DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.021

NO对内毒素血症大鼠胰岛细胞的作用

李 强* 许霖水 (第三军医大学基础医学部生物化学教研室)重庆, 400038

提 要 目的: 探讨一氧化氮(NO)在内毒素血症大鼠胰岛细胞损伤中的作用机制。方法: 以2 mg/kg体重 LPS腹腔注射致内毒素血症大鼠为模型,观察血清、胰腺 NO含量的动态变化,用β-NADPH-d组化染色检测胰岛诱生型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,采用单细胞凝胶电泳技术,分析外源 NO供体(硝普钠)和 LPS在体外对胰岛细胞的损伤。结果: 内毒素血症大鼠血清 NO水平明显增高,胰腺 NO含量在注射6 h开始增高,12 h达峰值,1 d后恢复至正常水平,胰岛 iNOS表达于6 h开始升高,12 h明显增强。体外试验显示硝普钠能明显引起胰岛细胞 DNA的损伤,而 LPS作用不明显。结论: NO在内毒素血症胰岛细胞损伤中的作用机制可能是由于 LPS在体内引起炎性细胞浸润,通过炎性或非炎性细胞促进胰岛细胞 iNOS的表达,产生 NO介导胰岛细胞 DNA直接损伤所致。

关键词 一氧化氮;内毒素;胰岛细胞;单细胞凝胶电泳
中图法分类号 Q578

感染或炎症时可引起胰岛炎性细胞浸润,导致胰岛细胞损害,在胰岛素依赖型糖尿病(Insulin dependent diabetes mellitus, IDDM)的发病过程中有重要意义。资料表明,内毒素在体内亦能引起单核巨噬细胞浸润胰岛诱导胰岛表达 iNOS[1]。但是内毒素诱导胰岛细胞损伤的详细机制尚不完全清楚,国内报道不多。本实验观察 LPS致内毒素血症大鼠血清、胰腺 NO含量的动态变化和胰岛 iNOS的表达,比较研究 NO供体硝普钠与 LPS在体外对胰岛细胞 DNA的直接损伤作用,以阐明 LPS引起胰岛细胞损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

胶原酶(V型),常熔点与低熔点琼脂糖,RPMI 1640培养基,内毒素(LPS, E coli 0127: B8),十二烷基肌氨酸钠,溴化乙锭均为 Sigma产品,β-NADPH(德国宝灵曼公司),其它试剂为分析纯。CO_2孵箱(美国),Olympus荧光显微镜及照像系统(日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型 Wistar大鼠40只,由本校实验动物中心提供,体重180~200 g,雌雄不拘,随机分成6、12 h、1、3 d组,并设正常对照组,每组8只,按2 mg/kg体重 LPS剂量腹腔注射大鼠,断头取血并摘取胰腺。

1.2.2 NO含量测定 胰腺制成匀浆,Lowry法蛋白定量进行校正,用 NO_2^-/NO_3^-测定间接反映 NO含量,结果以μmol/g蛋白表示。血清直接测定。参考 Najwek等[2]的方法,用镀铜镉还原 NO_3^-再与 Griess试剂显色,通过标准曲线回归方程计算结果。

1.2.3 iNOS表达 取正常组和内毒素血症组大鼠胰腺,参照 Dawson[3]方法,胰腺切片进行胰β-NADPH-d组化染色,光镜观察胰岛,以每个胰岛50%以上胰岛细胞胞浆呈蓝色作为阳性,结果以阴性(-)、阳性(+)表示。

1.2.4 DNA损伤检测

1.2.4.1 胰岛细胞分离 无菌取正常 Wistar大鼠胰腺剪成1~2 mm^3,用胶原酶消化[4],经 Ficoll密度梯度离心纯化,所得胰岛经抗胰岛素抗体免疫组织化学染色鉴定,胰岛含量大于80%,用 EDTA和胰酶消化成单个细胞,于含10%小牛血清的1640培养液培养3 d,台盼蓝染色鉴定成活率大于85%。

1.2.4.2 单细胞凝胶电泳 上述培养细胞用1640培养液调整细胞数为10 000个/ml,在培养板上每孔加入0.5 ml,加入硝普钠终浓度分别为0、10、20、40 mmol/L 4组,同时另做终浓度为5、10μg/ml LPS两组,每组平行5孔,置 CO_2孵箱育温5 h。按照 Ross等[5]的方法,取每孔孵育胰岛细胞,作一张琼脂糖胶板进行电泳,经溴化乙锭染色,置 Olympus荧光显微镜上观察,每个实验组随机计数100个细胞,计算慧星细胞百分率表示细胞迁移度(损伤度)。同时用接目测微器测定100个细胞核直径和慧尾长度,以(核直径+慧尾长度)±标准差表示细胞迁移率。

1.2.5 统计学处理 实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,并采用 t 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 NO含量变化

内毒素血症大鼠血清 NO含量在注射 LPS后6 h显著升高($P<0.01$),12 h虽缓慢下降,但直到3 d仍高于对照组(P

* 李 强 男,27岁,住院医师,硕士,现在附属新桥医院检验科 重庆, 400037

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

< 0.01)。胰腺 NO含量 6 h开始上升,12 h达峰值(P < 0.01),1 d后恢复至正常,见表 1。

表 1　内毒素血症大鼠血清和胰腺 NO含量变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes in NO in serum and pancreas of endotoxemic rats ($\bar{x}\pm s$)

	Control	Time after injection of LPS			
		6 h	12 h	1 d	3 d
Serum(C_B/μmol·L^{-1})	57.61± 11.69	354.27± 142.37*	270.42± 102.79*	151.93± 40.41*	123.03± 42.54*
Pancreas(μmol/g)	2.18± 0.63	2.49± 0.61	3.79± 1.29*	2.27± 0.68	2.25± 0.28

* : P < 0.01 *vs* control

2.2　iNOS表达

正常对照组胰岛 iNOS组化染色呈 - ~ ±,注射内毒素 6 h,大鼠胰岛 iNOS组化染色呈± ~ + 显示表达增强,12 h染色呈+ ~ ++,iNOS表达明显增强,1 d后恢复到正常,染色结果见图 1。

2.3　NO和 LPS致胰岛细胞损伤

表 2所示,10、20、40 mmol/L的硝普钠体外作用 5 h,胰岛细胞的细胞迁移率显著高于对照组(P < 0.01),说明胰岛细胞 DNA损伤显著,损伤细胞的百分率(细胞迁移度)明显高于对照组,并呈剂量依赖关系。而 5、10 μg/ml的 LPS作用 5 h后,胰岛细胞损伤不明显(P < 0.05)。图 2显示正常及损伤细胞经单细胞凝胶电泳后 DNA损伤形成慧星的荧光显微镜照像结果。

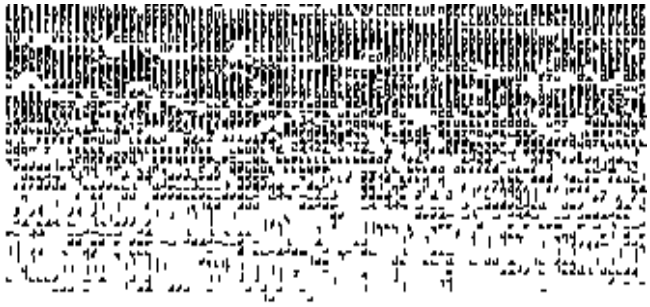


图 1　iNOS在大鼠胰腺胰岛的表达
β-NADPH组化染色　(× 200)
A:阴性胰岛　B:阳性胰岛

Fig 1　The expression of iNOS in pancreatic islets　β-NADPH-d stain　(× 200)
A: Negative pancreatic islets　B: Positive pancreatic islets

表 2　硝普钠和 LPS作用胰岛细胞后细胞迁移率和迁移度改变($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes in DNA migration and rate of DNA damaged islet cells of pancreas with sodium nitroprusside or LPS($\bar{x}\pm s$)

	Control	Sodium nitroprusside (mmol/L)			LPS(μg/ml)	
		10	20	40	5	10
DNA migration(μm)	34.85± 2.36	41.18± 4.61	59.99± 10.79*	70.49± 20.29*	35.41± 2.87	36.16± 3.47
Percent of damaged cells	15%	42%	63%	90%	14%	17%

* : P < 0.01 *vs* control



图 2　损伤胰岛细胞核 DNA慧星的单细胞凝胶电泳照像结果
A:正常细胞　B:损伤细胞(× 400)

Fig 2　Single cell gel eletrophoresis of damaged nuclear DNA comets of islet cell after assay
A: Normal cell　B: Damaged cell(× 400)

3　讨论

已知内毒素(LPS)在体内可通过刺激炎症细胞对胰岛浸润,引起胰岛或胰岛周围炎症反应,并通过巨噬细胞、淋巴细胞释放 IL-1β、TNF-α、IFN-γ等细胞因子损伤胰岛细胞而导致 IDDM[6]。同时体外试验也证实细胞因子单独或与 LPS协同作用,亦能诱导胰岛细胞表达 iNOS,产生 NO抑制胰岛素分泌[7]。然而有关 LPS引起胰岛细胞损伤的详细机制和作用环节未完全清楚,国内未见有报道。我们在整体观察 LPS作用的基础上,还在离体条件下比较观察 LPS和外源 NO供体(硝普钠)对大鼠胰岛的损害,探讨 LPS对胰岛损伤的详细作用机制。结果显示,大鼠注射 LPS 6 h后血

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

清和胰腺,NO水平明显升高,与此同时胰岛 iNOS也同步于早期表达明显增强,表明内毒素(LPS)能诱导大鼠胰岛细胞 iNOS的表达,产生 NO增多。体外试验发现外源 NO供体(硝普钠)对胰岛细胞 DNA有明显损伤作用,而 LPS在体外损伤不明显,提示 LPS对胰岛的损伤作用是一种通过细胞因子刺激 iNOS表达和 NO生成,并由 NO介导的间接作用。

细胞因子上述作用是通过激活核因子 κB(NFκB)而启动系列信号传导,从而诱导 iNOS的表达[8],大量产生 NO,NO是一种具有广泛生物学活性的氮化物自由基,能与含硫铁中心的酶或含巯基多肽反应,抑制 DNA合成;能产生高毒性的羟自由基和过氧化硝基化合物(ONOO),引起核酸亚硝酰基化反应,直接导致细胞 DNA链断裂[9]。我们建立了单细胞凝胶电泳技术能快速、灵敏检测单个哺乳动物细胞 DNA断裂[5],结果证实外源 NO供体硝普钠在体外明显引起胰岛细胞 DNA的断裂、损伤,但 LPS作用不明显。由以上结果可以推断,内毒素(LPS)在体内引起胰岛炎性浸润,同时刺激巨噬细胞、淋巴细胞释放细胞因子,通过细胞因子诱导胰岛细胞表达 iNOS,产生 NO,并通过 NO介导对胰岛细胞的损伤,可能在自身免疫性糖尿病发病中起重要作用。这一结果与 Corbett[9]提出的 LPS作为诱导物,诱导胰岛细胞损伤而导致糖尿病的看法相一致。

参考文献

1 Pollock J S, Forstermann U, Tracey W R, *et al*. Nitric oxide synthase isozymes antibodies. Histochem J, 1995, 27(10): 738

2 Cortas N K, Wakid N W. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. Clin Chem, 1990, 36(8): 1440

3 Dawson T M, Bredt D S, Fotubi M, *et al*. Nitric oxide synthase and neuronal β-NADPH diaphorase are indentical in brain and periphercal tissue. Proc Natl Acad Sci, 1991, 88(17): 7797

4 Gotoh M, Maki T, Satomi S, *et al*. Reproducible high yield of rat islets by stationary *in vitro* digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. Transplantation, 1987, 43(5): 725

5 Ross G M, Mcmillan T J, Wilcox P, *et al*. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): Technical aspects and applications. Mut Res, 1995, 337(1): 57

6 Kwon G, Corbett J A, Hauser S, *et al*. Evidence for involvement of the proteasome complex (26S) and NFκB in IL-β-induced nitric oxide and prostaglandin production by rats islet and RINm5F cells. Diabetes, 1998, 47(4): 583

7 Stoltje P, Mcdaniel M. Multiple cytokins required for induction of nitric oxide synthase in mouse islets. Diabetes, 1994, 43(Suppl): 235A

8 Flodstrom M, Welsh N, Eizirik D L. Cytokines activate the nuclear factor κB (NFκB) and induce nitric oxide production in human pancreatic islet. FEBS lett, 1996, 385(1): 4

9 Corbett J A, Mcdniel M L. Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of β-cells. Diabetes, 1992, 41(8): 897

(收稿: 1998-10-30;修回: 1998-12-23)

(编辑 汪勤俭)

Effects of nitric oxide on islet cells during endotoxemia in rats

Li Qiang, Xu Linshui (Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To explore the mechanism of the effects of nitric oxide (NO) on islet cells during endotoxemia in rats. **Methods**: After the model of endotoxemia was established in rats with intraperitoneal injection of LPS (2 mg/kg), the changes in NO levels of the serum and pancreas were dynamically observed. The expression of inducible nitric oxide (iNO) in the islet was determined with β-NADPH-d histochemical staining. DNA damage in islet cells by the external donor of NO (sodium nitroprusside) or LPS were assessed *in vitro* with single cell gel electrophoresis. **Results**: NO level in serum was significantly increased at the 6th h, picked at the 12th h and recovered to the normal on the 1st d in the pancreas after injection. The expression of iNOS in pancreatic islet also began to be enhanced at the 6th h and significantly enhanced at the 12th h after endotoxemia. *In vitro* experiment showed that sodium nitroprusside markedly damaged DNA in the islet cells but LPS did not exert the same effects. **Conclusion**: The mechanism of the effects of NO on islet cells during endotoxemia might be that the infiltration of the inflammatory or non-inflammatory cells induced by LPS stimulates the expression of iNOS that generates the NO free radicals inducing the DNA damage of islet cells.

Key words nitric oxide; endotoxin; islet cell; single cell gel electrophoresis

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net