

· 基础研究 ·

 α -生育酚缓解链脲佐菌素诱导乳鼠胰岛细胞损伤的研究袁 英, 张 艳, 宋仕卿, 郭 兵 Δ

(重庆医药高等专科学校基础部 401331)

摘要:目的 探讨 α -生育酚(α -T)对链脲佐菌素(STZ)诱导的胰岛细胞损伤的作用及其机制。方法 原代培养大鼠胰岛细胞,电镜观察 STZ 处理前、后胰岛 β 细胞形态,检测 STZ 处理前、后胰岛细胞活性、胰岛细胞凋亡率以及 Bcl-xl 和 Bax 的变化。并进一步观察给予 α -T 预处理后上述指标的变化。结果 (1)随着 α -T 浓度增高, α -T 干预组中反映胰岛细胞活性的吸光度(A)值呈剂量依赖性增加;(2)STZ 组与空白对照组比较,胰岛细胞凋亡率增加($P < 0.01$),细胞 Bcl-xl 表达下降及 Bax 表达增强($P < 0.01$);(3) α -T 干预组与 STZ 组比较,胰岛细胞凋亡率降低($P < 0.01$),细胞 Bcl-xl 表达增强及 Bax 表达下降($P < 0.01$)。结论 α -T 能够缓解 STZ 诱导大鼠胰岛细胞损伤,其机制可能与抑制胰岛细胞凋亡有关。

关键词: α -生育酚;链脲佐菌素;胰岛分泌细胞;bcl-X 蛋白质;bcl-2 相关 X 蛋白质

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.07.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)07-0676-02

Effects of α -tocopherol on streptozotocin-induced apoptosis of neonatal rat pancreatic cellsYuan Ying, Zhang Yan, Song Shiqing, Guo Bing Δ

(Department of Basic Courses, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, 401331, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of α -tocopherol on the streptozotocin-induced damage of rat islet cells. Methods Isolated islet cells from wistar rats of 1-3 d incubated in monolayer in vitro. β -cell morphology, islet cell viability, apoptotic rate of islet cells, expression of Bcl-xl and Bax after incubation with streptozotocin were measured, and the potential effects of α -tocopherol was investigated. Results (1) α -tocopherol increased the islet cell viability in a dose-dependent fashion. (2) Compared with the control group, apoptotic rate of pancreatic islet cells increased, Bcl-xl expression decreased and Bax gene expression increased when co-cultured with streptozotocin ($P < 0.01$). (3) Compared with the STZ group, apoptotic rate of pancreatic islet cells decreased, Bcl-xl expression increased and Bax gene expression decreased in the α -tocopherol group ($P < 0.01$). Conclusion α -tocopherol can effectively attenuate streptozotocin-induced damage of rat islet cells by means of regulating Bcl-xl and Bax gene expressions.

Key words: alpha-tocopherol; streptozotocin; insulin-secreting cells; bcl-X protein; bcl-2-associated X protein

维生素 E 具有胰岛保护效应^[1-3], α -生育酚(alpha-tocopherol, α -T)在维生素 E 的各种形式中活性最高^[4]。本实验室前期研究发现, α -T 对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)所致胰岛功能损伤具有保护作用^[5]。本文就 α -T 对 STZ 诱导大鼠胰岛细胞损伤的影响及其作用机制作进一步探讨。

1 材料与与方法

1.1 材料 RPMI-1640 培养液(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物制剂公司);STZ、V 型胶原酶(美国 Sigma 公司);高 α -T(d- α -tocopherol)(核工业北京化工冶金研究院);胰岛素放射免疫检测试剂盒(中国原子能同位素研究所);Bcl-xl 抗体(武汉博士德);Bax 抗体(美国 Santa Cruz 公司);免疫组化通用试剂盒、DAB 显色剂、抗体稀释液(北京中山公司);四甲基偶氮唑盐(MTT)(上海华舜生物工程有限公司);二甲基亚砷(重庆东方试剂厂)。清洁级 Wistar 乳鼠(大坪医院实验动物中心)。

1.2 方法

1.2.1 胰岛细胞分离培养 取出生 1~3 d 龄 Wistar 大鼠,无菌取出胰腺, Hank's 液清洗后剪至 0.5~1 mm³ 大小,加入 5 倍体积 1 mg/mL V 型胶原酶溶液混匀, 38℃ 恒温水浴振荡消化 8~10 min, 经 200 目筛网过筛, 离心(1 000 r/min×3 min), 细胞沉淀接种于含 10% 胎牛血清的 1640 培养液, 置含 5% CO₂ 培养箱内培养。18 h 后换液去除成纤维细胞, 再用 1640 培养液调节细胞浓度至 1×10⁶/mL, 接种于培养板, 继续培养

72 h。

1.2.2 胰岛细胞活性检测 将生长良好的胰岛细胞分为 4 组:(1)空白对照组, 不做任何干预处理;(2) α -T 对照组, 培养液中加入 α -T(0.08 mmol/L);(3)STZ 组, 培养液中加入 STZ(2.2 mmol/L);(4) α -T 干预 I、II、III 和 IV 组, 培养液中分别加入不同浓度 α -T(0.01、0.02、0.04、0.08 mmol/L)后, 再加入 STZ 2.2 mmol/L。各组 α -T 均作用 24 h, STZ 均作用 30 min。用 MTT 法测定各组吸光度(A)值。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率 将生长良好的胰岛细胞分为 3 组:(1)空白对照组, 不做任何干预处理;(2)STZ 组, 培养液中加入 STZ(2.2 mmol/L);(3) α -T 干预组, 培养液中加入 α -T(0.08 mmol/L)后, 再加入 STZ(2.2 mmol/L)。各组 α -T 均作用 24 h, STZ 均作用 30 min。收集细胞, 磷酸缓冲液(PBS)洗涤至少 3 次, 75% 乙醇固定, 送流式细胞室检测。

1.2.4 电镜观察胰岛细胞形态 实验干预及分组同“1.2.3”。收集细胞, 2.5% 戊二醛固定 4 h, PBS 充分漂洗, 1% 锇酸溶液 4℃ 条件下固定 30 min。再次漂洗, 30%~100% 乙醇逐级脱水, 每次 15 min。环氧树脂包埋液浸透、包埋, 超薄切片, 枸橼酸铅和醋酸还氧钠电子染色, 透镜下观察并摄影。

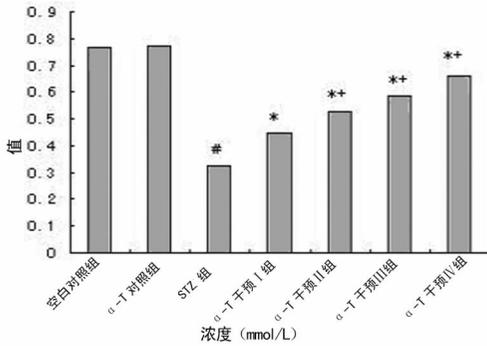
1.2.5 Bcl-xl 和 Bax 蛋白表达的检测 实验干预及分组同“1.2.3”。免疫组化检测 Bcl-xl 和 Bax 蛋白表达。根据细胞着色强弱分为 4 个等级记分:无着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。按公式 HSCORE = Pi(i+1) (i=0、

1、2、3;Pi 表示评分为 i 的比例), 计算 HSCORE 得分。

1.3 统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据用 SAS 软件处理, 采用方差分析、q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 胰岛细胞活性的变化 STZ 组 A 值显著低于空白对照组 ($P < 0.01$); 各 α -T 干预组 A 值较 STZ 组明显回升 ($P < 0.01$); 各干预组内, 随着 α -T 浓度的增加 A 值增大, 在 α -T 浓度为 0.08 mmol/L 时, A 值最大。 α -T 干预组与空白对照组间比较, A 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。



: $P < 0.01$, 与空白对照组比较; * : $P < 0.01$, 与 STZ 组比较; + : $P < 0.01$, α -T 干预组间比较。

图 1 不同浓度 α -T 对胰岛细胞活性的影响

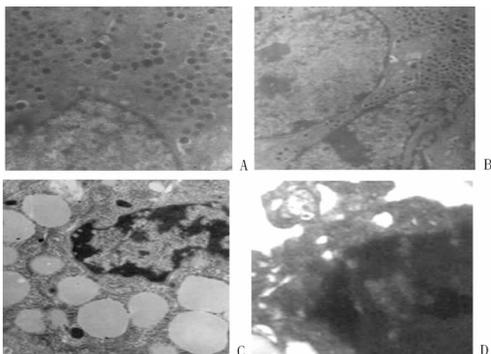
2.2 胰岛细胞凋亡率的变化 STZ 组较空白对照组细胞凋亡率显著增高 ($P < 0.01$); 而 α -T 干预组中的细胞凋亡率较 STZ 组明显降低 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 各组胰岛细胞凋亡率、Bcl-xl 和 Bax HSCORE 评分 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	凋亡率 (%)	Bcl-xl (分)	Bax (分)
空白对照组	6.14 ± 0.56	3.64 ± 0.05	1.52 ± 0.07
STZ 组	32.18 ± 1.25*	2.14 ± 0.08*	2.54 ± 0.06*
α -T 干预组	17.36 ± 1.08#	2.98 ± 0.11#	2.04 ± 0.09#

* : $P < 0.01$, 与空白对照组比较; # : $P < 0.01$, 与 STZ 组比较。

2.3 电镜下胰岛 β 细胞形态(图 2) 正常胰岛 β 细胞形态正常, 核形完整, 核内可见数个核仁, 胞浆中充满分泌颗粒; 加入 STZ 后胞浆内分泌颗粒明显减少, 可见大量脂滴, 胞核内染色质高度凝集、边缘化。同时可见凋亡的 β 细胞, 其胞质电子密度增强, 胞体凝缩, 并以“发芽”的根部断离形成胞体片块, 仅有完整的细胞膜包裹, 内含浓缩的胞浆, 称之为凋亡小体。



A: 正常 β 细胞电镜图 ($\times 6000$); B: 正常 β 细胞电镜图 ($\times 15000$); C: 受损 β 细胞电镜图 ($\times 8000$); D: 凋亡 β 细胞电镜图 ($\times 25000$)。

图 2 电镜观察 β 细胞形态

2.4 Bcl-xl 和 Bax 蛋白表达的变化 空白对照组 Bcl-xl 高表达、Bax 低表达, STZ 组较空白对照组 Bcl-xl 表达降低而 Bax 表达增高 ($P < 0.01$)。 α -T 干预组明显抑制 STZ 所致 Bcl-xl 和 Bax 的变化 ($P < 0.01$) (插 IV 图 3)。从 HSCORE 评分来看, Bcl-xl 评分 STZ 组较空白对照组明显降低, α -T 干预组较 STZ 组则明显回升 ($P < 0.01$); 而 Bax 评分结果与 Bcl-xl 评分相反, 见表 1。

3 讨 论

β 细胞凋亡是 1 型糖尿病 β 细胞丢失的主要方式^[6-9]。STZ 是一种含亚硝基的化合物, 具有选择性 β 细胞毒作用^[10], 其损伤机制与氧自由基清除障碍致使胰岛 β 细胞脂质过氧化损伤有关^[11-13]。本实验采用低浓度 STZ 与离体大鼠胰岛细胞共同培养, 发现胰岛 β 细胞在形态学上表现出明显凋亡特征; 与空白对照组比较, STZ 组胰岛细胞活性明显降低, 而细胞凋亡率明显上升; 在加入 STZ 前给予不同浓度 α -T (0.01~0.08 mmol/L) 预处理, STZ 所致胰岛细胞活性降低得到明显改善, 并表现出明显剂量依赖趋势; 给予 α -T 预处理后, STZ 所致胰岛细胞凋亡程度明显降低。上述结果提示 α -T 能够有效抑制 STZ 诱导 β 细胞凋亡, 该作用可能延缓 1 型糖尿病的发生。另外, 本研究在培养液中加入高浓度 (0.08 mmol/L) α -T, 并未观察到胰岛细胞明显损伤, 提示正常人群适当补充 α -T 在预防 1 型糖尿病发生的同时, 并不会导致胰岛自身功能的紊乱。

研究表明, 凋亡抑制蛋白 Bcl-xl 表达增强或促凋亡蛋白 bax 表达降低, 可抵抗多种致凋亡因素对胰岛 β 细胞的损伤^[14-15]。本实验发现, 伴随空白对照组和 α -T 对照组的低胰岛细胞凋亡率, Bcl-xl 高表达, Bax 低表达; 培养液中单独加入 STZ 后, Bcl-xl 表达降低, 而 Bax 表达增强, 胰岛细胞凋亡率也明显升高。给予 α -T 预处理后再加入 STZ, Bcl-xl 表达较 STZ 组明显回升而 Bax 表达明显降低, 同时伴有胰岛细胞凋亡率显著下降。因此, 本研究认为 α -T 可能通过调控 Bcl-xl 和 Bax 的表达, 减少 STZ 等其他外在因素诱导的细胞凋亡, 从而实现对胰岛 β 细胞的保护作用。

参考文献:

- [1] Singh U, Devaraj S, Jialal I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation [J]. Annu Rev Nutr, 2005 (25): 151-154.
- [2] Lako JV, Nguyen VC. Dietary patterns and risk factors of diabetes mellitus among urban indigenous women in Fiji [J]. Asia Pac J Clin Nurt, 2001, 10(3): 188-193.
- [3] 孙各琴, 邓守恒. 高硒情况下维生素 E 对老龄大鼠血清中抗氧化作用的影响 [J]. 广东微量元素科学, 2002, 9(1): 16-19.
- [4] Zapolska-Downar D, Zapolskiq-Downar A, Markiewski M, et al. Selective inhibition by alpha-tocopherol of vacuolar cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 274(3): 609-615.
- [5] 袁英, 方海立, 侯爱莲. 不同浓度 α -生育酚对 STZ 诱导胰岛细胞抗氧化能力变化的影响 [J]. 重庆医科大学学报, 2008, 37(7): 803-805.
- [6] Kurrer MO, Pakala SV, Hanson HL, et al. β -cell apoptosis in T cell mediated autoimmune diabetes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(1): 213-218. (下转第 682 页)

19.05%的人选择去疾病控制中心或结核病防治所,由此可见,结核病诊治的卫生宣传力度不大,健康教育不到位,防治知识知晓率低,有病盲目相信大医院,而不是去结核病防治专门机构。在“国家有无免费检查、诊断与治疗政策”方面,被调查对象的知晓率低,分别只有 34.09%和 35.06%,如果不了解国家减免政策,很多经济负担较重的患者,无法负担诊疗费用,决定不就诊而拖延治疗,导致病情恶化,为结核病的控制工作增加困难。因此,加大宣传力度,进一步提高结核病患者的发现率及就诊率,对控制传染源有非常重要的意义。

3.3 关于结核病相关知识获取的来源途径 调查结果显示,被调查对象对核心信息来源途径排在前 5 位的是电视、报纸、医生、宣传单、聊天,与成都市大学生获取结核病防治信息途径基本一致^[12]。电视、报纸所占比例最高,提示电视、报纸以其覆盖面广、可信度高、通俗易懂的特点,容易被学生所接受,成为信息最主要的来源途径。而宣传单所占比例稍微小一点,但是其具有专业的,针对性较强的优点,也是一种较好的获取知识的途径。聊天作为主要信息来源途径之一,作为结核病健康教育的三级目标人群的学生,居住相对集中,接触密切,特别是向家庭和社会的辐射面大^[13]。此外亦可将广播、网络、专题讲座、书籍杂志等作为有益的补充,提高结核病知识知晓率。因此,可以选择学生作为重点,利用多种有效的传播手段开展学校结核病防治知识健康教育,提高学生结核病知识的知晓率及患者的发现率,从而促使肺结核病患者能及时就诊、早期发现和规范治疗^[14],减少传染和发病,最终达到控制结核病的目的。

3.4 关于对结核病患者的态度 在对患者家属对肺结核病患者的态度中,在邻居或社区居民中仍然还是有近半数的人(38.89%)不愿意与患者接触,这些都是由于大众对肺结核病防治知识的知晓率偏低,对结核病缺乏正确认识,所以会一定程度上不愿意与患者接触。因此有必要进一步的加强结核病防治知识的普及,消除大众对结核病的恐惧,给予患者心理上的支持,增强患者治疗信心^[15],从而利于结核病患者早日康复。

参考文献:

[1] 中国疾病预防控制中心. 卫生部公布 2010 年 1 月及 2009

年度全国法定传染病疫情[EB/OL]. (2010-02-24)[2010-04-05]. <http://www.chinacdc.net.cn/n272442/n272530/n272757/35766.html>.

- [2] 刘剑君, 么鸿雁. 我国结核病的流行现状和防治对策[J]. 预防医学论坛, 2006, 12(5): 638-641.
- [3] 万康林. 中国结核病流行新特点及挑战[J]. 疾病监测, 2008, 23(11): 667-670.
- [4] 贺玉芬, 年峰, 陈德花, 等. 日照市某中学校结核病暴发的调查[J]. 职业与健康, 2000, 16(1): 45.
- [5] 范春, 胡代玉, 周开宪, 等. 重庆市某中学高三年级 24 例结核情况分析[J]. 重庆医学, 2007, 36(19): 2004-2005.
- [6] 赵梅柱, 张荣, 吴东昊, 等. 深圳市宝安区居民结核病防治知识知晓率调查[J]. 中国健康教育, 2006, 22(8): 622.
- [7] 刘刚, 孙唯, 向觅, 等. 四川省公众结核病防治知信行调查[J]. 预防医学情报杂志, 2008, 24(9): 673-676.
- [8] 陈小菁, 应潜, 聂志学, 等. 某大中专院校学生结核防治知识信念, 行为调查分析[J]. 结核病健康教育, 2008(2): 65-68.
- [9] 杜昌廷, 王宏, 唐琴. 重庆市三峡库区村民结核病防治知识知晓率调查分析[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(8): 714-715.
- [10] 卫生部疾病控制司. 中国结核病防治规划实施工作指南[Z]. 北京, 2002: 65-66.
- [11] 付莉, 田明, 潘蓉, 等. 成都市高校学生结核病防治知信行调查分析[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2008, 6(4): 185.
- [12] 田明, 潘蓉, 付莉, 等. 成都市高校学生结核病防治信息获取途径调查分析[J]. 西部医学, 2009, 21(8): 1424-1426.
- [13] 陈益芳, 杜亚平, 翁丽霞. 农村居民肺结核防治知识调查[J]. 浙江预防医学, 2008, 20(4): 67-68.
- [14] 刘英, 胡代玉. 重庆市结核病防治规划 5 年执行情况分析[J]. 重庆医学, 2007, 36(8): 747-749.
- [15] 刘振芬. 行为干预在老年肺结核患者健康教育中的应用[J]. 重庆医学, 2008, 37(10): 1132-1133.

(收稿日期: 2010-04-09 修回日期: 2010-09-12)

(上接第 677 页)

- [7] Kay TWH, Thomas HE, Harrison LC, et al. The beta-cell in autoimmune diabetes: many mechanisms and pathway of loss[J]. Trend Endocrinol Metab, 2000, 11(1): 11.
- [8] Eizirik DL, Darville MI. beta-cell apoptosis and defense mechanism: lessons from type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2001, 50 Suppl 1: 64-69.
- [9] Lally FJ, Ratcliff H, Bone AJ. Apoptosis and disease progression in the spontaneously diabetes BB/S rat[J]. Diabetologia, 2001, 44(3): 320-324.
- [10] Kasono K, Yasu T, Kakehashi A, et al. Nicorandil improves diabetes and rat islet beta-cell damage induced by streptozotocin in vivo and in vitro[J]. Eur J Endocrinol, 2004, 151(2): 277-285.
- [11] Gunther L, Liu X, Neef H, et al. Glucagon expression shift in a syngeneic single-donor intrahepatic rat islet transplantation model[J]. Transplant Proc, 2005, 37(8):

3487-3489.

- [12] Fridlyand LE, Phipson LH. Oxidative reactive species in cell injury: mechanism in diabetes mellitus therapeutic approaches[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1066(1): 136-151.
- [13] Piro S, Anello M, Di Pietro C, et al. Chronic exposure to fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidation[J]. Metabolism, 2002, 51(10): 1340-1347.
- [14] Zhou YP, Pena JC, Roe MW, et al. Overexpression of Bcl-xL in β cells prevents cell death but impairs mitochondrial signal for insulin secretion[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000, 278(2): 340-351.
- [15] 何庆, 王保平, 刘铭, 等. 高浓度游离脂肪酸对胰岛细胞凋亡及相关基因表达的影响[J]. 天津医药, 2004, 32(5): 293-295.

(收稿日期: 2010-05-10 修回日期: 2010-09-10)