

龙血素 B 对棕榈酸引起的胰岛 β 细胞功能损伤的保护作用

徐勤*, 邓立东, 宋英
(桂林医学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] **目的:**初步探讨龙血素 B 对棕榈酸引起的胰岛 β 细胞功能损伤的保护作用及其机制。**方法:**以小鼠胰岛 β 细胞系 NIT-1 细胞作为实验细胞。实验分为空白对照组, 5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 龙血素 B 对照组, 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 棕榈酸处理组, 5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 龙血素 B 干预组。用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法检测细胞活性, 流式细胞术检测细胞内活性氧自由基 (ROS) 含量和细胞凋亡率, 半定量 RT-PCR 测定葡萄糖转运受体-2 (GLUT-2) 编码基因表达水平。**结果:**和棕榈酸处理组比较, 龙血素 B 高剂量组可使 NIT-1 细胞活性存活率显著上升 ($P < 0.05$), 能显著降低细胞内 ROS 水平和细胞早期凋亡率 ($P < 0.05$), 可提高 GLUT-2 编码基因的表达水平 ($P < 0.05$)。**结论:**龙血素 B 对棕榈酸引起的胰岛 β 细胞功能损伤的保护作用可能是通过降低细胞内 ROS 含量、显著上调受抑制的 GLUT2 编码基因表达、降低细胞氧化应激水平、减少游离脂肪酸引起的 NIT-1 细胞早期凋亡、逆转由氧化应激激活的转录因子叉头框蛋白-1 (FOXO1) 导致的葡萄糖代谢障碍和其他效应, 产生对胰岛 β 细胞的保护作用。

[关键词] 龙血素 B; 胰岛分泌细胞; 凋亡; 氧化应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0254-04

[doi] 10.11653/syfy2013230254

Protective Effects of Loureirin B on Dysfunction of Pacreatic Islet β Cell Induced by Palmitate

XU Qin*, DENG Li-dong, SONG Ying
(Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effects and mechanism of loureirin B on the dysfunction of pancreatic islet β cell induced by palmitic acid. **Method:** NIT-1 cells were cultured in medium added palmitic acid, and treated with loureirin B. Cell apoptosis ratio and content of reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry, the expressions of glucose transport receptor-2 (GLUT2) was examined by semi-quantitate reverse transcript PCR. **Result:** Compared with palmitic acid treated group, survival rate of NIT-1 with loureirin B (20, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was increased significantly ($P < 0.05$). Loureirin B (20, 10, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) scavenged excessive ROS and lowered its concentration significantly ($P < 0.05$). Loureirin B (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was increased the expressions of GLUT2 ($P < 0.05$), and loureirin B (20, 10, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was effective on reducing apoptosis ratio induced by palmitic acid ($P < 0.05$). **Conclusion:** Loureirin B can increase the survival rate of NIT-1 cultured in the medium added palmitic acid, scavenge excessive ROS induced by palmitic acid, decrease the cell apoptosis ratio and elevate the expressions of GLUT2. This indicates loureirin B may accomplish its islet cell protection effects by reducing ROS within cell and reversing glucose metabolism disorder and other effects induced by forkhead box protein-1 (FOXO1) activated by oxidative stress.

[Key words] loureirin B; insulin-secreting cells; apoptosis; oxidative stress

[收稿日期] 20130416(009)

[基金项目] 2011 年度广西高等学校一般资助科研项目(200103YB095); 2012 年广西科技厅资助项目(2012GXNSFAA053092); (广西医学科学实验中心 2011 年度开放课题)

[通讯作者] * 徐勤, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 从事糖尿病病理生理学与药物代谢动力学的工作, Tel: 0773-2295167, E-mail: xuqincpu@126.com

黄酮类成分是龙血竭的主要有效成分,龙血素 B 为主要黄酮类化合物之一,其化学名为 4'-羟基-2,4,6-三甲氧基双氢查耳酮。文献报道,龙血竭提取物能降低四氧嘧啶糖尿病模型小鼠的空腹血糖,能改善小鼠对糖的耐受力,增加正常小鼠的胰岛素分泌^[1];龙血竭胶囊有较强的清除自由基和抗氧化活性^[2]。近年研究^[3]提出胰岛素抵抗导致的血糖血脂水平调节紊乱可使胰岛 β 细胞处于持续氧化应激状态,活化叉头框蛋白-1 (FOXO1) 等转录因子抑制葡萄糖代谢和胰岛素合成,损害胰岛素分泌功能并导致凋亡。大量研究表明,糖尿病患者体内氧化应激增强^[4-5],龙血素 B 可能通过抗氧化作用保护胰岛 β 细胞的胰岛素分泌功能并控制糖尿病动物的血糖水平,但有关机制的研究尚未见文献报道。本研究通过观察龙血素 B 干预棕榈酸导致的胰岛素分泌细胞氧化应激损伤效应,初步探讨龙血素 B 通过抗氧化作用保护胰岛 β 细胞的机制,为今后进一步阐明龙血竭中黄酮类化合物降血糖机制奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 SW-CJ-2F 型超净工作台(苏州净化设备有限公司),Galaxy170S 二氧化碳细胞培养箱(德国 Eppendorf 公司),酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),倒置相差显微镜(德国蔡司公司),FACSAria III 流式细胞仪(美国 BD 公司),Tprofessional PCR 仪(德国 Biometra 公司),DYY-6D 型琼脂糖电泳仪(北京六一仪器厂),JS-780 型凝胶成像仪(上海培清科技有限公司)。

1.2 试剂与药品 龙血素 B(纯度为 99.9%,中国药品生物制品检定所,批号 111558-200303),棕榈酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号 T20100903),牛血清白蛋白(美国 Amresco 公司,批号 0332),MTT(美国 Amresco 公司,批号 0793-250),低糖 DMEM 培养液(美国 Thermo Scientific 公司,批号 NXH0681),高糖 DMEM 培养液(美国 Thermo Scientific 公司,批号 NLX0750),胎牛血清(批号 NXA0544)、0.25% 胰蛋白酶溶液(美国 Thermo Scientific 公司,批号 J122961),PBS 磷酸盐缓冲液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZLI-9062),活性氧检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 S0033),FITC Annexin V-PI 双染凋亡试剂盒(美国 BD 公司,批号 2195781),超纯总 RNA 快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司,批号 RN03), $2 \times Taq$ PCR MasterMix(北京艾德

莱生物科技有限公司,批号 PC0902),HiFi-MMLV 逆转录 cDNA 合成试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 C28025-032)。

1.3 细胞 小鼠胰岛瘤传代细胞株 NIT-1 细胞(桂林医学院冯乐平教授研究组惠赠)。

2 方法

2.1 NIT-1 细胞培养与加药干预 NIT-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清与含 1% 抗生素($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素)的低糖 DMEM 培养液中,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$,5% CO_2 恒温培养箱内静置培养,并每隔 2 天换液 1 次。当细胞占据培养瓶底面积的 80% 左右时以胰酶消化并离心收集细胞,按 1:2 传代。取对数生长期细胞种板进行试验,实验分为空白对照组、棕榈酸组、龙血素 B 对照组(龙血素 B 药物浓度分别为 $20, 10, 5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、龙血素 B 干预组(龙血素 B 终浓度分别为 $20, 10, 5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),每组 6 孔。药物于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 预孵 48 h 后,进行 MTT 法检测细胞活力等实验。至少重复 3 次实验。

2.2 细胞活力检测 用 MTT 法。将接种过细胞的 96 孔培养板中培养液吸去,用 PBS 洗涤 1 次,加入每孔 PBS 0.12 mL 和 MTT($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) $20 \text{ } \mu\text{L}$ 。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 4 h 后终止培养,吸弃孔内培养上清液,每孔加入二甲亚砜(DMSO) $150 \text{ } \mu\text{L}$,摇床振荡 10 min,使结晶物充分溶解,用全自动酶标仪检测各孔吸光度(A_{490})值。设只含溶解液的平行孔作空白对照,比色时,以正常空白孔调零。计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{试验组}} / A_{\text{空白对照组}} \times 100\%$$

2.3 NIT-1 细胞内活性氧自由基(ROS)含量与凋亡率测定 细胞加药干预 48 h 后,一部分加入适量无血清低糖 DMEM 培养液洗涤,每孔加入无血清低糖 DMEM 培养液 1 mL 与 DCFH-DA 工作液 $1 \text{ } \mu\text{L}$,混匀后置培养箱孵育 30 min,孵育完毕后洗涤,胰酶消化后制成细胞悬液,按说明书进行活性氧(ROS)测定;一部分制成细胞悬液后按 Annexin-V PI 双染凋亡试剂盒说明书测定细胞凋亡率;以 200 目滤网过滤细胞悬液,收集于流式细胞仪上样管。激发光波长 488 nm,检测波长 525 nm,在流式细胞仪上对每个样品中 1 万个细胞采集荧光强度数据。

2.4 细胞葡萄糖转运受体-2(GLUT2)基因表达 用半定量 RT-PCR 测量细胞加药处理 48 h 后,以 D-Hanks 平衡盐液洗涤 2 次,按 RNA 抽提试剂盒说明操作,提取细胞中的总 RNA。各样本经测量 RNA 浓度后,按照逆转录和 PCR 试剂盒说明操作,逆转

录生成各样本的 cDNA 片段,再对 cDNA 片段进行半定量 PCR。PCR 产物以最大电压 250 V,最大电流 400 mA 的参数在 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳,在

凝胶成像仪中拍摄电泳条带照片。基因表达量以目的基因灰度值与 GAPDH 灰度值的比值表示。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

目标基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
slc2a2(葡萄糖转运受体-2 编码基因)	TCAGAAGACAAGATCACCG	ATAGTTAATGGCAGCTTCCG
gapdh(磷酸甘油醛脱氢酶编码基因)	AGCCTCGTCCCGTAGACA	CACCAGTAGACTCCACGACA

2.5 数据处理 采用 SPSS 17.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计意义。

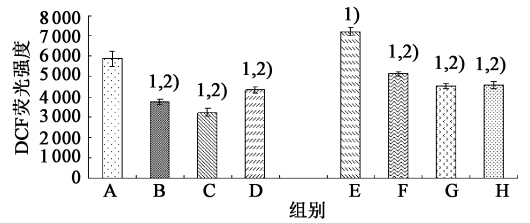
3 结果

3.1 对棕榈酸诱导的 NIT-1 细胞存活率的影响 与空白对照组比较,5 ~ 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 龙血素 B 对照组对 NIT-1 细胞存活率无显著影响,存活率分别为 (96.18 ± 8.03)%, (97.10 ± 10.79)%, (102.64 ± 7.37)% ; 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的棕榈酸使 NIT-1 细胞存活率显著下降 ($P < 0.05$),细胞存活率为 (57.40 ± 3.16)%。与棕榈酸组比较,10 ~ 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的龙血素 B 干预棕榈酸组使 NIT-1 细胞存活率显著上升 (均 $P < 0.05$),细胞存活率分别为 (70.32 ± 7.53)%, (71.44 ± 9.06)%。

3.2 对 β 细胞内 ROS 的影响 与空白对照组比较,0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的棕榈酸使 NIT-1 细胞内 ROS 含量明显增加 ($P < 0.05$); 5 ~ 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 龙血素 B 对照组能使 NIT-1 细胞内 ROS 含量显著减少 (均 $P < 0.05$)。与棕榈酸组比较,加入 5 ~ 10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 龙血素 B 则显著降低细胞内 ROS 含量 (均 $P < 0.05$),表明龙血素 B 可显著降低细胞内 ROS 含量,对棕榈酸导致的 NIT-1 细胞内增加的 ROS 作用更为明显,见图 1。

3.3 对 NIT-1 细胞凋亡的影响 棕榈酸组在 24 h 的流式细胞术检测结果呈现 4 个细胞群,即正常细胞(双阴性)、凋亡细胞(Annexin V 阳性,PI 阴性)、凋亡和坏死细胞(Annexin V 阴性,PI 阳性)和坏死细胞(双阳性)。0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的棕榈酸使 NIT-1 细胞 24 h 的凋亡率为 (14.77 ± 0.59)%,空白对照组为 (5.67 ± 0.21)%,差异显著 ($P < 0.05$); 与棕榈酸组比较,5, 10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的龙血素 B 均可显著降低细胞凋亡率 (均 $P < 0.05$), 5, 10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 龙血素 B 干预组的细胞凋亡率分别为 (11.20 ± 0.46)%, (10.43 ± 1.12)% 和 (9.23 ± 0.23)%。

3.4 对 GLUT-2 表达水平的影响 对各样本总 RNA 的逆转录 PCR 均成功合成出 PCR 产物,分别



A. 空白对照组; B. 龙血素 B 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;
C. 龙血素 B 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 龙血素 B 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;
E. 棕榈酸组; F. 龙血素 B 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组
G. 龙血素 B 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组;
H. 龙血素 B 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组 (图 3 同)
与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与棕榈酸组比较²⁾ $P < 0.05$
图 1 龙血素 B 对棕榈酸作用下的胰岛 β 细胞内 ROS 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

为小鼠磷酸甘油醛脱氢酶编码基因 gapdh 的 315 bp 产物、小鼠葡萄糖转运受体-2 (GLUT-2) 编码基因 slc2a2 的 174 bp 产物。0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 棕榈酸可导致 NIT-1 细胞的 GLUT-2 编码基因 slc2a2 细胞内 mRNA 含量下降 ($P < 0.05$),表明此组基因的表达下调。龙血素 B 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组能上调 NIT-1 细胞的 GLUT-2 基因表达水平 ($P < 0.05$), 5, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组对 GLUT-2 基因表达水平无显著影响,见图 2。

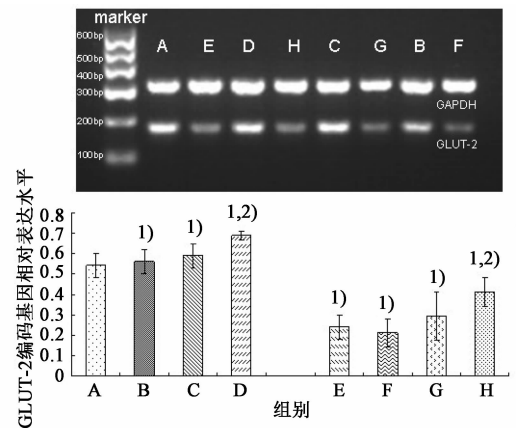


图 2 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图和龙血素 B 对棕榈酸作用下的胰岛 β 细胞 GLUT-2 基因表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

小鼠胰岛 β 细胞系 NIT-1 细胞来源于转基因小鼠的胰岛 β 细胞瘤的杂交细胞,基本保持了小鼠正常胰岛 β 细胞的形态与功能,和正常胰岛 β 细胞无显著差异^[6-7],是常用的与胰岛 β 细胞功能相关的实验细胞。黄酮类化合物是植物中最普遍的抗氧化成分之一,师梅梅等研究发现^[8],龙血竭胶囊能清除 DPPH·, $O_2^- \cdot$, $\cdot OH$ 自由基,具有一定的还原能力,且可有效抑制 Fe^{2+} 诱导的脂质过氧化反应和 β -胡萝卜素/亚油酸的自氧化,具有明显的体外抗氧化活性。龙血素 B 为龙血竭中主要的黄酮类化合物之一,在龙血竭黄酮类化合物中含量最高。因此,本实验探讨龙血素 B 降血糖作用机制是否与其抗氧化作用有关。研究表明,龙血素 B 可以提高体外游离脂肪酸棕榈酸培养环境下的 NIT-1 细胞存活率,显著降低 NIT-1 细胞内 ROS 水平,减少游离脂肪酸引起的 NIT-1 细胞早期凋亡。高剂量龙血素 B 棕榈酸干预组可显著上调受抑制的 GLUT-2 编码基因表达,其机制可能是通过降低细胞内 ROS 含量,减少游离脂肪酸引起的 NIT-1 细胞早期凋亡,对 NIT-1 细胞起保护作用,在胰腺 β 细胞中 GLUT-2 数量的变化可能与糖尿病模型葡萄糖诱导胰岛素释放异常相关^[9],但具体的作用机制有待进一步研究,本研究结果与文献报道一致^[10]。

[参考文献]

[1] 刘培培,雍克岚,吕敬慈,等. 龙血竭提取物对正常及四氧嘧啶糖尿病模型小鼠的影响[J]. 时珍国医国

药,2006,17(10):1886.

- [2] 师梅梅,杨建雄. 龙血竭胶囊的体外抗氧化研究[J]. 中成药,2007,29(11):1591.
- [3] Poitout V, Robertson R P. Glucolipotoxicity: fuel excess and β -cell dysfunction [J]. *Endocr Rev*, 2008, 29(3):351.
- [4] Folmer V, Soares J C, Rocha J B. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002, 34(10):1279.
- [5] Ziegler D, Sohr C G, Nourooz-Zadeh J. Oxidative stress and antioxidant defense in relation to the severity of diabetic polyneuropathy and cardiovascular autonomic neuropathy[J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(9):2178.
- [6] 付青姐,余乐,吴曙光. IL-1 β 对体外培养 NIT-1 β 细胞胰岛素分泌的影响[J]. 生命科学研究, 2002, 6(4):188.
- [7] Hamaguchi K, Gaskins H R, Leiter E H. NIT-1, a pancreatic beta-cell line established from a transgenic NOD/Lt mouse [J]. *Diabetes*, 1991, 40(7):842.
- [8] 师梅梅,杨建雄. 龙血竭胶囊的体外抗氧化研究[J]. 中成药,2007,29(11):1591.
- [9] Thorens B, Weir G C, Leahy J L, et al. Reduced expression of the liver/ β -cell glucose transporter isoform in glucose - insensitive pancreatic β cells of diabetic rats [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(17):6492.
- [10] 陈善源,邓立东,徐勤. 罗汉果甜苷干预棕榈酸致胰岛 β 细胞氧化应激相关损伤的机制研究[J]. 中国药房, 2012, 23(23):2116.

[责任编辑 李玉洁]