

[文章编号] 1000-4718(2007)06-1172-04

## IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和 IFN- $\gamma$ 引起的大鼠胰岛细胞凋亡及牛磺酸的影响

余华荣<sup>1</sup>, 张能<sup>1</sup>, 董毅龙<sup>1</sup>, 周琴<sup>1</sup>, 周岐新<sup>2</sup>  
(重庆医科大学基础医学院<sup>1</sup>生理教研室,<sup>2</sup>药理教研室,重庆 400016)

**[摘要]** 目的: 观察白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )引起胰岛细胞凋亡、胰岛素分泌、Bcl-xL和Bax蛋白表达变化及其牛磺酸的影响。方法: 应用体外单层培养 Wistar 大鼠胰岛细胞, 分别检测 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  对胰岛细胞凋亡细胞百分率、DNA 片段、培养液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量及 NOS 活性、胰岛素分泌、Bcl-xL 和 Bax 表达的影响, 并进一步观察牛磺酸的作用。结果: IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  联合可诱导胰岛细胞凋亡率明显增加, DNA 明显片段化, 同时 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量和 NOS 活性亦明显升高, 胰岛素分泌明显降低, Bcl-xL 表达下降和 Bax 表达增强 ( $P < 0.01$ ); 牛磺酸能阻断上述细胞因子的作用 ( $P < 0.01$ ), 并有一定的剂量依赖性。结论: 牛磺酸能够改善 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  诱导的胰岛细胞凋亡, 其机制可能与抑制 NOS 活性从而减少 NO 的生成以及下调 Bax/Bcl-xL 比例有关。

**[关键词]** 白细胞介素 1; 细胞凋亡; 一氧化氮; 基因表达; 牛磺酸; 胰岛

**[中图分类号]** R335

**[文献标识码]** A

### Effects of taurine on the change of apoptosis induced by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ and IFN- $\gamma$ in rat pancreatic islet cells

YU Hua-rong<sup>1</sup>, ZHANG Neng<sup>1</sup>, DONG Yi-long<sup>1</sup>, ZHOU Qin<sup>1</sup>, ZHOU Qi-xin<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Physiology, <sup>2</sup>Department of Pharmacology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the changes of apoptosis in isolated pancreatic islet cells, insulin secretion, expression of Bcl-xL and Bax induced by combination of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , and effects of taurine on them. **METHODS:** Isolated pancreatic islet cells from Wistar rat were incubated in monolayer *in vitro*. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> production, NOS activity, insulin secretion, the protein expression of Bcl-xL and Bax, percentage of islet cell apoptosis and DNA fragmentation in pancreatic islet cells incubated with combination of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were measured, and the effects of taurine on the changes of them were further investigated. **RESULTS:** Combination of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  induced a significant increase in percentage of pancreatic islet cell apoptosis, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> production and NOS activity, DNA ladder appearance, a decrease in insulin content, up-regulation in the protein expression of Bax and down-regulation in the protein expression of Bcl-xL ( $P < 0.01$ ), which were blocked by addition of taurine ( $P < 0.01$ ). These effects occurred in a dose dependent manner. **CONCLUSION:** Taurine attenuates  $\beta$  cell apoptosis induced by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . The mechanism of which may be the inhibition of NOS activity and the decrease of NO production as well as the downregulation of Bax/Bcl-xL proportion.

**[KEY WORDS]** Interleukin-1; Apoptosis; Nitric oxide; Gene expression; Taurine; Islets of langerhans

1型糖尿病是一种T淋巴细胞介导的器官特异性自身免疫性疾病。细胞因子作为免疫反应的中介者和调节者,在1型糖尿病发病过程中起重要作用。其中作为免疫损伤的主要效应分子IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 可诱导多种属来源的 $\beta$ 细胞株发生大量凋亡<sup>[1]</sup>。对于原代培养的胰岛 $\beta$ 细胞,上述细胞因子是否亦引起大量凋亡?目前报道较少。牛磺酸(taurine)是体内含量较高的含磺

酸基 $\beta$ 自由氨基酸,具有广泛的细胞保护作用。近年来发现,牛磺酸具有胰岛素样生物效应<sup>[2]</sup>。我们的前期工作亦证明,牛磺酸能逆转白细胞介素-1 $\beta$ 引起的胰岛素分泌抑制<sup>[3]</sup>。本研究在我们前面工作的基础上进一步观察IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 引起的大鼠胰岛细胞凋亡与Bcl-xL和Bax表达的变化以及牛磺酸的影响,以期对糖尿病的病因研究及防治提供依据。

[收稿日期] 2005-09-22

[修回日期] 2005-12-22

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

白细胞介素-1(IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )均购于军事医学科学院基础医学研究所;Hanks液、RPMI-1640培养液购于Gibco公司;胶原酶V型购于Sigma公司;pBR322DNA/BstNI markers购自北方同正公司;胰岛素放射免疫检测试剂盒为中国原子能同位素研究所产品;一氧化氮(NO)检测试剂盒和一氧化氮合酶(NOS)检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品;Bcl-xL抗体购于武汉博士德;Bax抗体购于美国Santa Cruz公司;即用型免疫组化通用试剂盒、DAB显色剂、抗体稀释液为北京中山产品;牛磺酸为南京制药厂产品。Wistar大鼠由本校实验动物中心供给。

### 2 大鼠胰岛细胞分离与培养

出生3-5 d的Wistar乳鼠,无菌取出胰腺, Hanks液清洗后剪成约1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  1 mm小块,转入盛有胶原酶(2.0 g/L)的锥形瓶中,37  $^{\circ}$ C恒温水浴振荡消化30 min,150目筛网过筛,离心(1 000 r/min)3 min后弃上清。加入含10%胎牛血清RPMI-1640培养液,置含5% CO<sub>2</sub>培养箱内培养。24 h后换液,去除贴壁的成纤维细胞。再用RPMI-1640培养液调节细胞至适宜浓度,接种于培养板,分组进行实验。

### 3 实验分组

分离、培养的胰岛细胞分为4组:(1)正常对照组:胰岛细胞不作任何干预处理;(2)损伤组:培养液中加入IL-1 $\beta$ 75  $\times$  10<sup>3</sup> U/L + TNF- $\alpha$ 25  $\times$  10<sup>4</sup> U/L + IFN- $\gamma$ 25  $\times$  10<sup>4</sup> U/L;(3)牛磺酸保护I组:培养液中加入5 mmol/L的牛磺酸后,再加入IL-1 $\beta$ 75  $\times$  10<sup>3</sup> U/L + TNF- $\alpha$ 25  $\times$  10<sup>4</sup> U/L + IFN- $\gamma$ 25  $\times$  10<sup>4</sup> U/L;(4)牛磺酸保护II组:培养液中加入20 mmol/L的牛磺酸后,再加入IL-1 $\beta$ 75  $\times$  10<sup>3</sup> U/L + TNF- $\alpha$ 25  $\times$  10<sup>4</sup> U/L + IFN- $\gamma$ 25  $\times$  10<sup>4</sup> U/L。各组均培养24 h后做检测。

### 4 细胞形态学观察(光镜)

收集各种不同培养条件的细胞悬液,离心,培养液置-20  $^{\circ}$ C冰箱保存备用。细胞进行涂片,用瑞氏染液染色,光镜下观察细胞形态并进行凋亡细胞计数,胰岛细胞出现胞浆浓缩,细胞核固缩,染色质凝固,沿核膜呈新月型、杆状改变或核碎裂、出现凋亡小体者为凋亡细胞。每玻片随机观察200个细胞,计算凋亡细胞百分率。

凋亡细胞百分率 = 凋亡阳性细胞数 / (正常细胞 + 凋亡细胞 + 坏死细胞数)  $\times$  100%。

### 5 DNA片段观察

收集不同培养条件的胰岛细胞,提取DNA,

1.5%琼脂糖凝胶电泳2 h,电压100 V,DNA分子量标准用pBR322DNA/BstNI,电泳结束后在1 mg/L溴化乙锭中染色30 min,紫外透射分析仪下观察片段DNA梯度,并照相记录。

### 6 细胞培养液中NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量以及NOS活性的检测

用NO和NOS检测试剂盒检测,步骤严格按试剂盒说明书进行。

### 7 胰岛素分泌量的测定

取收集的细胞培养液,用放射免疫法定量检测胰岛素分泌量。

### 8 Bcl-xL和Bax蛋白表达的变化

用免疫组化的方法检测。根据细胞着色强弱分为4个等级记分:无着色记0分、淡黄色记1分、棕黄色记2分、棕褐色记3分。按公式HSCORE =  $\sum P_i(i+1)$  ( $i=0,1,2,3$ ;  $P_i$ 表示评分为*i*的比例),计算HSCORE得分。

### 9 统计学处理

应用SSPP10.0 for windows统计软件处理,实验数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,均数比较采用方差分析,组与组间比较用*t*检验。

## 结 果

### 1 胰岛细胞凋亡百分率、胰岛素水平、细胞培养液中NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量、NOS活性和胰岛素含量的变化

损伤组胰岛细胞凋亡率、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量及NOS活性均显著高于正常对照组,而胰岛素含量则显著低于正常对照组;牛磺酸保护组的上述指标较损伤组则发生明显变化,其中胰岛细胞凋亡率、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量及NOS活性均低于损伤组,而胰岛素含量显著高于损伤组( $P < 0.01$ ),且与牛磺酸浓度具有一定的量效关系(表1)。

表1 牛磺酸对IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 引起的胰岛细胞凋亡百分率、胰岛素水平、培养液中NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量及NOS活性的影响

Tab 1 Effect of taurine on the change of apoptotic rate of islet cells, insulin level, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> content and NOS activity induced by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

Group	Apoptotic rate (%)	Insulin level (mU/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> content (nmol/10 <sup>6</sup> cells)	NOS activity (U/10 <sup>6</sup> cells)
Normal control	3.5 $\pm$ 0.6	274 $\pm$ 18	11.4 $\pm$ 3.0	1.5 $\pm$ 0.4
Injury	30.2 $\pm$ 3.3 * $\Delta$	109 $\pm$ 11 * $\Delta$	525.0 $\pm$ 46.0 * $\Delta$	34.4 $\pm$ 3.8 * $\Delta$
Taurine protection I	17.1 $\pm$ 1.2 * $\Delta$	178 $\pm$ 12 * $\Delta$	263.0 $\pm$ 28.0 * $\Delta$	19.0 $\pm$ 1.9 * $\Delta$
Taurine protection II	10.2 $\pm$ 0.7 * $\Delta$	225 $\pm$ 14 * $\Delta$	158.0 $\pm$ 23.0 * $\Delta$	12.3 $\pm$ 1.3 * $\Delta$

\*  $P < 0.01$  vs normal control group;  $\Delta P < 0.01$  vs each group in sequence.

### 2 不同培养条件下的胰岛细胞 DNA 电泳

图 1 显示正常对照组中胰岛细胞 DNA 电泳后为一大分子条带,损伤组中可见 DNA 明显片段化。而同时加入了牛磺酸的保护组中,DNA 片段减少且变得模糊,并且牛磺酸浓度越高,胰岛细胞 DNA 片段化倾向越小。

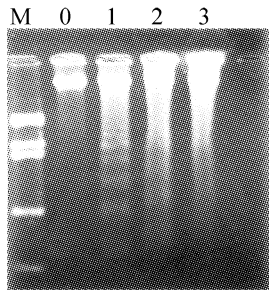


Fig 1 DNA electrophoresis of islet cell in different groups. M: molecular marker; 0: normal control group; 1: injury group; 2: taurine protection group I; 3: taurine protection group II.

图 1 胰岛细胞 DNA 电泳

### 3 不同培养条件下 Bcl-xL 和 Bax 蛋白的表达

免疫组化结果显示,正常对照组 Bcl-xL 高表达、Bax 低表达,损伤组中 Bcl-xL 表达低于正常对照组,而 Bax 表达高于正常对照组( $P < 0.01$ )。预先采用牛磺酸处理,可部分抑制 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  所致的 Bcl-xL 表达降低和 Bax 表达增高,与损伤组比较,有显著差异( $P < 0.01$ )。组间 Bcl-xL 和 Bax 蛋白的表达也表现出显著差异( $P < 0.01$ )(表 2)。

表 2 Bcl-xL and Bax 表达 (Hscore 评分)

Tab 2 Expressions of Bcl-xL and Bax ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Group	Bcl-xL	Bax
Normal control	3.50 $\pm$ 0.73	1.44 $\pm$ 0.29
Injury	2.33 $\pm$ 0.40 <sup>▲</sup>	2.35 $\pm$ 0.43 <sup>▲</sup>
Taurine protection I	2.85 $\pm$ 0.53 <sup>*</sup>	2.01 $\pm$ 0.40 <sup>*</sup>
Taurine protection II	3.11 $\pm$ 0.69 <sup>**</sup>	1.78 $\pm$ 0.41 <sup>**</sup>

<sup>▲</sup> $P < 0.01$  vs normal control group; <sup>\*</sup> $P < 0.01$  vs injury group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs taurine protection group I.

## 讨 论

细胞因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  能诱导胰岛  $\beta$  细胞凋亡,已在多种属来源的  $\beta$  细胞株上得到证实<sup>[1,4]</sup>。本工作在大鼠离体培养的原代胰岛细胞上亦获得完全一致的结果,提示诱导 1 型糖尿病发生的病理学机制,具有高度同源性,并未表现出种属差异。许多实验资料表明,上述的细胞因子介导胰岛细胞凋亡过程中,它们与其受体结合后,并未影响传统的信号转导系统。例如 cAMP<sup>[5]</sup>、磷脂酶系

统<sup>[6]</sup>、蛋白激酶<sup>[7]</sup>或者离子通道蛋白<sup>[8]</sup>。而最近有研究表明,细胞因子引起胰岛素分泌的抑制、胰岛  $\beta$  细胞的破坏、凋亡可能是由代谢过程中生成的一种氧自由基—一氧化氮(nitric oxide, NO)所引起的。本实验进一步观察到,IL-1 $\beta$  等细胞因子能诱导胰岛细胞凋亡,降低胰岛素含量,激活 NOS,增加 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的生成量。说明 NO 是上述细胞因子引起胰岛细胞凋亡明显增加的介质之一。细胞培养液中 NOS 的活性增高,提示 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  是通过提高 NOS 的活性而引起 NO 增高的。

牛磺酸即 2-氨基乙磺酸(H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub>H),广泛分布在动物机体的组织细胞内,具有广泛的生物学效应。虽然,牛磺酸具有胰岛素样生物学效应已较早为人们所认识,但对胰岛  $\beta$  细胞的保护作用迄今报道并不多见,上个世纪 70 年代开始,国外有报道牛磺酸可保护胰岛  $\beta$  细胞的内分泌功能<sup>[9]</sup>。此前我们利用 STZ 糖尿病大鼠研究亦得到相同的结果<sup>[10]</sup>。另外,袁敏生等<sup>[11]</sup>报道牛磺酸可降低非胰岛素依赖型糖尿病患者 OGTT 曲线的峰值水平,且不伴胰岛素水平的升高。本文运用直接诱导 1 型糖尿病的 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  等细胞因子作用于离体培养的 Wistar 大鼠胰岛细胞,证明上述细胞因子可诱导胰岛  $\beta$  细胞发生大量凋亡,而同时加入牛磺酸共同孵育后的  $\beta$  细胞凋亡率显著低于损伤组,胰岛素分泌量明显增加,细胞 DNA 电泳梯度现象减弱。再次证明牛磺酸对 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  引起的胰岛  $\beta$  细胞凋亡具有明显的拮抗作用,并且该作用具有一定的剂量依从关系。运用牛磺酸后的保护组胰岛细胞培养液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量与 NOS 活性均明显低于单纯损伤组。表明牛磺酸对抗上述细胞因子诱导胰岛  $\beta$  细胞凋亡,抑制 NOS 活性,减少细胞内 NO 生成,从而减轻 NO 对  $\beta$  细胞的毒性作用也是一个重要的机制。

在实验中我们还观察了 bcl-2 基因家族中的抗凋亡成员 Bcl-xL 和促凋亡成员 Bax 的表达。bcl-2 基因家族是在细胞凋亡调控中有重要作用的凋亡基因,在细胞凋亡信号转导中发挥重要作用。其中抗凋亡成员 Bcl-xL 和促凋亡成员 Bax 是其家族中最具代表性的两个成员。Bax 为重要的异二聚体伴分子,与 Bcl-xL 共存于线粒体,Bax 可与 Bcl-xL 构成异二聚体,而 Bax 自身也可组成同二聚体而诱导凋亡。Bcl-xL 必须结合 Bax 才能发挥其作用,Bcl-xL 的过度表达与 Bax 形成异二聚体而阻抑凋亡<sup>[12,13]</sup>。在本实验中,使用 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的损伤组,相比于正常对照组 Bcl-xL 表达降

低, Bax 的表达增强, 同时胰岛细胞凋亡率明显增加, 胰岛素含量明显降低。而在使用了牛磺酸的保护组中胰岛细胞较单纯损伤组细胞 Bcl - xL 表达升高和 Bax 表达降低, 并随牛磺酸浓度的增加而更为明显, 具有统计学意义。提示 *bcl - 2* 基因家族既是 IL - 1 $\beta$ 、TNF -  $\alpha$  和 IFN -  $\gamma$  诱导胰岛细胞凋亡过程中的一种调节因子, 也是牛磺酸发挥其保护作用的一个途径。

#### [参 考 文 献]

- [1] Nerup J, Mandrup - Poulsen T, Molvig J, et al. Mechanisms of pancreatic  $\beta$  - cell destruction in type 1 diabetes: an experimental model[J]. *Diabetes Care*, 1988, 11(1): 16 - 23.
- [2] 杨 军, 田 青. 牛磺酸与糖尿病[J]. *国外医学: 内分泌分册*, 1995, 15(1): 8 - 11.
- [3] 张 能, 方海立, 张 英, 等. 牛磺酸对白细胞介素 - 1 损伤的胰岛细胞分泌的影响[J]. *中国糖尿病杂志*, 1996, 4(4): 225 - 227.
- [4] Bendtzen K. Immune hormones (cytokines): pathogenic role in autoimmune rheumatic and endocrine disease [J]. *Autoimmunity*, 1989, 2(2): 177 - 189.
- [5] O' Neill LAJ, Bird TA. How does interleukin 1 activate cells? Interleukin - 1 signal transduction [J]. *Immunol Today*, 1990, 11(11): 392 - 394.
- [6] Mizel SB. How does interleukin 1 activate cells? Cyclic AMP. Interleukin - 1 signal transduction [J]. *Immunol Today*, 1990, 11(11): 390 - 391.
- [7] Kester M, Simonson MS, Mene P, et al. Interleukin - 1 generation transmembrane signal from phospholipids through novel pathways in cultured rat mesangial cell [J]. *J Clin Invest*, 1989, 83(2): 718 - 723.
- [8] Kuar P, Welsh WJ, Sakltvala J. Interleukin - 1 and tumor necrosis factor increase phosphorylation of the small heat shock protein. Effects in fibroblasts. HspG<sub>2</sub> and U937 cells [J]. *FEBS Lett*, 1989, 258(2): 269 - 273.
- [9] Goodman HO, Shihabi ZK. Supplemental taurine in diabetics rats: effects on plasma glucose and triglycerides [J]. *Biochem Med Metab Biol*, 1990, 43(1): 1 - 9.
- [10] 张 能, 方海立, 张 徽, 等. 链佐霉素糖尿病大鼠胰岛损伤及牛磺酸对损伤保护的病理形态免疫组化研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 1997, 22(3): 203 - 206.
- [11] 袁敏生, 黄济齐, 岳 颖, 等. 牛磺酸对糖尿病患者糖耐量曲线的影响 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 1997, 13(3): 148 - 150.
- [12] 严瑞兰, 王剑波, 惠宏襄, 等. 促凋亡基因 Bax 在上皮性卵巢肿瘤中的表达及意义 [J]. *第四军医大学学报*, 1998, 19(3): 322 - 324.
- [13] 汤群辉, 王 禾, 陈宝琦, 等. 抗凋亡基因 *bcl - 2* 在肾癌中的表达与意义 [J]. *第四军医大学学报*, 1999, 20(2): 141 - 145.