

## 高糖经内质网应激途径诱导胰岛内皮细胞凋亡

刘璇,徐宽枫,陈恒,许馨予,杨涛\*

(南京医科大学第一附属医院内分泌科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨高糖诱导胰岛微血管内皮细胞株 MS-1 凋亡及其可能机制。方法:体外培养 MS-1 细胞,用含有不同浓度葡萄糖(5.6、25.0 和 33.6 mmol/L)的培养液分组培养 12、24 h。流式细胞术分析各组细胞凋亡率变化;四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测各组细胞增殖率变化;RT-PCR 分析 GRP78、CHOP、caspase-3、caspase-12 mRNA 表达变化情况;Western blot 分析 GRP78、CHOP 蛋白表达变化情况。结果:与 5.6 mmol/L 组相比,培养 12 h 及 24 h 后,25.0 和 33.6 mmol/L 组 MS-1 细胞凋亡率显著增加( $P < 0.05$ );而细胞增殖率显著下降( $P < 0.05$ ),且呈浓度和时间依赖性。进一步研究表明,在高糖刺激 12 h 及 24 h 后,caspase-3、caspase-12 mRNA 表达显著上调( $P < 0.05$ ),CHOP mRNA 和蛋白表达水平均显著上调( $P < 0.05$ );而 GRP78 mRNA 和蛋白表达水平在刺激 12 h 后显著上调,24 h 后却显著下降( $P < 0.05$ )。结论:高糖可以促进胰岛内皮细胞凋亡增加,并呈浓度和时间依赖性升高,其机制可能与启动胰岛内皮细胞内质网应激有关。

**[关键词]** 胰岛内皮细胞;高糖;凋亡;增殖;内质网应激

**[中图分类号]** R587.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)03-349-05

## Hyperglycemia induced islet endothelial cell line MS-1 apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway

LIU Xuan, XU Kuan-feng, CHEN Heng, XU Xin-yu, YANG Tao\*

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of hyperglycemia on the apoptosis and proliferation of islet endothelial cell line MS-1. **Methods:** MS-1 cells were treated with different concentrations of glucose (5.6, 25.0 and 33.6 mmol/L) for different time (12 or 24 h). The apoptotic cells were detected by flow cytometry, and the cell proliferation was tested using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The expressions of GRP78, CHOP, caspase-3, caspase-12 mRNA were examined by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR), and the expressions of GRP78, CHOP protein were examined by Western blot. **Results:** After treated with glucose for 12 h or 24 h, the apoptotic rates were obviously higher in 25.0 and 33.6 mmol/L group than in 5.6 mmol/L group ( $P < 0.05$ ), while the cell proliferation was significantly lower in 25.0 and 33.6 mmol/L glucose treated group than that in 5.6 mmol/L glucose treated group ( $P < 0.05$ ). The mRNA levels of CHOP, caspase-3, caspase-12 and the protein level of CHOP increased in a dose-dependent manner after treated with glucose ( $P < 0.05$ ); while the mRNA and protein levels of GRP78 increased after treated for 12 h, and decreased at 24 h ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Hyperglycemia significantly promotes apoptosis and decreases proliferation of MS-1 cells, the mechanism may account for endoplasmic reticulum stress.

**[Key words]** islet endothelial cells; hyperglycemia; apoptosis; proliferation; endoplasmic reticulum stress

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 349-353]

胰岛含有大量的微血管,血管密度约为相应胰腺外分泌部的 5 倍。内皮细胞是胰岛细胞群的重要

组成部分,不仅参与了向胰岛内分泌细胞供应必需的氧气及营养物质的过程,而且与胰岛发育过程中胰岛素基因表达、 $\beta$  细胞增生、血糖感知及调节等密切相关,对于维持正常胰岛功能具有重要意义<sup>[1]</sup>。研究发现,糖尿病动物模型中胰岛微血管结构和功能均发生显著变化,进而导致  $\beta$  细胞功能和数量进行

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2010CB535008)

\*通讯作者, E-mail: yangt@njmu.edu.cn

性减少<sup>[2-3]</sup>。胰岛内皮细胞含有高度发达的内质网,是对内质网应激最为敏感的细胞之一。众多研究证实,高血糖能诱导大血管及微血管内皮细胞功能紊乱,包括增殖、屏障功能、凋亡、血管生成及合成功能等<sup>[4-5]</sup>。然而,目前高糖对于胰岛内皮细胞作用的研究甚少。本文即通过体外实验观察高糖对于胰岛内皮细胞凋亡和增殖的影响,并初步探讨内质网应激在其中的可能作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

胰岛内皮细胞株 MS-1 购自中国科学院上海细胞库;胎牛血清、DMEM 培养基、青霉素、链霉素、0.25% 胰酶-EDTA(美国 Gibco 公司);四甲基偶氮唑盐(MTT 美国 Sigma 公司);TRIzol 核酸提取液(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司);PCR 试剂、蛋白预染 Marker(美国 Fermentas 公司);DL 600 DNA Marker(上海博彩生物公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒(南京凯基生物公司);PVDF 膜(美国 Roche 公司);ECL 发光试剂盒(美国 Thermo 公司);GRP78、CHOP、 $\beta$ -actin 抗体及二抗(美国 Cell Signaling Technology, Santa Cruz 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养及分组

MS-1 细胞使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。待细胞 60%~

70%融合,换用含 1%BSA 的低糖 DMEM 同步化 24 h 后,加入含不同浓度葡萄糖的 DMEM,分别孵育 12、24 h。细胞按加入葡萄糖的浓度分为 5.6、25.0 和 33.6 mmol/L 3 组。

#### 1.2.2 各组 MS-1 细胞凋亡检测

各组细胞分别处理 12、24 h,行胰酶消化并 PBS 洗涤 2 遍后,每组加入 195  $\mu$ l Annexin V 结合液和 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 避光共孵育 10 min,2 000 r/min 离心 10 min,去上清,加入 190  $\mu$ l Annexin V 结合液和 10  $\mu$ l PI 避光孵育,用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

#### 1.2.3 各组 MS-1 细胞增殖率检测

收集对数生长期 MS-1 细胞,制备成终浓度为  $1 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液接种于 96 孔板,每孔加入 100  $\mu$ l,边缘孔用无菌 PBS 填充,5%CO<sub>2</sub> 37℃ 分组孵育。分别在孵育 12、24 h 后每孔加入 10  $\mu$ l MTT 溶液(5 mg/ml),继续培养 4 h 后,加入 150  $\mu$ l DMSO。置于摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。应用酶联免疫检测仪测量各孔吸光度值。每组设 10 个复孔。

#### 1.2.4 RT-PCR 分析内质网应激相关分子的 mRNA 表达水平

TRIzol 裂解后抽提总 RNA,逆转录生成 cDNA,进行 RT-PCR,引物序列见表 1。琼脂糖凝胶电泳分析 RT-PCR 结果,根据目的基因与内参 GAPDH 条带灰度比值计算 mRNA 相对表达量。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 RT-PCR primers

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
GRP78	ATCAGGGCAACCGCATCAC	ACCGAAGGGTCATCCAAGTG
CHOP	TCCAGATTCCAGTCAGAGTTC	CGTTCTCCTGCTCCTTCTC
caspase-3	TCTGACTGGAAAGCCGAAAC	GGACTGGATGAACCACGACC
caspase-12	AGGTAGGCAAGACTGGTTCC	AATAGCGTGTGCATGGATACTCTC
GAPDH	ACTGGAGAAACCTGCCAAGTA	TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGT

#### 1.2.5 Western blot 分析 GRP78、CHOP 蛋白表达水平

抽提总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,并根据浓度计算上样体积,常规聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将蛋白转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉溶液 37℃ 封闭 1 h, TBST 漂洗,分别加不同的一抗(1:1 000),4℃ 摇床过夜。隔日洗膜后加二抗 37℃ 孵育 1 h, TBST 漂洗,加入显影液,ECL 化学发光法曝光。用 Quality-One 图像分析软件(美国 Bio-Rad 公司),根据光密度定量分析。

### 1.3 统计学方法

应用 SPSS17.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用重复测量设计资料的方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高糖诱导各组 MS-1 细胞凋亡变化情况

与 5.6 mmol/L 组比较,高糖作用 12 h 或 24 h 均可使 MS-1 细胞凋亡率显著升高,差异具有统计学意义,且效应呈浓度和时间依赖方式升高(表 2)。

### 2.2 高糖对 MS-1 细胞增殖率的影响

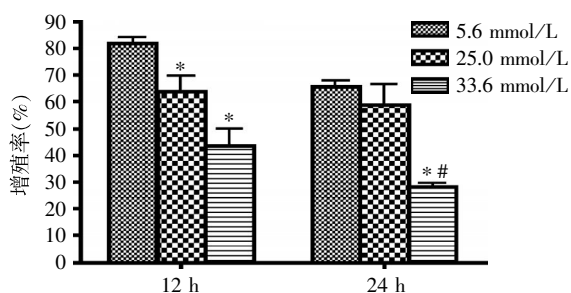
表 2 高糖对 MS-1 细胞凋亡率的影响

Table 2 Apoptosis of MS-1 cells cultured in high glucose (% ,  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	处理 12 h	处理 24 h
5.6 mmol/L 组	9.00 ± 0.53	13.60 ± 1.00
25.0 mmol/L 组	12.40 ± 1.48*	18.57 ± 3.13**
33.6 mmol/L 组	15.97 ± 0.45*	26.40 ± 2.80**

与 5.6 mmol/L 葡萄糖处理组相比, \* $P < 0.05$ ; 与处理 12 h 组相比, \*\* $P < 0.05$ 。

为评估不同葡萄糖浓度对于 MS-1 细胞增殖率的影响, 采用不同浓度葡萄糖 (5.6、25.0、33.6 mmol/L) 处理 MS-1 细胞, 行 MTT 分析。结果显示刺激 12 h 后, 25.0 和 33.6 mmol/L 高糖组细胞增殖率均较 5.6 mmol/L 组明显下降 ( $P < 0.05$ ), 刺激 24 h 后, 33.6 mmol/L 组细胞增殖率较 5.6 mmol/L 组细胞明显下降 ( $P < 0.05$ )。与刺激 12 h 相比, 24 h 后 33.6 mmol/L 组细胞增殖率均明显降低 ( $P < 0.05$ , 图 1)。



与 5.6 mmol/L 葡萄糖处理组相比, \* $P < 0.05$ ; 与处理 12 h 组相比, # $P < 0.05, n = 11$ 。

图 1 高糖对 MS-1 细胞增殖率的影响

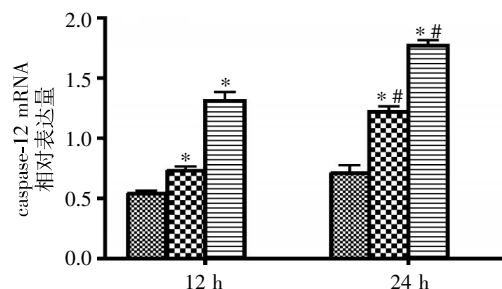
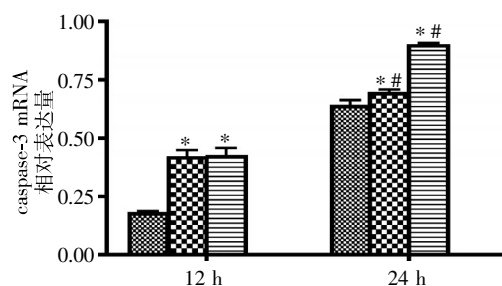
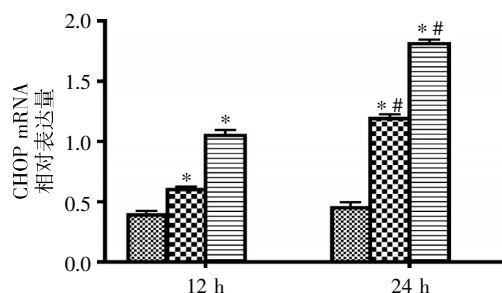
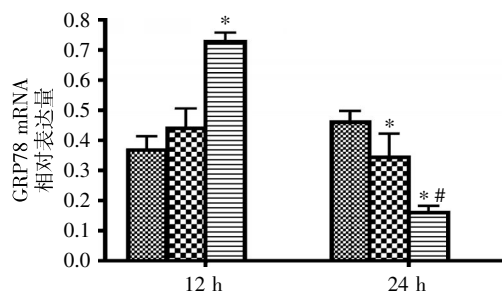
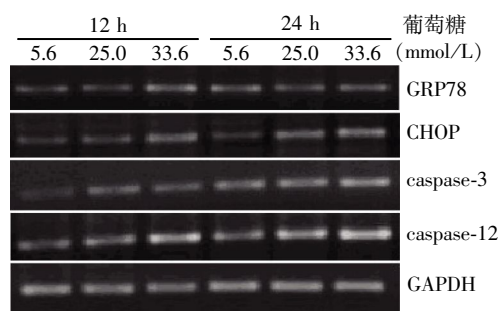
Figure 1 Effect of high concentration of glucose on cell death and cell proliferation in MS-1 cells

### 2.3 高糖诱导 MS-1 细胞内质网应激相关分子 mRNA 表达变化情况

刺激 12、24 h 后, 25.0 和 33.6 mmol/L 高糖组 CHOP、caspase-3、caspase-12 mRNA 表达均显著高于 5.6 mmol/L 组 ( $P < 0.05$ )。与刺激 12 h 相比, 25.0、33.6 mmol/L 高糖刺激 24 h 后, CHOP、caspase-3、caspase-12 mRNA 表达均显著增加 ( $P < 0.05$ )。而 GRP78 mRNA 在 33.6 mmol/L 葡萄糖刺激 12 h 后, 表达显著高于 5.6 mmol/L 组 ( $P < 0.05$ ), 刺激 24 h 后表达反而下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 2)。

### 2.4 高糖诱导 MS-1 细胞 GRP78、CHOP 蛋白表达变化情况

结果显示, 刺激 12 h 后, 33.6 mmol/L 高糖组 GRP78、CHOP 蛋白表达较 5.6 mmol/L 组分别增加了 88% 和 67% ( $P < 0.05$ ); 刺激 24 h 后, 25.0 和 33.6 mmol/L 组 CHOP 蛋白表达较 5.6 mmol/L 组分别增



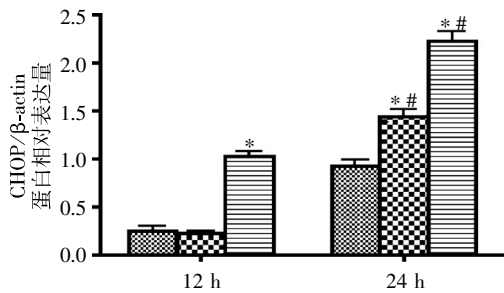
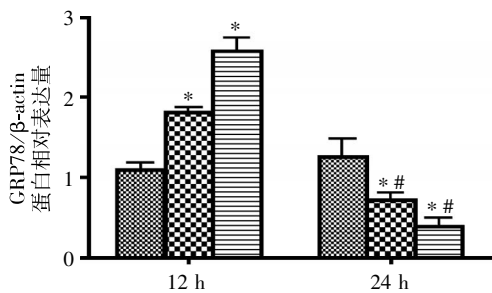
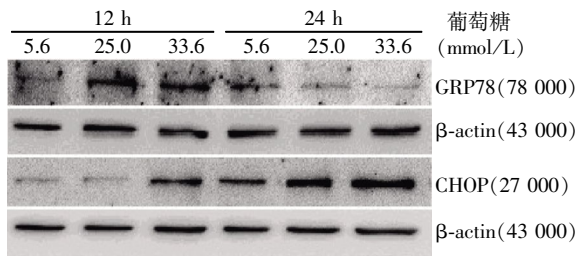
5.6 mmol/L 25.0 mmol/L 33.6 mmol/L

与 5.6 mmol/L 葡萄糖处理组相比, \* $P < 0.05$ ; 与处理 12 h 组相比, # $P < 0.05$ , 实验重复 3 次。

图 2 RT-PCR 检测高糖刺激后 MS-1 细胞内质网应激相关分子 mRNA 表达情况

Figure 2 The expression of reticulum related molecular mRNA detected by RT-PCR

加了 70% 和 147% ( $P < 0.05$ ); 而 GRP78 蛋白表达较 5.6 mmol/L 组下降了 57% 和 87%。与刺激 12 h 相比, 刺激 24 h 的 25.0 和 33.6 mmol/L 组 CHOP 蛋白表达均显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而 GRP78 蛋白表达均显著减少 (图 3)。



■ 5.6 mmol/L □ 25.0 mmol/L ▨ 33.6 mmol/L

与 5.6 mmol/L 葡萄糖处理组相比, \* $P < 0.05$ ; 与处理 12 h 组相比, # $P < 0.05$ , 实验重复 3 次。

图 3 Western blot 检测 GRP78、CHOP 蛋白表达情况

Figure 3 The expression of GRP78 and CHOP protein detected by Western blot

### 3 讨论

胰岛内皮细胞对维持正常胰岛功能具有重要意义。胰岛是一个高度血管化的器官,除了内分泌细胞( $\alpha$  细胞、 $\beta$  细胞和  $\delta$  细胞)外,还含有极其丰富的胰岛内皮细胞。胰岛内皮细胞具有独特的窗孔样结构,负责为胰岛输送氧气、提供各种养分,并输送分泌的激素。除此之外胰岛内皮细胞通过表达的受体及分泌多种活性物质对胰岛微血管形成、胰腺内分泌部发育、胰岛炎症反应、胰岛血供以及移植胰岛再血管化等发挥调节作用<sup>[1]</sup>。以往的研究已证实高糖在  $\beta$  细胞的存活及增殖中的作用,本研究关注高糖对胰岛内皮细胞的作用,发现持续高糖刺激不

仅影响  $\beta$  细胞的存活及增殖,也会促进胰岛内皮细胞凋亡,进而导致 2 型糖尿病自然病程中  $\beta$  细胞功能和数量进行性减少。但目前高血糖诱导内皮细胞凋亡的机制尚不完全明了,可能包括氧化应激、细胞内  $Ca^{2+}$  浓度的变化、线粒体功能紊乱、胞内游离脂肪酸代谢紊乱、p-Akt 途径的激活、JNK 及下游 caspase-3 激活等<sup>[6-8]</sup>。

内质网是细胞内膜型/分泌型蛋白合成的细胞器,在调节蛋白质正确折叠、钙稳态和细胞凋亡等方面具有重要作用,是维持血管内皮功能的重要亚细胞器。多种刺激因素诱导的内质网内未折叠/错误折叠蛋白质的聚集和钙稳态失衡等状态被称为内质网应激,可通过多条途径引发细胞凋亡。

GRP78 是热休克蛋白 70 家族中的一员,也是内质网中一种特征性的伴侣蛋白,被认为是内质网应激的一种标志蛋白。为了解内质网应激途径是否参与了高糖导致胰岛内皮细胞的凋亡,本实验观察了高糖处理后 MS-1 细胞内质网应激特异性标志蛋白 GRP78 mRNA 及蛋白表达的变化,结果显示,持续高糖刺激 12 h 后胰岛内皮细胞 GRP78 mRNA 和蛋白表达水平均显著增加,说明高糖刺激确实可以引起胰岛内皮细胞内质网应激。在内质网稳态的情况下,GRP78 与 p-ERK、ATF6 及 IRE1 暴露于内质网腔中的结构域结合,当稳态失衡时,大量未折叠蛋白聚集,由于 GRP78 与未折叠蛋白亲和力更高,导致其与 p-ERK、ATF6 及 IRE1 解离,转而与未折叠蛋白结合,由此促进蛋白质正确折叠。而解离后的 p-ERK、ATF6 及 IRE1 分别被激活,启动下游通路,对细胞产生保护作用<sup>[9]</sup>。研究发现 GRP78 在胰岛  $\beta$  细胞感受内质网应激时表达增加具有抗凋亡的作用,能保护  $\beta$  细胞免于内质网应激引起的细胞死亡<sup>[10]</sup>。既往研究发现 GRP78 表达上调在人脐静脉内皮细胞内质网应激导致的细胞损伤中有重要的保护作用<sup>[11]</sup>。另外,在肿瘤生长过程中血管内皮细胞也出现内质网应激,通过促进 GRP78 适度表达、抑制 CHOP 等内质网应激凋亡途径的激活,促进肿瘤生长<sup>[12]</sup>。本研究还发现,高糖刺激 24 h 后 GRP78 基因下调、蛋白表达减少,而且此时细胞凋亡较 12 h 明显增加,推测 GRP78 蛋白表达减少可能是引发细胞凋亡增加的原因之一,但还需要进一步研究确认。

CHOP 途径是内质网相关凋亡途径之一,CHOP 是在内质网应激不同阶段均能被激活的转录因子。在本实验中发现持续高糖刺激 12 h 及 24 h 后 CHOP mRNA 及蛋白表达增加,说明该途径也参与

了胰岛内皮细胞的凋亡过程。以前的研究也发现在 2 型糖尿病患者的胰岛  $\beta$  细胞中有 CHOP 的表达,且脂类引起的 CHOP 表达可以促进胰岛  $\beta$  细胞凋亡的发生<sup>[13]</sup>。也有研究证实高血糖可通过诱导 CHOP 表达,导致糖尿病小鼠心肌细胞凋亡增加<sup>[14]</sup>。Park 等<sup>[15]</sup>研究发现阿米洛利衍生物剂量依赖性地促进人脐静脉内皮细胞 CHOP 表达和细胞凋亡。

此外,Schildberg 等<sup>[16]</sup>研究发现,脂多糖作用人脐静脉内皮细胞 12 h 后细胞活力显著降低,同时 p-ERK 磷酸化增加,继而 caspase-12 及其下游分子 caspase-3 激活导致细胞凋亡。本实验也发现持续高糖处理 12 h 及 24 h 后,caspase-12 及 caspase-3 mRNA 表达均上调,说明该凋亡通路的激活也导致了胰岛内皮细胞凋亡增加。

综上所述,众多研究表明胰岛内皮细胞参与了内分泌组织的发生及病理生理过程,其病理生理作用及凋亡机制尚不明确。目前对血管内皮细胞内质网应激的研究还处于起步阶段,其信号转导途径及其在多种疾病中的作用还需要进一步研究。调控胰岛微血管内皮细胞的凋亡可能成为保护胰岛  $\beta$  细胞,阻止糖尿病进程的一个新途径。

#### [参考文献]

- [1] Olsson R, Carlsson PO. The pancreatic islet endothelial cell; emerging roles in islet function and disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(5-6): 710-714
- [2] Lacraz G, Giroix MH, Kassis N, et al. Islet endothelial activation and oxidative stress gene expression is reduced by IL-1Ra treatment in the type 2 diabetic GK rat [J]. *PLoS One*, 2009, 4(9): e6963
- [3] Li X, Zhang L, Meshinchi S, et al. Islet microvasculature in islet hyperplasia and failure in a model of type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2006, 55(11): 2965-2973
- [4] Goligorsky MS, Chen J, Brodsky S. Workshop: endothelial cell dysfunction leading to diabetic nephropathy: focus on nitric oxide[J]. *Hypertension*, 2001, 37(2 part 2): 744-748
- [5] Ido Y, Carling D, Ruderman N. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells; inhibition by the AMP-activated protein kinase activation[J]. *Diabetes*, 2002, 51(1): 159-167
- [6] Favaro E, Miceli I, Bussolati B, et al. Hyperglycemia induces apoptosis of human pancreatic islet endothelial cells; effects of pravastatin on the Akt survival pathway [J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(2): 442-450
- [7] Gong L, Liu FQ, Wang J, et al. Hyperglycemia induces apoptosis of pancreatic islet endothelial cells via reactive nitrogen species-mediated Jun N-terminal kinase activation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(6): 1211-1219
- [8] Symons JD, McMillin SL, Riehle C, et al. Contribution of insulin and Akt1 signaling to endothelial nitric oxide synthase in the regulation of endothelial function and blood pressure[J]. *Circ Res*, 2009, 104(9): 1085-1094
- [9] Eiras S, Fernandez P, Pineiro R, et al. Doxazosin induces activation of GADD153 and cleavage of focal adhesion kinase in cardiomyocytes en route to apoptosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 71(1): 118-128
- [10] Lee JW, Kim WH, Yeo J, et al. ER stress is implicated in mitochondrial dysfunction-induced apoptosis of pancreatic beta cells[J]. *Mol Cells*, 2010, 30(6): 545-549
- [11] Chen YY, Zheng MZ, Lv PP, et al. Hydrogen peroxide regulates glucose-regulated protein 78 expression via a cyclooxygenase-2 dependent mechanism [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2010, 24(5): 279-285
- [12] Virrey JJ, Dong D, Stiles C, et al. Stress chaperone GRP78/BiP confers chemoresistance to tumor-associated endothelial cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(8): 1268-1275
- [13] Lu X, Liu J, Hou F, et al. Cholesterol induces pancreatic beta cell apoptosis through oxidative stress pathway [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2011, 16(5): 539-548
- [14] Wu T, Dong Z, Geng J, et al. Valsartan protects against ER stress-induced myocardial apoptosis via CHOP/Puma signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 42(5): 496-502
- [15] Park KS, Poburko D, Wollheim CB, et al. Amiloride derivatives induce apoptosis by depleting ER Ca<sup>(2+)</sup> stores in vascular endothelial cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 156(8): 1296-1304
- [16] Schildberg FA, Schulz S, Dombrowski F, et al. Cyclic AMP alleviates endoplasmic stress and programmed cell death induced by lipopolysaccharides in human endothelial cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2005, 320(1): 91-98

[收稿日期] 2011-11-12