

牛磺熊脱氧胆酸对棕榈酸诱导的 INS-1 细胞凋亡的保护作用

钟继娟, 祝 群*, 缪 珩*

(南京医科大学第二附属医院内分泌科, 江苏 南京 210011)

[摘要] 目的:探讨牛磺熊脱氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TUDCA)对棕榈酸(palmitate)诱导的 INS-1 细胞凋亡的保护作用。方法:分别用不同浓度棕榈酸(0.25、0.50、1.00 mmol/L)、棕榈酸(0.50 mmol/L)加 TUDCA(100 μ mol/L)培养 INS-1 细胞 24 h, 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早期凋亡,Western blot 检测内质网应激相关蛋白 GRP78 的表达。结果:与对照组相比,棕榈酸组(浓度 ≥ 0.5 mmol/L)的 INS-1 细胞凋亡率显著上升($P < 0.05$);加 TUDCA 培养 24 h 以后,与棕榈酸组相比,INS-1 细胞凋亡率显著下降($P < 0.05$)。此外,棕榈酸组(0.5 mmol/L)INS-1 细胞内质网应激相关蛋白 GRP78 的表达显著上升($P < 0.05$);加 TUDCA 培养 24 h 以后,与棕榈酸组相比,INS-1 细胞 GRP78 蛋白表达显著下降($P < 0.05$)。结论:TUDCA 能够减少游离脂肪酸引起的 INS-1 细胞凋亡,对 INS-1 细胞发挥保护作用。而减少内质网应激蛋白的表达,缓解内质网应激可能是其作用机制之一。

[关键词] 牛磺熊脱氧胆酸;棕榈酸;内质网应激;INS-1 细胞;凋亡

[中图分类号] R587.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)03-354-05

Protective effects of tauroursodeoxycholic acid on the apoptosis of INS-1 cells cultured by palmitate

ZHONG Ji-juan, ZHU Qun*, MIAO Heng*

(Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) on the apoptosis of INS-1 cells cultured by palmitate *in vitro*. **Methods:** INS-1 cells were cultured in the presence of different concentrations of palmitate (0.25, 0.50, 1.00 mmol/L) or combined with TUDCA (100 μ mol/L) for 24 h. Cell viability was evaluated with MTT reduction conversion assay. The annexin-V/FITC cell death detection kit was used to monitor cell apoptosis. The expressions of endoplasmic reticulum (ER) stress marker GRP78 were detected by Western blotting. **Results:** The proliferation of INS-1 cells was inhibited, and the apoptosis was induced significantly by palmitate (concentration ≥ 0.5 mmol/L, $P < 0.05$). The apoptosis rate was significantly decreased when INS-1 cells were co-cultured with TUDCA ($P < 0.05$). Moreover, the expression of GRP78 was increased in INS-1 cells incubated with palmitate ($P < 0.05$), and it was repressed by TUDCA ($P < 0.05$). **Conclusion:** Our results suggest that TUDCA could protect INS-1 cells from palmitate-induced apoptosis, and it might work through repressing the expression of ER stress response protein GRP78 and alleviating ER stress.

[Key words] tauroursodeoxycholic acid (TUDCA); palmitate; endoplasmic reticulum stress; INS-1 cell; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 354-358]

糖尿病的发生发展与胰岛 β 细胞功能失调和胰岛素抵抗有密切关系。近年来研究发现,无论对于 1 型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)还是 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM),胰岛 β 细胞凋亡是其发病的中心环节。有报道指出,T2DM

患者与体质指数相当的非糖尿病人群相比,其胰岛 β 细胞数目明显减少,胰岛细胞凋亡发生率也明显高于正常人群^[1]。在引起 T2DM 胰岛 β 细胞凋亡的诸多损害因素中,细胞凋亡的脂毒性理论受到越来越多的重视^[2]。其中,游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)增加可损伤胰岛 β 细胞功能,使葡萄糖刺激的胰岛素分泌(glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)减少, β 细胞凋亡增加,与 T2DM 发病密切相关。已有的研究资料表明,生理浓度的 FFA 对葡萄糖诱导的胰岛

[基金项目] 江苏省自然科学基金面上项目(BK2011861);江苏省科技厅社会发展计划(BS2005066)

*通讯作者, E-mail: qun_zhu@163.com; miaoheng@medmail.com.cn

素分泌有加强作用,但长期暴露于高浓度 FFA 下可诱导 β 细胞凋亡并引起 β 细胞坏死,使细胞数目减少。其中,又以诱导细胞凋亡的作用为主,称为脂性凋亡(lipoapoptosis)。体外实验表明,将人胰岛细胞在高血浆 FFA 环境下培养 48 h,胰岛细胞凋亡率比对照组高 2 倍^[3]。

内质网是细胞内具有重要生理功能的细胞器,主要负责蛋白质的合成、转运、糖基化修饰以及 Ca^{2+} 的储存与分布、信号转导等。细胞在缺氧、营养物质缺乏、化学毒物、紫外线等多种理化因素刺激下,内质网腔内出现错误折叠与未折叠蛋白聚集以及 Ca^{2+} 代谢紊乱而导致内质网稳态的破坏,称为内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)。近年研究发现,ERS 在介导细胞适应、损伤及凋亡中起重要作用,并可能与肥胖、胰岛素抵抗及糖尿病的发生发展密切相关^[4]。Wang 等^[5]发现,高糖和游离脂肪酸能显著升高大鼠胰岛 β 细胞系 INS-1 细胞的 ERS 水平,导致细胞凋亡和 GSIS 功能受损。

熊脱氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)及其衍生物牛磺熊脱氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TUDCA)已广泛用于治疗胆源性肝病并取得较好疗效。近年的研究发现,其具有显著抗凋亡和抗氧化的性质。目前有在体或离体研究表明,TUDCA 作为分子伴侣能缓解 ob/ob 糖尿病小鼠的 ERS,增强其胰岛素活性,减轻小鼠脂肪肝,提高小鼠肝脏、脂肪、肌肉的胰岛素敏感性^[6],表明 TUDCA 有用于治疗糖尿病的可能性。然而,TUDCA 是否能够抑制胰岛 β 细胞凋亡及其机制尚不十分清楚,本实验以 INS-1 细胞为研究对象,观察了在棕榈酸(FFA)引起 ERS 的条件下,TUDCA 对 INS-1 细胞增殖、凋亡及相关蛋白表达的影响,以揭示 TUDCA 通过缓解 ERS 减轻 β 细胞的脂毒性损伤的机制,为糖尿病新药的开发提供新的作用靶点。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大鼠胰岛 β 细胞系 INS-1(16~50 代),由南京医科大学韩晓教授赠予。棕榈酸(美国 Sigma 公司),TUDCA 和牛血清白蛋白 BSA(德国 CalBiochem-Merck 公司),RPMI-1640 和青霉素-链霉素溶液(美国 Gibco 公司),胎牛血清和胰酶(美国 HyClone 公司),小鼠抗人 Bip/GRP78 单克隆抗体(美国 BD 公司),小鼠抗大鼠 β -actin 单克隆抗体和羊抗小鼠 IgG-HRP(武汉博士德公司),聚偏二氟乙烯膜

(PVDF 膜,美国 Biosharp 公司),ECL 显色剂(美国 Pierce 公司),医用 X 线胶片(美国柯达公司),流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 INS-1 细胞培养

INS-1 细胞中加入含 10%胎牛血清 RPMI-1640 完全培养基(含青霉素 100 U/ml,链霉素 100 mg/L,50 $\mu\text{mol/L}$ 巯基乙醇,11 mmol/L 葡萄糖,1 mmol/L 丙酮酸钠,10 mmol/L HEPES,2 mmol/L 谷氨酰胺),放入 5% CO_2 培养箱,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置培养,并每隔 1~2 d 换液。

1.2.2 游离脂肪酸的配制

取适量棕榈酸溶于纯乙醇配制游离脂肪酸溶液,并在常温无菌条件下用 0.22 μm 过滤器过滤,配成 200 mmol/L 储存液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。1%胎牛血清 RPMI-1640 完全培养基、2%的 BSA 及 200 mmol/L 游离脂肪酸溶液配成游离脂肪酸终浓度为 0.5 mmol/L 的混合液,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中震荡 15 min,充分摇匀室温冷却后加入细胞培养皿,放入 5% CO_2 培养箱,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置培养。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖

取生长状态良好的 INS-1 细胞接种于 96 孔培养板,每孔 200 μl ,含 3.0×10^4 个细胞,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,加入无血清培养液,继续培养 3 h,使各孔细胞同步化。棕榈酸刺激浓度与时间参考 Karaskov 等^[7]的实验数据,TUDCA 的实验浓度参考 Chen 等^[8]实验数据:实验分为空白对照组(BSA)、DMSO 组(含有 0.05% DMSO 的培养液,与最高浓度棕榈酸组相同,以检测 DMSO 对细胞是否有毒性)、棕榈酸(0.25、0.50、1.00 mmol/L)组共 5 组,每组均设 5 个复孔,干预 24 h。实验结束前 4 h 加入 MTT(5 g/L,每孔 20 μl)继续孵育 4 h,终止培养,弃培养液,每孔加入 DMSO 150 μl ,振荡 5 min,使结晶物充分溶解,选择 492 nm 的波长,用酶联免疫检测仪测各孔吸光值 $D(492 \text{ nm})$,记录结果。计算存活率=[实验组 $D(492 \text{ nm})$ /阴性对照组 $D(492 \text{ nm})$] $\times 100\%$ 。

1.2.4 流式细胞术检测细胞早期凋亡

将细胞消化接种于 6 孔培养板中,每孔 2 ml,含 2.5×10^5 个细胞,培养 24 h 待细胞贴壁,3 h 同步化后,经 BSA、棕榈酸(0.5 mmol/L)、TUDCA(100 $\mu\text{mol/L}$)、棕榈酸(0.5 mmol/L)加 TUDCA(100 $\mu\text{mol/L}$)共 4 组处理 24 h,消化收集细胞,用冷 PBS 液洗涤 3 遍,充分吹打,制成细胞悬液,采用流式细胞术,以碘化丙

啶综合染液用“一步法”对样品进行荧光避光染色 30 min, 上机检测。流式细胞仪为 FACSCalibur(美国 B&D 公司), 用 Cellquest 软件程序自动获取每样品 2×10^4 个细胞。经 ModFitLT 软件程序分析细胞 DNA 含量, 检测细胞凋亡。

1.2.5 Western blot 检测内质网应激相关蛋白 GRP78 的表达

10 cm 培养皿内加入 400 μ l 蛋白裂解液, 提取细胞总蛋白, 按 BCA 法测定蛋白浓度。取总蛋白 50 μ g, 经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h, 加 GRP78 鼠单克隆抗体(工作浓度 1:500)和 β -actin 单克隆抗体(工作浓度 1:500), 4 $^{\circ}$ C 杂交过夜, 洗膜后加辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体(工作浓度均为 1:2 000)。室温孵育 2 h, 再次洗膜加入 ECL 显色剂。用凝胶图像分析系统对条带密

度扫描, 测量得到的光密度比值(GRP78/ β -actin)作为 GRP78 蛋白的相对表达量。各组实验至少重复 4 次。

1.3 统计学方法

以 SPSS13.0 统计分析软件进行统计, 各项指标以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两组均数之间采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 棕榈酸对 INS-1 细胞活性的影响

INS-1 细胞加入不同浓度棕榈酸培养 24 h 后, 与空白对照组(BSA 组)相比, DMSO 组对 INS-1 细胞生长无明显影响($P > 0.05$); 当棕榈酸浓度 ≥ 0.5 mmol/L 时, INS-1 细胞存活率显著下降($P < 0.05$), 呈剂量-效应关系, 见表 1。

表 1 不同浓度棕榈酸对 INS-1 细胞增殖的影响

Table 1 Effect of different concentrations of palmitate on the proliferation of INS-1 cells

组别	<i>n</i>	吸光度	细胞生存率(%)
空白对照组	5	0.944 \pm 0.066	100.00 \pm 6.62
0.05%DMSO 组	5	0.920 \pm 0.070	97.95 \pm 6.65
0.25 mmol/L 棕榈酸	5	0.869 \pm 0.050	92.16 \pm 5.11
0.50 mmol/L 棕榈酸	5	0.650 \pm 0.027*	70.47 \pm 3.02*
1.00 mmol/L 棕榈酸	5	0.176 \pm 0.072*	18.69 \pm 3.40*

与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 TUDCA 对棕榈酸诱导的 INS-1 细胞早期凋亡的影响

图 1 可见, 与 BSA 对照组相比, 棕榈酸组(0.5 mmol/L)INS-1 细胞凋亡率显著上升[(26.4 \pm 3.7)%, $P < 0.05$]; 当同时加用 TUDCA(100 μ mol/L)培养时, 与棕榈酸组相比, INS-1 细胞凋亡率显著下降[(15.0 \pm 2.6)%, $P < 0.05$]。

2.3 TUDCA 对棕榈酸诱导的 INS-1 细胞内质网应激蛋白 GRP78 表达的影响

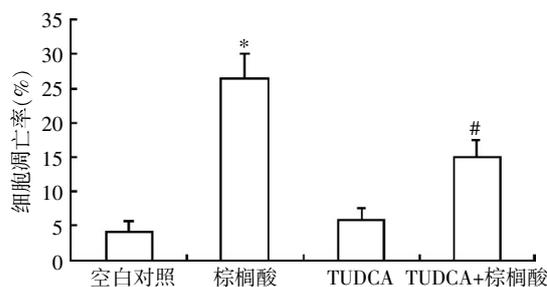
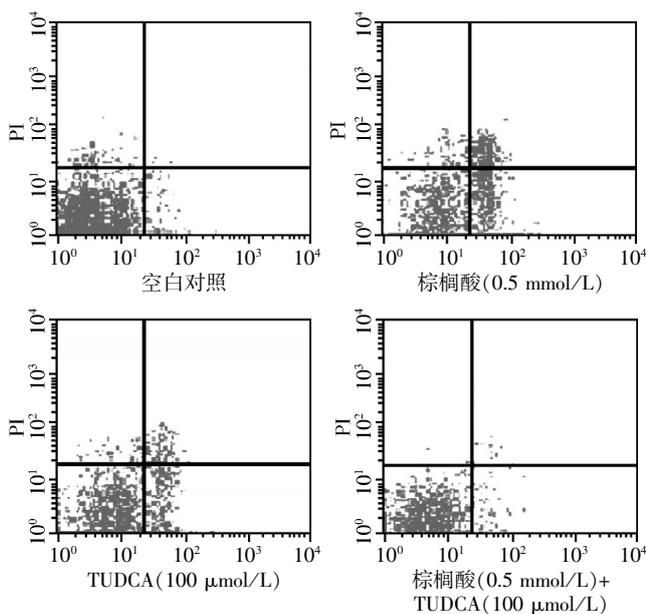
图 2 可见, 与 BSA 对照组相比, 棕榈酸组(0.5 mmol/L)INS-1 细胞内质网应激蛋白 GRP78 表达显著上升($P < 0.05$); 当同时加用 TUDCA(100 μ mol/L)培养后, INS-1 细胞内质网应激蛋白 GRP78 表达显著下降($P < 0.05$)。

3 讨论

近年来, 越来越多的研究显示, 人体出生后胰岛 β 细胞的数量是由 β 细胞的自我分化、再生和 β 细胞的死亡(主要是由凋亡引起)这一动态平衡所

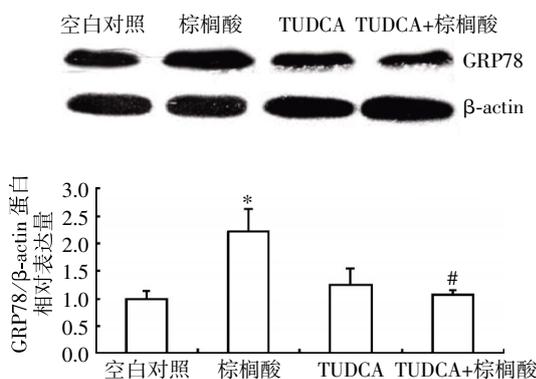
决定。T2DM 和肥胖患者常伴有脂代谢紊乱, 血中胆固醇、甘油三酯和游离脂肪酸水平常增高。有研究表明血中 FFA 水平升高后, 超过脂肪组织的储存能力和各组织对 FFA 的氧化能力, 使过多的 FFA 以甘油三酯的形式在非脂肪组织过度沉积而造成该组织的损伤。近年来研究显示, T2DM 的发生发展与 β 细胞的凋亡密切相关^[9]。本研究观察了体外不同浓度棕榈酸培养对胰岛 β 细胞凋亡的影响, 发现棕榈酸增加胰岛细胞凋亡率, 随着浓度升高凋亡率增加, 提示高浓度棕榈酸可通过诱导胰岛 β 细胞凋亡进而引起胰岛 β 细胞功能衰竭。

TUDCA 是一种亲水性胆汁酸, 生理状态下, 人体内源性 TUDCA 含量很低, 它是 UDCA 的衍生物, UDCA 和 TUDCA 对肝细胞具有保护作用^[10-11]。它们已广泛用于治疗胆汁淤积性肝硬化及溃疡性结肠炎^[12]。其作用机制主要为稳定线粒体膜、阻止细胞色素 C 释放及随后 Caspase-9、Caspase-3 活化, 以及激活 Ca^{2+} 介导的 PKC、MAPK 和 P13K 信号途径等^[13]。Ozcan 等^[6]研究结果显示, TUDCA 能够缓



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与棕榈酸组比较, # $P < 0.05$ ($n = 3$)。
图 1 用流式细胞仪观察 TUDCA 对棕榈酸诱导的 INS-1 细胞早期凋亡的影响

Figure 1 Effects of TUDCA on the apoptosis of INS-1 cells cultured in palmitate by examined flow cytometry



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与棕榈酸组比较, # $P < 0.05$ ($n = 4$)。

图 2 用 Western blot 检测 TUDCA 对棕榈酸诱导的内质网应激相关蛋白 GRP78 的表达

Figure 2 Effect of TUDCA on the level of GRP78 protein expression of INS-1 cells cultured in palmitate determined by Western blot

解脂肪细胞的 ERS,减轻胰岛素抵抗,表明 TUDCA 可能成为糖尿病潜在治疗药物。Asli 等^[14]研究结果显示, TUDCA 通过缓解 ERS 明显改善肥胖患者心肌功能失调。最近有研究证实, TUDCA 能缓解糖基化终末产物引起的小鼠肾小球足细胞的 ERS,减少其凋亡,是治疗糖尿病肾病潜在的有效药物^[11]。然而, TUDCA 是否对损害因素导致的 β 细胞凋亡具有保护作用,目前尚不清楚。本研究通过流式细胞仪检测细胞凋亡发现, TUDCA 可减轻棕榈酸引起的 INS-1 细胞的凋亡,提示 TUDCA 对棕榈酸引起胰岛 β 细胞凋亡具有保护作用。

胰岛 β 细胞凋亡的分子机制正成为近年来国内外研究的热点。研究显示, ERS 在介导 β 细胞适应、

损伤及凋亡中起重要作用。近年有研究表明,游离脂肪酸能引起 ERS 并最终导致胰岛 β 细胞凋亡^[15-16]。胰岛 β 细胞具有高度发达的内质网,对 ERS 极为敏感。Marchetti 等^[17]发现, T2DM 患者胰岛细胞的内质网密度较非糖尿病者显著增高,在高糖培养下糖尿病患者胰岛 β 细胞 GRP78 等 ERS 标志物明显增高。本研究结果显示,高浓度棕榈酸培养明显增加了 GRP78 的表达以及 INS-1 细胞的凋亡。这一变化与 ERS 导致其他细胞发生凋亡的机制相似,提示 GRP78 的表达变化可能在高浓度游离脂肪酸所致的 ERS 及胰岛 β 细胞凋亡中起重要作用。进一步研究发现,应用 TUDCA 干预后, ERS 蛋白 GRP78 的表达明显下降,提示 TUDCA 通过降低 ERS 相关蛋白的表达,缓解 ERS,从而减少细胞的凋亡,起到保护胰岛 β 细胞存活的作用。

综上所述, FFA 诱导的 INS-1 细胞凋亡与 ERS 有关。TUDCA 通过减少 ERS 相关蛋白 GRP78 的表达,缓解 ERS,对 FFA 诱导的 β 细胞凋亡起到一定的保护作用。本研究结果提示, TUDCA 在临床上可能作为一个新的靶点药物,通过减轻糖尿病患者体内胰岛 β 细胞的凋亡,从而有助于糖尿病患者的治疗。

[参考文献]

- [1] Butler AE, Janson J, Bonnet-Weir S, et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2003, 52(1):102-110
- [2] McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes[J]. Dia-

betes,2002,51(1):7-18

[3] Girard J. Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action.mechanism of beta-cell lipotoxicity[J]. Med Sci(Paris),2005,21(1):19-25

[4] Nakatani Y,Kaneto H,Kawamori D,et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes[J]. J Biol Chem,2005,280(1):47-51

[5] Wang H,Kouri G,Wollheim CB. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity[J]. J Cell Sci,2005,118(7):3905-3915

[6] Ozcan U,Yilmaz E,Ozcan L,et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes [J]. Science,2006,313(5790):1137-1140

[7] Karaskov E,Scott C,Zhang L,et al. Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis[J]. Endocrinology,2006,147(7):3398-3407

[8] Chen Y,Liu CP,Kuan FX,et al. Effect of taurine-conjugated ursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by advanced glycation end products in cultured mouse podocytes[J]. Am J Nephrol,2008,28(6):1014-1022

[9] DeFronzo RA. From the triumvirate to the ominous octet;a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. Diabetes,2009,58(4):773-795

[10] Alpini G,Baiocchi L,Glaser S,et al. Ursodeoxycholate and tauroursodeoxycholate inhibit cholangiocyte growth and secretion of BDL rats through activation of PKC alpha[J]. Hepatology,2002,35(5):1041-1052

[11] Alpini G,KallnO N,Phinazy JL,et al. Tauroursodeoxycholate inhibits human cholangiocarcinoma growth via Ca²⁺-,PKC-,and MAPK-dependent pathways [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2004,286(6):973-982

[12] Ikegami T,Matsuzaki Y. Ursodeoxycholic acid;mechanism of action and novel clinical applications[J]. Hepatol Res,2008,38(2):123-131

[13] Marzioni M,Francis H,Benedetti A,et al. Ca²⁺-dependent cytoprotective effects of ursodeoxycholic and tauroursodeoxycholic acid on the biliary epithelium in a rat model of cholestasis and loss of bile ducts[J]. Am J Pathol,2006,168(2):398-409

[14] Ceylan-Isik AF,Sreejayan N,Ren J,et al. Endoplasmic reticulum chaperon tauroursodeoxycholic acid alleviates obesity-induced myocardial contractile dysfunction[J]. J Mol Cell Cardiol,2011,50(1):107-116

[15] Cunha DA,Hekerman P,Cnop M,et al. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells[J]. Cell Sci,2008,121(14):2308-2318

[16] Cnop M,Igoillo-Esteve M,Cunha DA,et al. An update on lipotoxic endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells[J]. Biochem Soc Trans,2008,36(5):909-915

[17] Marchetti P,Bugliani M,Lupi R,et al. The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients[J]. Diabetologia,2007,50(12):2486-2494

[收稿日期] 2011-12-01

