

多氯联苯(PCB1254)诱导胰岛细胞凋亡的机制研究

陶 鸿¹, 易丽娴¹, 孙中文¹, 吕志刚², 顾刘宝², 解雨春^{2*}

(¹苏州卫生职业技术学院医学技术学院, 江苏 苏州 215002; ²江苏省省级机关医院中心实验室, 江苏 南京 210024)

[摘要] 目的:本研究探讨多氯联苯(PCB1254)诱导体外培养胰岛β细胞株 INS-1 凋亡的可能机制。方法:用不同浓度的 PCB1254 刺激 INS-1 细胞后,使用 CCK-8 法检测细胞活性,选择适当浓度的 PCB1254 进行 INS-1 细胞凋亡机制的研究;PCB1254(5 μg/ml)刺激 INS-1 细胞后,倒置显微镜下观察细胞的形态学变化,并以流式细胞仪检测细胞凋亡;Western blot 检测 Cleaved Caspase-3、Caspase-3、Bim、Bcl-2、c-Fos、p-JNK、p-P38、p-ERK 蛋白的表达;二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)荧光探针检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平;PCB1254 诱导 INS-1 细胞凋亡后,使用 ERK 抑制剂 PD98059 进行干预,倒置显微镜下观察细胞凋亡情况。结果:随着浓度的增加,PCB1254 对细胞活性的抑制逐渐增强,当浓度≥5 μg/ml 时,与对照组差异有统计学意义($P < 0.01$);倒置显微镜下观察 PCB1254(5 μg/ml)能引起 INS-1 细胞凋亡,凋亡细胞脱落,漂浮于培养基中;流式细胞术检测结果显示 PCB1254 能诱导 INS-1 细胞凋亡;Western blot 检测凋亡细胞中凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3、Bim 表达上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,氧化应激相关蛋白 c-Fos 表达上调,ROS 荧光增强;MAPK 信号通路中 p-ERK 蛋白表达上调;ERK 抑制剂 PD98059 干预后细胞凋亡无明显变化。结论:PCB1254 可能通过氧化应激信号通路引起 INS-1 细胞的凋亡,此过程中伴有 ERK 信号通路的激活。

[关键词] 多氯联苯;PCB1254;胰岛细胞;INS-1;凋亡;氧化应激

[中图分类号] R587.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)03-346-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20150310

Apoptosis induced by polychlorinated biphenyls (PCB1254) in islet cells

Tao Hong¹, Yi Lixian¹, Sun Zhongwen¹, Lü Zhigang², Gu Liubao², Xie Yuchun^{2*}

(¹School of Medical Technology, Suzhou Health Vocational and Technical College, Suzhou 215002; ²The Center Lab, Jiangsu Province Official Hospital, Nanjing 210024, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the possible mechanisms of apoptosis occurred in islet β-cell line(INS-1) which was induced by PCB1254 *in vitro*. **Methods:** After the treatment with different concentrations of PCB1254, the cell viability of INS-1 was assayed by CCK-8. After the treatment with PCB1254(5 μg/ml), the morphological change and apoptosis situation of INS-1 were observed by inverted microscope. The apoptosis of INS-1 was further detected by flow cytometry. The expression of Caspase-3, Bim, Bcl-2, C-Fos, P-JNK, P-P38 and P-ERK were measured by Western blot. Reactive oxygen species(ROS) level was detected by dihydroethidium (DHE) fluorescence probe. The apoptosis level of INS-1 was observed under inverted microscope after ERK inhibitor PD98059 intervening the PCB1254 treated INS-1 cells. **Results:** With the increasing of concentration of PCB1254, the cell viability of INS-1 declined. When the concentration was higher than 5 μg/ml, there were significant differences compared with the control group($P < 0.01$). INS-1 cells apoptosis, which was induced by PCB1254 (5 μg/ml), was observed through inverted microscope. The apoptosis cells turned dark and floated in the medium. Flow cytometry assay showed that PCB1254 could induce the apoptosis of INS-1 cells. Western blot showed that the expressions of apoptosis related Cleaved Caspase-3 and Bim proteins were up-regulated, while the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 was down-regulated. The expression of oxidative stress related protein C-Fos was up-regulated and the ROS fluorescence was enhanced. The expression of p-ERK in MAPK signal pathway was up-regulated. No obvious change of apoptosis was found under the intervention of ERK inhibitor PD98059. **Conclusion:** PCB1254 may induce the apoptosis of INS-1 cells through oxidative stress signaling pathway, and this process may be accompanied with the activation of ERK signaling pathway.

[Key words] polychlorinated biphenyls; PCB1254; islet cell; INS-1; apoptosis; oxidative stress

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(03): 346-351]

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81170726);苏州卫生职业技术学院专项课题

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xyc_18@hotmail.com

多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)是一种化学性质稳定、绝缘、阻燃、抗热解能力较好的人工合成有机化合物,被广泛应用于工业生产的众多环节^[1]。但这种含氯联苯化合物的生物蓄积性和高毒性对人体内分泌系统和免疫功能有重要影响^[2]。研究表明,多氯联苯 PCB153 可诱导大鼠胰岛 β 细胞株 INS-1 凋亡^[3],而胰岛细胞凋亡在糖尿病发病中起着重要作用^[4]。因此,研究多氯联苯引起 INS-1 细胞凋亡机制,对于糖尿病的防治有重大指导意义。由于氯原子数目及位置的不同,多氯联苯有多种不同的化学结构,PCB1254 是一种不同于 PCB153 单体的有机化合物,对海洋生物的毒性有较多研究,但对于细胞凋亡的研究甚少。本研究体外培养 INS-1 细胞,用 PCB1254 处理 INS-1,并检测其对凋亡、氧化应激及 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响,探讨 PCB1254 诱导胰岛细胞凋亡的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

将 PCB1254 溶于 DMSO 中,配成不同浓度的溶液(PCB1254 标准品,AccuStandard 公司,美国)。RPMI-1640 培养液、青链霉素混合液、0.25%胰蛋白酶均购于美国 HyClone 公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于美国 Sciencell 公司;二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)购于美国 Sigma 公司, CCK-8 细胞增殖毒性检测试剂盒购于日本 Dojindo 公司, Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司;倒置荧光显微镜购于日本 Olympus 公司,流式细胞仪购于美国 BD 公司;抗 Caspase-3 (9662)、Bim (2819)、c-Fos (2250)、p-JNK (9251)、p-P38 (9211)、p-ERK (4370)、 β -actin (4967) 抗体均购于美国 CST 公司,抗 Bcl-2 抗体(ab7973)购于英国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理

INS-1 细胞常规培养于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中(内含 1×10^5 U/L 的青链霉素),在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,每天观察细胞数量及形态,待细胞汇合至 80% 时,用 0.25% 的胰蛋白酶 1 ml 消化 5 min,至贴壁细胞漂浮后予 5 ml 含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基终止消化,轻轻吹打,制成单细胞悬液,于低速离心机中 1 000 r/min 离心 4 min,吸引器吸出上清液,培养基重悬,吹打混匀,取处于对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞活性

收集处于对数生长期的 INS-1 细胞接种于 96 孔板中,铺板密度为 2×10^4 个/孔,每孔含 100 μ l 完全培养基,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中预培养 24 h。第 2 天吸去培养基,分别向对照组和实验组加 100 μ l 无药物培养基和 PCB1254 浓度为 2.5、5.0、7.5、10.0 μ g/ml 的含药培养基,继续孵育 24 h。第 3 天吸去上述培养基,每孔加 50 μ l 完全培养基和 5 μ l CCK-8 溶液,轻轻振荡培养板,在培养箱内孵育 1~4 h,每 30 min 取出观察显色程度,部分孔颜色变橙色后,用酶标仪测定各孔在 450nm 处的吸光度值,每组做 4 个复孔取平均值,对照组细胞活性为 100%,实验组细胞活性=实验组吸光度值/对照组吸光度值 \times 100%。

1.2.3 倒置显微镜观察细胞凋亡的形态学变化

取处于对数生长期的 INS-1 细胞接种于 12 孔板,铺板密度为 2×10^5 个/孔,37 °C、5%CO₂ 培养 24 h 后,所有孔均用含 1% FBS 的 RPMI-1640 培养基换液,实验组予浓度为 5.0 μ g/ml 的 PCB1254 刺激,分别于 12、24、48 h 拍照。PD98059 干预组于 PCB1254 刺激前加入培养基中,终浓度为 50.0 μ mol/L,观察细胞凋亡的形态学变化。

1.2.4 流式细胞仪检测凋亡

以 PCB1254 (5.0 μ g/ml) 分别处理 INS-1 细胞 0、12、24、48 h 后,消化收集贴壁及漂浮细胞,1 ml PBS 离心洗涤 2 遍,每组样品中分别加入 500 μ l Binding Buffer、5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l Propidium Iodide,混匀后避光反应 8 min,用流式细胞仪进行细胞凋亡分析。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达

实验组加入 PCB1254 (5.0 μ g/ml) 刺激并作时间梯度处理,分别为 30 min 和 1、3、6、24 h。收集各个孔的培养基,2 000 r/min 离心 5 min,去上清液,往离心得到的细胞中加入 20 μ l 裂解液裂解 15 min。培养板用 PBS 洗 2 次,每孔加入 80 μ l 裂解液,于冰上裂解 15 min 后收板。SDS 电泳后电转至硝酸纤维素膜上,3%BSA 封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 5 min \times 3 次,二抗孵育 1.5 h, TBST 洗 5 min \times 3 次,ECM 显影。Image-Pro 软件做蛋白半定量分析。

1.2.6 ROS 荧光探针检测细胞内活性氧水平

将终浓度为 10.0 μ mol/L 的 DHE 加入 INS-1 细胞培养板中,37 °C 避光孵育 20 min,加入 PCB1254 (5.0 μ g/ml) 和 0.03% H₂O₂ 后 2 h,用荧光显微镜观测红色荧光的亮度并拍照,红色荧光的亮度表示细胞内活性氧的水平。

1.3 统计学方法

SPSS17.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数比较采用非参数检验 (Mann-Whitney U 秩和检验), $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

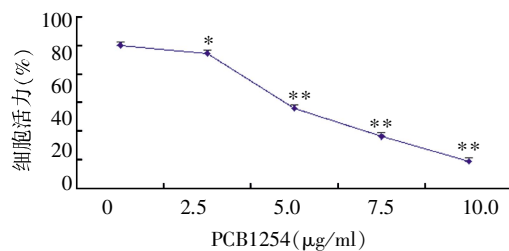
2 结果

2.1 不同浓度 PCB1254 对 INS-1 细胞活性的影响

CCK-8 法检测结果显示 (图 1), 与正常对照组相比, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的 PCB1254 使 INS-1 细胞活性显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 随着浓度的增加, INS-1 细胞的活性逐渐降低。在进行浓度摸索后, 本研究采用 PCB1254 (5.0 $\mu\text{g/ml}$) 进行后续实验。

2.2 PCB1254 引起 INS-1 细胞凋亡的形态学变化

PCB1254 (5.0 $\mu\text{g/ml}$) 刺激 INS-1 细胞 12 h 后, 细胞亮度变暗, 形态变化不明显; 刺激 24 h 和 48 h 后, 凋亡细胞明显增多, 脱落并漂浮于培养基中 (图



与对照组 (PCB1254 0 $\mu\text{g/ml}$) 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

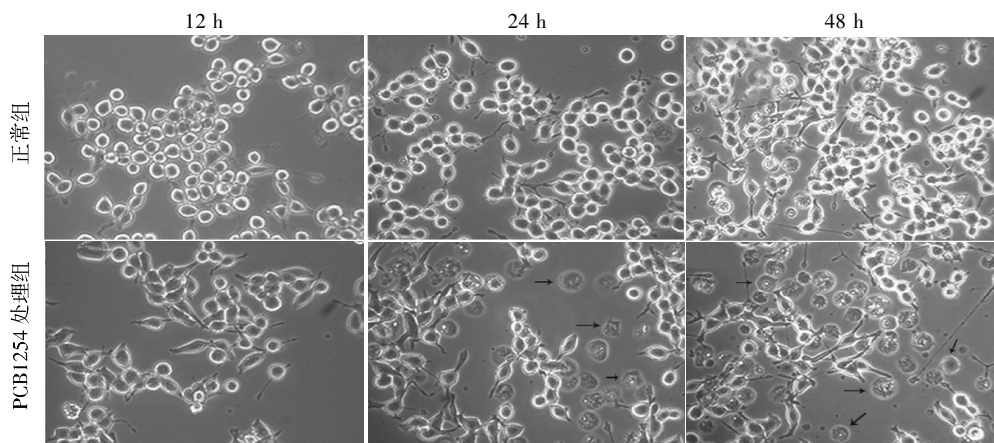
图 1 不同浓度 PCB1254 对 INS-1 细胞活性的影响

Figure 1 Effect of different concentrations of PCB1254 on the viability of INS-1 cells

2)。表明 PCB1254 (5.0 $\mu\text{g/ml}$) 可引起 INS-1 细胞凋亡的形态学变化。

2.3 流式细胞仪检测 PCB1254 诱导的 INS-1 细胞凋亡

如图 3 所示, 正常细胞 Annexin V 和 PI 均低染并分布于左下象限 (Annexin V⁻PI⁻), 晚期凋亡及死细胞 Annexin V 和 PI 均高染并分布于右上象限 (Annexin V⁺PI⁺), PCB1254 处理后 INS-1 细胞后各时间点的凋亡率明显增加, 进一步证实其能诱导凋亡。



PCB1254 浓度为 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 箭头所示为凋亡细胞。

图 2 PCB1254 引起 INS-1 细胞凋亡的形态学变化 (×200)

Figure 2 Morphological changes of apoptotic INS-1 cells induced by PCB1254 (×200)

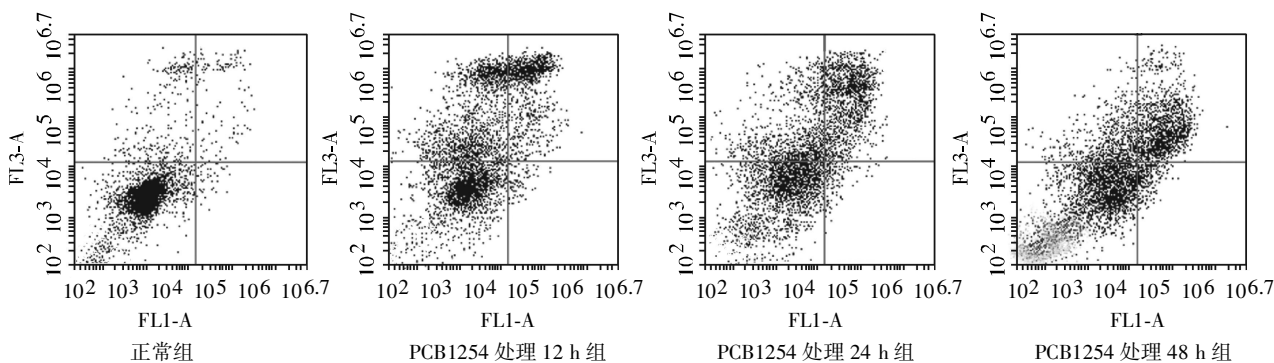


图 3 流式细胞术检测 PCB1254 诱导的 INS-1 细胞凋亡

Figure 3 Cell apoptosis of INS-1 induced by PCB1254 was detected by flow cytometry

2.4 PCB1254 对凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bim 及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的影响

PCB1254(5.0 $\mu\text{g/ml}$)刺激 INS-1 细胞后,凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3 和 Bim 表达均上调(图 4),Cleaved Caspase-3 在 6 h 表达最高,Bim 在 1 h 表达最高;抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调(图 4),在 6 h 表达最低。提示 PCB1254 可以通过调控线粒体凋亡信号通路中的 Bim/Bcl-2/Caspase-3 通路,诱导 INS-1 细胞凋亡。

2.5 PCB1254 对氧化应激相关蛋白 c-Fos 及活性氧(ROS)水平的影响

PCB1254(5.0 $\mu\text{g/ml}$)刺激 INS-1 细胞后,氧化应激相关蛋白 c-Fos 的表达上调(图 5),在 30 min 表达最高。刺激后 2 h,实验组和 H_2O_2 阳性对照组红色荧光细胞数目增加,亮度增强(图 6)。结果证实,

PCB1254 能诱导 INS-1 细胞氧化应激。

2.6 PCB1254 对 MAPK 信号通路的影响

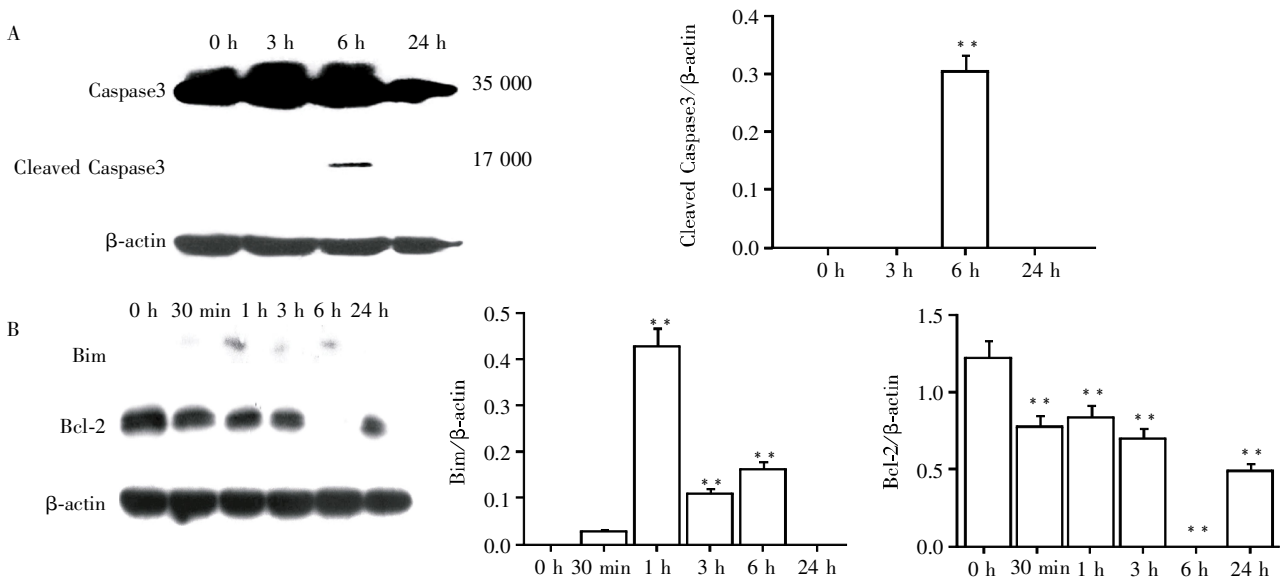
PCB1254(5.0 $\mu\text{g/ml}$)刺激 INS-1 细胞后,p-P38 表达下调,p-JNK 表达变化不明显,p-ERK 表达上调,在 30 min 和 1 h 时达到峰值(图 7)。表明 PCB1254 能够激活 INS-1 细胞中 ERK 信号通路。

2.7 ERK 抑制剂 PD98059 对 PCB1254 诱导的 INS-1 细胞凋亡的影响

PD98059 处理组与实验组比较,细胞凋亡情况无明显改善(图 8)。结果提示抑制 ERK 信号通路不能够改善 PCB1254 诱导的细胞凋亡。

3 讨论

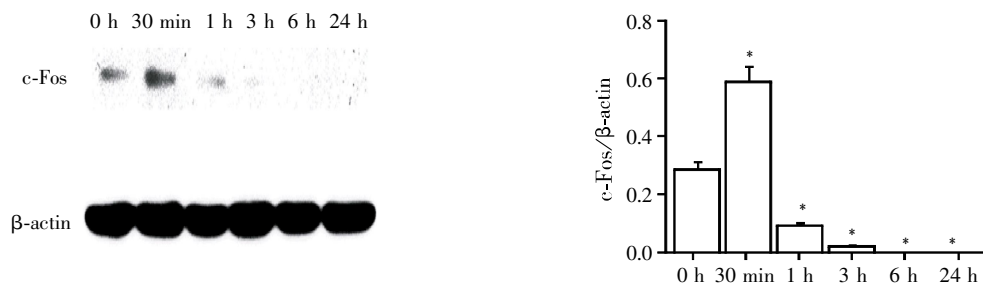
多项研究表明,糖尿病的发生与环境毒素多氯联苯的暴露之间存在密切联系^[5-6],其病理机制主要



A: Western blot 检测 Caspase 3、Cleaved Caspase-3 蛋白表达及数据分析; B: Western blot 检测 Bim、Bcl-2 蛋白表达及数据分析。与对照组(0 h)相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 4 PCB1254 干预 INS-1 细胞后不同时间点 Caspase 3、Cleaved Caspase-3、Bim 和 Bcl-2 蛋白的表达

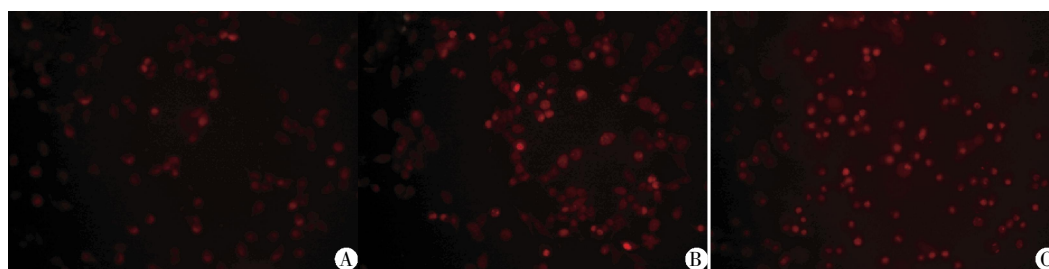
Figure 4 Protein expressions of Caspase 3, Cleaved Caspase-3, Bim and Bcl-2 in INS-1 cells at different time after PCB1254 intervention



与对照组(0 h)相比, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图 5 PCB1254 干预 INS-1 细胞后不同时间点 c-Fos 蛋白的表达

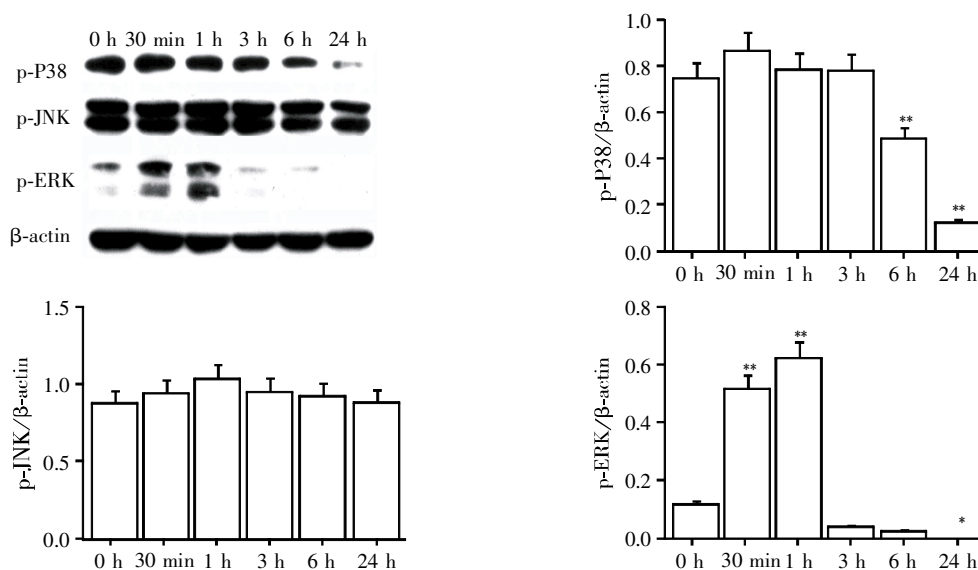
Figure 5 Protein expression of c-Fos in INS-1 cells at different time after PCB1254 intervention



细胞经 10.0 μmol/L 的 DHE 孵育 20 min(A), 实验组(B)予 5.0 μg/ml PCB1254 刺激, 阳性对照组(C)予 0.03% H₂O₂ 刺激, 2 h 后荧光显微镜下观察红色荧光。

图 6 PCB1254 对 INS-1 细胞活性氧水平的影响

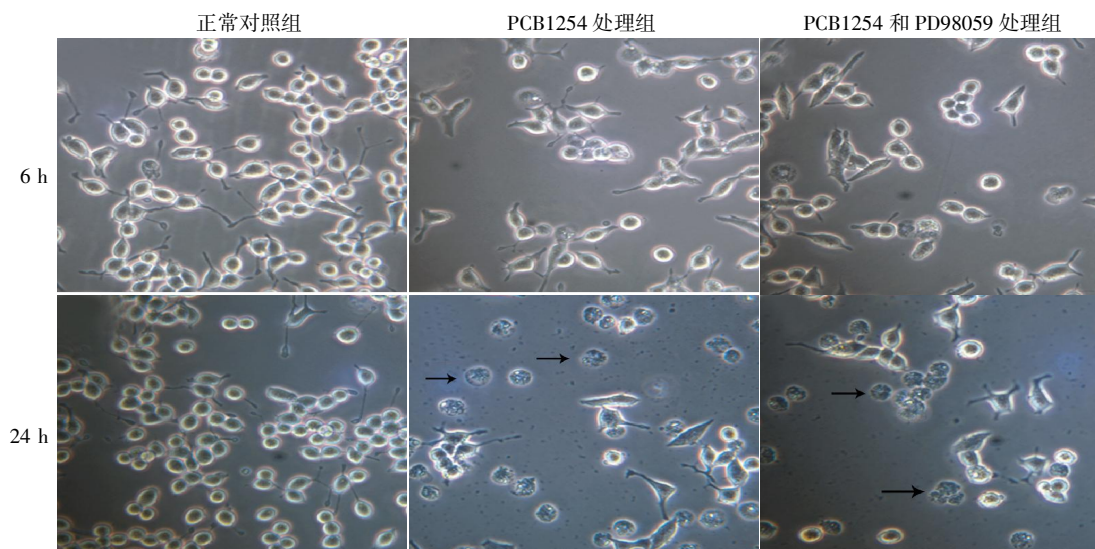
Figure 6 Effect of PCB1254 on the ROS level in INS-1 cells



与对照组(0 h)相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 7 PCB1254 干预 INS-1 细胞后不同时间点 p-P38、p-JNK 和 p-ERK 蛋白的表达

Figure 7 Protein expressions of p-P38, p-JNK and p-ERK in INS-1 cells at different time after PCB1254 intervention



PCB1254 浓度为 5.0 μg/mL, PD98059 浓度为 50.0 μmol/L, 分别于处理 6 h 和 24 h 后显微镜下观察, 箭头所示为凋亡细胞。

图 8 PD98059 对 PCB1254 诱导的 INS-1 细胞凋亡的影响($\times 200$)

Figure 8 Effect of PD98059 on INS-1 cells apoptosis induced by PCB1254($\times 200$)

为多氯联苯诱导胰岛细胞凋亡,胰岛素分泌能力下降。作为多氯联苯中常见的一种化合物,低剂量的 PCB1254 可造成内分泌系统疾病,如甲状腺结构破坏和功能损伤^[7],但对于 PCB1254 促胰岛细胞凋亡的研究甚少,本研究对 PCB1254 诱导 INS-1 细胞凋亡的机制进行了初步探索。

在细胞凋亡中,Caspase-3 是主要执行者,其活化时首先被剪切产生活性片段 Cleaved Caspase-3,继而在细胞内发挥蛋白水解酶作用而促进细胞凋亡,因而可以通过 Cleaved Caspase-3 大致反映细胞凋亡情况^[8]。Bcl-2 是一种公认的位于 Caspase-3 上游的抗凋亡蛋白,它的过表达可以抑制 Caspase-3 激活,从而减少凋亡发生^[9]。同样属于 Bcl-2 家族中的前凋亡蛋白 Bim 具有助凋亡活性,在细胞凋亡中,通常伴随有 Bim 表达增加,Bcl-2/Bim 比值减小,这与 Bim 诱导凋亡有关^[10]。本研究结果显示,PCB1254 能引起 INS-1 细胞的活性明显下降,凋亡细胞明显增多,同时 Cleaved Caspase-3 及 Bim 过表达,而 Bcl-2 表达量明显减少。其中,前凋亡蛋白 Bim 的表达在 PCB1254 处理后 1 h 最多,表明 Bim 受影响较早,而 Cleaved Caspase-3 的表达在处理 6 h 最多,抗凋亡的 Bcl-2 表达在处理 6 h 最少,表明刺激 6 h 后为细胞凋亡发生的高峰期。由此推测,PCB1254 可能通过上调前凋亡蛋白 Bim,导致 Bcl-2 表达下调,继而促使 Caspase-3 转化为具有活性的 Cleaved Caspase-3,最终诱导 INS-1 细胞凋亡。但刺激 12 h 后显微镜下并未观察到大量凋亡细胞,可能是由于细胞从凋亡机制启动到完全凋亡需要一定时间。

大量研究资料表明,氧化应激状态与 2 型糖尿病之间存在密切联系,氧化应激可直接损伤胰岛 β 细胞,诱导 β 细胞凋亡,这也是糖尿病发展的核心机制之一^[11-12]。本研究中氧化应激相关蛋白 c-Fos 表达的最高值在刺激后 30 min,ROS 荧光探针在 PCB1254 刺激 2 h 后也能看出与对照组的差异,表明氧化应激发生的时间较早,进一步证实了细胞凋亡可能是由氧化应激诱导的。其可能机制是 PCB1254 诱导 INS-1 细胞氧化应激,细胞内活性氧增加,引发氧化还原平衡失调,从而诱导凋亡发生。

近年来,MAPK 信号通路在细胞凋亡调控中的研究越来越多^[13],本研究发现 PCB1254 刺激 INS-1 后 p-ERK 的表达也出现上调,但在使用 ERK 抑制剂 PD98059 后细胞凋亡情况无明显改善,说明细胞凋亡不是 ERK 信号通路介导的,ERK 信号通路的激活发生在凋亡之后。但 ERK 信号通路是如何被激

活,激活后是否会对氧化应激及凋亡产生一定影响;除 MAPK 信号之外,是否有其他未知的信号通路参与了 PCB1254 诱导 INS-1 细胞凋亡的作用,这些问题仍然值得深入研究。

[参考文献]

- [1] 任加云,刘娟娟,于 祥,等. 多氯联苯(PCB_(1254))对栉孔扇贝消化盲囊和鳃丝抗氧化系统及脂质过氧化水平的影响[J]. 海洋湖沼通报,2011,3:149-156
- [2] 王红梅,段小丽,王跃文,等. 多氯联苯的内分泌影响及机制[J]. 环境与职业医学,2009,26(2):191-194
- [3] 何 平,阮晓倩,丁晶莹,等. PCB153 对 INS-1 细胞毒性作用及机制[J]. 中国公共卫生,2013,29(1):76-78
- [4] McKenzie MD, Jamieson E, Jansen ES, et al. Glucose induces pancreatic islet cell apoptosis that requires the BH3-only proteins Bim and Puma and multi-BH domain protein Bax[J]. Diabetes, 2010, 59(3): 644-652
- [5] Silverstone AE, Rosenbaum PF, Weinstock RS, et al. Polychlorinated biphenyl(PCB) exposure and diabetes: results from the Anniston Community Health Survey[J]. Environ Health Perspect, 2012, 120(5): 727-732
- [6] Martinez-Moreno JM, Garciacaballero M. Influences of the diabetes surgery on pancreatic beta-cells mass[J]. Nutr Hosp, 2013, 28(2): 88-94
- [7] 解雨春,李 文,汤金梅,等. Aroclor1254 对大鼠甲状腺结构及功能的影响[J]. 环境科学学报,2012,32(11):2891-2897
- [8] Cunha KS, Caruso AC, Faria PA, et al. Evaluation of Bcl-2, Bcl-x and cleaved caspase-3 in malignant peripheral nerve sheath tumors and neurofibromas[J]. An Acad Bras Cienc, 2013, 85(4): 1497-1511
- [9] 陈秀侠,李 军,武静茹,等. 亚低温对沙土鼠前脑缺血/再灌注海马 CA1 区神经元凋亡及 Bcl-2、Caspase-3 表达的影响[J]. 中国药理学通报,2007,23(1):77-81
- [10] Wan L, Tan M, Yang J, et al. APC (Cdc20) suppresses apoptosis through targeting Bim for ubiquitination and destruction[J]. Dev cell, 2014, 29(4): 377-391
- [11] Fujimoto S, Mukai E, Inagaki N. Role of endogenous ROS production in impaired metabolism-secretion coupling of diabetic pancreatic β cells[J]. Prog Biophys Biol, 2011, 107(2): 304-310
- [12] Bhatti F, Mankhey RW, Asico L, et al. Mechanisms of antioxidant and pro-oxidant effects of alpha-lipoic acid in the diabetic and nondiabetic kidney[J]. Kidney Int, 2005, 67(4): 1371-1380
- [13] 周雪媛,严 凌,朱铁兵,等. 钙敏感性受体活化促进缺血/再灌注损伤心肌细胞的凋亡及炎症反应[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(10):1366-1371

[收稿日期] 2014-09-04