

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00604

噻唑烷二酮类药物对 GK 大鼠胰岛 B 细胞凋亡的影响

李文君, 和明丽, 程晓芸, 徐 倍, 顾 耀, 吴国亭*

同济大学附属上海市第十人民医院内分泌科, 上海 200072

[摘要] **目的** 选择 GK 大鼠为 2 型糖尿病模型, 研究噻唑烷二酮类药物(TZDs)罗格列酮和吡格列酮对胰岛 B 细胞保护作用的机制。**方法** 以雄性 GK 大鼠和正常对照雄性 Wistar 大鼠为研究对象, 随机分为 4 组: Wistar 正常对照组 13 只(W 组), GK+罗格列酮组 10 只(R 组), GK+吡格列酮组 10 只(P 组)和 GK 未治疗组 10 只(G 组)。其中罗格列酮组给予罗格列酮钠 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, 吡格列酮组给予吡格列酮 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, GK 未治疗组不予药物干预, 实验为期 6 周。实验结束后, 取胰腺标本固定并进行电镜观察。同时采用免疫组化法检测胰岛细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达, 并采用 TUNEL 法检测胰岛 B 细胞凋亡情况。**结果** 电镜下, G 组大鼠胰岛 B 细胞出现核皱缩, 核仁消失, 染色质边集, 呈现凋亡早期改变; 其他 3 组胰岛未见凋亡改变($P < 0.01$)。R 组和 P 组的 Bcl-2 表达显著高于 G 组($P < 0.01$); W 组与 G 组相比差异无统计学意义。R 组、P 组和 W 组的 Bax 表达低于 G 组($P < 0.05$); R 组和 P 组间差异无统计学意义。**结论** GK 大鼠胰岛 B 细胞存在细胞凋亡, 可能与其发生糖尿病有关。罗格列酮和吡格列酮可以减少 GK 大鼠胰岛 B 细胞凋亡, 且与 Bcl-2、Bax 表达变化有关。

[关键词] 罗格列酮; 吡格列酮; 2 型糖尿病; 胰岛素分泌细胞; 细胞凋亡

[中图分类号] R 587.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)06-0604-04

Effect of rosiglitazone and pioglitazone on apoptosis of pancreatic beta-cell in GK rats

LI Wen-jun, HE Ming-li, CHENG Xiao-yun, XU Bei, GU Yao, WU Guo-ting*

Department of Endocrinology, Tenth People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China

[Abstract] **Objective** To study the protective effect of two thiazolidinediones (TZDs), rosiglitazone and pioglitazone, on the apoptosis of pancreatic islet beta-cells. **Methods** Male Goto-Kakizaki (GK) rats (a spontaneously diabetic animal model of type 2 diabetes mellitus) and non-diabetic Wistar rats were randomly divided into four groups: Wistar group (W group, $n = 13$), GK rats fed with rosiglitazone (R group, $n = 10$), GK rats fed with pioglitazone (P group, $n = 10$) and GK non-treated rats (G group, $n = 10$). Rats in R group were given rosiglitazone ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by gavage for 6 weeks; those in A group were given pioglitazone ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by gavage for 6 weeks. The pancreatic specimens were obtained and treated for light microscope and transmission electron microscope. Bcl-2, Bax protein expression was examined by immunohistochemistry. The apoptosis of pancreatic islet beta-cell was examined by TUNEL. **Results** The β -cells in G group showed signs of early apoptosis: nuclei shrinkage, disappearing nucleoli, and chromatin aggregation to nuclear membrane, and the changes were not observed in the other three groups. Bcl-2 expression was significantly higher in R group and P group than in G group ($P < 0.01$), and there was no significant difference between the W group and G group. Bax expression was significantly lower in R group, P group, and W group than in G group ($P < 0.05$), and there was no difference between the R group and P group. **Conclusion** Increased β -cells apoptosis does exist in GK rat pancreatic islets, which may contribute to the development of diabetes. Rosiglitazone and pioglitazone can prevent β -cell from apoptosis, which might be related to the changes of Bcl-2 and Bax expression.

[Key words] rosiglitazone; pioglitazone; type 2 diabetes mellitus; insulin-secreting cells; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(6): 604-607]

2 型糖尿病以胰岛素抵抗和胰岛 B 细胞功能受损为特征, B 细胞功能受损与细胞数量减少有关, B 细胞数量是决定胰岛素分泌量的关键因素。GK 大鼠是一种遗传性非肥胖 2 型糖尿病模型, 成年 GK

[收稿日期] 2009-12-01 **[接受日期]** 2010-01-02

[基金项目] 上海申康医院发展中心慢性病防治项目(SHDC12007310)。Supported by the Project for Chronic Disease Control of Shanghai Shengkang Hospital Development Center(SHDC12007310).

[作者简介] 李文君, 副主任医师。E-mail: liwenjun1@smmail.cn

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-66302533, E-mail: WGT1212@hotmail.com

大鼠 B 细胞数量下降,伴随轻中度高血糖、糖耐量受损、糖刺激的胰岛素分泌受损、肝糖原过度输出、中等程度的外周胰岛素抵抗(如骨骼肌和脂肪组织)。噻唑烷二酮类药物(TZDs)可以增加胰岛素敏感性,降低血糖水平,保护胰岛细胞数量和功能,其机制尚不清楚。本研究选用 2 型糖尿病 GK 大鼠模型,用 TZDs(罗格列酮和吡格列酮)进行干预,应用 TUNEL 法检测不同实验组别的大鼠胰岛 B 细胞凋亡,用免疫组化方法检测大鼠胰岛 B 细胞中 Bcl-2、Bax 的表达,旨在分析各组凋亡发生率的差异,以及 Bcl-2、Bax 在凋亡发生过程中的作用。同时运用透射电镜观察不同组别大鼠胰岛 B 细胞超微结构变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组 10 周龄雄性 GK 大鼠 30 只,同龄雌性 Wistar 大鼠 13 只,SPF 级,由中国科学院上海实验动物中心提供;动物生产许可证号:SCXK(沪)2003-0003,使用许可证号:SYXK(沪)2004-0011。

将 GK 大鼠随机分为 3 组($n=10$),糖尿病对照组(G 组);罗格列酮组(R 组),罗格列酮钠 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃;吡格列酮组(P 组),吡格列酮 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃。预设鼠龄、体质量相匹配的 Wistar 大鼠 13 只作为正常对照组(W 组)。G 组和 W 组大鼠给予等量的生理盐水灌胃。所有大鼠均自由饮水,标准大鼠饲料饲养,每周测量体质量和血糖。实验为期 6 周。

1.2 试剂和仪器 罗格列酮:太极集团涪陵制药厂(该厂家提供的标准品)。吡格列酮:江苏恒瑞制药有限公司(该公司提供的标准品)。Bcl-2 免疫组化试剂盒(SA2015)、Bax 免疫组化试剂盒(SA2030):武汉博士德生物工程有限公司。摄片系统:SONY SSC-DC18P 彩色成像系统。电镜:PHILIPS CM120 透射电子显微镜。

1.3 电镜观察 实验结束时以颈椎脱臼法处死动物,迅速开腹并找出胰腺,剥离周围脂肪组织,剪取胰腺尾部小块组织,立即置于预冷培养皿上,滴加 4°C 的 2.5%戊二醛固定液,用锋利的手术刀片将小块胰腺切划为约 $0.5 \sim 1 \text{ mm}^3$ 大小的组织 10 余块,将组织转移至 4°C 的 2.5%戊二醛固定液中。固定、脱水、浸透、固化、切片,3%醋酸铀-枸橼酸铅双重染色,以 PHILIPS CM-120 透射电子显微镜观察并拍片。

1.4 免疫组织化学染色 使用免疫组化链酶亲和素-过氧化物酶复合物法(StreptAvidin-Biotin Com-

plex,SABC)及 DAB 显色系统,检测胰岛细胞内 Bcl-2 和 Bax 的表达。

1.5 TUNEL 法检测细胞凋亡 将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸酶混合液,在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)的作用下,标记到 DNA 的 3'-末端,进行凋亡细胞的检测。

1.6 图像分析与显微拍照 所有切片均应用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统进行免疫组化的定量分析和细胞凋亡分析。免疫组化每张切片在放大 200 倍图像的胰岛区域依次选取 5 个视野,每个观察指标在同一标本中制作 3 张切片,即每个观察指标随机选取 15 个视野,统计阳性率。细胞凋亡采用放大 400 倍图像进行分析。应用显微成像系统进行显微拍照。

1.7 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SAS 6.12 软件进行统计分析,多组间均数的比较及任意两组间均数的比较用完全随机设计资料的方差分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 胰岛 B 细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 表达 结果见表 1。B 细胞凋亡:W 组、R 组和 P 组显著低于 G 组($P < 0.01$);R 组和 P 组间差异无统计学意义。Bcl-2 表达:R 组、P 组显著高于 G 组($P < 0.01$);R 组和 P 组间差异无统计学意义($P > 0.05$);W 组与 G 组相比差异无统计学意义。Bax 表达:R 组、P 组和 W 组低于 G 组($P < 0.05$);R 组和 P 组间差异无统计学意义。

表 1 胰岛 B 细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达

Tab 1 Pancreatic islet β -cell apoptosis and Bcl-2, Bax protein expression

($\bar{x} \pm s, \%$)				
Group	<i>n</i>	Apoptosis	Bcl-2	Bax
W	13	0.006 1 ± 0.002 8**	0.22 ± 0.05	0.25 ± 0.17*
R	10	0.022 3 ± 0.011 6**	0.53 ± 0.19**	0.31 ± 0.10*
P	10	0.026 3 ± 0.011 8**	0.54 ± 0.20**	0.27 ± 0.11*
G	9	0.059 7 ± 0.019 9	0.19 ± 0.14	0.52 ± 0.18

W: Wistar group; R: Rosiglitazone group; P: Pioglitazone group; G: Goto-Kakizaki group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group G

2.2 胰岛 B 细胞超微结构改变(透射电镜观察)

W 组大鼠胰岛 B 细胞细胞核形状呈规则的卵圆形,核仁清晰,核染色质均匀。胞质有大量密度不一的分泌颗粒及丰富的结构正常的粗面内质网和散在的线粒体,分泌颗粒与界膜之间空隙较大。R 组和 P 组大鼠胰岛 B 细胞细胞核形状基本规则,核仁明显,

细胞器结构基本正常,内分泌颗粒较 W 组减少。G 组大鼠胰岛 B 细胞细胞核形状欠规则,核仁消失,染色质边集,核周间隙扩张,无明显线粒体肿胀,呈现

凋亡早期改变。内分泌颗粒较 W 组明显减少。结果见图 1。

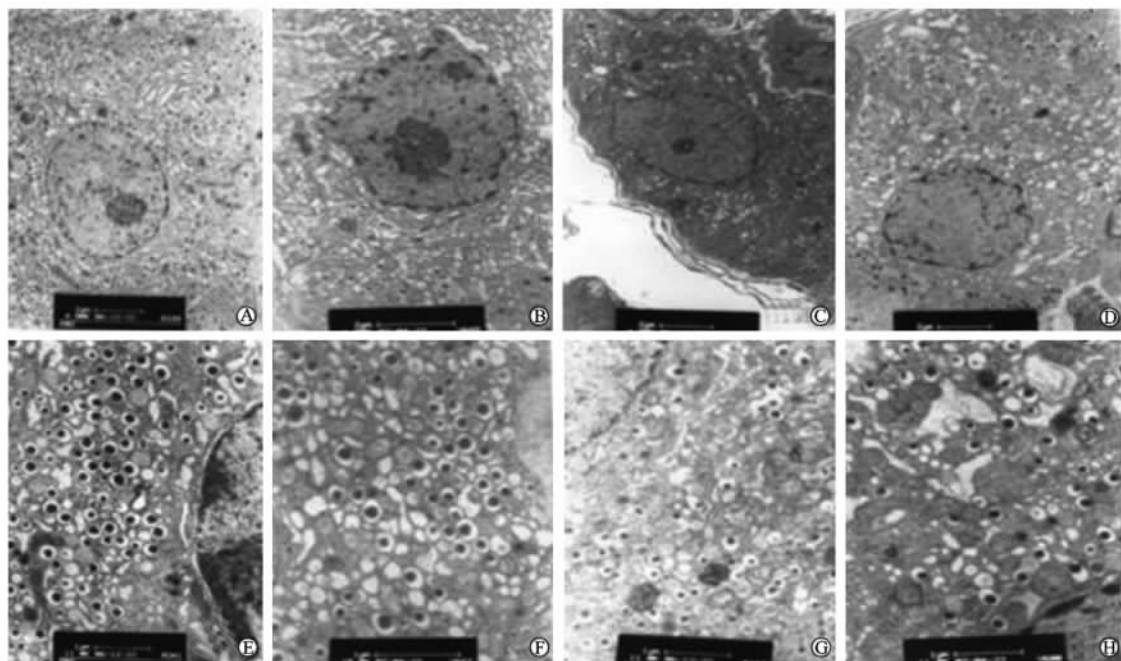


图 1 大鼠胰岛 B 细胞超微结构

Fig 1 Ultrastructure of pancreatic islet beta-cells(TEM)

A,E: Wistar group; B,F: Rosiglitazone group; C,G: Pioglitazone group; D,H: Goto-Kakizaki group. Original magnification: $\times 4\ 800$ (A-D); $\times 15\ 000$ (E-H)

3 讨论

胰岛 B 细胞功能受损是 2 型糖尿病的重要特征。空腹血糖受损(impaired fasting glucose, IFG)和 2 型糖尿病患者的 B 细胞数量均明显减少,并以后者为著;而且糖尿病患者体内细胞凋亡率明显提高,但增殖、复制正常,提示 B 细胞凋亡增加是其数目减少的根本原因。Akiyama 等^[1]研究发现,Wfs1 基因敲除糖尿病小鼠 B 细胞出现粗面内质网肿胀、核碎裂等超微结构改变,同时提示细胞凋亡的标记蛋白:内质网伴侣免疫球蛋白结合蛋白(ER chaperone immunoglobulin-binding protein, Bip)的表达,以及真核翻译启动子 2- α 亚基(phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2, eIF2 α)磷酸化水平均显著提高。

细胞凋亡是许多细胞有机体调控机体发育,维护内环境稳定,由基因控制的细胞主动死亡过程。我们的实验中,透射电镜下观察到 G 组大鼠胰岛 B 细胞出现核皱缩,核仁消失,染色质边集,核周间隙扩张,无明显线粒体肿胀,呈现凋亡早期改变。而经过罗格列酮和吡格列酮干预的大鼠胰岛 B 细胞细胞

核形状基本规则,核仁明显,细胞器结构基本正常,说明罗格列酮和吡格列酮可以抑制 GK 大鼠胰岛 B 细胞凋亡的病理学改变。

对人离体胰岛 B 细胞研究发现,吡格列酮和水杨酸钠共同作用,通过阻断 NF- κ B/Fas 通路,保护人胰岛 B 细胞免受血糖和 IL-1 β 介导的细胞凋亡^[2]。罗格列酮激活 PPAR γ 后,通过磷脂酰肌醇-3 激酶级联反应,保护人胰岛 B 细胞免受胰岛素淀粉样多肽(IAPP)诱导的凋亡作用^[3]。

在细胞凋亡的两个进化保守的信号转导途径中,Bcl-2 家族成员的构成比例是凋亡调控的关键因素,尤其是 Bcl-2/Bax 比率是启动细胞凋亡的“分子开关”^[4]。Bax 和 Bcl-2 通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡;当 Bax 形成同源二聚体时诱导细胞凋亡;Bax 与 Bcl-2 形成异源二聚体时则抑制细胞凋亡。细胞凋亡的数学模型认为,Bcl-2 家族的促凋亡和抑凋亡分子的比率直接决定了线粒体外膜各种通道的开放程度,形成细胞凋亡调控的枢纽^[5]。故有学者认为 Bcl-2/Bax 比率是调控细胞死亡的“可变电阻器”^[6]。本研究发现 GK 大鼠胰岛组织中 Bcl-2/Bax 比值显著降低,伴随 Bax 基因表达明显升

高和 Bcl-2 基因的表达降低。在进一步验证了 GK 大鼠胰岛 B 细胞凋亡存在的同时,初步探索了 B 细胞凋亡进程中可能的分子信号的改变。

目前诱导胰岛 B 细胞凋亡发生的因素主要包括糖毒性、脂毒性及氧化应激途径。糖毒性可以通过 Bcl-2 家族影响 B 细胞凋亡。在高糖条件下,胰岛细胞的凋亡水平升高,Bcl-X_L 表达下降,而 Bad、Bid、Bik 则过表达,而阻断 c-Jun N 端激酶活性可抑制高糖诱导的 Bcl-2 凋亡家族相关蛋白的改变^[7]。进一步证实了高血糖导致 B 细胞凋亡可能与 Bcl-2 蛋白家族间抗凋亡与促凋亡成分表达调节有关。

Maedler 等^[8]和 Lupi 等^[9]通过对人胰岛 B 细胞体外实验发现,在高血糖和 FFA 诱导 B 细胞凋亡时,Bcl-2 表达下降。Piro 等^[10]将鼠胰岛分别暴露于 FFA 培养 7 d,高糖培养 3 d,结果均发现 B 细胞凋亡增加,caspase-3 活性增加,Bax 基因表达增加,Bcl-2 表达下降,说明在 FFA 诱导 B 细胞凋亡同时,Bcl-2 表达下降,提示 Bcl-2 与 FFA 诱导的 B 细胞凋亡有关。

上述实验均证实在胰岛 B 细胞凋亡发生时,存在 Bcl-2、Bax 的参与。本实验亦证实罗格列酮和吡格列酮减少 B 细胞凋亡时,Bcl-2 表达上调,Bax 表达下调。推测是否与罗格列酮和吡格列酮降低血糖,调节血脂有关,还是存在其他机制,如与其受体 PPAR γ 结合后的效应,如何调节触发内源性凋亡的因子表达,此外,Bcl-2、Bax 表达的变化,通过何种下游因子作用,而最终作用于 B 细胞凋亡均需进一步研究。

总之,本研究发现 GK 大鼠体内存在少量的 B 细胞凋亡,可能是糖尿病发生的部分原因。罗格列酮和吡格列酮均能减少胰岛 B 细胞凋亡,其机制与 Bcl-2、Bax 表达变化有关。本研究结果对于探讨 2 型糖尿病的发病机制提供了些许思路,提示噻唑烷二酮类药物临床应用可能延缓 2 型糖尿病患者胰岛 B 细胞功能衰竭的进程。

[参考文献]

[1] Akiyama M, Hatanaka M, Ohta Y, Ueda K, Yanai A, Uehara

Y, et al. Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in Wfs1 knockout mice [J]. *Diabetologia*, 2009, 52: 653-663.

- [2] Zeender E, Maedler K, Bosco D, Berney T, Donath M Y, Halban P A. Pioglitazone and sodium salicylate protect human β -cells against apoptosis and impaired function induced by glucose and interleukin-1 β [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89: 5059-5066.
- [3] Lin C Y, Gurlo T, Haataja L, Hsueh W A, Butler P C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by rosiglitazone protects human islet cells against human islet amyloid polypeptide toxicity by a phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent pathway [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90: 6678-6686.
- [4] Hasnan J, Yusof M I, Damitri T D, Faridah A R, Adenan A S, Norbaini T H. Relationship between apoptotic markers (Bax and Bcl-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus [J]. *Singapore Med J*, 2010, 51: 50-55.
- [5] Reed J C. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13: 1378-1386.
- [6] Westphal D, Ledgerwood E C, Tyndall J D, Hibma M H, Ueda N, Fleming S B, et al. The orf virus inhibitor of apoptosis functions in a Bcl-2-like manner, binding and neutralizing a set of BH3-only proteins and active Bax [J]. *Apoptosis*, 2009, 14: 1317-1330.
- [7] Yang P, Zhao Z, Reece E A. Blockade of c-Jun N-terminal kinase activation abrogates hyperglycemia-induced yolk sac vasculopathy *in vitro* [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2008, 198: e1-e7.
- [8] Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinass G A, Donath M Y. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic β -cell turnover and function [J]. *Diabetes*, 2003, 52: 726-733.
- [9] Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that β -cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated [J]. *Diabetes*, 2002, 51: 1437-1442.
- [10] Piro S, Anello M, Di Pietro C, Lizzio M N, Patane G, Rabuazzo A M, et al. Chronic exposure to free fatty acid or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress [J]. *Metabolism*, 2002, 51: 1304-1347.

[本文编辑] 尹 茶