

红景天苷对高糖条件下培养的 胰岛 β 细胞功能的影响

崔明凯^{1*} 张 伟¹ 赵 易² 刘 波¹ 屈志义¹

(1. 神木县医院泌尿外科, 陕西 神木 719000; 2. 兰州军区兰州总医院乳腺科, 甘肃 兰州 730050)

摘要:目的 研究红景天苷对高糖条件下培养的胰岛 β 细胞功能的影响。方法 用 30mM 葡萄糖培养 INS-1 胰岛细胞, 加入不同浓度的红景天苷(0.1 μ M、1.0 μ M 和 10 μ M) 进行干预, 并用 5.6 mM 浓度的葡萄糖作为阴性对照。通过 MTT 检测 INS-1 细胞活性、Real time PCR 检测胰岛素、TRX、TXNIP mRNA 表达变化; 用酶联免疫法检测培养上清胰岛素分泌量; 使用活性氧检测试剂盒检测细胞内自由氧生成水平。**结果** 体外诱导条件下, 高浓度葡萄糖通过上调 TXNIP mRNA 以及下调 TRX mRNA 表达, 使 INS-1 细胞内 ROS 升高, 降低胰岛素的分泌; 而红景天苷通过下调 TXNIP mRNA、上调 TRX mRNA 水平, 维持细胞内 ROS 的低水平, 提高胰岛素的分泌。**结论** 红景天苷对胰岛 β 细胞的糖毒性损坏具有保护作用。

关键词:2 型糖尿病; 胰岛 β 细胞; 红景天苷; 氧化应激; 糖毒性

中图分类号:Q591, R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-0571(2015)06-0103-05

DOI:10.13424/j.cnki.mtcm.2015.06.042

糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢性疾病。据统计, 目前全世界糖尿病患者已达 2.85 亿, 按目前的增长速度, 估计到 2030 年全球将有近 5 亿人患糖尿病。我国成人糖尿病总数达 9240 万, 其中 2 型糖尿病患者占 90 % 以上, 我国已成为世界上糖尿病患者最多的国家^[1]。2010 年全世界 11.6 % 的医疗卫生费用花费在防治糖尿病上, 世界卫生组织估计 2005 年至 2015 年中国由于糖尿病及相关心血管疾病导致的经济损失达 5577 亿美元。糖尿病已成为影响我国乃至全世界的重大公共卫生问题。

胰岛 β 细胞功能缺陷导致胰岛素分泌减少(或相对减少)是导致 2 型糖尿病产生的重要原因, 但引起胰岛 β 细胞功能缺陷的机制仍不完全明确。有研究表明, 长期高血糖可导致氧化应激反应^[2]。在链脲霉素诱导的糖尿病鼠血浆中检测到高水平的超氧化物^[3]。陈莹晖等人研究表明, 高浓度葡萄糖通过氧化应激引起胰岛细胞损伤与凋亡, 导致胰岛素合成及分泌减少^[4]。

红景天苷(Salidroside, Sal)又名 2,4-羟基苯

乙基- β -D-葡萄糖苷, 是中药红景天的主要活性成分之一。诸多研究表明, 红景天苷有抗疲劳、抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、保护肝功能等多种作用^[5-8]。研究证实, 红景天苷能够通过增加抗氧化酶(SOD、GPx、CAT)来抑制氧化应激反应, 提高小鼠胰岛素水平^[9]。红景天苷亦能够促进胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖的利用和糖原合成^[10]。但是目前研究对于红景天苷与胰岛 β 细胞损伤的相互作用并不明确。

本研究通过体外培养 INS-1 胰岛细胞, 探讨红景天苷对高浓度葡萄糖培养条件下 INS-1 细胞胰岛素分泌水平变化的效应。

1 材料与方法

1.1 药物和细胞系 红景天苷购自北京华迈科技生物技术公司, 大鼠 INS-1 胰岛素瘤细胞, 购自美国标准生物品种保藏中心(ATCC)。

1.2 主要试剂和仪器 RPMI-1640 培养基, 胎牛血清, 0.25 % 胰酶(Gibco, 美国); MTT 试剂(Hyclone 公司, 美国), 大鼠胰岛素酶联免疫试剂盒(R&D 公司, 美国), Trizol 试剂(Invitrogen, 美国),

* 作者简介: 崔明凯(1962-), 男, 大学专科学历, 外科副主任医师, 擅长普外专业手术。E-mail:1295996468@qq.com。

M-MLV 反转录试剂盒 (Thermo, 美国), SYBR Premix Ex Taq 试剂盒 (Takara, 日本), BIO-RAD 550 型酶标仪 (Bio-Rad 公司, 美国), 活性氧检测试剂盒 (碧云天生物技术研究, 中国), BCA 蛋白分析试剂盒 (Pierce, 美国), 细胞培养箱 (Thermo, 美国), 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国)。

1.3 Real time PCR 引物 见表 1。

表 1 real time PCR 引物

引物名称	引物序列 (5'-3')
Insulin	Forward: CACCCAAGTCCGTCGTGAAT
	Reverse: GATCCACAATGCCACGTTCT
TXNIP	Forward: GAAGCTCCTCCTGTATATGGA
	Reverse: CCATGTCATCTAGCAGAGGAGTTGT
TPX	Forward: TTAACGAGGAAATTCGACA
	Reverse: AACGCACGCTCATAGA
β-actin	Forward: ATATCGCTGCGCTGCTCGTC
	Reverse: AGGATGGCGTGAGGGAGAGC

1.4 方法步骤

1.4.1 细胞培养及分组 用含 10 % 胎牛血清和青链霉素的 RPMI-1640 培养液 (含葡萄糖 11.1 mmol/L) 在 37 ℃, 含 5 % CO₂ 的恒温培养箱中培养 INS-1 细胞。待细胞处于对数生长期, 以 10⁴/mL 的细胞密度铺 6 孔细胞培养板, 细胞生长到 80 % 融合密度时, 根据培养基所添加的成份不同, 将细胞分为 5 组进行实验 (细胞分组见表 2)。按照实验分组, 更换不同培养基及不同浓度药物后培养 48 小时。然后根据实验目的进行下一步实验。

表 2 细胞分组及培养条件

组 别	培养条件
阴性对照组 (NC)	5.6 mM 葡萄糖+RPMI-1640 培养液
高糖组 (HG)	30 mM 葡萄糖+RPMI-1640 培养液
	0.1 μMSal+30 mM 葡萄糖+RPMI-1640 培养液
药物组 (Sal)	1 μMSal+30 mM 葡萄糖+RPMI-1640 培养液
	10 μMSal+30 mM 葡萄糖+RPMI-1640 培养液

1.4.2 红景天苷对 INS-1 细胞活力影响的测定

采用 MTT 法检测红景天苷对大鼠 INS-1 细胞活力的影响。取对数生长期的 INS-1 细胞, 调整细胞悬液浓度为 1×10⁴ 个细胞/ml, 分别加入到 96 孔板中, 每孔 200 μL, 置于 5 % CO₂, 37 ℃ 恒温培养箱培养 2 小时后, Sal 组分别加入 0.1 μM, 1 μM, 10 μM 的红景天苷, 每组设 6 个复孔, 继续培养 48

小时。然后每孔加入 20 μLMTT 溶液 (5 mg/mL)。继续培养 4 小时后终止培养, 加入 150 μL 二甲基亚砷, 置摇床上低速震荡 10 分钟, 使结晶物充分溶解。450 nm 条件下测量各孔的吸光值。并将空白对照组细胞活力计作 100 %。实验重复 3 次。细胞的存活率 (%) = (实验孔 OD 值 - 调零孔 OD 值) / (对照孔 OD 值 - 调零孔 OD 值)。

1.4.3 实时定量 PCR 检测相关 mRNA 表达 根据 Trizol 法提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计 260 nm 波长进行定量。按照 InvitrogenM-MLV 反转录试剂盒所示方法进行反转录。Real time PCR: 按照 Takara 公司 SYBR® Premix Ex Taq 试剂盒说明书进行操作。反应条件为: 95.0 ℃ 预变性 3 min, 45 个循环 (95.0 ℃ 5sec, 60 ℃ 30sec)。使用管家基因 β-actin 作为内参, 用 Excel 软件对 β-actin 和各样品 RNA 循环阈值 (Ct) 进行计算分析。应用 2^{-ΔΔCt} 法^[11] 处理数据, 计算目的基因转录水平表达量。

1.4.4 细胞内活性氧生成检测 按照试剂盒说明书步骤进行操作。取培养第 48 小时各组细胞, PBS 冲洗 2 次, 加入 DCFH-DA 37 ℃ 条件下孵育 20 分钟后用荧光酶标仪检测 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长下的荧光强度。

1.4.5 胰岛素分泌量的检测 (酶联反应法) 分组培养 48 小时后各组细胞上清中的胰岛素水平用美国 R&D 公司 Elisa 试剂盒按照说明书进行检测。

1.4.6 统计学方法 上述实验均进行 3 次重复, 每次实验均设置 2 个重复; 实验数据使用 SPSS20 统计软件进行分析。数据以 (mean ± SD) 表示, 组间比较使用单因素方差分析, 组间比较使用 bonferroni 法。P < 0.05 认为有统计学差异; P < 0.01 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 不同浓度红景天苷对 INS-1 活性的影响 分组培养 48 小时后运用 MTT 实验检测 INS-1 细胞活性。结果如图 1 显示, 高糖组 INS-1 细胞相较阴性对照组细胞活力明显降低 (P < 0.01); 红景天苷组与高糖组相比, INS-1 细胞细胞活性出现浓度依赖性升高, 其中加入 1.0 μM、10 μM 红景天苷后, INS-1 细胞活力与高糖组相比, 存在统计学差异 (P < 0.05、P < 0.01)。加入 10 μM 红景天苷,

INS-1 细胞活力仍低于阴性对照组细胞。表明红景天苷可以部分恢复高糖导致的 INS-1 细胞活性下降水平。

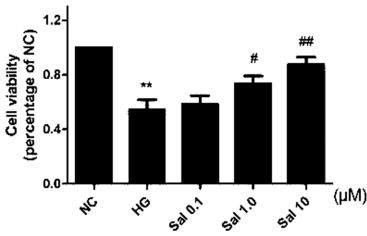


图1 分组培养48小时各组INS-1细胞活力(n=3; *代表阴性对照组与高糖组之间的统计学比较, #表示药物干预组分别与高糖组之间的统计学比较; #/ *表示 $P<0.05$; ###/ * *表示 $P<0.01$)

2.2 胰岛素 mRNA 表达及分泌水平 分别收集培养48小时的各组细胞,提取RNA,实时定量PCR检测mRNA表达情况。结果如图2(A)所示,高糖组胰岛素mRNA表达较阴性对照组明显低($P<0.01$),加入红景天苷后胰岛素mRNA表达较高糖组高,出现浓度依赖性;但最大剂量的红景天苷组胰岛素mRNA仍低于阴性对照组。

收集培养48小时各组细胞上清,检测胰岛素分泌情况。如图2(B)所示,加入红景天苷后各组细胞胰岛素分泌较高糖组浓度依赖性升高,但仍低于阴性对照组。

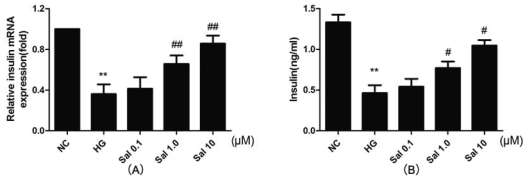


图2 分组培养48小时各组INS-1细胞表达和分泌胰岛素情况。(A)实时定量PCR检测Insulin mRNA表达;(B)酶联免疫法检测培养上清中胰岛素分泌水平。(n=3; *代表阴性对照组与高糖组之间的统计学比较, #表示药物干预组分别与高糖组之间的统计学比较; #/ *表示 $P<0.05$; ###/ * *表示 $P<0.01$)

2.3 TXNIP 和 TRX mRNA 表达变化 收集培养48小时各组细胞,提取RNA,实时定量检测TXNIP和TRX mRNA表达情况。结果如图3所示,高糖组TXNIP mRNA表达较阴性对照组高,但加入红景天苷后TXNIP mRNA表达水平较高糖组细胞出现浓度依赖性的降低。而在高糖条件下,TRX mRNA表达水平较阴性对照组明显降低($P<0.01$),加入红景天苷后,TRX mRNA表达升高。

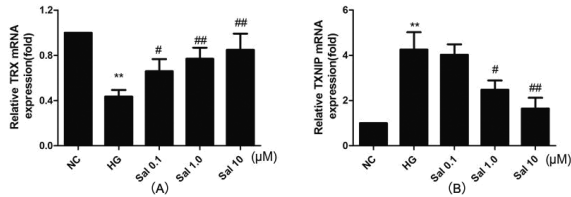


图3 分组培养48小时各组INS-1细胞TRX、TXNIP mRNA表达水平。(A)实时定量PCR检测TRX mRNA表达;(B)实时定量PCR检测TXNIP mRNA表达。(n=3; *代表阴性对照组与高糖组之间的统计学比较, #表示药物干预组分别与高糖组之间的统计学比较; #/ *表示 $P<0.05$; ###/ * *表示 $P<0.01$)

2.4 细胞内 ROS 水平变化 选取培养48小时的各组细胞检测胞内ROS水平。结果如图4所示,高糖组INS-1细胞内ROS生成较阴性对照组明显上升($P<0.01$),加入红景天苷各组INS-1细胞内ROS生成水平相较于高糖组出现浓度依赖性的降低。红景天苷能降低高糖条件下INS-1细胞内ROS的生成。

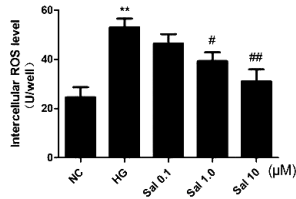


图4 分组培养48小时各组INS-1细胞胞内ROS生成检测。(n=3; *代表阴性对照组与高糖组之间的统计学比较, #表示药物干预组分别与高糖组之间的统计学比较; #/ *表示 $P<0.05$; ###/ * *表示 $P<0.01$)

3 讨论

本研究通过30 mM高浓度葡萄糖^[12]培养胰岛β细胞模型表明INS-1细胞体外培养时,高浓度葡萄糖通过上调硫氧还原蛋白相互作用蛋白(thioredoxin interacting protein, TXNIP) mRNA以及降低硫氧还原蛋白(thioredoxin, TRX) mRNA表达,使INS-1细胞内ROS升高,INS-1细胞生存水平下降,并降低胰岛素的表达和分泌;而红景天苷通过下调TXNIP mRNA、上调TRX mRNA水平,维持细胞内ROS的低水平,升高了INS-1细胞生存水平,提高胰岛素的分泌。证明红景天苷具有保护胰岛β细胞的功能。

胰岛素是由胰岛β细胞分泌、体内惟一能够降低血糖的蛋白质激素。胰岛β细胞损伤导致的胰岛素分泌下降是糖尿病发生的一个关键性事件,最终导致糖尿病患者体内血糖浓度的升高。

胰岛 β 细胞对血糖浓度极其敏感,稳态范围内的血糖浓度的改变能够动态地影响胰岛 β 细胞的功能和数量。事实上,长期的高血糖会通过多种机制导致胰岛素合成/分泌、胰岛 β 细胞存活受影响(“糖毒性”),这又导致高血糖和 β 细胞恶化进入了恶性循环^[13]。目前研究表明,糖毒性的产生有多种可能机制:胰岛素基因表达丢失、内质网应激、非免疫系统介导的炎症反应及氧化应激,其中氧化应激是引起 β 细胞功能缺陷的主要原因^[13-17]。长期的高血糖增加了线粒体的代谢流(metabolic flux),引起氧自由基产生过量,最终导致氧化应激^[17]。大量研究表明:高浓度的葡萄糖培养胰岛 β 细胞,会导致胰岛 β 细胞凋亡,降低胰岛素的分泌水平^[12,18-20]。临床研究证实糖尿病患者体内促氧化物质及氧化组织损伤标志物升高^[21-23]。在我们的研究中这一结论亦得到了证实。

TRX 系统(TRX, TRX 还原酶, GADPH)是一种广泛存在的氧化还原系统。硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)通过巯基结构中具有还原能力的二硫键清除 ROS;硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin interacting protein, TXNIP)是细胞内源性的 TRX 抑制剂,通过结合 TRX 的半胱氨酸残基使 TRX 失去抗氧化能力^[24]。高浓度葡萄糖培养 INS-1 细胞,活性氧代谢物质 MDA 升高,胰岛素分泌水平下降,这一结论与本研究相符。2 型糖尿病大鼠血清过氧化物酶(SOD/CAT)水平降低,MDA 升高,胰岛细胞内 TRX 和胰岛素蛋白表达水平降低, TXNIP 蛋白水平升高, TRX 具有保护胰岛细胞功能^[25]。TXNIP 能够促使胰岛 β 细胞凋亡。相关内源性诱导 INS-1 细胞高表达 TXNIP,活性氧水平升高,其凋亡水平升高 10 倍^[26]。高糖也能够诱导胰岛 β 细胞 TXNIP 高表达,从而导致胰岛 β 细胞凋亡。TXNIP 表达下降对胰岛 β 细胞的糖毒性有保护作用^[27],与本研究相符合。

本研究首次在细胞水平证明红景天苷能够通过调节 TRX 氧化还原系统发挥胰岛 β 细胞保护作用,对于胰岛 β 细胞损伤保护研究提供了方向,具有重要的临床意义。

参考文献

[1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南

(2013 年版)[J]. 中国糖尿病杂志, 2014, 22(8): 2-42.

- [2] Hou Z Q, Li H L, Gao L, et al. Involvement of chronic stresses in rat islet and INS-1 cell glucotoxicity induced by intermittent high glucose[J]. Mol Cell Endocrinol, 2008, 291(1): 71-78.
- [3] Matsumoto S, Koshiishi I, Inoguchi T, et al. Confirmation of superoxide generation via xanthine oxidase in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Free Radic Res, 2003, 37(7): 767-772.
- [4] 陈莹晖, 李裕明, 林松挺, 等. 高糖诱导氧化应激对胰岛细胞功能的影响[J]. 海南医学院学报, 2012, 18(1): 12-14.
- [5] Gupta V, Saggi S, Tulsawani R K, et al. A dose dependent adaptogenic and safety evaluation of *Rhodiola imbricata* Edgew, a high altitude rhizome[J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(5): 1645-1652.
- [6] Wu Y L, Lian L H, Jiang Y Z, et al. Hepatoprotective effects of salidroside on fulminant hepatic failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in mice[J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61(10): 1375-1382.
- [7] Mao G X, Wang Y, Qiu Q, et al. Salidroside protects human fibroblast cells from premature senescence induced by H_2O_2 partly through modulating oxidative status[J]. Mech Ageing Dev, 2010, 131(12): 723-731.
- [8] Skopinska-Rozewska E, Malinowski M, Wasiutynski A, et al. The influence of *Rhodiola quadrifida* 50% hydro-alcoholic extract and salidroside on tumor-induced angiogenesis in mice[J]. Pol J Vet Sci, 2008, 11(2): 97-104.
- [9] Li F, Tang H, Xiao F, et al. Protective effect of salidroside from *Rhodiola* Radix on diabetes-induced oxidative stress in mice[J]. Molecules, 2011, 16(12): 9912-9924.
- [10] 张晓英, 王鹏翔, 张致英, 等. 红景天苷改善胰岛素抵抗 HepG2 细胞糖代谢及分子机制初探[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(1): 28-31.
- [11] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [12] Kim Y W, Moon J S, Seo Y J, et al. Inhibition of fatty acid translocase cluster determinant 36 (CD36), stimulated by hyperglycemia, prevents glucotoxicity in INS-1 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 420(2): 462-466.
- [13] Robertson R P, Harmon J, Tran P O, et al. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2004, 53(s1): 119

-124.

[14] Herchuelz A, Nguidjoe E, Jiang L, et al. beta-Cell preservation and regeneration in diabetes by modulation of beta-cell Ca(2)(+) homeostasis[J]. Diabetes Obes Metab,2012,14(3):136-142.

[15] van Raalte D H, Diamant M. Glucolipotoxicity and beta cells in type 2 diabetes mellitus: target for durable therapy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 93 (S1): S37-S46.

[16] Kim J W, Yoon K H. Glucolipotoxicity in Pancreatic beta-Cells[J]. Diabetes Metab J,2011,35(5):444-450.

[17] Robertson R P, Harmon J, Tran P O, et al. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection [J]. Diabetes, 2003,52(3):581-587.

[18] Matsunaga T, Li S, Adachi T, et al. Hyperoxia reverses glucotoxicity-induced inhibition of insulin secretion in rat INS-1 beta cells[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2014,78(5):843-850.

[19] Lee S H, Park M H, Park S J, et al. Bioactive compounds extracted from Ecklonia cava by using enzymatic hydrolysis protects high glucose-induced damage in INS-1 pancreatic beta-cells[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012,167(7):1973-1985.

[20] Lin P, Chen L, Li D, et al. Adiponectin reduces glucotoxicity-induced apoptosis of INS-1 rat insulin-secreting cells on a microfluidic chip [J]. Tohoku J Exp Med,

2009,217(1):59-65.

[21] Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, et al. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients[J]. Diabetologia,2002,45(1):85-96.

[22] Shin C S, Moon B S, Park K S, et al. Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients [J]. Diabetes Care,2001,24(4):733-737.

[23] Sedeek M, Montezano A C, Hebert R L, et al. Oxidative stress, Nox isoforms and complications of diabetes--potential targets for novel therapies[J]. J Cardiovasc Transl Res,2012,5(4):509-518.

[24] Michelet L, Zaffagnini M, Massot V, et al. Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: new crosstalks to explore[J]. Photosynth Res,2006,89(2):225-245.

[25] Liu J H, Liu D F, Wang N N, et al. Possible role for the thioredoxin system in the protective effects of probucol in the pancreatic islets of diabetic rats [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol,2011,38(8):528-533.

[26] Chen J, Saxena G, Mungrue I N, et al. Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis[J]. Diabetes,2008,57(4):938-944.

[27] Shalev A. Lack of TXNIP protects beta-cells against glucotoxicity [J]. Biochem Soc Trans, 2008, 36 (5): 963-965.

(收稿日期:2015-02-13 编辑:文颖娟)

(上接第 72 页) 泥于“到气才可清气”的顺应疗法, 而是邪在卫分, 即早用重用清热解毒, 把好气分关; 邪初入营, 不待耗血动血, 即凉血化瘀, 避免血分危证的出现。在熟悉疾病特点和自身发展规律的前提下, 这种先证而治的做法有效地截断了病情的恶化, 与叶天士“卫之后方言气, 营之后方言血”相较, 姜春华先生将动态性的预防思维提升到了更高的境界。

姜氏“截断扭转”法的另一特点是对早期急性传染病的治疗, 常果敢地使用通腑攻下法, 如治疗重症肺炎, 邪热鸱张之时, 先用大黄 12 g 于复方之首, 因肺与大肠相表里, 肺气的肃降与大肠传导功能之间构成相互为用的整体关系, 肠中垢粪泄下, 邪无所羁, 肺热自清。又如治疗中风重症脑溢血, 痰热风火闭遏清阳, 姜氏常以安宫牛黄丸加大承

气汤, 使风火痰热随便而泄, 清窍得清, 神志复苏。这种病在上, 取之下的截断方法无疑是对整体性预防思维的进一步发挥。

研究思维, 对于透过事物现象, 把握事物本质具有执简驭繁的作用。经历代医家不断升华, 整体性、动态性的预防思维逐步成为中医预防医学发展的轴心与精髓, 虽历经沧桑, 思维层面的内涵永远具有鲜活长久的生命力, 也必将为现代预防医学的发展提供启发。

参考文献

[1] 翟双庆. 内经选读 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2013: 161, 227, 273.

[2] 叶天士. 温热论 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2010: 12.

(收稿日期:2015-05-20 编辑:孙理军)