

过氧化氢酶对高糖诱导 NIT-1 胰岛 细胞 Pax6 基因表达下降的影响

周 嘉, 李 英, 杨 川, 严 励, 傅祖植

(中山大学附属第二医院内分泌科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】探讨过氧化氢酶 (catalase) 对高糖诱导的 NIT-1 胰岛 细胞成对同源异形盒转录因子 6 (Pax6) 基因表达下降的影响。【方法】体外培养 NIT-1 胰岛 细胞 24 h, 分 4 个处理组: 低糖组 (NG), 低糖+过氧化氢酶组 (NG +C), 高糖组 (HG), 高糖+过氧化氢酶组 (HG +C), 用 2,7 二氯氢化荧光素二酯 (H₂DCF-DA) 染色检测活性氧簇 (ROS) 的水平, RT-PCR 半定量检测 Pax6 mRNA 表达。【结果】HG 组 ROS 水平 (1.10 ± 0.24) 明显高于 NG 组 (0.95 ± 0.26), P < 0.05; HG +C 组 ROS 水平 (0.94 ± 0.26) 低于 HG 组, P < 0.05; HG 组 Pax6 mRNA 表达 (0.64 ± 0.09) 低于 NG 组 (0.93 ± 0.12), P < 0.05; HG +C 组 Pax6 mRNA 表达 (0.74 ± 0.11) 高于 HG 组, 但差异无统计学意义, P > 0.05。【结论】高糖可使 NIT-1 胰岛 细胞内 ROS 产生增加, 胰岛 细胞特异性转录因子 Pax6 基因表达下降, 给予 ROS 的抗氧化剂过氧化氢酶后, Pax6 基因表达有所恢复, 但差异无统计学意义。

关键词: NIT-1 胰岛 细胞; Pax6; 活性氧簇; 过氧化氢酶

中图分类号: R581

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)03-0262-04

Effects of Catalase on Decrease of Pax6 Expression Induced by Hyperglycemia

ZHOU Jia, LI Ying, YANG Chuan, YAN Li, FU Zu-zhi

(Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To observe the effect of catalase on the decrease of Pax6 expression induced by hyperglycemia in NIT-1 cells. 【Methods】 NIT-1 cells were divided into four groups: normal glucose concentration without or with catalase (NG, NG+C); high glucose concentration without or with catalase (HG, HG+C). In vitro the cells were cultured in the different medium as mentioned above for 24 hours. Then the cells were used for 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) staining to detect the level of reactive oxygen species (ROS) and evaluate the expression of Pax6 mRNA by RT-PCR. 【Results】 The levels of ROS in HG group (1.10 ± 0.24) were higher than those of in NG group (0.95 ± 0.26, P < 0.05), but the levels of ROS in HG+C group (0.94 ± 0.26, P < 0.05) were lower as compared with HG group. On the contrary, the expression of Pax6 in HG group (0.64 ± 0.09) was lower than in NG group (0.93 ± 0.12, P < 0.05). The mRNA level of Pax6 in HG+C group (0.74 ± 0.11, P > 0.05) was higher than in HG group without statistical significance. 【Conclusion】 The hyperglycemia could induce the increase of ROS and decrease of Pax6 mRNA levels in NIT-1 cells. The antioxidant could partially restore the decline of Pax6 caused by hyperglycemia, but not significant.

Key words: NIT-1 cell line; Pax6; reactive oxygen species; catalase

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):262-265]

胰岛素抵抗和 细胞分泌功能障碍是 2 型糖尿病发病机制中的两个重要环节^[1]。研究表明, 长期的高血糖可以导致 细胞特异性转录因子如胰和十二指肠同源盒基因 - 1 (pancreatic duodenal

homeobox-1, PDX-1)、成对同源异形盒转录因子 6 (paired homeobox transcription factor 6, Pax6) 等基因表达下降, 从而影响胰岛素的合成和 细胞的分化^[2], 但机制未明。对酒精引起胎儿眼、脑畸形的

收稿日期: 2005-11-04

基金项目: 教育部博士点科研基金资助项目 (D002000001); 卫生部科学研究基金资助项目 (D000099009)

作者简介: 周 嘉 (1975-), 女, 广西南宁人, 博士生. E-mail: Kelly_zhoujia@hotmail.com

研究^[3,4]发现,活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)导致 Pax6 基因表达的下降可以被抗氧化剂过氧化氢酶纠正,结合目前许多研究表明氧化应激参与细胞的“葡萄糖毒性”^[5],我们以前的研究也提示体外长期高糖培养 细胞株 NIT-1, Pax6 基因表达下降。本研究讨论该现象是否是由于高糖导致 ROS 升高所致,ROS 的抗氧化剂过氧化氢酶是否能改善此现象。

1 材料与方 法

1.1 材 料

NIT-1 胰岛 细胞由北京 301 医院母义明教授惠赠,DMEM 低糖、高糖培养基(分别含 1.0 g/L, 4.5 g/L 葡萄糖)购自 Gibco 公司,过氧化氢酶、2,7-二氯化荧光素二酯(H₂DCF-DA)、葡萄糖购自 Sigma 公司,Trizol 购自 Invitrogen 公司,RT 试剂盒购自 Fermentas 公司,PCR 试剂盒购自宝生物工程有 限公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 NIT-1 胰岛 细胞予含 150 mL/L 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基(1.0 g/L 葡萄糖、4 mmol/L 谷氨酰胺、10 mmol/L HEPES、1 mmol/L 丙酮酸钠、2.0 g/L 碳酸氢钠)培养于 37 含体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱。取对数生长期的细胞,按 1×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板,细胞生长至 60%~80% 融合时,予含 5 g/L 牛血清白蛋白(BSA)的 DMEM 低糖无血清培养基饥饿细胞 2 h,弃除培养基,分为 4 组处理组:低糖组(normal glucose, NG, DMEM 中葡萄糖 5.6 mmol/L),低糖+过氧化氢酶组(NG +C, 过氧化氢酶 200 U/mL),高糖组(high glucose, HG, DMEM 中葡萄糖 30 mmol/L),高糖+过氧化氢酶组(HG +C, 过氧化氢酶 200 U/mL),培养 24 h。

1.2.2 RNA 提取 NIT-1 胰岛 细胞按上述分组培养 24 h 后,采用 Trizol 法制备总 RNA。制备的 RNA 样品用紫外分光光度计检测 A₂₆₀, A₂₈₀, 并计算 A₂₆₀/A₂₈₀ 值以判断 RNA 浓度。

1.2.3 RT-PCR cDNA 第一链的合成按产品说明书进行。PCR 扩增的引物序列:Pax6 上游 5'-GTCAGACCTCCTCATACTCGTG-3' 下游 5'-TGC TCTCTCCTTCTCTCTTTAC-3', 242 bp; -actin 上游 5'-TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3' 下游 5-

-TGAGGGACTTCCTGTAACCACT-3', 880 bp)。反应条件:95 预变性 3 min, 94 变性 30 s, 62 退火 30 s, 72 延伸 50 s, 末次循环后 72 延伸 5 min, 共进行 30 个循环。重复实验次数为 3 次。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统存图,Alphalmager2200 软件分析。

1.2.5 荧光显微镜检测细胞内 H₂O₂ 的量 NIT-1 胰岛 细胞按上述分组培养 24 h 后,吸弃培养液,用 PBS 洗 3 次,加入含 H₂DCF-DA 的培养基 1 mL (终浓度为 10 μmol/L),室温下避光孵育 60 min。吸弃含荧光探针的培养基,用 PBS 洗 3 次,加入 1 mL PBS 待测。细胞内 H₂O₂ 的测定选用激发波长为 488 nm,吸收波长为 525 nm,20× 物镜下观察摄片,曝光时间为 1 s,亮度、对比度固定,每样品取 5 个视野,绿色荧光强度平均光密度使用 Image-pro plus 软件定量分析,实验数据以 NG 组为 1 进行标化分析,重复实验次数为 3 次。

1.3 统计学处理

资料进行正态分布检验以均数±标准差表示,统计方法采用析因分析,检验水准 =0.05。

2 结 果

2.1 过氧化氢酶对高糖培养的 NIT-1 胰岛 细胞的影响

2,7-二氯化荧光素二酯(H₂DCF-DA)为不发光的荧光染料,进入细胞后可被细胞内产生的 H₂O₂ 氧化为发光的染料 2,7-二氯荧光黄(DCF),DCF 的生成量与细胞内 H₂O₂ 的产量成正比。因此,细胞内荧光强度可表示细胞内产生的 H₂O₂ 的量。结果显示,NIT-1 胰岛 细胞在不同处理组培养 24 h 后,经过 H₂DCF-DA 染色,在荧光显微镜下可见胞浆呈绿色荧光(图 1)。高糖诱导 NIT-1 胰岛 细胞产生 H₂O₂ 明显增加,HG 组细胞平均积分光密度(1.10±0.24)与 NG 组的(0.95±0.26)相比,差异有统计学意义(F=8.252, P=0.005);给予过氧化氢酶能明显抑制高糖诱导的 H₂O₂ 增加,HG+C 组平均积分光密度(0.94±0.26)与 HG 组平均积分光密度相比,差异有统计学意义(F=8.351, P=0.005)。而葡萄糖浓度与过氧化氢酶的交互效应无统计学意义(F=0.029, P=0.864)。

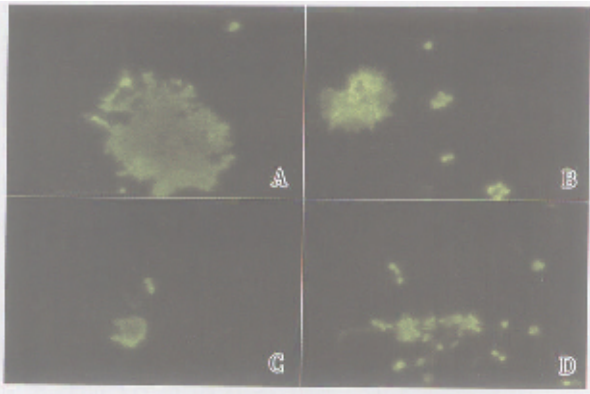


图 1 NIT-1 胰岛 细胞 DCF 荧光显微成像

Fig.1 Micrograph of DCF in NIT-1 cells (20 \times)

A: normal glucose group; B: high glucose group; C: normal glucose + catalase group; D: high glucose + catalase group

2.2 过氧化氢酶对高糖培养 NIT-1 胰岛 细胞的 Pax6 基因表达的影响

Pax6 mRNA 表达半定量分析,以 PCR 产物与内参 β -actin PCR 产物灰度的比值反映。NIT-1 胰岛 细胞在不同处理组培养 24 h 后, Pax6 mRNA 表达在 HG 组 (0.64 ± 0.09) 明显低于 NG 组 (0.93 ± 0.12), 差异有统计学意义 ($F=10.481, P=0.012$); HG+C 组 (0.74 ± 0.11) 高于 HG 组, 但差异无统计学意义 ($F=0.002, P=0.964$); 而葡萄糖浓度与过氧化氢酶的交互效应无统计学意义 ($F=3.267, P=0.108$), 电泳见图 2。

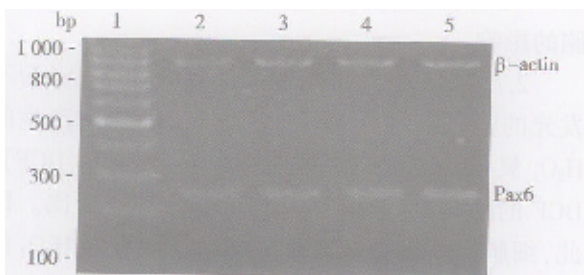


图 2 Pax6 mRNA RT-PCR 电泳图

Fig.2 Electropherogram of Pax6 mRNA RT-PCR

1: marker; 2: normal glucose group; 3: normal glucose + catalase group; 4: high glucose group; 5: high glucose+catalase group

3 讨论

胰岛素抵抗和 细胞分泌功能障碍是 2 型糖尿病发病机制中的两个重要环节^[1]。正常的 细胞可以通过增加胰岛素分泌或 细胞数量代偿胰岛

素抵抗, 而长期慢性的高血糖初期可导致 细胞功能代偿性的增强, 但随时间的延长, 其功能也将逐步下降, 其机制十分复杂, 既涉及 细胞内的信号传导通路, 也与维持 细胞功能的有关转录因子有关。Jonas 等^[2]在通过切除大部分胰腺造成长期高血糖的大鼠模型中发现, 一些涉及 细胞转录分化的基因如 PDX-1、NeurD1、Pax6 等的表达下降。而 Kjørholt、Silva 等^[6,7]分别在对 db/db 小鼠和人的研究结果也支持长期高血糖使涉及 细胞转录分化的基因表达下降。

长期高血糖损害 细胞功能的分子机制仍未完全清楚, Wu 等^[8]研究显示暴露在高糖环境中离体胰岛的 ROS 产生增加, 在 2 型糖尿病动物模型的胰岛 细胞和罹患 2 型糖尿病患者中均证实氧化应激增加^[8-10]。此外, 细胞自身的抗氧化能力明显低于其它脏器。许多研究表明氧化应激参与 细胞的“葡萄糖毒性”^[5]。ROS 是一类活性分子包括带电荷系列如超氧阴离子 ($\cdot O_2^-$)、羟基 ($\cdot OH$) 和不带电荷的过氧化氢 (H_2O_2) 等。目前许多研究均表明, 在糖尿病动物模型或 细胞系给予抗氧化剂如 N-乙酰半胱氨酸 (NAC)、过氧化氢酶等可以改善 ROS 产生增加所致的 PDX-1 表达下降及活性改变, 从而改善 细胞功能^[5,9]。对其他 细胞特异性转录因子如 Pax6、NeuroD1、Pax4 等研究甚少。NIT-1 细胞株来源于 NOD 小鼠, 是由肉瘤病毒 40 和大鼠胰岛素基因的启动子经转基因方式产生的 细胞腺瘤 NIT-1 细胞, 主要分泌胰岛素和极少量的胰高糖素, 对葡萄糖等刺激物的反应与体外培养的胰岛 细胞相似^[11]。因此, 本研究利用该细胞株研究高糖对 Pax6 的影响及其相关机制。

我们的研究显示 NIT-1 胰岛 细胞在高糖环境中培养 24 h, ROS 产生增加; 高糖培养同时给予抗氧化剂过氧化氢酶, ROS 的产生明显低于 HG 组, 与 MIN6、HIT-T15 等胰岛 细胞株在高糖刺激下的变化相似^[9,12], 说明高糖可导致 细胞内 ROS 生成增多。其具体的机制仍未完全明确, 有研究显示细胞内的线粒体可能是 ROS 产生的一个重要来源^[13]。Oliveira 等^[14]研究证实在大鼠胰岛中也存在 NADPH oxidase。Tsubouchi 等^[12]也证实高糖可以刺激 MIN6 的 ROS 生成增加, 而 NADPH oxidase 特异性抑制剂 DPI 可以阻断上述现象, 提示在 细胞中高糖激活 NADPH oxidase 也是 ROS 产生增加的重要途径。

Pax6 是编码转录因子发育控制基因的超家族的成员之一, 在眼和中枢神经系统发育以及成体胰腺的所有内分泌细胞中均有表达, 是胰腺细胞分化和发育的关键调节因子。Yasuda 等^[15]研究发现 Pax6 基因突变可引起眼的发育异常和糖耐量异常; Ashery-Padan 等^[16]研究也提示 Pax6 基因失活可引起早发糖尿病, 因此, Pax6 基因的功能对维持胰岛 细胞正常功能具有一定的作用。Peng 等^[3,4]在研究酒精对胚胎期眼和脑发育中发现, 抗氧化剂过氧化氢酶可以逆转酒精诱导的 ROS 对 Pax6 基因表达的抑制, 从而改善眼和脑的发育的一些异常, 提出 ROS 介导的 Pax6 基因表达下降在酒精导致的眼、脑发育异常中有重要的作用。我们的研究也显示 NIT-1 胰岛 细胞在高糖环境中培养 24 h, Pax6 mRNA 表达下降, 明显低于 NG 组; 高糖培养同时给予抗氧化剂过氧化氢酶, Pax6 mRNA 表达水平高于 HG 组, 但差异无统计学意义, 需要进一步的研究。

总之, 本研究的结果表明高糖可使 NIT-1 胰岛 细胞内 ROS 产生增加, 胰岛 细胞特异性转录因子 Pax6 基因表达下降, 给予 ROS 的抗氧化剂过氧化氢酶, Pax6 基因表达有所恢复, 但差异无统计学意义, ROS 在高糖导致 Pax6 基因表达下降中的作用仍需进一步探讨。

参考文献:

- [1] SALTIEL A R, KAHN C R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism [J]. *Nature*, 2001, 414(6865):799-806.
- [2] JONAS J C, SHARMA A, HASENKAMP W, et al. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic β -cell differentiation in an animal model of diabetes[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(20):14112-14121.
- [3] PENG Y, YANG P H, GUO Y, et al. Catalase and peroxiredoxin 5 protect *Xenopus* embryos against alcohol-induced ocular anomalies[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(1): 23-29.
- [4] PENG Y, YANG P H, NG S S, et al. Protection of *Xenopus laevis* embryos against alcohol-induced delayed gut maturation and growth retardation by peroxiredoxin 5 and catalase [J]. *J Mol Biol*, 2004, 40(4): 819-827.
- [5] ROBERTSON R P, HARMON J, TRAN P O, et al. Glucose toxicity in β -cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection[J]. *Diabetes*, 2003, 52(3): 581-587.
- [6] KJORHOLT C, AKERFELDT M C, BIDEN T J, et al. Chronic hyperglycemia, independent of plasma lipid levels, is sufficient for the loss of β -cell differentiation and secretory function in the db/db mouse model of diabetes[J]. *Diabetes*, 2005, 54(9): 2755-2763.
- [7] SILVIA D G, ROBERTO L, LORELLA M, et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2005, 54(3): 727-735.
- [8] WU L, NICHOLSON W, KNOBEL S M, et al. Oxidative stress is a mediator of glucose toxicity in insulin-secreting pancreatic islet cell lines [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(13): 12126-12134.
- [9] TANAKA Y, GLEASON C E, TRAN P O, et al. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(19): 10857-10862.
- [10] SAKURABA H, MIZUKAMI H, YAGIHASHI N, et al. Reduced β -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.
- [11] HAMAGUCHI K, REX GASKINS H, EDWARD H, et al. NIT-1, a pancreatic β -cell line established from a transgenic NOD/Lt mouse [J]. *Diabetes*, 1991, 40(7): 842-849.
- [12] TSUBOUCHI H, INOGUCHI T, INUO M, et al. Sulfonylurea as well as elevated glucose levels stimulate reactive oxygen species production in the pancreatic β -cell line, MIN6-a role of NAD(P)H oxidase in β -cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326(1): 60-65.
- [13] GREEN K, BRAND M D, MURPHY M P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes [J]. *Diabetes*, 2004, 53(s11): s110-118.
- [14] OLIVEIRA H R, VERLENGIA R, CARVALHO C R, et al. Pancreatic β -cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase [J]. *Diabetes*, 2003, 52(6): 1457-1463.
- [15] YASUDA T, KAJIMOTO Y, FUJITANI Y, et al. Pax6 mutation as a genetic factor common to aniridia and glucose intolerance [J]. *Diabetes*, 2002, 51(1): 224-230.
- [16] ASHERY-PADAN R, ZHOU X, MARQUARAT T, et al. Conditional inactivation of pax6 in the pancreas cause early onset of diabetes [J]. *Dev Biol*, 2004, 269(2):479-488.

(编辑 张恩健)