

# 甘精胰岛素对游离脂肪酸诱导的 RIN-m 细胞凋亡的影响

傅静奕, 李焱, 严励, 张淼, 陈黎红, 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】研究甘精胰岛素(insulin glargine)对游离脂肪酸诱导的 $\beta$ 细胞凋亡是否具有保护作用。【方法】不同浓度的甘精胰岛素、普通人胰岛素以及 IGF-1 与 0.3 mmol/L 棕榈酸分别加入 RIN-m 细胞培养液中, 24 h 后, 采用 Hoechst33342 染色、流式细胞仪以及 ELISA 方法检测 RIN-m 细胞的凋亡。【结果】0.3 mmol/L 棕榈酸诱导 RIN-m 细胞凋亡率达  $42.10\% \pm 4.24\%$ , 同时加入甘精胰岛素或者普通胰岛素(均为 100 nmol/L)的凋亡率分别为  $32.00\% \pm 3.08\%$  和  $35.97\% \pm 3.14\%$ , 甘精胰岛素对凋亡的抑制作用明显强于普通胰岛素, 并呈剂量依赖性。【结论】甘精胰岛素对游离脂肪酸诱导的 $\beta$ 细胞凋亡具有呈剂量依赖性的保护作用。

**关键词:**甘精胰岛素; 胰岛 $\beta$ 细胞凋亡; 游离脂肪酸

中图分类号: R349.14

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)04-0413-04

## Effects of Insulin Glargine on FFA-induced Apoptosis in RIN-m Cells

FU Jing-yi, LI Yan, YAN Li, ZHANG Miao, CHEN Li-hong, FU Zu-zhi

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

**Abstract:** 【Objective】To investigate the effects of insulin glargine on apoptosis induced by free fatty acid in pancreatic  $\beta$  cells. 【Methods】Apoptosis was determined by Hoechst staining, flow cytometry, and ELISA kit in RIN-m cells incubated by palmitic acid (0.3 mmol/L) for 24 hours in the absence or presence of insulin glargine, regular insulin or IGF-1 at various dosages. 【Results】The percentages of SubG1 cells in palmitic acid-treated control group, glargine treated group, and regular insulin-treated group were  $42.10\% \pm 4.24\%$ ,  $32.00\% \pm 3.08\%$ , and  $35.97\% \pm 3.14\%$ , respectively. The anti-apoptotic effect of insulin glargine was dose-dependent and stronger than regular insulin at all corresponding dosage. 【Conclusion】Insulin glargine can dose-dependently protect apoptosis induced by free fatty acid in pancreatic  $\beta$  cells.

**Key words:** insulin glargine; pancreatic  $\beta$  cell; free fatty acid

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(4): 413-416]

甘精胰岛素 (insulin glargine [GlyA21, Arg-B31, ArgB32]) 是目前已经应用于临床的超长效胰岛素类似物。Kurtzhals 等<sup>[1]</sup>研究显示, 甘精胰岛素与 IGF-1 (胰岛素样生长因子 1) 受体结合的能力比天然人胰岛素强 6.5 倍, 促进 Saos/B10 细胞 (人骨肉瘤细胞系) 增殖的能力比天然人胰岛素强 8 倍, 而 IGF-1 具有强烈的抗细胞凋亡的作用, 由此理论上推测甘精胰岛素可能具有比天然胰岛素更强的对胰岛 $\beta$ 细胞凋亡的保护作用。目前国内外

尚无甘精胰岛素是否具有保护胰岛 $\beta$ 细胞凋亡作用的研究。本研究通过游离脂肪酸诱导 $\beta$ 细胞凋亡的体外实验体系, 证实甘精胰岛素对 $\beta$ 细胞凋亡是否具有保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与设备

RIN-m 细胞株 (33-50 代, 购自 ATCC, CRL-

收稿日期: 2004-11-24

基金项目: 广东省社会发展重点攻关项目 (2002C30503)

作者简介: 傅静奕 (1970-), 女, 四川绵竹人, 博士生, 讲师。E-mail: Jenny\_awake@hotmail.com

2057, 美国), 棕榈酸 (palmitic acid, Sigma, 产品号 27734, 美国), 无脂肪酸牛血清白蛋白 (free fatty acid-free BSA, 上海微科生化试剂有限公司, 产品号 K41-002-10), 甘精胰岛素 (insulin Glargine, Aventis 公司惠赠, 法国), 人胰岛素样生长因子 1 (IGF-1, Peptotech, 产品号 100-11, 美国), Hoechst 33342 (Sigma, 产品号 B-2261, 美国), Cell Death Detection ELISA plus 试剂盒 (Roche, 产品号 1774425, 德国)。

## 1.2 实验方法

1.2.1 含棕榈酸的培养基的制备 基本按照 Irini Rakatzki 等人<sup>[2]</sup>的方法制备。先用 MTT(四唑盐法)以及流式细胞仪法进行了棕榈酸及 FBS 浓度梯度下 RIN-m 细胞活力和凋亡率的检测, 最终选取 20 mL/L 与 0.3 mmol/L 分别为本实验诱导凋亡采用的 FBS 与棕榈酸浓度。乙醇及 fatty acid free-BSA 在培养基中的终浓度分别为 10 mL/L 和 10 g/L, 此浓度乙醇不影响胰岛素瘤细胞或者胰岛的功能与生存<sup>[3]</sup>。正常对照组所用的培养基中加入同样浓度的乙醇、BSA 和 FBS, 但不加入棕榈酸。经过滤除菌储存于 4℃ 备用。

1.2.2 细胞培养、凋亡的诱导以及分组 RIN-m 细胞被培养含 4.5 g/L 葡萄糖、10 mmol/L HEPES、1.5 g/L 碳酸氢钠、1 mmol/L 丙酮酸, 并添加 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 常规培养传代。将细胞从培养瓶中按照  $(3\sim 4)\times 10^5$ /孔接种于 6 孔板或者  $4\times 10^4$ /孔接种于 96 孔板。接种后常规培养 2 d, 待细胞长至 70% 满左右时, 吸去培养基, 加入含 10 g/L BSA、10 mL/L 乙醇、20 mL/L FBS 的培养基(N 组, 正常对照组), 或者另加 0.3 mmol/L 棕榈酸的培养基(C 组, 凋亡对照组), 或者另加 0.3 mmol/L 棕榈酸以及 100 nmol/L 甘精胰岛素(G 组, glargine 组) 或者 100 nmol/L 普通胰岛素(R 组, regular insulin 组) 或者 10 nmol/L IGF-1 (I 组, IGF-1 组, 阳性对照) 的培养基, 孵育 24 h。

1.2.3 浓度-效应实验 将细胞从培养瓶中按照  $(3\sim 4)\times 10^5$ /孔接种于 6 孔板, 按照前述方法诱导凋亡并分别加入浓度为 1、10、100、500 nmol/L 的甘精胰岛素或者同浓度的普通胰岛素(RI), 或者浓度为 1、10、100 nmol/L 的 IGF-1 (阳性对照)。

1.2.4 凋亡的形态学证实 诱导凋亡结束后, 直接置于倒置显微镜下观察。Hoechst33342 染色: 将 RIN-m 细胞按数密度为  $4\times 10^5$ /mL 接种于 6 孔板内的盖玻片上, 经过 2 d 让细胞生长为爬片, 诱导凋亡后, PBS 洗 1 次, 加入 40 g/L 多聚甲醛在 4℃ 下固定 20 min, 移去固定液。用双蒸水洗 1 次, 加

入 5 mg/L Hoechst33342 染色 10 min, 用双蒸水洗 2 次, 置于荧光显微镜下, 在波长为 365 nm 的紫外激发光下观察、拍照。

1.2.5 流式细胞仪检测 DNA 含量 细胞接种于 6 孔板内, 诱导凋亡后, 吸去并保留上清(上清中含有脱壁的凋亡细胞), PBS 洗 3 次, 用 2.5 g/L 的胰酶消化后, 将细胞悬液与上清一起离心。离心后的细胞沉淀用 PBS 洗 1 次, 用 4℃ 的 700 mL/L 乙醇 2 mL 重悬细胞, 固定过夜后离心弃去固定液, 3 mL PBS 重悬, 400 目的筛网过滤 1 次,  $200\sim 300\times g$  离心 5 min, 弃去 PBS。用 50 g/L PI 染液 1 mL 染色, 4℃ 避光 30 min。流式细胞仪检测: 计数 10 000 个细胞, 以 SubG1 峰细胞为凋亡细胞计算凋亡率。

1.2.6 凋亡细胞 DNA 断裂的定量检测 细胞接种于 96 孔板内, 诱导凋亡后, 吸去上清, 按照 Cell Death Detection ELISA plus 试剂盒的操作说明, 裂解细胞后将细胞裂解液移入包被了 streptavidin 的多孔板中, 加入生物素标记的抗组蛋白抗体及过氧化物酶标记的抗 DNA 抗体, 振摇 2 h 后加入呈色剂, 呈色 15 min 后在酶标仪上以 405 nm 和 492 nm 双波长检测吸光度, 以其代表细胞裂解液中核小体的数量, 即 DNA 断裂的数量。

## 1.3 统计学处理

各组间数据经正态分布检验后, 以  $\bar{x}\pm s$  表示。除浓度-效应分析外, 组间比较用单因素方差分析。浓度-效应分析采用多因素方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 法, 取  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 凋亡的形态学

倒置相差显微镜: 正常生长的 RIN-m 细胞呈不规则的多边、多角形, 细胞有连接融合倾向, 胞浆内可见颗粒。棕榈酸孵育 24 h 后, 见细胞缩小、变圆, 细胞间连接融合明显减少, 胞浆内颗粒增多, 并有一部分细胞漂浮脱壁(图 1)。荧光显微镜: 正常细胞核 Hoechst 33342 染色浅淡, 核内结构清楚, 核膜光滑, 染色质分布均匀。凋亡细胞的 Hoechst 33342 染色明显增强, 胞核缩小, 核膜皱缩, 染色质凝聚、边缘化, 晚期染色质碎裂(图 2)。

### 2.2 流式细胞仪检测及 DNA 断裂的定量检测

正常对照组、凋亡对照组、甘精胰岛素组、普通胰岛素组、IGF-1 组的 subG1 细胞比率分别为  $(3.28\pm 1.44)\%$ 、 $(42.10\pm 4.24)\%$ 、 $(32.00\pm 3.08)\%$ 、 $(35.97\pm 3.14)\%$ 、 $(25.25\pm 1.66)\%$ , 多组比较  $F=43.67$ ,  $P<0.01$ , 经 Bonferroni 法行两两比较, 凋亡

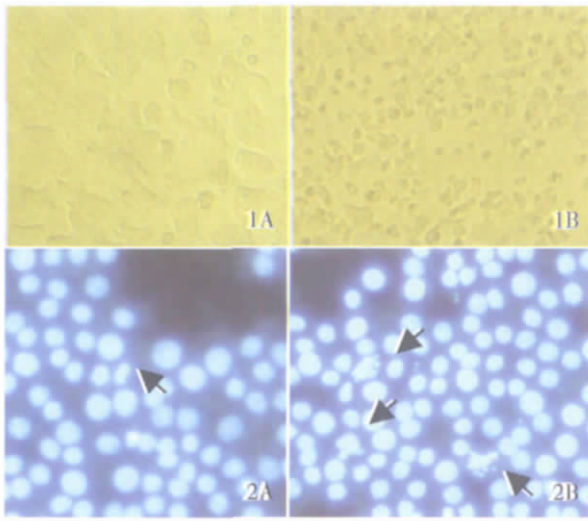


图1 倒置显微镜下RIN-m细胞图

图2 荧光显微镜下RIN-m细胞Hoechst33342染色

Fig.1 Morphological analysis of RIN-m cells under invert microscope

cultured for 24 h in the absence (A) or presence (B) of 0.3 mmol/L palmitic acid ( $\times 100$ )

Fig.2 Hoechst 33342 staining of RIN-m cells observed by fluorescence microscope

(A)cultured in normal medium; (B)cultured in 0.3 mmol/L palmitic acid for 24 h. The arrows refer to chromosome condensation and fragmentation of nuclei, which is characteristic of apoptotic cells

对照组、甘精胰岛素组、普通胰岛素组、IGF-1组明显高于正常对照组；甘精胰岛素组、普通胰岛素组、IGF-1组较凋亡对照组下降( $P < 0.01$ )。它们的DNA断裂的吸光度值分别为 $0.341 \pm 0.023$ 、 $3.333 \pm 0.230$ 、 $2.372 \pm 0.210$ 、 $2.758 \pm 0.200$ 、 $1.704 \pm 0.160$ ，多组比较 $F=99.918$ ， $P < 0.01$ ，经Bonferroni法行两两比较，各组间差别皆有统计学意义。凋亡对照组、甘精胰岛素组、普通胰岛素组、IGF-1组明显高于正常对照组；甘精胰岛素组、普通胰岛素组、IGF-1组的DNA断裂较凋亡对照组明显下降( $P < 0.01$ )，反映凋亡受到不同程度的抑制。甘精胰岛素组较普通胰岛素组低( $P < 0.05$ )。

### 2.3 抗凋亡作用的浓度-效应分析

G组在1~500 nmol/L浓度水平上，对凋亡的抑制作用均强于R组( $F=8.141$ ， $P < 0.05$ )；I组在以上各浓度水平上，对凋亡的抑制作用强于G组和R组( $F=42.36$ ， $P < 0.05$ ，图3)。

## 3 讨论

研究显示胰岛素抵抗及 $\beta$ 细胞功能缺陷是2

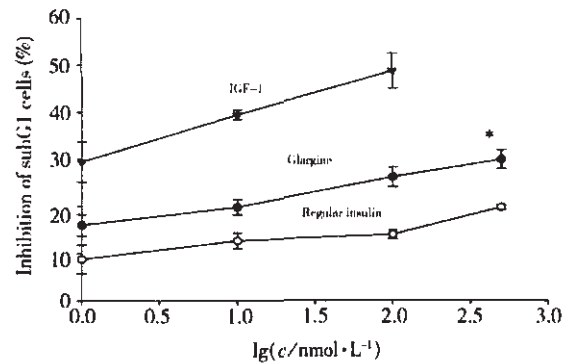


图3 Glargine,RI 以及 IGF-1 抗棕榈酸诱导的RIN-m细胞凋亡的浓度-效应曲线

Fig 3 Dose-dependent effect of glargine, RI, and IGF-1 on palmitic acid-induced SubG1 cells in RIN-m cells

Data were derived from 4-6 samples and expressed as inhibition ratio of palmitic acid-induced SubG1 cells in RIN-m cells. Inhibition ratio was calculated using the following formula: inhibition ratio = (SubG1 cells of C group - SubG1 cells of G or R or I group) / SubG1 cells of C group. Difference between the groups was analyzed by multivariate ANOVA. \*significantly different from the values of group Regular insulin and IGF-1 ( $P < 0.05$ )

型糖尿病(T2DM)发病的主要决定因素<sup>[4]</sup>。 $\beta$ 细胞功能缺陷的原因因为 $\beta$ 细胞总数的下降以及 $\beta$ 细胞分泌功能障碍<sup>[5]</sup>。对于T2DM， $\beta$ 细胞总数下降的原因主要是 $\beta$ 细胞凋亡而非新生 $\beta$ 细胞减少<sup>[6,7]</sup>。在T2DM的发生及发展中，FFA被证实是引起 $\beta$ 细胞凋亡的主要原因之一，FFA可能通过增加ROS(活性氧族)、诱导神经酰胺合成而使NF $\kappa$ B(核因子 $\kappa$ B)、JNK/MAPK(c-jun N-terminal kinase/mitogen activated protein kinase)、蛋白激酶C(PKC)激活，iNOS(inducible nitric-oxide synthase)表达增加，NO(一氧化氮)产生增多，并下调Bcl-2(为抗凋亡因子)等途径导致 $\beta$ 细胞凋亡<sup>[8-11]</sup>。

如能研制出既具有降血糖作用，又可减少 $\beta$ 细胞凋亡的药物，则对延缓糖尿病的病程以及防治糖尿病产生重要的影响。临床上至今尚未证明现有的降糖药物具有保护 $\beta$ 细胞不被破坏的作用。基因工程合成的胰岛素类似物为此提供了这种可能性。

虽然胰岛素类似物的代谢作用与天然胰岛素相似，但一级结构的改变仍可能影响其信号传导过程，从而改变全面的生物学效应。研究显示，胰岛素及其类似物与胰岛素受体的结合能力主要与代谢作用有关，另外也可介导增殖作用；与胰岛素受体解离的能力与增殖作用有关，如果与胰岛素受体的解离能力降低，胰岛素受体持续激活，增殖

作用将增强;与 IGF-1 受体结合能力是影响增殖作用的主要因素<sup>[12,13]</sup>。这些构效关系中的特点可以用于设计、合成、筛选对  $\beta$  细胞具有突出保护作用的胰岛素类似物。

本研究显示,甘精胰岛素(100 nmol/L)对游离脂肪酸所诱导的 RIN-m 细胞凋亡具有明显的保护作用,SubG1 细胞的比率及核小体的释放均明显下降。浓度-效应分析显示其对凋亡的抑制作用有明显的剂量依赖性,在浓度自 1 nmol/L 增加至 500 nmol/L 时,凋亡抑制率从  $16\% \pm 2.24\%$  增加到  $29.92\% \pm 2.02\%$ ,在各个浓度上,抑制率均明显大于普通胰岛素。其中 1 nmol/L 为胰岛素的生理浓度,也是甘精胰岛素的体内可达水平,提示其对  $\beta$  细胞的保护作用可能具有临床意义。

甘精胰岛素的结构是在天然胰岛素 B 链的羧基端第 31、32 位上添加 2 个精氨酸残基,并且在 A 链的第 21 位上以甘氨酸替代天冬酰胺。研究显示,B 链的羧基端第 31、32 位上添加 2 个精氨酸残基可使其与 IGF-1 受体结合能力增加约 20 倍,而 A 链的第 21 位上以甘氨酸替代天冬酰胺,可使这一结合能力下降约 2.6 倍,双重影响的结果,使甘精胰岛素与 IGF-1 受体结合能力较天然胰岛素增加了约 6.5 倍,其促进 Saos/B10 细胞(人骨肉瘤细胞系)增殖的能力比天然人胰岛素强 8 倍<sup>[1]</sup>。最近 Irini Rakatzi 等人进行了胰岛素类似物抗  $\beta$  细胞凋亡作用的研究,发现 Insulin Glulisin(LysB3, GluB29) 具有明显的抗细胞因子以及游离脂肪酸所诱导的 INS-1 细胞凋亡的作用,强于 Insulin Lispro (LysB28,ProB29)、Insulin Glulisin(AspB28) 和普通胰岛素<sup>[2]</sup>。Rakatzi 等人<sup>[2]</sup>的研究提示甘精胰岛素抗  $\beta$  细胞凋亡作用的机制与 IRSs(胰岛素受体底物)→PI3K(磷脂酰肌醇-3 激酶)→Akt/PKB(蛋白激酶 B)→BAD 磷酸化途径有关,但其他机制是否涉及则未研究。本实验亦属初步研究,对胰岛素类似物的  $\beta$  细胞的保护作用及其机理宜深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Kurtzhals P, Schaffer L, Sorensen A, *et al.* Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use [J]. *Diabetes*, 2000, 49(6):999-1005.
- [2] Rakatzi I, Seipke G, Eckel J. [LysB3,GluB29]insulin:a

novel insulin analog with enhanced  $\beta$  cell protective action [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310(3):852-59.

- [3] Zhou YP, Grill VE. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle[J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(2):870-76.
- [4] Gerich JE. Contributions of insulin-resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus [J]. *Mayo Clin Proc*, 2003, 78(4):447-56.
- [5] Kahn SE. The importance of the  $\beta$ -cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus [J]. *Am J Med*, 2000, 108(suppl 6a):2S-8S.
- [6] Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, *et al.* Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2003, 52(1):102-10.
- [7] Butler AE, Janson J, Soeller WC, *et al.* Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid [J]. *Diabetes*, 2003, 52(9):2304-14.
- [8] Mandrup-Poulsen T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(8):1433-40.
- [9] Robertson RP, Harmon J, Tran PO, *et al.*  $\beta$ -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2004, 53 (Suppl 1):S119 - 24.
- [10] Peruzzi F, Prisco M, Dews M, *et al.* Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic  $\beta$ -cells [J]. *J Cell Physiol*, 2002, 194 (1):1 - 12.
- [11] Lupi R, Dotta F, Marselli L, *et al.* Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that  $\beta$ -cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated [J]. *Diabetes*, 2002, 51(5):1437-42.
- [12] Vajo Z, Duckworth WC. genetically engineered insulin analogs: diabetes in the new millennium [J]. *Pharmacol Rev*, 2000, 52(1):1-9.
- [13] Kurtzhals P, Schaffer L, Sorensen A, *et al.* Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use [J]. *Diabetes*, 2000, 49(6):999-1005.

(编辑 张恩健)