

· 临床研究 ·

## $\alpha$ -生育酚对链脲菌素诱导乳鼠胰岛细胞凋亡的影响

郭 兵, 秦观海, 袁 英  
(重庆医药高等专科学校 400030)

**摘要:**目的 探讨  $\alpha$ -生育酚( $\alpha$ -T)对链脲菌素(STZ)所致胰岛细胞凋亡、氧化的影响。方法 用体外单层细胞培养方法培养存活 1~3 d Wistar 大鼠胰岛细胞,并随机分为 4 组,即对照组、 $\alpha$ -T 组、STZ 组、不同浓度  $\alpha$ -T 干预组。分组处理后荧光染色观察细胞形态,检测胰岛细胞凋亡率、胰岛素分泌、超氧化物歧化酶(SOD)及一氧化氮合酶(NOS)活性、丙二醛(MDA)及  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  含量变化等。结果 STZ 组基础及高糖刺激下胰岛素分泌量明显降低( $P < 0.05$ ),SOD 活性明显减弱( $P < 0.05$ );胰岛细胞凋亡率、MDA 及  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  水平明显上升( $P < 0.05$ ),而 NOS 活性变化不明显;荧光染色见发强荧光的凋亡细胞数明显增多。不同浓度(0.01~0.12 mmol/L) $\alpha$ -T 能有效抑制 STZ 所致胰岛素分泌量的下降,其抑制程度随  $\alpha$ -T 浓度增大而增强,呈剂量依赖趋势。终浓度为 0.08 mmol/L  $\alpha$ -T 能有效抑制 STZ 所致胰岛细胞凋亡、SOD 活性、MDA 及  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  水平的变化( $P < 0.05$ ),而对 NOS 活性无明显影响。结论  $\alpha$ -T 能够改善 STZ 诱导的胰岛细胞凋亡,其机制可能与增强胰岛细胞抗氧化能力有关。

**关键词:**  $\alpha$ -生育酚;链脲菌素;胰岛细胞;细胞凋亡;抗氧化能力

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.16.050

中图分类号:R365.587

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)16-2190-02

### Effects of $\alpha$ -tocopherol on streptozotocin-induced apoptosis of neonatal rat pancreatic cells

GUO Bing, QIN Guan-hai, YANG Ying

(Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the inhibition effect of  $\alpha$ -tocopherol on the apoptosis of isolated pancreatic islet cells, anti-oxidation competence induced by streptozotocin. **Methods** Pancreatic islet cells from Wistar rats of 1 to 3 days incubated in monolayer in vitro were divided into 4 groups. Then, the apoptotic cells were identified by Hoechst33258 fluorescence staining, and insulin secretion, apoptotic rate of islet cells, SOD activity, MDA levels, NOS activity and  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  production were measured by different detection methods. **Results** Streptozotocin induced a significant decrease in basal and high-sugar stimulated insulin release level, which was inhibited significantly by different concentrations of  $\alpha$ -tocopherol, and the inhibition effect of  $\alpha$ -tocopherol was shown in a concentration-dependent trend manner. Streptozotocin also induced a significant decrease of SOD activity ( $P < 0.05$ ), an increase in apoptotic rate of islet cells, MDA levels,  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  production ( $P < 0.05$ ) and apoptotic islet cells identified by Hoechst33258 fluorescence staining. These effects were inhibited significantly by the concentration of 0.08 mmol/L  $\alpha$ -tocopherol. Streptozotocin induced an indistinct change of NOS activity, that could not be blocked by  $\alpha$ -tocopherol. **Conclusion**  $\alpha$ -tocopherol can attenuate the streptozotocin-induced islet cells apoptosis, the mechanisms of which may be that  $\alpha$ -tocopherol can reinforce the anti-oxidation competence of islet cells.

**Key words:**  $\alpha$ -tocopherol; streptozotocin; pancreatic cells; apoptosis; anti-oxidation competence

维生素 E 是体内重要的抗氧化剂之一,不仅具有维持机体正常生命活动的重要作用,而且具有对抗多种细胞损伤的保护功能。近年来研究和实验结果都表明,维生素 E 具有保护胰岛细胞的作用,其缺乏将增加对 1、2 型糖尿病发生的易感性<sup>[1-2]</sup>。在维生素 E 的各种形式中  $\alpha$ -生育酚( $\alpha$ -tocopherol,  $\alpha$ -T)分布最广泛,含量最丰富,活性最高。本研究就  $\alpha$ -T 对链脲菌素(streptozotocin, STZ)诱导的胰岛细胞氧化和凋亡的影响及其作用机制作一探讨。

### 1 材料与方 法

**1.1 主要材料** RPMI-1640 培养液(美国 Gibco 公司)、胎牛血清(杭州四季青生物制剂公司)、链脲菌素及 V 型胶原酶(美国 Sigma 公司)、高  $\alpha$ -生育酚(核工业北京化工冶金研究院)、胰岛素放射免疫检测试剂盒(北京原子高科股份有限公司)、TUNEL 试剂盒(Roche 公司)、Hoechst33258 染色试剂盒(江苏碧云天生物科技公司)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、一氧化氮合酶(NOS)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)等。

**1.2 胰岛细胞分离与培养** 清洁级 Wistar 乳鼠,出生 1~3 d,由重庆医科大学实验动物中心提供。无菌取出胰腺,用 Hank's 液清洗后剪碎,转入盛有胶原酶溶液(1.0 g/L)的锥形瓶中,37 °C 恒温水浴手工振荡消化 8~10 min,4 °C、Hank's 液终止消化,200 目筛网过滤,离心,加入含 10% 胎牛血清、100 u/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液,置 5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C 孵箱内孵育。24 h 后换液,去除贴壁成纤维细胞。用 0.4% 台盼蓝染色,要求活细胞数大于 90%。再用上述培养液调整细胞数为  $1 \times 10^5/\text{L}$ ,接种于培养板,分组进行实验。

**1.3 胰岛细胞功能检测** 将分离、培养的胰岛细胞随机分为 4 组:(1)对照组不作任何干预处理;(2) $\alpha$ -T 组在培养液中加入  $\alpha$ -T(0.12 mmol/L);(3)STZ 组在培养液中加入 STZ(2.2 mmol/L);(4) $\alpha$ -T 干预 I、II、III、IV、V 组分别在培养液中加入 0.01、0.02、0.04、0.08、0.12 mmol/L  $\alpha$ -T 作用后,再加入 STZ(2.2 mmol/L)。 $\alpha$ -T 作用 24 h,STZ 作用 30 min。将处理完毕的各组细胞培养液离心收集上清液,用放射免疫法定量检

测基础胰岛素分泌量。在提取了上清液的各组细胞中加入含 20 mmol/L 葡萄糖培养液继续培养 1 h, 离心收集上清液, 用放射免疫法定量检测高糖刺激下胰岛素分泌量。操作步骤按照产品说明书进行。

**1.4 胰岛细胞凋亡检测** 根据以上检测结果确定  $\alpha$ -T 最佳保护浓度, 并在  $\alpha$ -T 组和  $\alpha$ -T 干预组中用此浓度处理, 检测以下指标。

**1.4.1 Hoechst33258 染色观察  $\beta$  细胞凋亡** 将各组细胞培养液离心, 用 0.5 mL 固定液重悬细胞沉淀, 4  $^{\circ}$ C 固定过夜, PBS 清洗重悬细胞后涂片, 滴加 Hoechst33258 染色液, 用抗荧光淬灭封片液封片, 在荧光显微镜下观察并摄像。

**1.4.2 TUNEL 法检测胰岛  $\beta$  细胞凋亡率** 将各组细胞培养液离心, 用 PBS 清洗重悬后制成细胞涂片, 采用 TUNEL 法标记凋亡细胞核中 DNA3'-OH 末端。凋亡细胞半定量分析: 镜下凋亡细胞核呈深浅不一的棕黄色颗粒状。每份样品在高倍镜下随机选取 10 个视野, 根据公式计算凋亡细胞百分率, 凋亡细胞百分率 = 凋亡细胞数 / 10 个视野中的细胞总数  $\times$  100%。

**1.5 SOD、MDA、NOS 及  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  检测** 将各组细胞培养液离心收集上清液, 按照各试剂盒说明书操作。

**1.6 统计学方法** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SAS8.2 统计软件进行统计分析, 采用方差分析、 $q$ (S-N-K 法) 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 胰岛素基础分泌量和高糖刺激下分泌量** STZ 组比对照组胰岛素基础分泌量及高糖刺激下胰岛素分泌量明显减少 ( $P < 0.05$ ); 各干预组比 STZ 组胰岛素水平明显回升 ( $P < 0.05$ ); 各干预组 (0.01、0.02、0.04、0.08 mmol/L) 之间胰岛素水平比较, 差异有统

计学意义 ( $P < 0.05$ ), 并呈剂量依赖趋势, 见表 1。

**2.2 Hoechst33258 染色观察胰岛细胞凋亡** 凋亡细胞对 Hoechst33258 摄取增高, 染色后呈明亮淡蓝色荧光。对照组和  $\alpha$ -T 组发光细胞数较少, 且荧光较暗。而 STZ 组发光细胞数明显增多 ( $P < 0.05$ ), 呈强荧光性。 $\alpha$ -T 干预组发光细胞数比对照组多 ( $P < 0.05$ ), 但比 STZ 组少 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。

**表 1 各组胰岛素基础分泌量和高糖刺激下胰岛素分泌量比较 ( $\mu\text{u/mL}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )**

组别	胰岛素基础分泌量	高糖刺激下胰岛素分泌量
对照组	186.78 $\pm$ 6.78	148.57 $\pm$ 7.48
$\alpha$ -T 组	178.42 $\pm$ 8.46	152.35 $\pm$ 6.43
STZ 组	64.59 $\pm$ 4.32 <sup>a</sup>	37.58 $\pm$ 4.26 <sup>a</sup>
$\alpha$ -T 干预 I 组	80.66 $\pm$ 5.25 <sup>bc</sup>	52.20 $\pm$ 4.55 <sup>bc</sup>
$\alpha$ -T 干预 II 组	92.47 $\pm$ 4.26 <sup>bc</sup>	69.06 $\pm$ 6.21 <sup>bc</sup>
$\alpha$ -T 干预 III 组	114.28 $\pm$ 6.42 <sup>bc</sup>	86.89 $\pm$ 8.37 <sup>bc</sup>
$\alpha$ -T 干预 IV 组	138.62 $\pm$ 7.15 <sup>bc</sup>	108.46 $\pm$ 5.72 <sup>bc</sup>
$\alpha$ -T 干预 V 组	126.74 $\pm$ 8.23 <sup>bcd</sup>	102.43 $\pm$ 7.63 <sup>bcd</sup>

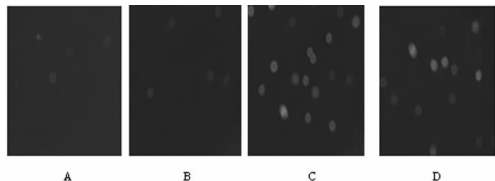
<sup>a</sup>: 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>: 与 STZ 组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>c</sup>: 各  $\alpha$ -T 干预组间比较,  $P < 0.05$ ; <sup>d</sup>: 与  $\alpha$ -T 干预 IV 组比较,  $P > 0.05$ 。

**2.3 胰岛细胞凋亡百分率、SOD、MDA、NOS 及  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  测定结果** 与对照组比较, STZ 组细胞凋亡率、MDA 及  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  含量明显升高, SOD 活性明显降低 ( $P < 0.05$ );  $\alpha$ -T 干预组细胞凋亡率、SOD 活性、MDA 及  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  含量虽未恢复到对照组水平, 但其下降或上升程度与 STZ 组比较, 出现明显抑制现象 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

**表 2 各组胰岛细胞凋亡率、SOD、NOS 活性及 MDA、 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	细胞凋亡率 (%)	SOD(u/mL)	MDA(nmol/mL)	NOS(u/mL)	$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (nmol/mL)
对照组	6.14 $\pm$ 0.56	23.14 $\pm$ 3.22	35.39 $\pm$ 2.46	7.68 $\pm$ 0.52	50.44 $\pm$ 8.62
$\alpha$ -T 组	5.72 $\pm$ 0.44	24.21 $\pm$ 1.32	35.13 $\pm$ 2.73	7.42 $\pm$ 0.73	48.65 $\pm$ 6.37
STZ 组	32.18 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>	3.45 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	148.66 $\pm$ 7.42 <sup>a</sup>	8.04 $\pm$ 1.54	247.52 $\pm$ 15.03 <sup>a</sup>
$\alpha$ -T 干预组	17.36 $\pm$ 1.08 <sup>b</sup>	16.37 $\pm$ 2.35 <sup>b</sup>	68.47 $\pm$ 2.95 <sup>b</sup>	8.22 $\pm$ 0.76	108.26 $\pm$ 11.57 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>: 与 STZ 组比较,  $P < 0.05$ 。



A: 对照组; B:  $\alpha$ -T 组; C: STZ 组; D:  $\alpha$ -T 干预组。

**图 1 胰岛细胞 Hoechst33258 免疫荧光染色结果 ( $\times 400$ )**

**3 讨论**

1 型糖尿病是以胰岛  $\beta$  细胞选择性破坏, 在病理学上表现为  $\beta$  细胞凋亡的内分泌疾病。STZ 可选择性破坏胰岛  $\beta$  细胞<sup>[3]</sup>。以往研究发现, STZ 对小鼠胰岛  $\beta$  细胞有毒性作用, 大剂量 STZ 作用以细胞坏死为主, 小剂量 STZ 作用以细胞凋亡占据主导地位。本实验采用低浓度 STZ 与离体大鼠胰岛细胞共同培养, 发现  $\beta$  细胞分泌功能明显受到抑制, STZ 组胰岛素水平与对照组相比明显下降, 同时细胞凋亡率明显上升; 应用荧光染色也观察到, STZ 损伤时细胞发明亮淡蓝色强荧光, 表

明具有明显凋亡特征。多项研究表明, 胰岛细胞凋亡与氧自由基密切相关。体内自由基产生过多或清除障碍均能造成细胞损伤, 其介导机制可能与使生物膜脂质过氧化反应增强等有关<sup>[4]</sup>。SOD 是存在于体内的一种重要的金属酶, 能阻断自由基引发的一系列连锁反应, 其活力的高低反映了抗自由基的能力。MDA 是氧自由基作用于生物膜中多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化的主要代谢产物, 能促使蛋白质合成能力下降或合成功能紊乱, 其值的高低反应了受自由基攻击的程度。本研究结果显示, 加入 STZ 后培养液中 SOD 活性较对照组明显降低, MDA、 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  水平明显升高, 提示 STZ 可能通过抑制 SOD 的活力, 导致自由基清除障碍, 引发胰岛  $\beta$  细胞生物膜脂质过氧化; 而过量的  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  也可能参与了 STZ 的细胞损伤机制, 但 STZ 组中 NOS 的活性较对照组无明显变化, 说明 NOS 活性变化可能与 STZ 介导的胰岛  $\beta$  细胞损伤无关, 与本课题组前期研究结果一致<sup>[5]</sup>。

$\alpha$ -T 是生物体内最重要的自由基清除剂之一, 其色原烷醇环上含有羟基, 具有还原性, 极易与氧分子及(下转第 2193 页)

### 3 讨 论

VAP 是医院获得性肺炎中最常见、最严重的,随着机械通气技术的迅速发展,机械通气患者增多,VAP 也逐渐增多,发生率为 9%~70%<sup>[4]</sup>,死亡率高达 33%~71%。VAP 发生率与机械通气时间成正比,机械通气时间越长,发生 VAP 的概率越大。张亚莉等<sup>[5]</sup>报道机械通气增加 1 d,VAP 发生率增加 1%~3%,如通气时间小于 1 周,VAP 发生率为 20.9%,机械通气时间 1~2 周,VAP 发生率达 73.68%,>3 周者,VAP 发生率为 83.33%。

VAP 发病机制与多种因素有关,常见致病因素有:(1)气管插管及气管切开后破坏了上呼吸道屏障,减弱了纤毛的清除及咳嗽反射,增加了将口咽部细菌直接种植于呼吸道的机会,且机械通气患者声门下与支气管气囊之间的间隙积液存留流入下呼吸道引起 VAP。(2)胃肠道细菌的误吸。一般 VAP 患者因应用制酸剂导致胃酸 pH 升高,pH 超过 4,则胃内细菌过度增殖;同时患者需长时间留置胃管行肠内营养,从而减弱食管下段括约肌功能,增加了胃食管反流及误吸的机会。(3)呼吸机管道的管理不当。含有液体的装置易引起细菌在水中大量繁殖,通过呼吸机管道直接引流微生物在下呼吸道种植,并发 VAP。(4)广谱抗菌物及激素的不合理应用,导致菌群失调,且机械通气患者常因免疫力下降,增加了 VAP 发生机会。

在 VAP 病例中常见病原菌以革兰阴性杆菌为主,革兰阳性球菌次之,再次为真菌。王美霞等<sup>[6]</sup>报道,VAP 病原菌革兰阴性杆菌占 77.2%,常见菌为铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、大肠杆菌等;革兰阳性球菌占 17.7%,主要为金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌等;真菌占 5.79%。本组病原菌种类与该研究一致,抗菌物中以  $\beta$ -内酰胺类对病原菌有较好作用。

VAP 患者病情重,初始治疗尤为关键,因 VAP 相关死亡率更依赖于最初抗菌药治疗的准确性。治疗原则应是早期、联合、足量应用抗菌药。一旦考虑为 VAP 疑似病例,应立即采集下呼吸道分泌物进行细菌培养及药敏试验,同时采取“猛击”

策略全面覆盖,特别要兼顾对 VAP 常见病原菌的联合覆盖。一旦获得细菌学诊断后,再改以敏感抗菌药治疗。

加强对 VAP 的预防,能有效降低 VAP 发生率:(1)严格执行消毒隔离及无菌操作技术,防止交叉感染,工作人员须有效洗手消毒,严格无菌操作,呼吸机管道要加强消毒灭菌,对监护室及医疗设备要及时消毒。(2)缩短机械通气时间。只要患者病情符合拔管条件,应尽快拔管以缩短机械通气时间,减少感染机会。(3)应用胃黏膜保护剂替代制酸剂或  $H_2$  受体阻滞剂,降低胃液 pH 值。(4)加强重症患者的营养支持,增强机体免疫力。(5)对声门下与支气管气囊之间的积液进行引流,防止积液进入下呼吸道。(6)体位设置。将患者上半身抬高 30°~45°,可减少胃食管反流和误吸的发生,降低 VAP 的发生。

总之,对机械通气患者采取积极有效的预防,同时早期诊断,及时有效的抗菌药和全身综合治疗,才能有效控制和减少 VAP 的发生率,降低死亡率。

### 参考文献:

- [1] 汪洪. 呼吸机相关肺炎研究现状[J]. 实用医院临床杂志, 2007,4(1):84.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会. 医院获得性肺炎诊断和治疗指南(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志,1999,22(4):201.
- [3] 殷少军,瞿介明. 呼吸机相关肺炎抗生素治疗策略[J]. 中华结核和呼吸杂志,2001,24(6):329.
- [4] Bauer TT, Ferrer R, Angrill J, et al. Ventilator-associated pneumonia: incidence, risk factor and microbiology[J]. *Semin Respir Infect*, 2002,15(4):272.
- [5] 张亚莉,耿穗娜,王能平,等. 呼吸机相关肺炎临床与病原菌特点分析[J]. 中华医院感染学杂志,2000,23(4):166.
- [6] 王美霞,刘虹,郝小林,等. 呼吸机相关肺炎病原学及耐药性分析[J]. 中国药物与临床,2006,6(1):72.

(收稿日期:2010-02-13 修回日期:2010-04-13)

(上接第 2191 页)

自由基结合。通过自身被氧化成生育醌,从而将  $ROO^-$  转变为化学性质不活泼的  $ROOH$ , 阻断生物膜内黄嘌呤氧化酶(XO)反应链,抑制脂质过氧化反应的启动和链传递,保护细胞结构免于氧化损伤<sup>[6]</sup>。在本实验条件下,分离培养的胰岛细胞经不同浓度  $\alpha$ -T 预先作用后再加入 STZ,基础和ator 高糖刺激下胰岛素分泌量减少的程度明显降低,并且变化程度随药物浓度的增加而增大,提示  $\alpha$ -T 对胰岛功能的保护作用呈剂量依赖趋势。预先加入  $\alpha$ -T 作用后,胰岛细胞凋亡率及荧光染色中具有发强荧光凋亡特征的细胞数明显减少,提示  $\alpha$ -T 能有效抑制 STZ 诱导的胰岛细胞凋亡。 $\alpha$ -T 干预组较 STZ 组培养液中 SOD 活性明显增加,MDA、 $NO_2^-/NO_3^-$  水平明显降低,提示  $\alpha$ -T 可能通过增强细胞抗氧化性及清除自由基能力,减少脂质过氧化损伤,从而对抗诸如 STZ 等外源性损伤因子引起的胰岛细胞凋亡,发挥细胞保护功能。

### 参考文献:

- [1] Lako JV, Nguyen VC. Dietary patterns and risk factors of

diabetes mellitus among urban indigenous women in Fiji [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2001,10:188.

- [2] 张桂珍,崔亚男,薄立华,等. 硒和维生素 E 对大鼠糖尿病异感性的影响[J]. 营养学报,2001,23(2):110.
- [3] Gunther L, Liu X, Neef H, et al. Glucagon expression shift in a syngeneic single-donor in trahepatic rat islet transplantation model[J]. *Transplant Proc*, 2005,8:3487.
- [4] Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, et al. Oxidative stress and cell signaling[J]. *Curr Med Chem*, 2004,11:1163.
- [5] 余华荣,张能. 牛磺酸对 STZ 诱导大鼠胰岛细胞凋亡及 BCL-xL 和 BAX 表达变化的影响[J]. 基础医学与临床, 2006,26(6):613.
- [6] Kapelusiak-Pielok M, Adamczewska-Goncarzewicz Z, Dorszewska J, et al. The protective action of alpha-tocopherol on the white matter lipids during moderate hypoxia in rats[J]. *Folia Neuropathol*, 2005,2:103.

(收稿日期:2010-02-13 修回日期:2010-04-13)