

论著·基础研究      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.01.011

八肽胆囊收缩素对游离脂肪酸损伤胰岛β细胞氧化应激的影响\*

魏立民,章冬梅,何学峰,吕秀芹,刘娜  
(河北省人民医院内分泌科,石家庄 050051)

**[摘要]** **目的** 观察八肽胆囊收缩素(CCK-8)对游离脂肪酸(FFAs)损伤的小鼠胰岛β细胞(本文为 NIT-1 细胞株)氧化应激及细胞增殖的影响,探讨 CCK-8 对胰岛β细胞保护作用的机制。**方法** 将培养良好的 NIT-1 细胞分为对照组、FFAs 组(加入 0.25 mmol/L 油酸+0.25 mmol/L 软脂酸)、CCK-8 组(FFAs 组基础上同时加入  $1\times 10^{-8}$  mmol/L CCK-8),分别培养 48 h 和 72 h,观察细胞生长状态,MTT 比色法检测细胞增殖能力,流式细胞仪检测细胞凋亡率,检测细胞培养上清液总抗氧化能力(T-AOC),谷胱甘肽还原酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)活性。**结果** FFAs 组显微镜下可见较多细胞碎片,CCK-8 组细胞碎片明显减少;与 FFAs 组比较,48 h 和 72 h CCK-8 组的光密度( $OD_{570}$ )值显著增高(均  $P<0.01$ ),与 CCK-8 处理 48 h 比较,72 h 组  $OD_{570}$  值明显增高( $P<0.01$ );与 FFAs 组比较,CCK-8 组细胞上清液 CAT、T-AOC、SOD 及 GSH-Px 活性均明显增高,MDA 含量降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );72 h CCK-8 组较 48 h 组 CAT、SOD 活性增加,MDA 含量降低。**结论** CCK-8 对 FFAs 损伤的胰岛β细胞具有一定的抗氧化应激作用,同时 CCK-8 能够显著刺激 NIT-1 细胞的增殖。

**[关键词]** 胆囊收缩素;胰岛分泌细胞;氧化性应激;细胞增殖;脂肪酸类,非酯化

**[中图分类号]** R589.1      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2016)01-0030-03

The influence of cholecystokinin-octapeptide on oxidative stress in islet beta cells injured by free fat acids\*

Wei Limin, Zhang Dongmei, He Xuefeng, Lv Xiuqin, Liu Na

(Department of Endocrinology, General Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of cholecystokinin-octapeptide(CCK-8) on oxidative stress and cell proliferation in mice islet β cells (NIT-1 cells) injured by high concentration free fat acids. **Methods** In vitro cultured NIT-1 cells were divided into 3 groups, they were control group, FFAs group (add 0.25 mmol/mL of oleic acid+0.25 mmol/mL of palmitic acid) and CCK-8 group (add FFAs and  $1\times 10^{-8}$  mmol/L of CCK-8 simultaneously). Cell morphologies were observed; NIT-1 cells proliferations were detected by MTT method, and apoptosis rates were measured by flow cytometry; The levels of T-AOC, GSH-Px, CAT, SOD and MDA in supernatant were also measured. **Results** There were less cell debris in CCK-8 group than FFAs group (all  $P<0.01$ ); the  $OD_{570}$  value of CCK-8 group was significant higher than FFAs group ( $P<0.01$ ), and the 72 h CCK-8 group was higher than 48 h CCK-8 group ( $P<0.01$ ). Compared with FFAs group, the levels of CAT, T-AOC, SOD and GSH-Px in CCK-8 group were increased and the concentration of MDA was decreased obviously ( $P<0.05$ ), the levels of CAT, SOD in 72 h CCK-8 group were higher than 48 h CCK-8 group, MDA was lower than 48 h CCK-8 group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** CCK-8 could protect islet β cells injury from FFAs through anti-oxidative stress mechanism and promote NIT-1 cells proliferation.

**[Key words]** cholecystokinin; insulin-secreting cells; oxidative stress; cell proliferation; fatty Acids, nonesterified

糖尿病是严重影响人类健康的一种内分泌紊乱,其发病率在发展中国家增长迅速,并且在未来的 20 年仍将持续增加。以往的研究表明,血糖代谢紊乱时通常伴随着活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生过量导致的氧化应激,这种应激表现为机体氧化和抗氧化系统间的失衡,在胰岛β细胞功能的衰退中起着重要的作用<sup>[1]</sup>。因此,通过抗氧化机制保护胰岛β细胞功能也是糖尿病治疗的策略之一。胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)是由小肠黏膜 I 细胞释放的一种肽类激素,8 肽胆囊收缩素(CCK-8)为其主要形式。以往的研究表明,CCK 具有刺激胰岛素分泌、抑制胰岛β细胞凋亡等作用,具有对损伤后胰岛β细胞的保护作用,但还没有研究表明这种作用是否存

在抗氧化应激机制。本研究旨在观察 CCK-8 对游离脂肪酸(FFAs)损伤的小鼠胰岛β细胞(本文为 NIT-1 细胞株)氧化应激及细胞增殖能力的影响。

1 材料与方法

**1.1 材料** NIT-1 细胞为本实验室保存。油酸、软脂酸、CCK-8 均购自美国 Sigma 公司。总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽还原酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)活性检测试剂盒购自南京建成生物工程公司。其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

**1.2.1 NIT-1 细胞培养** 采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高

\* 基金项目:河北省科技厅科技支撑计划项目(12276104D-86)。      作者简介:魏立民(1967—),主任医师,博士,主要从事胰岛细胞的损伤与保护研究。

糖培养基,将培养至对数生长期的 NIT-1 细胞用胰酶消化成单细胞悬液,以  $2\times 10^4$  的密度接种于 96 孔培养板中,换用含有 5% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,于 95% 空气、5%  $\text{CO}_2$ 、37℃、饱和湿度条件下培养。

**1.2.2 分组** 将培养至贴壁良好的 NIT-1 细胞分为对照组、FFAs 组(加入 0.25 mmol/L 油酸+0.25 mmol/L 软脂酸)、CCK-8 组(FFAs 组基础上同时加入  $1\times 10^{-8}$  mmol/L CCK-8)。37℃、5%  $\text{CO}_2$  条件下分别培养 48 h 和 72 h,观察各组细胞生长状态,并留取上清液待测。

**1.2.3 MTT 比色法检测细胞增殖能力** 处理好的细胞,每孔加 5 mmol/L 的 MTT 液 20  $\mu\text{L}$  稍摇匀后继续培养 4 h,弃培养液,各孔加 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砷,振荡器上振荡 10 min,然后置于酶标仪中测 570 nm 波长的光密度(OD)值,结果以 OD 值表示。

**1.2.4 细胞凋亡率的测定** 消化贴壁细胞,离心、回收细胞,用 Hank's 液洗 1~2 次,将细胞以 70% 乙醇 4℃ 固定 12 h 以上。再用 Hank's 液洗 2 次后,悬浮于 0.5 mL Hank's 液中。加 Rnase A(终浓度 100 mg/L),37℃ 温育 30 min。加入 PI(终浓度 50 mg/L),4℃ 避光染色 45 min 后,300 目尼龙网过滤。上流式细胞仪分析细胞凋亡率。

**1.2.5 氧化应激指标的测定** T-AOC、GSH-Px、CAT、SOD 及 MDA 活性,均应用上清液标本进行检测,测定方法:T-AOC 采用还原法;GSH-Px 采用二硫代二硝基苯甲酸法;CAT 采用分光光度法;SOD 采用 WST 法;MDA 采用硫代巴比妥酸比色法(TBA 法)。试剂盒由专人按说明要求进行检测,T-AOC、GSH-Px、CAT、SOD 酶活性及 MDA 测定试剂批内及批间变异系数分别为 5.7% 和 7.0%、3.7% 和 9.3%、4.1% 和 7.9%、3.2% 和 3.7%。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,各组资料经方差齐性检验后,组间比较采用单因素方差分析,进一步的两两比较采用 LSD-*t* 检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 NIT-1 细胞生长状态观察** 对照组细胞生长状态良好,

FFAs 组细胞培养基内浑浊,显微镜下观察可见较多细胞碎片,CCK-8 组培养基内细胞碎片明显减少。

**2.2 CCK-8 对 NIT-1 胰岛  $\beta$  细胞增殖的影响** MTT 检测结果显示,与 FFAs 相比,48 h 和 72 h CCK-8 组的  $OD_{570}$  值显著增高(均  $P<0.01$ );CCK-8 组处理 48 h 与 72 h 比较, $OD_{570}$  值明显增高( $P<0.01$ )。见表 1。

表 1 CCK-8 对胰岛素  $\beta$  细胞增殖的影响  
( $\bar{x}\pm s$ )

组别	48 h $OD_{570}$ 值	72 h $OD_{570}$ 值
对照组	0.42 $\pm$ 0.05	0.52 $\pm$ 0.06
FFAs 组	0.21 $\pm$ 0.03	0.25 $\pm$ 0.04
CCK-8 组	0.33 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与对照组和 FFAs 组比较;<sup>b</sup>: $P<0.01$ ,与 48 h 比较。

**2.3 CCK-8 对 NIT-1 胰岛  $\beta$  细胞凋亡的影响** 遗传物质 DNA 变化发现,在正常 2 倍体 DNA 峰前均出现 DNA 碎片峰,即凋亡峰。FFAs 处理组的细胞凋亡率明显增加(均  $P<0.01$ );加入 CCK-8 的 NIT-1 细胞凋亡率较 FFAs 组明显降低( $P<0.01$ )。见表 2。

**2.4 氧化应激及抗氧化应激指标** 与 FFAs 组比较,经 CCK-8 处理 48 h 及 72 h 后细胞上清液 CAT、T-AOC、SOD 及 GSH-Px 活性均明显增高,MDA 含量降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );72 h CCK-8 组较 48 h CAT、SOD 活性增加,MDA 含量明显降低,其余指标变化不明显。见表 3。

表 2 CCK-8 对 NIT-1 胰岛素  $\beta$  细胞凋亡的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	48 h	72 h
对照组	1.22 $\pm$ 0.33	1.48 $\pm$ 0.28
FFAs 组	5.27 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	7.81 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>
CCK-8 组	2.83 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>	3.11 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>: $P<0.01$ ,与 FFAs 组比较。

表 3 CCK-8 对氧化应激指标的影响( $\bar{x}\pm s$ ,U/mL)

组别	CAT		T-AOC		SOD	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
对照组	1.51 $\pm$ 0.16	1.55 $\pm$ 0.17	5.12 $\pm$ 0.54	5.35 $\pm$ 0.73	19.32 $\pm$ 1.34	19.82 $\pm$ 1.50
FFAs 组	0.41 $\pm$ 0.05	0.43 $\pm$ 0.06	3.67 $\pm$ 0.34	3.51 $\pm$ 0.29	14.18 $\pm$ 1.09	13.74 $\pm$ 1.15
CCK-8 组	1.22 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	1.46 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	4.20 $\pm$ 0.62 <sup>c</sup>	4.32 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	16.08 $\pm$ 1.85 <sup>a</sup>	18.02 $\pm$ 1.55 <sup>ad</sup>

续表 2 CCK-8 对氧化应激指标的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	GSH-Px(U/mL)		MDA(mmol/mL)	
	48 h	72 h	48 h	72 h
对照组	15.71 $\pm$ 1.32	14.66 $\pm$ 1.64	4.40 $\pm$ 0.60	4.35 $\pm$ 0.59
FFAs 组	9.30 $\pm$ 0.73	9.05 $\pm$ 1.02	8.74 $\pm$ 0.88	8.28 $\pm$ 0.84
CCK-8 组	12.22 $\pm$ 1.56 <sup>a</sup>	12.38 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup>	6.10 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	5.49 $\pm$ 0.69 <sup>ad</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,<sup>c</sup>: $P<0.05$ ,与 FFAs 组比较;<sup>b</sup>: $P<0.01$ ,<sup>d</sup>: $P<0.05$ ,与 48 h 比较。

3 讨 论

糖尿病是一种严重的内分泌代谢紊乱性疾病,其特点是慢性高血糖和糖脂代谢、蛋白质代谢异常,糖尿病发病的主要病理生理机制为胰岛素分泌不足和胰岛素抵抗。研究表明,氧化应激是引起 2 型糖尿病发生、发展的重要因素,而高血糖是产生氧化应激的主要原因<sup>[2]</sup>。氧化应激会造成机体组织细胞及蛋白和核酸等生物大分子损伤<sup>[1,3]</sup>。氧化应激的产生可直接损伤 β 细胞,特别是破坏细胞线粒体结构,促进 β 细胞凋亡;同时还可通过影响胰岛素信号转导通路间接抑制 β 细胞功能,如激活核转录因子 κB(NF-κB) 信号通路,引起 β 细胞炎性反应;抑制胰十二指肠同源盒因子 1 (PDX-1) 的核质易位,抑制线粒体能量代谢,减少胰岛素合成与分泌<sup>[4]</sup>。SOD 为机体主要的自由基清除酶之一,糖代谢异常导致内源性氧自由基清除剂 SOD 下降,同时 SOD 合成减少,氧自由基清除不足,反过来又进一步抑制 SOD 的活性。SOD 活性下降引发脂质过氧化物在金属离子存在下催化裂解产生 MDA,MDA 对细胞有毒性作用,可与蛋白质分子内和分子间交联,诱发细胞凋亡<sup>[5]</sup>。氧化及抗氧化系统之间的失衡最终会导致胰岛 β 细胞的损伤及凋亡。此外,β 细胞抗氧化防御酶如 SOD、CAT 等水平较低,对自由基导致的损伤非常敏感也是其容易受损的原因之一。因此,避免胰岛 β 细胞的氧化应激损伤记忆,增加胰岛素分泌可能是糖尿病治疗中一个重要的方面。FFAs 在糖尿病及其并发症的发生、发展过程中起着重要的作用,其可导致糖代谢异常及胰岛素抵抗,FFAs 还可以通过炎症、氧化应激等机制导致胰岛 β 细胞的损伤<sup>[6]</sup>。

本研究结果显示,CCK-8 与胰岛 β 细胞共同孵育后可显著降低 FFAs 诱导的氧化应激因子 MDA 的水平,提高抗氧化应激防御酶 SOD、CAT、T-AOC 及 GSH-Px 的水平。本研究也第 1 次证实 CCK-8 对游离脂肪酸损伤的胰岛 β 细胞有一定的抗氧化应激作用。以往有研究报道,给予内毒素休克大鼠模型 CCK-8 干预,结果发现 SOD 水平在大鼠血中增加<sup>[7]</sup>;另一项研究表明 CCK-8 可呈剂量依赖性抑制过氧亚硝基阴离子诱导的色素上皮细胞的氧化应激,同时也显著减少了色素上皮细胞的凋亡<sup>[8]</sup>。郝丽娜等<sup>[9]</sup>应用腹腔注射链尿佐菌素制作大鼠糖尿病模型,并给予 CCK-8 治疗,结果显示 CCK-8 可明显减轻晶状体损伤,其机制可能与抑制 iNOS 基因表达、减少 NO 生成有关。这些研究均表明 CCK-8 具有一定的抗氧化作用。

CCK-8 是一种典型的脑肠肽,为 CCK 的主要形式,具备天然 CCK 的全部生物学活性,通过细胞表面 CCK 受体在中枢、外周神经系统及消化系统发挥着多方面调节作用。有研究表明 CCK-8 具有刺激胰岛 β 细胞增殖,抑制胰岛细胞凋亡及增加胰岛素的作用<sup>[10-11]</sup>。与此结果类似,本研究也提示 CCK-

8 能够刺激胰岛细胞的增殖,同时具有减少由 FFAs 诱导的细胞凋亡的作用。CCK-8 是否通过抗氧化应激途径或其他机制刺激了胰岛细胞的增殖尚无结论。

总之,本研究结果表明,CCK-8 对 FFAs 损伤的胰岛 β 细胞具有一定的抗氧化应激作用,同时 CCK-8 能够显著刺激 NIT-1 细胞的增殖,抑制由 FFAs 诱导的细胞凋亡的作用,本文结果对胰岛 β 细胞损伤的保护研究具有一定的帮助。

参考文献

[1] Ahangarpour A, Heidari H, Mard SA, et al. Progesterone and cilostazol protect mice pancreatic islets from oxidative stress induced by Hydrogen peroxide[J]. Iran J Pharm Res, 2014, 13(3): 937-944.

[2] Fardoun RZ. The use of vitamin E in type 2 diabetes mellitus[J]. Clin Exp Hypertens, 2007, 29(3): 135-148.

[3] Reddy VP, Zhu X, Perry G, et al. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2009, 16(4): 763-774.

[4] 任春久, 张瑶, 崔为正, 等. 氧化应激在 2 型糖尿病发病机制中的作用研究进展[J]. 生理学报, 2013, 65(6): 664-673.

[5] Stanton RC. Oxidative stress and diabetic kidney disease [J]. Curr Diab Rep, 2011, 11(4): 330-336.

[6] Watterson KR, Hudson BD, Ulven T, et al. Treatment of type 2 diabetes by free Fatty Acid receptor agonists[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2014, 5(5): 137.

[7] 凌亦凌, 黄善生, 张君岚, 等. 胆囊收缩素对内毒素性休克大鼠 SOD、MDA 及吞噬细胞发光的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1997, 13(5): 33-36.

[8] Liu Y, Zhang Y, Gu Z, et al. Cholecystokinin octapeptide antagonizes apoptosis in human retinal pigment epithelial cells[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(14): 1402-1408.

[9] 郝丽娜, 王秋红, 凌亦凌, 等. 八肽胆囊收缩素对大鼠糖尿病性白内障的影响[J]. 基础医学与临床, 2005, 25(7): 648-652.

[10] Gj D. Cholecystokinin[J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2012, 19(1): 8-12.

[11] 魏立民, 李海英, 朱铁年, 等. 八肽胆囊收缩素对游离脂肪酸损伤的胰岛 β 细胞的保护作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(8): 49-51.

(收稿日期: 2015-06-12 修回日期: 2015-09-18)

《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号: ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读作者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读作者免费订阅。读作者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“Chongqing Medicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。