

• 基础研究 •

同型半胱氨酸对 NIT-1 细胞凋亡及细胞内 SOD 活性的影响

张耀 陆菊明 谷伟军 杨国庆 张雪莲 母义明 窦京涛 汪保安 潘长玉

【摘要】 目的 探讨同型半胱氨酸(Hcy)对克隆的胰岛β细胞 NIT-1 细胞株的存活率和凋亡的影响,以及对细胞内超氧化物歧化酶(SOD)的影响。方法 将不同浓度的 Hcy 作用于 NIT-1 细胞后,用 MTT 的方法检测细胞生存率;用流式细胞仪 Annexin V/PI 双染色法和琼脂糖凝胶电泳检测不同浓度的 Hcy 作用不同时间对 NIT-1 细胞凋亡的影响;用黄嘌呤氧化酶法和 WST 结合的方法检测 Hcy 作用后的 NIT-1 细胞内 SOD 的活性。结果 Hcy 以时间、剂量依赖性的方式抑制 NIT-1 细胞的存活率($P < 0.01$)。Hcy 可诱导 NIT-1 细胞的凋亡,随作用时间的延长和 Hcy 浓度增加 NIT-1 细胞的凋亡率逐渐增加,浓度为 100 μmol/L 的 Hcy 作用 24 h 细胞凋亡明显增加,凋亡率为 7.21% ($P < 0.01$),250 μmol/L 的 Hcy 作用 12 h 后细胞凋亡率达 8.91% ($P < 0.01$)。100 μmol/L 的 Hcy 作用 24 h 后 NIT-1 细胞内 SOD 活性较正常组细胞下降 20.2% ($P < 0.01$)。结论 Hcy 可抑制 NIT-1 细胞的存活率,并以时间和剂量依赖性的方式诱导细胞凋亡;这些有害作用可能是通过抑制细胞内的 SOD 的活性而发挥作用,为研究保护胰岛细胞功能提供一种新的思路。

【关键词】 同型半胱氨酸; 凋亡; 超氧化物歧化酶

Effects of homocysteine on apoptosis and SOD activity of NIT-1 cells

ZHANG Yao, LU Juming, GU Weijun, et al

Department of Endocrinology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To study the possible effect of homocysteine on apoptosis and superoxide dismutase (SOD) activity in cells of NIT-1 cell line, which is a mouse pancreatic beta-cell line derived from a transgenic NOD/Lt mouse. Methods NIT-1 cells were cultured in the culture medium containing 5.6mmol/L glucose. Homocysteine at various concentrations was added to the culture medium according to a time schedule. The cell viability was determined by MTT colorimetric assay. The apoptosis of NIT-1 cells was evaluated by flow cytometry Annexin V/PI double staining method and electrophoresis on agarose gel. The SOD activity in NIT-1 cells was also assayed. Results

In comparison with that in the control group, the cell viability was inhibited by homocysteine in a time- and concentration-dependent manner. Both Annexin V/PI FACS and electrophoresis analysis on agarose gel indicated that cell apoptosis could be induced by homocysteine in a time- and concentration-dependent manner. In comparison with the control group, intra-cellular SOD activity significantly declined as the concentration of homocysteine increased to 100 μmol/L ($P < 0.01$). Conclusion Homocysteine can inhibit the cell viability and induce cell apoptosis of NIT-1 cells in a time- and dose-dependent manner. These detrimental effects may be effectuated through inhibiting SOD activity in the cells. This provides a new thought for studying protection of pancreatic islet cell function.

【Key words】 homocysteine; apoptosis; superoxide dismutase

研究表明,高同型半胱氨酸血症是血管疾病的独立危险因素,也是增加 2 型糖尿病死亡率的重要因素。笔者前期的研究也显示,同型半胱氨酸(ho-

mocysteine, Hcy)水平与 2 型糖尿病微血管并发症的发生发展相关;Hcy 的中间代谢产物同型半胱氨酸硫内酯(homocystein thiolactone, HcyT)可通过细胞内反应性氧类(reactive oxygen species, ROS)诱导内皮细胞凋亡^[1,2]。

β细胞凋亡在糖尿病发病机制中的作用已日益受到人们的关注,许多研究显示,胰腺的β细胞长期暴露于高糖和高脂的环境中均会导致胰岛β细胞功

收稿日期:2007-09-27

作者单位:100853 北京市,解放军总医院内分泌科

作者简介:张耀,女,1979年1月生,河北省保定市人,在读博士研究生

通讯作者:陆菊明, Tel.:010-66939881, E-mail: lujm@medmail.com.cn

能的损伤,甚至会引起细胞凋亡,但有关高 Hcy 对 β 细胞产生的可能影响的研究甚少。本研究应用一种转基因来源的小鼠 β 细胞系 NIT-1 细胞,通过观察 Hcy 对细胞生长和凋亡的影响来探讨 Hcy 对胰岛 β 细胞的毒性作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 NIT-1 细胞购自美国 ATCC 细胞库;D,L-Hcy、DMEM 培养基均购自 Sigma 公司;MTT(溴化(4,5-二甲-2-噻唑基)2,5-二苯基四氮唑)为 Sigma 公司分装;新生胎牛血清为 Hyclone 公司产品;凋亡 DNA ladder 提取试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司;凋亡 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒购自上海同仁化学研究所。Model BB5060 CO₂ 培养箱: Heraeus 公司(上海);FACS Calibur 流式细胞仪: Becton-Dickinson (美国);UVP 凝胶成像系统: GENE 公司(美国)。

1.2 细胞培养 NIT-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,5% CO₂、37℃ 培养,取对数生长期的细胞用于实验。

1.3 MTT 法检测细胞活力 消化细胞,调整细胞密度为 1×10^5 /L,将其均匀接种于 24 孔板,每孔 1ml 的细胞悬液,同时设空白组(不加细胞只加等体积的培养基)和正常对照,待细胞融合至 60%~70%时,加入终浓度分别为 50, 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hcy 作用 12、24、48、72h 后吸弃培养液, PBS 洗 2 次,加入无血清 DMEM 和 100 μl MTT (5 g/L),继续培养 4h 后弃上清, PBS 洗 2 次,加入 500 μl DMSO,振荡 10 min,结晶物充分溶解。将每孔内液体对应吸至 96 孔板,用酶联检测仪测定 490nm 处的光密度值(OD)。细胞存活率(%) = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / 对照组 OD 值 \times 100%。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 采用 Annexin V/PI 双染色法。在细胞凋亡早期位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(PS)迁移至细胞膜外侧。磷脂结合蛋白 V(Annexin V)与 PS 具有高度的结合力。Annexin V 联合 PI 染色法检测早期细胞凋亡。将试验分为:(1) 浓度梯度组:将终浓度为 0, 50, 100,

250, 500, 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hcy 作用细胞 24h;(2) 时间梯度组:将终浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hcy 分别作用于细胞 0, 6, 12, 24, 48h。按试剂盒操作步骤收集细胞、处理标本,加入 10 μl Annexin V 和 5 μl PI,轻轻混匀,避光室温反应 15min,加入 300 μl Binding Buffer,立即上机检测。结果判断:凋亡细胞对所有用于细胞活性鉴定的染料如 PI 有抗染性,坏死细胞则不能。细胞膜有损伤的细胞的 DNA 可被 PI 着染产生红色荧光,而细胞膜保持完好的细胞则不会有红色荧光产生。因此,在细胞凋亡的早期 PI 不会着染而没有红色荧光信号。在双变量流式细胞仪的散点图上,左下象限显示活细胞,为(FITC/PI);右上象限是非活细胞,即坏死细胞,为(FITC⁺/PI⁺);而右下象限为凋亡细胞,显现(FITC⁺/PI)。

1.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳 凋亡中晚期的细胞 DNA 发生有规律的断裂,出现 180~200bp DNA 片段,断裂的 DNA 片段经琼脂糖凝胶电泳可表现为一种特异的、状如“楼梯”的电泳条带,正常细胞和坏死细胞则无这种梯带出现。将终浓度分别为 50, 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hcy 作用细胞 72h 后收集细胞,按试剂盒的操作步骤提取凋亡细胞 DNA 片段,取 20 μl 提取物上样,以 1.8% 琼脂糖 50V 电泳 90min,以自动凝胶荧光成像系统摄像分析。

1.6 细胞内 SOD 的检测 采用黄嘌呤氧化酶法和 WST 法相结合的方法。将终浓度分别为 50, 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hcy 作用于细胞 24h,收集细胞,用反复冻融的方法裂解细胞,提取细胞裂解物,分析细胞总蛋白含量,然后按试剂盒提供的操作步骤加样,在 37℃ 条件下孵育 20min,用酶标仪测定 450nm 的吸光度。

1.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS11.0 软件对各组数据应用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hcy 对 NIT-1 细胞存活率的影响 MTT 法显示,细胞的存活率与 Hcy 呈现时间和剂量依赖性关系(图 1),低浓度的 Hcy 短时间作用于 NIT-1 细胞对细胞存活率无显著影响,但随着 Hcy 作用时间的延长和浓度的增加,细胞的存活率逐渐降低。250 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hcy 作用 48h 后细胞存活率下降至 70.22%,与正常对

照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 Hcy 对 NIT-1 细胞凋亡的影响 各组细胞经 Annexin V /PI 染色,流式细胞仪检测结果如图 2 所示。Hcy 以浓度和时间依赖性的关系诱导 NIT-1 细胞发生凋亡。正常对照组细胞凋亡率为 3.17%,随着 Hcy 浓度的增加细胞凋亡率也相应增加,Hcy

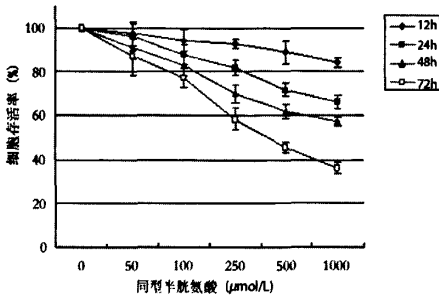
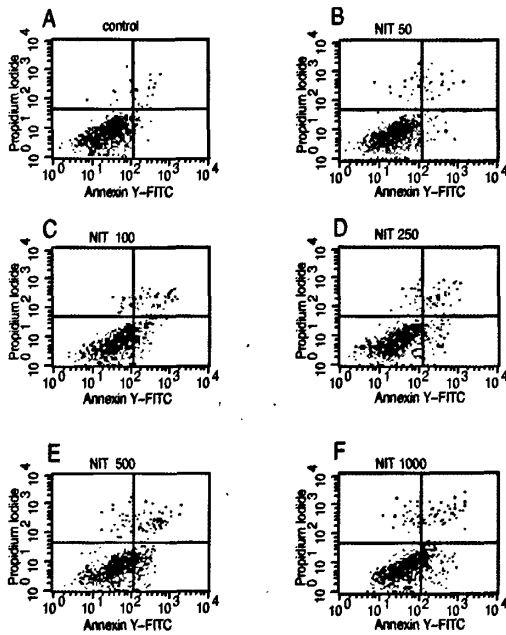


图 1 Hcy 对细胞存活率的影响

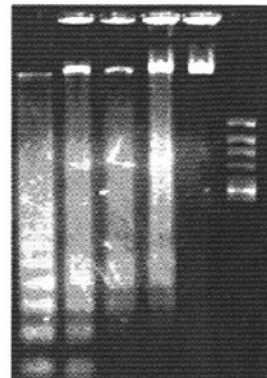


A: 对照组; B: 50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy; C: 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy; D: 250 $\mu\text{mol/L}$ Hcy; E: 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy; F: 1000 $\mu\text{mol/L}$ Hcy
图 2 Annexin V/PI 方法检测不同浓度 Hcy 对 NIT-1 细胞凋亡的影响

作用 24h 当浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,NIT-1 细胞凋亡率为 7.21%,与正常对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$);当 Hcy 浓度增至 1000 $\mu\text{mol/L}$ 时,NIT-1 细胞凋亡率可达 21.95% ($P < 0.01$)。将 250 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hcy 作用于 NIT-1 细胞,随着作用时间的延长细胞凋亡率也逐渐增加,作用 12h 后

细胞凋亡率达 8.91%,与正常对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);作用 48h 后凋亡率可达 38.2% ($P < 0.01$)。

DNA 琼脂糖凝胶电泳结果显示,正常对照组细胞的 DNA 条带位于加样孔附近,无梯形条带出现,而不同浓度的 Hcy 作用于 NIT-1 细胞 72h 后的细胞 DNA 电泳条带呈现为明显的梯形条带(图 3)。



M: marker; 1: 正常对照组; 2: 50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy; 3: 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy; 4: 250 $\mu\text{mol/L}$ Hcy; 5: 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy

图 3 Hcy 诱导 NIT-1 细胞凋亡的 DNA 琼脂糖凝胶电泳

2.3 Hcy 对细胞内 SOD 活性的影响 不同浓度的 Hcy 作用于 NIT-1 细胞可诱导细胞凋亡,随着细胞凋亡率的增加,Hcy 也能以浓度依赖的关系降低细胞内 SOD 的活性。当 Hcy 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞内 SOD 的活性降低,较正常对照组相比,两者之间的差异即具有统计学意义(表 1)。

表 1 不同浓度的 Hcy 作用 24 h 后对细胞凋亡和 SOD 活性的影响

组别	凋亡率(%)	SOD 活性 (U/mg)
正常对照组	3.174 \pm 0.84	6.24 \pm 0.22
Hcy 实验组($\mu\text{mol/L}$)		
50	5.40 \pm 0.92	5.51 \pm 0.19
100	7.39 \pm 0.70	4.98 \pm 1.02*
250	12.93 \pm 0.93*	3.67 \pm 0.31*
500	18.90 \pm 1.18*	2.71 \pm 0.21*
1000	20.35 \pm 1.31*	0.227 \pm 0.23*

注:与对照组相比,* $P < 0.01$

3 讨论

2 型糖尿病以胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能受损为特征^[3]。几项大规模的尸检发现,空腹血糖受损者和 2 型糖尿病患者 β 细胞数量均明显减少,2

型糖尿病患者 β 细胞数量仅为正常对照的50%^[4~6];且剩余的 β 细胞分泌胰岛素功能也低于正常细胞,因而不能维持正常的血糖水平。研究显示,糖尿病患者体内 β 细胞凋亡频率明显增高,但增生、复制功能正常,说明 β 细胞凋亡增加是其数目减少的根本原因^[6]。目前,胰岛细胞凋亡在糖尿病发病机制中的作用已日益受到人们的关注,但其具体机制尚不清楚。

糖尿病患者由于胰岛素相对和绝对缺乏或作用障碍,会影响Hcy的分解代谢,导致高Hcy血症^[7]。Hcy对多种细胞系均可产生有害作用,且在胰岛素抵抗的患者中Hcy水平明显增加,此外在2型糖尿病的患者中高Hcy水平升高也有较高的流行率,特别是那些肾功能受损的糖尿病患者。糖尿病伴Hcy水平升高的人群往往是那些代谢情况控制较差、存在血管疾病的危险因素、肾脏疾病或是患有妊娠糖尿病的患者。目前,高Hcy对 β 细胞产生的可能影响尚未得到充分的重视。Patterson等^[8]使用克隆的胰岛 β 细胞系BRIN-BD11细胞,将中浓度到高浓度的Hcy短期作用于BRIN-BD11细胞,观察到Hcy对BRIN-BD11细胞的代谢和胰岛素分泌产生有害作用。

笔者研究将Hcy较长时间作用于NIT-1细胞,观察Hcy对 β 细胞产生的毒性作用,结果显示Hcy可以表现为时间和剂量依赖性的方式抑制NIT-1细胞的生存率,且通过DNA琼脂糖凝胶电泳的结果证实Hcy诱导了 β 细胞的凋亡。流式细胞分析仪检测到 β 细胞的凋亡率与Hcy也呈现出时间和剂量依赖性的关系。

氧化应激是指体内活性氧化物质的产生和抗氧化防御体系之间失衡,从而导致组织损伤的一种状态。SOD作为体内重要的抗氧化酶,在氧化防御体系中起着重要作用。在糖尿病,糖基化反应是自由基产生的主要途径之一,很多组织都受糖基化反应的影响。胰岛 β 细胞也是糖基化反应的靶细胞,蛋白糖基化终末产物及氧化应激标志物均可在糖尿病实验动物胰岛 β 细胞内发现^[9]。此外,与其他组织相比,一些抗氧化酶,如SOD、谷胱甘肽过氧化物酶

等在胰岛 β 细胞内的表达很低,因此胰岛 β 细胞的抗氧化能力较弱,与其他组织相比,它对ROS更加敏感。

笔者研究进一步检测了NIT-1细胞内SOD的活性,结果显示低浓度的Hcy即可降低 β 细胞内SOD的活性,提示 β 细胞抗氧化能力的降低可能参与了Hcy诱导的 β 细胞凋亡过程。在糖尿病患者降低高Hcy水平,以及抗氧化剂的应用对保护胰岛 β 细胞功能具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] 杨国庆, 陆菊明, 潘长玉. 血浆同型半胱氨酸浓度与2型糖尿病视网膜病变的关系. 中华内科杂志, 2002, 41: 34-38.
- [2] 谷伟军, 陆菊明, 杨国庆, 等. 同型半胱氨酸硫内酯对EVC-304细胞凋亡即ROS生成的影响. 中华老年多器官疾病杂志, 2005, 4: 200-203.
- [3] Kahn CR, Vicent D, Doria A. Genetics of non-insulin-dependent(type II) diabetes mellitus. Annu Rev Med, 1996, 47:509-531.
- [4] Kloppel G, Lohr M, Habich K, et al. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. Surv Synth Pathol Res, 1985, 4:110 - 125.
- [5] Clark A, Wells CA, Buley ID, et al. Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. Diabetes Res, 1988, 9:151-159.
- [6] Butler AE, Janson J, Bonner WS, et al. β Cell deficit and increased β cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. Diabetes, 2003, 52:102-110.
- [7] Chan NN. Homocysteine and insulin levels in type 2 diabetic patients. Diabetes Care, 2000, 23: 1041-1042.
- [8] Patterson S, Flatt PR, Brennan L, et al. Detrimental actions of metabolic syndrome risk factor, homocysteine, on pancreatic A-cell glucose metabolism and insulin secretion. J Endocrinol, 2006, 189:301-310.
- [9] Thomas MP. β -Cell apoptosis stimuli and signaling. Diabetes, 2001, 50: S58-S63.