

## 基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002642

# 鸢尾素通过自噬对棕榈酸诱导的 INS-1 细胞功能和凋亡的影响

汪涓涓<sup>1</sup>, 刘师伟<sup>1,2</sup>, 段瑞雪<sup>2</sup>, 吴亚茹<sup>2</sup>, 郭胜慧<sup>3</sup>, 卫莹<sup>3</sup>

(1. 山西医科大学附属白求恩医院内分泌科, 太原 030032;

2. 山西医科大学附属太原市中心医院内分泌代谢中心, 太原 030009; 3. 山西医科大学研究生学院, 太原 030001)

**【摘要】目的:**探讨鸢尾素对棕榈酸(palmitic acid, PA)诱导的胰岛  $\beta$  细胞功能和凋亡的影响。**方法:**培养 INS-1 细胞, 用不同浓度梯度的鸢尾素干预 INS-1 细胞, 根据蛋白结果筛选出最佳鸢尾素干预浓度为 1 500 ng/mL。然后将 INS-1 细胞分为正常组、PA 组、PA+1 500 ng/mL 鸢尾素组、PA+1 500 ng/mL 鸢尾素+雷帕霉素组、PA+1 500 ng/mL 鸢尾素+3-MA 组。用 3.3 mmol/L 和 16.7 mmol/L 的葡萄糖浓度刺激检测干预后胰岛素的分泌水平, Western blot 检测自噬相关蛋白 p-mTOR、mTOR、p62、LC3 II、LC3 I 的蛋白水平, 用 mGFP-GFP-LC3 腺病毒转染观察自噬流水平, 流式细胞仪检测细胞凋亡水平。结果采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间差异比较采用单因素方差分析及 Turkey HSD 检验。**结果:**① PA 组 LC3 II / I 的比值较正常组增高 ( $0.745 \pm 0.035$  vs.  $1.015 \pm 0.012$ ,  $P=0.000$ ), 随着鸢尾素干预浓度增加, LC3 II / I 的水平较 PA 组逐渐升高且有统计学意义 (I1 组  $1.465 \pm 0.028$ , I2 组  $2.269 \pm 0.063$ , I3 组  $1.858 \pm 0.074$ , I4 组  $2.355 \pm 0.074$ , 均  $P=0.000$ ), 鸢尾素浓度为 1 500 ng/mL 时 LC3 II / I 的水平最高。② PA 组 INS-1 细胞上清液中胰岛素水平在 3.3 mmol/L 和 16.7 mmol/L 葡萄糖刺激下较正常组均下降 [ $0.447 \pm 0.067$ ] ng/mL vs. [ $0.138 \pm 0.012$ ] ng/mL,  $P=0.000$ ; [ $0.625 \pm 0.041$ ] ng/mL vs. [ $0.245 \pm 0.043$ ] ng/mL,  $P=0.000$ ], 鸢尾素干预后胰岛素水平较 PA 组均升高 [ $0.138 \pm 0.012$ ] ng/mL vs. [ $0.322 \pm 0.041$ ] ng/mL,  $P=0.001$ ; [ $0.245 \pm 0.043$ ] ng/mL vs. [ $0.414 \pm 0.036$ ] ng/mL,  $P=0.005$ ]。③与正常组相比, PA 干预细胞后, 自噬体数量增加 ( $2.33 \pm 1.53$  vs.  $10.33 \pm 1.53$ ,  $P=0.000$ ), 而自噬溶酶体数量无明显变化 ( $2.33 \pm 1.53$  vs.  $3.33 \pm 1.53$ ,  $P=0.939$ ), 鸢尾素干预后, 自噬体数量和自噬溶酶体数量较 PA 组均升高 ( $10.33 \pm 1.53$  vs.  $15.67 \pm 1.53$ ,  $P=0.007$ ;  $3.33 \pm 1.53$  vs.  $12.00 \pm 2.00$ ,  $P=0.001$ )。④与正常组相比, PA 干预后细胞凋亡率增加 [ $11.417 \pm 1.297$ ] % vs. [ $46.507 \pm 0.525$ ] %,  $P=0.000$ ], 鸢尾素干预后凋亡率降低 [ $46.507 \pm 0.525$ ] % vs. [ $33.767 \pm 1.083$ ] %,  $P=0.000$ ]。**结论:**鸢尾素通过自噬改善 PA 诱导的 INS-1 细胞分泌功能和凋亡。

**【关键词】**鸢尾素; 自噬; 棕榈酸; 胰岛  $\beta$  细胞功能; 凋亡**【中图分类号】**R589.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-01-20

## Effect of irisin on function and apoptosis of INS-1 cells induced by palmitic acid through autophagy

Wang Meimei<sup>1</sup>, Liu Shiwei<sup>1,2</sup>, Duan Ruixue<sup>2</sup>, Wu Yaru<sup>2</sup>, Guo Shenghui<sup>3</sup>, Wei Ying<sup>3</sup>

(1. Department of Endocrinology, Bethune Hospital of Shanxi Medical University;

2. Department of Endocrinology, Taiyuan Central Hospital of Shanxi Medical University;

3. Graduate School, Shanxi Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the effect of irisin on the function and apoptosis of pancreatic  $\beta$  cells induced by palmitic acid (PA). **Methods:** Firstly, INS-1 cells were cultivated and treated with different concentration gradients of irisin. The optimal concentration of 1 500 ng/mL was selected according to the protein results of Western blot. Secondly, INS-1 cells were divided into the nor-

作者介绍: 汪涓涓, Email: wmm1136015919@163.com,

研究方向: 胰岛素抵抗与代谢综合征。

通信作者: 刘师伟, Email: lswspring6@aliyun.com。

**基金项目:** 山西省留学回国人员科技活动择优重点资助项目 (编号: 2017-1389); 白求恩·默克糖尿病研究基金资助项目 (编号: G2017044); 山西省重点研发计划资助项目 (编号: 201803D31133); 山西省研究生教育创新资助项目 (编号: 2019SY291)。

**优先出版:** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200927.0932.002.html>  
(2020-09-28)

mal group, the PA group, the palmitate acid+1 500 ng/mL irisin group, the palmitate acid+1 500 ng/mL irisin+rapamycin group and the palmitate acid+1 500 ng/mL irisin+3-MA group. The glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) test (with glucose levels of 3.3 mmol/L and 16.7 mmol/L) was performed to determine the insulin level in each group. Western blot was used to determine the levels of mammalian target of rapamycin (mTOR), p-mTOR, p62, LC3 II and LC3 I; mRFP-GFP-LC3 and flow cytometry were used to determine the autophagic flow and cell

apoptosis, respectively. SPSS 20.0 was used to conduct data analysis. Results were presented as the mean  $\pm$  SD, one-way analysis of variance followed by Turkey HSD was used to calculate differences among the various study groups. **Results:** ① Compared with the normal group, the ratio of LC3 II/I in the PA group was higher ( $0.745 \pm 0.035$  vs.  $1.015 \pm 0.012$ ,  $P=0.000$ ). With the increase of irisin concentration, the level of LC3 II/I was gradually increased and had statistical significance (I1:  $1.465 \pm 0.028$ , I2:  $2.269 \pm 0.063$ , I3:  $1.858 \pm 0.074$ , I4:  $2.355 \pm 0.074$ ;  $P=0.000$ ). When irisin concentration was 1 500 ng/mL, the level of LC3 II/I was the highest. ② GSIS levels in the INS-1 cell supernatant in the PA group was significantly reduced for stimulation of 3.3 mmol/L and 16.7 mmol/L of glucose when compared with the normal group [ $(0.447 \pm 0.067)$  ng/mL vs.  $(0.138 \pm 0.012)$  ng/mL,  $P=0.000$ ;  $(0.625 \pm 0.041)$  ng/mL vs.  $(0.245 \pm 0.043)$  ng/mL,  $P=0.000$ ], while in the irisin treated group were increased when compared with the PA group [ $(0.138 \pm 0.012)$  ng/mL vs.  $(0.322 \pm 0.041)$  ng/mL,  $P=0.001$ ;  $(0.245 \pm 0.043)$  ng/mL vs.  $(0.414 \pm 0.036)$  ng/mL,  $P=0.005$ ]. ③ The number of autophagosome in the PA group was significantly higher than that in the normal group ( $2.33 \pm 1.53$  vs.  $10.33 \pm 1.53$ ,  $P=0.000$ ), but there was no obvious change in the number of autophagolysosome ( $2.33 \pm 1.53$  vs.  $3.33 \pm 1.53$ ,  $P=0.939$ ). In the irisin group, the autolysosome number and autolysosome number was increased when compared with PA group ( $10.33 \pm 1.53$  vs.  $15.67 \pm 1.53$ ,  $P=0.007$ ;  $3.33 \pm 1.53$  vs.  $12.00 \pm 2.00$ ,  $P=0.001$ ). Treated with PA for 24 hours, the apoptosis rate of INS-1 cells was increased when compared with the normal group [ $(11.417 \pm 1.297)\%$  vs.  $(46.507 \pm 0.525)\%$ ,  $P=0.000$ ], while the irisin-treated group had a significantly reduced apoptosis rate when compared with the PA group [ $(46.507 \pm 0.525)\%$  vs.  $(33.767 \pm 1.083)\%$ ,  $P=0.000$ ]. **Conclusion:** Irisin ameliorates apoptosis and improves secretion function of INS-1 cells induced by PA through autophagy.

**[Key words]** irisin; autophagy; palmitic acid; islet  $\beta$  cell function; apoptosis

随着生活水平的提高,糖尿病已经成为危害人们健康的常见疾病之一。胰岛  $\beta$  细胞功能衰竭、胰岛素抵抗、高血糖和高脂血症是 2 型糖尿病的特征<sup>[1]</sup>。其中,长期处于高游离脂肪酸环境是引起胰岛  $\beta$  细胞死亡的主要原因<sup>[2]</sup>。自噬是一种主要的分解代谢途径,负责清除受损的蛋白质、细胞器,将其转化为能量底物储存在细胞内,供机体需要时使用。目前认为,自噬是一种抗衰老过程,除了在细胞稳态中起基础作用外,也是一种生存的应激反应机制,破坏自噬可导致胰腺  $\beta$  细胞死亡<sup>[3-4]</sup>。越来越多的证据表明,自噬是对各种应激(即氧化应激)或高血糖的适应性反应,对  $\beta$  细胞起保护作用,以避免应激引起的细胞凋亡<sup>[5]</sup>。AMP 依赖的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路的激活使多种药物增强胰岛  $\beta$  细胞自噬,从而改善应激状态下细胞凋亡的共同信号通路<sup>[6-7]</sup>。

鸢尾素是 2012 年被首次发现并命名的一种肌肉因子,具有改善代谢的作用,同时也是一种脂肪细胞因子。研究表明,鸢尾素可以诱导白色脂肪组织棕色化,增加产热及能量消耗<sup>[8]</sup>。既往研究发现,鸢尾素可以通过细胞外调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路促进胰岛  $\beta$  细胞增殖,调节促凋亡蛋白及抗凋亡蛋白的表达,减少高糖诱导的 INS-1 细胞凋亡,从而改善胰岛  $\beta$  细胞功能<sup>[9]</sup>。研究发现,鸢尾素通过 AMPK

信号通路缓解糖脂毒性诱导的 INS-1 细胞的脂代谢功能障碍<sup>[10]</sup>。目前关于鸢尾素保护胰岛  $\beta$  细胞凋亡、改善其功能的具体机制尚不明确。本研究旨在通过对 INS-1 细胞进行自噬水平的相关测定,来探讨鸢尾素是否通过自噬来改善 PA 条件下的 INS-1 细胞功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

INS-1 细胞购自美国 ATCC 公司, RPMI 1640 培养基及胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco 公司, 棕榈酸(palmitic acid, PA)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自 Sigma 公司, 鸢尾素购自美国 Phoenix 公司, 自噬激活剂雷帕霉素、自噬抑制剂 3-MA 购自 Selleckchem 公司, 大鼠胰岛素 ELISA 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司, 兔抗大鼠多克隆抗体 mTOR、p-mTOR、LC3B、p62 及  $\beta$ -actin 抗体购自 Abcam 公司, 凝胶配置试剂盒购自博士德公司, HRP 羊抗兔 IgG 抗体、蛋白提取试剂盒购自 Abcam 公司, ECL 试剂盒购自 Affinity 公司, mRFP-GFP-LC3 腺病毒购自上海汉恒生物科技有限公司, Annexin-FITC 凋亡检测试剂盒购自 BD 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组 复苏一支 INS-1 细胞, 用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素双抗的 RPMI 1640 培养基培养, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱环境中。

鸢尾素对 PA 干预后 INS-1 细胞自噬水平的影响分组: 正常对照组(NC 组): 基础培养基培养 24 h; 棕榈酸组(PA 组): 0.4 mmol/L PA 培养 24 h; PA+100 ng/mL 鸢尾素组(PA+I1

组);0.4 mmol/L PA 干预 6 h 后加入 100 ng/mL 鸢尾素共培养 18 h;PA+500 ng/mL 鸢尾素组(PA+I2 组):0.4 mmol/L PA 干预 6 h 后加入 500 ng/mL 鸢尾素;PA+1 000 ng/mL 鸢尾素组(PA+I3 组):0.4 mmol/L PA 干预 6 h 后加入 1 000 ng/mL 鸢尾素共培养 18 h;PA+1 500 ng/mL 鸢尾素组(PA+I4 组):0.4 mmol/L PA 干预 6 h 后加入 1 500 ng/mL 鸢尾素,共培养 18 h。

鸢尾素通过自噬对 INS-1 细胞功能的影响分组:正常对照组(NC 组);基础培养基培养 24 h;棕榈酸组(PA 组):0.4 mmol/L PA 培养 24 h;PA+1 500 ng/mL 鸢尾素组(PA+鸢尾素组):0.4 mmol/L PA 干预 6 h 后加入鸢尾素共培养 18 h;PA+鸢尾素+雷帕霉素组:先用 50 nmol/L 雷帕霉素预培养细胞 2 h,再用 0.4 mmol/L PA 干预 6 h 后加入鸢尾素共培养 18 h;PA+鸢尾素+3-MA 组:先以 1 mmol/L 3-MA 预培养细胞 2 h,再用 0.4 mmol/L PA 干预 6 h 后加入鸢尾素共培养 18 h。

1.2.2 Western blot 检测自噬相关蛋白水平 待干预结束后,测定自噬相关蛋白 p-mTOR、mTOR、p62、LC3 II、LC3 I 的表达。收集细胞于 EP 管中,加入 101  $\mu$ L 混合液(100  $\mu$ L RIPA 裂解和 1  $\mu$ L 苯甲基磺酰氟 PMSF)吹散细胞,置于冰上裂解 2 h,4  $^{\circ}$ C 离心机 12 000 r/min 离心 10 min,取上清。BCA 法测定蛋白浓度,选择 20  $\mu$ g 蛋白上样量进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后,转膜 1 h,封闭用 5% BSA、2 h,TBST 洗膜 3 次之后一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日回收一抗,洗涤后室温二抗孵育 1 h,用 ECL 超灵敏发光液进行曝光。所得条带用 Image-Pro Plus 软件进行灰度值分析。

1.2.3 INS-1 细胞分泌功能的检测 选取对数期生长的 INS-1 细胞,以  $1 \times 10^5$  个/孔接种至 6 孔板中,干预结束后,用 PBS 清洗 1 次,加入 1 mL 无糖的 KRBH 液培养 1 h,去掉上清,加入 1 mL 含 3.3 mmol/L 或 16.7 mmol/L 葡萄糖的 KRBH 液,继续孵育 1 h 后,收集上清至 5 mL EP 管中,ELISA 试剂盒检测各组细胞中胰岛素的分泌量。每组实验重复 3 次,取平均值。

1.2.4 mRFP-GFP-LC3 检测自噬流情况 选取对数期生长的 INS-1 细胞,以细胞数  $5 \times 10^4$  个/孔接种至 6 孔板中,待细胞贴壁 24 h 后,用 mGFP-GFP-LC3 腺病毒转染 INS-1 细胞(MOI=60),预先感染 24 h,后给予 PA 和不同浓度鸢尾素共干预 24 h。待干预结束后,荧光显微镜观察自噬体和自噬溶酶体的形成情况,拍照分析。

1.2.5 INS-1 细胞凋亡的检测 将 INS-1 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种至 6 孔板中,干预结束后收集细胞,用 PBS 清洗 1 次,吹打收集细胞悬液,制成每管约含  $1 \times 10^6$  个/mL 的细胞悬液,离心后弃上清,加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC,轻轻摇晃,室温避光孵育 15 min,上机前 5 min 再加入 5  $\mu$ L PI 染色;使用流式细胞仪测定细胞凋亡率,并用 FlowJo 软件处理。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间差异比较采用单因素方差分析及

Turkey HSD 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度鸢尾素对 PA 干预后的 INS-1 细胞自噬相关蛋白水平的影响

与正常组相比,PA 组 INS-1 细胞 LC3 II/I 蛋白比值和 p62 蛋白水平明显增高( $0.745 \pm 0.035$  vs.  $1.015 \pm 0.012$ ,  $P=0.000$ ;  $0.188 \pm 0.021$  vs.  $1.471 \pm 0.190$ ,  $P=0.001$ ),随着鸢尾素干预浓度增加,LC3 II/I 的水平较 PA 组也逐渐升高(I1 组  $1.465 \pm 0.028$ , I2 组  $2.269 \pm 0.063$ , I3 组  $1.858 \pm 0.074$ , I4 组  $2.355 \pm 0.074$ , 均  $P=0.000$ );PA 干预后, p-mTOR/mTOR 蛋白水平较正常组呈降低趋势( $0.751 \pm 0.009$  vs.  $0.656 \pm 0.128$ ,  $P=0.000$ ), I2、I3、I4 干预浓度与 PA 组相比, p-mTOR/mTOR 的蛋白水平呈逐渐降低趋势(I2 组  $0.593 \pm 0.015$ , I3 组  $0.535 \pm 0.012$ , I4 组  $0.479 \pm 0.012$ ,  $P=0.001$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ );p62 蛋白水平在 I3、I4 组较 PA 组差异有统计学意义(I3 组  $0.520 \pm 0.192$ , I4 组  $0.612 \pm 0.260$ ,  $P=0.011$ ,  $P=0.022$ ), I1 干预浓度与 PA 组相比, p62 与 p-mTOR/mTOR 两者均无明显变化,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图 1。

### 2.2 鸢尾素对 PA 诱导的 INS-1 细胞胰岛素分泌的影响

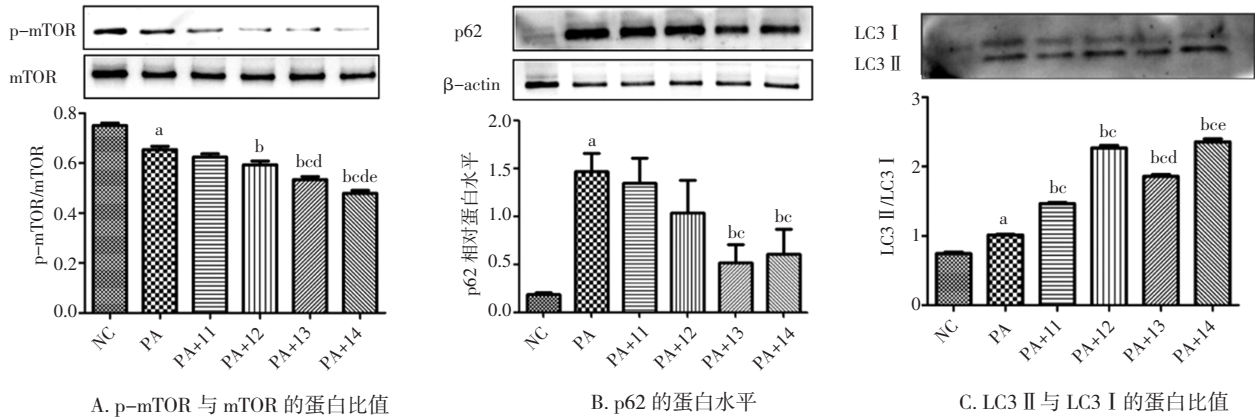
与正常组相比,PA 组 INS-1 细胞上清液中胰岛素水平在 3.3 mmol/L 葡萄糖和 16.7 mmol/L 葡萄糖刺激下均下降[( $0.447 \pm 0.067$ ) ng/mL vs. ( $0.138 \pm 0.012$ ) ng/mL,  $P=0.000$ ; ( $0.625 \pm 0.041$ ) ng/mL vs. ( $0.245 \pm 0.043$ ) ng/mL,  $P=0.000$ ], 鸢尾素干预组较 PA 组升高[( $0.138 \pm 0.012$ ) ng/mL vs. ( $0.322 \pm 0.041$ ) ng/mL,  $P=0.001$ ; ( $0.245 \pm 0.043$ ) ng/mL vs. ( $0.414 \pm 0.036$ ) ng/mL,  $P=0.005$ ],无论是低糖还是高糖刺激,在加入 3-MA 后,细胞胰岛素分泌水平均较鸢尾素干预组降低[3.3 mmol/L: ( $0.322 \pm 0.041$ ) ng/mL vs. ( $0.131 \pm 0.027$ ) ng/mL,  $P=0.001$ ; 16.7 mmol/L: ( $0.414 \pm 0.036$ ) ng/mL vs. ( $0.196 \pm 0.047$ ) ng/mL,  $P=0.001$ ],差异均有统计学意义。加入雷帕霉素组与鸢尾素干预组相比,葡萄糖刺激的胰岛素分泌水平变化不明显[3.3 mmol/L: ( $0.322 \pm 0.041$ ) ng/mL vs. ( $0.307 \pm 0.016$ ) ng/mL,  $P=0.987$ ; 16.7 mmol/L: ( $0.414 \pm 0.036$ ) ng/mL vs. ( $0.400 \pm 0.045$ ) ng/mL,  $P=0.994$ ],差异均无统计学意义。见图 2。

### 2.3 鸢尾素对 PA 诱导的 INS-1 细胞自噬相关蛋白水平的影响

与正常组相比,PA 组 p62 和 LC3 II/I 的水平均增加( $0.489 \pm 0.046$  vs.  $1.598 \pm 0.011$ ,  $P=0.000$ ;  $0.271 \pm 0.010$  vs.  $0.350 \pm 0.026$ ,  $P=0.002$ ),而 p-mTOR/mTOR 的水平降低( $2.257 \pm 0.012$  vs.  $2.069 \pm 0.027$ ,  $P=0.001$ );鸢尾素和雷帕霉素干预后,LC3 II/I 的水平均增加( $0.350 \pm 0.026$  vs.  $0.466 \pm 0.016$ ,  $P=0.000$ ;  $0.466 \pm 0.016$  vs.  $0.521 \pm 0.022$ ,  $P=0.022$ ),而加入 3-MA 后,LC3 II/I 的水平较鸢尾素干预组明显降低( $0.466 \pm 0.016$  vs.  $0.073 \pm 0.005$ ,  $P=0.000$ );鸢尾素干预组 p62 与 p-mTOR/mTOR 两者的蛋白水平较 PA 组均下降( $1.598 \pm$

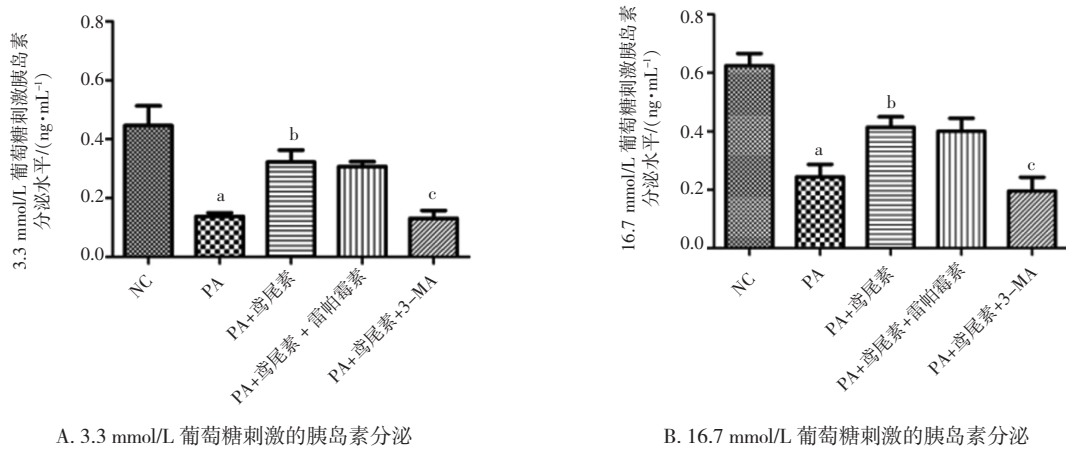
0.011 vs.  $1.289 \pm 0.120$ ,  $P=0.004$ ;  $2.069 \pm 0.027$  vs.  $1.829 \pm 0.029$ ,  $P=0.000$ 。经自噬抑制剂 3-MA 预处理后, PA+鸢尾素+3-MA 中 p62 的水平较 PA+鸢尾素组升高 ( $1.289 \pm 0.120$  vs.  $1.475 \pm 0.126$ ,  $P=0.048$ )。在加入自噬增强剂雷帕霉素后, p-mTOR/

mTOR 的水平较 PA+鸢尾素组明显降低 ( $1.829 \pm 0.029$  vs.  $0.858 \pm 0.059$ ,  $P=0.000$ ), p62 的水平较 PA+鸢尾素组无明显改变 ( $1.348 \pm 0.120$  vs.  $1.289 \pm 0.120$ ,  $P=0.493$ ), 差异无统计学意义。见图 3。



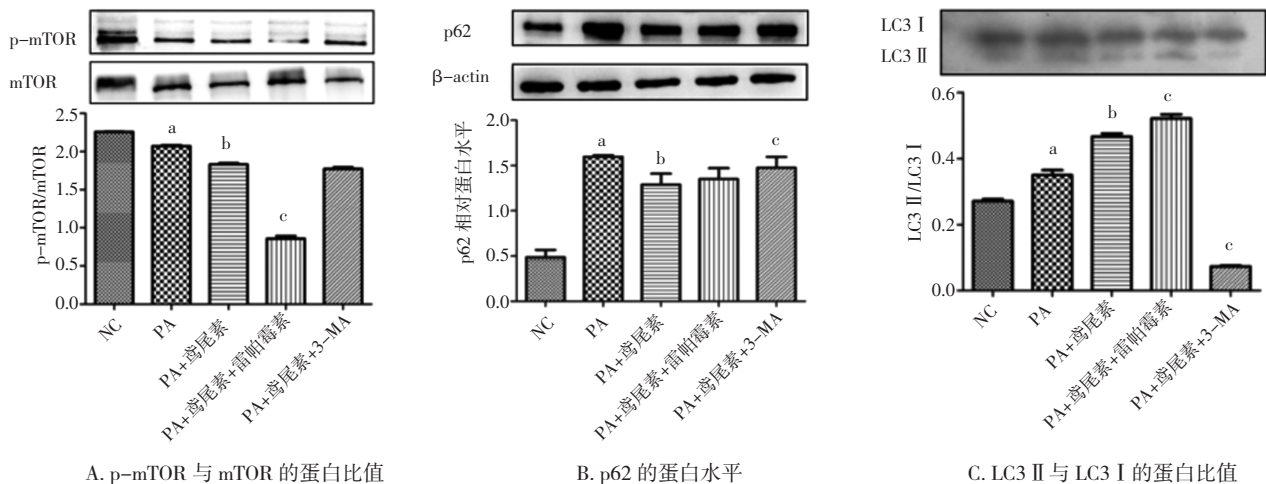
注: a, 与 NC 组比较,  $P < 0.05$ ; b, 与 PA 组比较,  $P < 0.05$ ; c, 与 PA+I1 组比较,  $P < 0.05$ ; d, 与 PA+I2 组比较,  $P < 0.05$ ; e, 与 PA+I3 组比较,  $P < 0.05$

图 1 不同浓度鸢尾素对自噬相关蛋白水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )



注: a, 与 NC 组比较,  $P < 0.05$ ; b, 与 PA 组比较,  $P < 0.05$ ; c, 与 PA+鸢尾素组比较,  $P < 0.05$

图 2 葡萄糖刺激胰岛素分泌实验 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )



注: a, 与 NC 组比较,  $P < 0.05$ ; b, 与 PA 组比较,  $P < 0.05$ ; c, 与 PA+鸢尾素组比较,  $P < 0.05$

图 3 Western blot 检测自噬相关蛋白水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

#### 2.4 鸢尾素对 PA 干预后的 INS-1 细胞自噬流水平的影响

本研究对 INS-1 细胞进行了 mRFP-GFP-LC3 腺病毒转染, PA 干预组的自噬体较正常组明显增加 ( $2.33 \pm 1.53$  vs.  $10.33 \pm 1.53$ ,  $P=0.000$ ), 而自噬溶酶体无明显变化 ( $2.33 \pm 1.53$  vs.  $3.33 \pm 1.53$ ,  $P=0.939$ )。鸢尾素组的自噬体和自噬溶酶体较 PA 组均明显增加 ( $10.33 \pm 1.53$  vs.  $15.67 \pm 1.53$ ,  $P=0.007$ ;  $3.33 \pm 1.53$  vs.  $12.00 \pm 2.00$ ,  $P=0.001$ ), 在鸢尾素的基础上加入 3-MA, 自噬体和自噬溶酶体的数量较鸢尾素组减少 ( $15.67 \pm 1.53$  vs.  $1.00 \pm 1.00$ ,  $P=0.000$ ;  $12.00 \pm 2.00$  vs.  $1.67 \pm 1.53$ ,  $P=0.000$ ), 而加入雷帕霉素与鸢尾素组相比, 无论是自噬体还是自噬溶酶体均无显著差异。见图 4。

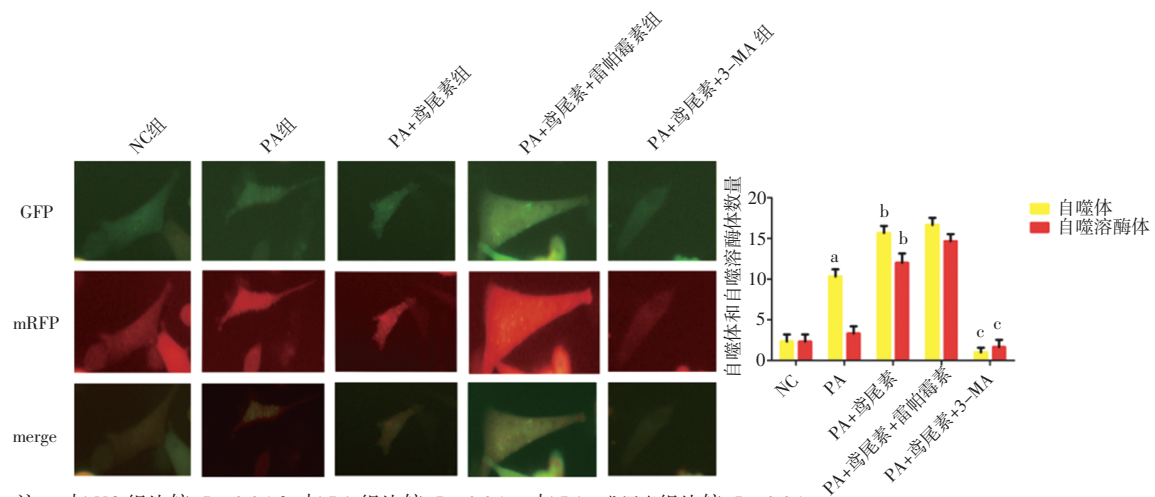
#### 2.5 鸢尾素对 PA 干预后的 INS-1 细胞凋亡水平的影响

与正常组相比, PA 干预 INS-1 细胞 24 h 后细胞凋亡水平增加 [ $(11.417 \pm 1.297)\%$  vs.  $(46.507 \pm 0.525)\%$ ,  $P=0.000$ ],

鸢尾素组较 PA 组细胞凋亡水平减少 [ $(46.507 \pm 0.525)\%$  vs.  $(33.767 \pm 1.083)\%$ ,  $P=0.000$ ], 3-MA 干预后, 细胞凋亡水平较鸢尾素组增加 [ $(33.767 \pm 1.083)\%$  vs.  $(53.707 \pm 2.055)\%$ ,  $P=0.000$ ], 雷帕霉素干预后, 细胞凋亡率较鸢尾素组无明显变化 [ $(33.767 \pm 1.083)\%$  vs.  $(34.810 \pm 2.078)\%$ ,  $P=0.913$ ]。见图 5。

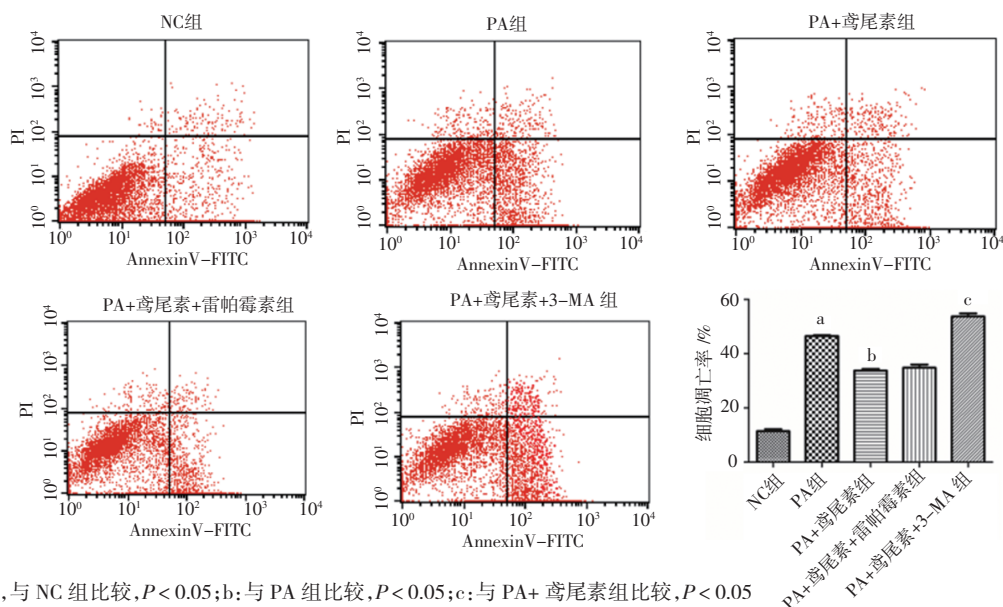
### 3 讨论

胰岛  $\beta$  细胞通过调节胰岛素的分泌, 在维持血糖稳态中发挥重要作用,  $\beta$  细胞功能受损是 2 型糖尿病发生发展的重要因素, 其中  $\beta$  细胞长期暴露于过量游离脂肪酸是导致 2 型糖尿病胰岛  $\beta$  细胞数量减少的主要原因, 而其中游离脂肪酸诱导机体产生活性氧<sup>[11]</sup>和内质网应激<sup>[12-13]</sup>的发生是导致胰岛  $\beta$



注: a, 与 NC 组比较,  $P < 0.05$ ; b, 与 PA 组比较,  $P < 0.05$ ; c, 与 PA+ 鸢尾素组比较,  $P < 0.05$

图 4 mRFP-GFP-LC3 腺病毒转染实验检测自噬流水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )



注: a, 与 NC 组比较,  $P < 0.05$ ; b, 与 PA 组比较,  $P < 0.05$ ; c, 与 PA+ 鸢尾素组比较,  $P < 0.05$

图 5 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

细胞死亡的关键介质。鸢尾素是 2012 年发现的主要从骨骼肌释放的一种激素,是含有Ⅲ型纤维蛋白域包含蛋白 5(fibronectin type Ⅲ domain-containing protein 5, FNDC5)的产物<sup>[4]</sup>。FNDC5 表达由过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (peroxisome proliferators-activated receptors  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )触发。此外,运动可激活 FNDC5 的表达,从而刺激白色脂肪组织中解偶联蛋白 1(uncoupling protein 1, UCP1)的表达,并诱导白色脂肪细胞的褐变,导致热量生成和能量消耗增加<sup>[4]</sup>。鸢尾素浓度的升高可以改善高糖诱导的胰岛  $\beta$  细胞的分泌功能和凋亡率<sup>[5]</sup>。本研究对棕榈酸干预的 INS-1 细胞用鸢尾素处理后发现,其凋亡水平较棕榈酸干预后的 INS-1 细胞明显减少,并且胰岛素分泌功能也增强,这与先前的研究结果相一致<sup>[9]</sup>。

自噬是真核细胞维持正常和应激状态下细胞功能和生存的关键降解机制。自噬的特点是形成一个双层膜结构,即自噬体,随之与功能正常的溶酶体结合后将细胞内受损的细胞器、聚集的蛋白质和多余的营养吞噬并处理,产生的代谢产物循环利用<sup>[6]</sup>,故溶酶体的数量和功能是否正常对自噬流的通畅同样起关键作用。最近的研究表明,胰岛  $\beta$  细胞的自噬在 2 型糖尿病的发生发展中起重要作用<sup>[7]</sup>。高脂毒性对  $\beta$  细胞自噬的影响对于细胞存活呈两面性,体内外研究均发现自噬不足的  $\beta$  细胞在高脂环境中表现为功能损害和存活率下降,从而认为在高脂环境下自噬增强可对细胞起保护作用<sup>[8-9]</sup>。本研究用 mRFP-GFP-LC3 荧光双标系统检测了自噬流的强弱。自噬体形成时,红、绿荧光同时存在,可叠加后呈黄色斑点;自噬体与溶酶体结合后,酸性环境使 GFP 荧光降解、猝灭, mRFP 的红色荧光将逐渐增强,表明自噬流发生,细胞中红色斑点与黄色斑点的比值可以反映细胞自噬流的强弱。结合本实验 PA 干预 INS-1 细胞后,自噬体水平增高,而自噬溶酶体水平降低,用鸢尾素干预后,细胞自噬溶酶体和自噬体水平均升高。因此猜测 PA 干预虽然可以促进自噬体的形成,但是不能促进自噬溶酶体的形成,而鸢尾素干预可以明显增强高脂环境下 INS-1 细胞的自噬流水平。

为了进一步验证鸢尾素对高脂环境下 INS-1 细胞自噬影响的具体机制,本研究检测了自噬相关蛋白的表达水平。先前有文献报道,在自噬的整个发生过程中, mTOR 是自噬启动阶段的关键调节因子, mTOR 磷酸化可以抑制自噬的发生,因此 p-mTOR 与 mTOR 的比值与自噬的发生呈负相关; LC3

定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,参与自噬体的形成。未发生自噬时,细胞合成的可溶性 LC3 I 在胞质常规表达;自噬发生时, LC3 I 被 Atg7 活化,经泛素样加工修饰,与细胞膜表面的磷脂酰乙醇胺结合,形成 LC3 II, LC3 II 结合并始终位于胞内自噬体膜上。其含量的多少与自噬体的数量呈正比,且 LC3 II 是目前最明确的贯穿整个自噬过程并能出现在晚期自噬溶酶体中的自噬相关蛋白。p62 是 SQSTM1 编码的泛素结合蛋白,作为一种调节因子参与自噬体的形成,在自噬体与溶酶体结合后被降解,所以,在细胞内整体 p62 的水平与自噬流的强弱程度存在负相关<sup>[20]</sup>。LC3 II / I 水平增加而 p62 水平减少,说明自噬流水平增强。若 LC3 II / I 水平增加的同时, p62 水平也增加,表明自噬溶酶体的形成与裂解受到影响。本实验发现, INS-1 细胞用棕榈酸干预后, p-mTOR 与 mTOR 的比值较正常组降低, LC3 II / I 明显增强,而 p62 较正常组呈现升高趋势。用不同浓度鸢尾素干预后,细胞 LC3 II / I 的蛋白水平较 PA 组逐渐升高,而 p-mTOR 与 mTOR 的比值与 p62 的水平呈逐渐降低趋势。结合 Western blot 结果及 mRFP-GFP-LC3 自噬流结果,进一步证实了 PA 干预可以增强自噬,同时影响自噬溶酶体的形成,而鸢尾素可以增强 INS-1 细胞自噬流的发生。先前也有研究发现高脂状态可以影响溶酶体的功能,从而影响自噬<sup>[21]</sup>。鸢尾素改善溶酶体功能的具体机制需要进一步证明。

本研究发现,用 PI3k 抑制剂 3-MA 后, INS-1 细胞的凋亡水平较鸢尾素干预组增多,细胞的分泌功能也降低,而用 mTOR 抑制剂雷帕霉素干预后,凋亡水平和分泌功能与鸢尾素干预组相比均无明显变化。细胞凋亡是染色体浓聚、细胞皱缩、DNA 降解和凋亡小体形成,依赖 Caspase 参与的一种程序性细胞死亡<sup>[22]</sup>。许多证据显示,自噬和凋亡在某些情况下可以相互拮抗或促进,可先后发生或同时共存于同一细胞<sup>[23]</sup>。多项研究表明, mTOR 抑制剂雷帕霉素通过增强自噬,可以缓解细胞的凋亡水平<sup>[24-25]</sup>,在加入自噬抑制剂 3-MA 后,细胞凋亡水平增加,且胰岛  $\beta$  细胞分泌功能也降低<sup>[26]</sup>。本研究结果与其一致。有研究发现,增强自噬也可改善胰岛  $\beta$  细胞分泌功能,其具体机制可能是增强自噬水平可以减少  $\beta$  细胞内人胰岛淀粉样多态的沉积,改善胰岛  $\beta$  细胞的内环境,从而增强其分泌功能<sup>[27]</sup>;而抑制自噬后,细胞凋亡水平升高,分泌功能也降低,可能与细胞内游离脂肪酸诱导的活性氧和内质网的产生相关<sup>[28]</sup>。

这表明一定水平的自噬是维持胰岛  $\beta$  细胞分泌功能的前提。

综上所述,鸢尾素作为一种肌肉因子,不仅可以增强棕榈酸诱导的 INS-1 细胞自噬体形成,还可增强其自噬流水平,从而增强其分泌功能,同时减少高脂诱导的凋亡水平。但是,鸢尾素是否通过改善溶酶体功能而起作用,及其作用于自噬的相关通路目前尚不清楚,还需进一步研究。期待鸢尾素对胰岛  $\beta$  细胞功能及 2 型糖尿病的进一步研究,为 2 型糖尿病的治疗提供更有效的治疗方法。

### 参 考 文 献

- [1] Oropeza D, Jouvett N, Bouyakdan K, et al. PGC-1 coactivators in beta-cells regulate lipid metabolism and are essential for insulin secretion coupled to fatty acids[J]. *Mol Metab*, 2015, 4(11): 811-822.
- [2] Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, et al. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function[J]. *Diabetes*, 2001, 50(1): 69-76.
- [3] Masini M, Bugliani M, Lupi R, et al. Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells[J]. *Diabetologia*, 2009, 52(6): 1083-1086.
- [4] Marsh BJ, Soden C, Alarcón C, et al. Regulated autophagy controls hormone content in secretory-deficient pancreatic endocrine beta-cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(9): 2255-2269.
- [5] Wu Y, Hu Y, Haiyan Z, et al. Xiaokeping induced autophagy protects pancreatic  $\beta$ -cells against apoptosis under high glucose stress[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 407-412.
- [6] Miao X, Gu Z, Liu Y, et al. The glucagon like peptide-1 analogue liraglutide promotes autophagy through the modulation of 5'-AMP-activated protein kinase in INS-1 $\beta$ -cells under high glucose conditions[J]. *Peptides*, 2018, 100: 127-139.
- [7] Lai D, Huang M, Zhao L, et al. Delphinidin-induced autophagy protects pancreatic  $\beta$  cells against apoptosis resulting from high-glucose stress via AMPK signaling pathway[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2019, 51(12): 1242-1249.
- [8] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis[J]. *Nature*, 2012, 481(7382): 463-468.
- [9] Liu SW, Du F, Li X, et al. Effects and underlying mechanisms of irisin on the proliferation and apoptosis of pancreatic  $\beta$  cells[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175498.
- [10] Zhang D, Xie T, Leung PS. Irisin ameliorates glucolipotoxicity associated  $\beta$ -cell dysfunction and apoptosis via AMPK signaling and anti-inflammatory actions[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(2): 924-937.
- [11] Wang X, Li H, De Leo D, et al. Gene and protein kinase expression profiling of reactive oxygen species-associated lipotoxicity in the pancreatic  $\beta$ -cell line MIN6[J]. *Diabetes*, 2004, 53(1): 129-140.
- [12] Kharroubi I, Ladrière L, Cardozo AK, et al. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms; role of nuclear factor- $\kappa$ B and endoplasmic reticulum stress[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(11): 5087-5096.
- [13] Karaskov E, Scott C, Zhang L, et al. Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(7): 3398-3407.
- [14] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis[J]. *Nature*, 2012, 481(7382): 463-468.
- [15] Li Q, Jia S, Xu L, et al. Metformin-induced autophagy and irisin improves INS-1 cell function and survival in high-glucose environment via AMPK/SIRT1/PGC-1 $\alpha$  signal pathway[J]. *Food Sci Nutr*, 2019, 7(5): 1695-1703.
- [16] Yang JS, Lu CC, Kuo SC, et al. Autophagy and its link to type II diabetes mellitus[J]. *Biomedicine(Taipei)*, 2017, 7(2): 1-12.
- [17] Stienstra R, Haim Y, Riahi Y, et al. Autophagy in adipose tissue and the beta cell: implications for obesity and diabetes[J]. *Diabetologia*, 2014, 57(8): 1505-1516.
- [18] Bachar-Wikstrom E, Wikstrom JD, Ariav Y, et al. Stimulation of autophagy improves endoplasmic reticulum stress-induced diabetes[J]. *Diabetes*, 2013, 62(4): 1227-1237.
- [19] Martino L, Masini M, Novelli M, et al. Palmitate activates autophagy in INS-1E  $\beta$ -cells and in isolated rat and human pancreatic islets[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36188.
- [20] Su H, Wang X. p62 stages an interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in the heart of defense against proteotoxic stress[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2011, 21(8): 224-228.
- [21] Zeng W, Tang J, Li H, et al. Caveolin-1 deficiency protects pancreatic  $\beta$  cells against palmitate-induced dysfunction and apoptosis[J]. *Cell Signal*, 2018, 47: 65-78.
- [22] Kim CG, Castro-Aceituno V, Abbai R, et al. Caspase-3/MAPK pathways as main regulators of the apoptotic effect of the phyto-mediated synthesized silver nanoparticle from dried stem of *Eleutherococcus senticosus* in human cancer cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 128-133.
- [23] Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, et al. Autophagy and apoptosis: where do they meet[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(4): 555-566.
- [24] Song S, Tan J, Miao Y, et al. Intermittent-hypoxia-induced autophagy activation through the ER-stress-related PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is a protective response to pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(6): 2955-2971.
- [25] Farrelly AM, Kilbride SM, Bonner C, et al. Rapamycin protects against dominant negative-HNF1A-induced apoptosis in INS-1 cells[J]. *Apoptosis*, 2011, 16(11): 1128-1137.
- [26] Barlow AD, Nicholson ML, Herbert TP. Evidence for rapamycin toxicity in pancreatic  $\beta$ -cells and a review of the underlying molecular mechanisms[J]. *Diabetes*, 2013, 62(8): 2674-2682.
- [27] Lv W, Zhang J, Jiao A, et al. Resveratrol attenuates hIAPP amyloid formation and restores the insulin secretion ability in hIAPP-INS1 cell line via enhancing autophagy[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2019, 97(2): 82-89.

(责任编辑:张学颖)