

内分泌腺疾病及代谢病基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002097

Vaspin 通过 Nrf2/ARE 信号通路对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞氧化应激的影响

吴亚茹¹, 刘师伟², 段瑞雪¹, 汪湄湄¹, 张佳新¹, 郭胜慧¹, 卫莹¹, 李欣³

(1. 山西医科大学研究生学院, 太原 030001; 2. 山西白求恩医院内分泌科, 太原 030032;

3. 太原市中心医院内分泌科, 太原 030009)

【摘要】目的:探讨 Vaspin 对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞氧化应激的影响。**方法:**培养 INS-1 细胞, 分为正常对照组 (NC 组)、高糖高脂组 (HG+PA 组)、高糖高脂+80 ng/mL Vaspin 组 (HG+PA+V1 组)、高糖高脂+160 ng/mL Vaspin 组 (HG+PA+V2 组)、高糖高脂+320 ng/mL Vaspin 组 (HG+PA+V3 组)、高糖高脂+640 ng/mL Vaspin 组 (HG+PA+V4 组)。通过 DCFH-DA 荧光探针染色法检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平; 比色法、酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测氧化应激相关指标; 葡萄糖 (3.3 mmol/L 和 16.7 mmol/L) 刺激胰岛素分泌实验检测各组胰岛素分泌水平; 流式细胞仪检测细胞凋亡水平; Western blot 检测核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 蛋白表达水平。**结果:**①与 HG+PA 组相比, HG+PA+V4 组中低糖和高糖刺激后的胰岛素分泌水平均有明显升高 (均 $P<0.05$); ②与 HG+PA 组相比, HG+PA+V4 组中高糖高脂诱导 INS-1 细胞中 ROS、丙二醛、8-羟基脱氧鸟苷水平明显降低, 总抗氧化能力、超氧化物歧化酶水平、谷胱甘肽过氧化物酶水平明显升高 (均 $P<0.05$); ③流式细胞实验发现, 与 HG+PA 组相比, 随着 Vaspin 浓度增加, 高糖高脂干预后 INS-1 细胞的凋亡水平明显下降 (均 $P<0.05$); ④Western blot 结果表明, 胞浆中 Nrf2 表达水平随着 Vaspin 浓度的增加呈上升趋势, 胞核 Nrf2 表达水平仅在 HG+PA+V4 组较 HG+PA 组升高 (0.798 ± 0.080 vs. 0.579 ± 0.065 , $P=0.039$)。**结论:** Vaspin 可以通过激活 Nrf2/抗氧化反应原件 (antioxidant response element, ARE) 信号通路, 改善高糖高脂诱导的 INS-1 细胞氧化应激损伤, 减少细胞凋亡, 增加胰岛素分泌水平。

【关键词】Vaspin; 氧化应激; 胰岛细胞功能; Nrf2/ARE 信号通路**【中图分类号】**R587.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-12-29

Effect of vaspin on high glucose and lipid induced oxidative stress in INS-1 cells via the Nrf2/ARE signaling pathway

Wu Yaru¹, Liu Shiwei², Duan Ruixue¹, Wang Meimei¹, Zhang Jiaxin¹, Guo Shenghui¹, Wei Ying¹, Li Xin³

(1. Department of Graduate School, Shanxi Medical University; 2. Department of Endocrinology, Shanxi Bethune Hospital; 3. Department of Endocrinology, Taiyuan Central Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of vaspin on high glucose and lipid induced oxidative stress in INS-1 cells. **Methods:** INS-1 cells were cultured and divided into normal control group, high glucose (HG)+palmitic acid (PA) group, HG+PA+vaspin (80 ng/mL) group, HG+PA+vaspin (160 ng/mL) group, HG+PA+vaspin (320 ng/mL) group, HG+PA+vaspin (640 ng/mL) group. Colorimetry and enzyme-linked immunosorbent assay were used to measure oxidative stress-related indicators; meanwhile, DCFH-DA

fluorescent probe staining, glucose-stimulated insulin secretion test (3.3 and 16.7 mmol/L), flow cytometry, and Western blot were used to determine the levels of intracellular reactive oxygen species (ROS), insulin secretion, apoptosis, and protein expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), respectively. **Results:** Compared with the HG+PA group, the HG+PA+vaspin (640 ng/mL) group had a significantly increased insulin secretion level after stimulation by both low-level and high-level glucose (both $P<0.05$) as well as significantly increased total antioxidant capacity and levels of superoxide dismutase

作者介绍: 吴亚茹, Email: wuyarunfm@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: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81471025); 山西省科技成果转化引导专项资助项目 (编号: 201604D131003); 山西省留学回国人员科技活动择优资助项目 (编号: 2017-1389); 白求恩·默克糖尿病研究基金资助项目 (编号: G2017044); 山西省自然科学基金资助项目 (编号: 201701D121150); 山西省重点研发计划资助项目 (编号: 201803D31133)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190429.0906.002.html> (2019-04-30)

and glutathione peroxidase (all $P < 0.05$), but had significantly decreased levels of ROS, malondialdehyde, and 8-hydroxydeoxyguanosine (all $P < 0.05$). With the increasing vaspin levels, the vaspin-treated groups had significantly reduced apoptosis in the INS-1 cells after intervention by high-level glucose and lipids compared with the HG+PA group, as revealed by flow cytometry (all $P < 0.05$), and showed an increasing trend in intracytoplasmic Nrf2 expression as revealed by Western blot, while the intranuclear Nrf2 expression was significantly higher only in the HG+PA+vaspin (640 ng/mL) group compared with the HG+PA group (0.798 ± 0.080 vs. 0.579 ± 0.065 , $P = 0.039$). **Conclusion:** Vaspin can suppress high glucose and palmitic acid induced oxidative stress injury in INS-1 cells, reduce apoptosis, and improve insulin secretion level by activating the Nrf2/ARE signaling pathway.

[Key words] vaspin; oxidative stress; islet cell function; Nrf2/ARE signaling pathway

胰岛 β 细胞衰退和功能障碍在 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 发展过程中起重要作用^[1]。随着糖尿病病程的延长, 胰岛 β 细胞功能逐渐下降, 凋亡增加, 最终发展为胰岛素的绝对分泌不足。因此, 从根本上来说, 对于糖尿病的治疗很大程度上就是针对胰岛 β 细胞的治疗。近年研究显示, 高血糖和(或)高游离脂肪酸可导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 大量生成和氧化应激毒性。与其他细胞相比, 胰岛 β 细胞中抗氧化酶水平及活性较低。因此, 胰岛 β 细胞更易受到氧化应激损伤, 导致胰岛素分泌异常, 加速糖尿病的发生发展^[2]。提高患者的抗氧化应激水平、改善氧化还原状态对糖尿病及其并发症的治疗非常重要。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 介导内源性抗氧化物表达被认为是机体防御 T2DM 引起氧化应激损伤的重要机制^[3]。先前研究证实, 当 Nrf2 激活后可保护胰岛 β 细胞损伤, 增加胰岛素敏感性, 这可能会更好地控制血糖, 预防糖尿病及微血管并发症的发展^[4-8]。

内脏脂肪特异性丝氨酸蛋白酶抑制剂 (visceral adipose tissue-derived serpin, Vaspin) 是 2005 年 Hida 等^[9]在自发性 T2DM 肥胖 OLETF 大鼠体内首次发现的, 是由内脏脂肪组织分泌的脂肪细胞因子。多项研究表明, Vaspin 是一个具有胰岛素增敏效应的脂肪细胞因子, 与胰岛素抵抗及 T2DM 密切相关^[9-10]。先前的研究发现, Vaspin 可通过胰岛素信号通路及炎症通路改善胰岛细胞分泌功能^[11]。然而, Vaspin 是否能通过抗氧化应激作用, 进而保护胰岛细胞, 改善胰岛细胞的功能, 目前国内外文献尚无研究报道。本研究将通过设立不同浓度的 Vaspin 干预组观察 Vaspin 对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞氧化应激水平

的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大鼠胰岛素瘤细胞 (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) 购于 Sigma 公司, 重组人 Vaspin 蛋白购于 Phoenix 公司, H2DCFDA 购于 MCE 公司, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC)、总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2 deoxyguanosine, 8-OHdG)、ELISA 试剂盒购自 Bio-Swamp 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, Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自 BD 公司, ECL 试剂盒购自 Pierce 公司, 兔抗大鼠 Nrf2 多克隆抗体购自 Abcam 公司, 兔抗大鼠 β -actin、Histone 抗体购自 CST 公司, 亚细胞结构胞浆和胞核蛋白提取试剂盒、凝胶配制试剂盒、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体购自北京碧云天公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 复苏 INS-1 细胞, 用含 10% 胎牛血清的普通 RPMI 1640 培养液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱进行细胞培养。将细胞分为 6 组: 正常对照组 (NC 组): 基础培养基培养 24 h; 高糖高脂组 (HG+PA 组): 33.3 mmol/L 葡萄糖 + 0.5 mmol/L PA 培养 24 h; 高糖高脂 + 80 ng/mL Vaspin 组 (HG+PA+V1 组)、高糖高脂 + 160 ng/mL Vaspin 组 (HG+PA+V2 组)、高糖高脂 + 320 ng/mL Vaspin 组 (HG+PA+V3 组)、高糖高脂 + 640 ng/mL Vaspin 组 (HG+PA+V4 组): 分别给予 80、160、320、640 ng/mL Vaspin 预处理 2 h 后, 再加入 33.3 mmol/L 葡萄糖 + 0.5 mmol/L PA 共培养 24 h。

1.2.2 葡萄糖刺激胰岛素分泌实验 将 INS-1 细胞以 1×10^5 个/mL 浓度接种于 24 孔板中,待细胞密度达 80%~90% 时,按 1.2.1 进行分组及处理。干预结束后,PBS 洗涤 2 次,在不含糖的 KRBH 缓冲液中平衡 30 min,分别用含糖 (3.3 mmol/L) 和高糖 (16.7 mmol/L) 的无血清培养液孵育 1 h,收集培养液,通过 ELISA 测定胰岛素含量来评价胰岛细胞基础和含糖刺激的胰岛素分泌能力。

1.2.3 DCFH-DA 荧光探针染色法检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平 将 INS-1 细胞以 2×10^5 个/mL 浓度接种于 6 孔板中,待细胞密度达 80%~90% 时,按 1.2.1 进行分组及处理。干预结束后,用 PBS 清洗 2 次,后加入 $10 \mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 的无血清培养液, 37°C 避光孵育 30 min 后,用 0.25% 不含 EDTA 的胰蛋白酶溶液消化收集细胞,并将其重悬于 2 mL PBS 中,立即用流式细胞仪进行分析,检测细胞内的 ROS 水平。

1.2.4 氧化应激及抗氧化应激水平 运用比色法测定脂质过氧化物 MDA, ELISA 法测定 DNA 氧化损伤作用的生物标志物 8-OHdG 含量。同时,通过比色法检测 T-AOC、T-SOD、GSH-PX 等抗氧化酶含量。

1.2.5 细胞凋亡水平 将 INS-1 细胞以 2×10^5 个/mL 浓度接种于 6 孔板中,待细胞密度达 80%~90% 时,按 1.2.1 进行分组及处理。收集处理后的 INS-1 细胞, $1\ 000\ \text{r/min}$ 离心 5 min,弃上清,用 $400\ \mu\text{L}$ $1 \times$ Binding Buffer 悬浮细胞,细胞浓度大约为 1×10^6 个/mL;在细胞悬浮液中加入 $5\ \mu\text{L}$ Annexin V-FITC,轻轻混匀后室温避光孵育 15 min,最后加入 $5\ \mu\text{L}$ PI 染色 5 min 后,在 1 h 内用流式细胞仪测定细胞凋亡率,并用 FlowJo (AsLand, OR, 美国) 软件处理。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达水平 根据亚细胞结构胞浆和胞核蛋白提取试剂盒说明书提取细胞胞浆与胞核蛋白, SDS-PAGE 分离蛋白,转膜 1 h, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入兔抗大鼠 Nrf2、 β -actin、Histone 抗体,浓度均为 1:1 000, 4°C 孵育过夜。TBS-T 洗涤 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育膜 1 h。TBS-T 洗涤 3 次后,膜与化学发光底物孵育,获得 Nrf2 目的条带,以 β -actin、Histone 分别作为胞浆蛋白与核蛋白的内参照,并用 Image J 分析软件分析目标带的分子量和净光密度值,结果代表样品的目的蛋白相对含量。

1.3 统计学处理

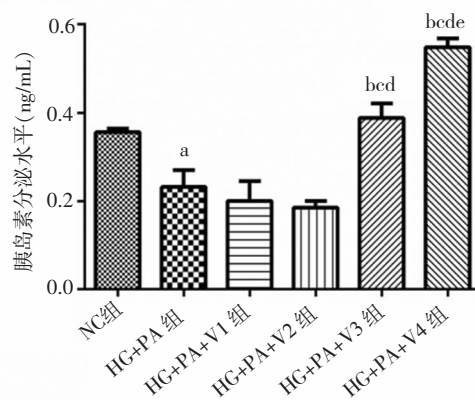
采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析及 Turkey 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

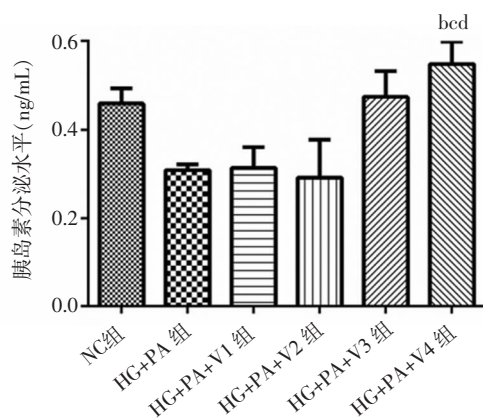
2.1 Vaspin 对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞胰岛素分泌的影响

与 NC 组相比,高糖高脂组 INS-1 细胞上清液中胰岛素

水平在 3.3 mmol/L 葡萄糖刺激下明显降低 (0.356 ± 0.009 vs. 0.232 ± 0.038 , $P=0.002$), 在 16.7 mmol/L 葡萄糖刺激下呈下降趋势,但差异无统计学意义 (0.459 ± 0.035 vs. 0.308 ± 0.013 , $P=0.096$)。HG+PA+V1 组、HG+PA+V2 组对高糖高脂干预后 INS-1 细胞低糖刺激后的胰岛素分泌功能无明显改善作用,而 HG+PA+V3 组、HG+PA+V4 组细胞分泌功能明显恢复 ($P=0.000$, $P=0.000$)。此外, HG+PA+V4 组高葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能 (0.540 ± 0.124) 较 HG+PA 组 (0.308 ± 0.013)、HG+PA+V1 组 (0.313 ± 0.047)、HG+PA+V2 组 (0.291 ± 0.156) 均有明显恢复 ($P=0.039$, $P=0.047$, $P=0.024$)。如图 1 所示。



A. 3.3 mmol/L 葡萄糖刺激的胰岛素分泌



B. 16.7 mmol/L 葡萄糖刺激的胰岛素分泌

注: a, 与 NC 组相比, $P<0.05$; b, 与 HG+PA 组相比, $P<0.05$; c, 与 HG+PA+V1 组相比, $P<0.05$; d, 与 HG+PA+V2 组相比, $P<0.05$; e, 与 HG+PA+V3 组相比, $P<0.05$

图 1 Vaspin 对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞胰岛素分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.2 Vaspin 对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞 ROS 水平的影响

本研究发现,采用高糖高脂干预 INS-1 细胞后,其 ROS 水平与 NC 组相比明显升高 (40.295 ± 0.2061 vs. 16.789 ± 0.870 , $P=0.000$),不同浓度 Vaspin ($80\ \text{ng/mL}$: 26.629 ± 1.032 ; $160\ \text{ng/mL}$: 18.740 ± 0.686 ; $320\ \text{ng/mL}$: 18.087 ± 0.611 ; $640\ \text{ng/mL}$: $17.785 \pm$

0.671) 干预 INS 细胞均可降低高糖高脂诱导的高 ROS 水平 (均 $P=0.000$)。进一步两两比较发现, HG+PA+V2 组、HG+PA+V3 组、HG+PA+V4 组差异无统计学意义, 而 3 组与 HG+PA+V1 组相比可明显降低 ROS 水平 (均 $P=0.000$)。如图 2 所示。

2.3 Vaspin 对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞氧化应激及抗氧化应激指标的影响

高糖高脂干预结束后, HG+PA 组 MDA、8-OHdG 水平较 NC 组明显增加 (26.421 ± 1.605 vs. 19.519 ± 0.736 , $P=0.000$; 87.998 ± 10.148 vs. 56.214 ± 3.817 , $P=0.000$), T-AOC、T-SOD、GSH-PX 水平较 NC 组明显降低 (0.017 ± 0.020 vs. 0.407 ± 0.136 , $P=0.005$; 29.208 ± 2.341 vs. 61.398 ± 2.440 , $P=0.000$; 57.545 ± 4.066 vs. 92.090 ± 8.358 , $P=0.001$)。随着 Vaspin 浓度的增加, MDA、8-OHdG 水平逐渐降低, T-AOC、T-SOD、

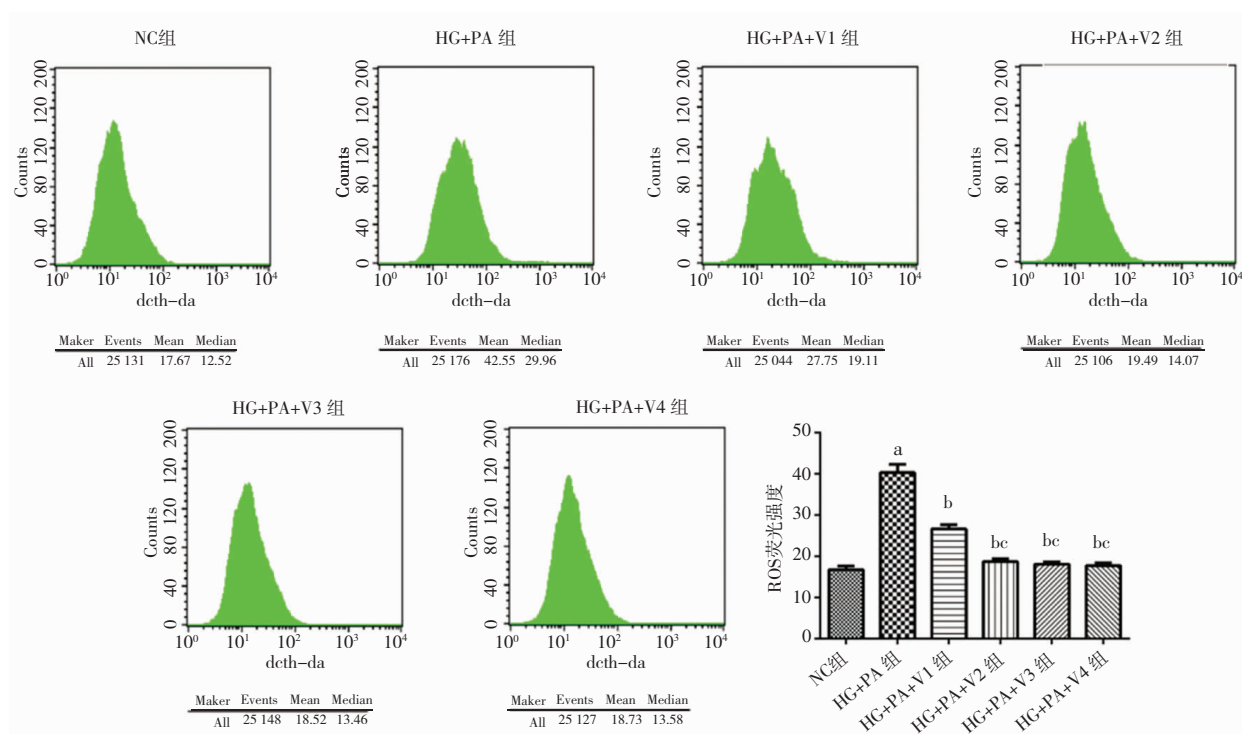
GSH-PX 水平呈增加趋势, 640 ng/mL Vaspin 对氧化应激指标的改善最为明显, 差异具有统计学意义 (表 1)。

2.4 Vaspin 对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞凋亡水平的影响

单因素方差分析显示, 与 NC 组相比, 高糖高脂干预 INS-1 细胞 24 h 后细胞凋亡水平明显增加 (13.087 ± 0.510 vs. 31.640 ± 1.318 , $P=0.000$)。Vaspin 对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞凋亡水平的影响呈浓度依赖性降低 (80 ng/mL: 28.231 ± 1.489 ; 160 ng/mL: 23.727 ± 1.208 ; 320 ng/mL: 22.156 ± 0.949 ; 640 ng/mL: 15.197 ± 0.792), 尤其以 640 ng/mL 时改善凋亡作用最为显著 ($P=0.023$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$)。如图 3 所示。

2.5 Vaspin 对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞 Nrf2/ARE 信号通路的影响

与 NC 组相比, 高糖高脂干预 INS-1 细胞 24 h 后, 胞浆



注: a, 与 NC 组相比, $P<0.05$; b, 与 HG+PA 组相比, $P<0.05$; c, 与 HG+PA+V1 组相比, $P<0.05$

图 2 Vaspin 对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

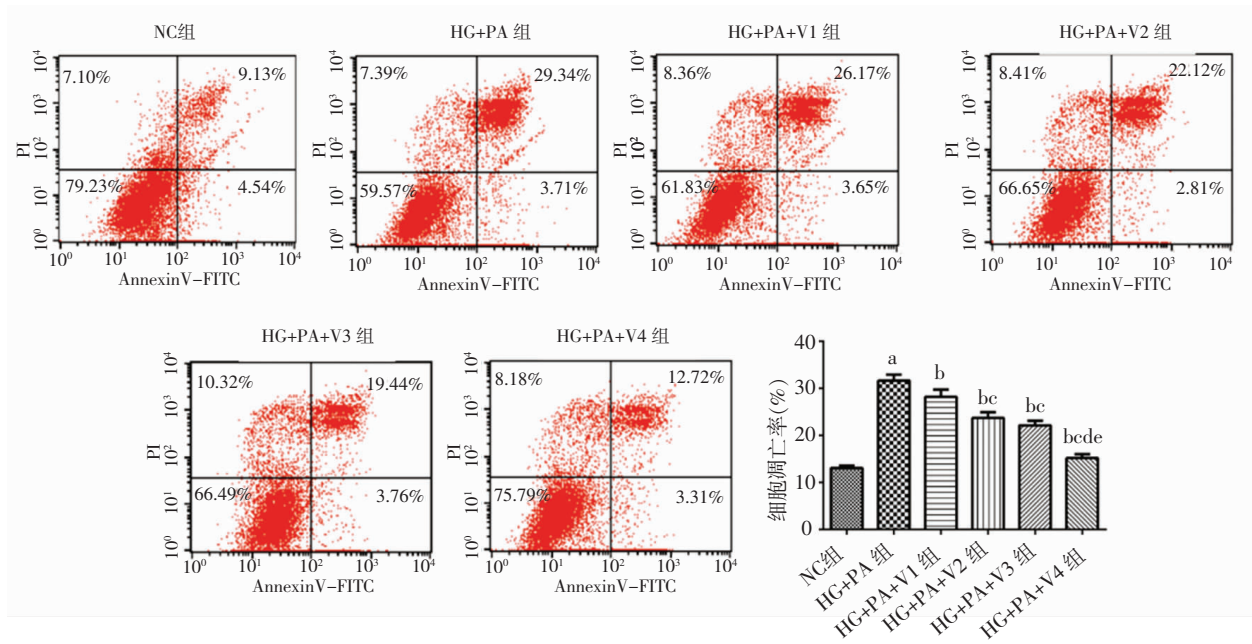
表 1 Vaspin 对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞氧化应激及抗氧化应激指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	MDA (nmol/mg 蛋白)	8-OHdG (pg/mL)	T-AOC (U/mg 蛋白)	T-SOD (U/mg 蛋白)	GSH-PX (活力单位)
NC组	19.519 ± 0.736	56.214 ± 3.817	0.407 ± 0.136	61.398 ± 2.440	92.090 ± 8.358
HG+PA组	26.421 ± 1.605^a	87.998 ± 10.148^a	0.017 ± 0.020^a	29.208 ± 2.341^a	57.545 ± 4.066^a
HG+PA+V1组	28.048 ± 1.623	66.898 ± 3.078^b	0.118 ± 0.192	31.780 ± 2.347	64.203 ± 6.110
HG+PA+V2组	25.911 ± 0.890	66.512 ± 2.745^b	0.326 ± 0.041^b	32.376 ± 2.527	64.996 ± 7.781
HG+PA+V3组	23.253 ± 0.653^{bc}	65.362 ± 3.042^b	0.572 ± 0.049^{bc}	34.189 ± 2.633	65.914 ± 5.132
HG+PA+V4组	18.171 ± 0.870^{bcd}	56.038 ± 2.779^b	0.717 ± 0.048^{cd}	52.931 ± 2.664^{bcd}	73.374 ± 9.476^b
F 值	36.940	16.127	20.275	86.781	8.739
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001

注: a, 与 NC 组相比, $P<0.05$; b, 与 HG+PA 组相比, $P<0.05$; c, 与 HG+PA+V1 组相比, $P<0.05$; d, 与 HG+PA+V2 组相比, $P<0.05$; e, 与 HG+PA+V3 组相比, $P<0.05$

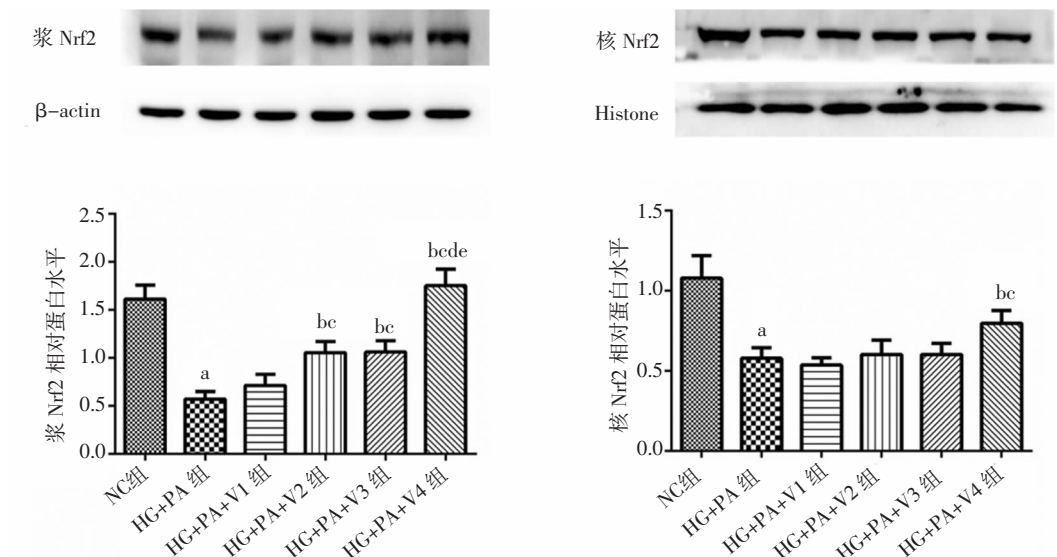
Nrf2 蛋白水平明显降低 (1.613 ± 0.146 vs. 0.572 ± 0.081 , $P=0.000$)。随着 Vaspin 浓度增加,胞浆中 Nrf2 蛋白的表达水平与 HG+PA 组相比呈增加趋势(HG+PA+V1 组: 0.714 ± 0.115 ; HG+PA+V2 组: 1.056 ± 0.115 ; HG+PA+V3 组: 1.062 ± 0.119 ; HG+PA+V4 组: 1.752 ± 0.174 ; $P=0.747$, $P=0.005$, $P=0.002$, $P=0.000$),且具有一定的浓度依赖性。与 NC 组相比,高糖高脂干

预 INS-1 细胞 24 h 后,胞核 Nrf2 蛋白水平明显降低(1.080 ± 0.141 vs. 0.579 ± 0.065 , $P=0.000$)。HG+PA+V1 组、HG+PA+V2 组、HG+PA+V3 组胞核 Nrf2 蛋白表达水平与 HG+PA 组无统计学差异,但是 HG+PA+V4 组胞核 Nrf2 蛋白较 HG+PA 组相比明显增加(0.798 ± 0.080 vs. 0.579 ± 0.065 , $P=0.039$)。如图 4 所示。



注:a,与 NC 组相比, $P<0.05$;b,与 HG+PA 组相比, $P<0.05$;c,与 HG+PA+V1 组相比, $P<0.05$;d,与 HG+PA+V2 组相比, $P<0.05$;e,与 HG+PA+V3 组相比, $P<0.05$

图 3 Vaspin 对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞凋亡水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



A. 细胞浆中 Nrf2 蛋白表达水平

B. 细胞核中 Nrf2 蛋白表达水平

注:a,与 NC 组相比, $P<0.05$;b,与 HG+PA 组相比, $P<0.05$;c,与 HG+PA+V1 组相比, $P<0.05$;d,与 HG+PA+V2 组相比, $P<0.05$;e,与 HG+PA+V3 组相比, $P<0.05$

图 4 Vaspin 对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞 Nrf2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 讨论

胰岛 β 细胞功能障碍和外周组织的胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是 T2DM 发病的 2 个关键环节^[12]。多项研究显示,氧化应激会导致胰岛 β 细胞功能损伤及外周胰岛素抵抗,诱发糖尿病,严重者更会导致糖尿病神经病变^[13]、糖尿病视网膜病变^[14]和糖尿病心血管病^[15]等多种并发症。因此,提高患者的抗氧化应激水平对糖尿病的治疗非常重要。Vaspin 是新近发现的一种具有胰岛素增敏作用的脂肪因子,可改善胰岛素抵抗^[9-10]。本研究团队前期研究发现,Vaspin 可通过胰岛素受体底物 2/磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白信号通路及 NF- κ B 炎症信号通路促进棕榈酸诱导的胰岛 β 细胞增殖,改善胰岛 β 细胞功能^[11]。此外,多项研究发现 Vaspin 还具有抗氧化应激的作用^[16-18]。那么,Vaspin 是否可以通过调节氧化应激反应来改善胰岛 β 细胞功能?

研究发现,长期慢性高血糖状态和(或)高游离脂肪酸介导的氧化应激毒性在诱发胰岛素抵抗、胰岛 β 细胞凋亡及功能障碍的过程中发挥了重要的作用^[19]。并且 ROS 产生过多或细胞内的抗氧化物质耗尽可以通过调节凋亡相关基因的表达,引起细胞凋亡^[20]。本研究通过高糖高脂培养液培养大鼠胰岛素瘤 INS-1 细胞,发现细胞 ROS、MDA、8-OHdG 及凋亡水平较 NC 组明显升高,T-AOC、T-SOD、GSH-PX、基础及高糖刺激的 INS-1 细胞胰岛素分泌功能较 NC 组明显降低,进一步证实了高糖毒性及高脂毒性可诱导胰岛 β 细胞产生氧化应激,严重损伤 β 细胞,诱发 β 细胞凋亡,从而影响 β 细胞功能。

Nrf2 介导内源性抗氧化物表达被认为是机体防御 T2DM 引起氧化应激损伤的重要机制^[3]。正常情况下,细胞质中的 Nrf2 与 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like-ECH associated protein 1, Keap1) 结合成二聚体形式,诱导 Nrf2 泛素化降解,导致胞浆及进入胞核内的 Nrf2 处于低水平状态,进而保持 Nrf2 下游基因处于基础表达水平,细胞处于稳态^[21]。当受到外界氧化应激分子或亲核物质刺激时,Keap1 中的半胱氨酸残基构象发生改变,Nrf2 与 Keap1 解离,游离的 Nrf2 由胞浆入核,通过与抗氧化反应原

件 (antioxidant response element, ARE) 相互作用,调控抗氧化酶和解毒酶如 SOD、GSH-PX 等的表达,中和过多 ROS,维持细胞氧化还原平衡,减轻糖尿病高血糖引起的氧化应激损伤,改善氧化应激诱导的胰岛素抵抗及胰岛细胞分泌功能障碍^[22]。本研究发现,Vaspin 可在一定程度上降低高糖高脂诱导的 ROS、MDA、8-OHdG 水平,提高细胞的总抗氧化能力,并且能增加 T-SOD 及 GSH-PX 水平,减轻氧化应激对细胞的损伤作用。李程等^[23]通过 Nrf2/ARE 通路特异性激活剂特丁基对苯二酚 (Tert-butyl hydroquinone, tBHQ) 证实了激活 Nrf2/ARE 通路可通过上调胰岛 β 细胞 II 相解毒酶和抗氧化酶表达,减少胰岛 β 细胞氧化应激反应和慢性炎症损伤。因此,本研究团队推测 Vaspin 可以作为一种新的抗氧化剂,调节高糖高脂环境下的氧化还原平衡。

在胰岛 β 细胞中,急性和短暂的葡萄糖依赖性 ROS 有助于保持正常的葡萄糖刺激胰岛素分泌功能。高葡萄糖和高脂肪酸导致 ROS 的长期持续升高,可能通过增加抗氧化酶水平来清除 ROS,减弱内源性 ROS 信号传导作用,从而损害 β 细胞功能^[24]。与此相反,抗氧化系统的激活也可以保护细胞免于氧化损伤与凋亡,最大限度降低氧化损伤造成的胰岛素分泌受损,从而改善胰岛分泌功能。Wang 等^[25]证实,Nrf2 可通过调节 ROS 诱导的氧化应激反应,增强胰岛 β 细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌和胰岛素敏感性。本研究中,高糖高脂干预 24 h 后,葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能明显降低。进一步研究发现,该组细胞氧化应激相关产物处于较高水平,而抗氧化酶处于较低水平,胞浆与胞核中 Nrf2 表达处于较低水平,细胞凋亡水平明显增加,证实了氧化-抗氧化防御系统失衡可导致 INS-1 细胞氧化应激损伤,引起分泌功能受损。不同浓度 Vaspin 干预后,可通过增加胞浆 Nrf2 蛋白水平,促进 Nrf2 蛋白核转位,改善高糖高脂环境造成的氧化应激损伤,提高基础和高糖刺激的胰岛素分泌功能。

综上所述,氧化应激在糖尿病的发生发展中起着举足轻重的作用。Vaspin 不仅能增加胰岛素敏感性,改善胰岛素抵抗状态,还能通过激活 Nrf2/ARE 通路改善氧化应激损伤引起的细胞凋亡及胰岛 β 细胞分泌功能。期待未来以 Vaspin 为代表的脂肪细胞因子能够从基础研究转化到临床,为 2 型糖尿病

等慢性代谢性疾病的预防及治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, et al. β -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment[J]. *Diabetes Care*, 2014, 37(6): 1751–1758.
- [2] Robertson RP, Harmon J, Tran PO, et al. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection[J]. *Diabetes*, 2003, 52(3): 581–587.
- [3] He X, Kan H, Cai L, et al. Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46(1): 47–58.
- [4] Yu Z, Shao W, Chiang Y, et al. Oltipraz upregulates the nuclear respiratory factor 2 alpha subunit (Nrf2) antioxidant system and prevents insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet in C57BL/6J mice[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(4): 922–934.
- [5] Yagishita Y, Fukutomi T, Sugawara A, et al. Nrf2 protects pancreatic beta-cells from oxidative and nitrosative stress in diabetic model mice[J]. *Diabetes*, 2014, 63(2): 605–618.
- [6] Negi G, Kumar A, Joshi RP, et al. Oxidative stress and Nrf2 in the pathophysiology of diabetic neuropathy: old perspective with a new angle[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 408(1): 1–5.
- [7] Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(7): 719–731.
- [8] Pergola PE, Raskin P, Toto RD, et al. Bardoxolone methyl and kidney function in ckd with type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(4): 327–336.
- [9] Hida K, Wada J, Eguchi J, et al. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(30): 10610–10615.
- [10] Liu SW, Duan RX, Wu YR, et al. Effects of vaspin on insulin resistance in rats and underlying mechanisms[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 13542.
- [11] Liu SW, Li X, Wu YR, et al. Effects of vaspin on pancreatic beta cell secretion via Pi3k/Akt and NF- κ B signaling pathways[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0189722.
- [12] Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism[J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 799–806.
- [13] Hernández-Beltrán N, Moreno CB, Gutiérrez-Álvarez AM. Contribution of mitochondria to pain in diabetic neuropathy[J]. *Endocrinol Nutr*, 2013, 60(1): 25–32.
- [14] Souza BM, Assmann TS, Kliemann LM, et al. The role of uncoupling protein 2 (UCP2) on the development of type 2 diabetes mellitus and its chronic complications[J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2011, 55(4): 239–248.
- [15] Selvaraju V, Joshi M, Suresh S, et al. Diabetes, oxidative stress, molecular mechanism, and cardiovascular disease—an overview[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2012, 22(5): 330–335.
- [16] Phalitakul S, Okada M, Hara Y, et al. Vaspin prevents methylglyoxal-induced apoptosis in human vascular endothelial cells by inhibiting reactive oxygen species generation[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2013, 209(3): 212–219.
- [17] Zahradka P. Inhibition of nadph oxidase by vaspin may prevent progression of atherosclerosis[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2013, 209(3): 195–198.
- [18] Qi D, Wang D, Zhang C, et al. Vaspin protects against lps-induced atherosclerosis by inhibiting inflammation, apoptosis and reactive oxygen species generation in pulmonary endothelial cells via the Akt/Gsk3 β pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(6): 1803–1817.
- [19] Piro S, Anello M, Di Pietro C, et al. Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress[J]. *Metabolism*, 2002, 51(10): 1340–1347.
- [20] Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, et al. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes[J]. *Cell*, 1991, 67(5): 879–888.
- [21] Kumar H, Kim IS, More SV, et al. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/Are pathway for chronic diseases[J]. *Nat Prod Rep*, 2014, 31(1): 109–139.
- [22] Wu KC, McDonald PR, Liu JJ, et al. Implementation of a high-throughput screen for identifying small molecules to activate the Keap1-Nrf2-Are pathway[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e44686.
- [23] 李程, 夏纪毅, 万沁. Nrf2/Are 通路对 2 型糖尿病大鼠胰岛 B 细胞的保护作用[J]. *中华内分泌外科杂志*, 2016, 10(3): 201–205.
- [24] Pi J, Collins S. Reactive oxygen species and uncoupling protein 2 in pancreatic beta-cell function[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2010, 12(S2): 141–148.
- [25] Wang X, Hai CX. Ros acts as a double-edged sword in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: is Nrf2 a potential target for the treatment?[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11(12): 1082–1092.

(责任编辑:唐秋姗)