

内分泌腺疾病及代谢病基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002088

Vaspin对棕榈酸诱导的 INS-1 细胞自噬水平的影响

段瑞雪¹, 刘师伟², 常冰梅¹, 吴亚茹¹, 汪涓涓¹, 张佳新¹, 郭胜慧¹, 李欣³, 张琦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:研究脂肪细胞因子 Vaspin 对棕榈酸诱导的 INS-1 细胞自噬水平的影响。**方法:**培养 INS-1 细胞, 分为正常组:用普通培养基培养 24 h; 棕榈酸(palmitic acid, PA)组:以 0.5 mmol/L PA 培养 24 h; PA+Vaspin 组:先加入 320 ng/mL Vaspin 预培养 2 h, 再以 0.5 mmol/L PA+320 ng/mL Vaspin 共培养 24 h; PA+Vaspin+雷帕霉素(rapamycin)组:先以 50 nmol/L Rapamycin 预培养 2 h, 再以 0.5 mmol/L PA+320 ng/mL Vaspin 共培养 24 h; PA+Vaspin+3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)组:先以 1 mmol/L 3-MA 预培养 2 h, 再以 0.5 mmol/L PA+320 ng/mL Vaspin 共培养 24 h。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, Western blot 检测哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、p-mTOR、Beclin-1、LC3-I、LC3-II 及 P62 蛋白水平, mRFP-GFP-LC3 检测自噬流水平, 流式细胞仪检测细胞凋亡水平。**结果:**与正常组相比, PA 组 INS-1 细胞上清液中胰岛素分泌水平在 3.3 mmol/L 葡萄糖和 16.7 mmol/L 葡萄糖刺激下均降低 [(1.02 ± 0.08) ng/mL vs. (0.54 ± 0.06) ng/mL, $P=0.000$; (1.15 ± 0.13) ng/mL vs. (0.71 ± 0.05) ng/mL, $P=0.000$], PA+Vaspin 组较 PA 组升高 [(0.76 ± 0.03) ng/mL vs. (0.54 ± 0.06) ng/mL, $P=0.001$; (0.91 ± 0.04) ng/mL vs. (0.71 ± 0.05) ng/mL, $P=0.011$]; 与正常组相比, PA 组 INS-1 细胞 p-mTOR 与 mTOR 蛋白比值低 (2.04 ± 0.14 vs. 1.19 ± 0.09, $P=0.000$), PA+Vaspin 组 p-mTOR 与 mTOR 蛋白比值较 PA 组高 (1.51 ± 0.05 vs. 1.19 ± 0.09, $P=0.005$); 同时, PA 组自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 II/LC3 I 比值与正常组相比明显增加 (0.81 ± 0.07 vs. 0.65 ± 0.04, $P=0.005$; 2.35 ± 0.25 vs. 1.16 ± 0.11, $P=0.000$), P62 蛋白水平降低 (1.04 ± 0.19 vs. 0.60 ± 0.08, $P=0.000$); PA+Vaspin 组 Beclin-1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平较 PA 组低 (0.58 ± 0.04 vs. 0.81 ± 0.07, $P=0.001$; 1.95 ± 0.08 vs. 2.35 ± 0.25, $P=0.007$), P62 蛋白增加 (0.82 ± 0.03 vs. 0.60 ± 0.08, $P=0.032$); PA 组自噬溶酶体数量较正常组多 (8.33 ± 1.53 vs. 0.33 ± 0.58, $P=0.000$), Vaspin 干预后降低 (3.67 ± 1.53 vs. 8.33 ± 1.53, $P=0.001$); 同时, PA 干预 INS-1 细胞 24 h 后细胞凋亡明显增加 (7.91 ± 0.50 vs. 22.15 ± 2.05, $P=0.000$), PA+Vaspin 组较 PA 组细胞凋亡减少 (13.23 ± 1.97 vs. 22.15 ± 2.05, $P=0.000$)。**结论:**Vaspin 能够改善棕榈酸诱导的 INS-1 细胞过度自噬和细胞凋亡, 改善胰岛 β 细胞分泌功能。

【关键词】Vaspin; 棕榈酸; 自噬; 胰岛 β 细胞功能**【中图分类号】**R587.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-09-08

Effect of vaspin on the level of palmitic acid-induced autophagy in INS-1 cells

Duan Ruixue¹, Liu Shiwei², Chang Bingmei¹, Wu Yaru¹, Wang Meimei¹, Zhang Jiaxin¹, Guo Shenghui¹,Li Xin³, Zhang Qi³

(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 the adipocytokine vaspin on the level of palmitic acid (PA)-induced autophagy in**作者介绍:**段瑞雪, Email: duanruixuenfm@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); 山西省回国留学人员科研资助项目(编号:2015-109); 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); 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)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190422.1342.002.html>
(2019-04-23)

INS-1 cells. **Methods:** INS-1 cells were divided into groups and cultured as follows: normal group: cultured in an ordinary medium for 24 hours; PA group: cultured with 0.5 mmol/L PA for 24 hours; PA+vaspin group: pre-cultured with 320 ng/ml vaspin for 2 hours, and then co-cultured with 0.5 mmol/L PA and 320 ng/mL vaspin for 24 hours; PA+vaspin+rapamycin group: pre-cultured with 50 nmol/L rapamycin for 2 hours, and then co-cultured with 0.5 mmol/L PA and 320 ng/mL vaspin for 24 hours; PA+vaspin+3-methyladenine(3-MA) group: pre-cultured with 1 mmol/L 3-MA for 2 hours, and then co-cultured with 0.5

mmol/L PA and 320 ng/mL vaspin for 24 hours. The glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) test (with glucose levels of 3.3 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, Beclin-1, LC3-I, LC3-II, and P62; mRFP-GFP-LC3 and flow cytometry were used to determine the autophagic flow and cell apoptosis, respectively. **Results:** Compared with the normal group, the PA group had significantly reduced GSIS levels in the INS-1 cell supernatant [(1.02 ± 0.08) ng/mL vs. (0.54 ± 0.06) ng/mL, $P=0.000$; (1.15 ± 0.13) ng/mL vs. (0.71 ± 0.05) ng/mL, $P=0.000$], while the vaspin-treated group had significantly increased GSIS levels than the PA group [(0.76 ± 0.03) ng/mL vs. (0.54 ± 0.06) ng/mL, $P=0.001$; (0.91 ± 0.04) ng/mL vs. (0.71 ± 0.05) ng/mL, $P=0.011$]. Compared with the normal group, the PA group had a significantly reduced p-mTOR-to-mTOR ratio (2.04 ± 0.14 vs. 1.19 ± 0.09, $P=0.000$), while the vaspin-treated group had a significantly increased ratio compared with the PA group (1.51 ± 0.05 vs. 1.19 ± 0.09, $P=0.005$). Compared with the normal group, the PA group had significant increases in the level of the autophagy-associated protein Beclin-1 and the ratio of LC3-II to LC3-I (0.65 ± 0.04 vs. 0.81 ± 0.07, $P=0.005$; 1.16 ± 0.11 vs. 2.35 ± 0.25, $P=0.000$) and a significant reduction in P62 level (1.04 ± 0.19 vs. 0.60 ± 0.08, $P=0.000$); the vaspin-treated group had significant decreases in the Beclin-1 level and the LC3-II-to-LC3-I ratio (0.58 ± 0.04 vs. 0.81 ± 0.07, $P=0.001$; 1.95 ± 0.08 vs. 2.35 ± 0.25, $P=0.007$) and a significant increase in P62 level (0.82 ± 0.03 vs. 0.60 ± 0.08, $P=0.032$) compared with the PA group. The PA group had a significantly higher number of autolysosomes than the normal group (8.33 ± 1.53 vs. 0.33 ± 0.58, $P=0.000$), while the vaspin-treated group had a significantly reduced number of autolysosomes compared with the PA group (3.67 ± 1.53 vs. 8.33 ± 1.53, $P=0.001$). After treatment for 24 hours, the PA group had a significantly increased apoptosis rate of INS-1 cells compared with the normal group (22.15 ± 2.05 vs. 7.91 ± 0.50, $P=0.000$), while the vaspin-treated group had a significantly reduced apoptosis rate compared with the PA group (13.23 ± 1.97 vs. 22.15 ± 2.05, $P=0.000$). **Conclusion:** Vaspin can inhibit PA-induced excessive autophagy and apoptosis of INS-1 cells, thus improving the secretory function of islet β cells.

[Key words] vaspin; palmitic acid; autophagy; islet β cell function

随着经济的飞速发展、生活方式的改变及不良生活习惯的形成,糖尿病的发病率在世界范围内日益增加。据国际糖尿病联盟(International Diabetes Federation, IDF)最新统计,2017 年全球糖尿病患者人数已达 4.25 亿,我国糖尿病患者人数已达 1.14 亿,仍居全球首位,其中 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者占绝大多数^[1]。胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和胰岛 β 细胞功能障碍是 T2DM 的主要发病机制,而胰岛 β 细胞功能缺陷是其中心环节。越来越多的研究表明,自噬与胰岛 β 细胞功能及 2 型糖尿病的发生密切相关^[2-3]。研究发现,在 2 型糖尿病患者的 β 细胞中可观察到自噬体和细胞内胰淀粉样多肽(islet amyloid polypeptide, IAPP)毒性低聚物的积累,表明 2 型糖尿病时自噬系统是活跃的,但是是有缺陷的^[4]。

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^[5]在自发性 T2DM 肥胖(otsuka long-evans tokushima fatty, OLETF)大鼠体内首次发现的由内脏脂肪组织分泌的脂肪细胞因子。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^[5-6]。Vaspin 对胰岛细胞功能的改善作用是否与自噬有关,目前尚未有研究报道。本研究结合自噬激活剂雷帕霉素(rapamycin)和抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)观察 Vaspin 对棕榈酸(palmitic acid, PA)诱导的 INS-1 细胞自噬水平的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大鼠 INS-1 胰岛素瘤细胞购自美国 ATCC 公司, RPMI-1640 培养基及胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco 公司, 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, 自噬激活剂 rapamycin、自噬抑制剂 3-MA 购于 MCE 公司, 大鼠胰岛素 Elisa 试剂盒购于上海西唐生物科技有限公司, 兔抗哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抗体、p-mTOR 抗体、LC3B 抗体、Beclin 1 抗体、P62 抗体及 β -actin 抗体购于 Abcam 公司, 蛋白提取试剂盒、凝胶配制试剂盒、HRP-羊抗兔 IgG 抗体购自北京碧云天公司, ECL 试剂盒购于 Pierce 公司, mRFP-GFP-LC3 腺病毒购于上海汉恒生物科技有限公司, Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购于 BD

公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 INS-1 细胞培养基为 RPMI-1640 培养基+丙酮酸钠+β-巯基乙醇+双抗+10%FBS。置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱进行培养。每 48 h 换液一次,当长到 80%~90%时,用 0.25%的胰蛋白酶消化细胞后进行传代。

分组情况:正常组,用普通培养基培养 24 h;PA 组,以 0.5 mmol/L PA 培养 24 h;PA+Vaspin 组,先加入 320 ng/mL Vaspin 预培养 2 h,再以 0.5 mmol/L PA+320 ng/mL Vaspin 共培养 24 h;PA+Vaspin+rapamycin 组,先以 50 nmol/L rapamycin 预培养 2 h,再以 0.5 mmol/L PA+320 ng/mL Vaspin 共培养 24 h;PA+Vaspin+3-MA 组:先以 1 mmol/L 3-MA 预培养 2 h,再以 0.5 mmol/L PA+320 ng/mL Vaspin 共培养 24 h。

1.2.2 葡萄糖刺激胰岛素分泌实验(glucose stimulated insulin secretion, GSIS) 各组细胞干预结束后,用 PBS 洗一次,加上 1 mL 无糖的 KRB Buffer 培养 1 h。去掉上清,加 1 mL 含 3.3 mmol/L (低糖)或 16.7 mmol/L (高糖)葡萄糖的 KRB Buffer,继续孵育 1 h 之后,收集上清至 2 mL EP 管中,ELISA 试剂盒检测各组细胞中胰岛素分泌量。每组重复实验 3 次,取平均值。

1.2.3 Western blot 检测自噬相关蛋白表达水平 提取细胞总蛋白,经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离,转移到 PVDF 膜上,用脱脂奶粉封闭 2 h,去离子水冲洗一遍后,加入兔抗大鼠 p-mTOR 抗体、mTOR 抗体、Beclin-1 抗体、LC3B 抗体、P62 抗体和抗 β-actin 抗体(TBS-T、5%脱脂奶粉/BSA 配制)4℃过夜。加入辣根过氧化物酶标记的二抗(TBS-T、5%脱脂奶粉/BSA 配制)以结合一抗,室温孵育膜 1 h。TBS-T 洗涤 3 次后,膜与化学发光底物孵育,经 X 胶片曝光显影。图片扫描保存为电脑文件,并用 Image J 分析软件将图片上每个特异条带灰度值数字化。目的蛋白的灰度值除以内参 β-actin 的灰度值以校正误差,所得结果代表样品的目的蛋白相对含量。每组重复实验 3 次,取平均值。

1.2.4 mRFP-GFP-LC3 检测自噬流 细胞接种于 24 孔板,待细胞贴壁 24 h 后,用 mRFP-GFP-LC3 腺病毒感染 INS-1 细胞(MOI=60),2 h 后换液,感染 24 h 后按照 1.2.1 的实验分组处理细胞,干预结束后进行细胞固定、封片,荧光显微镜观察自噬体和自噬溶酶体形成情况,拍照分析。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡 细胞处理结束后用 0.25%胰蛋白酶消化后分别收集细胞。冰 PBS 洗涤后轻轻吹打细胞,收集细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,倾去多余的培养液,吹打成单细胞悬液;用冰 PBS 洗涤 2 次,制成每管约含 1×10^5 个细胞/100 μL 的细胞悬液,离心后弃上清,以 500 μL 结合缓冲液重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻摇晃,室温避光孵育 15 min 后,上机前 5 min 再加入 5 μL 的 PI 染色;使用 BD ActuiC6 流式细胞仪测定细胞凋亡率,并用 FlowJo(AsLand, OR, 美国)软件处理。

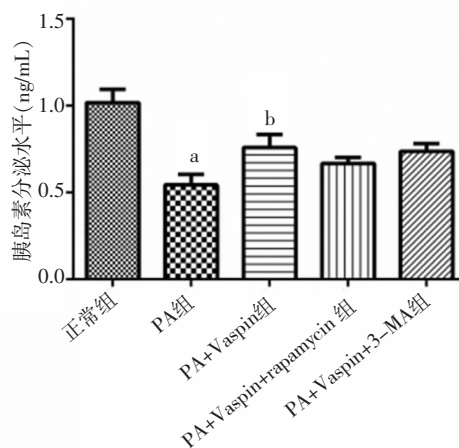
1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较用 *t* 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析及 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

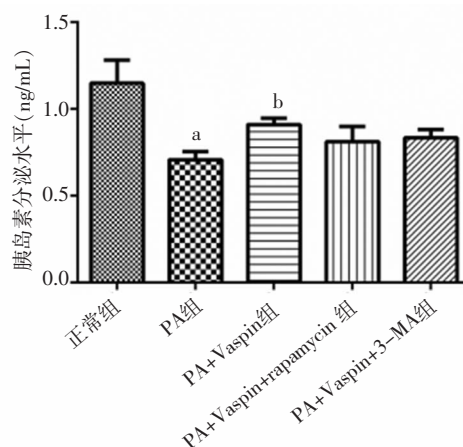
2 结果

2.1 Vaspin 对棕榈酸诱导的 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 葡萄糖刺激下均降低 [(1.02 ± 0.08) ng/mL vs. (0.54 ± 0.06) ng/mL, $P=0.000$; (1.15 ± 0.13) ng/mL vs. (0.71 ± 0.05) ng/mL, $P=0.000$], PA+Vaspin 组较 PA 组升高 [(0.76 ± 0.03) ng/mL vs. (0.54 ± 0.06) ng/mL, $P=0.001$; (0.91 ± 0.04) ng/mL vs. (0.71 ± 0.05) ng/mL, $P=0.011$]。PA+Vaspin+rapamycin 组和 PA+Vaspin+3-MA 组胰岛素水平与 PA+Vaspin 组相比,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。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,与正常组比较, $P<0.05$;b,与PA组比较, $P<0.05$

图1 葡萄糖刺激胰岛素分泌实验 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

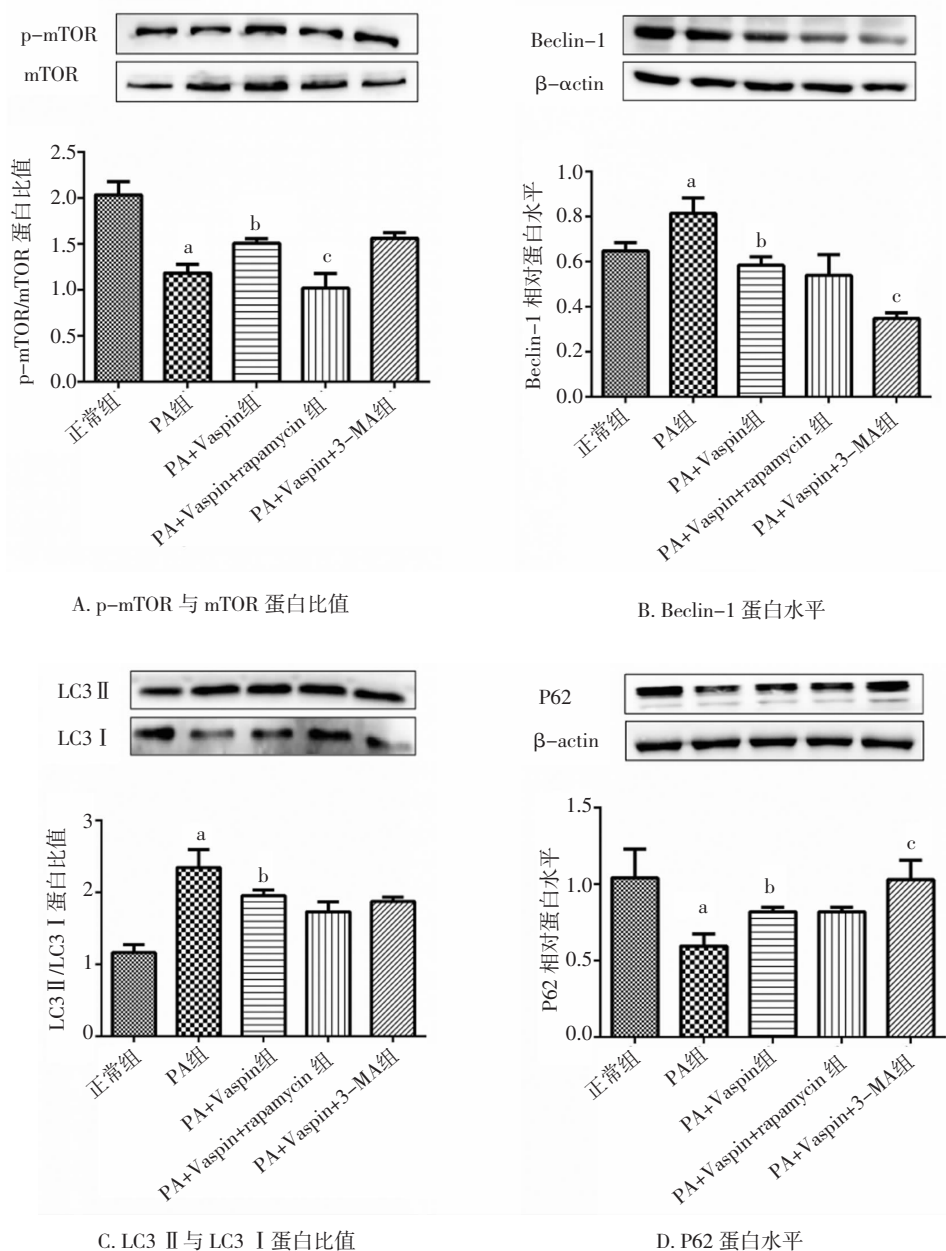
2.2 Vaspin 对棕榈酸诱导的 INS-1 细胞自噬水平的影响

与正常组相比,PA 组 INS-1 细胞 p-mTOR 与 mTOR 蛋白比值低(2.04 ± 0.14 vs. 1.19 ± 0.09 , $P=0.000$),Vaspin 干预后升高(1.19 ± 0.09 vs. 1.51 ± 0.05 , $P=0.005$);PA+Vaspin+rapamycin 组 p-mTOR 与 mTOR 蛋白比值较 PA+Vaspin 组低(1.02 ± 0.15 vs. 1.51 ± 0.05 , $P=0.000$),PA+Vaspin+3-MA 组与 PA+Vaspin 组相比,差异无统计学意义(1.56 ± 0.06 vs. 1.51 ± 0.05 , $P=0.545$)。同时,PA 组自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 II/LC3 I 与正常组相比明显增加(0.81 ± 0.07 vs. 0.65 ± 0.04 , $P=0.005$; 2.35 ± 0.25 vs. 1.16 ± 0.11 , $P=0.000$),P62 蛋白水平降低(0.60 ± 0.08 vs. 1.04 ± 0.19 , $P=0.000$);PA+Vaspin 组 Beclin-1、

LC3 II/LC3 I 较 PA 组降低(0.58 ± 0.04 vs. 0.81 ± 0.07 , $P=0.001$; 1.95 ± 0.08 vs. 2.35 ± 0.25 , $P=0.007$),P62 蛋白增加(0.82 ± 0.03 vs. 0.60 ± 0.08 , $P=0.032$);PA+Vaspin+3-MA 组 Beclin-1 蛋白水平与 PA+Vaspin 组相比较低(0.35 ± 0.02 vs. 0.58 ± 0.04 , $P=0.001$),P62 蛋白水平较高(1.03 ± 0.13 vs. 0.82 ± 0.03 , $P=0.040$),PA+Vaspin+rapamycin 组与 PA+Vaspin 组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。如图 2 所示。

2.3 Vaspin 对棕榈酸诱导的 INS-1 细胞自噬流的影响

与正常组相比,PA 干预后增加了自噬体和自噬溶酶体的数量(0.67 ± 0.58 vs. 3.33 ± 0.58 , $P=0.003$; 0.33 ± 0.58 vs. 8.33 ± 1.53 , $P=0.000$),Vaspin 干预后降低(0.33 ± 0.58 vs. 3.33 ± 0.58 ,



注:a,与正常组比较, $P<0.05$;b,与PA组比较, $P<0.05$;c,与PA+Vaspin组比较, $P<0.05$

图2 Western blot 检测自噬相关蛋白($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

$P=0.002$; 3.67 ± 1.53 vs. 8.33 ± 1.53 , $P=0.001$); PA+Vaspin+rapamycin 组自噬体数量较 PA+Vaspin 组增加 (4.67 ± 1.53 vs. 0.33 ± 0.58 , $P=0.000$), 自噬溶酶体无明显差异 (1.67 ± 1.53 vs. 3.67 ± 1.53 , $P=0.087$); PA+Vaspin+3-MA 组自噬体较 PA+Vaspin 组无明显改变 (0.67 ± 0.58 vs. 0.33 ± 0.58 , $P=0.644$), 自噬溶酶体数量减少 (1.00 ± 1.00 vs. 3.67 ± 1.53 , $P=0.030$)。如图 3 所示。

2.4 Vaspin 对棕榈酸诱导的 INS-1 细胞凋亡的影响

与正常组相比, PA 干预 INS-1 细胞 24 h 后细胞凋亡明显增加 (7.91 ± 0.50 vs. 22.15 ± 2.05 , $P=0.000$), PA+Vaspin 组较 PA 组细胞凋亡减少 (13.23 ± 1.97 vs. 22.15 ± 2.05 , $P=0.000$)。PA+Vaspin+rapamycin 组和 PA+Vaspin+3-MA 组细胞凋亡与 PA+Vaspin 组相比, 差异无统计学意义 (13.85 ± 1.09 vs. 13.23 ± 1.97 , $P=0.611$; 12.76 ± 0.90 vs. 13.23 ± 1.97 , $P=0.697$)。如图 4 所示。

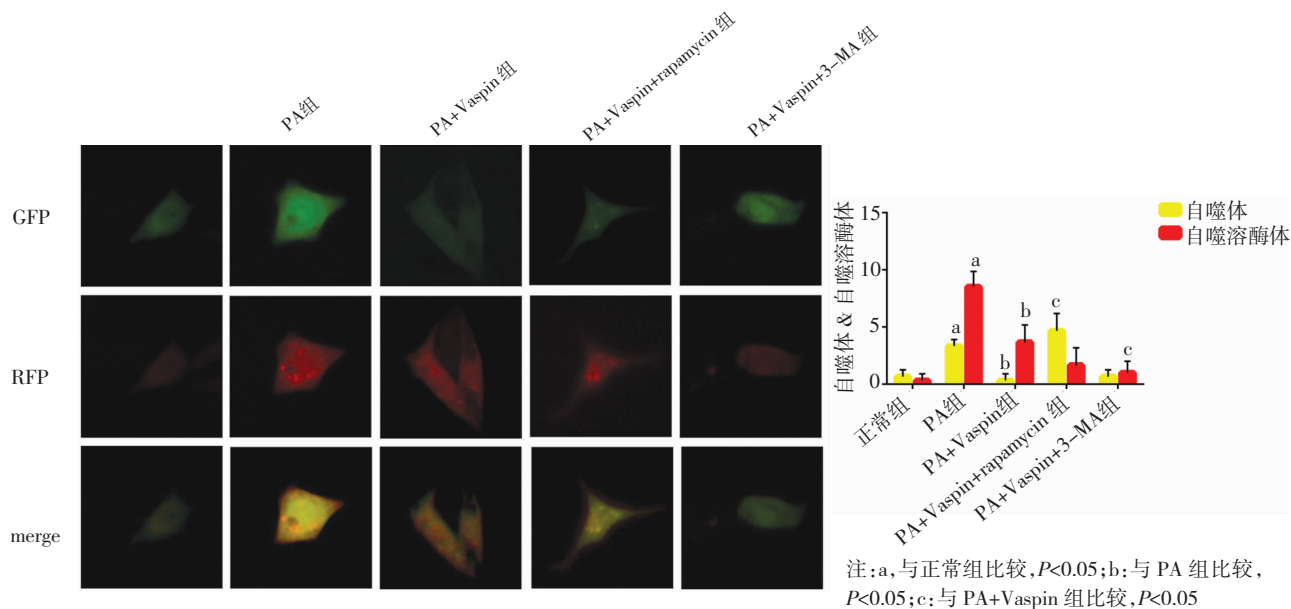


图 3 mRFP-GFP-LC3 检测自噬流 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

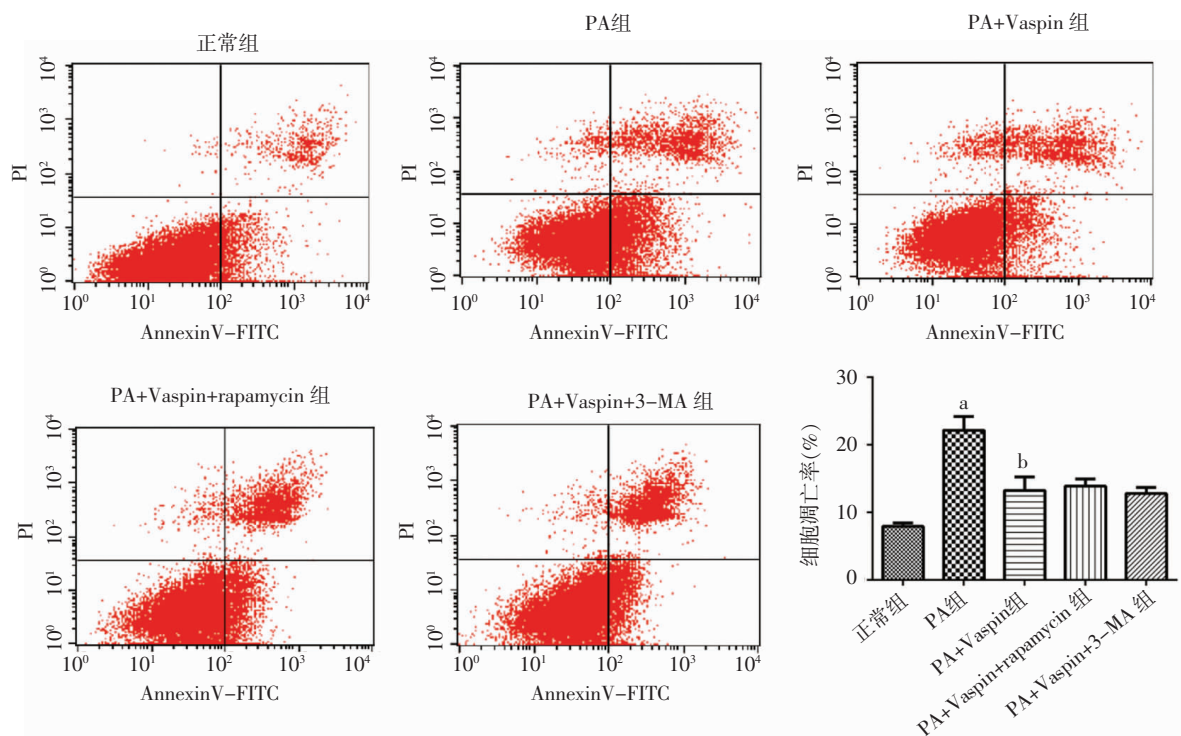


图 4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 讨论

胰岛 β 细胞功能障碍和胰岛素抵抗是 T2DM 发病的重要病理生理机制,胰岛 β 细胞功能障碍是其发生发展的关键因素。近几年的研究发现,脂肪组织不仅是机体储存能量的主要场所,还是一个活跃的内分泌器官,可以分泌一系列激素和细胞因子,参与生理病理过程的调节^[7-9]。Vaspin 是 2005 年首次报道的一种腹腔脂肪组织合成和分泌的脂肪细胞因子,属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员^[5]。研究发现,Vaspin 是一个具有胰岛素增敏效应的脂肪细胞因子,具有抗炎、抗胰岛素抵抗的作用,与胰岛细胞功能及 T2DM 密切相关^[10-12]。此外,有研究发现 Vaspin 可以改善棕榈酸诱导的 INS-1 细胞分泌功能,然而其具体作用机制尚不清楚,对 Vaspin 的深入研究可能为 2 型糖尿病的治疗提供新靶点。本研究发现,PA 干预明显减少了葡萄糖刺激的 INS-1 细胞胰岛素分泌量,而 Vaspin 干预则增加了 INS-1 细胞上清液中的胰岛素含量,提示 Vaspin 确实具有改善胰岛细胞分泌功能的作用,与之前的研究结果一致。

自噬是广泛存在于细胞中的生命现象,是生物在发育、老化过程都存在的一个净化自身多余或受损细胞器的共同机制^[13]。生理性自噬是细胞的自我保护机制,有益于细胞的生长发育,防止代谢应激和氧化损伤,对维持细胞内稳态及细胞产物的合成、降解和循环再利用具有重要作用。但是,自噬过度激活可能导致氧化应激、降解细胞成分、细胞死亡等,以一种不同于凋亡和坏死的方式使细胞死亡^[14]。近年来,越来越多的研究表明自噬与胰岛 β 细胞功能及 T2DM 的发生密切相关^[15-17]。先前有研究发现,在 2 型糖尿病患者的 β 细胞中可观察到自噬体和 IAPP 毒性低聚物的积累,表明 2 型糖尿病时自噬系统是活跃的,但是是有缺陷的^[4]。另外 1 项对 14 例糖尿病患者和 12 名非糖尿病者的 4 112 个胰岛 β 细胞进行研究发现,糖尿病患者胰岛 β 细胞死亡数量和自噬体数量均多于非糖尿病者^[18],提示 T2DM 时胰岛 β 细胞中存在自噬加强的现象。本研究结合自噬激活剂雷帕霉素及自噬抑制剂 3-MA 探讨了 Vaspin 对棕榈酸诱导的 INS-1 细胞自噬水平的影响。结果发现 PA 干预后 p-mTOR 与 mTOR 蛋白比

值降低,而 Vaspin 干预后增加。同时,PA 干预增加了自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平,降低了 P62 蛋白水平,Vaspin 干预后呈现相反的趋势。且加入自噬抑制剂 3-MA 后,自噬水平被进一步抑制。同时,本研究利用 RFP-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、淬灭,RFP 的红色荧光将逐渐增强,表示自噬流发生。本实验结果表明,PA 干预后自噬流水平升高,Vaspin 干预则抑制了自噬流水平的升高,加入 3-MA 后自噬流水平被进一步抑制。因此,本研究进一步从细胞水平证实,在 PA 诱导下 INS-1 细胞存在自噬过度激活的现象,而 Vaspin 减轻了自噬水平。

mTOR 是一种非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可整合细胞内外的信号,调控细胞的代谢、生长和增殖。作为自噬启动阶段的关键调节因子,mTOR 活化后可抑制自噬的发生,其参与自噬调控主要是通过磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/mTOR 和丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (serine/threonine kinase 1)/腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine mono-phosphate-activated protein kinase, AMPK)/结节性硬化蛋白(nodular sclerosis protein, TSC)/mTOR 复合物 2 条信号通路^[19]。研究发现 Vaspin 能够通过 PI3K/Akt 信号通路发挥其抗胰岛素抵抗和保护胰岛细胞功能的作用,而 PI3K/Akt/mTOR 通路已被证明参与自噬的调控^[12,20]。本研究结果发现,Vaspin 干预增加了 p-mTOR 和 mTOR 蛋白比值,且 Vaspin 的该作用可被雷帕霉素抑制,因此可推测 Vaspin 可能通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,抑制 PA 诱导的自噬过度激活状态。

同时,本研究发现 PA 干预增加了 INS-1 细胞凋亡,而 Vaspin 干预可以明显减少细胞凋亡,雷帕霉素和 3-MA 的加入对 Vaspin 的作用无明显影响。本研究团队猜测,PA 引起了 INS-1 细胞自噬和凋亡,而 Vaspin 减少细胞凋亡的机制可能与自噬有关。细胞凋亡是一种具有依赖 Caspase 参与、染色体浓聚、细胞皱缩、DNA 降解和凋亡小体形成等特征的程序性细胞死亡^[21]。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^[22]。研究发现,在一定氧化应激水

平下,自噬可以减少胰岛 β 细胞凋亡,保证其正常增殖,而当环境极度恶劣时,超出自噬的调控能力,自噬和凋亡将同时出现于细胞中^[23]。本研究团队之前的研究发现,Vaspin 可以作用于 PI3K/Akt/和 AMPK 信号通路,改善胰岛素抵抗,抑制氧化应激损伤,减少细胞凋亡^[24]。而 PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路是胰岛素抵抗、氧化应激和自噬信号通路的共同上游信号分子,因此推测 Vaspin 通过调控 PI3K/AKT/mTOR 以及 AMPK/mTOR 信号通路影响 INS-1 细胞的自噬水平,从而减少细胞凋亡。本研究中,未发现自噬诱导剂雷帕霉素组和自噬抑制剂 3-MA 组细胞凋亡与 Vaspin 组相比有统计学差异,可能是 Vaspin 对细胞凋亡的调控还存在一些其他方面的机制,例如通过细胞凋亡的内部线粒体途径及调节炎症信号通路影响细胞凋亡。

综上所述,本研究发现 Vaspin 能够抑制棕榈酸诱导的 INS-1 细胞过度自噬及细胞凋亡,改善胰岛 β 细胞分泌功能。然而,Vaspin 对胰岛细胞自噬及凋亡的具体影响及机制还需要进一步研究。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治疗提供新的希望。

参 考 文 献

- [1] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 8th ed. In: International Diabetes Federation, Brussels, Belgium. 2017[EB/OL]. (2017-11-14)[2018-09-10]. <https://diabetesatlas.org/>.
- [2] Jiang HW, Ma YJ, Fu LJ, et al. Influence of lipopolysaccharides on autophagy and inflammation in pancreatic islet cells of mice fed by high-fat diet[J]. Eur J Inflamm, 2018, 16: 1-11.
- [3] 吴英智, 刘旭, 高丽辉. 自噬对胰岛 β 细胞保护作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2015, 42(4): 447-452.
- [4] Rivera JF, Costes S, Gurlo T, et al. Autophagy defends pancreatic β cells from human islet amyloid polypeptide-induced toxicity[J]. J Clin Invest, 2014, 124(8): 3489-500.
- [5] 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.
- [6] 刘师伟, 王明明, 杜芳, 等. Vaspin 改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(11): 1560-1562.
- [7] Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ[J]. Proc Nutr Soc, 2001, 60(3): 329-339.
- [8] Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, et al. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2015, 309(8): 691-714.
- [9] Dusserre E, Moulin P, Vidal H. Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues[J]. Biochem Biophys Acta, 2000, 1500(1): 88-96.
- [10] Shaker OG, Sadik NA. Vaspin gene in rat adipose tissue: relation to obesity-induced insulin resistance[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 373(1-2): 229-239.
- [11] Zieger K, Weiner J, Krause K, et al. Vaspin suppresses cytokine-induced inflammation in 3T3-L1 adipocytes via inhibition of NF- κ B pathway[J]. Mol Cell Endocrinol, 2018, 460: 181-188.
- [12] Liu SW, Li X, Wu YR, et al. Effects of vaspin on pancreatic β cell secretion via PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathways[J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0189722.
- [13] 张志才, 邵增务. 自噬分子机制的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(1): 177-179.
- [14] 王燕梅, 徐恩. 自噬在脑缺血中的双重作用[J]. 国际脑血管病杂志, 2012, 20(3): 237-240.
- [15] 曹萌, 韦晓, 刘超. 自噬与胰岛 β 细胞功能及 2 型糖尿病[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2015, 35(1): 53-55.
- [16] Yang JS, Lu CC, Kuo SC, et al. Autophagy and its link to type II diabetes mellitus[J]. Biomedicine, 2017, 7(2): 8.
- [17] Wilsona CM, Magnaudeix A, Yardin C, et al. Autophagy dysfunction and its link to Alzheimer's disease and type II diabetes mellitus[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2014, 13(2): 226-246.
- [18] Masini M, Bugliani M, Lupi R, et al. Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells[J]. Diabetologia, 2009, 52(6): 1083-1086.
- [19] 陈洪菊, 李晋辉. mTOR 信号通路调节[J]. 医学分子生物学杂志, 2009, 6(6): 542-546.
- [20] Wang ZG, Wang Y, Huang Y, et al. bFGF regulates autophagy and ubiquitinated protein accumulation induced by myocardial ischemia/reperfusion via the activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Sci Rep, 2015, 5: 9287.
- [21] 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.
- [22] Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, et al. Autophagy and apoptosis: where do they meet[J]. Apoptosis, 2014, 19(4): 555-566.
- [23] 孙颖, 魏聪, 刘红利, 等. 自噬与 2 型糖尿病胰岛 β 细胞增殖及凋亡[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(22): 6598-6600.
- [24] Li H, Peng W, Zhuang J, et al. Vaspin attenuates high glucose-induced vascular smooth muscle cells proliferation and chemokinesis by inhibiting the MAPK, PI3K/Akt, and NF- κ B signaling pathways[J]. Atherosclerosis, 2013, 228(1): 61-68.

(责任编辑:唐秋姗)