

Beclin1 及 Atg7 在维格列汀保护 db/db 小鼠胰岛 β 细胞中的作用

吴彦菊 张捷 单春艳 陈莉明 刘德敏

【摘要】 目的 探讨维格列汀对糖尿病小鼠胰岛 β 细胞自噬相关因子表达及 β 细胞存活的影响。**方法** 16 只 db/db 小鼠按血糖水平分为糖尿病组(DM 组, $n=8$)及维格列汀治疗组(VT 组, $n=8$), 同龄野生型小鼠作为正常对照组(NC 组, $n=8$), 其中 DM 组及 VT 组间血糖水平无显著差异($t=1.918$, $P>0.05$)。VT 组小鼠给予维格列汀($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃, DM 组及 NC 组小鼠给予生理盐水灌胃。干预 6 周后, 经心脏穿刺取血检测随机 HbA1c 水平; 采用免疫荧光技术分析胰岛形态及结构; TUNEL 法检测 β 细胞凋亡; RT-PCR 技术分析胰岛 β 细胞自噬相关基因 6(Beclin1)及自噬相关基因 7(Atg7) mRNA 表达水平; 免疫组化技术分析 β 细胞 Beclin1 蛋白表达水平。**结果** DM 组小鼠血 HbA1c 水平明显高于 NC 组; VT 组小鼠血 HbA1c 水平较 DM 组降低($F=579.19$, $P<0.01$)。免疫荧光及细胞凋亡检测发现, 与 NC 组相比, DM 组胰岛 α 及 β 细胞分布紊乱, 凋亡增加($P<0.001$); 与 DM 组相比, VT 组胰岛 α 及 β 细胞分布趋于正常, β 细胞凋亡减少($F=37.25$, $P<0.01$)。RT-PCR 结果显示, DM 组小鼠胰岛 β 细胞 Beclin1 及 Atg7 mRNA 表达显著高于 NC 组($P<0.001$); VT 组中上述基因 mRNA 表达较 DM 组降低($F=61.35, 41.43$, P 均 <0.001)。免疫组化分析结果显示, DM 组 Beclin1 蛋白表达高于 NC 组, 而 VT 组中表达较 DM 组降低($F=15.92$, $P<0.05$)。**结论** 维格列汀治疗可下调 Beclin1 及 Atg7 在糖尿病小鼠 β 细胞中的表达, 该作用可能与其改善胰岛结构及促进 β 细胞存活有关。

【关键词】 糖尿病; 自噬; 细胞凋亡; Beclin1; Atg7

The role of Beclin1 and Atg7 in the protective effect of vildagliptin on islet β cells of db/db mice

Wu Yanju*, Zhang Jie, Shan Chunyan, Chen Liming, Liu Demin. *Department of Clinical Laboratory, The Metabolic Diseases Hospital, Tianjin Medical University, Key Laboratory of Hormones and Development, Ministry of Health, Tianjin 300070, China

Corresponding author: Liu Demin, Email: tjmuldm@126.com; Chen Liming, Email: xfx22081@vip.163.com

【Abstract】 Objective To investigate the influence of vildagliptin on the expressions of autophagy related genes in islet β cells and β cell survival in diabetic mice. **Methods** Sixteen db/db mice were allocated into two groups according to the blood glucose levels: diabetic group(DM group, $n=8$) and vildagliptin treatment group(VT group, $n=8$); the difference of blood glucose levels in DM and VT group was not significant($t=1.918$, $P>0.05$). Wildtype mice with the same age were used as normal control group(NC group, $n=8$). Mice in VT group were administered with vildagliptin ($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by oral gavage and mice in DM and NC group were administered with saline. After six weeks of treatment, blood samples collected by cardiac puncture were used to examine plasma HbA1c levels. The morphology of islet was analyzed by immunofluorescence. Apoptosis of islet cells were analyzed by TUNEL method. The mRNA expressions of Beclin1 and Atg7 were determined by RT-PCR. The protein expressions of Beclin1 were examined by immunohistochemistry method. **Results** Plasma HbA1c levels in DM group were higher than those in NC group, plasma HbA1c levels in VT group were lower than that in DM group ($F=579.19$, $P<0.01$). In contrast to NC group, DM group showed abnormal islet morphology and higher apoptosis rate of β cells ($P<0.001$). In contrast to DM group, VT group showed near normal islet morphology and lower apoptosis rate of β cells($F=37.25$, $P<0.01$). RT-PCR analysis

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2014.02.001

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81273915)

作者单位:300070 天津医科大学代谢病医院检验科, 卫生部激素与发育重点实验室(吴彦菊, 张捷, 刘德敏), 糖尿病肾病科(单春艳, 陈莉明)

通信作者: 刘德敏, Email: tjmuldm@126.com; 陈莉明, Email: xfx22081@vip.163.com

demonstrated the expressions of Beclin1 and Atg7 mRNA increased markedly in DM group compared with NC group ($P < 0.001$) and decreased in VT group in comparison with DM group ($F = 61.35, 41.43$, all $P < 0.001$). Beclin1 protein expressions increased significantly in DM group compared to NC group ($P < 0.01$) and decreased in VT group, compared to DM group ($F = 15.92, P < 0.05$). **Conclusion** Treatment with vildagliptin down-regulates expressions of Beclin1 and Atg7 in islet β cells of diabetic mice, which may contribute to improved islet architecture and β cells survival.

【Key words】 Type 2 diabetes mellitus; Autophagy; Apoptosis; Beclin1; Atg7

(Int J Endocrinol Metab, 2014, 34: 73-76)

自噬是将细胞内受损的细胞器、长寿蛋白等转运至溶酶体分解代谢的过程。在自噬过程中,细胞质中首先形成具有双层膜结构的自噬泡,包裹待降解的细胞器或蛋白等形成自噬体;自噬体外膜与溶酶体逐渐融合,进入溶酶体腔中的自噬体内膜及其包裹物被降解,释放到细胞质中供细胞再利用^[1]。多种基因参与自噬体的形成过程,其中 Beclin1 及 Atg7 是调节自噬体形成、延长及与溶酶体融合的关键因子^[1]。目前,研究者们认为,在正常情况下,细胞仅保持低水平的自噬,激活自噬有助于恢复细胞稳态^[2]。然而,自噬持续激活也可导致细胞死亡。已有报道发现 2 型糖尿病患者胰岛中自噬改变与细胞凋亡并存,提示自噬可能参与胰岛 β 细胞进行性衰竭的过程^[3]。维格列汀是一种新型的二肽基肽酶-4 抑制剂,因其具有改善血糖调控及保护胰岛 β 细胞功能的双重作用而备受关注。但维格列汀对胰岛 β 细胞的保护作用是否与其对自噬相关因子的调控作用有关尚无研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物分组与饲养 8 周龄雄性 db/db 小鼠 16 只、野生型小鼠 8 只,共 24 只,购于南京大学。按 SPF 级饲养标准于隔离屏障环境中适应性饲养 2 周后,尾静脉取血检测血糖,db/db 小鼠血糖超过 16.7 mmol/L 确定糖尿病模型构建成功。按血糖水平将 10 周龄 db/db 小鼠分为糖尿病组(DM 组, $n=8$)及维格列汀治疗组(VT 组, $n=8$)。同周龄野生型小鼠作为正常对照组(NC 组, $n=8$)。VT 组小鼠给予维格列汀($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃,持续 6 周;DM 组及 NC 组小鼠给予等体积生理盐水灌胃。实验期间,实验动物给予 SPF 级饲料喂养,自由进水,保持适宜温湿度,照明 12 h 交替。

1.1.2 试剂及抗体 RNAeasy Mini 试剂盒(Qiagen, 德国);逆转录试剂盒(Fermentas, 美国);实时荧光定量 PCR 试剂盒(Takara, 日本);兔抗自噬相关基因 6 多克隆抗体(Proteintech, 美国);豚鼠抗胰岛素

多克隆抗体(Abcam, 美国);小鼠抗胰高血糖素单克隆抗体(Sigma, 美国);荧光染料 Alexa-488 及 596 标记的二抗(Jackson, 美国);免疫组化 SP 试剂盒(中山金桥, 北京)。

1.1.3 仪器与设备 血糖分析仪(BIOSEN, 德国), CF-15D 冷冻离心机(日立, 日本),荧光定量分析仪(博日, 中国),光学显微镜(OLYMPUS, 日本),酶标仪(Thermo, 美国),化学发光仪(Thermo, 美国),荧光共聚焦显微镜(OLYMPUS, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 取材 治疗 6 周后,所有小鼠经心脏穿刺取血处死。75%酒精消毒腹部皮肤,迅速开腹,取完整胰腺,剥离周围组织;部分置于冻存管并立即投入液氮中,部分以 10%中性福尔马林溶液固定。将血标本于 4℃离心($3\,000 \text{ rpm}$, 15 min, 最大离心半径 74.9 mm)分离血浆,分装后于 -20℃储存。

1.2.2 小鼠随机体重及 HbA1c 检测 实验期间,所有小鼠于上午 8:00 给予照明后、日间进食前称量随机体重,每两周检测 1 次。6 周后,所有小鼠于上午 8:00 给予照明后、日间进食前经心脏穿刺采取血标本检测 HbA1c 水平。

1.2.3 RT-PCR 胰腺组织以液氮研磨成粉末,按照试剂盒的说明提取总 RNA,将 2 μg RNA 逆转录为 cDNA。以 Oligo7 软件设计特异引物,引物序列如下:Atg7 引物:上游 5'-CCTGCCCTACTTCTTATTC-3',下游 5'-CAGAGGACTTCAACGGAC-3',扩增产物大小为 216 bp。Beclin1 引物:上游 5'-GTTGCCGT-TATACTGTTCTG-3',Beclin1 下游 5'-CCTCCAGT-GTCTTCAATC-3',扩增产物大小为 180 bp。GAPDH 引物:上游 5'-TCAACAGCAACTCCCAC-3',下游 5'-GGTCCAGGGTTTCT-TACTC-3',扩增产物大小为 165 bp。RT-PCR 反应体系(25 μl)为:SYBR Premix Ex Taq 12.5 μl ,上、下游引物各 0.5 μl (引物浓度 10 $\mu\text{mol/L}$),cDNA 2 μl , dH₂O 9.5 μl 。RT-PCR 反应条件如下:预变性 95℃, 30 s;变性 95℃, 5 s;退火及延伸 60℃, 30 s;共 40 个循环。以 GAPDH 作为管家基因,采用 2^{- ΔCT} 方法

计算基因的相对表达。

1.2.4 免疫组化 将 4 μm 厚的胰腺组织石蜡切片经常规脱蜡水化等处理后,采用 SP 法检测 Beclin1 的表达水平。3%过氧化氢室温封闭 10 min, PBS 清洗后滴加抗 Beclin1 抗体(1:20), 4℃孵育过夜; 冲洗后滴加辣根过氧化物酶标记二抗, 37℃孵育 30 min; PBS 清洗后, DAB 显色, 苏木素复染后封片。显微镜下采图, Image pro-plus 软件对 Beclin1 的表达进行半定量分析; 每张切片选取 5 个不重叠视野, 计算棕黄色阳性区域的积分光密度 (IOD), 取均值($\times 10^3$)进行统计分析。

1.2.5 TUNEL 法检测细胞凋亡 制备 4 μm 厚的胰腺组织石蜡切片, 按照 TUNEL 检测试剂盒的相关操作说明检测胰岛细胞凋亡。显微镜下采图, 计数 TUNEL 阳性细胞核, 胰岛细胞凋亡率 = TUNEL 阳性细胞数/胰岛细胞总数。

1.2.6 免疫荧光 将 4 μm 厚的胰腺组织石蜡切片经常规脱蜡水化等处理后, 进行微波抗原修复; 以 10% 正常驴血清室温封闭 30 min, 滴加抗胰高血糖素抗体(1:1 000)及胰岛素抗体(1:100), 4℃孵育过夜; 滴加荧光染料 Alexa Fluor 488 及 596(1:200)标记的二抗, 室温避光孵育 1 h; PBS 充分清洗, 荧光封片剂封片。共聚焦显微镜下采图。

1.3 统计学处理 数据均采用 IBM SPSS19.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 采用 *LSD-t* 进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 时, 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠随机体重及 HbA1c 的变化 与 NC 组相比, DM 组小鼠 HbA1c 水平较高 ($P < 0.001$); VT 组 HbA1c 水平较 DM 组低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。DM 组小鼠随机体重呈现先上升后下降的趋势, 但仍显著高于 NC 组 ($P < 0.001$); VT 组小鼠与 DM 组随机体重的差异无统计学意义(表 1)。

2.2 小鼠胰岛形态及结构的改变 免疫荧光双染发现, NC 组小鼠胰岛 β 细胞主要分布于胰岛中央部, α 细胞主要分布于胰岛周边部, 且 β 细胞比例远高于 α 细胞。而 DM 组小鼠胰岛 α 细胞与 β 细胞分布紊乱, 其中 α 细胞散在分布于整个胰岛。VT 组胰岛 α 细胞与 β 细胞分布趋于正常(图 1, 封三)。

2.3 小鼠胰岛 β 细胞凋亡的变化 DM 组小鼠胰岛 β 细胞, 细胞凋亡率较 NC 组显著增加 [0.62 ± 0.07], *vs.* (0.22 ± 0.06), $P < 0.001$, $n = 4$]; 而 VT 组胰岛 β 细胞, 细胞凋亡率显著降低, 差异有统计学意义 [$0.35 \pm$

0.07], $P < 0.01$, $n = 4$](图 2, 封三)。

表 1 小鼠体重及 HbA1c 水平比较($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	体重(g)				HbA1c (%)
	0 周	2 周	4 周	6 周	
NC 组	2238 \pm 184	2445 \pm 121	2504 \pm 122	2600 \pm 124	3.11 \pm 0.18
DM 组	4113 \pm 223 ^a	4646 \pm 177 ^a	4863 \pm 263 ^a	4656 \pm 272 ^a	8.09 \pm 0.41 ^b
VT 组	4188 \pm 203 ^c	4713 \pm 236 ^c	4706 \pm 276 ^c	4467 \pm 309 ^c	7.46 \pm 0.33 ^d
F 值	234.03	393.23	260.76	160.78	579.19
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: NC 组: 正常对照组; DM 组: 糖尿病组; VT 组: 维格列汀治疗组; 与 NC 组比, ^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.001$; 与 DM 组比, ^c $P > 0.05$, ^d $P < 0.01$

2.4 小鼠胰岛 β 细胞 Beclin1 及 Atg7 mRNA 表达水平的变化 与 NC 组相比, DM 组小鼠胰岛 β 细胞 Beclin1 及 Atg7 mRNA 表达均显著增加 ($P < 0.001$); 而 VT 组中上述基因 mRNA 表达较 DM 组降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)(表 2)。

表 2 小鼠胰岛 β 细胞 Beclin1 及 Atg7 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	Beclin1	Atg7
NC 组	0.073 \pm 0.007	0.010 \pm 0.003
DM 组	0.172 \pm 0.023 ^a	0.021 \pm 0.002 ^a
VT 组	0.101 \pm 0.008 ^b	0.013 \pm 0.002 ^b
F 值	61.35	41.43
P 值	0.000	0.000

注: NC 组: 正常对照组; DM 组: 糖尿病组; VT 组: 维格列汀治疗组; 与 NC 组比, ^a $P < 0.001$; 与 DM 组比, ^b $P < 0.001$

2.5 小鼠胰岛 β 细胞 Beclin1 蛋白表达水平的变化 在 NC 组中, 胰岛 β 细胞胞质中少量棕黄色染色; 在 DM 组中, β 细胞胞质棕黄色染色增多, 半定量分析发现 Beclin1 蛋白表达较 NC 组显著升高 [(10.34 ± 1.64) *vs.* (4.15 ± 1.26), $P < 0.01$]; VT 组中, β 细胞胞质少量棕黄色染色, Beclin1 蛋白表达较 DM 组减少 (7.25 ± 1.34 , $P < 0.05$)(图 3, 封三)。

3 讨论

db/db 小鼠是经敲除瘦素受体基因而构建的自发性 2 型糖尿病动物模型, 因其起病特点与 2 型糖尿病患者最为相似, 且 β 细胞凋亡及自噬改变显著^[24], 故本研究采用 db/db 小鼠模型探究维格列汀对胰岛 β 细胞自噬相关因子的调控及 β 细胞存活的影响。

本研究发现, DM 组小鼠血 HbA1c 水平显著高于 NC 组; VT 组血 HbA1c 水平降低, 说明维格列汀干预改善了血糖控制。胰岛形态分析显示, DM 组小鼠胰岛 α 细胞与 β 细胞分布紊乱, 其中 α 细胞散在

分布于整个胰岛,提示 DM 组小鼠已出现胰岛结构紊乱。VT 组胰岛 α 细胞与 β 细胞分布趋于正常,说明维格列汀有效改善了胰岛的结构。

细胞凋亡是导致 2 型糖尿病胰岛 β 细胞结构及功能紊乱的主要机制。近年来研究发现,自噬与细胞凋亡之间有着密切的联系。在不同的情况下,自噬发挥着不同的调节作用。在生理状态下,自噬主要通过清除细胞内受损的蛋白、细胞器等机制保护细胞免受外界应激的损伤,抑制细胞凋亡^[1]。然而,在外界应激的持续作用下,自噬过度激活,并通过降解细胞中促存活蛋白或细胞凋亡抑制因子等机制,开启细胞凋亡及自噬性细胞死亡通路,共同导致细胞死亡^[5]。由此可见,自噬具有促细胞存活及死亡的双重作用,而不同的应激及自噬激活程度可能是决定自噬发挥促细胞存活或促细胞死亡作用的分子开关。但目前有关自噬与胰岛 β 细胞凋亡间作用的研究尚处于起步阶段。最初,研究者认为自噬是一种促存活的机制,主要发挥保护胰岛 β 细胞正常结构及功能的作用^[2]。后续研究提出自噬激活亦可增加胰岛 β 细胞凋亡^[6-7]。本研究发现,DM 组小鼠胰岛 β 细胞自噬相关因子 Beclin1 及 Atg7 表达较 NC 组显著升高,且 β 细胞凋亡显著。Beclin1 及 Atg7 是自噬激活过程中的关键因子,表达上调具有促细胞凋亡的作用^[8-9]。其中,Beclin1 可能通过改变与抗凋亡蛋白 Bcl-2 间的相互作用等机制引发细胞凋亡^[10]。由此推测,本研究中自噬相关因子 Beclin1、Atg7 的表达上调可能参与了胰岛 β 细胞凋亡的进程。

维格列汀是一种新型的二肽基肽酶-4 抑制剂。目前研究认为,维格列汀主要通过抑制内质网应激、氧化应激等机制缓解胰岛 β 细胞凋亡,从而发挥保护胰岛 β 细胞的作用^[11]。在本研究中,笔者发现维格列汀干预下调了自噬相关因子 Beclin1 及 Atg7 在胰岛 β 细胞的表达,并伴有 β 细胞凋亡减少。有研究者提出内质网应激、氧化应激与自噬之间也存在着交互作用。在外界应激作用下,细胞产生内质网应激及氧化应激,分别通过 PKR 样内质网应激激酶-真核细胞蛋白质翻译起始复合体信号通路及释放活性氧簇等机制激活自噬,上调 Beclin1、Atg7 等自噬相关因子的表达水平^[12-13]。而抑制自噬则可下调 Beclin1 等自噬相关因子的表达,并延缓 MIN6 细胞及胰岛 β 细胞凋亡^[5]。由此推测,在本研究中,维格列汀促胰岛 β 细胞存活的机制可能与其下调 Beclin1、Atg7 表达有关。

综上所述,维格列汀治疗可下调糖尿病小鼠 β 细胞自噬相关因子 Beclin1 及 Atg7 表达,可能是其保护胰岛 β 细胞的新机制。但有关维格列汀调控自噬相关因子表达的确切机制还有待进一步探究。

参 考 文 献

- [1] Hale AN, Ledbetter DJ, Gawriluk TR, et al. Autophagy: regulation and role in development[J]. *Autophagy*, 2013, 9(7):951-972.
- [2] Ebato C, Uchida T, Arakawa M, et al. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet[J]. *Cell Metab*, 2008, 8(4):325-332.
- [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] Puff R, Dames P, Weise M, et al. Reduced proliferation and a high apoptotic frequency of pancreatic beta cells contribute to genetically-determined diabetes susceptibility of db/db BKS mice[J]. *Horm Metab Res*, 2011, 43(5):306-311.
- [5] Yoshimori T. Autophagy: paying Charon's toll [J]. *Cell*, 2007, 128(5):833-836.
- [6] Tanemura M, Ohmura Y, Deguchi T, et al. Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both in vitro and in vivo[J]. *Am J Transplant*, 2012, 12(1):102-114.
- [7] Fujimoto K, Hanson PT, Tran H, et al. Autophagy regulates pancreatic beta cell death in response to Pdx1 deficiency and nutrient deprivation[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(40):27664-27673.
- [8] Zou M, Lu N, Hu C, et al. Beclin 1-mediated autophagy in hepatocellular carcinoma cells: implication in anticancer efficiency of oroxylin A via inhibition of mTOR signaling[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(8):1722-1732.
- [9] Shin JY, Hong SH, Kang B, et al. Overexpression of beclin1 induced autophagy and apoptosis in lungs of K-ras(LA1)mice[J]. *Lung Cancer*, 2013, 81(3):362-370.
- [10] Erlich S, Mizrachy L, Segev O, et al. Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members[J]. *Autophagy*, 2007, 3(6):561-568.
- [11] Hamamoto S, Kanda Y, Shimoda M, et al. Vildagliptin preserves the mass and function of pancreatic β cells via the developmental regulation and suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress in a mouse model of diabetes[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2013, 15(2):153-163.
- [12] B'chir W, Maurin AC, Carraro V, et al. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(16):7683-7699.
- [13] Li L, Chen Y, Gibson SB. Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(1):50-65.

(收稿日期:2013-09-05)