

下调导致细胞间黏附力的下降可能促进了垂体腺瘤侵袭的发生和进展,有望成为垂体腺瘤的诊断指标,更好地指导临床垂体腺瘤的治疗和随访。 α -cat 和 γ -cat 等的基因突变或表达异常,也可导致 E-cad 无法发挥其正常功能,进一步的研究应对侵袭性垂体腺瘤不同类型的侵袭机制进行分类研究,影响 CCC 在不同类型垂体腺瘤表达不同的机制,以及如何使 E-cad、 α -cat 和 γ -cat 在垂体腺瘤中重新表达,则需进一步的研究。

参考文献

- 1 Cottier JP, Destrieux C, Brunereau L, *et al.* Cavernous sinus invasion by pituitary adenoma: MR imaging[J]. *Radiology*, 2000, 215:463-469
- 2 Hardy J, Vezina JL. Transsphenoidal neurosurgery of intracranial neoplasm[J]. *Adv Neurol*, 1976, 15:261-273
- 3 Qu Qiu-yi, Zhang Qiu-hang, Wang Xing-yu. Expression of E-cadherin complex and invasiveness of pituitary adenoma[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2006, 41(6):433-436
- 4 Vieirajo JR, Cukiert A, Liberman B. Magnetic resonance imaging of cavernous sinus invasion by pituitary adenoma diagnostic criteria and surgical findings [J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2004, 62(2): 437-443

- 5 Kawamoto H, Mizoue T, Arita K, *et al.* Expression of epithelial cadherin and cavernous sinus invasion in human pituitary adenomas[J]. *J Neurooncol*, 1997, 34: 105-109
- 6 Wang Zhen, Lü Chang-hong, Si Hai-peng, *et al.* Expression of E-cadherin and nm23 and the in correlation with biological behavior in pituitary adenomas[J]. *J Clin Exp Pathol*, 2005, 20(3):339-341
- 7 Qian ZR, Li CC, Yamasaki H, *et al.* Role of E-cadherin, alpha-, Beta-, and gamma-catenins and p120 (cell adhesion molecules) in prolactinoma behavior[J]. *Mod Pathol*, 2002, 15:1357-1365
- 8 Shiozaki H, Oka H, Inoue M, *et al.* E-cadherin mediated adhesion system cancer cells[J]. *Cancer*, 1996, 77:1605-1606
- 9 Takahashi K, Suzuki H. Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadherin mediated cell-cell adhesion [J]. *Exp Cell Res*, 1996, 226(1):214-222
- 10 Nishioka H, Haraoka J, Akada K. Fibrous bodies are associated with lower GH production and decreased expression of E-cadherin in GH producing pituitary adenomas [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003, 59:768-772
- 11 Meij BP, Lopes MB, Ellegala DB, *et al.* The long-term significance of microscopic dural invasion in 354 patients with pituitary adenomas treated with transsphenoidal surgery[J]. *J Neurosurg*, 2002, 96:195-208

(收稿:2009-08-11)

(修回:2009-12-29)

不同胰岛素促泌剂对胰岛 β 细胞凋亡的影响

王庆美 季虹 荣海钦 孙海玲 黄丽芳

摘要 **目的** 研究胰岛素促泌剂在大鼠胰岛素瘤细胞 INS-1 凋亡中的作用。**方法** 细胞采用大鼠胰岛素瘤细胞株 INS-1,实验分 5 组:A 组:格列苯脲(根据药物浓度分 3 个亚组 A1:10 μ mol/L、A2:1 μ mol/L、A3:0.1 μ mol/L);B 组:格列美脲(3 个亚组 B1:10 μ mol/L、B2:1 μ mol/L、B3:0.1 μ mol/L);C 组:瑞格列奈(3 个亚组 C1:1 μ mol/L、C2:0.1 μ mol/L、C3:0.01 μ mol/L);D:阴性对照组(加等量培养基);E:空白对照组(加等量最高浓度药物溶剂)。各组药物分别干预 4h、24h、96h 后,观察细胞形态学变化,MTT 法检测细胞增生情况,琼脂糖凝胶电泳检测 DNA Ladder 凋亡条带、TUNEL 分析细胞凋亡率,收集细胞培养上清液测定基础和含糖刺激后胰岛素分泌量。**结果** 与阴性对照组相比,空白对照组对细胞凋亡无影响($P>0.05$),药物干预 4h,格列本脲(A3、A2、A1)、格列美脲(B2、B1)分别使细胞凋亡率增加了 2.21、2.5、2.71、2.57 倍($P<0.05$),格列美脲(B3)及瑞格列奈对细胞凋亡率无影响($P>0.05$);药物干预 24h,格列本脲(A3、A2、A1)、格列美脲(B3、B2、B1)、瑞格列奈(C2、C1)分别使细胞凋亡率增加了 2.35、2.71、2.94、1.71、1.88、2.35、1.53、1.94 倍($P<0.05$),瑞格列奈(C3)对细胞凋亡率无影响($P>0.05$);药物干预 4 天,格列本脲(A3、A2、A1)、格列美脲(B3、B2、B1)、瑞格列奈(C3、C2、C1)分别使细胞凋亡率增加 3.7、4.5、8.35、3.2、3.8、7、2.8、3.6、4.5 倍($P<0.05$)。组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 胰岛素促泌剂可以引起胰岛 β 细胞的凋亡,且其促凋亡的作用呈时间-剂量依赖性增加,说明胰岛素促泌剂在胰岛 β 细胞凋亡中的作用,可为胰岛 β 细胞凋亡的机制提供依据,指导 2 型糖尿病患者合理用药。

关键词 胰岛素促泌剂 INS-1 细胞 凋亡

The Effect of Insulin Secretagogues on Apoptosis of Pancreatic Beta Cells INS-1. Wang Qingmei, Ji Hong, Rong Haiqin, *et al.* Depart-

作者单位:250062 济南,山东省内分泌与代谢病研究所

通讯作者:荣海钦,电子信箱:haiqinrong@126.com

ment of Neurosurgery, Shandong Institute of Endocrine and Metabolic Diseases, Shandong 250062, China

Abstract Objective To study the possible effect of insulin secretagogues on apoptosis in cells of INS-1 cell lines, which is a rat pancreatic beta-cell line derived from the original radiation induced tumor. **Methods** INS-1 cell line was routinely cultured and divided into five groups: A: Glibenclamide group; B: Glimepiride group; C: Repaglinide group; D: negative control group; E: positive control group. MTT method was employed to evaluate the proliferation of the INS-1 cell line. Moreover, DNA Ladder and TUNEL method were enrolled to analyze the apoptosis of the INS-1 cell line. Radioimmunoassay (RIA) was used to investigate the insulin secretion. **Results**

Incubating INS-1 with insulin secretagogues showed obvious apoptosis as compared with control group ($P < 0.05$). The INS-1 cell line was treated by different concentrations of different groups for different times. Compared with negative control group, after treated for 4 hours, cell's apoptosis in Glibenclamide group ($0.1\mu\text{mol/L}$, $1\mu\text{mol/L}$, $10\mu\text{mol/L}$) was obviously increased by 2.21, 2.5, 2.71 folds ($P < 0.05$), Glimepiride ($0.1\mu\text{mol/L}$) didn't increase cells' apoptosis ($P > 0.05$), Glimepiride ($1\mu\text{mol/L}$, $10\mu\text{mol/L}$) increased cell's apoptosis by 2 and 2.57 folds ($P < 0.05$). Repaglinide ($0.01\mu\text{mol/L}$, $0.1\mu\text{mol/L}$, $1\mu\text{mol/L}$) didn't increase cell's apoptosis ($P > 0.05$); after 24 hours, Repaglinide ($0.01\mu\text{mol/L}$) didn't increase cell's apoptosis ($P > 0.05$), Glibenclamide ($0.1\mu\text{mol/L}$, $1\mu\text{mol/L}$, $10\mu\text{mol/L}$) increased cell's apoptosis by 2.35, 2.71, 2.94 folds ($P < 0.05$), Glimepiride ($0.1\mu\text{mol/L}$, $1\mu\text{mol/L}$, $10\mu\text{mol/L}$) increased cell's apoptosis by 1.71, 1.88, 2.35 folds ($P < 0.05$), Repaglinide ($0.1\mu\text{mol/L}$, $1\mu\text{mol/L}$) increased cell's apoptosis by 1.53, 1.94 folds ($P < 0.05$); after treated for 96 hours, Glibenclamide ($0.1\mu\text{mol/L}$, $1\mu\text{mol/L}$, $10\mu\text{mol/L}$), Glimepiride ($0.1\mu\text{mol/L}$, $1\mu\text{mol/L}$, $10\mu\text{mol/L}$), Repaglinide ($0.01\mu\text{mol/L}$, $0.1\mu\text{mol/L}$, $1\mu\text{mol/L}$) increased cell's apoptosis by 3.7, 4.5, 8.35, 3.2, 3.8, 7, 2.8, 3.6 and 4.5 folds ($P < 0.05$). **Conclusion** Insulin secretagogues can increase apoptosis of INS-1 cells in a time- and dose-dependent manner. This provides evidence for the mechanism of pancreatic beta cells' apoptosis, and also provides a new thought for studying the pancreatic islet cell function and guides reasonable use of insulin secretagogues in type 2 diabetes mellitus.

Key words Insulin secretagogues; INS-1 cell; Apoptosis

胰岛素促泌剂类药物是治疗 2 型糖尿病 (T2DM) 的一类十分重要的药物, 无论单独用药还是联合用药其降糖效果都很明显。但随着病程的进展机体对胰岛素促泌剂类药物的反应性减弱, 逐渐出现口服药物继发性失效现象, 这与胰岛 β 细胞的凋亡密不可分^[1]。本文旨在研究胰岛素促泌剂类药物对胰岛 β 细胞 INS-1 的凋亡及胰岛素分泌作用的影响。

材料与方法

1. 材料: INS-1 细胞 (购自中国典型培养物保藏中心); 胎牛血清 (TBD21HY 公司); RPMI 1640 培养液 (Gibco BRL); 蛋白酶 K (Sigma); RNase (Sigma); 琼脂糖 (Gibco BRL); 四氮唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) (Sigma); 酶标仪 (Bio-RAD, Model 680); 电泳仪 (DYY-12, 北京六一); 凝胶图像分析仪 (Alpha Innotech)。胰岛素放免试剂盒购自中国原子能生物研究所。

2. 方法: (1) 细胞培养及药物干预: INS-1 细胞在 RPMI 1640 培养液、5% CO_2 培养箱中培养, 培养液中含有 2mmol/L Gln, 100U/ml 青霉素, $100\mu\text{g/ml}$ 链霉素, 1mmol/L 丙酮酸钠, 100ml/L 热灭活胎牛血清 (heat inactivated fetal calf serum, HI-FCS), 10mmol/L HEPES, $50\mu\text{mol/L}$ 2-巯基乙醇。待细胞培养至对数生长期加入药物干预, 磺脲类药物格列苯脲、格列美脲, 苯甲酸衍生物瑞格列奈采用原料药, 用 DMSO 助溶, DMSO 终浓度 $< 0.5\%$ ^[2]。(2) MTT 实验: 接种 1×10^5 INS-1 细胞/毫升于 96 孔板中, 培养 24h 后更换含有不同浓度的药物的新鲜培养基, 并设不含细胞的空白调零孔, 只有细胞未用

药物干涉的阴性对照组, 以及用相同浓度 DMSO 干预的阳性对照组, 继续培养 4h、24h、48h、96h 后, 倒置显微镜下观察细胞形态学变化, 每孔加入 MTT 使终浓度为 0.5mg/ml , 继续孵育 2h, 去除培养液, 加 DMSO 摇震 5min 后, 用酶标检测仪测定 OD490nm 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 $\times 100\%$ 。(3) DNA ladder 实验: 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。将不同浓度药物作用细胞 24h、48h、96h 后收集细胞, 提取凋亡细胞 DNA 片段, 取 $20\mu\text{l}$ 提取物上样, 以 2% 琼脂糖 40V 电泳 90min, 以自动凝胶荧光呈像系统摄像分析。(4) 原位末端核苷酸标记法 (TUNEL): 用原位末端核苷酸标记法 (TUNEL) 检测各药物组细胞的凋亡率: 先在载玻片上铺一层薄薄的多聚赖氨酸, 干燥后在去离子水中漂洗, 再干燥后 4°C 保存; 药物干预细胞 4h、24h、96h 后, 离心收集约 1×10^6 个细胞, PBS 洗 1 次, 重悬, 加到铺好的多聚赖氨酸载玻片上, 涂片, 自然干燥, 使细胞很好地吸附到载玻片上, 按原位细胞凋亡检测试剂盒说明操作, DAB 显色凋亡细胞, 苏木素复染阴性细胞核。染成棕色或棕褐色细胞为凋亡细胞。每份样品于高倍镜下随机选取 6 个视野并摄像, 每视野计数 100 个细胞, 计算凋亡细胞所占百分率即为细胞的凋亡率。(5) 胰岛素释放实验: INS-1 细胞接种于 12 孔板中, 培养到接近充满底部, 更换含有不同浓度药物的新鲜 RPMI 1640 培养液, 分别继续孵育 4h、24h、96h。然后用无糖 Krebs-Ringer 缓冲液 (含 140mmol/L NaCl, 3.6mmol/L KCl,

0.5mmol/L NaH_2PO_4 , 0.5mmol/L MgSO_4 , 1.5mmol/L CaCl_2 , 10mmol/L HEPES, 2mmol/L NaHCO_3 和 0.1% 小牛血清, pH 值 7.4) 清洗细胞 2 次, 孵育细胞 30min。再用新鲜的 Krebs - Ringer 缓冲液(含 5.5 或 16.5mmol/L 葡萄糖)继续孵育 30min 后, 收集上清液, -20°C 储存以备胰岛素浓度测定。

3. 统计学处理: 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理, 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用方差齐性检验与单因素方差分析(one-way ANOVA), 各组间的两两比较用最小显著差法(the least significant difference, LSD) 分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

1. 显微镜下观察细胞形态: 镜下观察细胞, INS - 1 细胞正常生长时呈不规则的多边、多角形, 细胞间连接融合, 细胞质内可见颗粒。格列本脲浓度为 $0.1\mu\text{mol/L}$, 孵育 4h 后即可见到细胞凋亡明显, 细胞胞质回缩, 细胞间的连接明显减少, 随着药物浓度增加、作用时间的延长, 可见细胞变圆及出胞现象, 还可见到凋亡小体, 部分细胞脱落漂浮。格列美脲浓度为 $0.1\mu\text{mol/L}$, 孵育 4h 后细胞变化不明显, 增加浓度或延长作用时间也可见细胞胞质回缩, 变圆, 出胞、凋亡小体出现、细胞脱落。瑞格列奈浓度为

$0.01\mu\text{mol/L}$, 作用 48h, 及浓度为 $0.1\mu\text{mol/L}$, 作用 24h 细胞无明显形态学变化, 再增加药物浓度及作用时间亦可见细胞胞质回缩, 变圆, 出胞、凋亡小体出现、细胞脱落(封三彩图 28)。

2. MTT 检测结果: MTT 检测法显示, 细胞的存活率与药物呈现时间和剂量依赖性关系(表 1), 与阴性对照组相比, 空白对照组对细胞存活率的影响差异无显著性($P > 0.05$), 格列本脲和格列美脲(B3)作用于 INS - 1 细胞 4h 即可使细胞存活率明显下降($P < 0.05$), 随着药物作用时间的延长和浓度的增加, 细胞的存活率逐渐降低, 组内比较差异有显著性($P < 0.05$), 两组的组间比较差异无显著性($P > 0.05$), 瑞格列奈(C3)作用于 INS - 1 细胞 4h 对细胞存活率无显著影响($P > 0.05$), 瑞格列奈(C3)作用于 INS - 1 细胞 24h 甚至可以使细胞存活率增加, 但无统计学意义($P > 0.05$), 随着药物作用时间的延长和浓度的增加, 细胞的存活率逐渐降低, 组内比较差异有显著性($P < 0.05$), 组间比较苯甲酸衍生物瑞格列奈与磺脲类药物格列本脲和格列美脲相比, 差异亦有显著性($P < 0.05$)。

表 1 胰岛素促泌剂对 INS - 1 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$) (%) , $n = 6$)

作用时间 (h)	格列本脲($\mu\text{mol/L}$)			格列美脲($\mu\text{mol/L}$)			瑞格列奈($\mu\text{mol/L}$)			阴性 对照	空白 对照
	10	1	0.1	10	1	0.1	1	0.1	0.01	对照	对照
4	49.6 $\pm$ 4.2 *	58.4 $\pm$ 1.9 *	67.9 $\pm$ 3.3 *	54.2 $\pm$ 5.1 *	61.8 $\pm$ 4.7 *	71.4 $\pm$ 5.8 *	80.5 $\pm$ 5.4 *	90.8 $\pm$ 4.9	98.1 $\pm$ 3.5	100 $\pm$ 0	94.7 $\pm$ 3.5
24	50.1 $\pm$ 3.1 *	57.4 $\pm$ 4.8 *	66.4 $\pm$ 4.1 *	59.5 $\pm$ 5.7 *	64.6 $\pm$ 6.4 *	66 $\pm$ 4.5 *	75.3 $\pm$ 7.4 *	96.7 $\pm$ 7.3	107.4 $\pm$ 5.9	100 $\pm$ 0	98.3 $\pm$ 3.8
48	31.8 $\pm$ 4.4 *	46.5 $\pm$ 4.5 *	58 $\pm$ 4.6 *	39.7 $\pm$ 3.8 *	54.2 $\pm$ 6.4 *	55.5 $\pm$ 4 *	70.5 $\pm$ 3.2 *	97.2 $\pm$ 6.3	100 $\pm$ 5.2	100 $\pm$ 0	96.6 $\pm$ 6.2
96	16.6 $\pm$ 2.7 *	24.7 $\pm$ 5.8 *	43.9 $\pm$ 2.7 *	27.6 $\pm$ 7 *	27.2 $\pm$ 5.9 *	46.1 $\pm$ 4.9 *	41.9 $\pm$ 6.9 *	58.1 $\pm$ 9.6 *	64.2 $\pm$ 6.8 *	100 $\pm$ 0	99.7 $\pm$ 7.7

与相同作用时间的阴性对照组相比, * $P < 0.05$

3. DNA ladder 结果: DNA 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 阴性对照组及空白对照组细胞的 DNA 条带无梯形条带出现, 低浓度和中浓度格列本脲、格列美脲和瑞格列奈作用于细胞 24h、48h 后 DNA 条带无梯形

条带出现, 高浓度胰岛素促泌剂作用于细胞 48h 及中浓度胰岛素促泌剂作用于细胞 96h 后 DNA 梯形条带仍不明显, 高浓度胰岛素促泌剂作用于细胞 96h 后的细胞 DNA 电泳条带呈现为明显的梯形条带(图 1)。

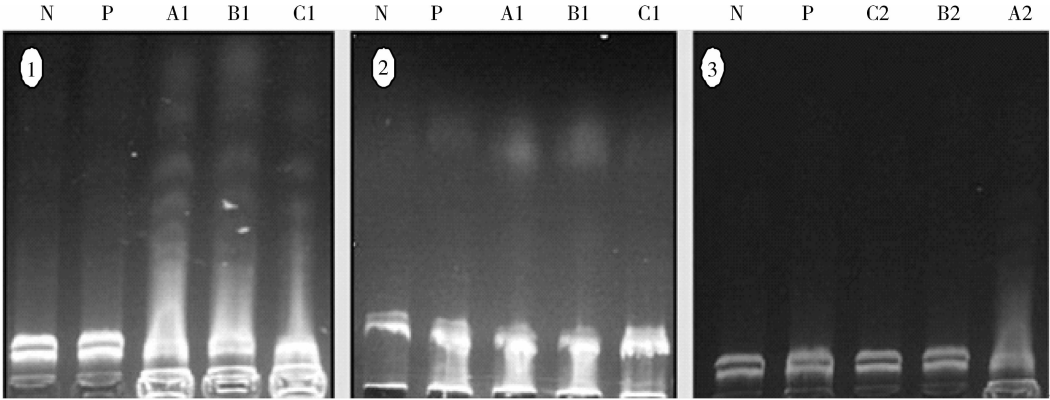


图 1 胰岛素促泌剂诱导 INS - 1 细胞凋亡的 DNA 凝胶电泳图

① 高浓度, 作用 96h; ② 高浓度, 作用 48h; ③ 高浓度, 作用 24h

4. 细胞凋亡的 TUNEL 检测结果:对照组 INS-1 细胞凋亡率最低,阴性对照组和空白对照组组间差异无显著性($P>0.05$),与阴性对照组相比,各药物组凋亡率明显增高(表 2),药物作用于细胞 4h,格列本脲(A3、A2、A1)、格列美脲(B2、B1)使细胞的凋亡率分别增加 2.21、2.5、2.71、2.2.57 倍($P<0.05$),格列美脲($0.1\mu\text{mol/L}$)及各浓度组瑞格列奈对细胞的凋亡率无显著性影响($P>0.05$);药物作用于细胞 24h,格列本脲(A3、A2、A1)、格列美脲(B3、B2、B1)、瑞格列奈(C2、C1)使细胞凋亡率分别增加 2.35、

2.71、2.94、1.71、1.88、2.35、1.53、1.94 倍($P<0.05$),瑞格列奈(C3)对细胞凋亡率无明显影响($P>0.05$);药物作用于细胞 4 天,格列本脲(A3、A2、A1)、格列美脲(B3、B2、B1)、瑞格列奈(C3、C2、C1)使细胞的凋亡率分别增加 3.7、4.5、8.35、3.2、3.8、7、2.8、3.6、4.5 倍($P<0.05$);各药物组间比较,格列本脲和格列美脲两组组间差异无统计学意义($P>0.05$),瑞格列奈与磺脲类药物组相比,组间差异有显著性($P<0.05$)。

表 2 胰岛素促泌剂对 INS-1 细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s$)(%, $n=6$)

作用时间 (h)	格列本脲($\mu\text{mol/L}$)			格列美脲($\mu\text{mol/L}$)			瑞格列奈($\mu\text{mol/L}$)			阴性	阳性
	10	1	0.1	10	1	0.1	1	0.1	0.01	对照	对照
4h	6.3±0.82*	5.8±0.75*	5.2±0.75*	6±0.63*	4.7±0.52*	2.7±0.52	2.2±1.17	1.8±0.41	2±0.63	2.3±0.82	2.5±0.55
24h	8.3±0.82*	7.7±0.82*	6.7±1.03*	6.7±1.21*	5.3±0.82*	4.8±0.41*	5.5±1.05*	4.3±0.82*	2.5±0.84	2.8±0.75	3.3±0.52
96h	27.8±4.45*	15±1.55*	12.3±1.97*	23.3±2.81*	12.7±1.03*	10.7±0.98*	15±2.28*	12±1.1*	9.3±1.64*	3.3±1.03	3.7±0.82

与相同作用时间阴性对照组相比,* $P<0.05$

5. 药物对胰岛细胞 INS-1 胰岛素分泌的影响:不同浓度药物作用 INS-1 细胞后,其基础和高糖刺激的胰岛素分泌量结果见表 3。与对照组比较,胰岛素促泌剂可以促进细胞分泌胰岛素,各组药物作用细胞 4h 对细胞胰岛素分泌无影响($P>0.05$),但随着药物浓度增加、作用时间延长,各浓度组药物均可明

显促进基础和高糖刺激后的胰岛素分泌,且呈浓度时间依赖性升高($P<0.05$);高糖组胰岛素分泌明显高于基础胰岛素分泌,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$);但随时间延长,各组胰岛素升高的幅度逐渐降低。

表 3 胰岛素促泌剂对 INS-1 细胞胰岛素释放的影响($\bar{x}\pm s$)(ng/ml, $n=6$)

作用时间	格列本脲($\mu\text{mol/L}$)			格列美脲($\mu\text{mol/L}$)			瑞格列奈($\mu\text{mol/L}$)			阴性	阳性
	10	1	0.1	10	1	0.1	1	0.1	0.01	对照	对照
4h 低糖	7.58±1.51*	6.51±1.00*	5.37±0.53	7.27±1.10*	6.70±1.26*	5.35±0.92	6.75±0.87*	5.53±1.01	4.51±1.11	5.89±2.03	6.30±1.17
高糖	15.17±1.81*	14.42±0.7*	13.29±0.96*	15.48±1.23*	13.66±1.41*	9.12±0.67	16.15±1.68*	13.75±2.89*	9.75±1.10	10.75±2.60	10.57±2.43
24h 低糖	16.31±3.63*	14.56±4.2*	9.92±1.30*	18.95±1.50*	14.19±3.11*	11.37±2.35*	15.31±1.76*	12.41±2.34*	8.30±1.21	9.39±0.52	8.99±1.44
高糖	24.32±3.58*	22.5±4.89*	17.95±1.63*	24.58±2.61*	21.67±2.63*	17.11±1.77*	24.31±1.60*	22.53±2.57*	17.16±1.75*	14.87±1.72	14.65±2.23
96h 低糖	20.23±3.26*	18.92±2.9*	13.09±1.45*	25.93±1.92*	18.42±1.46*	15.04±3.52*	19.93±1.35*	15.5±1.92*	10.81±1.25	10.86±3.27	10.16±2.67
高糖	27.74±4.76*	26.8±2.81*	21.27±1.72*	28.66±1.36*	24.32±2.85*	18.87±1.86*	24.87±1.60*	21.92±2.63*	19.42±2.57*	16.65±0.54	16.34±1.10

与相同糖浓度、相同作用时间的阴性对照组相比,* $P<0.05$

讨 论

β 细胞凋亡是引起胰岛功能障碍的主要原因之一,相关研究也表明 2 型糖尿病患者存在严重的胰岛 β 细胞功能减退^[3],使用磺脲类药物可以促进胰岛素分泌,降低血糖,短期应用可明显缓解糖尿病症状,但长期应用可产生磺脲类药物继发性失效。UKPDS 研究发现^[4]用磺胺类药物治疗 6 年, β 细胞功能比初诊时进一步减退 27%。其原因可能与药物导致胰岛 β 细胞凋亡有关,研究确定药物与胰岛 β 细胞凋亡之间的关系是非常必要的。

本研究发现,磺脲类药物格列本脲和格列美脲可以导致体外培养的大鼠胰岛素瘤细胞 INS-1 凋亡,

而另一类胰岛素促泌剂苯甲酸衍生物瑞格列奈对胰岛 β 细胞凋亡的影响较小,与 Maedler 等人^[2]的研究结果一致,各研究组药物在不同浓度不同作用时间下的凋亡率均高于阴性对照组,实验还发现,随着药物浓度的增加,药物作用时间的延长,细胞的凋亡率逐渐增加,高浓度药物作用于细胞 96h 可见明显的 DNA Ladder 凋亡条带,由于我们实验用药物浓度正好在临床上用药物治疗的病人的血浆药物浓度之内,例如:临床上应用 2.5mg 的格列本脲,它在血浆中的药物浓度是 72ng/ml($0.15\mu\text{mol/L}$)^[5],而我们用 $0.1\mu\text{mol/L}$ 的格列本脲作用细胞 4h 即可引起胰岛 β 细胞凋亡明显增加,这也为指导我们临床用药提供了

依据,同时,各类胰岛素促泌剂可以促进胰岛素的释放,高糖刺激的胰岛素释放也很明显,但随着药物作用时间的延长及药物浓度的增加,胰岛 β 细胞凋亡逐渐增加,胰岛素释放增加的幅度减少。综合实验结果可见,磺脲类药物对胰岛 β 细胞凋亡的影响较大,相比之下,苯甲酸衍生物对胰岛 β 细胞的凋亡影响较小,甚至在某种程度上可以促进胰岛 β 细胞增生,减少其凋亡。

胰岛素促泌剂对胰岛 β 细胞的凋亡的作用,可能与其产生的糖毒性恶性循环有关,胰岛素促泌剂尤其是磺脲类药物,与相应的受体结合以后,很难再与受体分离,可造成持续的胰岛素高分泌,直至凋亡,凋亡后的细胞无法释放胰岛素,产生磺脲类药物继发性失效的现象,血糖重新升高或者是低血糖的频发,使得本已不堪重负的 β 细胞也加快了走向衰竭的步伐,凋亡进一步加重^[6]。本研究结果可为胰岛 β 细胞凋亡的机制提供依据,对临床根据患者病程、胰岛细胞受损情况,指导 2 型糖尿病患者合理用药,选择

不同的降糖药物有一定的指导意义。

参考文献

- 1 Lupi R, Del Prato S. β - cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences[J]. *Diabetes & Metabolism*, 2008, 34: S56 - S64
- 2 Kathrin Maedler, Richard D. Carr, Domenico Bosco, *et al.* Sulfonylurea Induced β - Cell Apoptosis in Cultured Human Islets[J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005, 90(1): 501 - 506
- 3 Del Prato S, Bianchi C, Marchetti P. beta - cell function and anti - diabetic pharmacotherapy[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2007, 23(7): 518 - 527
- 4 UK. Prospective Diabetes Study Group. UK prospective diabetes study 16: overview of 6 years' therapy of type 2 diabetes: a progressive disease[J]. *Diabetes*, 1995, 44(11): 1249 - 1258
- 5 Jaber LA, Antal EJ, Slaughter RL, *et al.* compairson of pharmacokinetics and pharmacodynamics of short - and long - term glyburide therapy in NIDDM[J]. *Diabetes Care*, 1994, 17: 1300 - 1306
- 6 Donath MY, Ehses JA, Maedler K, *et al.* Mechanisms of β - cell death in type2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2005, 54(2): S108 - S113

(收稿: 2009 - 08 - 24)

(修回: 2009 - 12 - 28)

小鼠 SEB/OVA 变应性鼻炎模型的实验研究

马 靖 刘 涛

摘 要 目的 建立变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)小鼠模型,研究金黄色葡萄球菌肠毒素 B(SEB)和卵清蛋白(OVA)在建立 AR 模型中的作用。**方法** 将 40 只 6~8 周 Balb/c 小鼠随机分为 4 组:OVA 组、SEB 组、OVA + SEB 组、生理盐水组,并建立小鼠 AR 模型。采用析因设计分析各组小鼠临床症状评分、血清 IgE 和 IL - 4 的水平,并对鼻黏膜行组织形态学观察。**结果** OVA 组、SEB 组、OVA + SEB 组及生理盐水组小鼠的症状评分分别为: 0.90 ± 0.99 、 0.70 ± 0.82 、 6.80 ± 1.03 、 0.60 ± 0.70 , OVA、SEB 交互效应 $P < 0.01$,有统计学意义,且 OVA + SEB 组鼻黏膜出现明显的 AR 形态学改变。血清 IgE、水平分别为 $25.41 \pm 3.87\text{ng/ml}$ 、 $20.11 \pm 2.23\text{ng/ml}$ 、 $122.72 \pm 5.68\text{ng/ml}$ 、 $18.67 \pm 2.00\text{ng/ml}$; IL - 4 的水平分别为 $27.37 \pm 1.52\text{pg/ml}$ 、 $24.05 \pm 2.13\text{pg/ml}$ 、 $63.73 \pm 3.81\text{pg/ml}$ 、 $23.50 \pm 2.62\text{pg/ml}$,二者 OVA、SEB 交互效应均有统计学意义。**结论** 只有 SEB 和 OVA 协同作用后可致小鼠 AR,即 SEB 可以提高机体对 OVA 的易感性,发挥免疫佐剂的作用。

关键词 变应性鼻炎 金黄色葡萄球菌肠毒素 B SEB

The Study of SEB/OVA Allergic Rhinitis Mice Model. Ma Jing, Liu Tao. Department of Otolaryngology - Head & Neck Surgery, First Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China

Abstract Objective To establish mice modle of allergic rhinitis(AR) and to study the role of Staphylococcal enterotoxin B(SEB) and ovalbumin(OVA) in the modle. **Methods** Forty Balb/c mice were evenly randomized into OVA group, SEB group, OVA + SEB group and normal sodium group and AR modle was established. The symptom scores, total serum IgE concentration, IL - 4 concentration were analyzed by factorial design. Meanwhile, the morphology change of nasal mucosa was observed. **Results** The symptom scores in OVA group, SEB group, OVA + SEB group and normal sodium group were 6.80 ± 1.03 , 0.90 ± 0.99 , 0.70 ± 0.82 , 0.60 ± 0.70 respec-