

甘油三酯对体外培养大鼠胰岛细胞功能的影响

朱姿英 薛耀明 姜一真 姜一真 第一军医大学南方医院内分泌科 广东 广州 510515 宛

摘要 目的 研究甘油三酯对胰岛细胞分泌功能的影响 方法 体外分离 SD 大鼠胰岛细胞并进行单层细胞培养 以不同浓度甘油三酯(0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 mmol/L) 与胰岛细胞共同孵育 72 h 后进行葡萄糖负荷试验 放射免疫法检测培养液中胰岛素水平 以评价胰岛细胞功能变化 同时采用油红染色方法 显微镜下观察细胞内脂肪堆积情况 结果 低糖(2.8 mmol/L) 刺激下 甘油三酯对胰岛细胞的胰岛素分泌无明显影响 高糖(27.8 mmol/L) 负荷下 高浓度甘油三酯(5.0, 10.0 mmol/L) 可抑制胰岛细胞的胰岛素分泌($P < 0.05$) 油红染色见甘油三酯处理组胰岛细胞内均有脂肪堆积 以高浓度组明显 结论 甘油三酯可导致体外培养胰岛细胞内脂肪堆积 抑制细胞的分泌功能

关键词 胰岛细胞 高甘油三酯血症 脂毒性 糖尿病 2 型

中图分类号 R587.1 文献标识码 A 文章编号 000-02588(2003)06-0608-03

Effect of triglycerides on rat islet cell function in vitro

ZHU Zi-ying, XUE Yao-ming, JIANG Yi-zhen

Department of Endocrinology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the effect of triglycerides (TGs) on the function of in vitro cultured rat islet cells. Methods SD rat islet cells were isolated for monolayer cell culture and treated with TGs at different concentrations (0, 0.5, 2.5, 5.0, 10.0 mmol/L) for 72 h. Insulin level in the cell culture media was measured after glucose loading test, and the deposition of fat droplets in the islet cells observed by oil red O-staining. Results No obvious effect was observed after a 72-h incubation of the islet cells with TGs at low glucose level (2.8 mmol/L), while with the stimulation of high-level glucose (27.8 mmol/L), the insulin secretion was significantly inhibited by TGs of higher concentrations (5.0, 10.0 mmol/L). The deposition of fat droplets was found in the islet cells after incubation with TGs, with TGs of higher concentrations. Conclusion TGs induces deposition of fat droplets in islet cells in vitro, and may inhibit the insulin-secreting function of the cells.

Key words: islet cells; hypertriglyceridemia; lipotoxicity; diabetes mellitus, type 2

高甘油三酯血症是 2 型糖尿病常见的脂代谢紊乱特征 近年来国内外的一些前瞻性研究发现 2 型糖尿病患者的血脂代谢异常往往出现在糖代谢异常之前 人为血甘油三酯水平是 2 型糖尿病发病的独立危险因素 本实验以体外培养的正常胰岛细胞为研究对象 探讨甘油三酯对胰岛细胞功能的影响

1 材料和方法

1.1 主要试剂

呀型胶原酶购自 Sigma 公司 甘油三酯 0% Intralipid 购自 Sigma 公司 油红染料购自 Amresco 公司 取 2.1 g 加入 600 ml 异丙醇溶液 不搅拌室温过夜 滤过后加入 450 ml 双蒸水 不搅拌 4 益过夜 滤过 2 次 配制成油红染液 胰岛素放射免疫试剂盒由北京原子能研究院同位素研究所提供

1.2 胰岛细胞分离 纯化 培养及鉴定

取出生 1~3 d SD 大鼠 雌雄不拘 由本院动物所提供 常规消毒 剖腹取出胰腺 置于 4 益 Hanks 液

中 用眼科剪剪成 0.5 mm³ 组织块 约 3 mg/ml 呀型胶原酶 H7.4 益 进行消化 37 益 水中消化 6~8 min 益 Hanks 液终止消化 取上层浊液 未消化组织如此反复消化 4~5 次 至组织基本消化 收集各次消化浊液 1000 r/min 离心 5 min 取沉淀加入完全培养基调整细胞密度 接种进行单层细胞培养 通 16 h 后转血去除成纤维细胞 于 24 孔板 伊 0⁵ 细胞 / 孔 中继续培养 7 d 用于实验 同时于培养第 7 天 25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞 低速离心收集细胞 进行免疫组织化学染色 多数细胞呈棕黄色 证实为胰岛细胞

1.3 实验分组

取 24 孔板中生长良好的胰岛细胞分为 5 组 培养液中甘油三酯终浓度分别是 0 益 0.5 益 1.0 益 2.5 益 5.0 益 mmol/L 每组设 4 个复孔 37 益 5% CO₂ 孵育 72 h 进行葡萄糖刺激胰岛素分泌试验 测定相应介质中胰岛素含量 并进行油红染色 观察细胞内的甘油三酯

1.4 葡萄糖刺激的胰岛素释放试验

不同处理的胰岛细胞 弃去原培养液 分别用含葡萄糖 2.8 益 7.8 mmol/L 的 KRBB 液 (Krebs-Ringer bicarbonate buffer 液) 在 37 益 5% CO₂ 孵育箱中孵育 1 h 通

收稿日期 2003-03-24

作者简介 朱姿英 1970- 宛 陕西临潼人 1995 年毕业于第四军医大学 主治医师 电话 20-61641888-87140

分别收集刺激后的培养液采用放射免疫双抗体法表
通过 酌计数仪检测胰岛素分泌量遥

1.5 油红染色

各组细胞处理完毕后表anks 液洗涤细胞 3 次表
10% 甲醛室温下固定 1 h表去表加入油红染液室温下
染色 2 h表光镜下观察并摄像遥

1.6 数据处理

实验数据均以均值标准差表示表采用 SPSS 统计
软件处理遥用 One-way ANOVA 检验方差齐性表组间
两两比较用 SNK 法遥

2 结果

2.1 甘油三酯对胰岛细胞胰岛素分泌的影响表 1 冤

各处理组在低糖表.8mmol/L冤刺激下表胰岛素分泌
量无显著性差异表>0.05冤高糖表7.8mmol/L冤刺激下胰
岛素分泌量有显著性差异表<0.001冤高浓度甘油三酯
组表.0mmol/L冤.0mmol/L冤与对照组比较表高糖刺
激下的胰岛素分泌量显著降低表<0.05冤而较低浓度
甘油三酯组表.5mmol/L冤.5mmol/L冤与对照组比较表
高糖刺激下的胰岛素分泌量无显著性差异表>0.05冤高
浓度甘油三酯组与较低浓度甘油三酯组间比较表高糖
刺激下的胰岛素分泌量亦明显降低表<0.05冤

表 1 不同浓度甘油三酯作用下胰岛素释放量测定
渊IU/L冤n=4冤依冤

Tab.1 Released insulin content in the culture medium
in response to triglycerides treatment at different
concentrations after glucose loading test
(mIU/L, n=4, Mean冤D)

Group	Insulin content in medium	
	Low glucose	High glucose
Control	5.02冤.86	7.04冤.83
Triglycerides(mmol/L)		
0.5	5.18冤.43	6.63冤.38
2.5	6.01冤.89	6.57冤.58
5.0	5.68冤.52	3.75冤.43*
10.0	5.13冤.82	3.56冤.51*

*P<0.05 vs control, 0.5 and 2.3 mmol/L triglycerides group

2.2 甘油三酯引起胰岛细胞形态学改变及细胞内脂
质堆积情况

光镜下表对照组与甘油三酯处理组的胰岛细胞形
态学上有明显区别遥对照组细胞形状规则表多数细
胞呈圆形表胞膜光滑表胞质染色浅淡或无明显着色表
乎见不到红色颗粒表 1 冤而甘油三酯处理组细胞形
态发生改变表形状不规则表胞膜可见星状突起表胞
质内广泛着色表红色颗粒多见表其以 5.0冤.0mmol/L 甘
油三酯组明显表 2 冤 冤

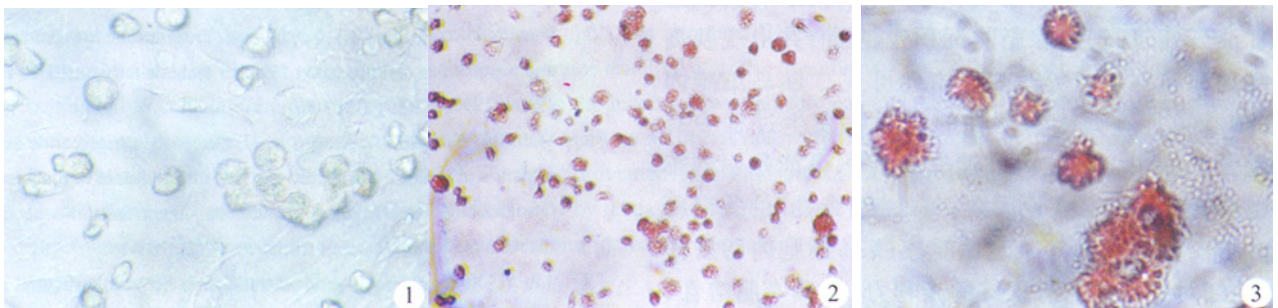


图 1 正常对照组胰岛细胞油红染色后光镜观察表放大倍数表冤冤

Fig.1 Islet cells under light microscope in control group with oil red O-staining

渊original magnification: 冤冤冤

图 2 5.0mmol/L 甘油三酯组胰岛细胞油红染色后光镜观察表放大倍数表冤冤

Fig.2 Islet cells under light microscope in 5.0 mmol/L triglycerides group with oil red O-staining

渊original magnification: 冤冤冤

图 3 10.0mmol/L 甘油三酯组胰岛细胞油红染色后光镜观察表放大倍数表冤冤

Fig.3 Islet cells under light microscope in 10.0 mmol/L triglycerides group with oil red O-staining

渊original magnification: 冤冤冤

3 讨论

甘油三酯即脂肪表是体内最丰富的脂类物质遥它的
代谢受许多激素的调节表而胰岛素由于能抑制脂肪
分解表被称为抗脂解激素遥未控制的糖尿病患者常常
存在明显的脂代谢紊乱表其中高甘油三酯血症最为常
见冤近年来国内外的一些前瞻性研究冤冤表明血甘油

三酯水平增高是 2 型糖尿病发病的独立危险因素冤
Sane 等冤冤追踪 6 个家族性高甘油三酯血症家系患者表
发现此类人群中 2 型糖尿病的发病率明显增加遥同时
Man 等冤冤对糖尿病大鼠的体外实验结果表明甘油三
酯对胰岛细胞的分泌功能有明显的抑制作用遥本实验
以体外培养正常大鼠的胰岛细胞为研究对象表发现在

甘油三酯的直接作用下胰岛细胞的分泌功能受到一定程度的影响。甘油三酯对胰岛素基础分泌量无明显影响。由于 2.8mmol/L 葡萄糖对胰岛细胞为无效刺激，故为基础分泌量。在高糖 7.8mmol/L 负荷下，表高浓度甘油三酯组 0.0mmol/L 影响胰岛细胞的胰岛素分泌。即甘油三酯浓度 5mmol/L 时，胰岛细胞分泌功能明显受抑制。提示高浓度甘油三酯对胰岛细胞具有直接的损伤作用。

甘油三酯是由 1 分子甘油和 3 分子脂肪酸组成。表高水平的甘油三酯必然使游离脂肪酸水平增高。而体内许多类型的细胞，包括胰岛细胞，均可以自由摄取脂肪酸。如果摄入的脂肪酸由于利用障碍不能被氧化，就以甘油三酯的形式储存于细胞内。Lee 等以肥胖的 2 型糖尿病动物模型 Fa/faZDF (Zucker diabetic fatty) 鼠为研究对象，发现 ZDF 鼠在糖尿病前期，血甘油三酯已升高，胰岛 B 细胞内 TG 含量较正常增加 3 倍。而发病后细胞内 TG 含量则升高 10 倍。表出现葡萄糖刺激的胰岛素分泌障碍。运用噻唑烷二酮类药物，细胞内 TG 含量下降，葡萄糖刺激的胰岛素分泌恢复正常。Manji 等人研究亦证实通过药物干预或限制 OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) 糖尿病大鼠饮食来降低大鼠血中 TG，可以减少胰岛细胞内的 TG 含量，使得胰岛细胞功能得到改善。而且从病理结构观察发现 OLETF 糖尿病大鼠血中甘油三酯越高，胰腺脂肪沉积也越重，并出现胰岛纤维化和胰腺萎缩等改变。由此可见，胰岛细胞内 TG 堆积可能在此模型动物的糖尿病发生过程中有着重要的作用。细胞内甘油三酯堆积可能是引起 B 细胞功能障碍的重要原因之一。是脂毒性的关键所在。本实验采用油红染色法观察胰岛细胞内脂肪情况。油红对中性脂肪有很好的亲和力，它具有脂溶性，能透过细胞膜，效能较好的显现细胞内脂肪。结果发现正常对照组与不同甘油三酯处理组的胰岛细胞形态学上有明显区别。正常对照组细胞形状规则，圆形表

胞膜光滑，胞质染色浅淡或无明显着色。几乎见不到红色颗粒。而甘油三酯处理组细胞形态发生改变，胞膜可见星状突起，胞质内广泛着色。红色颗粒多见。其以 5.0mmol/L 甘油三酯组明显。提示甘油三酯可引起体外培养的胰岛细胞内明显的甘油三酯堆积及细胞形态学改变，导致细胞分泌功能损害。

参考文献

- 邹效漫. 二型糖尿病的脂蛋白代谢特点. 见: 血脂的基础与临床. 北京: 人民军医出版社, 2002. 191-200.
- Sane T, Taskinen MR. Does familial hypertriglyceridemia predispose to NIDDM? *Diabetes Care*, 1993, 16(12): 1494-9.
- Montenegro RM, Montenegro AP, Fernandes MI, et al. Triglyceride-induced diabetes mellitus in congenital generalized lipodystrophy. *Pediatr Metab*, 2002, 15(4): 441-7.
- Yang WY, Xing XY, Lin H, et al. Baseline hypertriglyceridemia, a risk factor for non-insulin dependent diabetes mellitus: a 6-year follow-up study of 432 nondiabetics. *Chin J Intern Med*, 1995, 34(4): 583-6.
- Man ZW, Zhu M, Yoshihiko N, et al. Impaired B-cell function and deposition of fat droplets in the pancreas as a consequence of hypertriglyceridemia in OLETF rat, a model of spontaneous NIDDM. *Diabetes*, 1997, 46(16): 1717-24.
- Lee Y, Hirose H, Ohneda M, et al. B-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-B-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(43): 10878-82.
- Shimabukuro M, Zhou YT, Lee Y, et al. Troglitazone lowers islet fat and restores beta cell function of Zucker diabetic fatty rats. *Biol Chem*, 1998, 273(32): 3547-50.
- Man ZW, Hirashima T, Mori S, et al. Decrease in triglyceride accumulation in tissues by restricted diet and improvement of diabetes in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, a non-insulin-dependent diabetes model. *Metabolism*, 2000, 49(2): 108-14.
- Liu Y, Xu Z, Zhang J, et al. Relationship between structural and functional changes of glucose and lipids in OLETF rats with impaired glucose tolerance. *Chin Med J*, 2002, 80(2): 175-7.

责任编辑 杨金星