

# 贝那鲁肽对高糖诱导的胰岛 $\beta$ 细胞功能障碍和凋亡的影响及机制研究

辛丽娟<sup>a</sup>, 宁建峰<sup>b</sup>, 唐宏霞<sup>a</sup>, 左源渊<sup>a</sup>, 王新婷<sup>a</sup>, 彭 一<sup>c</sup>, 尚宏博<sup>d</sup>, 鲍喜静<sup>d</sup>

(张家口市第一医院 a. 内分泌二科; b. 检验科; c. 内分泌代谢病门诊; d. 内分泌一科, 河北张家口, 075000)

**摘要:** **目的** 探讨贝那鲁肽对高糖诱导的胰岛  $\beta$  细胞功能障碍和凋亡的影响以及相关机制。**方法** 将 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞随机分为对照组、高糖组、贝那鲁肽处理组、MG-132 预处理组和 ISO-1 预处理组, 对照组给予 5.5 mmol/L 葡萄糖处理, 高糖组给予 30 mmol/L 葡萄糖处理, 贝那鲁肽处理组在高糖组的基础上给予 1 nmol/L 贝那鲁肽处理, MG-132 预处理组和 ISO-1 预处理组分别在高糖的基础上给予 20  $\mu$ mol/L MG-132 和 50  $\mu$ mol/L ISO-1 预处理。培养 24h 后噻唑蓝 (MTT) 比色法评估细胞的活力, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞胰岛素和巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF) 的分泌, Western blot 检测凋亡相关蛋白 (Bax 和 cleaved caspase 3) 和 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白 (p-I $\kappa$ B, I $\kappa$ B 和 NF- $\kappa$ B p65) 的表达。**结果** 与对照组相比, 高糖组胰岛  $\beta$  细胞的存活率 ( $t=4.949$ ,  $P<0.01$ )、胰岛素的分泌 ( $t=3.168$ , 4.273, 均  $P<0.05$ ) 和 I $\kappa$ B 的表达 ( $t=3.062$ ,  $P<0.05$ ) 明显降低, 凋亡相关蛋白 (Bax 和 cleaved caspase 3) 的表达 ( $t=2.923$ , 3.141, 均  $P<0.05$ )、p-I $\kappa$ B 和 NF- $\kappa$ B p65 表达 ( $t=3.544$ , 4.658, 均  $P<0.01$ ) 以及 MIF 分泌 ( $t=3.024$ ,  $P<0.05$ ) 明显增加。与高糖组相比, 贝那鲁肽处理组可逆转高糖组上述指标的变化 ( $t=2.415 \sim 4.290$ , 均  $P<0.05$ ), 差异均有统计学意义。进一步给予 NF- $\kappa$ B 抑制剂 MG-132 和 MIF 抑制剂 ISO-1 预处理后, 与高糖组相比, MG-132 预处理组和 ISO-1 预处理组均可改善高糖诱导的 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞胰岛素分泌功能 ( $t=2.515 \sim 6.867$ , 均  $P<0.05$ ), 还可降低凋亡相关蛋白 Bax ( $t=4.022$ , 2.554, 均  $P<0.05$ ) 和 cleaved caspase 3 ( $t=4.022$ , 2.760, 均  $P<0.05$ ) 的表达, 差异均有统计学意义。**结论** 贝那鲁肽可通过抑制 NF- $\kappa$ B/MIF 依赖的炎症途径减轻高糖诱导的胰岛  $\beta$  细胞功能障碍和凋亡。

**关键词:** 贝那鲁肽; INS-1 胰岛  $\beta$  细胞; NF- $\kappa$ B; 巨噬细胞迁移抑制因子; 凋亡

**中图分类号:** R587; R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 01-103-05

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2022.01.021

## Effect and Mechanism of Benaglutide on Islet $\beta$ Cell Dysfunction and Apoptosis Induced by High Glucose

XIN Li-juan<sup>a</sup>, NING Jian-feng<sup>b</sup>, TANG Hong-xia<sup>a</sup>, ZUO Yuan-yuan<sup>a</sup>, WANG Xin-ting<sup>a</sup>,  
PENG Yi<sup>c</sup>, SHANG Hong-bo<sup>d</sup>, BAO Xi-jing<sup>d</sup>

(a. Department of Endocrinology II; b. Department of Clinical Laboratory; c. Endocrine and Metabolic Diseases Clinic;  
d. Department of Endocrinology I, the First Hospital of Zhangjiakou, Hebei Zhangjiakou 075000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects and mechanisms of benaglutide on high glucose-induced islet  $\beta$  cell dysfunction and apoptosis. **Methods** INS-1 islet  $\beta$  cells were randomly divided into control group, high glucose group, benaglutide treatment group, MG-132 pretreatment group and ISO-1 pretreatment group. The control group was administered 5.5 mmol/L glucose, the high glucose group was administered 30 mmol/L glucose, and the benaglutide treatment group was administered 1 nmol/L benaglutide on the basis of the high glucose group, the MG-132 pretreatment group and ISO-1 pretreatment group were administered 20  $\mu$ mol/L MG-132 and 50  $\mu$ mol/L ISO-1 on the basis of high glucose group. The cells viability, the levels of insulin and macrophage migration inhibitory factor (MIF), and the expression of apoptosis-related proteins (Bax and cleaved caspase 3) and NF- $\kappa$ B pathway-related proteins (p-I $\kappa$ B, I $\kappa$ B and NF- $\kappa$ B p65) in INS-1 islet  $\beta$  cells were respectively evaluated by the MTT assay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and Western blot after 24 hours of culture. **Results** Compared with the control group, the cells viability ( $t=4.949$ ,  $P<0.01$ ), insulin secretion ( $t=3.168$ , 4.273, all  $P<0.05$ ), and I $\kappa$ B expression ( $t=3.062$ ,  $P<0.05$ ) of islet  $\beta$  cells in the high glucose group were significantly reduced, apoptosis-related proteins (Bax and cleaved caspase 3) ( $t=2.923$ , 3.141, all  $P<0.05$ ), p-I $\kappa$ B ( $t=3.544$ ,  $P<0.01$ ) and NF- $\kappa$ B p65 ( $t=4.658$ ,  $P<0.01$ ) expression

**基金课题:** 2019 年度张家口市科技计划项目 (编号: 1921081D)。

**作者简介:** 辛丽娟 (1984-), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 内分泌临床代谢性疾病方向, E-mail: xinwin321@163.com。

**通讯作者:** 宁建峰 (1978-), 男, 本科, 主管检验师, 研究方向: 临床医学检验诊断, E-mail: 444256816@qq.com。

and MIF secretion ( $t=3.024$ ,  $P<0.05$ ) were significantly increased. Compared with the high glucose group, the changes of above indicators were reversed in benaglutide treatment group ( $t=2.415 \sim 4.290$ , all  $P<0.05$ ), the differences were statistically significant respectively. Furthermore, compared with the high glucose group, the MG-132 pretreatment group and the ISO-1 pretreatment group could improve the high glucose-induced INS-1 Insulin  $\beta$  cells insulin secretion function ( $t=2.515 \sim 6.867$ , all  $P<0.05$ ), and reduce apoptosis-related proteins Bax ( $t=4.022$ ,  $2.554$ , all  $P<0.05$ ) and cleaved caspase 3 ( $t=4.022$   $2.760$ , all  $P<0.05$ ) expression, the differences were statistically significant. **Conclusion** Benaglutide can alleviate high glucose-induced islet  $\beta$  cells dysfunction and apoptosis by inhibiting the NF- $\kappa$ B / MIF-dependent inflammatory pathway.

**Keywords:** benaglutide; INS-1 islet  $\beta$  cells; NF- $\kappa$ B; MIF; apoptosis

近年来糖尿病的发病率迅速增加<sup>[1]</sup>。糖尿病的高死亡率和心血管并发症仍然是目前卫生保健系统面临的难题,严重影响患者的生活质量,增加社会负担<sup>[2]</sup>。研究表明,胰岛 $\beta$ 细胞的丢失、破坏或功能障碍可导致糖尿病和高血糖,而促进胰岛 $\beta$ 细胞的再生和减少胰岛 $\beta$ 细胞的凋亡是近年来治疗糖尿病的研究热点<sup>[3-4]</sup>。贝那鲁肽是全球首个人源氨基酸序列的GLP-1药物,广泛用于治疗2型糖尿病。研究表明GLP-1可刺激胰岛 $\beta$ 细胞复制、再生和分化,并通过减少应激来抑制胰岛 $\beta$ 细胞的凋亡<sup>[7]</sup>,但具体机制尚不完全清楚。本研究旨在探究贝那鲁肽减轻高糖诱导的胰岛 $\beta$ 细胞系(INS-1)功能障碍和凋亡的分子机制,扩展对贝那鲁肽抗凋亡作用的理解,并进一步支持了GLP-1类似物在2型糖尿病患者治疗中的应用。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 大鼠胰岛素瘤细胞系INS-1购自上海抚生实业有限公司。将INS-1胰岛 $\beta$ 细胞培养于含有10ml/dl胎牛血清,100U/ml青霉素和100 $\mu$ g/ml链霉素的RPMI-1640中,置于37℃含有5ml/dl CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中,每2天换一次液。

1.2 仪器与试剂 电泳仪与转膜仪(美国,伯乐);曝光仪(美国,UVP),酶标仪及细胞培养箱(赛默飞世尔科技有限公司,美国)。贝那鲁肽购自上海仁会生物制药股份有限公司,RPMI-1640培养液、胎牛血清、96孔板和24孔细胞培养皿购自Gibco公司;青链霉素混合液购自上海碧云天生物技术有限公司;MG-132,ISO-1,二甲基亚砜和噻唑蓝(MTT)试剂盒购自美国Sigma-Aldrich公司;大鼠/小鼠胰岛素酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自美国LINCO research公司;巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)ELISA试剂盒购自Abcam公司;鼠抗鼠Bax和I $\kappa$ B抗体、兔抗鼠cleaved caspase3抗体、HRP标记山羊抗鼠IgG(H+L),HRP标记山羊抗兔IgG(H+L)购自美国Cell Signaling Technology公司;兔抗鼠p-I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B p65和 $\beta$ -actin购自Abclonal公司;蛋白质Marker购自Fermentas公司;总蛋白提取试剂盒购自南京凯基公司;磷酸盐缓冲液(PBS)、Tris缓冲盐溶液(TBS)购自武汉

博士德公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自美国Pierce公司;甲醇购自国药集团化学试剂有限公司;Tween-20购自北京普利莱基因技术有限公司;脱脂奶粉购自伊利乳业股份有限公司;5 $\times$ 上样缓冲液、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、RIPA细胞裂解液、免疫印迹化学发光试剂(ECL),抗荧光淬灭封片剂购自碧云天生物技术有限公司。

## 1.3 方法

1.3.1 分组:对照组(Control group):向培养液中加入5.5mmol/L葡萄糖,培养24h。高糖组(HG组):向培养液中加入30mmol/L葡萄糖,培养24h。贝那鲁肽处理组(HG+BL组):在高糖组的基础上,向培养液中加入1nmol/L贝那鲁肽,培养24h。MG-132预处理组:在高糖组的基础上,提前1h给予20 $\mu$ mol/L MG-132预处理,培养24h。ISO-1预处理组:在高糖组的基础上,提前1h给予50 $\mu$ mol/L ISO-1预处理,培养24h。

1.3.2 INS-1细胞活力测定:采用比色MTT测定法评估细胞活力,将细胞( $2 \times 10^4$ 细胞/孔)接种在96孔板中,设置对照组、高糖组和贝那鲁肽处理组,孵育48h,随后将MTT溶液(100 $\mu$ l, 1mg/ml)添加到96孔板的每个孔中,并在37℃下孵育4h至有紫蓝色结晶析出,离心弃上清。加入100 $\mu$ l二甲亚砜震荡。使用酶标仪在540nm处测定每个孔的内容物的吸光度。根据公式计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(样本孔 $A_{540nm}$ /对照孔 $A_{540nm}$ ) $\times 100\%$ 。

1.3.3 葡萄糖刺激胰岛素分泌(GSIS)实验:将细胞( $2 \times 10^4$ 个/孔)接种在24孔板中,设置对照组、高糖组、贝那鲁肽处理组、MG-132预处理组和ISO-1预处理组,在无葡萄糖Krebs-Ringer缓冲液(129mmol/L NaCl, 4.8mmol/L KCl, 2.5mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1.2mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 1.2mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mmol/L NaHCO<sub>3</sub>)中孵育1h后,小心除去培养液,PBS洗涤细胞,在37℃下用含有5或25mmol/L葡萄糖的Krebs-Ringer缓冲液刺激1h。然后收集细胞培养液分析胰岛素的分泌。使用大鼠/小鼠胰岛素酶联免疫吸附测定试剂盒测定胰岛素分泌。

1.3.4 Western blot:收集各组INS-1胰岛 $\beta$ 细胞,

加入适量 RIPA 裂解液,冰上研磨裂解后提取总蛋白,使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度,加入上样缓冲液,沸水煮 5min 使蛋白变性,取 30  $\mu$ g 蛋白电泳分离蛋白,而后将蛋白转移至 PVDF 膜上,5ml/dl 脱脂奶粉室温封闭 1h,加入 Bax (1:500)、cleaved caspase3 (1:1 000)、p-I $\kappa$ B (1:500)、I $\kappa$ B (1:1 000)、NF- $\kappa$ B p65 (1:300) 及  $\beta$ -actin (1:1 000) 一抗,4℃过夜。TBST 洗膜 3 次,37℃二抗孵育 1.5h, TBST 洗膜 3 次,使用 UVP 凝胶成像系统, ECL 化学发光显色,采用 Image J 图像分析系统软件分析条带光密度值。

表 1 贝那鲁肽对高糖诱导的 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞活力和胰岛素分泌的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	对照组	HG 组	HG+BL 组	F	P
细胞存活率 (%)	97.28 $\pm$ 4.5	49.49 $\pm$ 9.60 <sup>*</sup>	75.08 $\pm$ 4.83 <sup>#</sup>	12.63	<0.001
5mmol/L 葡萄糖 (ng/3 $\times$ 10 <sup>5</sup> cells/hr)	11.27 $\pm$ 1.54	5.53 $\pm$ 0.95 <sup>*</sup>	14.82 $\pm$ 2.12 <sup>#</sup>	8.484	<0.05
25mmol/L 葡萄糖 (ng/3 $\times$ 10 <sup>5</sup> cells/hr)	18.01 $\pm$ 1.42	10.00 $\pm$ 1.23 <sup>*</sup>	20.63 $\pm$ 2.15 <sup>#</sup>	11.30	<0.01

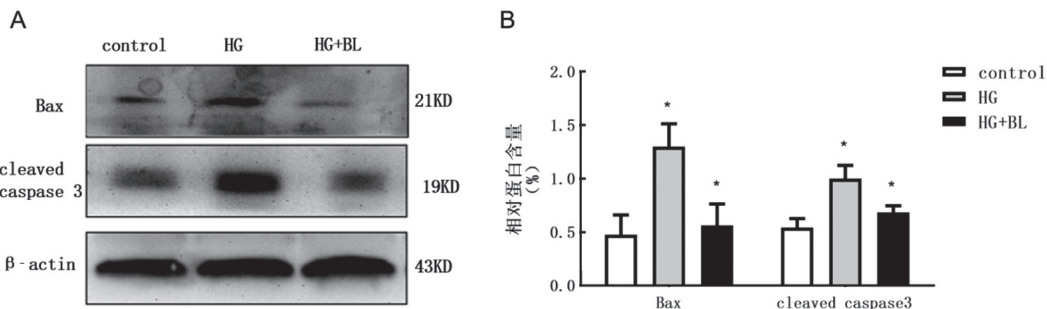
2.2 贝那鲁肽对高糖诱导的 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞凋亡的影响 见图 1。Western blot 检测结果发现,与对照组相比,高糖组 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞 Bax 蛋白和 cleaved caspase 3 表达明显增加 ( $t=2.923$ ,  $P$

1.4 统计学分析 统计学处理采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件,数据采用均数  $\pm$  标准差表示,组间比较采用  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 贝那鲁肽对高糖诱导的 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞活力和胰岛素分泌的影响 见表 1。与对照组相比,高糖组 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞的存活率和胰岛素的分泌均显著降低 ( $P < 0.05$ );与高糖组相比,贝那鲁肽处理组 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞的存活率和胰岛素的分泌均可显著增加 ( $P < 0.05$ )。

< 0.05;  $t=3.141$ ,  $P < 0.05$ );与高糖组相比,贝那鲁肽处理组 Bax 蛋白和 cleaved caspase 3 的表达显著降低 ( $t=2.500$ , 2.558, 均  $P < 0.05$ ),差异均有统计学意义。

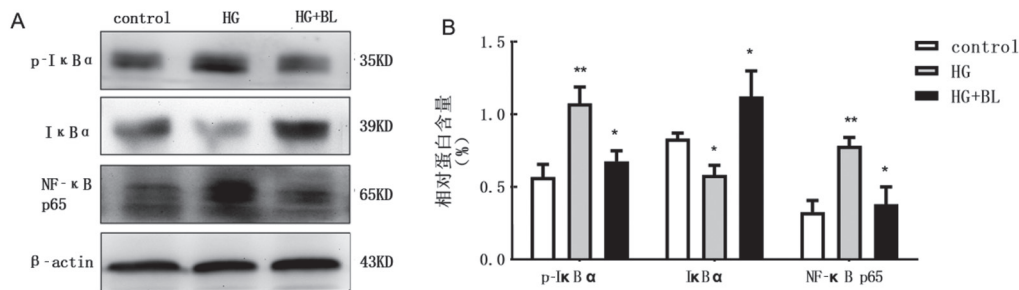


注: \* $P < 0.05$

图 1 Western blot 检测贝那鲁肽对高糖诱导的 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞 Bax 蛋白和 cleaved caspase 3 表达的影响

2.3 贝那鲁肽对高糖诱导的 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞内 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达的影响以及 MIF 分泌的影响 见图 2。与对照组相比,高糖组 MIF 分泌明显增加 ( $t=3.024$ ,  $P < 0.05$ );与高糖组相比,贝那鲁肽处理组 MIF 分泌明显降低 ( $t=2.415$ ,  $P < 0.05$ ),差异均有统计学意义。Western blot 检

测结果显示,与对照组相比,高糖组可增加磷酸化 I $\kappa$ B (p-I $\kappa$ B)和 NF- $\kappa$ B p65 的表达 ( $t=3.544$ , 4.658, 均  $P < 0.01$ ),减少 I $\kappa$ B 的表达 ( $t=3.062$ ,  $P < 0.05$ );与高糖组相比,贝那鲁肽可抑制 p-I $\kappa$ B 和 NF- $\kappa$ B p65 的表达 ( $t=2.959$ , 3.047, 均  $P < 0.05$ ),促进 I $\kappa$ B 的表达 ( $t=3.453$ ,  $P < 0.05$ )。



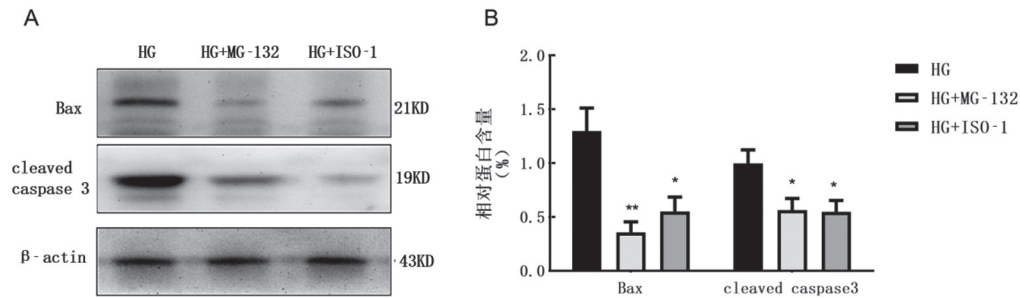
注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图 2 Western blot 检测贝那鲁肽对高糖诱导的 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞 p-I $\kappa$ B, I $\kappa$ B 和 NF- $\kappa$ B p65 表达的影响



2.4 高糖诱导 NF- $\kappa$ B/MIF 途径激活对 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞凋亡和功能障碍的影响 见图 3。Western blot 结果表明,与高糖组相比, MG-132 和 ISO-1

预处理均可显著降低 Bax ( $t=4.022, 2.554$ , 均  $P < 0.05$ ) 和 cleaved caspase 3 ( $t=4.022, 2.760$ , 均  $P < 0.05$ ) 的表达, 差异均有统计学意义。



注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图 3 Western blot 检测 MG-132 和 ISO-1 预处理对 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞 Bax 蛋白和 cleaved caspase 3 表达的影响  
2.5 MG-132 和 ISO-1 预处理组对高糖诱导的 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞胰岛素分泌的影响 见表 2。与高糖组相比, MG-132 和 ISO-1 预处理均可促进胰岛素的分泌 ( $P < 0.05$ )。

表 2 MG-132 和 ISO-1 预处理对高糖诱导的 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞胰岛素分泌的影响

项 目	HG 组	HG+MG-132 组	HG+ISO-1 组	F	P
5mmol/L 葡萄糖 (ng/3 × 10 <sup>5</sup> cells/hr)	5.53 ± 0.95	12.10 ± 0.52*	12.57 ± 0.56*	32.57	<0.001
25mmol/L 葡萄糖 (ng/3 × 10 <sup>5</sup> cells/hr)	10.01 ± 1.23	15.40 ± 1.14*	13.58 ± 0.83*	5.629	<0.05

注: \*与 HG 组比较, \* $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

慢性高血糖症是糖尿病的标志,它具有  $\beta$  细胞毒性,可加剧  $\beta$  细胞衰竭,形成恶性循环<sup>[8]</sup>。研究表明,高糖可增加人类胰岛细胞分泌 IL-1 $\beta$ ,导致 NF- $\kappa$ B 转录因子活化、FasL 上调和胰岛  $\beta$  细胞功能障碍<sup>[9]</sup>;高糖还可通过 NF- $\kappa$ B 依赖性方式诱导软骨细胞的分解代谢和炎症反应<sup>[10]</sup>。而过度炎症反应是诱导细胞凋亡和功能障碍的重要因素。本研究发现了高糖不仅可抑制 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞的活性和胰岛素的分泌功能,还可增加 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞 NF- $\kappa$ B 炎症通路相关蛋白的表达,而给予 NF- $\kappa$ B 抑制剂 MG-132 处理后,可降低凋亡相关蛋白的表达,还可改善胰岛  $\beta$  细胞胰岛素分泌功能,进一步说明了 NF- $\kappa$ B 炎症通路在胰岛细胞凋亡和功能障碍中的重要调节作用。

MIF 即巨噬细胞迁移抑制因子,是一种包括胰岛  $\beta$  细胞在内的多种免疫细胞和非免疫细胞产生的促炎细胞因子,其分泌过多可以增加机体的炎症<sup>[11]</sup>。此外, MIF 还是 NF- $\kappa$ B 下游促炎因子,可调节机体的固有免疫和适应性免疫。研究表明, MIF 可募集免疫细胞至炎症位点,进而增加促炎因子 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17 和 IFN- $\gamma$  的表达<sup>[12-14]</sup>。相关临床研究显示,糖尿病患者血清 MIF 明显升高,与糖耐量受损有关<sup>[15]</sup>。MIF 可在胰岛  $\beta$  细胞内实现适当的胰岛素构象,并发挥其全部活性, MIF 表达的固有或获得性变化可能导致不同的胰岛素加工过程和自身免

疫的开始<sup>[16]</sup>。此外, MIF 还被证实通过增强炎症环境并使靶细胞无法响应胰岛素,从而间接地和负面地影响胰岛素的作用<sup>[16]</sup>。本研究发现高糖诱导的 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞培养上清液中 MIF 明显增高,而给予 MIF 抑制剂 ISO-1 预处理后,可改善高糖诱导的胰岛  $\beta$  细胞活性和胰岛素分泌功能,降低凋亡蛋白 Bax 和 cleaved caspase 3 的表达,表明了 MIF 参与胰岛细胞凋亡和功能障碍。

贝那鲁肽是 2 型糖尿病治疗的主要药物,其主要活性成分 rhGLP-1 具有控制血糖的作用。研究表明, GLP-1 受体激动剂可通过急性促胰岛素作用以及在某些情况下通过长期作用来改善血糖控制,从而通过刺激  $\beta$  细胞增殖和抑制凋亡来保持  $\beta$  细胞质量<sup>[17-18]</sup>。这与本研究结果贝那鲁肽干预可以改善胰岛  $\beta$  细胞的活性并减少其凋亡一致。此外,贝那鲁肽还具有抗炎作用。研究表明, GLP-1 受体激动剂 exendin-4 (50 nmol/L) 处理培养的人胰岛细胞可抑制炎症基因 NF- $\kappa$ B1(p105)、NF- $\kappa$ B2(p100) 以及 TNF 受体超家族成员 1A 的表达<sup>[5]</sup>。exendin-4 还可抑制 ICAM-1 和 MIF 的表达,改善氧化型低密度脂蛋白对巨噬细胞迁移的抑制作用<sup>[19]</sup>。本研究发现贝那鲁肽可抑制高糖诱导的 INS-1 胰岛  $\beta$  细胞 MIF 的分泌和 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白 p-I $\kappa$ B 和 NF- $\kappa$ B p65 的表达,促进 I $\kappa$ B 的表达,而 NF- $\kappa$ B/MIF 抗炎通路可调控高糖诱导的胰岛  $\beta$  细胞凋亡和功能障碍。因此,贝那鲁肽(下转第 113 页)