

## • 基础研究 •

Kisspeptin 对胰岛  $\beta$  细胞的凋亡影响及作用机制研究

福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院老年科 (福州 350001) 李 敏 姜 锋<sup>1</sup> 魏潇琪 王小易  
林燕清 郑炜平

**【摘要】 目的** 研究 Kisspeptin 对胰岛  $\beta$  细胞的凋亡影响及可能的作用机制。**方法** 取 16 只 SD 大鼠胰腺组织分为 4 组: 1) 对照组: 在 20% 葡萄糖生理盐水中培养; 2) Kp 组: 在 20% 葡萄糖生理盐水培养液中加入 1  $\mu\text{mol/L}$  Kisspeptin; 3) PD 组: 在 20% 葡萄糖生理盐水培养液中加入 50  $\mu\text{mol/L}$  ERK1/2 信号通路抑制剂 PD98059; 4) Kp+PD 组: 在 20% 葡萄糖生理盐水培养液中加入 1  $\mu\text{mol/L}$  Kisspeptin 和 50  $\mu\text{mol/L}$  PD98059。各组在恒温  $\text{CO}_2$  培养箱培养 48 h 后制作 TUNEL 染色切片, 每组随机取 3 张切片采用医学图像分析系统 IPPS 6.0 软件计算每个胰岛组织  $\beta$  细胞凋亡指数, 比较每组平均  $\beta$  细胞凋亡指数差异。**结果** 与对照组 [(4.08 $\pm$ 0.42)%]、PD 组 [(4.10 $\pm$ 0.42)%]、Kp+PD 组 [(4.11 $\pm$ 0.47)%] 凋亡指数相比较, Kp 组 [(3.11 $\pm$ 0.46)%] 明显下降 ( $P$  均 $<0.01$ ); PD 组与对照组、Kp+PD 组与对照组、Kp+PD 组与 PD 组之间比较的差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。**结论** Kisspeptin 对  $\beta$  细胞凋亡具有抑制作用, ERK1/2 信号传导通路可能是其主要的通路之一。

**【关键词】** Kisspeptin; ERK1/2; 糖尿病; 凋亡

**【中图分类号】** R-332; R587 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2020)01-0125-03

**Study on the effect and mechanism of kisspeptin on apoptosis of islet  $\beta$  cells** LI Min, JIANG Feng, WEI Xiaoqi, WANG Xiaoyi, LIN Yanqing, ZHENG Weiping. Department of Geriatric Medicine, Fujian Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China

**【Abstract】 Objective** To study the effect of Kisspeptin on the apoptosis of islet  $\beta$  cells and its possible mechanism. **Methods** Pancreatic tissues of 16 SD rats were divided into four groups: 1) control group: cultured in 20% glucose saline; 2) Kp group: 1  $\mu\text{mol/L}$  Kisspeptin was added to 20% glucose saline solutions; 3) PD group: 50  $\mu\text{mol/L}$  PD98059 was added to 20% glucose saline solution; 4) Kp+PD group: 1  $\mu\text{mol/L}$  Kisspeptin and 50  $\mu\text{mol/L}$  PD98059 were added to 20% glucose saline solution. TUNEL staining sections were prepared in a constant temperature  $\text{CO}_2$  incubator for 48 hours. Three sections were randomly selected from each group. The  $\beta$ -cell apoptosis index of each islet tissue was calculated by the medical image analysis system IPPS 6.0 software and the average  $\beta$ -cell apoptosis index of each group was compared. **Results** Compared with the control group [(4.08 $\pm$ 0.42)%], the PD group [(4.10 $\pm$ 0.42)%], and the Kp+PD group [(4.11 $\pm$ 0.47)%], the average apoptotic index of the Kp group [(3.11 $\pm$ 0.46)%] was significantly decreased ( $P<0.01$  for each). There was no significant difference between PD group and control group, Kp+PD group and control group, Kp+PD group and PD group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Kisspeptin has an inhibitory effect on  $\beta$ -cell apoptosis, and ERK1/2 signaling pathway may be one of the main pathways.

**【Key words】** Kisspeptin; ERK1/2; diabetes; apoptosis

近年的流行病学调查研究显示我国糖尿病的患病率约为 10.4%<sup>[1]</sup>, 是危害人群健康的重要疾病之一, 因此对糖尿病治疗领域的研究和探索具有重要的临床意义。胰岛  $\beta$  细胞量 (pancreatic  $\beta$ -cell mass, BCM) 和功能的变化在各型糖尿病的发生、发展中起重要作用。阻止或逆转 BCM 的减少或功能进行性丧失可能成为糖尿病治疗的一个有效方法。体内外实验证明 Kisspeptin (Kp) 能够增强葡萄糖诱导的胰岛素分泌, 是  $\beta$  细胞功能的调控者<sup>[2-3]</sup>; 但 Kp 对  $\beta$  细胞凋亡影响及相关作用机制研究的文献报道较少。本研究通过观察在培养液加入 Kp、ERK1/2 抑制剂 PD98059 后大鼠胰腺组织  $\beta$  细胞凋亡指标的变化, 研究 Kp 对  $\beta$  细胞凋亡的影响, 并初步

探讨其可能的机制, 为今后 Kp 类似物能否用于糖尿病临床治疗寻找实验室依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料:** 1) 实验动物: 16 只 SPF 级别 SD 大鼠 (雄性, 18 周龄) 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2017-0009, 质量合格证号: 2017000324926。2) 主要试剂和仪器: Kp (MCE 公司, 批号 HY-P0254), PD98059 (上海金穗生物科技有限公司, 批号 J54649), TUNEL 检测试剂 (云天公司, 批号 C1091), Bouin 固定液 (北京百奥莱博科技有限公司, 批号 CY-F0356), 即用型 DAPI 染液 (凯基公司, 批号 KGA215-

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2016J01495)

1 通信作者, Email: fjslyyjiangfeng@sina.com

50)。恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱 (DHP-9054, 山东博科生物公司), 电热鼓风干燥箱 (DHG-9070A, 恒科学仪器有限公司), 切片机 (BQ-318D, 伯纳公司), 移液枪 (Research plus 0.5-10  $\mu$ L, eppendorf), 移液枪 (Research plus 20-200  $\mu$ L, eppendorf), 显微镜 (CKX53, OLYMPUS)。

## 1.2 方法

1.2.1 取材: 16 只大鼠颈椎脱臼处死, 在超净工作台剪开大鼠的腹部, 沿着十二指肠、胃和脾脏附近取下胰腺, 剥去多余的脂肪组织和血块, 放置在装有 PBS 的培养皿中。

1.2.2 分组与干预: 依据培养过程中干预的不同形式分为: 1) 对照组: 采用 20% 葡萄糖生理盐水培养; 2) Kp 组: 在 20% 葡萄糖生理盐水培养液中加入 1  $\mu$ mol/L Kp; 3) PD 组: 在 20% 葡萄糖生理盐水培养液中加入 50  $\mu$ mol/L PD98059; 4) Kp+PD 组: 在 20% 葡萄糖生理盐水培养液中加入 1  $\mu$ mol/L Kp 和 50  $\mu$ mol/L PD98059。置于 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱内无菌培养 48 h。

1.2.3 TUNEL 切片制作与观察: 1) 切片制作: CO<sub>2</sub> 恒温培养 48 h 后, 胰腺组织予 Bouin 固定液固定 10 h, 石蜡包埋制作待测组织切片, 待测切片经过烤片、脱蜡、水化、修复抗原、使用 PBS 配制的 3% 过氧化氢溶液室温孵育 20 min, 灭活切片内源的过氧化物酶后备用。2) TUNEL 检测: 待测切片加 50  $\mu$ L 生物素标记液, 37  $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 滴加 0.1~0.3 mL 标记反应终止液, 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次。待测切片上加 50  $\mu$ L Streptavidin-HRP 工作液, 室温孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 滴加 0.3 mL DAB 显色液, 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次。用苏木素染色液进行细胞核染色。随后用 PBS 洗涤 3 次, 封片。常规细胞核为蓝色, 凋亡细胞为棕色。每只大鼠胰腺切片在 100 倍显微镜视野下选取染色清晰的 3 个不同位置的胰岛组织, 在 1 000 倍油镜下拍摄, 采用医学图像分析系统 IPPS 6.0 软件计算视野中胰岛  $\beta$  细胞总数及凋亡阳性  $\beta$  细胞细胞数,  $\beta$  细胞凋亡指数 (AI) = 凋亡阳性  $\beta$  细胞/ $\beta$  细胞总数。

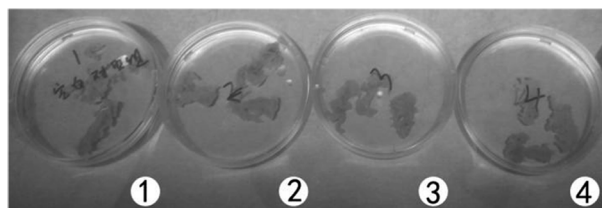
1.3 统计学方法: 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, Shapiro-Wilk 检验计量数据是否符合正态分布, 方差齐性用 Levene 检验。符合正态等方差数据多组比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 不符合正态分布的计量数据采用非参数检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 取材和组织培养: 4 组实验大鼠胰腺组织取材顺利, 组织剥离完整无损伤, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱内培养 48 h, 组织无分解、自溶现象, 形态保持完整, 见图 1。

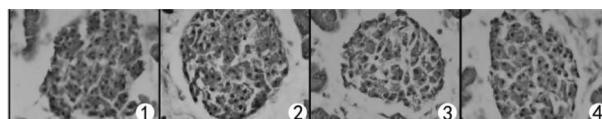
2.2 TUNEL 染色形态学表现: 4 组实验大鼠胰岛组织  $\beta$  细胞形态正常, TUNEL 染色清晰, 正常细胞核为蓝色, 凋亡细胞核为棕色, 见图 2。

2.3 4 组实验大鼠平均 AI 比较: 4 组共 16 只大鼠, 每只大鼠胰腺切片取 3 处染色清晰不同位置胰岛组织, 组间 AI 平均值方差分析 ( $P < 0.01$ ), 进一步两两检验提示: Kp 组平均 AI 明显低于对照组、PD 组、Kp+PD 组, 经比较的差异有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.01$ ); PD 组平均 AI 与对照组相比差异无统计学意义; Kp+PD 组平均 AI 与对照组相比差



注: 1 为对照组, 2 为 Kp 组, 3 为 PD 组, 4 为 Kp+PD 组。

图 1 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱内培养 48 h 情况



注: 1 为对照组, 2 为 Kp 组, 3 为 PD 组, 4 为 Kp+PD 组。

图 2 大鼠胰岛细胞 TUNEL 染色图谱 ( $\times 1\ 000$ )

异无统计学意义; Kp+PD 组与 PD 组平均 AI 相比差异无统计学意义。见表 1。

表 1 各组大鼠胰岛  $\beta$  细胞平均 AI 比较 ( $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	平均 AI/%
对照组	4.08 $\pm$ 0.42
Kp 组	3.11 $\pm$ 0.46 *
PD 组	4.10 $\pm$ 0.42
Kp+PD 组	4.11 $\pm$ 0.47

注: 与其他各组相比, \*  $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

胰岛  $\beta$  细胞分泌的胰岛素绝对或相对不足是糖尿病的主要发病机制。虽然胰岛只占胰腺体积的 1%~2%, 但是其接收的血流量却占整个胰腺的 5%~10%。胰岛具有一个血管内皮生长因子依赖的密集的肾小球样的血管结构, 确保胰岛的任何部位都能得到动脉血的供应<sup>[4]</sup>。BCM 主要由  $\beta$  细胞的复制和凋亡来调节<sup>[5]</sup>, 使得整体的  $\beta$  细胞群数量保持稳态。成年鼠的  $\beta$  细胞每天发生新旧更替的比例约占 3%。BCM 的缺乏是 1 型糖尿病和 2 型糖尿病 (T2DM) 主要病理特征<sup>[6]</sup>。病理状态如高糖、高脂状态或自身免疫性糖尿病会引起  $\beta$  细胞的凋亡率明显增加。尸检的研究表明, 在肥胖人群中, T2DM 患者 BCM 比血糖正常者减少了 63%; 非肥胖人群中, T2DM 患者的 BCM 比血糖正常者减少了 41%; 而  $\beta$  细胞的新生、复制率在二者之间差异无统计学意义<sup>[7]</sup>, 这提示 T2DM 患者 BCM 减少的主要原因可能是凋亡。因此, 减少胰岛  $\beta$  细胞凋亡、保存或者恢复 BCM 是糖尿病的重要的治疗策略。

Kp 由 KISS1 基因转录、翻译成含 145 个氨基酸残基的前体, 进一步剪切可得到更短的多肽产物, 分别命名为 Kp16、Kp14、Kp13 和 Kp10。这些多肽产物在大脑中均可检测, 被认为是内源性神经肽<sup>[8]</sup>。Kp 能与细胞膜受体相互作用, 该受体称为 KISS1R (也称 GPR54)<sup>[9]</sup>, 属 G 蛋白偶联受体超家族成员。KISS1 基因在下丘脑-垂体-性腺轴的控制中发挥了关键作用, 控制青春期的初始<sup>[10]</sup>。近年研究发

现 Kp 和 KISS1R 的功能并不局限在下丘脑神经元,二者都可在外周组织表达,尤其在胰腺中高水平表达。Hauge-Evans 等<sup>[1]</sup>的研究显示, Kp 和 KISS1R 的 mRNAs 都能在人和大鼠胰岛检测;在大鼠胰腺的切片上, Kp 和 KISS1R 的免疫活性定位于胰岛内的  $\beta$  细胞,而在外分泌的胰腺不能检测到。在 Bowe 等<sup>[2]</sup>的研究中, Kp 引起大鼠胰岛剂量依赖的葡萄糖诱导 (20 mmol/L) 的胰岛素分泌增强。另外两项胰岛  $\beta$  细胞的研究中,胰岛素的促泌剂 Kp 需要 ERK1/2 的活化来介导的胰岛素释放<sup>[12-13]</sup>。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 中的 ERK1/2 信号通路是胰岛  $\beta$  细胞的增生和凋亡的经典通路<sup>[11]</sup>, Kp 引起胰岛  $\beta$  细胞剂量依赖的葡萄糖诱导的胰岛素分泌增强需要 ERK1/2 信号通路的介导,这提示我们 Kp/KISS1R 系统也可能通过 ERK1/2 信号转导通路参与对胰岛  $\beta$  细胞的凋亡。在本研究中,根据 Bowe 等<sup>[2]</sup>的研究方法,采用 20 mmol/L 葡萄糖生理盐水培养, 1  $\mu$ mol/L Kp 干预。我们发现 Kp 干预组的胰岛  $\beta$  细胞凋亡率低于对照组;采用 ERK1/2 信号通路抑制剂 PD98059 后 Kp 抑制胰岛  $\beta$  细胞凋亡的作用渐弱;单纯加用 PD98059 对凋亡无明显影响。这提示, Kp/KISS1R 系统对胰岛  $\beta$  细胞凋亡具有抑制作用, ERK1/2 信号转导通路可能是其中一个主要的作用通路。

本研究的不足之处:因考虑到用经典的链脲佐菌素行糖尿病大鼠造模可能对胰腺组织有一定损伤,对凋亡结果产生不确定影响,因此采用 SD 大鼠,如有条件采用自发遗传性糖尿病大鼠则结论更为可靠。另外,我们还要进行免疫组化分析即基因表达层面的研究,以证实结论的可靠性。

总之, Kp/KISS1R 系统对胰岛  $\beta$  细胞凋亡具有抑制作用, ERK1/2 信号转导通路可能是其主要的通路之一, Kp 可能成为今后糖尿病临床干预的一个新靶点。

#### 参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版) [J]. 中华糖尿病杂志, 2018, 10 (1): 4-67.
- [2] Bowe J E, King A J, Kinsey-Jones J S, et al. Kisspeptin stimulation of insulin secretion: mechanisms of action in mouse islets and rats [J]. Diabetologia, 2009, 52 (5): 855-862.
- [3] Rahier J, Guiot Y, Goebbels R M, et al. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes [J]. Diabetes Obes Metab, 2008, 10 (Suppl 4): 32-42.
- [4] Carlsson P O, Palm F, Andersson A, et al. Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site [J]. Diabetes, 2001, 50 (3): 489-495.
- [5] Dor Y, Brown J, Martinez O I, et al. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation [J]. Nature, 2004, 429 (6987): 41-46.
- [6] Brüning J C, Winnay J, Bonner-Weir S, et al. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles [J]. Cell, 1997, 88 (4): 561-572.
- [7] Butler A E, Janson J, Bonner-Weir S, et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2003, 52 (1): 102-110.
- [8] 温俊平, 陈刚, 林丽香. Kisspeptin—连接能量与生殖的新纽带 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2016, 32 (7): 536-539.
- [9] Seminara S B, Messager S, Chatzidakis E E, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty [J]. N Engl J Med, 2003, 349 (17): 1614-1627.
- [10] Kitsou-Mylona I, Burns C J, Squires P E, et al. A role for the extracellular calcium-sensing receptor in cell-cell communication in pancreatic islets of langerhans [J]. Cell Physiol Biochem, 2008, 22 (5): 557-566.
- [11] Hauge-Evans A C, Richardson C C, Milne H M, et al. A role for kisspeptin in islet function [J]. Diabetologia, 2006, 49 (9): 2131-2135.
- [12] Horiuchi Y, Nakatsu D, Kano F, et al. Pyruvate kinase M1 interacts with A-Raf and inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by activating MEK1/ERK pathway in mouse insulinoma cells [J]. Cell Signal, 2017, 38 (10): 212-222.
- [13] Smith J T, Acohido B V, Clifton D K, et al. Kiss-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse [J]. J Neuroendocrinol, 2006, 18 (4): 298-303.

#### • 基础研究 •

## 畅脉乐胶囊的质量标准研究

福建省医疗器械与药品包装材料检验所 (福州 350001) 陈松旺 吴婷<sup>1</sup> 李煌<sup>1</sup> 翁一玲<sup>2</sup>

**【摘要】目的** 建立畅脉乐胶囊的质量标准。**方法** 薄层色谱法 (TLC) 定性鉴别黄芪、丹参、首乌、天麻、赤芍、葛根;高效液相色谱法 (HPLC) 测定芍药苷、丹酚酸 B 的含量。**结果** TLC 斑点清晰, 阴性无干扰; HPLC 两种成分在各自范围内线性关系良好 ( $r \geq 0.9991$ ), 平均加样回收率 96.70%~97.16%, 相对标准偏差 (RSD) 1.23%~1.65%。**结论** 该方法重复性好, 专属性强, 可用于畅脉乐胶囊的质量控制。

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目 (卫生联合资助) (2019J01482)

1 福建中医药大学; 2 福建中医药大学附属第二人民医院

2 通信作者, Email: 935713397@qq.com