

treated with steroids; a prospective, randomized, controlled, interventional study [J]. *Pediatr Nephrol*, 2014, 29 (6) : 1025-1032.

[17] Yadav VK, Sharma S, Debata PK, et al. Change in bone mineral density and role of vitamin D and calcium supplementation during treatment of first episode nephrotic syndrome [J]. *J Clin Diagn Res*, 2017, 11(9) :18-21.

[18] 门光国,张立明,王丽丽,等.预防性应用 VitD、钙剂对糖皮质激素治疗儿童肾病综合征骨密度的影响[J]. *儿科药学杂志*, 2012, (5) :20-23.

[19] Djulbegovic B, Guyatt GH. Progress in evidence-based medicine: a quarter century on[J]. *Lancet*, 2017, 390(10092) :415-423.

[20] Zaniew M, Jarmolinski T. Vitamin D status and bone density in steroid - treated children with glomerulopathies: effect of cholecalciferol[J]. *Adv Med Sci*, 2012, 57(1) :88-93.

[21] Malihi Z, Wu ZQ, Stewart AW, et al. Hypercalcemia, hypercalciuria, and kidney stones in long-term studies of vitamin D supplementation; a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Clin Nutr*, 2016, 104(4) :1039-1051.

[22] Singh DN, Krishnamurthy S, Kamalanathan SK, et al. Three - monthly bolus vitamin D supplements (1000 vs 400 IU/day) for prevention of bone loss in children with difficult - to - treat nephrotic syndrome: a randomised clinical trial [J]. *Paediatr Int Child Health*, 2018, 38(4) :251-260.

[23] Muske S, Krishnamurthy S, Kamalanathan SK, et al. Effect of two prophylactic bolus vitamin D dosing regimens (1000 IU/day vs. 400 IU/day) on bone mineral content in new - onset and infrequently - relapsing nephrotic syndrome: a randomised clinical trial [J]. *Paediatr Int Child Health*, 2018, 38(1) :23-33.

(收稿日期:2022-06-06)

活性维生素 D 对胰岛 β 细胞自噬及相关蛋白表达的影响

师佩兰 郭道华 余美玲 许健 宋乐乐 桑冉

【摘要】 目的 探讨活性维生素 D (VitD) 对高糖环境下胰岛 β 细胞自噬及相关蛋白表达的影响。
方法 体外培养 Min6 小鼠胰岛 β 细胞,将细胞分为 5 组:对照组 (Con, 5.6 mmol/L 葡萄糖)、高糖组 (HG, 30 mmol/L 葡萄糖)、高糖+1 nmol/L 活性 VitD 组 (HG+1VitD)、高糖+10 nmol/L 活性 VitD 组 (HG+10VitD)、高糖+100 nmol/L 活性 VitD 组 (HG+100VitD)。采用 MTT 法检测细胞存活率,免疫荧光 (IF) 法观察自噬相关蛋白 LC3-II 含量的变化,Western-Blot 法检测 AMPK、LC3 蛋白的表达。
结果 与对照组比较, HG 组及 HG+VitD 组细胞存活率降低 ($P<0.05$), HG+VitD 组 AMPK、LC3 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与 HG 组相比, HG+VitD 组细胞存活率、自噬相关蛋白 LC3-II 含量及 AMPK、LC3 蛋白表达呈浓度依赖性升高 ($P<0.05$)。
结论 活性 VitD 可改善高糖环境下胰岛 β 细胞的生长,其机制可能与调控 AMPK 通路诱导自噬相关。

【关键词】 活性维生素 D; 胰岛 β 细胞; 自噬; LC3; AMPK
 [中图分类号] R335 [文献标识码] A DOI: 10.3969/j.issn.1002-1256.2022.17.003

Effects of active Vitamin D on autophagy and related protein expression in pancreatic βcells Shi Peilan, Guo Daohua, Yu Meiling, Xu Jian, Song Lele, Sang Ran. Department of pharmacy, the first affiliated hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, 233004, China.
 Corresponding author: Shi Peilan, Email: 1044032692@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate effect of active Vitamin D on autophagy and related protein expression of pancreatic βcells under high glucose concentration. **Methods** The cultured Min6 mouse islet βcells were divided into 5 groups: the control group (Con, 5.6mmol/L glucose), high glucose group (HG, 30mmol/L glucose), high glucose+1nmol/L active VitD group (HG+1VitD), high glucose+10nmol/L active VitD group (HG+10VitD), high glucose+100nmol/L active VitD group (HG+100VitD). The cell survival rate was detected by MTT assay, the content of autophagy-associated protein LC3-II was observed by immunofluorescence (IF), the expression of AMPK and LC3 protein was detected by Western Blot. **Results** Compared with control group, the cell survival rate in HG and HG+VitD groups decreased ($P<0.05$), the expression of AMPK and LC3 protein in HG+VitD groups increased ($P<0.05$). Compared with HG group, cell survival rate, LC3-II content and expression of AMPK, LC3 protein in HG + VitD groups increased in a dose - dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusions** Active VitD could improve the growth of islet β cells cultured in high glucose concentration, and the mechanism may be related to the regulation of AMPK pathway inducing autophagy.

【Keywords】 Active Vitamin D; Islet βcells; Autophagy; LC3; AMPK

自噬是真核生物中一种保守的自食系统,是维持细胞稳态的分解代谢过程,其与多种疾病密切相关,如癌症、退行性病变、糖尿病等。胰岛 β 细胞进行性衰竭是糖尿病发生发展的关键,保护和促进胰岛 β 细胞存活是防治糖尿病的重要策略。研究发现,自噬可以通过多种途径来对抗应激源,对正常和受损的胰岛 β 细胞功能发挥重要作用^[1]。自噬可以保护胰岛 β 细胞的结构、维持胰岛素的正常分泌和稳态^[2]。因此,自噬可能成为预防和治疗糖尿病的一个潜在靶点。

维生素 D (vitamin D, VitD) 是一种脂溶性维生素,其主要通过钙磷代谢参与机体的骨骼发育。近年研究发现, VitD 可调节机体多种组织细胞增生、分化和功能^[3], 活性 VitD 可通过调节自噬活性对糖尿病大鼠肾足细胞发挥保护作用^[4]。本研究通过体外细胞实验,探讨活性 VitD 对高糖环境下胰岛 β 细胞生长与自噬功能的影响及可能的分子机制。现报道如下。

一、资料与方法

1. 一般资料: (1) 细胞株与试剂: Min6 小鼠胰岛 β 细胞(上海酶研生物科技有限公司); 活性维生素 D (罗盖全, 上海罗氏制药有限公司); 青链霉素混合液、胎牛血清 (FBS)、RPMI-1640 培养基、0.25% 胰酶 (Trypsin-EDTA) 均购自美国 Gibco 公司; 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 细胞增殖检测试剂盒 (江苏申基生物科技有限公司); LC3A/B 抗体、AMPK 抗体 (美国 CST 公司); PBS (江苏凯基生物技术股份有限公司); 羊抗小鼠 IgG-HRP、羊抗兔 IgG-HRP、GAPDH 抗体 (美国 abcam 公司); ECL Plus 发光试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 \times)、Western 及 IP 细胞裂解液、PMSF、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司。(2) 主要仪器: CO₂ 培养箱 (美国 SHELL LAB 公司); 酶标仪 (华东电子集团医疗装备有限责任公司); 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); 荧光显微镜 (日本 OLYMPUS BX53); Mini-Proten Tetra 电泳系统 (上海天能科技有限公司); 凝胶成像仪 (上海勤翔科学仪器有限公司)。

2. 方法: (1) 细胞培养: Min6 小鼠胰岛 β 细胞贴壁培养于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养, 细胞融合达 80%-90% 时传代一次。(2) 实验分组: 对照组 (Con, 5.6 mmol/L 葡萄糖)、高糖组 (HG, 30 mmol/L 葡萄糖)、高糖+1 nmol/L 活性 VitD 组 (HG+1VitD)、高糖+10 nmol/L 活性 VitD 组 (HG+10VitD)、高糖+

100 nmol/L 活性 VitD 组 (HG+100VitD)。(3) MTT 检测不同用药组对细胞存活率的影响: 取对数生长期细胞, 以每孔 5×10^3 个细胞密度接种于 96 孔细胞培养板。待细胞贴壁并长至 70% 左右时, 在对应受试孔中分别加入不同终浓度的葡萄糖、活性 VitD。每组设六个复孔, 重复实验 4 次。于加药处理后的 24 小时、48 小时及 72 小时, 每孔加入 20 μ l MTT, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 小时, 吸去上清, 每孔加入 150 μ l DMSO, 在振荡器上轻轻震荡使甲臞完全溶解, 将 96 孔板放入酶标仪, 490 nm 处测吸光度值 (OD490)。计算细胞存活率: 细胞存活率 (%) = [(实验组 OD - 空白组 OD) / (对照组 OD - 空白组 OD)] \times 100%。(4) IF 法检测 β 细胞 LC3-II 含量的变化: 细胞接种在六孔板, 培养至分化成熟后按实验分组进行干预, 准备细胞爬片, 常规培养 48h。自然晾干细胞样本浸入 4% 的多聚甲醛固定液中 30 分钟, PBS 浸洗 3 分钟 \times 3 次; 3% H₂O₂-甲醇溶液, 室温封闭 10 分钟, PBS 浸洗 3 次; 山羊血清封闭 20 分钟, 滴加 LC3-I 抗 (1 : 100) 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C, 湿盒孵育 2 小时, PBS 浸洗; 滴加荧光二抗 (1 : 100) 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C, 避光孵育 1 小时, PBS 浸洗 3 次; DAPI 染液 50 μ l 复染; 防萃灭封片胶封片, 荧光显微镜下观察细胞中 LC3-II 含量的变化。(5) Western Blot 法检测 AMPK、LC3 蛋白的表达: 细胞接种培养 24 小时后按照实验分组加入药物, 达到作用时间点后, 蛋白裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法蛋白定量, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭; 取出已封闭的 PVDF 膜, 加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日洗膜后加入二抗, 室温孵育 1 h, TBST 液充分洗膜, ECL 化学发光, 显影、定影。

3. 统计学处理: 使用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 行方差分析及 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 活性 VitD 对胰岛 β 细胞存活率的影响: 与对照组比较, HG 及 HG+VitD 组细胞存活率均下降 ($P < 0.05$); 与 HG 组相比, HG+VitD 组细胞存活率升高, 且随着 VitD 浓度的增加而逐渐升高 ($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

2. 活性 VitD 对自噬相关蛋白 LC3-II 含量的影响: 细胞免疫荧光结果显示, 对照组与高糖组胰岛 β 细胞胞质中 LC3-II 红色荧光斑点较少, 分别为 (3.01 \pm 0.12)/细胞、(3.06 \pm 0.13)/细胞。VitD 作用于 β 细胞后, 细胞胞质中 LC3-II 红色荧光斑点逐渐增多, 分别为 HG+1VitD (6.68 \pm 0.25)/细胞、HG+

10VitD (17.96 ± 0.59)/细胞、HG + 100VitD (30.65 ± 1.34)/细胞,与对照组及高糖组相比, VitD 组 LC3-II 含量显著升高 ($P < 0.05$)。见图 2。

3. 活性 VitD 对胰岛 β 细胞 AMPK、LC3 蛋白表

达的影响:与对照组及 HG 组相比, HG + VitD 组 AMPK、LC3 蛋白表达呈浓度依赖性升高 ($P < 0.05$)。且 VitD 各浓度组之间比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2、图 3。

表 1 VitD 对胰岛 β 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 24 h | 48 h | 72 h |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Con 组 ($n=3$) | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 |
| HG 组 ($n=3$) | 63.71 ± 1.52 * | 47.79 ± 0.66 * | 26.89 ± 1.05 * |
| HG+1VitD 组 ($n=3$) | 70.94 ± 1.66 *# | 66.12 ± 1.44 *# | 52.40 ± 2.99 ** |
| HG+10VitD 组 ($n=3$) | 79.53 ± 1.27 *# | 73.76 ± 1.57 *# | 63.81 ± 3.65 ** |
| HG+100VitD 组 ($n=3$) | 88.93 ± 1.09 *# | 86.56 ± 1.14 *# | 78.81 ± 2.56 ** |
| <i>F</i> 值 | 131.278 | 314.899 | 126.340 |
| <i>P</i> 值 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:与 Con 组比较, * $P < 0.05$; 与 HG 组比较, # $P < 0.05$

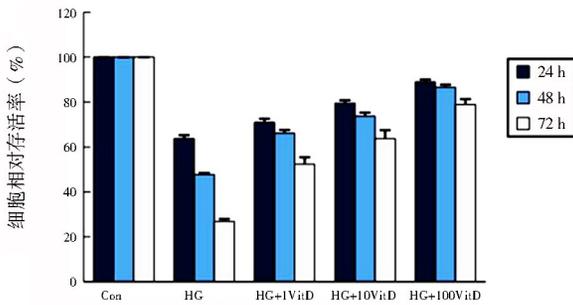
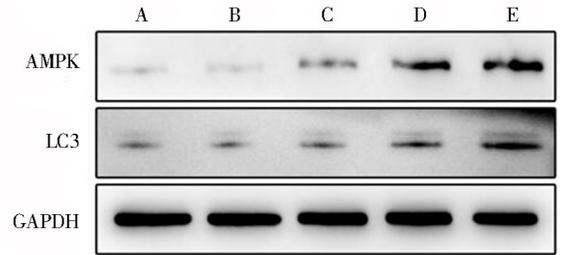
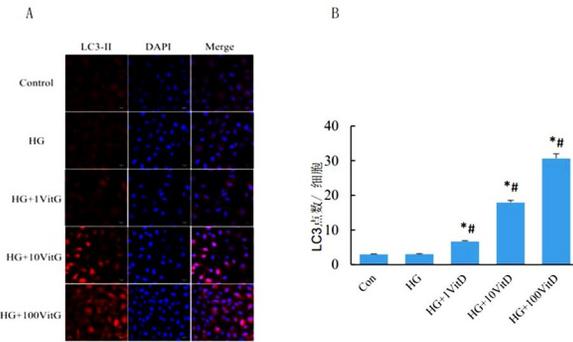


图 1 VitD 干预后胰岛 β 细胞相对存活率



注: A: Con 组; B: HG 组; C: HG + 1VitD 组; D: HG + 10VitD 组; E: HG + 100VitD 组

图 3 VitD 处理后 AMPK 和 LC3 蛋白表达水平的变化



注:与 Con 组比较, * $P < 0.05$; 与 HG 组比较, # $P < 0.05$ 。图 2A 为细胞免疫荧光图;图 2B 为定量统计图

图 2 VitD 干预后胰岛 β 细胞相对存活率 VitD 对胰岛 β 细胞 LC3-II 含量的影响

表 2 VitD 处理后 AMPK 和 LC3 蛋白表达量变化情况 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | AMPK | LC3 |
|------------------------|---------------------|---------------------|
| Con 组 ($n=3$) | 0.0338 ± 0.00194 | 0.1018 ± 0.01777 |
| HG 组 ($n=3$) | 0.0380 ± 0.00163 | 0.1259 ± 0.02519 |
| HG+1VitD 组 ($n=3$) | 0.1371 ± 0.00967 *# | 0.1837 ± 0.02362 *# |
| HG+10VitD 组 ($n=3$) | 0.2515 ± 0.02248 *# | 0.3744 ± 0.02823 *# |
| HG+100VitD 组 ($n=3$) | 0.3954 ± 0.02521 *# | 0.4750 ± 0.02293 *# |
| <i>F</i> 值 | 285.549 | 142.864 |
| <i>P</i> 值 | <0.001 | <0.001 |

注:与 Con 比较, * $P < 0.05$; 与 HG 组比较, # $P < 0.05$

讨论 细胞自噬 (autophagy) 指溶酶体降解胞质内受损的细胞器或生物大分子,并将其降解产物循环再利用的一种细胞内代谢降解的动态过程。自噬缺陷可引起胰岛 β 细胞功能失调,导致糖尿病的发生。Song 等^[5]发现在体内和体外间歇性缺氧的条件下,胰岛 β 细胞自噬被明显激活,表现为自噬泡形成和微管相关蛋白轻链 3 (LC3) 周转增加、p62 水平降低。形态学分析显示,β 细胞线粒体肿胀、内质网扩张和空泡改变,证明了自噬对维持胰岛 β 细胞结构和功能的重要性^[6]。

在糖尿病早期,胰岛素和营养物质过剩与氧化应激共同调节自噬;而在糖尿病后期由于胰岛素缺乏,活性氧 (ROS) 生成增加进而抑制雷帕霉素 (mammalian target of rapamycin, mTOR), 激活 LC3、自噬基因的表达以及线粒体自噬,从而清除衰老损伤的细胞器导致的氧化应激和内质网应激^[7]。Bachar 等^[8]发现在 Akita 啮齿动物糖尿病模型中,胰岛素原基因突变会导致蛋白质折叠错误和 β 细胞死亡;在胰岛素原过度折叠的情况下,通过抑制 mTOR, 刺激自噬可以减轻应激,防止细胞凋亡。由于糖尿病的发病与自噬受到共同的信号分子调节,因此,以这些信号分子 (如 mTOR、AMPK 等) 作为糖

尿病治疗的药物靶点,将调节自噬作为糖尿病治疗的新策略,具有重要意义。

维生素 D 是类固醇的衍生物,与健康关系最密切的是 $1,25-(OH)_2D_3$,即活性维生素 D。维生素 D 除影响钙磷代谢、调节免疫功能、细胞增生分化及炎症反应等外,还可介导细胞自噬^[9]。在肿瘤、心血管疾病及糖尿病等多种疾病中,维生素 D 可通过调节自噬,抑制细胞凋亡,延缓和治疗相关疾病^[10]。活性维生素 D 通过与维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)结合,在不同组织中发挥作用^[11]。糖尿病患者体内维生素 D 常常缺乏,其水平与糖尿病发病风险可能呈反向关系^[12]。

维生素 D 对 T_1DM 的影响一方面可能通过环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)途径及刺激第二信使系统使 β 细胞内的钙内流增加和细胞内葡萄糖增加,增加 β 细胞增殖,促进胰岛素分泌^[13];另一方面,维生素 D 参与固有免疫及细胞免疫,通过相关机制抑制胰岛 β 细胞凋亡,保护胰岛细胞功能^[14]。 T_2DM 进展的主要原因是炎症应激和胰岛素抵抗导致的 β 细胞功能障碍。越来越多的研究提示,补充维生素 D 可改善 T_2DM 患者的血糖,控制氧化应激及血脂水平^[15]。本研究结果显示,活性 VitD 处理后胰岛 β 细胞存活率升高($P < 0.05$),提示 VitD 对高糖环境下的 β 细胞有一定的保护作用。

VitD/VDR 可以在自噬的不同阶段,通过不同的信号通路或途径调节自噬,包括影响 CaMKK β 、mTOR、PI3K/Beclin-1 及溶酶体、炎性因子等途径。胞内 Ca^{2+} 的上调能激活钙/钙调素依赖性蛋白激酶 β (CaMKK β) 通路,并激活下游腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK),而 AMPK 是自噬重要的诱导因子,维生素 D 则通过调节 Ca^{2+} 代谢最终上调自噬作用^[16];维生素 D 可通过 mTOR 途径减少 mTOR 生成,解除 mTOR 形成的复合物对自噬的抑制作用,促进自噬发生^[17]。链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病小鼠中,维生素 D 可增加 LC3 和肌球蛋白样卷曲蛋白(Beclin 1)基因的 mRNA 表达,细胞凋亡率降低,说明维生素 D 可诱导胰岛细胞自噬,对糖尿病起调节作用^[18]。本研究结果显示,活性 VitD 处理后,胰岛 β 细胞 LC3-II 含量及 AMPK、LC3 蛋白表达均升高($P < 0.05$),提示 VitD 可能是一种自噬活化剂,通过调节自噬相关标志物的表达诱导胰岛 β 细胞自噬。

综上所述,高糖抑制了胰岛 β 细胞的生长,加入活性维生素 D 可改善高糖环境下胰岛 β 细胞的存活。其机制可能是通过调控自噬相关蛋白 LC3、

AMPK 的表达水平,促进自噬溶酶体的形成,减轻高糖诱导的细胞损伤。

参 考 文 献

- [1] Bhattacharya D, Mukhopadhyay M, Bhattacharyya M, et al. Is autophagy associated with diabetes mellitus and its complications? A review [J]. EXCLI J, 2018, 17: 709-721.
- [2] Sheng Q, Xiao X, Prasadan K, et al. Autophagy protects pancreatic beta cell mass and function in the setting of a high-fat and high-glucose diet [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 16348.
- [3] 谢忠建,程群,丁悦.维生素 D 代谢和作用[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2018,11(1):2633.
- [4] 肖超,张世忠,贾晓丽,等.活性维生素 D3 通过调节自噬活性发挥糖尿病大鼠足细胞保护作用[J].中华内分泌代谢杂志,2019,35(3):240-247.
- [5] Song S, Tan J, Miao Y, et al. Intermittent-hypoxia-induced autophagy activation through the ER-stress-related PERK/Eif2 α /ATF4 pathway is a protective response to pancreatic β -cell apoptosis [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(6): 2955-2971.
- [6] Riahi Y, Wikstrom JD, Bachar-Wikstrom E. Autophagy is a major regulator of beta cell insulin homeostasis [J]. Diabetologia, 2016, 59(7): 1480-1491.
- [7] Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, et al. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 119.
- [8] Bachar-Wikstrom E, Wikstrom JD, Kaiser N, et al. Improvement of ER stress-induced diabetes by stimulating autophagy [J]. Autophagy, 2013, 9(4): 626-628.
- [9] Uberti F, Lattuada D, Morsanuto V, et al. Vitamin D protects human endothelial cells from oxidative stress through the autophagic and survival pathways [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(4): 1367-1374.
- [10] Zhou KL, Chen DH, Jin HM, et al. Effects of calcitriol on experimental spinal cord injury in rats [J]. Spinal Cord, 2016, 54(7): 510-516.
- [11] Kheiri B, Abdalla A, Osman M, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular diseases: a narrative review [J]. Clin Hypertens, 2018, 24: 9.
- [12] Muscogiuri G, Mitri J, Mathieu C, et al. Mechanisms in endocrinology: vitamin D as a potential contributor in endocrine health and disease [J]. Eur J Endocrinol, 2014, 171(3): R101-R110.
- [13] Bornstedt ME, Gjerlaugsen N, Pepaj M, et al. Vitamin D increases glucose stimulated insulin secretion from insulin producing beta cells [J]. Int J Endocrinol Metab, 2019, 17(1): e74255.
- [14] Rojas J, Bermudez V, Palmar J, et al. Pancreatic beta cell death: novel potential mechanisms in diabetes therapy [J]. J Diabetes Res, 2018, 2018: 9601801.
- [15] Saif-Elnasr M, Ibrahim IM, Alkady MM. Role of vitamin D on glycemic control and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus [J]. J Res Med Sci, 2017, 22(1): 22-27.
- [16] Chang NC, Nguyen M, Shore GC. BCL2-CISD2: an ER complex at the nexus of autophagy and calcium homeostasis? [J]. Autophagy, 2012, 8(5): 856-857.
- [17] Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase- β and Bcl-2 [J]. Mol Cell, 2007, 25(2): 193-205.
- [18] Wang Y, He D, Ni C, et al. Vitamin D induces autophagy of pancreatic β -cells and enhances insulin secretion [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(3): 2644-2650.

(收稿日期:2022-03-01)