

行免疫应答的状态。目前治疗炎症性肠病的药物主要包括水杨酸类药物、激素类药物和免疫抑制剂,但是治疗后均易复发。因此在治疗后达到免疫耐受状态,从而抑制异常免疫应答,维持促炎因子和抗炎因子的平衡成为治疗炎症性肠病的核心。干细胞是近来研究的重点,通过干细胞技术和组织工程技术即干细胞移植,这可能是治疗肠道疾病的根本方法。骨髓间充质干细胞最近作为一种具有远大前景的细胞移植治疗手段出现,除了因为其具有多向分化潜能,MSC 还具有免疫调节功能,在多种情况下发挥免疫抑制效应。MSC 移植能够上调 Treg 水平,抑制 T 淋巴细胞的免疫活性。Treg 通过细胞因子,接触抑制和调节 APC 的机制参与免疫调节。Treg 能够限制逃出中枢耐受监视的自身免疫性细胞的活性,从而抑制免疫应答达到免疫耐受。干细胞移植后通过调节 Treg 活性达到免疫耐受,维持促炎因子和抗炎因子的动态平衡,可能为炎症性肠病治疗提供新的思路。

参考文献

- Hall BM, Pearce NW, Gurley KE, *et al.* Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4⁺ suppressor cell and its mechanisms of action[J]. J Exp Med, 1990,171(1):141-157
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 1995, 155(3):1151-1164
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, *et al.* CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor[J]. Immunity, 2002, 16(2):311-323
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(4):330-336

- Mouly E, Chemin K, Nguyen HV, *et al.* The Ets-1 transcription factor controls the development and function of natural regulatory T cells[J]. J Exp Med, 2010, 207(10):2113-2125
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells[J]. J Exp Med, 2006, 203(7):1701-1711
- Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, *et al.* IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells[J]. J Immunol, 2004, 172(10):5986-5993
- Eardley DD, Hugenberger J, McVay-Boudread L, *et al.* Immunoregulatory circuits among T-cell sets. I. T-helper cells induce other T-cell sets to exert feedback inhibition[J]. J Exp Med, 1978, 147(4):1106-1115
- Dijke IE, Weimar W, Baan CC. Regulatory T cells after organ transplantation: where do they take place? [J]. Hum Immunol, 2008, 69(7):389-398
- Annacker O, Asseman C, Read S, *et al.* Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis[J]. J Autoimmun, 2003, 20(4):277-279
- Samanta A, Li B, Song X, *et al.* TGF-beta and IL-6 signals modulate chromatin binding and promoter occupancy by acetylated FOXP3[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(37):14023-14027
- Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function[J]. Autoimmun, 2008, 7(5):370-375
- Bluestone JA, Stclair EW, Turka LA. CTLA4Ig: bridging the basic immunology with clinical application[J]. Immunity, 2006, 24(3):233-238
- Chen W, Jin W, Hardegen N, *et al.* Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3[J]. J Exp Med, 2003, 198(12):1875-1886
- Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, *et al.* CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function[J]. Science, 2008, 322(5899):271-275

(收稿日期:2012-07-01)

(修回日期:2012-08-27)

内质网应激和糖脂代谢紊乱的关系及中药干预研究

刘 颀 张孟仁

内质网是细胞内重要的钙离子贮存器,也是蛋白

合成后修饰、折叠及转运的重要场所。在细胞缺乏能量、脂质过度负荷、钙离子稳态失衡、分泌蛋白合成增加等条件下,新生肽链的修饰、折叠、组装受到干扰,将引起未折叠蛋白在内质网中堆积,使细胞发生内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)。此时内

作者单位:100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院

院

通讯作者:张孟仁,电子信箱:xhzhmr425@sina.com

质网伴侣分子脱离内质网跨膜蛋白活化转录因子 6 (activating transcription factor6, ATF6)、肌醇需求酶 - 1 (inositol requiring enzyme - 1, IRE1) 和 RNA - 依赖的蛋白激酶样激酶 (protein kinase RNA - like ER kinase, PERK), 激活未折叠蛋白响应 (UPR) 信号通路, 调控下游相关基因表达, 增强内质网对蛋白质的处理能力, 以缓解内质网的应激压力。若应激压力过重, 内质网处理负荷的能力仍不能满足需求, 则会影响细胞的生理功能, 表现为蛋白质合成暂停、内质网应激相关蛋白表达、钙离子稳态失衡和细胞凋亡^[1]。

一、内质网应激和糖脂代谢紊乱

生理状态下, UPR 信号分子在调控糖脂代谢、胰岛素生成、胰岛细胞分化增殖等方面具有重要作用。研究证实 ERS 和糖脂代谢紊乱有着密切的联系: 高血糖、游离脂肪酸增加、错误折叠蛋白堆积均可以引起 ERS, 而 ERS 又可以影响糖脂代谢, 加重胰岛素抵抗, 甚至诱导胰岛 β 细胞凋亡。Laybutt 等^[2]的研究发现, 2 型糖尿病病人胰岛 β 细胞中内质网应激标志分子如免疫球蛋白结合蛋白 (immunoglobulin binding protein, Bip)、C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 等的表达较非糖尿病对照组增多。此外 Marchetti 等^[3]进行的另一项研究中检测到与非糖尿病对照组相比, 2 型糖尿病患者胰岛 β 细胞中活化转录因子 3 (activating transcription factor3, ATF3) 的表达增多, 而 ATF3 是 ATF6 下游的信号分子。这为 2 型糖尿病和 ERS 之间的联系提供了直接的证据。

1. 糖代谢紊乱和内质网应激: 研究表明 UPR 信号通路分子参与生理状态下的糖代谢调节。例如 ATF6 与调节肝脏糖异生过程的转录因子 (CREB regulated transcription coactivator2, CRTC2) 之间的相互作用对抑制肝糖原的合成具有重要作用^[4]。而在持续的高糖条件下, 胰岛素原合成的增加可以超过内质网折叠蛋白的能力, 从而引发 ERS。Wang 等^[5]发现长期高糖处理可引起大鼠胰岛素瘤细胞 INS - 1 细胞中内质网应激相关分子如 CHOP 和 BiP 表达增加。由此可推测长期高血糖状态可以引起蛋白质合成的过度负荷从而导致内质网应激。另有 Bachar 等^[6]的研究发现长期高血糖可以引起胰岛 β 细胞中内质网标志分子 IRE1 α 、X - 盒结合蛋白 - 1 (X - box binding protein - 1, XBP1) 的活性增强。而且高血糖可以放大游离脂肪酸激活的 IRE1 α 、PERK 途径, 通过激活细胞应激调节中重要的营养物质感受器即雷帕霉素敏感复合物 1 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1), 进而增加 IRE1 α 蛋白表达水平和激活 JNK 途径, 放大游离脂肪酸的脂毒性, 造成胰岛 β 细

胞凋亡。研究表明 ERS 可以通过抑制信号转导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 的表达来增加肝脏糖异生, 影响糖代谢^[7]。

2. 脂代谢紊乱和内质网应激: UPR 信号分子在脂代谢调节中也具有重要作用, 例如 Lee 等^[8]研究表明 XBP - 1 参与调控肝脏中脂肪酸合成基因的转录, 如 Scd - 1、Acc - 2 等。同时 XBP - 1 基因敲除的小鼠, 血清甘油三酯和胆固醇的含量下降。在高脂饮食喂养的 ob/ob 小鼠的肝脏和脂肪组织中, 检测到 PERK、真核细胞翻译起始子 - 2 α (eukaryotic translation initiation factor2 - alpha, eIF2 α) 磷酸化增强, Bip 的表达增加, 提示 ERS 和脂代谢紊乱密切相关。有学者发现饱和脂肪酸可促进内质网中钙离子的解离, 减少内质网对钙离子的摄入, 通过干扰内质网的钙离子稳态来诱发 ERS^[9]。此外, 饱和脂肪酸可以快速增加内质网中脂质的含量, 引起内质网形态和完整性的改变, 直接或间接地引起 ERS^[10]。

ERS 可以通过多途径影响脂代谢: 研究表明 PERK - eIF2 α 途径可以通过诱导 C/EBP α 表达, 降低胰岛素诱导基因 1 (insulin inducible gene1, Insig1) 蛋白转录, 从而增强固醇调节元件结合蛋白 (sterol regulatory element binding protein, SREBP) 活性以增加脂肪合成^[11]。Ozcan 等^[12]实验发现高脂喂养的肥胖小鼠下丘脑中内质网应激压力增加, 而且 UPR 信号通路激活可以抑制瘦素受体信号转导。敲除 XBP1 引起内质网功能受损后可以造成严重的瘦素抵抗, 而缓解内质网应激压力的化学分子伴侣 4 - 苯基丁酸 (4 - phenyl butyric acid, PBA)、牛磺熊去氧胆酸 (taurooursodeoxycholic acid, TUDCA) 则可以改善瘦素敏感性, 提示 ERS 对脂代谢的影响机制与抑制瘦素受体信号转导相关。

3. 胰岛素抵抗和内质网应激: 肥胖状态下, Jun - 氨基端激酶 (Jun N - terminal kinase, JNK) 的磷酸化明显增强。JNK1 敲除的 ob/ob 小鼠与未敲除的小鼠相比, 空腹血糖含量下降、脂质储存减少、胰岛素受体的信号转导能力提高、胰岛素敏感性增强^[13]。Ozcan 等^[14]用毒胡萝卜素诱导肝细胞发生 ERS 后, JNK 磷酸化增强, 胰岛素受体底物 - 1 (insulin receptor substrate - 1, IRS - 1) 酪氨酸磷酸化和蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 磷酸化受到抑制, 丝氨酸磷酸化显著增强, 减弱了胰岛素信号的转导。而抑制 JNK 磷酸化可逆转 IRS - 1 丝氨酸位点的磷酸化。该实验还发现敲除 IRE1 α 后 ERS 不能诱导 IRS - 1 丝氨酸位点的磷酸化。由此推测 ERS 通过 IRE1 α - JNK 信号

通路抑制胰岛素受体信号转导,引起胰岛素抵抗。

4. 胰岛 β 细胞和内质网应激:除糖脂代谢紊乱可以诱导 ERS 外,胰岛 β 细胞中错误折叠蛋白累积也可以引起 ERS。胰岛素原是在内质网中加工成熟,其合成占胰岛 β 细胞总蛋白合成的 30% ~ 50%。长期的胰岛素抵抗导致对胰岛素原合成的需求明显提高,从而显著增加内质网蛋白合成加工的负荷,激活胰岛细胞的 UPR 信号。胰岛素合成基因突变的 Akita 小鼠胰岛细胞中,错误折叠的蛋白合成增加,ERS 标志分子如 XBP1、ATF6 的表达上调^[15]。Huang 等^[16]证实 2 型糖尿病患者的胰岛细胞中胰岛淀粉样蛋白(islet amyloid polypeptide, IAPP)可诱导 ERS 凋亡蛋白 CHOP 蛋白表达上调。以上研究均提示 β 细胞内的 IAPP 沉淀可能是激活 ERS 凋亡通路的诱导因素。

UPR 信号分子对胰岛 β 细胞增殖分化有重要的调控作用,如 Zhang 等^[17]研究发现 PERK 基因敲除的小鼠会发生胰岛细胞增殖分化缺陷和凋亡增加以及胰岛素分泌失常。但持续的 ERS 可以通过激活相关凋亡通路来诱导胰岛 β 细胞凋亡:(1) JNK 途径:持续的 ERS 可以引起 IRE1 磷酸化,进而诱发 TNF- α 受体相关因子 2(TNF- α receptor-associated factor 2, TRAF2)募集,激活凋亡信号调节激酶-1(Apoptosis signal regulating kinase, ASK-1),进而活化 JNK 途径,诱导 β 细胞凋亡^[9]。(2) CHOP 通路:Song 等^[18]发现在多种类型糖尿病小鼠模型中,敲除 CHOP 均可以改善血糖控制、减少胰岛 β 细胞凋亡。而且在 CHOP 敲除的胰岛 β 细胞中,氧化应激相关的损伤程度也降低。(3) Gsk3 β 途径:Srinivasan 等^[19]的研究表明 Gsk3 β 敲除的小鼠胰岛素瘤细胞可明显抵抗 ERS 介导的凋亡,且用毒胡萝卜素诱导细胞发生 ERS 后糖原合成激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , Gsk3 β)的活化增强,提示 Gsk3 β 参与 ERS 介导的细胞凋亡。(4) 线粒体凋亡通路:ERS 还可以引起线粒体内钙离子增加,导致 PT 孔开放,释放细胞色素 C 和凋亡前体蛋白来引起 β 细胞凋亡^[20]。此外,实验表明 ERS 还可通过和氧化应激相互作用促进 β 细胞凋亡^[21]。

二、中药及复方对内质网的干预研究

近期研究发现中药提取物、单煎剂和复方可通过干预内质网应激改善胰岛素抵抗和糖脂代谢紊乱,减少胰岛 β 细胞凋亡。

1. 中药提取物:邬姝等^[22]利用高果糖高脂饲料饲养建立胰岛素抵抗大鼠模型,小檗碱灌胃给药 6 周后,小檗碱组 OGTT 0、1h 血糖、空腹胰岛素降低,胰

岛素敏感指数增加,血脂紊乱改善,胰岛 β 细胞凋亡减少,凋亡相关蛋白 ASK1 表达减少,提示小檗碱能改善胰岛素抵抗状态、减少胰岛 β 细胞凋亡,与其抑制 ERS 信号通路相关。王念等^[23]用高脂饲料联合腹腔注射小剂量链脲佐菌素复制 2 型糖尿病大鼠模型,治疗组应用黄芪多糖连续灌胃 8 周后,空腹血糖较糖尿病组显著下降,OGTT 各时点血糖值较糖尿病组均显著降低,大鼠肝脏组织中磷酸化 PERK 的表达较糖尿病组明显减少,推测黄芪多糖可以通过减少磷酸化 PERK 的表达来缓解糖尿病状态下过强的内质网应激,改善糖代谢。

2. 中药复方和中药单煎剂:杨小玉等^[24]采用高脂高热卡饮食饲养 8 周制备胰岛素抵抗大鼠模型,成模后随机分为黄连解毒汤组、黄连单煎剂组、Alpha-硫辛酸组和模型组,药物干预 4 周后,黄连解毒汤组、黄连单煎剂组和模型组相比,大鼠空腹血糖下降、空腹胰岛素水平明显降低、胰岛素敏感性明显增加,而且肝组织中应激标志物 JNK 的水平、葡萄糖调节蛋白(Glucose-regulated protein 78, GRP78) mRNA 水平均明显下降。提示黄连解毒汤、黄连单煎剂可以抑制胰岛素抵抗大鼠肝组织中 JNK 通路激活,增强肝脏对胰岛素的敏感性。

综上所述,内质网应激在糖脂代谢发病机制中具有重要作用,不仅可以直接影响糖脂代谢,还可以通过加重胰岛素抵抗、诱导胰岛 β 细胞凋亡来间接造成糖脂代谢紊乱。但是 ERS 的生理和病理机制仍存在很多问题悬而未决,因此其上下游的信号分子和通路交叉网络仍需进一步明确,为阐明其在 2 型糖尿病中的作用机制和寻找有效的药物作用靶点提供相关的理论依据。

近期实验研究证实了中药在干预内质网应激方面所发挥的作用,但目前相关的研究并不多,而且多数仅选取一条信号通路的单一靶点作为检测指标,会影响实验结论的准确性。此外,目前的研究多集中在中药对胰岛素敏感性的干预上,而对胰岛 β 细胞功能和凋亡影响的研究较少。中医中药治疗一向重视整体调节和辨证论证,多通路、多机制干预正是其优势所在。因此未来可系统选取 ERS 信号通路的多个靶点作为检测指标,以更加全面的研究中药对 ERS 的干预作用。而且中药是否能够通过多途径有效抑制 ERS 介导的胰岛 β 细胞凋亡,也是下一步研究需探索的问题。

参考文献

- 1 Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(7): 519