

TRB3 在高糖诱导的胰岛细胞凋亡中的作用及机制

钱 波 余 瑞 汤 铜 刘志宁 于 刚 田 多 郑 璐

摘 要 **目的** 研究高表达 TRB3 基因对高糖诱导的 β 细胞凋亡的影响及其参与的凋亡机制。**方法** 构建强力土霉素 (DOX) 可诱导表达 TRB3 的 β 细胞系, RT-PCR 检测 TRB3、ATF4、Bip、Chop 等基因 mRNA 的表达, DNA 片段化检测高糖诱导的细胞凋亡, Western blot 检测 KDEL 蛋白的表达, 和油红 O 检测细胞内脂质的累积情况。**结果** DOX 可以诱导 TRB3 基因 mRNA 和蛋白表达升高, 高表达 TRB3 可以明显增加高糖诱导的 β 细胞凋亡, 高表达 TRB3 可以促进内质网应激相关的基因 mRNA 以及 KDEL 蛋白的表达上调, TRB3 可以抑制 β 细胞胰岛素分泌和减少细胞内脂质的累积。**结论** TRB3 基因通过内质网通路参与并促进高糖诱导的 β 细胞凋亡, 影响胰岛素分泌和脂质代谢功能。

关键词 TRB3 胰岛细胞 内质网应激 凋亡

[中图分类号] R587 [文献标识码] A

Effect and Mechanism of TRB3 in Islet Cells Apoptosis Induced by High Glucose. Qian Bo, Yu Rui, Tang Tong, et al. The Second Hospital of Anhui Medical University, Anhui 230601, China

Abstract Objective To explore the effect and mechanism of TRB3 over expressing on β cells apoptosis induced by high glucose. **Methods** β cell line expressing TRB3 gene induced by DOX was constructed. The mRNA expression of TRB3, ATF4, Bip, Chop were detected by RT-PCR. The cell apoptosis was observed by DNA ladder formation in high glucose medium. The expression of KDEL was examined by Western blot. The lipid accumulation was showed by Oil Red O in cells. **Results** DOX could induce the high expression of TRB3 mRNA and protein. High expression of TRB3 increased the apoptosis of β cells induced by high glucose. The expression of genes mRNA and KDEL protein was up-regulated by TRB3 in the pathway for endoplasmic reticulum stress. TRB3 could inhibit the insulin secretion and decrease the lipid accumulation. **Conclusion** TRB3 could involve in β cells apoptosis by high glucose in the endoplasmic reticulum stress pathway and interfere with the insulin secretion and the lipid metabolism.

Key words TRB3; Islet cell; Endoplasmic reticulum stress; Apoptosis

Tribbles 同源蛋白 3 (tribbles homolog 3, TRB3) 是果蝇体内发现的哺乳动物同源基因, 是人类伪激酶 Tribbles 家族成员之一。研究发现 TRB3 作为一种应激反应相关因子, 在钙代谢异常、生长因子缺失、谷胱甘肽缺乏、乙醇和缺氧等刺激条件都会导致其基因表达上调^[1,2]。糖尿病患者长期高糖微环境导致胰岛细胞应激并发生凋亡, 是导致糖尿病病情加重的重要因素。本研究探讨 TRB3 在高糖诱导的胰岛细胞凋亡过程中作用及可能机制。

材料与方法

1. 细胞培养和 TRB3 细胞系的建立: 原始细胞系为 β 细胞系 INS-1, 构建该细胞系具有强力土霉素 (doxycycline,

DOX) 依赖的反式转录激活因子控件, 可被 DOX 诱导, 导入含有 TRB3 基因序列的质粒, 经克隆筛选得到 DOX 可诱导的 TRB3 细胞系^[3]。DOX 最大诱导剂量为 500ng/ml, 诱导 TRB3 基因表达时间为 48h。本实验中高糖刺激使用的糖浓度为 30mmol/L, 72h。

2. 反转录 PCR: TRB3 细胞系培养 24h, 加入 DOX 继续培养 48h 或无 DOX, 培养液培养 72h。依 RNA 提取试剂盒 (Qiagen 公司) 说明书, 进行 RNA 提取。取 RNA 样品 2 μ g, 按 RNA 反转试剂盒 (Qiagen 公司) 说明书, 配制反应混合液, PCR 仪上 37 $^{\circ}$ C 反应 60min。RT-PCR 反应, 取 0.5 μ l cDNA 作为模板, 基因引物序列、退火温度和产物长度见表 1。反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 95 $^{\circ}$ C 30s、退火 (不同基因温度不同) 30s、72 $^{\circ}$ C 30s, 共 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

2.5% 琼脂糖电泳。

3. 免疫细胞染色: 细胞种于多聚鸟氨酸处理的盖玻片 24h, 换含有或不含 500ng/ml DOX 的培养液培养 48h。细胞洗后用 4% 的多聚甲醛固定。一抗孵育前, 细胞用 1% BSA ~ PBS 封闭非特异抗原, 一抗兔 TRB3 多克隆抗体 (Calbiochem 公司) 使用浓度 1:200, 二抗抗兔标记 (KPL 公司) 使用浓度 1:100。DAB 显色剂, 室温条件下显色 2min。

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目 (1308085QH152)

作者单位: 230601 合肥, 安徽医科大学第二附属医院普外科 (钱波、汤铜、刘志宁、于刚、田多、郑璐); 230032 安徽医科大学第一附属医院内分泌科 (余瑞)

通讯作者: 钱波, 电子信箱: qianbo79@163.com

表 1 PCR 反应的引物序列、退火温度及产物长度

基因	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	产物长度(bp)
TRB3	F:TGTCCTTCAGCAACTCTGAGAGGACGAAG	60	147
	R:GTAGGATGGCCGGGAGCTGACTATC		
β-actin	F:GACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	60	173
	R:ATAGAGCCACCAATCCACACAGAG		
ATF4	F:GTTGCTCAGTGCCTCAGACA	55	109
	R:CATTGCGAAACAGAGCATCGA		
Bip	F:CCACCAGGATGCAGACATTG	55	100
	R:AGGGCCTCCACTTCCATAGA		
Insulin	F:TGCCCAGGCTTTTGTCAA ACAGCACCTT	60	187
	R:CTC CAG TGC CAA GGT CTG AA		
Glut2	F:TGGGTTCTCTCCAGTTCG	55	182
	R:AGGCGTCTGCTGCTGATG		

4. DNA 片段化实验:5 × 10⁵ 细胞种于 T25 培养瓶,正常和高糖培养液,含有或不含 500ng/ml DOX,培养 5 天。收集悬浮和贴壁的细胞,细胞裂解后 37℃ 过夜。酚氯仿各抽提 1 次,无水乙醇 -20℃ 过夜沉淀 DNA。12000 × g 离心 20min,沉淀用 70% 乙醇洗涤 1 次,TE 溶液 37℃ 溶解沉淀。2% 琼脂糖 50V 电泳 4h。

5. Western blot 实验:5 × 10⁵ 细胞种于 T25 培养瓶,正常和高糖培养液,含有或不含 500ng/ml DOX,培养 3 天。收集细胞,细胞裂解液冰上裂解细胞 30min。4℃ 10000 × g 离心 10min,收集细胞上清。样本蛋白含量用 BCA 蛋白定量试剂盒检测(碧云天公司),牛血清白蛋白做为内参。100μg 总蛋白与 2% SDS 上样缓冲液 99℃ 加热变性 5min,用 10% SDS - PAGE 胶分离并在冰上转 PVDF 膜(Bio - Rad 公司)。电转后的 PVDF 膜用含 0.1% 吐温的 5% 脱脂牛奶室温下封闭 2h。一抗 4℃ 孵育过夜,鼠 KDEL 多克隆抗体(Santa Cruz 公司)使用浓度 1:500,鼠 α - tubulin 多克隆抗体(Santa Cruz 公司)使用浓度 1:500。辣根过氧化物酶标记的抗鼠(Sigma 公司)二抗室温孵育 1h。膜与 ECL(Millipore 公司)反应 5min,暗盒 X 线片曝光。

6. 油红 O 染色:细胞种于 96 孔板,换含有或不含 500ng/ml DOX 的培养液培养 48h。再换含有 0.1mmol/L 油酸培养液培养 48h。细胞洗后用 10% 的甲醇固定 40min,加入含有 0.3% 油红 O 工作液,染色 10min,异丙醇漂洗,镜下观察细胞内脂滴形成。

结 果

1. RT - PCR 检测 TRB3 基因 mRNA 在 DOX 诱导前后的表达:DOX 诱导 48h,转基因细胞中 TRB3 mRNA 水平显著上升。单纯高糖无 DOX 同样培养 72h 同样诱导 TRB3 mRNA 表达上调(图 1)。β - actin mRNA 作为内参,提示模板量一致。

2. 细胞免疫染色检测 DOX 诱导前后 TRB3 蛋白的表达:结果显示,无 DOX 培养条件下,TRB3 蛋白细胞中的基础表达水平很低。DOX 诱导 48h 后,细胞

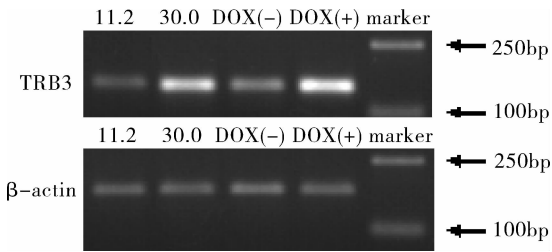


图 1 高糖和 DOX 诱导 TRB3 基因 mRNA 的表达

中 TRB3 表达明显上调,提示该细胞系的 DOX 可诱导性良好,内外源 TRB3 蛋白表达定位都以胞质为主(图 2)。

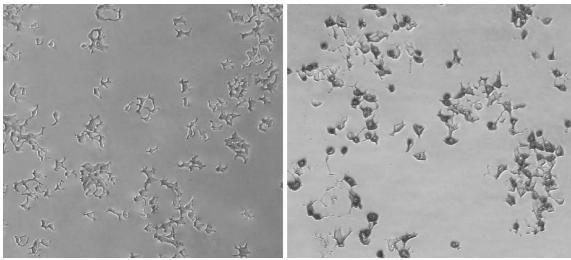


图 2 DOX 诱导前后 TRB3 蛋白的表达(免疫染色, × 100)

3. DNA 片段法检测高糖条件 TRB3 细胞系的凋亡情况:无 DOX 诱导条件下,30mmol/L 高糖培养 5 天,TRB3 细胞系无明显 DNA Ladder 条带出现。当 DOX 诱导 TRB3 基因表达开放,30mmol/L 高糖培养 2 天,有明显的 DNA Ladder 条带出现,随培养时间延长,DNA Ladder 条带更加明显,提示细胞凋亡程度的增加(图 3)。

4. 内质网应激相关基因 mRNA 的表达情况:TRB3 细胞在高糖条件下 Bip 基因 mRNA 有轻度升高,胰岛素基因表达也有上调。当加入 DOX 诱导 TRB3 表达后,ATF4、Bip 和 Chop 内质网应激相关基

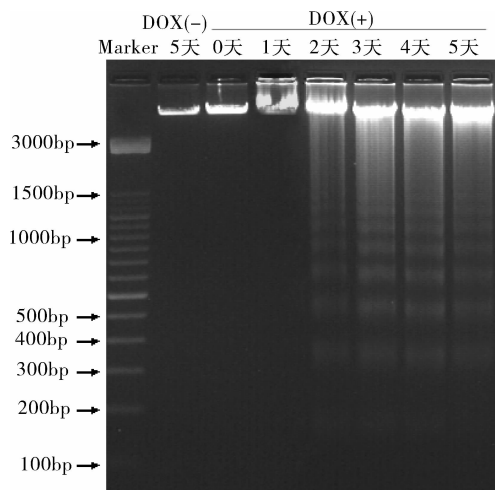


图3 高糖环境下 TRB3 细胞系的 DNA 片段化

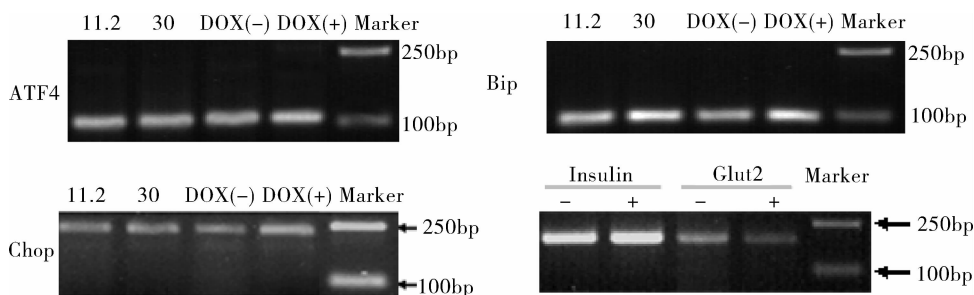


图4 TRB3 对内质网应激相关基因 mRNA 表达的影响

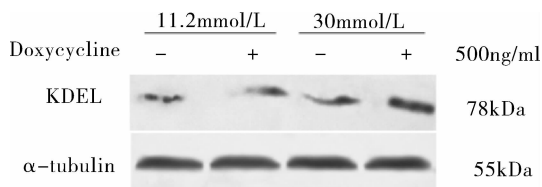
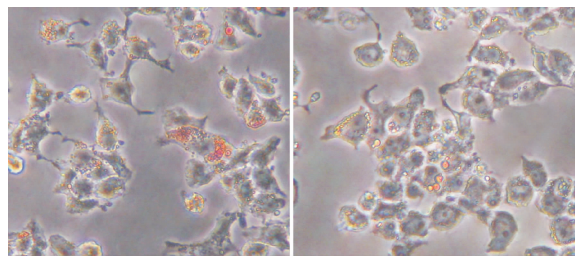


图5 高糖环境下 TRB3 对 KDEL 蛋白表达的影响

图6 TRB3 对油酸诱导的细胞内脂质累积的影响
油红 O 染色, $\times 400$

讨 论

2 型糖尿病的发生和发展过程包括胰岛素抵抗→胰岛 β 细胞功能代偿→胰岛 β 细胞功能失代偿→高血糖→胰岛细胞功能衰竭 5 个阶段。其中,持续的高糖状态引起胰岛 β 细胞功能衰竭是 2 型糖尿病发

因表达都有所升高。葡萄糖转运子 2 (GLUT2) 在 TRB3 高表达情况下, mRNA 表达明显下调,胰岛素基因表达无明显改变(图 4)。

5. Western blot 检测 KDEL 蛋白表达情况: KDEL 是内质网滞留信号肽,当表达紊乱时,可导致 Bip 等分子在内质网中聚积,加重内质网应激。本实验结果提示 TRB3 基因表达后,在高糖条件下,可明显上调 KDEL 表达(图 5)。

6. 油红 O 检测 TRB3 细胞内脂质沉积情况: 油红 O 为亲脂物质,可将细胞内的脂滴染成红色,而没有脂滴的细胞则不会被染色。DOX 诱导 TRB3 表达后,油酸在细胞内沉积明显减少,DOX (+) 细胞内脂滴明显少于 DOX (-) 组(图 6)。

展过程的关键环节^[4]。长期高糖环境会导致胰岛细胞内质网应激上调和线粒体凋亡通路开放,引起 β 细胞胰岛素分泌功能下降和凋亡增加^[5]。TRB3 作为一种酶,参与多种细胞生理功能,特别是和细胞应激反应以及凋亡过程密切相关。本课题组构建了 DOX 可诱导的高表达 TRB3 的 β 细胞,与 DOX 呈明显的量→效和时→效关系^[3]。本实验显示 β 细胞内 TRB3 基础表达水平较低,DOX 诱导后,TRB3 mRNA 和蛋白表达明显上调。高糖作为一种诱因可以导致胰岛细胞应激反应,实验中单纯高糖刺激也可以促进 TRB3 基因 mRNA 表达。检测自发性糖尿病大鼠的胰岛细胞,同样发现 TRB3 mRNA 表达明显升高^[6]。

TRB3 和细胞应激反应密切相关,钙代谢异常、生长因子缺失、谷胱甘肽缺乏、乙醇和缺氧等引起 TRB3 的表达。敲除小鼠体内 TRB3 基因,可以增加心肌细胞对缺氧耐受能力,心肌细胞凋亡程度也明显降低^[7]。本实验研究发现,DOX 诱导 TRB3 高表达,可以显著增加高糖导致的 β 细胞凋亡。TRB3 高表达可能使细胞处于一种高应激反应状态,高糖诱导后可以迅速促进细胞凋亡的发生。30mmol/L 浓度糖培养

第 2 天可检测 DNA Ladder 条带,随培养时间延长,条带更加明显。通常 DNA Ladder 出现提示约 30% 以上的细胞发生凋亡。内质网应激是诱导细胞凋亡的常见信号通路。长期的高糖环境会导致内质网内未折叠蛋白累积,出现内质网功能紊乱,诱发应激反应^[8]。本实验发现 TRB3 高表达后,可以引起内质网应激通路中 ATF4、Bip 和 Chop 基因 mRNA 表达上调,已有研究发现,内质网应激时,ATF4 和 Chop 可以形成复合物,促进 TRB3 的表达,认为 TRB3 是应激反应下游基因。本实验中 TRB3 可以上调 ATF4 等基因表达,提示其也可能扮演应激反应上游基因角色。KDEL 是内质网保留信号序列,内质网合成的蛋白 C 端加入 KDEL 序列,被转移至高尔基体包装分泌,而 KDEL 再返回内质网,人为增加 KDEL,可以促进未折叠蛋白累积,加重内质网应激^[9]。本实验发现 TRB3 高表达,可以增加高糖环境下 β 细胞内 KDEL 蛋白的含量。故提示 TRB3 可能上调 ATF4 等基因表达和增加 KDEL 蛋白含量,通过内质网通路参与高糖诱导的 β 细胞凋亡。

对小鼠的研究发现,肝脏高表达 TRB3 可以抑制细胞内脂质的合成^[10]。本实验同样发现,用含油酸的培养液培养,TRB3 高达可以减少 β 细胞内脂滴的形成的,提示 TRB3 参与细胞内脂质的代谢。合成和分泌胰岛素是 β 细胞的重要功能,TRB3 高表达可以抑制 β 细胞胰岛素的分泌^[6]。本研究进一步发现,TRB3 对胰岛素基因表达无明显影响,但可以下调 Glut2 基因的表达。Glut2 是主要的葡萄糖转移蛋白,将糖转移至 β 细胞内,诱发胰岛素分泌。Glut2 参与胰岛抵抗发生,长期的高脂喂养可以下调大鼠肝脏细胞中 Glut2 的表达,降低肝细胞对胰岛素的敏感度^[11]。故 TRB3 不影响 β 细胞内胰岛素的合成,但可能通过影响 Glut2,诱发 β 细胞产生自身胰岛素抵

抗,而影响胰岛素的分泌。

本研究表明,TRB3 可能在高糖诱导胰岛 β 细胞应激过程中扮演重要的角色,通过内质网通路促进细胞凋亡,此外还影响 β 细胞胰岛素分泌,TRB3 对研究糖尿病发病机制以及治疗都有潜在的价值。

参考文献

- 1 Jousse C, Deval C, Maurin AC, *et al.* TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 15851-15861
- 2 Kitano H, Young JM, Cheng J, *et al.* Gender-specific response to isoflurane preconditioning in focal cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27: 1377-1386
- 3 钱波,张文健,徐亚萍,等. Tet-on 系统对胰岛细胞瘤中 TRB3 基因的表达调控作用[J]. *肝胆外科杂志*, 2008, 16: 371-374
- 4 Weir GC, Bonner-Weir S. Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1281: 92-105
- 5 Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links [J]. *Cell*, 2012, 148: 852-871
- 6 Qian B, Wang H, Men X, *et al.* TRB3 is implicated in glucotoxicity-and endoplasmic reticulum-stress-induced beta-cell apoptosis [J]. *J Endocrinol*, 2008, 199: 407-416
- 7 Avery J, Etzion S, DeBosch BJ, *et al.* TRB3 function in cardiac endoplasmic reticulum stress [J]. *Circ Res*, 2010, 106: 1516-1523
- 8 Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes [J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 767-793
- 9 廖鹏,马青原,刘文森,等. RTA 和 RTA-KEEL/KDEL 基因的表达及细胞毒性[J]. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21: 475-478
- 10 Qi L, Heredia JE, Altarejos JY, *et al.* TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism [J]. *Science*, 2006, 312: 1763-1766
- 11 Samuel VT, Liu ZX, Qu X, *et al.* Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 32345-32353 (收稿日期:2014-01-07)
(修回日期:2014-02-01)

RNA 干扰 HO-1 的表达增强食管鳞癌 Eca109 细胞对氟尿嘧啶化疗的敏感度

王 喆 郭海谢 夏利龙 陈 宇 胡炳川 张 健 朱成楚 陈保富

摘 要 目的 探讨小干扰 RNA 沉默 HO-1 基因表达后食管鳞癌 Eca109 细胞对氟尿嘧啶化疗敏感度的影响。**方法** 利

基金项目:浙江省重大科技专项和优先主题项目(2011C13039-2);台州市科技局基金资助项目(11KY11)

作者单位:317000 临海,温州医科大学附属台州医院

通讯作者:朱成楚,电子信箱:xialilong1987@sina.com