

# 生物钟基因与胰岛功能的研究进展

张 艾 詹晓蓉 杨馥铭 李琳娜

**摘要** 人体生物钟基因分为中央及外周生物钟,它们同步振荡表达调节胰岛  $\beta$  细胞的功能,影响葡萄糖诱导的胰岛素分泌。这些机体内的振荡器的振幅、时相等改变参与糖尿病的发病过程。本文综述了生物钟基因与胰岛功能之间相互作用的机制,并阐明了环境因素对生物钟振荡表达结果产生的影响。从基因层面为糖尿病的预防与治疗指明了新的方向。

**关键词** 生物钟基因 胰岛功能 振荡 糖尿病

**中图分类号** R587.1

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.045

近年来,随着社会经济飞速的发展,工作形式出现多样化,轮班工作者如医护工作者、安保人员等也日益增多。流行病学研究发现轮班工作者发生 2 型糖尿病的风险增加<sup>[1]</sup>。事实上,饮食、运动时间不合理、高热量饮食、光/暗周期等均可增加糖尿病的风险,从基因层面上来说,这与环境变化导致的生物钟基因振荡表达紊乱有关。

## 一、中央和外周生物钟

1. 中央生物钟:哺乳动物的中央生物钟位于下丘脑的视交叉上核(suprachiasmatic nuclei, SCN),由CLOCK(circadian locomotor output cycles kaput)和BMAL1(brain and muscle Arnt-like protein-1)组成,可与E-box的增强子周期素(period, PER)和启动子隐花色素(cryptochrome, CRY)结合,诱导PER和CRY蛋白的表达<sup>[2]</sup>。PER和CRY蛋白质形成一个复合物,转移到细胞核抑制CLOCK-BMAL1诱导的转录过程。两种蛋白磷酸化在26S蛋白酶体的作用下降解。这种自我反馈机制使生物钟网络形成了24h的振荡模式。一些由生物钟基因编码的蛋白质调节下游基因的表达,进一步调节生物钟的功能,影响细胞的进程如代谢进程。另一个调控环由两个核受体基因组成,可被CLOCK-BMAL1异二聚体激活表达,REV-ERB $\alpha$ (因被致癌基因c-erb-A反编码而命名)蛋白可抑制BMAL1的表达,而维甲酸受体相关孤核受体 $\alpha$ (retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\alpha$ , ROR $\alpha$ )蛋白起相反的作用,可促进

BMAL1的表达。这些振荡器主要通过外界光/暗周期的信号刺激,协同大脑中枢管理温度、睡眠、进食、激素分泌、血糖动态平衡。

2. 外周生物钟:除了大脑中的中央生物钟,外周器官如肝、肾、心脏、脂肪组织和胰腺中也存在外周生物钟<sup>[2~5]</sup>。它们受中央生物钟调控,切除SCN可消除外周组织的同步性,外周生物钟由依赖光/暗周期的中央生物钟控制,从而达到全天最佳的代谢和能量平衡。昼夜节律改变和(或)外周生物钟、SCN紊乱可能与2型糖尿病的发病有关<sup>[6]</sup>。

## 二、生物钟基因与胰岛功能

胰腺是一个复杂的内分泌器官,由不同类型的细胞组成,根据生理需求调节糖代谢。参与葡萄糖稳态的主要是分泌胰岛素的 $\beta$ 细胞和分泌胰高血糖素的 $\alpha$ 细胞,它们呈脉冲式分泌,进食后数分钟即可分泌<sup>[7]</sup>。事实上,血浆胰岛素和胰高血糖素水平在未进食时也表现为24h振荡<sup>[8]</sup>。这种昼夜波动背后的确切机制仍是未知数。有研究发现胰腺中的PER1、PER2、BMAL1、CLOCK和REV-ERB $\alpha$ 的mRNA水平24h发生振荡现象<sup>[2]</sup>。此外,高表达的转录因子和生物钟控制的输出基因——D结合蛋白(d-binding protein, DBP)和促甲状腺细胞胚胎因子(thyrotroph embryonic factor, TEF),分别存在于人类胰岛中,并在分泌胰岛素的细胞中存在昼夜变化<sup>[9]</sup>。胰岛生物钟与其他外周生物钟组分相似,不同物种24h的生物钟基因表达均表现出振荡。大鼠胰腺、小鼠胰腺、小鼠胰岛、人胰岛和胰岛细胞都有生物钟基因的振荡表达<sup>[2~4,10,11]</sup>。此外,胰腺细胞系,如MIN6细胞、INS-1细胞、aTC1-9细胞也有表达<sup>[4,12,13]</sup>。在胰腺细胞系MIN6和小鼠胰岛中的DBP同样振荡表达<sup>[14]</sup>。这些发现支持了胰岛内生物钟的存在。

基金项目:黑龙江省教育厅基金资助项目(12511233)

作者单位:150000 哈尔滨医科大学附属第一医院

通讯作者:詹晓蓉,教授,博士生导师,电子信箱:zhanxiaorongai@

163.com

1. 中央生物钟与胰岛功能:在小鼠全身、胰腺或  $\beta$  细胞的生物钟基因敲除研究中,揭示了胰岛生物钟基因对胰岛素的分泌和糖尿病的发展具有重要的作用。CLOCK $^{\Delta 19/\Delta 19}$  突变小鼠和胰腺 BMAL1 基因敲除小鼠,表现出高血糖、低胰岛素血症和葡萄糖不耐受,这与胰岛素分泌应答反应的变化有关。从 CLOCK 突变小鼠分离出的胰岛尺寸缩小、胰岛素分泌受损。胰岛表现为  $\beta$  细胞增殖减少、不同生物钟基因(参与葡萄糖摄取及代谢、胰岛素信号、细胞周期及  $\beta$  细胞生长)表达减少或改变。分析提取出的胰腺发现,胰岛对葡萄糖的应答反应受损致胰岛素分泌减少,这表明很可能是胞外分泌受损,而不是葡萄糖代谢改变。胰岛素分泌前,葡萄糖诱导的钙离子( $Ca^{2+}$ )信号变化减少,参与囊泡转运、对接的蛋白质如 Vamp3、Syntaxin6 表达减少,进一步支持了  $\beta$  细胞胞吐的缺陷。

分别观察全身、胰岛 BMAL1 基因敲除小鼠的胰腺,胰岛素分泌有类似的变化。另一项研究报道的 BMAL1 基因敲除小鼠高血糖和低胰岛素血症证明,这种动物模型葡萄糖耐量异常的原因是第 1 时相胰岛素分泌缺陷<sup>[15]</sup>。研究敲除了 BMAL1 基因的小鼠和 INS - 1 细胞分离出的胰岛发现,解偶联蛋白 2 (uncoupling protein 2, Ucp2) 的表达增强,导致葡萄糖诱导升高的线粒体膜电位梯度降低,从而导致 ATP 水平和胰岛素分泌降低。抑制 Ucp2 可部分逆转这种缺陷。与 CLOCK $^{\Delta 19/\Delta 19}$  突变小鼠的结果相反<sup>[3]</sup>。Lee 等认为是糖代谢缺陷而不是胞外分泌发生了改变。

这些结果不同,可能与不同 CLOCK 和 BMAL1 的多效性作用有关(除了昼夜节律作用)。报道  $\beta$  细胞 BMAL1 基因敲除的小鼠有类似的糖尿病表型和分泌缺陷<sup>[16]</sup>。BMAL1 对氧化应激有重要的预防作用。从这些小鼠分离出的胰岛存在氧化应激,Ucp2 表达增加,胰岛素分泌受损。预防氧化应激或抑制 Ucp2 能逆转这些缺陷。另外,抗氧化剂的关键调控因子 Nrf2 是 BMAL1 的靶向目标。与这些研究一致,在小鼠和分离出的胰岛中,选择性敲除 BMAL1 基因也产生葡萄糖不耐受和胰岛素分泌缺陷<sup>[17]</sup>。

2. 外周生物钟与胰岛功能:除了中央生物钟组成的 CLOCK 和 BMAL1,其他外周生物钟基因如 REV - ERB $\alpha$  也对胰岛  $\beta$  细胞功能很重要。REV - ERB $\alpha$  在胰岛中表达,在 MIN6 细胞中表现出 24h 振荡。当该基因在小鼠胰岛中被沉默,葡萄糖诱导分泌的胰岛素和  $\beta$  细胞增殖降低<sup>[4]</sup>。同样,在  $\alpha$ TC1 - 9 细胞中 REV - ERB $\alpha$  的表达也表现出昼夜变化,当其下调

时,胰高血糖素的分泌将受损。REV - ERB $\alpha$  对  $\beta$  细胞和  $\alpha$  细胞分泌的影响,可能与胞吐过程有关。当 REV - ERB $\alpha$  表达沉默时,胞吐基因如 Vamp3、Syntaxin1、Munc18、Snap25 的表达明显下降,与前面的 CLOCK $^{\Delta 19/\Delta 19}$  突变小鼠结果一致<sup>[3,13]</sup>。因此,生物钟基因可能是通过调制  $\beta$  细胞的不同进程影响其质量和功能。

3. 其他基因与胰岛功能:有趣的是,除了生物钟基因,其他几个基因的表达也表现出胰腺、胰岛、 $\beta$  细胞系的昼夜节律。这些基因包括 Glut2、Glucokinase、Syntaxin1A、Insulin、Ucp2、Nrf2、CyclinD1、Pdx1 以及参与  $\beta$  细胞代谢、分泌、生长、胰岛素信号的其他基因<sup>[9]</sup>。据报道, Nrf2 是 BMAL1 的转录目标, TEF 直接结合启动子激活 Glut2, DBP 直接增强 Arnt / Hif1 $\beta$  的转录, Arnt / Hif1 $\beta$  是  $\beta$  细胞代谢和分泌的关键基因<sup>[9,14,16]</sup>。所有上述基因如何联合在  $\beta$  细胞的不同进程中表达昼夜振荡功能的,目前尚未完全阐明。

人类胰岛生物钟基因的研究相对较少。人胰岛也表达 BMAL1、CLOCK、PER1、PER2、PER3、CRY1 和 CRY2,并已发现荧光素酶标记的 BMAL1 表达有自我昼夜振荡节律<sup>[11]</sup>。2 型糖尿病患者的胰岛 CRY2、PER2、PER3 表达有所下降,这正与胰岛素含量密切相关。此外,人胰岛暴露在高葡萄糖和棕榈酸酯水平可降低 PER3 的表达<sup>[18]</sup>。虽然各项动物研究支持生物钟基因对内分泌胰腺具有重要的功能,它们对人胰腺的影响仍需要更进一步的研究。

### 三、环境改变生物节律和胰岛生物钟

外界环境可调节生物节律和胰岛生物钟,环境的改变(如饮食、运动时间不当、光/暗周期紊乱)可导致生物节律和胰岛生物钟的紊乱,与糖尿病的发病相关。研究表明睡眠不足与糖尿病的发生率增加有关<sup>[19]</sup>。即使睡眠时间充足,昼夜节律紊乱亦可通过改变睡眠时间表增加糖尿病的风险<sup>[6]</sup>。

近期的小鼠研究中,持续光照和(或)高脂喂养小鼠,改变了 SCN 的功能,影响了进食、耗能、胰岛素敏感度的生理节律模式<sup>[20]</sup>。高脂喂养小鼠发现,下丘脑、肝脏、脂肪组织中的生物钟基因及生物钟调控代谢基因表达发生了改变。此外,高脂喂养的小鼠暴露在光照下比黑暗处体重增加更明显。研究大鼠模拟轮班工作,结果导致了腹型肥胖和葡萄糖节律受损,当喂养时间再次恢复为生理节律时,这两个变化逆转了,表明适当的喂养时机对昼夜节律功能的维护具有重要的作用。因此,喂养时间不当可致昼夜节律

紊乱、中央和外周生物钟之间失去同步性，从而增加了代谢性疾病的风险。

内分泌胰腺中也已分析了环境因素的影响。用荧光素酶观察夜间持续光照对老鼠胰腺 PER1 的影响<sup>[21]</sup>。光/暗周期的变化产生胰岛生物钟转录时相的振荡。24h 持续光照 10 周的大鼠振荡器振荡的振幅、时相及同步性受损。在这种情况下，胰岛素的分泌因胰岛素分泌脉冲的质量降低而受损。也有研究认为葡萄糖调节 PER1 昼夜振荡的振幅和时相，说明胰岛生物钟有营养传感机制。也有报道持续光照或每 3 天光周期延长 6h 可加速 Sprague – Dawley 大鼠糖尿病的发展<sup>[22]</sup>。高脂喂养的小鼠胰岛已有昼夜表达的 REV – ERB $\alpha$ 、CLOCK、PER1 和 PER2 基因以及昼夜胰岛素分泌的改变<sup>[4]</sup>。模拟轮班工作，昼夜节律失调，导致了氧化应激、胰岛素释放改变，类似于  $\beta$  细胞 BMAL1 基因敲除的小鼠<sup>[16]</sup>。因此，影响生理环境节律会损害胰腺生物钟和这个器官的功能。

大量的动物模型表明生物钟基因和葡萄糖稳态之间存在着密切的联系。葡萄糖代谢及胰岛功能可能取决于组织生物钟基因的昼夜振荡表达，生物钟振荡器紊乱导致胰岛功能受损。外界环境因素对生物节律和胰岛生物钟具有重要的影响。通过基因治疗及外界环境干预防治糖尿病，这一创新可能成为糖尿病防治道路上的里程碑。

#### 参考文献

- Pan A, Schernhammer ES, Sun Q, et al. Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women [J]. PLoS Med, 2011, 8(12): e1001141
- Muhlbauer E, Wolgast S, Finckh U, et al. Indication of circadian oscillations in the rat pancreas [J]. FEBS Lett, 2004, 564(1–2): 91–96
- Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes [J]. Nature, 2010, 466(7306): 627–631
- Vieira E, Marroqui L, Batista TM, et al. The clock gene Rev – erb $\alpha$  regulates pancreatic  $\beta$  – cell function: modulation by leptin and high – fat diet [J]. Endocrinology, 2012, 153(2): 592–601
- Ando H, Kumazaki M, Motosuqi Y, et al. Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice [J]. Endocrinology, 2011, 152(4): 1347–1354
- Leproult R, Holmback U, Van Cauter E. Circadian misalignment augments markers of insulin resistance and inflammation, independently of sleep loss [J]. Diabetes, 2014, 63(6): 1860–1869
- Hellman B, Salehi A, Grapenbesser E, et al. Isolated mouse islets respond to glucose with an initial peak of glucagon release followed by pulses of insulin and somatostatin in antisynchrony with glucagon [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(4): 1219–1223
- Kalsbeek A, Yi CX, La Fleur SE, et al. The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis [J]. Trends Endocrinol Metab, 2010, 21(7): 402–410
- Allaman – Pillet N, Roduit R, Oberson A, et al. Circadian regulation of islet genes involved in insulin production and secretion [J]. Mol Cell Endocrinol, 2004, 226(1–2): 59–66
- Muhlbauer E, Gross E, Labucay K, et al. Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 606(1–3): 61–71
- Pulimeno P, Mannic T, Sage D, et al. Autonomous and self – sustained circadian oscillators displayed in human islet cells [J]. Diabetologia, 2013, 56(3): 497–507
- Muhlbauer E, Bazwinsky – Wutschke I, Wolgast S, et al. Differential and day – time dependent expression of nuclear receptors ROR $\alpha$ , ROR $\beta$ , ROR $\gamma$  and RXR $\alpha$  in the rodent pancreas and islet [J]. Mol Cell Endocrinol, 2013, 365(2): 129–138
- Vieira E, Marroqui L, Figueroa AL, et al. Involvement of the clock gene Rev – erb alpha in the regulation of glucagon secretion in pancreatic alpha – cells [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69939
- Nakabayashi H, Ohta Y, Yamamoto M, et al. Clock – controlled output gene Dbp is a regulator of Arnt/Hif – 1 $\beta$  gene expression in pancreatic islet  $\beta$  – cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 434(2): 370–375
- Lee J, Kim MS, Li R, et al. Loss of Bmal1 leads to uncoupling and impaired glucose – stimulated insulin secretion in  $\beta$  – cells [J]. Islets, 2011, 3(6): 381–388
- Lee J, Moulik M, Fang Z, et al. Bmal1 and  $\beta$  – cell clock are required for adaptation to circadian disruption, and their loss of function leads to oxidative stress – induced  $\beta$  – cell failure in mice [J]. Mol Cell Biol, 2013, 33(11): 2327–2338
- Sadacca LA, Lamia KA, deLemos AS, et al. An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice [J]. Diabetologia, 2011, 54(1): 120–124
- Stamenkovic JA, Olsson AH, Nagorny CL, et al. Regulation of core clock genes in human islets [J]. Metabolism, 2012, 61(7): 978–985
- Donga E, van Dijk M, van Dijk JG, et al. Partial sleep restriction decreases insulin sensitivity in type 1 diabetes [J]. Diabetes Care, 2010, 33(7): 1573–1577
- Coomans CP, van den Berg SA, Houben T, et al. Detrimental effects of constant light exposure and high – fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity [J]. FASEB J, 2013, 27(4): 1721–1732
- Qian J, Block GD, Colwell CS, et al. Consequences of exposure to light at night on the pancreatic islet circadian clock and function in rats [J]. Diabetes, 2013, 62(10): 3469–3478
- Gale JE, Cox HI, Qian J, et al. Disruption of circadian rhythms accelerates development of diabetes through pancreatic beta – cell loss and dysfunction [J]. J Biol Rhythms, 2011, 26(5): 423–433

(收稿日期:2015–10–13)

(修回日期:2015–10–20)