

研究论文

腺病毒过表达TXNIP抑制INS-1胰岛 β 细胞增殖

曹竹杰, 冯艳金, 李丹, 王瑾, 霍海燕, 张许梅, 焦向英*

山西医科大学生理学系, 细胞生理学省部共建教育部重点实验室, 太原 030001

摘要: 糖尿病可以引起硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin interaction protein, TXNIP)表达增加, 而TXNIP可以结合内源性硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)并抑制其活性。本研究旨在探讨TXNIP对INS-1胰岛 β 细胞增殖的影响及机制。构建TXNIP过表达(Ad-TXNIP-GFP)和半胱氨酸247位点突变的TXNIP过表达(Ad-TXNIPc247s-GFP)腺病毒载体并感染INS-1细胞, 用EdU法和Ki67法检测细胞增殖, 用Western blot检测ERK和AKT蛋白磷酸化水平。结果显示, TXNIP和TXNIPc247s(不能与Trx特异性结合并抑制其活性)蛋白过表达均显著抑制INS-1细胞增殖, 且TXNIP过表达细胞增殖的受抑制程度大于TXNIPc247s过表达细胞。另外, TXNIP和TXNIPc247s过表达均抑制INS-1细胞ERK和AKT的磷酸化。以上结果提示, TXNIP过表达可能通过Trx依赖途径以及非Trx依赖途径抑制ERK和AKT的磷酸化, 进而抑制INS-1细胞增殖。

关键词: 腺病毒; 硫氧还蛋白相互作用蛋白; INS-1细胞; 细胞增殖; ERK; AKT**中图分类号:** R332; R363.2; R329.2Adenovirus-mediated overexpression of thioredoxin interaction protein inhibits INS-1 islet β cell proliferation

CAO Zhu-Jie, FENG Yan-Jin, LI Dan, WANG Jin, HUO Hai-Yan, ZHANG Xu-Mei, JIAO Xiang-Ying*

Department of Physiology, Key Laboratory for Cellular Physiology of Ministry of Education, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: Diabetes can cause a significant increase in the expression of thioredoxin (Trx)-interacting protein (TXNIP), which binds to Trx and inhibits its activity. The present study was aimed to investigate the effect of TXNIP on proliferation of rat INS-1 islet β cells and the underlying mechanism. TXNIP overexpressing adenovirus vectors (Ad-TXNIP-GFP and Ad-TXNIPc247s-GFP) were constructed and used to infect INS-1 cells. Ad-TXNIPc247s-GFP vector carries a mutant C247S TXNIP gene, and its expression product (TXNIPc247s) cannot attach and inhibit Trx activity. The expression of TXNIP was detected by real-time PCR and Western blot. EdU and Ki67 methods were used to detect cell proliferation. Protein phosphorylation levels of ERK and AKT were detected by Western blot. The results showed that both TXNIP and TXNIPc247s protein overexpressions inhibited the proliferation of INS-1 cells, and the former's inhibitory effect was greater. Moreover, both of the two kinds of overexpressions inhibited the phosphorylation of ERK and AKT. These results suggest that TXNIP overexpression may inhibit the proliferation of INS-1 cells through Trx-dependent and non-Trx-dependent pathways, and the mechanism involves the inhibition of ERK and AKT phosphorylation.

Key words: adenovirus; thioredoxin-interacting protein; INS-1 cell; cell proliferation; ERK; AKT

随着发病率的迅速提高, 糖尿病已成为危害人类健康的最主要疾病之一, 而胰岛 β 细胞的损伤凋亡及功能异常是导致糖尿病发病的主要原因^[1]。因此, 抑制胰岛 β 细胞的损伤凋亡并促进其增殖成为

Received 2017-07-30 Accepted 2017-09-13

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30800399) and the Key Laboratory Construction Project of Shanxi Province, China (No. 2014011049-12).

*Corresponding author. Tel: +86-351-4135766; E-mail: jiaoxyty@163.com

治疗糖尿病的关键。已有研究证实,在糖尿病的发病过程中,胰岛β细胞中硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin interacting protein, TXNIP)的表达显著上升^[2],而TXNIP是目前唯一已知的可以内源性结合硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)并抑制其活性的物质^[3]。TXNIP通过抑制Trx系统的功能而发挥介导氧化应激、抑制细胞增殖及诱导细胞凋亡等作用^[4]。此外,已有研究证实TXNIP还存在非依赖Trx系统的作用机制^[5]。可见,糖尿病引起的TXNIP上调与胰岛β细胞的凋亡和增殖变化存在密切关系。目前已有研究证实, TXNIP的上调可以引起胰岛β细胞的凋亡^[6],但是TXNIP与胰岛β细胞增殖的关系尚不明确。本研究利用腺病毒作为载体,构建INS-1胰岛β细胞TXNIP过表达模型以模拟糖尿病引起的TXNIP表达上调,同时将TXNIP的半胱氨酸247位点突变,使TXNIP不能与Trx特异性结合,从而从依赖和非依赖Trx系统两方面去研究TXNIP对INS-1胰岛β细胞增殖的影响,以期明确糖尿病引起的TXNIP表达上调对胰岛β细胞增殖的影响及作用机制,为治疗糖尿病寻找新的作用靶点。

1 材料和方法

1.1 主要材料 大鼠INS-1胰岛β细胞购自中国医学科学院基础研究所协和细胞库。腺病毒载体:pAV(Exp)-CMV-GFP,载体编号:VB150925-10024,滴度 3.32×10^{10} PFU/mL; pAV(Exp)-CMV-rTXNIP(NM_001008767.1):T2A:GFP,载体编号:VB161021-1075spr,滴度 6.34×10^{10} PFU/mL; pAV(Exp)-CMV-rTxnip(NM_001008767.1)*(ns):T2A:GFP,载体编号:VB161021-1076nmt,滴度 1.26×10^{11} PFU/mL,由广州赛业生物公司包装完成。

1.2 主要试剂 RPMI 1640培养基购自Hyclone公司,胎牛血清购自北京全式金生物科技有限公司,BCA蛋白浓度测定试剂盒购自武汉博士德生物公司, RNA提取试剂盒(Code No. 9109)购自TAKARA公司, EdU试剂盒(c10634)购自Thermo Fisher公司,兔抗大鼠TXNIP抗体(ab86983)、兔抗大鼠Ki67抗体(ab15580)购自Abcam公司,兔抗大鼠β-actin抗体(#4970)、兔抗大鼠ERK1/2抗体(#9102)、兔抗大鼠P-ERK1/2抗体(#9101)、兔抗大鼠AKT抗体(#9272)、兔抗大鼠P-AKT抗体(#9271)、兔抗大鼠β-Catenin抗体(#9562)、兔抗大鼠P-β-Catenin

抗体(#9567)、AKT磷酸化抑制剂Perifosine(#14240)、ERK磷酸化抑制剂PD98059(#9900)均购自Cell Signaling Technology公司。

1.3 主要仪器 二氧化碳培养箱(Heal Force HF90),上海利康公司; SW-CJ-2FD超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司; IX73荧光倒置显微镜,日本OLYMPUS公司; MX3005P real-time PCR仪,美国STRATAGEN公司; 酶标仪,美国Molecular Devices公司; 高速离心机,美国Thermo Fisher公司; 立式超低温冰箱,美国New Brunswick Scientific公司; 超纯水机,上海Heal Force公司; JY92-2D超声波细胞粉碎机,宁波新芝科器研究所; 电泳仪,上海天能公司; 半干转印槽,美国BIO-RAD公司; Fluorchem HD2型化学发光仪,美国Protein Simple公司; MLS-3780型高压蒸汽灭菌器,日本SANYO公司; FACS-Calibur型流式细胞仪,美国BD公司。

1.4 INS-1细胞的培养 从-80℃冰箱中取出细胞冻存管,迅速放入37℃水浴锅,水浴1 min。使用吸管将冻存液移入10 mL离心管中,加入3 mL含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的RPMI 1640培养基(完全培养基),4℃、1 000 r/min离心5 min。弃上清液,加入4 mL完全培养基,轻轻吹打混匀后移入T25培养瓶,放入37℃、含5% CO₂的培养箱中培养。24 h后观察细胞状态并更换培养基。待细胞贴壁生长到瓶底的80%时,进行传代或者实验处理。

1.5 腺病毒感染INS-1细胞 选取贴壁生长到瓶底80%以上且状态良好的INS-1细胞,倒掉瓶内的旧培养基,用PBS洗3次。经细胞计数, T25培养瓶INS-1细胞贴壁长到80%时细胞数约为 2×10^6 ,按照感染复数(multiplicity of infection, MOI) = 25、50、75、100,根据病毒滴度,分别计算出各组所加的病毒液体积。取各组所需的病毒量分别加入到1 mL RPMI 1640培养基中混匀。Normal组直接加入1 mL RPMI 1640培养基。Ad-GFP组、Ad-TXNIP-GFP组和Ad-TXNIPc247s-GFP组分别加入pAV(Exp)-CMV-GFP、pAV(Exp)-CMV-rTXNIP(NM_001008767.1):T2A:GFP和pAV(Exp)-CMV-rTxnip(NM_001008767.1)*(ns):T2A:GFP病毒液。腺病毒感染4 h后,弃去含腺病毒的培养基, PBS洗3次,各组加入4 mL完全培养基分别培养24、48和72 h。收集细胞于10 mL离心管中,流式细胞术检测不同感染复数和不同作用时间下GFP的阳性率以及GFP

的平均荧光强度, 确定最适感染复数和作用时间。经检测最适感染复数为 75, 腺病毒最佳作用时间为 48 h, 并以此条件进行后续实验模型的建立。

1.6 Real-time PCR 检测 TXNIP mRNA 表达水平

RNA 的提取: 腺病毒感染 48 h 后, 用不含 EDTA 的胰酶消化, 加入 PBS 终止消化, 并且移入 10 mL 离心管。4 °C、2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重复两次。得到细胞沉淀后, 加入 RNAiso Plus, 并且按照试剂盒说明书进行 RNA 的提取操作。cDNA 合成: 以高压纯水作为本底, 分别检测各组在 260 和 280 nm 处的 OD 值。 $R = (OD_{260} - OD_{260 \text{ 本底}}) / (OD_{280} - OD_{280 \text{ 本底}})$, 当 R 值在 1.8~2.2 范围时样品可用。 $RNA \text{ 浓度} = (OD_{260} - OD_{260 \text{ 本底}}) \times 40 \times 100 / 1\ 000 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 根据 RNA 浓度配制反应体系: 5 × PrimeScript buffer 400 μL, RNA 溶液 1 mL, RNase free dH₂O 1 mL。微型离心机混匀, 按 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 1 h 反应条件进行反转录。RT-PCR 检测 mRNA 的表达: TXNIP: 上游引物: 3'-AGTGATTGGCAGGAGGTC-5', 下游引物: 3'-GGTGTCTGGGATGTTTAGG-5'; GAPDH: 上游引物: 3'-ATGGTGAAGGTCGGTGTG-5', 下游引物: 3'-AATCCGCCGTGGGTAGAG-5'。八排管中加入 PCR 上游引物 1 μL, PCR 下游引物 1 μL, dH₂O 8.5 μL, cDNA 模板 2 μL, SYBR Premi×ExTaq2 12.5 μL。离心机混匀, 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环。熔解曲线分析条件: 95 °C 1 min, 55 °C 30 s, 95 °C 30 s。将前 3~12 个循环所收集的荧光信号的标准差的 10 倍设置为荧光阈值, 记录达到荧光阈值时各组的 Ct 值, 并用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组 mRNA 相对表达量。

1.7 Western blot 检测 TXNIP、AKT、P-AKT、ERK、P-ERK、β-Catenin、P-β-Catenin 和 Ki67 蛋白表达水平

蛋白质的提取: 腺病毒感染 48 h 后, 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 加入 PBS 终止消化, 移入 10 mL 离心管中, 4 °C、4 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。向细胞沉淀中加入 80 μL 裂解液, 1 μL PMSF, 1 μL 广谱磷酸酶抑制剂, 轻轻吹打成悬液, 迅速进行超声破碎, 每个样本破碎 3 次, 每次 5 s, 4 °C 裂解 3 h。

BCA 法测蛋白浓度: 制备标准曲线, 配制 BCA 工作液 (A:B = 50:1), 将标准品和稀释后的待测样本各 25 μL 加入 96 孔板中, 每孔滴加 200 μL BCA 工作液, 37 °C 孵育 30 min, 然后用酶标仪检

测样本 562 nm 处的 OD 值, 根据标准曲线计算蛋白浓度, 根据上样量计算所需蛋白样本的体积, 剩余体积用裂解液补齐。在蛋白煮沸机上煮沸 5 min, 使蛋白变性, 然后使蛋白样本冷却至室温。

Western blot 实验流程: 配制 12% 或者 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 倒入电泳液, 轻轻拔出梳子, 按照每孔上样体积 15 μL 上样, 首端孔加入 5 μL Marker。80 V 电压开始电泳, 当蛋白样本跑至分离胶与浓缩胶的分界线时, 更换 120 V 电压至结束电泳。剪裁 PVDF 膜至适当大小, 制备滤纸-胶-膜-滤纸的结构, 使用半干转膜仪 15 V 转膜, 转膜时间根据不同蛋白的分子量决定。TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 5% BSA 室温封闭 2 h 后, 继续用 TBST 洗膜, 4 °C 一抗孵育过夜, 其中一抗的稀释浓度为 TXNIP (1:500)、AKT (1:1 000)、P-AKT (1:500)、ERK (1:1 000)、P-ERK (1:500)、β-Catenin (1:1 000)、P-β-Catenin (1:1 000) 和 Ki67 (1:500)。次日, 回收一抗, TBST 洗膜后, 室温二抗孵育 2 h。TBS 洗膜 3 次, 每次 5 min, 将膜置于曝光机上, 滴加发光液后曝光, 分析条带灰度值, β-actin 作为内参蛋白。

1.8 EdU 法检测细胞增殖 EdU 是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 其连有的炔基基团在天然化合物中很少见, 能够在 DNA 复制时期代替胸腺嘧啶渗入正在合成的 DNA 分子中, 基于荧光染料与 EdU 的特异性反应即可直接并准确地检测出 DNA 复制活性。腺病毒感染 48 h 后, 按照试剂盒说明书提示, 将 EdU 与完全培养基混匀制备成混合液, 在培养箱中孵育细胞 3 h。然后用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞至 10 mL 离心管中, 4 °C、1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 流式细胞术检测细胞 EdU 阳性率。

1.9 Ki67 法检测细胞增殖 Ki67 蛋白是一种定位于细胞核的增殖相关蛋白, 从 G1 后期开始出现, 在 S 期和 G2 期逐渐升高, M 期达到高峰, 有丝分裂结束后迅速消失。因此 Ki67 蛋白水平可反映细胞增殖情况。腺病毒感染 48 h 后, 用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞至 10 mL 离心管中, 4 °C、1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 轻轻摇匀细胞沉淀。80% 甲醇固定 5 min, PBS 终止固定, 4 °C、1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 摇匀细胞后用 1 mL 0.5% Triton X-100 破膜 50 s。用 PBS 终止破膜, 4 °C、1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 摇匀细胞。加入抗 Ki67 抗体, 室温作用 2 h, 再加入对应二抗, 室温作用 1 h 后, 用流式细胞术检测 Ki67 阳性率。

1.10 统计分析数据 数据用 mean ± SD 表示, 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 统计图使用 Prism GraphPad 软件绘制, 组间比较用单因素方差分析或 *t* 检验, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 INS-1细胞的最佳腺病毒感染条件

由于细胞感染腺病毒后会表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP), 我们通过流式细胞术分别检测了不同腺病毒感染时间和感染复数下 GFP 的阳性率和 GFP 平均荧光强度, 以确定最佳腺病毒感染条件。结果显示, 当感染时间为 48 h (图 1A、C)、感染复数为 75 时 (图 1B、D), Ad-GFP 组 GFP 的阳性率和平均荧光强度均显著高于其他感染时间或感染复数条件下 Ad-GFP 组。我们以此为 INS-1 细胞的最佳腺病毒感染条件进行后续实验。

2.2 INS-1细胞感染腺病毒后TXNIP mRNA表达明显提高

Real-time PCR 结果显示, Normal 组和 Ad-GFP 组的 TXNIP mRNA 表达之间无明显差异, 而 Ad-TXNIP-GFP 组和 Ad-TXNIPc247s-GFP 组的 TXNIP mRNA 表达水平均显著高于 Normal 组 (图 2A)(均 $P < 0.01$)。Western blot 检测结果显示, Normal 组与 Ad-GFP 组中 TXNIP 蛋白水平之间无明显差异, 而 Ad-TXNIP-GFP 组和 Ad-TXNIPc247s-GFP 组中 TXNIP 蛋白表达均显著高于 Normal 组 (图 2B)(均 $P < 0.05$)。以上结果表明, 腺病毒载体构建成功, TXNIP 过表达模型建立符合研究要求。

2.3 TXNIP过表达后可以从Trx依赖和非Trx依赖两种途径抑制INS-1细胞增殖

EdU 检测结果显示, 与 Normal 组相比, Ad-GFP 组的增殖情况无明显差异, Ad-TXNIP-GFP 组

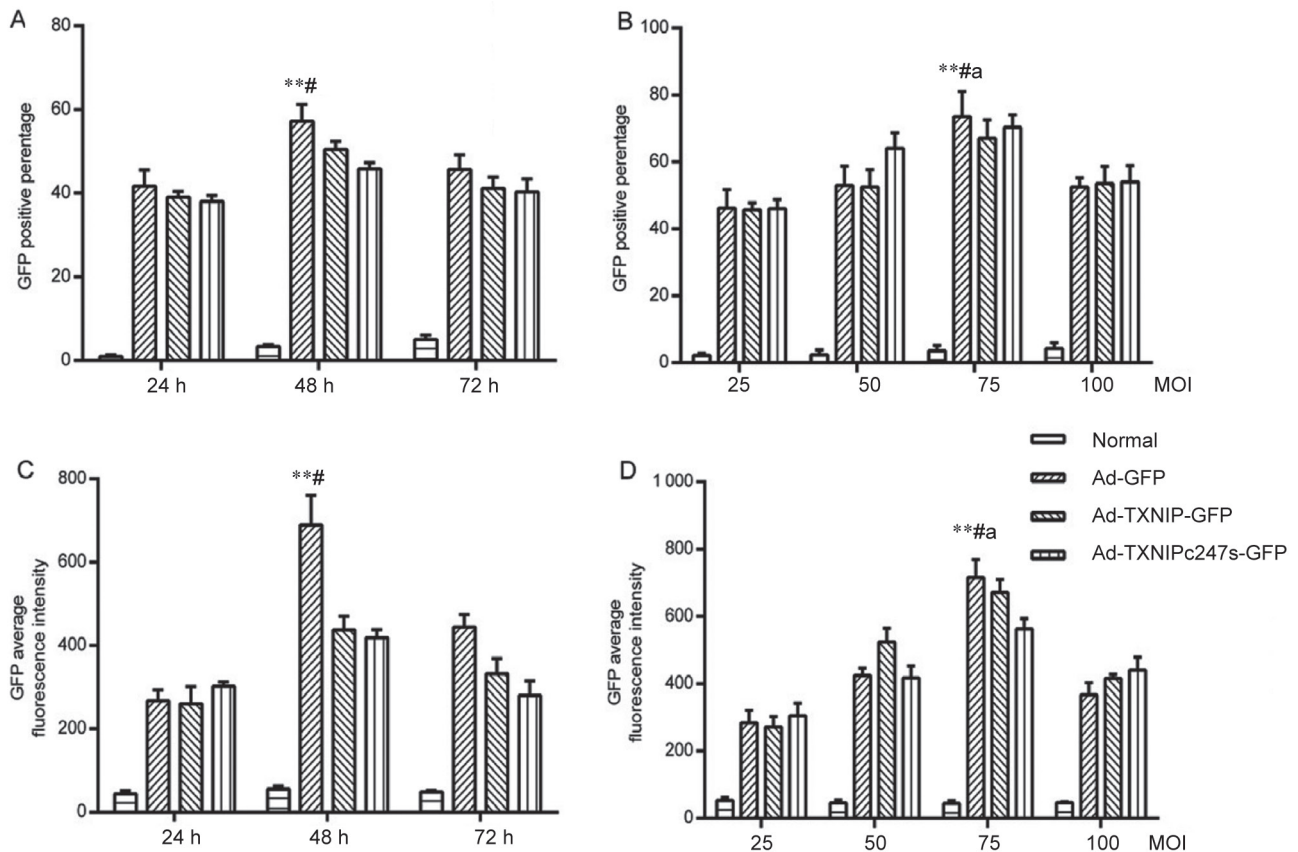


图 1. INS-1细胞的最佳腺病毒感染条件

Fig. 1. Optimal conditions for adenovirus infection in INS-1 cells. A, C: Positive rate (A) and mean fluorescence intensity (C) of green fluorescent protein (GFP) at different time points detected by flow cytometry. Mean ± SD, $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs Ad-GFP (24 h); # $P < 0.05$ vs Ad-GFP (72 h). B, D: Positive rate (B) and mean fluorescence intensity (D) of GFP with different multiplicity of infection (MOI) detected by flow cytometry. Mean ± SD, $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs Ad-GFP (25); # $P < 0.05$ vs Ad-GFP (50); ^a $P < 0.05$ vs Ad-GFP (100).

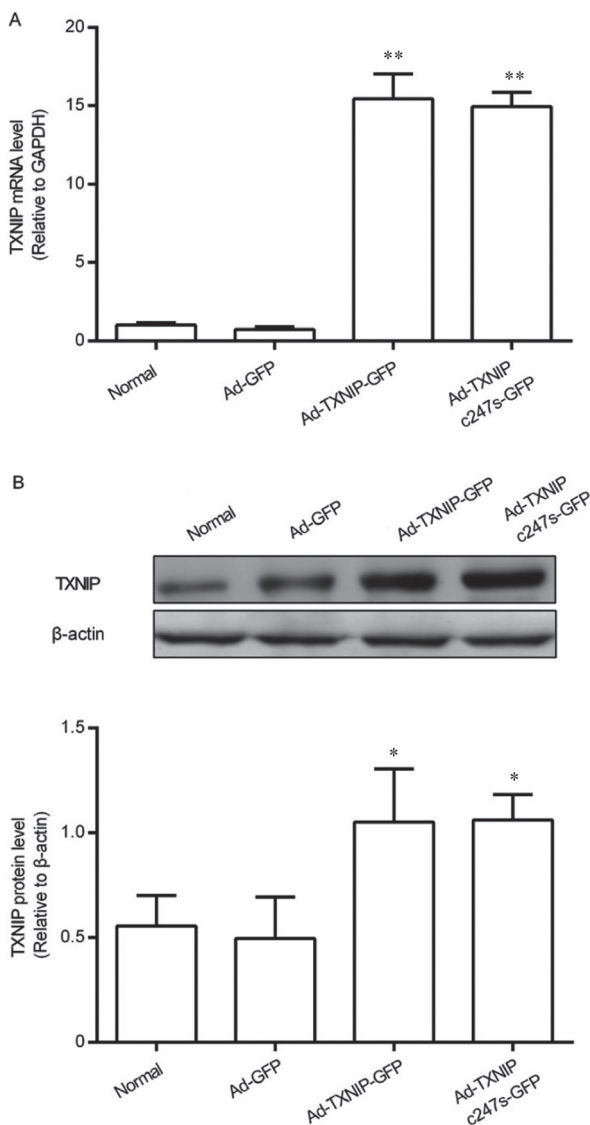


图 2. INS-1细胞感染腺病毒后的TXNIP表达

Fig. 2. The expression of TXNIP in INS-1 cells after adenovirus infection. A: TXNIP mRNA expression detected by real-time PCR. B: TXNIP protein expression detected by Western blot. Mean \pm SD, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Normal.

和 Ad-TXNIPc247s-GFP 组细胞增殖显著降低 (均 $P < 0.05$), 且 Ad-TXNIP-GFP 组细胞增殖的受抑制程度要高于 Ad-TXNIPc247s-GFP 组 ($P < 0.05$) (图 3A)。Ki67 检测结果显示, 和 Normal 组相比, Ad-GFP 组增殖情况无明显差异, Ad-TXNIP-GFP 组和 Ad-TXNIPc247s-GFP 组细胞增殖显著降低 (均 $P < 0.05$), 且 Ad-TXNIP-GFP 组细胞增殖的受抑制程度要高于 Ad-TXNIPc247s-GFP 组 ($P < 0.05$) (图 3B)。以上结果表明, TXNIP 过表达后, 其通过 Trx 依赖途径 (Ad-TXNIP-GFP) 和非 Trx 依赖途径 (Ad-TX-

NIPc247s-GFP) 都可抑制 INS-1 细胞增殖, 且 Trx 依赖途径对细胞增殖的抑制程度高于非 Trx 依赖途径。

2.4 TXNIP通过Trx依赖和非Trx依赖两种途径抑制AKT、ERK的磷酸化

Western blot 检测结果显示, 与 Normal 组相比, Ad-GFP 组各蛋白表达无明显差异, Ad-TXNIP-GFP 组和 Ad-TXNIPc247s-GFP 组 AKT 和 ERK 的磷酸化蛋白水平均显著下调 (图 4, $P < 0.05$)。检测结果显示 (图 4D) 四组 β -catenin 磷酸化蛋白水平之间无明显差异。该结果表明, TXNIP 通过 Trx 依赖途径和非 Trx 依赖途径都可以抑制 AKT 和 ERK 的磷酸化。

2.5 抑制AKT和ERK的磷酸化可以抑制INS-1细胞的增殖

为了确定 ERK、AKT 与 INS-1 细胞增殖间的关系, 我们在腺病毒感染前 20 min 向 Normal 组和 Ad-GFP 组中分别加入了 10 μ mol/L AKT 磷酸化抑制剂 Perifosine 和 20 μ mol/L ERK 磷酸化抑制剂 PD98059, 作用 20 min 后将含有抑制剂的培养基用 PBS 洗去, 然后进行正常的腺病毒感染。Western blot 检测结果显示 (图 5A), 与 Normal 组相比, Ad-GFP 组无明显差异, Normal+Perifosine 组、Ad-GFP+Perifosine 组、Ad-TXNIP-GFP 组、Ad-TXNIPc247s-GFP 组的 AKT 磷酸化水平和 Ki67 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 且 Ad-TXNIP-GFP 组 Ki67 的表达下调程度高于 Ad-TXNIPc247s-GFP 组。

与 Normal 组相比, Normal+PD98059 组、Ad-GFP+PD98059 组、Ad-TXNIP-GFP 组、Ad-TXNIPc247s-GFP 组的 ERK 磷酸化和 Ki67 蛋白表达也受到了明显的抑制 (图 5B, $P < 0.05$), 而这四组间无明显差异。

3 讨论

Trx 的分子量约为 12 kDa, 是在人体、动物、植物和微生物中广泛分布的一种小分子量的蛋白质^[7]。Trx 是一种还原酶, 在维持蛋白质的还原状态中发挥着重要的作用, 通过其活性中心将氧化状态的蛋白质还原, 同时自身被氧化, 被 Trx 还原酶和 NADPH 还原后继续发挥作用^[8]。众多研究表明, Trx 对细胞氧化还原调节和抵御氧化应激有着重要的意义。TXNIP 作为目前唯一已知的与 Trx 内源性结合的抑制蛋白质, 通过抑制 Trx 活性发挥介导作用。有研究表明当 TXNIP 高表达或过表达时,

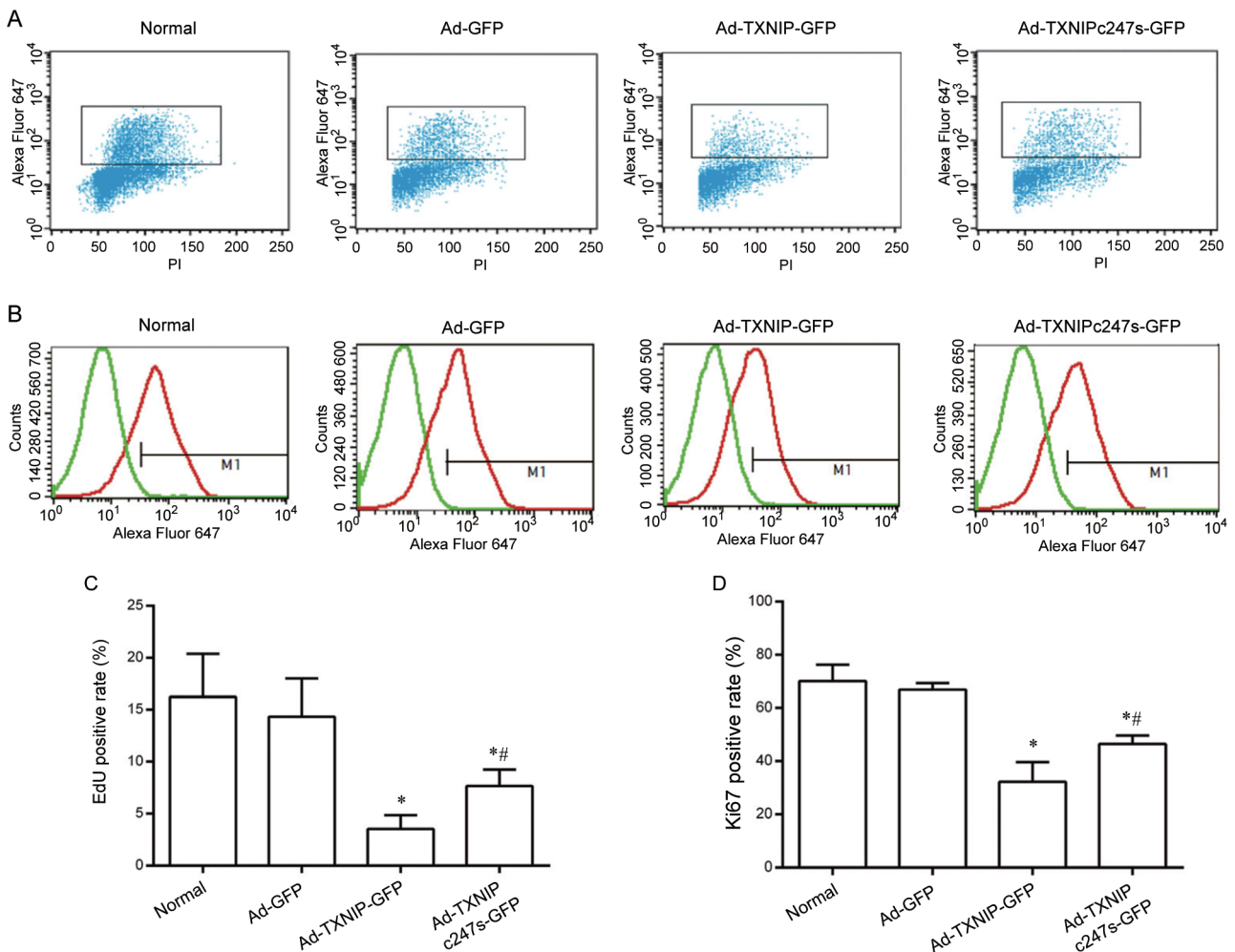


图 3. TXNIP过表达后可以从依赖Trx和非依赖Trx两种途径抑制INS-1细胞增殖

Fig. 3. TXNIP overexpression can inhibit INS-1 cell proliferation through both Trx-dependent and non-Trx-dependent pathways. A, C: Proliferation of INS-1 cells detected by EdU method after 48 h of adenovirus infection. B, D: Proliferation of INS-1 cells detected by Ki67 method after 48 h of adenovirus infection. Mean \pm SD, $n = 6$. * $P < 0.05$ vs Normal; # $P < 0.05$ vs Ad-TXNIP-GFP.

Trx 的蛋白活性减少近 50%^[9]。TXNIP 过表达可以引起成纤维细胞内自由基增加而对细胞造成自由基损伤^[3]。TXNIP 促进细胞凋亡作用也与 TXNIP 和 Trx 结合有关，TXNIP 和细胞凋亡信号调节激酶 1 (apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1) 都与 Trx 第 32 位的半胱氨酸结合，从而形成竞争性结合并相互抑制的关系。因此 TXNIP 上调也可妨碍 Trx 与 ASK1 的结合，促进 ASK1 与 Trx 解离，ASK1 解离后发生磷酸化而活化，引起线粒体细胞色素 c 的释放，激活 caspase-9 等凋亡相关途径，从而导致细胞凋亡的发生^[10]。

除了介导细胞凋亡损伤外，TXNIP 与细胞增殖也存在密切的联系。在乳腺癌细胞中，Myc 可降低 TXNIP 的表达，从而阻断 TXNIP 对细胞葡萄糖摄

取的抑制作用，加速细胞新陈代谢，使乳腺癌细胞的增殖速度加快^[11]；在黑色素瘤细胞中，TXNIP 过表达可有效降低细胞的存活率，抑制黑色素瘤的发展^[12]。在肺癌细胞中，D-allose 具有抑制癌症的作用，而这种作用的实现主要是通过上调 TXNIP 的表达实现^[13]。可见在肿瘤细胞中，TXNIP 一般扮演抑制肿瘤细胞增殖的角色，这种作用有利于肿瘤治疗。而在一般细胞中，TXNIP 与细胞增殖的关系虽有报道，但是数量较少。TXNIP 表达下调可抑制血管内皮生长因子和适度的高糖介导的视网膜血管再生作用，抑制血管内皮细胞的增殖^[14]。在血管平滑肌细胞中，TXNIP 可以通过特异性结合抑制 Trx 从而抑制血管平滑肌细胞的增殖^[15]。TXNIP 与胰岛 β 细胞增殖的关系尚不明确，根据现有为数不

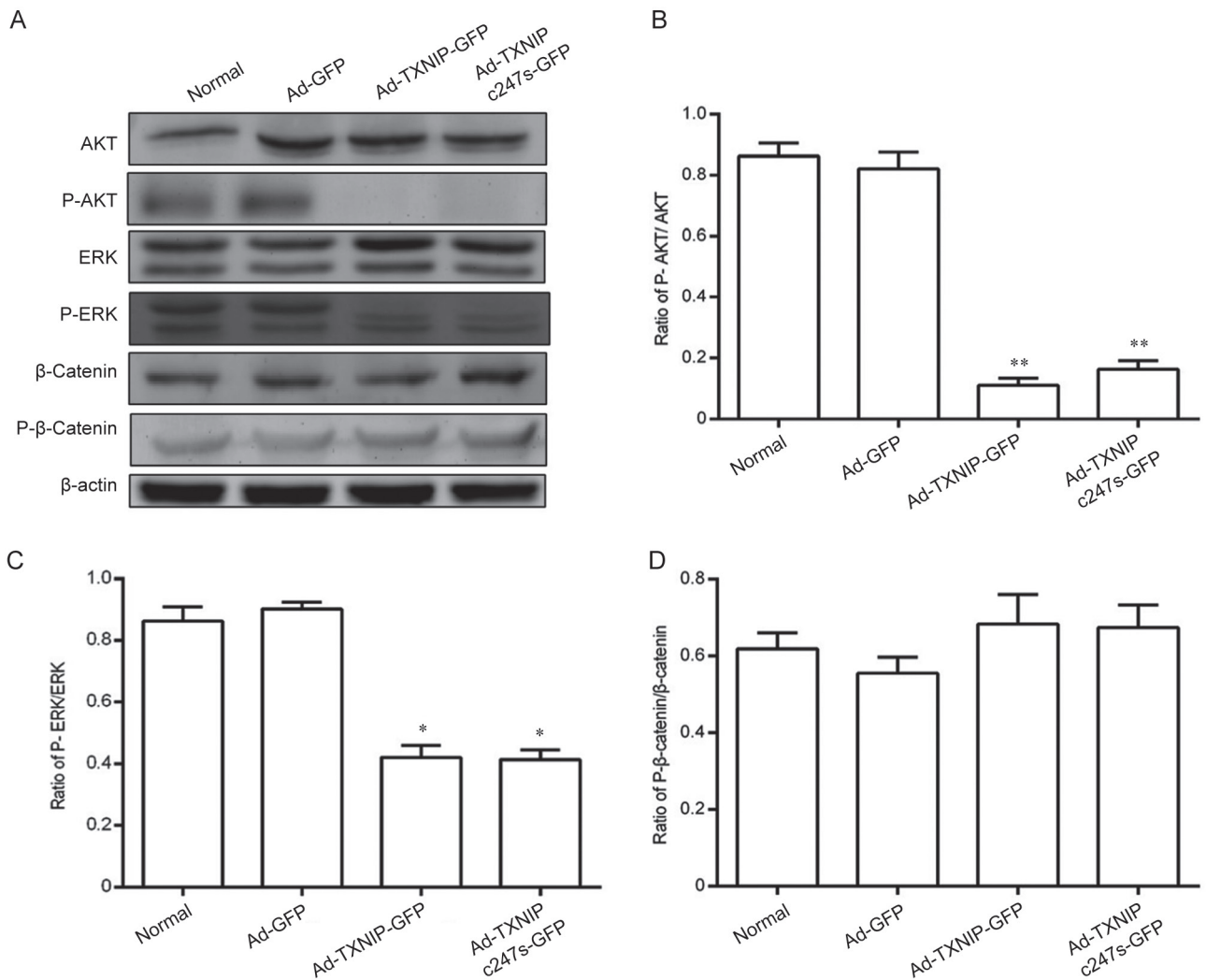


图 4. TXNIP通过Trx依赖和非Trx依赖两种途径抑制AKT、ERK的磷酸化

Fig. 4. TXNIP can inhibit the phosphorylation of AKT and ERK through both Trx-dependent and non-Trx-dependent pathways. *A*: Results of Western blot. *B*: Ratio of phosphorylated AKT/total AKT. *C*: Ratio of phosphorylated ERK/total ERK. *D*: Ratio of phosphorylated β-catenin/total β-catenin. Mean ± SD, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Normal.

多的报道来看, TXNIP 的上调对正常细胞增殖有抑制作用, 而本研究结果显示, 过表达的 TXNIP 抑制 INS-1 胰岛 β 细胞的增殖, 对细胞增殖也呈现了一种负性作用。

除了与 Trx 特异性结合后发挥作用外, 有研究表明 TXNIP 的作用还存在非 Trx 依赖的途径, 2009 年 Patwari 等的研究证明 TXNIP 在皮肤成纤维细胞中可以抑制葡萄糖的摄取, 而这种作用与 Trx 无关^[16]。在体外培养的脂肪细胞中, Chutkow 等使用 TXNIP 第 247 位半胱氨酸突变技术使得突变后的 TXNIP 不与 Trx 结合, 而突变后的 TXNIP 同样抑制了脂肪细胞对葡萄糖的摄取^[17]。以上研究表明,

在胰岛 β 细胞中存在 TXNIP 非 Trx 依赖的作用途径。为了研究这种途径对细胞增殖是否有作用, 本研究也采用了 TXNIP 第 247 位半胱氨酸突变技术, 结果显示, TXNIP 也可以通过非 Trx 依赖途径对胰岛 β 细胞的增殖产生抑制作用, 但是这种抑制作用小于 TXNIP 的 Trx 依赖途径。这可能是因为 TXNIP 作用的主要机制还是要通过抑制 Trx 的活性来实现, 而其本身的作用能力有限, 更为具体的机制还有待进一步研究。

在明确了 TXNIP 可以通过 Trx 依赖和非 Trx 依赖两种途径抑制胰岛 β 细胞增殖后, 我们继续探究了其背后可能的通路机制。已有研究显示, AKT 信

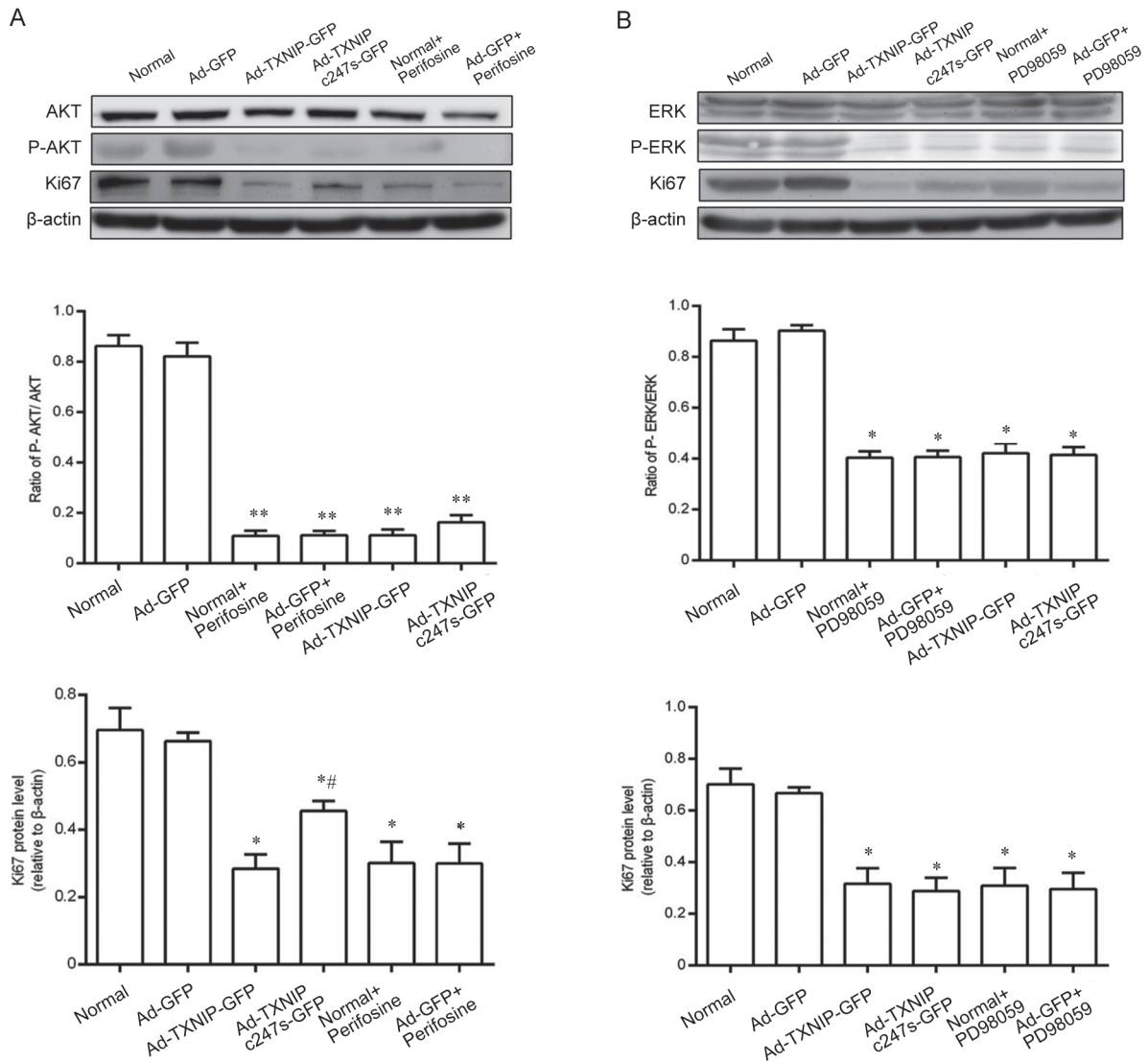


图 5. AKT、ERK 磷酸化水平的下调可以抑制INS-1细胞的增殖

Fig. 5. Inhibition of ERK and AKT phosphorylation can inhibit INS-1 cell proliferation. *A*: Ratio of P-AKT/AKT and Ki67 expression detected by Western blot. *B*: Ratio of P-ERK/ERK and Ki67 expression detected by Western blot. Mean \pm SD, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Normal; # $P < 0.05$ vs Ad-TXNIP-GFP.

号通路与胰岛β细胞增殖有密切的关系，β细胞中糖原合成激酶3β (glycogen synthase kinase-3β, GSK3β) 是 AKT 信号通路的靶点，AKT 可以通过磷酸化 GSK3β，抑制其及酶活性，阻止 cycling Ds 的降解，促进细胞增殖^[18]。同时 AKT 对细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子如 P21 等有负调节作用，从而促进细胞增殖^[19]。ERK1/2 信号通路在细胞增殖分化中也扮演了重要的角色，正常情况下 ERK1/2 位于细胞质内，受高糖和各种生长因子等因素刺激后发生磷酸化从而被激活，然后进入细胞核并作用于 NF-κB、ATF 等转录因子，从而促进基因表达，参与细

胞增殖^[20]。Wnt/β-catenin 通路在调控β细胞的增殖和存活方面也具有重要作用，在β细胞系或小鼠胰岛中激活 Wnt/β-catenin 通路可上调细胞周期蛋白 D1 和 D2 的表达，同时伴随β细胞增殖能力的提高^[21]。这些研究结果提示，在 TXNIP 通过两种途径抑制胰岛β细胞增殖时，可能通过抑制这些细胞通路发挥作用。本研究结果显示，TXNIP 依赖和非依赖 Trx 途径都可以通过抑制 AKT 和 ERK 通路来抑制胰岛β细胞增殖，而β-catenin 并没有参与到其中。另外，TXNIP 依赖和非依赖 Trx 途径对 AKT 和 ERK 通路的抑制作用之间没有统计学差异，而

本研究结果已经证明这两种途径对胰岛 β 细胞增殖的抑制效果是存在强弱差异的, 这提示可能还存在其他的抑制增殖相关机制, 具体是哪些机制还有待进一步研究。

综上所述, 本研究明确了 TXNIP 表达上调可抑制胰岛 β 细胞增殖, 这种抑制作用存在 Trx 依赖途径和非 Trx 依赖途径, 这两种途径都可通过抑制 AKT 和 ERK 通路发挥抑制胰岛 β 细胞增殖作用。本研究填补了 TXNIP 对胰岛 β 细胞增殖作用的研究空白, 为糖尿病的治疗提供了新靶点, 新思路, 但是更为具体的通路机制和上下游关系还有待进一步研究。

参考文献

- Diamant AL, Babey SH, Hastert TA, Brown ER. Diabetes: the growing epidemic. Policy Brief UCLA Cent Health Policy Res 2007; (PB2007-9): 1–12.
- Shalev A, Pise-Masison CA, Radonovich M, Hoffmann SC, Hirshberg B, Brady JN, Harlan DM. Oligonucleotide microarray analysis of intact human pancreatic islets: identification of glucose-responsive genes and a highly regulated TGF beta signaling pathway. *Endocrinology* 2002; 143(9): 3695–3698.
- Schulze PC, Yoshioka J, Takahashi T, He Z, King GL, Lee RT. Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem* 2004; 279(29): 30369–30374.
- Patwari P, Higgins LJ, Chutkow WA, Yoshioka J, Lee RT. The interaction of thioredoxin with Txnip. Evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange. *J Biol Chem* 2006; 281(31): 21884–21891
- Alvarez CE. On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evol Biol* 2008; 8(7): 222.
- Klöppel G, Löhr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res* 1985; 4(2): 110–125.
- Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 351–369.
- World CJ, Yamawaki H, Berk BC. Thioredoxin in the cardiovascular system. *J Mol Med (Berl)* 2006; 84(12): 997–1003.
- Kim SY, Suh HW, Chung JW, Yoon SR, Choi I. Diverse functions of VDUP1 in cell proliferation, differentiation, and diseases. *Cell Mol Immunol* 2007; 4: 345–351.
- Zhou J, Chng WJ. Roles of thioredoxin binding protein (TXNIP) in oxidative stress, apoptosis and cancer. *Mitochondrion* 2013; 13(3): 163–169.
- Nie W, Huang W, Zhang W, Xu J, Song W, Wang Y, Zhu A, Luo J, Huang G, Wang Y, Guan X. TXNIP interaction with the Her-1/2 pathway contributes to overall survival in breast cancer. *Oncotarget* 2015; 6(5): 3003–3012
- Song H, Cho D, Jeon JH, Han SH, Hur DY, Kim YS, Choi I. Vitamin D(3) up-regulating protein 1 (VDUP1) antisense DNA regulates tumorigenicity and melanogenesis of murine melanoma cells via regulating the expression of fas ligand and reactive oxygen species. *Immunol Lett* 2003; 86(3): 235–247.
- Kanaji N, Kamitori K, Hossain A, Noguchi C, Katagi A, Kadowaki N, Tokuda M. Additive antitumor effect of D-allose in combination with cisplatin in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 2018; 39(3): 1292–1298.
- Duan J, Du C, Shi Y, Liu D, Ma J. Thioredoxin-interacting protein deficiency ameliorates diabetic retinal angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2018; 94: 61–70.
- Schulze PC, De Keulenaer GW, Yoshioka J, Kassik KA, Lee RT. Vitamin D3-upregulated protein-1 (VDUP-1) regulates redox-dependent vascular smooth muscle cell proliferation through interaction with thioredoxin. *Circ Res* 2002; 91(8): 689–695.
- Patwari P, Chutkow WA, Cummings K, Verstraeten VL, Lammerding J, Schreiter ER, Lee RT. Thioredoxin-independent regulation of metabolism by the alpha-arrestin proteins. *J Biol Chem* 2009; 284(37): 24996–25003.
- Chutkow WA, Lee RT. Thioredoxin regulates adipogenesis through thioredoxin-interacting protein (Txnip) protein stability. *J Biol Chem* 2011; 286(33): 29139–29145.
- Liu Y, Tanabe K, Baronnier D, Patel S, Woodgett J, Cras-Méneur C, Permutt MA. Conditional ablation of Gsk-3 β in islet beta cells results in expanded mass and resistance to fat feeding-induced diabetes in mice. *Diabetologia* 2010; 53(12): 2600–2610.
- Velazquez-Garcia S, Valle S, Rosa TC, Takane KK, Demirci C, Alvarez-Perez JC, Mellado-Gil JM, Ernst S, Scott DK, Vasavada RC, Alonso LC, Garcia-Ocaña A. Activation of protein kinase C- ζ in pancreatic β -cells *in vivo* improves glucose tolerance and induces β -cell expansion via mTOR activation. *Diabetes* 2011; 60(10): 2546–2559.
- Ma LH (马莲环), Liu J. Research progress of ERK1/2. *Foreign Med Sci (国外医学)* 2005; 25(3): 279–282 (in Chinese).
- Liu Z, Habener JF. Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation. *J Biol Chem* 2008; 283(13): 8723–8735.