



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2021.05.017

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2021.05.017

· 临床研究 ·

肌醇依赖酶 1 α 调控下胰岛 β 细胞 凋亡和衰老的关系

张晓亮 汪雷 柏新乐

[摘要] **目的** 探讨肌醇依赖酶 1 α (IRE1 α) 信号通路调控的胰岛 β 细胞凋亡与衰老的关系。**方法** 取雄性野生型 C57BL/6 小鼠 50 只,另将胰岛 β 细胞特异性敲除 IRE1 α 的小鼠作为实验组 (IRE1 α -IKO),IRE1 α flox/flox 小鼠 (RIP cre 阴性) 作为对照组 (IRE1 α -WT),每组各 20 只。检测不同周龄 C57BL/6 小鼠随机血糖、IRE1 α 信号通路的激活水平及胰岛增殖/凋亡相关分子表达水平。检测不同周龄对照组、实验组小鼠的随机血糖及血清胰岛素水平、糖耐量和胰岛素耐量水平,采用蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测对照组、实验组 56 周龄小鼠胰岛中增殖和凋亡相关分子的表达水平。**结果** 随着周龄增加,野生型 C57BL/6 小鼠随机血糖水平、IRE1 α 磷酸化水平及 caspase 3 水平均增加,胰岛增殖相关分子胰腺十二指肠同源盒-1 (PDX-1) 和细胞周期素 D2 (cyclin D2) 表达水平降低 ($P < 0.05$)。随着周龄增加,实验组小鼠的随机血糖、胰岛素水平及糖耐量、胰岛素耐量较对照组明显改善 ($P < 0.05$)。高龄 (56 周龄) 实验组小鼠的 cyclin D2 表达水平较对照组明显增加, chop 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** IRE1 α 信号通路激活参与衰老引起胰岛 β 细胞凋亡增加、增殖减少的过程。

[关键词] 胰岛 β 细胞; 肌醇依赖酶 1 α 信号通路; 凋亡

[中图分类号] R587.1

[文献标识码] A

Relationship between pancreatic β -cell apoptosis and senescence under the regulation of inositol requiring enzyme-1 α

Zhang Xiaoliang, Wang Lei, Bai Xinle. Department of Respiratory and Endocrinology, the Sixth People's Hospital of Huizhou City, Guangdong Province, Huizhou 516000, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between apoptosis and senescence of islet β cells regulated by inositol requiring enzyme-1 α (IRE1 α) signaling pathway. **Methods** Fifty male wild-type C57BL/6 mice were selected. Twenty mice with islet β cell specific knockout IRE1 α were used as experimental group (IRE1 α -IKO), and 20 IRE1 α flox/flox mice (RIP cre negative) were used as control group (IRE1 α -WT). Random blood glucose, activation of IRE1 α pathway and expression levels of islet proliferation/apoptosis related molecules of different weeks C57BL/6 mice were measured. Furthermore, random blood glucose and plasma insulin levels, glucose tolerance and insulin tolerance of different weeks mice in control group and experimental group were detected. Expression levels of islet proliferation and apoptosis-related molecules of 56 weeks mice in control group and experimental group were detected by Western blotting. **Results** With the increase of age, random blood glucose level, the phosphorylation level of IRE1 α and the caspase3 level of wild-type C57BL/6 mice increased, the expression of pancreatic islet proliferation-related molecules pancreas duodenum homeobox factor-1 (PDX-1) and cyclin D2 decreased ($P < 0.05$). With the increase of age, the random blood glucose, insulin level, glucose tolerance and insulin tolerance of the experimental group were significantly improved compared with the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression level of cyclin D2 in the aged (56 weeks old) experimental group was significantly increased, and the expression of chop was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Activation of IRE1 α signaling pathway is involved in the process of increasing apoptosis and decreasing proliferation of islet β cells induced by aging.

[Key words] Islet β cell; Inositol requiring enzyme-1 α pathway; Apoptosis

随着我国社会的老龄化日益加剧,衰老及其相关疾病成为危害人类健康的重要疾病之一。流行病学调

查结果显示,中国成年人糖尿病的患病率随着年龄增加而同步升高,同时,高龄孕妇是妊娠期糖尿病的高危人群,表明衰老是糖尿病发病的危险因素^[1]。胰岛 β 细胞增殖是出生后维持胰岛 β 细胞数量稳态的主要

来源,胰岛 β 细胞数量的绝对或相对缺乏是糖尿病的基础病因^[2-3]。研究显示,小鼠及人类胰岛 β 细胞的增殖率在出生一段时间后逐渐降低,人类胰岛 β 细胞数量在成年后迅速下降,直到 60 岁以后下降幅度逐渐减小^[4-6]。不仅如此,胰岛 β 细胞在外界刺激作用下可代偿性增殖,而衰老胰岛 β 细胞虽然存在增殖潜能,但诱导增殖率很低^[7]。因此,阐明年龄影响胰岛 β 细胞增殖的机制、研究如何提高衰老胰岛 β 细胞增殖能力,对衰老引起的糖尿病具有重要意义。哺乳动物肝脏中的肌醇依赖酶 1α (IRE1 α) 作为细胞感应机体营养变化的感应分子,能激活 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 及 Caspase-12 介导内质网应激诱导的凋亡^[8]。有研究结果显示,抑制 IRE1 α 通路可减少胰岛细胞凋亡,但其在衰老影响胰岛 β 细胞增殖中的调控作用目前尚不明确^[9]。本研究通过检测不同周龄小鼠中 IRE1 α /JNK 信号通路的活性及胰岛细胞的增殖水平,旨在探究 IRE1 α 表达在衰老影响胰岛 β 细胞凋亡中的作用。

材料与方法

1. 材料:雄性野生型 C57BL/6 小鼠购自上海斯莱克实验动物中心;IRE1 α flox/flox 小鼠和胰岛 β 细胞特异性表达 (RIP cre) 的小鼠均由南京模式动物中心构建;小鼠 30 天断奶后均一直饲养在 SPF 级动物房中,可任意进食及饮水;动物房保持温度 (22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 (35 ± 4) %, 12 小时昼夜周期 (早晨 7 时亮灯);动物证号: SCXK (沪) 2018-002, 伦理审查受理号: 2018101023。胰岛素试剂盒购自 millipore 公司 (美国, 货号 EZRMI-13k); 血糖仪和血糖试纸购自雅培 (美国);蛋白酶抑制剂购自 Sigma-Aldrich 公司 (美国, 货号 s193-2)。磷酸化肌醇依赖酶 1α (p-IRE1 α) 抗体 (货号 10255-1)、IRE1 α 抗体 (货号 10124-s)、天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Caspase-3) 抗体 (货号 65432-1)、细胞周期素 D2 (cyclin D2) 抗体 (货号 23532-1)、微管蛋白 (Tubulin) 抗体 (货号 112334-1-AP) 均购自 Proteintech 公司 (美国)。胰腺十二指肠同源盒-1 (PDX-1) 抗体 (货号 3456-S)、C/EBP 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白 (chop) 抗体 (货号 2452-s) 购自 Cell Signaling Technology 公司 (美国)。

2. 方法

(1) 分组与模型建立:取雄性野生型 C57BL/6 小鼠 50 只;另将 IRE1 α flox/flox 和 RIP cre 这两种 c57 背景的小鼠交配筛选出胰岛 β 细胞特异性敲除 IRE1 α 的小鼠作为实验组 (IRE1 α -IKO), IRE1 α flox/flox 小鼠 (RIP cre 阴性) 作为对照组 (IRE1 α -WT), 每组各 20 只。

小鼠均饲养至 8 周龄开始实验,分别饲养 6 周 (14 周龄)、12 周 (20 周龄)、24 周 (32 周龄)、36 周 (44 周龄)、48 周 (56 周龄),建立不同周龄小鼠衰老模型。C57BL/6 小鼠于 14 周龄、20 周龄、32 周龄、44 周龄、56 周龄检测血糖、血清胰岛素后处死取胰腺组织块,于液氮中短暂保存,之后置入 -80°C 冰箱贮存用于蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测;实验组、对照组小鼠于 14 周龄、20 周龄、32 周龄、44 周龄检测血糖、血清胰岛素;56 周龄时,一半进行葡萄糖及胰岛素耐量试验,一半处死取胰腺组织块,于液氮中短暂保存后置入 -80°C 冰箱贮存用于 Western blot 检测。

(2) 小鼠血糖检测:小鼠饥饿 4 h 后,采用血糖仪检测小鼠的尾尖血糖,将血滴滴在试纸上然后读取血糖值,最后用纱布或棉球对鼠尾压迫止血。

(3) 小鼠血清胰岛素检测:采用戊巴比妥钠麻醉小鼠,心脏取血后于 4°C 、以 3 000 r/min 离心 10 min 获得血清。采用小鼠胰岛素试剂盒 (货号 EZRMI-13k, 检测范围为 0.2 ~ 10.0 ng/ml) 通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测其血清中胰岛素含量,操作如下:小鼠血清按 1:10 比例稀释,每个样品检测 3 个复孔,使用酶标仪读取吸光度,使用胰岛素标准品及标准品吸光度制作标准曲线,计算血清中胰岛素含量。

(4) 葡萄糖及胰岛素耐量试验:小鼠饥饿 16 h 后进行葡萄糖及胰岛素耐量试验,操作如下:将葡萄糖溶解于生理盐水中,按 1.5 g/kg 小鼠体重的剂量进行腹腔注射 (每个周龄组 6 只);将胰岛素稀释于生理盐水中,按 1 U/kg 小鼠体重的剂量进行腹腔注射 (每个周龄组 6 只)。注射前及注射后 30 min、60 min、120 min 使用血糖仪测量尾静脉血糖值。操作时保持小鼠安静状态,每只小鼠操作间隔保持一致。

(5) Western blot 检测 p-IRE1 α 、IRE1 α 、Caspase-3、PDX-1、cyclin D2、Tubulin、chop 蛋白:采用 RIPA 裂解液裂解胰岛组织后,进行蛋白浓度测定,再用 $6 \times$ 上样缓冲液制样,上样电泳、滤纸-凝胶-聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 膜-滤纸夹心转膜。然后用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 PVDF 膜 1 h。封闭结束后,孵育抗体,最后加入电化学发光 (ECL) 结合底物反应、曝光显影。

3. 统计学处理:应用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同周龄野生型 C57BL/6 小鼠随机血糖水平变化:野生型 C57BL/6 小鼠随机血糖水平在 32 周开始明显升高,32 周龄 [(8.7 ± 0.9) mmol/L]、44 周龄

[(10.1 ± 1.1) mmol/L],56 周龄[(11.7 ± 1.8) mmol/L]与14 周龄[(6.3 ± 1.1) mmol/L]小鼠比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),20 周龄[(6.4 ± 1.2) mmol/L]与 14 周龄小鼠比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2. 不同周龄野生型 C57BL/6 小鼠胰岛增殖/凋亡相关分子的表达水平:从 32 周开始,野生型 C57BL/6 小鼠的 IRE1 α 磷酸化水平及 Caspase-3 水平均明显高于 14 周龄小鼠,PDX-1 和 cyclin D2 的表达水平明显低于 14 周龄小鼠($P < 0.05$)。见图 1、表 1。

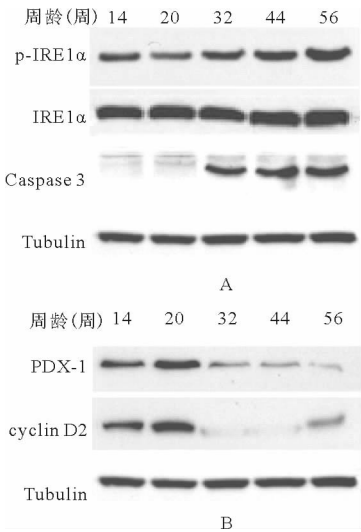


图1 不同周龄野生型 C57BL/6 小鼠胰岛增殖/凋亡相关分子的表达水平比较

表1 不同周龄野生型 C57BL/6 小鼠胰岛增殖/凋亡相关分子表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	p-IRE1 α	Caspase-3	PDX-1	cyclin D2
14 周龄组	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.1
20 周龄组	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.3	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.2
32 周龄组	1.3 ± 0.2^a	1.8 ± 0.2^a	0.5 ± 0.3^b	0.2 ± 0.1^a
44 周龄组	1.7 ± 0.1^a	2.1 ± 0.3^a	0.5 ± 0.3^b	0.3 ± 0.1^a
56 周龄组	2.4 ± 0.4^a	2.0 ± 0.2^a	0.3 ± 0.1^b	0.3 ± 0.1^a

注:与 14 周龄组比较,^a $P < 0.001$,^b $P < 0.05$

3. 不同周龄实验组和对照组小鼠随机血糖和胰岛素水平比较:实验组小鼠随机血糖水平从 32 周开始明显低于对照组($P < 0.05$);实验组小鼠血清胰岛素水平从 20 周开始明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

4. 实验组和对照组高龄小鼠糖耐量和胰岛素耐量比较:选取 56 周龄的两组高龄小鼠检测糖耐量和胰岛素耐量,结果显示,实验组小鼠在腹腔注射葡萄糖溶液的 30 min、60 min、120 min 后糖耐量明显低于对照组,实验组小鼠在腹腔注射胰岛素溶液的 30 min、60 min、120 min 后胰岛素耐量明显低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表2 不同周龄实验组和对照组小鼠随机血糖和胰岛素水平比较($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	随机血糖 (mmol/L)	胰岛素 (ng/ml)
对照组	14 周	6.2 ± 0.5
	20 周	8.1 ± 0.3
	32 周	10.1 ± 0.8
	44 周	11.8 ± 1.6
实验组	14 周	5.9 ± 0.4
	20 周	7.8 ± 0.2
	32 周	7.9 ± 0.3^a
	44 周	9.4 ± 0.3^a

注:与对照组同一周龄比较,^a $P < 0.01$

表3 实验组和对照组高龄小鼠糖耐量和胰岛素耐量比较($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	糖耐量 (mmol/L)	胰岛素耐量 (%)
对照组	30 min	27.2 ± 2.8
	60 min	25.1 ± 1.3
	120 min	20.2 ± 0.5
	30 min	18.4 ± 3.2^a
实验组	60 min	17.3 ± 3.0^a
	120 min	11.4 ± 2.7^a
	30 min	18.4 ± 3.2^a
	60 min	17.3 ± 3.0^a

注:与对照组同一时间比较,^a $P < 0.01$

5. 实验组和对照组高龄小鼠胰岛中增殖和凋亡相关分子表达比较:选取 56 周龄的两组小鼠,检测其胰岛中 cyclin D2 和 IRE1 α 信号通路下游凋亡相关分子 chop 的表达结果显示,高龄实验组小鼠 cyclin D2 的表达水平(1.0 ± 0.2 比 2.7 ± 0.4)较对照组明显增加,而 IRE1 α 信号通路下游凋亡相关分子 chop 表达水平(0.9 ± 0.3 比 0.3 ± 0.1)较对照组明显降低($P < 0.001$)。见图 2。

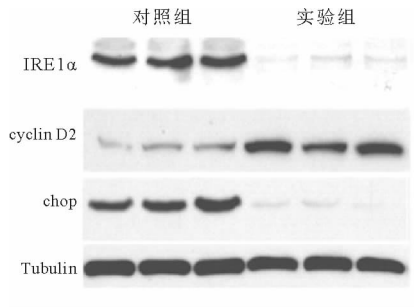


图2 实验组和对照组高龄小鼠胰岛中增殖和凋亡相关分子表达水平比较

讨 论

胰岛 β 细胞的增殖率在青少年期迅速减少,在成年期下降速度变慢,其降低幅度对老年人胰岛细胞的增殖尤为重要^[10]。研究表明,啮齿动物、人类胰岛 β 细胞的增殖速率在出生后迅速下降,而 β 细胞增殖速率的降低与粘附分子 E-钙粘素 (E-cadherin) 水平有关^[11-12]。另有研究发现,在结直肠癌细胞中,IRE1 α

的沉默或高表达可影响 E-cadherin 水平^[13]。本研究通过检测 IRE1 α 信号分子在不同周龄小鼠胰岛中的表达,并通过 IRE1 α 胰岛敲除小鼠探究相关的分子机制,结果显示,IRE1 α 基因敲除小鼠胰岛素水平较野生型小鼠增加,同时胰岛素耐量和葡萄糖耐量改善,提示敲除 IRE1 α 的高龄小鼠胰岛 β 细胞功能或数量高于对照组,同时表明 IRE1 α 信号通路可能参与调控年龄相关的胰岛细胞功能或数量,抑制 IRE1 α 功能可提高衰老 β 细胞应对外界增殖刺激的增殖反应,促进胰岛 β 细胞增殖以满足机体对胰岛素的需求。

随着年龄增长,胰岛对外部增殖信号的应答反应下降,即胰岛细胞表现为年龄相关的增殖能力下降^[11]。但随着年龄增加,胰岛素受体、催乳素受体及胰岛 β 细胞增殖的内源性调节因子如 Foxo-1 水平变化较小,表明细胞凋亡是参与调控小鼠及人的年龄相关的胰岛 β 细胞数量的主要机制^[14]。有研究结果显示,IRE1 α /JNK 通路中 JNK 磷酸化具有促进 P21 泛素化降解的作用,间接抑制 P21 介导的 cyclins/cdks 复合物的核转位,导致 cyclin D2 翻译及转录因子 E2F 激活降低,增殖减少^[15]。另有研究表明, chop 促发细胞凋亡的作用与其作为转录因子的功能相关,其可诱导一些促凋亡蛋白质的转录表达,同时还会降低抗凋亡基因 BCL2 的表达,并且通过招募 TRAF2 激活细胞质中的 Caspase-12,触发启动细胞的凋亡程序^[16]。

本研究结果显示,随着小鼠周龄增加,胰岛 β 细胞内质网应激损伤增加,IRE1 α 信号通路激活,提示 IRE1 α 信号通路激活可能参与了调控胰岛 β 细胞增殖和凋亡相关因子表达。进一步探究发现,高龄胰岛 β 细胞 IRE1 α 敲除小鼠 (IRE1 α -IKO) 较野生型小鼠的血糖代谢有所改善,其 PDX-1 和 cyclin D2 表达均较野生型增多,凋亡相关因子 chop 表达降低。鉴于 PDX-1 和 cyclin D2 作为年龄相关胰岛 β 细胞增殖的主要调控因子调节胰岛 β 细胞细胞周期的进程,提示 IRE1 α 可能为 β 细胞年龄相关增殖下降的因子之一,IRE1 α 信号通路在年龄介导的胰岛 β 细胞凋亡中发挥重要的调控作用。

综上所述,IRE1 α 信号通路激活可能参与了衰老增加胰岛 β 细胞凋亡率的过程,即老年糖尿病的发生可能与 IRE1 α 信号通路激活有关,而敲除 IRE1 α 可促

进高龄小鼠胰岛中增殖相关因子表达,并降低凋亡相关因子表达,改善小鼠血糖代谢,这可能为治疗老年糖尿病提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Lean M, McCombie L, McSorely J. Trends in type 2 diabetes[J]. BMJ, 2019, 366: 15407.
- [2] Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, et al. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans[J]. Diabetes, 2008, 57(6): 1584-1594.
- [3] Matveyenko AV, Butler PC. Beta-cell deficit due to increased apoptosis in the human islet amyloid polypeptide transgenic (HIP) rat recapitulates the metabolic defects present in type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2006, 55(7): 2106-2114.
- [4] Jezek P, Jaburek M, Plecita-Hlavata L. Contribution of Oxidative Stress and Impaired Biogenesis of Pancreatic beta-Cells to Type 2 Diabetes[J]. Antioxid Redox Signal, 2019, 31(10): 722-751.
- [5] Kawamori D, Shirakawa J, Liew CW, et al. GLP-1 signalling compensates for impaired insulin signalling in regulating beta cell proliferation in BIRKO mice[J]. Diabetologia, 2017, 60(8): 1442-1453.
- [6] Franklin ZJ, Tsakmaki A, Fonseca Pedro P, et al. Islet neuropeptide Y receptors are functionally conserved and novel targets for the preservation of beta-cell mass[J]. Diabetes Obes Metab, 2018, 20(3): 599-609.
- [7] De Mesmaeker I, Robert T, Suenens KG, et al. Increase Functional beta-Cell Mass in Subcutaneous Alginate Capsules With Porcine Prenatal Islet Cells but Loss With Human Adult Islet Cells[J]. Diabetes, 2018, 67(12): 2640-2649.
- [8] Abdullah A, Ravanian P. The unknown face of IRE1alpha-Beyond ER stress[J]. Eur J Cell Biol, 2018, 97(5): 359-68.
- [9] 金美英, 崔镇海, 朴春丽, 等. 基于 IRE1 α /JNK 通路探析解毒通络调肝方对 2 型糖尿病调控机制[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(12): 5353-5357.
- [10] Sheng Q, Xiao X, Prasad 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): 1-10.
- [11] Wakae-Takada N, Xuan S, Watanabe K, et al. Molecular basis for the regulation of islet beta cell mass in mice: the role of E-cadherin[J]. Diabetologia, 2013, 56(4): 856-866.
- [12] Meng Q, Mongan M, Wang J, et al. Repression of MAP3K1 expression and JNK activity by canonical Wnt signaling[J]. Dev Biol, 2018, 440(2): 129-136.
- [13] 郑晨果. IRE1 α -XBP1 通路引起结直肠癌细胞增生, 侵袭, 转移的相关机制研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2017.
- [14] Gorrepati KDD, Lupse B, Annamalai K, et al. Loss of Deubiquitinase USP1 Blocks Pancreatic beta-Cell Apoptosis by Inhibiting DNA Damage Response[J]. Science, 2018, 1(1): 72-86.
- [15] Yi S, Chen K, Zhang L, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Is Involved in Stress-Induced Hypothalamic Neuronal Injury in Rats via the PERK-ATF4-CHOP and IRE1-ASK1-JNK Pathways[J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13(1): 190.
- [16] Chen C, Cohrs CM, Stertmann J, et al. Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis[J]. Mol Metab, 2017, 6(9): 943-957.

(收稿日期: 2019-11-11)

(本文编辑: 张一冰)