

研究论文

早期反应基因*Egr-1*参与高糖诱导β细胞 凋亡的初步研究

李 聪¹ 姜 珊² 沈 宁² 高基民^{1*} 李朝军^{2*}¹温州医学院检验与生命科学院, 温州 325035; ²南京大学模式动物研究所, 南京 210093)

摘要 糖尿病是一种慢性代谢性疾病, 胰岛β细胞功能损伤或数量减少都会导致其发生。该研究主要探讨早期反应基因-1(early growth responsive gene-1, *Egr-1*)参与高糖诱导β细胞凋亡的过程。利用永生化的NIT-1胰岛β细胞株为实验模型, 分成正常对照组和高糖组; 通过MTT、DAPI染色和DNA Ladder以及流式细胞术等手段检测持续性高糖刺激对细胞活力和凋亡的影响; 采用Real-time PCR和Western blot法检测*Egr-1*转录和蛋白表达水平; 竞争性抑制*Egr-1*活性后检测细胞活力和凋亡的变化。研究发现, 与对照组相比持续性高糖刺激后细胞活力下降, 凋亡明显增加(48 h, $P<0.05$; 72 h, $P<0.01$); *Egr-1*转录和蛋白表达水平均显著上调($P<0.01$), 抑制其表达活性可以明显改善细胞活力和降低凋亡水平(48 h, $P<0.05$)。提示*Egr-1*的确参与到高糖诱导β细胞凋亡的过程中。

关键词 糖毒性; 胰岛β细胞; 细胞凋亡; *Egr-1*

Involvement of Early Growth Responsive Gene *Egr-1* in Hyperglycemia Induced Beta-cells Apoptosis

Li Cong¹, Jiang Shan², Shen Ning², Gao Jimin^{1*}, Li Chaojun^{2*}¹School of Laboratory and Life Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China;²Model Animal Research Center of Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract Diabetes is a chronic metabolic syndrome caused by the impaired function or reduced amount of pancreas beta cells. Herein, we studied the detailed mechanism by which the early growth responsive gene-1 (*Egr-1*) was involved in the high glucose induced apoptosis of beta cells. Using NIT-1 cells as a cell model, we measured the effect of consistent high glucose on the cell viability and apoptosis through MTT, DAPI, DNA Ladder and flow cytometry by comparing the control group with the high glucose group. The *Egr-1* expression level was determined by Real-time PCR and Western blot. We also detected the cell viability and apoptosis after inhibiting the *Egr-1* function. We found that the high glucose treatment decreased the cell viability and increased the cell apoptosis significantly (48 h, $P<0.05$; 72 h, $P<0.01$). *Egr-1* was highly expressed ($P<0.01$). Inhibiting the *Egr-1* function could improve the cell viability and reduce apoptosis (48 h, $P<0.05$). These results suggested that *Egr-1* was involved in the high glucose induced beta cell apoptosis.

Key words glucotoxicity; pancreas beta cells; apoptosis; *Egr-1*

收稿日期: 2013-04-18 接受日期: 2013-05-09

*通讯作者。Tel: 0577-86689748, E-mail: jimingao@yahoo.com; Tel: 025-83596289, E-mail: licj@nju.edu.cn

Received: April 18, 2013 Accepted: May 9, 2013

*Corresponding author. Tel: +86-577-86689748, E-mail: jimingao@yahoo.com; Tel: +86-25-83596289, E-mail: licj@nju.edu.cn

网络出版时间: 2013-06-09 16:11

URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130609.1611.002.html

糖尿病是一种慢性代谢性疾病,是由于胰岛素绝对或相对缺乏而引起的。在临床上患者被诊断为I型或II型糖尿病时,病人的胰岛β细胞均已达到50%~80%的减少。作为机体中唯一可以分泌降血糖激素即胰岛素的细胞群,胰岛β细胞功能的损伤或数量的减少都会导致糖尿病的发生。有研究表明,糖尿病病人的胰岛β细胞的凋亡是由于长期处在高血糖状态,即是由“糖毒性”诱发^[1]。

早期反应基因-1(early growth responsive gene-1, *Egr-1*)是一种早期应激蛋白,可以被很多细胞因子、生长因子快速激活^[2-3]。有研究报道, *Egr-1*可能通过调控下游基因多方面地参与到II型糖尿病的病理发生过程中。本实验室前期研究也发现, *Egr-1*与II型糖尿病发展过程中的部分胰岛素抵抗的发生有关,然而*Egr-1*是否参与到胰岛β细胞的凋亡方面还未见研究报道^[4]。因此在此项研究中,我们拟研究持续性高糖诱导条件下*Egr-1*在胰岛β细胞中表达水平变化与细胞凋亡间的关系,并探讨该基因对高糖诱导β细胞凋亡过程的影响,为临床II型糖尿病的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 NIT-1胰岛β细胞株,是一种从转基因小鼠*NOD/Lt*的胰腺β细胞增殖而来的永生化细胞株^[5],由南京医科大学韩晓教授馈赠。含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基常规培养,细胞密度达到70%左右,无血清培养基饥饿培养12 h后, NIT-1细胞分为对照组(CTL, 11.1 mmol/L D-glucose)、持续性高糖组(HG, 33.3 mmol/L D-glucose),所有分组均在37 °C、5% CO₂培养箱中培养。

1.1.2 主要试剂 D-glucose购于Sigma-Aldrich公司; DAPI和PI购自Invitrogen公司; Trizol、RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司; 实时荧光定量PCR kit购自Bioneer公司, 荧光定量PCR仪为ABI-7300; 一抗(兔抗*Egr-1*)购自Santa Cruz公司; 二抗(羊抗)购自南京生兴生物技术有限公司; 蛋白预染Marker购自Fermentas公司; 超敏ECL化学发光试剂盒购自Cell Signaling Technology公司; Dn*Egr-1*腺病毒以及含绿色荧光蛋白(GFP)的腺病毒为本实验室保存。

1.1.3 *Egr-1*引物设计 根据GenBank中*Egr-1*基因序列(Gene ID:13653),使用Primer Premier 5.0设计一

对引物,扩增目的片段为*Egr-1* cDNA 341-547,交由上海生工生物工程公司合成。引物序列为:上游引物: 5'-TCG GCT CCT TTC CTC ACT CA-3'; 下游引物: 5'-CTC ATA GGG TTG TTC GCT CGG-3'。

1.2 方法

1.2.1 MTT法检测持续性高糖刺激对NIT-1细胞活力水平的影响 将各组细胞分别培养24, 48, 72 h后,每孔加入20 μL MTT, 37 °C孵育4 h后吸尽并加100 μL DMSO,震荡充分溶解10 min,酶标仪测波长570 nm处吸光度*D*值,并计算存活率(存活率=处理组*D*值/培养液对照组*D*值×100%)。

1.2.2 DAPI染色、流式细胞术以及DNA Ladder法检测持续性高糖刺激对NIT-1细胞凋亡的影响 DAPI染色:每孔加入0.5 mL的4% PFA,固定10 min。加入0.5 mL的DAPI染色液(5 μg/mL),处理10 min,避光,吸干液体并通过荧光显微镜检测;流式细胞术:单细胞悬液用70%预冷酒精固定,室温放置30 min后离心,加入PI染液500 μL,避光,放入37 °C恒温水浴锅,30 min后进行流式细胞检测; DNA Ladder法:收集单细胞悬液,4 °C 2 000 r/min离心5 min,加入20 μL的溶解缓冲液混匀细胞沉淀,加入10 μL的RNA酶溶液(500 U/mL),37 °C孵育2 h,然后加入10 μL的蛋白酶K溶液(20 mg/mL),50 °C孵育过夜。进行琼脂糖凝胶电泳并利用凝胶成像系统分析电泳条带。

1.2.3 Real-time PCR和Western blot检测持续性高糖刺激后NIT-1细胞*Egr-1*的表达 Real-time PCR:将各组细胞分别培养0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 h后用Trizol抽提RNA。定量后进行反转录,采用TaKaRa公司的反转录试剂盒,37 °C反应15 min,85 °C 5 s终止反应。反应体系为:2×SYBR green 10 μL, Primers 1 μL, 50×ROX 0.4 μL, cDNA 1 μL, H₂O补至体积20 μL。引物序列见1.1.3; Western blot:按各组细胞分别培养0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 h后加入120 μL组织裂解缓冲液,冰上匀浆,4 °C 12 000 r/min离心15 min,蛋白定量后加入5 μL 5×SDS上样缓冲液,99 °C煮沸5 min。样品以10%的SDS-PAGE电泳,120 V恒压2 h,根据预染Marker切下目的胶片常规转膜。5%脱脂奶粉封闭1 h,4 °C孵育一抗过夜,37 °C孵育二抗,暗房显影。

1.2.4 竞争性抑制*Egr-1*活性后检测持续性高糖刺激对NIT-1细胞活力和凋亡的影响 将对数期的细胞消化计数,铺于6孔板中。加入适当滴度的Dn*Egr-1*

腺病毒感染细胞,其可以结合Egr-1下游靶基因的启动子,但是并不具有转录活性,从而可以竞争性抑制细胞中Egr-1的活性^[6]。同时,设立空白对照组(加入PBS)和阴性对照组(加入GFP腺病毒),过夜后换液按各组细胞分别培养一定时间。MTT法、DNA Ladder法和流式细胞术检测NIT-1细胞活力和凋亡,方法同上。

1.3 统计分析

结果用SPSS16.0软件处理,数据以均数±标准差表示,采用单因素方差分析进行显著性检验,组间采用 t 检验。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 持续性高糖刺激诱导NIT-1细胞活性下降

在不同时间经MTT法检测结果显示,两组细胞培养48 h后HG组细胞活性低于CTL组,二者有显著性差异($P<0.05$),而72 h后其活性降低程度更加明显,二者有极显著差异($P<0.01$)(图1A)。按照公式[存活率=(处理组 D 值/培养液对照组 D 值) $\times 100\%$]计算后得到细胞存活率,发现持续性高糖刺激明显降低了NIT-1细胞的存活率(图1B)。

2.2 持续性高糖刺激诱导NIT-1细胞凋亡增加

DAPI染色后,荧光显微镜下检测蓝色的细胞核,可以看到凋亡细胞的细胞核因染色质固缩而浓染呈强亮的蓝色荧光并伴有核形态的明显变化(图2A,如箭头所示)。结合流式细胞仪分析结果(图2B)发现,两组细胞培养48 h后HG组细胞凋亡高于CTL组,二者有显著性差异($P<0.05$),而72 h后凋亡

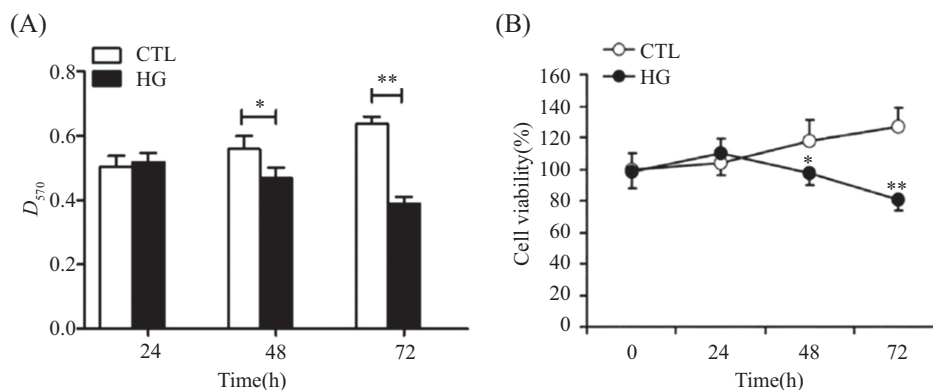
增加明显高于对照组,二者有极显著差异($P<0.01$)。DNA Ladder结果也显示(图2C),HG组在处理48 h后出现“弥散”条带,并且72 h后“弥散”条带更加显著。相比较CTL组却均始终未见明显DNA片段化,只是胶底部出现了代表完整基因组DNA的条带。上述结果均提示,持续性高糖刺激诱导NIT-1细胞凋亡增加。

2.3 持续性高糖刺激诱导NIT-1细胞中Egr-1表达水平上调

Real-time PCR结果显示(图3A),相比较CTL组,HG组细胞在凋亡增加的同时,Egr-1转录水平也明显上调。其中,早期在1, 2, 4 h最明显($P<0.01$),而后期在8 h和12 h最为明显($P<0.01$),虽然24 h表达水平有短暂下降但并没有显著性差异。同时Western blot结果显示(图3B),对照组Egr-1含量较低,并无增加趋势。而HG组Egr-1含量显著增加,其中早期在0.5 h和4 h最明显,后期在12 h和24 h增加最为明显,和PCR结果也相吻合。上述结果提示,Egr-1参与到调节持续性高糖诱导的细胞凋亡过程中。

2.4 竞争性抑制Egr-1活性后改善了NIT-1细胞的活性和凋亡水平

竞争性抑制Egr-1活性后MTT法检测结果显示,与对照组相比,HG组细胞在48 h后活性明显上升,虽然有少许下降但是并没有显著性差异(图4A);72 h培养后DNA Ladder也未见明显DNA片段化,只是胶底部出现了DNA条带(图4B);同时流式细胞术检测发现,HG组细胞在48 h后凋亡率明显下降,且与对照组相比无显著性差异(图4C)。提示抑制Egr-1的表达可以降低高糖诱导的细胞凋亡水平。

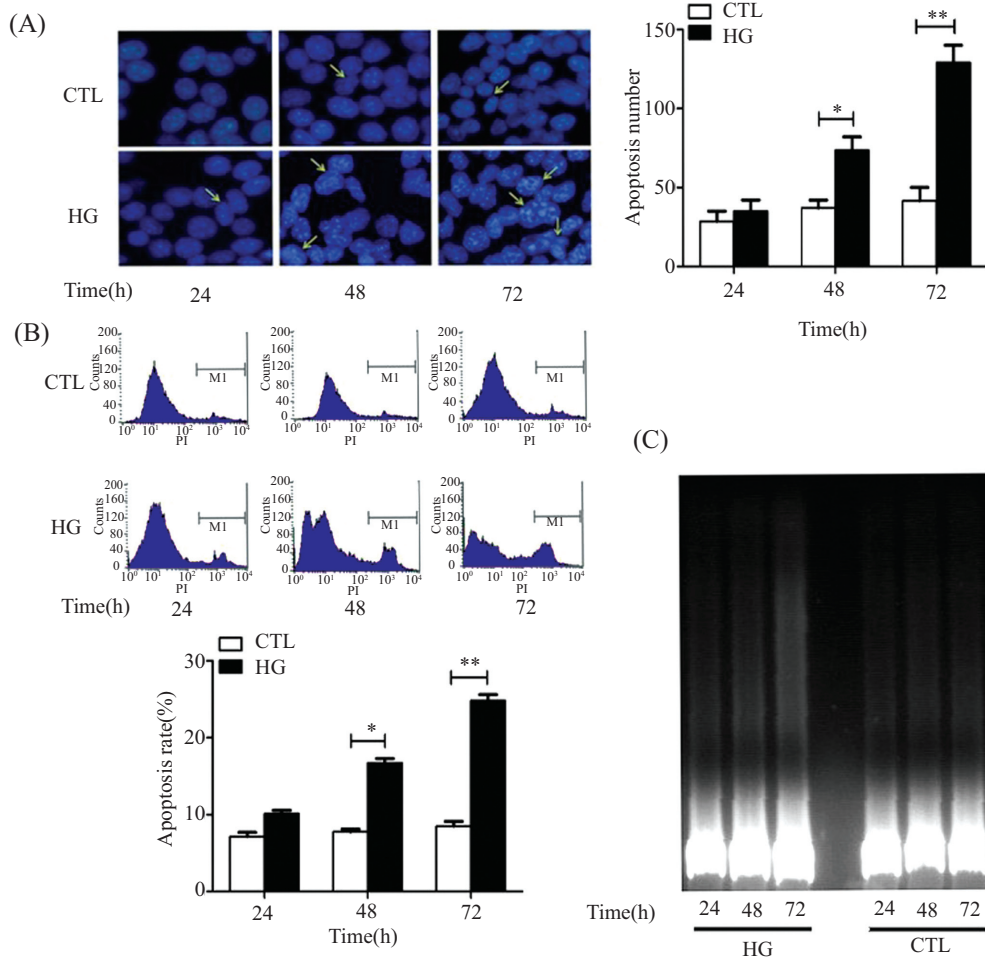


A: MTT法检测细胞活性; B: 细胞存活率; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与CTL组比较。

A: MTT analysis for cell viability; B: cell viability; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with CTL group.

图1 MTT法检测持续性高糖刺激对NIT-1细胞活性的影响

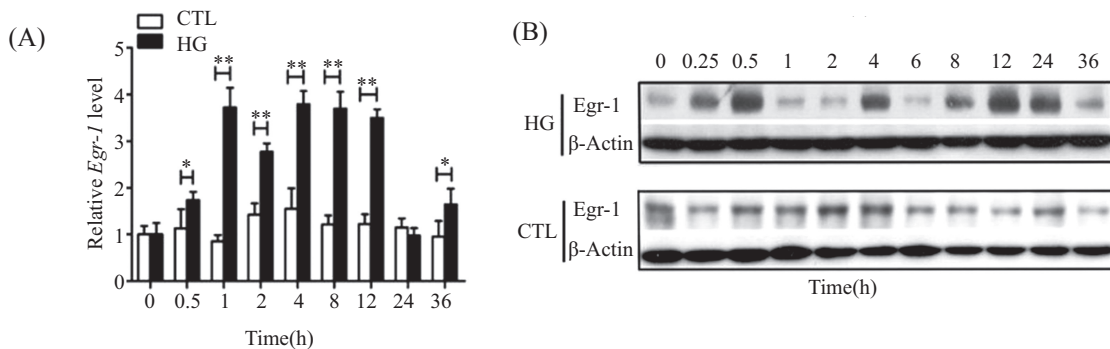
Fig.1 Effect of constant high glucose on NIT-1 cell viability by MTT analysis



A: DAPI染色观察细胞凋亡; B: 流式细胞术检测细胞凋亡; C: DNA Ladder法检测细胞凋亡; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与CTL组比较。
A: DAPI staining for cell apoptosis; B: flow cytometry for cell apoptosis; C: DNA Ladder for cell apoptosis; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with CTL group.

图2 持续性高糖刺激对NIT-1细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of constant high glucose on NIT-1 cell apoptosis



A: Real-time PCR检测*Egr-1*在mRNA水平上的变化; B: Western blot检测*Egr-1*在蛋白水平上的变化; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与CTL组比较。
A: Real-time PCR analysis for *Egr-1* mRNA level; B: Western blot analysis for *Egr-1* protein expression; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with CTL group.

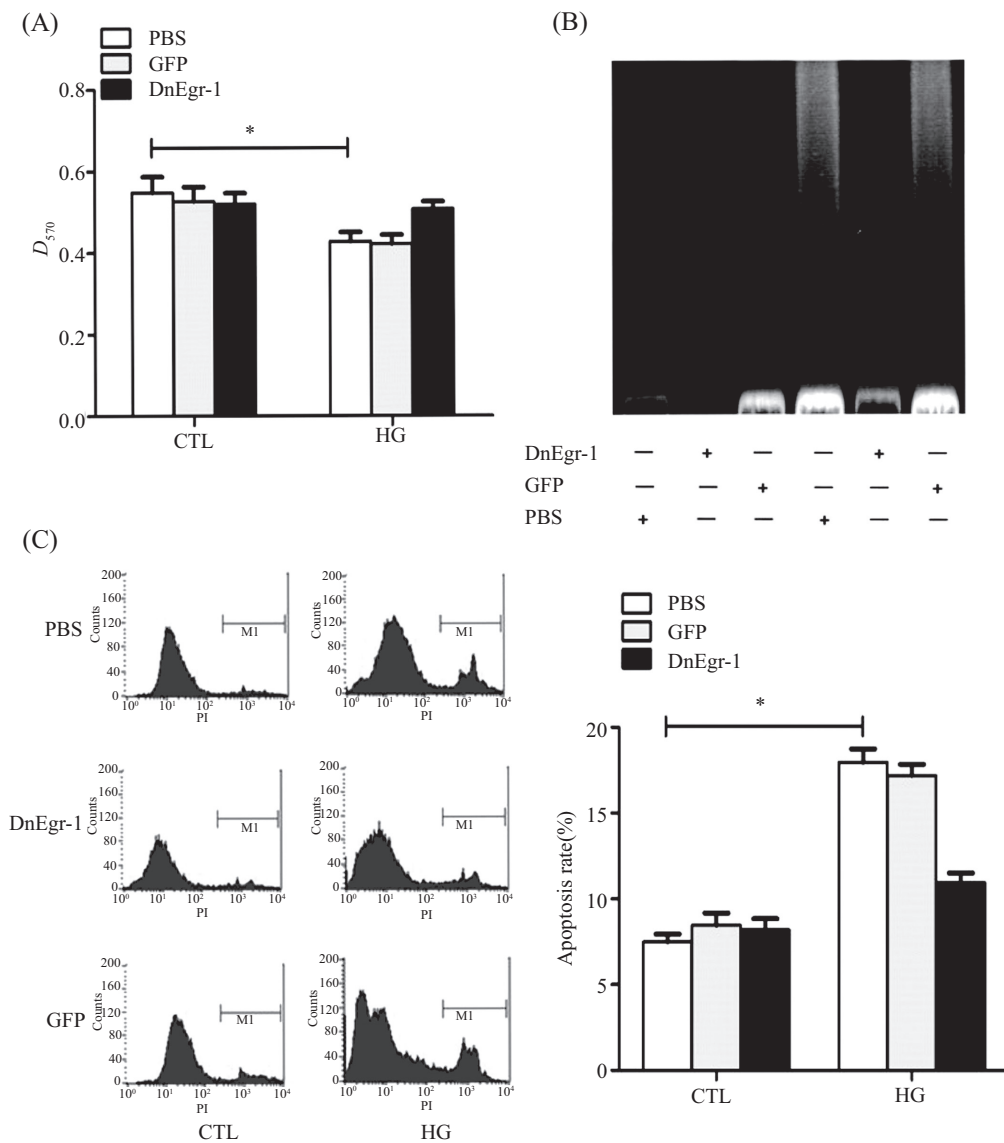
图3 持续性高糖刺激后NIT-1细胞中*Egr-1*的表达变化

Fig.3 Relative mRNA level and protein expression of *Egr-1* in NIT-1 cell with constant high glucose treatment

3 讨论

在II型糖尿病的发生和发展过程中, 高糖引起的胰岛β细胞功能衰竭是影响其进程的关键环节, 因此研究糖毒性对胰岛β细胞的损伤机制对于疾

病的防治具有重要意义^[7]。如今已经发现参与高糖诱导胰岛β细胞凋亡过程中的多种基因。Cai等^[8]研究发现, *SREBP-1*过表达可以加快高糖条件下β细胞内脂质的积累从而加重ER stress并使细胞凋亡。高血



A: MTT法检测细胞活性; B: DNA Ladder法检测细胞凋亡; C: 流式细胞术检测细胞凋亡; * $P < 0.05$, 与CTL组比较。

A: MTT analysis for cell viability; B: DNA Ladder for cell apoptosis; C: flow cytometry for cell apoptosis; * $P < 0.05$ compared with CTL group.

图4 竞争性抑制Egr-1活性后检测持续性高糖刺激对NIT-1细胞活力和凋亡的影响

Fig.4 Effect of cell viability and apoptosis treated by constant high glucose with inhibition of Egr-1

糖还可以通过改变 β 细胞内Bcl蛋白家族中抗凋亡和促凋亡蛋白成员之间的平衡来调节细胞凋亡的水平^[9]。另外高糖水平下 β 细胞内IL-1 β 、NF- κ B的含量也会增加,从而Fas蛋白的活化加强,使得 β 细胞凋亡^[10]。

Egr-1普遍存在于真核细胞基因组中,进化上高度统一并且保守^[11]。作为一种重要的转录因子,常被认为是一种早期应激蛋白,在应激的状态下其可以调控一系列下游靶基因的转录,包括生长因子(PDGF、TGF β -1)、细胞因子(TNF- α)和其它转录因子(Id1)、细胞周期调控因子(p21、p53)、以及凋亡

因子(Fas)等^[12]。有研究报道,Egr-1可能通过调控下游基因多方面地参与到II型糖尿病的病理发生过程中,其作为一种早期炎症反应蛋白可以参与诱导细胞凋亡。而在胰岛素刺激下Egr-1还可以通过调控PDX-1和VEGF在糖尿病以及血管并发症的发展中扮演重要作用^[13-14]。我们观察到的Egr-1的早期升高,可能和高糖刺激下胰岛素的合成增加有关,因为Egr-1可以通过PDX-1激活胰岛素的转录^[15];然而长期持续的高糖刺激最终可能导致 β 细胞发生凋亡,而Egr-1可能通过激活下游凋亡相关基因的表达参与这一过程。

本研究使用NIT-1细胞株来探讨*Egr-1*参与高糖诱导胰岛β细胞凋亡的过程。NIT-1细胞株是从转基因小鼠*NOD/Lt*的胰腺β细胞增殖而来的,基本保持了*NOD*小鼠正常β细胞的特性,目前主要用于胰岛β细胞凋亡研究。因此,我们选用NIT-1细胞株作为研究对象,不过随着体外培养时间的延长,其表型可能不太稳定或者对葡萄糖的敏感性会降低,这也是将要面对的问题^[5]。我们首先通过MTT法、DAPI染色和DNA Ladder法以及流式细胞术法等分子细胞生物学手段检测了持续性高糖刺激对NIT-1细胞活力和凋亡的影响。与对照组相比, HG组的细胞凋亡均有所增加,尤其是在72 h($P < 0.01$),且在荧光显微镜下可见明显的凋亡细胞。但是DNA Ladder实验中始终未出现细胞凋亡典型的“梯状”条带,一个原因可能是由于NIT-1细胞凋亡发生时DNA的断裂并不是以核小体之间DNA断裂的方式。还有另一个原因,由于长期的高糖刺激NIT-1细胞的表型稳定性发生了改变,细胞已经发生了坏死。有研究发现,可能是其作为一种判断细胞凋亡的常规方法和细胞类型与凋亡所处时期有很大关系^[6]。其次,为了研究*Egr-1*是否参与到持续性高糖诱导β细胞凋亡的过程中,我们通过Real-time PCR和Western blot在分子和蛋白水平上检测了*Egr-1*的表达水平,结果显示, HG组细胞中*Egr-1*在转录和蛋白水平上均在12 h后明显增加,这说明其可能参与了长期高糖诱导的胰岛β细胞凋亡的过程。而关于其早期短暂上升,可能是由于对于高糖环境的应激作用,作为一种早期反应蛋白,可被很多生长因子、细胞因子和一些有害刺激快速和瞬时激活。同时,我们在竞争性抑制*Egr-1*活性后通过MTT法、DNA Ladder法以及流式细胞术检测细胞活力和凋亡的结果也证实了在长期高糖刺激导致的β细胞凋亡过程中确实有*Egr-1*参与,其也肯定扮演着不可替代的角色。本研究结果提示, *Egr-1*有可能成为防治II型糖尿病药物的作用潜在靶点,但具体机制仍需要进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patané G, Laybutt R, *et al.* Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic β cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 1999; 274(20): 14112-21.
- 2 Gousseva N, Kugathasan K, Chesterman CN, Khachigian LM. Early growth response factor-1 mediates insulin-inducible vascular endothelial cell proliferation and regrowth after injury. *J Cell Biochem* 2001; 81(3): 523-34.
- 3 Goetze S, Kintscher U, Kaneshiro K, Meehan WP, Collins A, Fleck E, *et al.* TNFα induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis* 2001; 159(1): 93-101.
- 4 Yu X, Shen N, Zhang ML, Pan FY, Wang C, Jia WP, *et al.* Egr-1 decreases adipocyte insulin sensitivity by tilting PI3K/Akt and MAPK signal balance in mice. *EMBO J* 2011; 30(18): 3754-65.
- 5 Hamaguchi K, Gaskins HR, Leiter EH. NIT-1, a pancreatic β-cell line established from a transgenic NOD/Lt mouse. *Diabetes* 1991; 40(7): 842-9.
- 6 Levkovitz Y, Baraban JM. A dominant negative inhibitor of the Egr family of transcription regulatory factors suppresses cerebellar granule cell apoptosis by blocking c-Jun activation. *J Neurosci* 2001; 21(16): 5893-901.
- 7 Lifshitz F, Hall JG. Reduction in the incidence of type II diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; 346(6): 393-403.
- 8 Cai Y, Martens GA, Hinke SA, Heimberg H, Pipeleers D, van de Casteele M. Increased oxygen radical formation and mitochondrial dysfunction mediate beta cell apoptosis under conditions of AMP-activated protein kinase stimulation. *Free Radic Biol Med* 2007; 42(1): 64-78.
- 9 Ritzel RA, Butler AE, Rizza RA, Veldhuis JD, Butler PC. Relationship between β-cell mass and fasting blood glucose concentration in humans. *Diabetes Care* 2006; 29(3): 717-8.
- 10 Rutter G. Visualising insulin secretion. *Diabetologia* 2004; 47(11): 1861-72.
- 11 Hamilton TB, Borel F, Romaniuk PJ. Comparison of the DNA binding characteristics of the related zinc finger proteins WT1 and EGR1. *Biochemistry* 1998; 37(7): 2051-58.
- 12 Day RM, Yang Y, Suzuki YJ, Stevens J, Pathi R, Perlmutter A, *et al.* Bleomycin upregulates gene expression of angiotensin-converting enzyme via mitogen-activated protein kinase and early growth response 1 transcription factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25(5): 613-9.
- 13 Hasan RN, Phukan S, Harada S. Differential regulation of early growth response gene-1 expression by insulin and glucose in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(6): 988-93.
- 14 Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan S-F, *et al.* Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor α expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression Presented in abstract form at the 42nd annual meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA. *Blood* 2001; 98(5): 1429-39.
- 15 Mayer SI, Müller I, Mannebach S, Endo T, Thiel G. Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells: Activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors. *J Biol Chem* 2011; 286(12): 10084-96.
- 16 Martin SJ, Green DR, Cotter TG. Dicing with death: Dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* 1994; 19(1): 26-30.