

# Prdx V在链脲佐菌霉素诱导MIN6细胞 凋亡过程中的调控作用

王 闯 孙虎男 金成浩\*

(黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 大庆 163319)

**摘要** Prdx V(peroxiredoxin V)是过氧化物还原酶家族中一员,可有效地保护细胞免受氧化应激造成的氧化损伤。该文主要阐明了链脲佐菌霉素(streptozotocin, STZ)诱导MIN6小鼠胰岛瘤细胞凋亡的分子机制及Prdx V在这一过程中的调控作用。该研究利用STZ处理MIN6小鼠胰岛瘤细胞,通过MTT法、荧光显微镜照相、流式细胞术、蛋白质免疫印迹分析等方法检测细胞存活率、细胞内活性氧类(reactive oxygen species, ROS)及细胞凋亡水平、一氧化氮(nitric oxide, NO)含量、凋亡相关蛋白质及相关信号通路蛋白质水平。结果表明,STZ主要通过激活p38信号通路调控NO的生成,引起MIN6细胞发生凋亡,而与细胞内增加的ROS无内在联系。与此同时,STZ可致使细胞内Prdx V蛋白质水平明显上升,当Prdx V基因沉默之后,发现STZ诱导的Prdx V缺失型MIN6细胞凋亡率明显高于对照组,提示Prdx V对STZ诱导MIN6细胞凋亡过程具有一定的调控作用。该研究结果揭示了STZ诱导MIN6细胞凋亡分子机制,同时初步探析了Prdx V对STZ引起MIN6胰岛细胞凋亡的调控作用,为研究氧化应激引起胰岛细胞损伤及死亡机制提供了一定的理论基础。

**关键词** 链脲佐菌霉素; MIN6细胞; 一氧化氮; 细胞凋亡; p38; Prdx V

## Regulatory Effect of Prdx V on Streptozotocin-Induced Apoptosis in MIN6 Cells

Wang Chuang, Sun Hunan, Jin Chenghao\*

(College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

**Abstract** Peroxiredoxin V (Prdx V) is a thioredoxin peroxidase involved in peroxiredoxins family, which can effectively protect cells against oxidative damage caused by oxidative stress. This study is aimed to explore the molecular mechanism of STZ-induced apoptosis in MIN6 cells and the regulatory function of Prdx V during the process. We used the MTT assay, fluorescence microscopy, flow cytometry and Western blot assay for analyzing the cell viability, the cellular ROS levels, nitric oxide production and apoptosis-related-proteins levels in STZ-treated MIN6 cells, respectively. The results showed that the STZ-induced MIN6 cell apoptosis was mainly resulted in NO production regulated by p38 signaling pathway, and the Prdx V protein levels were also increased during the process. Furthermore, knockdown the Prdx V gene expressions with Lenti-virus, resulted in decreasing of the cell viability and increasing the cell apoptosis in STZ-treated MIN6 cells. Our findings provide a theoretical basis for the study of the mechanism of oxidative stress caused islet cell damage and death.

**Keywords** STZ; MIN6 cells; nitric oxide (NO); apoptosis; p38; Prdx V

收稿日期: 2017-08-17 接受日期: 2017-11-16

黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(批准号: YJSCX2017-Y68)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18745968262, E-mail: sunmkbb@qq.com

Received: August 17, 2017 Accepted: November 16, 2017

This work was supported by the Innovative Research Projects for Postgraduates of Heilongjiang Bayi Agricultural University (Grant No. YJSCX2017-Y68)

\*Corresponding author. Tel: +86-18745968262, E-mail: sunmkbb@qq.com

网络出版时间: 2018-01-29 17:32:26 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180129.1732.014.html>

胰岛 $\beta$ 细胞主要通过分泌胰岛素参与调控机体血糖的过程。过量蓄积的氧自由基和线粒体功能低下可引起 $\beta$ 细胞的凋亡<sup>[1]</sup>,这是引起机体糖尿病的主要原因之一。一氧化氮(nitric oxide, NO)是活性氮类(reactive nitrogen species, RNS)的重要组成部分,是机体内重要的生物信使,参与多种生理及病理过程。NO可以抑制DNA分子修复,调控凋亡相关蛋白,引起细胞凋亡<sup>[2-3]</sup>。目前在胰岛素依赖型糖尿病(insulin-depend diabetes mellitus, IDDM)和非胰岛素依赖型糖尿病(non-insulin-depend diabetes mellitus, NIDDM)以及糖尿病的多种并发症中均发现有NO的参与<sup>[4-6]</sup>。NO可以通过调控MAPK信号通路诱导 $\beta$ 细胞凋亡,同时也会引起胰岛素信号通路异常,导致胰岛素正常的生物学效应降低,形成胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)<sup>[7-8]</sup>。目前,有效地清除 $\beta$ 细胞内NO、使 $\beta$ 细胞免受氧化应激损伤已成为基础研究的热门领域。

Prdx(peroxiredoxin)是一类抗氧化还原酶家族,主要有清除细胞内过氧化氢和有机氢过氧化物的功能<sup>[9]</sup>。目前已知Prdx家族内至少含有6种不同的亚型(Prdx I~VI)<sup>[10]</sup>。Prdx V作为Prdx家族中的一员,属于非典型2个半胱氨酸Prdx家族,广泛存在于细胞质、线粒体以及过氧化物酶体中,可有效地清除细胞内的ROS与NO,发挥一定的保护作用<sup>[11]</sup>。本实验室前期研究结果表明,硝普化钠(sodium nitroprusside dihydrate, SNP)、谷氨酸盐和 $\beta$ -拉帕醌诱导的细胞凋亡过程中均有Prdx V的参与,并且其蛋白质水平伴随着细胞内ROS水平的改变而改变,提示了Prdx V在氧化应激过程中对细胞死亡的调控作用<sup>[2,12-13]</sup>。但是,Prdx V在胰岛细胞凋亡过程中的作用及其机制尚不清楚。

链脲佐菌霉素(streptozotocin, STZ)可以选择性地进入胰岛 $\beta$ 细胞,引起DNA烷基化,诱发氧化应激,进而导致胰岛 $\beta$ 细胞凋亡。因此,STZ被视为建立糖尿病模式动物的专用化合物<sup>[14-15]</sup>,广泛地用于制作体内、体外糖尿病模型研究。MIN6胰岛瘤细胞系在功能上与胰腺组织非常接近,是作为体外研究糖尿病发病机制的理想模型<sup>[16-17]</sup>。

本研究主要利用STZ诱导MIN6胰岛瘤细胞凋亡,阐明其凋亡机制,探究Prdx V对STZ诱导MIN6细胞凋亡过程的调控作用。研究结果显示,STZ通过p38 MAPK信号通路调控MIN6细胞凋亡,同时引起

细胞内NO水平急剧上升,导致Prdx V蛋白质水平的上升。另外,Prdx V基因沉默实验结果表明,Prdx V基因缺失致使STZ诱导的MIN6细胞凋亡显著增高。我们的研究结果证明,Prdx V在STZ诱导MIN6细胞凋亡机制中具有重要的调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

链脲佐菌霉素购于Sigma公司;MIN6小鼠胰腺瘤细胞来自黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院分子药理与药效学研究实验室。

### 1.2 试剂及仪器

DMEM/高糖培养基购于Hyclone公司。胎牛血清购于Gibco公司。 $\beta$ -ME购于Gibco公司。抗mouse anti-Bcl-2、Bad、cleavage-Caspase-3、Prdx V、P-p38、iNOS、 $\beta$ -actin单克隆抗体购于Santa Cruz公司。DAF-FM DA(NO荧光探针)、Annexin V-FITC和CM-H<sub>2</sub>DCFDA购于上海碧云天生物技术有限公司。ROS清除剂N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)购于Sigma公司。iNOS抑制剂S-甲基异硫脲硫酸盐(S-methylisothiourea sulfate, SMT)、PD98059(MEK抑制剂)、SB203580(p38抑制剂)、SP600125(JNK抑制剂)购于Merck公司。

6孔、12孔和96孔细胞培养皿购于Costar公司。流式细胞仪(Beckman Coulter CytoFLEX)、蛋白质免疫印迹系统购于Amersham Bioscience公司。

### 1.3 细胞培养

MIN6细胞培养于内含10%的灭活新生胎牛血清(FBS)、100 U/mL青霉素/链霉素(penicillin/streptomycin, P/S)及1.443  $\mu$ L的 $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -mercaptothanol,  $\beta$ -ME)的DMEM培养基中,置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中培养。

### 1.4 MTT法检测细胞毒性

取对数生长期的MIN6细胞,以5 000/孔接种于96孔细胞培养皿中。待细胞贴壁后,用含1%的灭活新生胎牛血清(FBS)及100 U/mL青霉素/链霉素的培养液进行饥饿处理2 h,随后分别加入不同浓度STZ(0、0.1、0.5、1、5、10、20、30 mmol/L)继续孵育24 h,加入10  $\mu$ L MTT溶液孵育2 h,去掉上清,每孔加入100  $\mu$ L DMSO摇匀10 min,检测在490 nm处的吸光度(D)值。筛选出细胞凋亡的最适浓度。每组实验均做3次重复。

## 1.5 检测细胞凋亡

**1.5.1 流式细胞术检测法** 收集对照组(STZ浓度0 mmol/L)和处理组细胞(STZ浓度1、5、10、20、30 mmol/L)重悬于Binding buffer中,加荧光标记的Annexin V-FITC和PI-PE,在室温避光条件下孵育15 min。随即用流式细胞术分析10 000个细胞,得到细胞散点图。收集对照组和处理组细胞,重悬于Binding buffer中,加荧光标记的Annexin V-PE,在室温避光条件下孵育15 min。随即用流式细胞术分析10 000个细胞,得到波峰图。

**1.5.2 荧光显微镜检测法** 首先利用5 mmol/L的NAC和1 mmol/L的SMT预处理MIN6细胞24 h后,弃去上清液后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗2~3遍,分别加入Binding buffer,随后加入荧光标记的Annexin V-FITC和PI-PE,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>、相对饱和湿度(95%)培养箱中孵育15 min,利用荧光显微镜分别检测白光、红光、绿光以及红光与绿光的重叠下的荧光强度。

## 1.6 检测一氧化氮(NO)水平

收集处理组细胞,弃去上清液后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗2~3遍,加入5 μmol/L的DAF-FM DA(NO荧光探针),置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>中孵育30 min,弃去上清液,再用磷酸盐缓冲液(PBS)洗1~2遍,利用流式细胞术分析10 000个细胞。每组均重复3次。

## 1.7 蛋白质免疫印迹法(Western blot)

将处理后的细胞回收,加入蛋白质裂解液裂解,4 °C、12 000 r/min离心30 min,回收上清(蛋白质)。采用12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对20 μg细胞总蛋白提取物进行电泳。然后,蛋白质转移到硝酸纤维素膜,封闭,抗BAD(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、cleavage-Caspase-3(1:1 000)、P-p38(1:1 000)、p38(1:1 000)、iNOS(1:1 000)、Prdx V(1:1 000)和β-actin(1:2 000)一抗4 °C摇床孵育过夜。用TBST[含有10 mmol/L (Tris-HCL, TBS)、15 mmol/L的NaCl, 0.2% Tween-20]洗涤5次,每次5 min,与HRP标记的鼠或兔二抗(1:5 000)孵育1 h,洗膜、ECL底物作用、用蛋白质免疫印迹系统进行曝光、显影、定影及结果分析。每组实验均重复3次。

## 1.8 Prdx V基因沉默型MIN6细胞系构建

取对数生长期的MIN6细胞计数均匀种到12孔培养皿内,根据计数出的最佳浓度滴度加入病毒。

将含有ShPrdx V与Mock Prdx V的慢病毒分别转染MIN6细胞,并分别命名为ShPrdx V组与Mock组,未转染的MIN6细胞作为空白对照组。细胞从12孔细胞培养皿不断扩增直到生长到10 cm培养皿后,将常规培养24 h的各组细胞更换为含有5 μg/mL嘌呤霉素(puromycin)的DMEM培养液中进行抗性筛选,经过筛选后,利用Western blot对蛋白表达进行分析。

## 1.9 统计学分析

所有结果以均值±标准差表示,利用SPSS 13.0软件对所有数据进行t检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。每组实验均至少重复3次。

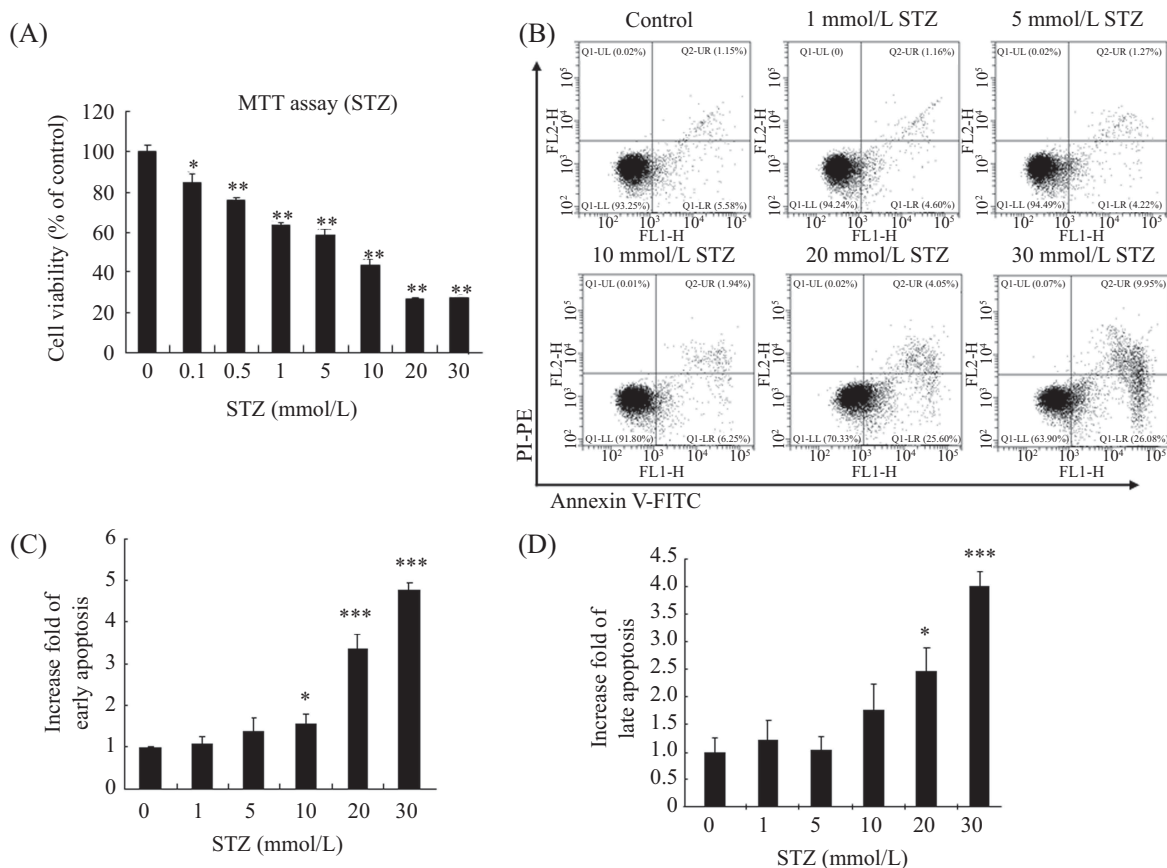
## 2 结果

### 2.1 STZ对MIN6细胞凋亡的影响

为研究STZ对MIN6细胞存活率的影响,我们用不同浓度(0、0.1、0.5、1、5、10、20、30 mmol/L)的STZ处理MIN6细胞24 h,利用MTT法检测MIN6细胞活性。结果显示,随着STZ浓度的增加,MIN6细胞存活率明显降低(图1A)。此外,为研究STZ对MIN6细胞凋亡的影响,用不同浓度(0、1、5、10、20、30 mmol/L)的STZ处理MIN6细胞24 h,利用流式细胞术检测MIN6细胞的凋亡情况。结果显示,随着STZ浓度的增加,MIN6细胞的早晚期(图1B~图1D)凋亡比率明显升高,呈现出浓度依赖性。

### 2.2 STZ通过p38信号通路调控NO的产生而诱导细胞凋亡

STZ不仅可以作为NO供体,还可通过抑制三羧酸循环产生大量ROS<sup>[14-15]</sup>。为了检测STZ诱导的细胞凋亡是否与细胞内的ROS、NO相关,我们利用NAC(N-Acetyl-L-cysteine,一种ROS清除剂)与SMT(S-methylisothiourea sulfate,一种iNOS抑制剂)预处理MIN6细胞30 min后,加入STZ(20 mmol/L)处理24 h,通过荧光显微镜和Western blot检测细胞凋亡情况及凋亡相关蛋白质表达量变化。结果显示,SMT可以有效地缓解STZ诱导的MIN6细胞凋亡,同时降低细胞内cleavage-Caspase-3的表达水平,而加入ROS清除剂NAC对STZ诱导的MIN6细胞凋亡及其相关蛋白质表达量没有产生影响(图2A和图2B)。为了进一步阐明STZ诱导MIN6细胞凋亡的机制,我们利用Western blot检测细胞内MAPK相关蛋白质表达量变化。结果发现,在STZ处理MIN6细胞1 h后,p38的磷酸化水平达到顶峰,JNK与ERK的



A: MTT法检测STZ对MIN6细胞活力的影响; B: 流式细胞术检测不同浓度的STZ处理MIN6细胞24 h后, 细胞凋亡情况; C: 流式细胞术检测细胞早期凋亡情况后的半定量分析; D: 流式细胞术检测细胞晚期凋亡情况后的半定量分析。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与0 mmol/L的STZ组比较。  
A: effect of STZ on the viability of MIN6 cells detected by MTT assay; B: the apoptosis of MIN6 cells treated with STZ for 24 h detected by flow cytometry; C: increased fold of cell early apoptosis was represented by the mean±S.D.. D: increased fold of cell late apoptosis was represented by the mean±S.D.. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs 0 mmol/L STZ group.

图1 STZ对MIN6细胞凋亡的影响

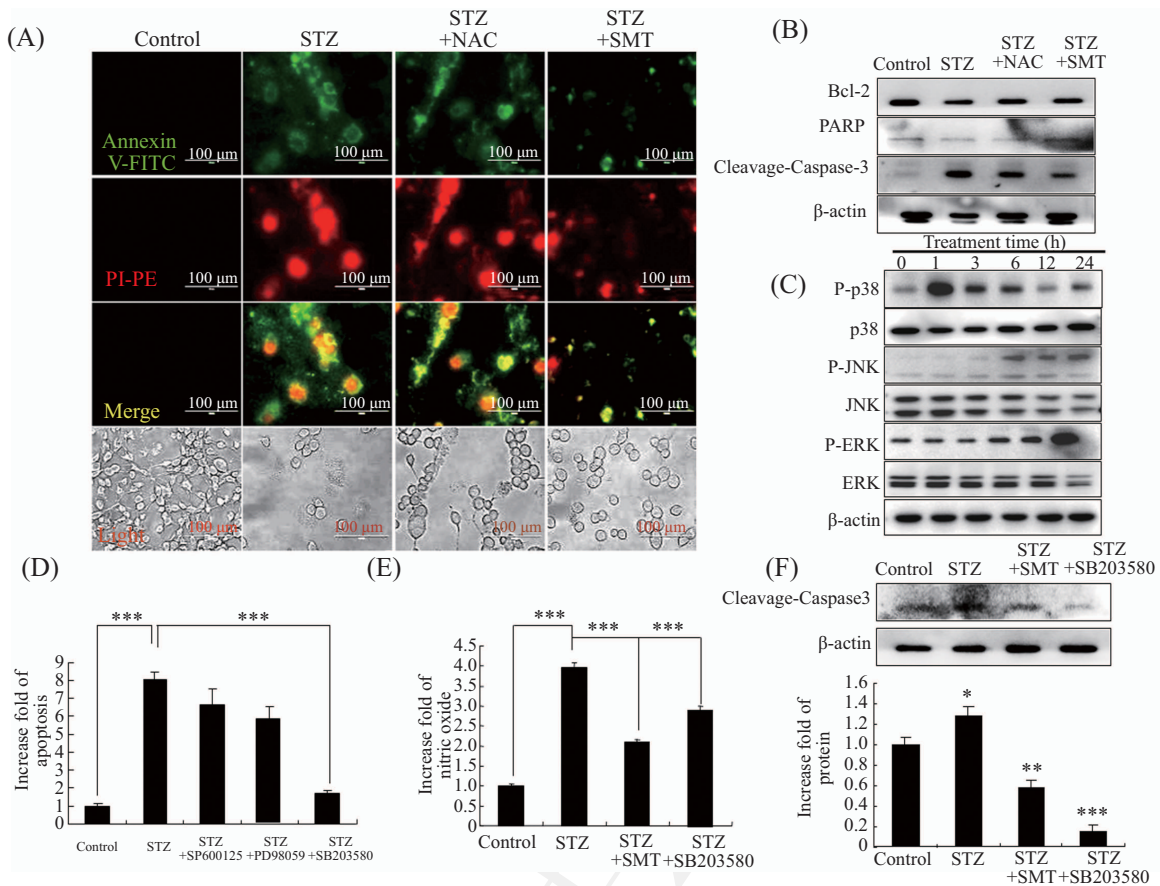
Fig.1 The effect of STZ on the apoptosis of MIN6 cells

磷酸化水平也逐渐增加(图2C)。同时, 利用三种不同的MAPK相关抑制剂[SP600125(JNK MAPK抑制剂)、PD98059(ERK MAPK抑制剂)和SB203580(p38 MAPK抑制剂)]分别预处理MIN6细胞30 min后, 加入STZ处理24 h, 利用流式细胞术检测细胞凋亡。结果显示, 三种MAPK抑制剂中, 只有SB203580明显缓解STZ诱导的MIN6细胞凋亡(图2D), 揭示p38信号传导通路调控STZ诱导的MIN6细胞凋亡。为了阐明细胞内NO产生与p38 MAPK信号通路的相互关系, 用SB203580处理细胞并检测细胞内的NO含量与凋亡相关蛋白表达水平的变化。结果显示, SB203580有效地抑制细胞内NO含量和cleavage-Caspase-3蛋白质水平(图2E和图2F)。

### 2.3 Prdx V基因沉默增加STZ诱导MIN6细胞凋亡程度

我们的前期研究结果显示, 在谷氨酸盐、SNP

和β-拉帕醌等诱导细胞凋亡过程中, 细胞内Prdx V均能起到一定的调控作用。为检测STZ诱导MIN6细胞凋亡过程中Prdx V水平的变化, 检测了用STZ(20 mmol/L)处理MIN6细胞不同时间段Prdx V的表达水平。结果显示, 随着STZ处理时间的增加, Prdx V蛋白质的表达水平与凋亡相关蛋白质cleavage-Caspase-3和cleavage-PARP水平均有明显上升(图3A)。为进一步研究Prdx V在STZ诱导MIN6细胞凋亡过程中的调控作用, 我们利用慢病毒转染技术, 构建了Prdx V基因沉默型(shPrdx V)和空载体MIN6细胞系(Mock)两种细胞系, 并且利用Western blot进行鉴定。结果显示, 构建的Prdx V基因沉默型MIN6细胞内Prdx V的蛋白质水平明显下降, 可用于后续实验和研究(图3B)。为了检测Prdx V基因沉默对STZ诱导的MIN6细胞存活率和凋亡的影响, Mock组和shPrdx V组MIN6细胞分别用不同浓度的STZ处



A: NAC、SMT预处理细胞30 min后, STZ处理24 h, 检测MIN6细胞凋亡情况(荧光显微镜照片), 绿光为Annexin V-FITC染色, 红光为PI染色, Merge为红光与绿光叠加, Light为白光下的细胞状态; B: NAC、SMT预处理细胞30 min后, STZ处理24 h, 检测细胞内凋亡相关蛋白质水平的变化; C: 通过Western blot检测STZ(20 mmol/L)处理MIN6细胞不同时间后, MIN6细胞内MAPKs相关蛋白水平变化情况; D: 利用SP600125、PD98059、SB203580分别预处理30 min后, 加入STZ处理24 h, 通过流式细胞术检测其凋亡情况, 并对其半定量分析; \*\*\* $P < 0.001$ 。E: 利用SMT、SB203580分别预处理30 min后, 加入STZ处理24 h, 通过流式细胞术检测细胞内的NO; \*\*\* $P < 0.001$ 。F: 利用SMT、SB203580分别预处理30 min后, 加入STZ处理24 h, 检测细胞内凋亡相关蛋白质cleavage-Caspase-3水平的变化。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与对照组比较。

A: the MIN6 cells were pretreated with NAC and SMT for 30 min, followed by STZ treatment for 24 h. The apoptosis of MIN6 cells was observed under fluorescence microscope. Annexin V-FITC (green), PI-PE (red), merge (Yellow) and light images were measured by fluorescence microscope. B: the MIN6 cells were pretreated with NAC for 30 min, followed by STZ treatment for 24 h. The apoptosis related protein levels were determined by Western blot. C: MIN6 cells were treated with STZ (20 mmol/L) for different times. The MAPKs-related-proteins levels in the MIN6 cells were analyzed by Western blot. D: the MIN6 cells were pretreated with SP600125, PD98059 and SB203580 for 30 min, followed by STZ treatment for 24 h. The apoptosis of MIN6 cells was detected by flow cytometry. \*\*\* $P < 0.001$ . E: the MIN6 cells were pretreated with SMT and SB203580 for 30 min, followed by STZ treatment for 24 h. NO production was then detected by flow cytometry. \*\*\* $P < 0.001$ . F: the MIN6 cells were pretreated with SMT and SB203580 for 30 min, followed by STZ treatment for 24 h, the level of cleavage-Caspase3 protein was determined by Western blot. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

### 图2 STZ通过p38 MAPK信号通路调控NO的产生

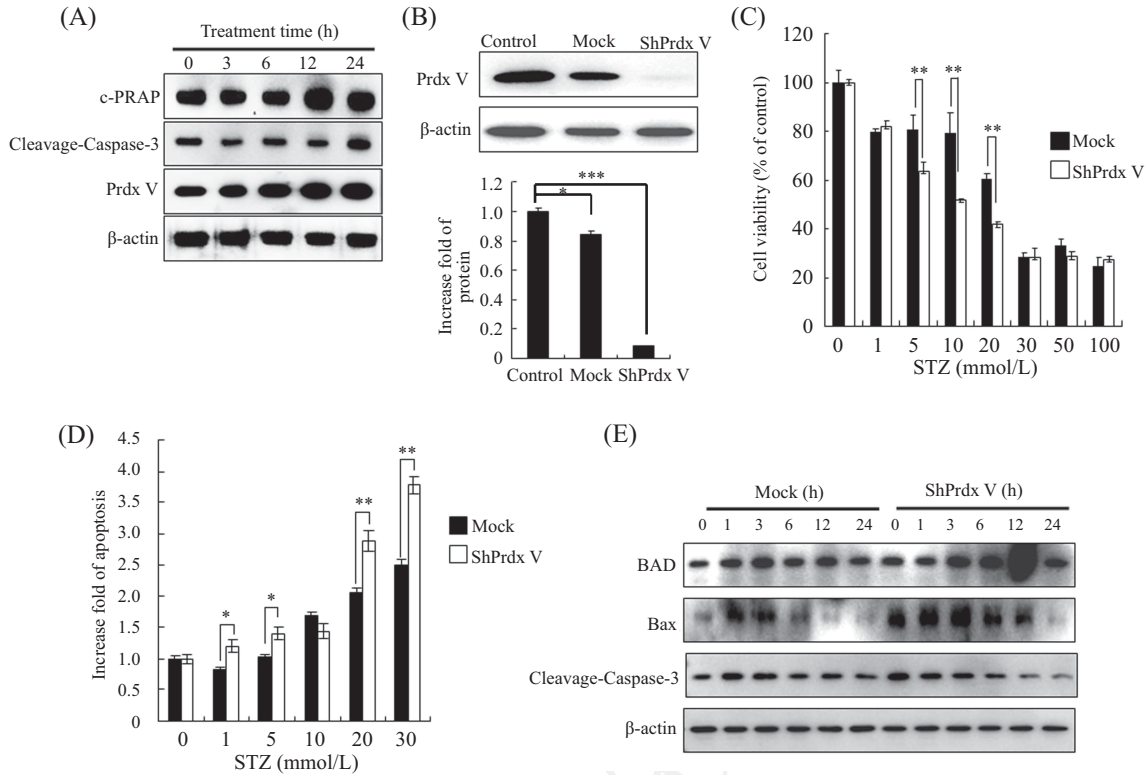
Fig.2 NO generated by STZ-induced p38 MAPK activation in the MIN6 cells

理24 h, 并利用MTT法和流式细胞术检测其细胞存活率和细胞凋亡情况。结果显示, ShPrdx V组的MIN6细胞的存活率明显低于Mock组(图3C), 并且细胞凋亡率明显高于Mock组(图3D和图3E)。同时, 通过Western blot检测STZ处理Mock组细胞与ShPrdx V组细胞不同时间段后细胞内凋亡相关蛋白质水平的变化, 结果发现, ShPrdx V组细胞中促凋亡蛋白质Bax与Bad水平明显高于Mock组, 凋亡相关蛋白Caspase-3

前体水平明显低于Mock组(图3F)。综上所述, STZ在ShPrdx V组细胞内通过激活Caspase-3信号通路引起ShPrdx V组细胞凋亡。

## 3 讨论

根据国际糖尿病联合会(International Diabetes Federation, IDF)统计报告显示, 中国2015年糖尿病患者人数居世界首位<sup>[18]</sup>。胰岛β细胞的过量凋亡是



A: 用20 mmol/L的STZ处理MIN6细胞不同时间后, 利用Western blot检测Prdx V蛋白质水平; B: 利用Western blot检测Prdx V缺失型MIN6细胞系中Prdx V的表达; C: 利用MTT检测STZ对ShPrdx V组与Mock组两种MIN6细胞系的细胞存活率的影响; D: 利用流式细胞术检测STZ对ShPrdx V组与Mock组两种MIN6细胞系的凋亡情况的影响; E: 利用Western blot检测凋亡相关蛋白质水平变化。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A: MIN6 was treated with STZ (20 mmol/L) for different times. The proteins level of Prdx V was determined by Western blot. B: the expression of Prdx V in the ShPrdx V MIN6 cells and Mock MIN6 cells detected by Western blot. C: effect of STZ on ShPrdx V MIN6 cells and Mock MIN6 cells viability detected by MTT assay. D: effect of STZ on ShPrdx V MIN6 cells and Mock MIN6 cells apoptosis detected by flow cytometry. E: the apoptosis-related-proteins levels were analyzed by Western blot. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图3 Prdx V基因沉默促进STZ诱导MIN6细胞凋亡

Fig.3 Silencing Prdx V promoted STZ-induced apoptosis in the MIN6 cells

诱发糖尿病的主要原因之一, 所以如何减少β细胞凋亡在研究糖尿病的发病机理具有重要的意义。

对STZ引起β细胞死亡的机制研究中学者发现, STZ主要通过产生大量的NO抑制线粒体内ATP生成, 引起黄嘌呤氧化酶催化反应, 造成DNA烷基化, 最终引起β细胞死亡<sup>[14-15]</sup>。另外, 也有研究表明, 细胞内过高的ROS和RNS也可以通过多种机制引起β细胞功能紊乱与细胞凋亡<sup>[3,19,20]</sup>。因此, 有效地清除细胞内ROS和NO是缓解STZ引起β细胞凋亡的有效途径之一。本研究发现, STZ可以有效地降低MIN6细胞的细胞存活率, 诱导MIN6细胞发生凋亡。同时, 利用ROS清除剂(NAC)和iNOS抑制剂(SMT)处理MIN6细胞后检测其凋亡以及凋亡相关蛋白质水平, 研究结果发现, STZ诱导的MIN6细胞凋亡主要与细胞内大量蓄积的NO相关而与细胞内的ROS水平并无直接的内在联系。这样的现象极有可能与STZ药

物的本身特点相关, 但其实际的作用机制需要进一步的研究和验证。

大量的研究表明, STZ主要通过调控细胞内MKK-MAPK信号通路引起细胞凋亡<sup>[20-24]</sup>, 同时, NO与MAPK信号通路之间也存在相互调节作用<sup>[25-26]</sup>。利用抑制剂分别抑制ERK、JNK和p38 MAPK信号通路后检测其对STZ诱导的MIN6细胞凋亡和细胞内NO含量影响, 研究结果显示, 只有p38 MAPK抑制剂具有明显抑制细胞凋亡及细胞内NO含量的效果。但是, 对于STZ诱导的p38 MAPK信号通路的激活机制以及p38 MAPK调控STZ诱导的NO产生分子机制有待于进一步的研究。

近年来的研究发现, Prdx I、Prdx II、Prdx III与Prdx VI等通过清除胰岛β细胞内ROS水平缓解细胞凋亡; 同时, 细胞内Prdx IV可改善内质网的折叠能力, 提高β细胞分泌胰岛素的能力<sup>[27-31]</sup>; 而Prdx V对胰

岛 $\beta$ 细胞凋亡的调控作用却尚不清晰。本研究结果发现,随着STZ诱导的MIN6细胞凋亡的增加细胞内Prdx V蛋白质水平也随之升高,预示着Prdx V极有可能参与STZ诱导的MIN6细胞凋亡过程并且具有一定的调控作用。利用慢病毒载体沉默Prdx V基因后检测其对STZ诱导的MIN6细胞活性和细胞凋亡的研究表明,Prdx V沉默增强了STZ诱导MIN6细胞凋亡程度。这说明,Prdx V对STZ诱导的MIN6细胞凋亡存在着重要的调控作用,但其作用机制及相关信号通路有待于进一步的研究和阐明。

综上所述,本研究初步阐明了STZ在MIN6细胞内引起细胞凋亡的机制及Prdx V在STZ诱导MIN6细胞凋亡过程中发挥的调控作用,为氧化应激诱导的胰岛 $\beta$ 细胞凋亡研究提供了新的理论依据。

### 参考文献 (References)

- Cai Y, Martens GA, Hinke SA, Heimberg H, Pipeleers D, Van de Casetele 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.
- 冯丽, 金永哲, 刘磊, 韩冰, 吕春阳, 崔玉东, 等. Peroxiredoxin V保护HT22小鼠海马神经细胞抵抗NO诱导的细胞凋亡. *中国细胞生物学学报*(Feng Li, Jin Yongzhe, Liu Lei, Han Bing, Lü Chunyang, Cui Yudong, *et al.* Peroxiredoxin V protects the HT22 cells against NO mediated apoptosis. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(1): 53-8.
- 赵君怡, 刘伟国, 郭秀丽. 一氧化氮与细胞凋亡相关疾病的关系及其调控. *中国药学杂志*(Zhao Junwei, Liu Weigou, Guo Xiuli. Relationship between nitric oxide and apoptosis related diseases and its regulation. *Chinese Pharmaceutical Journal*) 2010; 45(14): 1044-7.
- van Dyke K, Jabbour N, Hoeldtke R, Van Dyke C, Van Dyke M.. Oxidative/nitrosative stresses trigger type I diabetes: preventable in streptozotocin rats and detectable in human disease. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1203(1): 138-45
- Kitiphongspattana K, Khan TA, Ishii-Schrade K, Roe MW, Philipson LH, Gaskins HR. Protective role for nitric oxide during the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292(6): E1543-54.
- Gurdol F, Cimsit M, Oner-Iyidogan Y, Kocak H, Sengun S, Yalcinkaya-Demirsoz S. Collagen synthesis, nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in diabetic subjects undergoing hyperbaric oxygen therapy. *Physiol Res* 2010; 59(3): 423-9.
- 王宏, 莫畏, 王东. 2型糖尿病胰岛素抵抗与一氧化氮关系的研究进展. *医学综述*(Wang Hong, Mo Wei, Wang Dong. Study progress of relationship between insulin resistance in type 2 diabetes mellitus and nitric oxide. *Medical Recapitulate*) 2010; 16(8): 1242-4.
- Soskić SS, Dobutović BD, Sudar EM, Obradović MM, Nikolić DM, Djordjević JD, *et al.* Regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and its potential role in insulin resistance, diabetes and heart failure. *Open Cardiovasc Med J* 2011; 5: 153-63.
- Abbas K, Riquier S, Drapier J C. Peroxiredoxins and sulfiredoxin at the crossroads of the NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling pathways. *Methods Enzymol* 2013; 527: 113-28.
- Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 2001; 52(1/2): 35-41.
- Sun HN, Kim SU, Huang SM, Kim JM, Park YH, Kim SH, *et al.* Microglial peroxiredoxin V acts as an inducible anti-inflammatory antioxidant through cooperation with redox signaling cascades. *J Neurochem* 2010; 114(1): 39-50.
- 刘磊. Prx V对谷氨酸盐诱导HT22海马神经细胞凋亡的保护作用及其机理研究. 黑龙江八一农垦大学(硕士毕业论文)(Liu Lei. Protective role and mechanism study for Peroxiredoxin V in HT22 cell apoptosis induced by glutamate. Heilongjiang Bayi Agricultural University), 2016.
- 刘悦, 焦冰洋, 于楠楠, 王闯, 韩英浩, 金成浩, 等.  $\beta$ -拉帕醌通过下调过氧化物酶V诱导SW480结肠癌细胞凋亡. *中国细胞生物学学报*(Liu Yue, Jiao Bingyang, Wang Chuang, Yu Nannan, Han Yinghao, Jin Chenghao, *et al.*  $\beta$ -lapachone induced the apoptosis of SW480 colorectal cancer cell through down-regulation of the peroxiredoxin V expression. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2016; 38(12): 1487-93.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; 51(2): 216-26.
- Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; 50(6): 537-46.
- 冯俊杰, 戴阳丽, 王秀敏. MIN6细胞系的细胞学特性及其应用. *国际内分泌代谢杂志*(Feng Junjie, Dai Yangli, Wang Xiumin. Cytological characteristics and application of MIN6 cell line. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*) 2016; 36(2): 135-8.
- 王威, 张丹, 陈颖, 曹翠萍, 韩玲玲, 刘国良. 胰岛 $\beta$ 细胞株INS-1和MIN6有关糖毒性的比较研究. *中国现代医学杂志*(Wang Wei, Zhang Dan, Chen Ying, Cao Cuiping, Hang Lingling, Liu Guoliang. Comparison of glucotoxicity in pancreatic  $\beta$ cell line INS-1 and MIN6. *China Journal of Modern Medicine*) 2010; 20(13): 1940-2.
- 刘国栋, 王桦, 汪琦, 李晨芳, 曾尔亢, 吴晓玲. 四大类主要慢性病流行现状与应对策略. *中国社会医学杂志*(Liu Guodong, Wang Hua, Wang Qi, Li Chenfang, Zeng Erkang, Wu Xiaoling. The prevalence and coping strategies for four main chronic non-communicable diseases. *Chinese Journal of Social Medicine*) 2017; 34(1): 53-6.
- Meares GP, Fontanilla D, Broniowska KA, Andreone T, Lancaster JR Jr, Corbett JA. Differential responses of pancreatic  $\beta$ -cells to ROS and RNS. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 304(6): E614-22.
- Zhang Y, Mei H, Shan W, Shi L, Chang X, Zhu Y, *et al.* Lentinan protects pancreatic  $\beta$  cells from STZ-induced damage. *J Cell Mol Med* 2016; 20(10): 1803-12.
- Fukuda K, Tesch GH, Yap FY, Forbes JM, Flavell RA, Davis RJ, *et al.* MKK3 signalling plays an essential role in leukocyte-mediated pancreatic injury in the multiple low-dose streptozotocin model. *Lab Invest* 2008; 88(4): 398-407.

- 22 Mokhtari D, Myers J W, Welsh N. The MAPK kinase kinase-1 is essential for stress-induced pancreatic islet cell death. *Endocrinology* 2008; 149(6): 3046-53.
- 23 Cheon H, Cho JM, Kim S, Baek SH, Lee MK, Kim KW, *et al.* Role of JNK activation in pancreatic beta-cell death by streptozotocin. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 321(2): 131-7.
- 24 乌格敦其其格, 赵宗江, 蒋玉凤, 杨美娟, 张新雪, 张晓枚, 等. 糖肾平胶囊对STZ诱导糖尿病肾病大鼠肾脏保护及其对TGF- $\beta$ 1/p38MAPK信号转导通路的影响. *中华中医药杂志* (Wu Gedunqiqige, Zhao Zongjiang, Jiang Yufeng, Yang Meijuan, Zhang Xinxue, Zhang Xiaomei, *et al.* Protectory effects of Tang Shen Ping Capsule on kidneys in STZ-induced diabetic nephropathy rats and TGF- $\beta$ 1/p38MAPK signal pathway. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*) 2012; 27(4): 1092-7.
- 25 唐利华, 蒋竹英, 方热军. L-精氨酸/一氧化氮信号通路研究进展. *饲料研究*(Tang Lihua, Jiang Zhuying, Fang Rejun. *Progress in L-arginine/nitric oxide signaling pathway. Feed Research*) 2011; (3): 20-2.
- 26 陶 勇, 张美佳, 洪海燕, 夏国良. 哺乳动物细胞中一氧化氮与MAPK信号转导途径的调节关系. *自然科学进展*(Tao Yong, Zhang Meijia, Hong Haiyan, Xia Guoliang. *Regulation of nitric oxide in mammalian cells and the relationship of the MAPK signal transduction pathway. Progress in Natural Science*) 2004; 14(12): 1375-82.
- 27 Yoo JS, Lee YJ, Hyung KE, Yoon JW, Lee IH, Park SY, *et al.* Effect of PRX-1 downregulation in the type 1 diabetes microenvironment. *Korean J Physiol Pharmacol* 2012; 16(6): 463-8.
- 28 Oláhová M, Veal EA. A peroxiredoxin, PRDX-2, is required for insulin secretion and insulin/IIS-dependent regulation of stress resistance and longevity. *Aging Cell* 2015; 14(4): 558-68.
- 29 Wolf G, Aumann N, Michalska M, Bast A, Sonnemann J, Beck JF, *et al.* Peroxiredoxin III protects pancreatic cells from apoptosis. *J Endocrinol* 2010; 207(2): 163-75.
- 30 Mehmeti I, Lortz S, Elsner M, Lenzen S. Peroxiredoxin 4 improves insulin biosynthesis and glucose-induced insulin secretion in insulin-secreting INS-1E cells. *J Biol Chem* 2014; 289(39): 26904-13.
- 31 Paula FM, Ferreira SM, Boschero AC, Souza KL. Modulation of the peroxiredoxin system by cytokines in insulin-producing RINm5F cells: Down-regulation of PRDX6 increases susceptibility of beta cells to oxidative stress. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 374(1/2): 56-64.