

Toll 样受体 3 抑制胰岛 β 细胞生长的分子机制研究

王 怡¹, 祁岳坤², 姚旺林², 刘银龙², 郭 军^{1*}

(¹南京医科大学生物化学与分子生物学系, ²基础医学实验教学中心, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探索 Toll 样受体 3 (Toll-like receptor 3, TLR3)在调节大鼠胰岛 β 细胞株 INS-1 细胞生长中的作用及其相关机制。方法:采用 1%牛血清白蛋白 (BSA) 代替血清培养 12 h 使 INS-1 细胞同步化处于 G0 期。TLR3 的特异性激动剂聚肌胞 (polyinosinic-polycytidylic acid, PIC) 激活 TLR3, 26S 蛋白酶体抑制剂 MG132 抑制蛋白酶体活性。MTT 法检测细胞活力, 流式细胞术测定细胞周期, 实时定量 RT-PCR、免疫印迹 (Western blot) 法检测细胞周期相关蛋白 Cyclin D1 的表达。结果:和对照组相比, PIC 呈剂量依赖性抑制 INS-1 细胞生长活力 ($P < 0.05$); PIC 能显著阻滞 INS-1 细胞周期于 G1 期 ($P < 0.05$); PIC 处理组 Cyclin D1 的 mRNA 水平无明显变化 ($P > 0.05$), 但其蛋白水平显著下调 ($P < 0.05$); 给予蛋白酶体抑制剂 MG132 预处理能缓解此下调作用。结论:激活的 TLR3 可能通过蛋白酶体介导的 Cyclin D1 降解, 导致胰岛 β 细胞 G1 期阻滞, 从而抑制其增殖, 参与机体胰岛 β 细胞整体功能障碍的调节。

[关键词] 胰岛 β 细胞; Toll 样受体 3; 聚肌胞; Cyclin D1; 细胞周期

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)05-621-05

Effect of Toll-like receptor 3 on the proliferation of pancreatic β -cell

WANG Yi¹, QI Yue-kun², YAO Wang-lin², LIU Yin-long², GUO Jun^{1*}

(¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, ²Laboratory Center for Basic Medical Sciences, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of elevated Toll-like receptor 3 (TLR3) on the growth of INS-1 pancreatic β -cell and possible cell cycle changes during this process. **Methods:** INS-1 cells were synchronized at the G0 phase by serum deprivation for 12 h. Polyinosinic-polycytidylic acid (PIC) was used to activate TLR3, and the proteasome was inhibited with MG132. Cell viability was assessed by MTT colorimetric assay. Cell cycle distribution was measured by FACS analysis, and cell cycle protein Cyclin D1 was further detected using real-time RT-PCR and Western blot analysis. **Results:** PIC significantly inhibited the viability of INS-1 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Furthermore, PIC induced an increase in the proportion of cells at the G1 phase and a corresponding decrease in the number of cells at the S phase ($P < 0.05$). Additionally, PIC treatment caused a significant reduction in Cyclin D1 levels ($P < 0.05$), but without a parallel decrease in Cyclin D1 mRNA levels ($P > 0.05$). Inhibition of the proteasome with MG132 rescued Cyclin D1 protein from degradation. **Conclusion:** The results suggest that TLR3 activation with PIC directly inhibits pancreatic β -cell proliferation through cell cycle arrest at the G1 phase, possibly by downregulation of Cyclin D1 in a proteasome-dependent manner, which ultimately results in an overall β -cell mass deficiency.

[Key words] pancreatic β -cell; TLR3; polyinosinic-polycytidylic acid; Cyclin D1; cell cycle

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 621-625]

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是一种模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRRs)。其中, Toll 样受体 3 (TLR3) 是机体抗病毒免疫应答系统的一个重要组成成分, 除了能识别病毒的双链

RNA (double stranded RNA, dsRNA) 外, 还能识别一种人工合成的 dsRNA 类似物聚肌胞 (polyinosinic-polycytidylic acid, PIC)^[1]。在 2 型糖尿病患者中常伴有 TLRs 活性升高的现象。研究发现, TLRs 的激活可能与 β 细胞的功能障碍密切相关^[2]。有报道称 TLR3 的激活能显著抑制内皮细胞的增殖^[3]; PIC 诱导的 TLR3 激活能促进胰岛 β 细胞凋亡^[4], 但对其

[基金项目] 国家自然科学基金 (81170714)

*通讯作者, E-mail: Guoj69@yahoo.com.cn

在增殖方面的调节作用尚不十分清楚。本实验以大鼠胰岛 β 细胞株 INS-1 细胞为实验对象,观察不同浓度的 PIC 对体外培养的 INS-1 细胞增殖的影响,并探讨其发生的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠的 INS-1 细胞为本实验室保存的美国 ATCC 细胞系。胎牛血清购自美国 Gibco 公司, RPMI1640 培养基、Antibiotic-Antimycotic (100 \times)、TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;蛋白抑制剂购自瑞士 Roche Applied Science 公司;实时定量 RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;ECL-plus 显色液购自美国 Thermo 公司;MG132 和抗兔细胞周期相关蛋白 Cyclin D1 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;抗小鼠单克隆抗体 β -actin 购自武汉博士德生物工程有限公司;辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;PIC、四甲基偶氮唑盐 (MTT)、牛血清白蛋白 (BSA) 及其余化学试剂均购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物处理

INS-1 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基 (10 mmol/L 丙酮酸钠、10 mmol/L HEPES 及 55 μ mol/L β -巯基乙醇、10 ml/L Antibiotic-Antimycotic) 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的细胞孵箱中培养,待 INS-1 细胞长至 80% 左右融合度时,弃去原有培养基,用无血清的含 1% BSA 的 RPMI1640 培养基对细胞进行 12 h 同步化培养,然后给予细胞不同浓度的 PIC 处理,或提前 1 h 给予 26S 蛋白酶体抑制剂 MG132 (20 μ mol/L) 进行预处理。

1.2.2 MTT 法测定细胞生长活力

将 INS-1 细胞按每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板,待融合度达 80% 左右时,细胞同步化 12 h,弃去原有培养基,分别加入 0、25、50、75、100、150 μ g/ml 的 PIC 处理,每组 5 个复孔,每孔总反应体系为 200 μ l。48 h 后,每孔加入 MTT 20 μ l,继续培养 4 h。弃去上清液,每孔加入二甲亚砜 150 μ l,震荡 10 min,酶标仪测定 490 nm 波长处各实验组的吸光度值 $D(490 \text{ nm})$ 。实验重复 3 次。

1.2.3 细胞周期分析

将 INS-1 细胞按每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔培养板,待融合度达 80% 左右时,细胞同步化培养 12 h 后,弃去原有培养基,分别加入 0、50、75、

100、150 μ g/ml 的 PIC 处理。48 h 后分别消化细胞,离心收集悬浮和贴壁细胞,用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 缓冲液洗细胞 2 遍。然后用 4 $^{\circ}$ C 预冷 75% 的乙醇重悬细胞,并于 -20 $^{\circ}$ C 固定过夜。离心弃去上清液, PBS 洗细胞 1 遍。每个样本取 450 μ l PBS 重悬细胞,加入 50 μ l 的碘化丙锭 (PI, 0.5 mg/ml), 混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30 min。离心弃去上清液, PBS 重悬细胞,上流式细胞仪 (FACSCalibur, 美国 BD 公司) 检测细胞周期分布并分析。

1.2.4 实时定量 RT-PCR 检测 Cyclin D1 的 mRNA 水平

将 INS-1 细胞按每孔 1×10^6 个细胞接种于 60 mm 的培养皿,待融合度达 80% 左右时,细胞同步化 12 h,弃去原有培养基,分别加入 0、50、75、100、150 μ g/ml 的 PIC 处理。48 h 后消化细胞收集样本,提取各组细胞总 RNA。分别合成 Cyclin D1 和 β -actin 引物。Cyclin D1 上游引物:5'-AATGGAACTGCTTCTGTGAACA-3', 下游引物:5'-CGGATGATCTGCTTGT-TCTCATC-3'; β -actin 上游引物:5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTG-3', 下游引物:5'-GGGCTGTTGAGGTCTCAAA-3'。采用一步法实时定量 RT-PCR 分析各组细胞中 Cyclin D1 的 mRNA 水平。反应体系 20 μ l: dH₂O 6.0 μ l, DNA 模板 2.0 μ l, Cyclin D1 上下游引物各 0.8 μ l (或 β -actin 上下游引物各 0.8 μ l)、ROX Reference Dye (50 \times) 0.4 μ l, SYBR 10.0 μ l。反应条件为:预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s,接着 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s 进行 40 个循环,最后 1 个循环结束后,得到 1 条 55~95 $^{\circ}$ C 的溶解曲线。每个样本设置 3 个复孔。

1.2.5 Western blot 检测 Cyclin D1 的蛋白表达水平

采用蛋白裂解液 (50 mmol/L HEPES pH7.4, 100 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 320 mmol/L 蔗糖, 50 mmol/L NaF, 1 mmol/L 原钒酸钠, 蛋白酶抑制剂) 在 4 $^{\circ}$ C 提取细胞蛋白。10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白。采用半干转移法转膜,并将转膜后的硝酸纤维素膜浸入封闭液 (3% BSA), 室温封闭 2 h。分别加入稀释的各种一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜。洗膜后, HRP 标记的二抗室温孵育 2 h。ECL-plus 显色液显色,扫描后进行图像分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理,数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,样本均数比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的 PIC 对 INS-1 细胞生长的影响

用不同浓度的 PIC (0、25、50、75、100、150 $\mu\text{g/ml}$) 分别作用于 INS-1 细胞 48 h。与对照组(PIC 0 $\mu\text{g/ml}$) 相比,75、100、150 $\mu\text{g/ml}$ PIC 均能抑制细胞生长,且呈剂量依赖性,各浓度作用下细胞生长程度分别为对照组的 93.5%、83.2%、57.2%,差异有统计学意义 (P 均 < 0.05 ,图 1),表明 TLR3 的激活能抑制 INS-1 细胞的生长活力。

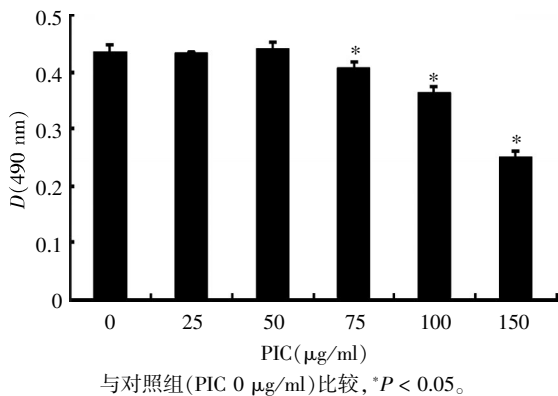


图 1 不同浓度的 PIC 对 INS-1 细胞生长活力的影响

Figure 1 Effects of different concentrations of PIC on cell viability of INS-1 cells

2.2 不同浓度的 PIC 对 INS-1 细胞周期的影响

用不同浓度的 PIC (0、50、75、100、150 $\mu\text{g/ml}$) 分别作用于细胞 48 h。与对照组 (PIC 0 $\mu\text{g/ml}$) 相比,100、150 $\mu\text{g/ml}$ PIC 均可使细胞周期阻滞于 G1 期,细胞比例分别明显上升至(59.52 \pm 4.23)%和(65.94 \pm 4.87)%;S 期细胞比例显著降低,分别降至(20.87 \pm 1.85)%和(18.85 \pm 1.17)%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 2),表明 TLR3 的激活诱导 INS-1 细

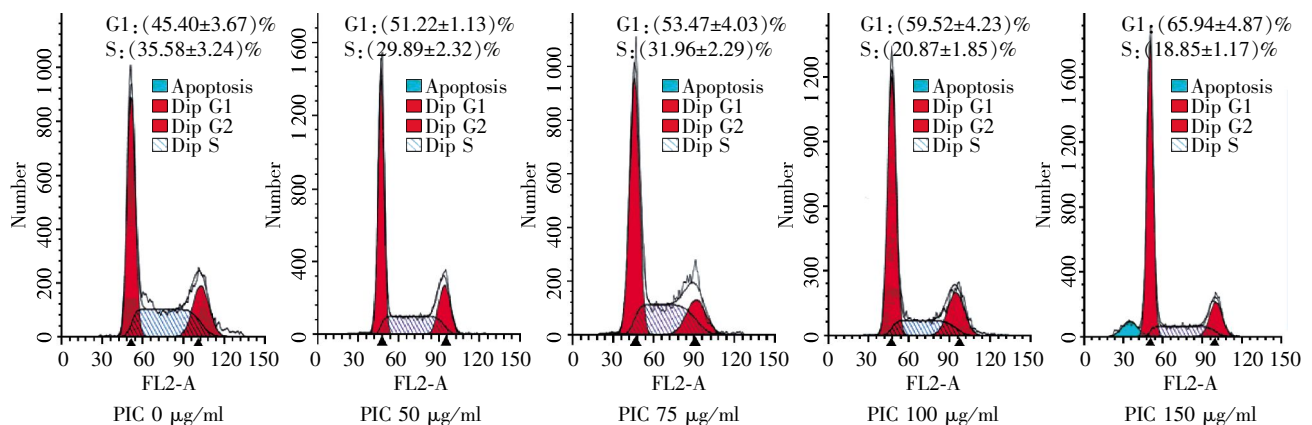


图 2 不同浓度的 PIC 对 INS-1 细胞周期的影响

Figure 2 Effects of different concentrations of PIC on cell cycle distribution of INS-1 cells

胞周期 G1 期阻滞。

2.3 实时定量 RT-PCR 结果

用不同浓度的 PIC (0、50、75、100、150 $\mu\text{g/ml}$) 分别作用于细胞 48 h。以 β -actin 为内参,采用一步法实时定量 RT-PCR 分析各组细胞中 Cyclin D1 的 mRNA 水平。与对照组(PIC 0 $\mu\text{g/ml}$) 相比,各实验组 Cyclin D1 mRNA 水平无明显变化,差异无统计学意义 ($P > 0.05$,图 3)。

2.4 Cyclin D1 蛋白表达分析结果

Western blot 法检测 TLR3 的激活对 Cyclin D1 蛋白含量的影响。与对照组(PIC 0 $\mu\text{g/ml}$) 相比,随着 PIC 剂量逐渐加大,Cyclin D1 蛋白表达水平显著降低,在 100、150 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下,Cyclin D1 蛋白表达水平较对照组分别降低 (36.08 \pm 8.23)%、(74.89 \pm 1.98)%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 4A),表明 TLR3 的激活下调 INS-1 细胞中 Cyclin D1 的蛋白水平。而提前 1 h 给予蛋白酶体抑制剂 MG132 (20 $\mu\text{mol/L}$) 预处理后,PIC 诱导的 Cyclin D1 表达下调作用得到缓解,下调程度与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$,图 4B)。

3 讨论

近年来,越来越多的研究发现,代谢性疾病如 2 型糖尿病的发病机制与免疫系统的激活及代谢功能的紊乱密切相关,而免疫应激和代谢系统之间存在密切的联系。当机体面临各种环境威胁如微生物感染和理化损伤时,免疫系统激活且诱导一系列的应激反应,这个过程需要机体能量的组织与再分配,通过病原体识别途径和营养物识别途径相互协调来完成^[5]。最原始的应答系统同时整合了病原体和营养物识别途径,以致营养物能诱导免疫应答,病原

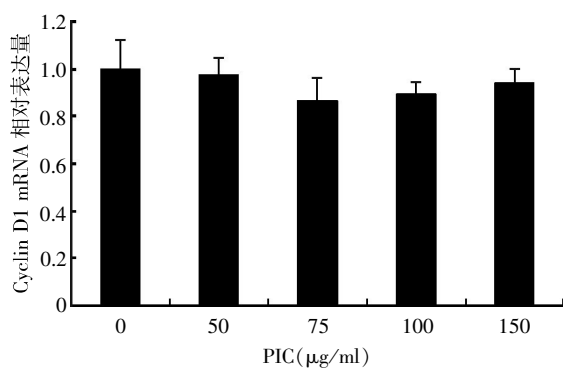
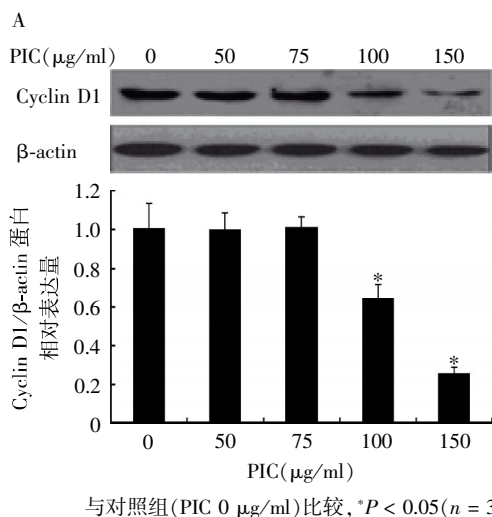


图3 实时定量 RT-PCR 检测不同浓度 PIC 处理 48 h Cyclin D1 的 mRNA 水平

Figure 3 INS-1 cells were treated with different concentrations of PIC and real-time RT-PCR was used to determine Cyclin D1 mRNA expression



与对照组(PIC 0 µg/ml)比较, * $P < 0.05$ ($n = 3$)。

A: 以不同浓度 PIC 处理 INS-1 细胞 48 h, Western blot 检测 Cyclin D1 表达; B: 提前 1 h 给予 MG132 (20 µmol/L) 预处理, 随后以不同浓度 PIC 处理 INS-1 细胞 48 h, Western blot 检测 Cyclin D1 表达。

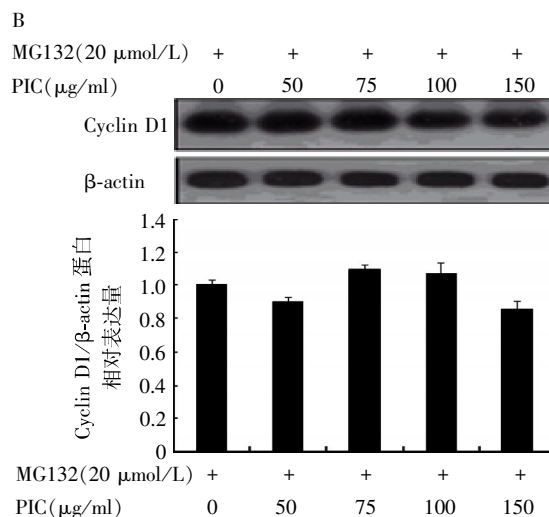
图4 Western blot 检测 Cyclin D1 表达

Figure 4 Western blot analysis of the protein level of Cyclin D1

型中, TLR4 水平显著上调, 并参与调节胰岛 β 细胞功能障碍^[9]。TLR3 作为 TLRs 家族的另一成员, 能特异性识别病毒的 dsRNA 及其类似物 PIC。已有研究表明, 体内多种细胞均可表达 TLR3, 如胰岛 β 细胞和神经细胞。PIC 刺激可以抑制神经祖细胞的增殖并诱导其功能障碍^[10]; PIC 刺激内皮细胞能显著性抑制其增殖并诱导细胞凋亡^[3]。本研究结果显示, PIC 诱导的 TLR3 激活可显著抑制胰岛 β 细胞的生长活力, 且作用呈剂量依赖性。在细胞周期调控中, G1~S 期之间的调控点是细胞内外信号传递、整合汇集到细胞核对细胞的增殖进行调控的关键点。本研究结果显示, TLR3 的激活可使胰岛 β 细胞阻滞于 G1 期, 降低 S 期细胞比例。提示通过阻滞细胞周期进程中 G1 期向 S 期的转换是 TLR3 激活对胰岛 β

体亦能促发和调节代谢反应。天然免疫系统主要由一系列的免疫细胞组成, 行使抗原递呈的功能^[6]。这些细胞内部或表面存在 TLRs。TLRs 是参与天然免疫的主要模式识别受体之一, 与许多微生物病原体及其产物的病原相关分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMP) 结合后通过刺激信号的级联反应诱导炎症因子和细胞因子的产生, 在抗感染的过程中起重要作用。近年来研究表明, TLRs 可以作为联系免疫系统与代谢系统的纽带, 参与代谢性疾病如 2 型糖尿病的发病过程。

作为在代谢系统中发挥重要作用的一类免疫分子, 有研究报道发现, TLRs 的表达在 2 型糖尿病患者中出现显著性上调^[7-8]。在胰岛 β 细胞脂毒性模



细胞增殖抑制作用的机制之一。

细胞周期蛋白 Cyclin D 家族是细胞周期 G1~S 期之间的重要调控分子。研究表明, Cyclin D 的各成员 Cyclin D1、D2 和 D3 均为 G1 期的正性调节蛋白, 在细胞分裂增殖方面发挥重要作用^[11-12]。与其他细胞一样, β 细胞中也有 Cyclin D1、D2 和 D3 的表达, 但 Cyclin D3 的表达水平比较低^[13]。其中 Cyclin D1 的过表达能显著诱导小鼠胰岛细胞的增殖, 且对成年小鼠 β 细胞的数量维持具有极其重要的作用^[14-15]。本研究检测了 Cyclin D1 的蛋白水平, 结果显示, 与对照组比较, PIC 处理组 Cyclin D1 蛋白水平明显下调, 且呈剂量依赖性。但值得注意的是, Cyclin D1 的 mRNA 水平并没有表现出与其蛋白水平一致的下调现象(图 3)。由此推测可能存在翻译后调节方式。最

近有研究表明,泛素/蛋白酶体介导的降解途径在 Cyclin D1 的调控中扮演重要角色^[6]。于是本研究采用 26S 蛋白酶体抑制剂 MG132 在给予 PIC 前对 INS-1 细胞进行预处理,结果显示 PIC 诱导的 Cyclin D1 表达下调现象得到缓解(图 4B)。这一结果证实了本研究的推测,提示 TLR3 的激活可能通过诱导蛋白酶体介导的 Cyclin D1 降解,从而阻滞 β 细胞周期进程,影响其分裂增殖。

综上所述,本研究证实了 TLR3 的激活能抑制 INS-1 细胞的生长和增殖,继而可能影响机体胰岛 β 细胞的整体功能。且该过程可能通过蛋白酶体介导的 Cyclin D1 降解,使细胞滞留于 G1 期,从而抑制细胞周期进程,影响其增殖。这一结果有助于更全面地认识 TLR3 信号对胰岛 β 细胞功能障碍的调节作用,并为 2 型糖尿病的治疗提供新的思路。

[参考文献]

- [1] Bruno ME, Frantz AL, Rogier EW, et al. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor by the classical and alternative NF- κ B pathways in intestinal epithelial cells [J]. *Mucosal Immunol*, 2011, 4(4): 468-478
- [2] Ehse JA, Meier DT, Wueest S, et al. Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet [J]. *Diabetologia*, 2010, 53(8): 1795-1806
- [3] Zimmer S, Steinmetz M, Asdonk T, et al. Activation of endothelial Toll-like receptor 3 impairs endothelial function [J]. *Circ Res*, 2011, 108(11): 1358-1366
- [4] Dogusan Z, Garcia M, Flamez D, et al. Double-stranded RNA induces pancreatic beta-cell apoptosis by activation of the Toll-like receptor 3 and interferon regulatory factor 3 pathways [J]. *Diabetes*, 2008, 57(5): 1236-1245
- [5] 朱大龙. 对代谢性疾病病因学研究的思考 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2007, 15(10): 581-585
- [6] 陈海冰, 贾伟平. 糖尿病与免疫 [J]. *临床内科杂志*, 2007, 24(3): 159-161
- [7] Dasu MR, Devaraj S, Park S, et al. Increased Toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(4): 861-868
- [8] Wang YZ, Liang QH, Ramkalawan H, et al. Expression of Toll-like receptors 2, 4 and 9 in patients with guillain-barre syndrome [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2012, 19(1): 60-68
- [9] Reyna SM, Ghosh S, Tantiwong P, et al. Elevated Toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects [J]. *Diabetes*, 2008, 57(10): 2595-2602
- [10] Lathia JD, Okun E, Tang SC, et al. Toll-like receptor 3 is a negative regulator of embryonic neural progenitor cell proliferation [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(51): 13978-13984
- [11] Kushner JA, Ciemerych MA, Sicinska E, et al. Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic β -cell growth [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(9): 3752-3762
- [12] Cozar-Castellano I, Weinstock M, Haught M, et al. Evaluation of β -cell replication in mice transgenic for hepatocyte growth factor and placental lactogen: comprehensive characterization of the G1/S regulatory proteins reveals unique involvement of p21^{cip} [J]. *Diabetes*, 2006, 55(1): 70-77
- [13] Heit JJ, Karnik SK, Kim SK. Intrinsic regulators of pancreatic beta-cell proliferation [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22(10): 311-338
- [14] Zhang X, Gaspard JP, Mizukami Y, et al. Overexpression of Cyclin D1 in pancreatic β -cells in vivo results in islet hyperplasia without hypoglycemia [J]. *Diabetes*, 2005, 54(3): 712-719
- [15] He LM, Sartori DJ, Teta M, et al. Cyclin D2 protein stability is regulated in pancreatic beta-cells [J]. *Mol Endocrinol*, 2009, 23(11): 1865-1875
- [16] Jennifer F, Dionissios B, Shuo W, et al. PKR and PKR-like endoplasmic reticulum kinase induce the proteasome-dependent degradation of Cyclin D1 via a mechanism requiring eukaryotic initiation factor 2 α phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(6): 3097-3108

[收稿日期] 2012-01-03