

RIG-I 上调抑制胰腺 β 细胞增殖机制研究

潘 漪,高丽丽,王鼎玉,陈婷婷,郭 军*

(南京医科大学生物化学与分子生物学系,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨维甲酸诱导基因 I(retinoic acid inducible gene-I, RIG-I)在小鼠胰岛 β 细胞株 NIT-1 生长中的作用及其相关分子机制。**方法:**应用不同浓度(1、5、10、20、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$)的 RIG-I 特异性激动剂维甲酸(retinoic acid, RA)分别刺激 NIT-1 细胞 6、12、24 h,上调 RIG-I。MTT 法检测细胞生长活力;real-time PCR 测定 RIG-I 的 mRNA 水平;免疫印迹法检测 RIG-I 和细胞周期蛋白 P27 蛋白水平;EdU 和流式细胞术检测 β 细胞的增殖和分裂周期。**结果:**维甲酸处理能刺激 NIT-1 细胞 RIG-I 蛋白水平增加($P < 0.05$),能剂量依赖地抑制 NIT-1 细胞生长活力($P < 0.05$),且诱导 NIT-1 细胞 G1 期阻滞和周期抑制蛋白 P27 蛋白水平增加($P < 0.05$)。**结论:**RIG-I 的功能增强能诱导小鼠胰岛 β 细胞 P27 蛋白水平上调,一定条件下抑制 β 细胞增殖和诱导细胞周期 G1 期阻滞,从而导致机体胰岛 β 细胞整体功能的失代偿,可能是 2 型糖尿病发生发展的重要诱因。

[关键词] 维甲酸;维甲酸诱导基因 I;胰腺 β 细胞;p27;细胞周期

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)05-564-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160511

Effects of retinoic acid inducible gene-I on the proliferation of pancreatic β -cell

Pan Yi, Gao Lili, Wang Dingyu, Chen Tingting, Guo Jun*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of elevated retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) on the growth of NIT-1 pancreatic β -cell and possible mechanisms during this process. **Methods:** Different concentrations of retinoic acid (RA) were used to activate RIG-I with different periods. Cell viability was assessed by MTT colorimetric assay. RIG-I was detected using real-time RT-PCR and Western blot analysis. Cell cycle distribution was measured by FACS analysis, and cell cycle protein p27 was further detected by Western blot analysis. **Results:** Retinoic acid upregulated the mRNA and protein level of RIG-I in NIT-1 cells ($P < 0.05$). Elevated RIG-I significantly inhibited the viability of NIT-1 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Furthermore, elevated RIG-I 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, elevated RIG-I caused a significant increase of p27 protein ($P < 0.05$). **Conclusion:** The results suggest that activated RIG-I induced upregulation of p27 in pancreatic β -cell, which inhibits proliferation through cell cycle arrest at the G1 phase, and ultimately results in an overall β -cell mass deficiency.

[Key words] retinoic acid; RIG-I; pancreatic β -cell; p27; cell cycle

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(05):564-568, 582]

维甲酸(RA)诱导基因 I (RIG-I) 是一个典型的胞内模式识别受体。在病毒 dsRNA 刺激下, RIG-I 能激活并参与多种炎症因子表达的调节^[1-2], 继而启动固有免疫和适应性免疫效应, 通过诱导感染细胞凋亡和增殖抑制来保护机体。最近的研究发现: RIG-I 能在 1 型糖尿病中激活, 并参与了胰岛 β 功

能下调及糖尿病的发生^[3]。而其是否与 2 型糖尿病有关并不清楚。

2 型糖尿病是以营养过度、肥胖、代谢组织慢性炎症为诱因的代谢性疾病。胰岛 β 细胞功能失代偿是其发病的重要特征^[4]。机体内 β 细胞数量是调节胰岛 β 细胞代偿功能的重要因素。本研究拟确定 RIG-I 激活对胰岛 β 细胞分裂增殖的影响, 揭示 RIG-I 抑制机体胰岛 β 细胞增殖抑制的机制, 为 2 型糖尿病的防治探寻新的药物靶点和治疗途径。

[基金项目] 国家自然科学基金(面上项目 81170714)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: guoj@njmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

RPMI1640 培养基(含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素)。RIG-I 抗体(Cell Signalling Technology 公司,美国)、P27 抗体(Enogene Biotech 公司,美国)、 β actin 抗体(武汉博士德公司)。维甲酸(RA, Sigma 公司,美国)。FITC 标记山羊抗兔 IgG、罗丹明标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 NIT-1 细胞培养

NIT-1 细胞由本实验室保存。将复苏后的 NIT-1 细胞培养于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,置于含 5%CO₂、37℃恒温培养箱中生长。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 实时定量 RT-PCR 分析

NIT-1 细胞按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,培养 24 h,细胞贴壁后进行给药处理。用含有不同浓度 RA 的 RPMI1640 培养基处理 24 h,提取各组细胞总 RNA。分别合成 RIG-I 和 β -actin 引物。RIG-I 上游引物:5'-GGACGTGGCAAACAAATCAG-3',下游引物:5'-GCAATGTCAATGCCTTCATCA-3'; β -actin 上游引物:5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTG-3',下游引物:5'-GGGGTGTGAAGTCTCAA-3'。采用一步法实时定量 RT-PCR 分析各组细胞中 RIG-I 的 mRNA 水平。反应体系 20 μ L:ddH₂O 6.0 μ L、DNA 模板 2.0 μ L、RIG-I 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℃ 30 s;接着 95℃ 5 s,60℃ 34 s 进行 40 个循环;最后 1 个循环结束后,得到 1 条 55~95℃的熔解曲线。每个样本设置 3 个复孔。

1.2.3 Western blot 分析

NIT-1 细胞按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,培养 24 h,细胞贴壁后进行给药处理。用含有不同浓度 RA 的 RPMI1640 培养基处理 24 h 后,收集细胞提取物。检测 RIG-I、P27 蛋白表达。 β -actin 用作内参照。实验方法:处理后的细胞弃去培养基,用预冷的 PBS 润洗 3 次,加入总蛋白裂解液,于冰上裂解 30 min,用细胞刮刀收集裂解液于 EP 管中,高速离心(15 000 g 10 min),取上清,用 BCA 法测定蛋白质浓度。按 5:1 体积比与上样缓冲液混合,100℃变性 5 min,冷却后置于-20℃保存。电泳时,约取 10 μ g 蛋白上样于

10%聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后转印至 NC 膜,牛奶封闭 2 h,4℃过夜孵育 RIG-I、P27 或 β -actin 特异性一抗,后与特异性二抗室温孵育 2 h,ECL 试剂处理曝光。扫描图片,用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.2.4 MTT 分析

NIT-1 细胞按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板,每孔 200 μ L 培养基,每组 5 个复孔培养,培养 24 h,细胞贴壁后进行给药处理。对照组为 DMSO 溶剂,实验组分别用含有 1、5、10、20、50、100 μ mol/L RA 的 RPMI1640 培养基处理 6、12、24 h 进行检测。检测方法:每孔加 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μ L,继续孵育 4 h,弃去孔内上清液,每孔加 150 μ L DMSO,振荡 5 min,用酶标仪检测 490 nm 波长各孔的吸光度值。

1.2.5 EdU 荧光标记检测细胞增殖

NIT-1 细胞按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,培养 24 h,细胞贴壁后进行给药处理。用含有不同浓度 RA 的 RPMI1640 培养基处理 24 h 吸去液体每孔加入 500 μ L 50 μ mol/L 的 EdU 培养基孵育 2 h 后 PBS 洗 1~2 次,每次 5 min。每孔加入 100 μ L 细胞固定液,室温脱色摇床孵育 30 min。弃固定液用 2 g/L 甘氨酸每孔 1 mL 脱色摇床孵育 5 min 后用每孔 1 mL PBS 脱色摇床孵育,每次 5 min。吸去 PBS,每孔加入 500 μ L 渗透剂,脱色摇床孵育 10 min 后用每孔 1 mL PBS 脱色摇床孵育 10 min。吸去 PBS,每孔加入 500 μ L 的 Apollo 反应液,避光,室温脱色摇床孵育 30 min。吸去反应液每孔加入 500 μ L 渗透剂于脱色摇床孵育 3 次,每次 10 min。吸去渗透剂每孔每次加入 1 mL 甲醇冲洗 1~2 次,每次 5 min。吸去甲醇每孔加入 Hoechst 33342 反应液,避光,室温脱色摇床孵育 30 min。吸去 Hoechst 33342 每孔加入 1 mL PBS 脱色摇床孵育 1~3 次,染色完成后立即于荧光显微镜下观察。

1.2.6 细胞流式术分析

NIT-1 细胞按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,培养 24 h,细胞贴壁后进行给药处理。用含有不同浓度 RA 的 RPMI1640 培养基处理 24 h 后,收集细胞于流式管中,用 75%乙醇固定过夜。细胞用碘化丙啶(PI)染色,测定 G1 期和 S 期细胞的百分比。

1.3 统计学方法

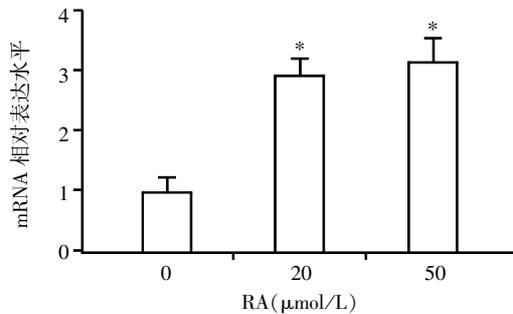
统计分析采用 SPSS12.0 统计软件完成。计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较用方差分析和 SNK 法两两比较。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计

学意义。

2 结果

2.1 RA 能上调 RIG-I 在小鼠胰岛 β 细胞的表达水平

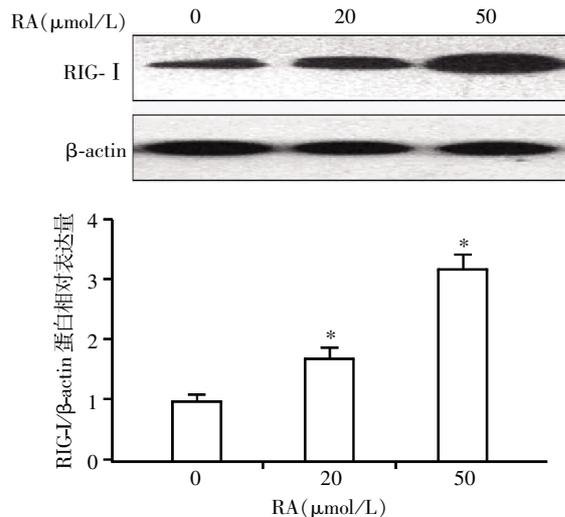
不同剂量 RA(20、50 μmol/L) 处理小鼠胰岛 β 细胞系 NIT-1 24 h。以 β-actin 为内参,采用一步法实时定量 RT-PCR 分析各组 RIG-I 的 mRNA 水平。与对照组 (DMSO) 相比,20、50 μmol/L RA 能使 RIG-I 的 mRNA 水平显著上调,分别为 (289 ± 3.88)%、(312.00 ± 3.93)%、有显著性差异 ($P < 0.05$,图 1)。接着采用 Western blot 技术检测 RIG-I 蛋白含量。与对照组比,20、50 μmol/L RA 能使 RIG-I 蛋白含量显著增加,分别为(170.31 ± 15.47)%、(313.71 ± 24.82)%、差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 2)。



与对照组(RA 0 μmol/L)比较, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图 1 实时定量 RT-PCR 检测不同浓度 RA 处理 24 h RIG-I 的 mRNA 水平

Figure 1 NIT-1 cells were treated with different concentrations of RA and real-time PCR was used to determine RIG-I mRNA expression



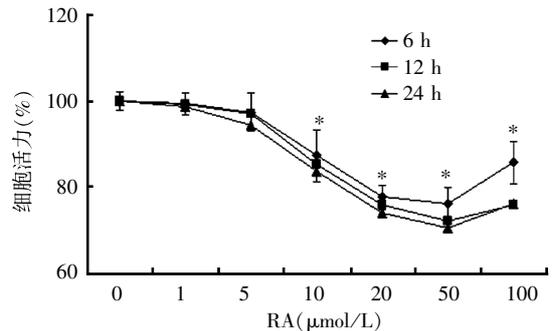
与对照组(RA 0 μmol/L)比较, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图 2 Western blot 检测不同浓度 RA 处理 24 h RIG-I 的蛋白表达水平

Figure 2 NIT-1 cells were treated with different concentrations of RA and Western blot analysis was used to determine the protein level of RIG-I

2.2 RIG-I 上调对 NIT-1 细胞增殖的影响

配制不同浓度的 RA(1、5、10、20、50、100 μmol/L) 分别作用 NIT-1 细胞 6、12、24 h。MTT 检测表明,与对照组相比,在上述时间点 10、20、50 μmol/L RA 均能抑制细胞生长,有剂量依赖性 ($P < 0.05$)。在不同浓度 RA(10、20、50 μmol/L)作用下,随着时间延长,对细胞生长的抑制作用越来越明显 ($P < 0.05$,图 3)。表明 RIG-I 的上调能时间和剂量依赖性地抑制 NIT-1 细胞的生长活力。



分别与对照组(RA 0 μmol/L)比较, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图 3 不同浓度、时间的 RA 刺激对 NIT-1 细胞生长活力的影响

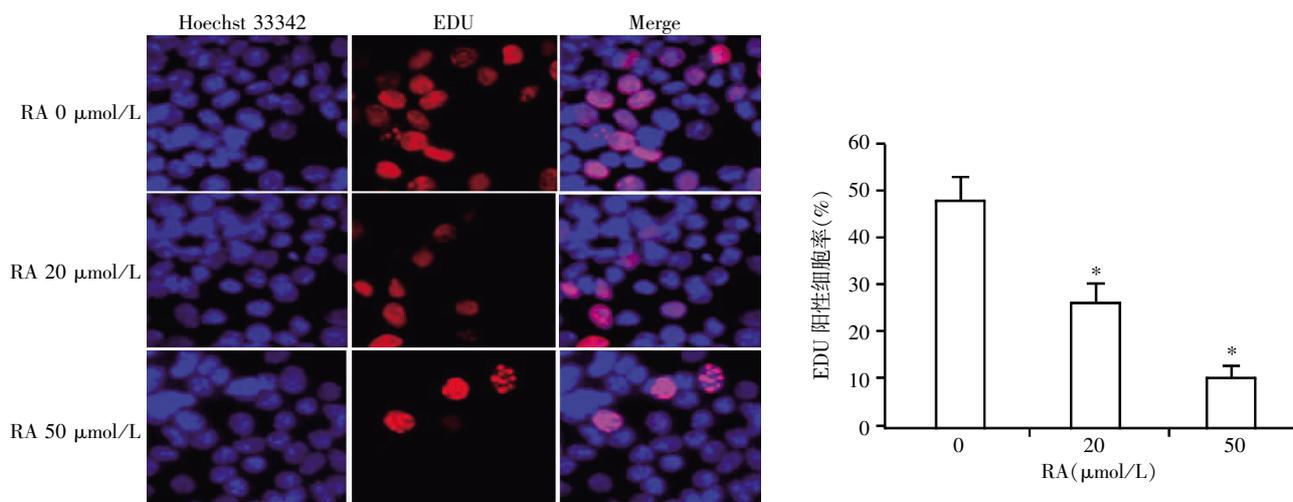
Figure 3 Effects of different concentration and time of RA on cell viability of NIT-1 cells

采用 EdU 荧光标记检测了 RIG-I 激活对胰岛 β 细胞 DNA 合成的影响,探讨其对 β 细胞增殖的调节作用。不同浓度的 RA(0、20 和 50 μmol/L)分别作用 NIT-1 细胞 24 h,荧光显微观察并对 EdU 阳性细胞进行计数。与对照组相比,药物处理组 EdU 阳性细胞比例呈剂量依赖性下降,20、50 μmol/L RA 作用 NIT-1 细胞的 EdU 阳性细胞比例,分别为对照组的 55.3% ($P < 0.05$) 和 22.1% ($P < 0.05$,图 4)。上述结果表明,RIG-I 的表达上调能抑制胰岛 β 细胞的增殖。

2.3 RIG-I 上调对 NIT-1 细胞周期的影响

用两种剂量的 RA(20、50 μmol/L)处理小鼠胰岛 β 细胞 24 h。流式细胞术检测表明:与对照组相比,20、50 μmol/L RA 能明显诱导 NIT-1 细胞周期阻滞于 G1 期,细胞比例上升至 (39.88 ± 1.58)% 和 (45.89 ± 1.93)%;S 期细胞比例显著降低,分别下降至 (53.86 ± 1.17)% 和 (47.53 ± 2.82)%、差异有显著性 ($P < 0.05$,图 5)。表明 RIG-I 的功能上调能诱导 NIT-1 细胞周期 G1 期向 S 期转换的阻滞。

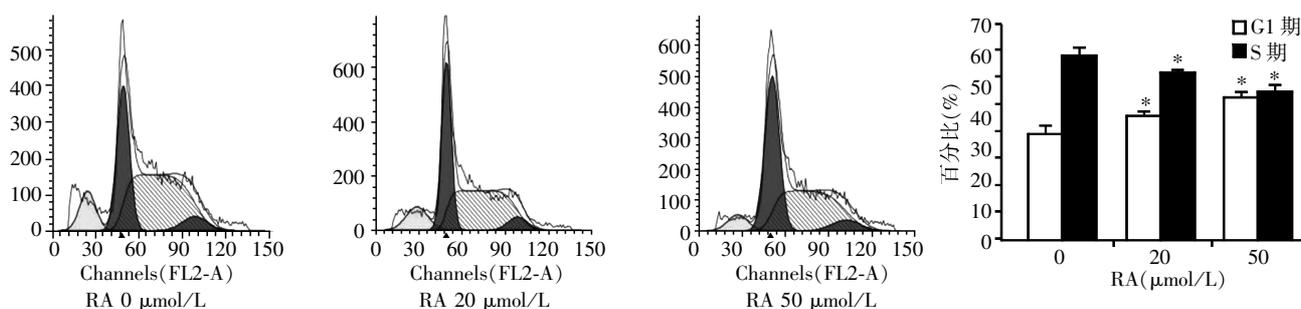
2.4 RIG-I 上调对 NIT-1 细胞相关周期蛋白水平的影响



与对照组(RA 0 $\mu\text{mol/L}$)比较, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图 4 不同浓度的 RA 对 NIT-1 细胞增殖的影响

Figure 4 Effects of different concentrations of RA on the proliferation of NIT-1 cells



分别与对照组(RA 0 $\mu\text{mol/L}$)比较, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图 5 不同浓度的 RA 对 NIT-1 细胞周期的影响

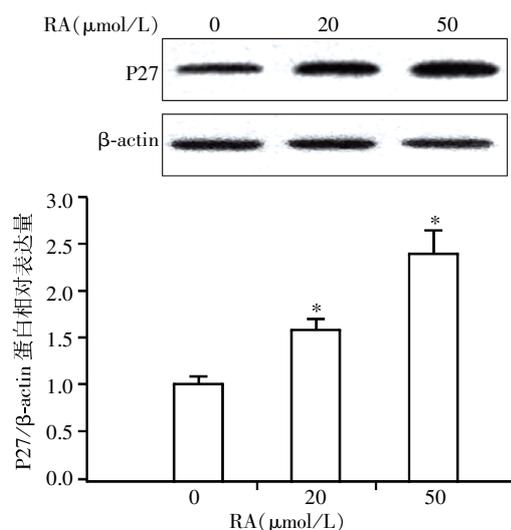
Figure 5 Effects of different concentrations of RA on cell cycle distribution of NIT-1 cells

P27 是胰岛 β 细胞周期调控的重要负性周期调控分子。用上述剂量的 RA (20、50 $\mu\text{mol/L}$) 分别作用于 NIT-1 细胞 24 h。以 β -actin 为内参, Western blot 技术测定了 RIG-I 上调对 P27 蛋白水平的影响。与对照组相比, 20、50 $\mu\text{mol/L}$ RA 能使 P27 蛋白水平显著增加, 分别为 $(160.07 \pm 11.25)\%$ 、 $(240.55 \pm 22.78)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 6)。表明 RIG-I 通过上调 P27 蛋白功能, 诱导了小鼠胰岛 β 细胞增殖抑制。

3 讨论

2 型糖尿病是一种机体胰腺 β 细胞分泌胰岛素相对不足的代谢性疾病, 当胰岛 β 细胞数量相对减少且整体功能下调, 不能代偿体内胰岛素需求时, 机体才呈现出持续高血糖等代谢病临床症状。因而, 识别胰岛 β 细胞数量变化及其周期调控对揭示 2 型糖尿病的发生至关重要^[5-6]。

生物进化论观点认为: 营养代谢系统和免疫系



与对照组(RA 0 $\mu\text{mol/L}$)比较, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图 6 Western blot 检测 P27 表达

Figure 6 Western blot analysis of the protein level of P27

统是维持生命活动的基本组成, 两者在生物长期发生发展过程中, 相互融合, 整合一体; 免疫系统变化

必然会影响到机体营养代谢过程,因此越来越多的模式识别受体被发现在营养代谢紊乱中扮演重要角色。例如,在糖脂毒性和促炎性细胞因子刺激下,激活的 PKR 和升高的 TLR3 能抑制 β 细胞增殖,下调它们的整体功能,从而导致胰岛内 β 细胞功能代偿失调,参与了 2 型糖尿病的发生发展^[7-12]。

而 RIG-I 是体内另一种免疫分子,是维甲酸诱导基因 I 样受体家族(RLRs)的主要成员,能识别 5'端带有三磷酸基团的 RNA(包括单链和双链 RNA)和短的双链 RNA。有研究表明,体内多种细胞均可表达 RIG-I,如胰岛 β 细胞和髓系细胞。RIG-I 能通过抑制 Src-AKT 信号通路来调节髓系细胞的增殖^[13]。最近研究也表明 RIG-I 能被肥胖、炎症因子等 2 型糖尿病诱发因素激活,参与了外周组织胰岛素抵抗的发展^[14-15]。

本研究揭示,维甲酸诱导的 RIG-I 激活参与了营养代谢中心组织胰岛 β 细胞功能调控,能显著抑制胰岛 β 细胞的生长活力,有明显的剂量依赖性。同时,EdU 荧光标记发现 RIG-I 激活对胰岛 β 细胞增殖起到显著抑制作用。当前研究认为,在成熟的哺乳动物体内, β 细胞数量的维持是由成熟 β 细胞复制完成的,与干细胞关系不大。因而本文推测,RIG-I 的激活诱导了胰岛 β 细胞的增殖抑制及其数量的相对减少,参与了体内胰岛 β 细胞功能失代偿调节。

在细胞周期调控中,G1~S 期转换的调控是细胞内外信号传递、整合汇集到细胞核对细胞增殖调控的关键点。本实验结果表明,RIG-I 表达的上调可使胰岛 β 细胞阻滞于 G1 期,降低 S 期细胞比例。提示 G1 期向 S 期的转换阻滞是 RIG-I 激活调控胰岛 β 细胞增殖抑制的重要机制之一。细胞周期蛋白 P27 是细胞周期 G1~S 期之间的重要调控分子。P27 作为一种周期素依赖性激酶,对细胞周期有负调节作用^[16-17]。本研究结果发现,RA 处理组 P27 蛋白水平明显上调,表明 RIG-I 通过上调 P27 表达诱导了胰岛细胞 β 细胞增殖抑制。

综上所述,在胰岛 β 细胞中,RIG-I 上调能通过诱导细胞周期负性调控蛋白 P27 的积累,导致细胞周期发生 G1 期阻滞,进而抑制胰岛 β 细胞的生长和增殖。在机体内,可能诱导机体胰岛细胞数量的相对减少和机体胰岛素分泌总量的失代偿,成为 2 型糖尿病发生发展的重要诱因。因而,上述研究揭示了 2 型糖尿病发病可能的新机制并为 RIG-I 作为一种 2 型糖尿病药物靶标提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] Cao L, Ge X, Gao Y, et al. Porcine epidemic diarrhea virus inhibits dsRNA-induced interferon-beta production in porcine intestinal epithelial cells by blockade of the RIG-I-mediated pathway[J]. *Virology*, 2015, 12: 127
- [2] Xu J, Mercado-Lopez X, Grier J T, et al. Identification of a natural viral RNA motif that optimizes sensing of viral RNA by RIG-I[J]. *MBio*, 2015, 6(5): e1215-e1265
- [3] Aida K, Nishida Y, Tanaka S, et al. RIG-I- and MDA5-initiated innate immunity linked with adaptive immunity accelerates beta-cell death in fulminant type 1 diabetes [J]. *Diabetes*, 2011, 60(3): 884-889
- [4] Shoemaker R, Yiannikouris F, Thatcher S, et al. ACE2 deficiency reduces beta-cell mass and impairs beta-cell proliferation in obese C57BL/6 mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015, 309(7): E621-E631
- [5] Alonso-Magdalena P, Garcia-Arevalo M, Quesada I, et al. Bisphenol-A treatment during pregnancy in mice: a new window of susceptibility for the development of diabetes in mothers later in life [J]. *Endocrinology*, 2015, 156(5): 1659-1670
- [6] Yaghoobkar H, Stancakova A, Freathy RM, et al. Association analysis of 29,956 individuals confirms that a low-frequency variant at CCND2 halves the risk of type 2 diabetes by enhancing insulin secretion [J]. *Diabetes*, 2015, 64(6): 2279-2285
- [7] Wang Y, Wu H, Gao L, et al. Elevated toll-like receptor 3 inhibits pancreatic beta-cell proliferation through G1 phase cell cycle arrest [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 377(1-2): 112-122
- [8] Chen SS, Jiang T, Wang Y, et al. Activation of double-stranded RNA-dependent protein kinase inhibits proliferation of pancreatic beta-cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(3): 814-820
- [9] Song Y, Wan X, Gao L, et al. Activated PKR inhibits pancreatic beta-cell proliferation through sumoylation-dependent stabilization of P53 [J]. *Mol Immunol*, 2015, 68(2 Pt A): 341-349
- [10] Gao L, Tang W, Ding Z, et al. Protein-binding function of RNA-dependent protein kinase promotes proliferation through TRAF2/RIP1/NF-kappaB/c-Myc pathway in pancreatic beta cells [J]. *Mol Med*, 2015, 21: 154-166
- [11] 陈珊珊, 王怡, 顾丽泽, 等. PKR 抑制胰岛 β 细胞生长的机制研究 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2012, 32(9): 1187-1191
- [12] 王怡, 祁岳坤, 姚旺林, 等. Toll 样受体 3 抑制胰岛 β 细胞生长的分子机制研究 [J]. *南京医科大学学报 (自*