

· 基础研究 ·

宫内发育迟缓新生大鼠胰 WFS1 的表达变化及其可能作用

戴程婷, 袁逸, 李一卉, 袁庆新*

南京医科大学第一附属医院内分泌科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:旨在阐明宫内发育迟缓(intrauterine growth retardation, IUGR)新生大鼠胰岛功能、内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)的改变及WFS1的表达变化,进一步探讨2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)发病相关的分子基础,为有效阻止IUGR导致T2DM提供新的治疗靶点。方法:IUGR造模组孕鼠自妊娠14 d起给予50%对照组饲料直至新生鼠出生。采用免疫组化、RT-PCR、透射电镜和Western blot技术观察新生鼠胰腺中WFS1和ERS变化情况。结果:①IUGR大鼠胰腺及成年大鼠胰岛中WFS1、GRP78的表达明显增加($P < 0.05, n=10$)。②电镜下IUGR新生鼠胰腺中内质网明显肿胀、融合。③胰腺葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78/Bip)和C/EBP同源蛋白(CHOP)在IUGR新生大鼠胰腺和成年大鼠胰岛中表达明显升高。结论:WFS1可能通过ERS参与IUGR导致的胰岛功能损伤。

[关键词] WFS1;宫内发育迟缓;胰岛功能;糖尿病;内质网应激

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)05-658-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20200508

The effects of WFS1 on pancreatic islet β cell function in rats born with intrauterine growth retardation

DAI Chengting, YUAN Yi, LI Yihui, YUAN Qingxin*

Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** The aim of this study is to clarify ERS and the expression level of WFS1 in IUGR newborn rats, further exploring the molecular basis related to T2DM, which may provide a new therapy for preventing IUGR from leading to T2DM. **Methods:** The pregnant rats in the IUGR group were fed 50% calorie restriction from gestational day 14 until term. Immunohistochemistry, RT-PCR, transmission electron microscope and western blot were applied. **Results:** ①The expressions of WFS1 and GRP78 in the pancreas and islets of IUGR rats were increased ($P < 0.05, n=10$). ②Electron microscope showed that the endoplasmic reticulum in the pancreas of newborn IUGR rats were swollen and fused. ③Glucose-regulated protein 78 (GRP78/Bip) and CHOP were significantly elevated in the pancreas and islets of IUGR. **Conclusion:** This study demonstrated that WFS1 might play roles in maintaining islet structure and function in IUGR rats, maybe partly via UPR.

[Key words] WFS1; intrauterine growth retardation; islet function; type 2 diabetes mellitus; endoplasmic reticulum stress

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(05): 658-662]

宫内发育迟缓(intrauterine growth retardation, IUGR)是胚胎发育异常最常见的一种形式,其成年后2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的易感性明显增加^[1-2]。Barker等^[3-4]的“节俭表型假说”认为,IUGR胎儿出生后摄入过多食物,脂肪沉积增加,能量输出减少。研究发现,过度的热量摄入可能使胰岛中发达内质网的稳态调节机制发生改变,加重内质网应激(endoplasmic reticulum stress,

[基金项目] 国家自然科学基金(81570697,81170715)

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

ERS),促进胰岛素原的积累和 β 细胞凋亡,最终导致糖尿病的发生^[5]。因此,ERS可能在IUGR导致成年糖尿病发病过程中有重要作用。

近年研究指出,Wolfram syndrome 1(WFS1)基因编码的内质网膜内蛋白是ERS过程中重要因子^[6],同时WFS1是T2DM发病的高危基因,参与T2DM的发生、发展^[7-8]。WFS1主要表达于胰岛 β 细胞,其基因位于人类常染色体4p16.1,基因全长2 742 bp,编码内质网膜内蛋白^[7,9]。研究发现,WFS1的许多功能皆与胰岛素的合成和分泌相关^[8],同时,它作为内质

网上的钙离子通道及非折叠蛋白应答(unfolded protein response, UPR)系统的重要组成因子,对维持内质网稳态,减轻内质网应激造成的损伤也起到重要作用^[10]。WFS1基因突变可通过ERS导致罕见的Wolfram综合征(遗传性少年型糖尿病),其表达改变也可增加T2DM的发病风险^[11]。因此,WFS1被认为是联系ERS和T2DM的桥梁。但是,WFS1在IU-GR胰岛功能损伤中的作用尚未见报道。

本课题组前期工作提示:①IU-GR新生大鼠空腹血糖和胰岛素降低,糖负荷后血糖值升高,胰岛素释放水平降低;胰岛素染色阳性区域亦明显减少^[12]。②WFS1广泛表达于大鼠胚胎发育各阶段的胰岛β细胞,在胚胎期胰岛发育、形成的高峰时期(E15.5 d~E18.5 d)发生高表达,参与胚胎胰岛的发育及功能完善^[9]。本文重在阐明IU-GR新生大鼠胰岛功能的改变、ERS的改变及WFS1的表达变化,进一步探讨IU-GR胰岛功能损伤的分子基础,为有效阻止IU-GR引起的胰岛功能损伤和T2DM的发病提供新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

成年Sprague-Dawley大鼠由南京医科大学实验动物中心提供。于每天18:00合笼,次日通过阴道涂片中存在精子来确认交配。BCA试剂盒(上海碧云天);兔抗WFS1多克隆抗体(Novus Biologicals公司,美国);兔抗GRP78/BIP多克隆抗体、小鼠抗CHOP单克隆抗体(Abcam公司,英国);山羊抗兔抗体(Pierce公司,美国);胰岛素多克隆抗体(Santa Cruz公司,美国);TRIzol(Invitrogen公司,美国);戊二醛(北京Coolaber公司);胶原酶P(Roche公司,美国);Biometra PCR热循环仪(蒙特利尔生物技术公司,加拿大)。

1.2 方法

1.2.1 胰腺组织分离

将妊娠大鼠随机分为两组:对照组和造模组,每组各10只。造模组从妊娠第14天起给予50%对照组饲料直至新生鼠出生,产后予母鼠正常饲料饲养,待新生鼠断奶,予小鼠正常饲料饲养。造模组新生鼠出生体重低于对照组新生鼠平均体重2个标准差者入选为IU-GR组。对各组10只新生鼠进行糖负荷试验,收集空腹时血液和糖负荷后血液,分离血清。每组各10只新生鼠迅速取下其胰腺,放入液氮中冷冻保存或置于戊二醛中固定。喂养新生鼠至15周,每组各取10只雄鼠用胶原酶P提取其胰岛。

1.2.2 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

使用TRIzol从胰腺和胰岛中提取总RNA。取2 μg体系,用逆转录酶合成cDNA。取1 μL cDNA作为模板,加入Taq DNA聚合酶,在梯度Biometra PCR热循环仪中催化目的基因WFS1、GRP78和内参基因18S rRNA扩增。在1%琼脂糖凝胶上分析扩增产物,并通过溴化乙锭染色可视化。数据针对18S rRNA、GRP78表达进行了标准化。PCR反应引物由上海Invitrogen公司合成,序列如下所示:WFS1:正义5'-CTGCTCTTTTGCTGGTCT-3',反义5'-GATGT-CCTTGGTGATGTCG-3';18S rRNA:正义5'-ACGAA-CCAGAGCGAAAGC-3',反义5'-GGACATCTAAGG-GCATCACAG-3'。GRP78:正义5'-TATTGAAACT-GTGGGAGGTG-3',反义5'-ACCCAGAAGGTGATT-GTCTT-3'。

1.2.3 透射电镜

将新生鼠胰腺放入戊二醛中,再浸泡于锇酸固定后行脱水、渗透、包埋,制成超薄切片于透射电镜下观察胰腺中内质网超微结构病理学改变。

1.2.4 Western blot

胰腺组织RIPA裂解液充分匀浆。4℃12000 r/min离心取上清。BCA测定蛋白浓度。10%分离胶和5%浓缩胶行SDS-PAGE电泳,转膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h;一抗4℃孵育过夜,TBST洗膜,二抗室温孵育1.5 h,TBST洗膜后曝光显影。Image J对显影条带进行灰度值定量分析,即目的条带灰度值/内参灰度值,表示目的条带的相对表达量情况。

1.3 统计学方法

应用SPSS17.0统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组独立样本比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

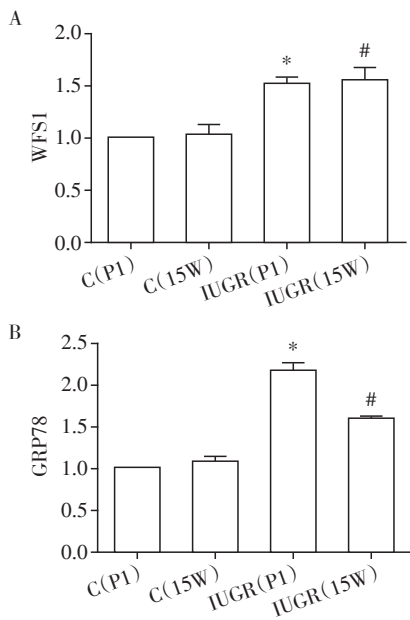
2 结果

2.1 IU-GR新生大鼠胰腺及成年大鼠胰岛中WFS1、GRP78基因表达

与对照组相比,IU-GR组新生大鼠胰腺及成年大鼠胰岛中WFS1的表达明显增加($P < 0.05, n = 10$),GRP78表达亦增加($P < 0.05, n = 10$,图1)。

2.2 新生鼠胰腺组织超微结构改变

图2显示,白色箭头所指为扩大的内质网腔。电镜下观察,正常胰腺组织内质网结构完整,线粒体嵴较致密,内质网分布在细胞核周围。IU-GR组新生鼠胰腺中内质网腔扩大,部分发生脱颗粒等明



C(P1): 对照组新生大鼠胰腺; C(15W): 对照组 15 周大鼠胰岛; IUGR(P1): IUGR 组新生大鼠胰腺; IUGR(15W): IUGR 组 15 周大鼠胰岛。与对照组新生大鼠相比, * $P < 0.05$; 与对照组 15 周大鼠相比, # $P < 0.05$ ($n=10$)。

图1 新生大鼠胰腺及 15 周大鼠胰岛中 WFS1、GRP78 表达 (RT-PCR)

Figure 1 WFS1 and GRP78 expression levels in newborn rat pancreas and 15-week rat islets (RT-PCR)

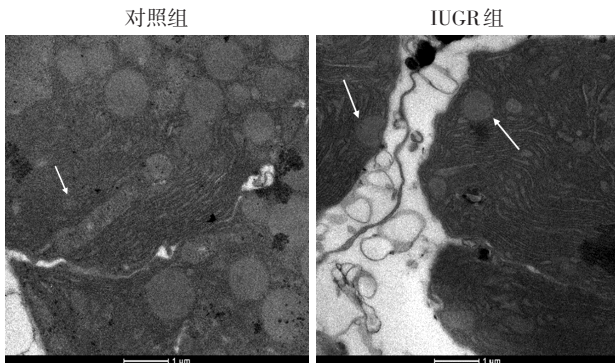


图2 新生大鼠胰腺中内质网结构改变 (电镜, $\times 10\ 000$)

Figure 2 Changes of endoplasmic reticulum structure in the pancreas of newborn rats (electron microscopy, $\times 10\ 000$)

显的损伤。

2.3 IUGR 新生大鼠胰腺和成年大鼠胰岛中 GRP78/Bip、CHOP 蛋白表达

Western blot 显示, 在 IUGR 新生大鼠胰腺和成年胰岛中 GRP78/Bip、CHOP 蛋白含量较对照组明显升高 ($P < 0.001, n=10$, 图 3)。

3 讨论

多个国家和种族中的流行病学调查都证实, IU-

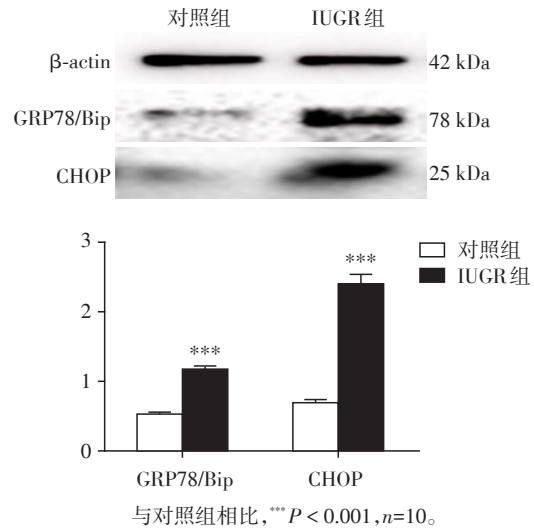


图3 新生大鼠胰腺中 GRP78/Bip、CHOP 表达

Figure 3 GRP78/Bip and CHOP expressions in newborn rat pancreas and 15-week rat islets

GR 是糖耐量异常和成年 T2DM 的独立危险因素^[13]。既往研究和本课题组前期研究发现, IUGR 新生大鼠糖负荷后血糖明显高于正常组, 空腹及糖负荷后胰岛素释放水平都明显减少, 免疫组化示胰岛素染色阳性区域亦明显减少, 表明 IUGR 胎鼠的胰岛体积减小, 胰岛素分泌减少, 成年后发生糖尿病的风险增加^[12, 14]。

有研究显示, IUGR 胰岛功能损伤与胰岛素相关生长因子表达异常、下丘脑-垂体-肾上腺轴活跃和基因突变等相关^[15-16]。近年来, 内质网应激在其中的作用受到越来越多的重视。胰岛 β 细胞具有高度发达的内质网, 是胰岛素合成和分泌的重要场所, 对 ERS 尤其敏感^[17-18]。

内质网是所有分泌型蛋白和膜蛋白折叠、成熟、储存和转运的场所。ERS 是内质网功能异常的具体表现, 是细胞对体内外各种刺激的适应性反应。Ca²⁺ 的丢失、氧化还原状态的改变或 ROS 的产生、能量剥夺及基因突变、ER 蛋白负荷过重、翻译后修饰的改变皆可造成内质网蛋白质结构成熟障碍, 这些非折叠、未成熟蛋白的积蓄, 干扰内质网稳态, 产生应激, 激活 UPR 系统^[19]。UPR 系统通过减少细胞蛋白合成、增强蛋白折叠、促进内质网相关降解以维持细胞稳态; 但应激过强或持续时间过长时, 又会进一步促进细胞凋亡, 从而引起糖尿病等疾病的发生^[20-21]。正常状态下, 细胞内 GRP78 与 PERK (protein kinase R-like ER kinase)、ATF6 (activating transcription factor 6) 和 IRE1 (inositol requiring enzyme 1) 这 3 种内质网应激相关的标志蛋白结合在

一起;当应激出现时,GRP78/Bip便解离出来,释放这3种蛋白,触发UPR。所以,GRP78/Bip上调一般作为ERS开始的标志^[22]。同时,过强、持续的ERS导致PERK激活,活化ATF4,使ATF4/CHOP复合体分离,激活CHOP,继而诱发内质网相关性细胞凋亡^[23-24]。CHOP蛋白作为C/EBP转录因子家族成员,是ERS反应最具代表性的分子之一^[25]。本研究中,电镜显示IUGR新生鼠胰腺中内质网明显肿胀、融合,内质网腔扩大;Western blot显示IUGR新生大鼠胰腺及成年鼠胰岛中GRP78/Bip蛋白明显上调,CHOP蛋白含量亦增加,均提示ERS可能参与IUGR胰岛功能损伤的发病过程。

WFS1作为UPR系统固有元件调控ERS。Riggs等^[17]利用条件性基因敲除技术,建立了胰岛 β 细胞特异性WFS1基因敲除小鼠模型,发现WFS1表达下降导致 β 细胞内质网扩张,UPR标志物BIP表达增加。研究发现,Wolfram综合征患者的WFS1基因突变时,增加了GRP78的启动子活性,诱导ERS^[26]。WFS1位于胰岛 β 细胞内,其表达水平改变可诱导胰岛 β 细胞发生特异性ERS,导致胰岛 β 细胞数量缺失和功能损伤^[6]。因此,WFS1通过ERS参与T2DM的发病过程^[27-28]。前期实验发现,WFS1参与胚胎期胰腺细胞的发育及功能完善,也与出生后的胰岛重塑密切相关。本研究在IUGR新生大鼠胰腺中发现WFS1明显高表达,说明WFS1可能参与IUGR胰岛功能损伤的发病过程。

以上结果提示,WFS1可能通过ERS参与IUGR导致的胰岛功能损伤。在IUGR大鼠血糖调节异常的病理条件下,WFS1可能通过高表达发挥保护胰岛 β 细胞的作用,这可为有效阻止IUGR导致的糖耐量异常和T2DM提供新的治疗靶点。

[参考文献]

[1] GREEN A S, ROZANCE P J, LIMESAND S W. Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function[J]. *J Endocrinol*, 2010, 205(3): 211-224

[2] PALLOTTO E K, KILBRIDE H W. Perinatal outcome and later implications of intrauterine growth restriction [J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2006, 49(2): 257-269

[3] BERENDS L M, DEARDEN L, TUNG Y C L, et al. Programming of central and peripheral insulin resistance by low birthweight and postnatal catch-up growth in male mice[J]. *Diabetologia*, 2018, 61(10): 2225-2234

[4] BARKER D J, ERIKSSON J G, FORSEN T, et al. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis[J]. *Int J Epidemiol*, 2002, 31(6): 1235-1239

[5] SCHEUNER D, VANDER MIERDE D, SONG B, et al. Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis[J]. *Nat Med*, 2005, 11(7): 757-764

[6] UEDA K, KAWANO J, TAKEDA K, et al. Endoplasmic reticulum stress induces Wfs1 gene expression in pancreatic beta-cells via transcriptional activation[J]. *Eur J Endocrinol*, 2005, 153(1): 167-176

[7] IVASK M, HUGILL A, AKOKS S. RNA -sequencing of WFS1-deficient pancreatic islets[J]. *Physiol Rep*, 2016, 4(7): e12750

[8] HATANAKA M, TANABE K, YANAI A, et al. Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product localizes to secretory granules and determines granule acidification in pancreatic beta-cells[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(7): 1274-1284

[9] XU R, XIA B, GENG J, et al. Expression and localization of Wolfram syndrome 1 gene in the developing rat pancreas[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(43): 5425-5431

[10] FONSECA S G, ISHIGAKI S, OSLOWSKI C M, et al. Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(3): 744-755

[11] AKIYAMA M, HATANAKA M, OHTA Y, et al. Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in Wfs1 knockout mice[J]. *Diabetologia*, 2009, 52(4): 653-663

[12] YUAN Q X, ZHOU J Y, TENG L P, et al. Intrauterine growth retardation leads to the functional change of insulin secretion in the newborn rats [J]. *Horm Metab Res*, 2010, 42(7): 491-495

[13] JAQUET D, GABORIAU A, CZERNICHOW P, et al. Insulin resistance early in adulthood in subjects born with intrauterine growth retardation [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(4): 1401-1406

[14] LONGO S, BOLLANI L, DECEMBRINO L, et al. Short-term and long-term sequelae in intrauterine growth retardation(IUGR)[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2013, 26(3): 222-225

[15] YIN D D, ZHANG E B, YOU L H, et al. Downregulation of lncRNA TUG1 affects apoptosis and insulin secretion in mouse pancreatic beta cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(5): 1892-1904

[16] GONZALEZ-RODRIGUEZ P, CANTU J, O'NEIL D, et al. Alterations in expression of imprinted genes from the H19/IGF2 loci in a multigenerational model of intrauterine growth restriction (IUGR) [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2016, 214(5): 625 e1-625 e11

[17] RIGGS A C, BERNAL-MIZRACHI E, OHSUGI M, et al. Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreat-

ic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis[J]. *Diabetologia*, 2005, 48(11):2313-2321

[18] THIVOLET C, VIAL G, CASSEL R, et al. Reduction of endoplasmic reticulum- mitochondria interactions in beta cells from patients with type 2 diabetes[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7):e0182027

[19] XU C, BAILLY-MAITRE B, REED J C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10):2656-2664

[20] LADIGES W C, KNOBLAUGH S E, MORTON J F, et al. Pancreatic beta-cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58IPK [J]. *Diabetes*, 2005, 54 (4) : 1074-1081

[21] OAKES S A, PAPA F R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology [J]. *Annu Rev Pathol*, 2015, 10: 173-194

[22] WANG M, KAUFMAN R J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease [J]. *Nature*, 2016, 529(7586):326-335

[23] XU L, SU L, LIU X. PKCdelta regulates death receptor 5 expression induced by PS - 341 through ATF4 - ATF3/CHOP axis in human lung cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(10):2174-2182

[24] 宋成洁,王 敏,汤韞祎,等. ISRIB对Aβ₁₋₄₂诱导的SH-SY5Y细胞的神经保护作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(12):1712-1715, 1722

[25] 徐朝琪,许玉宇,姜 盼,等. 橄榄苦苷抑制丙烯醛诱导的HBE细胞内质网应激的机制研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(9):1124-1130

[26] MORIKAWA S,TAJIMA T,NAKAMURA A, et al. A novel heterozygous mutation of the WFS1 gene leading to constitutive endoplasmic reticulum stress is the cause of Wolfram syndrome[J]. *Pediatr Diabetes*, 2017, 18(8):934-941

[27] VAN DER KALLEN C J, VAN GREEVENBROEK M M, STEHOUWER C D, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the development of diabetes: is there a role for adipose tissue and liver? [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(12):1424-1434

[28] SHANG L S, HUA H Q, FOO K, et al. β-cell dysfunction due to increased er stress in a stem cell model of wolfram syndrome[J]. *Diabetes*, 2014, 63(3):923-933

[收稿日期] 2019-10-09

(上接第 634 页)

国家卫生健康委员会公告(2020年第1号)[EB/OL]. (2020-01-20)[2020-02-20]. http://www.gov.cn/xinwen/2020-01/21/content_5471158.htm

[3] PAN F, YE T, SUN P, et al. Time course of lung changes on chest CT during recovery from 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia [J]. *Radiology*, 2020, 295(3):715-721

[4] SHI H, HAN X, ZHENG C, et al. Evolution of CT manifestations in a patient recovered from 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) pneumonia in Wuhan, China [J]. *Radiology*, 2020, 295(1):20

[5] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)[EB/OL]. (2020-03-04)[2020-03-14] <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.

[6] FRANQUET T. Imaging of pulmonary viral pneumonia [J]. *Radiology*, 2011, 260(1):18-39

[7] KOO H J, LIM S, CHO E J, et al. Radiographic and CT features of viral pneumonia [J]. *Radiographics*, 2018, 38(3):719-739

[8] HANSELL D M, BANKIER A A, MACMAHON H, et al. Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging [J]. *Radiology*, 2008, 246(3):697-722

[9] WANG D, HU B, HU C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China [J]. *JAMA*, 2020, 323(11):1061-1069

[10] CHEN N, ZHOU M, DONG X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223):507-513

[11] SHI H, HAN X, JIANG N, et al. Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20(4):425-434

[12] DAS K M, LEE E Y, ENANI M A, et al. CT correlation with outcomes in 15 patients with acute Middle East respiratory syndrome coronavirus [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2015, 204(4):736-742

[13] 周廉政,张明顺,吉宁飞,等. 新型冠状病毒肺炎潜在治疗药物研究进展[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(3):315-321

[收稿日期] 2020-03-23