

## PKR 抑制胰岛 $\beta$ 细胞生长的机制研究

陈珊珊<sup>1,2</sup>, 王 怡<sup>1</sup>, 顾丽泽<sup>1</sup>, 高丽丽<sup>1</sup>, 郭 军<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学生物化学与分子生物学系, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>淮阴卫生高等职业技术学校生物教研室, 江苏 淮安 223002)

**[摘要]** 目的:探讨 PKR 激活诱导的胰岛  $\beta$  细胞生长抑制及其相关分子机制。方法:采用 PKR 激动剂 BEPP 处理 INS-1 细胞, MTT 法检测其对细胞活力的影响; EdU 荧光标记结合流式细胞术测定胰岛  $\beta$  细胞增殖及细胞周期变化; 免疫印迹技术评价 PKR 下游信号分子 eIF2 $\alpha$  蛋白及其磷酸化水平变化, 并检测细胞周期相关蛋白 cyclin D1 的表达。结果: MTT 显示 BEPP 呈剂量和时间依赖性抑制 INS-1 细胞生长活力 ( $P < 0.05$ ); EdU 荧光标记显示细胞增殖显著下降; 流式细胞术表明 BEPP 处理组 G1 期细胞比例明显升高, 而 S 期细胞比例显著下降 ( $P < 0.05$ ); Western blot 结果表明: BEPP 能下调 eIF2 $\alpha$  磷酸化而不是其蛋白水平, 同时伴随 cyclin D1 蛋白含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。结论: PKR 激活剂 BEPP 能诱导 eIF2 $\alpha$  磷酸化, 阻断蛋白合成, 且通过下调 cyclin D1 蛋白水平, 诱导胰岛  $\beta$  细胞 G1 期阻滞, 抑制其增殖, 从而导致机体胰岛  $\beta$  细胞整体功能的失代偿和 2 型糖尿病的发生。

**[关键词]** 胰岛  $\beta$  细胞; BEPP; PKR; cyclin D1; 细胞增殖

**[中图分类号]** Q291

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)09-1187-05

### Effect of PKR on proliferation of pancreatic $\beta$ -cell

CHEN Shan-shan<sup>1,2</sup>, WANG Yi<sup>1</sup>, GU Li-ze<sup>1</sup>, GAO Li-li<sup>1</sup>, GUO Jun<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Biology, Huaiyin Advanced Vocational & Technical School of Health, Huaian 223002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate PKR activation-induced pancreatic  $\beta$  cell growth inhibition and its underlying molecular mechanisms. **Methods:** BEPP was used to activate PKR in INS-1 cells, cell viability was assessed by MTT assay. EdU labeling together with flow cytometry was applied to detect  $\beta$ -cell proliferation and cell cycle progression. Western blot assay was used to detect the expression of eIF2 $\alpha$  and its phosphorylation and the expression of cyclin D1. **Results:** BEPP significantly inhibited the viability of INS-1 cells in a time and dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). EdU labeling assay indicated a significant reduction on proliferation of  $\beta$ -cell ( $P < 0.05$ ). Cell number in G0/G1 phase was increased and that in S phase was decreased ( $P < 0.05$ ). Treatment with BEPP led to an increase in phosphorylation of eIF2 $\alpha$  and a decreased expression of cyclin D1. **Conclusion:** BEPP (PKR inducer) could phosphorylate eIF2 $\alpha$  which leads to inhibition of protein synthesis, at the same time, it can inhibit pancreatic  $\beta$ -cell proliferation through cell cycle arrest at G1 phase by downregulation of cyclin D1. Therefore, it can lead to the overall functions of the body of islet  $\beta$ -cell decompensation and the occurrence of type 2 diabetes.

**[Key words]** pancreatic  $\beta$ -cell; BEPP; PKR; cyclin D1; cell proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(9): 1187-1191]

PKR (double-stranded RNA-dependent protein kinase) 是双链 RNA 依赖性蛋白激酶, 是胞内模式识别受体, 参与多种刺激因子介导的细胞凋亡和生长抑制<sup>[1-2]</sup>。PKR 是一个丝/苏蛋白激酶, 是 eIF2 $\alpha$  的

特异性蛋白激酶, 能催化 eIF2 $\alpha$  磷酸化, 抑制蛋白质合成, 是诱导细胞损伤的重要途径<sup>[3]</sup>。胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和胰岛  $\beta$  细胞功能障碍是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 发病的两个关键因素<sup>[4]</sup>, 其中机体胰岛  $\beta$  细胞数量减少是胰岛  $\beta$  细胞功能损伤的一个重要表现<sup>[5]</sup>。最近发现高糖高脂和炎症因子刺激能激活 PKR, 影响胰岛素信

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81170714)

\*通讯作者, E-mail: Guoj69@yahoo.com.cn

号转导,参与外周组织胰岛素抵抗的发生、发展,是诱发2型糖尿病的重要发病机制之一<sup>[6]</sup>。而PKR激活是否参与胰岛 $\beta$ 细胞增殖抑制和整体功能下调并不十分清楚。最近发现小分子化合物BEPP[1H-benzimidazole-1-ethanol,2,3-dihydro-2-imino-a-(phenoxymethyl)-3-(phenylmethyl)-monohydrochlorid e]是一种有效的PKR激动剂<sup>[7]</sup>。本实验以大鼠胰岛 $\beta$ 细胞株INS-1细胞为实验对象,观察BEPP对体外培养INS-1细胞增殖的影响,并探讨PKR信号通路对胰岛 $\beta$ 细胞生长及整体功能的影响及其分子机制。

## 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。RPMI1640培养基、胎牛血清、antibiotic-antimycotic(100 $\times$ )购自美国Invitrogen公司;E-CL-plus显色液购自美国Thermo公司;抗兔单克隆抗体eIF2 $\alpha$ 和p-eIF2 $\alpha$ 购自美国Cell Signaling Technology公司;抗兔cyclin D1多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;抗小鼠 $\beta$ -actin单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase,HRP)标记二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;EdU试剂盒购自广州锐博生物公司;RIPA裂解液(强)购自上海碧云天公司;DMSO购自合肥BIOSHARP公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)、BEPP、牛血清白蛋白(BSA)及其余化学试剂均购自美国Sigma公司。硝酸纤维素(NC,pore size,0.2  $\mu$ m)膜购自美国Bio-Rad公司。BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天公司。

### 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,55  $\mu$ mol/L  $\beta$ -巯基乙醇,10 ml/L antibiotic-antimycotic)在37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub>的细胞孵箱中培养,待INS-1细胞长至80%左右融合度时,胰酶消化,按1:2比例传代。待细胞贴壁后给予不同浓度的BEPP处理。周期实验需提前用无血清的含0.1% BSA的RPMI1640培养基对细胞进行24 h同步化培养再用正常培养基进行药物处理。EdU荧光标记增殖实验用无血清的含0.1% BSA的RPMI1640培养基对细胞进行12 h同步化培养后再用正常培养基进行药物

处理。

#### 1.2.2 MTT法测定细胞生长活力

取对数生长期的INS-1细胞接种于96孔培养板,每孔 $1.5 \times 10^4$ 个细胞,每孔体积为200  $\mu$ l,每组5个复孔培养,24 h后弃上清加入不同浓度的BEPP处理。对照组是DMSO溶剂,实验组分别是浓度为2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0  $\mu$ mol/L的BEPP。24、48、72 h后,每孔加入MTT 20  $\mu$ l,继续培养4 h。弃去上清液,每孔加入二甲亚砷150  $\mu$ l,震荡10 min,酶标仪测定570 nm波长处各孔的吸光度。

#### 1.2.3 细胞周期分析

将INS-1细胞按每孔 $1 \times 10^6$ 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24 h后,弃去原有培养基,加入含不同浓度BEPP的培养基。48 h后分别消化细胞,离心收集细胞,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1 d。离心弃去上清液,PBS洗细胞1遍。每个样本取450  $\mu$ l PBS重悬细胞,加入50  $\mu$ l的碘化丙啶(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,BD公司,美国)检测细胞周期分布并分析。

#### 1.2.4 EdU荧光标记检测细胞增殖

将INS-1细胞按每孔 $1.5 \times 10^4$ 个细胞接种于96孔板。待细胞80%贴壁后,细胞同步化12 h,弃去原有培养基,给药处理相应时间。吸去液体每孔加入100  $\mu$ l 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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100  $\mu$ l脱色摇床孵育5 min后用每孔100  $\mu$ l PBS脱色摇床孵育,每次5 min。吸去PBS每孔加入100  $\mu$ l渗透剂,脱色摇床孵育10 min后用每孔100  $\mu$ l PBS脱色摇床孵育10 min。吸去PBS每孔加入100  $\mu$ 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100  $\mu$ 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100  $\mu$ l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100  $\mu$ l 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。

#### 1.2.5 Western blot检测eIF2 $\alpha$ 、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 MgCl<sub>2</sub>、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℃提取细胞蛋白。10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白。采用半干法转膜,加封闭液室温封闭 2 h。分别加入稀释的各种一抗 4℃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 数据处理

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,单因素样本均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。多样本均数间两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度的 BEPP 对 INS-1 细胞生长的影响

采用不同浓度 BEPP (0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 分别作用 INS-1 细胞不同时间(0、24、48、72 h)。MTT 检测表明:与对照组(DMSO)相比,3 个时间点 10.0、25.0、50.0、100.0  $\mu\text{mol/L}$  浓度 BEPP 呈剂量依赖性抑制细胞生长,且具有统计学意义( $P < 0.05, n = 3$ ),在 BEPP(0、2.5、5.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 浓度下,随着时间延长它对细胞的抑制作用越来越明显,差异有统计学意义( $P < 0.05, n = 3$ ,图 1)。表

明 PKR 的激活呈时间和剂量依赖性地抑制 INS-1 细胞的生长活力。

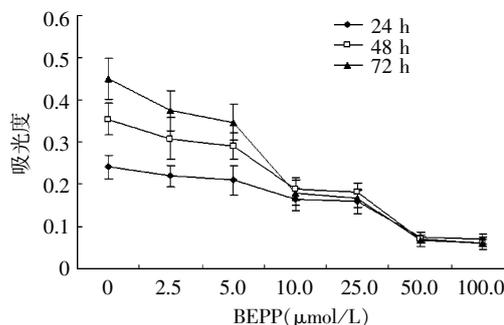
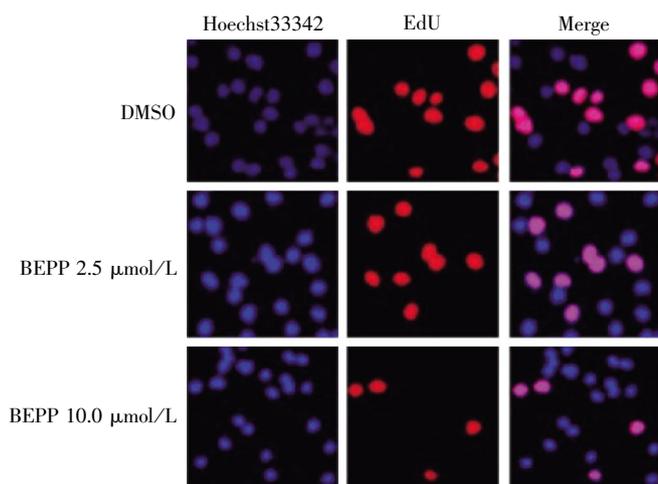


图 1 不同浓度、时间的 BEPP 刺激对 INS-1 细胞生长活力的影响

Figure 1 Effects of different concentrations and time of BEPP on cell viability of INS-1 cells

### 2.2 不同浓度的 BEPP 对 INS-1 细胞增殖的影响

采用 EdU 荧光标记检测 PKR 激活对胰岛  $\beta$  细胞 DNA 合成的影响,探讨其对  $\beta$  细胞增殖的调节作用。不同浓度的 BEPP(0、2.5、10.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 分别作用于 INS-1 细胞 48 h,荧光显微镜观察并对 EdU 阳性细胞进行计数。与对照组(DMSO)相比,药物处理组 EdU 阳性细胞比例呈剂量依赖性下降趋势,2.5、10.0  $\mu\text{mol/L}$  作用下 INS-1 细胞的 EdU 阳性细胞比例分别为对照组的 77.9% ( $P < 0.05$ ) 和 38.2% ( $P < 0.05$ ,图 2)。上述结果表明,PKR 的激活能诱导胰岛  $\beta$  细胞增殖抑制。



与对照组比较, \* $P < 0.05$  ( $n = 3$ )。

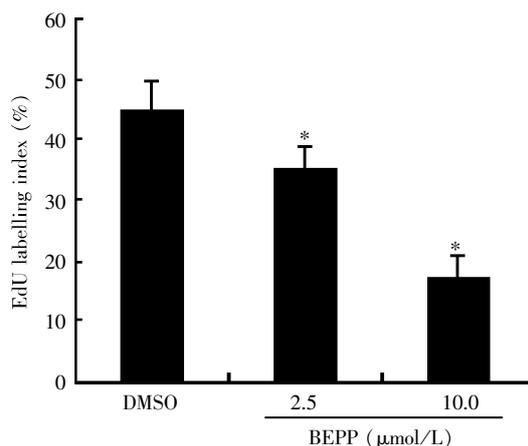
图 2 不同浓度的 BEPP 对 INS-1 细胞增殖的影响

Figure 2 Effects of different concentrations of BEPP on the proliferation of INS-1 cells

### 2.3 不同浓度的 BEPP 对 INS-1 细胞周期的影响

用不同浓度的 BEPP (0、2.5、5.0、10.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 分别作用 INS-1 细胞 48 h。流式细胞术检测表明(图 3):与对照组(DMSO)相比,10  $\mu\text{mol/L}$  浓度的 BEPP

明显将细胞周期阻滞于 G1 期,细胞比例明显上升至 [(84.03  $\pm$  3.89)% , $P < 0.05$ ];S 期细胞比例显著降低至 [(10.35  $\pm$  1.32)% , $P < 0.05$ ]。表明 PKR 的激活诱导 INS-1 细胞 G1 期阻滞。



## 2.4 PKR 激活对 INS-1 细胞增殖相关蛋白水平的影 响

Western blot 法检测 PKR 的激活对 cyclin D1、p-eIF2 $\alpha$  蛋白含量的影响。与对照组(DMSO)相比, 2.5、10.0  $\mu\text{mol/L}$  BEPP 能够使 cyclin D1 蛋白表达水平显著降低, 其降低比例分别为 (29.10  $\pm$

2.95)%、(39.93  $\pm$  0.93)% ( $P < 0.05$ , 图 4A)。与对照组相比, 随着 BEPP 给药浓度增高, p-eIF2 $\alpha$  蛋白表达水平显著升高, 其升高比例分别为: 2.5  $\mu\text{mol/L}$  时 (76.51  $\pm$  1.65)%; 10.0  $\mu\text{mol/L}$  时 (98.41  $\pm$  2.23)% ( $P < 0.05$ , 图 4B)。表明 PKR 的激活使 p-eIF2 $\alpha$  水平上调, 同时诱导 cyclin D1 蛋白水平下调。

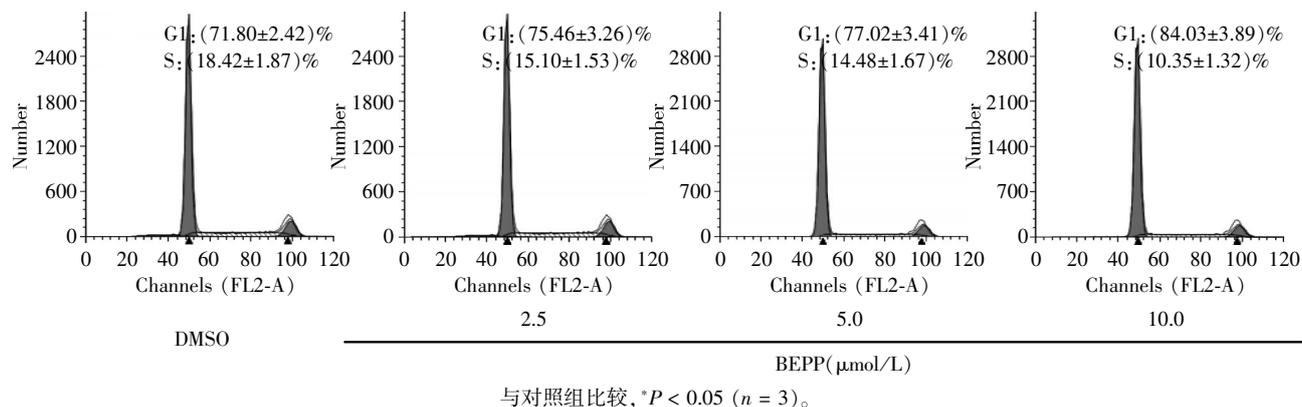


图 3 不同浓度的 BEPP 对 INS-1 细胞周期的影响

Figure 3 Effects of different concentrations of BEPP on cell cycle distribution of INS-1 cells

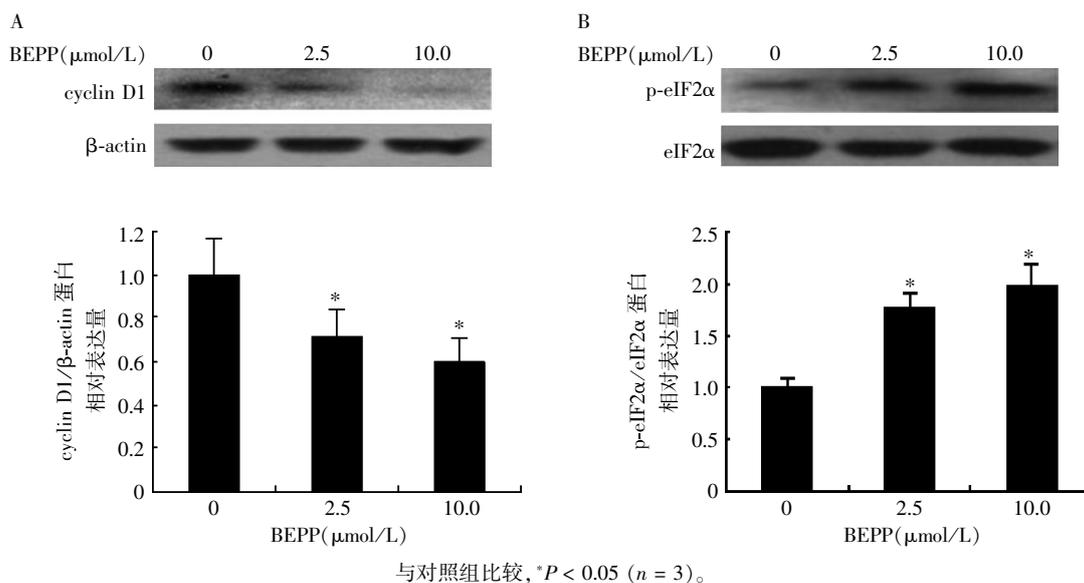


图 4 Western blot 检测 cyclin D1(A)、p-eIF2 $\alpha$ (B) 表达

Figure 4 Western blot analysis of the protein level of cyclin D1 and p-eIF2 $\alpha$

## 3 讨论

2 型糖尿病是一种常见、多发的内分泌代谢失常性疾病, 具有发病率高、难根治、并发症多的特点, 现已成为仅次于肿瘤和心血管疾病之后的第三大非传染性疾病。外周组织的胰岛素抵抗和胰岛  $\beta$  细胞的失代偿是糖尿病的重要发病机制<sup>[8-9]</sup>。通常当机体诱发胰岛素抵抗后, 将经历一个“应激-代偿-失代偿”的过程, 只有当胰岛  $\beta$  细胞数量相对减少且整

体功能下调时, 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  $\beta$  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。

已有研究表明 PKR 能被肥胖、高糖高脂及炎症因子等因素激活, 参与外周组织胰岛素抵抗<sup>[6,10]</sup>。本研究证明, 激活的 PKR 也参与了中心组织胰岛  $\beta$  细胞功能调控, 通过诱导其凋亡及其细胞周期阻滞, 参与了其整体功能调节。

PKR 又被称为 DAI 或 p68, 属于丝/苏氨酸蛋

白激酶,也是胞内模式识别受体。PKR 能识别胞内病毒双链 RNA<sup>[11]</sup>,通过诱导性二聚化激活。激活的 PKR 能磷酸化真核细胞翻译启动因子 eIF2 $\alpha$ ,导致胞内蛋白质合成抑制,通过诱导宿主细胞的增殖抑制和凋亡,参与抗病毒感染<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,PKR 激活可显著抑制胰岛  $\beta$  细胞的生长活力,且有明显的时间和剂量依赖性。同时,EdU 荧光标记也发现 PKR 激活对胰岛  $\beta$  细胞增殖起到显著的抑制作用。其可使胰岛  $\beta$  细胞周期显著阻滞于 G1 期,降低 S 期细胞比例。同时免疫印迹实验证实:PKR 诱导的增殖抑制可能与其重要的下游信号分子 eIF2 $\alpha$  的激活密切相关。

最近的研究揭示,在成熟的哺乳动物体内, $\beta$  细胞数量的维持是由成熟  $\beta$  细胞的复制完成的,而与干细胞关系不大。因而,胰岛  $\beta$  细胞的增殖过程受到细胞周期进程的调控与平衡。而细胞周期进程通过一系列复杂的分子机制进行调控,以确保细胞周期各时相(G1、S、G2、M)严格有序地进行。cyclin D 家族为细胞周期 G1 期的正性调节蛋白,其在细胞周期中与相应的 CDK 结合,在细胞分裂增殖方面发挥重要作用。其中,cyclinD1 是 G1/S 期过渡检查点的重要调控因子。有研究报道 cyclin D1 在小鼠胰岛  $\beta$  细胞的增殖及对成年小鼠  $\beta$  细胞的数量维持方面均具有极其重要的作用<sup>[13]</sup>。本研究表明,激活的 PKR 能下调 cyclin D1 水平,可能是其诱导  $\beta$  细胞增殖抑制的重要途径<sup>[14]</sup>。然而其精确的调控机制并不清楚。已有研究显示,尽管活化的 PKR 可以磷酸化 eIF2 $\alpha$  阻碍蛋白合成,但是 PKR 与 cyclin D1 Thr280 位点磷酸化及其泛素-蛋白酶体途径诱导的降解也密切相关<sup>[15]</sup>,因而,cyclin D1 的降解及其蛋白合成抑制均可能参与了 PKR 诱导的  $\beta$  细胞周期阻滞调控。

综上所述,本实验证实激活的 PKR 可能通过磷酸化 eIF2 $\alpha$  抑制细胞内蛋白质合成,下降 cyclin D1 蛋白表达从而阻滞细胞周期于 G1 期,抑制胰岛  $\beta$  细胞的生长和增殖,导致机体胰岛细胞数量的减少和机体胰岛素分泌总量的失代偿。该研究揭示了 2 型糖尿病的新机制,为新药物靶点的识别提供了新的理论依据。

#### [参考文献]

[1] Colli ML, Nogueira TC, Allagnat F, et al. Exposure to the viral by-product dsRNA or Cocksackie virus B5 triggers pancreatic beta cell apoptosis via a Bim/Mcl-1 imbalance [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(9):e1002267

[2] Dharel N, Kato N, Muroyama R, et al. Potential contribution of tumor suppressor p53 in the host defense against hepatitis C virus[J]. Hepatology, 2008, 47(4):1136-1149

[3] Der SD, Yang YL, Weissmann C, et al. A double-stranded RNA activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(7):3279-3283

[4] Jacob S, Deyo DJ, Cox RA, et al. Mechanisms of toxic smoke inhalation and burn injury:role of neutral endopeptidase and vascular leakage in mice [J]. Toxicol Mech Methods, 2009, 19(3):191-196

[5] Masiello P. Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic beta-cell mass [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(5-6):873-893

[6] Nakamura T, Furuhashi M, Li P, et al. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis[J]. Cell, 2010, 140(3):338-348

[7] Hu W, Hofstetter W, Wei X, et al. Double-stranded RNA-dependent protein kinase-dependent apoptosis induction by a novel small compound [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 328(3):866-872

[8] Ackermann AM, Gannon M. Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion[J]. J Mol Endocrinol, 2007, 38(1-2):193-206

[9] 贾伟平. 胰岛素抵抗在 2 型糖尿病发病机制中的作用 [J]. 诊断学理论和实践, 2009, 8(3):233-236

[10] Yang X, Nath A, Opperman MJ, et al. The double-stranded RNA-dependent protein kinase differentially regulates insulin receptor substrates 1 and 2 in HepG2 cells [J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(19):3449-3458

[11] Pyo CW, Lee SH, Choi SY. Oxidative stress induces PKR-dependent apoptosis via IFN-gamma activation signaling in Jurkat T cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(3):1001-1006

[12] 段玉坤, 伍志强, 韩为东. PKR 诱导细胞凋亡发生机制的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(9):1863-1865

[13] Zhang X, Gaspard JP, Mizukami Y, et al. Overexpression of cyclin D1 in pancreatic beta-cells in vivo results in islet hyperplasia without hypoglycemia [J]. Diabetes, 2005, 54(3):712-719

[14] Raven JF, Koromilas AE. PERK and PKR:old kinases learn new tricks[J]. Cell Cycle, 2008, 7(9):1146-1150

[15] Baltzis D, Pluquet O, Papadakis AI, et al. The EIF2alpha kinases PERK and PKR activate glycogen synthase kinase 3 to promote the proteasomal degradation of P53[J]. J Biol Chem, 2007, 282(43):31675-31687