

追糖溯源

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000579

过表达前列腺凋亡反应因子-4 对 NIT-1 细胞的影响

吴琦楠¹, 甘露光¹, 邓武权¹, 张玲², 陈兵¹

(第三军医大学第一附属医院 1. 内分泌科; 2. 门诊部, 重庆 400038)

【摘要】目的:构建携带前列腺凋亡反应因子-4(prostate apoptosis response-4, PAR-4)基因 PRKC apoptosis WT1 regulator (pawr)表达的重组腺病毒载体,研究 PAR-4 对胰岛 β 细胞株 NIT-1 的影响。**方法:**利用 Oligo Designer3.0 设计 Pawr 模版引物,通过 RT-PCR 扩增出 pawr 基因片段,使用双酶切克隆至腺病毒载体 ADV1,构建重组载体质粒 pAdTrack-pawr-CMV。线性化 pAdTrack-pawr-CMV 和 pAd-Easy-1 共同转化到感受态大肠杆菌构建重组腺病毒载体质粒 pAdTrack-pawr。将 NIT-1 细胞分为 4 组:低糖组、高糖对照组、低糖+PAR-4 过表达组以及高糖+PAR-4 过表达组,Western blot 检测各组 PAR-4 蛋白表达,MTT 法检测各组细胞增殖能力,ELISA 检测经葡萄糖刺激后的各组细胞胰岛素分泌功能。**结果:**克隆的 pawr 基因片段测序正确。高纯度质粒中量抽提试剂盒抽提重组腺病毒载体质粒成功,单酶切鉴定,质粒转染 HEK293 细胞后有 GFP 表达,扩增 48 h 后出现细胞病变效应,病毒滴度测定为 1×10^9 pfu/ml,低糖和高糖过表达 PAR-4 后均较相应对照组 PAR-4 表达明显升高,高糖培养+过表达 PAR-4 组细胞增殖能力均较低糖($P=0.000$)和高糖对照组细胞($P=0.000$)明显下降,较低糖($P=0.003$)和高糖对照组细胞($P=0.001$)胰岛素分泌明显下降。**结论:**成功构建高滴度 pawr 基因表达的重组腺病毒载体并转染 NIT-1 细胞,转染 PAR-4 后高糖培养的 NIT-1 细胞增殖能力和胰岛素分泌功能明显下降。

【关键词】前列腺凋亡反应因子-4;腺病毒载体;2 型糖尿病

【中图分类号】R58

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-10-28

Effects of overexpression of prostate apoptosis response-4 on the NIT-1 cell

Wu Qinan¹, Gan Xianguang¹, Deng Wuquan¹, Zhang Ling², Chen Bing¹

(1. Department of Endocrinology; 2. Outpatient Department,

the First Affiliated Hospital of the Third Military Medical University)

【Abstract】Objective: To construct recombinant adenovirus vector containing PAR-4 gene, so as to lay a foundation for further study of the function of PAR-4 and to illuminate the effect of PAR-4 on islet β cell line-NIT-1. **Methods:** Oligo Designer 3.0 was used to design the PCR primers: PRKC apoptosis WT1 regulator(pawr). Then, the gene fragments of pawr were obtained by RT-PCR and inserted into the ADV1 vector by restriction enzyme digestion. The recombinant vector plasmid pAdtrack-pawr-CMV was constructed, and then, the recombinant pAdTrack-pawr-CMV was linearized and translated into the competent bacteria with pAd-Easy-1 for homologous recombination to obtain pAdTrack-PAR-4. NIT-1 cell was divided into 4 groups: low glucose control, low glucose+overexpression of PAR-4, high glucose control, high glucose + overexpression of PAR-4, and protein expression level was detected by Western blot, the proliferation ability by MTT, the secretion ability after glucose stimulation by ELISA. **Results:** The pawr genes were verified by gene sequencing. The recombinant plasmid was successfully extracted by high purity plasmid extraction median kit. The recombinant adenovirus vector plasmid with mono-restriction endonuclease enzyme was evaluated. The earliest expression of GFP was observed in HEK293 cells and after 48 h of amplification the CPE was observed and the final viral titer was 1×10^9 pfu/ml. The protein expression level of PAR-4 was significantly increased in low glucose+overexpression of PAR-4 group and high glucose+overexpression of PAR-4 group than in its control groups. Proliferation ability and insulin secretion were decreased in high glucose+overexpression of PAR-

4 group than in low glucose+overexpression of PAR-4 group and high glucose control group. **Conclusion:** The over-expression of PAR-4 group has higher expression of PAR-4. After transfection and culture by high glucose concentration, the proliferation ability of high-glucose cultured NIT-1 is decreased.

【Key words】 prostate apoptosis response-4; adenovirus vector; type 2 diabetes mellitus

作者介绍: 吴琦楠, Email: wqn11@126.com,

研究方向: 内分泌与代谢病研究。

通信作者: 陈兵, Email: chenbing3@medmail.com.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81370885); 重庆市教委研究生科研创新资助项目(编号: CYB14097); 第三军医大学青年人才基金资助项目(编号: SWH2013QN02)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150401.1724.001.html>
(2015-04-01)

由 PRKC apoptosis WT1 regulator(pawr)基因编码的前列腺凋亡反应因子-4(prostate apoptosis response-4, PAR-4)是近年来发现的一种细胞因子,研究发现其可影响细胞的增殖能力,进一步启动细胞死亡途径,从而参与肿瘤以及多种增殖性疾病的病理生理过程。PAR-4 通过与细胞膜上的葡萄糖调节蛋白 78 结合从而启动内质网应激,内质网应激又可使 PAR-4 分泌增加,不断分泌增加的 PAR-4 诱导细胞的增殖能力下降,启动细胞死亡途径。已知内质网应激是 2 型糖尿病主要的发病机制,其所诱导的胰岛 β 细胞增殖能力和分泌功能下降,继而功能失调,在 2 型糖尿病的发病过程占有重要地位^[4],但目前尚无关于 PAR-4 通过影响胰岛 β 细胞增殖能力和分泌功能,从而参与 2 型糖尿病发病方面的研究。因此,本研究通过构建 pawr 基因腺病毒表达载体并检测其对于胰岛 β 细胞增殖能力方面的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

Pawr 基因引物、腺病毒载体、质粒,大肠杆菌购自上海吉玛生物有限公司;HEK293 细胞和胰岛 β 细胞株 NIT-1 均为第三军医大学第一附属医院内分泌科程立庆博士所赠;酵母提取物、胰蛋白胨购自 OXOID;DNA 内切酶(*EcoR* I、*Bam* H I)、DNA 连接酶、DNA marker 购自 MBI Fermentas;琼脂糖、DNA 凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司;Ampicillin 购自 Sigma;低糖(5.6 mmol/L)和高糖(25.5 mmol/L) DMEM 细胞培养基、胎牛血清均购自 Gibco 公司;质粒中量抽提试剂盒购自杭州爱思进生物技术有限公司,脱脂奶粉购自 SIGMA 公司,PAR-4 兔抗鼠抗体购自 SANTACRUZE 公司,兔抗鼠 β -actin 抗体购自 SANTACRUZE 公司,MTT 购买自 Sigma 公司,ELISA 试剂盒购自上海酶联生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 腺病毒载体构建 使用 Oligo Designer 3.0 设计长度为 61 bp 的 pawr 引物模版,经过 RT-PCR 获取 pawr 基因片段, pawr 基因片段以 *EcoR* I、*Bam* H I 双酶切连入线性化 pAdtrack-CMV 载体(图 1),获得重组 pAdtrack-PAR-4-CMV 质粒,与 pAd-Easy-1 共同转化到感受态大肠杆菌构建重组腺病毒载体质粒 pAdTrack-PAR-4。采用高纯度质粒中量抽提试剂盒抽提提取质粒作酶切与测序鉴定(由上海吉玛制药有限公司完成)。

1.2.2 pAdTrack-PAR-4 包装及滴度测定 低糖 DMEM(葡萄糖 5.5 mmol/L)+10%胎牛血清培养 HEK293 细胞,脂质体介导 pAdTrack-PAR-4 转包装 HEK293 细胞,扩增纯化腺病毒作滴度测定。

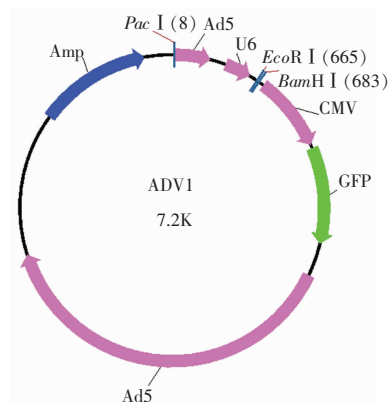


图 1 ADV1 载体图

Fig.1 Vector of ADV1

1.2.3 NIT-1 细胞转染及 Western blot 鉴定 低糖 DMEM+10%胎牛血清培养 NIT-1 细胞 48 h 后分为 4 组,将 NIT-1 细胞分为 4 组,低糖对照组(低糖 DMEM+10%胎牛血清)、低糖+PAR-4 过表达组(低糖 DMEM+10%胎牛血清+脂质体包裹 pAdTrack-PAR-4 重组腺病毒质粒)、高糖对照组(高糖 DMEM+10%胎牛血清)、高糖+PAR-4 过表达组(高糖 DMEM+10%胎牛血清+脂质体包裹 pAdTrack-PAR-4 重组腺病毒质粒),各组再分别培养 48 h 后收集细胞,提取各组的细胞全蛋白进行聚丙烯酰胺电泳,半干电转法将分离胶上的蛋白转移到经甲醇处理的 PVDF 膜上。脱脂奶粉封闭 12 h,再加入稀释的 PAR-4 兔抗鼠抗体(1:400 稀释)以及 1:400 稀释的兔抗鼠 β -actin 抗体(SANTACRUZE,北京中山生物技术有限公司分装)于 4 °C 孵育过夜,TBST 清洗,加入 1:1 000 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(SANTACRUZE 公司生产,北京中山生物技术有限公司分装)37 °C 摇床上以 50 r/min 孵育 60 min,TBST 清洗。用化学发光试剂盒(北京中山生物技术有限公司)检测结合的辣根过氧化物酶标记的二抗,X 线片显影,Image J 软件扫描条带灰度值,用各组的 PAR-4 条带灰度值/actin 条带灰度值得到相应组的灰度比值,Excel 软件做柱状图。

1.2.4 MTT 比色法检测 NIT-1 细胞增殖情况 将各组细胞培养 48 h 后调整细胞密度为 1×10^4 个/ml,然后接种 96 孔板,每组共设 10 个复孔。37 °C CO₂ 培养箱中培养 72 h,加入 MTT (PBS 配制 5 mg/ml, pH=7.4),继续孵育 4 h,弃去培养液,每孔加入 100 μ l 二甲基亚砷,摇床振荡 10 min,酶标仪检测 570 nm 处的吸光度值($A_{570\text{nm}}$)。

1.2.5 ELISA 检测 NIT-1 细胞胰岛素分泌功能 4 组细胞培养 48 h 后,调整细胞密度为 1×10^7 个/ml,然后接种 24 孔板,每组共设 6 个复孔。37 °C CO₂ 培养箱中低糖 DMEM+10%胎牛血清培养 48 h,弃去培养基并用 PBS 冲洗后,加入含葡萄糖 3.3 mmol/L 的 Krebs-Ringer 缓冲液同步化 2 h,继续以无血清高糖 DMEM (葡萄糖浓度 25.5 mmol/L) 培养基孵育 60 min,使用 ELISA 试剂盒检测胰岛素浓度,按说明书进行,酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值($A_{450\text{nm}}$)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,

多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 pawr 基因重组腺病毒载体鉴定

2.1.1 酶切鉴定 重组腺病毒载体 PAdTrack-PAR-4 经 *Pac* I 单酶切,获得 7 093 bp 的线性化重组质粒,证实 pawr 基因已插入载体 ADV1 中(图 2)。

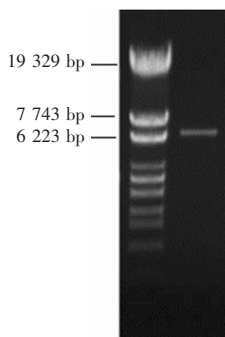


图 2 重组腺病毒载体酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant adenovirus vector

2.1.2 测序鉴定 经酶切挑选部分正确质粒进行测序鉴定。测序结果通过 chromas 软件分析比对与 GeneBank 中的 pawr 序列相同(图 3)。

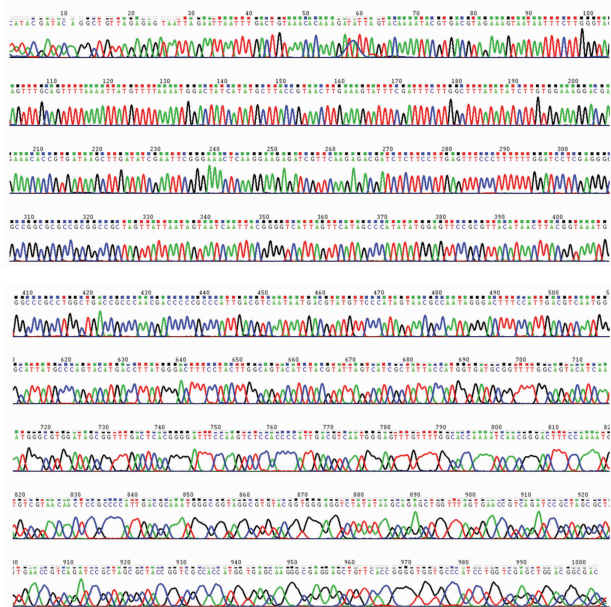


图 3 PAR-4 基因测序图

Fig.3 Gene sequencing of PAR-4

2.2 病毒滴度测定

2.2.1 转染效率的测定 脂质体包裹 PAdTrack-PAR-4 重组腺病毒质粒转染活度良好的 HEK293 细胞 48 h 后,光镜及荧光显微镜下可观察到细胞变圆、飘起、葡萄串样的致细

胞病变效应(cytopathic effect,CPE)改变,转染效率 90%以上(图 4)。

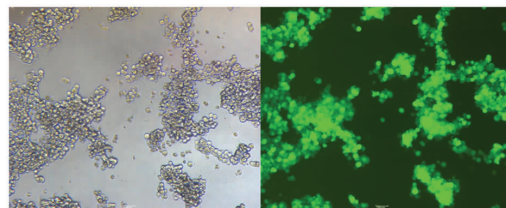


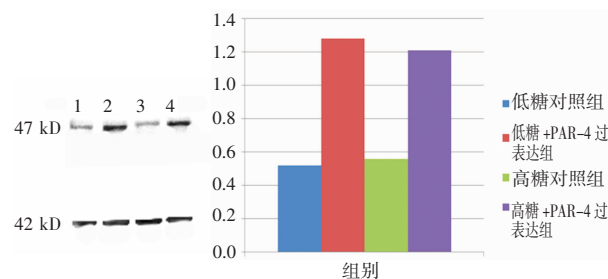
图 4 转染重组 PAd-track-PAR-4 载体 48 h 后细胞形态变化 (100 ×)

Fig.4 After 48 h, the morphological changes of cells transfected by recombinant PAd-track-PAR-4 vector (100 ×)

2.2.2 病毒滴度的测定 用 PAd-track-PAR-4 重组腺病毒质粒感染包装 HEK293 细胞,约 48 h 后可见 CPE 反应,采用 Reed-Muench 法计算病毒滴度为 1×10^9 pfu/ml(图 4)。

2.3 PAR-4 转染 NIT-1 细胞和蛋白表达

低糖+PAR-4 过表达组和高糖+PAR-4 过表达组较低糖对照组和高糖对照组 PAR-4 蛋白表达明显升高(图 5)。



PAR-4:47 kD, β -actin:42 kD

1. 低糖对照组;2. 低糖+PAR-4 过表达组;

3. 高糖对照组;4. 高糖+PAR-4 过表达组

图 5 各组细胞 PAR-4 的蛋白表达

Fig.5 PAR-4 protein expression of each group

2.4 PAR-4 转染 NIT-1 细胞后增殖能力变化

低糖对照组与低糖+PAR-4 过表达组 $A_{570\text{ nm}}$ 值无明显差异($P=0.721$),低糖对照组与高糖对照组 $A_{570\text{ nm}}$ 值也无明显差异($P=0.373$),高糖+PAR-4 过表达组较低糖对照组细胞 $A_{570\text{ nm}}$ 值明显下降($P=0.000$),高糖+PAR-4 过表达组较高糖对照组 $A_{570\text{ nm}}$ 值明显下降($P=0.000$),高糖+PAR-4 过表达组较低糖+PAR-4 过表达组细胞 $A_{570\text{ nm}}$ 值明显下降($P=0.000$),见表 1。

2.5 PAR-4 转染 NIT-1 细胞后葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能变化

低糖对照组与低糖+PAR-4 过表达组 $A_{450\text{ nm}}$ 值无明显差异($P=0.801$),低糖对照组与高糖培养组 $A_{450\text{ nm}}$ 值也无明显差异($P=0.616$),高糖+PAR-4 过表达组较低糖对照组细胞 $A_{450\text{ nm}}$ 值明显下降($P=0.003$),高糖+PAR-4 过表达组较高糖对照组 $A_{450\text{ nm}}$ 值明显下降($P=0.001$),高糖+PAR-4 过表达组较低糖+PAR-4 过表达组细胞 $A_{450\text{ nm}}$ 值明显下降($P=0.002$),见表 1。

表 1 各组 $A_{570\text{ nm}}$ 、 $A_{450\text{ nm}}$ 比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab.1 Comparison of $A_{570\text{ nm}}$ and $A_{450\text{ nm}}$ among groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	$A_{570\text{ nm}}$ ($n=10$)	$A_{450\text{ nm}}$ ($n=6$)
低糖对照组	0.64 ± 0.13	0.47 ± 0.08
低糖+PAR-4 过表达组	0.62 ± 0.12	0.48 ± 0.12
高糖对照组	0.59 ± 0.14	0.50 ± 0.17
高糖+PAR-4 过表达组	0.35 ± 0.11	0.25 ± 0.05
<i>F</i> 值	11.827	6.450
<i>P</i> 值	0.000	0.003

注:低糖对照组 vs. 高糖+PAR-4 过表达组 ($P_{A_{570\text{ nm}}}=0.000, P_{A_{450\text{ nm}}}=0.003$), 高糖对照组 vs. 高糖+PAR-4 过表达组 ($P_{A_{570\text{ nm}}}=0.000, P_{A_{450\text{ nm}}}=0.001$), 低糖+PAR-4 过表达组 vs. 高糖+PAR-4 过表达组 ($P_{A_{570\text{ nm}}}=0.000, P_{A_{450\text{ nm}}}=0.002$)

3 讨论

我国是糖尿病第一大国,据报告成年糖尿病患者已超过 1 亿,其中 90% 以上都是 2 型糖尿病患者^[2-3]。在中国人群中,胰岛 β 细胞功能失调是中国人群 2 型糖尿病的最主要的特征,因此,针对胰岛 β 细胞功能失调的机制研究在中国 2 型糖尿病的防治中占有重要地位^[4-7]。PAR-4 是近年来发现的一种细胞因子,目前研究发现其效应不仅作用于肿瘤细胞,还参与了其他多种增龄性疾病的病理生理过程^[8-9]。PAR-4 通过与细胞膜上的葡萄糖调节蛋白 78 结合启动内质网应激,而内质网应激也可使 PAR-4 分泌增加,不断分泌增加的 PAR-4 可通过多种途径诱导细胞的增殖能力下降及死亡,形成恶性循环,不断诱导细胞功能失调^[10-11]。实验组通过前期理论上的总结,推测糖尿病内质网应激状态下,PAR-4 分泌增多,有可能通过影响胰岛 β 细胞增殖能力,参与胰岛 β 细胞功能失调的过程^[1]。

为证明该观点,本实验采用 AdEasy 腺病毒改良载体系统构建 PAR-4 基因重组腺病毒载体^[12-13],通过成功设计引物,利用 RT-PCR 成功扩增出 pawr 基因片段,并将其克隆入 ADV1 载体,获得 PAd-track-CMV-pawr 载体质粒,酶切及测序鉴定验证了 pawr 基因序列的正确性,证实构建 PAR-4 重组腺病毒表达载体成功,通过 Western blot 发现较之阴性对照组,转染该 PAR-4 重组腺病毒表达载体的 NIT-1 细胞蛋白表达 PAR-4 明显增高,说明成功构建高滴度能表达 PAR-4 的腺病毒载体并成功转染 NIT-1 细胞。进一步检测到在低糖 DMEM 培养环境下,转染 PAR-4 后 NIT-1 胰岛 β 细胞的增殖能力和胰岛素分泌功能与正常 NIT-1 细胞无明显差别,说明正常

情况下,过表达 PAR-4 并不影响胰岛 β 细胞的增殖能力和分泌功能。经过短期高糖培养后,NIT-1 细胞的增殖能力和胰岛素分泌功能与正常 NIT-1 细胞相比也无明显差别,说明短期的高糖培养尚不会改变胰岛 β 细胞的增殖能力和分泌功能。但相同高糖培养环境中过表达 PAR-4 的 NIT-1 细胞增殖能力和分泌功能却较之正常培养 NIT-1 细胞和高糖培养未过表达 PAR-4 的 NIT-1 细胞明显下降,推测其可能的机制为高糖环境中,PAR-4 可通过促进内质网应激,从而影响胰岛 β 细胞增殖能力和分泌能力,PAR-4 的表达在 2 型糖尿病胰岛 β 细胞的凋亡和功能失调中是否占有重要的地位,仍需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Qinan W, Ling Z, Bing C. PAR-4: a possible new target for age-related disease[J]. Expert Opin Ther Targets, 2014, 18(8): 917-927.
- [2] Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. JAMA, 2013, 310(9): 948-959.
- [3] Bensellam M, Laybutt DR, Jonas JC. The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions[J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 364(1-2): 1-27.
- [4] Xu X, Wang G, Zhou T, et al. Novel approaches to drug discovery for the treatment of type 2 diabetes[J]. Expert Opin Drug Discov, 2014, 9(9): 1047-1058.
- [5] Yang W, Weng J. Early therapy for type 2 diabetes in China[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2014, 2(12): 992-1002.
- [6] Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes[J]. Science, 2004, 306(5695): 457-461.
- [7] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation[J]. Science, 2011, 334(6059): 1081-1086.
- [8] Gurumurthy S, Goswami A, Vasudevan KM, et al. Phosphorylation of PAR-4 by protein kinase A is critical for apoptosis[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(3): 1146-1161.
- [9] Burikhanov R, Zhao Y, Goswami A, et al. The tumor suppressor PAR-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis[J]. Cell, 2009, 138(2): 377-388.
- [10] Shrestha-Bhattarai T, Rangnekar VM. Cancer-selective apoptotic effects of extracellular and intracellular PAR-4[J]. Oncogene, 2010, 29(27): 3873-3880.
- [11] Burikhanov R, Shrestha-Bhattarai T, Qiu S, et al. Novel mechanism of apoptosis resistance in cancer mediated by extracellular PAR-4[J]. Cancer Res, 2013, 73(2): 1011-1019.
- [12] He TC, Zhou S, Luis T, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998(95): 2509-2514.
- [13] Luo J, Deng ZL, Luo X, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1236-1247.

(责任编辑:唐宗顺)