

过表达 MST-1 基因对大鼠 INS-1 细胞增殖与凋亡的影响*

陈立强¹, 王洋洋², 伍华颖¹, 赵思婷¹, 陈嘉雯¹, 彭淑莹¹

1. 肇庆医学高等专科学校, 广东肇庆 526060; 2. 广东省肇庆市第一人民医院输血科, 广东肇庆 526060

摘要:目的 探讨过表达哺乳动物不育系 20 样激酶-1(MST-1)基因对大鼠胰腺 β 瘤(INS-1)细胞增殖与凋亡的影响。方法 转染 pJ3H-HA-MST-1 质粒于 INS-1 细胞, 设为实验组, 另设立对照组(空载体), 利用 Western blot 检测 MST-1、Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达水平, CCK-8 法检测各组细胞活性。结果 实验组通过 pJ3H-HA-MST-1 质粒转染细胞后, MST-1、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平较对照组增高, 而 Bcl-2 表达降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。CCK-8 法检测结果显示过表达 MST-1 对 INS-1 细胞的增殖有明显的抑制作用。结论 MST-1 基因过表达可诱导 INS-1 细胞凋亡, 这可能是 2 型糖尿病中胰腺 β 细胞凋亡形成的机制之一。

关键词: 2 型糖尿病; 哺乳动物不育系 20 样激酶-1; 细胞凋亡; 胰腺 β 瘤细胞**中图法分类号:** R394.3**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2019)14-2042-03

2 型糖尿病是一种常见的内分泌代谢疾病, 随着饮食和运动方式的改变, 目前我国糖尿病发病率呈快速上升趋势^[1]。2 型糖尿病病程后期, 胰腺 β 细胞长期处于高糖环境中, 导致胰腺 β 细胞功能障碍, 进而加重糖尿病的临床症状, 机体糖代谢功能紊乱加重, 胰腺 β 细胞数量减少与功能障碍使机体血糖进一步失控^[2]。研究表明, Hippo 通路在细胞的增殖与凋亡过程中发挥着重要作用, 然而该通路在胰腺 β 细胞中的调控机制仍未明确。哺乳动物不育系 20 样激酶-1(MST-1)是一种广泛表达的丝氨酸/苏氨酸激酶, 它是 Hippo 信号转导通路的一部分, 参与多种细胞生长过程, 如形态形成、增殖、应激反应和凋亡等^[3-4]。本研究通过观察过表达 MST-1 基因对大鼠胰腺 β 瘤(INS-1)细胞的影响, 为进一步探讨 2 型糖尿病病程晚期胰腺 β 细胞凋亡的机制奠定基础, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 大鼠 INS-1 细胞株购于北京北纳创联生物技术研究院; DMEM 细胞培养基、胎牛血清和双抗购于北京索莱宝科技有限公司; MST-1、Bax、Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白抗体购于 Santa Cruz 公司; BCA 蛋白水平检测试剂盒、抗体稀释液和 CCK-8 检测试剂盒、质粒抽提试剂盒购于碧云天生物科技公司; pJ3H-HA-MST-1 质粒购于 Addgene 公司; LipofectamineTM 购于 Invitrogen 公司。

1.2 细胞培养及分组 INS-1 细胞生长于含 10% 热灭活胎牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中传代培养, 待 INS-1 细胞生长至大于 90% 融合时, 用倒置显微镜对细胞形态进行观察, 用

0.25% 的胰酶消化和传代, 对细胞进行分瓶传代培养。实验细胞处于对数生长期时用 PBS 缓冲液将 INS-1 细胞洗 3 遍, 分为对照组和实验组, 对照组为空载体组, 将 pJ3H-HA-MST-1 质粒转染至实验组的 INS-1 细胞, 规范处理细胞进行下一步实验。

1.3 检测方法

1.3.1 Western blot 法测定蛋白表达水平 按照实验计划处理细胞, 48 h 后加入细胞裂解液, 裂解后以 Bradford 法测定蛋白水平, 制备好蛋白样品, 样品蛋白进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 然后将蛋白转至聚偏氟乙烯(PVDF)上, 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 溶液洗膜 3 次; PVDF 膜与一抗在 4 °C 条件下混合过夜, 洗膜并将膜与二抗在室温中孵育 1 h, 根据电化学发光免疫(ECL)法操作程序进行显色, 利用成像系统进行曝光, 条带图像经过灰度扫描软件 Band Scan 进行灰度值扫描分析, 依据灰度值计算蛋白与内参照 β-actin 蛋白灰度值之比作为蛋白表达水平的检测值。

1.3.2 CCK-8 法检测各组细胞活性 依据碧云天生物科技公司 CCK-8 试剂说明操作, 待细胞长满培养瓶并处于增殖期时, 利用胰酶消化, 制备细胞悬液并进行细胞计数, 每孔加入 100 μL 细胞悬液, 每孔约 2 000 个细胞接种于细胞培养板中, 每组实验设置 5 个复孔, 另外设定 5 个空白孔用于调零; 分别于 24、48、72、96 h 进行检测, 检测前 2 h 加入 CCK-8 试剂 10 μL, 并继续孵育, 2 h 后用酶标仪检测 450 nm 下的吸光度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数

* 基金项目: 广东省肇庆市科技创新计划项目(201704031423); 肇庆医学高等专科学校青年科技基金项目(Zyq17-006)。

据处理及统计分析, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 计数资料以例数或百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组细胞各项蛋白表达水平比较 按照实验计划处理细胞, 48 h 后进行蛋白电泳, 实验组较对照组 MST-1、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平增高, 而 Bcl-2 表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1 及表 1。

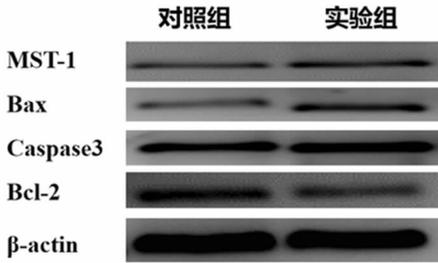


图 1 两组细胞各项蛋白表达水平

表 1 两组细胞各项蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MST-1	Bax	Caspase-3	Bcl-2
对照组	0.239±0.017	0.125±0.011	0.389±0.028	0.425±0.037
实验组	0.327±0.026*	0.275±0.021*	0.472±0.033*	0.316±0.029*

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

2.2 两组细胞活性比较 CCK-8 法检测结果显示, 过表达 MST-1 对 INS-1 细胞的增殖有明显的抑制作用, 实验组 72、96 h 细胞活性明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2 及表 2。

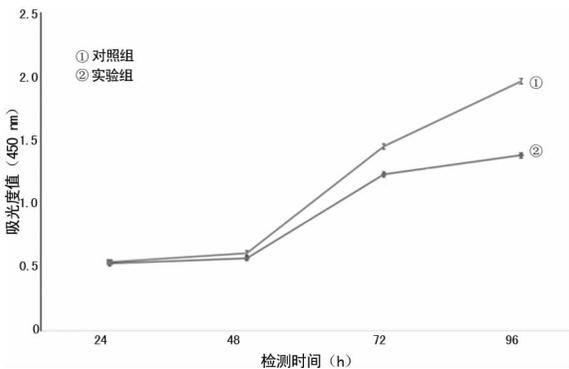


图 2 两组细胞活性比较

表 2 两组细胞活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
实验组	0.53±0.02	0.57±0.05	1.23±0.08*	1.38±0.06*
对照组	0.54±0.03	0.61±0.03	1.45±0.07	1.96±0.11

注: 数据为吸光度值; 与对照组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

Hippo 通路控制组织生长, 且是器官大小控制的

关键, 于果蝇中首先被发现, 在哺乳动物中比较保守, 其一系列磷酸化作用最终导致了转录辅激活物 Yorkie(Yki)的表达被抑制^[5]。首先, MST-1 和 WW 支架蛋白 Salvador(Sav)形成复合体, 该复合体磷酸化激活 DBF 家族 Warts(Wts), 从而抑制 Yki, 且 Wts 在多个位点磷酸化 Yki, 包括 Ser168, Ser168 是形成 14-3-3 蛋白复合物结合位点和限制 Yki 进入细胞质的关键^[6]。哺乳动物 Hippo 通路中 MST-1 和 LATS 的磷酸化作用最终导致了 YAP 和 TAZ(两个 Yki 同源体)的磷酸化, MST-1 是激活细胞凋亡信号通路的重要组成部分, MST-1 通过激活细胞凋亡多个下游目的蛋白如 LATS1/2、组蛋白 H2B 和调节 FOXO 家族成员及活化诱导 JNK 和 Caspase-3 等^[7]。YAP 是一个癌基因, 其活性表达取决于细胞内定位, 磷酸化 YAP 与 14-3-3 蛋白造成的细胞质滞留而失活, 未磷酸化的 YAP 转移至细胞核内, 与转录因子结合, 启动下游基因的转录。YAP 和 TAZ 在细胞核中都能与 TEAD1/4(Sd 同源体)结合, 激活促进细胞生长和抑制凋亡的基因进行表达^[8]。

研究表明, MST-1 基因表达异常是诱导胰腺 β 细胞凋亡的重要因素, 高糖高胰岛素血症及氧化刺激是 2 型糖尿病后期诱导胰腺细胞凋亡的首要因素。因此, 细胞凋亡是糖尿病患者胰腺 β 细胞数量减少的重要原因, 目前的治疗方式难以维持正常功能的胰腺 β 细胞数量, 因此在糖尿病治疗方案中防止 β 细胞凋亡和维持其功能稳定非常重要^[9]。2 型糖尿病患者的胰腺 β 细胞功能障碍和数量减少常见于胰岛素抵抗者, 胰腺 β 细胞功能障碍可导致多种效应, 包括糖毒性、脂毒性、炎症细胞因子内质网应激和氧化应激等。目前针对维持胰腺 β 细胞功能和数量的药物使用不广泛, 然而事实证明维持胰岛素正常分泌对临床治疗有很大的帮助^[10]。胰腺 β 细胞对多种凋亡刺激因子引起的凋亡反应很敏感, 例如炎症因子和氧化活性分子的刺激。因此, 发现诱导 β 细胞凋亡的关键调节因子并深入探讨, 有望为糖尿病提供一种新的治疗方案^[11]。

本研究中, 实验组通过 pJ3H-HA-MST-1 质粒转染细胞后, MST-1、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平较对照组增高, 而 Bcl-2 表达降低, CCK-8 法检测结果显示过表达 MST-1 对 INS-1 细胞的增殖有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)。这些结果显示高糖刺激可增强 INS-1 细胞 MST-1 基因表达, 进而促使 INS-1 细胞凋亡, 这可能是 2 型糖尿病中高糖血症诱导胰腺 β 细胞凋亡的机制之一。

参考文献

[1] QIN F, TIAN J, ZHOU D, et al. Mst1 and Mst2 kinases;

regulations and diseases[J]. Cell Biosci, 2013, 3(1):31.

[2] CINAR B, COLLAK F K, LOPEZ D, et al. MST1 is a multifunctional caspase-independent inhibitor of androgenic signaling[J]. Cancer Res, 2011, 71(12):4303-4313.

[3] MENG Z P, MOROISHI T, GUAN K L. Mechanisms of hippo pathway regulation[J]. Genes Dev, 2016, 30(1):1-17.

[4] AVRUCH J, ZHOU D, FITAMANT J, et al. Mst1/2 signalling to Yap: gatekeeper for liver size and tumour development[J]. Br J Cancer, 2011, 104(1):24-32.

[5] LIN C W, YAO E, CHUANG P T. A conserved MST1/2-YAP axis mediates Hippo signaling during lung growth[J]. Dev Biol, 2015, 403(1):101-113.

[6] RAWAT S J, CREAMY C L, PETERSON J R. The tumor suppressor Mst1 promotes changes in the cellular redox state by phosphorylation and inactivation of peroxiredoxin-1 protein[J]. J Biol Chem, 2013, 288(12):8762-8771.

[7] AMIN A, FEDERICO P, AZIZI Z, et al. MST1 is a novel regulator of apoptosis in pancreatic beta-cells [J]. Nat Med, 2014, 20(4):385-397.

[8] KUSER-ABALI G, ALPTEKIN A, CINAR B. Overexpression of MYC and EZH2 cooperates to epigenetically silence MST1 expression[J]. Epigenetics, 2014, 9(4):634-643.

[9] KURZ A, PRUENSTER M, ROHWEDDER I, et al. MST1 dependent vesicle trafficking regulates neutrophil transmigration through the vascular basement membrane [J]. Eur J Immunol, 2016, 46(1, SI):271.

[10] MARKOWITZ J T, KATHARINE C G, LORI M B. Developmental changes in the roles of patients and families in type 1 diabetes management[J]. Curr Diabetes Rev, 2015, 11(4):231-238.

[11] HILLIARD M E, PRISCILLA W P, ANDERSON B J. Evidence-Based behavioral interventions to promote diabetes management in children, adolescents, and families [J]. Am Psychol, 2016, 71(7):590-601.

(收稿日期:2019-01-18 修回日期:2019-04-11)

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 14. 026

孕产妇抗磷脂抗体水平检测及其临床意义*

何国才¹, 罗兆芹², 白清², 谢秋群²

广西壮族自治区桂林市人民医院:1. 检验科;2. 妇产科, 广西桂林 541002

摘要:目的 通过检测孕中期孕妇抗磷脂抗体(APLs),探讨 APLs 与病理妊娠的关系及临床意义。
方法 对有特定指征的 653 例孕妇及 598 例健康孕妇分别检测抗心磷脂抗体(ACL)、抗 β_2 糖蛋白 I (β_2 GP I) 和狼疮样抗凝物(LA)水平,计算 APLs 阳性率并进行比较。
结果 观察组 APLs 阳性率为 14.24%,对照组 APLs 阳性率为 0.84%,差异有统计学意义($\chi^2=77.70, P<0.05$)。
结论 APLs 异常孕妇极易导致病理妊娠,孕妇孕中期及时检测 APLs,有助于早发现、早干预孕妇妊娠病理状态,提高孕产质量及新生儿生存质量。

关键词:抗磷脂抗体; 孕妇; 病理性妊娠

中图分类号:R446.6

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)14-2044-03

抗磷脂抗体(APLs)是一组作用于磷脂、磷脂结合蛋白或两者的复合物,识别并结合血小板和内皮细胞膜上磷脂结合蛋白的自身免疫性抗体,主要由抗心磷脂抗体(ACL)、狼疮样抗凝物(LA)和抗 β_2 糖蛋白 I (β_2 GP I) 抗体组成。APLs 异常是导致抗磷脂综合征(APS)高凝状态及血栓形成、病理妊娠的主要病因^[1]。APS 的病理基础主要是由于 APLs 作用于绒毛外滋养细胞,使其增殖侵袭能力降低,容易导致子宫螺旋动脉血管产生功能障碍,会造成进入胎盘的血流减少,甚至中断,胎儿血氧及营养物质的供应相应减少,最终引发流产、胎儿生长受限、死胎、子痫前期等不良妊娠结局^[2]。本研究通过检测孕妇 APLs 主

要指标水平,探讨孕妇妊娠结局与 APLs 水平的相关性,以便及时对妊娠病理状态进行有效干预,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月至 2018 年 6 月于本院就诊的 653 例有特定指征的孕中期孕妇纳入观察组,年龄 22~43 岁,平均(28.5±3.6)岁。特定指征包括血栓或子痫前期史、子痫史、反复流产史、胎盘早剥史等病理妊娠事件,且本次妊娠有同样症状出现的情况,排除由于内分泌因素、免疫因素、遗传因素等异常而引起习惯性流产者。同期到本院就诊的无免疫性疾病和血栓病史的 598 例孕中期健康孕妇纳入

* 基金项目:桂林市科学研究与技术开发计划项目(20150403-1-3)。