

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.06.006

敲除 TRIF 基因对 TLR3 介导胰岛  $\beta$  细胞损伤的影响及机制研究\*张子月<sup>1</sup>, 朱祎婧<sup>2</sup>, 钟大鹏<sup>3 $\Delta$</sup> 

1. 中国人民解放军西部战区总医院干部病房, 四川成都 610083; 2. 四川省成都新华医院药学部, 四川成都 610081; 3. 中国人民解放军西部战区总医院内分泌科, 四川成都 610083

**摘要:**目的 探讨敲除 TRIF 基因后, 激活 Toll 样受体 3 (TLR3) 对胰岛  $\beta$  细胞增殖的影响及可能的作用机制。方法 首先利用 CRISPR/Cas9 技术, 在小鼠胰岛素瘤  $\beta$  细胞 NIT-1 细胞株中敲除 TRIF 基因, 得到敲除 TRIF 基因细胞株。再以敲除 TRIF 基因的 NIT-1 细胞株为研究对象, 用 DMEM 培养基进行细胞培养, 当细胞处于增殖期比例达到 80%~90% 时进行实验分组, 分为空白对照组和实验组, 实验组予以不同水平 (30、60、90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 TLR3 特异性激动剂病毒聚肌胞 (PIC) 刺激, 刺激干预 48 h 后再检测细胞增殖、细胞周期与凋亡蛋白表达, 以及核转录因子- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) 的 mRNA 和蛋白表达。结果 与空白对照组相比, PIC 刺激敲除 TRIF 基因后的 NIT-1 细胞株, 细胞停留在  $G_0/G_1$  期细胞的比例明显上调, 而在 S 期和  $G_2/M$  期的细胞比例出现明显下调, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); CyclinD1 表达在不同水平的 PIC 刺激下明显下调 ( $P < 0.05$ ); 细胞因子 NF- $\kappa\text{B}$  和凋亡蛋白 Caspase-3 的表达在不同水平的 PIC 刺激下则明显上调 ( $P < 0.05$ )。结论 PIC 刺激敲除 TRIF 基因后的小鼠胰岛  $\beta$  细胞株的 TLR3, 与刺激正常小鼠胰岛  $\beta$  细胞株一样, 仍可以上调细胞因子 NF- $\kappa\text{B}$  和凋亡蛋白 Caspase-3 的表达, 以及抑制周期蛋白 CyclinD1 的表达, 最终抑制胰岛  $\beta$  细胞增殖。

**关键词:** TRIF; Toll 样受体 3; 胰岛  $\beta$  细胞; 核转录因子- $\kappa\text{B}$ 

中图分类号: R587.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)06-0739-04

Effect and mechanism of TRIF gene knockout on TLR3 mediated islet  $\beta$  cell injury\*ZHANG Ziyue<sup>1</sup>, ZHU Yijing<sup>2</sup>, ZHONG Dapeng<sup>3 $\Delta$</sup> 

1. Cadre Ward, General Hospital of Western Theater of Chinese People's Liberation Army, Chengdu, Sichuan 610083, China; 2. Department of Pharmacy, Chengdu Xinhua Hospital, Chengdu, Sichuan 610081, China; 3. Department of Endocrinology, General Hospital of Western Theater of Chinese People's Liberation Army, Chengdu, Sichuan 610083, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect and possible mechanism of toll-like receptor 3 (TLR3) activation after TRIF gene knockout on islet  $\beta$  cell proliferation. **Methods** The CRISPR/Cas9 technique was used to knockout the TRIF gene in  $\beta$  cell NIT-1 of mice insulinoma. The TRIF gene knockout cell line of NIT-1 was obtained. Then, the NIT-1 cell line with TRIF gene knockout was used as the research object, and the cell culture was carried out with DMEM medium. When the proportion of cells in the proliferative phase reached 80%–90%, the experimental grouping was performed, which was divided into the blank control group and experimental group, and the experimental group was given different concentrations (30, 60, 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of TLR3-specific agonist virus polyinosinic (PIC) stimulation, after stimulation intervention 48 h, the cell proliferation, cell cycle and apoptosis protein, nuclear transcription factor- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) mRNA and protein expressions were detected. **Results** Compared with the blank control group, in the NIT-1 cell line after the TRIF gene knockout by PIC stimulation, the proportion of cells resting in  $G_0/G_1$  phase was significantly up-regulated, while the proportion of cells in S phase and  $G_2/M$  phase was significantly down-regulated, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The expression level of CyclinD1 was significantly down-regulated by different concentrations of PIC stimulation ( $P < 0.05$ ). The expression levels of cytokine NF- $\kappa\text{B}$  and apoptosis protein Caspase-3 were significantly up-regulated under different levels of PIC stimulation ( $P < 0.05$ ).

\* 基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会科技项目(16PJ012)。

作者简介: 张子月, 女, 医师, 主要从事老年医学方面的研究。  $\Delta$  通信作者, E-mail: zhongdap821@163.com。网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1167.R.20230116.1138.001.html\(2023-01-16\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1167.R.20230116.1138.001.html(2023-01-16))

**Conclusion** The mouse islet  $\beta$  cell line TLR3 after TRIF gene knockout by PIC stimulation as well as stimulating the normal mice islet  $\beta$  cell still up-regulate cytokine NF- $\kappa$ B and apoptosis Caspase-3 expression levels and inhibit the Cyclin D1 expression level, and finally inhibit the islet  $\beta$  cell proliferation.

**Key words:** TRIF; Toll like receptor 3; islet  $\beta$  cells; nuclear transcription factor- $\kappa$ B

糖尿病是一组由遗传和环境相互作用所致的代谢性疾病,据最新统计数据显示,我国 18 岁以上人群糖尿病患病率为 11.2%<sup>[1]</sup>,已成为威胁人类健康的主要公共卫生问题之一。目前,糖尿病的发病机制尚不完全清楚,有研究发现 Toll 样受体家族(TLRs)所介导的非特异性炎症反应可以导致胰岛  $\beta$  细胞功能的损伤<sup>[2-3]</sup>。本研究团队在前期研究中亦证实,激活胰岛  $\beta$  细胞的 Toll 样受体 3(TLR3)会通过 TRIF 信号通路释放核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B),损伤胰岛  $\beta$  细胞,抑制细胞的增殖和促进细胞的凋亡<sup>[4]</sup>。由此推测,在 TLR3 所介导的胰岛  $\beta$  细胞免疫损伤机制中 TRIF 信号通路至关重要。因此,本研究中将敲除 TRIF 基因,阻断 TRIF 信号通路,观察能否减轻胰岛  $\beta$  细胞的免疫损伤程度并探讨相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株** 小鼠胰岛素瘤  $\beta$  细胞株 NIT-1。

**1.1.2 药物及试剂** Poly(I:C)购自美国 Sigma 公司,DMEM、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,F-12K 购自美国 Gibco 公司,Triton X-100 购自美国 Sigma 公司,Rnase A solution 购自上海生工生物有限公司,Light Cycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master 购自瑞士 Roche 公司,RIPA lysis buffer、BCA 蛋白定量检测试剂盒、细胞膜蛋白与细胞质蛋白提取试剂盒购自碧云天生物公司,HRP 标记山羊抗兔二抗、HRP 标记山羊抗小鼠二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司,Membrane nuclear and cytoplasmic protein Extraction Kit 购自上海生工生物有限公司,CCND1、CASP3 购自武汉三鹰生物技术有限公司,TRIF 购自英国 Abcam 公司,NF- $\kappa$ B 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 敲除 TRIF 基因细胞株的制备及鉴定** 利用 CRISPR/Cas9 技术制备敲除 TRIF 基因的细胞株,首先设计引物(表 1),用 Bbs I 限制性内切酶酶切 pX330 载体,构建 pX330-sgRNA-1 和 pX330-sgRNA-2 敲减载体,再通过细胞转染、DNA 提取、PCR 扩增、单克隆铺板、纯合细胞株筛选,最终得到敲除 TRIF 基因的细胞株。

**1.2.2 细胞培养及分组** 以敲除 TRIF 基因的 NIT-1 细胞株为研究对象,用 DMEM 培养基进行细胞培

养,当细胞处于增殖期比例达到 80%~90% 时进行实验分组,分为空白对照组和实验组。实验组根据给予不同水平的 TLR3 特异性激动剂病毒聚肌胞(PIC)刺激 48 h,分为 30  $\mu$ g/mL PIC 组、60  $\mu$ g/mL PIC 组、90  $\mu$ g/mL PIC 组。

表 1 引物设计

名称	序列(5'-3')
GT-RY-Tic	F:GGTCTCTCTGGAGTCCTTGAAG R:TGTTTCATCAGCCCTGGCATGGA
gRNA-RY-Tic-5	F:CACCGCCACCGTCCAGGACAAGTC R:AAACGACTTGTCTGGACGGTGGC
gRNA-RY-Tic-3	F:CACCGCTGTCCATTGAATGCACAG R:AAACCTGTGCATTCAATGGGACAG

**1.2.3 流式细胞术检测细胞周期** 取敲除 TRIF 基因的细胞株,吸去原培养液,经胰酶消化、离心(1 000 r/min,5 min)、计数后,以  $2 \times 10^5$  个/孔(12 孔板)进行铺板,在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下过夜培养。次日细胞再经沉淀、离心(1 500 r/min,10 min)后,加入 200  $\mu$ L DNA 染液(PI 溶液 20  $\mu$ g + Triton X-100 1  $\mu$ L + RNase A 溶液 0.2 mg + PBS 定容到 1 mL),孵育(室温)15 min 后检测细胞。

**1.2.4 Western blot 检测 NF- $\kappa$ B、CyclinD1 及 Caspase-3 蛋白表达** 取敲除 TRIF 基因的细胞株,经 RIPA 裂解后离心(12 000 r/min,10 min),取上清液,采用 BCA 法测定 NF- $\kappa$ B、CyclinD1 及 Caspase-3 蛋白水平。具体检测方法严格按照检测试剂盒说明书进行操作。

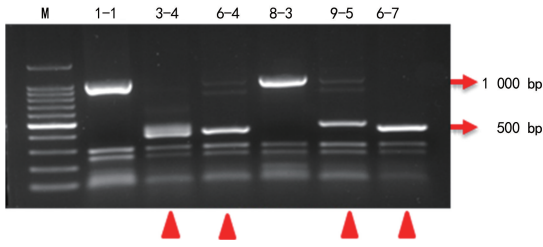
**1.2.5 PCR 检测 NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达** 取敲除 TRIF 基因的细胞株,提取 RNA 后加入反应混合液(42 °C 反应 2 min,然后置于 4 °C 保持),最后严格按照 RT-PCR 试剂盒说明书检测 NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达量。参照 GenBank 设计引物。

**1.3 统计学处理** 数据采用 SPSS 17.0 软件进行分析。呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用方差分析,多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 敲除 TRIF 基因细胞株鉴定** 利用 CRISPR/Cas9 技术,在小鼠 NIT-1 细胞株中敲除 mouse TRIF 基因,通过筛选,得到敲除 TRIF 基因的单克隆细胞

株,见图 1。



注:通过筛选,在 3-4、6-4、9-5、6-7 号孔板中成功制备敲除 TRIF 基因的细胞株,1-1 和 8-3 号孔板为正常细胞株对照。结果显示 3-4、6-4、9-5、6-7 在 1 000 bp 左右没有条带,500 bp 左右条带明显,证明这 4 株细胞 TRIF 基因敲除彻底。

图 1 制备敲除 TRIF 基因的细胞株及鉴定

**2.2 细胞周期** 与空白对照组相比,PIC 刺激后细胞停留在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的比例明显增加(P<0.05),并呈浓度依赖性(P<0.05),而细胞在 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期的比例出现明显下调(P<0.05),细胞增殖受抑制。见表 2。

表 2 刺激敲除 TRIF 基因细胞株的 TLR3 对细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> /M 期
空白对照组	60.60±1.17	28.01±2.31	10.70±1.24
30 μg/mL PIC 组	64.94±0.39*	17.81±0.52*	15.98±1.07*
60 μg/mL PIC 组	71.55±1.20*	12.45±0.66*	13.00±0.24*
90 μg/mL PIC 组	74.25±0.29*	7.16±0.49*	17.20±0.59*

注:与空白对照组比较,\*P<0.05。

**2.3 CyclinD1、CASP3 及 NF-κB 蛋白表达** Western blot 检测各组 CyclinD1、CASP3 及 NF-κB 表达情况。敲除 TRIF 基因后,刺激细胞 TLR3,周期蛋白 CyclinD1 表达下降,凋亡蛋白 CASP3 及细胞因子 NF-κB 表达增加,差异均有统计学意义(P<0.05),并呈浓度依赖性(P<0.05)。见表 3。

表 3 刺激敲除 TRIF 基因细胞株的 TLR3 对 CyclinD1、CASP3 及 NF-κB 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	CyclinD1	CASP3	NF-κB
空白对照组	1.01±0.02	0.24±0.01	0.06±0.01
30 μg/mL PIC 组	0.80±0.01*	0.54±0.03*	0.38±0.01*
60 μg/mL PIC 组	0.70±0.02*#	0.82±0.01*#	0.91±0.02*#
90 μg/mL PIC 组	0.31±0.01*#△	0.91±0.04*#△	1.49±0.02*#△

注:与空白对照组比较,\*P<0.05;与 30 μg/mL PIC 组比较,#P<0.05;与 60 μg/mL PIC 组比较,△P<0.05。

**2.4 NF-κB mRNA 表达** 敲除 TRIF 基因后,与空白对照组相比,刺激细胞 TLR3,仍能上调 NF-κB mRNA 表达(P<0.05),并呈浓度依赖性(P<0.05)。与正常细胞株相比较,敲除 TRIF 基因细胞株的 NF-κB mRNA 表达差异无统计学意义(P>

0.05),均可上调 NF-κB mRNA 表达。见表 4。

表 4 分别刺激敲除 TRIF 基因细胞株和正常细胞株的 TLR3 对 NF-κB mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	敲除 TRIF 基因细胞株	正常细胞株
空白对照组	1.01±0.20	1.03±0.27
30 μg/mL PIC 组	1.35±0.08*	1.38±0.38
60 μg/mL PIC 组	1.98±0.20*#	1.94±0.28
90 μg/mL PIC 组	2.24±0.28*#△	2.35±0.40

注:与空白对照组比较,\*P<0.05;与 30 μg/mL PIC 组相比,#P<0.05;与 60 μg/mL PIC 组相比,△P<0.05。

### 3 讨 论

糖尿病防治中,如何保护及改善胰岛 β 细胞功能一直是研究的热点,近年来免疫炎症学说备受关注。有研究发现天然免疫系统的激活可导致胰岛 β 细胞损伤,破坏胰岛 β 细胞增殖、凋亡的动态平衡,最终导致血糖的波动及糖尿病并发症的发生<sup>[5-7]</sup>。

本研究团队在前期研究中已经相继证实了小鼠胰岛 β 细胞表面有 TLR3 受体的表达,并刺激 TLR3 受体后,可激活 NF-κB、IL-6、TNF-α 等细胞因子,抑制细胞的增殖,促进其细胞凋亡<sup>[8-9]</sup>。有研究表明,TLR3 的激活依赖于 TRIF 相关接头分子(TRAM)信号通路<sup>[10]</sup>。本研究团队在前期研究中同样发现激活 NIT-1 细胞的 TLR3 可上调 TRIF mRNA 表达,抑制细胞增殖,提示 NIT-1 细胞的损伤可能与 TLR3-TRIF-NF-κB 炎症信号通路有关,并且 TRIF 可能是整个信号通路中的关键因子。因此,在本研究中敲除小鼠胰岛 β 细胞 TRIF 基因后,再次刺激细胞 TLR3,观察能否改善细胞的增殖。

本研究发现,敲除小鼠胰岛 β 细胞的 TRIF 基因后,刺激细胞 TLR3,同样能刺激 NF-κB 的表达,促使细胞凋亡,抑制细胞增殖,也并不能保护胰岛 β 细胞。研究人员推测有以下原因:其一,天然免疫系统是一个极其复杂的系统,目前已知的 TLRs 就多达 12 种,同样已知的信号通路除激活 TLR3 的 TRIF 非 MyD88 依赖信号通路外,还有 MyD88 依赖信号通路<sup>[11-13]</sup>,其中 TRIF 介导的非 MyD88 依赖信号通路又可分为激活干扰素调节因子 3(IRF-3)及肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6)等多种 NF-κB 活化途径<sup>[12]</sup>,由此可见,本研究只阻断其中一条信号通路,并不能完全阻断炎症因子的激活。其二,细胞周期同样受到复杂分子机制调控,除常见的周期蛋白 CyclinD、凋亡蛋白外<sup>[14-16]</sup>,还受其他因素调控,例如激活 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)通路,同样能导致胰岛 β 细胞凋亡,抑制细胞增殖<sup>[17-19]</sup>。

综上所述,敲除 TRIF 基因后刺激 TLR3,并不能

保护胰岛  $\beta$  细胞。但该研究为后续进一步深入研究胰岛素  $\beta$  细胞 TLR3 信号通路奠定了基础,同时也为寻找新的抑制靶点提供了新的思路。

## 参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南: 2020 年版[J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(4): 315-409.
- [2] ZARE-BIDAKI M, HAKIMI H, ABDOLLAHI S H, et al. TLR4 in Toxoplasmosis; friends or foe? [J]. Microb Pathog, 2014, 69: 28-32.
- [3] SHALABY K H, AL HEIALY S, TSUCHIYA K, et al. The TLR4-TRIF pathway can protect against the development of experimental allergic asthma[J]. Immunology, 2017, 152(1): 138-149.
- [4] 朱祎婧, 艾智华, 钟大鹏. TRIF-NF- $\kappa$ B 信号通路参与 TLR3 介导的胰岛  $\beta$  细胞损伤[J]. 西南国防医药, 2021, 31(6): 461-465.
- [5] CURTISS L K, TOBIAS P S. Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis [J]. J Lipid Res, 2009, 50 (Suppl): S340-S345.
- [6] SHI H, KOKOEVA M V, INOUE K, et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance [J]. J Clin Invest, 2006, 116(11): 3015-3025.
- [7] DAVIS J E, GABLER N K, WALKER-DANIELS J, et al. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat[J]. Obesity (Silver Spring), 2008, 16(6): 1248-1255.
- [8] 钟大鹏, 呈煜, 胡朝恩, 等. Toll 样受体 3 对胰岛  $\beta$  细胞增殖及胰岛素分泌的影响[J]. 检验医学与临床, 2014, 11 (20): 2810-2812.
- [9] 胡朝恩, 钟大鹏, 艾智华. 糖脂毒性诱导胰岛  $\beta$  细胞炎症因子过表达的研究[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(12): 1716-1719.
- [10] BLASIUS A L, BEUTLER B. Intracellular toll-like receptors[J]. Immunity, 2010, 32(3): 305-315.
- [11] BARTON G M, MEDZHITOV R. Toll-like receptor signaling pathways [J]. Science, 2003, 300 (5625): 1524-1525.
- [12] GAY N J, SYMMONS M F, GANGLOFF M, et al. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes[J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(8): 546-558.
- [13] TSUKUMO D M, CARVALHO-FILHO M A, CARVALHEIRA J B, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance[J]. Diabetes, 2007, 56(8): 1986-1998.
- [14] KUSHNER J A, CIEMERYCH M A, SICINSKA E, et al. Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(9): 3752-3762.
- [15] COZAR-CASTELLANO I, WEINSTOCK M, HAUGHT M, et al. Evaluation of beta-cell replication in mice transgenic for hepatocyte growth factor and placental lactogen: comprehensive characterization of the G1/S regulatory proteins reveals unique involvement of p21cip[J]. Diabetes, 2006, 55(1): 70-77.
- [16] HEIT J J, KARNIK S K, KIM S K. Intrinsic regulators of pancreatic beta-cell proliferation[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006, 22: 311-338.
- [17] MATSUMOTO S, MIYAGISHI M, AKASHI H, et al. Analysis of double-stranded RNA-induced apoptosis pathways using interferon-response noninducible small interfering RNA expression vector library [J]. J Biol Chem, 2005, 280(27): 25687-25696.
- [18] COLLI M L, MOORE F, GURZOV E N, et al. MDA5 and PTPN2, two candidate genes for type 1 diabetes, modify pancreatic beta-cell responses to the viral by-product double-stranded RNA [J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(1): 135-146.
- [19] SUBRAMANIAN S L, HULL R L, ZRAIKA S, et al. cJUN N-terminal kinase (JNK) activation mediates islet amyloid-induced beta cell apoptosis in cultured human islet amyloid polypeptide transgenic mouse islets[J]. Diabetologia, 2012, 55(1): 166-174.

(收稿日期: 2022-07-30 修回日期: 2023-01-13)

(上接第 738 页)

- [8] 刘锐, 侯体保, 何嘉, 等. 清气化痰通络方治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期临床观察[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10): 4753-4757.
- [9] 赵栋梁, 黄艳, 李风雷, 等. 清气化痰汤加减治疗对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者血清 MCP-1, sTREM-1 水平的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(11): 2125-2129.
- [10] 任英杰, 王起, 陈秋生. 黄芪汤加减治疗急性加重期慢性阻塞性肺疾病疗效研究[J]. 陕西中医, 2020, 41(1): 57-59.
- [11] 王春风. 清金化痰汤加减治疗痰热阻肺型慢性阻塞性肺疾病急性加重期疗效分析[J]. 四川中医, 2019, 37(8): 89-92.
- [12] 王少霞, 丁兰, 魏玉芳, 等. 自拟清热化痰方治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期痰热壅肺证临床效果观察[J]. 山东医药, 2021, 61(23): 51-53.

(收稿日期: 2022-04-09 修回日期: 2023-01-17)