

利用 Trim-Away 技术降低人胰岛淀粉样多肽在大鼠胰岛瘤细胞中的毒性

龚葭薇, 孔德麟, 杨琳, 聂玉哲, 梁洋, 滕春波

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

摘要: 人胰岛淀粉样多肽(human islet amyloid polypeptide, hIAPP)又称胰淀素(Amylin), 是胰岛 β 细胞中胰岛素的共分泌蛋白, 与胰岛素共同包裹在囊泡中被分泌出细胞。正常生理条件下, hIAPP 有助于胰岛素分泌并调节机体血糖平衡; 但其蛋白错误折叠或过量积累则会对细胞造成毒性, 进而影响 β 细胞功能, 导致机体罹患 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)。为了清除细胞内过度积累的 hIAPP, 且不影响其正常的合成功能, 本研究选用一种新的蛋白质降解技术——Trim-Away, 该技术可以在短时间内降解目标蛋白质, 且不会对靶蛋白的 mRNA 转录、翻译等功能产生影响。首先在大鼠(*Rattus norvegicus*)胰岛瘤细胞(insulinoma cells, INS1)中过表达 hIAPP 模拟其过度累积的情况, 并通过乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的释放、CCK8 (cell counting kit-8)的活性以及 PI-Annexin V 流式检测的阳性比例变化, 证明 hIAPP 的过度积累造成 β 细胞的凋亡; 通过实时定量 PCR 及 ELISA 检测发现胰岛素的合成和分泌都受到了阻碍; 最后利用 Trim-Away 技术在 hIAPP 过表达的 INS1 细胞中特异性清除了过度积累的 hIAPP 蛋白。细胞活性实验证实清除 hIAPP 蛋白可以减少细胞的死亡, ELISA 实验证实 INS1 细胞恢复了胰岛素的分泌能力。本研究验证了 hIAPP 过度积累对 INS1 细胞的毒性作用, 并且证明 Trim-Away 技术在清除胰腺 β 细胞中 hIAPP 毒性具有效果, 为利用 Trim-Away 治疗糖尿病提供了新的策略。

关键词: Trim-Away; 人胰岛淀粉样多肽; β 细胞; 胰岛素分泌

Toxicity reduction of human islet amyloid polypeptide by Trim-Away technique in insulinoma cells

Jiawei Gong, Delin Kong, Lin Yang, Yuzhe Nie, Yang Liang, Chun-Bo Teng

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Human islet amyloid polypeptide (hIAPP, also known as amylin) is a co-secreting protein of insulin in human pancreatic β -cells. It is encapsulated in vesicles and secreted out of the cells with insulin. hIAPP can promote insulin

收稿日期: 2020-03-07; 修回日期: 2020-06-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31472159)和黑龙江省自然科学基金重点项目(编号: ZD2017001)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31472159), and the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No. ZD2017001)]

作者简介: 龚葭薇, 在读硕士研究生, 专业方向: 发育生物学。E-mail: 869268764@qq.com

通讯作者: 滕春波, 教授, 博士生导师, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: chunboteng@nefu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.20-061

网络出版时间: 2020/6/10 10:06:43

URI: kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200609.1526.002.html

secretion and regulate blood glucose homeostasis in the body under the normal physiological conditions. However, hIAPP misfolding or excessive accumulation can cause toxic effects on the β cells, which in turn affect cell function, resulting in type 2 diabetes mellitus (T2DM) for the affected individuals. In order to eliminate the excessive accumulation of hIAPP in the cell and to maintain its normal synthetic function, we have adopted a new protein degradation technology called Trim-Away, which can degrade the target protein in a short time without affecting the mRNA transcription and translation synthesis function of the target protein. First, we overexpressed hIAPP in the rat insulinoma cells (INS1) to simulate its excessive accumulation and analyzed its effect in INS1 cells by measuring the release of LDH (lactate dehydrogenase), CCK8 activity and PI-Annexin V positive ratio. Results showed that excessive accumulation of hIAPP caused β cell apoptosis. Second, real-time quantitative PCR analysis and ELISA detection showed that the synthesis and secretion of insulin were hindered. We used Trim-Way technology to specifically eliminate the excessive accumulation of hIAPP protein in hIAPP overexpressing INS1 cells. Cell activity experiments confirmed that clearance of hIAPP reduced the cell death phenotype. Further ELISA experiments confirmed that INS1 cells restored insulin secretion ability. This study examined the toxic effect of hIAPP excessive accumulation in INS1 cells and demonstrated the cytotoxicity clearance effect of Trim-Way technology in pancreatic β -cells. Our research has provided a new strategy for using Trim-Away technology for treatment of diabetes.

Keywords: Trim-Away; human islet amyloid polypeptide (hIAPP); β -cell; insulin secretion

人胰岛淀粉样多肽(human islet amyloid polypeptide, hIAPP)是一种由 37 aa 构成的神经内分泌多肽激素^[1], 也被称为胰淀素(amylin)^[2]。由 89 aa 构成的前激素原 preproIAPP 经历蛋白水解及翻译后修饰在内质网和高尔基体上被加工成熟^[1], 随后处于分泌泡外围, 与核心的胰岛素、锌离子共分泌^[3]。正常生理条件下, hIAPP 协助胰岛素调节胃排空和饱腹感来维持血糖平衡^[4]。hIAPP 的自身结构特点导致其极易产生错误折叠, 不断累积的错误折叠的 hIAPP 在机体胰岛素抵抗情况下抑制胰岛素分泌^[5], 并且 hIAPP 本身分泌量远远大于胰岛素, 在细胞内外累积形成淀粉样多肽沉积^[6]。1901 年, Opie 等^[7]首次观察到 hIAPP 累积现象, 这种现象被描述为“胰岛透明样化”。最初并非所有糖尿病患者体内都能观察到 hIAPP 累积, 目前超过 90% 的 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者体内存在该现象^[8]。对动物模型的研究发现, hIAPP 的累积先于 β 细胞功能紊乱和其他 T2DM 临床症状的发生^[9]。研究表明, hIAPP 累积会在脂质双分子层上形成非选择性离子通道, 破坏脂质膜的稳定性, 产生 β 细胞毒性^[10]。在 hIAPP 聚集过程中也会产生活性氧自由基, 引起 DNA 损伤^[11]; hIAPP 的寡聚体会引起内质网应激、对线粒体造成损伤^[12], 使细胞功能受损、数量减少,

从而诱导人体罹患 T2DM。在 T1DM 胰腺移植失败患者体内的大多数胰岛中也检测到 hIAPP 的累积, 表明 hIAPP 累积是导致移植失败的因素之一^[13]。

目前在细胞水平上降低目的蛋白表达主要有两种方式: 一种是利用 CRISPR 对基因组 DNA 进行敲除; 另一种是利用 shRNA、siRNA 等对 mRNA 进行敲低。而 Trim-Away 技术则是在蛋白水平上直接降解目标蛋白质, 该技术既不需要对内源蛋白质做任何修饰, 还可以在短时间内完成目的蛋白降解^[14-16]。Trim21 是 TRIM 家族成员之一, 它具有 E3 泛素连接酶活性, 是细胞内抗体的特异性受体。在细胞里表达 Trim21 并转入目的蛋白的抗体后, 抗体会与目的蛋白结合, Trim21 去识别抗体的 Fc 端, 并能通过自身的 RING 结构域连接泛素蛋白酶体, 形成蛋白酶体复合物, 对细胞内的目的蛋白质进行降解^[17-19]。

为了保护胰腺 β 细胞免受 hIAPP 诱导的细胞损伤, 本研究在大鼠(*Rattus norvegicus*)胰岛素瘤细胞(insulinoma cells, INS1)中过表达 hIAPP 建立 β 细胞功能障碍模型, 利用 Trim-Away 技术清除细胞内外累积的 hIAPP。通过碘化丙啶(propidium iodide, PI)、CCK8 (cell counting kit-8)以及胰岛素 ELISA 试剂盒检测等, 发现清除累积的 hIAPP 可以抑制细胞死亡, 恢复细胞增殖能力、胰岛素合成和分泌能力。由此

证明利用 Trim-Away 技术可以清除细胞内外累积的 hIAPP,并且该技术不影响新生的 hIAPP 和胰岛素,这对于调节由 hIAPP 累积引发的 T2DM 的血糖水平具有重要的临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 *hIAPP* 和 *Trim21* 过表达载体构建

提取人胰腺组织(哈尔滨医科大学惠赠) RNA, 反转录为 cDNA 作为模板, PCR 扩增获得 *hIAPP*

片段;选用 *Xba* I 或 *EcoR* I 酶切位点,通过同源重组连接的方法,将 *hIAPP* 片段连接到 lv3-copGFP 或 pcDNA3.1 载体(苏州吉玛基因公司)上,lv3-hIAPP-copGFP 中 *hIAPP* 与 *copGFP* 融合表达。

分别以人肝癌细胞 HepG2 和大鼠 INS1 细胞(美国 ATCC 细胞库)的 cDNA 为模板,PCR 扩增获得相应片段 *humanTrim21* 与 *ratTrim21*, 选用 *EcoR* I 酶切位点,通过同源重组连接的方法,将 *humanTrim21* 与 *ratTrim21* 分别连接到 pcDNA3.1 载体上。

序列合成及载体测序由吉林库美生物公司完成, PCR 扩增引物序列见表 1。

表 1 本研究使用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

目的	引物名称	序列(5'→3')
PCR	lv3- <i>hIAPP</i>	F: acctccatagaagattctagaATGGGCATCCTGAAGCTGC R: ctctccatggtgctctagaTAAAGGGGCAAGTAATTCAGTGG
	pcDNA3.1- <i>hIAPP</i>	F: tagtccagtgtggtggaattcATGGGCATCCTGAAGCTGC R: tgctggatatctgcagaattcTAAAGGGGCAAGTAATTCAGTGG
	pcDNA3.1- <i>humanTim21</i>	F: tagtccagtgtggtggaattcATGGCTTCAGCAGCACGC R: tgctggatatctgcagaattcATATAGTCAGTGGATCCTTGATGATCC
	pcDNA3.1- <i>ratTrim21</i>	F: tagtccagtgtggtggaattcATGTCACACTCTACAACCTCAAAAATG R: tgctggatatctgcagaattcGGTATCTTTAGTGGACAGAGCTTTAGAG
qPCR	<i>Bax</i>	F: TGTTACAGGGTTTCATCCAGG R: GTGTCCACGTCAGCAATCA
	<i>Bcl2</i>	F: AAGCACATCCAATAAAAAGCGC R: GTTATCATACCCTGTTCTCCCG
	<i>Ins1</i>	F: CTAAGTGACCAGCTACAATCA R: CCACTTCACGACGGGACTTG
	<i>Ins2</i>	F: TACAGTCGGAACCATC R: GAAGGTCACCTGCCCCCG
	<i>PDX1</i>	F: CCTACCCCGGGCTGCCGGCC R: CCGGGGGACTTCCCTGTTCC
	<i>NeuroD1</i>	F: CTCTTTCAAACACGAACCATCC R: GAATGGTGAACTGACGTGC
	<i>Nkx6.1</i>	F: AGCACAAATCCAGCGGAG R: CTCCTTTCCTCGCCATCAC
	<i>SLC2a2</i>	F: AGATTGCTCCAACCACACTC R: GCTTTTCTTTGCCCTGACTTC
	<i>Actin</i>	F: CAAGCAGGAGTACGATGAGTC R: AACGCAGCTCAGTAACAGTC

PCR 扩增引物序列中,大写字母表示目的基因的 cDNA 序列,小写字母表示基础载体的同源臂序列,下划线表示酶切位点识别序列。

1.2 细胞培养及载体转染

大鼠 INS1 细胞培养在 RPMI-1640 培养基(美国 HyClone 公司)中, 添加 10% 胎牛血清(以色列 Biological Industries 公司)、2 mmol/L 谷氨酰胺、10 mmol/L HEPES(美国 Gibco 公司)、1 mmol/L 丙酮酸钠、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素(美国 HyClone 公司)、50 mmol/L 巯基乙醇(美国 Sigma 公司), 在 37°C (95% 相对湿度, 5% CO₂) 下培养。

人肝癌细胞 HepG2 培养在 RPMI-1640 培养基中, 添加 10% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素, 在 37°C (95% 相对湿度, 5% CO₂) 下培养。

转染前将细胞按照 5×10^4 /孔密度铺在 24 孔内, 转染过表达载体时, 换成无双抗培养基, 用 lipo2000 (英潍捷基上海贸易有限公司)进行载体转染。

1.3 外源基因的电转化

使用 Neon Transfection System 电转化仪器(英潍捷基上海贸易有限公司)进行抗体的电转。对目的细胞用 lipo2000 转染过表达载体, 48 h 后, 将细胞消化后计数。取 10^6 个细胞吸取 120 μ L R 液重悬, 同时加入 2.5 μ g 抗体, 轻轻混匀, 电极外槽中加入 E2 液。设置 1100 V 30 ms 2 pulse, 将电转枪头插入外槽中, 点击开始, 结束后重新将细胞铺到孔板中, 在 Delta Vision 高分辨率成像显微镜(美国通用电气公司)下进行观察。

1.4 PI-Annexin V 染色以及流式细胞仪检测

INS1 细胞过表达 *hIAPP* 基因 48 h 后, 经 PBS 清洗、胰酶消化、PBS 重悬后计数, 取 5×10^4 个细胞, 加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液, 混匀后再加入 5 μ L Annexin V-FITC 染色液, 轻轻混匀, 加入 10 μ L PI 染色液, 混匀后室温避光孵育 20 min, 期间混匀 2~3 次, 20 min 后上机检测。数据结果用软件 GraphPad Prism v.7.0 进行差异显著性分析。

1.5 蛋白免疫印迹(Western blot)

电转抗体 4 h 后, 在 RIPA (细胞强裂解液) 中添加 PMSF (蛋白酶抑制剂) 裂解细胞并收集裂解液。用 BCA (上海碧云天公司) 测量蛋白浓度, 加入上样缓

冲液煮沸变性后, 加入等量蛋白(可用 $1 \times$ 上样缓冲液补齐)进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 5% 封闭液 37°C 封闭 1 h, *hIAPP* 一抗(武汉三鹰公司, cat# 22305-1-AP) 1:500 4°C 孵育过夜; *copGFP* 一抗(美国 Origene 公司, cat# TA150041) 1:1000 37°C 孵育 1 h; Actin 一抗(美国 Sigma Aldrich 公司, cat# A5441) 1:5000 37°C 孵育 1 h; 二抗(美国 Thermo Fisher 公司) 1:3000 37°C 孵育 1 h。抗体剥离时将膜置于剥离液中, 52°C 旋转孵育 30 min。用 ECL 试剂(上海天能公司)检测目的蛋白免疫反应条带, 使用软件 Image J 进行蛋白条带灰度分析以及用软件 GraphPad Prism v.7.0 进行数据统计及分析。

1.6 实时定量 PCR (qPCR)检测凋亡及胰岛素分泌相关基因表达量

过表达载体转染 48 h 后, 用 RNAiso Plus (宝日医生物技术北京有限公司)收集细胞, 提取细胞总 RNA, 用 One-Step gDNA Removal 试剂盒(北京全式金公司)将 1 μ g 总 RNA 反转录成 cDNA, 加入 Green qPCR SuperMix (北京全式金公司), 用定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)检测凋亡相关基因如 *Bax*、*Bcl2*, 以及胰岛素分泌相关基因如 *Ins1*、*Ins2*、*PDX1*、*NeuroD1*、*Nkx6.1* 和 *SLC2a2* 的 mRNA 相对表达量。引物由吉林库美生物公司合成, qPCR 扩增引物序列见表 1。数据用软件 GraphPad Prism v.7.0 进行统计及分析。

1.7 葡萄糖刺激胰岛素分泌

在经过电转化抗体入细胞, 细胞恢复 48 h 后, 用 KRB (Krebs-Ringer bicarbonate buffer) 缓冲液孵育细胞 30 min, 然后用 2.8 或 16.7 mmol/L 葡萄糖在 37°C 下刺激 1 h。取细胞培养上清液, 采用胰岛素 ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所公司)利用酶标仪(瑞士 Tecan 公司)测定胰岛素含量。将细胞胰酶消化后计数, 胰岛素含量数据利用总细胞数进行校正, 用软件 GraphPad Prism v.7.0 进行统计及分析。

1.8 刚果红染色

采用刚果红检测 *hIAPP*^[20], PBS 洗涤后, INS1

细胞在室温下用 4% 多聚甲醛孵育 15 min, 用 0.2% Triton-X 100 打孔 5 min。用无水酒精配置 1.2% 的刚果红染液, 用氢氧化钠调节 pH 值为 13.57, 加入适量刚果红染液于细胞培养板中, 室温下孵育 20 min, 用 PBS 洗去多余的染液。镜下观察后使用软件 Image J 进行染色强度分析, 软件 Graphpad prism 7 整理数据得出统计结果, 并进行差异显著性分析。

1.9 药物处理

根据实验需要, 细胞转染后 6 h, 添加药物处理。按照 20 $\mu\text{mol/L}$ 凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 坏死抑制剂 NSA (美国 Selleck Chemicals 公司) 的浓度, 先将各药品加到 50 μL 新鲜培养基中, 混合均匀后再分别添加到细胞培养孔板中, 轻轻摇晃混匀后, 继续培养。DMSO 用作阴性对照。

1.10 统计分析

统计结果均采用 GraphPad Prism v.7.0 软件进行数据统计及分析, 每组数据包含 3 次或以上独立实验, 根据数据类型选择两组样本的 “unpaired two-tailed Student's *t*-test” 或多组样本的 “one-way ANOVA” 算法进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 被视为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 hIAPP 累积对 INS1 细胞的毒性作用

向 INS1 细胞中转染 pcDNA3.1-hIAPP, qPCR 检测结果显示 hIAPP 过表达效率达到 2000 倍(图 1A), 同时刚果红染色表明 hIAPP 在细胞内聚集(图 1B), 统计结果显示过表达 hIAPP 后刚果红染色强度增强 2.25 倍(图 1C)。hIAPP 转染后 72 h, INS1 细胞活力降低, 显微镜下可直接观察到细胞密度和数目明显减少(图 1D), CCK8 检测结果表明 hIAPP 过表达显著抑制细胞增殖能力(图 1E)。此外, 过表达后检测 LDH 的释放量增加 1.33 倍, 表明其积累对细胞膜产生损伤(图 1F)。通过 PI 染色及统计结果(图 1, G 和 H)得出, 在添加凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 和坏死抑制剂 NSA 后, PI 染色阳性率细胞减少, 说明抑制剂可以部分回复细胞死亡表型, 同时表明 hIAPP 累积

引起的细胞死亡包括凋亡和坏死两种类型。通过直接观察细胞形态(图 1I)及 CCK8 检测(图 1J)细胞活性, 可以观察到添加 Z-VAD-FMK 组细胞数目明显增多、细胞活性增强, 表明 Z-VAD-FMK 对细胞活性的回复程度比 NSA 大, 说明细胞凋亡是 hIAPP 累积引起的细胞死亡主要类型。综上所述, hIAPP 的过表达抑制 INS1 细胞的增殖, hIAPP 的累积对细胞膜产生毒性, 并主要通过凋亡引起细胞死亡。

2.2 Trim-Away 系统的构建与验证

本研究首先在 HepG2 和 INS1 细胞系中验证 Trim-Away 系统的可行性。分别扩增人和大鼠 *Trim21*, 连接到 pcDNA3.1 载体上, 构建 *Trim21* 过表达载体, *lv3* 基础载体用于过表达 *copGFP*, *copGFP* 绿色荧光蛋白用于待敲除蛋白, 载体示意图见图 2A。在 HepG2 或 INS1 细胞中转染 pcDNA3.1-Trim21 及 *lv3-copGFP* 载体, 显微镜下观察。HepG2 细胞中电转入 *copGFP* 抗体 20 min 后, 荧光强度开始变化, 在 40 min 内显著下降达 50%, 4 h 后荧光基本消失(图 2B)。统计结果也显示, 荧光强度随时间而下降, 4 h 时降到最低(图 2C)。在 INS1 细胞中也观察到类似的 *copGFP* 降解, 并且在转入抗体 24 h 及 48 h 后, *copGFP* 的荧光仍处于部分消失的情况(图 2D), 说明 Trim-Away 系统降解目的蛋白且能维持一段时间。因此, 本研究成功地建立了 Trim-Away 系统, 并在 HepG2 和 INS1 细胞中表现出快速、高效的性能。

2.3 Trim-Away 系统减少 hIAPP 的累积

为了确定 Trim-Away 系统是否可以通过降解 hIAPP 来减少其毒性, 本研究首先通过直接观察 hIAPP-*copGFP* 融合蛋白的荧光变化来检测其降解效率。在过表达大鼠 *rTrim21* 和 hIAPP-*copGFP* (载体示意图见图 2A 和图 3A) 的 INS1 细胞中, 电转入 hIAPP 抗体后, 观察到 hIAPP-*copGFP* 的荧光几乎全部淬灭(图 3B), 统计结果显示荧光强度显著下降 83% (图 3C), 表明 hIAPP 抗体结合并降解了 hIAPP-*copGFP* 融合蛋白。Western blot 检测 hIAPP 和 *copGFP* 蛋白水平, 结果表明, hIAPP 和 *copGFP* 蛋白表达水平均明显减少(图 3D), 统计结果也验证了 hIAPP-*copGFP* 融合蛋白含量减少 50% (图 3, E 和 F)。这表明 hIAPP 抗体、hIAPP-*copGFP* 和 *rTrim21*

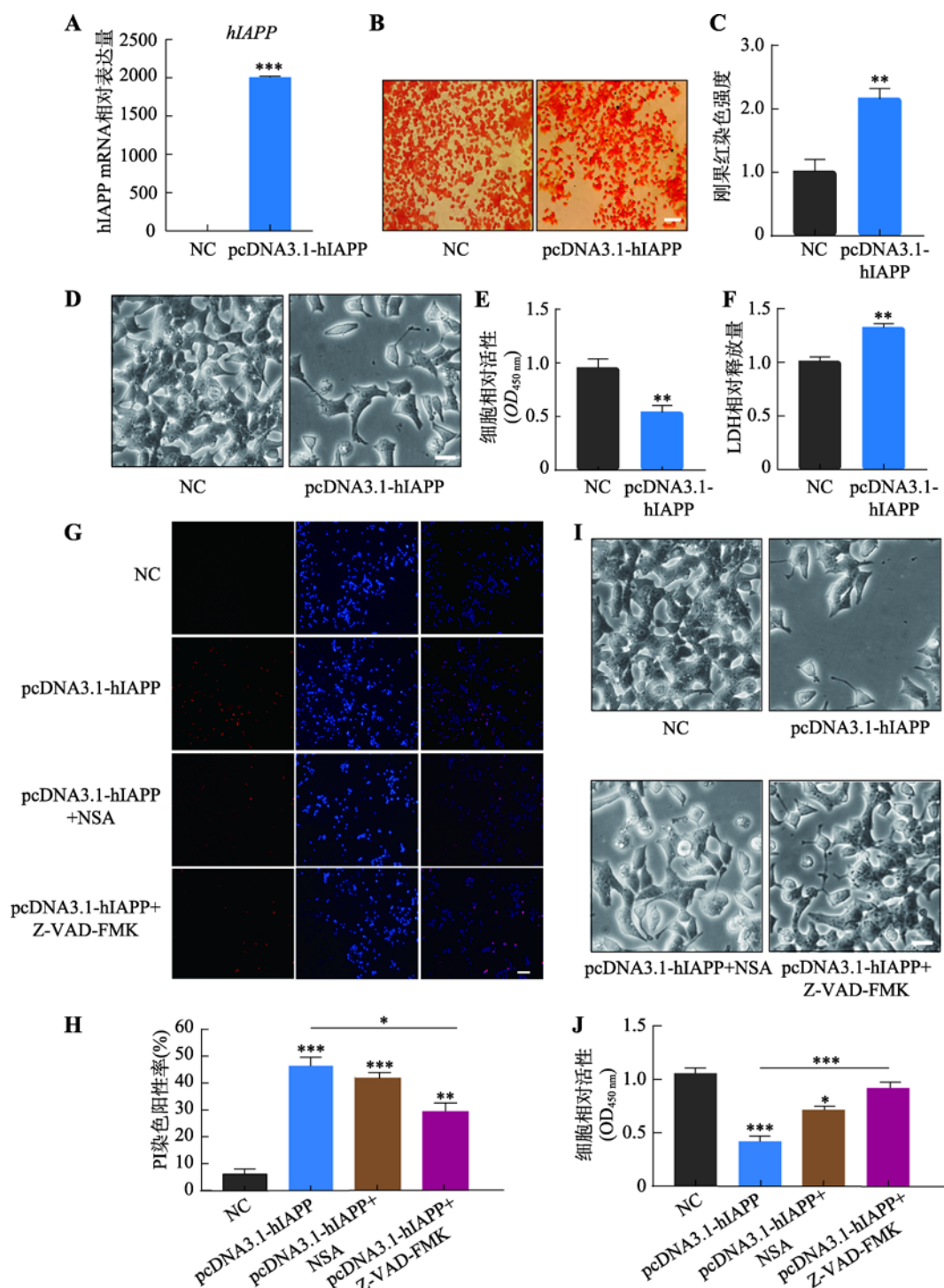


图 1 hIAPP 累积对 INS1 细胞的毒性作用

Fig. 1 Toxic effects of hIAPP overexpression on INS1 cells

A: qPCR 检测 *hIAPP* 过表达。B、C: 刚果红染色及染色强度统计 *hIAPP* 过表达后的积累情况。D: 显微镜下观察过表达 *hIAPP* 后 INS1 细胞形态变化。E: CCK8 检测 *hIAPP* 过表达后的细胞活力。F: 检测 *hIAPP* 过表达后细胞 LDH 的释放量。G: 显微镜下观察过表达 *hIAPP* 及加入抑制剂后 PI 染色结果。其中红色为 PI 阳性细胞, 蓝色为细胞核。H: PI 染色统计分析结果。I: 显微镜下观察加入抑制剂后细胞的形态变化。J: CCK8 检测加入抑制剂后细胞的活性。B、G 图中标尺为 100 μm , D、I 图中标尺为 50 μm ; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; A~F 图中 NC 表示转入 pcDNA3.1 空白载体作为阴性对照, G~J 图中 NC 表示转入 pcDNA3.1 空白载体后加入等体积 DMSO 作为阴性对照。

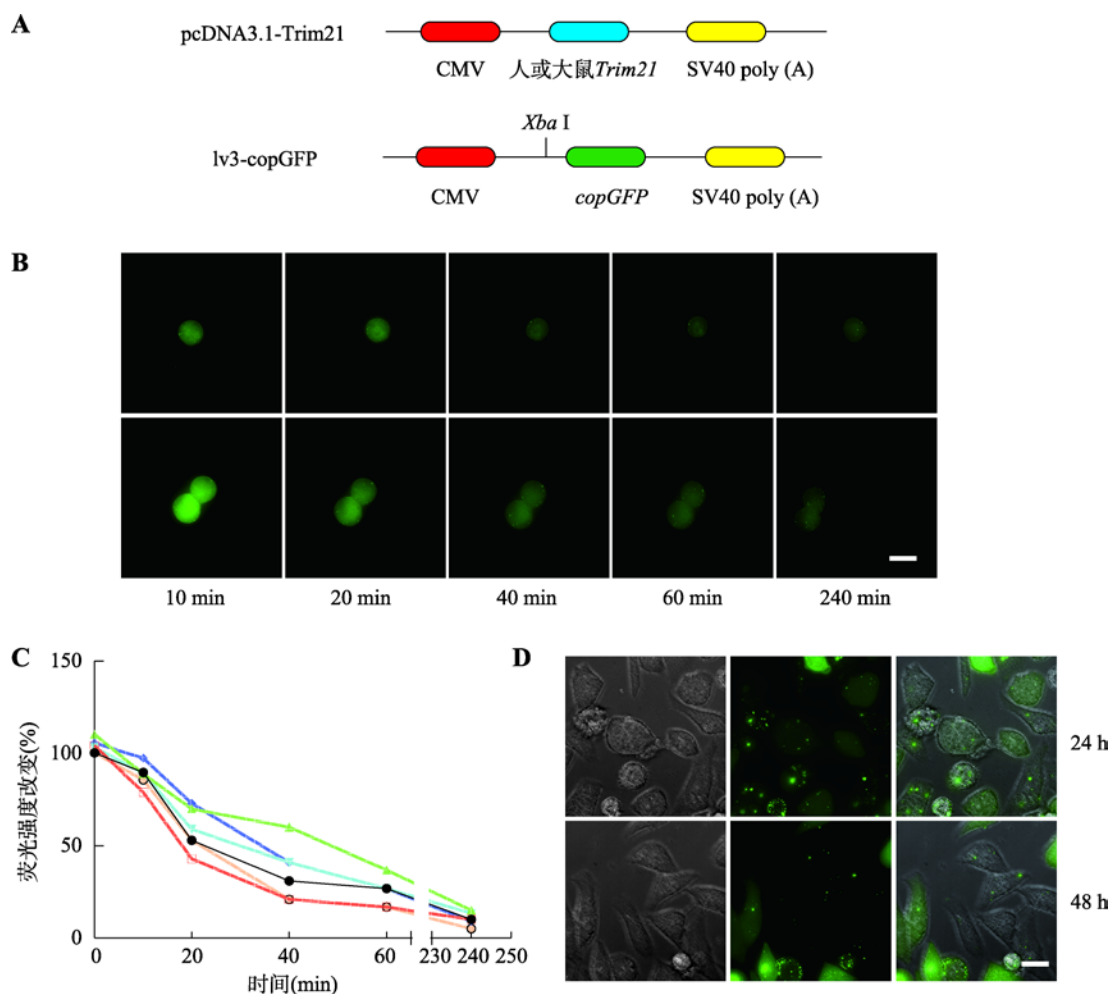


图 2 Trim-Away 系统的构建与验证

Fig. 2 Construction and verification of Trim-Away system

A: Trim-Away 系统载体示意图。B: 转入 Trim-Away 系统后 HepG2 细胞在两个不同视野下 copGFP 的荧光强度变化。C: 转入 Trim-Away 系统后 HepG2 细胞中不同视野下检测到的荧光强度变化统计。不同颜色的 6 条折线表示所统计的 6 个不同视野随时间变化(横坐标)而降低的荧光强度(纵坐标)。D: 转入 Trim-Away 系统 24 h 及 48 h 后显微镜下观察 INS1 细胞中 copGFP 的荧光变化。图中标尺为 20 μ m。

被募集到泛素蛋白酶体中并被降解。考虑到 hIAPP-copGFP 融合蛋白可能会影响 Trim-Away 的敲除效率, 随后将 pcDNA3.1-rTrim21 过表达载体和无标签的 pcDNA3.1-hIAPP 过表达载体(载体构建示意图见图 2A 和图 3A)转入 INS1 细胞中, Western blot 检测 hIAPP 蛋白表达水平(图 3, G 和 H), 结果显示, 在转入 hIAPP 抗体后外源 hIAPP 蛋白表达水平减少 92%, 此外与 NC 组对比, 内源性的 IAPP 也有 70% 被降解。利用 Trim-Away 系统清除 hIAPP 时, 加入 IgG 作为 hIAPP 抗体的对照, Western blot 检测 hIAPP 蛋白表达水平, 结果表明, 加入 IgG 抗体组的 hIAPP 蛋白表达水平并未改变(图 3I), 结合统计

结果(图 3J), IgG 抗体并未对 hIAPP 造成明显影响, 也说明该系统严格进行了抗体与目标蛋白间的特异结合。

2.4 Trim-Away 系统改善 hIAPP 诱导的 INS1 细胞死亡

如前所述, Trim-Away 系统可以有效减少 hIAPP 的积累, 因此推测该系统能对 hIAPP 过表达导致的 INS1 细胞毒性起到改善作用。在向过表达 hIAPP 的 INS1 细胞中转入 hIAPP 抗体后细胞的形态和数量发生显著恢复(图 4A); 同样, CCK8 实验结果也显示, 转入抗体能有效回复 hIAPP 过表达引起的细胞活力

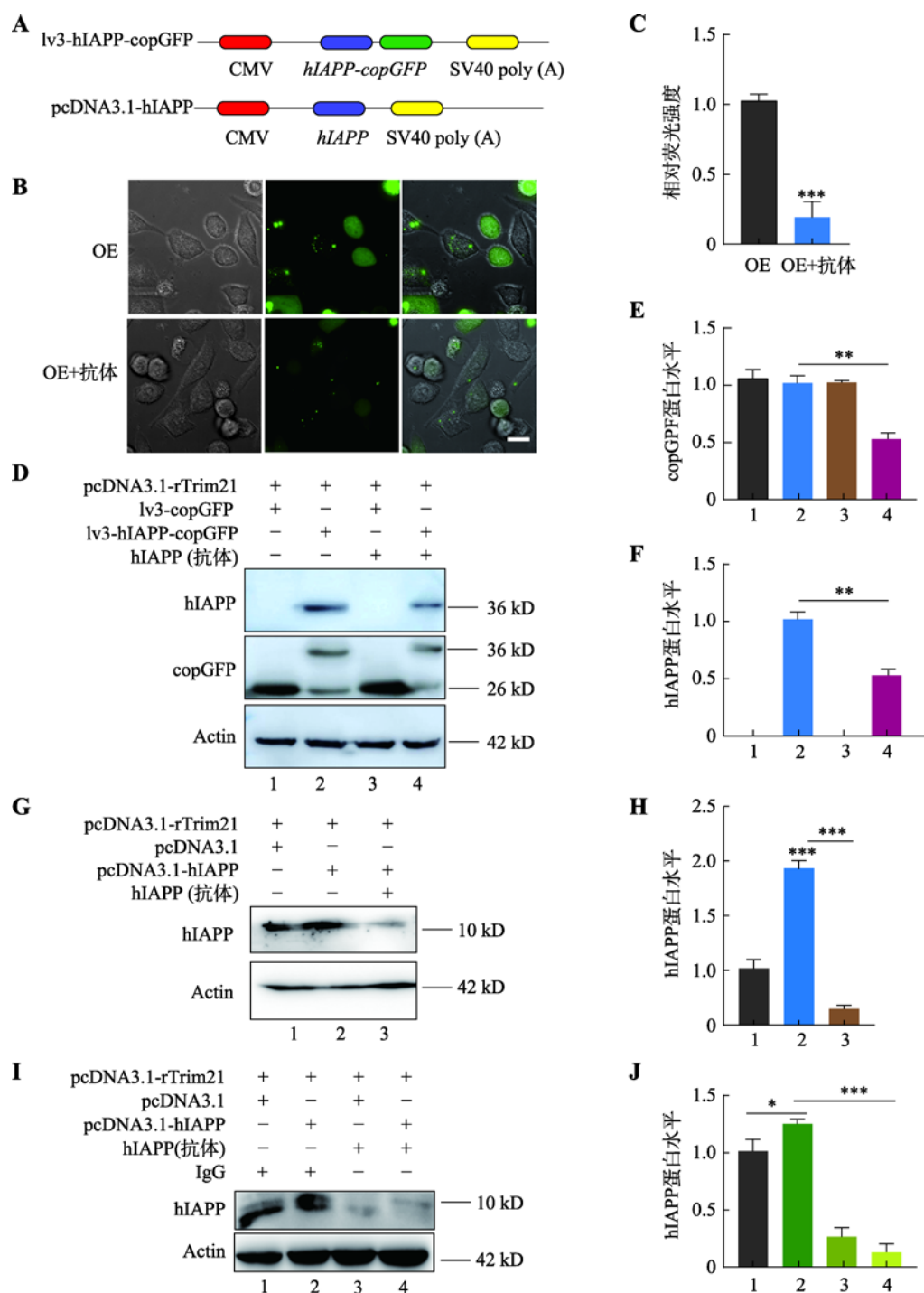


图 3 Trim-Away 系统减少 hIAPP 的累积

Fig. 3 Trim-Away reduce the excessive hIAPP

A: *hIAPP* 过表达载体示意图。B: 转入 Trim-Away 系统后 INS1 细胞中 *hIAPP-copGFP* 融合蛋白的荧光变化。C: 转入 Trim-Away 系统后荧光强度变化统计结果。D: Western blot 检测转入 Trim-Away 系统后 *hIAPP-copGFP* 蛋白的表达水平。E、F: *copGFP* 和 *hIAPP* 蛋白表达水平统计结果。G: Western blot 检测转入 Trim-Away 系统后 *hIAPP* 蛋白的表达水平。H: G 图中 *hIAPP* 蛋白表达水平统计结果。I: Western blot 检测 IgG 作为 *hIAPP* 抗体对照实验条件下 *hIAPP* 的蛋白表达水平; J: I 图中 *hIAPP* 蛋白表达水平的统计结果。B, C 图中 OE 表示向 INS1 细胞中转入 pcDNA3.1-rTrim21 及 lv3-*hIAPP-copGFP*, H 图中 OE 表示向 INS1 细胞中转入 pcDNA3.1-rTrim21 及 pcDNA3.1-*hIAPP*, OE+抗体表示过表达后转入 *hIAPP* 抗体, 应用 Trim-Away 系统; 图中标尺为 20 μm ; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

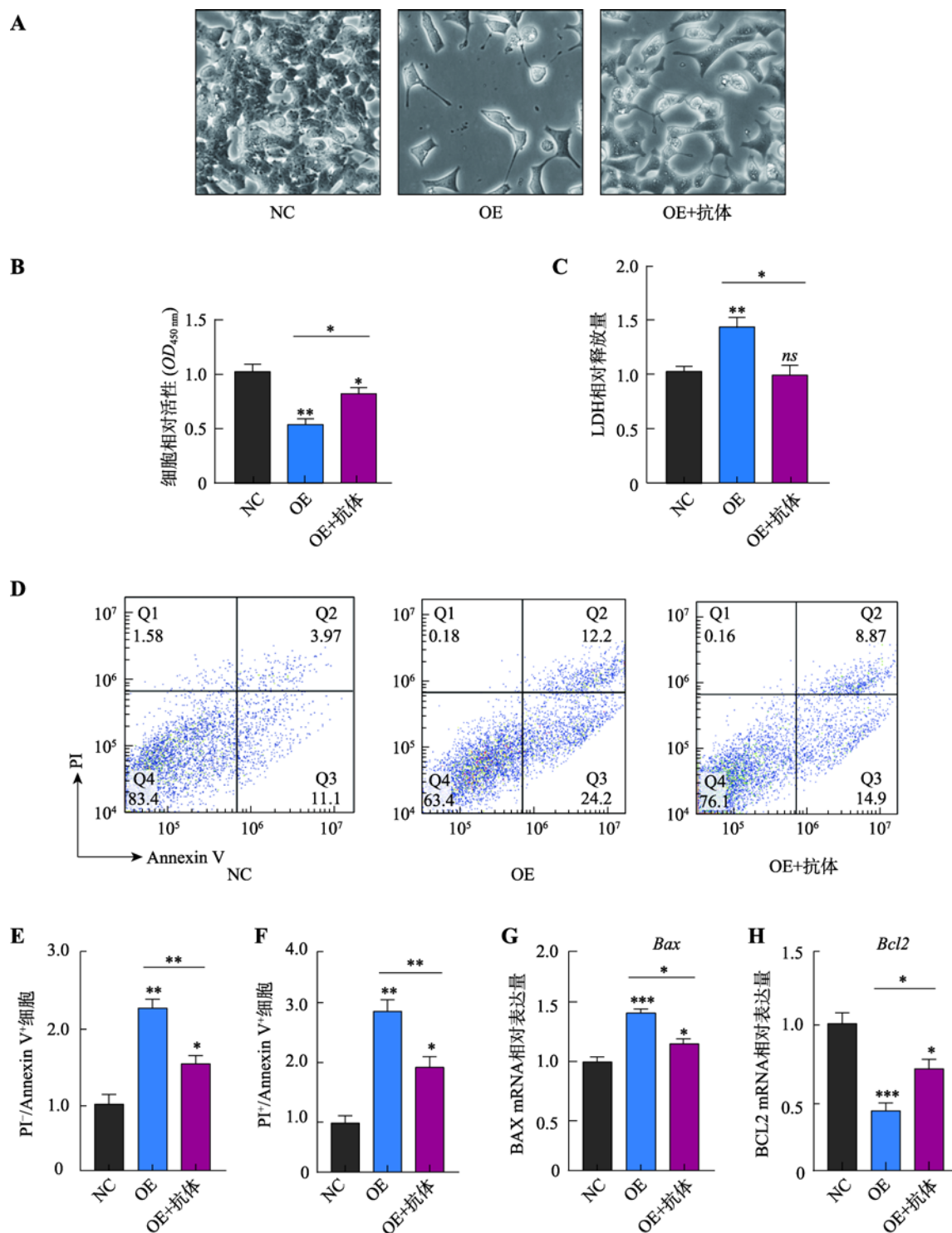


图 4 Trim-Away 系统可改善 hIAPP 诱导的 INS1 细胞死亡

Fig. 4 Trim-Away ameliorates hIAPP-induced cell death in INS1

A: 显微镜下观察转入 Trim-Away 系统后 INS1 细胞数目的变化。B: CCK8 检测转入 Trim-Away 系统后的细胞活性。C: 转入 Trim-Away 系统后检测 LDH 的释放量。D: 流式细胞仪检测 PI-Annexin V 染色的结果。E, F: D 图中早期凋亡和晚期凋亡细胞数目的统计结果。G, H: qPCR 检测转入 Trim-Away 系统后 *Bax* 和 *Bcl2* mRNA 的相对表达量。图中 NC 表示向 INS1 细胞中转入 pcDNA3.1-rTrim21 及 pcDNA3.1 空白载体作为阴性对照, OE 表示向 INS1 细胞中转入 pcDNA3.1-rTrim21 及 pcDNA3.1-hIAPP, OE+抗体表示过表达后转入 hIAPP 抗体, 应用 Trim-Away 系统; 标尺为 50 μ m; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$ 。

下降(图 4B)。与 CCK8 结果一致, hIAPP 抗体转入后, LDH 的释放量下降至与对照组相同(图 4C), 进一步证实了 Trim-Away 系统可以减弱 hIAPP 对细胞产生的毒性。这些结果表明, Trim-Away 系统有效地抑制了 hIAPP 诱导的细胞死亡。由于凋亡是 hIAPP 诱导的 INS1 细胞死亡的主要类型, 本研究采用流式细胞术检测细胞的凋亡情况。Annexin V-FITC 单阳性细胞被认为是早期凋亡细胞, Annexin V-FITC 和 PI 双阳性细胞被认为是晚期凋亡细胞或死亡细胞(图 4D)。结果显示, Trim-Away 系统可减少早期凋亡(由 24.2% 下调为 14.9%)和晚期凋亡细胞(由 12.2% 下调为 8.87%)(图 4, E 和 F)。此外, 本研究还利用 qPCR 检测了抗凋亡因子 *Bcl2* 和促凋亡因子 *Bax* mRNA 的相对表达量。当 hIAPP 过表达时, *Bax* 表达升高, *Bcl2* 表达降低, *Bax/Bcl2* 比值升高(图 4, G 和 H), 表示细胞有发生凋亡的倾向, 与图 1G 检测到的凋亡表型现象一致。在 Trim-Away 系统降低 hIAPP 积累水平后, *Bax/Bcl2* 比值回复(图 4, G 和 H)。这些结果证明, Trim-Away 系统靶向 hIAPP 的

积累减少细胞凋亡, 具有保护作用。

2.5 Trim-Away 系统可减轻 hIAPP 累积对 β 细胞功能的损害

正常情况下, hIAPP 与胰岛素共同分泌, hIAPP 的过量或错误折叠会导致其在细胞膜内外积累和聚集, 引起细胞毒性, 影响 β 细胞分泌胰岛素。本研究使用刚果红染色检测 hIAPP 的积累, 结果显示转入 Trim-Away 系统组较对照组 hIAPP 染色强度下降, 说明减少了 hIAPP 的聚集(图 5, A 和 B)。此外, qPCR 结果显示, 过表达 hIAPP 组 β 细胞分泌胰岛素的相关基因如 *Neurod1*、*PDX1*、*Nkx6.1*、*Ins1*、*Ins2* 和 *SLC2a2* 的表达量减少, 但 Trim-Away 系统转入后可以回复这些基因的表达水平(图 5C)。随后, 用 ELISA 试剂盒检测胰岛素的分泌能力, 结果显示 Trim-Away 系统也回复了 hIAPP 抑制的胰岛素分泌(图 5D)。这些结果表明, hIAPP 累积会抑制胰岛素分泌, 而 Trim-Away 系统通过减少 hIAPP 的积累减轻了 β 细胞功能的损伤。

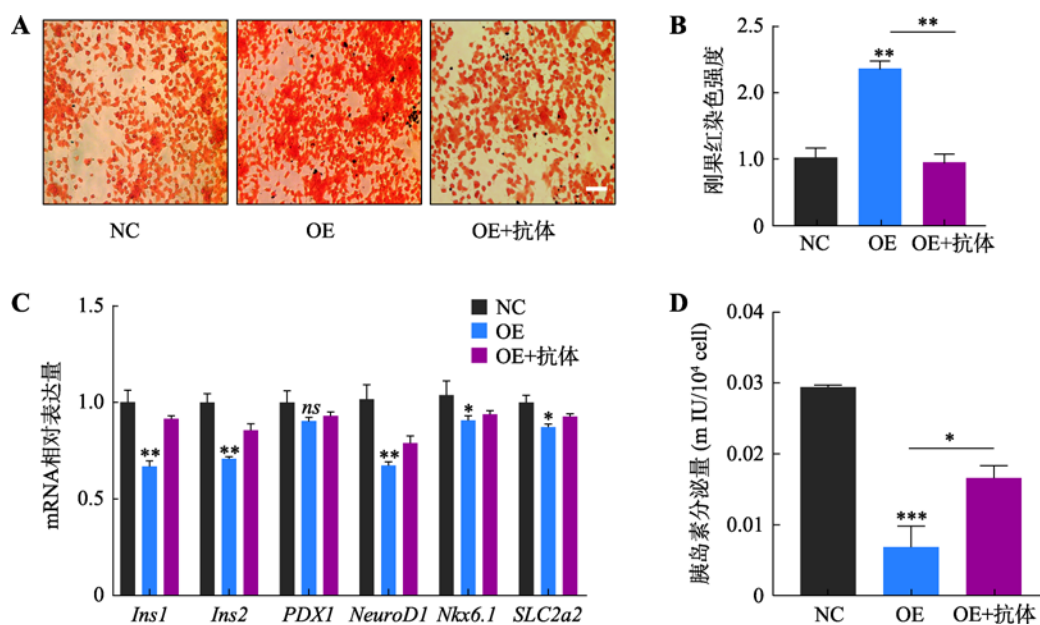


图 5 Trim-Away 系统可减轻 hIAPP 累积对 β 细胞功能的损害

Fig. 5 Trim-Away relieved the impairment of beta cell function induced by excess hIAPP

A: 显微镜下观察转入 Trim-Away 系统后刚果红染色结果。B: 刚果红染色强度统计结果。C: qPCR 检测转入 Trim-Away 系统后 *Ins1* 等胰岛素分泌相关基因 mRNA 的相对表达量变化。D: ELISA 检测转入 Trim-Away 系统后的胰岛素分泌量变化。NC 表示向 INS1 细胞中转入 pcDNA3.1-rTrim21 及 pcDNA3.1 空白载体作为阴性对照, OE 表示向 INS1 细胞中转入 pcDNA3.1-rTrim21 及 pcDNA3.1-hIAPP, OE+抗体表示过表达后转入 hIAPP 抗体, 应用 Trim-Away 系统; 标尺为 100 μ m; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$ 。

3 讨论

在人(*Homo sapiens*)、猫(*Felis catus*)和非灵长类动物中 IAPP 的累积会导致糖尿病,但在啮齿类动物中不会导致糖尿病。已有研究报道 IAPP 在人、小鼠(*Mus musculus*)、大鼠、猫和豚鼠(*Cavia porcellus*)体内的 20~29 位氨基酸残基在不同物种间存在差异^[21,22],这可能是 IAPP 在人类、猫和非灵长类动物细胞内外聚集而在啮齿动物体内不存在的原因。本研究利用大鼠胰岛素瘤细胞 INS1 过表达人源 IAPP 进行研究,证实过量的 hIAPP 可导致 INS1 细胞死亡,损害细胞功能。大鼠与人的 IAPP 蛋白除 20~29 位氨基酸不同外,其余氨基酸序列相似性很高,本研究所用抗体也可以识别 INS1 细胞中表达的 rIAPP,如图 3 中 Western blot 结果显示对照组中出现 hIAPP 条带也属正常。由于 INS1 中不表达 hIAPP,所以在转入 hIAPP 过表达载体后,qPCR 检测结果显示高倍数的过表达效率(图 1A)。

淀粉样变性是淀粉样物质在细胞内造成沉积,使细胞功能受损的一种临床症状。其特征有蛋白质的错误折叠,或淀粉样纤维的严重累积。研究表明许多疾病都与淀粉样变性相关,例如 hIAPP 与 T2DM^[23],淀粉样 β 肽(A β)、Tau 蛋白与阿尔茨海默症(Alzheimer disease, AD)^[24,25]以及朊蛋白(PrP)与海绵状脑病^[26]等。其中 hIAPP 一般先形成毒性寡聚体, α 螺旋结构增多,能够穿透细胞膜,然后进一步聚集成成熟纤维,以 β 折叠结构为主,在细胞内外累积^[27]。多种淀粉样蛋白聚集小分子抑制剂多为多酚类化合物,其中咖啡酸和绿原酸可以延缓 α 螺旋向 β 折叠结构的转变,并改变 hIAPP 最终形态的二级结构;水飞蓟宾可与 hIAPP 疏水表面结合抑制其聚集;丹酚酸 B 延缓 α 螺旋向 β 折叠结构的转变^[28]。小分子抑制剂多是从中药或其他植物提取,因为人体产生 hIAPP 累积是个漫长的过程,日常摄入可以有效减少 hIAPP 的聚集,但是这些药物其他成分的长期摄入是否会产生副作用还未知。并且多酚类小分子的透膜性很差,目前还未很好解决^[29]。此外小分子抑制剂的抑制作用主要依靠芳香烃结构,是否会对细胞内其他类似结构的化合物产生不利影响目前还不清楚,但抗体的特异性能很大程度地降低这

些潜在的影响。一些自行设计并合成的短肽类也可以抑制淀粉样蛋白沉积,如短肽 FLPNF 可以通过增强脑啡肽酶活性进而抑制 hIAPP 聚集^[30],但是增强脑啡肽酶活性是否会对多种肽类底物水解造成影响目前还不清楚。

应用 CRISPR/Cas9、RNAi 等技术可以在 DNA 或 RNA 水平上降低 hIAPP 的表达,但这些技术降低其表达的同时也会抑制其正常生理功能,产生非特异性的缺陷,因此这些技术不适合清除已经合成的蛋白质^[31]。Trim-Away 利用抗体特异性和胞内泛素蛋白酶体系统去除过量的 hIAPP 蛋白,将对细胞其他成分产生的不良影响降到最低,并能正常转录和翻译 hIAPP。另外 Trim-Away 系统可以在 60 min 内降解 80%左右的蛋白水平,比传统的敲除技术快得多。因此,该技术在提高细胞活力和改善胰岛素产生功能方面表现出良好的性能。

由于现在的培养技术尚不支持本研究对人类胰腺 β 细胞进行离体平面培养,所以本研究选择在大鼠细胞中进行模拟。但随着科学技术的进步,该技术定会对清除人 β 细胞里 hIAPP 累积有所帮助。在实际临床运用中最大的问题是如何将 hIAPP 抗体在需要的时候引入患者体内并靶向胰岛细胞。目前,通过转入特异性抗体的 cDNA 在小鼠、牛、家蚕等生物体内表达抗体的技术已经比较成熟^[32,33]。可以利用腺病毒诱导特定细胞表达特异性抗体 Fc 结构域,克服长期引入抗体的限制。此外,应用纳米技术或其他科技手段可以加载 hIAPP 抗体,并能根据胰岛细胞的特异性标志物靶向胰岛细胞。而且针对内源性 hIAPP 的特异性抗体已经被研发出来,可以区别前体 hproIAPP 及成熟的 hIAPP、寡聚及聚集的、纤维状和非纤维状的 hIAPP,所以精确调控内源性 hIAPP 指日可待。综上所述,Trim-Away 技术可以改善由于 hIAPP 累积而对 β 细胞产生的毒性及功能损伤,为 β 细胞功能损伤导致的 2 型糖尿病提供基础依据。

参考文献(References):

- [1] Westermark P, Wernstedt C, Wilander E, Hayden DW, O'Brien TD, Johnson KH. Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are

- derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(11): 3881–3885. [DOI]
- [2] Cooper GJ, Leighton B, Dimitriadis GD, Parry-Billings M, Kowalchuk JM, Howland K, Rothbard JB, Willis AC, Reid KB. Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(20): 7763–7766. [DOI]
- [3] Westermark P, Li ZC, Westermark GT, Leckstrom A, Steiner DF. Effects of beta cell granule components on human islet amyloid polypeptide fibril formation. *FEBS Lett*, 1996, 379(3): 203–206. [DOI]
- [4] Westermark P, Andersson A, Westermark GT. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev*, 2011, 91(3): 795–826. [DOI]
- [5] Akesson B, Panagiotidis G, Westermark P, Lundquist I. Islet amyloid polypeptide inhibits glucagon release and exerts a dual action on insulin release from isolated islets. *Regul Pept*, 2003, 111(1–3): 55–60. [DOI]
- [6] Westermark P, Wernstedt C, O'Brien TD, Hayden DW, Johnson KH. Islet amyloid in type 2 human diabetes mellitus and adult diabetic cats contains a novel putative polypeptide hormone. *Am J Pathol*, 1987, 127(3): 414–417. [DOI]
- [7] Opie EL. On the relation of chronic interstitial pancreatitis to the islands of Langerhans and to diabetes mellitus. *J Exp Med*, 1901, 5(4): 397–428. [DOI]
- [8] Jurgens CA, Toukatly MN, Fligner CL, Udayasankar J, Subramanian SL, Zraika S, Aston-Mourney K, Carr DB, Westermark P, Westermark GT, Kahn SE, Hull RL. β -cell loss and β -cell apoptosis in human type 2 diabetes are related to islet amyloid deposition. *Am J Pathol*, 2011, 178(6): 2632–2640. [DOI]
- [9] Guardado-Mendoza R, Davalli AM, Chavez AO, Hubbard GB, Dick EJ, Majluf-Cruz A, Tene-Perez CE, Goldschmidt L, Hart J, Perego C, Comuzzie AG, Tejero ME, Finzi G, Placidi C, La Rosa S, Capella C, Halff G, Gastaldelli A, DeFronzo RA, Folli F. Pancreatic islet amyloidosis, β -cell apoptosis, and α -cell proliferation are determinants of islet remodeling in type-2 diabetic baboons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(33): 13992–13997. [DOI]
- [10] Merikallio H, Turpeenniemi-Hujanen TT, Paakko P, Makitaro R, Kaarteenaho R, Lehtonen S, Salo S, Salo T, Harju T, Soini Y. Slug is associated with poor survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(9): 5846–5854. [DOI]
- [11] Gurlo T, Ryazantsev S, Huang CJ, Yeh MW, Reber HA, Hines OJ, O'Brien TD, Glabe CG, Butler PC. Evidence for proteotoxicity in beta cells in type 2 diabetes: toxic islet amyloid polypeptide oligomers form intracellularly in the secretory pathway. *Am J Pathol*, 2010, 176(2): 861–869. [DOI]
- [12] Li XL, Chen TF, Wong YS, Xu G, Fan RR, Zhao HL, Chan JC. Involvement of mitochondrial dysfunction in human islet amyloid polypeptide-induced apoptosis in INS-1E pancreatic beta cells: An effect attenuated by phycocyanin. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(4): 525–534. [DOI]
- [13] Clift D, McEwan WA, Labzin LI, Konieczny V, Mogessie B, James LC, Schuh M. A method for the acute and rapid degradation of endogenous proteins. *Cell*, 2017, 171(7): 1692–1706. [DOI]
- [14] Leon Fradejas M, Kandil D, Papadimitriou JC, del Pino Florez Rial M, Prieto Sanchez E, Drachenberg CB. Islet amyloid in whole pancreas transplants for type 1 Diabetes Mellitus (DM): possible role of type 2 DM for graft failure. *Am J Transplant*, 2015, 15(9): 2495–2500. [DOI]
- [15] Clift D, Schuh M. A three-step MTOC fragmentation mechanism facilitates bipolar spindle assembly in mouse oocytes. *Nat Commun*, 2015, 6: 7217. [DOI]
- [16] Clift D, Schuh M. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(9): 549–562. [DOI]
- [17] James LC, Keeble AH, Khan Z, Rhodes DA, Trowsdale J. Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(15): 6200–6205. [DOI]
- [18] Mallery DL, McEwan WA, Bidgood SR, Towers GJ, Johnson CM, James LC. Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(46): 19985–19990. [DOI]
- [19] Rhodes DA, Isenberg DA. TRIM21 and the function of antibodies inside cells. *Trends Immunol*, 2017, 38(12): 916–926. [DOI]
- [20] Dong HR, Wang YY, Yang M, Sun LJ, Cheng H, Shen YP. An evaluation of various congo red staining and different microscopic observation for the diagnosis of renal amyloidosis. *Chin J Integr Tradit West Nephrol*, 2016, 17(11): 956–958.
- 董鸿瑞, 王艳艳, 杨敏, 孙丽君, 程虹, 谌贻璞. 不同刚果红染色及观察方法对肾脏淀粉样病变诊断的研究. *中国中西医结合肾病杂志*, 2016, 17(11): 956–958. [DOI]

- [21] Nishi M, Chan SJ, Nagamatsu S, Bell GI, Steiner DF. Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(15): 5738–5742. [DOI]
- [22] Betsholtz C, Christmanson L, Engstrom U, Rorsman F, Jordan K, O'Brien TD, Murtaugh M, Johnson KH, Westermark P. Structure of cat islet amyloid polypeptide and identification of amino acid residues of potential significance for islet amyloid formation. *Diabetes*, 1990, 39(1): 118–122. [DOI]
- [23] Kahn SE, Andrikopoulos S, Verchere CB. Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes*, 1999, 48(2): 241–253. [DOI]
- [24] Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Dore V, Fowler C, Li QX, Martins R, Rowe C, Tomita T, Matsuzaki K, Ishii K, Ishii K, Arahata Y, Iwamoto S, Ito K, Tanaka K, Masters CL, Yanagisawa K. High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*, 2018, 554(7691): 249–254. [DOI]
- [25] Lo AC, Iscru E, Blum D, Tesseur I, Callaerts-Vegh Z, Buee L, De Strooper B, Balschun D, D'Hooge R. Amyloid and Tau neuropathology differentially affect prefrontal synaptic plasticity and cognitive performance in mouse models of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 2013, 37(1): 109–125. [DOI]
- [26] Imran M, Mahmood S. An overview of animal prion diseases. *Virology*, 2011, 8(6): 493. [DOI]
- [27] Haataja L, Gurlo T, Huang CJ, Butler PC. Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis. *Endocr Rev*, 2008, 29(3): 303–316. [DOI]
- [28] Cheng B. Research on inhibitors of toxic aggregation of human islet amyloid peptide [Dissertation]. Huazhong University of Science and Technology, 2014.
程彪. 人胰岛淀粉样多肽毒性聚集的抑制剂研究[学位论文]. 华中科技大学, 2014. [DOI]
- [29] Wang QQ, Guo JJ, Jiao PZ, Liu HX, Yao XJ. Exploring the influence of EGCG on the β -sheet-rich oligomers of human islet amyloid polypeptide (hIAPP₁₋₃₇) and identifying its possible binding sites from molecular dynamics simulation. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94796. [DOI]
- [30] Shi Y, Jiao A, Lin JZ, Zhang CS, Sun N, Zhang JL. Study of reduction of hIAPP aggregation by short peptide FLPNF in INS-1 cells. *Int J Endocrinol Metab*, 2019, 39(6): 377–382.
石悦, 焦奥, 林建贞, 张城硕, 孙宁, 张佳林. 短肽 FLPNF 抑制大鼠胰岛素瘤 INS-1 细胞内 hIAPP 聚集的研究. 国际内分泌代谢杂志, 2019, 39(6): 377–382. [DOI]
- [31] Niu XR, Yin SM, Chen X, Shao TT, Li DL. Gene editing technology and its recent progress in disease therapy. *Hereditas(Beijing)*, 2019, 41(7): 582–598.
牛煦然, 尹树明, 陈曦, 邵婷婷, 李大力. 基因编辑技术及其在疾病治疗中的研究进展. 遗传, 2019, 41(7): 582–598. [DOI]
- [32] Reis U, Blum B, von Specht BU, Domdey H, Collins J. Antibody production in silkworm cells and silkworm larvae infected with a dual recombinant bombyx mori nuclear polyhedrosis virus. *Biotechnology (NY)*, 1992, 10(8): 910–912. [DOI]
- [33] Zu Putlitz J, Kubasek WL, Duchene M, Marget M, von Specht BU, Domdey H. Antibody production in baculovirus-infected insect cells. *Biotechnology (NY)*, 1990, 8(7): 651–654. [DOI]

(责任编辑: 陈雁)