

· 老年人心肾疾病专栏 ·

TFP5 对高糖诱发的细胞周期素依赖性激酶过度激活及胰岛 β 细胞凋亡的影响

张霞¹, 付海霞², 郑亚莉^{1*}

(¹宁夏人民医院肾脏内科, 银川 750002; ²山东日照市中心医院血液净化中心, 日照 276800)

【摘要】目的 探讨TFP5对高糖诱发的细胞周期素依赖性激酶5(Cdk5)活性的抑制作用及其对胰岛 β 细胞的保护作用。**方法** 体外培养小鼠胰岛细胞株Min6。将TFP5转染Min6细胞, 分别用免疫印迹和免疫荧光观察其表达。实验分3组: 低糖(5mmol/L)组, 高糖(25mmol/L)+空病毒载体(EV)组和高糖(25mmol/L)+TFP5组, 分别用同位素标记法测定3组细胞内Cdk5激酶活性; 用酶联免疫吸附法测定3组细胞胰岛素分泌水平; 用免疫印迹法测定胰岛 β 细胞凋亡。**结果** (1)表明TFP5来源和它的分子序列; (2)TFP5在Min6细胞内表达良好; (3)在高糖+TFP5组Cdk5的活性明显低于高糖+EV组($P < 0.01$), 而且在高糖+TFP5组胰岛素分泌明显高于高糖+EV组($P < 0.01$); (4)在高糖组Min6细胞的Bax表达增加, Bcl-2表达减少, Bax/Bcl-2比值升高, 细胞凋亡增加($P < 0.01$, vs 低糖组), 而加入TFP5后, Bax表达减少, Bcl-2表达增加, Bax/Bcl-2的比值减低($P < 0.01$, vs 高糖组), 细胞的凋亡减少。**结论** TFP5可抑制高糖诱发的Cdk5激酶的过度活性、减少高糖刺激下胰岛细胞凋亡, 从而恢复胰岛素分泌, 具有潜在的以Cdk5为靶点治疗2型糖尿病的前景。

【关键词】 TFP5; 细胞周期素依赖性激酶5; 葡萄糖; 胰岛素; 细胞凋亡

【中图分类号】 R587.1

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2014.00030

Effects of TFP5 on high glucose-induced hyperactivity of cyclin dependent kinase 5 and pancreatic beta cells apoptosis

ZHANG Xia¹, FU Hai-Xia², ZHENG Ya-Li^{1*}

(¹Department of Nephropathy, Ningxia People's Hospital, Yinchuan 750002, China; ²Center of Blood Purification, Central Hospital of Rizhao City, Rizhao 276800, China)

【Abstract】Objective To determine the inhibitory effect of TFP5 on the hyperactivity of cyclin dependent kinase 5 (Cdk5) induced by high glucose and its protection for the pancreatic beta cells from apoptosis. **Methods** After TFP5 was delivered into mouse insulinoma line 6 (Min 6), the expression of TFP5 was detected in the cells by Western blotting and immunofluorescence staining. Then, the cells were treated by low (5mmol/L), high glucose (25mmol/L)+empty vector (EV), and high glucose +TFP5, respectively. Cdk5 activities were measured by immune precipitation and isotope labeling. The level of insulin secretion were detected with ELISA; and the apoptosis of Min 6 cells were analyzed by Western blotting. **Results** (1) Our results indicated the derivation of TFP5 peptide from p35 and its sequence. (2) TFP5 was well expressed in the Min 6 cells. (3) Cdk5 activity was significantly lower in the high glucose+TFP5 cells than in the high glucose+EV cells ($P < 0.01$); the insulin secretion level in the high glucose+TFP5 cells was significantly higher than that in the high glucose cells ($P < 0.01$). (4) In the high glucose cells, the expression of Bax was increased while that of Bcl-2 was decreased, and the ratio of Bax/Bcl-2 was increased ($P < 0.01$, vs the low glucose cells), indicating the increase of cell apoptosis. However, the expression of the 2 proteins was opposite, and the ratio was decreased in the high glucose+TFP5 cells, showing lesser apoptotic cells ($P < 0.01$, vs the high glucose cells). **Conclusion** TFP5 inhibits the hyperactivity of Cdk5 induced by high glucose, protects pancreatic cells from apoptosis, and recovers the insulin secretion. Therefore, it may have a potential therapeutic agent for type 2 diabetes targeting on Cdk5.

【Key words】 TFP5; cyclin dependent kinase 5; glucose; insulin; apoptosis

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81060066), the Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region (NZ10162), the Tackling Project of Science and Technology of Ningxia Hui Autonomous Region (KGX-19-10-16) and the Tackling Project of Science and Technology from International Cooperation Program of

收稿日期: 2013-11-06; 修回日期: 2013-12-07

基金项目: 国家自然科学基金(81060066); 宁夏回族自治区自然科学基金(NZ10162); 宁夏回族自治区科技攻关项目(KGX-19-10-16); 宁夏回族自治区科技攻关国际合作项目(2011ZYH169)

通信作者: 郑亚莉, E-mail: yalinew@yahoo.com

Ningxia Hui Autonomous Region (2011ZYH169).

Correspond author: ZHENG Ya-Li, E-mail: yalinew@yahoo.com

2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 属于老年退行性疾病, 严重影响着人类的身体健康。细胞周期素依赖性激酶5 (cyclin dependent kinase 5, Cdk5) 作为Cdk家族成员, 在病理情况下, 由于p35裂解为p25, 而被过度激活^[1]。过度活化的Cdk5在神经系统可导致Tau蛋白过度磷酸化, 引起神经细胞凋亡, 参与神经退行性疾病的发生和进展^[2]。近年研究发现, 胰岛细胞中存在p35, 高糖刺激可使p35表达增高, 使Cdk5过度激活、抑制胰岛素分泌, 而抑制该激酶活性可能发挥治疗T2DM作用^[2]。前期的研究已经发现, 由p35分解得到的短肽Cdk5抑制肽 (Cdk5 inhibitory peptide, CIP) 可抑制Cdk5活性, 可能用于治疗神经退行性疾病^[3]。有研究发现, T2DM与神经退行性疾病发病有着共同的病理生理机制^[2,4]。本研究中, 继续分解CIP得到24个氨基酸的短肽p5, 连接TAT蛋白和FITC后合成TFP5, 探究TFP5对高糖刺激下胰岛细胞中Cdk5活性、胰岛细胞存活和功能的影响, 探讨其对T2DM的防治作用。

1 材料与方法

1.1 抗体和试剂

Cdk5、p35抗体购自Santa Cruz生物公司, 微管蛋白 (tubulin) 单克隆抗体、Bax、Bcl-2抗体和Lipofectamine基因转染试剂购自Invitrogen公司, DMEM培养液购自Gibco公司, 胎牛血清购自Hyclone公司, 胰岛素分泌测定酶标免疫试剂盒购自Linco Research公司。小鼠胰岛β细胞 (Min6细胞株), 由NIH, Dr. Abner Notkins' Lab赠送。TFP5肽由21st Century Biochemicals (Marlboro, MA) 合成。

1.2 细胞的培养及刺激

Min6细胞在含有4.5g/L的葡萄糖、10%的胎牛血清、100kU/L的青霉素G和100mg/L链霉素的DMEM培养液中培养。胰岛细胞铺板于6孔培养盘 (100万/孔)。次日分别用不同浓度的葡萄糖 (5, 25mmol/L) 培养刺激, 并将高糖条件下培养的细胞分别转染EV、TFP5和携带p5基因的病毒 (1ml/L), 48h后收取细胞和上清液。裂解细胞, 收取蛋白做各种蛋白表达及Cdk5酶活性测定。用ELISA试剂盒检测上清液中胰岛素的分泌量。

1.3 Cdk5激酶活性测定

用细胞裂解液收取细胞, 提取蛋白, BCA法进行蛋白定量分析 (Biorad protein assay)。取200μg蛋白加Cdk5多克隆抗体, 在4℃中旋转孵育过夜, 次

日加免疫球蛋白A琼脂糖凝胶珠在4℃中旋转孵育4h, 用细胞溶解液洗3次, 得到Cdk5激酶, 用同位素γ-32P标记测定酶的活性。

1.4 免疫印迹 (Western blot)

裂解细胞提取蛋白与上样缓冲液混合后, 按每道35μg上样到4%~20% SDS-PAGE凝胶, 电泳分离, 转膜到PVDF膜 (100V, 90min)。用封闭液封闭1h, 加入一抗反应液 (以5%脱脂奶粉封闭液稀释抗Cdk5和p35多克隆抗体, 1:200), 4℃孵育过夜, TBST溶液漂洗4次, 与辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:5000) 在室温下孵育1~2h, 再以TBST溶液漂洗4次, ECL显色, X线底片曝光。

1.5 胰岛素分泌水平测定

将Min6细胞铺板到6孔培养盘 (100万/孔), 在DMEM培养基中培养, 其中加10%胎牛血清, 和100kU/L的青、链霉素。放在37℃, 5%CO₂培养箱中培养。次日加TFP5或带有p5基因的腺病毒 (浓度1mg/L每孔)。48h后收取细胞和上清液, 裂解液裂解细胞提取蛋白进行体外激酶活性实验测定Cdk5活性变化; 用胰岛素ELISA试剂盒分别检测细胞培养上清液中胰岛素的分泌水平, 用免疫酶标的方法进行测定分析。

1.6 免疫荧光染色

细胞用4%甲醛固定30min, 5% BSA/PBS (含0.1% TritonX-100) 封闭液封闭30min, 加入用封闭液稀释的一抗, 4℃孵育过夜或室温下孵育2h。加入免疫荧光标记的IgG抗体 (二抗) 在室温下孵育1h, 然后用PBS洗涤3遍, 细胞核用Hoescht33342染色。荧光图像使用Zeiss LSM-510扫描共聚焦显微镜, 图像处理使用Adobe Photoshop。

1.7 统计学处理

采用SPSS13.0统计学软件进行分析。计量资料以均数 ± 标准差表示, 组间比较采用t检验。P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TFP5来源及基因序列

将p35的C端24个氨基酸序列 (Lys254-Ala277) 短肽分解出来, 命名为p5 (图1A); 在p5短肽-C端连接一具有11个氨基酸的TAT蛋白 (一种细胞穿透肽), N端连接FITC (一种绿色荧光蛋白) 合成TFP5 (图1B)。

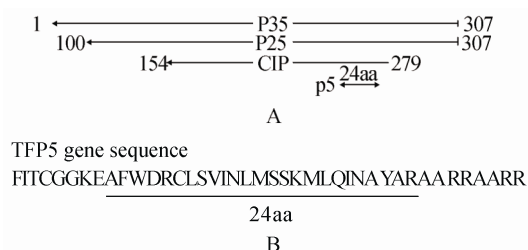


图1 TFP5结构示意图
Figure 1 The schematic diagram of TFP5
A: the origin of TFP5; B: the sequence of TFP5

2.2 TFP5可有效转导入细胞内并在Min6细胞表达

将TFP5肽导入Min6细胞（100nmol/L），以腺病毒-p5和空病毒载体为对照，以抗p35抗体为一抗，用Western印迹法检测p5蛋白表达，结果发现3组Min6细胞均有p35蛋白表达，导入TFP5和腺病毒-p5后，可检测到Min6细胞表达p5蛋白（图2A）。

免疫荧光镜下显示导入TFP5肽后Min6细胞内有绿色荧光，也证实TFP5可有效进入细胞内（图2B）。

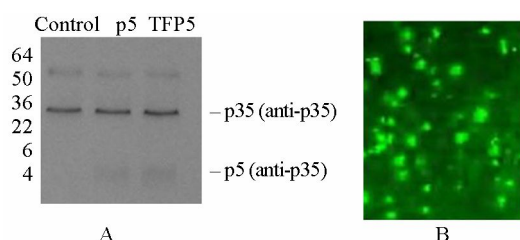


图2 TFP5转染Min6细胞后表达检测
Figure 2 The expression of TFP5 in Min6 cells
A: the expression of p5 in Min6 cells detected by Western blot analysis; B: immunofluorescence shows the expression of TFP5 in Min6 cells(FITC × 400)

2.3 TFP5抑制高糖刺激下Cdk5过度活性、恢复胰岛素分泌

实验分3组。1组：低糖组（5mmol/L）；2组：高糖（25mmol/L）+空病毒载体（EV）组；3组：高糖（25mmol/L）+TFP5组。提取3组细胞中的蛋白检测Cdk5活性，组蛋白H1为底物，结果发现高糖环境下组蛋白H1磷酸化水平升高，Cdk5活性增高（图3A、3B，

2组 vs 1组）；导入TFP5后组蛋白H1磷酸化水平下降，Cdk5活性降低（图3A、3B，3组 vs 2组）。

收集3组细胞培养上清液，ELISA方法检测上清中胰岛素分泌水平，发现高糖环境下胰岛素分泌减少（图3C，2组 vs 1组），转染TFP5后，可恢复Min6细胞的胰岛素分泌（图3C，3组 vs 2组）。

2.4 TFP5抑制高糖刺激下Min6细胞凋亡

以TFP5或空病毒载体（EV）转染Min6细胞，24h后给予高糖或低糖刺激。试验共分4组：TFP5+低糖刺激组（5mmol/L）、TFP5+高糖刺激组（25mmol/L）、EV+低糖刺激组（5mmol/L）、EV+高糖刺激组（25mmol/L）。作用24h后收集细胞提取蛋白，采用Western印迹法分析细胞凋亡标志物Bax和Bcl-2蛋白表达水平，发现低糖刺激，TFP5不影响细胞凋亡；高糖刺激可诱导细胞凋亡，转染TFP5后细胞凋亡明显减少（图4）。

3 讨论

T2DM的病理生理基础是胰腺β细胞损害和凋亡，发病率、病死率越来越高，严重威胁人类健康^[5]。Cdk5是Cdk家族的成员，是脯氨酸限制性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，普遍存在于哺乳动物的细胞内^[1]。生理情况下，Cdk5与其激活亚基p35结合形成Cdk5/p35复合物而被激活，参与一系列生理过程。而在病理状态下，如氧化应激、高血糖等环境下，p35分解为p25与Cdk5结合形成Cdk5/p25复合物，使Cdk5处于过度激活状态，使某些底物过磷酸化，诱导细胞的凋亡。

在阿尔茨海默病中，Cdk5与p25结合后过磷酸化tau蛋白导致神经细胞凋亡^[3]。许多研究已经发现T2DM与阿尔茨海默病在发生发展过程中有相似的病理生理机制参与^[6-9]。近来有研究发现胰岛β细胞中表达Cdk5和p35，Cdk5过度激活参与了T2DM的发病，提示Cdk5激酶抑制剂可能用于治疗T2DM。

Cdk5激酶化学抑制剂大部分竞争性地结合ATP结

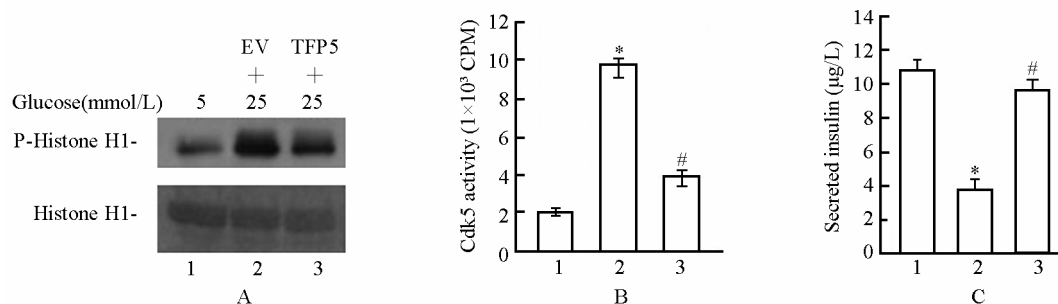


图3 TFP5对Min6细胞中Cdk5活性和胰岛素分泌的影响

Figure 3 The effect of TFP5 on Cdk5 activity and insulin secretion
A: the phosphorylation of histone H1 in the presence of Cdk5 from three groups of Min6 cells; B: the bar chart describes the activity of Cdk5; C: insulin secretion in the cell culture supernatants. 1: low glucose group (5mmol/L); 2: high glucose (25mmol/L)+empty virus (EV) group; 3: high glucose (25mmol/L)+TFP5 group. Compared with group 1, * $P < 0.05$; compared with group 2, # $P < 0.05$

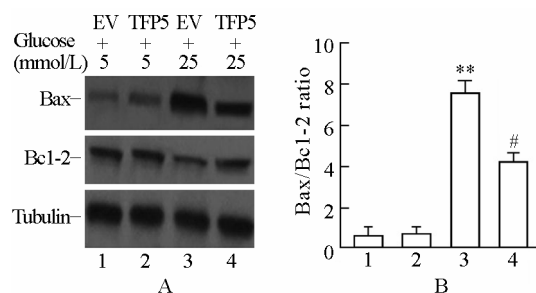


图4 TFP5对高糖刺激下Min6细胞凋亡的作用

Figure 4 The effect of TFP5 on apoptosis of Min6 cells treated with high glucose

A: the expression of Bax and Bcl-2, detected by Western blot; B: bar chart shows the ratio of Bax/Bcl-2. 1: EV + low glucose group (5mmol/L); 2: TFP5 + low glucose group (5mmol/L); 3: EV + high glucose group (25mmol/L); 4: TFP5 + high glucose group (25mmol/L). Compared with group 1, ** $P < 0.01$; compared with group 2, # $P < 0.05$

合位点, 缺乏特异性, 且有严重不良反应无法应用于临床。笔者在前期研究中发现, 将P35蛋白分解得到短肽CIP (含125个氨基酸残基) 可特异性地抑制Cdk5激酶活性^[3,10], 进一步分解得到24个氨基酸残基的短肽p5仍可特异性地抑制Cdk5激酶活性, 甚至作用优于CIP^[3]。但在p5临床应用的研究过程中, 面临的一个重要的问题是基因载体的选择。目前常用的载体有质粒载体和病毒载体, 前者安全性高, 但对细胞的转染率低, 影响疗效, 后者对细胞的转染率高, 但有潜在致癌性, 而且病毒蛋白易引起免疫反应, 在治疗安全性上存在问题。本实验通过连接FITC和TAT, 用基因重组技术合成得到含p5肽、TAT并标记了绿色荧光的TFP5短肽。TAT是一个具有细胞穿透能力的短肽, 可作为一个安全而又细胞转染率高的载体。以TAT蛋白为载体, 能否高效进入细胞内? 本实验第二部分, 观察了TFP5导入Min6的效果, 发现TFP5进入细胞率高达90% (图2B)。那么, 在胰岛β细胞中, TFP5是否具有抑制Cdk5活性的作用, 进而能否调节胰岛素的分泌? 本试验第三部分, 用高糖刺激细胞诱发Min6细胞中Cdk5过度活性, 并加入TFP5, 观察Cdk5激酶活性变化和细胞胰岛素分泌水平。结果证实, 高糖刺激可以诱发Cdk5高活性, 抑制胰岛素分泌, TFP5能有效地抑制Cdk5高活性, 恢复胰岛素分泌水平。以上的结果是否是通过抑制了高糖对胰岛β细胞的损伤而起作用? 本试验第四部分, 比较了高糖刺激下, 加入TFP5后Min6细胞表

达Bax/Bcl-2比例水平变化, 结果发现TFP5可抑制高糖刺激下胰岛细胞的异常凋亡。

综上所述, TFP5作为Cdk5激酶过度活性的抑制短肽, 不需要载体可直接进入细胞内, 抑制高糖诱导的Cdk5过度活性, 减轻胰岛细胞凋亡, 恢复高糖环境下胰岛细胞对胰岛素的分泌, 可能成为靶向Cdk5激酶治疗T2DM病的新途径。

【参考文献】

- [1] Hisanaga S, Saito T. The regulation of cyclin-dependent kinase 5 activity through the metabolism of p35 or p39 Cdk5 activator[J]. *Neurosignals*, 2003, 12(4-5): 221-229.
- [2] Zheng YL, Hu YF, Zhang A, *et al*. Overexpression of p35 in Min6 pancreatic beta cells induces a stressed neuron-like apoptosis[J]. *J Neurol Sci*, 2010, 299(1-2): 101-107.
- [3] Dhavan R, Tsai LH. A decade of CDK5[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(10): 749-759.
- [4] Zheng YL, Kesavapany S, Gravell M, *et al*. A Cdk5 inhibitory peptide reduces tau hyperphosphorylation and apoptosis in neurons[J]. *EMBO J*, 2005, 24(1): 209-220.
- [5] Andrali SS, Sampley ML, Vanderford NL, *et al*. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells[J]. *Biochem J*, 2008, 415(1): 1-10.
- [6] Wei FY, Tomizawa K. Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5): a potential therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases and diabetes mellitus[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2007, 7(10): 1070-1074.
- [7] Zhao WQ, Townsend M. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(5): 482-496.
- [8] Haan MN. Therapy insight: type 2 diabetes mellitus and the risk of late-onset Alzheimer's disease[J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006, 2(3): 159-166.
- [9] Li L, Holscher C. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review[J]. *Brain Res Rev*, 2007, 56(2): 384-402.
- [10] Zheng YL, Li C, Hu YF, *et al*. Cdk5 inhibitory peptide(CIP) inhibits Cdk5/p25 activity induced by high glucose in pancreatic beta cells and recovers insulin secretion from p25 damage[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e63332.

(编辑: 周宇红)