

胰岛素原稳态与胰岛 β 细胞功能

朱丹 蔡可英 曹萌 刘超

【摘要】 胰岛 β 细胞内质网中有大量新合成的胰岛素及胰岛素前体即胰岛素原,胰岛素原经过正确的处理转换为天然折叠单体形式即有活性的胰岛素,后者经过剪切去除 C 肽而形成胰岛素,从而发挥生物学效应。未折叠或者错误折叠的胰岛素原仍以非天然折叠多肽的形式存在于内质网中。任何原因导致的胰岛素原折叠率的改变均会导致胰岛素原稳态失衡,导致内质网应激和胰岛 β 细胞的功能改变。

【关键词】 胰岛素原;胰岛 β 细胞;糖尿病;胰岛素原稳态

Proinsulin homeostasis and islet β cell function Zhu Dan*, Cai Keying, Cao Meng, Liu Chao.*Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China

Corresponding author: Cai Keying, Email: caikaying@medmail.com.cn

【Abstract】 There is a large number of newly synthetic insulin and proinsulin in endoplasmic reticulum of islet β cells. If correctly folded, proinsulin can be converted into native folded monomeric proinsulin with activity. Unfolded or misfolded non-native form of proinsulin will be preserved in the endoplasmic reticulum as the folded polypeptide. Changes of proinsulin folding rate caused by any reasons will result in the imbalance of proinsulin homeostasis, endoplasmic reticulum stress and islet β cells dysfunction.

【Key words】 Proinsulin; Islet β cell; Diabetes mellitus; Proinsulin homeostasis

(Int J Endocrinol Metab, 2015, 35: 110-113)

众所周知,2 型糖尿病发病的重要机制是胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能衰竭。研究发现,在 2 型糖尿病发病之前就有胰岛素抵抗的长期存在。但并不是所有胰岛素抵抗均会发展为糖尿病,因为此时的胰岛 β 细胞还可以产生过量的胰岛素来代偿胰岛素抵抗状态,遗传缺陷、缺氧、氧化应激、细胞内钙离子浓度的改变等均可扰乱胰岛素的合成和分泌过程,抑制胰岛素基因的表达,促进胰岛 β 细胞的凋亡等,进而导致 2 型糖尿病的发生^[1]。可见,胰岛 β 细胞功能衰竭是糖尿病发病的中心环节。

1 胰岛素原合成及胰岛素原稳态(PIHO)

正常条件下,前胰岛素原在信号肽与内质网膜上的信号系统相互作用,被协同转运到内质网腔中。转运至内质网中的前胰岛素原的信号肽被裂解后形成胰岛素原,新合成的胰岛素原必须在内质网中正确折叠才能转运至高尔基体被包裹成分泌颗粒,

进而在其中转化为有生物活性的胰岛素^[2]。任何原因导致的胰岛素原错误折叠均可使之在内质网中堆积,导致内质网应激(ERS),最终导致胰岛 β 细胞功能失调^[3]。PIHO 失衡是指胰岛 β 细胞内胰岛素原天然折叠单体与非天然折叠多肽比例失调所致胰岛素释放异常、胰岛 β 细胞功能衰竭^[4]。

胰岛素原在转换为胰岛素的过程中,通过正确折叠形成天然胰岛素单体,是形成胰岛素双链结构的先决条件。但是若错误折叠,则形成的胰岛素原由于空间结构不稳定,无法组装成有活性的胰岛素^[5]。已有研究发现,胰岛素原天然折叠率在糖尿病的发病中起重要作用。Wang 等^[4]发现,正常小鼠胰岛 β 细胞内胰岛素原的天然折叠单体约占 70%,非天然折叠多肽占 30%,而糖尿病小鼠胰岛 β 细胞内胰岛素原的天然折叠单体仅占 10%,非天然折叠多肽占 90%。说明胰岛素原折叠率决定了胰岛素释放的效率,胰岛素原的自身成熟及转化可能是一个动态的平衡。

正常条件下,胰岛 β 细胞会形成少量错误折叠的胰岛素原。这些胰岛素原在内质网折叠相关蛋白或分子伴侣的帮助下,可再折叠成空间构型正常的

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2015.02.010

作者单位:221004 徐州医学院(朱丹);221006 徐州医学院第二附属医院内分泌科(蔡可英);210028 南京中医药大学附属中西医结合医院内分泌代谢病区(曹萌,刘超)

通信作者:蔡可英,Email:caikaying@medmail.com.cn

胰岛素原,而不能再次正确折叠的胰岛素原通过内质网蛋白降解系统被降解。因此,少量错误折叠的蛋白质并不影响正常胰岛 β 细胞的功能^[6]。即在正常条件下,胰岛素原的折叠率是可以保持在正常范围内的,被称为 PIHO^[7]。持久或剧烈的 ERS 会引起胰岛 β 细胞功能失调,导致细胞凋亡^[8]。

2 PIHO 失衡的发现

在体外生物工程制造胰岛素类似物治疗糖尿病时,首次发现了异常的胰岛素原二硫化物异构体,体内研究发现,在生理条件下 β 细胞会形成少量错误折叠的胰岛素原^[9-10]。在与内质网蛋白折叠相关酶及分子伴侣的帮助下,错误折叠的胰岛素原可再折叠形成正常的空间构型,而不能再次正确折叠者,将被内质网蛋白降解系统降解。进一步研究发现其原因为胰岛素原二硫键不能正确配对,导致胰岛素原不能正确折叠生成有活性的胰岛素原,使异常且错误折叠的胰岛素原增多^[11]。单胰岛素基因 C(A7)Y 突变的糖尿病小鼠即 Akita 小鼠模型已广泛用于对糖尿病的研究,其特征是胰岛 β 细胞明显受损而不伴有胰岛素抵抗^[12]。通过对 Akita 小鼠的研究发现其体内存在胰岛素原失衡。Yuan 等^[13]对 Akita 鼠及相关的胰岛细胞系的研究发现,在胰岛素基因的转录和翻译水平未见明显异常,而在翻译后加工过程发现错误折叠的胰岛素原堆积、胰岛素分泌明显减少。这一现象在非肥胖小鼠模型中也同样存在,提示胰岛素原形成胰岛素的过程存在异常,错误折叠的胰岛素原滞留在内质网中,不能被转运至高尔基体及下游的分泌通路,胰岛素合成减少并激活 ERS,诱导 β 细胞凋亡。

现有资料表明,PIHO 失衡对胰岛 β 细胞的影响主要有两个方面。首先,它可以导致胰岛 β 细胞的结构发生改变。在电子显微镜下,与正常小鼠胰岛 β 细胞相比,Akita 小鼠胰岛 β 细胞成熟胰岛素颗粒明显减少,内质网、高尔基体以及线粒体不同程度扩张,溶酶体数量增多^[14]。还有研究发现,Akita 小鼠胰岛 β 细胞内发现一些类似豆荚样的结构,猜测可能是未成熟的胰岛素颗粒^[13]。其次,它可以导致胰岛 β 细胞发生 ERS。研究显示,Akita 鼠体内 ERS 标志物如转录活化因子 6、X-结合蛋白 1 的表达明显增加^[15]。ERS 诱导的 CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)表达增加,可诱导胰岛 β 细胞凋亡,促进 Akita 小鼠糖尿病的发生,而敲除 CHOP 基因的小鼠,ERS 诱导的 β 细胞凋亡减少,糖尿病的发生延迟^[16]。以上研究均说明 Akita 鼠发生糖尿病主

要是由于错误折叠或未折叠的胰岛素原堆积在内质网导致 PIHO 失衡,进而引起 ERS,导致 β 细胞凋亡。

3 PIHO 的机制

3.1 胰岛素原过度合成导致 PIHO 失衡 有研究发现,在糖尿病发生之前,胰岛素抵抗已长期存在,为了代偿其所引起的胰岛素分泌相对不足,胰岛 β 细胞代偿性合成超过其折叠能力的胰岛素原,致使错误折叠或未折叠的胰岛素原显著增加^[17]。对 Akita 小鼠 β 细胞中胰岛素原合成、折叠及转运过程的研究发现,尽管 β 细胞分泌的胰岛素的量明显减少,但新合成的胰岛素原的量并未减少(包括正确折叠和错误折叠的胰岛素原)^[18]。细胞中错误折叠的胰岛素原增多,其可能是突变的胰岛素基因与未突变的基因相互作用,影响胰岛素原的正确合成和折叠,并阻断其转运、加工及分泌,进一步加重胰岛素的缺乏。其具体的分子机制尚须更深入的研究。但胰岛素原天然折叠率的比例发生改变,诱导了 PIHO 失衡。

3.2 胰岛素合成相关的基因突变导致 PIHO 失衡 正常小鼠体内有 2 对有功能、不等位的胰岛素基因即 INS1 和 INS2。来自胰岛素基因敲除的研究证实,小鼠拥有一半以上的正常胰岛素基因就可避免发生糖尿病^[19]。Akita 小鼠有 4 条胰岛素合成相关的基因,其中 1 条基因 INS2 发生突变时,动物实验已证实其不影响 INS1、INS2 的转录水平,理论上胰岛 β 细胞功能尚可维持。然而,进一步对 Akita 小鼠的研究却发现,3.5 到 4 周龄时小鼠就发生了严重的胰岛素缺乏^[14,20]。这提示胰岛素基因突变的毒性作用被放大了,其发病病因并非由于丧失了 1 条正常的胰岛素基因,可能还有其他机制存在。通过对 Akita 小鼠的进一步研究发现,INS2 基因突变导致胰岛素第 96 位表达半胱氨酸的基因被酪氨酸取代,胰岛素 A 链、B 链之间的二硫键形成受阻,无法形成稳定的三级结构,导致错误折叠的胰岛素原在内质网中堆积,引发持续的 ERS,最终引起胰岛 β 细胞功能失调^[21]。

目前研究证实,很多与糖尿病有关的胰岛素基因突变都是通过引发胰岛素原的错误折叠导致 ERS,使胰岛素合成减少。其中一些胰岛素基因突变是通过改变胰岛素原肽链上的半胱氨酸的数量,导致半胱氨酸残基变成奇数,破坏胰岛素原分子内部二硫键的正确形成,或因游离的半胱氨酸与未突变的胰岛素原分子上的二硫键异常配对,导致胰岛素原的错误折叠,进而引发 ERS^[22]。

3.3 分子伴侣表达量的改变导致 PIHO 失衡 在内质网中,前胰岛素原被裂解成信号肽和胰岛素原,后者在分子伴侣的帮助下正确折叠,继而转运至高尔基体,进入未成熟的分泌颗粒。在未成熟的颗粒中胰岛素原在蛋白水解酶的作用下除去 C 肽生成成熟的胰岛素并储存在成熟的分泌微粒中。

G 蛋白耦联受体(GRP)78 是内质网中重要的分子伴侣之一,其利用 ATP 水解的能量加速内质网中蛋白质的折叠并阻止其堆积在内质网中。正常生理条件下,GRP78 与内质网膜上的 3 个跨膜蛋白(蛋白激酶 R 样内质网激酶、肌醇激酶 1 活化转录因子 6)结合形成复合物使它们不能被磷酸化活化,处于非激活状态^[23]。这 3 个跨膜蛋白已被确定为 ERS 的感应蛋白,其磷酸化后可诱发 ERS。当内质网腔内未折叠或错误折叠的胰岛素原增多时,其首先与 GRP78 结合,竞争性干扰 GRP78 与 3 个跨膜蛋白结合,进而促进跨膜蛋白的解离释放并通过一系列反应发生磷酸化活化,诱发 ERS^[24]。ERS 是细胞的一种保护性机制,适度的 ERS 可使细胞在外界刺激下恢复稳定,维持生存,但持续的 ERS 可导致胰岛细胞凋亡^[25]。

GRP78 一方面通过参与未折叠蛋白的正确折叠、修饰来保护细胞,另一方面还可以与钙离子结合保持钙离子平衡以维持内质网环境的稳态^[26]。正常组织中,GRP78 的表达水平较低,在缺血、缺氧、钙离子失衡等应激环境下,其表达明显增加,协助蛋白质进行重新装配和跨膜转运,从而缓解内质网压力,保护细胞。但当持续或严重的 ERS,内质网平衡不能恢复时,细胞将启动与内质网相关的凋亡程序。所以,GRP78 的表达量反映了细胞损伤情况和应激能力,对决定细胞的生存状态有重要的作用。对链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠的研究发现,在诱导初期,GRP78 的表达量增加,以保护细胞,随着诱导时间的延长,GRP78 的表达量明显下降,未折叠及错误折叠的胰岛素原增多^[27]。除 GRP78 外,内质网分子伴侣 P58 也参与了蛋白质的折叠。敲除 P58 基因的小鼠,其胰岛 β 细胞功能的紊乱,胰岛素分泌减少^[28]。

综上所述,PIHO 失衡导致严重的 ERS、葡萄糖刺激的胰岛素分泌减少以及胰岛 β 细胞存活率降低。因此,任何原因导致的 PIHO 失衡均可能引起胰岛 β 细胞功能失调、血糖调节受损,从而引发糖尿病的发生。通过对 PIHO 的研究,可以发现治疗糖尿病的新靶点,为临床尽早诊断和治疗糖尿病提供了一个新的思路,值得深入研究。但目前对于胰岛素

原的研究都是基于鼠源性胰岛 β 细胞,其与人胰岛 β 细胞在形态及功能等方面具有很大区别,因此,鼠源性胰岛 β 细胞并不是研究人类糖尿病发病机制的理想模型,故需要开展基于人胰岛 β 细胞平台的研究。

参 考 文 献

- [1] Reaven GM. Relationships among insulin resistance, type 2 diabetes, essential hypertension, and cardiovascular disease: similarities and differences[J]. J Clin Hypertens (Greenwich), 2011, 13(4): 238-243.
- [2] Weiss MA. Proinsulin and the genetics of diabetes mellitus [J]. J Biol Chem, 2009, 284(29): 19159-19163.
- [3] Gidalevitz T, Prahlad V, Morimoto RI. The stress of protein misfolding: from single cells to multicellular organisms[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3(6): a009704.
- [4] Wang J, Chen Y, Yuan X, et al. Control of precursor maturation and disposal is an early regulative mechanism in the normal insulin production of pancreatic β -cells[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19446.
- [5] Mahler HC, Friess W, Gauschof U, et al. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis[J]. J Pharm Sci, 2009, 98(9): 2909-2934.
- [6] Liu M, Li YL, Cavener D, et al. Proinsulin disulfide maturation and misfolding in the endoplasmic reticulum[J]. J Biol Chem, 2005, 280(14): 13209-13212.
- [7] Zhang XP, Yuan QX, Tang W, et al. Substrate-favored lysosomal and proteasomal pathways participate in the normal balance control of insulin precursor maturation and disposal in beta-cells[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27647.
- [8] Eizirik DL, Miani M, Cardozo AK. Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation[J]. Diabetologia, 2013, 56(2): 234-241.
- [9] Zhang BY, Liu M, Arvan P. Behavior in the eukaryotic secretory pathway of insulin-containing fusion proteins and single-chain insulins bearing various B-chain mutations[J]. J Biol Chem, 2003, 278(6): 3687-3693.
- [10] Liu M, Li Y, Cavener D, et al. Proinsulin disulfide maturation and misfolding in the endoplasmic reticulum[J]. J Biol Chem, 2005, 280(14): 13209-13212.
- [11] Liu M, Ramos-Castaneda J, Arvan P. Role of the connecting peptide in insulin biosynthesis[J]. J Biol Chem, 2003, 278(17): 14798-14805.
- [12] Basu R, Oudit GY, Wang XH, et al. Type 1 diabetic cardiomyopathy in the Akita (Ins2(WT/C96Y)) mouse model is characterized by lipotoxicity and diastolic dysfunction with preserved systolic function [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 297(6): H2096-H2108.
- [13] Yuan QX, Tang W, Zhang XP, et al. Proinsulin atypical maturation and disposal induces extensive defects in mouse Ins2(+akita) beta-cells[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35098.
- [14] Rajan S, Eames SC, Park SY, et al. *In vitro* processing and secretion of mutant insulin proteins that cause permanent

- neonatal diabetes[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298(3): E403-E410.
- [15] Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, et al. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(4): 525-532.
- [16] Sou SN, Ilieva KM, Polizzi KM. Binding of human BiP to the ER stress transducers IRE1 and PERK requires ATP[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(2): 473-478.
- [17] Laybutt R, Preston A, Akerfeldt M, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta-cell apoptosis in type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2006, 55(1): A58.
- [18] Liu M, Hodish I, Rhodes CJ, et al. Proinsulin maturation, misfolding, and proteotoxicity[J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 2007, 104(40): 15841-15846.
- [19] Babaya N, Nakayama M, Moriyama H, et al. A new model of insulin-deficient diabetes: male NOD mice with a single copy of Ins1 and no Ins2[J]. *Diabetologia*, 2006, 49(6): 1222-1228.
- [20] Leroux L. Compensatory responses in mice carrying a null mutation for Ins1 or Ins2 [J]. *Diabetes*, 2001, 50(90001): S150-S153.
- [21] Araki E, Oyadomari S, Mori M. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus[J]. *Exp Biol Med (May-wood)*, 2003, 228(10): 1213-1217.
- [22] Mori K. Tripartite management of unfolded protein in the endoplasmic reticulum[J]. *Cell*, 2000, 101(5): 451-454.
- [23] Harding HP, Zhang YH, Bertolotti A, et al. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response[J]. *Mol Cell*, 2000, 5(5): 897-904.
- [24] Bertolotti A, Zhang YH, Hendershot LM, et al. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(6): 326-332.
- [25] Biden TJ, Boslem E, Chu KY, et al. Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, beta cell failure, and type 2 diabetes mellitus[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(8): 389-398.
- [26] Teodoro-Morrison T, Schuiki I, Zhang L, et al. GRP78 overproduction in pancreatic beta cells protects against high-fat-diet-induced diabetes in mice[J]. *Diabetologia*, 2013, 56(5): 1057-1067.
- [27] Yamagishi N, Ueda T, Mori A, et al. Decreased expression of endoplasmic reticulum chaperone GRP78 in liver of diabetic mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(1): 364-370.
- [28] Ladiges WC, Knoblaugh SE, Morton JF, et al. Pancreatic beta-cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58 (IPK)[J]. *Diabetes*, 2005, 54(4): 1074-1081.

(收稿日期: 2014-11-16)

(上接第 102 页)

- 2011, 34(5): E110-E114.
- [15] Ma Y, Tucker KL, Smith CE, et al. Lipoprotein lipase variants interact with polyunsaturated fatty acids for obesity traits in women: replication in two populations[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2014, 24(12): 1323-1329.
- [16] Nicklas BJ, Ferrell RE, Rogus EM, et al. Lipoprotein lipase gene variation is associated with adipose tissue lipoprotein lipase activity, and lipoprotein lipid and glucose concentrations in overweight postmenopausal women[J]. *Hum Genet*, 2000, 106(4): 420-424.
- [17] Jemaa R, Tuzet S, Portos C, et al. Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with hypertriglyceridemia and body mass index in obese people[J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1995, 19(4): 270-274.
- [18] Shirakawa T, Nakajima K, Yatsuzuka S, et al. The role of circulating lipoprotein lipase and adiponectin on the particle size of remnant lipoproteins in patients with diabetes mellitus and metabolic syndrome[J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 440: 123-132.
- [19] 王娟, 胡耀敏, 刘学荣, 等. Asn291Ser 和 Lys312InsC 联合突变脂蛋白脂酶蛋白功能研究[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2010, 26(2): 150-152.
- [20] 金晶, 胡耀敏, 李圣贤, 等. 脂蛋白脂酶基因敲除小鼠糖脂代谢及胰岛素敏感性研究[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2011, 27(5): 427-429.
- [21] 金晶, 胡耀敏, 李圣贤, 等. 脂蛋白脂肪酶基因敲除小鼠糖脂代谢与脂肪组织内质网应激研究[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2011, 31(4): 401-405.
- [22] 黄融, 范竹萍, 陈雅文, 等. 三酰甘油对糖耐量正常的 2 型糖尿病家系一级亲属代谢状况的影响研究[J]. *中国全科医学*, 2012, 15(19): 2160-2162.
- [23] Ding YL, Wang YH, Huang W, et al. Glucose intolerance and decreased early insulin response in mice with severe hypertriglyceridemia [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2010, 235(1): 40-46.
- [24] Qi Y, Liu J, Wang W, et al. The HindIII polymorphism in the lipoprotein lipase gene predicts type 2 diabetes risk among Chinese adults[J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(13-14): 1229-1233.
- [25] Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis [J]. *Circulation*, 1999, 99(22): 2901-2907.
- [26] Saika Y, Sakai N, Takahashi M, et al. Novel LPL mutation (L303F) found in a patient associated with coronary artery disease and severe systemic atherosclerosis[J]. *Eur J Clin Invest*, 2003, 33(3): 216-222.
- [27] Moennig G, Wiebusch H, Enbergs A, et al. Detection of missense mutations in the genes for lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in patients with dyslipidemia undergoing coronary angiography[J]. *Atherosclerosis*, 2000, 149(2): 395-401.

(收稿日期: 2014-11-03)