

· 论著 ·

高糖、高脂对 2 型糖尿病单个核细胞内信号蛋白 RasGRP4 表达的影响

黄帅 赵建彤 周赛君 于珮

天津医科大学朱宪彝纪念医院, 天津市内分泌研究所, 国家卫健委激素与发育重点实验室, 天津市代谢性疾病重点实验室 300134

通信作者: 于珮, Email: peiyu@tmu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨高糖、高脂对 2 型糖尿病 (T2DM) 患者外周血单个核细胞 (PBMCs) 中 Ras 鸟苷酸释放蛋白 4 (RasGRP4) 表达水平的影响。**方法** 纳入 2016 年 8 月至 2017 年 2 月于天津医科大学朱宪彝纪念医院住院的 T2DM 患者 120 例 (T2DM 组) 和年龄、性别相匹配的健康志愿者 50 例 (NC 组), 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 检测受试者 PBMCs 中 RasGRP4 及其变异体 mRNA 的表达情况。采用双变量相关分析和多元线性回归分析糖尿病病程及主要临床指标与 RasGRP4 及其变异体 mRNA 表达水平之间的关系。采用不同浓度葡萄糖 (低糖: 5.5 mmol/L, 高糖: 12.5 mmol/L 和 25 mmol/L)、不同浓度的棕榈酸 (低脂: 0.2 mmol/L, 高脂: 0.5 mmol/L) 及高糖高脂 (25 mmol/L 葡萄糖 + 0.5 mmol/L 棕榈酸) 分别处理人单核细胞系 (THP-1) 细胞 6、12 和 24 h, 采用 RT-qPCR 技术检测 RasGRP4 及其变异体 mRNA 的水平, 采用蛋白质免疫印迹技术 (Western blot) 检测 RasGRP4 蛋白表达情况。**结果** 与 NC 组相比, T2DM 组 PBMCs 中 RasGRP4 mRNA 及其变异体 a、b、c、d、f 和 g 的 mRNA 水平均升高 ($t = 4.308, 5.432, 5.654, 5.931, 4.018, 3.958, 5.073$, 均 $P < 0.05$), 而变异体 e 的 mRNA 水平下降 ($t = -3.821, P < 0.05$)。双变量相关分析显示 T2DM 组 RasGRP4 mRNA 水平与病程、血清甘油三酯 (TG)、超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP)、糖化血红蛋白 A1c (HbA1c) 呈正相关 ($r = 0.973, 0.237, 0.472, 0.245$, 均 $P < 0.05$); 多元线性回归分析显示 T2DM 病程和 HbA1c 是主要影响因素。高糖、高脂可促进 THP-1 细胞表达 RasGRP4, 且高糖、高脂同时干预对 RasGRP4 表达的影响具有明显的协同促进作用。**结论** T2DM 患者 PBMCs 内信号蛋白 RasGRP4 高表达且出现变异体, 慢性高血糖、高血脂可能是激活 RasGRP4 及其变异体产生的重要因素。

【关键词】 外周血单个核细胞; 2 型糖尿病; Ras 鸟苷酸释放蛋白 4

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (81600643); 天津市自然科学基金 (17JCYBJC27000); 天津市卫生健康科技项目 (ZC20128); 天津市卫生健康科技项目 (RC20175); 天津市研究生科研创新项目 (2019YJSS187)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121383-20210125-01074

Effects of high glucose and high lipid on the expression of signaling protein RasGRP4 in mononuclear cells of type 2 diabetes mellitus Huang Shuai, Zhao Jiantong, Zhou Saijun, Yu Pei. NHC Key Laboratory of Hormones and Development, Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Chu Hsien-I Memorial Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300134, China

Corresponding author: Yu Pei, Email: peiyu@tmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of high glucose and high lipid on the expression of Ras guanine nucleotide-releasing protein-4 (RasGRP4) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** From August 2016 to February 2017, a total of 120 T2DM patients (T2DM group) who were hospitalized in the Metabolic Disease Hospital of Tianjin Medical University and 50 healthy volunteers (NC group) were included. The mRNA expression of RasGRP4 and its variants of PBMCs were determined by quantitative real-time PCR (RT-qPCR). Bivariate correlation analysis and multivariate linear regression analysis were performed to investigate the relationship between the course of disease and primary clinical indicators and the mRNA expression levels of RasGRP4 and its vari-

ants. THP-1 cells were treated with different concentrations of glucose (low glucose: 5.5 mmol/L, high glucose: 12.5 mmol/L and 25 mmol/L), different concentrations of palmitic acid (low lipid: 0.2 mmol/L, high lipid: 0.5 mmol/L) and high glucose with high lipid (25 mmol/L glucose + 0.5 mmol/L palmitic acid) for 6 h, 12 h and 24 h, respectively. RT-qPCR was used to detect the mRNA levels of RasGRP4 and its variants. Western Blot was used to detect the protein expression level of RasGRP4. **Results** Compared with NC group, the mRNA levels of RasGRP4 and its variants a, b, c, d, f and g in PBMC of T2DM group were significantly increased ($t=4.308, 5.432, 5.654, 5.931, 4.018, 3.958, 5.073$, all $P<0.05$), while the mRNA level of variant e was decreased ($t=-3.821, P<0.05$). Bivariate correlation analysis showed that RasGRP4 mRNA level was positively correlated with disease course, serum triglyceride (TG), hypersensitivity C protein (hs-CRP) and HbA1c in T2DM group ($r=0.973, 0.237, 0.472, 0.245$, all $P<0.05$). Multiple linear regression analysis suggested that the course of T2DM and HbA1c were the main factors influencing the expression of RasGRP4. The expression of RasGRP4 in THP-1 cells was promoted under high glucose or high lipid condition, and the effect of high glucose with high lipid on the expression of RasGRP4 had a synergistic effect. **Conclusion** Signal protein RasGRP4 and its variants are highly expressed in PBMCs of T2DM patients. Chronic hyperglycemia and hyperlipidemia may be critical factors that activate RasGRP4 and induce the production of its variants.

【Keywords】 Peripheral blood mononuclear cells; Type 2 diabetes mellitus; Ras guanine nucleotide-releasing protein-4

Fund program: National Science Foundation for Young Scientists of China (81600643); Tianjin Natural Science Foundation of China (17JCYBJC27000); Tianjin Health Science and Technology Project (ZC20128); Tianjin Health Science and Technology Project (RC20175); Tianjin Research Innovation Project for Postgraduate Students (2019YJSS187)

DOI:10.3760/cma.j.cn121383-20210125-01074

2 型糖尿病 (T2DM) 是一种发病率逐年上升的慢性代谢性疾病,各种糖尿病并发症的发生给全世界人民健康和社会经济带来极大的负担^[1]。目前 T2DM 已被公认是一种系统性炎症性疾病,这种慢性低度炎症反应以多种免疫细胞和炎症因子介导为主要特征^[2]。糖尿病糖脂代谢紊乱,介导免疫细胞内代谢重编程,导致异常代谢产物在细胞内蓄积,从而导致各类免疫细胞功能失调,分泌大量炎症细胞因子和趋化因子,进一步促进机体慢性炎症反应状态^[3]。

Ras 鸟苷酸释放蛋白 (RasGRP) 家族是鸟苷酸交换因子 (GEFs) 中的一员,该家族蛋白可使 Ras 蛋白由无活性的 Ras-GDP 形式转变为有活性的 Ras-GTP 形式, Ras 属于小 GTP 酶,被认为是一种分子开关,通过调节细胞内多种信号通路的启闭,调控细胞增殖、发育及分化、凋亡和基因表达等^[4]。RasGRP4 是近年来由美国科学家发现的 RasGRP 家族的新成员,目前研究发现, RasGRP4 表达于外周血单个核细胞 (PBMCs) 中^[5-6],且 RasGRP4 信号蛋白异常表达与多种免疫炎症性疾病的发生相关^[7-9]。信号蛋白 RasGRP4 是否在糖尿病慢性炎症反应中起作用尚不明确。本研究探讨 T2DM 患者 PBMCs 内 RasGRP4

的表达情况,以及高糖、高脂对该信号蛋白表达的影响,以期防治代谢性炎症反应提供新思路。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2016 年 8 月至 2017 年 2 月于天津医科大学朱宪彝纪念医院住院治疗的 T2DM 患者 120 例作为 T2DM 组,其中男性 66 例,女性 54 例,平均年龄 (57.1 ± 12.04) 岁。另外选取年龄、性别相匹配的健康志愿者 50 例作为对照组 (NC 组)。T2DM 诊断参考 1999 年世界卫生组织糖尿病诊断标准。本研究经天津医科大学朱宪彝纪念医院伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。人单核细胞系 (THP-1) 由天津医科大学基础医学院免疫系牛文彦教授惠赠。

1.2 研究方法

1.2.1 主要试剂 低糖及高糖 DMEM 培养基、RP-MI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司、胎牛血清 (FBS) 购自以色列 BI 公司,红细胞裂解液、人全血 PBMCs 分离液 (Ficoll) 购自北京索莱宝生物科技有限公司, Trizol 总 RNA 抽提试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司、BCA 蛋白浓度测定试剂盒

购自上海碧云天生物技术有限公司, 兔抗人 RasGRP4 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司, 鼠抗 β -actin 单克隆抗体购自天津三箭生物技术有限公司。PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

采用德国 Byer 公司的全自动生化分析仪检测各项血清生化指标, 葡萄糖氧化酶法检测空腹静脉血糖, 高压液相法检测糖化血红蛋白 A1c(HbA1c)。

1.2.2 两组 PBMCs 的分离提取 所有研究对象在清晨空腹抽取肘正中静脉血, 置入乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝无菌管中, Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMCs。

1.2.3 细胞培养 用含有 10% FBS、RPMI 1640 培养基, 在 37℃, 5% CO₂ 的细胞培养箱中用悬浮细胞培养皿培养 THP-1 细胞。根据细胞状态每 3~4 d 更换培养液或传代 1 次, 必要时更换 15% FBS 的 RPMI 1640 培养基促进细胞增殖。

1.2.4 细胞实验分组 于对数生长期收获细胞, 使细胞达到同步化以后采用不同浓度的葡萄糖及不同

浓度的棕榈酸^[10-11]培养基处理细胞, 设置分组如下: 低糖(LG, 5.5 mmol/L 葡萄糖), 高糖 1(HG1, 12.5 mmol/L 葡萄糖), 高糖 2(HG2, 25 mmol/L 葡萄糖), 低脂(LL, 0.2 mmol/L 棕榈酸), 高脂(HL, 0.5 mmol/L 棕榈酸), HG2 + HL(25 mmol/L 葡萄糖 + 0.5 mmol/L 棕榈酸), 调整每孔细胞浓度为 1×10^6 /ml, 恒温培养箱中分别培养 6、12、24 和 48 h。

1.2.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR) 检测 RasGRP4 及其变异体 mRNA 表达 按照 Trizol 法提取细胞总 RNA, 采用紫外分光光度法测定 RNA 在 260 和 280 nm 的吸光度, 计算 RNA 含量, 逆转录合成 cDNA。PCR 引物序列见表 1。PCR 反应体系为 20 μ l, 反应条件: 预变性, 95℃, 3 min, 1 次循环; PCR 反应, 95℃ 5 s, 60℃ 20 s, 35~40 次循环; 溶解曲线分析: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃, 15 s, 60℃, 15 s, 1 次循环。计算并比较各指标的相对表达量, 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。Ct 值为 PCR 仪器测量荧光的阈值循环数。 ΔCt = 目的基因的 Ct 值 - 内参基因(GAPDH)的 Ct 值。

表 1 目的基因及内参基因引物序列

基因名称	引物序列
<i>RasGRP4</i>	上游引物: 5'TCACCTTCCGAAAGCCTACCG3' 下游引物: 5'CTACCTTCACCTGGTCTCTGC3'
<i>RasGRP4</i> 变异体 a	上游引物: 5'CCCCACTCCCAATGAGCAG3'(661, 679) 下游引物: 5'CCGTCTCCAAGTGGTCGAAA3'(735, 716)
<i>RasGRP4</i> 变异体 b	上游引物: 5'ACTCTTCTGACCTCCCAGGC3'(625, 644) 下游引物: 5'CTCGTACTGAGCCCTGCAAA3'(792, 773)
<i>RasGRP4</i> 变异体 c	上游引物: 5'CTGACAGCACCAGCTCTCC3'(1069, 1088) 下游引物: 5'ACCACCAGAGTGCATTGAA3'(1195, 1176)
<i>RasGRP4</i> 变异体 d	上游引物: 5'GACTCAAGGACTCCCATGCC3'(1039, 1058) 下游引物: 5'AGGTGCAGCAGATCCTCATT3'(1144, 1125)
<i>RasGRP4</i> 变异体 e	上游引物: 5'TCACGGTGATGGTGTGAG3'(787, 805) 下游引物: 5'GGCATGGGAGTCCCTTGAGTC3'(956, 937)
<i>RasGRP4</i> 变异体 f	上游引物: 5'CTCCAGGCTATCACGCTCT3'(776, 795) 下游引物: 5'ACCACCAGAGTGCATTGAA3'(904, 885)
<i>RasGRP4</i> 变异体 g	上游引物: 5'GCGCAAAGTGTCTTGCTTT3'(698, 717) 下游引物: 5'TGCATTCTGTGGGACTTC3'(837, 818)
<i>GAPDH</i>	上游引物: 5'CTCCTCCACCTTGACGCTG3' 下游引物: 5'TCCTCTGTGCTCTTGCTGG3'

注: RasGRP4: Ras 鸟苷酸释放蛋白 4; GAPDH: 3-磷酸甘油醛脱氢酶

1.2.6 蛋白质免疫印迹技术(Western blot) 检测 RasGRP4 蛋白的表达 取干预后的 THP-1 细胞, 收集至 2 ml 离心管, 离心后加磷酸盐缓冲液(PBS)重悬, 用 PBS 清洗 3 遍后, 加入裂解液, 充分裂解后移入 1.5 ml EP 管中, 4℃, 12 000 r/min, 离心 10 min, 取上清分装于 0.5 ml 离心管中并置于 -80℃ 保存。

采用 BCA 法测定总蛋白浓度, 取 10 μ l 蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 一抗(1:1 000)于 4℃ 孵育过夜, TBST 漂洗 10 min, 共 3 次, 二抗(1:4 000)室温孵育 1 h, TBST 洗膜 10 min, 共 3 次, 电化学发光化学(ECL)发光法显色, 扫描仪记录实验结果。

应用 Image J 软件分析目的蛋白 (RasGRP4) 及内参蛋白 (β -actin) 灰度值, 计算相对灰度值。

1.2.7 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较两组间数据采用独立样本 t 检验分析, 比较多组间数据采用单因素方差分析。采用 Pearson 相关分析两个符合正态分布计量资料的相关性, 采用 Spearman 相关分析非正态分布计量资料的相关性。采用多元线性回归分析连续性计量资料与多个计量资料间的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般临床资料比较 统计结果显示 T2DM 组与 NC 组性别与年龄比较差异无统计学意义。与 NC 组相比, T2DM 组直接胆红素 (DBIL)、甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、血尿素氮 (BUN)、空腹血糖 (FBG)、HbA1c、超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 和体重指数 (BMI) 明显升高, 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 明显下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 两组间谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GGT)、血清肌酐 (SCr)、尿酸 (UA) 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 T2DM 组与 NC 组临床资料比较 ($\bar{x} \pm s, n$)

项目	NC 组 ($n=50$)	T2DM 组 ($n=120$)
性别 (男/女)	27/23	66/54
年龄 (岁)	51.7 \pm 6.01	57.1 \pm 12.04
ALT (IU/L)	20.43 \pm 4.91	22.09 \pm 7.31
AST (IU/L)	19.70 \pm 3.51	20.15 \pm 4.37
γ -GGT (IU/L)	26.05 \pm 5.88	29.46 \pm 7.86
DBIL (μ mol/L)	2.67 \pm 0.82	4.38 \pm 2.29 ^b
TG (mmol/L)	1.15 \pm 0.58	2.19 \pm 1.19 ^a
TC (mmol/L)	4.63 \pm 0.79	5.31 \pm 1.16 ^a
HDL-C (mmol/L)	1.40 \pm 0.37	1.01 \pm 0.33 ^b
LDL-C (mmol/L)	1.71 \pm 0.88	3.01 \pm 1.37 ^b
BUN (mmol/L)	4.85 \pm 1.27	5.74 \pm 1.45 ^a
SCr (μ mol/L)	66.27 \pm 11.28	72.54 \pm 13.45
UA (μ mol/L)	311.80 \pm 70.39	316.94 \pm 77.64
FBG (mmol/L)	5.26 \pm 0.59	8.01 \pm 1.39 ^a
HbA1c (%)	5.31 \pm 0.35	8.5 \pm 1.59 ^b
hs-CRP (mg/L)	1.06 \pm 0.30	2.95 \pm 0.42 ^b
BMI (kg/m ²)	21.65 \pm 2.34	24.73 \pm 3.59 ^a
病程 (年)	0.00	10.35 \pm 6.47 ^b

注: ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶; γ -GGT: γ -谷氨酰转肽酶; DBIL: 直接胆红素; TG: 甘油三酯; TC: 总胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; BUN: 血尿素氮; SCr: 血清肌酐; UA: 尿酸; FBG: 空腹血糖; HbA1c: 糖化血红蛋白 A1c; hs-CRP: 超敏 C 反应蛋白; BMI: 体重指数; 与 NC 组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

2.2 两组 PBMCs 中 RasGRP4 及其变异体 mRNA 表达水平比较 与 NC 组相比, T2DM 组 PBMCs 的 RasGRP4 mRNA 及其变异体 a、b、c、d、f 和 g 的 mRNA 水平均升高, 而变异体 e 的 mRNA 水平下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1A、图 1B)。

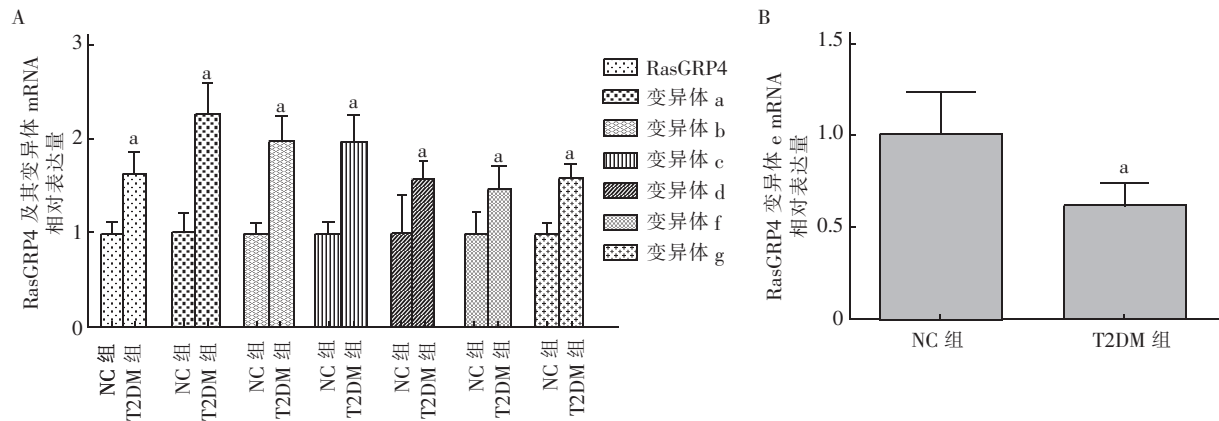
2.3 T2DM 组 PBMCs 中 RasGRP4 及其变异体 mRNA 水平的影响因素分析 双变量相关分析结果显示, T2DM 组 RasGRP4 mRNA 水平与病程 ($r = 0.973$, $P < 0.01$)、TG ($r = 0.237$, $P = 0.035$)、hs-CRP ($r = 0.472$, $P < 0.01$)、HbA1c ($r = 0.245$, $P < 0.01$) 呈正相关。多元线性回归分析结果显示, 病程和 HbA1c 是主要 T2DM 患者 PBMCs 中 RasGRP4 及其变异体 mRNA 水平的影响因素 (表 3)。

表 3 T2DM 患者 RasGRP4 mRNA 水平相关因素的

多元线性回归分析				
项目	B	标准误差	β	P 值
常量	7.756	2.785	—	0.018
病程	0.386	0.127	0.825	0.011
HbA1c	0.558	0.383	0.213	0.039

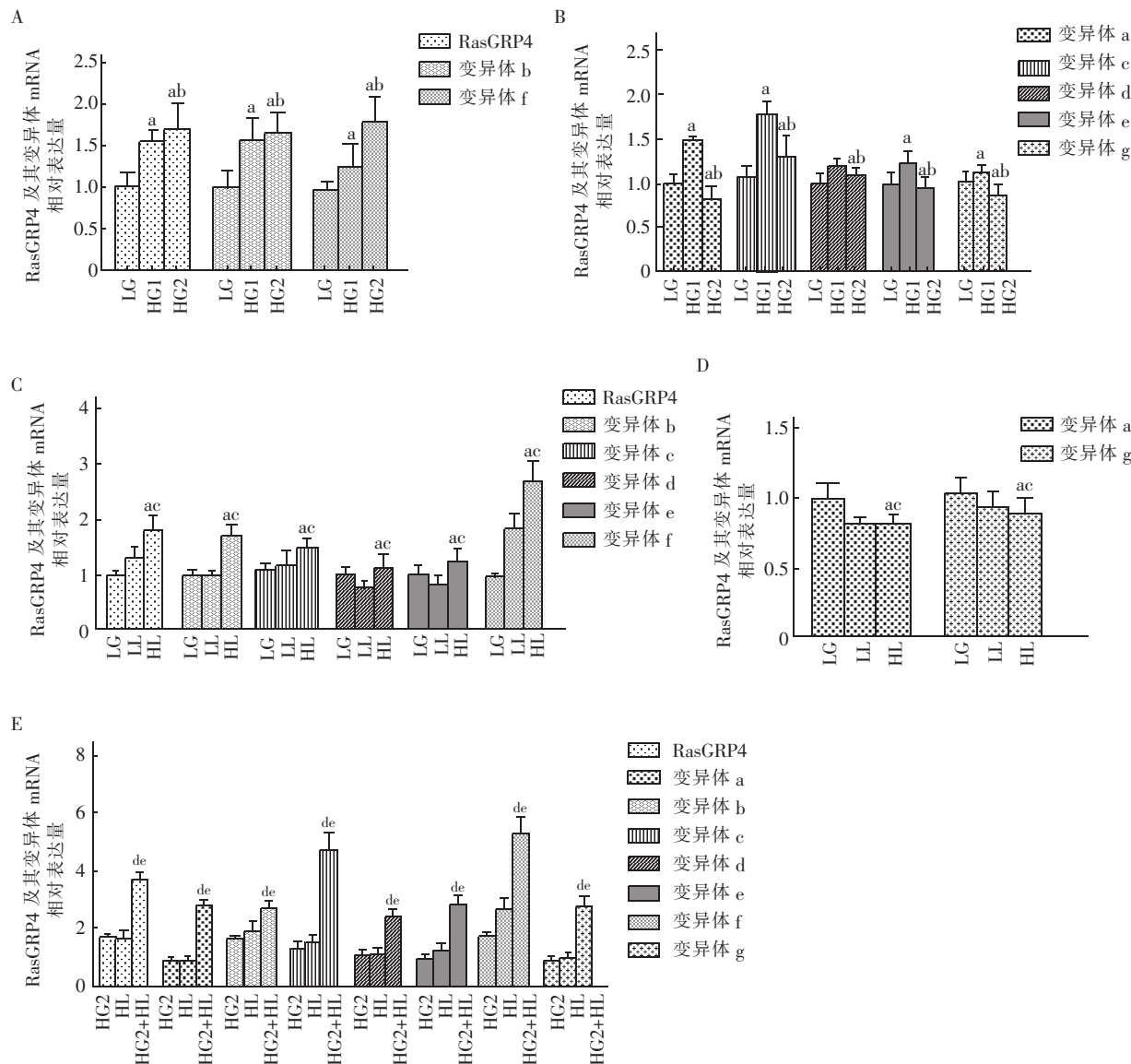
注: T2DM: 2 型糖尿病; RasGRP4: Ras 鸟苷酸释放蛋白 4; HbA1c: 糖化血红蛋白 A1c

2.4 高糖高脂干预 THP-1 细胞后 RasGRP4 及其变异体 mRNA 的表达水平 RT-qPCR 结果显示: (1) 高糖可促进 THP-1 细胞 RasGRP4 及其变异体 b 和 f mRNA 的表达, 且具有葡萄糖浓度依赖性 (图 2A), 而对 RasGRP4 变异体 a、c、d、e 和 g 的作用是使其先升高后降低 (图 2B); 高脂可促进 THP-1 细胞 RasGRP4 及其变异体 b、c、d、e 和 f mRNA 的表达 (图 2C), 但抑制变异体 a 和 g mRNA 的表达 (图 2D); 高糖高脂同时干预可使细胞 RasGRP4 及其变异体 a-g mRNA 的表达明显增高 (图 2E)。(2) 高糖高脂分别干预 THP-1 细胞 6、12、24 h 后的 RT-qPCR 结果显示, 高糖组 (25 mmol/L 葡萄糖) 干预 24 h 后细胞 RasGRP4 mRNA 的相对表达量最高, 而高脂和高糖高脂同时干预后对细胞 RasGRP4 mRNA 的影响具有时间依赖性, 即随着干预时间的延长其相对表达量呈上升趋势 (图 3A)。高糖、高脂干预 12 h 后 THP-1 细胞 RasGRP4 变异体 e mRNA 的相对表达量最高 (图 3B)。高糖组干预 24 h 后 THP-1 细胞 RasGRP4 变异体 g mRNA 的相对表达量最高; 高脂组干预 24 h 后 RasGRP4 变异体 g mRNA 的相对表达量最高; 高糖高脂组干预后对细胞 RasGRP4 变异体 g mRNA 表达的影响具有时间依赖性 (图 3C)。



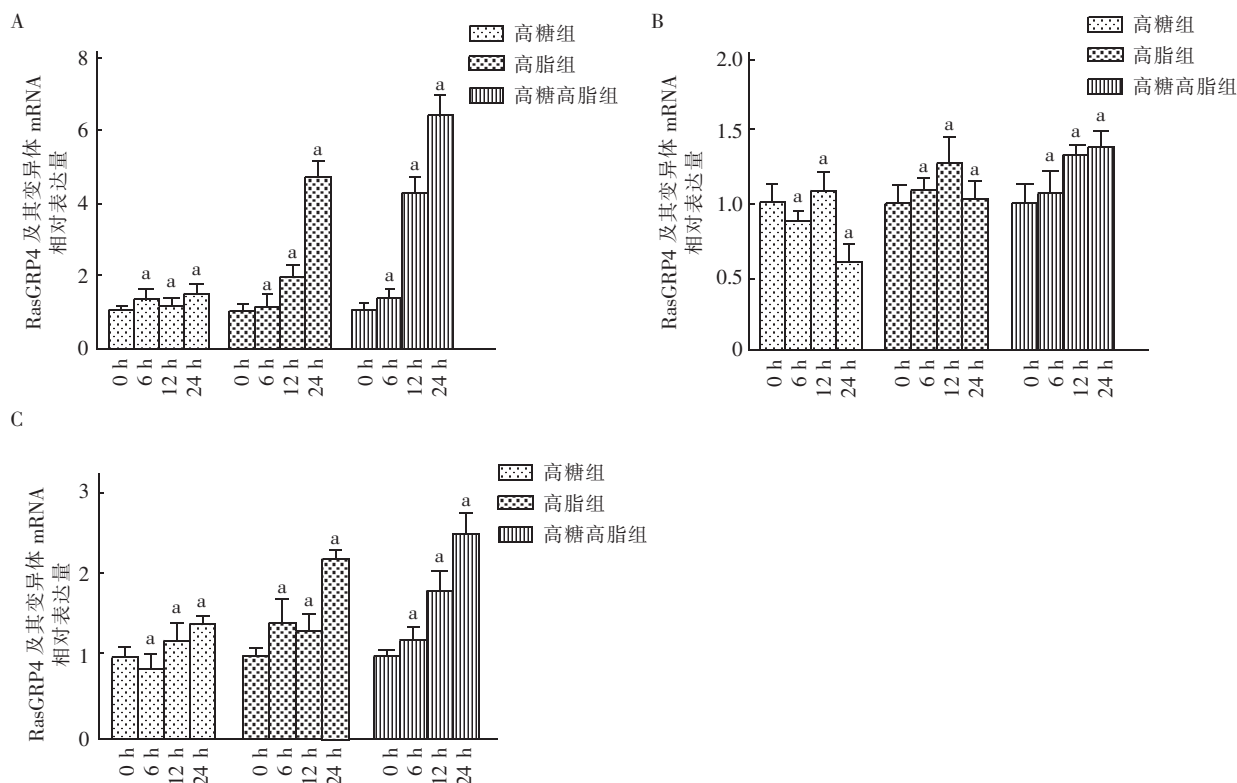
注: NC 组: 对照组; T2DM: 2 型糖尿病组; PBMCs: 单个核细胞; RasGRP4: Ras 鸟苷酸释放蛋白 4; A: NC 组与 T2DM 组 RasGRP4 及变异体 a-d、f、g mRNA 相对表达量; B: NC 组与 T2DM 组 RasGRP4 变异体 e mRNA 相对表达量; 与 NC 组比较, * $P < 0.05$

图 1 NC 组与 T2DM 组 PBMCs 的 RasGRP4 及变异体 mRNA 相对表达量



注: RasGRP4: Ras 鸟苷酸释放蛋白; THP-1: 单核细胞系-1; LG: 低糖 (5.5 mmol/L); HG1: 高糖 (12.5 mmol/L); HG2: 高糖 (25 mmol/L); LL: 低脂 (0.2 mmol/L); HL: 高脂 (0.5 mmol/L); HG2+HL: 高糖高脂 (25 mmol/L 葡萄糖+0.5 mmol/L 棕榈酸); 与 LG 组相比, * $P < 0.05$; 与 HG1 组相比, ^b $P < 0.05$; 与 LL 组相比, ^c $P < 0.05$; 与 HG2 组相比, ^d $P < 0.05$; 与 HL 组相比, ^e $P < 0.05$

图 2 高糖高脂干预 THP-1 细胞 24 h 后 RasGRP4 及其变异体 mRNA 表达水平变化

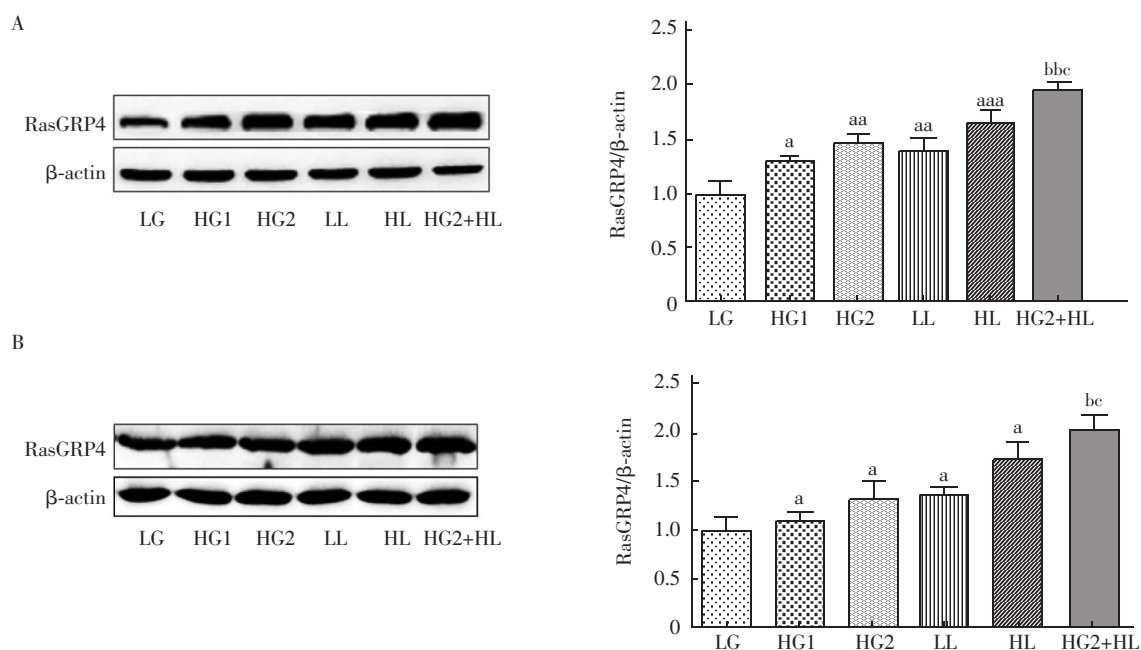


注: THP-1; 单核细胞系-1; RasGRP4; Ras 鸟苷酸释放蛋白 4; 与 0 h 比较, ^a $P < 0.05$; h: 干预小时数

图 3 高糖高脂干预 THP-1 细胞不同时间点(0、6、12、24 h)对 RasGRP4 及其变异体 mRNA 表达水平的影响

2.5 高糖高脂干预 THP-1 细胞后 RasGRP4 蛋白的变化情况 高糖、高脂以及高糖联合高脂分别干预 THP-1 细胞 24、48 h 后, 与低糖组相比, 高糖、高脂处

理可促进 THP-1 细胞 RasGRP4 蛋白的表达, 且具有时间和浓度依赖性(图 4A、4B)。



注: THP-1; 单核细胞系-1; RasGRP4; Ras 鸟苷酸释放蛋白 4; LG: 低糖(5.5 mmol/L); HG1: 高糖(12.5 mmol/L); HG2: 高糖(25 mmol/L); LL: 低脂(0.2 mmol/L); HL: 高脂(0.5 mmol/L); HG2+HL: 高糖高脂(25 mmol/L 葡萄糖+0.5 mmol/L 棕榈酸); 与 LG 相比, ^a $P < 0.05$; 与 HG2 相比, ^b $P < 0.05$; 与 HL 相比, ^c $P < 0.05$

图 4 高糖高脂干预 THP-1 细胞 24 和 48 h 后 RasGRP4 蛋白表达情况

3 讨论

T2DM 已成为威胁人类健康的全球性公共卫生问题,且其发病率和死亡率逐年上升,因此,寻找有效防治T2DM的干预靶点是目前临床亟待解决的关键问题。T2DM的病因和发病机制错综复杂,目前普遍接受的观点是慢性炎症反应在T2DM及其并发症的发病进程中扮演重要角色^[12-14]。研究表明,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、 γ -干扰素 (IFN- γ) 等促炎性细胞因子以自分泌和旁分泌的方式干扰外周组织中的胰岛素信号,或诱导胰岛 β 细胞不同程度的功能障碍,进而导致胰岛素的缺乏^[15]。大量人群试验表明,血清炎性因子水平与T2DM相关并发症(包括糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变及心血管病变等)的进展密切相关^[16-17]。部分临床研究表明,应用细胞因子中和抗体治疗可以减轻糖尿病患者机体炎性反应水平,进而改善血糖控制情况^[18-19]。但是由于针对炎性因子中和治疗的人群研究范围的受限,应用抗炎策略治疗代谢性疾病的临床试验数据相对较少,抗炎治疗措施在人群中获益有限,这表明针对上游分子的靶向治疗可能是更有效的治疗方法^[20]。因此如何有选择地特异性抑制上游信号分子进行抗炎治疗,同时保证对机体免疫系统没有不利影响,是目前糖尿病抗炎治疗面临的关键问题。

Ras 蛋白是一类小分子 GTPases 蛋白,参与多种细胞内信号传递的网络系统,影响下游的信号通路,从而发挥不同的作用。基因敲除小鼠相关试验研究证明,特异性调节 Ras 蛋白信号通路中的相关蛋白激酶可以有效改善葡萄糖稳态,预防肥胖、胰岛素抵抗和糖尿病的发生^[21]。笔者前期研究发现,信号蛋白RasGRP4基因敲除小鼠在脂多糖 (LPS) 刺激下白细胞介素-6 (IL-6)、IFN- γ 等炎性因子的分泌出现缺陷,提示信号蛋白RasGRP4在调节炎症反应反应中具有关键作用^[22]。据此推测,在糖尿病状态高糖、高脂的环境中,参与调控炎症反应的信号蛋白RasGRP4及其变异体表达可能增加。故本研究首先检测了T2DM患者PBMCs内信号蛋白RasGRP4的表达情况及其变异体的表达水平,结果发现,与健康对照组相比,T2DM组PBMCs中RasGRP4 mRNA水平明显升高 ($P < 0.05$)。且PBMCs内RasGRP4的表达量与T2DM患者血清炎性反应标志物hsCRP呈显著正相关,该结果提示T2DM患者 PBMCs 内RasGRP4的表达异常以及RasGRP4变异体的形成,可能在糖尿

病慢性炎症反应中发挥重要作用。此外,我们发现RasGRP4表达水平与 TG、HbA1c以及糖尿病病程显著相关。这提示,高血糖、高 TG 血症可能是导致RasGRP4异常表达的原因。

本研究在证实 T2DM 患者PBMCs内信号蛋白RasGRP4表达异常的基础上,为进一步揭示高糖、高脂对PBMCs内信号蛋白RasGRP4表达以及变异体产生的影响,以及高糖、高脂对信号蛋白RasGRP4的影响是否有协同作用,采用高糖、高脂和高糖联合高脂处理THP-1细胞。结果显示:高糖、高脂干预THP-1细胞可促进信号蛋白RasGRP4的表达,且该促进作用分别具有浓度依赖性和时间依赖性,提示慢性高血糖、高血脂可能是激活RasGRP4及其变异体产生的重要因素。

综上所述,T2DM 患者PBMCs内RasGRP4异常表达可能参与T2DM慢性炎症反应过程,且高血糖、高血脂可导致RasGRP4的异常表达。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(2): 88-98. DOI: 10.1038/nrendo.2017.151.
- [2] Prasad M, Chen EW, Toh SA, et al. Autoimmune responses and inflammation in type 2 diabetes [J]. J Leukoc Biol, 2020, 107(5): 739-748. DOI: 10.1002/JLB.3MR0220-243R.
- [3] Zatterale F, Longo M, Naderi J, et al. Chronic adipose tissue inflammation linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes [J]. Front Physiol, 2020, 10: 1607. DOI: 10.3389/fphys.2019.01607.
- [4] Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease [J]. Cell, 2017, 170(1): 17-33. DOI: 10.1016/j.cell.2017.06.009.
- [5] Yang Y, Li L, Wong GW, et al. RasGRP4, a new mast cell-restricted Ras guanine nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. Identification of defective variants of this signaling protein in asthma, mastocytosis, and mast cell leukemia patients and demonstration of the importance of RasGRP4 in mast cell development and function [J]. J Biol Chem, 2002, 277(28): 25756-25774. DOI: 10.1074/jbc.M202575200.
- [6] Hashimoto T, Yasuda S, Koide H, et al. Aberrant splicing of the hRasGRP4 transcript and decreased levels of this signaling protein in the peripheral blood mononuclear cells in a subset of patients with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(5): R154. DOI: 10.1186/ar3470.
- [7] Zhu L, Xia C, Wu L, et al. The critical role of RasGRP4 in the growth of diffuse large B cell lymphoma [J]. Cell Commun Signal, 2019, 17(1): 92. DOI: 10.1186/s12964-019-0415-6.

(下转第 246 页)

基因组测试,证实SUCLG2和PPGL有关。对SUCLG2突变病例的研究将进一步阐明SUCLG2和SDH,特别是SDHB之间的关系,以及它们在病因学中的作用。

4 临床病例讨论

4.1 病例 1 – CS 诊断和治疗的复杂性 牛津大学丘吉尔医院Grossman教授等通过分析 1 例ACTH依赖性CS病例,提出临床上典型的库欣面貌、高血皮质醇水平和ACTH不低需高度怀疑ACTH依赖性CS。目前双侧岩下窦取血仍是鉴别ACTH依赖性CS的“金标准”。活动期的CS患者可能死于严重的脓毒症、凝血功能障碍或代谢紊乱,需要加以重视,必要时可进行预防性治疗。随后,他们用3例其他类型的CS(早发的CD、异位ACTH综合征)提出,当皮质醇水平过高,可静脉注射依托咪酯,为后续治疗争取时间。

4.2 病例 2 – 继发性肾上腺皮质功能不全的诊断要点 ACTH兴奋试验是评估肾上腺皮质功能不全的“金标准”。但ACTH兴奋试验对继发性肾上腺皮质功能减退的诊断敏感性为64%。梅奥中心的

Bancos教授等讨论了1例由曲马多(阿片类药物)诱导的继发性肾上腺皮质功能不全病例。该病例有肾上腺皮质功能不全的临床表现,且血皮质醇低、ACTH低、脱氢表雄酮(DHEAS)低,但ACTH兴奋试验正常。因此,临床上血皮质醇低、ACTH低时要考虑继发性肾上腺皮质功能减退。另外也强调了脱氢表雄酮水平的辅助诊断价值。必要时可行隔夜甲吡酮试验、低血糖试验。

4.3 病例 3 – 家族性嗜铬细胞瘤和副神经节瘤综合征 宾夕法尼亚大学Nathanson教授等通过讨论5个家族性嗜铬细胞瘤和副神经节瘤病例,认为基因突变类型决定不同的临床表型,进而指导治疗方式,因此基因检测对家族性嗜铬细胞瘤和副神经节瘤综合征患者至关重要。由于起病年龄较小,故需对有家族史的幼儿进行早期筛查,甚至进行常规监测。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

(收稿日期:2021-04-09)

(本文编辑:刘欣)

(上接第 202 页)

- [8] Kono M, Yasuda S, Stevens RL, et al. Ras guanine nucleotide-releasing protein 4 is aberrantly expressed in the fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis and controls their proliferation [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67 (2): 396-407. DOI: 10.1002/art.38924.
- [9] Adachi R, Krilis SA, Nigrovic PA, et al. Ras guanine nucleotide-releasing protein-4 (RasGRP4) involvement in experimental arthritis and colitis [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (24): 20047-20055. DOI: 10.1074/jbc.M112.360388.
- [10] Higa M, Shimabukuro M, Shimajiri Y, et al. Protein kinase B/Akt signalling is required for palmitate-induced beta-cell lipotoxicity [J]. *Diabetes, Obes Metab*, 2006, 8 (2): 228-233. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2005.00488.x.
- [11] Chen X, Xu S, Wei S, et al. Comparative proteomic study of fatty acid-treated myoblasts reveals role of Cox-2 in palmitate-induced insulin resistance [J]. *Sci Rep*, 2016, 6 (1): 21454. DOI: 10.1038/srep21454.
- [12] 梁书卉, 王阳, 孙续图, 等. 空腹血糖受损人群炎症标志物与胰岛素抵抗、胰岛β细胞功能受损的相关性分析[J]. *天津医科大学学报*, 2020, 26 (3): 266-270.
- [13] Tang SCW, Yiu WH. Innate immunity in diabetic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16 (4): 206-222. DOI: 10.1038/s41581-019-0234-4.
- [14] 张路, 姚平. 炎症因子及氧化应激在糖尿病肾病中的作用[J]. *临床内科杂志*, 2018, 35 (2): 141-142. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9057.2018.02.026.
- [15] Xie K, Xu B, Zhang Y, et al. A multi-method evaluation of the effects of inflammatory cytokines (IL-1β, IFN-γ, TNF-α) on pancreatic β-cells [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233 (12): 9375-9382. DOI: 10.1002/jcp.26518.
- [16] Neelofar K, Arif Z, Arafat MY, et al. A study on correlation between oxidative stress parameters and inflammatory markers in type 2 diabetic patients with kidney dysfunction in north Indian population [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120 (4): 4892-4902. DOI: 10.1002/jcb.27763.
- [17] Fernández-Juárez G, Villacorta Perez J, Luño Fernández JL, et al. High levels of circulating TNFR1 increase the risk of all-cause mortality and progression of renal disease in type 2 diabetic nephropathy [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2017, 22 (5): 354-360. DOI: 10.1111/nep.12781.
- [18] Das AK, Kalra S, Tiwaskar M, et al. Expert Group Consensus Opinion: role of anti-inflammatory agents in the management of type-2 diabetes (T2D) [J]. *J Assoc Physicians India*, 2019, 67 (12): 65-74.
- [19] Ruscitti P, Masedu F, Alvaro S, et al. Anti-interleukin-1 treatment in patients with rheumatoid arthritis and type 2 diabetes (TRACK): a multicentre, open-label, randomised controlled trial [J]. *PLoS Med*, 2019, 16 (9): e1002901. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002901.
- [20] Agrawal S, Maity S, AIRaawi Z, et al. Targeting drugs against fibroblast growth factor(s)-induced cell signaling [J]. *Curr Drug Targets*, 2021, 22 (2): 214-240. DOI: 10.2174/1389450121999201012201926.
- [21] Akan DT, Howes JE, Sai J, et al. Small molecule SOS1 agonists modulate MAPK and PI3K signaling via independent cellular responses [J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14 (3): 325-331. DOI: 10.1021/acscchembio.8b00869.
- [22] 李昕, 于珮, 于德民, 等. 信号蛋白RasGRP4对自然杀伤细胞干扰素-γ分泌的调控作用[J]. *国际内分泌与代谢杂志*, 2018, 38 (6): 374-380. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2018.06.004.

(收稿日期:2021-01-25)

(本文编辑:刘欣)