

文章编号:2095-6134(2015)03-0301-08

Nrf2 抵抗胰岛 β 细胞氧化损伤的作用机制*

宁梦丽, 丁文军, 张 芳[†]

(中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049)

(2014 年 5 月 7 日收稿; 2014 年 5 月 28 日收修稿稿)

Ning M L, Ding W J, Zhang F. Cytoprotective effect of Nrf2 expression on hyperglycemia-induced oxidative stress in pancreatic NIT-1 β -cells[J]. Journal of University of Chinese Academy of Sciences, 2015, 32(3):301-308.

摘 要 长期高血糖导致糖尿病患者的氧化应激,引起胰岛 β 细胞氧化损伤,但核转录因子 Nrf2(NF-E2-related factor 2)抵抗胰岛 β 细胞氧化损伤的作用机制还不清楚.本研究用低浓度葡萄糖(LG, 5.6 mmol/L)、LG + H₂O₂ 和高浓度葡萄糖(HG, 27.6 mmol/L)分别处理小鼠胰岛 NIT-1 β 细胞 48 h,检测细胞内活性氧(ROS, reactive oxygen species)生成、胰岛素合成与分泌变化和 Nrf2 入核表达水平.研究发现,高糖诱导 NIT-1 β 细胞的 ROS 生成,降低细胞合成与分泌胰岛素的水平,但 Nrf2 入核表达降低胰岛 β 细胞氧化应激.结果提示 Nrf2 入核表达可以抵抗高糖诱导的胰岛 β 细胞氧化损伤,改善细胞合成与分泌胰岛素的功能.

关键词 高糖; 胰岛 β 细胞; 氧化应激; Nrf2

中图分类号:587.1 文献标志码:A doi:10.7523/j.issn.2095-6134.2015.03.003

Cytoprotective effect of Nrf2 expression on hyperglycemia-induced oxidative stress in pancreatic NIT-1 β -cells

NING Mengli, DING Wenjun, ZHANG Fang

(College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract It is well known that hyperglycemia results in oxidative stress in diabetes mellitus, which causes pancreatic β cell dysfunction. However, this cytoprotective effect of Nrf2 on hyperglycemia-induced oxidative stress in pancreatic β cell is not fully understood. In the study, reactive oxygen species (ROS) and insulin synthesis and secretion as well as nucleus NF-E2-related factor 2 (Nrf2) expression in NIT-1 β cells were determined after treatment of 48 h with low glucose (LG, 5.5 mmol/L), high glucose (HG, 27.6 mmol/L), or LG plus H₂O₂, respectively. We found that HG significantly induced ROS generation and decreased insulin synthesis and secretion in NIT-1 β cells. However, HG-induced oxidative damage was improved by nucleus NF-E2-related factor 2 (Nrf2) expression. The results suggested that activation of Nrf2 through promotion of nuclear accumulation plays an important role in protection against hyperglycemia-induced oxidative injury.

Key words hyperglycemia; pancreatic β cell; oxidative stress; Nrf2

* 国家自然科学基金(11075207, 21377127)和中国科学院知识创新工程重大项目(KSCX2-EW-J-29)资助

[†] 通信作者, E-mail: zhangfang@ucas.ac.cn

糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢性疾病^[1]. 胰岛 β 细胞功能损伤在糖尿病发病过程中起到关键作用^[2]. 胰岛 β 细胞的主要功能是合成与分泌胰岛素. 正常情况下, 胰岛 β 细胞通过响应机体血糖升高的信号, 合成并分泌胰岛素来调节脂肪和肌肉等组织对葡萄糖的利用, 从而维持机体的血糖平衡. 在糖尿病患者体内胰岛 β 细胞长期受到高糖刺激, 导致其功能受损^[3]. 胰岛 β 细胞的功能受损主要体现在葡萄糖刺激下胰岛素合成与分泌 (GSIS) 能力的下降^[4]. 肌腱膜纤维肉瘤癌基因同系物 A (Maf A)、胰腺十二指肠同源框-1 (*Pdx-1*) 是胰岛 β 细胞中调控胰岛素合成和分泌的主要转录因子, 与胰岛 β 细胞的胰岛素合成相关^[5]. GSIS 功能缺失与胰岛 β 内一系列基因和蛋白表达的改变紧密相关. GSIS 功能的缺失导致胰岛 β 细胞不能及时分泌胰岛素, 血糖不能及时降低, 糖尿病进一步恶化^[6].

人体在高血糖刺激下会产生大量自由基, 造成机体氧化应激^[7]. 氧化应激指机体氧化与还原状态失衡, 倾向于氧化的一种状态^[8]. 细胞在代谢过程中会产生少量活性氧族 (ROS, reactive oxygen species), ROS 的产生会激活细胞内的抗氧化酶清除多余的 ROS, 使得细胞保持在一个氧化还原平衡的状态, 当 ROS 大量产生, 超过细胞的氧化清除能力时, 细胞就会发生氧化应激^[9]. 研究表明, 胰岛组织抗氧化能力比机体其他组织都要弱, 其超氧化物歧化酶 (SOD) 的量是肝脏中的 30% ~ 40%, 谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶仅为肝脏的 5% ~ 15%, 因此胰岛组织更容易受到氧化应激的损伤^[10].

Nrf2/ARE (NF-E2-related factor 2/antioxidant response element) 是细胞内重要的抗氧化信号通路^[11]. Nrf2 是核因子 NF-E2 (nuclear factor erythroid 2) 的相关因子, 广泛存在于肝脏、肾脏等解毒器官和皮肤、呼吸道和消化道等与外界环境直接接触的器官^[12]. 一般情况下, Nrf2 在细胞质内与其负调控蛋白 Keap1 (kelch-like ECH associated protein 1) 结合, 被 Keap1 锚定在细胞骨架蛋白上, 受到泛素化依赖蛋白的降解调节作用而维持在较低的水平^[13]. 当细胞内的活性氧水平升高时, 活性氧能够与 Keap1 结合, 释放 Nrf2 入核, Nrf2 入核后与抗氧化元件 (ARE) 结合, 启动醌氧化还原酶 (NQO-1) 等 II 相抗氧化酶的表

达^[14]. 若细胞 Nrf2 基因被敲除后, 氧化应激引起内质网蛋白的错误折叠^[15]. 但是 Nrf2 在抵抗高糖诱导的胰岛 β 细胞氧化损伤的作用机制还不清楚.

为了探讨 Nrf2 抵抗高糖引起的胰岛 β 细胞氧化损伤的作用机制, 我们首先检测高糖对 NIT-1 胰岛 β 细胞活力、细胞内 ROS 生成、胰岛素合成与分泌的影响, 其次使用抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸 (NAC, N-acetyl-L-cysteine)、Nrf2 激活剂 tBHQ^[16] 和抑制剂鸡胆子苦醇^[17] 研究 Nrf2 在高糖诱导的 ROS 影响胰岛 β 细胞合成与分泌胰岛素的作用机制.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株

小鼠胰岛素瘤细胞 NIT-1 β 细胞由北京大学医学部杨晓达教授惠赠.

1.1.2 试剂与仪器

RPMI 1640 完全培养基、PBS 缓冲液 (加拿大 wisent 公司); RPMI 1640 无糖培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (奥地利 PAA 公司); 细胞培养板 (美国 Nunc 公司); 细胞计数器 (青岛求精计数器有限公司); RNA 逆转录试剂盒 (美国 Promega 公司); Anti-Lam B (美国 Bioworld 公司); Anti-Nrf2 (美国 RND 公司); Tris-base (美国 Amresco 公司); NaCl (国药集团化学试剂北京有限公司); TWEEN、N-乙酰半胱氨酸、tBHQ、D-glucose Anhydrous (美国 sigma 公司); 鸡胆子苦醇 (成都植标化纯生物技术有限公司); 链霉素/青霉素、一抗稀释液、HRP-标记山羊抗兔/抗小鼠二抗、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 (PMSF), 超纯 RNA 提取试剂盒、UltraSYBR Mixture (北京康为世纪生物科技有限公司), Krebs-Ringer HEPES 缓冲液 (北京中生科美生物技术有限公司), 活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (中国碧云天生物技术公司); H_2O_2 (国药集团化学试剂有限公司), 胞核-胞浆蛋白制备试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司); 小鼠胰岛素分泌检测试剂盒 (美国 ALPCO 公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (北京原平皓生物技术有限公司).

CO_2 恒温培养箱 (MCO-15AC, Sanyo, Japan)、酶联免疫检测仪 (MK3, Thermo, USA)、

多功能酶标仪 (TriStar LB 941, Berthold, Germany)、化学发光成像系统(北京原平皓生物技术有限公司)、RT-PCR (Mx3000P, Stratagene, USA).

1.2 实验方法

1.2.1 胰岛素测定

NIT-1 β 细胞用 RPMI 完全培养基(含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素和 10 μ g/mL 链霉素),在饱和湿度,5% CO₂ 和 37 $^{\circ}$ C 恒温条件下培养.待细胞密度达到 80%,以 2.0 \times 10⁵/孔的细胞密度将细胞接种于 6 孔细胞培养板.将 D-葡萄糖溶液加入 RPMI 1640 无糖培养基配制低糖(LG, 5.6 mmol/L)与高糖(HG, 27.6 mmol/L)培养基.待细胞稳定培养 24 h 后,分别加入低糖、高糖、低糖 + H₂O₂ (50 μ mol/L),高糖 + NAC (5 mmol/L)、高糖 + tBHQ (20 μ mol/L)、高糖 + Brusatol (120 nmol/L) 处理 48 h (后面实验处理相同).PBS 清洗细胞 3 遍,Krebs-Ringer HEPES 缓冲液预培养 1 h.用含有 25 mmol/L 葡萄糖的 Krebs-Ringer HEPES 刺激 1 h,收集上清液,13 000 rpm 离心 2 min 除去多余的细胞,按照 ALPCO 胰岛素检测试剂盒中的方法测定上清中胰岛素的含量.同时,在 6 孔细胞培养板中每孔加入 150 μ L RIPA 裂解液(含 1% PMSF)裂解细胞,采用 BCA 法测定蛋白含量,用二者的比值表示细胞的胰岛素分泌量.

1.2.2 细胞内活性氧水平的检测

以 5 \times 10⁴/孔的密度将细胞接种于 24 孔平底培养板上,每组设 8 个平行孔培养 24 h 后,加入上述不同葡萄糖等处理 48 h 后.DCFH-DA 探针(终浓度为 40 μ mol/L)加入到孔板中,孵育 30 min 后,PBS 清洗,其中 4 个平行孔在荧光显微镜下进行荧光检测,其余 4 个平行孔每孔加入 0.4 mol/L NaOH 裂解细胞,将细胞裂解液取 200 μ L 加入到 96 孔黑色微孔板中,使用多功能酶标仪测定 DCF(485 ~ 538 nm)荧光强度.同时,采用 BCA 法测定蛋白含量,用二者的比值(U/mg protein)来表示相对密度蛋白的荧光值.

1.2.3 Western blotting 检测

以 3.0 \times 10⁵/孔的密度将细胞接种于 60 mm 小皿中,每组设 4 个平行孔,培养 24 h.加入上述不同葡萄糖等处理 48 h 后,每皿加入 1 mL PBS,用细胞刮刀将细胞轻轻刮下,收集于 1.5 mL

Eppendorf 管中,800 rpm,离心 5 min,收集细胞样品.利用胞浆-胞核蛋白提取试剂盒提取胞核蛋白.采用 10% SDS-PAGE 凝胶分离胞核蛋白质,用电转膜仪将凝胶中的样品转移到硝酸纤维素膜上,用 5% 牛奶室温封闭 1 h.对比蛋白 Marker,将含有 Nrf2 与细胞核内参 Lam B 的条带分别剪切下来,放入相应一抗(1 μ g/mL Anti-Nrf2 与 1 μ g/mL Anti-Lam B)中,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育.用含有 1% 的 TBST 清洗 3 遍,将含有 Nrf2 的条带放入 HRP 标记的羊抗鼠抗体 IgG,含有 Lam B 的条带放入 HRP 标记的羊抗兔抗体 IgG 中孵育 1 h 后,进行曝光检测.

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析基因表达

以 2.0 \times 10⁵/孔的密度将细胞接种于 6 孔细胞培养板中,培养 24 h 后,加入上述不同葡萄糖处理 48 h 后,用超纯 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,按照说明书进行操作,用超纯水将提取的 RNA 1:100 稀释后,分光光度计(A260/280)测定 RNA 浓度,按照 RNA 逆转录试剂盒说明书进行逆转录实验.荧光定量 PCR 采用荧光染料法,各个基因的引物序列如表 1 所示.反应体积为 10 μ L,循环参数:95 $^{\circ}$ C,10 min 预变性;95 $^{\circ}$ C,30 s,56 $^{\circ}$ C,30 s,72 $^{\circ}$ C,30 s,35 个循环,95 $^{\circ}$ C,1 min,56 $^{\circ}$ C,1 min,95 $^{\circ}$ C,45 s.数据采用 MxPRO-Mx3000P 系统分析.

表 1 实时荧光定量 PCR 基因引物序列
Table 1 Primer sequences for real-time PCR

基因	引物	序列
<i>Insulin</i>	Forward	5' - AGCGTGGCTTCTTCTACACACC - 3'
	Reverse	5' - AGTGCCAAGGTCTGAAGGTCAC - 3'
<i>NQO-1</i>	Forward	5' - ATCCAGTCTCTCCATCAAGATTCC - 3'
	Reverse	5' - AACAAGTTAGTCCCTCGGCCA - 3'
<i>Pdx-1</i>	Forward	5' - CAGCCCTGAGCTTCTGAAAAC - 3'
	Reverse	5' - GAGCCCAGGTGTCTAAATTGG - 3'
<i>Maf A</i>	Forward	5' - CATCCGACTGAAACAGAAGCG - 3'
	Reverse	5' - CGCCAACCTTCTCGTATTTCTCC - 3'
β -actin	Forward	5' - GCTACAGCTTCACCACCACAG - 3'
	Reverse	5' - GGTCTTTACGGATGTCAACGT - 3'

1.3 统计分析

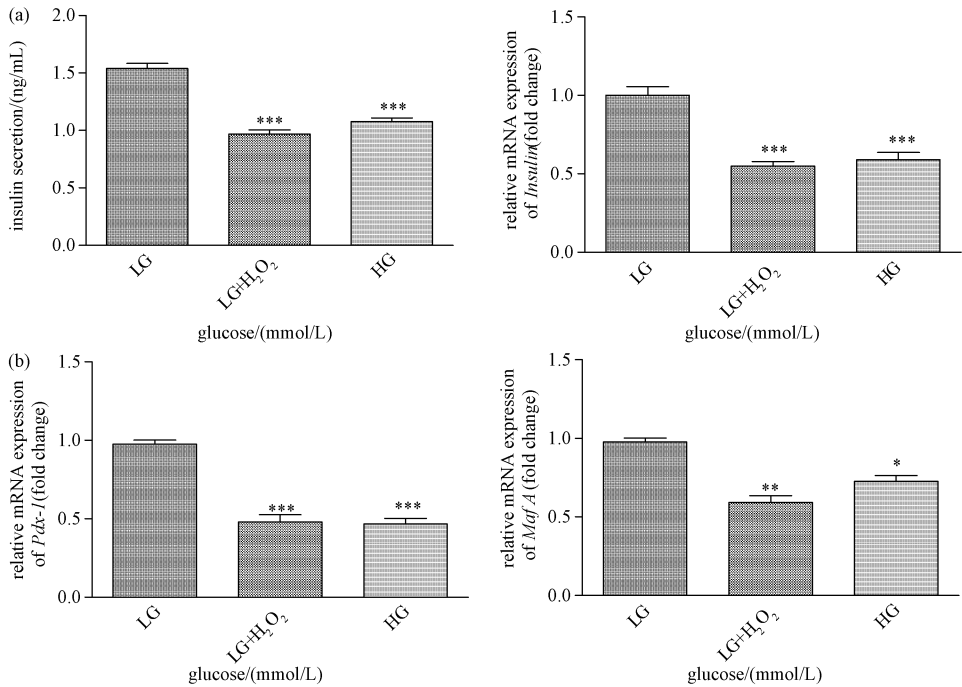
采用 Graphpad prism5.0 软件进行单因素方差分析(one way ANOVA)和 t 检验,实验数据以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示. $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义.

2 结果

2.1 高糖对 NIT-1 胰岛 β 细胞功能的影响

为研究高糖对胰岛 β 细胞功能的影响,我们建立了 NIT-1β 细胞高糖处理模型. 结果显示,经过高糖处理 48 h 后,NIT-1β 细胞的 GSIS 功能与

胰岛素基因的表达均有所下降(图 1(a)). 与之相应,高糖处理后 *Pdx-1*、*Maf A* 基因表达水平显著下降(图 1(b)),证明高糖使胰岛 β 细胞合成与分泌胰岛素的功能受损. 低糖 + H_2O_2 (50 $\mu\text{mol/L}$) 处理后,NIT-1β 细胞胰岛素合成与分泌水平明显下降,可以推断高糖诱导的胰岛 β 细胞合成与分泌胰岛素的能力下降与 ROS 的生成有关.



NIT-1β 细胞经过 LG、LG + H_2O_2 、HG 处理 48 h 后,ELISA 法检测胰岛素分泌(a),RT-PCR 法检测 *Insulin* (a), *Pdx-1*, *Maf A* (b) 基因的表达量. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. LG.

图 1 高糖对 NIT-1β 细胞胰岛素合成和分泌的影响

Fig. 1 Effect of high glucose on insulin synthesis and secretion in NIT-1 β cells

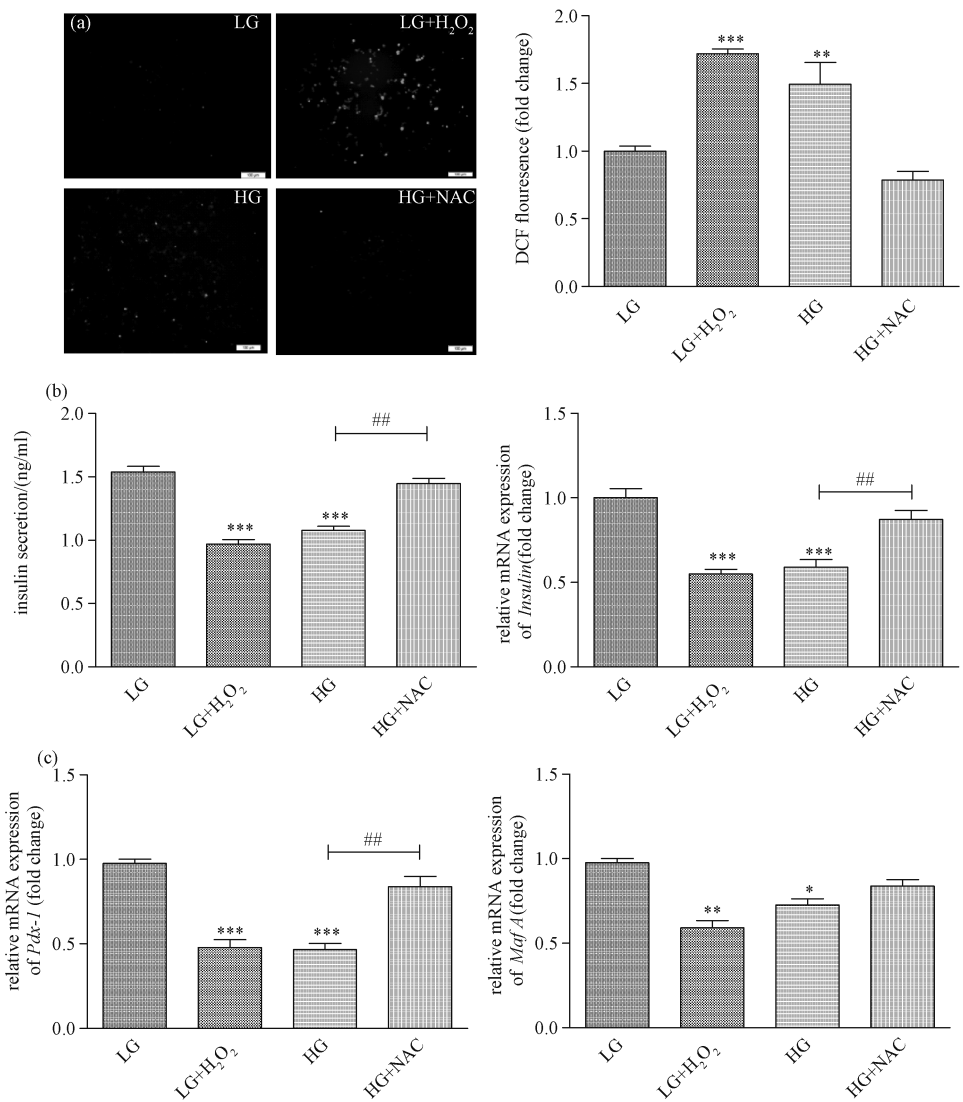
2.2 高糖诱导的 ROS 生成对 NIT-1β 细胞功能的影响

为了进一步探讨高糖对胰岛 β 细胞功能损伤的机制,我们对高糖处理的 NIT-1β 细胞进行了活性氧含量的测定,用 H_2O_2 作为阳性对照,同时检测 N-乙酰半胱氨酸(NAC)处理后细胞内活性氧含量的变化. 如图 2(a) 所示,高糖处理 NIT-1β 细胞 48 h 后,细胞内 ROS 水平上升. H_2O_2 处理同样诱导 NIT-1β 细胞 ROS 生成. 抗氧化剂 NAC (5 mmol/L) 使细胞内的 ROS 生产量降低. 图 2(b)、2 (c) 结果表明,高糖处理的 NIT-1β 细胞胰岛素分泌水平和基因表达量显著下降,*Pdx-1*、*Maf A* 基因的表达量显著下降,说明高糖损伤了胰岛 β 细胞合成与分泌胰岛素的功能. H_2O_2 处理后胰岛素分泌与合成水平明显下降,*Pdx-1*、*Maf A* 基因的

表达量下降与高糖处理组结果一致. 提示我们高糖可能是通过 ROS 对胰岛 β 细胞功能产生影响. NAC 处理后,NIT-1β 细胞的胰岛素分泌与合成功能均得到恢复,即清除 ROS,高糖对胰岛 β 细胞功能的影响消除,证明高糖通过 ROS 生成影响胰岛 β 细胞功能的.

2.3 Nrf2 入核表达对高糖诱导 NIT-1β 细胞氧化应激和功能的影响

为研究 Nrf2 入核表达对高糖诱导胰岛 β 细胞氧化应激和功能的作用,分别用低糖、低糖 + H_2O_2 、高糖、高糖 + NAC、高糖 + tBHQ、高糖 + Brusatol 处理 NIT-1β 细胞 48 h, Western blotting 检测细胞核内 Nrf2 水平的变化. 与低糖处理组相比,高糖处理组 Nrf2 的入核增多,*NQO-1* 基因的表达量上调,说明高糖能够激活 Nrf2 入核表达,



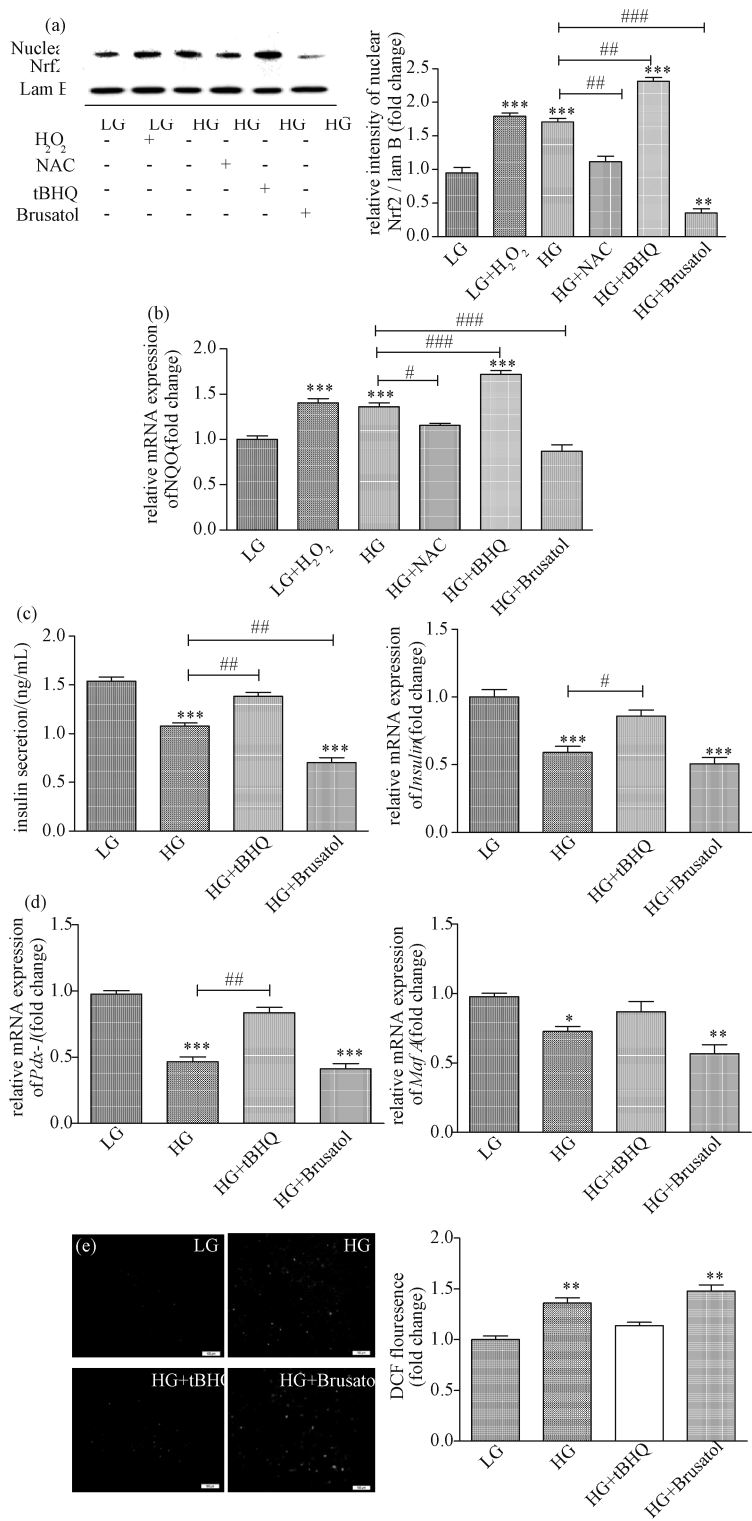
NIT-1β 细胞经 LG、LG + H₂O₂、HG、HG + NAC 分别处理 48 h 后,用 DCFH-DA 探针检测细胞内 ROS 生成水平(a),ELISA 法检测胰岛素分泌(b),RT-PCR 法检测 *Insulin*(b), *Pdx-1*, *Maf A* 基因的表达量(c). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. LG, ## $p < 0.01$ vs. HG.

图 2 高糖诱导 NIT-1β 细胞 ROS 生成对胰岛素合成和分泌的影响

Fig. 2 Effect of high glucose-induced ROS production on insulin synthesis and secretion in NIT-1 β cells

并上调其下游抗氧化酶基因 *mRNA* 的表达. tBHQ (20 μmol/L) 作用 NIT-1β 后, Nrf2 的入核增加, *NQO-1* 基因表达量上调, (图 3(a)、3(b)), 同时胰岛素分泌与合成功能恢复(图 3(c)、3(d)). 说明外源激活 Nrf2 能够缓解高糖对胰岛 β 细胞的损伤. 鹅胆宁苦醇(Brusatol 120 nmol/L)处理 NIT-1β 细胞后, 细胞 Nrf2 蛋白及 *NQO-1* *mRNA* 的表达水平下降明显(图 3(a)、3(b)), NIT-1β 细胞的胰岛素分泌与合成能力受到损伤(图 3(c)、3(d)), 与高糖组相比损伤更加严重, 说明 Nrf2 入核受到抑制后, 高糖对胰岛 β 细胞的氧化损伤加

重. 长期高糖处理引起 *Maf A*、*Pdx-1* 基因的表达量下调(图 3(c)). 当细胞经 tBHQ 处理后, *Pdx-1* 基因的表达量明显上调, 但 *Maf A* 基因与高糖组相比没有明显变化(图 3(c)). 图 3(e) 的结果显示, tBHQ 可以减少高糖引起的细胞内 ROS 生成, Brusatol 使细胞内的 ROS 生成增加, 说明外源激活 Nrf2 增强 NIT-1β 细胞的抗氧化能力, 保护胰岛 β 细胞合成与分泌胰岛素的功能. 说明 Nrf2 入核表达后激活抗氧化酶, 进一步清除 ROS, 保护胰岛 β 细胞免受高糖的氧化损伤.



NIT-1 β 细胞经 LG、LG + H₂O₂、HG、HG + NAC、HG + tBHQ、HG + Brusatol 处理 48 h 后,Western-blot 法检测细胞核内 Nrf2 的表达量(a),RT-PCR 法检测 *NQO-1* 基因的表达量。NIT-1 β 细胞经 LG、HG、HG + tBHQ、HG + Brusatol 处理 48 h 后,用 ELISA 法检测胰岛素分泌(b),RT-PCR 法检测 *Insulin* (c), *Pdx-1*, *Maf A* (d) 基因的表达量,DCFH-DA 探针法检测细胞内 ROS 水平(e)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. LG;# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. HG。

图 3 Nrf2 入核表达对 NIT-1 β 细胞氧化应激和功能的影响

Fig. 3 Effect of Nrf2 on HG-induced oxidative stress and insulin synthesis and secretion in NIT-1 β cells

3 讨论

糖尿病患者体内长期的高血糖水平导致机体发生氧化应激,胰岛β细胞的氧化损伤在糖尿病的发展过程中起了重要作用.研究证明,大鼠胰岛β细胞INS-1E因受到长期的高糖刺激,其胰岛素合成与分泌功能受到损伤,细胞凋亡增多^[18].文献报道,高糖能够通过氧化应激诱导内皮细胞凋亡^[19].我们也发现,高糖作用小鼠NIT-1β细胞后,细胞内ROS水平升高、胰岛素合成与分泌功能受损.抗氧化剂NAC清除ROS后能够恢复胰岛素合成与分泌的功能,说明高糖通过诱导ROS的产生影响NIT-1β细胞功能.

Nrf2是与细胞抗氧化能力相关的重要的核转录因子,受到细胞代谢应激,如氧化应激的调控.当细胞内出现氧化应激时,Nrf2被激活入核,上调Ⅱ相抗氧化酶的表达,提高细胞的抗氧化能力^[20].研究表明,高血糖环境下,人类冠状血管内皮细胞(CAECs)中Nrf2被ROS激活,并上调Ⅱ相抗氧化酶的表达.我们也发现,高糖刺激下,NIT-1β细胞内的Nrf2入核增多,Ⅱ相抗氧化酶NQO-1的表达上调.但NIT-1β细胞合成与分泌胰岛素的功能却受到损伤,说明Nrf2的激活不能抵抗长期高糖诱导的氧化应激,Nrf2入核启动Ⅱ相抗氧化酶的表达不足以缓解氧化应激所带来的损伤.文献报道,白藜芦醇能够激活人主动脉平滑肌细胞(ASMC)内Nrf2,启动Ⅱ相抗氧化酶的表达,提高细胞的抗氧化能力^[21].莱菔硫烷能够激活人类微血管内皮细胞HMEC-1中的Nrf2,上调Ⅱ相抗氧化酶的表达,提高细胞的抗氧化能力,使HMEC-1免受氧化应激损伤.敲除Nrf2后,HMEC-1细胞内的ROS升高,细胞活力下降^[22].我们同样发现,Nrf2激活剂tBHQ激活了Nrf2信号通路,上调Ⅱ相抗氧化酶表达水平,降低了细胞内ROS水平,并进而恢复了NIT-1β细胞胰岛素合成与分泌的功能,另外Nrf2抑制剂鸦胆子苦醇却作用相反,说明Nrf2通过调控Ⅱ相抗氧化酶表达水平降低高糖引起NIT-1β细胞内产生的氧化应激.因此,Nrf2激活剂类药物可以改善或恢复糖尿病患者的胰岛β细胞合成与分泌胰岛素.

Pdx-1与Maf A是调控胰岛素基因表达的核转录因子,与胰岛素基因表达水平的变化密切相关.研究发现,ZDF糖尿病大鼠胰岛β细胞内的

Pdx-1 基因的表达量下降^[23],高糖环境下的胰岛β细胞βTC-3内*Maf A*基因的表达量下降^[24-25].我们也发现,在高糖条件下,NIT-1β细胞内的*Pdx-1*与*Maf A*基因的表达均下调,说明高糖影响*Pdx-1*与*Maf A*基因的表达抑制胰岛素的合成.与此相比,当细胞经NAC、tBHQ处理后,其*Pdx-1*基因的表达明显上调,但是*Maf A*基因的表达量与高糖处理组没有明显差异,说明*Pdx-1*基因的表达下调与氧化应激关系更加密切,而*Maf A*基因的表达下调可能是通过其他信号通路作用的.另有研究表明,长期高糖水平通过胰岛β细胞内的microRNA-204直接降解mRNA下调*Maf A*基因的表达,进而降低胰岛素的合成^[26].

长期高糖诱导胰岛β细胞氧化应激,进而影响胰岛素合成和分泌的功能,而Nrf2能够抵抗这种损伤.Nrf2可作为药物靶点,筛选有效无毒的Nrf2激活剂对于治疗糖尿病可能有重要意义.

参考文献

- [1] Polonsky K S. The past 200 years in diabetes [J]. New England Journal of Medicine, 2012, 367(14): 1 332-1 340.
- [2] Talchai C, Xuan S, Lin H V, et al. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure [J]. Cell, 2012, 150(6): 1 223-1 234.
- [3] Mahadevan J, Parazzoli S, Oseid E, et al. Ebselen treatment prevents islet apoptosis, maintains intranuclear *Pdx-1* and *MafA* levels, and preserves β-cell mass and function in ZDF rats [J]. Diabetes, 2013, 62(10): 3 582-3 588.
- [4] Lin Y, Sun Z. Current views on type 2 diabetes [J]. Journal of Endocrinology, 2010, 204(1): 1-11.
- [5] Shao S, Fang Z, Yu X, et al. Transcription factors involved in glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic beta cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 384(4): 401-404.
- [6] Stumvoll M, Goldstein B J, van H T W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy [J]. The Lancet, 2005, 365(9 467): 1 333-1 346.
- [7] Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, et al. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis [J]. Mediators of Inflammation, 2010, 453 892: 1-11.
- [8] Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2007, 9 (3): 343-353.
- [9] Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production

- through protein kinase C; dependent activation of NAD (P) H oxidase in cultured vascular cells [J]. *Diabetes*, 2000, 49 (11): 1 939-1 945.
- [10] Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004, 24(5): 816-823.
- [11] Ungvari Z, Bailey-Downs L, Gautam T, et al. Adaptive induction of NF-E2-related factor-2-driven antioxidant genes in endothelial cells in response to hyperglycemia [J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2011, 300(4): H1 133-H1 140.
- [12] Nguyen T, Nioi P, Pickett C B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(20): 13 291-13 295.
- [13] Yagishita Y, Fukutomi T, Sugawara A, et al. Nrf2 protects pancreatic β -Cells from oxidative and nitrosative stress in diabetic model mice [J]. *Diabetes*, 2014, 63(2): 605-618.
- [14] Deng X, Rui W, Zhang F, et al. PM_{2.5} induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells [J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2013, 29(3): 143-157.
- [15] Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2004, 10(11): 549-557.
- [16] Li J, Johnson D, Calkins M, et al. Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells [J]. *Toxicological Sciences*, 2005, 83(2): 313-328.
- [17] Ren D, Villeneuve N F, Jiang T, et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(4): 1 433-1 438.
- [18] Schvartz D. Dysfunction of rat INS-1E pancreatic β -cells induced by chronic high glucose stimuli [D]. Geneva: University of Geneva, 2012.
- [19] Piconi L, Quagliaro L, Assaloni R, et al. Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction [J]. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2006, 22(3): 198-203.
- [20] Kensler T W, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47: 89-116.
- [21] Morrison C D, Pistell P J, Ingram D K, et al. High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased Nrf2 signaling [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2010, 114(6): 1 581-1 589.
- [22] Xue M, Qian Q, Adaikalakoteswari A, et al. Activation of NF-E2-related factor-2 reverses biochemical dysfunction of endothelial cells induced by hyperglycemia linked to vascular disease [J]. *Diabetes*, 2008, 57(10): 2 809-2 817.
- [23] Harmon J S, Gleason C E, Tanaka Y, et al. In vivo prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression [J]. *Diabetes*, 1999, 48 (10): 1 995-2 000.
- [24] Hang Y, Stein R. MafA and MafB activity in pancreatic β cells [J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2011, 22 (9): 364-373.
- [25] Kitamura Y I, Kitamura T, Kruse J P, et al. FoxO1 protects against pancreatic β cell failure through NeuroD and MafA induction [J]. *Cell Metabolism*, 2005, 2(3): 153-163.
- [26] Xu G, Chen J, Jing G, et al. Thioredoxin-interacting protein regulates insulin transcription through microRNA-204 [J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(9): 1 141-1 146.