

GALNT2通过EGFR信号通路影响胰岛素自身免疫综合征的作用机制

奥日瀚¹, 格日勒图²

(1. 内蒙古自治区人民医院 内分泌科, 内蒙古 呼和浩特 010017; 2. 内蒙古自治区人民医院 眼科)

摘要:目的:探究GALNT2通过激活EGFR信号通路影响胰岛素自身免疫综合征的作用机制。方法:首先在L-02细胞中过表达或者敲低GALNT2,利用Western blot检测在EGF刺激诱导下的EGFR磷酸化水平,同时利用凝集素下拉试验检测EGFR的糖基化水平。随后在细胞中过表达GALNT2以及同时加入PI3K抑制剂,利用Western blot检测EGFR的下游信号通路PI3K/AKT的激活情况。接下来检测过表达GALNT2以及同时加入PI3K抑制剂时细胞内NADPH/NADP+比率,以及培养基中的葡萄糖和乳酸含量,探索GALNT2对细胞代谢的影响。最后在高胰岛素处理的胰岛素抵抗细胞模型中,检测GALNT2对细胞的葡萄糖摄取能力的影响。结果:过表达GALNT2的细胞在EGF刺激后,EGFR的磷酸化水平升高,并且EGFR的O型糖基化修饰水平也同样升高;而敲低GALNT2的细胞EGFR磷酸化和O型糖基化水平降低。过表达GALNT2的细胞AKT和mTOR的磷酸化水平升高,而同时加入PI3K抑制剂则能够逆转GALNT2的影响,即GALNT2能够通过促进EGFR磷酸化,激活PI3K/AKT信号通路。GALNT2能够提高NADPH/NADP+比率,促进细胞代谢,而同时加入PI3K抑制剂则能够逆转GALNT2的影响。在高胰岛素诱导的胰岛素抵抗细胞模型中,过表达GALNT2提高了PPAR- γ 和PEPCK的mRNA水平,提高了葡萄糖摄取能力。结论:GALNT2通过糖基化修饰EGFR,促进了EGFR的磷酸化,激活PI3K/AKT信号通路,从而促进PPAR- γ 和PEPCK的表达,促进细胞代谢,减少能量储存,从而可能诱发胰岛素自身免疫综合征。

关键词: GALNT2; EGFR; 胰岛素自身免疫综合征; PI3K/AKT; 胰岛素抵抗

中图分类号: R371

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2022)01-0057-04

胰岛素自身免疫综合征又称自身免疫性低血糖,是由于血中非外源性胰岛素诱导产生高浓度免疫活性胰岛素和高效价胰岛素自身抗体引起的,以反复发作性、严重自发性低血糖为特征的一种罕见病^[1,2]。胰岛素自身免疫综合征在1970年由日本Hirata首次报道,故又称Hirata病,在日本被列为自发性低血糖症的第三大原因,需要与胰岛素瘤和胰腺外肿瘤相互区分^[3]。目前胰岛素自身免疫综合征的确切发病机制尚不明确,但是被广泛认可的原因是与自身免疫缺陷和含巯基药物的作用相关,产生胰岛素自身抗体导致高胰岛素血症,引发低血糖^[4,5]。

糖基化修饰是常见的蛋白质翻译后修饰类型之一,影响着如细胞增殖、迁移、凋亡等多种细胞功能^[6,7]。研究表明蛋白质主要有N型和O型两种糖基化修饰类型,而GALNT2是调控黏蛋白O型糖基

化起始步骤的重要酶^[8,9]。有研究发现GALNT2的表达与酪氨酸激酶受体的活化有关,而EGFR是最早报道也是研究最多的酪氨酸激酶的受体,可以通过下游的PI3K/AKT信号通路参与细胞信号转导和多种细胞功能调节^[10,11]。在肝癌细胞等肿瘤细胞中,GALNT2可以通过糖基化修饰EGFR,进而促进EGFR的磷酸化,激活其下游信号通路,影响肿瘤细胞的恶性程度^[12]。

GALNT2和EGFR在多种肿瘤的恶性进展中发挥的功能已经被多次报道,然而在代谢疾病发生发展中所起的作用,以及对该作用的分子机制却仍需要探索。本研究表明GALNT2通过影响EGFR的翻译后修饰,激活PI3K/AKT信号通路,从而促进PPAR- γ 和PEPCK的表达,提高了细胞对葡萄糖的摄取和代谢。胰岛素自身免疫综合征患者在发病时会呈现血糖高低交替现象,并且出现严重的糖尿

收稿日期: 2021-10-30; 修回日期: 2021-12-29

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2021LHMS08064)

作者简介: 奥日瀚(1981-),女,内蒙古自治区人民医院内分泌科副主任医师。

通讯作者: 格日勒图,主任医师,E-mail:1542573174@qq.com 内蒙古自治区人民医院眼科,010017

病酮症酸中毒和低血糖^[3]。我们的结果证实 GALNT2 通过 EGFR 及其下游信号通路,参与了细胞内的葡萄糖代谢过程,引起体内血糖和胰岛素水平的变化,GALNT2 的异常表达可能是胰岛素自身免疫综合征发病的原因之一。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与细胞转染

使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37 °C 恒温、CO₂ 浓度为 5% 及饱和湿度的细胞培养箱中进行培养。为了防止细菌污染,培养基可添加青/链霉素抗生素,其中青霉素的终浓度为 100 U/mL,链霉素的终浓度为 100 μg/mL。使用阳离子脂质体转染试剂转染细胞。提前 24 h 接种待转染的细胞,细胞密度以第二天转染时汇合度达到 50%~70% 为宜。将过表达质粒或者 siRNA 与转染试剂加入到不含血清的 DMEM 培养基中吹打混匀,室温孵育 20 min,逐滴加入上述转染混合液,轻轻混匀后放于培养箱中培养。转染后 6~8 h 更换新鲜培养基,并继续培养 24~48 h 后进行后续实验。

1.2 蛋白免疫印迹(Western blot)

收集处理后的各组细胞,用 RIPA 裂解液置于冰上裂解 30 min,然后用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白浓度的测定。取 20~60 μg 蛋白样品,用 SDS-PAGE 进行分离,将分离后的蛋白质转移到 NC 膜上,5% BSA 室温封闭 1~2 h,分别加入稀释的一抗 4 °C 孵育过夜,洗膜后加入对应种属的 HRP 标记的二抗,室温孵育 1 h,使用化学发光法进行曝光显影,以 β-actin 作为内参。

1.3 凝集素下拉试验

将细胞裂解液与长柔毛野豌豆外源凝集素琼脂糖珠在 4 °C 共同孵育 12 h,通过离心收集凝集素/糖蛋白复合物。将凝集素/糖蛋白煮沸变性分离,用 Western blot 检测发生 O 型糖基化的 EGFR 蛋白含量,以细胞内总 EGFR 蛋白含量作为对照。

1.4 葡萄糖、乳酸和 NADP⁺/NADPH 含量检测

将待检测细胞接种至 6 孔板中,待细胞生长至 90% 汇合度时,更换新鲜培养基继续培养 6 h,收集上清液用葡萄糖分析试剂盒和乳酸分析试剂盒测定葡萄糖和乳酸的含量,通过从培养基初始浓度中减去最终浓度来计算葡萄糖消耗量。使用 NADP⁺/NADPH 分析试剂盒在 450 nm 的光密度下测定细胞裂解物中的 NADP⁺/NADPH 比率。

1.5 RNA 提取和 RT-qPCR 实验

使用 Trizol 试剂提取总 RNA,取 1 μg 总 RNA 按照试剂盒说明书反转录成 cDNA。对合成的荧光定量 PCR 试剂盒进行 RT-qPCR 检测,取 2 μL cDNA 作为模板,加入特异基因引物,50 μL 体系进行扩增,每个孔均设置 3 个重复,以 β-actin 作为内参。

1.6 细胞葡萄糖摄取能力检测

将待检测细胞接种至 96 孔板中,待细胞生长至 90% 汇合度时,用不含葡萄糖的 DMEM 培养基清洗细胞 2 次后,加入不含葡萄糖的培养基培养 15 min。加入用不含葡萄糖的培养基稀释的探针,37 °C 下培养 15 min,洗去多余的探针后在荧光显微镜下观察葡萄糖摄取情况。

1.7 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 21.0 统计学软件进行处理,计量资料采用均值 ± 标准差的形式表示,两组间比较采用 *t* 检验。检验水准为 α = 0.05,当 *P* < 0.05 时,认为两组样本均值之间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GALNT2 对 EGF 刺激下 EGFR 磷酸化的影响

将转染 GALNT2 过表达质粒和转染 siRNA 的 L-02 细胞无血清处理 6 h,随后加入 100 ng/mL 的 EGF 刺激 10 min,随后收集细胞进行 Western blot 试验。结果表明过表达 GALNT2 增强了 EGF 诱导的 EGFR 磷酸化水平,而敲低 GALNT2 的细胞 EGFR 磷酸化水平明显降低(见图 1)。

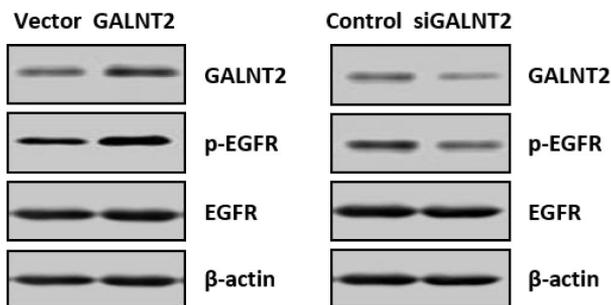


图 1 GALNT2 对 EGF 刺激下 EGFR 磷酸化的影响

2.2 GALNT2 对 EGFR 的 O 型糖基化水平的影响

为了探究 GALNT2 是否影响 EGFR 在 L-02 细胞中的 O 型糖基化水平,我们进行了凝集素下拉试验。如图 2 所示,过表达 GALNT2 增加了 EGFR 的 O 型糖基化,而敲低 GALNT2 的细胞 EGFR 的 O 型糖基化水平降低。

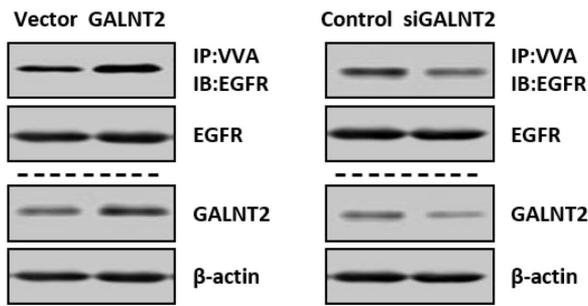


图2 GALNT2对EGFR的O型糖基化水平的影响

2.3 GALNT2对EGFR下游PI3K/AKT通路活性的影响

前面的实验结果证实了在L-02细胞中GALNT2能够促进EGFR的磷酸化,随后我们检测了EGFR的下游信号通路。结果表明,过表达GALNT2能够促进AKT和mTOR的磷酸化,激活PI3K/AKT通路。而同时加入PI3K抑制剂LY294002则逆转了GALNT2的作用,表明GALNT2确实是通过PI3K/AKT信号通路发挥功能(见图3)。

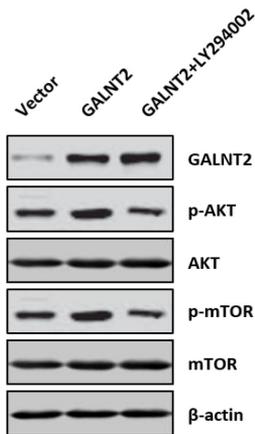


图3 GALNT2对EGFR下游PI3K/AKT通路活性的影响

2.4 GALNT2对细胞代谢能力的影响

过表达GALNT2的细胞培养基中的葡萄糖消耗增加($t = 5.856, P < 0.05$),乳酸生成增加($t = 5.543, P < 0.05$),并且细胞内的NADPH/NADP+比例升高($t = 4.364, P < 0.05$),而同时加入PI3K抑制剂LY294002则逆转了GALNT2的作用,表明GALNT2能够通过PI3K/AKT信号通路促进细胞代谢(见表1)。

2.5 GALNT2对PPAR-γ和PEPCK表达的影响

随后我们检测了糖代谢通路下游基因PPAR-γ和PEPCK的mRNA水平,结果表明过表达GALNT2的细胞中PPAR-γ和PEPCK的mRNA含量升高(** $P < 0.05$)(见图4)。

表1 GALNT2对细胞代谢能力的影响

组别	葡萄糖消耗量 (μmol/μg)	乳酸生成量 (μmol/μg)	NADPH/NADP+比例
对照组	30.40 ± 2.06	12.03 ± 0.96	17.06 ± 0.96
过表达组	21.13 ± 1.80	7.70 ± 0.95	13.60 ± 0.98
过表达+抑制剂组	30.93 ± 2.90	11.83 ± 1.31	17.47 ± 1.00

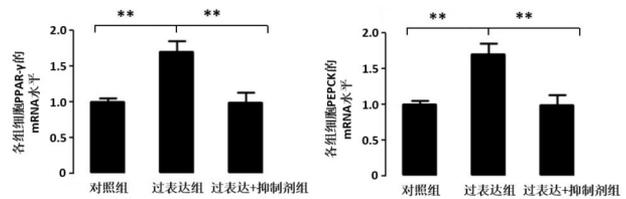


图4 GALNT2对PPAR-γ和PEPCK表达的影响

2.6 GALNT2对胰岛素抵抗模型的细胞葡萄糖摄取能力的影响

最后我们用含有1 μmol/L胰岛素的DMEM培养基处理细胞16 h,构建胰岛素抵抗模型,通过葡萄糖摄取实验表明GALNT2增强了胰岛素抵抗模型的细胞对葡萄糖摄取能力(见图5)。

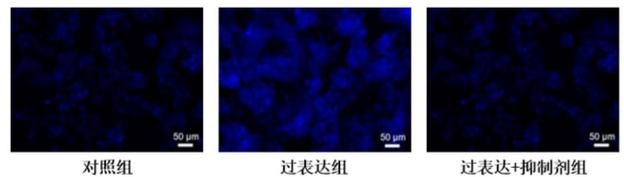


图5 GALNT2对胰岛素抵抗模型的细胞葡萄糖摄取能力的影响

3 讨论

胰岛素自身免疫综合征是一种比较罕见的疾病,可以引发低血糖甚至死亡,在国内外也都有误诊为胰岛细胞瘤而进行手术的病例报告^[14]。这提醒我们正确全面地认识这一疾病,探究其发病因素显得尤为重要。我们的研究表明,GALNT2通过影响EGFR及其下游信号通路,促进了细胞内的葡萄糖代谢过程,是导致机体血糖降低的原因之一,也初步揭示了胰岛素自身免疫综合征的发病的可能机制。

胰岛素自身免疫综合征的治疗主要以清除胰岛素自身抗体、及时纠正并预防低血糖的发生为主。治疗措施包括停用可能诱发自身免疫的药物、调整饮食结构、选用阿卡波糖,通过延缓葡萄糖的吸收和降低胰岛素的分泌而发挥作用。对于低血糖反复发作且难以控制的患者,可以口服糖皮质激素或进一步使用免疫抑制剂,病情严重的患者甚至

需要血浆置换。我们的研究表明,PI3K的抑制剂LY294002能够逆转GALNT2对葡萄糖代谢的影响,延缓细胞代谢速率,对于胰岛素自身免疫综合征患者可能会有积极的作用,在将来的研究中我们可以尝试使用EGFR信号通路的抑制剂来治疗胰岛素自身免疫综合征等细胞代谢疾病。

有研究报道,GALNT2基因多态性与血脂HDL和TG水平密切相关^[15,16]。在GALNT2基因的第一个内含子中存在6个研究较多的突变位点,不同的突变位点具有不同的生物学特性,在未来的研究中会不断发掘GALNT2基因多态性与包括胰岛素自身免疫综合征在内的多种疾病发生的关系。对GALNT2的生理功能进一步探索,将有助于设计针对GALNT2功能的药物,从平衡细胞内的O型糖基化水平的角度来治疗各类疾病,拓宽包括抗恶性肿瘤与调节代谢疾病等方面药物的开发视野,为全人类的健康事业作出更多的贡献。

参考文献

- [1]黄秀丽,战丽萍. 胰岛素自身免疫综合征1例[J]. 中国急救医学, 2015; 35(2): 438-440
- [2]林少达,陈仲贤,张汉灵. 胰岛素自身免疫综合征[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2006; 10(03): 149-151
- [3]Hirata Y. Methimazole and insulin autoimmune syndrome with hypoglycemia[J]. Lancet, 1983; 2(8357): 1037-1038
- [4]金丽霞,肖建中. 胰岛素自身免疫综合征研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018; 04(2): 399-403
- [5]秦艳,沈赟,戴佩芳,等. 101例药物致胰岛素自身免疫综合征的文献分析[J]. 药学服务与研究, 2020; 03(5): 213-216
- [6]Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications[J]. Nat Rev Cancer, 2015; 15(9): 540-550
- [7]Dimitroff CJ. Galectin-binding o-glycosylations as regulators of malignancy[J]. Cancer Res, 2015; 75(16): 3195-3202
- [8]Tian E, Ten KG. Recent insights into the biological roles of mucin-type O-glycosylation[J]. Glycoconj J, 2009; 26(3): 325-334
- [9]Bennett EP, Mandel U, Clausen H, et al. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family[J]. Glycobiology, 2012; 22(6): 736-756
- [10]Lin MC, Huang MJ, Liu CH, et al. GALNT2 enhances migration and invasion of oral squamous cell carcinoma by regulating EGFR glycosylation and activity[J]. Oral Oncol, 2014; 50(5): 478-484
- [11]Lin F, Gooijer MC, Hanekamp D, et al. PI3K-mTOR Pathway inhibition exhibits efficacy against high-grade glioma in clinically relevant mouse models[J]. Clin Cancer Res, 2017; 23(5): 1286-1298
- [12]Wu YM, Liu CH, Hu RH, et al. Mucin glycosylating enzyme GALNT2 regulates the malignant character of hepatocellular carcinoma by modifying the EGF receptor[J]. Cancer Res, 2011; 71(23): 7270-7279
- [13]卢亚男,李伟,李玉秀,等. 硫辛酸介导的2型糖尿病患者胰岛素自身免疫综合征二例[J]. 中国医学科学院学报, 2020; 42(5): 702-705
- [14]金丽霞,肖建中. 胰岛素自身免疫综合征研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018; 32(4): 399-403
- [15]Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans[J]. Nat Genet, 2008; 40(2): 189-197
- [16]Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease[J]. Nat Genet, 2008; 40(2): 161-169
- [25]Sheehan DV, Sheehan KH, Shytle RD, et al. Reliability and validity of the mini international neuropsychiatric interview for children and adolescents (MINI-KID)[J]. J Clin Psychiatry, 2010; 71(3): 313-326
- [26]Liu YX, Liu J, Wang YF. Reliability and validity of chinese version of the mini international neuropsychiatric interview for children and adolescents (child version)[J]. Chin Ment Health J, 2011; 25(1): 8-13
- [27]Blackburn JS. Tic Disorders and PANDAS[J]. Semin Pediatr Neurol, 2018; 25(4): 25-33
- [28]Bloch MH, Leckman JF. Clinical course of tourette syndrome[J]. J Psychosom Res, 2009; 67(6): 497-501
- [29]Cohen SC, Leckman JF, Bloch MH. Clinical assessment of tourette syndrome and tic disorders[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2013; 37(6): 997-1007
- [30]刘敏,石靖. 儿童抽动障碍的临床与脑电图分析[J]. 现代电生理学杂志, 2008; 15(3): 138
- [31]Swain JE, Scahill L, Lombroso PJ, et al. Tourette syndrome and tic disorder: a decade of progress[J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2007; 46(8): 947-968
- [32]Rizzo R, Gulisano M. Treatment options for tic disorders[J]. Expert Rev Neurother, 2019; 3(27): 1-9
- [33]Yu J, Ye Y, Liu J, et al. Acupuncture for tourette syndrome: a systematic review[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016; 22(5): e1834646
- [34]赵润芝,辛渊,王文好,等. 针刺治疗抽动障碍临床疗效的Meta分析[J]. 上海针灸杂志, 2020; 39(02): 244-252

(上接第56页)