DOI:10.16016/j.1000-5404.202011146

高糖环境对胰岛β细胞系转录组表达谱的影响

李向前[1],王丽娜[1],张梦军[2],陈晓玲[1],王 莉[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):基础医学院全军免疫学研究所[1],药学与检验医学系药物分析学教研室[2]

[摘要] **目的** 研究高浓度葡萄糖刺激因素对1型糖尿病(type 1 diabetes, T1D)模型小鼠来源的胰岛β细胞系全转录组表达谱的影响,探讨高糖环境因素参与T1D发病的可能机制。**方法** 将处于对数生长期的非肥胖糖尿病(non-obese diabetic, NOD)小鼠来源的胰岛β细胞系NIT-1细胞分为对照组(NIT1)和高糖处理组(HG),采用RNA-Seq技术进行全转录组测序,获取差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),并对DEGs进行GO注释以及KEGG Pathway富集性分析。**结果** NIT1组和HG组之间共检测到DEGs 5 548个;其中HG组上调DEGs 2 701个,下调DEGs 2 847个,其中上调DEGs显著富集在内质网应激、内质网蛋白加工处理、泛素化介导的蛋白质降解、自噬、凋亡等途径;下调基因主要富集在核糖体、代谢、生物合成、细胞周期、DNA复制等途径。HG组部分关键T1D自身抗原的mRNA表达显著增加。**结论** 高糖诱导胰岛β细胞系全转录组显著变化,表现出胰岛β细胞自身抗原的表达及抗原加工、处理能力增强,提示高糖因素可能与诱导β细胞自身免疫反应及T1D的发生、发展有关。

[关键词] 1型糖尿病;高糖;胰岛β细胞;转录组;自身抗原
[中图法分类号] R322.57; R363.13; R394.3 [文献标志码] A

Effect of high glucose environment on transcriptome expression profile of islet β cell line

LI Xiangqian[1], WANG Lina[1], ZHANG Mengjun[2], CHEN Xiaoling[1], WANG Li[1] [1]Institute of Immunology, College of Basic Medical Sciences; [2]Department of Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of high glucose concentration on the transcriptome expression profile of islet β cells derived from type 1 diabetes (T1D) mice and to explore the possible mechanism of high glucose environment in the pathogenesis of T1D. **Methods** The non-obese diabetic (NOD) mice-derived islet β cell line NIT-1 in logarithmic growth phase were divided into high glucose-treated (HG) and control (NIT1) group. The cells in the NIT1 group were routinely cultured in F-12K medium, while HG group were treated with 20 mmol/L glucose. Whole transcriptome profile was analyzed using RNA-sequencing technology to obtain the differentially expressed genes (DEGs). And the DEGs were further analyzed by GO annotation and KEGG pathway enrichment analysis. **Results** A total of 5 548 DEGs were detected between the NIT1 group and HG group. Among them, 2 701 DEGs were up-regulated in the HG group, which were significantly enriched in endoplasmic reticulum stress, endoplasmic reticulum protein processing, ubiquitin-mediated protein degradation, autophagy and apoptosis pathways. And the 2 847 down-regulated genes were mainly concentrated in ribosome, metabolism, biosynthesis, cell cycle and DNA replication. Moreover, the mRNA levels of some important T1D auto-antigens were significantly increased in the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81871301)
[通信作者] 王 莉,E-mail:liwang118@tmmu.edu.cn

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

HG group. **Conclusion** High glucose environment significantly changes the whole-transcriptome profile of islet β cells, and promotes the abilities of antigen processing and presentation, suggesting that high glucose might be associated with the induction of autoimmune response of islet cells and the incidence and development of T1D.

[**Key words**] diabetes mellitus, type 1; high glucose; islet β cells; transcriptome; auto-antigen

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81871301). Corresponding author: WANG Li, E-mail: liwang118@tmmu.edu.cn

1 型糖尿病(type 1 diabetes,T1D)是胰岛 β 细胞自身抗原特异性 T 细胞介导 β 细胞破坏,导致胰岛素分泌绝对不足而引起糖代谢功能紊乱的一种器官特异性自身免疫性疾病[1]。目前 T1D 的发病机制仍不完全清楚,但遗传因素和环境因素均发挥重要作用。目前已发现 50 多个基因位点与 T1D 易感有关,这些基因位点可能影响 β 细胞功能、免疫调节和胰岛素表达等[2],同时,饮食、肠道微生物、感染、药物等环境因素是 T1D 发病的诱因[3]。现已清楚,环境因素如感染诱生的 IL-1β、IFN-γ 以及 TNF-α 等炎症因子可以在早期通过诱导 β 细胞内质网应激、凋亡及自身抗原形成,促进 T1D 发病[4]。

流行病学调查结果初步显示:T1D 易感儿童进展为 T1D 的可能性与摄入的总糖量显著相关[5],从而推测长期高糖饮食可能成为 T1D 发病的诱因。尽管已有证据显示高糖环境也能诱导胰岛 β 细胞发生内质网应激和凋亡,并且在患 2 型糖尿病(type 2 diabetes,T2D)个体中,胰岛 β 细胞长期暴露于高糖环境中可发生功能失调及凋亡[6],但高糖环境是否成为 T1D 发病的诱因尚缺乏实验依据。本研究拟利用全转录组测序(RNA-Seq)技术,系统研究高糖环境对非肥胖性糖尿病(non-obese diabetic,NOD)小鼠来源的胰岛 β 细胞系 NIT-1 细胞全转录组的影响,旨在全面分析高糖环境刺激对胰岛 β 细胞关键生物学功能产生的潜在影响,为进一步理解高糖环境因素参与 T1D 发病的机制提供新的切入点。

1 材料与方法

1.1 主要材料、细胞培养和实验分组

NIT-1 细胞为本实验室长期保存。其他材料包括:F-12K Nutrient Mixture 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司),青霉素链霉素溶胶(美国 Invitrogen 公司),胰蛋白酶(美国 HyClone 公司)、PBS(中杉金桥公司)、葡萄糖(瑞士罗恩公司)、TRIzol 试剂盒(美国 Ambion 公司),TB Green premix Ex Taq Ⅱ试剂盒(日本 TaKaRa 公司)。

NIT-1 细胞培养于含 10%胎牛血清、1%青霉素链霉素溶胶、7 mmol/L 葡萄糖的 F-12K 完全培养基中,37 ℃,5% CO_2,贴壁细胞融合程度达到 80%时,按照 1∶2传代。NIT1 组:F-12K 完全培养基常规培养 48 h 收取细胞。HG 组:20 mmol/L 高浓度葡萄糖预处理 24 h,撤离后继续常规培养 24 h 后收取细胞。各组取 3 个生物学重复样品,各取 2×10^6 个细胞,用 TRIzol 试剂重悬后进行实验。

1.2 样品 RNA 提取及全转录组测序

使用 Oligo(dT)磁珠富集 mRNA 以后,用打断试剂将 mRNA 片段化,用 PCR 仪合成一链以及二链 cDNA,在末端修复和接头连接后,进行 PCR 反应及产物回收;最后将产物环化即得到最终的文库。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测文库的片段大小及浓度。最终上机通过联合探针锚定聚合技术(cPAS)进行测序,得到 50 bp/100 bp/150 bp 的测序读长。

1.3 差异表达基因(differential expression genes,DEGs)及生物信息学分析

将测序所得的 raw reads 用 SOAPnuke 软件[7]进行过滤,以去除接头污染、未知碱基 N 含量大于 5%的 reads 和低质量的 reads;使用 HISAT[8]将质控后得到的 clean reads 比对小鼠基因组参考基因组序列,进行基因定量分析,定义 FDR<0.05、$\log_2$ fold change>0 为有显著差异。差异基因的筛选基于 DEseq2 方法[9],此法原理为负二项分布;筛选出 HG 组与 NIT1 组的 DEGs。利用华大基因自主研发的 Dr. Tom 平台对 DEGs 进行聚类分析、GO 和 KEGG 富集分析、蛋白互作网络和转录因子等更深入的挖掘分析。随后对样品中检测到的所有基因进行基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测

NIT1 组和 HG 组细胞处理同前,采用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, Nanodrop 分光光度计检测 RNA 样本的浓度;Prime-Script RT reagent kit 试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,用于 PCR 反应。反应条件:95 ℃预变性 3 min,循环 1 次;95 ℃变性 10 s,58 ℃退火 10 s,

72 ℃延伸 20 s,共循环 39 次。所有基因使用 β-actin 作为内参基因,采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 方法进行结果统计分析,引物序列见表 1。

1.5 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。Real-time PCR 数据采用两独立样本均数的 t 检验,检验水准:$\alpha=0.05$。

表 1 Real-time PCR 引物序列与片段长度

基因名称	引物序列(5′→3′)	扩增长度/bp
Ins2	上游 GCTTCTTCTACACACCCATGTC 下游 AGCACTGATCTACAATGCCAC	147
ChgA	上游 CCAAGGTGATGAAGTGCGTC 下游 GGTGTCGCAGGATAGAGAGGA	129
ATF6	上游 TCGCCTTTTAGTCCGGTTCTT 下游 GGCTCCATAGGTCTGACTCC	190
Actin	上游 AATCGTGCGTGACATCAAAG 下游 GGATTCCATACCCAAGAAGG	116
Txnip	上游 GGCCGGACGGGTAATAGTG 下游 AGCGCAAGTAGTCCAAAGTCT	134
Ube3a	上游 ATCCCAGTCTGAGGACATTGA 下游 GCACAAAACTCATTCGTGCAG	126

2 结果

2.1 各组样本测序质控情况

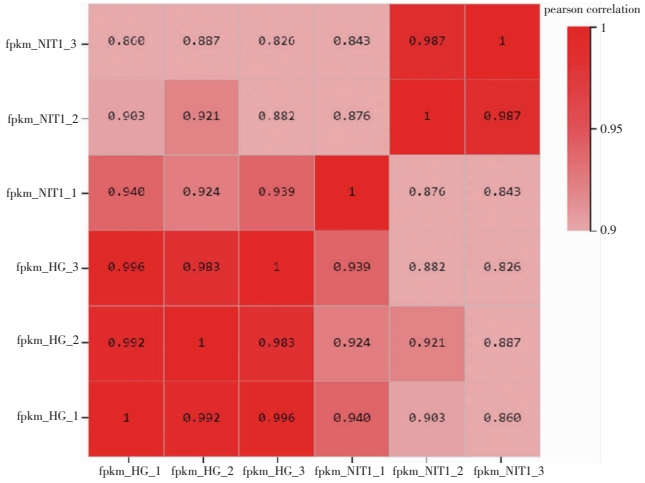
HG 组 3 个生物学重复得到的原始 reads 数($\times10^6$)、过滤后的 clean reads($\times10^6$)以及 clean reads 占比分别为 45.57、45.57、45.57;44.93、44.95、45.00;98.58%、98.64%、98.74%。NIT1 组 3 个生物学重复得到的原始 reads 数($\times10^6$)、过滤后的 clean reads($\times10^6$)以及 clean reads 占比分别为 45.57、45.57、45.57;44.79、44.90、44.89;98.27%、98.52%、98.50%(表 2)。其中各样本碱基质量值大于等于 30 占比均在 85%以上,提示测序质量较好。

表 2 两组样本 reads 数比较

组别	原始 reads ($\times10^6$)	clean reads ($\times10^6$)	clean reads (%)	碱基质量值 ≥30%(%)
HG-1	45.57	44.93	98.58	91.94
HG-2	45.57	44.95	98.64	91.51
HG-3	45.57	45.00	98.74	91.26
NIT1-1	45.57	44.89	98.50	91.12
NIT1-2	45.57	44.79	98.27	91.73
NIT1-3	45.57	44.90	98.52	91.62

2.2 各组生物学重复样本的基因表达量及相关性分析

两组样本的基因表达量的 Pearson 相关系数如图 1 所示,相关系数越高,代表基因表达水平越相似。结果显示:HG 组 3 个生物学重复样本 HG-1、2、3 的检测结果一致性较好,而 NIT1 组中生物学重复样品 NIT1-1 与 NIT1-2、NIT1-3 存在明显偏离。因此,为了减少误差,后续分析将 NIT1-1 样本数据剔除。



颜色代表 Pearson 相关性系数(颜色越深,代表相关性越高,颜色越浅,代表相关性越低)

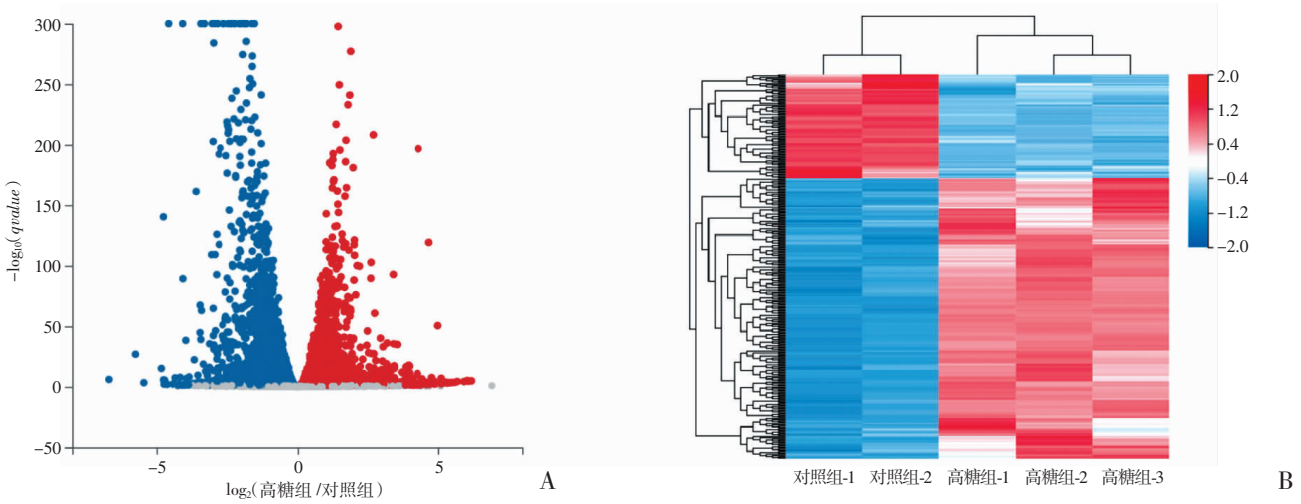
图 1 HG 组和 NIT1 组样本相关性分析

2.3 差异表达基因(DEGs)的筛选及聚类分析

HG 组和 NIT1 组之间检测到 DEGs 5 548 个,其中 HG 组上调 DEGs 2 701 个,下调 DEGs 2 847 个(图 2A)。对其中 303 个差异较大的 DEGs(FDR<0.05,$\log_2$ fold change>1)进行聚类分析,获得聚类热图(图 2B),更直观看到组间 DEGs 表达量的变化以及组内样品表达一致性。

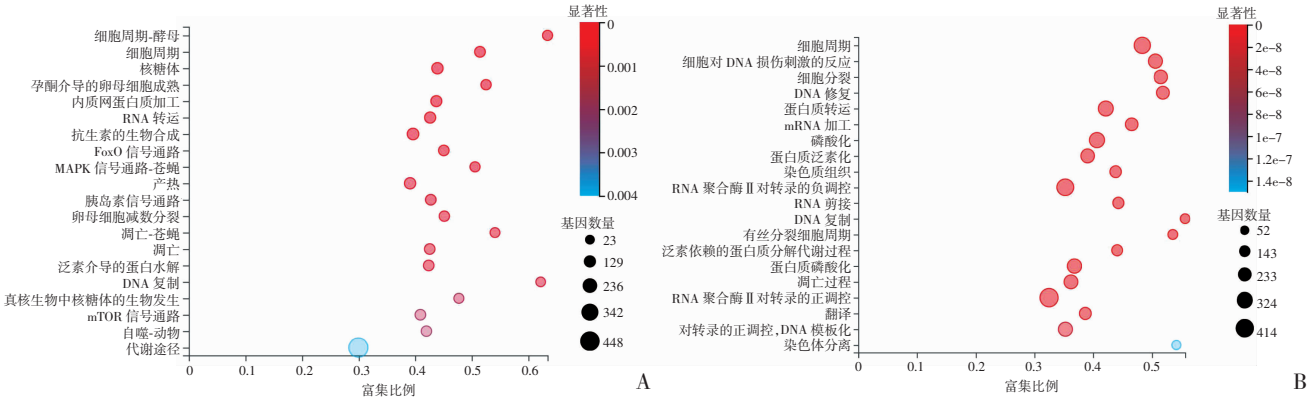
2.4 DEGs 的 KEGG Pathway 富集分析以及 GO 生物学过程富集分析

对全部 DEGs 进行 KEGG 通路(pathway)和 GO 生物学过程(biological process)富集分析,前 20 位结果如图 3 所示。分别对上、下调 DEGs 进行 KEGG Pathway 和 GO 生物学过程富集分析,前 10 位结果显示:上调基因主要富集在 MAPK signaling pathway-fly、Apoptosis-fly、Autophagy-animal、Protein processing in endoplasmic reticulum、mTOR signaling pathway 等通路,以及 cellular response to DNA damage stimulus、protein transport、positive regulation of transcription by RNA polymerase Ⅱ、ubiquitin-dependent protein catabolic process、mRNA processing 等相关生物学过程(表 3)。下调基因主要富集在 Ribsome、Biosynthesis、Cell cycle、Metabolic pathways、DNA replication 等通路以及 DNA repair、cell division、translation、rRNA processing 等生物学过程(表 4)。



A:差异基因火山图 红色代表上调的 DEGs;蓝色代表下调的 DEGs;灰色代表非 DEGs;B:差异基因聚类热图色块的颜色越红,表达量越高;颜色越蓝,表达量越低

图 2 HG 组与 NIT1 组间的差异基因



气泡的大小表示注释到某个通路上的基因数目;颜色代表富集 *qvalue* 值,颜色越深,代表 *qvalue* 值越小

图 3 差异基因的 KEGG(A)和 GO(B)富集分析

2.5 差异基因生物学功能的 GSEA 验证

对样品中检测到的所有基因进行 GSEA 验证(表 5、6),可以看到,胰岛素分泌通路、泛素介导的蛋白质降解、炎症反应、抗原的提呈等通路的富集分数均大于 0,说明他们在 HG 组的表达上调,与 KEGG Pathway 对上调基因的富集分析的结果(表 3)基本一致。同时泛素化介导的蛋白质降解、胰岛素分泌相关过程、自噬及抗原加工提呈等生物学过程也与 GO 功能显著性分析结果(表 3)基本一致,均在 HG 组中表达上调,说明 KEGG Pathway 和 GO 富集方法的可靠性较高。

表 3 HG 组上调 DEGs 的 KEGG Pathway 以及 GO 富集分析

通路名称	富集基因数	校正后的显著性
上调基因前 10 位 KEGG Pathway		
MAPK signaling pathway-fly	87	1.49E-05
Apoptosis-fly	61	1.49E-05
Adherens junction	75	6.34E-04
Autophagy-animal	150	8.67E-04
MAPK signaling pathway	332	0.001 164 761
Hedgehog signaling pathway-fly	28	0.001 247 686
Protein processing in endoplasmic reticulum	192	0.002 191 812
Cholinergic synapse	119	0.002 191 812
Cell cycle-yeast	71	0.002 567 446
mTOR signaling pathway	171	0.002 567 446
上调基因 GO 分析前 10 位 Biological Process		
cellular response to DNA damage stimulus	492	1.67E-07
protein transport	650	1.67E-07
positive regulation of transcription by RNA polymerase Ⅱ	1 274	1.09E-06
ubiquitin-dependent protein catabolic process	288	1.44E-06
phosphorylation	691	2.34E-06
mRNA processing	395	5.43E-06
negative regulation of transcription by RNA polymerase Ⅱ	1 001	1.48E-05
protein localization to plasma membrane	153	2.69E-05
post-embryonic development	116	6.46E-05
DNA repair	368	9.02E-05

表 4 HG 组下调 DEGs 的 KEGG Pathway 以及 GO 富集分析

通路名称	富集基因数	校正后的显著性
下调基因前 10 位 KEGG Pathway		
Ribosome	223	1.36E-15
Biosynthesis of antibiotics	275	3.69E-09
Biosynthesis of secondary metabolites	474	3.79E-07
Biosynthesis of amino acids	105	2.01E-06
Carbon metabolism	161	2.12E-06
Cell cycle	138	2.12E-06
Metabolic pathways	1 497	3.47E-06
RNA transport	211	4.82E-06
DNA replication	37	1.40E-05
Progesterone-mediated oocyte maturation	99	1.97E-05
下调基因 GO 分析前 10 位 Biological Process		
cell cycle	672	5.23E-31
cell division	425	1.24E-26
translation	437	3.57E-22
cellular response to DNA damage stimulus	492	2.23E-18
DNA repair	368	2.37E-17
mitotic cell cycle	140	9.37E-11
DNA replication	124	1.16E-10
chromosome segregation	96	3.26E-09
rRNA processing	177	4.11E-09
mRNA processing	395	2.15E-08

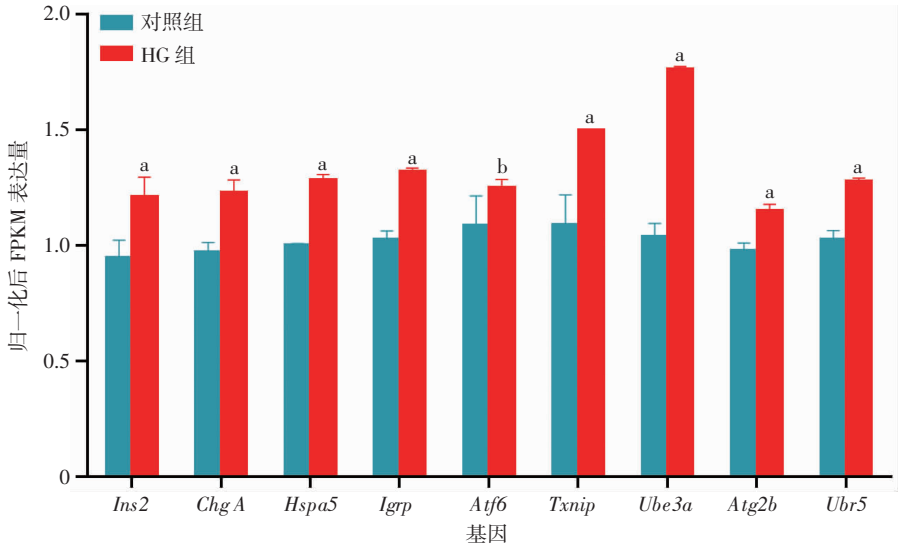
表 5 KEGG Pathway 富集分析的 GSEA 验证

通路代码	KEGG Pathway 通路	富集基因数目	富集分数
4141	Protein processing in endoplasmic reticulum	163	0.172 981 77
4911	Insulin secretion	84	0.213 707 94
4910	Insulin signaling pathway	136	0.122 902 45
4120	Ubiquitin mediated proteolysis	144	0.188 684 17
4215	Apoptosis-multiple species	30	0.178 407 92
4630	Jak-STAT signaling pathway	120	0.310 245 80
4010	MAPK signaling pathway	273	0.163 864 27
4064	NF-kappa B signaling pathway	79	0.241 611 93
4612	Antigen processing and presentation	71	0.182 947 58
3010	Ribosome	170	−0.238 397 94
1130	Biosynthesis of antibiotics	226	−0.305 821 80
1110	Biosynthesis of secondary metabolites	385	−0.204 304 81
1230	Biosynthesis of amino acids	84	−0.326 236 46
1200	Carbon metabolism	128	−0.320 427 40
4110	Cell cycle	128	−0.177 749 14
3030	DNA replication	35	−0.294 243 60

表 6 GO 分析中 Biological Process 的 GSEA 验证

通路代码	GO_Biological Process 名称	富集基因数目	富集分数
GO:0030968	endoplasmic reticulum unfolded protein response	42	0.248 792 62
GO:0034620	cellular response to unfolded protein	22	0.244 105 44
GO:0035774	positive regulation of insulin secretion involved in cellular response to glucose stimulus	38	0.402 310 52
GO:0031398	positive regulation of protein ubiquitination	66	0.193 261 52
GO:0006914	autophagy	147	0.199 917 80
GO:0097194	execution phase of apoptosis	16	0.397 355 68
GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process	255	0.282 350 48
GO:0051726	regulation of cell cycle	145	−0.208 222 79
GO:0051301	cell division	386	−0.129 876 48
GO:0006412	translation	312	−0.291 277 77
GO:0006281	DNA repair	345	−0.143 457 93
GO:0000278	mitotic cell cycle	130	−0.232 457 88
GO:0006260	DNA replication	120	−0.212 249 26
GO:0007059	chromosome segregation	86	−0.283 986 30
GO:0006364	rRNA processing	152	−0.136 235 27

从这些 DEGs 中选择出与 T1D 自身抗原以及内质网应激、蛋白质降解、加工及处理过程有关的基因,分析它们在对照组和 HG 组的 mRNA 表达情况(图 4),其中 *Ins*2(Gene ID:16334;蛋白名称:胰岛素 Ⅱ)与胰岛素信号通路有关;并且和 *Chg A*(Gene ID:12652)编码的嗜铬粒素 A(Chromogranin A)、*Hspa*5(Gene ID:14828)编码的 HSPA5(热休克蛋白 5)以及 *Igrp*(Gene ID:14378)编码的 IGRP 葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基相关蛋白)同为关键的胰岛 β 细胞自身抗原;*Atf*6(Gene ID:226641)涉及内质网应激反应通路;*Txnip*(Gene ID:56338)编码的 TXNIP(硫氧还蛋白相互作用蛋白)是被内质网应激上调的蛋白,*Ubr*5(Gene ID:70790)、*Ube3a*(Gene ID:22215)是泛素介导的蛋白质降解相关酶基因;*Atg2b*(Gene ID:76559)是自噬通路的代表基因。结果显示:与对照组相比,它们在 HG 组中均显著性上调表达。进一步使用定量 PCR 检测未处理及高糖处理的 NIT-1 中 *Ins*2、*Chg A*、*Atf*6、*Txnip* 及 *Ube3a* 等基因的 mRNA 水平(图 5),结果显示:与对照组相比,除 *Atf*6 外,其余基因的 mRNA 水平均在 HG 组显著上调,但变化倍数不大。因此,这些结果表明本研究的转录组测序分析结果基本可靠。



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较

图 4 对照组和高糖组差异基因归一化后表达量

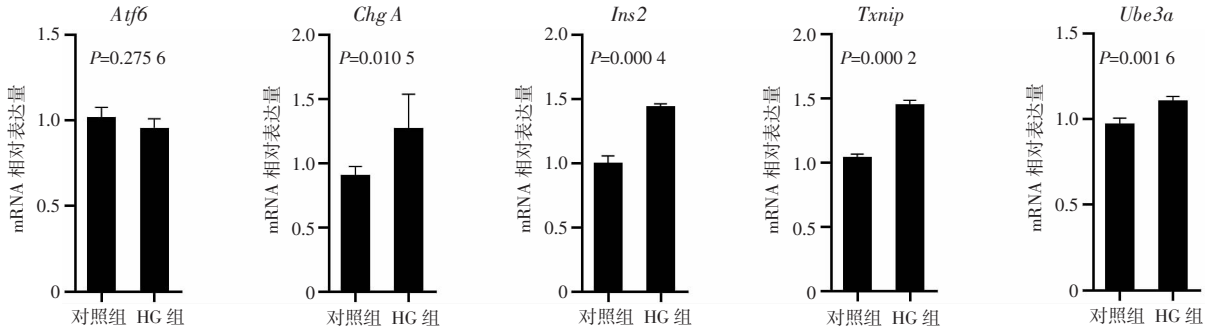


图 5 对照组和 HG 组中各基因 mRNA 相对表达量

3 讨论

本研究选用的胰岛 β 细胞系 NIT-1 细胞来源于 10 周龄雌性 NOD 小鼠,该小鼠具有 T1D 遗传易感基因表型,可自发进展为 T1D,因此分析高糖因素对 NIT-1 细胞系的全转录组表达谱的影响,对于进一步在 NOD 小鼠模型中研究高糖参与 T1D 发病的作用机制有较好的指导意义。RNA-Seq 技术是基于高通量测序对转录组进行的全面分析,能够从整体水平上对生物体基因表达的变化进行研究。

以往研究表明:在 T1D 中真正造成 β 细胞大量破坏的是针对 β 细胞自身抗原的自身反应性 T 细胞[10],而环境因素可能为这些自身抗原的产生、暴露等创造了有利条件。早期研究发现:β 细胞在高糖刺激后,可增加自身抗原谷氨酸脱羧酶 GAD 的表达[11]。本研究 RNAseq 数据显示:在高糖刺激下 NIT-1 细胞的胰岛素(insulin)表达上调。胰岛素作为一种关键自身抗原在 T1D 发生的过程中发挥重要作用。文献[12]证实:在高糖浓度下,β 细胞的胰岛素原信号表位呈递增加,细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤作用也增强。在携带易感基因的 T1D 患者体内,胰岛素在胸腺中的表达出现缺陷,导致特异性识别胰岛素表位的自身反应性 T 细胞逃避阴性选择进入外周,进而特异性攻击提呈了胰岛素表位的 β 细胞[13-14],但不同分泌形式或者不同处理方式的胰岛素被抗原提呈细胞摄取和激活 T 细胞的能力不同[15],可见胰岛素的表达水平及其致病性表位的形成在 T1D 中的具体作用仍有较大的研究空间。此外,本研究还发现 Chg A、HSP 和 IGRP 等重要 T1D 自身抗原的表达也在高糖处理后的 NIT-1 细胞中上调。ChgA 是一种 β 细胞分泌颗粒蛋白,其肽段 WE14 可被 NOD 小鼠 $CD4^+$T 细胞克隆特异性识别[16]。这些结果提示:高糖可能通过上调 β 细胞关键致病性自身抗原的表达,促进自身免疫反应的启动。

β 细胞由于其正常的胰岛素产生和分泌的生理作

用而自然承受高水平的内质网应激,已有研究证实高糖环境能诱导 β 细胞发生内质网应激和凋亡[6]。本研究通过全转录组测序分析也同样发现高糖刺激能显著上调 NIT-1 细胞内质网应激和凋亡过程。高糖条件下,内质网蛋白质加工通路上的 Atf6(activating transcription factor 6)显著上调,Atf6 是一种跨膜蛋白,与核糖核酸依赖的蛋白激酶样 ER 激酶(PERK)、肌醇需求蛋白 1(IRE1)都位于内质网膜上,为了应对错误蛋白在内质网内的积聚引起的内质网应激而被激活,启动未折叠蛋白反应以减轻内质网蛋白负荷[17]。同时,TNXIP,一种被内质网应激上调的蛋白质,最近被认为与糖尿病相关的 β 细胞死亡有关[18],也在高糖刺激后表达上调。在 T1D 中,环境因素诱导的 β 细胞内质网应激和凋亡可能是形成自身抗原并早期触发自身免疫反应的重要原因[19]。有研究创新性提出"阈值假设"模型[20],即在许多环境因素,如病毒感染、化学物质或炎性细胞因子的影响下,β 细胞持续发生高强度内质网应激并达到 1 个阈值,导致自身抗原形成及修饰发生改变,而自身抗原的降解及加工提呈也相应发生改变,在易感的遗传背景下,这些自身抗原可以激活自身反应性 T 细胞,进而特异性攻击 β 细胞,最终发生 T1D[21-22]。本研究结果显示:高糖条件下,NIT-1 中 *Ubr5*、*Ube3a*、*Ube2l3* 等泛素化过程相关基因显著上调。由泛素化介导的蛋白酶体途径是降解错误蛋白重要路径之一[23]。研究证实蛋白酶体抑制剂硼替佐米在 T1D 早期可能具有抗 β 细胞凋亡保护作用[24],这可能是因为泛素化介导的蛋白酶体途径对错误蛋白质的降解促进了自身抗原表位的产生[25-26],进一步导致自身反应性 T 细胞对 β 细胞的破坏。

自噬与 T1D 的关系近年来才开始被关注,有假说提出胰岛 β 细胞自噬途径的过度表达会导致 T1D 的加剧[27]。本研究 RNA-Seq 结果显示:高糖条件下,NIT-1 细胞自噬相关基因 *Ulk1*、*Atg2b* 的表达显著上调,表明高糖条件促进了 β 细胞的自噬进程。由于一些细胞内抗原的溶酶体蛋白水解产物形成自噬小体可以加载到主要组织相容性复合体(MHC)Ⅱ类分子,提呈给 $CD4^+$ T 细胞识别并活化[28],进而有研究提出自噬产物可以作为自身抗原的来源,虽然具体的机制仍未得到明确的阐释。我们推测高糖诱导的自噬也可能促进了自身抗原的产生、加工与提呈,从而加速自身免疫介导的 β 细胞破坏以及 T1D 的进程。如果这种假设是正确的,就可以通过靶向自噬,为 T1D 患者提供新的治疗方法。

本研究仍存在以下不足:一是虽然样本的重复性较好,但生物性重复样品量偏少,可能会遗漏部分差异基因;二是仅在 β 细胞转录组水平上对高糖的影响进行研究,未分析蛋白质水平的表达差异;三是只筛选了部分得到验证的 T1D 自身抗原,缺少在蛋白质或肽水平的自身抗原全面筛选,下一步可以结合蛋白质组学进行深入研究。

综上所述,本研究通过全转录组测序发现高糖环境可刺激 NOD 小鼠来源的胰岛 β 细胞自身抗原以及处理异常蛋白的内质网应激反应、泛素蛋白酶体途径以及自噬相关基因的表达上调。进而推测高糖环境可能通过促进胰岛 β 细胞中自身抗原的产生及加工、处理及提呈,进而参与 T1D 的发生、发展。研究结果提示:对高糖环境下胰岛 β 细胞自身抗原产生、异常蛋白降解途径、加工与提呈变化的深入研究,将有助于进一步理解饮食习惯和 T1D 的关系,以及 T1D 的发病机制,并提供新的防治靶点及策略。

参考文献:

[1] DIMEGLIO L A, EVANS-MOLINA C, ORAM R A. Type 1 diabetes[J]. Lancet, 2018, 391(10138): 2449-2462. DOI: 10.1016/s0140-6736(18)31320-5.

[2] POCIOT F, LERNMARK Å. Genetic risk factors for type 1 diabetes[J]. Lancet, 2016, 387(10035): 2331-2339. DOI: 10.1016/s0140-6736(16)30582-7.

[3] ESPOSITO S, TONI G, TASCINI G, *et al*. Environmental factors associated with type 1 diabetes[J]. Front Endocrinol, 2019, 10: 592. DOI:10.3389/fendo.2019.00592.

[4] BROZZI F, NARDELLI T R, LOPES M, *et al*. Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms[J]. Diabetologia, 2015, 58(10): 2307-2316. DOI:10.1007/s00125-015-3669-6.

[5] LAMB M M, FREDERIKSEN B, SEIFERT J A, *et al*. Sugar intake is associated with progression from islet autoimmunity to type 1 diabetes: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young[J]. Diabetologia, 2015, 58(9): 2027-2034. DOI: 10.1007/s00125-015-3657-x.

[6] BACK S H, KAUFMAN R J. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes[J]. Annu Rev Biochem, 2012, 81(1): 767-793. DOI:10.1146/annurev-biochem-072909-095555.

[7] COCK P J A, FIELDS C J, GOTO N, *et al*. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(6): 1767-1771. DOI:10.1093/nar/gkp1137.

[8] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nat

Methods, 2015, 12(4): 357-360. DOI:10.1038/nmeth.3317.

[9] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biol, 2014, 15(12): 550. DOI:10.1186/s13059-014-0550-8.

[10] LENNON G P, BETTINI M, BURTON A R, *et al*. T cell islet accumulation in type 1 diabetes is a tightly regulated, cell-autonomous event[J]. Immunity, 2009, 31(4): 643-653. DOI:10.1016/j.immuni.2009.07.008.

[11] BJÖRK E, KÄMPE O, KARLSSON F A, *et al*. Glucose regulation of the autoantigen GAD65 in human pancreatic islets[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1992, 75(6): 1574-1576. DOI:10.1210/jcem.75.6.1464667.

[12] SKOWERA A, ELLIS R J, VARELA-CALVIÑO R, *et al*. CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope[J]. J Clin Investig, 2008, 118(10): 3390-3402. DOI:10.1172/JCI35449.

[13] WEI J J, YEWDELL J W. Peptide secretion triggers diabetes[J]. Nature, 2018, 560(7716): 33-34. DOI:10.1038/d41586-018-05710-z.

[14] MOHAN J F, LEVISETTI M G, CALDERON B, *et al*. Unique autoreactive T cells recognize insulin peptides generated within the islets of Langerhans in autoimmune diabetes[J]. Nat Immunol, 2010, 11(4): 350-354. DOI:10.1038/ni.1850.

[15] FERRIS S T, CARRERO J A, UNANUE E R. Antigen presentation events during the initiation of autoimmune diabetes in the NOD mouse[J]. J Autoimmun, 2016, 71: 19-25. DOI:10.1016/j.jaut.2016.03.007.

[16] STADINSKI B D, DELONG T, REISDORPH N, *et al*. Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes[J]. Nat Immunol, 2010, 11(3): 225-231. DOI:10.1038/ni.1844.

[17] ENGIN F. ER stress and development of type 1 diabetes[J]. J Investig Med, 2016, 64(1): 2-6. DOI:10.1097/JIM.0000000000000229.

[18] SHALEV A. Minireview: Thioredoxin-interacting protein: regulation and function in the pancreatic β-cell[J]. Mol Endocrinol, 2014, 28(8): 1211-1220. DOI: 10.1210/me.2014-1095.

[19] MARRÉ M L, JAMES E A, PIGANELLI J D. B cell ER stress and the implications for immunogenicity in type 1 diabetes[J]. Front Cell Dev Biol, 2015, 3: 67. DOI:10.3389/fcell.2015.00067.

[20] MARRÉ M L, PIGANELLI J D. Environmental factors contribute to β cell endoplasmic Reticulum stress and neo-antigen formation in type 1 diabetes[J]. Front Endocrinol, 2017, 8: 262. DOI:10.3389/fendo.2017.00262.

[21] BLUESTONE J A, HEROLD K, EISENBARTH G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes[J]. Nature, 2010, 464(7293): 1293-1300. DOI:10.1038/nature08933.

[22] LAM-TSE W K, LERNMARK A, DREXHAGE H A. Animal models of endocrine/organ-specific autoimmune diseases: do they really help us to understand human autoimmunity?[J]. Springer Semin Immunopathol, 2002, 24(3): 297-321. DOI: 10.1007/s00281-002-0110-2.

[23] THOMAIDOU S, ZALDUMBIDE A, ROEP B O. Islet stress, degradation and autoimmunity[J]. Diabetes Obes Metab, 2018, 20(Suppl 2): 88-94. DOI:10.1111/dom.13387.

[24] MONDANELLI, G, ALBINI E, PALLOTTA M T, *et al*, The proteasome inhibitor bortezomib controls indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 breakdown and restores immune regulation in autoimmune diabetes[J]. Front Immunol, 2017, 8: 428. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00428. eCollection 2017.

[25] EBSTEIN F, TEXTORIS-TAUBE K, KELLER C, *et al*. Proteasomes generate spliced epitopes by two different mechanisms and as efficiently as non-spliced epitopes[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24032. DOI:10.1038/srep24032.

[26] BERKERS C R, DE JONG A, SCHUURMAN K G, *et al*. Peptide splicing in the proteasome creates a novel type of antigen with an isopeptide linkage[J]. J Immunol, 2015, 195(9): 4075-4084. DOI:10.4049/jimmunol.1402454.

[27] FIERABRACCI A. The putative role of proteolytic pathways in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: the 'autophagy' hypothesis[J]. Med Hypotheses, 2014, 82(5):553-557. DOI: 10.1016/j.mehy.2014.02.010.

[28] SCHMID D, PYPAERT M, MÜNZ C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class Ⅱ molecules continuously receive input from autophagosomes[J]. Immunity, 2007, 26(1): 79-92. DOI:10.1016/j.immuni.2006.10.018.

(收稿:2020-11-16;修回:2021-01-13)

(编辑 王 红)