维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0921-04

蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 与胰岛素抵抗及 2 型糖尿病的关系

丁岩军 综述,彭惠民 审校

(重庆医科大学细胞生物学及遗传学教研室,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R587.1;R329.2+8 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-07-05

蛋白质酪氨酸磷酸化是细胞代谢、信号传导及细胞周期调控的重要调节步骤。蛋白质酪氨酸磷酸酶 -1B(Protein-tyrosine Phosphatase-1B,PTP1B)属于蛋白质酪氨酸磷酸酶家族,是在体内广泛表达的胞内蛋白质酪氨酸磷酸酶,由 PTPN1 基因编码,PTP1B 通过对胰岛素受体激酶 (insulin receptor kinase,IRK)或 IRK 活性片段的磷酸化酪氨酸残基去磷酸化作用对胰岛素信号传导进行负调节。PTP1B 表达的改变,与人类的多种疾病相关,包括 2 型糖尿病和癌症等。越来越多的证据表明:PTPIB 在调节胰岛素敏感性和能量代谢过程中均起着重要作用。

1 PTP1B 的基因定位、表达调控和蛋白质结构

1.1 基因定位

人类 PTPN1(Protein Tyrosine Phosphatese N1)基因编码 PTP1B,该基因于 1990 年首次克隆成功,定位于 20ql3.1-q13.2,为单拷贝基因。2000 年 Forsell 克隆并确定了人及大鼠 PTPN1 基因包括启动子的结构,人类 PTPN1 基因全长约 74kb,共有 10 个外显子,其中内含子 1 长度超过 54kb。人与大鼠 PTPN1 基因的结构十分相似,但人类 PTPN1 基因的 3' 末端比大鼠多 1 个外显子。大鼠的 PTP1B 基因被定位于 2 号染色体的远端 H2~H3 区,与人类 20 号染色体有保守性同源序列。PTPN1 启动子序列内有一增强子序列是转录因子 YB-1(Ybox-binding protein-1)的结合位点,用特异的反义核苷酸抑制 YB-1 表达可导致 PTP1B 表达水平下降约 70%[1]。

1.2 表达调控

人类 PTP1B 基因 mRNA 有两种选择性剪接产物。一种长约 4.7kb,终止于内含子 9,另一种长 3.5kb,内含子 9 被剪切,序列终止于外显子 10[2]。发生选择性剪接的原因目前尚不清楚。Susan 等[3]通过对 21 名 Pima 印第安人测试后发现,在加入胰岛素培养的人成纤维细胞中可观察到两种剪接体的比率发生了变化,剪接变体的比率与空腹血浆胰岛素浓度 ($r=0.757$;$P=0.000\,1$)、口服葡萄糖耐量试验 2h 后血浆胰岛素浓度($r=0.614$;$P=0.01$, $n=16$)、机体脂肪百分数($r=0.746$;$P=0.0001$)分别呈正相关。两种剪接体在分离的血细胞中均可表达,两种剪接体比率变化的生化意义目前仍未明确,可能是反映了信号传导水平的高低。

1.3 蛋白质结构

PTPN1 基因 cDNA 全长 1305bp,编码 435 个氨基酸的蛋白质,分子量为 49966Da。PTP1B 的 N 端是 N- 乙酰蛋氨酸,为催化结构域,富含脯氨酸的 C 末端将其锚定于内质网。PTP1B 通过 N 端结构域与胰岛素受体(IR)结合并负调节胰岛素信号,该结构域的点突变不影响 PTP1B 活性,但干扰 PTP1B 和 IR 的结合,这种结合缺陷的 PTP1B 突变体不能有效地对 IR 去磷酸化,而不能有效抑制胰岛素信号的传导[4]。PTP1B C 端可对整合后的信号传导过程进行负调节。PTP1B 的结构与白细胞共同抗原 CD45 胞浆区相关,与神经细胞粘附分子相似。PTP1B 121 和 215 位的半胱氨酸残基是该家族的保守区域,与催化活性有关;259 位残基是甘氨酸允许底物识别,该残基是 PTP1B 底物特异性的决定因素。

2 PTP1B 与胰岛素信号传导的关系

细胞信号传导复杂,细胞内存在着数不胜数的磷酸化和去磷酸化,仅一个 PTP1B 就存在于许多信号传导途径中,包括 Neu 致癌基因的转化、Src 激酶的活化、leptin 和胰岛素刺激的信号传导途径等。事实证明,PTP1B 使胰岛素信号传导途径中的信号分子磷酸化的酪氨酸残基去磷酸化从而阻止胰岛素信号传导级联放大效应。

IR 是一种异四聚体膜蛋白 ($\alpha_2\beta_2$),α 亚单位位于胞外,β 亚单位包括胞外部分、跨膜部分及胞内部分,胞内部分包括近膜区、调控区及 C 末端区。胞内亚单位含有酪氨酸激酶活性区域。胰岛素结合质膜上的 IR 引起 IR 四聚体分子两对 α β 亚基之间的变构作用,使 β 亚单位催化结构域自身磷酸化,酪氨酸激酶活性被激活,自动磷酸化激酶活性区三个重要的酪氨酸残基,包括 IR Tyr 1146、1150 和 1151,而使酪氨酸激酶的活性达到最大。继而将胰岛素受体底物 -1 (insulin receptor substrate,IRS-1) 的多个酪氨酸残基磷酸化,

作者介绍:丁岩军(1979-),女,硕士研究生,
主要研究方向:糖尿病分子遗传学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

IRS-1 的这些磷酸化的酪氨酸残基成为细胞内信号蛋白的高亲和力结合位点和激活位点。对该过程的调节涉及到正负调节因子的协同作用,在众多负调节因子中 PTP1B 作用尤为突出。

Xu J 等[5]用 RNA 干扰技术下调肝肿瘤细胞中 PTP1B 的表达,结果上调了胰岛素信号的传导。PTPN1 基因敲除小鼠不仅胰岛素敏感性增强,对饮食诱导的肥胖有很强的抵抗作用,且在肌肉和肝组织中,胰岛素诱导的受体的酪氨酸磷酸化增加。这些研究表明 PTP1B 是胰岛素信号传导的负调节因子。

Seely 等用 PTP1B 和有一突变位点的谷胱甘肽 S- 转移酶(GST)融合蛋白研究 PTP1B 与 IR 间的相互作用。融合蛋白 GST 无活性,但保留了磷酸酶结合磷酸化酪氨酸的部位。用 PTP1B-GST 从精制的受体制品和完整细胞的溶解产物提取出了活化的 IR,证明了他们之间的直接的相互关系。无催化活性的[35S]PTP1B- 融合蛋白直接与 IR 激酶区域结合,可以浓度依赖的方式被移除,相互作用的部位是多个不同的磷酸化酪氨酸部位。

PTP1B 位于内质网的胞浆面,IR 位于质膜,Boute 等[6]用 BRET 技术研究活细胞中 PTP1B 和 IR 的相互作用,证明二者在细胞里利用生物发光共振能量转移(BRET)相互作用。IR 融合于花虫荧光素酶,PTP1B 底物诱捕突变体融合于绿色荧光蛋白的黄色突变种 YFP。二者相互作用时,荧光素酶与 YFP 间能量转移,YFP 发出荧光信号可以检测,胰岛素剂量依存性地刺激二者间的相互作用。IR 与溶解的 PTP1B 间的相互作用比与定位于内质网上的 PTP1B 间的相互作用低的多,提示 IR 与 PTP1B 的相互作用主要发生于内质网。采用共聚焦显微镜技术和细胞分部分离实验表明在基础状态下(胰岛素依赖性的二者间的相互作用) 二者同位于内质网上。衣霉素抑制 IR 的加工过程表明 PTP1B 不仅去磷酸化胰岛素激活的 IR 而且调节生物合成阶段的胰岛素受体前体[7]。

生物体内 IR 与 PTP1B 相互作用,使 PTP1B 酪氨酸磷酸化增加。在体外,胰岛素受体激酶催化 PTP1B 的酪氨酸磷酸化。在体内,细胞中 53%的 PTP1B 酪氨酸磷酸化源于胰岛素刺激作用。PTP1B 的酪氨酸由 IR 磷酸化,完全依赖于胰岛素刺激的受体自磷酸化作用。在生物体内和体外,分子间的相互去磷酸化得到了证明。在无细胞系统中,通过活性的野生型酶去磷酸已被磷酸化的 CS-PTP1B,在人胰岛素受体和 CS-PTP1B 过多表达的鼠成纤维细胞株(Hirc-M 细胞株)中野生型 PTP1B 过多表达而去磷酸化已被磷酸化的 CS-PTP1B。这些结果揭示了 PTP1B 是胰岛素受体激酶的底物,PTP1B 还自身去磷酸化调节磷酸酶的活性,维持活性状态(磷酸化的)与非活性状态(非磷酸化的)间的平衡[8]。

PTP1B 活性的调节机制仍不十分清楚。PTP1B 的晶体结构与变构抑制因子的复合体揭示了离催化部位约 20A 处存在一个部位,该部位变构抑制因子阻止酶活性部位的形成,妨碍 PTP1B 晶体环的灵活性,而增强细胞内胰岛素信号的传导[9]。Hansen 等[10]利用荧光指示剂 (4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (ABDF)) 选择性地与 PTP1B Cys121 残基反应,Cys121 被修饰而其他半胱氨酸残基不被修饰,结果 PTP1B 活性减弱。Cys121 位于催化活性中心以外,该部位高度保守。这种修饰降低酶 Vmax(酶促反应的最大速度),基本不影响底物结合的 Km(酶反应速度(V)达到 Vmax 一半时底物的浓度),说明存在活性中心以外的变构调节机制。His214 对 PTP1B 催化活性极其重要,其接触的残基与 Cys121 相互作用。PTP1B 变构调节机制使 PTP1B 磷酸酶的活性降低,以增强胰岛素信号的传导。

人们在对不同组织中表达的 PTP1B 进行研究时,发现体内还有一些小分子物质,如一氧化氮(NO)、过氧化氢(H_2O_2)也可能参与了 PTP1B 活性的调节。NO 在脊椎动物中有信号分子的作用,因为它是疏水性较强的胞外小信号分子,很容易通过扩散越过靶细胞质膜,一旦进入胞内就直接调节细胞质中特异蛋白质的活性。Sreejayan 等[11]证实了小鼠血管平滑肌细胞中的 NO 可增加 PTP1B 的活性,NO 可通过 PTP1B 对胰岛素信号传导下调机制减弱胰岛素刺激细胞的能动性。Mahadev 等[12]用胰岛素刺激胰岛素敏感的肝癌和脂肪细胞,胞内 H_2O_2 突然升高,PTP1B 活性被抑制 88%以上。表明氧化还原信号可使 PTP1B 氧化失活,加强了胰岛素刺激早期酪氨酸磷酸化的级联反应。

尽管 PTP1B 可能是胰岛素敏感性的重要调节因子,它在体内与胰岛素抵抗之间的相关性尚有争议。有报道称在肥胖的胰岛素抵抗研究对象中的脂肪和肌肉组织中 PTP 活性增加,其它在胰岛素抵抗和 2 型糖尿病啮齿动物模型中的研究则发现 PTP 活性降低。因此 PTP1B 在胰岛素抵抗和糖尿病中的生理病理机制尚有待进一步研究。

3 PTP1B 与胰岛素抵抗、2 型糖尿病的关系

2 型糖尿病属于多基因遗传病,由于其遗传异质性及多因子参与发病,其主要特征是胰岛素抵抗。广泛的 PTPN1 基因遗传分析发现其与代谢相关特征显著相关,与 PTP1B 蛋白在体内发挥的作用一致,去磷酸化胰岛素受体激酶活性部分的磷酸化的酪氨酸残基。在鼠模型中破坏 PTPN1 基因胰岛素敏感性增强。在体外,小分子物质抑制 PTP1B 后胰岛素敏感性增强[13]。

Clampit 等[14]用电穿孔法用特异性的 PTP1B 反义寡核苷酸 ASO 或对照寡核苷酸转染大鼠肝癌细胞。蛋白印迹分析 PTP1B ASO 使 PTP1B 蛋白表达减少 50%~70%,胰岛素刺激下,IRS 和 IRS 磷酸化增加,蛋白表达水平不变。Zinker 等[15]反义寡核苷酸处理糖尿病小鼠,使血糖水平、餐后葡萄糖和血红蛋白 A1c 趋于正常化,高胰岛素血症减轻,胰岛素敏感性改善,胰岛素信号蛋白水平增加。肝糖异生所需的酶磷酸烯醇丙酮酸羧激酶、果糖 -1,6- 二磷酸酶表达下降。肝和脂肪组织中 PTP1B 蛋白和 mRNA 水平降低。这些结果表明

维普资讯 http://www.cqvip.com

PTP1B 调节肝和脂肪组织中胰岛素信号传导。

有些研究小组检测到有些 PTPN1 基因 DNA 序列的变异、单核苷酸多态性(SNP)与 T2DM 相关,PTPN1 编码区的变异比较少见。Echwald 等[16]研究发现,在丹麦白种人 T2DM 个体之中 P387L 变异为 2.6%,健康对照者个体中为 1%,中国汉族样本[17](329 例 2 型糖尿病患者和 238 例对照)和芬兰样本[18](257 例 2 型糖尿病患者和 285 例对照)研究,报道该突变与 T2DM 无相关。Mok 等[19]确定了 981C→T 多态性,没有 T 等位基因的纯合体,与 PTP1B 蛋白无义突变相符,该多态性 Oji-Cree 印第安部落 2 型糖尿病者糖耐量受损有关,但与西班牙人群葡萄糖稳态的六个参数无关[20]。

此基因非编码区基因变异相继报道。Di Paola 等使用聚合酶链反应单链构象多态 (PCR-SSCP) 法在 PTPN1 的编码区及调节区寻找多态性。在意大利两个不同人群中确定了在 3' 非翻译区的 1484insG 变异与胰岛素抵抗的几项指标有关。通过对基因型不一致的同胞对进行家系相关研究也得到了同样的结论,携带 1484insG 的受试者骨骼肌中的 PTP1B mRNA 呈现过度表达[21]。在人胚肾细胞中分别转染 1484insG PTP1B 和野生型 PTP1B,前者 mRNA 的稳定性显著高于后者。因此,携带 1484insG 基因型的个体可能对于治疗胰岛素抵抗的 PTP1 B 抑制剂比较敏感。但此多态性与丹麦样本人群[16]2 型糖尿病患者体重指数(BMI)、空腹血糖(FPG)或空腹胰岛素无关,与瑞典的样本人群[22]2309 例非糖尿病研究对象无关。

Palmer 等[20]从胰岛素抵抗动脉硬化症研究家庭研究(I-RASFS)中抽取 811 例研究对象,评估 PTPN1 与葡萄糖稳态指标的相关性。在包含 PTPN1 的基因区内,确认了 35 个 SNP,大多数 SNPs 位于非编码区,平均密度为 1SNP/4.7kb,最大的 SNPs 间距为 19.4kb,最小的为 4bp,基因型频率符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。SNP rs4811077 到 SNP rs1060402 共 94 kb,包含整个 PTPN1 基因,位于一个连锁不平衡单倍型内。分析 8 个 SNP(rs941798、rs3787345、rs754118、rs2282147、rs718049、rs718050、rs3787348、1484insG) 组成的单倍型与胰岛素敏感指数(Si)和 FPG 的关系。在显性模型中,单倍型 ACTTCAG0 与低 Si 和高 FPG 明显相关;在附加的和隐性模型中单倍型 GTCCTGT0 与高 Si 和低 FPG 明显相关;在隐性模型中,单倍型 ATCCTGG0 与 Si 相关,该单倍型与 FPG 无关,所以认为 ATCCTGG0 是中性作用。单倍型 ACTTCAG0 和 GTCCTGT0 分别与 2 型糖尿病风险和保护作用有关[23]。

诸多研究表明 PTPN1 基因 SNP 多态性及变异与 2 型糖尿病有密切联系。但 PTPN1 基因的遗传分析往往是局限于某一种族人群样本中进行的,且不同国家和群体的研究结果也不尽相同,因此,PTPN1 基因与 2 型糖尿病间的关系尚有待各国研究者证实。

4 前景和展望

2 型糖尿病与影响世界过亿人的代谢综合症紧密相关,寻找高效高选择性的 PTP1B 抑制剂将为 2 型糖尿病的治疗开辟新途径。特异性的 PTP1B 小分子抑制剂已逐渐开发并用于 2 型糖尿病的治疗中。特异的反义核苷酸可抑制 γB-1 表达,使胰岛素敏感性增加,与 PTP1B 结构相似的 TC-PTP 的表达水平未受影响。PTP1B 的天然抑制因子复合物 1-3 是目前报道的有效的选择性 PTP1B 抑制因子,复合物 2 和 3 能使 IRβ、IRS-1 的酪氨酸磷酸化增加近 2 倍。基于 PTP1B 的变构抑制效应可寻找有效的变构抑制因子。

PTP1B 抑制剂的研究已取得一定的进展,但 PTPN1 基因多态性与 2 型糖尿病的关系及 PTP1B 在胰岛素信号传导中的作用途径和调节机制还未完全明确,继续深入研究不但可以阐明 PTP1B 的生理功能,也可为治疗 2 型糖尿病提供光明前景。

参 考 文 献

[1] Fukada T,Tonks NK.Identification of YB-1 as a regulator of PTP1B expression: implications for regulation of insulin and cytokine signaling[J]. EMBO J,2003;22(3):479-493.

[2] Forsell P K A L,Bole Y,Montalib J,et al.Genomic Characterization of the human and mouse protein tyrosine phosphatase-1B[J]. Gene,2000;260:145-153.

[3] Sell SM,Reese D.Insulin-inducible changes in the relative ratio of PTP1B splice variants[J].Mol Genet Metab,1999;66(3):189-192.

[4] Dadke S,Kusari J,Chernoff J. Down-regulation of insulin signaling by protein-tyrosine phosphatase 1B is mediated by an N-terminal binding region[J]. J Biol Chem,2000;75:23642-23647.

[5] Xu J,Li L,Qian Z,Hong J,et al.Reduction of PTP1B by RNAi upregulates the activity of insulin controlled fatty acid synthase promoter[J]. Biochem Biophys Res Commun,2005;329(2):538-543.

[6] Boute N, Boubekeur S, Lacasa D, et al. Dynamics of the interaction between the insulin receptor and protein tyrosine-phosphatase 1B in living cells[J]. EMBO Rep,2003;4: 313-319.

[7] Issad T, Boute N, Boubekeur S, Lacasa D.Interaction of PTPB with the insulin receptor precursor during its biosynthesis in the endoplasmic reticulum[J]. Biochimie,2005;87(1):111-116.

[8] Shrikrishna Dadke, Anasua Kusari, Jyotirmoy Kusari. Phosphorylation and activation of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B by insulin receptor[J]. Molecular and Cellular Biochemistry,2001;221: 147-154.

[9] Wiesmann C, Barr KJ, Kung J, et al. Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B[J].Epub 2004 Jul 18. Nat Struct Mol Biol,2004;(8):730-737.

[10] Hansen SK, Cancilla MT, Shiau TP,et al. Allosteric inhibition of PTP1B activity by selective modification of a non-active site cysteine residue[J]. Biochemistry, 2005;44(21):7704-7712.

[11] Sreejayan N,Lin Y,Hassid A. NO attenuate insulin signaling and motility in aortic smooth muscle cells via tyrosine phosphatase 1B-mediated mechanism [J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,2002;22(7):

维普资讯 http://www.cqvip.com

1086-1092.

[12] Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, et al. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1B in vivo and enhances the early insulin action cascade [J].J Biol Chem, 2001; 276(24): 21938-21942.

[13] Xie L, Lee SY, Andersen JN, et al. Cellular effects of small molecule PTP-1B inhibitors on insulin signaling [J].Biochemistry, 2003; 42: 12792-12804.

[14] Clampit JE, Meuth JL, Smith HT, et al .Reduction of protein-tyrosine phosphatase-1B increases insulin signaling in FAO hepatoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003; 300(2):261-267.

[15] Zinker BA, Rondinone CM, Trevillyan JM,et al. PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diahetic mice [J].Proc Natl Acad Sci U S A, 2002; 99(17):11357-11362.

[16] Echwald SM, Bach H, Vestergaard H, et al. A P387L variant in protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) is associated with type 2 diabetes and impaired serine phosphorylation of PTP-1B in vitro [J].Am J Hum Genet. Diabetes, 2002; 51:1-6.

[17] Weng J, Yan J, Huang Z, et al. Missense mutation of Pro387Leu in protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) is not associated with type 2 diabetes in a Chinese Han population (Letter) [J]. Diabetes Care, 2003; 26: 2957.

[18] Santaniemi M, Ukkola O, Kes?niemi YA, Tyrosine phosphatase 1B and leptin receptor genes and their interaction in type 2 diabetes [J]. J Intern Med, 2004; 256: 48-55.

[19] Mok A, Cao H, Zinman B, et al. A single nucleotide polymorphism in protein tyrosine phosphatase PTP-1B is associated with protection from diabetes or impaired glucose tolerance in Oji-Cree [J].J Clin Endocrinol Metab, 2002; 87 :724-727.

[20] Palmer ND, Bento JL, Mychaleckyj JC, et al. Association of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Gene Polymorphisms With Measures of Glucose Homeostasis in Hispanic Americans: the insulin resistance atherosclerosis study (IRAS) family study[J].Diabetes, 2004; 53(11):3013-3019.

[21] Di Paola R, Frittitta L, Miscio G, et al. A variation in 3' UTR of hPTP1B increases specific gene expression and associates with insulin resistance[J]. Am J Hum Genet, 2002; 70(5):1388.

[22] Dahlman I, Wahrenberg H, Persson L, et al. No association of reported functional protein tyrosine phosphatase 1B 3' UTR gene polymorphism with features of the metaholic syndrome in a Swedish population[J]. J Intern Med, 2004; 255: 694-695.

[23] Bento JL, Palmer ND, Mychaleckyj JC, et al. Association of protein tyrosine phosphatase 1B gene polymorphisms with type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2004; 53: 3007-3012.

(上接第 905 页)

有待于进一步实践。

参 考 文 献

[1] 汤耀卿.重症急性胰腺炎的监测与治疗[J].中国实用外科杂志, 2003; (23): 62-64.

[2] Schein M.Ivatury 1K Intra—abdominal hypertension and the abdominal compartment syndrome[J].Br J Surg, 1998; 85: 1027-1028.

[3] Menelis J, Soffer S, Marini CP, et al.Abdomi nal compartment syn drome in the surgical intensive care unit[J].Am Surg, 2002; 68: 18-23.

[4] Decker G.Abdomi nal compartment syndrome [J].J Chir, 2001; 138: 270-276.

[5] Gecelter G, Fahoum B, Gardezi S, et al.Abdominal compartment syn drome in severe acute pancreatitis: an indication for a decompressing laparotomy[J].Dig Surg, 2002; 19: 402-405.

[6] Pickbardt P, Shimony J, Heiken J, et al.The abdominal syn drome: CT findings[J].Am J Roentgenol, 1999; 173: 575-579.