

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620071151991

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

重组人胸腺素 α 原在糖代谢和脂代谢中的
作用和机理研究

Study on the Effects and Mechanisms of Recombinant
Human Prothymosin α in Metabolism of Glucose and Lipid

吴 汉 洲

指导教师姓名: 刘 升 发 教 授

专 业 名 称: 动 物 学

论文提交日期: 2010 年 08 月

论文答辩时间: 2010 年 09 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: 杨文川教授

评 阅 人: _____

2010 年 09 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(刘升发和周克夫)课题(组)的研究成果,获得(刘升发和周克夫)课题(组)经费或实验室的资助,在(刘升发)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 吴汉洲

2010 年 09 月 10 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：吴汉洲

2010年09月10日

目 录

中文摘要	1
英文摘要	3
第一章 前言	5
1 人类糖尿病的现状	5
2 现有的糖尿病发病机制及治疗方案	6
3 胸腺素 α 原概述	10
4 本课题组对胸腺素 α 原的研究情况及重要意义	13
第二章 ProT α 对食用高糖高脂饲料小鼠的影响	15
1 材料与方法	15
2 结果与分析	18
3 讨论	34
第三章 ProT α 对STZ诱导糖尿病小鼠的影响	37
1 材料与方法	37
2 结果与分析	38
3 讨论	48
第四章 ProT α 多克隆抗体的制备	51
1 材料与方法	51
2 结果与分析	53
3 讨论	56
第五章 成年大鼠胰岛的分离纯化	57
1 材料与方法	57
2 结果与分析	58
3 讨论	61
第六章 ProT α 在胰岛中的表达	62
1 材料与方法	62
2 结果与分析	63
3 讨论	69
结论及今后的研究工作	70
参考文献	72
致谢	82

CONTENTS

ABSTRACT IN CHINESE.....	1
ABSTRACT IN ENGLISH.....	3
Chapter I Preface.....	5
1 Present situation of human diabetes	5
2 Present pathogenesis and treatment of diabetes.....	6
3 Summarize of ProT α	10
4 Our study on ProT α and important significance.....	13
Chapter II Effect of ProT α on mice fed with HSFC diet.....	15
1 Materials and methods.....	15
2 Results and analysis.....	18
3 Discussion	34
Chapter III Effect of ProT α on STZ-induced diabetes mice.....	37
1 Materials and methods.....	37
2 Results and analysis.....	38
3 Discussion	48
Chapter IV Preparation of polyclonal antibody to ProT α	51
1 Materials and methods.....	51
2 Results and analysis.....	53
3 Discussion	56
Chapter V Isolation and purification of rat pancreatic islet.....	57
1 Materials and methods.....	57
2 Results and analysis.....	58
3 Discussion	61
Chapter VI Expression of ProT α in pancreatic islet.....	62
1 Materials and methods.....	62
2 Results and analysis.....	63
3 Discussion	69
CONCLUSION AND FURTHER STUDY.....	70
REFERENCES	72
ACKNOWLEDGEMENTS	82

摘要

目前,人们正越来越多地食用高糖高脂食品。大量研究表明,长期食用高糖高脂食品将引起肥胖症,而肥胖将导致机体糖耐量作用下降,引发胰岛素抵抗,最终诱发2型糖尿病。更为严重的是,糖尿病将引发如酮症酸中毒、脑血管疾病、肾病等其它并发症。如何预防和治疗糖尿病及其并发症已经成为医学界关注的焦点。糖尿病的基本特征是胰岛 β 细胞的结构和功能受损,导致机体胰岛素分泌不足。依赖外供给胰岛素是目前主要的治疗方案,然而通过防止胰岛 β 细胞凋亡和促进胰岛 β 细胞分裂的角度进行研究,将是预防和治疗糖尿病的新途径。

经研究证实,胸腺素 α 原(ProT α)具有促进机体免疫功能,促进细胞增殖和抗氧化功能的作用。由于ProT α 的特殊氨基酸序列使其成为性质稳定的强酸性蛋白,此外,ProT α 能够被体内正常酶分解成具有生物学功能的胸腺素 α 1(T α 1)和胸腺素 α 11(T α 11)两个部分,因此,我们通过口服ProT α 方法,开展其在机体糖及脂代谢中的作用和机理研究。

我们用高糖高脂饲料喂食小鼠的同时口服ProT α ,60天后,从生理学和组织学水平的研究发现,ProT α 能够有效地提高小鼠的糖耐量能力、减少体重增加、降低血液中甘油三酯含量、抑制体内脂肪堆积以及保护肝脏、肾及胰腺组织。实验结果表明了ProT α 能够通过调节机体的糖代谢和脂代谢,维持正常的生理代谢水平。通过研究,我们认为ProT α 能够明显促进胰岛分泌胰岛素。此外,对于由链脲佐菌素(STZ)诱导的1型糖尿病小鼠,ProT α 能够明显降低其空腹血糖。根据现有的STZ致病机理,我们认为ProT α 主要通过促进胰岛 β 细胞的增殖、抑制细胞凋亡和提高抗氧化能力等途径,起到保护胰岛 β 细胞和促进胰岛素分泌的效果。

在制备ProT α 多克隆抗体以及分离纯化大鼠胰岛之后,我们采用了一系列免疫学方法包括细胞荧光免疫、免疫组化以及蛋白质杂交等,对ProT α 在胰岛 β 细胞中的表达情况进行了研究。结果发现,在正常条件下,ProT α 主要表达在胰岛 β 细胞的胞浆中;然而,当胰岛与ProT α 经过一段时间的孵育,ProT α 将由 β 细胞的胞浆转移到细胞核中。所以,我们认为ProT α 对胰岛 β 细胞具有重要的作用:首先,我们证实了ProT α 是 β 细胞的重要组成成分之一,其功能

可能是调节 β 细胞分泌胰岛素；其次，ProT α 可能对 β 细胞的增殖和抗凋亡能力起重要作用，尤其是当 ProT α 从 β 细胞的胞浆转入细胞核中，可能参与了促进 β 细胞的增殖和抗凋亡能力的作用。此外，ProT α 还可能通过提高 β 细胞的抗氧化能力，抑制氧自由基如 NO、过氧化物等对胰岛 β 细胞的损伤的途径来达到保护胰岛 β 细胞的目的。

我们的研究工作丰富了 ProT α 在促进细胞增殖和抗细胞凋亡方面的内容，为今后探索临床治疗糖代谢和脂代谢紊乱提供新的途径。

关键词：胸腺素 α 原；糖代谢；脂代谢

Abstract

High sucrose and high fat diet (HSFC diet) is more and more popular in the world. There are a lot of evidence indicated that a long term intake HSFC diet will lead overweight obesity that usually will cause glucose intolerant, insulin resistance and eventually result in type 2 diabetes. Even worse, diabetes will cause ketoacidosis, cerebrovascular disease, diabetic nephropathy and other syndromes. How to prevent and cure them also has been paid more medical attention. Diabetes is characterized by the damage of pancreatic β cell cellularity and function, which results in insulin insufficiency. Insulin treatment in vitro is considered to be the main treatment of disease. However, β cell regeneration and anti apoptosis will become a new approach for treating diabetes patients.

The important biological function of Prothymosin α (ProT α) have been reported to promote immunity, cell proliferation and anti-oxidation. Because of the special amino acid sequence, the steady and strong acidic protein ProT α can be resolved in vivo by enzyme action with the result of thymosins α 1 and thymosins α 11. That's why we try to study the effects and mechanisms of oral ProT α on glucose and lipid metabolism.

After we fed mice with HSFC diet for 60 days, the physiological and histological results showed that ProT α could obviously enhance glucose intolerant ability, reduce fat accumulation, prevent over weight, decrease triglyceride level in serum and fat index in body, protect liver and pancreatic tissue from the damage of HSFC. These remarkable results indicated that ProT α can regulate the glucose and lipid metabolism, maintain the normal metabolism level. Then we propose that ProT α can obviously promote pancreatic islets to secrete insulin. Moreover, ProT α could obviously reduce the fasting blood glucose of mice that were induced

type 1 diabetes mellitus (T1DM) by streptozotocin (STZ) . According to the reported mechanisms of STZ-induced T1DM, we consider that ProT α can protect pancreatic β cell and promote insulin release by enhancing the proliferation, anti-apoptosis and anti-oxidation of β cell.

After the preparation of polyclonal antibody to ProT α , we gained many pancreatic islets to analyse the expression of ProT α in β cell with immunity method, including cell immunofluorescence, immunity histo-chemistry and western-blotting analysis. We found that ProT α was expressed in β cell. It was located in cytoplasm of β cell in normal condition. However, when the islets were incubated with ProT α , the ProT α was transported into nucleus of β cell. So we hypothesize that ProT α has important function on pancreatic β cell. Firstly, ProT α is an important content in β cell. It will affect β cell to regulate insulin release. Secondary, ProT α may play an important role in proliferation and anti apoptosis of β cell, especially when ProT α transport into nucleus of β cell, it might have relationship to β cell proliferation and anti-apoptosis. Furthermore, there might be another mechanism that ProT α can protect β cell from damage factors such as nitric oxide and superoxide dismutase by promoting the anti-oxidation of pancreatic β cell.

Our work revealed another new function of ProT α . And the experimental results will benefit to find a new method to prevent glucose and lipid metabolic disturbance.

Key Words: Prothymosin α ;glucose metabolism;lipid metabolism

第一章 前言

1 人类糖尿病的现状

在人类的众多疾病中，糖尿病的死亡率位居第三，仅次于肿瘤和心血管疾病。糖尿病除了自身带来的糖尿症、糖代谢混乱、高血糖、多饮、多食、多尿以及体重下降等临床症状外，其并发症更是直接关系到人的健康乃至生命安全，例如：酮症酸中毒、低血糖症、高血压、糖尿病足病、脑血管疾病、肾病、眼病、神经病变等^[1]。据国际糖尿病联盟（International Diabetes Federation, IDF）统计，20世纪90年代，全球共有糖尿病患者约1.00亿人；2007年，全球糖尿病患者约2.46亿人，其中46%为40-49岁的劳动力人口；若不采取任何措施，预计到2025年，全世界糖尿病患者将增加到3.8亿人，其中80%集中在中低收入国家。2006年12月20日，在美国纽约召开的联合国大会通过了划时代的决议，各国政府首次认识到糖尿病如同艾滋病、结核、疟疾等传染病一样严重威胁着人类，认识到全球正在受到来自糖尿病流行的严重威胁。每年的11月14日是“世界糖尿病日”；而与往年不同的是，从2007年起，“世界糖尿病日”正式更名为“联合国糖尿病日”，这一变化清楚地表明，糖尿病防治问题开始由学术行为上升为各国的政府行为。我国曾经对糖尿病的流行病学进行了四次普查，结果显示，1980年患病率为0.6%，1994年为2.5%，1996年为3.2%，2002年为2.6%。近年来，随着我国生活水平的提高，糖尿病患者的人数也急剧增加，并且逐步向青年和青少年蔓延。2007年世界糖尿病联盟预计我国到2025年，糖尿病患者至少有4600万人。2008年，中华医学会糖尿病分会关于糖尿病流行病学的研究指出，中国大、中城市和乡镇20岁以上的人群糖尿病患病率已经超过10%，而且患有糖尿病前期的人数高达15%。糖尿病的医疗费用直接给患者造成了巨大的经济负担和心理负担，社会已经对此高度关注^[2,3]。

在糖尿病的治疗上，主要包括降低血糖和治疗并发症。患者除了合理饮食，控制体重，增加锻炼等日常调理外，最为广泛的治疗方式是定期注射胰岛素，以补充自身分泌的胰岛素不足，同时进行相应的并发症治疗。然而，胰岛素注射往

往容易造成低血糖，对患者的健康甚至生命带来危险。医学界普遍认为胰腺或者胰岛移植是治疗糖尿病，尤其是胰岛素依赖型的1型糖尿病的一个新选择。目前，该研究已经取得可喜的进展，并且在临床上开始使用。然而，这一方法的开展必须面临一个重要难题，就是要有可用于移植的器官或者细胞来源，即要有具备正常生理功能和适用于患者的胰腺或胰岛，以避免或者尽量降低患者自身的免疫排斥反应。此外，胰岛干细胞的移植也被人们寄予很大的希望。但仍然需要解决机体自身的免疫排斥反应问题，而且如何控制好胰岛干细胞的增殖与分化平衡，从而防止干细胞出现癌变显得更为重要^[4]。

因此，预防和治疗糖尿病也成为了全球瞩目的重要研究课题。基于糖尿病本身及其并发症的危害如此严重，研究糖尿病的发病机制并开发相应的预防和治疗糖尿病的相关药物理所当然成为科学界关注的重点和迫切解决的医学难题。

2 现有的糖尿病发病机制及治疗方案

糖尿病是由于胰岛素作用不足和胰岛 β 细胞分泌的胰岛素不能满足机体所需而引起的以血糖升高为特征的临床症候群。糖尿病主要分为1型糖尿病、2型糖尿病、妊娠糖尿病及其它原因导致的糖尿病，其中以1型和2型患者分布最为广泛^[1, 4, 5]。其主要原因都与胰岛 β 细胞不同程度的死亡造成胰岛 β 细胞数量减少有关。1型糖尿病通常是由于自身免疫反应攻击自身胰岛 β 细胞，从而导致大量胰岛 β 细胞死亡引起的；而2型糖尿病又称非胰岛素依赖糖尿病。所谓的“2型糖尿病”，是各种致病因素的作用下，经过漫长的病理过程而形成的。由于致病因子的存在，正常的血液结构平衡受到破坏，血中胰岛素效力相对减弱，经过体内反馈系统的启动，首先累及胰岛，使之长期超负荷工作失去代偿能力。从遗传角度看，1型糖尿病与人白细胞抗原（HLA）相关，2型糖尿病则与HLA无关。从后天因素分析，1型糖尿病往往与病毒感染有关，而2型糖尿病则与肥胖有关^[6]。

目前认为，无论是1型还是2型糖尿病，其发生都与胰岛细胞暴露在炎症介导体有关，特别是白细胞介素-1 β （IL-1 β ）激发了 β 细胞凋亡的通路，最后导致大量 β 细胞死亡，引起糖尿病的发生。体外实验证明，胰岛 β 细胞在IL-1 β 或者IL-1 β 和IFN- γ 同时作用下，能引起细胞凋亡，胰岛素分泌减少等现象。

其中, 1 型糖尿病往往和单核细胞的侵入胰岛组织, 引发巨噬细胞联合 T 淋巴细胞攻击胰岛自身抗原, 进而引起大量 β 细胞死亡。细胞因子对胰岛细胞引起的凋亡主要包括两条通路。一条是细胞在细胞因子 IL-1 β 、IFN- γ 以及 TNF- α 作用下, 激活了 IKK 酶活性, IKK 酶分别磷酸化 I κ B α 的 32 和 36-Ser, 这一结果导致平时抑制 NF- κ B 的 I κ B α 泛素化而解除对 NF- κ B 的抑制, 之后 NF- κ B 进入细胞核, 调节目的基因的转录, 其中包括一氧化氮合酶 (Inducible nitric oxide synthase, iNOS)、Fas 基因等的转录, 而 iNOS 基因的表达产生了大量 NO, 其结果不仅造成与胰岛素分泌和糖代谢有关的基因下调, 如 Pdx-1、IsI-1、Glut-2, 引起胰岛 β 细胞功能下降, 同时还引起 CHOP、TRAF-2、ATF-4 基因上调, 造成内质网应激反应 (ER-stress), 最终导致胰岛 β 细胞死亡。另外, Fas 基因的过度表达将与 FasL 结合引起细胞死亡。体内外实验证明, 应用 NF- κ B 或者 iNOS 抑制物可以延迟或者防止糖尿病的发展。细胞因子对胰岛 β 细胞的影响还通过另一条通路, 如 IFN- κ 与 β 细胞结合后引起包括 IL-15、IP-10、MCP-1 和 ICAM-1 因子的上调, 导致单核细胞的侵入和活性增强, 此外还可以引起 MHC-1 相关基因和蛋白酶复合体的上调, 两个结果都将导致胰岛 β 细胞产生胰岛炎症 (Insulinitis), 最终结果也导致胰岛 β 细胞死亡^[6-14]。

流行病学调查发现肥胖常常导致 2 型糖尿病的发生。现在认为脂肪组织不仅是一个储存脂类的仓库, 同时还起到内分泌的作用。它能够分泌脂肪酸、激素、细胞因子和趋化因子等多肽类物质。脂肪组织中不仅包括脂肪细胞, 还包括免疫细胞 (如巨噬细胞、淋巴细胞等)、前脂肪细胞和内皮细胞。在肥胖动物和人类的脂肪细胞中, 巨噬细胞 (Adipose tissue macrophages, ATM) 的数量达到了 40%, 而相对于瘦型动物和人, 其脂肪组织中的巨噬细胞不到 10%^[15]。国外的 Danielle Melloul 等诸多学者研究证明, 当脂肪组织中的巨噬细胞被激活后, 会释放出大量细胞因子而激活了 JNK 和 (IKK) β 两个分子信号, 导致 AP1 和 NF- κ B 通路被打通, 最终激活一系列炎症相关通路基因的转录, 引起炎症反应, 而炎症反应被认为是诱发胰岛素抵抗的重要因素之一^[8-13]。在 2 型糖尿病中, 高葡萄糖可以诱导 IL-1 β 水平上调, 导致 NF- κ B 激活和 Fas 基因上调, 引起胰岛 β 细胞死亡。NF- κ B 在胰岛 β 细胞的死亡调控中发挥重要作用^[16]。肥胖人群和动物的血浆中含有高水平的游离脂肪酸 (Free fat acid, FFA) 和甘油三酯。据

Zhou YP 等人的体外研究发现, FFA 开始与胰岛细胞作用时, 能促进胰岛很快分泌大量胰岛素; 但是当延长作用时间后, 则会导致胰岛细胞的葡萄糖诱导胰岛素分泌 (Glucose induce insulin secrete, GIIS) 能力下降^[17]。Umut Ozcan 等人则通过体内实验证明了 FFA 可诱导 iNOS 上调, 结果造成由 NO 诱导的胰岛细胞凋亡。此外 FFA 还可以导致 XBP-1, ATF-6 以及 CHOP 等显示内质网应激的分子的上调。目前普遍认为的一个观点是, ER-stress 是肥胖引发胰岛素抵抗的一个重要因素, 尽管 FFA 在其中的详尽分子机制还不明了^[18]。

高糖诱导的线粒体电子传递链中活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 生成过多可能为糖尿病并发症发病的共同机制。高糖相关的线粒体 ROS 生成增加可导致对氧化还原敏感的核因子激活、终末期糖基化产物形成、激活蛋白激酶 C 和多元醇通路, 而所有这些都可以通过锰超氧化物歧化酶、解耦联蛋白 1 来阻断线粒体 ROS 产生而纠正, 这就进一步说明了线粒体 ROS 生成过多可能是高糖损伤的共同基础^[19-25]。因此, 防护线粒体氧化损伤在糖尿病并发症的病理生理中起十分关键的作用。防护线粒体的氧化损伤可成为糖尿病并发症防治的新策略。研发以线粒体为靶点的抗氧化药物, 并提高其生物利用度、药代动力学和稳定性, 对糖尿病并发症的防治具有重要意义。国外学者已经成功设计出一些非常有希望的具有线粒体靶向的防治线粒体氧化损伤药物, 其疗效仍在实验中。可以相信, 深入研究药物与线粒体靶点的相互作用, 对于糖尿病并发症的防治有着重要的促进意义^[25-29]。

综上所述的国内外有关糖尿病的发生机制, 我们发现, 预防和防治糖尿病发生的关键是阻止分泌胰岛素的胰岛 β 细胞数量减少和功能退化。针对以上结果分析, 要达到防治和治疗糖尿病的目的, 首先必须阻断引起胰岛 β 细胞凋亡的通路; 其次, 针对胰岛细胞移植, 必须要有足够多的可以用于移植的胰岛 β 细胞, 也就是找到能有效抑制胰岛 β 细胞凋亡的分子并揭示其确切的作用机制; 最后, 有效诱导胰岛及胰岛以外的如胰腺外分泌细胞、导管细胞等进行分化, 找到与胰岛 β 细胞增殖相关的可能因子。目前医学界非常重视小肽分子在药物治疗糖尿病方面的功能, 而有关胰岛 β 细胞增殖的研究就理所当然成为糖尿病研究的一个热点, 尤其是针对成人胰岛 β 细胞的增殖, 更是受到大家的关注, 因此有大量的相关文献发表在 Nature、Science、Cell、PNAS、Diabetes^[30-41] 等权威刊物上。目前有

关胰岛 β 细胞增殖主要有两个观点。一种认为从包括胰岛内部的原祖细胞 (Progenitor) 和本身的胰岛 β 细胞分裂分化实现胰岛 β 细胞增殖^[42]；另一种认为可以将胰腺组织中的如胰腺导管细胞、胰腺外分泌细胞等转化成具有分泌胰岛素功能的胰岛 β 细胞^[43-48]。而有关来源的重要性问题也存在争议。有些学者如 Bonner-Weir S 等人认为原祖细胞分化成 β 细胞起主导作用，而自身复制作用很小^[44-47]；而 Lee CS 等人则认为胰岛 β 细胞自身复制是主要的，原祖细胞并不重要^[48]。然而，所有观点都与胰岛代偿性增殖有关，例如胰岛 β 细胞出现一定数量死亡或功能受损，或是生理上发生了改变（包括摄入大量葡萄糖^[49]、孕期动物需要大量胰岛素分泌来满足生理期需要^[50-52]等）。相关的实验主要是制备各种动物模型，包括外科手术如胰腺部分切除 (Pancreatectomy)^[48]，胰腺导管结扎 (Pancreatic duct ligation, PDL)^[44-46]，孕期小鼠，STZ 诱导胰岛 β 细胞大量死亡的糖尿病小鼠模型^[53, 54]，以及高糖高脂肪饲料喂养的肥胖小鼠。虽然目前已经得到大量有关胰岛 β 细胞增殖的证据，但其确切的分子机理还不是很明确。眼下比较清楚的一个证据是 CDK4 and cyclin D2 在成体胰岛 β 细胞增殖中起到关键作用。至少在小鼠中发现，这两个成分在胰岛 β 细胞增殖中，尤其是在细胞分裂的 G1/S 期活性增强了。Georgia S 等采用转基因小鼠，通过基因高表达和基因敲除小鼠中获得了该结论。但是什么激活了 CDK4 and cyclin D2 的活性目前还不清楚^[55-58]。

相反，抑制细胞分裂周期激酶的抑制物如 P27，则负调控胰岛 β 细胞增殖。Karnik SK 等研究者发现，当胰岛 β 细胞增殖处于静止状态时，P27 积累增多，而 P27 的降解需要激活 Skp1 后对 P27 进行泛素化才能实现。P27 一旦降解，细胞分裂抑制被解除，细胞开始出现分裂^[59-66]。此外，Heit JJ 等人还发现了钙调神经磷酸酶—活化 T 细胞核因子 (Calcineurin/NFAT) 信号途径和 P21cip 信号分子也能调控胰岛 β 细胞的增殖^[67, 69]。

近来发现一种肿瘤抑制因子如 menin 蛋白，对多种内分泌肿瘤的发生其重要调节作用，并被认为是胰岛 β 细胞增殖的调节器。通过研究孕鼠，Karnik SK 发现，menin 蛋白具有改变染色体的结构，调节细胞周期蛋白激酶抑制物的表达等功能。menin 蛋白能对胰腺中分泌胰岛素的细胞起到“刹车”作用，所以在怀孕期间胰腺中的 menin 蛋白含量会下降时，体内胰岛素产量得到提高，以满足怀

孕期间机体对胰岛素的需要。然而，在妊娠期糖尿病人身上，menin 的这种刹车作用却失灵了，导致机体不能产生足够的胰岛素，形成了妊娠糖尿病。研究人员还发现机体内的催乳激素对胰腺 menin 蛋白的含量起调节作用。这种催乳激素在妊娠期间会升高。当人为地给予非妊娠的老鼠这种激素时，menin 蛋白的含量会下降而胰岛细胞会像妊娠期一样增长^[52, 59]。肥胖老鼠体内血液循环中的 menin 蛋白含量也比较少，这说明 menin 蛋白在与肥胖相关的 2 型糖尿病发病中也扮演了一定的角色^[67]。

针对是否胰岛 β 细胞之外的细胞也能够增殖，即是否存在胰岛 β 细胞的原祖细胞，最近，国内北京大学的邓宏魁等人采用 Tet-on 系统专一性地在小鼠胰岛 β 细胞中高表达能够抑制胰岛 β 细胞分裂的 P21，在抑制了胰岛 β 细胞增殖后，用高剂量（200mg/kg）的 STZ 进行处理，经 Brdu 和 Ki-67 检测，结果发现了在 STZ 处理后，仍然有处于分裂的细胞存在，并且这些细胞有 Pdx-1、胰高血糖素（Glucagon）和生长激素抑制素（Somatostatin）的表达，部分还发现表达了胰岛素。这就证明了在胰岛中确实存在原祖细胞，当受到外界或生理条件变化的刺激时，这些细胞能够进入细胞周期，经诱导分化，成为有功能的胰岛 β 细胞^[69]。

尽管我们了解了一些有关胰岛 β 细胞增殖的现象，但是有许多问题我们还是需要进一步探索和证实。例如，为什么在胰岛素抵抗和胰岛细胞大量死亡后胰岛 β 细胞出现增殖？为什么胰腺导管结扎后出现了特有的原祖细胞增殖？更为重要的是胰岛 β 细胞增殖反应是如何被限制和终止的？有没有更多的其他蛋白质参与胰岛 β 细胞增殖？是否可以通过外界因素促进胰岛 β 细胞增殖？等等。因此，研究胰岛 β 细胞增殖和再生，明确胰岛 β 细胞增殖的分子机理，正是研究者们目前最大的挑战，它将引导一条治疗人类糖尿病新的途径。

3 胸腺素 α 原概述

根据国内外的研究成果，结合本课题组前期的研究数据，我们初步断定胸腺素 α 原 (Prothymosin α , ProT α) 在防止胰岛 β 细胞凋亡，促进胰岛 β 细胞分裂方面扮演着重要角色。现将 ProT α 的分子特点和在抑制细胞凋亡，促进细胞分裂等方面的国内外研究成果阐述如下：

人胸腺素 α 原是由 110 个氨基酸(包括 ATG 编码的蛋氨酸)残基组成、高度保守的酸性蛋白质。在正常条件下,无二级结构形成,C 末端有核定位序列 KKQK。ProT α 不仅具有免疫刺激活性,可调节细胞和体液免疫功能,而且在调节细胞增殖方面也表现明显的生物学功能^[70,71]。自从 1984 年 Hariotos 从大鼠胸腺分离到前胸腺素 α 原(ProT α)以及 1986 年 Pan 和 Hariotos 将人 ProT α 克隆测序完成,国外已从基因水平和分子结构水平、蛋白功能及其分布等方面对 ProT α 进行广泛细致的研究,一系列的研究结果证明 ProT α 不仅存在于胸腺,而且在身体的许多组织中都广泛存在^[72,73]。体内外动物实验发现,ProT α 不仅能够提高机体的非特异性免疫功能,而且还能显著提高机体的细胞免疫和体液免疫,使得 ProT α 在抗感染,抗肿瘤以及抵抗艾滋病方面都显示出独特的功能。此外,在细胞分裂、转录水平调控、染色体结构改变、细胞凋亡和氧化抑制反应中,ProT α 也都发挥了重要作用^[70,74]。

ProT α 作为一种核蛋白,在调节细胞分裂和抗细胞凋亡中的作用成为了研究的热点。Javier Freire 等人采用亲和层析、免疫印迹等方法,发现 ProT α 不但可以与 H2A, H2B, H3 和 H4 核内的组蛋白结合,参与染色体的解旋和重建,而且能与细胞分裂直接相关的 PCNA、Cdk2 和 cyclinA 直接起作用^[75]。Zoe Karetsoy 等则应用 3H-胸腺嘧啶标记法和 Northern-blot 证明了 ProT α 主要在细胞周期的 S/G2 阶段水平升高,说明 ProT α 是在细胞周期的关键检测点中发挥作用;此外,ProT α 还与结合有 CREB 蛋白的 CBP 相互作用,调节细胞转录环节^[76]。ProT α 作为 Cmy 的下游调控基因,当 Cmy 表达升高时,ProT α 水平明显上调。Rodriguez P 等发现在某些肿瘤细胞如 HL-60 中 ProT α 水平的升高,可以提高细胞的分裂能力,而用反义寡核苷酸的方法抑制 ProT α 的表达,则使细胞分裂停止^[77,78]。Ashish Lal 等人还发现了在抗凋亡中具有重要作用的 RNA 结合蛋白 HuR 必须通过 ProT α 才能起作用^[79]。

在线粒体内细胞色素 C 诱导的细胞凋亡通路中,细胞色素 C 被释放到细胞浆中。当核苷酸 dATP/ATP 存在时,细胞色素 C 与凋亡蛋白酶活化因子-1(Apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)多聚化形成凋亡体(Apoptosome)后,Apaf-1 通过 CARD 结构域招募多个 Caspase-9 分子进入复合物,而 Caspase-9 自身又发生构象变化而水解,激活下游天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库