

## FoxO1 与糖尿病的关系

周园媛 王战建

糖尿病已成为继心脑血管疾病和肿瘤之后第三位严重危害人类身体健康的慢性非传染性疾病,预计到2025年,全球糖尿病患者将达到3.66亿,其中90%为2型糖尿病。目前我国糖尿病患者人数已接近1个亿,中国已成为全球范围糖尿病增长最快的地区,是世界糖尿病第一大国。对糖尿病内在机制的深入研究和理解,有利于我们更好地预防和治疗糖尿病。近年的研究显示, FoxO1 通过参与调节氧化应激、 $\beta$  细胞凋亡、炎症在糖尿病及其并发症的发生发展中发挥重要作用。

### 一、FoxO 的结构和表达

叉头框(forkhead box, Fox)蛋白家族是一类DNA结合区具有翼状螺旋结构的转录因子,目前已有17个亚族。Fox蛋白作为典型的转录因子不仅通过招募共激活因子等调节基因转录,有些还能直接同凝聚染色质结合参与其重构,协同其他转录因子参与转录调节。目前研究较多的是FoxO亚族。人类中有4个FoxO同源基因,分别命名为FoxO1、FoxO3a、FoxO4和FoxO6。既往研究已证实, FoxO主要通过转录调控和信号传导途径来调节动物的生长发育、细胞分化、凋亡、炎症和免疫等<sup>[1]</sup>。FoxO1是FoxO家族中最早被发现的成员,它能促进脂肪细胞的分化、负调控骨骼肌的生成和I型肌纤维基因的表达,且对肝细胞、胰岛 $\beta$ 细胞及脂肪细胞中胰岛素作用的发挥起重要作用。

### 二、FoxO1 的共价修饰

FoxO1 转录因子活性主要受三种共价修饰的调节,磷酸化、乙酰化和泛素化。其中以磷酸化修饰最为重要。

1. 磷酸化修饰: FoxO1 广泛存在于胰岛素敏感组织,如肝脏、脂肪组织、胰腺。但值得注意的是,在胰腺组织中, FoxO1 专一表达在 $\beta$ 细胞,并不表达在腺泡细胞或其他类型的胰岛细胞<sup>[2]</sup>。正常生理状态下, FoxO1 是胰岛素/胰岛素样生长因子-1(INS/IGF-1)信号通路下游关键分子,其上游主要受PI3K/Akt调控。INS/IGF-1/PI3K/Akt信号途径使 FoxO1 发生磷酸化后出核而失去转录活性。然而值得注意的是,氧化应激状态下,由于细胞内活性氧簇(ROS)水平增加,ROS主要通过活化Jun-N末端激酶(JNK)或哺乳动物Ste20-样激酶激活 FoxO1, FoxO1 发生磷酸化修饰却是由胞质转入胞核<sup>[3]</sup>。

2. 乙酰化修饰: 沉默信息调节因子-2(Sir2)基因家族是一种保守的从古细菌到哺乳动物都存在的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性的组蛋白去乙酰化酶。酵母 Sir2 蛋白连同与它相互作用的几个蛋白质在基因沉默、基因组稳定性、细胞寿命以及代谢调节上起着不可缺少的作用。Sirt1 是哺乳动物7种 Sir2 同源

簇之一。Sirt1 与 FoxO1 乙酰化修饰密切相关。

3. 泛素化修饰: 泛素化是大多数蛋白质降解的重要途径, FoxO1 也不例外,其发生泛素化修饰后将被蛋白酶水解。

### 三、FoxO1 与氧化应激

近年的研究显示, FoxO1 是高糖状态下细胞发生氧化应激、炎症和凋亡过程中的重要调节因子。通过探究 FoxO1 与糖尿病的关系有助于我们更深入的了解糖尿病的发病机制。

氧化应激是 ROS 生成增多或抗氧化剂清除防御作用减弱引起体内氧化与抗氧化的平衡紊乱。ROS 包括自由基如超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )、羟自由基( $HO^{\cdot}$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )等。氧化应激有多种来源,主要包括非酶性和酶性。前者包括:葡萄糖自氧化、线粒体途径、多元醇途径。后者包括 NAD(P)H 氧化酶、黄嘌呤氧化酶、功能受损的内皮诱生型一氧化氮合酶(eNOS)等。ROS 可造成生物大分子,如 DNA、蛋白质、脂质的损伤。

FoxOs 是氧化还原敏感因子,在许多细胞中,ROS 可导致 FoxOs 的活化,主要指 FoxO1、FoxO3a 和 FoxO4。既往研究证实, FoxOs 通过上调抗氧化基因的表达使细胞免于 ROS 的损伤<sup>[3]</sup>。Tothova 等<sup>[4]</sup>研究发现, FoxOs (FoxO1/3/4) 基因敲除小鼠的造血干细胞(HSCs)自我更新的能力下降。同时, HSCs 内抗氧化剂的表达下降,而 ROS 的水平和细胞凋亡却是增加的。近期研究表明 FoxO1 通过上调抗氧化酶类的表达而在骨骼代谢中发挥着重要作用<sup>[5]</sup>。FoxO1 基因缺失可致成骨细胞细胞数目减少,抗氧化能力下降,骨形成减少。此外,研究发现成骨细胞 FoxO1 基因缺失与细胞内蛋白质合成减少相关<sup>[6]</sup>。然而值得注意的是, FoxO1 可因所处细胞类型的不同而发挥不同的生理作用<sup>[3]</sup>。

1. FoxO1 与 $\beta$ 细胞的关系:如前所述,在胰腺组织中 FoxO1 专一表达在 $\beta$ 细胞,相同的,胰腺十二指肠同源异形盒(Pdx1)也广泛表达于胰腺上皮细胞,随着器官形成最终分布在成熟 $\beta$ 细胞内, Pdx1 对胰岛 $\beta$ 细胞的增殖、分化具有重要的调节作用。FoxO1 是 Pdx1 的负性调节剂, FoxO1 和 Pdx1 在核内时呈现互相排斥的形式。正常生理状态下, INS/IGF-1/PI3K/Akt 信号途径使 FoxO1 发生磷酸化后出核而失去转录活性,而 Pdx-1 的核表达却上调,从而对在 $\beta$ 细胞的生长起重要作用。当 PI3K/Akt 活性减弱时, FoxO1 呈去磷酸化状态,重新定位于胞核内,转录活性增强<sup>[7]</sup>。

2. 氧化应激状态下 FoxO1 对 $\beta$ 细胞的“双刃剑”作用: 研究显示高糖环境下的氧化应激是糖尿病发病机制的关键环节<sup>[8]</sup>。探究氧化应激、FoxO1 与 $\beta$ 细胞的关系有助于进一步揭示糖尿病的发病机制。近年研究显示,氧化应激状态下 FoxO1 对 $\beta$ 细胞发挥“双刃剑”作用。

短期高糖环境下,氧化应激介导 $\beta$ 细胞的 FoxO1 核内重新

分布可发挥短暂的 $\beta$ 细胞保护作用。原因在于氧化应激条件下, FoxO1 发生核转运的同时伴随着神经源性分化蛋白(NeuroD)和肌腱膜纤维肉瘤癌基因同系物(MafA)的表达增加, NeuroD和 MafA 是 FoxO1 的直接靶向基因, 能显著地上调 INS 编码基因 Ins2 的表达, 从而在短时间内增加胰岛素的分泌, 迅速下调血糖水平。

但有趣的是, 这种保护作用却由于 FoxO1 的快速降解而持续时间短暂。因氧化应激条件下, FoxO1 也可被核共激活剂 Cbp/p300 乙酰化。乙酰化的 FoxO1 结合早幼粒细胞白血病联合蛋白 Pml, 并定位于 Pml 核小体。此时的乙酰胺能防止 FoxO1 发生泛素化后降解。当定位于 Pml 核小体后, FoxO1 又被 Sirt1 去乙酰化, 去乙酰化作用使 FoxO1 以去乙酰化的形式发生泛素化而降解。因此 FoxO1 这种先被乙酰化再被去乙酰化的过程缩短了 FoxO1 的半衰期, 从而使 FoxO1 对 $\beta$ 细胞保护作用只对短期高血糖状态有效, 而对长期的高血糖状态则无效。

既往研究认为异源脂肪在肥胖患者的胰腺积聚, 最终可导致 $\beta$ 细胞的凋亡。然而, “脂毒性”并不能完全解释“ $\beta$ 细胞凋亡”的机制, 近年的动物实验显示, 即便脂肪组织处于胰岛素抵抗和炎症状态, 无碳水化合物饮食也可完全抑制 $\beta$ 细胞凋亡<sup>[9]</sup>。这与先前提出餐后血糖在 $\beta$ 细胞凋亡中发挥重要作用的观点是相符的。因此认为“脂毒性”和“糖毒性”在诱导 $\beta$ 细胞凋亡时并不相互排斥而是具有联合作用<sup>[10]</sup>。“糖毒性”主要通过氧化应激诱导 $\beta$ 细胞凋亡, 与此同时伴随 FoxO1 磷酸化水平的下降和 Pdx-1 核表达的下调。Kluth 等<sup>[11]</sup>研究进一步证实了这一观点, 研究将胰岛素瘤细胞(mouse insulinoma cells, MIN6)暴露于不同的葡萄糖浓度(5, 10, 25, 50 mmol/L), 合并或不合并软脂酸(0.3 mmol/L)。48 h 后, 合并软脂酸组可见 FoxO1 磷酸化水平随糖浓度的增加而进行性下降, 当糖浓度达到 50 mmol/L 时, 将无法检测到 FoxO1 磷酸化。AKT 的磷酸化也存在相似的变化。然而, 未合并软脂酸组中 FoxO1 和 AKT 的磷酸化未受影响。为了进一步探究软脂酸是否单独影响 FoxO1 和 AKT 的磷酸化水平, 将 MIN6 细胞分别暴露于不同的软脂酸浓度, 合并或不合并葡萄糖(50 mmol/L), 结果发现只有在合并葡萄糖时, FoxO1 和 AKT 的磷酸化才受到影响。

此外, 一些研究显示 2 型糖尿病的发生与 FoxO1 组成性激活密切相关<sup>[4]</sup>。一方面, 高糖诱导的线粒体源性 ROS (主要是  $H_2O_2$ ) 可通过介导 ROS-Jun-N 末端激酶(JNK)-FoxO1 通路增强肝细胞的糖异生和糖原分解。当机体总体血糖水平持续上升并最终超过 $\beta$ 细胞糖酵解的能力时, 将导致氧化应激状态<sup>[12]</sup>。长期氧化应激状态下, JNK 过度表达,  $\beta$ 细胞的 FoxO1 在核内表达增强, 而 Pdx-1 的核表达则显著下降。最终导致 $\beta$ 细胞增殖、胰岛素的分泌受抑。另一方面, 胰岛素抵抗状态下出现的 $\beta$ 细胞代偿性增生也可因胰岛细胞内 FoxO1 的组成性激活而受到抑制<sup>[2]</sup>。

#### 四、FoxO1 与糖尿病炎症状态

炎症状态被认为是糖尿病的主要危险因素之一, 且与糖尿病并发症的发生发展密切相关。高糖诱导的氧化应激通过介导内皮细胞结构功能的损伤, 增加微循环通透性, 上调促炎因子

如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 白细胞介素-6 (IL-6) 的表达使机体处于持续的炎症状态, 并最终导致胰岛素敏感性的下降, 甚至发展为糖尿病。FoxO1 也可由促炎因子激活, 从而形成恶性循环。

高糖状态下, TNF- $\alpha$  水平持续缓慢的增长可减少胶原生成, 延迟皮肤创面愈合。研究显示经久未愈的溃疡组织<sup>[13]</sup>和 2 型糖尿病动物模型创面中 TNF- $\alpha$  的水平是升高的。原因在于 TNF- $\alpha$  通过激活 FoxO1 介导了成纤维细胞内促炎、促凋亡相关基因的表达, 此时成纤维细胞密度减少, 细胞凋亡增加。反之, 当 TNF- $\alpha$  表达受抑时, 成纤维细胞增生, 密度增加, 细胞凋亡减少。相似的, Kayal 等<sup>[14]</sup>研究显示, 糖尿病合并骨折时, 软骨细胞凋亡和骨吸收的增强与骨折愈合延迟相关。体外研究也证实 TNF- $\alpha$  可增加成纤维细胞 FoxO1 转录活性。通过三色共聚焦激光扫描显微镜检测成纤维细胞中 FoxO1 的核转运活动, 结果显示 db/db 小鼠 2 型糖尿病模型中成纤维细胞内 FoxO1 的核转运水平是正常对照组的 3 倍。阻断 TNF- $\alpha$  后, FoxO1 的核转运也将受到抑制<sup>[15]</sup>。

巨噬细胞是参与肥胖、2 型糖尿病相关炎症状态的主导免疫细胞<sup>[16]</sup>。研究发现 FoxO1 可通过增强成熟巨噬细胞内 TLR-4 介导的信号通路促进并维持炎症状态。Toll-样受体 (TLRs) 属于模式识别受体, 其分布十分广泛, 可以识别某些病原体或其产物所共有的特定结构, 是介导内毒素/脂多糖应答的主要受体。TLR-4 与相应配体结合之后, 通过激活下游级联信号分子, 如髓样分化因子 88 (MyD88)、IFN- $\beta$ , 并最终参与调节转录因子 NF- $\kappa$ B、干扰素调节因子 3 (IRF3) 的活性。长期进食富含饱和脂肪酸 (SFAs) 的饮食易于引发代谢综合征和动脉粥样硬化。一些独立研究机构证实 SFAs 可激活 TLR-4 信号通路, 在高脂饮食诱导肝脏、脂肪组织产生胰岛素抵抗的机制中发挥重要作用<sup>[17-18]</sup>。Fan 等<sup>[19]</sup>通过染色质免疫共沉淀测序进一步证实 FoxO1 作为 TLR-4 基因及其介导的炎症通路的转录调节因子, 在肥胖、胰岛素抵抗中发挥“分子桥梁”的作用。胰岛素靶组织内促炎信号通路的持续激活可最终导致胰岛素抵抗。啮齿类动物实验和临床研究均显示, 随着体重的增加, 巨噬细胞在脂肪组织内的积聚也随之增加<sup>[20]</sup>。

#### 五、FoxO1 与糖尿病视网膜病变

目前关于 FoxO1 与糖尿病相关并发症的研究较少, 近年的研究显示, FoxO1 通过调节细胞凋亡参与了糖尿病视网膜病变的发生发展。

周细胞变性退化是糖尿病视网膜病变早期的组织病理特点。微血管内皮细胞和周细胞的凋亡与糖尿病早期视网膜病变相关<sup>[21]</sup>。成年后视网膜周细胞不再自我更新, 一旦发生变性, 将导致血管通透性增加和视网膜水肿。同时, 认为周细胞的缺失可激发局部视网膜毛细血管内皮细胞增生并最终形成微动脉瘤或伴随内皮细胞变性退化形成局部毛细血管内无灌注。导致周细胞凋亡的机制主要有: 快速的血糖波动; 高糖状态下 Bax 表达的增加; AGEs 积聚; TNF- $\alpha$  表达的上调<sup>[22]</sup>。

FoxO1 作为 AGEs 和 TNF- $\alpha$  的共同下游信号分子, 在糖尿病视网膜病变发病机制中也发挥着重要作用。Behl 等<sup>[21]</sup>研究证

实, 无论 1 型还是 2 型糖尿病动物模型, 其视网膜细胞中 FoxO1 mRNA 水平、核内转运和 DNA 结合活性均增加。利用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 使 FoxO1 基因沉默后可减少视网膜无细胞毛细血管的形成。AGEs 和 TNF- $\alpha$  是诱导视网膜病变的上游信号分子, p38、JNK 和细胞外信号调节激酶 (ERK) 属于 MAPK 家族成员。p38 和 JNK 同属应激激活的蛋白激酶, 在绝大多数细胞中发挥促凋亡作用, 而 ERK 则主要发挥抗凋亡作用。近年研究证实, 高糖状态下 TNF- $\alpha$ 、羧甲基赖氨酸 (CML) 通过激活 p38 和 JNK 通路, 增加 FoxO1 的 DNA 结合活性而诱导周细胞的凋亡<sup>[23]</sup>。

## 六、展望

综上所述, FoxO1 转录因子通过参与调节细胞的氧化应激、凋亡、炎症等, 在糖尿病的发生、发展中发挥着重要的作用。研究并阐明其具体的分子调节机制不仅有助于进一步完善糖尿病发病机制, 更重要的是为防治糖尿病提供新的治疗方案。

## 参 考 文 献

- [1] Potente M, Urbich C, Sesaki K, et al. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2382-2392.
- [2] Kitemura T, Ido Kitamura Y. Role of FoxO1 Proteins in Pancreatic  $\beta$ cells. *Endocr J*, 2007, 54: 507-515.
- [3] Storz P. Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2011, 14: 593-605.
- [4] Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*, 2007, 128: 325-339.
- [5] Ambrogini E, Almeida M, Martin-Millan M, et al. FoxO-mediated defense against oxidative stress in osteoblasts is indispensable for skeletal homeostasis in mice. *Cell Metabolism*, 2010, 11: 136-146.
- [6] Rached MT, Kode A, Xu L, et al. FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts. *Cell Metabolism*, 2010, 11: 147-160.
- [7] Brunet A, Kanai F, Stehn J, et al. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol*, 2002, 156: 817-828.
- [8] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*, 2010, 107: 1058-1070.
- [9] Jürgens HS, Neschen S, Ortmann S, et al. Development of diabetes in obese, insulin-resistant mice: essential role of dietary carbohydrate in beta cell destruction. *Diabetologia*, 2007, 50: 1481-1489.
- [10] Poynter V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev*, 2008, 29: 351-366.
- [11] Kluth O, Mirhashemi F, Scherneck S, et al. Dissociation of lipotoxicity and glucotoxicity in a mouse model of obesity associated diabetes: role of forkhead box O1 (FOXO1) in glucose-induced beta cell failure. *Diabetologia*, 2011, 54: 605-616.
- [12] Robertson RP, Harmon JS. Pancreatic islet beta-cell and oxidative stress: the importance of glutathione peroxidase. *FEBS Lett*, 2007, 581: 3743-8.
- [13] Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*, 2005, 366: 1736-1743.
- [14] Kayal RA, Siqueira M, Alblowi J, et al. TNF- $\alpha$  mediates diabetes-enhanced chondrocyte apoptosis during fracture healing and stimulates chondrocyte apoptosis through FOXO1. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2010, 25: 1604-1615.
- [15] Alikhani M, Alikhani Z, Graves DT. FoxO1 functions as a master switch that regulates gene expression necessary for tumor necrosis factor-induced fibroblast apoptosis. *J Biol Chem*, 2005, 280: 12096-12102.
- [16] Patsouris D, Li PP, Thapar D, et al. Ablation of cd11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab*, 2008, 8: 301-309.
- [17] Fessler MB, Rudel LL, Brown JM. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol*, 2009, 20: 379-385.
- [18] Saberi M, Woods NB, de Luca C, et al. Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. *Cell Metab*, 2009, 10: 419-429.
- [19] Fan W, Morinaga H, Kim JJ, et al. FoxO1 regulates tlr4 inflammatory pathway signalling in macrophages. *Embo J*, 2010, 29: 4223-4236.
- [20] de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*, 2008, 582: 97-105.
- [21] Behl Y, Krothapalli P, Desta T, et al. FOXO1 plays an important role in enhanced microvascular cell apoptosis and microvascular cell loss in type 1 and type 2 diabetic rats. *Diabetes*, 2009, 58: 917-925.
- [22] Behl Y, Krothapalli P, Desta T, et al. Diabetes-enhanced tumor necrosis factor- $\alpha$  production promotes apoptosis and the loss of retinal microvascular cells in type 1 and type 2 models of diabetic retinopathy. *Am J Pathol*, 2008, 172: 1411-1418.
- [23] Alikhani M, Roy S, Graves DT. FoxO1 plays an essential role in apoptosis of retinal pericytes. *Mol Vis*, 2010, 16: 408-415.

(收稿日期: 2013-06-17)

(本文编辑: 戚红丹)