

• 基础实验研究论著 •

葡萄糖对 INS-1 细胞线粒体谷氨酸转运体 1 基因表达的影响

陈立强¹, 王洋洋¹, 岑丽莲¹, 梁洁玲¹, 李海珠¹, 林德健², 李 刚³

(1. 广东省肇庆市第一人民医院检验科, 广东肇庆 526021; 2. 广东省肇庆医学高等专科学校, 广东肇庆 526040; 3. 广东吉赛生物科技有限公司, 广东广州 510663)

摘 要:目的 观察葡萄糖对小鼠胰腺 β 瘤细胞 INS-1 线粒体谷氨酸转运体 1(MGC1) 基因表达的影响。方法 分别采用半定量 RT-PCR 和 Western blot, 检测葡萄糖对 INS-1 细胞 MGC1 基因 mRNA 和蛋白表达的影响。结果 葡萄糖浓度的提高对 INS-1 细胞 MGC1 基因 mRNA 和蛋白的表达有明显的增强作用($P < 0.05$)。结论 高浓度葡萄糖能增强 INS-1 细胞 MGC1 基因表达。

关键词:葡萄糖; 线粒体; RNA, 转移, 谷氨酸

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.24.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)24-2945-02

Effect of glucose on the gene expression of mitochondrial glutamate carrier 1 of INS-1 cell

Chen Liqiang¹, Wang Yangyang¹, Cen Lilian¹, Liang Jieling¹, Li Haizhu¹, Lin Dejian², Li Gang³

(1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Zhaoqing, Zhaoqing, Guangdong 526021, China; 2. Zhaoqing Medical College, Zhaoqing, Guangdong 526040, China; 3. Genesee Biotech Co., Ltd, Guangzhou, Guangdong 510663, China)

Abstract:Objective To investigate the effect of glucose on the gene expression of mitochondrial glutamate carrier 1 of INS-1 cell. **Methods** The gene expression of MGC1 of INS-1 cell was detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blotting at mRNA and protein level respectively. **Results** The mRNA and protein expression of MGC1 was increased in high glucose concentration($P < 0.05$). **Conclusion** The gene expression of MGC1 was increased in the condition of high glucose concentration.

Key words:glucose; mitochondria; RNA, transfer, Glu

线粒体内外膜的分子转运机制在线粒体正常运作过程中发挥着重要作用。线粒体溶质转运体(SLC25)是一类辅助溶质在线粒体内外膜之间进行转运的膜镶嵌蛋白^[1]。人类基因组包含 SLC25 家族中的 48 个成员, 其中 30 个已经被认知和深入研究, 然而到目前为止对谷氨酸转运体的功能还是知之甚少。线粒体谷氨酸转运体 1(MGC1)和线粒体谷氨酸转运体 2(MGC2)有 SLC25A22 和 SLC25A18 编码, 负责线粒体内外膜之间谷氨酸的转运。研究表明 MGC1 在不同的组织中(特别是在脑、肝脏和胰腺组织中)均有表达^[2]。

线粒体代谢与胰腺 β 细胞分泌胰岛素的信号产生有关键联系, 胰岛素有快分泌和慢分泌两种形式, 快分泌主要是由 ATP 依赖性钾通道(KATP)产生激发信号的, KATP 关闭抑制了质膜的去极化; 随后, Ca^{2+} 电压门控通道开放, 大量 Ca^{2+} 内流导致细胞质 Ca^{2+} 浓度升高, Ca^{2+} 浓度升高激发了胰岛素的分泌, 其作用时间较快(在 2~5 s 内完成胰岛素快分泌过程), 快分泌使机体对血糖的升高及时并迅速作出反应。然而胰岛素快分泌的 Ca^{2+} 信号的产生不足以维持胰岛素的持续分泌, 故一定有 1 种存在于线粒体但不同于 ATP 的信号分子存在。Li 等^[3]研究证明这种信号分子是谷氨酸, 葡萄糖进入胰岛 β 细胞后经过线粒体的三羧酸循环生成谷氨酸, 谷氨酸激发了胰岛素的慢分泌。谷氨酸信号激发慢分泌作用较 KATP 晚(胰岛素慢分泌过程可持续 5~10 min), 但其作用时间较长, 可持续激发胰岛素释放。因此, 慢分泌在维持体内血糖的稳定发挥着更为重要的作用^[4]。在对敲除了谷氨酸脱氢酶的转基因小鼠(β Glud1^{-/-})的研究中发现, 该小鼠对葡萄糖诱导胰岛素分泌的能力下降了 40%^[5]; 由此而知, 谷氨酸在胰腺 β 细胞分泌胰岛素的过程中发挥着关键作用, 而谷氨酸转运体是谷氨

酸信号产生的关键环节。本实验研究不同浓度的葡萄糖对 INS-1 细胞 MGC1 基因 mRNA 和蛋白表达, 以揭示葡萄糖对 MGC1 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 INS-1 细胞(购于中科院上海细胞库), 生长于含 5% 热灭活胎牛血清、1 mmol/L 丙酮酸钠、2 mmol/L 谷氨酰胺、10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 置于 37 ℃、5% CO_2 的相对饱和的培养箱中传代培养, 实验细胞均处于对数生长期。当 INS-1 细胞生长至大于 90% 融合时, 用无糖培养基将 INS-1 细胞洗 3 遍, 在这 3 种浓度(2.8、7.5、15 mmol/L)葡萄糖环境下孵育 12 h, 提取细胞 mRNA 和蛋白用于半定量 RT-PCR 和 Western blot 实验。

1.2 仪器与试剂 RNA 提取试剂盒(invitrogen); 逆转录试剂盒(大连宝生物公司)、PCR 引物(上海生物工程公司), MGC-1 抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc), PCR 分析仪(ABI 9700)。

1.3 方法

1.3.1 抽提 INS-1 细胞总 RNA 取 TRIzol 处理好的匀浆 INS-1 细胞, 室温静置; 加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈震动 15 s, 室温静置 2 min; 12 000×g 4 ℃ 离心 15 min, 移上层水相至新 EP 管, 加 0.5 mL 异丙醇, 混匀后室温静置 10 min; 4 ℃ 12 000×g 离心 10 min 弃上清液, 75% 乙醇洗涤沉淀, 4 ℃ 7 500×g 离心 5 min; 弃上清空气中干燥; 20 μL 无 RNA 酶水溶解总 RNA, 60 ℃ 孵育 10 min。紫外分光光度仪检测提取的总 RNA 浓度; -80 ℃ 保存。

1.3.2 引物的设计与合成 根据 MGC1 基因在文献服务检

索系统(Pubmed)中查到的 GenBank 序列,按照引物设计原则设计引物,引物交由上海生物工程公司合成,见表 1。

表 1 MGC1 和 β-肌动蛋白(β-actin)引物的设计与合成

基因名称	引物名称	引物序列	最佳退火温度(℃)	产物长度(bp)
MGC1	上游引物(F)	5'-GGC CTG ACT CCT GCT TCA CTT-3'	56	978
	下游引物(R)	5'-GGC CTG GGG TTC TTG CAG CAG-3'		
β-actin	上游引物(F)	5'-TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT-3'	56	267
	下游引物(R)	5'-CTT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG-3'		

1.3.3 RT-PCR 技术检测 MGC1 的基因表达 以 RNA 为模板,利用大连宝生物公司的 RT-PCR 反应试剂盒进行 RT-PCR 反应。反应条件为 50 ℃ 30 min,94 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,56 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,30 个循环。RT-PCR 反应完成后取 3 μL RT-PCR 产物,在 1% 琼脂糖凝胶中于 80 V 恒压电泳 30 min,紫外透射仪观察并拍照。图片经图像分析软件 Band Scan 进行光密度值扫描分析,计算各泳道 MGC1 与内参照 β-actin 光密度之比作为 MGC1 相对含量值。

1.3.4 Western blot 检测 MGC1 的蛋白表达 取 INS-1 细胞细胞(1×10⁶)裂解后以 Bradford 法测定蛋白浓度,牛血清清蛋白(BSA)为标准品;每个标本取 50 g 样品蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白电转至聚偏氟乙烯(PVDF)上,电化学发光免疫(ECL)法显色。

1.4 统计学处理 采用统计学软件 SPSS15.0 统计软件进行分析,两组之间比较采用独立样本 t 检验;以 α=0.05 为检验水准,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 INS-1 细胞中 MGC1 mRNA 表达结果 以 β-actin 作为内参,利用 RT-PCR 测定 INS-1 细胞中 MGC1 的相对含量。INS-1 细胞 MGC1 基因 mRNA 表达随葡萄糖浓度增加明显升高(P<0.05),见图 1。

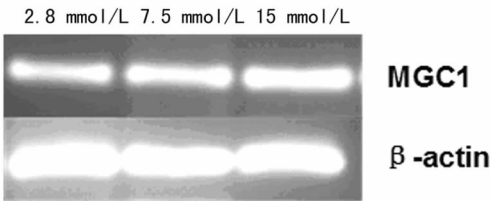


图 1 INS-1 细胞中 MGC1 基因 mRNA 表达

2.2 INS-1 细胞中 MGC1 蛋白表达结果 Western blot 结果表明,INS-1 细胞 MGC1 蛋白表达随葡萄糖浓度增加明显升高(P<0.05),见图 2。

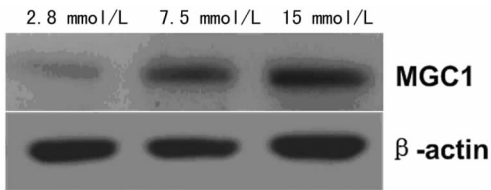


图 2 INS-1 细胞中 MGC1 基因蛋白表达

3 讨 论

本研究采用 RT-PCR 和 Western blot 比较 INS-1 细胞在不同葡萄糖浓度下 MGC1 基因及蛋白表达水平的差异,发现在高糖浓度下 MGC1 基因 mRNA 水平和蛋白水平均显著升高(P<0.05)。这些结果显示 MGC1 在谷氨酸信号激发胰岛

素慢分泌的过程中发挥着重要作用。
谷氨酸是哺乳类动物中枢神经系统的主要神经递质,以谷氨酸为主要信号传导分子的胰腺分泌系统称为谷氨酰胺能系统^[6];谷氨酰胺能系统由谷氨酸受体、囊泡膜谷氨酸转运体和膜谷氨酸转运体组成^[7]。谷氨酸的收集与储存需要两个转运系统,它们分别是存在于细胞膜上的高亲和力 Na⁺ 依赖的转运系统和在囊泡膜上的低亲和力 Na⁺ 非依赖的转运系统^[8]。谷氨酸受体分亲离子型谷氨酸门控离子通道受体和 G 蛋白偶联亲代谢型(mGlu)两种受体。亲离子型谷氨酸门控离子通道受体分为 N-甲基-D-天(门)冬氨酸(NMDA)受体、α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(AMPA)和红藻氨酸受体。这 3 种谷氨酸受体均为配基门控 Ca²⁺ 和(或)Na⁺ 离子通道^[9]。mGlu 受体存在突触前膜和突触后膜上,谷氨酸与 mGlu 受体结合后不但能产生兴奋性作用,并且可以产生抑制性神经作用。mGlu 受体有 8 种类型,可分为 3 组,分别是 1 组(mGlu1,5)通过偶联 Gq 型蛋白激活磷脂酶 C 而发挥作用,2 组(mGlu2,3)和 3 组(mGlu4,6,7,8)通过偶联 Gi/Go 型抑制 cAMP 活性,从而减少 Ca²⁺ 的流入而减少谷氨酸的释放,故谷氨酸信号的激发在胰岛素分泌过程中发挥着关键作用,对谷氨酸转运体的深入研究有利于加深了解胰岛素分泌的确切机制^[10]。

参考文献

[1] Palmieri F. Diseases caused by defects of mitochondrial carriers; a review[J]. Biochim Biophys Acta,2008,1777(7/8):564-578.
[2] Fiermonte G, Palmieri L, Todisco S, et al. Identification of the mitochondrial glutamate transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms[J]. J Biol Chem,2002,277(22):19289-19294.
[3] Li T, Bai L, Li J, et al. Sp1 is required for glucose-induced transcriptional regulation of mouse vesicular glutamate transporter 2 gene[J]. Gastroenterology,2008,134(7):1994-2003.
[4] Maechler P, Carobbio S, Rubi B. In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion [J]. Int J Biochem Cell Biol,2006,38(5/6):696-709.
[5] Carobbio S, Frigerio F, Rubi B, et al. Deletion of glutamate dehydrogenase in beta-cells abolishes part of the insulin secretory response not required for glucose homeostasis[J]. J Biol Chem,2009,284(2):921-929.
[6] Skerry TM, Genever PG. Glutamate signalling in non-neuronal tissues[J]. Trends Pharmacol Sci,2001,22(4):174-181.
[7] Li T, Ghishan FK, Bai L. Molecular physiology of vesicular glutamate transporters in the digestive system [J]. World J Gastroenterol,2005,11(12):1731-1736.
[8] Liu S, Okada T, Assmann A, et al. Insulin signaling regulates mitochondrial function in pancreatic beta-cells[J]. PLoS One,2009,4(11):e7983.
(下转第 2948 页)

2.2 中性粒细胞 VCS 参数结果 MDS、AA 和对照组的中性粒细胞 VCS 参数值见表 2。MDS 和 AA 患者中性粒细胞体积增大,中性粒细胞平均体积(MNV)值均明显大于对照组($P<0.01$);MDS 组中性粒细胞平均电导率(MNC)值高于对照组,

而 AA 组与对照组差异无统计学意义($P>0.05$);相对于对照组和 AA 组,MDS 组中性粒细胞平均散射率(MNS)值降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

表 2 中性粒细胞和淋巴细胞 VCS 值($\bar{x}\pm s$)

组别	MNV	MNC	MNS	MLV	MLC	MLS
对照组	142.8±4.5	145.4±3.0	132.2±4.2	86.5±2.5	114.4±2.7	50.7±2.2
MDS 组	155.2±15.7	147.5±8.8	126.2±11.9	91.8±7.2	118.3±7.4	60.7±11.0
AA 组	152.1±11.2	146.4±8.8	132.5±10.2	87.3±5.1	112.8±6.2	57.0±12.8

2.3 淋巴细胞 VCS 参数结果 MDS、AA 和健康对照组淋巴细胞 VCS 参数值见表 2。MDS 组淋巴细胞体积增大,淋巴细胞平均体积(MLV)值大于对照组和 AA 组($P<0.01$);MDS 组淋巴细胞平均电导率(MLC)值高于对照组和 AA 组,差异有统计学意义($P<0.01$);相对于对照组,MDS 组和 AA 组淋巴细胞光散射参数分布明显变宽,淋巴细胞平均散射率(MLS)值增高,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨 论

MDS 是一种骨髓恶性克隆增殖性疾病,AA 为干细胞增殖分化障碍引起的疾病,MDS 和 AA 均可以表现为全血细胞减少,根据文献[3]报道 MDS 和 AA 为引起全血细胞减少症(PCP)的常见血液系统疾病。MDS 和 AA 在临床诊断中存在着很多困扰,极易与其他一些血液疾病混淆,其中尤以增生减退型 MDS 与慢性再障之间的鉴别十分困难^[4-5],因此寻找更多有价值的实验室诊断指标显得很重要。

血常规为临床常规检测项目,具有创伤小、方便、经济等特点。近年来,随着全自动血液分析仪检测技术的发展,提供的参数越来越多。而其中细胞 VCS 参数越来越受到大家的重视,VCS 参数能敏感地反映细胞的形态学改变,被证明在多种疾病诊断中具有一定的应用价值。例如中性粒细胞 VCS 参数可以用于细菌性感染、血液病等的诊断及鉴别诊断,而且还可能与肿瘤的预后相关^[6-7],而淋巴细胞的 VCS 参数则对恶性淋巴瘤等疾病具有诊断价值^[8-9]。

本研究通过对 MDS 和 AA 两组疾病的外周血中性粒细胞和淋巴细胞 VCS 参数研究发现,MDS 和 AA 患者中性粒细胞和淋巴细胞 VCS 参数与对照组相比,存在异常改变。AA 患者 MNV 和 MLS 增高,MLC 降低,而 MDS 患者 MNV、MNC、MLV、MLC 和 MLS 均增高,MNS 降低。

MDS 和 AA 患者外周血白细胞存在形态学上的改变。MDS 患者中性粒细胞可见假性佩尔杰异常症血象(Pelger-Huet)畸形,中性粒细胞核分叶异常,颗粒少或缺失,并可能出现一些病态的淋巴细胞。而 AA 患者中性粒细胞内可见类中毒性

颗粒,可有活化的抑制性 T 淋巴细胞群增多^[1],而这些形态学上的改变导致了中性粒细胞和淋巴细胞 VCS 参数的变化。

综上所述,MDS 和 AA 患者外周血中性粒细胞和淋巴细胞 VCS 参数存在异常改变,其中 MNS、MLV 和 MLC 对 MDS 和 AA 患者的鉴别诊断具有一定应用价值。

参考文献

[1] 浦权.实用血液病学[M].2 版.北京:科学出版社,2009.
[2] 熊立凡,刘成玉.临床检验基础[M].4 版.北京:人民卫生出版社,2007:96.
[3] 叶海燕,陈焯文.全血细胞减少 186 例病因分析[J].实用医学杂志,2008,24(8):1385-1387.
[4] 刘新月.细胞发育异常——MDS 诊断关键之所在[J].临床血液学杂志,2011,24(6):642-644.
[5] 黄琳,刘会芸.骨髓增生异常综合征与再障缺铁性贫血巨幼红细胞贫血增生性贫血实验室鉴别诊断研究进展[J].临床军医杂志,2011,39(5):1027-1030.
[6] 王剑超,马春芳,吕国才.等.中性粒细胞 VCS 参数在急性细菌感染筛查中的初步应用[J].中华检验医学杂志,2009,32(2):179-183.
[7] Gus'kova NK,Nerodo GA,Levchenko NE,et al. Informative value of the VCS parameters of peripheral blood neutrophils in the evaluation of status of patients with recurrent and metastatic cervical cancer[J].Klin Lab Diagn,2010,22(3):37-39.
[8] 张丽霞,张杰,周芸,等.恶性淋巴瘤患者外周血淋巴细胞 VCS 参数的变化[J].临床检验杂志,2011,29(8):631.
[9] Silva M,Fourcade C,Fartoukh C,et al. Lymphocyte volume and conductivity indices of the haematology analyser Coulter GEN. S in lymphoproliferative disorders and viral diseases[J].Clin Lab Haematol,2006,28(1):1-8.

(收稿日期:2012-06-12)

(上接第 2946 页)

[9] Casimir M,Lasorsa FM,Rubi B,et al. Mitochondrial glutamate carrier GC1 as a newly identified player in the control of glucose-stimulated insulin secretion[J].J Biol Chem,2009,284(37):25004-25014.

[10] Julio-Pieper M,Flor PJ,Dinan TG,et al. Exciting times beyond the brain: metabotropic glutamate receptors in peripheral and non-neural tissues[J].Pharmacol Rev,2011,63(1):35-58.

(收稿日期:2012-08-08)