

• 基础实验研究论著 •

高糖对 HSkMCs 细胞株 AT1R、mfn2 mRNA 表达的影响*

蔡俊玮^{1,2}, 黄成虎¹, 李雪峰^{1△}, 徐焱成²

(1. 湖北医药学院附属太和医院内分泌科, 湖北十堰 442000; 2. 武汉大学中南医院内分泌科, 湖北武汉 430071)

摘要:目的 探讨骨骼肌局部肾素血管紧张素系统(RAS)在高糖状态的变化及对线粒体融合蛋白 2(mfn2)基因表达的影响。方法 体外培养人骨骼肌细胞(HSkMC),分为不同浓度葡萄糖组进行培养:5.55 mmol/L 组,11.1 mmol/L 组,22.2 mmol/L 组,分别培养 48 h,应用 RT-PCR 检测各组的血管紧张素 II-1 型受体(AT1R)、mfn2 基因表达。结果 以 5.55 mmol/L 组作为基础对照组,11.1 mmol/L 组、22.2 mmol/L 组 AT1R mRNA 表达均较对照组增加 ($P < 0.05$),而 mfn2 基因表达则下降 ($P < 0.05$)。结论 高糖能诱导骨骼肌细胞 AT1R mRNA 表达上调,mfn2 mRNA 表达下调,且呈剂量依耐性。

关键词:肾素-血管紧张素系统; 胰岛素抗药性; 重组融合蛋白质类

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)19-2500-02

The effect of high glucose on the expressions of AT1R and Mfn2 mRNA in HSkMCs*

Cai Junwei^{1,2}, Huang Chenghu¹, Li Xuefeng^{1△}, Xu Yancheng²

(1. Department of endocrinology, Taihe Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China;

2. Department of endocrinology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: Objective This research investigated the effects of different concentrations of glucose on the expression of AT1R mRNA and Mfn2 mRNA in HSkMCs. **Methods** HSkMCs were cultivated in vitro and treated with glucose of different concentration(5.55mmol/L group, 11.1mmol/L group, 22.2 mmol/L group) for 48 h. Then the expressions of AT1R and mfn2 were detected by RT-PCR. **Results** Compared with the expression of AT1R and mfn2 mRNA in HSkMCs cultivated with 5.55 mmol/L glucose, AT1R mRNA expression in 11.1mmol/L and in 22.2 mmol/L increased ($P < 0.05$), mfn2 mRNA expression in 11.1 mmol/L and in 22.2 mmol/L decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** High level glucose can upregulate the expression of AT1R mRNA and downregulate the expression of mfn2 mRNA in HSkMCs.

Key words: renin-angiotensin system; insulin resistance; recombinant fusion proteins

局部肾素血管紧张素系统(RAS)与胰岛素抵抗(IR)的关系日益受到关注。线粒体融合蛋白 2(mfn2)基因是从大鼠血管平滑肌细胞中克隆出的一种新基因^[1],在体内以心脏、骨骼肌、脂肪组织含量最高。mfn2 基因表达产物在哺乳动物细胞中不仅在参与维持线粒体网状结构和功能中发挥重要作用^[2],而且与 IR 有关。高糖是 IR 的病理生理基础,其是否影响局部组织 RAS、mfn2 的表达,目前研究较少涉及。本研究利用不同浓度葡萄糖培养人骨骼肌细胞(HSkMCs),探讨葡萄糖浓度对 HSkMCs 细胞血管紧张素 II-1 型受体(AT1R)、mfn2 mRNA 表达的影响,以阐述高糖对骨骼肌局部 RAS、mfn2 mRNA 表达的影响,为糖尿病的发病机制做一些基础性的研究。

1 材料与方 法

1.1 材料 HSkMCs 细胞株购自上海众华生物科技有限公司。RPMI-1640(无糖)培养基购自 Sigma 公司,胎牛血清(FBS)购自浙江天杭生物科技有限公司,PCR 逆转录试剂盒、Premix、引物合成均由 TaKaRa 提供。其余试剂均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 不同浓度葡萄糖培养基的配置 干粉 RPMI-1640 10.4 g、NaHCO₃ 2 g、HEPES 2 g,双蒸水溶解,定容至 1 000 mL,各取 100 mL,分别加入无水葡萄糖 180 mg、360 mg、720

mg,分别经 0.22 μm 滤膜负压,分装备用,4 ℃ 保存。使用之前加入胎牛血清,浓度为 10%。

1.2.2 细胞培养及干预 复苏、培养 HSkMCs,待进入对数生长期后用胰酶消化,吹打均匀后接种于 6 孔板,每孔 10⁶ 个细胞。待细胞贴壁 24 h 后吸出培养基,细胞根据葡萄糖浓度进行分组,每组重复试验 4 次,具体分组如下,对照组:培养基中葡萄糖的浓度为 5.55 mmol/L,培养 48 h;11.1 mmol/L 葡萄糖组:培养基中葡萄糖浓度为 11.1 mmol/L,培养 48 h;22.2 mmol/L 葡萄糖组:培养基中葡萄糖浓度为 22.2 mmol/L,培养 48 h。

1.2.3 RT-PCR 检测 AT1R、mfn2 mRNA 表达 常规提取 RNA,逆转录 cDNA。RT-PCR 扩增目的基因。PCR 引物:(1)AT1R 上游引物 5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3',下游引物 5'-TCT GCA ACT TGA CGA CTA CTG CTT A-3',扩增长度 140 bp;(2)mfn2 上游引物 5'-TCA AGC GCC AGT TTG TGG AG-3',下游引物 5'-AGA TGA GCA AAG GTC CCA GAC AG-3',扩增长度 115 bp;(3)β-actin 上游引物 5'-GTC CAC CGC AAA TGC TTC TA-3',下游引物 5'-TGC TGT CAC CTT CAC CGT TC-3',扩增长度 190 bp。退火温度分别为 55 ℃、60 ℃、55 ℃。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,以凝胶成像分析仪进行凝胶灰度分析并照相。

* 基金项目:湖北省教育厅科研重点项目(D20112105);湖北省十堰市科技局项目(2010st12);湖北医药学院 2010 博士启动项目(2010QDJ24);太和医院 2010 博士启动项目(2010QD15)。 作者简介:蔡俊玮,男,主治医师,主要从事糖尿病发病机制研究。 △ 通讯作者, E-mail:ymclxf0629@163.com。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件包进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度葡萄糖对骨骼肌细胞 AT1R 基因表达的影响

11.1 mmol/L 葡萄糖培养 48 h 后 AT1R mRNA 表达较对照组增加了 0.26 倍 ($P < 0.05$); 22.2 mmol/L 葡萄糖培养 48 h 后, AT1R 表达水平较对照组增加了 0.82 倍 ($P < 0.05$)。见图 1、表 1。

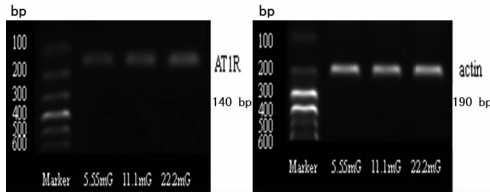


图 1 不同葡萄糖浓度对 HSkMCs 细胞 AT1R mRNA 表达的影响

2.2 不同浓度葡萄糖对骨骼肌细胞 mfn2 表达的影响

11.1 mmol/L 葡萄糖培养 48 h 后 mfn2 mRNA 表达较对照组下降 12.3% ($P < 0.05$); 22.2 mmol/L 葡萄糖培养 48 h 后 mfn2 基因表达较对照组下降了 47.3% ($P < 0.05$)。见图 2、表 1。

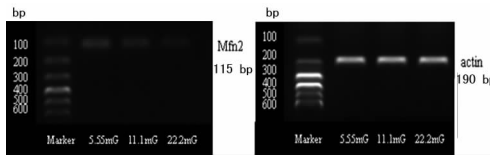


图 2 不同葡萄糖浓度对 HSkMCs 细胞 mfn2 mRNA 表达的影响

表 1 不同浓度葡萄糖对 HSkMCs 细胞 mfn2 mRNA、AT1mRNA 表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	mfn2/actin(mRNA)	AT1R/actin(mRNA)
对照组	0.355 0 ± 0.016 4	0.434 2 ± 0.018 3
11.1 mmol/L 葡萄糖组	0.312 1 ± 0.018 8*	0.547 4 ± 0.017 4*
22.2 mmol/L 葡萄糖组	0.189 5 ± 0.009 2*	0.789 5 ± 0.020 7*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

近年局部 RAS 在 2 型糖尿病发病机制中的作用的研究正成为糖尿病研究领域的一个热点, 胰岛、脂肪组织局部 RAS 对 IR 的影响在近年国内外研究中涉及较多, 而针对骨骼肌局部 RAS 的调控因素的研究鲜有报道。

骨骼肌为外周组织胰岛素敏感性、葡萄糖摄取的主要靶器官, 约有 80%~90% 的胰岛素刺激葡萄糖摄取由其完成^[3]。因而全身 IR 的产生与骨骼肌对胰岛素刺激下的葡萄糖摄取、利用的下降有重要关系。有研究表明外周组织葡萄糖摄取减少主要发生在肌肉^[4]。骨骼肌 IR 是代谢紊乱的基础, 有研究表明, 骨骼肌 IR 是 2 型糖尿病发展的前奏和特征标志^[5-6]。

持续高血糖可导致机体的 IR 产生, 是糖尿病的病理生理基础。研究证实, 高糖可以抑制骨骼肌细胞的葡萄糖转运, 诱导 IR^[7]。高春林等^[8]的研究也表明, 高糖可以降低大鼠骨骼肌 L6 细胞的葡萄糖摄取效率。研究还表明骨骼肌局部 RAS 在 2 型糖尿病患者中也会被激活^[9]。血管紧张素 II (AT II) 是

RAS 主要效应物质, Ang II 的生物活性绝大部分是由 AT1R 介导。在本研究中作者分别采用不同浓度葡萄糖的培养基 (5.55 mmol/L、11.1 mmol/L、22.2 mmol/L) 培养骨骼肌细胞 48 h 后观察到, 骨骼肌细胞 AT1R 水平与葡萄糖浓度呈浓度依耐性, 且从 11.1 mmol/L 到 22.2 mmol/L 增幅更加显著, 提示高糖通过诱导骨骼肌 AT1R 表达上调, 参与了骨骼肌局部 RAS 的调控, 进一步表明高糖是导致骨骼肌局部 RAS 活化的重要因素。

2005 年, Lowell 等^[10]就提出线粒体功能失常是 IR 和糖尿病发生的重要原因, 线粒体功能失常导致的氧化失衡和脂毒性在其中可能发挥了重要作用。而线粒体形态的改变会扰乱其生物学功能, 故常被视为骨骼肌各种病变的重要标志。Kelley 等^[11]的研究发现 2 型糖尿病患者或者肥胖个体骨骼肌线粒体体积较小, 而且呈现较大空泡。Anello 等^[12]也发现在 2 型糖尿病患者中线粒体密度增高, 体积增大, 线粒体出现肿胀。

mfn2 是 Chen 等^[13]在正常血压大鼠和高血压大鼠的血管平滑肌细胞中克隆出的一种新基因。其主要功能是负责调控线粒体融合。mfn2 在机体中分布广泛, 其中以心脏、骨骼肌、脂肪组织含量最高。2 型糖尿病的发生与 mfn2 在骨骼肌表达失调有关。在离体和在体模型研究中均发现, 葡萄糖氧化能力随着 mfn2 表达水平改变而变化^[14]。mfn2 的表达受多种因素调控。在机体消耗能量增加, 如运动、寒冷刺激、 β 肾上腺素能增效剂刺激等情况会上调 mfn2 的表达。肥胖、糖尿病、IR 等都能影响骨骼肌 mfn2 的表达。其中肥胖、糖尿病、TNF α /IL-6 可下调 mfn2 的表达, 而运动和减肥则可上调 mfn2 的表达增加。Lastra 等^[15]的研究观察到骨骼肌局部 RAS 激活导致线粒体内膜电位与线粒体形态异常, 使用阿利吉仑阻断 RAS 后可逆转上述改变。而高糖激活局部 RAS 通过何种途径影响线粒体形态及膜电位的变化目前尚不明确。在本研究中发现随葡萄糖浓度增加骨骼肌 mfn2 基因表达则逐渐减弱。故推测高糖激活骨骼肌局部 RAS 可能是通过调节 mfn2 的基因表达来影响线粒体的形态与线粒体膜电位的变化, 进而诱导 IR 的产生。

综上所述, 本实验通过体外细胞培养方法直接观察到了不同浓度葡萄糖对骨骼肌局部 RAS 的激活及对 mfn2 的影响, 为揭示葡萄糖浓度、局部 RAS 与 mfn2 的表达之间的关联提供了直接的依据。但是其中还有一些分子机制尚未完全阐明, 有待进一步研究明确。

参考文献

- [1] Chen G, Liu N, Zhou A, et al. The role of hypertension-related gene in aortic vascular smooth muscle cells from mice and rats [J]. Chin Med J, 2001, 114(8): 833-836.
- [2] Bach D, Pich S, Soriano FX, et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity [J]. J Biol Chem, 2003, 278(19): 17190-17197.
- [3] DeFronzo RA, Gunnarsson R, Bjorkman O, et al. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus [J]. J Clin Invest, 1985, 76(1): 149-155.
- [4] Pendergrass M, Bertoldo A, Bonadonna R, et al. Muscle glucose transport and phosphorylation in type 2 diabetic. (下转第 2504 页)

的意义。

本研究利用 MSRE Hpa II 对甲基化位点不能切割的特性,将所提取的 DNA 做 MSRE Hpa II 酶切处理后,再进行 SYBR PCR 检测,分析孕妇外周血中游离胎儿 DNA 浓度在不同组之间的差异,分别对早孕组、中孕组和晚孕组进行组间比较。结果发现早孕、中孕和晚孕各组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),孕妇外周血中游离胎儿 DNA 浓度随孕周的增加而增加,与之前文献报道的相符^[12]。这一结果非常有助于无创性产前诊断唐氏综合征的研究^[13]。

本研究进一步确定了甲基化 ERG 基因作为胎儿 DNA 的标志物应用于无创性产前诊断唐氏综合征的可行性。后续研究中作者希望通过焦磷酸测序或质谱分析等技术方法来获得游离胎儿 DNA 上更多的甲基化位点信息,最终能够利用孕妇外周血中的游离胎儿 DNA 建立早期、快速、准确、无创伤性的产前诊断方法。

参考文献

- [1] 陈熙,熊礼宽. 无创性产前诊断研究进展及甲基化技术的应用[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(4):427-430.
- [2] Kruse EA, Loughran SJ, Baldwin TM, et al. Dual requirement for the ETS transcription factors Fli-1 and Erg in hematopoietic stem cells and the megakaryocyte lineage[J]. PNAS, 2009, 106(33): 13814-13819.
- [3] Old RW, Crea F, Puszyk W, et al. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome[J]. Reprod Biomed Online, 2007, 15(2): 227-235.
- [4] Zejskova L, Jancuskova T, Kotlabova K, et al. Feasibility of fetal-derived hypermethylated RASSF1A sequence quantification in maternal plasma-next step toward reliable non-invasive prenatal diagnostics[J]. Exp Mol Pathol, 2010, 89(3): 241-247.
- [5] Miura K, Higashijima A, Shimada T, et al. Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant car-

riers of X-linked genetic disorders[J]. J Hum Genet, 2011, 56(4): 296-299.

- [6] Vodicka R, Vrtel R, Dusek L, et al. Refined fluorescent STR quantification of cell-free fetal DNA during pregnancy in physiological and Down syndrome fetuses[J]. Prenat Diagn, 2008, 28(5): 425-433.
- [7] Tong YK, Ding C, Chiu RW, et al. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: theoretical and empirical considerations[J]. Clin Chem, 2006, 2(3): 2194-2202.
- [8] Chan KC, Ding C, Gerovassili A, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis[J]. Clin Chem, 2006, 52(2): 2211-2218.
- [9] Bellido ML, Radpour R, Lapaire O, et al. MALDI-TOF mass array analysis of RASSF1A and SERPINB5 methylation patterns in human placenta and plasma[J]. Biol Reprod, 2010, 82(4): 745-750.
- [10] Tong YK, Jin S, Chiu RW, et al. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach[J]. Clin Chem, 2010, 56(1): 90-98.
- [11] Tong YK, Chiu RW, Akolekar R, et al. Epigenetic-genetic chromosome dosage approach for fetal trisomy 21 detection using an autosomal genetic reference marker[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15244.
- [12] Lo Y, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(4): 768-775.
- [13] Lee T, LeShane ES, Messerlian GM, et al. Down syndrome and cell-free fetal DNA in archived maternal serum[J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 187(5): 1217-1221.

(收稿日期:2013-06-15)

(上接第 2501 页)

- obese nondiabetic, and genetically predisposed individuals[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, 292(1): E92-E100.
- [5] Nistala R, Stump CS. Skeletal muscle insulin resistance is fundamental to the cardiometabolic syndrome[J]. J Cardiometab Syndr, 2006, 1(1): 47-52.
- [6] Kurtz TW, Pravenec M. Antidiabetic mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists: beyond the renin-angiotensin system[J]. J Hypertens, 2004, 22(12): 2253-2261.
- [7] Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance[J]. J Clin Invest, 2000, 106(2): 165-169.
- [8] 高春林, 赵亚萍, 陈小慧, 等. 不同浓度葡萄糖和游离脂肪酸对大鼠骨骼肌细胞株 L6 细胞胰岛素敏感性和细胞内活性氧的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2011, 19(3): 221-224.
- [9] Jones A, Woods DR. Skeletal muscle RAS and exercise performance[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35(6): 855-866.
- [10] Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes[J]. Science, 2005, 307(5708): 384-387.

- [11] Kelley DE, He J, Menshikova EV, et al. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2002, 51(10): 2944-2950.
- [12] Anello M, Lupi R, Spampinato D, et al. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients[J]. Diabetologia, 2005, 48(2): 282-289.
- [13] Chen KH, Guo X, Ma D, et al. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders[J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(9): 872-883.
- [14] Debard C, Laville M, Berbe V, et al. Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptors, in skeletal muscle of Type 2 diabetic patients[J]. Diabetologia, 2004, 47(5): 917-925.
- [15] Lastra G, Habibi J, Whaley-Connell AT, et al. Direct renin inhibition improves systemic insulin resistance and skeletal muscle glucose transport in a transgenic rodent model of tissue renin overexpression[J]. Endocrinology, 2009, 150(6): 2561-2568.

(收稿日期:2013-02-05)