

慢病毒介导shRNA特异性干扰MRPL18基因对胰岛 素瘤细胞线粒体能量代谢的影响

施孟如 陈琳 周林双 杨宇 吕建新 李伟*

(温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 浙江省遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 为了观察线粒体核糖体蛋白大亚基18(mitochondrial ribosomal proteins L18, *MRPL18*)基因低表达对小鼠胰岛素瘤细胞(MIN6)线粒体能量代谢的影响, 该研究利用慢病毒介导的*MRPL18* shRNA特异性干扰*MRPL18*基因, 构建*MRPL18*基因低表达的MIN6细胞模型。Real-time PCR和Western blot检测干扰前后*MRPL18* mRNA和蛋白质的表达情况。流式细胞仪检测细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平变化。海马生物能量代谢仪检测细胞线粒体功能。高效液相色谱检测细胞ATP、ADP和AMP含量。结果显示: 转染*MRPL18*-shRNA后, *MRPL18* mRNA和蛋白质表达均显著降低($P<0.05$ 、 $P<0.01$), 细胞ROS明显升高($P<0.05$); 细胞氧耗率、基础呼吸、最大呼吸和储备呼吸能力显著降低, 同时ATP产量和质子漏也减少($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。细胞ATP含量和能荷较对照组减少, ADP和AMP含量显著增加($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。证实了*MRPL18*基因表达下调后细胞内发生了代谢障碍。推测*MRPL18*是影响线粒体功能的关键蛋白质, 该蛋白在细胞代谢过程中发挥着重要作用。*MRPL18*表达下降所建立的线粒体功能障碍的MIN6细胞模型, 可用于线粒体糖尿病发病分子机制的研究。

关键词 线粒体核糖体蛋白大亚基18; 慢病毒; RNA干扰; 线粒体能量代谢; 糖尿病

Effect of Lentivirus Expressing *MRPL18* shRNA on Mitochondrial Energy Metabolism of MIN6 Cells

Shi Mengru, Chen Lin, Zhou Linshuang, Yang Yu, Lü Jianxin, Li Wei*

(School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou 325035, China)

Abstract The effects of lentivirus expressing mitochondrial ribosomal protein L18 (*MRPL18*) shRNA on mitochondrial energy metabolism of MIN6 cells were observed in this study. *MRPL18* gene low-expressing MIN6 cell models were established using lentivirus expressing *MRPL18* shRNA. The expressions of *MRPL18* mRNA and protein in MIN6 cells were detected by Real-time PCR and Western blot. Flow cytometric analysis was used to detect the reactive oxygen species (ROS) in MIN6 cells. The Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyser was used to evaluate cell mitochondrial function. The contents of ATP, ADP and AMP in cells were detected by high-performance liquid

收稿日期: 2014-05-29 接受日期: 2014-07-02

浙江省科技厅公益技术研究项目(批准号: 2011C37090)、教育部科技重点项目(批准号: 210084)、浙江省医药卫生平台重点资助计划(批准号: 2011ZDA016)和浙江中医药管理局(批准号: 2010ZA084)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86699399, E-mail: liwei@wzmc.edu.cn

Received: May 29, 2014 Accepted: July 2, 2014

This work was supported by Technological Research for Public Welfare Projects of Zhejiang Province (Grant No.2011C37090), Key Project of Chinese Ministry of Education (Grant No.210084), Key Project of Medical Scientific Research Foundation of Zhejiang Province (Grant No.2011ZDA016) and Administration of Traditional Chinese Medicine of Zhejiang Province (Grant No.2010ZA084)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86699399, E-mail: liwei@wzmc.edu.cn

网络出版时间: 2014-09-26 14:22 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.0188.html>

chromatography (HPLC). Compared with control group, the mRNA and protein expressions of MRPL18 decreased significantly in MRPL18-shRNA group ($P<0.05$, $P<0.01$), and there was no significant difference between control group and MRPL18-NC group. After *MRPL18* interference, the cellular ROS increased significantly ($P<0.05$), while the basal respiratory capacity, maximal respiratory capacity, pare respiratory capacity and proton leak, ATP content and energy charge (EC) in cells decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$) compared with control group. Meanwhile, the content of ADP and AMP increased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). The results proved that there were intracellular metabolism disorders after down-regulation of *MRPL18*. *MRPL18* might play an important role in energy metabolism that maintain the mitochondrial function. MIN6 cell models with mitochondrial dysfunction caused by down-regulation of *MRPL18* gene can be used to clarify the mechanism of mitochondrial diabetes mellitus.

Key words mitochondrial ribosomal protein L18; lentivirus; RNA interference; mitochondrial energy metabolism; diabetes mellitus

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种由多种病因引起的以慢性高血糖为特征的代谢紊乱疾病。随着人们生活水平的改善、生活方式和饮食结构的改变以及人口老龄化的来临,糖尿病的发病率在全球呈迅速上升趋势,发展中国家和部分发达国家尤其明显。根据国际糖尿病联盟(international diabetes federation, IDF)预计,到2050年全球糖尿病患者将达到3.8亿^[1]。糖尿病成为继心血管病变和肿瘤之后的第三大严重威胁人类健康和生命的慢性疾病,备受医学界的广泛关注。

线粒体是细胞代谢网络的中心枢纽,它在调控细胞凋亡、能量代谢方面起着重要作用。目前越来越多的研究结果证实,线粒体功能障碍会影响细胞的功能,从而影响糖稳态。近十多年来,线粒体功能与糖尿病及其并发症的关系正逐渐受到关注。线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)编码13种参与线粒体氧化磷酸化反应的蛋白质,这些蛋白质在线粒体基质内的线粒体核糖体(mitochondrial ribosome)上翻译合成。mtDNA的表达异常会严重干扰这些蛋白质的合成,引起线粒体氧化磷酸化功能障碍,进而参与神经退行性疾病、糖尿病、衰老、肿瘤等线粒体疾病的发生^[2-3]。线粒体核糖体蛋白(mitochondrial ribosomal proteins, MRPs)作为线粒体核糖体的组成成分,其中任何一种发生突变或缺失都会影响线粒体蛋白的合成,并有可能导致线粒体膜电位下降、活性氧(reactive oxygen species, ROS)增多和能量产生不足,从而引起体内各种代谢障碍,进而导致糖尿病的发生^[4]。本实验室前期开展的“大鼠妊娠期低蛋白饮食对后代糖耐量的影响”的研究,通过全基因组芯片检测发现,妊娠期低蛋白饮食

导致的糖耐量异常大鼠胰腺中,细胞线粒体核糖体蛋白大亚基18(mitochondrial ribosomal protein L18, *MRPL18*)基因表达降低显著,提示*MRPL18*基因的低表达可能与糖耐量异常和胰岛素抵抗有相关性。在此基础上,本研究拟采用RNA干扰方法抑制小鼠胰岛素瘤细胞(mouse insulinoma, MIN6) *MRPL18*基因的表达,观察细胞ROS水平、线粒体呼吸链以及能量代谢ATP的变化情况,从而明确*MRPL18*在维持机体能量代谢中的作用,并进一步探讨*MRPL18*在糖尿病发生发展中的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞系 大肠杆菌菌株 Stb13、含有*eGFP*报告基因的psiHIV-H1 *MRPL18* shRNA慢病毒表达质粒和阴性对照质粒(Catalog No.MSH034267-HIVH1)以及慢病毒包装试剂盒 Lenti-pac™ HIV Expression packaging kit均购自广州复能基因有限公司。MIN6株和293T细胞株由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂及仪器 SYBR® Green I及PCR试剂、*MRPL18*引物和 β -actin引物购自宝生物工程(大连)有限公司; *MRPL18*小鼠单抗隆抗体、辣根酶标记山驴抗兔IgG(H+L)购自Santa Cruz Biotechnology公司; GAPDH小鼠单克隆抗体、辣根酶标记山羊抗鼠IgG(H+L)、青霉素-链霉素溶液、氨苄青霉素、胰蛋白酶细胞消化液购自碧云天生物技术有限公司; 胎牛血清购自德国Biochrom公司; Opti-MEM培养基和Trizol购自Invitrogen公司; 慢病毒包装试剂盒(Lenti-Pac™ HIV Expression packaging kit)购

自GeneCopoeia公司; 聚凝胺(Polybrene)、丙酮酸钠、寡霉素、解耦剂(carbonyl cyanide-4-trifluoromethoxy phenyl hydrazone, FCCP)、鱼藤酮和磷酸二氢钾购自Sigma公司; 无糖DMEM和XF96孔培养板购自Seahorse Bioscience公司; CellROX[®] Oxidative Stress Reagents购自Life Technology公司; 嘌呤霉素购自Gene Operation公司; CellRox[™] Deep Red Reagent购自Invitrogen公司; 其他试剂均为国产分析纯。

Accela高效液相色谱仪(high performance liquid chromatography, HPLC)购自美国Thermo Scientific公司; Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzer购自Seahorse Bioscience公司; 台式高速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司; StepOne Plus荧光定量PCR仪购自Applied Biosystems公司; FACS Aria II流式细胞仪购自美国BD Biosystems公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 实验分组如下: 对照组(CON): 未经转导的细胞组; scramble shRNA组(MRPL18-NC): 携带目的siRNA随意打乱之后编排的序列基因的慢病毒转导的细胞组; MRPL18干扰组(MRPL18-shRNA): MRPL18 RNA干扰慢病毒载体转导的细胞。293T细胞和MIN6细胞均于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 µg/mL链霉素的DMEM培养基中, 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.2 慢病毒包装和转染 合成的慢病毒干扰RNA转染严格遵循慢病毒包装试剂盒(Lenti-Pac[™] HIV Expression packaging kit)说明书进行操作。将2.5 µg的对照组MRPL18-NC和MRPL18-shRNA分别转染293T细胞, 并于10 cm培养皿中培养, 转染后12 h换液, 48 h后荧光显微镜下观察细胞有强绿色荧光及细胞融合现象时, 拍照并收集细胞培养液。4 500 r/min离心15 min, 0.45 µm滤膜过滤以去除细胞碎片, 4 °C、20 331 r/min离心浓缩病毒2 h, RNase-free DMEM悬浮病毒颗粒沉淀, -80 °C冻存, 以备后续转染MIN6细胞建立稳定转染的细胞系。

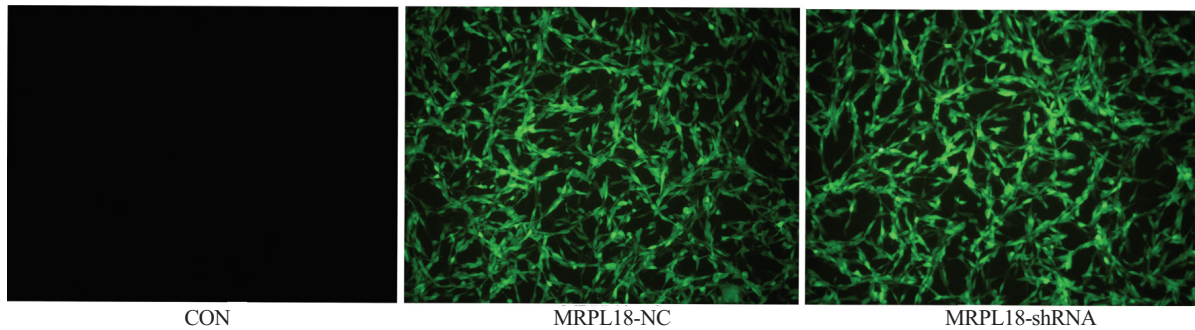
1.2.3 稳定细胞系的建立 取对数生长期的MIN6细胞, 以2×10⁴/孔的密度接种于24孔板, 每孔加0.5 mL含5% FBS和青霉素-链霉素的培养基, 37 °C、5% CO₂培养24 h后换液。取100 µL病毒原液加入到400 µL含5%胎牛血清的培养基中稀释, 同时加入聚凝胺至终浓度为8 µg/mL, 37 °C、5% CO₂培养24 h。换用0.5 mL不含聚凝胺的培养基, 培养24 h后将细胞传至6孔

板, 并继续培养48 h, 每1~2 d用含5 ng/mL嘌呤霉素(puromycin)的新鲜完全培养基培养, 直到抗药性克隆变得明显。

1.2.4 Real-time PCR检测MRPL18 mRNA表达 Trizol法提取各组的总RNA, 使用紫外分光光度法检测RNA浓度。RNA逆转录反应严格按照TaKaRa公司逆转录试剂盒说明书进行操作, 各组以等量RNA为起始模板, 合成cDNA。用TaKaRa公司荧光定量PCR试剂盒在Applied Biosystems公司的StepOne Plus荧光定量PCR仪上进行Real-time PCR。PCR条件为: 95 °C预热变性5 min; 95 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共40个循环。分析扩增曲线和融解曲线以确保反应特异性, 以β-actin为内参, 按公式2^{-ΔΔC_t}计算各组MRPL18 mRNA相对表达量。MRPL18引物序列为: 上游: 5'-ACC CTC GGA ATC TGG AGC TCT TA-3', 下游: 5'-AGT GGA TGC TGA AAC AAC AAC CTG-3'; 内参基因β-actin引物序列为: 上游: 5'-GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG-3', 下游: 5'-CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T-3'。

1.2.5 Western blot检测MRPL18蛋白的表达 收集各组细胞用PBS洗2次, 每瓶加入300 µL含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液, 充分振荡混匀后, 静置30 min, 转移至1.5 mL EP管, 4 °C、12 000 r/min离心30 min, 吸取上清液测蛋白浓度。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 电转膜至硝酸纤维素膜, 5%脱脂奶粉封闭1 h, 加一抗(MRPL18, 1:250稀释; GAPDH, 1:1 000稀释), 4 °C过夜。TBST洗膜5 min/次×3次, 加1:2 500二抗, 室温放置2 h, 再洗膜3次, 加入ECL荧光剂, 经ChemiDoc MP荧光化学发光成像系统(Bio-Rad公司, 美国)曝光获得图像。Quantity One图像分析软件对结果进行分析。以目的蛋白与内参GAPDH光密度D值的比值代表目的蛋白表达的相对含量。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞ROS 各实验组细胞分别按照每孔1×10⁶/mL接种于12孔板, 培养24 h后, 用预冷的PBS洗涤细胞3次, 每孔加入含终浓度5 µmol/L探针(CellRox[™] Deep Red Reagent)的DMEM 500 µL, 轻轻晃动培养板(避光操作), 置于37 °C、5% CO₂培养箱中反应30 min。收集细胞, 用DMEM洗涤细胞3次, 2 000 r/min离心5 min, 加200 µL DMEM充分混匀后, 流式细胞仪检测ROS, 波长Ex: 644 nm、mE: 665 nm, 计数10 000个细胞, 计算其平均荧光强度, 代表ROS水平。

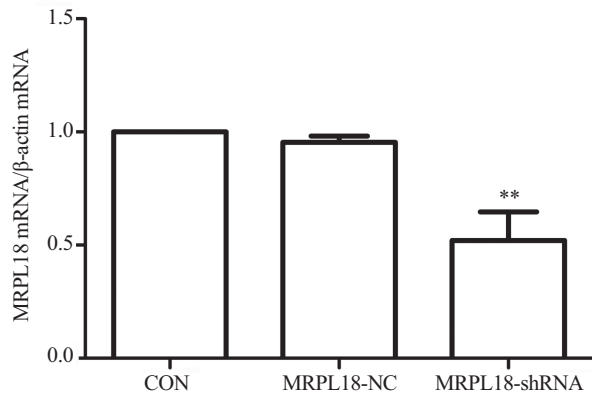


CON: 对照组; MRPL18-NC: scramble shRNA组; MRPL18-shRNA: MRPL18干扰组。

CON: control group; MRPL18-NC: scramble shRNA group; MRPL18-shRNA: MRPL18 RNA interference group.

图1 病毒载体转染MIN6细胞48 h后GFP表达(200×)

Fig.1 The green fluorescence protein expression of MIN6 cells 48 h after plasmid transfection (200×)



** $P < 0.01$, 与CON组及MRPL18-NC组比较($n=3$)。

** $P < 0.01$ compared with CON group and MRPL18-NC group ($n=3$).

图2 MRPL18-shRNA转染对MIN6细胞MRPL18 mRNA表达的影响

Fig.2 Effects of MRPL18-shRNA transfection on MRPL18 mRNA expression of MIN6 cells

1.2.7 细胞线粒体能量代谢检测 各组细胞按照每孔 $2 \times 10^4/80 \mu\text{L}$ 接种于 Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzer专用的96孔板, 培养24 h细胞融合度达到约85%, 四个角为孔板校正孔。在96孔测试板中加入 $140 \mu\text{L}$ pH7.4的XF96校正液, 将测试板和探针暗盒放于 37°C 、无 CO_2 培养箱中孵育过夜。检测前将细胞培养基换成测试液(含无糖DMEM、 4.5 g/L 葡萄糖和 2 mmol/L 丙酮酸钠), 37°C 、无 CO_2 培养箱中孵育30 min, 向探针的药槽A、B、C孔中分别加入寡霉素、FCCP、鱼藤酮至终浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$, 仪器上校正30 min后开始检测。测试完毕后回收细胞板, 收集各孔中细胞并提取蛋白, 通过蛋白浓度校正各孔中的细胞数, 以便对所得数据进行校正。

1.2.8 细胞ATP、ADP、AMP含量以及能荷测定 采用优化的反相高效液相色谱分析法^[5]检测。收集

细胞, 计数后冰PBS洗涤1次, 加入预冷的高氯酸溶液(0.1 mol/L)充分混匀, 低速漩涡振荡30 s, 冰上裂解15 min, 将裂解液于 4°C 、 $14\,000 \text{ r/min}$ 离心10 min, 上清液用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 在Thermo高效液相色谱仪上测定。选用GL Sciences公司 C_{18} 反相柱(粒径 $3 \mu\text{m}$, 规格 $4.6 \times 250 \text{ mm}$, $\text{pH}2 \sim 7.5$), 参数设定: 柱温 25°C ; 流动相 150 mmol/L 磷酸二氢钠缓冲液; 纯甲醇($95\%:5\%$); 流速 0.6 mL/min ; 紫外检测波长 259 nm ; 样品进样体积 $10 \mu\text{L}$; 样品温度 4°C 。

1.3 数据统计

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析, 结果采用 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 表示, 各组之间的统计学差异分析选用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

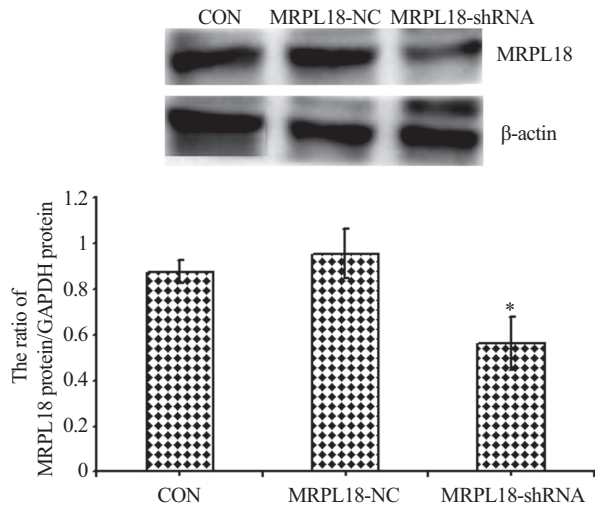
2.1 慢病毒转导MIN6的结果

慢病毒转导MIN6细胞后, MIN6细胞在荧光显微镜下均可见大量绿色荧光(图1), 荧光随着细胞传代可持续, 而空白组未见特异绿色荧光。

2.2 MRPL18 shRNA转染后MIN6细胞中MRPL18 mRNA和蛋白质水平的变化

慢病毒转导MIN6细胞后, Real-time PCR检测MRPL18 mRNA结果显示, 与CON组及MRPL18-NC组比较, MRPL18-shRNA组MRPL18 mRNA水平显著降低($P < 0.01$)(图2)。

Western blot检测MRPL18的蛋白表达, 结果显示, 在分子量 21 kDa 处均出现蛋白印迹杂交结果。与CON组和MRPL18-NC组比较, MRPL18-shRNA组MRPL18蛋白质水平显著降低($P < 0.05$)(图3)。



* $P < 0.05$, 与CON组及MRPL18-NC组比较($n=3$)。

* $P < 0.05$ compared with CON group and MRPL18-NC group ($n=3$).

图3 MRPL18-shRNA转染对MIN6细胞MRPL18蛋白质表达的影响

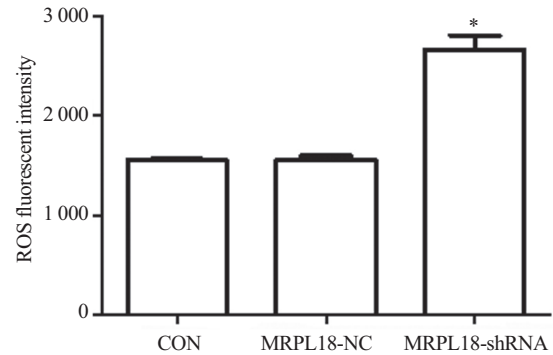
Fig.3 Effects of MRPL18-shRNA transfection on MRPL18 protein expression of MIN6 cells

2.3 MIN6细胞ROS检测结果

CON组、MRPL18-NC组和MRPL18-shRNA组ROS水平分别为: 1553.7 ± 15.7 、 1557.0 ± 42.9 、 2668.3 ± 141.5 , 与CON组和MRPL18-NC组比较, MRPL18-shRNA组细胞ROS水平显著升高($P < 0.05$)(图4)。

2.4 细胞线粒体能量代谢检测结果

MRPL18基因被干扰以后, 用Seahorse XF96



* $P < 0.05$, 与CON组及MRPL18-NC组比较($n=3$)。

* $P < 0.05$ compared with CON group and MRPL18-NC group ($n=3$).

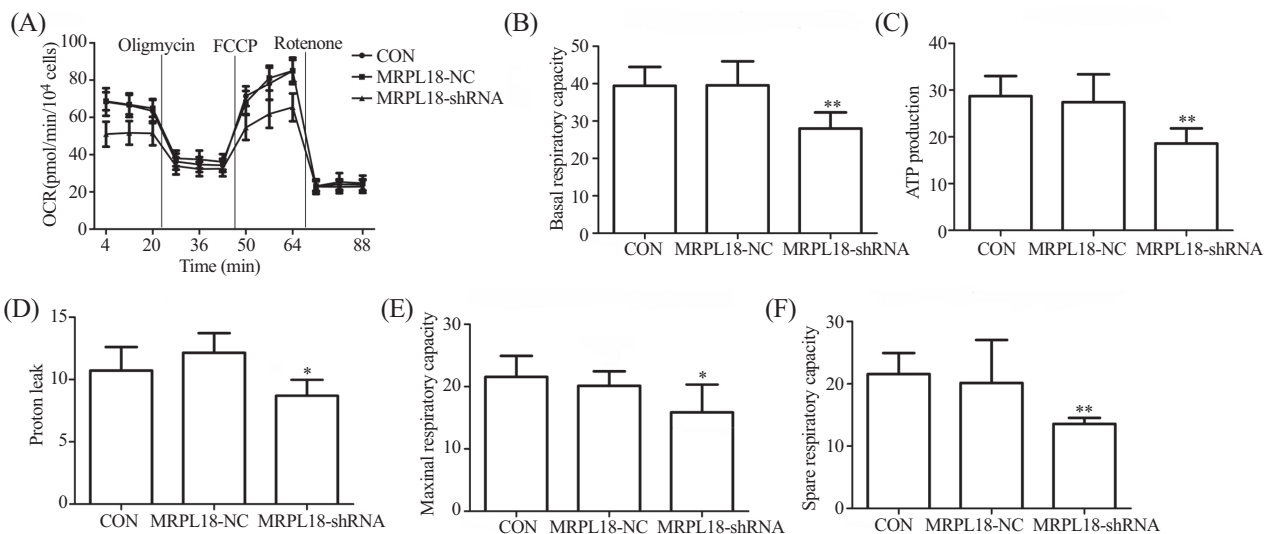
图4 MRPL18-shRNA转染对MIN6细胞ROS的影响

Fig.4 Effects of MRPL18-shRNA transfection on ROS of MIN6 cells

Extracellular Flux Analyzer对线粒体能量代谢细胞氧耗率(oxygen consumption rate, OCR)进行检测, 结果如下: 与CON组和MRPL18-NC组比较, MRPL18-shRNA组基础氧耗率明显降低(图5A), 其中基础呼吸(图5B)、最大呼吸(图5E)和储备呼吸能力(图5F)显著降低($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$); 同时ATP产量(图5C)和质子漏(图5D)也明显减少($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。

2.5 细胞中ATP、ADP和AMP含量测定结果

以外标定量法获得三者标准品的回归方程相关系数分别为: ATP: $y = -21.397 + 24679.7x$, $R^2 = 0.9920$ ($n=6$); ADP: $y = 397.643 + 20967.7x$, $R^2 = 0.9927$ ($n=6$);



A: 细胞氧耗率; B: 基础呼吸; C: ATP产量; D: 质子漏; E: 最大呼吸; F: 储备呼吸。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与CON组及MRPL18-NC组比较($n=10$)。

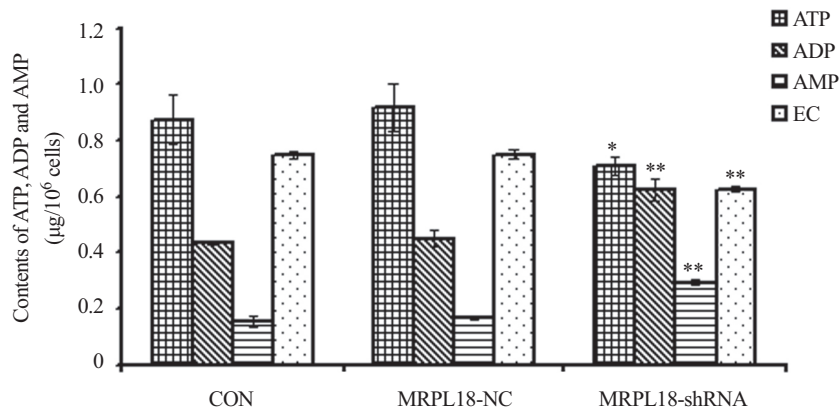
A: oxygen consumption rate (OCR); B: basal respiratory capacity; C: ATP production; D: proton leak; E: maximal respiratory capacity; F: spare respiratory capacity. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with CON group and MRPL18-NC group ($n=10$).

图5 MRPL18-shRNA转染对MIN6细胞氧耗率的影响

Fig.5 Effects of MRPL18-shRNA transfection on OCR of MIN6 cells

表1 细胞内ATP、ADP和AMP含量测定
Table 1 ATP, AMP and ADP contents of the cells

组别 Groups	三磷酸腺苷 ($\mu\text{g}/10^6$ cells) ATP ($\mu\text{g}/10^6$ cells)	二磷酸腺苷 ($\mu\text{g}/10^6$ cells) ADP ($\mu\text{g}/10^6$ cells)	磷酸腺苷 ($\mu\text{g}/10^6$ cells) AMP ($\mu\text{g}/10^6$ cells)	能荷 EC	ATP与ADP比值 ATP/ADP
CON	0.875 $\pm$ 0.091	0.433 $\pm$ 0.006	0.154 $\pm$ 0.024	0.746 $\pm$ 0.014	1.880 $\pm$ 0.077
MRPL18-NC	0.918 $\pm$ 0.086	0.405 $\pm$ 0.028	0.166 $\pm$ 0.005	0.752 $\pm$ 0.016	2.267 $\pm$ 0.026
MRPL18-shRNA	0.709 $\pm$ 0.033*	0.623 $\pm$ 0.039**	0.293 $\pm$ 0.011**	0.626 $\pm$ 0.006**	1.138 $\pm$ 0.034*



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与CON组及MRPL18-NC组比较($n=3$)。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with CON group and MRPL18-NC group ($n=3$).

图6 MRPL18-shRNA转染对MIN6细胞ATP、ADP、AMP和能荷的影响

Fig.6 Effects of MRPL18-shRNA transfection on ATP, ADP, AMP and EC of MIN6 cells

AMP: $y=255.473+24328.5x$, $R^2=0.9928$ ($n=6$)。

以相同的HPLC条件分别检测各组细胞的ATP、ADP和AMP含量。(1)计算ATP、ADP和AMP含量的公式为: $X=C/N \times K$ [X : ATP、ADP和AMP含量($\mu\text{g}/10^6$ cells), 其中 C : 根据标准曲线计算的ATP、ADP和AMP浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$); N : 样品的细胞数(1×10^6 cells/ mL); K : 样品稀释倍数]。(2)能荷(energy charge, EC)计算公式为: $EC = ([\text{ATP}] + 1/2[\text{ADP}] + [\text{AMP}]) / ([\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}])$ 。结果显示, 与CON组和MRPL18-NC组比较, MRPL18-shRNA组ATP含量以及ATP/ADP比值明显降低, 差异显著($P < 0.05$), 能荷(EC)显著降低($P < 0.01$), ADP和AMP含量显著升高($P < 0.01$)(表1和图6)。

3 讨论

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是2型糖尿病的重要特征, 也是形成代谢综合征(metabolic syndrome)的重要机制^[6], 胰岛素抵抗和高胰岛素血症可以使心血管疾病风险增加2倍^[7]。线粒体是真核细胞的能量加工工厂, 是细胞功能和代谢的一种关键的细胞器。它的主要作用是产生ATP, 控制细胞的代谢

和调节细胞凋亡, 因此, 线粒体氧化磷酸化产生ATP过程的任何一个环节出现故障, 都有可能导致线粒体功能异常。许多研究已经显示, 线粒体功能障碍在胰岛素抵抗中可能起着重要的作用, 糖类、脂类和蛋白质代谢的终极阶段都在线粒体内经三羧酸循环完成氧化。因而, Saris等^[8]提出所有的代谢障碍最终都可归因于线粒体功能异常。

更多的研究也证实了在不同的胰岛素抵抗状态中会出现线粒体代谢的异常, 这些状态包括肥胖、T2DM、多囊卵巢综合症等^[9]。通过对胰岛素抵抗个体进行肌肉活检, 发现线粒体相关基因的mRNA水平下降、线粒体DNA含量减少和呼吸链蛋白亚基表达也随之下降^[10]。线粒体功能障碍和胰岛素抵抗之间有着密切的联系。

MRPs负责线粒体基因(mtDNA)编码蛋白的翻译。它作为线粒体核糖体的活性中心, 是mtDNA正常表达的基础。近年来, 已明确人类MRPs全部78个组成蛋白编码基因的序列及染色体定位^[11], 使我们可以进一步研究MRPs并从中鉴定出影响线粒体代谢功能相关的关键蛋白。我们前期实验通过全基因组芯片检测发现, 妊娠期低蛋白饮食导致的糖耐量

异常大鼠胰腺中MRPL18基因表达显著降低,提示MRPL18基因的低表达可能与糖耐量异常和胰岛素抵抗有相关性。

有文献报道,线粒体产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)与糖尿病的发病有关^[12]。也有研究发现,线粒体是细胞内ROS产生的主要部位,线粒体功能障碍可引起胰岛素信号通路的ROS产生过多^[13],而ROS的增多可促进细胞凋亡。B细胞的抗氧化能力低,对ROS相当敏感。线粒体产生的ROS可氧化线粒体心磷脂和其他磷脂的多不饱和脂肪酸,从而损伤线粒体膜的完整性,最后导致B细胞凋亡。本研究的结果显示,MRPL18基因被干扰以后,与对照组、MRPL18-NC组相比,ROS产生显著增加,可能原因是干扰MRPL18后引起MIN6细胞线粒体功能障碍,进而通过胰岛素信号通路产生过多的ROS。

线粒体是细胞呼吸和能量代谢的中心,含有细胞呼吸所需要的酶和电子传递载体。同时,线粒体也负责ATP的产生、能量消耗以及ROS的清除。清除有害自由基是基础代谢率的一项重要功能。质子漏是清除自由基的一条途径,有害自由基的产生与细胞中氧气的浓度呈正相关,质子漏的产生可以降低氧浓度,从而减少自由基的产生。本研究结果证实,MRPL18基因被干扰以后,与对照组、MRPL18-NC转染组相比,基础氧耗率明显降低,基础呼吸、最大呼吸和储备呼吸能力显著降低,同时,ATP产量和质子漏也明显减少,可能是MRPL18基因被干扰以后,细胞基础呼吸受抑制,导致细胞的生物力能学受损。低表达MRPL18可引起线粒体态4呼吸速率降低。1974年,Nicholl^[14]发现 $\Delta\psi$ 与态4呼吸速度呈非欧姆导体,即高膜电位时质子导性增加,出现质子漏回基质的现象。由于ATP合成酶是线粒体呼吸链中控制ATP合成的关键酶,其利用线粒体膜间隙与内膜间H⁺梯度电位差($\Delta\psi$)合成ATP^[15],可解释低表达MRPL18基因诱导MIN6细胞ATP产量降低的现象。同时,该机制也与线粒体ROS产生增多、细胞色素的释放以及细胞凋亡的启动有关^[16]。本实验中,MRPL18干扰组ATP含量及能荷较正常对照组和MRPL18-NC组明显降低,ADP和AMP含量显著升高,此结果可能与线粒体氧化磷酸化效率增高所伴随的ROS增加有关。

综上所述,本研究利用慢病毒介导的shRNA特异性干扰MIN6细胞MRPL18基因后,观察到细胞

内ROS升高,基础呼吸、质子漏、最大呼吸及储备呼吸能力均下降,同时ATP含量和能荷降低等损伤性改变,提示此时细胞内发生了代谢障碍。证实了MRPL18是影响线粒体功能的关键蛋白质,该蛋白在细胞代谢过程中发挥着重要作用。MRPL18基因表达减少可能是糖尿病发病机制在分子水平上的变化。如若能得到证实,MRPL18可能成为糖尿病治疗的新靶点。今后,我们将开展MRPL18 knock-down动物模型的研究,以便进一步提供MRPL18基因与线粒体糖尿病发病机制的相关理论和实验依据。

参考文献 (References)

- 1 Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27(5): 1047-53.
- 2 Hsieh CJ, Weng SW, Liou CW, Lin TK, Chen JB, Tiao MM, *et al.* Tissue-specific differences in mitochondrial DNA content in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 92(1): 106-10.
- 3 Kloss-Brandstatter A, Schafer G, Erhart G, Huttenhofer A, Coassin S, Seifarth C, *et al.* Somatic mutations throughout the entire mitochondrial genome are associated with elevated PSA levels in prostate cancer patients. *Am J Hum Genet* 2010; 87(6): 802-12.
- 4 Sylvester JE, Fischel-Ghodsian N, Mougey EB, O'Brien TW. Mitochondrial ribosomal proteins: Candidate genes for mitochondrial disease. *Genet Med* 2004; 6(2): 73-80.
- 5 郑屹, 陈赛慧, 叶薇, 吕建新. 高效液相色谱法检测细胞能量代谢物质的方法建立与应用. *科技通报* (Zheng Yi, Chen Saihui, Ye Wei, Lü Jianxin. Establishment of high-performance liquid chromatography for energy metabolic materials assay and its applications. *Bulletin of Science and Technology*) 2012; 28(7): 46-50.
- 6 Garcia-Roves PM. Mitochondrial pathophysiology and type 2 diabetes mellitus. *Arch Physiol Biochem* 2011; 117(3): 177-87.
- 7 Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, *et al.* Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(4): 403-14.
- 8 Saris WH, Heymsfield SB. All metabolic roads lead to mitochondrial(dys)-function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10(6): 661-3.
- 9 Turner N, Heilbronn LK. Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance? *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19(9): 324-30.
- 10 Heilbronn LK, Gan SK, Turner N, Campbell LV, Chisholm DJ. Markers of mitochondrial biogenesis and metabolism are lower in overweight and obese insulin-resistant subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(4): 1467-73.
- 11 O'Brien TW. Properties of human mitochondrial ribosomes. *IUBMB Life* 2003; 55(9): 505-13.
- 12 Moreira PI, Duarte AI, Santos MS, Rego AC, Oliveira CR. An integrative view of the role of oxidative stress, mitochondria and insulin in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009; 16(4): 741-61.

- 13 Erol A. Insulin resistance is an evolutionarily conserved physiological mechanism at the cellular level for protection against increased oxidative stress. *BioEssays* 2007; 29(8): 811-8.
- 14 Nicholls DG. The non-Ohmic proton leak—25 years on. *Biosci Rep* 1997; 17(3): 251-7.
- 15 Pedersen PL. Transport ATPases into the year 2008: A brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39(5/6): 349-55.
- 16 Dineley KE, Votyakova TV, Reynolds IJ. Zinc inhibition of cellular energy production: Implications for mitochondria and neurodegeneration. *J Neurochem* 2003; 85(3): 563-70.