

( $r=0.95, P<0.01$ ) and suppressed the cell volume regulation. There was no effect of mouse MDR1 antisense on the expression of MDR1 gene and the volume regulation in NPE cells. The results suggest that P-gp plays an important role in the cell volume regulation.

**Key words:** Antisense oligonucleotide MDR1 P-glycoprotein Immunofluorescence Volume regulation

## 人肾小球系膜细胞葡萄糖转运蛋白的研究

李颖健 刘志红 章 精 陈朝红 黎磊石

南京大学医学院临床学院

(南京军区南京总医院 解放军肾脏病研究所 南京 210002)

肾小球系膜细胞在维持肾小球正常结构与功能方面起着非常重要的作用。其主要生理功能包括:(1)合成多种细胞外基质;(2)通过其收缩与扩张作用,参与肾小球血流动力学的调节;(3)通过其吞噬作用,参与肾小球系膜区大分子物质的清除。此外,系膜细胞可产生多种细胞因子,通过自分泌或旁分泌途径参与肾小球炎症反应,进而使细胞外基质(ECM)产生增加。肾小球系膜细胞ECM合成增加在糖尿病肾病肾小球硬化中起关键作用。增高培养液中葡萄糖浓度能直接刺激体外培养的系膜细胞ECM净合成增加<sup>[1]</sup>,但葡萄糖是如何进入系膜细胞并调节ECM合成的目前还不清楚。国外对于大鼠系膜细胞研究表明,葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter 1, GLUT1)是系膜细胞葡萄糖转运蛋白的主要类型<sup>[2,6]</sup>,而对于人系膜细胞GLUT1的研究国内外尚无报道,本文首次研究了GLUT1在人肾小球系膜细胞的表达与功能。

### 材料和方法

#### 1. 系膜细胞的培养和鉴定

取不适合肾移植的供肾,按常规方法<sup>[3]</sup>用机械网筛法分离收获肾小球,镜检小球纯度 $>95\%$ ,用0.1%的IV型胶原酶(Sigma)37℃消化20min后,置于含20%小牛血清(杭州四季青生物工程研究所)的DMEM/F-12(Promega)中培养,2-3天后可见卵圆形的上皮细胞长出,以后上皮细胞逐渐死亡,代之以梭形

或星形的系膜细胞,3周后铺满瓶底。用0.25%胰蛋白酶消化,传代培养。间接免疫荧光鉴定,抗结蛋白、Thy-1染色阳性,抗角蛋白、因子Ⅷ阴性,证实为系膜细胞。实验采用第10-15代培养细胞。

#### 2. 原位逆转录和PCR

胰蛋白酶消化,收集细胞,取 $1\times 10^5$ 细胞用PBS洗涤后,加入30 $\mu$ l 2% Triton 溶液(4% Triton 50 $\mu$ l, RNAsin 10 $\mu$ l, 1mmol/L DTT 1 $\mu$ l, DEPC 水 39 $\mu$ l),液氮中反复冻融3次。将其分装成4管。按照逆转录试剂盒(Promega)操作要求进行逆转录<sup>[4]</sup>。用于扩增人GLUT1的正引物序列为5'-CATGTGCTTCCAGT-ATGTGG,负引物序列5'-GTCAGGTTTGGAAAGT-CTCAT。PCR扩增产物为313bp。PCR反应条件为94℃ 1min, 65℃ 1min, 72℃ 1min, 共35个循环<sup>[5]</sup>。3%琼脂糖溴乙锭电泳,紫外灯下判断结果。PCR扩增产物的特异性用限制性内切酶BstO 1进一步鉴定。PCR试剂及限制性内切酶均购自Promega公司。

#### 3. 免疫染色荧光

每孔 $2\times 10^4$ 系膜细胞接种至纤连蛋白预先包被的Chamber Slides培养过夜, PBS洗3次。用2%多聚甲醛固定。正常山羊血清处理后加入GLUT1多克隆抗体(CALBIOCHEM®),室温温育30min, PBS洗涤3次,加FITC-猪抗兔IgG(DARKO),室温温育30min, PBS洗涤3次,荧光显微镜下观察结果<sup>[7]</sup>。

#### 4. 流式细胞仪分析

用Versene(含0.2% EDTA的PBS)消化,收集细胞。取 $1\times 10^6$ 细胞,用预冷的0.1% PBA(PBS+0.1% BSA)洗涤细胞后,加入GLUT1多克隆抗体(CAL-

本课题为国家自然科学基金资助项目,39870288。

BIOCHEM ⑤), 4℃作用 30min, 用 0.1% PBA 洗涤两次, 加 FITC-猪抗兔 IgG (DARKO), 4℃避光作用 30min, 0.1% PBA 洗涤两次后, 用 COULTER EPICS XL 流式细胞仪分析。阴性对照为正常兔血清代替第一抗体<sup>[4]</sup>。

### 5. 系膜细胞葡萄糖摄入测定

系膜细胞以每孔  $2 \times 10^5$  细胞接种六孔板, 培养 24h, 弃培养液, 换成 20mmol/L HEPES (140mmol/L NaCl, 1mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 5mmol/L KCl, 2.5mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , 20mmol/L HEPES, 0.1% BSA, pH 7.4) 作用 30min, 每孔加入 1ml 含  $1\mu\text{Ci/ml}$  的 2-Deoxy- $^{3}\text{H}$ -D-Glucose (2-DG Amersham) 的 HEPES 液, 37℃温育 30min。加入 1mol/L NaOH 裂解细胞, 盐酸中和, Beckmen 液闪仪计数<sup>[4]</sup>。蛋白质浓度测定采用考马斯亮兰 G250 法。此外, 为测定系膜细胞葡萄糖摄入的动力学关系, 在 1ml 含  $1\mu\text{Ci/ml}$  的 2-DG 的 HEPES 液中, 加入非标记的 2-DG, 依此为 0.2、0.25、0.33、0.5、1、5、10mmol/L, 按上述方法测定系膜细胞葡萄糖摄入。我们还观察了根皮素 (Phloretin) 对细胞糖摄入的影响, 在 2-DG 温育的同时, 加入不同浓度的根皮素 (0.08、0.4、2、10 $\mu\text{mol/L}$ ), 按上述方法测定葡萄糖摄入<sup>[10]</sup>。本实验的结果均重复 3 次以上。

## 结 果

### 1. 人系膜细胞 GLUT1 mRNA 的表达

人系膜细胞经原位逆转录后, 用特异性人 GLUT1 引物进行 PCR 扩增后琼脂糖电泳出现 313bp 的目的条带, BStO1 酶切分析进一步证实了 GLUT1 扩增产物的序列特异性 (图 1)。

### 2. 人系膜细胞 GLUT1 蛋白质的表达

为了进一步证实人系膜细胞不仅能够表达 GLUT1 mRNA, 同时还具有蛋白质翻译功能。我们用抗 GLUT1 抗体对系膜细胞表面 GLUT1 蛋白质的存在用免疫荧光染色技术 (图 2) 和流式细胞仪 (图 3) 进行了分析。结果发现人系膜细胞表面存在 GLUT1 蛋白质的表达。

### 3. 人系膜细胞葡萄糖摄入动力学

细胞外葡萄糖浓度与细胞的葡萄糖摄入间的关系符合典型的米氏方程 (图 4), 双倒数作

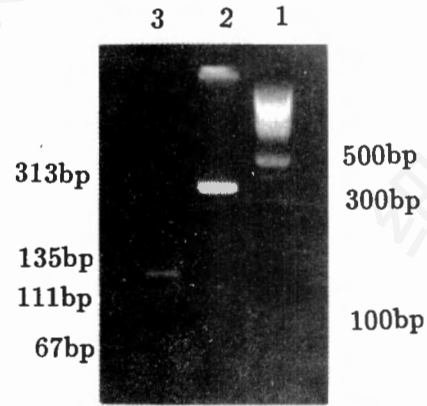


图 1 系膜细胞 GLUT1 的 RT-PCR 结果  
泳道 1 为分子量标记; 泳道 2 为 GLUT1 的 RT-PCR 产物 (313bp);  
泳道 3 为 PCR 产物经 BStO1 酶切后的结果 (135bp, 111bp 和 67bp)。

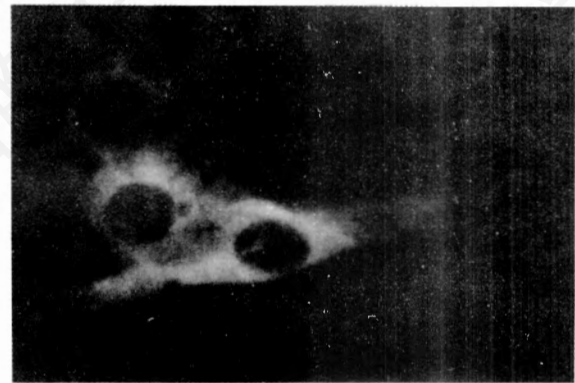


图 2 人系膜细胞 GLUT1 免疫荧光染色结果 (IF,  $\times 400$ )

图结果得出  $K_m$  值为 0.36mmol/L,  $V_{max}$  值 462nmol/mgprot  $\cdot$  h<sup>-1</sup> (图 5)。

### 4. 人系膜细胞 GLUT1 功能抑制实验

根皮素能竞争性地抑制葡萄糖转运蛋白的功能<sup>[11]</sup>, 随着根皮素浓度的增加, 葡萄糖摄入逐渐被抑制, 10 $\mu\text{mol/L}$  根皮素能使肾小球系膜细胞葡萄糖的摄入降至 23.3% (图 6), 进一步证实了葡萄糖转运蛋白在介导系膜细胞葡萄糖转运中的作用。

## 讨 论

葡萄糖转运蛋白 (glucose transporter

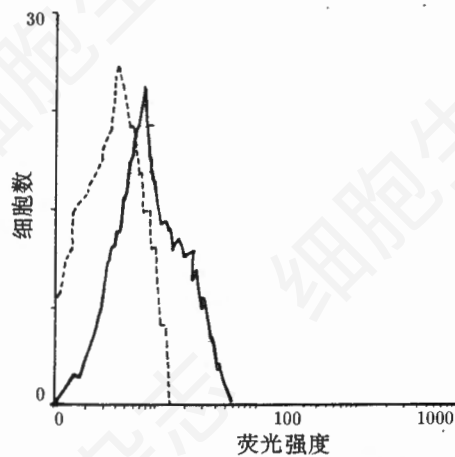


图 3 流式细胞仪分析结果

虚线峰代表阴性对照(正常兔血清代替第一抗体);实线峰代表 GLUT1 抗体染色结果。系膜细胞经 GLUT1 抗体染色后其荧光强度明显右移,说明系膜细胞有 GLUT1 蛋白质的阳性表达。

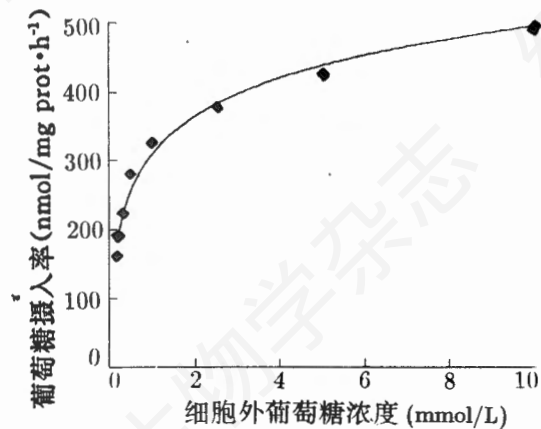


图 4 人系膜细胞葡萄糖摄入率与细胞外糖浓度的动力学的关系

GLUT)是膜上负责葡萄糖跨膜转运的一类膜蛋白。目前已发现六种 GLUT, GLUT1-5 和 GLUT7。它们在体内的分布具有组织和细胞特异性,对葡萄糖的转运具有各自的动力学特性,并受不同因子调节<sup>[8]</sup>。其中 GLUT1 广泛分布于各个器官和组织中,其中尤以红细胞、血管内皮细胞及脑血屏障表达量最高。GLUT1 是一种葡萄糖的高亲和性转运体,分子量大约 46 KD。GLUT1 一般不受胰岛素的调节,负责细胞的基础代谢, GLUT1 表达量往往是细胞

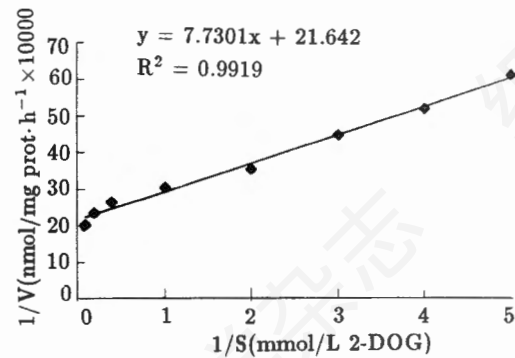


图 5 人系膜细胞葡萄糖摄入动力学双倒数分析

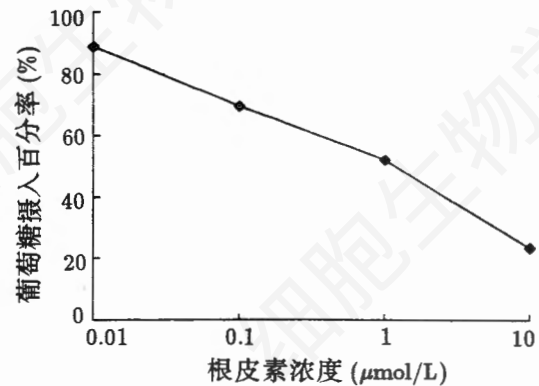


图 6 根皮素抑制人系膜细胞葡萄糖摄入曲线

糖代谢的主要限速步骤(rate-limiting step)。因此,了解肾小球系膜细胞上 GLUT1 的分布及其功能对于进一步阐明 GLUT1 在糖尿病、肾病发病机制中的作用具有重要意义。

我们首先从 mRNA 与蛋白质水平证实了人肾小球系膜细胞有 GLUT1 的表达,继而又用 2-Deoxy-[<sup>3</sup>H]-D-Glucose 摄入法确定它的功能。人系膜细胞葡萄糖转运动力学呈典型的米氏方程曲线,与大鼠系膜细胞基本类似<sup>[2,9]</sup>,而且它们的米氏常数也很接近。这说明人系膜细胞的 GLUT1 与大鼠系膜细胞的 GLUT1 生理特性有相似之处,即是一种高亲和性转运蛋白并能在生理葡萄糖浓度(5mmol/L 左右)下接近饱和。GLUT1 的这种特性对维持系膜细胞胞内糖代谢的正常进行具有重要的意义。

根皮素是 GLUT1 的特异性抑制剂,图 6 的结果表明它可以抑制人系膜细胞葡萄糖的摄入,进一步证实了人系膜细胞对葡萄糖的摄入主要是 GLUT1 介导的。Spiro 等人的实验表明大鼠系膜细胞还存在一种钠依赖性的葡萄糖转运蛋白 SGLT ( $\text{Na}^+$ -dependent glucose transporter),这种转运体不能被根皮素所抑制<sup>[2]</sup>,本文未对这种转运体进行研究,但根皮素几乎完全抑制了葡萄糖摄入,说明 SGLT 在本研究实验条件下,对人系膜细胞葡萄糖转运不起重要影响。

大鼠系膜细胞除了表达 GLUT1 和 SGLT 外,还存在少量 GLUT4 的表达,而且随着细胞在体外的传代而逐渐丢失,因此 GLUT4 在系膜细胞的糖摄取中不起主要作用<sup>[2]</sup>。我们对人系膜细胞的研究亦证实了这种现象。GLUT4 主要存在于肌肉、脂肪等胰岛素敏感组织中,静息状态时主要位于胞浆内膜系统中,胰岛素刺激下可以使 GLUT4 转位至细胞膜,进而细胞的糖摄取增加<sup>[8]</sup>。但系膜细胞表面 GLUT4 具有何种生理功能,受哪些因素调节,病理状态下如何变化,这些还有待于我们进一步的研究。

本项研究分别从 mRNA 表达,蛋白质水平和功能上证实了人系膜细胞存在功能性的 GLUT1,该结果为进一步研究系膜细胞 GLUT1 在糖尿病肾病发病中的作用奠定了基础。

## 摘 要

本文采用了 RT-PCR,细胞免疫荧光染色

## IDENTIFICATION OF GLUCOSE TRANSPORTER 1 IN HUMAN MESANGIAL CELLS AND ITS FUNCTION ASSAY

LI Ying Jian LIU Zhi Hong ZHANG Jing CHEN Zhao Hong LI Lei Shi  
(Jin Ling Hospital, Nanjing University School of Medicine, Nanjing 21002)

### ABSTRACT

To evaluate the role of glucose transporter in the glucose uptake of glomerular mesangial cells, the expression of glucose transporter 1 (GLUT1) mRNA and protein in human mesangial cells were detected by RT-PCR, immunofluorescence and flow cytometry. Both GLUT1 mRNA and proteins were found in human mesangial cells. 2-Deoxy-D-Glucose uptake and its kinetics assay showed that GLUT1 is a functional glucose transporter in mesangial cells, and its function could be inhibited by specific inhibitor Phloretin. This result indicates that GLUT 1 is the predominant

及流式细胞仪分析技术证实人肾小球系膜细胞有 GLUT1 (glucose transporter 1) mRNA 和蛋白质的表达。用 2-Deoxy [<sup>3</sup>H]-D-Glucose 摄入法与根皮素抑制实验肯定了系膜细胞上 GLUT 1 的功能及其在系膜细胞葡萄糖摄入中的作用。本项研究为进一步研究系膜细胞 GLUT1 在糖尿病肾病发病机理中的作用奠定了基础。

关键词: 葡萄糖转运蛋白 肾小球系膜细胞

### 参 考 文 献

- [1] Ayo S. et al., 1990, *Am J Pathol*, 136:1339-1348.
- [2] Wakisaka M, et al., 1995, *Diabetologia*, 38: 291-297.
- [3] Kreisbery JI, et al., 1983, *Kidney Int.*, 23: 439-445.
- [4] Liu Z H. et al., 1996, *Am J Physiol.*, 270: C1595-601.
- [5] Seino S, et al., 1993, *J Clin Endocrinol Metab.* 76:75-78.
- [6] Heilig CW, et al., 1997, *Kidney Int.*, 52 *Suppl.* 60:S91-99.
- [7] Dio T. et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:2873-2890.
- [8] Baldwin SA, 1993, *Biochem Biophys Acta*, 1154:17-49.
- [9] Heilig CW, et al., 1995, *J Clin Invest.* 96: 1802-1807.
- [10] Sameer Barghouthi et al., 1995, *J Immunol*, 154:3420-3429.
- [11] Helgerson AL, 1987, *J. Biol. Chem.*, 12 (262):5464-5475.

facilitative glucose transporter in human mesangial cells.

Key words: Glucose transporter Mesangial cells

## 胸腺素 $\alpha$ 原体外诱导小鼠胸腺细胞凋亡的初步探讨

郑金来 刘佃辛 李君文 高兰兴 张符光

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所 天津 300050)

李国亮 吴小枫

(南开大学生物化学系 天津 300071)

1972 年澳大利亚昆士兰大学医学院学者 Keer 等人发现了一类不同于坏死的细胞死亡方式,称之为细胞凋亡(apoptosis)。细胞凋亡是基因控制的细胞自我消亡过程,凋亡最突出的特征是染色质的有控降解,DNA 双链在核小体联结部位被  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  活化的核酸内切酶断裂而形成大小是核小体整数倍的 DNA 片段,其凝胶电泳呈现梯状。细胞凋亡对免疫系统的建立,免疫反应的进行及免疫耐受的维持等都有重要的意义,本文主要探讨了胸腺素  $\alpha$  原(prothymosin $\alpha$ , ProT $\alpha$ )在体外对小鼠胸腺细胞凋亡的诱导作用。

### 材料与 方法

#### 一、主要实验材料

6—8 周龄昆明种小鼠购自我院实验动物中心;ProT $\alpha$  由本室制备<sup>[1]</sup>;PI 系 Sigma 公司产品;RPMI1640 系 Gibco 产品;琼脂糖系杭州微生物试剂厂产品;胎牛血清是天津血液制品厂产品;A<sub>23187</sub>、Fluo-3/AM、Pluromic F-127 购自北京岳泰公司;CO<sub>2</sub> 培养箱为美国 Harris 产品;普通凝胶电泳仪为北京六一仪器厂生产;MPF-4 荧光光度计是日立公司产品;流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

#### 二、细胞培养

按常规制备胸腺细胞悬液,调整细胞浓度约为  $1 \times 10^7$ /ml。实验分四组①空白对照组,②氢化考的松组,③ ProT $\alpha$  组及④氢化考的松+ProT $\alpha$  组,其中 ProT $\alpha$  的终浓度为  $10^{-9}$  mol/L,氢化考的松的终浓度为  $10^{-7}$  mol/L。根据预试验将细胞放入培养箱内培养 12 小时,收集培养后的细胞备用。

#### 三、DNA 片段化检验

取细胞悬液 1ml,以 2%胎牛血清 Hank's 液洗涤两次,加入 400 $\mu$ l 细胞裂解液(10mmol/L Tris,1mmol/L EDTA,0.5% TritonX-100,pH8.0)置 4 $^{\circ}$ C 30min,然后离心 10,000rpm 10min。上清中含片段化 DNA,沉淀为完整的高分子量的 DNA,上清作琼脂糖凝胶电泳定性分析 DNA 片段化。

#### 四、流式细胞仪检测亚二倍体细胞百分率<sup>[2]</sup>

取培养后的细胞悬液 100 $\mu$ l,70%的乙醇固定,染色前用 PBS(0.01mol/L,pH7.2)洗涤离心以除去固定液。加入 1mg/ml 的 RNaseA 200 $\mu$ l 后 37 $^{\circ}$ C 水浴 30min,再加入 800 $\mu$ l PI 染色液(PI 100 $\mu$ g/ml, Triton X-100 1.0%,NaCl 0.9%)混匀,4 $^{\circ}$ C 避光 30min 然后上机测试,记录激发波长 488nm 处的红色荧光。

#### 五、 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的测定<sup>[3]</sup>

取细胞悬液 1ml,加入终浓度为 20 $\mu$ mol/L 的 Fluo-3/AM,1 $\mu$ l25%(体积比)Pluromic F-127,再培养一小时。以无血清的 RPMI1640 离心洗涤三次,并恢复原体积。在荧光光度计上检测细胞悬液的荧光强度,激发与测量波长分别为 490、520nm。细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度可由下式求出:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = kd(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$$

其中 kd 为 400nmol/L;F<sub>max</sub> 为饱和时所测得的荧光强度,采用在细胞悬液中加入 1mmol/L CaCl<sub>2</sub>,5 $\mu$ mol/L A<sub>23187</sub> 后染色检测所得的荧光强度;F<sub>min</sub> 为 Fluo-3 未与  $\text{Ca}^{2+}$  结合时所测得的荧光强度,采用细胞悬液中加入 1mmol/L MnSO<sub>4</sub> 后染色检测所得的荧光强度。

### 结 果

#### 1. DNA 梯形成情况(见图 1)

胸腺细胞经 ProT $\alpha$  和/或氢化考的松处理