

环孢霉素A抑制NIT-1胰岛 β 细胞胰岛素释放并下调线粒体氧化磷酸化酶系基因的表达

环孢霉素A(CsA)作为一种强效免疫抑制剂被广泛应用于治疗心脏、肾脏、肝脏、胰腺和肺等多种器官和细胞移植后的排斥反应,早期应用CsA治疗还可以延缓自身免疫过程导致的I型糖尿病[1][2]。但是,很多报道也指出CsA有影响胰岛 β 细胞功能、破坏糖耐量导致糖尿病的副作用[3][4],并且在体外也观察到用CsA处理后可直接抑制大鼠胰岛细胞和HIT胰岛 β 细胞株胰岛素的释放[5]。线粒体氧化磷酸化以ATP形式产生能量,是体内许多器官或组织ATP的主要来源。胰岛 β 细胞感知血糖水平变化分泌胰岛素过程中,ATP起着重要作用。CsA在一定剂量下可引起小鼠胰岛 β 细胞线粒体ATP合成下降,同时观察到 β 细胞胰岛素分泌下降[6],但其引起线粒体ATP合成下降的机制目前还不明确。本实验通过半定量RT-PCR检测CsA处理NIT-1胰岛 β 细胞后线粒体氧化磷酸化酶系中合成ATP的几种主要成员[NADH-CoQ氧化还原酶23 k亚单位(Nuox23)、细胞色素C氧化酶7c亚单位(Cox7c)和ATP合成酶e链(Atp5K)]mRNA的表达情况,研究CsA在基因水平上对胰岛 β 细胞ATP合成的影响,探讨其抑制胰岛素分泌的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

NIT-1胰岛 β 细胞购自华中科技大学免疫学教研室,DMEM购自Gibco BRL公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,胰酶购自美国AMRESCO公司,CsA购自NOVARTIS公司,Trizol购自Gibco BRL公司,RT-PCR试剂购自Promega公司, ^{125}I -胰岛素放射免疫分析药盒购自中国原子能科学研究院,其他试剂均为分析纯级。

1.2 仪器

CO_2 细胞培养箱(日本NAPCO),倒置显微镜(日本NIKON),低温离心机(德国Beckman),紫外分光光度计(德国Beckman),PCR仪(美国MJ Research),SN-682型放射免疫 γ -计数器(上海核辐射光电仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 胰岛素释放 将培养至对数生长期的NIT-1胰岛 β 细胞用0.25%胰酶和0.02%EDTA(体积比为1:1)消化成单细胞悬液,以104/孔密度接种于96孔平板,每孔培养液体积为200 μl 。于95%空气、5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 、饱和湿度条件下培养。培养液含有85%DMEM、15%胎牛血清。接种48 h后,抽出培养基,加入含有10 $\mu\text{mol/L}$ CsA的培养液200 μl ,分别继续培养24和48 h。吸出上清,2 000 r/min离心5 min后取100 μl ,用 ^{125}I -胰岛素放射免疫分析药盒检测胰岛素释放。试验分为无药对照组和加药处理组,每组设6个复孔。1.3.2 RNA的提取 NIT-1胰岛 β 细胞按 1.5×10^6 密度接种于6孔板,培养48 h后,抽弃培养基,换上含10 $\mu\text{mol/L}$ CsA的培养基,继续培养24和48 h。采用Trizol法制备总RNA,用Trizol裂解细胞后,加入氯仿并离心使之分为水相和有机相两层。转移RNA所在的水相,并用异丙醇沉淀RNA,经75%乙醇洗涤后用水(RNase free)溶解。制备的RNA样品用紫外分光光度计检测 D_{260} 、 D_{260}/D_{280} 值,并计算产量。

1.3.3 RT-PCR cDNA第一链的合成:使用25 μl 体系,主要成分为反应缓冲液、10 mmol/L dNTP、2 μg 总RNA、1 μg oligo(dT)₁₈、40 U RNA酶抑制剂、30 U AMV逆转录酶,于42 $^\circ\text{C}$ 反应60 min。PCR:建立50 μl 反应体系,主要成分为反应缓冲液、10 mmol/L dNTP、引物(上、下游引物终浓度均为0.4 $\mu\text{mol/L}$,引物序列见表1)、0.2~2.0 μl cDNA产物(通过预试验确定最适模板浓度,使得PCR扩增在指数级范围内)、1.25 U Taq聚合酶。95 $^\circ\text{C}$ 2 min灭活AMV逆转录酶,30个循环,每循环95 $^\circ\text{C}$ 30 s、60 $^\circ\text{C}$ 1 min、72 $^\circ\text{C}$ 1 min,最后72 $^\circ\text{C}$ 保温10

min。实验分24 h正常细胞组、24 h CsA处理组、48 h正常细胞组和48 h CsA处理组。

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab.1 Specific primers for RT-PCR

mRNA	Size of PCR product(bp)	Primer sequence(5'→3')
NADH-ubiquinone oxidoreductase 23 k subunit (<i>Nuox23</i>)	408	ggacaaagccttcatagca ctggcagaaaccacagtaga
Cytochrome C oxidase subunit VIIC (<i>Cox7c</i>)	174	cagaacttcagcagcgacat ggtgcggcaaaccagat
ATP synthase e chain (<i>Atp5K</i>)	240	cgcgaaggcagcgacaa acgcctcacttgagaatgctgt
β -actin	274	ccagagcaagagaggtatcc ctgtgttacgaccagaggca

1.3.4 琼脂糖凝胶电泳 2%琼脂糖凝胶(含0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EB)电泳,紫外灯下观察结果并照相。

1.4 统计学处理

组间差异采用t检验,重复试验次数为3次。

2 结果

2.1 CsA对NIT-1细胞胰岛素释放的影响

培养细胞进入指数生长期后,用10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CsA处理细胞24和48 h。培养基中胰岛素含量检测结果表明,CsA对细胞胰岛素的释放有明显抑制作用,其时效关系见图1。

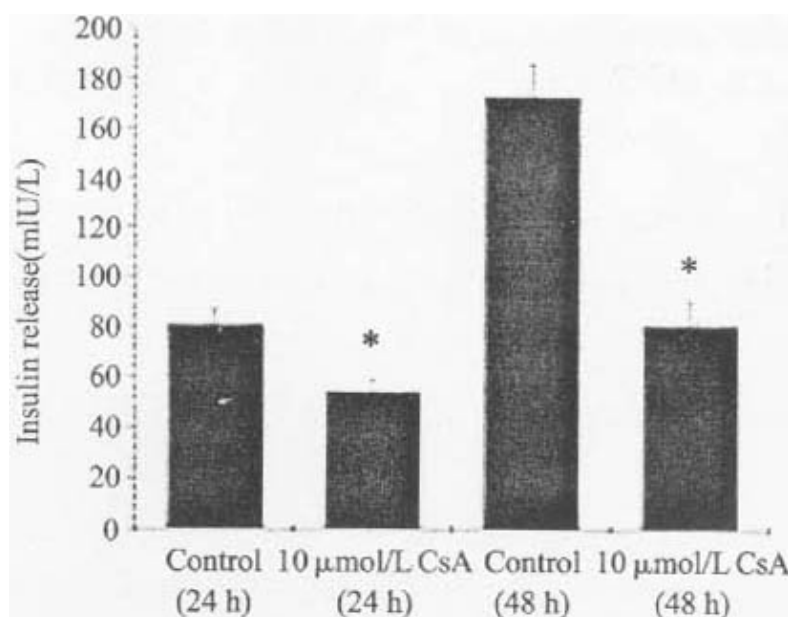


图1 CsA对NIT-1胰岛 β 细胞胰岛素分泌的影响

Fig.1 Effects of cyclosporine A on insulin release by NIT-1 cells
* $P < 0.01$ vs control

2.2 CsA对Nuox23、Cox7c和Atp5K mRNA表达的影响

10 $\mu\text{mol/L}$ CsA处理NIT-1胰岛 β 细胞24和48 h后,对Nuox23、Cox7c和Atp5K mRNA表达进行半定量分析,以PCR产物与内参 β -actin PCR产物灰度积分值(Volume)的比值(Relative volume, RV)反映CsA对Nuox23、Cox7c和Atp5K mRNA表达的影响。结果(图2)显示,10 $\mu\text{mol/L}$ CsA处理细胞24 h后,对Nuox23、Cox7c和Atp5K mRNA表达的抑制率分别为30.7%、19.5%和35.7%;处理细胞48 h后,对Nuox23、Cox7c和Atp5K mRNA表达的抑制率分别为50.8%、31.7%和64.8%。由此可见,CsA对NIT-1胰岛细胞线粒体氧化磷酸化酶系中的几种酶mRNA表达分别有不同程度的抑制作用,且随着处理时间的延长,抑制作用越明显。

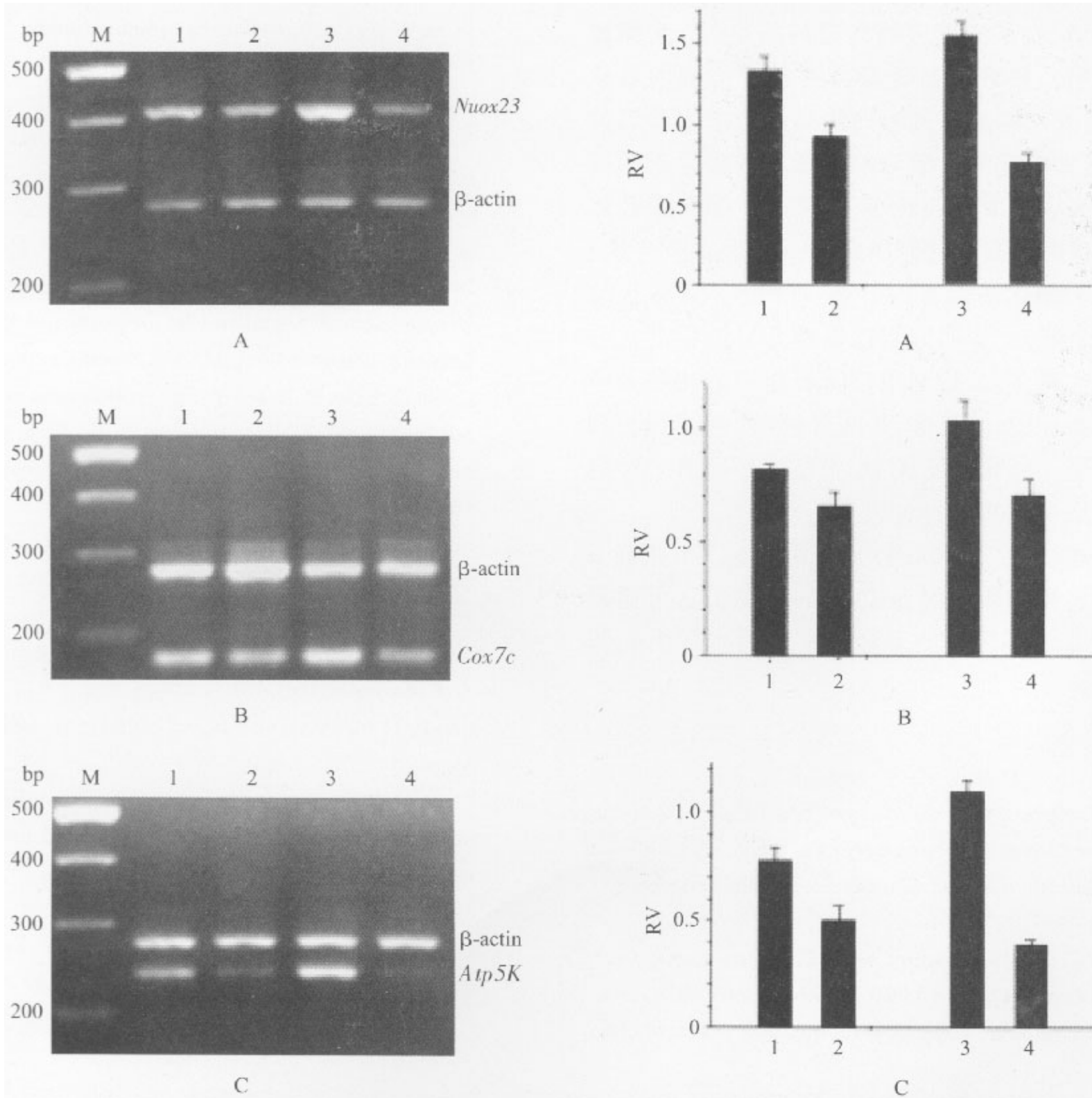


图2 CsA对Nuox23、Cox7c和Atp5K mRNA表达的影响

Fig.2 Effects of cyclosporine A on the expressions of Nuox23, Cox7c and Atp5K mRNA
 Left: Electrophoretic patterns. M: DNA size marker; Lane 1: Control (24 h); Lane 2: 10 $\mu\text{mol/L}$ CsA (24 h); Lane 3: Control (48 h); Lane 4: 10 $\mu\text{mol/L}$ CsA (48 h)
 Right: Semi-quantification of mRNA expression of Nuox23 (A), Cox7c(B) and Atp5K (C) in the

3 讨论

线粒体是真核细胞内一种重要的细胞器，是动物细胞生成ATP的主要场所。线粒体基质的三羧酸循环酶系通过底物脱氢氧化生成NADH。NADH通过线粒体内膜呼吸链氧化，即在NADH脱氢酶作用下，把氢传递给CoQ， CoQH_2 接着将电子传递给细胞色素，细胞色素通过辅基中铁的化合价的可逆变化而依次将电子传递给细胞色素氧化酶，最终再传递给分子氧，使氧还原成 O^{2-} ， O^{2-} 具有很活泼的性质，可以与环境中的质子结合成水，同时释放出大量化学能。与此同时，导致跨膜质子移位形成跨膜质子梯度和/或跨膜电位。线粒体内膜上的ATP合成酶利用跨膜质子梯度能量合成ATP。这种伴随电子传递链的氧化过程所进行的能量转换和ATP生成即为氧化磷酸化。合成的ATP通过线粒体内膜ADP/ATP载体与细胞质中ADP交换进入细胞质，参与细胞的各种需能过程。本实验根据以上过程，通过检测CsA处理后Nuox23、Cox7c和Atp5K这三种主要酶mRNA的表达，从基因水平反映CsA对细胞线粒体氧化磷酸化合成ATP功能的影响。

餐后高血糖反应性胰岛素分泌依赖于一系列代谢事件：(1)葡萄糖转运体GLUT-2对葡萄糖的摄取；(2)葡萄糖被葡萄糖激酶磷酸化；(3)糖酵解中丙酮酸和NADH的产生；(4)线粒体氧化磷酸化的刺激。4个事件的结果使ATP水平上升，最终导致胰岛 β 细胞分泌胰岛素。有研究表明，CsA可抑制大鼠胰岛细胞瘤RIN-38 GLUT2 mRNA表达，但对葡萄糖激酶 mRNA表达无明显影响[7]。在一定条件下，CsA还可剂量依赖性地抑制人胰岛素基因的转录水平[8]。生理情况下，葡萄糖在 β 细胞代谢过程中可刺激线粒体氧化磷酸化，使ATP浓度增加，关闭ATP依赖性 K^+ 通道，细胞膜去极化，电压敏感的 Ca^{2+} 通道开放， β 细胞 Ca^{2+} 内流增加，从而促进胰岛素的分泌[9]。离体鼠胰岛实验表明，高浓度葡萄糖可提高 β 细胞的氧化率，但若抑制氧化磷酸化过程则胰岛素分泌也受到抑制[10]。链脲霉素引起胰岛素分泌降低导致糖尿病的机制就是通过高反应氧如自由基，抑制 β 细胞线粒体氧化磷酸化基因复制及转录所致[11]。因而很有可能，线粒体氧化磷酸化基因表达下调，降低了胰岛 β 细胞氧化磷酸化能力，从而抑制葡萄糖介导的胰岛素分泌。本研究发现，CsA抑制线粒体氧化磷酸化酶系中的几种主要酶mRNA表达，并随处理时间的延长，抑制作用越明显。由此可见，CsA可在多个环节上影响与胰岛素分泌有关基因的表达。

综上所述，免疫抑制剂CsA下调NIT-1胰岛 β 细胞线粒体氧化磷酸化酶mRNA的表达，这可能是CsA抑制胰岛 β 细胞胰岛素释放在基因水平上的作用机制之一。

(责任编辑：黄开颜)

参考文献：

- [1] Canadian-European Randomized Control Trial Group. Cyclosporin- induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion[J]. Diabetes, 1988, 37(11): 1574-82.
- [2] De Filippo G, Carel JC, Biotard C, et al. Long-term results of early cyclosporin therapy in juvenile IDDM[J]. Diabetes, 1996, 45(1): 101-4.
- [3] Krentz AJ, Dousset B, Mayer D, et al. Metabolic effects of cyclosporin A and FK506 in liver transplant recipients[J]. Diabetes, 1993, 42(12): 1753-9.
- [4] Yamamoto H, Akazawa S, Yamaguchi Y, et al. Effects of cyclosporin A and low dosages of steroid on posttransplantation diabetes in kidney transplant recipients[J]. Diabetes Care, 1991, 14(10): 867-70.
- [5] Robertson RP. Cyclosporin-induced inhibition of insulin secretion in isolated rat islets and HIT cell[J]. Diabetes, 1986, 35(9): 1016-9.
- [6] Duffer M, Krippeit-Drews P, Lembert N, et al. Diabetogenic effect of cyclosporin A is mediated by interference with mitochondrial function of pancreatic B-cells[J]. Mol Pharmacol,

2001, 60(4): 873-9.

[7] Cohen O, Einav Y, Cohen Y, et al. Implantation of rat insulinoma cell line into cyclosporine treated rats: effect of the in vivo environment on β -cell specific gene expression[J]. *Transplantation*, 2000, 69(7): 1464-70.

[8] Oetjen E, Grapentin D, Blume R, et al. Regulation of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus at concentrations that inhibit calcineurin activity and involving the transcription factor CREB[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2003, 367(3): 227-36.

[9] Bataille D. Molecular mechanisms of insulin secretion[J]. *Diabetes Metab*, 2002, 28(6 Suppl): 7-13.

[10] Duchen MR, Smith PA, Ashcroft FM. Substrate-dependent changes in mitochondrial function, intracellular free calcium concentration and membrane channels in pancreatic beta-cells[J]. *Biochem J*, 1993, 294 (Pt 1): 35-42.

[11] Gerbitz KD. Does the mitochondrial DNA play a role in the pathogenesis of diabetes [J]. *Diabetologia*, 1992, 35(12): 1181-6.

参考文献:

[1] Canadian-European Randomized Control Trial Group. Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion[J]. *Diabetes*, 1988, 37(11): 1574-82.

[2] De Filippo G, Carel JC, Biotard C, et al. Long-term results of early cyclosporin therapy in juvenile IDDM[J]. *Diabetes*, 1996, 45(1): 101-4.

[3] Krentz AJ, Dousset B, Mayer D, et al. Metabolic effects of cyclosporin A and FK506 in liver transplant recipients[J]. *Diabetes*, 1993, 42(12): 1753-9.

[4] Yamamoto H, Akazawa S, Yamaguchi Y, et al. Effects of cyclosporin A and low dosages of steroid on posttransplantation diabetes in kidney transplant recipients[J]. *Diabetes Care*, 1991, 14(10): 867-70.

[5] Robertson RP. Cyclosporin-induced inhibition of insulin secretion in isolated rat islets and HIT cell[J]. *Diabetes*, 1986, 35(9): 1016-9.

[6] Duffer M, Krippeit-Drews P, Lember N, et al. Diabetogenic effect of cyclosporin A is mediated by interference with mitochondrial function of pancreatic B-cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 60(4): 873-9.

[7] Cohen O, Einav Y, Cohen Y, et al. Implantation of rat insulinoma cell line into cyclosporine treated rats: effect of the in vivo environment on β -cell specific gene expression[J]. *Transplantation*, 2000, 69(7): 1464-70.

[8] Oetjen E, Grapentin D, Blume R, et al. Regulation of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus at concentrations that inhibit calcineurin activity and involving the transcription factor CREB[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2003, 367(3): 227-36.

[9] Bataille D. Molecular mechanisms of insulin secretion[J]. *Diabetes Metab*, 2002, 28(6 Suppl): 7-13.

[10] Duchen MR, Smith PA, Ashcroft FM. Substrate-dependent changes in mitochondrial function, intracellular free calcium concentration and membrane channels in pancreatic beta-cells[J]. *Biochem J*, 1993, 294 (Pt 1): 35-42.

[11] Gerbitz KD. Does the mitochondrial DNA play a role in the pathogenesis of diabetes [J]. *Diabetologia*, 1992, 35(12): 1181-6.

