

环孢霉素A对NIT-1胰岛 β 细胞基因表达谱的影响

环孢霉素A(Cyclosporin A, CsA)是从真菌中分离出来的由11个氨基酸组成的环多肽,相对分子质量为1202.6,具有疏水性,易溶于甲醇、乙醇等多种有机溶剂。CsA作为一种强效的免疫抑制剂,现已广泛地应用于器官、细胞移植后排斥反应的防治以及自身性免疫疾病的治疗。但是,不少临床观察显示CsA有影响胰岛 β 细胞功能、破坏糖耐量甚至导致移植后糖尿病(post-transplant diabetes mellitus, PTDM)的发生,体外研究也显示以CsA处理后可直接抑制大鼠胰岛细胞和一些胰岛 β 细胞株胰岛素的释放[1][2],但具体机制尚不明确。我们在前期研究中证实,以10 $\mu\text{mol/L}$ CsA处理NIT-1胰岛 β 细胞24 h后,可抑制NIT-1细胞胰岛素的释放[3]。为进一步探讨CsA对NIT-1细胞的可能作用机制,本研究采用基因芯片技术,检测了10 $\mu\text{mol/L}$ CsA作用于NIT-1细胞24 h后,NIT-1细胞基因表达谱的变化,并结合生物信息学方法,对CsA抑制NIT-1细胞胰岛素分泌的相关基因进行了初步筛选。

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、胰蛋白酶购自美国AMRESCO公司、Taq DNA聚合酶购自上海博亚生物技术公司、Trizol购自Gibco BRL公司、RT-PCR试剂购自Promega公司,其他试剂均为分析纯级。上海博星基因芯片公司BiostarM-40s cDNA芯片。

1.2 仪器

CO₂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PE公司)、凝胶图像分析仪 GDS-8000P(美国Gene公司)、ScanArray4000扫描仪(美国General Scanning公司)、GenePix Pro 3.0图像处理软件(美国Axon Instruments公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 冻存于液氮中的NIT-1细胞株经常规复苏后,接种于培养瓶中。DMEM培养基,胎牛血清含量15%,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂及饱和湿度条件下培养。每2~3 d换液1次。细胞生长至指数生长期时,用0.25%胰酶和0.02%EDTA(体积比为1:1)消化,1000 r/min离心5 min,细胞沉淀后用完全培养基调整细胞数,以1 \times 10⁶密度接种于6孔板。培养48 h后,吸去培养基,换上含10 $\mu\text{mol/L}$ CsA的培养基,继续培养24 h,分设不加CsA的对照组及加入10 $\mu\text{mol/L}$ CsA的实验组。

1.3.2 RNA提取 对于以上2组NIT-1细胞,分别采用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(不含Rnase)溶解。制备的RNA样品用紫外分光光度计检测D₂₆₀、D₂₆₀/D₂₈₀值,并计算产量。

1.3.3 探针标记 参照Schna等[4]方法逆转录标记cDNA。Cy3-dCTP标记对照组mRNA, Cy5-dCTP标记实验组mRNA。

1.3.4 芯片杂交 基因芯片由上海博星基因有限公司提供,包含有4096个cDNA克隆。芯片杂交参照Li[5]的方法。杂交过程中,以荧光染料cy3标记对照组, cy5标记实验组。

1.3.5 数据分析 用ScanArray4000扫描芯片。用GenePix Pro 3.0软件进行原始图像分析,得到原始数据,然后按以下方法进行分析:(1)先将所有数据的前景值与背景值相减,得出cy3、cy5标记的强度值;将cy5小于200的强度值以200取代;(2)计算总数为n的有效基因(cy3、cy5值两者皆大于200,或其一大于800, Ri=cy5/cy3在0.1~10之间)的Ri=cy5/cy3的自然对数值Ri'=ln(Ri),算出Ri'的平均值R',均一化系数 ND=EXP(R')。此次所得ND分别为:对照组(0.994)、实验组(1.043);(3)将所有数据项的cy3标记强度乘上Normalize系数,得出调整后的cy3*,将所有cy3*小于200的强度值以200取代,算出所有基因调整后的Ratio值(cy5/cy3*);(4)筛选出Ratio大于2或小于0.5的数据项,这些基因在与两种探针杂交时表现出一定的差异。

1.3.6 RT-PCR cDNA第一链的合成 Zfr引物(5'-3'):正向:GCTCTACGCCACGCTAA,反向:ACTAT CCCTTCTCGTTTCC,扩增450 bp。Tpi引物(5'-3'):正向:CGCCACCGCTTACATCG,反向:GAG GGGTTGCCGCTTGC,扩增408 bp。

Pax6引物(5'-3'):正向:TGGGAAATCCGAGA CAGA,反向:CTGCTGCTGATAGGAATGTG,扩增572 bp。 β -actin作为标准对照,正向:CCAGAGCAA GAGAGGTATCC,反向:CTGTGGTACGACCAGAG GCA,扩增274 bp。

主要成分为反应缓冲液、10mmol/L dNTP、2 μg 总RNA、1 μg oligo(dT)18、40U RNA酶抑制剂、30U AMV逆转录酶,42 $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h。RT-PCR:主要成分为反应缓冲液、10 mmol/L dNTP、引物(引物反应终浓度均为0.4 $\mu\text{mol/L}$)、2.0 μl cDNA产物,1.25 U Tag聚合酶。94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,28次循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。

1.3.7 琼脂糖凝胶电泳 取PCR反应产物4 μl ,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶图像分析仪分析。以PCR产物与 β -actin PCR产

2 结果

2.1 芯片杂交结果

CsA作用于NIT-1细胞24 h不同RNA样本(对照组/实验组)芯片双色荧光标记叠加图及杂交信号强度散点图分别见图1、2。



图1 双色荧光标记叠加图

Fig.1 Scanning results of hybridization signals in the gene chip

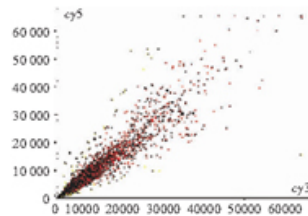


图2 杂交信号强度散点图

Fig.2 Scatter plot of the differentially expressed genes

图1中, 每一点代表cy3和cy5扫描图像的叠加荧光信号, 即双探针杂交信号。对于某一点的两种叠加荧光信号, 如果cy3信号较强, 该点多显绿色, 表明实验组中该基因表达呈下调趋势; 如果cy5信号较强, 该点多显红色, 表明实验组中该基因表达呈上调趋势; 如果强度相似, 即显黄色, 表明实验组和对照组中, 该基因无明显差异表达。筛选出 $\text{ratio} > 2$ 或 < 0.5 的数据项(差异表达数据)列于filtered工作表中。图2中, X轴、Y轴分别以cy3荧光强度值(=前景值-背景值)和cy5荧光强度值为坐标, 每一个数据点代表芯片上一个基因点的杂交信号; 数据点若为红色, 则代表Y值与X值的比值在0.5至2.0之间, 基本属非差异表达; 数据点若为黄色, 则代表Y值与X值的比值在0.5到2.0范围之外, 该点很可能属于表达差异。

2.2 CsA作用于NIT-1胰岛 β 细胞24 h后的基因表达

在4096条基因中, 有38条基因表达上调, 其中已知功能基因13条, 主要有(1)应激反应类: Herpud1、Hspa5; (2)细胞周期类: Gas5; (3)蛋白翻译合成类: Blu、Cai、Srm; (4)转录因子类: Zfr等, 见表1。有46条基因表达下调, 其中已知功能基因25条, 主要有(1)细胞周期及生长发育类: Pax6、Emp1、Emp3; (2)氧化磷酸化相关类: Cox7a1、Slc25a11、G6pt1等; (3)蛋白合成类: Ttr、Sftpc、Tpi; (4)转录因子类: Zfp46; (5)细胞因子类: Ccl27; (6)其它: Tpx1、Nsg2等, 见表2。

表 1 CsA 作用 24 h 表达上调的已知功能基因

Tab.1 Up-regulated genes(known functions) after 24 h of cyclosporin A treatment

Gene	Definition	24 h Ratio
<i>Rip1</i>	Mm. Ral-interacting protein 1, mRNA	2.004
<i>Srm</i>	Mm. spermidine synthase, mRNA	2.004
<i>Ep</i>	Mm. pale ear, mRNA	2.034
<i>Zfr</i>	Mm. zinc finger RNA binding protein, mRNA	2.095
<i>LOC234521</i>	Mm. similar to nucleolar cysteine-rich protein; zinc finger autoantigen 330, mRNA	2.149
<i>Cai</i>	Mm. calcium binding protein, intestinal, mRNA	2.221
<i>Mthfd2</i>	Mm. methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NAD ⁺ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, mRNA	2.318
<i>H2-Aa</i>	Mm. histocompatibility 2, class II antigen A, alpha, mRNA	2.335
<i>Gas5</i>	Mm. growth arrest specific 5, mRNA	2.513
<i>Blu</i>	Mm. Blu protein, mRNA	2.708
<i>Hspa5</i>	Mm. heat shock 70 kD protein 5 (glucose-regulated protein, 78kD), mRNA	2.726
<i>Slc7a3</i>	Mm. solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), member 3, mRNA	5.318
<i>Herpud1</i>	Mm. homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1, mRNA	6.432

Mm.: Mus musculus

表 2 CsA 作用 24 h 表达下调的已知功能基因

Tab.2 Down-regulated genes(known functions) after 24 h of cyclosporin A treatment

Gene	Name Definition	24 h Ratio
<i>Adh1</i>	Mm.alcohol dehydrogenase 1, complex, mRNA	0.216
<i>Ttr</i>	Mm.transthyretin, mRNA	0.240
<i>Lrrfip1</i>	Mm.leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1, mRNA	0.323
<i>Tmsb4x</i>	Mm.thymosin, beta 4, X chromosome, mRNA	0.357
<i>Emp3</i>	Mm.epithelial membrane protein 3, mRNA	0.373
<i>Emp1</i>	Mm.Epithelial membrane protein 1, mRNA	0.376
<i>Elovl3</i>	Mm.elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 3, mRNA	0.379
<i>Tpi</i>	Mm.triosephosphate isomerase, mRNA	0.381
<i>Spi1-4</i>	Mm.serine protease inhibitor 1-4, mRNA	0.381
<i>Kcnma3</i>	Mm.potassium large conductance pH-sensitive channel, subfamily M, alpha member 3, mRNA	0.388
<i>Aldh3a1</i>	Mm.aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A1, mRNA	0.392
<i>Emb</i>	Mm.embigin, mRNA	0.407
<i>Hao3</i>	Mm.hydroxyacid oxidase (glycolate oxidase) 3, mRNA	0.418
<i>Tpx1</i>	Mm.testis specific gene 1, mRNA	0.423
<i>Ccl27</i>	Mm.chemokine(c-c motif) ligand 27, mRNA	0.426
<i>Rdh5</i>	Mm.retinol dehydrogenase type 5, mRNA	0.435
<i>Sftpc</i>	Mm.surfactant associated protein C, mRNA	0.436
<i>Hadhs</i>	Mm.L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain, mRNA	0.439
<i>Aldo1</i>	Mm.aldolase 1, A isoform, mRNA	0.445
<i>G6pt1</i>	Mm.glucose-6-phosphatase, transport protein 1, mRNA	0.458
<i>Zfp46</i>	Mm.zinc finger protein 46, mRNA	0.478
<i>Pax6</i>	Mm.paired box gene 6, mRNA	0.48
<i>Slc25a11</i>	Mm.solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11, mRNA	0.484
<i>Cox7a1</i>	Mm.cytochrome c oxidase, subunit VIIa 1, mRNA	0.487
<i>Nsg2</i>	Mm.neuron specific gene family member 2, mRNA	0.490

Mm.: Mus musculus

2.3 RT-PCR 结果

经RT-PCR检测, CsA作用于NIT-1细胞24h后, *Zfr*的诱导率为17.8%, *Tpi*的抑制率为68%, *Pax6*的抑制率为49.7%, 取得了与芯片评价一致的结果, 证明了芯片结果的可靠性(图3)。

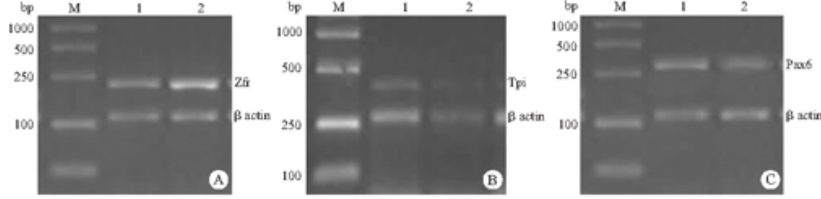


图3 CsA作用于NIT-1细胞24h后, Zfr, Tpir, Pax6 mRNA的表达
 Fig.3 Expressions of Zfr(A), Tpi(B)and Pax6(C)mRNA in NIT-1 cells treated by cycloporin A for 24 h
 M: DNA size marker; Lane 1: Control (24 h); Lane 2: 10 $\mu\text{mol/L}$ CsA (24 h)

3 讨论

应用基因芯片技术在研究差异表达基因中具有简便、快捷、高通量、高灵敏度等特点。本研究结合前期研究工作,应用基因芯片技术,对10 $\mu\text{mol/L}$ CsA处理NIT-1胰岛 β 细胞24 h后, NIT-1细胞的基因表达谱进行了研究,目前国内外尚未见报道。同时结合生物信息学技术,对CsA抑制NIT-1细胞胰岛素分泌的可能相关基因进行了初步筛选。

研究发现,以10 $\mu\text{mol/L}$ CsA处理NIT-1细胞24 h后,在4 096条检测基因中,有38条基因表达上调,其中已知功能基因13条,主要是与细胞生长、蛋白质合成与应激反应相关的基因。Hspa5是热激蛋白家族成员,热激蛋白通常在外界刺激或环境变恶劣时被诱导,以帮助蛋白正常折叠或加速蛋白的降解从而对细胞起保护作用。本研究中,Hspa5被诱导是NIT-1细胞对CsA刺激的一种保护性反应,这与IL-1 β 对大鼠胰岛 β 细胞损伤反应的报道一致[6]。Herpud1编码内质网中的一种蛋白,在胰腺组织中高表达,与一种DNA修复蛋白HHR23A高度同源,在外界应激时高表达[7],本研究中,Herpud1也是NIT-1细胞受药物作用后应激反应的一种表现。一些编码蛋白及氨基酸的基因表达上调,如Srm、Cai、Blu等,这可能是由于NIT-1细胞被药物刺激诱导后首先要激活代谢活动,为下一步的整体活化做物质上的准备。以上表明在CsA处理后,NIT-1细胞对新的环境的应激反应,细胞的代谢呈现了活跃的特点。但这些反应是否CsA作用所特有的,还需进一步深入研究。

另外,我们还发现,Gas5基因在CsA作用后表达上调,而Gas5基因在细胞生长抑制时高表达[8],这提示CsA对NIT-1细胞的生长可能有一定的抑制作用,进而可影响到NIT-1细胞胰岛素的释放。

差异表达基因中,有46条基因表达下调,其中已知功能基因25条,结合生物信息学方法,对这25条已知功能基因进行筛选,可发现CsA对一些基因表达的下调可能是其抑制NIT-1胰岛素释放的基因水平上的作用机制:(1)Pax6是paired box基因家族中的一员,编码与发育过程有关的转录调节因子,对胰腺的形态形成中有着重要作用,是胰岛细胞发育不可缺少的一个转录因子,它的突变或功能损害可导致糖尿病的发生[9]。此外,Pax6对胰岛 α 细胞胰高血糖素原基因表达及小肠、大肠L细胞所分泌的胰高血糖素样多肽(GLP-1、GLP-2)基因的转录有重要作用[10],而GLP-1具有调节胰岛素分泌的功能。本研究中,Pax6表达下调,表明CsA抑制胰岛素释放的部分机制可能是通过抑制Pax6 mRNA的表达,影响胰岛 β 细胞的生长发育,从而引起胰岛素的合成和分泌减少;在活体中还可能进而抑制GLP-1 mRNA的表达,从而影响胰岛素的释放。(2)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,但如果抑制氧化磷酸化过程则胰岛素分泌也受到了抑制[11]。另有研究也证实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[12]。在本实验中,发现与氧化磷酸化过程相关的一些酶类或蛋白mRNA的表达下调,包括Aldh3a1、Hao3、G6pt1、Slc25a11和Cox7a1等,表明CsA下调NIT-1细胞氧化磷酸化过程中有关酶类或蛋白mRNA的表达,从而影响胰岛素分泌的代谢-偶联过程,可能是其抑制胰岛素释放的分子水平的作用之一。(3)EMP1和EMP3是周围髓磷脂蛋白基因PMP22家族成员,与细胞的增殖和细胞间的相互作用有关[13]。本研究中,它们在NIT-1细胞中表达,推测也具有上述功能。CsA作用后,其表达下调,推测CsA通过此作用影响了NIT-1细胞的增殖和细胞间的相互作用。(4)Tpi编码磷酸丙糖异构酶,该酶在糖酵解途径中催化磷酸二羟丙酮转变为3-磷酸甘油醛这一可逆反应。本研究发现CsA抑制Tpi mRNA的表达,从而影响到糖酵解途径,进而影响到氧化磷酸化过程,产生抑制胰岛素释放的作用。(5)研究发现丝氨酸蛋白酶抑制剂(Spil)的低表达或突变与慢性胰腺炎及糖尿病的发生有关[14]。本研究发现CsA可抑制Spil亚单位Spil-4 mRNA的表达,从而可影响到丝氨酸蛋白酶抑制剂的表达,推测CsA可能通过这种机制影响到胰岛素的分泌。

综上所述,CsA对NIT-1胰岛 β 细胞基因表达谱的影响是多方面的,它涉及到应激反应、细胞生长发育、氧化磷酸化过程及蛋白合成等诸多方面。通过初步评筛和分析,我们发现CsA抑制细胞生长发育、氧化磷酸化过程及蛋白合成有关基因的表达可能是其抑制NIT-1胰岛 β 细胞胰岛素分泌的基因水平的作用机制,对进一步深入研究CsA抑制NIT-1细胞胰岛素分泌的作用机制提供了线索和依据。但是,细胞内的基因调控网络是十分复杂的,很难通过一次芯片或一个时段的芯片实验中表现出来,更广泛深入的研究以及确定特异性药物作用相关基因还需通过多个不同时期域的表达谱分析并借助更多的分子生物学、生物信息学手段来完成。

(责任编辑:吴锦雅)

参考文献:

- [1]Yamanoto 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.
- [2]Hahn HJ, Laube F, Lucke S, et al. Toxic effects of cyclosporine on the endocrine pancreas of Wistar rats

[J]. Transplantation, 1986, 41(1): 44-7.

[3]余乐,雷林生,吴曙光. 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[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23 (8), 833-836.

Yu L, Lei LS, Wu SG. Cyclosporin A inhibits insulin release and down-regulate gene expressions of mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes in NIT-1 cells[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(8): 833-6.

[4]Schna M, Schalton D, Davis R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270: 567-70.

[5]Li Y, Li YL, Tang R, et al. Discovery and analysis of hepatocellular carcinoma genes using cDNA microarrays[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2002, 128: 369-79.

[6]Strandell E, Buschard K, Saldeen J, et al. Interleukin-1 beta induces the expression of Hsp70, heme oxygenase and Mn-SOD in FACS-purified rat islet beta-cells, but not in alpha-cells[J]. Immunol Lett, 1995, 48 (2): 145-8.

[7]Sai X, Kawamura Y, Kokame K, et al. Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 12915-20.

[8]Smith CM, Steitz JA. Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5-prime terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes[J]. Mol Cell Biol, 1998, 18: 6897-909.

[9]Yasuda T, Kajimoto Y, Fujitani Y, et al. PAX6 mutation as a genetic factor common to aniridia and glucose intolerance[J]. Diabetes, 2002, 51(1): 224-30.

[10]Hill ME, Asa SL, Drucker DJ, et al. Essential requirement for Pax6 in control of enteroendocrine proglucagon gene transcription[J]. Mol Endocrinol, 1999, 13(9): 1474-86.

[11]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(Pt1): 35-42.

[12]Dufer 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.

[13]Taylor V, Suter U. Epithelial membrane protein-2 and epithelial membrane protein-3: two novel members of the peripheral myelin protein 22 gene family[J]. Gene, 1996, 175: 115-20.

[14]Hassan Z, Mohan V, Ali L, et al. SPINK1 is a susceptibility gene for fibrocalculous pancreatic diabetes in subjects from the Indian subcontinent[J]. Am J Hum Genet, 2002, 71: 964-8.