

环孢霉素 A 抑制 NIT-1 胰岛 茁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

余 乐 雷林生 袁曙光 第一军医大学药物研究所 广东 广州 510515

摘要 目的 研究免疫抑制剂环孢霉素 A 对 NIT-1 胰岛 茁细胞胰岛素分泌的影响及在基因水平上对线粒体氧化磷酸化水平的影响 方法 体外培养 NIT-1 胰岛 茁细胞 10 滋mol/L CsA 处理 24 和 48 h 放射免疫测定法 测定胰岛素释放 半定量 RT-PCR 检测 CsA 处理 NIT-1 胰岛 茁细胞后线粒体氧化磷酸化酶系中的几种主要成员 Nuox23 尧ox7c 和 Atp5K 在 mRNA 水平上的表达 结果 CsA 处理 24 和 48 h 可显著抑制胰岛素的释放并下调 Nuox23 尧ox7c 和 Atp5K 基因 mRNA 表达 结论 CsA 下调线粒体氧化磷酸化酶系基因的表达可能是其降低 ATP 合成引起胰岛素释放下降的机制之一

关键词 环孢霉素 A 胰岛素 RT-PCR NIT-1 细胞

中图分类号 R979.5 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2003)08-0833-04

Cyclosporin A inhibits insulin release and down-regulates gene expressions of mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes in NIT-cells

YULe, LEILin-sheng, WUShu-guang

Institute of Pharmaceutic Science, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the effects of cyclosporin A on insulin release and the gene expression profiles of mitochondrial oxidative phosphorylation in NIT-1 cells. Methods NIT-1 cells were exposed to cyclosporin A (10 滋mol/L) for 24 and 48 h respectively, after which the amount of insulin release was determined by means of radioimmunoassay (RIA), and the differential expressions of Nuox23, Cox7c and Atp5K genes assessed by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. Results Cyclosporin A reduced insulin release in the cell culture after 24 and 48 h exposure and decreased Nuox23, Cox7c and Atp5K mRNA expressions. Conclusion Cyclosporin A induces inhibition of insulin release in NIT-1 cells, possibly due to the reduction of ATP synthesis involving the down-regulation of the gene expression of mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes.

Key words: cyclosporin A; insulin; reverse transcription polymerase chain reaction; NIT-1 cell line

环孢霉素 A 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 1 型糖尿病 但是 很多报道也指出 CsA 有影响胰岛 茁细胞功能 破坏糖耐量导致糖尿病的副作用 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 茁细胞株胰岛素的释放 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 茁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 茁细胞线粒体 ATP 合成下降 同时观察到 茁细胞胰岛素分泌下降 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 茁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 茁细胞色素 C 氧化酶 7c 亚单位 ox7c 和 ATP 合成酶 e 链 tp5K] mRNA 的表达情况 研究 CsA 在基因水平上对胰岛 茁细胞 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 茁细胞购自华中科技大学免疫学教研室 MEM 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 rizol 购自 Gibco BRL 公司 RT-PCR 试剂购自 Promega 公司 ¹²⁵I-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

CO₂ 细胞培养箱 日本 NAPCO 倒置显微镜 日本

收稿日期 2003-05-02

作者简介 余 乐 1979 年生 湖北英山人 2000 年毕业于中国药科大学 第一军医大学在读硕士研究生 e-mail: yule@fimmu.com

通讯作者 袁曙光, 第一军医大学药物研究所教授 博士生导师 主任医师 电话 020-61648167 e-mail: shuguang@fimmu.com

本 NIKON 低温离心机 德国 Beckman 紫外分光光度计 德国 Beckman 离心机 美国 MJResearch SN-682 型放射免疫 计数仪 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 胰岛细胞用 0.25% 胰酶和 0.02% EDTA 消化成单细胞悬液以 10^4 /孔密度接种于 96 孔平板每孔培养液体积为 200 μ l 置于 95% 空气 5% CO_2 饱和湿度条件下培养 培养液含有 85% DMEM 5% 胎牛血清 接种 48 h 后 取出培养基 加入含有 10 μ mol/L CsA 的培养液 200 μ l 分别继续培养 24 和 48 h 取出上清液 1000 r/min 离心 5 min 后取 100 μ l 用 ^{125}I -胰岛素放射免疫分析试剂盒检测胰岛素释放 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 胰岛细胞按 1.5×10^6 密度接种于 6 孔板 培养 48 h 后 弃去培养基 换上含 10 μ 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 用水洗 用 Nasefree 溶解 制备的 RNA 样品用紫外分光光度计检测 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 μ l 体系 主要成分为反应缓冲液 10 mmol/L dNTP 总 RNA 1 μ l oligo dT 10 U RNA 酶抑制剂 10 U AMV 逆转录酶 于 42 $^{\circ}C$ 反应 60 min 建立 50 μ l 反应体系 主要成分为反应缓冲液 10 mmol/L dNTP 引物 1 μ l 上下游引物终浓度均为 0.4 μ mol/L 引物序列见表 1 1.2~2.0 μ l 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 5 μ l 2 min 灭活 AMV 逆转录酶 10 个循环 每循环 95 $^{\circ}C$ 30 s 60 $^{\circ}C$ 1 min 72 $^{\circ}C$ 1 min 最后 72 $^{\circ}C$ 保温 10 min 实验分 24 h 正常细胞组 48 h CsA 处理组 8 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 23k subunit (Nuox23)	408	ggacaagccttcatagca ctggcagaaacacagtaga
Cytochrome C oxidase subunit VIIC (Cox7c)	174	cagaacttcagcagcagat ggtgcggcaaacacagat
ATP synthase chain (Atp5K)	240	cgcgaaggtcacggacaa acgcctcacttgagaatgctgt
β -actin	274	ccagagcaagagaggtatcc ctgtgtagcaccagaggca

1.3.4 琼脂糖凝胶电泳 2% 琼脂糖凝胶 含 0.5 μ g/ml

EB 染色 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 μ mol/L CsA 处理细胞 24 和 48 h 培养液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

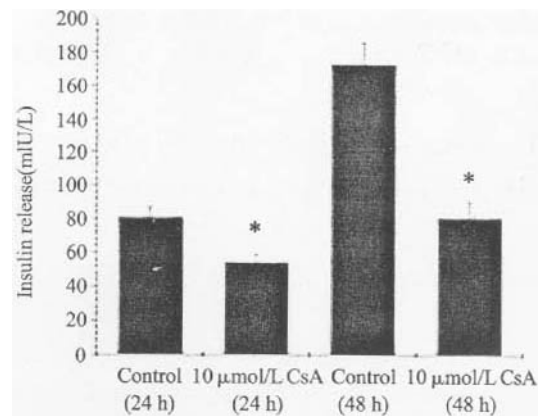


图 1 CsA 对 NIT-1 胰岛 细胞胰岛素分泌的影响
Fig.1 Effects of cyclosporine A on insulin release by NIT-1 cells

*P<0.01 vs control

2.2 CsA 对 Nuox23ox7c 和 Atp5K mRNA 表达的影响

10 μ mol/L CsA 处理 NIT-1 胰岛 细胞 24 和 48 h 后 对 Nuox23ox7c 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 的比值 反映 CsA 对 Nuox23ox7c 和 Atp5K mRNA 表达的影响 结果显示 10 μ mol/L CsA 处理细胞 24 h 后 对 Nuox23ox7c 和 Atp5K mRNA 表达的抑制率分别为 30.7% 和 9.5% 处理细胞 48 h 后 对 Nuox23ox7c 和 Atp5K mRNA 表达的抑制率分别为 50.8% 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

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

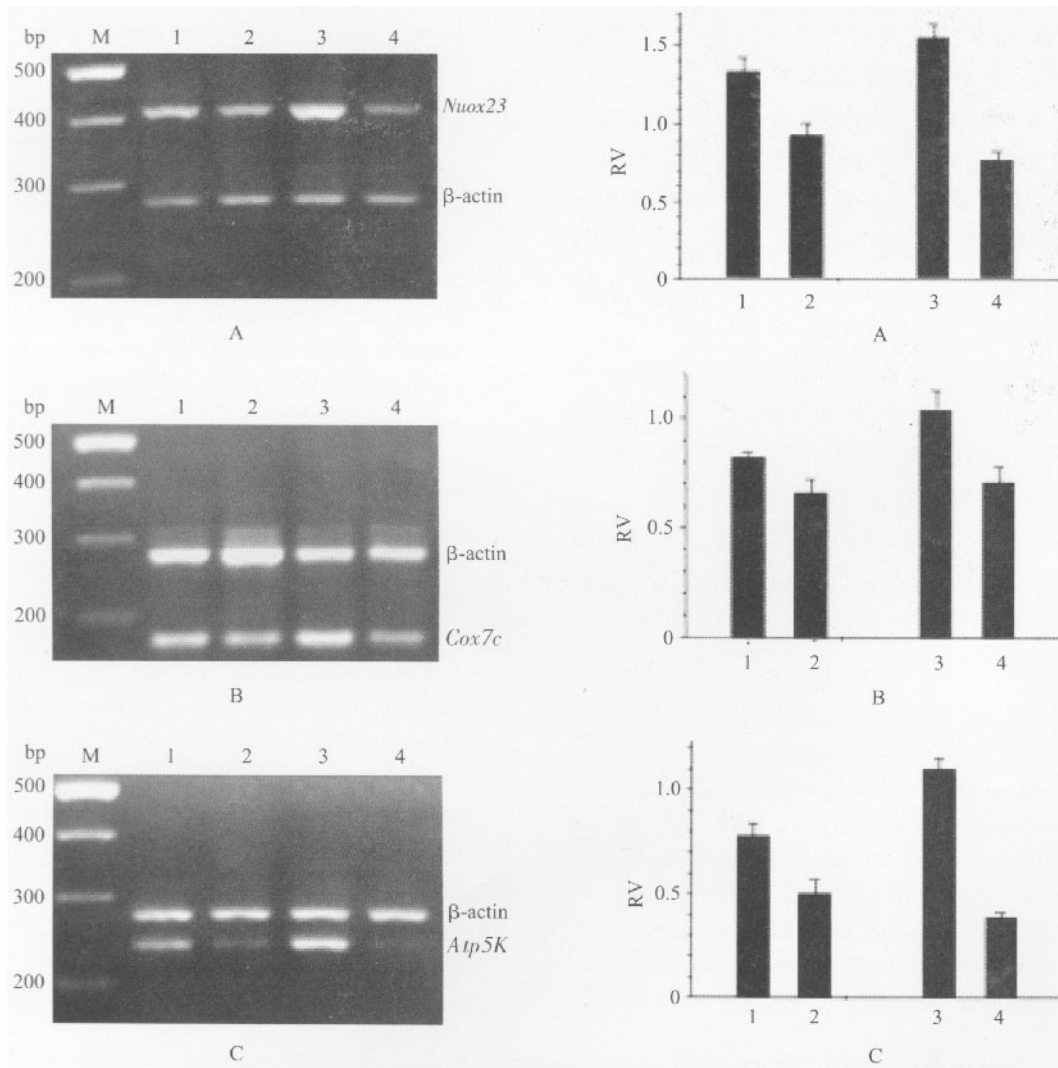


图 2 CsA 对 Nuox23、Cox7c 和 Atp5K mRNA 表达的影响

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 (24h); Lane 2: 10 μmol/L CsA (24h); Lane 3: Control (48h); Lane 4: 10 μmol/L CsA (48h)

Right: Semi-quantification of mRNA expression of Nuox23 (A), Cox7c (B) and Atp5K (C) in the absence or presence of 10 μmol/L CsA. RV: Relative volume. The results are averaged from three independent experiments. Column 1: Control (24h); Column 2: 10 μmol/L CsA (24h); Column 3: Control (48h); Column 4: 10 μmol/L CsA (48h)

线粒体内膜呼吸链氧化磷酸化在 NADH 脱氢酶作用下把氢传递给 CoQ，接着将电子传递给细胞色素 c，细胞色素 c 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 O²⁻，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 3 种主要酶 mRNA 的表

达量从基因水平反映 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。葡萄糖转运体 GLUT-2 对葡萄糖的摄取，葡萄糖被葡萄糖激酶磷酸化，糖酵解中丙酮酸和 NADH 的产生，线粒体氧化磷酸化的刺激。4 个事件的结果使 ATP 水平上升，最终导致胰岛茁细胞分泌胰岛素。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。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。生理情况下，葡萄糖在茁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 Ca²⁺ 通道开放，细

胞 Ca^{2+} 内流增加从而促进胰岛素的分泌。遥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。遥连腺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。遥因而很有可能 β 细胞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统中的几种主要酶 mRNA 表达。并随处理时间的延长抑制作用越明显。遥由此可见 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。

参考文献

咱 Canadian-European Randomized Control Trial Group. Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. 咱 Diabetes, 1988, 37(11): 1574-82.
 咱 De Filippo G, Carel JC, Biotard C, et al. Long-term result of early cyclosporin therapy in juvenile IDDM. 咱 Diabetes, 1996, 45(1): 101-4.
 咱 Krentz AJ, Dousset B, Mayer D, et al. Metabolic effects of cyclo-

sporin A and FK506 in liver transplant recipients. 咱 Diabetes, 1993, 42(12): 1753-9.
 咱 Yamanoto H, Akazawa S, Yamaguchi Y, et al. Effects of cyclosporin A and low dosages of steroid on posttransplantation diabetes in kidney transplant recipients. 咱 Diabetes Care, 1991, 14(10): 867-70.
 咱 Robertson RP. Cyclosporin-induced inhibition of insulin secretion in isolated rat islets and HIT cell. 咱 Diabetes, 1986, 35(9): 1016-9.
 咱 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. 咱 Mol Pharmacol, 2001, 60(4): 873-9.
 咱 Cohen O, Einav Y, Cohen Y, et al. Implantation of rat insulinoma cell line into cyclosporin treated rats: effect of the in vivo environment on β cell specific gene expression. 咱 Transplantation, 2000, 69(7): 1464-70.
 咱 Oetjen E, Grapentin D, Blume R, et al. Regulation of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drug cyclosporin A and tacrolimus at concentration that inhibit calcineurin activity and involving the transcription factor CREB. 咱 Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2003, 367(3): 227-36.
 咱 Bataille D. Molecular mechanisms of insulin secretion. 咱 Diabetes Metab, 2002, 28(6 Suppl): 7-13.
 咱 Duchen MR, Smith PA, Ashcroft FM. Substrate-dependent changes in mitochondrial function, intracellular free calcium concentration and membrane channels in pancreatic beta-cells. 咱 Biochem J, 1993, 294(Pt 1): 35-42.
 咱 Gerbitz KD. Does the mitochondrial DNA play a role in the pathogenesis of diabetes. 咱 Diabetologia, 1992, 35(12): 1181-6.

责任编辑 隋开颜

接 832 页

参考文献

咱 曾庆乐, 李彦豪, 陈勇, 等. 平阳霉素碘油乳剂治疗肝海绵状血管瘤的临床应用. 咱中华放射学杂志, 2000, 34(7): 456-8.
 Zeng QL, Li YH, Chen Y, et al. Clinical application of pingyangmycin lipid emulsion embolization to treat cavernous hemangioma of liver. 咱 Chin J Radiol, 2000, 34(7): 456-8.
 咱 李彦豪, 刘彪, 曾庆乐, 等. 平阳霉素碘油乳剂子宫动脉栓塞治疗症状性子宫肌瘤. 咱中华放射学杂志, 2000, 34(12): 827-30.
 Li YH, Liu B, Zeng QL, et al. Uterine artery embolization with pingyangmycin lipid emulsion for treatment of symptomatic uterine fibroids. 咱 Chin J Radiol, 2000, 34(12): 827-30.
 咱 陈光, 孙辉臣, 成继民, 等. 平阳霉素治疗血管瘤的临床病理学观察. 咱上海口腔医学 (Shanghai J Stomatol), 2000, 9(2): 127.
 咱 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. 咱 J Immunol Methods, 1983, 65(1-2): 55-63.
 咱 王文锦. 平阳霉素作用机制和临床应用. 咱中国肿瘤临床 (Chin J Clin Oncol), 1992, 19(3): 223-4.
 咱 Takahashi K, Sawasaki Y, Hata J, et al. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. 咱 In Vitro Cell Dev Biol, 1990, 26(3 Pt 1): 265-74.
 咱 薛绍白, 李电东, 李素文, 等. 用流式细胞光度术研究争光霉

素对肿瘤及正常细胞周期的影响. 咱药学学报, 1984, 19(7): 491-4.
 Xue SB, Li DD, Li SW, et al. A study of the effect of zhengguangmycin on the cell cycle of CHO cell line and tumors with flow cytometry (FCM). 咱 Acta Pharm Sini, 1984, 19(7): 491-4.
 咱 郭军, 李澄, 顾晓琴, 等. 平阳霉素对体外培养的脐静脉内皮细胞损伤的研究. 咱南京铁道医学院学报, 1998, 17(4): 245-7.
 Guo J, Li C, Gu XQ, et al. Effects of pingyangmycin on cell injuring in human umbilical vein endothelial cells. 咱 J Nanjing Railway Med Coll, 1998, 17(4): 245-7.
 咱 郭军, 吴汉江. 多种药物对体外培养的血管内皮细胞损伤作用比较的研究. 咱华西口腔医学杂志, 2000, 18(5): 310-3.
 Guo J, Wu HJ. Changes of cultured human vein endothelial cells in the presence of therapeutic agents of cavernous hemangioma. 咱 West Chin J Stomatol, 2000, 18(5): 310-3.
 咱 李学汤, 李佩茵, 林晨. 平阳霉素的体外抗癌谱. 咱中国医学科学院学报, 1990, 12(3): 182-5.
 Li XT, Li PY, Lin C. Anticancer spectrum of pingyangmycin in vitro. 咱 Acta Acad Med Sini, 1990, 12(3): 182-5.
 咱 王慧君, 武忠弼, 汪广嘉, 等. 婴幼儿毛细血管瘤的组织结构及超微结构分析. 咱同济医科大学学报, 1996, 25(4): 257-9.
 Wang HJ, Wu ZB, Wang GJ, et al. A histological and ultrastructural analysis of capillary hemangioma in infants. 咱 Acta Univ Med Tongji, 1996, 25(4): 257-9.