文章编号:1000-5404(2005)03-0209-04

论著

缺氧诱导肝细胞中葡萄糖转运体 1 表达变化机制的实验研究

戚华兵,王凤君,汪仕良 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨缺氧诱导肝细胞中葡萄糖转运体 1(GLUT-1)蛋白表达变化的机制。**方法** 以含有 GLUT-1 全长调控序列的表达载体(构建体 A)为模板,构建野生型(构建体 N)和突变型(构建体 M)缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)表达质粒,转染体外培养的肝细胞 BRL,与含有全长缺氧诱导因子 1α(HIF-1α)cDNA 的质粒 p(HA)HIF-1 共转染,1%氧浓度诱导表达,分析报告基因的表达及变化。**结果** 成功构建了构建体 N 和构建体 M,转染 BRL 细胞后,缺氧明显诱导了构建体 N 和构建体 M 中报告基因的表达,与转染空载体的对照相比,报告基因的表达分别增加了 7.2 倍($P<0.05$)和 3.1 倍($P<0.05$),且两者之间具有明显的差异($P<0.05$)。构建体 N 与 p(HA)HIF-1 共转染,报告基因的表达增强了 16 倍,而构建体 M 与 p(HA)HIF-1 共转染时,与单独转染构建体 M 相比,两者没有显著差异($P>0.05$)。**结论** HRE 中的 HIF-1 结合位点在 GLUT-1mRNA 的缺氧诱导中起重要的作用。

关键词:缺氧;葡萄糖转运蛋白 1;糖代谢;缺氧诱导因子 1
中图法分类号:R322.47; R329.25; R364.4 **文献标识码**:A

Experimental study of mechanisms of hypoxia-induced expression of glucose transporter 1 in rat liver cells

QI Hua-bing, WANG Feng-jun, WANG Shi-liang (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the mechanisms of hypoxia-induced expression of glucose transporter 1 (GLUT-1) in rat liver cells. **Methods** Wild type hypoxia response element (HRE) plasmid (construct N) containing the potential HIF-1 binding site was constructed by using construct A which contains the full length of the 5′-flanking region of the rat GLUT-1 gene as a template of PCR, and the PCR product was subcloned into the reporter plasmid pGL3-Promoter. Mutation type HRE plasmid (construct M) was made using a two-step overlapping PCR strategy. Then the liver cells were transfected with constructs N and M, respectively. At 24 h after transfection, the cells were subjected to hypoxia (1% O_2) to mimic the hypoxic environment caused by burn for 12 h. The samples were harvested and the determination of the reporter gene luciferase activity and pSV-β-galactosidase activity was performed. **Results** Constructs N and M were successfully constructed and the liver cells were successfully transfected with construct N or construct M. Hypoxia induced more enhanced luciferase activity of constructs N and M as compared with the control ($P<0.05$). When construct N was cotransfected with p(HA)HIF-1, the expression of the reporter gene increased by 16 folds ($P<0.05$), but when construct M was cotransfected with p(HA)HIF-1, no difference in the expression was found as compared with transfection with construct M alone ($P<0.05$). **Conclusion** HIF-1 binding site of HRE may play an important role in the hypoxia-induced GLUT-1 mRNA expression in rat liver cells.

Key words: hypoxia; glucose transporter 1; glucose metabolism; hypoxia inducible factor-1

葡萄糖经无氧酵解产生 ATP 是许多哺乳动物细胞缺氧时的主要能量来源。葡萄糖经载体跨膜转运入细胞内是多数细胞糖代谢的限速步骤。其中,膜糖蛋白葡萄糖转运体(glucose transporters, GLUTs)家族参与了葡萄糖的跨膜转运。早期的实验中,我们观察到严重烧伤早期,肝脏葡萄糖转运蛋白 1 水平及其转录活性明显升高[1]。为了进一步明确缺氧诱导 GLUT-1 表达升高的机制,本研究通过点突变等技术方法,构建不同的表达质粒,体外转染 BRL 细胞,缺氧(1%O_2)诱导表达,以期进一步阐明缺氧对 GLUT-1 诱导的机制。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054202)
作者简介:戚华兵(1977-),男,云南省陆良县人,博士研究生,助理研究员,主要从事严重烧伤后肠道功能损伤及其调理方面的研究。电话:(023)68754148-8051; E-mail: hbqi3@hotmail.com
通讯作者:汪仕良,电话:(023)68754148-8031,E-mail: cmasha@public.cta.cq.cn
收稿日期:2004-09-10;修回日期:2004-12-20

1 材料与方法

1.1 细胞来源、主要试剂及仪器

大鼠肝细胞株 BRL 购自中科院上海细胞库；构建体 A[2]，含 GLUT-1 全长调控序列和编码萤火虫荧光素酶的报告基因，美国宾夕法尼亚大学 Maity 博士惠赠；p(HA)HIF-1cDNA[3] 质粒，含 HIF-1αcDNA 全长序列，美国哈佛大学 Bunn 博士惠赠；pGL3-promoter 质粒购自 Promega 公司；DMEM 高糖培养基和小牛血清购自 Hyclone 公司；FuGENE 6 购自 Roche 公司；萤火虫荧光素酶分析试剂(Bright-Glo™ Luciferase Report Assay Buffer)和 pSV-β-半乳糖苷酶分析试剂盒(β-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer)购自 Promega 公司；LS6000TA 型液闪计数器、DU-7 型紫外分光光度计均为美国 Beckman 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 野生型 HRE 表达质粒(构建体 N)的构建 以构建体 A 中的 *Sac* Ⅰ/*Pst* Ⅰ片断为模板行 PCR 扩增，上游引物 P1A：5′-GAC AGG TAC CCA ACA GAG CCT TTT C-3′(含 *Kpn* Ⅰ位点)，下游引物 P2B：5′- TAA TAG AGA TCT GAG CTC CCA GGA ACT TG -3′(含 *Bgl* Ⅱ位点)。PCR-HRE 产物长度为 206 bp，亚克隆到表达质粒 pGL3-promoter 中，即为构建体 N。

1.2.2 突变型 HRE 表达质粒(构建体 M)的构建 两步 PCR 法构建含有突变位点的重组质粒。引物分别为 P1A；HBS-2A：5′-CAC AGG ATG TCT GGC TGA CAC GCA-3′；HBS-1B：5′-TGC GTG TCA GCC AGA CAT CCT GTG-3′；P2B。其中 HBS-2A 和 HBS-1B 在 GLUT-1 的 HRE 位点处有重叠，引入 4 bp 的突变，将野生型中的 GGCGTG 突变为 GGATGT。以构建体 A 为模板，分别以 P1A 和 HbS-2A 为引物扩增得到 PCR-1，P1A 和 P2B 为引物扩增得到 PCR-2，再以 PCR-1 和 PCR-2 产物为模板，P1A 和 P2B 为引物行 PCR 扩增，将扩增的 PCR 产物亚克隆到不含增强子的表达质粒 pGL3-promoter 中，即为构建体 M。具体过程见图 1。

1.2.3 细胞的培养及缺氧模型的建立 正常大鼠肝细胞 BRL，5% ~ 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素、pH 7.6 的 DMEM 培养基中，5% CO_2 孵箱 37 ℃培养。细胞生长融合为单层后用于实验。本实验用细胞均在 20 ~ 30 代之间。为了模拟烧伤后体内缺氧状况，配制 1% O_2、5% CO_2、94% N_2 的混合气体，作为细胞的生长环境。细胞于缺氧孵育室内，进行缺氧处理。

1.2.4 构建体的转染和缺氧诱导表达 BRL 细胞以(2 ~ 4) × 10^5/ml 接种于 24 孔细胞培养板，每孔 1 ml。16 ~ 20 h 后，融合 50% ~ 80%，DMEM 培养基换液。细胞分为对照组、N 组和 M 组，每组设 3 复孔。另备 3 个 1.5 ml EP 管，加入 97 μl 无血清 DMEM 培养基和 3 μl FuGENE 6，混匀室温放置 5 min。分别加入 1.0 μg pGL3-promoter 载体、构建体 N 和构建体 M，每管中均加入 0.5 μg pSV-β-半乳糖苷酶表达质粒(内参)；HIF-1 与构建体的共转染实验中，5 μl FuGENE 6，构建体 N/M 和 p(HA)HIF-1cDNA 质粒各 1.0 μg，0.5 μg pSV-β-Galactosidase Control vector。室温放置 30 min 后 100 μl DNA/FuGENE 6 混合物直接加入相应细胞中，放回 5% CO_2 孵箱，24 h 后行缺氧处理，37 ℃诱导表达，各时相点取出细胞。

1.2.5 报告基因的检测 具体过程参见文献[1]。

1.3 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，行方差分析及均数间多重比较。

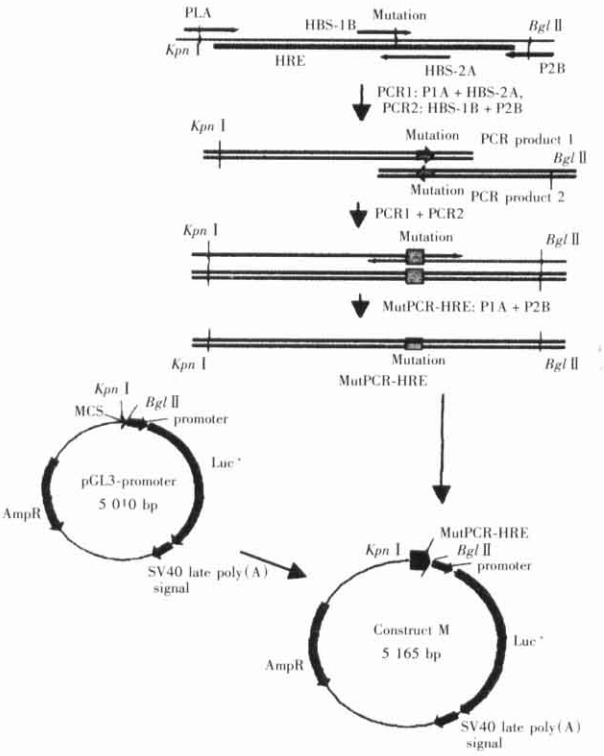


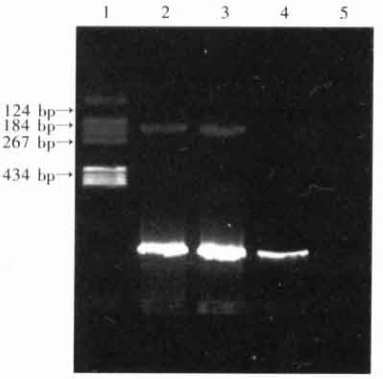
图 1 构建体 M 的构建

Fig 1 Construction of expression vector construct M

2 结果

2.1 构建体 N、构建体 M 的构建及序列分析

PCR-HRE 及 MutPCR-HRE 产物经 *Kpn* Ⅰ/*Bgl* Ⅱ酶切后，与相应酶切的报告基因载体 pGL3-promoter 连接，转化 DH5α，经 *Kpn* Ⅰ/*Bgl* Ⅱ双酶切鉴定含有外源插入片段的重组质粒，结果见图 2。酶切后在分子量约 200 bp 处出现一 DNA 条带，空载体 pGL3-promoter 经 *Kpn* Ⅰ/*Bgl* Ⅱ双酶切后，电泳发现未切出 200 bp 大小的片段。任取一个阳性质粒测序，所测序列与基因库报告序列完全一致。经软件进行序列比对，除了 4 个碱基不同之外，其余的碱基完全一致，与实验设计一致。



1：PBR322DNA/*Bsu* RⅠ；2：Construct N/*Kpn* Ⅰ + *Bgl* Ⅱ；3：Construct M/*Kpn* Ⅰ + *Bgl* Ⅱ；4：pGL3-promoter/*Kpn* Ⅰ + *Bgl* Ⅱ；5：Negative control

图 2 构建体 N、构建体 M 的酶切鉴定分析

Fig 2 Analysis of constructs N and M by double restriction endonucleases

2.2　构建体 M、N 的转染及缺氧的诱导

与转染空载体的对照相比，构建体 N、构建体 M 转染以后，缺氧（1% O_2）诱导 12 h，报告基因的表达均明显升高（$P<0.05$），构建体 N 的诱导效率明显高于含有突变位点的构建体 M（$P<0.05$）。构建体 M、构建体 N 与 p(HA)HIF-1cDNA 共转染，缺氧明显诱导了构建体中报告基因的表达。但与只转染构建体 M 的实验组相比较，缺氧和 p(HA)HIF-1cDNA 对报告基因的表达无明显的协同效应（$P>0.05$）；与单独转染构建体 N 的实验组相比较，缺氧和 p(HA)HIF-1cDNA 对报告基因的表达就有明显的协同效应（$P<0.05$），两者共同作用使报告基因的表达增强逾 16 倍。结果见表 1。

表 1　缺氧对 BRL 细胞中构建体 M、N 报告基因的诱导表达

Tab 1　Effects of hypoxia on the activity of luciferase of construct M or construct N in rat BRL cells

Group	β-Galactosidase activity (mU)	Luciferase intensity	Relative luciferase intensity ($\times 10^3$)
Control	0.141 6 ± 0.035 6	77 985.06 ± 9 914.00	563.10 ± 80.10
M	0.047 7 ± 0.012 5	81 646.16 ± 5 843.6	1 754.60 ± 336.4△
N	0.024 8 ± 0.010 5	101 039.00 ± 13 908.8	4 374.53 ± 1 278.1△
M + H	0.015 0 ± 0.002 7	34 448.89 ± 3 757.58	2 332.20 ± 265.50
N + H	0.012 3 ± 0.002 2	11 566.02 ± 12 206.3	9 171.16 ± 685.69*

△：$P<0.05$，*vs* control；*：$P<0.05$，*vs* N；M：Construct M；N：Construct N；M + H：Construct M + p(HA)HIF-1cDNA；N + H：Construct N + p(HA)HIF-1cDNA

3　讨论

细胞膜上 GLUT-1 数量的调节可能是组织对缺氧、缺血应激适应的一个重要机制，环境和内在因素可在多个环节参与对 GLUT-1 蛋白表达的调控。我们早期的实验结果表明，严重烧伤大鼠肝脏 GLUT-1 蛋白的量明显升高，在 4 ~ 8 h 达到高峰，约为正常对照的 2 倍，16 h 下降，提示烧伤可导致 GLUT-1 蛋白的增加；缺氧条件下培养的正常大鼠肝细胞中 GLUT-1 蛋白的表达增加，并随缺氧时间的延长而变得明显，其中 1% O_2 组 8 h 达到高峰，约为对照的 2.17 倍，16 h 仍保持较高的水平；通过 RT-PCR 分析 GLUT-1 的 mRNA 水平，发现 1% O_2 孵育 4 h 后，GLUT-1 的 mRNA 水平增加了 1.76 倍，缺氧明显诱导了 GLUT-1 的转录活性[4]。Gamelli 等[5]观察到 15%TBSA 烧伤后 4 h 和 72 h 时，脑组织中 GLUT-1mRNA 和蛋白水平均显著增加。烧伤导致 GLUT-1mRNA 和蛋白水平增加，与烧伤后机体损伤修复需要大量能量相适应。GLUT-1 受缺氧本身和缺氧导致的氧化磷酸化抑制的诱导，GLUT-1 基因 5′侧翼区的全长调控序列中一个 480 bp 的 *Sac*Ⅰ/*Pst*Ⅰ片段与氯化钴（模拟缺氧本身）诱导的 GLUT-1mRNA 相关[2]。

目前各种研究表明，缺氧诱导因子 1（hypoxia inducible factor 1，HIF-1）是维持细胞和全身氧稳态的重要调节因子，HIF-1 由缺氧诱导的 α 亚基和组成型表达的 β 亚基组成。缺氧时，HIF-1 稳定性增加，转位入核，形成 HIF-1α/HIF-1 异二聚体，与 DNA 顺式作用元件 HRE（hypoxia response element，缺氧反应元件）结合，参与了缺氧早期组织的血管生成、糖酵解的增强和细胞增殖的变化，是机体适应缺氧应激的重要机制[6]。HIF-1 上调的基因调控序列包含一段 HRE 增强子/启动子序列。该 HRE 包括一个或多个 HBS（HIF-binding site，HIF-1 结合位点）和 HBS 附近的一个或多个辅助的顺式作用元件 HAS（HIF-1 ancillary sequence，HIF-1 辅序列）[7]。

为了观察 HBS 在 GLUT-1mRNA 转录激活中的作用，我们以 GLUT-1 全长调控序列中与缺氧反应相关的 480 bp *Sac*Ⅰ/*Pst*Ⅰ片段为模板，PCR 扩增得到一段长度为 186 bp 的片断，该片段位于全长调控序列转录起始位点上游约 3.2 ~ 3.0 kb 处，清除了 *Sac*Ⅰ/*Pst*Ⅰ序列中位于核苷酸序列 + 287 ~ + 296 的一个血清反应元件（serum response element，SRE），该位点对 GLUT-1 基因的转录具有明显的上调作用，但该片段保留了其中唯一的 HIF-1 结合位点 HBS（核苷酸 + 396 ~ + 401）[8]。由于扩增到的片段不含 GLUT-1 转录所需的启动子元件，故将其克隆到含 SV40 启动子、不含增强子元件的 pGL3-promoter 荧光素酶报告基因载体中（即构建体 N）。同时，我们重组了构建体 M。构建体 M 和构建体 N 除了将构建体 N 中的 HBS 位点由 5′-GGCGTG-3′突变为 5′-GGATGT-3′以外，其余的完全相同。构建体 N 和构建体 M 转染 BRL 细胞株，与转染空载体的正常对照相比，构建体 M 和构建体 N 中的报告基因均能被缺氧诱导表达增强，但是，构建体 N 的增幅（增加 7.77 倍）却远远高于构建体 M（3.1 倍）的诱导倍数（$P<0.01$）。结果提示，HIF-1 结合位点在缺氧时 GLUT-1 调控序列对报告基因的表达调控中起重要的作用。但前期报道多认为，HBS 的突变能使缺氧诱导的功能完全丧失，这除了试验条件的原因外，可能还有其他的因素调控了报告基因的表达。

为了明确 HIF-1α 对 HBS 直接的调控作用，我们将构建体 N 和构建体 M 分别与含有 HIF-1αcDNA 编码序列的表达质粒 p(HA)HIF-1 共转染培养的 BRL 细胞株，结果表明，缺氧和 HIF-1 对报告基因的表达具有明显的协同效应，这进一步证实了 HBS 序列在缺氧诱导的 GLUT-1 表达变化中起重要的作用。除缺氧外，HBS 也可能是其他一些物质（如 NO、胰岛素等）调节基因表达的靶序列[9]。

目前认为，HIF-1 是缺氧的适应性反应所需要的核信号，但缺氧在不同的细胞类型中引发的反应不同，其他因子可能控制反应的特异性。这些反应可能依赖不同的细胞类型、其它共存在的生理信号以及缺氧的严重程度。除了介导缺氧的适应性反应，HIF-1 也参与了常氧条件下的一些病理生理过程，如正常组织和

肿瘤的发育、细胞的死亡或生存、免疫反应、机械牵张的适应性反应等。因此，对 HIF-1 作用和机制的深入研究，将为缺血缺氧性损伤、肿瘤、创伤愈合、心血管疾病的防治提供新的策略和方案[10]。

参考文献：

[1] 戚华兵，王凤君，汪仕良．严重烧伤大鼠肝脏葡萄糖转运体 1 蛋白表达的实验研究[J]．第三军医大学学报，2003，25(18)：1613－1616.

[2] Behrooz A, Ismail-Beigi F. Dual control of glut1 glucose transporter gene expression by hypoxia and by inhibition of oxidative phosphorylation[J]. J Biol Chem, 1997, 272(9): 5555－5562.

[3] Huang L E, Gu J, Schau M, *et al*. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O_2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(14): 7987－7992.

[4] 汪仕良．烧伤后代谢与缺血缺氧[J]．中华烧伤杂志，2002，18(4)：199－200.

[5] Gamelli H, Liu H, He L K, *et al*. Alterations of glucose transporter mRNA and protein levels in brain following thermal injury and sepsis on mice [J]. Shock, 1994, 1(6): 395－400.

[6] Pugh C W, Ratcliffe P J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system[J]. Nat Med, 2003, 9(6): 677－684.

[7] Kimura H, Weisz A, Ogura T, *et al*. Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide[J]. J Biol Chem, 2001, 276(3): 2292－2298.

[8] Chen C, Pore N, Behrooz A, *et al*. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia[J]. J Biol Chem, 2001, 276(12): 9519－9525.

[9] Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, *et al*. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide[J]. Blood, 2000, 95(1): 189－197.

[10] Giaccia A, Siim G, Johnson S. HIF-1 as a target for drug development [J]. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(10): 803－811.

（编辑　刘洪娥）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)03-0212-01

甲状腺机能亢进症患者肝功能改变及影响因素的初探

Changes of hepatic function and its affecting factors in patients with hyperthyroidism

冯正平[1]，王富华[2]　（[1]重庆医科大学第一附属医院内分泌科，重庆 400016；[2]第三军医大学西南医院内分泌科，重庆 400038）

甲状腺机能亢进症（hyperthyroidism，HT），简称甲亢，是一常见的内分泌疾病，其病变可累及机体多个脏器，临床上以心血管及神经系统多见，亦可累及肝脏，导致肝功能异常[1]。本研究中观察了 189 例甲亢患者的肝功能情况，以探讨甲亢性肝损害的影响因素。

1　对象与方法

1.1　研究对象

初诊甲亢病患者 189 例，男性 37 例，女性 152 例，年龄（34.1±16.5）岁，病程（7.8±11.6）个月。根据肝功能测定又分为无肝损害组（HT-A 组）和合并肝损害组（HT-B 组），甲亢性肝损害的诊断标准参照文献[2]。以上研究对象均无病毒性肝炎的血清学证据，排除酒精性肝病、慢性肝胆病史及抗甲状腺药物治疗史，无导致急性肝损害的全身性因素。

1.2　方法

1.2.1　FT3、FT4、TSH 的测定　采用放免法，正常参考值为 TSH 0.3～5.0 μIU/ml，FT3 2.5～9.8 pmol/L，FT4 10.0～25.0 pmol/L。

1.2.2　肝功能测定　自动生化分析仪检测，正常参考值为：ALT 5～45 IU/L，AST 5～45 IU/L，GGT 4～50 IU/L，ALP 53～114 IU/L，TBIL 6～21 μmol/L，DBIL 0～6 μmol/L，ALB 38～51 g/L，TP 60～83 g/L。

1.3　统计学处理

检测结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用第三军医大学数学教研室统计软件包，组间比较用 χ^2 和 t 检验，分析肝功能的影响因素采用 Logistic 逐步回归分析。

2　结果

2.1　甲亢性肝损害的特点

189 例甲亢患者中有肝功能异常者 56 例，占 29.6%，其中 ALT 升高者 53 例（94.6%），AST 升高 46 例（82.1%），GGT 升高 31 例（55.3%），TBIL 升高 15 例（26.8%），A/G 异常 3 例（5.4%）。HT-A 与 HT-B 组比较：

表 1　甲亢患者有无肝损害组间性别、年龄、病程、血 FT3、FT4 水平比较

组别	例数	性别（男：女）	年龄（岁）	病程（月）	FT3（pmol/L）	FT4（pmol/L）
HT-A 组	133	28：105	32.7±14.1	6.2±10.4	21.3±9.6	40.9±14.7
HT-B 组	56	9：47	36.4±17.9	9.8±12.1	35.7±11.4*	69.1±18.5*

△：$t=2.87$，$P<0.05$，*：$t=3.87$、2.93，$P<0.01$，vs HT-A 组

作者简介：冯正平（1967－），男，四川省西昌市人，硕士，主治医师，主要从事糖尿病和甲状腺疾病方面的研究，发表论文 10 篇．电话：13618329135

收稿日期：2004-09-15；修回日期：2004-12-13

（下转 216 页）