论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201501204

缺氧上调成纤维细胞葡萄糖转运蛋白1的表达

李晓栩[1,3],黄 瑊[1,3],徐 刚[2,3],杨诚忠[1,3],谭小玲[1,3],官立彬[1,3] (400038 重庆,第三军医大学高原军事医学系:高原生理学与高原生物学教研室[1],高原特殊药物与装备研究室[2];高原医学教育部重点实验室,全军高原医学重点实验室[3])

[摘要] **目的** 探讨成纤维细胞缺氧后葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter 1,GLUT-1)表达特点与规律。**方法** 分离培养大鼠肺成纤维细胞,将细胞分成4组($n=3$):常氧组[普通培养箱(5% CO_2,21% O_2,37 ℃)]及缺氧12、24、48 h组[置缺氧培养箱(1% O_2,5% CO_2,94% N_2,37 ℃)中培养12、24、48 h]。取各组细胞进行免疫荧光和免疫印迹分析蛋白水平的表达变化,RT-PCR分析细胞GLUT-1 mRNA水平的变化,GOD-PAP测定培养上清葡萄糖含量。**结果** 免疫印迹检测结果显示,缺氧12、24、48 h组GLUT-1的蛋白表达均显著高于常氧组($P<0.05$),缺氧48 h组GLUT-1表达显著高于缺氧12、24 h组($P<0.05$),缺氧24 h组与缺氧12 h组差异无统计学意义($P>0.05$);免疫组化结果与免疫印迹结果相一致,缺氧12、24、48 h组GLUT-1蛋白表达水平均高于常氧组;RT-PCR及琼脂糖凝胶电泳结果显示,GLUT-1 mRNA表达水平随缺氧时间逐渐升高,缺氧12 h组与常氧组相比差异无统计学意义($P>0.05$),缺氧24、48 h组均显著高于常氧组($P<0.05$),缺氧48 h组显著高于缺氧24 h组($P<0.05$);缺氧12、24、48 h组上清中葡萄糖含量均较常氧组显著降低($P<0.05$)。**结论** 缺氧上调大鼠肺成纤维细胞GLUT-1的表达,有利于细胞在缺氧状态下对葡萄糖的摄取。

[关键词] 缺氧;成纤维细胞;葡萄糖转运蛋白1

[中图法分类号] R322.35; R364.4; R394.2 [文献标志码] A

Hypoxia up-regulates expression of glucose transporter 1 in rat fibroblasts

Li Xiaoxu[1,3], Huang Jian[1,3], Xu Gang[2,3], Yang Chengzhong[1,3], Tan Xiaoling[1,3], Guan Libin[1,3] ([1]Department of High Altitude Physiology and Biology, [2]Department of High Altitude Special Drugs and Equipments, [3]Key Laboratory of High Altitude Medicine of Ministry of Education, Key Laboratory of High Altitude Medicine, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression profile of glucose transporter 1 (GLUT-1) in lung fibroblasts under hypoxia exposure. **Methods** Fibroblasts were isolated from rat lung tissues and cultured *in vitro*, and then incubated under either normoxia (5% CO_2, 21% O_2, 37 ℃) or hypoxia (1% O_2, 5% CO_2, 94% N_2, 37 ℃) condition for 12, 24 and 48 h, respectively. The expression of GLUT-1 protein was observed by Western blotting and immunohistochemical staining, while the mRNA level was assayed by reverse transcription PCR, and the content of glucose in the supernatant was determined with a GOD-PAP Glucose reagent kit. **Results** Compared with the normoxic group, the expression of GLUT-1 was significantly higher in 12, 24 and 48 h after hypoxia exposure ($P<0.05$). There was no difference in the level between the groups under hypoxia for 24 and 12 h ($P>0.05$), but that of the 48 h hypoxic group was significantly higher than the groups under hypoxia for 24 and 12 h ($P<0.05$). The results of immunohistochemical assay were consistent with those of Western blotting, GLUT-1 protein were increased in the fibroblasts after hypoxic exposure for 12, 24 and 48 h. The mRNA expression levels were gradually increased after hypoxia challenge

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2012CB518201);国家自然科学基金面上项目(81370150,30973446)

[通信作者] 官立彬,电话:(023)68752387,E-mail:libinguan84@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150703.1449.014.html(2015-07-03)

in a time-dependent manner. There was a significant difference in the mRNA level of GLUT-1 between hypoxic 24 h and 48 h groups ($P<0.05$), as well as the hypoxic 24 h and 12 h groups ($P<0.05$), but not between the hypoxia 12 h group and the normoxic group ($P>0.05$). Moreover, the level of glucose in the supernatant was significantly decreased in the groups after hypoxia exposure for 12, 24 and 48 h than the normoxia group ($P<0.05$). **Conclusion** Hypoxia up-regulates the expression of GLUT-1, which is beneficial to glucose uptaking in rat lung fibroblasts under hypoxic condition.

[**Key words**] hypoxia; fibroblasts; glucose transporter 1

Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program, 2012CB518201) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (81370150, 30973446). Corresponding author: Guan Libin, Tel: 86-23-68752387, E-mail: libinguan84@163.com

缺氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension,HPH)是一种以肺血管重塑为主要病理变化的疾病,其发病机制尚未完全明了[1-3]。目前认为,肺血管收缩和重塑是缺氧性肺动脉高压形成的主要病理生理基础[4]。在此过程中,肺动脉外膜出现大量的纤维增生,肺动脉成纤维细胞发挥了重要作用[5-6]。葡萄糖经糖酵解产生ATP是哺乳动物细胞缺氧时的主要能量来源,其经载体跨膜转运进入细胞内是许多细胞糖代谢的限速步骤,葡萄糖转运蛋白家族参与了其跨膜转运这一过程。葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter 1,GLUT-1)是葡萄糖转运蛋白家族中最具代表性的成员之一,是组织细胞进行跨膜转运葡萄糖的重要载体[7-9],其广泛分布于间质组织、红细胞、血脑屏障、胎盘的基底膜和内皮细胞等[10]。在缺氧条件下,成纤维细胞是否通过GLUT-1上调促进葡萄糖转运尚不清楚。本研究拟通过检测GLUT-1的表达,探讨缺氧性肺动脉高压形成过程中早期成纤维细胞葡萄糖摄取的特点,为缺氧性肺动脉高压形成的机制提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

GLUT-1抗体(Abcam公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG+IgM、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG+IgM、Cy3标记山羊抗小鼠IgG(H+L)(中杉金桥生物有限公司);RNAsimple总RNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司);cDNA合成及荧光定量产品(宝生物工程有限公司);DMEM高糖培养基、胰蛋白酶(HyClone公司);胎牛血清(Gibco公司);二甲基亚砜(Sigma公司);其余常规试剂为国产分析纯。超净工作台(苏州净化设备厂);CO_2培养箱(NUAIR公司);低氧培养箱(Thermo Scientific科技公司);PCR仪(Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肺成纤维细胞的分离培养 采用组织块培养法分离培养肺成纤维细胞,取正常SD大鼠肺组织,置于含有10×10^4 U/L的氨苄青霉素和100 mg/L硫酸链霉素的PBS中,反复漂洗3~5次,移至培养皿中去除脂肪和结缔组织,用眼科剪剪成1 mm^3左右组织块,用眼科镊将组织块在培养皿上均匀摆置,每小块间距5 mm左右,用含10%胎牛血清的DMEM、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素配制成DMEM完全培养基,每3天换液1次,形成细胞系后,取第3代细胞用于实验。

1.2.2 细胞缺氧 细胞以5×10^5/mL的密度传代培养,常规培养2 d后细胞约占培养瓶底部8%,将细胞分为常氧组和缺氧组(12、24、48 h),常氧组细胞置常规培养箱内(5% CO_2)培养,缺氧各组细胞置缺氧培养箱内培养(1% O_2,5% CO_2,94% N_2),在接种细胞后,依次将48、24、12 h组放入低氧培养箱中培养,未放入前均放于常氧培养箱中,常氧组则在常氧培养箱中培养48 h后统一取出测定各指标。

1.2.3 Western blot检测 细胞经Western及IP裂解液裂解后提取总蛋白,用Bradford测定蛋白浓度,变性后取40 μg经12% SDS-PAGE,转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,用小鼠抗大鼠GLUT-1单抗4 ℃孵育过夜,洗膜后加入辣根过氧化物标记的山羊抗小鼠二抗,室温孵育1 h,ECL显影,用凝胶成像分析系统进行扫描并记录光密度强度。缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)在常氧条件下很快会被降解,在缺氧条件能够稳定表达,以其作为急慢性缺氧的标志物。实验结束后,将各条带与同一膜上常氧组第一泳道上的条带进行比较形成相对灰度,以相对灰度值进行统计学分析。

1.2.4 PCR检测mRNA水平 使用RNAsimple总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA,然后用逆转录试剂盒将mRNA逆转录为cDNA,进行PCR扩增,PCR反应条件:95 ℃、30 s,95 ℃、5 s,60 ℃、25 s,72 ℃、25 s,72 ℃、3 min,40个循环,通过Ct值计算缺氧组GLUT-1

基因相对于常氧组的变化倍数。采用1.5 %的琼脂糖凝胶电泳检测各组 GLUT-1 mRNA 的表达。GLUT-1：上游引物5′-CGTCCATTCTCCGTTTCA-3′，下游引物5′-GCGGTGGTTCCATGTTTG-3′，208 bp；β-actin：上游引物 5′-GTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3′，下游引物 5′-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGAGGG-3′，245 bp。

1.2.5 免疫组织化学 将大鼠皮肤成纤维细胞培养于玻片上，4 % 多聚甲醛固定 20 min，PBS 漂洗 5 min×3 次，5 % 山羊血清室温封闭 1 h，加入小鼠抗大鼠 GLUT-1 抗体 4 ℃孵育过夜，PBS 漂洗 5 min×3 次，加入山羊抗小鼠 IgG，室温孵育 1 h 后 PBS 漂洗 5 min×3 次，DAB 显色，苏木精复染，中性树脂封片，显微镜下观察并拍照。

1.2.6 细胞培养上清中葡萄糖含量测定 细胞经低糖培养基培养后，进行缺氧处理，按照南京建成葡萄糖测定试剂盒（葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法，GOD-PAP 法）测定细胞培养上清葡萄糖含量。

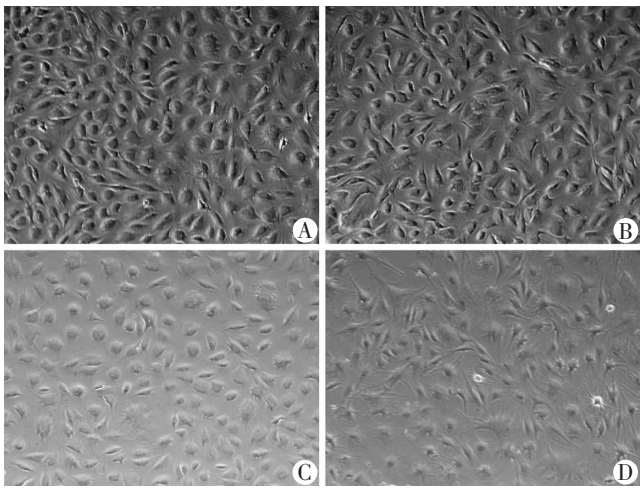
1.3 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析，组间比较采用非配对样本 t 检验。

2 结果

2.1 缺氧对肺成纤维细胞形态的影响

常氧与缺氧条件下培养的肺成纤维细胞在形态上有明显差别。光学显微镜下，常氧组细胞呈长梭形、放射状生长（图1A），缺氧组细胞体积较大，个别细胞由梭形变为圆形、三角形，且生长速度受到影响，缺氧24 h 组和缺氧48 h 组尤为显著（图1B～D）。

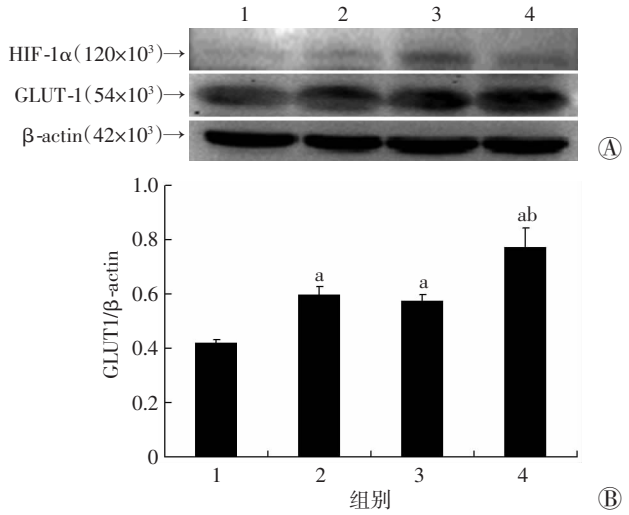


A：常氧组；B：缺氧 12 h 组；C：缺氧 24 h 组；D：缺氧 48 h 组

图1 缺氧对培养大鼠肺成纤维细胞形态的影响 （LM ×100）

2.2 肺成纤维细胞缺氧后 GLUT-1 的蛋白表达量升高

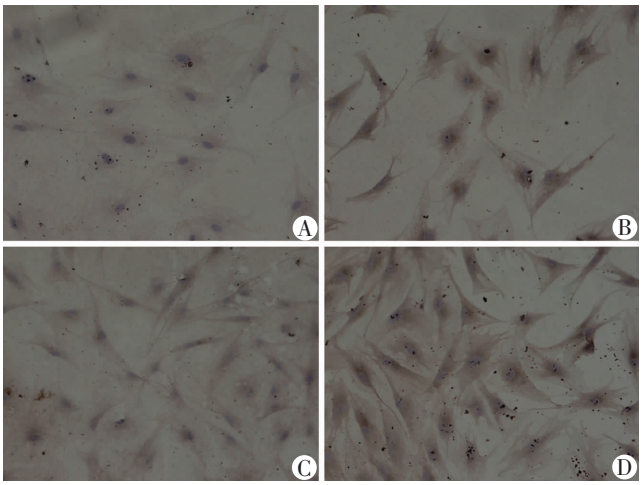
Western blot 检测结果显示（图2），GLUT-1 的蛋白表达随着缺氧时间的延长逐渐增加，缺氧 12、24 h 和48 h 组与常氧组相比较，差异均具有统计学意义（$P<0.05$），缺氧 24 h 组与缺氧 12 h 组差异无统计学意义（$P>0.05$），缺氧 48 h 组与缺氧 12 h 组、缺氧 24 h 组相比较，GLUT-1 表达显著升高（$P<0.05$）。免疫组织化学同样检测到 GLUT-1 表达具有时间依赖性升高趋势（图3）。



1：常氧组；2：缺氧 12 h 组；3：缺氧 24 h 组；4：缺氧 48 h 组

A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果 a：$P<0.05$，与常氧组比较；b：$P<0.05$，与缺氧 12、24 h 组比较

图2 Western blot 检测缺氧对肺成纤维细胞 GLUT-1 蛋白表达的影响



A：常氧组；B：缺氧 12 h 组；C：缺氧 24 h 组；D：缺氧 48 h 组

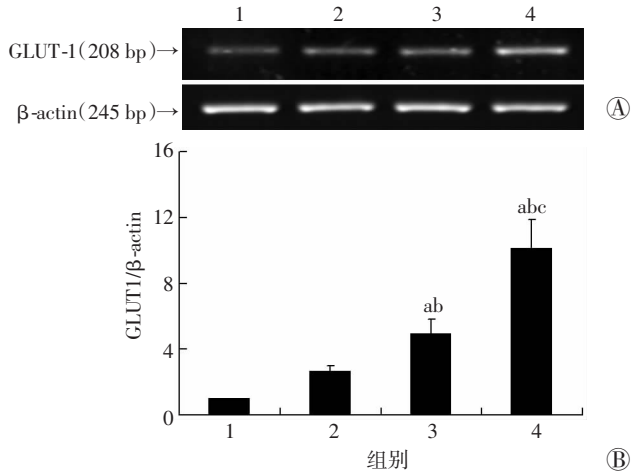
图3 免疫组织化学检测缺氧对肺成纤维细胞 GLUT-1 蛋白表达的影响 （S-P ×400）

2.3 肺成纤维细胞缺氧后GLUT-1 mRNA表达水平升高

通过RT-PCR及琼脂糖凝胶电泳结果显示，GLUT-1 mRNA表达水平随缺氧时间推移逐渐升高，缺氧12 h组与常氧组相比，差异无统计学意义（$P>0.05$），缺氧24、48 h组均显著高于常氧组（$P<0.05$），缺氧48 h组显著高于缺氧24 h组（$P<0.05$），见表1、图4。

表1 荧光定量PCR检测缺氧对肺成纤维细胞GLUT-1 mRNA表达的影响

缺氧时间（h）	GLUT-1 Ct	β-actin Ct	△Ct	△△Ct	$2^{-\triangle\triangle Ct}$
0	17.418 82	12.454 26	4.964 563	0	1
12	16.016 34	12.455 42	3.560 923	−1.403 64	2.645 683
24	16.892 58	14.220 42	2.672 157	−2.292 41	4.898 726
48	16.180 22	14.553 63	1.626 593	−3.337 97	10.111 81



1：常氧组；2：缺氧12 h组；3：缺氧24 h组；4：缺氧48 h组
A：RT-PCR检测结果；B：半定量分析结果 a：$P<0.05$，与常氧组比较；b：$P<0.05$，与缺氧12 h组比较；c：$P<0.05$，与缺氧24 h组比较

图4 RT-PCR检测缺氧对肺成纤维细胞GLUT-1 mRNA表达的影响

2.5 肺成纤维细胞缺氧后细胞培养上清中葡萄糖含量降低

各组加入DMEM低糖培养基（葡萄糖糖浓度5.5 mmol/L），经常氧或缺氧处理后，检测细胞培养上清葡萄糖含量发现，缺氧12 h（0.94 mmol/L）、24 h（0.34 mmol/L）和48 h（0.84 mmol/L）组较常氧组（1.63 mmol/L）上清中葡萄糖含量显著降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

3 讨论

葡萄糖的优先利用可以在产生相同分子数ATP时节约用氧，在缺氧习服过程中，围绕“氧/ATP”这一矛盾，机体进行复杂而有序的代谢调整，以适应缺氧环境[11-12]。本实验结果发现，缺氧12、24、48 h后，大鼠肺成纤维细胞培养上清中葡萄糖含量较常氧组显著降低（$P<0.05$），因葡萄糖上清含量是在离体下检测的，虽不足以反映成纤维细胞在体时葡萄糖摄取的情况，但是这一指标的变化间接反映了成纤维细胞葡萄糖摄取的能力。这一能力的增强对于缓解“氧/ATP”矛盾，增强成纤维细胞耐缺氧能力具有重要意义。虽然48 h显著高于24 h组上清含量，但这可能与细胞的凋亡或增殖有关（在缺氧48 h后，细胞在形态上和数量上都发生明显变化，图1）。

葡萄糖跨膜转运的过程十分复杂，GLUT-1是葡萄糖转运蛋白家族中最具代表性的成员之一，是组织细胞进行跨膜转运葡萄糖的重要载体[13]。本研究结果显示，当大鼠肺成纤维细胞缺氧12 h后，GLUT-1蛋白表达水平上调，缺氧48 h表达上调更为显著，与免疫组化结果一致。本实验进一步明确了，缺氧时GLUT-1 mRNA的水平随缺氧时间的延长持续升高。Bruckner等[14]研究也发现，脑组织缺氧20 min即可检测到GLUT-1 mRNA水平的升高。但缺氧组GLUT-1蛋白水平的变化先于其mRNA水平，提示这可能与成纤维细胞葡萄糖转运的储备能力有关。

肺血管外膜成纤维细胞增殖和细胞外基质成分堆积是慢性缺氧性肺动脉高压和血管重塑的重要血管病变。有研究证实，缺氧诱导的肺血管重塑需要募集单核/巨噬细胞[5]，纤维细胞[15]等血液中循环的间质祖细胞，而成纤维细胞[16]、成肌纤维母细胞[17]等均来源于间质祖细胞。这些细胞产生大量的细胞外基质沉积于血管周围，肺动脉外膜和中膜增厚，动脉管腔直径缩小，肺组织的生物活性和功能表型都发生适应性改变，是造成不可逆性肺血管重塑和持续性肺动脉高压的关键。GLUT-1蛋白在成纤维细胞中调控葡萄糖的转运，是能量供给的“关卡”，缺氧条件下，这些细胞的功能发挥依赖于细胞能量的供给，GLUT-1表达增加导致细胞对葡萄糖的消耗增多，有利于成纤维细胞在缺氧条件下对葡萄糖的利用，从而使得成纤维细胞仍能进行胶原等细胞外基质的合成。本研究发现，在缺氧条件下，肺成纤细胞中GLUT-1的蛋白和mRNA水平均表

达升高,培养上清中葡萄糖含量降低。这对于维持成纤维细胞缺氧条件下的能量代谢尤为重要,而成纤维细胞在缺氧肺动脉高压的形成中发挥重要作用。GLUT-1是HIF-1α下游的靶基因,受到HIF-1α的调控,但其具体的机制还不明确,有待进一步实验证明。

参考文献:

[1] Pugliese S C, Poth J M, Fini M A, *et al*. The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanisms to clinical phenotypes[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 308(3): L229 - L252.

[2] Zhang R, Shi L, Zhou L, *et al*. Transgelin as a therapeutic target to prevent hypoxic pulmonary hypertension[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 306(6): L574 - L583.

[3] Rowan S C, McLoughlin P. Hypoxic pulmonary hypertension: the paradigm is changing[J]. Exp Physiol, 2014, 99(6): 837 - 838.

[4] Fuchs B, Dietrich A, Gudermann T, *et al*. The role of classical transient receptor potential channels in the regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction[J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 661:187 - 200.

[5] Frid M G, Brunetti J A, Burke D L, *et al*. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage[J]. Am J Pathol, 2006, 168(2): 659 - 669.

[6] Luo Y, Dong H Y, Zhang B, *et al*. miR-29a-3p attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting pulmonary adventitial fibroblast activation[J]. Hypertension, 2015, 65(2): 414 - 420.

[7] Mogi A, Koga K, Aoki M, *et al*. Expression and role of GLUT-1, MCT-1, and MCT-4 in malignant pleural mesothelioma[J]. Virchows Arch, 2013, 462(1): 83 - 93.

[8] van-de-Nes J A, Griewank K G, Schmid K W, *et al*. Immunocytochemical analysis of glucose transporter protein-1 (GLUT-1) in typical, brain invasive, atypical and anaplastic meningioma[J]. Neuropathology, 2015, 35(1): 24 - 36.

[9] Mao Z P, Zhao L J, Zhou S H, *et al*. Expression and significance of glucose transporter-1, P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein and glutathione S-transferase-pi in laryngeal carcinoma[J]. Oncol Lett, 2015, 9(2): 806 - 810.

[10] Semaan A, Munkarah A R, Arabi H, *et al*. Expression of GLUT-1 in epithelial ovarian carcinom: correlation with tumor cell proliferation, angiogenesis, survival and ability to predict optimal cytoreduction[J]. Gynecol Oncol, 2011, 121(1):181 - 186.

[11] Ichiki T, Sunagawa K. Novel roles of hypoxia response system in glucose metabolism and obesity[J]. Trends Cardiovasc Med, 2014, 24(5): 197 - 201.

[12] Madonna R, Gorbe A, Ferdinandy P, *et al*. Glucose metabolism, hyperosmotic stress, and reprogramming of somatic cells[J]. Mol Biotechnol, 2013, 55(2): 169 - 178.

[13] Husain A N, Mirza M K, Gibbs A, *et al*. How useful is GLUT-1 in differentiating mesothelial hyperplasia and fibrosing pleuritis from epithelioid and sarcomatoid mesotheliomas? An international collaborative study[J]. Lung Cancer, 2014, 83(3): 324 - 328.

[14] Bruckner B A, Ammini C V, Otal M P, *et al*. Regulation of brain glucose transporters by glucose and oxygen deprivation[J]. Metabolism, 1999, 48(4): 422 - 431.

[15] Riddell M R, Winkler-Lowen B, Jiang Y, *et al*. Fibrocyte-like cells from intrauterine growth restriction placentas have a reduced ability to stimulate angiogenesis[J]. Am J Pathol, 2013, 183(3): 1025 - 1033.

[16] Iwakura T, Lee S Y, Miwa M, *et al*. Analysis of circulating mesenchymal progenitor cells in arterial and venous blood after fracture[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2013, 7(6): 501 - 504.

[17] Tigges U, Komatsu M, Stallcup W B. Adventitial pericyte progenitor/mesenchymal stem cells participate in the restenotic response to arterial injury[J]. J Vasc Res, 2013, 50(2): 134 - 144.

(**收稿**:2015-01-26;**修回**:2015-03-23)

(编辑 栾 嘉)