技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)11-1684-03

GOD-POD 法在 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗评价中的应用

朱晓云,王朋倩,韩 曼,刘喜明
(中国中医科学院广安门医院糖尿病研究室,北京 100053)

【摘 要】目的:通过葡萄糖氧化酶 - 过氧化物酶(Glucose oxidase - peroxidase,GOD-POD)法检测脂肪细胞葡萄糖消耗,建立简便、经济的脂肪细胞胰岛素敏感性的评价方法。方法:诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞,分别采用高浓度葡萄糖(25 mmol/L)、地塞米松(Dexamethasone,DEX)(1.0 μmol/L)诱导脂肪细胞产生胰岛素抵抗(Insulin resistance,IR),GOD-POD 法测定糖浓度,动态观察诱导过程中细胞糖消耗,并计算胰岛素敏感性指数(Insulin sensitivity index,ISI);同时应用 RT-PCR 检测脂联素(Adiponectin)mRNA 表达。结果:通过该方法检测,可以反映脂肪细胞对葡萄糖的摄取利用,以胰岛素刺激下较基础状态细胞葡萄糖消耗的增加量,计算出 ISI,能够反映细胞对胰岛素的敏感性及抵抗程度。结论:GOD-POD 法能够准确测定细胞总体葡萄糖消耗,可用于脂肪细胞糖摄取利用与 IR 评价,此方法操作简便、经济易行。

【关键词】葡萄糖氧化酶 - 过氧化物酶;胰岛素抵抗;3T3-L1;脂联素
【中国图书分类法分类号】R781.6+4 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-02-26

GOD-POD assay for evaluating insulin resistance of 3T3-L1 adipocytes

ZHU Xiao-yun, et al
(*Laboratory of Diabetes Guang'AnMen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences*)

【Abstract】*Objective*: To establish a simple and economical method for evaluating the insulin resistance of adipocyte with Glucose oxidase - peroxidase (GOD-POD) assay in vitro. *Methods*: 3T3-L1 cells were induced into mature adipocytes which were stimulated with glucose (25 mmol/L) and DEX (1.0 μmol/L) respectively to induce insulin resistance. Glucose concentration was measured with GOD-POD assay during the induction , the glucose consumption dynamic viewed and the insulin sensitivity index (ISI) calculated. And the mRNA expression of Adiponectin was tested by RT-PCR. *Results*: The glucose metabolism of adipocytes was detected with this method. The insulin sensitivity and resistance levels of adipocytes were reflected by ISI calculated by the increase of insulin-stimulated glucose consumption. *Conclusion*: Glucose consumption can be accurately detected with GOD-POD assay which proves to be a simple, easy and economical method to evaluate insulin resistance of adipocytes.

【Key words】GOD-POD; Insulin resistance; 3T3-L1; Adiponectin

脂肪组织不仅是人体的能量库,也是人体最大的内分泌器官,脂肪细胞是胰岛素抵抗(Insulin resisitance,IR)产生的根源,异位脂肪在非脂肪组织沉积导致非脂肪组织胰岛素抵抗。脂肪细胞作为体外研究胰岛素抵抗的重要模型,葡萄糖的消耗是判断脂肪细胞糖摄取利用能力及胰岛素敏感性的关键指标。体外实验检测葡萄糖糖的消耗多采用同位素标记的 ^{14}C 标记葡萄糖掺合试验、^{3}H 标记 2-DOG 的摄取试验、^{14}C 标记葡萄糖合成糖原试验[1-4]等,这些方法能反映糖代谢的动态变化过程,灵敏度较高;但存在放射线侵害,易污染环境,价格昂贵、需要特定的仪器场地等诸多缺点。临床上常使用葡萄糖氧化酶 - 过氧化物酶(Glucose oxidase - peroxidase,GOD-POD)法检测血液中糖浓度,该方法灵敏、准确,干扰因素少,并且简单快捷、费用低廉。因此,我们将 GOD-POD 法引入到脂肪细胞糖摄取实验中,旨在建立经济、安全、简便易行的评价脂肪细胞胰岛素敏感性的方法。

作者介绍:朱晓云(1978-),女,实习研究员,
研究方向:甲状腺疾病与糖尿病基础研究。
通讯作者:刘喜明,男,主任医师,E-mail:lxmhos@yahoo.com.cn。
基金项目:北京市自然科学基金(编号:7082082)。

1 材料方法

1.1 材料与试剂

3T3-L1 细胞株(中国医学科学院基础研究所);优级胎牛血清(杭州四季青);地塞米松(Dexamethasone,DEX)、胰岛素、3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤(IBMX),均购自 sigma 公司;低糖无酚红 DMEM、高糖 DMEM 培养基,均购自 gibco;葡萄糖临床检测试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司);全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物技术公司);Trizol(Invitrogen);Reverti-Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas);SYBR Green I Master Mix(Applied Biosystems);引物由北京赛百盛生物技术公司合成。

1.2 3T3-L1 前脂肪细胞的培养和诱导分化[5]

将 3T3-L1 细胞株，置于含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中，37℃、饱和湿度、5%CO_2 培养箱内培养。待细胞融合 2 d 后，加含 0.5 mmol/L 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤，1.0 μmol/L DEX，1 μg/ml 胰岛素，10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养 72 h，换以含 1 μg/ml 胰岛素的培养基再培养 48 h，随后以 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基继续培养，2 d 换培养液 1 次，诱导分化 10~14 d 的 3T3-L1 细胞，90%以上呈脂肪细胞表型可用于试验。

1.3 IR 细胞模型的建立[3,6]及分组

分化成熟的细胞采用高糖或 DEX 诱导胰岛素抵抗，按不同处理分为：正常对照组 Control（5.5 mmol/L 葡萄糖）、高糖组（25 mmol/L 葡萄糖）、DEX 组（葡萄糖为 5.5 mmol/L，DEX 为 1 μmol/L），每 24 h 换液 1 次，分别诱导 24、48、72、96 h。

1.4 GOD-POD 法测定葡萄糖消耗试验

各组吸弃培养液，PBS 洗 2 次，加入无血清含或不含 500 ng/ml 胰岛素的低糖 DMEM 溶液 300 μl，37℃继续培养 3 h。应用 GOD-POD 法测定上清中糖浓度，复孔检测，详细方法根据试剂盒说明书进行。以培养前后上清中葡萄糖浓度之差乘以反应体积除以反应时间计算脂肪细胞每小时葡萄糖消耗量。为了降低孔间细胞数量引起的误差，同时提取每孔总蛋白，采用 BCA 法测定每孔细胞的总蛋白量。用每毫克蛋白每小时葡萄糖消耗量[mmol/L/(mgpro·h)]来反映不同实验组葡萄糖消耗的情况。

1.5 胰岛素敏感性评价

通过胰岛素刺激状态下较基础状态细胞葡萄糖消耗的差值反映胰岛素敏感性，得出计算公式。胰岛素敏感性指数（Insulin sensitivity index，ISI）=(GIns -GBasic)X/(GIns-GBasic) CON × 100%，GIns：胰岛素刺激状态下葡萄糖消耗量，GBasic：基础状态葡萄糖消耗量，CON：正常对照组。

1.6 脂联素 mRNA 表达检测

应用 TRIzol 提取细胞总 RNA，紫外分光光度计检测总 RNA 的浓度。逆转录合成第一链，以此为模板进行扩增，肌动蛋白 β-actin 为参比基因。Adiponectin 引物序列：上游 5'-AAG GAC AAG GCC GTT CTC T-3'，下游 5'-TAT GGG TAG TTG CAG TCA GTT GG -3'，扩增长度 222 bp；β-actin 引物序列：上游 5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3'，下游 5'-AAT GTC ACG CAC GAT TTC CC-3'，扩增长度 264 bp。PCR 反应条件：95℃预变性 10 min，95℃变性 25 s，55℃复性 25 s，72℃延伸 50 s，40 个循环，为避免假阳性信号，使用熔解曲线来检查非特异性产物的构成。参照文献[7]使用比较法（△△CT）来计算基因的相对定量。

1.7 统计学处理

试验数据采用 SPSS11.5 统计软件分析，数据用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，应用一般线性模型（General linear model）的 Repeated measures 过程实现重复测量资料的方差分析，并用 Multivariate 过程实现组间比较，两两比较采用最小显著差法（LSD）。

2 结 果

2.1 GOD-POD 法测定基础状态葡萄糖消耗

高糖或 DEX 作用脂肪细胞后，均使细胞葡萄糖摄取利用不同程度降低，与对照组比较，25 mmol/L 高糖作用脂肪细胞 24~96 h，基础糖消耗均显著减少（$P<0.01$），与作用时间正相关；与对照组比较，1 μmol/L 的 DEX 作用脂肪细胞 96 h，基础糖消耗降低显著（$P<0.05$），DEX 作用 24~72 h，基础糖消耗有降低趋势，但差异不显著。见表 1。

2.2 胰岛素敏感性评价

2.2.1 胰岛素刺激状态下细胞糖消耗 由表 2 可见：①给予胰岛素刺激后，各组细胞葡萄糖消耗均较基础糖消耗增加。②与对照组比较，25 mmol/L 高糖诱导脂肪细胞 24~96 h，胰岛素刺激状态下，糖消耗减少 21.09%~61.01%，差异显著（$P<0.01$）。③1 μmol/L 的 DEX 诱导脂肪细胞，与对照组比较，胰岛素刺激状态下糖消耗减少，72、96 h 差异显著（$P<0.05$，$P<0.01$）。

2.2.2 胰岛素敏感性评价 由表 3 可见：高糖或 DEX 诱导，使脂肪细胞 ISI 降低，随着作用时间延长，IR 程度增加。与对照组比较，高糖作用 72、96 h，ISI 降低至 67.93%（$P<0.05$）、32.87%（$P<0.01$），差异显著。DEX 作用 96 h，IS 降低至 70.93%，差异显著（$P<0.01$）。

2.3 Adiponectin 基因 mRNA 表达检测结果

由表 4 可见：当高糖或 DEX 诱导细胞后，Adiponetic 基因 mRNA 表达降低，诱导 72 h 与 96 h 降低显著。

3 讨 论

IR 是代谢综合征、2 型糖尿病、心脑血管病等临床慢性重大疾病的共同发病基础。脂肪细胞是胰岛素作用的重要靶细胞，是能量代谢的关键部位，胰岛素抵抗时，脂肪细胞对糖摄取利用障碍，机体糖脂调节紊乱，能量代谢失衡。因此，对脂肪细胞 IR 发生机制及改善 IR 药物的研究日益为人们所重视。我们采用国内外广泛用于研究 IR 的 3T3-L1 细胞模

表 1 脂肪细胞基础状态下葡萄糖消耗[$\bar{x} \pm s$，10^{-4} mmol/L/(mgpro·h)]

分组	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	2.77 ± 0.44	3.21 ± 0.42	2.85 ± 0.32	2.93 ± 0.14
高糖组	1.72 ± 0.21#	1.92 ± 0.17#	2.01 ± 0.25#	1.36 ± 0.23#
DEX	2.61 ± 0.27	2.72 ± 0.11	2.45 ± 0.12	2.53 ± 0.08*

注：与对照组比较，*$P<0.05$，#$P<0.01$

表 2 脂肪细胞胰岛素刺激状态下葡萄糖消耗[$\bar{x}\pm s$, 10^{-4} mmol/L/mgpro·h]

分组	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	5.86 ± 0.27	6.46 ± 0.29	6.09 ± 0.17	6.37 ± 0.07
高糖组	4.62 ± 0.21#	4.41 ± 0.33#	4.21 ± 0.12#	2.49 ± 0.22#
DEX	5.41 ± 0.20	5.29 ± 0.32#	5.23 ± 0.43#	4.97 ± 0.22#

注:与对照组比较,#P<0.01

表 3 脂肪细胞胰岛素敏感性指数($\bar{x}\pm s$,%)

分组	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	100.43 ± 6.39	100.10 ± 4.23	100.44 ± 9.76	100.04 ± 2.42
高糖组	94.15 ± 6.85	76.72 ± 4.97#	67.93 ± 4.36*	32.87 ± 3.09#
DEX	90.69 ± 2.45	79.18 ± 7.21#	85.60 ± 17.03	70.93 ± 4.19#

注:与对照组比较,*P<0.05,#P<0.01

表 4 脂联素基因 mRNA 表达($\bar{x}\pm s$)

分组	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	1.00 ± 0.09	1.05 ± 0.14	1.22 ± 0.18	1.11 ± 0.21
高糖组	0.88 ± 0.12	0.76 ± 0.11	0.57 ± 0.09#	0.24 ± 0.06#
DEX	0.97 ± 0.18	0.94 ± 0.12	0.79 ± 0.04*	0.50 ± 0.08*

注:与对照组比较,*P<0.05,#P<0.01。

型,分别以高糖、DEX 诱导细胞产生胰岛素抵抗,通过 GOD-POD 法对诱导过程中细胞糖消耗能力进行动态研究,评价胰岛素敏感性。

GOD-POD 法经下列反应:β-D-葡萄糖 $+O_2+H_2O$ GOD H_2O_2+D-葡萄糖酸;H_2O_2 + 4-AAP + 酚 POD H_2O + 红色醌类化合物。产生的红色醌类化合物与样品中葡萄糖含量成正比,并可由吸光度(Optical density,OD)来量化。杨桂枝[8]等发现,该方法缩小反应体积后 OD 值仍与糖浓度成正比,并成功检测了 3T3-L1 和 HepG2 脂肪细胞培养后上清中葡萄糖浓度变化。也有学者[9,10]应用该方法评价脂肪细胞葡萄糖摄取,均直接检测含或不含胰岛素培养 24 h/48 h 后,培养液中糖浓度的改变,但是,培养液中往往含血清及药物等刺激因子,干扰因素多。此外,近期研究表明,长时间胰岛素刺激同样能使脂肪细胞产生 IR[11],因此,在评价胰岛素对细胞葡萄糖代谢作用时,不应给予胰岛素刺激太长时间。同时,葡萄糖进入脂肪细胞通过被动转运,其速率受溶液中糖浓度影响大,当观察不同浓度葡萄糖培养条件下细胞糖代谢能力时,直接检测培养液中糖浓度变化来计算糖消耗能力,会产生较大误差,不利于药物药效评价。在试验中,我们进行了两方面改进:①细胞培养后,去掉药物等刺激因子后,再检测细胞糖代谢能力及对胰岛素的敏感性;②各组均给予相同浓度的低糖 DMEM 作为检测糖消耗实验的反应液,避免了由于糖浓度不同而产生的误差。

实验中我们对糖消耗实验反应时间、体积进行优化,发现以 12 孔培养板为例,反应体积以 250~500 μl 适宜,反应时间 3~6 h,若体积过大、反应时间过短糖浓度变化不明显。同时摸索了胰岛素刺激时间,首先给予胰岛素刺激 1 h 后,撤去胰岛素,再加反应液 3 h,与同时给予 500 ng/ml 胰岛素培养 3 h,两者结果基本一致。成熟脂肪细胞贴壁能力弱,细胞内脂滴容易破裂,而后者实验步骤少,减少换液及 PBS 洗涤次数,降低了对脂肪细胞的损害。因此,我们最终采用同时给予 500 ng/ml 胰岛素培养 3 h,以含 5.5 mmol/L 糖的 DMEM 为反应液,检测胰岛素刺激状态下糖消耗量。

结果发现,高糖、DEX 均使脂肪细胞糖利用降低,并显著降低对胰岛素的敏感性,与文献[3,6]的结果相一致。脂联素作为脂肪细胞特异性分泌蛋白,具有拮抗 IR 的作用,在肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化等 IR 相关性疾病中,血浆脂联素水平均明显下降。通过对 mRNA 表达检测发现,高糖、DEX 均下调 3T3-L1 脂肪细胞脂联素基因的表达,进一步证明高糖、DEX 诱导脂肪细胞产生 IR。GOD-POD 法是临床检测血糖的常用方法,系普通试剂,与体外同位素标记法检测细胞糖消耗实验相比,虽不能反映糖代谢过程中的葡萄糖转运、氧化、糖原合成等具体步骤情况,但可以用于细胞总体糖消耗定量检测及评价胰岛素敏感性,并且具有价格便宜、操作简单快捷,可采用酶标仪、分光光度计等常规仪器,避免同位素对实验人员的放射线侵害,反应产物不需特殊处理,对环境无射线污染等诸多优点,值得运用和推广。

参 考 文 献

[1] Yin J, Gao Z H, Liu D, et al. Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 294(1): E148-E156.

[2] Claire Regazzetti, Pascal Peraldi, Thierry Gre'meaux, et al. Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes[J]. Diabetes, 2009, 58(1): 95-103.

[3] Anil Kumar K L, Marita A R. Troglitazone prevents and reverses dexamethasone induced insulin resistance on glycogen synthesis in 3T3 adipocytes[J]. British Journal of Pharmacology, 2000, 130(2): 351-358.

技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)11-1687-03

利用 T7 噬菌体展示技术构建人舌鳞癌细胞多肽文库

王景涛,季 平,邓 诚,伍明毅,刘 凯,孙守娟,邹 波
(重庆医科大学附属口腔医院口腔颌面外科,重庆 400015)

【摘 要】目的:本研究拟构建人舌鳞癌细胞株 Tca8113 的 T7 噬菌体展示多肽文库,为进一步筛选和鉴定与舌鳞癌相关的蛋白或多肽打下基础。方法:人舌癌细胞株 Tca8113,QiaGen 法提取细胞 mRNA,逆转录合成双链 cDNA 后与 T7Select 10-3 载体连接,体外包装并扩增得到 T7 噬菌体展示多肽文库。结果:构建了人舌鳞癌细胞株 Tca8113 的 T7 噬菌体展示多肽文库,原始文库重组滴度为鳞癌 1.7×10^6 pfu,扩增后滴度为 3×10^{10} pfu/mL。随机从文库中抽取 10 个克隆 PCR 扩增插入片断,电泳结果显示构建的文库中均有插入片段,文库插入率高达 100%。所构建的文库插入片断大小在(0.4~1.0)kbp 之间。结论:成功构建了人舌癌细胞株 Tca8113 的 T7 噬菌体展示多肽文库,为下一步筛选和鉴定与舌癌相关的蛋白或多肽奠定了基础。

【关键词】噬菌体展示;多肽库;人舌鳞癌;Tca8113
【中国图书分类法分类号】R322.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-04-28

Construction of a T7 phage display library of human tongue squamous carcinoma

WANG Jing-tao, et al
(*Department of Dentofacial Surgery, the Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construction human tongue squamous carcinoma T7 phage display peptides library from the cell of human tongue squamous carcinoma cell line Tca8113. *Methods*: mRNA was isolated from the cells of human tongue squamous carcinoma cell line Tca8113 with the methods of QiaGen, and then mRNA was reversely transcribed into double stranded cDNA. After digestion, the cDNA was inserted into T7 Select 10-3 vector. The phage display peptides library was constructed by package reaction in vitro and plate proliferation. Plaque assay and PCR were used to evaluate the library. *Results*: T7 phage display peptides library was established. Plaque assay showed the titer of the library was 1.7×10^6. The phage titer of the amplified library was 3×10^{10} pfu/mL. PCR amplification of random plaque showed insert ratio of 100% in the library. With insert range from 0.4 kbp to 1.0 kbp. *Conclusion*: The phage display peptides library from human tongue squamous carcinoma cell line Tca8113was constructed.

【Key words】 Phage display; Peptides library; Human tongue squamous carcinoma; Tca8113

作者介绍:王景涛(1983-),男,硕士,
研究方向:口腔颌面部肿瘤及其靶向治疗。
通讯作者:季 平,男,主任医师,教授,E-mail:jiping@cta.cq.cn。
基金项目:重庆市科委自然科学基金资助课题(编号:CSTC,2005DB 5241);重庆市卫生局科研基金资助课题计划(编号:2008-2-231,2008-2-232);重庆市卫生局科研基金资助课题(编号:052153)。

[4] Byoung-Seob Ko, Soo Bong Choi, Seong Kyu Park, et al. Insulin sensitizing and insulinotropic action of berberine from cortidis [J].Biol. Pharm. Bull,2005,28(8):1431-1437.
[5] Takahiro Horie, Koh Ono, Minako Kinoshita, et al. TG-inter-acting factor is required for the differentiation of preadipo-cytes[J]. Journal of Lipid Research,2008,49(6):1224-1234.
[6] Nelson B A,Robinson K A,Buse M G.High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes [J]. Diabetes, 2000,49:981-991.
[7] Livak K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-△△CT Method[J].Methods, 2001,25(4):402-408.
[8] 杨桂枝,高小平,晏菊芳,等. GOD-POD 法微量化测定方法的建立及其在 3T3-L1 脂肪细胞和 HepG2 细胞糖摄取中的应用[J]. 四川解剖学杂志,2003, 11(1):12-15.
[9] 王振基,刘 泉,邹晨辉,等. PPAR 双激动剂 GCP-02 对细胞葡萄糖利用、前脂肪细胞分化和细胞活力的影响[J].南京医科大学学报,2007,31(9):916-980.
[10] 郭晓农,杨具田,牛 峰,等.胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞模型的建立及鉴定[J].中药材,2008,31(2):258-261.
[11] Ge X M,Yu Q J,Qi Wei,et al. Chronic insulin treatment causes insulin resisitance in 3T3-L1 adipocytes through oxidative stress. Free Radical Research, 2008,42(6):582-591.

(责任编辑:关蕴良)