INS-1 细胞后,PLCζ 的表达量明显上调(图 4),其基因的表达量为 0.357 6±0.091 4(n=3),较刺激前 0.071 4±0.080 7(n=3)明显增加(P < 0.01)。

2.5 Western Blot 检测 INS-1 细胞中 PLCζ 蛋白的表达

40 mmol/L 葡萄糖刺激 INS-1 细胞 60 min,Western-blot 检测刺激前后 PLCζ 蛋白的表达(图5)。结果显示 2 组都出现预期大小的条带,而葡萄糖刺激后此条带较前者明显。

3 讨 论

PLC 作为磷脂酰肌醇信号传导途径中的关键酶,在细胞分裂、代谢、运动、分泌、内吞及趋化等生命活动中发挥重要的作用。至今在哺乳动物中,根据其不同的氨基酸序列分为 6 大类:PLCβ、PLCγ、PLCδ、PLCε 和新近发现的 PLCζ[2]及 PLCη[3]。先前 Sophia 等[1]提出 PLC 参与 GSIS 信号转导,使经典的 GSIS 通路得到补充。Sophia 等研究发现:当细胞内的钙离子浓度增加时,PLC 被激活,引起下游蛋白质磷酸化而诱发胰岛素的释放。

基础研究显示,INS-1 细胞胰岛素分泌阈、最大分泌强度和分泌曲线的趋势与人类胰岛 β 细胞相似,现广泛用于 GSIS 机制的研究,如 Pi J 等[6]以 INS-1 细胞为对象研究发现活性氧簇是 GSIS 信号转导途径中重要的调节因子。本实验亦以 INS-1 细胞为研究对象,设计 6 类 PLC 引物,RT-PCR 检测其在 INS-1 细胞中的表达。实验结果显示,6 类 PLC 中 PLCβ、PLCγ、PLCδ、PLCζ、PLCη 在 INS-1 细胞中有表达,PLCε 没有表达。在实验结果中 PLCζ 引起了本研究小组的关注,先前 Saunders CM 等提出 PLCζ 特异分布于哺乳动物的睾丸组织内,而本研究在国内首次报道 PLCζ 在 INS-1 细胞中有表达,该发现拓宽了 PLCζ 的分布范围,为本课题组进一步探讨 PLCζ 在信号转导途径中发挥何种作用提供了新线索。

INS-1 细胞内的钙离子浓度增加,激活 PLC,促进胰岛素释放;与此相似的是 Kurokawa 等[7]研究发现:细胞内的钙离子浓度增加,激活 PLCζ,开放钙离子通道,精子内钙离子浓度的改变,受精过程开始。且本课题组亦证明 PLCζ 在 INS-1 细胞中有表达,那么葡萄糖刺激 INS-1 细胞,引起细胞内增加的钙离子能否激活 PLCζ? 激活后的 PLCζ 是否参与GSIS 信息传导途径? 目前尚无研究证实。鉴于此,本实验首先绘制 INS-1 细胞在葡萄糖刺激下的胰岛素分泌曲线,确定葡萄糖刺激 INS-1 细胞胰岛素分泌量达最大的刺激条件。以最适葡萄糖浓度刺激 INS-1 细胞适当时间后,半定量 RT-PCR、Western Blot 检测 PLCζ 的表达上调,提示 PLCζ 有可能参与 GSIS 信息传导途径,但具体机制有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Thore S, Dyachok O, Gylfe E, et al. Feedback activation of phospholipase C via intracellular mobilization and store-operated influx of Ca^{2+} in insulin-secreting beta-cells[J]. J Cell Sci, 2005, 76(13): 4463-4471.

[2] Swann K, Saunders C M, Rogers N T, et al. PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca^{2+} oscillations and egg activation in mammals[J]. Semin Cell Dev Biol, 2006, 17(2): 264-273.

[3] Zhou Y, Wing M R, Sondek J, et al. Molecular cloning and characterization of PLC-eta2[J]. Biochem J, 2005, 391(3): 667-676.

[4] Saunders C M, Swann K. PLCzeta, a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization[J]. Biochem Soc Symp, 2007, (74): 23-36.

[5] Ito M, Shikano T, Kuroda K, et al. Relationship between nuclear sequestration of PLCzeta and termination of PLCzeta-induced Ca^{2+} oscillations in mouse eggs[J]. Cell Calcium, 2008, 20(9): 127-131.

[6] Pi J, Bai Y, Zhang Q, et al. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion[J]. Diabetes, 2007, 56(7): 1783-1791.

[7] Kurokawa M, Alfandari D. Proteolytic processing of phospholipase Czeta and $[Ca^{2+}]$ i oscillations during mammalian fertilization[J]. Development Biology, 2007, 312(1): 407-418.

(责任编辑:冉明会)

读者·编者·作者

标引关键词须知

标引关键词应针对文章的重点内容,请尽量使用最新版美国国立医学图书馆编辑的《Index Medicus》中的医学主题词表(MeSH)内所列的词汇。如果最新的 MeSH 中还无相应的词汇,处理办法有:①可选用直接相关的几个关键词组配。②如果无法组配,可选用最直接的上位关键词汇。关键词中的缩写应按 MeSH 还原为全称,如"HBsAg"应标引为乙型肝炎表面抗原。

本刊编辑部

2009 年 10 月