基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1305-04

PLCζ 在 INS-1 细胞中的表达及功能初步分析

周恒宇[1],邓华聪[1],吴 明[2],罗 娟[3]

(1.重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016;2.重庆市云阳县妇幼保健医院,重庆 400038;
3.重庆市地勘局二零五地质队医院,重庆 402160)

【摘 要】目的:探讨磷脂酶 Cζ(Phospholipase C ζ,PLCζ)在 INS-1 细胞中的表达,并初步分析 PLCζ 对葡萄糖刺激胰岛素分泌(Glucose-stimulated insulin secretion,GSIS)的影响。方法:(1)设计 6 类 PLC 的引物,RT-PCR 检测 INS-1 细胞中各类 PLC 的表达。(2)设定葡萄糖浓度梯度:10、20、40、80、100 mmol/L,分别刺激 INS-1 细胞 40 min,ELISA 检测细胞培养上清液中胰岛素的含量,确定最适葡萄糖刺激浓度,设定时间梯度:20、40、60、80、120 min,以最适葡萄糖浓度刺激后 ELISA 检测细胞培养上清液中胰岛素含量,确定最适刺激时间。(3)用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 的表达变化。结果:(1)6 类 PLC 中 PLCβ、PLCγ、PLCδ、PLCζ、PLCη 在 INS-1 细胞中表达,PLCε 不表达。(2)用 40 mmol/L 葡萄糖刺激 60 min,INS-1 细胞的胰岛素分泌量最大,半定量 RT-PCR、Western Blot 检测葡萄糖刺激 INS-1 细胞后 PLCζ 的表达上调。结论:(1)先前发现在精子中特异表达的 PLCζ 在 INS-1 细胞中有表达。(2)葡萄糖刺激 INS-1 细胞后 PLCζ 的表达明显增加,提示 PLCζ 可能参与 GSIS 信号转导。

【关键词】磷脂酶 cζ;表达;RT-PCR;葡萄糖刺激胰岛素分泌

【中国图书分类法分类号】R587 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-01-15

The primary study on expression and function of PLCζ in INS-1 cell lines

ZHOU Heng-Yu, et al

(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of PLCζ in INS-1, and the role of PLCζ in glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). *Methods*: (1)The six primers of PLC isoforms were designed. The template of INS-1's RNA was collected, RT-PCR was used to analyse the expression of PLC isoforms. (2)The glucose concentration were set at: 10,20,40,80,100 mmol/L, and stimulated INS-1 respectively. The content of insulin in INS-1's supernatant liquid was detected. The time groups were set as: 20,40,60,80,120 min. The content of insulin in INS-1's supernatant liquid was detected. (3)After the stimulus of glucose, RT-PCR and Western Blot were used to detect the expression of PLCζ. *Results*: (1) PLCβ, PLCγ, PLCδ, PLCζ, PLCη were expressed in INS-1. (2) Exposure of INS-1 to 40mM glucose for 60 min, the content of insulin secretion reached the maximum and RT-PCR and Western Blot detected that the expression of PLCζ was raised. *Conclusion*: (1)PLCζ was expressed in INS-1. (2)Under the stimulation of glucose, the PLCζ's expression was augmented, so PLCζ was probably participated in the signal transduction pathway of GSIS in INS-1.

【Key words】PLCζ; Expression; RT-PCR; Glucose-stimulated insulin secretion

磷脂酶 C(Phospholipase C,PLC)是磷脂酰肌醇信号通路的关键酶,许多细胞外信息分子,如激素、神经递质、免疫球蛋白、细胞因子、生长因子等都可以激活 PLC。Sophia[1]等研究证实 PLC 参与葡萄糖刺激胰岛素分泌(Glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)信号转导途径。

至今已鉴定出 6 类 PLC:PLCβ、PLCγ、PLCδ、PLCε 和新近发现的 PLCζ[2]及 PLCη[3]。各类 PLC 具有特异性分布和独特生理作用。除 PLCζ 外,其余各类 PLC 分布较广泛如:PLCβ 在肝脏、心脏、脑组织、脾脏等组织中有表达。Saunders CM 等[4]指出 PLCζ 特异性分布于精子细胞中,Ito M 等[5]研究发现激活后的 PLCζ 在顶体反应中引起精子内钙离子振荡,完成受精。

作者介绍:周恒宇(1982-),女,硕士,研究方向:胰岛素分泌机制。

通讯作者:邓华聪,女,教授,E-mail:Deng huacong@yahoo.com。

基金项目:国家自然科学基金(30700384);重庆市自然科学基金资助项目(2006BB5098)。

INS-1 细胞属体外培养的大鼠胰岛素瘤细胞系,因其分泌阈、最大分泌强度和分泌曲线的趋势与人类的胰岛 β 细胞相似,所以广泛用于 GSIS 机制的研究。目前,对于 PLCζ 是否在 INS-1 细胞中表达,以及是否在 GSIS 中发挥作用均缺乏证据。鉴于此,本研究利用半定量 RT-PCR 检测 PLCζ 是否在 INS-1 细胞中表达、PLCζ 在适量葡萄糖刺激后的表达变化,以期为下一步深入探讨 PLCζ 在 GSIS 信息传导途径中发挥的作用提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

INS-1 细胞购自武汉大学,RPIM1640 培养基及胎牛血清购自 Gibco 公司,TRIZOL 购自 Invitrogen 公司,AMV 酶购自 TaKaRa 公司,Taq 酶购自 Invitrogen,RPMI-1640 培养液及胎牛血清购自 Gibco 公司,大鼠胰岛素 ELISA 试剂盒为 R&D 公司产品,鼠抗 PLCζ 为 BD 公司产品,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中杉公司,ECL 化学发光试剂为 Pierce 公司产品。

1.2 INS-1 细胞的培养

INS-1 细胞培养于 RPMI1640 培养基中,加入 10 %胎牛血清、5.6 mmol/L 葡萄糖、10 mmol/L HEPES、50 μmol/L β_2 巯基乙醇、1 mmol/L 丙酮酸钠、100 U /L 青霉素、100 mg/L 链霉素,置于 5 % CO_2 的 37℃孵箱中培养,每 3 d 换液 1 次,每周按 1:3 传代。

1.3 RT-PCR

1.3.1 提取 RNA 收集 处于对数生长期的 INS-1 细胞,按常规步骤提取 RNA,用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳分析并证实其完整性,紫外分光光度仪测其吸光度值和浓度。

1.3.2 逆转录 向灭 RNA 酶的 PCR 管中加入 OligdT18 6 μl,根据 RNA 浓度计算所加 RNA 的体积,总 RNA 的投入量为 2 μg。置于 70℃ 10 min,0℃ 10 min 后再向 PCR 管中加入 5 × RT buffer 4 μl、RNA 酶抑制剂 1 μl、AMV 1 μl、dNTP 2 μl,置于 42℃ 1 h 后 94℃ 5 min 将酶灭活。逆转录产物 -20℃保存,取 1 μl 产物用于 PCR 反应。

1.3.3 PCR PCR 反应条件为 94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,共 35 个循环。PCR 扩增产物以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行鉴定,通过 PCR 扩增片断条带位置与 Marker 进行比较,判断扩增片断的大小(表 1)。

1.4 设计葡萄糖刺激 INS-1 细胞的浓度梯度和时间梯度

设定葡萄糖浓度梯度为 10、20、40、80、100 mmol/L,分别刺激 INS-1 细胞 40 min,收集细胞培养上清液;设定时间梯度为 20、40、60、80、120 min,收集细胞培养上清液。

1.5 胰岛素含量的检测

采用大鼠胰岛素 ELISA 试剂盒检测细胞培养上清液中胰岛素的含量,在波长 450 nm 读取光密度(D)值,以 D 值为纵坐标,分别以相应的葡萄糖刺激浓度、葡萄糖刺激时间为横坐标,绘制 INS-1 细胞胰岛素分泌曲线。

1.6 半定量 RT-PCR

以最适葡萄糖浓度刺激 INS-1 细胞适当时间后,收集 INS-1 细胞,提取 RNA,反转录;以不含葡萄糖的 RPMI 1640 培养液刺激 INS-1 细胞相同时间后收集 INS-1 细胞,提取 RNA,反转录,作为对照。PLCζ 的半定量引物见表 1,PCR 反应条件为 94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 1 min,共 35 个循环。PCR 扩增产物以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.7 统计学分析

利用 Bio-Rad 凝胶成像扫描分析系统,分别计算目的条带的峰度值(Volume, INT* mm^2),以 GAPDH 为标准进行校正,以其均数代表该样本的表达强度,反映目的基因 mRNA 的表达水平,t 检验进行统计学分析。

1.8 PLCζ 蛋白的 Western blot 分析

将 INS-1 细胞接种于 24 孔板中,60 μl 1 × SDS/ 孔裂解

表 1 RT-PCR 的引物设计

引物名称	引物序列	产物大小(bp)
PLC β	F:5'- TCCTCCCACAACACCTATCT -3' R:5'- CAAAGGAGAGGATGACAGGG -3'	229
PLC γ	F:5'- AACACGTACCTCACTGGGGA -3' R:5'- CTGCAGTGCTCCTCGATAGA -3'	280
PLC δ	F:5'- CAAGATGAGCTTCAAGGAAGGT -3' R:5'- AGGTACATGAGGAAGCCATC -3'	343
PLC ε	F:5'- GCGGTCCACGTTGTTAGTC -3' R:5'- TTTGGAGGGTAGCACGGAAT -3'	415
PLC ζ	F:5'- CAAGTATGCCTTTGTGACAT -3' R:5'- TCTGGAGACGGTAGTGTAT -3'	165
PLC η	F:5'- GAGGGCAGGCAGTCTGAAAT -3' R:5'- GACCAATGGCTGAAGCAGAC -3'	211

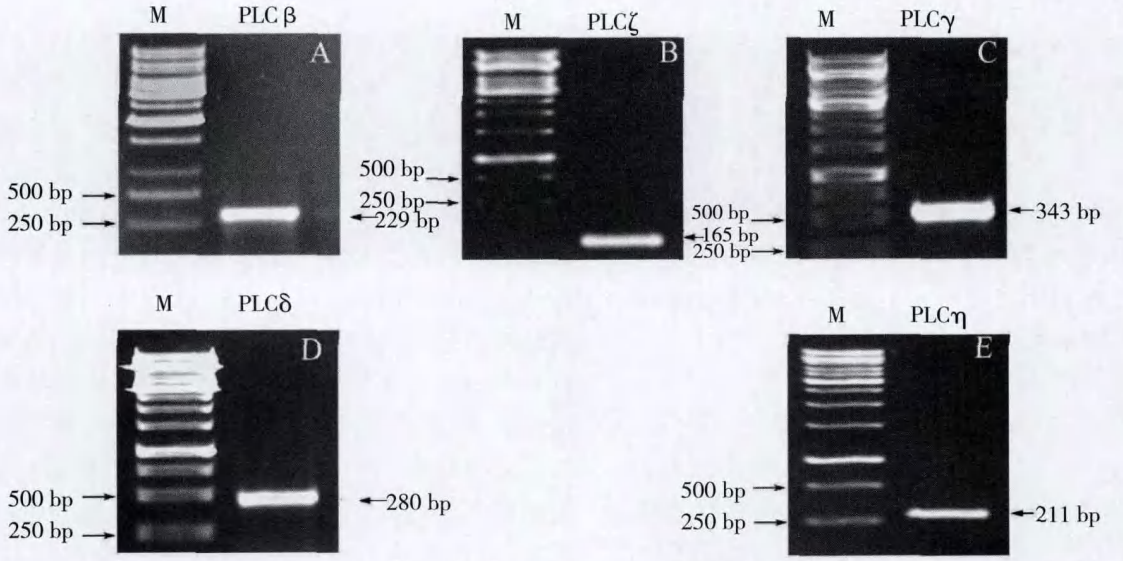
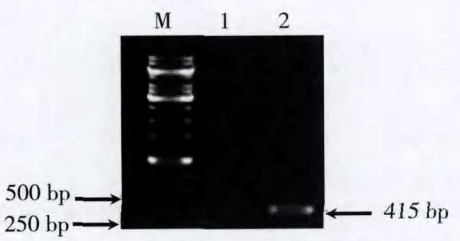
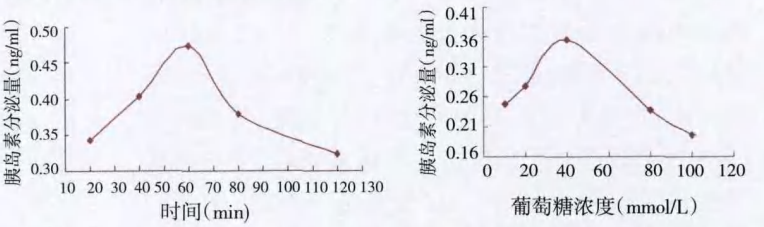


图 1　5 类 PLC 在 INS-1 细胞中的表达



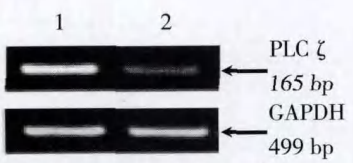
1. INS-1 细胞；2. 阳性对照（大鼠脑组织）；M. Marker

图 2　PLCε 在 INS-1 细胞中无表达



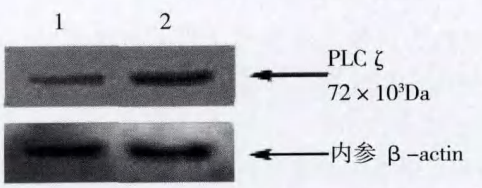
A.不同浓度葡萄糖刺激 INS-1 细胞胰岛素分泌曲线；B.不同葡萄糖刺激时间 INS-1 细胞胰岛素分泌曲线

图 3　INS-1 细胞胰岛素分泌曲线



1. 葡萄糖刺激 INS-1 细胞后；2. 对照组；M. Marker

图 4　RT-PCR 检测 PLCζ 在 INS-1 细胞中的表达



1. 葡萄糖刺激前；2. 葡萄糖刺激后

图 5　Western-blot 检测 PLCζ 蛋白的表达

细胞，提取蛋白，10%SDS-PAGE 电泳，转印至硝酸纤维素膜（NC 膜）上，5%脱脂牛奶液封闭，分别用稀释 1 000 倍的兔抗鼠 PLC ζ 一抗和稀释 2 000 倍 HRP 标记的羊抗兔二抗孵育，chemiluminescent substrate 试剂盒显色。

2　结　果

2.1　INS-1 细胞生长情况

细胞贴壁生长，形状不规则，由胞体向外伸出触角，生长 2~3 d 后，细胞融合成细胞岛。

2.2　各类 PLC 在 INS-1 细胞中的表达

RT-PCR 检测 6 类 PLC 在 INS-1 细胞中的表达，结果显示 6 类 PLC 中 PLCβ、PLCγ、PLCδ、PLCζ、PLCη 在 INS-1 细胞中有表达（图 1），PLCε 没有表达（图 2）。

2.3　绘制葡萄糖刺激 INS-1 细胞胰岛素分泌曲线

设定葡萄糖刺激的浓度梯度和时间梯度，刺激 INS-1 细胞，收集细胞培养上清液，ELISA 检测胰岛素含量，描绘 INS-1 细胞胰岛素分泌曲线（图 3）。如图所示：40 mmol/L 葡萄糖刺激 INS-1 细胞 60 min，胰岛素分泌量达最大。

2.4　半定量 RT-PCR 检测 INS-1 细胞中 PLCζ 蛋白的表达

提取葡萄糖刺激前后 INS-1 细胞的 RNA，以反转录产物为模板，RT-PCR 检测葡萄糖刺激前后 PLCζ 的表达变化。实验结果显示，适量葡萄糖刺激

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