

[文章编号] 1000-1182(2011)04-0348-03

糖尿病大鼠下颌骨成骨细胞葡萄糖转运蛋白-1 及胰岛素受体 $\alpha 1$ 的表达

吴璇¹ 刘洪臣² 鄂玲玲² 李振春¹

(1.大连市口腔医院 口腔修复科, 大连 116021; 2.解放军总医院 口腔医学研究所, 北京 100853)

[摘要] 目的 检测糖尿病大鼠下颌骨成骨细胞中葡萄糖转运蛋白(GLUT)-1、胰岛素受体(IR) $\alpha 1$ 的表达, 探讨其对成骨细胞分化功能障碍的影响。方法 采用逆转录聚合酶链反应、蛋白质印迹分析、免疫组织化学染色观测糖尿病大鼠下颌骨成骨细胞及对照组细胞中GLUT-1、IR $\alpha 1$ 的表达。结果 糖尿病组GLUT-1及IR $\alpha 1$ 的mRNA表达均高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。2组细胞中GLUT-1、IR $\alpha 1$ 的蛋白表达与其mRNA表达相似。结论 糖尿病大鼠下颌骨成骨细胞保留了对供体来源的高糖、低胰岛素环境作出的适应性变化, 这可能是造成其分化功能障碍的原因之一。

[关键词] 糖尿病; 下颌骨; 成骨细胞; 葡萄糖转运蛋白; 胰岛素受体

[中图分类号] Q 51 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.04.003

Expression of glucose transporter-1 and insulin receptor $\alpha 1$ in osteoblast obtained from diabetic rats' mandibles Wu Xuan¹, Liu Hongchen², E Lingling², Li Zhenchun¹. (1. Dept. of Prosthodontics, Stomatology Hospital of Dalian City, Dalian 116021, China; 2. Stomatology Institute, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression of glucose transporter(GLUT)-1 and insulin receptor(IR) $\alpha 1$ in osteoblast obtained from diabetic rats' mandibles. **Methods** The expression of GLUT-1 and IR $\alpha 1$ of diabetic and control groups were measured by reverse transcription polymerase chain reaction, Western blot and immunohistochemistry stain. **Results** The mRNA expressions of GLUT-1 and IR $\alpha 1$ of diabetic group were significantly higher than control group($P < 0.05$). The protein expressions of GLUT-1 and IR $\alpha 1$ were similar to the mRNA expressions. **Conclusion** Osteoblasts obtained from diabetic rats' mandibles keep the adaptation changes to hyperglycemia and hypoinsulinemia, which may contribute to their dysfunction.

[Key words] diabetes mellitus; mandible; osteoblast; glucose transporter; insulin receptor

糖尿病患者常并发牙周炎、全身骨质疏松, 而引起颌骨丧失, 影响牙齿存留及义齿修复成功率^[1]。糖尿病患者的骨整合形成率低, 种植体周围骨形成障碍是其主要原因^[2]。目前的体外实验中多采用高浓度的葡萄糖干预非糖尿病供体来源的成骨细胞(系)模拟糖尿病状态下成骨细胞的生物学行为^[3], 但这仅反映了高糖对成骨细胞的影响。本课题的前期研究显示: 四氧嘧啶糖尿病大鼠下颌骨来源的成骨细胞在传代培养后仍然出现了分化功能障碍, 表现为增殖加快, 增殖期延长, 基质形成、成熟及矿化能力下降^[4]。高糖、低胰岛素环境可能是引起成骨细胞功能下降的主要原因^[5]。葡萄糖进入成骨细胞属于易

化扩散, 需要葡萄糖转运蛋白(glucose transporter, GLUT)的参与, GLUT-1存在于包括成骨细胞在内的所有组织中^[6]。成骨细胞表面广泛存在着胰岛素受体(insulin receptor, IR)^[7], 胰岛素通过IR直接影响成骨细胞的活性。糖尿病大鼠下颌骨培养的成骨细胞是否会保持对来源供体的高糖、低胰岛素环境作出的适应性反应, 从而导致分化功能障碍, 目前尚不清楚。本实验从基因和蛋白质水平对GLUT-1和IR亚单位在体外培养糖尿病大鼠成骨细胞上的表达进行研究, 并初步探讨其可能对成骨细胞分化功能障碍造成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 6~8周龄SD大鼠16只, 清洁级, 雌雄各半, 体重200~250 g。将16只大鼠随机分为糖尿病组

[收稿日期] 2010-08-18; [修回日期] 2010-12-01

[作者简介] 吴璇(1978—), 女, 湖南人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 刘洪臣, Tel: 010-66939974

(10只)和对照组(6只),空腹24 h后,糖尿病组大鼠以每公斤体重200 mg经腹腔注射四氧嘧啶,对照组以每公斤体重100 mL注射生理盐水。72 h后,用血糖仪测尾血血糖,以任意血糖大于等于16.7 mmol·L⁻¹、空腹血糖大于等于7.8 mmol·L⁻¹或尿糖阳性视为四氧嘧啶糖尿病大鼠建模成功,排除未达到上述指标者。于建模成功后10 d处死动物,取材双侧下颌骨。原代培养得到糖尿病组及对照组大鼠下颌骨成骨细胞,方法详见参考文献[4]。原代培养10~21 d后可进行第一次传代,首次传代得到的细胞作为P1代,用含糖量5.5 mmol·L⁻¹的培养基进行传代培养并纯化,实验用的细胞为P5代细胞。每组实验重复6次。

1.1.2 主要试剂和药品 低糖DMEM培养基(Gibco公司,美国),Triton X-100(Sigma公司,美国),兔抗大鼠GLUT-1(Santa Cruz公司,美国),兔抗大鼠IR α1、即用型SABC试剂盒、DAB显色剂、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),BCA定量试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),预染蛋白质相对分子质量标准(北京天根生化科技有限公司),ECL化学发光试剂盒(北京普利来基因技术公司)。

1.1.3 仪器设备 IM-50图像采集系统(Leica公司,德国),centrifuge 5415D小型离心机、centrifuge 5810R低温高速离心机(Eppendorf公司,德国),DU-640紫外分光光度计(Beckman公司,美国),EPS-300电泳仪、转移电泳槽、水平/垂直凝胶电泳槽(上海天能科技有限公司),超低温冰箱(Thermo Forma公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 逆转录聚合酶链反应 逆转录聚合酶链(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)提取2组细胞RNA并定量,取等量的RNA反转录后进行PCR检测。GLUT-1、IR α1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, G-APDH)的引物序列、大小及退火温度见表1。

表1 GLUT-1、IR α1、GAPDH的引物序列、大小及退火温度

Tab 1 Primers, size and melting temperature of GLUT-1, IR α1 and GAPDH

基因	引物序列	大小/bp	退火温度/℃
GLUT-1	F 5'-TGTCTGCCGTGCTTATGG-3'	409	54.5
	R 5'-AGGTCTCGGGTCACATCG-3'		
IR α1	F 5'-GCTCCTATGCTCTGCTGTC-3'	116	52.3
	R 5'-CTGCCTCAGTTCTGCTT-3'		
GAPDH	F 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAG-3'	439	58
	R 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'		

1.2.2 蛋白质印迹分析 提取2组细胞蛋白质并定量,加入5×SDS上样缓冲液,100 ℃加热5 min,使蛋白质变性。经SDS-PAGE凝胶电泳后,转移,分别加入兔抗大鼠GLUT-1(1:2 000稀释)及IR α1(1:500稀释)孵育,洗膜,经辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(1:4 000稀释)再次孵育后,化学发光法显示抗原抗体复合物,X线片显影并定影,同一张膜洗脱后,用1:2 000稀释的兔抗鼠β-肌动蛋白一抗孵育,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(1:4 000稀释)重新杂膜,洗片显带。

1.2.3 免疫组织化学染色及染色强度判断 制作细胞爬片,将对照组和糖尿病组第5代细胞以每毫升2×10⁴个接种到玻片上,培养5 d后固定细胞,按照试剂盒说明行免疫组织化学染色。染色强度的判断标准如下。1)阴性:细胞核或胞质中无着色;2)弱阳性:细胞核或胞质中出现浅黄色染色颗粒;3)阳性:细胞核或胞质中出现棕黄色染色颗粒;4)强阳性:细胞核或胞质中出现深棕色染色颗粒。

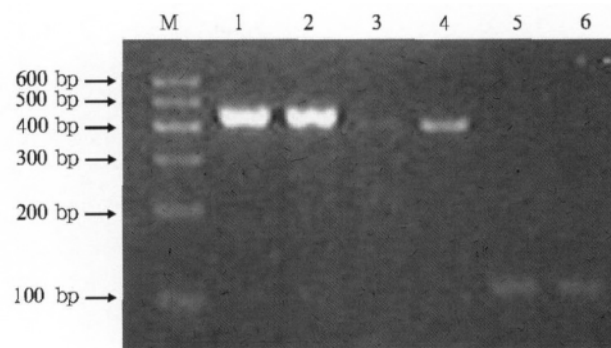
1.3 统计分析

采用SPSS 11.0软件进行统计分析,2组间比较使用单因素方差分析,以P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 GLUT-1、IR α1的mRNA及其蛋白表达

RT-PCR检测2组细胞中GLUT-1、IR α1的表达见图1。糖尿病组GLUT-1 mRNA的表达约为对照组的2.66倍,差异具有统计学意义(P<0.01);IR α1 mRNA的表达约为对照组的1.21倍,差异亦具有统计学意义(P<0.05)。2组细胞中GLUT-1、IR α1的蛋白表达与其mRNA表达相似(图2)。



M: Marker; 1、3、5: 对照组的GAPDH、GLUT-1、IR α1; 2、4、6: 糖尿病组的GAPDH、GLUT-1、IR α1。

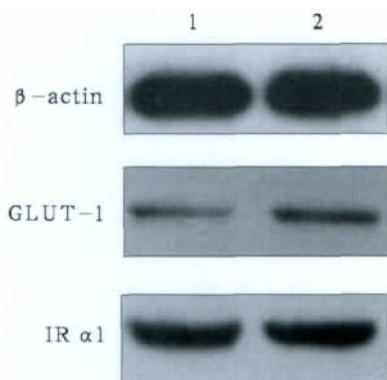
图1 RT-PCR检测2组细胞中GLUT-1、IR α1的表达

Fig 1 The expressions of GLUT-1, IR α1 of two groups by RT-PCR

2.2 GLUT-1、IR α1免疫组织化学染色

2组细胞GLUT-1、IR α1的免疫组织化学染色见图3。从图3可见,对照组GLUT-1表达弱阳性,IR α1

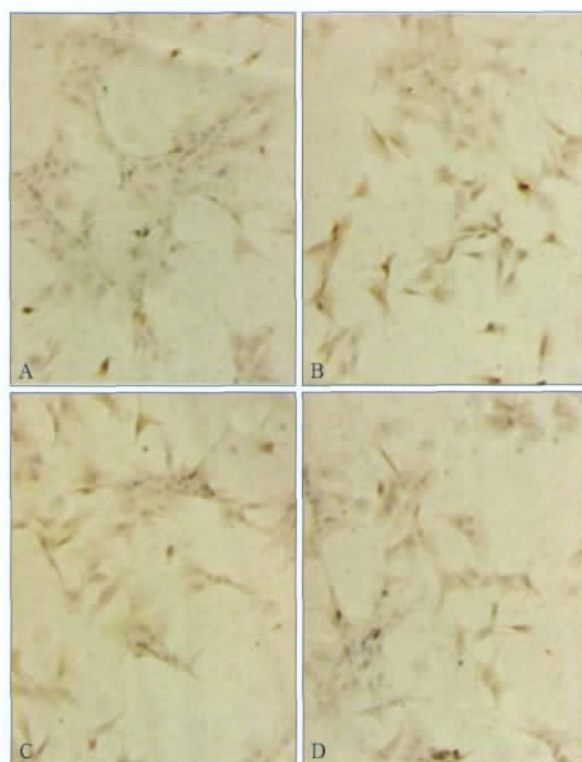
表达阳性；糖尿病组GLUT-1表达强阳性，IR $\alpha 1$ 表达阳性。



1: 对照组; 2: 糖尿病组。

图2 蛋白质印迹检测2组细胞中GLUT-1、IR $\alpha 1$ 的表达

Fig 2 The expressions of GLUT-1, IR $\alpha 1$ of two groups by Western blot



A: 对照组GLUT-1; B: 糖尿病组GLUT-1; C: 对照组IR $\alpha 1$;

D: 糖尿病组IR $\alpha 1$ 。

图3 2组细胞中GLUT-1、IR $\alpha 1$ 的表达 免疫组织化学染色 $\times 100$

Fig 3 The expressions of GLUT-1, IR $\alpha 1$ of two groups immunohistochemistry $\times 100$

3 讨论

3.1 GLUT-1在成骨细胞的表达及其意义

葡萄糖从胞外进入成骨细胞需要GLUT作为中介，哺乳动物中已发现的GLUT有14种，在成骨细胞中检测到的GLUT主要是GLUT-1。本研究发现四氧嘧啶糖尿病大鼠下颌骨来源成骨细胞GLUT-1的表达增强，这说明该成骨细胞保持了对供体来源高糖环境的记

忆，胞内葡萄糖的摄取增加。葡萄糖摄取实验同样证明了该点^[8]。葡萄糖摄取是维持细胞新陈代谢所必需，但是过量地摄取可能会对细胞的功能产生许多不良影响。GLUT表达增强是许多糖尿病并发症如肾病、视网膜病变、皮肤病等的发病机制。Fang等^[3]发现用含糖量 $25.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预的胎鼠颅盖骨成骨细胞GLUT-1的表达上调，同时细胞的矿化能力下降。另外，有研究^[9]显示骨肿瘤细胞GLUT的上调与细胞的增殖成正相关，推测糖尿病大鼠成骨细胞GLUT-1的表达上调也可能是其增殖加快的原因之一。因此，GLUT-1的上调可能参与了糖尿病大鼠成骨细胞的分化功能障碍。

3.2 IR在成骨细胞的表达及其意义

胰岛素对成骨细胞的生物作用是通过与细胞膜上的特异受体结合而启动的。IR仅可与胰岛素或含有胰岛素分子的胰岛素原结合，具有高度的特异性，是一种四聚体糖蛋白，由2个 α 亚基和2个 β 亚基通过二硫键连接。 α 亚基穿过细胞膜，一端暴露在细胞膜表面，其上有胰岛素的结合位点； β 亚基由细胞膜向细胞质延伸，是胰岛素引发细胞膜与细胞内效应的功能单位，起信号转导作用。当胰岛素与受体的 α 亚基结合并改变了 β 亚基的构型后，酪氨酸蛋白激酶才被激活。胰岛素与靶细胞膜表面的受体结合后，目前已知细胞内信号转导的主要途径可分为两大类：1)激活胰岛素受体底物家族磷酸化和磷酸酰肌醇-3激酶，这条途径主要为胰岛素在其靶细胞(肝、骨骼肌和脂肪细胞)中发挥代谢作用所必需，也具有促核分裂作用；2)磷酸化Shc蛋白，激活丝裂原激活蛋白激酶信号通路，其主要影响细胞的有丝分裂和生长。IR数目受血中胰岛素浓度和血糖浓度的调节，当胰岛素浓度和血糖浓度增高时往往IR数下降，称为下降调节，临床上表现为胰岛素抵抗，常见于2型糖尿病患者。1型糖尿病患者的胰岛素分泌绝对不足，胰岛素浓度下降，使IR数上调，但同时出现的高血糖又使IR数下调；另外，胰岛素与受体结合的程度还与受体的亲和力有关，因此有关1型糖尿病患者是否会出现胰岛素抵抗还未有定论。本研究发现四氧嘧啶糖尿病大鼠下颌骨来源成骨细胞的IR数目上调，这个结果提示该成骨细胞对胰岛素的敏感性不会因为受体数目而出现下降。

本研究中糖尿病组成骨细胞GLUT-1、IR $\alpha 1$ 的表达均上调，说明成骨细胞对来源的高糖、低胰岛素环境作出了适应性反应，GLUT-1表达上调可能参与了糖尿病大鼠成骨细胞的分化功能障碍。

(下转第354页)

- cer[J]. J Clin Gastroenterol, 2000, 31(3) :217-221.
- [3] Krajden S, Fuksa M, Anderson J, et al. Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*[J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(6) :1397-1398.
- [4] Madinier IM, Fosse TM, Monteil RA. Oral carriage of *Helicobacter pylori* : A review[J]. J Periodontol, 1997, 68(1) :2-6.
- [5] Jiang C, Li C, Ha T, et al. Identification of *H.pylori* in saliva by a nested PCR assay derived from a newly cloned DNA probe [J]. Dig Dis Sci, 1998, 43(6) :1211-1218.
- [6] Tiwari SK, Khan AA, Ahmed KS, et al. Rapid diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients using salivary secretion : A non-invasive approach[J]. Singapore Med J, 2005, 46(5) :224-228.
- [7] Li C, Ha T, Ferguson DA Jr, et al. A newly developed PCR assay of *H.pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H.pylori* in saliva supports oral transmission[J]. Dig Dis Sci, 1996, 41(11) :2142-2149.
- [8] Song Q, Lange T, Spahr A, et al. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR[J]. J Med Microbiol, 2000, 49(4) :349-353.
- [9] Young KA, Allaker RP, Hardie JM. Morphological analysis of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies and dental plaque by scanning electron microscopy[J]. Oral Microbiol Immunol, 2001, 16(3) :178-181.
- [10] 彭惠, 潘国宗, 曹世植, 等. 在唾液中检测幽门螺杆菌的意义[J]. 中华内科杂志, 1999, 38(3) :171-173.
Peng Hui, Pan Guozong, Cao Shizhi, et al. The significance of detection of *Helicobacter pylori* in saliva[J]. Chin J Intern Med, 1999, 38(3) :171-173.
- [11] Czesnikiewicz-Guzik M, Karczewska E, Bielanski W, et al. Association of the presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and in the stomach[J]. J Physiol Pharmacol, 2004, 55(Suppl 2) :105-115.
- [12] Czesnikiewicz-Guzik M, Bielanski W, Guzik TJ, et al. *Helicobacter pylori* in the oral cavity and its implications for gastric infection, periodontal health, immunology and dyspepsia[J]. J Physiol Pharmacol, 2005, 56(Suppl 6) :77-89.
- [13] Umeda M, Kobayashi H, Takeuchi Y, et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients[J]. J Periodontol, 2003, 74(1) :129-134.
- [14] Dowsett SA, Kowolik MJ. Oral *Helicobacter pylori* : Can we stomach it[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2003, 14(3) :226-233.
- [15] Tursi A, Cammarota G, Papa A, et al. The modes of transmission of *Helicobacter pylori* infection[J]. Recenti Prog Med, 1997, 88(5) :232-236.
- [16] Miyabayashi H, Furihata K, Shimizu T, et al. Influence of oral *Helicobacter pylori* on the success of eradication therapy against gastric *Helicobacter pylori*[J]. Helicobacter, 2000, 5(1) :30-37.
- [17] Nguyen AM, el-Zaatari FA, Graham DY. *Helicobacter pylori* in the oral cavity. A critical review of the literature[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1995, 79(6) :705-709.
- [18] Czesnikiewicz-Guzik M, Loster B, Bielanski W, et al. Implications of oral *Helicobacter pylori* for the outcome of its gastric eradication therapy[J]. J Clin Gastroenterol, 2007, 41(2) :145-151.
- [19] Loster BW, Majewski SW, Czesnikiewicz-Guzik M, et al. The relationship between the presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric in the stomach[J]. J Physiol Pharmacol, 2006, 57(Suppl 3) :91-100.
- [20] Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction : A review[J]. Helicobacter, 2004, 9(2) :115-123.
- [21] Song Q, Haller B, Schmid RM, et al. *Helicobacter pylori* in dental plaque : A comparison of different PCR primer sets[J]. Dig Dis Sci, 1999, 44(3) :479-484.

(本文编辑 胡兴戎)

(上接第350页)

[参考文献]

- [1] Liu R, Bal HS, Desta T, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation [J]. J Dent Res, 2006, 85(6) :510-514.
- [2] Kotsovilis S, Karoussis IK, Fourmoussis I. A comprehensive and critical review of dental implant placement in diabetic animals and patients[J]. Clin Oral Implants Res, 2006, 17(5) :587-599.
- [3] Fang Y, Wang ZY, Mao Y, et al. Effects of insulin-like growth factor on the development of osteoblasts in hyperglycemia[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2006, 73(1) :95-97.
- [4] 吴璇, 刘洪臣, 马卫东, 等. 糖尿病大鼠下颌骨成骨细胞体外特性的研究[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2008, 6(2) :97-100.
Wu Xuan, Liu Hongchen, Ma Weidong, et al. Effect of alloxan-induced diabetes mellitus on the differentiation of osteoblasts obtained from rat mandible *in vitro*[J]. Chin J Geriatric Dent, 2008, 6(2) :97-100.
- [5] Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, et al. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation[J]. Endocrinology, 2003, 144(1) :346-352.
- [6] Fulzele K, DiGirolamo DJ, Liu Z, et al. Disruption of the insulin-like growth factor type 1 receptor in osteoblasts enhances insulin signaling and action[J]. J Biol Chem, 2007, 282(35) :25649-25658.
- [7] Irwin R, Lin HV, Motyl KJ, et al. Normal bone density obtained in the absence of insulin receptor expression in bone[J]. Endocrinology, 2006, 147(12) :5760-5767.
- [8] 吴璇, 刘洪臣, 吕娇, 等. 胰岛素对糖尿病大鼠下颌骨成骨细胞糖摄取的影响[J]. 口腔医学研究, 2010, 26(3) :346-348.
Wu Xuan, Liu Hongchen, Lü Jiao, et al. Effect of insulin on the glucose uptake of osteoblasts obtained from diabetic rats mandibles [J]. J Oral Sci Res, 2010, 26(3) :346-348.
- [9] Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, et al. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(17) :5899-5912.

(本文编辑 李彩)