

自噬对葡萄糖转运蛋白 4 动力学影响分析

王李洁^a, 吴 坚^a, 陈思聪^a, 杨 怡^{a, b}, 孙永红^a, 郑筱祥^{a, b*}

(浙江大学 a. 生物医学工程教育部重点实验室; b. 求是高等研究院, 中国浙江 杭州 310027)

摘 要: 葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 与胰岛素抵抗有着紧密联系, 抑制自噬能减缓胰岛素抵抗. 为了探讨自噬对胰岛素抵抗方面的作用, 现以 GLUT4 囊泡为动力学模型, 通过全内反射荧光显微镜实时观测 3T3-L1 成熟脂肪细胞中 GLUT4 囊泡的运动, 并采用高斯拟合及相应的搜索算法, 从 TIRFM 时间序列中提取运动轨迹、速度等信息进行统计分析. 结果显示: 自噬对 GLUT4 的运动具有一定的影响. 抑制自噬后, GLUT4 囊泡运动的胰岛素响应程度增强, 长距离运动囊泡增多, 平均运动速度加快.

关键词: 脂肪细胞; 葡萄糖转运蛋白 4; 自噬; 动力学分析

中图分类号: Q334; Q336

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2012)02-0108-05

Research on the Dynamics Effects of Autophagy on GLUT4

WANG Li-jie^a, WU Jian^a, CHEN Si-cong^a, YANG Yi^{a, b}, SUN Yong-hong^a,
ZHENG Xiao-xiang^{a, b*}

(a. Key Laboratory for Biomedical Engineering of Ministry of Education; b. Qiushi Academy for Advanced Studies, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China)

Abstract: Insulin resistance can be alleviated when autophagy is inhibited. Glucose transporter 4 has close relationships with insulin resistance. However, the dynamics effects of autophagy on glucose transporter 4 have not been concerned. Using glucose transporter vesicles as kinetic model and combining of Gauss distribution regression fitting method with total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM), the real-time and dynamic movements of GLUT4 vesicles in the 3T3-L1 adipocyte cells were studied. Similarly utilizing this fitting and coordinate with the corresponding search algorithm to the time-lapse images, their moving trajectories were depicted and the results were statistically analyzed. When autophagy was inhibited, the insulin sensitivity of GLUT4 vesicles were enhanced, the number of vesicles in long-range movements was increased, and also the velocity of vesicles was increased. Autophagy has some effects with the movements of GLUT4 vesicles.

Key words: adipocyte; glucose transporter 4; autophagy; dynamics analysis

(*Life Science Research*, 2012, 16(2): 108~112)

胰岛素抵抗是糖尿病病理发生的重要原因. 在胰岛素抵抗的发生发展中, 胰岛素信号通路及葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 转运障碍起着关键作用. 细胞内 GLUT4 囊泡的动态转运过程及转运相关机制的研究一直都是研究糖尿病的热门.

自噬 (autophagy) 是细胞利用溶酶体降解细胞内物质成分的过程. 细胞自噬是细胞器功能和胰岛素

信号的重要调节因子, 细胞自噬水平低是肥胖者胰岛素作用缺陷的重要原因^[1]. 胰岛素抵抗/高胰岛素血症患者的自噬活性是降低的^[2]. Seimon^[3-5]等研究指出, 自噬通过调节内质网应激调节胰岛素信号通路, 减缓胰岛素抵抗. 敲除自噬相关基因 atg7 (autophagy-related gene 7) 后, 3T3-L1 成熟脂肪细胞内 GLUT4 蛋白表达量降低^[6], 这说明自噬与 G-

收稿日期: 2012-01-15; 修回日期: 2012-02-19

基金项目: 中国博士后科学基金面上资助项目(20100481427); 中国博士后科学基金特别资助(201104735)

作者简介: 王李洁(1987-), 女, 湖南张家界人, 硕士研究生, 主要从事生物医学工程研究; * 通讯作者: 郑筱祥(1945-), 女, 浙江杭州人, 浙江大学求是高等研究院、浙江大学生物医学工程与仪器科学学院教授, 主要从事定量与系统生理方法学研究, Tel: 0571-87951091, Fax: 0571-87953860, Email: zxx@mail.bme.zju.edu.cn.

LUT4 之间具有某种内在联系. 本研究以 3T3-L1 成熟脂肪细胞为研究对象, 用自噬抑制剂 chloriquine (CQ) 处理细胞, 通过全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 获得细胞膜附近 100 nm 区域内的囊泡运动轨迹、运动模式等信息, 对这些信息进行统计后, 从动力学上分析 CQ 抑制自噬后对胰岛素抵抗靶蛋白 GLUT4 囊泡的影响, 以了解自噬对胰岛素抵抗的作用, 为治疗 II 型糖尿病打下基础.

1 材料与方法

1.1 材料

3T3-L1 细胞系, 购自上海中科院.

1.2 实验试剂与设备

氯喹 (chloriquine, CQ, 美国 Sigma 公司); HA-GLUT4-GFP 质粒由 NIH/NIDDK 的 Dr.Cushman 提供; 全内反射荧光显微镜系统 (TIRFM System) 及活细胞工作站 (Olympus, Japan); 电转染系统 (GenePuleser Xcell Electroporation System, Bio-Rad).

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与分化

3T3-L1 细胞系采用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), 50 U/mL 青霉素, 50 mg/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基培养. 传代采用胰蛋白酶消化法, 为保证分化率, 采用传代代数不超过 4 代的细胞进行诱导分化^[7].

3T3-L1 细胞的分化采用经典鸡尾酒法; 在细胞铺满 1~2 d 后加入分化试剂分化; 细胞正常培养液 (含 10% FBS, 50 U/L 青霉素, 50 mg/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基) 中加入分化剂: IBMX (终浓度 20 mmol/L) + 地塞米松 (终浓度 2 mg/L) + 胰岛素 (终浓度 1 mg/L); 分化剂培养细胞 48 h 后更换培养液; 采用胰岛素终浓度为 1 mg/L 的 DMEM 培养液培养 72 h, 其中 36 h 时更换含胰岛素浓度相同的 DMEM 培养液, 再换用细胞正常培养液培养; 加入分化试剂 7~10 d 后分化成熟.

1.3.2 3T3-L1 成熟脂肪细胞的转染与培养

细胞分化成熟后, 用 0.125% 的胰酶消化 4~8 min, 再用 DMEM 正常培养液 (含 10% FBS) 和 DMEM 高糖培养液 (不含 FBS) 分别清洗一次, 调整细胞体积分数为每 mL 2×10^4 cell; 采用电转染系统转染; 每个 0.4 cm 电转杯中含 30 μ g GLUT4-GFP 质粒, 细胞悬液总体积为 400 μ L; 设置电压为 180 V, 电容为 950 μ F; 转染后细胞稀

释后接种于 3.5 cm 培养皿中, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}$ C, 体积比为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养; 实验设 ctrl (control) 组, chloriquine 组 (CQ 组) 两个小组进行实验; 2 h 后, ctrl 组使用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基培养, CQ 组更换使用含 CQ 的正常培养基培养, CQ 使用浓度为 10 μ m; 24 h 后置于全内反射荧光显微镜下观察.

1.3.3 成像及图像处理

全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 系统采用 60 \times 1.45NA 油镜 (PlanApoN, Olympus), 整个实验均在 37 $^{\circ}$ C 下进行. 选取细胞内运动的囊泡作为研究对象, 通过 Andor iQ 1.5 版本软件控制 CCD 成像, 动态序列图像的拍摄频率为 5 张/秒.

实验拍摄了 4 组细胞: ctrl (control) 组、ctrl+insulin 组、CQ 组、CQ+insulin 组. 每组 20 个样本序列图片, 每个序列 200 张图片, 拍摄间隔 200 ms. 使用 Matlab 2011a (The Mathworks Inc., USA) 和 Image J (Version 1.44, National Institute of Health, USA) 进行图像处理. 对序列图像中囊泡点应用高斯拟合算法和相应的搜索算法, 得到所有囊泡的高斯中心点荧光强度值序列, 继而描绘出囊泡的动态转运途径^[8], 从而对不同条件下囊泡运动的参数进行分析.

2 结果

2.1 CQ 抑制自噬 24 h 后, 3T3-L1 脂肪细胞内 GLUT4 囊泡

加入 CQ 培养 24 h 后, 在 TIRFM 下观察, 相对于 ctrl 组而言, CQ 组内细胞 GLUT4 囊泡容易产生块状堆积. 这可能是由于 CQ 抑制自噬, 导致未能降解 GLUT4 囊泡 (图 1). 这些块状堆积的 GLUT4 几乎不运动.

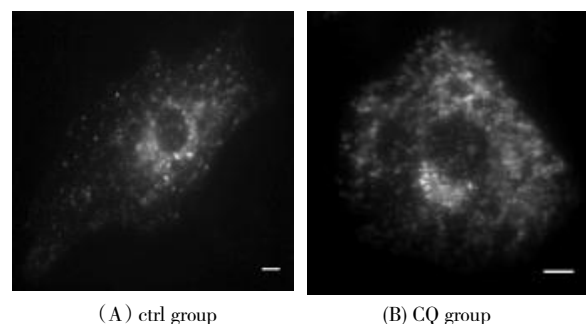


图 1 CQ 作用 24 h 后 3T3-L1 脂肪细胞内 GLUT4 囊泡 (scale bar, 10 μ m)

Fig.1 GLUT4 vesicles in 3T3-L1 adipocytes after 24 h of chloriquine (scale bar, 10 μ m)

2.2 CQ 抑制自噬后, 3T3-L1 脂肪细胞内 GLUT4 囊泡运动平均速度分析

对细胞内所有运动的 GLUT4 囊泡描绘出动态转运途径后, 进行平均运动速度的统计分析. ctrl 组加入胰岛素后, 胰岛素的刺激使得更多的 GLUT4 囊泡锚定在细胞膜上或在原地摆动呈限制性运动. 胰岛素刺激后平均速度低于 1 μm/s

之间的囊泡个数比升高. CQ 组相对于 ctrl 组, 平均速度低于 1 μm/s 之间的囊泡个数比降低, 表明 CQ 组运动较为激烈. 加入胰岛素刺激后, CQ 组平均速度低于 1 μm/s 之间的囊泡个数比显著升高. 与 ctrl 组相比反应程度更为剧烈, 说明加入 CQ 抑制自噬后, GLUT4 囊泡在运动性上的胰岛素响应程度显著增强(图 2).

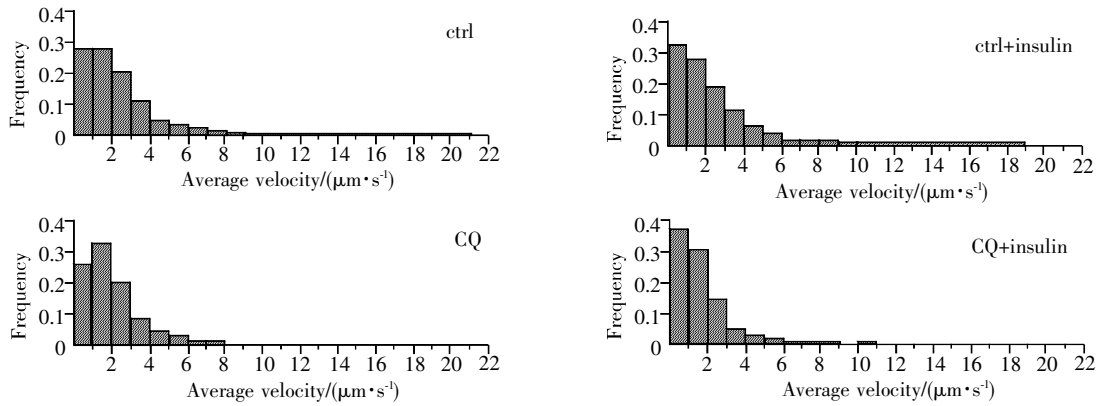


图 2 3T3-L1 脂肪细胞内 GLUT4 囊泡平均运动速度分析

纵坐标为 GLUT4 囊泡出现的频率.

Fig.2 Statistic analysis of GLUT4 vesicles' average velocity in 3T3-L1 adipocyte cells

y-axis shows the frequency of GLUT4 vesicles.

使用 Image J 对图像进行 Z stacks 叠加描绘出囊泡运动轨迹, 并用 kymograph 功能对其进行分析计算得出了相同实验结果. 图 3 中 ctrl 组所示长距离运动中 GLUT4 囊泡平均运动速度为 0.991 μm/s, 胰岛素刺激后 GLUT4 囊泡平均运动

速度为 0.875 μm/s, CQ 组所示长距离运动中 GLUT4 囊泡的平均运动速度为 2.158 μm/s, 胰岛素刺激后细胞内无长距离运动点, 说明 CQ 组细胞相对于 ctrl 组细胞来说, GLUT4 囊泡在运动速度上对胰岛素响应性更强.

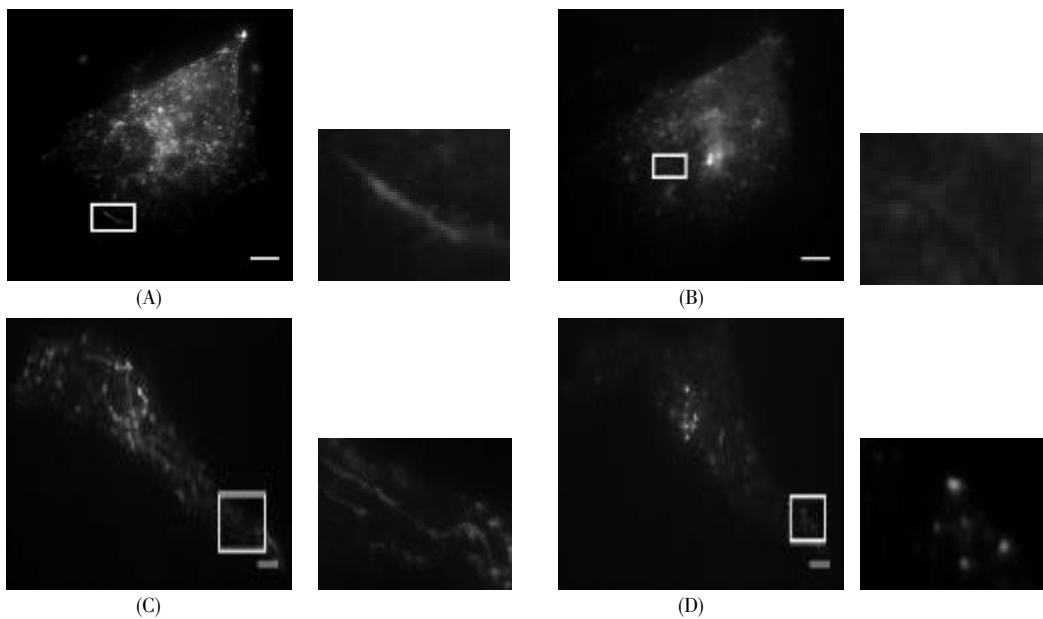


图 3 Z stacks 叠加后 3T3-L1 脂肪细胞 GLUT4 囊泡运动轨迹成像 (scale bar, 10 μm)

Fig.3 Visualization of the tracks of GLUT4 vesicles in 3T3-L1 adipocyte cells after Z stacks (scale bar, 10 μm)

(A) ctrl group ; (B)ctrl+insulin group; (C) CQ group; (D) CQ+insulin group.

2.3 CQ 抑制自噬后, 3T3-L1 脂肪细胞内 GLUT4 囊泡长距离运动分析

对 4 组图像中所有运动的 GLUT4 囊泡描绘出其动态转运途径后, 统计分析囊泡的长距离运动. 分析发现: 胰岛素的刺激使长距离运动的囊泡数目变少. CQ 组相对于 ctrl 组而言, 长距离运动的囊泡数目增多(图 4).

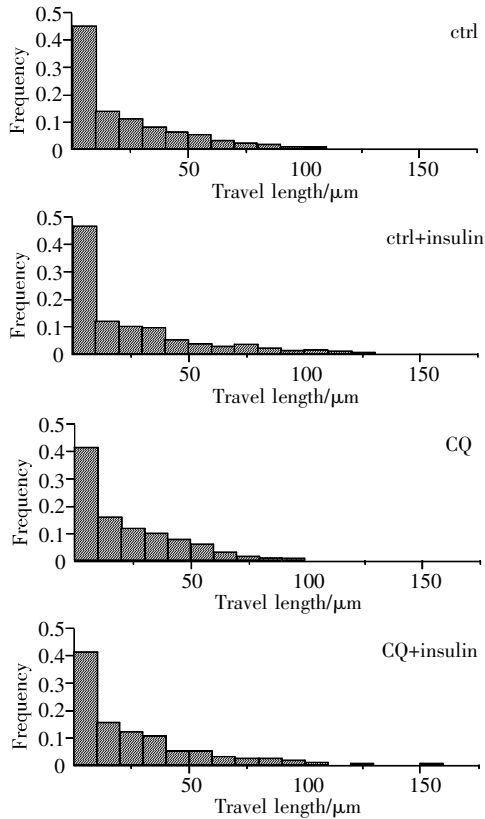


图 4 3T3-L1 脂肪细胞内 GLUT4 囊泡长距离运动分析
纵坐标为 GLUT4 囊泡出现的频率.

Fig.4 Statistic analysis of GLUT4 vesicles' long range movements in 3T3-L1 adipocyte cells

y-axis shows the frequency of GLUT4 vesicles movement.

胰岛素刺激下, 多数 GLUT4 囊泡迁移至细胞膜附近, 与细胞膜发生融合. 在 TIRF 状态下, 胰岛素的刺激使细胞的长距离运动减少, 多数 GLUT4 与细胞膜融合锚定在膜上或在原地做限制性运动. 与细胞膜融合后 GLUT4 囊泡的总荧光强度值不变, 中间点荧光强度值降低, 宽度增大, 囊泡变得相对模糊(图 5), 这一现象也与 Huang^[9]等的研究结果相符合.

2.4 CQ 抑制自噬后, 3T3-L1 脂肪细胞内 GLUT4 囊泡运动活性分析

首先采用小波多尺度乘积方法将囊泡从细胞

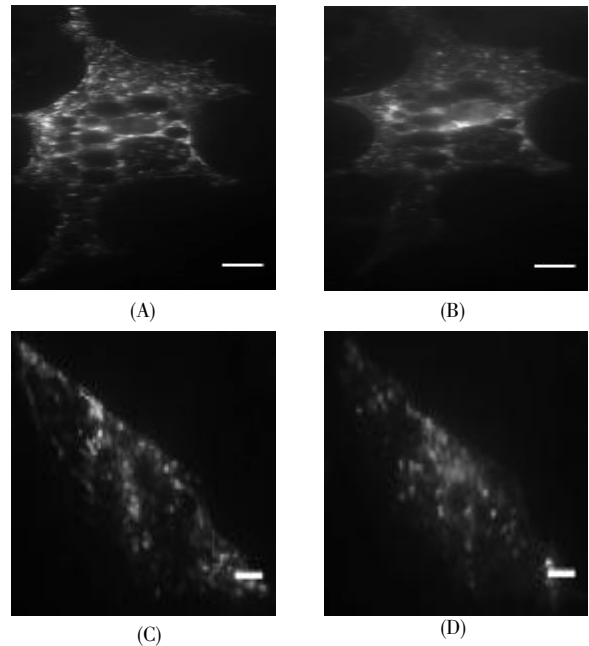


图 5 3T3-L1 细胞内长距离运动 (scale bar, 10 μm)
Fig.5 Visualization of long-range transport of GLUT4 vesicles in 3T3-L1 adipocyte cells (scale bar, 10 μm)
(A)ctrl group; (B)ctrl+insulin group; (C)CQ group; (D)CQ+ insulin group.

图像中分割出来. 细胞图像按细节层次被分成 W_1 、 W_2 、 W_3 、 W_4 4 个分量, 其中 W_1 分量代表图像噪声, W_2 分量代表图像小细节, W_3 分量代表图像大细节, W_4 分量代表图像背景. 用反映图像细节的 W_2 和 W_3 分量重构原图像. 在分析前对图像进行二值化, 将属于囊泡的像素设为 1, 其它的设为 0.

针对相同物体不同时刻的位置关系. 在序列图像 I 中, I_n 表示第 n 张图像, I_{n+k} 表示第 $n+k$ 张图像, k 为图像间隔. 每张图像的像素为 M , N_n 和 N_{n+k} 分别表示两张图像中分割出来的囊泡的总像素, N_{col} 表示共定位的像素数目. 评价物体运动的共定位系数为 $R_{col} = \frac{N_{col}}{N_n}$. 考虑到在有限的图像中,

囊泡运动后的位置可能与之前的位置重叠. 同时两张图像中的囊泡是完全没有关联并且随机分布的, 两者依然会表现随机共定位现象. 随机共定位的像素数目为 $\frac{N_n \times N_{n+k}}{M}$, 修正后的共定位系数

为 $R = \frac{N_{col}}{N_n} - \frac{N_{n+k}}{M}$. 如果共定位程度越高, 表明物

体的活动性越低, 运动比较缓慢. 所以定义反映运动性能的移动部分比例系数 (moved section ratio,

MSR) 为 $MSR = 1 - R = 1 - \frac{N_{col}}{N_n} + \frac{N_{n+k}}{M}$. 由此可知,

MSR 越大, 细胞图像中囊泡的运动程度越剧烈。

对图像序列进行运动分析, 两帧图像共定位的时间间隔分别选 0.2、1、2、3、4、5、10、15 s。这里以 0.2 s 为例, 计算出一个图像序列中所有间隔 0.2 s 的图片共定位情况, 将其平均值作为整个图像序列间隔 0.2 s 的运动度量。每组 15 个样本序列再进行平均以消除样本差异, 得到反映该组试验具有统计意义的运动参数。由图 6 可以看到, CQ 组细胞的 MSR 更大, 说明该组细胞囊泡的运动程度更剧烈。实验结果是统计学意义上囊泡对胰岛素响应的剧烈程度, 而不是单个囊泡对胰岛素响应的剧烈程度。该方法由 Huang^[9]的方法改进而来。

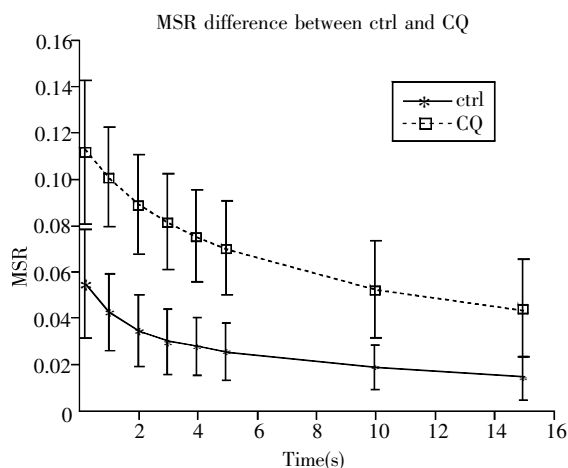


图 6 CQ 组与 ctrl 组细胞移动部分比例系数 (MSR) 对比
Fig.6 Moved section ratio comparison between CQ group and ctrl group

3 讨论

GLUT4 是脂肪细胞中最主要的葡萄糖转运蛋白, GLUT4 介导的葡萄糖转运能力的下降在胰岛素抵抗中起主导作用。胰岛素抵抗是 II 型糖尿病的主要病理表现。因而, 关于 GLUT4 转运的研究对于 II 型糖尿病的研究具有十分重要的意义。

实验采用目前已建立的小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞系, 以其分化后的脂肪细胞作为转染对象, 运用 TIRFM 来研究细胞膜附近 100 nm 处 GLUT4 囊泡的转运情况。基础状态下, 细胞内有一部分的囊泡在做长距离运动, 大部分囊泡在长距离运动后锚定在膜上或者离开 TIRFM 视野。胰岛素刺激后, 囊泡运动速度变慢, 长距离运动减少, 多数 GLUT4 在原地呈限制性运动状态或者锚定在膜上。胰岛素刺激使 GLUT4 迅速往膜方向转运, 使 GLUT4 含量增加到基础状态的 10 倍以上^[10-14], 并对其运

动状态产生影响。

大量统计发现: 抑制自噬使 GLUT4 囊泡转运的平均运动速度加快, 同时在速度上对胰岛素响应更加敏感。CQ 抑制自噬后, 运动距离小于 10 μm 的囊泡个数比显著减少, 长距离运动 GLUT4 囊泡数目增多。说明自噬极有可能在动力学上增强了 GLUT4 囊泡胰岛素响应敏感性。对细胞进行 MSR 分析后也发现, 抑制自噬后, 囊泡对胰岛素响应程度增强。

自噬可能与胰岛素信号通路有相互联系。最近几项研究结果也支持了这一观点。Gökhan 等证实细胞自噬是细胞器功能和胰岛素信号的重要调节因子, 细胞自噬缺陷提升内质网压力并导致胰岛素抵抗, 细胞自噬水平低是肥胖者胰岛素作用缺陷的重要原因^[1]。也有报道指出, 抑制自噬能减缓因内质网压力而导致的胰岛素受体水平减少^[5]。胰岛素抵抗患者的自噬活性是降低的^[2]。根据以上研究结果, 以及 GLUT4 与胰岛素信号通路关系密不可分的关系, 推测自噬可能通过影响胰岛素信号通路对 GLUT4 囊泡运动产生影响。

相对于 ctrl 组, CQ 组细胞中易出现 GLUT4 囊泡大量堆积(图 1)。CQ 是抑制自噬的药品, 可能是抑制自噬导致 GLUT4 降解障碍。GLUT4 囊泡堆积的 CQ 组细胞内, 大多数 GLUT4 囊泡体积过大, 丧失了运动能力。研究发现, 自噬能抑制胰岛素受体的降解导致胰岛素受体数目的增多但其功能已出现了损伤^[5]。究竟自噬是否也抑制了 GLUT4 囊泡的降解, 但其功能已出现损伤, 需要进一步实验进行论证。

为了进一步探讨自噬对 GLUT4 囊泡运动的作用, 可以进一步特异性抑制自噬, 如敲除自噬基因或采用 RNA 干扰, 探讨自噬对 GLUT4 囊泡动力学影响。

参考文献 (References):

- [1] SEIMON T A, NADOLSKI M J, LIAO X, *et al.* Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell metabolism*, 2010, 12(5): 467-478.
- [2] ZHAO J H, BRAULT J, SCHILD A, *et al.* AfoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagy/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells[J]. *Cell Metabolism*, 2007, 6(12): 472-483.
- [3] CEDERBERG A, GRONNING L M, AHREN B, *et al.* FOXO2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance[J]. *Cell*, 2001, 106(5): 563-573.

(下转第 124 页)