中国科学 C 辑: 生命科学
2007 年 第 37 卷 第 4 期: 402~409
http://www.scichina.com

《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

# 葡萄糖转运的胰岛素敏感性以及 forskolin, dipyridamole 和 pentobarbital 对三种 L6 骨骼肌细胞葡萄糖转运的抑制作用

牛文彦[①*] Philip J Bilan[②] Michiko Hayashi[②] 笪宇蓉[①] 姚 智[①*]

(① 天津医科大学免疫学教研室, 天津 300070; ② Programme in Cell Biology, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada M5G 1X8)

**摘要** 用稳定过表达并带有 myc 表位的葡萄糖转运子 1(glucose transporter 1, GLUT1)或葡萄糖转运子 4(glucose transporter 4, GLUT4)的 L6 骨骼肌细胞株定征 GLUT1 和 GLUT4 对胰岛素的响应. 所筛选的 L6-GLUT1myc 细胞克隆分化前后的葡萄糖摄取量均在线性范围. 100 nmol/L 胰岛素使 L6-GLUT1myc 和 L6-GLUT4myc 肌原细胞膜上 GLUT1 或 GLUT4 的量分别达到基础组的(1.58±0.01)倍和(1.96±0.11)倍, 2-脱氧葡萄糖摄取量分别达到了(1.53±0.09)倍和(1.86±0.17)倍, 此作用可被渥曼青霉素(wortmannin)抑制. 胰岛素刺激了此2种细胞中的Akt磷酸化. L6-GLUT1myc 肌原细胞的葡萄糖摄取量对胰岛素浓度呈剂量依赖性, 但与野生型细胞相比, 其对胰岛素的敏感性和最大响应没有改变. 但 L6-GLUT4myc 肌原细胞的葡萄糖摄取量对胰岛素的敏感性和最大响应均增加. 以前的研究提示毛喉素(forskolin)可能影响胰岛素刺激的 GLUT4 转位. 本研究表明, 在 L6-GLUT4myc 细胞中, 毛喉素使胰岛素刺激的葡萄糖摄取减少了 65%, 此作用是由它对 GLUT4 的直接抑制而不是由其对 GLUT4 转位的影响造成的. 毛喉素和 dipyridamole 对 GLUT4 比对GLUT1有更强的抑制作用, 而戊巴比妥(pentobarbital)对GLUT1的抑制作用强于GLUT4. 应用这些抑制剂的结果表明、L6 肌原细胞中基础状态下和胰岛素刺激状态下的葡萄糖主要由过表达的 GLUT1 或 GLUT4 转运. 因此, L6-GLUT1myc 和 L6-GLUT4myc 细胞株为筛查对肌肉细胞 GLUT1 或 GLUT4 的活性或转位有不同作用的化合物提供了一个平台.

**关键词** **L6 骨骼肌细胞株 葡萄糖转运子(glucose transporter, GLUT) 胰岛素 2-脱氧葡萄糖摄取**

葡萄糖进入肌肉是葡萄糖在骨骼肌和培养的骨骼肌细胞中代谢的限速步骤. 葡萄糖转运子 1 (glucose transporter 1, GLUT1)和葡萄糖转运子 4 (glucose transporter 4, GLUT4)是嵌膜蛋白SLC2 葡萄糖转运子家族成员, 转运葡萄糖进入细胞. GLUT1 普遍表达, 由于主要位于多种细胞的细胞膜上, 因此被认为负责基础状态下的葡萄糖摄取 [1]. GLUT4 在脂肪和骨骼肌等响应胰岛素的组织中表达, 大部分

收稿日期: 2007-02-03; 接受日期: 2007-07-04
国家自然科学基金项目(批准号: 30570912)、国家自然科学基金中加(NSFC-CIHR)健康研究合作项目(批准号: 30611120532)、天津市科学技术委员会应用基础研究重点项目(批准号: 07JCZDJC07900 和 06YFGPSH03300)和天津市高等学校科技发展基金(批准号: 20040106)资助
* 联系人, E-mail: wniu@tijmu.edu.cn, yaozhi@tmu.cn

GLUT4 位于细胞内直径为 100~200 nm的囊泡上, 在胰岛素作用下, 可快速地从胞内转位到细胞膜上 [2]. 虽然与GLUT4 相比, GLUT1 倾向于定位在细胞膜上, 但仍有一些GLUT1 位于胞内. 携带GLUT1 的囊泡和携带GLUT4 的囊泡都可在胰岛素的作用下转位到细胞表面. 现已普遍认为胰岛素信号分子PI3K和Akt介导胰岛素刺激的GLUT4 转位. 大鼠L6 骨骼肌细胞株保留有很多骨骼肌的性质, 被用于研究响应胰岛素的葡萄糖摄取作用[3]. L6成肌细胞胰岛素刺激的葡萄糖转运和GLUT4 表达均具有分化依赖性 [4]. 应用稳定过表达在第一和第二个跨膜螺旋膜外区插入myc表位的GLUT4 蛋白的L6 细胞, 通过检测myc表位, 可方便地用类似ELISA的方法测定细胞表面GLUT4密度 [5]. 此外, L6-GLUT4myc中的葡萄糖转运全部由GLUT4 完成 [6]. 过表达GLUT4myc的L6 肌原细胞响应胰岛素的作用, 表明此细胞具有形成和运输GLUT囊泡所需的机制和信号蛋白 [7].

许多SLC2 葡萄糖运载体的葡萄糖结合位点和一些小分子相互作用, 抑制葡萄糖转运, 其中细胞松弛素B是目前了解最清楚的. 双萜毛喉素(forskolin)、戊巴比妥(pentobarbital)、核苷转运抑制剂dipyri- damole和HIV蛋白酶抑制剂indinavir也竞争性或非竞争性地抑制葡萄糖转运 [8~10]. 相对于GLUT1, indinavir对GLUT4 的亲和力比对GLUT1 的亲和力高两个数量级, 仅抑制L6 细胞中的GLUT4[6], forskolin, pentobarbital和dipyridamole对不同的GLUT有不同的亲和力. 本研究应用过表达GLUT1myc或GLUT4myc的L6 细胞株, 比较这些化合物对基础和胰岛素刺激状态下葡萄糖摄取的抑制作用, 结果表明, 过表达的GLUT控制细胞中的葡萄糖摄取; 与GLUT4myc不同, 过表达GLUT1myc不能改善L6 细胞葡萄糖摄取对胰岛素的敏感性和最大响应. L6- GLUT1myc和L6-GLUT4myc细胞为筛查针对不同GLUT的抑制剂和筛选促进GLUT1 或GLUT4 转位到细胞膜的化合物提供了一个有效的平台.

## 1　材料和方法

### 1.1　试剂

胰岛素(Humulin R)购自 Eli Lilly. 细胞松弛素 B, 2-脱氧葡萄糖, 邻苯二胺, forskolin, dipyridamole, pentobarbital 和渥曼青霉素(wortmannin)购自 Sigma 公司. 2-脱氧-$^3$H-D-葡萄糖购自 ICN. 抗 myc 单克隆抗体(9E10)购自 Santa Cruz 公司. 抗 GLUT1 和抗GLUT4 兔抗血清识别各自羧基末端的 12 个氨基酸残基. 抗磷酸化 Akt Ser473 抗体购自 Cell Signal 公司. 偶联 HRP 的山羊抗兔和驴抗鼠 IgG 购自 Jackson Immunoresearch 公司.

### 1.2　L6 细胞株和细胞培养

将人的c-myc表位(14 个氨基酸残基)插入到GLUT1 和GLUT4 的第一个胞外区, 亚克隆到pCXN2载体构建GLUT1myc和GLUT4myc的cDNA[11]. 将质粒稳定转染到L6 肌原细胞 [12]. L6 野生型、L6-GLUT1myc和L6-GLUT4myc肌原细胞用含 10% FBS的αMEM中 37℃, 5% $CO_2$ 培养. 肌原细胞用含2% FBS的培养基分化为成肌细胞. 将细胞接种在 24 孔板中, 测定葡萄糖摄取和细胞膜上GLUT4myc水平. 在直径为 10 cm培养皿中接种L6 野生型、L6-GLUT1myc和L6-GLUT4myc肌原细胞和成肌细胞, 提取总膜蛋白, 采用BCA法测蛋白质浓度.

### 1.3　2-脱氧葡萄糖摄取

2-脱氧葡萄糖摄取的测定按文献 [13]所述. 用无血清培养基培养细胞, 加入或不加入 100 nmol/L的胰岛素 37℃孵育细胞 30 min. 为检测化合物的直接抑制作用, 在设定浓度的forskolin, dipyridamole或pentobarbital存在时测定 2-脱氧葡萄糖摄取. 除非特殊标明, 细胞不用这些化合物预孵育, forskolin在胰岛素孵育的最后 15 min加入到 37℃的培养基中, wortmannin先于胰岛素 20 min加入, 再与胰岛素共同孵育细胞 20 min, 但不加入到测定葡萄糖摄取的溶液中. 用DMSO配制forskolin和wortmannin储存液, 于一周内使用. 新鲜dipyridamole和pentobar- bital分别用DMSO和 10%(*v*/*v*)乙醇配置, 在所有的测定中, 溶剂的终浓度都不超过 0.1%(*v*/*v*).

### 1.4　细胞表面 GLUT1myc 或 GLUT4myc 密度

用偶联抗体的比色法测定完整细胞表面的GLUT1myc或GLUT4myc水平, 具体方法为用抗myc的单抗 9E10 作一抗, 偶联HRP的驴抗鼠IgG作二抗, 加入$H_2O_2$ 和邻苯二胺(OPD)后引发颜色反应 [14].

### 1.5　电泳和免疫印迹

细胞用胰岛素孵育不同时间后, 在冰上用 150

μL含 7.5% β巯基乙醇(*v*/*v*)、磷脂酶抑制剂okadaic acid和钒酸钠以及蛋白酶抑制剂的 2×Laemmli缓冲液裂解，65℃加热裂解液 15 min，用 7.5% (*v*/*v*) SDS-PAGE分离 30 μg总蛋白后，用抗磷酸化Akt Ser473 抗体检测Akt磷酸化水平[15].

如前所述，用 7.5%(*v*/*v*) SDS-PAGE分离细胞总膜蛋白样品，转到PVDF膜[15]. 用抗myc单克隆抗体9E10(稀释 1000 倍)、抗GLUT4 羧基末端的兔抗血清(稀释 1000 倍)或抗GLUT1 羧基末端的兔抗血清(稀释 1500 倍)分别检测myc，GLUT4 和GLUT1，二抗分别使用偶联HRP的驴抗小鼠(稀释 10000 倍)和山羊抗兔(稀释 15000 倍)IgG，蛋白条带用增强化学发光法检测、曝光、定量.

### 1.6 统计学分析

成组 *t* 检验分析组间差异，$P<0.05$ 为显著性差异. 结果为相对于相应基础组的倍数，表示为平均值±标准误.

## 2 结果

### 2.1 定征胰岛素刺激的 L6-GLUT1myc 肌原细胞葡萄糖摄取

为测定化合物对 3 种细胞葡萄糖摄取的抑制作用，我们定征 L6-GLUT1myc 细胞对胰岛素的响应. 在4, 6和10 min的葡萄糖摄取测定时间内，基础和胰岛素刺激状态下的L6-GLUT1myc肌原细胞和成肌细胞的 2-脱氧葡萄糖摄取速率(pmol/min·(mg 蛋白))一致，表明葡萄糖摄取在线性范围，仍然是限速步骤，并未被过表达的GLUT1myc影响. 此外，我们还测定了 3 种肌原细胞对胰岛素的剂量响应.

图 1 表明，L6 野生型和 L6-GLUT1myc 肌原细胞对胰岛素的最大响应量都接近于基础组葡萄糖摄取率的 1.5~1.6 倍. L6 野生型和 L6-GLUT1myc 肌原细胞的胰岛素敏感性相似，$ED_{50}$ 分别约为 20 nmol/L 和 30 nmol/L. 与此不同的是，L6-GLUT4myc 肌原细胞最大响应胰岛素的葡萄糖摄取量为基础组的 2 倍，$ED_{50}$ 为 10 nmol/L(图 1).

### 2.2 Wortmannin 预孵育对 L6-GLUT1myc 肌原细胞 2-脱氧葡萄糖摄取和 GLUT1myc 转位的影响

借助药物抑制剂，人们认识到PI3K是使肌肉和脂肪细胞中GLUT4 转位到细胞膜上必需的信号分子[16]. 过表达显性负突变Akt1 抑制了胰岛素刺激的L6 肌原细胞的GLUT4 转位[17]. 本研究中，我们检测L6-GLUT1myc和L6-GLUT4myc肌原细胞的Akt磷酸化对胰岛素的响应，并检测wortmannin对 2-脱氧葡萄糖摄取和GLUT转位的影响.

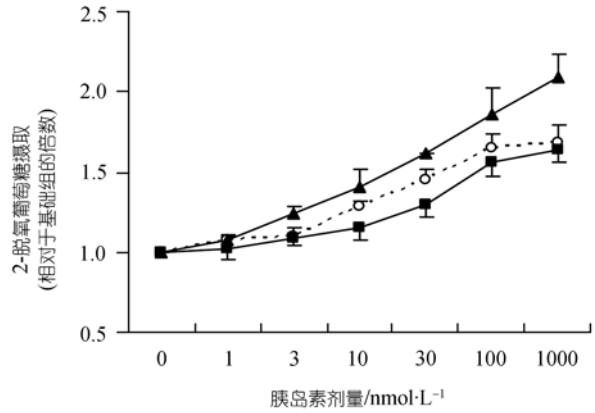


图 1 胰岛素刺激的 2-脱氧葡萄糖摄取对胰岛素的剂量依赖性

用图中所示浓度的胰岛素孵育无血清培养后的肌原细胞 30 min，然后测定 2-脱氧葡萄糖的摄取. 结果为 4 个独立实验的平均值±标准误(其中每一条件都做 3 个复孔). ○示 L6 野生型; ■示 L6-GLUT1myc; ▲示 L6-GLUT4myc

胰岛素使L6-GLUT1myc细胞2-脱氧葡萄糖摄取和细胞表面 GLUT1 数量分别增加了 1.56 和 1.62 倍(图2(a)和(b))，这些响应比L6-GLUT4myc细胞低，并均可被 wortmannin 抑制至低于基础水平(图 2(a)). 图 3 表明胰岛素刺激 L6-GLUT1myc(图 3(a))和 L6-GLUT4myc(图 3(b))肌原细胞 Akt 的磷酸化.

上述结果显示: (ⅰ)胰岛素刺激此2种细胞的Akt磷酸化; (ⅱ)胰岛素增加葡萄糖摄取和细胞膜上GLUT1 和 GLUT4 的含量，此作用可被 wortmannin 抑制.

### 2.3 GLUT1myc 和 GLUT4myc 表达水平的比较

免疫印迹检测L6 肌原细胞和成肌细胞总膜蛋白中的GLUT含量. 野生型细胞上样量多于过表达GLUT4myc的细胞以便于在同一个SDS-PAGE胶中比较2种细胞中GLUT4的量. 已有报道，不同的组织或细胞中GLUT4 的迁移率不同[18].

表 1 显示 L6-GLUT1myc 细胞中 GLUT1 含量明显高于 L6 野生型和 L6-GLUT4myc 细胞. L6-GLUT1myc 肌原细胞和成肌细胞中 GLUT1 的含量分

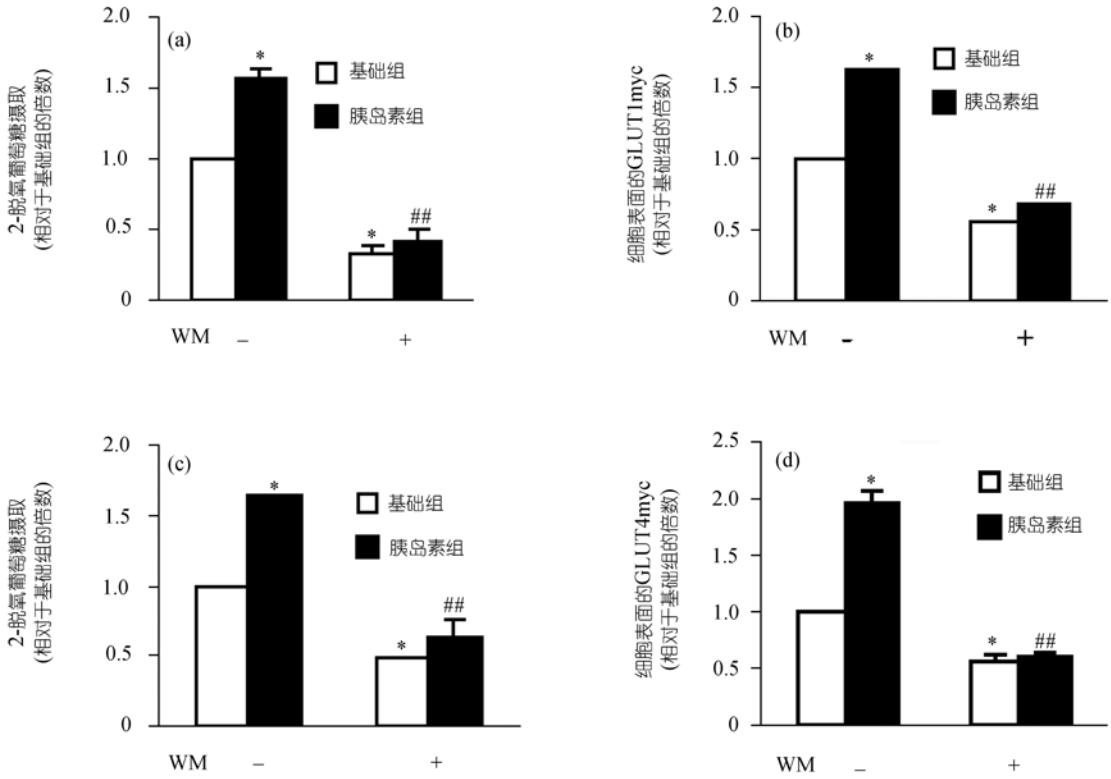


图 2　Wortmannin(WM)抑制 L6-GLUT1myc((a)和(b))和 L6-GLUT4myc((c)和(d))肌原细胞葡萄糖摄取和 GLUT1 或 GLUT4 转位

用 100 nmol/L wortmannin 预孵育无血清培养的肌原细胞 20 min, 然后与 100 nmol/L 胰岛素一同孵育细胞 20 min. 测定 2-脱氧葡萄糖摄取和细胞表面 GLUT1myc 或 GLUT4myc. 结果为 3 或 4 个独立实验(其中每一条件都做 3 个复孔)的平均值±标准误, 相对于基础组, 相对于胰岛素组, *, $P<0.05$; ##, $P<0.01$

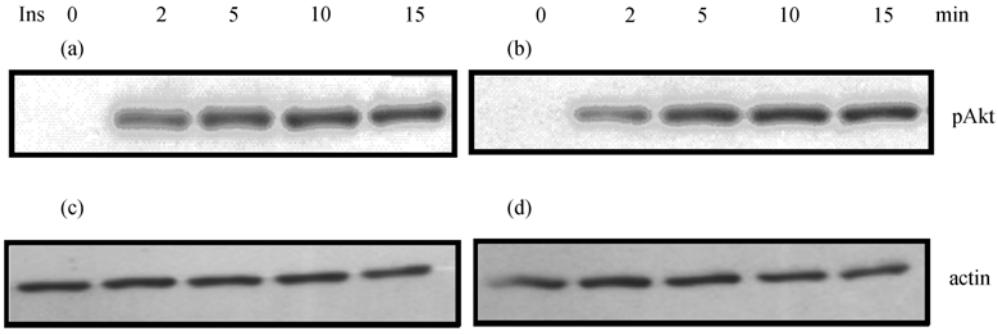


图 3　胰岛素刺激的 L6-GLUT1myc 肌原细胞(a)和 L6-GLUT4myc 肌原细胞(b)Akt 磷酸化

按如图所示的时间加入或不加入 100 nmol/L 胰岛素孵育肌原细胞, 然后免疫印迹检测 30 μg 细胞裂解液中 Akt Ser473 的磷酸化和 actin 水平((c), (d)). 图中所示为 L6-GLUT1myc(a)和 L6-GLUT4myc(b)肌原细胞的免疫印迹结果

表 1　GLUT1, GLUT4 和 myc 在不同细胞株和组织中的相对表达量

| 细胞株和组织 | GLUT1 | | GLUT4 | | myc | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 肌原细胞 | 成肌细胞 | 肌原细胞 | 成肌细胞 | 肌原细胞 | 成肌细胞 |
| L6 野生型 | 1 | | | 0.02±0.00 | | |
| L6-GLUT1myc | 8.27±3.47 | 5.53±1.39 | | | 1 | 1.00±0.46 |
| L6-GLUT4myc | | | 1 | 2.49±0.02 | 15.82±4.55 | 13.17±0.92 |
| 3T3-L1 脂肪细胞 | 3.21±0.47 | | 0.25±0.03 | | | |
| 小鼠骨骼肌 | 1.23±0.58 | | 0.20±0.05 | | | |

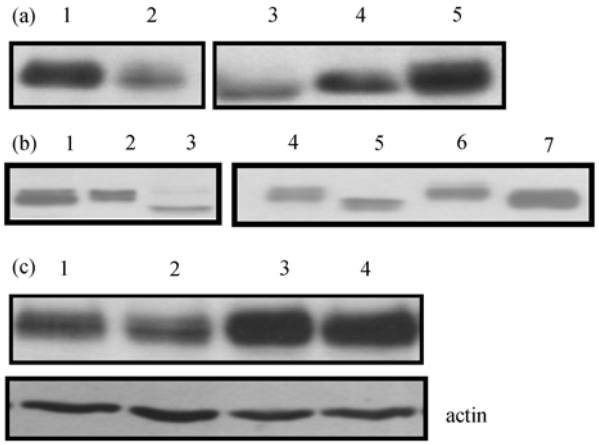


图 4 GLUT1(a), GLUT4(b)和 myc(c)在小鼠骨骼肌和不同细胞株中的表达

提取细胞总膜蛋白, 免疫印迹检测 GLUT1, GLUT4, myc 和 actin. (a)中: 1, L6-GLUT1myc 肌原细胞; 2, L6 野生型肌原细胞; 3, 小鼠骨骼肌; 4, 3T3-L1 脂肪细胞; 5, L6-GLUT1myc 成肌细胞. 上样量均为 20 μg 蛋白; (b)中: 1, 5 μg L6-GLUT4myc 成肌细胞; 2, 5 μg L6-GLUT4myc 肌原细胞; 3, 100 μg L6 野生型成肌细胞; 4, 25 μg 3T3-L1 脂肪细胞; 5, 25 μg 小鼠骨骼肌; 6, 10 μg L6-GLUT4myc 肌原细胞; 7, 10 μg L6-GLUT4myc 成肌细胞. (c)中: 1, L6-GLUT1myc 肌原细胞. 2, L6-GLUT1myc 成肌细胞. 3, L6-GLUT4myc 肌原细胞. 4, L6-GLUT4myc 成肌细胞, 上样量均为 20 μg 蛋白

别为 L6 野生型的 8.27 和 5.53 倍(图 4(a)). 与 L6 野生型细胞内源性 GLUT4 相比, L6-GLUT4myc 肌原细胞和成肌细胞中 GLUT4 的表达显著升高(分别升高 50 和 124 倍)(图 4(b)). L6-GLUT1myc 和 L6-GLUT4myc 细胞分化前后, myc 的表达没有变化(表 1). L6-GLUT4myc细胞的 myc 表达量显著高于 L6-GLUT1myc 细胞(肌原细胞和成肌细胞分别为 15.82 和 13.17 倍) (图 4(c)). 与其他细胞或组织相比, GLUT1myc 肌原细胞 GLUT1 的含量分别为 3T3-L1 脂肪细胞和小鼠骨骼肌的 2.58 和 6.72 倍, L6-GLUT4myc 肌原细胞 GLUT4 的含量分别为 3T3-L1 脂肪细胞和小鼠骨骼肌的 3.38 和 4.79 倍(图 4(a)和(b)), 因此, 每种细胞株中主要的葡萄糖转运子是带有 myc 表位的 GLUT.

### 2.4 forskolin 预孵育对 L6 肌原细胞 2-脱氧葡萄糖摄取和 GLUT4 转位的影响

先前报道 [19]利用forskolin预孵育L6 野生型成肌细胞可特异地抑制胰岛素刺激的葡萄糖摄取. 我们又发现L6 肌原细胞表达SLC2 家族成员GLUT1 和GLUT3, 分化为成肌细胞后, 还表达GLUT4[4,20]. 在另一个有关的研究中, 应用能有效抑制GLUT4 但不影响GLUT1, GLUT2 和GLUT3 转运葡萄糖的一种临床使用的HIV蛋白酶抑制剂indinavir, 证实主要是GLUT1 和/或GLUT3 负责基础状态下L6 野生型成肌细胞的葡萄糖转运, 而在胰岛素作用下, GLUT4 成为葡萄糖的主要转运子 [6]. 由此推论, forskolin可能是通过影响GLUT4 转位到细胞表面或直接抑制其转运葡萄糖而特异地作用于GLUT4.

在先前的应用forskolin的实验中, 利用 100 μmol/L forskolin预孵育成肌细胞 15 min, 发现它抑制胰岛素刺激的葡萄糖摄取, 但不影响基础葡萄糖摄取 [4]. 重复forskolin预孵育 15 min对胰岛素刺激的L6成肌细胞葡萄糖摄取的抑制作用. 用 100 μmol/L的forskolin 预孵育 L6 野生型、L6-GLUT1myc 和L6-GLUT4myc肌原细胞, 在测定葡萄糖摄取前洗去, 发现其对胰岛素刺激的野生型和L6-GLUT1myc肌原细胞的葡萄糖摄取没有影响, 但抑制了 65%的胰岛素刺激的L6-GLUT4myc肌原细胞的 2-脱氧葡萄糖摄取(图 5), 这些结果表明forskolin预孵育对L6-GLUT4myc肌原细胞有残存的影响.

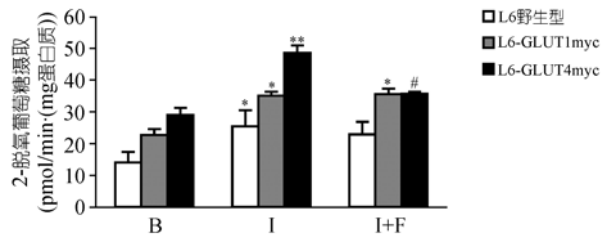


图 5 forskolin 预孵育对胰岛素刺激的 2-脱氧葡萄糖摄取的影响

如材料和方法所述处理细胞并测定 2-脱氧葡萄糖摄取. 结果为 3~6 次实验(其中每个条件都做 3 个复孔)的平均值±标准误. B, 基础组; I, 胰岛素组; I+F, 胰岛素+forskolin 组. 相对于基础组, *示 $P<0.05$, **示 $P<0.01$. 相对于仅用胰岛素处理组, #示 $P<0.05$.

为检测加入胰岛素前用 forskolin 预孵育肌原细胞 15 min 是否会抑制介导 GLUT4 转位的某些信号, 测定了 GLUT4myc 的转位, 结果表明 forskolin 预孵育对胰岛素增加细胞表面 GLUT4myc 的作用没有影响(图 6).

利用 forskolin 预孵育 L6-GLUT1myc 肌原细胞也不影响胰岛素刺激的 GLUT1myc 转位, 此结果与我们推测的一致(结果未显示), 因此, forskolin 抑制胰岛素刺激的 L6-GLUT4myc 细胞葡萄糖摄取, 可能是

由于 forskolin 与 GLUT4 的结合力大于与 GLUT1 的结合力.

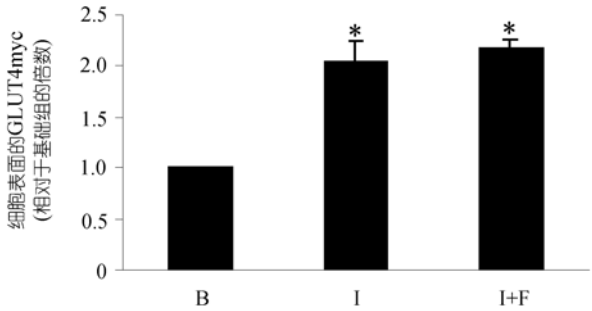


图 6　forskolin 预孵育 L6-GLUT4myc 肌原细胞对胰岛素刺激的 GLUT4myc 转位的影响

如材料和方法所述方法处理细胞并测定细胞表面 GLUT4. 结果为 3 个实验(其中每个条件都做 3 个复孔)的平均值±标准误. 设基础组细胞表面 GLUT4 的数量为 1, 其他组数值为相对于此组的倍数. B, 基础组. I, 胰岛素组. I+F, 胰岛素+forskolin 组. 相对于基础组, *示 $P<0.05$

## 2.5　forskolin 对 3 种细胞 2-脱氧葡萄糖摄取的直接作用

为进一步检测 forskolin 是否对 GLUT4 有更强的抑制作用, 测定 L6 野生型、L6-GLUT1myc 和 L6-GLUT4myc 肌原细胞在基础和胰岛素刺激状态的葡萄糖摄取, 将浓度为 0~100 μmol/L 的 forskolin 直接加入到测定葡萄糖摄取的溶液中. 图 4 显示, 基础状态的肌原细胞中, forskolin 对 L6-GLUT4myc($IC_{50}$=0.50±0.23 μmol/L)转运葡萄糖的抑制作用比对 L6-GLUT1myc($IC_{50}$=3.88±0.41 μmol/L)的抑制作用约强 10 倍(图 7(a), 表 2).

在胰岛素作用下, forskolin 对 GLUT4 比对 GLUT1 有更强的抑制作用, 但使 L6-GLUT1myc 和 L6-GLUT4myc 细胞葡萄糖摄取 $IC_{50}$ 的差别减少(图 7(b), 表 2).

## 2.6　dipyridamole 对 3 种细胞 2-脱氧葡萄糖摄取的直接作用

将不同浓度的 dipyridamole 直接加入到测定葡萄糖摄取的溶液中, 发现 dipyridamole 和 forskolin 对葡萄糖摄取有相似的作用. 例如, 相对于 L6-GLUT1-myc 或 L6 野生型肌原细胞, dipyridamole 能更有效的抑制 L6-GLUT4myc 细胞的葡萄糖摄取(图 8(a)).

此外, dipyridamole 对胰岛素作用下 L6-GLUT4-myc 肌原细胞葡萄糖摄取的抑制作用减少(图 8(b)). 0.3 μmol/L dipyridamole 不影响 L6-GLUT4myc 肌原细胞基础和胰岛素刺激条件下的葡萄糖摄取, 且对两者的 $IC_{50}$ 分别是 (3.15±1.07) 和 (3.98±0.60) μmol/L, 因此 forskolin 是比 dipyridamole 更有效的 GLUT4 抑制剂.

## 2.7　pentobarbital 对葡萄糖摄取的影响

相对于GLUT4 介导的葡萄糖摄取, pentobarbital 能更有效的抑制GLUT1, GLUT2 和GLUT3 转运葡萄糖 [9]. 在测定葡萄糖摄取的溶液中加入 1 mmol/L pentobarbital, 可抑制L6-GLUT1myc细胞 46%的基础葡萄糖摄取量(图 9(a)).

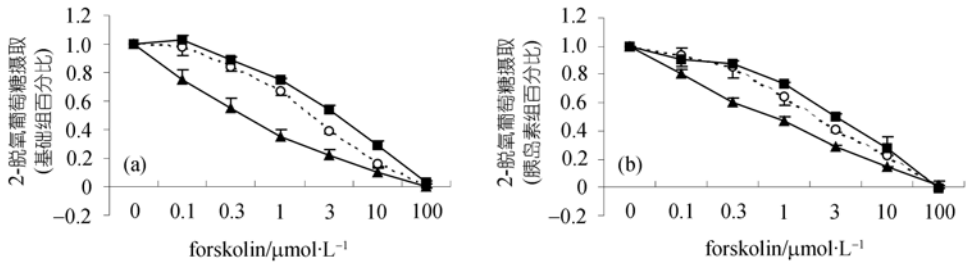


图 7　forskolin 抑制 2-脱氧葡萄糖摄取

细胞不加入(a)或加入(b)100 nmol/L 胰岛素孵育 30 min, 然后在图中所示浓度的 forskolin 存在时测定 2-脱氧葡萄糖摄取. 结果为 3~4 个实验的平均值±标准误(其中每个条件都做 3 个复孔). ○示 L6 野生型; ■示 L6-GLUT1myc; ▲示 L6-GLUT4myc

表 2　forskolin 和 dipyridamole 对 L6 肌原细胞基础和胰岛素作用下 2-脱氧葡萄糖摄取的 $IC_{50}$ a)

| | forskolin/μmol·L⁻¹ | | dipyridamole/μmol·L⁻¹ | |
|---|---|---|---|---|
| | 基础状态 | 胰岛素状态 | 基础状态 | 胰岛素状态 |
| L6-GLUT1myc | 3.88 ± 0.41 | 3.14 ± 0.24 | 12.97 ±3.23 | 13.04 ± 1.82 |
| L6 野生型 | 2.23 ± 0.36 | 2.30 ± 0.62 | 11.23 ± 2.50 | 10.94 ± 2.02 |
| L6-GLUT4myc | 0.50 ± 0.23 | 0.82 ± 0.12 | 3.15 ± 1.07 | 3.98 ± 0.60 |

a) 按材料和方法所述方法处理细胞

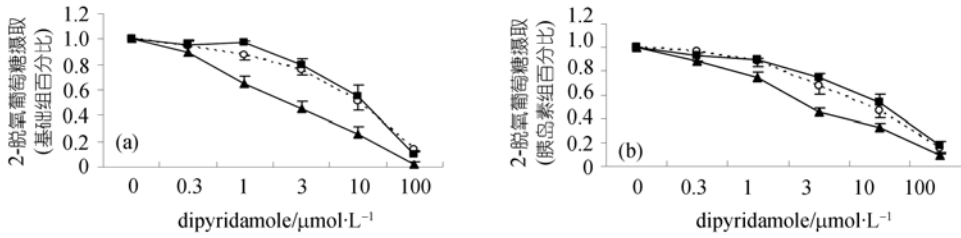


图 8 dipyridamole 对 2-脱氧葡萄糖摄取的抑制作用

细胞不加入(a)或加入(b)100 nmol/L 胰岛素孵育 30 min, 然后在图中所示浓度的 dipyridamole 存在时测定 2-脱氧葡萄糖摄取. 结果为 3~5 个实验的平均值±标准误(其中每个条件都做 3 个复孔). ○示 L6 野生型; ■示 L6-GLUT1myc; ▲示 L6-GLUT4myc

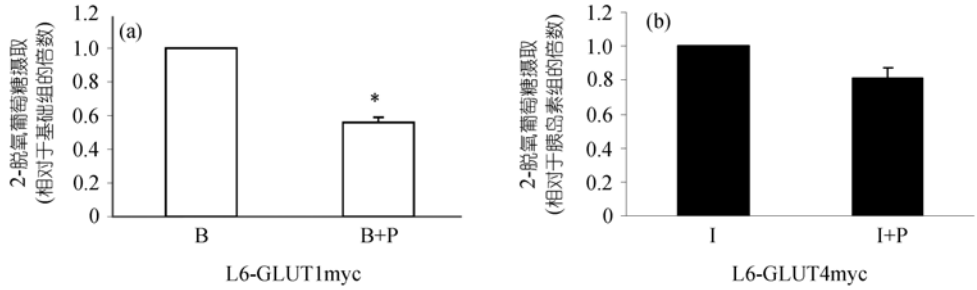


图 9 pentobarbital 对 2-脱氧葡萄糖摄取的影响

细胞不加入(a)或加入(b)100 mmol·L⁻¹ 胰岛素孵育 30 min, 在孵育的最后 15 min 不加入或加入 1 mmol/L pentobarbital, 然后在 pentobarbital 不加入或加入时, 测定 2-脱氧葡萄糖摄取. 结果为 3 个实验的平均值±标准误(其中每个条件都做 3 个复孔). B, 基础组; I, 胰岛素组; B+P, 基础+pentobarbital 组; I+P, 胰岛素+pentobarbital 组. 相对于基础组, *示 $P<0.05$

1 mmol/L pentobarbital 减少 20%胰岛素刺激的 L6-GLUT4myc 细胞葡萄糖摄取, 10 mmol/L pentobarbital 则可完全抑制 L6-GLUT1myc 和 L6-GLUT4myc 细胞的葡萄糖摄取(结果未在此文显示).

## 3 讨论

GLUT1 普遍表达, 被认为决定许多细胞的基础葡萄糖摄取速率. 脂肪细胞和骨骼肌都表达 GLUT1, 但主要的葡萄糖转运子是 GLUT4. 在这些细胞中, 胰岛素刺激 GLUT4 转位到细胞膜上转运葡萄糖. 我们建立了高表达 GLUT1myc 或 GLUT4myc 的 L6 肌肉细胞株以观察不同 GLUT 转运葡萄糖的能力.

本研究进一步定征了 L6-GLUT1myc 细胞. 虽然 GLUT1myc 响应胰岛素的作用依赖 PI3K 转位到细胞膜上, 且 Akt 磷酸化水平升高, 但过表达的 GLUT-1myc 并没有像 GLUT4myc 那样增加 L6 细胞对胰岛素的敏感性和最大响应, 由此显示了 GLUT4 在胰岛素作用下的独特功能, 并证实 L6 肌原细胞具有独特的机制和信号分子, 可产生并调节响应胰岛素的携带 GLUT4 的囊泡.

应用 2 种过表达 GLUT 的细胞, 我们发现葡萄糖转运子抑制剂对不同的 GLUT 有不同的抑制效果. forskolin 和 dipyridamole 是已知的对 GLUT4 敏感的抑制剂, 而 pentobarbital 则能更好地抑制 GLUT1. 虽然低浓度的 forskolin 和 dipyridamole 可能仅抑制 GLUT4, 而不影响 GLUT1, 但这些抑制剂均不能高度特异地抑制一种 GLUT 而不影响另一种 GLUT. 我们应用这些抑制剂对不同 GLUT 的不同作用, 证实了我们成功地建立了 2 种细胞株, 其中过表达的 GLUT 控制该细胞的葡萄糖摄取.

此外, 本研究应用的 2 种细胞株, 可作为 GLUT 特异性抑制剂的筛查平台, 还可作为研究工具, 研究化合物或基因干预如何改善胰岛素抵抗并可能增强或改变葡萄糖摄取的机制, 即它们是影响 GLUT1 还是 GLUT4 转运系统. 这 2 种细胞株还可用于筛查这些药物(如 forskolin 和 dipyridamole)的同系物潜在的副作用, 或筛查对葡萄糖摄取有不利影响的药物. 最后, 能适度抑制 GLUT1 的抑制剂可能有利于减少具有高血糖症的糖尿病人血中葡萄糖向肾、神经和眼等

组织的转运. 高血糖极易损害这些组织, 降低这些组织摄取过量葡萄糖可能有助于减少高血糖造成的并发症和组织损伤. 另外, 可不再应用亚细胞分级的方法, 而是应用过表达胞外区带 Myc 表位的 GLUT1 或 GLUT4 的 L6 细胞精确地定量测定完整细胞膜上的 GLUT 分子, 这将有利于在同样的条件下平行测定和比较葡萄糖摄取和 GLUT 转位.

**致谢**　衷心感谢 Amira Klip 教授对本研究的帮助和支持.

## 参　考　文　献


1 Mitsumoto Y, Liu Z , Klip A. A long-lasting vitamin C derivative, ascorbic acid 2-phosphate, increases myogenin gene expression and promotes differentiation in L6 muscle cells. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 199(1): 394—402 [DOI]

2 Marsh B J, Alm R A, McIntosh S R, et al. Molecular regulation of GLUT-4 targeting in 3T3-L1 adipocytes. J Cell Biol, 1995, 130: 1081—1091 [DOI]

3 Sargeant R, Mitsumoto Y, Sarabia V, et al. Hormonal regulation of glucose transporters in muscle cells in culture. J Endocrinol Invest, 1993, 16(2): 147—162

4 Mitsumoto Y, Burdett E, Grant A, et al. Differential expression of the GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during differentiation of L6 muscle cells. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 175(2): 652—659 [DOI]

5 Wang Q, Khayat Z, Kishi K, et al. GLUT4 translocation by insulin in intact muscle cells: detection by a fast and quantitative assay. FEBS Lett, 1998, 427(2): 193—197 [DOI]

6 Rudich A, Konrad D, Torok D, et al. Indinavir uncovers different contributions of GLUT4 and GLUT1 towards glucose uptake in muscle and fat cells and tissues. Diabetologia, 2003, 46(5): 649—658

7 Ueyama A, Yaworsky K L, Wang Q, et al. GLUT4myc ectopic expression in L6 myoblasts generates a GLUT-4-specific pool conferring insulin sensitivity. Am J Physiol, 1999, 277(3 Pt 1): E572—578

8 Hellwig B, Joost H G. Differentiation of erythrocyte-(GLUT1), liver-(GLUT2), and adipocyte-type (GLUT4) glucose transporters by binding of the inhibitory ligands cytochalasin B, forskolin, dipyridamole, and isobutylmethylxanthine. Mol Pharmacol, 1991, 40(3): 383—389

9 Haspel H C, Stephenson K N, Davies-Hill T, et al. Effects of barbiturates on facilitative glucose transporters are pharmacologically specific and isoform selective. J Membr Biol, 1999, 169(1): 45—53 [DOI]

10 Murata H, Hruz P W, Mueckler M. The mechanism of insulin resistance caused by HIV protease inhibitor therapy. J Biol Chem, 2000, 275(27): 20251—20254 [DOI]

11 Kanai F, Nishioka Y, Hayashi H, et al. Direct demonstration of insulin-induced GLUT4 translocation to the surface of intact cells by insertion of a c-myc epitope into an exofacial GLUT4 domain. J Biol Chem, 1993, 268(19): 14523—14526

12 Kishi K, Muromoto N, Nakaya Y, et al. Bradykinin directly triggers GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. Diabetes, 1998, 47(4): 550—558 [DOI]

13 Somwar R, Niu W, Kim D Y, et al. Differential effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibition on intracellular signals regulating GLUT4 translocation and glucose transport. J Biol Chem, 2001, 276(49): 46079—46087 [DOI]

14 Li D, Randhawa V K, Patel N, et al. Hyperosmolarity reduces GLUT4 endocytosis and increases its exocytosis from a VAMP2-independent pool in L6 muscle cells. J Biol Chem, 2001, 276(25): 22883—22891 [DOI]

15 Huang C, Somwar R, Patel N, et al. Sustained exposure of L6 myotubes to high glucose and insulin decreases insulin-stimulated GLUT4 translocation but upregulates GLUT4 activity. Diabetes, 2002, 51(7): 2090—2098 [DOI]

16 Lund S, Pryor P R, Ostergaard S, et al. Evidence against protein kinase B as a mediator of contraction-induced glucose transport and GLUT4 translocation in rat skeletal muscle. FEBS Lett, 1998, 425(3): 472—474 [DOI]

17 Wang, Q, Somwar R, Bilan P J, et al. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. Mol Cell Biol, 1999, 19: 4008—4018

18 Mitsumoto Y, Klip A. Development regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscle cells. J Biol Chem, 1992, 267: 4957—4962

19 Bilan P J, Mitsumoto Y, Maher F, et al. Detection of the GLUT3 facilitative glucose transporter in rat L6 muscle cells: regulation by cellular differentiation, insulin and insulin-like growth factor-I. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 186(2): 1129—1137 [DOI]

20 Klip A, Ramlal T, Douer A G, et al. Inhibition by forsklin of insulin-stimulated glucose transport in L6 muscle cells. Biochem J. 1988, 255(3): 1023—1029