

IGF1 对高糖下内皮细胞增殖及移行的影响

腾佳丽, 刘彦君

摘要 目的 观察高糖下胰岛素样生长因子 1(IGF1) 对高糖下人脐静脉内皮细胞(HUVEC) 增殖和移行的影响, 并探讨其可能影响机制。方法 体外培养 HUVEC, 分为对照组、高糖组、高渗组、高糖 + IGF1 组和高糖 + IGF1 + AZD5363 组, 四甲基偶氮唑蓝(MTT) 比色法检测内皮细胞增殖, Transwell 小室观察细胞移行。实时荧光定量 PCR 测定丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt) 及叉头转录因子 1(FoxO1) 的 mRNA 水平。免疫组化法测定内皮细胞 Akt、p-Akt、FoxO1 和 p-FoxO1 的蛋白表达, 并行半定量分析。结果 与对照组比较, 高糖组细胞存活率、移行率明显降低, FoxO1 mRNA 表达明显升高, FoxO1/p-FoxO1 蛋白表达增加, Akt/p-Akt 比值增加, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与高糖组比较, 高糖 + IGF1 组细胞存活率、移行率明显增加, FoxO1 mRNA 的表达明显降低, FoxO1/p-FoxO1 蛋白表达降低, Akt/p-Akt 蛋白表达降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 高糖 + IGF1 + AZD5363 组细胞存活率未见明显差异, 移行未增加, FoxO1 mRNA 的表达明显降低($P < 0.05$), FoxO1/p-FoxO1 未见明显差异。5 组 Akt mRNA 的表达差异无统计学意义。结论 IGF1 能改善高糖对内皮细胞增殖移行的抑制作用, 其机制可能是 IGF1 激活 Akt 进一步调节 FoxO1 的表达。

关键词 IGF1; FoxO1; 高糖; 内皮细胞; 细胞增殖; 移行

中图分类号 R 587.1; R 587.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1373-05

研究^[1]显示糖尿病患者心脑血管病变及周围血管闭塞的风险远高于非糖尿病患者。研究^[2]显示高血糖与糖尿病血管病变有关, 内皮细胞功能失调可能继发于高血糖。胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor 1, IGF1) 是细胞生长、分化和凋亡的重要调节因子。研究^[3]证明 IGF1 具有多种代谢和血管保护作用, 从很多方面直接对抗内皮功能失调, 目前关于 IGF1 的报道^[4]多关注其在神经损伤方面的研究, 在血管保护方面的报道较少, 且机制不清。IGF1 可激活磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphati-

dylinositol 3 kinase, PI3K)/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine kinase, Akt) 通路, 调控叉头转录因子-1(forkhead transcription factor 1, FoxO1) 表达^[3]。高糖可能通过 PI3K/Akt 的解偶联参与糖尿病血管并发症的发展^[5]。该研究拟探讨 IGF1 对高糖下内皮细胞增殖及移行的保护作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 获赠于中科院生物物理研究所(购自 ATCC 细胞库), 由解放军 306 医院实验室保存, 第 2~5 代的细胞用于本研究。内皮细胞培养液(endothelial cell growth medium, EGM) (瑞士 Lonza 公司); 含有 EDTA 的胰酶(美国 Gibco 公司); D-葡萄糖粉、缺乏生长因子的 IV 型胶原纤维(美国 Sigma 公司); RNAiso 及 Q-PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司); 抗-Akt 单克隆抗体、抗磷酸化特异性 Thr308Akt 单克隆抗体、抗-FoxO1 单克隆抗体、抗磷酸化特异性 Ser256 FoxO1 单克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司); 抗 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的抗鼠抗体、免疫组化 DAB 发光试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); Akt 抑制剂(AZD5363, 美国 Selleck 公司); 6、24、96 孔板、24 孔板 Transwell 小室(美国 Corning 公司); PCR 引物由上海生物工程技术有限公司合成; AIRTECH 超净工作台(天津钧星瑞科技有限公司); 7500 Real Time PCR System(美国 Applied biosystems 公司); 一体式微型化学发光成像仪(SmartChemi, 北京赛智创业科技有限公司); 电子显微镜(ICC50 HD, 德国 LEICA 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HUVEC 的培养 用 EGM 培养基(含 2% 进口胎牛血清), 在 37℃、5% CO₂ 条件下进行培养, 瓶底被细胞铺满 80% 时, 用 0.25% 胰酶消化、传代, 取 2~5 代增殖旺盛的细胞用于实验。随机分为 5 组进行干预: 对照组(5 mmol/L 葡萄糖); 高糖组(25 mmol/L 葡萄糖); 高糖 + IGF1 组(25 mmol/L 葡萄糖 + 80 ng/ml IGF1); 高糖 + IGF1 + AZD5363 组(25

2015-04-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(编号: 21331001)

作者单位: 安徽医科大学解放军第 306 临床学院内分泌科, 北京 100101

作者简介: 腾佳丽, 女, 硕士研究生;

刘彦君, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: liuyanji@yeah.net

mmol/L 葡萄糖 + 80 ng/ml IGF1 + 5 μ mol/L AZD5363); 高渗组(20 mmol/L 甘露醇 + 5 mmol/L 葡萄糖)。

1.2.2 HUVEC 增殖实验 将 1×10^5 个细胞/孔接种于 0.1% IV 型胶原纤维处理后的 96 孔板。无血清培养 24 h 后更换 EGM 培养液,按照不同方式分 5 组进行干预,终体积为 200 μ l/孔。培养 48 h 后,弃上清液,每孔依次加入 EGM 培养液和四甲基偶氮唑蓝(MTT)溶液 20 μ l(5 mg/ml),继续培养 4 h 后弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μ l,置摇床室温均匀震荡 10 min,使结晶物充分溶解。酶标仪检测波长 490 nm 处吸光度(absorbance, A) 值。按照下列公式计算细胞存活率:细胞存活率(%) = 实验组 A 值/对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

1.2.3 Transwell 小室检测 HUVEC 迁移 将细胞按照 5×10^5 个细胞/孔接种于 0.1% IV 型胶原纤维处理后的 24 孔板,上室 EGM 培养液每孔 500 μ l,下室为对照组、高糖组、高糖 + IGF1 组、高糖 + IGF1 + AZD5363 组和高渗组培养液各 1.5 ml,培养 12 h 后取出上室,刮除膜上层内皮细胞,10% 甲醛溶液固定后结晶紫染色,于光学显微镜下随机 6 个视野计数,取均值。计算迁移抑制率,迁移抑制率(%) = (对照组迁移细胞数 - 实验组迁移细胞数)/对照组迁移细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 采用 SYBR Green I 染料法实时荧光定量 PCR 检测 Akt、FoxO1 mRNA 表达 将 5×10^5 个细胞/ml 接种于 6 孔培养板,按照对照组、高糖组、高糖 + IGF1 组、高糖 + IGF1 + AZD5363 组和高渗组培养 48 h 后,Trizol 法提取 5 组细胞总 RNA,RT-PCR 扩增目的基因。PCR 引物序列为 FoxO1 上游引物:5'-GGCTGAGGGTTAGTGAGCAG-3'; FoxO1 下游引物:5'-AAGGGAGTTGCTGAAAGACATC-3'; Akt 上游引物:5'-CTCATTCAGACCCACGAC-3'; Akt 下游引物:5'-ACAGCCCGAAGTCCGTTA-3'; β -actin 上游引物:5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'; β -actin 下游引物:5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'。反应参数:95 $^{\circ}$ C 预热变性 30 s; 两步法 PCR: 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s; 60 $^{\circ}$ C 退火 34 s; 扩增 40 个循环; 60 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。应用 7500 System Software 分析软件,检测目的基因与内参扩增的 Ct 值,根据 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$,计算 $\Delta\Delta Ct$ 值,得到实验组目的基因相对于对照组目的基因的表达量(relative quantity, RQ), $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$,然后进行统计分析。

1.2.5 免疫组化法检测细胞 Akt/p-Akt、FoxO1/p-

FoxO1 蛋白表达 制备细胞爬片,培养细胞 48 h 后,进行免疫组化检测。在高倍镜下随机观察 3 个视野,计数细胞并对每个细胞进行评分。细胞不着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,深棕黄色为 3 分。将评分之和除以细胞数作为 FoxO1 蛋白表达强度,表达率(%) = (实验组表达强度/对照组表达强度) $\times 100\%$ 。计算 Akt/p-Akt、FoxO1/p-FoxO1 蛋白的值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间计量资料比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 检验。

2 结果

2.1 IGF1 对高糖下 HUVEC 生存率的影响 MTT 结果显示,设对照组培养 48 h 时的 HUVEC 细胞存活率为 100%,则高渗组 HUVEC 的细胞存活率为 93.71%,与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);高糖组细胞存活率为 69.10%,明显低于对照组($P < 0.05$)。对照组细胞存活率与高渗组存活率差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组比较,高糖组细胞存活率明显降低($t = 6.48, P < 0.05$)。与高糖组比较,高糖 + IGF1 组细胞存活率明显增加($t = 2.90, P < 0.05$);高糖 + IGF1 + AZD5363 组细胞存活率未见明显改变($t = 0.28, P > 0.05$)。见表 1。

表 1 5 组细胞生长比较($n = 4, \bar{x} \pm s$)

组别	A 值	细胞存活率(%)
对照	0.86 $\pm$ 0.07	100
高糖	0.59 $\pm$ 0.04*	69.10 $\pm$ 4.65
高糖 + IGF1	0.71 $\pm$ 0.07 [#]	83.30 $\pm$ 8.14
高糖 + IGF1 + AZD5363	0.60 $\pm$ 0.01*	69.77 $\pm$ 1.16
高渗	0.80 $\pm$ 0.04	93.71 $\pm$ 4.65

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与高糖组比较: [#] $P < 0.05$

2.2 IGF1 对高糖下 HUVEC 迁移的影响 与对照组比较,高糖组细胞迁移抑制率显著增高($t = 5.27, P < 0.05$)。与高糖组比较,高糖 + IGF1 组的细胞迁移抑制率显著降低($t = 7.21, P < 0.05$);高糖 + IGF1 + AZD5363 组的细胞迁移抑制率未见明显改变($t = 0.31, P > 0.05$)。高渗组中 HUVEC 迁移数与对照组比较差异无统计学意义($t = 0.12, P > 0.05$)。见表 2。

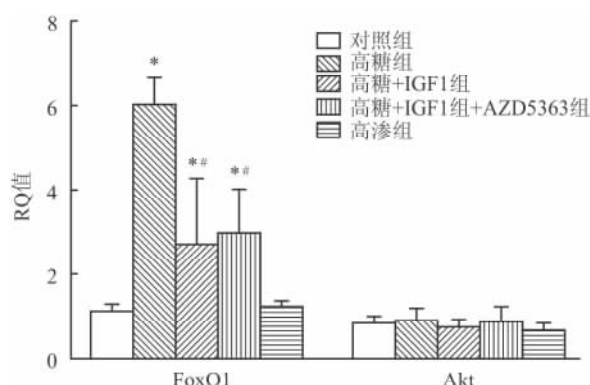
2.3 IGF1 对高糖下 Akt、FoxO1 mRNA 表达的影响 高糖组 FoxO1 mRNA 的表达量与对照组比较明显降低(6.00 ± 0.65 vs $1.14 \pm 0.15, t = 12.62, P <$

表2 5组 HUVEC 细胞迁移的比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	迁移数	迁移抑制率(%)
对照	45.8 ± 12.4	0
高糖	16.0 ± 2.3 [*]	65.1 ± 5.02
高糖 + IGF1	26.6 ± 2.3 [#]	41.9 ± 5.02
高糖 + IGF1 + AZD5363	16.6 ± 3.6 [*]	63.8 ± 7.86
高渗	45.0 ± 8.9	1.7 ± 1.94

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与高糖组比较: [#] $P < 0.05$

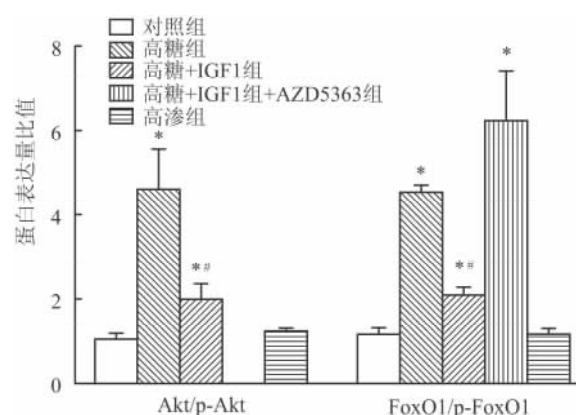
0.05)。与高糖组比较,高糖 + IGF1 组 FoxO1 mRNA 的表达量明显增加 (2.73 ± 1.52 vs 6.00 ± 0.65 , $t = 3.42$, $P < 0.05$),高糖 + IGF1 + AZD5363 组 FoxO1 mRNA 的表达量明显降低 (2.97 ± 1.04 vs 6.00 ± 0.65 , $t = 4.27$, $P < 0.05$)。5 组 Akt mRNA 的表达差异无统计学意义 ($F = 0.39$, $P > 0.05$)。见图 1。

图1 5组 HUVEC 的 Akt、FoxO1 mRNA 表达 ($n=3$)

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与高糖组比较: [#] $P < 0.05$

2.4 IGF1 对高糖下 Akt、p-Akt、FoxO1 和 p-FoxO1 蛋白表达的影响 与对照组比较,高糖组的 FoxO1/p-FoxO1 比值升高 (4.50 ± 1.15 vs 1.08 ± 0.14 , $t = 5.10$, $P < 0.05$); 与高糖组比较,高糖 + IGF1 组 FoxO1/p-FoxO1 比值降低 (2.15 ± 0.29 vs 4.50 ± 1.15 , $t = 3.41$, $P < 0.05$),高糖 + IGF1 + AZD5363 组的 FoxO1/p-FoxO1 比值与高糖组差异无统计学意义 (6.22 ± 1.19 vs 4.50 ± 1.15 , $t = 1.81$, $P > 0.05$),高渗组 FoxO1/p-FoxO1 比值与对照组差异无统计学意义 (1.10 ± 0.08 vs 1.08 ± 0.14 , $t = 0.25$, $P > 0.05$)。与对照组比较,高糖组的 Akt/p-Akt 比值升高 (3.95 ± 1.12 vs 1.03 ± 0.07 , $t = 4.50$, $P < 0.05$); 与高糖组比较,高糖 + IGF1 组 Akt/p-Akt 比值降低 (1.92 ± 0.35 vs 3.95 ± 1.12 , $t = 2.99$, $P < 0.05$),高糖 + IGF1 + AZD5363 组的 p-Akt 未见表达, Akt/p-Akt 比值接近正无穷,高渗组 Akt/p-Akt

比值与对照组差异无统计学意义 (1.12 ± 0.06 vs 1.03 ± 0.07 , $t = 1.71$, $P > 0.05$)。见图 2。

图2 5组 HUVEC 的 Akt/p-Akt、FoxO1/p-FoxO1 蛋白表达情况 ($n=3$)

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与高糖组比较: [#] $P < 0.05$

3 讨论

研究^[6]表明,高糖可抑制细胞增殖,干扰细胞周期,诱发 DNA 损伤并可轻度加速细胞死亡,最终导致糖尿病血管病变的发生^[7]。内皮细胞稳态失调被认为是糖尿病血管并发症发生发展过程中的重要始动因素^[8]。糖尿病因血管并发症导致的致死率逐年升高,可能与糖尿病患者血管形成侧支循环的能力下降有关^[9]。研究^[10]表明,IGF1 对内皮细胞有明确保护作用。本研究中结果显示高糖对 HUVEC 增殖及移行有明显的抑制作用,表明高糖具有细胞毒性作用;加入 IGF1 可明显改善高糖的抑制作用。

内皮细胞表达的 FoxO1 蛋白可激活其下游的多种因子,加速细胞凋亡^[10]。为探究 IGF1 是否通过影响 Akt-FoxO1 通路的 Akt 活性进而调控 FoxO1 的表达,本研究在高糖 + IGF1 基础上进一步加入 Akt 阻滞剂 AZD5363 后显示 FoxO1/p-FoxO1 未降低反而增高, Akt 活化受抑制, p-Akt 未发现表达,此时 Akt/p-Akt 无意义。其原因可能是在加入 Akt 阻滞剂后 PI3K/Akt 活化减弱, FoxO1 去磷酸化,重新转位于细胞核内,去磷酸化的 FoxO1 在核内发挥转录活性,抑制内皮细胞的增殖移行功能。研究^[11]表明 PI3K-Akt-FoxO1 信号通路在血管生成及内皮细胞生长与存活中发挥重要作用。IGF1 可激活 PI3K/Akt,活化的 Akt 可使 FoxO1 发生磷酸化而发生核输出,由核内转至细胞质中,失去转录活性,从而抑制细胞的凋亡^[12]。本研究的结果与报道^[12-13]一致,

说明 IGF1 是通过 Akt-FoxO1 通路保护内皮细胞增殖及移行的功能。为高糖下因 FoxO1 高表达所导致的内皮细胞功能受损提供了直接依据。提示 IGF1 保护血管内皮细胞的作用是通过调控 FoxO1 表达实现的。

本研究结果显示,高糖抑制 FoxO1 mRNA 水平的表达,但在蛋白表达水平上 FoxO1/p-FoxO1 比值增高,说明高糖抑制了 FoxO1 的磷酸化。IGF1 使高糖下 FoxO1 mRNA 的表达量明显增加,高糖 + IGF1 + AZD5363 后 FoxO1 mRNA 的表达量明显降低,但 FoxO1/p-FoxO1 比值显著升高,可能是其他信号通路对 FoxO1 蛋白表达的影响,具体信号通路机制有待进一步研究。5 组中 Akt mRNA 的表达未发现明显变化,可能是 IGF1 对 Akt 的调节作用主要体现在蛋白表达水平。

本研究显示高渗组对实验结果未产生影响,排除高糖处理下的高渗状态对内皮细胞实验结果的影响。本研究推测 IGF1 是通过激活 Akt 影响下游 FoxO1/p-FoxO1 水平进而调节内皮细胞的增殖及移行达到保护血管内皮的作用,IGF1 对减缓糖尿病血管并发症的发生和发展具有重要意义。FoxO 蛋白在血管病变发生发展中的作用和机制目前尚不清楚,进一步研究需通过核实动物模型来探索 FoxO 在体内变化的病理生理学意义,加强对糖尿病血管病变发病机制的探讨,为糖尿病血管病变的防治做出更大贡献。

参考文献

- [1] Yiu K H, Tse H F. Specific role of impaired glucose metabolism and diabetes mellitus in endothelial progenitor cell characteristics and function [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(6): 1136-43.
- [2] Mortuza R, Chen S, Feng B, et al. High glucose induced alteration of SIRT6 in endothelial cells causes rapid aging in a p300 and

- FOXO regulated pathway [J]. *PLoS one*, 2013, 8(1): e54514.
- [3] Sandri M, Barberi L, Bijlsma A Y, et al. Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle: the role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway [J]. *Biogerontology*, 2013, 14(3): 303-23.
- [4] Werner H, LeRoith D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the brain: physiological and pathological aspects [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2014, 24(12): 1947-53.
- [5] Shao S, Nie M, Chen C, et al. Protective action of liraglutide in beta cells under lipotoxic stress via PI3K/Akt/FoxO1 pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(6): 1166-75.
- [6] 周卫凤,王萍,鲁云霞,等. 辛伐他汀对高糖诱导的血管内皮细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(12): 1408-12.
- [7] Zhao Y, Yu Y, Tian X, et al. Association study to evaluate FoxO1 and FoxO3 gene in CHD in Han Chinese [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86252.
- [8] Behl Y, Krothapalli P, Desta T, et al. FOXO1 plays an important role in enhanced microvascular cell apoptosis and microvascular cell loss in type 1 and type 2 diabetic rats [J]. *Diabetes*, 2009, 58(4): 917-25.
- [9] Liu X F, Yu J Q, Dalan R, et al. Biological factors in plasma from diabetes mellitus patients enhance hyperglycaemia and pulsatile shear stress-induced endothelial cell apoptosis [J]. *Integr Biol (Camb)*, 2014, 6(5): 511-22.
- [10] Alhosin M, Anselm E, Rashid S, et al. Redox-sensitive up-regulation of eNOS by purple grape juice in endothelial cells: role of PI3-kinase/Akt, p38 MAPK, JNK, FoxO1 and FoxO3a [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57883.
- [11] Dharaneeswaran H, Abid M R, Yuan L, et al. FOXO1-mediated activation of Akt plays a critical role in vascular homeostasis [J]. *Circ Res*, 2014, 115(2): 238-51.
- [12] Yin X, Pavone M E, Lu Z, et al. Increased activation of the PI3K/AKT pathway compromises decidualization of stromal cells from endometriosis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(1): E35-43.
- [13] 陈瑶,伍亚民,龙在云,等. IGF-1 对受损血管内皮细胞存活和增殖的影响其机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(3): 784-6.

Effects of IGF1 on proliferation and migration of endothelial cells on high glucose

Teng Jiali, Liu Yanjun

(Dept of Endocrinology, 306 Teaching Hospital of Anhui Medical University, Beijing 100101)

Abstract Objective To investigate the effects and the possible mechanism of insulin like growth factor-1 (IGF1) on proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in high glucose. **Methods** Cultured HUVEC were divided into 5 groups (control group, high glucose group, hypertonic group, high glucose + IGF1 group, high glucose + IGF1 + AZD5363 group). The proliferation was detected by methyl thiazolyl tetrazolium

人 E2F1 蛋白的表达及与 Sedlin 蛋白共定位研究

汪燕燕, 潘林鑫, 王梦媛, 刘晓颖, 范礼斌

摘要 目的 研究人 E2F1 蛋白在真核细胞内的表达及其与 Sedlin 蛋白的共定位。方法 构建 pcDNA3.1-E2F1-FLAG 真核表达质粒,然后瞬时转染至 HEK 293T 细胞内,Western blot 法检测 E2F1 蛋白的表达;瞬时单转 E2F1-FLAG 和共转 E2F1-FLAG + Sedlin-绿色荧光蛋白(GFP)至非洲绿猴肾细胞(COS7)内,免疫荧光制片,荧光显微镜下观察 E2F1-FLAG 在细胞内的定位及其和 Sedlin 的共定位。结果 真核表达质粒 pcDNA3.1-E2F1-FLAG 构建成功,且在 HEK 293T 细胞中能够成功表达,在 COS7 细胞中主要定位在细胞核,且与 Sedlin 共定位于细胞核。结论 人 E2F1 在 HEK 293T、COS7 细胞中都能够正常表达,且与 Sedlin 蛋白存在共定位现象,为进一步了解人 E2F1 的功能及其蛋白质相互作用提供了一定的细胞学基础。

关键词 E2F1; 转染; 基因表达; 细胞定位

中图分类号 R 341; R 394.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)10-1377-04

细胞周期相关转录因子 E2F1,最早是在研究^[1]腺病毒 E2 启动子的过程中被发现的,在多种生理和病理过程中发挥重要作用,具有调控细胞周期进展、诱导细胞凋亡的功能。E2F1 基因全长约为 11 000 bp,定位于人 20 号染色体的长臂上即 20q11.2, mRNA 全长为 2 486 bp,由 7 个外显子与 6 个内含子组成,编码包含 437 个氨基酸残基的约为 60 ku 的蛋白质,即 E2F1 蛋白。E2F1 蛋白结构包含以下多个结构域:从 N 端至 C 端分别为 Skp2 结合区、S31、Cyclin A/Cdk2 结合区、核定位信号 NLS 区、DNA 结合区、二聚体化功能区、标记盒、S364 激活区和 pRB 结合区。SEDL 基因定位在人染色体 Xp22.12-Xp22.31 上,含有 6 个外显子,全长 20 000 bp,其编码的蛋白为含有 140 个氨基酸的 Sedlin,与骨骼的正常发育有着密切关系^[2]。该研究通过构建下游带 FLAG 标签的真核表达质粒 pcDNA3.1-E2F1-FLAG,过表达于 HEK 293T 和非洲绿猴肾细胞(COS7)细胞中,探讨 E2F1 蛋白在真核细胞中的表达及其与 Sedlin 蛋白的共定位情况,现报道如下。

2015-05-18 接收

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:81201368);安徽省级大学生创新创业训练计划项目(编号:AH201410366017, AH201410366132)

作者单位:安徽医科大学生命科学学院生物学教研室,合肥 230032

作者简介:汪燕燕,女,硕士研究生;

刘晓颖,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: liuxi-aoying@ahmu.edu.cn;

范礼斌,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: lfan@ahmu.edu.cn

(MTT), the migration was detected by transwell chamber. The mRNA expressions of serine/threonine kinase(Akt) and FoxO1 were detected by real-time PCR. The protein expressions of FoxO1/p-FoxO1 and Akt/p-Akt were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the rate of cell survival in high glucose group decreased significantly($P < 0.05$), the transitional was decreased significantly($P < 0.05$), the mRNA expression of FoxO1 was increased significantly($P < 0.05$), the protein expressions of FoxO1/p-FoxO1 and Akt/p-Akt were increased. Compared with high glucose group, the cell survival rate and migration rate in high glucose + IGF1 group were increased significantly, the mRNA expression of FoxO1 was decreased significantly($P < 0.05$), the protein expressions of FoxO1/p-FoxO1 and Akt/p-Akt were decreased. Compared with high glucose group, the cell survival rate and migration rate in high glucose + IGF1 + AZD5363 group had no significant difference, the mRNA expression of FoxO1 was decreased significantly($P < 0.05$), the protein expressions of FoxO1/p-FoxO1 had no significant difference. The mRNA expression of Akt in five groups had no significant difference. **Conclusion** IGF1 can improve the proliferation and migration of endothelial cell in high glucose. It shows that IGF1 acts through Akt to promote FoxO1 phosphorylation.

Key words insulin-like growth factor 1; forkhead transcription factors; high glucose; endothelial cells; proliferation; migration