

甘氨酸谷氨酰胺对猪离体骨骼肌卫星细胞增殖和分泌 IGF-1 的影响

高 萍, 朱晓彤, 杨玉存, 宋 刚, 傅伟龙

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 为探讨甘氨酸谷氨酰胺(Gly-Gln)对猪离体骨骼肌卫星细胞增殖和分泌 IGF-1 的作用, 取 10 日龄仔猪的半腱肌和背最长肌, 将分离出的半腱肌卫星细胞和背最长肌卫星细胞分别按 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种于培养板上, 采用浓度为 0.6、1.2 和 2.4 mmol/L 的 Gly-Gln 处理离体培养的猪半腱肌和背最长肌卫星细胞, 观察 Gly-Gln 对离体骨骼肌卫星细胞增殖和分泌 IGF-1 的影响。结果表明: 用上述浓度的 Gly-Gln 处理细胞, 对离体培养的猪半腱肌卫星细胞的增殖有显著促进作用 ($P < 0.05$), 而对离体培养的猪背最长肌卫星细胞的增殖有极显著的促进作用 ($P < 0.01$); 同时发现: 添加 0.6 mmol/L Gly-Gln 对猪背最长肌卫星细胞分泌 IGF-1 有显著的促进作用, 提示: 不同浓度的 Gly-Gln 对猪离体骨骼肌卫星细胞的增殖均有促进作用, 但不同部位的骨骼肌卫星细胞对 Gly-Gln 的反应性不同。

关键词: 甘氨酸谷氨酰胺; 骨骼肌卫星细胞; 猪; 类胰岛素生长因子-1

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2005) 02-0100-03

The effects of glycyl-glutamine on the proliferation of *in vitro* cultivated porcine skeletal muscle satellite cells and medium IGF-1 level

GAO Ping, ZHU Xiao-tong, YANG Yu-cun, SONG Gang, FU Wei-long

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The purpose of this experiment was to explore the effects of glycyl-glutamine on the *in vitro* cultivated porcine skeletal muscle satellite cells. The satellite cells were separated from semitendinosus muscle and longissimus dorsi of 10-day-old male healthy piglet and inoculated on cell-culture plate with a concentration of $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$. The effects of glycyl-glutamine on proliferation and medium IGF-1 level of *in vitro* cultivated porcine skeletal muscle satellite cells were observed. The results showed that the addition of glycyl-glutamine at 0.6, 1.2 and 2.4 mmol/L had distinct stimulating effect on the proliferation of satellite cells, and the addition of glycyl-glutamine at 0.6 mmol/L could significantly improve the secretion IGF-1 from the longissimus dorsi satellite cells.

Key words: glycyl-glutamine; skeletal muscle satellite cell; porcine; insulin-like growth factor-1

甘氨酸谷氨酰胺(Gly-Gln)是一种人工合成的小分子二肽, 相对分子质量为 203, 它具有多种生物学功能。有研究报道, Gly-Gln 能显著改善猪自体移植小肠细胞的代谢、组织结构与吸收功能^[1,2]。华南农业大学动物生理实验室在前期的研究中发现, 在断奶仔猪饲料中添加适量的 Gly-Gln 可降低仔猪血液中皮质醇水平, 减少断奶应激, 促进仔猪生长^[3,4]。本试验研究 Gly-Gln 对猪离体骨骼肌卫星细胞增殖

和分泌 IGF-1 功能的影响, 试图从细胞水平探讨 Gly-Gln 促进仔猪生长的可能机理。

1 材料与方法

1.1 试验动物及试剂

10 日龄健康雄性仔猪由华南农业大学种猪场提供; 胎牛血清为杭州四季青生物工程公司产品; 双抗(青霉素、链霉素)为 Hyclone 公司产品; 类胰岛素生

长因子-1 放免试剂盒购自天津九鼎公司; DMEM、DMEM/F12、胶原酶 II 均为 Gibico 产品; 胰蛋白酶为上海生工的产品。

1.2 试验方法

1.2.1 猪离体骨骼肌卫星细胞的分离与培养 参考王继新^[5]方法分离猪半腱肌和背最长肌卫星细胞。台盼兰检测细胞活性, 计数, 按照 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度进行接种, 培养 24 h 后进行处理。

1.2.2 甘氨酸谷氨酰胺对骨骼肌卫星细胞增殖的影响 将分离出的半腱肌卫星细胞和背最长肌卫星细胞分别按 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种于 96 孔培养板上, 共设 4 个组, 每个组设 24 个重复。第 1 组为对照组, 用含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养液培养, 第 2~4 组为处理组, 各处理组在完全培养液中分别添加 0.6、1.2 和 2.4 mmol/L 的 Gly-Gln。每隔 48 h 换液, 培养至第 7 d, 采用 MTT 法^[6]测定骨骼肌卫星细胞的增殖能力。

1.2.3 甘氨酸谷氨酰胺对骨骼肌卫星细胞分泌 IGF-1 功能的影响 分离后的骨骼肌卫星细胞按 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种于 24 孔板。共设 4 个组, 每组 6 个重复, 用含体积分数为 10% 胎牛血清的完全培养液培养 24 h 后, 对照组用无血清的 DMEM/F12 培养液培养, 各处理组在无血清的 DMEM/F12 培养液中分别添加 0.6、1.2 和 2.4 mmol/L 的 Gly-Gln。分别收集培养了 48、96 h 的细胞上清液, 3 000 r/min, 30 min 离心, 吸取上清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存, 采用放射免疫方法 (RIA) 测定培养液中 IGF-1 的含量。

1.3 数据统计与处理方法

试验数据以平均值 $\pm$ 标准误表示。数据采用 SPSS 10.0 的邓肯氏新复极差法 (DMRT 法) 进行差异

显著性检验。

2 结果与分析

2.1 甘氨酸谷氨酰胺对猪离体骨骼肌卫星细胞增殖的影响

由表 1 可知: 在半腱肌卫星细胞中, 0.6、1.2 mmol/L Gly-Gln 组与对照组相比差异均显著 ($P < 0.05$), 2.4 mmol/L Gly-Gln 组与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。在背最长肌卫星细胞中, 添加 Gly-Gln 的各处理组与对照组相比差异均达到极显著 ($P < 0.01$)。表明在猪离体骨骼肌卫星细胞培养液中添加一定浓度的 Gly-Gln 对猪离体培养的骨骼肌卫星细胞增殖均有显著的促进作用。

表 1 Gly-Gln 对猪离体骨骼肌卫星细胞增殖的影响
Tab. 1 Effects of Gly-Gln on proliferation of *in vitro* cultivated porcine skeletal muscle satellite cells $\times 10^{-2}$

组别 groups	<i>D</i> _{570 nm}	
	背最长肌 longissimus dorsi	半腱肌 semitendinosus muscle
对照组 control	6.54 $\pm$ 0.33 aA	5.93 $\pm$ 0.29 aA
0.6 mmol/L Gly-Gln	7.73 $\pm$ 0.39 bB	6.33 $\pm$ 0.19 bAB
1.2 mmol/L Gly-Gln	7.77 $\pm$ 0.41 bB	6.30 $\pm$ 0.22 bAB
2.4 mmol/L Gly-Gln	7.83 $\pm$ 0.31 bB	6.88 $\pm$ 0.34 cBC

1) $n = 24$ 同列数据后不同小写字母为差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母为差异极显著 ($P < 0.01$, DMRT 法)

2.2 甘氨酸谷氨酰胺对猪离体骨骼肌卫星细胞分泌 IGF-1 功能的影响

由表 2 可知: 在离体培养的背最长肌卫星细胞和半腱肌卫星细胞中, 96 h 时各试验组细胞培养液中 IGF-1 浓度均高于 48 h, 表明随着时间的延长,

表 2 Gly-Gln 对猪离体骨骼肌卫星细胞分泌 IGF-1 功能的影响

Tab. 2 Effects of Gly-Gln on medium IGF-1 level of *in vitro* cultivated porcine skeletal muscle satellite cells

组别 groups	$\rho(\text{IGF-1})/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$			
	背最长肌 longissimus dorsi		半腱肌 semitendinosus muscle	
	48 h	96 h	48 h	96 h
对照组 control	87.70 $\pm$ 2.31a	139.28 $\pm$ 9.81a	111.02 $\pm$ 8.66a	135.96 $\pm$ 7.55a
0.6 mmol/L Gly-Gln	97.73 $\pm$ 4.22b	141.17 $\pm$ 10.31a	107.87 $\pm$ 5.06a	139.13 $\pm$ 7.16a
1.2 mmol/L Gly-Gln	93.77 $\pm$ 4.18a	143.44 $\pm$ 5.99a	96.15 $\pm$ 4.01a	131.89 $\pm$ 16.01a
2.4 mmol/L Gly-Gln	83.37 $\pm$ 2.81a	133.72 $\pm$ 16.68a	97.92 $\pm$ 7.03a	132.34 $\pm$ 5.48a

1) $n = 6$ 同列数据后不同小写字母为差异显著 ($P < 0.05$, DMRT 法)

IGF-1 的浓度也随之增加。在背最长肌卫星细胞培养液中, 48 h 时, 添加 0.6 mmol/L Gly-Gln 组显著高于对照组和其他各组 ($P < 0.05$)。96 h 时, 仍高于对照组, 但差异不显著。在半腱肌卫星细胞培养液中 IGF-

1 浓度在 48、96 h 时, 各组间均无显著性差异。但添加 2.4 mmol/L Gly-Gln 组, 在背最长肌卫星细胞培养液或半腱肌卫星细胞培养液中 IGF-1 浓度的数值均略低于对照组。

3 讨论

动物的生长和瘦肉率的提高主要体现在骨骼肌的生长. 骨骼肌由大量排列成束的肌纤维组成, 每条肌纤维是一个独立的肌细胞. 骨骼肌卫星细胞是骨骼肌中位于肌细胞膜和基膜之间的具有增殖分化潜力的肌源性干细胞.

本研究在猪离体骨骼肌卫星细胞培养液中添加不同浓度的 Gly-Gln, 培养至第 7 d, MTT 染色法测定结果表明, Gly-Gln 对猪离体培养的背最长肌卫星细胞和半腱肌卫星细胞均有促进增殖作用. 此结果与 Schepach^[7]报道的外源添加 Gln 二肽可刺激肠粘膜细胞的增殖相类似, 与我们在断奶仔猪饲料中添加适量 Gly-Gln, 可促进仔猪生长相吻合, 为 Gly-Gln 可促进仔猪机体生长提供了佐证. 但有研究报道 Gly-Gln 进入机体能快速水解, 释放谷氨酰氨单体以满足机体的需要^[8,9]. 本研究中, Gly-Gln 促进猪离体骨骼肌卫星细胞增殖的作用是 Gly-Gln 对细胞的直接作用, 还是完全培养液中的胎牛血清或鸡胚浸出液对 Gly-Gln 的水解促使 Gln 持续而稳定地释放, 对细胞的增殖产生显著的促进作用, 仍需进一步研究.

肝脏是产生 IGF-1 的主要场所, 但许多组织细胞均可产生 IGF-1 与 IGF-2, 从而发挥自分泌、旁分泌作用^[10]. 本研究结果显示, 在无血清骨骼肌卫星细胞培养液中, 添加或不添加 Gly-Gln 的各组, 骨骼肌卫星细胞均能分泌一定量的 IGF-1, 且各组中 96 h 时 IGF-1 浓度均显著高于 48 h, 表明骨骼肌卫星细胞在离体条件下具有分泌 IGF-1 的能力. 随着培养时间的延长, IGF-1 的浓度是增加的, 原因可能是由于细胞数目的增加, 其分泌的 IGF-1 浓度相应上升. 另外, 在本研究中发现不同浓度的 Gly-Gln 处理组中, 猪背最长肌卫星细胞和半腱肌卫星细胞分泌 IGF-1 浓度有差异, 添加 0.6 mmol/L Gly-Gln 的猪背最长肌卫星细胞分泌 IGF-1 的水平在 48 h 时明显高于对照组 ($P < 0.05$), 至 96 h 时也高于对照组, 但差异不显

著. 而添加量较大的处理组 IGF-1 的水平大部分低于对照组, 但没有显著差异. 这一方面是不同部位的骨骼肌卫星细胞分泌 IGF-1 的功能不同或骨骼肌卫星细胞对 Gly-Gln 的反应性可能有差异. 另一方面与加入剂量的多少有关.

参考文献:

- [1] 蒋建文, 李幼生, 王新波, 等. 甘氨酸谷氨酰胺二肽改善猪自体移植小肠的组织结构[J]. 肠外与肠内营养, 2001, 8(2): 90—92.
- [2] 蒋建文, 黎介寿, 李幼生, 等. 甘氨酸谷氨酰胺二肽改善猪自体移植小肠的吸收功能[J]. 肠外与肠内营养, 2000, 7(2): 80—82.
- [3] 黄冠庆, 傅伟龙, 高萍, 等. 甘氨酸谷氨酰胺二肽对断奶仔猪生长性能及血液激素水平的影响[J]. 华南农业大学学报, 2003, 24(3): 66—68.
- [4] 黄冠庆, 傅伟龙, 高萍, 等. 谷氨酰胺、甘氨酸谷氨酰胺对断奶仔猪生长及内分泌的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2004, 40(7): 11—13.
- [5] 王继新, 江青艳, 高淑静, 等. 骨骼肌卫星细胞培养方法的建立[J]. 华南农业大学学报, 2002, 23(1): 89—91.
- [6] 徐淑云. 药理实验方法学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1 221—1 222.
- [7] SCHEPACH W, LOGES C, CHRISTL S U, et al. Effect of free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on mucosal proliferation of the human ileum and colon[J]. Gastroenterology, 1994, 107: 429—432.
- [8] ADIBI S A. Experimentable basis for use of peptide as substrates for parenteral nutrition: A review [J]. Metabolism, 1987, 36: 1 001.
- [9] FURST P, POGAN K, STEHLE P. Glutamine dipeptides in clinical nutrition [J]. Nutrition, 1997, 13: 731—737.
- [10] MENUËLLE P, BABAJKO S, PLAS C. Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins modulate the glucocorticoid-dependent biological effects of IGF-II in cultured fetal rat hepatocytes [J]. Endocrinology, 1999, 140(5): 2 232—2 240.

【责任编辑 柴 焰】