

撤稿声明

赵平, 周琦, 毕龙俊, 沈金花, 杨新洲, 刘庆华. 脂肪细胞中Munc18c的缺失不影响胰岛素诱导的GLUT4转运. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41(11): 1144-1154 [ZHAO Ping, ZHOU Qi, BI Long-Jun, SHEN Jin-Hua, Yang Xin-Zhou, LIU Qing-Hua. Munc18c is dispensable for insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2014, 41(11): 1144-1154].

应论文作者请求, 撤销上列已发表论文. 作者撤稿函刊登如下.

《生物化学与生物物理进展》编委会
2016年1月13日

撤稿函

尊敬的《生物化学与生物物理进展》编辑部:

在贵刊2014年第41卷第11期1144-1154页上发表的文章《脂肪细胞中Munc18c的缺失不影响胰岛素诱导的GLUT4转运》, 由于未通知到所有对该文章有贡献的人员, 现经所有作者同意, 请求将该论文撤销. 本人对贵编辑部和读者表示深深的歉意.

赵平
2016年1月5日

赵平 周琦 毕龙俊
沈金花 杨新洲 刘庆华

Retraction

Dear Editor of *Progress in Biochemistry and Biophysics*:

I request to retract the paper published in *Progress in Biochemistry and Biophysics*: Munc18c is Dispensable for Insulin-stimulated GLUT4 Translocation in Adipocytes. 2014, 41 (11): 1144- 1154. Since not all the contributors to the paper were informed before publication, now all the authors agree to withdraw the paper. I deeply apologize to the editors of *Progress in Biochemistry and Biophysics* and readers.

ZHAO Ping
January 5, 2016

Zhao Ping Zhou Qi Bi Long Jun
SHEN Jin-Hua Yang Xinzhou

脂肪细胞中 Munc18c 的缺失不影响胰岛素诱导的 GLUT4 转运*

赵平^{1)**} 周琦¹⁾ 毕龙俊¹⁾ 沈金花¹⁾ 杨新洲^{2)**} 刘庆华^{1)**}

¹⁾中南民族大学生命科学院, 武汉 430074; ²⁾中南民族大学药学院, 武汉 430074)

摘要 动物脂肪和肌肉组织中葡萄糖的摄取是通过受胰岛素调控的 GLUT4 储存囊泡的运输实现的. Sec1p 的同源物 Munc18c 被认为是通过控制 SNARE 复合物的装配来使 GLUT4 囊泡锚定到质膜上的重要物质. 我们发现 Munc18c 的缺失没有影响 GLUT4 的转运上膜, 也没有影响 Syntaxin4 在细胞膜上的定位. 在缺少 Munc18c 和功能性 Syntaxin2 的时候, GLUT4 的转运可能和 Munc18b 有关. 在 3T3-L1 脂肪细胞中与 Syntaxin4 具有强烈相互作用的是 Munc18c 而不是 Munc18a 和 Munc18b. 然而, 当缺少 Munc18c 时, Munc18a 和 Munc18b 与 Syntaxin4 体现出较弱的相互作用. 因此, Syntaxin4 可能在胰岛素刺激 GLUT4 转运过程中起到重要的作用, 且与 SM 蛋白的相互作用是有代偿性的.

关键词 脂肪细胞, 葡萄糖摄取, SM 蛋白, GLUT4 转运, Syntaxin4

学科分类号 Q27

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00089

SM 蛋白 (Sec1p/Munc18-like proteins, Sec1p/Munc18 类蛋白) 是一类 SNARE 结合蛋白, 可能在囊泡锚定和融合过程中起到关键作用^[1]. 它们是高度保守的蛋白质家族, 联通了细胞内各种膜与膜之间的相互作用^[2]. 将许多 SM 基因进行无效突变会导致生物体的发育缺陷, 在许多情况下还会导致较高的致死率^[3-4]. 酵母中包含四种 SM 蛋白: Sec1p、Sly1p、Vps45p 和 Vps33p. Sec1p 是第一个被鉴定出来的 SM 蛋白. Novick 和 Schekman^[5] 用酵母基因筛选法鉴别出与分泌过程有关的基因, 通过对 *SECI* 基因 (*sec1-1*) 的热敏突变导致细胞内囊泡的累积和细胞分裂的阻断. SM 蛋白在细胞质膜上起作用, 并能特定地定位到酵母芽颈部^[5]. 而在哺乳动物细胞中囊泡运输到细胞膜的过程中有三种 SM 蛋白参与调控. 其中 Munc18a (n-Sec1, Munc18-1) 是最初从大脑溶解物中鉴定出的突触融合蛋白 Syntaxin1 结合蛋白, 当 Munc18a 缺损时会导致神经传递的完全阻断^[4]. 它的两个亚型 Munc18b (Munc18-2) 和 Munc18c 随后也被 Tellam 及他的同事所发现^[6]. 每个 Munc18 亚型都有着不同的表达分布. Munc18a 在大脑中的表达比较显著, 而

Munc18b 和 Munc18c 两个亚型则在不同组织中都能表达. 近期 Shen 和他的同事^[7] 研究表明 Munc18a 可同时与 t 和 v-SNARE 结合, 从而引起脂质体囊泡融合. 不同细胞膜上的 Syntaxin(1~4) 与 Munc18 的每个亚型都有着不同的联系, 如 Syntaxin4 只与 Munc18c 结合^[8-9]. Syntaxin4 和 Munc18c 的特殊作用有利于我们研究 Munc18c 在 GLUT4 转运过程中的作用. 一些研究表明, 在 3T3-L1 脂肪细胞^[10-11] 和骨骼肌细胞^[12] 中, Munc18c 的过量表达抑制了 GLUT4 向细胞膜的转运以及葡萄糖的摄取. 而在杂合基因敲除 Syntaxin4(+/-) 的小鼠骨骼肌细胞中胰岛素刺激 GLUT4 的转运是明显减少的, 但是在脂肪组织和肝脏中, 杂合基因敲除 Syntaxin4(+/-) 对于胰岛素刺激的葡萄糖摄取却没有影响^[13].

为了进一步了解 Munc18c 蛋白的功能, 以及

* 国家自然科学基金(31070744, 81102798), 中央高校基本业务费专项基金(CZY14013), 国家大学生创新创业训练项目(备选)(BCX13102)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 027-67842576, E-mail: zping0124@163.com

收稿日期: 2014-03-28, 接受日期: 2014-06-26

Syntaxin4 与 Munc18c 的联系, 我们利用 Munc18c 基因敲除小鼠与 C 型肉毒毒素轻链(botulinum toxin type C light chain, BoNT/C)表达相结合, 试验结果表明 Munc18c 缺失并不会影响 GLUT4 的上膜, Munc18c 的存在与否也不会影响到 Syntaxin4 在细胞膜上的定位. 我们还发现, 在 Munc18c 和功能性 Syntaxin2/3 缺失的情况下, GLUT4 的转运与 Munc18b 有联系. 不管是在 Munc18c 野生型还是在 BoNT/C 转染 Munc18c 基因敲除小鼠的胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)分化得到的原代脂肪细胞中, HA-GLUT4 与细胞膜融合的量并没有明显的区别. 我们同时将 HA-Syntaxin4 和 V5-Munc18a、V5-Munc18b、V5-Munc18c 中任意一个通过逆转录病毒共同转染至 3T3-L1 脂肪细胞. Syntaxin4 与 Munc18c 具有强烈的相互作用, 而不是 Munc18a 或 Munc18b. 然而, 在转染了 HA-Syntaxin4 逆转录病毒的 Munc18c 基因敲除的 MEF 分化的脂肪细胞中, 在缺少 Munc18c 时 Munc18a 和 Munc18b 与 Syntaxin4 表现出了较弱的相互作用. 以上数据表明, Syntaxin4 可能在胰岛素刺激 GLUT4 转运过程中起到重要的作用, 且与 SM 蛋白的相互作用是可以相互代偿的.

1 材料与方法

1.1 材料

Syntaxin4 抗体根据 Tellam 的方法制备^[8]; VAMP2 抗体购自 Invitrogen 公司^[14]; Munc18c 抗体根据 Widberg 所述的方法制备^[15]; Munc18a 的抗体购自 Thomas Südhof (University of Texas Southwestern, TX); 小鼠抗 HA 抗体(16B12 peptide)购自 Covance Research Products (CA, USA); 小鼠抗 V5 抗体购自 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA); 鼠抗和兔抗红外染料标记的二抗购自 Rockland Immunochemicals (PA, USA); Cy3 和 Cy5 标记的二抗购自 Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA); 兔抗 14-3-3 β 抗体和小鼠抗 GFP 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); C57Bl/6J 背景的 Munc18c 杂合小鼠购自 Masato Kasuga (Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan)^[16]. Munc18c 目标序列 (5' acaggaaucucaggtttattt 3') 和非目标控制序列 (5' nnuuaaggcuagaagagauac 3') siRNA 由 Dharmacon

(Dharmacon, Inc., IL, USA)设计和合成.

1.2 方法

1.2.1 质粒构建

pEGFP-C1-BoNT/C cDNA 从 Robert Burgoyne 教授 (The University of Liverpool, UK)处获得. V5-Munc18a、b 和 c 逆转录病毒的构建是通过 PCR 扩增将单个 V5 抗原决定因子引进小鼠 Munc18a、b、c 的 cDNA 的 N 端而获得. 利用 BP 反应将 PCR 产物克隆进入 pDONR221 载体中. V5-Munc18-pDONR221 克隆载体利用 LR 重组进 pQCXIP 逆转录病毒表达载体. 完整的 Syntaxin4、2 的 cDNA 是从来自于 R. Scheller (Genentech, South San Francisco, CA, USA)的完整小鼠 Syntaxin4、2 pBluescript 质粒扩增, 两倍的 HA 抗原决定簇引进 Syntaxin4 和 2 的羧基端, 且被克隆进入 pBABE 逆转录病毒表达载体中.

1.2.2 转染

培养的脂肪细胞来自于 MEFs^[17]. 待 7 天后开始分化, 用 0.05%的 trypsin-EDTA(Gibco)进行消化, 室温 400 g 离心收获细胞, 然后用 PBS 洗 1 次除去残留的培养基成分, 最后用 Cytomix 溶液重悬细胞, 加入 20 μ g 质粒使终体积为 400 μ l. 将细胞悬液加入 4 mm 电击池, 冰浴, 用 BTX 830 Electroporator (Biocompare, South San Francisco, CA, USA)电转仪, 电压 250 V, 电击 20 ms. 电击后马上将细胞滴在涂有 gelatin 的玻片上. 细胞贴壁 2 天即可用于实验. 实验前, 细胞必须经过 2 h 以上无血清培养基的饥饿. 实验中的外液为 KRBB (单位 mmol/L): 129 NaCl、4.7 KCl、1.2 KH₂PO₄、5 NaHCO₃、10 HEPES、3 Glucose、2.5 CaCl₂、1.2 MgCl₂ 和 0.1% BSA (pH 7.2)^[18]. 该研究中胰岛素的浓度为 100 nmol/L, 除特殊注明外, 所有试剂均购于 Sigma 公司.

1.2.3 TIRFM 成像采集与分析

TIRFM 装置是通过改变激光的入射角来实现的^[19]. 在 488 nm 激光下测量出棱镜的入射角($n=1.518$), 且其瞬间的穿透深度有 113 nm. 任意选择一些已经转染了 GLUT4-eGFP 的绿色荧光细胞. 用终浓度为 100 nmol/L 的胰岛素刺激这些细胞, GLUT4-eGFP 的荧光将会通过 TIRFM 的瞬时作用而被检测出.

1.2.4 MEF 原代脂肪细胞膜组分的纯化和免疫印迹
先用冰浴的 PBS 洗涤细胞 3 遍, 换为含有

蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 HES 缓冲液 (20 mmol/L HEPES, 10 mmol/L EDTA, 250 mmol/L 蔗糖, pH 7.4). 用刀轻刮细胞后, 分别用带 22G 针头的注射器和带 27G 针头的注射器抽吸细胞 12 次. 将该混合液 500 g 离心 10 min 后吸取上清, 再经 18 000 g 离心 20 min 而获得所需膜组分. 获得的样品经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 在 10% 的分离胶上进行分析. 在一个单因素实验中, 每个孔道都被加入了相同数量的蛋白. 蛋白质分离后将其转移到 PVDF 膜上, 用封闭缓冲液 (PBS 中加入 2% 脱脂牛奶和 0.1% 吐温 20) 进行封闭, 然后用含有一抗的缓冲液进行孵育, 培养后用缓冲液将膜清洗 3 次, 再用红外染料 800 标记的二抗进行孵育. 最后用 Odyssey IR 成像系统在 800 nm 信号通路下对膜进行扫描.

1.2.5 HA-GLUT4 逆转录病毒的包装和 MEF 细胞的感染

用脂质体介导逆转录病毒载体 pBABE-HA-GLUT4 转染 Platinum-E 包装细胞^[20]. 48 h 后收集含逆转录病毒颗粒的培养基. 用 4 ml 含病毒颗粒的培养基感染 10 cm 培养皿中 2×10^5 MEF 细胞, 24 h 后可加 puromycin 进行筛选.

1.2.6 激光共聚焦扫描显微成像及 HA-GLUT4 细胞膜染色的定量测量

将 MEF 分化的脂肪细胞培养在玻璃片上. 用含 3% 多聚甲醛的 PBS 溶液固定, 用含 2% (w/v) BSA 的 PBS 溶液封闭, 然后用鼠抗 HA 抗体 (稀释度 1:200) 孵育, 细胞被标记上含有 Cy3 标记的二抗. 在正常和含有胰岛素 (100 nmol/L) 两种情况下孵育表达 HA-GLUT4 的脂肪细胞 30 min 后, 利用激光共聚焦扫描显微镜对细胞进行分析 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), 用 Leica 共聚焦软件分析处理并通过 HCA-Vision 软件对正常和胰岛素处理的细胞质膜荧光强度进行定量分析 (<http://www.hca-vision.com/>).

1.2.7 D-2-脱氧葡萄糖吸收实验

将分化好的细胞平均分到 12 孔板中, 细胞无血清饥饿 2 h 后, 在含 1 nmol/L 或者 100 nmol/L 胰岛素的 KRH 溶液 (25 mmol/L HEPES-NaOH pH 7.4, 120 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L MgSO₄, 1.3 mmol/L CaCl₂, 1.3 mmol/L KH₂PO₄) 中孵育 20 min, 然后每个孔中加入 50 μ l 含 0.5 mmol/L 2-deoxy-D-[1, 2-³H]glucose (0.25 μ Ci) 的 KRH 溶液,

5 min 后, 用冰浴的 KRH 溶液洗 3 次, 终止实验. 裂解细胞并收集, 用液闪仪测量各个孔的放射性并计数^[21].

1.2.8 统计分析

通过非配对的两个独立样本 *t* 检验得到 $\bar{x} \pm s$. 当 $P < 0.05$ 时则称具有统计学意义.

1.2.9 细胞裂解和免疫沉淀反应

准备 4 个 10 cm 的培养皿 (2 个未感染, 2 个被逆转录病毒感染) 在不含血清的培养皿中 37°C / 5% CO₂ 条件下饥饿 2 h. 取 2 个培养皿 (1 个被感染, 1 个未被感染) 用浓度 100 nmol/L 的胰岛素刺激 5 min. 然后将细胞转移到冰上用冰浴的 PBS 洗涤 3 次. 将每个 10 cm 培养皿中的细胞刮起来放入 300 μ l 冰浴的含有完全蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液中 (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% (v/v) Triton-X-100). 然后分别用带 22G 针头的注射器和带 27G 针头的注射器抽吸 10 次和 2 次, 将溶解产物在 18 000 g、4°C 离心 30 min. 吸取上清液 400 μ l, 从该上清液中取出 40 μ l (10% 作为免疫印迹实验的对照样品). 剩余上清液与结合了 V5 抗体的琼脂糖珠一起 4°C 下培养过夜. 培养后, 将该琼脂糖珠用 400 μ l 冰浴的裂解缓冲液冲洗 4 次, 再用 400 μ l 冰浴的 PBS 洗 2 次, 1 000 g 离心 2 min, 吸去上清. 通过加入 40 μ l 4 倍浓度的 SDS 上样缓冲液将蛋白洗脱下来, 100°C 加热 5 min 后, 2 000 g 离心 3 min. 最后该洗脱液将通过 SDS-PAGE 胶和免疫印迹法利用鼠抗 V5 和兔抗 Syntaxin4 的抗体进行分析.

2 结 果

2.1 脂肪细胞中, Munc18c 基因沉默不影响胰岛素刺激下的葡萄糖摄取与 GLUT4 上膜

SM 蛋白中的 Munc18c 被认为是脂肪细胞中通过与 t-SNARE 蛋白 syntaxin-4 相结合来调控 GSVs (GLUT4 storage vesicles, GLUT4 储存囊泡) 与细胞膜锚定和融合的. 首先, 我们检测了对照组和 Munc18c 基因沉默的脂肪细胞中胰岛素刺激下的葡萄糖摄取. 在分别使用 100 nmol/L 胰岛素刺激之后 (图 1a), Munc18c 基因沉默的脂肪细胞和对照组细胞中, 胰岛素刺激下的葡萄糖摄取没有明显的区别. 这说明了内源性的 GLUT4 转运不受 Munc18c 缺失的影响. 有报道指出, 酵母中 Vps45p (一种 Sec1p/Munc18 (SM) 蛋白) 的缺失会导致 Tlg2p (一

种 syntaxin-like SNARE 蛋白) 的降解^[22], Munc18a 基因敲除小鼠中, Syntaxin1 的蛋白水平也会降低^[4]. 与这些报道类似, 我们用 siRNA 将脂肪细胞中目标蛋白 Munc18c 的量减少了约 90%后, 发现细胞

中 Syntaxin4 的量减少了 50%(图 1b). 这一发现表明了 Munc18c 和 Syntaxin4 这两种蛋白之间的相互关系, 即它们在细胞内可能是以稳定的复合物形式存在.

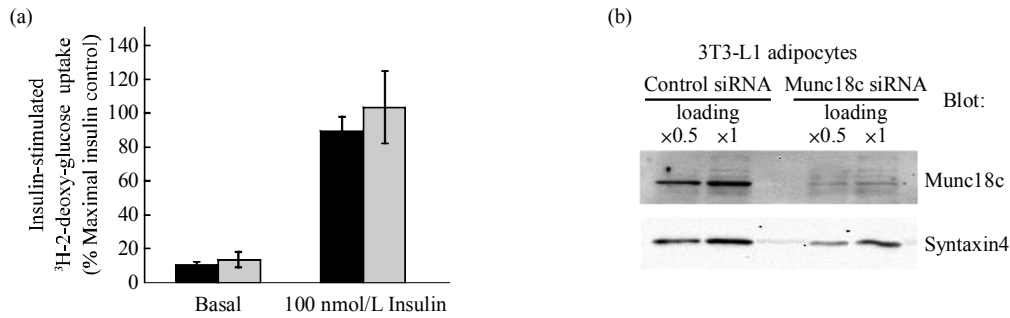


Fig. 1 Insulin-stimulated glucose uptake in Munc18c KD adipocytes

(a) Insulin-stimulated glucose transport in Munc18c KD adipocytes. Uptake of 2-deoxy-D-[1, 2-³H] glucose was assayed in control or Munc18c siRNAs adipocytes stimulated with the indicated concentration of insulin. Data represent $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments and are expressed as fold stimulation of glucose uptake relative to that without insulin. ■: Control siRNA; □: Munc18c siRNA. (b) siRNA mediated knockdown of Munc18c in 3T3-L1 adipocytes results in a co-incident downregulation of Syntaxin4 protein expression levels. 3T3-L1 adipocytes were electroporated with control or Munc18c siRNAs. After 72 h, whole cell lysates were prepared and immunoblotted for Munc18c and Syntaxin4.

我们利用全内反射荧光显微镜(total internal reflection fluorescence microscope, TIRFM)检测了 3T3-L1 脂肪细胞中的加强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, eGFP) 标记的 GLUT4 转运. 我们之前的研究表明, 通过 eGFP 标记的 GLUT4 在 TIRFM 下可以看到 3T3-L1 脂肪细胞中的单个 GSVs^[18, 23]. 发现在 Munc18c 减少的情况下, 无论在动力学(图 2a)还是数量变化(图 2b)

上对胰岛素依赖的 GLUT4 转运的响应都没有明显影响. 为了确认 siRNA 对 Munc18c 基因沉默的效果, 在 3T3-L1 脂肪细胞中, 利用对照组和经 siRNA 处理的 Munc18c 蛋白, 通过免疫印迹实验, 可以清楚地看到 Munc18c 蛋白经 siRNA 处理后有非常显著的减少(图 2c). 这说明 Munc18c 基因沉默对胰岛素依赖的 GLUT4 转运没有明显影响.

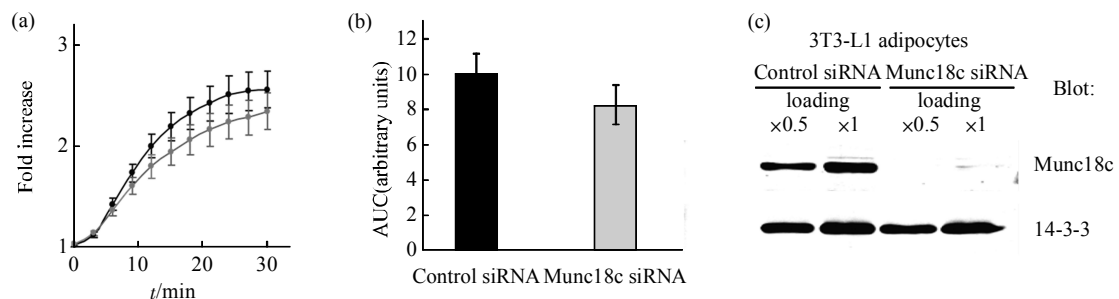


Fig. 2 Insulin-stimulated GLUT4 trafficking in Munc18c KD adipocytes

(a) Time course of the change in fluorescence induced by insulin within the evanescent field in Control ($n=35$ cells) and Munc18c siRNAs ($n=50$ cells) adipocytes. Fluorescence was normalized to the value prior to insulin application. ●—●: Control siRNA; ●—●: Munc18c siRNA. (b) $\bar{x} \pm s$ of arbitrary units of the change in fluorescence from (a). Data represent the fold increase in fluorescence induced by insulin from 0 to 30 min. (c) siRNA mediated knockdown of Munc18c in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were electroporated with control or Munc18c siRNAs. After 72 h, whole cell lysates were prepared and immunoblotted for Munc18c and 14-3-3. 14-3-3 was used as a loading control.

2.2 Munc18c 的缺失不影响 MEF 分化的脂肪细胞中胰岛素刺激的 GLUT4 转运

由于 Munc18c 的基因沉默并没有影响胰岛素依赖的 GLUT4 转运. 我们认为可能是基因沉默无法达到 100%的效率. 所以用 Munc18c 基因敲除小鼠(Munc18c ko)的脂肪细胞来检测 GLUT4 的转运. Munc18c 基因敲除的小鼠表现出了新生鼠致死现象, 因此分离基因敲除小鼠胚胎的 MEFs 细胞, 将其分化成脂肪细胞^[23]. 发现缺少 Munc18c 对 MEF 细胞分化成脂肪细胞的能力没有显著影响.

此外, Munc18c 的缺失明显地减少了 Syntaxin4 蛋白的表达量, 而对 Munc18a、Munc18b、Syntaxin2 和 VAMP2 的表达没有影响(图 3a). 通过检测 MEF 分化的脂肪细胞中 eGFP 标记的 GLUT4 转运, 发现 Munc18c 的缺失无论在动力学(图 3b)还是数量变化(图 3c)上, 对胰岛素依赖的 GLUT4 转运都没有明显的影响. 这和 Munc18c 基因沉默的 3T3-L1 脂肪细胞中胰岛素刺激的 GLUT4 转运到质膜上的影响是完全一致的.

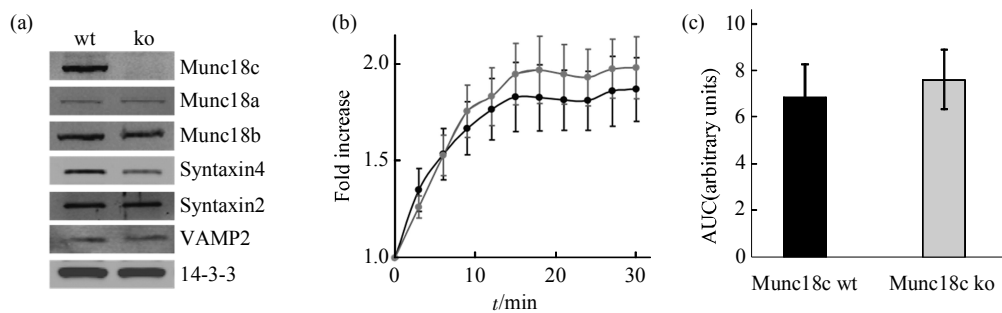


Fig. 3 Insulin-stimulated GLUT4 trafficking on the kinetics or magnitude in Munc18c ko adipocytes

(a) Immunoblot analysis of Munc18c ko adipocytes protein lysates. Lysates prepared from MEF-derived adipocytes of Munc18c wt and ko mice were subjected to immunoblot analysis with antibodies specific for the indicated proteins. 14-3-3 was used as a loading control. (b) Time course of the change in fluorescence induced by insulin within the evanescent field in Munc18c wt ($n=16$ cells) and ko ($n=28$ cells) adipocytes. Fluorescence was normalized to the value prior to insulin application. ●—●: Munc18c wt; ●—●: Munc18c ko. (c) $\bar{x} \pm s$ of arbitrary units of the change in fluorescence from (b). Data represent the fold increase in fluorescence induced by insulin from 0 to 30 min. wt: Wild type; ko: Gene knock out.

2.3 Munc18c 的缺失不影响 Syntaxin4 在质膜上的定位

通过免疫印迹分析表明, 与野生型小鼠相比, Munc18c 基因敲除小鼠细胞中的 Syntaxin4 蛋白含量减少了约 60%(图 4a, b). 说明了脂肪细胞中

Munc18c 可能是通过与 Syntaxin4 形成复合物使 Syntaxin4 稳定表达的. 然而, Munc18c 基因敲除小鼠脂肪细胞质膜上 Syntaxin4 的量只减少了约 20%(图 4a, b). 这表明 Syntaxin4 在质膜上的定位可能并不完全依赖于 Munc18c.

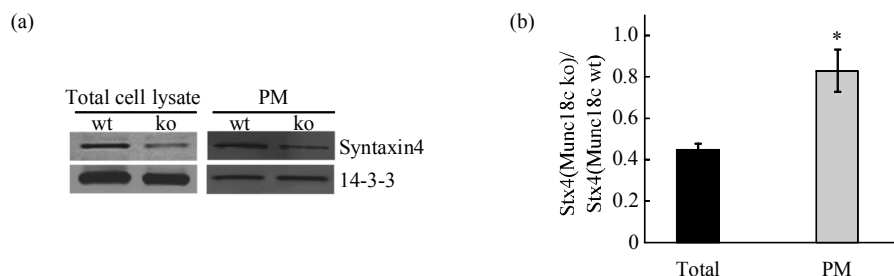


Fig. 4 The expression of Syntaxin4 in Munc18c ko adipocytes

(a) Immunoblot analysis of the expression of Syntaxin4 protein at the plasma membranes (PM) in Munc18c ko MEF-derived adipocytes. Total cell lysates prepared from MEF-derived adipocytes of Munc18c wt and ko mice were subjected to immunoblot analysis with Syntaxin4 antibody (left). Plasma membranes of Munc18c wt and ko MEF-derived adipocytes were isolated using the cationic silica isolation method and Syntaxin4 protein levels at the plasma membranes were detected by immunoblotting (right). 14-3-3 was used as a loading control. (b) Quantification of changes in protein expression of Syntaxin4 in total cell lysates and at the plasma membranes between Munc18c wt and ko MEF-derived adipocytes from (a). Data represent $\bar{x} \pm s$ of values from three separate experiments. * $P < 0.01$; a statistically significant difference.

2.4 在 3T3-L1 脂肪细胞中 Syntaxin2 的降解不影响胰岛素刺激的 GLUT4 转运上膜

Munc18c 被认为是介导 GLUT4 转运上膜的主要 SM 蛋白^[24], 然而我们在 Munc18c 缺失的细胞中没有发现对 GLUT4 转运的影响. 这个结果表明, Munc18c 可能并不是胰岛素刺激 GLUT4 转运所必需的, 也可能是由于细胞中其他 Munc18 亚型补偿了 Munc18c 的功能, 因此不能反映出 GLUT4 转运中 Munc18c 的重要性. 最近研究表明, Munc18b 是外分泌系统中分泌活动的重要调控者^[25], 它在唾液腺分泌淀粉酶和胰泡细胞分泌酶原颗粒的过程中都起到重要作用. 我们在 3T3-L1 脂肪细胞和 MEF 分化的脂肪细胞中都发现了 Munc18b. 而 Syntaxin2 在 3T3-L1 脂肪细胞中的胰岛素刺激 GLUT4 转运过程中可以与 Munc18b 结合. 为了确

定 Munc18b 在 GLUT4 转运过程中是否有作用, 使用了对 Syntaxin2 有较强降解作用的 BoNT/C. BoNT/C 可以有效剪切 Syntaxin1、2 和 3 但不能剪切 4. 使用 GFP-BoNT/C 质粒, 使其可以同时表达毒素和标记蛋白 GFP. 3T3-L1 脂肪细胞中, GFP-BoNT/C 的表达有效地剪切了共表达的 HA-Syntaxin2, 但不剪切 HA-Syntaxin4(图 5b). 我们还用转染 HA-GLUT4 的 3T3-L1 脂肪细胞研究了 GLUT4 与质膜的融合. 通过测量细胞表面 HA 抗体的荧光标记, 监测这些细胞中胰岛素诱导的 GLUT4 与质膜的融合^[26]. 发现 GFP-BoNT/C 对胰岛素诱导的 HA-GLUT4 表面分布没有明显影响(图 5a, c). 这表明 Syntaxin2/Munc18b 可能并没有涉及胰岛素诱导的 GLUT4 与质膜的融合.

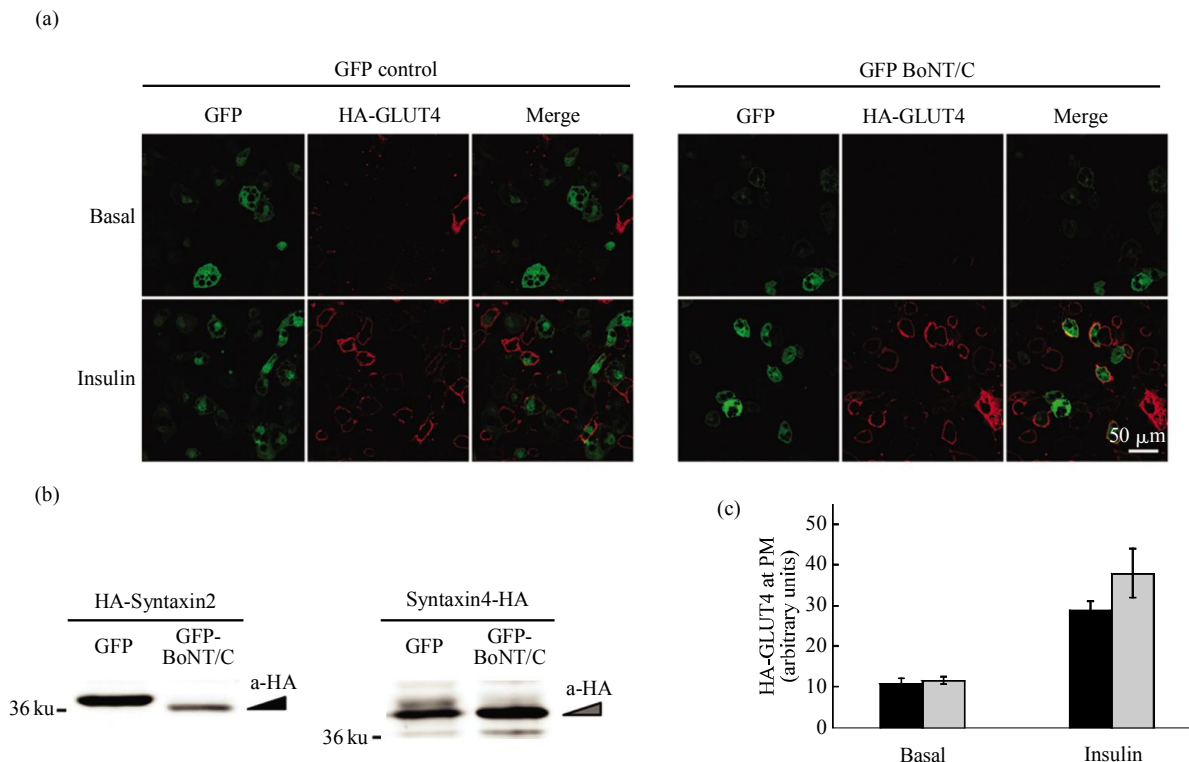


Fig. 5 GFP-BoNT/C does not affect insulin-induced surface deployment of HA-GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes

(a) 3T3-L1 adipocytes were infected with pBabe-HA-GLUT4 retrovirus in the presence of GFP control cDNA (left) or GFP-BoNT/C cDNA (right) and processed for indirect immunofluorescence using anti-HA antibodies under basal and insulin-treated conditions. GFP or GFP-BoNT/C is shown in green and HA antibody labeled with Cy3-conjugated secondary antibody is shown in red. Representative images are shown. (b) BoNT/C can effectively cleave Syntaxin2 but not Syntaxin4 chimeras in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were transfected with HA-Syntaxin2 (left) and Syntaxin4-HA (right) in the presence of GFP control or GFP-BoNT/C cDNA as shown. Total cell lysates from all samples were separated by 10% SDS-PAGE and immunoblotted with anti-HA antibodies. The black and gray arrowheads indicate the cleaved and uncleaved fragments of the t-SNAREs, respectively. (c) Quantification of surface HA fluorescence measured from adipocytes in the presence of GFP control or GFP-BoNT/C cDNA under both basal and insulin-treated conditions from (a). Data represent $\bar{x} \pm s$ of values from three separate experiments, with ~ 20 cells quantified per experiment. ■: Control; □: BoNT/C.

2.5 在 Munc18c 基因敲除小鼠的 MEF 分化的脂肪细胞中, Syntaxin2 的缺失不影响胰岛素刺激 GLUT4 的转运上膜

已知证据表明, 细胞内细胞膜的融合反应并不依赖于特定的 v-SNARE 蛋白, 目前几个研究也发现 v-SNARE 蛋白的功能是可以被其他 v-SNARE 亚型所代替的^[27-28]. 为了了解 SM 蛋白是否也有

v-SNARE 蛋白的冗余现象, 我们通过在 Munc18c 基因敲除小鼠的 MEF 分化的脂肪细胞中瞬时转染 GFP-BoNT/C, 对同时缺少 Syntaxin2 和 Munc18c 时 GLUT4 的转运进行研究. 发现在 Munc18c 基因敲除的同时, 将 Syntaxin2 剪切掉对胰岛素诱导的 HA-GLUT4 表面分布并没有明显的影响(图 6).

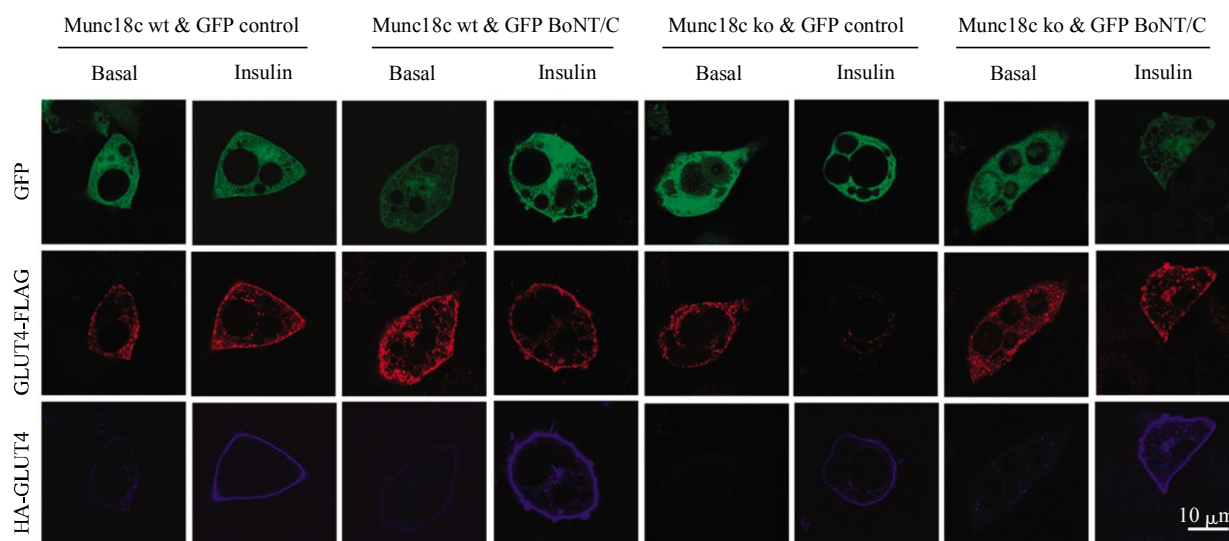


Fig. 6 Inactivation of Syntaxin2 does not affect GLUT4 externalization in Munc18c ko adipocytes

Munc18c wt and ko adipocytes were transfected with HA-GLUT4-FLAG cDNA in the presence of GFP or GFP-BoNT/C cDNA as shown and processed for indirect immunofluorescence using anti-HA and anti-FLAG antibodies under basal and insulin-treated conditions. GFP and GFP-BoNT/C are shown in upper panel, FLAG antibody labeled with Cy3-conjugated secondary antibody is shown in middle panel and HA antibody labeled with Cy5-conjugated secondary antibody is shown in lower panel. Representative images are shown. Images are from three separate experiments, with ~20 cells for each condition per experiment.

2.6 缺少 Munc18c 时, Munc18a/b 与 Syntaxin4 具有一定的相互作用

为了研究 Syntaxin4 与 Munc18 亚基之间的相互作用. 首先, 我们同时将 HA-Syntaxin4 和 V5-Munc18a、V5-Munc18b、V5-Munc18c 中的任意一个通过逆转录病毒共同转染至 3T3-L1 脂肪细胞. HA-Syntaxin4 首先与 HA 抗体连接的琼脂糖珠结合而从细胞中分离出来, 然后通过免疫印迹法对与其结合的 Munc18 亚基进行定量分析. 图 7a 显示了在细胞中与 Syntaxin4 具有强烈相互作用的是

Munc18c 而不是 Munc18a 和 Munc18b. 接下来分别将 HA-Syntaxin4 逆转录病毒转染到野生型和基因敲除 Munc18c 的 MEFs 中. HA-Syntaxin4 与 HA 抗体连接的琼脂糖珠结合而从细胞中分离出来, 通过免疫印迹法对与其结合的 Munc18 亚基进行定量分析. 发现 Munc18a 和 Munc18b 在缺少 Munc18c 的时候与 Syntaxin4 表现出了较弱的结合力(图 7b). 这个数据不仅表明了 Syntaxin4 可能在胰岛素刺激的 GLUT4 转运过程中起到重要作用, 而且与 SM 蛋白的相互作用是可以相互代偿的.

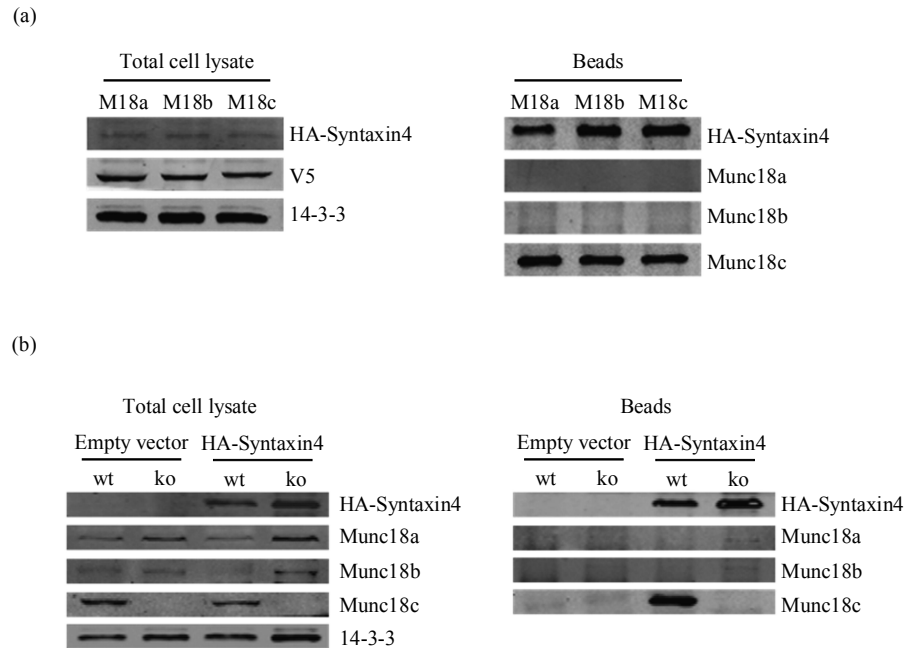


Fig. 7 Syntaxin4 can interact with Munc18a and Munc18b in the absence of Munc18c

(a) HA-Syntaxin4 binds Munc18c but not Munc18a or Munc18b in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were co-infected with HA-Syntaxin4 and each of the V5-Munc18a, V5-Munc18b or V5-Munc18c retrovirus. After 48 h, Triton-X-100 detergent lysates were prepared and combined with HA antibody-conjugated beads overnight, then washed, eluted and analysed by immunoblotting for the HA and V5 protein tags and Munc18a, Munc18b and Munc18c antibodies. The left panel shows equal fractions of the starting material. The right panels show the amount of both HA-Syntaxin4 and Munc18a/b/c bound to the beads. 14-3-3 was used as a loading control. (b) HA-Syntaxin4 binds Munc18a and Munc18b in Munc18c ko MEFs. Munc18c wt and ko MEFs were infected with HA-Syntaxin4 retrovirus. After 48 h, Triton-X-100 detergent lysates were prepared and combined with HA antibody-conjugated beads overnight, then washed, eluted and analysed by immunoblotting for the HA, Munc18a, Munc18b and Munc18c antibodies. The left panel shows equal fractions of the starting material. The right panels show the amount of both HA-Syntaxin4 and Munc18a/b/c bound to the beads. 14-3-3 was used as a loading control.

3 讨 论

3.1 脂肪细胞中 SM 蛋白在胰岛素刺激 GLUT4 的转运过程中可能存在功能冗余

有报道指出, Munc18a 的发现不仅表现了 N 端的结合模式^[7,29], 而且这种模式对于 Munc18a 与 SNARE 复合体的相互作用是很重要的^[30], 它作为一个正调控蛋白起到了功能性的作用^[7]. Shen 等^[7]认为将 Munc18a 和 t-、v-SNARE 同时结合在一起, 从而可以发挥它们在脂质体囊泡融合上的积极作用. 在脂肪细胞中, Syntaxin4 是唯一一个参与了调控胰岛素刺激下 GLUT4 转运的 syntaxin 亚型. 过量表达 syntaxin4 的胞浆端或是向细胞内导入 syntaxin4 的抗体, 都会阻断 GSVs 的锚定或融合, 从而抑制 GLUT4 的转运^[31]. 相反, Syntaxin4 转基

因小鼠的肌肉细胞中胰岛素介导的葡萄糖吸收明显增强^[32]. 因此对于 Munc18c 的作用, 有一个可能的推测: 将 3 种 SNARE 蛋白(Syntaxin4、SNAP23 和 VAMP2)首先并排在一起, 使之相互结合封闭成一个整体一起形成 SNARE 复合物, Munc18c 通过 N 端与 Syntaxin4 结合, 并且通过 SNAP23 和 VAMP2 的附属结合位点, 来稳定该复合物^[33]. 我们假设这种较高的亲和作用可能是一个关键的调控位点, 它对于 GLUT4 转运的过程是必需的. 但是, 我们的实验表明, 基因敲除 Munc18c 的脂肪细胞中胰岛素依赖的 GLUT4 转运没有明显的影响. 在缺少 Munc18c 时, Syntaxin4 蛋白在细胞内整体的表达减少了 60%, 但是质膜上 Syntaxin4 的量只减少了约 20%. 以上研究结果表明, 基因敲除 Munc18c 的小鼠脂肪细胞可能以某种方法已经

适应了 Munc18c 的缺失, 这种适应性很可能导致一种功能性的补偿. 因此我们认为脂肪细胞中 SM 蛋白在胰岛素刺激的 GLUT4 转运过程中可能存在功能冗余现象.

3.2 在脂肪细胞中胰岛素刺激 GLUT4 转运时 SM 和 t-SNAREs 的结合模式

我们研究了 Munc18c 和 Syntaxin4 之间的结合模式, 以及它们在脂肪细胞中胰岛素刺激的 GLUT4 转运过程中的重要作用. 之前有研究表明在酵母中缺少 SM 蛋白 Vps45p 的表达时, 会导致 Tlg2p (syntaxin-like SNARE) 的表达下调^[22]. 这个重要的发现说明了它们之间通过相互作用而稳定表达. 类似的, 也观测到了在脑组织中 Munc18a 和 Syntaxin1 的相互作用^[24]. 我们目前的研究也表明在脂肪细胞中 Munc18c 和 Syntaxin4 有类似的相互作用. Munc18c 基因敲除的脂肪细胞中 Syntaxin4 蛋白的表达量显著减少了. 因此我们认为这些蛋白可以特定地、稳定地在细胞中相互作用, 或者它们可能形成二聚体从而发挥作用. 而脂肪细胞内 Munc18c 缺失的胰岛素刺激 GLUT4 的转运过程中, SM 和 t-SNARE 蛋白有两种可能的结合模式: a. Munc18b 与 Syntaxin2 结合对 Munc18c/Syntaxin4 复合物的功能进行代偿; b. Munc18b 与 Syntaxin4 结合直接对 Munc18c 的功能进行代偿. 我们的研究结果更倾向于第二种结合模式. 为了进一步研究在缺少 Munc18c 时, Munc18a 和 Munc18b 与 Syntaxin4 表现出的结合力是否直接参与了 GLUT4 的转运, 我们将在以后的实验中, 利用 siRNA 分别处理 Munc18a 和 Munc18b 这两种蛋白, 观察在 Munc18c 基因敲除的脂肪细胞中, 当缺少 Munc18a/Munc18b 或缺少 Munc18a 和 Munc18b 时对胰岛素刺激 GLUT4 转运上膜的影响.

致谢 感谢 David E James 对本研究的指导. 感谢 Jamie Lopez, Masato Kasuga, Yoshikazu Tamori, Hajime Kanda, Takayuki Kawaguchi 对本研究的帮助. 感激 Masato Kasuga 给我们提供了 Munc18c 基因敲除小鼠. David E James 是澳大利亚国家健康和医学研究会(NHMRC)高级首席研究员, 本研究同时得到了 NHMRC 的资金支持.

参 考 文 献

- [1] Carr C M, Rizo J. At the junction of SNARE and SM protein function. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, **22**(4): 488-495
- [2] Park M, Touihri S, Müller I, *et al.* Sec1/Munc18 protein stabilizes fusion-competent syntaxin for membrane fusion in arabidopsis cytokinesis. *Developmental Cell*, 2012, **22**(5): 989-1000
- [3] Novick P, Schekman R. Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**(4): 1858-1862
- [4] Verhage M, Maia A S, Plomp J J, *et al.* Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science*, 2000, **287**(5454): 864-869
- [5] Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, *et al.* Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *The Lancet*, 1999, **353**(9170): 2093-2099
- [6] Tellam J T, McIntosh S, James D E. Molecular identification of two novel munc-18 isoforms expressed in non-neuronal tissues. *J Biol Chem*, 1995, **270**(11): 5857-5863
- [7] Shen J, Tareste D C, Paumet F, *et al.* Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins. *Cell*, 2007, **128**(1): 183-195
- [8] Tellam J T, Macaulay S L, McIntosh S, *et al.* Characterization of Munc-18c and Syntaxin-4 in 3T3-L1 adipocytes. putative role in insulin-dependent movement of GLUT4. *J Biol Chem*, 1997, **272**(10): 6179-6186
- [9] Kioumourtoglou D, Gould G W, Bryant N J. Insulin stimulates syntaxin4 complex assembly *via* a novel regulatory mechanism. *Mol Cell Biol*, 2014, **34**(7): 1271-1279
- [10] Tamori Y, Kawanishi M, Niki T, *et al.* Inhibition of Insulin-induced GLUT4 translocation by Munc18c through interaction with Syntaxin4 in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 1998, **273**(31): 19740-19746
- [11] Ren W, Jhala U S, Du K. Proteomic analysis of protein palmitoylation in adipocytes. *Adipocyte*, 2013, **2**(1): 17-28
- [12] Khan A H, Thurmond D C, Yang C, *et al.* Munc18c regulates insulin-stimulated GLUT4 translocation to the transverse tubules in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 2001, **276**(6): 4063-4069
- [13] Yang C, Coker K J, Kim J K, *et al.* Syntaxin 4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance. *J Clin Invest*, 2001, **107**(10): 1311-1318
- [14] Larance M, Ramm G, Stöckli J, *et al.* Characterization of the role of the rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. *J Biol Chem*, 2005, **280**(45): 37803-37813
- [15] Widberg C H, Bryant N J, Girotti M, *et al.* Tomosyn interacts with the t-SNAREs Syntaxin4 and SNAP23 and plays a role in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *J Biol Chem*, 2003, **278**(37): 35093-35101
- [16] Schoch S, Deák F, Königstorfer A, *et al.* SNARE function analyzed in Synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science*, 2001, **294**(5544): 1117-1122
- [17] Kanda H, Tamori Y, Shinoda H, *et al.* Adipocytes from Munc18c-null mice show increased sensitivity to insulin-stimulated GLUT4 externalization. *J Clin Invest*, 2005, **115**(2): 291-301
- [18] Bai L, Wang Y, Fan J, *et al.* Dissecting multiple steps of GLUT4 trafficking and identifying the sites of insulin action. *Cell*

- Metabolism, 2007, **5**(1): 47-57
- [19] Li C H, Bai L, Li D D, *et al.* Dynamic tracking and mobility analysis of single GLUT4 storage vesicle in live 3T3-L1 cells. Cell Research, 2004, **14**(6): 480-486
- [20] Shewan A M, Marsh B J, Melvin D R, *et al.* The cytosolic C-terminus of the glucose transporter GLUT4 contains an acidic cluster endosomal targeting motif distal to the dileucine signal. Biochemical J, 2000, **350**(1): 99-107
- [21] Van Dam J, Bosmans H, Marchal G, *et al.* Characteristics of dosimeter types for skin dose measurements in practice. Radiation Protection Dosimetry, 2005, **117**(1-3): 185-189
- [22] Bryant N J, James D E. Vps45p stabilizes the syntaxin homologue Tlg2p and positively regulates SNARE complex formation. The EMBO J, 2001, **20**(13): 3380-3388
- [23] Zhao P, Yang L, Lopez J A, *et al.* Variations in the requirement for v-SNAREs in GLUT4 trafficking in adipocytes. J Cell Sci, 2009, **122**: 3472-3480
- [24] Jain S S, Snook L A, Glatz J F, *et al.* Munc18c provides stimulus-selective regulation of GLUT4 but not fatty acid transporter trafficking in skeletal muscle. FEBS Letters, 2012, **586**(16): 2428-2435
- [25] Lam P P, Ohno M, Dolai S, *et al.* Munc18b is a major mediator of insulin exocytosis in rat pancreatic β -cells. Diabetes, 2013, **62**(7): 2416-2428
- [26] Lizunov V A, Stenkula K G, Lisinski I, *et al.* Insulin stimulates fusion, but not tethering, of GLUT4 vesicles in skeletal muscle of HA-GLUT4-GFP transgenic mice. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, **302**(8): 950-960
- [27] Borisovska M, Zhao Y, Tsytsyura Y, *et al.* v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. EMBO J, 2005, **24**(12): 2114-2126
- [28] Liu Y, Barlowe C. Analysis of Sec22p in endoplasmic reticulum/Golgi transport reveals cellular redundancy in SNARE protein function. Mol Biol Cell, 2002, **13**(9): 3314-3324
- [29] Rickman C, Medine C N, Bergmann A, *et al.* Functionally and spatially distinct modes of munc18-syntaxin 1 interaction. J Biol Chem, 2007, **282**(16): 12097-12103
- [30] Dulubova I, Khvotchev M, Liu S, *et al.* Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, **104**(8): 2697-2702
- [31] Volchuk A, Wang Q, Ewart H S, *et al.* Syntaxin 4 in 3T3-L1 adipocytes: regulation by insulin and participation in insulin-dependent glucose transport. Mol Biol Cell, 1996, **7**(7): 1075-1082
- [32] Spurlin B A, Park S Y, Nevins A K, *et al.* Syntaxin 4 transgenic mice exhibit enhanced insulin-mediated glucose uptake in skeletal muscle. Diabetes, 2004, **53**(9): 2223-2231
- [33] Ramalingam L, Oh E, Yoder S M, *et al.* Doc2b Is a key effector of insulin secretion and skeletal muscle insulin sensitivity. Diabetes, 2013, **61**(10): 2424-2432
- [34] Colbert K N, Hattendorf D A, Weiss T M, *et al.* Syntaxin1a variants lacking an N-peptide or bearing the LE mutation bind to Munc18a in a closed conformation. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, **110**(31): 12637-12642

Munc18c is Dispensable for Insulin-stimulated GLUT4 Translocation in Adipocytes*

ZHAO Ping^{1)**}, ZHOU Qi¹⁾, BI Long-Jun¹⁾, SHEN Jin-Hua¹⁾, YANG Xin-Zhou^{2)**}, LIU Qing-Hua^{1)**}

¹⁾ College of Life Science, South Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;

²⁾ College of Pharmacy, South Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract The insulin-dependent uptake of glucose by adipose and muscle tissues is accomplished through the regulated vesicle trafficking of the GLUT4 glucose transporter to the plasma membrane. The Sec1p homologue Munc18c is believed to play a central role in the docking of GLUT4 vesicles by controlling SNARE complex assembly. In the present study we have examined the function of SM proteins in insulin-stimulated GLUT4 trafficking in adipocytes. Syntaxin4 at the plasma membrane is not dependent on the presence of Munc18c. We found that absence of Munc18c did not affect GLUT4 externalization at the plasma membrane and GLUT4 trafficking was normal in the absence of Munc18c and functional Syntaxin2, known to be associated with Munc18b. Syntaxin4 demonstrates a robust interaction with Munc18c but not either Munc18a or Munc18b in 3T3-L1 adipocytes. However, Munc18a and Munc18b exhibited weak interaction with Syntaxin4 in the background of absence of Munc18c. These data suggest that Syntaxin4 may play an important role in insulin-stimulated GLUT4 trafficking and its interaction with SM proteins are complementary.

Key words adipocytes, glucose uptake, SM proteins, GLUT4 trafficking, Syntaxin4

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00089

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31070744, 81102798), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (CZY14013) and The National Innovative and Entrepreneurial Training Project for College Students (BCX13102).

**Corresponding author.

Tel: 86-27-67842576, E-mail: zping0124@163.com

Received: March 28, 2014 Accepted: June 26, 2014