

论著 · 实验研究

PI3K 抑制剂 LY294002 对鼠前脂肪细胞分化和 C/EBPα 及 PPARγ 表达的影响

高金枝 郑睿丹 王成斌 应艳琴 罗小平

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科,湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的 研究磷脂酰肌醇激酶(PI3K)抑制剂 LY294002 对小鼠前脂肪细胞分化和 CCAAT 增强子结合蛋白 α(C/EBPα)及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(PPARγ)表达的影响,探讨胰岛素受体底物(IRSs)/PI3K 信号通路在前脂肪细胞分化中的作用。**方法** 小鼠 3T3-L1 细胞分为实验组和对照组,实验组加入 LY294002(25 μmol/L),对照组加入同体积 DMSO。应用 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、10⁻⁶ mol/L 地塞米松和 5 μg/mL 胰岛素诱导两组前脂肪细胞分化,在培养的 0 d、2 d、4 d、8 d 分别收集细胞,实时 PCR 法及 Western blot 法检测细胞中 C/EBPα 和 PPARγ 表达水平。培养 8 d 油红 O 染色,观察细胞分化情况。**结果** 小鼠 3T3-L1 细胞基础状态下两组 C/EBPα 及 PPARγ 表达差异无统计学意义($P>0.05$);诱导分化时实验组 C/EBPα 及 PPARγ 表达低于对照组(分别 $P<0.05$, $P<0.01$)。油红 O 染色示实验组细胞无明显脂滴。**结论** PI3K 抑制剂 LY294002 能抑制小鼠前脂肪细胞分化及 C/EBPα 和 PPARγ 的表达,提示 IRSs/PI3K 信号通路可通过调节 PPARγ 和 C/EBPα 的表达在 3T3-L1 前脂肪细胞的分化中发挥重要作用。

[中国当代儿科杂志,2011,13(10):823-826]

[关键词] PI3K 抑制剂; 3T3-L1 细胞; 分化; C/EBPα; PPARγ; 小鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)10-0823-04

Effects of PI3K inhibitor LY294002 on the differentiation of mouse preadipocytes and the expression of C/EBPα and PPARγ

GAO Jin-Zhi, ZHENG Rui-Dan, WANG Cheng-Bin, YING Yan-Qin, LUO Xiao-Ping. Department of Pediatrics, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Luo X-P, Email: xpluo@tjh.tjmu.edu.cn)

Abstract: Objective This study examined the effects of PI3K inhibitor LY294002 on the differentiation of mouse preadipocytes and the expression of CCAAT enhancer binding protein α (C/EBPα) and peroxisome proliferation activated receptor γ (PPARγ), in order to study the possible roles of insulin receptor substrate (IRSs)/PI3K signal pathway in the differentiation of preadipocytes. **Methods** The mouse 3T3-L1 cells were cultured normally and divided into experimental and control groups. 3T3-L1 cells in the experimental group were treated with PI3K inhibitor LY294002 (25 μmol/L) and those in the control group were treated with DMSO culture medium. 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMx) (0.5 mmol/L), dexamethasone (10⁻⁶ mol/L) and insulin (5 μg/mL) were used to induce the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in both groups. Before culture, and 2, 4 and 8 days after culture, the cells were collected to detect the expression of C/EBPα and PPARγ by real-time PCR and Western blot assays. The lipid droplets of 3T3-L1 preadipocytes were observed by oil-red O staining. **Results** PI3K inhibitor LY294002 did not affect the expression of C/EBPα and PPARγ in un-induced 3T3-L1 preadipocytes ($P>0.05$), but decreased the expression of C/EBPα and PPARγ during the *in vitro* induced differentiation of 3T3-L1 preadipocytes compared with the control group ($P<0.05$ or 0.01). The lipid droplets count was greatly reduced by LY294002. **Conclusions** PI3K inhibitor LY294002 can inhibit the differentiation of mouse 3T3-L1 preadipocytes and the expression of C/EBPα and PPARγ in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, suggesting that IRSs/PI3K signal pathway may play an important role in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes by regulating the expression of C/EBPα and PPARγ.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (10):823-826]

Key words: PI3K inhibitor; 3T3-L1 cell; Differentiation; C/EBPα; PPARγ; Mice

[收稿日期]2011-05-30;[修回日期]2011-07-17
[基金项目]国家自然科学基金资助项目(No. 30672262)。
[作者简介]高金枝,女,博士研究生。
[通信作者]罗小平,教授。

儿童肥胖的发生率及其严重程度在世界范围内呈上升趋势,肥胖儿童普遍存在胰岛素抵抗和敏感性下降。研究表明体质量指数可作为初步筛查胰岛素抵抗的首要指标^[1]。肥胖并发症的病理基础与脂肪细胞的增殖分化及功能改变密切相关^[2]。胰岛素受体底物(IRSs)在前脂肪细胞的增殖分化中起着非常重要的作用^[3]。调节脂肪细胞分化的众多因素中,CCAAT增强子结合蛋白 α (CCAAT enhancer binding protein α , C/EBP α)和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferations-activated receptor γ , PPAR γ)为脂肪细胞最终分化所必需^[4],但对C/EBP α 、PPAR γ 的上游调节信号研究较少。本研究应用磷脂酰肌醇激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)抑制剂LY294002阻碍胰岛素受体底物下游信号通路PI3K的活化,研究PI3K信号传导阻滞对3T3-L1前脂肪细胞的分化和C/EBP α 及PPAR γ 表达的变化,以探讨IRSs、PI3K是否作为C/EBP α 及PPAR γ 的上游调节信号在脂肪细胞分化中发挥决定性作用。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM高糖培养基和胎牛血清购自Gibico公司;胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)和地塞米松购自Sigma公司;PI3K抑制剂LY294002购自Cell Signaling公司;Trizol购自Invitrogen公司;实时PCR试剂盒购自Toyobo公司;引物由上海生物工程技术服务有限公司合成;兔抗小鼠PPAR γ 单克隆抗体购自Abcam公司;兔抗小鼠C/EBP α 单克隆抗体购自CST公司;兔抗小鼠GAPDH单克隆抗体购自Boster公司;BCA试剂盒购自Beyotime。鼠3T3-L1前脂肪细胞购自美国标准生物品收藏中心(ATCC)。

1.2 方法

1.2.1 3T3-L1细胞培养和分化 3T3-L1前脂肪细胞分为实验组和对照组,实验组用含10% FBS、25 μ mol/L LY294002的DMEM高糖培养基培养,对照组用等体积的DMSO代替LY294002培养,生长至接触抑制2 d后(d0)进行诱导分化:用含有10% FBS、0.5 mmol/L IBMx、 10^{-6} mol/L地塞米松、5 μ g/mL胰岛素的DMEM高糖培养基(鸡尾酒)诱导2 d(d2)后,换含10% FBS和5 μ g/mL胰岛素的DMEM高糖培养基继续培养2 d(d4)。以后每隔1 d更换含10% FBS的

DMEM高糖培养基。

1.2.2 油红O染色检测3T3-L1前脂肪细胞分化

诱导分化后的第8天(8 d)时将两组细胞进行油红O染色。弃培养基,PBS冲洗3次,3.7%中性福尔马林固定5 min,PBS洗3次,油红O稀释液(0.5%油红O储存液用水按3:2稀释)室温孵育1 h后,60%乙醇镜下分化至间质清晰,水洗,倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.3 LY294002对前脂肪细胞C/EBP α 、PPAR γ mRNA表达的影响

在诱导分化的第0、2、4、8天分别收集细胞,参照Trizol试剂盒说明书抽提RNA,以oligo dT12-18为引物,使用MLLV酶进行逆转录合成cDNA。C/EBP α 上游引物5'-CGGCGG-GAACGCAACAACATC-3',下游5'-GGCGGTCATT-GTCACTGGTCAACTC-3',PCR产物109 bp;PPAR γ 上游引物5'-TGACCACTCCCATTCCTTT-3',下游5'-GCTCTACTTTGATCGCACTTT-3',PCR产物167 bp;内参GAPDH上游引物5'-GCACAGTCAAGGCT-GAGAATG-3',下游5'-GGTGGTGAAGACGCCAGTA-3',PCR产物142 bp。PCR反应体系每管50 μ L,扩增条件:95 $^{\circ}$ C 1 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,40个循环;72 $^{\circ}$ C 45 s时收集数据。通过 $2^{-\Delta CT}$ 计算将统计数据转化成线性形式后进行统计学处理。

1.2.4 LY294002对脂肪细胞C/EBP α 和PPAR γ 蛋白表达的影响

在诱导分化的第0、2、4、8天分别收集细胞抽提蛋白。用考马斯亮蓝法蛋白定量并调整蛋白浓度,取样经SDS-PAGE转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,一抗4 $^{\circ}$ C过夜,洗涤加二抗室温孵育2 h,洗膜,胶片显影定影,图像扫描分析各条带光密度。

1.3 统计学分析

使用SPSS 11.0统计软件,所有数据均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LY294002对前脂肪细胞脂滴形成的影响

倒置显微镜下可见,对照组3T3-L1前脂肪细胞分化第8天时细胞明显变大变圆,胞浆中有空泡样改变,油红O染色着红色,脂滴分布于核周呈“戒环”样结构。实验组8 d时细胞仍呈长梭形,油红O染色示无明显脂滴聚集,提示LY294002明显阻滞前脂肪细胞分化,见图1。

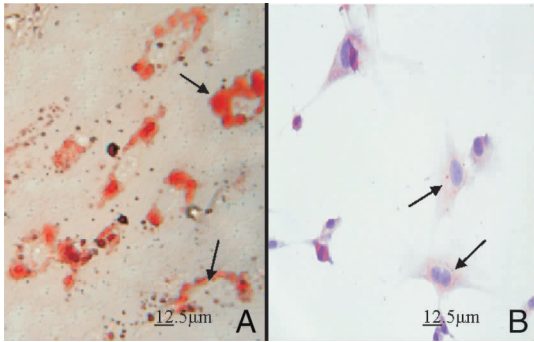


图1 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化8 d, 油红 O 染色倒置显微镜下观察(×400) A:“鸡尾酒”法成功诱导3T3-L1 前脂肪细胞分化,8 d 时细胞呈圆形或椭圆形,油红 O 染色显示胞内大量脂滴; B:PI3K 抑制剂 LY294002 阻滞3T3-L1 前脂肪细胞分化,诱导分化8 d 时细胞仍呈梭形,部分可见双核,油红 O 染色示无明显脂滴。

2.2 LY294002 对前脂肪细胞分化过程中 C/EBPα 和 PPARγ mRNA 表达的影响

在未进行诱导分化时,两组 3T3-L1 细胞 C/EBPα、PPARγ mRNA 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。在诱导分化第2天至第8天,实验组前脂肪细胞 C/EBPα、PPARγ mRNA 表达水平明显低于对照组($P < 0.05$ 或 0.01),见图2。

2.3 LY294002 对前脂肪细胞分化过程中 C/EBPα 和 PPARγ 蛋白表达的影响

在未进行诱导分化时,两组 3T3-L1 细胞 C/EBPα、PPARγ 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。在诱导分化第2~8天,实验组前脂肪细胞 C/EBPα、PPARγ 蛋白表达水平明显低于对照组($P < 0.05$ 或 0.01),见图3~4。

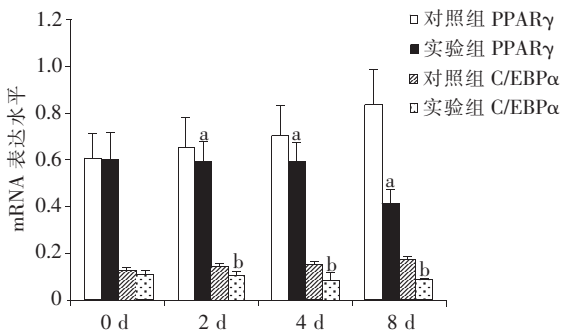


图2 LY294002 对3T3-L1 前脂肪细胞 C/EBPα、PPARγ mRNA 表达的影响 a:与同时时间点对照组比较, $P < 0.05$;b:与同时时间点对照组比较, $P < 0.01$ 。

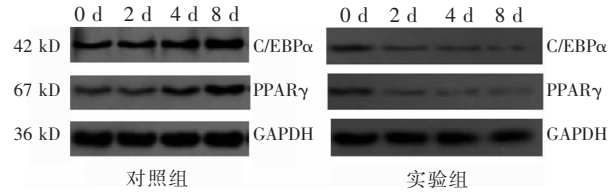


图3 LY294002 对前脂肪细胞分化过程中 C/EBPα、PPARγ 蛋白表达的影响 在诱导分化的第2~8天,实验组 C/EBPα 及 PPARγ 蛋白表达明显低于对照组。

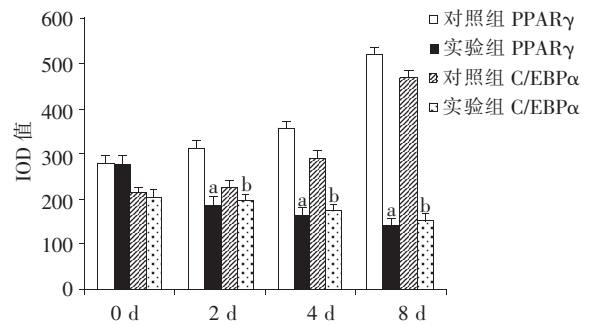


图4 LY294002 对前脂肪细胞分化过程中 C/EBPα、PPARγ 蛋白表达的影响 a:与同时时间点对照组比较, $P < 0.05$; b:与同时时间点对照组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

目前普遍认为脂肪细胞分化障碍可能参与胰岛素抵抗、高脂血症、Ⅱ型糖尿病等肥胖相关并发症的病理机制^[5-6]。前脂肪细胞分化成熟受多种信号途径,尤其受 C/EBPα 和 PPARγ 家族转录因子的密切调控^[7]。有研究显示宫内发育迟缓大鼠发生胰岛素抵抗与胰岛素受体底物 2 (IRS2) 表达下降有关^[8],或与 PI3K 及其下游靶蛋白的表达和活性降低有关^[9],推测 IRSs/PI3K 可能作为 C/EBPα 和 PPARγ 上游调节信号影响前脂肪细胞分化。

IRSs 和 PI3K 是胰岛素信号途径的关键分子^[10]。同时 PI3K 也是促进前脂肪细胞分化成熟的重要激酶,不仅促进脂滴的形成,还促进脂联素、瘦素等激素的分泌^[11]。Yun 等^[12]发现 Akt1/PKBα 缺陷原代小鼠胚胎成纤维细胞向成熟脂肪细胞分化障碍,推测 Akt1/PKBα 异构体在脂肪细胞分化中起决定性作用。本研究用 PI3K 抑制剂 LY294002 阻碍 IRSs、PI3K 信号转导后,3T3-L1 前脂肪细胞分化成熟障碍,与 Yun 等的报道相符。

本研究发现,PI3K 抑制剂 LY294002 阻碍 IRSs、PI3K 信号转导后,经典的鸡尾酒和胰岛素诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化成熟时,C/EBPα、PPARγ mRNA

及蛋白的表达水平在整个培养过程中明显低于对照组。培养的第8天,油红O染色倒置显微镜下见PI3K活化抑制组(实验组)红色脂滴形成减少。说明PI3K抑制剂LY294002不改变基础状态下3T3-L1前脂肪细胞C/EBP α 、PPAR γ 的表达,但却能阻碍诱导分化状态下C/EBP α 、PPAR γ 的表达,阻碍前脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化。C/EBP α 、PPAR γ 并非前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞的充分条件,至少在PI3K活化受阻的情况下,即使基础状态下C/EBP α 、PPAR γ 表达正常,前脂肪细胞也不能被诱导分化成熟并分泌脂滴。所以,本研究结果提示IRSs/PI3K信号转导通路正常是前脂肪细胞分化成熟的前提条件。IRSs/PI3K信号通路参与C/EBP α 、PPAR γ 的上游调节信号。IRSs/PI3K可能通过调节C/EBP α 、PPAR γ 的表达,在3T3-L1前脂肪细胞的分化中发挥重要作用。

[参 考 文 献]

[1] 鲍鹏丽,刘戈力,杨菁岩,姜丽红,魏莹,穆青,等. 体格测量指标对肥胖儿童胰岛素抵抗的预测意义[J]. 实用儿科临床杂志,2010,25(7):484-485.

[2] Achike FI, To NH, Wang H, Kwan CY. Obesity, metabolic syndrome, adipocytes and vascular function: A holistic viewpoint[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011, 38(1): 1-10.

[3] Tseng YH, Butte AJ, Kokkotou E, Yechoor VK, Taniguchi CM,

Kriauciunas KM, et al. Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and nectin[J]. Nat Cell Biol, 2005, 7(6): 601-611.

[4] Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway[J]. Genes Dev, 2002, 16(1): 22-26.

[5] Ros Pérez M, Medina-Gómez G. Obesity, adipogenesis and insulin resistance [J]. Endocrinol Nutr, 2011, 58(7): 360-369.

[6] Hayashi T, Nozaki Y, Nishizuka M, Ikawa M, Osada S, Imagawa M. Factor for adipocyte differentiation 158 gene disruption prevents the body weight gain and insulin resistance induced by a high-fat diet[J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(8): 1257-1263.

[7] Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(12): 885-896.

[8] 李瑶,辛颖. 胰岛素受体底物在宫内发育迟缓大鼠胰腺组织中的表达[J]. 中国当代儿科杂志,2010,12(12):972-975.

[9] 刘晓梅,焦伊胜,潘莉莉,卢岩,李书琴. 宫内生长受限大鼠肝脏磷酸肌醇-3-激酶信号通路分子的变化[J]. 中国当代儿科杂志,2009,11(3):221-224.

[10] Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(2): 85-96.

[11] Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation[J]. J Biol Chem, 1996, 271(49): 31372-31378.

[12] Yun SJ, Kim EK, Tucker DF, Kim CD, Birnbaum MJ, Bae SS. Isoform-specific regulation of adipocyte differentiation by Akt/protein kinase B α [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 371(1): 138-143.

(本文编辑:王庆红)