

· 实验研究 ·

血管紧张素 II 对 L6 大鼠成肌细胞胰岛素作用机制的研究

闫朝丽 任小燕 孟兴凯 胡康洪 苏秀兰 张嘉玲

【摘要】 目的 研究血管紧张素 II (Ang II) 对 L6 大鼠成肌细胞的胰岛素信号传导的影响, 探讨 Ang II 影响胰岛素信号传导通路的可能机制。方法 培养及诱导分化 L6 细胞, 根据 Ang II 或 JAK2-PKA 抑制剂 H89 干预的不同, 将其分为 4 组: 对照组、胰岛素组、胰岛素 + Ang II 组及胰岛素 + Ang II + H89 组。采用 RT-PCR 方法检测 IRS1、GLUT4 mRNA 的表达水平, Western blot 方法检测 IRS1、P^{tyr}-IRS1、总蛋白和膜蛋白中 GLUT4 的蛋白表达。结果 RT-PCR 检测 4 组间 GLUT4 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 后 3 组间 IRS1 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但均较对照组增加 ($P < 0.05$)。Western blot 检测后 3 组 IRS1、P^{tyr}-IRS1、膜蛋白中 GLUT4 表达均较对照组升高 ($P < 0.05$), 而 3 组间 IRS1 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 4 组间 GLUT4 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 胰岛素 + Ang II + H89 组 P^{tyr}-IRS1、GLUT4 较胰岛素 + Ang II 组表达增加 ($P < 0.05$), 较胰岛素组表达减少 ($P < 0.05$)。结论 Ang II 在骨骼肌细胞中通过 JAK2-PKA 通路抑制 IRS1 的酪氨酸磷酸化, 抑制 GLUT4 由胞浆转移至胞膜, 进而导致胰岛素抵抗。

【关键词】 L6; 血管紧张素 II; H89; 胰岛素受体底物 1; 葡萄糖转运蛋白 4

【中图分类号】 R972.4 R977.15

【文献标识码】 A

Effects of angiotensin II on insulin signal transduction in myoblasts of L6 rats YAN Zhao-li*, REN Xiao-yan, MENG Xing-kai, HU Kang-hong, SU Xiu-lan, ZHANG Jia-ling. *Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010050, China

Corresponding author: MENG Xing-kai, Email: mengxingkai6788@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To study the effects of angiotensin II (AngII) on insulin signal transduction pathway in skeletal myoblast of L6 rats, and further to explore the possible mechanism of AngII on glucose utilization. **Methods** Myoblast cells of L6 rats were cultured and induced to differentiate. They were divided into 4 groups according to different treatment by AngII or JAK2-PKA inhibitor H89: normal control group (NC group), insulin group, insulin + AngII group and insulin + AngII + H89 group. Expression of IRS1 and GLUT4 mRNA was detected by RT-PCR. Expression of IRS1, P^{tyr}-IRS1 and GLUT4 (total and membrane protein) were detected by Western blot. **Results** The difference of GLUT4 mRNA expression in the 4 groups detected by RT-PCR had no statistical significance ($P > 0.05$). The difference of IRS1 mRNA expression among the latter 3 groups had no statistical significance ($P > 0.05$), however, IRS1 expression in the latter 3 groups was higher than that in NC group ($P < 0.05$). Western blot results showed expression of IRS1, P^{tyr}-IRS1 and GLUT4 (membrane protein) was higher in the latter 3 groups than in NC group ($P < 0.05$). The difference of IRS1 expression among the latter 3 groups ($P > 0.05$) and GLUT4 (total protein) expression among the 4 groups had no statistical significance ($P > 0.05$). The expression of P^{tyr}-IRS1 and GLUT4 membrane protein in Ins + AngII + H89 group was much higher than that in Ins + AngII group, and lower than that in insulin group ($P < 0.05$). **Conclusion** AngII inhibits IRS1's tyrosine phosphorylation and GLUT4's transfer from cytoplasm to plasma membrane in skeletal muscle

cells through JAK2-PKA signaling pathway, and therefore induces insulin resistance.

【Key Words】 L6; Angiotensin II; H89; IRS1; GLUT4

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-6090.2011.05.010

基金项目: 春晖计划 (Z2007-1-01008); 内蒙古医学院附属医院重大科研项目 (NYFY ZD 201005)

作者单位: 010050 呼和浩特, 内蒙古医学院附属医院内分泌科 (闫朝丽, 任小燕); 普通外科 (孟兴凯); 临床医学研究中心 (苏秀兰, 张嘉玲); 430040 武汉, 中国科学院武汉病毒研究所病毒 RNA 结构与功能关系学科组 (胡康洪)

通信作者: 孟兴凯, Email: mengxingkai6788@yahoo.com.cn

胰岛素抵抗是指各种原因使胰岛素促进葡萄糖摄

取和效率下降,机体代偿性分泌过多胰岛素产生高胰岛素血症,以维持血糖稳定的状态。动物实验证实,血管紧张素 II 受体拮抗剂(angiotensin II receptor blockers, ARBs)可改善肥胖或高血压大鼠的胰岛素抵抗^[1]。有关血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)引起胰岛素抵抗机制的研究涉及到胰岛素传导通路中多个信号分子,然而具体机制目前尚不清楚。有研究表明^[2] Ang II 与 Ang II 1 型受体结合后,通过 NADPH 途径介导的活性氧抑制了胰岛素受体底物 1 (insulin receptor substance 1, IRS1) 酪氨酸磷酸化,进而抑制磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide-3-kinase, PI3K) 途径,减少葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 由胞浆转移至胞膜,细胞不能有效利用葡萄糖,证实了 Ang II 能导致胰岛素抵抗。也有试验^[3]表明在血管平滑肌细胞中,使用 JAK2-PKA 抑制剂 H89,可显著抑制胰岛素介导的 IRS1 的酪氨酸磷酸化,说明 Ang II 可能通过 JAK2-PKA 途径影响胰岛素的作用,然而国内外尚无在骨骼肌上的研究报道。由于肌肉组织是糖利用的主要器官,本研究以 L6 大鼠成肌细胞为研究对象,观察 Ang II 和 H89 对胰岛素信号传导通路的影响,探讨 Ang II 诱导产生胰岛素抵抗的机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

L6 大鼠成肌细胞购自中国科学院细胞库, RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0 购自 TaKaRa 公司, IRS1、P^β-IRS1、GLUT4 多克隆抗体购自 Cell Signaling 公司, ECL 化学发光试剂盒购自 Amersham 公司, SDS-PAGE 和 Western blotting 试剂及 Anti-mouse IgG, Anti-rabbit IgG 购自 Cell signaling 公司, H89、Ang II 购自 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 L6 成肌细胞培养 L6 成肌细胞培养于 10% 胎牛血清的 DMEM 中,在 5% CO₂, 37℃ 的 CO₂ 细胞培养箱中培养,生长到 80% 时进行诱导分化,将细胞置于 2% DMEM 培养液中,培养 6~8 d,当肌管生长到 60%~70% 时用于实验。

1.2.2 实验分组 实验分 4 组:对照组 (CN 组)、胰岛素组 (Ins 组)、胰岛素 + 血管紧张素 II (Ins + Ang II 组)、胰岛素 + 血管紧张素 II + H89 组 (Ins + Ang II + H89 组)。Ins + Ang II 组, Ins + Ang II + H89 分别于 Ang II、Ang II + H89 作用 24 h,然后 Ins 组, Ins + Ang II 组, Ins + Ang II + H89 均用胰岛素刺激 (10 nmol/L) 30 min 培养 1 d, Ang II 终浓度 10⁻⁷ mol/L, H89 终浓度 10 μmol/L,设立空白对照组,每组 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.3 提取膜蛋白与测定蛋白浓度 收集细胞后用细胞总蛋白提取试剂盒、细胞膜蛋白提取试剂盒提取膜蛋白,用 Bradford 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

1.2.4 总 RNA 提取 按照 Trizol Reagent (Invitrogen) 说明书提取总 RNA: Trizol、氯仿、异丙醇、75% 乙醇分离沉淀 RNA,最后于 RNA 沉淀中加 40 μl 焦碳酸二乙酯处理的无菌去离子水常温干燥,取 2 μl RNA 分别测 RNA OD 值 (OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~2.0 之间),用 1% 变性琼脂糖凝胶电泳示 28S、18S rRNA 2 条清晰带以示所提 RNA 的纯度和完整性,将 RNA 置于 -80℃ 储存备用。

1.2.5 RT-PCR

1.2.5.1 引物 引物序列从文献中获得^[4], GLUT4、IRS1 及内对照三磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物由 Invitrogen 公司合成。引物序列及反应条件见表 1。

表 1 GAPDH、IRS1、GLUT4 引物序列及 RT-PCR 反应条件

cDNA	引物序列	片断 (bp)	退火温度 (°C)
GAPDH	上游引物: 5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGTGGCC-3'	465	60
	下游引物: 5'-ACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGG-3'		
IRS1	上游引物: 5'-AGAGTGGTGGAGTTGAGTTG-3'	336	58
	下游引物: 5'-GCTGTAACAGAAGCAGAAGC-3'		
GLUT4	上游引物: 5'-GGGCTGTGAGTGTGCTTTC-3'	150	60
	下游引物: 5'-CAGCGAGGCAAGCCATAGATT-3'		

1.2.5.2 RT-PCR 检测 IRS1 及 GLUT4 mRNA 相对含量 按 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0 逆转录试剂盒步骤,将 mRNA 逆转录为 cDNA,用所得 cDNA 在 EDC-810 PCR 仪上扩增内参照 GAPDH、IRS1 及 GLUT4,扩增体系为 25 μl 体系: 5 × PCR 缓冲液 5 μl, cDNA 模板 5 μl, M13 引物 M4 0.2 μmol · L⁻¹, 引物对各 200 nmol · L⁻¹, Taq 酶 0.125 μl, PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶 (含终浓度 0.15 μg · ml⁻¹ 溴化乙锭) 上电泳,经 GEL-PRO 凝胶成像系统进行吸光度扫描,比较 IRS1 及 GLUT4 与 GAPDH 的灰度比值。实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 法检测骨骼肌细胞 IRS1、P^β-IRS1、总蛋白和膜蛋白中 GLUT4 的蛋白水平 取各样本 80 μg 蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,电转移法将蛋白转移至 PVDF 膜,封闭后分别加入抗 GLUT4 或抗 IRS1 或抗 P^β-IRS1 抗体孵育过夜,洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h,充分洗涤后与 ECL 反应, Kodak 底片曝光,之后测定吸光度,用 IPP (image-pro plus analysis soft ware) 软件对扫描图像的目的条带进行灰度分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计学软件处理,实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间数据比较用 ANOVA 方差分析,组间应用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

①L6 大鼠成肌细胞经 AngII 和 H89 作用后 IRS1、GLUT4 mRNA 水平的改变,4 组间 GLUT4 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$),Ins 组、Ins + AngII 组、Ins + AngII + H89 组 IRS1 mRNA 表达无差异($P > 0.05$),均较 CN 组升高($P < 0.05$),见表 2、图 1。②L6 大鼠成肌细胞经 AngII 和 H89 作用后 Western blot 检测 IRS1、P^{tyr}-IRS1、GLUT4 蛋白表达。Ins 组、Ins + AngII 组、Ins + AngII + H89 组 IRS1、P^{tyr}-IRS1、膜蛋白中 GLUT4 表达较 CN 组增加($P < 0.05$);而 3 组间 IRS1 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$);4 组间总蛋白中 GLUT4 表达也无差异($P > 0.05$);Ins + Ang II + H89 组 P^{tyr}-IRS1、膜蛋白中 GLUT4 较 Ins + Ang II 组表达增加($P < 0.05$),较 Ins 组表达减少($P < 0.05$),见图 2、3。

表 2 4 组 L6 大鼠成肌细胞 IRS1、GLUT4 mRNA RT-PCR 结果

组别	IRS1	GLUT4
NC	1.33 ± 0.09	1.11 ± 0.13
Ins	2.18 ± 0.55*	1.16 ± 0.15
Ins + Ang II	2.00 ± 0.36*	1.17 ± 0.14
Ins + Ang II + H89	1.88 ± 0.19*	1.16 ± 0.13

注:与 NC 组比较,* $P < 0.05$

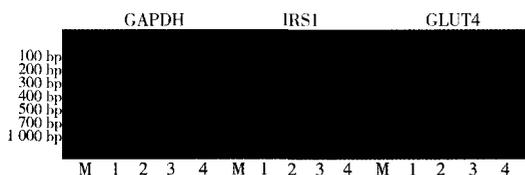
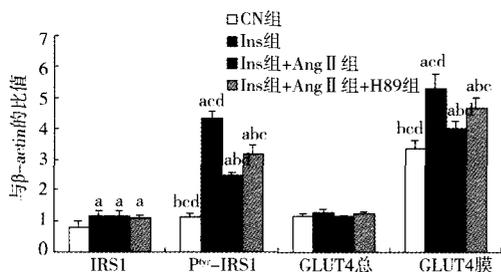


图 1 1 CN 组、2 Ins 组、3 Ins + Ang II 组、4 Ins + Ang II + H89 组 GAPDH、IRS1、GLUT4 基因 RT-PCR 产物电泳图



注:与 NC 组比较,^a $P < 0.05$;与 Ins 组比较,^b $P < 0.05$;与 Ins + Ang II 组比较,^c $P < 0.05$;与 Ins + Ang II + H89 组比较,^d $P < 0.05$

图 2 各组间 IRS1、P^{tyr}-IRS1、总蛋白和膜蛋白中 GLUT4 与 β -actin 比值的比较

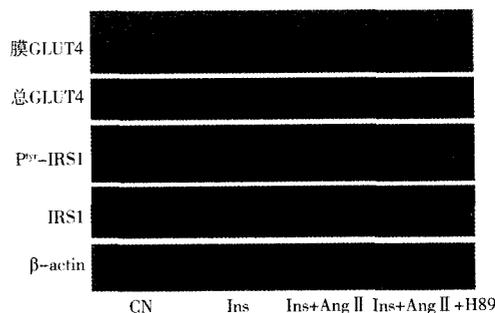


图 3 Western blot 检测 IRS1、P^{tyr}-IRS1、总蛋白和膜蛋白中 GLUT4 在 L6 成肌细胞的表达 IRS1 分子量 180 kd, P^{tyr}-IRS1 分子量 180 kd, GLUT4 分子量 65 kd

3 讨论

近年来研究表明 Ang II 与胰岛素抵抗密切相关,ARBs 可改善胰岛素抵抗。对 SD 大鼠连续静脉输注 Ang II,血浆中胰岛素水平明显升高,用血糖钳夹试验评价机体对胰岛素的敏感性时,葡萄糖输注速度和输注率显著低于对照组,提示 Ang II 可诱发胰岛素抵抗^[5]。临床研究显示,高血压患者多伴有胰岛素抵抗,进而导致 2 型糖尿病的发生^[6]。Ang II 抑制胰岛素作用机制涉及到胰岛素下游通路的部分环节,但具体途径尚不清楚。

L6 细胞株是骨骼肌发育分化研究中常用的细胞模型,成肌过程是一个成肌细胞的诱导增殖和分化的过程,分化成熟后的细胞具有骨骼肌的生物学特性^[7-8]。基于此,实验通过对 L6 细胞株进行分化诱导,使其具有骨骼肌的生物学特点来进行研究。

胰岛素受体主要存在于肝脏、肌肉及脂肪,其中肌肉组织占身体重量的 40%,是血糖利用的最主要器官,且 Ang II 可在骨骼肌中合成,其中可检测到 Ang II 1 型受体。而以往试验中多以血管平滑肌作为肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的研究对象,对骨骼肌的研究甚少,本试验为进一步说明胰岛素的作用,使用骨骼肌细胞作为研究对象。

胰岛素与靶细胞上的胰岛素受体亚单位结合后,可激活细胞内的 PI3K 途径。使胰岛素受体自身磷酸化,进而使 IRS1 磷酸化,与 PI3K 的 P85 亚基结合并招募其催化亚基 P110 而激活 PI3K,激活丝/苏氨酸激酶,使 GLUT4 由胞浆转移至胞膜,运载葡萄糖进入细胞^[9]。

本实验观察到 Ang II 作用于 L6 成肌细胞,IRS1、GLUT4 mRNA 表达无差异,提示 Ang II 并未使 IRS1、GLUT4 mRNA 表达水平发生变化。此结果与 Kahn^[10]研究相同,IRS1 酪氨酸磷酸化是胰岛素信号传导通路激活的前提。RT-PCR 结果显示 IRS1 mRNA 表达无差异,是由于提取的 IRS1 mRNA 包含了活化形式及非活

化形式的 IRS1,因此 IRS1 mRNA 表达的无差异并不能说明 Ang II 对 IRS1 无作用。Ang II 作用 L6 大鼠成肌细胞后 P^{yr}-IRS1、GLUT4 膜蛋白表达显著下降,证实在骨骼肌中 Ang II 导致 P^{yr}-IRS1 表达减少,下游通路受抑制,进而 GLUT4 由胞浆转移至胞膜减少, GLUT4 膜蛋白表达下降,葡萄糖利用受阻,诱发胰岛素抵抗,此结果与 Yong 等^[11]研究相同。

在此基础上,进一步加入 JAK2-PKA 抑制剂 H89 后, Ins + Ang II + H89 组 P^{yr}-IRS1、GLUT4 膜蛋白表达较 Ins + Ang II 组显著增加,说明 H89 抑制了 Ang II 引起的 P^{yr}-IRS1 的水平下降及 GLUT4 的转位障碍,从而使 GLUT4 膜蛋白表达增加,使葡萄糖得以利用,可改善 Ang II 引起的胰岛素抵抗,与 Mario 等^[3]在平滑肌细胞上的研究结果一致。另外 IRS1 蛋白表达无差异,与 RT-PCR 结果一致。

Ang II 作用于 L6 成肌细胞后,通过 JAK2-PKA 途径作用于 IRS1,导致 P^{yr}-IRS1 减少,是否通过蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase-1B, PTP-1B) 作用于 IRS1 导致 IRS1 酪氨酸磷酸化减少,本实验未进行研究,但 Mario 等^[3]实验观察到:Ang II 通过 JAK2-PKA 途径诱导 PTP-1B 的活化,导致 IRS1 去磷酸化。PTP-1B 是蛋白酪氨酸 PTPs 家族中的一员,在胰岛素信号转导中起负性调节作用,PTP-1B 能使激活后的胰岛素受体脱磷酸,也能使 IRS1 脱磷酸,影响了胰岛素信号传导。

总之,本研究从 JAK2-PKA 途径探讨了 Ang II 对 L6 大鼠成肌细胞胰岛素抵抗的机制,对骨骼肌胰岛素抵抗与 RAS 系统的关系及具体途径进行了新的探索;为阐明 ARBs 改善胰岛素抵抗的机制提供了部分依据,然而在胰岛素代谢中是否还有其他通路,基础实验及临床实验是否相符,有待进一步研究。

参考文献

[1] Iwai M, Chen R, Imura Y, et al. TAK-536, a new AT1 receptor blocker, improves glucose intolerance and adipocyte differentiation [J]. *Am J Hypertens*, 2007, 20(5):579-586.

[2] Henriksen EJ. Improvement of insulin sensitivity by antagonism of the renin-angiotensin system[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007, 293(3):974-980.

[3] Marrero MB, Fulton D, Stepp D, et al. Angiotensin II-induced insulin resistance and protein tyrosine phosphatases[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(11):2009-2013.

[4] Park SY, Choi GH, Choi HI, et al. Depletion of mitochondrial DNA causes impaired glucose utilization and insulin resistance in L6 GLUT4myc myocytes [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(11):9855-9864.

[5] Ogihara T, Asano T, Ando K, et al. Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling[J]. *Hypertension*, 2002, 40(6):872-879.

[6] Perkins JM, Davis SN. The renin-angiotensin-aldosterone system: a pivotal role in insulin sensitivity and glycemic control[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2008, 15(2):147-152.

[7] Marchesi C, Belicchi M, Meregalli M, et al. Correlation of circulating CD133⁺ progenitor subclasses with a mild phenotype in Duchenne muscular dystrophy patients [J]. *PLoS One*, 2008, 3(5):e2218.

[8] Ounzain S, Dacwag CS, Samani NJ, et al. Comparative in silico analysis identifies bona fide MyoD binding sites within the Myocyte stress 1 gene promoter[J]. *BMC Mol Bio*, 2008, 9:50.

[9] 张利莉. 血管紧张素 II 信号系统与胰岛素信号转导[J]. *国际内科学杂志*, 2008, 35(1):8-10.

[10] Kahn BB. Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes[J]. *Clin Invest*, 1992, 89(5):1367-1374.

[11] Wei Y, Sowers JR, Nistala R, et al. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells[J]. *Biol Chem*, 2006, 281(46):35137-35146.

(收稿日期:2010-09-25)

(本文编辑:宋妹丹)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

稿件远程管理系统专家审稿说明

1. 浏览器中输入 <http://www.cma.org.cn/ywzx/ywzx.asp>;
2. 点击“登陆”,进入到中华医学会信息管理平台;
3. 输入“登录名”“密码”,点击“登录”,进入系统(专家的登录名和密码获得有两种途径:①由杂志编辑部提供给专家,可以直接登陆;②专家通过点击收到邮件中的链接,激活登录名和密码);
4. 点击左菜单栏中的【稿件远程管理系统】,相应的功能就显示在下方;
5. 如果您是多个杂志的专家,请在系统上方杂志角色切换栏中选择您要处理的杂志名称和相应的角色,点击“确定”;
6. 看到当前角色处您是要处理杂志稿件的专家后,点击“未审稿件”,可以查看当前杂志所有的未审稿件;
7. 点击“稿件编号”一栏的链接,进入到提交审稿意见的页面;
8. 填写相应的内容后点击“提交审稿意见”,审稿完成。