

文章编号 1006-8147(2014)02-0102-03

论著

电刺激促进大鼠骨骼肌细胞 GLUT4 转位并激活 Akt 信号通路

李青¹, 郭刚¹, Bilan Philip², Klip Amira²

(1. 天津医科大学代谢病医院内分泌研究所, 卫生部激素与发育重点实验室, 天津 300070; 2. 加拿大病童医院细胞生物学实验室, 多伦多 M5G1X8)

摘要 目的: 利用 L6 细胞模型研究电脉冲刺激对骨骼肌细胞 GLUT4 转位及其信号通路的影响。方法: 将稳定过表达 GLUT4myc-AS160 的 L6-GLUT4myc-AS160 大鼠骨骼肌细胞体外培养于 6 孔培养板中, 用含 2% 胎牛血清的细胞分化液诱导分化为肌管, 将 6 孔板随机分成对照组、胰岛素组和电脉冲刺激(EPS)组, 用终浓度为 100 nmol/L 的胰岛素或电刺激仪对细胞刺激, 对照组不做任何处理。ELISA 测定细胞膜上的 GLUT4myc 含量, 免疫印记法测定蛋白激酶 B(Akt) 和 Rab-GTPase 激活蛋白 AS160 的磷酸化。结果: 与对照组相比, 1 h 电刺激显著增加细胞膜表面 GLUT4myc 水平并磷酸化 Akt 及 Rab-GTPase 激活蛋白 AS160。结论: 电刺激促进 L6 骨骼肌细胞 GLUT4myc 转位, 激活 Akt 信号通路。

关键词 电刺激; 骨骼肌; 葡萄糖转运子 4; 蛋白激酶 B; AS160; 胰岛素

中图分类号 R58

文献标志码 A

Electric pulse stimulation-induced GLUT4 translocation and activated Akt signaling pathway in L6-GLUT4myc-AS160 myotubes

LI Qing¹, GUO Gang¹, Bilan Philip², Klip Amira²

(1. Institute of Endocrinology, Metabolic Diseases Hospital, Tianjin Medical University, Key Laboratory of Hormone and Development, Ministry of Health, Tianjin 300070, China; 2. The Hospital for Sick Children, Program in Cell Biology, Toronto M5G 1X8, Canada)

Abstract **Objective:** To study the electric pulse stimulation (EPS)-stimulated signal transduction and GLUT4myc translocation in L6-GLUT4myc-AS160 myotubes. **Methods:** L6-GLUT4myc-AS160 myoblasts were incubated in 6-well plates, differentiated to myotubes with 2% FBS differentiation media, after which they were divided into 3 groups (EPS, insulin, control) with the first two treated with 100 nmol/L insulin or contract cell and the control group receiving no treatment. The amount of GLUT4myc on the cell surface was measured by ELISA and the phosphorylation of protein kinase B (Akt) and Rab-GTPase AS160 were obtained by immunoblotting. **Results:** Compared to the control group, EPS stimulated GLUT4myc translocation significantly in 1h and the Akt and AS160 were both phosphorylated by EPS. **Conclusion:** EPS-induced GLUT4myc can be translocated to the cell surface and activate the Akt signaling pathway.

Key words electrical pulse stimulation; skeletal muscle; glucose transporter 4; PKB; AS160; insulin

胰岛素和运动是骨骼肌细胞中促进葡萄糖利用的两个重要的生理刺激, 多种葡萄糖转运子在骨骼肌细胞中表达, 而葡萄糖转运子 4(glucose transporter, GLUT4) 是骨骼肌细胞中转运葡萄糖的主要转运子, 胰岛素和运动刺激增加的葡萄糖摄取主要通过促进位于骨骼肌细胞内的 GLUT4 从胞内储存囊泡转位到细胞膜表面。胰岛素诱导的葡萄糖摄取的信号通路主要包括胰岛素受体下游-1 (IRS-1)、PI3K、Akt 和 Rab-GTPase 激活蛋白 AS160^[1]。适当的运动具有广泛的生理作用, 例如增加葡萄糖利用、改变骨骼肌纤维类型、血管生成的感应以及调节免疫系统^[2]。并且, 充足的运动不但能够延缓 2 型糖

尿病的发展而且有益于胰岛素抵抗的病人^[3-4]。然而运动或肌肉收缩带来的这些有益影响的分子机制尚不明确, 目前提出骨骼肌细胞收缩促进葡萄糖摄取的 3 个主要机制为骨骼肌横纹肌中钙离子的增加, 能量消耗和机械拉伸, 但是其影响 GLUT4 转位和相关调节信号通路还了解不完全, 由于分离的动物肌肉组织结构的特点很难对每一个细胞表面的 GLUT4 含量进行检测, 因此细胞株可以解决这个问题并且合适的细胞模型将有助于研究这一复杂生理现象的信号分子机制, 所以我们选择不具有收缩能力的 L6 大鼠骨骼肌细胞作为细胞模型, 采用电刺激的方法体外模拟运动收缩刺激, 目的为研究排除机械拉伸及肌肉收缩消耗能量的因素, 电刺激对 GLUT4 转位的影响及其相关的信号通路。在 L6 大

作者简介 李青(1987-), 女, 硕士在读, 研究方向: 生物化学与分子生物学; 通信作者: 郭刚, E-mail: guogangtj@126.com。

鼠骨骼肌细胞中 Rab-GTPase 激活蛋白 AS160 表达量很低,很难用免疫印记法来检测其磷酸化水平,加拿大 Amira Klip 实验室在 L6 大鼠骨骼肌细胞中成功稳定过表达了此蛋白,此研究利用过表达 GLUT4myc-AS160 的 L6 大鼠骨骼肌细胞株检测电刺激对 GLUT4 转位的调节作用并检测其对 Akt 和 AS160 磷酸化水平的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 稳定过表达 GLUT4myc-AS160 的 L6 大鼠骨骼肌细胞株(L6-GLUT4myc-AS160)由加拿大 Amira Klip 教授提供。抗生素、 α -MEM (加拿大 Wisent Inc, St-Bruno 公司),胎牛血清(美国 HyClone 公司),胰岛素(加拿大 Eli Lilly 公司),不含脂肪酸的牛血清蛋白(瑞士 Roche 公司),山羊血清(加拿大 Wisent 公司),抗 myc 抗体(美国 Sigma 公司),抗磷酸化 Akt 和 AS160 抗体(美国 cell signaling),偶联辣根过氧化物酶(HRP)的山羊抗兔抗体、增强化学发光底物检测试剂盒(美国 Millipore 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含有 10%胎牛血清的 α -MEM 培养基,于 37 °C,5% CO₂ 条件下培养 L6-GLUT4myc-AS160 大鼠骨骼肌细胞,将接种在 6 孔培养板中的细胞用含有 2%胎牛血清的细胞分化液诱导分化为肌管,隔天换液,于接种后的第 6 天用于实验。

1.2.2 ELISA 检测细胞膜 GLUT4myc 将 6 孔板的细胞随机分为对照组、胰岛素组和电刺激组。胰岛素组加入终浓度为 100 nmol/L 的胰岛素刺激 20 min,其它组加入不含有胎牛血清及抗生素的 α -MEM,对照组不做任何处理,电刺激组分别用电刺激仪在 24 ms,20 V,1 Hz 的刺激条件下刺激不同时间(20、30、40、60 min)。细胞处理后,3%多聚甲醛固定,甘氨酸淬灭,5%(v/v)山羊血清封闭,用 1:500 抗 myc 抗体冰上孵育 1 h;用 1:1 000 偶联 HRP 的山羊抗兔抗体冰上孵育 1 h;加入底物邻苯二胺溶液,反应约 20~30 min 后用 3 mol/L 盐酸终止,取上清,测定在 492 nm 的吸光度,重复 4 次。增加的细胞表面 GLUT4myc 水平=电刺激组(或胰岛素组)吸光度值/对照组的吸光度值。

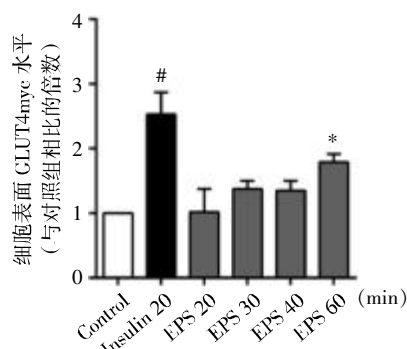
1.2.3 免疫印记检测 Akt, AS160 的磷酸化 在 6 孔板上,将细胞分为对照组、胰岛素组和电刺激组,每组 2 个复孔。处理细胞后,裂解细胞,97 °C加热 5 min,10%(v/v)SDS-PAGE 电泳,免疫印迹检测 Akt 和 AS160 的磷酸化,一抗用各自的磷酸化抗体,二

抗用偶联 HRP 的山羊抗兔抗体,以 GAPDH 作为内参,增强化学发光底物试剂盒检测,曝光。用 Image J 软件处理,各蛋白的磷酸化水平增高倍数=电刺激组(或胰岛素组)灰度值/对照组的灰度值。

1.3 统计学方法 采用 GraphPad Prism6 统计软件进行统计学分析,对符合正态分布的正态计量以均数 \pm 标准误($\bar{x}\pm s_x$)表示,用单因素方差分析比较多组均数间的差异,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各电刺激组和胰岛素组增加的 GLUT4myc 水平的比较 与对照组相比,胰岛素显著增加细胞膜表面 GLUT4myc(2.5 倍, $P<0.001$)。与对照组相比,随着电刺激时间的延长细胞表面 GLUT4myc 水平逐渐升高,60 min 后显著增加细胞膜表面 GLUT4myc 水平(1.8 倍, $P<0.05$),但电刺激增加细胞表面的 GLUT4myc 水平低于胰岛素组,见图 1。



$n=3$, * $P<0.05$, # $P<0.001$

图1 胰岛素和电刺激各组增加细胞表面 GLUT4myc 水平
Fig 1 The level of insulin and EPS stimulated cell surface GLUT4myc

2.2 电刺激对 Akt 和 AS160 磷酸化的影响 胰岛素刺激后显著激活了胰岛素信号通路,Akt 的两个磷酸化位点 (Thr308、Ser473)、Rab-GTPase 激活蛋白 AS160 的磷酸化水平均显著升高 (1.78 倍, $P<0.01$),电刺激组中从 20 min 开始显著增加了 Akt 的两个磷酸化位点的磷酸化水平,30 min 达最大值,随着时间的增加 Akt-Ser473 的磷酸化水平略有下降但维持在与 20 min 相似的磷酸化水平,而 Akt-Thr308 的磷酸化水平随着时间的增加先下降后升高(图 2,表 1)。AS160 的磷酸化水平随着时间的增加其磷酸化水平逐渐升高,30 min 起与对照组比较有显著性差异,在 40 min 达最大值(1.66 倍, $P<0.01$),并且维持这一水平至 60 min(图 2,表 1)。胰岛素激活的 Akt 及 AS160 磷酸化水平均高于电刺激组(图 2,表 1)。

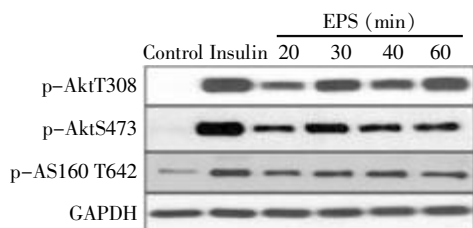


图 2 胰岛素和电刺激各组对 L6-GLUT4myc-AS160 细胞 Akt 和 AS160 磷酸化的影响

Fig 2 The phosphorylation of Akt and AS160 effected by insulin and EPS in L6-GLUT4myc-AS160 cell

表 1 各组中 Akt 和 AS160 磷酸化水平增高倍数的比较(与对照组比)(倍, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The compare of Akt and AS160 phosphorylation fold increase (compare to control) (fold, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	对照组	胰岛素组	EPS 20 min
p-AktT308	3	1 \pm 0.00	15.82 \pm 1.21 [#]	9.28 \pm 3.57 [*]
p-AktS473	3	1 \pm 0.00	8.57 \pm 1.85 [#]	4.40 \pm 0.33 ^{##}
p-AS160 T642	3	1 \pm 0.00	1.78 \pm 0.21 ^{**}	1.38 \pm 0.10
组别	n	EPS 30 min	EPS 40 min	EPS 60 min
p-AktT308	3	14.45 \pm 2.58 ^{**}	9.23 \pm 1.01 [*]	12.11 \pm 0.34 ^{**}
p-AktS473	3	5.34 \pm 0.34 ^{##}	4.01 \pm 0.42 [#]	4.17 \pm 0.33 [#]
p-AS160 T642	3	1.58 \pm 0.07 [*]	1.66 \pm 0.08 ^{**}	1.58 \pm 0.12 [*]

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, # $P < 0.001$, ## $P < 0.0001$

3 讨论

骨骼肌的收缩水平是底物代谢及转录事件的重要的调节因子,然而调节这些反应的信号机制知之甚少。电脉冲刺激是体外模拟收缩刺激的一种有效的实验手段,但是不同的肌纤维类型、电刺激条件和强度等都有可能对细胞产生不同的影响^[5-6]。本研究以 L6-GLUT4myc-AS160 骨骼肌细胞株为细胞模型,采用细胞刺激器给予细胞一定条件的电脉冲刺激,体外模拟肌肉收缩,并对电刺激调节的 GLUT4myc 转位和其相关的调节信号机制进行初步研究。

此研究结果显示 24 ms、20 V、1 Hz、1 h 的刺激条件能够引起 GLUT4myc 转位,说明此细胞模型及刺激条件是体外研究运动刺激对骨骼肌细胞 GLUT4myc 转位影响的一个成功的细胞模型和条件。

L6 不具有收缩能力,因此在细胞接受电刺激时不进行收缩同时也不会因收缩消耗能量, GLUT4myc 的转位发生变化表明其它的分子机制发挥作用。当电脉冲刺激骨骼肌细胞时,骨骼肌细胞横小管去极化导致钙离子从肌浆网中释放出来,从而引发肌动蛋白和肌球蛋白的相互作用。细胞中肌动蛋白和肌球蛋白间的相互作用以及细胞为抵抗

细胞内增加的钙离子流,向细胞外泵出钙离子的过程中消耗能量 ATP,ATP 转换为 ADP,即细胞内 AMP/ATP 或 ADP/ATP 的比率增加,这一比率增加激活 AMPK^[7]。其它研究及此研究中发现电脉冲刺激显著升高 AMPK 的磷酸化水平^[13],说明此电刺激有可能促进了 L6 细胞横小管去极化、胞浆内钙离子升高进而消耗 ATP 激活 AMPK,最终导致 GLUT4myc 转位。

有研究提出有关运动或收缩刺激对胰岛素受体信号通路具有激活作用从而增强胰岛素作用的信号机制^[8-9]。但也有报道认为运动并不影响胰岛素信号通路^[10]。因此,运动是否影响胰岛素信号通路还存在争议。Akt 对多种细胞的生长、存活及代谢有重要的调节作用,同时还是胰岛素信号通路的关键信号分子,因此 Akt 被认为是骨骼肌收缩刺激激活的信号通路中一个重要的潜在信号分子。目前有研究应用多种肌纤维类型,多个时间点和多种特定肌纤维亚型抗体,通过体内刺激和在没有系统因素存在的情况下体外刺激离体肌肉,发现 Akt 磷酸化显著、快速增加 15 min 后其磷酸化水平恢复到基础水平^[11]。本研究用培养的细胞模型,得出了相似的实验结果,在本研究的电脉冲条件下 20 min 开始显著增加了 Akt 的磷酸化水平,并且其下游与 GLUT4 转位具有关键作用的 AS160 的磷酸化水平也显著增加^[4,12]。胰岛素促进葡萄糖摄取信号通路基本明确,在此研究中胰岛素激活 Akt 及磷酸化 AS160,1 h 电刺激增加了细胞表面的 GLUT4myc 水平,同时激活 Akt 和增加 AS160 的磷酸化水平,随着时间的延长 AS160 的磷酸化水平逐渐升高的趋势与细胞表面增加的 GLUT4myc 水平一致,这些结果都表明电刺激引起的 GLUT4 转位可能与 Akt 信号通路的激活有关,但与肌肉的收缩无关。

综上所述,电刺激显著增加 GLUT4 的转位,Akt 及其下游分子 AS160 磷酸化水平被提高。早期的报道显示细胞内的钙离子水平升高或 cAMP 的激活都可能激活 Akt,所以本研究中是否升高细胞内的钙离子水平、Akt 的激活机制是否与细胞内钙离子的升高有关、Akt 的激活机制是依赖 PI3K 的形式或是不依赖 PI3K 的形式仍是未知的,对于电刺激激活的 Akt 是否对 GLUT4 转位起决定性作用还需要以后通过其他实验手段如采用抑制剂、基因敲除或基因突变等方法进行进一步地探讨。本研究为探讨电刺激引起的 GLUT4 转位及其相关的调节信号通路提供了初步结果、实验模型和刺激条件,有助于

(下转第 115 页)

- [3] 中华医学会心血管病学分会、中华心血管病杂志编辑委员会. 急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2010, 38(8): 675
- [4] 于会宁, 张迎怡, 丛洪良. 冠心病患者糖耐量减低与冠状动脉 Gensini 评分的关系[J]. 临床心血管病杂志, 2010, 1(26): 1001
- [5] Varriale P, Chrysos B E. The RSR' complex not related to right bundle branch block: diagnostic value as a sign of myocardial infarction scar[J]. Am Heart J, 1992, 123(2): 369
- [6] Gardner P I, Ursell P C, Fenoglio J J, et al. Electrophysiologic and anatomic basis for fractionated electrograms recorded from healed myocardial infarction[J]. Circulation, 1985, 72(3): 596
- [7] Lesh M D, Spear J F, Simson M B. A computer model of the electrogram: what causes fractionation [J]. Electrocardiol, 1988, 21(suppl): 69
- [8] Varriale P, Chrysos B E. The RSR' complex not related to right bundle branch block: diagnostic value as a sign of myocardial infarction scar[J]. Am Heart J, 1992, 123(2): 369
- [9] 郭继鸿. 碎裂 QRS 波[J]. 临床心电图学杂志, 2008, 17(1): 60
- [10] Das M K, El Masry H. Fragmented QRS and other depolarization abnormalities as a predictor of mortality and sudden cardiac death[J]. Curr Opin Cardiol, 2010, 25(1): 59
- [11] Das M K, Maskoun W, Shen C, et al. Fragmented QRS on a 12-lead ECG: a predictor of mortality and cardiac events in patients with artery disease[J]. Heart Rhythm, 2007, 4(11): 1385
- [12] Michael M K, Das M K. Fragmented QRS on a 12-lead ECG is a sign of acute or recent myocardial infarction[J]. Circulation, 2006, 114(18 suppl): 512
- [13] Orn S, Manhenke C, Anad I S, et al. Effect of left ventricular scar size, location, and transmural on left ventricular remodeling with healed myocardial infarction[J]. Am J Cardiol, 2007, 99(8): 1109
- [14] Mahenthiran J, Khan B R, Sawada S G, et al. Fragmented QRS complexes not typical of a bundle branch block: a marker of greater myocardial perfusion tomography abnormalities in coronary artery disease[J]. J Nucl Cardiol, 2007, 14(3): 347
- [15] Das M K, Michael M A, Suradi H, et al. Usefulness of fragmented QRS on a 12-lead electrocardiogram in acute coronary syndrome for predicting mortality[J]. Am J Cardiol, 2009, 104(12): 1631
- [16] Torigoe K, Tamura A, Kawano Y, et al. The number of leads with fragmented QRS is independently associated with cardiac death or hospitalization for heart failure in patients with prior myocardial infarction[J]. J Cardiol, 2012, 59(1): 36
- [17] Guo R, Zhang J, Li Y, et al. Prognostic significance of fragmented QRS in patients with non-ST elevation myocardial infarction Results of a 1-year, single-center follow-up[J]. Herz, 2012, 37(7): 789
- [18] Torigoe K, Tamura A, Kawano Y, et al. The number of leads with fragmented QRS is independently associated with cardiac death or hospitalization for heart failure in patients with prior myocardial infarction[J]. J Cardiol, 2012, 59(1): 36

(2013-10-14 收稿)

+++++

(上接第 104 页)

研究运动有益于胰岛素抵抗或糖尿病病人的分子机制。

参考文献:

- [1] Klip A. The many ways to regulate the glucose transporter4 [J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2009, 34(3): 481
- [2] Farmawati A, Kitajima Y, Nedachi T, et al. Characterization of contraction-induced IL-6 up-regulation using contractile C2C12 myotubes [J]. Endocr J, 2013, 60(2): 137
- [3] Roberts C K, Little J P, Thyfault J P. Modification of insulin sensitivity and glycemic control by activity and exercise [J]. Med Sci Sports Exerc, 2013, 45(10): 1868
- [4] Lee S, Kim Y. Effects of exercise alone on insulin sensitivity and glucose tolerance in obese youth [J]. Diabetes Metab J, 2013, 37(4): 225
- [5] Burch N, Arnold AS, Item F, et al. Electric pulse stimulation of cultured murine muscle cells reproduces gene expression changes of trained mouse muscle [J]. PLoS One, 2010, 5(6): e10970
- [6] Raney M A, Turcotte L P. Regulation of contraction-induced FA uptake and oxidation by AMPK and ERK1/2 is intensity dependent in rodent muscle [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006, 291(6): E1220
- [7] Hardie D G. AMPK: A target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer [J]. Diabetes, 2013, 62(7): 2164
- [8] Wadley G D, Konstantopoulos N, Macaulay L, et al. Increased insulin-stimulated Akt pSer473 and cytosolic SHP2 protein abundance in human skeletal muscle following acute exercise and short-term training [J]. J Appl Physiol, 2007, 102(4): 1624
- [9] Osorio-Fuentealba C, Contreras-Ferrat A E, Altamirano F, et al. Electrical stimuli release ATP to increase GLUT4 translocation and glucose uptake via PI3K γ -Akt-AS160 in skeletal muscle cells [J]. Diabetes, 2013, 62(5): 1519
- [10] Wojtaszewski J F, Hansen B F, Gade J, et al. Insulin signaling and insulin sensitivity after exercise in human skeletal muscle [J]. Diabetes, 2000, 49(3): 325
- [11] Sakamoto K, Hirshman M F, Aschenbach W G, et al. Contraction regulation of Akt in rat skeletal muscle [J]. JBC, 2002, 277(14): 11910
- [12] Cartee G D, Funai K. Exercise and insulin: Convergence or divergence at AS160 and TBC1D1[J]. Exerc Sport Sci Rev, 2009, 37(4): 188
- [13] Jensen T E, Schjerling P, Viollet B, et al. AMPK α activation is required for stimulation of glucose uptake by twitch contraction, but not by H₂O₂, in mouse skeletal muscle [J]. PLoS one, 2008 3(5):e2102

(2013-09-29 收稿)