

文章编号 1006-8147(2017)01-0001-04

论 著

# 电脉冲刺激的骨骼肌细胞条件培养基逆转内皮细胞胰岛素抵抗和功能障碍

赵一贺, 张 畅, 牛文彦

(天津医科大学免疫学系, 天津 300070)

**摘要** 目的:探讨电脉冲刺激的 C2C12 肌管细胞条件培养基对内皮细胞的影响。方法:提取常氧和缺氧培养的 3T3-L1 脂肪细胞上清液为条件培养基 CM-N 和 CM-H, 电脉冲刺激的 C2C12 肌管细胞上清液为条件培养基 CM-EPS, 单独或按比例混合分别孵育内皮细胞 16 h。Western blot 检测 Akt、eNOS、IKK 和 NF- $\kappa$ B 的磷酸化。结果:CM-H 降低内皮细胞 Akt 和 eNOS 的磷酸化, 并升高 IKK 和 NF- $\kappa$ B 的磷酸化。CM-EPS 逆转此作用。结论:CM-EPS 逆转 CM-H 造成的内皮细胞胰岛素抵抗并改善内皮功能。

**关键词** 电脉冲刺激波; 内皮功能障碍; 胰岛素抵抗; 炎症; 糖尿病

中图分类号 R392.1

文献标志码 A

## Conditional medium from electric pulse-stimulated C2C12 skeletal muscle cells reverses insulin resistance and endothelial dysfunction in endothelial cells

ZHAO Yi-he, ZHANG Chang, NIU Wen-yan

(Department of Immunology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To explore the effects of conditional medium from electric pulse-stimulated C2C12 myotube on endothelial insulin resistance and dysfunction. **Methods:** The supernatant of normoxic and hypoxic 3T3-L1 adipocytes were collected as conditional medium CM-N and CM-H, respectively. The supernatant of pulsed electrical-stimulated C2C12 myotube was collected as conditional medium CM-EPS. Endothelial cells were incubated with CM-N, CM-H and CM-EPS for 16 hours, respectively. The phosphorylation of Akt, eNOS, IKK and NF- $\kappa$ B in endothelial cells were analyzed by Western blot. **Results:** The phosphorylation of Akt and eNOS were increased significantly, and the phosphorylation of IKK and NF- $\kappa$ B were reduced under CM-H treatment, which were reversed by adding CM-EPS. **Conclusion:** CM-EPS can reverse insulin resistance in endothelial cells and improve endothelial dysfunction induced by CM-H.

**Key words** electric pulse stimulation; endothelial dysfunction; insulin resistance; inflammation; diabetes

2 型糖尿病是一种以葡萄糖代谢异常为特征的代谢性疾病, 胰岛素抵抗是其发展的核心环节<sup>[1-2]</sup>, 肥胖是主要诱因。脂肪组织缺氧是肥胖的早期表现之一<sup>[3]</sup>, 并伴有细胞因子和脂肪酸等的分泌变化。这些因子除了造成脂肪组织炎症和胰岛素抵抗外, 还可以通过血液循环, 影响骨骼肌和肝脏的胰岛素敏感性, 导致周身胰岛素抵抗<sup>[4]</sup>, 同时也会影响心血管系统, 造成内皮功能障碍<sup>[5-6]</sup>。相比较于以节食减肥为主的方案, 规律性运动在预防和治疗这些疾病方面已成为最佳的策略之一<sup>[7]</sup>。目前, 骨骼肌被认为是分泌器官, 分泌细胞因子和活性肽, 也称作“肌肉因子”<sup>[8]</sup>。体外培养的多核肌管(鼠或人)已在多项研究中用于发现和识别肌肉因子, 电脉冲刺激(electric

pulse stimulation, EPS)可诱导肌管收缩模拟运动<sup>[9-10]</sup>。本研究应用缺氧的 3T3-L1 脂肪细胞上清(条件培养基 CM-H)造成内皮细胞胰岛素抵抗, 通过加入电脉冲刺激的小鼠 C2C12 骨骼肌肌管上清(条件培养基 CM-EPS), 探讨 CM-EPS 对内皮细胞胰岛素抵抗和内皮功能的影响。

### 1 材料与方法

1.1 实验材料 小鼠胚胎成纤维细胞 3T3-L1 (加拿大多伦多大学 Amira Klip 教授惠赠), 小鼠骨骼肌细胞株 C2C12 (美国 ATCC 公司), 人脐静脉内皮细胞 (美国 allcells 公司), DMEM 培养基 (美国 GIBCO 公司), VascuLife Basal 培养基 (美国 Lifeline Cell Technology 公司), 胎牛血清 (以色列 Bioind 公司), 马血清 (美国 GIBCO 公司), 抗磷酸化 Akt、eNOS、NF- $\kappa$ B、IKK $\alpha$ / $\beta$  和  $\beta$ -actin 抗体 (CST), 偶联 HRP 的山羊抗兔抗体 (美国 JacksonImmuno Research 公司), 增强化学发光底物检测试剂盒 (美国 Millipore 公司), ChemoScope3300mini 化学发光成像系统

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81170740, 81161120545); 高等学校博士学科点专项基金资助项目(20121202110014); 天津市科委应用基础研究重点项目(15JCZDJC35500); 天津市卫计委重点攻关项目(15KG102)

作者简介 赵一贺(1990-), 男, 硕士在读, 研究方向: 免疫学; 通信作者: 牛文彦, E-mail: wniu@tmu.edu.cn。

(CLINX 科学仪器有限公司)。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 3T3-L1 细胞培养与上清提取** 用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基将细胞接种于 6 孔板中, 在 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 待细胞生长至融合, 按比例加入三联诱导分化液 (IBMX, 1:1 000; 地塞米松, 1:1 000; 胰岛素, 1:1 000), 隔 2 d 后按比例加入一联诱导分化液 (胰岛素, 1:1 000), 隔天换含有 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基继续培养, 细胞中出现细小脂滴, 大约 1 周后约 85% 以上的脂肪细胞中细小的脂滴相互融合。选取分化较好的脂肪细胞培养板, 分别在常氧 (20% O<sub>2</sub>) 和缺氧 (1% O<sub>2</sub>) 培养箱培养 16 h, 提取细胞上清至无菌的 Eppendorf 管中, 即为常氧/缺氧脂肪细胞条件培养基 (CM-N/CM-H)。

**1.2.2 C2C12 细胞培养与上清提取** 用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基将细胞接种于 6 孔板中, 在 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 细胞密度达 100% 时, 用含 5% HS 的 DMEM 高糖培养基诱导其分化为多核肌管。分化成熟后, 弃去 5% HS 的高糖培养基, 换成 DMEM 低糖培养基, 将电极板放入 6 孔板内, 在 20 V, 1 Hz, 2 ms 条件下, 刺激成熟的 C2C12 肌管 16 h。提取细胞上清至无菌的 Eppendorf 管中, 即为电刺激骨骼肌细胞条件培养基 (CM-EPS)。

**1.2.3 HUVECs 细胞培养与处理** 用含 10% FBS 和生长因子的 VasculLife Basal 培养基将细胞接种于 6 孔板中, 在 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。隔天细胞长满后, 分别将不同的细胞条件培养基单独或混合孵育内皮细胞 16 h, 对照组孵育正常培养基 (regular medium, RM)。

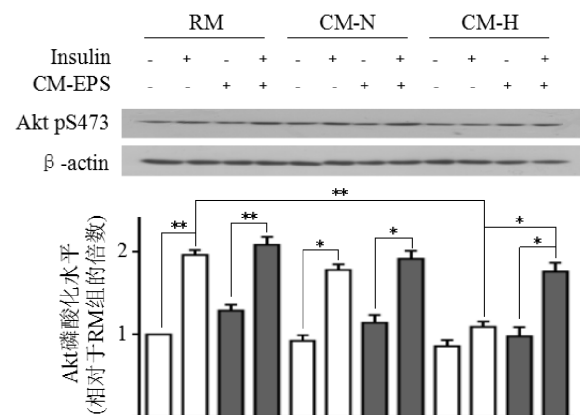
**1.2.4 免疫印记检测蛋白水平** 弃掉细胞上清, 用预冷的 PBS 缓冲液清洗 2 次。150 μL/孔含蛋白酶抑制剂 (1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 μmol/L PIC, 200 μmol/L PMSF, 0.5 mmol/L NaF) 的裂解液, 置于冰上 20 min, 并收集。预冷离心机至 4 ℃, 13 000 r/min 离心 10 min, 收集上清。按照 BCA Protein Assay Kit 说明书测定蛋白浓度, 再与 5×LSB 缓冲液按 4:1 的比例混合, 65 ℃加热 15 min, 7.5% (V/V) SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品, 转到 PVDF 膜上, 用 3% 牛血清白蛋白封闭 2 h, 再分别用各自一抗 4 ℃孵育过夜, 二抗使用偶联辣根过氧化物酶 HRP 的山羊抗兔 IgG 孵育 2 h, 蛋白条带用增强化学发光法检测。用 β-actin 作为内参, Image J 软件定量, 即可检测蛋白的磷酸化水平。

**1.3 统计学处理** 采用 GraphPad Prism6 统计软件进行统计学分析, 实验数据均以  $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$  表示, 多组

间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Western blot 检测 Akt S473 磷酸化水平** 分别用 RM、CM-N 和 CM-H 条件培养基或与 CM-EPS 条件培养基混合, 孵育内皮细胞, Western blot 检测基础和胰岛素作用下的 Akt 磷酸化。结果见图 1, CM-N 不影响基础和胰岛素刺激的 Akt S473 磷酸化, 而 CM-H 组胰岛素刺激的 Akt S473 磷酸化水平显著低于 RM 组胰岛素刺激的水平 ( $P < 0.01$ ), 与 CM-H 组内无胰岛素刺激的基础状态无显著差异。加入 CM-EPS 后胰岛素刺激的 Akt pS473 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 为其基础状态的  $1.80 \pm 0.04$  倍 ( $P < 0.05$ ), 逆转了 CM-H 对内皮细胞 Akt 磷酸化的抑制作用, 提示 CM-EPS 能够提高内皮细胞的胰岛素敏感性。



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

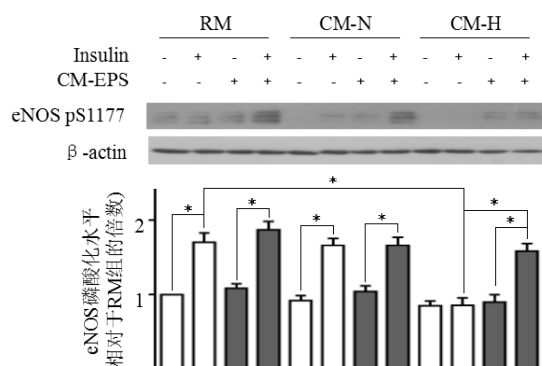
图 1 内皮细胞中 Akt S473 的磷酸化水平

Fig 1 The phosphorylation of Akt S473 in endothelial cells

**2.2 Western blot 检测 eNOS S1177 磷酸化水平** 分别用 RM、CM-N 和 CM-H 条件培养基或与 CM-EPS 条件培养基混合, 孵育内皮细胞, 检测基础和胰岛素作用下的 eNOS 磷酸化。结果见图 2, CM-N 不影响基础和胰岛素刺激的 eNOS S1177 磷酸化, 而 CM-H 组胰岛素刺激的 eNOS S1177 磷酸化水平显著低于 RM 对照组 ( $P < 0.05$ ), 与未加胰岛素的基础状态无显著差异。加入 CM-EPS 后胰岛素刺激的 eNOS pS1177 显著升高 ( $P < 0.05$ ), 为其基础状态的  $(1.76 \pm 0.10)$  倍 ( $P < 0.05$ ), 逆转了 CM-H 对内皮细胞 eNOS 磷酸化的抑制作用, 表明 CM-EPS 条件培养基可以改善内皮细胞的功能。

**2.3 Western blot 检测 IKKα/β S180/181 和 NF-κB p65 S536 磷酸化水平** 检测 CM-EPS 对脂肪细胞条件培养基影响血管内皮细胞 NF-κB 信号通路的作用, 结果见图 3, 与 RM 组相比, CM-N 组没有显

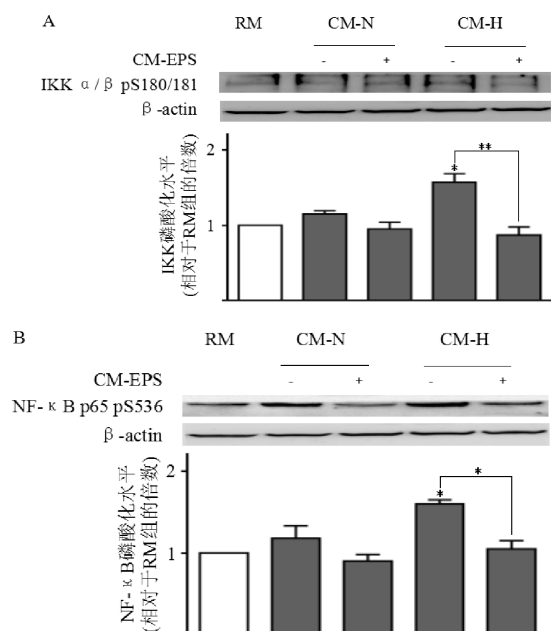
著差异,而 CM-H 组 IKK $\alpha/\beta$  S180/181 和 NF- $\kappa$ B p65 S536 的磷酸化水平分别升高了 ( $1.57 \pm 0.11$ ) 倍和 ( $1.61 \pm 0.05$ ) 倍 ( $P < 0.05$ )。加入 CM-EPS 后,相较于 CM-H 组 IKK $\alpha/\beta$  和 NF- $\kappa$ B 磷酸化水平分别降低了 ( $45 \pm 3$ )% ( $P < 0.01$ , 图 3A) 和 ( $34 \pm 4$ )% ( $P < 0.05$ , 图 3B), CM-EPS 逆转了 CM-H 的作用,表明 CM-EPS 能够缓解胰岛素抵抗的内皮细胞的炎症反应。



\* $P < 0.05$

图2 内皮细胞中 eNOS S1177 的磷酸化水平

Fig 2 The phosphorylation of eNOS S1177 in endothelial cells



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图3 内皮细胞中 IKK  $\alpha/\beta$  S180/181 和 NF- $\kappa$ B p65 S536 的磷酸化水平

Fig 3 The phosphorylation of IKK  $\alpha/\beta$  S180/181 and NF- $\kappa$ B p65 S536 in endothelial cells

### 3 讨论

骨骼肌作为分泌器官,释放多种细胞因子,包括 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-15 和 irisin 等<sup>[8,11-12]</sup>。相比较于以动物和受试者为模型的肌肉收缩活动,在体外试验中培养多核肌管,通过 EPS 诱导收缩模

拟运动,存在特定的优势,且已经越来越多地被用于研究肌肉收缩引起的生物反应的分子机制<sup>[13]</sup>。本实验中,笔者建立肌肉作用血管内皮的模型,通过 EPS 诱导 C2C12 肌管,探究 C2C12 骨骼肌细胞分泌的因子对内皮细胞的影响。

内皮细胞覆盖在血管腔内表面,对维持正常的血管功能至关重要,可释放多种效应因子,通过自分泌、内分泌和旁分泌发挥作用,其中 NO 对于维持血管舒张至关重要。健康的血管内皮功能依赖内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的活性,当内皮功能受到影响时,eNOS 的活性下降,磷酸化水平降低,从而影响 NO 水平<sup>[14]</sup>。血管内皮响应胰岛素的作用,内皮损伤可能引起内皮细胞表面的胰岛素受体异常,影响胰岛素与其结合。因此,通常情况下,胰岛素抵抗与内皮功能障碍共存,许多与内皮功能障碍相关的疾病,动脉粥样硬化、糖尿病、肥胖等都伴随着不同程度的血管内皮胰岛素抵抗<sup>[15]</sup>。增加内皮胰岛素信号通路的活性,激活 IRS/PI3K/Akt 通路,增加 eNOS 的表达和活性,可以增加 NO 的产生<sup>[16]</sup>。本课题组前期研究发现 CM-H 诱发内皮细胞胰岛素抵抗、内皮细胞功能障碍,本研究发现 CM-EPS 增加 Akt 磷酸化,改善了内皮细胞胰岛素抵抗;增加 eNOS 的活性,改善了内皮功能。本研究结果与低强度运动改善果糖诱导的胰岛素抵抗大鼠心血管功能的结果一致<sup>[17]</sup>。因此,模拟肌肉收缩的 CM-EPS 改善了 CM-H 诱导的内皮细胞胰岛素抵抗和功能障碍。

炎症是导致胰岛素抵抗的重要因素之一,NF- $\kappa$ B 是炎症启动、调节的关键核转录因子,在炎症细胞因子的刺激下,IKK 的活化激活 NF- $\kappa$ B,并转移至细胞核内结合特定的靶基因启动细胞粘附分子和促炎因子等的转录<sup>[18]</sup>。动脉粥样硬化作为一种慢性炎症,在其发生发展过程中涉及血管壁的疾病<sup>[19-20]</sup>,内皮细胞中 NF- $\kappa$ B 的活化,作为典型途径,调节潜在的动脉粥样硬化斑块的形成<sup>[21]</sup>。因此血管内皮功能障碍作为心血管疾病的重要发病机制,炎症在其中发挥着重要作用。本研究发现 CM-H 激活 NF- $\kappa$ B 信号通路,CM-EPS 逆转此作用,提示 CM-EPS 阻断了一些脂肪因子或者炎症细胞因子对于 NF- $\kappa$ B 的活化作用,这些脂肪因子和炎症细胞因子在胰岛素抵抗的发展中可以通过 IKK/NF- $\kappa$ B 通路激活炎症信号<sup>[22-23]</sup>。缺氧处理的脂肪细胞的 TNF $\alpha$  和 HIF-1 升高,诱导 NF- $\kappa$ B 活化,这与在胰岛素抵抗的受试者中 NF- $\kappa$ B 的水平升高一致<sup>[24]</sup>。因此,CM-EPS 模拟肌肉收缩后分泌的因子,抑制了 CM-H 对 NF- $\kappa$ B 的活化作用。



综上,收缩诱导骨骼肌细胞分泌的细胞因子可能通过增加 Akt/eNOS 通路的敏感性,并抑制 IKK/NF- $\kappa$ B 通路,逆转胰岛素抵抗,改善内皮功能。本研究对进一步探讨运动改善糖尿病及其并发症的机制具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Hesselink M K, Schrauwen-Hinderling V, Schrauwen P. Skeletal muscle mitochondria as a target to prevent or treat type 2 diabetes mellitus[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016,104 [Epub ahead of print]
- [2] Ryder J W, Gilbert M, Zierath J R. Skeletal muscle and insulin sensitivity: pathophysiological alterations[J]. *Front Biosci*, 2001, 6: D154
- [3] Lolmède K, Durand De Saint Front V, Galitzky J, et al. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes[J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003, 27 (10): 1187
- [4] Sears D D, Miles P D, Chapman J, et al. 12/15-lipoxygenase is required for the early onset of high fat diet-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (9): e7250
- [5] Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and National prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. *Lancet*, 2014, 384(9945): 766
- [6] Charakida M, Khan T, Johnson W, et al. Lifelong patterns of BMI and cardiovascular phenotype in individuals aged 60–64 years in the 1946 British birth cohort study: an epidemiological study[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014, 2(8): 648
- [7] Evers-Van Gogh I J, Alex S, Stienstra R, et al. Electric pulse stimulation of myotubes as an in vitro exercise model: Cell-mediated and non-cell-mediated effects[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10944
- [8] Pedersen B K, Febbraio M A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8(8): 457
- [9] Raschke S, Eckardt K, Bjørklund Holven K, et al. Identification and validation of novel contraction-regulated myokines released from primary human skeletal muscle cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62008
- [10] Nieman D C, Davis J M, Henson D A, et al. Muscle cytokine mRNA changes after 2.5 h of cycling: influence of carbohydrate[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2005, 37(8): 1283
- [11] Nielsen A R, Pedersen B K. The biological roles of exercise-induced cytokines: IL-6, IL-8, and IL-15[J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2007, 32(5): 833
- [12] Bostrom P, Wu J, Jedrychowski M P, et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis[J]. *Nature*, 2012, 481(7382): U72
- [13] 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
- [14] Lee J, Bae E H, Ma S K, et al. Altered nitric oxide system in cardiovascular and renal diseases[J]. *Chonnam Med J*, 2016, 52(2): 81
- [15] Cersosimo E, Defronzo R A. Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2006, 22(6): 423
- [16] King G L, Park K, Li Q. Selective insulin resistance and the development of cardiovascular diseases in diabetes: the 2015 edwin bierman award lecture[J]. *Diabetes*, 2016, 65(6): 1462
- [17] Stanišić J, Korićanac G, Čulafić T, et al. Low intensity exercise prevents disturbances in rat cardiac insulin signaling and endothelial nitric oxide synthase induced by high fructose diet[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 420: 97
- [18] Pamukcu B, Lip G Y, Shantsila E. The nuclear factor- $\kappa$ B pathway in atherosclerosis: a potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease[J]. *Thromb Res*, 2011, 128(2): 117
- [19] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 868
- [20] Lorenzatti A J, Retzlaff B M. Unmet needs in the management of atherosclerotic cardiovascular disease: Is there a role for emerging anti-inflammatory interventions[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 221: 581
- [21] Monaco C, Andreacos E, Kiriakidis S, et al. Canonical pathway of nuclear factor  $\kappa$ B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(15): 5634
- [22] Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity[J]. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 621
- [23] He Q, Yang Q C, Zhou Q, et al. Effects of varying degrees of intermittent hypoxia on proinflammatory cytokines and adipokines in rats and 3T3-L1 adipocytes[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86326
- [24] Tantiwong P, Shanmugasundaram K, Monroy A, et al. NF- $\kappa$ B activity in muscle from obese and type 2 diabetic subjects under basal and exercise-stimulated conditions[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(5): E794

(2016-07-30 收稿)

欢迎投稿

欢迎订阅