

抵抗素对 C2C12 肌细胞株葡萄糖代谢的影响

李芳萍, 李志臻, 张 淼, 付玉如, 严 励, 傅祖植
(中山大学附属第二医院内分泌科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】抵抗素(resistin)是一种与胰岛素抵抗(IR)密切相关的脂肪细胞因子。本研究通过观察 resistin 对 C2C12 肌细胞株葡萄糖代谢的影响,以探讨 resistin 在骨骼肌 IR 发生中的作用。【方法】构建含 resistin 基因的重组表达质粒 pcDNA3.1-resistin,用于转染 C2C12 肌细胞株,使其表达 resistin,用 ^3H -2-脱氧葡萄糖进行葡萄糖摄取试验,用 D- ^{14}C (U)葡萄糖进行葡萄糖氧化和糖原合成试验,RT-PCR 检测肌细胞的葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)mRNA。【结果】pcDNA3.1-resistin 转染的 C2C12 肌细胞株可表达 resistin;resistin 使肌细胞胰岛素刺激的葡萄糖摄取率减少约 30%,并使 GLUT4mRNA 表达降低 28%,而对葡萄糖氧化和糖原合成无显著影响。【结论】resistin 可能通过抑制骨骼肌 GLUT4mRNA 的表达而降低葡萄糖摄取,但对葡萄糖氧化和糖原合成影响较小,提示 resistin 在骨骼肌 IR 发生中的作用有限。

关键词: 抵抗素; 葡萄糖代谢; 肌细胞

中图分类号: Q25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)06-0691-05

Effects of Resistin on Glucose Metabolism in C2C12 Myocytes

LI Fang-ping, LI Zhi-zhen, ZHANG Miao, FU Yu-ru, YAN Li, FU Zu-zhi

(Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 Resistin is an adipokine highly related to insulin resistance (IR). Our study was to investigate how resistin influences skeletal glucose metabolism, and that the roles of resistin in the pathogenesis of skeletal IR. 【Methods】 The recombinant plasmids PcDNA3.1 expressing resistin were constructed and then transfected into C2C12 myocytes. The expression of resistin in C2C12 myocytes was detected by Western blot. Glucose uptake was measured by ^3H -labeled glucose, glucose oxidation and glycogen synthesis were detected with ^{14}C -labeled glucose. GLUT4 mRNA was measured by RT-PCR. 【Results】 Resistin was expressed in transfected myocytes. Resistin decreased insulin stimulated glucose uptake rate about 30% and inhibited the expression of GLUT4 mRNA about 28%. However, there were no significant differences in glucose oxidation and glycogen synthesis. 【Conclusions】 Resistin inhibited insulin stimulated glucose uptake in myocytes by downregulating the expression of GLUT4, and it had no effects on glucose oxidation and glycogen synthesis. The roles of resistin in the pathogenesis of skeletal IR may be a little.

Key words: resistin; glucose metabolism; myocytes

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(6):691-695]

抵抗素(resistin)是一种与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)密切相关的脂肪细胞因子。研究发现 resistin 影响机体的葡萄糖代谢,如给 C57BL/6J 小鼠腹腔注射纯化重组 resistin 后,小鼠血糖较对照组升高 28%;resistin 可使 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素介导的葡萄糖摄取率降低 37%^[1]。骨骼肌是机体葡萄糖代谢最主要的组织,如骨骼肌对胰岛

素的敏感性降低将导致机体 IR 的发生^[2]。既然 resistin 影响机体的葡萄糖代谢,那么 resistin 如何影响骨骼肌的葡萄糖代谢,值得深入探讨。resistin 基因在骨骼肌无表达^[1],本研究拟用载有 resistin 基因的重组真核表达质粒,转染成肌细胞株 C2C12 肌细胞,使肌细胞表达 resistin,观察 resistin 对肌细胞的葡萄糖代谢的影响,旨在探讨 resistin

收稿日期: 2009-05-16

基金项目: 国家自然科学基金(30570886)

作者简介: 李芳萍,医学博士,副主任医师,硕士生导师,E-mail: Amiy36@hotmail.com

在骨骼肌 IR 发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

THERMOSCRIPT™ RT-PCR System 购自 GibcoBrl 公司; pGEM-T Vector system I 购自 Promega 公司; pcDNA3.1 购自 Invitrogen 公司; SuperFect Transfection Reagent 购自 QIAGEN 公司; C2C12 成肌细胞购自 ATCC, CRL-1772; 豚鼠抗小鼠 resistin 抗体(一抗, guinea pig anti-mouse resistin, Linco 公司), 辣根过氧化物酶结合的抗豚鼠 IgG (H + L) 购自晶美公司; 3-异丁基 1-甲基黄嘌呤 (3-isobutyl-1-methylxanthine), 细胞松弛素 B (cytochalasin B) 和氢氧化海胺 (benzethonium hydroxide) 购自 Sigma 公司短效胰岛素 (humulin R) 购自美国礼来公司; ^3H -2-脱氧葡萄糖(放射性比活度 5.4 Ci/mmol) 购自中国同位素总公司; D-[^{14}C (U)]葡萄糖(放射性比活度 250 ~ 360 m Ci/mmol, 购自 NEC 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组真核表达质粒 pcDNA3.1-resistin 构建 根据小鼠 resistin 基因 mRNA 序列, 设计扩增 resistin 基因 mRNA 编码区序列的特异引物, 上游引物: 5'-CGGAATTCATGAAGAACCTTTCATTTCC-3' (下划线的部分为 *EcoR* I 酶切位点), 下游引物: 5'-CTAGTCTAGATCAGGAAGCGACCTGCAGCT-3' (下划线的部分为 *Xba* I 酶切位点)。按 TRIzol Reagent 操作说明抽提小鼠脂肪组织总 RNA, 用 RT-PCR System 优化反应条件合成 resistin cDNA, 并克隆于 pGEM-T 载体, 行 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切, resistin cDNA 再亚克隆 pcDNA3.1, 构建的重组真核表达质粒送测序鉴定。

1.2.2 转染和鉴定 按 SuperFect Transfection Reagent 说明进行操作, 通过脂质体将 pcDNA3.1-resistin 转染 C2C12 肌细胞株, 并用含终浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 培养液筛选转染阳性细胞克隆。Western blot 方法鉴定被转染的 C2C12 肌细胞株 resistin 蛋白质的表达。

1.2.3 细胞分组 对照组(未转染)、瞬时组(瞬时转染 pcDNA3.1-resistin)、载体组(瞬时转染 pcDNA3.1) 和稳定组(稳定转染 pcDNA3.1-resistin)。瞬时转染后 3 h, 将含 100 mL/L 胎牛血

清的高糖 DMEM 培养液培养, 换为含 50 mL/L 马血清的高糖 DMEM 培养液诱导 C2C12 成肌细胞分化为出肌小管, 在倒置显微镜下观察诱导分化情况, 当在镜下见 90% 的细胞融合形成条索状, 刮取细胞送电镜鉴定。

1.2.4 葡萄糖代谢的检测 4 组细胞按不加胰岛素或加 100 nmol/L 短效胰岛素又分为细胞基础状态(base)或胰岛素刺激状态(insulin) 2 个亚组, 每种试验条件均重复 6 次, 液体闪烁计数器 (LS3801, Beckman, USA) 检测样品的放射活性。
①葡萄糖摄取的测定: 细胞以 5×10^5 接种于 6 孔板中, 培养至 60% 融合, 换用无血清 5.5 mmol/L 葡萄糖的 MEM 培养液, 以使细胞处在无血清和低糖的饥饿状态。每孔加入 37 kBq [^3H] 脱氧葡萄糖, 在室温下放置 10 min。每孔立即加入 10 μL 浓度为 0.48 mg/mL 细胞松弛素 B (终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 以终止葡萄糖摄取。细胞用冰冷的 PBS 冲洗 2 次, 每孔加入 0.5 g/L 氢氧化钠 0.2 mL, 在室温放置 20 min, 使细胞裂解。吸全部溶液点于层析纸上, 液闪烁计数检测。
②葡萄糖氧化代谢的测定: 细胞以 2×10^5 接种于接种于 12 孔板中, 培养至 60% 融合, 换用无血清 5.5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养液, 以使细胞饥饿 3 h。每孔加入含 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ D-[U- ^{14}C] 葡萄糖, 无血清、无抗生 素含 5.5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 1 mL, 每孔盖上 1 张浸有氢氧化海胺的半干层析纸, 盖上培养板盖子培养 2 h。每孔加 700 mL/L 高氯酸 0.2 mL 终止反应, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇荡 1 h, 以让层析纸充分吸收氧化产生的 CO_2 。层析纸滤纸干燥后, 液闪烁计数检测。
③糖原合成的测定: 细胞以 1×10^5 接种于 24 孔板中, 换用无血清 5.5 mmol/L 葡萄糖的 MEM 培养液, 以使细胞饥饿 18 h。细胞用 PBS 洗 2 次后, 加入含 18.5 kBq/mL D-[U- ^{14}C] 葡萄糖, 每孔加入 300 g/L 氢氧化钾 0.1 mL, 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 30 min, 充分裂解细胞。将所用溶液点于层析纸上, 液闪烁计数检测。

1.2.5 检测 GLUT4 mRNA 按 TRIzol Reagent 操作说明抽提 C2C12 总 RNA。按 THERMOSCRIPT™ RT-PCR System 操作说明, 在优化的条件下进行 RT-PCR, GLUT4 上游引物: 5'-GCCCGAAAGAGTCTAAAGCG-3', 下游引物: 5'-ACTAAGAGCACCGAGACCAA-3', PCR 产物长度为 312 bp。 β -actin 上游引物: 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTTC-

3', 下游引物: 5'-ATCGTGGGCCGCTCTAGGCACC-3', PCR 产物长度为 542 bp。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 在紫外光透射下摄像。应用图像分析系统(KONTRON IBAS2.0, Germany)分析, 以 GLUT4 mRNA/ β -actin mRNA 灰度值作为 GLUT4mRNA 表达的相对量。

1.2.6 数据处理和分析 葡萄糖摄取量是根据 ^3H -2-脱氧葡萄糖放射性比活度及所测的 dpm 值换算, 以每 10 min 10^6 细胞葡萄糖摄取的 pmol 数表示 ($\text{pmol} \cdot 10^{-6}$ 细胞 $\cdot 10 \text{ min}^{-1}$), 6 孔板每孔细胞数以 2×10^6 计算, 细胞的葡萄糖摄取即为测得的 $\text{dpm} / (2.0 \times 10^{11} \text{ Bq} / \text{mmol} \times \text{细胞数})$ 。细胞葡萄糖氧化或糖原合成的量是根据 D-[^{14}C] 葡萄糖放射性比活度及所测的 dpm 值换算, 以每小时 10^6 细胞葡萄糖氧化或糖原合成的 pmol 数表示 ($\text{pmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot 10^{-6}$ 细胞), 12 孔板每孔细胞数以 1×10^6 计算, 24 孔板每孔细胞数以 5×10^5 计算, 葡萄糖氧化或糖原合成的量即为测得的 $\text{dpm} / (1.13 \times 10^{10} \text{ Bq} / \text{mmol} \times \text{细胞数})$ 。数据以均数 \pm 标准差表示, 组间比较用方差分析, 采用 SPSS 11.0 统计软件分析, 显著性水准为小于 0.05。

2 结 果

2.1 重组真核表达质粒 pcDNA3.1-resistin 构建

RT-PCR 产物凝胶电泳图见位于 250 bp 与 500 bp 之间有一条带, 与欲扩增 resistin cDNA 理论长度 363 bp 相符 (图 1)。重组质粒 pGEM-T-resistin 酶切图示 PCR 产物 resistin cDNA 成功插入 pGEM-T (图 2)。核苷酸序列分析结果显示: 插入 pcDNA3.1 的 DNA 片段的核苷酸序列与小鼠 resistin 基因 mRNA 编码区序列一致, 表明已成功构建载有小鼠 resistin 基因的重组真核表达质粒 pcDNA3.1-resistin。

2.2 细胞分化的判断

C2C12 成肌细胞诱导分化第 6 天, 在倒置显微镜下见 90% 以上细胞融合成条索状 (图 3A), 电镜下见细胞内有肌小管 (图 3B)。

2.3 Western blot 检测

瞬时组和稳定组的细胞有 resistin 蛋白的表达, 对照和载体组的细胞无 resistin 蛋白的表达, 表明 pcDNA3.1-resistin 已成功转染瞬时组和稳定组的细胞, 并能表达 resistin 蛋白 (图 4)。

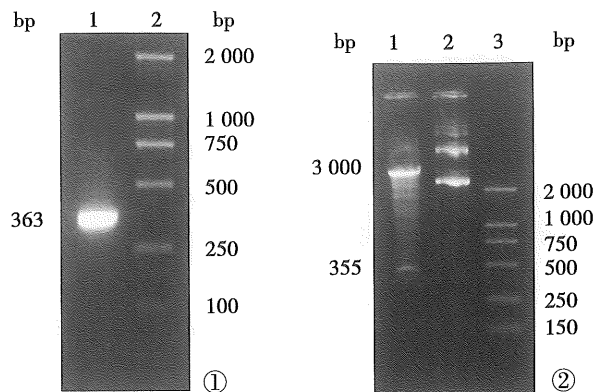


图 1 RT-PCR 产物

Fig.1 RT-PCR product

1: resistin cDNA; 2: marker

图 2 重组 pGEM-T—resistin *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切

Fig.2 recombination plasmids pGEM-T-resistin were verified by using *Eco*R I and *Xba* I digestion

1: pGEM-T—resistin were digested into pGEM-T vector 3000bp and inserted DNA 355bp; 2: The recombinant pGEM-T—resistin; 3: Marker

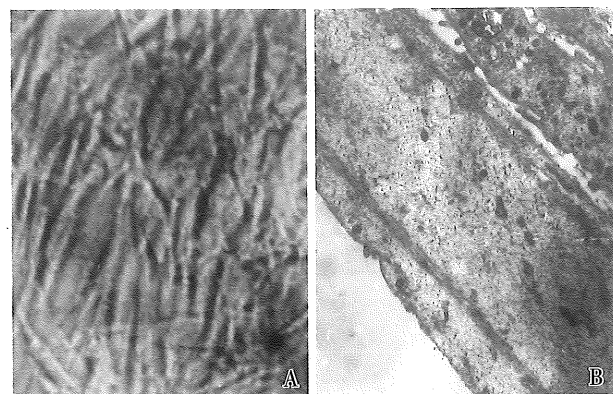


图 3 C2C12 成肌细胞株中的肌小管

Fig.3 Filamentous and myotubes inside the C2C12 myocytes

A: $\times 200$; B: $\times 12000$

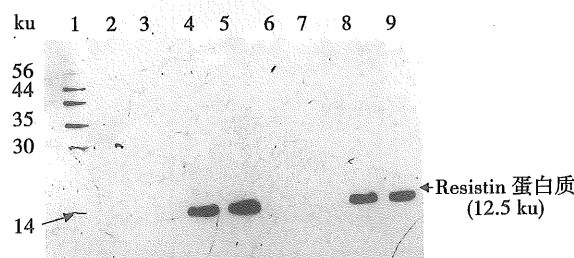


图 4 转染的 C2C12 肌细胞株表达 resistin 蛋白

Fig.4 Resistin protein was detected in transfected C2C12 myocytes by western blotting

1: Marker; 2,3: control group; 4,5: transient group; 6,7: vector group; 8,9: stable group

2.4 葡萄糖代谢的检测

2.4.1 葡萄糖摄取检测 对照组、瞬时组、载体组和稳定组 4 组间,细胞基础状态的葡萄糖摄取无显著性差别($P > 0.05$),而胰岛素刺激的葡萄糖摄取有显著性差别($P < 0.05$),resistin 使 C2C12 肌细胞株胰岛素刺激的葡萄糖摄取减少约 30%(表 1)。

2.4.2 葡萄糖氧化的检测 4 组细胞,基础状态和胰岛素刺激的葡萄糖氧化差别均无显著性($P > 0.05$,表 1)。

2.4.3 糖原合成的检测 4 组间细胞基础状态和胰岛素刺激的糖原合成差别均无显著性($P > 0.05$,表 1)。

表 1 resistin 对 C2C12 肌细胞株糖原合成及葡萄糖摄取、氧化的影响

Table 1 Effect of resistin on glycogen synthesis, glucose uptake and glucose oxidation in C2C12

($n = 6$, $\text{pmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot 10^{-6} \text{cells}$)

Group	Glycogen synthesis		Glucose uptake		glucose oxidation	
	base	insulin	base	insulin	base	insulin
Control	1.09 ± 0.67	2.44 ± 0.43	4.00 ± 0.33	7.81 ± 0.87	0.89 ± 0.19	4.25 ± 1.71
Transient	0.89 ± 0.35	1.99 ± 0.50	3.85 ± 0.37	5.63 ± 1.56	1.16 ± 0.72	5.19 ± 1.35
Vector	1.06 ± 0.45	2.80 ± 0.21	4.20 ± 0.23	7.88 ± 1.50	1.18 ± 0.81	4.72 ± 0.82
Stable	0.89 ± 0.23	2.49 ± 0.82	4.21 ± 0.68	5.79 ± 1.26	0.74 ± 0.43	4.52 ± 2.20
P value	0.582	0.218	0.454	0.011	0.519	0.781

2.5 resistin 对 C2C12 肌细胞株 GLUT4mRNA 的影响

对照组、瞬时组、载体组和稳定组 C2C12 肌细胞株 GLUT4mRNA 表达的相对量分别是 0.73 ± 0.11 、 0.53 ± 0.16 、 0.69 ± 0.08 和 0.49 ± 0.09 ($P = 0.041$, $n = 3$), resistin 使 C2C12 肌细胞株 GLUT4 mRNA 表达降低 28%(图 5)。

3 讨论

C2C12 成肌细胞属小鼠肌母细胞系,诱导分化形成肌小管,常用作研究骨骼肌功能的细胞模型。本研究通过用含 50 mL/L 马血清的 DMEM 培养基成功诱导 C2C12 成肌细胞分化为肌小管(图 3)。

进行本研究时尚未有商品化的小鼠 resistin 蛋白质购买,为探讨 resistin 对小鼠 C2C12 肌细胞株葡萄糖代谢的影响,本研究用 RT-PCR 技术从小鼠脂肪组织扩增 resistin 基因 cDNA,构建载有小鼠 resistin 基因的重组真核表达质粒,通过脂质体将 pcDNA3.1-resistin 转染 C2C12 肌细胞株,使本身不表达 resistin 基因的 C2C12 肌细胞株表达 resistin 蛋白质(图 4)。由于在瞬时转染中重组质粒导入细胞以获得目的基因暂时但高水平的表达,最好在转染后 1 ~ 4 d 内检测目的基因的表达。C2C12 细胞需诱导 6 d 才能分化出肌小管,本研究为避免瞬时转染细胞表达 resistin 基因高峰期已过,而通过 G418 筛选稳定转染株。

本研究葡萄糖摄取实验 resistin 使瞬时和稳定转染的细胞胰岛素刺激的葡萄糖摄取显著低于对照组和载体组的细胞,说明 resistin 抑制

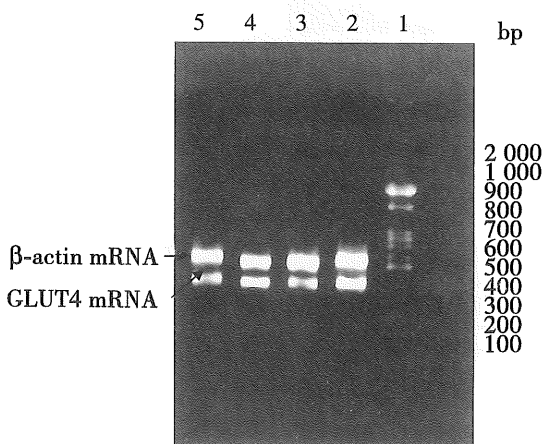


图 5 resistin 抑制 C2C12 肌细胞株 GLUT4mRNA 的表达

Fig.5 resistin inhibited GLUT4mRNA expression in C2C12 myocytes

1: Marker; 2: control group; 3: transient group; 4: vector group; 5: stable group

C2C12 肌细胞株胰岛素刺激的葡萄糖摄取。这与 Moon 等^[3]的研究结果相似,其用不同剂量的重组 resistin (0 ~ 500 nmol/L) 孵育 L6 大鼠骨骼肌细胞, 发现 100 nmol/L 和 500 nmol/L 的 resistin 可完全抑制细胞胰岛素介导的葡萄糖摄取, 10 nmol/L 和 50 nmol/L 可使细胞基础的葡萄糖摄取降低 10% ~ 14%。用载有小鼠 resistin 基因的质粒稳定转染 L6 大鼠骨骼肌细胞后, 细胞基础状态和胰岛素刺激的葡萄糖摄取均明显受抑制。Fan^[4]的研究也得出了类似的结果。

resistin 是通过什么途径抑制 C2C12 肌细胞株胰岛素刺激的葡萄糖摄取? 本研究发现 resistin 使 C2C12 肌细胞株 GLUT4 mRNA 表达减少 28%。Palanivel 等^[5]研究发现 resistin 使 GLUT4 转移到 L6 大鼠骨骼肌细胞表面的数量减少, 从而抑制胰岛素刺激的葡萄糖摄取。而 Moon 的研究发现, resistin 抑制 L6 细胞葡萄糖摄取, 不是通过影响 GLUT4 转位到浆膜的数量, 而是使转位到浆膜的 GLUT4 功能减弱所致。可见, resistin 使肌细胞葡萄糖摄取率降低与 GLUT4 有密切的关系。

本研究发现 resistin 对基础状态和胰岛素刺激的葡萄糖氧化及糖原合成均无明显影响。Pravenec 等^[6]研究发现 resistin 可通过抑制三羧酸循环而减少葡萄糖的氧化, 抑制糖原合成激酶 3 β 磷酸化而减少胰岛素介导的糖原合成。Dietze 等^[7]将人的骨骼肌细胞与人的脂肪细胞共培养, 发现脂肪细胞分泌的细胞因子导致骨骼肌细胞的 IR, 但 resistin 在骨骼肌细胞表面的量极低, 推测 resistin 可能没有参与骨骼肌细胞 IR 的发生。有研究显示 resistin 导致机体糖代谢异常主要是通过使肝脏糖异生增强, 从而肝糖输出增多所致^[8-9]。

本研究的结果显示, resistin 对骨骼肌葡萄糖代谢的影响, 可能仅通过抑制细胞 GLUT4 的表达, 使 GLUT4 数量减少, 从而抑制细胞的葡萄糖摄取, 但不影响细胞葡萄糖氧化和糖原合成, 而这些是细胞内葡萄糖利用主要环节, resistin 在骨骼肌 IR 发生中的作用是有限的。总之, resistin 对细胞糖代影响非常复杂, 目前研究结论不尽一

致^[10-11]。

参考文献:

- [1] Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes [J]. *Nature*, 2001, 409(8): 307-312.
- [2] Petersen KF, Dufour S, Savage DB, et al. The role of skeletal muscle insulin resistance in the atherogenesis of the metabolic syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(31): 12587-12594.
- [3] Moon B, Kwan JJ, Duddy N, et al. Resistin inhibits glucose uptake in L6 skeletal muscle cells independent of changes in insulin signaling components and Glut-4 translocation [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 285(1): E106-115.
- [4] Fan HQ, Gu N, Liu F, et al. Prolonged exposure to resistin inhibits glucose up in rat skeletal muscles [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(3): 410-416.
- [5] Palanivel R, Maida A, Liu Y, et al. Regulation of insulin signalling, glucose uptake and metabolism in rat skeletal muscle cells upon prolonged exposure to resistin [J]. *Diabetologia*, 2006, 49(1): 183-190.
- [6] Pravenec M, Kazdová L, Landa V, et al. Transgenic and recombinant resistin impair skeletal muscle glucose metabolism in the spontaneously hypertensive rat [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(46): 45209-45215.
- [7] Dietze D, Koenen M, Rohrig K, et al. Impairment of insulin signaling in human skeletal muscle cells by co-culture with human adipocytes [J]. *Diabetes*, 2002, 51(8): 2369-2376.
- [8] Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, et al. Regulation of fasted blood glucose by resistin [J]. *Science*, 2004, 303(5661): 1195-1198.
- [9] Evan D. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance [J]. *J clin invest*, 2004, 114(2): 232-239.
- [10] Qi Y, Nie Z, Lee YS, et al. Loss of Resistin Improves Glucose Homeostasis in Leptin Deficiency [J]. *Diabetes*, 2006, 55(11): 3083-3090.
- [11] 李小庆, 马中富, 廖晓星, 等. 肥胖症及 2 型糖尿病合并肥胖症患者皮下脂肪组织 resistin mRNA 的表达 [J]. *热带医学杂志*, 2004, 4(4): 387-389.

(编辑 孙慧兰)