

p38 介导油酸对小鼠 c2c12 细胞 PGC-1 α 表达的影响

洪 涛¹, 邹琪婧², 钟 警², 曹仁贤², 文格波²

(1. 南华大学附属第一医院内分泌科, 湖南 衡阳 421001;

2. 南华大学附属第一医院临床研究所)

摘 要: **目的** 研究油酸(OA)对小鼠 c2c12 细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (PGC-1 α)表达的影响,探讨 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路在其中的作用。 **方法** 以不同浓度油酸及 p38 抑制剂 SB203580(SB)分别处理 c2c12 细胞,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 PGC-1 α mRNA 表达,Western Blot 检测 PGC-1 α 蛋白表达。 **结果** 油酸处理组 PGC-1 α mRNA 及蛋白表达明显高于对照组($P < 0.05$); OA + SB 组 PGC-1 α 表达减低($P < 0.05$)。 **结论** 油酸能促进 c2c12 细胞 PGC-1 α mRNA 转录和蛋白的表达,该作用可能与 p38 MAPK 信号通路有关。

关键词: 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α ; 油酸; p38 丝裂原活化蛋白激酶; c2c12 细胞
中图分类号:R587.1 文献标识码:A

Oleic Acid Induces PGC-1 α Expression in Mouse c2c12 Cells Through p38 MAPK Pathway

HONG Tao, ZOU Qijing, ZHONG Jing, et al

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of oleic acid(OA) on the expression of PGC-1 α mRNA and protein in mouse c2c12 cells and to unravel the mechanism of its transcriptional regulation. **Methods** Cultured c2c12 cells were treated by oleic acid with or without SB203580(SB) respectively; PGC-1 α mRNA was detected by RT-PCR; PGC-1 α protein were detected by Western Blot. **Results** Compared with control group, the expression of PGC-1 α mRNA and protein increased significantly in OA groups ($P < 0.05$); compared with the OA group, the expression of PGC-1 α mRNA and protein decreased significantly in OA + SB group ($P < 0.05$). **Conclusion** Oleic acid can stimulate the expression of PGC-1 α mRNA and protein in c2c12 cells; oleic acid might regulate the PGC-1 α gene expression through p38 MAPK pathway.

Key words: PGC-1 α ; oleic acid; p38 MAPK; c2c12 cells

胰岛素抵抗是 2 型糖尿病发病的一个主要环节,其发生机制尚未阐明。目前有证据表明,血浆中脂类水平的升高,尤其是游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)的升高是导致胰岛素抵抗的重要独立危险因素之一^[1],但其具体机制仍不明确。

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子

1 α (peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1, PGC-1 α)是一种核受体家族辅助激活因子,可通过协同激活多种因子,广泛调节能量生成与利用过程,如细胞线粒体的生物合成、机体适应性产热、脂肪酸氧化、肌肉葡萄糖转运、肝糖异生等生理过程,对于维持生物体能量动态平衡有重要的生理意义^[2],其表达异常与多种代谢性疾病相关^[3-5],但游离脂肪酸对 PGC-1 α 表达的影响尚不清楚。本实验采用在日常饮食中占比重最大也最具代表性的单不饱和脂肪酸油酸(oleate Acid, OA)来处理小鼠

肌肉细胞,分析油酸对小鼠肌肉细胞的 PGC-1 α 表达的影响,并初步探讨 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司, SB203580 (SB)、牛血清蛋白 (BSA) 粉剂、油酸粉剂购自 Sigma 公司;PCR 引物由上海生工公司合成;Trizol、2 $\times$ Tap PCR Master Mix 及逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自凯基生物公司;兔抗小鼠 PGC-1 α 蛋白多克隆一抗、GAPDH 一抗购自 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自 Invitrogen 公司;Super ECL 超敏发光液购自北京普利莱公司;核蛋白提取试剂盒购自 MERCK 公司;Luciferase Reporter Assay System 购自美国 Promega 公司;LipofectamineTM2000 购自 invitrogen 公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养与分组

小鼠 c2c12 肌肉细胞株购自上海中国科学院细胞库,细胞用含有 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养,当细胞贴壁生长状态良好且达到 60% 的融合密度时,以含 2% Horse serum 的高糖 DMEM 培养基,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中静置分化培养 48 h 诱导分化。分别以 DMEM、BSA、0.1 mmol/L 油酸、0.2 mmol/L 油酸、0.5 mmol/L 油酸作用于小鼠 c2c12 细胞 12 h 后,提取细胞总 RNA,RT-PCR 检测 PGC-1 α mRNA 表达。信号通路研究分为 5 组:DMEM 组、BSA 组、20 μ mol/L SB 组、0.2 mmol/L 油酸组、0.2 mmol/L 油酸 + 20 μ mol/L SB 组,处理 12 h 后提取细胞总 RNA,24 h 后提取细胞核蛋白,分别用 RT-PCR 和 Western Blot 检测 PGC-1 α mRNA 和蛋白表达。

1.3 RT-PCR 法

Trizol 提取 c2c12 细胞 RNA 后,半定量逆转录—聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 PGC-1 α mRNA 水平,所用引物:PGC-1 α 上游引物 5'-GGA GCT GGA TGG CTT GGG ACA T-3',下游引物 5'-TTC GCA GGC TCA TTG TTG TAC;GAPDH 上游引物 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',下游引物 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。

1.4 Western Blot 法

收集处理后的 c2c12 细胞,提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。所得蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,将电泳后的蛋白胶进行湿法转膜印迹,以免抗小鼠 PGC-1 α 、抗 GAPDH 蛋白多克隆抗体为一抗,辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体为二抗分别与膜进行杂交、洗膜、ECL 发光,采用 Bio-Rad ChemiDocXRS 凝胶分析仪曝光,截获图像。

1.5 统计学分析

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 油酸促进小鼠 c2c12 细胞中 PGC-1 α mRNA 转录

图 1 显示,小鼠 c2c12 细胞经过不同浓度 (0.1、0.2、0.5 mmol/L) 油酸处理 12 h 后,DMEM 及 BSA 对照组仅可检测到微弱的 226 bp PGC-1 α 特异性条带,而随着油酸浓度的增加,PGC-1 α 条带亮度逐渐增加,在 0.2 mmol/L 组 PGC-1 α mRNA 扩增产物条带亮度最大。灰度扫描结果显示,0.2 mmol/L 浓度油酸组 PGC-1 α mRNA 表达水平较对照组明显升高 ($P < 0.05$)。

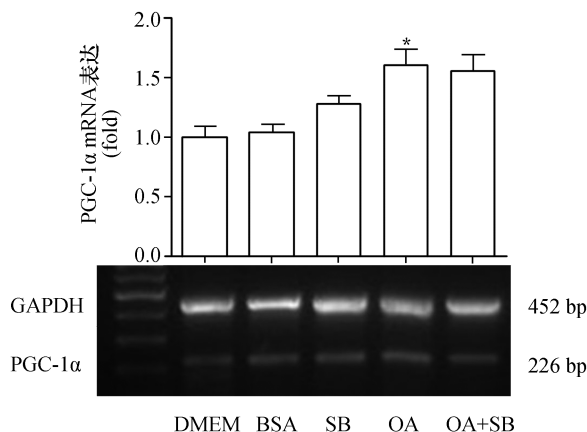


图 1 不同浓度油酸对 c2c12 细胞 PGC-1 α mRNA 转录的影响 * :与 BSA 组比较, $P < 0.05$

Fig. 1 The effect of Oleic acid on the mRNA transcription of PGC-1 α in c2c12 cells

2.2 油酸通过 p38 MAPK 促进小鼠 c2c12 细胞 PGC-1 α mRNA 转录和蛋白表达

图 2 显示,小鼠 c2c12 细胞经过 0.2 mmol/L 油酸或油酸加 SB203580 处理后,在油酸组 PGC-1 α

mRNA 扩增产物条带亮度最大, 给予 p38 抑制剂 SB203580 处理后, PGC-1 α mRNA 扩增产物条带亮度降低。定量分析结果显示, 油酸组 PGC-1 α mRNA 表达水平较对照组明显升高 ($P < 0.05$); 与油酸组比较, 油酸加 SB203580 处理组 PGC-1 α mRNA 表达水平下降 ($P < 0.05$)。Western Blot 结果显示了同样的趋势 ($P < 0.05$) (见图 3)。

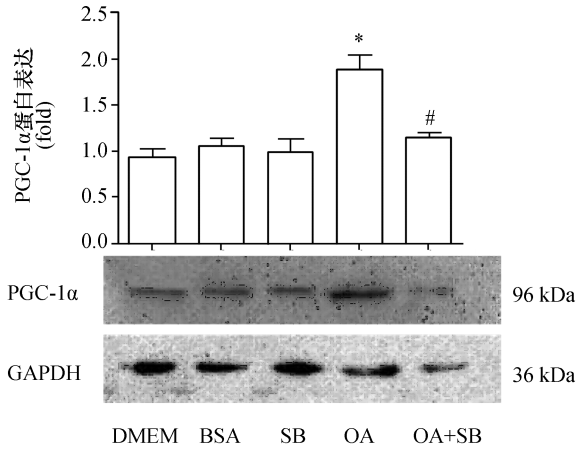


图 2 油酸及 p38 抑制剂 SB203580 对 c2c12 细胞 PGC-1 α mRNA 转录的影响 * : 与 BSA 组比较, $P < 0.05$; #: 与油酸组比较, $P < 0.05$

Fig. 2 The effects of Oleic acid and p38 inhibitor on the mRNA transcription of PGC-1 α in c2c12 cells

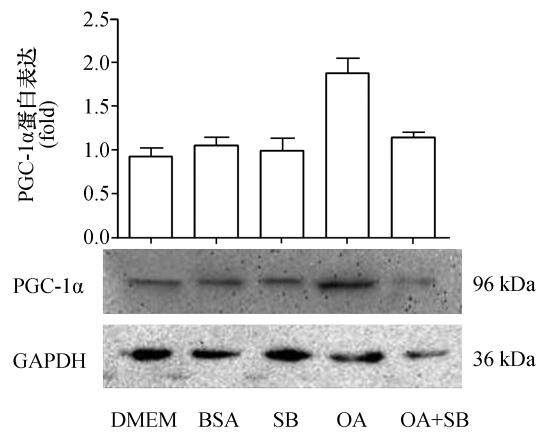


图 3 油酸及 p38 抑制剂 SB203580 对 c2c12 细胞 PGC-1 α 蛋白表达的影响 * : 与 BSA 组比较, $P < 0.05$; #: 与油酸组比较, $P < 0.05$

Fig. 3 The effects of Oleic acid and p38 inhibitor on the protein expression of PGC-1 α in c2c12 cells

3 讨 论

2 型糖尿病被认为是人类三大疾病杀手之一, 已经成为世界性的流行性疾病, 其发病率及发病人数日益剧增。胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 不仅是 2 型糖尿病发病的重要环节, 同时也是其他代谢性疾病如肥胖、心脑血管疾病的共同病理基础^[6]。

研究表明, 循环中的血脂水平增高可损伤胰岛素信号通路、降低胰岛素依赖的葡萄糖转运、减少胰岛素刺激的糖原合成、损伤胰岛素刺激的氧化磷酸化即 ATP 生成、甘油三酯异位沉积^[7-9], 导致胰岛素抵抗^[10]。PGC-1 α 是一种核受体家族辅助激活因子, 可通过协同激活多种因子, 广泛调节参与生物合成、机体产热、脂肪酸氧化等生理过程, 对于维持生物体能量动态平衡有重要的生理意义。有研究发现, 在小鼠肝脏、骨骼肌等组织中 PGC-1 α 表达过高或过低都能够通过干扰线粒体的功能而导致胰岛素抵抗的发生^[11-12], 因此, 维持 PGC-1 α 的正常表达对预防和改善胰岛素抵抗可能具有一定临床意义。

为了解游离脂肪酸是否通过干扰 PGC-1 α 的表达而导致胰岛素抵抗, 本研究用不同浓度的油酸来处理小鼠 c2c12 细胞, 结果发现油酸在一定浓度范围内能使 PGC-1 α mRNA 表达增高。在研究游离脂肪酸对小鼠肝脏糖异生影响的过程中发现, 游离脂肪酸能够通过激活 p38 MAPK, 正向调节糖异生的关键限速酶如丙酮酸羧激酶 (PEPCK)、葡萄糖六磷酸酶 (G6Pase) 的表达, 从而促进糖异生^[13]。而 PGC-1 α 正是 PEPCK、G6Pase 的上游转录调控因子。那么, 油酸是否通过 p38 MAPK 信号通路来影响 PGC-1 α mRNA 表达呢? 本研究取 0.2 mmol/L 油酸为最佳刺激浓度, 予以 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 共同干预小鼠 c2c12 细胞, 结果表明由油酸和 SB203580 共同干预组 PGC-1 α 的表达较 0.2 mmol/L 油酸处理组显著降低。以上实验结果提示, 油酸可能通过 p38 MAPK 信号通路来调节 PGC-1 α 的表达。但其具体调控机制需要进一步研究明确。

参考文献:

- [1] Adams SH. Emerging perspectives on essential aminoacid metabolism in obesity and the insulin-resistant state[J]. Adv Nutr, 2011, 2(6):445-456.

(上接第333页)

- [2] Rodgers JT, Lerin C, Puigserver P. Metabolic adaptations through the PGC-1 α and SIRT1 pathways[J]. FEBS Letters, 2008(1), 582:46-53.
- [3] Suh S, Jeong IK, Kim MY, et al. Effects of resistance training and aerobic exercise on insulin sensitivity in overweight Korean adolescents: a controlled randomized trial [J]. Diabetes Metab J, 2011, 35(4):418-426.
- [4] Hsieh MC, Lin KD, Tien KJ, et al. Common polymorphisms of the peroxisome proliferator activated receptor- γ (Pro12Ala) and peroxisome proliferator activated receptor- γ coactivator-1 (Gly482Ser) and the response to pioglitazone in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Metabolism, 2010, 59(8):1139-1144.
- [5] Rogge MM. The role of impaired mitochondrial lipid oxidation in obesity [J]. Biol Res Nurs, 2009, 10(4):356-373.
- [6] Wanders RJ, Komen J, Ferdinandusse S, et al. Cellular and molecular effects of sirtuins in health and disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1811(9):498-507.
- [7] Daniele SM, Montenegro SM, Tarres MC, et al. The eSS rat, a nonobese model of disordered glucose and lipid metabolism and fatty liver[J]. Diabetes Metab Syndr, 2010, 17(2):10-15.
- [8] Shaw CS, Clark J, Wagenmakers AJ, et al. The effect of exercise and nutrition on intramuscular fat metabolism and insulin sensitivity[J]. Annu Rev Nutr, 2010, 21(30):13-34.
- [9] 何皓, 阳学风, 李传辉, 等. 2型糖尿病患者血清内脂素浓度与血脂的相关性研究[J]. 中南医学科学杂志, 2011, 39(1):81-83.
- [10] Roden M. Muscle triglycerides and mitochondrial function: possible mechanisms for the development of type 2 diabetes [J]. Int J Obes, 2005, 29(2):111-115.
- [11] Bai XP, Li HL. Effects of fenofibrate on the expression of peroxisome proliferator activated- γ coactivator-1 α in skeletal muscle of rats infused with intralipid [J]. Zhonghua Yixue Zazhi, 2010, 90(40):2856-2859.
- [12] Yuzefovych L, Wilson G, Racheck L. Differential regulation of PGC-1 α expression in rat liver and skeletal muscle in response to voluntary running [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010, 299(6):1096-1105.
- [13] Ragheb R, Shanab GM. Free fatty acid-induced muscle insulin resistance and glucose uptake dysfunction: evidence for PKC activation and oxidative stress activated signaling pathways [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 389(2):211-216.