

[文章编号] 1674-8115(2011)12-1702-05

· 论著 ·

氯沙坦改善 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的机制研究

刘晓莉¹, 潘瑜¹, 束金莲¹, 高丰厚², 金惠敏¹

(上海交通大学医学院附属第三人民医院 1. 肾内科, 2. 中心实验室, 上海 201900)

[摘要] 目的 探讨氯沙坦改善 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的主要作用机制。方法 以地塞米松诱导 3T3-L1 脂肪细胞, 建立胰岛素抵抗细胞模型, 根据细胞模型添加干预药物的不同分为模型对照组(不添加任何药物)、氯沙坦组(分别给予 1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 氯沙坦干预 48 h)和 wortmannin + 氯沙坦组, wortmannin + 氯沙坦组以 100 nmol/L 的磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)特异性抑制剂 wortmannin 预处理 20 min 后再加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 氯沙坦干预 48 h。观察脂肪细胞体积的变化, 采用葡萄糖氧化酶法检测细胞培养上清液中葡萄糖的浓度, 采用 Western blotting 分析脂肪细胞中 PI3K 和胰岛素受体底物 1(IRS-1)的表达以及 IRS-1 丝氨酸磷酸化水平。结果 与模型对照组比较, 氯沙坦组脂肪细胞体积明显缩小($P < 0.01$), 细胞培养上清液中葡萄糖的浓度显著降低($P < 0.01$), PI3K 和 IRS-1 表达明显上升($P < 0.01$), IRS-1 丝氨酸磷酸化水平显著下降($P < 0.01$)但可被 wortmannin 阻断。结论 氯沙坦可使 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型的细胞体积缩小, 并增加细胞对葡萄糖的利用, 其机制可能与 PI3K 信号通路有关。

[关键词] 氯沙坦; 脂肪细胞; 胰岛素抵抗

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.12.009

[中图分类号] R9; R587.1

[文献标志码] A

Mechanism of losartan in treatment of insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes

LIU Xiao-li¹, PAN Yu¹, SHU Jin-lian¹, GAO Feng-hou², JIN Hui-min¹

(1. Department of Nephrology, 2. Experimental Center, the Third People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the main mechanism of losartan in treatment of insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. **Methods** The model of insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes was induced by dexamethasone. Model control group (without treatment with any drug), losartan group (treatment with 1 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ losartan for 48 h respectively) and wortmannin + losartan group were divided. Adipocytes in wortmannin + losartan group were pretreated with 100 nmol/L wortmannin, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor for 20 min, and were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ losartan for 48 h. The size of adipocytes was observed, glucose oxidase method was employed to measure the glucose concentration in supernatant of culture fluid, and Western blotting was adopted to detect the expression of PI3K and insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and level of IRS-1 serine phosphorylation in adipocytes. **Results** Compared with model control group, the size of adipocytes significantly reduced ($P < 0.01$), the glucose concentration in supernatant of culture fluid significantly decreased ($P < 0.01$), the expression of PI3K and IRS-1 significantly increased ($P < 0.01$). The level of IRS-1 serine phosphorylation significantly decreased compared with model control group ($P < 0.01$), but the effect could be blocked by wortmannin. **Conclusion** Losartan could significantly decrease the cell size and increase the consumption of glucose in 3T3-L1 adipocytes with insulin resistance, and the mechanism might be associated with PI3K pathway.

[Key words] losartan; adipocyte; insulin resistance

研究证明, 胰岛素抵抗在糖尿病、心血管疾病和慢性肾脏病等多种疾病中普遍存在, 并已成为上述疾病的共同危害因素^[1]。胰岛素抵抗指胰岛素作用

的靶器官对胰岛素的敏感性下降, 尤其是肝、脂肪细胞和肌肉等对葡萄糖的利用发生障碍, 即为胰岛素不能发挥其正常生理效应的一种状态。肥胖相关的

[基金项目] 上海市宝山区科委基金(08-E-8)(Foundation from Science and Technology Committee of Baoshan District, Shanghai, 08-E-8)。

[作者简介] 刘晓莉(1986—), 女, 硕士生; 电子信箱: liuxiali1986@163.com。

[通信作者] 金惠敏, 电子信箱: hmjgli@yahoo.com.cn。

胰岛素抵抗常伴有脂肪细胞体积的增大^[2]。

血管紧张素Ⅱ受体阻滞剂(angiotensin receptor blockers, ARB)能够改善高血压患者的胰岛素抵抗^[3]。临床研究^[4]表明,氯沙坦能够减轻2型糖尿病肾病患者的胰岛素抵抗,降低血脂联素水平;动物实验^[5]发现,ARB对2型糖尿病大鼠的胰岛素抵抗具有改善作用;但氯沙坦改善胰岛素抵抗的机制并未完全阐明,本研究利用地塞米松诱导3T3-L1脂肪细胞,建立胰岛素抵抗细胞模型,观察氯沙坦对3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗的作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂和仪器

小鼠3T3-L1前脂肪细胞来源于American Type Culture Collection(ATCC),购自中国科学院上海生命科学研究院。DMEM高糖培养基干粉、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶和青、链霉素(Gibco);1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、地塞米松(dexamethasone, DEX)、磷酸肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)特异性抑制剂wortmannin、油红O(Sigma);重组人胰岛素(Lilly Egyp);氯沙坦钾粉(Merck);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG抗体、硝酸纤维素膜、丽春红染液(碧云天);兔抗鼠胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)抗体、兔抗鼠IRS-1 pSer307抗体(CST);兔抗鼠PI3K-p85抗体(Santa Cruz)。

1.2 3T3-L1前脂肪细胞的培养和诱导分化

参考相关文献^[6]对3T3-L1前脂肪细胞进行诱导分化。将3T3-L1前脂肪细胞置于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,于37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养;细胞状态良好时接种于培养皿,待细胞融合2d后,换用含10%胎牛血清、0.5 mmol/L IBMX、0.25 μmol/L地塞米松、10 μg/mL人胰岛素的DMEM高糖培养基培养48 h,换用含10%胎牛血清、10 μg/mL人胰岛素再培养48 h,随后以10%胎牛血清的DMEM高糖培养基继续培养,每48 h更换1次培养液。诱导分化8~10 d的3T3-L1前脂肪细胞90%以上可分化为成熟的脂肪细胞。在加药处理前,细胞用不含血清的DMEM高糖培养基培养2 h。

1.3 胰岛素抵抗细胞模型的建立及实验分组

1.3.1 细胞模型的建立 将3T3-L1脂肪细胞接种于24孔板,参照相关文献^[7]进行分组检测,细胞同

步化12 h,每孔细胞按分组加入相同体积的培养液(对照组不加地塞米松,建模细胞中添加0.01、0.1、1 μmol/L地塞米松)孵育48 h。取各组细胞培养液上清,用葡萄糖氧化酶法测定细胞培养上清液中的葡萄糖浓度,所得浓度与未接种细胞的DMEM高糖培养基的葡萄糖浓度相减,得出各组细胞的葡萄糖消耗量,筛选出添加合适地塞米松浓度的最佳细胞模型。

1.3.2 实验分组 ①对照组:不建模,以10 mL含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养。②模型对照组:建模但不添加任何药物干预;③氯沙坦组:建模并加入1、10、100 μmol/L氯沙坦干预48 h;④氯沙坦+wortmannin组:建模并先以100 nmol/L wortmannin预处理20 min,再加入100 μmol/L氯沙坦干预48 h。

1.4 鉴定和检测

1.4.1 油红O染色鉴定3T3-L1脂肪细胞及细胞体积测定 将细胞培养于6孔板中,每组4孔细胞。3T3-L1前脂肪细胞诱导分化为成熟脂肪细胞后,PBS洗2次,中性甲醛固定5 min,蒸馏水洗2次,加入油红O染色剂染色30 min,倒置显微镜观察。随机选取数个视野,应用ImageProPlus软件测量100个细胞的直径,细胞体积以各组细胞直径的中位数表示^[8]。

1.4.2 细胞培养上清液中的葡萄糖浓度测定 分别于分组处理后第2、4、6、8天,每孔吸取0.5 mL上清液,采用葡萄糖氧化酶法检测细胞上清液中的葡萄糖浓度,实验重复3次。所得浓度与未接种细胞的DMEM高糖培养基的糖浓度相减,可反映各组细胞的葡萄糖消耗量。

1.4.3 PI3K、IRS-1蛋白表达及IRS-1丝氨酸磷酸化水平检测 采用Western blotting分析3T3-L1脂肪细胞PI3K、IRS-1蛋白表达及IRS-1丝氨酸磷酸化水平(IRS-1 pSer307的蛋白表达)。细胞取15 μL蛋白样品经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,将蛋白转移到PVDF膜上,用5%脱脂牛奶室温封闭2 h,膜与相应一抗4℃孵育过夜;1:2 000稀释的HRP标记的羊抗兔二抗室温孵育2 h;用ECL化学发光对膜进行处理,在暗室中曝光、显影和定影。用目的条带与GAPDH的灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.5 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分

析;非正态分布资料用中位数(最小值,最大值)表示,组间比较采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

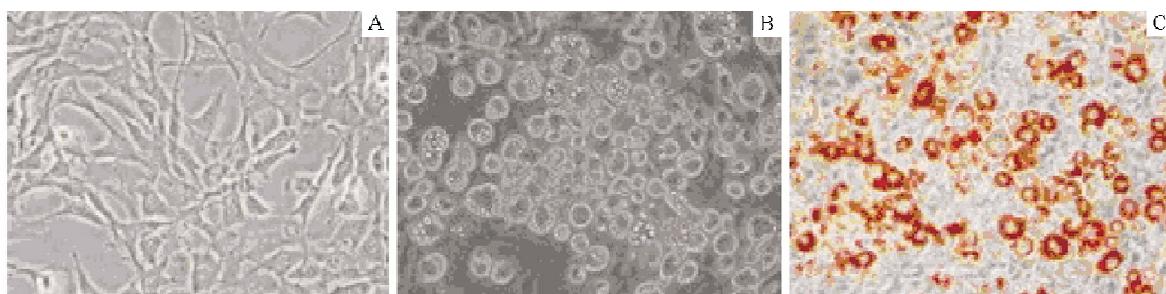
2.1 3T3-L1 脂肪细胞及胰岛素抵抗模型的鉴定

3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化后第 10 天,细胞变大、变圆,胞质内充满圆形脂滴,油红 O 染色可见胞质中的脂滴被染成红色(图 1),此时细胞已分化成为成熟脂肪细胞。对照组和经 0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松刺激的 3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖消耗量分别为(4.77 ± 1.12)、(4.20 ± 0.95)、(3.73 ± 0.71)、

(2.07 ± 0.45) mmol/L ,与对照组比较,1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松刺激脂肪细胞的葡萄糖消耗量最小($P < 0.01$),提示 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松为诱导 3T3-L1 脂肪细胞发生胰岛素抵抗的最佳浓度。

2.2 各组 3T3-L1 脂肪细胞体积和葡萄糖消耗量比较

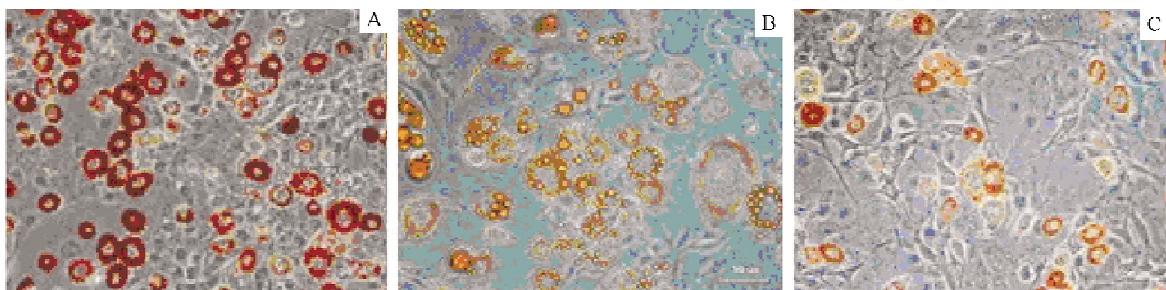
对照组、模型对照组和氯沙坦 100 $\mu\text{mol/L}$ 组 3T3-L1 脂肪细胞的直径分别为 47.91、51.75、50.32 μm ,氯沙坦 100 $\mu\text{mol/L}$ 组脂肪细胞体积显著小于模型对照组($P < 0.01$)(图 2)。分组处理后第 4、6、8 天,与模型对照组比较,氯沙坦 100 $\mu\text{mol/L}$ 组 3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖消耗量明显高于模型对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)(图 3)。



A. 3T3-L1 前脂肪细胞；B. 成熟 3T3-L1 脂肪细胞(诱导第 10 天)；C. 油红 O 染色鉴定成熟 3T3-L1 脂肪细胞。

图 1 3T3-L1 脂肪细胞的鉴定 $\times 200$

Fig 1 Identification of 3T3-L1 adipocytes $\times 200$



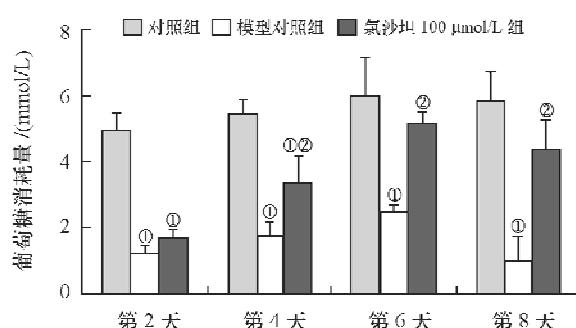
A. 对照组；B. 模型对照组；C. 氯沙坦组。

图 2 3T3-L1 脂肪细胞大小的测量 $\times 200$

Fig 2 Size of 3T3-L1 adipocytes $\times 200$

2.3 各组 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1、PI3K 和 IRS-1 pSer307 蛋白的表达

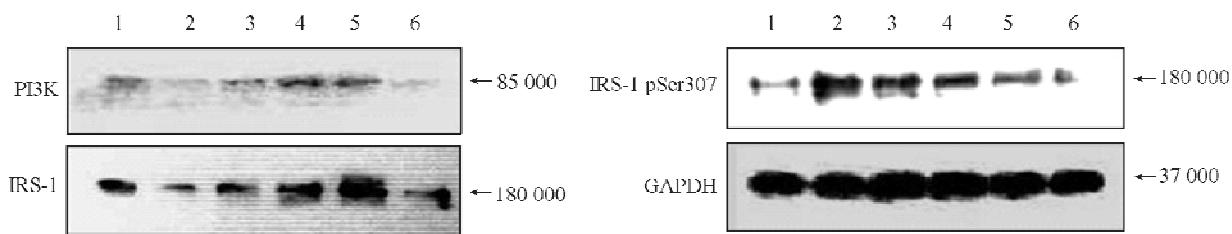
Western blotting 分析结果显示:模型对照组 3T3-L1 脂肪细胞 PI3K、IRS-1 蛋白的相对表达量低于对照组,IRS-1 pSer307 蛋白的相对表达量则明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与模型对照组比较,氯沙坦不同浓度组 3T3-L1 脂肪细胞 PI3K 和 IRS-1 蛋白的相对表达量不同程度上调,而 IRS-1 pSer307 蛋白的相对表达量则显著下调,wortmannin 预处理能够逆转氯沙坦组 IRS-1 pSer307 蛋白的下调(图 4、5)。



^① $P < 0.01$ 与对照组比较; ^② $P < 0.01$ 与模型对照组比较。

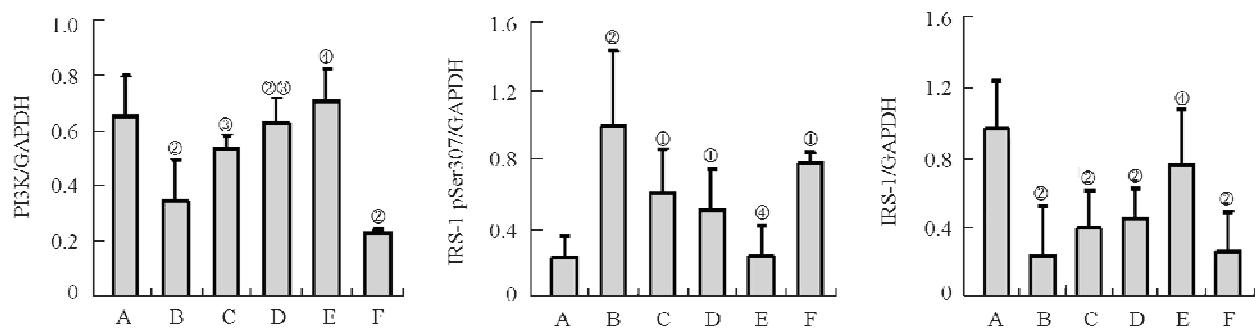
图 3 各组 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量比较

Fig 3 Glucose consumption in 3T3-L1 adipocytes in each group



注: 1~6 泳道分别表示对照组、模型对照组、氯沙坦 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、氯沙坦 10 $\mu\text{mol/L}$ 组、氯沙坦 100 $\mu\text{mol/L}$ 组、氯沙坦 + wortmannin 组。

图 4 Western blotting 分析 SDS-PAGE 电泳图谱
Fig 4 SDS-PAGE electrophoresis analysed by Western blotting



注: A~F 分别表示对照组、模型对照组、氯沙坦 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、氯沙坦 10 $\mu\text{mol/L}$ 组、氯沙坦 100 $\mu\text{mol/L}$ 组、氯沙坦 + wortmannin 组; ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$ 与对照组比较; ③ $P < 0.05$, ④ $P < 0.01$ 与模型对照组比较。

图 5 各组 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1、PI3K 和 IRS-1 pSer307 蛋白的相对表达量

Fig 5 Relative expression of IRS-1, PI3K and IRS-1 pSer307 protein in 3T3-L1 adipocytes in each group

3 讨 论

脂肪组织在胰岛素抵抗的发生和发展中发挥关键性作用^[9]。脂肪组织可分泌多种脂肪细胞因子,如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、瘦素、脂联素、抵抗素以及在脂肪组织中特异表达的蛋白过氧化物酶增殖体激活受体 γ (PPAR γ)等^[10]。脂肪组织的生长往往通过脂肪细胞数量的增多和前脂肪细胞的不断分化成熟^[11]。脂肪细胞增殖分化异常可引起肥胖和胰岛素抵抗^[12]。肥胖相关的胰岛素抵抗常伴有脂肪细胞体积的增大^[2]。胰岛素抵抗是 2 型糖尿病和代谢综合征的典型特征,也是诸多心血管疾病和糖尿病的危险因素^[13]。本实验利用 3T3-L1 脂肪细胞建立胰岛素抵抗模型,研究氯沙坦对脂肪细胞胰岛素抵抗的作用及其可能作用机制。

ARB 广泛用于高血压和高血压相关心血管病变和终末器官损害的治疗^[14],且能够降低糖尿病的发生率^[15]。本课题组以往的研究^[13]证实:氯沙坦能够降低 2 型糖尿病肾病患者空腹血胰岛素的水平和改善胰岛素抵抗。本实验结果显示:氯沙坦能够增加胰岛素抵抗细胞葡萄糖的消耗量,即增加对葡萄糖的摄取利用,减小脂肪细胞体积,改善细胞形态;从

而证实 ARB 具有改善 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的作用。

胰岛素通过胰岛素信号转导通路 IRS/PI3K/Akt/葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, Glu4) 完成糖转运。IRS-1 在胰岛素信号转导通路中具有重要作用^[9]。在病理生理状态下,IRS-1 丝氨酸磷酸化可能干扰胰岛素信号的传递而导致胰岛素抵抗^[16]。PI3K 由 p85 和 p110 两个亚基组成,p85 作为调节亚基,有着与 p110 激活酪氨酸激酶的作用。PI3K 信号转导通路在脂肪细胞中起着调节细胞代谢、增殖、分化以及胰岛素刺激下 Glu4 糖转运的作用^[17]。PI3K/Akt 信号转导通路原件水平的降低与人类多种疾病有关^[18]。研究^[9]显示脂肪细胞胰岛素抵抗可导致由胰岛素刺激激活的 PI3K 通路受损。本实验结果显示:与对照组比较,模型对照组脂肪细胞 PI3K 和 IRS-1 表达下降,IRS-1 pSer307 表达升高;氯沙坦作用 48 h 后,氯沙坦组脂肪细胞 PI3K 和 IRS-1 表达升高,IRS-1 pSer307 表达下降,并呈现一定程度的剂量依赖性,推测氯沙坦引起的上述改变可能与 PI3K 信号通路有关;因此,设计加入 PI3K 抑制剂 wortmannin 预处理 20 min 后再给予氯沙坦刺激,该组脂肪细胞 PI3K、IRS-1、IRS-1 pSer307 的相对表

达量与模型对照组比较差异无统计学意义,提示氯沙坦可能通过PI3K信号通路发挥作用。本实验中氯沙坦引起的改变与Muñoz等^[10]报道的结果相符,即ARB类药物厄贝沙坦可上调IRS/PI3K/Akt/Glu4通路原件的表达,减小脂肪细胞体积,从而改善大鼠的胰岛素抵抗。

综上所述,氯沙坦通过调节胰岛素抵抗脂肪细胞的胰岛素信号转导通路上作用原件(PI3K、IRS-1和IRS-1pSer307)的表达,减小胰岛素抵抗脂肪细胞的体积,并增加细胞对葡萄糖的利用,从而改善脂肪细胞的胰岛素抵抗。

[参考文献]

- [1] Booth GL, Kapral MK, Fung K, et al. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study[J]. Lancet, 2006, 368(9529): 29–36.
- [2] Koenen TB, Tack CJ, Kroese JM, et al. Pioglitazone treatment enlarges subcutaneous adipocytes in insulin-resistant patients[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(11): 4453–4457.
- [3] Aksnes TA, Flaa A, Sevre K, et al. Effects on plasma noradrenaline may explain some of the improved insulin sensitivity seen by AT-1 receptor blockade[J]. Blood Press, 2008, 17(3): 156–163.
- [4] Watanabe S, Okura T, Kurata M, et al. The effect of losartan and amlodipine on serum adiponectin in Japanese adults with essential hypertension[J]. Clin Ther, 2006, 28(10): 1677–1685.
- [5] Lee MH, Song HK, Ko GJ, et al. Angiotensin receptor blockers improve insulin resistance in type 2 diabetic rats by modulating adipose tissue[J]. J Kidney Int, 2008, 74(7): 890–900.
- [6] Chang E, Donkin SS, Teegarden D. Parathyroid hormone suppresses insulin signaling in adipocytes[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 307(1–2): 77–82.
- [7] 王丽静,张尉,刘小莺,等.地塞米松诱导3T3L1脂肪细胞胰岛素抵抗模型的建立[J].福建医科大学学报,2007,41(3): 282–284.
- [8] Tamori Y, Masugi J, Nishino N, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes[J]. Diabetes, 2002, 51(7): 2045–2055.
- [9] Heydrick SJ, Gautier N, Olichon-Berthe C, et al. Early alteration of insulin stimulation of PI 3-kinase in muscle and adipocyte from gold thioglucose obese mice[J]. Am J Physiol, 1995, 268(4 Pt 1): E604–E612.
- [10] Muñoz MC, Giani JF, Dominici FP, et al. Long-term treatment with an angiotensin II receptor blocker decreases adipocyte size and improves insulin signaling in obese Zucker rats[J]. J Hypertens, 2009, 27(12): 2409–2420.
- [11] Svedman P. Mechanical homeostasis regulating adipose tissue volume[J]. Head Face Med, 2007, 3(1): 34.
- [12] 温宇,王宏伟,卢慧玲,等.脂肪酸诱导的3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗的研究[J].中国病理生理杂志,2007,23(3): 543–547.
- [13] Guo LL, Pan Y, Jin HM, et al. Adiponectin is positively associated with insulin resistance in subjects with type 2 diabetic nephropathy and effects of angiotensin II type 1 receptor blocker losartan[J]. J Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(6): 1876–1883.
- [14] Schupp M, Janke J, Clasen R, et al. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity[J]. J Circulation, 2004, 109(17): 2054–2057.
- [15] Clasen R, Schupp M, Foryst-Ludwig A, et al. PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin[J]. J Hypertension, 2005, 24(1): 137–143.
- [16] Tanti JF, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation[J]. Curr Opin Pharmacol, 2009, 9(6): 753–762.
- [17] Tengholm A, Meyer T. A PI3-kinase signaling code for insulin-triggered insertion of glucose transporters into the plasma membrane [J]. Curr Biol, 2002, 12(21): 1871–1876.
- [18] Maiuri T, Ho J, Stambolic V. Regulation of adipocyte differentiation by distinct subcellular pools of protein kinase B (PKB/Akt)[J]. J Biol Chem, 2010, 285(20): 15038–15047.

[收稿日期] 2011-07-21

[本文编辑] 王淑平