

NF- κ B p65 在高糖诱导 3T3-L1 脂肪细胞 胰岛素抵抗中的作用

易 屏¹ 陆付耳^{2*} 陈 广² 徐丽君² 王开富²

(华中科技大学同济医学院附属同济医院,¹中医科,²中西医结合研究所, 武汉 430030)

摘要 建立高糖诱导胰岛素抵抗的细胞模型, 研究高糖对 3T3-L1 脂肪细胞 NF- κ B p65 表达及转位的影响。诱导成熟的 3T3-L1 脂肪细胞与 5.0 mmol/L 的葡萄糖含或不含 0.6 nmol/L 的胰岛素(LGIns⁺组与 LGIns⁻组)或者与 25.0 mmol/L 葡萄糖含或不含 0.6 nmol/L 的胰岛素(HGIns⁺组与 HGIns⁻组)培养 18 h, 以 2-脱氧-[³H]-D-葡萄糖摄入量法观察葡萄糖的转运率, 用 Western 印迹检测总 NF- κ B p65 及核 NF- κ B p65 的表达, 用激光扫描共聚焦(CLSM)对 NF- κ B p65 进行定位显示。结果显示, 仅 HGIns⁺组, 即 3T3-L1 脂肪细胞与 25.0 mmol/L 葡萄糖含 0.6 nmol/L 的胰岛素培养 18 h 后, 胰岛素刺激的葡萄糖转运减少 55% ($P < 0.01$), 同时 Western 印迹和 CLSM 均显示 NF- κ B p65 核转位增加($P < 0.01$), 但对 3T3-L1 脂肪细胞总 NF- κ B p65 的表达无明显影响($P > 0.05$)。研究结果表明, 只有在胰岛素(0.6 nmol/L)存在的条件下, 高糖(25.0 mmol/L)才可以诱导胰岛素抵抗, 其分子机制可能与其刺激 NF- κ B p65 的核转位, 调节相关基因的表达有关。

关键词 高糖; NF- κ B p65; 胰岛素抵抗; 3T3-L1 脂肪细胞

高血糖在胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、高血压病、2型糖尿病(T2DM)等发病过程中起着非常重要的作用。最新研究显示, IKK β 的活化与胰岛素抵抗的发生密切相关, 是治疗胰岛素抵抗的重要分子靶点^[1], IKK β 的主要功能之一是调节 NF- κ B 的转位活化^[2-4]。高血糖是 IKK β 的重要激活物之一, 也是促进 IR 发病的关键因素^[5], 那么 NF- κ B 的核转位是否是高糖诱导胰岛素抵抗的分子机制之一呢? 本研究以高糖加胰岛素诱导 3T3-L1 脂肪细胞产生胰岛素抵抗, 观察高糖对核因子 NF- κ B 表达和转位的影响, 探讨其在高糖诱导 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、地塞米松、胰岛素、乙酰水杨酸钠(阿司匹林)、DMSO、细胞松弛素 B 为 Sigma 公司产品; 牛血清白蛋白(BSA)、DMEM、胎牛血清(FBS)为 Gibco BRL 公司产品; 2-脱氧-[³H]-D-葡萄糖(北京原子高科股份有限公司); 3T3-L1 前脂肪细胞(3T3-L1 preadipocyte)(中国医学科学院基础医学研究所细胞中心); NF- κ B p65 抗体(Neomarkers 公司); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG(Pierce

公司); 蛋白质 marker(Fermentas 公司); BCA 蛋白检测试剂盒、增强化学发光法(ECL)试剂盒为 Pierce 公司产品; Cy-3 标记的羊抗兔 IgG(博士得公司); DAPI(Sigma 公司); 其他化学试剂均为分析纯。SH87261616 型 CO₂ 培养箱(美国 Sheldon 公司); 倒置相差显微镜(日本 Olympus CHK 公司); YJ-1450 型医用净化工作台(苏州净化设备公司); Micro Beta 1540 型液闪仪(美国 PE 公司); FV500 型激光扫描共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 细胞培养及诱导分化

在 37 °C、5%CO₂ 的条件下, 3T3-L1 前脂肪细胞在含 10%FBS 的高糖 DMEM 中培养, 待细胞汇合 2 天后, 加入含 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、1 μ mol/L 地塞米松、10 mg/L 胰岛素和 10%FBS 的高糖 DMEM 培养 48 h, 然后换上含 10 mg/L 胰岛素和 10%FBS 的高糖 DMEM 再培养 48 h, 随后以 10%FBS 的高糖 DMEM 继续培养, 2 天换培养液一次, 诱导分化 8~12 天的 3T3-L1 细胞 90%~95% 呈脂肪细胞表型, 可用于实验^[6]。

收稿日期: 2007-04-12 接受日期: 2007-08-29

国家自然科学基金资助项目(No.30371816)

* 通讯作者。Tel/Fax: 027-83663237, E-mail: felu@tjh.tjmu.edu.cn

1.3 3T3-L1 细胞的分组处理

将诱导分化成熟的3T3-L1脂肪细胞换上含0.2% BSA的DMEM无血清培养液培养12 h后,分别换上含5.0 mmol/L葡萄糖,0.6 nmol/L的胰岛素,1%FBS的DMEM(低糖胰岛素组, LGIns⁺);含5.0 mmol/L葡萄糖,1%FBS的DMEM(低糖无胰岛素组,即正常对照组, LGIns);含25.0 mmol/L葡萄糖,0.6 nmol/L胰岛素,1%FBS的DMEM(高糖胰岛素组, HGIns⁺)含25.0 mmol/L葡萄糖,1%FBS的DMEM(高糖无胰岛素组, HGIns);培养18 h。

1.4 葡萄糖转运实验

将24孔板中诱导分化成熟的3T3-L1脂肪细胞以含0.2%BSA的DMEM培养液培养12 h,换以含0.2% BSA的含药培养液温育一定时间后,移去培养液,以KRP缓冲液(131.2 mmol/L NaCl, 4.71 mmol/L KCl, 2.47 mmol/L CaCl₂, 1.24 mmol/L MgSO₄, 2.48 mmol/L Na₃PO₄, 10 mmol/L HEPES, pH 7.4)洗3次,再以含或不含100 nmol/L胰岛素的KRP缓冲液37℃温育30 min,加入1 ml含0.5 μCi/ml 2-脱氧-[³H]-D-葡萄糖的KRP缓冲液37℃温育10 min,以预冷含10 mmol/L葡萄糖的PBS快速洗3次中止反应,加1 ml 0.1 mol/L NaOH作用2 h,取细胞裂解液,用液闪仪计数其每分钟衰变数。另设一组加10 μmol/L细胞松弛素B作为2-脱氧-[³H]-D-葡萄糖的非特异摄取率,所有数据减去此值,作为各组细胞的葡萄糖摄取率^[7]。每次实验设三复孔,共重复3次实验。另用CCK-8法监测细胞的数目和活力^[8]。

1.5 Western 印迹

分化成熟经不同处理的各组3T3-L1脂肪细胞用细胞裂解液裂解后分别提取总蛋白和核蛋白,用BCA试剂盒测定蛋白质浓度。取等量的蛋白质样品50 μg用样品缓冲液处理,蛋白质变性、SDS-PAGE胶电泳分离蛋白质、电转移法使蛋白质转移至PDVF膜上,用含5%脱脂奶粉的TBST(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4, 0.1%Tween-20)室温下封闭2 h以减少非特异性结合,封膜后加入NF-κB p65抗体(1:1 000),4℃过夜,TBST洗膜后以辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:3 000)温育,室温下轻摇2 h,TBST洗膜后用ECL化学发光法曝光显影,洗片后用Bio-Rad图像分析系统对Western印迹目的条带进行扫描,然后用Quantity One软件进行分析。

1.6 免疫荧光激光扫描共聚焦

将6孔板中生长于盖玻片上分化成熟经不同处理的3T3-L1脂肪细胞取出,将盖玻片用固定液(无水乙醇:丙酮=1:1)固定10 min;1%Tron X-100处理5 min,充分水洗、PBS洗后滴加50 μl兔抗人NF-κB p65抗体(1:100),4℃过夜;次日PBS洗后滴加Cy-3标记的羊抗兔IgG,湿盒中避光温育37℃,30 min;PBS避光振洗后滴加DAPI溶液对核进行复染30 s(避光,常温,37℃左右);PBS避光振洗、蒸馏水洗涤后用50%缓冲甘油封片。采用40×油镜观察样品,CY-3和DAPI两种染料分别由氦离子激光器552 nm,358 nm激发,分辨率为1 024×1 024,发射波长分别为565 nm和460 nm。

1.7 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据应用SPSS软件进行统计学分析,用Independent-samples *t* test进行均数比较,以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组3T3-L1脂肪细胞葡萄糖转运的变化

以2-脱氧-[³H]-D-葡萄糖摄入量检测3T3-L1脂肪细胞葡萄糖转运发现,仅HGIns⁺组,即3T3-L1脂肪细胞与25.0 mmol/L葡萄糖含0.6 nmol/L胰岛素培养18 h后,胰岛素刺激的葡萄糖转运减少55% ($P < 0.01$),而HGIns组、LGIns⁺组均无明显影响($P > 0.05$)(图1)。

CCK-8结果显示:5.0 mmol/L的葡萄糖含或不含0.6 nmol/L胰岛素或者25.0 mmol/L葡萄糖含或不含0.6 nmol/L胰岛素培养18 h,3T3-L1脂肪细胞的CCK-8值均无明显影响($P > 0.05$)(表1)。

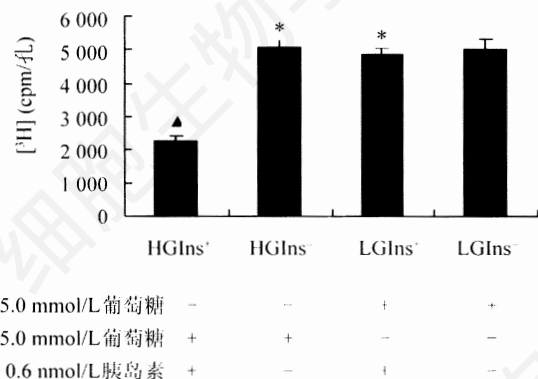


图1 各组3T3-L1脂肪细胞对2-脱氧-[³H]-D-葡萄糖的摄取
HGIns⁺:高糖胰岛素组;HGIns:高糖无胰岛素组;LGIns⁺:低糖胰岛素组;LGIns:低糖无胰岛素组,即正常对照组。与LGIns组比较,▲ $P < 0.01$,* $P > 0.05$ 。

表 1 各组 3T3-L1 脂肪细胞 CCK-8 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(n)	CCK-8 值(A ₄₉₅)
HGIns ⁺	9	1.854 ± 0.024 ▲
HGIns ⁻	9	1.869 ± 0.038 ▲
LGIns ⁺	9	1.839 ± 0.042 ▲
LGIns ⁻	9	1.855 ± 0.025

HGIns⁺: 高糖胰岛素组; HGIns⁻: 高糖无胰岛素组; LGIns⁺: 低糖胰岛素组; LGIns⁻: 低糖无胰岛素组, 即正常对照组。与 LGIns⁻ 组比较, ▲*P*>0.05。

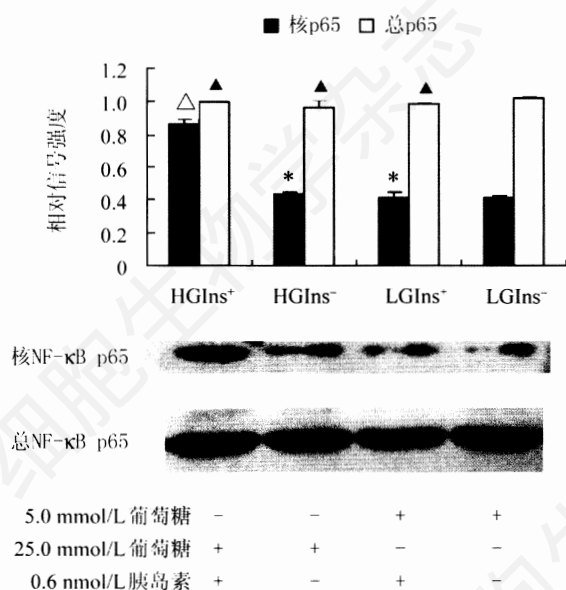


图 2 各组 3T3-L1 脂肪细胞总 NF- κ B p65 与核 NF- κ B p65 的表达

HGIns⁺: 高糖胰岛素组; HGIns⁻: 高糖无胰岛素组; LGIns⁺: 低糖胰岛素组; LGIns⁻: 低糖无胰岛素组, 即正常对照组。与 LGIns⁻ 组比较, Δ *P*<0.01, **P*>0.05, ▲*P*>0.05。

2.2 各组 3T3-L1 脂肪细胞总 NF- κ B p65 与核 NF- κ B p65 的表达

采用 Western 印迹同时检测 3T3-L1 脂肪细胞总 NF- κ B p65 与核 NF- κ B p65 的表达, 结果显示: 仅 HGIns⁺ 组, 即 3T3-L1 脂肪细胞与 25.0 mmol/L 葡萄糖含 0.6 nmol/L 胰岛素培养 18 h 后, 核 NF- κ B p65 的表达明显增加(*P*<0.01), 而 HGIns⁺ 组、LGIns⁺ 组均无明显改变(*P*>0.05)。但 HGIns⁺ 组、HGIns⁺ 组、LGIns⁺ 组、LGIns⁻ 组总 NF- κ B p65 的表达无显著性差异(*P*>0.05)(图 2)。

2.3 各组 3T3-L1 脂肪细胞 NF- κ B p65 的核转位 (图 3)

免疫荧光激光扫描共聚焦检测 NF- κ B p65 显示: 蓝色为 DAPI 标记, 指示核区; 红色为 CY-3 标记, 指示 NF- κ B p65; 两种荧光共聚焦重合后为粉红色, 指

示 NF- κ B p65 转位到核内。

如图 3 所示: 仅 HGIns⁺ 组, 即 3T3-L1 脂肪细胞与 25.0 mmol/L 葡萄糖含 0.6 nmol/L 胰岛素培养 18 h 后, 可见到 NF- κ B p65 转移到核内, 图中既可见到红色又可见到粉红色; 而 HGIns⁻ 组、LGIns⁺ 组、LGIns⁻ 组 NF- κ B p65 均在胞浆中表达, 呈红色; 这说明在胰岛素(0.6 nmol/L)存在的条件下, 高糖(25.0 mmol/L)可以刺激 NF- κ B p65 的核转位, 此结果与 Western 印迹的检测结果一致。

3 讨论

Rel/NF- κ B/I κ B/IKK 信号转导途径广泛存在于真核细胞, 调控着炎症反应、免疫反应等相关的一系列基因表达。新近研究表明, IKK β 的活化与 IR 的发生密切相关, 是治疗 IR 的重要分子靶点^[1], IKK β 的主要功能之一是调节 NF- κ B 的转位活化, IKK β 可能通过促进 NF- κ B 的活化转位调节相关基因的表达而引起 IR^[2-4]。高血糖是 IKK β 的重要激活物之一, 也是促进 IR 发病的关键因素^[5], 那么高血糖是否通过促进 NF- κ B 的核转位而诱导 IR 呢?

由于体内的 IR 是在胰岛素和高血糖存在下发生的慢性病理过程, 为了更好地模拟体内 IR 发生的条件, 本次试验采用葡萄糖和胰岛素处理 3T3-L1 脂肪细胞, 我们发现: 只有当 3T3-L1 脂肪细胞与 25.0 mmol/L 葡萄糖含 0.6 nmol/L 胰岛素培养 18 h 后, 胰岛素刺激的葡萄糖转运显著减少, 而 3T3-L1 脂肪细胞与 25.0 mmol/L 葡萄糖不含 0.6 nmol/L 胰岛素培养 18 h 或与 5.0 mmol/L 葡萄糖含 0.6 nmol/L 胰岛素培养 18 h, 胰岛素刺激的葡萄糖转运均无明显改变。胰岛素刺激的葡萄糖转运是衡量胰岛素敏感性、判断 IR 的重要指标, 这说明只有当胰岛素(0.6 nmol/L)存在时, 高糖(25.0 mmol/L)才可以诱导 3T3-L1 脂肪细胞产生 IR, 这与国外报道是一致的^[6], 而这也正符合体内 IR 发生的条件。

为了进一步研究高糖诱导的胰岛素抵抗与 NF- κ B p65 核转位的关系, 接下来我们用 Western 印迹检测了 3T3-L1 脂肪细胞中总 NF- κ B p65 和核 NF- κ B p65 的表达。试验发现, 仅 HGIns⁺ 组, 即 3T3-L1 脂肪细胞与 25.0 mmol/L 葡萄糖含 0.6 nmol/L 胰岛素培养 18 h 后, 核 NF- κ B p65 的表达明显增加(*P*<0.01), 而 HGIns⁺ 组、LGIns⁺ 组核 NF- κ B p65 均无明显改变(*P*>0.05); 而且葡萄糖和胰岛素对 3T3-L1 脂肪细胞总 NF- κ B p65 的表达无明显影响(*P*>0.05)。我们进一步

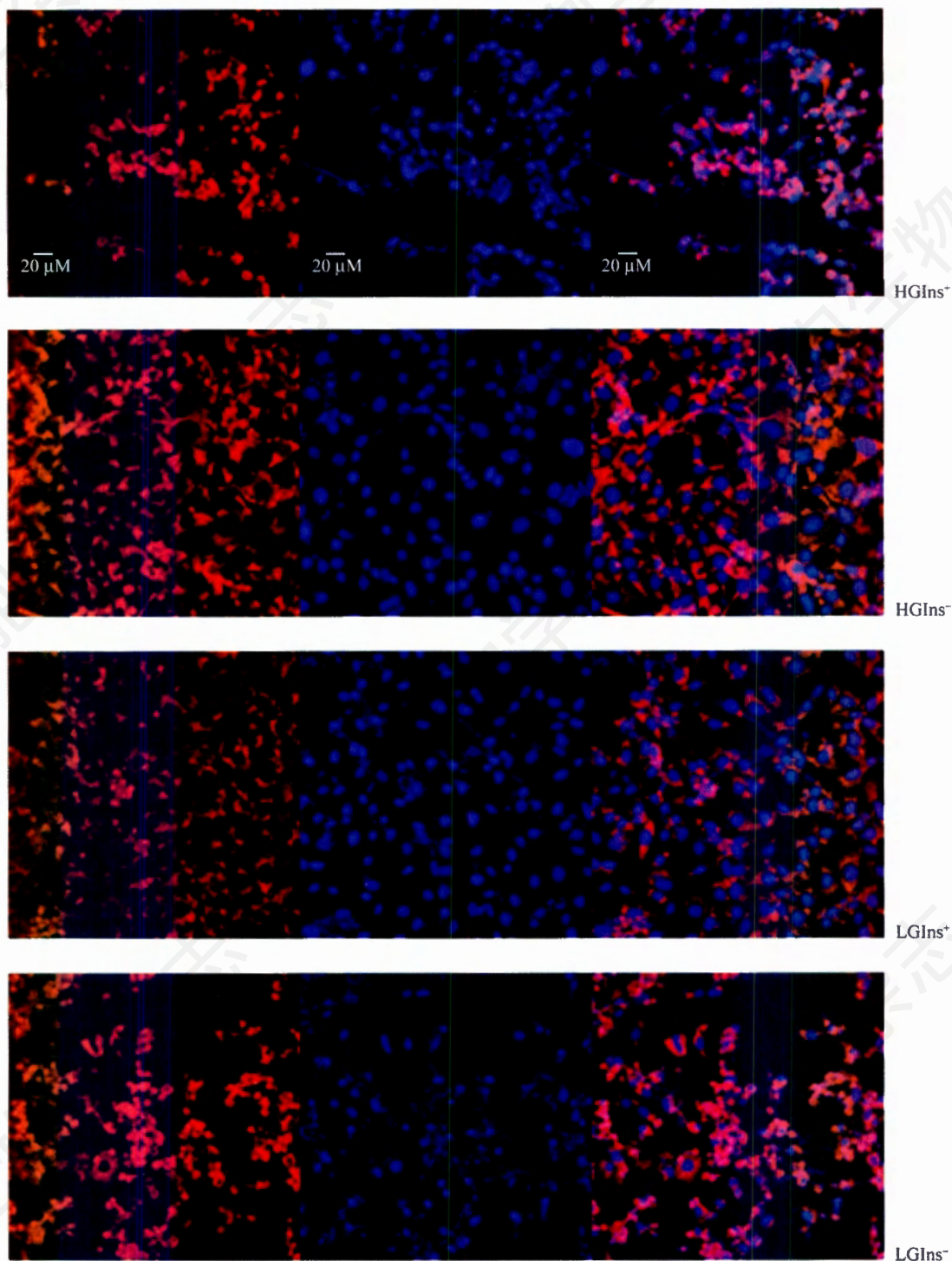


图3 免疫荧光激光扫描共聚焦显示各组3T3-L1脂肪细胞NF-κB p65的核转位

HGIns⁺: 高糖胰岛素组; HGIns⁻: 高糖无胰岛素组; LGIns⁺: 低糖胰岛素组; LGIns⁻: 低糖无胰岛素组, 即正常对照组。

用免疫荧光激光扫描共聚焦对NF-κB p65进行定位显示, 结果发现, 仅HGIns⁺组, 即3T3-L1脂肪细胞与25.0 mmol/L葡萄糖含0.6 nmol/L胰岛素培养18 h后, 可见到NF-κB p65转移到核内, 图中既可见到红色又可见到粉红色; 而HGIns⁻组、LGIns⁺组、

LGIns⁻组NF-κB p65均在胞浆中表达, 呈红色; 这说明在胰岛素(0.6 nmol/L)存在的条件下, 高糖(25.0 mmol/L)可以刺激NF-κB p65的核转位, 此结果与Western印迹的检测结果一致。

由此我们认为在胰岛素(0.6 nmol/L)存在的条件

下,高糖(25.0 mmol/L)可以诱导 IR, 其机制可能与其活化 NF- κ B p65, 使 NF- κ B p65 进入核内调节相关基因的表达, 抑制葡萄糖的转运有关。至于高糖通过何种机制促进 NF- κ B 的活化转位, NF- κ B 又通过何种途径作用于胰岛素信号转导相关蛋白而导致 IR 还需要进一步探索。

参考文献(References)

- [1] Yuan M *et al. Science*, 2001, **293**: 1673
- [2] Perreault M *et al. Nat Med*, 2001, **7**: 1138
- [3] Ruan H *et al. Diabetes*, 2002, **51**:1319
- [4] Itani S I *et al. Diabetes*, 2002, **51**: 2005
- [5] Patti ME *et al. Diabetes*, 1999, **48**: 1562
- [6] Nelson BA *et al. Diabetes*, 2000, **49**: 981
- [7] Romero R *et al. J Endocrinol*, 2000, **164**: 187
- [8] Takeuchi A *et al. Nat Genet*, 2003, **33**: 172

The Role of NF- κ B p65 in Insulin Resistance Induced by High Glucose in 3T3-L1 Adipocytes

Ping Yi¹, Fu-Er Lu^{2*}, Guang Chen², Li-Jun Xu², Kai-Fu Wang²

(¹Department of Traditional Chinese Medicine, ²Institute of Integrated Traditional Chinese & Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract This study was carried out to establish insulin-resistant cell model induced by high glucose and to investigate the effect of high glucose on NF- κ B p65 expression and translocation in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated for 18 h with DMEM (1%FBS) containing 25 mmol/L glucose with or without 0.6 nmol/L insulin, or 5 mmol/L glucose with or without 0.6 nmol/L insulin. 2-deoxy-[³H]-D-glucose method was used for the determination of glucose uptake. Western blot was used for the determination of the protein expression of total NF- κ B p65 and nuclear NF- κ B p65. Confocal laser scanning microscope (CLSM) was used to investigate the distribution of NF- κ B p65. Only in HGIns⁺ group, namely 3T3-L1 adipocytes were treated for 18 h with DMEM (1%FBS) containing 25 mmol/L glucose with 0.6 nmol/L insulin, the insulin-stimulated glucose transport of 3T3-L1 adipose cells were decreased by 55%. Both the expression of nuclear NF- κ B p65 and nuclear translocation of NF- κ B p65 was increased. But total NF- κ B p65 protein abundance was no change during this study. These results showed only in the presence of 0.6 nmol/L insulin, high glucose can induced insulin resistance and the molecular mechanism of which might be associated with the activation and translocation of NF- κ B p65.

Key words high glucose; NF- κ B p65; insulin resistance; 3T3-L1 adipocytes

Received: April 12, 2007 Accepted: August 29, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30371816)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-27-83663237, E-mail: felu@tjh.tjmu.edu.cn