

低功率激光调节脂肪细胞内 ERK 与 Akt 促进 甘油三酯的合成

蒋笑笑 巩龙龙 黄磊

(华南师范大学生物光子学研究院激光生命科学研究部暨激光生命科学教育部重点实验室, 广东 广州 510631)

摘要 低功率激光照射(LPLI)可以激活细胞内多种信号途径促进细胞增殖、迁移、分化等,但是 LPLI 能否调节脂肪细胞内胞外信号调节激酶(ERK)和蛋白激酶 B(Akt)促进甘油三酯的合成却尚未见报道。利用 LPLI 刺激前脂肪细胞和成熟脂肪细胞并结合蛋白质免疫印迹法分析处理后细胞内 ERK 和 Akt 活性的变化。研究结果表明 LPLI 处理后前脂肪细胞内 ERK 和 Akt 的活性增高,而 LPLI 处理成熟脂肪细胞后 ERK 活性下降而 Akt 活性增高,说明 LPLI 在脂肪细胞内可以差异性调节 ERK 和 Akt 的活性。此外,LPLI 能通过抑制 ERK、激活 Akt 而增加胰岛素抵抗脂肪细胞内甘油三酯的含量。该结果暗示 LPLI 可能通过调节 ERK 与 Akt 信号缓解脂代谢紊乱造成的胰岛素抵抗。

关键词 生物光学; 低功率激光照射; 蛋白质免疫印迹; 脂肪细胞; 胞外信号调节激酶; 蛋白激酶 B

中图分类号 O436 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/CJL201340.1204002

Triglyceride Biosynthesis Induced by Low-Power Laser Irradiation via Regulation of ERK and Akt in Adipocytes

Jiang Xiaoxiao Gong Longlong Huang Lei

(MOE Key Laboratory of Laser Life Science & Institute of Laser Life Science, College of Biophotonics,
South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China)

Abstract Low-power laser irradiation (LPLI) can promote cell proliferation, migration and differentiation through activation of multiple signaling pathways. However, it is unclear whether LPLI can promote triglyceride biosynthesis in adipocytes via regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and protein kinase B (PKB, also named Akt). In the present study, the changes of the ERK and Akt activity in 3T3-L1 pre-adipocytes and mature adipocytes upon LPLI stimulations is investigated using western blot analysis. The findings indicate that the activity of ERK and Akt is significantly elevated in 3T3-L1 pre-adipocytes under LPLI treatment. In contrast, the activity of ERK is dramatically reduced in mature adipocytes, but the activity of Akt is significantly elevated under LPLI treatment, suggesting that LPLI can differentially regulate the activity of ERK and Akt. Furthermore, the concentration of triglyceride in insulin resistant adipocytes is increased which is induced by LPLI through inhibition of ERK and activation of Akt. These results imply that LPLI can improve lipid metabolic disorders-induced insulin resistance through regulation of ERK and Akt.

Key words biotechnology; low-power laser irradiation; western blotting; adipocyte; extracellular signal-regulated kinase; protein kinase B

OCIS codes 170.1420; 170.4730; 170.5380

收稿日期: 2013-06-26; **收到修改稿日期:** 2013-07-31

基金项目: 国家 973 计划(2011CB910402,2010CB732602)、教育部“长江学者与创新团队计划”创新团队项目(IRT0829)、国家自然科学基金(81101741)

作者简介: 蒋笑笑(1988—),女,硕士研究生,主要从事激光在生命科学研究中的应用方面的研究。

E-mail: xiaoxiao0826@126.com

导师简介: 黄磊(1982—),男,博士,讲师。主要从事光调控细胞信号转导与分子医学应用等方面的研究。

E-mail: huanglei@scnu.edu.cn(通信联系人)

1 引 言

低功率激光照射(LPLI)可以激活细胞内多种信号途径从而促进细胞增殖、迁移、分化等。LPLI已经被广泛应用于再生缺陷疾病的治疗和促进伤口的愈合^[1]。然而LPLI调节生理过程的分子机制仍未不清楚。一种可能的机制是LPLI处理后光能被胞内发色基团吸收导致代谢能的改变,细胞内三磷酸腺苷(ATP)水平增加^[2]。另外一些研究表明LPLI可诱导细胞膜释放Ca²⁺,导致胞内Ca²⁺浓度瞬时增高^[3],激活蛋白激酶C(PKC)^[4]。目前的研究表明LPLI可能激活细胞膜上的G蛋白偶联受体^[5]或激活细胞膜上的酪氨酸激酶^[6],从而引起胞内信号分子如原癌基因编码的酪氨酸蛋白激酶(Src)、蛋白激酶C(PKC)、蛋白激酶B(Akt)、大鼠肉瘤蛋白(Ras)和胞外信号调节激酶(ERK)等活化^[7-8],进而引起多种细胞生理过程。最新的研究表明,LPLI可以通过激活血管内皮细胞中的Ras/Raf/MEK/ERK信号通路促进转录因子SP1的转录活性并诱导细胞增殖^[9]。此外,LPLI还可以通过激活PI3-K/Akt信号以配体非依赖的方式诱导核转录因子——雌激素受体在细胞核内的重分布及转录活性的升高^[10]。

不同细胞内相同信号蛋白的功能不尽相同。如在前脂肪细胞中,活化的ERK能促进细胞的增殖^[9],而在成熟的脂肪细胞中,活化的ERK能磷酸化生脂基因PPAR γ 而促进其降解^[11-13],进而促进甘油三酯的分解。活化的Akt除了能促进细胞摄取葡萄糖外,还能抑制甘油三酯脂肪酶的活性,减少甘油三酯的分解,促进能量储存^[14],与ERK共同维持脂肪细胞内甘油三酯合成与分解的平衡。有研究表明,胰岛素抵抗的脂肪组织中,Akt的活性被抑制,ERK过度激活^[15-16],导致脂肪细胞内甘油三酯大量分解,产生过多游离脂肪酸并加重胰岛素抵抗,导致2型糖尿病^[17-18]。

LPLI通过激活Akt和ERK促进细胞增殖已被证实,但在脂肪细胞中,LPLI是否可以差异性调节ERK和Akt的活性,促进甘油三酯的合成还尚未见报道。因此,本文利用LPLI刺激前脂肪细胞和成熟脂肪细胞并结合蛋白质免疫印迹法分析LPLI处理后细胞内ERK和Akt活性及甘油三酯含量的变化。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

细胞培养基DMEM/F12购于英国GIBCO公

司;ERK和Akt单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;胰岛素、地塞米松(Dex)、IBMX和Oil-red O等其他试剂主要购于美国Sigma公司;荧光羊抗兔二抗购自美国Rockland Immunochemicals公司。甘油三酯检测试剂盒购自普利莱基因技术有限公司。

2.2 细胞培养与脂肪细胞的分化

3T3-L1前脂肪细胞购自ATCC公司。细胞培养在含体积分数10%小牛血清的DMEM/F12培养基中,并置于含体积分数5%CO₂的37℃恒温Thermo培养箱中培养。3T3-L1前脂肪细胞诱导分化为成熟脂肪细胞的具体方法参考相关文献进行操作^[19]:细胞融合2天后,加入诱导A液(5 mg/L胰岛素,1 μ mol/L Dex,0.5 mmol/L IBMX)培养2天,之后换诱导B液(5 mg/L胰岛素)培养2天,最后加入DMEM/F12培养基培养至第8天。大约8天后,3T3-L1前脂肪细胞诱导分化为成熟脂肪细胞。胰岛素抵抗模型的建立参考相关文献进行操作^[20]:将成熟的脂肪细胞孵育地塞米松(20 nmol/L)8天,即可诱导脂肪细胞产生胰岛素抵抗。

2.3 脂肪细胞鉴定

Oil-red O是一种油溶性偶氮染料,可以与细胞中的中性脂肪滴结合而使之着色。将诱导培养8天的脂肪细胞用PBS清洗2遍并使用体积分数3.7%的甲醛溶液室温固定10 min,随后加入Oil-red O工作液染色30 min,最后用PBS轻轻洗2遍去除多余的染料并置于显微镜(100 \times)下观察,颜色越深(红色)说明胞内的中性脂肪滴越多。

2.4 LPLI处理细胞

使用无血清培养基饥饿3T3-L1前脂肪细胞和成熟脂肪细胞过夜,之后使用632.8 nm氦氖激光照射细胞10 min,使用LPLI的剂量分别为2.5,5,10 J/cm²。

2.5 免疫印迹分析

使用无血清培养基饥饿3T3-L1前脂肪细胞和成熟脂肪细胞过夜,之后使用632.8 nm氦氖激光照射细胞,然后利用Western Blot实验检测相关蛋白表达量的变化,具体方法如下^[21]:将细胞(75 cm²培养瓶,2 \times 10⁶个细胞)破碎提取总蛋白并使用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。将分离后的蛋白转移到PVDF膜上并在4℃孵育一抗过夜,随后使用TBST清洗PVDF膜并于室温孵育荧光二抗2 h,最后利用ODYSSEY激光双色红外成像系统分析结果。

3 结 果

3.1 LPLI 以剂量依赖的方式激活 3T3-L1 前脂肪细胞内的 ERK 和 Akt

为检测 LPLI 是否能激活 3T3-L1 前脂肪细胞内的 ERK 和 Akt, 将培养的细胞饥饿过夜并使用不同剂量的 LPLI (2.5, 5, 10 J/cm²) 处理细胞, 未处理组 (control) 作为对照。LPLI 处理后 0.5 h 收集细胞, 提取蛋白并利用蛋白质免疫印迹法检测不同剂量 LPLI 处理后 3T3-L1 前脂肪细胞内 ERK 和 Akt 磷酸化水平。实验结果表明, LPLI 以剂量依赖的方式诱导 3T3-L1 前脂肪细胞中 ERK 和 Akt 磷酸化水平的上升, 如图 1(a) 和 (b) 所示。此外, 图 1

(a) 和 (b) 结果显示不同剂量的 LPLI 不能影响 Akt 和 ERK 总蛋白的表达。活化的 ERK 可以促进转录因子 SP1 的转录活性并诱导血管内皮细胞增殖^[9], 而 LPLI 能否通过激活 ERK 促进前脂肪细胞增殖, 抑制脂肪细胞分化有待于进一步的研究。为检测 LPLI 激活 ERK 的效应是否是瞬时效应, 利用 2.5 J/cm² 和 5 J/cm² 的 LPLI 处理细胞, 分别于处理后 0.5、1、2 h 提取蛋白并检测 3T3-L1 前脂肪细胞内 ERK 磷酸化水平。实验结果表明 LPLI 处理细胞后 2 h ERK 的磷酸化水平仍然高于对照组, 说明 LPLI 引起细胞内 ERK 活化不是瞬时效应。如图 1(d) 所示。

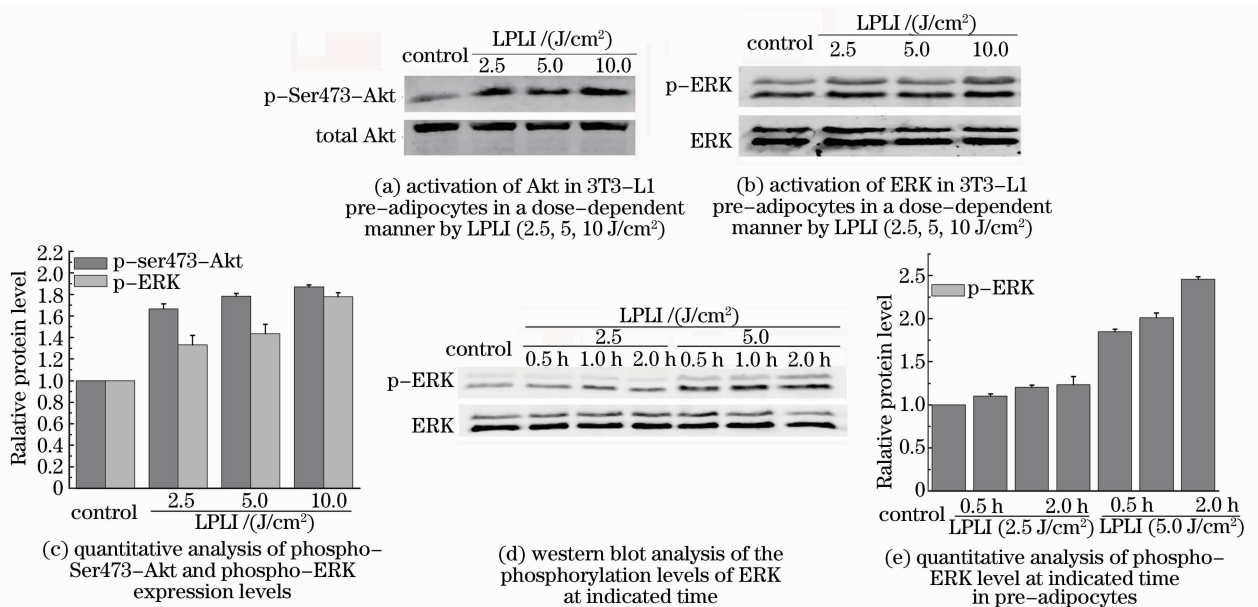


图 1 LPLI 激活 3T3-L1 前脂肪细胞内的 ERK 和 Akt

Fig. 1 LPLI activates ERK and Akt in 3T3-L1 pre-adipocytes

3.2 3T3-L1 细胞的分化与脂肪细胞的鉴定

3T3-L1 细胞是小鼠的前脂肪细胞株, 具有分化为成熟脂肪细胞的潜能。研究中使用诱导 A 液 (含 5 mg/L 胰岛素, 1 μmol/L Dex, 0.5 mmol/L IBMX) 和诱导 B 液 (5 mg/L 胰岛素) 成功诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞。细胞分化 8 天后用 Oil-red O 染色, 实验结果发现诱导分化后脂肪细胞内会储存大量的中性脂肪滴, 如图 2 所示。

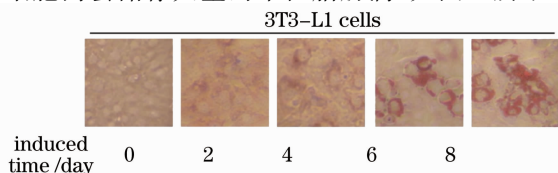


图 2 成熟脂肪细胞的鉴定 (100×)

Fig. 2 Identification of mature adipocytes (100×)

3.3 LPLI 差异性调节成熟脂肪细胞中 ERK 和 Akt 的活性

为探究 LPLI 对成熟脂肪细胞中 ERK 和 Akt 活性的影响, 使用不同剂量的 LPLI (2.5、5、10 J/cm²) 处理脂肪细胞, 未处理组 (control) 作为对照, 利用蛋白质免疫印迹法检测脂肪细胞中 ERK 和 Akt 磷酸化水平的变化。实验结果显示, LPLI 能够诱导 Akt 的磷酸化水平升高 [如图 3(a) 所示], 却降低了 ERK 的磷酸化水平 [如图 3(b) 所示]。这个结果表明 LPLI 能够在脂肪细胞中差异性调节 ERK 和 Akt 的活性, 并暗示了 LPLI 可能促进成熟脂肪细胞内甘油三酯的合成^[22-23]。为探究 LPLI 抑制脂肪细胞中 ERK 磷酸化是否瞬时效应, 用 5 J/cm² 的 LPLI 处理细胞, 分别于处理后 0.5、1、2 h 提取总蛋白检测 ERK 磷酸化水平的变化。实验结

果表明 LPLI 处理后 2 h ERK 的磷酸化水平仍然较低,说明 LPLI 引起脂肪细胞内 ERK 的活性降低不

是瞬时效应,如图 3(c)所示。

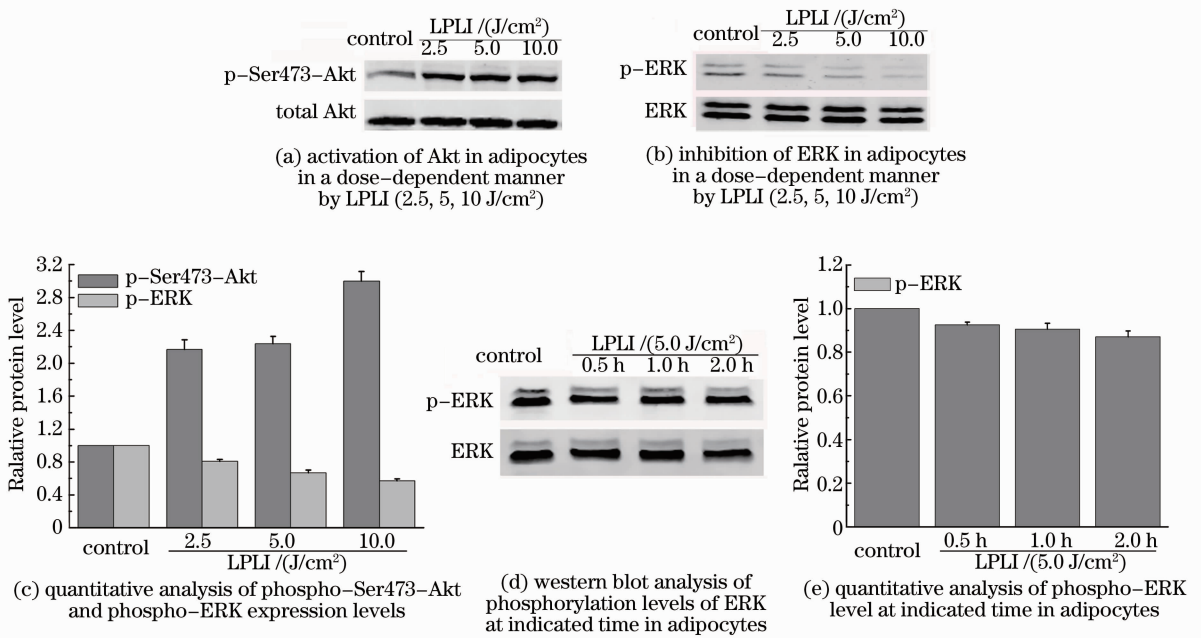


图 3 LPLI 差异性调节成熟脂肪细胞中 ERK 和 Akt 的活性

Fig. 3 LPLI differentially regulated the activity of ERK and Akt in mature adipocytes

3.4 LPLI 抑制胰岛素抵抗脂肪细胞内甘油三酯的分解

为验证 LPLI 能够抑制脂肪细胞内甘油三酯的分解,将成熟脂肪细胞用含 20 nmol/L 地塞米松培养 8 天诱导其产生胰岛素抵抗,随后分别使用 10 J/cm² LPLI(Dex+LPLI),PD98059(MEK 抑制剂)(Dex+PD98059)和 Wortmannin (PI3K 抑制剂)(Dex+Wortmannin)处理细胞。8 天后破碎细胞提取胞内甘油三酯,以成熟的脂肪细胞(untreated)为阳性对照,用胰岛素抵抗的脂肪细胞(Dex)为阴性对照,试剂盒检测细胞内甘油三酯的含量。实验结果显示,用 Dex 处理 8 天后,脂肪细胞内甘油三酯含量明显减少,而使用 10 J/cm² LPLI 和 PD98059 处理细胞能显著抑制胰岛素抵抗的脂肪细胞内甘油三酯的分解。加入 Wortmannin 处理组甘油三酯含量较胰岛素抵抗组有所减少,说明 LPLI 能减少胰岛素抵抗的脂肪细胞内甘油三酯的分解。胰岛素抵抗的脂肪细胞会释放过多的 FFA,影响其他组织(肝、胰岛、肌肉)代谢平衡而加重胰岛素抵抗。而 LPLI 能否作用于活体的脂肪组织,减少 FFA 的释放,从而缓解胰岛素抵抗还需要更深入的探究。总而言之,此结果揭示了 LPLI 在前脂肪细胞与成熟脂肪细胞内不仅能够差异性调节 ERK 和 Akt 的活性,而且能够减少胰岛素抵抗脂肪

细胞内甘油三酯的过度分解,为 LPLI 更好地运用于临床治疗 2 型糖尿病提供理论依据。

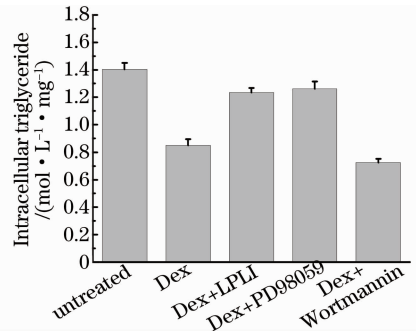


图 4 LPLI 通过抑制 ERK 和激活 Akt 上调胰岛素抵抗脂肪细胞内甘油三酯含量

Fig. 4 LPLI up-regulates the concentration of triglyceride in insulin resistant adipocytes through inhibition of ERK and activation of Akt

4 结 论

利用 LPLI 刺激前脂肪细胞与成熟脂肪细胞发现 LPLI 能差异性调节 ERK 和 Akt 的活性。这种现象可能是由于在脂肪细胞中高表达一些特殊的信号分子,如 Dok1 蛋白。Dok1 作为广谱酪氨酸激酶受体的接头蛋白,能募集 p120 rasGAP,从而抑制 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路。然而,关于 LPLI 差异性调节脂肪细胞中 ERK 和 Akt 的具体分子机

制还尚待进一步深入研究。

PPAR γ 是脂肪细胞中重要的生脂因子,能与 RXR 组成异二聚体,起始转录多种参与脂肪生成的蛋白分子,如 FABP4, acyl-CoA synthase, perilipin 等,促进甘油三酯合成,目前已成为治疗肥胖相关胰岛素抵抗的重要靶点。有研究表明,活化的 ERK 能入核磷酸化 PPAR γ ,促进其泛素化降解从而加速甘油三酯的分解。另外一些研究表明,Akt 可以抑制多种脂肪酶(甘油三酯脂肪酶、激素敏感的脂肪酶)而抑制甘油三酯的分解。胰岛素抵抗的脂肪细胞中 Akt 的活性被抑制,而 ERK 被过度激活,因此,ERK 和 Akt 的活性异常有可能是导致胰岛素抵抗的脂肪细胞释放游离脂肪酸的重要原因。本研究发现,LPLI 能通过抑制 ERK 和激活 Akt 从而阻抑胰岛素抵抗的脂肪细胞内甘油三酯的过度分解,这就有可能抑制脂肪细胞向细胞外释放过多的游离脂肪酸。而游离脂肪酸的增加是引起肥胖相关胰岛素抵抗和心血管疾病的重要因素。本研究暗示了利用 LPLI 可以减少胰岛素抵抗的脂肪细胞释放过多的游离脂肪酸,进而缓解胰岛素抵抗。

参 考 文 献

- 1 T Karu, L Pyatibrat, G Kalendo. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated *in vitro* [J]. J Photochem Photobiol B, 1995, 27(3): 219-223.
- 2 S Kato, H Endoh, Y Masuhiro, *et al.*. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase[J]. Science, 1995, 270(5241): 1491-1494.
- 3 R Lavi, A Shainberg, H Friedmann, *et al.*. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(42): 40917-40922.
- 4 X Gao, T Chen, D Xing, *et al.*. Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation[J]. J Cell Physiol, 2006, 206(2): 441-448.
- 5 B Maier, A Kramer. A NONO-gate times the cell cycle[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(5): 1565-1566.
- 6 X Gao, D Xing. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation[J]. J Biomed Sci, 2009, 16(1): 4.
- 7 S K Sharma, G B Kharkwal, M Sajo, *et al.*. Dose response

- effects of 810 nm laser light on mouse primary cortical neurons [J]. Lasers Surg Med, 2011, 43(8): 851-859.
- 8 J Zhang, D Xing, X Gao. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2008, 217(2): 518-528.
 - 9 J Feng, Y Zhang, D Xing. Low-power laser irradiation (LPLI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp1 pathway[J]. Cell Signal, 2012, 24(6): 1116-1125.
 - 10 L Huang, Y Tang, D Xing. Activation of nuclear estrogen receptors induced by low-power laser irradiation via PI3-K/Akt signaling cascade[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(5): 1045-1059.
 - 11 O Van Beekum, V Fleskens, E Kalkhoven. Posttranslational modifications of PPAR-gamma: fine-tuning the metabolic master regulator[J]. Obesity (Silver Spring), 2009, 17(2): 213-219.
 - 12 S Kersten, B Desvergne, W Wahli. Roles of PPARs in health and disease[J]. Nature, 2000, 405(6785): 421-424.
 - 13 T Ronti, G Lupattelli, E Mannarino. The endocrine function of adipose tissue: an update[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2006, 64(4): 355-365.
 - 14 E Gonzalez, E Flier, D Molle, *et al.*. Hyperinsulinemia leads to uncoupled insulin regulation of the GLUT4 glucose transporter and the FoxO1 transcription factor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(25): 10162-10167.
 - 15 J Jager, V Corcelle, T Gremeaux, *et al.*. Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity [J]. Diabetologia, 2011, 54(1): 180-189.
 - 16 E Burgermeister, R Seger. PPARgamma and MEK interactions in cancer[J]. PPAR Res, 2008, 2008: 309469.
 - 17 G Boden. Obesity, insulin resistance and free fatty acids[J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2011, 18(2): 139-143.
 - 18 R Zechner, P C Kienesberger, G Haemmerle, *et al.*. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores [J]. J Lipid Res, 2009, 50(1): 3-21.
 - 19 F Picard, M Kurtev, N Chung, *et al.*. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma[J]. Nature, 2004, 429(6993): 771-776.
 - 20 N Houstis, E D Rosen, E S Lander. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance[J]. Nature, 2006, 440(7086): 944-948.
 - 21 Lei Huang, Shengnan Wu, Da Xing. High fluence low-power laser irradiation induces apoptosis via inactivation of Akt/GSK3b signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(3): 588-601.
 - 22 Y Yamanashi, D Baltimore. Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok[J]. Cell, 1997, 88(2): 205-211.
 - 23 T Hosooka, T Noguchi, K Kotani, *et al.*. Dok1 mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and obesity through modulation of PPAR-gamma phosphorylation[J]. Nature Med, 2008, 14(2): 188-193.