

## 肌源性 IL-6 对骨骼肌细胞胰岛素抵抗的影响及其机制\*

唐 晖<sup>1</sup>, 赵一平<sup>1</sup>, 黄 丹<sup>1</sup>, 蔡建光<sup>1</sup>, 汪 毅<sup>2△</sup>

(1. 湖南科技大学体育学院, 湘潭 411201; 2. 中国人民大学体育部, 北京 100872)

**【摘要】 目的:** 研究外源性钙负荷促进离体细胞肌源性 IL-6 释放, 调节 AMPK、p38MAPK 等信号通路以改善胰岛素抵抗的效应。**方法:** 以正常培养的 C2C12 细胞系和棕榈酸诱导形成胰岛素抵抗 C2C12 细胞系为实验对象。预实验通过不同浓度钙培养肌细胞 24 h 后, 检测培养液葡萄糖浓度并在显微镜下观察其收缩的情况。正式试验 1 将细胞分为 4 组: A 组为 Control 组(正常培养液培养), B 组为 IR 组(0.6 mmol/L 棕榈酸哺育细胞 24 h 后备用), C 组为 1 000 ng/ml IL-6 哺育 IR 细胞 48 h 组(IL-6+IR 组), D 组为 IL-6shRNA 哺育正常细胞 48 h 组(IL-6shRNA 组)。正式试验 2 将细胞分为 3 组: A 组为 IR 组, B 组为 100 μmol/L CaCl<sub>2</sub> 哺育 IR 细胞 48 h 组(钙哺育组, CaCl<sub>2</sub>+IR 组), C 组为 100 μmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 IL-6shRNA 共哺育 IR 细胞 48 h 组(共哺育组, CaCl<sub>2</sub>+IL-6shRNA+IR 组), 采用 Real-time PCR 方法检测 IL-6 mRNA、GLUT mRNA 表达水平, 采用 Western blot 方法检测 AMPK、p38MAPK、IRS-1 和 PI-3K 蛋白表达水平。**结果:** 预实验结果表明, 与不加 CaCl<sub>2</sub> 组比较, 加入不同浓度 CaCl<sub>2</sub> 24 h 后, 培养液上清葡萄糖浓度均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 显微镜下观察可见肌细胞有明显收缩, 且以 100 μmol/L CaCl<sub>2</sub> 最为明显。正式实验 1 结果表明, 与 IR 组比较, IL-6+IR 组 p-AMPK、p-IRS-1、p-PI-3K 蛋白表达水平、GLUT4mRNA 水平、葡萄糖摄取能力均显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), p38MAPK 蛋白表达水平显著降低( $P < 0.01$ ); 与 Control 组比较, IL-6shRNA 组 p-AMPK、p-IRS-1、p-PI-3K 蛋白表达水平、IL-6、GLUT4mRNA 表达水平均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), p38MAPK 蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.01$ )。正式试验 2 结果表明, 与 IR 组比较, CaCl<sub>2</sub>+IR 组 p-AMPK、p-IRS-1、p-PI-3K 蛋白表达水平和 GLUT4mRNA 表达水平均显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), p38MAPK 蛋白表达水平显著降低( $P < 0.01$ ); 与 CaCl<sub>2</sub>+IR 组比较, CaCl<sub>2</sub>+IL-6shRNA+IR 组 p-AMPK、p-IRS-1、p-PI-3K 蛋白表达水平和 GLUT4mRNA 表达水平均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), p38MAPK 蛋白表达水平显著升高( $P < 0.01$ )。**结论:** 外源性钙负荷可以引发肌细胞收缩, 并且肌源性 IL-6 通过激活 AMPK、PI-3K 等信号通路抑制 p38MAPK 信号通路而改善骨骼肌细胞胰岛素抵抗。

**【关键词】** 肌源性白细胞介素 6; 钙负荷; C2C12 细胞系; 胰岛素抵抗

**【中图分类号】** R587.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1000-6834(2024)01-146-007

**【DOI】** 10.12047/j.cjap.6310.2022.099

## Effects of muscle derived-IL-6 on insulin resistance of skeletal muscle cells and its mechanisms

TANG Hui<sup>1</sup>, ZHAO Yi-ping<sup>1</sup>, HUANG Dan<sup>1</sup>, CAI Jian-guang<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>2△</sup>

(1. Department of P. E., Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201; 2. Department of P. E., Renmin University of China, Beijing 100872, China)

**【ABSTRACT】 Objective:** To study the effects of exogenous calcium-load on promoting muscle-derived IL-6 secretion, and regulating AMPK and p38MAPK signal pathway to improve insulin resistance. **Methods:** C2C12 cell lines and palmitic acid-induced insulin resistance C2C12 cell lines were selected as the experimental objects. Preliminary experiment was aimed to determinate the glucose concentrations of culture solutions and observe contraction status of cells under microscope following different calcium concentrations culture 24 h. In the first official experiment, cells were divided into four groups: control group (A group, normal culture solution), IR group (B group, 0.6 mmol/L palmitic acid culture cells 24 h), 1 000 ng/ml IL-6 culture IR B group cells 48 h (IL-6+IR group) and IL-6 shRNA culture A group cells (IL-6shRNA group). In the second official experiment, cells were divided into three groups: IR group (A group), 100 μmol/L CaCl<sub>2</sub> culture IR group cells 48 h (CaCl<sub>2</sub>+IR group) and 100 μmol/L CaCl<sub>2</sub> and IL-6shRNA co-culture IR group cells 48 h (CaCl<sub>2</sub>+IL-6shRNA+IR group). The expression levels of GLUT4 mRNA and IL-6 mRNA were measured by real-time PCR, the protein expression levels of p-AMPK, p-p38MAPK, p-IRS-1 and p-PI-3K were measured by Western blot. **Results:** Preliminary experiment results showed that compared with 0 μmol/L CaCl<sub>2</sub> group, the glucose concentrations were decreased significantly after cells treated with CaCl<sub>2</sub>, at different concentrations. The cell contractions were observed under microscope and the cell contraction was most obvious treated with 100 μmol/L CaCl<sub>2</sub>. The first official experiment results showed that compared with IR group, the contents of p-AMP-activated protein kinase (p-AMPK), p-insulin receptor substrate 1 (p-IRS-1), p-phosphoinositide-3 kinase (p-PI-

3K), the expression level of glucose transporter 4 (GLUT4) mRNA and the glucose uptake of IL-6+IR group were increased significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), the p-p38MAPK protein expression level was decreased significantly ( $P<0.01$ ); Compared with control group, the expression levels of p-AMPK, P-IRS-1, p-PI-3K, the expression level of GLUT4 mRNA and the glucose uptake of IL-6shRNA group were decreased significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), the p-p38MAPK protein expression level was increased significantly ( $P<0.01$ ). The second official experiment results showed that compared with IR group, the expression levels of p-AMPK, P-IRS-1, p-PI-3K, the level of GLUT4 mRNA of  $\text{CaCl}_2$ +IR group were increased significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), the p-p38MAPK protein expression level was decreased significantly ( $P<0.01$ ); Compared with  $\text{CaCl}_2$ +IR group, the contents of p-AMPK, P-IRS-1, p-PI-3K, the expression level of GLUT4 mRNA and the glucose uptake of  $\text{CaCl}_2$ +IL-6 shRNA+IR group were decreased significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), the p-p38MAPK protein expression level was increased significantly ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Exogenous Ca-load can stimulate muscle cells contraction, and exercise-induced IL-6 improves insulin resistance by activating AMPK, PI-3K and inhibiting p38MAPK signal pathway.

**【KEY WORDS】** muscle-derived IL-6; Calcuim-load; C2C12 cell lines; insulin resistant

众所周知,运动可以改善胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR),但其机制还未完全阐明。近年来对“肌因子”的研究有助于人们认识运动改善 IR 的机制。所谓“肌因子”,是指机体运动时,运动器官骨骼肌释放的激素样物质,它可以调节机体运动时的物质代谢和能量代谢,使机体的功能满足运动时的需要<sup>[1]</sup>。第一个被确定的肌因子是白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6)<sup>[2]</sup>。

运动导致机体循环血 IL-6 浓度显著上升<sup>[3]</sup>,并且有研究表明运动时机体 IL-6 的升高大部分来源于骨骼肌。肌源性 IL-6 可以增加骨骼肌对葡萄糖的摄取,增加肝脏葡萄糖输出,促进游离脂肪酸的动员和利用<sup>[4]</sup>。Wallenius 的研究表明,与正常野生型小鼠相比,IL-6 基因缺失小鼠的碳水化合物代谢和脂代谢出现紊乱,在 8 周龄左右出现继发型肥胖和明显的胰岛素抵抗症状,并且低剂量 IL-6 注射能改善此症状<sup>[5]</sup>。上述研究均表明,肌源性 IL-6 对于机体 IR 的改善具有重要作用。然而,到目前为止,肌源性 IL-6 改善 IR 的机制还不十分清楚。

有部分学者对此进行了研究,但绝大部分都是进行在体实验。在离体实验中使培养的肌细胞收缩部分采用电刺激法,然而此方法存在一定的问题。本文在文献的基础上,采用钙负荷法诱发培养肌细胞收缩,探讨肌源性 IL-6 改善 IR 的机制,为临床外源性 IL-6 注射以改善其胰岛素抵抗的应用提供试验资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞

小鼠成肌细胞系 C2C12 来自于 ATCC。使用 10% 胎牛 DMEM 高糖培养基,37℃ 下置于 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。待细胞融合至 80%,用 0.25% 胰酶消化传代后接种 (细胞密度  $5 \times 10^4$ ) 于新的培养孔板,待细胞融合至约 70% 后用于后续实验。每个实验组接种 5 孔,每孔接种 100  $\mu\text{mol/L}$ ,培养 12 h 细胞贴壁后,吸弃培养液,按各实验分组分别加入相应培养液 100  $\mu\text{mol/L}$  继续培养。后续实验分为两部分。

### 1.2 主要试剂及仪器

重组小鼠 IL-6 购自 Sigma,Trizol 购自 Invitrogen (#15596-026),RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas (#K1631),Deoxyribonuclease I (DNase I) 购自 Fermentas (#EN0521),RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor 购自 Fermentas (#EO0381),SYBR GreenPCR Master Mix 购自 ABI (4309155)。一抗为兔 p-p38 抗体,38 kD,购自 Abcam (ab7952); 鼠 p-PI-3K 抗体,85 kD,购自 Abcam (ab22653); 鼠 p-AMPK $\alpha$  抗体,62 kD,购自 CST (2793); 兔 p-IRS-1 抗体,160 kD,购自 SANTA (SC-559); 鼠 GAPDH 抗体,37 kD,购自 ProMab (2005079); 二抗为羊抗兔 IgG/HRP,购自 SCBT (sc-2030); 羊抗鼠 IgG + A + M (H + L)/HRP,购自 ZYMED (#62-64201)。Total protein Extraction Kit 购自 ProMab (SJ-200501)。超净工作台 (苏州安泰空气技术公司)。Real-time PCR 仪 (Bio-Rad 伯乐)。Western blot 仪 (Protein Simple, Wes)。

### 1.3 实验分组

实验 1 为 IL-6 负荷胰岛素抵抗 C2C12 细胞及 IL-6shRNA 转染 C2C12 细胞,分为空白对照组 (Con-

\*【基金项目】国家自然科学基金项目(31250004)

【收稿日期】2022-04-07【修回日期】2022-09-09

△【通讯作者】Tel: 13401042524; E-mail: wyi@bsu.edu.cn

trol 组,正常培养 C2C12 细胞),胰岛素抵抗对照组 (IR 组,0.6 mmol/L 棕榈酸培养 C2C12 细胞组),IL-6 哺育胰岛素抵抗细胞组 (IL-6+IR 组,1 000 ng/ml IL-6 哺育胰岛素抵抗细胞 48 h),IL-6shRNA 组 (IL-6shRNA 组,IL-6shRNA 哺育正常细胞 48 h)。因为本设计的假说是肌源性 IL-6 改善胰岛素抵抗,因此本分组只考虑用 IL-6 哺育胰岛素抵抗骨骼肌细胞,用 IL-6shRNA 哺育空白对照组。

实验 2 为钙负荷胰岛素抵抗 C2C12 细胞和 IL-6shRNA 转染钙负荷胰岛素抵抗 C2C12 细胞,分为胰岛素抵抗对照组 (IR 组,0.6 mmol/L 棕榈酸培养 C2C12 细胞 24 h),钙哺育组 (CaCl<sub>2</sub> + IR 组,100 μmol/L CaCl<sub>2</sub> 哺育 IR 细胞 48 h),共哺育组 (CaCl<sub>2</sub> + IL-6shRNA + IR 组,100 μmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 IL-6shRNA 共哺育 IR 细胞 48 h)。

#### 1.4 C2C12 细胞胰岛素抵抗模型

以 0.6 mmol/L 棕榈酸与 1% 牛血清白蛋白的 DMEM 培养 C2C12 细胞系建立骨骼肌细胞胰岛素抵抗模型 (IR 模型),对照组则没有加入棕榈酸,16 h 后检测葡萄糖转运率,如果转运率的下降率具有统计学意义,表明 IR 模型建立成功。

#### 1.5 钙负荷哺育 C2C12 细胞诱导其收缩模型

10% 胎牛 DMEM 高糖培养基培养细胞,分别加入 0、10、25、50、75、100 μmol/L CaCl<sub>2</sub>,24 h 后检测培养液葡萄糖浓度,并在显微镜下观察 (250 倍) 肌细胞长度,如其出现明显缩短,并且培养液葡萄糖浓度相对于 0 μmol/L CaCl<sub>2</sub> 显著降低,表明钙负荷诱导培养肌细胞收缩。

#### 1.6 IL-6shRNA 载体构建

制备 shRNA 载体时,shRNA 模板中的 loop 结构选用了 TTCAAGAGA 以避免形成终止信号,shRNA 的转录终止序列采用 T6 结构。正义链模板的 5' 端添加了 CACC,与 BbsI 酶切后形成粘端互补;反义链模板的 5' 端添加了 GATC,与 BamHI 酶切后形成粘端互补。我们选择的 IL-6-410 寡核苷酸片段为:5'-GGTCTTCTGGAGTTCGGTTTC-3'; 3'-GAAACG-GAACTCCAGAAGACC-5'。合成的寡核苷酸序列为:正义链:5'-CACCGGTCTTCTGGAGTTC-CGTTTCTTCAAGAGAGAAACGGAAGTCCAGAAGACCTTTTTTG-3';反义链:5'-GATCCAAAAAGGTCT-TCTGGAGTTCGGTTTCTCTTGAAGAAACGGAAC-TCCAGAAGACC-3'。重组 IL-6-410-shRNA 用 BamH I 和 Pst I 酶切后进行测序鉴定。阴性对照载体选用下面序列插入相同位置。阴性对照正义链为:5'-CACCGTCTCCGAACGTGTCACGTCAAGA-

GATTACGTGACACGTTCCGGAGAATTTT TTG-3',反义链为:5'-GATCCAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACG-TAATCTCTTGACGTGACACGTTCCGGAGAAC-3'。具体过程,如细胞培养、寡核苷酸合成、shRNA 模板的退火、pGPU6/GFP/Neo 载体的线性化、pGPU6/GFP/Neo-shRNA 载体的构建、shRNA 转染及 RT-PCR 鉴定略。

#### 1.7 Real-time PCR 检测基因表达水平

采用 TRIzol 试剂盒提取各组的总 RNA,参照试剂盒说明书反转录成 cDNA,每个样品重复 3 次。引物由 primer3.0 软件设计,并由 ProMab 合成。IL-6-F:GGTGACAACCACGGCCTTCCC,IL-6-R:AAGC-CTCCGACTTGTGAAGTGCT; GLUT4-F:TCCCACCA-GACCCGCCCTTT, GLUT4-R:ACTCGCTGC-CGAGGGGGTTC; GAPDH-F:AACCTTGGCATTGTG-GAAGG, GAPDH-R:GGATGCAGGGATGATGTTCT。依照  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因表达水平。

#### 1.8 Western blot 检测蛋白表达水平

取各细胞,分别加 200 μmol/L RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,收集上清液。使用 BCA 法测定蛋白浓度,每个样品取 50 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。利用半干转膜法将细胞蛋白转至 PVDF 膜,将膜置于 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入稀释过的一抗 4℃ 过夜,TBST 洗膜后,加入 HRP 标记的二抗孵育 1 h。TBST 洗膜后再加入 ECL 发光液进行显影并拍照。采用 Image J 软件对目的蛋白和内参蛋白条带的灰度值进行分析,以二者的比值作为蛋白表达相对量,所有实验独立重复 3 次。

#### 1.9 统计学处理

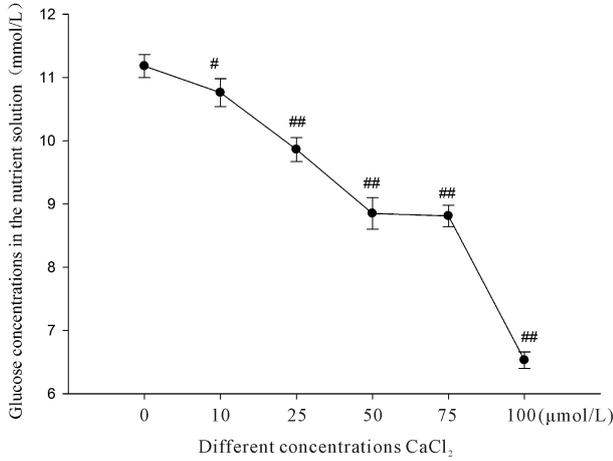
所有数据均以“平均数±标准差”(x̄±s)表示。统计分析使用 SPSS 11.5 和 Sigmaplot 9.0 版本统计分析软件完成。各组之间的指标比较先进行方差齐性检验,方差齐者采用单因素方差分析,如具有显著性,则在两组之间采用 *t* 检验;如方差不齐,则采用多个独立样本非参数检验。

## 2 结果

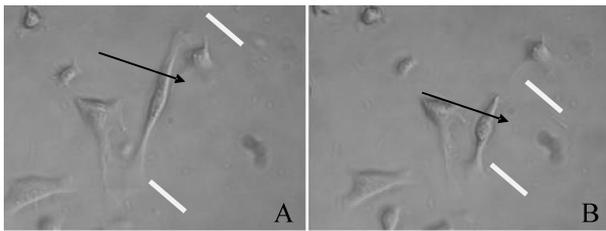
### 2.1 CaCl<sub>2</sub> 负荷 C2C12 细胞诱导其收缩模型的建立

图 1 表明,与不加 CaCl<sub>2</sub> (0 μmol/L) 相比,10、25、50、75 和 100 μmol/L CaCl<sub>2</sub> 培养 C2C12 细胞 24 h 后,培养液上清葡萄糖浓度均显著降低 (*P*<0.05 或 *P*<0.01)。图 2 表明,100 μmol/L CaCl<sub>2</sub> 负荷 C2C12 细胞时,可以清楚地看到肌细胞的收缩 (其它浓度的钙负荷也能引起肌细胞收缩,只是没有这

么明显,因而没有在此显示)。由于肌细胞收缩需要摄取培养液葡萄糖作为能量,因此本结果从另一方面证明,这些浓度的CaCl<sub>2</sub>培养C2C12细胞,均能引起细胞收缩。根据这两个结果,正式实验采用100 μmol/L CaCl<sub>2</sub>哺育进行研究。



**Fig. 1** The glucose concentration in nutrient solution following different concentration CaCl<sub>2</sub> 24 h culture  
#*P*<0.05, ##*P*<0.01 vs 0 μmol/L



**Fig. 2** 100 μmol/L CaCl<sub>2</sub> load C2C12 (Uncoulored ×250)  
A: Before CaCl<sub>2</sub> load; B: After CaCl<sub>2</sub> load

### 2.2 IL-6 对胰岛素抵抗 C2C12 细胞相关基因和蛋白表达的影响

表 1,2 和图 3 表明,与 IR 对照组相比,IL-6+IR 组 p-AMPK、p-IRS-1、p-PI-3K 蛋白含量、GLUT4 mRNA 水平、葡萄糖摄取能力显著升高 (*P*<0.05 或 *P*<0.01), p38MAPK 蛋白含量显著降低 (*P*<0.01)。该结果表明,IL-6 显著激活胰岛素抵抗肌细胞的 AMPK 信号、抑制 p38MAPK 信号,显著提高胰岛素

**Tab. 2** The p-AMPK, p-p38MAPK, p-IRS-1 and p-PI-3K protein expression levels in C2C12 cells ( $\bar{x}\pm s$ , *n*=5)

Group	p-AMPK	p-p38MAPK	p-IRS-1	p-PI-3K
Control	196.32±48.51	61.82±21.35	176.39±53.01	125.13±45.88
IR	58.95±18.12 <sup>##</sup>	163.21±19.43 <sup>##</sup>	45.30±21.12 <sup>##</sup>	36.09±14.27 <sup>##</sup>
IL-6+IR	143.45±26.76 <sup>###</sup>	82.97±24.33 <sup>###</sup>	113.68±29.43 <sup>###</sup>	88.14±18.22 <sup>###</sup>
IL-6shRNA	82.34±21.43 <sup>###</sup>	182.56±31.87 <sup>###</sup>	50.24±17.67 <sup>##</sup>	30.93±11.36 <sup>##</sup>

IR: Insulin resistance; IL-6: Interleukin-6

#*P*<0.05, ##*P*<0.01 vs control group; \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 vs IR group

### 2.3 钙负荷或和 IL-6shRNA 对胰岛素抵抗 C2C12 细胞相关基因和蛋白表达的影响

如表 3,4 和图 4 所示,与 IR 组相比,钙哺育组

抵抗肌细胞的葡萄糖转运和摄取能力,激活胰岛素抵抗肌细胞的胰岛素信号通路和胰岛素敏感性。

与 Control 组相比,IL-6shRNA 组 p-AMPK、p-IRS-1、p-PI-3K 蛋白含量,IL-6、GLUT4 mRNA 水平、葡萄糖摄取能力显著降低 (*P*<0.05 或 *P*<0.01), p38MAPK 蛋白含量显著升高 (*P*<0.01)。该结果表明,IL-6 基因沉默显著抑制胰岛素抵抗肌细胞的 AMPK 信号、激活 p38MAPK 信号,显著降低胰岛素抵抗肌细胞的葡萄糖转运和摄取能力,降低胰岛素抵抗肌细胞的胰岛素敏感性。

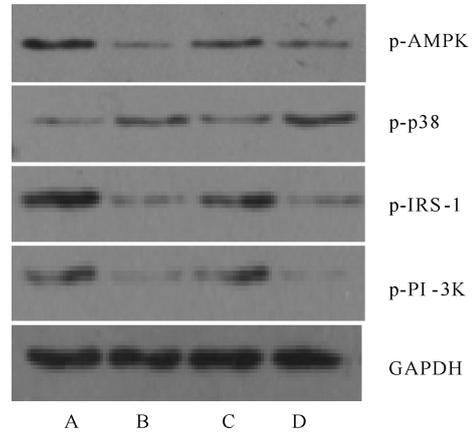
**Tab. 1** The glucose concentrations in nutrient solution, IL-6 mRNA and GLUT4 mRNA expression levels in C2C12 cells ( $\bar{x}\pm s$ , *n*=5)

Group	Glucose (mmol/L)	IL-6 mRNA (/GAPDH)	GLUT4 mRNA (/GAPDH)
Control	11.25±1.67	4.95±1.25	11.59±1.71
IR	19.06±2.52 <sup>##</sup>	4.18±1.79 <sup>#</sup>	1.67±1.00 <sup>##</sup>
IL-6+IR	11.90±2.08 <sup>**</sup>	4.61±1.66	6.96±2.61 <sup>###</sup>
IL-6shRNA	18.53±1.81 <sup>##</sup>	1.34±0.35 <sup>###</sup>	4.19±0.58 <sup>###</sup>

IR: Insulin resistance; IL-6: Interleukin-6

#*P*<0.05, ##*P*<0.01 vs control group; \**P*<0.05, \*\**P*<

0.01 vs IR group



**Fig. 3** The protein expressions of p-AMPK, p-p38MAPK, p-IRS-1 and p-PI-3K determined by Western blot  
IR: Insulin resistance; IL-6: Interleukin-6  
A: Control group; B: IR group; C: IL-6+IR group; D: IL-6shRNA group

(CaCl<sub>2</sub>+IR 组) p-AMPK、p-IRS-1、p-PI-3K 蛋白含量和 GLUT4 mRNA 水平显著升高 (*P*<0.01), p38MAPK 蛋白含量显著降低 (*P*<0.01)。该结果表明,钙负荷

诱导肌细胞收缩会导致胰岛素抵抗肌细胞的 AMPK 信号激活, p38MAPK 信号抑制, 同时摄取葡萄糖能力增强, 胰岛素信号通路激活, 胰岛素敏感性增加。

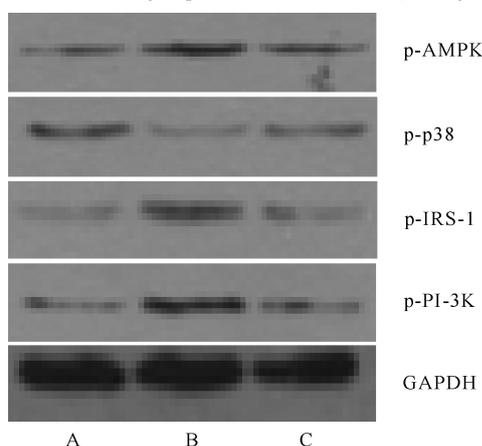
与钙哺育组 (CaCl<sub>2</sub> + IR 组) 相比, 共哺育组 (CaCl<sub>2</sub> + IL-6shRNA + IR 组) p-AMPK、p-IRS-1、p-PI-3K 蛋白含量和 IL-6、GLUT4 mRNA 水平显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), p38MAPK 蛋白含量显著升高 ( $P < 0.01$ )。该结果表明, 当 IL-6 基因沉默时, 钙负荷诱导胰岛素抵抗肌细胞收缩引起的胰岛素敏感性

**Tab. 4** The protein expression levels of p-AMPK, p-p38MAPK, p-IRS-1 and p-PI-3K in C2C12 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Group	p-AMPK	p-p38MAPK	p-IRS-1	p-PI-3K
IR	61.17 ± 17.83	165.01 ± 18.65	46.12 ± 20.88	34.96 ± 15.12
CaCl <sub>2</sub> + IR	144.32 ± 51.32 <sup>##</sup>	47.14 ± 26.17 <sup>##</sup>	132.42 ± 28.47 <sup>##</sup>	164.02 ± 31.63 <sup>##</sup>
CaCl <sub>2</sub> + IL-6shRNA + IR	79.74 ± 20.15 <sup>##**</sup>	128.56 ± 30.22 <sup>**</sup>	61.26 ± 18.51 <sup>##**</sup>	37.11 ± 13.93 <sup>**</sup>

IR: Insulin resistance; IL-6: Interleukin-6

<sup>##</sup>  $P < 0.01$  vs IR group; <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs CaCl<sub>2</sub> + IR group



**Fig. 4** The protein expressions of p-AMPK, p-p38MAPK, p-IRS-1 and p-PI-3K determined by Western blot

IR: Insulin resistance; IL-6: Interleukin-6

A: IR group; B: CaCl<sub>2</sub> + IR group; C: CaCl<sub>2</sub> + IL-6shRNA + IR group

### 3 讨论

在体试验中, 引起机体胰岛素抵抗一般是通过高脂饮食或高能量饮食与链脲霉素诱导而形成。在离体肌细胞试验中, 则一般是通过棕榈酸培养而诱导形成<sup>[6]</sup>。本文参照国内外研究报道, 采用棕榈酸诱导形成 C2C12 细胞胰岛素抵抗。通过个预实验发现, 当棕榈酸浓度达到 0.6 mmol/L 时, 培养液葡萄糖浓度的降低开始变得比较平稳。因此在后面的正式试验中采取此浓度来形成 C2C12 细胞胰岛素抵抗。

运动诱导骨骼肌释放的 IL-6 可以通过自分泌促进骨骼肌对葡萄糖的摄取, 但是很少看到离体实验的报道。因此, 刺激离体培养的肌细胞收缩而导

增加效应显著降低, 此时 AMPK 信号抑制, p38MAPK 信号激活。

**Tab. 3** The IL-6 mRNA and GLUT4 mRNA expression levels in C2C12 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Group	IL-6mRNA	GLUT4mRNA
IR	4.12 ± 1.54	1.71 ± 0.92
CaCl <sub>2</sub> + IR	4.25 ± 1.39	4.53 ± 1.08 <sup>##</sup>
CaCl <sub>2</sub> + IL-6shRNA + IR	1.83 ± 0.42 <sup>##**</sup>	2.91 ± 0.83 <sup>##**</sup>

IR: Insulin resistance; IL-6: Interleukin-6

<sup>##</sup>  $P < 0.01$  vs IR group; <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs CaCl<sub>2</sub> + IR group

致 IL-6 释放成为本研究需重点解决的问题。目前刺激离体 C2C12 细胞收缩的主要方法是低频电刺激<sup>[7]</sup>。然而, 人体骨骼肌收缩是神经兴奋传到神经肌肉接头, 通过化学递质将兴奋传到肌细胞, 引起肌浆网钙离子释放, 最终导致肌肉收缩。直接利用电刺激肌细胞导致其收缩并不太符合生理规律。细胞在激动时, 细胞内游离的 Ca<sup>2+</sup> 呈双相升高, 其来源为内储的 Ca<sup>2+</sup> 释放和胞外 Ca<sup>2+</sup> 内流。在体状态下, 骨骼肌收缩的激发主要是由于内质网 Ca<sup>2+</sup> 的释放, 而心肌细胞的收缩则在很大程度上依赖于胞外 Ca<sup>2+</sup> 的内流。在肌细胞中, 胞外 Ca<sup>2+</sup> 内流主要依赖电压依赖性钙离子通道 (voltage dependent calcium channel, VDCC), 骨骼肌细胞中主要是 L 型, 其特点是激活后, 开放时间较长, 失活慢。VDCC 的激活由诸如环核苷酸、脂类衍生物或 Ca<sup>2+</sup> 本身等介质所调节, 这些介质或者使 Ca<sup>2+</sup> 通道由静息状态转化为活化状态, 或者在接受兴奋性电刺激后调整 Ca<sup>2+</sup> 通道的活性<sup>[8]</sup>。因此, 钙离子负荷和电刺激引起肌细胞收缩的原理可能是一样的。通过预实验发现, 在显微镜下可以清晰地看到 100 μmol/L 钙负荷时肌细胞的收缩, 并且钙负荷 24 h 后培养液葡萄糖浓度与 0 μmol/L 钙负荷相比显著降低也间接地证明钙负荷可以导致培养的肌细胞收缩。因此, 在正式试验中, 我们选取 100 μmol/L 钙负荷 C2C12 细胞导致其收缩。

本项目组以前的报道表明, IL-6shRNA 可以在体抑制 IL-6 基因的表达<sup>[4]</sup>。Leslie 等人也用 IL-6shRNA 转染 Ha-rasV12 转化的乳腺上皮细胞使其 IL-6 基因沉默<sup>[9]</sup>。以前的实验结果均表明, IL-6 的在体或离体 RNA 干扰均可以导致 IL-6 基因的沉

默。通过预实验发现, IL-6shRNA 转染培养的 C2C12 肌细胞, 可以显著降低 IL-6 基因的表达和 IL-6 蛋白含量。虽然本实验结果发现钙哺育 IRC2C12 细胞没有引起肌细胞 IL-6mRNA 的升高, 但是用钙负荷与 IL-6shRNA 共哺育却导致 AMPK 等信号通路的显著抑制和 p38MAPK 通路的显著激活。此原因可能与实验对象是 IR 肌细胞, 不是正常肌细胞, 而胰岛素抵抗肌细胞可能对运动促进 IL-6 释放的敏感性要低。

PI-3K 是胰岛素信号的经典通路。胰岛素首先与细胞表面胰岛素受体结合, 激活其  $\beta$  亚基的蛋白酪氨酸激酶。IRS 作为一种锚定蛋白, 与含肉瘤同源区段 2 (src homology 2 domain, SH2) 结构域的信号分子结合激活 PI-3K 途径。而骨骼肌胰岛素敏感性最终与 GLUT4 的含量有关。机体出现胰岛素抵抗症状时, 各组织的 PI-3K 和 IRS 的磷酸化显著降低<sup>[10]</sup>, GLUT4 基因表达降低<sup>[11]</sup>, 葡萄糖摄取能力降低。有研究表明, 运动或身体活动改善机体的胰岛素抵抗与激活 IRS-1/PI-3K/Akt 途径<sup>[12,13]</sup> 和 GLUT4 表达<sup>[14]</sup> 有关。实验 1 结果表明, 棕榈酸诱导形成 C2C12 细胞出现胰岛素抵抗时, IRS-1/PI-3K 信号显著抑制, GLUT4 表达显著降低, 葡萄糖摄取显著减少。用 IL-6 哺育胰岛素抵抗 C2C12 细胞 24 h 后, 这些指标均显著增加。当用 IL-6shRNA 转染正常 C2C12 细胞时, 这些指标显著降低。该结果表明, IL-6 在离体状况下可以激活 IRS-1/PI-3K 信号通路, 提高 GLUT4 的表达, 增加肌细胞对葡萄糖的摄取, 提高骨骼肌的胰岛素敏感性, 改善骨骼肌的胰岛素抵抗。但是正式实验 1 的结果并不能说明 IL-6 是由肌肉收缩(运动)而导致骨骼肌分泌的。在正式实验 2 中, 我们利用钙负荷诱导培养的肌细胞收缩, 发现肌肉收缩可以导致胰岛素抵抗 C2C12 细胞 IRS-1/PI-3K 信号显著激活, GLUT4 基因表达显著增加。但是用 IL-6shRNA 转染 48 h 后, 这种激活效应被显著抑制。因此, 肌肉收缩(运动)通过 IL-6 激活肌细胞的 IRS-1/PI-3K 信号通路, 提高肌细胞 GLUT4 的基因表达, 增加肌细胞对葡萄糖的摄取, 提高肌细胞的胰岛素敏感性, 从而改善肌细胞的胰岛素抵抗。

AMPK 与胰岛素抵抗关系十分密切。研究表明, AMPK 能磷酸化 IRS-1 的第 789 位丝氨酸, 这种磷酸化加强胰岛素的信号传导<sup>[15]</sup>。AMPK 的激活可通过减少胰岛  $\beta$  细胞的脂毒性和抗  $\beta$  细胞凋亡来改善  $\beta$  细胞功能。AMPK 的激活还可以增加肌肉对葡萄糖的摄入, 减少肝脏葡萄糖的产生与输出, 增

加脂肪酸的氧化。还有研究表明, AMPK 的激活可以持续性激活 IRS-1/PI-3K/Akt 信号通路<sup>[16]</sup>。运动时, 随着钙离子从肌浆网的释放和细胞内能源物质的消耗, 可以通过细胞内钙离子浓度的升高或/和 AMP/ATP 比值而激活 AMPK。前面的结果发现, 肌肉收缩(运动)释放的 IL-6 能激活 IRS-1/PI-3K 信号通路, 提高骨骼肌 GLUT4 的基因表达, 增加骨骼肌对葡萄糖的摄取, 提高骨骼肌的胰岛素敏感性, 从而改善骨骼肌的胰岛素抵抗。那么 IL-6 的这种改善作用是否通过 AMPK 信号而起作用呢? 试验 1 结果表明, 棕榈酸形成 C2C12 胰岛素抵抗导致 p-AMPK 显著降低, 胰岛素敏感性降低。IL-6 哺育胰岛素抵抗 C2C12 细胞 24 h 后, p-AMPK 显著升高, 胰岛素敏感性也显著升高。并且 IL-6shRNA 转染 C2C12 正常肌细胞也显著降低 p-AMPK 含量和胰岛素敏感性。实验 2 结果表明, 钙负荷胰岛素抵抗 C2C12 细胞显著增加 p-AMPK 含量, 提高肌细胞的胰岛素敏感性。但是 IL-6shRNA 转染钙负荷胰岛素抵抗 C2C12 细胞 48 h 后, p-AMPK 含量显著降低, 胰岛素敏感性也显著降低。因此, IL-6 通过激活肌细胞的 AMPK 信号通路而提高肌细胞的胰岛素敏感性, 改善肌细胞的胰岛素抵抗。

作为一种应激激活的蛋白激酶, p38MAPK 参与机体炎症、应激、细胞周期和凋亡等生理病理过程, 并且主要介导应激反应<sup>[17,18]</sup>。p38MAPK 的激活与胰岛素抵抗的形成关系十分密切。高糖可以激活 p38MAPK, 但是 PKC 的抑制剂不能阻止高糖引起的 p38MAPK 的升高。PRDX-1 能够通过激活 p38MAPK 而诱发肝脏胰岛素抵抗, 表明 p38MAPK 的激活与肝细胞胰岛素抵抗形成有关<sup>[19]</sup>。有研究发现, 在高脂饮食形成肥胖的过程中, 精氨酸酶 II 引起的 eNOS 解偶联是通过激活 p38MAPK 而起作用的。由此可见, p38MAPK 的激活是胰岛素抵抗形成的关键因素之一。目前, p38MAPK 已经作为一个治疗糖尿病有关的肾病等并发症的靶点引起了人们较大的兴趣。运动是否激活 p38MAPK 信号通路还存在争议。有实验表明, 不同形式的肌肉收缩激活 p38MAPK 信号通路<sup>[20]</sup>, 然而, 也有研究表明, 正常大鼠和人体耐力运动后 48 h 骨骼肌 p38 蛋白含量和活性均显著降低<sup>[21]</sup>。实验 1 结果表明, 棕榈酸形成 C2C12 胰岛素抵抗导致 p-p38MAPK 显著升高, 胰岛素敏感性降低。IL-6 哺育胰岛素抵抗 C2C12 细胞 24 h 后, p-p38MAPK 显著降低, 胰岛素敏感性也显著升高。并且 IL-6shRNA 转染 C2C12 正常肌细胞也显著升高 p-p38MAPK 含量和降低胰岛素敏

感性。实验2结果表明,钙负荷胰岛素抵抗 C2C12 细胞显著降低 p-p38MAPK 含量,提高肌细胞的胰岛素敏感性。但是 IL-6shRNA 转染钙负荷胰岛素抵抗 C2C12 细胞 48 h 后, p-p38MAPK 含量显著升高,胰岛素敏感性也显著降低。因此,可以确定,IL-6 通过抑制肌细胞的 p-p38MAPK 信号通路而提高肌细胞的胰岛素敏感性,改善肌细胞的胰岛素抵抗。

综上所述:外源性钙负荷可以引发培养的肌细胞收缩。肌源性 IL-6 能激活肌细胞的 IRS-1/PI-3K 信号通路,提高肌细胞 GLUT4 的基因表达,增加肌细胞对葡萄糖的摄取,提高肌细胞的胰岛素敏感性,从而改善肌细胞的胰岛素抵抗,并且这种改善胰岛素抵抗的作用与激活 AMPK 信号通路,抑制 p38MAPK 信号通路有关。

### 【参考文献】

- [1] Suriano F, Van Hul M, Cani PD. Gut microbiota and regulation of myokine-adipokine function[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2020, 52(5): 9-17.
- [2] Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6[J]. *Physiol Rev*, 2008, 88(4): 1379-1406.
- [3] 宋博雅, 郝选明. 运动干预对衰老模型大鼠血清炎症因子水平的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(1): 42-44.
- [4] Tang H, Xie MH, Lei Y, et al. The roles of aerobic exercise training and suppression IL-6 gene expression by RNA interference in the development of insulin resistance [J]. *Cytokine*, 2013, 61(2): 394-405.
- [5] Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity [J]. *Nat Med*, 2002, 8(1): 75-79.
- [6] 姜少颖, 刘毅, 陈伟华, 等. 蒲黄总黄酮抑制棕榈酸培养下 C2C12 骨骼肌细胞白细胞介素 6 的表达 [J]. *中西医结合学报*, 2008, 6(5): 488-492.
- [7] Marotta M, Bragós R, Gómez-Foix AM. Design and performance of an electrical stimulator for long-term contraction of cultured muscle cells [J]. *Biotechniques*, 2004, 36(1): 68-73.
- [8] Oliveira AG, Guimaraes ES, Andrade LM, et al. Decoding calcium signaling across the nucleus [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2014, 29(5): 361-368.
- [9] Leslie K, Gao SP, Berishaj M, et al. Differential interleukin-6/Stat3 signaling as a function of cellular context mediates Ras-induced transformation [J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(5): R80.
- [10] Pandey J, Dev K, Chattopadhyay S, et al.  $\beta$ -Sitosterol-D-Glucopyranoside mimics estrogenic properties and stimulates glucose utilization in skeletal muscle cells [J]. *Molecules*, 2021, 26(11): 3129.
- [11] Bagul PK, Banerjee SK. Application of resveratrol in diabetes: rationale, strategies and challenges [J]. *Curr Mol Med*, 2015, 15(4): 312-330.
- [12] Zhang QJ, Li QX, Zhang HF, et al. Swim training sensitizes myocardial response to insulin; role of Akt-dependent eNOS activation [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 75(2): 369-380.
- [13] Chen MJ, Ivy AS, Russo-Neustadt AA. Nitric oxide synthesis is required for exercise-induced increases in hippocampal BDNF and phosphatidylinositol 3' kinase expression [J]. *Brain Res Bull*, 2006, 68(4): 257-268.
- [14] Flores-Opazo M, McGee SL, Hargreaves M. Exercise and GLUT4 [J]. *Exerc Sport Sci Rev*, 2020, 48(3): 110-118.
- [15] Kaur H, Moreau R. Curcumin represses mTORC1 signaling in Caco-2 cells by a two-sided mechanism involving the loss of IRS-1 and activation of AMPK [J]. *Cell Signal*, 2021, 78(2): 109842.
- [16] Efsun Antmen S, Canacankatan N, Gürses İ, et al. Relevance of lipogenesis and AMPK/Akt/mTOR signaling pathway in endometrial cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(2): 687-695.
- [17] Yadav RK, Minz E, Mehan S. Understanding abnormal c-JNK/p38MAPK signaling in amyotrophic lateral sclerosis: Potential drug targets and influences on neurological disorders [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2021, 20(5): 417-429.
- [18] 赵嘉涵, 贾雨涵, 汤雅婷, 等. 参麦注射液对肠缺血/再灌注肺损伤大鼠肺组织 p38MAPK 及凋亡相关基因表达的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2019, 35(1): 65-68.
- [19] Tang Z, Xia N, Yuan X, et al. PRDX1 is involved in palmitate induced insulin resistance via regulating the activity of p38MAPK in HepG2 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 465(4): 670-677.
- [20] Pieri BL, Souza DR, Luciano TF, et al. Effects of physical exercise on the P38MAPK/REDD1/14-3-3 pathways in the myocardium of diet-induced obesity rats [J]. *Horm Metab Res*, 2014, 46(9): 621-627.
- [21] Wen C, Ying Y, Zhao H, et al. Resistance exercise affects catheter-related thrombosis in rats through miR-92a-3p, oxidative stress and the MAPK/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2021, 21(1): 440.