

北京市属高等学校高层次人才引进与培养计划项目资助 (CIT&TCD201504086)
国家自然科学基金资助 (No.30570897)

不同能量状态下运动诱导 肌源性 IL-6 表达的 机制研究

BUTONG NENGLIANGZHUANGTAIXIA YUNDONGYOU DAO
JIYUANXING IL-6 BIAODA DE JIZHIYANJIU

张雪琳◎著

北京体育大学出版社

北京市属高等学校高层次人才引进与培养计划项目资助 (CIT&TCD201504086)
国家自然科学基金资助 (No.30570897)

不同能量状态下运动诱导肌源性 IL-6表达的机制研究

张雪琳 著

北京体育大学出版社

策划编辑: 钱春华 郑春竹
责任编辑: 钱春华
审稿编辑: 李 飞
责任校对: 李志诚 宋海昕 孙志宏
排版设计: 李 鹤 曹 诤

图书在版编目(CIP)数据

不同能量状态下运动诱导肌源性IL-6表达的机制研究/
张雪琳著. — 北京: 北京体育大学出版社, 2017.11
ISBN 978-7-5644-2775-7

I. ①不… II. ①张… III. ①运动生物化学 IV.
①G804.7

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第277074号

不同能量状态下运动诱导肌源性IL-6表达的机制研究

张雪琳 著

出 版: 北京体育大学出版社
地 址: 北京市海淀区信息路48号
邮 编: 100084
邮 购 部: 北京体育大学出版社读者服务部 010-62989432
发 行 部: 010-62989320
网 址: <http://cbs.bsu.edu.cn/>
印 刷: 北京京华虎彩印刷有限公司
开 本: 710×1000毫米 1/16
印 张: 6.5
字 数: 120千字

2017年12月第1版第1次印刷

定 价: 28.00 元

(本书因印制装订质量不合格本社发行部负责调换)

目 录

摘 要 / 1

1 前 言 / 5

2 文献综述 / 7

2.1 IL-6的生物学特性	7
2.1.1 IL-6 的分子特征	7
2.1.2 IL-6 受体系统与信号转导	8
2.1.3 IL-6的主要生物学功能	8
2.2 运动与肌源性IL-6	9
2.2.1 运动对机体IL-6水平的影响	9
2.2.2 运动时IL-6的主要来源——骨骼肌	12
2.3 肌源性IL-6在能量代谢调控中的生物学作用	13
2.3.1 肌源性IL-6促进脂代谢	13
2.3.2 肌源性IL-6促进肝脏葡萄糖输出	14
2.3.3 肌源性IL-6调节骨骼肌糖代谢	14
2.4 不同能量状态下运动诱导肌源性IL-6表达的信号调控机制	15
2.4.1 不同能量状态对运动诱导肌源性IL-6表达的影响	15
2.4.2 与不同能量状态下运动诱导肌源性IL-6表达有关的信号通路	16
2.5 成肌细胞在运动医学研究中的应用	22
2.5.1 成肌细胞的生物学特性	22
2.5.2 成肌细胞在肌肉骨骼系统疾病基因治疗中的应用	22
2.5.3 成肌细胞在骨骼肌基础研究中的应用	26
2.6 选题依据及实验总体设计	27
2.6.1 选题依据	27
2.6.2 实验总体设计	28

3 研究方法 / 31

3.1 实验材料与仪器	31
3.1.1 实验材料	31
3.1.2 主要试剂与耗材	31
3.1.3 主要仪器	32
3.2 实验方法	33
3.2.1 C2C12小鼠骨骼肌成肌细胞增殖及诱导分化培养	33
3.2.2 糖剥夺对C2C12细胞IL-6表达水平影响的实验方案	34
3.2.3 糖剥夺状态下抑制相关信号转导通路对IL-6表达水平影响的 实验方案	35
3.2.4 Real-Time PCR测定C2C12细胞IL-6mRNA表达水平	37
3.2.5 双抗夹心ELISA 法测定C2C12细胞培养基IL-6蛋白浓度	40
3.3 统计学处理	42

4 实验结果 / 43

4.1 C2C12小鼠骨骼肌成肌细胞增殖及诱导分化培养	43
4.2 糖剥夺对C2C12细胞IL-6表达水平的影响	46
4.2.1 糖剥夺对C2C12细胞IL-6mRNA表达水平的影响	46
4.2.2 糖剥夺对C2C12细胞IL-6蛋白水平的影响	47
4.3 糖剥夺状态下抑制相关信号通路对C2C12细胞IL-6表达水平的 影响	48
4.3.1 糖剥夺状态下抑制ROS信号通路对C2C12细胞IL-6表达水平的 影响	48
4.3.2 糖剥夺状态下抑制p38MAPK信号通路对C2C12细胞IL-6表达 水平的影响	49
4.3.3 糖剥夺状态下抑制NF- κ B信号通路对C2C12细胞IL-6表达 水平的影响	50
4.3.4 糖剥夺状态下抑制不同信号通路对C2C12细胞IL-6表达 水平影响的比较	52

5 讨论 / 54

- 5.1 C2C12小鼠骨骼肌成肌细胞诱导分化模型的建立 54
- 5.2 糖剥夺状态下肌源性IL-6表达及释放的规律 55
- 5.3 糖剥夺状态下调控肌源性IL-6表达的信号转导机制 57
 - 5.3.1 糖剥夺状态下ROS信号通路对肌源性IL-6表达的影响 57
 - 5.3.2 糖剥夺状态下p38MAPK信号通路对肌源性IL-6表达的影响 ... 58
 - 5.3.3 糖剥夺状态下NF- κ B信号通路对肌源性IL-6表达的影响 60
 - 5.3.4 糖剥夺状态下调控肌源性IL-6表达的信号转导机制 61
- 5.4 小结 63

6 结论与展望 / 65

- 6.1 结论 65
- 6.2 展望 65

7 参考文献 / 66

8 主要缩略词表 / 78

9 附录 / 79

致谢 / 92

摘要

目的: IL-6是一种多效的细胞因子,运动时IL-6主要来源于骨骼肌。本研究以体外培养的C2C12小鼠骨骼肌成肌细胞为模型,观察糖剥夺(Glucose deprivation, GD)对肌源性IL-6基因表达和蛋白水平的影响,探讨糖剥夺状态下诱导肌源性IL-6表达的信号调控机制。

方法: (1) 培养C2C12细胞,诱导分化为成熟的肌管细胞。(2) 以含葡萄糖4.5g/L(对照GC组)和不含葡萄糖(糖剥夺GD组)培养基处理细胞0、6、12、18、24小时,分别采用Real-Time PCR和双抗夹心ELISA方法测定细胞IL-6mRNA和培养液中IL-6蛋白水平。(3) GD状态下,分别加入ROS清除剂(NAC)、p38MAPK抑制剂(SB203580)和NF- κ B抑制剂(NF- κ B Activation Inhibitor)阻断与IL-6表达有关的信号通路,ELISA检测24小时后IL-6蛋白水平。

结果: (1) GD组所有时间点IL-6mRNA表达均高于GC组,其中在18和24小时差异具有显著性($p<0.05$)。(2) GC及GD组IL-6蛋白水平均自0~24小时逐渐升高;自6小时起GD组所有时间点IL-6蛋白水平均高于GC组($p<0.05$)。(3) GC+NAC组较GC组、GD+NAC组较GD组IL-6蛋白水平均显著降低(均 $p<0.01$);糖剥夺与NAC之间存在交互作用($p<0.01$),NAC(RoS清除剂)可抑制GC和GD状态下IL-6表达。(4) GC+SB203580组较GC组、GD+SB203580组较GD组IL-6蛋白水平显著降低($p<0.01$),糖剥夺与SB203580之间存在交互作用($p<0.01$),SB203580(p38MAPK抑制剂)可抑制GC和GD状态下IL-6表达。(5) NF- κ B抑制剂对IL-6蛋白水平无显著性影响($p>0.05$)。

结论: (1) 体外培养C2C12小鼠骨骼肌成肌细胞诱导分化模型成功建立,可用于糖剥夺对IL-6表达影响及其调控机制研究。(2) 正常培养的C2C12细胞存在IL-6基因表达和蛋白释放现象,糖剥夺可增强IL-6基因表达和蛋白释放。(3) 糖剥夺诱导的肌源性IL-6表达是多条信号通路共同作用的结果,ROS和p38MAPK信号通路在糖剥夺诱导肌源性IL-6表达的信号调控过程

中起到主要作用。(4) NF- κ B信号通路在糖剥夺诱导的肌源性IL-6表达的信号调控过程中不起主要作用。

关键词: C2C12细胞; 糖剥夺; 肌源性IL-6; p38MAPK; ROS; NF- κ B

ABSTRACT

Objective: IL-6 is a pleiotropic cytokine secreted by many different cell types and skeletal muscles, which is an important source of IL-6 during exercises. The purpose of present research was to explore the effect of glucose deprivation on skeletal muscle-derived IL-6 expression and its signaling regulation in C2C12 cell model in vitro.

Methods: (1) C2C12 mouse myoblast was differentiated into matured myotube. (2) C2C12 myotubes were cultured in DMEM medium containing 4.5 g/L glucose (glucose control, GC) or DMEM medium containing no glucose (glucose deprivation, GD) for 0, 6, 12, 18 and 24 hours. IL-6mRNA level of C2C12 was measured by Real-Time PCR and IL-6 protein level in medium was measured by ELISA. (3) C2C12 myotubes were incubated with 10mM NAC (a ROS scavenger), 10 μ M SB203580 (a p38MAPK inhibitor) or 10 μ M NF- κ B Activation Inhibitor under either GC or GD conditions to 24 hours later. IL-6 protein levels in the medium were measured using ELISA.

Results: (1) Compared with GC, IL-6mRNA expression was increased by GD at 18h and 24h ($p<0.05$). (2) Both GC and GD IL-6 protein level was increased gradually from 0h to 24h. As compared to GC, IL-6 protein level in medium was increased in GD at all time ($p<0.05$). (3) IL-6 protein level in GC+NAC decreased compared with GC ($p<0.01$). Also, its level in GD+NAC decreased compared with GD significantly ($p<0.01$). Thus, NAC (ROS scavenger) could inhibit IL-6 protein level at the condition of GC and GD. (4) IL-6 protein level in GC+SB203580 decreased compared with GC significantly ($p<0.01$) and its level in GD+ SB203580 decreased compared with GD ($p<0.01$). Thus, SB203580 (p38MAPK inhibitor) could inhibit IL-6 protein level at the condition of GC and GD ($p<0.01$). (5) NF- κ B Activation Inhibitor had no significantly effect on IL-6 protein level ($p>0.05$).

Conclusions: (1) C2C12 cell model in vitro can be used to study glucose deprivation on skeletal muscle-derived IL-6 expression and its signaling regulation. (2) As compared to control, Glucose deprivation was able to enhance skeletal muscle-

derived IL-6 expression and release. (3) Skeletal muscle-derived IL-6 expression was mainly induced by both ROS and p38MAPK pathways. (4) NF- κ B pathway wasn't primary cause in the regulation of skeletal muscle-derived IL-6 expression.

Key Words: C2C12, glucose deprivation, skeletal muscle-derived IL-6, p38MAPK, ROS, NF- κ B

1 前言

白细胞介素6 (Interleukin-6, IL-6) 是一个包含白血病抑制因子、IL-11、纤毛嗜神经因子、制瘤素等细胞因子的家族成员之一, 这个家族的相似结构是螺旋状蛋白质和共用的受体亚单位 (跨膜糖蛋白130, gp130) [1]。多种细胞均能产生IL-6, IL-6的受体分布也极其广泛, 没有严格的靶细胞特异性。因此, IL-6具有广泛的生物学功能。

1991年Northoff等人 [2] 研究发现, 运动可以引起循环血中IL-6水平升高。随后陆续有研究表明, 循环血中IL-6水平受运动方式、强度和持续时间等多种因素的影响 [3]。虽然对于运动时IL-6的来源还存在着一定的争议, 但大部分研究者认为, 运动时IL-6的大幅度增加主要来源于运动器官——骨骼肌。这一发现改变了人们对骨骼肌的传统认识, 即: 骨骼肌不仅是一个单纯的运动器官, 它同时还具有内分泌功能。运动时骨骼肌产生的IL-6可以被看作是一种激素, 释放入血后随血液循环运送到各靶器官而发挥生物学效应。2004年, 丹麦哥本哈根大学肌肉研究中心Pedersen教授提议 [4], 将IL-6和其他一些由骨骼肌产生和释放, 并对骨骼肌本身及机体其他组织器官产生效应的细胞因子统称为“肌因子” (myokines)。

最初, 人们普遍认为运动中肌源性IL-6的增加与免疫反应关系密切, IL-6可以通过提高IL-1ra和IL-10的水平起到介导抗炎症反应的作用 [5]。随后的研究发现, 肌源性IL-6与机体能量代谢也有着密切的关系。肌源性IL-6作用于肝脏, 可以促进肝脏葡萄糖输出; 作用于脂肪组织, 增强脂解; 作用于骨骼肌, 增加骨骼肌对血糖的摄取与利用, 并促进肌细胞内的糖脂代谢 [6]。因此, 肌源性IL-6很可能作为机体能量代谢的“预警信号”参与到能量代谢的调节过程中。

那么, 机体本身的能量状态是否也可以直接或间接反馈调节肌源性IL-6的表达释放呢? 糖是人体能量代谢最重要的物质, 肌糖原、肝糖原以及血液中的葡萄糖在运动中起到非常重要的作用。有研究表明, 运动时肌糖原水平及碳水化合物 (糖) 的摄入与肌源性IL-6的表达关系密切。

研究发现,运动时,如果肌糖原含量处于较低水平,骨骼肌分泌IL-6明显增加^[7,8]。反之,碳水化合物(糖)的摄入能够减弱运动时血浆中IL-6的增加^[9,10]。本实验室先前的研究^[11]也得到了类似的结果。首先采用运动和低糖膳食相结合的方法造成大鼠低肌糖原实验模型,在此基础上进行定量负荷跑台运动2小时。结果显示运动前低肌糖原状态可以促进血浆中IL-6蛋白水平升高及骨骼肌中IL-6mRNA的表达。并且推测低肌糖原状态下运动诱导肌源性IL-6表达可能与p38MAPK及NF- κ B等信号通路有密切的关系。

从以往的研究我们确实可以看出,肌源性IL-6基因表达和蛋白释放与糖代谢之间存在着密切的关系。但以往的研究均为在体(in vivo)研究,受研究方法的局限,尚无法确切地证实糖代谢参与调节肌源性IL-6基因表达和蛋白释放的规律及其信号调控机制。

目前,体外培养(in vitro)的C2C12小鼠骨骼肌成肌细胞系被广泛应用到有关骨骼肌细胞能量代谢、胰岛素抵抗及信号转导机制的研究中^[12,13]。C2C12小鼠骨骼肌成肌细胞系有强大的增殖能力,具有易培养、可控性强、样本均一性高、便于观察和检测记录等特点。且在结构功能上与在体骨骼肌有许多相同点,因此可作为骨骼肌研究的首选体外模型,为骨骼肌研究提供了一个良好的研究平台。

本研究采用体外培养的C2C12小鼠骨骼肌成肌细胞为研究模型,观察糖剥夺(glucose deprivation,无糖培养状态的极端条件下模拟骨骼肌低糖原状况)对培养细胞肌源性IL-6基因表达和蛋白水平的影响及其规律,并探讨糖剥夺状态下诱导肌源性IL-6表达的信号调控机制。旨在从分子水平认识肌源性IL-6产生和释放的规律、肌源性IL-6与机体能量代谢的关系及其可能的信号调控机制,为进一步研究运动能量代谢的调控提供实验依据。

2.1 IL-6的生物学特性

2.1.1 IL-6 的分子特征

IL-6是一个包含白血病抑制因子、IL-11、纤毛嗜神经因子、制瘤素等细胞因子的家族成员之一,这个家族相似的结构是螺旋状蛋白质和共用受体亚单位(跨膜糖蛋白130, gp130)^[1]。

人的IL-6基因位于第7号染色体短臂上,全长5kb,含有4个内含子及5个外显子^[14]。1986年人的IL-6cDNA克隆成功之后,小鼠及大鼠等的IL-6基因也相继获得^[15-17]。它们均具有4个内含子、5个外显子。在3'和5'端的非翻译区序列以及内含子与外显子边界序列都显示出高度保守性。

IL-6基因启动子区含有多个调控元件,包括核转录因子NF- κ B、核转录因子NF-IL6、核转录因子AP-1、糖皮质激素、性激素等。后两种调控元件可抑制启动子区活性,但糖皮质激素和性激素不能直接与IL-6基因结合,而是通过形成的受体——配体复合物与核转录因子NF-IL6、核转录因子NF- κ B结合后,抑制IL-6基因启动子区活性。除了淋巴细胞,大部分细胞中的IL-1、TNF- α 可通过核转录因子NF- κ B诱导IL-6基因的表达。该基因有3个转录起始位点(ATG)和3个TATA样序列(TATA盒),ATG上游300bp左右的5'端非编码区包含了绝大部分IL-6基因表达的调控序列,如NF- κ B、NF-IL6结合位点等,这些位点与相应的核转录因子结合后,可调节基因表达^[18]。

从人T细胞株克隆的IL-6 cDNA约1000~1100bp,含一个开放阅读框架,从起始密码ATG到终止密码TAG,共有211个三联体密码子,可编码完整的IL-6蛋白。

IL-6蛋白是一种糖基化蛋白,由于其细胞来源不同,并且转录后修饰的程度也不一样,因此分子量在21~30kD之间变化^[19-21]。在机体内合成为一种含212氨基酸的前体蛋白,带有28个信号序列和184个成熟片段^[22]。

2.1.2 IL-6 受体系统与信号转导

白细胞介素6受体 (Interleukin-6 receptor, IL-6R) 系统是一个双链模式, 由分子量 0.8×10^5 的IL-6结合蛋白 (IL-6R, gp80) 和分子量 1.3×10^5 的信号转导蛋白——跨膜糖蛋白130gp (gp130) 两部分组成。

IL-6R的基因定位于人1号染色体和鼠2号染色体上。人IL-6R由468个氨基酸组成, 切除N端19个氨基酸残基后的成熟分子有449个氨基酸, 胞膜外区、穿膜区和胞浆区分别为339、28和82个氨基酸, 分子量为80KD, 6个N糖基化位点。胞膜外区由一个Ig样区 (C2, 约100氨基酸)、2个III型纤维结合蛋白结构 (各含100氨基酸) 及1个细胞因子受体的同源区所组成, 后者含4个保守的Cys和一个WSXWS结构。IL-6受体既属于造血生长因子受体家族, 又属于免疫球蛋白超家族^[23]。IL-6R有两种存在方式, 膜结合受体和可溶性受体 (Soluble Interleukin-6 Receptor, sIL-6R)。gp80向体液中脱落形成sIL-6R, 对IL-6R的生物学效应起介导、扩增和延长血浆中IL-6半衰期 (half-life) 的作用^[24]。

gp130是与IL-6家族其他细胞因子受体共用的单位。gp130不能直接与IL-6结合, 在生理情况下, IL-6与IL-6受体结合后使IL-6R的构象发生变化并迅速与两个gp130分子结合, 形成高亲和力的结合位点, 并通过gp130亚单位传递信号。gp130在细胞中无所不在, 因此IL-6R是一种影响IL-6信号传导的限制因素^[25]。

目前的研究表明, IL-6胞内信号转导途径主要包括两条: Ras/MAPK途径和Jak/STAT途径^[26]。也有研究表明, 在细胞内腺苷酸活化蛋白激酶 (Adenosine Monophosphate-Activated Protein, AMPK) 激发了许多生物效应, IL-6的信号也可以通过AMPK信号通路来完成级联反应。肌细胞在IL-6的孵育下会引起AMPK磷酸化, 其靶分子可能是骨骼肌内的乙酰CoA羧化酶。研究发现, 在IL-6基因敲除的小鼠中, 乙酰CoA羧化酶水平和AMPK活性也相当低。以上研究结果提示: IL-6可以通过活化AMPK起到相应的生物学作用^[27-30]。还有研究表明, IL-6的信号在细胞内也可以激活磷脂酰肌醇3激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 途径^[31]。

2.1.3 IL-6的主要生物学功能

多种细胞均能产生IL-6, 主要有巨噬细胞、单核细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、角化细胞、造骨细胞、T细胞、B细胞、中性粒细胞、嗜曙红细胞、肥大细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞及脂肪细胞等。

IL-6的受体分布也极为广泛,且没有严格的靶细胞特异性。活化B淋巴细胞、静止T淋巴细胞、骨髓瘤细胞、单核细胞、巨噬细胞、骨骼肌细胞、成骨细胞、破骨细胞、肝细胞及脂肪细胞等的胞膜上均有IL-6R。

因此,IL-6具有广泛的生物学功能。它是B淋巴细胞终末分化和分泌免疫球蛋白的必需因子;还能促进T淋巴细胞的增殖、分化和激活;在机体的免疫应答、造血调控和急性时相反应中发挥重要的作用;此外还参与神经细胞的增殖和分化;抗病毒、抗肿瘤;调节能量代谢等多种生理功能。

2.2 运动与肌源性IL-6

2.2.1 运动对机体IL-6水平的影响

1991年Northoff等人^[2]研究发现,运动可以引起循环血中IL-6水平升高,随后陆续有研究证明此现象^[32-39]。循环血中IL-6水平受多种因素的影响,如运动持续时间、运动强度和运动方式等(表2.2-1、图2.2-1^[3])。从表2.2-1及图2.2-1中我们可以看出,运动持续时间是引起IL-6升高的重要原因,随着时间的延长,IL-6水平显著升高。且IL-6对于运动强度的反应也比较敏感^[40]。研究还发现上肢运动对IL-6的影响很小^[41-43],而跑步运动却可以引起IL-6水平大幅度上升^[32, 33, 44-58],这可能与运动形式不同而导致的肌肉募集有关。尽管曾有研究表明,运动中肌源性IL-6的增加与肌肉损伤有关^[59],但随后的研究表明,离心收缩运动与向心收缩运动相比,IL-6水平并没有显著升高,见图2.2-1。而且肌肉损伤导致IL-6产生出现较晚,多出现在恢复期,而且比向心收缩所引起的IL-6的升高要小得多^[60-63]。

表2.2-1 急性运动对人血浆IL-6水平的影响

Knee-extensor			Bicycling			Running		
n	Duration (h)	IL-6 (fold change)	n	Duration (h)	IL-6 (fold change)	n	Duration (h)	IL-6 (fold change)
7	3.0	3	9	0.4	1	12	0.2	1
7	0.8	3	9	0.3	1	19	6.0	4
7	3.0	6	16	0.7	1	7	1.0	4
6	3.0	11	7	1.0	2	8	1.5	4
7	3.0	12	17	1.0	2	6	9.1	6

6	3.0	15	6	2.0	2	8	1.5	8
6	5.0	19	9	0.5	2	30	2.5	8
7	5.0	36	8	1.0	2	7	1.0	9
			9	1.5	2	12	0.9	9
			7	0.3	2	10	1.6	10
			7	0.3	2	16	3.0	10
			8	0.4	2	10	1.5	20
			8	1.5	2	10	2.5	25
			6	2.0	3	13	9.8	28
			11	1.5	3	7	9.9	29
			6	0.8	3	7	2.5	29
			8	2.0	4	9	2.5	30
			8	1.0	5	50	4.5	42
			7	1.0	5	18	3.7	43
			9	1.0	5	6	3.0	50
			7	1.5	6	10	2.5	52
			6	2.0	8	16	3.3	63
			18	3.0	8	10	2.6	80
			8	1.0	9	18	3.5	88
			8	2.0	11	10	3.5	92
			8	3.0	13	16	2.5	109
			15	2.5	16	60	26.3	126
			6	2.0	20	10	3.5	128
			10	2.5	24			
			6	3.0	26			
			8	2.0	38			

(摘自Christian, 2006)

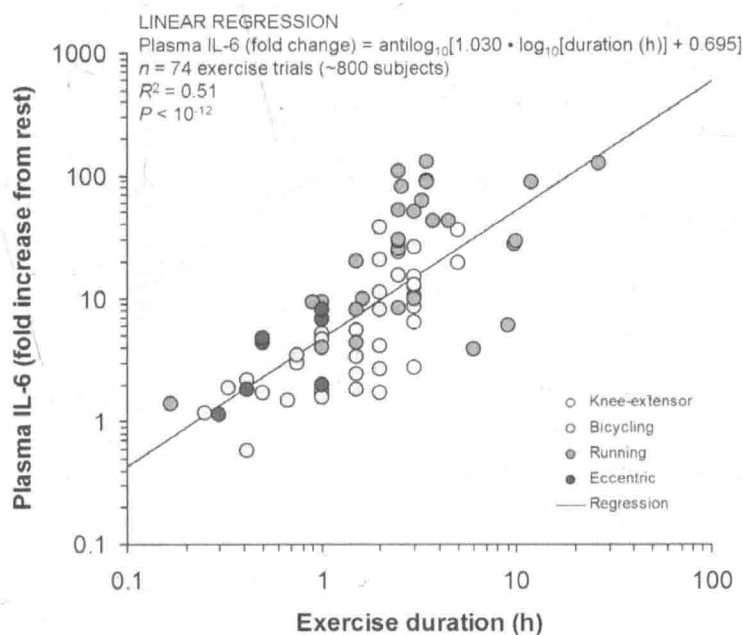
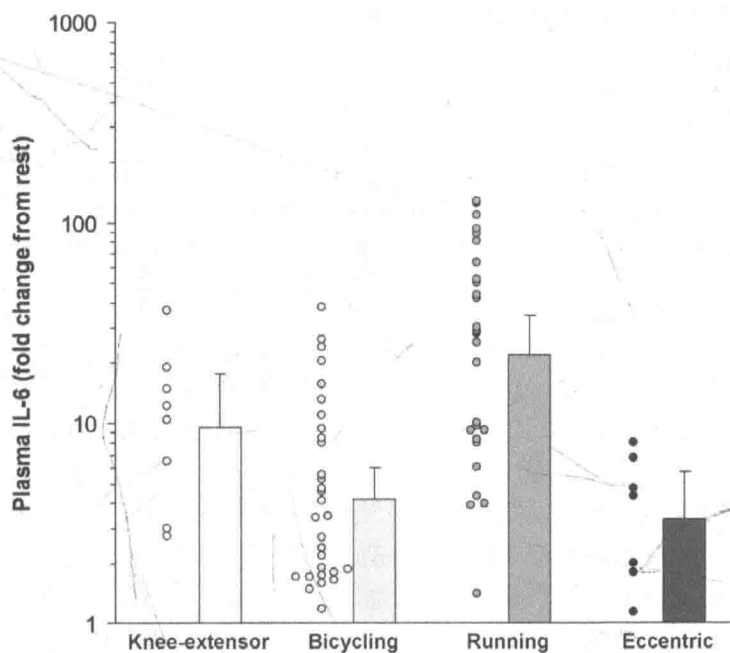


图2.2-1 运动方式和时间对运动后血浆IL-6水平的影响
 (摘自Christian, 2006)