

外源性瘦素通过丝裂素活化蛋白激酶抑制猪骨骼肌成肌细胞分化

于太永, 庞卫军, 吴江维, 卢荣华, 杨公社

西北农林科技大学 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌, 712100

摘要: 研究瘦素(leptin)对猪骨骼肌成肌细胞分化的影响, 并探讨其可能的作用机制。原代培养猪骨骼肌成肌细胞, 通过倒置显微镜定性观察细胞分化的形态学变化; 肌酸激酶(CK)活性测定法定量分析成肌细胞分化程度; 细胞免疫化学方法分析 myogenin 的表达情况; 免疫印迹技术(Western Blot)检测丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)的表达变化。结果显示, 在猪骨骼肌成肌细胞分化过程中, 外源性 leptin 减少细胞核融合和肌管形成, 呈浓度和时间依赖性地显著降低 CK 活性($P < 0.05$), 并显著抑制 myogenin 和 MAPK 的蛋白表达($P < 0.05$)。以上结果说明, leptin 抑制猪骨骼肌成肌细胞分化, 并且这种作用可能是通过激活 MAPK 信号转导通路实现的。研究结果显示, leptin 在骨骼肌成肌细胞分化过程中可能具有重要作用。

关键词: 瘦素, 丝裂素活化蛋白激酶, 成肌细胞, 分化, 猪

Exogenous Leptin Inhibits Differentiation *via* MAPK in Swine Skeletal Myoblasts

Taiyong Yu, Weijun Pang, Jiangwei Wu, Ronghua Lu, and Gongshe Yang

Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: We determined whether body-weight regulator, leptin, could influence differentiation of swine skeletal myoblasts. Myoblast occurred in non-leptin and leptin formed in different concentrations (10~1000 ng/mL) for various duration (12~60 h). The morphologic assay demonstrated that leptin significantly decreased the formation of myotubes and myogenic index. In addition, biochemical analysis showed that leptin inhibited Creatine Kinase (CK) activity, expressions of myogenin and mitogen activated protein kinase (MAPK). As conclusion, exogenous leptin could inhibit differentiation *via* MAPK in swine skeletal myoblasts and this suggests that leptin be an important mediator in the regulation of muscle-cell differentiation.

Keywords: Leptin, MAPK, skeletal myoblasts, differentiation, swine

Leptin 是一种主要由脂肪细胞分泌的蛋白, 其主要功能是参与机体体重和能量平衡的调控^[1]。血

Received: April 13, 2007; **Accepted:** June 4, 2007.

Supported by: the National Basic Research Program of China (973) (No. 2004CB117506) and the National Nature Science Foundation of China (Nos. 30471239 and 30600437).

Corresponding author: Gongshe Yang. Tel: +86-29-87092430; Fax: +86-29-87092430; E-mail: gsyang999@hotmail.com
国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No.2004CB117506)和国家自然科学基金项目(Nos.30471239 and 30600437)资助。

浆 leptin 的含量与体重相关, 同时 leptin 也被认为是机体的一种饱感因子, 直接调控人类和动物的食欲^[2]。因此, 目前有关 leptin 研究的主要目的是阐明其在机体体脂沉积中的作用及其作用机理, 进而为尽早有效治疗人类肥胖及肥胖相关疾病提供理论依据。然而, 近来越来越多的研究显示: leptin 除了以中枢神经调节的方式发挥作用以外, 还通过内分泌、自分泌或旁分泌方式对机体外周组织或器官的功能发挥广泛的生物调节作用如胚胎发育^[3]、嗅觉^[4]、免疫^[5]、血管发生和创伤愈合^[6]、性成熟和繁殖^[7]、肾和肺功能^[8]等。尽管人类对 leptin 进行了大量研究取得了重大进展, 但对其功能要完整全面地理解和认识仍需不断地试验和探索。

脂肪和肌肉的生长与发育是在一系列蛋白因子的精密调控下实现的。最近研究认为: 脂肪和肌肉间信号分子的相互作用在肌肉生长与发育、脂肪形成和机体能量利用方面扮演着重要的角色^[9]。这些信号分子主要包括 leptin、胰岛素样生长因子和脂联素。本试验旨在研究外源性 leptin 在猪骨骼肌成肌细胞分化中的作用及其部分机理, 完善对 leptin 外周效应的理解和认识, 并为最终实现家畜脂肪和肌肉含量与分布的有效调控奠定一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

猪骨骼肌成肌细胞取自本校实验猪场 1~3 日龄长白仔猪; leptin 购自美国 Pepro Tech 公司; 胎牛血清(FBS)、DMEM/F12 培养基和链酶蛋白酶均购自 Gibco 公司; myogenin 和 MAPK 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; β -actin 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; Super ECL Plus 超敏发光液购自北京普利莱基因技术公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 猪骨骼肌成肌细胞的原代培养

采用本实验室已建立的方法^[10]。获取的细胞以 5×10^4 个/cm² 密度接种于 6 孔培养板, 置 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 生肌指数(the myogenic index)的测定

多核细胞数(3 个核)/观察细胞总数。

1.2.3 CK 活性测定

参照 Xi. G 等^[11]的方法。骨骼肌成肌细胞在生长培养液(DMEM / F12 + 10% FBS+ 100 IU/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素)中生长汇合至 90%时, 把培养液更换为分化培养液 (DMEM/F12 + 2% FBS + 100 IU/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素), 分别以终浓度为 0、10、100 和 1000 ng/mL 的 leptin 处理 24 h 测定 CK 活性, 以分析骨骼肌成肌细胞分化对 leptin 浓度的依赖性效果; 以 100 ng/mL 的 leptin 分别处理 12、24、36、48 和 60 h 测定 CK 活性, 以分析骨骼肌成肌细胞分化对 leptin 的时间依赖性效果。

1.2.4 细胞免疫化学分析 myogenin 的表达

骨骼肌成肌细胞在玻片上用生长培养液培养 5 d, 把生长培养液更换为分化培养液, 分别以终浓度为 0 和 20 ng/ml 的 leptin 处理 24 h; 吸除培养液, 用 75%的乙醇固定 30 min, PBS 冲洗 2~3 次, 加入 myogenin 一抗, 放湿盒中 4°C 过夜; 第二天早上取出, 37°C 孵育 30 min, PBS 冲洗 2~3 次, 加入 FITC 荧光二抗, 37°C 作用 60 min, PBS 冲洗; 37°C 下 PI (propidium iodide) 染细胞核 10 min, PBS 冲洗并用甘油封片。激光共聚焦扫描电镜观察, 并照相分析。

1.2.5 Western Blot 检测 MAPK 蛋白表达

消化并收集细胞, 加入 1 mL 组织裂解液, 4°C 充分混匀, 4°C 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 留一部分检测蛋白质浓度, 其余与等体积上样缓冲液混匀, 100°C 孵育 5 min, -70°C 保存。取蛋白质样品 80 μ g, 上样, 以 80 V 电压, 在 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中分离约 2 h 后, 转移至 PVDF 膜上。蛋白免疫印迹: 5%BSA 室温封闭 2h, 一抗(MAPK 为 1: 500, β -actin 为 1: 300)室温孵育 2 h, 二抗(MAPK 为 1: 2000, β -actin 为 1: 4000)室温孵育 2 h, ECL 发光液混合后作用 PVDF 膜 3 min, 压 X 光片 1 min, X 光片显影和定影。将胶片进行扫描, 用凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。通过 Smart-Sequence 软件对蛋白相对含量进行分析。

1.3 统计方法

数据或资料来自重复 3~4 次的独立试验。试验数据应用 SPSS13.0 统计软件 One-way ANOVA 进行方差分析与显著性检验。试验数据以均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, 方差分析采用 LSD 法。

2 结果

2.1 Leptin 影响猪骨骼肌成肌细胞分化的形态学分析

生长的骨骼肌成肌细胞当受到外部分化因子的刺激或相应信号的作用时,相互接触的细胞发生融合,进而形成多个细胞核的肌管细胞,这是其分化的典型形态特征^[12]。如图 1 所示,外源性 leptin 明显

减少猪骨骼肌成肌细胞分化过程中多核肌管的形成。分别用 0、10、20、40 ng/mL 的 leptin 在分化培养液中处理猪骨骼肌成肌细胞,24 h 后在倒置显微镜下观察。0 ng/mL leptin 处理组有大量的成肌细胞发生融合,形成多核的肌管细胞,而 10、20、40 ng/mL leptin 处理组细胞融合和形成肌管的数量明显减少,并且减少程度与 leptin 浓度呈正相关。

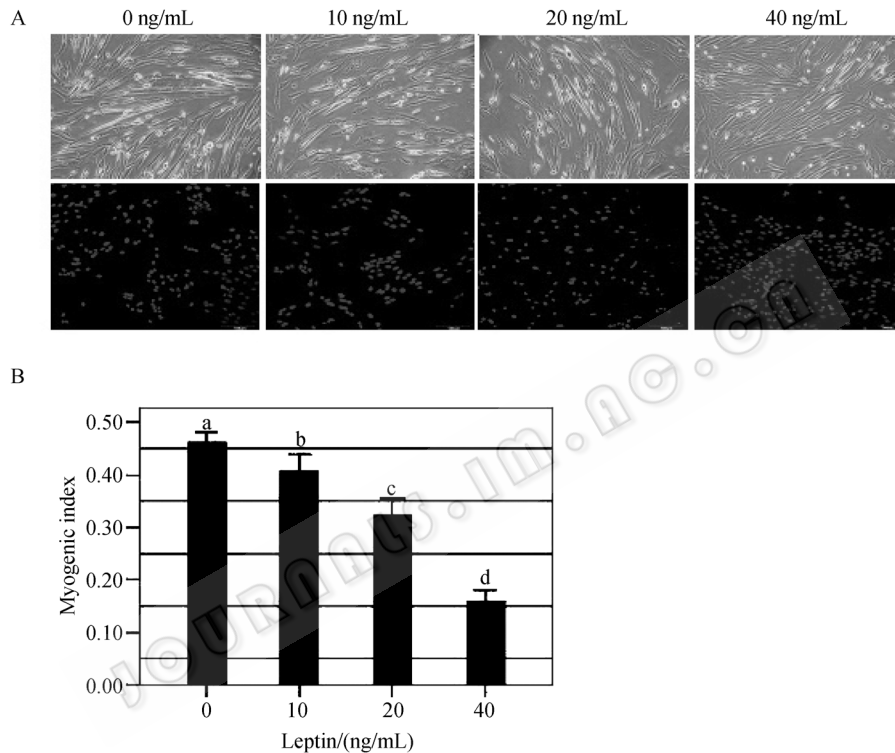


图 1 Leptin 影响猪骨骼肌成肌细胞分化的形态学分析

Fig. 1 Morphology of differentiation was evaluated in control and leptin-exposed porcine skeletal myoblasts

A: morphology was evaluated by phase-contrast microscopy. A representative result of four separate experiments is shown ($\times 100$). B: morphology was evaluated by assessment of the myogenic index. Data are means \pm SD of four separate experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA and test significance ($P < 0.05$)

2.2 Leptin 降低猪骨骼肌成肌细胞分化期间 CK 的活性

在骨骼肌成肌细胞分化过程中 CK 活性随肌管形成而增加,因此它常被作为重要的生化指标之一用来衡量成肌细胞分化程度^[13]。试验结果表明:10、100、1000 ng/mL leptin 分别处理分化中的猪骨骼肌成肌细胞,24 h 后 leptin 呈浓度依赖性地显著降低细胞 CK 活性($P < 0.05$)(图 2-A);100 ng/mL leptin 处理分化中的猪骨骼肌成肌细胞,12、24、36、48 h 后细胞 CK 活性呈时间依赖性地显著降低($P < 0.05$)(图 2-B),

并且 leptin 的这种抑制作用在 48 h 后达到饱和。更有趣的是随 leptin 浓度的增大,它的抑制作用达到饱和的时间到来的也越早(此数据未显示)。

2.3 Leptin 抑制猪骨骼肌成肌细胞分化过程中 myogenin 的表达

骨骼肌成肌细胞的生长和发育是受一系列转录因子的精密调控而完成的如: *MyoD*、*Myf-5*、*myogenin* 和 *MRF4* 等。其中, *myogenin* 主要在成肌细胞分化融合过程中发挥作用,调节肌管形成。因此,在骨骼肌细胞的发育研究中, *myogenin* 常被作为成肌

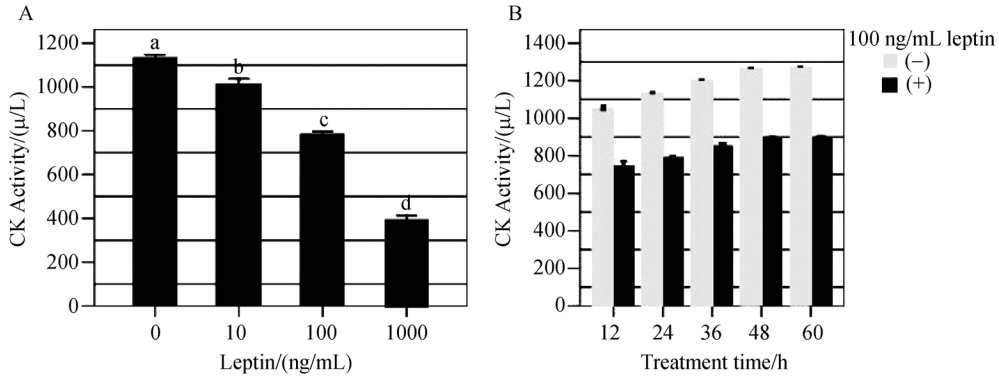


图2 Leptin 抑制猪骨骼肌成肌细胞分化期间 CK 活性

Fig. 2 Leptin inhibits CK activity during porcine skeletal myoblasts differentiation

A: treatment with various concentrations leptin for 24 h inhibits CK activity in a dose-dependent manner in porcine skeletal myoblasts. Data are means ± SD of three separate experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA and test significance ($P < 0.05$).
 B: treatment with 100 ng/ml leptin for various periods inhibits CK activity in a time-dependent manner in porcine skeletal myoblasts. Data are means ± SD of three separate experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA and test significance ($P < 0.05$)

细胞分化的标志基因^[14]。细胞免疫组织化学分析表明：外源性的 leptin 明显抑制猪骨骼肌成肌细胞分化过程中 myogenin 的表达(图 3)。20 ng/mL leptin 处理分化中的猪骨骼肌成肌细胞, 24 h 后 myogenin 在细胞浆和细胞核中的表达数量明显受到抑制, 并且发生融合形成肌管的细胞数量与对照相比显著减少。

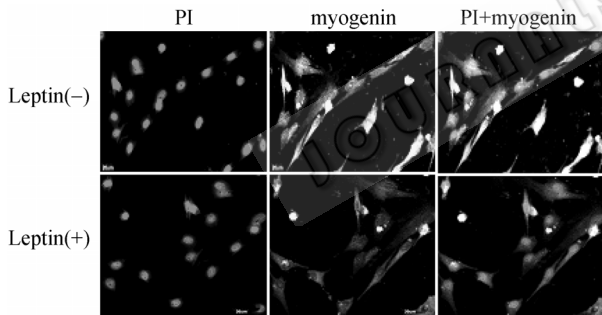


图3 细胞免疫化学方法分析 Leptin 对猪骨骼肌成肌细胞分化期间 myogenin 蛋白表达的影响(×200)

Fig. 3 Leptin inhibits myogenin protein expression during porcine skeletal myoblasts differentiation by Immunocytochemistry analyses (× 200)

2.4 Leptin 激活猪骨骼肌成肌细胞分化期间 MAPK 信号转导通路

Leptin 生理功能的发挥是通过其受体进而激活或抑制相关的生物学信号转导通路实现的。已经证实 MAPK 是骨骼肌成肌细胞分化过程中最为重要的信号转导通路之一^[15]。Western Blot 检测结果显示：10、50、100 ng/mL leptin 分别处理分化中的猪骨骼肌成肌细胞, 24 h 后外源性 leptin 呈浓度依赖性地显著促进细胞 MAPK 蛋白的表达($P < 0.05$)(图 4)。

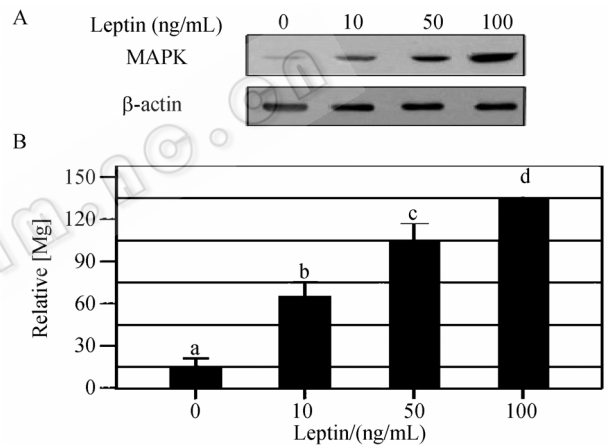


图4 免疫印迹技术分析 Leptin 对猪骨骼肌成肌细胞分化期间 MAPK 蛋白表达的影响

Fig. 4 Leptin increases MAPK protein expression during porcine skeletal myoblasts differentiation by Western Blot analysis

A: cultures were lysed and equal amounts of protein were analyzed by Western for MAPK and β-actin expression. A representative Western blot is shown.
 B: the relative amounts of MAPK protein were measured by scanning densitometry and Image Quant software analysis. MAPK content was normalized to β-actin. Data are means ± SD of four separate experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA and test significance ($P < 0.05$)

3 讨论

近年来, 在世界范围内肥胖和肥胖相关疾病(如糖尿病、高血压和心血管系统疾病等)的发生呈逐年上升趋势, 已经成为威胁人类健康的重大问题之一。预防和治疗肥胖及肥胖相关疾病成为当今世界科学研究的重要内容。自从 leptin 发现以后, leptin 和脂肪细胞成为这一领域研究的热点之一。根据目前的研究结果, 我们知道 leptin 的主要生理作用是

通过中枢神经系统调节机体体重和能量平衡^[1,2]。但是,越来越多的研究显示在机体外周组织或器官的功能调控方面, leptin 通过内分泌、自分泌或旁分泌方式可能发挥着更加广泛重要的作用^[3-8]。已有研究证实, leptin 可以激活骨骼肌早期发育的细胞内信号^[16]。但是它在骨骼肌发育过程中的具体作用仍然知之甚少。

当生长中的骨骼肌成肌细胞受到外部刺激或相应信号的作用时,首先要退出细胞周期,相互接触的细胞发生融合现象,进而形成多个细胞核的肌管细胞,同时表达与肌肉分化相关或分化必需基因^[12,14]。因此,骨骼肌成肌细胞被公认为是研究肌肉发育及其发育机制的理想模型。本研究通过测定外源 leptin 对猪骨骼肌成肌细胞分化过程中成肌指数、CK 活性和 myogenin 的影响,初步证实了 leptin 抑制猪骨骼肌成肌细胞的分化。新近的研究显示, MAPK 信号转导通路是成肌细胞发育的重要调节者^[15]。Paola M 等研究显示外源 leptin 可显著增强成肌细胞中 MAPK 的磷酸化^[17]。本研究通过 Western Blot 检测,也证实了外源 leptin 可以增强骨骼肌成肌细胞分化期间 MAPK 蛋白的表达。以上报道和我们的研究结果共同说明了 leptin 在骨骼肌成肌细胞分化中可能具有重要作用。然而, Solberg R 等^[18]研究显示在人的未分化的骨骼肌成肌细胞中 leptin mRNA 是高表达的,在由成肌细胞分化进入初级肌管阶段其表达是降低的,而且在分化期间外源重组 leptin 对 myogenin 和 myoD 的 mRNA 表达不产生影响。其研究结果暗示,外源重组 leptin 对骨骼肌成肌细胞的分化可能不发挥作用。这种试验结果的差异可能是由于所用试验材料不同造成的。同时,这种试验结果的差异也提示我们, Leptin 在不同物种的骨骼肌成肌细胞分化过程中可能具有不同作用。这有待于进一步研究证实。另外, ERK(extracellular regulated kinase)和 PI3-K(phosphoinositide 3-kinase)等在成肌细胞分化中也占举足轻重的地位, leptin 对猪骨骼肌成肌细胞分化的抑制作用是否也通过这些信号通路,这部分工作我们正在进行研究。

总之,本研究证实了外源性的 Leptin 抑制体外猪骨骼肌成肌细胞的分化,而且这种作用可能是通过激活 MAPK 信号转导通路实现的。

REFERENCES

[1] Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of

body weight in mammals. *Nature*, 1998, **398**: 763-770.

- [2] Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, *et al* .Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 1996, **334**: 292-295.
- [3] Kim HS, Lee GS, Kim JH, *et al* . Expression of leptin ligand and receptor and effect of exogenous leptin supplementation on *in vitro* development of porcine embryos. *Theriogenology*, 2006, **65**: 831-844.
- [4] Thomas VG, Kevin K, Christopher PS, *et al* . Leptin regulates olfactory-mediated behavior in ob/ob mice. *Physiology & Behavior*, 2006, **87**: 848-856.
- [5] Mehdi F, Hamid ZE, Wu ZD, *et al* . Identification of a monoclonal antibody against the leptin receptor that acts as an antagonist and blocks human monocyte and T cell activation. *Journal of Immunological Methods*, 2006, **312**: 190-200.
- [6] Iversen PO, Drevon CA, Reseland JE. Prevention of leptin binding to its receptor suppresses rat leukemic cell growth by inhibiting angiogenesis. *Blood*, 2002, **100**: 4123-4129.
- [7] Wauters M, Considine RV, Gaal LF. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol*, 2000, **143**: 293-311.
- [8] Baratta M. Leptin—from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit*, 2002, **8**: 282-292.
- [9] Kokta TA, Dodsonb MV, Gertler A, *et al* . Intercellular signaling between adipose tissue and muscle tissue. *Domestic Animal Endocrinology*, 2004, **27**: 303-331.
- [10] Yu TY, Wu JW, Yang GS, *et al* . Characterization of Culture and Biological Properties of myoblast *in vitro* from Bamei Pig Skeletal Muscle. In: 12th AAAP Animal Science Congress proceedings. Busan, Korea 2006, 330.
- [11] Xi G, Kamanga ES, Hathaway MR, *et al* . Effect of constitutive expression of porcine IGFBP-3 on proliferation and differentiation of L6 myogenic cells. *Domestic Animal Endocrinology*, 2006, **31**: 35-51.
- [12] Brzoska E, Grabowska I, Wrobel E, *et al* . Syndecan-4 distribution during the differentiation of satellite cells isolated from soleus muscle treated by phorbol ester and calphostin C. *Cell Mol Biol Lett*, 2002, **7**: 269-278.
- [13] Kirchnerberger M. Excitation and Contraction of Skeletal Muscle. *Physiological Basis of Medical Practice*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991, 62-102.
- [14] Molkentin JD, Olson EN. Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr Opin Genet Dev*, 1996, **6**: 445-453.
- [15] Aviad K, Yael T, Eyal B. The p38 MAPK signaling pathway: A major regulator of skeletal muscle development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006, **252**: 224-230.
- [16] Maroni P, Bendinelli P, Piccoletti R. Early intracellular events induced by *in vivo* leptin treatment in mouse skeletal muscle. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2003, **201**: 109-121.
- [17] Paola M, Paola B, Roberta P, *et al* . Intracellular signal transduction pathways induced by leptin in C2C12 cells. *Cell Biology International*, 2005, **29**: 542-550.
- [18] Solberg R, Aas V, Thoresen GH, *et al* . Leptin expression in human primary skeletal muscle cells is reduced during differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005, **96**(1): 89-96.