

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.01282

PI3K/AKT 抑制剂渥曼青霉素对猪前体脂肪细胞增殖和凋亡的影响

郭云学, 莫德林, 陈瑶生, 张悦, 张云, 肖书奇, 刘小红

中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510006

摘要: 为探寻 *PI3K/AKT* 抑制剂渥曼青霉素(Wortmannin, WM)对猪前体脂肪细胞增殖和凋亡均无影响的适宜浓度, 文章首先分离并验证了猪原代前体脂肪细胞的分化潜能, 然后对不同浓度渥曼青霉素处理 11 d 的细胞采用 Annexin V-FITC/PI 双标法检测细胞凋亡, 并通过凋亡相关基因的表达以及 DNA 损伤程度进行验证, 同时利用甲硫代磺酸盐(Methanethiosulfonate, MTS)检测了细胞的增殖活性。结果表明, 100 nmol/L 渥曼青霉素对猪前体脂肪细胞的增殖和凋亡均无显著影响, 而 200 nmol/L 的渥曼青霉素对猪原代脂肪细胞的增殖活性虽没有显著影响, 但对细胞凋亡有显著促进作用。研究发现, 处理后促凋亡因子 *caspase8* 和 *TNFR1* 表达显著上调, 非 *caspase* 依赖促凋亡因子 *GZMA* 表达无显著性差异, 而 *GZMB* 表达则显著上调, 抗凋亡因子 *Bcl-x1* 表达显著上调, *cFLIP* 表达则无显著性差异。100 nmol/L 的渥曼青霉素对细胞 DNA 的损伤不显著。因此, 100 nmol/L 的渥曼青霉素对猪前体脂肪细胞的增殖和凋亡均无显著影响, 是在不影响细胞生长的情况下研究 *PI3K* 通路对脂肪细胞分化的较为理想的浓度。

关键词: 渥曼青霉素; 脂肪细胞; 增殖; 凋亡

Effects of *PI3K/AKT* inhibitor wortmannin on proliferation and apoptosis of primary porcine preadipocytes

GUO Yun-Xue, MO De-Lin, CHEN Yao-Sheng, ZHANG Yue, ZHANG Yun, XIAO Shu-Qi, LIU Xiao-Hong

State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006 China

Abstract: The purpose of this study was to determine the proper concentration of wortmannin that effectively inhibits *PI3K/AKT* but does not affect the proliferation and apoptosis of primary porcine preadipocytes. Firstly, primary porcine preadipocytes were isolated and their abilities to be induced to differentiation into mature adipocytes were evaluated. The preadipocytes were then treated with different concentrations of wortmannin, and the proliferation of the cells was detected with methanethiosulfonate (MTS). Annexin V- FITC/PI double-staining was used to detect the level of cell apoptosis. The

收稿日期: 2012-03-17; 修回日期: 2012-07-04

基金项目: 国家现代农业产业技术体系重大专项(编号: CARS-36)和广州市科技支撑重点项目(编号: 2008Z1-E121)资助

作者简介: 郭云学, 博士研究生, 研究方向: 动物分子遗传与育种。Tel: 020-39332842; E-mail: yunxueguo@gmail.com

通讯作者: 刘小红, 博士, 研究员, 研究方向: 数量遗传学与动物育种。E-mail: xhliu@163.net

网络出版时间: 2012-8-13 03:20:59

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120813.1520.001.html>

apoptosis-related gene expressions were also quantified by qRT-PCR. At the same time, single cell electrophoresis was used to examine the extent of cellular DNA damage. Our data demonstrated that the primary porcine preadipocytes could differentiate into mature adipocytes. Up to 200 nmol/L of wortmannin had no effect on the proliferation ability of primary porcine preadipocytes ($P>0.05$). Results from the flow cytometry Annexin V- FITC/PI double-staining showed that 200 nmol/L wortmannin significantly induced apoptosis of the primary porcine preadipocytes ($P<0.05$). QRT-PCR results also showed that the expressions of *caspase8*, *TNFR1*, *GZMB*, and *Bcl-x1* were significantly upregulated, while the expression of *GZMA* and *cFLIP* were not significantly affected when treated with 200 nmol/L wortmannin. In addition, results from the single cell gel electrophoresis indicated that 100 nmol/L wortmannin did not induce DNA damage. In conclusion, our results collectively showed that 100 nmol/L wortmannin can be used to study the role of *PI3k* pathway on the preadipocytes differentiation without affecting the cell proliferation and apoptosis.

Keywords: wortmannin; adipocytes; proliferation; apoptosis

肥胖是世界五大流行性疾病之一, 严重危害着人类的健康^[1]。肥胖的主要表象是脂肪组织的过度堆积, 脂肪细胞是脂肪组织的主体, 前体细胞为可分化为成熟脂肪细胞, 为脂滴堆积提供空间。抑制前脂肪细胞分化对于预防或治疗肥胖及相关疾病具有十分重要的意义。

脂肪细胞的分化过程受到众多信号通路和转录因子的调节, 胰岛素信号通路是其中一条关键的通路。胰岛素是诱导脂肪细胞体外分化最主要的激素, 它促进脂肪细胞对葡萄糖的吸收并激活脂肪合成相关酶的活性, 如脂肪酸合成酶和乙酰辅酶A羧化酶。胰岛素还可以通过抑制激素敏感脂酶的活性而抑制脂肪分解^[2]。磷脂酰肌醇-3-激酶(Phosphatidylinositol-3-kinase, *PI3K*)是细胞内胰岛素信号通路的核心分子, 它在细胞有丝分裂、增殖、凋亡和分化等分子事件中发挥重要作用。研究表明 $PI3K$ 可被胰岛素激活, 以转录后调节的方式促进脂肪细胞分化^[3]。此外, $PI3K$ 特异抑制剂渥曼青霉素(Wortmannin, WM)降低 $PI3K$ 的活性, 抑制 3T3-L1 脂肪细胞、人 1246 脂肪细胞和人原代脂肪细胞的分化^[4-7]。 $PI3K$ 可以作为多种疾病的治疗靶点, 如癌症、慢性炎症、过敏、心血管衰竭等^[8]。需要注意的是, 又不能无限制地抑制 $PI3K$ 的活性。研究表明, 适当抑制 $PI3K$ 的活性会明显抑制人类髓细胞白血病细胞K562 和舌鳞癌细胞系Tca8113 的增殖并诱导其凋亡^[9,10], 而过度的抑制则会导致肿瘤细胞死亡^[11]。然而直到目前, 未见 $PI3K$ 抑制剂对脂肪细胞增殖和凋亡影响的

报道。猪(*Sus Scrofa*)与人(*Homo sapiens*)的亲缘关系近于小鼠(*Mus musculus*)与人, 且猪在解剖学、生理性、生物化学、病理学和药理学方面与人的相似度相当高, 是研究肥胖和相关疾病的理想生物模型。为此, 本研究分离了猪的皮下前体脂肪细胞, 并着重研究了不同浓度渥曼青霉素对猪前体脂肪细胞增殖和凋亡的影响, 以便找到不影响细胞生长的适宜渥曼青霉素作用剂量, 为后续研究渥曼青霉素对脂肪细胞的分化调节作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞分离

1 日龄长白公猪购自广东农业良种示范推广中心。无菌条件下分离颈部和背部皮下脂肪组织, 用含 10 倍抗生素PBS清洗 3 次, 剪成 1 mm³大小组织块, 加入I型胶原酶消化 60~90 min。用含 20%血清的DMEM/F12完全培养基终止消化, 2 000 r/min离心 10 min。离心后弃上清, 加入 5 mL红细胞裂解液, 吹打均匀后室温静置 10 min, 1 000 r/min离心 5 min。离心后用无血清DMEM/F12清洗 3 次, 每次均 1 000 r/min离心 5 min。第 3 次离心后用含 20%血清的DMEM/F12完全培养基将细胞悬浮, 以 1×10^5 个/mL 的密度接入 6 孔板中, 于 37℃、5% CO₂条件下培养, 1 h后将培养基和未贴壁细胞弃去, 加入新鲜的完全培养基, 于 37℃、5% CO₂条件下培养, 10 h后更换新鲜培养基, 每隔两天换液, 直至细胞长至 80%左右传代培养。

1.2 诱导分化、油红 O 染色

采用鸡尾酒法对脂肪细胞进行诱导分化。细胞长至汇合为-2 d, 0 d 时培养基更换为含 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、0.25 μ mol/L 地塞米松(dexamethasone)、5 μ g/mL 重组牛胰岛素(insulin)和 20%血清的 DMEM/F12 分化培养液(MDI)。3 d 后培养液换为仅含 5 μ g/mL 重组牛胰岛素和 20%血清的 DMEM/F12 分化培养液, 6 d 后更换为正常生长培养液。用生长培养基持续培养的细胞做对照(GM)。油红 O 染色不同分化天数的细胞, 显微镜观察照相。用 100%异丙醇萃取染色细胞中的油红 O, 并测定 510 nm 吸光度。

1.3 蛋白印迹分析

将 0 d、2 d、4 d、6 d、8 d 和 10 d 的细胞用 PBS 清洗 3 次后, 6 孔板的每孔加入 100 μ L RIPA 裂解液(P0013)进行裂解(碧云天), 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 10 min。收集上清。采用考马斯亮蓝法测定蛋白含量。取 40 μ g 蛋白按比例加入 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 煮 5 min 使蛋白变性。每泳道上样 40 μ g 蛋白, 然后用垂直电泳装置 80V 跑电泳 2.5 h, 15 V 电压下将蛋白转移至 PVDF 膜上。用 5%的脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, C/EBP α 一抗购自 Cell Signaling Technology (#2295), PPAR γ 一抗购自 AbD-

Serotec (AHP1461), 内参 GAPDH 一抗购自 Santa Cruz Biotechnology (sc-59540)。用含 0.05% Tween 的 TBS 清洗, 二抗孵育 1 h, C/EBP α 和 PPAR γ 二抗均为羊抗兔, GAPDH 二抗为羊抗鼠。用含 0.05% Tween 的 TBS 清洗后, 使用 DAB 显色后照相。

1.4 Annexin V-FITC /PI 双标法检测细胞凋亡、qRT-PCR 检测凋亡相关基因表达

对 1.1 中传代细胞进行 0、100 和 200 nmol/L 及 10 μ mol/L 的渥曼青霉素处理 11 d, 以等体积的二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)作对照, 11 d 时采用流式细胞术并按照凋亡试剂盒(Invitrogen, V13241)说明书进行细胞凋亡情况检测。Trizol 法提取处理 11 d 细胞的总 RNA, 试剂盒法(Progema, A3500)进行目标基因的反转录。凋亡相关基因表达的检测采用 TaKaRa 的荧光定量试剂(DRR091A)。引物序列和扩增长度见表 1。

1.5 单细胞凝胶电泳检测渥曼青霉素对 DNA 损伤的影响

对 1.1 中传代细胞进行 0、100 nmol/L 的渥曼青霉素处理 11 d, 以等体积的 DMSO 作对照, 收集细胞做单细胞凝胶电泳实验, 具体方法为 45 $^{\circ}$ C 预热磨砂载玻片; 将 100 μ L 1%的正常熔点的琼脂糖加到载玻片上, 加盖玻片, 4 $^{\circ}$ C 放置 10 min; 用尖头镊子

表 1 QRT-PCR 的引物

基因	引物(5'→3')	产物长度(bp)
<i>GAPDH</i>	F: ACAGTCAAGGCGGAGAACG	204
	R: GGCAGAAGGGGCAGAGAT	
<i>caspase8</i>	F: AGATGACTCCGGAAGCTTGA	103
	R: AGAGGCAGAGGCTCATGTGT	
<i>TNFR1</i>	F: GCCACAAAGGCACCTACCTA	145
	R: GACATTTCACTCCGGCACTT	
<i>GZMA</i>	F: GGAGCTCACTCGATAACCAAGAAA	117
	R: GCTTTAGAAGTTTAAGGTCACCTCAT	
<i>GZMB</i>	F: TCTCCTATGGAAGAAAGGATGGAA	69
	R: ATCCAGGGCAGGAACTTGA	
<i>Bcl-xl</i>	F: GAAACCCCTAGTGCCATCAA	196
	R: GGGACGTCAGGTCACTGAAT	
<i>cFLIP</i>	F: GAGCAAGCCCCTAGGAATCT	172
	R: GTCTTGGTGTGGGGCATAAC	
<i>Bax</i>	F: TAACATGGAGCTGCAGAGGA	133
	R: AAAGTAGAAAAGCGCGACCA	

轻轻揭掉盖玻片,铺一层混匀的 10 μL 的 PBS 细胞悬液与 75 μL 1%的低熔点琼脂糖的混合液,加盖玻片,4 放置 10 min;揭掉盖玻片,铺 75 μL 1%的低熔点琼脂糖,加盖玻片,4 放置 10 min;浸入裂解液中,4 裂解 1~2 h;用蒸馏水浸洗一遍,置 TBE 电泳液中浸泡平衡 15 min;在电压 50 V、300 mA 的 TBE 电泳液中电泳 45 min;0.4 mol/L 的 Tris(pH 7.5)浸洗 15 min;滤纸吸干,无水乙醇浸泡 1 h;取出晾干,加 50 μL 的 250 $\mu\text{g/mL}$ PI 染色液,4 , 20 min;蒸馏水浸洗 3 min,滤纸吸干水分,荧光显微镜下照相。

1.6 MTS 法检测猪脂肪细胞的增殖

分离获得的猪前体脂肪细胞以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 250 μL 。在培养液中同步加入浓度为 0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 和 200 nmol/L 的渥曼青霉素,同时以等体积的 DMSO 作对照,每隔 2 d 换一次液,处理细胞 11 d,然后按照检测细胞增殖的试剂盒(G3580, Promega 公司)的 MTS 方法检测 490 nm 的吸光度。另外,动态观察了 100 nmol/L 渥曼青霉素处理 1、3、5、7、9 和 11 d 对脂肪细胞活力的影响。

1.7 统计分析

应用统计学软件 SPSS 16.0 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 油红 O 染色鉴定脂肪细胞

为检测分离的猪皮下前体脂肪细胞是否可以有效分化为成熟的脂肪细胞,对其进行诱导分化。结果表明,加入诱导剂诱导 3 d 后,细胞变圆且有部分细胞内可见脂滴,随后脂滴开始积聚,第 6 d 大部分细胞出现脂滴,且脂滴大小增加(图 1B),第 8 d 和第 10 d 细胞内脂滴进一步增加(图 1: C, D),且油红染色表明诱导组细胞内脂肪含量与对照组存在明显差异(图 1E)。对不同分化阶段细胞内脂肪含量的定量研究表明,加入分化诱导剂后,细胞内脂肪含量呈现显著上升的趋势($P < 0.05$, 图 2),而未加诱导剂的对照组内脂肪含量的增加显著低于加入诱导剂的细胞($P < 0.05$, 图 2)。

2.2 不同分化阶段脂肪细胞内成脂相关蛋白的表达

作者在前期研究了成脂相关基因和 miRNA 的表达,本研究利用 Western blotting 检测了脂肪细胞分化关键蛋白 C/EBP α 和 PPAR γ 随细胞分化的表达量变化(图 3)。结果表明, C/EBP α 和 PPAR γ 表达量均随着分化的进行不断上升,最大表达量在分化后 8 d,第 10 d 表达量较第 8 d 有所下降。

2.3 不同浓度渥曼青霉素对猪前体脂肪细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI 双标法检测细胞凋亡 3 次,其中一次的流式结果见图 4。对 3 次结果进行统计,完全培养基、DMSO、100 nmol/L 渥曼青霉素和 200 nmol/L 渥曼青霉素处理 11 d 的猪前体脂肪细胞的凋亡率分别为 $(0.27 \pm 0.04)\%$ 、 $(0.30 \pm 0.04)\%$ 、 $(0.58 \pm 0.12)\%$ 和 $(1.61 \pm 0.31)\%$ 。单因素方差分析表明,100 nmol/L 渥曼青霉素处理组与完全培养基对照和 DMSO 对照组无显著性差异 ($P > 0.05$); 200 nmol/L 渥曼青霉素显著诱导猪前体脂肪细胞凋亡,与完全培养基组、DMSO 组及 100 nmol/L 组均有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.4 渥曼青霉素对脂肪细胞凋亡相关基因表达的影响

为了从分子角度进一步检测渥曼青霉素对凋亡的影响,用 100 nmol/L、200 nmol/L、10 $\mu\text{mol/L}$ 处理猪脂肪细胞 11 d,收集细胞并检测凋亡相关基因的相对表达量,qRT-PCR 结果见图 5。凋亡启动因子 *caspase8* 和 *TNFR1* 在 200 nmol/L 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 组显著高于 GM 对照组、DMSO 对照组和 100 nmol/L 渥曼青霉素组 ($P < 0.05$); 非 *caspase* 依赖凋亡途径的启动因子 *GZMA* 在各组间未出现显著差异,而 *GZMB* 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 组显著高于其他各组 ($P < 0.05$)。凋亡促进和辅助因子 *caspase1* 和 *Bax* 均在 10 $\mu\text{mol/L}$ 组显著高于其他各组 ($P < 0.05$)。而抗凋亡因子 *Bcl-xl* 在 200 nmol/L 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 组显著高于其他各组 ($P < 0.05$),而 *cFLIP* 在各组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.5 渥曼青霉素对猪前体脂肪细胞 DNA 损伤的影响

为了研究对猪前体脂肪细胞凋亡没有显著影响的最高渥曼青霉素浓度 100 nmol/L 是否对该细胞的

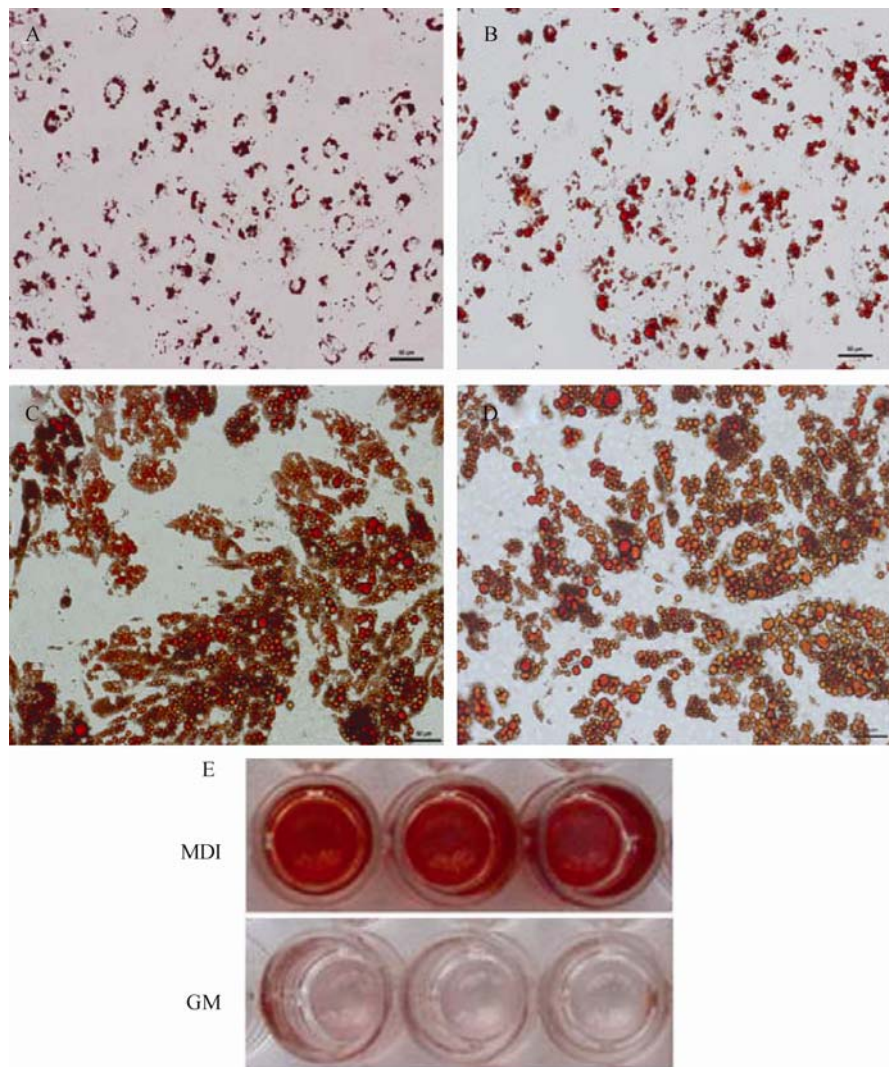


图 1 不同分化阶段脂肪细胞油红 O 染色(200×)

A : 4 d; B : 6 d; C : 8 d; D : 10 d; E : 10 d 油红 O 染色结果。MDI : 分化培养基, GM : 生长培养基。

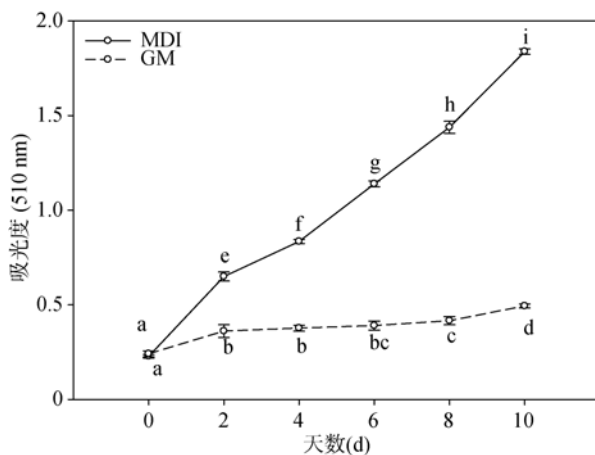


图 2 诱导分化不同分化阶段的脂肪细胞内脂肪含量
MDI : 分化培养基; GM : 生长培养基; 图中小写字母代表显著性水平, 不同字母为有显著性差异($P < 0.05$)。

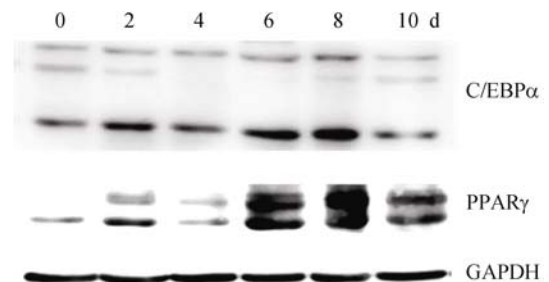


图 3 Western blot 检测 C/EBPα 和 PPARγ 蛋白

DNA 造成损伤, 采用单细胞凝胶电泳实验检测 DNA 损伤情况, 结果见图 6。100 nmol/L 渥曼青霉素处理组猪前体脂肪细胞的 DNA 完整性与 GM 对照组和 DMSO 对照组没有任何差异。

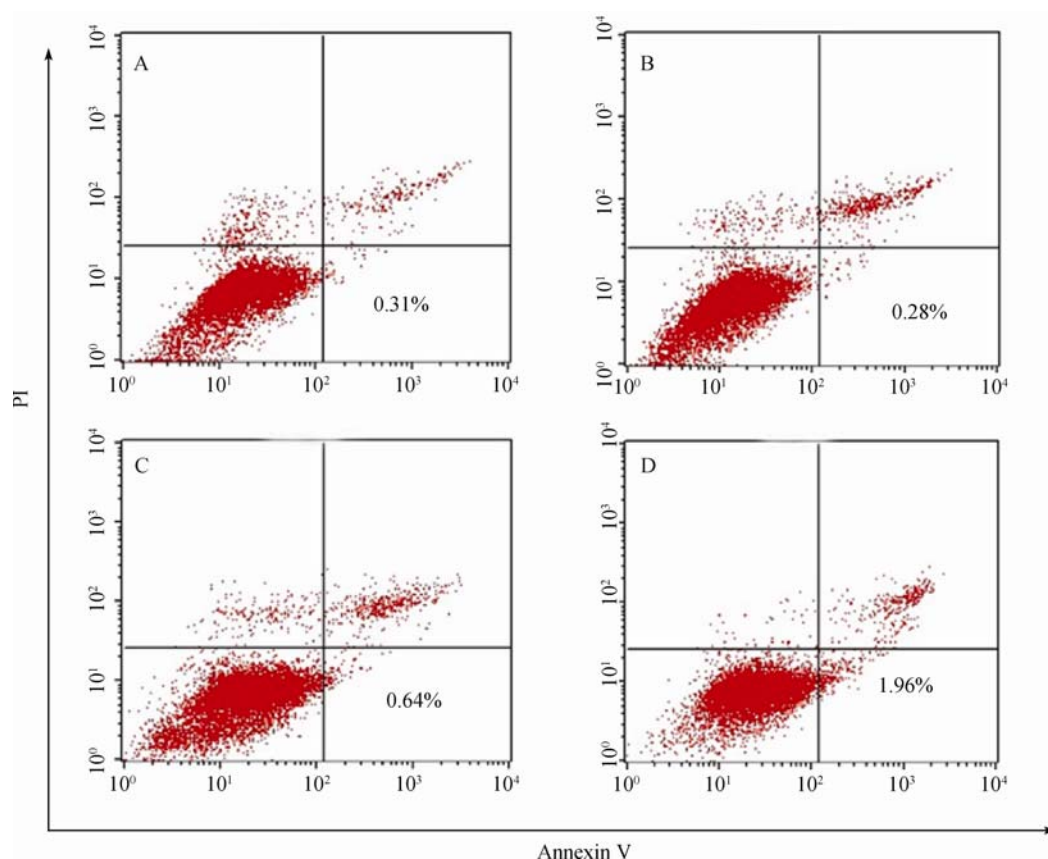


图 4 渥曼青霉素对猪脂肪细胞凋亡的影响

A: 生长培养基(GM); B: 二甲基亚砷(DMSO); C: 100 nmol/L 渥曼青霉素; D: 200 nmol/L 渥曼青霉素。横坐标为 Annexin V 染料的强度, 纵坐标为碘化丙锭(PI)染料的强度。A、B、C、D 的左上象限为机械性损伤细胞; 右上为晚期凋亡细胞或者坏死细胞; 左下为阴性正常细胞; 右下为早期凋亡细胞。

2.6 渥曼青霉素对猪前体脂肪细胞增殖的影响

渥曼青霉素对猪前体脂肪细胞增殖的影响见图 7、图 8。用 0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 及 200 nmol/L 渥曼青霉素处理脂肪细胞 11 d, 细胞的增殖情况在各组和 DMSO 组间未出现任何显著性差异 ($P>0.05$)。另在第 1、3、5、7、9、11 d 检测 0、100 nmol/L 以及 DMSO 组处理的脂肪细胞增殖表明, 3 种处理的脂肪细胞的增殖曲线均呈现典型的“S”型曲线, 且自第 5 d 开始进入对数生长期, 第 9 d 达到最大值随后进入平台期。相关性分析表明, 整个处理过程中 3 个处理组细胞活力变化皮尔森(Pearson)显著相关($P<0.01$)。

3 讨论

胰岛素信号通路关键基因 *PI3K* 对脂肪细胞的分

化至关重要, 抑制 *PI3K* 活性可显著抑制人和小鼠脂肪细胞分化^[3~7]。然而, 也有研究表明抑制 *PI3K* 的活性对人原代脂肪细胞的分化无影响, 这可能受采样个体及数量的限制, 也可能与处理时抑制剂更新时间间隔过长导致抑制剂失效有关, 因为研究表明渥曼青霉素在水溶液中会很快失去活性^[12]。至今, 未见抑制 *PI3K* 活性对猪脂肪细胞分化影响的报道。猪脂肪细胞是人脂肪细胞的最好替代细胞, 而且可以作为研究脂肪细胞分化和代谢的新模型^[13]。本研究分离了猪前体脂肪细胞, 并对不同分化阶段猪脂肪细胞中成脂关键蛋白 *PPAR γ* 、*C/EBP α* 的表达水平进行检测, 结果表明, 二者在分化后表达明显高于分化前, 且在分化后 8 d 时表达量最高, 该结果符合脂肪细胞分化过程中 *PPAR γ* 和 *C/EBP α* 蛋白典型表达趋势^[14]。研究抑制 *PI3K* 活性对猪脂肪细胞分化影响的前提是抑制剂不影响细胞的增殖和凋亡, 已知

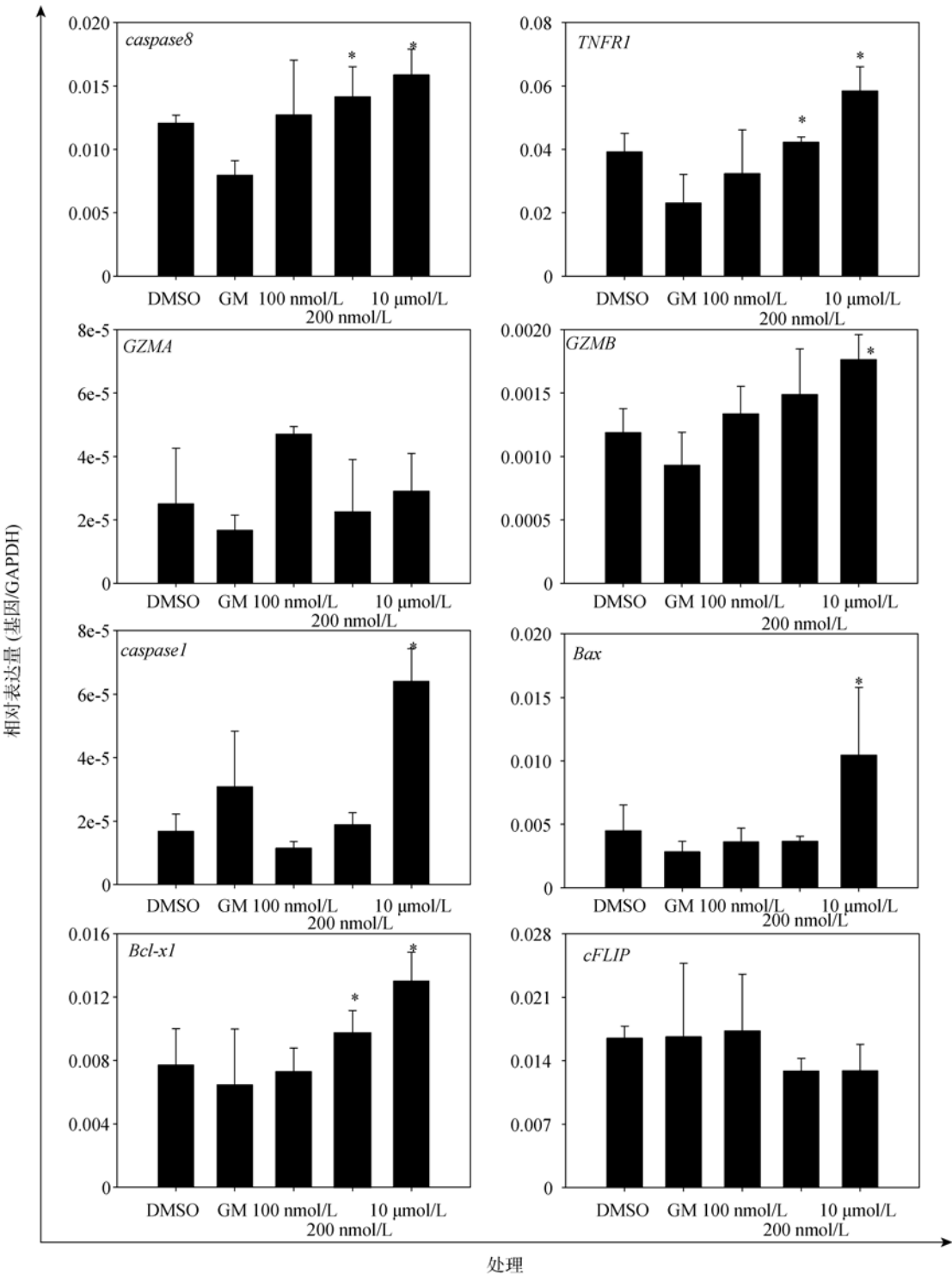


图 5 渥曼青霉素对猪脂肪细胞凋亡相关基因表达的影响

*PI3K/AKT*通路是促进细胞凋亡和抑制细胞增殖的主要途径之一[10]；为此，本研究的主要目的是寻找对猪前体脂肪细胞增殖和凋亡均无影响的适宜 *PI3K/AKT*抑制剂浓度。

渥曼青霉素及其类似物是真菌代谢产物，可以通过与 *PI3K*的催化亚单位p110结合，非竞争性和不可逆地阻断 *PI3K/Akt*信号通路，是 *PI3K*的特异性抑制剂[15]，而对 *PI4K*、*c-src*酪氨酸激酶及蛋白激酶C

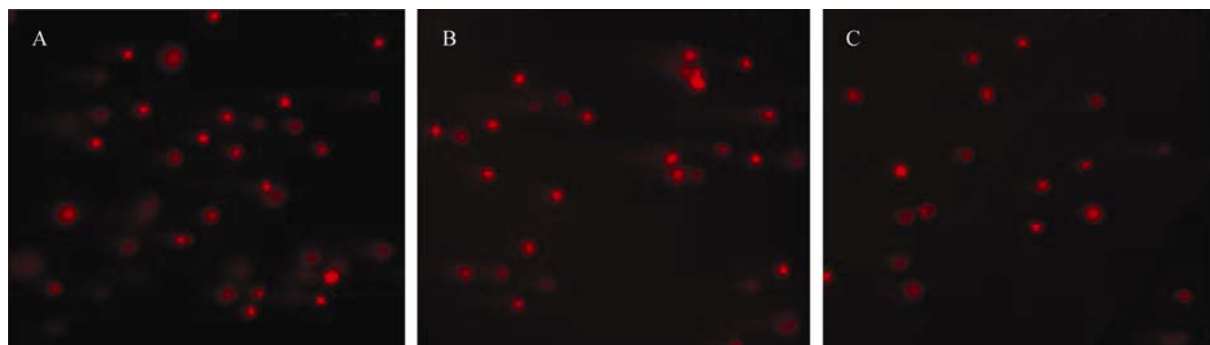


图 6 渥曼青霉素对猪脂肪细胞 DNA 损伤的影响(200×)

A: 生长培养基(GM); B: 二甲基亚砜(DMSO); C: 100 nmol/L 渥曼青霉素。

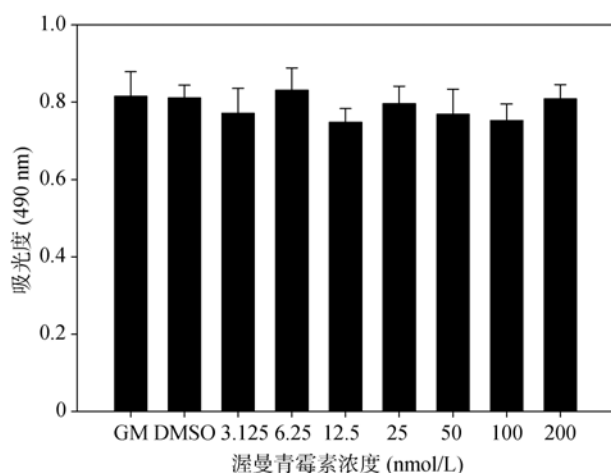


图 7 不同浓度渥曼青霉素对猪脂肪细胞增殖的影响

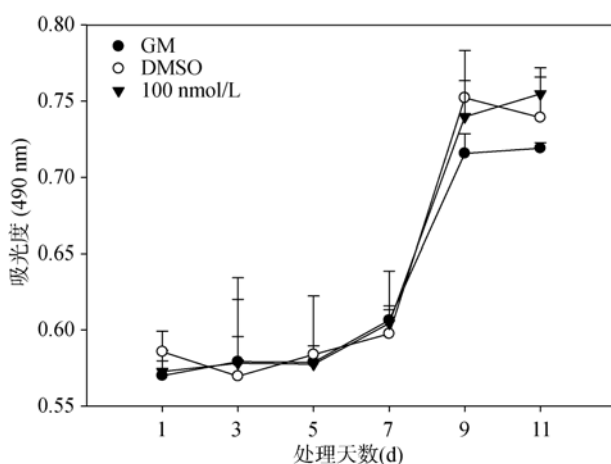


图 8 渥曼青霉素对猪脂肪细胞增殖的影响

无抑制作用, 其对 *PI3K* 50%活性的抑制剂量为 2-4 nmol/L, 100 nmol/L 浓度可全部抑制, 更高浓度的渥曼青霉素(2.3-58.4 μ mol/L)会导致细胞死亡^[12,16,17]。

6.25 nmol/L 渥曼青霉素处理人类髓细胞白血病细胞 K562 24 h 可显著促进细胞凋亡, 但 12.5 nmol/L 浓度才对该细胞增殖有显著抑制作用^[9]。此外, 10 nmol/L 渥曼青霉素类似物 LY294002 可显著抑制舌鳞癌细胞系 Tca8113 的增殖并诱导其凋亡^[10]。这两种 *PI3K* 特异性抑制剂都可下调磷酸化 *PI3K/Akt* 信号通路以及 NF- κ B 蛋白表达^[9,10], 这可能是其对增殖和凋亡产生影响的机制。本研究中流式细胞术及凋亡相关的基因检测表明, 100 nmol/L 的渥曼青霉素对凋亡无明显促进作用, 200 nmol/L 的渥曼青霉素可以显著诱导细胞的凋亡。200 nmol/L 渥曼青霉素对凋亡外在途径中凋亡启动因子 *TNFR1* 具有显著促进作用, 而 *TNFR1* 又对其下游凋亡相关基因 *caspase8* 有显著的促进作用。*caspase8* 基因的表达也被检测到有显著提高。*caspase8* 下游凋亡相关基因的表达又受抗凋亡因子 *Bcl-xl* 的抑制, 本研究中 200 nmol/L 的渥曼青霉素可以显著上调 *Bcl-xl* 的表达。促进凋亡和抑制凋亡的基因同时被诱导表达, 说明这两个途径通过相互制约而调节细胞的生存或凋亡, 这可能是细胞的适应性变化或自我保护反应。已有研究表明, 低于 25 nmol/L 的 *PI3K* 抑制剂会破坏癌细胞 DNA 的完整性, 然后细胞会激活维持生长的通路^[10, 18]。而本实验中用 100 nmol/L 的渥曼青霉素处理猪的前体脂肪细胞对 DNA 的完整性无影响, 可能与细胞类型有关, 该浓度的渥曼青霉素不足以对猪前体脂肪细胞的 DNA 完整性造成破坏, 也可能是本研究中渥曼青霉素诱导细胞凋亡的比例较低而未检测到 DNA 的损伤。在本研究中, 200 nmol/L 的渥曼青霉素对猪前体脂肪细胞的增殖无明显影响, 100 nmol/L 渥曼青霉素

对猪皮下前体脂肪细胞的动态增殖过程也无任何影响。而其他学者却发现比此研究低得多的渥曼青霉素浓度可以有效抑制白血病细胞和胃癌细胞的增殖^[9,15], 这可能与细胞的种类及抗药性有关, 也可能是因为本实验中渥曼青霉素促进细胞凋亡的比例较少。

综上, 100nmol/L 渥曼青霉素对猪前体脂肪细胞的增殖和凋亡均无显著影响, 为在不影响脂肪细胞增殖和凋亡的情况下, 研究 *PI3K/AKT* 对细胞聚酯分化的影响奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] Wolin KY, Carson K, Colditz GA. Obesity and cancer. *Oncologist*, 2010, 15(6): 556–565. DOI
- [2] Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 2001, 414(6865): 799–806. DOI
- [3] Sakaue H, Ogawa W, Matsumoto M, Kuroda S, Takata M, Sugimoto T, Spiegelman BM, Kasuga M. Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, 1998, 273(44): 28945–28952. DOI
- [4] Cross MJ, Stewart A, Hodgkin MN, Kerr DJ, Wakelam MJO. Wortmannin and its structural analogue demethoxyviridin inhibit stimulated phospholipase A₂ activity in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*, 1995, 270(43): 25352–25355. DOI
- [5] Tomiyama K, Nakata H, Sasa H, Arimura S, Nishio E, Watanabe Y. Wortmannin, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, inhibits adipocytic differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 212(1): 263–269. DOI
- [6] Xia X, Serrero G. Inhibition of adipose differentiation by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *J Cell Physiol*, 1999, 178(1): 9–16. DOI
- [7] Aubin D, Gagnon A, Sorisky A. Phosphoinositide 3-kinase is required for human adipocyte differentiation in culture. *Int J Obesity*, 2005, 29(8): 1006–1009. DOI
- [8] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 2002, 296(5573): 1655–1657. DOI
- [9] 王晓南, 吴青, 张连生, 吴一品, 舒砚文. PI3K/Akt 抑制剂渥曼青霉素对白血病细胞增殖和凋亡的影响. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(1): 82–87. DOI
- [10] 石丹, 范德生, 甄蕾, 张红. PI3K/Akt 信号通路抑制剂在舌鳞癌细胞系增殖和凋亡中的作用. *口腔颌面外科杂志*, 2010, 20(5): 324–326. DOI
- [11] Ihle NT, Lemos R Jr, Wipf P, Yacoub A, Mitchell C, Siwak D, Mills GB, Dent P, Kirkpatrick DL, Powis G. Mutations in the phosphatidylinositol-3-kinase pathway predict for antitumor activity of the inhibitor PX-866 whereas oncogenic ras is a dominant predictor for resistance. *Cancer Res*, 2009, 69(1): 143–150. DOI
- [12] Varticovski L, Lu ZR, Mitchell K, de Aos I, Kopecek J. Water-soluble HPMA copolymer-wortmannin conjugate retains phosphoinositide 3-kinase inhibitory activity *in vitro* and *in vivo*. *J Controlled Rel*, 2001, 74(1–3): 275–281. DOI
- [13] Nobusue H, Kano K. Establishment and characteristics of porcine preadipocyte cell lines derived from mature adipocytes. *J Cell Biochem*, 2010, 109(3): 542–552. DOI
- [14] 王丽, 那威, 王宇祥, 王彦博, 王宁, 王启贵, 李玉茂, 李辉. 鸡PPAR γ 基因的表达特性及其对脂肪细胞增殖分化的影响. *遗传*, 2012, 34(5): 454–464. DOI
- [15] 谢霞, 高青, 王艳丽, 田翀. 抑制PI3K/PKB信号通路提高胃癌细胞化疗敏感性的研究. *中国药理学通报*, 2008, 24(12): 1666–1670. DOI
- [16] Arcaro A, Wymann MP. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochemical J*, 1993, 296(Pt2): 297–301. DOI
- [17] Yano H, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y, Nonomura Y, Matsuda Y. Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J Biol Chem*, 1993, 268(34): 25846–25856. DOI
- [18] Prevo R, Deutsch E, Sampson O, Diplexcito J, Cengel K, Harper J, O'Neill P, McKenna WG, Patel S, Bernhard EJ. Class I PI3 kinase inhibition by the pyridinylfuranopyrimidine inhibitor PI-103 enhances tumor radiosensitivity. *Cancer Res*, 2008, 68(14): 5915–5923. DOI