

# GLUT4 和脂联素在 3T3 - L1 脂肪细胞中 共享囊泡转运机制

崔 菊 庞 静 宫 环 蔡剑平 张铁梅

**摘 要** **目的** 观察葡萄糖转运蛋白 GLUT4 和脂联素在 3T3 - L1 细胞中的亚细胞分布。**方法** 诱导 3T3 - L1 前脂肪细胞分化,比较细胞分化前后 GLUT4 和脂联素的表达情况;通过蔗糖密度梯度离心比较 GLUT4 囊泡和脂联素囊泡的密度;采用结构照明超高分辨率显微镜(3D - SIM)观察 GLUT4 和脂联素在 3T3 - L1 脂肪细胞内的分布情况。**结果** 3T3 - L1 前脂肪细胞呈梭形,胞质内无脂滴,细胞分化成熟后呈圆形,胞质内含有大量脂滴;GLUT4 和脂联素在 3T3 - L1 前脂肪细胞中不表达,在分化成熟的脂肪细胞中高表达;GLUT4 囊泡和脂联素囊泡具有相似的密度;GLUT4 和脂联素在细胞中共定位。**结论** GLUT4 和脂联素在 3T3 - L1 脂肪细胞中分布于相似的细胞囊泡结构,共享转运机制。

**关键词** 葡萄糖转运蛋白 脂联素 细胞囊泡 3T3 - L1 细胞

**中图分类号** R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.006

**GLUT4 and Adiponectin Share Similar Intracellular Trafficking Pathways.** Cui Ju, Pang Jing, Gong Huan, et al. The Key Laboratory of Geriatrics, National Center of Gerontology, Beijing Hospital & Beijing Institute of Geriatrics, Beijing 100730, China

**Abstract** **Objective** To investigate the subcellular distribution of glucose transporter GLUT4 and adiponectin in 3T3 - L1 adipocytes. **Methods** 3T3 - L1 preadipocytes were differentiated in medium containing 10% FBS, 5  $\mu$ g/ml insulin, 1  $\mu$ mol/L dexamethasone and 0.5 mmol/L IBMX. Western blot was used to examine the expression levels of GLUT4 and adiponectin before and after cell differentiation. The densities of GLUT4 vesicles and adiponectin vesicles were compared by sucrose gradient centrifugation. The subcellular distributions of GLUT4 and adiponectin were investigated by three - dimensional structured illumination microscopy (3D - SIM). **Results** As 3T3 - L1 adipocytes matured, the cell shape changed noticeably, from fibroblastic to spherical with numerous oil droplets in the cytoplasm. GLUT4 and adiponectin were not expressed in 3T3 - L1 preadipocytes, but highly expressed in mature adipocytes. GLUT4 and adiponectin distribution overlapped in the sucrose gradient, suggesting that GLUT4 vesicles and adiponectin vesicles have similar densities. Furthermore, 3D - SIM revealed that the endogenous GLUT4 in the steady state was co - localized with adiponectin, which was supported by a value of pearson coefficient of correlation of (0.842  $\pm$  0.021) (mean  $\pm$  SEM). **Conclusion** GLUT4 and adiponectin are present in the same membranous cellular compartment and share similar intracellular trafficking pathways.

**Key words** GLUT 4; Adiponectin; Cellular membranous compartment; 3T3 - L1 adipocytes

随着人们生活方式的改变和人口老龄化,肥胖和 2 型糖尿病已经成为危害人类健康和生活质量的主要疾病。研究表明,脂肪组织不仅是一个被动的储存能量的器官,它还是一个调节机体内分泌、能量代谢及炎症的内分泌器官。

葡萄糖转运蛋白 GLUT4 是一种膜蛋白,在胰岛

素敏感的骨骼肌、心肌和脂肪细胞中表达。胰岛素刺激激发一系列级联反应,导致富含 GLUT4 的囊泡从细胞内向细胞外膜移动,GLUT4 转位至细胞外膜,与葡萄糖结合并将葡萄糖转运至细胞内。当循环胰岛素水平下降时,GLUT4 通过吞饮作用从细胞外膜内吞到胞内储存囊泡中,从而保持血糖平衡<sup>[1]</sup>。在小鼠脂肪组织中特异性敲除 GLUT4 导致小鼠肌肉和肝脏胰岛素抵抗,表明脂肪细胞 GLUT4 水平的降低可继发诱导其他组织的胰岛素抵抗<sup>[2]</sup>。

脂联素(adiponectin, Acrp30)是脂肪细胞特异性分泌的一种重要的脂肪细胞因子,在血中有较高的浓度(5 ~ 30  $\mu$ g/ml),几乎占血浆总蛋白的 0.01%<sup>[3, 4]</sup>。近年来研究发现,脂联素的血浆水平在胰岛素抵抗和

基金项目:国家自然科学基金资助项目(青年项目)(31400995);北京市自然科学基金项目(7154234);北京医院科技新星项目(BJ - 2016 - 034)

作者单位:100730 北京医院、国家老年医学中心、国家卫生和计划生育委员会(原卫生部)老年医学重点实验室

通讯作者:张铁梅,电子信箱:tmzhang126@126.com;蔡剑平,电子信箱:caijp51@vip.sina.com

肥胖的情况下降低,在合并冠心病的患者中降低更加明显<sup>[5]</sup>。这一变化趋势与包括肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ ),瘦素(leptin)和抵抗素(resistin)等在内的其他脂肪因子相反。脂联素作为一种多肽激素,具有改善胰岛素抵抗、抗动脉粥样硬化、降血糖、降血脂等作用,是一种潜在的治疗代谢疾病的新药靶。本研究旨在观察葡萄糖转运蛋白 GLUT4 和脂联素在 3T3-L1 脂肪细胞中的亚细胞分布,探讨其胞内运输调控机制。

### 材料与方法

1. 材料:3T3-L1 细胞株:购于北京协和细胞中心,由美国 ATCC 公司建系;细胞培养皿购自 Corning 公司;小牛血清(CS)和胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司;胰岛素(insulin)、地塞米松(dexamethasone)和3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)购自 Sigma 公司;山羊源 adiponectin 抗体购自 R&D 公司;鼠源 GLUT4 抗体购自 Abcam 公司;兔源 PPAR $\gamma$  抗体购自 Thermo 公司兔源  $\beta$ -actin 抗体购自康为世纪公司。

2. 方法:(1)3T3-L1 细胞培养和分化:小鼠 3T3-L1 细胞以含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基传代培养。细胞汇合两天后,细胞培养液换为脂肪细胞分化诱导液(10% FBS, 5 $\mu$ g/ml 胰岛素, 1 $\mu$ mol/L 地塞米松, 0.5mmol/L IBMx, DMEM)培养 2 天;换脂肪细胞分化培养液(10% FBS, 5 $\mu$ g/ml 胰岛素, DMEM)培养 2 天,接着换 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液维持培养,每 2 天换 1 次液。到第 8 天时细胞分化成熟,含脂滴的成熟的脂肪细胞数量增多,脂滴变大变圆。(2)蔗糖密度梯度离心:将分化的 3T3-L1 脂肪细胞(8 天)用 PBS 清洗两遍,用刮刀将细胞收集于细胞裂解液(0.3mol/L 蔗糖, 5mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris-HCl, pH 7.4),用玻璃杵研磨裂解细胞。细胞裂解液经 25G 针头抽吸混匀 20min。细胞裂解过程均在冰上操作。细胞裂解碎片和细胞核在 4 $^{\circ}$ C 经 500g 离心 15min 去除。上清液继续在 4 $^{\circ}$ C 经 100000 $\times$ g 离心 1h(XL-90 ultracentrifuge, Beckman)。将富集于沉淀中的膜结构成分悬浮于细胞裂解液中,进行蔗糖密度梯度离心。蔗糖密度梯度管的制备包括从 0.5mol/L 到 1.7mol/L, 7 个不同的浓度的蔗糖各 1ml 和管底铺 2mol/L 的蔗糖 2ml。密度梯度离心管在 4 $^{\circ}$ C 经 200000 $\times$ g 离心 16h。离心后,收集不同密度区带中间相做 Western blot 法检测。(3)Western blot 法检测:用细胞裂解液[10mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 0.15mol/L NaCl, 5mmol/L EDTA, 1%

Triton X-100] 提取 3T3-L1 细胞总蛋白,检测 GLUT4、adiponectin、PPAR $\gamma$  和  $\beta$ -actin 的表达量。蔗糖密度梯度离心分离产物直接加上样缓冲液,通过 Western blot 法检测 GLUT4 和 adiponectin 的蛋白量。(4)细胞免疫荧光染色和结构照明超高分辨率显微镜(3D-SIM):3T3-L1 前脂肪细胞接种于包被有多聚赖氨酸(Poly-D-Lysine)的盖玻片上诱导分化。分化成熟的脂肪细胞用 4% PFA/PBS 在 4 $^{\circ}$ C 固定 10min,然后用 0.2% Triton X-100/PBS 在 4 $^{\circ}$ C 孵育 10min 破膜。用 GLUT4 和 adiponectin 的一抗在 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育细胞。然后用 Alexa Fluor 488-和 Fluor 555-标记的二抗在室温孵育细胞 1h。通过 DeltaVision OMX V3 图像系统采集 3T3-L1 脂肪细胞的 3D-SIM 图像。Z 轴间隔 250nm 连续扫描采集图像信息。通过宽场去卷积的方法对所采集的图片进行叠加处理。通过 SoftWoRx6.6.1 对生成的图片进行最大强度投影处理。

### 结 果

1. GLUT4 和脂联素在 3T3-L1 脂肪细胞中高表达:诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化的过程中,细胞形态发生显著变化。3T3-L1 前脂肪细胞呈梭形,核质比较大,胞质内无脂滴。诱导 8 天以后,细胞分化成熟后,细胞形态接近圆形,核质比缩小,胞质内含有大量透明脂滴(图 1A)。伴随着细胞形态的改变,基因的表达水平也发生显著变化。转录因子 PPAR $\gamma$  和 C/EBP $\alpha$  大量表达,激活糖代谢的相关基因表达,促进脂滴形成,细胞形态进一步变圆,最终分化为脂肪细胞。PPAR $\gamma$  和 C/EBP $\alpha$  在未分化的 3T3-L1 前脂

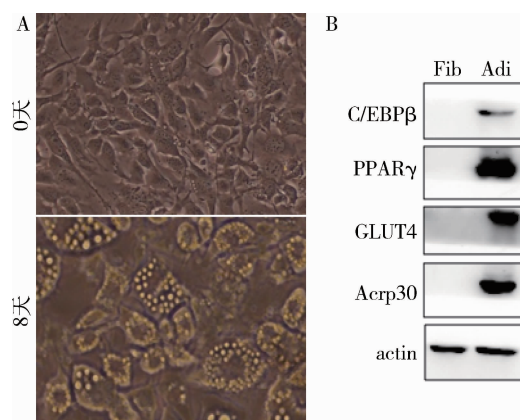


图 1 GLUT4 和脂联素在 3T3-L1 脂肪细胞中特异表达

A. 3T3-L1 细胞分化前后细胞形态发生显著变化;B. GLUT4 和脂联素(Acrp30)在 3T3-L1 细胞分化前后的表达情况;Fib. 前脂肪细胞;Adi. 脂肪细胞

肪细胞中不表达,在 3T3-L1 脂肪细胞中大量表达,PPAR $\gamma$  是脂肪细胞分化成熟的标记蛋白。GLUT4 和脂联素的表达变化趋势与 PPAR $\gamma$  一致,在未成熟的 3T3-L1 前脂肪细胞中不表达,在分化成熟的脂肪细胞中大量表达(图 1B)。GLUT4 和脂联素在脂肪细胞中特异性表达表明其与脂肪细胞调节体内分泌、能量代谢的功能密切相关。

2. GLUT4 囊泡和脂联素囊泡具有相似的密度:为了研究 GLUT4 囊泡和脂联素囊泡在脂肪细胞中的分布情况,3T3-L1 脂肪细胞的膜结构成分通过蔗糖密度梯度离心分选为不同密度组分。对不同密度组分进行 Western blot 法检测分析 GLUT4 和脂联素的蛋白水平。结果表明,GLUT4 和脂联素的分布重叠。GLUT4 囊泡和脂联素囊泡具有相似的浮力表明,GLUT4 和脂联素有可能分布于相同的细胞膜结构(图 2)。

3. GLUT4 和脂联素在 3T3-L1 脂肪细胞中共定位:为了进一步观察 GLUT4 和脂联素的亚细胞分布情况,分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞经 PFA 固定和

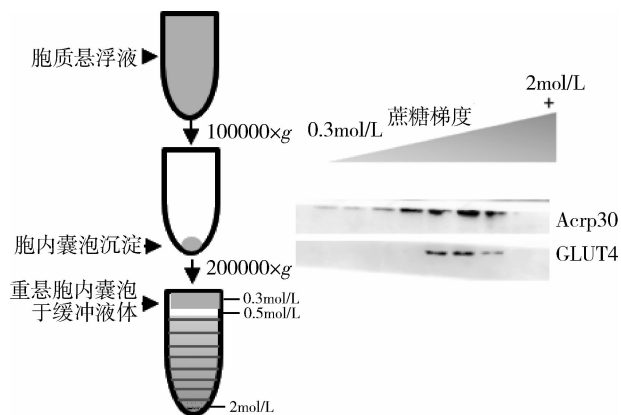


图 2 GLUT4 囊泡和脂联素囊泡具有相似的密度

去垢剂破膜处理之后,通过免疫双荧光染色标记 GLUT4(红色)和脂联素(绿色)。通过结构照明超高分辨率显微镜(3D-SIM, OMX)分析发现,在分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞内,GLUT4 与脂联素(Acp30)呈点状分布于胞质内,并且有充分的共定位(黄色, Pearson 系数为  $0.842 \pm 0.021$ ,图 3)。

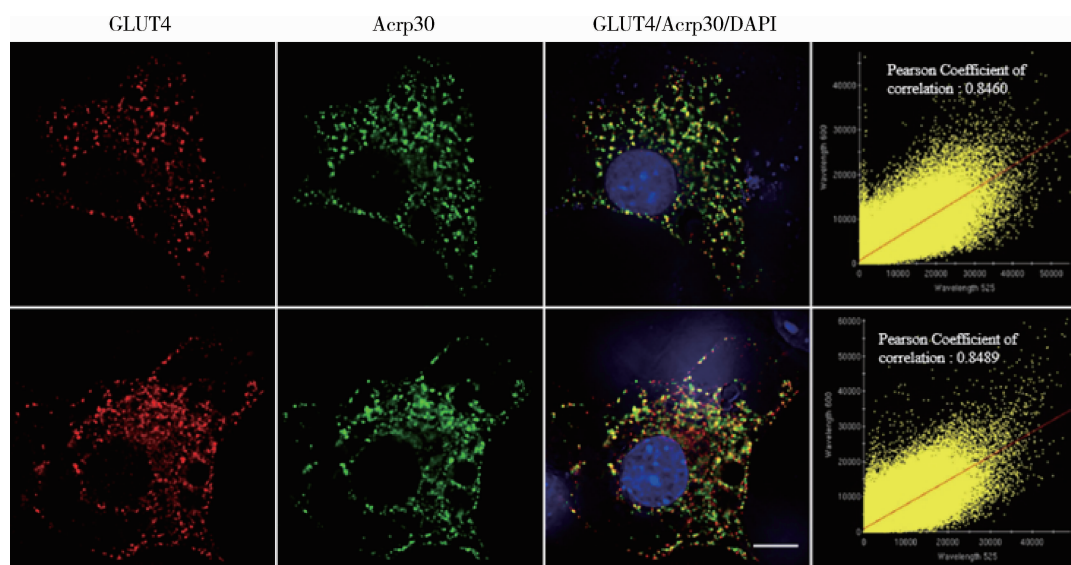


图 3 GLUT4 和脂联素在 3T3-L1 脂肪细胞内共定位

## 讨 论

结构照明超高分辨率显微镜,能够突破传统光学显微镜无法逾越的空间和时间上的技术极限,大大提高空间的分辨率,保持高分辨率的同时还能实现极快速的图像更新。本研究首次通过结构照明超高分辨率显微镜观察到 GLUT 和脂联素在 3T3-L1 脂肪细胞中共定位。脂联素分泌和 GLUT4 细胞膜转位对糖代谢都有重要作用。已有的研究表明,在分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞中,调控 GLUT4 细胞膜转位和脂

联素分泌的机制有诸多相似之处,体现在以下几个方面:胰岛素刺激能够激活 PI $_3$ K,同时促进 GLUT4 细胞膜转位和脂联素分泌<sup>[6,7]</sup>。在高尔基体反面网络中, GLUT4 被特异性分选到 GGA1 标记的包被小泡而离开高尔基体,GGA1 干扰突变体同样能够阻断脂联素的分泌,而对瘦素的分泌没有影响<sup>[8,9]</sup>;离开高尔基体, GLUT4 的细胞膜转位和脂联素的分泌均需内涵体的参与<sup>[10,11]</sup>。此外, Vti1a(即 v-SNARE 蛋白,位于运输小泡上,特异性地识别靶膜上的 t-SNARE 并

与之结合,实现运输小泡向卸载)同时调控胰岛素刺激下的 GLUT4 细胞膜转位和脂联素分泌<sup>[12]</sup>。GLUT4 囊泡和脂联素分泌泡从高尔基体运输到内涵体并最终转位到细胞膜或者分泌到细胞外的过程均需要马达蛋白 KIF5B 的参与<sup>[13]</sup>。这一系列研究结果表明脂肪细胞极有可能采取类似的调控机制,甚至是相同的胞内运输途径和分子机制来同时调控 GLUT4 细胞膜转位和脂联素分泌,从而最大效应地响应细胞外胰岛素信号。

#### 参考文献

- 1 Assimacopoulos - Jeannet F, Cusin I, Greco - Perotto RM, *et al.* Glucose transporters: structure, function, and regulation [J]. *Biochimie*, 1991, 73 (1): 67 - 70
- 2 Abel ED, Peroni O, Kim JK, *et al.* Adipose - selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver [J]. *Nature*, 2001, 409 (6821): 729 - 733
- 3 Scherer PE, Williams S, Fogliano, *et al.* A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270 (45): 26746 - 26749
- 4 Arita Y, Kihara S, Ouchi N, *et al.* Paradoxical decrease of an adipose - specific protein, adiponectin, in obesity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 257 (1): 79 - 83
- 5 Pajvani UB, Scherer PE. Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity [J]. *Curr Diab Rep*, 2003, 3 (3): 207 - 213

- 6 Bogan JS, Lodish HF. Two compartments for insulin - stimulated exocytosis in 3T3 - L1 adipocytes defined by endogenous ACRP30 and GLUT4 [J]. *J Cell Biol*, 1999, 146 (3): 609 - 620
- 7 Rea S, James DE. Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles [J]. *Diabetes*, 1997, 46 (11): 1667 - 1677
- 8 Watson RT, Khan AH, Furukawa M, *et al.* Entry of newly synthesized GLUT4 into the insulin - responsive storage compartment is GGA dependent [J]. *EMBO J*, 2004, 23 (10): 2059 - 2070
- 9 Xie L, Boyle D, Sanford D, *et al.* Intracellular trafficking and secretion of adiponectin is dependent on GGA - coated vesicles [J]. *J Bio Chem*, 2006, 281 (11): 7253 - 7259
- 10 Xie L, O'Reilly CP, Chapes SK, *et al.* Adiponectin and leptin are secreted through distinct trafficking pathways in adipocytes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1782 (2): 99 - 108
- 11 Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4 [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3 (4): 267 - 277
- 12 Bose A, Guilherme A, Huang S. The v - SNARE Vti1a regulates insulin - stimulated glucose transport and Acrp30 secretion in 3T3 - L1 adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (44): 36946 - 36951
- 13 Cui J, Pang J, Lin YJ, *et al.* Conventional kinesin KIF5B mediates adiponectin secretion in 3T3 - L1 adipocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 476 (4): 620 - 626

(收稿日期: 2016 - 07 - 14)

(修回日期: 2016 - 07 - 14)

## 心肌线粒体改变对 1 型糖尿病小鼠 心脏结构与功能的影响

陈 翠 孟哲颖 郑元义 胡 兵 申 镆

**摘 要** **目的** 探讨心肌线粒体改变对 1 型糖尿病小鼠心脏结构与功能的影响。**方法** 20 只 8 周龄雄性 C57/BL6J 小鼠随机分为对照组 ( $n = 10$ ), 1 型糖尿病组 ( $n = 10$ )。单次腹腔注射 STZ (150mg/kg) 建立 1 型糖尿病动物模型, 实验到达终点时采用小动物用高分辨超声仪观察小鼠心脏结构, 测量心脏功能; 光镜下观察心肌细胞形态改变, 透射电镜下观察心肌细胞线粒体变化, Western blot 法检测线粒体相关蛋白 TFAM 及 PGC - 1 $\alpha$ 。原代培养 C57BL/6J 乳鼠心肌细胞, 观察在不同糖浓度 (5mmol/L、33mmol/L) 中培养 48h 后心肌细胞的形态学变化, 透射电镜下观察心肌细胞线粒体的改变, Western blot 法检测线粒体相关蛋白 TFAM 及 PGC - 1 $\alpha$ 。**结果** 与正常组小鼠相比, 1 型糖尿病组小鼠心肌线粒体排列不规则, 肿胀, 脊脱落溶解, 线粒体相关蛋白 TFAM 及 PGC - 1 $\alpha$  表达减低 ( $P < 0.05$ ), 1 型糖尿病小鼠心脏肥大, 室壁增厚, 心功能减低。与正常糖浓度培养组相比, 高糖培养组线粒体肿胀、脊断裂溶解, 线粒体相关蛋白 TFAM 及 PGC - 1 $\alpha$  表达减低 ( $P < 0.05$ ), 心肌细胞肥大显著, 形态欠规则。**结论** 心肌线粒体结构与功能的改变与 1 型糖尿病小鼠心脏结构与功能改变有关。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (面上项目) (81270208)

作者单位: 200233 上海交通大学附属第六人民医院超声医学科 (陈翠、孟哲颖、郑元义、胡兵); 200233 上海超声医学研究所 (胡兵、申镆); 200336 上海交通大学附属同仁医院 (申镆)

通讯作者: 申镆, 电子信箱: shenel26@126.com