

炎症因子 IFN- γ 调控小鼠成肌细胞 FoxO1 乙酰化及活性的机制研究

方明明¹, 吴晓燕², 李平³, 袁艺标^{2*}

(¹江苏建康职业学院医学护理系, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学基础医学国家级实验教学示范中心, 江苏 南京 210029; ³南京医科大学第二附属医院消化科, 江苏 南京 210011)

[摘要] 目的: 在炎症信号 IFN- γ 作用下, 研究小鼠成肌细胞(C2C12)内 FoxO1 的活性和乙酰化水平的改变, 探讨炎症在 2 型糖尿病发病过程中的机制。方法: 免疫共沉淀分析 III 型脱乙酰化酶沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1) 激动剂白藜芦醇对 IFN- γ 升高 FoxO1 乙酰化水平的影响。通过荧光素酶报告基因活性实验分析 IFN- γ 、C II TA 对 FoxO1 转录活性的影响, 同时用小 RNA 干扰内源性 C II TA 后再检测 IFN- γ 作用下 FoxO1 转录活性的改变。结果: 蛋白实验显示, IFN- γ 处理后 FoxO1 乙酰化水平明显升高, 白藜芦醇降低该效应。报告基因实验显示 IFN- γ 抑制野生型 FoxO1 的转录活性, 对赖氨酸突变的 FoxO1 作用不大。过表达 C II TA 抑制了 FoxO1 靶基因 FHRE 启动子的活性, 且在同时转染 FoxO1 时抑制 60% 左右。IFN- γ 抑制 FoxO1 的转录活性, 内源性 C II TA 干扰后再给予 IFN- γ , 抑制作用消失。结论: IFN- γ 通过激活 C II TA 降低 SIRT1 酶活性, 使 SIRT1 对 FoxO1 的去乙酰化作用减弱, 提高了 FoxO1 乙酰化水平, 抑制了 FoxO1 的转录活性。本研究为临床 2 型糖尿病的治疗提供了新思路。

[关键词] IFN- γ ; C II TA; III 型脱乙酰化酶(SIRT1); FoxO1

[中图分类号] R392.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)11-1316-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20161107

Effects of IFN- γ on FoxO1 acetylation and activity in mouse myoblast cells and its mechanism

Fang Mingming¹, Wu Xiaoyan², Li Ping³, Yuan Yibiao^{2*}

(¹Department of Nursing Medicine, Jiangsu Jiankang Vocational College, Nanjing 210029; ²National Model Center of Laboratory Teaching in Basic Medical Science, NJMU, Nanjing 210029; ³Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the activity and acetylation of FoxO1 after inflammatory cytokine IFN- γ treatment in mouse myoblast cells (C2C12) and its regulatory mechanisms on T2DM. **Methods:** Acetylation of FoxO1 after IFN- γ and silent information regulator 1(SIRT1) activator resveratrol treatment were evaluated by co-immunoprecipitation (co-IP) followed by Western blot. Luciferase reporter assays were performed to assess the effect of IFN- γ and C II TA on the promoter activities of FoxO1. To evaluate whether C II TA was necessary for the repression of SIRT1 activity by IFN- γ , cells were transfected with C II TA small interfering RNA (siRNA). **Results:** IFN- γ augmented the acetylation level of FoxO1 while down-regulated by resveratrol. IFN- γ suppressed the transcriptional activity of wild-type FoxO1, mutation of lysine residues in FoxO1 abrogated such effects. C II TA directly inhibited FoxO1 dependent transcription and while transfected with FoxO1 simultaneously, the inhibition was up to 60%. C II TA depletion restored FoxO1 transcriptional activity in the presence of IFN- γ . **Conclusion:** IFN- γ induced the expression of C II TA, which in turn inhibited SIRT1 enzyme activity, increased the acetylation level of FoxO1, thus reduced its transcriptional activity. Therefore, our study provides a potential target for clinical intervention in T2DM.

[Key words] IFN- γ ; C II TA; type III deacetylase(SIRT1); FoxO1

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(11): 1316-1320]

[基金项目] 国家自然科学基金(81570420)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yuanyb@njmu.edu.cn

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是由遗传和环境因素引起的一类复杂的代谢紊乱综合征,其特征是外周组织包括骨骼肌细胞对胰岛素耐受并伴有向心性肥胖。动物实验表明,线粒体生物合成损伤、氧化磷酸化缺陷,参与能量消耗的蛋白质合成减少,在 T2DM 发病过程中起着重要作用^[1]。

多个转录因子共同作用形成调控网络调控着能量消耗和代谢稳态,该网络的异常会导致骨骼肌线粒体功能障碍最终发展为 T2DM^[2]。FoxO1 属于叉头框转录因子家族,被认为是线粒体依赖的能量消耗的主要调节因子之一。FoxO1 催化细胞糖脂代谢和能量代谢中一些关键基因如 pdk4、mcad、ppargc-1 α 和 cyps 的转录激活,其活性受磷酸化和乙酰化翻译后修饰机制的影响^[3-4]。

III 型脱乙酰化酶沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 已经被证实去乙酰化 FoxO1, 促进其核积聚, 增强与靶基因启动子的结合^[5]。SIRT1 与酵母染色质沉默信息调节因子 Sir2 同源性最高, 是一种依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 的脱乙酰酶。SIRT1 通过作用于调节内分泌与代谢信号的转录因子, 如 p53、FoxO、PGC1 α 和 LXR 等^[6-8], 参与细胞的能量代谢。

近年来,越来越多的证据支持细胞因子介导的炎症反应在 T2DM 发病机制中的作用。最新研究发现肥大细胞通过 IFN- γ 和 IL-6 导致饮食诱导的肥胖和葡萄糖耐量下降,提示 IFN- γ 可能影响细胞的代谢,从而在糖尿病的发生过程中发挥作用^[9]。本研究拟在炎症信号 IFN- γ 作用下,通过诱导 MHC II 类反式激活因子 (MHC class II transactivator, CII TA), 研究 C2C12 小鼠成肌细胞内 FoxO1 的活性和乙酰化水平的改变,进一步探讨炎症在 T2DM 发病过程中的分子机制,以期在 T2DM 及相关代谢性疾病找到新的治疗方法。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠成肌细胞 (C2C12, ATCC 公司, 美国); DMEM 高糖培养液 (GIBCO 公司, 美国), 胎牛血清 (杭州四季青公司); IFN- γ (R&D 公司, 美国), 白藜芦醇 (resveratrol, Res)、抗 FoxO1 多克隆抗体、抗赖氨酸乙酰化多克隆抗体 (Cell signaling 公司, 美国); 报告基因分析试剂盒 (Promega 公司, 美国), 化学发光检测试剂盒 (Pierce 公司, 美国), LipofectamineTM2000 (Invitrogen 公司, 美国), 蛋白 A/G 结合

的琼脂糖小珠 (Santa Cruz 公司, 美国); 凝胶成像系统 (BIO-RAD 公司, 美国), CO₂ 培养箱 (Thermo 公司, 美国), 荧光检测仪 (Biosystem 公司, 美国)。pGL3-3x FHRE、pcDNA3.1、GFP 和 myc-FoxO1 质粒由本室保存。FoxO1-6KR 与 FoxO1-6KQ 突变质粒由哥伦比亚大学 Accili 博士赠送。鼠 C II TA 干扰 RNA 和阴性对照 (SCR) 由上海吉玛公司设计合成。

1.2 方法

1.2.1 C2C12 细胞的培养

用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度条件下常规培养, 待细胞至对数生长期用于实验。

1.2.2 免疫共沉淀检测 SIRT1 激动剂处理时 IFN- γ 诱导的 FoxO1 乙酰化水平

C2C12 细胞生长至 90% 融合时, 换无血清 DMEM 饥饿 20 h 后, 分为 3 组: ①实验对照组; ②IFN- γ 处理组; ③IFN- γ + Res 处理组。分别给予 IFN- γ (100 U/mL)、SIRT1 激动剂 Res (50 μ mol/L) 处理 24 h。常规收集细胞提取全蛋白裂解液, 用抗 FoxO1 抗体免疫共沉淀, 洗脱免疫复合物, 进行 SDS-PAGE 电泳, 用抗 FoxO1 抗体和抗赖氨酸乙酰化多克隆抗体免疫印记检测 FoxO1 乙酰化水平的变化。

1.2.3 用荧光素酶报告基因法分析 CII TA 对 pGL3-3x FHRE 启动子的作用

C2C12 细胞接种于 12 孔板, 1 \times 10⁵ 个/孔。接种 24 h 后转染重组荧光素酶报告基因质粒和小鼠 C II TA siRNA (序列见表 1), 步骤按照 LipofectamineTM2000 转染程序进行。转染 18 h 后更换无血清 DMEM 饥饿 24 h, 给予 IFN- γ (100 U/mL) 处理, 24 h 后检测荧光素酶活性, 每组重复 3 孔。BCA 试剂盒测定每组蛋白浓度。转染 GFP 检测转染效率, 荧光素酶活性分析用蛋白浓度和 GFP 荧光校正, 所得数据是校正随机荧光素酶单位 (NRLU) = 荧光素酶活性/蛋白浓度/GFP 荧光值。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 post-hoc 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

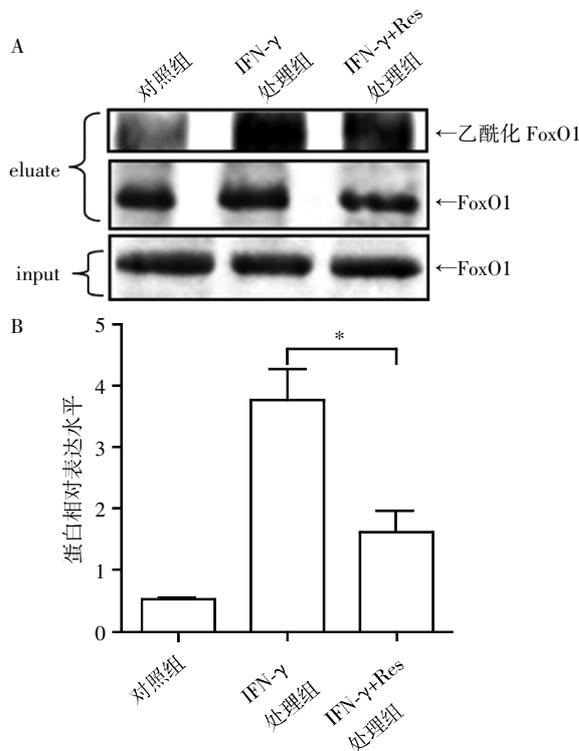
表 1 小鼠 CII TA siRNA 的序列

Table 1 Primer sequences of mouse CII TA siRNA	
siRNA	序列 (5'→3')
C II TA	正义 CAGGCCAAGACUUACAUGATT
	反义 UCAUGUAAGUCUUGGCCUGTT
SCR	正义 UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	反义 ACGUGACACGUUCGGAGAATT

2 结果

2.1 SIRT1 激动剂对 IFN- γ 诱导的 FoxO1 乙酰化水平的影响

Western blot 曝光结果可见, 各组处理可见特异性的乙酰化 FoxO1 蛋白表达条带(图 1)。灰度分析发现, IFN- γ 处理后 FoxO1 乙酰化水平较对照组明显升高, 在此基础上使用 SIRT1 激动剂 RES 处理后, FoxO1 乙酰化水平降低, IFN- γ 对 FoxO1 乙酰化水平的增强作用减弱, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。表明 SIRT1 激动剂 Res 能够减弱 IFN- γ 升高 FoxO1 乙酰化的作用。



A: 免疫共沉淀检测结果; B: FoxO1 乙酰化水平蛋白灰度分析。两组比较, $*P < 0.05$ 。

图 1 SIRT1 激动剂抑制了 IFN- γ 诱导的 FoxO1 乙酰化
Figure 1 SIRT1 activation prevents IFN- γ induced FoxO1 acetylation

2.2 赖氨酸残基突变对 IFN- γ 诱导的 FoxO1 转录活性的影响

已知 FoxO1 的 6 个赖氨酸残基(K242、K245、K259、K262、K271、K291) 是 SIRT1 的去乙酰化位点, 将这 6 个赖氨酸突变为精氨酸(FoxO1-6KR)或谷氨酰胺(FoxO1-6KQ)后, SIRT1 不能对 FoxO1 去乙酰化^[10]。在 C2C12 细胞中, 每组细胞分别转染以下质粒: 0.1 μg pGL3-3x FHRE-luc 报告基因质粒、0.1 μg FoxO1 表达质粒(FoxO1-6KR、FoxO1-6KQ 突

变质粒)。同时每组转染 0.03 μg 内参 GFP 质粒。转染后给予 IFN- γ (100 U/mL) 处理 24 h, 每组重复 3 孔。结果显示, 过表达 FoxO1 显著激活 FHRE 启动子活性, IFN- γ 抑制了 FoxO1 对 FHRE 启动子的激活作用, 差异有统计学意义。但过表达 FoxO1-6KR、FoxO1-6KQ 突变质粒之后再给予 IFN- γ 处理, 却发现 IFN- γ 对 FHRE 启动子活性的抑制作用消失(图 2)。说明 IFN- γ 使 SIRT1 对 FoxO1 的去乙酰化作用减弱, 提高了 FoxO1 的乙酰化水平, 降低其核转移, 进而抑制了 FoxO1 对 FHRE 启动子的转录激活。因此, IFN- γ 可能通过抑制 SIRT1 的活性发挥对 FoxO1 转录活性的抑制。

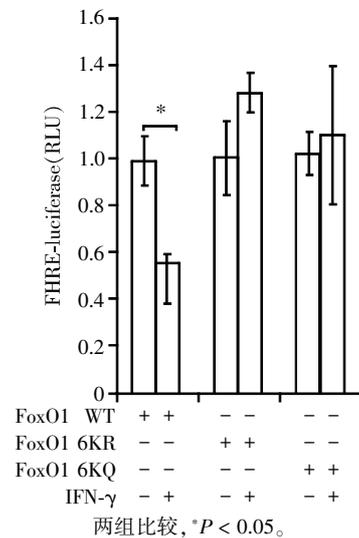


图 2 FoxO1 的赖氨酸残基突变消除了 IFN- γ 诱导的转录抑制

Figure 2 Mutation of lysine residues in FOXO1 abrogates IFN- γ induced repression

2.3 C II TA 对 FoxO1 转录活性的影响

本课题组以往研究发现, IFN- γ 对 I 型胶原基因(COL1A2)及清道夫受体基因(CD36)的转录抑制由 C II TA 介导^[11]。在 C2C12 细胞中, IFN- γ 能诱导内源性 C II TA 的表达^[12], 推测 IFN- γ 对 FHRE 的转录抑制是否也是依赖 C II TA 的。在 C2C12 细胞中, 每组细胞分别转染以下质粒: 0.1 μg pGL3-3x FHRE-luc 报告基因质粒, 0.1 μg pGL3-3x FHRE-luc+0.1 μg C II TA 表达质粒, 0.1 μg pGL3-3x FHRE-luc+0.1 μg FoxO1 表达质粒, 0.1 μg pGL3-3x FHRE-luc+0.1 μg FoxO1+0.1 μg C II TA。同时每组转染 0.03 μg 内参 GFP, 空载 pcDNA3.1 配平, 重复 3 孔。结果显示, 过表达 C II TA 抑制了 FHRE 启动子的活性, 并且这种抑制作用在同时过表达 FoxO1 的情况下更为显著, 达 60% 左右, 差异明显有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。

说明 C II TA 直接抑制了 FoxO1 依赖的转录活性, IFN- γ 对 FoxO1 靶基因(FHRE)启动子活性的抑制作用可能是通过激活 C II TA 发挥的。

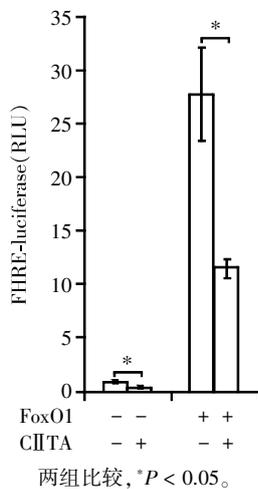


图 3 CII TA 直接抑制了 FoxO1 的转录活性

Figure 3 CII TA directly represses FoxO1 dependent transcription

2.4 干扰内源 C II TA 对 FoxO1 转录活性的影响

在 C2C12 细胞中, 每组细胞转染以下质粒: ① 0.1 μ g pGL3-3x FHRE-luc 报告基因质粒+0.1 μ g SCR; ② 0.1 μ g pGL3-3x FHRE-luc+0.1 μ g SCR+0.1 μ g FoxO1 表达质粒; ③ 0.1 μ g pGL3-3x FHRE-luc+0.1 μ g SCR+0.1 μ g FoxO1, 转染后 IFN- γ (100 U/mL) 处理 24 h; ④ 0.1 μ g pGL3-3x FHRE-luc +0.1 μ g C II TA siRNA+0.1 μ g FoxO1, 转染后 IFN- γ (100 U/mL) 处理 24 h。每组转染 0.03 μ g 内参 GFP, 空载 pcDNA-3.1 配平, 重复 3 孔。结果显示, 过表达 FoxO1 显著激活 FHRE 启动子活性, IFN- γ 抑制了 FoxO1 对 FHRE 启动子的激活作用, 内源性 C II TA 干扰后再给予 IFN- γ 处理, 发现 IFN- γ 对 FHRE 启动子活性的抑制作用减弱, 差异明显有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。说明 C II TA 对 IFN- γ 诱导的 FoxO1 靶基因启动子的转录抑制是必须的, C II TA 干扰后, IFN- γ 对 FHRE 的抑制作用消失。

3 讨论

免疫反应和代谢调控是相互联系、相互依赖的。近年来炎症学说在胰岛素抵抗、肥胖及 T2DM 发病中的机制关注较多。Hotamisligil 等^[13]在肥胖和糖尿病模型的脂肪组织中, 发现炎症因子 TNF- α 的 mRNA 和蛋白水平增加, 且通过多种机制引起胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能减退。因此, 炎症信号可能是 T2DM 发病的重要环节。

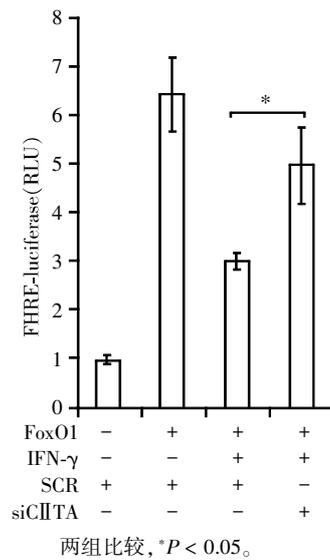


图 4 IFN- γ 处理后干扰 CII TA 恢复了 FoxO1 的转录活性
Figure 4 CII TA depletion restores FoxO1 transcriptional activity in the presence of IFN- γ

C II TA 是 MHC II 表达及获得性免疫的主要调节因子, 作为免疫系统中重要的转录因子, 参与了多种炎症反应性疾病的病理生理过程, 包括动脉粥样硬化、癌症、心肌炎和肺纤维化等^[14-17]。C II TA 不仅在免疫系统内、在免疫系统外也具有其他功能, 可直接调控 IL-4、IL-10、plexin 和 FasL 配体等多种基因的转录, 凸显了 C II TA “全能型” 转录调节因子的功能。Xu 等^[11]用 IFN- γ 诱导人成纤维细胞, 发现 C II TA 与转录因子 RFX5 结合, 被招募到 I 型胶原蛋白 (COL1A2) 启动子上, 通过表观遗传改变 COL1A2 的组蛋白修饰并抑制其转录。本研究首次发现 IFN- γ 对 T2DM 发生和发展的作用也是由 C II TA 介导的。

众所周知, SIRT1 作为 NAD⁺ 依赖的组蛋白去乙酰化酶, 通过调节核转录因子的乙酰化水平参与能量代谢, 是 T2DM 过程中重要的生物大分子。SIRT1 不仅去乙酰化组蛋白, 且通过去乙酰化抑制机体衰老相关的 p53 的活性从而延长胰岛 β 细胞的寿命^[18]; 通过去乙酰化炎症因子 NF- κ B 下调其活性, 影响胰岛素的敏感性^[19]。同时, 其去乙酰化活性作用于 PGC1 α 和 FoxO1, 调节糖脂的代谢, 并参与胰岛素信号途径, 改善胰岛素抵抗。另外, SIRT1 在细胞内受到转录及转录后水平、翻译后水平等精细的网络调节。FoxO 家族中的 FoxO1 与 FoxO3a 均是 SIRT1 的去乙酰化底物^[20]。作为正性调节因子, FoxO1 与 SIRT1 启动子上 IRS-1 和 FKHD-L 位点结合直接激活 SIRT1 启动子活性, 且过表达 FoxO1 增加 SIRT1 表达。同时, SIRT1 能与 FoxO1 互相作用催化其去乙酰化并

增强其转录活性,调节 SIRT1 的转录。因此,SIRT1 使 FoxO1 去乙酰化,能增强其在核内的水平,进而增强其 DNA 结合活性。然而炎症因子诱导下,CⅡTA 对 SIRT1 的转录后调控作用引起的能量代谢关键转录因子 FoxO1 乙酰化水平的改变未见报道。本研究首次报道了 IFN- γ 通过激活 CⅡTA 抑制 SIRT1 的活性,导致 SIRT1 去乙酰化底物 FoxO1 的乙酰化水平和活性发生变化,最终引起细胞代谢紊乱。

综上,本研究发现 SIRT1 的转录抑制是依赖于 CⅡTA 的,阐明了炎症导致糖尿病发生的分子机制。以 IFN- γ 抗炎治疗为靶点可能对维持细胞能量代谢稳态和治疗 T2DM 及相关性疾病意义重大。但是有关 CⅡTA 调控 SIRT1 转录的研究仍处于初期阶段,未来的探索应结合蛋白质组学来研究组蛋白修饰,探讨整个表观遗传机制。

[参考文献]

- [1] Yechoor VK, Patti ME, Saccone R, et al. Coordinated patterns of gene expression for substrate and energy metabolism in skeletal muscle of diabetic mice [J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(16): 10587-10592
- [2] 王星云,朱 剑,蒋兰兰,等. 过表达 Sirt1 对高糖诱导的人肾小球系膜细胞增殖与 TGF- β 1 表达的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2015, 35(4): 480-486
- [3] Jeong JY, Jeoung NH, Park KG, et al. Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase [J]. Diabetes Metab J, 2012, 36(5): 328-335
- [4] Sin TK, Yung BY, Siu PM. Modulation of SIRT1-Foxo1 signaling axis by resveratrol: implications in skeletal muscle aging and insulin resistance [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(2): 541-552
- [5] Liang R, Rimmelé P, Bigarella CL, et al. Evidence for AKT-independent regulation of FOXO1 and FOXO3 in haematopoietic stem and progenitor cells [J]. Cell Cycle, 2016, 15(6): 861-867
- [6] 袁 媛,詹志鹏,崔玉丰,等. 白藜芦醇对小鼠脂代谢及相关蛋白表达影响 [J]. 中国公共卫生, 2014, 30(4): 443-445
- [7] Li XL. SIRT1 and energy metabolism [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2013, 45(1): 51-60
- [8] 胡明珠,周 波,盛 琼,等. PI3K/Akt/Sirt1 信号通路介导硫化氢后处理对大鼠缺血心肌的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(2): 268-273
- [9] Liu J, Divoux A, Sun J, et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice [J]. Nat Med, 2009, 15(8): 940-945
- [10] Kitamura YI, Kitamura T, Kruse JP, et al. FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction [J]. Cell Metab, 2005, 2(3): 153-163
- [11] Xu Y, Wang L, Buttice G, et al. Major histocompatibility class II transactivator (CⅡTA) mediates repression of collagen (COL1A2) transcription by interferon gamma (IFN-gamma) [J]. J Biol Chem, 2004, 279(40): 41319-41332
- [12] Wu X, Kong X, Chen D, et al. SIRT1 links CⅡTA deacetylation to MHC II activation [J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(22): 9549-9558
- [13] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance [J]. Science, 1993, 259(5091): 87-91
- [14] Truax AD, Thakkar M, Greer SF. Dysregulated recruitment of the histone methyltransferase EZH2 to the Class II transactivator (CⅡTA) promoter IV in breast cancer cells [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e36013
- [15] 方明明,宋鸣子,周 红,等. ox-LDL 通过 NAD 依赖性脱乙酰酶 SIRT1 抑制 MHC II 反式激活蛋白的转录活性 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2014, 34(4): 405-409
- [16] Kong X, Fang M, Li P, et al. HDAC2 deacetylates class II transactivator and suppresses its activity in macrophages and smooth muscle cells [J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 46(3): 292-299
- [17] Xu Y, Luchsinger L, Lucey EC, et al. The effect of Class II transactivator mutations on bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(6): 898-905
- [18] Li P, Zhang L, Lin N, et al. Sirt 1 activator inhibits the AGE-induced apoptosis and p53 acetylation in human vascular endothelial cells? [J]. J Toxicol Sci, 2015, 40(5): 615-624
- [19] 杜月光,柴可夫,汪丽佩. SIRT1 对高糖诱导的系膜细胞 NF- κ B、p65 乙酰化及 MCP-1 表达的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2014, 35(7): 722-726
- [20] Lee D, Goldberg AL. SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth [J]. J Biol Chem, 2013, 288(42): 30515-30526

[收稿日期] 2016-05-07