

过表达磷脂酶 D3 影响成肌细胞中 Akt 磷酸化水平

张军林¹, 陈帅¹, 张淑金¹, 卢智娟¹, 杨和平², 王华岩¹

1 西北农林科技大学动物医学院 陕西省干细胞工程技术研究中心 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100

2 杨陵职业技术学院动物工程系, 杨凌 712100

摘要: 磷脂酶 D(PLD)催化卵磷脂(Phosphatidylcholine, PC)水解产生胆碱(Choline)和磷脂酸(Phosphatidic acid, PA), 其代谢产物参与调控细胞内许多生理和生化过程。在过表达磷脂酶 D3 (PLD3)的成肌细胞(C2C12 细胞)中, 研究了 PLD3 对胰岛素刺激后 Akt 通路激活的影响。研究表明, PLD3 过表达细胞的 Akt 磷酸化水平比对照组低, 并且不受胰岛素浓度变化的调控。虽然 PLD3 过表达细胞中 Akt 磷酸化水平随胰岛素刺激时间的延长而有所增加, 但磷酸化总水平比对照组低。磷脂酶 D 抑制剂丁-1 醇能够抑制对照组胰岛素刺激下 Akt 磷酸化, 却不能抑制 PLD3 过表达细胞的 Akt 磷酸化, 并且 PLD3 过表达细胞 Akt 磷酸化水平比对照组高 6 倍。用磷脂酸(PA)做刺激时, 对照组的 Akt 磷酸化明显增加, 而 PLD3 过表达细胞株的 Akt 磷酸化没有显著变化; 用 PA 和胰岛素同时刺激时, PLD3 过表达株和对照组的 Akt 磷酸化均比 PA 单独刺激时降低。这说明 PLD3 的过表达抑制成肌细胞内胰岛素信号的传导。

关键词: 磷脂酶 D3, Akt, 胰岛素, C2C12 细胞

Over-expression of phospholipase D3 inhibits Akt phosphorylation in C2C12 myoblasts

Junlin Zhang¹, Shuai Chen¹, Shujin Zhang¹, Zhijuan Lu¹, Heping Yang², and Huayan Wang¹

1 Shaanxi Center of Stem Cell Engineering and Technology, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

2 Yangling Vocational & Technical College, Department of Animal Engineering, Yangling 712100, China

Abstract: Phospholipase D (PLD) hydrolyzes phosphocholine into choline and phosphatide acid, and these metabolites play an important role in regulating cell physiology and biochemistry. To study the biological function of phospholipase D3 (PLD3) during the insulin stimulation in C2C12 myoblasts, we constructed PLD3 over-expressed cell lines (C2C12/pPLD3) and investigated the phosphorylation of Akt. The results showed that the level of phosphorylated Akt (P-Akt) was significantly increased in control C2C12 cells when insulin concentration was elevated during cell treatment, whereas the level of P-Akt in C2C12/pPLD3 cells was not changed. When extending the time of insulin treatment, P-Akt level in C2C12/pPLD3 cells was increased around 2 folds, but the total level of P-Akt in C2C12/pPLD3 was still lower than that in control group. 1-Butanol, a PLD inhibitor, could completely block Akt phosphorylation in C2C12 cells that even stimulated by insulin. However, 1-Butanol did not inhibit the Akt phosphorylation in C2C12/pPLD3 cells, but increased the phosphorylation up to 6 folds higher than control cells. The level of Akt phosphorylation in control C2C12 cells was increased significantly when stimulated by phosphatidic acid (PA), while there was no change in

Received: May 5, 2009; **Accepted:** August 5, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2008AA101005), National Natural Science Foundation of China (No. 30871786).

Corresponding author: Huayan Wang. Tel: +86-29-87090069; E-mail: hhwang101@163.com

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2008AA101005), 国家自然科学基金 (No. 30871786)资助。

C2C12/pPLD3 cells with the similar treatment. When cells simulated by both PA and insulin, P-Akt level in both C2C12/pPLD3 cells and C2C12 cells were down regulated. Our observations indicated that PLD3 over expression may inhibit Akt phosphorylation and further block the transduction of insulin signaling in C2C12 cells.

Keywords: phospholipase D3, Akt, insulin, C2C12 cell

在细胞外信号刺激下磷脂酶 D (PLD) 能够催化水解卵磷脂(PC)产生磷脂酸(PA)和胆碱,是细胞内信号转导的重要调控因子。对哺乳动物 PLD 研究发现,PLD 的水解产物 PA 能和其他分子结合,如哺乳动物雷帕霉素靶标蛋白(mTOR)^[1]和蛋白激酶 C(PKC)^[2],参与调控细胞内多个信号传导,包括细胞分泌、细胞骨架重组、细胞增殖和减数分裂等,其具体的作用机制成为目前关注的热点^[3-4]。

哺乳动物的磷脂酶 D 家族有多个亚型,包括:PLD1、PLD2 和 PLD3^[5]。PLD3 的蛋白质结构域是由 2 个 PLDc 域、1 个 PLD-envelope 域和 3 个 CIs 域组成。PLDc 是磷脂酶 D 的催化活性位点,通常要以二聚体的形式起作用。PLDc 域水解磷脂的末端磷酸二酯键产生磷脂酸和另一个亲水性成分。因此存在于高尔基体膜上的磷脂酶,也可以通过将磷脂转换成磷脂酸改变膜上的脂质成分,参与调控脂质运动。PLD-envelope 域主要存在于磷脂酶和病毒包膜蛋白的 PLDc 基序之间。CIs 域是磷脂酰丝氨酸/磷脂酰甘油磷酸/心磷脂合成的重要位点,并且与脂质代谢有关。尽管 PLD3 蛋白具有磷脂酶 D 家族的共同结构特征,但其在细胞中的理化功能目前还没有完全弄清。

目前已知胰岛素信号传导途径至少有 2 条:一是通过胰岛素受体底物蛋白(IRS)激活磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/Akt 途径;另一条是通过 Grb2/SOS 和 RAS 蛋白活化丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)途径。胰岛素主要通过 Akt 通路调控细胞内葡萄糖转运与代谢和细胞核内相关蛋白质因子的合成。Akt 也是参与调控细胞增殖和生存信号的关键蛋白,Akt 的磷酸化水平是反映其信号通路活化程度的重要标志。但是目前关于 PLD 在胰岛素刺激下对 Akt 信号通路影响的研究报道不多,而对 PLD3 是否影响 Akt 磷酸化的活化过程尚未见报道。本研究利用成肌细胞 C2C12 建立了人 PLD3 过表达细胞株,研究了 PLD3 在胰岛素刺激后对 Akt 磷酸化水平的影响,结果表

明磷脂酶 D3 过表达抑制 Akt 的磷酸化,从而抑制胰岛素信号在细胞内的传导。这个发现可能是 2 型糖尿病中导致胰岛素抑制的一个重要方面,同时也为进一步研究新药靶标磷脂酶 D 家族中 PLD3 的功能,尤其是 PLD3 在胰岛素信号传导方面的作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

hPLD3 基因为美国宾州州立大学史裕光教授惠赠。C2C12 成肌细胞为本实验室所有,细胞培养试剂和培养基购自 Gibco BRL 公司。兔抗 Akt 和 P-Akt(serine473)多克隆抗体来自 Cell Signalling 公司。兔抗 β -actin 抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG 均购自碧云天公司。生物素标记的抗 Flag 抗体,HRP 标记的 Streptomycin-avidin,磷脂酸和卵磷脂均购自 Sigma。其他试剂未经提示均购自 Amerson。

1.2 方法

1.2.1 PLD3 过表达细胞系的建立与检测

构建真核表达载体 pPLD3(图 1A)。当 6 孔板中 C2C12 生长至 50%~60%覆盖率时,用脂质体 2000 分别转染 pPLD3 和空载体 pCDNA3flag。24 h 后加入筛选培养基高糖 DMED+G418(400 μ g/mL),适时换液。大约 3 周后,6 孔板内有部分细胞克隆集落出现。转移集落至 24 孔板中,扩大培养至 60 mm 皿,用 RT-PCR 和免疫印迹杂交检测阳性克隆。带有 PLD3 基因过表达的阳性细胞命名为 C2C12/pPLD3,对照组细胞命名为 C2C12/Vector。

用常规方法提取细胞 RNA,转录成 cDNA,于 -80°C 保存。PCR 反应条件为 94°C 5 min; 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 90 s 共 30 个循环;最后 72°C 5 min。内参 β -actin 引物为:上游 5'-TTCCTTCTTGGGTATGGAAT-3'和下游 5'-GAGCAATGATCTTGATCTTC-3';PLD3 的检测引物为:上游 5'-ATGACTCAG

CTGTTTCTATGGG-3'和下游 5'-TCAGAGCAGGCG GCAGG-3'。

在进行免疫印记杂交检测时,将生长良好的细胞用胰酶消化,细胞收集在EP管中,再用PBS清洗一次,加入200 μ L RIPA裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4; 150 mmol/L NaCl; 1 mmol/L PMSF; 1 mmol/L EDTA; 1% Triton X-100; 1%脱氧胆酸钠; 0.1% SDS)充分吹打,冰上静置30 min。12 000 \times g离心10 min,保留上清-80 $^{\circ}$ C冻存。取15 μ L蛋白样品加样到12% SDS-PAGE胶上,80 V电泳2 h。半干转印槽中15 V转膜30 min。8%的脱脂奶粉室温封闭90 min, TBST(Tris Buffered Saline with Tween-20, pH 8.0),洗膜3次,每次10 min。然后将膜与一抗杂交4 $^{\circ}$ C过夜, TBST洗膜3次,每次10 min。加入二抗室温杂交60 min, TBST洗膜3次,每次10 min。再用ECL方法显影成像。

1.2.2 hPLD3 过表达细胞系的细胞学特征

将生长良好的细胞接种在24孔板中,每孔2000个细胞,根据细胞生长情况及时换液。每天同一时间计数,每次3个重复,连续观察8~10 d。将所得数据用统计学方法处理,用平均值做生长曲线。在生长曲线的指数增长区拟合指数方程 $y = a_1 e^{b_1 x}$,用方程中的相关参数计算倍增时间(DT=P/b1)。

1.2.3 胰岛素刺激下Akt表达和磷酸化Akt的免疫印记检测

在检测不同胰岛素浓度对细胞的影响时,分别用终浓度为0、0.1、1、10、100 nmol/L的胰岛素处理C2C12/pPLD3和C2C12/pcDNA3细胞。在培养箱中孵育20 min后收集细胞并提取蛋白质。

在检测不同处理时间对细胞的影响时,用终浓度为1 nmol/L的胰岛素刺激C2C12/pPLD3过表达细胞和对照组。培养箱中分别孵育0、5、10、20、30 min后收集细胞并提取蛋白质。将所收集蛋白质在-80 $^{\circ}$ C保存,免疫印记方法如上所述。

1.2.4 丁-1-醇对Akt表达和磷酸化的影响

用终浓度为1%的丁-1-醇处理生长良好的hPLD3过表达细胞和对照细胞5 min,再用终浓度为1 nmol/L的胰岛素刺激细胞。同时设置终浓度1%丁-2-醇和胰岛素刺激组作为对照。然后培养箱中孵育

10 min后收集细胞,提取蛋白质。将所收集蛋白质在-80 $^{\circ}$ C保存,免疫印记方法如上所述。

1.2.5 PA对Akt表达和磷酸化Akt的影响

用10 mmol/L的PA处理生长良好的hPLD3过表达细胞和对照细胞5 min,再用终浓度为1 nmol/L的胰岛素刺激细胞。同时设置10 mmol/L的PC和胰岛素刺激组作为对照。然后培养箱中孵育10 min后收集细胞提取蛋白质。将所收集蛋白质于-80 $^{\circ}$ C保存,免疫印记方法如上所述。

2 结果

2.1 建立PLD3过表达细胞株

经3周左右G418药物筛选后,培养皿中出现大量PLD3稳定转染细胞团。对PLD3稳定表达细胞单克隆株进行RT-PCR和免疫印记检测(图1B, 1C),得到了2个强表达克隆株3AF2和3CF11,及2个低表达克隆株3CF13和3CF14,并且过表达克隆株的表达强度是低表达克隆株的3~5倍。因此,选定PLD3过表达细胞3CF11用于实验组,空载体转染细胞作为对照组。

2.2 PLD3过表达细胞株的细胞生物学特性

显微镜观察下,PLD3过表达细胞(3AF2和3CF11)、低表达细胞株(3CF13和3CF14)以及空载体转染细胞(Vector),在细胞形态上没有显著差别,都表现为典型的成纤维样形态(图2A~E)。但是有报道称,过表达PLD2的大鼠胚胎成纤维细胞会发生形态学变化,细胞内出现类似伪足状的结构。在有血清刺激时,细胞外围会有更多的伪足形成,说明PLD2在细胞内肌动蛋白细胞骨架重组中有一定作用^[6]。本实验说明,PLD3的过表达并不影响细胞的正常形态,可能不参与细胞骨架重组过程。

绘制的细胞生长曲线(图2A~E)表明,各组间细胞生长有明显差别。PLD本身具有抗凋亡的功能,PLD3也具有类似作用。实验中多次观察到,对照组细胞生长铺满后即开始凋亡,并且是不可逆的。

但是PLD3过表达细胞株即使开始有细胞凋亡,在更换培养液后细胞数量虽然有所损失却能重新恢复生长,所以在图A、B中(3AF2和3CF11)细胞生

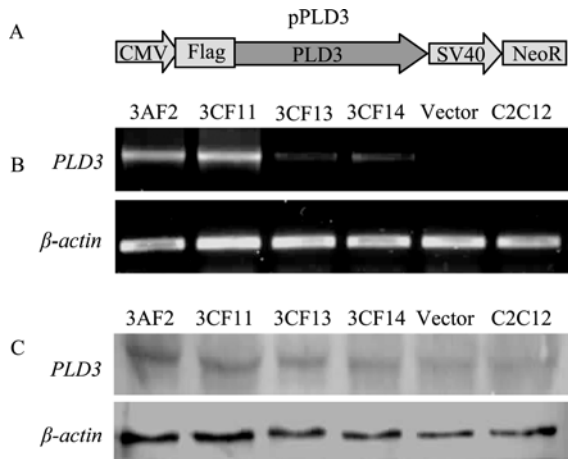


图 1 PLD3 过表达细胞的建立

Fig. 1 Establishment of PLD3 over-expression cell lines. (A) Schematic diagram of pPLD3 derived from pcDNA3-flag. (B) RT-PCR analysis of PLD3 expression in C2C12 and its stable transfected cell lines. (C) Western blotting analysis of PLD3 expression in C2C12 and its stable transfected cell lines.

长曲线的平台期 day 7 左右出现拐点, 这可能是 PLD3 抗凋亡功能导致的。对照组 C2C12 细胞生长最快 (DT=20 h), PLD3 过表达细胞倍增时间为 23~24 h, 而低表达细胞株生长相对较慢 (DT=26~31 h)。用各组细胞生长曲线的对数增长期拟合指数方程 (图 2H) 计算倍增时间发现, PLD3 过表达细胞株的倍增时间比空载体转染细胞株平均慢 4.1 h, 这说明了 PLD3 的过表达可能抑制细胞增殖相关的信号通路, 后面实验中 Akt 磷酸化被抑制也证明了这一点, 因为 Akt

信号可以通过启动丝裂原活化的蛋白激酶 (MAPK) 信号级联途径调控细胞增殖。而如果 PLD3 基因重组到染色体非开放区, 细胞生长周期会延长, 所以 PLD3 低表达细胞株比过表达细胞株平均慢 4.5 h。综上所述, 虽然 PLD3 超表达细胞株细胞周期略有延长, 但是细胞生长和形态基本正常, PLD3 的过量表达对 C2C12 细胞的正常生长影响不大。

2.3 PLD3 抑制胰岛素刺激下 Akt 的磷酸化

在实验中用不同浓度的胰岛素分别刺激 PLD3 过表达细胞和对照组细胞后, 发现随着胰岛素浓度的增加, Akt 的表达均呈现下降趋势, 而 Akt 磷酸化水平即磷酸化 Akt 与总 Akt (p-AKT/Akt) 比值出现明显不同 (图 3 A, C)。对照组细胞的 p-Akt 水平随着胰岛素浓度提高而增加, 而 PLD3 过表达细胞的 p-Akt 水平在不同浓度胰岛素刺激下, 没有显著变化。p-Akt 水平在 PLD3 过表达细胞株中明显比在对照组细胞中的低, 这说明在胰岛素刺激下, PLD3 可能抑制了 C2C12 细胞中 Akt 的磷酸化过程。

采用 1 nmol/L 胰岛素浓度处理细胞, 观察不同处理时间 PLD3 过表达细胞和空载体转染细胞内 Akt 磷酸化的相应水平的变化。实验结果表明, Akt 的表达随着刺激时间的增加而减弱, 而 PLD3 过表达细胞株和对照组细胞内 p-Akt 水平则在 10 min 时差异最显著。PLD3 过表达细胞株的 p-Akt 水平比对照组细胞相对低 (图 3 B, D)。因此, 用 1 nmol/L 胰岛素

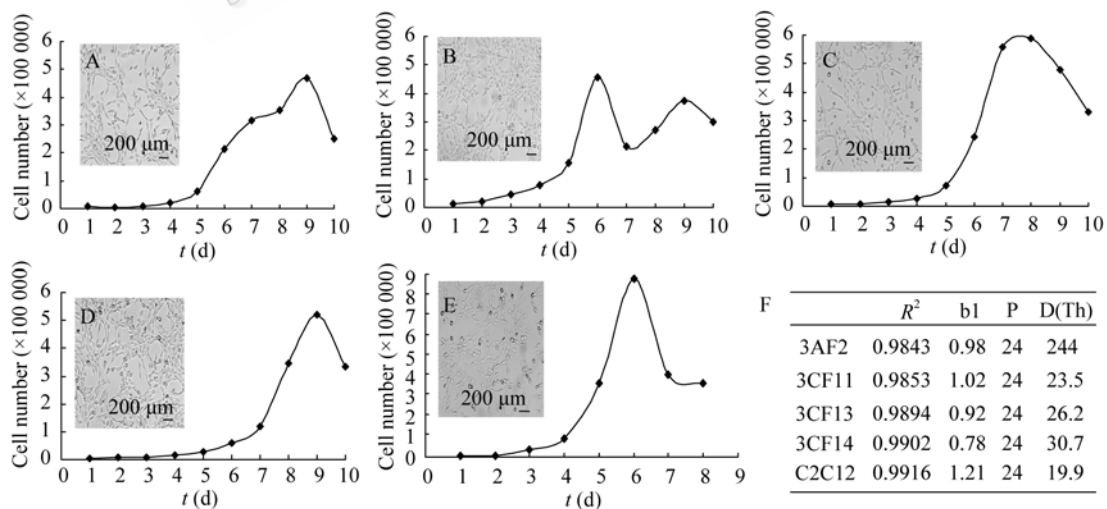


图 2 转染细胞的细胞生物学特性

Fig. 2 Biological characters of transfected cells. (A-E) Cell morphology and growth curves of transfected cells (3AF2, 3CF11, 3CF13, 3CF14 and Vector), respectively. (F) The related parameters including fitting degree (R^2) and doubling time (DT) of mimic exponent equations from growth curves.

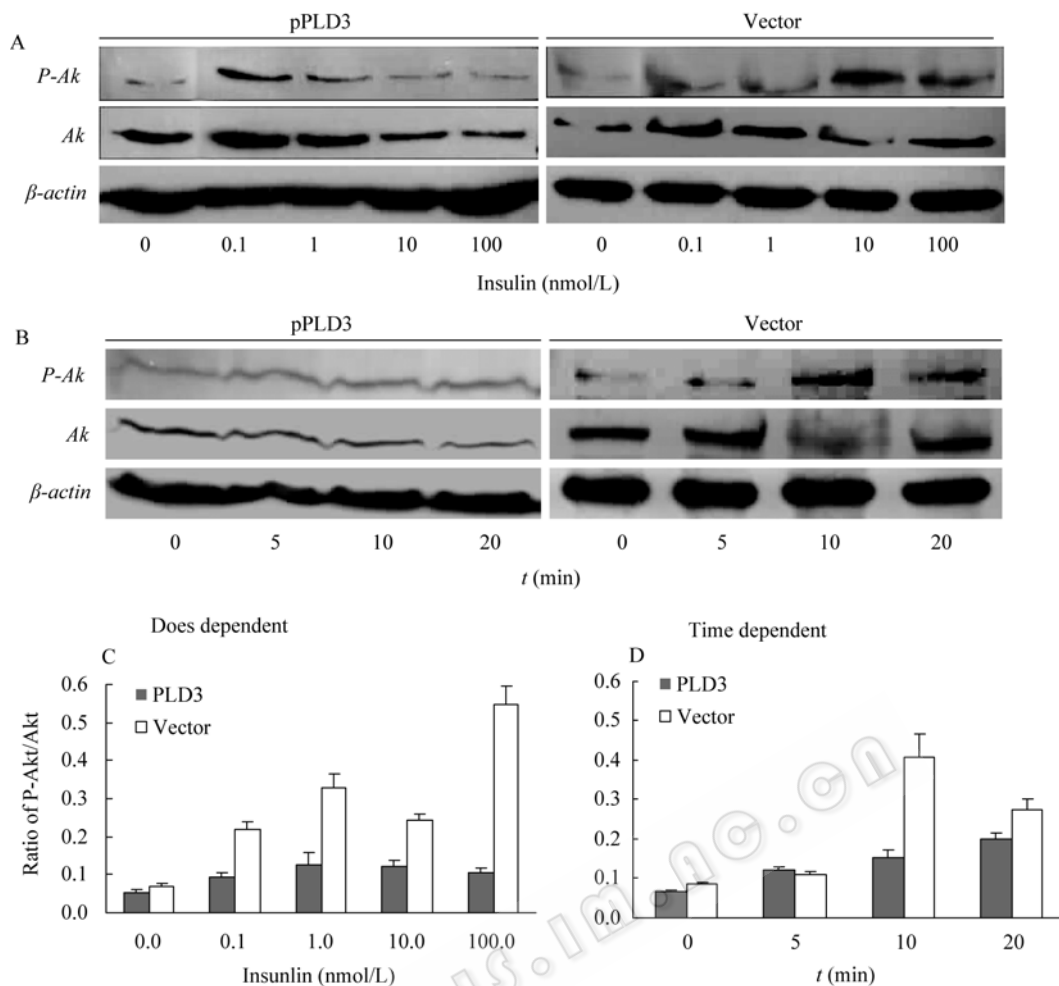


图3 胰岛素激活 C2C12 细胞中 Akt 的磷酸化

Fig. 3 Insulin activates Akt phosphorylation in C2C12 cells. (A) Both 3CF11 cells with pPLD3 and C2C12 cells with pcDNA3-flag (vector) were incubated with Insulin at the different concentrations (0–100 nmol/L) for 20 min. (B) The 3CF11 cells transfected with pPLD3 and C2C12 cells transfected with pcDNA3-flag (vector) were incubated with Insulin at the concentration of 1 nmol/L for different times (0–20 min). (C) Quantitative analysis of Akt phospholation by P-Akt/Akt from section A. (D) Quantitative analysis of Akt phospholation by the ratio of P-Akt/Akt from section B.

刺激细胞 10 min 可以作为检测 p-Akt 水平最优化的实验条件。综上所述, 胰岛素能够激活 C2C12 细胞, 从而间接影响细胞内的糖转运和其他相关的信号通路。

2.4 PLD 抑制剂丁-1-醇对 Akt 磷酸化的影响

丁-1-醇因能给磷脂酶 D 提供羟基产生磷脂酰丁醇, 从而使磷脂酶 D 不能产生磷脂酸, 失去信号传导的功能。检测丁-1-醇存在时胰岛素刺激对细胞内 p-Akt 水平的影响发现, 丁-1-醇能够明显抑制对照组细胞的 Akt 磷酸化; 再用丁-1-醇和胰岛素同时处理细胞时发现, 对照组细胞不产生对胰岛素刺激响应(图 4A)。但是, 丁-1-醇的类似物丁-2-醇却不能抑制胰岛素信号对对照组细胞 Akt 的激活。这一研

究结果表明, 通过抑制磷脂酶 D 的活性, 丁-1-醇能够特异性地阻断 C2C12 细胞中胰岛素信号的传导。然而在相同处理条件下, PLD3 过表达细胞中 p-Akt 水平的变化与对照组明显不同。经丁-1-醇处理后, PLD3 过表达细胞内 p-Akt 水平比对照组细胞高 6 倍(图 4B), 与胰岛素处理的细胞相比也有明显提高。当用丁-1-醇和胰岛素同时处理 PLD3 过表达细胞时, 细胞内 p-Akt 水平与单独用丁-1-醇处理相比没有显著变化。有一点值得注意, 丁-1-醇作为一级醇可以优先给 PC-PLD 复合物提供羟基, 最终产生磷脂酰丁醇而非磷脂酸, 从而特异性地抑制磷脂酶 D 活性。丁-2-醇是丁-1-醇的同分异构体, 然而它是二级醇, 提供羟基的能力远不如丁-1-醇, 通常作为丁-1-

醇的对照试验。由于目前对于 PLD3 的生物化学催化功能及其调控还不清楚, 本实验从侧面揭示丁-2-醇可能对 PLD3 的酶催化活性具有更加强烈的抑制作用, PLD3 在这一点上与 PLD1 和 PLD2 很不相同。对照组 Akt 的磷酸化作用也有明显下降, 也说明丁-1-醇对磷脂酶 D 具有一定的抑制性作用, 只不过这种作用对 PLD1 和 PLD2 的抑制作用远不如对 PLD3 强烈。综上所述, 当 PLD3 的酶活性被丁-1-醇抑制时, 它对胰岛素信号通路中 Akt 磷酸化过程不再有抑制作用。因此, 可以推断磷脂酶 D3 和磷脂酶 D 家族其他成员都位于胰岛素信号通路中 Akt 的上游, 但是 PLD3 却具有负向调节胰岛素信号通路的作用。

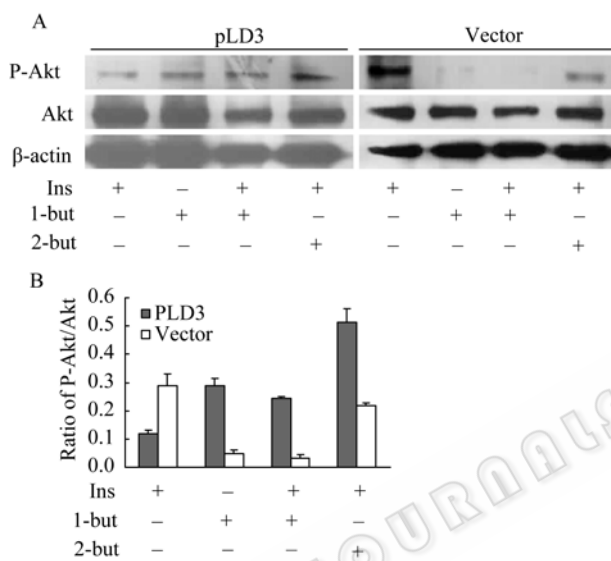


图 4 丁-1-醇和丁-2-醇对胰岛素刺激下转染细胞内 Akt 激活的影响

Fig. 4 Effect of 1- and 2- butanol (1-but, and 2-but) on Akt activation in transfected cells after insulin (Ins) stimulation. (A) The 3CF11 cells transfected with pPLD3 and C2C12 cells transfected with pcDNA3-flag (vector) were analyzed by Western blotting with anti-phospho-Akt (Ser473) and Akt antibodies. Anti- β -actin antibody was used as the internal control. Cells were treated for 10 min by insulin (1 nmol/L) or 1% 1-but and 2-but, respectively. (B) Quantitative analysis of Akt phosphorylation by the ratio of P-Akt/Akt from section A.

2.5 磷脂酸 PA 对 Akt 的磷酸化的影响

磷脂酶 D 能够通过水解卵磷脂产生磷脂酸 PA 传导细胞内信号, 同时磷脂酸也可以转化成二酰甘油(DAG)和溶血卵磷脂(LPA)。磷脂酸和二酰甘油与溶血磷脂酸的相互转换在对细胞内脂质信号的协调中有重要作用。胰岛素信号向细胞内传递过程中, 丁-1-醇能够明显抑制 PLD 下游信号分子 Akt 的磷酸

化, 这说明 PLD 家族其他成员参与了这一信号传递过程。由图 5(A, B)可知, 在没有胰岛素刺激时, 外加 PA 能够完全模拟对照组细胞内胰岛素信号, 导致 P-Akt 水平的显著提高, 相当于胰岛素单独刺激的 4 倍; 但是, 在用外加 PA 和胰岛素同时处理对照组细胞时, 细胞内 P-Akt 水平并没有升高, 降低到用胰岛素单独刺激时的 2 倍。卵磷脂加入对胰岛素的刺激下细胞内 Akt 的磷酸化水平没有显著影响。然而, 用 PA 单独处理 PLD3 过表达细胞的 P-Akt 水平相对于用胰岛素单独刺激时没有发生显著变化, 并且 PA 和胰岛素共同刺激使得 PLD3 过表达细胞的 Akt 磷酸化水平略微降低。这说明虽然 PLD 家族通过产生 PA 传导胰岛素信号, 但是当细胞内 PA 达到一定浓度时(如 PLD3 过表达)就可能抑制胰岛素信号。综上所述, PA 作为 PLD 的产物能够模拟胰岛素信号在正常细胞内的传递, 但是当有 PLD3 过表达时细胞对胰岛素信号的响应可能会发生很大变化, 也许大量积聚的 PA 在短时间内转化成了 DAG 或 LPA, 成为胰岛素信号向细胞内传导的负调控因子。

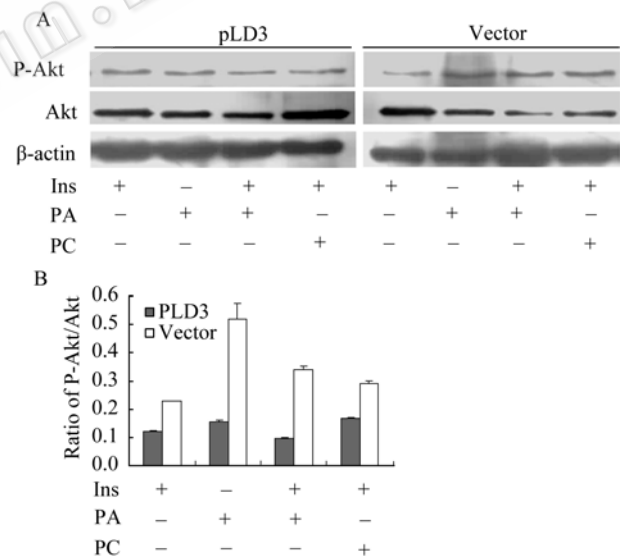


图 5 磷脂酸(PA)和卵磷脂(PC)对胰岛素刺激下转染细胞 Akt 激活的影响

Fig. 5 Effect of phosphatidic acid (PA) and Phosphatidylcholine (PC) on Akt activation in transfected cells after insulin (Ins) stimulation. (A) The 3CF11 cells with pPLD3 and C2C12 cells with pcDNA3-flag (vector) were analyzed by Western blotting with anti-phospho-Akt (Ser473) and Akt antibodies. Anti- β -actin antibody was used as the internal control. Cells were treated for 10 min by insulin (1 nmol/L) or 10 mmol/L PA and 10 mmol/L PC respectively. (B) Quantitative analysis of Akt phosphorylation by the ratio of P-Akt/Akt from section A.

3 讨论

为了研究在胰岛素刺激下 PLD3 对 Akt 信号通路的影响, 构建了 C2C12 过表达 PLD3 细胞株, 并且检测了其细胞生物学特征。结果表明, PLD3 过表达细胞在细胞形态和生长方面均正常。在胰岛素刺激下, PLD3 过表达细胞株的 Akt 磷酸化水平明显低于对照组, 不论在不同剂量胰岛素刺激下, 还是不同时间梯度下都保持这种特性。进一步研究 PLD 抑制剂丁-1-醇对 PLD3 在胰岛素刺激下抑制 Akt 磷酸化水平的影响发现, 与对照组细胞不同, PLD3 过表达细胞中 Akt 磷酸化水平显著增高。PA 是 PLD 的产生作用的信使分子, 是细胞内信号传导的重要脂质分子之一。当存在 PA 时, 只有对照组细胞 Akt 磷酸水平显著增加; 另外加入胰岛素刺激时, PLD3 过表达细胞株和对照组细胞的 Akt 磷酸化水平都均有降低, 这表明过量的 PA 对胰岛素信号的传导有一定的抑制作用, 这可能是 PLD3 抑制胰岛素信号传导的原因。

有研究表明, PLD 的激活与在 S1P3-CHO 细胞中生长因子诱导的 PI3K/Akt 信号通路活化有关^[7]。本研究也表明 PLD 与 C2C12 细胞中胰岛素诱导的 PI3K/Akt 信号通路的活化有关, 但是 PLD3 的过表达却会抑制这一过程。虽然磷脂酶 D 家族有同样的蛋白结构域和酶学功能, 都能通过水解 PC 产生 PA 来维持细胞的正常功能和进行细胞内信号的转导, 然而不同家族成员的作用是不相同的。PLD2 几乎在所有组织和细胞中都有表达, 它负责维持细胞内磷脂酶 D 的基本功能, 参与多种细胞内基本的代谢和信号传导过程。胰岛素能够通过酪氨酸受体激酶活化 PLD2, 进而调控细胞骨架重组和 ARF 介导的细胞内吞过程。Lee 等证明 PLD2 的过表达抑制细胞外信号调节激酶(ERK)激活和负向调控有丝分裂信号^[4]。PLD1 主要在肾脏和肺脏中表达, 但是在其他组织中也有微量表达^[8]。PLD1 也参与 ARF 介导的活化, 在内质网、超尔基体、核膜和质膜之间的囊泡运输中起作用^[9]。PLD3 主要存在于大脑、心脏和骨骼肌, 是在内质网上广泛表达的 II 型跨膜蛋白, 关于它在胰岛素刺激下 PI3K/Akt 通路中的作用未见报道^[10]。

磷脂酶 D 家族都是通过水解 PC 产生 PA 实现其生物学功能的。PA 能够通过激活 PI4P5 激酶和 mTOR 参与调控细胞内多个信号通路。一方面, PA 激活 I 型 PI4P5 激酶把 PI4P 转化为 PI4、5P2、PI4、5P2 进而激活 PI3K/Akt 通路, 并且 PA 的这种作用具有专属性, 不能被 LPA 代替^[5]。另一方面, PLD 产生的 PA 能与 mTOR 的 FRB 区域直接结合起到激活作用^[11]。PLD2 的过表达参与抑制雷帕霉素导致的细胞增殖阻滞^[12]和 PLD1 过表达的能增加 S6K1 在血清刺激下的活性, 而失活型 PLD1 的过表达却会减弱 S6K1 的活性^[13]都能证明 PA 能够激活 mTOR。另外, 与 PA 结合的蛋白还有 ARF、N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子和驱动蛋白。PA 也是重要的细胞内脂质合成前体。PA 通过 PAP 转化成的 DAG 是重要的脂质第二信使。DAG 已被多次证实能够激活经典型和多数新型 PKC 家族成员^[14]。但是由 PA 转化成的 DAG 的酰基链来自原始的单链不饱和和饱和脂肪酸, 这种高饱和度的 DAG 在体内并不能激活 PKC^[15]。由 PA 衍生出来的这种饱和型 DAG 作用仍需要进一步研究, 或许 PLD 正是通过这种方式削弱 PA 信号。PA 也可以被磷脂酶 A 转成单个酰基链的溶血磷脂酸(LPA)^[16-17]。LPA 是重要的促有丝分裂剂, 在细胞增殖、迁移和生存中发挥重要作用。但是, 这种由 PLD 产生的 PA 衍生而来的 LPA 还未被研究清楚。因此, PLD3 是否正是通过衍生出相应的 DAG 或者 LPA 而抑制胰岛素刺激下 PI3K/Akt 的活化有待进一步研究。

致谢 非常感谢美国宾州州立大学医学院史裕光教授为本实验提供了 *hPLD3* 基因, 并且在实验过程中给予宝贵的意见和支持。

REFERENCES

- [1] Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, *et al.* Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science*, 2001, **294**(5548): 1942-1945.
- [2] Andresen BT, Rizzo MA, Shome K, *et al.* The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade. *FEBS Lett*, 2002, **531**(1): 65-68.
- [3] Joseph T, Bryant A, Frankel P, *et al.* Phospholipase D overcomes cell cycle arrest induced by high-intensity Raf signaling. *Oncogene*, 2002, **21**(22): 3651-3658.
- [4] Lee S, Park JB, Kim JH, *et al.* Actin directly interacts with

- phospholipase D, inhibiting its activity. *J Biol Chem*, 2001, **276**(30): 28252–28260.
- [5] Munck A, Böhm C, Seibel NM, *et al.* Hu-K4 is a ubiquitously expressed type 2 transmembrane protein associated with the endoplasmic reticulum. *FEBS J*, 2005, **272**(7): 1718–1726.
- [6] Colley WC, Sung TC, Roll R, *et al.* Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol*, 1997, **7**(3): 191–201.
- [7] Banno Y, Takuwa Y, Yamada M, *et al.* Involvement of phospholipase D in insulin-like growth factor-I-induced activation of extracellular signal-regulated kinase, but not phosphoinositide 3-kinase or Akt, in Chinese hamster ovary cells. *Biochem J*, 2003, **369**(Pt 2): 363–368.
- [8] Lopez I, Arnold RS, Lambeth JD. Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). *J Biol Chem*, 1998, **273**(21): 12846–12852.
- [9] Colley WC, Altshuler YM, Sue-Ling CK, *et al.* Cloning and expression analysis of murine phospholipase D1. *Biochem J*, 1997, **326**(Pt 3): 745–753.
- [10] Ktistakis NT, Brown HA, Waters MG, *et al.* Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *J Cell Biol*, 1996, **134**(2): 295–306.
- [11] Moritz A, De Graan PN, Gispen WH, *et al.* Phosphatic acid is a specific activator of phosphatidylinositol 4 phosphate kinase. *J Biol Chem*, 1992, **267**(11): 7207–7210.
- [12] Hornberger TA, Chu WK, Mak YW, *et al.* The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(12): 4741–4746.
- [13] Chen Y, Zhang Y, Foster DA. Phospholipase D confers rapamycin resistance in human breast cancer cells. *Oncogene*, 2003, **22**(25): 937–942.
- [14] Fang Y, PerK IH, Wu AL, *et al.* PLD1 regulates mTOR signaling and mediates Cdc42 activation of S6K1. *Curr Biol*, 2003, **13**(23): 2037–2044.
- [15] Newton AC. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, **9**(2): 161–167.
- [16] Pettitt TR, McDermott M, Saqib KM, *et al.* Phospholipase D1b and D2a generate structurally identical phosphatidic acid species in mammalian cells. *Biochem J*, 2001, **360**(Pt 3): 707–715.
- [17] Pettitt TR, Martin A, Horton T, *et al.* Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipases C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and functions. Phospholipase D-derived diacylglycerol does not activate protein kinase C in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, 1997, **272**(28): 17354–17359.

快 讯

STEM CELLS: 人类干细胞可用于制造结肠癌疫苗

来自美国和中国的科学家在《干细胞》杂志上发表的一项研究中说,他们发现了人类干细胞具有提供结肠癌疫苗的潜力。

由免疫学专家 Bei Liu 博士和 Zihai Li 博士领导的这项发现是建立在具有一个世纪的历史的一项理论之上的,即用胚胎物质进行免疫接种可能产生一种抗肿瘤应答。然而,这种理论从未超出过动物研究,因此这项关于人类干细胞可以用于预防结肠癌的免疫接种的发现既新又令人意外。

“这项发现有潜力为癌症疫苗研究打开一个新的范式”, Zihai Li 博士说。“癌和干细胞同样拥有许多分子和生物特征。通过用干细胞为宿主接种,我们有能力‘欺骗’免疫系统认为癌细胞存在,因此也就启动了一个抗癌免疫程序。”

该研究是首个涉及人类干细胞在预防结肠癌的免疫接种方面的研究,而且代表了 Zihai Li 博士与干细胞专家 Renhe Xu 在康涅狄格大学干细胞研究所的著名实验室之间的合作。

这个研究组用人类胚胎干细胞(hES)为实验室小鼠进行的免疫接种,并发现了针对结肠癌的持续的免疫应答。该研究组见到了接受免疫的小鼠的肿瘤生长显著减少。这显示了接受免疫接种的小鼠可能通过应用 hES 细胞从而产生强有力的抗肿瘤应答。

该研究还发现,尽管天然的胚胎干细胞有能力产生应答,人造的诱导多能干细胞(iPSC)却不能。这很重要,因为它挑战了一种理论,即 iPSC 和 hES 一样、而且可能在干细胞研究的前沿领域代替后者。

“尽管我们仅仅测试了对结肠癌的保护作用,我们认为干细胞可能有助于产生广谱抗癌免疫应答,因此可以作为一种通用的癌症疫苗。”Bei Liu 博士得出结论说。

来源: EurekAlert

Journals.im.ac.cn