

УДК 577.2

## ИНТЕРЛЕЙКИН-4 ВОССТАНАВЛИВАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ИНСУЛИНУ В АДИПОЦИТАРНОЙ МОДЕЛИ ЛИПИД-ИНДУЦИРОВАННОЙ ИНСУЛИНОВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ\*

© 2018 Ю.С. Стафеев<sup>1,2\*\*</sup>, С.С. Мичурина<sup>1,3</sup>, Н.В. Подкуйченко<sup>1,3</sup>,  
А.В. Воротников<sup>1,4\*</sup>, М.Ю. Меньшиков<sup>1</sup>, Е.В. Парфенова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИИ экспериментальной кардиологии, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, 121552 Москва, Россия;

<sup>2</sup> электронная почта: yuristafeev@gmail.com, a.vorotnikov@icloud.com

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 117192 Москва, Россия

<sup>4</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия

<sup>5</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Медицинский центр, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 29.08.17

После доработки 26.10.17

Ожирение и латентное воспаление в жировой ткани вносят ключевой вклад в возникновение инсулиновой резистентности (ИР) и развитие диабета 2 типа. Мы исследовали возможность использования интерлейкина-4 (ИЛ-4) для активации противовоспалительной сигнализации и восстановления чувствительности к инсулину в культивируемых адипоцитах 3T3-L1. Активность ключевых компонентов инсулинового каскада оценивали с помощью иммуноблоттинга с использованием фосфоспецифичных антител к субстрату инсулинового рецептора IRS-1 (остаток Tyr-612), Akt (остатки Thr-308 и Ser-473), и белка AS-160 (160 кДа субстрата Akt, регулирующего выход глюкозного транспортера GLUT4 на плазматическую мембрану, остаток Ser-318). ИР вызывали путем обработки зрелых адипоцитов конъюгатом пальмитиновой кислоты с альбумином, что достоверно снижало уровень фосфорилирования всех этих белков по указанным остаткам. Введение ИЛ-4 в среду индукции ИР приводило к дозозависимому усилению способности инсулина стимулировать фосфорилирование IRS-1, Akt и AS-160. ИЛ-4 полностью восстанавливал активацию инсулинового каскада при оптимальной концентрации 50 нг/мл. В этой концентрации ИЛ-4 не оказывал влияния на активность инсулинового каскада в контрольных адипоцитах без индуцированной ИР, а также на уровень экспрессии мРНК генов-маркеров адипогенеза *GLUT4* и *PPAR $\gamma$*  и накопление нейтральных липидов в адипоцитах. Эти результаты означают, что ИЛ-4 имеет потенциал для восстановления инсулиновой чувствительности в адипоцитах, и механизм действия ИЛ-4 не связан с адипогенной дифференцировкой и формированием новых жировых депо.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** инсулиновая резистентность, интерлейкин-4, воспаление.

Ожирение и сахарный диабет 2-го типа являются важными причинами инвалидизации и смертности населения в современном мире. Ожирение провоцирует латентное воспаление жировой ткани, вызывая гипертрофию адипоцитов и возникновение гипоксических условий [1], а также активируя окислительный стресс и

стресс эндоплазматического ретикулума в ответ на избыточное поступление питательных веществ [2, 3]. Эти опосредованные воздействия, а также прямая стимуляция TLR-4 и TLR-зависимой воспалительной сигнализации жирными кислотами в адипоцитах ведут к активации транскрипции и экспрессии провоспалитель-

Принятые сокращения: GLUT4 – глюкозный транспортер 4 типа; IKK – I $\kappa$ B киназа; IRS-1 – субстрат инсулинового рецептора 1 типа; Akt - протеинкиназа B; TLR – толл-подобные (toll-like) рецепторы; БСА-ПК – конъюгат бычьего сывороточного альбумина (БСА) и пальмитиновой кислоты (ПК); ИЛ-4 – интерлейкин 4; ИР – инсулиновая резистентность, ПЦР – полимеразная цепная реакция; PDK1 – фосфоинозитид-зависимая киназа; AS160 – Akt-субстрат с молекулярной массой 160 кДа; FBS – эмбриональная бычья сыворотка; PPAR $\gamma$  – peroxisome proliferator activated receptor type  $\gamma$ .

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM 17-398, 00.00.2018.

\*\* Адресат для корреспонденции.

ных цитокинов. Действуя аутокринно в жировой ткани, эти цитокины поддерживают латентное воспаление [4–6].

Воспалительная компонента вносит значительный вклад в развитие инсулиновой резистентности (ИР) [7], в т.ч. ИР в жировой ткани [8]. Связь между воспалением и ИР регулярно подтверждается как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях. Противовоспалительная терапия используется в клинической практике, и ее основная стратегия направлена на подавление воспалительной сигнализации в клетках за счет применения антагонистов рецепторов провоспалительных цитокинов (анакинра, этанерцепт и т.д.) или неспецифических противовоспалительных препаратов (салицилаты). Однако мало внимания уделяется противоположному подходу – активации противовоспалительной сигнализации. В плане терапевтического применения для этого лучше всего подходят природные агонисты противовоспалительных рецепторов – цитокины противовоспалительного действия (ИЛ-4, ИЛ-13 и другие). Первые работы в этой области появились в 2010 г. и сейчас активно продолжаются [9, 10]. Данная работа направлена на изучение возможности восстановления активности инсулиновой сигнализации с помощью противовоспалительного цитокина ИЛ-4 в модели экспериментальной ИР в линейных адипоцитах 3T3L1.

Рецептор инсулина представляет собой классический тирозинкиназный рецептор, сопряженный с несколькими сигнальными системами клетки [8]. Его особенностью является использование в качестве непосредственного субстрата белка IRS и его основной изоформы IRS-1. Тирозинное фосфорилирование IRS-1 рецептором инсулина запускает передачу сигнала внутрь клетки, в т.ч. по основному инсулиновому каскаду, который находится в фокусе данной работы. Этот каскад включает последовательную передачу сигнала от IRS-1, фосфорилированного по нескольким остаткам тирозина, включая Tyr-612, к PI3-киназе, образованию фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфата (PIP3), активации фосфоинозитид-зависимой киназы (PDK1) и PDK1-зависимому фосфорилированию протеинкиназы В (Akt) по остатку Thr-308, который критичен для активации Akt [8]. Полная активация Akt требует дополнительного фосфорилирования по остатку Ser-473, которое также зависит от PI3-киназы. В числе многих субстратов Akt фосфорилирует Akt-субстрат с массой 160 кДа (белок AS160), вызывая выход инсулинзависимого транспортера глюкозы GLUT4 на плазматическую мембрану. Таким путем инсулин активирует транспорт глюкозы из кровотока в адипоциты и мышечные клетки, которые содержат GLUT4.

ИР характеризуется как нарушение способности инсулина стимулировать тирозинное фосфорилирование IRS-1 и активацию инсулинового каскада. Считается, что это происходит в ответ на фосфорилирование IRS по остаткам серина, которое нарушает фосфорилирование IRS по тирозинам. Серинное фосфорилирование IRS запускается вследствие разных причин, и активация воспалительных механизмов рассматривается как одна из основных [5–8]. В результате ИР уменьшается инсулинзависимое фосфорилирование AS160, снижается выход GLUT4 на плазматическую мембрану, и транспорт глюкозы в клетки, что ведет к развитию гипергликемии и сахарного диабета 2-го типа. Таким образом, противовоспалительная терапия может рассматриваться в качестве превентивного подхода в профилактике диабета 2-го типа.

ИЛ-4 представляет собой цитокин плейотропного действия. Его продуцируют в основном активированные Т-лимфоциты, остальной вклад в общую концентрацию вносят макрофаги и эозинофилы. Действуя аутокринно через активацию транскрипционного фактора STAT6, ИЛ-4 вызывает противовоспалительную поляризацию (дифференцировку) макрофагов и формирование альтернативного противовоспалительного фенотипа Т-лимфоцитов [11]. Изменение баланса иммунных клеток в сторону противовоспалительного фенотипа должно иметь важные последствия для жировой ткани, в которой латентное воспаление играет ключевую роль в формировании ИР. Таким образом, ИЛ-4 можно рассматривать как потенциальный фармакологический агент для терапии ИР в жировой ткани.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Общий дизайн исследования.** Работу проводили на стандартной модели культивируемых преадипоцитов мыши 3T3-L1, имеющих фибробластоподобную морфологию. Клетки 3T3-L1 подвергали адипогенной дифференцировке в течение 10 дней. Полноту дифференцировки контролировали на 10-й день по окраске клеток липофильным красителем OilRedO. В дифференцированных адипоцитах вызывали ИР с помощью пальмитиновой кислоты в присутствии трех различных концентраций ИЛ-4 (25, 50 и 100 нг/мл), время действия ИЛ-4 составляло 24 ч.

Для оценки чувствительности к инсулину клетки стимулировали инсулином в концентрации 100 нМ в течение 20 мин. Активацию инсулинового каскада определяли с помощью вестерн-блоттинга по инсулинзависимому возрастанию активационного фосфорилирования ос-

новных участников инсулиновой сигнализации – субстрата инсулинового рецептора 1 типа (IRS-1), Akt-киназы и белка AS160 – Akt-субстрата с молекулярной массой 160 кДа. После выбора оптимальной действующей концентрации ИЛ-4 изучали ее влияние на адипогенную дифференцировку преадипоцитов 3T3-L1. Для этого клетки дифференцировали по стандартному протоколу в присутствии оптимальной концентрации ИЛ-4 или без него и сравнивали по накоплению в них нейтральных липидов и экспрессии генов-маркеров адипогенной дифференцировки.

**Материалы.** Для культивирования клеток 3T3-L1 использовали DMEM с высокой концентрацией глюкозы (4,5 г/л, «Панэко», Россия, кат. № С420п), эмбриональную бычью сыворотку (FBS, «Gibco», США, кат. №10082147), L-глутамин и пенициллин/стрептомицин («Gibco», США). Для адипогенной дифференцировки преадипоциты 3T3L1 предкультивировали с сывороткой новорожденных телят (NBCS, «Gibco», США, кат. № 26010074) и дифференцировали в присутствии инсулина, изобутилметилксантина, дексаметазона и розиглитазона («Sigma Aldrich», США). Полноту дифференцировки оценивали по окраске клеток липофильным красителем OilRedO («Merck Millipore», США).

Для ПЦР в реальном времени использовали прибор Applied Biosystems StepOnePlus (США) и набор реагентов с красителем SYBRGreen («Синтол», Россия). Тотальную РНК выделяли из адипоцитов, используя набор RNEasy Mini Kit (Qiagen, США). Синтез кДНК проводили с помощью набора RevertAid H Minus First Strand cDNA («Thermo Fisher Scientific», США). Для амплификации кДНК использовали праймеры («Евроген», Россия), представленные в таблице.

Для иммуноблоттинга использовали антитела к фосфо-Тур612 в IRS-1 (44816, «Thermo Fisher Scientific», США); антитела к IRS-1 (#3407), фосфо-Thr308 в Akt (#9275), фосфо-Ser473 в Akt (#4060), фосфо-Ser318 в AS160 (#8619), AS160 (#2670) («Cell Signaling», США); антитело к Akt (ab64148) и вторичное антитело к IgG кролика,

конъюгированное с пероксидазой хрена (ab6721, оба «Abcam», Великобритания).

**Культивирование и дифференцировка преадипоцитов 3T3-L1.** Мышиные преадипоциты 3T3-L1 были приобретены в АТСС. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 4,5 г/л глюкозы, 2 мМ L-глутамин, по  $6 \times 10^4$  ед/л пенициллина и стрептомицина, а также 10% FBS.

Адипогенную дифференцировку проводили по протоколу Zebisch et al. [12]. Кратко, преадипоциты 3T3-L1 культивировали до конfluence (~90% в среде DMEM, после чего на следующие 2 дня среду заменяли на DMEM, содержащую 10% сыворотки новорожденных телят (NBCS) вместо FBS, (0–2 дни дифференцировки). На 3-й день среду меняли на DMEM, содержащую 10% FBS, 0,5 мМ дексаметазона, 0,25 мкМ изобутилметилксантина, 2 мкМ розиглитазона и 1 мкг/мл инсулина. Через 2 дня (5-й день) среду меняли на DMEM, содержащую 10% FBS и 1 мкг/мл инсулина. В этой среде клетки находились еще 2 дня (5–7 дни дифференцировки), после чего их переводили в исходную среду DMEM. С 10-го дня клетки использовали для экспериментов или фиксировали с помощью 4%-ного формальдегида и в течение часа окрашивали липофильным красителем OilRedO.

**Моделирование липид-индуцируемой инсулиновой резистентности.** В качестве классического индуктора ИР при имитации высокожировой диеты использовали конъюгат пальмитиновой кислоты с бычьим сывороточным альбумином (БСА-ПК). В таком виде БСА поддерживает растворимость пальмитиновой кислоты и ее поглощение клетками. Конъюгаты БСА-ПК готовили по протоколу Svedberg et al. [13], смешивая 0,2 М раствор пальмитиновой кислоты в 96%-ном этаноле с 20%-ным раствором БСА в буфере Кребса–Рингера (120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,1 мМ MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 25 мМ NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4) в соотношении 1 : 25, осторожно перемешивая в течение 1 ч и контролируя pH смеси равным 7,4.

Зрелые адипоциты 3T3-L1 депривировали от сыворотки в течение 24 ч в среде DMEM (1 г/л

Праймеры для ПЦР в реальном времени

Мишень	Последовательности праймеров (5'–3')	
	прямой	обратный
<i>GLUT4</i>	AGAGAGAGCGTCCAATGTCC	ACTAAGAGCACCGAGACCAAC
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	TCTCAGAGGGCCAAGGATTC	GCAGCAGGTTGTCTTGATG
<i>GAPDH</i>	CGACTTCAACAGCAACTCCCACTCTTCC	TGGGTGGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT

глюкозы, 2 мМ L-глутамин, по по  $6 \times 10^4$  ед/л пенициллина и стрептомицина), содержащей 0,1% БСА. После этого к клеткам добавляли конъюгат БСА-ПК до концентрации 300 мкМ по пальмитиновой кислоте. Далее клетки культивировали 24 ч в той же среде и стимулировали добавлением 100 нМ инсулина в течение 20 мин. Среду аспирировали, клетки трижды промывали холодным фосфатно-солевым буфером и лизировали на льду в RadioImmuno Precipitation Assay-буфере (150 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% SDS, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0) с ингибиторами протеаз (cOmplete Tablets EASYpack, «Roche», Швейцария) и фосфатаз (10 мМ глицерофосфата натрия, 20 мМ пироглутата натрия, 10 мМ фторида натрия, 1 мМ ортованадата натрия). Лизаты центрифугировали 10 мин при 16 000 g и собирали, осторожно отделяя от осадка и флотирующих липидов.

**Иммуноблоттинг.** Клеточные лизаты разделяли с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза по методу Лэммли [14]. Электроперенос белков проводили на поливинилиденфторидные (PVDF) мембраны в режиме 1 Ампер-час. Мембраны блокировали не менее 2 ч в растворе 5%-ного обезжиренного молока («AppliChem», Германия) в Tris buffer solution с Tween20 (TBST) и последовательно обрабатывали первичными и вторичными антителами в TBST и 1%-ном молоке, в разведениях, предложенных производителем. Белковые полосы визуализовали с использованием хемилюминесценции и реагентов Clarity ECL («Bio-Rad», США), а также гель-документирующей системы Vilber Lourmat FusionX (Франция) в накопительном режиме. Для количественной денситометрии использовали программу GelAnalyzer2010. Результаты представляли в виде гистограмм с параметром «Стимуляция фосфорилирования по активационному остатку», который отражает, как выросло фосфорилирование активационного остатка исследуемого белка в ответ на стимуляцию инсулином. Для этого вычисляли относительный уровень фосфорилирования данного белка (фосфорилированная форма исследуемого белка/общий исследуемый белок) до и после стимуляции клеток инсулином. Каждое из полученных таким образом значений дополнительно нормировали на белок-контроль нагрузки (обычно винкулин). После этого рассчитывали соотношение этих значений для стимулированных к нестимулированным образцам.

**ПЦР в реальном времени.** Дифференцированные адипоциты 3T3-L1 лизировали в RLT-буфере набора RNeasy («Qiagen», США) и выделяли тотальную РНК по инструкции произво-

дителя. Концентрацию и чистоту РНК конечной фракции определяли спектрофотометрически на микрообъемном спектрофотометре NanoDrop 2000 («Thermo Fisher Scientific», США). Синтез кДНК проводили с использованием тотальной фракции РНК и набора реактивов RevertAid H Minus First Strand cDNA («Thermo Fisher Scientific», США), согласно инструкции производителя. В реакции брали по 1 мкг тотальной РНК, поэтому общее количество кДНК в пробах считали одинаковым.

**Окраска нейтральных липидов липофильным красителем OilRedO.** Для визуализации зрелых адипоцитов, клетки 3T3-L1 окрашивали красителем OilRedO на 10-й день дифференцировки. Для этого клетки фиксировали в течение 30 мин в 4%-ном растворе формальдегида и трижды промывали фосфатно-солевым буфером. Затем клетки окрашивали в течение 50 мин раствором красителя OilRedO и дважды промывали деионизированной водой. После аспирации красителя проводили световую микроскопию с использованием микроскопа AxioVert 200 («Carl Zeiss», Германия). После этого OilRedO экстрагировали из клеток с помощью изопропанола, экстракт спектрофотометрировали при длине волны 600 нм с использованием спектрофотометра Eppendorf BioPhotometer («Eppendorf», Германия).

**Статистический анализ.** Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью MS Excel 2007. Результаты представляли в гистограммах как средние значения  $\pm$  стандартные отклонения. Для расчета достоверности различий использовали двухвыборочный Т-критерий с различной дисперсией выборок, принимая достоверными различия с вероятностью  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

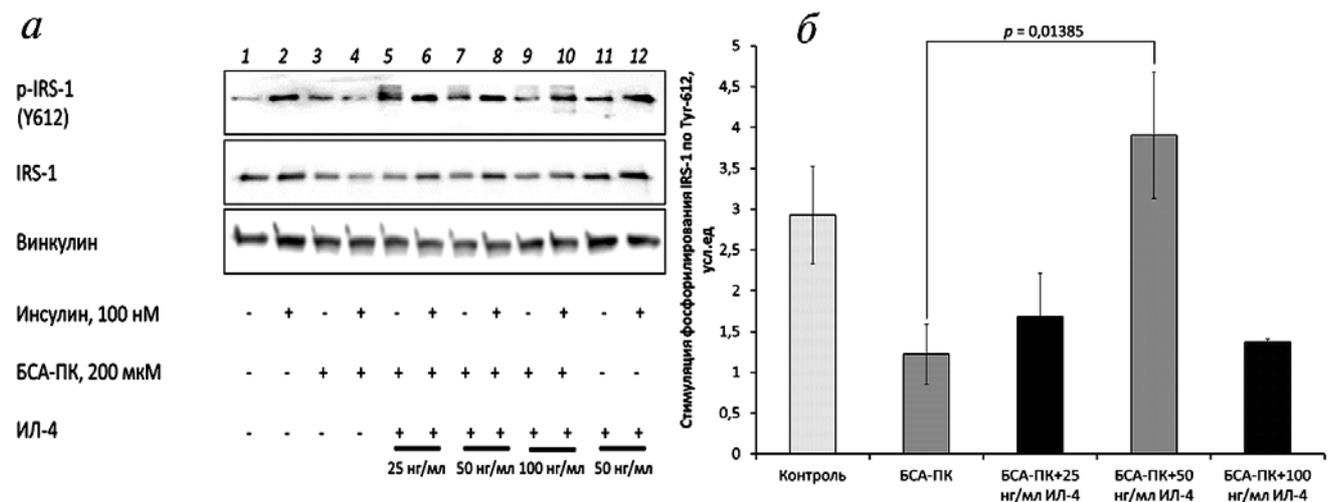
**ИЛ-4 восстанавливает активирующее фосфорилирование IRS-1 в условиях липид-индуцированной ИР.** Прежде всего, мы определили, как ИЛ-4 влияет на первые этапы инсулиновой сигнализации в стандартной модели липид-индуцированной ИР. Чтобы вызвать ИР, зрелые адипоциты 3T3-L1 обрабатывали конъюгатом БСА-ПК и с помощью вестерн-блоттинга определяли, во сколько раз инсулин стимулирует фосфорилирование Tug-612 в IRS-1. На рис. 1 показано, что в нормальных условиях инсулин в  $\sim 3$  раза стимулирует фосфорилирование IRS-1, но практически не влияет на это фосфорилирование в клетках, обработанных БСА-ПК ( $p = 0,02$  по сравнению с контролем без БСА-ПК). Эти результаты означают, что БСА-ПК эффективно вызывает ИР в адипоцитах 3T3-L1.

Активация воспалительного каскада считается важным механизмом развития ИР в условиях жировой перегрузки. Для того чтобы выяснить возможность восстановления активации инсулинового каскада в условиях ИР, мы исследовали влияние противовоспалительного цитокина ИЛ-4. В концентрации 25 нг/мл ИЛ-4 не оказывал статистически значимого эффекта ( $p = 0,3$ ), но в концентрации 50 нг/мл ИЛ-4 значимо восстанавливал инсулинзависимое фосфорилирование IRS-1 по тирозину-612 ( $p = 0,014$ ) (рис. 1, *a* и *б*). Дальнейшее повышение концентрации ИЛ-4 в среде роста клеток (до 100 нг/мл) оказывало обратный эффект, снижая стимулирующее действие инсулина на фосфорилирование Tyr-612 в IRS-1 (рис. 1, *б*). Хотя механизм этого снижения остается неясным, представленные результаты означают, что в концентрации 50 нг/мл ИЛ-4 эффективно восстанавливает способность инсулина стимулировать фосфорилирование IRS-1 в адипоцитах 3T3-L1 в условиях экспериментальной липид-индуцированной ИР.

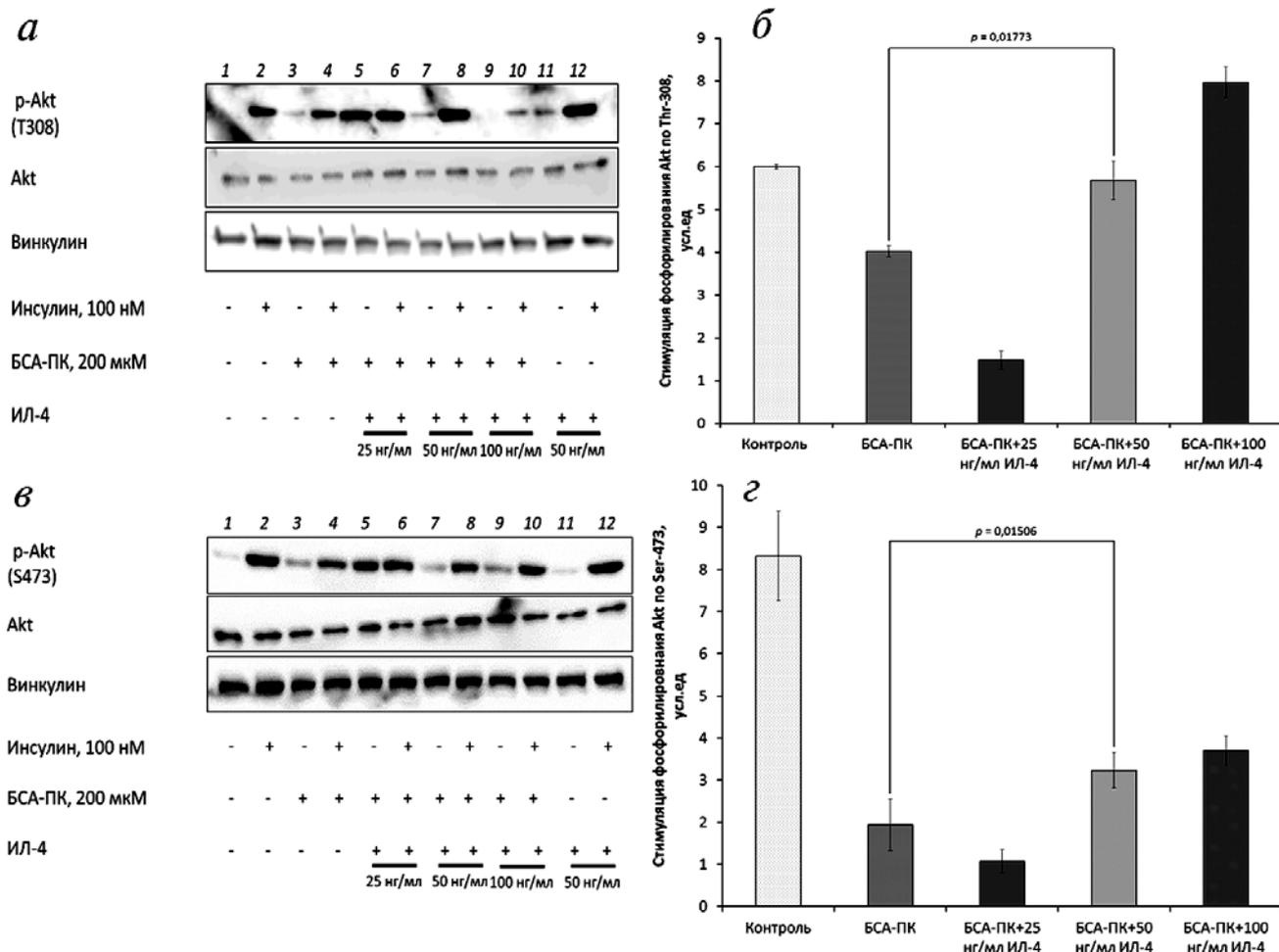
**ИЛ-4 восстанавливает активирующее фосфорилирование Akt в условиях липид-индуцированной ИР.** Для того чтобы выяснить, как ИЛ-4 влияет на активность промежуточных этапов передачи инсулинового сигнала, мы исследовали фосфорилирование Akt по обоим активационным остаткам. На рис. 2, *a* и *б* показаны изменения фосфорилирования Akt по остатку Thr-308, наиболее критичному для активации Akt. В нормальных условиях инсулин стимулировал это фосфорилирование в 6 раз, тогда как в условиях липид-индуцированной ИР стимуляция сни-

жалась до 4-кратной ( $p < 0,001$ ). На рис. 2, *в* и *г* показаны изменения фосфорилирования Akt по дополнительному активационному остатку Ser-473. В этом случае стимуляция инсулином была 8–9-кратной в контроле и снижалась до двукратной в условиях ИР ( $p < 0,001$ ). В совокупности эти результаты показывают, что способность инсулина активировать PI3-киназный каскад и фосфорилирование его главной мишени, киназы Akt, существенно снижается в условиях ИР.

В условиях липид-индуцированной ИР ИЛ-4 оказывал активирующее воздействие на фосфорилирование Akt как по остатку Thr-308 (рис. 2, *a* и *б*), так и по остатку Ser-473 (рис. 2, *в* и *г*). При этом эффект ИЛ-4 был неравномерным. Так, в низких концентрациях ИЛ-4 (25 нг/мл) формально рассчитанная стимуляция фосфорилирования Akt инсулином была существенно ниже, чем в отсутствие ИЛ-4, и не превышала 1,5 раз. Однако ИЛ-4 усиливал как базальное, так и инсулинзависимое фосфорилирование Akt так, что различия между этими значениями практически исчезали. Вероятно, эти значения отражают максимальный уровень фосфорилирования Akt. Напротив, при более высоких концентрациях (50 и 100 нг/мл), ИЛ-4 не изменял базального фосфорилирования Akt, но усиливал инсулинзависимое фосфорилирование Akt предположительно до максимального уровня, т.е. сопоставимого с таковым в контроле без ИР (рис. 2, *a* и *в*). Как следствие, в условиях ИР ИЛ-4 полностью восстанавливал стимуляцию фосфорилирования Thr-308 инсулином до нормального уровня без ИР (рис. 2, *б*) и увеличивал стимуляцию



**Рис. 1.** ИЛ-4 усиливает инсулинзависимое фосфорилирование IRS-1 по тирозину-612 в адипоцитах 3T3-L1 в условиях экспериментальной липид-индуцированной ИР. *a* – Репрезентативные результаты вестерн-блоттинга; *б* – результаты статистического анализа стимуляции фосфорилирования IRS-1 по Tyr-612 инсулином в трех независимых экспериментах. Индукцию ИР с помощью БСА-ПК проводили в течение суток в отсутствие или в присутствии указанных концентраций ИЛ-4 в клеточной среде, как описано в разделе «Методы исследования»



**Рис. 2.** ИЛ-4 восстанавливает инсулинзависимое фосфорилирование Akt в адипоцитах. 3Т3-L1 в условиях липид-индуцированной ИР. *а* и *б* – Изменения уровня фосфорилирования Akt по остатку Thr-308: *а* – репрезентативный иммуноблоттинг; *б* – результаты статистического анализа стимуляции фосфорилирования Akt по Thr-308 в трех независимых экспериментах; *в* и *г* – изменения уровня фосфорилирования Akt по остатку Ser-473: *в* – репрезентативный иммуноблоттинг; *г* – результаты статистического анализа стимуляции фосфорилирования Akt по Ser-473 в трех независимых экспериментах

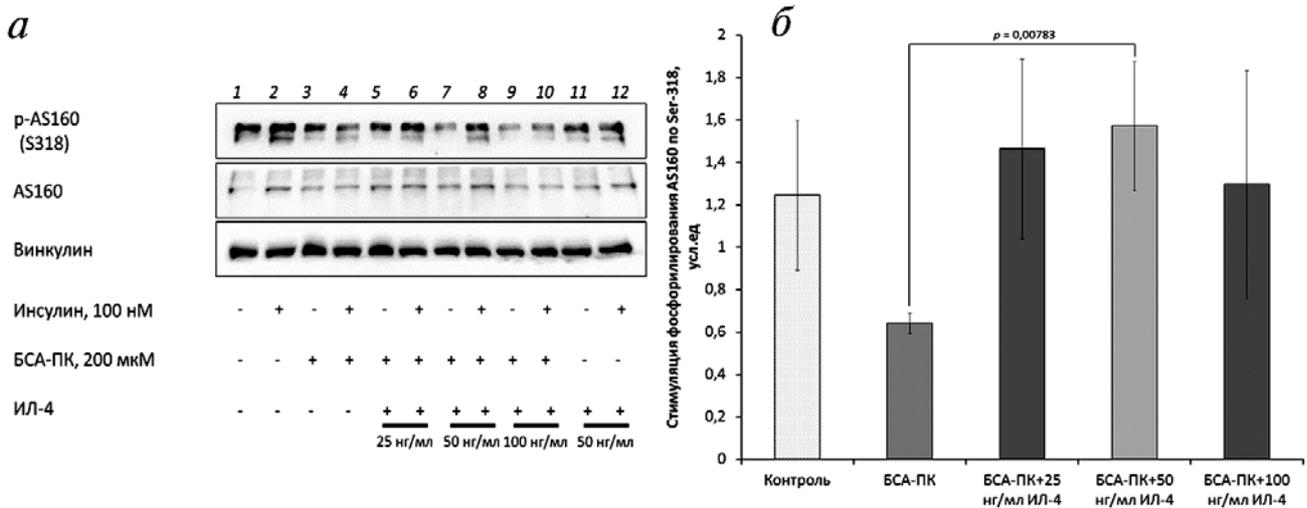
фосфорилирования Ser-473 инсулином в ~2 раза (рис. 2, *г*). В концентрации 50 нг/мл ИЛ-4 не изменял профиля фосфорилирования Akt в отсутствие ИР (рис. 2, *а* и *в*, справа).

Таким образом, ИЛ-4 восстанавливает способность инсулина активировать PI3-киназный каскад и фосфорилирование Akt в условиях липид-индуцированной ИР в адипоцитах 3Т3-L1. Концентрация 50 нг/мл ИЛ-4 является оптимальной для развития максимального эффекта.

**ИЛ-4 восстанавливает Akt-зависимое фосфорилирование AS160 в условиях липид-индуцированной ИР.** Фосфорилируя AS160, Akt запускает выход инсулинзависимого глюкозного транспортера GLUT4 на клеточную мембрану и транспорт глюкозы в клетки. Анализ фосфорилирования ключевого остатка Ser-318 в AS160 показал, что в адипоцитах 3Т3-L1 инсулин стимулирует его фосфорилирование лишь незначи-

тельно (в 1,2 раза, рис. 3). Это может быть связано с наличием нескольких участков, фосфорилируемых Akt в AS160 и имеющих разную чувствительность к инсулину [15–16]. Однако в условиях ИР стимуляция фосфорилирования Ser-318 инсулином нарушалась и достоверно снижалась в ~2 раза ( $p = 0,04$ ) (рис. 3, *б*).

В условиях экспериментальной ИР ИЛ-4 усиливал инсулинзависимое фосфорилирование Ser-318 в AS160, не повышая базального фосфорилирования этого остатка (рис. 3, *а*). В присутствии 25 и 50 нг/мл ИЛ-4 инсулин стимулировал фосфорилирование AS160 в ~1,5 раза, что выше контрольных значений в отсутствие ИР (рис. 3, *б*). В концентрациях 25 и 50 нг/мл эффект ИЛ-4 был статистически значимым по сравнению с контролем без ИР ( $p = 0,03$  и  $p < 0,01$  соответственно), тогда как в концентрации 100 нг/мл эффект ИЛ-4 был недостоверным ( $p = 0,09$ ).



**Рис. 3.** ИЛ-4 усиливает инсулинзависимое фосфорилирование AS160 по серину-318 в адипоцитах 3Т3-Л1 в условиях липид-индуцированной ИР. *а* – Репрезентативные результаты вестерн-блоттинга; *б* – результаты статистического анализа стимуляции фосфорилирования AS160 по Ser-318 инсулином в трех независимых экспериментах

В отсутствие ИР обработка клеток ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл не изменяла профиля фосфорилирования AS160 по остатку Ser-318 (рис. 3, *а*, справа).

Таким образом, ИЛ-4 восстанавливает способность инсулина активировать инсулин- и Akt-зависимое фосфорилирование AS160 в условиях липид-индуцированной ИР в адипоцитах 3Т3-Л1. При этом концентрации 25 и 50 нг/мл ИЛ-4 являются достаточными для развития максимального эффекта.

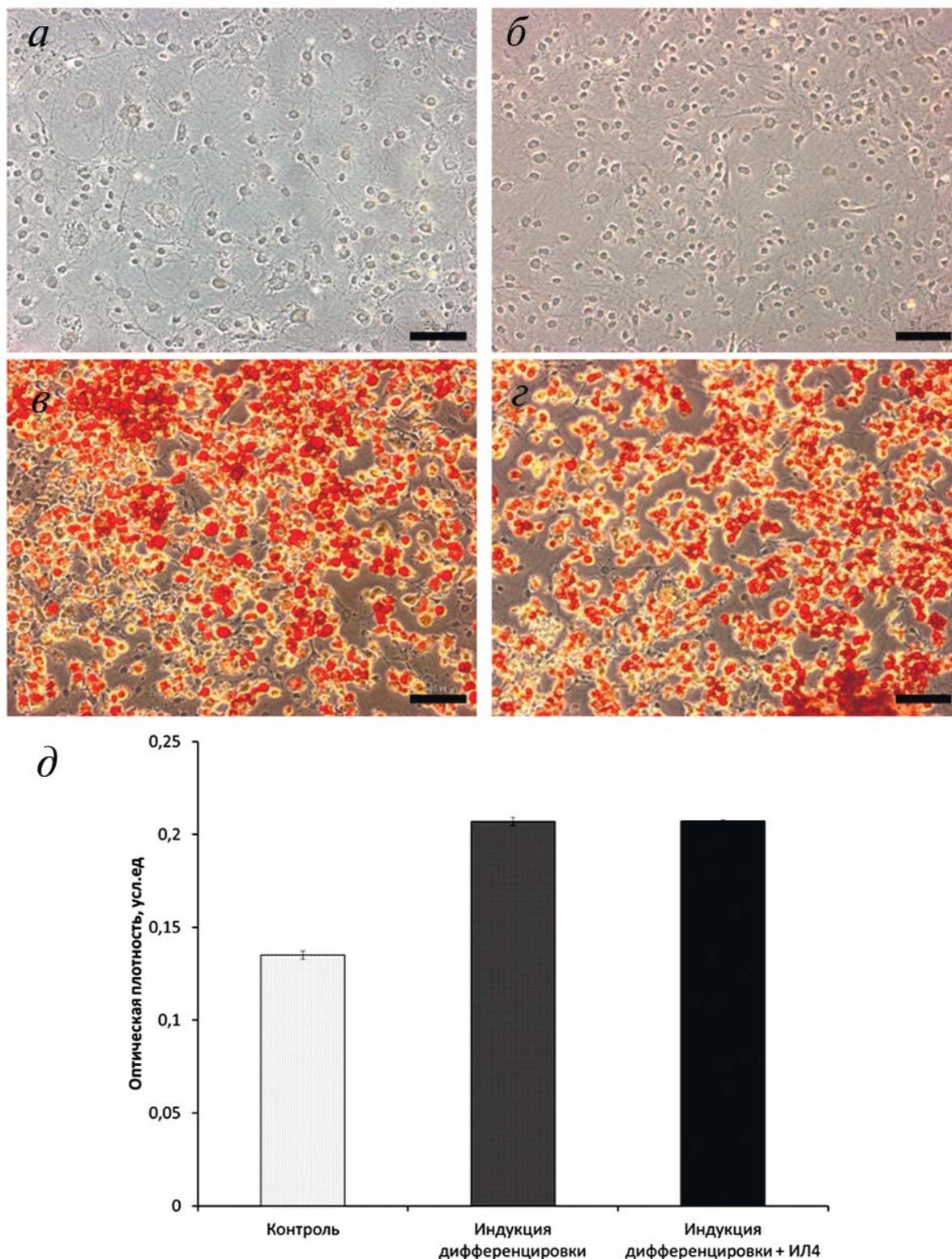
**ИЛ-4 не влияет на накопление нейтральных липидов адипоцитами 3Т3-Л1.** Известно, что действие ряда антидиабетических препаратов (тиазолидиндионы, метформин), восстанавливающих чувствительность жировых клеток к инсулину, связано с формированием новых жировых депо за счет активации адипогенной дифференцировки клеток-предшественников [17]. Поэтому мы исследовали как ИЛ-4 влияет на адипогенную дифференцировку преадипоцитов 3Т3-Л1. Для этого клетки дифференцировали стандартно в присутствии 50 нг/мл ИЛ-4 или без него. Степень дифференцировки определяли на 10-й день, окрашивая жировые капли липофильным красителем OilRedO и далее экстрагируя краситель изопропанолом для количественной оценки.

По данным световой микроскопии ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл не вызывал накопления нейтральных липидов в культуре преадипоцитов (рис. 4, *а* и *б*). К 10-му дню дифференцировки около 80% клеток 3Т3-Л1 содержали нейтральные липиды, окрашиваемые OilRedO, независимо от того, присутствовал ли ИЛ-4 в среде роста

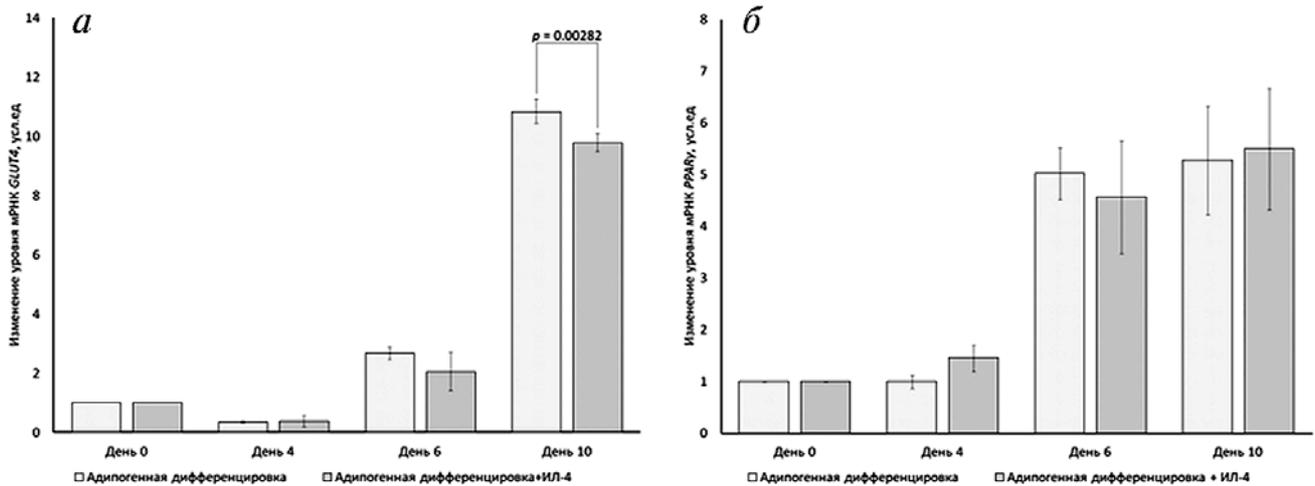
на протяжении всего срока дифференцировки или нет (рис. 4, *в* и *г*). Количественный анализ экстрагированного из клеток OilRedO также не выявил различий между клетками, дифференцированными в присутствии OilRedO или без него (рис. 4, *д*). Вместе с тем преадипоциты, культивированные без индукции дифференцировки в течение 10 дней, содержали в 2 раза меньше липофильного красителя, чем клетки после адипогенной дифференцировки (рис. 4, *д*, контроль). Эти результаты означают, что ИЛ-4 не стимулирует накопления нейтральных липидов в клетках 3Т3-Л1, по крайней мере, в концентрации 50 нг/мл. По-видимому, это связано с тем, что ИЛ-4 не способен стимулировать адипогенную дифференцировку.

**ИЛ-4 незначительно ослабляет экспрессию GLUT4 и не влияет на экспрессию PPAR $\gamma$ .** Для того чтобы доказать неспособность ИЛ-4 вызывать или влиять на скорость адипогенной дифференцировки, мы определили уровень мРНК генов-маркеров адипогенеза GLUT4 и PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor type  $\gamma$ ) в процессе адипогенной дифференцировки клеток 3Т3-Л1, проведенной в присутствии 50 нг/мл ИЛ-4 или без него.

Как и ожидалось, экспрессия генов GLUT4 и PPAR $\gamma$  значительно возрастала, начиная с 6-го дня адипогенной дифференцировки клеток 3Т3-Л1 (рис. 5). Однако мы не обнаружили существенных различий в содержании мРНК GLUT4 (рис. 5, *а*) или PPAR $\gamma$  (рис. 5, *б*) между клетками, дифференцированными в присутствии 50 нг/мл ИЛ-4 или без него. Лишь на 10-й день удалось обнаружить незначительное, но



**Рис. 4.** ИЛ-4 не влияет на адипогенную дифференцировку преадипоцитов 3Т3-Л1. *а–г* – Фазово-контрастная микроскопия культур клеток 3Т3-Л1 без индукции адипогенной дифференцировки в отсутствие (*а*) или в присутствии (*б*) 50 нг/мл ИЛ-4, на 10-й день после начала адипогенной дифференцировки в отсутствие (*в*) или в присутствии (*г*) 50 нг/мл ИЛ-4; все клеточные культуры окрашены липофильным красителем OilRedO; *д* – результат количественного анализа накопления нейтральных липидов на 10-й день после начала дифференцировки. Приведена оптическая плотность экстракта OilRedO, измеренная при длине волны 600 нм. Контроль соответствует усредненным данным *а* и *б* вместе



**Рис. 5.** Влияние ИЛ-4 на уровень мРНК генов-маркеров адипогенной дифференцировки в адипоцитах 3Т3-Л1. Показаны результаты ПЦР в реальном времени для трех независимых экспериментов. Адипогенную дифференцировку клеток 3Т3-Л1 проводили в течение разного времени в присутствии 50 нг/мл ИЛ-4 или без него. Определено изменение уровня мРНК *GLUT4* (а) и *PPAR $\gamma$*  (б)

статистически достоверное уменьшение уровня мРНК *GLUT4*, в клетках, дифференцированных в присутствии ИЛ-4 ( $p = 0,003$ ). В целом, эти результаты согласуются с данными по накоплению нейтральных липидов и позволяют заключить, что ИЛ-4 не вызывает и не усиливает адипогенную дифференцировку клеток 3Т3-Л1.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы показали, что ИЛ-4 позитивно влияет на активность всех участников инсулинового каскада в модели экспериментальной липид-индуцируемой ИР в линейных адипоцитах 3Т3-Л1. В оптимальной концентрации 50 нг/мл ИЛ-4 максимально активировал фосфорилирование всех ключевых участников инсулинового каскада (IRS-1, Akt, AS-160) и восстанавливал чувствительность к инсулину. В этой концентрации ИЛ-4 слабо влиял на активность инсулинового каскада в контрольных клетках без ИР, не увеличивал экспрессию мРНК генов-маркеров адипогенеза *GLUT4* и *PPAR $\gamma$* , а также не влиял на адипогенную дифференцировку преадипоцитов 3Т3-Л1. Таким образом, механизм действия ИЛ-4 не связан с восстановлением чувствительности к инсулину за счет формирования новых жировых депо и, скорее всего, имеет сигнальную природу.

Причины позитивного воздействия ИЛ-4 на чувствительность клеток к инсулину следует связывать с особенностями механизмов развития липид-индуцируемой ИР в адипоцитах. Вероятнее всего, действие свободной жирной кис-

лоты в этих клетках не связано с эффектом липотоксичности и активацией атипичных изоформ протеинкиназы С, что прежде всего характерно для мышечных клеток и печени [18]. В жировой ткани основной механизм действия свободных жирных кислот связан с активацией толл-подобных рецепторов 4 типа (TLR4) и запуском классического воспалительного каскада с участием I $\kappa$ B kinase/Nuclear factor  $\kappa$ B (IKK/NF- $\kappa$ B) [5–8]. Активация IKK/NF- $\kappa$ B в жировой ткани усиливает экспрессию провоспалительных цитокинов, которые действуют аутокринно, поддерживая латентное воспаление [5, 6]. При этом повышается активность стресс-активируемых киназ (JNK, IKK); они опосредуют ингибиторное сериновое фосфорилирование IRS-1, нарушая передачу инсулинового сигнала и транспорт глюкозы в клетки и вызывая хронические метаболические расстройства [7].

ИЛ-4 представляет собой классический противовоспалительный цитокин. Механизм его действия связан с активацией противовоспалительного транскрипционного фактора STAT6 – функционального антагониста основного воспалительного транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [11]. STAT6 усиливает экспрессию противовоспалительных цитокинов (ИЛ-13, ИЛ-33, TGF $\beta$  и др.), а также подавляет активность провоспалительных транскрипционных факторов и экспрессию провоспалительных цитокинов, противодействуя латентному воспалению в жировой ткани. Это создает предпосылки использования ИЛ-4 в качестве инсулинсенситизирующего агента в модели липид-индуцированной ИР в адипоцитах. Результаты данной работы да-

ют экспериментальное подтверждение этой гипотезы.

Мы проследили концентрационную зависимость инсулинсенситизирующего действия ИЛ-4 по восстановлению активации инсулинового каскада в классической адипогенной модели липид-индуцируемой ИР. Концентрация ИЛ-4, равная 25 нг/мл, была явно недостаточной для восстановления активирующего фосфорилирования IRS-1 и Akt — ключевых участников инсулинового каскада (рис. 1 и 2). Только в случае AS160 ИЛ-4 в концентрации 25 нг/мл восстанавливал инсулинзависимое фосфорилирование остатка Ser-318 (рис. 3). Однако известно, что Ser-318 является одним из нескольких остатков, фосфорилируемых в AS160 под действием Akt [15–16]. Таким образом, остается вероятность того, что фосфорилирование одного Ser-318 может не полностью отражать активирующее действие инсулина на общее инсулинзависимое фосфорилирование AS160.

Концентрация ИЛ-4, равная 50 нг/мл, была достаточной и оптимальной для восстановления активации всех ключевых участников инсулинового каскада до контрольного уровня без ИР в условиях липид-индуцируемой ИР в адипоцитах (рис. 1–3). Единственным исключением являлось инсулин-зависимое фосфорилирование Ser-473 в Akt, которое достоверно усиливалось, но не возвращалось к контрольным значениям, характерным для клеток в отсутствие ИР (рис. 2, в и г). Однако следует отметить, что для активации Akt критически необходимо фосфорилирование по остатку Thr-308, расположенному в активационной петле фермента, тогда как фосфорилирование Ser-473 внутри гидрофобной последовательности фермента носит вспомогательный характер [19]. Если фосфорилирование Thr-308 обеспечивает киназа PDK1 в составе PI3-киназного каскада, активируемого инсулином, то за фосфорилирование Akt по Ser-473 отвечает белковый комплекс mammalian target of rapamycin type 2 (mTORC2) [20]. Точные механизмы активации mTORC2 в клетках пока недостаточно ясны и включают инсулиннезависимые механизмы. Они могут отвечать за неполный эффект ИЛ-4 на сериновое фосфорилирование Akt, обнаруженный в данной работе.

Аналогично в концентрации 100 нг/мл ИЛ-4 не проявлял существенно более сильного воздействия на инсулинзависимое фосфорилирование участников инсулинового каскада, а в случае IRS активирующий эффект ИЛ-4 в концентрации 100 нг/мл был даже ниже по сравне-

нию с 50 нг/мл данного цитокина. Это может быть связано с несколькими механизмами действия ИЛ-4 в клетках, некоторые из которых могут не зависеть от инсулина или PI3-киназного каскада [11]. Сигнальные каскады, активируемые ИЛ-4 в адипоцитах, мало изучены и требуют отдельных исследований для того, чтобы объяснить оптимальность использования промежуточных концентраций ИЛ-4 порядка 50 нг/мл для восстановления чувствительности к инсулину, по крайней мере, в клеточных моделях.

Механизм действия основных антидиабетических препаратов, таких как метформин и тиазолидиндионы, во многом связан с активацией жировой дифференцировки клеток-предшественников и формированием новых жировых депо, чувствительных к инсулину [16]. В этой связи важно, что в культивируемых адипоцитах ИЛ-4 не влиял на адипогенную дифференцировку и не стимулировал экспрессии маркеров адипогенеза. Это указывает на иную природу механизма действия ИЛ-4, предположительно за счет активации противовоспалительной сигнализации, и позиционирует использование ИЛ-4 в качестве принципиально иного подхода для восстановления чувствительности к инсулину в жировой ткани.

Резюмируя, мы продемонстрировали высокий потенциал ИЛ-4 для коррекции ИР в жировой ткани. В оптимальных концентрациях ИЛ-4 восстанавливает чувствительность жировых клеток к инсулину в условиях резистентности и не влияет на адипогенную дифференцировку и активность инсулинового каскада в нормальных условиях. Дальнейшие исследования должны быть направлены на подтверждение позитивного действия ИЛ-4 в первичных адипоцитах человека, на создание генно-терапевтических препаратов на основе ИЛ-4 и их валидацию в животных моделях высокожировой диеты.

#### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Фонда поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» (грант № 17-34-80026 «мол\_эв\_а»).

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Trayhurn, P. (2013) Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity, *Physiol. Rev.*, **93**, 1–21.
2. Ozcan, L., and Tabas, I. (2012) Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic diseases and other disorders, *Annu. Rev. Med.*, **63**, 317–328.
3. Matsuda, M., and Shimomura, I. (2013) Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis and cancer, *Obes. Res. Clin. Pract.*, **7**, e330–e341.
4. Satripy, P., and Loskutoff, D.J. (2003) Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance, *PNAS*, **100**, 7265–7270.
5. Reilly, S.M., and Saltiel, A.R. (2014) A complex role for adipose tissue macrophages, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **10**, 193–194.
6. Stafeev, I.S., Menshikov, M.Y., Tsokolaeva, Z.I., Shestakova, M.V., and Parfyonova, Ye.V. (2015) Molecular mechanisms of latent inflammation in metabolic syndrome. Possible role of sirtuins and peroxisome proliferator-activated receptor type  $\gamma$ , *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1480–1492.
7. Hotamisligil, G.S., and Erbay, E. (2008) Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases, *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 923–934.
8. Stafeev, I.S., Vorotnikov, A.V., Ratner, E.I., Menshikov, M.Y., and Parfyonova, Ye.V. (2017) Latent inflammation and insulin resistance in adipose tissue, *Int. J. Endocrinol.*, **2017**, 1–12.
9. Ricardo-Gonzalez, R.R., Red Eagle, A., Odegaard, J.I., Jouihan, H., Morel, C.R., Heredia, J.E., Mukundal, L., Wu D., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2010) IL-4/STAT6 immune axis regulate peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity, *PNAS*, **107**, 22617–22622.
10. Darkhal, P., Gao, M., Ma, Y., and Liu, D. (2015) Blocking high-fat diet-induced obesity, insulin resistance and fatty liver by overexpression of IL-13 gene in mice, *Int. J. Obes.*, **39**, 1292–1299.
11. Luzina, I.G., Keegan, A.D., Heller, N.M., Rook, G.A.W., Shea-Donohue, T., and Atamas, S.P. (2012) Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”, *J. Leuk. Biol.*, **92**, 1–12.
12. Zebisch, K., Voight, V., Wabitsch, M., and Brandsch, M. (2012) Protocol for effective differentiation of 3T3L1 cells to adipocytes, *Anal. Biochem.*, **425**, 88–90.
13. Svedberg, J., Bjorntorp, P., Smith, U., and Lonroth, P. (1990) Free-fatty acid inhibition of insulin binding, degradation and action in isolated rat hepatocytes, *Diabetes*, **39**, 570–574.
14. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **15**, 680–685.
15. Kane, S., Sano, H., Liu, S.C.H., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.C., and Lienhard, G.E. (2002) A method to identify serine kinases substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain, *J. Biol. Chem.*, **277**, 22115–22118.
16. Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.W., and Lienhard, G.E. (2003) Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulated GLUT4 translocation, *J. Biol. Chem.*, **278**, 14599–14602.
17. Hauner, H. (2002) The mode of action of thiazolidinediones, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **18**, S10–S15.
18. Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2012) Integrating mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links, *Cell*, **148**, 852–871.
19. Pearce, L.R., Komander, D., and Alessi, D.R. (2010) The nuts and bolts of AGC protein kinases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 9–22.
20. Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005) Growing roles for the mTOR pathway, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 596–603.

## INTERLEUKIN-4 RESTORES INSULIN SENSITIVITY IN LIPID-INDUCED INSULIN RESISTANT ADIPOCYTES

I. S. Stafeev<sup>1,2\*</sup>, S. S. Michurina<sup>1,3</sup>, N. V. Podkuychenko<sup>1,3</sup>,  
A. V. Vorotnikov<sup>1,4\*</sup>, M. Yu. Menshikov<sup>1</sup>, and Ye. V. Parfyonova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center for Cardiology, 121552 Moscow, Russia; E-mail: yuristafeev@gmail.com, a.vorotnikov@icloud.com

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Basic Medicine, 117192 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Lomonosov Moscow State University Medical Center, 119991 Moscow, Russia

Received August 29, 2017

Revision received October 26, 2017

Obesity and latent inflammation in adipose tissue critically contribute to development of insulin resistance (IR) and type 2 diabetes. Here we asked whether the antiinflammatory interleukin-4 (IL-4) can restore insulin sensitivity in cultured 3T3-L1 adipocytes. The activity of the key signaling intermediates was assessed by Western blots using phospho-specific antibodies to insulin receptor substrate (IRS-1, Tyr-612), Akt (Thr-308 and Ser-473), and AS-160 (160 kDa Akt substrate, Ser-318), which regulates translocation of the glucose transporter Glut4 to the plasma membrane. The IR condition was induced in adult adipocytes by albumin-conjugated palmitate. It significantly reduced phosphorylation levels of all the above proteins at the indicated sites. Including IL-4 into the IR induction medium led to a dose-dependent increase in insulin stimulation of IRS-1, Akt, and AS-160 phosphorylation. At the optimal concentration of 50 ng/ml, IL-4 fully restored insulin cascade activation while not affecting the activation of insulin signaling in control cells without IR. IL-4 neither increased mRNA levels of the key adipogenesis markers *GLUT4* and *PPAR $\alpha$*  nor affected lipid accumulation in adipocytes. These results demonstrate the potential of IL-4 in restoring insulin sensitivity in adipocytes via mechanisms that are not associated with induced adipogenesis and de novo formation of lipid depots.

**Keywords:** insulin resistance, interleukin-4, inflammation