

PI3K/Akt 在 C2C12 肌细胞生脂转分化中的作用 *

齐仁立^{1,2)**} 黄晓凤^{1)**} 吴泳江³⁾ 王敬¹⁾ 刘虹¹⁾ 黄金秀^{1,2)} 王琪^{1)***}

(¹⁾ 重庆市畜牧科学院, 荣昌 402460; ²⁾ 农业部养猪科学重点实验室, 荣昌 402460; ³⁾ 西南大学荣昌校区, 荣昌 402460)

摘要 本研究的主要目的在于探明 PI3K/Akt 通路在肌细胞生脂转分化中的调控作用。试验培养并诱导 C2C12 肌细胞生脂转分化, 同时使用抑制剂 Wortmannin 处理细胞抑制 PI3K 的激活, 或者使用特异性 siRNA 转染沉默细胞内源 PI3K 基因的表达, 观察其对肌细胞生脂转分化的影响。结果表明, 随着 C2C12 细胞的生脂转分化, PI3K 蛋白(P55 亚基和 P85 亚基)和其下游效应分子 Akt 的磷酸化水平, 在转分化前期提高而在转分化后期明显降低。使用 Wortmannin 处理细胞能够有效抑制 PI3K/Akt 激活, 这导致 C2C12 细胞的生脂转分化明显受到抑制, 细胞内脂肪生成量显著降低, 生脂基因 *PPAR γ* 、*C/EBP α* 、*FABP4* 和 *FATP1* 的表达水平均显著下调。使用特异性 siRNA 转染细胞显著下调 PI3K 基因表达水平和蛋白质含量, 同样明显抑制了 C2C12 细胞的生脂转分化。此外, 在转分化过程中抑制 PI3K/Akt 的活性和表达还激活了 Caspase-3 并导致细胞凋亡。综合上述结果可以确认 PI3K/Akt 的正常表达和激活是肌细胞生脂转分化必不可少的。

关键词 C2C12 细胞, 生脂, PI3K, Akt, 转分化

学科分类号 180.21

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0243

C2C12 细胞是一种鼠源肌前体细胞系, 是研究肌肉生长发育、肌细胞分化和代谢的理想细胞模型^[1]。由于脂肪细胞和肌肉细胞都起源于胚胎干细胞, 在特定条件下肌细胞可以转分化为脂肪细胞或者脂肪细胞样细胞(adipocyte-like cell)^[2-3]。如在受到药物刺激或者环境改变的情况下, C2C12 细胞会失去肌细胞的生肌特性而转分化为脂肪细胞, 细胞内产生大量脂滴并表达脂肪细胞特异性基因^[4]。这个过程涉及大量的转录调控因子的激活和众多功能基因的差异表达, 经由不同的信号通路精密地调控细胞的分化程序。我们的前期研究发现一些 microRNAs 的表达水平随着 C2C12 肌细胞生脂转分化显著改变, 生物信息学分析提示, 这些差异表达 microRNAs 及其靶基因主要富集于胰岛素信号通路, 特别是磷脂酰肌醇 3- 激酶(PI3K)和下游分子丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶(Akt)组成的 PI3K/Akt 通路^[5]。

PI3K/Akt 通路是细胞内一条重要的信号传导途径。PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶, 具有丝氨酸 / 苏氨酸(Ser/Thr) 激酶活性, 它由调节亚基 P85、P55、P50 和催化亚基 P110 组成, 不同的调

节亚基和催化亚基结合介导不同的 PI3K 通路^[6]。胰岛素通过胰岛素受体(IRS)激活 PI3K, 激活的 PI3K 可以催化 4, 5- 二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)生成 PIP3, 其作为第二信使激活下游效应分子 Akt^[7]。PI3K/Akt 是胰岛素调控的主要下游通路, 在细胞生长、存活以及物质代谢中发挥重要作用, 特别是与糖代谢、胰岛素信号传导和肿瘤的发生发展密切相关^[8-11]。研究发现活化的 Akt 激活底物蛋白 AS160, 进而促进 GLUT4 转座和细胞对葡萄糖的吸收^[12]。活化的 Akt 也能够通过磷酸化 GSK3 β 而抑制其活性, 从而促进葡萄糖的代谢和调节细胞的周期。PI3K/Akt 通路在脂肪细胞分化和脂肪生成方面也有重要的调节作用, 激活的 PI3K 能在转录后水平控制 3T3-L1 脂肪细胞分化, 抑制 PI3K 激活能够阻止脂肪细胞内的脂肪生成^[13]。

* 国家自然科学基金(31302055, 31470117)和重庆市基本科研业务费(14403, 14404, 16418)资助项目。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 023-46792097, E-mail: wangq0418@126.com

收稿日期: 2016-12-30, 接受日期: 2017-02-22

然而, PI3K/Akt 在肌细胞的生脂转分化中发挥怎样的调控作用还不清楚. 本研究在诱导 C2C12 肌细胞生脂转分化的过程中使用特异性抑制剂 Wortmannin 处理细胞抑制 PI3K 激活, 另外使用特异性 Small interfering RNA(siRNA)转染沉默细胞内 PI3K 的表达, 探索 PI3K/Akt 通路对肌细胞生脂转分化的影响.

1 材料与方法

1.1 主要试剂和药品

C2C12 细胞购于中国科学院上海细胞研究所. DMEM 培养基、DMEM-F12 培养基、胎牛血清购自 GIBCO 公司. siRNA 由百奥迈克生物技术公司设计合成. BODIPY 荧光染料和 Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司. PI3K 抑制剂 Wortmannin 购自碧云天公司. RIPA 蛋白提取试剂、总 RNA 提取试剂、cDNA 合成试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司. 用于蛋白质印迹分析的一抗和二抗以及 Pathscan Intracellular Signaling Array Kit 蛋白检测芯片均购自 Cell Signaling Technology (CST) 公司. 胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、地塞米松、罗格列酮和油红 O 染料购自 Sigma-Aldrich 公司. 定量 PCR 检测所用引物由上海生工公司设计合成. PVDF 膜和 ECL 化学发光试剂购自 Millipore 公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理

复苏冻存的 C2C12 细胞, 使用 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清)培养, 待细胞密度达到 90%以上时传代. 传代后的细胞使用 DMEM-F12 培养基培养, 待细胞密度达到 60%~70%左右开始生脂分化诱导. 使用含有胰岛素、地塞米松、IBMx 和罗格列酮的培养基(含 10%胎牛血清)培养 2 d, 更换为只含有胰岛素和罗格列酮的培养基继续培养 2 d, 然后, 再更换为正常培养基继续培养 4~6 d, 每 2 d 换液 1 次. 实验一: 培养的细胞分为实验组和对照组, 从开始诱导分化的同时, 实验组(Trial group)细胞的培养基中持续加入 PI3K 阻断剂 Wortmannin(终浓度 100 nmol/L)一直到分化末期, 对照组(Control group)细胞培养基中加入等体积的 DMSO 溶液, 一定时间后染色观察和收获细胞. 实验二: 培养的细胞分为 siRNA 转染组和阴性对照组, 在诱导分化前 24 h, 分别使用特异性 siRNA 和阴性对照 oligo 转染细胞, 一定时间后染色观察

和收获细胞.

1.2.2 siRNA 合成与转染

根据 PI3K 的基因序列(Genbank 数据库, NM_001164071.1)设计合成 PI3K siRNA 和阴性对照. siRNA 的序列(5'→3'): 正义链, GCAACUC-AAUAGAGCAUAUdTdT, 反义链 AUAUGCUCU-AUUGAGUUGCdTdT. 细胞转染 siRNA(终浓度 100 nmol/L)使用 Lipofectamine 2000 转染试剂, 具体操作参照转染试剂说明书进行.

1.2.3 油红 O 染色和 BODIPY 染色

油红 O 染色用于判断细胞分化程度和细胞内脂肪生成情况. 取分化一定时间的细胞, 弃去培养基, PBS 溶液漂洗 3 遍, 4%中性甲醛固定 30 min, PBS 再次漂洗 3 遍, 使用油红 O 溶液染色 10~30 min. 然后用 60%异丙醇溶液迅速漂洗, PBS 漂洗 2 遍. 倒置显微镜下观察细胞内脂肪沉积情况并照相. 照相后用 100%异丙醇提取细胞内的油红 O, 然后检测吸光度.

BODIPY 是一种脂肪特异性荧光染料, 能够与脂质结合发出绿色荧光. 取分化一定时间的细胞, 弃去培养基, PBS 溶液漂洗 3 遍, 4%中性甲醛固定 30 min, PBS 再次漂洗 3 遍, 避光环境下使用 BODIPY 溶液染色 10 min. 然后弃去染液, PBS 漂洗 2 遍, 再使用 DAPI 复染 3 min, 然后在倒置荧光显微镜下观察照相. Biotek 多功能酶标仪检测荧光信号强度.

1.2.4 荧光定量 PCR

从分化第 8 d 的细胞中提取总 RNA, 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测质量合格的 RNA 用于反转录. 使用 cDNA 合成试剂盒把 RNA 反转录为 cDNA, 作为荧光定量 PCR 反应的模板. 使用 ABI 公司的 Step one 型 RCR 仪进行荧光定量 PCR 反应, 反应条件为: 95℃ 预变性 30 s; (95℃ 5 s, 60℃ 35 s) 40 个循环. GAPDH 为参照基因, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量.

1.2.5 蛋白质印迹检测

在分化不同时间收获细胞, 使用 RIPA 裂解液提取总蛋白. 通过 10%的 SDS-PAGE 凝胶电泳(250V, 30 min)进行蛋白质分离, 40V 电压条件下转膜 1 h. 然后使用 5%的脱脂奶粉溶液在室温条件下固定 PVDF 膜 2 h. 4℃条件下使用相应的一抗溶液孵育过夜, 然后使用对应的二抗室温条件下孵育 1~2 h. 最后使用 ECL 化学发光试剂和 Bio-Rad 公司的化学发光成像系统对蛋白条带进行曝光显影

和分析。

1.2.6 蛋白质芯片检测

Cell Signaling Technology (CST) 公司生产的 Pathscan intracellular signaling array 蛋白质芯片 (#7323) 被用于检测和比较细胞内一些重要蛋白质因子的激活情况。该蛋白质芯片通过抗体抗原反应, 可以检测 20 种不同蛋白质分子的磷酸化水平和激活状态, 具体操作步骤参考使用说明。

1.2.7 数据处理

实验数据采用“平均值 $\pm$ 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示, 实验结果采用 SPSS 13.0 分析软件进行单因素方差分析, 并采用 LSD 法和 Duncan 法进行多重比较和显著性分析。以 $P < 0.05$ 作为显著性标准, 以 $P < 0.01$ 作为极显著性标准。

2 结 果

2.1 PI3K/Akt 在肌细胞生脂转分化中的表达变化

如图 1 显示, 诱导 C2C12 细胞生脂转分化后, 细胞逐渐变圆, 细胞内大量产生脂滴。图 2 显示与未分化的细胞相比, 脂肪细胞分化调控因子过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors γ , PPAR γ) 的蛋白质水平在分化

第 2 天显著升高, 然后又逐渐降低, 而脂肪酸结合蛋白 4(fatty acid binding protein 4, FABP4) 蛋白则在分化中期(4 d)以后持续高水平表达。PI3K 总蛋白随着肌细胞的转分化逐渐降低, 而磷酸化的 PI3K 则有不同变化。调节亚基 P55 磷酸化水平, 在分化前期略有增加而在分化末期显著降低, 催化亚基 P85 的磷酸化水平随着转分化过程明显增加而在分化末期也略有减少。在 C2C12 细胞生脂转分化过程中, Akt 总蛋白水平和磷酸化蛋白水平都是在分化早期较高而后随着分化进程下降, 特别是磷酸化的 Akt 蛋白在细胞分化 4 d 以后明显减少。

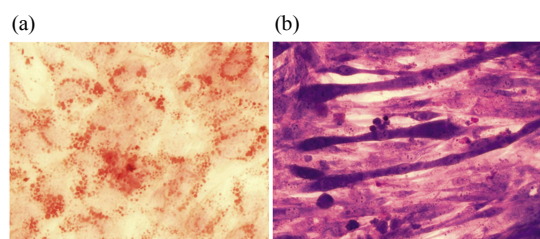


Fig. 1 Differentiation of C2C12 cells

(a) Adipogenic trans-differentiation by Oil red O staining. (b) Myogenic differentiation by Gimsa staining. 200 $\times$ magnification.

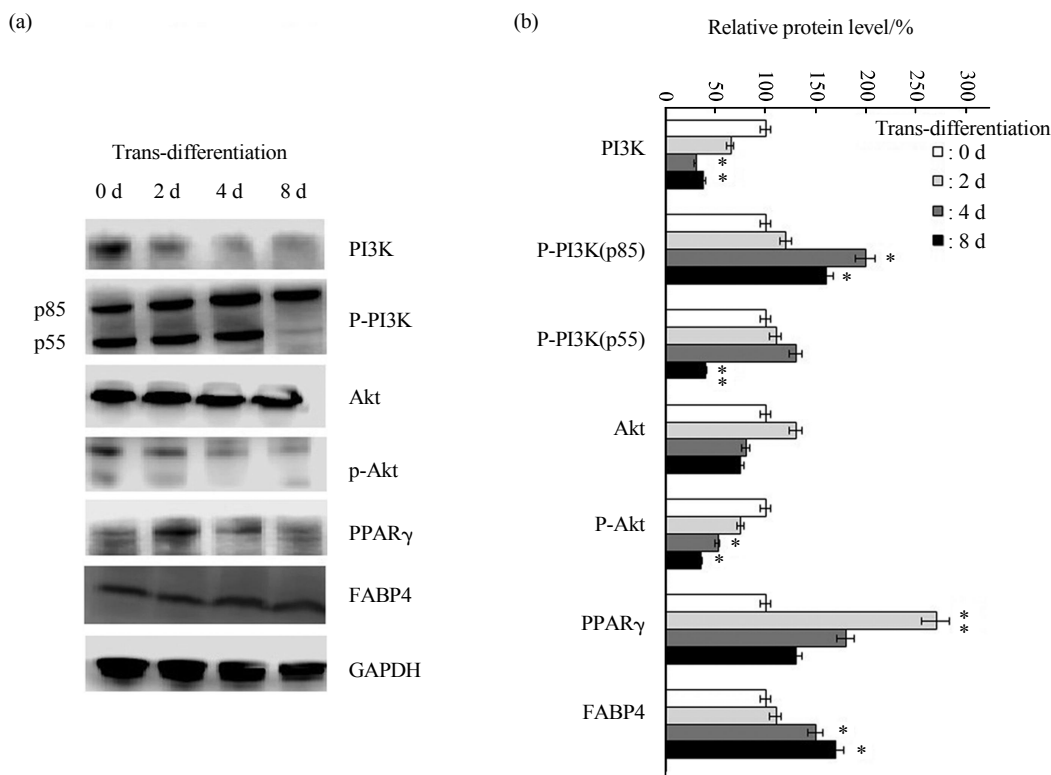


Fig. 2 The expression of PI3K/Akt proteins during the adipogenic trans-differentiation of C2C12 cells

(a) Western blotting. (b) Relative expression levels of proteins from (a). Significant differences between an indicated protein and the control GAPDH, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.2 Wortmannin 抑制 PI3K/Akt 激活阻碍肌细胞的生脂转分化并诱导细胞凋亡

检测发现 Wortmannin 处理 24 h 后, 细胞内 PI3K(P55 亚基)和 Akt 的磷酸化水平均显著低于

对照组细胞, 这一结果确认 PI3K/Akt 活性被抑制(图 3a)。在分化第 8 d 用定量 PCR 检测基因表达发现, 试验组细胞中脂肪细胞分化调控因子和脂肪合成调控基因 *PPAR γ* 、*CCAAT* 增强子结合蛋白 α

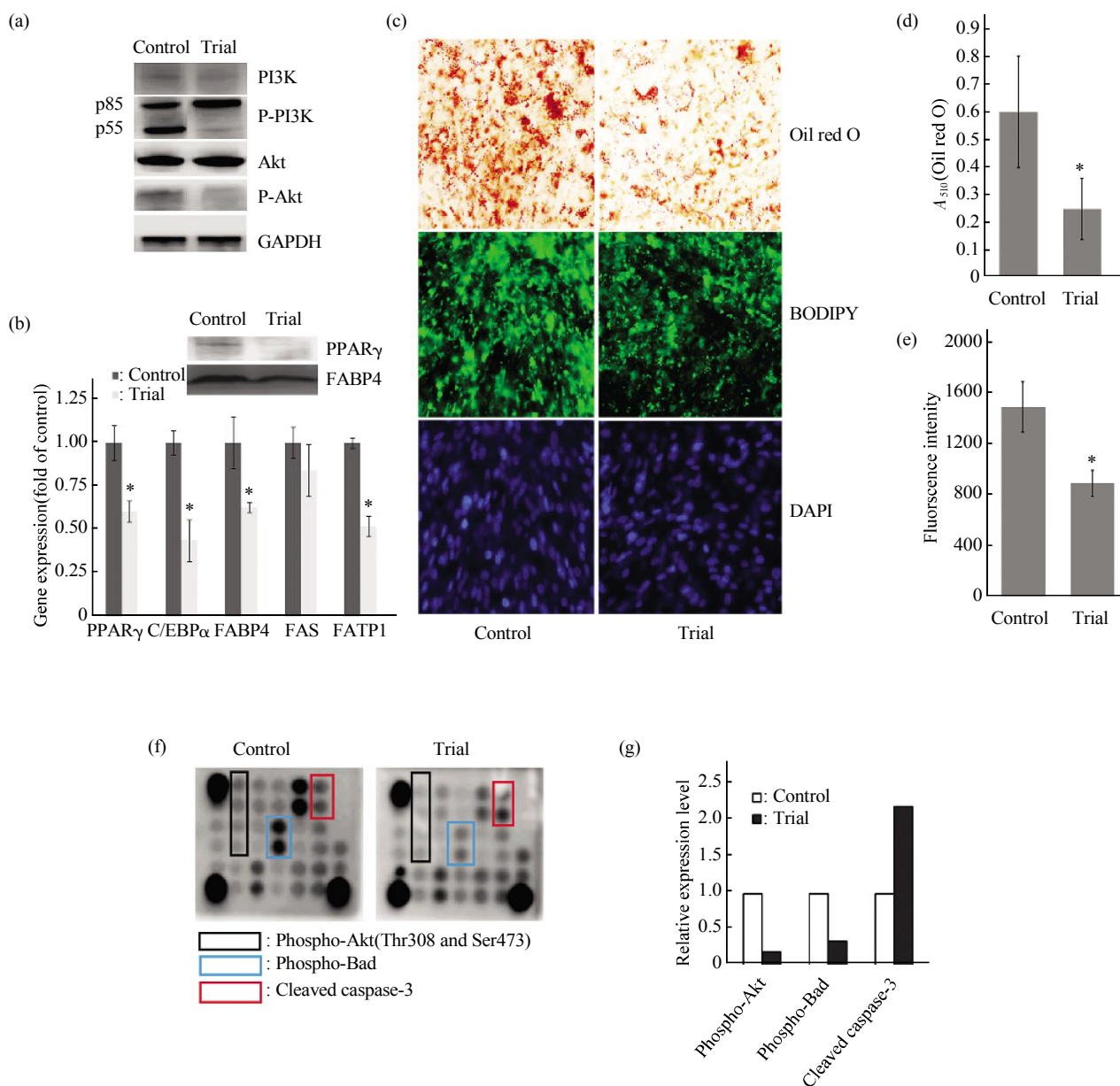


Fig.3 Inhibition of PI3K/Akt by wortmannin reduced adipogenesis, but induced apoptosis in C2C12 cells

(a) Wortmannin treatment (Trial group) suppressed the expression of PI3K/Akt proteins. (b) Quantitation of the relative expression of proteins from (a). (c) Microscopy of C2C12 cells stained by Oil red O and BODIPY. (d-e) Quantitative analysis of lipid accumulation. (f) Detection of protein array. (g) Quantification of the relative expression of proteins from (f). Significant differences between the control and the trial, * $P < 0.05$.

(CCAAT/enhancer binding protein α , *C/EBP α*)、FABP4 和脂肪酸转运蛋白 1 (fatty acids transport protein 1, *FATP1*) 的表达均显著低于对照组细胞 ($P < 0.05$), 但两组细胞中脂肪酸合成酶 (fatty acid synthetase, *FAS*) 的表达水平差异不显著 ($P > 0.05$). 进一步用蛋白质印迹检测 PPAR γ 和 FABP4 的蛋白质水平, 其结果与 mRNA 水平变化情况相似 (图 3b). 通过油红 O 染色和 BODIPY 染色观察细胞形态变化和细胞内脂肪生成情况 (图 3c), 结果发现, 分化 8 d 以后, 对照组细胞明显变圆, 细胞内脂滴大量集聚, 并有许多体积较大的脂肪小球产生. 实验组细胞多数还是梭型, 细胞中多为沙点状的小脂滴, 没有融合成大的脂肪滴. 定量分析结果显示实验组细胞中甘油三酯 (triglyceride, TG) 含量约为对照组细胞的 45% 左右 ($P < 0.05$) (图 3d, e).

观察发现 Wortmannin 处理引起死亡细胞数量明显增多. 使用 CST 公司的 Pathscan intracellular signaling array 蛋白质芯片检测了细胞内一些重要

蛋白质分子的磷酸化水平 (图 3f, g). 与蛋白质印迹检测结果一致, 芯片检测结果也显示试验组细胞中 Akt 的磷酸化水平显著降低. 更为重要的是, 蛋白质芯片结果显示, 细胞凋亡的关键执行因子 Caspase-3 被激活, 激活型 Cleaved-Caspase3 的表达水平显著升高, 而促凋亡因子 Bad 的磷酸化水平显著下降, 说明其促凋亡作用的增强. 这一结果说明生脂转分化过程中抑制 PI3K/Akt 的激活同时也会引起 C2C12 细胞凋亡.

2.3 siRNA 沉默 PI3K 基因同样抑制肌细胞的生脂转分化并诱导细胞凋亡

为了确认 PI3K/Akt 对于肌细胞生脂转分化的调控影响, 我们还使用 siRNA 来沉默细胞内源 *PI3K* 基因, 观察其对 C2C12 细胞生脂转分化的影响. 在细胞诱导分化前 24 h 使用 *PI3K* 基因特异性 siRNA 转染细胞, 转染 48 h 后定量 PCR 检测结果显示, *PI3K* mRNA 水平下调约 86% ($P < 0.05$, 图 4a), 蛋白质印迹结果显示 PI3K 的总蛋白水平和磷酸化

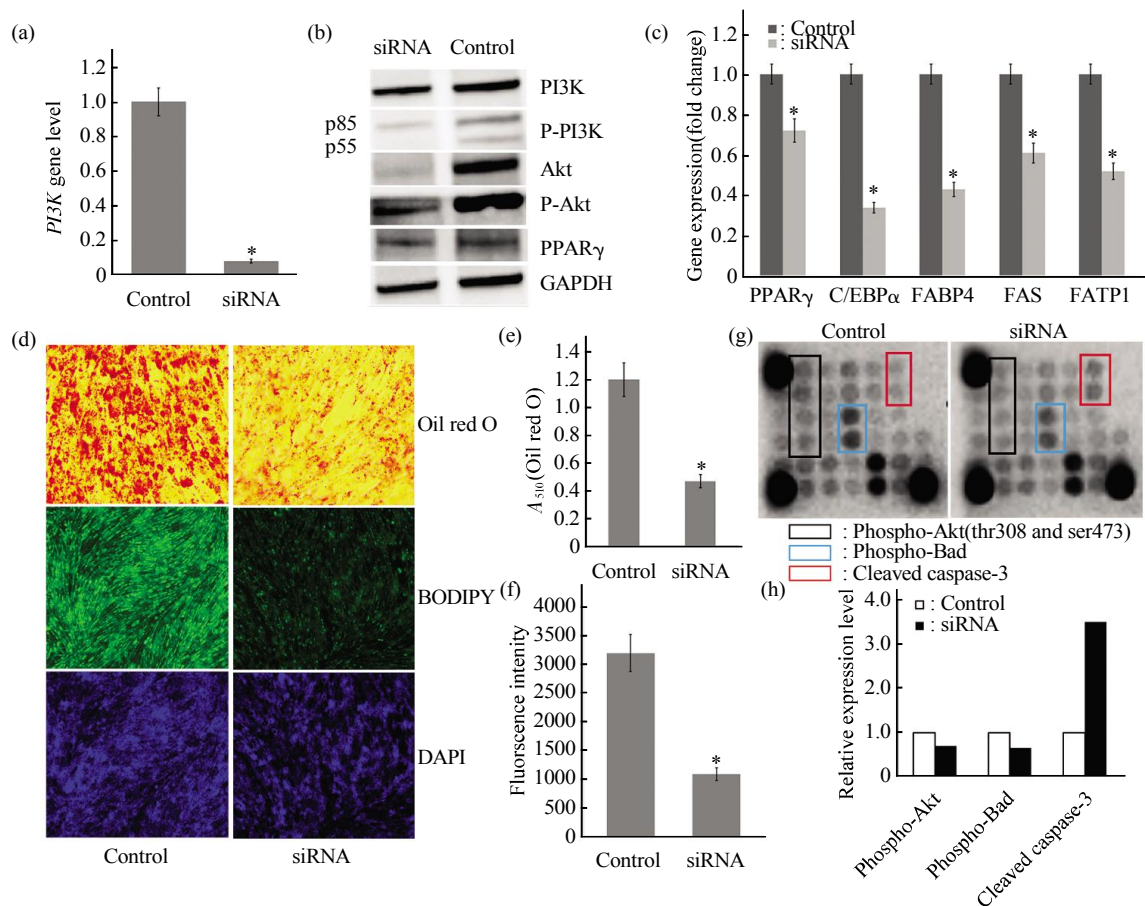


Fig. 4 Reduction of PI3K by siRNA reduced adipogenesis but induced apoptosis in C2C12 cells

(a) Relative expression of *PI3K* by siRNA treatment. (b) Western blot analysis. (c) Relative mRNA expression of adipogenic genes. (d) Microscopy of C2C12 cells stained by Oil red O staining and BODIPY. (e, f) Quantitative analysis of lipid accumulation from (d). (g) Detection of protein array. (h) Quantification of the relative expression of proteins from (g). Significant differences between the control and the trial, $*P < 0.05$.

水平都明显降低, Akt 的总蛋白水平和磷酸化水平也相应地大幅下降(图 4b), 说明阻碍 PI3K 的表达也会抑制 PI3K 和 Akt 的活化. 细胞转分化 6d 后, 定量 PCR 和蛋白质印迹结果显示 siRNA 转染组细胞中生脂因子的基因和蛋白质表达水平也都显著下调(图 4b, c). 显微镜下观察发现 siRNA 转染组细胞形态为细长条状而对照组细胞则接近椭圆形. 油红 O 染色观察和 TG 定量分析显示 siRNA 转染组细胞内的 TG 含量显著少于对照组细胞(图 4d~f). 同样地, 蛋白质芯片检测结果显示 siRNA 转染组细胞中激活型 Cleaved-Caspase3 的含量明显高于对照组细胞, 显示 PI3K 基因沉默引起了细胞的凋亡.

3 讨 论

正常情况下骨骼肌细胞可以产生少量脂肪, 哺乳动物的肌肉脂肪一般在成年以后逐渐增加^[14]. 在特殊条件下, 肌细胞会失去生肌能力而转分化为具有生脂能力的脂肪细胞或脂肪细胞样细胞, 这一转分化过程涉及大量的基因重编程和不同的代谢调节. 之前的一些实验研究着眼于肌细胞和脂肪细胞之间互相转化的分子特性和调控机制, 并得到了许多有重要意义的研究成果. Teboul 等^[3](1995 年)首先报道了使用噻唑烷二酮类药(thiazolidinediones)和脂肪酸处理 C2C12 肌细胞, 可以降低细胞内肌生成素(myogenin)基因的表达, 抑制肌管的形成, 并且使细胞产生脂肪细胞分化的特性. 在小鼠的骨骼肌卫星细胞上也得到相似的实验结果, 但是他们也提出药物和脂肪酸刺激对处于终末分化阶段的多核肌管没有明显的作用. 随后的实验报道认为 MKK3 激酶对于肌细胞生脂转分化具有重要的影响, 罗格列酮能够诱使 MKK3 显性失活的 C2C12 细胞生脂转分化^[4]. Lee 等^[15](2011 年)报道了炎症因子 IL-17 也能够促进 C2C12 肌细胞的生脂转分化. Chen 等^[16](2015 年)研究发现在临床治疗中使用地塞米松会造成破裂的肌腱自我修复能力减弱并伴随着脂肪化形变. 在体外实验中使用地塞米松处理鼠的肌腱干细胞(tendon stem cells)能够诱导细胞分化为脂肪细胞, 在这个过程中伴随着 Dickkopf1(DKK1)表达显著升高, 敲除 DKK1 基因能够明显抑制肌细胞生脂转分化. 但是, 肌细胞的生脂转分化是个非常复杂的调控和转化过程, 迄今为止还不能完全明确其分子调控机制.

肌肉和脂肪的生长和发育都受到胰岛素的密切调控. 本课题组的前期研究结果也提示胰岛素信号

传输途径可能影响了肌细胞生脂转分化^[9]. 由于 PI3K/Akt 是胰岛素通路的主要组成部分, 所以在本研究重点关注 PI3K/Akt 在肌细胞生脂转分化中的表达和调控作用. 实验结果显示 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平在 C2C12 肌细胞生脂转分化早期升高而在分化末期又显著降低, 与生脂调控因子 PPAR γ 的表达情况相似. Wortmannin 抑制细胞内 PI3K/Akt 的活化或者 siRNA 沉默 *PI3K* 基因表达都会导致肌细胞生脂转分化受阻, 胞内脂肪生成量明显减少, 生脂基因表达水平不同程度下调. 这些说明 PI3K/Akt 正常表达和激活是肌细胞生脂转分化的基础条件. 在 3T3-L1 脂肪细胞上的研究同样发现, PI3K 活性随着细胞分化进程逐渐增加但是在分化后期(8 d 以后)又显著减少, 抑制 PI3K 的激活会明显阻碍细胞生脂^[13]. 这些相似的实验结果提示 PI3K/Akt 可能主要是在生脂分化的早期阶段发挥作用.

PI3K/Akt 对于细胞凋亡的形成和发展也有重要调节作用^[17-19]. 活化的 Akt 能够激活 I κ B 激酶(IKK α), 导致 NF- κ B 的抑制剂 I κ B 的降解, 从而使 NF- κ B 发生核转移和激活, 进而发挥抗凋亡作用促进细胞的存活^[17-18]. Akt 还能够通过磷酸化 Bad 蛋白, 使其与 14-3-3 蛋白结合而阻止其与 Bcl-XL 结合抑制凋亡的启动^[20]. 本实验结果表明, 抑制 PI3K/Akt 激活或者沉默 *PI3K* 基因表达都能够减少生脂转分化的 C2C12 细胞中促凋亡蛋白 Bad 的磷酸化水平, 激活细胞凋亡的关键执行因子——Caspase-3. 这一结果提示 PI3K/Akt 的正常表达和激活可能会抑制细胞凋亡.

综合本研究的结果表明, PI3K/Akt 通路在肌细胞生脂转分化过程中扮演重要调控角色, 阻碍 PI3K/Akt 的表达和激活会显著抑制肌细胞生脂转分化, 并诱导细胞凋亡.

参 考 文 献

- [1] Lee J H, Tachibana H, Morinaga Y, *et al.* Modulation of proliferation and differentiation of C2C12 skeletal muscle cells by fatty acids. *Life Sciences*, 2009, **84**(13-14): 415-420
- [2] Asakura A, Rudnicki M A, Komaki M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation*, 2001, **68**(4-5): 245-253
- [3] Teboul L, Gaillard D, Staccini L, *et al.* Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**(47): 28183-28187
- [4] Yeowa K, Phillips B, Dani C, *et al.* Inhibition of myogenesis enables adipogenic trans-differentiation in the C2C12 myogenic

- cell line. FEBS Letters, 2001, **506**(2): 157–162
- [5] Qi R L, Long D B, Wang J, *et al.* MicroRNA-199a targets the fatty acid transport protein 1 gene and inhibits the adipogenic trans-differentiation of c2c12 myoblasts. Cell Physiol Biochem, 2016, **39**(3): 1087–1097
- [6] Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. Nature Reviews Immunology, 2003, **3**(4): 317–330
- [7] Fresno-Vara J A, Casado E, Castro J, *et al.* PI3K/Akt signalling pathway and cancer. Cancer Treatment Reviews, 2004, **30**(2): 193–204
- [8] Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. Apoptosis, 2004, **9**(6): 667–676
- [9] Wua W L, Gana W H, Tong M L, *et al.* Over-expression of NYGGF4 (PID1) inhibits glucose transport in skeletal myotubes by blocking the IRS1/PI3K/AKT insulin pathway. Molecular Genetics and Metabolism, 2011, **102**(3): 374–377
- [10] Cantley L C. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. Science, 2002, **296**(5573): 1655–1657
- [11] Schultzea S M, Hemmingsa B A, Niessen M, *et al.* PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2012, **14**: e1
- [12] Miinea C P, Sano H, Kane S, *et al.* AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. Biochemical Journal, 2005, **391**(1): 87–93
- [13] Sakaue H, Ogawa W, Matsumoto M, *et al.* Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-Kinase. The Journal of Biological Chemistry, 1998, **273**(44): 28945–28952
- [14] Schrauwen-Hinderling V B, Hesselink M, Schrauwen P, *et al.* Intramyocellular lipid content in human skeletal muscle. Obesity, 2006, **14**(3): 357–367
- [15] Lee S J, Lee E J, Kim S H, *et al.* IL-17A promotes transdifferentiation of mouse myoblast cells (C2C12) into adipocytes by increasing the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ through CAAT/enhancer binding protein β signaling. Biotechnology Letters, 2011, **33**(2): 229–235
- [16] Chen W, Tang H, Liu X, *et al.* Dickkopf1 up-regulation induced by a high concentration of dexamethasone promotes rat tendon stem cells to differentiate into adipocytes. Cellular Physiology Biochemistry, 2015, **37**(5): 1738–1749
- [17] Mortenson M M, Schlieman M G, Virudalchalam S, *et al.* Overexpression of BCL-2 results in activation of the Akt/NF- κ B cell survival pathway. Journal of Surgical Research, 2003, **114**(2): 302
- [18] Mitsiades C S, Mitsiades N, Poulaki V, *et al.* Activation of NF- κ B and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins *via* the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. Oncogene, 2002, **21**(37): 5673–5683
- [19] Gottlieb T M, Leal J F, Seger R, *et al.* Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. Oncogene, 2002, **21**(8): 1299–1303
- [20] Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, *et al.* JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. The Journal of Cell Biology, 2005, **170**(2): 295–304

Role of PI3K/Akt in The Adipogenic Trans-differentiation of C2C12 Myoblasts*

QI Ren-Li^{1,2)**}, HUANG Xiao-Feng^{1)**}, WU Yong-Jiang³⁾, WANG Jing¹⁾,
LIU Hong¹⁾, HUANG Jin-Xiu^{1,2)}, WANG Qi^{1)***}

⁽¹⁾ Chongqing Academy of Animal Sciences, Rongchang 402460, China;

⁽²⁾ Key Laboratory of Pig Industry Sciences, Ministry of Agriculture, Rongchang 402460, China;

⁽³⁾ Southwest University Rongchang Campus, Rongchang 402460, China)

Abstract The aim of this study was to explore the regulatory role of the PI3K/Akt pathway in adipogenic trans-differentiation of myoblasts. C2C12 myoblasts were cultured and, subsequently, induced for adipogenic trans-differentiation. During trans-differentiation, levels of phosphorylated PI3K (P85 and P55 subunits) were increased progressively with early differentiation, but significantly decreased during late-phase differentiation. There were no changes in Akt protein levels, but its phosphorylation levels changed similarly to those of PI3K. Wortmannin treatment of the cells efficiently suppressed PI3K/Akt activation, resulting in significant inhibition of adipogenesis and to varying extents, downregulated expression of several adipogenic genes (*PPAR γ* , *C/EBP α* , *FABP4* and *FATP1*). In addition, silencing the *PI3K* gene by siRNA transfection also inhibited adipogenic trans-differentiation in C2C12 cells. Moreover, suppressing both activation and expression of PI3K/Akt induced apoptosis. Taken together, our findings indicated that the PI3K/Akt pathway plays a key role in adipogenic trans-differentiation of myoblasts.

Key words C2C12 cell, adipogenic, PI3K, Akt, trans-differentiation

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0243

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31302055, 31470117) and the Chongqing Fundamental Research Project (14403, 14404, 16418).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-23-46792097, E-mail: wangq0418@126.com

Received: December 30, 2016 Accepted: February 22, 2017