

УДК 571.175.722

ИНТЕРЛЕЙКИН-4 ВОССТАНАВЛИВАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ИНСУЛИНУ В ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНЫХ ОСТЕОБЛАСТАХ, ПОВЫШАЯ ЭКСПРЕССИЮ СУБСТРАТА РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНА 1

© 2020 Ж. Чао¹, Д. Ли¹, Ц. Юэ¹, Ц. Хуан¹, Ю. Коу¹,
Ц. Чжоу¹, Ю. Гао¹, Т. Хасэгава², Ц. Го¹, М. Ли^{1*}

¹ Department of Bone Metabolism, School of Stomatology Shandong University,
Shandong Provincial Key Laboratory of Oral Tissue Regeneration,
Jinan 250012, China; E-mail: liminqi@sdu.edu.cn

² Department of Developmental Biology of Hard Tissue,
Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University,
Sapporo 060-8586, Japan

Поступила в редакцию 14.10.2019

После доработки 30.11.2019

Принята к публикации 31.12.2019

Ожирение и латентные воспалительные процессы могут привести к возникновению резистентности к инсулину и развитию диабета 2-го типа (T2D – type 2 diabetes). В настоящей работе для изучения механизма восстановления чувствительности клеток к действию инсулина с помощью противовоспалительного интерлейкина-4 (IL-4 – interleukin-4) была создана модель инсулиновой резистентности с использованием остеобластов. Нами было показано, что IL-4 ингибирует пролиферацию клеток в зависимости от его концентрации и длительности воздействия. Устойчивость к действию инсулина в значительной степени понижала уровни фосфорилирования белков, выступающих в качестве субстратов инсулинового рецептора, а именно белков IRS1 (Tyr612), Akt (Ser473) и AS160 (Ser318). Добавление IL-4 в модель инсулиновой резистентности вызывало дозозависимую стимуляцию фосфорилирования белков IRS1, Akt и AS160. В концентрации 50 нг/мл IL-4 полностью восстанавливал процесс активации инсулинового каскада в резистентных к инсулину клетках. Кроме того, IL-4 способствовал повышению уровня экспрессии белка IRS1 в зависимости от продолжительности воздействия. Мы предполагаем, что IL-4 восстанавливает чувствительность остеобластов к действию инсулина путем повышения уровня экспрессии белка IRS1. Также нами было показано, что IL-4 способствует экспрессии остеопротегерина (OPG) в зависимости от продолжительности экспонирования. Этот эффект может играть важную роль в регуляции обмена энергии во всем организме.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ожирение, инсулиновая резистентность, интерлейкин-4, остеобласты.

DOI: 10.31857/S0320972520030094

Популярность системы быстрого питания (фастфуд) и продуктов быстрого приготовления и отсутствие физической нагрузки превратили ожирение в глобальную проблему здравоохранения. Ожирение увеличивает риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, скелетно-мышечных нарушений и некоторых типов рака. В частности, диабет 2-го типа (T2D – type 2 diabetes) тесным образом связан с ожирением [1]. Случаи возникновения T2D составляют ~90–95% всех заболеваний диабетом, и для больных диабетом 2-го типа в основном характерен фенотип инсулиновой резистентности [2].

Принятые сокращения: ALP – щелочная фосфатаза; IL-4 – интерлейкин-4; IR – инсулиновый рецептор; T2D – диабет 2-го типа; IRS1 – субстрат инсулинового рецептора 1; OPG – остеопротегерин; OCN – остеокальцин; PA – пальмитиновая кислота.

* Адресат для корреспонденции.

Эпидемиология воспалительных процессов при T2D, ассоциированных с ожирением, восходит к концу 50-х и 60-м годам прошлого столетия. Еще в 1876 г. Ebstein [3] пришел к заключению, что натриевая соль салициловой кислоты может привести к полной отмене симптомов диабета. Notamisliligil et al. [4] впервые показали, что провоспалительный цитокин TNF- α может индуцировать устойчивость к действию инсулина. Резистентность к инсулину повышает уровень сахара в крови, приводя к возникновению T2D, при котором секреция инсулина не приводит к компенсации инсулиновой резистентности, ассоциированной с ожирением. Несмотря на растущую распространенность диабета во всем мире механизм резистентности к инсулину в патогенезе T2D изучен плохо. Значительно позже выхода работы Notamisliligil et al. другие исследователи, изучающие роль воспалительных про-

цессов в патогенезе инсулиновой резистентности, Hundal et al. [5] и Shoelson et al. [6], пересмотрели гипогликемическую функцию салициловой кислоты и подтвердили, что ее молекулярной мишенью является каскад I κ B-киназа- β (IKK β)/NF- κ B. Было показано, что высокие дозы салициловой кислоты могут повысить чувствительность к действию инсулина у больных с T2D, воздействуя на эту мишень.

Существование взаимных связей между воспалением и резистентностью к инсулину были продемонстрированы во многих клинических и экспериментальных исследованиях. Использование антагонистов рецепторов провоспалительных цитокинов (анакинра, этанерцепт) или неспецифических противовоспалительных лекарств (салициловая кислота) являются двумя наиболее широко применяемыми терапевтическими противовоспалительными стратегиями. Другие способы активации противовоспалительных рецепторов, такие как использование природного противовоспалительного цитокина интерлейкина-4 (IL-4), изучены в меньшей степени [7, 8]. Тем не менее Stafeev et al. [9] обнаружили, что IL-4 восстанавливает чувствительность к действию инсулина резистентных к инсулину адипоцитов через механизмы, которые не связаны с индуцированным адипогенезом или образованием *de novo* липидных отложений.

Инсулин, секретируемый островковыми бета-клетками, в основном действует на белую жировую ткань (WAT – white adipose tissue) и инсулиновые рецепторы (IR – insulin receptors) мышечных клеток и способствует усвоению глюкозы и, действуя в гепатоцитах, увеличивает синтез гликогена в печени. Инсулин играет важную роль в поддержании гомеостаза глюкозы во всем организме [10]. В то время как IR в основном экспрессируется в клетках жировой ткани, миоцитах и гепатоцитах, он также экспрессируется в других клетках, таких как остеобласты и остеокласты. Avnet et al. [11] провели измерения уровня экспрессии IR и других рецепторов в образцах, полученных у больных остеосаркомой. Полученные ими результаты указывали на то, что при остеосаркоме человека изоформа A инсулинового рецептора экспрессируется более интенсивно по сравнению с рецептором инсулиноподобного фактора роста I (IGFIR – Insulin-like growth factor receptor). Свободные жирные кислоты могут вызывать инсулиновую резистентность остеобластов, увеличивая степень убиквитинирования IR, тем самым приводя к возникновению метаболических нарушений. Кроме того, костная ткань может рассматриваться как эндокринный

орган, регулирующий метаболизм глюкозы через секрецию остеокальцина (OCN – osteocalcin) и таким образом оказывающий влияние на системное откладывание жира и уровень сахара крови [10, 12, 13].

Поэтому в настоящей работе мы ставили целью создать остеогенную модель инсулиновой резистентности, изучить восстановление чувствительности остеобластов к действию инсулина с помощью IL-4 и выявить механизмы этого процесса. Нами также было изучено влияние IL-4 на уровень экспрессии белков остеопротегерина (OPG) и OCN в остеобластах с различной степенью дифференцировки с целью разработки новых подходов для изучения влияния IL-4 на системный обмен энергии *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы и антитела. В работе использовали следующие реактивы: IL-4, антитела против beta-актина («Proteintech», США); препарат инсулина, антитела против белка Akt (ab32505), Akt с фосфорилированным остатком Ser473 (ab192623), антитела против белка AS160 с фосфорилированным остатком Ser318 (ab189890), антитела против белка OPG (ab9986) и против белка OCN (ab93876) («Abcam», Великобритания); пальмитиновая кислота (PA – palmitic acid) была приобретена у Xian Kunchuang. Наборы ALP, используемые для определения активности щелочной фосфатазы (ALP), были приобретены в Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute. Процедура иммуноблоттинга проводили с использованием первичных антител против субстрата инсулинового рецептора 1 (IRS1) из CST (#3407); против белка IRS1 с фосфорилированным остатком Tyr612 (GTX24868; «GeneTex, Inc.», США); против белка AS160 (AF2317; Affinity).

Клетки. Клетки линии MG-63 остеосаркомы человека были получены от Банка Клеток Китайской Академии Наук (Шанхай, Китай). Клетки культивировали в культуральной среде DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки («Gibco», США), 1% неэссенциальных аминокислот (NEAA – non-essential amino acid) и 1% пенициллина-стрептомицина при стандартных условиях культивирования (37 °C, 95% увлажненная атмосфера и 5% CO₂). Каждые 3 дня производили смену культуральной среды.

Дифференцировка остеогенных клеток. Клетки линии MG-63 рассевали при плотности ~3000 клеток/см² и выдерживали в инкубаторе

при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 48 ч стандартную среду заменяли на среду, способствующую остеогенезу, которая содержала среду DMEM/F12, 10% фетальной бычьей сыворотки (FCS), 50 мкг/мл 2Р-аскорбиновой кислоты, 10 мМ β-глицерофосфата натрия, 100 нМ дексаметазона, 1% неэссенциальных аминокислот и 1% смеси пенициллина и стрептомицина. Каждые 3 дня производили смену культуральной среды.

Окрашивание ализариновым красным и количественное определение активности ALP. Остеобласты линии MG-63 рассеивали в 6-луночные планшеты при плотности ~3000 клеток/см². Затем клетки обрабатывали реагентом, вызывающим их дифференцировку, и отбирали для проведения анализа через 0, 4, 7 и 14 дней. Для определения минерализации остеобластов использовали окраску ализариновым красным. Активность ALP измеряли с помощью набора для обнаружения флуоресценции в соответствии с протоколом производителя.

Анализ жизнеспособности клеток. Для определения влияния различных концентраций IL-4 на пролиферацию клеток MG-63 использовали метод определения выживаемости клеток. Клетки инкубировали в 96-луночных планшетах в 100 мкл культуральной среды в течение 24 ч при плотности клеток 5 × 10³ клеток/ячейка. Затем клетки обрабатывали различными концентрациями IL-4 (0; 0,1; 1; 10; 50 и 100 нг/мл, при трех повторах для каждого образца). Через 12, 24 и 48 ч определяли выживаемость клеток с использованием набора Cell Counting Kit-8 assay («MedChemExpress», Китай) и рассчитывали значения для различных экспериментальных групп.

Индукцированная липидами модель инсулиновой резистентности. В модели богатого жирами пищевого рациона в качестве классического индуктора инсулиновой резистентности был использован конъюгат пальмитиновой кислоты и бычьего сывороточного альбумина (BSA – bovine serum albumin). В предыдущих работах PA и клетки MG-63 уже использовали для создания модели инсулиновой резистентности [9, 14]. Зрелые остеобласты инкубировали в течение 24 ч в не содержащей фетальную сыворотку среде DMEM/F12 (1% неэссенциальных аминокислот, 1% пенициллин-стрептомицин). Затем добавляли раствор PA до достижения низкого, стандартного и высокого значения ее концентрации (100, 200 и 500 мкМ PA соответственно). Клетки культивировали в течение 48 ч в той же среде и затем добавляли 10 нМ инсулина (ab123768) и инкубировали в течение 20 мин [13].

Обработка IL-4 и инсулином. IL-4 в низкой, стандартной и высокой концентрациях (10, 50 и 100 нг/мл соответственно) добавляли в индуцированную липидом модель инсулиновой резистентности в течение 24 ч. Затем чтобы оценить инсулин-зависимую передачу сигнала, клетки обрабатывали 10 нМ инсулина (ab123768) в течение 20 мин. На основе полученных результатов была определена оптимальная концентрация IL-4 (50 нг/мл). IL-4 в концентрации 50 нг/мл добавляли в среду дифференцировки на 0, 7 и 14 день, чтобы исследовать, восстанавливает ли IL-4 временную зависимость чувствительности к инсулину.

Экстракция белков и вестерн-блоттинг. Клетки четыре раза промывали в ледяном фосфатном буфере (PBS) и лизировали во льду в буфере RIPA (Betotium Institute of Biotechnology, Пекин, Китай), содержащем смесь ингибиторов протеаз («CoWin BioSciences», США) и смесь ингибиторов фосфатаз («CoWin BioSciences», США) в соотношении 98 : 1 : 1. Полученные лизаты клеток центрифугировали в течение 15 мин при 16 000 об./мин, и собранные супернатанты объединяли. Концентрацию белка в белковых экстрактах определяли с использованием наборов для определения белка с BCA (Bicinchoninic acid, «Beyotime», Китай). Белки разделяли с помощью гель-электрофореза в 6–12%-м полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE), и разделенные белки переносили из геля на поливинилиденфлюоридные мембраны (PVDF – polyvinylidene fluoride). Мембраны подвергали фиксации в течение по крайней мере 1 ч в 5%-м обезжиренном молоке в TBS (Tris-buffered saline), содержащем 0,1% (v/v) Tween 20 (TBST). Затем мембраны инкубировали в течение ночи при 4 °C с разведенными препаратами первых антител (1 : (500–3000)) и потом со вторыми антителами при комнатной температуре в течение 1 ч. Наконец зону иммунной реакции измеряли, используя ECL систему детекции («Smart Chemi 420», Китай). Каждый эксперимент повторяли не менее трех раз.

Статистическая обработка полученных результатов. Все полученные данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Статистический анализ был проведен с использованием программы Graphpad prism 7 software (Сан-Диего, Калифорния, США). Различия между экспериментальными и контрольными группами были оценены с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия между экспериментальными группами были рассчитаны с помощью метода двухфакторного дисперсионного анализа вариаций (ANOVA). Значение *p* < 0,05 считали статистически достоверным.

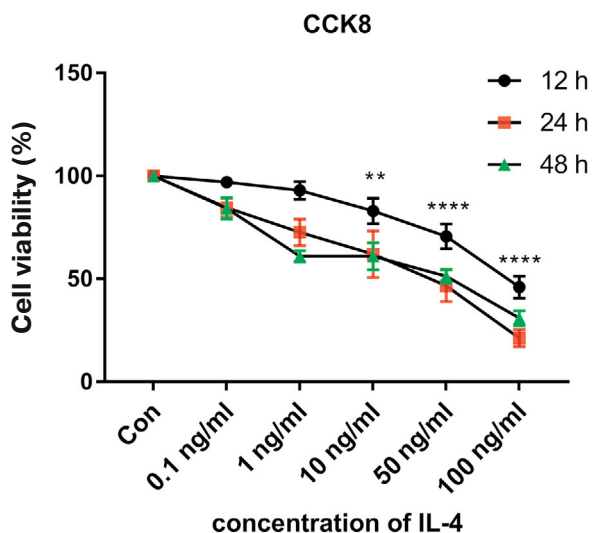


Рис. 1. Выживаемость клеток, определяемая с помощью метода с использованием ССК8 ($n = 3$). Относительное число клеток — это соотношение значений оптической плотности (OD), определенное при анализе экспериментальной и контрольной групп. Клетки MG-63 обрабатывали указанной дозой IL-4 (0; 0,1; 1; 10; 50 и 100 нг/мл) в течение различного времени (12, 24 и 48 ч). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием метода двухфакторного дисперсионного анализа вариаций (ANOVA). (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, 12-часовые группы в сравнении с контрольной группой). С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

IL-4 ингибирует пролиферацию клеток MG-63 в зависимости от дозы и продолжительности действия. Различные концентрации IL-4 оказывали действие на клетки MG-63 на протяжении 12, 24 и 48 ч соответственно и в различной степени ингибировали пролиферацию клеток (рис. 1). Более выраженный ингибирующий эффект наблюдали в случае более высоких концентраций IL-4. Так, 100 нг/мл IL-4 в течение одного дня снижали выживаемость клеток на ~50%, в то время как IL-4 в концентрации 0,1 нг/мл проявлял незначительный ингибирующий эффект. Также было обнаружено, что ингибирование усиливается с увеличением времени действия цитокина. Например, ингибирующий эффект различных концентраций IL-4, определяемый через 24 ч и 48 ч, был значительно сильнее, чем через 12 ч (1 нг/мл $p < 0,01$, $p < 0,0001$; 10 нг/мл $p < 0,01$, $p < 0,01$; 50 нг/мл $p < 0,001$, $p < 0,01$; 100 нг/мл $p < 0,001$, недостоверный результат). При концентрации 1 нг/мл ингибирующий эффект через 48 ч был сильнее, чем через 24 ч, хотя подобное не наблюдали при концентрациях, равных 10, 50 и 100 нг/мл.

Модель индукции остеогенеза была успешно создана. На основании результатов окрашивания красителем ализариновым красным (Alizarin Red S) было выяснено, что через 7 дней

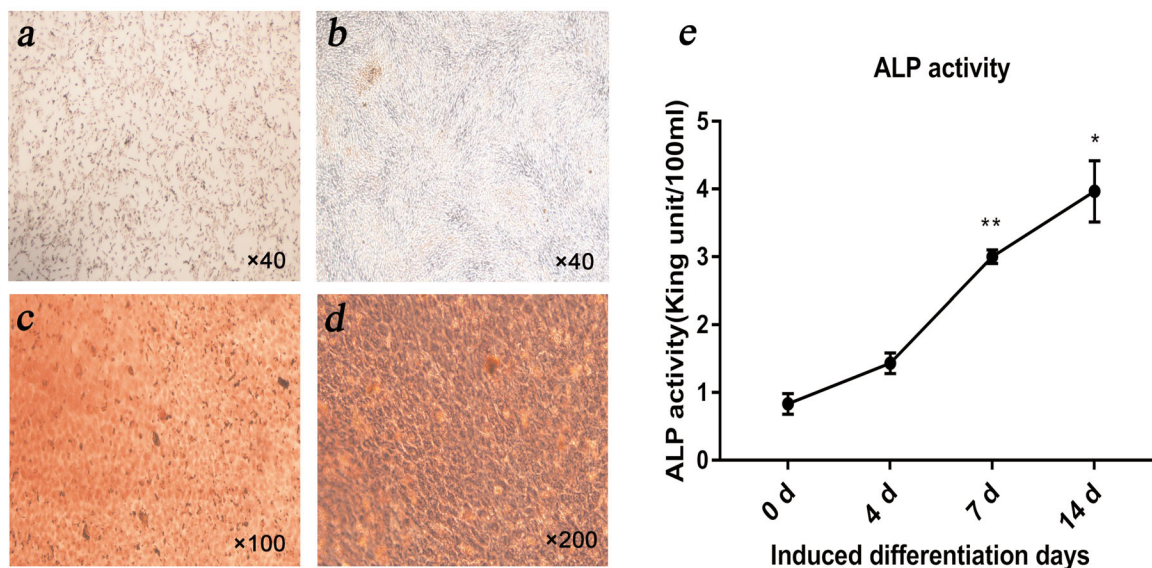


Рис. 2. Окрашивание ализариновым красным и определение активности ALP. *a* — Окрашивание ализариновым красным в самом начале индукции остеогенеза (0 дней). *b* — Окрашивание образцов ализариновым красным через 7 дней после начала остеогенной индукции. *c* и *d* — Окрашивание образцов ализариновым красным через 7 дней после начала индукции, наблюдаемое при световой микроскопии при различном увеличении. *e* — Определение активности ALP в клетках после различной продолжительности индукции. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ в сравнении с контрольной группой). С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

после индукции процесса минерализации клетки MG-63 были частично окрашены в красный цвет и частично темный с небольшим числом минерализованных узелков. Через 14 дней после индукции процесса минерализации наблюдали обширное окрашивание в красный цвет, и локальные пятна были сильно окрашены. При этом плотность минерализованных узелков была значительно выше, чем у образцов, подвергшихся индукции в течение 7 дней (рис. 2, a–d).

Результаты определения активности щелочной фосфатазы продемонстрировали ту же тенденцию, что и результаты окрашивания ализариновым красным. При этом не было выявлено статистически значимого повышения активности ALP на 4-й день. Активность ALP была зна-

чительно повышена на 7-й день после индукции дифференцировки ($p < 0,01$), и это повышение было выражено еще в большей степени на 14-й день процесса дифференцировки ($p < 0,05$) (рис. 2, e). С увеличением продолжительности индукции количество остеобластов, окрашенных ализариновым красным, количество кальциевых узелков и активность ALP также повышались. Таким образом, модель индукции остеогенеза оказалась успешной.

IL-4 полностью восстанавливает процесс активации инсулинового каскада в клетках резистентных к инсулин. Инсулиновая резистентность характеризуется инсулин-стимулируемым фосфорилированием остатка серина в IRS1 и нарушением инсулин-зависимой пере-

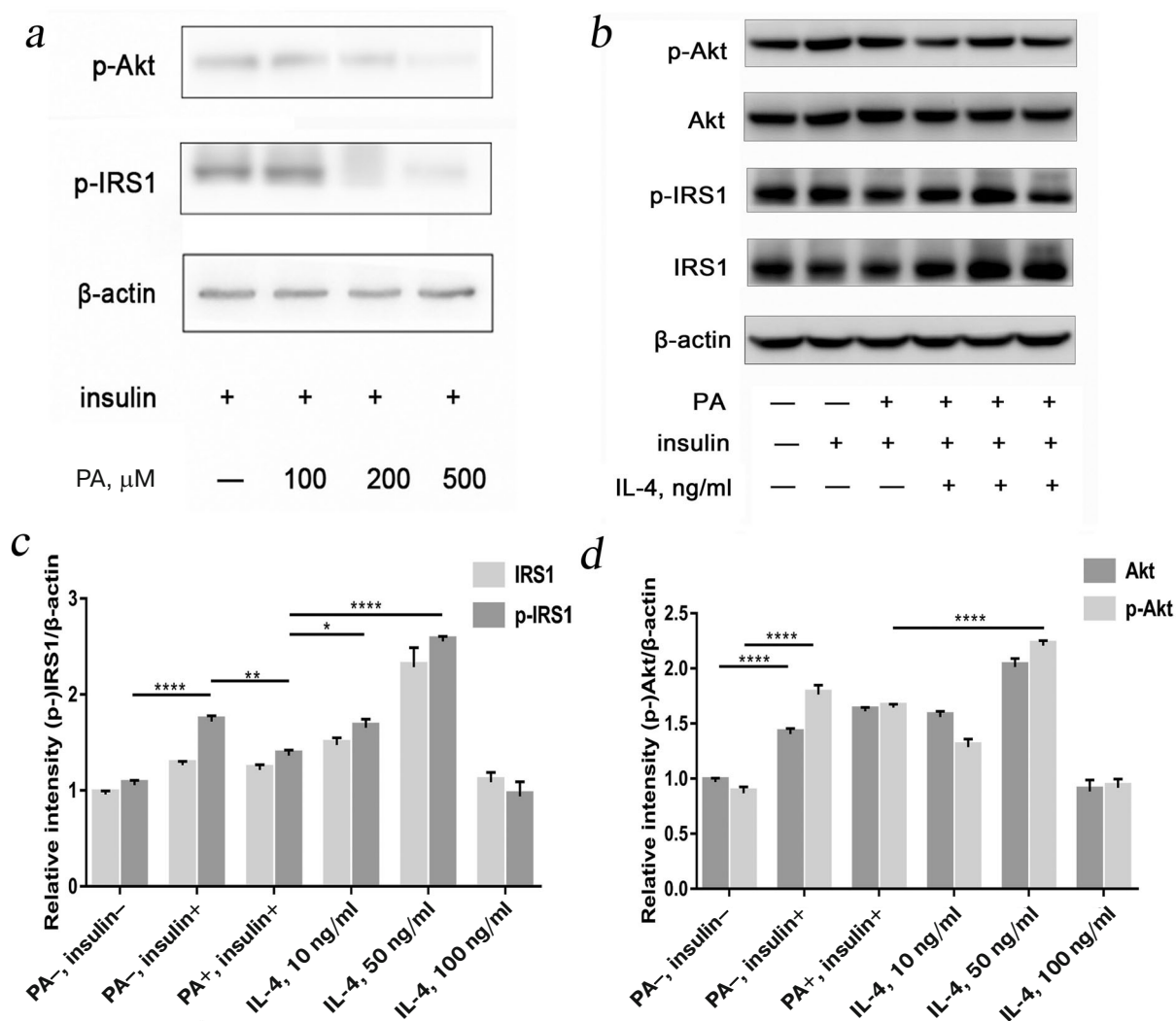


Рис. 3. Обработка ПА снижала уровень инсулин-зависимой передачи сигнала. IL-4 полностью восстанавливал процесс активации инсулинового каскада в инсулинорезистентных клетках. a – Экспрессию белков инсулин-зависимого сигнального пути оценивали с помощью метода вестерн-блоттинга. Добавление 200 мкМ и 500 мкМ пальмитиновой кислоты эффективно нарушали активность инсулин-зависимого сигнального пути ($n = 3$). b–d – С помощью метода вестерн-блоттинга показана экспрессия IRS1, p-IRS1(Тyr612), Akt и p-Akt (Ser473) в различных группах. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

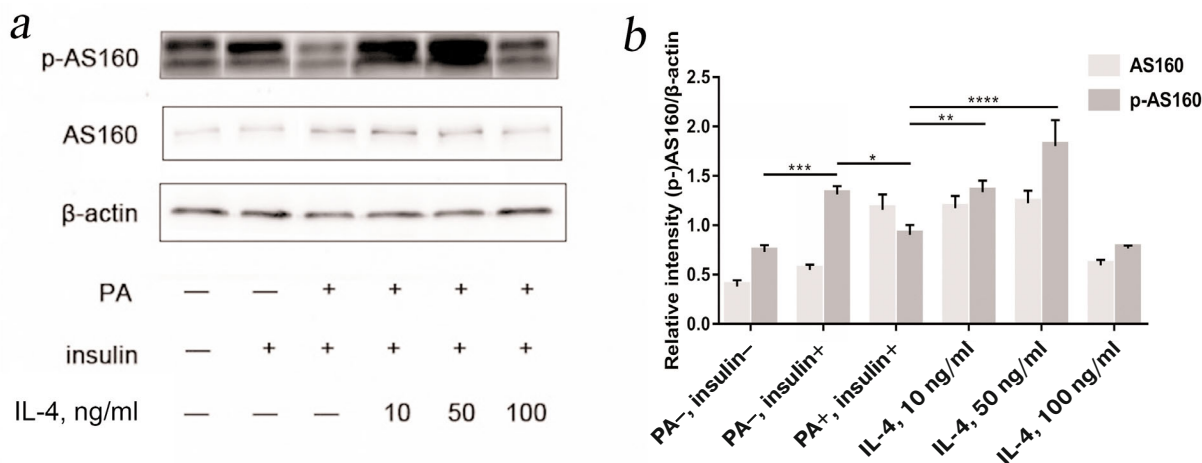


Рис. 4. *a* и *b* – Клетки были обработаны 200 мкМ РА, 10 нМ инсулина и различными концентрациями IL-4 в соответствии с группами, описанными выше. Для определения уровня экспрессии AS160 и p-AS160(Ser318) использовали метод вестерн-блоттинга. В качестве контроля использовали β-актин. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

дачи сигнала. Стимуляция свободными жирными кислотами может привести к возникновению инсулиновой резистентности. Так, добавляли РА в различных концентрациях (0, 100, 200 и 500 мкМ) в течение двух дней после 14 дней индукции остеогенеза и дифференцировки. Было показано, что 200 мкМ и 500 мкМ РА могут эффективно нарушить активность инсулин-зависимого сигнального пути ($p < 0,01$, $p < 0,01$) (рис. 3, *a*). В результате для создания модели инсулиновой резистентности была выбрана концентрация 200 мкМ РА, которую далее использовали.

Сначала нами было изучено влияние IL-4 на субстрат инсулинового рецептора в РА-индуцированной модели инсулиновой резистентности. Для обнаружения сайтов фосфорилирования IRS1 и фосфорилирования остатка тирозина Tyr612 был использован метод иммуноокрашивания. На рис. 3, *b* показано, что в необработанных клетках, инсулин повышал уровни фосфорилирования как IRS1, так и остатка тирозина Tyr612 ($p < 0,05$, $p < 0,0001$). Обработка пальмитиновой кислотой снижала уровень фосфорилирования IRS1 Tyr612 ($p < 0,01$). Добавление 10 нг/мл IL-4 приводило к восстановлению уровня фосфорилирования IRS1 Tyr612 ($p < 0,05$), а добавление 50 нг/мл IL-4 вызывало значительное усиление фосфорилирования Tyr612 в инсулин-индуцированном IRS1 ($p < 0,0001$) (рис. 3, *c*). Однако повышение концентрации IL-4 до 100 нг/мл приводило к ослаблению стимуляции инсулин-индуцированного фосфорилирования остатка Tyr612, приводя к противоположному эффекту.

Далее нами было изучено влияние IL-4 на фосфорилирование Akt и его остатка Ser473. Инсулин-стимулируемое фосфорилирование

остатка Ser473 является одним из условий для активации инсулин-зависимого сигнального пути. Нами было показано, что инсулин усиливает фосфорилирование Akt и Akt Ser473 ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$). Напротив, не было выявлено статистически достоверного влияния РА на уровни экспрессии Akt и его фосфорилированной формы. IL-4 (10 и 100 нг/мл) ингибировал в различной степени фосфорилирование Akt Ser473 ($p < 0,01$, $p < 0,001$), в то время как 50 нг/мл IL-4 достоверно повышал уровень фосфорилирования Akt Ser473 ($p < 0,0001$) (рис. 3, *d*). В целом картина влияния различных концентраций IL-4 на Akt была сходна с его влиянием на Akt Ser473, и степень фосфорилирования оставалась без изменений.

Фосфорилирование белком Akt белка AS160 приводит к активации процесса транслокации транспортера глюкозы 4-го типа (GLUT4) к клеточной мембране, способствуя транспорту глюкозы в клетки, и этот процесс является ключевым фактором активации инсулин-зависимого сигнального пути. Как показано на рис. 3, *b*, в необработанных клетках инсулин повышал уровень фосфорилированного остатка Ser318 в AS160 ($p < 0,001$), в то время как обработка конъюгатом РА-BSA приводила к снижению уровня фосфорилированного остатка Ser318 в AS160 ($p < 0,05$). Как показано на рис. 4, уровень фосфорилирования AS160 Ser318 восстанавливался при добавлении 10 или 50 нг/мл IL-4, и при этом наблюдали статистически достоверные различия ($p < 0,01$, $p < 0,0001$). Однако при добавлении 100 нг/мл IL-4 его влияние на уровень фосфорилирования AS160 не было статистически достоверным.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что РА обладает выраженным индуцирующим влиянием на экспрессию инсулиновой резистентности в остеобластах, и что активация воспалительного ответа представляет собой важный механизм противодействия липидной перегрузке, который приводит к возникновению инсулиновой резистентности. Различные концентрации IL-4 оказывали различное влияние на уровень фосфорилирования IRS1 Tyr612, Akt Ser473 и AS160 Ser318. При сравнении различных концентраций цитокина, его концентрация (50 нг/мл) проявляла наиболее сильный эффект в плане восстановления активности классического инсулин-зависимого сигнального пути, в то же время 100 нг/мл IL-4 приводили к противоположному эффекту.

IL-4 усиливает экспрессию IRS1 с зависящим от времени эффектом. Белки-субстраты инсулинового рецептора (IRS) являются важными компонентами инсулин-зависимой передачи сигнала.

Все эти белки представляют собой скаффолды, задействованные в дальнейшей передаче сигнала путем сборки и кластеризации специфических сигнальных комплексов через доменные взаимодействия Src-гомологии (SH2) [15]. Существует шесть изоформ белка IRS, из которых IRS1 является наиболее распространенным, он широко экспрессируется. Чтобы изучить влияние IL-4 на экспрессию IRS1 в клетках MG-63, была осуществлена остеогенная дифференцировка в присутствии 50 нг/мл IL-4 или в его отсутствии. На 0-й, 7-й и 14-й дни из клеток экстрагировали белки и определяли уровень экспрессии IRS с помощью метода иммуноблоттинга (рис. 5, *a*).

На рис. 5, *b* показано, что уровень экспрессии IRS1 был повышен как в присутствии IL-4, так и без него, при этом наблюдали статистически достоверные различия. IL-4 повышал экспрессию IRS1 на различных стадиях процесса дифференцировки клеток. Добавление IL-4

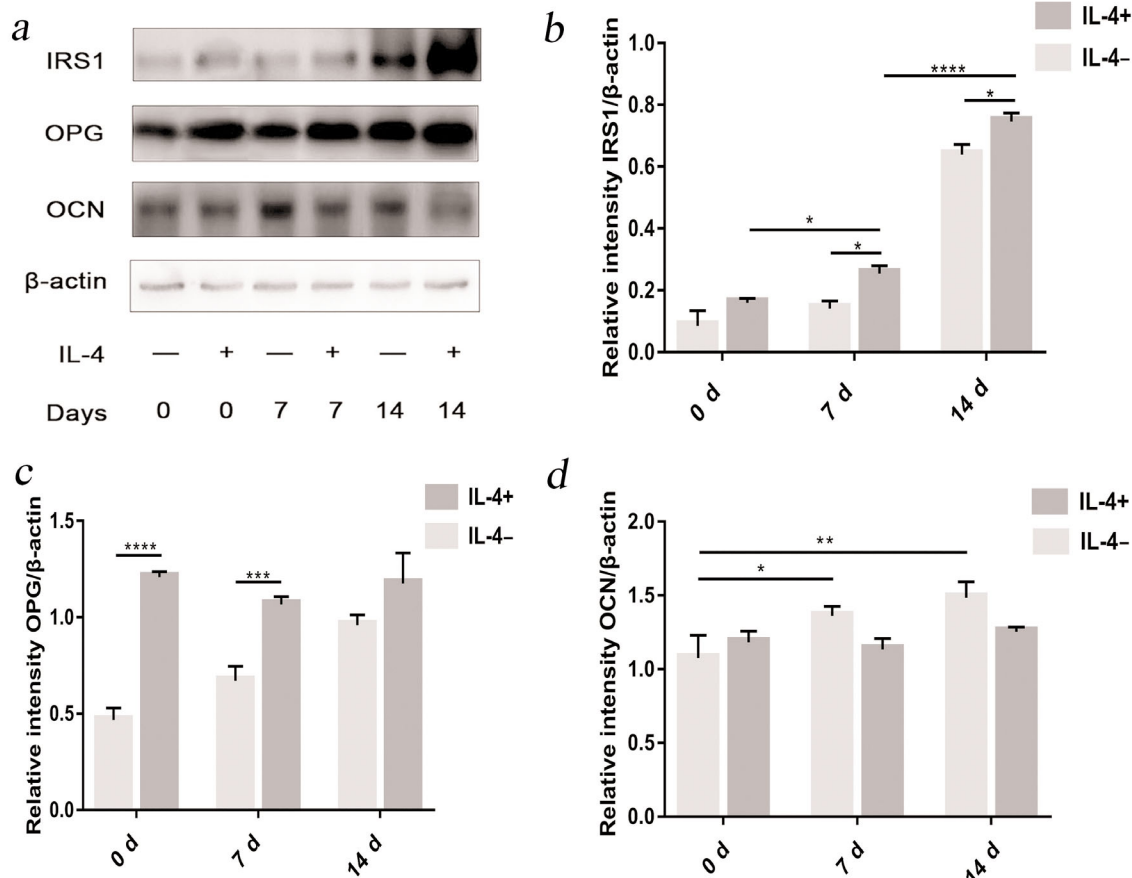


Рис. 5. Влияние 50 нг/мл IL-4 на уровни экспрессии IRS1, OPG и OCN в остеобластах после различной продолжительности остеогенной индукции (0, 7 и 14 дней). *a* – Для определения уровня экспрессии белков IRS1, OPG и OCN использовали метод вестерн-блоттинга ($n = 3$). *b* – Экспрессию белка IRS1 анализировали с помощью метода вестерн-блоттинга ($n = 3$). *c* – Уровень экспрессии белка OPG определяли с помощью метода вестерн-блоттинга ($n = 3$). *d* – Уровень экспрессии белка OCN определяли с помощью метода вестерн-блоттинга ($n = 3$). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

на 7-й и 14-й дни индукции значительно усиливало экспрессию IRS1 ($p < 0,05$). В то же время не было выявлено статистических различий с образцами, взятыми сразу в начале эксперимента (0-й день). Кроме того, было обнаружено, что экспрессия IRS1 повышалась по мере усиления дифференцировки. Было высказано предположение, что эффект IL-4 имеет отношение к стадии дифференцировки клеток и что восстановление чувствительности к инсулину резистентных к нему остеобластов под влиянием IL-4 обусловлено повышением экспрессии IRS1 (по крайней мере, при концентрации IL-4 50 нг/мл).

IL-4 влияет на зависящее от времени увеличение экспрессии OPG и не действует на экспрессию OCN. Остеопротегерин, индуцируемый инсулин-зависимым сигнальным путем, может способствовать дифференцировке остеокластов и затем реабсорбироваться в зазор между костями и снижать значение pH. Это приводит к декарбонизации остеокальцина, что способствует секреции инсулина поджелудочной железой, а также приносит пользу печени, мышцам и другим органам и влияет на системный метаболизм глюкозы [13]. Белки OPG и OCN играют основную роль в общем метаболизме глюкозы. Поэтому нами сначала было изучено влияние IL-4 на экспрессию белков OPG и OCN в остеобластах. Результаты этого исследования также позволили сделать предположение, что IL-4 регулирует системный метаболизм глюкозы, оказывая влияние на костную ткань, что открывает новое направление для будущих исследований.

На рис. 5, с показано, что экспрессия белка OPG в группе с IL-4 повышается со временем по мере усиления дифференцировки клеток с наблюдаемыми статистически достоверными различиями между группами от 0 до 14 дней дифференцировки клеток ($p < 0,0001$). Хотя добавление IL-4 приводило к повышению уровня экспрессии OPG, этот эффект не зависел от времени. Было показано, что в 0-й и 7-й день индукции в группе с добавленным IL-4 уровень экспрессии был значительно повышен по сравнению с соответствующей IL-4-группой ($p < 0,0001$, $p < 0,001$). Уровень экспрессии белка OPG повышался на 14-й день, однако этот эффект не был статистически значимым.

Экспрессия белка OCN повышалась в группе с IL-4 по мере увеличения количества дней индукции (7 дней – $p < 0,05$, 14 дней – $p < 0,01$, в сравнении с днем 0 соответственно). Полученные результаты показывают, что добавление IL-4, по-видимому, оказывает слабый ингибирующий эффект в отношении OCN, и этот эффект не является статистически значимым и нет корреля-

ции со временем воздействия. Таким образом, экспрессия белков OPG и OCN повышается по мере увеличения степени дифференцировки клеток. IL-4 может повышать уровень экспрессии OPG в остеобластах и не оказывает значимого влияния на экспрессию белка OCN.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Инсулин в основном действует на жировые клетки, клетки скелетных мышц и клетки печени. Были проведены исследования, посвященные изучению механизмов, с помощью которых воспалительные процессы, вызванные ожирением, влияют на инсулиновый путь в адипоцитах, а именно на накопление триглицеридов, цитопатический эффект, окислительный стресс, нарушения микроциркуляции, вызванные гипоксией, и снижение уровня снабжения клеток кислородом, приводящее к фосфорилированию или нарушению функционирования белков IRS. Действительно, стресс-активируемые киназы (ERK, JNK, AMPK), киназа IKK и ниже лежащие киназы Akt, aPKC и mTOR вносят вклад в фосфорилирование серина/треонина IRS. Ингибирование при фосфорилировании остатков серина может быть достигнуто различными способами, такими как отделение IRS от IR, превращение IRS в ингибитор активности тирозинкиназы, увеличение уровня деградации IRS и содействие отделению адапторного белка [16–19]. Wei et al. [13] на основе использования обогащенной жирами пищи создали модель инсулиновой резистентности у крыс и обнаружили, что в результате употребления такой пищи в клетках костной ткани также может возникнуть инсулиновая резистентность. Было предположено, что насыщенные жирные кислоты повышают уровень экспрессии Smurf1 и усиливают smurf1-опосредованное убиквитинилирование инсулинового рецептора, внося вклад в развитие инсулиновой резистентности остеобластов. К настоящему моменту большинство работ было сосредоточено на изучении ингибиторов противовоспалительных цитокинов и на противовоспалительных лекарствах, таких как салицилаты. В то же время только ограниченное число работ было посвящено изучению противовоспалительных лекарств, как возможных мишеней для терапевтического вмешательства. В частности, Stafeev et al. показали, что IL-4 восстанавливает чувствительность к действию инсулина в резистентных к нему индуцированных липидами адипоцитах [9]. IL-4 является противовоспалительным фактором, который непосредственно активирует факторы транскрипции

STAT6, и было предположено, что IL-4 может замедлять процессы воспаления и восстанавливать чувствительность к инсулину в инсулинорезистентных остеобластах.

Снижение активности остеобластов и нарушение дифференцировки может привести к нарушению процесса формирования костей. Это может регулироваться различными цитокинами и факторами роста, присутствующими в костной ткани. Интерлейкин-4 регулирует активность различных лимфоцитов, гематопоетических и мезенхимных клеток, однако его влияние на клетки костной ткани было недостаточно изучено. Ura et al. [20] показали, что IL-4 и IL-13 дозозависимо индуцируют клеточную пролиферацию. Однако в других работах было показано, что IL-4 ингибирует пролиферацию остеобластоподобных клеток MG-63 человека [21]. Riancho et al. [22] сообщили, что mIL-4 не оказывает заметного влияния на пролиферацию клеток MC3T3-E1. В наших экспериментах было показано, что IL-4 ингибирует активность клеток MG-63, и также была подтверждена зависимость этого эффекта от дозы и продолжительности воздействия. Расхождения между результатами, полученными Riancho et al., и нашими могут быть объяснены различиями в методологических подходах. Также следует учесть, что были использованы различные клеточные линии. Полученные нами результаты способствуют более глубокому пониманию возможной роли интерлейкина-4, как регулятора пролиферации остеобластов, но для полного понимания этой проблемы необходимы более глубокие исследования. Frost et al. [23] и Silfversward et al. [24] показали, что IL-4 способствует секреции щелочной фосфатазы, образованию коллагена и минерализации остеобластов человека, поддерживая клетки в дифференцированной продуктивной фазе. Мы обнаружили, что 50 нг/мл IL-4 эффективно усиливает экспрессию OPG в остеобластах в зависимости от времени (0 дней — $p < 0,0001$, 7 дней — $p < 0,001$), но не оказывает существенного влияния на ОКН.

Инсулин-зависимая передача сигнала осуществляется высокоинтегрированной сетью, контролирующей несколько процессов. В присутствии инсулина инсулиновый рецептор фосфорилирует IRS, которые связаны с активацией фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3K)—АКТ/протеинкиназа В (PKB)-зависимого сигнального пути, ответственного за большинство метаболических действий инсулина (рис. 6). В сигнальных сетях есть несколько ключевых узлов, которые играют важную роль в нормальных физиологических условиях и при патологиях, таких как диабет, ожирение и метаболический синд-

ром [25]. В наших экспериментах было показано, что IL-4 восстанавливает и даже существенно активирует инсулин-зависимую передачу сигнала в инсулинорезистентных клетках MG-63. Фосфорилирование ключевых компонентов инсулин-зависимого сигнального пути (IRS1, Akt и AS160) в клетках, находящихся в инсулинорезистентном состоянии, максимально активировалось при добавлении 50 нг/мл IL-4. В некоторых работах было показано, что IL-4 может стимулировать IRS2/PI3K-зависимый сигнальный путь в CD4⁺ и CD8⁺ клетках через IL-4R-зависимый сигнальный путь [26]. Добавление IL-4 к остеобластам активирует комплекс IRS1 через IL-4R, тем самым активируя PI3K/Akt-зависимый сигнальный путь. Мы также обнаружили, что положительное влияние IL-4 на чувствительность клеток к инсулину может быть связано со специфическим механизмом развития инсулиновой резистентности в результате действия липидов. Инсулин связывается с IR и инициирует сигнальный каскад путем активации рецепторных тирозиновых киназ, и это приводит к активации транспорта глюкозы и другим метаболическим эффектам. В целом, эти результаты указывают на то, что IRS1 является непосредственным физиологическим субстратом инсулинового рецептора и может играть роль в инсулин-зависимой передаче сигнала [27–29]. Нами также было показано, что экспрессия IRS1 в значительной степени возрастает по мере остеогенной дифференцировки, и добавление IL-4 на 7-й и 14-й день вызывает повышение IRS1 ($p < 0,05$). Было высказано предположение, что повышение экспрессии IRS под воздействием IL-4 может быть одной из причин восстановления чувствительности остеобластов к действию инсулина с помощью IL-4.

В работах, выполненных Wei et al. [13], было показано, что инсулиновая резистентность в костной ткани приводит к снижению уровня цикла остеокальцина, гормона из костной ткани, разрушая остеокальцин-зависимый сигнальный путь и приводя к непереносимости глюкозы. OCN необходим для повышения чувствительности мышц и клеток белой жировой ткани к инсулину [30, 31]. Глюкоза может регулировать экспрессию гена остеокальцина через процесс транскрипции на уровне транскрипции. Совсем недавно было показано, что инсулиновая резистентность и высокий уровень глюкозы понижают экспрессию OCN *in vitro*, и что инсулинорезистентные остеобласты могут вызвать снижение уровня OCN, образуемого в костной ткани, и привести к возникновению системных нарушений [14]. Специфичный для костной ткани гормон OCN может влиять на

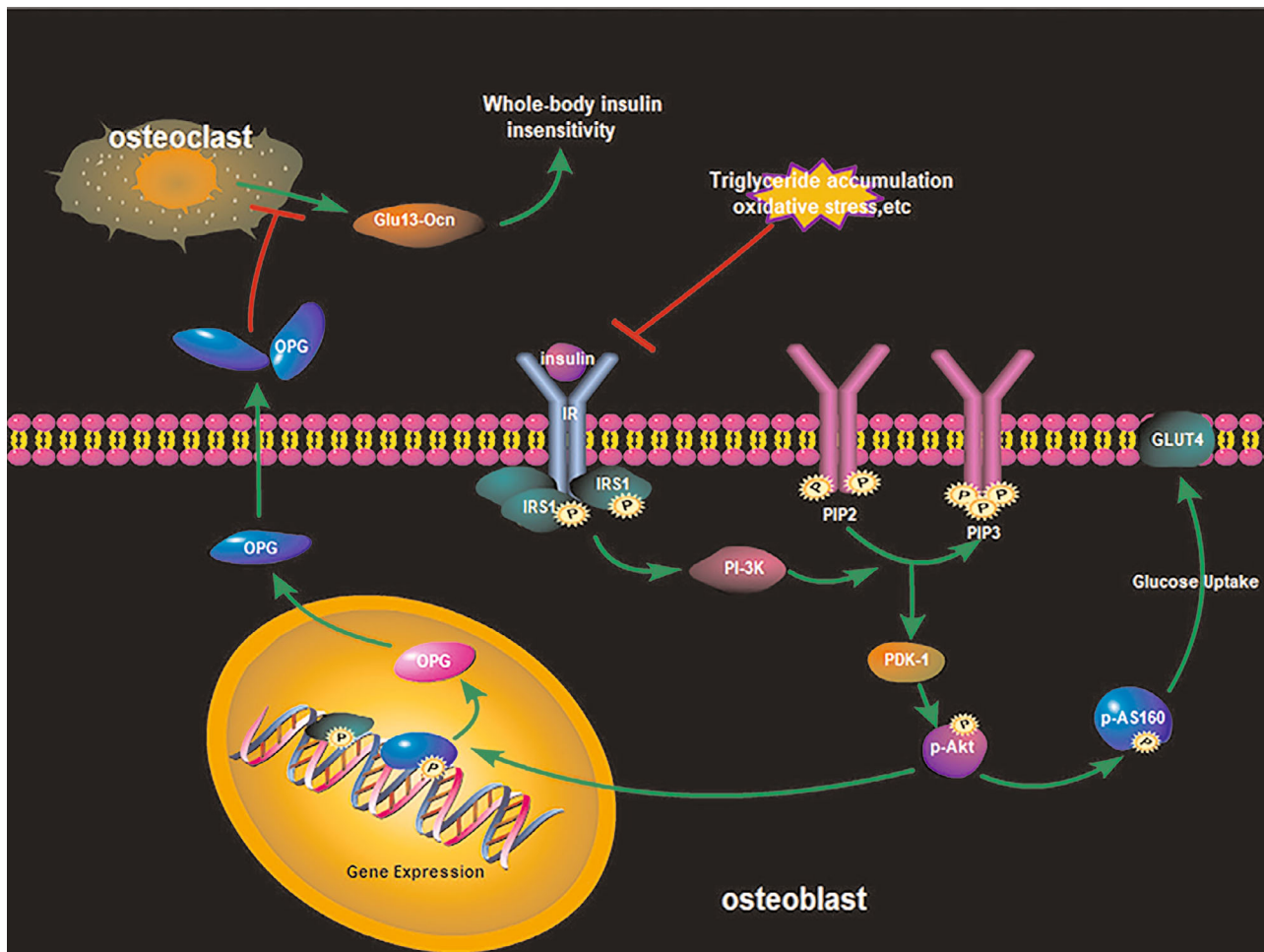


Рис. 6. Инсулин-зависимый сигнальный путь и общий обмен глюкозы в остеобластах и остеокластах.

С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

секрецию инсулина, чувствительность клеток к инсулину, и он крайне необходим для общего обмена энергии. Наши эксперименты показали, что экспрессия OCN повышается по мере увеличения продолжительности индукции. Добавление IL-4, по-видимому, вызывало небольшое ингибирующее действие на экспрессию OCN, но этот эффект был незначителен, статистически не значим и при этом не было выявлено корреляции с продолжительностью индукции. IL-4 не оказывал заметного влияния на уровень экспрессии OCN. Карбоксилированный OCN (GLA) является неактивной формой OCN, и активация белка происходит в результате его декарбоксилирования (рис. 5). Ferron et al. [10] обнаружили, что нарушение инсулин-зависимой передачи сигнала стимулирует экспрессию OPG, снижает адсорбцию остеокластов, повышает уровень карбоксилирования OCN и ингибирует активность инсулин-чувствительных

клеток. Действительно, низкие значения pH, достигаемые при резорбции кости, являются важным условием для декарбоксилированного остеокальцина. OPG играет важную роль в трансформации OCN при активации и инактивации [10, 12]. Нами было обнаружено, что экспрессия OPG увеличивалась со временем по мере повышения степени дифференцировки клеток. Добавление IL-4 вызывало повышение уровня экспрессии OPG, но в этом случае не было выявлено временной зависимости. Однако в этой работе были изучены эффекты IL-4 на OPG остеобластов только при нормальных условиях, и полученные нами результаты не указывают на процесс активации OCN в результате декарбоксилирования в условиях *in vivo*. Влияние IL-4 на экспрессию OPG остеобластов и в целом на системный метаболизм глюкозы в моделях инсулинорезистентности и на животных еще предстоит исследовать в дальнейших работах.

В заключение отметим, что это исследование продемонстрировало, что IL-4 ингибирует пролиферацию клеток MG-63 в зависимости от времени и концентрации. Также было показано, что IL-4 восстанавливает и даже значительно усиливает активность инсулин-зависимого сигнального пути в остеобластах, находящихся в инсулинорезистентном состоянии. Восстановление чувствительности остеобластов к действию инсулина с помощью IL-4 может быть связано с повышением уровня экспрессии IRS1. Кроме того, было показано, что уровни белков OPG и OCN повышаются по мере возрастания степени дифференцировки клеток, и 50 нг/мл IL-4 способствуют секреции OPG в остеобластах без оказания какого-либо влияния на уровень OCN. Из-за тесной взаимосвязи между метаболизмом костной ткани и глюкозы исследование положительного влияния IL-4 на чувствительность к инсулину в остеобластах полезно для снижения риска остеопороза у пациентов с

диабетом и для повышения системной резистентности к инсулину через факторы, связанные с костью.

Финансирование. Li M. получил частичную поддержку от Государственного фонда естественных наук Китая (National Nature Science Foundation of China, грант № 81470719 и № 81611140133) и проекта Shuang Key Research and development Project (Grant No. 2018GSF118114). Guo J. получил поддержку от Государственного фонда естественных наук Китая (National Nature Science Foundation of China, грант № 81771108).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bluher, M. (2016) Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? *Clin. Sci. (Lond.)*, **130**, 1603–1614, doi: 10.1042/cs20160005.
2. Karalliedde, J., and Gnudi, L. (2016) Diabetes mellitus, a complex and heterogeneous disease, and the role of insulin resistance as a determinant of diabetic kidney disease, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **31**, 206–213, doi: 10.1093/ndt/gfu405.
3. Ebbstein, W. (2002) Invited comment on W. Ebbstein: On the therapy of diabetes mellitus, in particular on the application of sodium salicylate, *J. Mol. Med. (Berl.)*, **80**, 618.
4. Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance, *Science*, **259**, 87–91, doi: 10.1126/science.7678183.
5. Hundal, R.S., Petersen, K.F., Mayerson, A.B., Randhawa, P.S., Inzucchi, S., Shoelson, S.E., and Shulman, G.I. (2002) Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes, *J. Clin. Invest.*, **109**, 1321–1326, doi: 10.1172/jci14955.
6. Shoelson, S.E., Lee, J., and Goldfine, A.B. (2006) Inflammation and insulin resistance, *J. Clin. Invest.*, **116**, 1793–1801, doi: 10.1172/jci29069.
7. Ricardo-Gonzalez, R.R., Red Eagle, A., Odegaard, J.I., Jouihan, H., Morel, C.R., Heredia, J.E., Mukundan, L., Wu, D., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2010) IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 22617–22622, doi: 10.1073/pnas.1009152108.
8. 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. (Lond.)*, **39**, 1292–1299, doi: 10.1038/ijo.2015.52.
9. Stafeev, I.S., Michurina, S.S., Podkuychenko, N.V., Vorotnikov, A.V., Menshikov, M.Y., and Parfyonova, Y.V. (2018) Interleukin-4 restores insulin sensitivity in lipid induced insulinresistant adipocytes, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 498–506, doi: 10.1134/s0006297918050036.
10. Ferron, M., Wei, J., Yoshizawa, T., Del Fattore, A., DePinho, R.A., Teti, A., Ducy, P., and Karsenty, G. (2010) Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism, *Cell*, **142**, 296–308, doi: 10.1016/j.cell.2010.06.003.
11. Avnet, S., Sciacca, L., Salerno, M., Gancitano, G., Cassarino, M.F., Longhi, A., Zakikhani, M., Carboni, J.M., Gottardis, M., Giunti, A., Pollak, M., Vigneri, R., and Baldini, N. (2009) Insulin receptor isoform A and insulin-like growth factor II as additional treatment targets in human osteosarcoma, *Cancer Res.*, **69**, 2443–2452, doi: 10.1158/0008-5472.can-08-2645.
12. Clemens, T.L., and Karsenty, G. (2011) The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis, *J. Bone Miner. Res.*, **26**, 677–680, doi: 10.1002/jbmr.321.
13. Wei, J., Ferron, M., Clarke, C.J., Hannun, Y.A., Jiang, H., Blaner, W.S., and Karsenty, G. (2014) Bone-specific insulin resistance disrupts whole-body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation, *J. Clin. Invest.*, **124**, 1–13, doi: 10.1172/jci72323.
14. Bilotta, F.L., Arcidiacono, B., Messineo, S., Greco, M., Chiefari, E., Britti, D., Nakanishi, T., Foti, D.P., and Brunetti, A. (2018) Insulin and osteocalcin: further evidence for a mutual cross-talk, *Endocrine*, **59**, 622–632, doi: 10.1007/s12020-017-1396-0.
15. Shaw, L.M. (2011) The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer, *Cell Cycle*, **10**, 1750–1756, doi: 10.4161/cc.10.11.15824.
16. Stafeev, I.S., Vorotnikov, A.V., Ratner, E.I., Menshikov, M.Y., and Parfyonova, Y.V. (2017) Latent inflammation and insulin resistance in adipose tissue, *Int. J. Endocrinol.*, **2017**, 5076732, doi: 10.1155/2017/5076732.
17. Boura-Halfon, S., and Zick, Y. (2009) Serine kinases of insulin receptor substrate proteins, *Vitam. Horm.*, **80**, 313–349, doi: 10.1016/s0083-6729(08)00612-2.
18. Boura-Halfon, S., and Zick, Y. (2009) Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **296**, E581–E591, doi: 10.1152/ajpendo.90437.2008.
19. Zick, Y. (2004) Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance, *Biochem. Soc. Trans.*, **32**, 812–816, doi: 10.1042/bst0320812.

20. Ura, K., Morimoto, I., Watanabe, K., Saito, K., Yanagihara, N., and Eto, S. (2000) Interleukin (IL)-4 and IL-13 inhibit the differentiation of murine osteoblastic MC3T3-E1 cells, *Endocr. J.*, **47**, 293–302, doi: 10.1507/endocrj.47.293.
21. Riancho, J.A., Zarrabeitia, M.T., Olmos, J.M., Amado, J.A., and Gonzalez-Macias, J. (1993) Effects of interleukin-4 on human osteoblast-like cells, *Bone Miner.*, **21**, 53–61, doi: 10.1016/s0169-6009(08)80120-1.
22. Riancho, J.A., González-Marcías, J., Amado, J.M., Olmos, J.M., and Fernández-Luna, J.L. (1995) Interleukin-4 as a bone regulatory factor: effects on murine osteoblast-like cells, *J. Endocrinol. Invest.*, **18**, 174–179.
23. Frost, A., Jonsson, K.B., Brandstrom, H., Ljunghall, S., Nilsson, O., and Ljunggren, O. (2001) Interleukin (IL)-13 and IL-4 inhibit proliferation and stimulate IL-6 formation in human osteoblasts: evidence for involvement of receptor subunits IL-13R, IL-13Ralpha, and IL-4Ralpha, *Bone*, **28**, 268–274.
24. Silfversward, C.J., Penno, H., Frost, A., Nilsson, O., and Ljunggren, O. (2010) Expression of markers of activity in cultured human osteoblasts: effects of interleukin-4 and interleukin-13, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **70**, 338–342, doi: 10.3109/00365513.2010.488698.
25. Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 85–96, doi: 10.1038/nrm1837.
26. O'Connor, J.C., Sherry, C.L., Guest, C.B., and Freund, G.G. (2007) Type 2 diabetes impairs insulin receptor substrate-2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase activity in primary macrophages to induce a state of cytokine resistance to IL-4 in association with overexpression of suppressor of cytokine signaling-3, *J. Immunol.*, **178**, 6886–6893, doi: 10.4049/jimmunol.178.11.6886.
27. Myers, M.G., Jr., and White, M.F. (1996) Insulin signal transduction and the IRS proteins, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **36**, 615–658, doi: 10.1146/annurev.pa.36.040196.003151.
28. Paz, K., Voliovitch, H., Hadari, Y.R., Roberts, C.T., Jr., LeRoith, D., and Zick, Y. (1996) Interaction between the insulin receptor and its downstream effectors. Use of individually expressed receptor domains for structure/function analysis, *J. Biol. Chem.*, **271**, 6998–7003, doi: 10.1074/jbc.271.12.6998.
29. Sun, X.J., Miralpeix, M., Myers, M.G., Jr., Glasheen, E.M., Backer, J.M., Kahn, C.R., and White, M.F. (1992) Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission, *J. Biol. Chem.*, **267**, 22662–22672.
30. Ferron, M., Hinoi, E., Karsenty, G., and Ducy, P. (2008) Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 5266–5270, doi: 10.1073/pnas.0711119105.
31. Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., Zhang, Z., Kim, J.K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., and Karsenty, G. (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton, *Cell*, **130**, 456–469, doi: 10.1016/j.cell.2007.05.047.

INTERLEUKIN-4 RESTORES INSULIN SENSITIVITY IN INSULIN-RESISTANT OSTEOBLASTS BY INCREASING THE EXPRESSION OF INSULIN RECEPTOR SUBSTRATE 1

R. Chao¹, D. Li¹, Z. Yue¹, C. Huang¹, Y. Kou¹, Q. Zhou¹,
Y. Gao¹, T. Hasegawa², J. Guo¹, and M. Li^{1*}

¹ Department of Bone Metabolism, School and Hospital of Stomatology, Shandong University; Shandong Key Laboratory of Oral Tissue Regeneration; Shandong Engineering Laboratory for Dental Materials and Oral Tissue Regeneration, Jinan, 250012 China; E-mail: liminqi@sdu.edu.cn

² Department of Developmental Biology of Hard Tissue, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Sapporo, 060-8586 Japan

Received October 14, 2019
Revised November 30, 2019
Accepted December 31, 2019

Obesity and latent inflammation can give rise to insulin resistance and type 2 diabetes. Here we established an insulin resistance model of osteoblasts to explore the restoration effect of anti-inflammatory interleukin-4 (IL-4) on insulin sensitivity and its mechanism. We found that IL-4 inhibited cell proliferation in a concentration- and time-dependent manner. Insulin resistance significantly reduced the phosphorylation levels of the insulin receptor substrate 1 (IRS1; Tyr612), Akt (Ser473), and AS160 (Ser318) proteins. The addition of IL-4 to the insulin resistance model led to a dose-dependent stimulation of the phosphorylation of IRS1, Akt, and AS160. IL-4 fully restored the activation of the insulin cascade in insulin-resistant cells at the concentration of 50 ng/ml. Additionally, IL-4 promoted the expression of IRS1 in a time-dependent manner. We conjecture that IL-4 restores insulin sensitivity in osteoblasts by upregulating the expression of IRS1. It was also found that IL-4 promoted the expression of osteoprotegerin depending on the time of exposure. This effect may play an important role in the regulation of the energy metabolism in the whole body.

Keywords: obesity, insulin resistance, interleukin-4, osteoblast