

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.08.018

论著·实验研究

左旋精氨酸对低出生体重仔鼠 PI3K 和 PKB 的影响

罗开菊 陈平洋 谢宗德 李雯 李素萍 贺鸣凤

(中南大学湘雅二医院新生儿科, 湖南长沙 410011)

[摘要] 目的 生命早期应用左旋精氨酸(L-Arg)干预低出生体重仔鼠,检测其肝脏磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)和蛋白激酶B(PKB)的表达,探讨L-Arg对改善胰岛素抵抗的影响。方法 以孕期低蛋白饮食法建立低出生体重仔鼠模型,18只孕鼠随机分为对照组、模型组和干预组,每组6只。对照组孕期给予21%正常蛋白饲料建立正常出生体重仔鼠模型,模型组及干预组孕期给予10%低蛋白饲料建立低出生体重仔鼠模型,3组孕鼠所生仔鼠分别纳入仔鼠对照组、模型组、干预组。生后21d仔鼠的哺乳期内,3组孕鼠均给予21%正常蛋白饲料喂养,对照组及模型组给予正常饮用水喂养,干预组给予富含L-Arg(200 mg/kg·d)的饮用水喂养。断乳后,3组仔鼠均给予21%正常蛋白饲料及正常饮用水喂养。于仔鼠生后1周、3周、8周时,分别留取3组仔鼠的肝脏标本,用Western blot法检测肝脏PI3K和PKB的蛋白表达。结果 1周时干预组仔鼠肝脏PI3K的蛋白表达高于模型组($P=0.045$),且与正常组相比差异无统计学意义($P=0.503$)。8周时干预组仔鼠肝脏PKB蛋白表达明显高于模型组($P=0.039$),且与正常组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 生命早期补充L-Arg可促进蛋白质的合成,增加肝脏PI3K及PKB的蛋白表达,促进胰岛素信号传导,改善胰岛素抵抗。

[中国当代儿科杂志, 2013, 15(8): 682-685]

[关键词] 左旋精氨酸; 低出生体重; 肝脏; 胰岛素信号传导; 胰岛素抵抗; 大鼠

Effects of L-Arg on expression of PI3K and PKB in liver among low-birth-weight newborn rats

LUO Kai-Ju, CHEN Ping-Yang, XIE Zong-De, LI Wen, LI Su-Ping, HE Ming-Feng. Department of Neonatology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China (Chen P-Y, Email: wycpyfu@163.com)

Abstract: Objective To measure the expression of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (PKB) in liver tissue among low-birth-weight newborn rats treated with L-arginine (L-Arg) in early life, and to investigate the effect of L-Arg on insulin resistance. **Methods** Eighteen pregnant rats were randomly divided into three groups: control, model and intervention ($n=6$ each). The control group was fed with normal protein feed (protein content=21%) during pregnancy to establish a normal-birth-weight newborn rat model, and the model and intervention groups were fed with low-protein feed (protein content=10%) during pregnancy to establish a low-birth-weight newborn rat model. Newborn rats from the three pregnant rat groups were also assigned to control, model and intervention groups. During 21 days of lactation, maternal rats in the control and model groups were fed with normal protein feed and normal drinking water, while maternal rats in the intervention group were fed with normal protein feed and drinking water rich in L-Arg (200 mg/kg·d). After ablactation, the three groups of newborn rats were fed with normal protein feed and normal drinking water. Liver tissue samples were collected from these newborn rats at 1, 3 and 8 weeks after birth. Protein expression of PI3K and PKB in liver tissue was measured by Western blot. **Results** At 1 week after birth, the newborn rats in the intervention group had significantly higher protein expression of PI3K than in the model group ($P=0.045$), but there was no significant difference when compared with the control group ($P=0.503$). At 8 weeks after birth, the newborn rats in the intervention group had significantly higher protein expression of PKB than the model group ($P=0.039$), but there was no significant difference when compared with the control group ($P>0.05$). **Conclusions** A supplement of L-Arg in early life can boost protein synthesis, increase protein expression of PI3K and PKB in liver tissue, promote insulin signaling and reduce insulin resistance.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(8): 682-685]

Key words: L-arginine; Low birth weight; Liver; Insulin signaling; Insulin resistance; Rats

[收稿日期] 2013-04-07; [修回日期] 2013-04-23

[基金项目] 湖南省科技计划一般项目(No. 2007SK3042)。

[作者简介] 罗开菊,女,硕士研究生。

[通信作者] 陈平洋,主任医师。

胎儿生长受限 (fetal growth restriction, FGR) 包括宫内发育迟缓 (intrauterine growth retardation, IUGR) 和低出生体重 (low birth weight, LBW)。近年来大量流行病学调查和动物实验研究发现, LBW 不仅是造成围产儿发病和死亡的重要原因之一, 而且是成年期发生代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 的独立发病因素^[1]。目前, LBW 引起成年后 MS 的机制尚未完全明确, 成年期相关疾病的早期防治已成为研究热点。

营养素是基因表达的重要调节因子, 可通过控制代谢产物或代谢状态导致 mRNA 和蛋白质合成与功能的改变。精氨酸是体蛋白的组成部分, 在生物体内有生理活性的是左旋精氨酸 (L-arginine, L-Arg)。L-Arg 是一种条件必需氨基酸, 具有多种独特的生理与药理作用, 可以治疗 FGR、促进胎儿生长发育、降低血糖和改善胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 等。IR 与 MS 具有一个共同的病理生理基础。肝细胞中, 胰岛素主要通过胰岛素受体底物蛋白激活磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K) 信号传导途径的一系列级联反应, 发挥生物效应。PKB 作为 PI3K 下游直接的靶蛋白, 在肝脏胰岛素信号传导中可能参与了肝脏组织的分化、生长和调节胰岛素介导的糖代谢^[2]。PI3K 信号传导途径正常运转, 肝内物质代谢才能正常进行, 其中任何一个环节出现异常, 都可能出现葡萄糖转运和代谢的异常, 导致 IR 的发生。因此, 本研究采用孕期 10% 低蛋白饲料法建立 LBW 仔鼠模型, 在产后 21 d 哺乳期内给予干预组母鼠 L-Arg 营养干预, 检测仔鼠不同年龄段肝脏 PI3K 和 PKB 的蛋白表达。探讨 L-Arg 对改善 IR 的影响, 为 L-Arg 应用于 LBW 相关成年期 MS 的早期防治提供有力的实验动物学数据。

1 材料与方法

1.1 实验分组与建模

参考文献^[3]取健康 3 月龄 Sprague-Dawley (SD) 二级大鼠 36 只, 雌雄各半, 体重 250~300 g, 按照雌雄 1:1 的比例置于同一笼中交配, 次日清晨检测出阴栓者定为受孕成功。查找随机数字表, 将 18 只孕鼠随机分配到正常蛋白饲料对照组 (正常组)、低蛋白饲料模型组 (模型组) 和低蛋白饲料干预组 (干预组), 每组 6 只孕鼠。对照组母鼠自受孕后第 1 天开始给予 21% 正常蛋白饲料喂养, 建立正常出生体重仔鼠模型, 所生仔鼠纳入仔鼠正常组, 仔鼠生后 21 d 的哺乳期内继续给予

母鼠 21% 正常蛋白饲料、正常饮用水喂养。模型组和干预组母鼠自受孕后第 1 天开始给予 10% 低蛋白饲料喂养, 建立 LBW 仔鼠模型, 所生仔鼠分别纳入仔鼠模型组和干预组, 模型组仔鼠生后 21 d 的哺乳期内给予母鼠 21% 正常蛋白饲料、正常饮用水喂养; 干预组仔鼠生后 21 d 的哺乳期内给予母鼠 21% 正常蛋白饲料以及富含 L-Arg (200 mg/kg-d) 的饮用水喂养。3 组仔鼠断乳后均给予 21% 正常蛋白饲料及正常饮用水喂养至第 8 周。

1.2 方法

1.2.1 标本留取 3 组仔鼠分别于生后 1 周、3 周、8 周时各取 6 只, 称体重, 用 10% 水合氯醛 (0.35 mL/0.1 kg) 腹腔注射麻醉后处死。迅速剖腹取肝脏存于 EP 管中, 置 -70℃ 冰箱内保存, 用于 Western blot 检测。

1.2.2 肝脏 PI3K 和 PKB 表达的检测 (1) 蛋白样本的制备: 称量肝脏重量, 置于离心管中。按照每 20 mg 组织加入 100~200 μ L 裂解液的比例加入裂解液, 在冰上将离心管中组织剪切成细小碎片。用细胞超声粉碎仪匀浆, 直至充分裂解。参数设定: 工作 30 s, 间歇 60 s, 重复 5 次。充分裂解后, 14000 rpm 离心 5 min, 取上清液。在上清液中加入 5 \times 变性缓冲液, 于 PCR 仪中 99.9℃ 10 min, 如有混浊则 8000 rpm 离心 2 min, 取上清液。置于 4℃ 保存备用检测 PI3K 和 PKB 蛋白的表达。(2) 蛋白浓度的测定: 按照 BCA 蛋白浓度测定法测定 A562 波长的吸光度值。用 Excel 绘制标准曲线, 根据标准曲线函数公式计算出蛋白浓度。(3) 肝脏 PI3K 和 PKB 蛋白的表达: 用 Western blot 技术检测肝脏组织 PI3K 和 PKB 蛋白的表达; 采用 Image J 图像处理软件对 Western blot 结果进行灰度分析, 计算检测因子 (PI3K 和 PKB) 与内对照 β -actin 蛋白条带的积分光密度比值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据统计分析。计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组仔鼠各时间点肝脏 PI3K 蛋白表达

1 周、3 周和 8 周时模型组仔鼠肝脏 PI3K 的表达量均明显低于正常组 (分别 P=0.010、0.037、0.043); 1 周时干预组仔鼠肝脏 PI3K 的表达量高于模型组 (P=0.045), 且与正常组相比差异

无统计学意义 ($P=0.503$)。3周和8周时干预组仔鼠肝脏 PI3K 的表达量介于正常组和模型组之间,与正常组、模型组比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表1,图1。

2.2 3组仔鼠各时间点肝脏 PKB 蛋白表达

1周和3周时3组仔鼠肝脏 PKB 的表达量差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。8周时模型组仔鼠肝脏 PKB 的表达量明显低于正常组 ($P=0.008$),干预组仔鼠肝脏 PKB 蛋白表达量明显高于模型组 ($P=0.039$),且与正常组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表2,图2。

表1 3组仔鼠各时间点肝脏 PI3K 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	1周	3周	8周
正常组	6	0.65 ± 0.03	0.54 ± 0.04	0.56 ± 0.06
模型组	6	0.59 ± 0.04 ^a	0.49 ± 0.03 ^a	0.49 ± 0.05 ^a
干预组	6	0.63 ± 0.04 ^b	0.53 ± 0.03	0.52 ± 0.06
<i>F</i> 值		9.764	7.192	4.270
<i>P</i> 值		<0.001	0.003	0.022

a: 与正常组比较, $P<0.05$; b: 与模型组相比, $P<0.05$

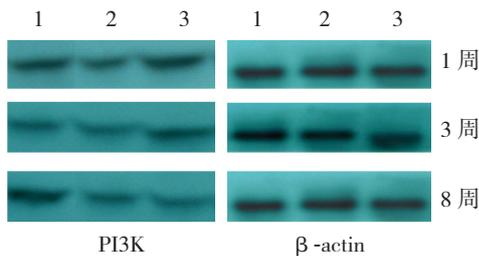


图1 3组仔鼠各时间点肝脏 PI3K 蛋白表达量 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 干预组。

表2 3组仔鼠各时间点肝脏 PKB 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	1周	3周	8周
正常组	6	0.76 ± 0.05	0.68 ± 0.05	0.62 ± 0.03
模型组	6	0.72 ± 0.05	0.65 ± 0.04	0.56 ± 0.04 ^a
干预组	6	0.73 ± 0.03	0.68 ± 0.06	0.62 ± 0.05 ^b
<i>F</i> 值		1.506	1.282	9.334
<i>P</i> 值		0.237	0.291	0.001

a: 与正常组比较, $P<0.05$; b: 与模型组相比, $P<0.05$

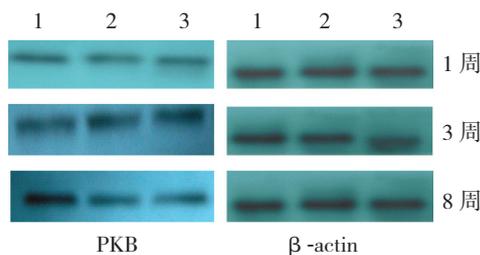


图2 3组仔鼠各时间点肝脏 PKB 蛋白表达量 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 干预组。

3 讨论

“营养程序化”概念指出在发育的关键或敏感时期的营养状况将对机体或各器官功能产生长期以至终生的影响^[4],这一认识指导人们寻求营养干预来改变生命早期不利的营养环境,从而防治 LBW 相关成年期 MS。IR 与 MS 具有一个共同的病理生理学基础。肝细胞中,胰岛素主要通过胰岛素受体底物蛋白激活 PI3K 信号传导途径的一系列级联反应,发挥生物效应。PI3K 及 PKB 是肝脏胰岛素信号传导途径中的重要蛋白,其表达量或活性的异常,都可能会影响肝脏 PI3K 信号传导途径的正常运转,出现葡萄糖转运和代谢的异常,从而导致肝脏 IR 的发生^[5]。

Sun 等^[6]发现在 PEPCK 过度表达的小鼠中出现肝脏 IRS2 蛋白表达下调,李瑶等^[7]研究表明 IUGR 子鼠胰腺组织中胰岛素受体底物 2 的 mRNA 和蛋白水平显著下降,从而可使 PI3K 活性降低导致 IR。Andreelli 等^[8]证实在 2 型糖尿病患者的骨骼肌和脂肪细胞中 PI3K 基因表达调控存在缺陷。王涤非等^[9]建立 2 型糖尿病动物模型研究得出其骨骼肌中 PI3K 蛋白表达减少了 19%。本实验发现自生后 1 周开始, LBW 仔鼠肝脏 PI3K 的蛋白表达就明显低于正常,这一现象一直持续到成年期。Ozanne 等^[10]研究在成年 LBW 个体中,无论是人体还是动物模型, PI3K 的两个亚基蛋白表达均降低。

PKB 作为胰岛素受体和 PI3K 下游直接的靶蛋白,对胰岛素代谢、激素信号转导和葡萄糖转运起着重要作用^[11]。已有研究表明,宫内营养不良可改变宫内代谢环境,造成仔鼠骨骼肌中 PKB 的表达和胰岛素相关活性降低,导致胰岛素介导的葡萄糖转运蛋白 4 转位受抑制,这可能引起机体对葡萄糖的摄取和利用降低,促进糖尿病的发生;该研究亦证实宫内营养不良造成的 IUGR 鼠 2 月龄时机体基础状态和胰岛素刺激状态下, IUGR 组肝脏 PKB 和磷酸化 PKB 表达水平均明显低于对照组^[12]。已知磷酸化的 PKB 才具有主要生物学活性。本实验中 LBW 仔鼠肝脏 PKB 表达的异常出现于生后第 8 周, LBW 仔鼠肝脏胰岛素信号传导途径发生异常, PI3K 及 PKB 表达降低,且 PI3K 蛋白表达的异常先于 PKB 的发生。故可推测 LBW 仔鼠成年期 IR 的出现可能是由于 PI3K 传导通路的异常,即早期 PI3K 蛋白表达的降低,使其下游因子 PKB 的磷酸化程度减弱,但此时 PKB 表达的异常并不明显,进而减慢了葡萄糖转运蛋

白2向膜的转运,使肝细胞对葡萄糖的摄取减少;到了青春期可能同时存在PKB表达及活性的明显降低,加重PKB活化的障碍,使其对胰岛素刺激的反应能力降低,从而影响胰岛素信号的进一步传导,使葡萄糖转运蛋白2向膜的转运异常。另一方面也可能通过减弱对PEPCK、葡萄糖-6-磷酸酶基因转录的抑制作用,使糖异生增加,导致血糖的升高,促进IR及2型糖尿病的发生。

目前精氨酸已用于糖尿病的治疗。研究发现糖尿病条件下机体精氨酸水平降低^[13],在动物试验中用精氨酸治疗糖尿病大鼠,可起到降低血糖浓度,缓解体重下降的作用。L-Arg有良好的免疫调节剂,并能兴奋胰岛β细胞分泌胰岛素^[14],影响胰岛素样生长因子及受体的表达^[15]。IR是糖尿病重要的发病机制,在肝细胞中,胰岛素主要通过PI3K信号传导途径调节糖代谢。国外学者在糖尿病大鼠模型上证实L-Arg可以降低2型糖尿病大鼠的脂肪量、体重、血糖、甘油三酯和同型半胱氨酸等生化指标水平^[16]。高果糖喂养可以使正常SD大鼠出现IR并伴有血压升高,血脂代谢紊乱,而L-Arg可以改善IR及血脂代谢紊乱,并防止大鼠出现血压升高^[17]。

本实验发现补充L-Arg后1周时干预组仔鼠肝脏PI3K表达开始高于模型组,且接近于正常组,而后3周和8周时表达增高均不明显,介于正常组和模型组之间,且与两组比较差异均无统计学意义。干预组仔鼠肝脏PKB的表达在1周、3周时与正常组和模型组之间比较差异无统计学意义,即L-Arg干预后其表达无明显变化。8周时干预组仔鼠肝脏PKB的表达明显高于模型组,即补充L-Arg后PKB的表达显著增高,达正常组水平。提示生命早期补充L-Arg可增加肝脏PI3K和PKB的表达,改善胰岛素信号传导,从而调节糖代谢,达到延缓IR的目的。而L-Arg的作用机制目前尚缺乏相关研究。

综上所述,在生命早期给予LBW仔鼠补充L-Arg可增加肝脏PI3K及PKB蛋白的表达,促进胰岛素信号传导,改善IR。同时本研究发现在给予L-Arg干预后的早期1周时PI3K的表达量明显增多,8周时受损的PKB的表达明显增多。这些提示需斟酌干预的时间是否足够,以及干预的量是否合适,以寻找最佳干预方法、时间及剂量,达到最佳效果,为LBW相关成年期MS的防治提供实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Rinaudo P, Wang E. Fetal programming and metabolic syndrome[J]. *Annu Rev Physiol*, 2012, 74: 107-130.
- [2] Schultze SM, Jensen J, Hemmings BA, Tschopp O, Niessen M. Promiscuous affairs of PKB/AKT isoforms in metabolism[J]. *Arch Physiol Biochem*, 2011, 117(2): 70-77.
- [3] Xie Z, Dong Q, Ge J, Chen P, Li W, Hu J. Effect of low birth weight on impaired renal development and function and hypertension in rat model[J]. *Ren Fail*, 2012, 34(6): 754-759.
- [4] Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach[J]. *J Nutr*, 1998, 128(2 Suppl): 401S-406S.
- [5] Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(9): a011189.
- [6] Sun Y, Liu S, Ferguson S, Wang L, Klepcyk P, Yun JS, et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(26): 23301-23307.
- [7] 李瑶, 辛颖. 胰岛素受体底物在宫内发育迟缓大鼠胰腺组织中的表达[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(12): 972-975.
- [8] Andreelli F, Laville M, Ducluzeau PH, Vega N, Vallier P, Khalfallah Y, et al. Defective regulation of phosphatidylinositol-3-kinase gene expression in skeletal muscle and adipose tissue of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients[J]. *Diabetologia*, 1999, 42(3): 358-364.
- [9] 王涤非, 蒋丽娟, 张锦, 刘国良. 2型糖尿病小鼠骨骼肌细胞受体后胰岛素信号转导蛋白的下降调节[J]. *山西医药杂志*, 2006(1): 10-12.
- [10] Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Mechanisms underlying the developmental origins of disease[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2012, 13(2): 85-92.
- [11] Soumaya K. Molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 771: 240-251.
- [12] 刘晓梅, 焦伊胜, 潘莉莉, 卢岩, 李书琴. 宫内生长受限大鼠肝脏磷酸肌醇-3-激酶信号通路分子的变化[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 3(3): 221-224.
- [13] Escudero A, Petzold G, Moreno J, Gonzalez M, Junod J, Aguayo C, et al. Supplementation with apple enriched with L-arginine may improve metabolic control and survival rate in alloxan-induced diabetic rats[J]. *Biofactors*, 2013[Epub ahead of print].
- [14] Marchetti P, Bugliani M, Boggi U, Masini M, Marselli L. The pancreatic beta cells in human type 2 diabetes[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 771: 288-309.
- [15] 卢岩, 刘晓梅, 李书琴. L-精氨酸对宫内发育迟缓胎鼠胰岛素样生长因子及其结合蛋白表达的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2006, 7(4): 319-322.
- [16] Fu WJ, Haynes TE, Kohli R, Hu J, Shi W, Spencer TE, et al. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats[J]. *J Nutr*, 2005, 135(4): 714-721.
- [17] Feng Y, Li J, Yang J, Yang Q, Lv Q, Gao Y, et al. Synergistic effects of taurine and L-arginine on attenuating insulin resistance hypertension[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 775: 427-435.

(本文编辑: 周勇)