

· 实验研究 ·

宫内生长受限大鼠肝脏糖异生酶的表达增加与胰岛素抵抗

刘晓梅¹, 卢岩¹, 潘莉莉², 李书琴¹

(中国医科大学盛京医院 1. 实验中心; 2. 检验科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 宫内生长受限(IUGR)和成年胰岛素抵抗密切相关,但其发生机制不清楚,该研究通过检测 IUGR 子鼠肝脏中糖异生关键酶及可促进糖异生的转录因子的表达,探讨 IUGR 个体发生胰岛素抵抗的分子机制。**方法** 通过孕期全程蛋白质营养不良方法建立大鼠 IUGR 模型,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 技术检测 IUGR 子鼠幼年(3周)和成年(8周)肝脏中 PGC-1 α mRNA 和蛋白表达变化,同时检测磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)和葡萄糖 6-磷酸酶(G6-P 酶)的 mRNA 表达变化。**结果** ①IUGR 组子鼠平均出生体重 4.97 ± 0.83 g 明显低于正常对照组 6.54 ± 0.52 g ($P < 0.01$),4 周时 IUGR 组平均体重达到对照组平均水平,8 周时 IUGR 组体重为 152.03 ± 13.57 g 超过正常对照组的 136.05 ± 12.24 g ($P < 0.05$);②IUGR 子鼠幼年(3周)空腹血糖和胰岛素水平与对照组没有差异,成年(8周)后 IUGR 子鼠出现高胰岛素血症($P < 0.01$),胰岛素抵抗指数(IRI)增高($P < 0.05$);③与对照组相比,IUGR 组 3 周和 8 周龄子鼠肝脏 PGC-1 α mRNA 和蛋白表达明显增高($P < 0.05$);同时肝脏 PEPCK 和 G6-P 酶的 mRNA 水平也明显高于对照组($P < 0.01$)。**结论** IUGR 鼠自幼年至成年肝脏中糖异生的关键调控因子 PGC-1 α 的 mRNA 和蛋白表达增加,诱导糖异生关键酶的表达,可能增加肝脏糖异生,促进胰岛素抵抗发生。
[中国当代儿科杂志,2008,10(2):216-220]

[关键词] 宫内生长受限;胰岛素抵抗;糖异生;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)02-0216-05

Increased expression of gluconeogenic enzymes in the liver of IUGR rats and subsequent insulin resistance

LIU Xiao-Mei, LU Yan, PAN Li-Li, LI Shu-Qin. Central Laboratory, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Li S-Q, Email: lisq@cmu2h.com)

Abstract: Objective Intrauterine growth retardation (IUGR) is associated with insulin resistance in later life but the mechanism remains unclear. To explore the molecular mechanism of insulin resistance, we determined the expression of gluconeogenic enzymes as well as the expression of transcription factor which promotes gluconeogenesis in the liver of IUGR rats. **Methods** Rat model of IUGR was established by maternal protein-malnutrition. Hepatic mRNA levels of the key enzymes for gluconeogenesis, PEPCK and G6Pase, and of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator (PGC) - 1 α were measured by RT - PCR in male IUGR pup rats at 3 and 8 weeks of their lives. Hepatic PGC-1 α protein levels were determined by Western blot. **Results** The average birth weights of the IUGR group (4.97 ± 0.83 g) were significantly lower than normal controls (6.54 ± 0.52 g) ($P < 0.01$). Until to 4 weeks of age, the weights of the IUGR rats increased to the control level and were higher than normal controls at 8 weeks of age ($P < 0.05$). There were no significant differences in blood glucose and insulin concentrations between the IUGR rats and normal controls at 3 weeks of age. By 8 weeks of age, the IUGR rats showed high insulin concentrations ($P < 0.01$) and high insulin resistance index ($P < 0.05$) compared with the controls. Hepatic PGC-1 α mRNA and protein levels as well as hepatic mRNA levels of PEPCK and G6Pase in IUGR rats significantly increased at 3 and 8 weeks compared with controls. **Conclusions** An increased PGC-1 α expression may contribute to increased mRNA levels of PEPCK and G6Pase, and thus induce the development of insulin resistance in later life in IUGR rats.
[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (2):216-220]

Key words: Intrauterine growth retardation; Insulin resistance; Gluconeogenesis; Rats

[收稿日期]2007-05-12;[修回日期]2007-07-13

[基金项目]辽宁省自然科学基金资助项目(9910500709)。

[作者简介]刘晓梅,女,博士,助理研究员。主攻方向:宫内生长受限。

[通讯作者]李书琴,教授,博士生导师,中国医科大学盛京医院实验中心,邮编:110004。

胎儿宫内生长受限 (intrauterine growth retardation, IUGR), 是一种常见的妊娠并发症, 是围生期疾病和死亡的重要原因。Hales 等^[1]首先提出了宫内环境不良可以导致成年疾病的假说, IUGR 儿成年后 2 型糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 和高血压、高脂血症、肥胖等代谢综合征的发病率增高。尽管胰岛素缺乏和胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 都促进了 DM 的发生, 但 IUGR 个体中胰岛素抵抗起主导作用^[2]。IUGR 个体发生胰岛素抵抗的机制目前尚不明确。糖异生增加导致的肝葡萄糖输出增多是 2 型糖尿病机体胰岛素抵抗的重要组成部分^[3]。肝脏中调控糖异生的关键酶是磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)、葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6-P 酶) 和果糖 1, 6-二磷酸酶 (fructose-1, 6-bisphosphatase, FBP 酶), 过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ 的辅激活因子 (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator, PGC-1 α) 控制这些酶的基因表达^[4]。本研究通过孕期蛋白质营养不良法建立大鼠 IUGR 模型, 研究 IUGR 雄性子鼠在幼年 (3 周) 和成年 (8 周) 肝脏中糖异生关键酶和 PGC-1 α 的表达, 探讨 IUGR 个体发生胰岛素抵抗的分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制作

参考 Desai 方法^[5]建立 IUGR 模型。Wistar 大鼠由中国医科大学实验动物中心提供, 雌性与雄性按 4: 1 比例合笼后以阴道涂片发现精子为确定妊娠, 孕鼠按受孕顺序随机分为两组, 正常对照组 (CON) 孕鼠饲以标准饲料 (热卡 1 583 kJ/100 g, 蛋白质 23%), IUGR 组孕鼠自受孕第 1 日饲以低蛋白饲料 (热卡 1 558 kJ/100 g, 蛋白质 8%), 所有孕鼠自然分娩, 称量 12 h 内新生子鼠的体重, 精确到 0.01 g。每窝超过 10 只者舍弃部分雌鼠仔, 使每窝控制在 8 ~ 10 只。分娩后母鼠都饲以标准饲料, 满 3 周后断乳, 子鼠饲以标准饲料。选择雄性子鼠研究, 分别于 3 周龄和 8 周龄空腹 12 h 后取血收集血清, 同时分离肝脏液氮冻存。

1.2 试剂

兔抗大鼠 PGC-1 α IgG 购自 SantaCruz 公司, 碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG 购自 Sigma 公司, Trizol 试剂由 Invitrogen 公司提供, 逆转录的 RNA PCR Kit (AMV) 和 PCR 扩增的试剂购自 TaKaRa 公司。

1.3 生化检测

血清血糖的测定采用葡萄糖氧化酶法, 血清胰岛素水平检测采用 ELISA 方法 (Mercodia AB 公司, 瑞士)。

1.4 RT-PCR

用 Trizol 试剂抽提肝组织的总 RNA, 测定紫外吸光度以检验纯度并计算 RNA 浓度, 通过甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 完整性。取 2 μ g RNA 合成 cDNA, 采用 GAPDH 为内参照, PCR 引物序列和退火温度见表 1。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 采用 GIS-2020 凝胶成像及分析系统进行密度分析, 目的基因的 mRNA 表达水平以其与内参 mRNA 的相对量来计算。

表 1 目的基因的 PCR 引物序列

基因	序列	产物 (bp)	退火温度 (°C)
PGC-1 α	5'-GACTATTGACGGAACCTTA-3' 5'-TGACTGGGATGACCGAAG-3'	579	58
PEPCK	5'-CCGAAGGCAAGAAGAAAT-3' 5'-CGTAGCCAATGGGAGTGA-3'	857	53
G6Pase	5'-TCCTGGACACTGACTATTACA-3' 5'-CCACGAAAGATAGCGAGA-3'	157	57
GAPDH	5'-TCAACGGGCACAGTCAAGG-3' 5'-GGCTAAGCAGTGGTGGT-3'	308	55

1.5 Western blot 检测 PGC-1 α 蛋白表达

肝组织总蛋白提取采用组织裂解液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 1% TritonX-100, 2 mmol/L EDTA, 140 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EGTA, 2 mmol/L PMSF), 用 Bradford 法进行总蛋白定量。取 100 μ g 总蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 将蛋白转移至硝酸纤维膜上 (4°C, 100 V, 1 h)。转印膜用 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h, 再与兔抗 PGC-1 α 多克隆抗体 (1: 100) 4°C 杂交过夜。洗膜后与碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG (1: 1 000) 室温下杂交 1 h, 加入显色剂反应至特异性条带出现, 应用 GIS-2020 凝胶成像分析系统分析密度并计算 1 mg 总蛋白中 PGC-1 α 表达的相对值。

1.6 统计学处理

所有结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 11.0 软件对数据进行分析, 均数比较采用 *t* 检验, 相关分析用 Pearson 直线相关分析, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 孕期蛋白缺乏对子鼠生长发育的影响

IUGR 组和对照组平均孕期均为 21.5 d (21 ~

22 d),平均产仔数也无差别。IUGR 组 IUGR 发生率为 52.4%,明显高于正常对照组的 4.23% ($\chi^2 = 42.069, P < 0.01$)。IUGR 组子鼠的平均出生体重与对照组相比明显降低($P < 0.01$)。4 周时 IUGR 组平均体重达到对照组子鼠平均水平,8 周时 IUGR 组体重已经超过正常对照组($P < 0.05$)。子鼠平均体重数据见表 2。两组幼鼠(3 周龄)的空腹血糖和胰岛素浓度以及免疫反应性胰岛素(immunoreactive insulin, IRI)无明显差别,8 周龄时,与对照组比较,IUGR 组空腹血糖无明显差异,但空腹胰岛素浓度

明显升高($P < 0.01$);IRI 比较差异有显著性($P < 0.05$)。空腹血糖和血清胰岛素以及 IRI 的数据见表 3。

表 2 两组子鼠的不同发育阶段的体重(g) ($\bar{x} \pm s$)

分组	出生	3 周	4 周	8 周
对照组	6.49 ± 0.58	31.31 ± 5.73	48.5 ± 6.59	136.05 ± 12.24
IUGR 组	4.64 ± 0.56	27.55 ± 4.58	45.23 ± 6.55	152.03 ± 13.57
<i>t</i>	6.399	3.578	1.677	2.834
<i>P</i>	<0.01	<0.01	>0.05	<0.05

表 3 子鼠空腹血糖和血清胰岛素测定值 ($\bar{x} \pm s$)

分组	3 周			8 周		
	血糖(mmol/L)	胰岛素(mU/L)	IRI	血糖(mmol/L)	胰岛素(mU/L)	IRI
对照组	4.93 ± 0.87	32.36 ± 5.5	1.93 ± 0.14	5.08 ± 0.66	39.39 ± 3.79	2.17 ± 0.12
IUGR 组	4.72 ± 0.69	34.63 ± 3.01	1.97 ± 0.16	5.39 ± 0.67	75.45 ± 13.61	2.88 ± 0.18
<i>t</i>	0.454	0.887	0.459	0.772	4.908	3.332
<i>P</i>	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.05

2.2 IUGR 子鼠肝脏 PGC-1α 的 mRNA 和蛋白水平的变化

IUGR 鼠 3 周($t = 4.764, P < 0.01$)和 8 周($t = 2.809, P < 0.05$)的肝脏 PGC-1α 的 mRNA 相对表达量明显高于正常对照。同样,IUGR 组幼鼠($t = 3.233, P < 0.05$)和成年鼠($t = 2.834, P < 0.05$)肝脏 PGC-1α 的蛋白水平与正常对照比较也明显增加,分别是对照组的 162% 和 230%。Western blot 结果见图 1,RT-PCR 结果见图 2。

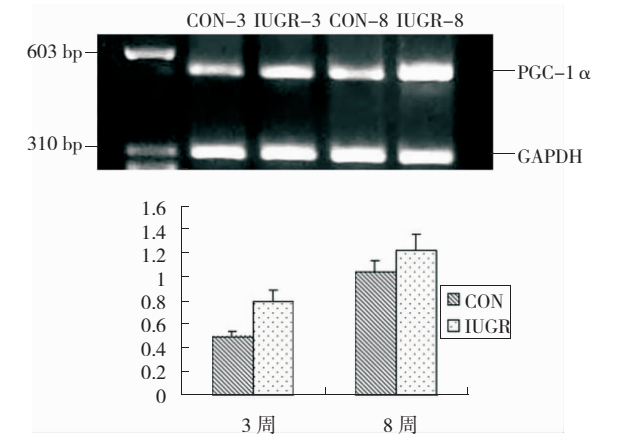


图 2 肝脏 PGC-1 的 RT-PCR 产物定量 IUGR 组 mRNA 电泳条带密度增加。

2.3 IUGR 子鼠肝脏 PEPCK 和 G6-P 酶 mRNA 水平的变化

采用 RT-PCR 技术检测两种酶转录水平的变化。3 周龄子鼠肝脏 PEPCK 的 mRNA 的表达水平都比较低,其中 IUGR 组的相对表达量略高于正常对照($t = 1.973, P < 0.05$)。8 周龄时,子鼠肝脏 PEPCK 的 mRNA 表达水平明显升高,其中 IUGR 组的相对表达量显著高于正常对照组($t = 2.931, P < 0.01$)。无论幼鼠($t = 2.754, P < 0.01$)还是成年鼠($t = 3.873, P < 0.01$),IUGR 组肝脏中 G6-P 酶的 mRNA 表达水平都明显高于正常对照。而且 PEPCK($r = 0.907, P < 0.01$)和 G6-P 酶($r = 0.726, P < 0.01$)的 mRNA 水平与 PGC-1 的 mRNA 含量显示高度正相关。RT-PCR 结果见图 3,4。

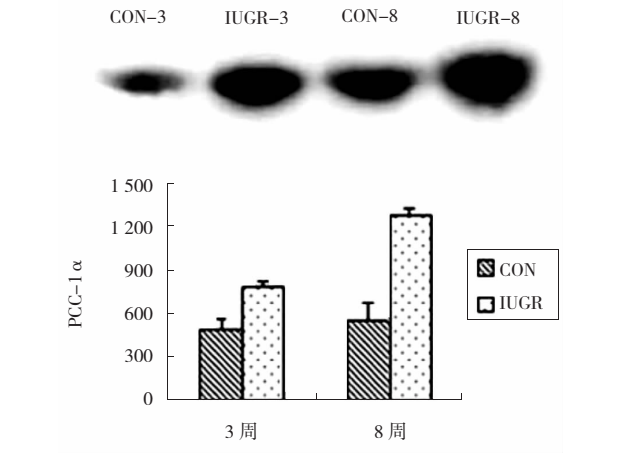


图 1 肝脏 PGC-1α 的 Western blot 蛋白定量 CON-3,IUGR-3,CON-8,IUGR-8 分别代表正常组 3 周鼠;IUGR 组 3 周鼠,正常组 8 周鼠(下同);IUGR 组 8 周鼠。IUGR 组蛋白条带密度增加。

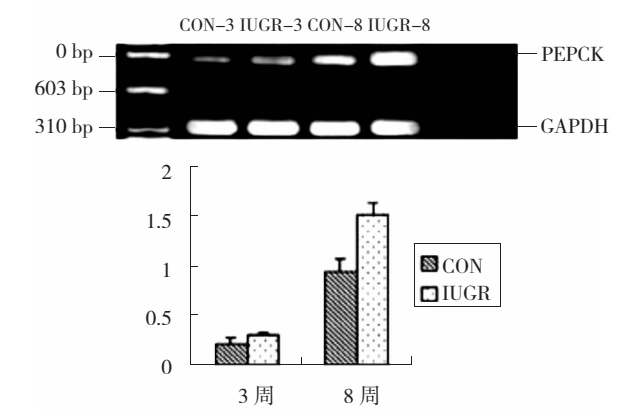


图3 肝脏PEPCK的RT-PCR产物定量 IUGR组mRNA电泳条带密度增加

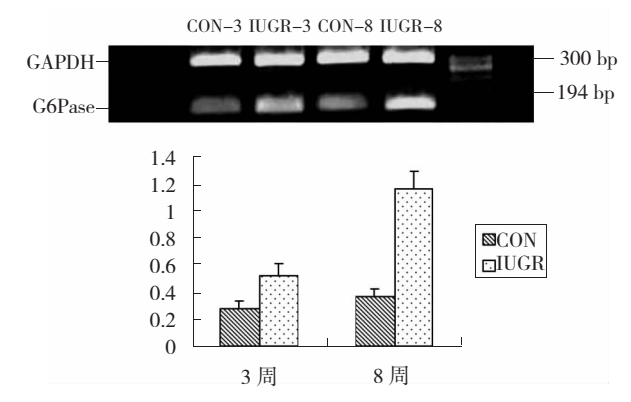


图4 肝脏G6P酶的RT-PCR产物定量 IUGR组mRNA电泳条带密度增加

3 讨论

Barker提出的“胎儿起源的成人疾病”假说认为低出生体重儿的肥胖、高血压、2型糖尿病的风险明显增高,此后众多流行病学调查结果都支持这一假说^[6,7]。但这种关联是否具有性别特异性尚无一致结论,为排除激素和性别的可能干扰,我们选择雄性子鼠进行比较。结果显示孕期低蛋白饮食导致IUGR的发生率明显增高,IUGR组新生鼠的平均体重明显低于对照组,但生后生长速度快于正常对照,在4周时体重已经达到正常水平,8周时已经超过对照组,这种生长趋势与人类的研究结果相似。Ong等^[8]对英国0~5岁儿童前瞻性研究发现,30.7%的低出生体重儿在0~2岁期间出现生长追赶,这些有生长追赶的儿童在5岁时已经表现肥胖,体内脂肪呈向心性分布。向心性肥胖可引起胰岛素抵抗和高胰岛素血症,是2型糖尿病发病的重要危险因素之一^[9]。有研究认为^[10],IUGR时为适应宫

内营养不良的环境,胎儿会减少对葡萄糖的能量依赖,提高其他底物的氧化,并最优化的利用有限的营养供给以保证生存,导致外周组织胰岛素抵抗,而胰岛素的作用之一就是使能量以最经济的脂肪形式储存起来,从而抵消胰岛素的作用使营养重新分配,满足重要生命器官的发育。所以IUGR大鼠成年后腹部内脏脂肪的增多可能是由于宫内营养不良造成脂肪发育的特定的“程序化”,导致成年期脂肪组织异常持续增长的结果。

本研究显示IUGR组子鼠哺乳期(3周龄)空腹血糖、空腹胰岛素水平和IRI与对照组没有明显差异,但成年后(8周)出现高胰岛素血症,空腹胰岛素水平是对照组的191%,IRI也高于对照组。其他动物模型研究中也有类似的结果,子宫动脉钳夹产生的IUGR大鼠,自幼鼠期就表现为血糖异常,成年后有明显糖尿病症状,表现为空腹血糖升高和高胰岛素血症^[11]。Chen等^[12]研究发现孕期给予酒精造成的IUGR鼠血浆和肝中甘油三酯水平升高,糖耐量指数和胰岛素敏感性降低。多项研究都证实IUGR个体自幼年期机体就存在胰岛素抵抗。

肝脏通过控制肝糖输出对维持血糖稳态起重要作用。糖异生增加导致的肝糖输出增多是2型糖尿病机体胰岛素抵抗的重要组成部分。肝脏糖异生的关键调节因子是辅激活因子PGC-1 α ,它广泛调节能量生成与利用过程,包括肝脏糖异生、肝脏脂肪酸 β 氧化、肌肉中葡萄糖转运等。胰岛素可通过蛋白激酶B依赖的信号途径抑制PGC-1 α 启动子的活性,使其mRNA表达下降^[13]。进食状态下肝脏中PGC-1 α 表达不明显,但空腹鼠和胰岛素功能障碍时PGC-1 α 表达增加。在多个胰岛素缺乏的模型鼠:链脲佐菌素诱导的糖尿病鼠、肝胰岛素受体基因敲除小鼠中,肝脏中PGC-1 α mRNA水平都明显增高,同时伴有肝糖异生增加^[14,15]。

本研究以幼年(3周)和成年(8周)IUGR鼠为研究对象,采用RT-PCR和Western杂交方法检测不同发育阶段肝脏中PGC-1 α 的mRNA和蛋白表达变化。结果显示,宫内蛋白缺乏造成的IUGR鼠自幼年期肝脏中PGC-1 α 的mRNA和蛋白表达量就明显高于对照,成年后,IUGR鼠肝脏中PGC-1 α 蛋白表达增高更加明显,约是正常对照的2.3倍。

PGC-1 α 是肝糖异生的主要调节者,是肝中胰岛素-cAMP轴的中心靶位。PGC-1 α 对糖异生的调控主要发生在转录水平,可诱导肝细胞糖异生关键酶组,包括PEPCK、G6-P酶和FBP酶,从而引起肝糖输出增加^[16]。本研究结果显示,在3周龄时,IUGR

鼠肝脏中糖异生关键酶 PEPCK 的表达已经略高于正常对照,成年后 PEPCK 的 mRNA 表达增高更加明显,约是对照组的 2.6 倍。糖异生的最后一步限速酶 G6-P 酶的 mRNA 含量则自幼年就明显高于对照组,至成年后增高更加显著,达到对照组的 3.2 倍。而且 PEPCK 和 G6-P 酶的 mRNA 表达增加与 PGC-1 的 mRNA 水平升高显示高度正相关。肝细胞中的 PEPCK 和 G6-P 酶表达过高,在三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)的参加下可以催化更多的草酰乙酸生成磷酸烯醇丙酮酸,再经甘油异生糖的途径,最后生成的葡萄糖-6-磷酸在 G6-P 酶的催化下水解,生成葡萄糖,从而使肝脏的葡萄糖输出增多,促进血糖升高。

综上所述,不良的宫内环境可导致胎鼠肝脏糖代谢发生永久性变化, IUGR 导致子鼠肝脏中 PGC-1 α 蛋白表达增加, PGC-1 α 诱导糖异生关键酶 PEPCK 和 G6-P 酶的表达,增加肝糖输出,以保证重要脏器的发育,这种病理生理改变出生后持续存在,促进了机体胰岛素抵抗,导致成年糖尿病发生^[17]。

[参 考 文 献]

[1] Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis [J]. Br Med Bull, 2001, 60:5-20.

[2] Phillips DI, Barker DJ, Hales CN, Hirst S, Osmond C. Thinness at birth and insulin resistance in adult life [J]. Diabetologia, 1994, 37(2):150-154.

[3] Song S, Andrikopoulos S, Filippis C, Thorburn AW, Khan D, Proietto J. Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis; effect of metformin [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001, 281(2):275-282.

[4] Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1 [J]. Nature, 2001, 413 (6852):131-138.

[5] Desai M, Gayle D, Babu J, Ross M G. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns; modulation by newborn nutrition [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 288 (2): 91-96.

[6] Ibanez L, Ong K, Dunger DB, Francis de Zegher. Early development of adiposity and insulin resistance after catch-up weight gain in small-for-gestational-age children [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(6): 2153-2158.

[7] Bazaes RA, Alegria A, Pittaluga E, Avila A, Iniguez G, Mericq V. Determinants of insulin sensitivity and secretion in very-low-birth-weight children [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89 (3): 1267-1272.

[8] Ong K, Ahmed ML, Emmett PM, Michael A, David P, Dunger B. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study [J]. BMJ, 2000, 320 (7240):967-971.

[9] Osmand C, Barker DJ. Fetal, infant and childhood growth are predictor of coronary heart disease, diabetes and hypertension in adult man and women [J]. Environ Health Perspect, 2000, 108 (Suppl 3):545-553.

[10] Bjorntorp P, Rosmond R. Visceral obesity and diabetes [J]. Drugs, 1999, 58(S1): 13-18.

[11] Vuguin P, Raab E, Liu B, Barzilai N, Simmons R. Hepatic insulin resistance precedes the development of diabetes in a model of intrauterine growth retardation [J]. Diabetes, 2004, 53 (10): 2617-2622.

[12] Chen L, Nyomba BL. Whole body insulin resistance in rat offspring of mothers consuming alcohol during pregnancy or lactation; comparing prenatal and postnatal exposure [J]. J Appl Physiol, 2004, 96(1): 167-172.

[13] Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR [J]. Diabetes, 2003, 52(3):642-649.

[14] Yoon JC, Xu G, Deeney JT, Yang SN, Rhee J, Puigserver P, et al. Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1 α [J]. Dev Cell, 2003, 5(1):73-83.

[15] Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction [J]. Nature, 2003, 423 (6939):550-555.

[16] Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, et al. Regulation of hepatic fasting response by PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1): Requirement for hepatocyte nuclear factor 4 α in gluconeogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(7): 4012-4017.

[17] 黄婷婷,丘小汕,沈振宇,何志勇,赖峰. IUGR 大鼠胰岛素样生长因子与小肠及体格发育关系的研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(6):515-518.

(本文编辑:吉耕中)