

论著·实验研究

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

刘晓梅¹, 焦伊胜², 潘莉莉³, 卢岩¹, 李书琴¹

(中国医科大学附属盛京医院 1. 实验研究中心; 2. 妇产科; 3. 检验科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 研究宫内生长受限(IUGR)成年子鼠肝脏中受体后胰岛素信号传导通路分子的表达变化, 探讨 IUGR 个体发生 2 型糖尿病的分子机制。方法 通过低蛋白饮食法建立大鼠 IUGR 模型, 采用 Western blot 检测雄性子鼠(8周)基础状态下肝脏中胰岛素受体底物(IRS)2、磷酸肌醇-3-激酶(PI-3K)、糖原合成酶激酶(GSK)3 β 的蛋白表达水平, 以及胰岛素刺激后蛋白激酶 B(PKB)的磷酸化水平变化。结果 基础状态下, IUGR 成年子鼠肝脏 IRS-2 的蛋白表达与正常对照差异无显著性, PI-3K 的催化亚单位 p110 的蛋白表达比对照组明显降低; 而 GSK-3 β 蛋白含量比对照组明显增加, 差异均有显著性($P < 0.01$)。基础状态和胰岛素刺激状态下, IUGR 组肝脏 PKB 和磷酸化的 PKB-Ser473 表达水平都明显低于对照组($P < 0.01$), 胰岛素刺激后, 对照组肝脏磷酸化的 PKB-Ser473 表达明显增加, 是基础状态的 182% ($P < 0.01$), 而 IUGR 组肝脏磷酸化的 PKB-Ser473 的增加幅度较小, 仅是基础状态的 123% ($P < 0.05$)。结论 宫内蛋白营养不良造成的 IUGR 鼠机体胰岛素抵抗的发生可能与肝脏中 PI-3K 和其下游靶蛋白 PKB 的表达和活性降低, 以及 GSK-3 β 的表达增高有关。

[中国当代儿科杂志, 2009, 11(3): 221-224]

[关键词] 宫内生长受限; 胰岛素抵抗; 信号传导; 磷酸肌醇-3-激酶; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)03-0221-04

Perturbed hepatic phosphoinositol 3-kinase signaling pathway in the rat with intrauterine growth restriction

LIU Xiao-Mei, JIAO Yi-Sheng, PAN Li-Li, LU Yan, LI Shu-Qin. Experiment Research Center, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Li S-Q, Email: lisq@cmu2h.com)

Abstract: Objective To determine the molecular mechanisms linking intrauterine growth restriction (IUGR) to adult type 2 diabetes mellitus, the effect of IUGR on the hepatic post-receptor insulin-signaling pathway was investigated in the adult offspring. **Methods** The IUGR model was prepared by maternal protein-malnutrition. Western blotting analysis was undertaken to assess hepatic expression of insulin receptor substrate (IRS-2), phosphoinositol 3-kinase (PI-3K), protein kinase B (PKB), phosphorylated PKB-Ser473 and glycogen synthase kinase (GSK) 3 in 8-week-old male IUGR rats. **Results** The basal levels of PI-3K protein decreased in IUGR rats compared with normal controls ($P < 0.01$), whereas GSK-3 β protein level significantly increased in IUGR rats ($P < 0.01$). Both PKB and phosphorylated PKB-Ser473 protein levels significantly decreased in the liver of IUGR rats compared with normal controls ($P < 0.01$). After insulin administration, phosphorylated PKB-Ser473 significantly increased to 182% of basal level in control rats ($P < 0.01$); However, phosphorylation of PKB which responded to insulin was markedly blunted in IUGR rats compared with controls and only increased to 123% of basal level ($P < 0.05$). **Conclusions** The level of PI-3K and PKB and phosphorylated PKB-Ser473 expression decreased in the liver of IUGR rats, whereas the levels of GSK-3 β protein increased. It may contribute to the pathogenesis of insulin resistance in the IUGR rats.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(3): 221-224]

Key words: Intrauterine growth restriction; Insulin resistance; Signal transduction; Phosphoinositol 3-kinase; Rats

代谢综合征的发生在全球范围内呈逐年上升的趋势, 胎儿宫内生长受限(intrauterine growth restriction, IUGR)是成年胰岛素抵抗和 2 型糖尿病等代

谢综合征的重要的危险因素, 阐明其发生的机制有可能对 IUGR 进行早期干预, 减少其成年期代谢性疾病的发生。胰岛素抵抗是指机体组织或靶细胞对

[收稿日期] 2008-04-10; [修回日期] 2008-05-14

[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, 女, 教授, 中国医科大学附属盛京医院实验研究中心, 邮编 110004。

胰岛素的敏感性和反应性降低,目前研究表明,受体后缺陷—胰岛素与受体结合后信号传导过程障碍,是胰岛素抵抗的主要发生机制^[1]。肝脏中磷酸肌醇-3-激酶(phosphoinositol 3-kinase,PI-3K)信号通路是实现胰岛素代谢效应的主要途径,该通路任何一个环节出现异常,都可以出现葡萄糖转运和代谢的异常,导致胰岛素抵抗的发生^[2]。本课题采用母鼠低蛋白饮食法制作大鼠IUGR模型,以成年(8周)雄性子鼠为研究对象,检测肝脏中PI3-K信号通路分子包括胰岛素受体底物(insulin receptor substrates,IRS)2、PI-3K、蛋白激酶B(protein kinase B,PKB)、糖原合成酶激酶(glycogen synthase kinase,GSK)3等的蛋白表达和磷酸化水平变化,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 实验药品与试剂

组织蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物公司,抗IRS-2、PI-3Kp110和GSK-3β的IgG(Santa Cruz,美国),PKB和磷酸化PKB(Ser473)兔抗小鼠IgG(Cell Signaling Technology,美国),碱磷酶标记的山羊抗兔IgG、马抗小鼠IgG(Sigma,美国),短效胰岛素诺和灵R(诺和诺得,丹麦)。

1.2 实验动物与分组

清洁级雌性Wistar大鼠16只(中国医科大学实验动物中心提供),体重230~280g,按4:1雌雄比合笼后,次日晨阴道涂片镜检,发现精子为妊娠第1天,孕鼠随机分为两组,每组8只。正常对照组孕鼠饲以标准饲料(蛋白质23%),IUGR组孕鼠自受孕第1日饲以同热卡的低蛋白饲料(蛋白质8%)直至自然分娩^[3]。每窝超过10只者舍弃部分鼠仔,使控制在8~10只。分娩后母鼠都饲以标准饲料,满3周断乳,子鼠饲以标准饲料。8周龄时空腹12h后,两组各自取16只雄性子鼠随机分为基础状态(INS-)和胰岛素刺激状态(INS+)两组,INS+组腹腔注射稀释好的胰岛素溶液8U/kg,20min后处死,取肝脏液氮中速冻后于-70℃保存。INS-组腹腔注射同样剂量的生理盐水后,进行相同的处置。

1.3 肝脏胰岛素信号传导分子的蛋白表达检测

1.3.1 肝组织总蛋白提取 按照试剂盒说明操作。取样品20μL采用Lowry法进行蛋白定量,以浓度最低管为基准,调节蛋白浓度。取50μg蛋白样品,加入10μL的5×样品缓冲液,100℃煮沸

4min待用。

1.3.2 Western blot 检测 采用5% SDS-PAGE浓缩胶电泳1h,再经不同浓度(6%~10%)的分离胶电泳分离蛋白条带,然后100V电压转印40~90min,用5%牛血清白蛋白室温封闭NC膜2h,洗膜后在针对各个蛋白的特异性的一抗(1:100~1:200)溶液中4℃过夜杂交,再将NC膜转移到碱性磷酸酶标记的与一抗种属对应的二抗溶液(1:1000~1:2000)中杂交反应2h,加入新鲜配制的显色液显色至条带清晰呈现后终止染色,用GIS-2020数码图像分析软件分析图像,检测蛋白条带密度。

1.4 统计学分析

数据结果用均数±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, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 肝脏IRS-2、PI-3K和GSK-3β的蛋白表达变化

Western blot结果显示,8周时IUGR组大鼠肝脏IRS-2的蛋白表达密度值与正常对照组差异无显著性。PI-3K的催化亚单位p110的蛋白表达明显降低,与对照组比较差异有显著性($t = 5.217$, $P < 0.01$)。与之相反,IUGR组大鼠肝脏中GSK-3β的蛋白表达增加,与对照组比较差异有显著性意义($t = 5.486$, $P < 0.01$)。Western blot结果见图1,统计分析结果见图2。

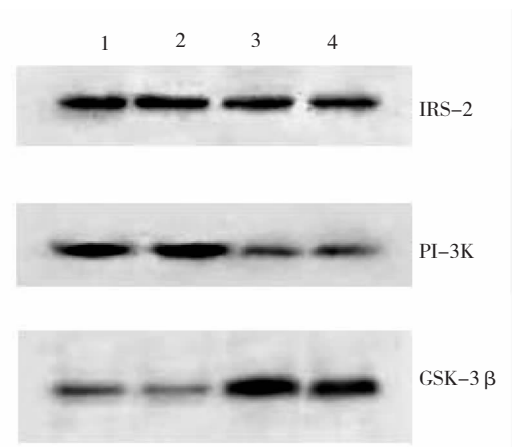


图1 Western blot 检测肝脏PI-3K等蛋白的表达
从左至右:1~2 对照组;3~4 IUGR组。

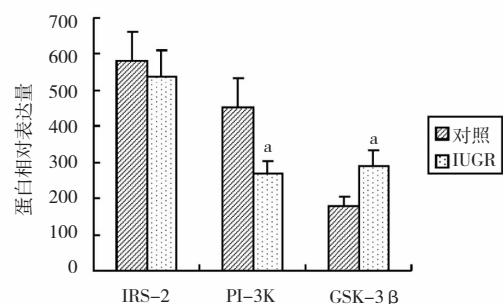


图2 肝脏 IRS-2, PI-3K 和 GSK-3 β 的蛋白表达
a: 与对照组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 肝脏 PKB 的蛋白表达及磷酸化水平的变化

8周时在基础状态(INS-)下,IUGR组与对照组相比,肝脏中PKB和磷酸化的PKB-Ser473蛋白表达都明显降低,其中PKB蛋白表达量,IUGR组仅是对照组的52% ($t = 10.372, P < 0.01$),磷酸化的PKB-Ser473 IUGR组约是对照组的38% ($t = 6.689, P < 0.01$)。胰岛素刺激状态(INS+)下,与对照组相比,IUGR组肝脏磷酸化的PKB-Ser473的表达轻度增加,仅是基础状态下的123% ($t = 2.262, P < 0.05$);而对照组肝脏磷酸化的PKB-Ser473表达明显增加,是基础状态下的182% ($t = 5.61, P < 0.01$)。IUGR组肝脏磷酸化的PKB-Ser473的表达始终低于对照组,胰岛素刺激状态下是对照组的25% ($t = 8.399, P < 0.01$)。Western blot结果见图3,统计分析结果见图4。

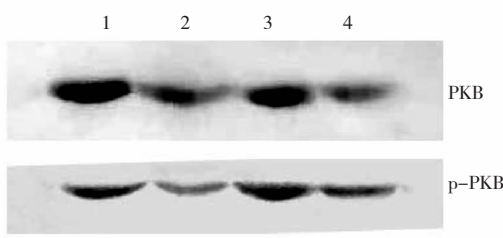


图3 Western blot 检测肝脏 PKB 及 p-PKB 蛋白的表达
从左至右:1. 对照组 INS-; 2. IUGR 组 INS-; 3. 对照组 INS+; 4. IUGR 组 INS+。

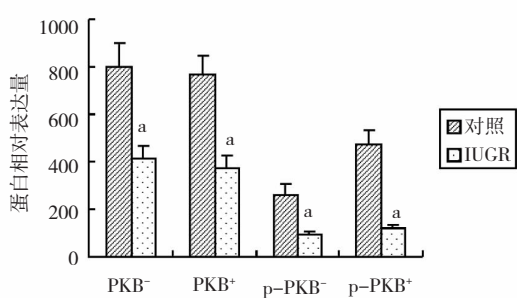


图4 肝脏 PKB 和磷酸化 PKB-Ser473 的蛋白表达
a: 与对照组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

不利的子宫环境如孕期蛋白营养不良、吸烟、酗酒和饥饿等是引起 IUGR 的重要因素。流行病学和动物实验均证明 IUGR 可引起成年胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的发生^[4,6]。本研究采用妊娠期蛋白质营养不良法建立大鼠 IUGR 模型。研究发现 IUGR 子鼠成年后(8 周)空腹血清胰岛素浓度升高,胰岛素抵抗指数增加,证实蛋白营养不良造成的 IUGR 大鼠机体存在胰岛素抵抗^[7]。胰岛素抵抗与其信号转导和效应的各个环节的多种基因的遗传变异和功能改变相关。胰岛素信号转导主要有 3 条途径,分别是 PI-3K 途径、丝裂原激活蛋白激酶(mitogen activator protein kinase, MAPK)途径和 CAP/Cb1/ Tc10 途径。其中 PI-3K 途径是实现胰岛素代谢效应的主要信号通路,胰岛素受体激活后,可使 IRS 1/2 的酪氨酸残基磷酸化,磷酸化 IRS 与 PI-3K 的 p85 亚单位结合并激活 PI-3K 的 p110 亚单位,活化的 PI-3K 可通过一系列级联反应激活 PKB,PKB 激活后使肝脏中糖原合成酶激酶(GSK) 3 丝氨酸残基磷酸化而失活,加速糖原合成,从而调节葡萄糖的代谢^[8,9]。

IRS 家族在肝脏中发挥生理效应上的主要是 IRS-2,研究发现在 2 型糖尿病模型鼠的肝脏中,IRS-2 的蛋白含量和活性显著降低;IRS-2 基因敲除的小鼠也出现中重度胰岛素抵抗,表现出明显糖尿病症状^[10,11]。本实验结果显示 IUGR 鼠肝脏的 IRS-2 的蛋白含量与对照组无明显差别。可能 IRS-2 不参与 IUGR 机体胰岛素抵抗,有必要进一步研究 IRS 家族其他成员的变化。

PI-3K 与胰岛素抵抗密切相关,在肥胖、胰岛素抵抗和糖尿病状态下,PI-3K 活性及含量均有改变。本研究结果显示 IUGR 鼠肝脏的 PI-3K 的蛋白含量与对照组比较明显降低,并对其下游靶蛋白 PKB 的表达和活性产生影响。基础状态下,IUGR 大鼠肝脏 PKB 蛋白含量明显降低,仅是对照组的 52%;磷酸化的 PKB 的水平也明显降低,约是对照组的 38%;胰岛素刺激后,IUGR 组肝脏磷酸化的 PKB 增加幅度明显低于对照组。以上结果说明,IUGR 大鼠肝脏中 PI-3K 和 PKB 的含量和活性均降低,并对胰岛素刺激的敏感性降低。

胰岛素刺激糖原合成主要是由 GSK-3 介导的。GSK-3 可抑制糖原合成酶的活性,还能调节糖异生途径中的限速酶磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(phosphoenol-pyruvate carboxykinase, PEPCK)和葡萄糖 6

磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6Pase) 的基因表达,所以 GSK-3 可以从糖原合成和糖异生等多个方面影响胰岛素的作用,参与胰岛素抵抗^[12,13]。动物实验已证实选择性抑制 GSK-3 可降低糖尿病小鼠的血糖,促进组织中糖原合成,改善糖耐量^[14]。本研究发现,IUGR 大鼠肝脏中 GSK-3 β 的蛋白含量明显增加,作为胰岛素作用的负性调控因子,它的表达增高可导致肝脏糖原合成酶磷酸化增加而失活,从而抑制肝糖原合成^[15]。

综上所述,宫内蛋白营养不良造成大鼠肝脏中 PI-3K 的蛋白表达下降,引起其下游靶蛋白 PKB 的表达水平和活性降低,进而对 GSK-3 β 的抑制作用减弱,GSK-3 表达增高可抑制肝糖原的合成,增加肝葡萄糖输出,促进空腹血糖升高。PI-3K 信号传导通路的分子异常可能构成了 IUGR 大鼠肝脏胰岛素抵抗的分子基础。

[参 考 文 献]

[1] 李静,华琦. 胰岛素抵抗[M].//张建,华琦,李静. 代谢综合征. 北京:人民卫生出版社,2003,64-72.

[2] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. Science, 2002, 296: (5573): 1655-1657.

[3] Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns; modulation by newborn nutrition[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 288 (1):R91-96.

[4] Ibáñez L, Ong K, Dunger DB, de Zegher F. 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.

[5] Matharu K, Ozanne SE. The fetal origins of disease and associations with low birthweight[J]. NeoReviews, 2004, 5(12): 522-526.

[6] 刘军,丘小汕,张怡坚,杜敏联,郑树森. 高蛋白质喂养对生后早期营养不良的宫内生长迟缓大鼠糖代谢的远期影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(4):294-296.

[7] 刘晓梅,卢岩,潘莉莉,李书琴. 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[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(2):216-220.

[8] Kido Y, Nakae J, Accili D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86 (3):972-979.

[9] Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signaling: a hard Akt to follow[J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26 (11):657-664.

[10] Suzuki R, Tobe K, Aoyama M, Inoue A, Sakamoto K, Yamauchi T, et al . Both insulin signaling defects in the liver and obesity contribute to insulin resistance and cause diabetes in Irs2 (-/-) mice[J]. J Biol Chem, 2004, 279(24):25039-25049.

[11] White MF. IRS proteins and the common path to diabetes[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002, 283(3):413-422.

[12] Kaidanovich O, Eldar-Finkelman H. The role of glycogensynthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes[J]. Export Opin Ther Targets, 2002, 6(5): 555-561.

[13] Lochhead PA, Coghlan M, Rice SQJ, Sutherland C. Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression[J]. Diabetes, 2001, 50 (5):937-946.

[14] Kaidanovich-Beilin O, Eldar-Finkelman H. Long-term treatment with novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor improves glucose homeostasis in ob/ob mice; molecular characterization in liver and muscle [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316(1):17-24.

[15] Plotkin B, Kaidanovich O, Talior I, Finkelman HE. Insulin mimetic action of synthetic phosphorylated peptide inhibitors of glycogen synthase kinase-3 [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 305 (3):974-980.

(本文编辑:吉耕中)