

高脂诱导糖耐量低减大鼠模型骨骼肌中相关蛋白的表达

姜广坤, 肖洪彬, 李凤金, 牛雯颖, 李雨庭, 宋颖星, 张广庆, 郑慧娟, 马伯艳*
(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**研究 45% 高脂饲料长程喂养复制糖耐量低减(IGT)大鼠骨骼肌中磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K), 蛋白激酶 B (PKB), 糖原合成酶激酶 3 (GSK-3 β)、葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT-4) 的蛋白表达, 探讨该模型产生糖耐量低减的分子机制。**方法:**20 只 SD 大鼠随机分为 2 组, 分别为正常组和模型组, 正常组给予 10% 热量比对照饲料, 模型组给予 45% 热量比高脂饲料喂养 20 周建立 IGT 大鼠模型, 分别取骨骼肌采用免疫组化法测定 PI3K 蛋白含量, Western blot 法检测 PKB, GSK-3 β , GLUT-4 蛋白表达, Real Time-PCR 法检测 IGT 大鼠骨骼肌中 GLUT-4 蛋白相对含量。**结果:**与正常组比较, IGT 组骨骼肌 PI3K, PKB, 蛋白表达均显著降低($P < 0.01$), GSK-3 β 蛋白表达明显升高($P < 0.01$), IGT 模型大鼠骨骼肌中 GLUT-4 mRNA 的表达降低, 但与正常组比较无统计学差异。**结论:**45% 高脂饲料长程喂养建立的 IGT 模型骨骼肌 PI3K, PKB, GSK-3 β , GLUT-4 蛋白表达发生明显的变化, 这可能是该种造模方式导致 IGT 发生的分子机制之一。

[关键词] 糖耐量低减; 磷脂酰肌醇 3 激酶; 蛋白激酶 B; 糖原合成酶激酶 3; 葡萄糖转运蛋白 4

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0183-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210183

Experiment on Protein Expression in Skeletal Muscle of Rats with Impaired Glucose Tolerance

JIANG Guang-kun, XIAO Hong-bin, LI Feng-jin, NIU Wen-ying, LI Yu-ting,
SONG Ying-xing, ZHANG Guang-qin, ZHENG Hui-juan, MA Bo-yan*
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the molecular mechanisms of impaired glucose tolerance (IGT) development induced by long term high-fat diet by investigating the protein expressions of phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) /protein kinase B (PKB) /glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) /glucose transporter-4 (GLUT-4) in the rat skeletal muscle with IGT. **Method:** The IGT rat model was replicated by being fed with high fat diet with 45% lipid energy for twenty weeks. The protein concentration of PI3K in the skeletal muscle was examined by immunohistochemical staining, the protein expressions of PKB/GSK-3 β /GLUT-4 were detected by Western Blot, and the relative amount of GLUT-4 protein in IGT rats skeletal muscle tissue was tested by Real Time-PCR. **Result:** Compared to the control group, the protein expressions of PI3K/PKB in skeletal muscle of IGT group were all decreased, the protein expressions of GSK-3 β was obviously increased ($P < 0.01$). The mRNA expression of GLUT-4 in IGT group was decreased as compared with the control group, but there was no significant difference. **Conclusion:** The protein expressions of PKB/GSK-3 β /GLUT-4 in skeletal muscle of IGT rats

[收稿日期] 20140625(006)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81102545);黑龙江省自然科学基金(D201263);黑龙江中医药大学优秀创新人才计划项目

[第一作者] 姜广坤, 博士, 实验师, 从事方剂配伍规律及方剂疗效客观化研究, Tel:0451-82196204, E-mail:54430070@qq.com

[通讯作者] * 马伯艳, 博士, 副教授, 从事温病学理法方药防治代谢综合征相关研究, Tel:0451-82196296, E-mail:zymaboyan@163.com

established by long-term high fat diet with 45% lipid energy are obviously changed, which seems to be one of the molecular mechanisms for IGT in this model formation.

[Key words] impaired glucose tolerance; rat model; phosphatidyl inositol 3-kinase; protein kinase B; glycogen synthase kinase-3 β ; glucose transporter-4

糖耐量低减(impaired glucose tolerance, IGT)是机体的糖代谢处于正常和糖尿病之间的过渡状态,是 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的前期阶段^[1-2],且 IGT 患病率略高于糖尿病,并呈逐年上升趋势。目前,IGT 机制不甚明确,但多数学者倾向于现有胰岛素抵抗(insulin resistance, IR),随之出现的 β 细胞功能缺陷。胰岛素代谢功能主要通过磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(PKB)通路,活化 PI3K,PKB 促进葡萄糖转运蛋白 4(GLUT-4)转位和糖原合成酶激酶 3(GSK-3 β)的去磷酸化,进而促进葡萄糖的摄取和糖原合成。课题组以 45% 高脂饲料喂养大鼠 20 周成功建立 IGT 大鼠模型,本实验旨在深入观察 IGT 模型大鼠骨骼肌中的 PI3K,PKB,GSK-3 β ,GLUT-4 蛋白表达,进而探讨该模型 IGT 产生的丝/苏氨酸激酶通路机制。

1 材料

1.1 动物 20 只 4~6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,由黑龙江中医药大学 GLP 中心提供,动物合格证号 SCXK(黑)2013-004,体质量 200~220 g。

1.2 试剂 AKT 一抗(美国 Cell Singaling 公司,批号 4060),GSK-3 β 一抗(美国 Cell Singaling 公司,批号 9322),GLUT-4 一抗(美国 Cell Singaling 公司,批号 2213),山羊抗兔二抗 HRP-Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(北京赛诺博生物技术中心,批号 S001F),GAPDH(北京赛诺博生物技术中心,批号 TDY042C),UltraSYBR Mixture(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 CW0957)。

1.3 仪器 2135 型切片机(德国莱卡),Mini-PROTEAN Tetra 电泳及转膜设备(美国 Bio-Rad 公司),IQ5 型荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组、模型复制及 IGT 模型判定标准 随机分为 45% 高脂饲料组(IGT 组)和 10% 正常饲料组(正常组),每组 10 只。IGT 组给予 45% 热量比高脂饲料,对照组给予 10% 热量比对照饲料(饲料由江苏美迪森生物医药有限公司生产提供,具体饲料配方见表 1)。IGT 组大鼠按平均 10 g 每只给予 45% 热量比高脂饲料,对照组大鼠按平均 5 g 每只饲料量给予 10% 热量比对照饲料。每日固定时间投食,给

水,不限饮水量,次日投食前回收前日剩余饲料及饮水,计算大鼠进食、饮水情况。复制模型期间上述大鼠至于 12 h 明暗交替环境,室内温度控制在 25~27 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度保持为 50%~70%。持续喂养 20 周。根据美国糖尿病协会 2006 年标准^[3]:空腹血糖 $>5.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,口服葡萄糖耐量试验 2 h 后血糖水平在 7.8~11.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,即 IGT 造模成功。正常组空腹血糖 $<5.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及餐后 2 h 血糖 $<7.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 1 IGT 大鼠模型复制所用饲料配方质量(gm)与热量(kcal)对比 %

组别	与热量(kcal)对比 %					
	脂肪		蛋白质		碳水化合物	
	gm	kcal	gm	kcal	gm	kcal
高脂饲料	24	45	24	20	41	35
正常饲料	4.3	10	19.2	20	67.3	70

2.2 免疫组化法^[4]检测大鼠骨骼肌 PI3K 相对含量 骨骼肌组织修块后,经脱水、透明、浸蜡、包埋后,采用 PV 二步法免疫组化染色, Motoc3000 显微摄影系统于 400 倍下摄片,采用 Image-Pro Plus6.0 病理图像分析系统对阳性表达进行分析,以积分吸光度(IA)代表蛋白相对表达量,IA = 阳性面积 \times 平均吸光度,每组随机分析 8 个高倍镜视野倍。染色结果细胞核呈蓝色,蛋白表达位于细胞质中,阳性为黄色或黄棕色。

2.3 Western blot 法^[5]检测大鼠骨骼肌 PKB,GSK-3 β ,GLUT-4 磷酸化水平 每组分别取 6 只大鼠骨骼肌,用电动匀浆器粉碎,冰浴上裂解蛋白,BCA 蛋白定量。SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白(4% 浓缩胶 80 V,12% 分离胶 120 V),蛋白上样量为 40 μg 。200 mA,90 min 转至 NC 膜上,BSA 封闭 30 min,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日,洗膜 3 次,每次 5 min,TBST 稀释二抗,室温孵育 1 200 min,洗膜 3 次,每次 5 min,滴加 Ecl 发光液,拍照,使用 QuantityOne 软件进行图像吸光度分析,将样品条带与内参条带吸光度进行比较,计算出目的条带相对表达量。

2.4 Real Time-PCR 法^[6]检测 IGT 大鼠骨骼肌中 GLUT-4 mRNA 表达 骨骼肌组织按 Trizol Reagent 试剂盒说明书要求提取总 RNA,逆转录合成第一链

cDNA,采用 PCR 方法扩增目的基因片段。引物由北京康为世纪生物科技有限公司合成。GLUT-4 引物序列 Rat-GLUT-4-F 为 5-GCTTCTGTT GCCCTTCT-GTC-3, Rat-GLUT-4-R 为 5-TGGACGC TCTCTTTC-CAACT-3, 用 UltraSYBR Mixture (NO Rox) 进行扩增,实验操作按产品说明书进行。扩增程序为 95 °C 10 min, (95 °C 15 s, 60 °C 60 s) × 40 个循环。取 2 μL 的 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳。用 Roche LC-480 II 型荧光定量 PCR 仪, 采用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法进行数据的相对定量分析。根据 Real-time PCR 原始检测结果, 按照 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 相对定量计算公式, 即

$$\Delta\Delta ct = [(\text{待检样品目的基因平均 } ct - \text{待检样品自家基因平均 } ct) - (\text{对照组目的基因平均 } ct - \text{对照组看家基因平均 } ct)]$$

$$F = 2^{-\Delta\Delta ct}$$

计算出各样品的目的基因相对定量结果, 即其他各个样品相对于对照样品。

2.5 统计方法 数据采用 SPSS 16.0 软件进行分析处理, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

3 结果

3.1 IGT 模型大鼠骨骼肌中 PI3K 含量 免疫组化染色后, 黄色或棕黄色属阳性表达, 经免疫组化法测定, IGT 大鼠骨骼肌中 PI3K 的 IA 明显低于对照组, 两者比较有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 1 及表 2。

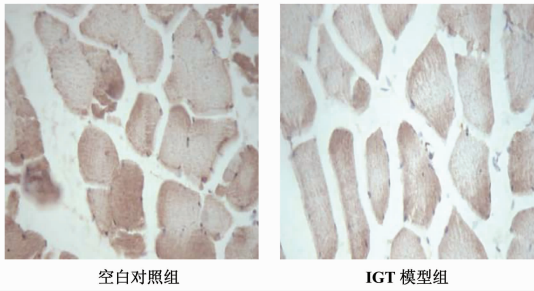


图 1 IGT 模型大鼠骨骼肌中 PI3K 的变化 (组化染色, 400 ×)

表 2 IGT 模型大鼠骨骼肌中 PI3K 的 IA ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	IA
正常	7 203.3 ± 454.8
IGT 模型	3 336.7 ± 402.8 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.2 IGT 模型大鼠骨骼肌中 PKB, GSK-3β, GLUT-4 的蛋白表达 Western blot 法检测 IGT 大鼠骨骼肌中 PKB 蛋白表达与正常组比较明显降低 ($P < 0.01$); IGT 大鼠骨骼肌中 GSK-3β 蛋白表达与正常组比较明显升高 ($P < 0.01$); IGT 大鼠骨骼肌中

GLUT-4 蛋白表达与正常组比较明显降低 ($P < 0.01$)。见图 2 及表 3。

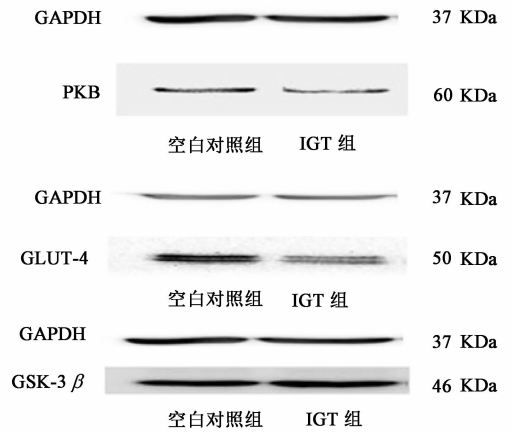


图 2 IGT 模型大鼠骨骼肌中 PKB, GSK-3β, GLUT-4 蛋白表达

表 3 骨骼肌组织中 PKB, GSK-3β, GLUT-4 蛋白的相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	相对灰度值		
	PKB/GAPDH	GSK-3β/GAPDH	GLUT-4/GAPDH
正常	0.31 ± 0.02	0.84 ± 0.02	4.70 ± 0.20
IGT 模型	0.24 ± 0.01 ²⁾	1.00 ± 0.04 ²⁾	1.73 ± 0.10 ²⁾

3.3 IGT 模型大鼠骨骼肌中 GLUT-4 mRNA 的表达

RNA 样品经琼脂糖凝胶电泳后, 紫外灯下观察可以看到 3 条清晰的 5, 18, 28 S 处条带, 表明 RNA 样品保持完好, 未被降解。Real Time-PCR 法检测 IGT 大鼠骨骼肌中 GLUT-4 mRNA 的表达, 与正常组比较有升高趋势, 但无显著差异。见图 3 及表 4。

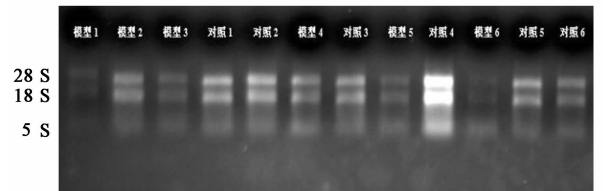


图 3 骨骼肌组织中 GLUT-4 mRNA 电泳表达的变化

表 4 骨骼肌组织中 GLUT-4 mRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$2^{-\Delta\Delta ct}$
正常	1.00 ± 0.14
IGT 模型	1.18 ± 0.06

4 讨论

IGT 基本病理生理改变为胰岛素绝对或相对不足及胰岛素作用减低, 即胰岛素靶组织对胰岛素的抵抗, 由此而引起机体一系列的代谢紊乱, 其中主要表现为胰岛素分泌第一时相的降低或消失和血糖诱

导的胰岛素分泌反应的延缓以及外周胰岛素抵抗^[7]。

丝/苏氨酸激酶通路主要负责由 PI3K 始动的生物信息的传导,PKB 处于这一通路的中心环节,它在细胞代谢、细胞周期调控、细胞生长凋亡等多种生物学过程中发挥着重要作用。PI3K 激活 PKB 后,通过糖原合成酶激酶 3 (GSK-3) 促进糖原合成。GSK-3 是第一个被发现的 PKB/Akt 的生理底物,PI3K,PKB 和 GSK-3 形成了胰岛素调节糖原合成的信号级联系统中的一个重要支路^[8],活化的 PI3K,PKB 促进 GLUT4 转位和 GSK-3 的去磷酸化,进而促进葡萄糖的摄取和糖原的合成^[9]。

本实验中,IGT 大鼠与正常对照组大鼠比较,PI3K,PKB, GLUT-4 蛋白表达明显降低,GSK-3 蛋白表达明显增高, GLUT-4 基因表达无变化。PI3K,PKB 蛋白磷酸化表达降低,使 GSK-3 的磷酸化水平降低,从而引起 GSK-3 蛋白表达异常升高^[10]。GSK-3 表达升高,可使糖原合成降低,并使 IRS-1 磷酸化减少,抑制胰岛素信号传导,降低葡萄糖转运,从而使细胞膜上 GLUT-4 的蛋白表达降低,使血糖升高,进而产生骨骼肌 IR^[11]。可见,PI3K,PKB, GSK 通路在胰岛素介导的能量代谢功能中发挥主要作用,其传导机制相当复杂,任何一个步骤出现障碍,都会导致机体出现胰岛素抵抗或糖尿病^[12]。

Real Time-PCR 法检测 IGT 大鼠骨骼肌中 GLUT-4 mRNA 的表达,与正常组比较有升高趋势,但无显著差异,这与其蛋白表达结果不相一致。分析其原因可能与以下原因有关:首先,可能是真核基因表达的转录和翻译发生的时间和位点存在时空间隔;其次,mRNA 在转录后,又会有转录后加工,转录产物的降解、翻译、翻译后加工及修饰多个层面。所以从转录水平和翻译水平并不完全一致;再次因为检测的时间点不同,可能在蛋白达到峰值的时候 mRNA 已经降解了或者在 mRNA 达到峰值的时候蛋白量还在增加中^[13]。

综上所述,本实验中采取长程 45% 高脂饮食喂养诱导所形成的大鼠 IGT,可能与其骨骼肌存在 IR 有关,而其机制可能与丝/苏氨酸激酶通路中 PI3K,PKB,GSK-3 β ,GLUT-4 蛋白表达变化有关。

[参考文献]

- [1] 李津,冯前进,宋强,等. 复方葛根胶囊对葡萄糖耐量减低小鼠糖耐量及胰岛素抵抗干预作用的研究[J]. 中华中医药杂志,2014,4(29):1061.
- [2] 杨瑞玲,杨时洪,刘建华,等. 糖耐量减低患者血管内皮舒张功能的超声评价[J]. 西部医学,2014,4(26):494.
- [3] 刘晓云,杨涛. 2011 年美国糖尿病学会糖尿病医学诊治标准解读[J]. 中国医学前沿杂志,2011,4(3):9.
- [4] 张明军. 运动对 RBP4 诱导的胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 PI3-K 表达的影响[J]. 天津体育学院学报,2010,6(25):482.
- [5] 陈广,陆付耳,王增四,等. 小檗碱改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗与 PI3K、GLUT4 蛋白相关性研究[J]. 中国药理学通报,2008,24(8):1007.
- [6] 肖方喜,孙晖,陈璐璐. 高脂喂养诱导大鼠骨骼肌胰岛素抵抗的机制研究[J]. 华中科技大学学报,2008,3(37):309.
- [7] 郑晓珂,王玮玮,冯卫生. 胰岛素 PI3K_PKB 信号转导通路研究进展[J]. 中国新药杂志,2012,21(23):2763.
- [8] 常盛. PI3K/Akt 信号通路与胰岛素抵抗的研究进展[J]. 中医药导报,2008,7(14):113.
- [9] Pearce N J, Arch J C, Clapham M P, et al. Development of glucose intolerance in male transgenic mice over expressing human glycogen synthase 3-kinase on amouse specific promoter [J]. Metabolism, 2004, 53(10):1322.
- [10] 杨运华. 运动对胰岛素抵抗状态下胰岛素 PI3K/Akt/GSK-3 信号转导通路影响的研究进展[J]. 长江大学学报,2013,21(10):142.
- [11] 陈梦华,凌宏艳,周寿红,等. 槟榔碱上调高果糖诱导胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 GLUT-4 和 p-PI3K 的表达[J]. 中南医学科学杂志,2012,2(40):17.
- [12] 詹巾卓,李娜,孙汇,等. PI-3K 转导通路在 II 型糖尿病发病机制中的研究进展[J]. 北华大学学报,2012,2(13):186.
- [13] Sousa Abreu R, Penalva L O, Marcotte E M, et al. Global signatures of protein and mRNA expression levels [J]. Mol Biosyst, 2009, 12(5):1512.

[责任编辑 周冰冰]