

• 基础研究 •

罗格列酮和二甲双胍治疗对胰岛素抵抗 KKAY 糖尿病小鼠肝及横纹肌组织 PTEN 蛋白表达的影响

曾静波, 李玉秀, 孙琦, 王 姮

【摘要】 目的 观察罗格列酮和二甲双胍治疗后胰岛素抵抗 KKAY 糖尿病小鼠肝及横纹肌组织 PTEN 蛋白表达的变化。方法 KKAY 小鼠制备糖尿病模型后随机分为未治疗组、罗格列酮治疗组及二甲双胍治疗组。C57BL 小鼠普通饲料喂养, 为对照组。4 周后处死小鼠, Western blot 检测肝及横纹肌 PTEN 蛋白、胰岛素刺激后磷酸化 473Akt 的表达并进行定量分析。结果 罗格列酮及二甲双胍处理后 KKAY 糖尿病小鼠肝及横纹肌组织磷酸 Akt 升高倍数与 KKAY 糖尿病小鼠相比均无明显变化 ($P>0.05$), 罗格列酮和二甲双胍处理后肝及骨骼肌 PTEN 蛋白表达与糖尿病未治疗组相比差异没有统计学意义 ($P>0.05$)。结论 罗格列酮和二甲双胍不会影响 PI3k-Akt 通路活性及 PTEN 蛋白的表达, 两者改善血糖和胰岛素抵抗可能与胰岛素敏感组织 PTEN 蛋白的表达无关。

【关键词】 KKAY 小鼠; 胰岛素抵抗; PTEN; PI3K-Akt; 罗格列酮; 二甲双胍**【中图分类号】** R335.6**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1671-5403(2010)-06-0529-04

Effects of rosiglitazone and metformin on PTEN protein expression in liver and skeletal muscles of insulin resistant diabetic KKAY mice

ZENG Jingbo, LI Yuxiu, SUN Qi, et al

Department of Endocrinology, Fuxing Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100038, China

【Abstract】 Objective To detect the effects of rosiglitazone and metformin on phosphatase and tension homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) protein expression in liver and skeletal muscle tissues of insulin resistant diabetic KKAY mice. Methods KKAY mice were fed high fat diet for 4 weeks to prepare diabetic models, which were then randomly divided into 3 groups: diabetic group, rosiglitazone treatment group [$12.5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], and metformin treatment group [$3 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]. C57BL mice of 16-week old, fed normal diet, served as control group. After 4 weeks, the mice were sacrificed. Expressions of PTEN protein and phosphoserine Akt in liver and skeletal muscle tissues were determined by Western blot and analyzed quantitatively by gel image analysis instrument. Results Insulin-induced phosphoserine Akt increase in liver and skeletal muscle tissues was not significantly different among rosiglitazone treatment group, metformin treatment group, and KKAY diabetic mice ($P>0.05$). PTEN protein expression in liver and skeletal muscle tissues was without significant difference among rosiglitazone treatment group, metformin treatment group, and KKAY diabetic mice ($P>0.05$). Conclusion Rosiglitazone and metformin may not exert any effect on the activity of PI3K-Akt pathway and PTEN protein expression. Their roles in improving insulin resistance and decreasing glucose may be not related with the PTEN expression in insulin sensitive tissue.

【Key words】 KKAY mice; insulin resistance; PTEN; PI3K-Akt; rosiglitazone; metformin

三磷酸肌醇激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)通路为胰岛素主要信号传导通路, 发生胰岛素抵抗时, PI3K-Akt 通路的活性降低^[1,2]。PTEN(phosphatase and tension homologue deleted on chromosome 10, 染色体 10 删除的强力同系物的物磷酸酶)

为一种脂质磷酸酶, 是一个很有效的 PI3K-Akt 通路的负性调节因子^[3-5]。我们已有的研究结果表明胰岛素抵抗糖尿病 KKAY 小鼠肝及横纹肌组织 PTEN 蛋白的表达增加^[6]。Lo 等^[7]研究了肥胖 Zucker 大鼠比目鱼肌 PTEN 的表达, 发现胰岛素抵

作者单位: 100038 北京市, 首都医科大学附属复兴医院内分泌科(曾静波); 100730 北京市, 中国医学科学院 中国协和医科大学 北京协和医院 内分泌科(李玉秀, 孙琦, 王姮)

通讯作者: 李玉秀, Tel: 010-65295358, E-mail: liyuxiu@medmail.com.cn

抗时 PTEN 的表达明显增加,但其机制不详。罗格列酮及二甲双胍均可改善胰岛素敏感性^[8,9]。罗格列酮可以快速上调细胞中 PTEN mRNA 水平和蛋白水平的表达^[10]。目前尚无罗格列酮及二甲双胍在组织水平对 PTEN 表达影响的报道。本研究通过观察胰岛素抵抗 KKAY 糖尿病小鼠罗格列酮和二甲双胍治疗后 PI3K-Akt 通路活性及 PTEN 表达的变化,探讨降糖治疗以及改善胰岛素敏感性对肝及横纹肌组织 PTEN 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及标本采集 实验动物均为雄性小鼠,购自中国医学科学院实验动物所,饲养在室温 22~25 ℃、湿度约 50% 的动物房中,每昼夜给予 12 h 光照和 12 h 黑暗。分为对照 C57BL/6 J 小鼠组和 KKAY 小鼠组,C57BL/6 J 小鼠普通饲料喂养至 16~18 周龄,处死取材;KKAY 小鼠普通饲料喂养至 12 周龄,随后高脂饲料(1.5% 胆固醇和 5% 动物油)喂养 4 周,测定尾静脉血糖(罗氏爱康全血糖仪),连续两次随机血糖大于 16.7 mmol/L 诊断为糖尿病。KKAY 糖尿病小鼠随机分为 3 组,一组不经任何处理,一组给予罗格列酮(4 mg/片,葛兰素史克公司赠送)12.5 mg/kg bid 灌胃,一组给予二甲双胍(粉剂,施贵宝公司赠送)3 g/kg bid 灌胃,治疗 4 周。实验动物均在处死前空腹 12 h,每组动物分别随机分为未用胰岛素处理组及胰岛素处理组,未用胰岛素处理组小鼠尾静脉血测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG),眼内眦静脉取血,留眦取血清 ELISA 法测定血胰岛素后处死;胰岛素处理组胰岛素处理前后尾静脉取血测血糖,腹腔注射胰岛素(5 mU/g)后 10 min 处死小鼠。各组小鼠在处死后即取肝组织、股四头肌。

1.2 试剂 小鼠胰岛素检测 ELISA 试剂盒购自 Linco 公司, PTEN 单克隆抗体及 Phospho-Akt (Ser473) 多克隆抗体均购自 Cell Signaling 公司。辣根酶标记的抗 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物技术公司。

1.3 组织蛋白提取及定量 50 mg 样本加组织裂解液,肝组织在 Polytron 15 000 r/min 冰上匀浆 1 min,肌肉组织匀浆 1.5 min,两种匀浆液分别 14 000×g 离心 10 min,取上清-70 ℃ 保存,并用 Bradford 法测组织蛋白浓度。

1.4 SDS-PAGE 制备 10% 的分离胶及 5% 的浓缩胶,取冻存肝、横纹肌及脂肪组织上清各 20 μl 及蛋白相对分子质量标准上样电泳。采用半干式电转移法,将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,PVDF 膜

先后与一抗抗体、过氧化物酶标志的二抗及显色底物孵育后显色。显色条带照相,并用凝胶图像分析仪(GAS7001B,英国,UVI;成像软件 UVIPhoto,分析软件为 UVISoft UVIB and Application V97.04)灰度扫描定量分析,每个组织的测定值均为两次结果平均值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件包,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用方差分析,组间比较采用 *q* 检验。

2 结果

2.1 二甲双胍和罗格列酮对 KKAY 糖尿病小鼠血糖和胰岛素水平的影响 糖尿病组小鼠胰岛素和血糖水平显著高于对照组小鼠,经过二甲双胍和罗格列酮处理后血糖较未处理的 KKAY 小鼠显著降低;处理后血清胰岛素水平较未处理 KKAY 小鼠显著下降,但仍高于正常对照组(表 1)。

表 1 各组小鼠血糖和胰岛素水平

组别	<i>n</i>	血糖 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	胰岛素 (IU/L)
C57BL 小鼠	5	6.0 ± 1.9	0.59(0.42~1.2)
未处理组	6	10.7 ± 2.8**	4.06(3.64~7.90)**
二甲双胍处理 KKAY 小鼠	6	5.7 ± 1.6**	2.55(0.55~3.64)***
罗格列酮处理 KKAY 小鼠	6	6.7 ± 1.7**	3.20(1.90~6.70)***

注:与 C57BL 小鼠比较,* *P* < 0.05,** *P* < 0.001;与 KKAY 小鼠未处理组比较,* *P* < 0.05,** *P* < 0.001

2.2 肝组织胰岛素刺激后磷酸化 Akt 及 PTEN 蛋白的表达 KKAY 糖尿病小鼠肝组织胰岛素刺激后磷酸化 Akt 升高的倍数较 C57BL/6J 小鼠显著降低(*P* < 0.001);KKAY 糖尿病小鼠经罗格列酮及二甲双胍治疗后磷酸化 Akt 升高倍数与 KKAY 糖尿病小鼠相比均无明显变化(*P* > 0.05;图 1,表 2)。KKAY 糖尿病小鼠 PTEN 蛋白较 C57BL/6J 小鼠显著升高,约 1.24 倍(*P* < 0.001);KKAY 糖尿病小鼠经罗格列酮及二甲双胍治疗后,PTEN 蛋白表达无明显变化(*P* > 0.05;图 2,表 2)

2.3 横纹肌组织胰岛素刺激后磷酸化 Akt 及 PTEN 蛋白的表达 KKAY 糖尿病小鼠横纹肌组织胰岛素刺激后磷酸化 Akt 升高的倍数较 C57BL/6J 小鼠显著降低(*P* < 0.001)。KKAY 糖尿病小鼠经罗格列酮及二甲双胍治疗后横纹肌组织磷酸化 Akt 升高倍数与 KKAY 糖尿病小鼠相比均无明显变化(*P* > 0.05;图 3,表 3)。KKAY 糖尿

病小鼠横纹肌 PTEN 蛋白较 C57BL/6J 小鼠显著升高($P<0.001$),KKAy 糖尿病小鼠经罗格列酮及二甲双胍治疗后横纹肌组织 PTEN 与 KKAy 糖尿病小鼠相比均无明显变化($P>0.05$;图 4,表 3)。

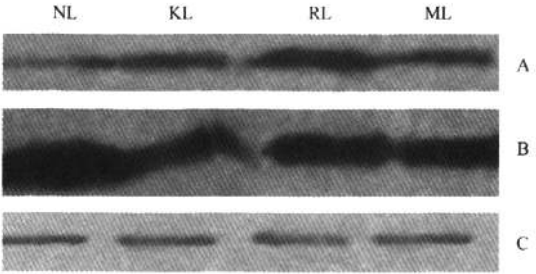


图 1 二甲双胍和罗格列酮处理后 KKAy 糖尿病小鼠肝组织 P-Ser473 Akt 蛋白水平

A:胰岛素刺激前 anti-P-Ser473 Akt;B:胰岛素刺激后 anti-P-Ser473 Akt;C:anti-β-actin;NL:对照肝组织;KL:KKAy 未处理组肝组织;RL:KKAy 罗格列酮处理组肝组织;ML:KKAy 二甲双胍处理组肝组织

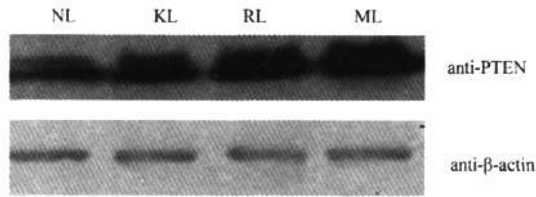


图 2 二甲双胍和罗格列酮处理后 KKAy 糖尿病小鼠肝组织 PTEN 蛋白水平

NL:对照肝组织;KL:KKAy 未处理组肝组织;RL:KKAy 罗格列酮处理组肝组织;ML:KKAy 二甲双胍处理组肝组织

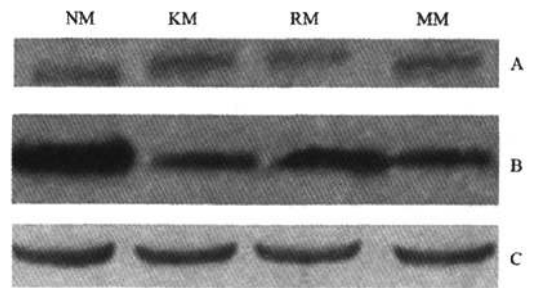


图 3 二甲双胍和罗格列酮处理后 KKAy 糖尿病小鼠横纹肌组织 P-Ser473 Akt 蛋白水平

A:胰岛素刺激前 anti-P-Ser473 Akt;B:胰岛素刺激后 anti-P-Ser473 Akt;C:anti-β-actin;NL:对照横纹肌组织;KL:KKAy 未处理组横纹肌组织;RL:KKAy 罗格列酮处理组横纹肌组织;ML:KKAy 二甲双胍处理组横纹肌组织

万方数据

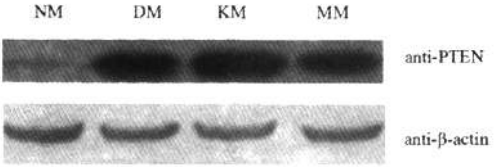


图 4 二甲双胍和罗格列酮处理后 KKAy 糖尿病小鼠 G 横纹肌组织 PTEN 蛋白水平

NL:对照横纹肌组织;KL:KKAy 未处理组横纹肌组织;RL:KKAy 罗格列酮处理组横纹肌组织;ML:KKAy 二甲双胍处理组横纹肌组织

表 2 各组小鼠肝组织 Akt 蛋白磷酸化水平及 PTEN 蛋白的变化情况($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Akt 磷酸化 升高倍数	PTEN 蛋白/ β-actin
C57BL 小鼠	5	4.67±0.55	6.0±1.2
未处理小鼠	6	2.51±0.29**	13.5±0.3**
二甲双胍处理 KKAy 小鼠	6	2.77±0.26**	15.6±1.1**
罗格列酮处理 KKAy 小鼠	6	2.56±0.18**	15.0±0.9**

注:与 C57BL 小鼠比较,** $P<0.001$

表 3 各组小鼠横纹肌组织 Akt 蛋白磷酸化水平及 PTEN 蛋白的变化情况($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Akt 磷酸化 升高倍数	PTEN 蛋白/ β-actin
C57BL 小鼠	5	4.82±0.22	0.18±0.19
未处理小鼠	6	2.31±0.48**	0.98±0.21**
二甲双胍处理 KKAy 小鼠	6	2.55±0.40**	1.13±0.21**
罗格列酮处理 KKAy 小鼠	6	2.40±0.31**	1.07±0.18**

注:与 C57BL 小鼠比较,** $P<0.001$

3 讨论

KKAy 小鼠是目前研究伴随肥胖及胰岛素抵抗的一种较好的 2 型糖尿病动物模型,本研究中 KKAy 糖尿病小鼠空腹血糖升高的同时伴随明显的高胰岛素血症,因此存在胰岛素抵抗。

胰岛素刺激可以激活 PI3K-Akt 通路,其中 Akt Ser473 的磷酸化为 PI3K 激活后 Akt 的主要磷酸化形式。已有研究表明,发生胰岛素抵抗时 PI3K-Akt 通路的活性降低^[1,2],我们的研究结果显示胰岛素刺激后肝及脂肪组织 Akt Ser473 磷酸化升高水平较 C57BL 小鼠普通饲料喂养组及高脂喂

养组均显著降低,说明此种糖尿病小鼠肝及横纹肌组织 PI3K-Akt 通路的活性显著降低。KKAy 糖尿病小鼠经罗格列酮及二甲双胍治疗 4 周后,胰岛素敏感性得到了一定的改善,但肝及横纹肌组织已经表达增加的 PTEN 蛋白水平以及降低的胰岛素刺激后 Akt Ser 473 磷酸化水平均无显著性变化。Kano 等^[11,12]观察了 Goto-Kakizaki 糖尿病大鼠在给予罗格列酮处理 10~14 d 后脂肪组织及股外侧肌 PI3K 及 Akt 活性的变化,结果显示,罗格列酮不会引起胰岛素刺激后 GK 大鼠 PI3K 以及 Akt Ser473 磷酸化水平的变化,这与我们的结果是一致的,表明罗格列酮及二甲双胍可能不会影响胰岛素抵抗时的 PI3K-Akt 通路活性。

细胞培养方面的实验结果表明罗格列酮通过激动 PPAR γ 可以快速上调 PTEN mRNA 水平和蛋白水平的表达^[13,14],同时伴随 PI3K 依赖性信号通路的下调。这与我们的研究结果不一致。其原因可能在于:(1)KKAy 糖尿病小鼠发生胰岛素抵抗后,PTEN 已经处于过度表达状态,因此虽然罗格列酮为 PPAR γ 激动剂,可以上调 PTEN 的表达,但是对于已经处于过度表达状态的 PTEN 的表达不再有影响;(2)可能存在导致 PTEN 持续表达的因素,虽然对 KKAy 糖尿病小鼠用罗格列酮治疗了 4 周,但是引起 PTEN 表达的因素可能一直未能去除且持续存在。

发生胰岛素抵抗的 KKAy 糖尿病小鼠在应用二甲双胍治疗后,空腹血糖及胰岛素均显著下降,但已经表达增加的肝及横纹肌组织 PTEN 蛋白水平在治疗后无变化,已经降低的胰岛素刺激后 Akt 磷酸化水平亦无显著变化,表明二甲双胍的降糖机制可能与 PTEN 无关。

因此,罗格列酮及二甲双胍治疗后胰岛素抵抗 KKAy 糖尿病小鼠在胰岛素抵抗改善的情况下,肝及横纹肌组织胰岛素刺激后 P-Akt 及 PTEN 表达无显著变化,说明两者降糖途径可能均为非 PI3K-Akt 途径,并且不会影响 PTEN 蛋白的表达。PTEN 有可能作为改善胰岛素抵抗的一个新靶点,从而为研究开发新的改善胰岛素抵抗的药物提供基础理论依据。

【参考文献】

- [1] Carvalho E, Rondinone C, Smith U. Insulin resistance in fat cells from obese Zucker rats: evidence for an impaired activation and translocation of protein kinase B and glucose transporter 4 [J]. Mol Cell Biochem, 2000, 206(1): 7-16.
- [2] Kim Y, Peroni O, Franke T, et al. Divergent regulation of Akt1 and Akt2 isoforms in insulin target tissues of obese Zucker rats [J]. Diabetes, 2000, 49(5): 847-856.

- [3] Gil EB, Malone link E, Liu LX, et al. Regulation of the insulin-like developmental pathway of *Caenorhabditis elegans* by a homolog of the PTEN tumor suppressor gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(6): 2925-2930.
- [4] Mihaylova VT, Borland CZ, Manjarrez L, et al. The PTEN tumor suppressor homolog in *Caenorhabditis elegans* regulates longevity and dauer formation in an insulin receptor-like signaling pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(13):7427-7432.
- [5] Ogg S, Ruvkun G. The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway [J]. Mol Cell, 1998, 2(6): 887-893.
- [6] 曾静波,李玉秀,王 姮,等. 胰岛素抵抗糖尿病 KKAy 小鼠肌肉和肝组织 PTEN 蛋白表达增强[J]. 基础医学与临床, 2007, 27(2): 166-168.
- [7] Lo YT, Tsao CJ, Liu IM, et al. Increase of PTEN gene expression in insulin resistance[J]. Horm Metab Res, 2004, 36(10): 662-666.
- [8] Muherjee R, Davies PJ, Crombie DL, et al. Sensitation of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists[J]. Nature, 1997, 386(6623): 407-410.
- [9] Valensi P, Behar A, Cohen-Boulakia F, et al. In vivo kinetics of 123 iodine-labelled insulin in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes; effect of metformin[J]. Diabetes Metab, 2002, 28(2): 95-103.
- [10] Patel L, Pass I, Coxon P, et al. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN[J]. Curr Biol, 2001, 11(10): 764-768.
- [11] Kano Y, Bandyopadhyay G, Sajan MP, et al. Rosiglitazone, insulin treatment, and fasting correct defective activation of protein kinase C-zeta/lambda by insulin in vastus lateralis muscles and adipocytes of diabetic rats[J]. Endocrinology, 2001, 142(4): 1595-1605.
- [12] Kano Y, Bandyopadhyay G, Sajan-Mini P, et al. Thiazolidinedione treatment enhances insulin effects on protein kinase C-zeta /lambda activation and glucose transport in adipocytes of nondiabetic and Goto-Kakizaki type II diabetic rats[J]. J Biol Chem, 2000, 275(22): 16690-16696.
- [13] Teresi RE, Shaiu CW, Chen CS, et al. Increased PTEN expression due to transcriptional activation of PPAR γ by lovastatin and rosiglitazone [J]. Int J Cancer, 2006, 118(10): 2390-2398.
- [14] Bonfiglio D, Gabriele S, Aquila S, et al. Estrogen receptor α binds to peroxisome proliferator-activated receptor response element and negatively interferes with peroxisome proliferator-activated receptor γ signaling in breast cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(17): 6139-6147.

(收稿日期:2009-05-07;修回日期:2010-07-20)