

同型半胱氨酸对葡萄糖代谢和骨骼肌 p-Akt (Ser-473)的影响

柴雁菁¹⁾, 顾玉²⁾, 魏云芳¹⁾, 贺铭³⁾, 王昕³⁾, 李树德³⁾

(1) 昆明学院医学院基础教研室, 云南昆明 650500; 2) 承德市中心医院病理科, 河北承德 067000;
3) 昆明医科大学生物化学与分子生物学系, 云南昆明 650500)

[摘要] 目的 在高同型半胱氨酸血症中, 探讨同型半胱氨酸对葡萄糖代谢和骨骼肌组织 PI3K/Akt 胰岛素信号通路中 p-Akt (Ser-473) 的影响, 揭示同型半胱氨酸诱导葡萄糖代谢异常的机理. **方法** 40 只小鼠随机分为空腹正常对照组、空腹高同型半胱氨酸血症组、进食正常对照组和进食高同型半胱氨酸血症组, 每组 10 只; 空腹高同型半胱氨酸血症组和进食高同型半胱氨酸血症组用含 1.5% 的甲硫氨酸饮水 3 个月. 3 个月后, 各组取血分别测定同型半胱氨酸、葡萄糖、胰岛素, 计算胰岛素敏感指数; 利用 Western blot 检测 p-Akt (Ser-473) 的改变.

结果 空腹高同型半胱氨酸血症组与空腹正常对照组、进食高同型半胱氨酸血症组与进食正常对照组比较葡萄糖和胰岛素增加 ($P < 0.05$), 胰岛素敏感指数降低 ($P < 0.05$), p-Akt (Ser-473) 蛋白下调 ($P < 0.05$), Akt 无明显变化. **结论** 同型半胱氨酸可诱导葡萄糖代谢异常, 这可能与骨骼肌组织 PI3K/Akt 胰岛素信号通路的 p-Akt (Ser-473) 降低有关.

[关键词] 高同型半胱氨酸血症; 同型半胱氨酸; p-Akt (Ser-473); PI3K/Akt 胰岛素信号通路

[中图分类号] R575.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 01 - 0015 - 04

Effect of Homocysteine on Glucose Metabolism and p-Akt (Ser-473) in Muscle Tissue

CHAI Yan-jing¹⁾, GU Yu²⁾, WEI Yun-fang¹⁾, HE Ming³⁾, WANG Xin³⁾, LI Shu-de³⁾

(1) Dept. of Basic Medicine, Medical College, Kunming University, Kunming Yunnan 650500; 2) Dept. of Pathology, The Central Hospital of Chengde, Chengde Hebei 067000; 3) Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] Objective To discuss the effect of homocysteine on glucose metabolism and p-Akt (Ser-473) in the PI3K/Akt insulin signal pathway in the muscle tissues of mice with hyperhomocysteinemia, and to reveal the mechanism of abnormal glucose metabolism induced by homocysteine. **Methods** Forty mice were divided into the fasting control group ($n = 10$), the feeding control group ($n = 10$), the fasting hyperhomocysteinemia (HHcy) group ($n = 10$) and the feeding HHcy group ($n = 10$). Normal food and 1.5% (mass fraction) methionine were fed in the fasting HHcy group and the feeding HHcy group. After mice in each group were fed for three months, the blood was obtained. The blood glucose and blood insulin levels were detected. The insulin sensitivity index was calculated. Akt and p-Akt (Ser-473) were observed in the muscle tissue by the western blot. **Results** In the fasting HHcy group or the feeding HHcy group, the blood levels of glucose and insulin were higher than the fasting normal control group or the feeding normal control group ($P < 0.05$), the insulin sensitivity index was decreased ($P < 0.05$). Expression levels of p-Akt (Ser-473) were decreased compared the fasting normal control group or the feeding normal control group ($P < 0.05$). Expression levels of Akt had no obvious changes in each group.

[基金项目] NSFC - 云南联合基金资助项目 (U1132606); 云南省科技厅 - 昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2009CD213, 2010CD223); 云南省教育厅科研基金资助项目 (2010C148)

[作者简介] 柴雁菁 (1971~), 女, 云南玉溪市人, 硕士, 高级讲师, 主要从事代谢性疾病研究工作. 顾玉和柴雁菁对本文有同等贡献.

[通讯作者] 李树德. E-mail: shudeli006@vip.sina.com

Conclusion Homocysteine induces abnormal glucose metabolism, the mechanism may be related with the decrease of the phosphorylation of Akt (Ser-473) in the PI3K/Akt insulin signal pathway in muscle tissue.

[**Key words**] Hyperhomocysteinemia; Homocysteine; p-Akt (Ser-473); PI3K/Akt insulin signal pathway

Akt 是蛋白激酶家族中的一员, 为一种重要的细胞内信号调节介质, 与细胞死亡、增殖、分化和代谢密切相关. 该蛋白丝氨酸 473 位点的磷酸化是其激活的关键. 同型半胱氨酸是甲硫氨酸代谢的中间产物, 是动脉粥样硬化的危险因素, 最近的研究表明, 同型半胱氨酸与糖代谢密切相关. 但同型半胱氨酸影响糖代谢的分子机理不完全清楚. 本研究通过建立高同型半胱氨酸血症的动物模型, 研究同型半胱氨酸对葡萄糖代谢和骨骼肌组织 p-Akt (Ser-473) 的影响.

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性昆明小鼠 40 只 (由昆明医科大学实验动物部提供), 鼠龄 6 周, 体重 18~22 g. 适应性喂养 2 周后用于实验.

1.2 主要试剂

甲硫氨酸购自美国 Sigma 公司, 血糖测定试剂盒和胰岛素测定试剂盒购自南京建成生物公司, 兔多隆抗体 Akt、p-Akt (Ser-473) 和 ECL 化学发光试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司.

1.3 方法

1.3.1 模型建立和取材 40 只小鼠随机分为空腹高同型半胱氨酸血症组和空腹正常对照组, 进食高同型半胱氨酸血症组和进食正常对照组, 每组各 10 只. 空腹或者进食高同型半胱氨酸血症组模型建立采用饮用水中含 1.5% 的甲硫氨酸. 3 个月后, 空腹高同型半胱氨酸血症组和空腹正常对照组空腹 12 h, 进食高同型半胱氨酸血症组和进食正常对照组正常进食. 各组眼眶取抗凝血, 4 000 r/min, 离心 5 min, 获得血浆; 同时取骨骼肌组织 -80℃ 保存备用.

1.3.2 生化指标和胰岛素敏感指数计算 各组取血浆利用 ELISA 测定同型半胱氨酸浓度, 葡萄糖氧化酶法测定血糖, 化学发光法测定胰岛素. 根据空腹血糖浓度和血清胰岛素浓度, 按照公式:

$$ln = \frac{1}{\text{空腹血糖浓度} \times \text{血清胰岛素浓度}}^{[1]}$$

计算胰岛素敏感指数 (insulin sensitivity index, ISI).

1.3.3 Akt 和 p-Akt (Ser-473) 蛋白的检测

用组织裂解液提取蛋白质, BCA 法测定总蛋白的含量, 取各样本 80 μg 进行 SDS-PAGE 电泳, 电转移法将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 的脱脂牛奶封闭后分别加入 Akt 和 p-Akt (Ser-473) 一抗过夜孵育, 洗膜后加入 HRP 标记的二抗孵育, 充分洗涤后与 ECL 反应, 即刻以 Kodak 底片曝光洗片. 用 Quantity one 4.4.0 扫描各条带的灰度值, 计算 p-Akt (Ser-473) 与 Akt 和 Akt 与 β-actin 的比值. 每组实验至少重复 3 次.

1.4 统计学处理

数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 软件 One-Way ANOVA 分析法进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 同型半胱氨酸测定

与空腹正常对照组比较, 空腹 HHcy 组的同型半胱氨酸浓度增加 4.5 倍; 与进食正常对照组比较, 进食 HHcy 组的同型半胱氨酸浓度增加 4.3 倍. 提示高同型半胱氨酸血症的动物模型建立成功 (见图 1).

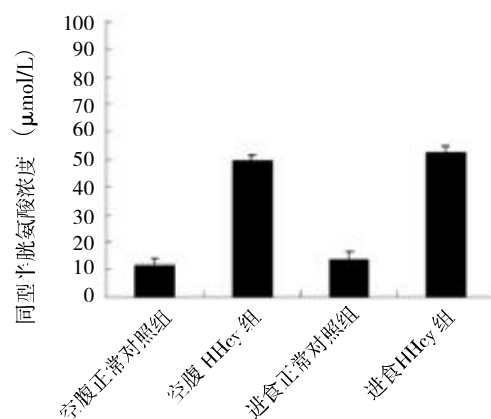


图 1 同型半胱氨酸浓度

Fig. 1 Concentration of blood homocysteine

2.2 血糖、血胰岛素和胰岛素敏感指数

与空腹正常对照组比较, 空腹 HHcy 组的血糖和血胰岛素浓度增加, 胰岛素敏感指数降低 ($P <$

0.05), 结果提示, 同型半胱氨酸可导致胰岛素抵抗, 引起葡萄糖代谢异常. 与进食正常对照组比较, 进食 HHcy 组的血糖和血胰岛素浓度增加 ($P < 0.05$), 结果提示, 进食状态下, 同型半胱氨酸可抑制骨骼肌组织对葡萄糖的摄取 (见图 2 ~ 4).

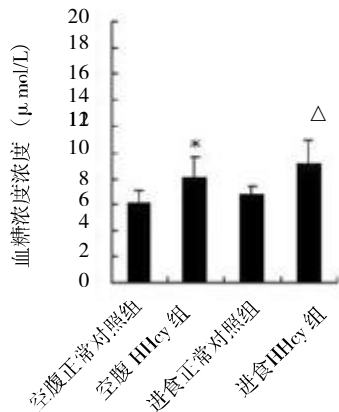


图 2 血糖浓度

Fig. 2 Concentration of the blood glucose

与空腹正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与进食正常对照组比较, $^{\Delta}P < 0.05$.

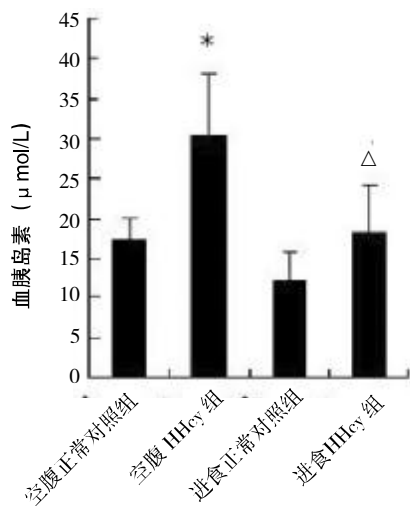


图 3 血胰岛素浓度

Fig. 3 Concentration of the blood insulin

与空腹正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与进食正常对照组比较, $^{\Delta}P < 0.05$.

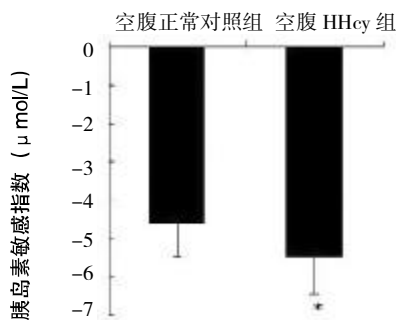


图 4 胰岛素敏感指数

Fig. 4 Insulin sensitivity index

与空腹正常对照组比较, * $P < 0.05$

2.3 Akt 和 p-Akt (Ser-473) 蛋白的表达

与空腹正常对照组比较, 空腹 HHcy 组 p-Akt (Ser-473) 的表达降低 ($P < 0.05$); 与进食正常对照组比较, 进食 HHcy 组的 p-Akt (Ser-473) 表达降低 ($P < 0.05$). 但 Akt 的表达在空腹或者进食状态下无统计学意义 (见图 5、图 6). 结果提示, 同型半胱氨酸导致 p-Akt (Ser-473) 的表达降低, 影响 PI3K/Akt 胰岛素信号通路可能是导致葡萄糖代谢异常的因素之一.

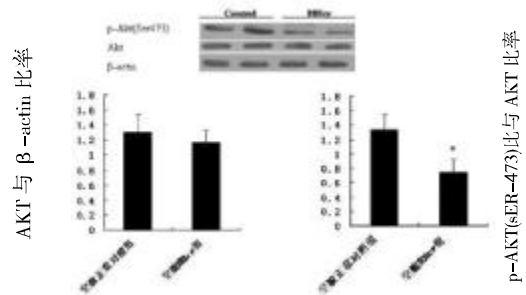


图 5 空腹状态下, 骨骼肌组织 p-Akt (Ser-473) 和 Akt 的表达

Fig. 5 Expression of p-Akt (Ser-473) and Akt in the muscle tissue in fasting state

与正常对照组比较, * $P < 0.05$.

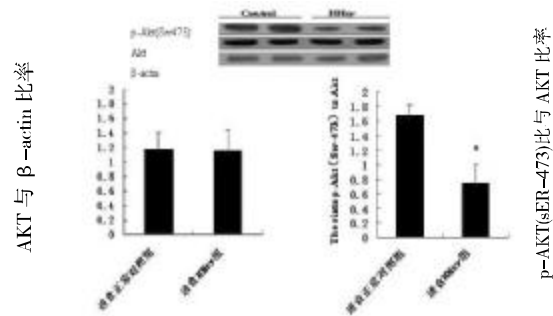


图 6 进食状态下, 骨骼肌组织 p-Akt (Ser-473) 和 Akt 的表达

Fig. 6 Expression of p-Akt (Ser-473) and Akt in the muscle tissue in feeding state

与正常对照组比较, * $P < 0.05$.

3 讨论

异常的葡萄糖代谢是导致糖尿病的原因. 其中, 空腹状态下出现的胰岛素抵抗是 2 型糖尿病的主要诱因. 在胰岛素抵抗发生中, 遗传、肥胖和炎症等^[2-4]是主要因素. 近期的研究表明, 作为诱导动脉粥样硬化发生的独立危险因素之一——同型半

胱氨酸^[5], 不仅与心脑血管病密切相关, 而且在胰岛素抵抗的发生过程中, 该物质也伴演了关键的角色^[6]. 笔者的前期研究已经发现, 在空腹和进食状态下, 同型半胱氨酸的增加, 将引起葡萄糖代谢异常^[7,8]. 本研究发现: 在空腹状态下, 同型半胱氨酸使血糖和血胰岛素增加, 导致胰岛素抵抗指数上升和胰岛素的敏感性降低; 在进食状态下, 同型半胱氨酸也引起血糖和血胰岛素增加, 这与以前的报道一致. 所以, 在高同型半胱氨酸的动物模型中, 同型半胱氨酸可导致空腹和进食状态下葡萄糖代谢异常.

骨骼肌组织作为机体处理葡萄糖的主要器官, 可通过其相应的葡萄糖转运体, 摄取和利用外周组织的葡萄糖, 调节机体的葡萄糖的代谢^[9,10], 因此, 当骨骼肌组织对葡萄糖的摄取和利用发生障碍, 将导致胰岛素抵抗的发生. 然而, 在骨骼肌组织对葡萄糖代谢的分子机理中, PI3K/Akt 信号通路是主要途径^[11]. 由于诸多因素所导致的骨骼肌组织 PI3K/Akt 胰岛素信号通路相关因子的改变是形成胰岛素抵抗的主要原因^[12,13]. Akt 是该途径的关键因子, 该因子的表达和磷酸化激活, 可促进 GLUT4 从细胞的胞浆转移到细胞膜上, 增加骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取和利用^[14,15]. 在 Akt 激活过程中, Thr308 位点和 Ser473 位点磷酸化是 Akt 激活的主要部位^[16], 其中, Akt 的 Ser473 位点的磷酸化是最关键的过程. 笔者的研究发现, 不管在空腹和进食状态下, 同型半胱氨酸的增加, 均可导致 Akt 的 Ser473 位点磷酸化程度下调.

总之, 同型半胱氨酸使骨骼肌组织 Akt (Ser-473) 磷酸化程度降低, 引起 PI3K/Akt 胰岛素信号通路障碍. 这可能是同型半胱氨酸诱导葡萄糖代谢异常的原因之一.

[参考文献]

- [1] 李光伟, 潘孝仁, LLILLIOJA S, et al. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数 [J]. 中华内科杂志, 1993, 32(10): 656 - 660.
- [2] PAL A, BARBER T M, VAN DE BUNT M, et al. PTEN mutations as a cause of constitutive insulin sensitivity and obesity [J]. N Engl J Med, 2012, 367(11): 1 002 - 1 011.
- [3] LOTTENBERG A M, AFONSO MDA S, LAVRADOR M S, et al. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome [J]. J Nutr Biochem, 2012, 23(9): 1 027 - 1 040.
- [4] BARBARROJA N, LOPEZ-PEDRERA C, GARRIDO-S-ANCHEZ L, et al. Progression from high insulin resistance to type 2 diabetes does not entail additional visceral adipose tissue inflammation [J]. PLoS One, 2012, 7(10): 48 155.
- [5] WANG X, CUI L, JOSEPH J, et al. Homocysteine induces cardiomyocyte dysfunction and apoptosis through p38 MAPK-mediated increase in oxidant stress [J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(3): 753 - 760.
- [6] LI Y, JIANG C, XU G, et al. Homocysteine upregulates resistin production from adipocytes in vivo and in vitro [J]. Diabetes, 2008, 57(4): 817 - 827.
- [7] 王雅楠, 顾玉, 黄尤光, 等. 同型半胱氨酸对骨骼肌细胞 GLUT4 表达和分布的影响 [J]. 昆明医学院学报, 2012, 33(1): 16 - 19.
- [8] 顾玉, 王昕, 郭家智, 等. 同型半胱氨酸对骨骼肌组织 PDK1 的影响 [J]. 昆明医学院学报, 2012, 33(2): 40 - 44.
- [9] 邓向群, 毕会民. 罗格列酮对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌蛋白激酶 B 表达的影响 [J]. 中国新药与临床杂志, 2004, 23(5): 269 - 272.
- [10] HEI Y J. Recent progress in insulin signal transduction [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 1998, 40(3): 123 - 135.
- [11] 蒙碧辉, 舒昌达. 骨骼肌胰岛素抵抗的分子机制 [J]. 国外医学内分泌学分册, 2002, 22(6): 398 - 400.
- [12] WU W L, GAN W H, TONG M L, et al. Over-expression of NYGGF4 (PID1) inhibits glucose transport in skeletal myotubes by blocking the IRS1/PI3K/AKT insulin pathway [J]. Mol Genet Metab, 2011, 102(3): 374 - 377.
- [13] GUPTA A, DEY C S. PTEN and SHIP2 regulates PI3K/Akt pathway through focal adhesion kinase [J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 309(1-2): 55 - 62.
- [14] 迟毓婧, 李晶, 管又飞, 等. PI3K-Akt 信号传导通路对糖代谢的调控作用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(10): 879 - 885.
- [15] JAISWAL N, MAURYA C K, VENKATESWARLU K, et al. 4-Hydroxyisoleucine stimulates glucose uptake by increasing surface GLUT4 level in skeletal muscle cells via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway [J]. Eur J Nutr, 2012, 51(7): 893 - 898.
- [16] 汤葐, 李树清, 李凡, 等. 缺血后适应对树鼯海马 CA1 区神经元 Akt 信号转导调控的机制研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(3): 560 - 565.

(2012-10-23 收稿)