

磷脂酰肌醇 3 激酶及葡萄糖转运蛋白 4 在巴马小型猪 2 型糖尿病模型中的表达

于健¹ 邹迪莎² 叶瑶² 谢梦婷² 于萍¹

(1. 桂林医学院附属医院内分泌科, 广西壮族自治区 桂林 541001; 2. 桂林医学院研究生院, 广西壮族自治区 桂林 541001)

【摘要】目的 观察高脂高糖饮食联合链脲佐菌素(STZ)多次注射诱导巴马小型猪 2 型糖尿病(T2DM)模型糖脂代谢情况以及骨骼肌、肝脏、胰腺组织磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3-K)及葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)的表达变化,探讨该模型的特征。**方法** 10 只健康雄性巴马小型猪,按随机数字表法分为对照组和糖尿病模型组,每组 5 只。T2DM 模型组用高脂高糖饲料(蔗糖 37%、猪油 10%、胆固醇 2%、普通饲料 51%)喂养,11 个月初腹腔注射 STZ 100 mg/kg,1 周后重复 1 次;对照组喂养普通饲料,同时腹腔注射等量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。两组实验期为 12 个月。检测两组动物空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FINS)及血脂水平,采用胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)评价胰岛素抵抗(IR)情况,并检测骨骼肌、肝脏及胰腺组织 PI3-K 及 GLUT4 的表达水平。**结果** 给予高脂高糖饲料后模型组小型猪 FPG、FINS、HOMA-IR、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平较对照组明显升高,注射 STZ 后,模型组动物 FPG 较对照组明显升高(mmol/L: 11.46 ± 1.64 比 4.64 ± 0.47),FINS 水平较对照组明显降低($\mu\text{U/mL}$: 6.57 ± 0.33 比 8.11 ± 0.28),差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。模型组骨骼肌、肝脏及胰腺组织 PI3-K、GLUT4 蛋白表达水平较对照组明显降低[骨骼肌:PI3-K 为 $(6.55 \pm 1.81)\%$ 比 $(13.16 \pm 3.66)\%$,GLUT4 为 $(42.34 \pm 10.62)\%$ 比 $(116.10 \pm 15.57)\%$,肝脏:PI3-K 为 $(6.79 \pm 1.73)\%$ 比 $(14.17 \pm 3.73)\%$,GLUT4 为 $(40.35 \pm 16.81)\%$ 比 $(126.17 \pm 13.73)\%$,胰腺:PI3-K 为 $(5.71 \pm 1.51)\%$ 比 $(10.39 \pm 2.57)\%$,GLUT4 为 $(38.90 \pm 16.69)\%$ 比 $(73.41 \pm 16.39)\%$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$]。**结论** 采用高脂高糖饲料联合 STZ 多次注射可以成功诱导巴马小型猪 T2DM 模型,模型组小型猪存在明显 IR 及糖脂代谢紊乱,且模型组骨骼肌、肝脏及胰腺组织 PI3-K、GLUT4 蛋白表达水平降低。

【关键词】 巴马小型猪; 2 型糖尿病; 磷脂酰肌醇 3 激酶; 葡萄糖转运蛋白 4

Expressions of phosphatidylinositol 3-kinase and glucose transporter 4 in a Bama miniature pig model with type 2 diabetes mellitus Yu Jian*, Zou Disha, Ye Yao, Xie Mengting, Yu Ping. *Department of Endocrinology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi, China

Corresponding author: Yu Jian, Email: duduyu1623@qq.com

【Abstract】Objective To establish a Bama miniature pig model with type 2 diabetes mellitus (T2DM) using a high-fat and high-sugar diet combined with streptozotocin (STZ) injection for many times to observe the changes of animal glucolipid metabolism as well as the expressions of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) and glucose transporter 4 (GLUT4) in skeletal muscle, liver and pancreatic tissues, and to discuss the model characteristics. **Methods** A total of 10 healthy male Bama miniature pigs were randomly divided into two groups: a control group and a diabetic model group (each $n = 5$). The diabetic model group was fed with a high-fat and high-sugar diet (cane sugar 37%, lard oil 10%, cholesterol 2%, normal fodder 51%), and accepted intraperitoneal injection of STZ 100 mg/kg at the beginning of the 11th month, and 1 week later the injection was repeated; while the control group was fed with a normal diet, and at the same time accepted intraperitoneal injection of equal volume of citric acid and sodium citrate buffer. The experimental period was 12 months in both groups. The levels of fasting plasma glucose (FPG), fasting insulin (FINS) and serum lipids, as well as the PI3-K and GLUT4 expressions in the skeletal muscle, liver and pancreatic tissues of two groups were detected, and the insulin resistance index (HOMA-IR) was applied to evaluate the insulin resistance (IR). **Results** After feeding with high-fat and high-sugar diet, the FPG, FINS, HOMA-IR, triglycerides (TG), total cholesterol (TC), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels of the miniature pigs in the model group were significantly higher than those in the control group. After injection of STZ, the FPG level in the model group was obviously higher than those in the control group (mmol/L: 11.46 ± 1.64 vs. 4.64 ± 0.47), and the FINS level was markedly lowered ($\mu\text{U/mL}$: 6.57 ± 0.33 vs. 8.11 ± 0.28), the differences being statistically significant (both $P < 0.01$). The PI3-K and GLUT4 expression levels of the skeletal muscle, liver and pancreas in the model group were statistically lower than those in control group [skeletal muscle: PI3-K was $(6.55 \pm 1.81)\%$ vs. $(13.16 \pm 3.66)\%$, GLUT4 was $(42.34 \pm 10.62)\%$ vs. $(116.10 \pm 15.57)\%$;

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.04.020

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 1347003-5); 广西桂林市科学研究与技术开发计划项目(20150126-1-1); 广西壮族自治区卫生厅科研项目(Z2014301)

通讯作者: 于健, Email: duduyu1623@qq.com

liver: PI3-K was $(6.79 \pm 1.73)\%$ vs. $(14.17 \pm 3.73)\%$, GLUT4 was $(40.35 \pm 16.81)\%$ vs. $(126.17 \pm 13.73)\%$; pancreas: PI3-K was $(5.71 \pm 1.51)\%$ vs. $(10.39 \pm 2.57)\%$, GLUT4 was $(38.90 \pm 16.69)\%$ vs. $(73.41 \pm 16.39)\%$, $P < 0.05$ or $P < 0.01$]. **Conclusions** The high-fat and high-sugar diet combined with STZ injection for many times can successfully establish a Bama miniature pig model with T2DM. The miniature pigs in the model group show significant IR and glucolipid metabolism disorder, and the levels of PI3-K and GLUT4 protein expressions in the skeletal muscle, liver and pancreatic tissues of the miniature pigs in the model group were reduced.

【Key words】 Bama miniature pig; Type 2 diabetes mellitus; Phosphatidylinositol 3-kinase; Glucose transporter 4

目前,糖尿病(DM)已成为继肿瘤、心脑血管疾病之后第3位严重威胁人类健康的主要慢性非传染性疾病,其中约95%为2型糖尿病(T2DM)。至今T2DM确切的发病机制仍不明确,其中胰岛素抵抗(IR)是T2DM的主要病理机制。建立真实模拟人类T2DM的动物模型对深入研究T2DM的发生发展、慢性并发症的转归及防治措施意义重大。小型猪的生理解剖结构、糖脂代谢、血液生化指标和疾病发生机制与人类都很相似,被广泛应用于医学领域的研究^[1-4]。因此,本研究选用体型小、容易饲养、抗病力强的巴马小型猪,应用高脂高糖饮食联合链脲佐菌素(STZ)多次注射复制巴马小型猪T2DM模型,观察小型猪骨骼肌、肝脏及胰腺组织中胰岛素信号通路的两个关键分子磷脂酰肌醇3激酶(PI3-K)、葡萄糖转运蛋白4(GLUT4)的表达水平,探讨该模型特征。

1 材料与方法

1.1 主要药品及试剂:纯化的STZ购自美国Sigma公司;胰岛素放射免疫分析试剂盒购自北京北方生物技术研究所;RIPA裂解液购自碧云天生物技术公司;PI3-K一抗购自美国Santa Cruz公司;GLUT4一抗购自英国Abcam公司。

1.2 动物分组:选择10只健康雄性广西巴马小型猪,2~3月龄,体质量10~20 kg。小型猪适应性喂养1周后,按随机数字表法分为两组。对照组($n=5$)采用普通饲料喂养;T2DM模型组($n=5$)采用高脂高糖饲料喂养(高脂高糖饲料配方为:蔗糖37%、猪油10%、胆固醇2%、普通饲料51%)。实验期为12个月。

1.3 T2DM模型制备:参照本课题组前期制模方法^[5]复制T2DM小型猪模型,根据动物体质量称取适量STZ溶于柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH值4.2~4.5)中,浓度为10 g/L。分2次给禁食过夜的模型组小型猪注射STZ溶液:11个月初腹腔注射STZ 100 mg/kg,1周后重复注射1次。对照组腹腔注射等剂量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。成模标准:参照1999年世界卫生组织(WHO)糖尿病诊断标准。

1.4 伦理学:本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 胰岛素、血脂水平检测:小型猪禁食经前腔静脉取血,采用瑞士罗氏公司7600型全自动生化分析仪检测生化指标,葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖(FPG),胰岛素放射免疫分析试剂盒检测空腹胰岛素(FINS)水平;甘油磷酸氧化酶-过氧化物酶法(GPO-POD)检测三酰甘油(TG),胆固醇氧化酶法检测总胆固醇(TC),表面活性剂清除法(SUR)检测低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。

1.5.2 胰岛素抵抗的评价:利用胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)评价胰岛素抵抗情况: $HOMA-IR = FPG \times FINS / 22.5$ 。

1.5.3 PI3-K及GLUT4蛋白表达水平检测:实验结束时(12个月末),麻醉动物后股动脉放血处死,取胰腺、肝脏和骨骼肌组织置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测PI3-K及GLUT4的蛋白表达。RIPA裂解液裂解得到的组织总蛋白,使最终上样总蛋白为50 μg ,以预染Marker作为蛋白质分子质量的标记。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE,浓缩胶80V,分离胶120V恒压电泳),电泳完毕后以湿转移的方法[恒流250 mA, β 肌动蛋白(β -actin)60 min、PI3-K 100 min、GLUT4 60 min]将分离的蛋白条带转移至(0.45 μm)聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。使用5%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭2 h。1:1 000稀释 β -actin鼠抗以及PI3-K、GLUT4兔单克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱缓慢摇动孵育过夜。三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBST)洗膜3次,每次10 min,加入稀释好的二抗,室温在摇床上缓慢摇动孵育1 h, TBST洗膜3次,每次10 min,使用super ECL Plus超敏发光液进行显影。用Image Lab 3.0软件分析各条带面积灰度值,以目的条带与内参照条带的比值 $\times 100\%$ 代表目的蛋白的表达水平。

1.6 统计学处理:使用SPSS 19.0软件进行数据分析,所有数据行正态分布检验,对于符合正态分布的

计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较采用 *t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高脂高糖诱导后动物 FPG、FINS、HOMA-IR 及血脂水平的变化(表 1):用高脂高糖饲料喂养 10 个月后,模型组动物 FPG、FINS、HOMA-IR、TG、TC、LDL-C 水平较对照组明显升高(均 $P < 0.01$)。

表 1 高脂高糖诱导后小型猪生化指标、FINS 及 HOMA-IR 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	FPG (mmol/L)	FINS (μ U/mL)	HOMA-IR
对照组	5	4.66 ± 0.45	8.12 ± 0.32	1.69 ± 0.22
模型组	5	6.46 ± 0.31 ^a	15.67 ± 1.46 ^a	4.51 ± 0.53 ^a

组别	动物数(只)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
对照组	5	0.54 ± 0.18	2.52 ± 0.29	1.79 ± 0.32
模型组	5	1.11 ± 0.25 ^a	6.99 ± 0.51 ^a	2.93 ± 0.37 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$

2.2 注射 STZ 后动物 FPG、FINS 的变化比较(表 2):模型组动物 FPG 较对照组明显升高, FINS 较对照组明显降低(均 $P < 0.01$)。

2.3 两组动物骨骼肌、肝脏、胰腺组织 PI3-K、GLUT4 蛋白表达水平比较(图 1~2):模型组骨骼肌、肝脏及胰腺组织 PI3-K 和 GLUT4 蛋白表达水平较对照组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 注射 STZ 后小型猪 FPG、FINS 的变化比较($\bar{x} \pm s$)

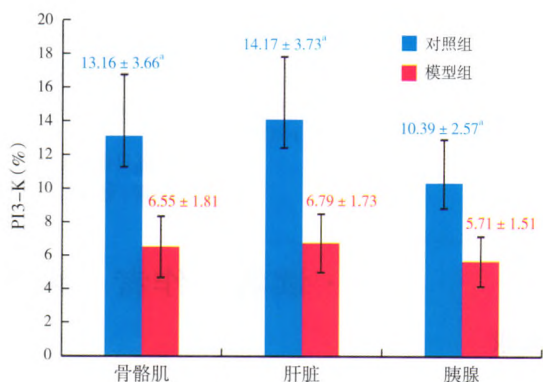
组别	动物数(只)	FPG (mmol/L)	FINS (μ U/mL)
对照组	5	4.64 ± 0.47	8.11 ± 0.28
模型组	5	11.46 ± 1.64 ^a	6.57 ± 0.33 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$

3 讨论

目前 T2DM 糖尿病的发病机制仍未完全阐明,其中 IR 是 T2DM 的主要病理机制。胰岛素的代谢功能和血糖调节主要受胰岛素受体、胰岛素受体底物 1、PI3-K、下游的蛋白激酶 B(PKB) 及 GLUT4 等信号通路的影响,所以当路径中任何一个信号分子及环节发生异常均可导致机体对葡萄糖摄取和利用障碍,引起 IR,从而导致糖尿病的发生。其中 PI3-K 是调节葡萄糖转运信号转导的关键蛋白,PI3-K 途径是葡萄糖吸收与利用、调节血糖平衡的主要转导途径。研究发现,PI3-K 抑制剂渥曼青霉素和 LY294002 可完全抑制胰岛素刺激的 GLUT1/4 的转运,降低葡萄糖摄取,从而证实 PI3-K 是胰岛素刺激葡萄糖转运和摄取的重要介导分子^[6]。还有研究发现,T2DM 大鼠骨骼肌、脂肪组织及 IR 细胞模型 PI3-K 含量均显著降低,激活 PI3-K 通路可以改善 IR,提示 PI3-K 与 IR 关系密切^[7-9]。

本研究选用巴马小型猪建立 T2DM 模型,主要基于以下优势:小型猪的胰岛素肽链氨基酸组成与人类最相近,只相差 1 个氨基酸(β 链第 30 位氨



注:与对照组比较,^a $P < 0.01$

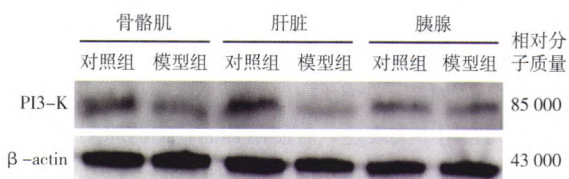
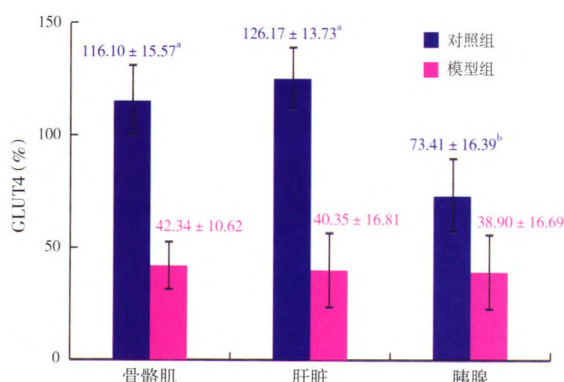


图 1 模型组与对照组骨骼肌、肝脏及胰腺 PI3-K 的蛋白表达比较



注:与对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$

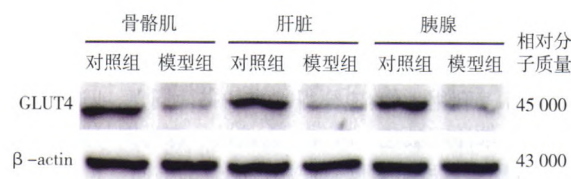


图 2 模型组与对照组骨骼肌、肝脏及胰腺 GLUT4 的蛋白表达比较

基酸,猪是丙氨酸,人是苏氨酸),小型猪的血生化指标与人类接近,便于与人类病理生理改变进行比较^[10];还有研究显示,巴马小型猪对高脂高糖饲料诱导 DM 模型比较敏感,表现为体型肥胖、高胰岛素血症、糖脂代谢紊乱等^[11]。

Natarajan 等^[12]报道,采用高脂高糖饲料联合 STZ (50 mg/kg,连续 3 d) 诱导约克郡小型猪,出现高血糖、高三酰甘油血症及高胆固醇血症。本实验采用在高糖高脂饮食基础上联合多次 STZ (STZ 100 mg/kg,共用 2 次) 注射成功诱导巴马小型猪 T2DM 动物模型,该模型接近人类 T2DM 发病特点,且多次小剂量注射 STZ 可以大大降低 STZ 的毒副作用,与文献^[13]报道一致。

另外,本研究还采用 Western Blot 检测两组小型猪骨骼肌、肝脏及胰腺组织 PI3-K 和 GLUT4 的蛋白表达水平,结果发现,模型组骨骼肌、肝脏及胰腺组织 PI3-K 和 GLUT4 蛋白表达水平明显低于对照组,提示出现了 IR 倾向,与其他研究结果^[14-15]相一致。

综上所述,采用高脂高糖饲料联合 STZ 多次注射可以成功诱导巴马小型猪 T2DM 动物模型,且模型组骨骼肌、肝脏及胰腺组织 PI3-K 和 GLUT4 蛋白表达水平明显降低,该模型具有与人类 T2DM 相似的症状及病理机制,操作方法简便、易于掌握,且模型安全性好。该模型可用于糖、脂代谢紊乱等相关代谢疾病的研究,为相关药物新靶点发现及临床前药效学评价等生物医学研究提供了良好的载体和可靠的研究模型。

参考文献

- [1] 王祥瑞,陈长志,等.电针刺激辅助低温对猪缺血/再灌注损伤心肌功能的保护作用[J].中国中西医结合急救杂志,2001,8(2):73-75.
- [2] 侯经元,胡森.血红蛋白氧载体和凝血因子 VII a 对非控制性失血性休克猪免疫反应的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(5):278.
- [3] 燕晓雯,李维勤,王浩,等.持续高流量血液滤过对重症急性胰腺炎猪炎症反应的影响[J].中华危重病急救医学,2006,18(3):165-168.
- [4] 郝岱峰,郭振荣,柴家科.生长激素对烧伤猪蛋白质氧化率及非蛋白呼吸商的影响[J].中华危重病急救医学,2005,17(7):397-398.
- [5] 于健,叶瑶,黄漓莉,等.高脂高糖饮食联合链脲佐菌素构建巴马小型猪 2 型糖尿病模型稳定性研究[J].山西医药杂志,2014,43(21):2499-2501.
- [6] Nolte LA, Han DH, Hansen PA, et al. A peroxovanadium compound stimulates muscle glucose transport as powerfully as insulin and contractions combined [J]. Diabetes, 2003, 52(8):1918-1925.
- [7] 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 PI-3K、GLUT4 蛋白相关性的研究[J].中国药理学通报,2008,24(8):1007-1010.
- [8] 王艳军,尤雪娜,赵丹,等.PI3K、p70S6K 在胰岛素抵抗大鼠脂肪中的表达及其意义[J].中国老年学杂志,2008,28(6):559-561.
- [9] 刘聪,冉春泉,钟民涛,等.灵芝多糖对 3t3-11 胰岛素抵抗细胞模型 PI3-Kp85 和 GLUT4 蛋白表达的影响[J].中国微生态学杂志,2012,24(8):715-717.
- [10] Bellinger DA, Merricks EP, Nichols TC. Swine models of type 2 diabetes mellitus: insulin resistance, glucose tolerance, and cardiovascular complications [J]. ILAR J, 2006, 47(3):243-258.
- [11] Liu Y, Wang Z, Yin W, et al. Severe insulin resistance and moderate glomerulosclerosis in a minipig model induced by high-fat/high-sucrose/high-cholesterol diet [J]. Exp Anim, 2007, 56(1):11-20.
- [12] Natarajan R, Gerrity RC, Gu JL, et al. Role of 12-lipoxygenase and oxidant stress in hyperglycaemia-induced acceleration of atherosclerosis in a diabetic pig model [J]. Diabetologia, 2002, 45(1):125-133.
- [13] 肖国华,张素君,余坚,等.高糖高脂联合低剂量 STZ 诱导版纳微型猪 2 型糖尿病动物模型的建立[J].中南医学科学杂志,2012,40(4):351-356.
- [14] Zhang WY, Lee JJ, Kim Y, et al. Amelioration of insulin resistance by scopoletin in high-glucose-induced, insulin-resistant HepG2 cells [J]. Horm Metab Res, 2010, 42(13):930-935.
- [15] Cao S, Li B, Yi X, et al. Effects of exercise on AMPK signaling and downstream components to PI3K in rat with type 2 diabetes [J]. PLoS One, 2012, 7(12):e51709.

(收稿日期:2016-03-18)

(本文编辑:邸美仙 李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对图表的要求

作者投稿时,原稿中若有图表,每幅图表应紧随文字叙述之后排。每幅图表应冠有准确的图表题。说明性的文字应置于图表下方注释中,并在注释中标明图表中使用的全部非公知公用的缩写。图不宜过大,最大宽度半栏图不超过 7.5 cm,通栏图不超过 16.5 cm,高宽比例以 5:7 为宜。以计算机制图者应提供原始图片(eps、spv、pdf 格式)。照片图要求有良好的清晰度和对比度;图中需标注的符号(包括箭头)请用另纸标上,不要直接写在照片上。每幅图的背面应贴上标签,注明图号、方向及作者姓名。若刊用人像,应征得本人的书面同意,或遮盖其能被辨认出系何人的部分。大体标本照片在图内应有尺度标记。病理照片要求注明染色方法和放大倍数。森林图另附 word 文档,重点标目词宜用中文表述。若使用其他刊物的原图表,应注明出处,并附版权所有人同意使用该图表的书面材料。

表格建议采用三横线表(顶线、表头线、底线),如遇有合计和统计学处理内容(如 *t* 值、*P* 值等),则在此行上面加一条分界横线;表内数据要求同一指标保留的小数位数相同,一般比可准确测量的精度多一位。