

氯沙坦通过增加葡萄糖转运蛋白 4 膜转位改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗

闫朝丽 王慧 孟兴凯 苏秀兰 张嘉玲 胡康洪

【摘要】 目的 研究 2 型糖尿病(T2DM)SD 大鼠血管紧张素 II 受体拮抗剂(ARB)是否改善胰岛素抵抗及对 IRS1 磷酸化、PI3K 途径中 Akt 磷酸化及 GLUT4 转位的影响。**方法** 42 只 SD 大鼠分别给予高脂高糖饮食/链脲佐菌素(STZ)或普通饮食喂养,当空腹血糖(FPG) ≥ 7.8 mmol/L 且伴有胰岛素抵抗者为成模 T2DM 大鼠 20 只,正常组 20 只;分为正常不干预组(A 组)、正常干预组(B 组)、T2DM 不干预组(C 组)及 T2DM 干预组(D 组),每组 10 只。B 组及 D 组给予氯沙坦($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),干预 6 周后计算胰岛素敏感指数(ISI),取腓肠肌备用。通过免疫组织化学(IHC)及 Western blotting 检测 IRS1/P^{tyr}-IRS1、Akt/P^{ser473}-Akt 及 GLUT4 蛋白表达。**结果** (1)成功制备了 T2DM 大鼠模型。IHC 结果示 C、D 组较 A、B 组 P^{tyr}-IRS1、P^{ser473}-Akt 蛋白表达减少;Western blotting 结果示 P^{tyr}-IRS1、GLUT4 膜蛋白表达减少($P < 0.05$)。(2)氯沙坦干预后,D 组 FBG(mmol/L)、FINS($\mu\text{U}/\text{ml}$)(18.8 ± 4.1 , 27 ± 5)较 C 组(19.7 ± 3.7 , 27 ± 6)降低,ISI 升高(D 组 -6.18 ± 0.08 , C 组 -6.18 ± 0.08 , $P < 0.05$);IHC 示 P^{tyr}-IRS1 蛋白表达升高($P < 0.05$);Western blotting 示 GLUT4 膜蛋白、P^{tyr}-IRS1 上升($P < 0.05$),P^{ser473}-Akt 蛋白的表达无差异($P > 0.05$)。**结论** 氯沙坦通过增加骨骼肌组织中 GLUT4 的转位而改善 T2DM 大鼠的胰岛素抵抗。

【关键词】 2 型糖尿病大鼠; 氯沙坦; 葡萄糖转运蛋白 4; 胰岛素抵抗

Insulin resistance is improved by losartan in type 2 diabetic rats through glucose transporter protein 4 pathway Yan Zhaoli*, Wang Hui, Meng Xingkai, Su Xiulan, Zhang Jialing, HU Kanghong.

* Department of Endocrinology, Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China

Corresponding author: Yan Zhaoli, Email:aliceyzl@126.com

【Abstract】 Objective An animal model for type 2 diabetes mellitus(T2DM) was developed for studying improvement of angiotensin II receptor blocker on insulin resistance(IR) and influence on insulin receptor substrate 1(IRS1) and Akt phosphorylation of phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K) pathway and translocation of glucose transporter-4(GLUT4). **Methods** Twenty of 42 male SD rats were randomly fed with high-fat/high-sugar diet and treated with Streptozotocin for type 2 diabetic model and other 20 for normal control group fed with standard diet. Rats with FPG ≥ 7.8 mmol/L accompanied by IR were considered as T2DM models. Rats were randomly divided into control group A, control treated group B, T2DM control group C and T2DM treated group D($n = 10$ in each group), rats in group B and D were treated with losartan. Six weeks later, blood samples were measured to calculate ISI(insulin-sensitivity index). Skeletal muscles were removed from hind legs and stored. Expressions of IRS1/P^{tyr}-IRS1, Akt/P^{ser473}-Akt and GLUT4 protein detected by Immunohistochemistry(IHC) and Western blotting. **Results** (1) Models of T2DM rats were successfully induced. Compared with group A and B, expressions of P^{tyr}-IRS1, P^{ser473}-Akt in group C and D by IHC and expressions of P^{tyr}-IRS1 and membrane GLUT4 by Western blotting reduced significantly($P < 0.05$). (2) The value of FPG(mmol/L), FINS($\mu\text{U}/\text{ml}$) of T2DM rats decreased in Group D (18.8 ± 4.1 , 27 ± 5) compared with group C(19.7 ± 3.7 , 27 ± 6), while ISI increased(D group -6.18 ± 0.08 , C group -6.18 ± 0.08 , $P < 0.05$), the expression of P^{tyr}-IRS1 increased($P < 0.05$)(IHC), expression of membrane GLUT4 and P^{tyr}-IRS1 increased($P < 0.05$)(Western blotting), there was no difference of P^{ser473}-

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2014.01.009

基金项目:教育部春晖计划(Z2007-1-01008);内蒙古医科大学附属医院重大科研项目(NYFY ZD 201005)

作者单位:010050 呼和浩特,内蒙古医科大学附属医院内分泌科(闫朝丽、王慧),普通外科(孟兴凯),临床医学研究中心(苏秀兰、张嘉玲);中国科学院武汉病毒研究所病毒 RNA 结构与功能关系学科组(胡康洪)

通信作者:闫朝丽,Email:aliceyzl@126.com

Akt expression in both ways. **Conclusion** Losartan can increase the translocation of GLUT4 in muscle tissues to improve IR status of T2DM rats.

【Key words】 Type 2 diabetic rats; Losartan; Glucose transporter 4; Insulin resistance

胰岛素抵抗是 2 型糖尿病(T2DM)发生的启动因素。血管紧张素 II (Ang II)是肾素-血管紧张素系统(RAS)的重要效应分子,激活的 RAS 改变了胰腺血流、加重炎症反应及氧化应激,使胰岛形态和功能受损并使肌肉及脂肪功能受损导致胰岛素抵抗^[1]。因此抑制 RAS 是针对 T2DM 的胰岛素抵抗的重要靶点。研究显示 Ang II 受体拮抗剂(ARB)类药物可改善胰岛素抵抗^[2]。与阿替洛尔相比,氯沙坦可使新发糖尿病发生率下降 25%;缬沙坦较那格列奈能降低糖尿病的累积发病率^[2]。在胰岛素信号转导途径中,磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)是经典的下游通路,胰岛素受体底物 1(IRS1)磷酸化即 P^{tyr} -IRS1,再与 PI3K 的 P85 调节亚基结合,激活 Akt,促使葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4)由胞浆转移至胞膜,使组织有效利用葡萄糖。对于 ARB 改善胰岛素抵抗是否通过 PI3K-Akt 及 GLUT4 途径,目前仍有争议。本实验旨在研究氯沙坦对 T2DM 大鼠骨骼肌 IRS1、 P^{tyr} -IRS1、Akt、 P^{ser473} -Akt 及 GLUT4 表达的影响。

材料与方法

一、材料

雄性 SPF 级 SD 大鼠[北京维通利华实验动物中心,动物许可证号为 SCXK(京)2006-0009],高脂高糖动物饲料(北京鸿润宝顺科技有限公司),链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司),氯沙坦(杭州默沙东制药有限公司),碘¹²⁵胰岛素放射免疫分析药盒(解放军总医院科技开发中心放射免疫所)。

二、方法

1. 造模:6 周龄健康雄性 SD 大鼠 42 只,体重 180~200 g,适应性喂养 1 周后,按随机数字表法分为正常组($n=20$)和造模组($n=22$)。正常组给予普通饲料喂养(热量组成:碳水化合物 62%、蛋白质 26%、脂肪 12%),造模组给予高糖高脂饲料喂养 4 周末禁食 18 h,造模组给予一次性腹腔注射 1% STZ 溶液 30 mg/kg;正常组腹腔注射同剂量 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液;2 周后禁食(不禁水)12 h,上午 8 时断尾取血检测空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FINS),计算胰岛素敏感指数。FPG ≥ 7.8 mmol/L 且伴有胰岛素抵抗者为造模成

功^[3]。分为正常不干预组(A组)、正常干预组(B组)、糖尿病不干预组(C组)和糖尿病干预组(D组),均 10 只。B 组及 D 组给予氯沙坦 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[4] 干预 6 周, A 组及 C 组给予等量生理盐水。

2. 标本采集:药物干预 6 周后禁食 18 h,称体重麻醉,取下 40 只大鼠腓肠肌(在注射 5 U/kg 胰岛素 15 min 后^[5]),置于液氮冷冻固定,储存于 -80°C 备用。

3. 指标检测:观察行为、皮毛、饮食饮水量、小便、体重等。检测 FPG、FINS(放免法),计算胰岛素敏感指数($\text{ISI} = \ln[1/(FPG \times FINS)]$)。

4. P^{tyr} -IRS1、 P^{ser473} -Akt 蛋白的表达(S-P 法):操作步骤按说明书,一抗为 P^{tyr} -IRS1 (1:50), P^{ser473} -Akt (1:50)。光镜下每张切片随机选取 5 个视野,通过 Smart Scape 图像系统分析计算其平均灰度值。

5. Western blotting 检测 GLUT4、IRS1、 P^{tyr} -IRS1、Akt、 P^{ser473} -Akt 的表达:提取蛋白,配制 18% SDS-PAGE 分离胶溶液,分别取 80 μg 蛋白量的组织总蛋白样品上样,采用半干电转移仪将蛋白质转移至 PVDF 膜,用 5% TBS-T 脱脂奶粉封闭,室温振荡 60 min。一抗(总蛋白 GLUT4 为 1:1000,膜蛋白 GLUT4 1:500, IRS1 1:1000, P^{tyr} -IRS1 1:1000, Akt 1:1000, P^{ser473} -Akt 1:1000),封口 4°C 孵育过夜;二抗(内参 β -肌动蛋白 actin 为 1:2000), 37°C 振荡 60 min;避光显影,用 IPP 图像分析软件对目的条带进行分析,计算其平均灰度值。

三、统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计学软件,指标数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,进行方差齐性检验,组间两两比较采用 SNK 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 有统计学意义。

结 果

一、T2DM 大鼠模型制备及一般情况

T2DM 成模大鼠 20 只,死亡 2 只;正常组 20 只。成模大鼠表现为少动、拱背扎堆、眯眼、精神萎靡;进食、饮水及小便量增加,毛发暗淡少毛、刺毛。尾部个别出现少许溃烂、褐斑。喂养 4 周末,与正常组(A组 284 ± 58 、B组 279 ± 49)比较, C组(399 ± 44)、D组(392 ± 30)体重增加($P < 0.01$),FPG 水平

无差异($P>0.05$)。实验 6 周末结果见表 1,氯沙坦干预 6 周后结果见表 2。

二、IHC 结果

表 1 基线时大鼠一般情况 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	FPG (mmol/L)	FINS (mU/L)	ISI	体重(g)
A 组	5.6 ± 1.2	15 ± 6	-4.35 ± 0.14	324 ± 37
B 组	5.2 ± 1.1	15 ± 4	-4.31 ± 0.12	328 ± 42
C 组	19.7 ± 3.7 ^{ab}	27 ± 6 ^{ab}	-6.18 ± 0.08 ^{ab}	391 ± 48 ^{ab}
D 组	18.8 ± 4.1 ^{ab}	27 ± 5 ^{ab}	-6.18 ± 0.08 ^{ab}	374 ± 28 ^{ab}
F 值	83.315	18.288	134.491	7.154
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:FPG:空腹血糖;FINS:空腹胰岛素;ISI:胰岛素敏感指数;与 A 组比较,^a $P<0.05$;与 B 组比较,^b $P<0.05$

表 2 氯沙坦干预后大鼠一般情况 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	FPG (mmol/L)	FINS (mU/L)	ISI	体重(g)
A 组	5.3 ± 1.6	14 ± 4	-4.26 ± 0.11	463 ± 39
B 组	5.6 ± 1.4	14 ± 4	-4.27 ± 0.16	450 ± 24
C 组	19.8 ± 4.3 ^{ab}	37 ± 8 ^{ab}	-6.55 ± 0.12 ^{ab}	346 ± 39 ^{ab}
D 组	17.0 ± 3.7 ^{abc}	23 ± 5 ^{abc}	-5.91 ± 0.08 ^{abc}	353 ± 27 ^{ab}
F 值	69.439	42.731	56.828	35.884
P 值	0	0	0	0

注:FPG:空腹血糖;FINS:空腹胰岛素;ISI:胰岛素敏感指数;与 A 组比较,^a $P<0.05$;与 B 组比较,^b $P<0.05$;与 C 组比较,^c $P<0.05$

1. P^{tyr}-IRS1 蛋白的表达:结果(灰度值)显示,与 A 组(0.65 ± 0.18)、B 组(0.63 ± 0.17)相比, C 组(0.82 ± 0.14)表达下降($P<0.05$), D 组(0.79 ± 0.1)表达升高($P<0.05$),见图 1。

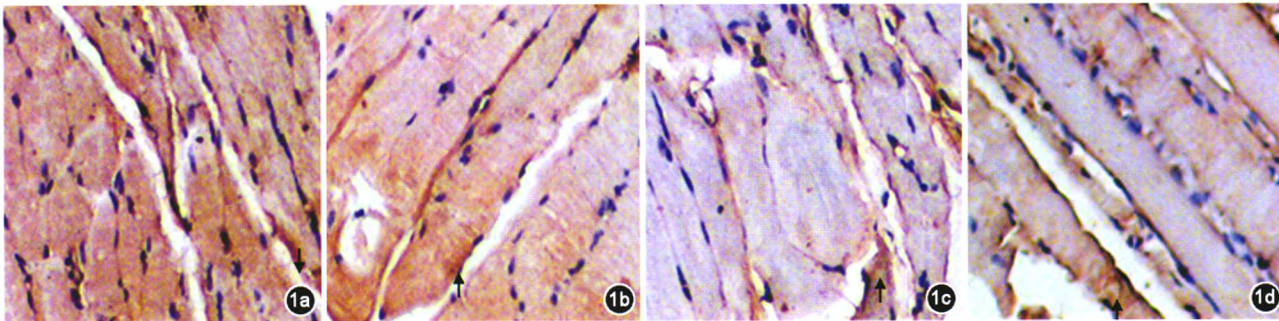
2. P^{ser473}-Akt 蛋白的表达: C 组(0.81 ± 0.10)与 A 组(0.70 ± 0.09)、B 组(0.68 ± 0.12)相比表达下降($P<0.05$), D 组(0.82 ± 0.12)与 C 组相比表达无差异($P>0.05$),见图 2。

三、Western blotting 结果(见图 3)

1. GLUT4 表达: GLUT4 总蛋白质水平($\bar{x} \pm s$)(/β-Actin)(A 组 0.65 ± 0.14, B 组 0.64 ± 0.10, C 组 0.63 ± 0.12, D 组 0.64 ± 0.09)没有差异($P>0.05$)。GLUT4 膜蛋白 C 组(0.64 ± 0.06)、D 组(0.67 ± 0.09)与 A 组(0.71 ± 0.10)、B 组(0.70 ± 0.07)相比降低($P<0.05$)。D 组较 C 组表达增加($P<0.05$)。

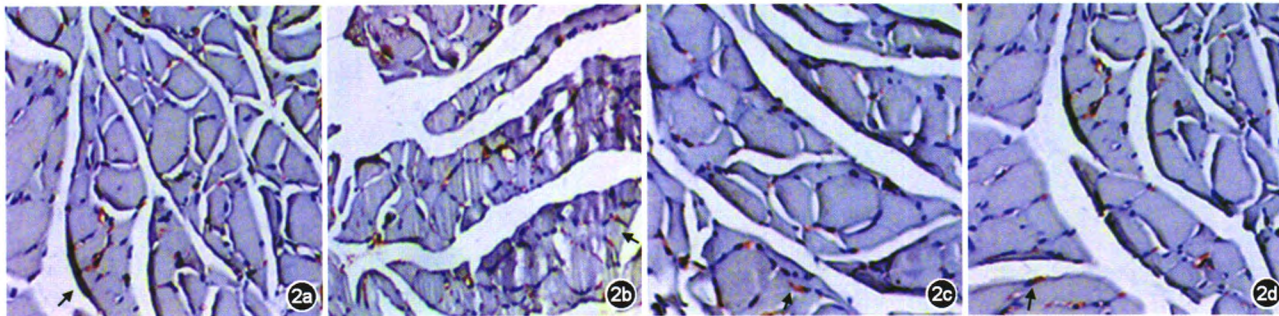
2. IRS1 及 P^{tyr}-IRS1 蛋白表达:IRS1 蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)(/β-Actin)在 4 组中没有差异(A 组 0.71 ± 0.02, B 组 0.66 ± 0.03, C 组 0.73 ± 0.09, D 组 0.69 ± 0.05, $P>0.05$)。P^{tyr}-IRS1 蛋白 C 组(0.95 ± 0.03)与 A 组(1.37 ± 0.10)、B 组(1.38 ± 0.08)相比下降($P<0.05$), D 组(1.09 ± 0.12)较 C 组表达增加($P<0.05$)。

3. Akt、P^{ser473}-Akt 蛋白表达: Akt 蛋白($\bar{x} \pm s$)



注:1a:正常不干预组;1b:正常干预组;1c:2 型糖尿病(T2DM)不干预组;1d:T2DM 干预组

图 1 P^{tyr}-IRS1 蛋白表达 低倍放大(箭头示 P^{tyr}-IRS1 蛋白表达阳性)



注:2a:正常不干预组;2b:正常干预组;2c:2 型糖尿病(T2DM)不干预组;2d:T2DM 干预组

图 2 P^{ser473}-Akt 蛋白表达 低倍放大(箭头示 P^{ser473}-Akt 蛋白表达阳性)

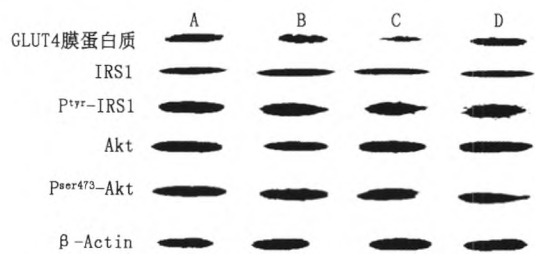


图 3 各组大鼠骨骼肌组织中蛋白表达 (n=10)
注:A:正常不干预组;B:正常干预组;C:2 型糖尿病 (T2DM) 不干预组;D:T2DM 干预组;GLUT4:葡萄糖转运蛋白 4; IRS1:胰岛素受体底物 1;P^{tyr}-IRS1:胰岛素受体底物 1 酪氨酸磷酸化;Akt:丝氨酸/苏氨酸激酶;P^{ser473}-Akt:丝氨酸激酶磷酸化

(/β-Actin)表达在 4 组中 (A 组 0.72 ± 0.02, B 组 0.63 ± 0.03, C 组 0.71 ± 0.11, D 组 0.62 ± 0.05) 没有差异 (P>0.05)。P^{ser473}-Akt C 组 (0.98 ± 0.28) 与 A 组 (1.37 ± 0.30)、B 组 (1.52 ± 0.39) 相比表达下降 (P<0.05), D 组 (0.97 ± 0.03) 与 C 组相比差异无统计学意义 (P>0.05)。

讨 论

伴胰岛素抵抗的 T2DM 大鼠造模方法一直在探索中^[3-6]。高脂高糖饮食/小剂量 STZ 大鼠模型缩短了造模时间,是研究 T2DM 胰岛素抵抗的理想模型。本文以血糖 >7.8 mmol/L 伴胰岛素敏感性降低为 T2DM 大鼠成模标准^[3]。本研究成功地建立了 T2DM 动物模型,大鼠 FPG 和 FINS 水平增高。氯沙坦干预后 FPG 及 FINS 水平下降,ISI 上升,改善了胰岛素抵抗。与厄贝沙坦的研究结果相似^[7],该研究在胰岛素抵抗的 ZK 大鼠及 L6 成肌细胞中证实厄贝沙坦促进了 GLUT4 的转位。胰岛素信号转导途径包括 PI3K、有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 及 CAP-Cbl。有研究在胰岛素抵抗大鼠的心肌细胞中发现 ARB 改善胰岛素抵抗通过 PI3K-Akt 途径^[8]。

本研究 Western blotting 结果显示 IRS1、Akt 蛋白表达没有差别,二者为非活性形式,因此不能说明问题。T2DM 组 P^{tyr}-IRS1、P^{ser473}-Akt 蛋白表达较正常组下降,氯沙坦干预后 P^{ser473}-Akt 水平并没有变化。在胰岛素抵抗患者的骨骼肌中 PI3K 活性降低,但仍能使 Akt 正常激活^[9]。PI3K 的下游靶分子除 Akt 之外,还有非典型 PKC 异型体 ζ 和 λ (PKCζ/λ)^[10]。Jiang 等^[11] 研究表明,使用 PI3K 抑制剂 (wortmannin) 能阻断 GLUT4 转位,而当加入 PI-3 类

似物后,该抑制剂并不能阻断脂肪细胞对葡萄糖摄取的增加,提示从 IRS 磷酸化到 Akt 的激活缺陷可能并不是 T2DM 胰岛素抵抗的唯一途径。

本研究中氯沙坦干预后 GLUT4 膜蛋白表达有差异,表明它可促进骨骼肌细胞膜 GLUT4 的易位,这与其他研究一致^[3]。GLUT4 是主要的葡萄糖运载体,其充分转位需 p38 MAPK 或其下游信号分子的磷酸化激活, GLUT4 磷酸化或构象改变,从而介导胰岛素调节 GLUT4 的活性^[12]。近期研究表明胰岛素还可通过 CAP/Cbl 通路促使 GLUT4 转位^[13]。但氯沙坦是否通过 p38 MAPK 调节 GLUT4 活性或通过 CAP-Cbl 途径影响葡萄糖的转运还有待探索。

参 考 文 献

[1] Goossens GH. The renin-angiotensin system in the pathophysiology of type 2 diabetes[J]. *Obes Facts*,2012,5:611-624.
[2] Luan FL. Effect of valsartan on the incidence of diabetes[J]. *N Engl J Med*,2010,263:792-793.
[3] Sahin K, Onderci M, Tuzcu M, et al. Effect of chromium on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetes mellitus: the fat-fed, streptozotocin-treated rat[J]. *Metabolism*, 2007,56:1233-1240.
[4] WU Yong, YANG Jing-Ping, ZHOU Yun-Feng, et al. Mechanism of improving effect of losartan on insulin sensitivity of non-insulin-dependent diabetes mellitus rats[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2004,56:539-549.
[5] Sun W, Bi Y, Liang H, et al. Inhibition of obesity-induced hepatic ER stress by early insulin therapy in obese diabetic rats [J]. *Endocrine*,2011,39:235-241.
[6] 陈嘉,张永斌,桑传兰,等. SD 大鼠 2 型糖尿病模型的建立及相关指标的测定[J]. *动物医学进展*,2012,33:91-95.
[7] Kobayashi T, Akiyama Y, Akiyama N, et al. Irbesartan enhances GLUT4 translocation and glucose transport in skeletal muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol*,2010, 649(1-3):23-28.
[8] Huisamen B, Pérel SJ, Friedrich SO, et al. ANG II type I receptor antagonism improved nitric oxide production and enhanced eNOS and PKB/Akt expression in hearts from a rat model of insulin resistance[J]. *Mol Cell Biochem*,2011,349(1-2):21-31.
[9] Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, et al. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes[J]. *J Clin Invest*,1999,104:733-741.
[10] Sajjan MP, Farese RV. Insulin signalling in hepatocytes of humans with type 2 diabetes: excessive production and activity of protein kinase C-α (PKC-α) and dependent processes and reversal by PKC-α inhibitors[J]. *Diabetologia*,2012,55: 1446-1457.
[11] Jiang T, Sweeney G, Rudolf MT, et al. Membrane-per-meant esters of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate [J]. *J Biol Chem*,1998,273:11017-11024.
[12] Furtado LM, Somwar R, Sweeney G. Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin[J]. *Biochem Cell Biol*,2002,80: 569-578.
[13] Zhao Y, Zhou Y. Puerarin improve insulin resistance of adipocyte through activating Cbl binding protein path [J]. *Chin J Integr Med*,2012,18:293-298.

(收稿日期: 2013-02-20)

(本文编辑:杨颖)

作者：

[闫朝丽](#)，[王慧](#)，[孟兴凯](#)，[苏秀兰](#)，[张嘉玲](#)，[胡康洪](#)，[Yan Zhaoli](#)，[Wang Hui](#)，[Meng Xingkai](#)，[Su Xiulan](#)，[Zhang Jialing](#)，[HU Kanghong](#)

作者单位：

[闫朝丽,王慧,Yan Zhaoli,Wang Hui\(内蒙古医科大学附属医院内分泌科, 呼和浩特, 010050\)](#)，[孟兴凯,Meng Xingkai\(内蒙古医科大学附属医院普通外科, 呼和浩特, 010050\)](#)，[苏秀兰,张嘉玲,Su Xiulan,Zhang Jialing\(内蒙古医科大学附属医院临床医学研究中心, 呼和浩特, 010050\)](#)，[胡康洪,HU Kanghong\(中国科学院武汉病毒研究所病毒RNA结构与功能关系学科组\)](#)

刊名：

[中华糖尿病杂志](#)

英文刊名：

[Chinese Journal of Diabetes Mellitus](#)

年，卷(期)：

2014, 6(1)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zhtnb201401009.aspx