文章编号:1000-5404(2010)09-0883-04

论著

炎症应激加重CD36基因敲除小鼠胰岛素抵抗

陈 昱[1],柳 青[1],雷 寒[2],刘 宏[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:临床研究中心[1],心血管内科[2])

[摘要] **目的** 研究炎症能否加重CD36基因敲除小鼠胰岛素抵抗。**方法** 14周正常饮食喂养的野生型C57BL/6($n=7$)和CD36基因敲除(CD36 KO)小鼠($n=12$),并将CD36 KO小鼠按随机数字表法分为炎症刺激组和无炎症刺激组,分别进行糖耐量、胰岛素测定和甘油三酯(TG)、血清淀粉样蛋白A(SAA)、白介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)以及肝脏组织中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、核糖体蛋白S6激酶(S6K)、胰岛素受体底物1(IRS-1)、pIRS-1,2的基因和蛋白表达相关检测。**结果** 与野生型小鼠相比,CD36 KO无炎症刺激组存在胰岛素抵抗,胰岛素抵抗指数增加[(3.01±1.24) *vs* (0.81±0.12),$P<0.05$],TG增高[(0.83±0.15)mmol/L *vs* (0.21±0.06) mmol/L,$P<0.05$],肝脏mTOR、S6K基因及蛋白水平增高,IRS-1基因及蛋白水平降低,pIRS-1,2蛋白水平增加。与CD36 KO无炎症刺激组相比,炎症刺激组小鼠胰岛素抵抗加强,胰岛素抵抗指数增加[(4.65±1.54) *vs* (3.01±1.24),$P<0.05$],TG[(2.66±0.17)mmol/L *vs* (0.83±0.15) mmol/L,$P<0.05$],SAA、IL-6、TNF-α水平增高[(13.62±5.05)ng/ml *vs* (5.74±1.54) ng/ml,$P<0.05$;(43.81±1.23)pg/ml *vs* (35.24±4.13) pg/ml,$P<0.05$;(235.1±32.6)pg/ml *vs*(169.2±36.1) pg/ml,$P<0.05$],肝脏的mTOR和S6K基因及蛋白水平增高,IRS-1基因及蛋白水平降低,pIRS-1,2蛋白水平增加。**结论** 炎症应激可以加重CD36基因敲除小鼠胰岛素抵抗。

[关键词] 抗原, CD36;小鼠,基因敲除;炎症;胰岛素抵抗
[中图法分类号] R-332; R363.27; R587.1 **[文献标志码]** A

Inflammatory stress induces insulin resistance in CD36 knockout mice

Chen Xian[1], Liu Qing[1], Lei Han[2], Liu Hong[1] ([1]Clinical Research Center, [2]Cardiology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To explore whether the inflammatory stress can increase insulin resistance in the CD36 knockout (KO) mice. **Methods** After the mice were fed a standard chow for 14 weeks, oral glucose tolerance test, insulin release tests, lipids metabolism, SAA, IL-6, TNF-α and hepatic mRNA and proteins expression of mTOR, S6K, IRS-1, pIRS-1,2 were measured. **Results** Compared with the wide-type, the CD36 KO mice un-inflamed exhibited insulin resistance, and the insulin resistance index was increased[(3.01±1.24) *vs* (0.81±0.12), $P<0.05$], the triglyceride level [(0.83±0.15) mmol/L *vs* (0.21±0.06) mmol/L, $P<0.05$] together with the hepatic mRNA and protein expression of mTOR and S6K were increased while the IRS-1 expression were reduced, and the protein of pIRS-1,2 were raised. Compared with the CD36 KO un-inflamed control, the inflammatory group represented the elevated lever of insulin resistance[(4.65±1.54) *vs* (3.01±1.24), $P<0.05$], triglyceride[(2.66±0.17) mmol/L *vs* (0.83±0.15) mmol/L, $P<0.05$], SAA[(13.62±5.05) ng/ml *vs* (5.74±1.54) ng/ml, $P<0.05$], IL-6[(43.81±1.23) pg/ml *vs* (35.24±4.13) pg/ml, $P<0.05$], TNF-α[(235.1±32.6) pg/ml *vs* (169.2±36.1) pg/ml, $P<0.05$], at the same time, the hepatic mRNA and proteins expression of mTOR and S6K were increased, while the hepatic mRNA and proteins expression of IRS-1 were reduced, also the protein of pIRS-1,2 were raised. **Conclusion** The inflammatory stress indeed increases insulin resistance in the CD36 knockout mice.

[Key words] antigens, CD36; mice, knockout; inflammation; insulin resistance

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2008CB517309), and the National Natural Science Foundation of China (30670869). Corresponding author: Liu Qing, Tel: 86-23-89012600, E-mail: qingliu5566@yahoo.cn

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划前期研究专项(973计划,2008CB517309);国家自然科学基金(30670869)
[通信作者] 柳 青,电话:(023)89012600,E-mail:qingliu5566@yahoo.cn

目前,胰岛素抵抗作为一个高危因素,可以引起高血压、肥胖症、血脂代谢异常,包括高密度脂蛋白低下

和甘油三酯的异常升高等症状。然而也有很多研究报道许多慢性炎症患者,其体质量指数和血脂水平均处于正常范围甚至低于正常水平,却依然可以产生胰岛素抵抗,在80年代后期就有慢性炎症可以诱导胰岛素抵抗相关的研究[1]。Williamson[2]曾在1901年就发现水杨酸盐可以有效降低人体尿糖的排泄。1957年也有研究报道可以给予糖尿病患者大剂量阿司匹林治疗从而代替胰岛素注射的方案[3]。现在,胰岛素抵抗已经被认为是一种慢性炎症反应,然而其机制以及与慢性炎症的关系却依然没有阐述清楚。

CD36又称脂肪酸转移酶,是一种广泛存在于各种组织细胞的膜糖蛋白。近年研究发现,CD36不仅参与长链脂肪酸(LCFA)的跨膜转运,而且与胰岛素分泌等密切相关,并在胰岛素抵抗以及动脉粥样硬化的发生、发展中起到一定的作用[4]。有研究证实CD36基因缺陷的SHR鼠表现为胰岛素抵抗和脂代谢紊乱[5]。同样有研究证明CD36基因敲除(CD36 KO)小鼠表现为糖耐量异常和高胰岛素血症,并极易产生胰岛素抵抗[6]。Pravenec等[7]也通过胰岛素钳夹实验发现CD36 KO小鼠可以诱导肝脏产生胰岛素抵抗。所以,我们选择CD36 KO小鼠作为模型,研究在慢性炎症刺激下是否可以引起胰岛素抵抗的加强。

1 材料与方法

1.1 实验动物和方案

7只14周[8]雄性野生型C57BL/6和12只CD36 KO小鼠(Dr Maria Febbraio, Lerner Research Institute, USA惠赠),体质量20~35 g,分笼饲养在重庆医科大学实验动物中心(22~28 ℃),明暗周期各12 h。自由饮水,每只小鼠每天供给食物3.5 g。同时将CD36 KO实验小鼠按随机数字表法分为无炎症刺激对照和炎症刺激2组,每组6只。炎症刺激组3周后隔天给予小鼠皮下注射0.5 ml 10%的酪蛋白(Casein),野生型C57BL/6和CD36无炎症刺激组隔天相应给予皮下注射0.5 ml生理盐水,直至处死前1周。3组小鼠均给予普通饲料喂养(脂肪含量11%[9])。

1.2 主要仪器和试剂

血糖仪(罗氏公司),成像仪(Synoptics公司),Real-Time PCR仪、比色计(Bio公司);血糖试纸(Roche公司),SAA试剂盒(Rapid Bio公司),IL-6、TNF-α试剂盒(RD公司),胰岛素测量试剂盒(Linco公司),RT-PCR试剂盒、SYBERGREEN(ABI公司),ECL化学发光液(Amersham公司),抗兔mTOR、IRS-1、抗羊pIRS-1,2 (Ser270[10],Santa Cruze公司)。

1.3 方法

1.3.1 葡萄糖耐量实验 第12周时测量野生型C57BL/6小鼠和2组CD36小鼠的糖耐量水平,每只小鼠禁食12 h后进行葡萄糖耐量实验(OGTT)。腹腔注射葡萄糖0.75 mg,分别观察其在0、15、30、60、120 min时的血糖水平,并详细记录。

1.3.2 血胰岛素及胰岛素抵抗指数 第12周时将3组小鼠禁食12 h后,腹腔注射氯胺酮(150 mg/kg)并经眶周静脉取血,ELISA法测定空腹胰岛素水平,其中胰岛素抵抗指数用HOMA-IR表示。

1.3.3 ELISA法检测 14周处死小鼠,获取血液样本和肝脏组织。血液样本离心后取上清,用ELISA法测量血清中甘油三酯(TG)含量和肝脏中SAA、IL-6和TNF-α含量。

1.3.4 Real-Time PCR 将小鼠肝脏组织用液氮研磨后用Trizol提取RNA,标化逆转录成cDNA后进行Real-Time PCR,引物序列见表1。扩增条件为mTOR:50 ℃ 2 min, 95 ℃ 5 min, 95 ℃ 20 s, 55 ℃ 20 s,循环数40次, 95 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 4 ℃ 5 min。S6K、IRS-1同mTOR。同时扩增β-actin作为内参。

表1 小鼠Real-Time PCR引物序列

基因	引物序列
mTOR	正义链5′-TCTGTCTTCGCTTGTCTTTCAACT-3′
	反义链5′-TGTCGCACGAGGACTTTATTCA-3′
IRS-1	正义链5′-GCACCTGGTGGCTCTCTACAC-3′
	反义链5′-TCGCTATCCGCGGCAAT-3′
S6K	正义链5′-CACTCAGGCCCCCCTACACT-3′
	反义链5′- GCCGTCACTGAAAACCAAGTTC-3′
β-actin	正义链5′-CGATGCCCTGAGGCTCTTT-3′
	反义链5′-TGGATGCCACAGGATTCCAT-3′

1.3.5 Western blot 测定肝脏组织mTOR、S6K、IRS-1、pIRS-1,2的蛋白表达,提取相应肝脏组织蛋白,经6% SDS-PAGE分离[11],电转膜后用5%脱脂奶粉封闭过夜,再分别与mTOR、S6K、IRS-1、pIRS-1,2抗体反应,继而和相应二抗作用,再用ECL发光显示蛋白条带。

1.4 统计学处理

采用SAS 9.1软件进行统计分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对3组小鼠不同时间点血糖水平比较,采用重复测量设计方差分析,其余指标2组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 血清指标检测

血清脂质指标检测结果显示,无炎症刺激组小鼠TG水平明显高于野生型组小鼠($P<0.05$),同时,CD36小鼠炎症刺激组与无炎症刺激组相比血清TG水平明显升高($P<0.05$)。小鼠血清中SAA、IL-6以及TNF-α水平检测结果显示,CD36 KO小鼠炎症刺激组较无炎症刺激组明显升高($P<0.05$,表2)。

表2 3组小鼠血清指标含量的比较

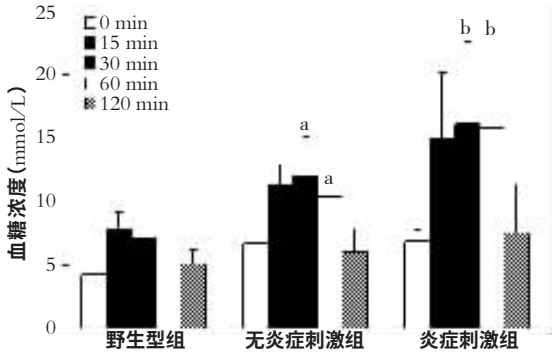
组别	n	TG(mmol/L)	SAA(ng/ml)	IL-6(pg/ml)	TNF-α(pg/ml)
野生型组	7	0.21±0.06	1.11±0.12	9.82±1.23	30.2±4.1
无炎症刺激组	6	0.83±0.15[a]	5.74±1.54[a]	35.24±4.13[a]	169.2±36.1[a]
炎症刺激组	6	2.66±0.17[b]	13.62±5.05[b]	43.81±1.23[b]	235.1±32.6[b]

a: $P<0.05$,与野生型组比较;b: $P<0.05$,与无炎症刺激组比较

2.2 糖耐量实验

对野生型组、无炎症刺激组和炎症刺激组3组小鼠进行血糖测定,多重比较结果显示,在120 min内,无炎症刺激组小鼠同野生型组小鼠相比,血糖浓度均有所升高,其中在30、60 min,差异有统计学意义($P<0.05$)。小鼠无炎症刺激组和炎症刺激组相比,2组血糖水平在空腹,15、120 min时水平差别

均无统计学意义($P>0.05$),但在 30、60 min 这 2 个时间点,炎症刺激组小鼠血糖水平明显高于无炎症刺激组($P<0.05$,图 1)。



a:$P<0.05$,与野生型组比较;b:$P<0.05$,与无炎症刺激组比较

图 1　3 组小鼠不同时间点糖耐量水平比较

2.3　各组小鼠空腹血糖、空腹胰岛素测定及胰岛素抵抗指数

对野生型组、无炎症刺激组和炎症刺激组小鼠进行空腹血糖及空腹胰岛素测定,无炎症刺激组同野生型组相比,空腹血糖和胰岛素水平均有所升高,且空腹胰岛素水平和胰岛素抵抗指数与野生型组小鼠相比差异有统计学意义($P<0.05$)。炎症刺激组同无炎症刺激组相比,空腹血糖和空腹胰岛素水平升高,且空腹胰岛素水平和胰岛素抵抗指数与无炎症刺激组小鼠相比差异有统计学意义($P<0.05$,表 3)。

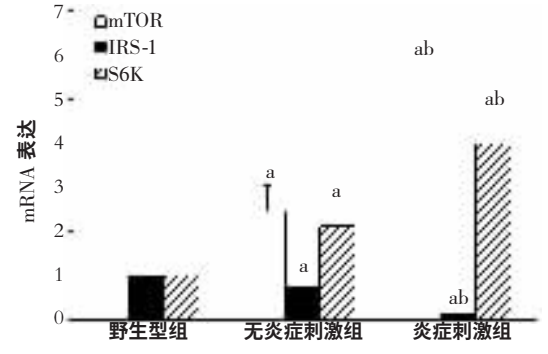
表 3　3 组小鼠空腹血糖及血胰岛素的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	血糖(mmol/L)	胰岛素(mIU/ml)	HOMA-IR
野生型组	7	4.32±1.21	5.21±0.80	0.81±0.12
无炎症刺激组	6	5.98±1.52	10.34±2.12[a]	3.01±1.24[a]
炎症刺激组	6	6.87±2.34	14.51±2.78[b]	4.65±1.54[b]

a:$P<0.05$,与野生型组比较;b:$P<0.05$,与无炎症刺激组比较

2.4　各组小鼠肝脏 mTOR、IRS-1、S6K mRNA 的表达

炎症刺激组和无炎症刺激组 mTOR、IRS-1、S6K 的 mRNA 表达水平与野生型组标准值 1 分别进行比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。同时,炎症刺激组与无炎症刺激组相比,差异也有统计学意义($P<0.05$,图 2)。

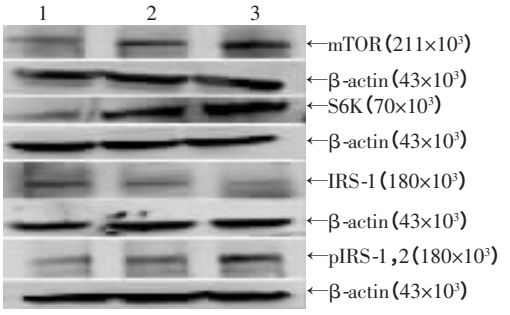


a:$P<0.05$,与野生型组比较;b:$P<0.05$,与无炎症刺激组比较

图 2　3 组小鼠肝脏 mTOR、IRS-1、S6K mRNA 的表达

2.5　各组小鼠肝脏 mTOR、S6K、IRS-1、pIRS-1,2 蛋白的表达

炎症刺激组和无炎症刺激组 mTOR、S6K、pIRS-1,2 的蛋白表达水平较之野生型组小鼠升高,而 IRS-1 的蛋白表达水平较之野生型组降低(图 3)。



1:野生型组;2:无炎症刺激组;3:炎症刺激组

图 3　3 组小鼠肝脏 mTOR、S6K、IRS-1、pIRS-1,2 蛋白的表达

3　讨论

胰岛素的生理功能有很多,其中很重要的一项是促进细胞摄取葡萄糖,加强糖原、脂肪的合成,并促进糖向脂质转化。当胰岛素分泌减少或者在胰岛素抵抗的状态下,机体的胰岛素并不能发挥正常的生理功能,容易导致脂质在组织器官内异常沉积并引起脂质介导的组织损伤。所以目前普遍认为胰岛素正常生理功能的缺失与脂肪肝、动脉粥样硬化的发病密切相关,而且胰岛素抵抗的程度同病变进展成正相关。Coort 等[12]分析了 Zucker 肥胖大鼠和正常 Zucker 大鼠心肌 LCFA 的摄取率与 CD36 分布的关系,结果显示 Zucker 肥胖大鼠心肌细胞甘油三酯的堆积与细胞膜 CD36 转位增加有关。分析认为可能是由于细胞内 CD36 运输小泡循环障碍,转位至细胞膜的 CD36 增多,其结果是 LCFA 向细胞内的转运增加,导致甘油三酯堆积。此外,对 MCK/CD36 小鼠(骨骼肌过度表达 CD36 的转基因小鼠)的研究显示,MCK/CD36 小鼠的体脂和血清游离脂肪酸虽较对照组降低,但仍然表现为高血糖和高胰岛素血症[13],提示 MCK/CD36 小鼠存在胰岛素抵抗,可能是因为骨骼肌过表达的 CD36 促进了 LCFA 的摄取,而使骨骼肌对葡萄糖的转运和氧化利用减少。上述研究表明 CD36 与细胞内甘油三酯聚集、胰岛素抵抗密切相关。

我们实验结果表明,CD36 KO 小鼠甘油三酯水平较野生型有明显的增加,糖耐量和空腹胰岛素测定实验证明,CD36 KO 小鼠同野生型小鼠相比存在较为明显的胰岛素抵抗,CD36 KO 小鼠的空腹血糖浓度以及空腹胰岛素水平要明显高于野生型组小鼠。结合文献表明,CD36 是一个较好的胰岛素抵抗模型。对给予皮下注射 Casein 从而引起慢性炎症反应的 CD36 KO 小鼠进行脂质检测,糖耐量以及胰岛素测定实验结果显示,注射 Casein 的 CD36 KO 小鼠甘油三酯水平进一步增加,炎症因子数目较无炎症刺激组也有显著升高,胰

岛素抵抗指数显著增加,抵抗程度进一步加强。

炎症是引起胰岛素抵抗的重要因素之一。许多炎症因子,如IL-6、TNF-α、干扰素γ等,通过血液或者旁分泌的作用干扰胰岛素的信号转导通路从而导致胰岛素抵抗。这些炎症因子主要通过干扰IRS的正常酪氨酸磷酸化,诱导IRS的异常丝氨酸/苏氨酸磷酸化而导致IRS的胰岛素受体的结合能力下降,同时使IRS激活其下游的磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3-K)的磷酸化过程减弱,从而干扰胰岛素信号经IRS/PI3-K通路下传。IRS的丝氨酸/苏氨酸磷酸化还可以增加IRS的降解,使IRS成为胰岛素受体激酶的抑制物。mTOR是雷帕霉素的靶分子,是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,其底物主要是控制与细胞生长和增殖密切相关的蛋白质的合成,从而在接受营养信号和调节细胞生长与增殖中起到重要的作用。研究发现TNF-α信号途径中一个主要的下游激酶IκB激酶β(IKKβ)与TSC1相互作用,并在Ser270、Ser307等位置上进行了磷酸化,从而导致TSC1的抑制,这一IKKβ介导TSC1抑制的过程同时又激活了mTOR途径,从而可以诱导胰岛素抵抗的发生[14,15]。也有研究发现那巴霉素(mTOR特异性抑制剂)可以逆转由TNF-α和IL-6介导的胰岛素抵抗,其预处理可以明显拮抗TNF-α、IL-6导致的IRS的酪氨酸磷酸化水平下降[16,17]。当出现TNF-α信号、IL-6等炎症因子刺激时,细胞因子与细胞膜表面的相应受体结合,可以有效刺激mTOR的活化。S6K则是mTOR的下游底物,研究表明,S6K在糖尿病发病过程中的主要作用就是介导IL-6、TNF-α等炎症因子,在4个丝氨酸位点磷酸化IRS,使其失活并降解,从而阻断胰岛素的作用[10]。我们的实验检测结果同样证实,在给予CD36 KO小鼠相应的炎症刺激后,其血中的炎症因子相对于无炎症刺激组显著增加,可以激活mTOR并进而活化其底物S6K,使得mTOR和S6K的表达量增加,并进一步导致IRS的异常丝/苏氨酸磷酸化,IRS的异常磷酸化表达量升高,从而干扰正常胰岛素转导信号通路并最终导致胰岛素抵抗。

本实验选择胰岛素抵抗模型CD36 KO小鼠作为研究对象,在给予CD36 KO小鼠炎症刺激后,通过相关炎症因子的增加刺激mTOR以及S6K的表达并最终导致IRS的异常磷酸化,最终验证了炎症应激确实可以加重CD36 KO小鼠胰岛素抵抗的加强。胰岛素相关信号转导通路相当复杂,多条通路(NF-κB、PI-3K、p38 MAPK和JNK通路)均与外周胰岛素抵抗发生有关,其各通路之间可能还有交互作用,这还有待我们进一步研究。

志谢 对重庆医科大学附属第一医院临床研究中心和重庆医科大学脂质中心以及统计学教研室钟晓妮教授为本课题提供的技术指导表示感谢

参考文献:

[1] Svenson K L, Pollare T, Lithell H, *et al*. Impaired glucose handling in active rheumatoid arthritis: relationship to peripheral insulin resistance [J]. Metabolism, 1988, 37(2): 125-130.

[2] Williamson R T. On the treatment of glycosuria and diabetes mellitus with sodium salicylate[J]. Br Med J, 1901, 1(2100): 760-762.

[3] Reid J, Macdougall A I, Andrews M M. Aspirin and diabetes mellitus [J]. Br Med J, 1957, 2(5053): 1071-1074.

[4] Erdman L K, Cosio G, Helmers A J, *et al*. CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria[J]. J Immunol, 2009, 183(10): 6452-6459.

[5] Aitman T J, Glazier A M, Wallace C A, *et al*. Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats[J]. Nat Genet, 1999, 21(1): 76-83.

[6] Hajri T, Ibrahimi A, Coburn C T, *et al*. Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy [J]. J Biol Chem, 2001, 276(26): 23661-23666.

[7] Pravenec M, Landa V, Zidek V, *et al*. Transgenic expression of CD36 in the spontaneously hypertensive rat is associated with amelioration of metabolic disturbances but has no effect on hypertension[J]. Physiol Res, 2003, 52(6): 681-688.

[8] Kim E, Tolhurst A T, Qin L Y, *et al*. CD36/fatty acid translocase, an inflammatory mediator, is involved in hyperlipidemia-induced exacerbation in ischemic brain injury[J]. J Neurosci, 2008, 28(18): 4661-4670.

[9] 李秀兰,柳青,雷寒,等. 炎症对SRA/CD36双基因敲除小鼠肝LDL受体表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(15): 1436-1439.

[10] Zhang J, Gao Z, Yin J, *et al*. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-alpha signaling through IKK2[J]. J Biol Chem, 2008, 283(51): 35375-35382.

[11] Hu M, Abe-Dohmae S, Tsujita M, *et al*. Biogenesis of HDL by SAA is dependent on ABCA1 in the liver *in vivo*[J]. J Lipid Res, 2008, 49(2): 386-393.

[12] Coort S L, Hasselbaink D M, Koonen D P, *et al*. Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese zucker rats[J]. Diabetes, 2004, 53(7): 1655-1663.

[13] Heron-Milhavet L, Haluzik M, Yakar S, *et al*. Muscle-specific overexpression of CD36 reverses the insulin resistance and diabetes of MKR mice[J]. Endocrinology, 2004, 145(10): 4667-4676.

[14] Lee D F, Kuo H P, Chen C T, *et al*. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis *via* the mTOR pathway [J]. Cell, 2007, 130(3): 440-445.

[15] Lee D F, Kuo H P, Chen C T, *et al*. IKKbeta suppression of TSC1 function links the mTOR pathway with insulin resistance[J]. Int J Mol Med, 2008, 22(5): 633-638.

[16] 曾天舒, 陈璐璐, 潘世秀. 肿瘤坏死因子α和白细胞介素6致脂肪细胞胰岛素抵抗的不同机制[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2007, 23(1): 77-78.

[17] 曾天舒, 袁莉, 陈璐璐. 肿瘤坏死因子α对3T3-L1细胞葡萄糖摄取和IRS-1信号通路的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22(9): 830-834.

(**收稿**:2009-11-04;**修回**:2009-12-08)

(编辑 吴培红)