论著

文章编号:1000-5404(2010)23-2530-03

不同浓度瘦素对人胚胎绒毛滋养细胞膜胰岛素受体磷酸化的抑制作用

李素芬,杨 鹰 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院妇产科)

【摘要】 目的 研究不同浓度瘦素对人胚胎绒毛滋养细胞胰岛素受体(InsR)酪氨酸磷酸化水平的影响,探讨瘦素在胰岛素受体信号转导分子机制中的作用。方法 体外培养人工流产胚胎的绒毛滋养细胞,根据培养基中加入瘦素的浓度不同将实验分为空白对照组以及瘦素浓度分别为100、250、500 μg/L的实验组。每组分别培养24 h后,采用Western blot方法测定滋养细胞膜磷酸化胰岛素受体β亚基的含量。结果 滋养细胞细胞膜磷酸化胰岛素受体β亚基水平测定:浓度分别为100、250、500 μg/L的实验组胰岛素受体的磷酸化水平均显著低于对照组($P<0.05$),并随着瘦素浓度的上升,绒毛滋养细胞细胞膜磷酸化胰岛素受体β亚基的含量进一步下降。空白对照组的磷酸化胰岛素受体蛋白水平为(1.216 2±0.032 2),当瘦素浓度分别为100、250 μg/L和500 μg/L时,磷酸化的胰岛素受体蛋白水平分别为(1.056 7±0.042 4)、(0.957 6±0.026 8)和(0.734 2±0.038 8)。瘦素浓度和滋养细胞膜胰岛素受体β亚基磷酸化水平呈负相关($r=-0.403\ 2$, $P<0.05$)。结论 瘦素与胰岛素受体信号转导系统有相关性,抑制细胞膜胰岛素受体β亚基磷酸化可能是其影响胰岛素受体信号转导的机制之一。

【关键词】 瘦素;胰岛素受体磷酸化;滋养细胞;胰岛素受体信号转导
【中图法分类号】 R321.5;R394.2;R977.1 【文献标志码】 A

Inhibitory effect of leptin on phosphorylation of insulin receptors in trophoblast cells

Li Sufen, Yang Ying (Department of Obstetrics and Gynecology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of leptin at different concentrations on phosphorylation of insulin receptors in human trophoblast cells and its role in molecular mechanism underlying insulin receptor signal transduction. Methods Trophoblast cells from artificially aborted embryo were cultured *in vitro* and divided into blank control group, 100 μg/L leptin group, 250 μg/L leptin group and 500 μg/L leptin group. After incubated for 24 h, phosphorylation of insulin receptors was detected by Western blotting. Results The phosphorylation of insulin receptor β subunit in trophoblast cells was significantly lower in 100 μg/L leptin group, 250 μg/L leptin group and 500 μg/L leptin group than in control group ($P<0.05$), which decreased with the increasing concentration of leptin. The phosphorylation of insulin receptor protein in trophoblast cells was 1.216 2±0.032 2 in control group, and 1.056 7±0.042 4, 0.957 6±0.026 8, 0.734 2±0.038 8, respectively, in 100 μg/L leptin group, 250 μg/L leptin group, and 500 μg/L group. Conclusion Leptin is correlated with insulin receptor signal transduction. Inhibition of phosphorylation in cell membrane insulin receptor β subunit may be one of the mechanisms underlying insulin receptor signal transduction.

【Key words】 leptin; phosphorylation of insulin receptor; trophoblast cells; insulin receptor signal transduction

Supported by the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing(2007). Corresponding author: Yang Ying, Tel: 86-23-68755612, E-mail: yy630917@126.com

瘦素(leptin)是由肥胖基因编码、脂肪细胞分泌的蛋白质类激素,具有广泛的生物学效应[1]。近年来研究证实瘦素在人类胎盘有表达,尤其在绒毛滋养细胞中有强表达[2],并且发现其在机体内参与了多种生理活动的调控[3]。妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)患者体内的瘦素水平明显增高,多数学者认为瘦素与GDM的发生、发展密切相关[4]。有体外实验证明,GDM孕妇胰岛素受体酪氨酸磷酸化水平比正常孕妇下降37%[5],然而瘦素是否通过影响滋养细胞膜上胰岛素受体磷酸化水平而参与GDM尚不

【基金项目】 重庆市自然科学基金面上项目(2007)
【通信作者】 杨 鹰,电话:(023)68755612,E-mail:yy630917@126.com

完全清楚。本实验采用体外培养人早孕绒毛滋养细胞的方法研究瘦素对人早孕绒毛滋养细胞膜胰岛素受体β亚基磷酸化的影响，以探讨瘦素影响胰岛素受体信号转导的分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源

绒毛组织：采集于第三军医大学新桥医院妇产科门诊。正常妊娠 45～60 d，发育正常，自愿人工流产终止妊娠的孕妇绒毛组织。置于预冷的无菌生理盐水中保存，迅速于超净工作台中分离并培养滋养细胞。

1.2 主要试剂及溶液

小鼠抗人角蛋白单克隆抗体、小鼠抗人波形蛋白单克隆抗体购于北京中山金桥生物技术公司。胎牛血清、DMEM-F12 培养基购于 HyClone 公司，重组人瘦素(Sigma, USA)，胰蛋白酶、胶原酶Ⅰ和 DNase Ⅰ均购自 Sigma 公司，细胞膜蛋白提取试剂盒购于上海贝博生物公司，ECL 化学发光试剂盒、抗磷酸化胰岛素受体抗体购自美国 Santa Cruz 公司，青链霉素购自罗氏公司。

1.3 人早孕绒毛滋养细胞的分离、培养以及鉴定

收集人早孕绒毛组织在无菌超净工作台内用无血清的 DMEM-F12 培养液洗涤 3 次，去除血污、蜕膜以及肉眼可见的血管等物质。加入适量的 0.25% 胰蛋白酶在 37 ℃水浴下消化 20 min 后终止消化，再加入适量的 0.1% 胶原酶Ⅰ 37 ℃消化 40 min，然后加入适量 0.02% DNase Ⅰ共同消化 10 min。消化液过滤后，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，未消化组织重复消化 1 次。无血清的 DMEM-F12 培养基漂洗 2 次，离心后沉淀的细胞加入足量含 15% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液，反复吹打混匀，并吸入培养瓶内，放在 37 ℃、5% CO_2 的培育箱内培养。24 h 后首次换液，以后每 48 小时换液 1 次。培养细胞鉴定：采用北京中杉生物试剂公司提供的小鼠抗人角蛋白单克隆抗体和小鼠抗人波形蛋白单克隆抗体进行免疫细胞化学染色，步骤参照 S-P 试剂盒的说明进行。

1.4 实验分组

取培养为第 3 代的滋养细胞，移入 50 ml 离心管中，1 000 r/min离心 5 min，弃上清，用预冷的 DMEM-F12 培养基反复悬浮沉淀，离心 3 次，制成 1×10^6/ml 细胞悬液，并将细胞悬液移入 12 孔培养板。分为 4 组，不加瘦素者作为空白对照组，其余 3 组分别加入浓度为 100、250、500 μg/L 的瘦素，然后置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养，4 组细胞均培养 24 h。

1.5 Western blot 检测滋养细胞磷酸化胰岛素受体β亚基蛋白的表达

提取滋养细胞的膜蛋白(步骤参照上海贝博生物公司膜蛋白提取试剂盒说明进行)，然后用微量蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。取蛋白样品 50 μg 进行电泳、转膜、封闭、加入抗磷酸化胰岛素受体一抗孵育。加入辣根过氧化物酶标记过的二抗，孵育，洗涤，ECL(增强发光剂)发光液反应，曝光，洗片。应用激光扫描仪进行定量分析，在同一张膜上用 α-actin 内参进行比较。

1.6 统计学处理

采用 Sigma Plot 11.0 软件进行统计，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，各样本均数间总体比较用单因素方差分析。两变量之间做线性相关分析。

2 结果

2.1 滋养细胞形态观察

倒置显微镜下滋养细胞形态见图 1。细胞呈不规则多角形，核大，细胞质丰富透明。

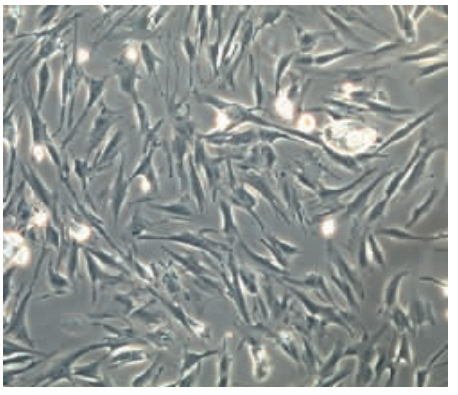
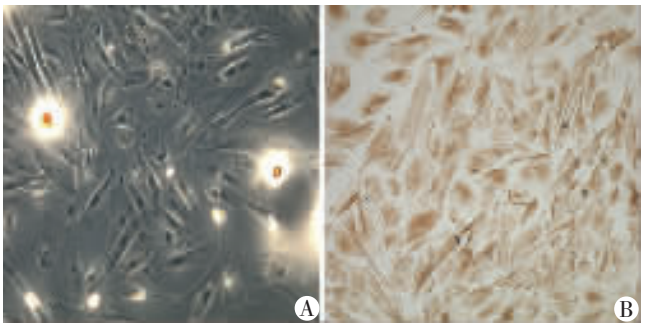


图 1 倒置显微镜下观察体外培养滋养细胞形态 (×200)

2.2 免疫组化染色观察

滋养细胞的波形蛋白染色阴性(图 2A)，角蛋白染色阳性，着色于细胞质(图 2B)。体外培养的滋养细胞中细胞角蛋白染色阳性率近 95%，波形蛋白阳性细胞小于 5%，可以满足后续实验的需要。

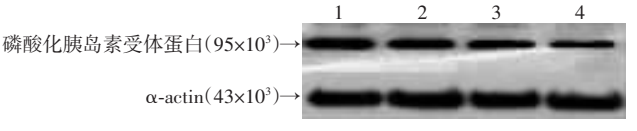


A：滋养细胞波形蛋白染色阴性；B：滋养细胞角蛋白染色阳性

图 2 体外培养滋养细胞的免疫组化鉴定结果 (S-P ×200)

2.3 不同浓度瘦素条件下滋养细胞细胞膜上磷酸化的胰岛素受体蛋白表达

空白对照组的磷酸化胰岛素受体蛋白水平为(1.216 2±0.032 2)。浓度为 100 μg/L 的瘦素培养细胞 24 h 后，胰岛素受体蛋白的磷酸化水平为(1.056 7±0.042 4)；当瘦素浓度为 250 μg/L 和 500 μg/L 时，磷酸化的胰岛素受体蛋白水平分别为(0.957 6±0.026 8)和(0.734 2±0.038 8)。见图 3。



1：对照组；2：100 μg/L 瘦素组；3：250 μg/L 瘦素组；4：500 μg/L 瘦素组

图 3 Western blot 检测不同浓度瘦素对滋养细胞膜磷酸化的胰岛素受体蛋白表达的影响

2.4 瘦素对滋养细胞胰岛素受体磷酸化程度的影响

与对照组相比，100 μg/L 瘦素浓度使滋养细胞的胰岛素受体β亚基磷酸化程度明显降低（$P<0.05$）；瘦素浓度为250、500 μg/L时，胰岛素受体磷酸化程度的下降趋势更加明显（$P<0.05$）。并发现随着瘦素浓度的增加，胰岛素受体β亚基磷酸化程度相应下降，说明瘦素对胰岛素受体β亚基磷酸化水平的抑制作用是呈浓度依赖性的。瘦素浓度和胰岛素受体磷酸化程度相关性分析结果表明，瘦素浓度和滋养细胞膜胰岛素受体β亚基磷酸化水平呈负相关（$r=-0.403\ 2$，$P<0.05$）。

3 讨论

瘦素在体内主要是由脂肪细胞分泌，它的主要生理作用是促进糖原、脂肪分解从而参与糖代谢、脂代谢、能量等代谢。在妊娠期间，瘦素的分泌明显增加。近年来，有研究证明妊娠期间瘦素的明显增高主要源于滋养细胞的分泌[2,6]，并发现瘦素与妊娠期糖尿病（GDM）密切相关[4]，即在妊娠期糖尿病患者体内瘦素的表达水平异常增高。Qiu 等[7]指出，妊娠早期时妇女血清瘦素水平的升高与 GDM 的发病呈显著正相关，去除其他因素的影响后发现瘦素水平高的孕妇发生 GDM 的风险比低瘦素水平的孕妇高了4.7倍，并且血清瘦素水平每上升 10 μg/L，发生 GDM 的风险便增加20%。故有人指出循环瘦素水平可作为 GDM 的一个预警指标。Pirc 等[8]研究发现，得到积极治疗（如血糖监测、饮食控制、必要时应用胰岛素等）的 GDM 患者脐血瘦素水平明显低于未经过治疗的 GDM 患者，并基本相当于正常妊娠妇女的脐血瘦素水平，提示瘦素水平可作为判断 GDM 治疗效果的指标之一。Wannamethee 等[9]研究也提示瘦素参与了2型糖尿病的发病过程。本实验着重于研究瘦素与 GDM 的关系，发现瘦素可能是通过降低滋养细胞细胞膜胰岛素受体的磷酸化水平从而参与 GDM 的发生和发展。

胰岛素受体位于滋养细胞膜表面，由2个α亚基和2个β亚基组成。β亚基有酪氨酸蛋白激酶的活性，起着信号转导的作用。胰岛素与胰岛素受体上的特异位点结合后，激活β亚基的酪氨酸蛋白激酶，从而将胰岛素受体底物-1（IRS-1）上的酪氨酸残基磷酸化，磷酸化的 IRS-1 结合、激活并将胰岛素信号传递给胞内含 SH2 结构域的蛋白。同时激活2条信号传递途径：磷脂酰肌醇-3-激酶（phosphatidylinositol-3-kinase，PI3-K）途径、Ras MAP 激酶途径，刺激葡萄糖转移因子4转位，最终促进葡萄糖向细胞内转运、糖原合成等生物学效应[10,11]。其中血糖的调节主要受胰岛素受体-IRS-1-PI3-K-蛋白激酶 B-葡萄糖转移因子4信号途径的影响[10]。在此过程中，任何一个环节受到干扰，都会引起滋养细胞胰岛素受体信号转导障碍，使滋养细胞对葡萄糖的摄取和利用能力减弱，从而导致妊娠期糖尿病的发生。

滋养细胞细胞膜上胰岛素受体β亚基的磷酸化水平对胰岛素受体的信号转导起着十分重要的作用，该水平的下降会导致 IRS-1 酪氨酸残基磷酸化降低，同时也会影响到其他一些含 SH2 结构域的信号蛋白与 IRS-1 的结合及活化，故而滋养细胞胰岛素受体的磷酸化水平直接影响了孕妇体内葡萄糖的吸收和转运。本实验发现，一定浓度的瘦素可以抑制滋养细胞胰岛素受体β亚基的磷酸化水平，并且抑制作用随着瘦素浓度的增高而增高。因此，抑制滋养细胞胰岛素受体β亚基磷酸化水平可能是瘦素参与妊娠期糖尿病发生、发展的机制之一。

参考文献：

[1] Baile C A, Della-Fera M A, Martin R J. Regulation of metabolism and body fat mass by leptin[J]. Annu Rev Nutr, 2000, 20:105-127.

[2] Linnemann K, Malek A, Sager R, *et al*. Leptin production and release in the dually *in vitro* perfused human placenta[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(11):4298-4301.

[3] Schram K, Wong M M, Palanivel R, *et al*. Increased expression and cell surface localization of MT1-MMP plays a role in stimulation of MMP-2 activity by leptin in neonatal rat cardiac myofibroblasts[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 44(5):874-881.

[4] Meller M, Qiu C, Vadachkoria S, *et al*. Changes in placental adipocytokine gene expression associated with gestational diabetes mellitus[J]. Physiol Res, 2006, 55(5):501-512.

[5] Friedman J E, Ishizuka T, Shao J, *et al*. Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes[J]. Diabetes, 1999, 48(9):1807-1814.

[6] Lepercq J, Challier J C, Guerre-Millo M, *et al*. Prenatal leptin production:evidence that fetal adipose tissue produces leptin[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(6):2409-2413.

[7] Qiu C, Williams M A, Vadachkoria S, *et al*. Increased maternal plasma leptin in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus[J]. Obstet Gynecol, 2004, 103(3):519-525.

[8] Pirc L K, Owens J A, Crowther C A, *et al*. Mild gestational diabetes in pregnancy and the adipoinsular axis in babies born to mothers in the ACHOIS randomised controlled trial[J]. BMC Pediatr, 2007, 7:18.

[9] Wannamethee S G, Lowe G D, Rumley A, *et al*. Adipokines and risk of type 2 diabetes in older men[J]. Diabetes Care, 2007, 30(5):1200-1205.

[10] 唐伟，朱剑，武晓泓，等. 胰岛素信号传导及其调节机制[J]. 实用糖尿病杂志，2005，1(3)：43-49.

[11] 周云枫，吴勇，欧阳静萍. 黄芪多糖对2型糖尿病大鼠肾组织胰岛素信号转导的影响[J]. 武汉大学学报：医学版，2005，26(2)：139-142.

（收稿 2010-07-11 修回 2010-09-29）

（编辑 邓强庭）