文章编号:1000-5404(2011)12-1269-04

论著

妊娠期糖尿病患者肌肉组织中胰岛素信号转导和GLUT-4表达的变化

伍 丽[1,2],刘 建[1],马 蓉[1,2],肖晓秋[2],蒋兴伟[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院妇产科[1];400016 重庆,重庆医科大学生命科学研究院[2])

【摘要】 **目的** 研究妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)孕妇肌肉组织中胰岛素信号通路及葡萄糖转运蛋白表达的变化,探讨其在GDM发病过程中的作用。**方法** 将40例孕妇分为糖耐量正常(NGT)组和GDM组,每组20例,分离少量腹直肌,分别置于含和不含胰岛素的培养液中温育30 min。用Real-time PCR法检测胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate 1, IRS-1)、胰岛素受体底物2(IRS-2)、葡萄糖转运蛋白2(glucose transporter 2, GLUT-2)、葡萄糖转运蛋白4(GLUT-4)mRNA的表达,Western blot检测蛋白激酶B(Akt)的磷酸化程度、GLUT-4蛋白水平的变化。**结果** ①基础状态时,GDM组IRS-1、IRS-2和GLUT-2 mRNA表达较NGT组降低($P<0.05$);GLUT-4 mRNA表达2组无统计学差异($P>0.05$);经胰岛素刺激后,NGT组中GLUT-4 mRNA较基础状态升高($P<0.05$),而GDM组则无明显变化($P>0.05$)。②NGT组经胰岛素刺激后,Akt蛋白的磷酸化程度明显增高($P<0.05$),GDM组无明显变化($P>0.05$);基础状态时,GDM组与NGT组相比,GLUT-4蛋白表达明显降低($P<0.05$);经胰岛素刺激后,GLUT-4蛋白的表达水平均增高,NGT组增加的幅度明显高于GDM组($P<0.05$)。**结论** GDM患者胰岛素信号通路中的关键效应分子存在转录或翻译水平的缺陷,对胰岛素的反应降低,导致胰岛素抵抗。

【关键词】 糖尿病,妊娠;受体,胰岛素;葡萄糖转运蛋白质类,易化性
【中图法分类号】 R587.102;R714.256;R362 【文献标志码】 A

Transduction of insulin signals and expression of glucose transporter 4 in skeletal muscle of women with gestational diabetes mellitus

Wu Li[1,2], Liu Jian[1], Ma Rong[1,2], Xiao Xiaoqiu[2], Jiang Xingwei[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Institute of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the transduction of insulin signals and the expression of glucose transporter in skeletal muscle of women with gestational diabetes mellitus (GDM) and the role of GDM in development of diseases. **Methods** Forty pregnant women were divided into normal glucose tolerance (NGT) group and GDM group, 20 women in each group. A small amount of rectus abdominis was isolated and placed into a culture medium with or without insulin. mRNA expression levels of insulin receptor substrate 1 (IRS-1), IRS-2, glucose transporter 2 (GLUT-2), and GLUT-4 were measured by real time PCR. Phosphorylation of protein kinase B (Akt) and expression level of GLUT-4 were assayed by Western blotting. **Results** The expression levels of IRS-1, IRS-2 and GLUT-2 mRNA in basal state were significantly lower in GDM group than in NGT group ($P<0.05$) and no significant difference was observed in expression of GLUT-4 mRNA between the two groups. However, after insulin stimulation, the expression level of GLUT-4 mRNA in basal state was significantly higher in NGT group than in GDM group ($P<0.05$), while the phosphorylation of Akt and the expression level of GLUT-4 were significantly lower in GDM group than in NGT group ($P<0.05$). **Conclusion** Defects of key effector molecules at transduction and translation levels in the insulin signaling pathway of GDM patients can reduce the reaction to insulin, thus leading to insulin resistance.

【**Key words**】 gestational diabetes mellitus; insulin receptor; facilitative glucose transport protein

Corresponding author: Liu Jian, E-mail: liu6898@sina.com; Xiao Xiaoqiu, E-mail: bx.shaw@gmail.com

【通信作者】 刘 建,E-mail:liu6898@sina.com
肖晓秋,E-mail:bx.shaw@gmail.com

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus,GDM)近年呈发病率增高趋势,我国报道为4.4%,大多数GDM患者产后糖代谢异常功能恢复正常,但将来发生2型糖尿病和心血管疾病的风险增加[1]。研究[2]证明虽然GDM患者能产下体质量正常的新生儿,但是当他们成年后发生肥胖和胰岛素抵抗的风险将大大增加。血糖水平是通过胰岛素信号通路来调节的,胰岛素和靶细胞膜上的受体结合,受体的酪氨酸蛋白激酶被激活后,其底物蛋白,如胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate 1, IRS-1)等借其SH2区与胰岛素受体分子中含磷酸化的酪氨酸序列结合,在受体酪氨酸蛋白激酶的作用下被磷酸化,由此启动磷酸化的级联反应并激活下游效应物如磷脂酰肌醇激酶3(PI3-K)。蛋白激酶B(Akt)是这一过程中重要的丝氨酸/苏氨酸激酶,它的活化可以使葡萄糖转运蛋白4(glucose transporter 4, GLUT-4)从细胞质转运至细胞膜,直接介导葡萄糖向细胞内转运,从而降低血糖浓度[3]。

骨骼肌作为调节机体糖代谢的重要外周组织,在基础状态和胰岛素刺激情况下,对糖的摄取利用量分别约占全身组织的20%和75%~95%[4]。本研究拟通过测定GDM产妇肌肉组织中IRS-1、IRS-2、Akt、GLUT-2、GLUT-4的表达情况,旨在探讨胰岛素信号通路改变及与葡萄糖转运蛋白之间的关系,分析GDM发生的分子机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象及分组

选择2010年3月至2010年8月重庆医科大学附属第二医院系统产检和剖宫产分娩的GDM孕妇20例(GDM组),诊断标准为孕24~28周行50 g糖筛查试验,阳性者(即1 h血糖>7.8 mmol/L)行75 g OGTT测定,按WHO标准诊断阳性者即为GDM,并选择其中经饮食治疗使血糖控制良好者;选择同期剖宫产的糖耐量正常孕妇20例(NGT组)。2组孕妇均无高血压、多囊卵巢、肝肾功能异常等疾病,2组产妇年龄,孕周,空腹血糖,产前、产时体质指数(BMI)差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。经患者同意并签署伦理学知情同意书后收取临床标本。

表1 2组孕妇临床资料($n=20$, $\bar{x}\pm s$)

组别	生产年龄(岁)	孕周	产前BMI	产时BMI
NGT组	29.71±0.86	39.62±1.51	20.91±0.68	24.97±2.63
GDM组	30.62±0.66	39.26±1.22	21.82±0.51	27.83±2.91
P	0.38	0.07	0.29	0.21

1.2 标本收集

①2组于手术前抽取空腹静脉血并立即送内分泌实验室检测空腹血糖和空腹胰岛素;②手术时按无菌要求留取少量腹直肌[5](约50 mg),用Krebs-Henseleit缓冲液(118 mmol/L氯化钠,4.7 mmol/L氯化钾,1.2 mmol/L无水硫酸镁,25 mmol/L碳酸氢钠,1.2 mmol/L磷酸二氢钾,11 mmol/L葡萄糖,2.5 mmol/L无水氯化钙,0.5 mmol/L乙二胺四乙酸二钠)清洗3次,等分成2份并分离成肌肉丝,分别放在含和不含10^{-7} mol/L胰岛素的Krebs-Henseleit缓冲液中,在37 ℃、95% O_2、5% CO_2孵箱中温育30 min后冰浴终止反应,标本置于-80 ℃冰箱保存待用。

1.3 方法

1.3.1 空腹血糖、血胰岛素测定 血糖测定采用葡萄糖氧化酶法,胰岛素测定采用放射免疫法。胰岛素抵抗指数和胰岛素分泌指数根据公式计算。

1.3.2 实时荧光定量PCR法检测各组肌肉组织中IRS-1、IRS-2、GLUT-2、GLUT-4 mRNA的表达 ①引物合成:引物由上海鼎安生物科技有限公司合成,以GAPDH为内参物,序列见表2。②组织总RNA的提取:取50 mg肌肉组织,采用Trizol一步法提取试剂盒提取肌肉组织中总RNA。用分光光度计测定$D(260)$、$D(260)/D(280)$值以确定RNA浓度及纯度,1.5%琼脂糖凝胶电泳确定RNA完整性。取2 μg RNA进行逆转录反应,逆转录试剂盒购自TaKaRa公司,再取1 μl cDNA用SYBR green进行多聚酶链反应,PCR反应条件为:预变性95 ℃ 3 min,变性95 ℃ 15 s,退火55 ℃ 45 s,延伸72 ℃ 45 s,共循环39次,95 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min。设计1条融解曲线的程序从55 ℃~95 ℃(每1 ℃为1个周期)并保持20 s,融解曲线呈现单一峰为特异性扩增。以GAPDH作为内参,实时定量PCR的结果用$2^{-\triangle\triangle Ct}$进行计算[6],NGT组作为参照标准(表2)。

表2 IRS-1、IRS-2、GLUT-2、GLUT-4、GAPDH引物序列

基因	序列	序列号
IRS-1	上游 5′-AAGAAGTGGCGGCACAAGTC-3′	NM_005544
	下游 5′-CAGCCCGCTTGTTGATGTT-3′	
IRS-2	上游 5′-GCAGAACATCCACGAGACCAT-3′	NM_003749
	下游 5′-GGAACTCGAAGAGCTCCTTGAG-3′	
GLUT-2	上游 5′-TGGCAGCTGCTCAACTAATCA-3′	NM_000340
	下游 5′-CCAACTGCAAAGCTGGATACAG-3′	
GLUT-4	上游 5′-CGTGGGCGGCATGATT-3′	NM_001042
	下游 5′-CCAGCATGGCCCTTTTCC-3′	
GAPDH	上游 5′-CAAGGCTGTGGGCAAGGT-3′	NM_002046
	下游 5′-GGAAGGCCATGCCAGTGA-3′	

1.3.3 Western blot检测GLUT-4、p-Akt、t-Akt蛋白的表达 2组分别各取50 mg肌肉组织用Western细胞裂解液(碧云天公司)1 ml在冰上匀浆,12 000×g,4 ℃离心20 min,收取上清;用BCA蛋白定量试剂盒定量,取80 μg蛋白加5×上样缓冲液(体积比为4:1)100 ℃煮沸10 min,12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及湿转至PVDF膜上,用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,按1:1 000比例稀释GLUT-4、p-Akt、t-Akt一抗(所有抗体均购自Millipore公司),4 ℃过夜;TBST漂洗3次,每次5 min;再按1:2 500比例稀释辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育1 h,再用TBST漂洗3次后用ECL化学发光剂在X光下曝光、显影。经Quantity One软件分析光密度值,结果

以目的蛋白条带与内参蛋白β-actin条带光密度比值表示。

1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间两两比较行 t 检验。

2 结果

2.1 2组生化指标

GDM组空腹胰岛素、胰岛素分泌指数、胰岛素抵抗指数均高于NGT组（$P<0.05$）。见表3。

表3 2组孕妇生化指标（$n=20$，$\bar{x} \pm s$）

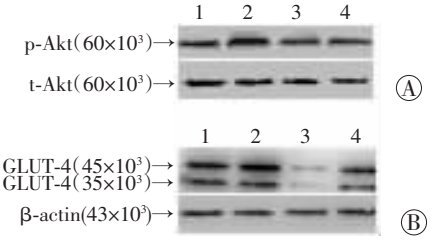
组别	空腹血糖（mmol/L）	空腹胰岛素（μU/ml）	胰岛素分泌指数	胰岛素抵抗指数
NGT组	4.59±0.18	12.91±1.52	53.02±6.61	2.66±0.30
GDM组	4.71±0.19	20.01±1.05	81.54±7.22	4.31±0.58
P值	0.66	0.01	0.01	0.01

2.2 2组基因表达

①基础状态时，GDM组较NGT组IRS-1、IRS-2和GLUT-2 mRNA表达分别降低59.22%、65.05%、87.25%，差异有统计学意义（$P<0.05$）；经胰岛素刺激后，GDM组较NGT组IRS-1、IRS-2和GLUT-2 mRNA表达分别降低60.25%、66.39%、92.92%，差异有统计学意义（$P<0.05$）。②2组内，经胰岛素刺激后与基础状态相比较，GLUT-2 mRNA的表达明显降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）；IRS-1 mRNA和IRS-2 mRNA经胰岛素刺激后分别与各自的基础状态相比，则无明显差异（$P>0.05$）。③基础状态时，GDM组和NGT组GLUT-4 mRNA表达2组无明显差异（$P>0.05$）；经胰岛素刺激后，NGT组中GLUT-4 mRNA比基础状态增高53.40%，而GDM组则无明显变化（$P>0.05$）。见图1。

2.3 2组蛋白水平表达

①基础状态时，GDM组与NGT组相比，Akt蛋白表达无明显差异（3.17±0.26 *vs* 3.36±0.31，$P>0.05$）；NGT组经胰岛素刺激后，与基础状态相比，Akt蛋白的磷酸化程度明显增高（18.34±1.07 *vs* 30.01±1.21，$P<0.05$）。②基础状态时，GDM组与NGT组相比GLUT-4蛋白表达明显降低（0.99±0.04 *vs* 31.20±1.75，$P<0.05$）；经胰岛素刺激后，NGT组、GDM组GLUT-4蛋白表达分别为52.29±1.26、14.06±1.39，与各自的基础状态相比，GLUT-4蛋白的表达水平均增高（$P<0.05$），NGT组增加的幅度明显高于GDM组（21.09±1.46 *vs* 13.07±1.32，$P<0.05$）。见图2。



1：NGT组基础状态 2：NGT组胰岛素刺激后 3：GDM组基础状态；4：GDM组胰岛素刺激后

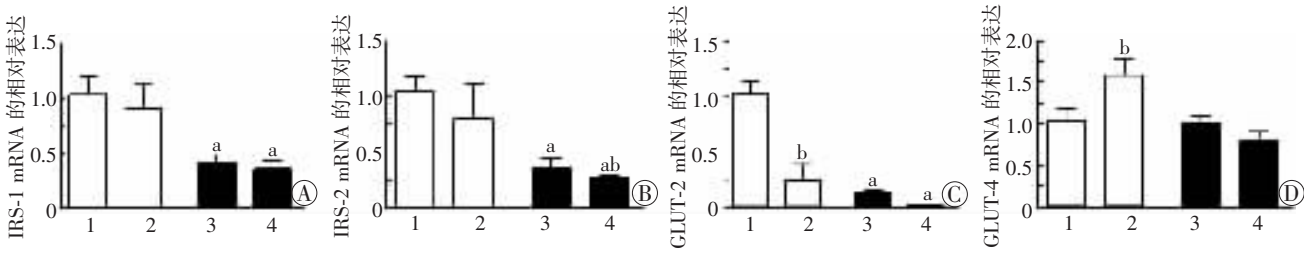
A：Akt；B：GLUT-4

图2 2组基础状态和经胰岛素刺激后Akt、GLUT-4蛋白的表达

3 讨论

Colomiere等[7]研究证明胰岛素在信号转导通路中的作用包括促发各式各样的细胞发生反应，如通过葡萄糖转运蛋白进行葡萄糖的转运、糖原合成、蛋白质合成和脂类代谢等，这样，如果发生胰岛素信号通路的缺陷，就会使代谢受到影响。本研究生化结果表明：由于GDM组通过饮食治疗，所以2组孕妇在空腹血糖上无统计学差异。在空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数和胰岛素分泌指数上GDM组明显高于NGT组，提示孕期母体胰岛β细胞分泌的胰岛素不足以抵消胰岛素敏感性的进行性下降，因此，虽然空腹血糖保持稳态无明显变化，但在胰岛素的靶组织之一骨骼肌中，已经出现胰岛素信号通路的缺陷，发生胰岛素抵抗。

胰岛素与细胞膜上的受体结合后，使胰岛素受体底物（主要为IRS-1和IRS-2）酪氨酸磷酸化。活化的胰岛素受体底物可以使下游区的PI3K信号分子发生募集反应[8]。进而激活Akt促进其磷酸化，使GLUT-4储存囊泡与细胞骨架结合，GLUT4易位至细胞膜从而使血液中的葡萄糖转运至组织细胞内，维持血糖的稳定。IRS-1、IRS-2是胰岛素受体及其他酪氨酸激酶的主要底物，是胰岛素的受体后信号转导中承上启下的一种关键信号蛋白，在胰岛素抵抗中发挥重要的作用[9]。



1：NGT组基础状态 2：NGT组胰岛素刺激后 3：GDM组基础状态 4：GDM组胰岛素刺激后；a：$P<0.05$，与NGT组比较；b：$P<0.05$，与基础状态比较

A：IRS-1；B：IRS-2；C：GLUT-2；D：GLUT-4

图1 2组基础状态和胰岛素刺激后IRS-1、IRS-2、GLUT-2、GLUT-4 mRNA的表达

Friedman 等[10]在剖宫产时分别从正常糖耐量妇女和GDM妇女腹直肌取活检,检测IRS-1的数量发现,与正常未孕妇女相比较,前者IRS-1下降23%,后者下降44%($P<0.01$),从而得出妊娠期胰岛素抵抗主要是由于IRS-1数量降低,发生GDM时降低更显著的结论。本实验结果示:在孕妇肌肉组织中,基础状态时和经胰岛素刺激后,GDM组和NGT组相比,IRS-1、IRS-2 mRNA的表达显著降低,提示转录水平的改变是GDM患者胰岛素受体底物表达下降的重要因素,触发IRS-1水平的受体后机制,使IRS-1在细胞内的数量减少或位置迁移,引起胰岛素和胰岛素受体结合异常,影响胰岛素信号的传递。

蛋白激酶B(Akt)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,当胰岛素刺激引起PI3-K激活后,即可引起其下游信号分子丝氨酸/苏氨酸磷酸肌醇依赖性蛋白激酶(PDK1)的激活。它的激活可使GLUT-4从胞浆到胞膜,介导葡萄糖向细胞内转运,促进糖的吸收。Cho等[11]的实验证明,缺乏Akt2(PKBβ)的小鼠胰岛素降低血糖的能力严重受损,出现胰岛素抵抗,并表现出类似人类2型糖尿病的症状。本研究实验结果示:基础状态时,NGT组和GDM组Akt的蛋白水平表达无明显差异,经胰岛素刺激后,NGT组孕妇Akt蛋白的磷酸化程度增高,而GDM组孕妇却无此变化。提示NGT孕妇对胰岛素敏感,经胰岛素刺激后,当信号传至Akt时,使Akt蛋白磷酸化程度增高,从而激活葡萄糖的摄取和利用等一系列生物学效应。而GDM患者不仅存在IRS-1和IRS-2表达水平的下降,同时对胰岛素的反应性降低,表现为经胰岛素刺激后,Akt不能发生磷酸化而进一步活化,即GDM组Akt蛋白磷酸化程度(p-Akt)较NGT孕妇为低,致使下游信号分子传递减弱,最终导致葡萄糖的摄取和利用减弱。

张平等[12]研究证实钒酸钠通过增加链尿佐菌素诱导(STZ-D)的大鼠骨骼肌GLUT-4基因表达使周围组织葡萄糖摄取利用增加可能部分解释其降血糖机制。本研究结果显示:在基础状态时,GDM组与NGT组相比,GLUT-4的蛋白表达水平明显降低,提示GDM患者由于胰岛素信号通路中的上游信号分子胰岛素受体底物(IRS-1/IRS-2)、蛋白激酶B(Akt)出现转录或翻译水平的缺陷,影响了信号的传递;虽然经过胰岛素刺激后,2组分别与各自的基础状态相比,GLUT-4蛋白的表达水平均增高,但可以看到GDM组增加的幅度小于NGT增加的幅度,再次证明GDM患者由于胰岛素抵抗,使信号传递发生障碍,影响GLUT-4的表达和功能,进而阻碍GLUT-4从储存囊泡转运至细胞膜摄取葡萄糖,致外周血糖水平增高。

综上所述,本研究进一步证实了妊娠期糖尿病孕妇肌肉组织中胰岛素信号通路受损,对胰岛素的反应降低,影响了胰岛素靶蛋白GLUT-4的表达和功能,不能维持血糖稳定,导致胰岛素抵抗。目前发现的PI3K信号途径其信号转导机制尚未完全明确,比如Akt是如何与GLUT-4发生联系的,GLUT-4易位的具体机制和影响因素是怎样发挥作用的等,这些都为我们下一步的研究提供了方向。

参考文献:

[1] 丰有吉,沈铿. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:113.

[2] Mingrone G, Manco M, Mora M E, *et al*. Influence of maternal obesity on insulin sensitivity and secretion in offspring[J]. Diabetes Care, 2008, 31(9):1872-1876.

[3] Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, *et al*. Dietary cod protein restores insulin-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and GLUT4 translocation to the T-tubules in skeletal muscle of high-fat-fed obese rats[J]. Diabetes, 2003, 52(1):29-37.

[4] Baron, A D, Brechtel G, Wallace P, *et al*. Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans[J]. Am J Physiol, 1988, 255(6 Pt 1):E769-E774.

[5] Lappas M, Yee K, Permezel M, *et al*. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies[J]. J Endocrinol, 2005, 186(3):457-465.

[6] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Delta Delta C(T) Method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.

[7] Colomiere M, Permezel M, Lappas M. Diabetes and obesity during pregnancy alter insulin signalling and glucose transporter expression in maternal skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue[J]. J Mol Endocrinol, 2010, 44(4):213-223.

[8] Pessin J E, Saltiel A R. Signaling pathways in insulin action:molecular targets of insulin resistance[J]. J Clin Invest, 2000, 106(2):165-169.

[9] White M F. IRS proteins and the common path to diabetes[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002, 283(3):E413-E422.

[10] 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.

[11] Cho H, Mu J, Kim J K, *et al*. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2(PKB beta)[J]. Science, 2001, 292(5522):1728-1731.

[12] 张平,梁自文,王海慧,等. 钒酸钠治疗增加实验性糖尿病大鼠骨骼肌GLUT4表达的研究[J]. 第三军医大学学报,2004,26(6):533-536.

(收稿:2010-11-14 修回:2010-12-09)

(编辑 王小宴)