DOI:10.16016/j.1000-5404.201608081

骨形态发生蛋白7改善糖代谢的作用及其机制

姜友昭,练 渝,曾 俊,陈 文,陈 兵 (400038 重庆,第三军医大学西南医院内分泌科)

[摘要] **目的** 探索骨形态发生蛋白7(bone morphogenetic protein 7,BMP7)对2型糖尿病小鼠糖代谢的影响及其机制。**方法** 将8周龄雄性C57BL/6小鼠,采用小剂量链脲佐菌素注射联合高脂喂养建立2型糖尿病小鼠模型。将建模成功的小鼠分为4组($n=20$):2型糖尿病模型组,PBS对照组(PBS腹腔注射),BMP7低剂量组(BMP7,100 μg/kg,隔日腹腔注射),BMP7高剂量组(BMP7,200 μg/kg,隔日腹腔注射)。4周后,分别检测血糖、血总胆固醇、甘油三酯、血清胰岛素水平、体质量的变化,并计算胰岛素分泌指数HOMA-β和胰岛素抵抗指数HOMA-IR。取小鼠胰腺,Western blot检测蛋白激酶D1(protein kinase D1,PKD1)及磷酸化PKD1的表达变化。**结果** 与2型糖尿病模型组和PBS对照组相比,BMP7高剂量组和低剂量组的血糖、甘油三酯均明显降低($P<0.05$),而血清胰岛素水平、HOMA-β均显著升高($P<0.05$)。BMP7低剂量组和BMP7高剂量组的体质量均低于对照组($P<0.05$),BMP7高剂量组的HOMA-IR低于对照组($P<0.05$)。Western blot检测发现BMP7处理组的PKD1蛋白表达量与对照组相比差异均无统计学意义($P>0.05$),但磷酸化PKD1水平均明显升高($P<0.05$)。**结论** BMP7可以促进2型糖尿病小鼠的胰岛素分泌和改善其胰岛素敏感性,从而降低血糖,其改善胰岛素分泌作用可能与增加PKD1磷酸化有关。

[关键词] 骨形态发生蛋白7;胰岛素分泌;胰岛素抵抗;蛋白激酶D1;2型糖尿病
[中图法分类号] Q591.4;R587.1;R977.6 [文献标志码] A

Effect and mechanism of bone morphogenetic protein 7 on glucose metabolism

Jiang Youzhao, Lian Yu, Zeng Jun, Chen Wen, Chen Bing(Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect and investigate the mechanism of bone morphogenetic protein 7(BMP7)on glucose metabolism in type 2 diabetic mice. **Methods** C57BL/6 mice (male, 8 weeks old) were used for the establishment of type 2 diabetic mouse model by low-dose streptozocin injection combined with high-fat chow. The type 2 diabetic mice were divided into 4 groups($n=20$):type 2 diabetic mice model group, PBS control group (i.p., injected with phosphate buffered solution), low-dose BMP7 group (100 μg/kg, i.p. injection every other day) and high-dose BMP7 group (200 μg/kg, i.p. injection every other day). Four weeks later, blood glucose, total blood cholesterol, triglyceride, serum insulin and body weight were measured. The insulin secretion index homeostasis model assessment of β-cell (HOMA-β) and insulin resistance index HOMA-IR were calculated. Finally, the mice's pancreas were resected, and the protein expression and phosphorylation level of protein kinase D1(PKD1) were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group and PBS control group, the blood glucose and triglyceride were significantly decreased, and the insulin level and HOMA-β index were significantly increased in both low-dose and high-dose BMP7 groups($P<0.05$). BMP7 treatment resulted in significant reduction of body weight compared with the control group($P<0.05$). The HONMA-IR was lower in high-dose BMP7 group than in the

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10073)
[通信作者] 陈 兵,E-mail:chenbing3@medmail.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160901.0854.003.html(2016-09-01)

control group($P<0.05$). Western blot analysis showed that the expression of total PKD1 was not obviously changed by BMP7 treatment($P>0.05$), but the phosphorylation of PKD1 was greatly increased in both BMP7 groups compared with the control($P<0.05$). **Conclusion** BMP7 improves glucose metabolism through enhancing insulin secretion and attenuating insulin resistance. Its effect on insulin secretion may be associated with increased phosphorylation of PKD1.

[**Key words**] bone morphogenetic protein 7; insulin secretion; insulin resistance; protein kinase D1; type 2 diabetes

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2012jjA10073). Corresponding author: Chen Bing, E-mail: chenbing3@medmail.com.cn

目前认为2型糖尿病发病的中心环节是胰岛素抵抗和胰岛素分泌不足[1]。因此现有的糖尿病药物大多通过改善这两个因素来发挥降血糖作用,如二甲双胍、罗格列酮等药物主要通过改善胰岛素敏感性发挥作用[2],而磺脲类药物、二肽基肽酶抑制剂的作用环节主要在促进胰岛素分泌[3]。但是比较遗憾的是目前尚缺乏具有明确的同时改善以上两个环节的药物。

骨形态发生蛋白7(bone morphogenetic protein 7, BMP7)是TGFβ超家族成员之一,研究发现BMP7除参与肾脏的胚胎发育[4]、骨骼形成与骨折愈合[5]等病理生理过程外,还可诱导棕色脂肪的形成[6]、减少摄食、增加能量消耗、降低体质量[7]。鉴于肥胖在胰岛素抵抗发生中的重要作用,BMP7可能通过降低体质量改善机体的胰岛素抵抗。而且我们在前期研究中发现人血清BMP7水平与空腹胰岛素和胰岛素分泌指数呈明显正相关[8]。在进一步的细胞研究中,我们发现BMP7可促进其胰岛素分泌[9]。以上研究结果提示,BMP7有潜力成为同时改善胰岛素抵抗和胰岛素分泌的药物治疗靶点。本研究以2型糖尿病小鼠模型为研究对象,观察BMP7对其血糖、血脂、胰岛素抵抗和胰岛素分泌相关指标的影响,并初步探索BMP7改善胰岛素分泌的机制,以期为2型糖尿病的临床治疗提供新的线索和靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 8周龄雄性C57BL/6小鼠24只,体质量18~24 g,购自第三军医大学实验动物中心,饲养于22 ℃室温,相对湿度60%的环境中。

1.1.2 试剂 重组人骨形态发生蛋白7(rhBMP7)(PROSPEC,以色列)。链脲佐菌素(STZ,Sigma,美国),临用前溶解在10 mmol/L的柠檬酸缓冲液,调节pH至4.5。小鼠胰岛素检测试剂盒(Mercodia,瑞典)。PKD1抗体购自Santa Cruz公司,phospho-PKD1(Ser916)抗体购自Cell Signaling公司,Tubulin抗体购自Beyotime公司。

1.2 方法

1.2.1 2型糖尿病小鼠模型的建立 采用小剂量STZ腹腔注射联合高脂高糖饮食建立2型糖尿病小鼠模型:注射STZ前后均采用高脂饮食(10.0% 猪油,20.0% 蔗糖,2.5% 胆固醇,1.0% 胆酸盐,66.5% 常规饲料配制)[10],然后一次性给予STZ 40 mg/kg腹腔内注射。STZ注射3 d后尾静脉采血测定血糖,随机血糖大于16.7 mmol/L证明造模成功。

1.2.2 动物分组及处理 造模过程中4只小鼠死亡,将造模成功的小鼠20只,分为4组,每组5只:①2型糖尿病模型组;②PBS对照组;③BMP7小剂量组:给予rhBMP7剂量为100 μg/kg,隔日腹腔注射;④BMP7大剂量组:给予rhBMP7剂量为200 μg/kg,隔日腹腔注射。每周检测血糖。4周后,进行相关指标检测和分析。

1.2.3 血生化指标、胰岛素的测定 小鼠空腹12 h后,收集血标本,用全自动生化分析仪测定血糖、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG),胰岛素含量应用相应的试剂盒,按照说明书进行检测。计算胰岛素分泌指数HOMA-β和胰岛素抵抗指数HOMA-IR:HOMA-β(%)=20×空腹胰岛素水平(mIU/L)/[空腹血糖水平(mmol/L)-3.5]。HOMA-IR=空腹血糖水平(mmol/L)×空腹胰岛素水平(mIU/L)/22.5。

1.2.4 Western blot检测 取胰腺组织约100 mg加入0.5 mL预冷的蛋白裂解液(含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂),匀浆,离心并收集上清。BCA法测定蛋白浓度。取30 μg上样,以SDS-PAGE凝胶电泳,然后100 V恒压湿转至PVDF膜上,5% BSA溶液室温封闭2 h,分别用PKD1、phospho-PKD1和Tubulin一抗4 ℃摇床孵育过夜。孵育完后以TBST洗膜3次,加入相应二抗于室温孵育1 h。TBST洗膜3次,最后加入化学发光底物于室温反应2 min,将PVDF膜放入凝胶

成像仪中采集图像结果。

1.3　统计学方法

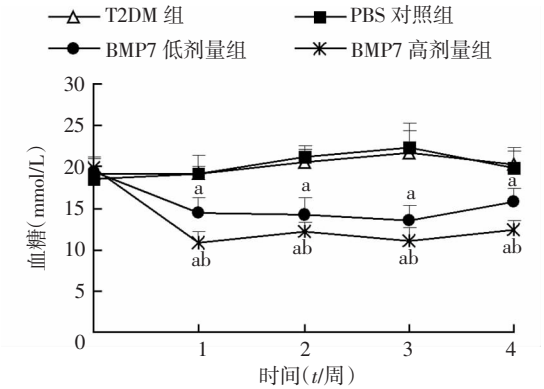
计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 统计软件,不同组别之间的比较采用 t 检验。

2　结果

在造模过程中,共有 4 只糖尿病小鼠死亡,可能与血糖过高导致的糖尿病并发症有关。

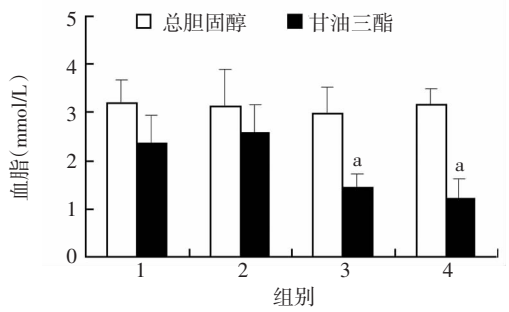
2.1　BMP7 降低 2 型糖尿病小鼠的血糖、血脂

与 PBS 对照组相比,1 周后 BMP7 低剂量组和高剂量组的空腹血糖均明显降低($P<0.05$),其降血糖效应一直持续至 4 周实验观察结束时。并且 BMP7 高剂量组血糖低于低剂量组($P<0.05$),提示 BMP7 的降血糖作用呈现出剂量依赖性(图 1)。通过检测各组的甘油三酯和胆固醇后发现,低剂量和高剂量的 BMP7 腹腔注射均可以降低小鼠的甘油三酯水平($P<0.05$),但是 BMP7 对小鼠的胆固醇水平无明显影响($P>0.05$,图 2)。



a:$P<0.05$,与 PBS 对照组比较;b:$P<0.05$,与 BMP7 低剂量组比较

图 1　BMP7 对各组 2 型糖尿病小鼠血糖的影响　($n=5, \bar{x} \pm s$)

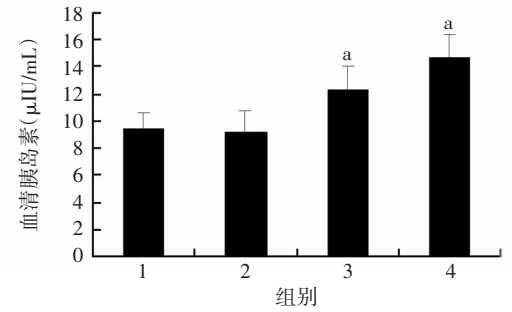


1:T2DM 组;2:PBS 对照组;3:BMP7 低剂量组;4:BMP7 高剂量组　a:$P<0.05$,与 PBS 对照组比较

图 2　BMP7 对各组 2 型糖尿病小鼠血脂的影响　($n=5, \bar{x} \pm s$)

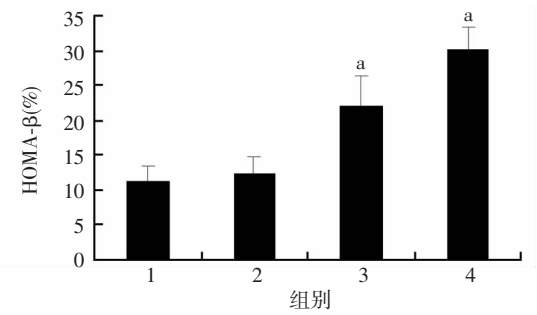
2.2　BMP7 促进 2 型糖尿病小鼠的胰岛素分泌

如图 3 所示,与 PBS 对照组相比,BMP7 低剂量组和高剂量组的空腹胰岛素水平明显升高($P<0.05$)。通过计算胰岛素分泌指数 HOMA-β 后,BMP7 处理组的 HOMA-β 指数显著高于 PBS 对照组($P<0.05$,图 4)。



1:T2DM 组;2:PBS 对照组;3:BMP7 低剂量组;4:BMP7 高剂量组　a:$P<0.05$,与 PBS 对照组比较

图 3　BMP7 对各组 2 型糖尿病小鼠胰岛素浓度的影响　($n=5, \bar{x} \pm s$)



1:T2DM 组;2:PBS 对照组;3:BMP7 低剂量组;4:BMP7 高剂量组　a:$P<0.05$,与 PBS 对照组比较

图 4　BMP7 对各组 2 型糖尿病小鼠 HOMA-β 指数的影响　($n=5, \bar{x} \pm s$)

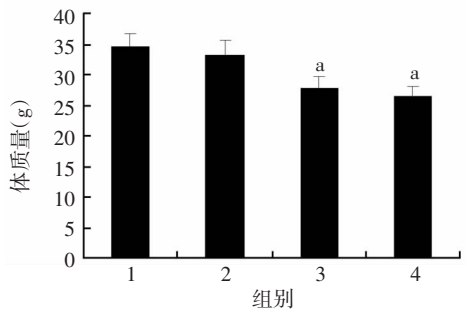
2.3　BMP7 降低 2 型糖尿病小鼠的体质量和胰岛素抵抗指数

BMP7 处理组小鼠体质量明显低于对照组($P<0.05$,图 5)。体质量的下降可能导致胰岛素敏感性增加。我们通过计算 HOMA-IR 指数来反映小鼠的胰岛素抵抗情况。结果发现,BMP7 高剂量组 HOMA-IR 显著低于对照组($P<0.05$),但 BMP7 低剂量组的 HOMA-IR 与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$,图 6)。

2.4　BMP7 增加小鼠胰岛磷酸化 PKD1 的表达

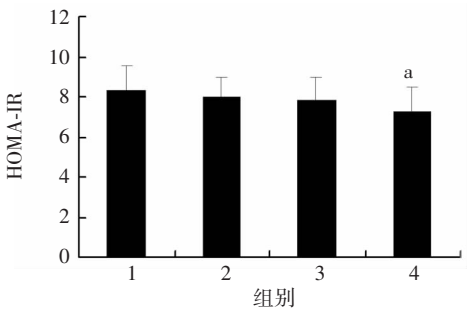
前期细胞研究中我们发现 BMP7 的促胰岛素分泌作用不依赖于钙离子内流,而 PKD1 的表达调控是非钙离子内流的促胰岛素分泌的重要途径。我们检测了 BMP7 处理后小鼠胰岛 PKD1 的表达。结果发现,处理前后,PKD1 表达无明显变化,但 BMP7 处理组磷酸化 PKD1(p-PKD1)的表达明显增加($P<0.05$)。提示

BMP7 的促胰岛素分泌作用可能通过 PKD1 的表达调控实现(图 7)。



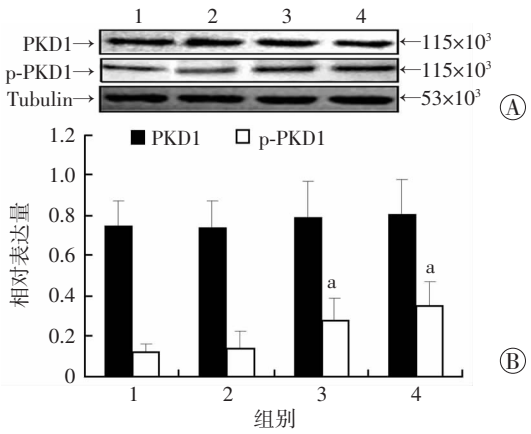
1:T2DM 组;2:PBS 对照组;3:BMP7 低剂量组;4:BMP7 高剂量组 a:$P<0.05$,与 PBS 对照组比较

图 5 BMP7 对各组 2 型糖尿病小鼠体质量的影响($n=5$, $\bar{x}\pm s$)



1:T2DM 组;2:PBS 对照组;3:BMP7 低剂量组;4:BMP7 高剂量组 a:$P<0.05$,与 PBS 对照组比较

图 6 BMP7 对各组 2 型糖尿病小鼠 HOMA-IR 的影响($n=5$, $\bar{x}\pm s$)



A:Western blot 检测;B:相对表达量($n=5$, $\bar{x}\pm s$);1:T2DM 组;2:PBS 对照组;3:BMP7 低剂量组;4:BMP7 高剂量组 a:$P<0.05$,与 PBS 对照组比较

图 7 Western blot 检测 BMP7 对各组 2 型糖尿病小鼠 PKD1 及 p-PKD1 表达的影响

3 讨论

胰岛素分泌不足和胰岛素抵抗是导致 2 型糖尿病发病的两大根本因素。在前期的细胞实验中,我们已经发现 BMP7 可以促进 MIN6 胰岛细胞的胰岛素分泌。但是在体实验中,BMP7 是否能够发挥相似的作用而达到降糖疗效尚不清楚。由于 BMP7 是一种细胞因子,其在组织中分泌后,可以直接进入血液中,发挥生物学效应。因此,我们采用重组人 BMP7 蛋白腹腔注射,观测其对小鼠血糖的影响。结果发现 BMP7 注射 1 周后,2 型糖尿病小鼠的血糖就明显下降,以后血糖一直维持在比较稳定的水平,直到 4 周实验观察期结束,证明 BMP7 有显著的降糖效果。进一步检测 2 型糖尿病小鼠的血浆胰岛素水平后发现,BMP7 注射可以使血浆胰岛素水平显著上升,并且反映胰岛素分泌能力的 HOMA-β 指数也明显升高。证实不管是在体中还是离体中,BMP7 均可以促进胰岛细胞胰岛素分泌。

胰岛素分泌的调控是一个很复杂的过程,但总体来讲,主要分近端步骤和末端步骤,其中近端步骤主要受 Ca^{2+} 内流调节,而末端步骤除了 Ca^{2+} 浓度依赖调节外,还存在非 Ca^{2+} 依赖的调节机制。在前期研究中,我们检测了 BMP7 处理的 MIN6 细胞的 Ca^{2+} 内流情况,结果发现,重组人 BMP7 处理后,MIN6 细胞内的钙离子浓度并无明显变化[9],提示 BMP7 调控胰岛素分泌的机制可能在非 Ca^{2+} 浓度依赖的胞吐环节。有研究发现,PKD1 是介导反式高尔基体网(TGN)胰岛素囊泡分裂,从而导致非 Ca^{2+} 浓度依赖胞吐的关键分子[11]。因此我们检测了 BMP7 对胰岛细胞 PKD1 表达的影响,结果发现,BMP7 并未增加 PKD1 蛋白的表达,但是 BMP7 组 PKD1 的磷酸化水平显著增加,提示 BMP7 可能通过增加 PKD1 的磷酸化从而达到促进胰岛素分泌的作用。

有研究发现,BMP7 可以促进小鼠前体细胞向棕色脂肪细胞分化,从而提高机体中棕色脂肪细胞的含量[12]。而棕色脂肪细胞中含有大量的线粒体,线粒体内膜解偶联蛋白(UCP)1 活性较高,有利于氧化呼吸链解偶联,使 ATP 转化为热能,将储存的能量以热能形式消耗掉[13-14]。因此增加棕色脂肪的数量或功能被认为是防治肥胖及代谢综合征的有效手段[15]。鉴于 BMP7 在促棕色脂肪形成中的关键作用,BMP7 水平有可能与代谢综合征及肥胖相关。我们前期研究中发现,血清 BMP7 水平与女性体质量指数呈负相

关[16]。本研究中,我们观察了重组人 BMP7 对 2 型糖尿病小鼠血脂和体质量指数的影响,结果发现 BMP7 组小鼠的甘油三酯水平明显下降,而胆固醇水平与对照组无明显差异。提示 BMP7 可能通过增加棕色细胞的脂肪酸氧化能力而发挥降血脂作用。进一步实验发现,BMP7 可以降低 2 型糖尿病小鼠的体质量,这与 Tseng 等[17]报道的一致。而体质量的降低可能会导致胰岛素敏感性的改善。我们的实验也发现,BMP7 高剂量组的胰岛素抵抗指数 HOMA-IR 显著低于 PBS 对照组。

综上所述,BMP7 可以促进 2 型糖尿病小鼠的胰岛素分泌和改善其胰岛素敏感性,从而降低血糖。由于 BMP7 是一种存在于血液中的细胞因子,因此其在 2 型糖尿病的治疗中具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] Dimas A S, Lagou V, Barker A, *et al*. Impact of type 2 diabetes susceptibility variants on quantitative glycemic traits reveals mechanistic heterogeneity[J]. Diabetes, 2014, 63(6): 2158-2171. DOI: 10.2337/db13-0949

[2] Zhao W, Li A, Xin F, *et al*. Metformin and resveratrol ameliorate muscle insulin resistance through preventing lipolysis and inflammation in hypoxic adipose tissue[J]. Cell Signal, 2016, 28(9): 1401-1411. DOI: 10.1016/j.cellsig.2016.06.018

[3] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版)[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(10): 893-942.

[4] Oxburgh L, Brown A C, Muthukrishnan S D, *et al*. Bone morphogenetic protein signaling in nephron progenitor cells [J]. PediatrNephrol, 2014, 29(4): 531-536. DOI: 10.1007/s00467-013-2589-2

[5] Morison Z, Vicente M, Schemitsch E H, *et al*. The treatment of atrophic, recalcitrant long-bone nonunion in the upper extremity with human recombinant bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7) and plate fixation: A retrospective review[J]. Injury, 2016, 47(2): 356-363. DOI: 10.1016/j.injury.2015.11.035

[6] Zheng L, Liu J M, Wang J X, *et al*. Effect of bone morphogenetic protein 7 on differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells into brown adipocytes in rats[J]. Zhongguo Yi XueKeXue Yuan XueBao, 2014, 36(6): 654-659. DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2014.06.018

[7] Townsend K L, Suzuki R, Huang T L, *et al*. Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) reverses obesity and regulates appetite through a central mTOR pathway[J]. FASEB J, 2012, 26(5): 2187-2196. DOI: 10.1096/fj.11-199067

[8] Zeng J, Jiang Y, Xiang S, *et al*. Serum bone morphogenetic protein 7, insulin resistance, and insulin secretion in non-diabetic individuals[J]. Diabetes Res ClinPract, 2011, 93(1): e21-e24. DOI: 10.1016/j.diabres.2011.03.010

[9] 姜友昭, 曾俊, 陈兵. 骨形态发生蛋白 7 对胰岛素分泌的影响及机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(9): 879-882. DOI:10.16016/j.1000-5404.2012.09.007

[10] 戚韵雯, 何选丽, 朱丽娟, 等. 糖尿病小鼠认知功能及不同时相点硫化氢的表达[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(24): 2625-2629. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2013.24.009

[11] Goginashvili A, Zhang Z, Erbs E, *et al*. Insulin granules. Insulin secretory granules control autophagy in pancreatic beta cells[J]. Science, 2015, 347(6224): 878-882. DOI: 10.1126/science.aaa2628

[12] Saini S, Duraisamy A J, Bayen S, *et al*. Role of BMP7 in appetite regulation, adipogenesis, and energy expenditure [J]. Endocrine, 2015, 48(2): 405-409. DOI: 10.1007/s12020-014-0406-8

[13] Lee P, Bova R, Schofield L, *et al*. Brown Adipose Tissue Exhibits a Glucose-Responsive Thermogenic Biorhythm in Humans[J]. Cell Metab, 2016, 23(4): 602-609. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.02.007

[14] Shan T, Xiong Y, Zhang P, *et al*. Lkb1 controls brown adipose tissue growth and thermogenesis by regulating the intracellular localization of CRTC3 [J]. Nat Commun, 2016, 7: 12205. DOI: 10.1038/ncomms12205

[15] Oliverio M, Schmidt E, Mauer J, *et al*. Dicer1-miR-328-Bace1 signalling controls brown adipose tissue differentiation and function[J]. Nat Cell Biol, 2016, 18(3): 328-336. DOI: 10.1038/ncb3316

[16] 曾俊, 姜友昭, 陈兵. 血清骨形成蛋白-7 浓度与女性肥胖的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(8): 857-860. DOI:10.16016/j.1000-5404.2011.08.004

[17] Tseng Y H, Kokkotou E, Schulz T J, *et al*. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure [J]. Nature, 2008, 454(7207): 1000-1004. DOI: 10.1038/nature07221

(**收稿**:2016-07-05;**修回**:2016-08-21)

(编辑 栗 嘉)