基础研究 文章编号:0253-3626(2009)11-1502-04

2 型糖尿病患者脂肪细胞胰岛素抵抗与微炎症的研究

黄朝莉[1],钟 玲[2],陈建伟[2]

(1. 四川成都铁路中心医院肾内科,成都 610081;2. 重庆医科大学附属第二医院肾内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:观察 2 型糖尿病患者脂肪细胞内胰岛素信号转导蛋白:胰岛素受体底物 -1(Insulin receptor substrate-1,IRS-1)酪氨酸磷酸化及蛋白激酶 B(Protein kinase B ,PKB/AKT)Ser473 磷酸化水平以及微炎症因子白细胞介素 6(Interleukin-6,IL-6)的表达。方法:取 2 型糖尿病患者(2 型糖尿病组)及非糖尿病患者(非糖尿病对照组)腹部皮下脂肪组织原代培养,用免疫沉淀法及蛋白印迹法(Western blot)检测两组脂肪细胞内胰岛素刺激后 IRS-1 酪氨酸磷酸化及 AKT-Ser473 磷酸化程度,酶联免疫吸附法检测脂肪细胞培养液中 IL-6 蛋白的水平。结果:(1)2 型糖尿病组脂肪细胞内胰岛素刺激后 IRS-1 酪氨酸磷酸化及 AKT-Ser473 磷酸化水平明显低于非糖尿病对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);(2)2 型糖尿病组脂肪细胞培养液中 IL-6 蛋白的水平明显高于非糖尿病对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:2 型糖尿病患者脂肪细胞存在胰岛素抵抗和微炎症状态。

【关键词】2 型糖尿病;脂肪细胞;胰岛素抵抗;微炎症

【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-04

Study of insulin resistance and microinflammation in the adipocytes of type 2 diabetics

HUANG Chao-li, et al

(*Department of Nephrology, Chengdu Railway Central Hospital*)

作者介绍:黄朝莉(1981-),女,硕士,
研究方向:糖尿病肾病。

通讯作者:钟 玲,女,副教授,E-mail: lzhi92@sina.com.cn。

基金项目:重庆市卫生局科研基金资助项目(04-2-080)。

【Abstract】*Objective*: to investigate the insulin signal transduction protein in the adipocytes of Type 2 diabetics: Insulin Receptor Substrate-1(IRS-1) tyrosine phosphorylation and Protein Kinase B (PKB/AKT) Ser473 phosphorylation level and expression of microinflammatory cytokine interleukin-6(IL-6). *Methods*: Using

表 2 重庆土家族 15 个 STR 基因座多态性参数比较

基因座	H	DP	Pm	PE	PIC	PI
CSF1PO	0.695 7	0.861 4	0.138 6	0.421 6	0.654 1	1.642 9
D13S317	0.800 0	0.917 4	0.082 6	0.599 0	0.753 2	2.500 0
D16S539	0.800 0	0.919 3	0.080 7	0.599 0	0.761 1	2.500 0
D18S51	0.843 5	0.963 2	0.036 8	0.682 1	0.858 3	3.194 4
D19S433	0.800 0	0.944 0	0.056 0	0.599 0	0.816 9	2.500 0
D21S11	0.843 5	0.933 5	0.066 5	0.682 1	0.792 4	3.194 4
D2S1338	0.826 1	0.951 5	0.048 5	0.648 3	0.833 8	2.875 0
D3S1358	0.739 1	0.878 6	0.121 4	0.491 4	0.675 7	1.916 7
D5S818	0.704 3	0.911 2	0.088 8	0.435 0	0.734 7	1.691 2
D7S820	0.782 6	0.895 9	0.104 1	0.567 2	0.712 9	2.300 0
D8S1179	0.887 0	0.939 3	0.060 7	0.768 9	0.812 6	4.423 1
FGA	0.852 2	0.964 2	0.035 8	0.699 2	0.854 8	3.382 4
TH01	0.643 5	0.872 4	0.127 6	0.346 3	0.663 5	1.402 4
TPOX	0.634 8	0.796 5	0.203 5	0.334 7	0.576 4	1.369 0
vWA	0.765 2	0.919 8	0.080 2	0.536 2	0.760 9	2.129 6

primary cell culture, adipocytes from abdominal subcutaneous adipose tissue of Type 2 diabetics(Type 2 diabetes group) and non-diabetics (non-diabetes control group) were cultured.IRS-1 tyrosine phosphorylation and AKT-Ser473 phosphorylation level in the adipocytes of the two groups with insulin stimulation was detected by the Immunoprecipitation and western blot. IL-6 level in adipocytes culture supernatant was evaluated by ELISA. *Results*: (1) The IRS-1 tyrosine phosphorylation and AKT-Ser473 phosphorylation level in the adipocytes with insulin stimulation of Type 2 diabetes group were significantly lower than that of the non-diabetes control group ($P<0.05$); (2) The IL-6 protein level in the adipocytes medium of Type 2 diabetes group was significantly higher than that of the non-diabetes control group ($P<0.05$). *Conclusion*: The adipocytes of Type 2 diabetics present insulin resistance and microinflammatory states.

【Key words】Diabetes, type 2; Adipocytes; Insulin resistance; Microinflammation

糖尿病是一种最常见的内分泌代谢疾病，胰岛素抵抗和 B 细胞分泌缺陷是 2 型糖尿病发病机制的两个主要环节。研究表明，胰岛素信号传导途径的异常是造成胰岛素抵抗的重要因素，随着对信号转导异常与胰岛素抵抗研究的不断深入，人们越来越认识到 2 型糖尿病的胰岛素抵抗涉及信号转导各个环节，可能是各个环节信号转导细微变化叠加的后果[1]。胰岛素抵抗主要发生在肝脏、骨骼肌及脂肪组织。现有研究表明，胰岛素抵抗与全身炎症反应有关，炎症因子可以通过影响胰岛素受体后信号转导从而导致胰岛素抵抗[2]。通过对 2 型糖尿病患者腹部皮下脂肪细胞的胰岛素受体后信号转导分子 IRS-1 及 AKT 磷酸化以及微炎症因子 IL-6 表达水平的观察，拟了解 2 型糖尿病患者脂肪组织的胰岛素抵抗及微炎症状态，从而为通过减轻低度炎症逆转胰岛素抵抗来治疗 2 型糖尿病提供依据。

1 材料与方法

1.1 对象

选择本院行胆囊切除术的 2 型糖尿病患者 10 例及非糖尿病患者 10 例，糖尿病患者平均年龄(45 ± 6.8)岁，性别为 6 例女性及 4 例男性，血压水平为(105~130)/(65~88) mmHg，BMI(24.56 ± 3.62) kg/m^2，糖尿病病程为(8.64 ± 3.25)年，空腹血糖水平为(8.8 ± 2.44) mmol/l，H bA1c 为 7.8% ± 0.88%，非糖尿病患者平均年龄(46 ± 3.8)岁，性别为 5 例女性及 5 例男性，血压水平为(95~135)/(68~82) mmHg，BMI(21.43 ± 3.58)kg/m^2，空腹血糖水平为(4.2 ± 0.85) mmol/l，H bA1c 为 4.9% ± 0.82%，无活动性肝病、心肌损害、肾脏病、感染性疾病、肿瘤、冠心病、脑血管疾病等其他动脉硬化性疾病史，取腹部皮下脂肪组织约 5 g。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 培养基(1:1)，胎牛血清为 Hyclone 公司产品，牛血清白蛋白购自 Roche 公司，Ⅱ型胶原酶，氢化可的松，胰岛素，转铁蛋白，生物素，泛酸盐，三碘甲状腺原氨酸，3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤均系 Sigma 公司产品，抗 IRS-1，抗磷酸化酪氨酸抗体，抗磷酸化 AKT(Ser473)抗体为美国 cell signaling 公司产品，ECL 化学发光试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司，ELISA 试剂盒购自美国 ADL 公司。

1.3 方法

1.3.1 人腹部皮下前脂肪细胞的分离和培养[3] 无菌条件下取人腹部皮下脂肪组织放于加有两种抗生素(青霉素 100 U/ml，链霉素 100 μg/ml)的 PBS 缓冲液中，经 PBS 漂洗数次后用眼科剪剪碎组织至 1mm^3 的小块，并仔细剔除血管及纤维条索状结缔组织，置于 0.2% Ⅱ型胶原酶(含 5%牛血清白蛋白)中消化 1.5 h(37℃水浴振荡)，过滤，转入离心管中 1 000 r/min，离心 10 min，弃去上层悬浮脂肪细胞，用 PBS 洗涤并离心，沉积的细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基调至密度为 2 × 10^4 个 /cm^2 接种于 50 ml 培养瓶中，每 2 ~ 3 d 换液 1 次，培养至长满 80%后常规传代，实验所用细胞为 3 ~ 4 代内。

1.3.2 人腹部皮下前脂肪细胞的分化及鉴定 取生长状况良好的前脂肪细胞，常规消化传代接种于 6 孔板内。待每孔细胞贴壁生长至覆盖孔板面积 70%左右，将完全培养基弃去，PBS 洗涤 1 次，加入无血清诱导培养基诱导分化(氢化可的松 100 nmol/l，胰岛素 60 nmol/l，三碘甲状腺原氨酸 0.2 nmol/l，生物素 33 μmol/l，泛酸盐 17 μmol/l，转铁蛋白 10 μg/ml，Hepes 15 mmol/l，青霉素 100 U/ml，链霉素 100 μg/ml，培养前 3 d 加用 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤 0.25 mmol/l)，每 2 ~ 3 d 换液 1 次。培养至 16 d 诱导完毕后，弃去培养孔内培养基，用 PBS 缓冲液漂洗 2 遍，加入 10%甲醛固定 20 min，PBS 洗 1 次，60%异丙醇洗 1 次，油红 O 工作液加入培养板孔中染色 30 min，PBS 洗 2 次，显微镜下观察，油红 O 将脂滴染为红色。

1.3.3 蛋白印迹法(Western blot)检测 AKT-Ser473 磷酸化程度 (1)体外培养的脂肪细胞蛋白质的提取：取分化成功的脂肪细胞，用 100 nmol/L 胰岛素刺激 15 min 后吸去培养液，用冷 PBS 洗涤细胞 3 次后加入适量蛋白提取液 RIPA 及 PMSF，短暂孵育后用细胞刮子刮下细胞，将细胞碎片及裂解液移入 1.5 ml EP 管中，冰上孵育 30 min，旋涡振荡 3 次，于 4℃离心 12 000 r/min × 5 min，将上清转移至干净的 EP 管内，用考马斯亮兰蛋白定量试剂盒测定各组样本蛋白质浓度，分

装后置于 -80℃冰箱保存。(2)取蛋白样品 40μg 进行 SDS-PAGE 电泳,然后转移至硝酸纤维素膜,用含 5%脱脂奶封闭液封闭该膜 2 h,再加入鼠抗人磷酸化 AKT(Ser473)抗体孵育。(3)洗涤后加入辣根过氧化酶标记的羊抗鼠二抗孵育 2 h,将膜用 TBST 缓冲液洗涤 3 次后加入 ECL 化学发光试剂,曝光,成像。(4)用 Quantity one 分析软件测定各条带光密度值,结果用目的条带的光密度值 /β -actin 条带的光密度值表示。

1.3.4 免疫沉淀法检测 IRS-1 酪氨酸磷酸化程度 (1)脂肪细胞蛋白的提取及浓度测定方法同前。(2)准备 A 蛋白 -Sepharose 珠:PBS 洗 2 遍珠子,再用 PBS 配制成 50%浓度,减掉枪尖,避免在涉及琼脂糖珠的操作中破坏琼脂糖珠。(3)准备 A 蛋白 -Sepharose 珠 -IRS-1 抗体复合物:按每 50 μl A 蛋白 -Sepharose 珠中加入 10μl IRS-1 抗体,4℃孵育 1 h,8 000 转离心 5 min,PBS 洗涤 3 次,加 50μlPBS。(4)取 100 μg 总蛋白,加入 50μl A 蛋白 -Sepharose 珠 -IRS-1 抗体复合物,4℃轻摇 2 h,PBS 洗涤 3 次,之后加入 50μl 1×SDS 凝胶上样缓冲液,100℃变性 3 min,以游离抗原、抗体、珠子,8 000 r 室温离心 5 min,蛋白上清储于 -20℃备用,按前述方法电泳、转膜、封闭,加鼠抗人磷酸化酪氨酸抗体,洗膜,加辣根过氧化酶标记的羊抗鼠二抗。(5)曝光,成像,分析方法均同上。

1.3.5 酶联免疫吸附法检测 IL-6 的水平 吸取培养细胞上清液,4℃温度下以 3 000 r/min 离心 5 min,去除细胞碎片收集上清液,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测脂肪细胞培养液中 IL-6 水平,严格按试剂盒和酶标仪说明书提示的步骤进行操作。IL-6 的浓度单位为 ng/L,每份样品均设复孔。

1.4 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用 t 检验,以 $P \leqslant 0.05$ 为差异具有统计学意义,所有数据统计分析应用 SAS 统计软件完成。

2 结 果

2.1 2 型糖尿病组及非糖尿病对照组腹部皮下脂肪细胞内 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平表达的比较(见表 1,图 1)

2 型糖尿病组脂肪细胞内胰岛素刺激后 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平明显低于非糖尿病对照组($P<0.05$)。

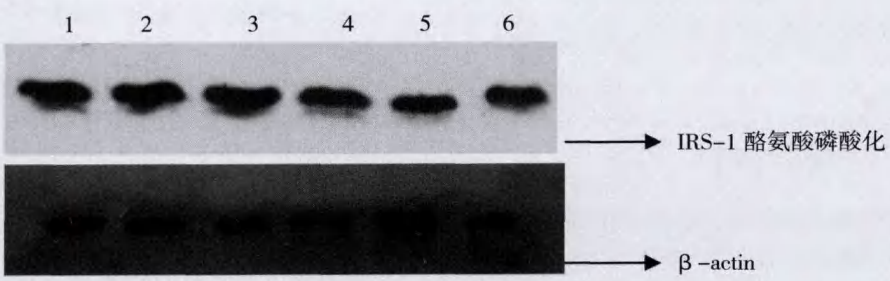
2.2 2 型糖尿病组及非糖尿病对照组腹部皮下脂肪细胞内 AKT-Ser473 磷酸化水平表达的比较

见表 1,图 2。2 型糖尿病组脂肪细胞内胰岛素

表 1 两组脂肪细胞内 IRS-1 及 AKT-Ser473 磷酸化水平(光密度,$\bar{x} \pm s$)

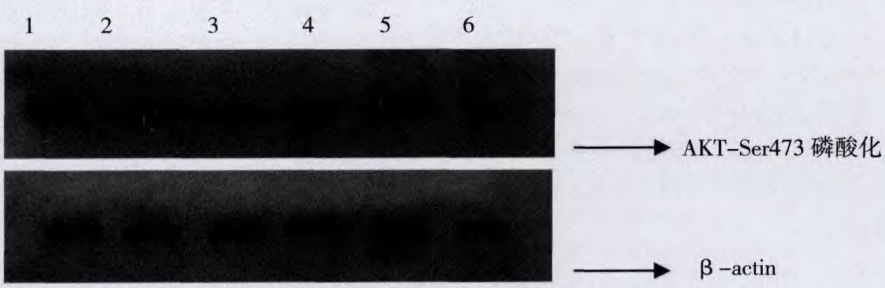
组别	例数	IRS-1 酪氨酸磷酸化	AKT-Ser473 磷酸化
非糖尿病对照组	10	8.90 ± 1.49	1.40 ± 0.26
2 型糖尿病组	10	3.79 ± 1.19*	0.50 ± 0.09*

注:与对照组比较,*$P<0.05$



1 ~ 3 为非糖尿病对照组;4 ~ 6 为 2 型糖尿病组

图 1 2 型糖尿病组及非糖尿病对照组腹部皮下脂肪细胞内 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平



1 ~ 3 为非糖尿病对照组;4 ~ 6 为 2 型糖尿病组

图 2 2 型糖尿病组及非糖尿病对照组腹部皮下脂肪细胞内 AKT-Ser473 磷酸化水平

表 2 两组脂肪细胞培养液中 IL-6 水平的比较

组别	例数	IL-6 蛋白的水平($\bar{x} \pm s$)
非糖尿病对照组	10	82.3 ± 37.1
2 型糖尿病组	10	111.8 ± 31.9*

注:与对照组比较,*$P<0.05$

刺激后 AKT-Ser473 磷酸化水平明显低于非糖尿病对照组($P<0.05$)。

2.3 2 型糖尿病组及非糖尿病对照组腹部皮下脂肪细胞培养液中 IL-6 水平的比较

见表 2。

3 讨 论

胰岛素抵抗是 2 型糖尿病的主要特征之一。现有的资料表明[4],胰岛素调节血糖主要通过 IR/IRS-1/PI3K/PDK1/AKT/GLUT4 信号通路,当这些信号通路中一个或多个信号分子或环节发生异常时,均可导致胰岛素抵抗,从而导致糖尿病的发生[5,6]。其中 IRS-1 是胰岛素受体酪氨酸激酶的一个主要底物。IRS-1 与胰岛素受体的 β 亚单位结合,在受体酪氨酸激酶作用下,IRS-1 的酪氨酸磷酸化,分子构型改变,出现多个能与 Src 同源区 2(Src homology 2, SH2)结合的位点。因此当 IRS-1 活性降低,可直接降低胰岛素的信号转导,导致胰岛素抵抗的发生[7]。

磷脂酰肌醇 3-激酶(Phosphatidyli-nositol 3-kinase,PI3-K)途径是胰岛素作用主要的信号转导途径之一,作为 PI3-K 下游激酶的 AKT 是这一途径中重要的丝氨酸/苏氨酸激酶,可使磷脂果糖激酶-2 活化,糖酵解增强;使糖原合成激酶 3(Glycogen synthase kinase 3,GSK3)失活,糖原合成增加;活化的 AKT 还可导致葡萄糖转运体 4(GLUT4)的合成、分泌、移位等发生变化;因此 AKT 活性的降低在糖尿病的发生、发展中起重要作用[8]。

本研究通过对糖尿病脂肪组织的 IRS-1 与 AKT 磷酸化水平的研究发现,在 2 型糖尿病患者的脂肪组织中 IRS-1 与 AKT 磷酸化水平较非糖尿病组都明显降低,与 Storgaard 等[9]的研究结果类似。这一结果表明 2 型糖尿病患者脂肪组织存在胰岛素抵抗。

近年来,大量人群的研究显示胰岛素抵抗与全身炎症反应有关。IL-6 是由内皮细胞、纤维母细胞、脂肪细胞等产生的一种多功能的细胞因子,它作为急性炎症的始发因子,在炎症反应中发挥重要作用。我们观察了 2 型糖尿病脂肪细胞培养液中微炎症因子 IL-6 蛋白的水平,结果发现 2 型糖尿病组明显高于非糖尿病对照组。表明 2 型糖尿病脂肪细胞存在胰岛素抵抗和微炎症,而微炎症可能在胰岛素抵抗的发生、发展过程中起重要作用[10]。这一结果为我们下一步实验通过采取措施抑制炎症反应以减轻脂肪细胞胰岛素抵抗程度来治疗 2 型糖尿病提供了依据。

参 考 文 献

[1] Shulman G I.Cellular mechanisms of insulin resistance[J]. J Clin Invest,2000,106(2):171-176.

[2] Grimble R F. Inflammatory status and insulin resistance[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care,2002,5(5):551-559.

[3] Hauner H,Petruschke T,Russ M,et al. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture[J]. Diabetologia,1995,38(7):764-771.

[4] Shao J,Yamashita H,Qiao L,et al.Decreased Akt kinase activity and insulin resistance in C57BL/KsJ-Leprdb/db mice[J]. J Endocrinol,2000,167(1):107-115.

[5] Karlsson M,Thorn H,Parpal S,et al.Insulin induces translocation of glucose transporter GLUT4 to plasma membrane caveolae in adipocytes[J]. FASEB J,2002,16(2):249-251.

[6] Pagliassotti M J,Kang J,Thresher J S,et al.Elevated basal PI 3-kinase activity and reduced insulin signaling in sucrose-induced hepatic insulin resistance[J].Am J Physiol Endocrinol Metab,2002,282(1):E170-176.

[7] Takano A,Haruta T,Iwata M,et al.Growth hormone induces cellular insulin resistance by uncoupling phosphatidylinositol 3-kinase and its downstream signals in 3T3-L1 adipocytes[J].Diabetes,2001,50(8):1891-1900.

[8] Lizcano J M,Alessi D R.The insulin signaling pathway[J]. Curr Biol,2002,12(7):R236-238.

[9] Storgaard H,Song X M,Jensen C B,et al.Insulin signal transduction in skeletal muscle from glucose-intolerant relatives of type 2 diabetic patients [J]. Diabetes, 2001,50(12):2770-2778.

[10] Wellen K E,Hotamisligil G S. Inflammation, stress, and diabetes [J]. J Clin Invest, 2005,115(5):1111-1119.

(责任编辑:冉明会)