

杨丹,姚衢,张晗,等.内脂素通过PI3K/Akt/FoxO1信号通路对糖尿病KKAy小鼠骨骼肌糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响[J].中国比较医学杂志,2021,31(9):16-23.
Yang D, Yao Q, Zhang H, et al. Effects of Visfatin on glycolipid metabolism and insulin resistance in the skeletal muscle of diabetic KKAy mice via the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 16-23.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 003

内脂素通过 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路对糖尿病 KKAy 小鼠骨骼肌糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响

杨丹^{1,2},姚衢¹,张晗¹,张琳¹,王茜¹,廖鑫¹,章莹¹,
李思成¹,高琳^{1*}

(1.遵义医科大学附属医院内分泌科,贵州遵义 563003;2.川北医学院附属医院健康管理中心,四川南充 637000)

【摘要】 目的 探讨内脂素对糖尿病 KKAy 小鼠骨骼肌糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响,初步分析其通过 PI3K/Akt/FoxO1 途径对糖尿病小鼠骨骼肌组织可能的作用机制。方法 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为普食 (ND) 组、普食+内脂素 (ND+V) 组、高脂 (HFD) 组和高脂+内脂素 (HFD+V) 组,同周龄雄性 KKAy 小鼠成模后随机分为糖尿病 (DM) 组和糖尿病+内脂素 (DM+V) 组,其中 ND+V 组、HFD+V 组和 DM+V 组连续 3 d 腹腔注射内脂素重组蛋白。检测各组小鼠空腹血糖 (FBG)、餐后血糖 (PBG)、总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、游离脂肪酸 (FFA) 及空腹胰岛素 (FIns),并进行葡萄糖耐量实验 (GTT)、胰岛素耐量实验 (ITT),计算曲线下面积 (AUC) 及稳态模型评估的胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR);RT-qPCR 及 Western blot 检测磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (Akt)、叉头框转录因子 1 (FoxO1)、丙酮酸脱氢酶激酶 4 (PDK4) 和磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 等相关分子的表达水平。结果 分别与 ND 组和 HFD 组比较,DM 组小鼠的体重、摄食、FBG、PBG、TC、TG、FFA、FIns、AUC_{GTT}、AUC_{ITT} 及 HOMA-IR 水平均显著增高 ($P < 0.05$)。与 DM 组相比,DM+V 组 FBG、TC、TG、AUC_{GTT}、AUC_{ITT} 及 HOMA-IR 水平均显著降低 ($P < 0.05$)。分别与 ND 组和 HFD 组比较,DM 组 PI3K、Akt 的 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.001$),而 FoxO1 的 mRNA 表达水平显著增高 ($P < 0.05$);与 DM 组比较,DM+V 组 PI3K 及 Akt 的 mRNA 表达均显著增高, FoxO1 的 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$)。与 ND 组比较,DM 组 PI3K_{110 α} 、p-Akt 蛋白表达水平显著降低, FoxO1、p-FoxO1 和 PDK4 的蛋白表达水平均显著增高 ($P < 0.05$);与 HFD 组相比,DM 组的 p-Akt、p-FoxO1 的蛋白表达水平均显著降低, FoxO1、PDK4 和 PEPCK 的蛋白表达水平均显著增高 ($P < 0.05$);与 DM 组比较,DM+V 组中 PI3K_{110 α} 、p-Akt 及 p-FoxO1 的蛋白表达均显著增高,而 FoxO1、PDK4 和 PEPCK 的蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。结论 内脂素可能通过 PI3K/Akt/FoxO1 途径下调糖尿病小鼠骨骼肌 PDK4 的表达,发挥改善糖脂代谢和胰岛素抵抗的作用。

【关键词】 内脂素;PI3K/Akt/FoxO1;胰岛素抵抗;2 型糖尿病;KKAy 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0016-08

Effects of Visfatin on glycolipid metabolism and insulin resistance in the skeletal muscle of diabetic KKAy mice via the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway

【基金项目】 国家自然科学基金 (81660142);贵州省社会发展攻关项目 (黔科合 SY 字 [2013] 3033 号)。

【作者简介】 杨丹 (1993—),女,硕士研究生,研究方向:糖尿病与脂肪因子。E-mail: 1318083212@qq.com

【通信作者】 高琳 (1961—),女,教授,主任医师,研究方向:糖尿病与脂肪因子。E-mail: lgzycm@sina.com

YANG Dan^{1,2}, YAO Qu¹, ZHANG Han¹, ZHANG Lin¹, WANG Qian¹, LIAO Xin¹,
ZHANG Ying¹, LI Sicheng¹, GAO Lin^{1*}

(1. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China.

2. Health Management Center, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000)

[Abstract] Objective To investigate the effects of Visfatin on glycolipid metabolism and insulin resistance in the skeletal muscle of diabetic KKAY mice, preliminarily analyze the possible mechanism of action through the PI3K/Akt/FoxO1 pathway. **Methods** Eight-week-old male C57BL/6J mice were randomly divided into a normal diet (ND) group, a normal diet+Visfatin (ND+V) group, a high-fat (HFD) group, and a high-fat+Visfatin (HFD+V) group. When the model was generated, male KKAY mice of the same age were randomly divided into a diabetes mellitus (DM) group and diabetes mellitus + Visfatin (DM+V) group. Among them, the ND+V, HFD+V and DM+V groups were intraperitoneally injected with recombinant Visfatin protein for 3 consecutive days. Fasting blood glucose (FBG), postprandial blood glucose (PBG), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), free fatty acids (FFA) and fasting insulin (FIns) were detected in each group of mice. The glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were measured; meanwhile, the area under curve (AUC) and homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) were calculated. At the same time, the expression levels of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), forkhead box transcription factor 1 (FoxO1), pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and other related molecules were detected by RT-qPCR and Western blot. **Results** Compared with the ND group and the HFD group, the body weight, food intake, FBG, PBG, TC, TG, FFA, FIns, AUC_{GTT}, AUC_{ITT} and HOMA-IR levels in the DM group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with DM group, FBG, TC, TG, AUC_{GTT}, AUC_{ITT}, and HOMA-IR levels in DM+V group were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the ND group and the HFD group, the mRNA expression levels of PI3K and Akt in the DM group were significantly decreased ($P < 0.001$), but the mRNA expression levels of FoxO1 were increased ($P < 0.05$). Compared with the DM group, PI3K and Akt mRNA expression in the DM+V group was obviously increased, but the mRNA expression of FoxO1 was significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with the ND group, PI3K_{10α} and p-Akt expression in the DM group was reduced, and the protein expression levels of FoxO1, p-FoxO1 and PDK4 were increased. Compared with the HFD group, p-Akt and p-FoxO1 expression was lower in the DM group, and the protein expression levels of FoxO1, PDK4 and PEPCK were increased ($P < 0.05$). While compared with the DM group, PI3K_{10α}, p-Akt and p-FoxO1 expression were increased in the DM+V group, but the protein expression levels of FoxO1, PDK4 and PEPCK were reduced ($P < 0.05$). **Conclusions** Visfatin may downregulate PDK4 expression in the skeletal muscle of diabetic mice through the PI3K/Akt/FoxO1 pathway and has a role in improving glucolipid metabolism and insulin resistance.

[Keywords] Visfatin; PI3K/Akt/FoxO1; insulin resistance; type 2 diabetes mellitus; KKAY mice

内脂素 (Visfatin) 是一种主要表达于内脏脂肪组织和 (或) 巨噬细胞的脂肪因子^[1], 可增加骨骼肌细胞中葡萄糖的转运, 促进葡萄糖摄取^[2]。研究表明 Visfatin 在葡萄糖代谢和胰岛素敏感性方面发挥作用, 可能参与了 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM)、胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)、肥胖、代谢综合征和多囊卵巢综合征等疾病的发生发展^[3-5]。叉头框转录因子 1 (forkhead box transcription factor 1, FoxO1) 在骨骼肌中高表达, 当蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt) 磷酸化后, FoxO1 的乙酰化以及泛素化等其他翻译后修饰与磷酸化相互作用, 从而影响其转录^[6]。丙酮酸脱氢酶激酶 4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4, PDK4) 是 FoxO1 的下游靶基因, 能够调控糖酵解和糖异生途

径。研究证实 Visfatin 可通过调控 PI3K/Akt 信号途径下游分子糖原合成酶激酶 3β 和葡萄糖转运体 4 的活性而促进细胞对葡萄糖的摄取, 改善糖脂代谢和 IR^[7-8], 但 Visfatin 是否能作用于 PI3K/Akt 下游 FoxO1/PDK4 通路而在糖脂代谢及 IR 中发挥作用, 目前鲜有报道。因此, 本研究拟探讨 Visfatin 在 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路中对糖脂代谢及胰岛素敏感性的影响, 旨在为防治糖尿病及 IR 相关疾病提供新的研究思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

10 只 8 周龄 SPF 级雄性 KKAY 小鼠, 体重为 30.0 g 左右, 20 只同周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小

鼠,体重为(20.0±2.0)g,连同高脂饲料均购于北京华卓康有限公司[SCXK(京)2019-0008],普通饲料由重庆腾鑫公司提供,喂养于重庆医科大学实验动物中心[SYXK(渝)2018-0003],给予充足饲料和自由饮水,环境温度(23±2)℃,湿度40%~60%,控制光照时间8:00~20:00。动物实验经遵义医科大学附属医院动物实验伦理委员会审核批准(KLLY-2018-075),并严格遵循实验动物使用的3R原则。

1.2 主要试剂与仪器

Visfatin 重组蛋白(以色列 PROSPEC 公司);蛋白浓度测定试剂盒、蛋白裂解液及磷酸酶抑制剂(美国 Thermo 公司);脱脂奶粉、兔抗 PI3K110 α 抗体、兔抗 Akt 抗体、兔抗 p-Akt (Ser473) 抗体、兔抗 FoxO1 抗体、兔抗 p-FoxO1 (Ser256) 抗体及兔抗 GAPDH 抗体(美国 CST 公司);兔抗 PDK4 抗体、兔抗 G6Pase 抗体及兔抗 PEPCK 抗体(美国 abcam 公司);SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5 \times)及 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(江苏碧云天生物公司);诺和灵 R(丹麦诺和诺德);DEPC 水(生工生物工程(上海)股份有限公司);TRIzol 试剂(TaKaRa 公司);cDNA 逆转录试剂盒和 2 \times SYBR Green qPCR master Mix(美国 Bimake 公司);戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司)和胰岛素试剂盒(江苏博深生物科技有限公司);胶成像系统(德国 Analytik Jena 公司);电泳槽及转槽(美国 BIO-RAD 公司);核酸蛋白浓度测定仪(杭州 ALLSHENG 公司);雅培血糖仪及配套试纸(英国 Abbott 公司);全自动生化仪(日本 Olympus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 造模及分组

C57BL/6J 小鼠按照随机数字表分为普通饲料组和高脂饲料组,喂养 8 周后,C57BL/6J 小鼠普通饲料组随机分为普食(ND)组和普食+内脂素(ND+V)组,高脂饲料组随机分为高脂(HFD)组和高脂+内脂素(HFD+V)组;KKAy 小鼠给予高脂饲料喂养 8 周后,连续 2 次空腹血糖(FBG) \geq 13.9 mmol/L 定义为糖尿病模型^[9],成模后的 KKAy 小鼠随机分为糖尿病(DM)组和糖尿病+内脂素(DM+V)组;ND+V 组、HFD+V 组和 DM+V 组连续 3 d 腹腔注射重组内脂素蛋白(6 μ g/kg)^[8],其余各组腹腔注射等量生理盐水,并于注射前后测定相关指标($n=5$)。

1.3.2 葡萄糖耐量实验(GTT)和胰岛素耐量实验(ITT)

GTT:将小鼠禁食 12 h,测定 FBG 后腹腔注射

2 g/kg 的 20% 葡萄糖溶液,于注射后 15、30、60、90、120 和 180 min 尾静脉取血测血糖,并计算 GTT 曲线下面积(AUC_{GTT})^[10]。GTT 实验结束间隔 1 周后行 ITT:将小鼠禁食 6 h,然后腹腔注射 0.75 U/kg 的 0.1 U/mL 胰岛素溶液后,测定 6 个时间点(0、15、30、60、90 和 120 min)血糖水平并计算 AUC_{ITT}^[11]。

1.3.3 标本的采集

小鼠禁食后按 50 mg/kg 体重腹腔注射戊巴比妥钠溶液麻醉,取血,室内静置 30 min,3000 r/min 离心 15 min,移液器吸取上清于 EP 管中,-80℃ 超低温冰箱保存。打开胸腹腔,用预冷的生理盐水心脏灌注,直至肝变白为止,游离后肢骨骼肌组织,生理盐水洗净,滤纸吸干后存放于冻存管,于液氮中保存。

1.3.4 基础指标的测定

每周定期测定各组小鼠体重和摄食;采用血糖仪测定 FBG(禁食 6 h)和餐后血糖(PBG);采用全自动生化仪检测小鼠血清中的甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)以及游离脂肪酸(FFA);采用酶联免疫吸附实验测定小鼠空腹血清胰岛素(FIns);并计算稳态模型评估胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),公式为(FBG \times FIns)/22.5。

1.3.5 RT-qPCR 反应

用 TRIzol 提取骨骼肌组织总 RNA,逆转录合成 cDNA,SYBR-Green 荧光染料 RT-qPCR 检测骨骼肌组织的 mRNA 表达。PI3K 上游引物 5'-CCCATGGGACAACATTCCA-3',下游引物 5'-CATGG CGACAAGCTCGGTA-3';Akt 上游引物 5'-TCAGGATGTGGATCAGCGAGA-3',下游引物 5'-CTGCAGGCAGCGGATGATAA-3';FoxO1 上游引物 5'-AGAGTTAGTGAGCAGGCTACAT-3',下游引物 5'-CCGCTGTTGCCAAGTCTGA-3'; β -actin 上游引物 5'-GGTGGGAATGGGTCAGAAGG-3',下游引物 5'-AGGTCTCAAACATGATCTGGCT-3'。

1.3.6 Western blot 检测

各组取适量骨骼肌组织置于冰上的匀浆器中,加入蛋白裂解液和蛋白磷酸酶抑制剂(100:1)充分研磨,直至乳糜状后转移到 EP 管中,每隔 5 min 振荡 1 次,共 30 min,4℃ 离心 10 min,吸取上清测定总蛋白浓度。另取上清与 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混合后沸水变性 5 min,按照每孔 40 μ g 蛋白上样进行电泳分离,转膜,5% 脱脂奶粉封闭,一抗(浓度为 1:1000~1:2000)4℃ 孵育摇床过夜,TBST 溶液

洗膜 3 次,加入二抗(浓度为 1:10000)室温孵育 1 h,洗膜后用 ECL 曝光显影, VisionWorks 软件进行分析条带的灰度值。

1.4 统计学方法

所有数据用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 25.0 软件进行分析,用 GraphPad Prism 7 和 Photoshop 软件进行作图。多组间比较用单因素方差分析,两组间比较方差齐时用 LSD 检验,方差不齐时用 Dunnett's T3 检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 造模 8 周后各组小鼠的体重、摄食和血糖

在喂养 8 周后,与 ND 组比较,HFD 组和 DM 组小鼠体重显著增高,DM 组小鼠的摄食显著增高;与 HFD 组比较,DM 组小鼠体重和摄食均显著增高($P<0.01$)。与 ND 组和 HFD 组比较,DM 组的 FBG 和 PBG 显著增高($P<0.001$)。见表 1。

2.2 干预后各组小鼠的相关指标

2.2.1 血清生化指标

与 ND 组比较,HFD 组小鼠 TC 和 FFA 水平显

表 1 喂养 8 周后三组小鼠的体重、摄食及血糖($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 1 Body weight, food intake and blood glucose in the three groups of mice after 8 weeks of feeded

指标 Index	普食组 ND group	高脂组 HFD group	糖尿病组 DM group
体重(g) Body wight	24.90±0.87	30.57±1.11 ^a	41.12±1.58 ^{bc}
摄食(g/d) Food intake	2.51±0.27	2.22±0.17	7.05±0.36 ^{bc}
空腹血糖(mmol/L) FBG	5.76±0.92	7.60±1.03	25.68±6.41 ^{bc}
餐后血糖(mmol/L) PBG	7.60±0.88	9.02±0.73	31.16±4.28 ^{bc}

注:与 ND 组相比,^a $P<0.01$,^b $P<0.001$;与 HFD 组相比,^c $P<0.001$ 。
Note. Compared with ND group, ^a $P<0.01$, ^b $P<0.001$. Compared with HFD group, ^c $P<0.001$.

表 2 六组小鼠血清生化指标($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Serum biochemical parameters of mice in six groups

指标 Index	普食组 ND group	普食+内脂素组 ND+V group	高脂组 HFD group	高脂+内脂素组 HFD+V group	糖尿病组 DM group	糖尿病+内脂素组 DM+V group
空腹血糖(mmol/L)FBG	6.42±0.62	6.47±0.65	9.36±0.16	7.59±1.10	18.70±3.18 ^{ac}	12.63±7.06 ^d
总胆固醇(mmol/L)TC	1.63±0.45	1.41±0.08	3.29±0.51 ^b	3.20±0.36	7.19±0.47 ^{bc}	4.78±0.63 ^c
甘油三酯(mmol/L)TG	0.62±0.29	0.52±0.13	0.40±0.13	0.40±0.25	2.31±0.30 ^{bc}	1.65±0.31 ^c
游离脂肪酸(mmol/L)FFA	0.30±0.01	0.22±0.04	0.46±0.14 ^b	0.36±0.02	0.69±0.08 ^{bc}	0.61±0.02
空腹胰岛(mU/L)FIns	7.68±1.42	7.17±0.24	9.29±0.48	10.60±0.62	15.38±0.74 ^{bc}	14.71±3.87
胰岛素抵抗指数 HOMA-IR	2.16±0.18	2.06±0.13	3.87±0.15	3.56±0.36	12.78±2.24 ^{bc}	7.47±1.95 ^c

注:与 ND 组相比,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与 HFD 组相比,^c $P<0.01$;与 DM 组相比,^d $P<0.05$,^e $P<0.01$ 。

Note. Compared with ND group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$. Compared with HFD group, ^c $P<0.01$. Compared with DM group, ^d $P<0.05$, ^e $P<0.01$.

著增高($P<0.01$),与 ND 组和 HFD 组比较,与 ND 组和 HFD 组比较,DM 小鼠 FBG、FIns、TC、TG、FFA 和 HOMA-IR 水平均显著增高($P<0.05$)。与 DM 组相比,DM+V 组的 FBG、TC、TG 和 HOMA-IR 显著降低($P<0.05$)。见表 2。

2.2.2 葡萄糖耐量实验和胰岛素耐量实验

在 GTT 实验中,注射葡萄糖后 15 min 时,ND 组、ND+V 组、HFD 组和 HFD+V 组的血糖浓度均上升到最大值,之后开始下降直到 180 min 时血糖浓度恢复到注射前左右;而 DM 组小鼠在注射后 90 min 时血糖才达到峰值,之后开始下降;DM+V 组在 $t=30$ min 时血糖升高到峰值,在 $t=180$ min 血糖回归到 0 点左右。与 ND 组比较,HFD 组和 DM 组 AUC_{GTT} 显著增高($P<0.01$ 或 0.001);与 HFD 组比较,DM 组 AUC_{GTT} 显著增高($P<0.001$);与 DM 相比,DM+V 组 AUC_{GTT} 显著降低($P<0.01$)。见图 1。

ITT 实验中,ND 组、ND+V 组、HFD 组、HFD+V 组和 DM+V 组的血糖均在 15~60 min 时降至最低点,而 DM 组血糖先升高后下降,60 min 时降至最低。分别与 ND 组和 HFD 组比较,DM 组 AUC_{ITT} 均显著增高($P<0.001$);和 DM 组相比,DM+V 组 AUC_{ITT} 显著降低($P<0.01$)。见图 2。

2.2.3 RT-qPCR 检测 PI3K、Akt 及 FoxO1 的 mRNA 表达

分别与 ND 组和 HFD 组比较,DM 组 PI3K、Akt 的 mRNA 表达水平均显著降低($P<0.001$),而 FoxO1 的 mRNA 表达水平均显著增高($P<0.05$);与 ND 组相比,ND+V 组 FoxO1 的 mRNA 表达显著降低($P<0.05$);与 HFD 组比较,ND 组 Akt 的 mRNA 表达组显著增高($P<0.05$);与 DM 组比较,DM+V 组 PI3K 及 Akt 的 mRNA 表达均显著增高,FoxO1 的 mRNA 表达显著降低($P<0.01$)。见表 3。

2.2.4 Western blot 法检测 PI3K/Akt 信号通路及其下游相关分子的蛋白表达

与 ND 组比较,DM 组 PI3K_{110α}、p-Akt 蛋白表达水平显著降低,FoxO1、p-FoxO1 和 PDK4 的蛋白表达水平均显著增高($P<0.05$);与 ND 组比较,HFD 组 FoxO1 的蛋白表达显著降低,而 p-FoxO1 的蛋白表达显著增高($P<0.05$);ND+V 组 FoxO1 蛋白表达

水平较 ND 组显著降低($P<0.001$)。与 HFD 组相比,DM 组的 p-Akt、p-FoxO1 的蛋白表达水平均显著降低,FoxO1、PDK4 和 PEPCK 的蛋白表达水平均显著增高($P<0.05$)。与 DM 组比较,DM+V 组中 PI3K_{110α}、p-Akt 及 p-FoxO1 的蛋白表达均显著增高,而 FoxO1、PDK4 和 PEPCK 的蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。见图 3~6。

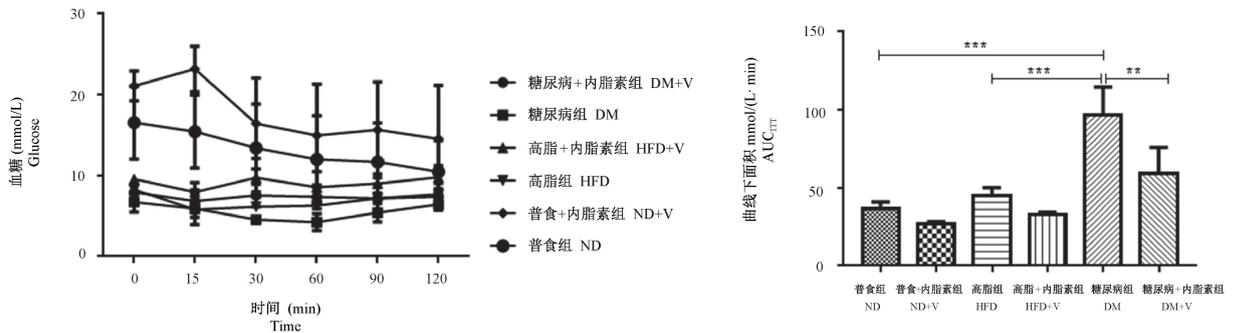


注:与 ND 组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与 HFD 组相比,*** $P<0.001$;与 DM 组相比,** $P<0.01$ 。

图 1 葡萄糖耐量实验和曲线下面积

Note. Compared with ND group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with HFD group, *** $P<0.001$. Compared with DM group, ** $P<0.01$.

Figure 1 Glucose tolerance test and area under curve



注:与 ND 组相比,*** $P<0.001$;与 HFD 组相比,*** $P<0.001$;与 DM 组相比,** $P<0.01$ 。

图 2 胰岛素耐量实验和曲线下面积

Note. Compared with ND group, *** $P<0.001$. Compared with HFD group, *** $P<0.001$. Compared with DM group, ** $P<0.01$.

Figure 2 Insulin tolerance test and area under curve

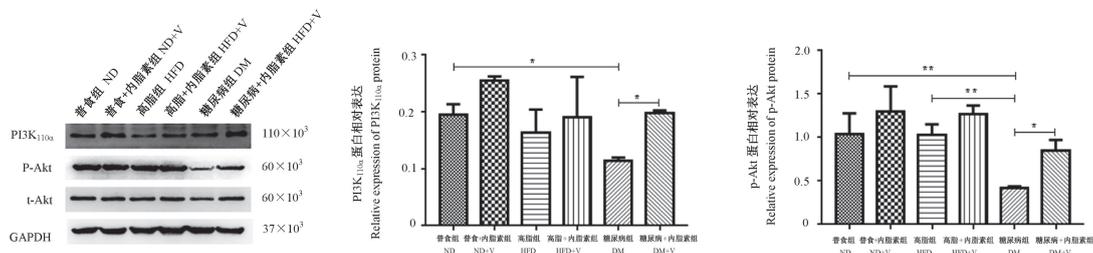
表 3 各组小鼠骨骼肌 PI3K、Akt 和 FoxO1 的 mRNA 表达($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 3 Expressions level of PI3K, Akt and FoxO1 mRNA in skeletal muscle of mice among each group

基因 Genes	普食组 ND group	普食+内脂素组 ND+V group	高脂组 HFD group	高脂+内脂素组 HFD+V group	糖尿病组 DM group	糖尿病+内脂素组 DM+V group
PI3K	1.00±0.05	1.09±0.05	0.85±0.09	0.95±0.15	0.48±0.11 ^{bc}	0.81±0.04 ^f
Akt	1.00±0.11	1.16±0.14	0.82±0.08 ^a	0.92±0.07 ^c	0.33±0.10 ^{bc}	0.75±0.05 ^h
FoxO1	0.53±0.14	0.32±0.16 ^a	0.43±0.12	0.41±0.14	0.72±0.16 ^{ad}	0.26±0.10 ^h

注:与 ND 组相比,^a $P<0.05$,^b $P<0.001$;与 HFD 组相比,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$,^e $P<0.001$;与 DM 组相比,^f $P<0.01$,^h $P<0.001$ 。

Note. Compared with ND group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.001$. Compared with HFD group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$, ^e $P<0.001$. Compared with DM group, ^f $P<0.01$, ^h $P<0.001$.

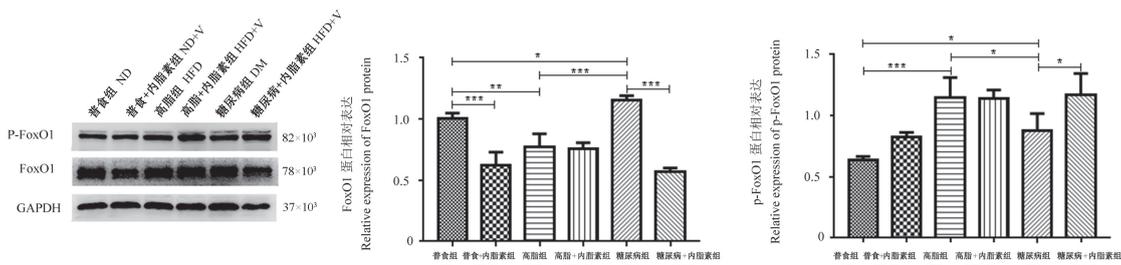


注:与 ND 组相比, **P*<0.05, ***P*<0.01;与 HFD 组相比, ***P*<0.01;与 DM 组相比, **P*<0.05。

图 3 各组小鼠骨骼肌组织 PI3K 和 Akt 的活性蛋白表达

Note. Compared with ND group, **P*<0.05, ***P*<0.01. Compared with HFD group, ***P*<0.01. Compared with DM group, **P*<0.05.

Figure 3 Active pntein expression of PI3K and Akt in skeletal muscle tissues of mice in each group

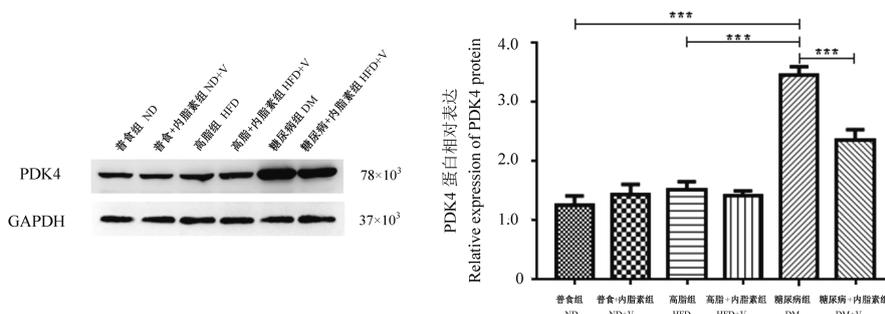


注:与 ND 组相比, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001;与 HFD 组相比, **P*<0.05, ****P*<0.001;与 DM 组相比, **P*<0.05, ****P*<0.001。

图 4 各组小鼠骨骼肌组织 FoxO1 的蛋白表达

Note. Compared with ND group, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001. Compared with HFD group, **P*<0.05, ****P*<0.001. Compared with DM group, **P*<0.05, ****P*<0.001.

Figure 4 Protein expression of FoxO1 in skeletal muscle tissues of mice in each group

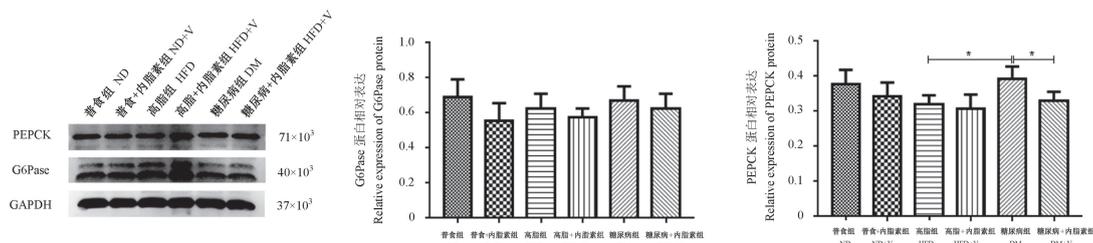


注:与 ND 组相比, ****P*<0.001;与 HFD 组相比, ****P*<0.001;与 DM 组相比, ****P*<0.001。

图 5 各组小鼠骨骼肌组织 PDK4 的蛋白表达

Note. Compared with ND group, ****P*<0.001. Compared with HFD group, ****P*<0.001. Compared with DM group, ****P*<0.001.

Figure 5 Protein expression of PDK4 in skeletal muscle tissues of mice in each group



注:与 HFD 组相比, **P*<0.05;与 DM 组相比, **P*<0.05。

图 6 各组小鼠骨骼肌组织 G6Pase 和 PEPCK 的蛋白表达

Note. Compared with HFD group, **P*<0.05. Compared with DM group, **P*<0.05.

Figure 6 Protein expression of G6Pase and PEPCK in skeletal muscle tissues of mice in each group

3 讨论

T2DM 是一种多基因遗传的慢性代谢紊乱综合征,主要以糖脂代谢紊乱和胰岛素作用受损、同时靶细胞或靶器官对胰岛素刺激的反应能力减弱为特征^[12-13]。近年来研究发现 Visfatin 可作用于胰岛素受体,使胰岛素受体底物酪氨酸磷酸化以激活下游 PI3K/Akt 等信号通路,具有与胰岛素类似的功能^[14]。前期研究也发现 Visfatin 可以通过 PI3K/Akt 信号途径上调其下游糖原合成酶激酶 3 β 和葡萄糖转运体 4 的活性,下调 FoxO1 的表达,增加 L6 骨骼肌细胞和 KKAY 小鼠骨骼肌组织对葡萄糖的摄取,改善 IR^[7-8,15],并且 FoxO1 与 FBG、TG 和 HOMA-IR 呈正性相关^[16]。

骨骼肌是调节糖脂代谢的关键外周组织,Visfatin 还可影响骨骼肌的胰岛素敏感性,维持葡萄糖稳态^[4]。临床研究表明 Visfatin 血浆浓度与人体内脏脂肪量密切相关,在肥胖和 T2DM 人群中 Visfatin 浓度明显升高,提示其可能参与肥胖相关的 IR 和糖尿病的发生^[17]。FoxO1 是能量稳态的关键转录因子,能直接上调骨骼肌组织 PDK4 的表达,减少葡萄糖的利用^[18-19],本实验中 KKAY 糖尿病小鼠的体重、摄食和血糖显著增高,出现典型的糖代谢紊乱特征^[20],分别与 ND 组和 HFD 组比较,DM 组 FBG、TC、TG、FFA、FIns、AUC_{GTT}、AUC_{ITT} 及 HOMA-IR 水平均显著增高,HFD 组小鼠 TC 和 FFA 水平较 ND 组均显著增高,而注射 Visfatin 重组蛋白后,DM+V 组的 FBG、TC、TG、HOMA-IR、AUC_{GTT} 和 AUC_{ITT} 水平显著降低,提示 Visfatin 可改善糖尿病小鼠的胰岛素敏感性及糖脂代谢。糖尿病小鼠骨骼肌 PI3K、Akt 的基因及蛋白活性表达较 ND 和 HFD 组显著降低,而 FoxO1 及 PDK4 的基因和蛋白表达水平较 ND 组和 HFD 组均明显增高;注射内脂素后 DM 组骨骼肌 PI3K、Akt 的基因和蛋白活性表达均显著增高,而 FoxO1 及 PDK4 基因和蛋白表达水平均显著降低。本实验证实 Visfatin 下调了骨骼肌 FoxO1 和 PDK4 的表达,但 HFD 组及 DM+V 组 FoxO1 与 p-FoxO1 蛋白水平表达结果不一致,我们推测:(1) FoxO1 不仅由磷酸化修饰,可能还与泛素化及乙酰化等其他蛋白翻译后修饰作用有关,从而影响 FoxO1 的表达;(2) FoxO1 包含三个由 Akt 控制的磷酸化位点,即 Thr24、Ser256 和 Ser319,而本实验中只检测了 FoxO1 蛋白磷酸化位点其中之一,不能完全代表

p-FoxO1 蛋白水平的表达。

FoxO1 可诱导其下游靶点 PDK4 的转录激活,同时,PDK4 可使丙酮酸脱氢酶复合物磷酸化失活,减少丙酮酸进入三羧酸循环,从而调节糖异生和糖酵解途径,而葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)和磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)是催化糖异生的关键酶^[19,21]。研究发现通过诱导 PDK 基因,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 激活因子 1 α 将促进丙酮酸代谢为乙酰辅酶 A,进入糖异生途径;相反,抑制 PDK4 基因后,可降低血糖、改善 IR^[22]。在肥胖小鼠和 IR 的肝细胞中 PEPCK 和 G6Pase 表达明显增加,而抑制 PEPCK 和 G6Pase 的表达可通过减少肝糖异生从而逆转 IR^[23-24]。本实验中 DM+V 组小鼠骨骼肌中 PEPCK 蛋白表达明显低于 DM 组小鼠,与上述研究结果一致,但 G6Pase 蛋白表达无明显差异,可能是实验中注射 Visfatin 的时间较短所致。因此,进一步构建 Visfatin 过表达腺相关病毒载体,拟研究长时间持续作用的 Visfatin 对糖脂代谢相关分子基因和蛋白表达的影响,有待于更进一步证实 Visfatin 在糖尿病及 IR 中的作用。

总之,在 KKAY 糖尿病小鼠骨骼肌组织中,Visfatin 可能通过 PI3K/Akt 途径下调 FoxO1、PDK4 的表达,发挥改善糖脂代谢和 IR 的作用。本研究也存在一定的局限性,后续将继续完成过表达腺相关病毒实验,同时用腺相关病毒干扰 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路后观察 FoxO1 及其下游分子的表达变化,以期对糖尿病和 IR 防治提供潜在的视点。

参考文献:

- [1] Hognogi LD, Simiti LV. The cardiovascular impact of visfatin-an inflammation predictor biomarker in metabolic syndrome [J]. Clujul Med, 2016, 89(3): 322-326.
- [2] Lee JO, Kim N, Lee HJ, et al. Visfatin, a novel adipokine, stimulates glucose uptake through the Ca²⁺-dependent AMPK-p38 MAPK pathway in C2C12 skeletal muscle cells [J]. J Mol Endocrinol, 2015, 54(3): 251-262.
- [3] Li F, Li Y, Duan Y, et al. Myokines and adipokines: Involvement in the crosstalk between skeletal muscle and adipose tissue [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2017, 33(3): 73-82.
- [4] Nicholson T, Church C, Baker DJ, et al. The role of adipokines in skeletal muscle inflammation and insulin sensitivity [J]. J Inflamm (Lond), 2018, 15: 9.
- [5] Hetta HF, Ez-Eldeen ME, Mohamed GA, et al. Visfatin serum levels in obese type 2 diabetic patients: relation to proinflammatory cytokines and insulin resistance [J]. Egypt J Immunol, 2018, 25(2): 141-151.

- [6] Accili D, Arden KC. FoxOs at the Crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation [J]. Cell, 2004, 117(4): 421-426.
- [7] 廖鑫, 邓凡曲, 杨丹, 等. 内脂素对大鼠成肌细胞 PI3K/Akt 信号通路及胰岛素敏感性影响的研究 [J]. 中国糖尿病杂志, 2019, 27(9): 677-681.
- [8] 陈其荣. 内脂素通过 PI3K/AKT/GSK 信号通路对 KKAY 糖尿病小鼠骨骼肌糖代谢的影响 [D]. 遵义: 遵义医学院, 2015.
- [9] Liu Q, Liu S, Gao L, et al. Anti-diabetic effects and mechanisms of action of a Chinese herbal medicine preparation JQ-R *in vitro* and in diabetic KK^{AY} mice [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2017(4): 461-469.
- [10] Zhang J, Zhou J, Zhang T, et al. Facile fabrication of an amentoflavone-loaded micelle system for oral delivery to improve bioavailability and hypoglycemic effects in KKAY mice [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(13): 12904-12913.
- [11] Bone DBJ, Meister J, Knudsen JR, et al. Skeletal muscle-specific activation of G_q signaling maintains glucose homeostasis [J]. Diabetes, 2019, 68(6): 1341-1352.
- [12] Han MS, Jung DY, Morel C, et al. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation [J]. Science, 2013, 339(6116): 218-222.
- [13] Åvall K, Ali Y, Leibiger IB, et al. Apolipoprotein CIII links islet insulin resistance to β -cell failure in diabetes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(20): E2611-E2619.
- [14] Wang Y, Gao C, Zhang Y, et al. Visfatin stimulates endometrial cancer cell proliferation via activation of PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signalling pathways [J]. Gynecol Oncol, 2016, 143(1): 168-178.
- [15] 程玉华. 内脏脂肪素对胰岛素抵抗 L6 细胞叉头框蛋白 1 的影响 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2019.
- [16] 廖鑫, 陈其荣, 阳琰, 等. 糖尿病小鼠骨骼肌 FoxO1 及 PPAR γ 的表达及意义 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(23): 5759-5761.
- [17] Tabassum A, Mahboob T. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation on visfatin, advanced glycation end products, and renal oxidative stress in obesity-induced type 2 diabetes mellitus [J]. Hum Exp Toxicol, 2018, 37(11): 1187-1198.
- [18] Zhang D, Li Y, Yao X, et al. miR-182 regulates metabolic homeostasis by modulating glucose utilization in muscle [J]. Cell Rep, 2016, 16(3): 757-768.
- [19] Sanchez AMJ, Candau RB, Bernardi H. FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis [J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(9): 1657-1671.
- [20] 党女, 卢延华, 管博文, 等. 白消安对 2 型糖尿病 KKAY 小鼠外周血细胞及骨髓细胞的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1): 45-50.
- [21] Xiang J, Lv Q, Yi F, et al. Dietary supplementation of vine tea ameliorates glucose and lipid metabolic disorder via akt signaling pathway in diabetic rats [J]. Molecules, 2019, 24(10): 1866-1888.
- [22] 杨蕊, 朱奕, 王颖, 等. 丙酮酸脱氢酶激酶 PDK4 在临床中的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(1): 101-105.
- [23] Xiao Q, Zhang S, Yang C, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates palmitic acid-induced hepatic steatosis and inflammation in HepG2 cells via the AMPK/NF- κ B pathway [J]. Int J Endocrinol, 2019, 2019: 7514802.
- [24] Fang P, Sun Y, Gu X, et al. Baicalin ameliorates hepatic insulin resistance and gluconeogenic activity through inhibition of p38 MAPK/PGC-1 α pathway [J]. Phytomedicine, 2019, 64: 153074.

[收稿日期] 2020-08-14