

糖调节受损模型大鼠胰岛 β -细胞功能、胰岛素抵抗水平及胰腺组织中AMPK-mTOR信号通路相关蛋白表达水平变化

吾热叶提·阿不都乃比, 蒋升, 艾比拜·玉素甫*

省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室, 新疆医科大学第一附属医院内分泌科, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2024年2月21日; 录用日期: 2024年3月15日; 发布日期: 2024年3月22日

摘要

目的: 观察糖调节受损大鼠模型胰岛 β -细胞功能、胰岛素抵抗水平及胰腺组织中AMPK-mTOR信号通路相关蛋白表达水平变化。方法: 选取82只雄性Wistar大鼠, 采用高脂饲料饲养及腹腔注射小剂量链脲佐菌素(STZ)建立糖调节受损(IGR)模型组, 普通饲料饲养建立对照组, 各组选6只检测血清样本中胰岛素、血糖、2小时后血糖含量, 计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR); 利用Western-blot方法检测p-AMPK、p-mTOR、ULK1、LC3、Beclin-1。结果: 与对照组比较, 模型组大鼠血清FBG、FINS、2 h后血糖、HOMA-IR均升高, 大鼠胰腺组织p-AMPK、p-mTOR、ULK1、LC3、Beclin-1表达均升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: IGR模型大鼠胰岛素抵抗明显、胰岛 β 细胞功能降低, AMPK-mTOR信号通路相关蛋白表达升高。

关键词

糖调节受损, AMPK-mTOR信号通路, 胰岛 β -细胞功能, 胰岛素抵抗, 糖尿病

Changes of Pancreatic β -Cell Function, Insulin Resistance and AMPK-mTOR Signaling Pathway-Related Protein Expression in Pancreatic Tissues of Rats with Impaired Glucose Regulation Model

Wu-Reyeti Abudunaibi, Sheng Jiang, Ai-Bibai Yusufu*

*通讯作者。

文章引用: 吾热叶提·阿不都乃比, 蒋升, 艾比拜·玉素甫. 糖调节受损模型大鼠胰岛 β -细胞功能、胰岛素抵抗水平及胰腺组织中AMPK-mTOR信号通路相关蛋白表达水平变化[J]. 临床医学进展, 2024, 14(3): 1071-1076.

DOI: 10.12677/acm.2024.143811

Abstract

Objective: To observe the changes of pancreatic islet β -cell function, insulin resistance level and the expression level of AMPK-mTOR signaling pathway related proteins in pancreatic tissues in the impaired glucose regulation rat model. **Methods:** 82 male Wistar rats were selected and fed with high-fat chow and intraperitoneal injection of small trick streptozotocin (STZ) to establish an impaired glucose regulation (IGR) model group, and a control group was established by normal chow. 6 rats from each group were selected to test the serum samples for insulin, glucose, and glucose level after 2 hours, and calculate the insulin resistance index (HOMA-IR); p-AMPK-mTOR signaling pathway related proteins expression level in pancreatic tissues were detected by Western-blot was used to detect p-AMPK, p-mTOR, ULK1, LC3 and Beclin-1. **Results:** Compared with the control group, serum FBG, FINS, post-2h glucose, and HOMA-IR were elevated in the model group, and the expression of p-AMPK, p-mTOR, ULK1, LC3, and Beclin-1 was elevated in the pancreatic tissues of the rats, and the difference had a statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion:** IGR model rats had obvious insulin resistance, reduced pancreatic β -cell function, and elevated expression of proteins related to AMPK-mTOR signaling pathway.

Keywords

Impaired Glucose Regulation, AMPK-mTOR Signaling Pathway, Pancreatic β -Cell Function, Insulin Resistance, Diabetes Mellitus

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

糖调节受损(Impaired Glucose Regulation, IGR)是指体内分泌的胰岛素不能够满足体内糖代谢的需要,从而出现有关糖代谢方面的调整一些紊乱。IGR 是 2 型糖尿病(Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM)的前期状态,尽管是处于糖尿病的初始阶段,血糖水平并没有达到糖尿病所规定的标准,仍可能导致有害的后果,且 IGR 与早期肾病、小纤维神经病变、早期视网膜病变以及心血管疾病的风险上升有关[1] [2] [3]。因此在糖尿病预防研究中,IGR 人群的生活方式干预被视为核心内容及首要步骤[4] [5]。T2DM 的早期阶段以胰岛素抵抗、胰岛 β -细胞功能降低为主要生理病理特征[6],因此 IGR 与两者关系密切。目前临床上通常以葡萄糖耐量试验(Oral Glucose Tolerance Test, OGTT)及胰岛素抵抗指数(Homeostasis Model Insulin Resistance Index, HOMA-IR)来评估胰岛功能。本研究旨在建立 IGR 大鼠模型,与正常对照组共同检测空腹胰岛素、空腹血糖、2 小时后血糖含量评估胰岛功能,计算 HOMA-IR 评价胰岛素抵抗水平,同时检测有关 AMPK-mTOR 信号通路相关蛋白 p-AMPK、p-mTOR、ULK1、LC3、Beclin-1,探讨糖调节受损对胰岛 β -细胞功能、胰岛素抵抗水平的影响,及其与 AMPK-mTOR 信号通路的相关性。

2. 材料与方法

2.1. 仪器

电子天平(上海菁海仪器有限公司, DY15K)、精密电子天平(上海菁海仪器有限公司, FA2004N)、数显游标卡尺(得力, DL91150)、台式低速离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司, SF-TDL-5C)、恒温箱(上海精宏实验设备有限公司, DNP-9272)、恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司, DHG 型)、血糖仪(罗氏)。

2.2. 试剂

链脲菌素(STZ, sigma 公司, S0130-1G)、大鼠胰岛素(INS) ELISA Kit (华美公司, CSB-E05070r)、葡萄糖(GLU)试剂盒(葡萄糖氧化酶法)(南京建成, A154-1-1)、D-(+)-葡萄糖(sigma 公司, D9434-250G)、二甲双胍盐酸盐(梯希爱(上海)化成工业发展有限公司, M2009)、盐酸赛拉嗪注射液(圣达动物药品有限公司)、舒泰 50 (法国维克, FBS060)。

2.3. 动物

82 只雄性 Wistar 大鼠, 购自杭州医学院动物实验中心, 8~10 周龄, 体重 200~250 g。饲养温度 23℃ ± 3℃, 相对湿度 40%~70%。

2.4. 饲料

高脂饲料配方: 脂肪占 61%, 蛋白质占 19%, 碳水化合物占 20%。

2.5. 试验方法

2.5.1. 动物分组及饲养

将 82 只雄性 wistar 大鼠适应性喂养一周后, 随机分为正常对照组 12 只(正常饲养)、IGR 模型组 70 只(普通饲料适应性喂养 1 周后, 体重约为 200~250 g, 继续给予高脂饲料喂养 4 周)(饲料配方: 脂肪占 61%, 蛋白质占 19%, 碳水化合物占 20%), 每 3 天腹腔注射链脲佐菌素 25 mg/kg (pH 4.45、0.01 mol/L 无菌柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液) 1~2 次。

2.5.2. 模型建立

注射第三天链脲佐菌素检测大鼠空腹血糖和糖耐量(OGTT)实验(大鼠禁食不禁水 16 h 后, 按照 2 g/kg 的剂量灌胃 50% 的葡萄糖溶液, 注射葡萄糖后分别在 0、2 h 后隔尾取血检测血糖, 并绘制葡萄糖耐量变化曲线), 以监测大鼠糖调节能力, 当 FBG 为 6.1~7.0 mmol/L, OGTT 2 h 血糖值为 7.8~11.1 mmol/L, 视为 IGR 模型建立成功。

2.6. 样本收集

各组选取正常对照组、IGR 模型组各 6 只大鼠; 大鼠处死以后, 收集腹腔动脉血 > 1~2 ml, 分离血清, 保存于 -80℃。大鼠处死 12 h 之前禁食, 收集胰腺组织, 在液氮速冻后, -80 冻存。

1) 使用大鼠胰岛素(INS) ELISA 实验方法试剂盒检测各组大鼠血清样本中胰岛素量, 按照试剂盒说明测定大鼠空腹葡萄糖(FBG), 进行空腹葡萄糖耐量试验(OGTT)并记录服糖后 2 h 后的血糖值。用公式 $HOMA-IR = FBG \text{ (空腹血糖)} \times FINS \text{ (空腹胰岛素)} / 22.5$ 计算 HOMA-IR, 评价胰岛素抵抗。

2) 提取各组大鼠胰腺组织总蛋白, Western-blot 方法检测 AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR, ULK1, LC3, Beclin-1 蛋白表达。样本经液氮研磨之后, 取约 100 mg 样本加入到预冷的 1.5 ml 离心管中, 然后

加入 400 μ L RIPA 裂解液(已加入蛋白酶抑制剂和广谱磷酸酶抑制剂),充分混匀,4 $^{\circ}$ C 放置 60 min 后,12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 15 min 收集上清。BCA 法测定蛋白浓度。样本加入适量 5 \times SDS-PAGE loading buffer (含 β -巯基乙醇), 100 $^{\circ}$ C 沸水加热处理 5 min, 使蛋白充分变性, 12,000 rpm 离心 5 min, 取上清备用。后制胶、加样、电泳, 电泳结束后转膜, 再将 PVDF 膜水洗 3 次(5 min/次), 使用含 5%脱脂奶粉的封闭液, 封闭转印膜 1 h, 然后 TBST 洗 3 次(5 min/次), 用 TBST 稀释一抗, 漂洗 3 次, 加入适当稀释的二抗室温孵育 1 h, 再漂洗 3 次, (15)将显色液 A 液和 B 液混合, 加 2 ml 至膜上, 用 ChemiScope mini 化学发光仪检测、拍照。

2.7. 统计学处理

所有数据采用均值 \pm 标准差表示, 运用 SPSS19.0 软件对各组中各蛋白含量进行统计学分析, 组间分析采用 T 检验分析方法统计, $P < 0.05$ 表明有显著性差异。

3. 结果

1) 模型组与对照组间血清中 FBG、FINS、2 h 后血糖、HOMA-IR 的比较与对照组相比, IGR 模型组大鼠血清中含量 FBG、FINS、2 h 后血糖及 HOMA-IR 均明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2) 模型组与对照组间 AMPK-mTOR 信号通路相关蛋白表达水平的比较与对照组相比, IGR 模型组大鼠胰腺组织中 p-AMPK、p-mTOR、ULK1、LC3、Beclin-1 的表达水平均明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2、表 3。

Table 1. Statistics of GLU and INS levels in serum of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 1. 各组血清中 GLU、INS 含量统计表($\bar{x} \pm s, n = 6$)

不同分组	FBG (mmol/L)	FINS (μ U/ml)	2 h 血糖 (mmol/L)	HOMA-IR
对照组	6.978 \pm 2.012	16.801 \pm 4.914	6.333 \pm 0.236	5.032 \pm 1.747
IGR 模型组	10.164 \pm 0.889 [△]	23.767 \pm 5.220 [△]	9.150 \pm 0.614 [△]	10.744 \pm 2.530 [△]

注: [△]与对照组相比, $P < 0.05$ 。

Table 2. Analysis of the expression level of each protein in rat pancreatic tissues ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

表 2. 大鼠胰腺组织中各蛋白的表达水平分析($\bar{x} \pm s, n = 4$)

不同分组	AMPK	p-AMPK	mTOR	p-mTOR
对照组	0.991 \pm 0.118	0.642 \pm 0.035	0.718 \pm 0.117	1.070 \pm 0.062
IGR 模型组	0.968 \pm 0.111	0.972 \pm 0.080 [△]	0.819 \pm 0.121	0.563 \pm 0.233 [△]

注: [△]与对照组相比, $P < 0.05$ 。

Table 3. Analysis of the expression levels of each protein in the pancreatic tissues of different groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

表 3. 不同分组大鼠胰腺组织中各蛋白的表达水平分析($\bar{x} \pm s, n = 4$)

不同分组	ULK1	LC3	Beclin-1
对照组	0.741 \pm 0.041	1.123 \pm 0.121	0.660 \pm 0.127
IGR 模型组	0.905 \pm 0.113 [△]	1.334 \pm 0.100 [△]	1.023 \pm 0.142 [△]

注: [△]与对照组相比, $P < 0.05$ 。

4. 讨论

IGR 是糖尿病发生早期出现的糖代谢紊乱, 是糖尿病发生发展过程中重要的病理生理状态。但针对 IGR 发生过程中, 是否导致胰岛素抵抗的发生、胰岛 β -细胞功能的受损, 是否引起信号通路的改变尚未明确, 本实验通过高脂饲料喂养及腹腔注射小剂量 STZ 的方法成功建立 IGR 模型, 并通过检测血清中空腹胰岛素、空腹葡萄糖、2 h 后血糖及胰腺组织中 p-AMPK、p-mTOR、ULK1、LC3、Beclin-1 表达水平的变化, 证明在 IGR 可以导致胰岛素抵抗及胰岛 β -细胞功能受损, 且在这一过程中 AMPK-mTOR 信号通路相关蛋白表达水平明显升高。

AMPK-mTOR 是与细胞自噬密切相关的信号通路, 可诱导细胞自噬的发生[7]。自噬是一种细胞膜上的部分胞质和细胞需要降解的细胞器、蛋白质等组成自噬体的过程。细胞自噬可以维持细胞的稳定状态并实时更新细胞器。近年来有研究者表明, 肥胖型 2 型糖尿病的发生与自噬功能的变化密切相关, 这是因为细胞自噬功能对胰岛 β -细胞功能及胰岛素抵抗的进展产生了影响[8]。胰岛 β -细胞缺乏自噬功能可导致细胞增殖能力下降、死亡增加、体积减少、胰岛素含量下降和葡萄糖刺激胰岛素分泌减少, 导致糖调节受损、糖尿病。因此适当增加自噬可以有效地缓解胰岛素抵抗。缺乏 AMPK 会增加 ULK1 信号传导及 LC3 的脂化[9]。Beclin-1 作为一种自噬相关蛋白, 是酵母自噬相关基因在哺乳动物中的同源物[10]。它是自噬的正调控因子, 主要调节其他自噬相关蛋白在自噬体膜上的聚集, 从而控制自噬体的形成和自噬活性[11]。从本实验的结果中可以推断, IGR 发生后, 大鼠空腹系统、空腹胰岛素水平均明显升高, 胰岛素抵抗明显, 同时胰腺组织中的 p-AMPK、p-mTOR、ULK1、LC3、Beclin-1 表达水平均显著升高, 提示 IGR 的发生发展, 与 AMPK-mTOR 信号通路诱导的细胞自噬密切相关, 虽 IGR 分子机制尚未明确, 但这一发现, 为临床上早期预防及治疗 2 型糖尿病制定新的策略, 提供科学依据。

基金项目

省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室开放课题(SKL-HIDCA2021-DX4)。

参考文献

- [1] Song, X., Qiu, M., Zhang, X., *et al.* (2016) Gender-Related Affecting Factors of Prediabetes on Its 10-Year Outcome. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, **4**, e000169. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2015-000169>
- [2] Huang, Y., Cai, X., Mai, W., *et al.* (2016) Association between Prediabetes and Risk of Cardiovascular Disease and All Cause Mortality: Systematic Review and Meta-Analysis. *The BMJ*, **355**, i5953. <https://doi.org/10.1136/bmj.i5953>
- [3] Bansal, N. (2015) Prediabetes Diagnosis and Treatment: A Review. *World Journal of Diabetes*, **6**, 296-303. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i2.296>
- [4] Guo, M., Wang, Z., Wang, S., *et al.* (2023) Investigation of Risk Factors Associated with Impaired Glucose Regulation: Using the Momentum Equation to Assess the Impact of Risk Factors on Community Residents. *Frontiers in Endocrinology*, **14**, Article 1145847. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1145847>
- [5] 柴鑫, 王雅晨, 王金平, 等. 糖尿病预防研究的创举: 大庆糖尿病预防研究 36 年回顾[J]. 科学通报, 2023, 68(Z2): 3834-3845.
- [6] Vidrio-Huerta, B., Plötz, T. and Lortz, S. (2024) Oxidative and ER Stress by Elevated Insulin Biosynthesis and Palmitic Acid in Insulin-Producing Cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, **72**, Article ID: e230087. <https://doi.org/10.1530/JME-23-0087>
- [7] Barlow, A.D. and Thomas, D.C. (2015) Autophagy in Diabetes: B-Cell Dysfunction, Insulin Resistance, and Complications. *DNA and Cell Biology*, **34**, 252-260. <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2755>
- [8] Riahi, Y., Wikstrom, J.D., Bachar-Wikstrom, E., *et al.* (2016) Autophagy Is a Major Regulator of Beta Cell Insulin Homeostasis. *Diabetologia*, **59**, 1480-1491. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3868-9>
- [9] Kazyken, D., Dame, S.G., Wang, C., *et al.* (2023) Unexpected Roles for AMPK in Suppression of Autophagy and Reactivation of Mtorc1 Signaling during Prolonged Amino Acid Deprivation. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.12.20.572593>

- [10] Broggi, G., Ieni, A., Russo, D., *et al.* (2020) The Macro-Autophagy-Related Protein Beclin-1 Immunohistochemical Expression Correlates with Tumor Cell Type and Clinical Behavior of Uveal Melanoma. *Frontiers in Oncology*, **10**, Article 589849. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.589849>
- [11] Rodriguez, M., Kaushik, A., Lapierre, J., *et al.* (2017) Electro-Magnetic Nano-Particle Bound Beclin1 siRNA Crosses the Blood-Brain Barrier to Attenuate the Inflammatory Effects of HIV-1 Infection *in Vitro*. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, **12**, 120-132. <https://doi.org/10.1007/s11481-016-9688-3>