

# 吡格列酮对 db/db 小鼠骨骼肌蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 表达的影响

卢斌 顾萍 邵加庆 杜宏 王坚

(南京军区南京总医院内分泌科, 南京 210002)

**【摘要】** 目的 探讨吡格列酮对 db/db 小鼠骨骼肌蛋白酪氨酸磷酸酶 1B( protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B) 表达水平的影响。方法 将 20 只 4 周龄 db/db 小鼠随机分为两组(吡格列酮组和 db/db 对照组), 每组 10 只, 分别给予吡格列酮 10mg/kg·d 和安慰剂灌胃。另设 10 只同周龄 db/m 小鼠, 给予安慰剂灌胃作为非糖尿病对照(db/m 对照组)。每周监测体重、血糖, 4 周后用蛋白印迹法检测各组小鼠骨骼肌组织中 PTP1B 蛋白含量。结果 db/db 组小鼠骨骼肌 PTP1B 表达显著高于 db/m 组, 给予吡格列酮干预, 血糖、胰岛素抵抗指数显著低于 db/db 组( $P < 0.05$ ), 骨骼肌 PTP1B 表达水平亦显著降低( $P < 0.05$ )。结论 吡格列酮改善胰岛素抵抗, 可能与降低骨骼肌 PTP1B 蛋白表达有关。

**【关键词】** 胰岛素抵抗; 骨骼肌; PTP1B; 吡格列酮

**【中图分类号】** R335 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)01-0048-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.001.002

## The Effects of Pioglitazone on Expression of Protein Tyrosine Phosphatase 1B in Muscle of db/db Mice

LU Bin, GU Ping, SHAO Jia-qing, DU Hong, WANG Jian

(Department of Endocrinology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China)

**【Abstract】** Objective To explore the effects of pioglitazone on expression of protein tyrosine phosphatase 1B in muscle of db/db mice. Methods Twenty db/db mice aged 4 weeks were randomized to pioglitazone group (PIO group) and db/db group, fed with 10mg/kg·d pioglitazone and placebo respectively. Ten age-matched db/misty mice were concurrently treated with placebo as non-diabetic control group (db/m group). Body weight and blood glucose were measured every week. After 4 weeks' treatment, the expression of PTP1B in muscle of mice were determined with Western blotting. Results The expression of PTP1B in muscle of db/db mice significantly increased compared with db/m ( $P < 0.05$ ). Pioglitazone treatment significantly decreased fasting blood glucose and HOMA-IR. The expression of PTP1B in muscle of pioglitazone-treated mice obviously decreased compared with db/db group ( $P < 0.05$ ). Conclusion Pioglitazone treatment could improve insulin resistance possibly by reducing the expression level of PTP1B in the muscle.

**【Key words】** Insulin resistance; Muscle; PTP1B; Pioglitazone

骨骼肌胰岛素抵抗是肥胖和 2 型糖尿病发生的重要机制。研究发现蛋白酪氨酸磷酸酶 1B( protein

[基金项目] 国家自然科学基金 81100568。

[作者简介] 卢斌(1977-) 男, 博士, 研究方向: 胰岛素抵抗。

[通讯作者] 王坚, Email: jianwang\_11@yahoo.com。

tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) 负性调节胰岛素信号转导,其表达增加及活性增强可以导致胰岛素抵抗的发生。吡格列酮作为胰岛素增敏剂改善胰岛素抵抗,但其作用机制尚未明确。本研究通过吡格列酮干预来观察其对 db/db 小鼠骨骼肌 PTP1B 表达的影响,探讨吡格列酮改善胰岛素敏感性的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组:

C57BL/KsJ db/db 小鼠购自美国 Jackson 实验动物中心,并在本院实验动物中心繁育成功(SCXK [军]20072012)。实验期间小鼠在层流柜中饲养,所有器具及食物均消毒,无菌操作。小鼠自由进食、进水,保持垫料干燥,温度保持在 23℃,12 h/12 h 亮暗周期。按随机数字表将小鼠分为吡格列酮组 10 只和 db/db 对照组 10 只,每日固定时间分别给予吡格列酮(艾汀,北京太洋药业有限公司生产) 10 mg/kg 体重和相同体积的安慰剂(5%阿拉伯胶)灌胃,连续给药 4 周,另选取 10 只同周龄同窝出生的 C57BL/KsJ db/m 小鼠给予安慰剂灌胃作为非糖尿病对照组(db/m 组)。实验结束,所有动物麻醉处死取骨骼肌,冻存于 -70℃。

1.2 观察指标

1.2.1 生理生化指标 每周监测小鼠体重和空腹血糖,投药前和投药 4 周后测定空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)。血糖测定使用强生公司生产的 One-Touch 血糖仪。血清胰岛素水平的测定采用小鼠胰岛素 ELISA 试剂盒(Morinaga, Yokohama,

Japan)。胰岛素敏感性用 HOMA 胰岛素抵抗指数(HOMA-IR, HOMA-IR = FPG × FINS/22.5)来评价。

1.2.2 PTP1B 蛋白表达的测定 提取骨骼肌蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白浓度,取 50 ug 蛋白经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,电转移法将蛋白转移至硝酸纤维素膜,封闭后加入羊抗鼠 PTP1B 多克隆抗体(Santa Cruz 公司)过夜孵育,洗膜后加入生物素标记的兔抗羊 IgG 抗体(Santa Cruz 公司)孵育 2 h,洗膜后用 ECL 增强显色。同时用同样方法对上述样品用抗鼠的 β-actin 单克隆抗体免疫杂交与显色作为内参对照。用 BioRad Flour-S 成像仪将胶片进行扫描,用凝胶图象处理系统进行半定量分析。

1.3 统计学分析

定量检测结果以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,使用 SPSS11.0 软件进行统计分析。多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生理生化指标

4 周龄 db/db 小鼠进入试验时已表现为肥胖,血糖升高,高胰岛素水平,与 db/m 组相比,差异有统计学意义(P < 0.05),而吡格列酮组与 db/db 对照组小鼠上述指标间差异无统计学意义(P > 0.05)。吡格列酮组小鼠在给予药物干预 4 周后 FBG、FINS 水平及 HOMA-IR 均显著低于 db/db 对照组,差异有统计学意义(P < 0.05),见表 1。

表 1 3 组小鼠的体重及生理、代谢指标比较  
Tab. 1 The comparison of weight, physiological and metabolic parameters

组别 Group	体重 Body weight(g)		FBG (mmol/L)		FINS (μg/L)		HOMA-IR	
	4 周 4 week	8 周 8 week	4 周 4 week	8 周 8 week	4 周 4 week	8 周 8 week	4 周 4 week	8 周 8 week
db/m 组 db/m group	17.9 ± 0.2	25.2 ± 0.3	5.7 ± 1.0	6.2 ± 0.8	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	3.3 ± 1.2	5.1 ± 1.0
db/db 对照组 db/db group	21.3 ± 0.8*	36.8 ± 0.4*	11.8 ± 1.9*	17.6 ± 1.4*	4.6 ± 1.0*	7.3 ± 1.0*	64.9 ± 16.2*	127.2 ± 26.9*
吡格列酮组 PIO group	21.8 ± 0.9*	35.6 ± 0.3*	11.7 ± 1.4*	7.6 ± 1.1 <sup>▲</sup>	4.7 ± 1.2*	5.2 ± 1.1* <sup>▲</sup>	50.9 ± 23.3*	38.8 ± 9.2* <sup>▲</sup>

注:与 db/m 组比较,\* : P < 0.05; 与 db/db 组比较,<sup>▲</sup>: P < 0.05; FBG = 空腹血糖, FINS = 空腹胰岛素, HOMA-IR = 胰岛素抵抗指数  
Note: Compare with Group db/m, \* : P < 0.05; Compare with Group db/db, <sup>▲</sup>: P < 0.05; FBG = fasting blood glucose, FINS = fasting insulin, HOMA-IR = FPG × FINS/22.5

2.2 Western blot 检测 PTP1B 蛋白表达

应用 WB 检测各组小鼠骨骼肌 PTP1B 蛋白的表达,结果显示,db/db 组小鼠骨骼肌 PTP1B 表达显著高于 db/m 组(P < 0.05),给予吡格列酮干预 4 周后,吡格列酮组 db/db 小鼠骨骼肌 PTP1B 表达水平较 db/db 对照组显著降低(P < 0.05)(图 1)。

3 讨论

db/db 小鼠是一种先天肥胖性 2 型糖尿病小鼠模型,由于瘦素受体基因发生突变所致。一般于出生后 3 ~ 4 周即可表现为肥胖,血糖升高,胰岛素抵抗等特性,是研究 2 型糖尿病的理想模型。本研究中 4 周龄 db/db 小鼠表现为高血糖、体重增加,胰岛

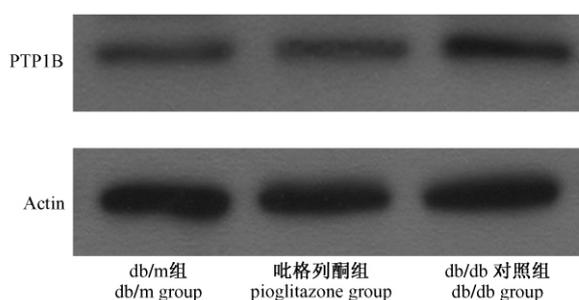


图 1 图 1 各组小鼠骨骼肌 PTP1B 蛋白表达量

Fig. 1 PTP1B protein expression in muscle of each group

素抵抗指数增加,与对照组相比有显著性差异。

肥胖、胰岛素抵抗的机制目前尚未完全阐明。研究发现胰岛素信号转导受到正负调节蛋白的协同作用,而在众多负调节因子中 PTP1B 作用突出。PTP1B 是蛋白酪氨酸磷酸酶家族中的一员,在人体多种组织细胞中普遍存在,主要位于胞浆内质网表面,它通过使激活的胰岛素受体及胰岛素受体底物等去磷酸化失活而发挥生理功能<sup>[1]</sup>。研究发现 PTP1B 的表达水平在糖尿病或发生胰岛素抵抗时明显升高。在啮齿类糖尿病动物的骨骼肌和脂肪细胞中,PTP1B 的表达和活性均显著升高<sup>[2]</sup>。PTP1B 基因敲除小鼠,与野生型小鼠相比,其胰岛素敏感性增强,肝脏及肌肉组织中的胰岛素受体磷酸化水平升高,该小鼠即使在致肥胖饮食条件下也不出现肥胖或胰岛素抵抗<sup>[3]</sup>。这些研究提示 PTP1B 是胰岛素信号转导的负性调节者,PTP1B 也就成为胰岛素抵抗机制研究的重要位点<sup>[4]</sup>。

吡格列酮属于噻唑烷二酮类药物(thiazolidinediones, TZDs),作为胰岛素增敏剂,能有效降低 2 型糖尿病患者血糖和血浆胰岛素水平,提示该药不刺激胰岛素的分泌,而是通过增强机体对胰岛素的敏感性达到降低血糖的效果。目前认为其主要作用机制是通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ),调节某些参与葡萄糖和脂肪酸代谢的胰岛素反应性基因的转录<sup>[5]</sup>。吡格列酮如何改善骨骼肌胰岛素敏感性具体机制目前还不确切,本研究对此进行初步探讨。PPAR $\gamma$  在骨骼肌表达量很低,只有脂肪组织表达量的 10%<sup>[6]</sup>,因此以往认为脂肪组织是吡格列酮的主要作用位点,而骨骼肌胰岛素作用改善是由于下调脂质水平及减少葡萄糖脂肪循环引起的。然而骨骼肌胰岛素敏感性改善非常明显,而且 TZD 类药物可以在成熟的骨骼肌

细胞 L6 增加葡萄糖转运<sup>[7]</sup>。TZD 类药物是否通过 PPAR 非依赖途径增加肌肉胰岛素敏感性?

本研究用 db/db 糖尿病小鼠模型,观察吡格列酮对其骨骼肌中 PTP1B 表达的影响,探讨吡格列酮改善骨骼肌胰岛素抵抗的分子机制。由于 PTP1B 是一种胞内蛋白,目前还没有定量检测的方法,所以我们采用 Western blot 进行半定量蛋白检测。实验证实,在胰岛素抵抗状态下,db/db 小鼠骨骼肌 PTP1B 蛋白表达明显增加。经吡格列酮处理 4 周后,db/db 小鼠血糖下降,胰岛素抵抗明显改善,同时伴随着骨骼肌 PTP1B 水平的下降。这提示 PTP1B 可能与吡格列酮改善骨骼肌胰岛素敏感性有关。因此吡格列酮可能是通过减少 PTP1B 表达从而增加骨骼肌胰岛素敏感性。但仍需大量进一步体外研究来证实该作用。下一步通过体外试验研究吡格列酮对骨骼肌细胞 PTP1B 表达的影响及应用 PTP1B 激动剂或抑制剂进行干预,这有助于研究 PTP1B 在胰岛素抵抗中的作用及吡格列酮作用机制。

#### 参考文献:

- [1] Goldstein BJ, Bittner Kowalczyk A, White MF, et al. Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(6): 4283-4289.
- [2] Hirata AE, Alvarez-Rojas F, Carvalheira JB, et al. Modulation of IR/PTP-1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats[J]. *Life Sci*, 2003, 73(11): 1369-1381.
- [3] Klamann LD, Boss O, Peroni OD, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(15): 5479-5489.
- [4] Ramachandran C, Kennedy BP. Protein tyrosine phosphatase 1B: a novel target for type 2 diabetes and obesity[J]. *Curr Top Med Chem*, 2003, 3(7): 749-757.
- [5] Kahn CR, Chen L, Cohen SE. Unraveling the mechanism of action of thiazolidinediones[J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(11): 1305-1307.
- [6] Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR $\gamma$  gene[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(30): 18779-18789.
- [7] Brunmaier B, Gras F, Neschen S, et al. Direct thiazolidinedione action on isolated rat skeletal muscle fuel handling is independent of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -mediated changes in gene expression[J]. *Diabetes*, 2001, 50(10): 2309-2315.

(修回日期)2011-10-27