

同型半胱氨酸对小鼠骨骼肌组织 PDK1 的影响

顾玉¹⁾, 王昕²⁾, 郭家智³⁾, 王雅楠¹⁾, 王芳¹⁾, 李树德^{2,4)}

(1) 昆明医学院病理学教研室, 云南昆明 650500; 2) 昆明医学院生物化学教研室, 云南昆明 650500; 3) 昆明医学院解剖学教研室, 云南昆明 650500; 4) 昆明医学院生物医学工程中心, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 研究高同型半胱氨酸血症中骨骼肌组织 PDK1 的变化, 探讨同型半胱氨酸对葡萄糖摄取的影响。 **方法** 20 只 6 周健康小鼠随机分为对照组 (10 只) 和高同型半胱氨酸血症组 (10 只)。3 个月饮水中加入蛋氨酸 (1.5%) 复制高同型半胱氨酸血症模型, 测定进食状态下血糖浓度。免疫组化检测骨骼肌细胞 PDK1、PDK1 磷酸化和 Akt 磷酸化的改变。Western Blot 检测骨骼肌细胞 PDK1 与 PDK1 磷酸化和 Akt 与 Akt 磷酸化的表达。 **结果** 与对照组比较, 高同型半胱氨酸血症组进食血糖浓度增加 ($P < 0.05$), 高同型半胱氨酸血症组骨骼肌细胞中 PDK1、p-PDK1 (Ser-241) 和 p-Akt (Thr-308) 平均灰度值增加 ($P < 0.05$); 高同型半胱氨酸血症组骨骼肌组织 PDK1、p-PDK1 (Ser-241) 和 p-Akt (Thr-308) 蛋白质水平下调 ($P < 0.05$), Akt 的表达无差异 ($P > 0.05$)。 **结论** 同型半胱氨酸可能通过降低骨骼肌组织 PDK1 的表达和 PDK1 磷酸化, 抑制对葡萄糖的摄取。

[关键词] 高同型半胱氨酸血症; 骨骼肌组织; PDK1; 苏氨酸激酶

[中图分类号] R337.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 02 - 0040 - 05

Effect of Homocysteine on PDK1 in Skeletal Muscle Tissue of Mice

GU Yu¹⁾, WANG Xin²⁾, GUO Jia-zhi³⁾, WANG Ya-nan¹⁾, WANG Fang¹⁾, LI Shu-de^{2,4)}

(1) Dept. of Pathology; 2) Dept. of Biochemistry; 3) Dept. of Anatomy; 4) Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in skeletal muscle tissue of hyperhomocysteinemia animal model, to explore the effect of homocysteine on glucose uptake. **Methods** Twenty healthy mice, six weeks of age, were randomly divided into control group ($n = 10$) and high hyperhomocysteinemia group ($n = 10$). Normal food was fed in control group; Normal food and 1.5% (mass fraction) methionine were fed in hyperhomocysteinemia group. After the feed in the hyperhomocysteinemia group and the control group were fed for three months, the levels of blood glucose were determined in the feeding. The variations of PDK1, phosphorylation of PDK1 and phosphorylation of Akt were observed with Immunohistochemistry in skeletal muscle cells. The expressions of PDK1, phosphorylation of PDK1, Akt and phosphorylation of Akt were determined with Western Blot in skeletal muscle tissue. **Results** The feeding plasma glucose in the hyperhomocysteinemia group were higher than that in the control group ($P < 0.05$). The gray values of PDK1, p-PDK1 (Ser-241) and p-Akt (Thr-308) were increased in the hyperhomocysteinemia group with Immunohistochemistry compared with the control group ($P < 0.05$). The levels of PDK1, p-PDK1 (Ser-241) and p-Akt (Thr-308) were the lower in the homocysteinemia group with Western Blot ($P < 0.05$). However, the

[基金项目] 云南省科技厅 - 昆明医学院联合专项基金资助项目 (2009CD213, 2010CD223); 云南省应用基础研究面上项目 (2010CD075, 2007Co70M); 云南省教育厅基金资助项目 (2010C148)

[作者简介] 顾玉 (1986~), 女, 河北承德市人, 在读硕士研究生, 主要从事代谢性疾病研究工作。

[通讯作者] 李树德. E-mail:shudeli006@vip.sina.com; 王芳. E-mail:wangfang_01@126.com

expression of Akt protein was not difference between the homocysteinemia group and the control group ($P > 0.05$).

Conclusion Homocysteine may decrease the expression of PDK1 and phosphorylation of PDK1 in skeletal muscle tissue, thus inhibits glucose uptake.

[Key words] Hyperhomocysteinemia; Skeletal muscle tissue; 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; Akt

骨骼肌、肝脏和脂肪组织是维持体内葡萄糖代谢平衡主要组织器官, PI3-K/Akt 信号通路是摄取葡萄糖的主要途径^[1-3]. 在该信号通路中, 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1) 是丝氨酸-苏氨酸激酶 (serine/threonine kinase, Akt/PKB) 的上游激酶, 可通过与 3, 4, 5-三磷酸磷脂酰肌醇激活相邻的 Akt 分子, 启动 PI3-K/Akt 信号通路, 促进对葡萄糖的摄取和利用^[4]. 同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 被认为是动脉粥样硬化的危险因素之一, 与多种疾病的发生密切相关. 在果糖诱导的胰岛素抵抗模型中, Hcy 的含量明显增加, 牛磺酸可以改善胰岛素抵抗, 但不能降低 Hcy 的浓度, 可能与牛磺酸的浓度和作用时间有关^[5]. 在肝脏细胞, Hcy 可通过蛋白激酶 (protein kinase A, PKA) 通路刺激 (phosphoenolpyruvate carboxy-kinase, PEPCK) 的表达, 增加糖异生作用, 使葡萄糖的输出增多^[6]. 在脂肪组织细胞, Hcy 抑制脂肪组织的生成, 可能影响对葡萄糖的摄取和利用^[7]. 但在骨骼肌细胞中, Hcy 是否通过改变 PDK1 的表达和磷酸化, 影响 PI3-K/Akt 信号通路对葡萄糖摄取不清楚. 本研究目的是在建立高同型半胱氨酸血症 (herpyhomocysteinemia, HHcy) 的动物模型基础上, 研究骨骼肌细胞中 PDK1 的表达和磷酸化, 探讨 PI3-K/Akt 信号通路对葡萄糖摄取的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

蛋氨酸购自美国 Sigma 公司, 血糖测定试剂盒和胰岛素测定试剂盒购自南京建成生物公司, 兔多隆抗体 PDK1 和 p-PDK1 (Ser-241) 购自北京博奥森生物有限公司, 兔多隆抗体 Akt、p-Akt (Thr-308) 和 ECL 化学发光试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司.

1.2 HHcy 动物模型建立

20 只小鼠随机分为 HHcy 组和对照组, 各组 10 只. HHcy 在饮用水中加入蛋氨酸 (浓度为

1.5%), 对照组正常饮食, 3 个月后, 取血测定 Hcy 的浓度, HHcy 组的浓度为 (51.68 ± 1.80) $\mu\text{mol/L}$ ($>15 \mu\text{mol/L}$), 模型建立成功.

1.3 血糖的测定

进食状态下, 2 组分别从眼眶取抗凝血, 4 000 r/min, 离心 5 min, 取血浆. 根据葡萄糖氧化酶法测定试剂盒的使用说明书, 分别用血浆测定血糖浓度.

1.4 免疫组织化学检测 PDK1、p-PDK1 (Ser-241)、Akt 和 p-Akt (Thr-308) 的表达

动物处死后, 取部分骨骼肌组织放入 10% 的甲醛固定液, 部分 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用. 固定液中的组织石蜡包埋, 进行石蜡切片脱蜡水化, 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶, 微波热处理修复抗原, 正常小牛血清封闭非特异性抗原, 分别加入兔抗小鼠 PDK1、p-PDK1 (Ser-241) 和 p-Akt (Thr-308) (1:100), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜后加入生物素化二抗, 室温下孵育 30 min, 滴加 DAB 显色液, 苏木素复染, 常规脱水透明封片. 用 PBS 代替一抗, 做阴性对照, 棕褐色为阳性着色, 应用病理图像分析软件进行平均灰度值扫描, 每个切片随机选取 10 个视野.

1.5 Western Blot 检测 PDK1、p-PDK1 (Ser-241)、Akt 和 p-Akt (Thr-308) 的蛋白表达

取骨骼肌组织用组织细胞裂解液制作匀浆, BCA 法测定蛋白质含量, 取各样本 $100 \mu\text{g}$ 进行 SDS-PAGE 电泳, 半干转移法将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 的脱脂牛奶封闭后分别加入兔多隆抗体 PDK1、p-PDK1 (Ser-241)、Akt 和 p-Akt (Thr-308) 一抗过夜孵育, 洗膜后加入 HRP 标记的二抗孵育, 洗涤后与 ECL 反应, 曝光洗片, 描图片后用 Quantity one 4.4.0 计算各条带的荧光强度值及其与 β -actin 的比值. 每组实验至少重复 3 次.

1.6 统计学处理

采用 SPSS 软件分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用配对 t 检验, $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 同型半胱氨酸增加血糖浓度

通过氧化酶法测定进食状态下血糖浓度, 在 HHcy 组中, 血糖浓度明显增加, 比正常组上升 1.30 倍 (见图 1)。结果提示, Hcy 可能通过抑制胰岛素信号通路, 使骨骼肌对葡萄糖的摄取能力较低, 外周血糖浓度增加。

2.2 Hcy 诱导骨骼肌细胞的 PDK1、p-PDK1 (Ser-241) 和 p-Akt (Thr-308) 的表达增加

HHcy 组与对照组比较, PDK1 p-PDK1 (Ser-241) 和 p-Akt (Thr-308) 阳性细胞减少, 平均灰度值增加 (见图 2~4、表 1)。结果提示, Hcy 影响骨骼肌细胞 PDK1 的表达和磷酸化, 降低 Akt 磷酸化, 使骨骼肌细胞摄取葡萄糖的降低。

2.3 PDK1、p-PDK1 (Ser-241)、Akt 和 Akt 磷酸化表达水平

Western Blot 显示, 与对照组比较, 在 HHcy

组 PDK1、p-PDK1 (Ser-241) 和 p-Akt (Ser-308) 蛋白质的表达明显下调 ($P < 0.05$), 但两组间的 Akt 表达无明显差异 ($P > 0.05$)。结果提示, Hcy 可能通过抑制 PDK1 的表达和磷酸化, 下调 Akt308 位点丝氨酸的磷酸化, 影响 Akt 的激活, 抑制 PI3-K/Akt 信号通路使骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取减少 (见图 5)。

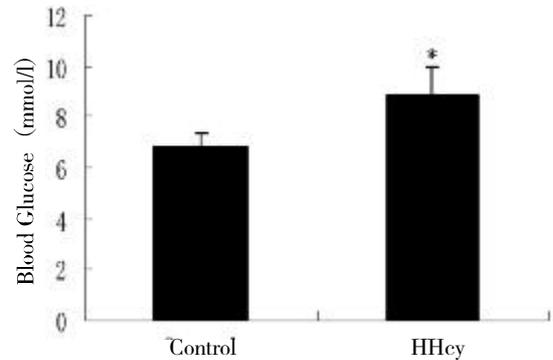
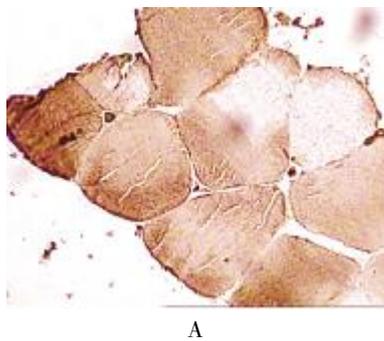


图 1 两组小鼠血糖浓度比较

Fig. 1 Comparison of blood sugar concentration of mice between two groups

与正常组比较, * $P < 0.05$.



A



B

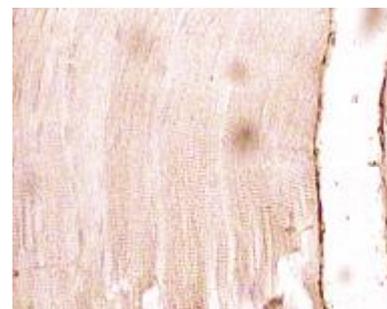
图 2 小鼠骨骼肌横断面 PDK1 的表达 (SP × 200)

Fig. 2 Expression of PDK1 in cross-section of skeletal muscle tissue of mice (SP × 200)

A: 对照组; B: HHcy 组.



A



B

图 3 小鼠骨骼肌纵断面 p-PDK1 (Ser-241) 的表达 (SP × 200)

Fig. 3 Expression of p-PDK1 (Ser-241) in vertical section of skeletal muscle tissue of mice (SP × 200)

A: 对照组; B: HHcy 组.



图 4 小鼠骨骼肌横断面 p-Akt (Thr-308) 的表达 (SP × 200)

Fig. 4 Expression of p-Akt (Thr-308) in cross-section of skeletal muscle tissue of mice

A:对照组; B: HHcy 组.

表 1 HHcy 组与对照组 PDK1、p-PDK1 (Ser-241) 和 p-Akt (Thr-308) 平均灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of PDK1, p-PDK1 (Ser-241) and p-Akt (Thr-308) expression between HHcy group and control group ($\bar{x} \pm s$)

| 分 组 | PDK1 | p-PDK1 (Ser-241) | p-Akt (Thr-308) |
|--------|-----------------|------------------|-----------------|
| 对照组 | 66.59 ± 15.28 | 48.90 ± 16.75 | 57.34 ± 13.46 |
| HHcy 组 | 172.70 ± 20.83* | 176.60 ± 20.58* | 172.70 ± 20.83* |

与对照组比较, *P < 0.05.

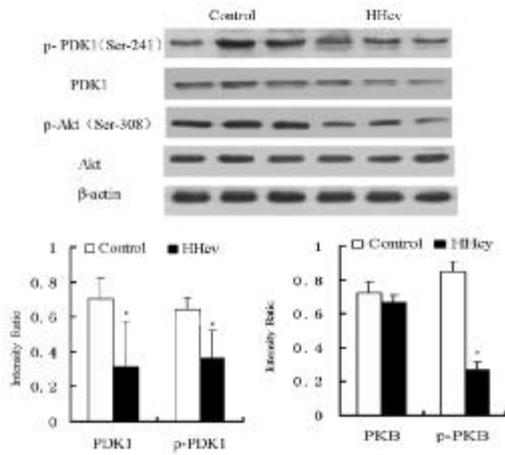


图 5 PDK1、p-PDK1 (Ser-241)Akt 和 p-Akt (Ser-308) 在骨骼肌的表达水平

Fig. 5 Expression of PDK1, p-PDK1 (Ser-241) Akt and p-Akt (Ser-308) in skeletal muscle tissue of mice

与对照组比较, *P < 0.05.

3 讨论

在 PI3-K/Akt 信号通路中, 胰岛素通过与骨骼肌细胞膜上的胰岛素受体结合, 使由一个调节亚基

(P85) 和一个催化亚基组成的 PI3-K 的 P85 激活, 激活的 P85 使 P110 聚合到细胞膜附近, 使膜内侧的磷酸肌醇二磷酸 (PI2P) 生成磷脂酰肌醇三磷酸 (PI3P), PI3P 招募 PDK1 和 Akt 到达细胞膜附近, PDK1 的丝氨酸 241 位点被磷酸化激活后, 促使 Akt308 位点的苏氨酸被磷酸化^[8], 同时当 Akt473 位点的丝氨酸磷酸化被 mTORC2 激活, 就能使 GLUT4 转移到细胞膜上促进对葡萄糖的摄取和利用, 降低血糖浓度^[9]. 所以, Akt308 位点的苏氨酸是否被磷酸化, 关系到 Akt 活性, 而 PDK1 的表达和 PDK1 的丝氨酸 241 位点的磷酸化是关键因素.

Hcy 是蛋氨酸代谢的中间产物, 正常情况下体内的含量较低, 在血液中一般小于 15 μmol/L, 血液中同型半胱氨酸增加称为 HHcy, 大量的国内外文献已经证实, HHcy 是心脑血管及外周血管病变的主要诱因^[10,11]. 研究报道, HHcy 也是 2 型糖尿病发生的危险因素之一^[12,13]. 在脂肪组织, 高同型半胱氨酸可以通过上调抵抗素, 抑制 PI3-K/Akt 信号通路, 影响脂肪细胞对葡萄糖的摄取, 诱导胰岛素抵抗, 使血糖浓度增加^[14]. 在肝脏组织, 高 Hcy 可以诱导 TRB3 表达, 抑制 Akt 磷酸化, 使糖原的合成减少; 增加磷酸烯醇式丙酮酸羧酶的活性, 使糖异生作用增强, 输出增多, 导致外周血糖增加^[15]. 但在 HHcy 中, 骨骼肌细胞的 PDK1 的表达和 PDK1 的磷酸化是否影响 PI3-K/Akt 信号通路, 减弱了骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取仍然不清楚. 本研究在建立 HHcy 的动物模型的基础上, 发现 HHcy 组进食后的血糖明显增加, PDK1 的表达、PDK1 的磷酸化和 Akt308 位点的苏氨酸磷酸化在 HHcy 组降低, 抑制 PI3-K/Akt 信号通路, 减弱了骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取, 可能与外周血糖浓度增加有关. 上述结果表明, Hcy 可能通过调节 PDK1 的表达和 PDK1 的磷酸化程度对血糖浓度进

行的调节.

[参考文献]

- [1] SINGH M K, KRISAN A D, CRAIN A M, et al. High-fat diet and leptin treatment alter skeletal muscle insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity and glucose transport[J]. *Metabolism*, 2003, 52(9):1 196 - 1 205.
- [2] ALFREDO CSIBI, DAVID COMMUNI, NATHALIE MUL-
LER, et al. Angiotensin II inhibits insulin-stimulated GLUT4 translocation and Akt activation through tyrosine nitration-dependent mechanisms [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5 (4):10 070.
- [3] SHINOZAKI S, CHOI C S, SHIMIZU N, et al. Liver-specific inducible nitric-oxide synthase expression is sufficient to cause hepatic insulin resistance and mild hyperglycemia in mice [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (40):34 959 - 34 975.
- [4] CANTRELL D A. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114:1 439 - 1 445.
- [5] ELMESALLAMY H O, EL-DEMERDASH E, HAMDAN LN, et al. Effect of taurine supplementation on hyperhomocysteinemia and markers of oxidative stress in high fructose diet induced insulin resistance [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2010, 30(2):46.
- [6] YU X, HUANG Y, HU Q, et al. Hyperhomocysteinemia stimulates hepatic glucose output and PEPCK expression [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2009, 41 (12):1 027 - 1 032.
- [7] WANG Z, DOU X, YAO T, et al. Homocysteine inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Exp Biol Med*, 2011, 236(12):1 379 - 1 388.
- [8] PEARCE L R, KOMANDER D, ALESSI D R. The nuts and bolts of AGC protein kinases [J]. *NAT REV MOL CELL BIOL*, 2010, 11:9 - 22.
- [9] BAYASCAS J R. PDK1: the major transducer of PI 3-kinase actions[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010, 346:9 - 29.
- [10] ZOU T, LIU W J, LI S D, et al. TRB3 mediates homocysteine-induced inhibition of endothelial cell proliferation [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(11):2 782 - 2 789.
- [11] 杨红玲, 张敏, 甘萍, 等. 同型半胱氨酸诱导人脐静脉血管内皮细胞活性氧升高的机制研究[J]. *昆明医学院学报*, 2009, (6):19 - 22.
- [12] RUSSO G T, BENEDETTO A D, GIORDA C E, et al. Correlates of total homocysteine plasma concentration in type 2 diabetes [J]. *European Journal of Clinical Investigation*, 2004, 34, 197 - 204.
- [13] TAKAYUKI HOSOI, HAJIME ORIMO, HIDEKI ITO, et al. Association of plasma homocysteine with serum interleukin-6 and C-peptide levels in patients with type 2 diabetes [J]. *Metabolism Clinical and Experimental*, 2005, 54:809 - 814.
- [14] LI Y, JIANG C, XU G, et al. Homocysteine upregulates resistin production from adipocytes in vivo and in vitro [J]. *Diabetes*, 2008, 57(4):817 - 827.
- [15] LIU W J, MA L Q, LIU W H, et al. Inhibition of hepatic glycogen synthesis by hyperhomocysteinemia mediated by TRB3[J]. *Am J Pathol*, 2011, 178 (4):1 489 - 1 499.

(2012-01-14 收稿)