

高同型半胱氨酸血症骨骼肌 TRB3 表达与糖代谢的关系

凌大庆¹⁾, 郭家智²⁾, 李树德³⁾, 顾玉⁴⁾, 李若楠⁵⁾

(1) 镇沅县人民医院急诊科, 云南 普洱 666500; 2) 昆明医科大学解剖学与组织胚胎学系, 云南昆明 650500; 3) 昆明医科大学生物化学与分子生物学系, 云南昆明 650500; 4) 承德市中心医院病理科, 河北承德 067000; 5) 云南省第三人民医院内分泌科, 云南昆明 650011)

[摘要] **目的** 在高同型半胱氨酸血症动物模型中, 研究骨骼肌组织 TRB3 的表达, 探讨 TRB3 与糖代谢的关系. **方法** 20 只小鼠随机分为正常对照组和高同型半胱氨酸血症组, 每组 10 只. 含 1.5% 的蛋氨酸饮水 3 个月制造高同型半胱氨酸血症模型. 测定进食状态下血糖改变. HE 染色观察骨骼肌细胞结构, Western blot 检测 TRB3、Akt 和 p-Akt (Ser-473) 蛋白质的表达水平. **结果** 高同型半胱氨酸血症组进食状态下血糖与正常对照组比较增加 ($P < 0.05$); HE 染色骨骼肌细胞结构无明显异常; Western blot 结果显示, 高同型半胱氨酸血症组 TRB3 的表达增加 ($P < 0.05$), p-Akt (Ser-473) 的表达减少 ($P < 0.05$). **结论** 同型半胱氨酸可能通过诱导骨骼肌组织中 TRB3 的表达, 抑制 PI3-K/Akt 信号通路, 导致糖代谢紊乱.

[关键词] 高同型半胱氨酸血症; 骨骼肌组织; 糖代谢; TRB3

[中图分类号] R57.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 04 - 0032 - 03

The Relationship between Expression of TRB3 and Glycometabolism in Skeletal Muscle of Hyperhomocysteinemia

LING Da - qing¹⁾, GUO Jia - zhi²⁾, LI Shu - de³⁾, GU Yu⁴⁾, LI Ruo - nan⁵⁾

(1) Dept. of Emergency, The People's Hospital of Zhenyuan County, Puer Yunnan 666500; 2) Dept. of Anatomy & Histoembryology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 3) Dept. of Biochemistry & Molecular Biology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 4) Dept. of Pathology, The Central Hospital of Chengde, Chengde Hebei 067000; 5) Dept. of Endocrine, The Third People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650011, China)

[Abstract] **Objective** To study expression of tribbles 3 (TRB3) in the skeletal muscle tissue in hyperhomocysteinemia animal model, and explore the relationship between TRB3 and glycometabolism. **Methods** Twenty mice, six weeks of age and healthy, were randomly divided into the control group ($n = 10$) and the hyperhomocysteinemia group ($n = 10$). Normal food was fed in the control group; Normal food and 1.5% (mass fraction) methionine were fed in the hyperhomocysteinemia group. After mice in the hyperhomocysteinemia group and the control group were fed for three months, the levels of blood glucose were determined in the feeding. The structure of skeletal muscle cells was observed by HE staining. The levels of TRB3, Akt and p-Akt (Ser-473) were observed with Western blot. **Results** The feeding blood glucose levels in the hyperhomocysteinemia group were higher than in the control group ($P < 0.05$). The structure of skeletal muscle cells was not obvious anomaly by HE staining. The levels of TRB3 protein in the hyperhomocysteinemia group were increased compared with the control group ($P < 0.05$), however, the expressions of the p-Akt (Ser-473) protein were decreased in the hyperhomocysteinemia

[基金项目] NSFC - 云南联合基金资助项目 (U1132606); 云南省科技厅 - 昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2009CD213); 云南省应用基础研究面上金资助项目 (2010CD075, 2011CD223)

[作者简介] 凌大庆 (1969~), 男, 云南镇沅县人, 大学本科, 主治医师, 主要从事代谢性疾病的临床工作.

[通讯作者] 顾玉. E-mail: guyuailong@163.com; 李若楠. E-mail: liruonan728@163.com

group compared with the control group. The levels of Akt were not different in the hyperhomocysteinemia group compared with the control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Homocysteine may induce expression of TRB3 in skeletal muscle tissue, resulting in inhibiting PI3-K/Akt signal pathway and leading to disturbance of glycometabolism.

[**Key words**] Hyperhomocysteinemia; Skeletal muscle tissue; Glycometabolism; Tribbles 3

同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 是动脉粥样硬化的危险因素之一, 与心脑血管疾病的发生密切相关^[1,2], 同时也是糖尿病及其并发症发生和发展的重要原因^[3]. 糖代谢紊乱是 2 型糖尿病的特点. 在调节糖代谢中, 无论在空腹和进食状态下, 骨骼肌通过 PI3-K/Akt 信号通路摄取葡萄糖, 使血糖浓度降低是维持正常糖代谢的主要途径. 在 PI3-K/Akt 信号通路中, TRB3 (tribbles 3) 对 Akt 磷酸化抑制, 将导致 PI3-K/Akt 信号通路受阻, 影响葡萄糖的摄取. 目前, 在高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia, HHcy) 的骨骼肌细胞中, 进食状态下, TRB3 是否影响 Akt 磷酸化, 抑制 PI3-K/Akt 信号通路引起糖代谢紊乱的机制不清楚. 本研究建立高同型半胱氨酸动物模型, 探讨进食状态下, TRB3 的表达对糖代谢的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性 6 周龄昆明小鼠 20 只, 体重 18~22 g (由昆明医科大学实验动物部提供). 实验室适应性喂养 2 周用于实验.

1.1.2 主要试剂 蛋氨酸购自美国 Sigma 公司, 血糖测定试剂盒购自南京建成生物公司, 兔多隆抗体 TRB3、Akt、Akt 磷酸化和 ECL 化学发光试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司.

1.2 方法

1.2.1 模型建立 20 只小鼠随机分为 HHcy 组和正常对照组, 各组 10 只. HHcy 组在正常饲料喂养的基础上, 饮用水中加入 1.5% 蛋氨酸; 正常对照组正常饲料和饮用水喂养. 3 个月后, 2 组取血测定 Hcy 的浓度, HHcy 组的浓度为正常对照组的 4.16 倍, 模型建立成功.

1.2.2 进食状态血糖的检测 饲养 3 个月后, 在进食状态下, 2 组用 3.6% 的水合氯醛麻醉, 眼眶取抗凝血, 4 000 r/min, 离心 5 min, 取血浆利用葡萄糖氧化酶法测定血糖.

1.2.3 骨骼肌的 HE 染色 采血后, 处死小鼠, 取骨骼肌组织, 一部分 10% 的甲醛固定, 石蜡包埋; 一部分 -80 °C 保存备用. 石蜡包埋组织切片后常

规进行 HE 染色, 观察骨骼肌的结构.

1.2.4 TRB3、Akt 和 p-Akt (Ser-473) 的检测 利用组织裂解液提取蛋白质, BCA 法测定总蛋白的含量, 取各样本 80 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳, 电转移法将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 的脱脂牛奶封闭后分别加入羊抗鼠的 TRB3、Akt 和 p-Akt (Ser-473 1:1 000) 过夜孵育, 洗膜后加入 HRP 标记的兔抗羊二抗孵育后, 充分洗涤与 ECL 反应, 即刻以 Kodak 底片曝光洗片. 用 Quantity one 4.40 扫描各条带的灰度值, 计算 p-Akt (Ser-473) 与 Akt 和 TRB3 与 β -actin 的比值. 每组实验至少重复 3 次.

1.3 统计学处理

数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS17.0 软件 One-Way ANOVA 分析法进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 进食状态血糖的改变

HHcy 组与正常对照组比较, 血糖为 1.35 倍. 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 HHcy 在进食状态下可导致血糖浓度的增加, 扰乱机体葡萄糖的代谢 (图 1).

2.2 进食状态骨骼肌组织的 HE 染色

正常对照组肌纤维呈带状, 排列整齐, 在肌纤维的周边可见深蓝色的细胞核. HHcy 组肌纤维的间隙扩大, 但见明显的肌纤维萎缩和坏死现象. 结果提示在 HHcy 中, 未出现糖尿病骨骼肌的病理改变现象 (图 2).

2.3 TRB3、Akt、p-Akt (Ser-473) 的 Western blot 检测

与正常对照组比较, 进食状态下 HHcy 组 TRB3 蛋白质的表达增加 ($P < 0.05$), p-Akt (Ser-473) 蛋白质表达降低 ($P < 0.05$), Akt 的表达在 2 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$). 结果提示, 进食状态下, Hcy 可能增加 TRB3 的表达, 抑制 Akt 磷酸化程度, 阻断 PI3-K/Akt 信号通路, 使葡萄糖的摄取减少, 是扰乱糖代谢的因素之一 (图 3).

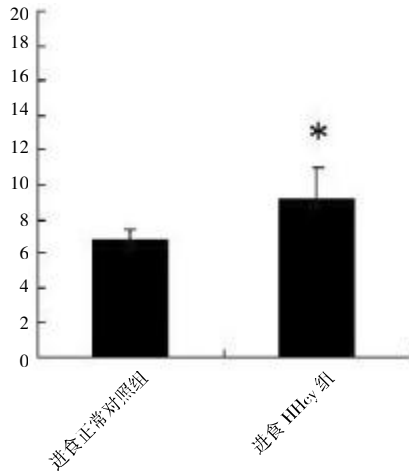


图 1 血糖浓度
Fig. 1 Concentration of the blood glucose
与正常对照组比较, * $P < 0.05$.

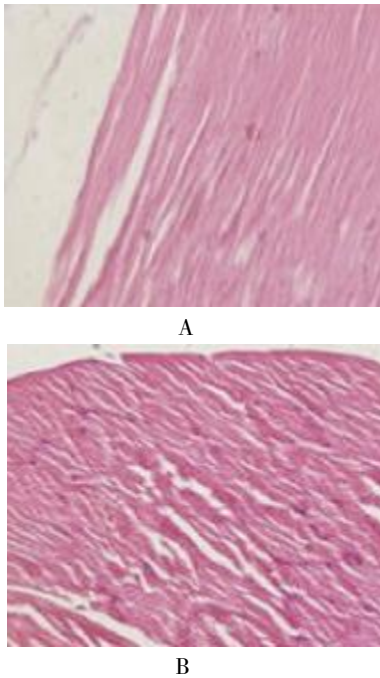


图 2 小鼠骨骼肌组织 (HE × 400)
Fig. 2 HE staining of skeletal muscle tissue of mice
A:正常对照组; B:HHcy 组.

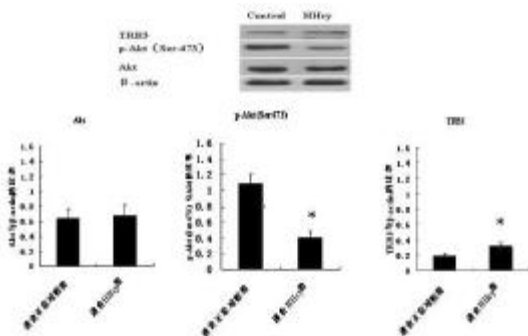


图 3 TRB3、Akt 和 p-Akt (Ser-473) 在小鼠骨骼肌中的表达
Fig 3 Expressions of Akt,TRB3 and p-Akt (Ser-473)
in mice skeletal muscle
与正常对照组比较, * $P < 0.05$.

3 讨论

Hcy 是蛋氨酸代谢的中间产物, 在体内的含量较低, 一般小于 $15 \mu\text{mol/L}$, Hcy 的增加可形成 HHcy. 研究表明, 在 2 型糖尿病患者体内, 血浆 Hcy 的含量升高^[4], HHcy 是 2 型糖尿病及并发症发生发展的危险因素之一^[5-7]. 因此, Hcy 与 2 型糖尿病的发生密切相关. 在 2 型糖尿病中, 餐后血糖的明显增加是机体糖代谢紊乱的主要特点之一. 本研究发现, 进食状态下, 血糖浓度增加, 这与本室以前的研究结果一致^[8]. 同时, 在胰岛素抵抗的 2 型糖尿病模型中, 骨骼肌可出现肌纤维萎缩变细, 肌丝走行紊乱, 部分区域坏死, 核固缩等病理现象. 本研究在进食状态下对骨骼肌进行 HE 染色发现, 可见肌纤维呈带状, 长卵圆形核位于肌纤维的周边, HHcy 组中肌纤维间隙较正常对照组增大, 但未见明显的肌纤维萎缩和坏死现象, 这与本室在空腹状态下的报道是一致的^[9].

TRB3 是一种参与体内细胞生长、应激反应和代谢的假性激酶, 最早在果蝇体内发现, 在骨骼肌、脂肪、肾脏、皮肤和肝脏等组织均有表达^[10-12]. 研究表明, 在糖尿病合并心肌病中, TRB3 的表示下调, 可以恢复 Akt 的磷酸化, 改善糖代谢, 对糖尿病合并心肌症具有保护性效应^[13]. TRB3 通过抑制 PI3-K/Akt 信号通路中 Akt 的磷酸化负性调控细胞对葡萄糖的摄取, 影响糖代谢过程^[14]. 因此, TRB3 是骨骼肌和脂肪细胞等摄取葡萄糖的一个重要的负性调控因子. 然而, 在进食状态下, Hcy 对骨骼肌组织 TRB3 的表达及 Akt 磷酸化目前未见报道. 本研究发现, 在 HHcy 的小鼠动物模型中, TRB3 的表达明显增加, p-Akt (Ser-473) 减低, 提示 Hcy 可促进骨骼肌细胞 TRB3 表达, 抑制 Akt 磷酸化, 影响 PI3-K/Akt 信号通路, 导致骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取降低, 与糖代谢的紊乱相关.

总之, 在 HHcy 中, TRB3 的表达上调, 可能是导致糖代谢紊乱的之一.

[参考文献]

[1] SIPKENS J A, KRIJNEN P A, HAHN N E, et al. Homocysteine-induced cardiomyocyte apoptosis and plasma membrane flipflop are independent of Sadenosyl homocysteine: a crucial role for nuclear p47 [J]. Mol Cell

(下转第 42 页)