

· 全科医学论著 ·

细胞因子信号转导抑制因子3对糖尿病大鼠胰岛素受体底物1及其丝氨酸磷酸化水平的影响

张旭, 陈俊国, 吴鸣, 陆燕, 章爱莲, 王琼, 平明芳

嘉兴市第二医院儿科, 浙江 嘉兴 314000

摘要:目的 观察糖尿病大鼠肝脏和骨骼肌中细胞因子信号转导抑制因子3(SOCS-3)、胰岛素受体底物1(IRS-1)及丝氨酸磷酸化胰岛素受体底物1(PIRS-1^{Ser307})水平,探讨其在胰岛素抵抗发生中的机制。方法 将40只雄性SD大鼠按随机数字表法分为对照组(20只)和糖尿病组(20只)。对照组大鼠予以普通饲料喂养,糖尿病组大鼠予以高糖高脂饲料喂养4周后腹腔注射链脲霉素,其中16只大鼠制成2型糖尿病模型。采用实时荧光定量PCR法检测大鼠肝脏和骨骼肌中SOCS-3、IRS-1 mRNA水平,Western blot法检测大鼠肝脏和骨骼肌中SOCS-3、IRS-1、PIRS-1^{Ser307}蛋白水平。应用t检验及Pearson直线相关进行分析。结果 ①与对照组相比,糖尿病组大鼠肝脏和骨骼肌SOCS-3 mRNA显著升高($P < 0.05$),IRS-1 mRNA显著降低($P < 0.05$);糖尿病组大鼠肝脏和骨骼肌SOCS-3和PIRS-1^{Ser307}蛋白显著升高($P < 0.05$),IRS-1蛋白显著降低($P < 0.05$);②糖尿病组大鼠肝脏和骨骼肌SOCS-3蛋白与IRS-1蛋白呈负相关($r = -0.865, -0.756, P < 0.05$),与PIRS-1^{Ser307}蛋白呈正相关($r = 0.678, 0.663, P < 0.05$)。结论 糖尿病大鼠可能通过上调SOCS-3基因,增加IRS-1丝氨酸磷酸化水平和降低IRS-1表达,诱发胰岛素抵抗。

关键词:糖尿病;细胞因子信号转导抑制因子3;胰岛素受体底物1;丝氨酸磷酸化胰岛素受体底物1;胰岛素抵抗

中图分类号: R587.1 R329.28 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-4152(2016)07-1095-03

DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.2016.07.010

Effect of suppressor of cytokine signaling 3 on insulin receptor substrate-1 and its serine phosphorylation in diabetes rat models ZHANG Xu, CHEN Jun-guo, WU Ming, et al. Department of Pediatrics, the Second Hospital of Jiaxing, Jiaxing, Zhejiang 314000, China

Abstract: Objective To observe the expression of suppressors of cytokine signaling 3 (SOCS-3), insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and phospho-IRS-1 (PIRS-1^{Ser307}) in liver and skeletal muscle, and to explore molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes rats models. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into two groups, the control group (20 male rats) fed with standard diet, and the Diabetes group (20 male rats) were fed with high sucrose-fat diet for 4 weeks and then injected intraperitoneally with streptozotocin (STZ), 16 male rats met the criteria of type-2 diabetes. The expressions of SOCS-3, IRS-1 and PIRS-1^{Ser307} in liver and skeletal muscle were detected by Real-time PCR and Western blot. The data were analyzed by T-test and Pearson linear correlation analysis. **Results** ①AS compared with control group, diabetes group showed that mRNA and protein expression of IRS-1 of liver and skeletal muscle were decreased ($P < 0.05$), the expression of SOCS-3 and PIRS-1^{Ser307} were increased ($P < 0.05$). ②The expression of SOCS-3 in liver and skeletal muscle were negatively correlated with IRS-1 ($r = -0.865, -0.756, P < 0.05$) and positively with PIRS-1^{Ser307} in diabetes group ($r = 0.678, 0.663, P < 0.05$). **Conclusion** Diabetes rats possibly produced insulin resistance by up-regulating SOCS-3 expression, by decreasing IRS-1 and increasing its serine phosphorylation levels in liver and skeletal muscle.

Key words: Diabetes; Suppressors of cytokine signaling 3; Insulin receptor substrate-1; Phospho-IRS-1; Insulin resistance

胰岛素抵抗是2型糖尿病发病机制的核心^[1]。胰岛素受体底物1(IRS-1)是调节胰岛素信号通路的关键分子,当IRS-1表达或其磷酸化水平异常时,将影响胰岛素在细胞内的正常水平,导致胰岛素效能下降,诱发胰岛素抵抗^[2]。SOCS-3是由多种细胞因子和激素诱导产生的负性调节蛋白,对细胞因子和激素的信号转导途径具有抑制性调节作用,其过度表达与胰岛素抵抗及2型糖尿病的发生密切相关^[3]。本研究通过建立2型糖尿病大鼠模型,观察其肝脏和骨骼肌中细胞

因子信号转导抑制因子3(SOCS-3)、胰岛素受体底物1(IRS-1)、丝氨酸磷酸化胰岛素受体底物1(PIRS-1^{Ser307})的变化,探讨糖尿病胰岛素抵抗的发生机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 体质量为180~220 g的SPF级雄性SD大鼠40只,购自上海斯莱克实验动物中心,许可证号:SCXK(沪)2012-0002。普通饲料和高脂高糖饲料,购自南通特洛菲饲料有限公司。

1.2 实验试剂 链脲佐菌素(美国Sigma),动物总RNA快速提取试剂盒(上海捷瑞),荧光定量PCR试剂盒(北京天根),SOCS-3、IRS-1、 β -actin引物由上海生工合成,ECL Plus发光试剂盒、BCA蛋白浓度测定

基金项目:浙江省科技厅公益性技术应用研究计划项目(2013-C37028)

通信作者:吴鸣, E-mail: jxeyek@126.com

试剂盒(上海碧云天), Rabbit IRS-1 antibody、Rabbit PIRS-1^{Ser307}(美国 CST), Goat SOCS-3 antibody、Rabbit β -actin antibody(美国 Santa Cruz), Rabbit Anti-goat IgG-HRP、Goat anti-Rabbit IgG-HRP(美国 Bioworld)。

1.3 造模方法和分组 将40只SD大鼠普通饲料适应性喂养1周后,采用随机数字表法将大鼠分为对照组和糖尿病组,每组各20只。对照组给予普通饲料喂养,糖尿病组给予高脂高糖饲料喂养。4周后,糖尿病组大鼠夜间禁食12h后,单次腹腔注射新鲜配制的1%链脲佐菌素(STZ, 30 mg/kg)。5d后连续3次经尾静脉采血测随机血糖,血糖值 > 16.7 mmol/L者确定为2型糖尿病大鼠模型。共16只大鼠造模成功,成模率80%。所有大鼠均每2只一笼饲养于20~25℃、昼夜交替环境中,期间自由摄取饲料和饮水。

1.4 标本收集与处理 大鼠术前禁食12h,用10%水合氯醛(3.5 ml/kg)腹腔内注射,麻醉后心脏取血5ml,离心后收集血清。采集肝脏和右后腿骨骼肌组织,用预冷的生理盐水洗净,于液氮冷冻后转移至-70℃冰箱保存。

1.5 肝脏和骨骼肌 SOCS-3 mRNA、IRS-1 mRNA 表达检测 采用 Trizol 法提取组织总 RNA,严格按照试剂说明书操作。用 Merinton SMA4000 分光光度仪检测 RNA 纯度和含量。SOCS-3 引物(Forward 5'-GGGGC-CCCTTCCTTTCTTTA-3', Reverse 5'-CGACAAAGAT-GCTGGAGGT-3'), IRS-1 引物(Forward 5'-CCTGACATTGGAGGTGGGTC-3', Reverse 5'-TTACCACCAC-CGCTCTCAAC-3'), 内参 β -actin 引物(Forward 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3', Reverse 5'-TTTAAT-GTCACGCACGATTTTC-3')。在 CFX Connect Real-Time System 实时荧光定量 PCR 仪上进行 PCR,PCR 反应参数为:95℃,10s;60℃,20s;72℃,30s,共40个循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 SOCS-3、IRS-1 mRNA 的表达量。

表2 2组大鼠肝脏和骨骼肌 SOCS-3、IRS-1、PIRS-1^{Ser307} 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	SOCS-3		IRS-1		PIRS-1 ^{Ser307}	
		肝脏	骨骼肌	肝脏	骨骼肌	肝脏	骨骼肌
对照组	20	0.44 ± 0.12	1.03 ± 0.21	0.52 ± 0.14	0.67 ± 0.16	0.12 ± 0.04	0.16 ± 0.07
糖尿病组	16	0.76 ± 0.15 ^a	1.51 ± 0.24 ^a	0.27 ± 0.10 ^a	0.40 ± 0.12 ^a	0.25 ± 0.09 ^a	0.46 ± 0.12 ^a
<i>t</i> 值		-6.86	-6.60	5.92	5.68	-5.25	-8.36
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,^a*P* < 0.05。

2.3 糖尿病组大鼠 SOCS-3 蛋白与 IRS-1、PIRS-1^{Ser307} 蛋白水平的相关性分析 Pearson 直线相关分析结果显示,糖尿病组大鼠肝脏和骨骼肌 SOCS-3 蛋白水平与 IRS-1 存在高度负相关($r = -0.865$ 、 -0.756 , $P < 0.05$),而与 PIRS-1^{Ser307} 呈显著正相关($r = 0.678$ 、 0.663 , $P < 0.05$)。

3 讨论

糖尿病是全球最主要的流行病之一,其中2型糖尿病占糖尿病患者的95%左右。胰岛素抵抗是2型糖尿病的重要病理生理特征。细胞膜上的胰岛素受体

1.6 肝脏和骨骼肌 SOCS-3、IRS-1、PIRS-1^{Ser307} 蛋白表达检测 用 RIPA 裂解液提取组织总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,按每泳道 30 μ g 蛋白上样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳及转膜。将 PVDF 膜浸入含 5% 脱脂奶粉的封闭液中,室温密闭 1 h 后分别加入一抗 4℃ 孵育过夜,洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h,加入 ECL 发光试剂盒液体,置凝胶成像仪中曝光显影。SOCS-3、IRS-1、PIRS-1^{Ser307} 蛋白表达水平以其与 β -actin 的比值表示。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,相关分析采用 Pearson 直线相关分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间均数差异比较用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组大鼠 SOCS-3、IRS-1 mRNA 表达水平的比较 糖尿病组大鼠肝脏和骨骼肌 SOCS-3mRNA 表达水平明显高于对照组($P < 0.05$),IRS-1mRNA 表达水平明显低于对照组($P < 0.05$),见表1。

表1 2组大鼠肝脏和骨骼肌 SOCS-3、IRS-1mRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

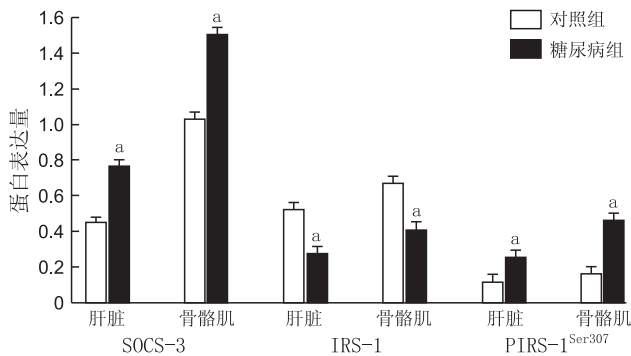
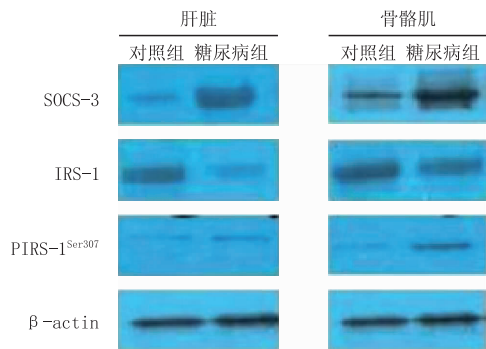
组别	例数	SOCS-3		IRS-1	
		肝脏	骨骼肌	肝脏	骨骼肌
对照组	20	0.67 ± 0.22	1.80 ± 0.52	1.13 ± 0.23	1.25 ± 0.25
糖尿病组	16	2.26 ± 0.40 ^a	4.26 ± 0.80 ^a	0.64 ± 0.13 ^a	0.74 ± 0.18 ^a
<i>t</i> 值		-15.30	-11.72	8.08	6.90
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,^a*P* < 0.05。

2.2 2 组大鼠 SOCS-3、IRS-1、PIRS-1^{Ser307} 蛋白表达水平的比较 与对照组比较,糖尿病组大鼠肝脏和骨骼肌 SOCS-3、PIRS-1^{Ser307} 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),IRS-1 蛋白表达显著下降($P < 0.05$),见表2、图1。

与胰岛素结合后,激活自身的 β 亚基酪氨酸蛋白激酶,后者诱导胰岛素受体底物(IRS)酪氨酸磷酸化,磷酸化的 IRS 能被胞浆内含有 SH2 结构域的磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)识别并结合,继而产生生物学效应。IRS/PI3K 途径是最主要的胰岛素信号传导通路。IRS-1 是调节胰岛素信号传导途径的重要细胞内分子,主要存在于骨骼肌、胰腺、脂肪、肝脏等组织中,其蛋白表达量及酪氨酸磷酸化水平是胰岛素信号传导的基础^[4]。胰岛素抵抗动物模型肝细胞中 IRS-1 表达水平显著降低^[5],敲除 IRS-1 基因的小鼠可导致胰岛素抵

抗^[6]。研究发现,IRS-1 丝氨酸位点过度磷酸化可阻止 IRS-1 与胰岛素受体结合,进而抑制其酪氨酸位点磷酸化,阻断胰岛素信号转导^[7-8],导致胰岛素抵抗。



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$ 。

图1 2组大鼠肝脏和骨骼肌 SOCS-3、IRS-1、PIRS-1^{Ser307} 蛋白表达

本研究结果显示,糖尿病大鼠肝脏和骨骼肌 IRS 的表达显著低于对照组,而 IRS-1 丝氨酸磷酸化水平明显升高,表明糖尿病大鼠存在胰岛素受体后信号传导的缺陷,IRS-1 表达下降及其磷酸化异常可能是引起胰岛素抵抗的重要机制。SOCS-3 由细胞因子和激素诱导产生,通过负反馈抑制细胞因子或激素与其受体结合后的信号转导,减弱其生理作用。SOCS-3 是胰岛素信号传导通路中的重要负性调节因子,可通过多种途径介导胰岛素抵抗。我们前期研究发现胰岛素抵抗的肥胖大鼠体内 SOCS-3 基因表达上调,基因敲除技术证实 SOCS-3 缺陷可阻止胰岛素抵抗的发生^[9]。目前研究认为 2 型糖尿病是慢性炎症性疾病,炎症因子在糖尿病大鼠体内表达增加^[10-11],进而诱导 SOCS-3 的过度表达^[12]。IRS-1 与 SOCS-3 结合后发生泛素化,从而被蛋白酶体降解^[13],抑制 IRS/PI3K 途径。此外,SOCS-3 还可通过促进 IRS-1 丝氨酸磷酸化,减少酪氨酸磷酸化,导致胰岛素抵抗^[14],干预 IRS-1 丝氨酸位点磷酸化可以改善 SOCS-3 诱导的胰岛素抵抗^[15]。因此推测 SOCS-3 促进 IRS-1 丝氨酸位点异常磷酸化是胰岛素抵抗的原因之一。本研究发现糖尿病大鼠肝脏和骨骼肌 SOCS-3 表达均显著上升,IRS-1、IRS-1 丝氨酸磷酸化水平与 SOCS-3 水平呈显著相关性,与国外报道一致^[14,16],提示 SOCS-3 的过度表达会增加 IRS 降

解及促进 IRS-1 丝氨酸磷酸化,导致胰岛素抵抗。

综上所述,本研究结果证实 SOCS-3 参与了 IRS 降解及 IRS-1 丝氨酸磷酸化过程,SOCS-3 可能与 IRS 相互影响,共同作用于胰岛素抵抗的发生,但其详细机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Ruderman NB, Carling D, Prentki M, et al. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123 (7): 2764-2772.
- [2] Xu E, Schwab M, Marettr A. Role of protein tyrosine phosphatases in the modulation of insulin signaling and their implication in the pathogenesis of obesity-linked insulin resistance [J]. *REV Endocr Metab Disord*, 2014, 15 (1): 75-97.
- [3] Feng X, Tang H, Leng J, et al. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) and type 2 diabetes [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41 (4): 2265-2274.
- [4] Hwang SL, Jeong YT, Hye Yang J, et al. Pinusolid improves high glucose-induced insulin resistance via activation of AMP-activated protein kinase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 437 (3): 374-379.
- [5] 叶娟, 王群, 郑瑞丹, 等. 生长追赶宫内发育迟缓大鼠肝细胞细胞因子信号转导抑制因子 3 表达与胰岛素抵抗的发生机制 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2012, 27 (8): 566-569.
- [6] Cheng C, Nakamum A, Minamimoto R, et al. Evaluation of organ-specific glucose metabolism by 18F-FDG in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) knockout mice as a model of insulin resistance [J]. *Ann Nucl Med*, 2011, 25 (10): 755-761.
- [7] Fatchiyah F, Christian N, Soeatmadji D, et al. Reducing IRS-1 activation cause mutation of tyrosine kinase domain hNSR gene on type-2 diabetes mellitus patients [J]. *Bioinformatics*, 2013, 9 (17): 853-857.
- [8] 陈琳, 喻明, 夏娟, 等. 咖啡对胰岛素抵抗大鼠胰岛素受体底物及其酪氨酸、丝氨酸磷酸化的影响 [J]. *山东医药*, 2014, 54 (20): 20-23, 27.
- [9] Jorgensen SB, O' Neill HM, Sylow L, et al. Deletion of skeletal muscle SOCS3 prevents insulin resistance in obesity [J]. *Diabetes*, 2013, 62 (1): 56-64.
- [10] 王君, 刘淑娟. 炎症细胞因子在糖尿病大鼠骨骼肌中表达及其与细胞凋亡相关因子关系 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2011, 25 (2): 124-125, 129.
- [11] 刘光, 穆维新, 沈亚欣, 等. 糖尿病大鼠肺组织中核因子- κ B、白介素-4, 6 的表达及意义 [J]. *河北医药*, 2012, 34 (23): 3525-3527.
- [12] Waller AP, Huettner L, Kohler K, et al. Novel link between inflammation and impaired glucose transport during equine insulin resistance [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012, 149 (3-4): 208-215.
- [13] Lu XM, Tompkins R, Fischman A. Burn injury-induced IRS-1 degradation in mouse [J]. *Int J Burns Trauma*, 2013, 3 (1): 37-48.
- [14] Jiang Y, Zhang Q, Soderland C, et al. TNF α and SOCS3 regulate IRS-1 to increase retinal endothelial cell apoptosis [J]. *Cell Signal*, 2012, 24 (5): 1086-1092.
- [15] Jiang Y, Biswas SK, Steinle JJ. Serine 307 on insulin receptor substrate 1 is required for SOCS3 and TNF- α signaling in the rMC-1 cell line [J]. *Mol Vis*, 2014, 23 (20): 1463-1470.
- [16] Broholm C, Brandt C, Schultz NS, et al. Deficient leukemia inhibitory factor signaling in muscle precursor cells from patients with type 2 diabetes [J]. *Am Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 303 (2): E283-E292.

(本文编辑:谢飞凤)

收稿日期:2015-08-05