

脂肪组织中 IRS-1 相关的 PI3K 活性在多囊巢综合征 胰岛素抵抗中的作用

王竹晨¹, 邱洁¹, 赖伟英¹, 丘惠娜¹, 胡钊², 顾熊飞³, 杨冬梓⁴, 邝健全⁴

(1. 深圳市第二人民医院妇产科, 广东 深圳 518035; 2. 深圳市宝安区人民医院普外科, 广东 深圳 518101
3. 中山大学中山医学院生物化学教研室, 广东 广州 510080; 4. 中山大学孙逸仙纪念医院妇产科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨多囊卵巢综合征(PCOS)脂肪组织胰岛素受体底物 I 相关的磷脂酰肌醇 3 激酶(IRS-1-Associated-PI3K)的活性在 PCOS 发病中的作用。【方法】PCOS 患者和对照者根据体质量指数(BMI)分为 PCOS 肥胖组、PCOS 非肥胖组、肥胖对照组和非肥胖对照组,各 12 例,采用免疫沉淀、薄层层析、放射自显影半定量检测脂肪组织 IRS-1 相关的 PI3K 活性。【结果】脂肪组织中 IRS-1-Associated PI3K 活性在 PCOS 肥胖组为 $55\% \pm 24\%$, 较非肥胖对照组 $84\% \pm 16\%$ 明显降低($P < 0.001$);肥胖对照组为 $46\% \pm 22\%$, PCOS 非肥胖组为 $71\% \pm 26\%$, 均较非肥胖对照组明显降低($P < 0.001$ 和 $P < 0.05$), PCOS 肥胖组和肥胖对照组之间以及 PCOS 肥胖组和 PCOS 非肥胖组之间的差异均无显著性意义($P > 0.05$)。【结论】PCOS 肥胖组和 PCOS 非肥胖组脂肪组织 IRS-1 相关的 PI3K 活性均较非肥胖对照组明显减弱,可能抑制胰岛素受体后的信号传导,并与 PCOS 胰岛素抵抗的发生有关。

关键词: 多囊卵巢综合征;胰岛素抵抗;脂肪组织;胰岛素受体底物 I 相关的 PI3K 活性

中图分类号: Q254; R711.75 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2008)03-0317-03

Insulin Receptor Substrate I-Associated Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Activity in Adipose Tissue of PCOS

WANG Zhu-chen¹, QIU Jie¹, LAI Wei-yin¹, QIU Hui-na¹, HU Ke², GU Xiong-fei³,
YANG Dong-zi⁴, KUANG Jian-quan⁴

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Shengzhen Second People's Hospital, Shengzhen 518035, China;
2. Department of Surgery, Shengzhen Baoan People's Hospital, Shengzhen 518101, China; 3. Department of Biochemistry, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 4. Department of Obstetrics and Gynecology, SUN Yat-sen Memorial Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To study insulin receptor substrate I-associated phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity of adipose tissue in polycystic ovary syndrome (PCOS) to approach the mechanism of insulin resistance (IR) in PCOS at the tissular and cellular level. 【Method】 Patients with PCOS and healthy controls were divided into the obese PCOS group, the non-obese PCOS group, the obese control group and the non-obese control group according to their body mass index (BMI) and with 25 cases each group. PI3K activity of adipose tissue were studied with immunoprecipitation, TLC, and phosphorimaging. 【Result】 PI3K activity of adipose tissue in the obese PCOS group ($55\% \pm 24\%$, $P < 0.001$), the obese control group ($46\% \pm 22\%$, $P < 0.001$) and in the non obese PCOS group ($71\% \pm 26\%$, $P < 0.05$) were markedly lower than the non obese control group ($84\% \pm 16\%$). The difference both between the obese PCOS group and the obese control group and the two PCOS groups were not significant ($P > 0.05$). 【Conclusion】 PI3K activity of adipose tissue in the two PCOS groups both decrease markedly than the non obese control group. It might lead to the disorder of insulin-signaling transduction downstream of insulin receptor and concern with the IR.

Key word: polycystic ovary syndrome; adipose tissue; insulin resistance; insulin receptor substrate I-associated phosphatidylinositol 3-kinase

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(3): 317-319]

收稿日期: 2007-09-11

基金项目: 广东省自然科学基金博士科研启动基金(5301121); 深圳市科技计划项目(200405034)

作者简介: 王竹晨(1973-), 女, 陕西西安人, 博士, 副主任医师, E-mail: wangzc66@sina.com; 邝健全, 通讯作者, 教授, 博士生导师

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS)是以双侧卵巢呈多囊性改变伴不孕、多毛、痤疮,月经紊乱的一组症候群。临床特点是高雄激素血症和不排卵。其病因不明。目前认为 PCOS 是以胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)为特征的内分泌代谢疾患,继发于胰岛素抵抗的高胰岛素血症对造成高雄激素征象起着重要作用^[1]。目前 PCOS 发生 IR 的机制尚不明了,为探讨 PCOS IR 的发病机制,我们对 PCOS 患者脂肪组织胰岛素受体底物 I 相关的磷脂酰肌醇 3 激酶 (insulin receptor Substrate I-associated phosphatidylinositol 3-kinase, IRS-1-Associated PI3K)的活性进行了研究,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

收集我院和深圳宝安区人民医院妇科病房从 2005 年 1 月至 2007 年 1 月临床确诊为 PCOS 患者 24 例,临床症状及内分泌检查均符合 PCOS 诊断^[1],术后病理检查证实为多囊卵巢。24 例 PCOS 患者据体重指数[体质量/身高²(kg/m²)]分为肥胖组(体质量指数 ≥ 24 kg/m²)和非肥胖组(体质量指数 < 24 kg/m²)各 12 例;另随机收集妇科病房诊断为卵巢囊肿或输卵管阻塞行开腹手术的肥胖和非肥胖妇女各 12 例。上述各组均无其它急慢性疾病。术中开腹时切取皮下脂肪组织适量,迅速置液氮中冻存。

1.2 方 法

1.2.1 脂肪组织蛋白质的提取 称取脂肪组织适量,即浸入冰冷细胞裂解液中(每克组织约需 1 mL),4 ℃组织匀浆,1 000 × g 低温离心 10 min,去除脂肪层后加入 1.0 mg/mL PMSF 贮存液(每克组织约需 30 μL),冰浴 30 min,转入离心管内 13 000 × g 低温离心 15 min,收集上清即为脂肪组织蛋白质抽提液。DNA/蛋白质分析仪测定蛋白质浓度,分装后置-20 ℃冰箱冻存^[2]。

1.2.2 脂肪组织 IRS-1 相关的 PI3K 的活性 采用免疫沉淀、薄层层析和放射自显影法检测 PI3K 的活性。取各样本蛋白质 1 mg,加入抗 IRS-1 多克隆抗体 4 μg,4 ℃孵育过夜,加入 40 μL 蛋白 A-Sepharose 4 ℃孵育 2 h,4 ℃9 000 × g 离心 1 min,含 1% Nonidet P-40 的冰冷 PBS Tris(pH7.4)洗涤

3 次;含 500 mmol/L LiCl 的 100 mmol/L Tris-HCl (pH7.6)洗涤 2 次;溶液 A [10 mmol/L Tris-HCl (pH7.4),100 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA]洗涤 1 次;溶液 B [20 nmol/L Tris (pH7.4)溶液含 100 mmol/L NaCl,10 mmol/L MgCl₂,0.5 mmol/L ethyleneglycol-bis-(β-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid, 120 μmol/L adenosine]洗涤 1 次。

所得免疫沉淀物加入 40 μL 溶液 B 重悬后,与 5 μL 溶液 C (2 μg/μL phosphatidylinositol 和 phosphatidylserine, 20 nmol/L HEPES, 1 mmol/L EDTA, pH7.4)30 ℃孵育 10 min。PI3K 反应通过加入 5 μL 280 μmol ATP (含 555 kBq [γ-³²P]ATP)开始。30 ℃下不断摇动 10 min 后用 200 μL 浓度为 1 mol/L 的 HCl 终止反应。加 160 μL 氯仿与甲醇(1:1)混合物,充分混匀以抽提 phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P)。13 000 × g 离心 5 min,弃上层水相,将下层有机相移入另一 EP 管中待测。室温下冻干。加 5 μL 氯仿与甲醇(1:1)混合物重溶解提取物,点样在薄层硅胶板上,在展层液中展层分离。对展层后的薄层硅胶板进行磷屏扫描测定 ³²P 的放射活性,结果用 OptiQuant 3.0 分析。

1.3 统计学处理

应用方差分析和 *q* 检验进行统计学处理。

2 结 果

2.1 各组的临床资料

PCOS 两组分别与其体质量相匹配的对照组相比,年龄($t_{肥}=1.70, P > 0.05; t_{非肥}=1.62, P > 0.05$)和 BMI($t_{肥}=1.64, P > 0.05; t_{非肥}=1.58, P > 0.05$)均无统计学差异。

2.2 各组脂肪组织 IRS-1 相关的 PI3K 活性磷屏扫描图像分析

PCOS 两组和肥胖对照组脂肪组织 IRS-1 相关的 PI3K 活性均较非肥胖对照组明显降低 ($F = 3.53, P < 0.05$),且以肥胖对照组降低更为明显,PCOS 肥胖组和肥胖对照组之间以及 PCOS 两组之间的差异均无显著性意义(图 1,表 1)。

3 讨 论

PCOS 患者发生 IR 的机理尚不明了,可能与

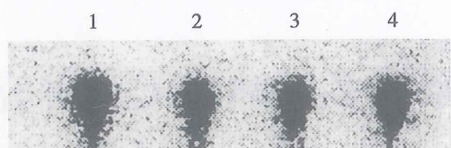


图1 各组脂肪组织 IRS-1 相关的 PI3K 活性磷屏扫描图

Fig.1 Insulin receptor substrate I-associated phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity of adipose tissue

1: non-obese control group; 2: obese control group; 3: obese PCOS group; 4: non-obese PCOS group

表1 各组脂肪组织 IRS-1 相关的 PI3K 活性的图像分析

Table 1 Insulin receptor substrate I-associated phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity of adipose tissue

Group	n	Insulin receptor substrate I-associated phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity ($\bar{x} \pm s, \%$)
Obese PCOS group	12	55 ± 24 ¹⁾
Obese control group	12	46 ± 22 ^{1),3)}
Non-obese PCOS group	12	71 ± 26 ²⁾
Non-obese control group	12	84 ± 16

Compared with the non-obese control group: 1) $P < 0.001$, 2) $P < 0.05$; Compared with the non-obese PCOS group, 3) $P < 0.05$

胰岛素受体后的信号传导障碍有关^[3-5],但机制不清,还需要进一步深入探讨。我们既往的研究提示 PCOS 脂肪组织 IRS-1 酪氨酸磷酸化作用较非肥胖对照组明显减弱,可能抑制 INS 受体后的信号传导,并与 PCOS IR 的发生有关^[6,7]。

最早发现的含有 SH2 结构并能与 IRS-1 结合的蛋白质是 PI3K^[8]。PI3K 由一个 110 ku 的催化亚单位和 一个 85 ku 的调节亚单位 (P85a) 组成。P85a 有两个 SH2 和一个 SH3 结构区。IRS-1 上的 YMXM 基元磷酸化后与 P85a 的 SH2 结合,并活化 PI3K。三维晶体结构分析显示,SH2 与 IRS-1 的结合发生在某些特定区域,这种结合位置的特异性是由磷酸氨酸周围的氨基酸顺序决定的,即 YMXM 基元,并且 P85a 只能与已磷酸化的 YMXM 基元结合。IRS-1 有 4 个能与 P85a 结合的位置,结合的先后顺序依次为:Y608MPM、Y939MNM、Y987MTM 和 Y460ICM。PI3K 是调节细胞摄取葡萄糖的重要物质,PI3K 活性降低后,脂肪细胞摄取葡萄糖量下降,葡萄糖转运体由胞浆到胞膜的转移减少。PI3K 的活性与基础状态骨骼肌细胞浆和胞膜上的葡萄糖转运体数量密切相

关。PI3K 对胰岛素刺激的细胞摄取氨基酸过程也有一定的调节作用。PI3K 的活性与 IRS-1 的磷酸化程度呈正相关。但当 PI3K 的活性达到一定程度时,进一步磷酸化 IRS-1 并不能增加 PI3K 的活性。我们此次的研究表明,PCOS 两组和肥胖对照组脂肪组织 IRS-1 相关的 PI3K 活性均较非肥胖对照组明显降低,且以肥胖对照组降低更为明显,PCOS 肥胖组和肥胖对照组之间以及 PCOS 两组之间的差异均无显著性意义。提示 PCOS 患者发生 IR 的机理可能与胰岛素受体后的信号传导障碍有关。

参考文献:

- [1] Dunaif A. Insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2006, 86 (Suppl 1): S13-14.
- [2] del Aguila LF, Claffey KP, Kirwan JP. TNF-alpha impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(5 Pt 1):E849-855.
- [3] Corbould A, Kim YB, Youngren JF, et al. Insulin resistance in the skeletal muscle of women with PCOS involves intrinsic and acquired defects in insulin signaling [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288(5): E1047-1054.
- [4] Li M, Youngren JF, Dunaif A, et al. Decreased insulin receptor (IR) autophosphorylation in fibroblasts from patients with PCOS: effects of serine kinase inhibitors and IR activators [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(9):4088-4093.
- [5] Dunaif A, Wu X, Lee A, et al. Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 281(2):E392-399.
- [6] 王竹晨, 顾熊飞, 杨冬梓, 等. 脂肪组织中胰岛素受体底物 I 的蛋白表达及其酪氨酸磷酸化在多囊卵巢综合征发病中的作用 [J]. *中华妇产科杂志*, 2005, 40 (2): 120-123.
- [7] 王竹晨, 顾熊飞, 杨冬梓, 等. TNF α 对体外培养的人脂肪细胞葡萄糖摄取和 IRS-1 酪氨酸磷酸化的影响 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(1): 48-50.
- [8] Shepherd PR. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues [J]. *Acta Physiol Scand*, 2005, 183(1): 3-12.

(编辑 张恩健)