

• 论 著 •

2 型糖尿病患者糖原合成酶激酶 β 的表达及活性

谭 婕¹, 吴建华^{2△}, 王江平², 邹俊清², 明安萍²

(1. 湖北中医药大学附属湖北省中医院检验科, 武汉 430061; 2. 湖北省中医院检验科, 武汉 430061)

摘要:目的 探讨糖原合成酶激酶 β (GSK- β) 在 2 型糖尿病患者和健康者外周血单个核细胞中的蛋白表达及活性水平。方法 运用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 30 例 2 型糖尿病血糖未控制患者(实验 1 组)、30 例 2 型糖尿病血糖控制患者(实验 2 组)和 30 例健康者(健康对照组)外周血单个有核细胞 GSK- β 蛋白表达及活性水平, 并分析其结果。结果 2 型糖尿病患者 GSK- β 蛋白水平比健康对照组升高($P < 0.05$), 实验 1 组 GSK- β 活性水平比健康对照组和实验 2 组升高($P < 0.05$); 实验 2 组 GSK- β 蛋白水平比健康对照组升高($P < 0.05$)。实验 1 组男性 GSK- β 活性水平比健康对照组男性升高($P < 0.05$)。结论 2 型糖尿病患者 GSK- β 蛋白高表达。经药物治疗后血糖控制者 GSK- β 蛋白仍高表达, 但活性水平明显下降。2 型糖尿病血糖未控制男性患者 GSK- β 活性水平明显增高。

关键词: 2 型糖尿病; 外周血单个核细胞; 糖原合成酶激酶 β

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.20.011

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)20-2831-03

The protein expression and activity of glycogen synthase kinase β in the peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetic patients

TAN Jie¹, WU Jianhua^{2△}, WANG Jiangping², ZOU Junqing², MING Anping²

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hubei 430061, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430061, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical value of observing the differences of GSK- β protein expression and activity level in the peripheral blood mononuclear cells between type 2 diabetes mellitus patients and healthy people. **Methods** Using ELISA to detect the GSK- β protein expression and activity levels of people who contained 30 patients with type 2 diabetes whose blood glucose were not controlled (test group 1), 30 cases of patients with type 2 diabetes whose blood glucose were controlled (test group 2) and 30 cases of healthy human and all the data were analyzed. **Results** The GSK- β protein content of Type 2 diabetes mellitus group was higher than the control group ($P < 0.05$), the activity level of GSK- β in test group 1 was higher than the control group and test group ($P < 0.05$). The GSK- β protein content of test group 2 was higher than the control group ($P < 0.05$). The male GSK- β activity level in the test group 1 was higher than the men's in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The GSK- β protein content has a high expression in the type 2 diabetes mellitus patients. After drug treatment, the patients, who have controlled the blood glucose effectively, still shows high expression of the GSK- β protein content, but the activity levels shows a significant decline. In male patients with type 2 diabetes blood sugar in the control group of GSK- β shows significantly higher activity level.

Key words: type 2 diabetes mellitus; peripheral blood mononuclear cells; glycogen synthase kinase β

糖原合成酶激酶 β (GSK- β) 是一种遗传保守的丝氨酸/苏氨酸类蛋白激酶, 可调控基因转录、细胞周期代谢、细胞凋亡、肿瘤发生等^[1-3]。目前已知 GSK- β 是细胞内胰岛素、生长因子等多种信号途径的交汇点, 具有广泛的底物(包括多种转录因子), 参与多种信号的负调控^[2-4]。GSK- β 在机体的表达可能会影响到胰岛素细胞信号的转导, 因此其在 2 型糖尿病患者体内的异常表达成为研究 2 型糖尿病发病机制的一个重要标志物。现采用 ELISA 法检测 2 型糖尿病患者外周血单个核细胞 GSK- β 蛋白表达及活性, 探讨其与 2 型糖尿病患者病情变化的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 5~10 月就诊于该院并经生化检查结合临床症状确诊为 2 型糖尿病的患者 60 例, 符合世界卫生组织(WHO)糖尿病专家委员会提出的诊断及分型标准(1999)。根据血糖控制情况分为 2 组, 实验 1 组为血糖未控制

患者, 共 30 例, 男 15 例, 女 15 例, 平均年龄 61.2(47~77)岁; 实验 2 组为血糖控制者, 共 30 例, 男 15 例, 女 15 例, 平均年龄 57.5(26~83)岁。健康对照组为该院体检中心的体检健康者, 共 30 例, 男 15 例, 女 15 例, 平均年龄 55.7(26~86)岁, 无糖尿病史。排除糖尿病急性并发症, 心、肝、肺及非糖尿病性神经病变等急性发作者, 急、慢性感染, 恶性肿瘤等。所有研究对象均清晨抽取空腹静脉血, EDTA 抗凝血 2 mL, 肝素抗凝血 2 mL, 采用肝素抗凝血做相关生化检查, 使用 EDTA 抗凝血做糖化血红蛋白检测, 在采血 4 h 内从剩余的 EDTA 抗凝血中提取外周血单个有核细胞。3 组研究对象的年龄、性别等一般资料比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。见表 1。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 吸取 EDTA 抗凝血 1 mL, 使用 Solarbio 公司的人外周血淋巴细胞分离液提取人外周血单个核细胞, 约取 2×10^6 个细胞, 使用 Solarbio 公司的白细胞裂解液充分裂解淋

巴细胞,把吹打之后的液体转移至 EP 管中,于-60℃冰箱保存,备用。

1.2.2 ELISA 法检测 采用 ELISA 双抗体夹心法对标本中 GSK-3 β 蛋白及活性水平进行定量分析。操作步骤严格按武汉华联科生物科技有限公司提供的试剂盒使用说明书进行。使用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算样品中人 GSK-3 β 蛋白及活性水平。

表 1 3 组研究对象的一般资料结果比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	年龄(岁)	空腹血糖(mmol/L)	糖化血红蛋白(%)
健康对照组	55.7 $\pm$ 15.7	5.31 $\pm$ 0.60	5.36 $\pm$ 0.42
实验 1 组	61.2 $\pm$ 9.1	10.46 $\pm$ 3.86	8.70 $\pm$ 1.63
实验 2 组	57.5 $\pm$ 14.5	6.15 $\pm$ 0.94	5.68 $\pm$ 0.42

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较使用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 糖尿病患者和健康者 GSK-3 β 蛋白及活性水平结果比较 2 型糖尿病患者 GSK-3 β 蛋白水平比健康对照者升高,差异有统计学意义($P<0.05$);但 GSK-3 β 活性水平与健康对照者比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 糖尿病患者和健康者 GSK-3 β 蛋白及活性水平结果比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	蛋白(ng/mL)	活性(U/L)
健康对照者	30	1.890 $\pm$ 0.616	91.250 $\pm$ 52.863
2 型糖尿病患者	60	2.247 $\pm$ 1.130*	102.801 $\pm$ 55.453

注:与健康对照组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 3 组研究对象 GSK-3 β 蛋白及活性水平结果比较 实验 1 组 GSK-3 β 活性水平比健康对照组和实验 2 组升高,差异有统计学意义($P<0.05$);实验 2 组 GSK-3 β 蛋白水平比健康对照组升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 3 组研究对象 GSK-3 β 蛋白及活性水平结果比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	蛋白(ng/mL)	活性(U/L)
健康对照组	30	1.890 $\pm$ 0.616	91.250 $\pm$ 52.863
实验 1 组	30	2.146 $\pm$ 0.853	114.976 $\pm$ 57.470* Δ
实验 2 组	30	2.348 $\pm$ 1.359*	90.625 $\pm$ 51.446

注:与健康对照组比较,* $P<0.05$;与实验 2 组比较, $\Delta P<0.05$ 。

2.3 3 组研究对象不同性别 GSK-3 β 蛋白及活性水平结果比较 GSK-3 β 蛋白水平在 3 组不同性别者差异无统计学意义($P>0.05$)。但实验 1 组男性 GSK-3 β 活性水平比健康对照组男性升高,差异有统计学意义($P<0.05$),其他组间不同性别者差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4.5。

表 4 3 组不同性别者 GSK-3 β 蛋白水平结果比较($\bar{x}\pm s$,ng/mL)				
性别	<i>n</i>	健康对照组	实验 1 组	实验 2 组
男性	15	1.764 $\pm$ 0.462	1.962 $\pm$ 0.951	2.091 $\pm$ 1.346
女性	15	2.017 $\pm$ 0.734	2.329 $\pm$ 0.728	2.604 $\pm$ 1.369

表 5 3 组不同性别者 GSK-3 β 活性水平结果比较($\bar{x}\pm s$,U/L)				
性别	<i>n</i>	健康对照组	实验 1 组	实验 2 组
男性	15	82.509 $\pm$ 47.323	125.961 $\pm$ 58.418*	93.062 $\pm$ 33.426
女性	15	99.992 $\pm$ 58.184	103.991 $\pm$ 56.306	88.189 $\pm$ 65.973

注:与同性别健康对照组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨 论

GSK-3 β 在细胞内作为众多信号转导通路的主要调控酶之一,可影响多种细胞的生长及凋亡,其在体内的作用各有利弊,过度激活或抑制都可能引起机体的病理改变^[5]。Pearce 等^[6]研究发现,GSK-3 β 过表达对小鼠整体葡萄糖耐量具有一定的影响。一个选择性地骨骼肌过度表达 GSK-3 β 亚型的小鼠模型与非转基因对照组小鼠比较,雄性 GSK-3 β 转基因小鼠糖原合成酶活性和糖原水平降低。口服葡萄糖耐量实验中,雄性 GSK-3 β 转基因小鼠表现出极其强烈的葡萄糖反应及胰岛素水平升高,提示整体水平的胰岛素敏感性降低,并表现出血脂障碍。动物模型显示 GSK-3 β 高表达与胰岛素敏感性降低具有相关性。Satish 等^[7]研究报道,GSK-3 β 是骨骼肌中葡萄糖合酶的主要调节基因,GSK-3 β 可一定程度抑制 2 型糖尿病患者骨骼肌及肝脏中胰岛素抵抗作用。凌振芬等^[8]研究证实,2 型糖尿病患者外周血白细胞中 GSK-3 β 的酶活性明显高于健康者。杨莉莉等^[5]研究发现,高糖环境下足细胞 GSK-3 β 表达量增多,足细胞单层屏障功能受损,可能是引起糖尿病肾病的重要因素之一。综上所述,大量的动物实验及人体指标监测都提示 GSK-3 β 在机体中的异常表达与高血糖密切相关。

前期实验发现,2 型糖尿病患者与健康对照者的 GSK-3 β 基因相对表达量,差异无统计学意义($P>0.05$)^[9]。但本实验结果表明,2 型糖尿病患者的外周血单个核细胞 GSK-3 β 蛋白表达量较健康对照组明显增多($P<0.05$),但两者的活性水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。将 2 型糖尿病患者分为血糖未控制组(实验 1 组)和血糖控制组(实验 2 组),提示实验 1 组的 GSK-3 β 活性水平比实验 2 组和健康对照组升高,差异有统计学意义($P<0.05$),实验 2 组的 GSK-3 β 活性水平与健康对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。实验 2 组的 GSK-3 β 蛋白水平比健康对照组升高($P<0.05$),而与实验 1 组差异无统计学意义($P>0.05$)。不同组别的性别者,男性 GSK-3 β 活性水平相对增高,尤其以实验 1 组男性增高更甚,高于健康对照组男性($P<0.05$)。

2 型糖尿病患者 GSK-3 β 基因并未发生结构或数量的改变,但在经过转录和翻译转变为蛋白质分子之后,出现蛋白质水平高表达。经过药物治疗后的 2 型糖尿病患者,血糖得到有效控制者 GSK-3 β 蛋白水平仍高表达,但活性水平明显下降。说明 2 型糖尿病治疗对 GSK-3 β 在机体的影响,更多的是其活性抑制,而对蛋白影响并不明显。提示同时检测 GSK-3 β 在人外周血单个核细胞中的蛋白及活性水平有利于 2 型糖尿病的临床诊断及病情发展的观察。临床用药方面可考虑进一步探索抑制 GSK-3 β 活性或蛋白合成的药物在 2 型糖尿病治疗中的应用。

参考文献

[1] Sutherland LI,Cnhen P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation;new (下转第 2835 页)

生理情况下可致机体产生肿瘤标志物,但这种升高是一过性的,一般 3 个月内会降至正常,因此对 C12 阳性且无病灶的人群应动态监测。

本研究结果表明,CA19-9+AFP+FER+CEA 对肝癌诊断的价值较大,CA19-9+CA242+CEA 对消化道恶性肿瘤的诊断阳性率较高,以及 NSE+CEA+CA125+CA15-3 联合检测提高了肺癌患者的早期诊断,肿瘤标志物组合检测为多种肿瘤的早期诊断提供了实验室依据。蛋白芯片 C12 具有敏感性高、损伤小、易操作、高通量等特点,易于被患者接受。本研究结果显示,除前列腺癌、绒癌外,其他肿瘤标志物单项检出阳性率均低于联合检出率。健康体检人群和无症状人群的早期肿瘤筛查时,对检测结果要综合考虑,避免造成经济负担及思想负担。

目前我国肺癌是发病率最高的肿瘤,也是癌症死因之首,胃癌、食管癌和肝癌也是发病率和病死率较高的常见肿瘤^[7]。本研究统计上海奉贤东部地区癌症患病率前 3 位分别为肝癌 16.7%(79/473)、肺癌 13.5%(64/473)、胃癌 12.3%(58/473)。上海 CDC 最新监测数据显示,癌症发病率达到 418/100 000,每年新发病例 5.9 万;癌症患病率为 2.1%,男性为 1.8%,女性为 2.4%。本研究数据显示,奉贤地区癌症发病率为 4.4%(473/10 736),远高于 CDC 统计结果,可能与调查人群的选取倾向于肿瘤高危人群有关。国内恶性肿瘤性别差异与全球基本相同,均为男性显著高于女性。全球男性恶性肿瘤发病率为 202.8/100 000,我国为 220.33/100 000;女性为 164.4/100 000,我国为 166.04/100 000^[8]。本研究资料表明,10 736 例人群中阳性检出率男性为 4.79%(515/10 736),女性 4.48%(481/10 736);男性肿瘤发病率略高于女性,与有关文献报道基本一致。

综上所述,肿瘤标志物蛋白芯片联合检测在肿瘤筛查中具有重要意义,且检测成本仅为同类化学发光法的 1/4。早期肿瘤筛查采用 C12 蛋白芯片法动态联合检测进行防癌健康体检,经济、实惠、简单、易行,能提高早期癌症的检出率^[9]。适用范围和优越性可用于大规模的体检筛查,如高危人群、易发地区的可疑肿瘤患者的辅助诊断;监测肿瘤患者病情动态观察疗效及跟踪随访,提高肿瘤检测的敏感性和特异性,降低漏检

率^[10-11]。

参考文献

[1] Eggeling F,Davies H,Lomas L,et al. Tissue-specific microdissection coupled with Protein Chip array technologies: applications in cancer research[J]. Biotechniques, 2000,29(5):1066-1070.

[2] 孙伟莉,袁媛,李卫鹏,等. 多肿瘤标志物蛋白芯片检测系统的临床应用[J]. 蚌埠医学院学报,2014,39(10):1422.

[3] 原佩贤,张江宇,巫剑雄,等. 多种肿瘤标志物联合检测对非小细胞肺癌早期诊断的临床意义[J]. 北京医学,2014,50(7):578-580.

[4] 李爱丽,黄丽芳,成君俐,等. 多种肿瘤标志物联合检测在常见恶性肿瘤诊治中的价值[J]. 检验医学与临床,2012,9(5):521-522.

[5] Duffy MJ. Tumor markers in clinical practice: a review focusing on common solid cancers[J]. Med Princ Pract, 2012,22(1):4-11.

[6] 汪广杰,王东,张涛. 血清多种肿瘤标志物联合检测对肺癌的诊断价值[J]. 重庆医学,2015,44(13):1759-1761.

[7] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.

[8] 陈万青,张思维,郑荣寿,等. 中国 2009 年恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2013,22(1):2-12.

[9] 郭晓英,王晓静,李剑华,等. 体检者及患者多肿瘤标志物蛋白芯片检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(1):125-126.

[10] 李清茹,李顺东. 多肿瘤标志物蛋白芯片检测在老年人健康体检中的应用价值及其临床意义[J]. 吉林大学学报(医学版),2016,42(3):535-540.

[11] 包珂涵. 老年人健康体检中的应用联合检测肿瘤标志物的效果分析[J]. 系统医学,2016,1(4):52-54.

(收稿日期:2016-03-15 修回日期:2016-05-21)

(上接第 2832 页)

kinase connections in insulin and growth-factor signaling[J]. Blood,1993,296:15-19.

[2] Frame S,Cohen P. GSK3 takes centre strage more than 20 years after its discovery[J]. Biochem J,2001,359:1-16.

[3] Fang XYS,Tanyi JL,Lu Y,et al. Convergence of multiple signaling cascades at glycogen synthase kinase 3:Edg receptor-mediated phosphorylation and inactivation by lysophosphatidic acid through a protein kinase C-dependent intracellular pathway[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(7): 2099-2110.

[4] Liang MH. Differential roles of glycogen sythase kinase-3 isoforms in the regulation of transcriptional activation[J]. J Biol Chem,2006,281(41):30479-30484.

[5] 杨莉莉,刘章锁. GSK-3 β 在高糖环境下足细胞转分化效应中的作用[J]. 重庆医学,2015,44(12):1609-1612.

[6] Pearce NJ,Arch JR,Clapham MP,et al. Development of glucose intolerance in male transgenic mice overexpressing human glycogen synthase kinase-3 on a muscle-specific promoter[J]. Metabolism,2004,53(11):1322-1330.

[7] Satish P,Bradley W,Doble A,et al. Tissue-specific role of glycogen synthase kinase 3 in glucose homeostasis and insulin action[J]. Mol Cell Biol,2008,29(12):6314-6328.

[8] 凌振芬,赵永波,沈翔. 糖尿病患者外周血白细胞 GSK-3 及 MMSE 的测定[J]. Nervous Diseases and Mental Health,2006,6(3):172-174.

[9] 谭婕,吴建华. 2 型糖尿病患者外周血有核细胞糖原合成酶激酶 β (GSK-3 β) 基因表达研究[J]. 现代检验医学杂志,2010,25(3):58-60.

(收稿日期:2016-04-06 修回日期:2016-06-11)