

高糖高脂联合低剂量链脲佐菌素对版纳微型猪 肝脏损伤和蛋白激酶 B 表达的影响

肖国华¹, 王月婷³, 张素君², 余坚², 张亚丽³, 王宗保^{3*}

(1. 南华大学医学院, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学实验动物部, 湖南 衡阳 421001;
3. 南华大学药学与生物科学学院, 湖南 衡阳 421001)

【摘要】 目的 观察高糖高脂联合低剂量链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 对版纳微型猪糖、脂代谢紊乱、肝组织病理改变及其蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 磷酸化的影响, 并探讨其机制。**方法** 高糖高脂联合低剂量 STZ 诱导云南版纳微型猪 2 型糖尿病模型, 每月末测定血糖、血脂、胰岛素, HE、PAS 和苏丹 IV 染色观察肝脏显微结构。12 个月末处死动物, real time-PCR 和 Western blotting 检测肝组织 PKB mRNA 和总蛋白表达及 PKB 丝氨酸 473 (PKB-Ser⁴⁷³) 的磷酸化水平。**结果** 喂养 12 月后, 与正常对照组比较, 模型组显示高血糖、血脂障碍及胰岛素缺乏 ($P < 0.05$)。肝脏脂肪病变, 肝糖原合成显著减少; PKB mRNA 及蛋白表达增高 ($P < 0.05$), 但 PKB 磷酸化降低 ($P < 0.05$)。**结论** 高糖高脂联合 STZ 可诱导版纳微型猪发生胰岛素抵抗、糖尿病, 促进肝脏脂质蓄积, 抑制糖原合成, 可能与信号分子 PKB 抑制有关。

【关键词】 链脲佐菌素; 高糖高脂饲料; 2 型糖尿病; 肝脏; 蛋白激酶 B; 版纳微型猪

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 01-0063-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.01.012

Effect of high sucrose/high fat diet and streptozotocin on liver damage and expression of protein kinase B in Chinese Banna minipigs

XIAO Guo-hua¹, WANG Yue-ting³, ZHANG Su-jun², YU Jian², ZHANG Ya-li³, WANG Zong-bao³

(1. School of Medicine, 2. Department of Laboratory Animal Science,
3. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

【Abstract】 Objective To observe the effect of high sucrose/high fat diet and streptozotocin (STZ) on glucose and lipid metabolism, liver histology and protein kinase B (PKB) phosphorylation in Chinese Banna miniature pigs, and to investigate its molecular mechanism. **Methods** Eight healthy 2-month old male Banna minipigs were randomly divided into control and diabetes groups, 4 pigs in each group. Diabetic minipigs were induced by high sucrose/high fat diet and STZ and the levels of fasting blood glucose, insulin, total cholesterol, triglycerides were measured per month for 12 months. At the end of 12th month, the minipigs were sacrificed and liver histology was examined using HE staining and the hepatic lipid accumulation was observed using Sudan IV staining. Real-time PCR and Western blot were used to determine the expression of PKB mRNA and protein, and the phosphorylation level of PKB-Ser⁴⁷³ in the liver tissue. **Results** At the end of 12th month, the minipigs of model group showed hyperglycemia, insulin deficiency and dyslipidemia compared with that of the control group ($P < 0.05$). The fat degeneration was increased, and glycogen was decreased in the liver tissue of model group. High sucrose/high fat diet and STZ increased the PKB mRNA and protein expression, while decreased PKB phosphorylation in the liver tissue ($P < 0.05$). **Conclusions** High sucrose/high fat diet and STZ can induce insulin resistance (IR) and diabetes mellitus, promote lipid and cholesterol accumulation, and inhibit hepatic glycogenogenesis, which may

[基金项目] 湖南省科技厅重点科研项目 (2012TT1001); 湖南省与衡阳市联合基金项目 (13JJ8012); 湖南省科技厅项目 (2013TT2006)。

[作者简介] 肖国华, 女, 主治医师, 硕士, 研究方向: 糖尿病和动脉粥样硬化机制研究; E-mail: xiaogh68@163.com。

[通讯作者] 王宗保, 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事糖尿病和动脉粥样硬化发病机制的研究; Phn: E-mail: wangzb65@hotmail.com

be related with inhibition of PKB phosphorylation.

【Key words】 Streptozotocin; High sucrose and high fat diet; Type 2 diabetes mellitus; Liver; Protein kinase B; Chinese Banna minipig

目前糖尿病已成为全球性的公共健康问题,我国糖尿病患者已超过 7 千万,预计至 2030 年全球发病人数将达 4.39 亿^[1]。因此,建立理想的动物模型在 2 型糖尿病研究中起着至关重要的作用。小型猪的胰腺发育和形态与人类相似,其糖脂代谢相关指标、糖耐量试验反应过程及糖的吸收、转运和利用方面也与人类十分近似。美国糖尿病协会发布的人类糖尿病诊断标准也可作为在猪体内诊断糖尿病的参照^[2]。

PKB 是胰岛素信号通路 PI3K/PKB 的一个重要分子,其催化结构域中的 Thr³⁰⁸ 和调节结构域中的 Ser⁴⁷³ 都发生磷酸化后,其活性被激活,进而调节下游分子,执行相应的功能。调节结构域中的 Ser⁴⁷³ 磷酸化对 PKB 发挥最大活性至关重要^[3,4]。

本研究采用高糖高脂联合低剂量 STZ 建立版纳微型猪糖尿病模型,观察其肝组织结构病理变化,检测肝组织 PKB 磷酸化水平,探讨高糖高脂联合低剂量 STZ 诱导版纳微型猪发生胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)、糖尿病的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

甘油三酯试剂盒、血糖试剂盒及血清总胆固醇试剂盒购自上海荣盛生物技术有限公司;蔗糖购自广西柳州糖厂;猪油购自湖南衡阳肉联厂;链脲佐菌素购自美国 Sigma 公司,进口分装;胰岛素试剂购自中国原子能研究院;PKB (9272) 一抗、p-PKB-Ser473 (9271) 一抗购自 Cell Signaling Technology, β -actin 一抗 (MA-0001) 购自 Auragene,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (CW0103) 购自康为世纪生物技术有限公司;PAS 染色试剂盒 (产品编号: MST-8038) 购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2 动物与饲料

2 月龄雌性云南版纳微型猪 8 头,体重 6 ~ 11 kg,购自上海交通大学【SCXK (沪) 2007-0013】。8 头猪先予正常饲料喂养 2 周,适应环境后按体重随机分为 2 组:正常对照组 ($n = 4$),喂普通猪饲料 (10% 玉米、50% 稻谷、8.5% 豆饼、30% 麦麸、1% 面粉和 0.5% 食盐);模型组 ($n = 4$),喂高糖高脂饲料 (5.3% 玉米、26.5% 稻谷、4.51% 豆饼、15.9% 麦麸、

0.53% 面粉、0.27% 食盐、10% 猪油和 37% 蔗糖)。动物分栏喂养,温度 20 ~ 25℃,湿度 55% ~ 65%,每天光照 12 h,每日投食 3 次,日粮为体重 4%,自由饮水。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准,在南华大学实验动物部完成。实验期为 12 个月。

1.3 链脲佐菌素液的配制和注射

0.1 mol/L 柠檬酸 28 mL 和 0.1 mol/L 柠檬酸三钠 22 mL 混合后,蒸馏水稀释成 pH 4.5 的缓冲液 100 mL,现配现用。根据动物体重,称取一定量 STZ,用预先配制好的缓冲液,配制为 25 g/L STZ,过滤除菌。

分两次给禁食过夜模型组版纳微型猪注射新配制链 STZ。1 月末腹腔一次性注射 50 mg/kg;7 月末耳缘静脉注射 50 mg/(kg·d),连续 3d,药物注射时间为 1 ~ 5 min。正常对照组版纳微型猪注射等剂量的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

1.4 血浆生物化学指标检测

每月末从禁食过夜的版纳微型猪眶静脉窦抽取血样,葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖 (glucose);GPO-PAP 酶法测定血浆甘油三酯 (triglyceride, TG),CHOD-PAP 酶法测定血浆总胆固醇 (total cholesterol, TC),胰岛素测定用放射免疫法。

1.5 HE 染色检查

12 月末,戊巴比妥钠麻醉后股动脉放血处死空腹过夜的版纳微型猪,取肝组织用 4% 中性甲醛固定 24 h,常规脱水,石蜡包埋,切片 (4 μ m) 后进行 HE 染色,显微镜下观察并摄影。

1.6 PAS 染色检查

肝组织石蜡切片常规脱蜡,蒸馏水洗涤,1% 的过碘酸水溶液氧化 5 ~ 10 min 后洗涤。Schiff 试剂染色 5 ~ 10 min,亚硫酸氢钠溶液洗涤 3 $\times$ 2 min,然后流水冲洗 10 min。滴加苏木素溶液浅染胞核 2 ~ 3 min,用 0.5% 的盐酸酒精溶液稍做分化,流水冲洗 5 ~ 10 min,之后脱水、透明,中性树胶封片。显微镜下观察。

1.7 苏丹 IV 染色检查

取肝组织的冰冻切片,漂于水中;蒸馏水稍洗;用 Harris 氏苏木素染液,淡染细胞核;水洗返兰,镜检如染色过深可用 0.5% 盐酸酒精分化,水洗返兰;

经 70% 乙醇迅速漂洗一次, 约 20 ~ 30 min; 用苏丹 IV 置于 56℃ 温箱内浸染 30 min; 经 70% 乙醇迅速分化数秒钟, 以洗去切片上的浮色; 游离切片漂浮于蒸馏水中, 用玻璃棒挑捞贴于载物片上; 用滤纸将切片及周围的水分吸去, 待稍干; 明胶封固。显微镜下观察。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测

取新鲜肝脏组织, 按照每 50 ~ 100 mg 组织样品加入 1 mL 的 Trizol 来提取总 RNA, 测 A_{260}/A_{280} 的比值, 范围在 1.8 ~ 2.1 之间, 琼脂糖凝胶电泳跑胶观察 RNA 条带来检查总 RNA 的提取质量。用逆转录试剂盒合成 cDNA。

用标准品的 cDNA 做为模板, 把每一个待测的目的基因与管家基因分别进行 PCR 扩增, 其产物进行梯度稀释用于制作标准曲线。然后梯度稀释过的 DNA 模板和所有待测的 cDNA 样品都加入到含有 SYBR Green 的 PCR 反应体系中, 进行 real-time PCR 扩增, β -actin 和 PKB 的退火温度均为 60℃ (引物见表 1)。收集每个循环的荧光量, 在梯度稀释的 DNA 标准曲线上, 检测各个样品目的基因和管家基因的浓度。样品基因的浓度除以相应的管家基因的浓度, 就是此样品校正后的相对含量。

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequences of the primers

基因名 Genes	双向引物序列 Primer sequences	产物长度/bp Product length
Beta-actin	5' -CACCACACCTTCTACAACGAGC-3'	100
	5' -TCATCTTCTCAGGTTGGCTT-3'	
PKB	5' -TGGAGGTGTCCTGGCTAA-3'	263
	5' -GTCGTGGCTCTGGAAGCAGTA-3'	

1.9 总蛋白提取及蛋白印迹实验

取大约 20 mg 的肝脏新鲜组织, 剪碎于 EP 管中, 再加入适量组织裂解液冰上放置 30 min。12,000 r/min 4℃ 离心 10 min, 吸取上清液, 用 BCA 法进行蛋白定量。进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶, 分离总蛋白。电泳后采用湿转法转移到 PVDF 膜上, 丽春红染色观察转移效果。5% 的脱脂奶粉封闭 4 h, 一抗 (1: 10,000) 4℃ 孵育过夜。洗膜后用 1: 2,000 稀释的二抗-HRP 交联物孵育 2 h。TBST 液洗 3 × 20 min。按 ECL 试剂盒说明, 加入显色剂, X 光片感光, 显影。Alpha Imager 2200 凝胶分析系统摄像并分析。

1.10 免疫组织化学检测

按照福州迈新生物技术有限公司提供的 S-P 两步法生物素化检测体系进行免疫组织化学染色, 检

测 PKB 蛋白在版纳微型猪肝脏的组织定位以及相对表达情况。试验步骤按试剂盒说明进行: 石蜡切片常规脱蜡、脱水。每张切片滴加 50 μ L 的过氧化物酶阻断溶液 (试剂 A) 37℃, 30 min, 以阻断内源性过氧化物酶的活性; 正常非免疫动物血清 (试剂 B) 37℃, 10 min; 滴加一抗 (1: 50), 4℃ 过夜; 生物素标记的二抗 (试剂 C) 37℃, 10 min; 链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液 (试剂 D) 37℃, 10 min, DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶封片, PBS 代替一抗作为阴性对照。阳性反应为胞质棕黄色。

1.11 统计学处理

用 SPSS 软件统计分析数据, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较用 t -检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

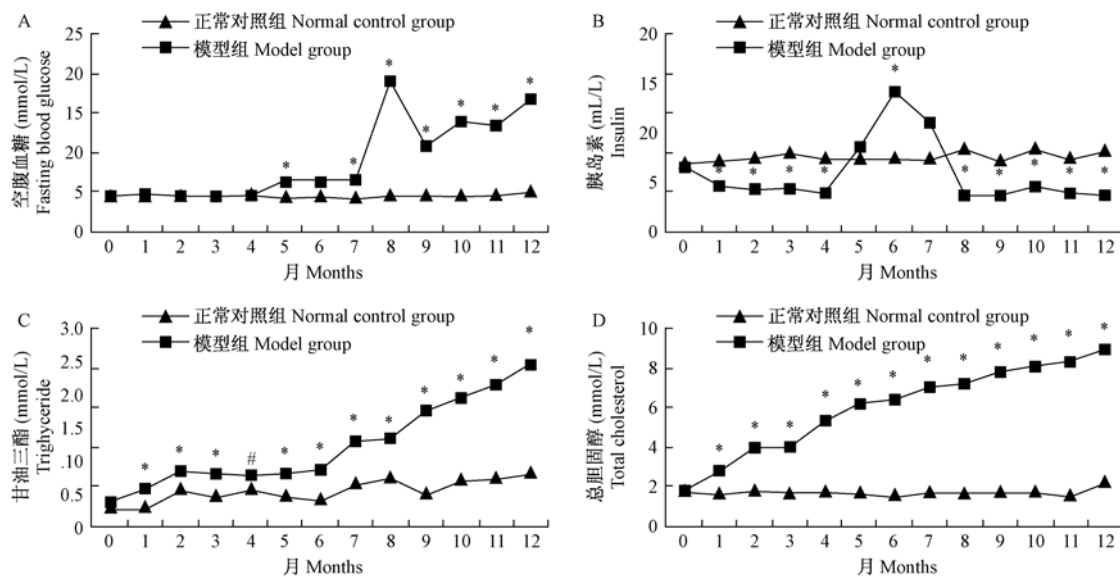
2 结果

2.1 血糖、胰岛素和血脂的检测

第一次注射 STZ (50 mg/kg) 可使模型组胰岛素水平明显下降 (与正常对照组比较, $P < 0.01$), 5 月其胰岛素水平明显升高, 6 月达到峰值 (14.35 ± 1.36) mU/L, 是正常对照组的 1.91 倍, 其间血糖葡萄糖水平缓慢升高; 第一次注射 STZ 50 mg/(kg · d), 连续 3d 后, 模型组血浆胰岛素浓度急剧下降至 (3.83 ± 0.30) mU/L (与正常对照组比较, $P < 0.01$), 并维持较低水平 (见图 1B), 而血糖显著上升, 8 月达到峰值 (19.28 ± 2.24) mmol/L, 是正常对照组的 4.27 倍, 然后呈下降趋势, 但仍维持较高水平 (见图 1A)。血浆甘油三酯和总胆固醇水平从第 1 月起即持续缓慢上升 (见图 1C, 1D)。这说明喂养高糖高脂饲料能导致版纳微型猪发生高葡萄糖血症、高胰岛素血症和高脂血症, STZ 可导致胰腺 β 细胞大量破坏, β 细胞功能减低, 体内胰岛素明显缺乏。

2.2 肝组织病理学检查结果

HE 染色可见模型组部分肝小叶边界不清晰, 肝索排列紊乱, 肝细胞水肿, 脂肪变性明显, 部分细胞萎缩, 核固缩 (如白色箭头所示) (图 2B)。PAS 染色可见高糖高脂饮食联合小剂量 STZ 可显著降低模型组肝组织的糖原含量 (图 2D)。苏丹 IV 染色可见模型组肝组织蓝染细胞核周围的胞质中有大量猩红色物质, 全小叶密集脂滴, 脂类物质沉积严重, 肝窦亦可见变形, 细胞间隙变小, 肝细胞脂肪变严重, 提示肝组织脂质蓄积 (图 2E)。正常对照组



注:与对照组比较, # $P < 0.05$, * $P < 0.01$ 。

图1 两组血糖、血脂和胰岛素水平的比较

Note: # $P < 0.05$, * $P < 0.01$, vs. the control group.

Fig. 1 Time course of the changes of plasma glucose, insulin, triglycerides and total cholesterol.

肝组织结构正常,核膜清晰,核质分布均匀,内质网、线粒体结构正常,胞质内未见明显脂滴沉积(图2A, 2C, 2E)。

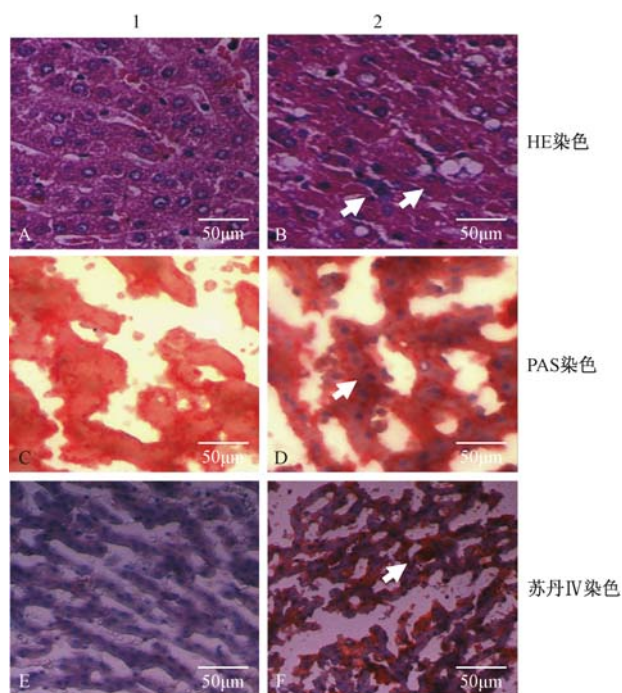


图2 两组肝组织 HE、PAS、苏丹 IV 染色($\times 400$)

Note: 1. Control group; 2. Model group.

Fig. 2 Histology of liver tissues in the minipigs of two groups. A, B: HE staining; C, D: Periodic acid-Schiff staining; and E, F: Sudan IV staining($\times 400$)

2.3 高脂高糖饮食联合小剂量 STZ 对肝 PKB 磷酸化的影响

结果显示,如图3所示,与正常对照组相比,PKB 主要表达在胞质里,正常对照组肝脏(图3A) PKB 的表达较少,在模型组(图3B)中,其蛋白表达较正常对照组增加,肝组织 Western Blot 结果显示,模型组 PKB 的表达增加,但与模型组相比差异没有显著性($P > 0.05$);高脂高糖饮食联合小剂量 STZ 诱导模型组肝组织 p-PKBSer⁴⁷³ 磷酸化显著降低,与正常对照组相比差异有显著性($P < 0.01$)(图4)。

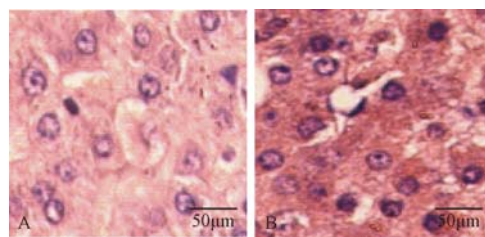


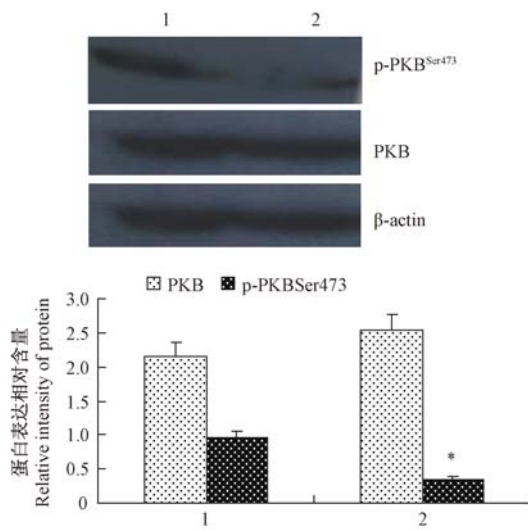
图3 两组动物肝组织 PKB 免疫组化结果(A. 正常对照组;B. 模型组。 $\times 400$)

Fig. 3 Representative photomicrographs of immunohistochemical staining for PKB in liver tissue from Chinese Banna minipigs. A. Control group; B Model group ($\times 400$)

2.4 高脂高糖饮食联合小剂量 STZ 对肝 PKB mRNA 表达的影响

结果显示,高脂高糖饮食联合小剂量 STZ

可显著增加 PKB mRNA 的表达, PKB mRNA 增大 4.37 倍(与正常对照组相比, $P < 0.01$) (见图 5)。

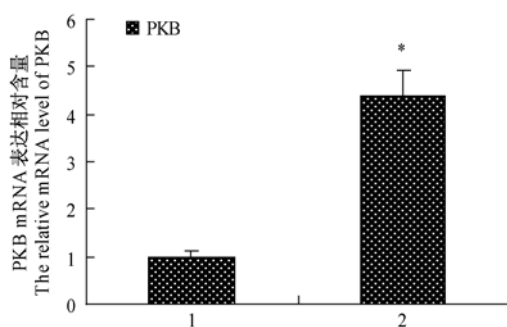


注: 1. 正常对照组; 2. 模型组 (* $P < 0.01$ 与正常对照组相比)。

图 4 两组动物肝组织 PKB 磷酸化和总蛋白表达结果

Note. 1. Control group; 2. Model group. * $P < 0.01$, vs. the control group.

Fig. 4 Western blot and densitometric quantification of PKB phosphorylation and PKB total protein in the liver of Chinese Banna minipigs.



注: 1. 正常对照组; 2. 模型组 (* $P < 0.01$ 与正常对照组相比)。

图 5 两组动物肝组织 PKB mRNA 表达结果

Note. 1. Control group; 2. Model group. * $P < 0.01$, vs. the control group.

Fig. 5 The mRNA expression of PKB in the liver of Chinese Banna minipigs determined by real-time PCR.

3 讨论

本研究通过高糖高脂联合 STZ 诱导版纳微型猪发生胰岛素抵抗、糖尿病, 既表现 2 型糖尿病的特征, 又表现 1 型糖尿病的特征, 成功模拟了人类 2 型糖尿病的发病过程^[5,6]。

PKB 是胰岛素主要信号通路 PI3K/PKB 中的中间分子, 在胰岛素抵抗中起着非常重要的作用。研究表明, PI3K 信号途径下游的 PKB 基因敲除的小鼠肝脏和骨骼肌等组织器官对胰岛素的反应较正常小鼠有不同程度的减弱, 其中肝脏表现为肝糖原合成减少, 骨骼肌则表现为对葡萄糖的吸收减少, 证明 PKB 是正常糖代谢平衡的必需基因。PKB 家族的基因编码区发生突变, 这种突变是胰岛素抵抗和糖尿病的常染色体显性突变。这些发现证明机体细胞在产生对胰岛素敏感的过程中 PKB 的重要作用^[7]。近年来在研究小鼠胚胎成纤维细胞 (3T3-L1) 时, 全面概述了 PKB 的组成性活化对于胰岛素刺激的 GLUT4 的转位与葡萄糖转运的影响^[8]。此外, 在体外细胞的研究中发现, 非 ATP 竞争的 PKB 的抑制剂 AKTi-1/2 能高效的选择性抑制 PKB α 和 PKB β 亚型^[9], 短期的抑制 PKB α 和 PKB β 导致细胞中葡萄糖的转运减少^[10]。

胰岛素的靶组织如肝脏、肾脏、骨骼肌、脂肪等伴随糖代谢紊乱与胰岛素抵抗会出现不同程度组织形态病变^[11]。胰岛素抵抗也可以理解为是由胰岛素信号转导缺陷引起的。肝脏是调控糖原合成与代谢的重要器官, 在胰岛素抵抗状态下, 肝组织输出肝糖增加, 是导致空腹血糖升高的主要原因之一。

PKB 在体内是以 Thr³⁰⁸ 和 Ser⁴⁷³ 活化形式存在, 磷酸化后其活性被激活, 调节下游分子, 发挥相应的功能^[12]。其中, Ser⁴⁷³ 被磷酸化对 PKB 发挥最大功能至关重要。说明 PKB 的磷酸化在机体中发挥极其重要的作用。研究发现, 模型组肝组织 PKB 基因表达量高于正常对照组, 与总 PKB 蛋白表达趋势一致, 这可能是 PKB 基因在转录水平发生改变, 此变化与高血糖有关^[13]。生理状态下, 血糖可刺激胰岛素释放, 但长期的高血糖导致胰岛素基因转录途径发生障碍, 致使胰岛素分泌减少, PI3K/PKB 信号途径减弱, PKB 磷酸化减少, 导致机体糖代谢紊乱。PKB 可通过以下几个方面调节糖代谢: (1) 通过糖原合成酶激酶-3 (glycogen synthase kinase-3, GSK-3) 促进糖原合成, GSK-3 是 PKB 最早发现的直接底

物之一,具有使糖原合成酶磷酸化而失活的作用,磷酸化的 PKB 可使 GSK-3 磷酸化,使之失去活性。糖原合成酶活性增加,终效应是细胞内的糖原合成增加。肝脏是贮存糖原的主要器官,本研究发现在长期高糖高脂饮食和 STZ 的诱导下模型组肝脏 PKB-Ser⁴⁷³被磷酸化显著低于正常对照组,肝小叶结构紊乱,糖原合成减少,脂质蓄积(图 2B,2D,2F,2H),机体内葡萄糖水平增加,导致高血糖(图 1),与文献报道一致。(2)通过调节葡萄糖转运体(glucose transporter 4, GLUT4)向质膜的转运来促进葡萄糖的吸收,维持机体血糖的稳定。p-PKBSer⁴⁷³水平降低使 GLUT4 转位受阻,葡萄糖的转运障碍,机体利用葡萄糖的能力降低,导致血糖升高。(3)通过抑制肝脏的糖异生,调节机体糖代谢平衡。这一过程通过胰岛素抑制磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶和葡萄糖-6-磷酸酶的表达^[14]完成。

综上所述,PKB 作为中间信号分子,调节终效应组织葡萄糖的摄取,是产生胰岛素抵抗的重要分子基础。当发生糖尿病小型猪肝组织 PKB 活性降低,肝小叶结构紊乱,糖原合成减少,脂质蓄积,葡萄糖的转运障碍,机体利用葡萄糖的能力降低,导致血糖升高。本研究可作为糖尿病治疗临床药物的理论依据。但目前糖尿病小型猪的发病机制仍不甚明确,是否有其他信号转导通路参与了肝组织脂质蓄积及糖原合成,以及这些通路之间的关系更有待于深入了解,且 PKB 磷酸化与肝组织脂质蓄积及糖原合成关系较为复杂。因此,改善肝组织脂质蓄积及糖原合成、治疗糖尿病的机制仍有必要进行更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87(1): 4-14.
- [2] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus [J]. *Diabetes Care*, 2006, 29(Suppl 1): S43-48.
- [3] He L, Simmen FA, Mehendale HM, et al. Chronic ethanol intake impairs insulin signaling in rats by disrupting Akt association with the cell membrane. Role of TRB3 in inhibition of Akt/protein kinase B activation [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(16): 11126-11134.
- [4] Greene MW, Gorofalo RS. Positive and negative regulatory role of insulin receptor substrate 1 and (IRS-1 and IRS-2) serine/threonine phosphorylation [J]. *Biochemistry*, 2002, 41: 7082-7091.
- [5] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 52(4): 313-320.
- [6] 肖国华, 张素君, 余坚, 等. 高糖高脂联合低剂量 STZ 诱导版纳微型猪 2 型糖尿病动物模型的建立 [J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 40(4): 351-356.
- [7] George S, Rochford JJ, Wolfrum C, et al. A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2 [J]. *Science*, 2004, 304(5675): 1325-1328.
- [8] Ng Y, Ramm G, Lopez JA, et al. Rapid activation of Akt2 is sufficient to stimulate GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Cell Metab*, 2008, 7(4): 348-356.
- [9] Barnett SF, Defeo-Jones D, Fu S, et al. Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors [J]. *Biochem J*, 2005, 385(Pt 2): 399-408.
- [10] Gonzalez, E, McGraw TE. Insulin signaling diverges into Akt-dependent and -independent signals to regulate the recruitment/docking and the fusion of GLUT4 vesicles to the plasma membrane [J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(10): 4484-4493.
- [11] 李翠玲, 李金玲, 张文. 2 型糖尿病大鼠早期肾损害的研究 [J]. *中国医药导报*, 2009, 6(19): 25-26.
- [12] He L, Simmen FA, Mehendale HM, et al. Chronic ethanol intake impairs insulin signaling in rats by disrupting Akt association with the cell membrane. Role of TRB3 in inhibition of Akt/protein kinase B activation [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(16): 11126-11134.
- [13] Horowitz JC, Lee DY, Waghray M, et al. Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by transforming growth factor-beta1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(2): 1359-1367.
- [14] Logie L, Ruiz-Alcaraz AJ, Keane M, et al. Characterization of a protein kinase B inhibitor in vitro and in insulin-treated liver cells [J]. *Diabetes*, 2007, 56(9): 2218-2227.

[收稿日期] 2014-07-21