

Neu-P11 下调 JNK 及其磷酸化水平改善睡眠限制大鼠葡萄糖稳态

余美华¹, 杨升华², Moshe Laudon³, 尹卫东¹

(1. 南华大学药学与生物科学学院生物技术系, 湖南省衡阳市 421001; 2. 浙江大学医学院附属第一医院, 浙江省杭州市 310003; 3. Drug Discovery, Neurim Pharmaceuticals Ltd, Tel-Aviv, Israel)

[关键词] Neu-P11; 褪黑素; 睡眠限制; 胰岛素敏感性; JNK

[摘要] **目的** 研究新型褪黑素(MLT)受体激动剂 Neu-P11 对睡眠限制大鼠胰岛素敏感性的影响及其作用机制。**方法** 采用转笼法对 SD 大鼠进行 8 天的睡眠限制,期间每天分别给予腹腔注射 Neu-P11 (20 mg/kg)、MLT (5 mg/kg)、生理盐水。实验末测定空腹血糖、胰岛素、丙二醛(MDA)水平及 GSH-Px、SOD 活性,检测骨骼肌组织 JNK 及其磷酸化水平。**结果** 与正常对照组比较,睡眠限制大鼠空腹血糖、胰岛素、HOMA-IR 及 MDA 水平明显升高, SOD、GSH-Px 活性降低, JNK 及其磷酸化水平显著增高;而 Neu-P11、MLT 处理的睡眠限制鼠血糖、胰岛素、MDA、JNK 及其磷酸化水平均下降,同时 SOD、GSH-Px 活性增强。提示 Neu-P11、MLT 可以改善睡眠限制鼠的抗氧化能力和葡萄糖稳态。**结论** Neu-P11 通过下调 JNK 及其磷酸化水平而改善其抗氧化能力,从而改善睡眠限制引起的胰岛素抵抗。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Neu-P11 Improves Glucose Homeostasis of Chronic Sleep Restricted Rats by Inhibiting JNK Phosphorylation

SHE Mei-Hua¹, YANG Sheng-Hua², Moshe Laudon³, and YIN Wei-Dong¹

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Sciences and Technology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310003, China; 3. Drug Discovery, Neurim Pharmaceuticals Ltd, Tel-Aviv, Israel)

[KEY WORDS] Neu-P11; Melatonin; Sleep Restriction; Insulin Sensitivity; JNK

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Neu-P11, a novel melatonin receptor agonist, on insulin sensitivity in sleep restricted rats as well as the underlying mechanism. **Methods** Method of rotating cage was adopted to establish SD rat models of sleep restriction. During the 8 days of sleep restriction, rats were injected intraperitoneally with Neu-P11 (20 mg/kg), MLT (5 mg/kg), saline respectively every day. Plasma glucose, fasting insulin, malondialdehyde (MDA) levels and enzyme activity of glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) were detected at the end of experiment, the proteins of JNK and phosphorylated JNK in muscles were measured by Western blot. **Results** Compared with control group, sleep restricted rats showed increased levels of plasma glucose, fasting insulin, but antioxidative potency decreased. However, in Neu-P11 and melatonin-treated sleep restricted rats, the levels of plasma glucose, fasting insulin and MDA decreased with an increase of SOD, GSH-Px activities. Neu-P11 or melatonin also down-regulated the levels of JNK and phosphorylated JNK which were increased by sleep restriction. These data suggest that glucose homeostasis and antioxidative potency of the chronic sleep restricted rats were protected by Neu-P11 and melatonin. **Conclusions** Neu-P11 could improve metabolic profiles and insulin resistant induced by sleep restriction, and the regulation of JNK and antioxidative potency may be the underlying mechanism.

褪黑素(melatonin, MLT)是松果体合成分泌的 一种神经内分泌激素,具有促进睡眠和调节糖脂代

[收稿日期] 2014-07-14

[基金项目] 国家自然科学基金(81200590);高等学校博士学科点专项科研基金(20124324120005)

[作者简介] 余美华,博士,副教授,研究方向为糖尿病的分子机制,E-mail 为 shemhbb@163.com。通讯作者尹卫东,教授,博士研究生导师,研究方向为糖尿病的分子机制,E-mail 为 wdy20042004@126.com。

谢的作用^[1];而 Neu-P11 是一种新型的 MLT 受体激动剂,目前主要用于改善睡眠^[2]。近年来的研究证明,代谢异常尤其是胰岛素抵抗与睡眠紊乱存在着密切联系^[3,4],基于此,本研究旨在探讨 Neu-P11 对睡眠限制动物模型葡萄糖稳态的影响及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

健康雄性 SD 大鼠,250 ~ 300 g,3 月龄,购自南华大学实验动物中心。胰岛素放射免疫试剂盒购自北京原子能研究所;血糖等生化检测试剂盒购自南京建成生物技术有限公司。Neu-P11 和 MLT 由以色列 Neurim Pharmaceuticals Ltd. 公司提供,纯度超过 99.9%;无水乙醇溶解,生理盐水稀释至工作浓度(乙醇终浓度低于 0.01%)。

1.2 动物饲养及分组

30 只雄性 SD 大鼠正常饲养一周后随机分为五组($n=6$):正常对照组、睡眠限制(sleep restriction, SR)组、睡眠限制 Neu-P11 治疗组(简称 SR-N 组)、睡眠限制 MLT 治疗组(简称 SR-M 组)和强制运动(free action, FA)组。分笼喂养,保持其室内温度 18℃ ~ 22℃,湿度 30% ~ 70%,定时通风换气,12 h 的黑暗光照交替处理(光照时间 6:00 a. m. -6:00 p. m.)。所有大鼠均自由进水和摄食。

1.3 建立睡眠限制模型和给药

采用转笼法建立 SD 大鼠睡眠限制模型。通过缓慢旋转转笼子(3 r/min) 20 h(12:00 a. m. -8:00 a. m.)使 SR 组、SR-N 组和 SR-M 组大鼠每天只有 4 h(8:00 a. m. -12:00 a. m.)睡眠;FA 组则以 2 倍速度(6 r/min)旋转 10 h(12:00 a. m. -2:00 p. m., 4:00 p. m. -6:00 p. m., 8:00 p. m. -10:00 p. m., 0:00 a. m. -2:00 a. m., 4:00 a. m. -6:00 a. m.),从而使 FA 组大鼠既保持相同的运动又有充足的睡眠

时间,以平衡运动量对大鼠的影响。上述处理连续进行 8 天。实验期间 SR-N 组和 SR-M 组每天分别给予 Neu-P11 (20 mg/kg)、MLT (5 mg/kg)^[5],正常对照组、SR 组和 FA 组则以生理盐水(5 mg/kg)代替。以上各处理因素均为腹部皮下注射,时间为每天 6:00 p. m.。

1.4 生物化学指标检测

实验末从禁食过夜的 SD 大鼠的尾部采集血样,离心(12000 r/min, 4 min)分离血浆,检测血糖、丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性;放射免疫分析法测定胰岛素水平。采用稳定模式评估法的胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)评价胰岛素敏感性:胰岛素抵抗指数 = 空腹血糖(mmol/L) × 空腹胰岛素(mU/L)/22.5。

1.5 Western blot 分析

提取骨骼肌组织总蛋白,BCA 法进行蛋白定量。取各组总蛋白 50 μg,经 SDS-PAGE 电泳,将目的条带转移至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭 2 h 后,一抗 4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜,辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗室温孵育 2 h,显影。

1.6 统计学方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Neu-P11 对睡眠限制大鼠糖脂代谢的影响

与正常对照组比较,SR 组大鼠在接受 8 天的睡眠限制后血糖和空腹胰岛素水平明显升高,HOMA-IR 也明显增高($P < 0.05$);而 Neu-P11 或 MLT 处理后血糖和空腹胰岛素水平、HOMA-IR 则明显降低,且与 SR 组有明显差异($P < 0.05$)。FA 组各指标没有显著性变化(表 1)。

表 1. 各组大鼠血糖、胰岛素水平的变化($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1. Changes of blood glucose and fasting insulin levels in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

指 标	正常对照组	SR 组	SR-N 组	SR-M 组	FA 组
血糖(mmol/L)	6.04 ± 0.35	8.26 ± 0.38 ^a	6.63 ± 0.42 ^b	6.70 ± 0.34 ^b	6.14 ± 0.42 ^b
胰岛素(mIU/L)	16.50 ± 0.42	28.52 ± 0.71 ^a	18.51 ± 0.90 ^b	18.93 ± 0.92 ^b	16.22 ± 1.24 ^b
HOMA-IR	4.40 ± 0.31	10.28 ± 1.03 ^a	5.43 ± 0.29 ^b	5.63 ± 0.19 ^b	4.39 ± 0.55 ^b

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 SR 组比较。

2.2 Neu-P11 改善睡眠限制大鼠的抗氧化能力

与正常对照组比较,SR 组大鼠 MDA 水平升高, SOD、GSH-Px 则下降 ($P < 0.05$);而与 SR 组比较, SR-N 组和 SR-M 组 MDA 水平则明显下降, SOD、GSH-Px 活性有所增强 ($P < 0.05$)。与正常对照组比较,FA 组各指标没有显著性差异(表 2)。

2.3 Neu-P11 对 JNK 表达及其磷酸化水平的影响

SR 组 JNK 和磷酸化 JNK 水平明显高于正常对照组 ($P < 0.01$),分别增高 87.2 % 和 171.1%;而 Neu-P11 或 MLT 处理后 JNK 和磷酸化 JNK 水平则明显降低,其中 Neu-P11 处理后效果更加显著,与 SR 组比较,分别降低 66.6% 和 76.5% (图 1)。

表 2. 各组大鼠血清 MDA、SOD 和 GSH-Px 的变化($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2. Changes of plasma MDA, SOD and GSH-Px in each group($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	MDA($\mu\text{mol/L}$)	SOD(kU/L)	GSH -Px(kU/L)
正常对照组	4.64 \pm 1.14	204 \pm 35	1550 \pm 78
SR 组	7.80 \pm 2.13 ^a	150 \pm 24 ^a	1200 \pm 61 ^a
SR-N 组	6.05 \pm 1.25 ^{ab}	177 \pm 15 ^b	1440 \pm 67 ^b
SR-M 组	6.60 \pm 0.94 ^{ab}	168 \pm 21 ^b	1460 \pm 39 ^b
FA 组	5.20 \pm 1.38 ^b	222 \pm 25 ^b	1470 \pm 62 ^b

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 SR 组比较。

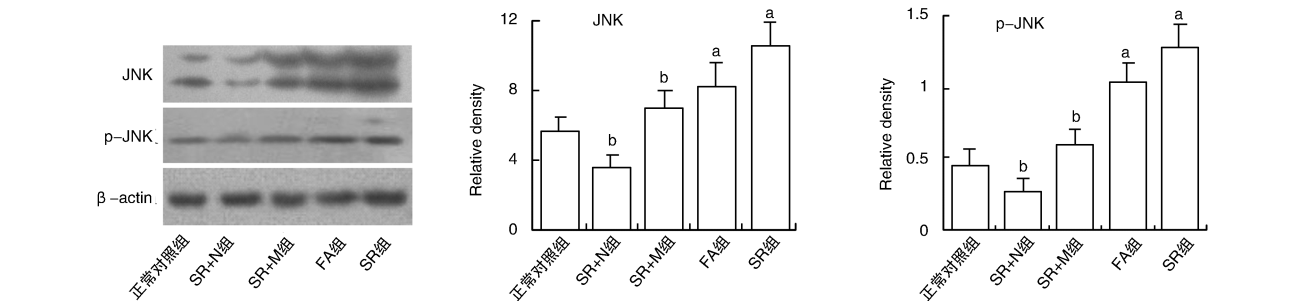


图 1. MLT 和 Neu-P11 对睡眠限制大鼠肌肉组织 JNK 及其磷酸化水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$) a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 SR 组比较。

Figure 1. Effects of MLT or Neu-P11 on the levels of JNK and phosphorylated JNK in muscles of sleep restricted rats($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3 讨 论

众所周知,睡眠紊乱及代谢性疾病的联系密切。基于 MLT 及其受体激动剂 Neu-P11 改善睡眠和参与代谢调节的作用^[1,2,5],本研究观察了 Neu-P11 对睡眠限制大鼠葡萄糖代谢的影响及机制。

采用转笼法强制 SD 大鼠运动以构建大鼠睡眠限制模型。为消除运动带来的影响,实验设立 FA 组使其保持相同的运动且保证有充足的睡眠时间。结果发现,8 天的睡眠限制后,SD 大鼠空腹血糖、胰岛素水平及 HOMA-IR 升高,而同时接受 Neu-P11 或 MLT 处理的睡眠限制大鼠各指标则接近于正常大鼠,且 FA 组与正常对照组并无明显差异。这一结果提示睡眠限制引起大鼠糖代谢紊乱和胰岛素敏感性降低,而 Neu-P11 或 MLT 能预防睡眠限制所引起这一效应。

本研究还证实睡眠限制大鼠存在着氧化防御系统的异常,表现为血浆 MDA 水平升高,氧自由基的有效清除剂 SOD、GSH-Px 活性降低;而 MLT 或

Neu-P11 处理的睡眠限制大鼠血浆 MDA 下降, SOD、GSH-Px 活性增高。表明 MLT 或 Neu-P11 可以明显减轻该模型大鼠的氧化代谢损伤而增强其抗氧化能力。基于氧化抗氧化系统与胰岛素抵抗的关系,作者认为,Neu-P11 和 MLT 提高睡眠限制大鼠的葡萄糖耐量、改善胰岛素抵抗的影响可能与抗氧化应激能力的改善有关。

Houstis 等^[6]采用地塞米松和 TNF- α 诱导建立胰岛素抵抗细胞,其反应活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平增加、应激相关蛋白 JNK 磷酸化增强,而抗氧化剂则可降低 ROS 水平、抑制 JNK 的表达及磷酸化活化、改善胰岛素抵抗。体外培养胰岛细胞,磷酸化 JNK 随着培养液中 H₂O₂ 水平增加而升高,提示氧化应激激活了 JNK 途径^[7]。这些研究结果提示氧化应激可能通过 JNK 影响胰岛素的作用。研究表明,胰岛素受体底物 1(insulin receptor substrate,IRS-1) Ser307 是 JNK 主要作用位点,JNK 通过磷酸化该丝氨酸残基使 IRS-1 信号传导受阻,从而引起胰岛素抵抗^[8,9],因此 JNK 通路是治疗糖

尿病和胰岛素抵抗的新靶点^[10]。在睡眠限制大鼠肌肉组织中,不管是磷酸化还是非磷酸化 JNK 的表达均明显升高,与正常对照组和 Neu-P11 或 MLT 处理后比较具有显著差异。提示慢性睡眠限制作为强烈刺激诱导 SD 大鼠表达应激相关蛋白 JNK,同时有效激活 JNK,而 Neu-P11 和 MLT 则通过下调 JNK 的表达和磷酸化活化而改善了睡眠限制所引起的胰岛素抵抗状态。

综上,我们认为 MLT 受体激动剂 Neu-P11 能改善睡眠限制所引起的氧化应激、下调 JNK 的表达和磷酸化活化,从而稳定睡眠限制大鼠的葡萄糖稳态、改善睡眠限制引起的胰岛素抵抗状态。

[参考文献]

[1] Agil A, Rosado I, Ruiz R, et al. Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats[J]. J Pineal Res, 2012, 52 (2): 203-210.

[2] Tian S, Laudon M. Neu-P11, a novel enhancing melatonin agonist: antidepressant effects in the learned helplessness model in rats [J]. Sleep, 2008, 31 (APSS Abstract Supp): A35.

[3] Donga E, van Dijk M, van Dijk JG, et al. A single night of partial sleep deprivation induces insulin resistance in multiple metabolic pathways in healthy subjects[J]. J Clin

Endocrinol Metab, 2010, 95 (6): 2 963-968.

[4] Stamatakis KA, Punjabi NM. Effects of sleep fragmentation on glucose metabolism in normal subjects [J]. Chest, 2010, 137 (1): 95-101.

[5] She M, Deng X, Guo Z, et al. NEU-P11, a novel melatonin agonist, inhibits weight gain and improves insulin sensitivity in high-fat/high-sucrose-fed rats [J]. Pharmacol Res, 2009, 59 (4): 248-253.

[6] Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance [J]. Nature, 2006, 440 (7086): 944-948.

[7] Kaneto H, Xu G, Fujii N, et al. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression[J]. Biol Chem, 2002, 277 (33): 30 010-018.

[8] 王 方, 孟 雁. 氧化应激与 2 型糖尿病[J]. 基础医学与临床, 2008, 28 (8): 886-889.

[9] Wei Y, Pagliassotti MJ. Hepatospecific effects of fructose on c-jun NH₂-terminal kinase: implications for hepatic insulin resistance [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004, 287 (5): E 926-933.

[10] 林春喜, 林建聪, 郭润民. 硫化氢通过调控 JNK 通路对抗高糖诱导的心肌细胞氧化应激损伤[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (1): 1-5.

(此文编辑 文玉珊)