

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00018

NF-κB 诱捕分子在 2 型糖尿病患者脂肪组织胰岛素抵抗中的作用

黄朝莉¹, 钟 玲^{2*}

1. 四川成都铁路中心医院肾内科, 成都 610081

2. 重庆医科大学附属第二医院内科, 重庆 400010

[摘要] **目的** 探讨 2 型糖尿病(T₂DM)患者脂肪细胞内异常胰岛素信号转导与核因子(NF)-κB 活化的关系;研究 NF-κB 靶向诱捕分子(NF-κB decoy)在体外对胰岛素抵抗的作用。**方法** 取 T₂DM 患者及非糖尿病患者腹部皮下脂肪组织进行原代培养,用免疫沉淀法及蛋白质印迹法检测两组脂肪细胞内胰岛素刺激后胰岛素信号转导分子胰岛素受体底物(IRS)-1酪氨酸磷酸化及 Akt-Ser473 磷酸化程度,用电泳迁移率变动分析(EMSA)测定两组脂肪细胞内 NF-κB 的活性;脂质体瞬时转染法将 NF-κB decoy 分子转入 T₂DM 患者脂肪细胞内,再检测转染后上述胰岛素信号分子及 NF-κB 的活性。**结果** T₂DM 患者脂肪细胞内 IRS-1 酪氨酸磷酸化及 Akt-Ser473 磷酸化水平明显低于非糖尿病患者($P < 0.05$),NF-κB 的活性明显高于非糖尿病患者($P < 0.01$);转染 NF-κB decoy 分子后 T₂DM 患者脂肪细胞内 NF-κB 的活性较转染前明显降低($P < 0.05$),IRS-1 酪氨酸磷酸化及 Akt-Ser473 磷酸化水平较转染前有明显升高($P < 0.05$)。**结论** T₂DM 患者的腹部皮下脂肪细胞存在胰岛素抵抗(IR)和 NF-κB 过度活化;NF-κB 靶向诱捕分子体外能部分逆转胰岛素抵抗作用。

[关键词] 2 型糖尿病;NF-κB;诱捕分子;脂肪组织;胰岛素抵抗

[中图分类号] R 587.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2010)01-0018-06

Inhibitory effect of NF-κB decoy on insulin resistance in adipocytes of patients with type 2 diabetes mellitus

HUANG Chao-li¹, ZHONG Ling^{2*}

1. Department of Nephrology, Central Hospital of Chengdu Railway Administration, Chengdu 610081, Sichuan, China

2. Department of Internal Medicine, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship of abnormal insulin signal transduction with NF-κB activation in the adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus(T₂DM), and to study the effect of NF-κB decoy on insulin resistance *in vitro*. **Methods** Decoy targeting NF-κB was designed and synthesized. Adipocytes from abdominal subcutaneous adipose tissues were obtained from T₂DM patients and non-diabetic patients. The phosphorylation of insulin signal transduction molecules IRS-1 tyrosine and Akt-Ser473 of adipocytes were examined by immunoprecipitation and Western blotting analysis after stimulation with insulin. The activity of NF-κB in the adipocytes was analyzed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The NF-κB decoy was transfected into the adipocytes of T₂DM patients *via* liposome. **Results** The phosphorylation levels of insulin signal transduction molecule IRS-1 tyrosine and Akt-Ser473 in adipocytes T₂DM patients were significantly less than that in adipocytes from non-diabetes mellitus controls($P < 0.05$). The activity of NF-κB in adipocytes of T₂DM patients was significantly higher than that in the controls($P < 0.01$). After transfection of NF-κB decoy, the activity of NF-κB was decreased compared with that before transfection($P < 0.05$), and the phosphorylation levels of IRS-1 tyrosine and Akt-Ser473 in adipocytes of T₂DM patients were significantly increased compared with those before transfection($P < 0.05$). **Conclusion** Insulin resistance and excessive activation of NF-κB exist in the adipocytes of patients with T₂DM; NF-κB decoy can partly ameliorate insulin resistance.

[Key words] type 2 diabetes mellitus; NF-κB ;decoy; adipose tissue; insulin resistance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(1):18-23]

胰岛素抵抗和 B 细胞分泌缺陷是 2 型糖尿病(T₂DM)发病机制的两个主要环节。涉及胰岛素抵抗的机制有很多,近 10 年来,针对大量人群的研究

将胰岛素抵抗与全身炎症联系起来^[1-2]。炎症介质通过不同途径激活一些 Ser/Thr 蛋白激酶,妨碍正常的酪氨酸磷酸化过程,从而影响胰岛素信号转导

[收稿日期] 2009-04-16 **[接受日期]** 2009-09-02

[基金项目] 重庆市卫生局科研基金(04-2-080). Supported by a Grant from Chongqing Municipal Health Bureau(04-2-080).

[作者简介] 黄朝莉,硕士. E-mail:huangchaoli_2001@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:023-63693080, E-mail:lzhi92@sina.com.cn

通路^[3-4]。核因子(NF)- κ B 作为调控炎症的重要核转录因子在体内各组织细胞中广泛存在,参与转录调控多种细胞因子、炎性介质、酶、黏附分子等基因的表达。而近年来的研究显示诱捕寡核苷酸可以抑制 NF- κ B 的活性^[5]。

本研究通过对 T₂DM 患者腹部皮下脂肪细胞内胰岛素受体后信号转导分子胰岛素受体底物(IRS)-1、Akt 磷酸化水平及 NF- κ B 的 DNA 结合活性的观察,拟了解脂肪细胞内胰岛素信号转导的异常与炎症状态;并在此基础上,合成NF- κ B 靶向诱捕分子,用阳离子脂质体将其导入患者脂肪细胞,通过电泳迁移率变动分析(EMSA)研究其对 NF- κ B 的抑制作用及对胰岛素抵抗的逆转,为胰岛素抵抗的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选择重庆医科大学附属第二医院行胆囊切除术的 T₂DM 患者及非糖尿病患者各 10 例,均签署知情同意书。糖尿病患者女性 6 例、男性 4 例,年龄(45±6.8)岁,收缩压(116±15) mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)、舒张压(75±13) mmHg,BMI(24.56±3.62) kg/m²,空腹血糖(8.8±2.44) mmol/L,HbA1c(7.8±0.88)%,糖尿病病程(8.64±3.25)年。非糖尿病患者女性 5 例、男性 5 例,年龄(46±3.8)岁,收缩压(112±18) mmHg、舒张压(73±12) mmHg,BMI(21.43±3.58) kg/m²,空腹血糖(4.2±0.85) mmol/L,HbA1c(4.9±0.82)%,无活动性肝病、心肌损害、肾脏病、感染性疾病、肿瘤,无冠心病、脑血管意外等动脉硬化性疾病史。所有患者取腹部皮下脂肪组织约 5 g。

1.2 主要试剂 牛血清白蛋白购自 Roche 公司,II 型胶原酶、氯化可的松、胰岛素、转铁蛋白、生物素、泛酸盐、三碘甲状腺原氨酸、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤均系 Sigma 公司产品,抗 IRS-1、抗磷酸化酪氨酸抗体、抗磷酸化 Akt(Ser473)抗体购自 Cell Signaling 公司,ECL 化学发光试剂盒购自 Santa Cruz 公司,脂质体 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司,NF- κ B 探针由 Invitrogen 公司合成及生物素标记。

1.3 方法

1.3.1 人腹部皮下前脂肪细胞的分离和培养^[3]

无菌条件下取人腹部皮下脂肪组织,剪碎,消化,过滤,600×g 离心 10 min,收集细胞用 DMEM/F12 培养液调至 2×10⁴/cm² 密度,接种于 50 ml 培养瓶中,至长满 80%后常规传代,实验所用细胞为 3~4 代内。

1.3.2 人腹部皮下前脂肪细胞的分化及鉴定 取生长状况良好的前脂肪细胞,接种于 6 孔板内。加入无血清诱导培养液,培养至 16 d,弃去培养液,漂洗,10%甲醛固定,60%异丙醇漂洗,油红 O 染色。

1.3.3 蛋白质印迹法检测 Akt-Ser473 磷酸化

(1)体外培养的脂肪细胞蛋白质的提取:取分化成功的脂肪细胞,用胰岛素刺激,洗涤细胞,加入 RIPA 及 PMSF,刮下细胞,冰上孵育,旋涡振荡 4℃ 离心,上清移至 EP 管内,考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒测定各组样本蛋白质浓度,分装置于 -80℃ 冰箱保存。(2)取蛋白样品 40 μg 进行 SDS-PAGE,转膜,5%脱脂奶封闭 2 h,加入鼠抗人磷酸化 Akt(Ser473)抗体孵育,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗孵育 2 h,TBST 缓冲液洗涤 3 次,加入 ECL 化学发光试剂,曝光,成像。Quantity one 分析软件测定各条带光密度值,结果用目的条带的光密度值/β-actin 条带的光密度值表示,实验重复 2 次。

1.3.4 免疫沉淀法检测 IRS-1 酪氨酸磷酸化程度

(1)脂肪细胞蛋白的提取及浓度测定方法同前。(2)PBS 洗涤 A 蛋白-Sepharose 珠,按每 50 μl A 蛋白-Sepharose 珠中加入 10 μl IRS-1 抗体,4℃ 孵育,离心,PBS 洗涤,加 50 μl PBS 制成 A 蛋白-Sepharose 珠-IRS-1 抗体复合物。取按上述方法获得的蛋白样品 100 μg,加入 50 μl A 蛋白-Sepharose 珠-IRS-1 抗体复合物,4℃ 轻摇 2 h,PBS 洗涤,加入 50 μl 1×SDS 凝胶上样缓冲液,100℃ 变性,离心,蛋白上清储于 -20℃ 备用。上清液按前述方法电泳、转膜、封闭,加鼠抗人磷酸化酪氨酸抗体,洗膜,加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗,曝光,成像,分析方法均同上,实验重复 2 次。

1.3.5 EMSA 检测 NF- κ B 的 DNA 结合活性

(1)脂肪细胞核蛋白的提取:收集细胞,加 400 μl 预冷的核蛋白提取 A 液,超声粉碎,冰浴,加入 10%NP-40 33 μl 剧烈振荡,离心,加 50 μl 预冷核蛋白提取 B 液重悬沉淀,4℃ 剧烈振荡,离心,上清为核蛋白,分装冻存于 -80℃ 待用。(2)DNA 结合反应体系:核蛋白提取物 2 μl,加入 1 μl 生物素标记的 NF- κ B 寡核苷酸探针,探针序列为:5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3',2 μl 5×结合缓冲液,用去离子水定容至 10 μl,取标记好的 5 根 EP 管,实验分 5 组。在室温下反应 30 min,加入 1 μl 10×上样缓冲液,上样至 6.5%非变性 PAGE、转膜,使膜上条带发光,并曝光至胶片,观察结果,实验重复 2 次。

1.3.6 NF- κ B decoy 及 decoy 对照的合成 NF- κ B decoy 的序列为:5'-CCT TGA AGG GAT TTC CCT CC-3',3'-GGA ACT TCC CTA AAG GGA

GG-5'; decoy 对照: 5'-TTG CCG TAC CTG ACT TAG CC-3', 3'-AAC GGC ATG GAC TGA ATC GG-5', 经过全硫代磷酸化修饰, 部分在 5'端作荧光 FITC 标记, 由 Invitrogen 公司合成。

1.3.7 NF-κB decoy 的转染 转染按脂质体 2000 转染说明书进行。先将 4.0 μg DNA 与 10 μl 脂质体分别溶于 250 μl OPTI-MEM 中, 两者混合。弃去 6 孔板中的旧培养液, 用无血清培养液清洗, 加入 2 ml 无血清培养液。逐滴加入 500 μl 脂质体/DNA 混合物到每孔中, 轻轻混匀, 在 37℃、5%CO₂ 孵箱中孵育 4 h 后更换培养液, 24 h 后在荧光显微镜下观察转染效果。未做荧光标记的 DNA 转染后 24 h 进行以下实验。

1.3.8 T₂DM 患者脂肪细胞转染后 Akt-Ser473 磷酸化及 IRS-1 酪氨酸磷酸化程度的检测 方法同 1.3.3 与 1.3.4, 实验重复 2 次。

1.3.9 T₂DM 患者脂肪细胞转染后 NF-κB 的 DNA 结合活性的检测 方法同 1.3.5, 实验重复 2 次。

1.4 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, 所有数据统计分析应用 SAS 统计软件完成。

2 结果

2.1 脂肪细胞的鉴定 生长状况良好的 3~4 代人腹部皮下前脂肪细胞, 经诱导分化后, 进行油红 O 染色, 可见被油红 O 染为红色的脂滴(图 1)。

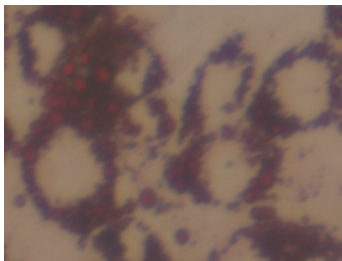


图 1 人腹部皮下前脂肪细胞诱导成熟后细胞内脂肪颗粒油红 O 染色
Fig 1 Oil red staining of fat droplets in mature preadipocytes
Original magnification: ×200

2.2 IRS-1 酪氨酸磷酸化及 Akt-Ser473 磷酸化水平 T₂DM 组脂肪细胞经胰岛素刺激后, IRS-1 酪氨酸磷酸化水平 (43.17 ± 14.23) 及 Akt-Ser473 磷酸化水平 (0.50 ± 0.09) 均明显低于非糖尿病对照组 ($346.83 \pm 13.93, 1.40 \pm 0.26$), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。

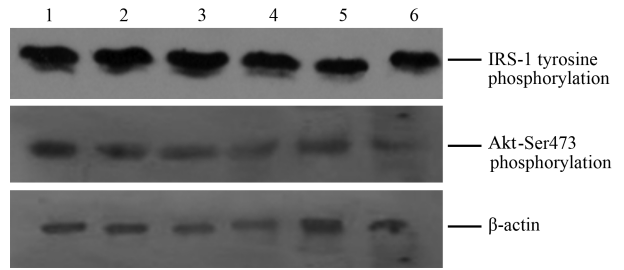


图 2 两组患者腹部皮下脂肪细胞内 IRS-1 酪氨酸磷酸化与 Akt-Ser473 磷酸化水平
Fig 2 IRS-1 tyrosine phosphorylation and Akt-ser473 phosphorylation level in adipocytes of two groups
1-3: Non-DM group; 4-6: T₂DM group

2.3 两组患者腹部皮下脂肪细胞内 NF-κB 的 DNA 结合活性的比较 结果见图 3, T₂DM 组 NF-κB 的 DNA 结合活性为 119.12 ± 8.68 , 明显高于非糖尿病组的 44.67 ± 3.16 , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

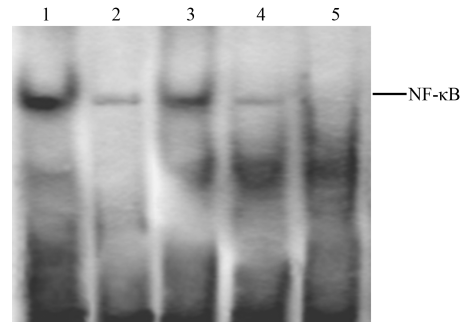


图 3 两组患者腹部皮下脂肪细胞内 NF-κB 的 DNA 结合活性
Fig 3 NF-κB DNA binding activity in adipocytes of two groups
1: T₂DM + labeled probes; 2: T₂DM + competitive probes; 3: Non-DM + labeled probes; 4: Non-DM + competitive probes; 5: Negative control group(only with labeled probes)

2.4 转染效果的观察 用脂质体瞬时转染法将 FITC 标记的双链 decoy 分子转染入细胞后 24 h, 在荧光显微镜下观察 decoy 分子已进入细胞核(图 4), 表明用脂质体瞬时转染法能成功地将 decoy 分子转染入脂肪细胞。

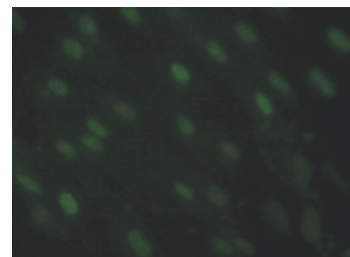


图 4 转染后脂肪细胞荧光图
Fig 4 Adipocytes after transfection of NF-κB decoy
Original magnification: ×200

2.5 转染后脂肪细胞内胰岛素刺激后 IRS-1 酪氨酸磷酸化及 Akt-Ser473 磷酸化水平比较 结果见表 1、图 5。T₂DM 患者脂肪细胞+脂质体+NF-κB decoy 组脂肪细胞内胰岛素刺激后 IRS-1 酪氨酸磷酸化及 Akt-Ser473 磷酸化水平明显高于 T₂DM 患

者脂肪细胞对照组 ($P < 0.05$)。T₂DM 患者脂肪细胞+脂质体组及 T₂DM 患者脂肪细胞+脂质体+decoy 对照组脂肪细胞内胰岛素刺激后 IRS-1 酪氨酸磷酸化及 Akt-Ser473 磷酸化水平较 T₂DM 患者对照组差异无统计学意义。

表 1 各组脂肪细胞内 IRS-1 及 Akt-Ser473 磷酸化水平

Tab 1 IRS-1 tyrosine and Akt-Ser473 phosphorylation levels in adipocytes of four groups

($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Group	IRS-1 tyrosine phosphorylation	Akt-Ser473 phosphorylation	NF-κB DNA binding activity
T ₂ DM	210.67 ± 8.55	0.380 ± 0.019	44.68 ± 2.71
T ₂ DM+lipofectamine	208.83 ± 13.29	0.377 ± 0.016	43.68 ± 2.59
T ₂ DM+lipofectamine+decoy control	204.67 ± 8.55	0.373 ± 0.015	44.58 ± 2.25
T ₂ DM+lipofectamine+NF-κB decoy	320.83 ± 9.37*	0.576 ± 0.304*	24.50 ± 1.34*

* $P < 0.05$ vs T₂DM group

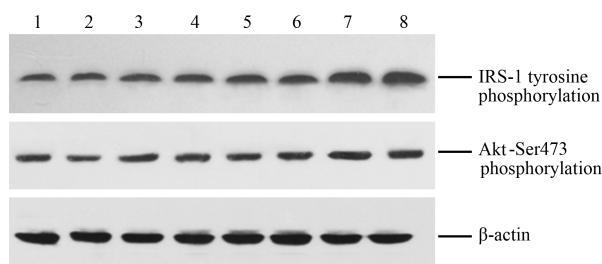


图 5 各组脂肪细胞内胰岛素刺激后 Akt-Ser473 磷酸化水平

Fig 5 Akt-Ser473 phosphorylation level in adipocytes with insulin stimulation

1-2: T₂DM group; 3-4: T₂DM + lipofectamine; 5-6: T₂DM + lipofectamine+decoy control; 7-8: T₂DM+lipofectamine+NF-κB decoy

2.6 转染后各组脂肪细胞内 NF-κB 的 DNA 结合活性的比较 结果见表 1、图 6。T₂DM 患者脂肪细胞+脂质体+NF-κB decoy 组脂肪细胞内 NF-κB 的 DNA 结合活性明显低于 T₂DM 患者脂肪细胞对照组,也低于 T₂DM 患者脂肪细胞+脂质体组及 T₂DM 患者脂肪细胞+脂质体+decoy 对照组 ($P < 0.05$),其余 3 组间差异无统计学意义。

3 讨论

胰岛素抵抗是 T₂DM 的主要特征之一。现有的资料表明^[6],胰岛素调节血糖主要通过 IR/IRS-1/PI3K/PDK1/Akt/GLUT4 信号通路,当这些信号通路中一个或多个信号分子或环节发生异常时,均可导致胰岛素抵抗,从而导致糖尿病的发生^[7-8]。其中 IRS-1 是胰岛素受体酪氨酸激酶的一个主要底物。IRS-1 与胰岛素受体的 β 亚单位结合,在受体酪氨酸激酶作用下,IRS-1 的酪氨酸磷酸化,分子构型改变,出现多个能与 Src 同源区 2 (Src homology 2,

SH2)结合的位点。因此当 IRS-1 活性降低,可直接降低胰岛素的信号转导,导致胰岛素抵抗的发生^[9]。

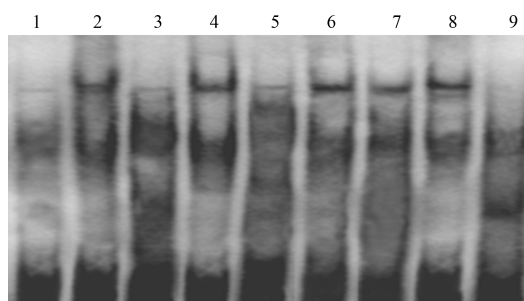


图 6 各组脂肪细胞内 NF-κB 的 DNA 结合活性

Fig 6 NF-κB DNA binding activity in adipocytes of each group

1: T₂DM + lipofectamine + NF-κB decoy + competitive probes; 2: T₂DM+lipofectamine+NF-κB decoy+labeled probes; 3: T₂DM+lipofectamine+decoy control+competitive probes; 4: T₂DM+lipofectamine+decoy control+labeled probes; 5: T₂DM+lipofectamine+competitive probes; 6: T₂DM+lipofectamine+labeled probes; 7: T₂DM control group+competitive probes; 8: T₂DM control group+labeled probes; 9: Negative control group(only with labeled probes)

磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 途径是胰岛素作用主要的信号转导途径之一,作为 PI3K 下游激酶的 Akt 是这一途径中重要的丝氨酸/苏氨酸激酶,可使磷脂果糖激酶-2 活化,糖酵解增强;使糖原合成激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3) 失活,糖原合成增加;活化的 Akt 还可导致葡萄糖转运体 4 (GLUT4) 的合成、分泌、移位等发生变化;因此 Akt 活性的降低在糖尿病的发生、发展中起重要作用^[10]。

有关胰岛素抵抗的机制有很多,已有的研究显示与免疫炎症明显有关。炎症因子可活化胰岛素信

号转导途径中的丝氨酸激酶,导致 PI3K 通路中胰岛素底物(IRS)和 PI3K 亚单位中丝/苏氨酸残基磷酸化,阻碍胰岛素刺激下的 IRS 与 PI3K 的蛋白酪氨酸磷酸化,使胰岛素信号转导受阻,导致胰岛素抵抗^[11-12]。NF- κ B 可高效诱导多种细胞因子、黏附分子和急性期反应蛋白的表达,同时这些靶基因又进一步活化 NF- κ B,并形成反馈调节,使炎症不断放大。阻断 NF- κ B 的活性理论上优于单独阻断每一个不同的炎性介质。因此阻断 NF- κ B 与其靶基因的结合可能是逆转胰岛素抵抗的方法之一。

诱捕策略是在信号转导的终点对基因的表达进行干预,与其他的基因治疗策略相比较,诱捕策略具有高效、特异的特点,并且诱捕分子易于设计合成、无须表达即可发挥拮抗作用。

我们通过对糖尿病患者脂肪组织的 IRS-1 与 Akt 磷酸化水平及 NF- κ B 的 DNA 结合活性的研究发现,在 T₂DM 患者的脂肪组织中 IRS-1 与 Akt 磷酸化水平较非糖尿病组都明显降低($P < 0.05$),表明 T₂DM 患者脂肪细胞存在多环节的胰岛素信号通路的异常,这些异常的信号通路导致胰岛素作用的降低、胰岛素抵抗的发生。同样在 T₂DM 患者的脂肪组织中 NF- κ B 的 DNA 结合活性较非糖尿病组明显增高($P < 0.01$),表明 T₂DM 患者的脂肪组织中转录因子 NF- κ B 处于不适当激活状态,激活的 NF- κ B 能启动与免疫和炎症有关的基因,这些基因的转录,在炎症和自身免疫反应中起重要作用^[13],诱发和加重脂肪组织内的微炎症。炎症因子即作为新的 NF- κ B 激活剂,进一步使 NF- κ B 持续活化又诱导相应基因持续转录,引起低度炎症反应的放大及恶性循环^[14-15]。

为了解胰岛素抵抗是否可能与 NF- κ B 这一在许多慢性炎症疾病中起主要调控作用的因子有关,我们通过脂质体将与顺式元件相一致的双链寡聚脱氧核苷酸 NF- κ B decoy 转染入 T₂DM 患者脂肪细胞内,EMSA 结果发现转染后 NF- κ B 与 DNA 结合活性明显较转染前降低($P < 0.05$),表明 NF- κ B decoy 能够竞争性抑制转录因子与 DNA 顺式元件的结合,干扰转录因子的 DNA 结合及下游基因的表达,同时通过对转染后 T₂DM 患者脂肪细胞内胰岛素刺激后 IRS-1 酪氨酸磷酸化及 Akt-Ser473 磷酸化水平的观察,发现转染后 T₂DM 患者脂肪细胞内胰岛素刺激后 IRS-1 酪氨酸磷酸化及 Akt-Ser473 磷酸化水平较转染前明显增高($P < 0.05$),胰岛素抵抗程度明显减轻,这提示 NF- κ B 确实可以影响胰岛素信号途径,利用 NF- κ B decoy 抑制 NF- κ B 活性的方法能减轻胰岛素抵抗程度。

总之,本研究结果显示 T₂DM 患者脂肪细胞内存在 NF- κ B 过度活化,抑制 NF- κ B 的过度活化可以部分逆转胰岛素抵抗,从而为治疗胰岛素抵抗提供一定的理论基础。

[参考文献]

- [1] Wei Y, Chen K, Whaley-Connell A T, Stump C S, Ibdah J A, Sowers J R. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 294: R673-R680.
- [2] Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard J P. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity[J]. *Diabetes Metab*, 2008, 34: 2-11.
- [3] Jaeschke A, Czech M P, Davis R J. An essential role of the JIP1 scaffold protein for JNK activation in adipose tissue[J]. *Genes Dev*, 2004, 18: 1976-1980.
- [4] Csehi S B, Mathieu S, Seifert U, Lange A, Zweyer M, Wernig A, et al. Tumor necrosis factor (TNF) interferes with insulin signaling through the p55 TNF receptor death domain[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329: 397-405.
- [5] Crinelli R, Bianchi M, Gentilini L, Palma L, Sorensen M D, Bryld T, et al. Transcription factor decoy oligonucleotides modified with locked nucleic acids: an *in vitro* study to reconcile biostability with binding affinity[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 1874-1885.
- [6] Shao J, Yamashita H, Qiao L, Friedman J E. Decreased Akt kinase activity and insulin resistance in C57BL/KsJ-Lepr^{db/db} mice[J]. *J Endocrinol*, 2000, 167: 107-115.
- [7] Karlsson M, Thorn H, Parpal S, Strålfors P, Gustavsson J. Insulin induces translocation of glucose transporter GLUT4 to plasma membrane caveolae in adipocytes[J]. *FASEB J*, 2002, 16: 249-251.
- [8] Pagliassotti M J, Kang J, Thresher J S, Sung C K, Bizeau M E. Elevated basal PI 3-kinase activity and reduced insulin signaling in sucrose-induced hepatic insulin resistance[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282: E170-E176.
- [9] Takano A, Haruta T, Iwata M, Usui I, Uno T, Kawahara J, et al. Growth hormone induces cellular insulin resistance by uncoupling phosphatidylinositol 3-kinase and its downstream signals in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Diabetes*, 2001, 50: 1891-1900.
- [10] Lizcano J M, Alessi D R. The insulin signaling pathway[J]. *Curr Biol*, 2002, 12: R236-R238.
- [11] Ueki K, Kondo T, Kahn C R. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 5434-5446.
- [12] Aguirre V, Werner E D, Giraud J, Lee Y H, Shoelson S E, White M F. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 1531-1537.
- [13] Tak P P, Firestein G S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107: 7-11.

- [14] AI-Rasheed N M, Willars G B, Brunskill N J. C-peptide signals via Galpha i to protect against TNF-alpha-mediated apoptosis of opossum kidney proximal tubular cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17: 986-995.
- [15] Rahman I, Gilmour P S, Jimenez L A, MacNee W. Oxidative stress and TNF-alpha induce histone acetylation and NF-kap-

paB/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation[J]. Mol Cell Biochem, 2002, 234-235: 239-248.

[本文编辑] 商素芳, 邓晓群