

# iNOS/IRS1/AKT/GSK-3 $\beta$ 信号通路 在慢性间歇低氧致胰岛素抵抗中的作用

靳美娜<sup>1</sup>,周雪利<sup>1</sup>,李海波<sup>1</sup>,白 炜<sup>1</sup>,贾楚璇<sup>1</sup>,高 立<sup>1</sup>,任丽珏<sup>2</sup>,陈青宇<sup>3</sup>,王 瑞<sup>4</sup>,李 华<sup>5</sup>,魏翠英<sup>1</sup>  
(包头医学院第一附属医院<sup>1</sup>老年医学科、<sup>2</sup>内分泌科、<sup>3</sup>口腔科,包头 014000;  
<sup>4</sup>包头医学院动物研究室,包头 014000;<sup>5</sup>包头市固阳县人民医院,包头 014200)

**摘要** 目的 对照观察慢性间歇低氧-复氧条件下大鼠肝脏病理改变和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、磷酸化胰岛素受体底物1丝氨酸307(p-IRS1ser 307)、磷酸化蛋白激酶B丝氨酸473(p-AKTser 473)、糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )、糖原合酶(GS)蛋白的表达水平,探讨iNOS/IRS1/AKT/GSK-3 $\beta$ 信号通路在慢性间歇低氧所致胰岛素抵抗中的作用。方法 将40只SD大鼠随机分为对照组(NC组)和实验组(CIH组),每组20只。NC组置于常氧环境12周,CIH组先予间歇低氧8周,随后恢复常氧饲养至第12周。两组均于基线、第8周、第12周分别测定空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)水平,并取肝脏组织进行病理检测和iNOS、p-IRS1ser 307、p-AKTser 473、GSK3 $\beta$ 、GS水平测定,比较组间差异。结果 基线时,两组肝脏病理及各项观察指标间差异无统计学意义;8周时,与NC组比较,CIH组肝脏病理出现肝血窦和肝细胞索排列紊乱、肝细胞水肿、细胞核变小、淋巴细胞浸润增多并可见少量脂肪空泡,FBG、FINS、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、iNOS mRNA、p-IRS1ser 307蛋白、GSK-3 $\beta$ 蛋白水平升高,p-AKTser 473蛋白、GS蛋白水平降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ );12周时,与NC组比较,CIH组未见淋巴细胞浸润,脂肪空泡增多,其它已发生的病理损伤无改善,p-AKTser 473蛋白水平升高,p-IRS1ser 307蛋白与GS蛋白水平降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。Pearson相关分析显示:8周时CIH组HOMA-IR与iNOS mRNA、p-IRS1ser 307蛋白、GSK-3 $\beta$ 蛋白水平正相关( $r = 0.874, 0.817, 0.872$ ;均 $P < 0.05$ ),与p-AKTser473蛋白、GS蛋白水平呈负相关( $r = -0.886, -0.879$ ;均 $P < 0.05$ )。结论 慢性间歇低氧可以导致肝脏病理损害,即使复氧干预也不能逆转,并可能通过上调iNOS mRNA的表达,调控IRS1/AKT/GSK-3 $\beta$ 信号通路,从而介导胰岛素抵抗的发生。

**关键词** 慢性间歇低氧-复氧;胰岛素抵抗;诱导型一氧化氮合酶;IRS1/AKT/GSK-3 $\beta$ 信号通路;SD大鼠;肝脏

**中图分类号** R 587.1

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2025)02-0210-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.004

临床常见阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS)与2型糖尿病(diabetes mellitus type 2, T2DM)两病共患现象,共病患者心脑血管卒中的风险显著增加。OSAHS可能是T2DM发生发展的原因,但相关机制不清<sup>[1]</sup>。胰岛素抵抗(insulin resistant, IR)和慢性间歇低氧(chronic intermittent hypoxia, CIH)分别是T2DM和OSAHS的基本病理生理机制,已知CIH可致IR<sup>[2]</sup>,揭示相关的机制将有助于认识共病并早期防治。诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)参与炎症、感染和T2DM等多种疾

病的发生发展<sup>[3]</sup>。iNOS可能通过影响胰岛素信号通路参与IR的发生,但目前尚无文献报道iNOS在大鼠肝脏CIH中的调控机制,胰岛素受体底物1/蛋白激酶B/糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (insulin receptor substrate 1/protein kinase B/glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , IRS1/AKT/GSK-3 $\beta$ )信号通路是糖代谢的关键信号通路,iNOS在CIH条件下是否会通过调控该通路介导IR未见报道。该研究拟建立OSAHS大鼠模型,模拟人类中重度OSAHS-无创正压通气无创状态,对照观察慢性间歇低氧-复氧条件下,大鼠空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)、iNOS、p-IRS1ser 307、p-AKTser 473、GSK3 $\beta$ 、糖原合酶(glycogen synthase, GS)在肝脏中的表达水平,探讨iNOS/IRS1/AKT/GSK-3 $\beta$ 信号通路在CIH所致IR中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2024-10-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81660020);内蒙古自治区自然科学基金(编号:2023MS08044);内蒙古自治区科技计划项目(编号:2021GG0219)

作者简介:靳美娜,女,硕士研究生;

魏翠英,女,教授,主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: weicuiying9@163.com

**1.1.1 实验动物** 5周龄雄性清洁SD大鼠40只,体质量150~180 g,由中国食品药品检定研究院提供。

**1.1.2 主要试剂与仪器** 大鼠胰岛素酶联免疫吸附测定试剂盒(华美生物工程有限公司);达乐C型血糖仪、血糖试纸(泰安市艾瑞德医疗器械有限公司);抗体、环保型脱蜡液、组织固定液、HE染液套装、SweScript All-in-One RT SuperMixforqPCR(One-Step gDNA Remover)、RNA提取液(武汉赛维尔生物科技有限公司);台式高速离心机、台式高速冷冻型微量离心机、水平摇床(天津市莱玻瑞仪器设备有限公司);BioTekElx×808酶标仪(美国BioTek公司);莱卡正置荧光显微镜(德国Leica公司);间歇低氧氧舱、氮气气瓶减压阀及压力表、轴流风机(包头市九星机电制造有限责任公司);AR2000减压阀、电磁阀(包头市昌昇环保设备制造公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 分组** 将40只SD大鼠随机分为对照组(NC组)和实验组(CIH组),每组20只,置于温度为22~23℃,湿度为42%~45%的适宜环境中,定期隔日更换干锯沫垫料,鼠笼定期消毒,可自由饮食、进水。基线阶段每组随机选取4只处死并取样,每组剩16只大鼠进入间歇低氧阶段。间歇低氧阶段CIH组大鼠置于间歇低氧舱内,每天8:30—16:30,以120 s为周期,循环充入氮气和空气,其余时间常氧环境下自由进食水。NC组置于常氧环境饲养,其余饲养条件相同,持续8周。在每组剩余大鼠随机选取8只处死并取样,其余大鼠进入复氧阶段。复氧阶段CIH组剩8只大鼠进行复氧干预处理,NC组一直处于常氧环境中,持续4周后处死取样。

**1.2.2 OSAHS模型的建立** 间歇低氧舱由上方的操作平台和下方由玻璃和铁皮及橡胶胶条组成的氧舱两部分构成,氧舱舱体下部开关门是封闭式设计,底部安装滑轮。用于充入氮气的塑料导管在左侧底部穿入舱体,固定式气体检测仪、全自动电控系统板面、AR2000减压阀、风机分别安装在舱体的上壁、左侧壁、右侧壁和后壁,用于控制气体切换的电磁阀系统在舱体下壁。以120 s为周期,循环向舱内充入氮气25 s,使氧浓度由21%降至最低氧浓度7%,维持10 s,再充入空气55 s,使氧舱内浓度逐渐恢复至21%后再维持30 s。在间歇低氧舱内部氧浓度达到最低点及恢复至最高点时抽取SD大鼠颈动脉血,行血气分析检测动脉血氧饱和度。

**1.2.3 取材** 分别于基线阶段、第8周、第12周,

大鼠禁食12 h后,3%水合氯醛腹腔麻醉,取内眦静脉血离心后取上清液,取肝脏组织保存于-80℃冰箱。

**1.2.4 生化检测** 内眦静脉法取血于血糖仪试纸上,读数并记录FBG;采用酶联免疫吸附法,应用全自动酶标分析仪检测FINS水平;采用血清稳态模型评估胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR)。

**1.2.5 肝脏组织病理切片制作与HE染色** 取肝脏组织块放入4%多聚甲醛中,6 h后将组织块修剪成3~5 mm<sup>3</sup>大小,分别用不同乙醇梯度进行脱水,再在二甲苯溶液中进行透明后浸蜡、包埋与切片,60℃烘箱内烤片,再依次将切片放入环保型脱蜡液中脱蜡,最后切片入伊红染液中染色,染色后脱水、中性树胶封片,室温下保存。

**1.2.6 RT-PCR法检测iNOS mRNA的表达** 用RNA抽提试剂盒提取肝脏总RNA,经过RNA纯度、完整性鉴定后,将其反转录为cDNA,以GAPDH为内部参照(上游和下游引物分别为5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3'和5'-GGTGAAGAATGGAGTTGCT-3'),iNOS mRNA上游和下游引物分别是5'-GAAAGCGGTGTTCTTTGCTTCT-3'和5'-CTTA-TACTGTTCCATGCAGACAACCT-3',PCR反应参数为:95℃预变性10 min,随后95℃变性15 s,60℃退火、延伸30 s,进行40个循环,实验重复3次,采用2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup>法计算iNOS mRNA的相对表达量。

**1.2.7 Western blot法检测p-IRS1ser 307、p-AKTser 473、GSK-3β、GS蛋白的表达水平** 取大鼠肝脏组织50 mg,冰浴下加入一定比例的裂解液完全裂解,提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,用SDS-PAGE凝胶配制胶槽后SDS-PAGE电泳、转膜,将PVDF膜放入封闭液中,摇床上封闭2 h。封闭后用1×TBST洗PVDF膜3次,置于摇床,每次10 min,洗膜完毕后,按不同的蛋白将一抗加入孵育盒中,4℃条件下摇床孵育过夜。取出孵育的PVDF膜,用1×TBST洗膜后加入二抗,室温条件下摇床孵育60 min。最后进行显影和图片采集,以β-actin作为参照,应用Image J计算各样本条带相应的灰度值及蛋白相对表达量,并记录p-IRS1ser 307、p-AKTser 473、GSK-3β、GS蛋白表达水平。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS 26.0软件、GraphPad Prism 8.0软件进行分析和作图,满足正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,组间和组内比较分别采用独立样本t检验或单因素方差分析,两因素之间的关

系用 Pearson 相关性分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 间歇低氧大鼠模型的构建** 大鼠颈动脉血气分析提示, 氧浓度为 7% 时动脉血氧饱和度为 72.0%; 氧浓度为 21% 时动脉血氧饱和度为 96.4%, 使大鼠发生间歇低氧事件频率为 30 次/h, 模拟人类中重度 OSAHS 事件, 提示 CIH 大鼠模型构建成功。

**2.2 两组大鼠一般状态比较** NC 组大鼠始终精神状态良好, 呼吸平稳、皮毛光亮。CIH 组大鼠, 实验初期进入间歇低氧舱首先出现呼吸急促、烦躁不安, 逐渐出现嗜睡、活动迟缓、口唇及四肢发绀缺氧现象, 间歇低氧 8 周时出现皮毛粗糙、灰暗, 精神萎靡。

### 2.3 两组大鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 水平比较

基线时两组大鼠 FBG、FINS、HOMA-IR 水平差异无统计学意义; 8 周时, CIH 组 FBG、FINS、HOMA-IR 水平高于 NC 组 ( $P < 0.05$ ); 12 周时, 两组 FBG、FINS 和 HOMA-IR 水平差异无统计学意义, 见表 1。

### 2.4 两组大鼠肝组织病理学形态比较

基线状态下, 视野偶见中央静脉内嗜酸性团状物, 可见肝细胞圆润、饱满, 肝细胞界限清楚, 胞膜完整, 胞质丰富, 胞核形态正常, 无炎症改变, 肝板排列整齐, 肝窦无明显扩张或挤压, 与正常肝组织无差异; 8 周时, CIH 组肝血窦和肝细胞索排列紊乱, 肝细胞界限清楚, 胞膜完整, 但肝细胞水肿明显, 胞浆稀疏, 细胞核变小, 染色较深, 可见少许淋巴细胞浸润, 少许脂肪空泡。NC 组只可见肝细胞水肿, 胞浆稀疏; 12 周时, CIH 组肝血窦和肝细胞索排列紊乱, 肝细胞界限清楚, 胞膜完整, 肝细胞水肿明显, 胞浆稀疏, 未见明显淋巴细胞浸润, 可见大量脂肪空泡。NC 组肝细胞水肿, 胞浆稀疏, 可见少量脂肪空泡。见图 1。

### 2.5 两组大鼠各节点 iNOS mRNA 水平比较

基线时两组大鼠 iNOS mRNA 表达水平比较差异无统计学意义; 8 周时 CIH 组 iNOS mRNA 表达水平较

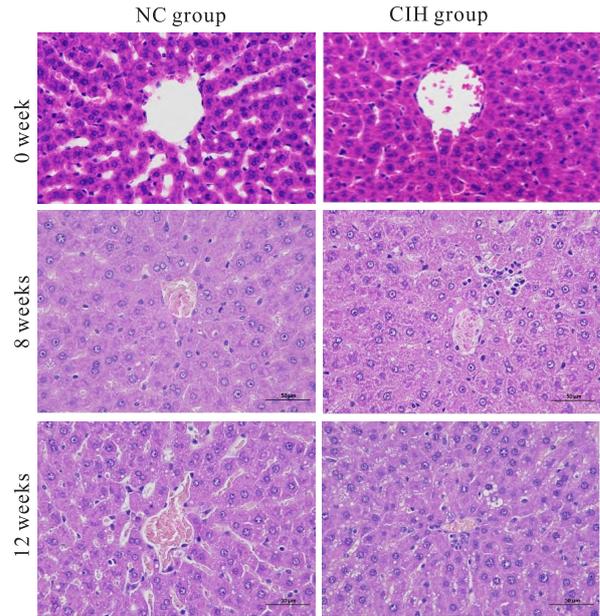


图 1 两组大鼠肝脏病理学形态变化比较 HE × 400

Fig. 1 Comparison of pathological and morphological changes in the liver of two groups of rats HE × 400

NC 组增高 ( $P < 0.01$ ); 12 周时两组 iNOS mRNA 表达水平比较差异无统计学意义。见表 2 和图 2。

### 2.6 HOMA-IR 与 iNOS mRNA 的 Pearson 相关性分析

8 周时, CIH 组 HOMA-IR 与 iNOS mRNA 水平呈正相关 ( $r = 0.874, P < 0.05$ ), NC 组 HOMA-IR 与 iNOS mRNA 水平无相关性; 12 周时, 两组 HOMA-IR 与 iNOS mRNA 水平均无相关性。

### 2.7 两组大鼠肝脏组织 p-IRS1ser 307、p-AKTser 473、GSK-3β 和 GS 蛋白表达水平比较

基线时两组大鼠各蛋白表达水平差异均无统计学意义; 8 周时, CIH 组 p-IRS1ser 307 蛋白、GSK-3β 蛋白表达水平较 NC 组增高 ( $P < 0.001$ ), p-AKTser 473 蛋白、GS 蛋白水平较 NC 组降低 ( $P < 0.01$ ); 12 周时, CIH 组 p-IRS1ser 307 蛋白、GSK-3β 蛋白表达水平较 CIH 8 周时回落 ( $P < 0.001$ ), p-AKTser 473 蛋白、GS 蛋白水平较 CIH 8 周时回升 ( $P < 0.001$ )。见图 3 和表 3。

### 2.8 两组大鼠 p-IRS1ser 307、p-AKTser 473、GSK-

表 1 两组大鼠各时间节点 FBG、FINS 及 HOMA-IR 变化比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of the changes of FBG, FINS and HOMA-IR at each time point between the two groups of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

Time	FBG (mmol/L)		FINS (ng/ml)		HOMA-IR	
	NC group	CIH group	NC group	CIH group	NC group	CIH group
0 week	5.34 ± 0.89	5.54 ± 0.74	1.67 ± 0.44	1.58 ± 0.28	0.40 ± 0.12	0.39 ± 0.08
8 weeks	5.79 ± 0.59	6.89 ± 0.87**	2.07 ± 0.50	3.02 ± 1.10*	0.53 ± 0.13	0.93 ± 0.39**
12 weeks	7.18 ± 1.27	6.81 ± 0.43	1.87 ± 1.14	1.60 ± 0.13	0.64 ± 0.54	0.49 ± 0.05

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs NC group.

表2 两组大鼠各时间节点 iNOS mRNA

相对表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Comparison of relative expression levels of iNOS mRNA at each time node in two groups of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

Time	NC group	CIH group
0 week	0.98 ± 0.11	0.99 ± 0.07
8 weeks	0.83 ± 0.05	1.19 ± 0.15 **
12 weeks	0.84 ± 0.08	0.85 ± 0.08

\*\*  $P < 0.01$  vs 8 weeks NC group.

**3β 蛋白和 GS 表达水平与 HOMA-IR 的 Pearson 相关性分析** 8 周时 CIH 组 HOMA-IR 与 p-IRS1ser 307 蛋白、GSK-3β 蛋白水平呈正相关( $r = 0.817, 0.872; P < 0.05$ ), 与 p-AKTser 473 蛋白、GS 蛋白水平呈负相关( $r = -0.886, -0.879; P < 0.05$ ); NC 组 HOMA-IR 与以上蛋白均无相关性。见表 4 和图 4~7。

### 3 讨论

OSAHS 是以夜间打鼾伴呼吸暂停和日间嗜睡为

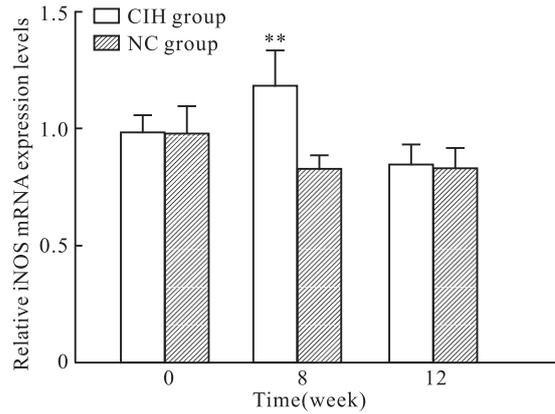


图2 两组大鼠 iNOS mRNA 相对表达水平比较

Fig.2 Comparison of relative iNOS mRNA expression levels in two groups of rats

\*\*  $P < 0.01$  vs 8 weeks NC group.

主要临床表现的慢性睡眠呼吸疾病, CIH 是 OSAHS 主要的病理生理特征<sup>[4]</sup>。T2DM 与 OSAHS 共患现象常见<sup>[5]</sup>, 早期会出现严重的并发症, 深入相关机制研究对提高公众的认识以及疾病的早期防治、新

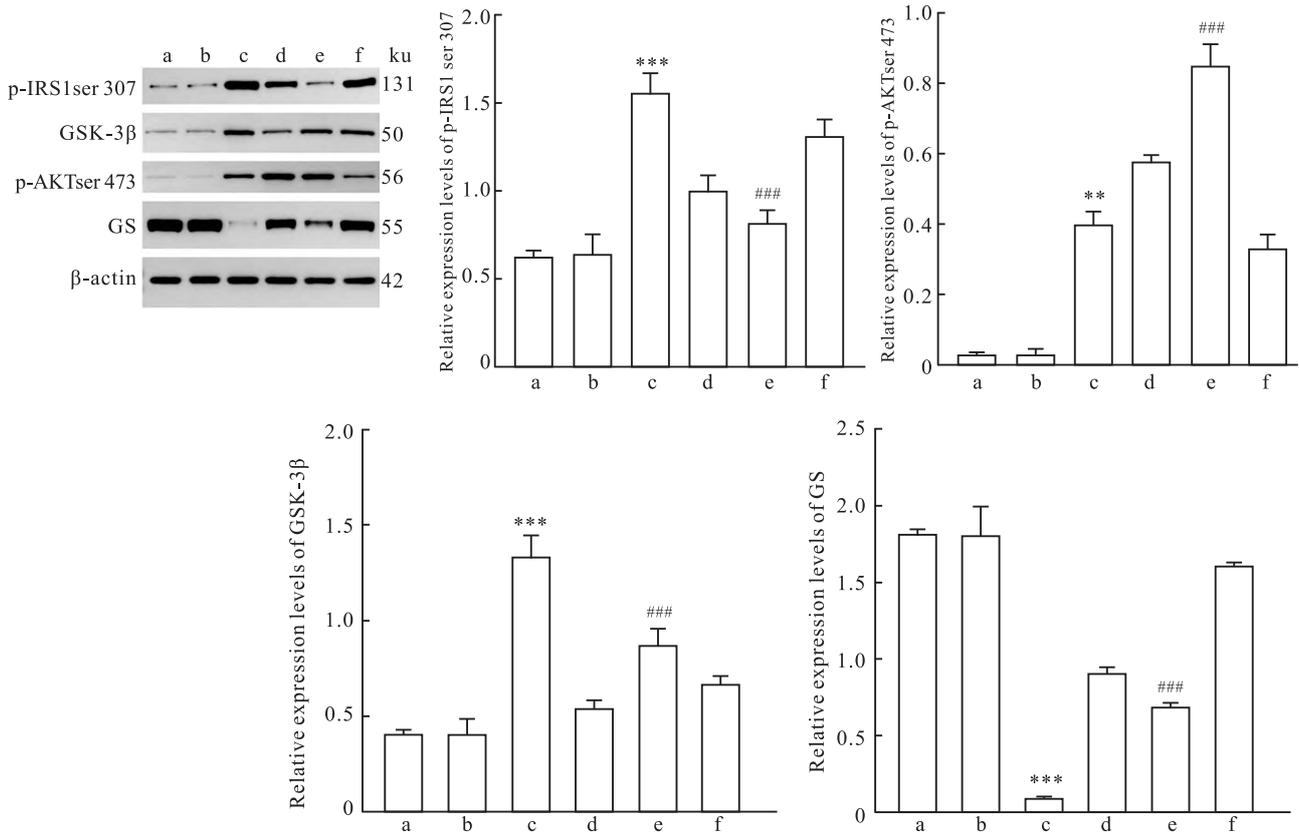


图3 两组大鼠肝脏组织不同时间节点 p-IRS1ser 307、p-AKTser 473、GSK-3β 和 GS 蛋白相对表达水平

Fig.3 Relative expression levels of p-IRS1ser 307, p-AKTser 473, GSK-3β and GS proteins at different time nodes in rat liver tissues of both groups

a: 0 week CIH group; b: 0 week NC group; c: 8 weeks CIH group; d: 8 weeks NC group; e: 12 weeks CIH group; f: 12 weeks NC group;

\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs 8 weeks NC group; ###  $P < 0.001$  vs 8 weeks CIH group.

表3 两组大鼠不同时间节点各蛋白相对表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.3 Comparison of relative expression levels of each protein at different time nodes in two groups of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

Protein	Groups	0 week	8 weeks	12 weeks	F value
p-IRS1ser 307	NC	0.64 ± 0.19	1.00 ± 0.21	1.31 ± 0.23	14.602
	CIH	0.63 ± 0.06	1.56 ± 0.27***	0.82 ± 0.18###	
p-AKTser 473	NC	0.03 ± 0.03	0.58 ± 0.05	0.33 ± 0.10	49.805
	CIH	0.03 ± 0.01	0.40 ± 0.09**	0.85 ± 0.15###	
GSK-3β	NC	0.41 ± 0.14	0.54 ± 0.11	0.67 ± 0.10	19.809
	CIH	0.41 ± 0.03	1.33 ± 0.28***	0.87 ± 0.21###	
GS	NC	1.81 ± 0.32	0.91 ± 0.09	1.61 ± 0.05	199.280
	CIH	1.81 ± 0.05	0.09 ± 0.02***	0.69 ± 0.05###	

\*\*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 vs 8 weeks NC group; ### P < 0.001 vs 8 weeks CIH group.

表4 两组大鼠8周时HOMA-IR与各蛋白Pearson相关性分析结果

Tab.4 Results of Pearson correlation analysis between HOMA-IR and each protein at 8 weeks in two groups of rats

Protein	Groups	Pearson correlation analysis results
p-IRS1ser 307	CIH	positive correlation (r = 0.817)
	NC	irrelevant
p-AKTser 473	CIH	negative correlation (r = -0.886)
	NC	irrelevant
GSK-3β	CIH	positive correlation (r = 0.872)
	NC	irrelevant
GS	CIH	negative correlation (r = -0.879)
	NC	irrelevant

药的研发均有重要意义。

CIH可导致IR的增加<sup>[6]</sup>,本课题组前期研究<sup>[7]</sup>也有同样的结果,而且还发现恢复常氧饲养可使已经升高了的FBG、FINS和HOMA-IR水平逆转,本次研究结果也再次验证CIH可能是糖代谢异常的直接原因之一。

肝脏是对缺氧敏感的组织,也是IR的靶器官,观察CIH对肝脏的病理损害有益于探讨CIH与IR相关的机制。有研究<sup>[8]</sup>显示CIH能够对肝脏造成

病理损伤,但未观察复氧是否能够逆转。本研究观察到CIH对肝脏造成病理损伤与以往文献报道一致,而且首次发现,经复氧4周干预,肝脏病理损伤并不能完全逆转,仍可见肝血窦和肝细胞索排列紊乱,肝细胞水肿,甚至脂肪浸润更加明显。

iNOS是一种炎症因子,其表达增高,可能与肝脏病理损害密切相关,但文献报道尚有分歧。张妍等<sup>[9]</sup>发现代谢综合征大鼠肝脏iNOS活性增高时,肝脏病理出现一定程度损伤,然而,另有研究<sup>[10]</sup>发现小鼠肝脏中特异性高表达iNOS基因可显著减少日本血吸虫感染引起的肝脏虫卵肉芽肿炎症反应和肝纤维化的形成。本研究发现,CIH组大鼠肝脏iNOS表达增加,肝脏病理出现肝血窦肝索排列紊乱,肝细胞水肿等病理损害,与部分文献报道一致<sup>[9]</sup>,但复氧后虽然iNOS表达降至基线水平,而肝脏病理损害未完全逆转,考虑除CIH对大鼠肝组织造成的损害,肝脏本身会随着周龄的增加,出现细胞水肿、脂肪浸润等病理改变<sup>[11]</sup>。

iNOS参与了胰岛素信号通路的调节。一项人体研究<sup>[12]</sup>报道,iNOS水平在新诊断的T2DM患者

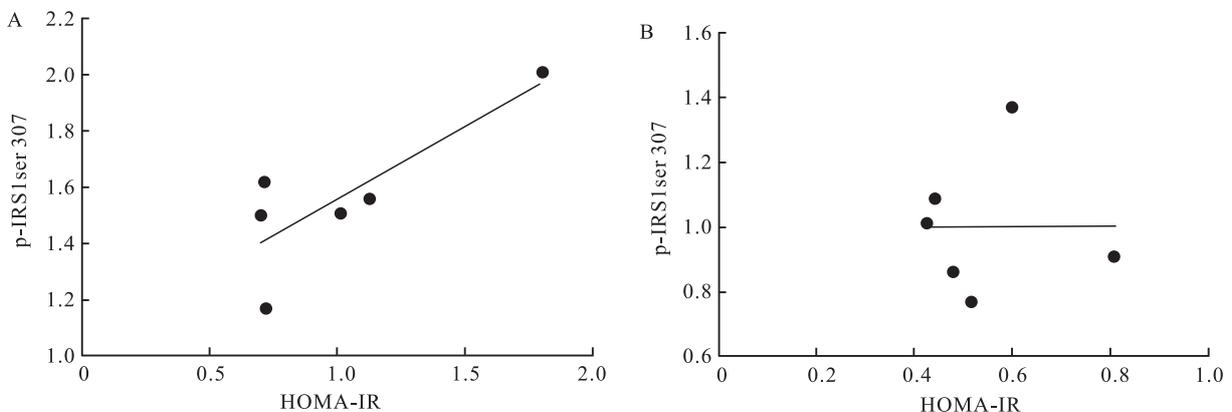


图4 两组大鼠p-IRS1ser 307与HOMA-IR的相关性分析

Fig.4 Correlation analysis of p-IRS1ser 307 with HOMA-IR in two groups of rats

A: CIH group; B: NC group.

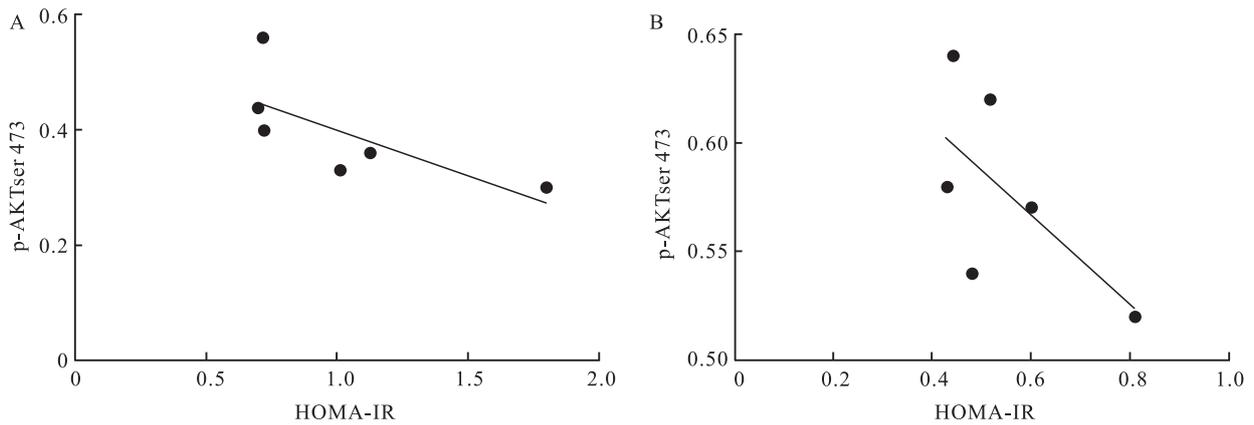


图5 两组大鼠 p-AKTser 473 与 HOMA-IR 的相关性分析  
 Fig. 5 Correlation analysis of p-AKTser 473 with HOMA-IR in two groups of rats  
 A: CIH group; B: NC group.

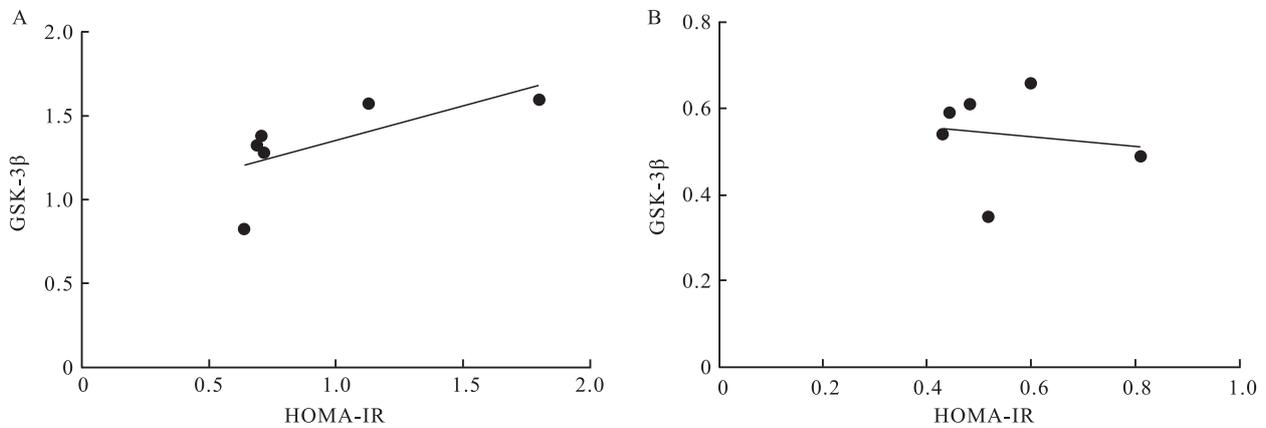


图6 两组大鼠 GSK-3β 与 HOMA-IR 的相关性分析  
 Fig. 6 Correlation analysis of GSK-3β and HOMA-IR in two groups of rats  
 A: CIH group; B: NC group.

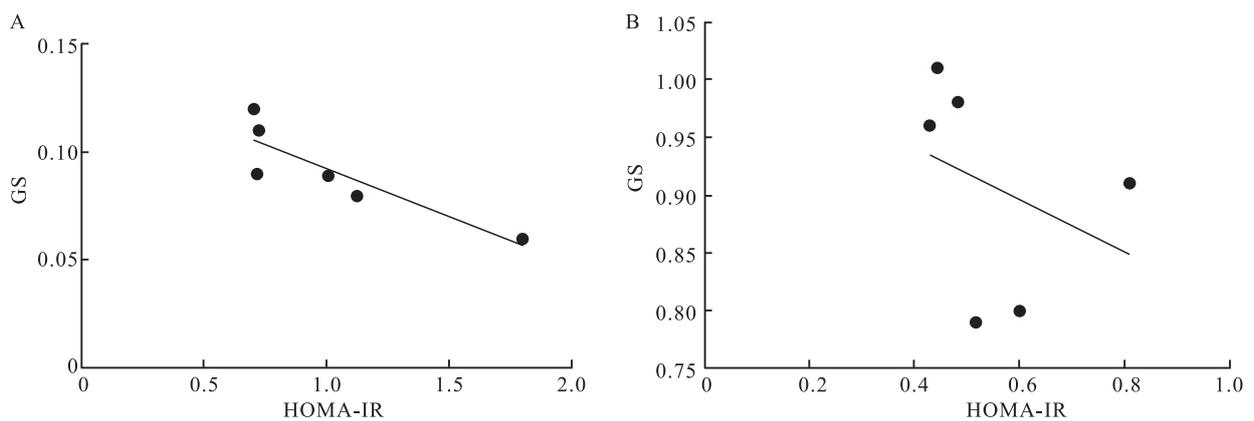


图7 两组大鼠 GS 与 HOMA-IR 的相关性分析  
 Fig. 7 Correlation analysis of GS and HOMA-IR in two groups of rats  
 A: CIH group; B: NC group.

显著高于正常对照组,但经 2 周胰岛素强化治疗后显著降低。另有研究<sup>[13]</sup>提示 iNOS 上调,核因子-κB

和 c-Jun 氨基末端激酶通路激活,能够诱发 IR。李瀚琪等<sup>[14]</sup>研究发现 iNOS 敲除的小鼠骨骼肌 Rab8

蛋白明显高于野生型小鼠,IR 减轻。上述研究均提示,iNOS 可能参与了 IR 的调节。本研究首次发现,CIH 可使大鼠肝脏 iNOS mRNA 表达显著增加,复氧后又回落至基线水平,与 IR 的变化一致,提示 iNOS 可能参与了 CIH 所致 IR 的调节。

肝脏 IRS1/AKT/GSK-3 $\beta$  是重要的胰岛素信号转导通路,与糖代谢关系密切,iNOS 可能通过影响此通路介导 IR 的发生。GSK-3 $\beta$  是 AKT 下游的靶蛋白之一,是参与肝糖代谢的关键酶<sup>[15]</sup>。目前仅见 1 篇研究<sup>[13]</sup>报道,高脂饮食能够使野生型小鼠肝脏、骨骼肌、附睾脂肪的 iNOS mRNA 表达水平增高,并通过上调 p-IRS1ser 307、下调 p-AKTser 473 影响糖代谢。本研究首次发现:CIH 条件下,大鼠肝脏 iNOS mRNA 表达增加,p-IRS1ser 307、GSK-3 $\beta$  的表达上调,同时 p-AKTser 473 表达下降,而复氧干预后,上述各项指标变化方向相反,均恢复至 NC 组水平。提示,CIH 可能通过上调肝脏 iNOS mRNA 的表达,进而调节 IRS1/AKT/GSK-3 $\beta$  信号转导通路介导了 IR。

本研究通过构建模拟中重度 OSAHS 以及无创正压通气干预的大鼠模型,发现 CIH 可致胰岛素靶作用的器官肝脏发生不可逆转的病理损害,使 iNOS mRNA 的表达上调,并可能通过 iNOS mRNA 调控 IRS1/AKT/GSK-3 $\beta$  信号通路,介导 IR 的发生。

### 参考文献

- [1] Ding S, Zhang P, Wang L, et al. Prevalence of obstructive sleep apnea syndrome in hospitalized patients with type 2 diabetes in Beijing, China[J]. *J Diabetes Investig*, 2022, 13(11): 1889 - 96. doi:10.1111/jdi.13868.
- [2] Briancon-Marjollet A, Netchitailo M, Fabre F, et al. Intermittent hypoxia increases lipid insulin resistance in healthy humans: a randomized crossover trial[J]. *J Sleep Res*, 2024, 12: e14243. doi: 10.1111/jsr.14243.
- [3] Chattopadhyay D, Das S, Guria S, et al. Fetuin-a regulates adipose tissue macrophage content and activation in insulin resistant mice through MCP-1 and iNOS: involvement of IFN $\gamma$ -JAK2-STAT1 pathway[J]. *Biochem J*, 2021, 478(22): 4027 - 43. doi:10.1042/bcj20210442.
- [4] Lv R, Liu X, Zhang Y, et al. Pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches in obstructive sleep apnea syndrome[J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2023, 8: 218. doi:10.1038/s41392-023-01496-3.
- [5] Zeineddine S, Rowley J A, Chowdhuri S. Oxygen therapy in sleep-disordered breathing[J]. *Chest*, 2021, 160(2): 701 - 17. doi:10.1016/j.chest.2021.02.017.
- [6] Kimura H, Ota H, Kimura Y, et al. Effects of intermittent hypoxia on pulmonary vascular and systemic diseases[J]. *Int J Environ*

- Res Public Health*, 2019, 16(17): E3101. doi:10.3390/ijer-ph16173101.
- [7] 刘宏飞, 孙婷婷, 田稼芸, 等. IL-22/STAT3 信号通路在慢性间歇低氧致胰岛素抵抗中的作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(10): 1678 - 82. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.012.
- [7] Liu H F, Sun T T, Tian J H, et al. The role of IL-22/STAT3 pathway in insulin resistance caused by intermittent hypoxia[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(10): 1678 - 82. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.012.
- [8] Fu Y, Zhang N, Tang W, et al. Chronic intermittent hypoxia contributes to non-alcoholic steatohepatitis progression in patients with obesity[J]. *Hepatol Int*, 2022, 16(4): 824 - 34. doi:10.1007/s12072-022-10347-2.
- [9] 张妍, 袁鹤鸣, 韩真. 吡格列酮改善代谢综合征大鼠肝脏氧化和硝化应激[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2013, 18(9): 988 - 92.
- [9] Zhang Y, Yuan H M, Han Z. Pioglitazone improves hepatic oxidative and nitrate stress in metabolic syndrome rats[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2013, 18(9): 988 - 92.
- [10] 赵思雨, 胡云逸, 张丽超, 等. 过表达 iNOS 基因小鼠模型对日本血吸虫寄生适应性影响的研究[J]. *热带医学杂志*, 2022, 22(12): 1611 - 5, 1620. doi:10.3969/j.issn.1672-3619.2022.12.001.
- [10] Zhao S Y, Hu Y Y, Zhang L C, et al. Effects of iNOS gene over-expression mouse model on parasitic adaptability of *Schistosoma japonicum*[J]. *J Trop Med*, 2022, 22(12): 1611 - 5, 1620. doi:10.3969/j.issn.1672-3619.2022.12.001.
- [11] Šošić-Jurjević B, Lütjohann D, Trifunović S, et al. Differences in cholesterol metabolism, hepato-intestinal aging, and hepatic endocrine milieu in rats as affected by the sex and age[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(16): 12624. doi:10.3390/ijms241612624.
- [12] 周国红. 胰岛素强化治疗对新诊断 2 型冠心病患者 I $\kappa$ B- $\alpha$ 、COX2、iNOS 表达的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2011. doi:10.7666/d.y1900897.
- [12] Zhou G H. Effect of intensive insulin therapy on the expression of I $\kappa$ B- $\alpha$ , COX2 and iNOS in patients with newly diagnosed type 2 coronary heart disease[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2011. doi:10.7666/d.y1900897.
- [13] 李瀚琪. 诱导型一氧化氮合酶联系肥胖诱导的炎症和胰岛素抵抗[D]. 天津: 天津医科大学, 2019. doi:10.27366/d.cnki.gtyku.2019.000780.
- [13] Li H Q. Inducible nitric oxide synthase is associated with obesity-induced inflammation and insulin resistance[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2019. doi:10.27366/d.cnki.gtyku.2019.000780.
- [14] 李瀚琪, 牛文彦. iNOS 调节 Rab8 参与肥胖诱导的胰岛素抵抗[J]. *天津医科大学学报*, 2019, 25(3): 201 - 4.
- [14] Li H Q, Niu W Y. iNOS participates in obesity-induced insulin resistance by regulating Rab8[J]. *J Tianjin Med Univ*, 2019, 25(3): 201 - 4.
- [15] Wu J, Chen M, Shi S, et al. Hypoglycemic effect and mechanism of a pectic polysaccharide with hexenuronic acid from the fruits of *Ficus pumila* L. in C57BL/KsJ db/db mice[J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 178: 209 - 20. doi:10.1016/j.carbpol.2017.09.050.

## Role of the iNOS/IRS1/AKT/GSK-3 $\beta$ signaling pathway in chronic intermittent hypoxia-induced insulin resistance

Jin Meina<sup>1</sup>, Zhou Xueli<sup>1</sup>, Li Haibo<sup>1</sup>, Bai Wei<sup>1</sup>, Jia Chuxuan<sup>1</sup>,

Gao Li<sup>1</sup>, Ren Lijue<sup>2</sup>, Chen Qingyu<sup>3</sup>, Wang Rui<sup>4</sup>, Li Hua<sup>5</sup>, Wei Cuiying<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Geriatrics, <sup>2</sup>Dept of Endocrinology, <sup>3</sup>Dept of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014000; <sup>4</sup>Animal Research Laboratory, Baotou Medical College, Baotou 014000;

<sup>5</sup>People's Hospital of Gushang County, Baotou, Inner Mongolia Autonomous Region, Baotou 014200)

**Abstract Objective** To pathological changes and inducible nitric oxide synthase (iNOS), phosphorylated insulin receptor substrate 1 serine 307 (p-IRS1ser 307), phosphorylated protein kinase B serine 473 (p-AKTser 473), glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), and gluconeogenic synthase (GS) proteins were observed in the liver of rats under the condition of chronic intermittent hypoxia-replicated oxygen in control. And to explore the role of iNOS/IRS1/AKT/GSK-3 $\beta$  signaling pathway in chronic intermittent hypoxia-induced insulin resistance. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into a control group (NC group) and an experimental group (CIH group), with 20 rats in each group. The NC group was placed in a normoxic environment for 12 weeks, while the CIH group was first subjected to intermittent hypoxia for 8 weeks, and then resumed normoxic rearing until the 12th week. Fasting blood glucose (FBG) and fasting insulin (FINS) were measured at baseline, week 8 and week 12, and liver tissues were taken for pathology and measurement of iNOS, p-IRS1ser 307, p-AKTser 473, GSK3 $\beta$  and GS levels, to compare the differences between groups. **Results** At baseline, there was no significant difference in liver pathology between the two groups, and the observed indexes were not statistically significant ( $P > 0.05$ ); at 8 weeks, compared with the NC group, liver pathology in the CIH group showed significant disorganization of hepatic blood sinusoids and hepatocyte cords, obvious hepatocyte edema, smaller nuclei, increased lymphocyte infiltration, and a small number of fat vacuoles, significantly higher levels of FBG, FINS, insulin resistance index (HOMA-IR), iNOS mRNA, p-IRS1ser 307 protein, GSK-3 $\beta$  protein levels, and decreased p-AKTser 473 protein and GS protein levels, all of which were statistically significant (all  $P < 0.05$ ). IRS1ser 307 protein, GSK-3 $\beta$  protein levels were increased, p-AKTser 473 protein and GS protein levels were decreased, and the differences were statistically significant (all  $P < 0.05$ ); at 12 weeks, no lymphocyte infiltration was seen in the CIH group compared with that of the NC group and fat vacuoles significantly increased, and there was no improvement in the other pathological damage that had already occurred, and the levels of p-AKTser 473 protein significantly increased. AKTser 473 protein level significantly increased, p-IRS1ser 307 protein and GS protein levels were significantly reduced, all of which were statistically significant (all  $P < 0.05$ ), and the rest of the observational indexes were not statistically significant. Pearson's correlation analysis showed that HOMA-IR of CIH group was significantly positively correlated with the levels of iNOS mRNA, p-IRS1ser 307 protein, and GSK-3 $\beta$  protein at 8 weeks ( $r = 0.874, 0.817, 0.872$ ; all  $P < 0.05$ ), and significantly negatively correlated with the levels of p-AKTser 473 protein and GS protein ( $r = -0.886, -0.879$ ; all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Chronic intermittent hypoxia can lead to hepatic pathological damage that cannot be reversed even by reoxygenation interventions and may mediate the development of insulin resistance by upregulating the IRS1/AKT/GSK-3 $\beta$  signaling pathway through the upregulation of iNOS mRNA expression.

**Key words** chronic intermittent hypoxia-reoxygenation; insulin resistance; inducible nitric oxide synthase; IRS1/AKT/GSK-3 $\beta$  signaling pathway; SD rat; liver

**Fund programs** National Natural Science Foundation of China (No. 81660020); Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 2023MS08044); Scientific and Technological Project Program of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 2021GG0219)

**Corresponding author** Wei Cuiying, E-mail: weicuiying9@163.com