

# GAS6/AXL 信号通路失活对小鼠能量代谢的影响

高娟, 郭萌, 霍学云, 李振坤, 张双悦, 杜小燕, 王超, 陈振文, 王钜

(首都医科大学基础医学院, 北京 100069)

**【摘要】** 目的 研究小鼠生长停滞特异蛋白6(growth arrest-specific gene 6, GAS6)信号通路的失活对维持机体能量代谢稳态的影响。方法 以 GAS6 主要受体 *Axl* 基因敲除(*Axl*<sup>-/-</sup>)小鼠及其野生型(*Axl*<sup>+/+</sup>)小鼠为研究对象,比较两组动物基础血糖值、血脂四项指标、脂肪系数及骨骼肌中糖代谢信号蛋白 PI3K、AKT 与葡萄糖转运蛋白4(glucose transporter 4, GLUT4)基因表达水平及其蛋白磷酸化水平间的差异;同时检测人工诱发2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)造模前后小鼠血清 GAS6 蛋白水平与 T2DM 模型成模率的改变之间是否存在相关性。结果 *Axl*<sup>-/-</sup>小鼠血脂出现异常波动,且脂肪沉积率显著高于野生型小鼠( $P < 0.01$ )。*Axl*<sup>-/-</sup>小鼠血糖调节能力受损,其空腹血糖值显著高于野生型,骨骼肌 *Glut4* 的 mRNA 水平升高,而 PI3K、AKT 和 GLUT4 蛋白的磷酸化水平均略有下降。经人工诱发 T2DM 后,*Axl*<sup>+/+</sup>和 *Axl*<sup>-/-</sup>小鼠血浆中 GAS6 浓度均显著低于各自对照组,且 *Axl*<sup>-/-</sup>小鼠 T2DM 模型的成模率是 *Axl*<sup>+/+</sup>小鼠的 2 倍( $P < 0.01$ )。结论 GAS6/AXL 信号通路的激活在一定程度上降低血糖和抑制脂肪沉积。

**【关键词】** GAS6/AXL 信号通路; 能量代谢; 骨骼肌; 葡萄糖转运蛋白 4

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 01-0057-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.01.011

## Effect of GAS6/AXL signaling pathway inactivation on energy metabolism in mice

GAO Juan, GUO Meng, HUO Xue-yun, LI Zhen-kun, ZHANG Shuang-yue,  
DU Xiao-yan, WANG Chao, CHEN Zheng-wen, WANG Ju

(Capital Medical University Basic Medical College, Beijing 100069, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of growth arrest-specific gene 6 (GAS6) inactivation on maintaining mouse energy metabolic homeostasis. **Methods** *Axl* gene encodes the major receptor of Gas6. Wild type gene (*Axl*<sup>+/+</sup>) and *Axl* gene-deficient (*Axl*<sup>-/-</sup>) mice were used as research models. For each genotype mice, the fasting glucose, blood lipids, aliphatic index in the blood, and the mRNA expression and protein phosphorylation levels of PI3K, AKT and glucose transporter 4 (GLUT4) in skeletal muscle were determined. After high fat high cholesterol diet-induced type 2 diabetes mellitus (T2DM) models from the two genotype mice were generated, the plasma Gas6 concentrations of the mice were detected respectively so as to compare the effect of *Axl* deficiency on the success ratio of induced T2DM models. **Results** Abnormal blood lipids in *Axl*<sup>-/-</sup> mice were observed, and the fat deposition rate was significantly higher than that of the wild-type mice as well ( $P < 0.01$ ). The stability of blood glucose in *Axl*<sup>-/-</sup> mice was impaired, in which the fasting glucose level in *Axl*<sup>-/-</sup> mice was significantly higher than that in the wild-type mice, and the mRNA level of *Glut4* in skeletal muscle was increased significantly, while the phosphorylation levels of PI3K, AKT and GLUT4 proteins were slightly decreased. The GAS6 plasma concentrations in the T2DM mouse models were significantly lower than that in the respective control groups, which was irrelevant to genotypes. Surprisingly, the success rate of induction of T2DM in *Axl*<sup>-/-</sup> mice was

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 31272393);首都医科大学基础临床合作项目(No. 13JL32)。

**【作者简介】** 高娟(1987年-),女,硕士研究生。研究方向:实验动物模型。E-mail: gaojuan\_gg@163.com。

**【通讯作者】** 王钜,教授。从事实验动物教学与科研。E-mail: wangju@ccmu.edu.cn。王超,副教授。从事实验动物教学与科研。E-mail: wangcam@126.com。

twice as high as that of the wild type mice ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Activation of GAS6/AXL signaling pathway contributes to lower blood glucose and inhibit fatty deposits to a certain extent.

**【Key words】** GAS6/AXL signaling pathway; Energy metabolism; Skeletal muscle; Glucose transporter 4; Mouse

现代社会的快节奏改变了人们的生活方式,导致膳食结构不合理,体力活动和运动减少,易因能量代谢失衡导致超重和肥胖(obesity)。骨骼肌和脂肪是全身最大的能量代谢器官,随着肥胖的逐步加剧,这些器官对胰岛素的反应性会渐次减退,进而出现胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、葡萄糖代谢率降低及脂肪酸氧化水平下降,最终导致 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)发生<sup>[1]</sup>。目前现有药物尚不能有效解决以上问题。因此,开发和研究新的与糖/脂代谢关系密切的分子和/或功能性蛋白,寻找新的药物靶点就显得十分必要。

生长停滞特异蛋白 6 (growth arrest-specific gene 6, GAS6) 是血液中存在的一种维生素 K 依赖性生长因子,是细胞膜上受体酪氨酸激酶(RTKs)家族成员 TAM (TYRO3, AXL, MER) 的配体<sup>[2]</sup>。GAS6/AXL 信号通路在机体中的作用广泛,参与了包括细胞存活和增殖、细胞黏附和迁移、血凝稳定性以及炎症因子的释放等生理和病理反应过程<sup>[3]</sup>。近期报道<sup>[4-12]</sup> GAS6/AXL 信号系统与人类及动物 T2DM 和肥胖的发生和发展有紧密联系,但具体作用机制尚不清楚。本研究以 *Axl* 基因敲除(*Axl*<sup>-/-</sup>)小鼠为对象,研究 GAS6/AXL 信号通路失活对小鼠糖/脂代谢影响,为阐明 GAS6 及其受体能否成为潜在的降血糖或减肥药物靶点提供基础数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实验动物

选用清洁级 B6.129-Axl<sup>tm1</sup>小鼠(*Axl*<sup>-/-</sup>)及其同窝野生型小鼠(C57BL/6J × 129)(*Axl*<sup>+/+</sup>),6 周龄,雄性,体重 16 ~ 18 g,各 40 只(美国 Louisville 大学卢清显教授馈赠),购自军事医学科学院【SCXK(军)2012-0004】。动物饲养在符合国家标准的屏障设施【SYXK(京)2010-0020】内的 IVC 设备中,环境控制:温度 20 ~ 25℃,日温差 ≤ 3℃,相对湿度 40% ~ 70%,每日 12 h 光照,昼夜循环,自由进食、饮水,按每笼 4 只喂养,每两天更换鼠笼和垫料一次。

#### 1.1.2 高脂饲料配方

基础饲料中添加 0.2% 胆汁盐,10% 猪油,10%

蛋黄粉和 1% 胆固醇。基础饲料及高脂饲料均购于军事医学科学院实验动物中心。

#### 1.1.3 主要试剂与试剂盒

链脲霉素(streptozotocin, STZ),美国 Sigma;血糖试纸,血糖仪,三诺生物传感股份有限公司;小鼠生长停滞特异性蛋白 6(GAS6)酶联免疫分析(ELISA)试剂盒,美国 R&D;TRNzol 总 RNA 提取试剂盒及 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒,天根生化科技有限公司;蛋白定量试剂盒(BCA 法),普利莱基因技术有限公司;组织蛋白抽提试剂盒及 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒,北京康为世纪生物科技有限公司;蛋白 Marker 及化学发光底物,美国 Thermo;一抗全部为兔抗鼠:PI3K(1:500, sc-292114, Santa Cruz),P-PI3K(1:500, #4228, Cell Signaling),AKT(1:500, sc-8312, Santa Cruz),P-AKT(1:500, sc-7985-R, Santa Cruz),GLUT4(1:500, ab33780, Abcam),P-GLUT4(1:500, sc-17558, Santa Cruz),GAPDH(1:2000, #2118, Cell Signaling);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔的二抗(IgG, 1:5000, ZDR-5306, 中杉金桥);其他未说明试剂均购自美国 Sigma 公司。

#### 1.1.4 引物设计与合成

根据 GenBank 公布的小鼠 *Axl*、*Pi3k*、*Akt*、*Glut4* 和  $\beta$ -*Actin* 基因序列设计相应的引物,引物序列分别为 *Axl*: 5'-TACACCAGCAAGAGCC-3', 5'-CTGTTTCAGCCGATTT-3'; *Pi3k*: 5'-AAGGCAAGTAGACCCA-3', 5'-TACCCATCACAGCACAT-3'; *Akt*: 5'-GGAGGACAACGACTACGG-3', 5'-CACGATGTTGGCAAAGAA-3'; *Glut4*: 5'-CAGCCTACGCCACCATA-3', 5'-CCATAGCATCCGCAACAT-3';  $\beta$ -*Actin*: 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3', 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3', 由生工生物工程(上海)有限公司合成。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 动物分组及处理

本研究中动物实验分为 4 组,分别为非 T2DM 组(*Axl*<sup>+/+</sup>; *Axl*<sup>-/-</sup>组)和 T2DM 组(*Axl*<sup>+/+</sup>-T2DM; *Axl*<sup>-/-</sup>-T2DM 组)。选取 6 周龄 16 ~ 18 g 清洁级雌性健康 *Axl*<sup>+/+</sup> 基因型及 *Axl*<sup>-/-</sup> 基因型小鼠各 40 只。每种基因型小鼠随机分为 2 组(20 只/组),一组饲喂基础饲料作为非 T2DM 组,另一组饲喂高脂饲料

并结合 STZ 注射制备 T2DM 模型。T2DM 造模方法参考已有文献<sup>[13,14]</sup>,即高脂饲料组小鼠在饲养 5 周后,每只小鼠经腹腔注射 1% STZ (柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液配制, pH 4.2 ~ 4.3),注射剂量为 90 mg/kg。之后分别在给药后第 3 天和第 6 天检测血糖值,如果两次检测空腹血糖值均在 11 ~ 17 mmol/L 范围内,且动物有多饮、多尿、多食和体重下降特征,则认为造模成功。

### 1.2.2 基础血糖检测

非 T2DM 组小鼠到 8 周时,随机选取体重相近的 *Axl*<sup>+/+</sup> 及 *Axl*<sup>-/-</sup> 基因型小鼠各 6 只,禁食 16 h 后,用剪尾的方法从尾静脉采血,按照血糖测定试剂盒(基于葡萄糖氧化酶法原理)相应说明检测基础血糖值。

### 1.2.3 血脂生化指标

随机选取体重相近的非 T2DM 组 *Axl*<sup>+/+</sup> 和 *Axl*<sup>-/-</sup> 小鼠各 10 只,禁食 16 h 后,称重,采用眼球摘除法取血。血液在室温静置 2 h 后,3000 r/min,离心 10 min,取上清后交由首都医科大学右安门临床检验中心检测血脂四项指标,并做统计分析。

### 1.2.4 脂肪系数检测

按 1.2.3 步骤所用动物取血结束后颈椎脱臼处死,解剖并分离出性腺脂肪团与腹股沟处脂肪并对分离出的脂肪进行称重,计算脂肪系数【性腺脂肪团与腹股沟脂肪占体重比值(g/g)】,以初步明确 *Axl* 基因敲除对脂肪沉积的影响。

### 1.2.5 骨骼肌中与葡萄糖转运相关分子表达检测

随机选取体重相近的非 T2DM 组 *Axl*<sup>+/+</sup> 及 *Axl*<sup>-/-</sup> 组小鼠各 6 只,颈椎脱臼处死后取腓肠肌组织(每只动物取 2 份,分别用于 RNA 和蛋白的提取),迅速放入液氮中保存。随后提取各组织中的总 RNA 和蛋白质,检测不同基因型小鼠 *Pi3k*, *Akt* 与 *Glut4* 的 mRNA 表达水平及蛋白磷酸化水平。

#### (1) mRNA 水平检测

利用 TRNzol 总 RNA 提取试剂提取各组动物骨骼肌组织总 RNA,取总 RNA 量 2  $\mu$ g,根据 TIAN-Script cDNA 第一链合成试剂盒说明(10  $\mu$ mol/L oligo dT 引物,70 $^{\circ}$ C,5 min,立即移到冰上 2 min,按以下顺序依次加入: M-MLV 5  $\times$  reaction buffer,5  $\mu$ L; dNTP,1.25  $\mu$ L; RNasin,25 units; M-MLV RT,200 units;加入无 RNase 的 H<sub>2</sub>O,至总体积达到 25  $\mu$ L,混匀,42 $^{\circ}$ C,孵育 60 min。95 $^{\circ}$ C,5 min) 反转录出 cDNA,进行 PCR 扩增,向反应体系中依次加入: Taq

Mix,10  $\mu$ L; sense (10  $\mu$ mol/L),0.4  $\mu$ L; antisense (10  $\mu$ mol/L),0.4  $\mu$ L; cDNA (100 ng/ $\mu$ L),1  $\mu$ L; 无 RNase 的 H<sub>2</sub>O,8.2  $\mu$ L;94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,设定各基因特异性引物的退火温度,退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C,7 min,充分延伸;4 $^{\circ}$ C,20 min;PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,用凝胶成像系统(Bio-Rad)检测,并进行定量分析。

#### (2) Western blot 检测

分别取非 T2DM 组 *Axl*<sup>+/+</sup> 及 *Axl*<sup>-/-</sup> 小鼠腓肠肌组织,用组织裂解液裂解并匀浆;在 4 $^{\circ}$ C 以 10 000 r/min 离心 20 min,取上清作样本,并用 BCA 法测定其蛋白浓度,制备蛋白样品,取各组样品 50  $\mu$ g 蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,5% 脱脂奶粉摇床封闭 1 h,一抗孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜,以上所用一抗全部为兔抗鼠;TBST 洗膜 5 min  $\times$  6 次;二抗,室温摇床孵育 1 h, TBST 洗膜 5 min  $\times$  6 次,化学发光底物孵育 30 s,用蛋白电泳印记杂交检测系统(Bio-Rad)曝光,并进行定量分析和比较。

### 1.2.6 血液中 GAS6 含量检测

对 *Axl*<sup>+/+</sup>, *Axl*<sup>-/-</sup>, *Axl*<sup>+/+</sup>-T2DM 和 *Axl*<sup>-/-</sup>-T2DM 4 组小鼠,每组分别选取 6 只,摘眼球取血。血浆在室温下静置 2 h,3000 r/min 离心 10 min,取上清并通过 GAS6 酶联免疫分析(ELISA)试剂盒进行血清 GAS6 的检测,严格按照试剂盒说明书进行操作。

### 1.2.7 统计学处理

所有实验结果均采用 SPSS18.0 软件对数据进行了分析。实验数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,其中多组间比较选用方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。实验重复 3 次以上。

## 2 结果

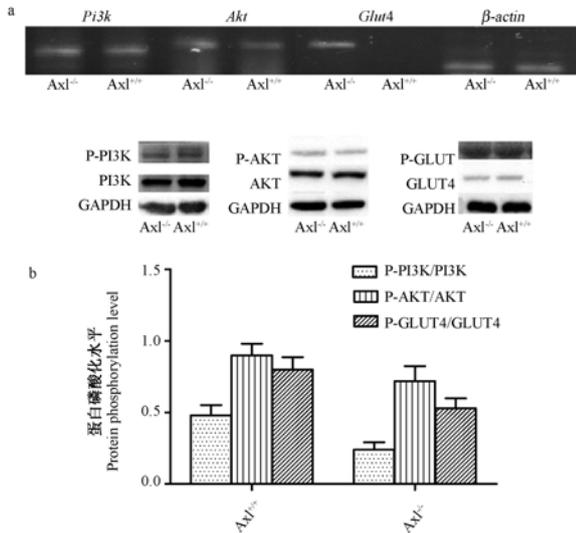
### 2.1 阻断 GAS6/AXL 信号通路促进了小鼠血糖水平的升高

经检测,非 T2DM 组 *Axl*<sup>-/-</sup> 小鼠 6 只,基础血糖值为(6.86  $\pm$  0.63),*Axl*<sup>+/+</sup> 小鼠 6 只,基础血糖值为(5.38  $\pm$  0.83),相比平均值升高 1.5 mmol/L ( $P < 0.05$ )。说明 *Axl* 基因被敲除后,小鼠血糖水平出现了上升,提示 GAS6/AXL 可能与小鼠血糖浓度的动态平衡有关。

### 2.2 阻断小鼠 GAS6/AXL 信号通路影响 *Pi3k*, *Akt* 与 *Glut4* 的 mRNA 表达水平及蛋白磷酸化水平

实验结果显示非 T2DM 组 *Axl*<sup>-/-</sup> 小鼠及 *Axl*<sup>+/+</sup>

小鼠骨骼肌中 *Pi3k*、*Akt* 和 *Glut4* 基因的表达水平也有变化,其中 *Akt* 和 *Glut4* 基因的转录水平增加较为明显(图 1 a)。同时,PI3K、AKT 和 GLUT4 蛋白的磷酸化水平略有下调(图 1b)。



注:a. *Axl*<sup>-/-</sup> 和 *Axl*<sup>+/+</sup> 小鼠骨骼肌组织中 *Pi3k*、*Akt* 和 *Glut4* 的 mRNA 表达水平的检测( $P > 0.05$ )。b. *Axl*<sup>-/-</sup> 和 *Axl*<sup>+/+</sup> 小鼠骨骼肌组织中 PI3K、AKT 和 GLUT4 蛋白水平的检测( $P > 0.05$ )。

图 1 非 T2DM 组 *Axl*<sup>-/-</sup> 和 *Axl*<sup>+/+</sup> 小鼠骨骼肌组织中 *Pi3k*、*Akt* 和 *Glut4* 的 mRNA 及蛋白表达水平( $n = 6$ )。

Note: a. The mRNA expression levels of *Pi3k*, *Akt* and *Glut4* in *Axl*<sup>-/-</sup> and *Axl*<sup>+/+</sup> mice. b. The phosphorylation levels of PI3K, AKT and GLUT4 in *Axl*<sup>-/-</sup> and *Axl*<sup>+/+</sup> mice.

Fig. 1 The mRNA and protein expression levels of *Pi3k*, *Akt* and *Glut4* in skeletal muscle in the *Axl*<sup>-/-</sup> and *Axl*<sup>+/+</sup> mice of non-T2DM group ( $n = 6$ ).

### 2.3 阻断 GAS6/AXL 信号通路对小鼠脂肪沉积和血脂稳态的影响

非 T2DM 组小鼠眼球摘除法取血后,测定其血脂四项生化指标,结果发现 *Axl*<sup>-/-</sup> 小鼠血浆中总胆固醇水平和高密度脂蛋白水平均显著低于 *Axl*<sup>+/+</sup> 小鼠( $P < 0.01$ ) (表 1)。计算两种基因型小鼠脂肪系数后发现 *Axl*<sup>-/-</sup> 小鼠 10 只,脂肪系数是( $0.05 \pm 0.01$ ),显著高于 *Axl*<sup>+/+</sup> 组( $0.02 \pm 0.01$ ) 的 10 只小鼠( $P < 0.01$ )。结果提示 GAS6/AXL 信号通路的激活有助于减少脂肪的沉积。

### 2.4 阻断 GAS6/AXL 信号通路对小鼠 T2DM 模型成功率的影响

利用人工诱导方法制备 *Axl* 基因敲除及其野生型小鼠的 T2DM 模型,结果显示敲除 *Axl* 基因后,20 只小鼠有 14 只发生 T2DM,而其野生型 20 只小鼠

只有 8 只发生 T2DM。显然, *Axl*<sup>-/-</sup> 组小鼠发生 T2DM 的几率(40%)与野生型(70%)相比显著增加( $P < 0.01$ )。提示 GAS6/AXL 信号通路的激活有助于稳定血糖。

表 1 *Axl*<sup>-/-</sup> 小鼠和 *Axl*<sup>+/+</sup> 小鼠血清中总胆固醇,甘油三酯,高密度脂蛋白和低密度脂蛋白水平的比较( $n = 10$  mmol/L,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of TC, TG, HDL-C and LDL-C concentrations between the *Axl*<sup>-/-</sup> and *Axl*<sup>+/+</sup> mice

分组 Groups	总胆固醇 TC	甘油三酯 TG	高密度脂蛋白 HDL-C	低密度脂蛋白 LDL-C
<i>Axl</i> <sup>+/+</sup>	1.46 ± 0.12	0.51 ± 0.08	1.55 ± 0.11	0.22 ± 0.02
<i>Axl</i> <sup>-/-</sup>	1.03 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.05	1.17 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.21 ± 0.01

注:与 *Axl*<sup>+/+</sup> 组比较;<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

Note:<sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs. *Axl*<sup>+/+</sup> group.

### 2.5 4 种动物模型小鼠的血清 GAS6 浓度比较

分别收集本实验所用的 4 种模型小鼠血清,每种模型 6 只小鼠,检测和统计各组小鼠血清 GAS6 水平间的差异。结果发现, *Axl*<sup>+/+</sup> 组小鼠,血清 GAS6 浓度为( $12.04 \pm 1.15$ ), *Axl*<sup>+/+</sup> 的糖尿病模型组小鼠血清 GAS6 浓度为( $5.79 \pm 1.14$ ); *Axl*<sup>-/-</sup> 组小鼠血清 GAS6 浓度为( $11.16 \pm 0.76$ ), *Axl*<sup>-/-</sup> 的糖尿病模型组小鼠血清 GAS6 浓度为( $4.18 \pm 1.06$ )。本实验结果显示,经人工诱导发生的 T2DM 小鼠血清中 GAS6 的浓度均显著低于各自的非诱导组动物( $P < 0.01$ )。提示小鼠 2 型糖尿病的发病可能与血浆 GAS6 水平的下降呈正相关。

## 3 讨论

本研究初步揭示了 GAS6/AXL 信号通路被阻断后对小鼠能量代谢稳态的影响。研究发现,在脂代谢方面,当 GAS6 的主要受体 AXL 被敲除后,一方面会引起血浆总胆固醇水平上升,而高密度脂蛋白水平下降,影响血脂的动态平衡;另一方面,在动物体重相近的前提下, *Axl*<sup>-/-</sup> 小鼠的脂肪系数显著高于 *Axl*<sup>+/+</sup> 组,提示敲除 *Axl* 基因的小鼠更容易发生肥胖。在糖代谢方面,血浆 GAS6 水平的稳定可能有助于血糖的稳定。首先,与野生型小鼠相比, *Axl*<sup>-/-</sup> 组小鼠血浆基础血糖值出现明显升高,而 *Pi3k*、*Akt* 和 *Glut4* 的 mRNA 表达出现了增加,而相应的磷酸化蛋白的水平出现了降低,提示 *Axl*<sup>-/-</sup> 基因型小鼠组织对血糖的吸收能力减弱。进一步,敲除 *Axl* 基因小鼠经人工诱发 2 型糖尿病模型的成功率是野生型的 1.75 倍。同时,无论 *Axl* 基因是否被敲除,一旦这些动物被诱发出 2 型糖尿病,则其血浆

中 GAS6 的水平均会出现显著下降。可见, 机体 GAS6/AXL 信号通路活性正常对稳定血糖有着重要意义。

新近临床调查发现, 血浆 GAS6 浓度的改变与罹患 T2DM 的几率关系密切。据统计, T2DM 患者血浆 GAS6 含量显著低于糖耐量正常人群, 且血浆 GAS6 水平与空腹血糖值、TNF- $\alpha$ 、IL-6 以及 CAM-1 的浓度负相关。而在非 T2DM 人群中, 血浆 GAS6 浓度高者罹患 T2DM 的风险显著减弱<sup>[5]</sup>。其次, *Gas6* 基因 c. 834 +7 位点的 SNP 多态性 G > A 也与 T2DM 相关, 与糖耐量正常人群相比, T2DM 患者该位点的 AA 基因型和 A 基因频率均低。T2DM 患者中, AA 型血浆 *Gas6* 的含量高而血糖水平低于 GG 型<sup>[6]</sup>。我们在动物水平上的研究结果与临床报道的结果完全一致, 即经高脂饲料配合链脲酶素处理所得 T2DM 小鼠, 包括 *Axl*<sup>-/-</sup> 小鼠及 *Axl*<sup>+/+</sup> 小鼠模型中与相应基因型的未造模动物相比, 其血浆 GAS6 水平均出现显著下降。表明糖尿病的发病与 GAS6 水平下降呈正相关。

转基因动物研究也发现 GAS6/AXL 通路的失活与糖代谢紧密相关, 研究发现, AXL 不仅存在于细胞膜上, 其 AXL 跨膜区有与胰岛素受体亚家族相似的蛋白水解位点, 水解片段呈水溶性<sup>[7]</sup>。当将可溶性 *Axl* 基因片段转入小鼠, 使其呈全身性表达时, 小鼠会表现出严重的 T2DM 症状<sup>[8]</sup>。有报道认为<sup>[9]</sup>, 当水溶性 AXL 与 GAS6 结合后, 就有可能造成胞膜上的 AXL 受体失活/或激酶活性下降。进而, 如果采用骨髓造血细胞特异性表达 *Axl* 的转基因方案时, 该小鼠也会出现程度较轻的 T2DM 症状。此时不仅向该组织特异性转基因鼠的外周血样中添加 GAS6 能恢复其 TNF $\alpha$  水平, 而且当将转 *Gas6* 基因鼠与该组织特异性表达 *Axl* 基因的转基因鼠交配, 所得杂合子也能长期保持健康<sup>[8]</sup>。据此推测, 转基因小鼠过表达 AXL 后, 很可能会促使这些蛋白与细胞膜上固有的 AXL 竞争血浆中的 GAS6, 造成血浆中 GAS6 总体水平下降(其结果与 T2DM 患者的流调结果相似), 进一步引起体细胞中 GAS6/AXL 通路活性下降, 从而可能影响到了机体对血糖的吸收。综上所述, GAS6 信号通路的阻断与小鼠能量代谢有关, 然而 GAS6/AXL 通路调节血糖和血脂的具体分子机制尚不明确。Insulin 与 GAS6 的受体均属于受体酪氨酸激酶家族成员<sup>[3]</sup>, 二者都能激活胞质内信号通路关键蛋白, 如 PI3K 和 AKT 等。

骨骼肌作为机体最大的脂肪酸氧化组织和对 insulin 最为敏感的组织之一, 在 insulin 作用下对全身葡萄糖代谢起到了至关重要的作用<sup>[15]</sup>。已知 *Gas6* 和 *Axl* 均显著表达于骨骼肌<sup>[16]</sup>。由此推测, GAS6 可能有类似于 insulin 的生理功能或者有增加细胞对 insulin 敏感性的潜力。基于以上假设, 我们选取小鼠骨骼肌对两种基因型小鼠的 *Pi3k*、*Akt* 和 *Glut4* 3 种基因进行了 mRNA 及蛋白水平的检测, 发现骨骼肌细胞 *Pi3k*、*Akt* 和 *Glut4* 的 mRNA 表达量均出现了增加趋势, 尤其 *Glut4* 的转录水平增加较为明显, 而 PI3K、AKT 和 GLUT4 磷酸化的水平均有不同程度的下降。因此, GAS6/AXL 通路的阻断可能干扰了 PI3K/AKT/GLUT4 通路, 并直接或间接调节血糖吸收。

此外, 对于 GAS6/AXL 系统能否促进脂肪沉积及其作用机制尚存在争议。一方面有研究者认为该通路与脂肪沉积有关, 如长期(12 ~ 15 周)饲喂高脂料的 *Gas6*<sup>-/-</sup> 小鼠脂肪组织的沉积率显著低于对照组, 据此认为 GAS6 能促进脂肪沉积, 且与脂肪细胞数量增加有关<sup>[10]</sup>。用 AXL 的抑制剂 R428 给饲喂高脂料的小鼠灌胃 5 周, 能显著抑制其体重增加、皮下和性腺脂肪沉积, 说明 AXL 的存在也能促进脂肪沉积<sup>[11]</sup>。而我们通过检测两种基因型小鼠脂肪系数发现 GAS6/AXL 通路被阻断后的小鼠脂肪系数显著升高, 机体脂肪沉积明显增加, 显然更易肥胖。在进一步对小鼠血清中的血脂四项检测并分析后发现, *Axl*<sup>-/-</sup> 小鼠血浆中 CH 和 HDL 水平均显著低于 *Axl*<sup>+/+</sup> 组小鼠。而 HDL 在 *Axl*<sup>-/-</sup> 小鼠中显著降低。另一方面, Holland 等<sup>[12]</sup>发现, 以 25 mg/kg 的 R428 连续饲喂正常饮食小鼠达 11 周没有出现明显的体重下降情况。因此认为 GAS6 与脂肪沉积无关。总之, GAS6 与脂肪代谢的关系尚有待于进一步研究。

本研究初步提示小鼠 GAS6/AXL 信号通路的活化与机体维持其能量代谢稳态有关。该通路的失活会导致血糖水平升高并增加脂肪的沉积, 从而可能增加罹患 2 型糖尿病的风险。本研究为进一步深入研究糖尿病的病理机制和寻找治疗方案提供了新的思路。

#### 参 考 文 献

- [1] Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome [J]. Lancet, 2005, 365: 1415-1428.
- [2] Nagata K, Ohashi K, Nakano T, et al. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases [J]. J Biol Chem,

- 1996, 271:30022-30027.
- [ 3 ] 吴俊. Gas6 系统研究进展 [J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2011, 3(3):53-56.
- [ 4 ] Hsiao FC, Lin YF, Hsieh PS, et al. Circulating growth arrest-specific 6 protein is associated with adiposity, systemic inflammation, and insulin resistance among overweight and obese adolescents [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(2):E267-74.
- [ 5 ] Hung YJ, Lee CH, Chu NF, et al. Plasma protein growth arrest-specific 6 levels are associated with altered glucose tolerance, inflammation, and endothelial dysfunction [J]. Diabetes Care, 2010, 33:1840-1844.
- [ 6 ] Lee CH, Chu NF, Shieh YS, et al. The growth arrest-specific 6 (Gas6) gene polymorphism c.834+7G>A is associated with type 2 diabetes [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2012, 95(2):201-206.
- [ 7 ] O'Bryan JP, Fridell YW, Koski R, et al. The transforming receptor tyrosine kinase, Axl, is post-translationally regulated by proteolytic cleavage [J]. J Biol Chem, 1995, 70:551-557.
- [ 8 ] Augustine KA, Rossi RM, Van G, et al. Noninsulin-dependent diabetes mellitus occurs in mice ectopically expressing the human Axl tyrosine kinase receptor [J]. J Cell Physiol, 1999, 181:433-447.
- [ 9 ] Costa M, Bellosta P, Basilico C. Cleavage and release of a soluble form of the receptor tyrosine kinase ARK in vitro and in vivo [J]. J Cell Physiol, 1995, 168:737-744.
- [ 10 ] Maquoi E, Vörös G, Carmeliet P, et al. Role of Gas-6 in adipogenesis and nutritionally induced adipose tissue development in mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25:1002-1007.
- [ 11 ] Lijnen HR, Christiaens V, Scroyen L. Growth arrest-specific protein 6 receptor antagonism impairs adipocyte differentiation and adipose tissue development in mice [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2011, 337(2):457-464.
- [ 12 ] Holland SJ, Pan A, Franci C, et al. R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer [J]. Cancer Res, 2010, 70:1544-1554.
- [ 13 ] 姜骊, 陈辉, 何勇, 等. 高脂饮食加低剂量链脲霉素建立小鼠 2 型糖尿病模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(03):35-38.
- [ 14 ] 杨娜, 孟宪丽, 董光新, 等. 链脲佐菌素加膳食诱导的小鼠 2 型糖尿病模型研究 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(01):74-76.
- [ 15 ] Jin W, Patti ME. Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of Type 2 diabetes [J]. Clin Sci (Lond), 2009, 116:99-111.
- [ 16 ] Hafizi S, Dahlback B. Gas6 and protein S: vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily [J]. FEBS J. 2006, 273:5231-5244.

[收稿日期] 2013-09-26

## 勘误启事

《中国实验动物学报》2013 年第 6 期《人参多糖对环磷酰胺的增效减毒作用》一文中第 63 页 图 1 GPS 对 CTX 化疗 H22 荷瘤小鼠体重的影响(A、B) 中图片 A, 由于折线图和图例不符, 现改为下图:

