

耐力运动对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌葡萄糖运载体 4 基因表达的影响*

王 丹¹ 吴 毅¹ 胡永善¹ 胡瑞萍¹ 林 强¹

摘要 目的:探讨耐力运动对糖尿病大鼠骨骼肌葡萄糖运载体 4(glucose transporter 4, GLUT4) mRNA 表达的影响。方法:32 只雄性 2 型糖尿病 OLETF 大鼠和 13 只雄性对照 LETO 大鼠随机分为 6 组:A1 组 OLETF 运动组、A2 组 OLETF 运动+胰岛素组、B1 组 OLETF 非运动组、B2 组 OLETF 非运动+胰岛素组、C 组 LETO 运动组、D 组 LETO 非运动组。A1、A2、C 组参照 Ploug 报道的大鼠游泳运动方法运动 12 周。A2、B2 组经肝门静脉予胰岛素 10U/Kg 的注射, 1min 后处死取材。Real-time PCR 方法测定 GLUT4 mRNA。结果:GLUT4 mRNA 表达在 A1 组比 B1 组升高 3 倍, A2 组比 A1 组升高 13 倍, B2 组比 B1 组升高 20 倍, 差异均有显著性意义; A2 组比 B2 组 GLUT4 mRNA 升高 2 倍, 差异无显著性意义。结论:耐力运动可以促进 GLUT4 mRNA 的表达, 耐力运动和胰岛素对糖尿病治疗具有协同作用, 两者不能相互替代。

关键词 糖尿病大鼠; 耐力运动; GLUT4 mRNA; 骨骼肌

中图分类号:R493, R587.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-05-0391-04

Effects of endurance training on GLUT4 gene expression in skeletal muscle of rats with type 2 diabetes/
WANG Dan, WU Yi, HU Yongshan, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(5):391—394

Abstract Objective: To explore effects of endurance training on GLUT4 gene expression rats with type II diabetes. **Method:** Thirty two diabetic rats were divided into four groups: training (group A1), training with insulin injection (group A2), no training (group B1) and no training with insulin injection (group B2). Thirteen no-diabetic rats were divided into two groups: training (group C) and no training (group D). Expressions of GLUT4 gene were measured by real-time PCR. **Result:** Expressions of GLUT4 mRNA in group A1 were 3 times higher than in group B1; in group A2 were 13 times higher than in group A1; in group B2 were 20 times higher than in group B1; in group A2 were 2 times higher than in group B2. **Conclusion:** Endurance training can increase gene expressions of GLUT4 mRNA in skeletal muscle of diabetic rats. The results showed that there is synergic effect of endurance training and insulin injection in diabetic treatment but these two interventions can not be replaced each other.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200040

Key words diabetic rat; endurance training; GLUT4 mRNA; skeletal muscle

骨骼肌是机体最主要利用葡萄糖的组织, 葡萄糖跨膜转运是骨骼肌利用葡萄糖的首要步骤, 骨骼肌摄取葡萄糖是一种耗能的主动吸收, 葡萄糖进入肌细胞内需通过细胞膜上的葡萄糖转运体的主动运输, 葡萄糖运载体 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 在转运过程中起着很重要的作用。有研究显示 GLUT4 表达异常是胰岛素抵抗的重要因素, 已发现运动使血糖降低、胰岛素抵抗下降, 但机制不明^[1]。本文的目的是观察耐力运动对糖尿病大鼠骨骼肌 GLUT4 基因的表达式的影响, 探讨运动影响 GLUT4 表达的可能机制, 了解运动、胰岛素对糖尿病的治疗是否是协同作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与饲养

由日本大冢制药株式会社德岛研究所赠送 32 只雄性 OLETF 大鼠和 13 只雄性 LETO 大鼠。OLETF 大鼠是一种可自发形成 2 型糖尿病的大鼠, LETO 大鼠与 OLETF 大鼠同系, 但不发生 2 型糖尿病, 作为 2 型糖尿病研究对照组。所有大鼠均为 44 周龄, 给予基础饲料(含粗蛋白 22%, 粗脂肪 3%, 碳水化合物等 75%)喂养。饲养室为清洁级。动物饲养室, 室温 25±3℃, 湿度 55%±15%, 光照每天 14h。

1.2 实验动物分组

32 只 OLETF 大鼠随机分为 4 组, 每组 8 只: A1 组为 OLETF 运动组(8 只)、A2 组为 OLETF 运动+胰

* 基金项目: 国家自然科学基金资助(39970841)

1 复旦大学附属华山医院康复科, 上海, 200040

作者简介: 王丹, 女, 硕士研究生

收稿日期: 2007-02-25

胰岛素组(8只)、B1组为OLETF非运动组(8只)、B2组为OLETF非运动+胰岛素组(8只)。13只LETO大鼠随机分2组:C组为LETO运动组(7只)试验中一只LETO大鼠溺死、D组为LETO非运动组(6只);A2、B2组处死前经肝门静脉给予胰岛素10U/kg的即刻注射,1min后处死,取材。

1.3 运动方法

参照Ploug报道^[2]的大鼠游泳运动方法,采用无负重耐力游泳运动方案,游泳水温 $29\pm 2^{\circ}\text{C}$,水深50cm,每只大鼠有200cm的活动面积以保证大鼠持续活动。运动组动物每天游泳1h,每周5d,历时12周。试验中1只LETO大鼠溺死。

1.4 检测指标

1.4.1 体重:44周龄时,游泳训练开始前测体重1次。56周龄游泳训练结束后,测体重1次。

1.4.2 口服葡萄糖耐量实验(oral glucose tolerance test, OGTT):实验大鼠在第44周(游泳训练开始前),及第56周(游泳训练结束后)分别进行1次OGTT试验,每次试验前禁食14h。从尾静脉取血,通过Freestyle血糖仪测定空腹血糖后,喂服葡萄糖(2g/kg BW),然后分别测定30min,60min及120min时的血糖水平。44周龄的OLETF大鼠按照糖耐量异常衡量标准:餐后血糖高峰值在16.8mmol/L以上,或者餐后2h血糖在11.2mmol/L以上,进行筛选,所选的32只大鼠全部符合糖耐量异常标准,是糖尿病发病大鼠。

1.4.3 GLUT4 mRNA:用Real-time PCR方法测定。

1.5 标本采集及处理

最后一次运动后14h,大鼠称重,腹腔注射戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉后,冰冻钳取活体骨骼肌(股四头肌)立即置于液氮内,后转入 -70°C 低温冰箱保存。

1.6 GLUT4的mRNA的测定

1.6.1 引物的设计:GLUT4的上游引物为5'-ATGGCTGTCGCTGGTTTCTC-3',下游引物为5'-ACGAGGAGGACGGCAAATAG-3'(上海生工)。

1.6.2 模板的制备:取约100mg肌肉组织,用生理盐水清洗2遍后置于离心管中,加入1ml的Trizol试剂(美国Gibco公司),剪碎,冰浴中匀浆,室温放置5min后加入0.2ml氯仿。颠倒混匀。离心20min(4°C , 12000r/min,德国Eppendorf公司Centrifuge5810R),转上层液相至另一个EP管中,加入0.5ml异丙醇(等体积),室温放置15min,再离心15min(4°C , 12000r/min),弃上清。沉淀中加入75%乙醇0.5ml,离心5min(4°C , 7500r/min),弃上清,空气干燥10min

后溶解于30 μl DEPC处理的水中。转入 -70°C 低温冰箱备用。

1.6.3 反转录:使用RT-PCR试剂盒(日本Takara公司)。RT过程:反转录反应液总体积10 μl 。

1.6.4 Real-time PCR:反应液总体积50 μl ,按照说明配制反应液。按照以下条件进行反应:首先是 95°C ,15min,1Cycle,然后以 95°C 15s, 55°C 30s, 72°C 40s的条件循环40次。 95°C ,15s, 60°C ,15s, 95°C ,15s。Real-time检测仪(7300 Sequence Detection System)(美国ABI公司)检测,数据采用仪器自带软件ABI Prism 7300 SDS软件分析; ΔCt =目标基因CT值-内参(GAPDH)CT值,mRNA相对表达量 $=2^{-\Delta\text{Ct}}\times 100\%$ 。

1.7 统计学分析

实验数据用均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。统计学分析采用STATA8.0。

2 结果

2.1 实验干预对各组大鼠体重的影响

游泳训练前,糖尿病大鼠运动组与非运动组比较,体重差异无显著性意义($P>0.05$);正常大鼠运动组与其对应的非运动组大鼠比较,体重差异无显著性意义($P>0.05$);经12周的游泳训练后,糖尿病大鼠运动组与非运动组比较,体重差异无显著性意义($P>0.05$);正常大鼠运动组大鼠体重与其对应的非运动组大鼠比较,体重差异无显著性意义($P>0.05$);见表1。

表1 各组大鼠运动前后体重的比较 ($\bar{x}\pm s$,g)

组别	鼠数	运动前体重	运动后体重
A1组	8	549.0 $\pm$ 60.4①	488.3 $\pm$ 50.2
A2组	8	611.5 $\pm$ 43.7	506.3 $\pm$ 66.6
B1组	8	582.3 $\pm$ 64.2	477.0 $\pm$ 112.6
B2组	8	533.3 $\pm$ 58.2	463.4 $\pm$ 68.1
C组	7	496.4 $\pm$ 14.7②	529.5 $\pm$ 31.2
D组	6	500.6 $\pm$ 11.4	564.8 $\pm$ 70.6

①与B1组比较 $P>0.05$; ②与D组比较 $P>0.05$

2.2 实验干预对各组大鼠糖耐量试验的影响

44周龄的OLETF大鼠按照糖耐量异常衡量标准:餐后血糖高峰值在16.8mmol/L以上,或者餐后2h血糖在11.2mmol/L以上,进行筛选,所选的32只大鼠全部符合糖耐量异常标准,是糖尿病发病大鼠。LETO大鼠血糖正常。运动前0min,30min,60min,120min糖尿病大鼠运动组,糖尿病大鼠运动组+胰岛素组,糖尿病大鼠非运动组和糖尿病大鼠非运动+胰岛素组血糖差异无显著性意义($P>0.05$);正常大鼠运动组与正常大鼠非运动组比较,血糖差异无显

著性意义 ($P>0.05$); 经过 12 周游泳训练后, 重测大鼠糖耐量 0min, 30min, 60min 糖尿病大鼠运动组, 糖尿病大鼠运动组+胰岛素组, 糖尿病大鼠非运动组和糖尿病大鼠非运动+胰岛素组血糖差异无显著性意义; 正常大鼠运动组与正常大鼠非运动组比较, 血糖差异无显著性意义 ($P>0.05$); 120min 糖尿病大鼠运动组, 糖尿病大鼠运动组+胰岛素组, 糖尿病大鼠非运动组和糖尿病大鼠非运动+胰岛素组, 血糖差异无显著性意义 ($P>0.05$); 正常大鼠运动组与正常非运动组比较, 血糖明显降低, 差异有显著性意义 ($P<0.05$); 见表 2。

2.3 实验干预对各组大鼠骨骼肌 GLUT4 mRNA 的影响

GLUT4 mRNA 的表达量: A1 组, 0.012125 ± 0.005710 ; A2 组, 0.150925 ± 0.149059 ; B1 组,

0.004175 ± 0.000970 ; B2 组, 0.082050 ± 0.039458 ; C 组, 0.022550 ± 0.019611 ; D 组, 0.0138775 ± 0.0079384 。

糖尿病大鼠非运动组比正常大鼠非运动组 GLUT4 mRNA 降低, 差异有显著性意义 ($P<0.01$); 糖尿病大鼠运动组比糖尿病大鼠非运动组 GLUT4 mRNA 升高 3 倍, 差异有显著性意义 ($P<0.01$); 糖尿病大鼠运动+胰岛素组比糖尿病大鼠运动组 GLUT4 mRNA 升高 13 倍, 差异有显著性意义 ($P<0.05$); 糖尿病大鼠非运动+胰岛素组比糖尿病大鼠非运动组 GLUT4 mRNA 升高 20 倍, 差异有显著性意义 ($P<0.01$); 糖尿病大鼠运动+胰岛素组比糖尿病大鼠非运动+胰岛素组 GLUT4 mRNA 升高 2 倍, 但差异无显著性意义 ($P>0.05$); 正常大鼠运动组比非运动组 GLUT4 mRNA 升高, 但差异无显著性意义 ($P>0.05$)。

表2 各组大鼠运动前后糖耐量试验比较

	$(\bar{x} \pm s, \text{mmol/L})$							
	0min		30min		60min		120min	
	运动前	运动后	运动前	运动后	运动前	运动后	运动前	运动后
A1 组	6.28 $\pm$ 1.80	7.51 $\pm$ 4.81	16.35 $\pm$ 4.00	18.36 $\pm$ 6.88	19.54 $\pm$ 2.09	16.27 $\pm$ 7.00	13.55 $\pm$ 1.95	12.53 $\pm$ 5.54
A2 组	6.23 $\pm$ 1.01 ^①	7.84 $\pm$ 1.74 ^①	15.56 $\pm$ 3.24 ^①	18.85 $\pm$ 2.94 ^①	19.56 $\pm$ 2.86 ^①	18.29 $\pm$ 3.84 ^①	13.59 $\pm$ 1.40 ^①	11.29 $\pm$ 4.39 ^①
B1 组	5.81 $\pm$ 0.99 ^②	8.95 $\pm$ 3.65 ^②	13.95 $\pm$ 2.46 ^②	22.93 $\pm$ 3.74 ^②	18.48 $\pm$ 1.89 ^②	19.75 $\pm$ 5.59 ^②	12.38 $\pm$ 1.07 ^②	12.85 $\pm$ 4.79 ^②
B2 组	7.03 $\pm$ 1.18 ^③	8.74 $\pm$ 2.54 ^③	16.48 $\pm$ 2.36 ^③	20.93 $\pm$ 4.19 ^③	19.86 $\pm$ 3.25 ^③	21.49 $\pm$ 2.60 ^③	14.75 $\pm$ 3.28 ^③	15.71 $\pm$ 2.98 ^③
C 组	4.00 $\pm$ 0.46	5.30 $\pm$ 0.23	5.80 $\pm$ 1.21	6.55 $\pm$ 0.81	6.92 $\pm$ 1.19	7.55 $\pm$ 0.46	4.92 $\pm$ 0.64	5.15 $\pm$ 0.46
D 组	4.36 $\pm$ 0.91 ^④	5.48 $\pm$ 3.65 ^④	7.06 $\pm$ 1.59 ^④	9.4 $\pm$ 5.52 ^④	7.08 $\pm$ 1.07 ^④	7.40 $\pm$ 2.54 ^④	4.80 $\pm$ 0.82 ^④	6.53 $\pm$ 0.85 ^⑤

①A1 组与 A2 组比较, $P>0.05$; ② A1 组与 B1 组比较, $P>0.05$; ③B1 组与 B2 组比较, $P>0.05$; ④C 组与 D 组比较, $P>0.05$; ⑤C 组与 D 组比较, $P<0.05$

3 讨论

非运动的糖尿病大鼠与运动的糖尿病大鼠体重、血糖差异无显著性, 考虑对于糖尿病治疗首要的方法是控制饮食, 如果单纯的只运动, 同一病程的大鼠, 运动组与非运动组体重、血糖差异不大。

GLUT4 是葡萄糖转运的限速因子, GLUT4 位于肌细胞内陷所形成的横小管膜上, 在运动或胰岛素刺激时会被激活, 可从细胞膜内转移到细胞膜上。然后将葡萄糖转运进细胞膜内, 在受胰岛素刺激后, 骨骼肌和脂肪细胞膜上的 GLUT4 数量可在短时间内增加几十倍, 同时, 膜上 GLUT4 的活性也有所增加, 对葡萄糖的摄取也相应增加^[3]。

本试验糖尿病大鼠非运动组比正常大鼠非运动组 GLUT4 mRNA 降低, 差异有显著性 ($P<0.01$), 显示: 糖尿病大鼠 GLUT4 mRNA 表达量明显低于正常大鼠。这和以往的实验结果一致^[4], 其原因推测可能与低胰岛素血症和高血糖对骨骼肌细胞内 GLUT4 的基因表达抑制有关, 这也可能是糖尿病大鼠发生胰岛素受体后抵抗的主要原因。

本实验经过 12 周的耐力运动后, 糖尿病大鼠运动组比糖尿病大鼠非运动组 GLUT4 mRNA 升高 3 倍, 差异有显著性意义 ($P<0.01$), 接近正常水平, 显

示耐力运动可以提高糖尿病大鼠 GLUT4 mRNA 的表达与以往研究相似^[5-6]。刘传道等^[7]研究发现, 经过 8 周的耐力运动后糖尿病大鼠运动组的 GLUT4 mRNA 表达均较糖尿病对照组明显升高; Ren 等^[8]研究表明经过一次耐力训练大鼠骨骼肌中 GLUT4 mRNA 量增加约 2 倍, GLUT4 增加 50%, 经过 2 次耐力训练(每天 1 次)GLUT4 增加约 2 倍, 而 GLUT4 mRNA 量未再增加, 在胰岛素刺激情况下细胞膜上 GLUT4 含量较正常组高 2 倍。Ren 还观察到正常大鼠运动 3h 后, 骨骼肌细胞内 GLUT4 mRNA 和蛋白含量就有所增加, 而且 GLUT4 蛋白含量的增加可持续到停止运动 1 周后, GLUT4 含量的增加和骨骼肌对胰岛素敏感性的改变在时间上和程度上相吻合^[9]。Cox 等^[10]也研究了短期运动训练对老年人骨骼肌细胞 GLUT4 的影响, 经过 7 天的耐力运动, 老年人骨骼肌细胞 GLUT4 的含量明显增加, 同时胰岛素活性也明显增加。因此, 通过有规律的运动锻炼有望改善因增龄引起的骨骼肌细胞 GLUT4 含量减少, 这对预防老年人发生胰岛素抵抗, 改善外周组织对胰岛素的敏感性有重要作用。

糖尿病大鼠运动组比糖尿病大鼠非运动组 GLUT4 mRNA 升高 3 倍, 差异有显著性意义 ($P<0.01$); 而糖尿病大鼠非运动+胰岛素组比糖尿病大

鼠非运动组 GLUT4 mRNA 升高 20 倍, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$) 提示: 运动和胰岛素刺激的葡萄糖转运机制不一样。胰岛素是主要通过 PI3 K 途径, 运动促进 GLUT4 mRNA 表达的具体信号机制目前尚不清楚。大多数学者认为 Ca^{2+} 和 AMPK 参与了其中。运动引起细胞内钙离子浓度的升高和 AMPK 的激活导致了一系列的信号瀑布, 最终作用 GLUT4 基因的转录因子如 MEF₂ 和 GEF 等从而引起 GLUT4 mRNA 水平的提高^[1], 但是仍需要大量深入的研究以进一步阐明。Douen 等^[12]研究发现, 正常大鼠进行 45min 的跑台运动后, 骨骼肌细胞的细胞膜上 GLUT4 增加, 但并未使 IM 中的 GLUT4 减少, 表明骨骼肌细胞中存在分别对胰岛素和运动敏感的 GLUT4。Douen 等让大鼠分别进行急性运动或给予大鼠胰岛素注射, 发现与正常对照组相比, 胰岛素注射组大鼠骨骼肌细胞外膜上 GLUT4 增加 1.5 倍, 内膜上 GLUT4 下降 33%, 急性运动组大鼠骨骼肌细胞外膜上 GLUT4 增加 2.5 倍, 内膜上 GLUT4 仅下降 8%。因此认为, 细胞内可能存在着分别对运动和胰岛素敏感的两种不同的 GLUT4 池, 运动和胰岛素通过不同途径作用于这两种特定的 GLUT4 池^[13]。

糖尿病大鼠运动+胰岛素组比糖尿病大鼠非运动+胰岛素组 GLUT4 mRNA 升高 2 倍, 提示运动加胰岛素对 GLUT4 的表达调节具有协同作用, 这种叠加的降糖效果是单独用胰岛素或运动治疗都不能达到的。刘传道等^[7]研究发现, 低强度运动加胰岛素对 GLUT4 的表达调节具有协同作用。相反, 在高强度运动加胰岛素组大鼠却未见到类似显著增高的结果, 可能与高强度运动容易导致游离脂肪酸和儿茶酚胺水平增高以及氧化应激损伤有关, 这些因素对 GLUT4 表达均有负性调节作用^[14]。

4 结论

运动不但可以预防糖尿病的发生, 而且也是糖尿病治疗的三大手段之一。运动能促进 GLUT4 mRNA 的表达, 运动和胰岛素刺激的葡萄糖转运机制不一样, 运动和胰岛素对糖尿病治疗具有协同作用, 两者不能相互替代。

参考文献

- [1] 吴毅, 李益明. 运动对糖尿病大鼠骨骼肌葡萄糖载体基因的表达的影响[J]. 中华医学杂志, 1997, 77(10): 758—761.
- [2] Ploug T, Stallknecht BM, Pedersen O, et al. Effect of Endurance Training On Glucose-Transport Capacity And Glucose Tranporter Expression In Rat Skeletal -Muscle [J]. American Journal of Physiology, 1990, 259 (6): E778—E786.
- [3] 李益明. 葡萄糖转运体 IV 和糖尿病 [J]. 国外医学·内科学分册, 1997, 24(1): 16—19.
- [4] Berger J, Strout, Saperstein HV, et al. Decreased expression of the insulin -responsive glucose transporter in diabetes and fasting[J]. Nature, 1989, 340(6228): 70—72.
- [5] 唐兆生, 袁莉, 刘赞, 等. 运动对 2 型糖尿病大鼠脂联素和 GLUT4 基因表达的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(22): 3439—3442.
- [6] 周思红. 运动与 GLUT4 [J]. 中国运动医学杂志, 2002, 21(6): 594—597.
- [7] 刘传道, 江钟立, 朱红军, 等. 不同强度的耐力运动对糖尿病大鼠骨骼肌 GLUT4 mRNA 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(4): 244—247.
- [8] Ren JM, Semenkovich CF, Gulve EA, et al. Exercise Induces Rapid Increases In Glut4 Expression, Glucose-Transport capacity, And Insulin-Stimulated Glycogen-Storage In Muscle [J]. Journal Of Biological Chemistry, 1994, 269 (20): 14396—14401.
- [9] Schalin JC, Yki JH, Bourey R, et al. Effect of insulin on GLUT4 mRNA and protein concentrations in skeletal muscle of patients with NIDDM and their first -degree relatives [J]. Diabetologia, 1994, 37: 401.
- [10] Cox JH, Cortright RN, Dohm GL, et al. Effect of aging on response the exercise training in humans: skeletal muscle GLUT4 and insulin sensitivity [J]. J Appl Physiol, 1999, 86: 2019.
- [11] Holmes B, Dohm GL. Regulation of GLUT4 gene expression during exercise [J]. Medicine And Science In Sports And Exercise, 2004, 36(7): 1202.
- [12] Marette A, Burdett E, Douen A, et al. Insulin Induces The Translocation Of Glut4 From A Unique Intracellular Organelle To Transverse Tubules In Rat Skeletal -Muscle [J]. Diabetes, 1992, 41 (12): 1562—1569.
- [13] 杨晓冰, 朱尚权. 运动促进大鼠骨骼肌细胞葡萄糖载体 4 的转位[J]. 中国运动医学杂志, 2000, 19(1): 37—38.
- [14] Pessler D, Rudich A, Bashan N, et al. Oxidative stress impairs nuclear proteins binding to the insulin responsive element in the GLUT4 promoter[J]. Diabetologia, 2001, 44(12): 2156—2164.