

·基础研究·

电刺激对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌细胞胰岛素信号通路的影响*

林 强¹ 吴 毅^{1,2} 胡永善¹ 胡瑞萍¹

摘要 目的:观察电刺激对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌细胞胰岛素相关信号转导通路的影响并探讨其内在机制。方法:取 20 只 OLETF 大鼠,分离趾长伸肌,按照抑制剂和电刺激干预的不同分为 4 组,分别为电刺激组、无电刺激组、compound C+电刺激组和 compound C 组。用 Western 印迹法测定骨骼肌中磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase,PI3K)、蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB/Akt)、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)的表达和活性变化。结果:电刺激组骨骼肌细胞中磷酸化 PI3K 蛋白较无电刺激组显著增加($P<0.05$),Akt 磷酸化程度(p-Akt/Akt)较无电刺激组显著增加($P<0.01$);而 ERK 磷酸化程度(p-ERK/ERK)与无电刺激组相比,差异无显著性意义($P>0.05$)。compound C+电刺激组骨骼肌细胞中磷酸化 PI3K 蛋白较 compound C 组显著增加($P<0.01$),Akt 磷酸化程度(p-Akt/Akt)较 compound C 组亦显著增加($P<0.01$)。结论:电刺激诱导骨骼肌收缩可以直接或间接激活骨骼肌 PI3K/Akt 信号转导通路,这一过程不依赖于 AMPK 信号转导通路。

关键词 葡萄糖转运载体 4;电刺激;糖尿病;信号转导通路

中图分类号:R587.1,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-11-0972-04

The effects of electrical stimulation on insulin related signal pathway in skeletal muscle of OLETF rats/LIN Qiang, WU Yi, HU Yongshan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(11):972—975

Abstract Objective: To observe the effects of electrical stimulation on insulin related signal pathway in skeletal muscle of Otsuka long-evans tokushina fatty (OLETF) rats, and to explore the intracellular mechanism. **Method:** Musculus extensor digitorum longus were isolated from twenty OLETF rats, and then the rats were randomly divided into four groups according to different interventions: electrical stimulation group, non-electrical stimulation group, compound C with electrical stimulation group and compound C group. PI3K, Akt and ERK proteins were detected by Western blot analysis. **Result:** The phosphorylated PI3K increased obviously in electrical stimulation group compared with non-electrical stimulation group ($P<0.05$). The phosphorylation level of Akt in electrical stimulation group also increased significantly compared with non-electrical stimulation group ($P<0.01$). However, There was no significant difference in phosphorylation level of ERK between electrical stimulation group and non-electrical stimulation group ($P>0.05$). The phosphorylated PI3K increased obviously in compound C with electrical stimulation group compared with compound C group ($P<0.01$). The phosphorylation level of Akt in compound C with electrical stimulation group also increased significantly compared with compound C group ($P<0.01$). **Conclusion:** Skeletal muscle contractions induced by electrical stimulation directly or indirectly activate PI3K/Akt signal pathway, which is independent of AMPK signal pathway.

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

Key words glucose transporter type 4; electrical stimulation; diabetes mellitus; signal transduction

胰岛素和运动都可以促进骨骼肌细胞葡萄糖运载体 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 的表达和转位,从而促进骨骼肌对葡萄糖的摄取。胰岛素信号通路包括磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 和 Ras-丝裂素原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 两大途径。运动改善骨骼肌葡萄糖代谢的信号转导机制可能涉及:AMP 激活的蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)、细胞内钙离子 (Ca^{2+})、一氧化氮 (nitric oxide, NO)、Akt 底物 (AS160) 等多种信号因

子^[1]。本研究通过电刺激使骨骼肌收缩,并以 AMPK 抑制剂阻断 AMPK 信号途径,观察电刺激诱导的骨骼肌收缩对胰岛素信号通路中的磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt),

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30370685)

1 复旦大学附属华山医院康复医学科,复旦大学上海医学院康复医学系,上海市乌鲁木齐中路 12 号,200040

2 通讯作者

作者简介:林强,男,硕士研究生,住院医师

收稿日期:2008-05-29

细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 的影响, 探讨电刺激激活骨骼肌胰岛素信号转导通路的内在机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采用自发发病的 2 型糖尿病大鼠 (otsuka long-evans tokushina fatty, OLETF) 作为糖尿病动物模型, 共 20 只, 每只体重 400—600g。实验期间, 动物饲养于复旦大学实验动物科学部, 所有大鼠均给予常规饮食和饮水, 饲养条件为室温 25℃, 每日光照约 12h。

实验溶液和试剂包括: Kreb 液: NaCl 6.9g、KCl 0.35g、CaCl₂ 0.28g、NaHCO₃ 2.1g、KH₂PO₄ 0.16g、MgSO₄ 0.29g、葡萄糖 2.0g, 加蒸馏水至 1000ml。兔抗大鼠 Tyr P85 磷酸化 PI3K 多克隆抗体购自 Cell signaling。兔抗大鼠 Ser473 磷酸化 Akt 多克隆抗体、小鼠抗大鼠磷酸化 ERK 单克隆抗体购自 Sigma, 兔抗大鼠 Akt 多克隆抗体、兔抗大鼠 ERK 多克隆抗体购自 Santa Cruz。compound C (AMPK 特异性抑制剂) 购自 Merck。小鼠抗大鼠 GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 和山羊抗鼠 IgG 购自康成生物公司。ECL 购自天根生物公司。

电刺激仪及信号处理系统: SMUP-E 型生物信号处理系统, 由复旦大学上海医学院生理与病理生理学系研制。

1.2 骨骼肌取材和静置

采取颈椎脱臼法处死大鼠, 分离出趾长伸肌, 两端保留完整的肌腱, 沿骨骼肌纵长切开数条肌膜。将骨骼肌两端的肌腱用细线结扎, 以静息张力固定于电极架上, 并垂直悬浮于 Kreb 液中, 静置 30min 使骨骼肌逐渐稳定。静置过程中始终保持 Kreb 液恒温 29℃, 通 O₂。

1.3 骨骼肌分组

根据抑制剂和电刺激干预的不同, 将骨骼肌样本分为 4 组, 每组含 6—8 个骨骼肌样本。4 组分别为电刺激组、无电刺激组、compound C+电刺激组和 compound C 组。

1.4 抑制剂孵育

静置 30min 后, 按照分组加入 compound C (终浓度 20μmol/L^[2]), 继续以静息张力孵育 30min, 未加抑制剂组也继续孵育 30min。孵育过程中始终保持孵育液恒温 29℃, 通 O₂。

1.5 电刺激干预

抑制剂孵育 30min 后, 给予电刺激使骨骼肌强

直性收缩。电刺激条件: 电压 25V、电刺激频率 100Hz, 电刺激脉冲持续时间 0.2ms。共刺激 2 次, 每次持续 5min, 中间休息 1min, 共 11min^[3]。电刺激过程中仍保持孵育液恒温 29℃, 通 O₂。

1.6 骨骼肌保存

将骨骼肌取下, 以锡箔纸包裹, 置于液氮速冻, 并转移至 -70℃ 冰箱, 以备 Western 印迹实验用。

1.7 Western 印迹法检测蛋白

取骨骼肌约 100mg, 剪碎后置于组织匀浆液 600μl (2% SDS, 50mmol/L Tris-HCl pH6.8, 10% 甘油, 1mmol/L Na₃VO₄, 1mmol/L PMSF, 5g/L Leupeptin) 中, 采用 Polytron PT10-35 组织扩散仪制备组织匀浆 (7500-10000g)。所得匀浆置于 4℃, 12000g 离心 10min, 取上清液, 采用改良 Lowery 法测定蛋白浓度, 以备上样。

采用 Western 印迹法测定蛋白含量。取含等量总蛋白 (50μg) 的样品, 100℃ 变性 10min 后, 进行 10% 不连续 SDS-PAGE 电泳。电泳毕, 在 Bio-Rad Mini 湿式转移电泳槽以 100V, 350mA 转膜 2h。转膜结束后, 将 PVDF 膜在 5% 脱脂奶粉中室温封闭 3h, 加一抗兔抗大鼠 Tyr P85 磷酸化 PI3K 多克隆抗体 1:1000、兔抗大鼠 Ser473 磷酸化 Akt 多克隆抗体 1:1000、小鼠抗大鼠磷酸化 ERK 单克隆抗体 1:1000, 4℃ 孵育过夜。PBS 漂洗 3 次后, 加二抗辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (磷酸化 ERK 用山羊抗鼠 IgG) 1:3000, 室温孵育 3h, PBS 漂洗 3 次, ECL 显影, 暗室压片。以相同的方法测总 Akt、ERK 及 GAPDH 蛋白含量。采用 TotalLab V2.01 图像分析软件对显影后的条带灰度进行分析。

1.8 统计学分析

数据采用 Stata7.0 统计软件进行分析。所有定量数据进行正态性和方差齐性检验。计量资料符合正态性分布者以均数±标准差表示, 组间差异用 *t* 检验, *P* 值 < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 电刺激对 OLETF 大鼠骨骼肌细胞胰岛素信号通路中 PI3K、Akt、ERK 蛋白的影响

电刺激组和无电刺激组骨骼肌细胞均可检测到 PI3K、Akt、ERK 的特异性条带。电刺激组骨骼肌细胞中磷酸化 PI3K 蛋白较无电刺激组增加 3.45 倍, 差异有显著性意义 (*P* < 0.05) (图 1); Akt 磷酸化程度 (p-Akt/Akt) 较无电刺激组增加 2.39 倍 (*P* < 0.01) (图 2); 而 ERK 磷酸化程度 (p-ERK/ERK) 与无电刺激组相比, 差异无显著性意义 (*P* > 0.05) (图 3, 表 1)。

2.2 阻断 AMPK 信号通路后,电刺激对 OLETF 大鼠骨骼肌细胞胰岛素信号通路中 PI3K、Akt 的影响

compound C+电刺激组和 compound C 组大鼠骨骼肌细胞均检测到磷酸化 PI3K 蛋白的特异性条带。compound C+电刺激组骨骼肌细胞中磷酸化 PI3K 蛋白较 compound C 组显著增加 3.11 倍 ($P<0.01$)(图 4)。compound C+电刺激组骨骼肌细胞中 Akt 磷酸化程度(p-Akt/Akt)较 compound C 组显著增加 2.73 倍($P<0.01$)(图 5,表 2)。

表 1 电刺激组和无电刺激组大鼠骨骼肌细胞中各信号蛋白活性的比较 ($\bar{x}\pm s$)

蛋白活性	电刺激组	无电刺激组
p-PI3K/GAPDH	0.507±0.177 ^①	0.147±0.076
p-AKT/AKT	1.247±0.109 ^①	0.522±0.033
p-ERK/ERK	0.475±0.167 ^②	0.456±0.134

①与无电刺激组比较 $P<0.05$;②与无电刺激组比较 $P>0.05$



图 1 与无电刺激组相比,电刺激组骨骼肌细胞中 p-PI3K 蛋白明显增高



图 2 与无电刺激组相比,电刺激组骨骼肌细胞中 p-Akt/Akt 明显增高

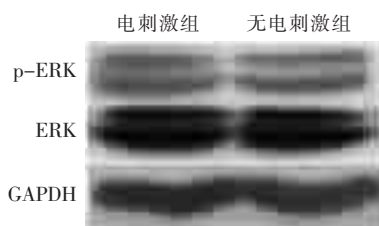


图 3 电刺激组与无电刺激组骨骼肌细胞中 p-ERK/ERK

表 2 compound C+电刺激组和 compound C 组大鼠骨骼肌细胞中各信号蛋白活性的比较 ($\bar{x}\pm s$)

蛋白活性	compound C+电刺激组	compound C 组
p-PI3K/GAPDH	0.318±0.059 ^①	0.122±0.034
p-AKT/AKT	2.224±0.231 ^①	0.815±0.126

①与 compound C 组比较 $P<0.01$

3 讨论

规律的运动增加骨骼肌血流量,改善骨骼肌对胰岛素的敏感性,促进葡萄糖的吸收和利用,已被动物和人体实验所证实^[4-5]。运动和胰岛素是促进葡萄糖代谢的主要因素,它们分别通过不同的信号转导

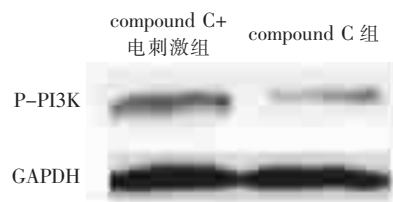


图 4 compound C+电刺激组骨骼肌细胞中 p-PI3K 蛋白较 compound C 组明显增加

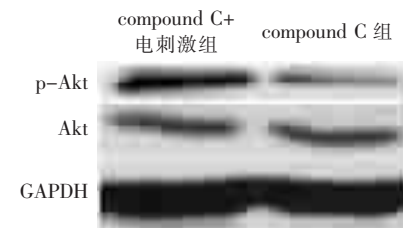


图 5 compound C+电刺激组骨骼肌细胞中 p-Akt/Akt 较 compound C 组明显增加

途径,促进骨骼肌细胞 GLUT4 的表达和转位,从而改善骨骼肌对葡萄糖的摄取^[6]。在胰岛素信号转导途径中,PI3K 和 MAPK 发挥着重要的作用。而在运动介导的 GLUT4 表达和转位的过程中,AMPK 起着关键的作用^[7]。

许多学者观察到运动还可以增加胰岛素通路中相关信号蛋白的活性,如 PI3K、Akt、ERK 等。Arias EB 等^[8]用跑台分别训练大鼠分别训练老龄鼠和幼年鼠 10 周,结果发现老龄鼠骨骼肌 PI3K 磷酸化增加,而幼年鼠无变化,但无论是幼年鼠还是老龄鼠 PI3K 含量均有升高的趋势。Reynolds TH^[9]等报道,轮滑训练 20—22 个月小鼠,骨骼肌 Akt 磷酸化水平高于对照组 45%,蛋白含量升高 50%。我们前期的研究同样表明,急性运动可以增加 2 型糖尿病大鼠骨骼肌 Akt、ERK 的活性;而耐力运动既可以增加 2 型糖尿病大鼠骨骼肌 Akt、ERK 的活性,也可以增加 Akt、ERK 的表达,从而改善骨骼肌 GLUT4 的表达和转位^[10]。这些研究结果均提示,骨骼肌收缩可能通过某种或多种途径激活胰岛素信号通路 PI3K/Akt 信号转导通路,从而促进骨骼肌对葡萄糖的摄取。

关于运动对胰岛素信号转导通路影响的研究,大多是活体动物实验,运动方式是游泳、跑台或轮滑训练等。因此,运动激活胰岛素信号通路的现象多解释为运动增加骨骼肌血流量,改善骨骼肌对胰岛素的敏感性^[11-12]。本研究采用离体骨骼肌,以电刺激方式使骨骼肌收缩,排除了活体动物体内的胰岛素效应,直接观察骨骼肌收缩对胰岛素信号转导途径的影响。研究表明,电刺激诱导 OLETF 大鼠骨骼肌收缩后,胰岛素信号通路中的 PI3K 和 Akt 蛋白磷酸化水平明显增加。该结果提示电刺激诱导骨骼肌收缩可以提高骨骼肌 PI3K 和 Akt 蛋白的磷酸化水平,从

而激活 PI3K 和 Akt, 这与我们前期活体动物实验的研究结果相吻合^[10]。Louden^[13]的实验也得出类似的结果。他用 AICAR 孵育胰岛素抵抗模型的胚胎细胞, 发现 AICAR 既可以通过上调 AMP/ATP 比例来激活 AMPK, 也可以激活胚胎细胞 PI3K 活性, 增加磷酸化 mTOR 和磷酸化 70S6K 蛋白水平, 并促进胰岛素诱导的 2-脱氧葡萄糖摄取。上述研究表明, 运动、电刺激诱导的骨骼肌收缩或 AICAR 模拟的骨骼肌收缩都可以通过某种途径激活胰岛素 PI3K 信号通路。此外, 本研究还观察到, 电刺激对骨骼肌 ERK 蛋白磷酸化水平无明显影响, 对 Akt、ERK 蛋白总含量也无明显影响, 而 Karlsson 的研究表明^[14], 耐力运动能增加大鼠骨骼肌 ERK 蛋白的活性, 我们前期的研究也提示, 耐力运动可以提高大鼠骨骼肌 Akt、ERK 蛋白的表达水平^[10]。这可能是因为电刺激诱导的骨骼肌收缩属于急性运动, 其效应尚不足引起各种蛋白含量及 ERK 活性的改变。

运动和胰岛素促进骨骼肌 GLUT4 转位和葡萄糖摄取的效应具有相加性^[15]。阻断 PI3K 信号途径后, 运动仍可以促进骨骼肌 GLUT4 转位和葡萄糖摄取^[16]。基于上述两点, 可以认为运动和胰岛素是分别通过不同的信号转导途径, 促进骨骼肌对葡萄糖的摄取。但是上述结果并不排斥运动同时激活 AMPK 和 PI3K/Akt 信号通路的可能性。为进一步分析电刺激激活骨骼肌 PI3K/Akt 途径的内在机制, 我们以 compound C 阻断 AMPK 信号通路, 再观察电刺激对骨骼肌胰岛素 PI3K、Akt 蛋白的影响。研究发现, compound C+电刺激组骨骼肌 PI3K 和 Akt 的活性较 compound C 组明显升高, 这说明阻断骨骼肌 AMPK 信号通路后, 电刺激仍然可以使骨骼肌 PI3K 和 Akt 蛋白的活性增加。也就是说, 电刺激激活骨骼肌 PI3K 和 Akt 并不依赖 AMPK 的活性。我们分析, 活体实验中运动提高胰岛素 PI3K 活性可能是因为运动改善骨骼肌血流和对胰岛素的敏感性, 而在骨骼肌离体实验中, 电刺激激活骨骼肌 PI3K/Akt 则可能是通过目前尚不清楚的途径, 而激活 PI3K 的上游信号分子则有待于进一步研究发现。

参考文献

[1] Rose AJ, Richter EA. Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2005, 20: 260—270.

[2] Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. Protein kinase inhibitors block the stimulation of the AMP-activated protein kinase by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside [J]. *FEBS Lett*, 2002, 531(2):189—192.

[3] Ai H, Ralston E, Lauritzen HP, et al. Disruption of microtubules in rat skeletal muscle does not inhibit insulin- or contraction-stimulated glucose transport [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 285(4):E836—844.

[4] Holloszy JO. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity [J]. *J Appl Physiol*, 2005, 99(1):338—343.

[5] Ostergard T, Andersen JL, Nyholm B, et al. Impact of exercise training on insulin sensitivity, physical fitness, and muscle oxidative capacity in first-degree relatives of type 2 diabetic patients [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 290(5):E998—1005.

[6] Jessen N, Goodyear LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle [J]. *J Appl Physiol*, 2005, 99(1):330—337.

[7] 王丹, 吴毅, 胡永善, 等. 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 [J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(5):391—394.

[8] Arias EB, Gosselin LE, Cartee GD. Exercise training eliminates age-related differences in skeletal muscle insulin receptor and IRS-1 abundance in rats [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2001, 56(10):B449—455.

[9] Reynolds TH, Reid P, Larkin LM, et al. Effects of aerobic exercise training on the protein kinase B (PKB)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in aged skeletal muscle [J]. *Exp Gerontol*, 2004, 39(3):379—385.

[10] 胡瑞萍, 吴毅, 胡永善. 运动对大鼠骨骼肌胰岛素信号转导蛋白表达和活性的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2005, 20(6):409—411.

[11] 曹师承, 孙黎光, 赵刚, 等. 耐力运动对大鼠骨骼肌 ERK1/2 活性的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2007, 23(3):351—354.

[12] 曹师承, 孙黎光, 赵刚, 等. 有氧运动对大鼠骨骼肌 mTOR 活性与蛋白表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(1):34—36.

[13] Louden E, Chi M, Moley K. Crosstalk between the AMP-activated kinase and insulin signaling pathways rescues murine blastocyst cells from insulin resistance [J]. *Reproduction*, 2008, 136:335—344.

[14] Karlsson HK, Nilsson PA, Nilsson J, et al. Branched-chain amino acids increase p70S6k phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 287(1):E1—7.

[15] Holloszy JO. A forty-year memoir of research on the regulation of glucose transport into muscle [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 284(3):E453—467.

[16] Schimack G, Defronzo RA, Musi N. AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2006, 8(6):591—602.