

mTOR/S6K1 信号通路与有氧运动改善小鼠高脂饮食诱导胰岛素抵抗间的关系*

苑 红¹ 牛燕媚¹ 刘彦辉¹ 苏照鹏¹ 李慧阁¹ 姜 宁¹ 傅 力^{1,2}

摘要 目的:探讨有氧运动对胰岛素抵抗小鼠骨骼肌中 mTOR/S6K1 和 PGC-1 α 的影响, 分析其分子生物学机制。**方法:** C57BL/6 小鼠高脂饮食喂养 8 周以建立胰岛素抵抗模型。后小鼠随机分为安静组(HC)和运动组(HE)。HE 组施以 6 周跑台有氧训练。实验结束后采用 OGTT 检测葡萄糖耐量, 组织学检测胰岛形态变化。ELISA 法检测血清空腹胰岛素水平, Northern blot、Western blot 和免疫荧光法检测骨骼肌中 mTOR、S6K1 及其磷酸化蛋白 (pS6K1-Thr³⁸⁹) 和 PGC-1 α mRNA 和蛋白的表达。**结果:**与 HC 组相比, 小鼠 HE 组 6 周有氧运动后体重、空腹血清胰岛素值和胰岛 β 细胞团面积百分比均呈显著下降; 葡萄糖耐量也得到明显改善; 骨骼肌中 mTOR、S6K1、pS6K1-Thr³⁸⁹ mRNA 和蛋白表达均明显降低, 而 PGC-1 α mRNA 和蛋白明显升高。**结论:**有氧运动明显增加了机体组织对胰岛素的敏感性, 推测有氧运动可能通过抑制 mTOR/S6K1 信号通路, 增加胰岛素抵抗小鼠骨骼肌的能量代谢从而改善胰岛素抵抗。

关键词 胰岛素抵抗; 有氧运动; 哺乳动物; 雷帕霉素靶蛋白; 核糖体 S6 激酶 1; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 α

中图分类号: R587.1, R493 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2009)-04-0297-06

A study on the relationship of mTOR/S6K1 signaling pathway and aerobic exercises attenuating insulin resistance induced by high fat diet in mice/YUAN Hong, NIU Yanmei, LIU Yanhui, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(4): 297—302

Abstract Objective: To investigate the effects of aerobic exercise on mTOR/S6K1 and PGC-1 α in mice with insulin resistance, and its possible mechanisms. **Method:** C57BL/6 male mice fed with high fat diet for 8 weeks were proved to establish insulin resistance models. Afterward mice were randomly divided to HC (high fat diet, no exercise) and HE (high fat diet+exercise) groups. Mice in HE group were submitted to treadmill aerobic training for 6 weeks. By the end of training, the changes of glucose tolerance by oral glucose tolerance test (OGTT) and morphology of pancreatic islets under microscope were observed. Insulin concentration was measured by ELISA. Northern blot, Western blot and immunofluorescence examination. All tests were performed to detect mTOR, S6K1 (and/or pS6K1-Thr³⁸⁹) and PGC-1 α mRNA and protein expression in skeletal muscle. **Result:** By comparing with HC group, after 6 week aerobic exercises the body weight, fasting serum insulin level and area of pancreatic islets of mice in HE group decreased significantly. Furthermore, OGTT improved. The expressions of mTOR, S6K1 (and/or pS6K1-Thr³⁸⁹) mRNA and protein decreased significantly. PGC-1 α mRNA and protein level increased markedly in skeletal muscles in HE group. **Conclusion:** Aerobic exercises attenuates insulin resistance by inhibiting activity of mTOR/S6K1 signaling pathway, activating energy metabolism and then elevating skeletal muscle insulin sensitivity.

Author's address Dept. of Health and Exercise Science, Tianjin University of Sports, Tianjin, 300381

Key words insulin resistance; aerobic exercises; mammalian target of rapamycin; p70 ribosomal S6 kinase 1; peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator 1 α

机体组织对胰岛素敏感性降低又称胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR), 主要表现为肝脏、骨骼肌和脂肪组织等胰岛素作用的靶器官对胰岛素刺激的敏感性降低。IR 是导致糖尿病、高脂血症、动脉粥样硬化、高血压等一系列常见多发病的主要原因, 已成为严重威胁人类健康的主要病因。随着人们生活水平和健康意识的提高, 对 IR 发生、发展的深入研究显得尤为重要, 发现新治疗靶点, 采取有效预防措施改善胰岛素抵抗已成为当今研究的热点课题。研究证

实, 有氧运动可以提高机体对胰岛素的敏感性。但其具体分子生物学机制仍不完全清楚。近年来, 与营养信号关系密切的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30570898 和 30871213) 和天津市重大攻关 (05YFGDSF02100)

1 天津体育学院运动人体科学系, 300381

2 通讯作者

作者简介: 苑红, 女, 硕士

收稿日期: 2008-07-22

(mammalian target of rapamycin, mTOR) 受到关注。mTOR 具有营养感受器的作用, 而且发现 mTOR 与 IR 的发生、发展有着密切的关系。另一方面, 经研究发现在长期反复的有氧运动后 mTOR 和核糖体 S6 激酶 1(S6K1) 表达明显下调, 从而降低了对胰岛素/PI3K/PKB 信号通路的抑制作用^[1], 但没有发现有氧运动对高脂饮食后或胰岛素抵抗后的影响情况的报道; 还发现 S6K1 表达的下调又起到减轻对过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 α (PGC-1 α) 抑制作用而使 PGC-1 α 表达明显上调, 从而增加线粒体生物合成, 增加机体能量代谢, 而起到改善胰岛素抵抗的作用^[2-3]。

因此, 本研究采用 C57BL/6 小鼠, 通过喂高脂饮食 8 周以建立 IR 动物模型, 随后对动物施以 6 周 75% VO_{2max} 的跑台训练, 观察 mTOR/S6K1 的表达情况, 分析 mTOR/S6K1 信号通路在有氧运动改善 IR 进程中的调节作用, 以期探究其分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验选用 30 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 体重为 24.6 ± 0.75 g, 由军事医学科学院实验动物中心提供。小鼠在本实验室随机分笼饲养, 自由进食饮水, 光照 12h/d。动物室室温 20—25℃, 湿度为 30%—40%。

1.2 实验动物分组

将实验动物进行适应性喂养后随机分为正常饮食组(10 只)和高脂饮食组(20 只)。分别喂以正常饲料和高脂饲料 8 周, 经空腹血清胰岛素值具有显著变化和口服葡萄糖耐量试验评价后确定胰岛素抵抗模型成功。随后将高脂饮食组随机分为高脂饮食安静组(HC 组, 10 只)和高脂饮食运动组(HE 组, 10 只)。

1.3 动物饲料配方

正常饮食组喂以标准饲料; 高脂饮食组喂以高脂饲料, 其成分: 蛋白 20% kCal、碳水化合物 35% kCal、脂肪 45% kCal; 以上饲料均购于中国医学科学院实验动物研究所。

1.4 动物的运动方案

运动组进行跑台训练, 正式运动前对小鼠进行适应性训练, 以使其适应试验跑台。后进行每天 1 次, 每次以 12m/min(相当于 75% VO_{2max}) 的速度运动 60min, 每周 5 次, 训练期为 6 周。

1.5 口服葡萄糖耐量试验

6 周有氧运动结束后, 进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT)。各组动物小鼠禁食 14—16h, 鼠尾静脉取

血微量用 One Touch 血糖仪测定各小鼠空腹(T0min)血糖值, 然后迅速给小鼠根据体重口腔灌注 10 μ l/g 20%葡萄糖溶液, 并测量 T15, T30, T60, T90, T150 和 T180min 各时间点的血糖值。

1.6 动物血液、骨骼肌、胰腺样本留取

动物运动训练结束后, 将各组小鼠禁食 12h, 乙醚麻醉, 采用内眦取血法留取小鼠血液样本, 静置 30min 后, 4℃, 3000g 离心 15min, 提取血清, 置于 -80℃ 保存, 以备测定运动后各组空腹胰岛素水平。随后, 立即分离小鼠三头肌和胰腺组织, 将小鼠三头肌迅速置于液氮中, 后保存于 -80℃ 冰箱; 胰腺放入 10% 甲醛溶液固定, 以备后续形态学实验使用。每组随机抽取四块不同小鼠三头肌切成 5mm 立方组织块, 用 1 $\times$ PBS 清洗后放入 4% 多聚甲醛内固定 3—4h, 后转入 30% 蔗糖溶液内 4℃ 脱水过夜。次日将脱水后的骨骼肌用 OCT 包埋后存放于 -80℃ 冰箱, 以备后续免疫荧光检测使用。

1.7 空腹血清胰岛素值检测

取 -80℃ 冻存的各组血清采用 ELISA 法测定空腹血清胰岛素值。

1.8 胰岛 β 细胞形态学观察

将甲醛固定的胰腺经乙醇梯度脱水, 再经丙酮、二甲苯脱水透明后, 用石蜡包埋, 切片, HE 法染色。高倍镜下观察单一视野下胰岛 β 细胞团面积, 统计分析各组间差异。

1.9 Northern blot 法测定骨骼肌中 mTOR、S6K1 和 PGC-1 α mRNA 表达

采用 Trizol 方法提取骨骼肌中总 RNA, 分光光度计测定总 RNA 的浓度和纯度。配制甲醛变性凝胶, 取等量总 RNA(10 μ g) 上样, 35V 电压电泳过夜。采用 Turboblotter 将 RNA 转至尼龙膜, 后紫外交联固定。探针制备采用 TOPO-TA 克隆法; PCR 采用引物序列为:

mTOR 上游 5'-GCGGCCTGGAATGCGGAAGTGG-3', 下游 5'-AAAGCCCCAAGGAGCCCCAACA-3'; S6K1 上游 5'-GGCGGGACGGCTTTTACCT-3', 下游 5'-ACCTTCCATAGC-CCCCTTTACC-3'; PGC-1 α 上游 5'-TTGCTCTTCCTT-TAACTCTCCGTG-3', 下游 5'-ATTGCTTTCTGCTTCTGCTCTC-3'。

将 PCR 产物克隆到 TOPO 载体内, 转化细菌, 扩增重组质粒 DNA, 并用 EcoR I 酶切回收 DNA 片段, DNA 测序鉴定克隆的 DNA 片段。

使用 Stratagene 随机引物标记试剂盒和 α -32PdCTP 标记探针, 45℃ 杂交过夜。次日, 取出杂交膜, 洗膜后放入装有增感屏的暗盒中, 曝光 48h。使用 Typhoon-9400 图像扫描仪分析结果。

1.10 Western blot 测定骨骼肌中 mTOR、S6K1、pS6K1-Thr³⁸⁹ 和 PGC-1 α 蛋白表达

采用 NP-40 法提取骨骼肌中总蛋白, 在垂直电泳仪 (Invitrogen) 上用等量蛋白质样品经 8% SDS-PAGE 分离后, 转移于 PVDF 膜 (Millipore) 上。用 5% BSA 按 1:1000 比例稀释一抗 (Cell Signal Technology), 4℃ 孵育过夜。次日 1×TBST 洗涤 5min×3 次, 用 5% 脱脂奶粉按 1:7500 比例稀释二抗 (Invitrogen), 室温孵育 1h, 1×TBST 充分洗涤 5min×3 次后, 使用 ECL 试剂盒 (Pierce) 发光显影, 胶片曝光, 扫描定量各条带的相对灰度值。

1.11 免疫荧光染色

OCT 包埋后的组织块冰冻切片, 厚度为 10 μ m; 切片后立即染色, 或于 -20℃ 保存备用。切片室温复温 1h, 用 100 μ l 封闭液 (0.2% TritonX-100, 1% BSA, 1% NGS) 封闭 1h, 其间用抗体稀释液按 1:50 稀释一抗。封闭后, 加入 100 μ l 已被稀释的一抗, 室温孵育 2—3h 或 4℃ 孵育过夜。然后, 用 1×PBS 洗片 3 次, 每次 5min, 其间用抗体稀释液按 1:2000 稀释二抗, 再加入已被稀释的二抗 100 μ l, 室温避光孵育 1h。最后加入 1×Hoechst 孵育 5min, 1×PBS 洗片 3 次, 每次 5min, 封片, ZEISS 共焦显微镜下扫描摄像。

1.12 统计学分析

所有实验数据由 SPSS 统计软件处理。计算均值和标准差, 数据采用单因素方差分析。各组间差异性检验的显著性水平定为 $P < 0.05$ 以上。

2 结果

2.1 有氧运动对小鼠体重、空腹血清胰岛素值、OGTT 和胰岛 β 细胞形态学的影响

经过 6 周有氧运动后, HE 组与 HC 组相比, 小鼠体重降低了 22.75% ($P < 0.01$) (见表 1), 空腹血清胰岛素降低了 41.9% (由 0.62 ± 0.26 至 0.30 ± 0.04 , $P < 0.05$)。HE 组与 HC 组相比, 峰值明显下降, 峰值出现的时间点前移, 在出现峰值时刻 15—60min 时葡萄糖耐量有明显改善, 但至 3h 时血糖值仍高于基础水平。从 HE 染色图亦可见 HE 组胰岛 β 细胞面积减小的同时胰岛炎性浸润表现轻于 HC 组, 边缘轮廓较清晰 (图 1, 见彩色插页)。

2.2 骨骼肌 mTOR mRNA 及蛋白表达

表 1 两组小鼠体重变化结果 ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	例数	运动前	运动后
HC 组	10	24.59 ± 0.83	38.77 ± 5.48
HE 组	10	24.56 ± 1.14	29.95 ± 1.12 ^①

①与 HC 组相比较 $P < 0.01$

Northern blot 检查和 Western blot 检查结果显示 (如表 2 和图 2—3 所示), 骨骼肌中 mTOR mRNA 和蛋白表达的趋势一致, 有氧运动后胰岛素抵抗小鼠骨骼肌中 mTOR mRNA 和蛋白分别下降了 16.27% ($P < 0.05$) 和 19.22% ($P < 0.05$)。从图 4 (见彩色插页) 免疫荧光染色的结果中可以看出 mTOR 蛋白表达与 Western blot 有同样的变化趋势且可以看出 mTOR 蛋白主要在胞浆内表达。

表 2 两组小鼠骨骼肌 mTOR mRNA 及蛋白表达变化结果 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	mTOR mRNA	mTOR 蛋白
HC 组	100.00	100.00
HE 组	83.73 ± 4.10 ^①	80.78 ± 7.33 ^①

①HE 组与 HC 组相比较 $P < 0.05$

2.3 骨骼肌中 S6K1 mRNA 和蛋白表达及 pS6K1-Thr³⁸⁹ 蛋白表达

Northern blot 检查和 Western blot 检查结果显示 (如表 3 和图 5—6), 有氧运动后胰岛素抵抗小鼠骨骼肌中 S6K1 mRNA 和蛋白分别下降了 22.02% ($P < 0.05$) 和 25.37% ($P < 0.05$)。pS6K1-Thr³⁸⁹ 蛋白表达在有氧运动后下降了 54.08% ($P < 0.05$)。从免疫荧光染色结果可以看出 S6K1 和 pS6K1-Thr³⁸⁹ 蛋白表达与 Western blot 的有同样的变化趋势 (图 7—8, 见彩色插页)。

表 3 骨骼肌中 S6K1 mRNA 和蛋白表达及 pS6K1-Thr³⁸⁹ 蛋白表达变化结果 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	S6K1 mRNA	S6K1 蛋白	pS6K1-Thr ³⁸⁹ 蛋白
HC 组	100.00	100.00	100.00
HE 组	77.98 ± 4.42 ^②	74.63 ± 14.43 ^②	45.92 ± 17.85 ^①

①HE 组与 HC 组相比较 $P < 0.01$, ②HE 组与 HC 组相比较 $P < 0.05$

2.4 骨骼肌中 PGC-1 α mRNA 和蛋白表达

Northern blot 检查和 Western blot 检查结果显示 (如表 4 和图 9—10 所示), 有氧运动后 HE 组骨骼肌中 PGC-1 α mRNA 和蛋白分别升高 128.30% ($P < 0.01$) 和 76.80% ($P < 0.001$)。

3 讨论

mTOR 属于磷脂酰肌醇相关蛋白激酶 (phosphatidylinositol kinase-related protein) 家族, 是 PI3K/PKB 信号通路下游的一个效应蛋白, 它具有丝/苏氨酸激酶活性。mTOR 目前被认为是一种营养

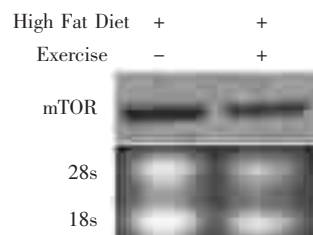


图 2 有氧运动对骨骼肌中 mTOR mRNA 表达的影响

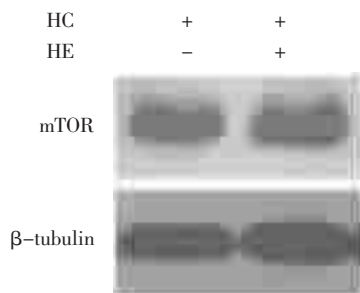


图3 有氧运动对骨骼肌中 mTOR 表达的影响

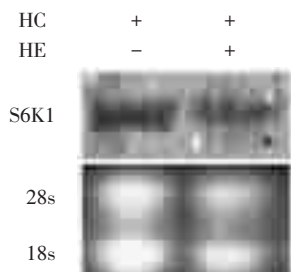


图5 有氧运动对骨骼肌中 S6K1 mRNA 表达的影响

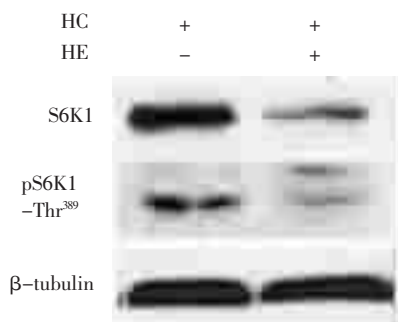


图6 有氧运动对骨骼肌中 S6K1 和 pS6K1 蛋白表达的影响

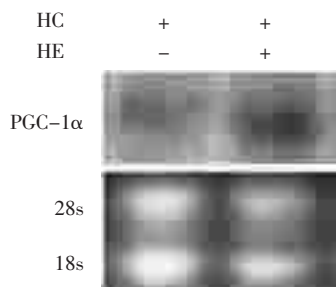


图9 有氧运动对骨骼肌中 PGC-1α mRNA 表达的影响

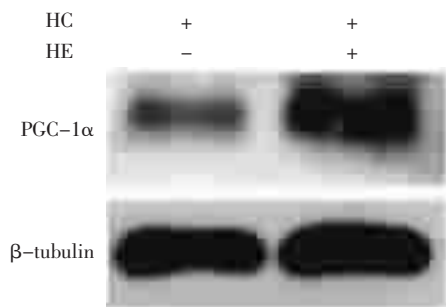


图10 有氧运动对骨骼肌中 PGC-1α protein 表达的影响

表4 两组小鼠骨骼肌中 PGC-1α mRNA 和蛋白表达变化结果

组别	PGC-1α mRNA	PGC-1α 蛋白
HC 组	100.00	100.00
HE 组	228.30±43.33 ^①	176.80±12.24 ^②

①HE 组与 HC 组相比较 $P<0.01$, ②HE 组与 HC 组相比较 $P<0.001$

素水平变化感受器,具有感受细胞外营养成分含量、能源物质水平变化,以及生长因子等信号的能力,并通过激活其下游效应蛋白对细胞的生长、分化、生存及蛋白合成等机体代谢过程进行调节。

3.1 有氧运动与胰岛素抵抗

现已证实,单次运动可以增加机体组织对胰岛素的敏感性^[4-5],但这种作用是短暂的,只持续到运动后 48h^[6-7]。许多学者认为有氧耐力训练结合反复抗阻性训练更有利于代谢综合征患者的心肺功能的适应性^[8-9]。Hawley^[10]也认为肥胖患者或胰岛素抵抗患者重复的运动训练可以持续增加胰岛素对于骨骼肌中葡萄糖摄取的作用。并且反复运动训练可以使一些关键信号蛋白(AMPK,AS160 等)的表达增加或活性增强而提高胰岛素敏感性,另外反复运动训练还可以上调线粒体内脂质氧化能力和一些生物合成蛋白的表达。DiPietro^[11]在研究不同强度的长期耐力性运动(9 个月)对提高老年人胰岛素敏感性的作用中发现,高强度(80% VO_{2max})有氧耐力性运动后受试者葡萄糖利用率和抑制脂质分解的能力显著性高于中强度(65% VO_{2max})和低强度(50% VO_{2max})的长期有氧耐力性运动。Noland 等^[12]在研究喂饲高脂饮食的大鼠分别进行高强度和低强度的耐力性运动训练,结果发现,进行低强度的高脂饮食大鼠体重和体脂含量都明显增加,且出现严重胰岛素抵抗症状,而在高强度运动的高脂饮食组没有发现这些现象。由此可见,大强度的有氧运动更利于提高胰岛素敏感性。

本实验对高脂饮食所诱导的胰岛素抵抗小鼠施以 6 周有氧跑台训练,强度为 75% VO_{2max} ,结果发现,HE 组与 HC 组相比,小鼠体重降低了 22.75% ($P<0.01$),空腹血清胰岛素降低了 41.9% ($P<0.05$)。OGTT 曲线出现峰值时间点也较 HC 组明显前移,峰值也有显著性下降且平台期消失;从胰岛 β 细胞形态学观察,运动后的胰岛 β 细胞团面积明显小于 HC 组,且炎性浸润减轻,边缘较清晰。从以上数据可见强度为 75% VO_{2max} 的 6 周有氧耐力运动明显改善胰岛素抵抗状态,我们所选择的运动强度也明显提高了胰岛素敏感性,有利于改善胰岛素抵抗。

3.2 有氧运动对骨骼肌细胞 mTOR 和 S6K1 表达的影响

我们的实验结果证明 6 周有氧运动可以明显改善胰岛素抵抗症状, 但 mTOR 和 S6K1 在此过程中的具体作用如何, 本实验尚无直接证据。有研究显示, 一次抵抗性运动恢复 2h 后骨骼肌 pmTOR-Ser²⁴⁴⁸ 和 pS6K1-Thr³⁸⁹ 蛋白表达呈显著性升高的趋势^[13]。当进行连续重复的抗阻性训练, 在运动前、运动后恢复 15min、60min 和 120min 后取骨骼肌进行活检, 结果发现骨骼肌中 pmTOR-Ser²⁴⁴⁸ 和 pS6K1-Thr³⁸⁹ 蛋白表达在运动后增加了数倍, 这种状态持续到运动后 2h^[14]。到目前为止, 对有氧运动对 pmTOR-Ser²⁴⁴⁸ 和 pS6K1-Thr³⁸⁹ 蛋白表达研究较少, 尤其对高脂饮食诱导产生胰岛素抵抗后的有氧运动后研究尚未见报道。Mascher^[15]在研究 6 名男受试者进行功率自行车训练 1h, 强度为 75%VO_{2max} 的单次有氧运动, 在运动前、运动后即刻、运动后 30min、60min、120min 和 180min 分别进行肌肉活检, 检测股外侧肌的 mTOR 和 S6K1 磷酸化程度变化, 结果发现, mTOR 的磷酸化在运动后即刻开始增加, 而 S6K1-Thr³⁸⁹ 磷酸化没有变化。而 Glynn^[1]等的研究发现, SD 大鼠进行 9 周跑台训练后 mTOR 和 S6K1 总蛋白表达没有变化, 但磷酸化 mTOR-Ser²⁴⁴⁸ 和 S6K1-Thr³⁸⁹ 蛋白表达均呈显著性下降。

本实验对胰岛素抵抗小鼠施以 6 周有氧跑台训练后, 有氧运动后 HE 组骨骼肌中总 mTOR、S6K1 mRNA 和蛋白以及 pS6K1-Thr³⁸⁹ 蛋白表达呈显著下降。并且我们的研究发现: 在高脂饮食条件或在胰岛素抵抗前提下, 运动后骨骼肌中总 mTOR 和 S6K1 mRNA 和蛋白表达也发生了显著性下降。但这一结果与 Glynn 在研究正常饮食下的 9 周跑台运动训练后结果一致。而且从我们数据分析得知有氧运动对这两个蛋白表达具有显著性抑制作用, 因此我们推测有氧运动明显降低了高脂饮食或胰岛素抵抗小鼠骨骼肌中总 mTOR 和 S6K1 mRNA 和蛋白及其磷酸化蛋白的表达。

3.3 mTOR 和 S6K1 在有氧运动改善 IR 过程中的作用

关于 mTOR 和 S6K1 在有氧运动改善胰岛素抵抗过程中的作用, 多数学者已证明有氧运动通过激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 后抑制 mTOR 和 S6K1 活性来实现的。主要表现为运动后 AMPK 活性显著升高^[16-17]活性增强, 具有活性的 AMPK 促使 mTOR-Ser²⁴⁴⁶ 磷酸化, 而磷酸化后的 mTOR-Ser²⁴⁴⁶ 抑制 mTOR-Ser²⁴⁴⁸ 的磷酸化, 从而降低 S6K1 磷酸化能力^[18]。Thomson^[19]等在对 8 月龄大鼠皮下注射 AICAR (AMPK 激动剂) 或生理盐水 40min 后, 对趾

长伸肌进行高频电刺激使其处于伸长状态达 22min, 结果发现用 AICAR 处理后, 趾长伸肌在伸长后细胞内 AMPK-Thr¹⁷² 和 ACC-Ser⁷⁹ 均呈显著性升高的同时却明显抑制了 pS6K1-Thr³⁸⁹ 蛋白的表达。本实验小鼠在进行 6 周有氧跑台训练后其骨骼肌 pS6K1-Thr³⁸⁹ 蛋白表达也呈显著性下降趋势。提示 AMPK 活性增强抑制了 pS6K1-Thr³⁸⁹ 蛋白表达。

Glynn 等^[1]认为长期营养过剩可以过度激活 mTOR 和 S6K1 信号通路导致了 IRS-1 丝氨酸残基磷酸化增加。且在研究长期耐力训练可以提高胰岛素抵抗骨骼肌对胰岛素的敏感性时发现 pmTOR-Ser²⁴⁴⁸ 和 pS6K1-Thr³⁸⁹ 蛋白表达和 pIRS1-Ser^{636/639} 呈显著性下降; 另外柠檬酸合成酶 (CS) 活性呈显著性升高。mTOR, S6K1, IRS-1 总蛋白表达没有变化。本实验 pS6K1-Thr³⁸⁹ 在长期有氧运动后呈显著性下降, 本实验虽然没有检测 mTOR-Ser²⁴⁴⁸, 但是总 mTOR 和 S6K1 在长期有氧运动后呈显著性下降趋势, 且根据 pS6K1-Thr³⁸⁹ 表达的下降, 可以推测磷酸化 mTOR 的表达也可能同步降低。

在 Um 等^[20]研究 S6K1 敲除小鼠发现无论是在脂肪组织还是骨骼肌中线粒体的氧化磷酸化基因如 UCP3、PGC-1 及 CPT1 的表达均明显升高。由此可见, S6K1 基因缺失更有利于体内营养物质的进一步氧化。大量研究表明, 有氧运动可以显著性增加 PGC-1 α 的表达, 而且这已经在苏丽等人的实验中得到了很好的证实^[21]。PGC-1 α 是一种细胞核受体转录辅助激活因子和多功能细胞能量代谢辅激活因子。它在葡萄糖代谢及脂肪酸氧化等方面都起重要的作用。同时 Patti^[2]和 Cunningham^[3]已经发现 mTOR 和 S6K1 的过表达可以抑制 PGC-1 α 表达。反之, 有氧运动后 mTOR 和 S6K1 的表达受到抑制时, 就降低了其对 PGC-1 α 表达的抑制作用, 使得 PGC-1 α 的表达增加。Patti^[2]还发现 S6K1 敲除可以增加 PGC1 的表达。本实验中 HE 组小鼠骨骼肌中总 mTOR 和 S6K1 mRNA 和蛋白及其磷酸化蛋白表达明显下降的同时, PGC-1 α mRNA 和蛋白的表达表达较 HC 组呈显著升高。

总之, 通过实验证实胰岛素抵抗小鼠在有氧运动后 mTOR 和 S6K1 及其磷酸化蛋白的表达下降, PGC-1 α 表达升高对改善胰岛素抵抗症状有利。

4 结论

mTOR 作为最新发现的细胞外营养成分感受因子因其与胰岛素抵抗及其他多种疾病发生的密切关系已经成为关注的焦点。目前发现, 当营养物质过剩

时激活 mTOR,使其下游效应子 S6K1 丝氨酸位点磷酸化,而 S6K1 上丝氨酸磷酸化后能够抑制胰岛素信号传导,从而使机体产生胰岛素抵抗。本研究推断,有氧运动可能是通过降低 mTOR/S6K1 信号通路的活性而促进了骨骼肌的能量代谢;同时 6 周有氧跑台训练可以显著提高小鼠骨骼肌对胰岛素敏感性而改善胰岛素抵抗的症状。

参考文献

- [1] Glynn EL, Lujan HL, Kramer VJ, et al. A chronic increase in physical activity inhibits fed-state mTOR/S6K1 signaling and reduces IRS-1 serine phosphorylation in rat skeletal muscle[J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2008, 33(1): 93—101.
- [2] Patti ME. Gene expression in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus[J]. *Curr Diab Rep*, 2004, 4(3): 176—181.
- [3] Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex [J]. *Nature*, 2007, 450(7170): 736—741.
- [4] Burstein R, Epstein Y, Shapiro Y, et al. Effect of an acute bout of exercise on glucose disposal in human obesity [J]. *J Appl Physiol*, 1990, 69(1): 299—304.
- [5] Perseghin G, Price TB, Petersen KF, et al. Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects [J]. *N Engl J Med*, 1996, 335(18): 1357—1362.
- [6] King DS, Dalsky GP, Clutter WE, et al. Effect of exercise and lack of exercise on insulin sensitivity and responsiveness [J]. *J Appl Physiol*, 1998, 64(5): 1942—1946.
- [7] Tammela ES, Koivisto VA. Exercise and the metabolic syndrome [J]. *Diabetologia*, 1997, 40(2): 125—135.
- [8] 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.
- [9] Ruderman N, Devlin JT. The health professional's guide to diabetes and exercise [M]. ADA, Alexandria, Virginia. 1995.
- [10] Hawley JA, Lessard SJ. Exercise training-induced improvements in insulin action [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2008, 192(1): 127—135.
- [11] DiPietro L, Dziura J, Yeckel CW, et al. Exercise and improved insulin sensitivity in older women: evidence of the endogenous benefits of higher intensity training [J]. *J Appl Physiol*, 2006, 100(1): 142—149.
- [12] Noland RC, Thyfault JP, Henes ST, et al. Artificial selection for high-capacity endurance running is protective against high-fat diet-induced insulin resistance [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293(1): E31—E41.
- [13] Dreyer HC, Fujita S, Cadenas JG, et al. Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle [J]. *J Physiol*, 2006, 576(2): 613—624.
- [14] Mascher H, Tannerstedt J, Brink-Elfegoun T, et al. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294(1): E43—E51.
- [15] Mascher H, Andersson H, Nilsson PA, et al. Changes in signalling pathways regulating protein synthesis in human muscle in the recovery period after endurance exercise [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2007, 191(1): 67—75.
- [16] Fujii N, Hayashi T, Hirshman MF, et al. Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273(3): 1150—1155.
- [17] Coffey VG, Zhong Z, Shield A, et al. Early signaling responses to divergent exercise stimuli in skeletal muscle from well-trained humans [J]. *FASEB J*, 2006, 20(1): 190—192.
- [18] Cheng SW, Fryer LG, Carling D, et al. Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(16): 15719—15722.
- [19] Thomson DM, Fick CA, Gordon SE. AMPK activation attenuates S6K1, 4E-BP1, and eEF2 signaling responses to high-frequency electrically stimulated skeletal muscle contractions [J]. *J Appl Physiol*, 2008, 104(3): 625—632.
- [20] Um SH, Frigerio F, Watanabe M, et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity [J]. *Nature*, 2004, 431(7005): 200—205.
- [21] 苏丽, 姜宁, 张玥, 等. 有氧运动对 C57BL/6 小鼠骨骼肌 PGC-1 α 表达和肌纤维类型影响的研究 [J]. *体育科学*, 2008, 28(4): 43—47.