

运动干预对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌蛋白激酶B活性和蛋白与基因表达的影响*

杜晓平¹ 衣雪洁¹ 符 谦¹ 常 波¹ 曹师承²

摘要 目的:探讨一次性游泳运动对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌蛋白激酶B(protein kinaes, PKB)mRNA表达、蛋白总量(t-PKB)及磷酸化PKB(p-PKB)的影响。方法:SD大鼠随机分为正常饮食组、高脂饮食组、高脂饮食+运动组。分别对高脂饮食组与高脂饮食+运动组饲以高脂饲料,4周后对高脂饮食+运动组大鼠运动干预2h。测血液葡萄糖和胰岛素浓度;Western blot法检测骨骼肌t-PKB蛋白表达、p-PKB磷酸化水平;RT-PCR法分析PKB mRNA表达。结果:高脂饮食组血糖和胰岛素浓度明显高于对照组;高脂饮食+运动组血糖和胰岛素浓度低于高脂饮食组;高脂饮食组PKB mRNA表达下降;高脂饮食+运动组PKB磷酸化水平和蛋白总量高于高脂饮食组。结论:运动干预改善高脂饮食诱发胰岛素抵抗大鼠对胰岛素的敏感性,增加PKB磷酸化水平和蛋白与基因的表达。

关键词 胰岛素抵抗;运动;蛋白激酶B;骨骼肌

中图分类号:R87,R59 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-04-0303-03

Effects of exercises on PKB phosphorylation and protein and gene expression in skeletal muscle of insulin-resistance rats/ DU Xiaoping, YI Xuejie, FU Qian, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(4): 303—305

Abstract Objective: To investigate the effects of a single bout of exercises on PKB phosphorylation, protein and gene expression in skeletal muscle of insulin-resistance rats. Method: Male rats were randomly divided into control diet and high-fat diet (HFD) and high-fat diet trained groups. Except control group, the rats were fed high-fat diet for 4 weeks and then the rats in exercises group exercised for 2 h swimming. The serum levels of glucose and insulin were measured. The levels of PKB protein and phosphorylation were determined by Western blot and the level of PKB mRNA was determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Result: Compared with control group, the serum levels of glucose and insulin increased in HFD rats. The serum levels of glucose and insulin in HFD with exercises training rats was significantly lower than that in HFD rats. The level of PKB mRNA in HFD rats was decreased as compared to control. The levels of PKB phosphorylation and protein expression in HFD with exercises training rats were higher than that in HFD rats. Conclusion: Exercises may improve PKB phosphorylation and protein and gene expression, elevate the sensitivity of skeletal muscle to insulin.

Author's address Exercise Human Science Dept., Shenyang Sport University, Shenyang, 110102

Key words insulin-resistance; exercises; protein kinase B; skeletal muscle

糖尿病和胰岛素抵抗的运动疗法已应用到临床实践。运动干预增加骨骼肌细胞摄取和利用葡萄糖,调节糖代谢,降低血糖,改善糖尿病患者糖耐量减低和脂代谢紊乱,缓解病情的发展^[1-3]。有资料报道运动可以增加胰岛素受体数量,改善骨骼肌对胰岛素的敏感性,提高胰岛素与受体的结合率,激活磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3-K)/蛋白激酶B(protein kinase, PKB)信号途径促进糖的吸收和利用,调节血糖平衡^[4]。一次运动是否通过影响胰岛素信号途径PI3K/PKB蛋白激酶的活性与表达,改善胰岛素抵抗现象的实验结果并不尽一致^[5-6]。跑台运动1h的胰岛素抵抗小鼠经胰岛素处理后,未影响比目鱼肌PKB的活性;而游泳运动3h的胰岛素抵抗大鼠,腓肠肌PKB的磷酸化水平

提高。运动干预方式、负荷强度和时间等不同,能否通过改善胰岛素依赖信号途径PI3K/PKB的活性,调节胰岛素抵抗个体糖代谢的分子机制目前尚未清楚。本研究通过高脂饮食诱导胰岛素抵抗大鼠模型,选择一次性中等负荷强度游泳2h,探讨单纯运动干预对PKB的磷酸化水平、总蛋白和mRNA表达的影响,旨在为胰岛素抵抗的预防、推迟其疾病发展和治疗的运动疗法提供分子水平的理论依据。

* 基金项目:辽宁省教育厅高等学校科研基金资助项目(2005L423)

1 沈阳体育学院运动人体科学系,沈阳,110102

2 中国医科大学基础医学院运动医学基础教研室

作者简介:杜晓平,女,副教授

收稿日期:2008-07-22

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型建立

SD 雄性大鼠 21 只(7 周龄), 体重 150—200g(中国医科大学实验动物中心提供)。购入后饲以正常饲料, 适应性饲养 1 周。随机分为 3 组, 正常饮食组 7 只(CD)、高脂饮食组 7 只(HFD)、高脂饮食+运动组 7 只(HFD+EXE)。建立胰岛素抵抗大鼠模型^[4], 分别对 HFD 和 HFD+EXE 组饲以高脂饲料 4 周。4 周高脂饲料处理后, 首先对 HFD+EXE 组在水温(32 ± 1)℃、水深 50cm 的有机玻璃泳池内适应性游泳 20min。各组大鼠禁食 12h, 对 HFD+EXE 组进行一次性游泳运动 2h 训练, 运动干预后对各组实验动物取材。

1.2 血液样品分析

运动干预后取各组大鼠血样分析。异戊巴比妥(15mg/kg)麻醉禁食大鼠, 经尾静脉取血样, 提取血清测空腹血糖、胰岛素、甘油三酯。

1.3 Western blot 分析

采血后, 继取麻醉大鼠适量腓肠肌样品立即放入预冷的粉碎缓冲液(20mmol/L Tris/HCl pH=7.5, 50mmol/L NaCl, 0.1mmol/L Na₃VO₄, 25mmol/L NaF, 2mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT, 1mg/ml 亮肽素/抑肽酶)中匀浆。4℃, 12000g 离心 1h 取上清。酚试剂法定蛋白。样品经 10%SDS-PAGE 电泳分离后, 转移到硝酸纤维素膜上, 分别与一抗(t-PKB、p-PKB)和相应二抗孵育。ECL 法显带, X-光片曝光。扫描后经 Image J 图像分析软件对图中印迹区进行灰度分析。

1.4 PKB mRNA 测定

提取总 RNA 后进行 cDNA 的合成; 引物序列采用电脑软件 prim5 设计, 由大连宝生物技术有限公司合成。片段长 442bp, 序列如下:

上游 5'-GAGGAGCGGG AAGAGTG-3'; 下游 5'-GAGACAGGTGGAAGAAGAGC-3'。内参考 β -actin 701bp: 上游 5'-GCCAACCGTAAAGATG-3'; 下游 5'-CCAGGATAGAGCCACCAAT-3'。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色检测结果。利用 Image J 图像分析软件分析, 取 PKB 和 actin mRNA 吸光度比值对产物进行相对定量。反应条件: 94℃ 2min, 循环 35 次; 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 1min, 32 个循环; 72℃ 5min 后结束扩增反应。

1.5 统计学分析

实验结果以均数±标准差表示。应用 SPSS 11.5 统计软件包对两组进行组间 t 检验。

2 结果

2.1 血液测试结果

结果显示, HFD 组大鼠血糖、胰岛素和甘油三酯水平明显高于 CD 组($P<0.05, P<0.01$); HFD+EXE 组血糖和胰岛素浓度下降, 与 HFD 组比较差异有显著性意义($P<0.05$), 甘油三酯含量差异无显著性意义。提示运动干预促进胰岛素抵抗大鼠血糖的吸收和利用, 改善了大鼠对胰岛素的敏感性(表 1)。

2.2 Western blot 分析

测试结果发现, HFD 组 PKB 磷酸化水平和蛋白总量明显下降, 与 CD 组比较差异有显著性意义($P<0.01, P<0.05$); HFD+EXE 组磷酸化水平和蛋白总量升高, 与 HFD 组比较差异有显著性意义($P<0.01, P<0.05$)。说明高脂饮食诱导胰岛素抵抗影响大鼠骨骼肌 PKB 的活性与表达, 运动干预改善 PKB 的磷酸化水平和蛋白表达(图 1, 表 2)。

2.3 PKBmRNA 分析

PCR 分析显示, HFD 组 PKBmRNA 表达低于 CD 组($P<0.05$); 与 HFD 组比较, HFD+EXE 组 PKBmRNA 表达无显著性意义, 说明一次运动干预不影响胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 PKBmRNA 表达(图 2, 表 2)。

3 讨论

葡萄糖运载体 4(glucose transporter,GLUT4)介导的葡萄糖转运是骨骼肌代谢的主要限速步骤, 而 GLUT4 表达失常是胰岛素抵抗的重要因素。资料报道^[7-9], 运动可以促进 GLUT4mRNA 表达, 运动加胰

表 1 运动对大鼠血液葡萄糖、胰岛素和甘油三酯的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	血糖 (mmol/L)	胰岛素 (uIU/ml)	甘油三酯 (mg/dl)
CD	7	4.687±1.3134	11.7029±1.9202	99.8900±8.8787
HFD	7	6.7314±1.1180 ^①	14.1843±1.475 ^②	112.2914±6.1247 ^②
HFD+EXE	7	4.7271±1.6558 ^③	11.8414±2.3916 ^③	108.7143±9.2058

①与 CD 比较 $P<0.01$; ②与 CD 比较 $P<0.05$; ③与 HFD 比较 $P<0.05$

表 2 运动对大鼠骨骼肌 PKB 磷酸化、蛋白总量和

PKB mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	PKB 磷酸化水平	PKB 蛋白总量水平	PKB mRNA 表达水平
CD	7	92.577±8.311	66.621±7.573	66.764±6.691
HFD	7	55.571±5.977 ^①	53.534±8.596 ^②	55.953±8.042 ^②
HFD+EXE	7	76.461±7.967 ^③	62.953±6.251 ^④	60.534±8.988

①与 CD 比较 $P<0.01$; ②与 CD 比较 $P<0.05$; ③与 HFD 比较 $P<0.01$;

④与 HFD 比较 $P<0.05$

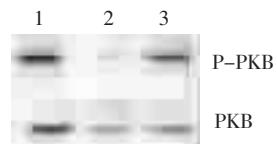


图 1 大鼠骨骼肌 PKB 活性和蛋白含量

1.CD; 2.HFD; 3.HFD+EXE

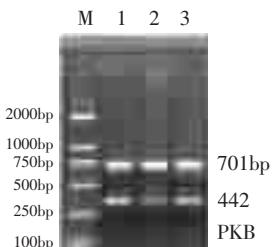


图2 大鼠骨骼肌PKB mRNA水平

M.Marker; 1.CD; 2.HFD; 3.HFD+EXE

胰岛素具有更高的GLUT4mRNA以及更好的降糖效果。胰岛素受体信号PI3-K/PKB转导途径是促进GLUT4跨膜转运,增加葡萄糖吸收的主要途径。研究发现^[10-12],长期耐力运动可以增加骨骼肌血流量,提高肌细胞摄取和利用葡萄糖,调节血糖平衡。其可能机制是由于运动改善了胰岛素受体信号PI3-K/PKB转导途径级联蛋白激酶的活性和表达,增加骨骼肌细胞对胰岛素的敏感性,促进葡萄糖的转运,调节糖代谢。Hawley JA等^[13]报道胰岛素抵抗个体存在整体水平胰岛素促进葡萄糖吸收和利用功能障碍。一次性运动刺激可以增加骨骼肌细胞对糖摄取和利用。然而,这种胰岛素敏感效应是短时的,几乎在48h内即可消失。而反复的运动刺激可使肥胖和胰岛素抵抗个体对胰岛素的敏感性持续增加,促进骨骼肌细胞摄取葡萄糖。其机制是上调了肌细胞对脂肪酸的氧化及改善了胰岛素信号途径PI3K/PKB级联蛋白激酶的活性与表达。但是,高脂饮食诱导肥胖和/或胰岛素抵抗实验大鼠模型,测试一次性运动干预对PI3-K/PKB信号途径级联蛋白激酶活性变化的实验结果也不尽一致。Eduardo R等^[13]采用4周龄Wistar大鼠,经3个月高脂饮食诱导为肥胖模型后,一次性游泳运动干预3h(运动1.5h后中间休息45min),经腔静脉注射胰岛素,取骨骼肌测试蛋白激酶的活性发现,PI3-K和PKB的磷酸化水平明显升高。提示运动干预增加了骨骼肌对胰岛素的敏感性和蛋白激酶的活性。而Satsuki等^[14]4周高脂饮食诱导胰岛素抵抗大鼠模型,运动训练1h后立即比目鱼肌取材,经体外组织培养30min后加胰岛素处理,检测PKB的磷酸化水平,发现运动干预并未影响PKB的活性,说明运动并未改善骨骼肌对胰岛素的敏感性和激酶的活性。Reynolds TH等^[14]采用长期耐力轮滑训练20—22月龄正常小鼠,观察单纯运动干预的作用证实,骨骼肌PKB磷酸化水平高于对照组45%,蛋白含量升高50%。也有研究发现,运动增加胰岛素抵抗大鼠PKB蛋白总量,但减少了磷酸化水平^[15]。正常人体实验证实,3周耐力运动增加PKB蛋白总量,但不改善其磷酸化水平,而经胰岛素处理后,PKB磷酸化水平明显升高^[16]。总之动物模型不同

实验结果各异。

本研究对饮食诱导胰岛素抵抗大鼠采用一次性中等负荷2h游泳运动干预,不经胰岛素处理,观察一次性中等负荷单纯运动处理是否影响胰岛素抵抗大鼠骨骼肌PI3K/PKB信号途径蛋白激酶B的活性和表达。结果证实,4周高脂饲料诱导胰岛素抵抗大鼠血糖和胰岛素水平明显升高,一次性运动干预后血糖和胰岛素浓度恢复正常,提示运动干预增加胰岛素抵抗大鼠对胰岛素的敏感性,促进葡萄糖的吸收和利用。PKB磷酸化水平和蛋白总量检测显示,胰岛素抵抗大鼠骨骼肌PKB活性和蛋白含量下降,而一次性2h游泳运动刺激可以改善饮食诱导性胰岛素抵抗大鼠PKB磷酸化水平,增加PKB蛋白总量。说明如负荷强度适当一次性运动干预可以改善PKB的活性和表达,克服因胰岛素抵抗引起骨骼肌PKB磷酸化水平与蛋白总量的下调。运动是否影响胰岛素抵抗大鼠骨骼肌PKB mRNA表达目前尚无报道。本实验发现,胰岛素抵抗大鼠PKB mRNA表达下降,说明胰岛素抵抗现象下调PKB基因表达;而一次性游泳运动干预并未扭转由胰岛素抵抗引起大鼠PKB mRNA表达减少的现象。这与PKB磷酸化和蛋白总量的实验结果不一致,是由于取材时间的原因,还是其他因素尚需探讨。

总之,本研究采用饮食诱导胰岛素抵抗大鼠模型,一次性中等负荷游泳训练2h,不经胰岛素处理单纯运动干预的实验方式,证实了如运动负荷强度选择和运动时间适当可以改善胰岛素依赖信号途径蛋白激酶PKB的活性和蛋白与基因的表达,增加骨骼肌葡萄糖运输能力,促进葡萄糖的摄取和利用,缓解胰岛素抵抗现象。

参考文献

- Wasserman DH, Zinman B. Exercise in individuals with IDDM [J]. Diabetes Care, 1994, 17(2):924—37.
- 商永芳,姚民秀,徐倩,等.运动疗法对2型糖尿病患者血糖、血脂的影响[J].中国康复医学杂志,2006,21(4):367.
- 景志强,景欣悦.运动对2型糖尿病脂代谢的影响[J].中国康复医学杂志,2005,20(8):636—638.
- Wojtaszewski JF, Hansen BF, Ursø B, et al. Wortmannin inhibits both insulin- and contraction-stimulated glucose uptake and transport in rat skeletal muscle[J]. Appl Physiol, 1996, 81 (4):1501—1509.
- Hawley JA, Lessard SJ. Exercise training-induced improvements in insulin action[J]. Acta Physiol (Oxf), 2008, 192(1):127—135.
- Satsuki T, Tanaka S, Hayashi T, et al. High-fat diet impairs the effects of a single bout of endurance exercise on glucose transport and insulin sensitivity in rat skeletal muscle [J].

(下转320页)