

长期大负荷刺激,易疲劳积累,与冲量研究相符。整足接触阶段、前掌接触阶段均小于自然行走,表明压力中心移动速度快,足中部触地控制不良,在健步走时应注意安全,同时也因此锻炼了联系者的平衡控制能力及肌肉调节能力。

4 结论

①自然走、健步走足底压力分布差异明显,健步走时足跟、第 1 跖骨、第 1 趾骨压力高于自然走,第 4 跖骨、第 5 跖骨压力低于自然走,足弓部位压力变化不显著。②健步走时足跟冲量远高于自然走,足后跟、前掌部均是易损伤的部位。③健步走时足底压力中心移动速度快,足中部触地控制不良。

参考文献

- [1] 李铁强,徐学峰,李海平.健步走对 55-59 岁退休妇女身体功能变化的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 10(40): 142—143.
- [2] 李伟,汪宗保,李国平,等.膝关节骨性关节炎患者步态运动学参数的研究[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(1): 11—13.
- [3] 李峰,李珩,文静,等.基于步态分析的击剑运动员膝损伤原因探讨[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(3): 254—255.
- [4] 江晓峰,胡雪艳.偏瘫步态膝关节角度分析[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(10): 918—920.
- [5] 李海,周安艳,黄东锋,等.痉挛型脑瘫儿童步行时的动态足底压力特征[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(1): 44—47.
- [6] 徐晴岩,周大伟,李立峰,等.使用硅胶足垫分解足底压力的研究[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(8): 736—738.
- [7] 周安艳,李海,尹运冬.正常学龄前儿童步行时的动态足底压力特征[J]. 中国临床康复, 2006, 10(24): 55—57.
- [8] 郝卫亚,陈严,胡水清.儿童倒步走足底压力的分布特征研究[J]. 力学与实践, 2008, 30(3): 56—59.
- [9] 陈严.男性儿童倒步走的运动生物力学特征研究及其对平衡能力的影响[D]. 北京:国家体育科学研究所, 2007.
- [10] Grasso R, Bianchi L, Lacquaniti F. Motor patterns for human gait: Backward versus forward locomotion [J]. J Neurophysiol, 1998, 80(4): 1868—1885.
- [11] Hallemans A, De Clercq D, Van Dongen S, et al. Changes in foot-function parameters during the first 5 months after the onset of independent walking: a longitudinal follow-up study [J]. Gait Posture, 2006, 3(2): 142—148.
- [12] 王明鑫,俞光荣.正常人足底压力分析的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 14(22): 1722—1724.
- [13] 毛宾尧,贾学文,郑菲蓉,等.行走和站立时足底应力分布研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2002, 10(12): 1211—1213.
- [14] Hau P, David G, Carolyn H, et al. Screening techniques to identify people at high risk for diabetic foot ulceration [J]. Diabetes Care, 2000, 23: 606—611.
- [15] De Cock A, Willems T, Witvrouw E, et al. A functional foot type classification with cluster analysis based on plantar pressure distribution during jogging [J]. Gait Posture, 2006, 23(3): 339—347.

·基础研究·

运动诱导甘丙肽分泌对 2 型糖尿病大鼠胰岛素敏感性的影响

郭丽丽¹ 任彩玲² 史明仪^{1,3}

摘要 目的:探讨运动后甘丙肽(GAL)分泌增加对 2 型糖尿病大鼠胰岛素敏感性的影响。方法:糖尿病大鼠随机分 4 组:安静对照组、运动对照组、安静用药组、运动用药组。安静对照组及运动对照组均腹腔注射生理盐水,安静用药组及运动用药组腹腔注射 GAL。快速血糖仪测空腹血糖以计算胰岛素抵抗指数,Western Blot 法检测骨骼肌葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)含量。结果:运动对照组与安静对照组以及运动用药组与安静用药组相比较,正糖钳的葡萄糖输注速率显著性增加($P<0.05$);安静用药组及运动用药组实验后比实验前血清胰岛素均显著增加($P<0.05$),安静用药组实验后比实验前胰岛素敏感指数有非常显著下降($P<0.01$);运动对照组比安静对照组骨骼肌 GLUT4 蛋白含量非常显著性提高($P<0.01$),运动用药组比安静用药组 GLUT4 蛋白含量显著性提高($P<0.05$)。结论:运动诱导 GAL 浓度增加,可能主要依靠增加 GLUT4 膜转运量或提高 GLUT4 活性来提高胰岛素敏感性。

关键词 甘丙肽; 2 型糖尿病; 运动; 葡萄糖转运蛋白 4; 胰岛素

中图分类号: R587.1, R493 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-1242(2009)-12-1121-03

甘丙肽(galanin, GAL)参与摄食、痛觉、情绪、学习记忆、神经内分泌等生理过程,在肥胖、抑郁症、早发性痴呆、神经细胞瘤等病理过程中发挥重要作用。运动一方面使血糖浓度升高,另一方面可提高骨骼肌葡萄糖转运蛋白 4(glucose transportation protein 4, GLUT4)含量 30%—200%^[1-2],

1 安徽滁州学院体育系,滁州市,239012

2 赣南医学院康复学院

3 通讯作者

作者简介:郭丽丽,女,硕士,讲师

收稿日期:2009-02-24

GLUT4 是运动促进骨骼肌细胞摄取葡萄糖的主要载体,从而增加骨骼肌摄取葡萄糖而降低血糖。许多资料支持运动也使 GAL 分泌显著增多^[3-4],GAL 可抑制胰岛素分泌而使血糖显著升高^[5]。运动诱导的 GAL 升高是否在增加骨骼肌摄入葡萄糖而降低血糖过程中发挥了作用,GAL 与 GLUT4 之间是否存在联系,国内外尚未见报道。仅有报导 GAL 基因敲除小鼠,胰岛素降低血糖作用显著下降^[6]。GAL 代谢紊乱容易导致 2 型糖尿病^[6],其机制不清。本实验对运动促进 GAL 分泌与胰岛素敏感性(insulin sensitivity, IS)之间存在的联系进行了初步探索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用健康雌性 3—4 周龄 SD 大鼠 80 只,由南京医科大学实验动物中心提供,体重 80—100g 左右,高脂饲料喂养 8 周后。大鼠由腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)30mg/kg。继续高脂饲料喂养 1 周,做糖耐量测试,挑选异常者继续高脂饲料喂养 4 周后,断尾采血测定血糖,DM(diabetes mellitus, DM)的诊断标准为连续 2 次空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)≥7.8mmol/L 或非空腹血糖≥16.7mmol/L。

1.2 分组和实验方案

大鼠造模成功后,称重随机分为 4 组,每组 6 只。安静对照组:腹腔注射生理盐水 0.3ml/d,连续 10d;运动对照组:预游泳 3d,每天分别游 15、30、50min。正式游泳 10d,每天 60min,正式游泳前腹腔注射生理盐水 0.3ml/d;安静用药组:腹腔注射 Galantide 3nmol/kg/d,连续 10d;运动用药组:预游泳 3d,每天分别游 15、30、50min。正式游泳 10d,每天 60min。游泳前腹腔注射 Galantide 3 nmol/kg/d,连续 10d。游泳水温 33℃±2℃,水深 50cm。实验前,禁食过夜(8—10h),称重,剪尾取血测空腹血糖。取血 1ml,加入肝素混匀后在 4℃冰箱放置 6h,以 3500r/min 离心 10min 取血浆,放入-20℃冰箱待测。腹腔注射生理盐水或 Galantide 第 10 天后,与上方法相同。

1.3 主要试剂与设备

Galantide 购自 Sigma 公司(产品批号:034K12281);Glut4 一抗购自 ABCAM 公司(产品批号:101443);Protran-BA83 硝酸纤维素膜购自上海过望化工仪器有限公司;SDS-PAGE 和 AuroraTM Western blotting 试剂均购自 Sigma 公司;HPIAS-2000 型图像分析系统;垂直板电泳槽:美国(BLO-RAD);超高速真空冷冻离心机:美国 DOPENG,RC-5C。

1.4 实验方法

1.4.1 正糖钳实验:参照 Kraegen E W 方法^[7]修改而成。各组大鼠最后一天注射结束后,禁食 8—10h,称重后腹腔注射 3% 异戊巴比妥钠 50mg/kg 麻醉,试验开始时从静脉 24mU·kg⁻¹·min⁻¹ 恒速输注胰岛素,同时输注 10% 葡萄糖溶液。每隔 10min 剪尾取血测定血糖,记录稳态下连续 60min 葡萄糖输注速率。取稳态下 6 次葡萄糖输注速率(glucose infusion rate, GIR) 平均值作为 GIR 稳态速率;取稳态下 6 次血糖(blood glucose, BG)平均值作为 BG 稳态速率。

1.4.2 大鼠骨骼肌细胞 GLUT4 蛋白含量测定:用 Klip 法制备大鼠骨骼肌细胞膜^[8]。取右后肢肌肉浸至 0℃ 250mmol/L

Sucrose, 50mmol/L Tris, 0.2mmol/L EDTA 溶液中,剪碎匀浆,9000g 离心 10min(4℃),沉淀再匀浆离心共 3 次。取 3 次上清 31000g 离心 1h(4℃),取沉淀得细胞膜悬浊液-20℃保存。膜蛋白浓度用考马斯亮蓝法测定。

Western 印迹法:取细胞膜 50ug,在 10%聚丙烯酰胺胶上行 SDS 凝胶电泳、转移,温浴 60min(37℃),加 GLUT4 多克隆抗体过夜(4℃)。与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记羊抗兔 IgG 温浴 1h(37℃),温育 2h(37℃),充分洗涤后与 Opti-MembraneTM 和 1 ml 的 StarlightTM 反应 1min,即刻与 Kodak 底片曝光,洗片后进行扫描,分析细胞膜 GLUT4 光密度。

1.5 统计学分析

数据用 SPSS11.0 处理,以平均值±标准差表示,t 检验进行显著性分析。

2 结果

2.1 正糖钳实验结果

从表 1 葡萄糖输注速率标准差可以看出,运动对照组与安静对照组相比,葡萄糖输注速率有显著性增加($P<0.05$)。运动用药组与安静用药组相比,葡萄糖输注速率有显著性增加($P<0.05$)。安静用药组与安静对照组及运动用药组与运动对照组相比,葡萄糖输注速率均有显著性下降($P<0.05$)。

2.2 大鼠空腹胰岛素测定结果

表 2 显示,安静用药组和运动用药组大鼠实验后比实验前空腹胰岛素均有显著增加($P<0.05$),其他两组大鼠实验前后空腹胰岛素比实验前稍有增加,但无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 大鼠胰岛素李氏敏感指数 (insulin sensitive index, ISI) 测定结果

按照李光伟设计的 ISI 计算方法,即空腹血糖(FBG)与空腹血清胰岛素(fasting serum insulin, FSI) 乘积的倒数表示,因该指数呈偏态分布,故取其自然对数(Ln)(见公式)^[9]。

$$ISI = \ln \frac{1}{FBG \times FSI}$$

表 2 显示,安静用药组大鼠实验后比实验前胰岛素敏感李氏指数有非常显著下降($P<0.01$)。运动用药组大鼠实验后比实验前胰岛素敏感李氏指数有非常显著下降($P<0.01$)。

2.4 大鼠骨骼肌细胞 GLUT4 蛋白含量的测定

Western 蛋白质免疫印记法检测显示,两用药组与两对照组相比较,GLUT4 含量没有显著差异;运动对照组大鼠比安静对照组 GLUT4 非常显著提高($P<0.01$);运动用药组比安静用药组显著提高($P<0.05$)。见图 1(见彩色插页)。

表 1 各组大鼠葡萄糖输注速率 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	血糖(mmol/L)		胰岛素速率 (mU/kg·min)	葡萄糖输注速率 (mg/kg·min)
	基础状态	稳定状态		
安静对照组	12.88±4.65	6.32±1.59	24	25.53±14.12
运动对照组	9.59±3.13	5.37±1.18	24	55.55±6.83 ^①
安静用药组	9.26±2.39	5.50±0.79	24	18.52±8.83
运动用药组	10.25±2.03	5.05±0.23	24	45.81±14.56 ^{②③}

①与安静对照组比较 $P<0.05$;②与运动对照组比较 $P<0.05$;③与安静用药组比较 $P<0.05$

3 讨论

表 1 显示,运动对照组与安静对照组相比较,葡萄糖输

表 2 各组大鼠空腹胰岛素、李氏敏感指数、GLUT4 光密度

($\bar{x} \pm s$)

组别	空腹胰岛素(mU/L)		李氏敏感指数		GLUT4 光密度
	实验前	实验后	实验前	实验后	
安静对照组	13.50±4.18	16.57±4.75	-4.9554±0.5731	-5.6051±0.4728	3.15±0.48
运动对照组	13.06±5.29	12.81±5.87	-4.9019±0.5883	-4.8201±0.6837	5.00±0.73 ^③
安静用药组	11.47±3.16	52.19±4.88 ^①	-4.589±0.3903	-6.3737±0.2328 ^③	2.91±0.25
运动用药组	11.37±4.80	45.75±14.99 ^②	-4.7653±0.3453	-6.1331±0.3919 ^④	4.50±0.43 ^②

①与安静用药组实验前相比 $P<0.05$; ③ $P<0.01$; ②与运动用药组实验前相比 $P<0.05$ ④ $P<0.01$

注速率有显著性增加($P<0.05$)。表明运动可以提高大鼠体内胰岛素敏感性。运动对照组与运动用药组相比,葡萄糖输注速率增加,有显著性差异($P<0.05$)。表明甘丙肽受体拮抗剂 Galantide 可降低大鼠胰岛素敏感性。提示内源性甘丙肽无论在安静状态或在运动时,均可以提高胰岛素敏感性,促进外周组织对葡萄糖的吸收,内源性甘丙肽对保持胰岛素敏感性有重要作用。

表 2 显示,安静用药组和运动用药组实验后比实验前空腹胰岛素均有显著增加($P<0.05$),安静对照组和运动对照组实验前后空腹胰岛素均无显著性变化。说明甘丙肽受体拮抗剂 Galantide 无论在安静状态还是运动时都能促进胰岛素分泌,也即内源性甘丙肽可抑制胰岛素分泌^[10-11]。该结果与 Kacs 等发现的结论基本一致^[12],即甘丙肽激动剂 GAL(1-16)对胰岛分泌有直接抑制作用,动物在游泳后血浆胰岛素下降。安静对照组和运动对照组实验前后空腹胰岛素之所以无显著性变化,可能与实验时间短有关系。另外据 Mazziotti^[13]最近研究,甘丙肽在 2 型糖尿病患者和非 2 型糖尿患者的血糖中并没有显著性变化。因此,本实验的结果与此实验结果还是相吻合的。安静用药组实验后比实验前胰岛素敏感指数有非常显著下降($P<0.01$)。运动用药组实验后比实验前胰岛素敏感指数有非常显著下降($P<0.01$),而安静对照组和运动对照组实验前后胰岛素敏感指数均无显著性变化。表明无论是安静还是运动状态甘丙肽受体拮抗剂 Galantide 均可降低大鼠空腹时的胰岛素敏感性。提示内源性 GAL 无论在安静状态或在运动时,都是保持胰岛素敏感性必不可少的重要因素。

Western 免疫印迹实验的结果。经过短期运动(游泳 10d,每天 60min),运动对照组 GLUT4 蛋白含量比安静对照组有显著性增加($P<0.05$)。运动用药组 GLUT4 蛋白的含量比安静用药组有显著性增加($P<0.05$)。这种结果可能源于 2 种可能:①骨骼肌细胞 GLUT4 蛋白总量增加,导致转位至细胞膜上的 GLUT4 总量增加^[14-16]。②骨骼肌细胞 GLUT4 蛋白总量不变,但是转位至细胞膜上的 GLUT4 增加,即转位率增加。安静用药组与安静对照组以及运动用药组与运动对照组比较,GLUT4 蛋白含量均无显著性变化,表明甘丙肽受体拮抗剂 Galantide 对 GLUT4 蛋白的生成没有影响。提示甘丙肽受体拮抗剂 Galantide 对 GLUT4 由细胞内向细胞膜的转运过程或对 GLUT4 活性有抑制作用,即 GAL 的作用主要是增加 GLUT4 由细胞内向细胞膜的转运或提高 GLUT4 活性,而不是增加 GLUT4 的总数量来提高胰岛素敏感性。

因此,2 型糖尿病患者 GLUT4 由细胞内向细胞膜的转位功能减弱,产生胰岛素抵抗,这也许是 GAL 代谢紊乱容易导致 2 型糖尿病的原因之一。随着对 GAL 与胰岛素敏感性关系认识的不断加深,将为 2 型糖尿病发病机制的探索及临床治疗带来新的启示。

参考文献

- [1] McGee SL, Hargreaves M. Exercise and myocyte enhancer factor 2 regulation in human skeletal muscle [J]. Diabetes, 2004, 53(5):1208—1214.
- [2] Holten MK, Zacho M, Gaster M, et al. Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2004, 53(2):294—305.
- [3] O'Neal HA, Van Hoomissen JD, Holmes PV, et al. Prepro-galanin messenger RNA levels are increased in rat locus coeruleus after treadmill exercise training [J]. Neurosci Lett, 2001, 299(1-2): 69—72.
- [4] Milot M, Trudeau F. Plasma galanin immunoreactivity in the rat after swimming[J]. Physiol Behav, 1997, 62(4):697—700.
- [5] Ahrén B, Pacini G, Wynick D, et al. Loss-of-function mutation of the galanin gene is associated with perturbed islet function in mice[J]. Endocrinology, 2004, 145(7):3190—3196.
- [6] Legakis IN. The role of galanin in metabolic disorders leading to type 2 diabetes mellitus [J]. Drug News Perspect, 2005, 18(3):173—177.
- [7] Kraegen EW, James DE, Bennett SP, et al. In vivo insulin sensitivity in the rat determined by euglycemic clamp [J]. Am J Physiol, 1983, 245(1):E1—E7.
- [8] Klip A, Ramlal T, Young DA, et al. Insulin-induced translocation of glucose transporters in rat hindlimb muscles [J]. FEBS Lett, 1987, 244(1):224—230.
- [9] 李光伟, 潘孝仁, Lillioja S, 等. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数[J]. 中华内科杂志, 1993, 32:656—660.
- [10] Cheng H, Straub SG, Sharp GW. Protein acylation in the inhibition of insulin secretion by norepinephrine, somatostatin, galanin, and PGE2 [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003, 285(2):E287—E294.
- [11] Quynh NT, Islam MS, Florén A, et al. Effects of galanin, a non-peptide galanin-receptor agonist, on insulin release from rat pancreatic islets [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328(1):213—220.
- [12] Takács T, Hegyi P, Czákó L, et al. Effects of galanin (1-16) on pancreatic secretion in anesthetized and conscious rats [J]. Res Exp Med (Berl), 2000, 199(5):275—283.
- [13] Mazziotti G, Bonadonna S, Doga M, et al. Biochemical evaluation of patients with active acromegaly and type 2 diabetes mellitus: efficacy and safety of the galanin test [J]. Neuroendocrinology, 2008, 88(4):299—304.
- [14] 吴毅, 吴军发. 运动疗法在糖尿病预防和治疗中的作用[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(5):385—386.
- [15] 吴毅, 孙莉敏, 胡永善, 等. 不同运动量对糖尿病大鼠血清瘦素水平的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(5):387—390.
- [16] 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载体 4 基因表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(5):391—394.