

·基础研究·

8周跑台运动对高脂膳食大鼠脂肪细胞分化和胰岛素敏感性的影响*

陈玉娟^{1,2} 刘 尊¹ 张海峰¹ 何玉秀^{1,3} 李 立²

摘要

目的:探讨大鼠经高脂膳食复制胰岛素抵抗模型后,运动对其的改善作用及脂肪细胞分化在其中的影响。

方法:SD纯系雄性大鼠40只,随机分为对照组(C)、高脂组(H)、高脂运动组(HE)和普通膳食运动组(E),各运动组进行8周跑台训练,对比各组的胰岛素敏感性指标和脂肪细胞分化各指标。

结果:8周高脂膳食成功复制大鼠胰岛素抵抗模型。大鼠脂肪细胞分化各指标变化:PPAR γ 在E组高于C组($P < 0.01$),H组高于C组; C/EBP α 在H组高于其他各组($P < 0.01$),E组高于C组,HE组低于H组; E组脂肪细胞分化程度最高($P < 0.01$);C组增殖指数最高,与H组和E组相比具有显著性差异($P < 0.01$; $P < 0.05$),HE组高于H组和E组($P < 0.05$);E组脂肪细胞体积小于C组($P < 0.01$),细胞数量高于C组;H组细胞体积小于C组($P < 0.01$),数量也增加($P < 0.01$),HE组与H组相比脂肪细胞体积较大($P < 0.01$),且数量减少。脂肪细胞分化指标与胰岛素抵抗指标间具有一定的相关关系。

结论:8周跑台运动可以改善由高脂膳食喂养引起的大鼠胰岛素抵抗现象,具体机制可能与其脂肪细胞分化的变化相关。

关键词 大鼠;高脂膳食;脂肪细胞分化;胰岛素抵抗

中图分类号:R587.1,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-06-0524-05

The effects of eight-week treadmill exercise on adipocyte differentiation and insulin sensitivity in high-fat diet rat/CHEN Yujuan, LIU Zun, ZHANG Haifeng, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(6): 524—528

Abstract

Objective: To study the effects of aerobic exercise on insulin resistance in the rats feed by high-fat-diet and discuss whether the effect acted via the adipocyte differentiation.

Method: Forty male SD rats were randomly assigned to four groups: control(C), high-fat diet control(H), high-fat diet control+exercise training(HE) and exercise training(E) group. Rats in HE and E groups were given treadmill exercise training. Insulin sensitivity and adipocyte parameters were evaluated.

Result: The insulin resistance rat model was duplicated successfully by high-fat-diet. The changes of adipose differentiation were as follows: PPAR γ protein of E group was higher than that of C group($P < 0.01$); that of H group was higher than C group, that of HE group was lower than H group. C/EBP α protein of H group was higher than that of other groups($P < 0.01$); that of E group was higher than C group, that of HE group was lower than H group. The adipose differentiation of E group was the highest compared with C and H groups($P < 0.01$); the proliferation index of C group was the highest compared with H and E groups($P < 0.01$ and $P < 0.05$), that of HE group was lower than H and E groups($P < 0.05$). In E group size of adipose cells was smaller than that of C

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.06.009

*基金项目:国家自然科学基金项目(30871215);石家庄学院博士科研启动基金(10BS003);石家庄学院科研启动基金项目(10QN007)

1 河北师范大学体育学院,石家庄,050016; 2 石家庄学院体育系; 3 通讯作者

作者简介:陈玉娟,女,博士,讲师; 收稿日期:2011-11-02

group($P<0.01$), number of cells were more than that of C group; in H group size of adipose cells was smaller than that of C group ($P<0.01$), and the number increased($P<0.01$); in HE group size of adipose cells was larger than that of G group($P<0.01$) and the number decreased. There was correlation between adipocyte differentiation and insulin resistance.

Conclusion: Treadmill exercise for 8 weeks could improve the insulin resistance induced by high-fat diet and the inner mechanism may be related to adipose differentiation.

Author's address Department of physical education, Hebei Normal University, Shijiazhuang, 050016

Key word rat; high-fat diet; adipocyte differentiation; insulin resistance

近年来,以脂肪细胞为中心探讨胰岛素抵抗发生机制已成为国际上研究的热点。已有研究显示脂肪细胞对胰岛素的敏感性的变化可以导致高胰岛素血症和胰岛素抵抗的发生,但其内部机制尚待阐明,脂肪细胞分化在其中的影响作用值得研究。而脂肪细胞分化是肥胖及其代谢综合征发生的前提,因此充分了解脂肪细胞分化在不同干预因素下的变化情况对于其调控具有重要意义,以便通过机体外部控制手段防止脂肪细胞分化异常,维持脂肪组织的正常功能。因此,探讨脂肪细胞分化的分子机制,分析脂肪细胞分化及其一系列形态和机能变化在胰岛素抵抗中的影响作用,可以了解运动改善脂肪细胞分化异常和胰岛素抵抗的机制,为防治肥胖相关代谢综合征运动处方的制定提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

本实验选用 Sprague-Dawley (SD) 纯系雄性大鼠 40 只(鼠龄 7 周),体重(176.36 ± 16.33)g,适应性饲养 1 周后,随机分为 4 组:安静对照组(C 组, $n=10$)、高脂膳食组(H 组, $n=10$)、高脂运动组(HE 组, $n=10$)、运动组(E 组, $n=10$)。高脂饲料是在普通饲料的基础上添加 2% 的胆固醇和 10% 猪油(即每 100g 高脂饲料中含普通饲料 88g,猪油 10g,胆固醇 2g)。运动方式:高脂运动组和运动组大鼠于上午 8—9 时进行跑台运动。运动持续 8 周,每周 5d,最终跑速为 20m/min,坡度 0°,每次 60min。训练从 5m/min 的速度开始,第一天训练 15min,在实验各阶段内逐渐增加速度和运动时间,直到达到目标运动量,待大鼠适应此运动强度后保持此运动时间直至实验结束,在最后 3 周实验运动强度约为 60% $\text{VO}_{2\text{max}}^{[1]}$ 。

1.2 取材及指标测试

实验第 8 周末,所有大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉(50mg/kg 体重)进行取材,在取材前 48h 内动物不进行训练,禁食 8h。腹腔静脉取血,4℃冰浴静置 20min,4℃离心 15min (3500 转/min),取血清,-30℃保存,待测血清生化指标。取血后以止血钳迅速封闭血管,在肋膈角处打开膈肌及胸腔,充分暴露心脏,心尖注射胰岛素(0.5U/100g 体重)^[2]。90s 后取附睾脂肪垫和肾周脂肪垫,4℃生理盐水充分冲洗净血液和组织液,滤纸吸干称重,按不同测试要求处理。主要的测试指标有:血糖、血胰岛素、胰岛素敏感指数、抵抗指数计算^[3]、PPAR γ 和 C/EBP α 蛋白表达量、脂肪细胞增殖能力(PI 值,流式细胞仪检测)、脂肪细胞分化程度检测^[4]、脂肪细胞数量与体积检测(石蜡切片)。

1.3 统计学分析

实验数据用 SPSS 11.5 数据软件包处理。结果以平均数 $\pm$ 标准差表示,同一指标不同组间进行方差分析,方差分析有差异后再进行多重比较。不同指标间采用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 成功复制大鼠胰岛素抵抗模型

见表 1。8 周末,4 组间血糖浓度差异无显著性($P>0.05$);H 组血清胰岛素浓度与 C 组和 HE 组相比均升高,但差异无显著性,E 组低于其他各组(分别为 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$)。H 组胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI)和胰岛素抵抗指数(insulin resistance index, IRI)与 C 组比较差异均具有显著性(分别为 $P<0.01$ 和 $P<0.05$),H 组的胰岛素敏感指数低于 HE 组,E 组高于 C 组和 HE 组,但差异均无显著性;胰岛素抵抗指数以 H 组最高,E 组低于 C 组和 HE 组,差异不具有显著性。血清游离脂

肪酸(free fatty acid, FFA)以H组最高,且与C组相比具有显著性差异($P < 0.01$)。结果显示,经8周实验后,高脂膳食已经造成大鼠胰岛素敏感性下降,表明本实验造模成功,满足了基本研究条件。

表1 8周跑台运动后大鼠血糖、胰岛素、胰岛素敏感指数及抵抗指数比较 $(\bar{x} \pm s)$

	C组	H组	HE组	E组
血糖(mmol/L)	4.08 ± 0.55	4.36 ± 0.61	4.52 ± 0.94	4.40 ± 0.62
血清胰岛素(μIU/ml)	37.47 ± 4.35	41.31 ± 3.08	36.73 ± 7.58	30.43 ± 4.03 ^{①④⑤}
胰岛素敏感指数(ISI)	-4.76 ± 0.12	-5.18 ± 0.17 ^②	-5.07 ± 0.29	-4.88 ± 0.23 ^④
胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)	6.75 ± 0.82	8.01 ± 1.35 ^①	7.35 ± 2.04	5.99 ± 1.40 ^④
游离脂肪酸(μM/L)	537.50 ± 137.09	897.46 ± 102.10 ^②	685.71 ± 105.01	610.70 ± 164.72 ^③

与C组比较,① $P < 0.05$,② $P < 0.01$;与H组比较,③ $P < 0.01$,④ $P < 0.01$;与HE组比较,⑤ $P < 0.05$

2.2 大鼠脂肪组织脂肪细胞分化各指标的比较

在一个视野下,E组脂肪细胞体积低小于C组($P < 0.01$),结合E组的细胞数量高于C组,提示运动可能增加脂肪组织小细胞数量;H组脂肪细胞体积小于C组($P < 0.01$),数量也多;HE组与H组相比脂肪细胞体积较大,且数量减少,显示在不同膳食干预下,运动表现出相反的变化趋势,可能的原因是运动促进高脂膳食大鼠脂肪细胞内脂质积累,从而避免其血液FFA的过度升高来改善胰岛素抵抗。

脂肪细胞分化重要转录因子的变化:①E组的PPAR γ 蛋白量最高,与C组比较差异具有显著性($P < 0.01$);在高脂膳食组,HE组较H组低,但差异无显著性意义。H组高于C组,差异不具有显著性,提示高脂膳食作用不如运动明显。②H组C/EBP α 蛋白表达量高于其他各组($P < 0.01$);E组高于C组;HE组较H组低,说明运动可以通过调节高脂膳食的作用来影响脂肪细胞分化。

从表2可知,脂肪细胞分化程度以E组最高,且与C组和H组相比差异具有高度显著性($P < 0.01$);HE组与H组相比比较高,H组略高于C组,但均无显著性差异。各组大鼠的细胞增殖指数以C组最高,与H组和E组相比具有显著性差异(分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),显示高脂膳食和运动这两种干预因素都可能降低了细胞增殖能力,且以高脂膳食影响程

度更大;H组和HE组相比,HE组的增殖指数高($P < 0.05$),表明在高脂膳食干预的前提下,运动可能改善了高脂膳食降低细胞增殖的能力;E组和HE组相比,以HE组的增殖指数大($P < 0.05$),提示不同的膳食对细胞增殖能力的影响在运动的前提下有所变化。

2.3 大鼠脂肪组织胰岛素敏感指数与各指标的相关性分析

ISI和IRI同为反映胰岛素敏感性高低的指标,二者相关程度极高, r 值达到-0.97,且ISI更能反映IR的情况,因此不再重复比较各蛋白及相关指标与HOMA-IR的相关性,仅用ISI与各指标的相关分析来了解脂肪细胞分化中的形态、蛋白表达和增殖分化程度与胰岛素敏感性的关系(表3)。

在IR相关指标中,PI3K与ISI相关系数为0.50,显示两者为正相关,而PKB与其相关系数较小,仅为-0.04;而在脂肪细胞分化相关指标中,具有显著性差异的指标有内脏脂肪重量和内脏脂肪百分比,相关系数分别为-0.42和-0.39,表明大鼠内脏脂肪积累越多,会使脂肪组织胰岛素敏感性越低,进而可能导致胰岛素抵抗现象;脂肪分化程度、增殖指数、PPAR γ 蛋白表达量、脂肪细胞的直径、面积、体积等指标与ISI的相关系数较低,表明这些指标与ISI相互作用不大。C/EBP α 蛋白指标与ISI相关性为中

表2 8周跑台运动后大鼠脂肪细胞分化各指标的比较 $(\bar{x} \pm s)$

	C组	H组	HE组	E组
细胞数量(个)	40.67 ± 4.16	58.00 ± 3.61 ^②	51.33 ± 4.16	48.67 ± 2.52
细胞体积($1 \times 10^3, \mu m^3$)	46.38 ± 26.77	26.47 ± 12.38 ^②	44.80 ± 23.35 ^③	27.26 ± 13.48 ^{②⑤}
PPAR γ 蛋白	0.82 ± 0.54	1.19 ± 0.27	1.34 ± 0.16	1.43 ± 0.18 ^①
C/EBP α 蛋白	0.86 ± 0.11	1.56 ± 0.46 ^①	1.34 ± 0.18	1.23 ± 0.16
脂肪细胞分化程度(OD值)	0.56 ± 0.04	0.60 ± 0.23	0.75 ± 0.07	0.96 ± 0.01 ^{②③}
脂肪细胞增殖指数(PI)	19.06 ± 5.25	13.87 ± 1.44 ^②	18.19 ± 0.59 ^①	14.57 ± 1.20 ^{①④}

与C组比较,① $P < 0.05$,② $P < 0.01$;与H组比较,③ $P < 0.01$;与HE组比较,④ $P < 0.05$,⑤ $P < 0.01$

表3 胰岛素敏感指数与各指标的相关性分析

指标	相关系数
胰岛素抵抗相关指标	
胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)	-0.97 ^①
PI3K	0.50
PKB	-0.04
脂肪细胞分化相关指标	
分化程度	0.18
内脏脂肪垫重量	-0.42 ^①
内脏脂肪垫%	-0.39 ^①
PPAR γ 蛋白	0.08
C/EBP α 蛋白	-0.55
脂肪增殖指数(PI)	0.04
脂肪细胞数量	0.95
脂肪细胞体积	0.12

①相关性在0.05水平具有显著意义

度相关,相关系数为-0.55;脂肪细胞数量与ISI呈现高度相关,相关系数为0.95,即脂肪细胞数量增加可以增大组织的胰岛素敏感性,从而改善胰岛素抵抗。

3 讨论

目前的动物和人体研究结果均显示出脂肪组织在维持代谢平衡方面起着非常重要的作用。流行病学调查认为肥胖患者的脂肪组织结构与功能上的变化与IR和糖耐量受损有关。2型糖尿病患者IR的早期症状包括脂肪组织中脂代谢增加,糖转运能力降低,另外,胰岛素成为维持脂肪组织正常功能的重要因素,像脂代谢、糖摄取及脂肪合成等均受到影响。证明胰岛素信号通路对于促进正常的脂肪储存、抑制脂肪分解和糖摄取都是必须的^[5]。FIRKO鼠表现出脂肪分解增加,包括整体脂肪组织重量的减少与全身甘油三酯量的降低,更重要的是这种差异与脂肪细胞数量关系不大,而是与细胞的体积大小密切相关^[6]。另外,胰岛素敏感性的提高可以抑制脂肪组织的分解从而减少血和肝组织FFA的浓度。由上述研究成果可知,胰岛素敏感性下降乃至胰岛素抵抗与脂肪组织、脂肪细胞的分布、功能等指标有着密切关系。

3.1 脂肪细胞数量和增殖能力与胰岛素敏感性关系及运动的影响

本实验中,高脂膳食刺激8周后会导致细胞增殖比例下降,可能不利于其糖脂代谢。细胞增殖比例的下降,有助于细胞内脂滴的积累,促进分化程度,但可能会引起胰岛素敏感性下降。相对于高脂

膳食的刺激,运动的影响有所区别。有研究显示,游泳运动可以促进脂肪细胞的增殖能力,而在本实验中,脂肪细胞的增殖能力出现降低,可能与运动性质有关。在高脂膳食前提下,运动的干预可以提高细胞增殖比例,与8周普通膳食运动组的比较显示出运动在高脂膳食和普通膳食干预下的不同影响,可能表明普通膳食作用下,运动降低细胞增殖能力,可以抑制整体内脏脂肪积累;而高脂膳食降低细胞增殖能力,但膳食的高热量有可能促进细胞内脂质积累,由此引起细胞体积增大,从而降低胰岛素敏感性,结合高脂膳食大鼠胰岛素敏感性和抵抗的变化来看,的确呈现出这样的结果,由此可知,在实验末期,虽然运动和高脂膳食均降低脂肪细胞,但在实验过程中二者的变化还是有区别的,高脂膳食的干预结果最终导致IR,而运动可以改善这种不利影响。

从脂肪细胞数量来看,普通膳食对照组的变化趋势为随着年龄增长,细胞数量逐渐减少,可能与其细胞增殖能力下降有关,而本实验中普通膳食对照组的增殖能力的确表现出下降趋势,验证了这一观点。至于运动的影响,有研究显示,运动可以增加小脂肪细胞数量,由此增加其胰岛素敏感性。本实验结果与以上文献结果一致。

3.2 脂肪细胞体积和分化程度与胰岛素的关系及运动的影响

小脂肪细胞对胰岛素更加敏感^[7]。本实验中,高脂膳食喂养后的大鼠脂肪细胞体积减小,数量增多,但其胰岛素敏感性显著下降,实际上从长期的干预效果来看,高脂膳食不仅引起脂肪细胞数量的增加,也可以促进脂肪细胞体积的增大,说明高脂膳食喂养后,机体发胖的潜力增大,可能引发肥胖乃至胰岛素抵抗,有研究显示高脂膳食能增加脂肪细胞的体积,同时降低脂联素的水平,本研究验证了此观点。从两组的胰岛素敏感性变化也可以间接说明,即高脂组造成的脂肪细胞数量增加可能是其细胞体积增大的前提或前期过程,由于高脂膳食的高热量摄入,推测继续的高脂膳食喂养会增大细胞体积,而导致胰岛素抵抗程度的加深。而在运动组,脂肪细胞数量增加和体积减小可能来自于其增殖能力的提高,由此来达到改善胰岛素敏感性的目的,由于运动促进了机体能量消耗的增加,脂肪细胞中脂质积累

较少,导致整体内脏脂肪量减少,但也说明一旦运动停止,原有的能量平衡被破坏,大基数的脂肪组织可能会迅速积累脂质,导致肥胖的发生。

脂肪细胞分化程度可以间接反映脂肪细胞内脂滴的积累程度。本研究结果显示,8周运动后,运动的影响较大,显示运动对脂肪组织分化程度的影响较大,而高脂膳食并无太大影响。可能与运动的刺激造成能量需求增大,引起脂代谢加快有关。

3.3 脂肪细胞转录因子与胰岛素敏感性关系及运动的影响

PPAR γ 和 C/EBP α 都是脂肪细胞分化过程中重要的转录受体,其中 PPAR γ 在分化前、中期起作用,而 C/EBP α 作用于分化后期^[8]。基础状态下脂肪组织 PPAR γ 的表达水平对于维持机体的胰岛素敏感性非常重要。PPAR γ 激活后可促进小脂肪细胞分化,减小细胞体积,并直接上调脂连素水平,从而增加胰岛素敏感性,改善胰岛素抵抗。张秀锦^[9]研究发现在老年鼠脂肪组织中,PPAR γ 1、PPAR γ 2mRNA 表达均明显减少,且与胰岛素敏感性降低有关,由此推测 PPAR γ 作为决定脂肪细胞分化的主要调节者,衰老大鼠脂肪组织 PPAR γ 表达降低可能通过降低脂肪细胞分化能力,使对胰岛素敏感的小脂肪细胞数目减少而影响胰岛素抵抗的形成。另有研究显示,PPAR γ 对胰岛素抵抗的改善作用可被 TZD 类药物的疗效所证明,而这种改善与脂肪细胞分化相关^[10]。C/EBP α 的变化特点为出生时水平相对较低,出生后的第 17d 开始上升^[11]。与此相对应的是胰岛素受体也在持续增加,由其在分化阶段中所处的位置可以推断其作用机制,并与胰岛素抵抗相联系。

本研究结果显示,在普通膳食组,采用的跑台运动形式可以促进脂肪组织中 PPAR γ 和 C/EBP α 蛋白的表达。在高脂膳食组二者表达也增高,而运动在不同膳食组别中变化不一致,显示运动对于高脂膳食的不良影响起到了中和作用。Akiyama 等^[12]认为 PPAR γ 的活性与胰岛素抵抗之间成 U 形曲线关系,从本研究的结果中也能体现,即高脂组的脂肪细胞分化关键转录因子过度增加,可能引发胰岛素抵抗,而运动组的蛋白表达增加是一种良好的促进。

4 结论

高脂膳食可以导致胰岛素敏感性下降,其脂肪细胞形态、内脏脂肪积累和细胞内脂质积累均表现出过度的变化,从而导致胰岛素抵抗;运动有减缓高脂膳食不利影响的作用。这种改善与运动引起的脂肪细胞数量、内脏脂肪重量、内脏脂肪比例及脂肪分化相关蛋白有关。

参考文献

- [1] Peres SB, de Moraes SM, Costa CE, et al. Endurance exercise training increases insulin responsiveness in isolated adipocytes through IRS/PI3-kinase/Akt pathway[J]. J Appl Physiol, 2005,98(3):1037—1043.
- [2] Folli F, Saad MJ, Backer JM, et al. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat [J]. J Biol Chem, 1992,267(31):22171—22177.
- [3] 李光伟. 胰岛素敏感性评价及其在临床研究中的应用[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2000,16(3):198—200.
- [4] Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracy to plasmic lipids with Oil red O[J]. Histochem, 1992,97:493—497.
- [5] Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, et al. Transcriptional regulation of adipogenesis[J]. Genes Dev, 2000,14(11):1293—1307.
- [6] Bluher M, Michael MD, Peroni OD, et al. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance[J]. Dev Cell, 2002,3(1):25—38.
- [7] Abbott WG, Foley JE. Comparison of body composition, adipocyte size, and glucose and insulin concentrations in Pima Indian and Caucasian children[J]. Metabolism, 1987,36(6):576—579.
- [8] Ding ST, McNeel RL, Mersmann HJ. Expression of porcine adipocyte transcripts: tissue distribution and differentiation in vitro and in vivo[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1999,123(3):307—318.
- [9] 张秀锦, 叶平, 王兆君. 老年大鼠过氧化体增殖物激活型受体- γ 的表达及其与胰岛素抵抗的关系[J]. 中华老年医学杂志, 2004,23(2):106—108.
- [10] Hammarstedt A, Andersson CX, Rotter Sopasakis V, et al. The effect of PPARgamma ligands on the adipose tissue in insulin resistance[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005,73(1):65—75.
- [11] McNeel RL, Ding ST, Smith EO, et al. Expression of porcine adipocyte transcripts during differentiation in vitro and in vivo[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2000, 126(3):291—302.
- [12] Akiyama TE, Nicol CJ, Gonzalez FJ. On par with PPARs[J]. Trends Genet, 2001,17(6):310—312.