

·基础研究·

运动通过增强大鼠 Caveolin-3/eNOS 信号转导缓解胰岛素抵抗形成的机制*

齐洁¹ 傅建² 张钧^{1,3}

摘要

目的:探讨 Caveolin-3/eNOS 信号转导在游泳运动改善高脂饮食大鼠胰岛素抵抗(IR)中的作用,为胰岛素抵抗及其并发症的防治提供理论依据。

方法:以SD大鼠为实验对象,随机分为3组:正常对照组(C组)、高脂饮食组(H组)、高脂饮食运动组(HE组)。通过8周高脂饲料喂养建立IR大鼠动物模型,同时对大鼠实施无负重游泳运动干预。用正糖钳技术结合胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)和胰岛素敏感指数(ISI)评价动物模型的建立;通过观察运动对高脂饮食IR大鼠骨骼肌eNOS和GLUT4含量, Caveolin3 (Cav-3) mRNA 的表达水平, pAktSer473 和 Akt 蛋白表达的变化,探讨运动干预IR的机制。

结果:①8周高脂饮食喂养后, H组大鼠葡萄糖输注速率(GIR)显著下降($P<0.01$), ISI水平显著下降($P<0.01$), HOMA-IR水平显著增加($P<0.01$),提示胰岛素抵抗大鼠建模成功。②8周游泳干预后,与H组相比, HE组大鼠GIR显著增加($P<0.01$),血清INS含量和HOMA-IR水平均显著降低($P<0.01$), ISI水平显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);骨骼肌Cav-3 mRNA表达水平, pAktSer473和Akt蛋白表达水平均显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

结论:8周游泳运动可通过上调骨骼肌Cav-3的表达水平,激活eNOS/Akt通路,从而增加GLUT4移位,缓解高脂饮食大鼠IR的形成。

关键词 胰岛素抵抗;运动;小窝蛋白3;内皮型一氧化氮合酶;2型糖尿病

中图分类号:R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2016)-07-0734-05

Exercise intervention improves insulin resistance by enhancing Caveolin-3/eNOS in rats/QI Jie, FU Jian, ZHANG Jun//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(7): 734—738

Abstract

Objective: To investigate the role of Caveolin-3/eNOS in swimming exercise-induced insulin resistance for high-fat-diet rats.

Method: SD rats were randomly assigned to 4 groups: ①Sedentary rats were fed with normal diet group (C group, n=10). ②Sedentary rats were fed with high-fat diet group (H group, n=9). ③High-fat diet rats were given 90min/time swimming(HE group, n=10). Rats of H group were fed with high-fat diet for 8 weeks to induce insulin resistance (IR). 8 weeks later, the FBG, FINS, HOMA-IR, ISI and euglycemic-hyperinsulinemic clamp experiments were used to evaluate the animal model of IR and effects of exercise intervention. By observing the contents of skeletal muscle eNOS and GLUT4, the expression of Caveolin3 (Cav-3) mRNA, pAktSer473 and Akt, we explored the mechanism involved in the exercise-induced IR.

Result: After 8-week exercise, in the HE group, the GIR was significantly increased ($P<0.01$), the levels of INS and HOMA-IR were dramatically decreased ($P<0.05$), the level of ISI was obviously increased ($P<0.01$),

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.07.004

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(31571223)

1 上海师范大学体育学院,200234; 2 扬州大学体育学院; 3 通讯作者

作者简介:齐洁,女,讲师; 收稿日期:2015-12-01

the expression of cav-3 mRNA, pAktSer473 and Akt were obviously increased ($P<0.01$ or $P<0.05$), when compared with those in the H group.

Conclusion: Swimming exercise can ameliorate high-fat-diet-induced skeletal muscle IR in rats through increasing caveolin 3/eNOS signaling transduction.

Author's address College of Physical Education, Shanghai Normal University, 200234

Key word insulin resistance; exercise; caveolin 3; eNOS; type 2 diabetes mellitus

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是指胰岛素在其作用靶组织(骨骼肌、肝脏和脂肪组织)摄取和清除葡萄糖的能力低下。由于人体骨骼肌组织是最重要的胰岛素效应组织^[1],研究发现^[2],肥胖或2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)状态下,骨骼肌细胞能够产生大量活性物质,统称为“myokine”,即肌肉因子,包括一些影响代谢的细胞因子和肽类物质,均与骨骼肌IR有密切联系,但其在骨骼肌IR发生发展中的作用和调控机制目前尚不清楚。新近研究发现的小窝蛋白3(caveolin-3,Cav-3),被认为是IR发生的关键肌肉因子^[3]。但其作用机制还有待实验进一步阐明。运动作为一种有效的非药物防治手段,已广泛应用到防治因IR而引起的慢性代谢性疾病中,游泳运动是否可通过改善骨骼肌Cav-3的表达水平,对胰岛素转导信号产生影响从而缓解IR的发生,尚需进一步探讨。因此,本研究以高脂饮食喂养诱导大鼠产生IR为模型,探讨游泳运动对高脂饮食IR大鼠骨骼肌Cav-3/eNOS信号通路的影响,为运动防治IR提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SD纯系SPF级5周龄雄性大鼠29只,体重 130 ± 20 g,购自江苏大学实验动物中心,许可证号:SCXK(苏)2009-0002。动物统一使用普通饲料适应性饲养一周后,随机分为3组:正常对照组(C组, $n=10$)、高脂模型组(H组, $n=9$)、高脂运动组(HE组, $n=10$)。分组后,C组继续使用基础饲料喂养,H组和HE组使用高脂饲料喂养。大鼠分笼喂养,每笼2只。室温 24°C ,相对湿度45%—55%。每天光照黑暗时间各12h。基础饲料和高脂饲料主要营养成分热量比例见表1—2。

1.2 运动方案

参照Benford^[4]动物运动负荷标准制定动物游泳

表1 饲料主要成分表 (g/1000g 饲料)

主要成分	基础饲料	高脂饲料
小麦粉	349	269
豆粕	230	177
玉米粉	220	169
次粉	100	77
磷酸氢钙	33.5	26
大豆油	30.5	24
猪油	0	140
石粉	11	8
玉米蛋白粉	10	8
啤酒酵母	10	8
盐	5	6
添加酪蛋白	0	86.8
维矿等补充物	1	1.2
合计	1000	1000

表2 基础饲料和高脂饲料蛋白质、脂肪和碳水化合物供能比

主要成分	基础饲料	高脂饲料
蛋白质	22%	22%
脂肪	13%	38%
碳水化合物	65%	40%
总热量(kCal)	3426	4243

运动方案。HE组大鼠每天进行1次连续90min的无负重游泳运动。游泳缸体积为 $(150\times 60\times 70)\text{cm}^3$,水温 $(31\pm 1)^{\circ}\text{C}$,水深60cm。大鼠每周游泳6天,持续8周。

1.3 实验取材及样本制备

HE组大鼠于末次游泳运动后,与C组和H组大鼠均禁食12h。次日用10%水合氯醛按 50mg/kg (体重)腹腔麻醉后,腹主动脉取血10ml,2500r/min离心10min,取血清,检测大鼠血清胰岛素和血糖水平。取双侧大腿红色股四头肌。迅速投于液氮中,再 -80°C 保存。将骨骼肌组织以 $50\text{mg}:500\mu\text{l}$ (质量分数10%)加入0.9%生理盐水,用超声波破碎仪(40A, 5s/次,间隙10s,反复5次)制备组织匀浆,匀浆液于 4°C 3000r/min离心15min,取上清, -20°C 保存,待测。

1.4 指标的测定

1.4.1 正糖钳试验:采用改良Kraegen法^[5]。大鼠用

10%水合氯醛 50mg/kg 麻醉后,仰卧固定,颈静脉插入细硅管,将三通管分别与静脉插管、输注胰岛素的蠕动泵及输注 10%葡萄糖的蠕动泵相连。双侧静脉分别输注胰岛素 $4\text{mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 10%葡萄糖液(恒速)。每隔 10min 尾静脉取血测定血糖,不断调节葡萄糖输注速率(glucose infusion rate, GIR)直至血糖稳态。记录稳态下 60min 内的 6 次 GIR,取平均值作为稳态下的 GIR。

1.4.2 胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)和胰岛素敏感指数(ISI)计算:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{FINS} \times \text{FBG}) / 22.5^{[6]}$$

$$\text{ISI} = 1 / (\text{FINS} \times \text{FBG}) (\text{取其自然对数})^{[7]}$$

1.4.3 骨骼肌 Cav-3 mRNA 表达水平:实时荧光定量 PCR 法检测大鼠骨骼肌 Cav-3 mRNA。Trizol 试剂(Takara)提取骨骼肌组织总 RNA,按照反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 反应试剂盒说明书操作步骤,获得 cDNA 产物,并进行实时荧光定量 PCR 反应,GAPDH 为内参。

GAPDH 上游引物: 5'-TGGGTGTGAACACGAGAA-3',

下游引物: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3';

Cav-3 上游引物: 5'-AGGACATTCACTGCAAGGA-GA-3',

下游引物: 5'-CAGAAGGTGCGGATACA-3'。

Cav-3 mRNA 表达采用实时 PCR SYBGreen 荧光染料法测定,配置 20 μl 体系,扩增条件为:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30s;PCR 反应 95 $^{\circ}\text{C}$ 5s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34s(共 40 循环), 95 $^{\circ}\text{C}$ 15s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15s。软件自动生成扩增曲线及融解曲线。 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值法计算 mRNA 表达水平。

1.4.4 大鼠骨骼肌内源性一氧化氮合成酶(eNOS)、葡萄糖转运子 4(GLUT4)含量的测定:应用双抗体夹心法酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠骨骼肌 eNOS 和 GLUT4 水平。具体操作步骤按照 eNOS 和 GLUT4 酶联免疫法试剂盒说明书进行。试剂盒由上海杰美基因公司提供。

1.4.5 大鼠骨骼肌 Cav-3、pAkt^{Ser473}磷酸化水平和 Akt 蛋白表达水平测定:Western blot 法检测大鼠骨骼肌组织 Cav-3、pAkt^{Ser473} 和 Akt 蛋白表达水平。将上样缓冲液与骨骼肌组织蛋白样品 1:3 混合煮沸 5min。在垂直电泳仪(美国 Bio-Rad)上用相同体积的 40 μg

骨骼肌蛋白质样品经 SDS-PAGE 分离后,转移于 PVDF 膜(Ferments 公司)上。1:1000 稀释一抗(CST 公司)4 $^{\circ}\text{C}$ 静置孵育过夜, PBS 洗涤 3 次,再以 1:2000 稀释二抗(CST 公司)室温孵育 2h, PBS 充分洗涤后,将膜取出放置在凝胶成像系统仪器(美国 Dophin 公司)中, ECL 化学发光反应液(美国 Thermo 公司)曝光。采用 AlphaView SA 图像分析软件对条带灰度进行分析和比较。

1.5 统计学分析

采用 SPSS17.0 进行统计分析,指标采用单因素方差分析和 LSD 法进行多重比较,统计学显著性为 $P < 0.05$,非常显著性为 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 正糖钳试验检测大鼠胰岛素敏感性

由表 3 可知,与 C 组大鼠相比, H 组大鼠 GIR 显著降低($P < 0.01$);与 H 组相比, HE 组大鼠葡萄糖输注速率显著增加($P < 0.01$)。

2.2 运动对大鼠血清 INS、FBG、ISI、HOMA-IR 的影响

由表 4 可知, H 组大鼠 FBG 与 C 组无显著差异($P > 0.05$), INS 和 HOMA-IR 均显著高于 C 组($P < 0.05$), ISI 显著低于 C 组($P < 0.01$);与 H 组相比, HE 组大鼠血糖无显著性差异($P > 0.05$),血清胰岛素含量显著减少($P < 0.01$), ISI 水平显著增加($P < 0.05$), HOMA-IR 水平显著下降($P < 0.01$),但 HE 组大鼠血清胰岛素、ISI 和 HOMA-IR 与 C 组还存在显著性差异。

2.3 运动对大鼠骨骼肌 Cav-3 表达的影响

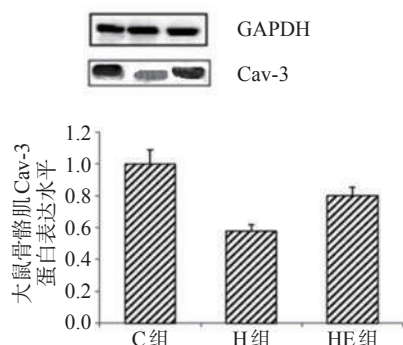
由表 5 和图 1 可知,与 C 组相比, H 组大鼠骨骼肌 Cav-3 mRNA 和蛋白表达量均显著降低($P < 0.01$);与 H 组相比, HE 组大鼠骨骼肌 Cav-3 mRNA 和蛋白表达量均显著增加($P < 0.01$)。

2.4 运动对大鼠骨骼肌 eNOS 和 GLUT4 水平的影响

由表 6 可知,与 C 组相比, H 组大鼠骨骼肌 eNOS 和 GLUT4 含量均显著低于 C 组($P < 0.01$, $P < 0.05$);与 H 组相比, HE 组大鼠骨骼肌 eNOS 和 GLUT4 含量均显著上升($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

2.5 大鼠骨骼肌组织 AKT 表达水平的比较

图1 大鼠骨骼肌Cav-3蛋白表达水平比较



由表7和图2可知,与C组相比,H组大鼠骨骼肌pAkt^{Ser473}的磷酸化水平和Akt蛋白表达水平均显著下降($P<0.01$);与H组相比,HE组大鼠骨骼肌pAkt^{Ser473}的磷酸化水平和Akt蛋白表达水平均显著增加($P<0.01$)。

图2 大鼠骨骼肌Akt表达水平比较

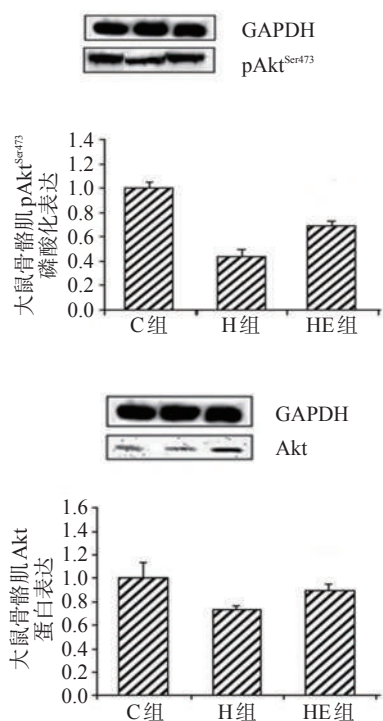


表4 大鼠FBG、FINS、ISI、HOMA-IR的变化

指标/组别	例数	FBG (mmol/L)	INS (mIU/L)	ISI	HOMA-IR
正常对照组	10	4.412±0.732	5.623±0.358	-3.129±0.381	1.015±0.721
高脂模型组	9	5.076±0.865	15.640±0.210 ^①	-4.473±0.523 ^①	3.895±0.682 ^①
高脂运动组	10	4.652±0.656	10.626±0.229 ^②	-3.956±0.256 ^③	2.322±0.302 ^②

注:①与正常对照组相比 $P<0.01$;②与高脂模型组相比 $P<0.01$;③与高脂模型组相比 $P<0.05$

表3 各组大鼠葡萄糖输注速率的变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	血糖 (mmol/L)		胰岛素 速率(mU/ kg/min)	葡萄糖输 注速率 (mg·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)
		基础状态	稳定状态		
正常对照组	10	5.62±0.41	5.29±1.15	24	25.03±2.79
高脂模型组	9	9.34±5.28	5.78±1.02	24	13.40±2.38 ^①
高脂运动组	10	8.62±3.76	5.37±1.56	24	16.79±2.27 ^②

注:①与正常对照组相比 $P<0.01$;②与高脂模型组相比 $P<0.05$

3 讨论

随着生活物质条件的改善,人们的饮食结构发生了很大的变化,脂肪的摄入量明显增加,目前研究认为不合理的膳食结构,特别是高脂肪膳食,加上久坐不运动的生活方式是引起肥胖、T2DM等代谢性疾病的主要原因。IR是指胰岛素在周围组织摄取和清除葡萄糖的能力低下。研究表明,IR是高血压、糖尿病、高脂血症、肥胖等疾病的重要病理生理基础及共同的发病危险因素,是代谢综合征(metabolic syndrome, MS)发生、发展的关键所在^[8-10]。因此,IR成为了近年来医学研究的热点之一。当前,运动作为公认的非药物干预手段,已广泛应用到防治因IR而引起的慢性代谢性疾病中,但其作用机制还尚未完全阐明。

3.1 游泳运动对高脂饮食大鼠IR的影响

机体糖代谢调控的目的是使血糖的波动减小至最低程度。正常生理条件下,糖代谢的调节主要由胰岛素和胰高血糖素(glucagon)介导。饥饿时,胰高血糖素分泌增多后激活糖异生途径、促进糖原分解;饱食后,INS分泌增多后可促进周围组织细胞对葡萄糖的摄取利用,激活糖酵解途径、促进糖原合成,加快糖的有氧氧化、抑制糖异生,减少脂酸动员向葡萄糖的转化。机体的这一系列代谢调控旨在使血糖的波动减小至最低程度。Chalkley等^[11]发现,正常动物经长期高脂饮食,可出现明显的IR,但其血糖升高并不明显。此外,还有研究表明^[12],在采用高脂饲料长期喂养Wistar大鼠后,发现前10个月大

表5 各组大鼠骨骼肌Cav-3表达水平的比较 ($\bar{x}\pm s$)

指标/组别	例数	骨骼肌	骨骼肌
		Cav-3 mRNA 表达	Cav-3 蛋白表达
正常对照组	10	1.0000±0.1186	1.0000±0.1438
高脂模型组	9	0.4238±0.0895 ^①	0.5788±0.0769 ^①
高脂运动组	10	0.7914±0.0786 ^②	0.8025±0.0841 ^②

注:①与正常对照组相比 $P<0.01$;②与高脂模型组相比 $P<0.01$

表6 各组大鼠骨骼肌eNOS和GLUT4含量的比较 ($\bar{x}\pm s$)

指标/组别	例数	骨骼肌eNOS	骨骼肌GLUT4
		(U/g prot)	(pmol/mg prot)
正常对照组	10	121.80±6.98	103.43±5.53
高脂模型组	9	103.84±4.54 ^①	80.95±4.23 ^②
高脂运动组	10	126.13±4.44 ^③	104.42±13.53 ^④

注:①与正常对照组相比 $P<0.01$;②与正常对照组相比 $P<0.05$;③与高脂模型组相比 $P<0.01$;④与高脂模型组相比 $P<0.05$

表7 各组大鼠骨骼肌Akt^{Ser473}的比较 ($\bar{x}\pm s$)

指标/组别	例数	pAkt ^{Ser473} 磷酸化水平	Akt蛋白表达
正常对照组	10	1.00±0.05	1.00±0.14
高脂模型组	9	0.44±0.06 ^①	0.73±0.03 ^①
高脂运动组	10	0.69±0.04 ^②	0.89±0.06 ^③

注:①与正常对照组相比 $P<0.01$;②与高脂模型组相比 $P<0.01$;③与高脂模型组相比 $P<0.05$

鼠FBG无显著升高,到第11个月时血糖才轻度升高。本实验结果表明,各组大鼠血糖无显著性差异,说明8周高脂饮食未导致大鼠糖代谢异常。与前人实验结果一致^[11]。本实验结果还表明,H组FINS显著高于C组,ISI显著低于C组,表明8周高脂饮食已导致H组大鼠血清胰岛素代偿性升高,出现高胰岛素血症,这可能也是各组大鼠间血糖未出现显著变化以及组织对INS敏感性下降的原因。8周游泳运动后,与高脂IR模型组大鼠相比,高脂运动组大鼠ISI和GIR均显著增加,胰岛素和HOMA-IR均显著下降。提示,8周游泳运动可有效缓解高脂饮食大鼠IR的发生、发展。

3.2 Cav-3在运动预防高脂饮食大鼠IR形成中的作用

近年来,细胞质膜微囊(caveolae)作为一种细胞器的研究已引起广泛关注,为研究细胞膜上的信号转导提供了一个重要线索^[13-15]。目前通过分子克隆已鉴定出3种不同的微囊蛋白基因,即微囊蛋白-1(caveolin-1, Cav-1)、微囊蛋白-2(caveolin-2, Cav-2)和微囊蛋白-3(caveolin-3, Cav-3)。其中,Cav-3基因特异表达于肌肉组织。有研究表明,Cav-3能增强INS刺激的作用,但不能增强其受体酪氨酸的

自身磷酸化,故Cav-3可能通过其他途径激活胰岛素受体^[16]。Penumathsa等^[17]的实验表明,白藜芦醇促进Cav-3与GLUT4相互作用,是通过AMPK/Akt/eNOS信号通路诱导GLUT4向细胞膜转移实现的。因此,我们推测,长期高脂饮食后,大鼠出现IR的同时Cav-3表达减少,从而抑制Akt/eNOS通路活性,阻碍了GLUT4的转运,导致骨骼肌摄取和利用葡萄糖的能力下降,产生IR。目前关于运动对Cav-3影响的相关报道尚不多见。本实验结果表明,与C组大鼠相比,H组大鼠Cav-3表达量下降,pAkt^{Ser473}磷酸化水平和Akt蛋白表达水平显著下调,eNOS和GLUT4含量均显著下降,骨骼肌产生IR。8周运动后,HE组大鼠骨骼肌Cav-3表达量显著增加,pAkt^{Ser473}磷酸化水平和Akt蛋白表达水平均显著上调,eNOS和GLUT4含量显著增多,骨骼肌IR有所改善。实验结果说明,8周每天1次连续90min的游泳运动可通过上调Cav-3的表达水平,激活eNOS/Akt通路,增加GLUT4移位,预防IR形成。

本实验结果表明,8周游泳运动可有效地改善高脂饮食诱导的胰岛素抵抗。Cav-3在运动改善高脂饮食大鼠IR中的作用机制可能为:8周游泳运动可通过上调骨骼肌Cav-3的表达水平,激活eNOS/Akt通路,从而增加GLUT4移位,缓解高脂饮食大鼠IR的形成。

参考文献

[1] Smith AG, Muscat GE. Skeletal muscle and nuclear hormone receptors: Implications for cardiovascular and metabolic disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(10): 2047—2063.

[2] Wu CK, Yang CY, Lin JW, et al. The relationship among central obesity, systemic inflammation, and left ventricular diastolic dysfunction as determined by structural equation modeling[J]. Obesity, 2011, 20(3): 36—42.

[3] Tan Z, Zhou LJ, Mu PW, et al. Caveolin-3 is involved in the protection of resveratrol against high-fat-diet-induced insulin resistance by promoting GLUT4 translocation to the plasma membrane in skeletal muscle of ovariectomized rats [J]. J Nutr Biochem, 2012, 23(12): 1716—1724.

[4] Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. Appl Physiol, 1979, 47(6): 1278—1293.

(下转第745页)