

## · 基础研究 ·

## 运动对胰岛素抵抗大鼠血清视黄醇结合蛋白 4 及骨骼肌磷脂酰肌醇 3 激酶表达的影响

张黎军 刘慧红 黄从新

**【摘要】目的** 研究运动对胰岛素抵抗(IR)大鼠血清视黄醇结合蛋白 4(RBP4)及骨骼肌磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)表达的影响。**方法** 将 30 只雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、IR 组及运动组,后 2 组大鼠均给予高糖高脂饲料喂养 8 周,经证实 IR 造模成功后,IR 组及运动组大鼠继续给予高糖高脂饲料喂养 6 周,运动组同时进行为期 6 周的游泳训练。于实验进行 14 周末时检测各组大鼠体重(BW),然后处死大鼠取血检测血糖(FPG)、血清胰岛素(FINS)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平,并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),选用 ELISA 技术检测血清 RBP4 水平,采用免疫组化法检测大鼠骨骼肌中 PI3K 表达;另外提取各组大鼠肠系膜、附睾、反折腹膜脂肪等组织称重,计算内脏脂肪重量与体重的比值。**结果** (1)运动组大鼠血清 RBP4、TC、TG、FPG 水平均显著低于 IR 组;IR 组大鼠内脏脂肪重量、内脏脂肪重量/体重比值、血清 RBP4、FINS、LDL、HOMA-IR 均高于其它两组( $P < 0.01$ );血清 HDL 水平均低于其它两组( $P < 0.01$ )。(2)运动组大鼠骨骼肌 PI3K 表达强度明显高于 IR 组( $P < 0.01$ )。(3)通过相关性分析发现,IR 大鼠血清 RBP4 与 FINS、内脏脂肪重量/体重比值、LDL、HOMA-IR 具有正相关性;与 HDL、骨骼肌 PI3K 水平具有负相关性。**结论** 运动能下调 IR 大鼠血清 RBP4 水平及增强骨骼肌 PI3K 表达,对改善机体胰岛素敏感性具有重要意义。

**【关键词】** 运动; 视黄醇结合蛋白 4; 磷脂酰肌醇 3 激酶; 胰岛素抵抗

**Effects of exercises on expressions of retinol binding protein-4 in serum and phosphatidylinositol 3 kinase in skeletal muscles of insulin resistant rats** ZHANG Li-jun\*, LIU Hui-hong, HUANG Cong-xin. \* Department of Geriatrics, Renming Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of exercises on expressions of retinol binding protein-4 (RBP4) in serum and phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) in skeletal muscles of insulin-resistant (IR) rats induced by diets. **Methods** A total of 30 Wistar rats were randomly divided into 3 groups: normal control group fed with normal diet, IR and exercises groups with high sugar and high fat diet. After 8 weeks, the Wistar rats in exercises group took swimming training for 6 weeks and all groups kept their assigned diets. At the end of 14-week experiment, the body weight (BW) of rats were measured, the general behaviors of rats were observed and then sacrificed. Rats' blood were sampled for measuring the levels of glucose (FPG) and serum RBP4, insulin (FINS), HDL-C, LDL-C, TG, TC. The indexes of IR (HOMA-IR) were calculated. The levels of RBP4 in serum were measured with ELISA technique. The ratios of visceral fat content to BW were calculated too. Immunohistochemistry method was applied to detect the expression levels of PI3K in skeletal muscle. **Results** (1) The levels of RBP4, TC, TG, FPG in serum in exercises group were lower than those in IR group significantly; the visceral fat content, ratio of visceral fat content to BW, FINS, RBP4, LDL and HOMA-IR in serum increased significantly in IR group after 6 weeks feeding compared with normal control group and exercises group ( $P < 0.01$ ); the levels of HDL in serum in IR group were lower than those in the other two groups. (2) The expression levels of PI3K in skeletal muscles in exercises group were significantly higher than that in IR group ( $P < 0.01$ ). (3) In a multiple stepwise regression analysis, FINS, ratio of visceral fat content to BW, LDL and HOMA-IR were correlated with RBP4 positively; HDL and PI3K were correlated with RBP4 negatively. **Conclusion** Exercises could downregulate the level of RBP4 in serum and upregulate the level of PI3K in skeletal muscles of IR rats. This effect was important for improving the organism sensibility to insulin.

**【Key words】** Exercises; Retinol binding protein-4; Phosphatidylinositol 3 kinase; Insulin resistant

心血管疾病危险因素包括高血压、腹型肥胖、脂代谢异常等,这一系列危险因素的集合被称为代谢综合征(metabolic syndrome, MS),胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是其中心环节及基本病理生理改变<sup>[1]</sup>。近年来研究发现,脂肪细胞因子作为内源性信号分子主要作用于机体脂肪组织及能量代谢器官,对维持体内能量合成及代谢稳定具有重要意义。Yang 等<sup>[2]</sup>发现血清视黄醇结合蛋白 4 (serum retinol binding protein-4, RBP4) 是一种新的致 IR 脂肪细胞因子,参与了 IR 及 2 型糖尿病的发病过程,如血清中 RBP4 升高可下调细胞葡萄糖转运体 4 (glucose transporter-4, GLUT4) 水平,从而导致 IR 发生、发展。运动训练作为改善机体胰岛素敏感性、预防及控制 MS 的有效手段,目前已逐渐引起人们广泛关注。大量研究发现,运动能显著降低脂肪细胞因子-瘦素及肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ) 水平,对脂联素无明显影响<sup>[3-5]</sup>,但鲜见有关运动对脂肪细胞因子 RBP4 影响的报道。本研究通过对 IR 大鼠进行游泳训练,并观察大鼠训练前后血脂、血清 RBP4 及磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)的变化情况,从而探讨运动对 MS 的干预作用及相关机制。现报道如下。

## 材料与方法

### 一、动物分组及处理

共选取健康 SPF 级雄性 6 周龄 Wistar 大鼠 30 只,购于武汉大学医学院实验动物中心(动物生产许可证号:SCXK[鄂]2003-0005;使用许可证号:SYXK[鄂]2004-0027),大鼠体重 160~212 g;大鼠饲料购自湖北省实验动物中心,普通饲料中蛋白质占 20.93%、脂肪占 16.67%、碳水化合物占 62.40%;高脂高糖饲料为在普通饲料配方中添加 20% 蔗糖、10% 熟猪油、2.5% 胆固醇、1% 胆酸盐。将上述 30 只 Wistar 大鼠随机分为对照组( $n=10$ )及模型组( $n=20$ )。实验期间每笼饲养 5 只大鼠,给予正常节律日光照射。所有大鼠经适应性喂养 3 d 后,对照组给予普通饲料喂养,模型组给予高脂高糖饲料喂养。经喂养 8 周后,模型组大鼠取血检测血糖(fasting plasma glucose, FPG)及血清胰岛素(fasting insulin, FINS)水平,并计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment-IR, HOMA-IR)。经证实 IR 模型制作成功后,将模型组大鼠随机分成 IR 组及运动组,每组各 10 只。从第 9 周开始,IR 组及运动组继续给予高脂高糖饲料喂养,运动组大鼠则参照 Ploug 等<sup>[6]</sup>介绍的训练方法进行为期 6 周的游泳训练,每周训练 5 d,前 2 周每天训练 40 min,以后每天训练 60 min,游泳池水深 50 cm,保持水温 35℃,每只大鼠活动面积约有 200 cm<sup>2</sup>。

### 二、主要仪器及试剂

主要实验仪器包括 Advantage II 型血糖仪(美国罗氏诊断公司提供)、CTX 型全自动生化分析仪(美国 Beckman 公司提供)、日本 Olympus-CH30 型显微镜及 HPIAS-1000 型全自动图像分析系统。主要实验试剂包括胰岛素放免试剂盒(原子高科股份有限公司提供)、大鼠 RBP4 ELISA 检测试剂盒(武汉中美科技有限公司提供)。

### 三、检测方法

1. 大鼠生化指标检测:于实验进行 14 周时测定各组大鼠体重(body weight, BW),禁食 12 h 后按每千克体重 300 mg 腹腔注射水合氯醛,待麻醉剂生效后心脏采血并处死大鼠。采用全自动生化仪检测血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)及低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平;采用罗氏血糖仪检测 FPG;采用放射免疫法检测 FINS。HOMA-IR 按照公式:HOMA-IR = (FPG × FINS)/22.5 进行计算。另外提取各组大鼠肠系膜、附睾、反折腹膜脂肪等组织并称重,计算内脏脂肪重量及其与体重的比值。

2. 大鼠 RBP4 水平检测:采用双抗体夹心酶标分析法检测各组大鼠 RBP4 水平,心脏采血经 1000 转/min 离心 20 min,分离血清。取标准品、待测样品各 100  $\mu$ l 加样于酶标板孔底部,并设置空白对照,混匀后在 37℃ 环境下反应 120 min;弃去液体、甩干,每孔加生物素化的抗大鼠 RBP4 抗体 100  $\mu$ l,于 37℃ 环境下反应 60 min,洗板 3 次;每孔加辣根过氧化物酶标记的亲合素 100  $\mu$ l,于 37℃ 环境下反应 60 min,洗板 5 次;每孔加 TMB 溶液 90  $\mu$ l,37℃ 避光显色,最后加 50  $\mu$ l 终止液终止反应。选用酶标仪检测各样本在 450 nm 波长下的光密度值,并采用标准曲线法计算各样品 RBP4 浓度。

3. 大鼠 PI3K 含量检测:采用免疫组织化学染色法(SP 法)检测 PI3K 含量,处死大鼠后取骨骼肌组织,经 4% 多聚甲醛固定、常规石蜡包埋后进行超薄切片(片厚 4  $\mu$ m);将标本置于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中,室温环境下孵育 10 min;再将标本置于 5%~10% 正常山羊血清中封闭 10 min;然后加入一抗,37℃ 孵育 1~2 h;滴加生物素标记的二抗,37℃ 孵育 10 min;再滴加辣根过氧化物酶标记的链卵白素,于 37℃ 环境下反应 10 min;DAB 显色 3 min,苏木素复染 1 min,然后梯度酒精脱水、中性树胶封片。采用高清晰彩色病理图像分析系统(HPIAS-1000)对各组大鼠标本进行检测,经标准灰度校正后,随机选取 5 个视野,测定 PI3K 平均积分光密度值。上述各组大鼠免疫组化检测过程均采用盲法

进行。

#### 四、统计学分析

本研究所得数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,选用 SPSS 13.0 版统计学软件包进行数据分析,各组间计量资料比较采用单因素方差分析,相关性检验选用 Pearson 分析, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 结 果

入选时各组大鼠 BW 组间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );饲养期间 IR 组及运动组摄食量差异也无统计学意义( $P > 0.05$ )。实验进行第 14 周时对各组大鼠 BW 进行比较,发现对照组、IR 组及运动组平均 BW 分别为( $476.28 \pm 12.41$ )g、( $530.72 \pm 33.45$ )g 和 ( $477.59 \pm 34.75$ )g,以 IR 组 BW 增加最显著,明显高于对照组及运动组(均  $P < 0.05$ )。IR 组大鼠内脏脂肪重量、内脏脂肪重量/体重比值、血清 FINS、LDL、HOMA-IR、RBP4 水平均显著高于对照组及运动组( $P < 0.01$ );血清 HDL 水平显著低于对照组及运动组( $P < 0.01$ )。运动组大鼠 FPG、TC、TG 水平均显著低于 IR 组( $P < 0.01$ ),具体数据详见表 1、表 2。

通过免疫组化染色发现,大鼠骨骼肌细胞浆中 PI3K 阳性染色呈棕黄色,对照组 PI3K 阳性染色均匀分布于骨骼肌细胞浆中,着色强,呈强阳性表达(图 1a);IR 组骨骼肌细胞浆中几乎未见 PI3K 阳性染色,仅有少许表达,较对照组明显减弱(图 1b);运动组骨骼肌细胞浆中可见 PI3K 阳性染色,较 IR 组明显增强(图 1c)。对各组大鼠免疫组化染色结果分析后发现,IR 组骨骼肌中 PI3K 表达水平明显低于对照组及运动组( $P < 0.01$ ),具体数据详见表 2。

对各组大鼠血清 RBP4 与其它各项指标的相关性进行分析,发现大鼠血清 RBP4 与 FINS、内脏脂肪重量/体重比值、LDL 及 HOMA-IR 有正相关性( $P < 0.01$ );与 HDL、骨骼肌 PI3K 水平有负相关性( $P < 0.01$ )。

表 1 实验进行 14 周时各组大鼠 BW、内脏脂肪重量/体重比值、TC、TG、HDL 及 LDL 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

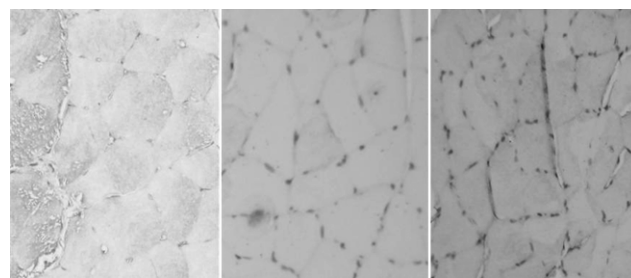
| 组 别  | 只数 | 体重<br>(g)               | 内脏脂肪重量/<br>体重     | TC<br>(mmol/L)    | TG<br>(mmol/L)    | HDL<br>(mmol/L)      | LDL<br>(mmol/L)   |
|------|----|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| 对照组  | 10 | $476.28 \pm 12.41$      | $0.41 \pm 0.07$   | $2.02 \pm 0.33$   | $0.95 \pm 0.29$   | $1.22 \pm 0.17$      | $0.56 \pm 0.11$   |
| IR 组 | 10 | $530.72 \pm 33.45^a$    | $0.64 \pm 0.07^a$ | $2.81 \pm 0.96^a$ | $1.45 \pm 0.53$   | $0.51 \pm 0.16^a$    | $1.26 \pm 0.49^a$ |
| 运动组  | 10 | $477.59 \pm 34.75^{ab}$ | $0.40 \pm 0.08^b$ | $1.82 \pm 0.31^b$ | $0.85 \pm 0.33^b$ | $1.07 \pm 0.17^{ab}$ | $0.56 \pm 0.15^b$ |

注:与对照组比较, $^a P < 0.05$ ;与 IR 组比较, $^b P < 0.05$

表 2 实验进行 14 周时各组大鼠 FPG、FINS、HOMA-IR、PI3K 及 RBP4 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组 别  | 只数 | FPG (mmol/L)         | FINS (mU/L)       | HOMA-IR           | PI3K              | RBP4 (ng/ml)          |
|------|----|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| 对照组  | 10 | $8.63 \pm 1.97$      | $5.22 \pm 1.49$   | $1.96 \pm 0.27$   | $0.25 \pm 0.06$   | $474.27 \pm 45.55$    |
| IR 组 | 10 | $0.44 \pm 3.32$      | $0.73 \pm 1.17^a$ | $4.91 \pm 0.37^a$ | $0.22 \pm 0.07^a$ | $652.24 \pm 126.18^a$ |
| 运动组  | 10 | $7.40 \pm 1.85^{ab}$ | $5.74 \pm 1.11^b$ | $1.95 \pm 0.26^b$ | $0.25 \pm 0.05^b$ | $514.18 \pm 90.28^b$  |

注:与对照组比较, $^a P < 0.05$ ;与 IR 组比较, $^b P < 0.05$



a 对照组 b IR 组 c 运动组

图 1 实验进行 14 周时各组大鼠骨骼肌中 PI3K 表达强度比较(DAB 染色,  $\times 400$ )

## 讨 论

目前有大量研究发现,运动量不足是 2 型糖尿病患者的独立危险因素,同时也是诱发 MS 的重要原因之一。运动疗法是糖尿病及 MS 患者最基本的治疗方法之一,适当的运动训练不仅可以控制体重,而且还能提高人体对胰岛素的敏感性,促进肌肉组织充分摄取、利用葡萄糖,降低血糖水平;同时运动训练还可促使 TG、TC 及血压水平下降,从而纠正机体各种异常代谢。机体有多种脂肪细胞因子(如瘦素、抵抗素、TNF- $\alpha$ 、脂联素等)与 IR 及 MS 关系密切,脂肪细胞因子与运动疗法间的关系也日益受到人们关注。本研究在上述背景下对 RBP4 与 IR 及 MS 各代谢因子间的关系以及运动对上述指标的影响进行了初步探讨。

以往多认为 RBP4 主要由肝脏系统分泌,是体内一种重要的转运蛋白,主要负责结合、转运全反式视黄醇。Yang 等<sup>[2]</sup>利用基因芯片技术发现 RBP4 是参与 IR 病理过程的重要脂肪细胞因子,它可通过下调细胞 GLUT4 水平导致血糖升高;另外 RBP4 还可以削弱肌肉组织中胰岛素信号传导通路,阻遏葡萄糖转运,并干扰胰岛素对肝脏中葡萄糖的生成抑制作用,最终导致 IR。

本研究结果表明,由高脂高糖饲料诱发的 IR 大鼠血清 RBP4 水平显著升高,相关性分析显示大鼠血清

RBP4 与 FINS、内脏脂肪重量/体重比值、HOMA-IR 等具有显著正相关性,提示 RBP4 与 IR 及肥胖(尤其是腹型肥胖)关系密切。关于腹型肥胖致 IR 的可能机制,目前多数研究认为腹型肥胖对象内脏脂肪有较活跃的内分泌功能,能释放大致 IR 及致炎性脂肪细胞因子,如瘦素、抵抗素、TNF- $\alpha$  等,而具有抗炎及改善 IR 功能的脂联素水平却显著降低<sup>[7]</sup>;并且内脏脂肪的脂解速率较皮下脂肪快,能释放出更多的游离脂肪酸,从而加快糖脂代谢紊乱及 IR 发生。

本研究通过相关性分析发现,实验大鼠血清 RBP4 与 LDL 具有正相关性( $r=0.337, P<0.05$ ),与 HDL 具有负相关性( $r=-0.550, P<0.01$ ),与 TC、TG 等无显著相关性( $r$  分别为 0.158 和 0.141, 均  $P>0.05$ ),上述结果与以往研究报道有所不同<sup>[8,9]</sup>,如吴海娅等<sup>[8]</sup>研究显示肥胖及 2 型糖尿病患者血清 RBP4 与 TG 具有显著相关性,而与 HDL、LDL 及 FINS 无显著相关性;Von 等<sup>[10]</sup>发现 2 型糖尿病患者 RBP4 与血浆 TC、LDL、TG 具有显著正相关性,冠心病患者 RBP4 与血浆 VLDL、TG 具有显著正相关性。造成上述各研究结果间差异的原因是否与研究对象不同(如啮齿类动物与人类)有关尚需进一步探讨。

PI3K 途径是机体胰岛素调节葡萄糖代谢的一个重要信号转导通路,胰岛素经血液循环到达相应靶组织后,与其上胰岛素受体(insulin receptor, InsR) A 亚单位结合,并同时激活 B 亚单位,导致 InsR 自磷酸化。磷酸化 InsR 一方面为其它信号分子提供结合位点,另一方面其磷酸激酶可导致胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substrate-1, IRS-1) 磷酸化。IRS-1 被磷酸化后即暴露出特异性结合位点,能激活 PI3K 使信号以激酶链式反应下传。在机体骨骼肌组织中,PI3K 被激活可导致 GLUT4 合成、分泌、转位等发生变化,使得由 GLUT4 介导的葡萄糖跨膜转运增强,促使骨骼肌组织对葡萄糖的利用增加,从而保证胰岛素的糖代谢调节作用得以实现。从以上内容可以看出,胰岛素信号转导途径中任意一个信号分子或环节发生障碍均可影响胰岛素生物学效应,诱发 IR 或糖尿病发生。

目前有大量研究发现 RBP4 具有致 IR 作用,但其确切机制尚未明确。本实验中 IR 大鼠血清 RBP4 明显升高,而骨骼肌中 PI3K 表达水平显著降低,且两者具有明显相关性,因此推测 RBP4 可能通过降低骨骼肌中 PI3K 表达,从而抑制胰岛素信号转导并导致 IR 发生。本研究针对 IR 大鼠给予运动训练,发现运动组大鼠血清 RBP4 水平明显低于 IR 组,PI3K 水平明显高于 IR 组,且 RBP4 及 PI3K 间具有显著负相关性,提示运动训练能下调 IR 大鼠血清 RBP4 水平,增强骨骼肌 PI3K 表达,改善受体后信号转导途径,减轻 IR 程度。

Haider 等<sup>[11]</sup>研究发现,病态肥胖患者体重减轻后,其血清 RBP4 含量明显下降;本研究中运动组大鼠 BW 及内脏脂肪重量/体重比值均明显低于 IR 组,因此推测体重减轻可能也是运动下调血清 RBP4 含量的重要机制之一。另外本研究结果还显示,运动组大鼠血清 FINS、FPG、TC、LDL、TG、HOMA-IR 水平均明显低于 IR 组,血清 HDL 水平明显高于 IR 组,提示运动训练不仅能改善 IR,对机体糖脂代谢也具有良性调节作用。

综上所述,本研究结果表明,运动训练能降低 IR 大鼠 RBP4 含量及增强骨骼肌 PI3K 表达,同时对机体糖脂代谢、体重等也具有良性调节作用,对控制糖尿病及 MS 病情发展具有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] Reaven GM. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Med*, 2005, 47: 201-210.
- [2] Yang Q, Graham TE, Mody N, et al. Serum retinol binding protein contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, 2005, 436: 356-362.
- [3] Kanaley JA, Fenicchia LM, Miller CS, et al. Resting leptin responses to acute and chronic resistance training in type 2 diabetic men and women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001, 25: 1474-1480.
- [4] Bouclou P, Sobngwi E, Manvais JF, et al. Absence of exercise-induced variations in adiponectin levels despite decreased abdominal adiposity and improved insulin sensitivity in type 2 diabetic men. *Eur J Endocrinol*, 2003, 149: 421-424.
- [5] Strackowski M, Kowalska I, Dzienis SS, et al. Changes in tumor necrosis factor-alpha system and insulin sensitivity during an exercise training program in obese women with normal and impaired glucose tolerance. *Eur J Endocrinol*, 2001, 145: 273-280.
- [6] Ploug T, Stallknecht BM, Pedersen D, et al. Effect of endurance training on glucose transport capacity and glucose transporter expression in rat skeletal. *Am J Physiol*, 1990, 259: 778-786.
- [7] 邹大进, 吴鸿. 腹型肥胖致胰岛素抵抗的机制及治疗展望. *中国糖尿病杂志*, 2006, 14: 309-312.
- [8] 吴海娅, 贾伟平, 魏丽, 等. 肥胖及 2 型糖尿病患者血清视黄醇结合蛋白 4 水平的变化及其临床意义. *中华内分泌代谢杂志*, 2006, 22: 290-293.
- [9] Gavi S, Stuart LM, Kelly P, et al. Retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance and body fat distribution in non-obese subjects without type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92: 1886-1890.
- [10] Von EM, Lepper PM, Liu D, et al. Retinol-binding protein 4 is associated with components of the metabolic syndrome, but not with insulin resistance in men with type 2 diabetes or coronary artery disease. *Diabetologia*, 2007, 50: 1930-1937.
- [11] Haider DG, Schindler K, Prager G, et al. Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92: 1168-1171.

(修回日期: 2009-06-19)

(本文编辑: 易 浩)