

· 基础研究 ·

运动对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌细胞腺苷酸活化蛋白激酶表达和活性的影响

吴毅 胡瑞萍 胡永善 吴军发 罗娟 孙莉敏

【摘要】目的 观察运动对正常大鼠和 2 型糖尿病大鼠骨骼肌中腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 的蛋白表达和活性的影响。**方法** 采用 OLETF 大鼠作为 2 型糖尿病组, LETO 大鼠作为正常对照组, 并分别随机分为 2 组, 即运动组和对照组, 每组 5 只。运动组进行急性游泳运动 3 h 后, 采用 Western blot 法对大鼠比目鱼肌和趾长伸肌中 AMPK 蛋白进行检测。**结果** OLETF 大鼠和 LETO 大鼠的比目鱼肌和趾长伸肌中 AMPK α 蛋白表达和磷酸化均无明显差异 ($P > 0.05$); OLETF 大鼠和 LETO 大鼠在急性运动 3 h 后, 趾长伸肌中 AMPK α Thr¹⁷² 磷酸化明显高于对照组 ($P < 0.05$), 比目鱼肌中 AMPK α 蛋白表达和 Thr¹⁷² 磷酸化则无明显变化 ($P > 0.05$)。**结论** AMPK α 的表达和激活在 2 型糖尿病大鼠比目鱼肌和趾长伸肌中无缺陷, AMPK 对运动的反应在不同肌纤维类型中存在差异, AMPK 可能参与了快肌 (趾长伸肌) 中运动所引发的信号传导机制。

【关键词】 运动; 腺苷酸活化蛋白激酶; 2 型糖尿病; 骨骼肌

The effect of exercise on protein expression and adenine mononucleotide activation protein kinase (AMPK) activity in skeletal muscle of type 2 diabetic rats WU Yi, HU Rui-ping, HU Yong-shan, WU Jun-fa, LUO Juan, SUN Li-min. Department of Rehabilitation Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

【Abstract】Objective To observe the effect of exercise on protein expression and activity of adenine mononucleotide activation protein kinase (AMPK) in skeletal muscle. **Methods** Ten Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats and 10 age-matched Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats were allocated into a type 2 diabetic group and a normal control group, respectively. Then they were each randomly allocated into two subgroups. One subgroup underwent a bout of 3-hour-termed swimming and the other one served as non-swimming controls. The protein expression and activation of AMPK in soleus and extensor digitorum longus of all the rats were measured by using Western blots after the intervention. **Results** There was no difference between OLETF and LETO rats with regard to the protein expression of AMPK α in soleus and extensor digitorum longus; There was no change in terms of AMPK α protein expression after acute exercise in either soleus or extensor digitorum longus of the two groups of rats. Yet phosphorylated AMPK α was increased in extensor digitorum longus in both OLETF and LETO rats after exercise. **Conclusion** The protein expression and activation of AMPK in soleus and extensor digitorum longus were not impaired in the type 2 diabetic rats. AMPK is probably involved in the signal transduction cascade induced by exercise in fast extensor digitorum longus and its response to exercise might be related to the type of muscle fiber.

【Key words】 Exercise; AMPK; Type 2 diabetes mellitus; Skeletal muscle

腺苷酸活化蛋白激酶 (5-AMP-activated protein kinase, AMPK) 是一种重要的代谢应激蛋白激酶, 主要作用为协调代谢和能量需要。它是由 α 、 β 、 γ 3 个亚基构成的异三聚体, 其中 α 亚基为催化亚基, 目前已知包括 2 种亚型 (α_1 和 α_2), 在骨骼肌细胞中均有表达。有研究提示, 运动可以激活 AMPK, 并且促进正常骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取^[1]。这表明, AMPK 可能作为关键的信号分子参与了运动促进骨骼肌细胞摄取葡萄糖的信号传导机制。因而本实验观察了

运动对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌细胞中 AMPK 蛋白表达和活性的影响, 旨在明确 AMPK 在 2 型糖尿病运动治疗中的作用。

材料和方法

一、实验材料

1. 实验动物: 同为 25 周龄的雄性 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 大鼠和雄性 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) 大鼠各 10 只, 由日本大冢制药株式会社德岛研究所赠送。OLETF 大鼠是一种自发发病的 2 型糖尿病动物模型。该鼠糖尿病的

发病与其染色体中的多个基因突变有关,其中最主要的原因在于其中枢和外周组织的胆囊收缩素 A 型受体基因发生突变,使得胆囊收缩素无法与此型受体相结合,从而导致饱食感的缺失而大量摄食,因而表现出体重急剧增加、高胰岛素血症、高甘油三酯血症和高血糖症等特点。该鼠早期以胰岛素抵抗、糖脂代谢紊乱为主,以后逐渐出现胰腺功能减退,晚期合并糖尿病肾脏病变,与人类 2 型糖尿病的病程十分相似(OLETF 组)。LETO 大鼠与 OLETF 大鼠同系但不同株,不发生糖尿病,作为正常对照组(LETO 组)。所有大鼠自日本引进时均为 4 周龄,经过 1 个月的检验检疫后,在复旦大学实验动物科学部清洁级动物实验室以普通饲料喂养,室温(23 ± 2)℃,湿度(55 ± 15)%,光照每天 8 h。

2. 实验试剂:兔抗大鼠 AMPK α 单克隆抗体(2532)、兔抗大鼠 AMPK α Thr¹⁷² 磷酸化单克隆抗体(2535)来自 Cell Signaling 公司;小鼠抗大鼠 α -tubulin 单克隆抗体(sc-5286)来自 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(KC-MM-035)、山羊抗兔 IgG(KC-RB-035)来自上海康成生物工程公司。

二、实验方法

1. 实验动物分组:两组大鼠饲养至 25 周龄时,经口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)确认 2 型糖尿病大鼠是否发病后,再将两组各随机分成 OLETF 运动组、OLETF 对照组和 LETO 运动组、LETO 对照组,每组 5 只大鼠。OLETF 运动组和 LETO 运动组进行单次急性运动干预,即按 Ploug^[2]方法游泳训练 3 h,游泳池水深 50 cm,水温保持(30 ± 2)℃,每只大鼠保证有 200 cm² 的活动面积以利于持续活动。干预前 1 d 将所有运动组大鼠均浸于游泳池中 20 min,水深 20 cm,使之适应水中环境但不进行游泳运动。OLETF 对照组和 LETO 对照组不作运动训练。

2. 标本采集与处理:运动组大鼠在运动干预后 10~40 min 内,行腹腔注射戊巴比妥钠(60 mg/kg 体重)麻醉,心内采血以备胰岛素测定,然后立即剥离并钳取右侧后肢比目鱼肌和趾长伸肌,冰预冷生理盐水冲洗后用滤纸吸干,称取湿重后立即置于液氮内,再转入 -70℃ 低温冰箱保存。OLETF 运动组和 LETO 运动组标本采集完毕后以同样的方法采集其自身对照组大

鼠标本。

3. Western blot 法测定蛋白含量:冰上称取骨骼肌 40 mg,剪碎后置于组织匀浆缓冲液 400 μ l 中,采用组织扩散仪 17 000 rpm,30 s 制备组织匀浆。所得匀浆 4℃、9 000 g 离心 20 min,取上清以备上样。改良 Lowery 法蛋白定量后,取含等量总蛋白(80 μ g)的样品,100℃ 变性 10 min 后,进行 10% 不连续 SDS-PAGE 电泳。电泳过程中浓缩胶电压 8 V/cm(50 V),当到达分离胶界面后提高至 15 V/cm(100 V)。电泳毕,在 Bio-Rad Mini 湿式转移电泳槽中以恒流 325 mA 转膜 2 h。转膜结束后,将 PVDF 膜在 0.1% TBST 中室温封闭 3 h,加一抗(兔抗大鼠 AMPK α Thr¹⁷² 磷酸化单克隆抗体 1:500),4℃ 孵育过夜。TBST 漂洗 3 次后,加辣根过氧化物酶标记的二抗(1:500),4℃ 孵育过夜,TBST 漂洗 3 次,ECL 显影,暗室压片。显影完成后将 PVDF 膜置于含 2% SDS,100 mmol/L β -巯基乙醇,62.5 mmol/L Tris 缓冲液(pH 6.8)的洗膜液中,于 70℃ 水浴振荡 1 h,洗去结合的抗体。然后以兔抗大鼠 AMPK α 单克隆抗体(1:500)为一抗,步骤同上作 Western 杂交。两次 Western 杂交显影的 X 光片经扫描后以磷酸化 AMPK 条带灰度/总 AMPK 条带灰度计算 AMPK 磷酸化程度。然后,再次洗膜,以小鼠抗大鼠 α -tubulin 单克隆抗体(1:5000)为一抗,步骤同上作 Western 杂交,作为参照。采用 TotalLab V2.01 图像分析软件对显影后的条带灰度进行分析。

三、统计学分析

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用双侧 t 检验进行统计分析。

结 果

一、OLETF 组与 LETO 组大鼠口服葡萄糖耐量试验结果

在大鼠 25 周龄时,对 OLETF 组与 LETO 组大鼠进行口服葡萄糖耐量试验,发现 LETO 组大鼠各时点的血糖值均在正常范围内,而 OLETF 组大鼠则均达到糖尿病诊断标准,即餐后血糖峰值达 16.7 mmol/L,餐后 2 h 血糖达 11.1 mmol/L,且 t 经检验表明,OLETF 组大鼠和 LETO 组大鼠的餐后峰值血糖及餐后 2 h 血糖值之间差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 OLETF 组和 LETO 组大鼠血糖、血胰岛素和血甘油三酯的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	峰值血糖 (mmol/L)	餐后 2 h 血糖 (mmol/L)	TG (mmol/L)	FBG (mmol/L)	FIN (μ IU/mL)	HOMA-IR	ISI
OLETF 组	10	18.8 $\pm$ 1.69 ^a	12.3 $\pm$ 1.31 ^a	1.41 $\pm$ 0.30 ^a	8.75 $\pm$ 2.91 ^a	4.19 $\pm$ 6.71	1.29 $\pm$ 1.53 ^a	-3.06 $\pm$ 0.71 ^a
LETO 组	10	6.9 $\pm$ 0.93	5.7 $\pm$ 0.34	0.31 $\pm$ 0.12	3.48 $\pm$ 0.33	2.34 $\pm$ 1.16	0.36 $\pm$ 0.19	-1.95 $\pm$ 0.62

注:与 LETO 组比较,^a $P < 0.05$

二、OLETF 组与 LETO 组大鼠空腹血糖、血胰岛素和血甘油三酯的比较

与 LETO 组大鼠比较, OLETF 组大鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、空腹血胰岛素 (fasting insulin, FIN) 和空腹血甘油三酯 (triglyceride, TG) 均呈增高趋势, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外, 根据稳态模型评估法所建立的公式^[3], 本研究进行了胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR, 即 $FBG \times FIN / 22.5$) 和胰岛素敏感指数 [ISI, 即 $\ln(1/FBG / FIN)$] 的计算, 发现 OLETF 组与 LETO 组之间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见表 1。

三、OLETF 组与 LETO 组大鼠骨骼肌中 AMPK α 蛋白表达和磷酸化的比较

分别取 OLETF 对照组和 LETO 对照组大鼠的比目鱼肌和趾长伸肌, 对其 AMPK α 和 Thr¹⁷² 磷酸化 AMPK α 的蛋白表达进行比较, 发现两组大鼠比目鱼肌和趾长伸肌中 AMPK α 蛋白表达和 Thr¹⁷² 磷酸化间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 详见图 1。

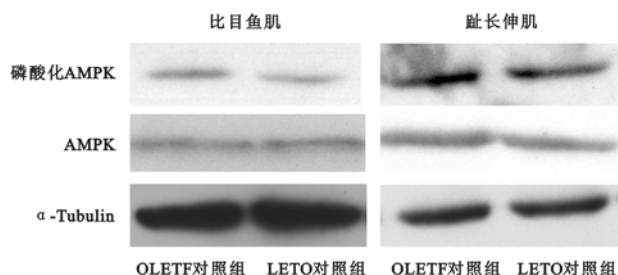


图 1 2 组大鼠比目鱼肌和趾长伸肌中 AMPK α 蛋白表达和磷酸化的比较

四、急性运动对大鼠骨骼肌中 AMPK α 蛋白表达和磷酸化的影响

OLETF 运动组和 LETO 运动组大鼠在急性运动 3 h 后趾长伸肌中 AMPK α 蛋白表达无变化, 但 Thr¹⁷² 磷酸化的 AMPK α 均明显高于对照组, 分别比对照组提高 72.4% 和 65.1%, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见图 2; 比目鱼肌中 AMPK α 蛋白表达和 Thr¹⁷² 磷酸化则无明显规律, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 详见图 3。

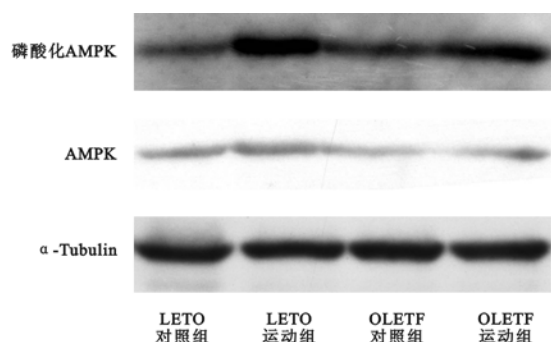


图 2 4 组大鼠急性运动后趾长伸肌中 AMPK α 蛋白表达和磷酸化的变化

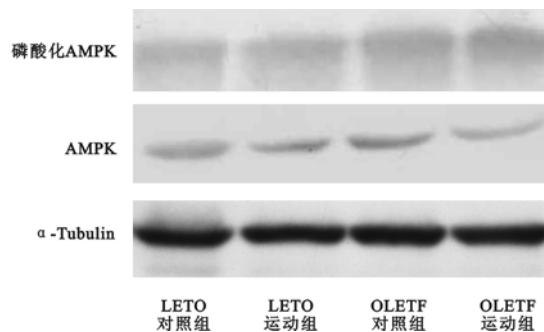


图 3 4 组大鼠急性运动后比目鱼肌中 AMPK α 蛋白表达和磷酸化的变化

讨 论

AMPK 是一种重要的代谢应激蛋白激酶, 最近许多研究提示, AMPK 可能在骨骼肌的糖脂代谢中发挥重要作用^[4], 故 AMPK 在 2 型糖尿病的运动治疗中的地位受到高度重视, 相关研究也日趋深入^[5,6]。研究提示, AMPK 的激活既可模拟运动的急性效应即促进骨骼肌对葡萄糖的摄取, 又可模拟运动的长期效应即促进 GLUT4 的表达等, 因而 AMPK 很可能在运动促进骨骼肌摄取葡萄糖的过程中发挥了重要作用。进一步的研究证明, 在正常骨骼肌中, 运动的确可以引起 AMPK 活性增高。在大鼠, 离体肌的体外收缩, 坐骨神经刺激引起的肌肉原位收缩和跑台运动均显著提高了骨骼肌中 AMPK 的活性^[7], 并伴有对葡萄糖摄取的增加。在人骨骼肌中, 脚踏车运动使得 AMPK $\alpha 2$ 活性增高^[1]。

上述研究表明, 在正常骨骼肌中运动可促进 AMPK 的激活, 并且这与运动刺激的葡萄糖转运增加相关。那么在 2 型糖尿病骨骼肌中, AMPK 的表达和激活是否存在缺陷, 运动能否通过促进 AMPK 的激活来促进 2 型糖尿病骨骼肌对葡萄糖的摄取呢? 这方面的研究尚较少。本实验中发现, 2 型糖尿病 OLETF 大鼠的比目鱼肌和趾长伸肌中的 AMPK α 的表达和 Thr¹⁷² 磷酸化均未较正常 LETO 大鼠减少, 表明 2 型糖尿病大鼠骨骼肌中 AMPK α 的表达和磷酸化激活未受损。这与在 ob/ob 小鼠中的研究一致: 在 ob/ob 小鼠的骨骼肌中, 激活 AMPK 通路可以诱发正常的葡萄糖转运反应^[8]。

同时, 本研究还发现, 经过 3 h 急性游泳运动后, OLETF 大鼠和 LETO 大鼠趾长伸肌中的 AMPK Thr¹⁷² 磷酸化增加, 但比目鱼肌中 AMPK Thr¹⁷² 磷酸化无改变。这种差异可能是由于在不同类型的肌纤维中 AMPK 对运动的反应是不同的。目前认为, 在组织化学染色和酶学分析的基础上, 骨骼肌纤维可以分为 3 种不同类型: I 型 (慢肌、耗氧), II a 型 (快肌、耗氧、糖分解), II b 型 (快肌、糖分解)。本研究中所选取的

比目鱼肌以 I 型肌纤维为主,属于慢肌;趾长伸肌则以 II 型肌纤维为主,属于快肌。有研究显示^[9],在慢收缩肌纤维中,糖原水平过高虽然可以抑制肌纤维收缩所诱导的 AMPK 活化,但不影响葡萄糖转运,因而认为 AMPK 活化在慢收缩肌纤维葡萄糖转运激活中并不是一个必需的步骤。本实验也发现在 3 h 急性运动后,2 型糖尿病比目鱼肌中 AMPK 磷酸化程度无改变。这一方面可能是由于 AMPK 在运动所致慢肌葡萄糖转运增加中并非必需,另一方面也可能是由于本实验所设计的运动强度和运动时间不足以充分激活慢肌中的 AMPK,这需要进一步的研究来证实。

而对于趾长伸肌而言,大鼠在 3 h 急性运动后,正常大鼠和 2 型糖尿病大鼠中 AMPK 均明显激活,且二者激活幅度无差异。这表明,2 型糖尿病大鼠的趾长伸肌保有了正常的被运动激活的 AMPK 通路。因而,对 AMPK 相关激活剂及其上下游因子的研究可以为防治 2 型糖尿病提供新靶点。另外,引人注意的是,在过度表达了 AMPK 抑制型突变体的转基因小鼠中,5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸刺激的葡萄糖摄取完全被抑制,但肌肉收缩刺激的葡萄糖转运量仅比对照组下降 30%^[10]。这表明在运动刺激的葡萄糖转运中,AMPK 通路仅传递了部分信号,该过程中还存在其他不依赖 AMPK 的通路。这将有待于进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Steinberg GR, Watt MJ, McGee SL, et al. Reduced glycogen availability is associated with increased AMPK alpha 2 activity, nuclear AMPK alpha 2 protein abundance, and GLUT4 mRNA expression in contracting human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2006,

31:302-312.

- [2] Ploug T, Stallknecht BM, Pedersen O, et al. Effect of endurance training on glucose transport capacity and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, 1990, 259:778-786.
- [3] Matthews DR, Hosker J P, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta2 cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 1985, 28:412-419.
- [4] 符庆瑛,高钰琪. 蛋白激酶 AMPK 的研究进展. *生命科学*, 2005, 17:147-152.
- [5] Jorgensen SB, Richter EA, Wojtaszewski JF. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J Physiol*, 2006, 574:17-31.
- [6] 袁涛,周京徽,王姮,等. 二甲双胍和饮食因素对糖尿病小鼠骨骼肌 AMPK 活性的影响. *中华内分泌代谢杂志*, 2006, 22:283-284.
- [7] Wright DC, Geiger PC, Holloszy JO, et al. Contraction-and hypoxia-stimulated glucose transport is mediated by a Ca^{2+} -dependent mechanism in slow-twitch rat soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288:1062-6.
- [8] Cool B, Zinker B, Chiou W, et al. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab*, 2006, 3:403-16.
- [9] Fujii N, Hirshman MF, Kane EM, et al. AMP-activated protein kinase alpha2 activity is not essential for contraction-and hyperosmolarity-induced glucose transport in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 2005, 280:39033-41.
- [10] Mu J, Brozinick J T Jr, Valladares O, et al. A role for AMP-activated protein kinase in contraction-and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell*, 2001, 7:1085-1094.

(修回日期:2007-01-11)

(本文编辑:阮仕衡)

· 消息 ·

药刀靶向治疗新技术推广与针刀、注射粘连点定位及疗效提高学习班招生通知

为了促进疼痛治疗靶向化、微创化,进一步提高临床疗效,由药刀疗法发明人、《中国药刀学》一书作者陕俊平教授亲自举办的第 45 届药刀靶向治疗临床经验推广学习班现对外招生。该学习班采取理论结合临床实践,现场进行病例操作,白天上课,晚上学员亲自实践。授课内容:①病变粘连点、痛点检查及准确定位,一次性针、刀、药(磁、药栓)、电、气靶向微创同施,以加快疼痛疾病根治;②痛点探查定位系统在疼痛诊疗中的应用;③药刀靶向微创松解术及调衡术;④药刀靶向特效注射、药液配制及常用注射术;⑤磁疗药栓具体制作方法及靶向应用;⑥如何开展针刀、注射、磁疗药栓植入三序列治疗及进一步提高疗效,预防针刀治疗后的创伤再粘连和注射治疗的复发;⑦走出针刀、注射治疗十大误区。重点讲解颈腰椎病、腰椎间盘突出症、骨质增生症、肩周炎、腱鞘炎、跟骨痛、股骨头坏死、骨性关节炎、神经卡压综合征、软组织疼痛、脊柱相关性疾病、内科疾病等多种疾病的治疗。学员通过学习后可掌握针刀、注射、磁疗药栓植入三序列靶向治疗方法,为康复科增添治疗疑难病症的新途径。

本学习班学费、书本及药刀刀具大全 1 套共计 1 680 元;授课时间为 2007 年 3 月 24 日~4 月 2 日,5 月 12 日~21 日,6 月 16 日~25 日,由陕俊平教授亲自对学员进行一对一辅导以确保教学质量,限招 40 人;报名方式:100029 北京中医药大学药学院 425 房间,岳老师;联系电话:010-84064077、84064076、64202604;药刀疗法发明人联系电话:(0)13892316858,联系时间限于每天 15:00~22:00,仅限疑难问题解答,详情请登陆中国药刀网(www.zgyaodao.com)。