

· 基础研究 ·

运动对胰岛素抵抗大鼠脂肪组织中糖原合成酶激酶 3 β 表达的影响

张丽锋 毕会民 王行富 王蜀鄂

【摘要】目的 探讨运动对高脂饮食诱导的胰岛素抵抗大鼠脂肪组织中糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β) 表达的影响。方法 将 30 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠随机分为 2 组, 其中正常对照组 10 只, 给予常规饲料喂养, 模型组 20 只, 给予高脂饲料喂养。模型组大鼠经喂养 4 周后制成胰岛素抵抗模型, 将其随机分为 2 个亚组 (即胰岛素抵抗组和运动干预组), 2 个亚组继续给予高脂饲料喂养, 同时运动干预组大鼠每周进行 5 d 游泳运动, 持续 6 周。采用 Western-blot 方法检测各组大鼠附睾脂肪组织中 GSK-3 β 的表达; 定期检测大鼠体重 (BW)、空腹血糖 (FPG)、血浆胰岛素 (FINS)、血甘油三酯 (TG) 及胆固醇 (TC) 水平, 并计算胰岛素敏感指数 (ISI)。结果 各组大鼠经高脂饲料喂养 4 周后, 与正常对照组比较, 模型组大鼠 BW、FPG、FINS、TC、TG 均显著升高 ($P < 0.05$ 或 0.01), ISI 则明显降低 ($P < 0.01$), 提示胰岛素抵抗模型诱导成功。经 6 周运动干预后, 与胰岛素抵抗组比较, 运动干预组大鼠脂肪组织 GSK-3 β 表达显著下降 ($P < 0.05$), 与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 运动可下调胰岛素抵抗大鼠脂肪组织 GSK-3 β 的表达, 促进葡萄糖的摄取及糖原合成, 具有改善胰岛素抵抗功能。

【关键词】糖原合成酶激酶 3 β ; 运动; 胰岛素抵抗; 脂肪组织

Exercise training and the expression of glycogen synthase kinase 3 β in the adipose tissues of insulin resistant rats ZHANG Li-feng*, BI Hui-min, WANG Xing-fu, WANG Shu-e. * Department of Endocrinology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of exercise training (ET) on the expression of glucogen synthase kinase 3 β (GSK 3 β) in the adipose tissues of insulin resistant (IR) rats on a high fat diet (HFD). Methods Thirty male Wistar rats were randomly divided into a control group ($n = 10$) and a model group (M group, $n = 20$). Insulin resistance was established by feeding a HFD to the M group for 4 w, while rats in the control group were fed a normal diet. The IR rats were then randomly divided into two subgroups: an IR group and an ET group. All rats in the IR and ET groups were fed a HFD, but ET was administrated to the ET group for 6w. The expression of GSK 3 β protein in the rats' epididymis adipose tissue was detected using Western blotting, and body weight (BW), the concentrations of serum triglyceride and cholesterol (TG and TC), fasting plasma glucose (FPG) and serum insulin (FINS), as well as insulin sensitivity index (ISI) were regularly detected. Results Compared with the control group, BW and the concentrations of serum TG and TC, FPG and FINS in the model group were significantly increased ($P < 0.05$), while ISI was decreased ($P < 0.01$). Compared with the control group, there was no difference in GSK 3 β protein expression in the ET group, but the expression of GSK 3 β protein in the ET group was obviously decreased in comparison with that in the IR group ($P < 0.05$). Conclusion ET can ameliorate IR by decreasing GSK 3 β protein expression in adipose tissues and enhancing the ingestion of glucose and the synthesis of glycogen.

【Key words】Glucogen Synthase Kinase 3 β ; Exercise training; Insulin resistance; Adipose tissue

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是指胰岛素在促进葡萄糖摄取和利用过程中受损, 即一定量的胰岛素所产生的生物学效应低于正常预计水平, 表现为靶细胞对胰岛素的敏感性和 (或) 反应性低下, 是胰岛素抵抗综合征中众多疾病的共同病理生理基础。近年来医学界对胰岛素与其受体的相互作用及其受体后信号转导进行了广泛研究, 对胰岛素抵抗的分子机制有了

更进一步的了解。胰岛素信号转导系统中任何环节 (受体前、受体、受体后水平) 的异常均可导致胰岛素作用减弱, 目前受体后水平异常倍受关注。糖原合成酶激酶 3 (glucogen synthase kinase-3, GSK-3) 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 其同种异构体分别为 GSK-3 α (51 kD) 和 GSK-3 β (46 kD), 被认为是胰岛素受体后机制中的重要负性因素, 参与 IR 的发生^[1,2]。众所周知, 运动能缓解胰岛素抵抗, 是治疗糖尿病的基本原则之一; 对于 2 型糖尿病患者而言, 运动及饮食是其一切治疗的基础及保障。运动疗法主要是提高机体对胰岛

作者单位: 430060 武汉, 武汉大学人民医院内分泌科 (张丽锋、毕会民、王蜀鄂); 福建医科大学附属第一医院病理科 (王行富)

素的敏感性,改善糖及脂肪代谢,增强机体维持血糖稳定的激素调节功能。本研究采用高脂饮食诱导大鼠制成胰岛素抵抗模型后给予运动干预,观察运动对胰岛素抵抗大鼠脂肪组织中 GSK-3 β 含量的影响,进一步探讨运动改善胰岛素抵抗的可能机制。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物与实验方法

共选取 SPF 级雄性 6 周龄 Wistar 大鼠[购于湖北省预防医学科学院省实验动物中心,合格证号:SCXK(鄂)2003-0005]30 只,体重 165 ~ 180 g,将其随机分为正常对照组(10 只)及模型组(20 只),均适应性喂养 1 周后,模型组给予高脂饲料喂养,高脂饲料配方为:脂肪热比为 59% (其中猪油占 39%),蛋白质热比为 21%,碳水化合物热比为 20% (其中玉米淀粉占 30%),此外附加必需的维生素及矿物质,每只大鼠每天供给的总热量约为 310 kJ^[3];正常对照组大鼠则继续给予常规饲料(由武汉大学医学院实验动物中心提供)喂养,其摄取能量与模型组基本相同。所有大鼠均饲养于标准环境下,期间自由摄食,每天 12 h 光照周期(于上午 6:00 开始光照)。模型组大鼠经喂养 4 周后,根据其空腹血糖、胰岛素、血脂及胰岛素敏感指数等指标判断模型是否诱导成功。

将造模成功的胰岛素抵抗大鼠随机分为 2 个亚组即胰岛素抵抗组及运动干预组。正常对照组继续用常规饲料喂养 6 周;胰岛素抵抗组则继续采用高脂饲料喂养,而运动干预组除给予高脂饲料外,还同时进行为期 6 周的游泳运动,游泳运动参照 Ploug 报道的方法^[4]:水温保持 35℃ 左右,水深 50 cm,每只大鼠有 200 cm² 的活动空间以保证其持续活动,每周游泳 5 d,前 2 周每天游泳 40 min,以后每天游泳 60 min,连续运动 6 周。

二、检测试剂与仪器

胰岛素放免分析试剂盒由中国原子能科学研究院同位素研究所提供;苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、亮抑肽(leupeptin)、抑蛋白酶肽(aprotinin)均购于美国 Sigma 公司;GSK-3 β 多克隆抗体购于 Santa Cruz Biotechnology 公司;辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠二抗购于武汉凌飞生物技术有限公司;ECL 试剂盒为 Pierce 公司产品;优越血糖仪 Advantage II 由美国罗氏诊断公司出品;本研究使用的仪器还包括美国 Beckman CXT 型全自动生化分析仪、电泳仪(Bio-Rad 公司 Mini-PROTEAN 3 cell 525BR 型)及电转仪(Bio-Rad 公司 Mini Trans-Blot cell 153BR 型);标本检测及分析采用 Bio-Profit 凝胶成像系统及 Bio-1D 图像分析软件(法国 VL 公司产品)。

三、检测指标测定

各组大鼠分别于实验第 1 周、第 5 周及第 11 周检测体重(body weight, BW)、血甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)、血浆胰岛素(fasting plasma insulin, FINS)等指标。于运动干预组大鼠最后 1 次游泳运动结束 48 h(且禁食 12 h)后,将各实验组动物均麻醉处死,测定附睾脂肪重量(epididymis weight, EPW)并计算胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI), $ISI = \ln[1/(FPG \times FINS)]$ 。

将各实验组动物处死后迅速分离其附睾脂肪垫,用预冷 PBS 液(4℃)洗后称重,每 1 g 组织中加入 10 ml 裂解液[成分为 10 mmol/L Tris-HCl(pH 值为 7.5)、1 mmol/L EDTA、10 mmol/L NaF、1 mmol/L DTT、0.5 mmol/L sodium orthovanadate、0.2 mmol/L PMSF、10 μ g/ml aprotinin、20 μ g/ml leupeptin、0.5% Triton X-100, pH 7.5],采用机械匀浆,将匀浆液离心(1 000 $\times$ g) 20 min,所得上清液以玻璃滤纸过滤,去除残余组织,将滤过液再次离心(10 000 $\times$ g) 20 min,取上清液分装贮于 -80℃ 环境中待检。上述操作均在 4℃ 环境下进行。

采用考马斯亮兰蛋白测定试剂盒检测各组样本中蛋白含量水平,调整各样本蛋白浓度一致,以 SDS-PAGE(12%)电泳分离后转印到硝酸纤维素膜上,洗膜后用封闭液(含 3% 脱脂奶粉、0.05% Tween-20 的 PBS)室温封闭 1 h,与 GSK-3 β 多克隆抗体于 4℃ 环境下孵育 12 h,经漂洗后再加入结合有辣根过氧化物酶的二抗于室温环境下孵育 1.5 h,充分漂洗后与 ECL 试剂反应 5 min,立即用 Kodak 底片曝光洗片。底片经凝胶成像系统扫描并分析其灰度值。

四、统计学分析

本研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 版统计软件进行分析,2 组间均数比较采用 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析(S-N-K 检验), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠检测指标结果比较

本研究各组大鼠经适应性喂养 1 周后,发现其 BW、FPG、FINS、TG、TC 及 ISI 间差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。经高脂饲料喂养 4 周后,与正常对照组比较,模型组大鼠 BW、FINS、TG、TC 水平明显升高($P < 0.01$),FPG 也升高显著($P < 0.05$),而 ISI 则明显下降($P < 0.01$),差异均有统计学意义(具体数据详见表 1)。模型组大鼠上述检测指标的改变均符合胰岛素抵抗的病理生理特征,而且模型组 20 只大鼠均表现出高胰岛素血症及 ISI 下降,提示模型组

胰岛素抵抗大鼠模型制备成功。

胰岛素抵抗组及运动干预组继续以高脂饲料喂养,同时给予运动干预组大鼠游泳运动,6 周后与正常对照组比较,胰岛素抵抗组 BW、EPW、FPG、FINS、TG、TC 均明显升高($P < 0.01$),ISI 则明显降低($P < 0.01$),差异均有统计学意义;运动干预组与正常对照组比较,前者 EPW、FINS、TG、TC 明显升高($P < 0.01$),ISI 明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$),但 BW、FPG 组间差异无统计学意义($P > 0.05$);与胰岛素抵抗组比较,运动干预组 BW、EPW、FPG、TG、TC 及 FINS 均明显降低($P < 0.01$),而 ISI 则显著升高($P < 0.05$),差异均有统计学意义。具体数据详见表 2。

二、各组大鼠脂肪组织 GSK-3 β 表达水平比较

各组大鼠标本经图像检测系统分析后发现,胰岛素抵抗组大鼠脂肪组织经 GSK-3 β 蛋白条带扫描后平均灰度值($25\ 412.80 \pm 8\ 301.30$)高于正常对照组($10\ 334.40 \pm 3\ 242.90$),差异有统计学意义($P < 0.05$);运动干预组平均灰度值($13\ 121.00 \pm 4\ 592.30$)低于胰岛素抵抗组,差异亦有统计学意义($P < 0.05$),前者与正常对照组比较,差异无统计学意义(图 1、2),提示胰岛素抵抗大鼠脂肪组织 GSK-3 β 含量较正常对照组明显增高,经运动干预后,其脂肪组

织 GSK-3 β 含量显著降低。

讨 论

目前对于胰岛素抵抗(胰岛素抵抗综合征的基础)的确切分子机制尚未完全阐明,但相关研究发现胰岛素受体后信号蛋白异常可能是其中一个重要原因。胰岛素主要调节机体糖代谢功能,首先与胰岛素受体结合并激活受体激酶,此激酶将细胞内目标底物(尤其是胰岛素受体底物 1)酪氨酸磷酸化,在大量胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS)结合蛋白作用下,下游信号蛋白磷酸酯醇 3 激酶再通过葡萄糖转运蛋白-4(glucose transporter 4, GLUT4)及糖原合成酶(glycogen synthase, GS)而刺激葡萄糖转运及糖原合成。GSK-3 则对上述反应过程起负性调节作用。

GSK-3 对葡萄糖代谢(由胰岛素介导)的负性调节作用主要通过以下两条途径——磷酸化 GS 和 IRS-1 实现^[1,2]。糖原合成是胰岛素刺激葡萄糖代谢的重要途径,而 GS 是糖原合成的重要限速酶之一。GSK-3 能磷酸化 GS,主要发生在位点 3a、3b、3c、4、5(分别是 ser640、644、648、652、656),其中以位点 3a(ser640)尤为关键^[5]。GS 被磷酸化后,其活性降低,糖原合成减少,相关临床研究也证实了在 2 型糖尿病患者中,GS

表 1 模型组大鼠经高脂饮食 4 周后与正常对照组比较($\bar{x} \pm s$)

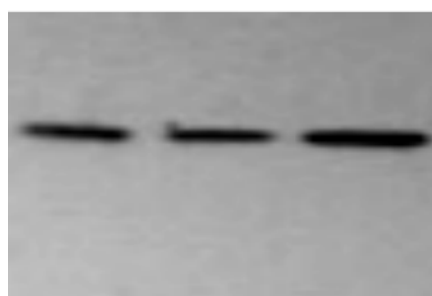
组 别	只数	BW(g)	FPG(mmol/L)	FINS(mU/L)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	ISI
正常对照组	10	268.0 $\pm$ 7.1	3.57 $\pm$ 0.28	11.40 $\pm$ 2.32	0.60 $\pm$ 0.21	1.50 $\pm$ 0.26	-3.68 $\pm$ 0.24
模型组	20	275.9 $\pm$ 8.0 ^{**}	3.84 $\pm$ 0.32 [*]	32.22 $\pm$ 2.72 ^{**}	1.29 $\pm$ 0.40 ^{**}	3.07 $\pm$ 0.49 ^{**}	-4.75 $\pm$ 0.30 ^{**}

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

表 2 经游泳运动 6 周后各组大鼠检测指标比较($\bar{x} \pm s$)

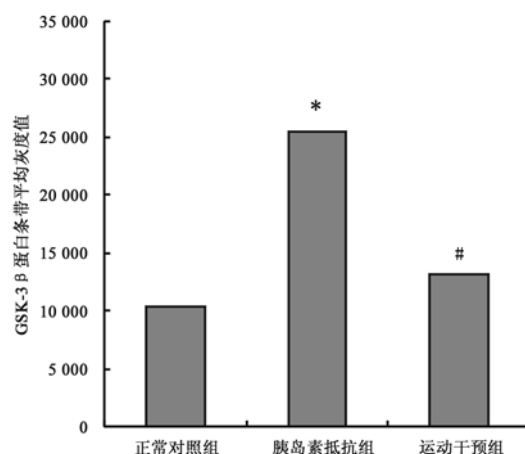
组 别	只数	BW(g)	EPW(g)	FPG(mmol/L)	FINS(mU/L)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	ISI
正常对照组	10	387.6 $\pm$ 5.1	5.04 $\pm$ 0.23	3.73 $\pm$ 0.30	11.75 $\pm$ 1.63	0.61 $\pm$ 0.21	1.51 $\pm$ 0.26	-3.77 $\pm$ 0.17
胰岛素抵抗组	10	404.4 $\pm$ 5.2 [*]	6.70 $\pm$ 0.39 [*]	4.34 $\pm$ 0.26 [*]	32.67 $\pm$ 3.60 [*]	1.95 $\pm$ 0.37 [*]	3.88 $\pm$ 0.47 [*]	-4.95 $\pm$ 0.13 [*]
运动干预组	10	392.2 $\pm$ 6.6 [△]	6.09 $\pm$ 0.45 ^{*△}	3.88 $\pm$ 0.32 [△]	30.20 $\pm$ 2.12 ^{*#}	1.20 $\pm$ 0.42 ^{*△}	3.00 $\pm$ 0.49 ^{*△}	-4.76 $\pm$ 0.14 ^{*#}

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与胰岛素抵抗组比较,[#] $P < 0.05$,[△] $P < 0.01$



运动干预组 正常对照组 胰岛素抵抗组

图 1 GSK-3 β 蛋白的表达(Western-blot)



注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与胰岛素抵抗组比较,[#] $P < 0.05$

图 2 各组大鼠 GSK-3 β 蛋白相对表达含量比较

活性明显降低,糖原合成功能受损^[6,7];另外 GSK-3 通过磷酸化 IRS-1 的 Ser332 位点也能减弱胰岛素信号的传导^[8]。IRS-1 是胰岛素信号下传的关键蛋白之一,当 IRS-1 的酪氨酸残基被磷酸化时即被激活,其丝氨酸残基被磷酸化时则使 IRS-1 活性降低,进而抑制其下游信号蛋白 GLUT4 介导的葡萄糖摄取及 GS 介导的糖原合成,降低葡萄糖的利用率,导致胰岛素抵抗。相关研究表明,在 GSK-3 的 2 个异构体中,以 GSK-3 β 较 GSK-3 α 在胰岛素抵抗中的负性作用更为重要,而 GSK-3 α 则在 Alzheimer's 病、精神分裂症等疾病的发病机制中具有重要作用。高度表达 GSK-3 β 的转基因小鼠其血浆胰岛素、血胆固醇、非饱和脂肪酸、甘油三酯水平均明显增高,糖原合成功能、IRS-1 活性均显著下降,并导致机体糖耐量降低^[9]。本研究中胰岛素抵抗组 GSK-3 β 的表达显著高于正常对照组,经过运动干预后,其 ISI 增高,胰岛素抵抗状态改善,GSK-3 β 的表达亦有显著下降,进一步证实了 GSK-3 β 在胰岛素代谢过程中的负性调节作用。

因高脂饮食导致的 IR 动物模型与人类 IR 的发生机制较为相似。目前认为饮食中若脂质成分增加,合成 TG 的原料则会增多,使肝脏合成及输出 TG 增加,从而引起外周组织 TG 沉积量上升。有研究证实,肌肉细胞的 TG 沉积量与肥胖呈显著正相关。肥胖是 IR 发生、发展的一个重要危险因素,尤其是内脏脂肪沉积容易引发一系列代谢紊乱,脂肪组织储存脂肪量增多,能促进脂肪细胞分泌肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、抵抗素等细胞因子,促进游离脂肪酸及减少脂连素(adiponectin)的分泌,这些因素可作用于胰岛素信号传导及调节脂质代谢的多个环节,导致机体发生 IR。本研究中实验大鼠经高脂饲料喂养 4 周后,其 BW、TG、TC 均明显高于正常对照组,FBG、FINS 也显著增高,ISI 显著降低,而且在胰岛素抵抗组大鼠继续给予高脂饲料喂养 6 周后,发现其 EPW 也较正常对照组增高,结果进一步证实高脂饮食能引起大鼠肥胖、血脂升高,并可能进而影响其 TNF- α 、脂连素、抵抗素等细胞因子分泌而降低机体对胰岛素的敏感性。

Siegrist-Kaiser 等^[10]证明人与动物的体重增加将降低其胰岛素敏感性和糖耐量,反之则增加胰岛素敏感性和糖耐量,因此减轻体重及降脂治疗对胰岛素抵抗及 2 型糖尿病患者较为重要,而运动可促进脂质代谢及体重减轻。吴军发等^[11]参照 Ploug 设计的游泳运动方案进行动物实验后发现,运动可显著降低 OLETF 大鼠血浆胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白水平,改善脂质代谢紊乱。本实验观察到游泳运动可明显降低 IR 大鼠的 BW、EPW、TC、TGF、PG 及 FINS 水平,促进 ISI 上升,进一步证实了运动可以缓解高脂血症、减轻体重

及改善胰岛素抵抗。Markuns 等^[12]研究发现,运动可使 SD 大鼠骨骼肌 GSK-3 β Ser9 位点磷酸化而导致其活性减弱(40~60)%,与静脉注射胰岛素的作用类似。本实验结果显示,运动干预可以明显降低 IR 大鼠脂肪组织中 GSK-3 β 的表达,而 GSK-3 β 表达下调后,能抑制 GS 及 IRS-1 丝氨酸的磷酸化,使其活性增强,进而促进葡萄糖摄取及糖原合成,改善机体的胰岛素抵抗状况。目前关于调节 GSK-3 β 蛋白表达的具体机制尚鲜见报道,推测运动下调 GSK-3 β 的表达可能与脂质代谢紊乱改善、脂肪细胞相关因子分泌改变等有关,还有待进一步研究、证实。

参 考 文 献

- 1 Eldar-Finkelman H, Schreyer SA, Shinohara MM, et al. Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes*, 1999, 48:1662-1666.
- 2 Eldar-Finkelman H, Krebs EG. Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94:9660-9664.
- 3 都健,赵玉岩,谢辉,等. 喂养型胰岛素抵抗动物模型的建立与评价. *中国医科大学学报*, 2002, 31:343-346.
- 4 Ploug T, Stallknecht BM, Pedersen D, 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.
- 5 Parker PJ, Caudwell FB, Cohen P. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle: effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues in vivo. *Eur J Biochem*, 1983, 130:227-234.
- 6 Shulman GI, Rothman DL, Jue T, et al. Quantitation of muscle glycogen diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med*, 1990, 22:223-228.
- 7 Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Abrams-Carter L, et al. Regulation of glycogen synthase activity in cultured skeletal muscle cells from subjects with type II diabetes: role of chronic hyperinsulinemia and hyperglycemia. *Diabetes*, 1997, 46:1017-1024.
- 8 Liberman Z, Eldar-Finkelman H. Serine 332 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 by glycogen synthase kinase-3 attenuates insulin signaling. *J Biol Chem*, 2004, 30:4422-4428.
- 9 Pearce NJ, Arch JR, Clapham JC, et al. Development of glucose intolerance in male transgenic mice overexpressing human glycogen synthase kinase-3 beta on a muscle-specific promoter. *Metabolism*, 2004, 53:1322-1330.
- 10 Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, et al. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest*, 1997, 100:2858-2864.
- 11 吴军发, 吴毅, 胡永善, 等. 运动改善原发 2 型糖尿病大鼠血糖和血脂代谢紊乱的实验研究. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24:536-538.
- 12 Markuns JF, Wojtaszewski JF, Goodyear LJ. Insulin and exercise decrease glycogen synthase kinase-3 activity by different mechanism in rat skeletal muscle. *J Biol Chem*, 1999, 274:24896-24900.

(修回日期:2006-04-20)

(本文编辑:易 浩)