

· 基础研究 ·

运动对胰岛素抵抗大鼠脂肪细胞葡萄糖转运蛋白-4 的影响

李娟娟 毕会民 李枫 汪保华

【摘要】目的 研究运动对高糖高脂饮食诱导的胰岛素抵抗大鼠脂肪细胞葡萄糖转运蛋白-4 (GLUT4) 的影响。**方法** 将实验大鼠随机分为正常组、模型组和运动组, 每组各 10 只。各组以基础饲料适应性喂养 1 周后, 模型组和运动组改用高糖、高脂饲料喂养, 第 5 周时运动组进行为期 6 周的游泳训练。各组于实验第 1、5 和 11 周检测大鼠的体重、血甘油三酯、血胆固醇、空腹血糖和血浆胰岛素水平, 计算胰岛素敏感指数。采用 Western blot 法检测大鼠脂肪细胞内、外膜 GLUT4 含量。**结果** 模型组大鼠与正常组相比, 脂肪细胞内、外膜 GLUT4 含量均显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 经过 6 周游泳训练的运动组大鼠脂肪细胞内 GLUT4 含量无明显变化, 而细胞外膜 GLUT4 含量显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 运动可提高胰岛素抵抗大鼠脂肪细胞外膜 GLUT4 含量, 促进葡萄糖的摄取和利用。

【关键词】 运动; 葡萄糖转运蛋白-4; 胰岛素抵抗; 脂肪细胞

Effect of exercise on GLUT4 in adipocyte of rats with insulin resistance Li Juan-juan*, Bi Hui-min, Li Feng, Wang Bao-hua. * Department of Endocrinology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of exercise on glucose transporter 4 (GLUT4) in adipocyte of rats with insulin resistance induced by diets. **Methods** Experimental rats were randomized into three groups: a control group ($n = 10$), a model group ($n = 10$) and an exercise group ($n = 10$). The model and exercise groups were fed with the diets enriched with sucrose (20%, w/w), lard (10%, w/w), cholesterol (2.5%, w/w) and cholic acid (1%, w/w) to induce insulin resistance. Exercise group was subject to swim for 6 weeks. After the plasma membrane and the intracellular membrane of adipocyte were prepared and separated, GLUT4 protein was detected by Western blot analysis. The body weight, serum triglyceride and cholesterol, fasting plasma glucose and serum insulin concentration were detected at the predetermined time points. And the insulin sensitivity index was calculated. **Results** Western blot analysis showed that intracellular membrane GLUT4 protein in adipocyte of the rats in the model group decreased by 38.72% ($P < 0.05$) and plasma membrane GLUT4 protein decreased by 21.91% ($P < 0.05$) as compared with those of the control group rats. After 6 weeks of exercise training, intracellular membrane GLUT4 protein of the rats of the exercise group did not change and plasma membrane GLUT4 protein increased 14.01% ($P < 0.05$) as compared with that of the model group rats. **Conclusion** Exercise training can increase the amount of GLUT4 protein in adipocyte of rats with insulin resistance and ameliorate translocation of GLUT4, enhancing the ingestion and utilization of glucose.

【Key words】 Exercise; GLUT4; Insulin resistance; Adipocyte

2 型糖尿病的重要病理特征之一, 是胰岛素敏感细胞对胰岛素介导的葡萄糖摄取和利用的抵抗。Maianu 等^[1]发现, 2 型糖尿病患者的脂肪细胞表现为富含葡萄糖转运蛋白-4 (glucose transporter 4, GLUT4) 的囊泡亚细胞分布及转位异常。同时有研究发现, 高脂饮食可下调白色脂肪组织的 GLUT4 水平, 并明显抑制受胰岛素调控的脂肪细胞 GLUT4 的转位及葡萄糖的摄取^[2]。本研究通过高糖高脂饮食诱导大鼠产生胰岛素抵抗, 观察胰岛素抵抗状态下脂肪细胞内、外膜 GLUT4 含量的变化, 同时观察有规律的运动训练对胰

岛素抵抗大鼠脂肪细胞 GLUT4 含量的影响, 旨在探讨运动改善机体外周组织对胰岛素的敏感性、减轻胰岛素抵抗的可能机制。

材料和方法

一、实验动物及分组

无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 6 周龄雄性 Wistar 大鼠 30 只 (由湖北省实验动物中心提供), 体重 165 ~ 180 g。随机分为正常组、模型组和运动组, 每组各 10 只。实验大鼠每笼 3 ~ 4 只, 标准环境饲养, 自由进食和饮水, 12 h 光照周期 (每日 6:00 ~ 18:00 照明)。以基础饲料适应性喂养 1 周后, 模型组

作者单位: 430060 武汉, 武汉大学人民医院内分泌科 (李娟娟、毕会民), 检验科 (李枫); 荆门市第一人民医院神经内科 (汪保华)

和运动组大鼠改喂高糖高脂饲料,正常组继续以基础饲料喂养。高糖高脂饲料由基础饲料添加 20% 蔗糖、10% 熟猪油、2.5% 胆固醇和 1% 胆酸盐混合而成。

二、运动方法

运动组大鼠以高糖高脂饲料喂养 4 周后,进行为期 6 周的游泳训练。按 Ploug 等^[3]报道的游泳训练方法,每周训练 5 d,前 2 周每天训练 40 min,以后每天训练 60 min,保持水温 35℃,水深 50 cm,每只大鼠的活动面积 200 cm²。有 1 只大鼠于第 2 次游泳训练时溺水死亡。

三、体重、血糖及血脂各项指标的检测

分别于实验第 1,5 和 11 周检测各组大鼠的体重。禁食 12 h 后,腹腔注射 1% 戊巴比妥(40 mg/kg 体重)麻醉大鼠,并进行心脏采血。以美国产 Beckman CXT 型全自动生化分析仪测定血甘油三酯(triglycerides, TG)和总胆固醇(total cholesterol, TC),美国产 Advantage II 血糖仪测定空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG),血浆胰岛素(fasting serum insulin, FINS)的检测采用 CIS 放免试剂盒(中国原子能研究所提供),同时计算胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI), $ISI = \ln[1/(FPG \times FINS)]^{[4]}$ 。

四、脂肪细胞 GLUT4 含量的测定

1. 标本的收集^[5]:运动组大鼠最后 1 次游泳训练结束 48 h 后,所有实验动物均麻醉处死,迅速分离其附睾脂肪垫并称重。每 3 g 脂肪组织加入 40 ml TES 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、250 mmol/L 蔗糖, pH = 7.4),剪碎、4℃ 下匀浆,匀浆液于 -80℃ 下冻存。

2. 脂肪细胞内、外膜的制备^[5]:匀浆液采用美国 Beckman 公司产 L8-80M 型超速冷冻离心机离心,3 000 × g 离心 15 min(4℃),丢弃上层的脂肪层和沉淀物 I(包括细胞核、线粒体和细胞碎片),收集不含脂肪的上清液 I;上清液 I 以 12 000 × g 离心 15 min(4℃),收集上清液 II,所得沉淀 II 即脂肪细胞外膜,将其混悬于 1 ml TES 缓冲液中, -20℃ 保存;上清液 II 以 28 000 × g 离心 15 min(4℃),丢弃沉淀物 III,保留上清液 III,继续以 146 000 × g 离心 75 min(4℃),所得沉淀物 IV 即脂肪细胞内膜,将其混悬于 1 ml TES 缓冲液中, -20℃ 保存。膜蛋白浓度以改良的 Lowery 法测定^[6],并将其调整为 50 μg/15 μl。

3. 免疫印迹法(Western blot)检测 GLUT4 含量:取等量的膜蛋白溶液,加入等体积的 2 × SDS 凝胶加样缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L 二硫苏糖醇、4% SDS、0.2% 溴酚蓝和 20% 甘油, pH = 6.8),煮沸 10 min,经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electropho-

resis, SDS-PAGE)分离后,电转移至硝酸纤维素膜上,室温下用封闭液封闭 1 h,然后与小鼠抗大鼠 GLUT4 单克隆抗体(R&D Systems 公司生产)4℃ 下孵育过夜,再与辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 室温下孵育 1 h。洗膜后加入 ECL 增强化学发光试剂反应 1 min,立即用 Kodak 底片曝光,洗片后经 Bid-1D 型凝胶电泳成像系统扫描。应用 HPIAS-1000 图像分析软件,以正常组细胞内膜的 GLUT4 含量作为标准来确定 X 光片上 GLUT4 的相对含量。封闭液、辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 和 ECL 试剂均采用 KPL 公司生产的 Western blot 试剂盒。

五、统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件对实验数据进行分析,所有数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间数据比较采用方差分析,2 组间比较采用 LSD-*t* 检验。

结 果

一、各组大鼠体重、血糖及血脂各项指标的变化

以基础饲料适应性喂养 1 周后,各组大鼠体重、TG、TC、FPG、FINS 水平及 ISI 比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。模型组和运动组大鼠给予高糖高脂饮食 4 周后,体重、TG、TC 和 FINS 水平均明显高于正常组,ISI 明显低于正常组(均 $P < 0.05$),而 FPG 水平与正常组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),提示高糖高脂饮食已成功地诱导模型组与运动组大鼠产生胰岛素抵抗。运动组经 6 周的运动训练后,与模型组相比,体重、TG、TC、FPG 及 FINS 水平均明显降低,而 ISI 明显升高(均 $P < 0.05$),提示运动组大鼠对胰岛素的敏感性有改善(表 1)。

二、各组大鼠脂肪细胞 GLUT4 含量的比较

正常组细胞内、外膜 GLUT4 相对含量分别为 100 和(57.91 ± 3.20),均明显高于模型组大鼠[(61.28 ± 4.75)和(36.00 ± 3.97)],差异均有统计学意义($P < 0.05$)。经过 6 周的游泳训练后,运动组大鼠脂肪细胞内膜 GLUT4 含量(58.33 ± 5.27)与模型组比较,差异无统计学意义;而细胞外膜 GLUT4 含量(50.01 ± 4.43)则明显高于模型组,但仍明显低于正常组,差异均有统计学意义($P < 0.05$,图 1~2)。

讨 论

机体外周组织细胞膜上葡萄糖的转运障碍是引起胰岛素抵抗受体后缺陷的重要原因之一。葡萄糖的跨膜转运由位于细胞膜上的 GLUT 介导,并以易化扩散的方式实现,GLUT4 则是 GLUT 家族中的重要成员,仅存在于对胰岛素敏感的脂肪细胞和肌细胞中。基础状态下,GLUT4 在细胞膜表面和细胞内不断循环,大部

表 1 各组大鼠不同时间点体重、TG、TC、FPG、FINS 水平和 ISI 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重(g)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	FPG(mmol/L)	FINS(mU/L)	ISI
正常组	10						
第 1 周		178.60 ± 4.62	0.59 ± 0.21	1.50 ± 0.25	3.55 ± 0.29	11.28 ± 1.91	-3.67 ± 0.20
第 5 周		268.00 ± 7.12	0.60 ± 0.21	1.50 ± 0.26	3.57 ± 0.28	11.68 ± 1.72	-3.68 ± 0.24
第 11 周		387.60 ± 5.06	0.61 ± 0.21	1.51 ± 0.26	3.73 ± 0.30	11.75 ± 1.63	-3.77 ± 0.17
模型组	10						
第 1 周		178.40 ± 4.30	0.56 ± 0.20	1.49 ± 0.20	3.58 ± 0.29	11.09 ± 2.22	-3.66 ± 0.21
第 5 周		278.20 ± 6.70 **	1.30 ± 0.39 **	3.06 ± 0.51 **	3.82 ± 0.32	32.69 ± 2.94 **	-4.82 ± 0.11 **
第 11 周		404.40 ± 5.23 **	1.95 ± 0.37 **	3.88 ± 0.47 **	4.34 ± 0.26 **	32.67 ± 3.60 **	-4.95 ± 0.13 **
运动组	9						
第 1 周		180.40 ± 6.85	0.57 ± 0.21	1.51 ± 0.22	3.51 ± 0.35	10.59 ± 2.48	-3.59 ± 0.31
第 5 周		273.60 ± 8.93 **	1.28 ± 0.41 **	3.08 ± 0.50 **	3.85 ± 0.33	31.75 ± 2.55 **	-4.80 ± 0.14 **
第 11 周		393.56 ± 5.27 *##	1.23 ± 0.44 *##	3.01 ± 0.52 *##	3.86 ± 0.35 ##	30.11 ± 2.22 *##	-4.75 ± 0.15 *##

注:与正常组相应时间点比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组相应时间点比较,* $P < 0.05$,## $P < 0.01$

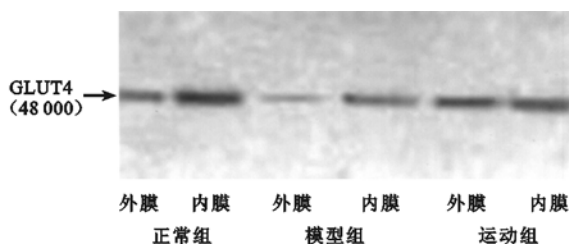


图 1 Western blot 法检测脂肪细胞 GLUT4 含量

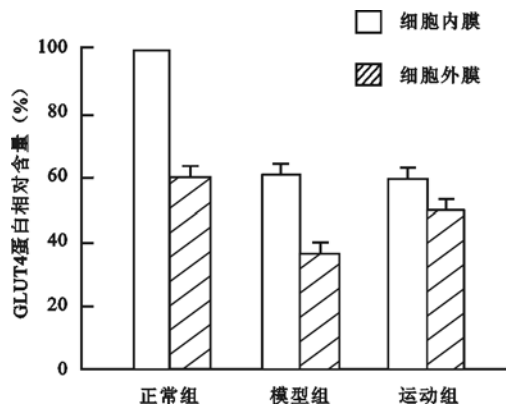


图 2 各组大鼠脂肪细胞内、外膜 GLUT4 相对含量的比较

分位于细胞内;在胰岛素刺激下,富含 GLUT4 的囊泡由细胞内向细胞膜表面以胞吐形式转位的速度可显著加快,使细胞外膜的 GLUT4 增多,细胞对葡萄糖的摄取增加^[7,8]。Dale 等^[9]通过选择性降低小鼠脂肪组织 GLUT4 的表达,发现尽管小鼠肌肉中 GLUT4 表达正常,但对葡萄糖的摄取能力大大降低(下降约 40%);同时,肌肉和肝脏的胰岛素刺激性 3-羟基磷酸肌醇激酶活性也比正常情况下低 50%~60%,说明脂肪细胞的 GLUT4 表达水平下降可诱导其它组织发生胰岛素抵抗,脂肪组织在介导体内葡萄糖的处理过程中具有重要的作用。Brozinick 等^[10]研究发现, GLUT4 过度表达的低龄 db/db 转基因小鼠较非转基因小鼠的葡萄糖耐受力有所改善,尽管这种改善趋势随年龄的增长而减弱,但其下降速度会有所减慢,并且高龄转基因小鼠在体内、外实验中对胰岛素的刺激仍有反应。这说明

通过转基因疗法提高 GLUT4 的表达可在细胞水平上增加胰岛素敏感性,防治胰岛素抵抗。

本实验结果显示,模型组大鼠脂肪细胞内、外膜 GLUT4 含量均明显低于正常组;运动组大鼠脂肪细胞内膜的 GLUT4 含量与模型组比较,差异无统计学意义,但细胞外膜 GLUT4 含量则明显高于模型组,提示运动训练提高了胰岛素抵抗大鼠脂肪细胞外膜 GLUT4 的表达水平。我们还发现,运动组大鼠的体重、TG、TC、FPG 和 FINS 水平均明显低于模型组,而 ISI 明显高于模型组,这一结果提示,胰岛素抵抗大鼠可能通过提高脂肪细胞外膜 GLUT4 的含量,促进脂肪细胞摄取和利用葡萄糖,从而提高机体外周组织对胰岛素的敏感性。杨晓冰等^[11]发现,运动可改善糖尿病大鼠骨骼肌细胞 GLUT4 的转位。至于运动对 GLUT4 转位的影响及作用机制,仍有待深入研究。

综上所述,脂肪细胞 GLUT4 含量降低,尤其是细胞外膜 GLUT4 表达水平的下降,可直接影响细胞对葡萄糖的摄取和利用,同时也可诱导肝脏及肌肉的胰岛素抵抗,从而降低机体外周组织对胰岛素的敏感性。本研究还证实,运动训练可提高胰岛素抵抗状态下脂肪细胞 GLUT4 的含量,促进脂肪细胞对葡萄糖的转运和利用。这可能是运动改善机体外周组织对胰岛素的敏感性、减轻胰岛素抵抗的机理之一。

参 考 文 献

- Maianu L, Keller SR, Garvey WT. Adipocytes exhibit abnormal subcellular distribution of vesicles containing GLUT4 and insulin-regulated aminopeptidase in type 2 diabetes mellitus; implications regarding defects in vesicle trafficking. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86:5450-5456.
- Takahashi Y, Ide T. Dietary n-3 fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. Br J Nutr, 2000, 84:175-184.
- 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.
- 李光伟, 潘孝仁, Lillioja S, 等. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指

- 数. 中华内科杂志, 1993, 32: 656-660.
- 5 Paula CP, Alessandra MV, Jos S, et al. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. Life Sci, 2002, 71: 1917-1928.
- 6 Lowery OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.
- 7 Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. J Clin Invest, 2000, 106: 165-169.
- 8 吴毅, 杨晓冰, 李益明, 等. 耐力运动对大鼠葡萄糖运载体基因表达及转位的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22: 82-85.
- 9 Dale A, Odile P, Jason K, et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. Nature, 2001, 409: 729-733.
- 10 Brozinick JT, McCoid SC, Reynolds TH, et al. GLUT4 overexpression in db/db mice dose-dependently ameliorates diabetes but is not a lifelong cure. Diabetes, 2001, 50: 593-600.
- 11 杨晓冰, 吴毅, 李益明, 等. 运动对糖尿病大鼠骨骼肌细胞葡萄糖运载体 4 转位机制的影响. 中华物理医学与康复杂志, 1999, 21: 214-215.

(修回日期: 2004-10-15)

(本文编辑: 吴倩)

· 短篇论著 ·

超短波治疗气胸的临床观察

范振芹 曲明苓 苗丰莲 宫照燕

气胸是胸科常见的临床急症, 临床多采用抽气、静卧休息、导管闭式引流及手术等方法治疗, 但此类方法疗程长, 易形成胸膜粘连, 影响肺复张。我院于 2001 年 3 月至 2003 年 10 月对收治的 28 例气胸患者采用超短波及抽气治疗, 取得较好效果。现报道如下。

一、资料与方法

1. 一般资料: 收治住院的气胸患者 53 例, 按 Kircher 计算方法计量气胸面积^[1], X 线检查肺脏压缩面积在 50% 以下, 均为首次发生的闭合性气胸患者。其中男 42 例, 女 11 例; 年龄 18 ~ 71 岁, 平均 37.5 岁; 胸痛 53 例, 胸闷 50 例, 咳嗽 43 例, 发热 10 例; 左侧气胸 28 例, 右侧气胸 25 例。全部患者生命体征稳定。

2. 治疗方法: 将 53 例气胸患者随机分为两组, 设观察组 28 例, 对照组 25 例。两组患者入院后均给予胸透, 伴有呼吸困难及肺压缩面积在 40% ~ 50% 的患者给予抽气 1 次, 发热患者给予静脉滴注头孢拉啶, 其余患者均口服罗红霉素。治疗过程中如果气胸症状加重, 气体明显增加, 可以再次抽气。另外, 观察组给予超短波治疗及静卧休息, 对照组给予静卧休息。超短波治疗在首次胸腔抽气后采用上海产 CDB-1 型超短波电疗机, 频率 40.68 MHz, 输出功率 200 W, 21 cm × 15 cm 的板状电极 2 个, 置于患侧胸部, 前、后对置, 间隙 4 ~ 5 cm, 温热量, 每日 1 次, 每次 30 min, 隔日 1 次 X 线检查, 10 d 为 1 个疗程。2 周后观察两组患者气体吸收情况。

3. 疗效标准: 治愈——胸痛、胸闷消失, 气体完全吸收; 显效——胸痛、胸闷消失, 肺压缩面积在 10% 以下; 有效——胸痛、胸闷消失, 肺压缩面积在 15% 以下; 无效——胸痛、胸闷未改善, 肺压缩面积增加。

二、结果

观察组 28 例, 治愈 25 例, 显效 2 例, 有效 1 例, 有效率为 100% (28/28), 显效率为 96.4% (27/28), 每日气体吸收率为 3% ~ 5.5%, 平均治愈天数为 6.5 d。对照组 25 例, 治愈 19 例, 显效 2 例, 有效 3 例, 无效 1 例, 有效率为 96% (24/25), 显效率

为 84% (21/25), 每日气体吸收率为 0.6% ~ 1.4%, 平均治愈天数为 12.7 d。两组有效率经 χ^2 检验, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.14, P > 0.05$); 显效率经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 11.94, P < 0.01$)。

三、讨论

气胸以青壮年多见, 常见于金葡菌肺炎、慢性阻塞性肺病、肺大泡破裂及肺肿瘤等。本病起病急, 可伴有胸痛、气急、呼吸困难、紫绀, 严重者出现心律失常、休克, 传统治疗方法采用抽气、导管闭式引流等, 但抽气及导管闭式引流后仍有 30% 的气体无法抽尽, 只有采用抗菌、静卧休息, 以待气体自行吸收和肺复张, 但气胸吸收速度较慢, 住院时间长, 容易引起胸膜感染粘连, 影响肺复张。超短波治疗气胸可使气体吸收速率明显提高, 肺完全复张时间缩短, 显效率高, 与对照组比较差异均有统计学意义, 同时观察组患者胸痛、胸闷等症状很快缓解和消失。超短波治疗气胸促进气体吸收的机制为: ①根据气胸病变的临床特点与气体分子热运动学原理, 大剂量超短波局部透热治疗, 可使胸膜腔气体温度升高, 增大气体膨胀压力, 使胸腔毛细血管血流加快, 有效地改善局部血液循环, 提高胸腔内气体的吸收率^[2]。②超短波治疗可使局部组织代谢加快, 促进炎症局部吸收, 加快炎症组织局部修复及创口愈合。③具有调节神经系统的功能, 使疼痛感受器的兴奋性下降, 从而起到镇痛作用。临床观察表明, 此疗法对肺中、小面积压缩的早期气胸疗效显著; 肺复张时间短, 胸痛、胸闷症状消失快, 且无不良反应及副作用; 对临床治疗气胸提供了快捷、有效的治疗方法, 降低了胸膜腔的感染率及气胸复发率。

参 考 文 献

- 1 李铁一, 李伟, 冀景玲. X 线诊断问答. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 110-111.
- 2 张鸾云, 刘又宁. 超短波治疗特发性气胸临床观察. 中华理疗杂志, 2000, 23: 367.

(修回日期: 2004-11-20)

(本文编辑: 熊芝兰)