

Ⅱ型糖尿病大鼠运动后骨骼肌 IRS-2、GLUT4 含量及 IRS-2 磷酸化变化的时间特征

Dynamic Effects of Exercise on Content of IRS-2 and GLUT4 and IRS-2 Tyrosine Phosphorylation in Skeletal Muscle of DM Rats

付颖¹,王耀光²,李永春³

FU Ying¹,WANG Yaoguang²,LI Yongchun³

摘要:为了解运动后大鼠肌细胞 IRS-2、GLUT4 蛋白含量及 IRS-2 磷酸化的动态变化及时间特征。制备Ⅱ型糖尿病大鼠模型。将 SD 大鼠分为正常对照组、糖尿病对照组和糖尿病运动组。用 Western blot 免疫印迹法检测运动后 IRS-2、GLUT4 蛋白含量及 IRS-2 磷酸化程度。结果得出:与糖尿病对照组相比,运动后 1 h、3 h 组、6 h、12 h、24 h 和 48 h 股四头肌 IRS-2 蛋白含量分别升高 6.8%、23.7% ($P < 0.01$)、20.7% ($P < 0.01$)、10%、5.4% 和 2.7%; GLUT4 蛋白含量分别显著升高 17.3%、32.7%、42.3%、46.2%、51.9% 和 45% ($P < 0.01$); IRS-2 磷酸化分别升高 49%、51.4%、45.1%、43.1%、21.6% ($P < 0.01$) 和 9.8% ($P < 0.05$)。结论:一次性中等强度的运动对 IRS-2、GLUT4 含量和 IRS-2 磷酸化产生显著的影响,其中 GLUT4 含量和 IRS-2 磷酸化升高的效应可持续到运动结束的 48 h。

关键词:运动后时间特征;Ⅱ型糖尿病;大鼠;IRS-2;磷酸化;GLUT4

中图分类号:G 804.55 **文章编号:**1009-783X(2011)04-0372-04 **文献标志码:**A

Abstract: Objective: To explore the dynamic effects of exercise on protein content of IRS-2, GLUT4 and IRS-2 tyrosine phosphorylation in DM rats. Method: SD rats were divided into normal control group (NC), diabetes mellitus group (DMC) and exercise group. The exercise group did one-bout exercise for 50min. The protein contents of IRS-2, GLUT4 and IRS-2 tyrosine phosphorylation were measured using Western bolt analysis. Result: The contents of IRS-2 protein in 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h groups increased up to 6.8%, 23.7% ($P < 0.01$), 20.7% ($P < 0.01$), 10%, 5.4% and 2.7%; GLUT4 protein in 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h groups increased up to 17.3%, 32.7%, 42.3%, 46.2%, 51.9% and 45% ($P < 0.01$). The tyrosine phosphorylation of IRS-2 protein in 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h groups increased up to 49%, 51.4%, 45.1%, 43.1%, 21.6% ($P < 0.01$) and 9.8% ($P < 0.05$) respectively compare with the DMC group. Conclusion: The results showed that the contents and the tyrosine phosphorylation of IRS-2 and GLUT4 protein have the obviously effect after once bout exercise, and the effect could last for 48 h after exercise.

Key words: time trait after exercise; Ⅱ diabetes; rat; IRS-2; phosphorylation; GLUT 4

胰岛素受体底-2 (insulin receptor substrate, IRS-2) 是细胞质中的接头蛋白 (adaptor), 主要连接胰岛素受体 (IR) 和多种效应分子, 从而介导细胞对胰岛素 (INS) 等的反应。随着基因剔除技术的发展, 发现剔除 IRS-2 基因的纯合子动物 (IRS-2^{-/-})

具有Ⅱ型 DM 的全部特征^[1], 因此, IRS-2 及活动规律成为近来 2 型 DM 研究的热点。运动是治疗Ⅱ型糖尿病的主要非药物手段, 许多学者的研究发现运动可提高 IRS-2 蛋白的表达和磷酸化程度^[2-3], 提高骨骼肌 GLUT4 蛋白的含量^[4], 有利于 GLUT4 蛋白细胞膜的易位, 提高葡萄糖进入组织细胞的效率; 但运动对 IRS-2 及 GLUT4 的含量和 IRS-2 磷酸化影响的时间特征我们还不完全清楚, 此方面的系统研究还未见报道, 因此, 开展此领域的研究对确定科学的锻炼间隔时间及制订科学的健身计划具有重要的理论和现实意义。

收稿日期: 2010-05-17

基金项目: 辽宁省教育厅自然科学基金资助课题 (20060474)。

作者简介: 付颖 (1964-), 女, 北京人, 学士, 研究方向为运动医学与康复和运动员机能评定; 王耀光 (1962-), 男, 辽宁人, 硕士, 教授, 研究方向为运动生理学和运动生物化学; 李永春 (1972-), 男, 辽宁人, 硕士, 研究方向为运动训练的生理学基础研究。

作者单位: 1. 国家体育总局奥林匹克体育中心, 北京 100029; 2. 辽宁师范大学体育学院, 大连 116029; 3. 辽宁警官高等专科学校, 大连 116033。

1. National Olympic Sports Centre, Beijing 100029, China; 2. College of Physical Education, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China; 3. Liaoning Advanced Police Officer School, Dalian 116033, China.

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

实验选用 90 只健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体质量 (200±17) g, 雌雄不拘, SD 大鼠由大连医科大学动物中心提供 (许可证号: SCXK (辽) 2004-0017)。在标准环境下常规分笼喂养, 自由饮水进食。适应性喂养 1 周后, 进行运动适应性训

练。随机挑选 10 只大鼠为正常对照组,其余大鼠为实验组。

1.1.1 II 型糖尿病大鼠模型的制备

II 型糖尿病的造模方法参照洪丽莉等的制备模型^[5]。将实验组大鼠进行 4 周的高脂饲料喂养,同时 3% 的果糖饮水,4 周后按 30 mg/kg 体重的剂量一次性腹腔内注射 STZ(溶于 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液, pH4.4)。在注射后 1 周做葡萄糖耐量试验。方法为:大鼠禁食 4~6 h,经腹腔注射葡萄糖 2 g/kg 体重,断尾采血测定 0.60 和 120 min 血糖,DM 的诊断标准为连续 2 次空腹血糖(FGB)≥7.8 mmol/L 或葡萄糖负荷后 1 h 血糖≥11.1 mmol/L^[6]。符合标准的 70 只大鼠随机分为糖尿病对照和运动组,大鼠禁食 12 h 后,进行运动实验。

1.1.2 糖尿病大鼠运动模型的建立

运动组运动强度的选择参照 Soya 等的实验^[7],选 20 m/m 强度的运动为负荷标准,进行一次运动,时间为 50 min,在运动后 1、3、6、12、24 和 48 h 分别测定 IRS-2 及 GLUT4 的含量和 IRS-2 磷酸化程度。对照组正常饲养。本实验动物的处置符合国际动物伦理学。

IRS-2 多克隆抗体购自美国 R&D Systems 公司,ECL 购自英国 Amersham 公司。预染蛋白 Marker 购自 New England BioLabs。血糖(FBG)用快速血糖仪检测,仪器及试纸由美国强生公司生产。胰岛素(FINS)用放射免疫法检测,试剂盒由南京生物工程研究所提供,批内 CV<3%,批间 CV<5%。甘油三酯(TG)及总胆固醇(Tc)试剂盒:北京福瑞生物工程公司生产。动物跑台为 SLY-RTML 六跑道大鼠跑台,由北京硕林苑科技有限公司生产。

1.2 研究方法

1.2.1 组织采样

大鼠腹腔内注射 3% 戊巴比妥钠(50 mg/kg 体重)麻醉,提取大鼠后肢股四头肌肌肉组织,置于液氮中,待提取蛋白质。

1.2.2 标本制备

1.2.2.1 IRS-2 标本制备

称取骨骼肌 100 mg,剪碎后置于组织匀浆液 600 μL (2% SDS, 50 mmol/L Tris-HCl, pH6.8, 10% 甘油, 1 mmol/L Na₃V04, 1 mmol/L PMSF, 5 g/L Leupeptin) 中,采用 Polytron PT10-35 组织扩散仪制备组织匀浆(7~10 kg)。所得匀浆置于 4 °C、1 万 g 离心 10 min,取上清液,以备上样。

1.2.2.2 GLUT4 标本制备

骨骼肌细胞膜的制备:参照 Huisman^[8] 的实验方法。取股四头肌肌肉组织 100 g,冰上剪碎,加入裂解液[Tris-HCl (pH7.5) 20 mol/L,蔗糖 330 mol/L,EDTA 0.5 mol/L,PMSF 1 mol/L,Lepetin 25 mg/L],冰浴中匀浆,4 °C 1 000 r/min 离心

10 min。取上清以 40 000 r/min 冷冻超速离心 1 h,弃上清,在沉淀中再加入前述裂解液(不含蔗糖,加入体积分数为 1% TritonX-100),用超声裂解(Amplitude 100, Frequency 20 Hz, SONICS-Δmaterials INS-USA)的方法循环萃取 7 次,再以 40 000 r/min 冷冻高速离心(sovall evolution RC, USA)1 h,得到的上清即是细胞膜组织。

1.2.3 样本测试

1.2.3.1 GLUT4 蛋白含量测定

采用 Western blot 免疫印迹法,取各组骨骼肌细胞膜样品 50 μg,进行 SDS-PAGE 分离蛋白,并将蛋白电转移至硝酸纤维素(NC)膜上。再用含 5% 脱脂奶粉的 TBS 封闭,4 °C 过夜,加抗 GLUT 4 单克隆抗体,室温 1 h,洗膜后加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温轻摇 1 h,充分洗涤后与 ECL 反应 1 min,即刻与 X 光片曝光,洗片后用 Leica Q550-IW 图像分析仪(德国)进行扫描,计算光密度,进行定量分析。以正常对照组的 GLUT4 蛋白含量为 100 作为标准,计算其他各组的相对含量。

1.2.3.2 IRS-2 蛋白表达测定

采用 Western blot 免疫印迹法。取含等量总蛋白(50 μg)的样品,经 7.5% SDS-PAGE 分离,电转膜后以 5% 脱脂奶粉封闭,再分别与兔抗人 IRS-1 和 IRS-2 多克隆抗体反应,继而与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗作用,以增强化学发光法(ECL)显示蛋白条带,并用激光光密度扫描仪测定蛋白条带光密度。

1.2.3.3 IRS-2 蛋白磷酸化的测定

采用免疫沉淀及增强化学发光法。取含等量总蛋白(500 μg)的样品,与抗-IRS-2-抗体 4 °C 孵育过夜。抗原-抗体复合物经固相化蛋白 G 沉淀后,重新溶解于 Laemml 上样缓冲液,加热到 95 °C 5 min,经 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 1.5 h。抗-磷酸化酪氨酸免疫印迹,醋酸纤维薄膜直接与辣根过氧化物酶结合的一抗 APY20H 孵育 1.5 h。充分洗涤后与 ECL 反应 1 min,即刻与 X 光片曝光,洗片后用 Leica Q550-IW 图像分析仪(德国)进行扫描,计算光密度。以正常对照组的 IRS-2 蛋白含量和磷酸化为 100 作为标准,计算其他各组的相对量。

1.2.4 统计处理

对所得实验数据用 SPSS 11.0 软件包进行统计处理,以均数±标准差表示,组间比较采用 *t* 检验。显著性水平 α 为 0.05。

2 实验结果

与正常对照组相比,在糖尿病建模后大鼠的体重明显增加($P<0.01$),血清甘油三酯和总胆固醇水平也明显升高($P<0.01$),表明血脂增加,产生肥胖。同时血糖和胰岛素水平明显升高($P<0.01$)。具有了 2 型糖尿病的明显特征。详情请见表 1。

表 1 造模成功后大鼠体重、血糖、血脂和胰岛素水平一览表

组别	<i>n</i>	体重/g	血糖/(mmol·L ⁻¹)	胰岛素/(mU·L ⁻¹)	血清甘油三酯/(mmol·L ⁻¹)	总胆固醇/(mmol·L ⁻¹)
NC 组	10	294±18	4.63±0.44	15.49±2.21	0.88±0.32	1.82±0.21
DMC 组	70	391±16*	11.43±3.86*	33.69±1.73*	1.48±0.34*	2.64±0.62*

注:※与正常对照组相比, $P<0.01$ 。

与对照组相比,糖尿病对照组股四头肌 IRS-2 蛋白质量分数下降 42%,具有显著性差异($P < 0.01$)。与糖尿病对照组相比,运动后 1 h、3 h 组、6 h、11 h、24 h 和 48 h 股四头肌 IRS-2 蛋白质量分数分别升高 6.8%、23.7% ($P < 0.01$)、20.7% ($P < 0.01$)、10%、5.4% 和 2.7%,但各组仍没有恢复到正常对照组水平。与对照组相比,糖尿病对照组股四头肌 GLUT4 蛋白质量分数下降 48%,具有显著性差异($P < 0.01$)。与糖尿病对照组相比,运动后 1 h、3 h 组、6 h、12 h、24 h 和 48 h 股四头肌 GLUT4 蛋白质量分数分别显著升高 17.3%、32.7%、42.3%、46.2%、51.9% 和 45% ($P < 0.01$),但各组仍没有恢复到正常对照组水平。与对照组相比,糖尿病对照组股四头肌 IRS-2 磷酸化水平下降 49%,具有显著性差异($P < 0.01$)。与糖尿病对照组相比,运动后 1 h、3 h 组、6 h、12 h、24 h 和 48 h 股四头肌 IRS-2 磷酸化分别升高 49%、51.4%、45.1%、43.1%、21.6% ($P < 0.01$) 和 9.8% ($P < 0.05$),但各组仍没有恢复到正常对照组水平(如图 1、图 2 和图 3 所示)。

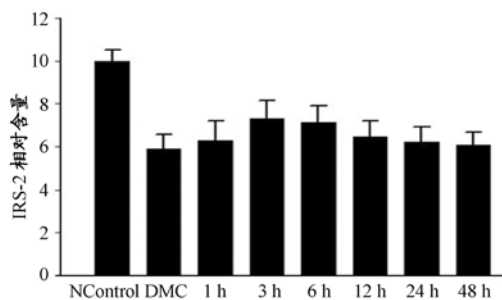


图 1 运动后 IRS-2 含量变化的时间特征

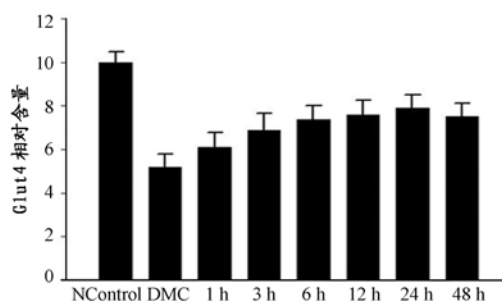


图 2 运动后 GLUT4 蛋白含量变化的时间特征

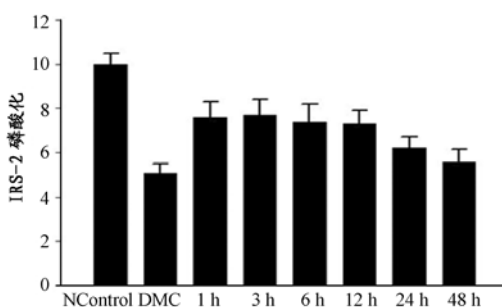


图 3 运动后 IRS-2 磷酸化变化的时间特征

3 分析与讨论

根据 Soya 运动强度的确定依据,20 m/m 相当于 LT(乳酸阈)强度,LT 为有氧代谢向无氧代谢的转折点,此强度已经成

为有氧健身锻炼和康复训练的一个强度标准。美国运动医学会(ACSM)和美国糖尿病协会(ADA)运动锻炼的方案、运动与糖尿病专业指南,也将 LT 强度列为糖尿病康复锻炼推荐的上限强度^[7]。

3.1 运动对鼠肌 IRS-2 蛋白含量和磷酸化的影响

胰岛素受体底物(IRS)主要连接胰岛素受体(IR)和多种效应分子,最终调节糖代谢。随着基因剔除技术的发展,发现剔除 IRS-1 基因的纯合子动物(IRS-1^{-/-})只发生胰岛素抵抗而不导致 DM,而剔除 IRS-2 基因的纯合子动物(IRS-2^{-/-})具有 II 型 DM 的全部特征,因此,IRS-2 及活动规律成为近来 2 型 DM 研究的热点^[9]。运动是治疗 2 型糖尿病的主要非药物手段,运动可提高胰岛素的敏感性、提高血糖的利用率并降低血糖水平,因此,了解运动对 IRS-2 的表达和介导过程的影响,对把握运动影响糖尿病的代谢及调节过程、运动治疗糖尿病的生物基础等都具有重要的意义^[10]。

本研究显示,经 50 min 的运动,与糖尿病对照组相比,运动后 IRS-2 蛋白的含量增加,但只在 3 h 和 6 h 时,其增加才具有统计学意义;F. Kirsten 等的研究发现,运动后 IRS-2 的磷酸化水平显著增加在运动后立即就会发生^[11],但运动后 IRS-2 的磷酸化更系统的观察还未见报道,但 K. F. Howlett 等人的研究发现,IRS-2 磷酸化的增加在运动过程中及运动后立即不明显,但在运动 60 min 后其磷酸化程度才显著增加^[12],与本实验的结果相似。这种变化对运动后机体的代谢极为有利,有助于葡萄糖的利用和糖原的合成。胰岛素(INS)进入细胞与 IR 结合后,IR 的 β 亚基近膜区酪氨酸(Tyr)自身磷酸化并且与 IRS-2 结合,为下游含 SH2 区的蛋白提供位点,形成信号蛋白复合物,以介导进一步的信号传导,最终激发细胞膜上 GLUT4 位移转运葡萄糖,II 型糖尿病此过程异常,而运动被认为是改善糖代谢异常的有效方法。

3.2 运动对大鼠肌肉 GLUT4 蛋白含量的影响

葡萄糖的跨膜转运是由位于细胞膜上的葡萄糖载体介导并以易化扩散方式实现的。GLUT4 是一种糖蛋白,由 509 个氨基酸组成,相对分子质量约 4 万 8 000,在静息状态下,绝大部分 GLUT4 位于细胞内的各种细胞器,包括微粒体、高尔基体和肌丝网的膜上,小部分的 GLUT4 位于细胞膜上,在葡萄糖转运蛋白基因家族中,GLUT4 蛋白由于主要分布在肌肉和脂肪组织中,目前研究认为运动和胰岛素是刺激骨骼肌内 GLUT4 转位和糖摄入的 2 个最重要的因素^[13]。研究发现,大鼠运动 3 h 后骨骼肌细胞内 GLUT4 mRNA 和蛋白含量就有所增加,其中 GLUT4 含量的增加可持续到运动后 1 周,对改善外周组织对胰岛素的敏感性有重要作用^[14]。本研究提示,GLUT4 含量和 IRS-2 磷酸化在运动后的趋势相近似,在运动后整个观察期内其升高均具有显著性意义,这可能是运动增强 INS 调节效果、改善机体 INS 抵抗、增加葡萄糖利用的基础。

本实验提示,一次 50 min 的中等强度运动,对 IRS-2 的磷酸化和 GLUT4 蛋白含量影响的效应至少可持续到运动后的 48 h,此结果可能为 II 型糖尿病患者运动康复时制定运动处方提供有益的参考。由于此领域的研究才刚开始,运动后 IRS-

2 及 GLUT4 蛋白的含量和 IRS-2 磷酸化变化的时间特征及活动规律还需要更进一步系统的实验进行探索。

4 结论

1) 一次性中等强度运动后鼠肌 IRS-2 蛋白含量在 3 h 和 6 h 显著升高, 其磷酸化水平在运动后的各观察时间均显著升高。

2) 一次性中等强度运动后鼠肌 GLUT4 蛋白含量在各观察时间均显著升高。

参考文献:

- [1] Stefan N, Kovacs P, Stumvoll M, *et al.* Metabolic effects of the Gly1057Asp polymorphism in IRS-2 and interactions with obesity [J]. *Diabetes*, 2003, 52(6): 1544-1550.
- [2] Arai T, Hashimoto H, Kawai K, *et al.* Fulminant type 1 diabetes mellitus observed in insulin receptor substrate 2 deficient mice [J]. *Clin Exp Med*, 2008, 8(2): 93-99.
- [3] Kubota N, Kubota T, Itoh S, *et al.* Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding [J]. *Cell Metab*, 2008, 8(1): 49-64.
- [4] Stuart C A, Howell M E, Baker J D, *et al.* Cycle training increased GLUT4 and activation of mammalian target of rapamycin in fast twitch muscle fibers [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2010, 42(1): 96-106.
- [5] 洪丽莉, 许冠荪, 申国明, 等. SD 大鼠 2 型糖尿病模型的建立 [J]. *中国比较医学*, 2005, 15(6): 379-381.
- [6] 郭啸华, 刘志红, 李恒, 等. 实验性 2 型糖尿病大鼠模型的建立 [J]. *肾脏病与透析肾移植*, 2000, 9(4): 351-355.
- [7] Soya H, Mukai A, Deocaris C C, *et al.* Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model [J]. *Neurosci Res*, 2007, 58(4): 341-348.
- [8] Huisman B, Zyl M V, Keyser A, *et al.* The effect of insulin and β -adrenergic stimulation on glucose transport, Glut 4 and PKB activation in the myocardium of lean and obese Non-insulin dependent diabetes mellitus rat [J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 223(4): 15-21.
- [9] Hoene M, Lehmann R, Hennige A M, *et al.* Acute regulation of metabolic genes and insulin receptor substrates in the liver of mice by one single bout of treadmill exercise [J]. *J Physiol*, 2009, 587(1): 241-252.
- [10] Park S, Hong S M, Sung S R. Exendin-4 and exercise promotes beta-cell function and mass through IRS2 induction in islets of diabetic rats [J]. *Life Sci*, 2008, 82(9-10): 503-511.
- [11] Kirsten F. Howlett, Kei Sakamoto, *et al.* Insulin signaling after exercise in insulin receptor substrate-2-deficient mice [J]. *Diabetes*, 2002, 51(2): 479-483.
- [12] Howlett KF, Sakamoto K, Yu H, *et al.* Insulin-stimulated insulin receptor substrate-2-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity is enhanced in human skeletal muscle after exercise [J]. *Metabolism*, 2006, 55(8): 1046-1052.
- [13] Jiang L, Shi M, Guo L, *et al.* Effect of M35, a neuropeptide galanin antagonist on glucose uptake translated by glucose transporter 4 in trained rat skeletal muscle [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 467(2): 178-181.
- [14] Ikemoto T, Hosoya T, Takata K, *et al.* Functional role of neuroendocrine-specific protein-like 1 in membrane translocation of GLUT4 [J]. *Diabetes*, 2009, 58(12): 2802-2812.
- (上接第 331 页)
- [4] 李靖. 体育院校与师范院校体育教育专业人才培养的比较研究 [J]. *西安体育学院学报*, 1999, 16(2): 5.
- [5] 张涵劲, 朱昌义. 我国普通高校体育教育专业体操课程内容设置的基本价值取向研究 [J]. *北京体育大学学报*, 2002, 25(2): 253.
- [6] 北京体育大学, 上海体育学院, 武汉体育学院, 等. 体育教育专业本科体操普修课程教学大纲 [S]. 北京: 体操教研室, 2005-2008.
- [7] 郭红, 何仲涛. 网络远程教学与高校体育教学改革 [J]. *四川体育科学*, 2001(1): 55-57.
- [8] 沈芝萍. 关于高校体教专业体操普修课程新体系的研究 [J]. *北京体育大学学报*, 2003, 26(4): 514-515.
- [9] 马海涛, 赵树耀, 张德强, 等. 高等体育院校体育教育专业体操普修课程教学改革实验研究 [J]. *西安体育学院学报*, 2006, 23(1): 121.
- (上接第 344 页)
- [12] 国家体育总局. 国家队人事管理暂行办法 [EB/OL]. [2011-04-20]. <http://www.sport.gov.cn>
- [13] 民政部, 国家劳动局, 国家体委. 关于招收和分配优秀运动员等问题的联合通知 [EB/OL]. [2011-04-20]. <http://www.sport.gov.cn>
- [14] 杨再淮, 余询. 我国竞技体育后备人才市场与宏观调控机制 [J]. *上海体育学院学报*, 2001, 25(1): 6-10.
- [15] 孔茨. 管理学 [M]. 北京: 经济科学出版社, 1998: 66.
- [16] 梁茂信. “人力资本论”中的劳工迁移观分析 [J]. *求是学刊*, 2007(1): 123-130.
- [17] 黄远翔, 周鹏飞. 我国竞技体育人才交流的现状与对策 [J]. *上海体育学院学报*, 2006(1): 64-66.
- [18] 张培峰, 王兴宇. 对市场经济条件下体育人才流动问题的探讨 [J]. *成都体育学院学报*, 2000, 26(5): 25-27.
- [19] 张杰. P2P 系统中激励相容的机制设计与实现 [D]. 天津: 天津大学, 2007.
- [20] 傅英略. 激励相容: 中国有效银行监管机构构建研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2007.