

· 基础论著 ·

## 2型糖尿病大鼠骨骼肌葡萄糖转运蛋白-4和磷脂酰肌醇-3-激酶与内脂素的关系

魏元元 张绍维 王巍 李鹏飞 张玉敏 罗雨葳 赵文州

**【摘要】 目的** 研究内脂素对糖尿病大鼠骨骼肌葡萄糖转运蛋白4 (GLUT4) 和磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 表达的影响并探讨其机制。**方法** 健康雄性 Wistar 大鼠随机分为普通饲料组(N组)、高脂饲料组(H组)、普通饲料糖尿病模型组(N+S组)及高脂饲料糖尿病模型组(H+S组)。糖尿病模型组大鼠腹腔注射链脲佐菌素造模。造模成功8周后,两组糖尿病大鼠再分别随机分出一组为V+N+S组和V+H+S组,腹腔注射内脂素重组蛋白。采用实时定量 RT-PCR 技术检测骨骼肌 GLUT4 mRNA 表达,Western blot 技术检测 GLUT4 和 PI3K 蛋白表达。**结果** N+S组与N组、H+S组与H组大鼠骨骼肌 GLUT4 mRNA, GLUT4 和 PI3K 蛋白表达水平比较明显减低( $P < 0.05$ )。V+N+S组与N+S组、V+H+S组与H+S组比较均有所升高( $P < 0.05$ )。**结论** 内脂素可能通过增加 PI3K 的蛋白表达影响 GLUT4 的基因表达,导致其蛋白表达增加,从而降低血糖。

**【关键词】** 糖尿病,2型; 烟酰胺磷酸核糖基转移酶; 葡萄糖转运体4型; 1-磷脂酰肌醇3-激酶

**Effect of visfatin on GLUT4 mRNA and PI3K signalling pathway of skeletal muscle in diabetic rats** WEI Yuan-yuan, ZHANG Shao-wei, WANG Wei, LI Peng-fei, ZHANG Yu-min, LUO Yu-wei, ZHAO Wen-zhou. Department of Endocrinology, 202 Hospital of PLA, Shenyang 116044, China  
Corresponding author: ZHANG Shao-wei, Email: zhasw@sina.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of visfatin on GLUT4 mRNA expression and PI3K protein expression in skeletal muscle of diabetic rats and explore its mechanism. **Methods** Wistar rats were randomly divided into four groups: normal diet feeding group (N), high-fat diet feeding group (H), normal diet feeding + streptozotocin (STZ)-induced diabetic group (N+S) and high-fat diet feeding + STZ-induced diabetic group (H+S). Diabetic rats were given intraperitoneal injection of small dose STZ to establish models of type 2 diabetes. Visfatin were intraperitoneally injected in partial rats (V+N+S, V+H+S) from group (N+S) and group (H+S) after 8 weeks of establishment of models. Western blotting were used to assess the protein expression of PI3K and GLUT4. GLUT4 mRNA expression were measured with real time RT-PCR. **Results** GLUT4 mRNA levels, GLUT4 and PI3K protein expression were decreased ( $P < 0.05$ ) in the Group(N+S) compared with group N, and in the Group(H+S) compared with group H, and increased ( $P < 0.05$ ) in the Group(V+N+S) compared with group (N+S), and in the Group(V+H+S) compared with group (H+S) respectively. **Conclusion** Our data show that visfatin may increase GLUT4 mRNA levels and protein expression and lower plasma glucose levels by increase PI3K protein expression in skeletal muscle of diabetic rats.

**【Key words】** Diabetes mellitus, type 2; Nicotinamide phosphoribosyltransferase; Glucose transporter type 4; 1-phosphatidylinositol 3-kinase

内脂素是近年由 Fukuhara 等<sup>[1]</sup>发现的一种具有促进肌肉和脂肪细胞葡萄糖摄取、抑制肝细胞葡萄糖释放、诱导脂肪细胞形成等多种模拟胰岛素样的生物学

效应的脂肪细胞分泌因子。内脂素能够明显增强胰岛素受体底物1(IRS-1)和胰岛素受体底物2(IRS-2)的酪氨酸磷酸化作用,激活胰岛素信号通路中蛋白激酶B(Akt)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)<sup>[2-4]</sup>,也可以通过增加细胞膜葡萄糖转运蛋白-1(GLUT1)的易位而介导葡萄糖的转运活动<sup>[5]</sup>。内脂素降糖机制可能与胰岛素信号转导通路密切相关。骨骼肌是机体利用葡萄糖的主要外周组织,而 GLUT4 介导的葡萄糖转运是骨骼肌组织摄取葡萄糖的关键限速步骤<sup>[6]</sup>。磷脂酰肌醇-3-

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.12.034

基金项目:辽宁省自然科学基金(20092085)

作者单位:116044 沈阳,解放军第202医院内分泌科(魏元元、张绍维、王巍、罗雨葳、赵文州);沈阳医学院环境卫生教研室(李鹏飞、张玉敏)

通讯作者:张绍维,Email:zhasw@sina.com

激酶(PI3K)是胰岛素信号转导通路的关键信号蛋白,可通过影响 GLUT4 转位而介导葡萄糖摄取。本实验对分别采用普通饲料和高脂饲料联合链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠腹腔注射内脂素后,观察其对骨骼肌中 PI3K 和 GLUT4 表达的影响。

## 材料和方法

### 一、实验材料

大鼠内脂素重组蛋白(北京爱迪博生物科技有限公司),链脲佐菌素(美国 Sigma 公司),PI3K(北京博奥森有限公司),GLUT4 和  $\beta$ -actin(美国 Santa Cruze 公司),Trizol Reagent(美国 Invitrogen Life technologies 公司),RT-PCR 试剂盒(大连 TaKaRa 公司),引物由北京华大基因公司合成。

### 二、动物模型的制备及分组

健康清洁级 6 周龄雄性 Wistar 大鼠 60 只,体重约为 180~200 g,购自沈阳医学院实验动物中心。按体重层次随机分为普饲组(N 组)、高饲组(H 组)、普通饲料糖尿病模型组(N+S 组)和高脂饲料糖尿病模型组(H+S 组)四组,按组别分别给予普通和高脂饲料喂养 4 周后,模型组大鼠腹腔注射 2% 链脲佐菌素(45 mg/kg)造模。72 h 后大鼠尾静脉采血,自动血糖仪测血糖,观察血糖持续高于 16.7 mmol/L 为造模成功。8 周后各组大鼠禁食 12 h,N+S 组和 H+S 组大鼠分别随机分出一组为 V+N+S 组和 V+H+S 组,给予内脂素重组蛋白干预(4  $\mu$ g/kg)。普通饲料:脂肪含量为 44.3 g/kg,脂肪供能占 9.9%。高脂高糖饲料:胆固醇 2.5%、蔗糖 10%、猪油 10%、牛胆酸钠 0.4%、基础饲料 77.1%。

### 三、检测项目

1. 空腹血糖(FPG)和空腹血清胰岛素(FINS)水平测定:注射内脂素重组蛋白前及注射后 30 min,自动血糖仪测大鼠尾静脉血糖。腹主动脉取血检测 FPG 和 FINS,并计算胰岛素敏感指数(ISI),公式如下,ISI = ln(1/FBG  $\times$  FINS)。

2. Western blot 测定 GLUT4 及 PI3K 的蛋白表达:取各组大鼠骨骼肌组织匀浆后取上清液,经 10% SDS-PAGE 分离蛋白,电转印至硝酸纤维素膜,5% 脱脂牛奶室温震荡封闭。加入一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,TTBS 洗膜后加入碱性磷酸酶标记的二抗孵育 2 h,充分洗涤后显色,扫描保存。以  $\beta$ -actin 作为内参照,采用美国 FlourChemV2.0 凝胶成像分析软件分析,记录每条蛋白电泳带的灰度值,进行定量分析。

3. 实时定量 RT-PCR 技术测定 GLUT4 mRNA 的表达:骨骼肌组织采用 Trizol 提取组织总 RNA,紫外分

光光度计测定纯度并定量。PCR 反应参数设置 94  $^{\circ}$ C, 5 min 预变性。94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,57  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 31 个循环。最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min 后结束扩增反应。引物序列:GLUT4 上游:5'-GTTGCGGATGCTATGGG-3';下游:5'-CTAAAGTGCTGCGAGGAA-3'(274 bp)。 $\beta$ -actin 上游:5'-CGTGCGTGACATTA-AAGAG-3';下游:5'-TTGCCGATAGTGATGACCT-3'(132 bp)。所得结果用 Ct 值表示,采用比较阈值法计算基因表达,公式为,目的基因的相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,其中  $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{目的基因} - \Delta Ct_{内参基因})_{实验组} - (\Delta Ct_{目的基因} - \Delta Ct_{内参基因})_{对照组}$ 。

### 四、统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件包对结果统计学分析,各项实验数据结果以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,计量资料自身对照采用配对资料的  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析,不符合正态分布的实验数据转化为自然对数后统计。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 实验室指标:实验结束时,V+N+S 和 V+H+S 组大鼠腹腔注射内脂素重组蛋白后尾静脉 FPG 较注射前比较均降低( $P < 0.05$ )。见表 1。N+S 组与 N 组、H+S 组与 H 组大鼠比较腹主动脉血 FPG 明显增高( $P < 0.05$ ),FINS 水平无明显变化( $P > 0.05$ ),ISI 明显下降( $P < 0.05$ )。V+N+S 组与 N+S 组,V+H+S 组与 H+S 组比较 FPG 明显下降( $P < 0.05$ ),FINS 水平仍无明显变化( $P > 0.05$ ),ISI 明显增高( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 V+N+S 组和 V+H+S 组大鼠腹腔注射内脂素重组蛋白前后尾静脉 FPG 比较(mmol/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	注射前	注射后
V+N+S 组	24.36 $\pm$ 0.06	15.93 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>
V+H+S 组	27.09 $\pm$ 0.08	23.16 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>

注:与注射前比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

表 2 各组大鼠 FPG、FINS 和 ISI 比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	FPG (mmol/L)	FINS (mU/L)	ISI
N 组	10	6.39 $\pm$ 0.38	6.67 $\pm$ 0.31	-3.73 $\pm$ 0.210
H 组	10	6.52 $\pm$ 0.58	7.42 $\pm$ 0.40	-3.87 $\pm$ 0.480
N+S 组	9	25.30 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	8.87 $\pm$ 1.23	-5.39 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>
H+S 组	10	27.37 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	9.41 $\pm$ 0.73	-5.55 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>
V+N+S 组	9	16.41 $\pm$ 0.76 <sup>c</sup>	8.70 $\pm$ 0.42	-4.84 $\pm$ 0.52 <sup>c</sup>
V+H+S 组	8	24.80 $\pm$ 0.27 <sup>d</sup>	9.79 $\pm$ 0.17	-5.08 $\pm$ 0.14 <sup>d</sup>

注:与 N 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 H 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 N+S 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 H+S 组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$

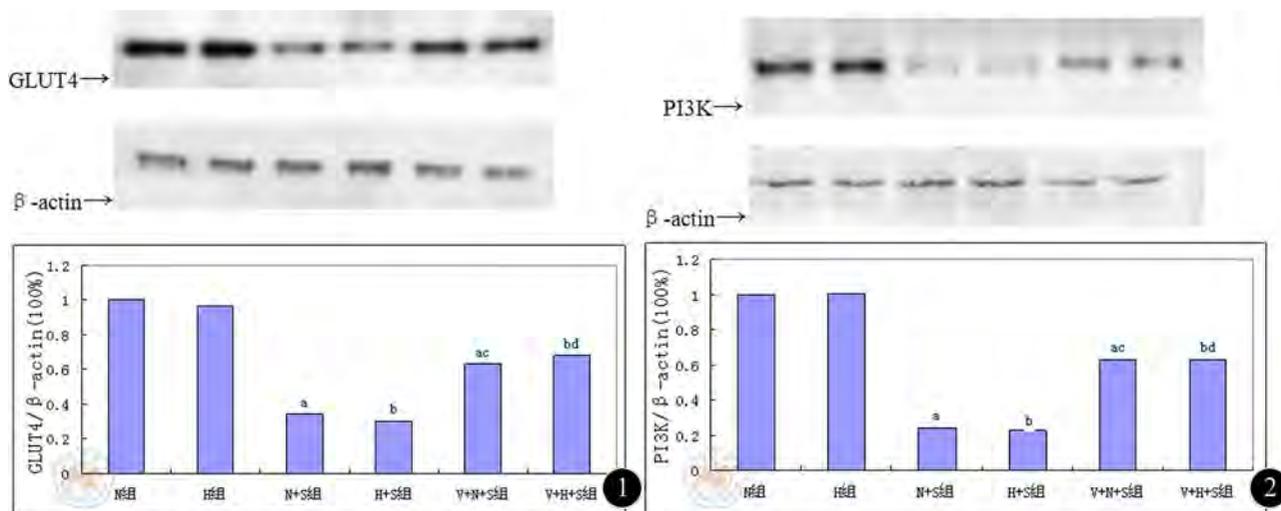


图1 各组大鼠骨骼肌GLUT4蛋白表达水平的比较。与N组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与H组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与N+S组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与H+S组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$  图2 各组大鼠骨骼肌PI3K蛋白表达水平的比较。与N组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与H组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与N+S组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与H+S组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$

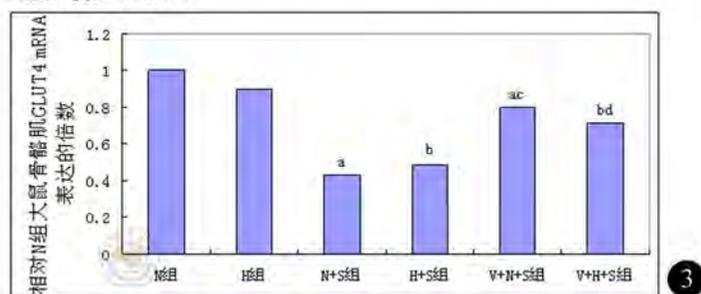


图3 各组大鼠相对对照组骨骼肌GLUT4 mRNA表达的倍数。与N组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与H组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与N+S组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与H+S组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$

2. 各组大鼠骨骼肌 GLUT4 和 PI3K 蛋白表达水平的比较: N + S 组与 N 组、H + S 组与 H 组 GLUT4 和 PI3K 蛋白表达水平比较明显减低 ( $P < 0.05$ )。V + N + S 组与 N + S 组、V + H + S 组与 H + S 组 GLUT4 和 PI3K 蛋白表达水平比较均有所升高 ( $P < 0.05$ ), 但均未接近对照组的蛋白表达。见图 1, 2。

3. 各组大鼠骨骼肌 GLUT4 mRNA 表达水平的比较: N + S 组与 N 组、H + S 组与 H 组大鼠骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 表达量比较均明显下降 ( $P < 0.05$ )。腹腔注射内脂素后, V + N + S 组比 N + S 组、V + H + S 组比 H + S 组 GLUT4 mRNA 的表达均升高 ( $P < 0.05$ )。各组大鼠相对对照组骨骼肌 GLUT4 mRNA 表达倍数的比较, 见图 3。

### 讨 论

中国人糖尿病患病率高, 估算目前最新的流行病学调查研究显示中国 20 岁以上的成年糖尿病患者已达 9240 万人, 并且尚有 1.48 亿人处于糖尿病前期<sup>[7]</sup>。2 型糖尿病患者血浆及内脏脂肪中内脂素浓度较正常人群显著升高<sup>[8-9]</sup>, 而超重的 2 型糖尿病患者血浆内脂

素浓度明显高于正常体重的 2 型糖尿病患者<sup>[10]</sup>, 机体可能通过升高血浆内脂素水平缓解重度肥胖或 2 型糖尿病患者体内胰岛素抵抗所致高糖血症而发挥它的模拟胰岛素作用。Haider 等<sup>[11]</sup>的研究发现内脂素浓度的改变与胰岛素敏感指数 (HOMA) 的改变有关, 且 HOMA、FINS、BMI 变化为内脂素改变的独立预测因素。内脂素可能是调节机体糖代谢稳态的重要机制之一, 在 2 型糖尿病的发生发展过程中起一定作用。

本实验分别采用普通饲料和高脂饲料联合链脲佐菌素诱导两种方法建立大鼠 2 型糖尿病模型, 结果显示, 两种方法建立的 2 型糖尿病模型组 (N + S 组和 H + S 组) 大鼠均出现多饮、多食、多尿, 体重增长放缓等症状, 测定血糖增高, ISI 下降, 提示两种方法均成功建立模型。V + N + S 组和 V + H + S 组 2 型糖尿病大鼠腹腔注射内脂素重组蛋白后尾静脉 FPG 较注射前均下降, FINS 水平无明显变化, ISI 增高也有统计学意义, 提示内脂素可能对胰岛素分泌水平无明显影响, 进一步证实了其具有降低链脲佐菌素诱导的糖尿病模型大鼠血糖的作用, 提示其可能通过促进外周组织转运和利用葡萄糖的能力, 使机体胰岛素敏感指数增高, 降低血

糖。因而可以认为外源性给予内脂素可以部分降低血糖、改善胰岛素敏感性。

关于内脂素降低血糖生理机制的进一步研究结果显示,2型糖尿病模型组(N+S组和H+S组)与对照组(N组和H组)比较骨骼肌PI3K蛋白表达显著减少,这说明糖尿病大鼠骨骼肌中PI3K明显受损,经腹腔注射内脂素后PI3K蛋白表达明显增高,提示内脂素可以逆转骨骼肌组织中PI3K的受损。在H组没有看到有意义的结果,说明单纯高脂喂养没有出现GLUT4和PI3K蛋白表达下调。N+S组和H+S组2种方法诱导的2型糖尿病模型中大鼠骨骼肌GLUT4 mRNA和蛋白表达量与对照组比较均明显下降,这提示链脲佐菌素诱导的糖尿病导致GLUT4 mRNA和蛋白的表达量显著下调,从而引起葡萄糖摄取和利用的障碍。但在高脂饮食诱导的N组大鼠中并未观察到骨骼肌组织GLUT4 mRNA和蛋白表达的下降。V+N+S组和V+H+S组大鼠经内脂素干预后明显增加GLUT4 mRNA和蛋白表达水平,说明内脂素的类胰岛素样降糖作用机制在糖尿病大鼠骨骼肌可能通过增加PI3K与胰岛素受体的结合能力,直接影响GLUT4的基因表达,最终影响葡萄糖的摄取和利用,并且这种调节不仅在转录水平,而且在转录后水平也存在。对于内脂素的降糖作用是否具有剂量-反应关系,有待于后续研究。

#### 参 考 文 献

[1] Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, et al. Visfatin: A protein secre-

ted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, 2005, 307:426-430.

[2] Haider DG, Mittermayer F, Schaller G, et al. Free fatty acids normalize a rosiglitazone-induced visfatin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 291:885-890.

[3] Zhou H, Yang X, Wang NL, et al. Macrostemonoside promotes visfatin expression in 3T3-L1 cells. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30:279-283.

[4] Liu SW, Qiao SB, Yuan JS, et al. Visfatin stimulates production of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-6 in human vein umbilical endothelial cells. *Horm Metab Res*, 2009, 41:281-286.

[5] Kang YS, Song HK, Lee MH, et al. Visfatin is upregulated in type-2 Diabetic rats and targets renal cells. *Kidney Int*, 2010, 78:170-181.

[6] Ren JM, Marshall BA, Gulve EA, et al. Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 1993, 268:16113-16115.

[7] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of Diabetes among Men and Women in China. *N Engl J Med*, 2010, 362:1090-1101.

[8] Hammarsted A, Pihlaimaki J. Rotter Source of resistin and visfatin. *Diabetologia*, 2006, 91:1181-1184.

[9] Dogru T, Sonmez A, Tascia I, et al. Plasma visfatin levels in patients with newly diagnosed and untreated type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract*, 2007, 76:24-29.

[10] Sandeep S, Velmurugan K, Deepa R, et al. Serum visfatin in relation to visceral fat, obesity, and type 2 diabetes mellitus in Asian Indians. *Metabolism*, 2007, 56:565-570.

[11] López-Bermejo A, Chico-Julit B, Fernández-Balsells M, et al. Serum visfatin increases with progressive beta-cell deterioration. *Diabetes*, 2006, 55:2871-2875.

(收稿日期:2012-09-27)

(本文编辑:戚红丹)

魏元元,张绍维,王巍,等.2型糖尿病大鼠骨骼肌葡萄糖转运蛋白4和磷脂酰肌醇-3-激酶与内脂素的关系[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2013,7(12):5378-5381.

中 华 临 床 医 师 杂 志