

· 实验研究 ·

NOD 受体在大鼠骨骼肌胰岛素抵抗中的作用*

赵健亚, 刘天娥, 肖静, 王晓珂

摘要:目的 探讨核苷酸结合寡聚化结构域(NOD)受体在高脂膳食诱导的不同肥胖易感大鼠骨骼肌胰岛素抵抗中的作用。方法 将雄性 SD 大鼠随机分为对照组和高脂组,分别喂以基础饲料和高脂饲料,8 周后高脂组筛选出肥胖易感组和肥胖抵抗组,继续喂养至 19 周进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT),20 周后处死大鼠,比较 Lee's 指数、脂/体比和胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),实时荧光定量 PCR 检测骨骼肌葡萄糖转运体 4(GLUT4)、NOD1 和 NOD2 mRNA 表达水平。结果 与对照组和肥胖抵抗组比较,肥胖易感组大鼠体重[(770.1 ± 45.9)g]、脂/体比[(7.1 ± 0.6)%]、空腹胰岛素水平[(74.76 ± 6.49)μIU/mL]、HOMA-IR(3.03 ± 0.10)均明显升高($P < 0.01$);与对照组比较,肥胖抵抗组大鼠体重无明显变化, Lee's 指数(313.9 ± 7.3)、脂/体比[(5.6 ± 0.8)%]和 HOMA-IR(1.77 ± 0.11)明显升高(P 均 < 0.05);与对照组和肥胖抵抗组比较,肥胖易感组大鼠骨骼肌组织 GLUT4 mRNA(0.66 ± 0.09)表达下调(P 均 < 0.05),NOD2 mRNA(1.27 ± 0.07)表达上调($P < 0.05$)。结论 高脂膳食可能通过激活大鼠骨骼肌 NOD2 表达参与该组织胰岛素抵抗。

关键词:高脂膳食;肥胖;核苷酸结合寡聚化结构域(NOD);胰岛素抵抗;骨骼肌

中图分类号:R 589.2 文献标志码:A 文章编号:1001-0580(2013)12-1785-03 DOI:10.11847/zgggws2013-29-12-21

Role of NOD receptor in insulin resistance of rat skeletal muscle

ZHAO Jian-ya, LIU Tian-e, XIAO Jing, et al (Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Nantong University, Nantong, Jiangsu Province 226019, China)

Abstract: Objective To investigate the role of nucleotide binding oligomerization domain(NOD)receptor in insulin resistance of skeletal muscle in different obesity susceptible rats induced by high fat diet. **Methods** Male Sprague-Dawley(SD)rats were randomly divided into control group and high fat group fed with normal and high-fat diet, respectively. The rats in high fat group were subdivided into obesity-prone(OP)group and obesity-resistant(OR)group at 8th week. Oral glucose tolerance test(OGTT)was performed at 19th week and all the rats were sacrificed at 20th week. Lee's index, fat content and homeostasis model assessment of insulin resistance(HOMA-IR)were measured. Glucose transporter 4(GLUT4), NOD1 and NOD2 mRNA expression were determined with real-time PCR. **Results** Body weight, fat content, fasting insulin level and HOMA-IR in rats of OP group were higher than control and OR group ($P < 0.01$). Though there was no difference in body weight between rats in OR and control group, OR group showed higher Lee's index, fat content and HOMA-IR compared with those of the control group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Expression of GLUT4 mRNA in rat skeletal muscle of OP group was down-regulated and NOD2 mRNA was significantly up-regulated than those of the control and OR group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** High fat diet might be a NOD2 activator in rat skeletal muscle and play an important role in skeletal muscle insulin resistance.

Key words: high fat diet; obesity; nucleotide binding oligomerization domain; insulin resistance; skeletal muscle

胰岛素抵抗是肥胖引起其它代谢性疾病过程中的重要环节^[1],研究表明固有免疫激活和慢性低度炎症反应与胰岛素抵抗发生发展有关^[2]。固有免疫系统通过特异性模式识别受体感知病原相关分子模式,是机体防御病原体入侵的第一道防线。核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide binding oligomerization domain, NOD)受体位于胞质,参与胞内病原体的识别,其主要成员 NOD1 和 NOD2 可识别细菌细胞壁的保守结构参与固有免疫应答诱导炎症反应^[3],也可被非细菌性物质(如膳食脂肪酸)激活诱导非感染性炎症反应^[4],这可能与肥胖和胰岛素抵抗伴随的慢性炎症状态有关。目前仅有个别人工合成配体激活剂和抑制剂的研究发现 NOD1/NOD2

活化与肌肉、脂肪、肝脏和肾脏细胞胰岛素抵抗有关^[5-9],缺少其它膳食来源和/或肥胖相关 NOD 激活因子的研究。Levin 等^[10]发现相同高脂膳食条件下,一部分大鼠肥胖易感,另一部分则肥胖抵抗,本研究通过高脂膳食构建不同肥胖易感大鼠模型,观察胰岛素抵抗相关指标,探讨葡萄糖转运体 4(glucose transporter 4, GLUT4)、NOD1 和 NOD2 激活在骨骼肌胰岛素抵抗中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 7600-020E 全自动生化分析仪(日本日立公司);LC-480 实时荧光定量 PCR 仪(德国罗氏公司);ACCU-CHEK 血糖仪和试纸

* 基金项目:国家自然科学基金(81202228)

作者单位:南通大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室,江苏 南通 226019

作者简介:赵健亚(1980-),女,江苏江阴人,讲师,硕士,研究方向:营养与疾病。

通讯作者:王晓珂, E-mail: wxkel11@hotmail.com

数字出版日期:2013-11-16 12:29

数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20131116.1229.002.html>

(德国罗氏诊断有限公司);血糖测定试剂盒(北京中生北控生物科技股份有限公司);胰岛素放免试剂盒(北京北方生物技术研究所);Trizol(美国 Invitrogen 公司);Primer Script RT reagent kit 和 SYBR® Premix Ex Taq™ II(日本 Takara 公司)。

1.2 动物分组与处理 雄性 SD 大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司)30 只,体重(120 ± 10)g, SPF 级,许可证号:SCXK(沪)2008-0016,适应性喂养 5 d 后随机分成对照组(6 只,基础饲料,总能量为 3.52 kcal/g,脂肪供能比 13.8%)和高脂组(24 只,高脂饲料,总能量为 4.67 kcal/g,脂肪供能比 45.0%,猪油为主要脂肪来源),饲料购自上海斯莱克实验动物有限公司。喂养 8 周后将高脂组大鼠体重大于对照组平均体重 + 1.96 倍标准差的纳入肥胖易感组(9 只,取体重大的 6 只),体重小于对照组平均体重 + 1 倍标准差的纳入肥胖抵抗组(共 7 只,取体重小的 6 只),继续高脂喂养,体重介于二者间的大鼠剔除。

1.3 口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT) 喂养 19 周后,大鼠禁食不禁水 16 h,先用罗氏血糖仪检测尾血 0 点血糖,灌胃葡萄糖溶液(2 g/kg)后 30、60、90、120 min 测尾血血糖值,并计算 OGTT 曲线下面积(AUC)。

1.4 取材及指标测定 每周定时称体重 1 次,至 20 周末将大鼠禁食不禁水 12 h 后麻醉处死,测量鼻尖到肛门长度,计算 Lee's 指数 = $\sqrt[3]{\text{体重(g)}} \times 1000/\text{体长(cm)}$;采股动脉血,分离血清,按试剂盒说明测空腹血糖和胰岛素水平,胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR) = [空腹血糖(mmol/L) × 胰岛素(μIU/mL)]/22.5,取自然对数转化为正态分布;分离大鼠

肾周脂肪和睾周脂肪组织并称量,计算脂/体比(%) = [肾周脂肪重量(g) + 睾周脂肪重量(g)] × 100% / 体重(g);分离一侧骨骼肌,取部分按 Trizol 说明书提总 RNA,测浓度后取 2.5 μg 总 RNA 按试剂盒说明逆转录合成 cDNA,由 Invitrogen 公司合成引物(表 1),反应体系在 LC-480 实时荧光定量 PCR 仪上进行。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	片段(bp)
β-actin	上游 - CTCCGGAGTCCATCACAATG	200
	下游 - CTACAATGAGCTGCGTGTGG	
GLUT4	上游 - GCAGCTCTCAGGCATCAATG	150
	下游 - CCAGCTCGCTCTACTAAGAG	
NOD1	上游 - TGAGGGTGAACCAGACACTG	185
	下游 - GAAACAGATGATCCGCTTCTC	
NOD2	上游 - GCAGAACTTCTATCTCTGAG	169
	下游 - GTGATCAGCCACAACCTTCAG	

1.5 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用最小显著差法分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重、Lee's 指数和体脂含量变化(表 2) 20 周时,肥胖易感组大鼠体重明显高于对照组和肥胖抵抗组($t = 8.64, 6.63, P < 0.01$);与对照组比较,肥胖易感和肥胖抵抗组大鼠 Lee's 指数明显升高($t = 6.44, 5.87, P < 0.01$);肥胖易感组大鼠脂/体比高于对照组和肥胖抵抗组,差异均具有统计学意义($t = 5.94, 3.19, P < 0.01$),肥胖抵抗组大鼠脂/体比高于对照组($t = 3.07, P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠体重、Lee's 指数和体脂含量比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体重(g)			Lee's 指数	脂/体比(%)
	0 周	8 周	20 周		
对照组	147.4 ± 7.6	468.88 ± 21.9	608.4 ± 23.8	295.5 ± 3.4	4.4 ± 0.3
肥胖易感组	148.3 ± 6.3	560.89 ± 27.7 ^{ab}	770.1 ± 45.9 ^{ab}	318.1 ± 4.5 ^a	7.1 ± 0.6 ^{ab}
肥胖抵抗组	145.3 ± 4.0	483.91 ± 17.9	641.8 ± 37.0	313.9 ± 7.3 ^a	5.6 ± 0.8 ^a
F 值	0.416	33.950	40.513	26.323	17.761
P 值	0.666	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较, a $P < 0.01$;与肥胖抵抗组比较, b $P < 0.01$ 。

2.2 各组大鼠空腹血糖、胰岛素、HOMA-IR 和 OGTT 变化(表 3) 3 组大鼠空腹血糖水平差异无统计学意义($P > 0.05$),肥胖易感组大鼠胰岛素水平和 HOMA-IR 明显高于对照组($t = 17.43, 17.17, P < 0.01$)和肥胖抵抗组($t = 15.91, 14.25, P < 0.01$);OGTT 试验结果显示,肥胖易感组大鼠

血糖在 60、90、120 min 各时间点均高于对照组($t = 2.76, 4.43, 3.33, P$ 均 < 0.05)和肥胖抵抗组($t = 3.39, 4.03, 2.59, P$ 均 < 0.05);肥胖易感组大鼠 AUC 明显高于对照组($t = 3.77, P < 0.01$)和肥胖抵抗组($t = 3.65, P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠空腹血糖、胰岛素、HOMA-IR 和 AUC 比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	空腹血糖 (mmol/L)	胰岛素 (μ IU/mL)	ln(HOMA-IR)	AUC
对照组	5.90 \pm 0.36	18.44 \pm 3.00	1.57 \pm 0.13	21.18 \pm 1.68
肥胖易感组	6.28 \pm 0.10	74.76 \pm 6.49 ^{bc}	3.03 \pm 0.10 ^{bc}	25.56 \pm 2.28 ^{bc}
肥胖抵抗组	5.95 \pm 0.21	23.35 \pm 3.41	1.77 \pm 0.11 ^a	21.32 \pm 1.44
F 值	2.777	186.336	168.846	9.196
P 值	0.115	0.000	0.000	0.004

注:与对照组比较, a $P < 0.05$, b $P < 0.01$; 与肥胖抵抗组比较, c $P < 0.01$ 。

2.3 各组大鼠骨骼肌 GLUT4、NOD1 和 NOD2 mRNA 表达水平变化(表 4) 与对照组和肥胖抵抗组比较,肥胖易感组大鼠骨骼肌组织 GLUT4 mRNA 水平明显下调($t = 3.77, 2.63, P$ 均 < 0.05);3 组大鼠骨骼肌 NOD1 mRNA 表达无明显差异($P > 0.05$);肥胖易感组大鼠 NOD2 mRNA 水平比对照和肥胖抵抗组明显上调($t = 2.58, 2.76, P < 0.05$)。

表 4 各组大鼠骨骼肌 GLUT4、NOD1 和 NOD2 mRNA 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	GLUT4	NOD1	NOD2
对照组	1.02 \pm 0.08	1.02 \pm 0.18	0.98 \pm 0.06
肥胖易感组	0.66 \pm 0.09 ^{bc}	1.01 \pm 0.09	1.27 \pm 0.07 ^{ac}
肥胖抵抗组	0.86 \pm 0.10	1.07 \pm 0.16	0.96 \pm 0.22
F 值	7.175	0.183	4.546
P 值	0.07	0.835	0.038

注:与对照组比较, a $P < 0.05$, b $P < 0.01$; 与肥胖抵抗组比较, c $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究结果显示,肥胖易感大鼠腹部脂肪蓄积,有高胰岛素血症和胰岛素抵抗现象;而肥胖抵抗大鼠体重虽无变化,但 Lee's 指数、脂/体比和 HOMA-IR 高于对照组,可见肥胖抵抗大鼠也存在脂肪蓄积和胰岛素敏感性下降,但程度比肥胖易感组轻。骨骼肌是机体利用葡萄糖的主要组织,葡萄糖借助细胞膜上葡萄糖转运因子 GLUT4 跨膜进入骨骼肌。本研究结果表明,肥胖易感大鼠骨骼肌 GLUT4 mRNA 水平比对照与肥胖抵抗组明显下调,而肥胖抵抗组与对照组之间无明显差异,提示仅肥胖易感大鼠出现了骨骼肌摄取葡萄糖异常现象。

NOD1 和 NOD2 蛋白可识别胞内细菌细胞壁肽聚糖的独特亚结构,参与固有免疫应答从而诱导炎症反应。研究发现,NOD1 激活后诱导小鼠和人脂肪细胞炎症反应、降低葡萄糖摄取^[7-8];NOD2 激活后可诱导肌细胞自发胰岛素抵抗^[5];腹腔注射 NOD1 激活剂后 6 h 小鼠产生全身胰岛素抵抗,肝脏和脂肪组织发生炎症反应,骨骼肌葡萄糖摄取减

少,但仅在 NOD2 活化后骨骼肌才出现炎症反应^[6],提示不同类型细胞对 NOD1 和 NOD2 激活配体的识别具有差异。本研究结果显示,3 组大鼠骨骼肌 NOD1 mRNA 表达无明显差异,但肥胖易感组大鼠 NOD2 mRNA 表达明显上调,表明大鼠骨骼肌胰岛素抵抗与 NOD2 活化可能有关,而与 NOD1 无关。与文献[5-6]报道一致。Zhao 等^[4]曾报道月桂酸(C12:0)可激活人结肠癌 HCT116 细胞 NOD1 和 NOD2 表达,而本研究采用的高脂膳食主要脂肪来源是富含饱和脂肪酸的猪油,推测高脂膳食可能是大鼠骨骼肌 NOD2 的激活因子。

参考文献

- [1] 宋爽,徐慧兰,肖水源,等.糖尿病家族史、饮食及肥胖与糖尿病交互作用[J].中国公共卫生,2012,28(2):159-160.
- [2] Kolb H, Mandrup-Poulsen T. The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation [J]. Diabetologia, 2010, 53(1): 10-20.
- [3] Le Bourhis L, Benko S, Girardin SE. Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders [J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(Pt 6): 1479-1484.
- [4] Zhao L, Kwon MJ, Huang S, et al. Differential modulation of Nods signaling pathways by fatty acids in human colonic epithelial HCT116 cells [J]. J Biol Chem, 2007, 282(16): 11618-11628.
- [5] Tamrakar AK, Schertzer JD, Chiu TT, et al. NOD2 activation induces muscle cell-autonomous innate immune responses and insulin resistance [J]. Endocrinology, 2010, 151(12): 5624-5637.
- [6] Schertzer JD, Tamrakar AK, Magalhães JG, et al. NOD1 activators link innate immunity to insulin resistance [J]. Diabetes, 2011, 60(9): 2206-2215.
- [7] Zhou YJ, Zhou H, Li Y, et al. NOD1 activation induces innate immune responses and insulin resistance in human adipocytes [J]. Diabetes Metab, 2012, 38(6): 538-543.
- [8] Zhao L, Hu P, Zhou Y, et al. NOD1 activation induces proinflammatory gene expression and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011, 301(4): E587-E598.
- [9] Du P, Fan B, Han H, et al. NOD2 promotes renal injury by exacerbating inflammation and podocyte insulin resistance in diabetic nephropathy [J]. Kidney Int, 2013, 84(2): 265-276.
- [10] Levin BE, Triscari J, Hogan S, et al. Resistance to diet-induced obesity: food intake, pancreatic sympathetic tone, and insulin [J]. Am J Physiol, 1987, 252: R471-R478.