文章编号:1000-5404(2005)01-0009-03

论著

慢性缺氧对大鼠骨骼肌胰岛素受体的影响及其在增强葡萄糖摄取能力中的作用

黄 缄,范有明,高钰琪,黄庆愿,罗德成,孙秉庸 (第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 从组织胰岛素受体变化及其对组织葡萄糖摄取能力的影响方面探讨缺氧习服的机制。**方法** 将大鼠置模拟海拔5 000 m低压舱内,30 d后取动脉血,测定血气、血浆胰岛素、血糖等,取双后肢骨骼肌测定在有或无胰岛素刺激下的葡萄糖摄取率,通过Scatchard分析胰岛素受体结合位点密度数及其亲和力。以平原大鼠为对照。**结果** 缺氧组大鼠血糖、血胰岛素以及骨骼肌中胰岛素受体高、低亲和力两种结合位点的密度,均显著高于对照组($P<0.05$)。有或无胰岛素刺激时的葡萄糖摄取率及其增量值,在缺氧组均非常显著地高于对照组($P<0.01$)。胰岛素受体的解离常数在缺氧与对照组之间没有显著性差异。**结论** 经30 d低压缺氧后,大鼠骨骼肌胰岛素受体密度显著增加,对胰岛素反应能力增强,是组织葡萄糖摄取方面对胰岛素信号反应能力增强的机制之一。

关键词: 缺氧;胰岛素受体;葡萄糖摄取;骨骼肌
中图法分类号: R322.74; R337; R339.54 **文献标识码**: A

Characteristics of insulin receptors and effects on glucose uptake of rat skeletal muscles after hypoxic acclimatization

HUANG Jian, FAN You-ming, GAO Yu-qi, HUANG Qing-yuan, LUO De-cheng, SUN Bing-yong (Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the characteristic of insulin receptors and their effects on glucose transport in rat skeletal muscles after hypoxic acclimatization. **Methods** Wistar rats in the hypoxic group were exposed to hypobaric hypoxic chamber simulating altitude 5 000 m for 30 d, while those in the control group at sea level. The artery blood gases, the concentrations of serum glucose and insulin, and the levels of glucose in skeletal muscle were determined. The glucose uptake rate of skeletal muscle stimulated by insulin was detected by ^{3}H-deoxy-glucose *in vitro*. The number of binding site and affinity of insulin receptor was analyzed by Scatchard. **Results** The glucose and insulin in blood and the glucose in skeletal muscle were higher in hypoxic group than those in the normal group. Compared with that in non-insulin group, the uptake rate stimulated by insulin increased significantly in both the hypoxic group and control group. The increment value of uptake in the hypoxic group was significantly higher than that in the control group ($P<0.01$). The number of insulin receptors in the hypoxic group was more than that in the control group. **Conclusion** Hypoxia may increase the number of insulin receptors in skeletal muscle, which may be the very important mechanism through which glucose uptake ability increases after hypoxia acclimatization.

Key words: hypoxia; insulin receptor; glucose transport; acclimatization; skeletal muscle

我们以往的研究结果显示,经过30 d缺氧后组织对葡萄糖摄取利用增强[1],但是其有关机制尚不清楚。葡萄糖摄取是由葡萄糖转运体(glucose transporter, GLUT)蛋白介导的。哺乳动物肌肉细胞中,绝大多数GLUT,尤其是GLUT4潴留于细胞内特定的膜性小泡内[2,3],只有转位于细胞膜上才能行使其功能。胰岛素是调节组织和细胞中葡萄糖转运最重要的激素,自从其被发现以来,一直被视为调节葡萄糖转运最原始的信号分子。它通过与胰岛素受体结合后引起含有葡萄糖转运体的囊泡向细胞膜转位[4,5],调节细胞葡萄糖摄取的速度。因而胰岛素-胰岛素受体信号的变化可能是缺氧习服过程中葡萄糖摄取能力增强的重要机制,但是在缺氧习服过程之中,胰岛素受体密度及其亲和力的变化特点以及这些变化在缺氧习服时葡萄糖摄取能力增强中的作用等方面尚缺乏深入研究。本研究从血糖、血胰岛素、胰岛素刺激后骨骼肌葡萄糖摄取特性、胰岛素受体结合位点及亲和常数等方面研究缺氧

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30393131,39730190,30200130)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30393131, 39730190, and 30200130)
作者简介:黄 缄(1968-),男,湖北省仙桃市人,博士,讲师,主要从事缺氧病理生理学方面的研究。电话:(023)60662834,E-mail: hj8686@yahoo.com
通讯作者:高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail: gaoy66@yahoo.com
收稿日期:2004-07-19;**修回日期**:2004-10-20

习服过程中胰岛素受体的变化特点。

1 材料与方法

1.1 试剂与动物

猪胰岛素(Sigma), ^{3}H-2-D-葡萄糖(^{3}H-2-DG,20 mCi/mg, 中国科学院原子能研究所), ^{125}I-胰岛素(中国科学院原子能研究所)。成年 Wistar 大鼠 20 只,体质量(180 ± 15)g (第三军医大学实验动物中心提供)。

1.2 分组及动物缺氧

动物随机分为对照组、缺氧组,每组 10 只。缺氧组除每天用 1 h 返回平原状态进行清洁、喂食外,其余时间均在海拔 5 000 m 低压舱内饲养。对照组大鼠在平原动物房内饲养。30 d 后大鼠在同海拔高度的低压舱内从颈总脉取血测血糖及血气,取大鼠双后肢骨骼肌测定葡萄糖摄取率,并进行胰岛素结合实验。

1.3 血气、血胰岛素、血糖测定

血气用美国 IL1303 型血气分析仪测定,血胰岛素采用放免法,血糖测定采用葡萄糖氧化酶法。

1.4 离体葡萄糖摄取测定

参考 Ludvigsen[6] 和 Turinsky[7] 的方法,将骨骼肌撕成肌丝置 KRBB 于缓冲液、pH 7.5 的保温瓶内,37 ℃振摇预温 30 min,将肌肉转移到含有或不含胰岛素的新鲜 KRBB 中保温 2 h,随后各管加入 ^{3}H-2-脱氧葡萄糖孵育 30 min,加入冷 KRBB 以终止反应。肌肉匀浆去蛋白后离心取上清液进行液闪计数。摄取率用 $pmol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$ 表示。

1.5 胰岛素受结合分析

按文献[8]操作进行,用 Prism 软件以双位点模式计算结合位点数(B_{max})及解离常数(Kd)。

1.6 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS11.0 进行双因素方差分析、t 检验。

2 结果

2.1 血红蛋白、血气等参数的变化

血红蛋白、血气等参数的变化:如表 1 所示,缺氧组红细胞数(red blood cell, RBC)、血红蛋白(hemoglobin, Hb)含量均显著高于对照组($P < 0.01$)。血液 pH 值、血氧饱和度(PaO_2)以及动脉 CO_2 分压($PaCO_2$)与对照组没有显著性差异($P > 0.05$)。缺氧组动脉氧分压显著低于对照组($P < 0.01$)。

表 1 缺氧对血红蛋白、血气等参数的影响 ($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of hypobaric hypoxia on hemoglobin, red blood cell and blood gases ($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Index	RBC ($\times 10^{12}$/L)	Hb (ρ/g·L^{-1})	pH	PaO_2 (p/kPa)	$PaCO_2$ (p/kPa)	SaO_2 (%)
Control	7.00 ± 1.01	121.10 ± 10.13	7.32 ± 0.05	11.58 ± 0.77	6.03 ± 0.79	98.93 ± 6.49
Hypoxia	9.29 ± 1.70▲	174.50 ± 20.91▲	7.33 ± 0.04	9.06 ± 0.72▲	5.95 ± 0.58	89.66 ± 13.64

▲: $P < 0.01$, *vs* control

2.2 血糖,血胰岛素及葡萄糖摄取率

见表 2,缺氧组血糖、血胰岛素较对照组有显著增加($P < 0.05$),骨骼肌中葡萄糖水平显著高于对照组($P < 0.01$)。

表 2 缺氧对血胰岛素、血糖、骨骼肌葡萄糖含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of hypoxic acclimatization on contents of plasma insulin and glucose in blood and in skeletal muscles ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Blood glucose (C_B/mmol·L^{-1})	Skeletal muscle glucose (b_B/μmol·g^{-1})	Insulin (μIU/ml)
Control	6	5.38 ± 0.61	2.84 ± 0.19	22.47 ± 3.18
Hypoxia	6	6.08 ± 0.42△	3.58 ± 0.14▲	26.24 ± 5.00△

△: $P < 0.05$, ▲: $P < 0.01$, *vs* control

2.3 胰岛素对骨骼肌葡萄糖摄取的刺激作用

结果见表 3,孵育液中有或者无胰岛素时,缺氧组骨骼肌的葡萄糖摄取率均非常显著高于平原对照组($P < 0.01$)。胰岛素刺激所引起的增值,缺氧组显著高于对照组($P < 0.01$)。

无论是对照组,还是缺氧组,孵育液中存在胰岛素时,骨骼肌葡萄糖摄取率均较未加胰岛素时增加($P < 0.01$)。

通过双因素方差分析,缺氧因素与胰岛素刺激因素对骨骼肌葡萄糖摄取存在交互作用,而且具有显著统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 骨骼肌细胞膜胰岛素受体结合位点分析

见表 4,胰岛素受体高亲和力结合位点(high)、低亲和力结合位点(low)两种结合位点的数量(或称密度,B_{max})缺氧组均高于对照组,并具有非常显著性统计学差异($P < 0.01$)。两种亲和力结合位点的解离常数(Kd)在缺氧组与对照组之间的差异没有显著性意义($P > 0.05$)。

表 3 胰岛素对缺氧骨骼肌葡萄糖摄取的刺激效应 ($pmol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Changes of glucose uptake of skeletal muscles after hypoxia induced by insulin ($pmol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Group	n	Insulin (−)	Insulin (+)	Addup
Control	6	2.32 ± 0.62	4.73 ± 1.91	2.41 ± 1.35
Hypoxia	6	4.22 ± 1.11▲	9.24 ± 1.45▲	5.01 ± 0.65▲

▲: $P < 0.01$, *vs* control

表 4 缺氧对骨骼肌细胞膜胰岛素受体结合位点的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Scatchard analysis of insulin receptors in skeletal muscles after hypoxia ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Affinity	B_{max} (fmol/μg)	Kd(nmol/L)
Control	6	High	0.994 ± 0.461	0.892 ± 0.072
	6	Low	37.105 ± 12.643	266.550 ± 49.057
Hypoxia	6	High	2.574 ± 0.262▲	0.906 ± 0.133
	6	Low	84.075 ± 11.7 67▲	265.317 ± 18.955

▲: $P < 0.01$, *vs* control

3　讨论

肌肉组织是葡萄糖消耗的主要器官。肌肉对葡萄糖的摄取主要依靠位于细胞膜上的葡萄糖转运体[9]。骨骼肌 GLUT4 受胰岛素-胰岛素受体信号的调节[10,11]。实验发现，缺氧组血浆胰岛素水平显著高于对照组。其原因是多方面的，随着缺氧习服过程的延长，内分泌系统对胰岛的调节作用以及胰岛氧供的逐步改善使得胰岛素分泌功能得以恢复。同时经过缺氧习服后，由于肺通气增强，以及组织毛细血管密度增加等，组织氧供缺乏已不是主要矛盾，此时能源物质选择性利用发生变化，对葡萄糖的依赖下降，因而血糖水平增高，血糖的增高是胰岛素水平增高的重要原因。缺氧组胰岛素受体两种亲和力的结合位点均显著高于对照组，而两种结合位点的解离常数在两组之间没有显著性差异，因而经过 30 d 的缺氧习服之后，骨骼肌组织中胰岛素受体的变化主要在于密度的变化，其性质没有明显变化。密度的增加可能与缺氧刺激引起胰岛素受体的基因表达增强有关。

血浆胰岛素水平及组织中胰岛素受体密度的变化必然影响组织葡萄糖摄取。如表 3 所示，在没有胰岛素刺激时，缺氧组骨骼肌对葡萄糖的摄取率显著高于对照组，其原因可能是由于组织在体时已经受到胰岛素-胰岛素受体信号的作用，动员贮存的葡萄糖转运体向细胞膜表面转位，使细胞膜表面的葡萄糖转运体密度增加。因为缺氧组血浆胰岛素水平显著高于对照组，而且骨骼肌胰岛素受体高，低亲和力结合位点数也显著高于对照组。

当用外源性胰岛素作用于骨骼肌组织时，缺氧组葡萄糖摄取率增加值显著高于对照组。说明经过缺氧习服后，除了可动员的葡萄糖转运体数量增多或活性增强之外，可动员的胰岛素受体信号传导能力也增强。前者已为我们的实验所证实[1]，后者可以从缺氧组胰岛素受体密度增加得到解释。因此，缺氧习服后，胰岛素受体密度增加，使得骨骼肌葡萄糖摄取对胰岛素刺激的反应能力增加，为骨骼肌组织再次受到应激时提高葡萄糖摄取率奠定了基础。

通过双因素方差分析，并对胰岛素及缺氧两种因素对葡萄糖摄取率的交互效果进行统计学分析发现，两者的交互效应具有显著性统计学意义（$P < 0.05$），说明胰岛素与缺氧具有叠加效应。因此，缺氧习服在增强葡萄糖转运体表达及贮备的同时，也为胰岛素的刺激准备了更多的受体。胰岛素-胰岛素受体相互作用后，可以动员处于贮备状态的葡萄糖转运体（如葡萄糖转运体-4）向细胞膜转位，使细胞膜上葡萄糖转运体密度增加[10]。所以，当加入胰岛素后，各组均较未加胰岛素时葡萄糖摄取率有显著增强。

总之，经过缺氧习服后，骨骼肌葡萄糖摄取能力贮备增强除了可动员的葡萄糖转运体的数量增加有关外，胰岛素受体密度增加，组织对胰岛素敏感性增强也是此能力贮备增强的另一机制。此两种能力的增强使组织更加容易强化葡萄糖利用以节约用氧，因而有利于机体生存于更高程度的缺氧环境。

参考文献：

[1] 黄　缄，高钰琪，张国斌，等. 大鼠缺氧习服后骨骼肌葡萄糖摄取的特点[J]. 第三军医大学学报，2004，26(1)：5－7.

[2] Wardzala L J, Jeanrenaud B. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat diaphragm. Apparent translocation of intracellular transport units to the plasma membrane[J]. J Biol Chem, 1981, 256(14): 7090－7093.

[3] Suzuki K, Kono T. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980, 77(5): 2542－2545.

[4] Rodrigues N R, Wannmacher C M, Dutra Filho C S, *et al*. Effect of phenylalanine, p-chlorophenylalanine and alpha-methylphenylalanine on glucose uptake *in vitro* by the brain of young rats[J]. Biochem Soc Trans, 1990, 8 (3): 419.

[5] 许霖林，吴喜贵. 严重烫伤肌肉葡萄糖摄取障碍机理的研究[J]. 第三军医大学学报，1995，17(6)：467－469.

[6] Ludvigsen C, Jarett L. A comparison of basal and insulin-stimulated glucose transport in rat adipocyte plasma membranes[J]. Diabetes, 1980, 29(5): 373－378.

[7] Turinsky J, Patterson S A. Proximity to a burn wound as a new factor in considerations of postburn insulin resistance[J]. J Surg Res, 1979, 26 (2): 171－174.

[8] 张　平，张忠辉. 钒酸钠降糖作用与胰岛素受体、葡萄糖摄取的研究[J]. 第三军医大学学报，1995，17(6)：499－502.

[9] Gould G W, Holman G D. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression[J]. Biochem J, 1993, 295 (Pt2): 329－341.

[10] Pessin J E, Thurmond D C, Elmendorf J S, *et al*. Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location [J]! J Biol Chem, 1999, 274(5): 2593－2596.

[11] Ezaki O. Regulatory elements in the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 241(1): 1－6.

（编辑　刘洪娥）