论著

文章编号:1000-5404(2010)09-0926-04

不同运动强度下糖尿病大鼠骨骼肌胰岛素受体 mRNA 表达及氧化应激变化

钱 荣[1],谈 艳[2],汪宗宝[2],叶 红[1] (233000 安徽 蚌埠,蚌埠医学院护理学系内科护理学教研室[1];200438 上海,上海体育学院运动科学学院[2])

[摘要] **目的** 观察不同运动强度下糖尿病大鼠骨骼肌胰岛素受体(insulin receptor,InsR) mRNA 表达及氧化应激变化。**方法** 将 SD 大鼠分为 5 组:正常对照组(A 组)、糖尿病非运动组(B 组)、糖尿病小强度运动组(C 组)、糖尿病中等强度运动组(D 组)和糖尿病大强度运动组(E 组),每组 6 只。采用高糖高脂饮食饲养 4 周后一次性腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)制备糖尿病大鼠模型。6 周跑台运动(小强度、中等强度、大强度运动的跑台速度分别为 10、20、35 m/min)前后检测空腹血糖(FBG)、空腹血清胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)含量,通过逆转录-聚合酶链反应测定 InsR mRNA 表达水平。**结果** 小强度、中强度、大强度运动组 InsR mRNA 表达水平分别为(0.55±0.05)、(0.53±0.04)、(0.41±0.05),与糖尿病非运动组(0.46±0.08)相比,中、小强度运动组 mRNA 表达水平均显著增加($P<0.05$)。6 周运动后,中、小强度运动组 SOD 活性较运动前明显增加($P<0.01$),大强度运动组 GSH-Px 活性显著升高($P<0.05$),中、小强度运动组 MDA 含量则明显下降($P<0.01$)。**结论** 不同运动强度下糖尿病大鼠骨骼肌胰岛素受体基因表达不一致,可能与氧化应激对胰岛素信号转导的抑制作用有关。

[关键词] 糖尿病;运动强度;胰岛素受体;氧化应激;骨骼肌

[中图法分类号] R339.4; R394.2; R587.1 **[文献标志码]** A

Expression of insulin receptor mRNA in skeletal muscle and oxidative stress change in diabetic rats at different intensity training

Qian Rong[1], Tan Yan[2], Wang Zongbao[2], Ye Hong[1] ([1]Department of Nursing, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui Province, 233000; [2]Shanghai University of Sport, Shanghai, 200438, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression of insulin receptor mRNA in skeletal muscle and the change of oxidative stress in diabetic rats at different intensity training. **Methods** Sprague-Dawley rats were divided into group A(control group), group B(non-exercise group), group C(low-intensity exercise group), group D(moderate-intensity exercise group) and group E(high-intensity exercise group), 6 rats in each group. A diabetic rat model was induced by injecting streptozotocin(STZ) for 4 weeks after high lipid and glucose breeding. Rats were trained for 6 weeks on a treadmill. Serum glucose and insulin, insulin resistance index(HOMA-IR), activities of SOD and GSH-Px, and MDA were detected before and after training. Expression levels of InsR mRNA in skeletal muscle were measured by RT-PCR. **Results** The InsR receptor mRNA expression level in three exercise groups at different intensities was 0.55±0.05, 0.53±0.04, and 0.41±0.05, respectively, and was significantly higher in low and moderate intensity exercise groups than in group B ($P<0.05$). Six weeks after training, the activity of SOD was significantly higher in low and moderate intensity exercise groups($P<0.01$), the activity of GSH-Px was significantly higher in high-intensity exercise group($P<0.05$) while the MDA level was lower in low and moderate intensity exercise groups than in group B($P<0.01$). **Conclusion** The InsR receptor mRNA expression is different in skeletal muscle of diabetic rats at different intensity training, which may be related to the inhibitory effect of oxidative stress on insulin signal transduction.

[Key words] diabetes; exercise intensity; insulin receptor; oxidative stress; skeletal muscle

Supported by the College Young Teacher Foundation of Anhui Education Department(2007jq1129). Corresponding author: Qian Rong, Tel: 86-552-3175210, E-mail: rongy1@163.com

胰岛素受体(insulin receptor,InsR)是一种跨膜糖蛋白,其基因及蛋白表达量下调影响胰岛素受体信号转导途径,与胰岛素抵抗(insulin resistance,IR)有

[基金项目] 安徽省教育厅高校青年教师项目(2007jq1129)

[通信作者] 钱 荣,电话:(0552)3175210,E-mail:rongy1@163.com

关[1]。越来越多的研究证实,运动训练可通过促进胰岛素信号蛋白对运动的应答,明显地改善外周组织(骨骼肌与脂肪)对胰岛素的抵抗,降低血糖[2-4];但是,运动中氧化应激产生的活性氧能够激活细胞内一系列应激信号,阻断胰岛素的作用通路[5,6]。运动、胰岛素受体表达、氧化应激三者之间的关系,尤其是不同运动强度对胰岛素受体和氧化应激的影响尚少见报道。本研究以糖尿病大鼠为研究对象,通过观察不同运动强度影响下骨骼肌胰岛素受体 mRNA 的表达及其氧化应激变化,探讨运动训练促进胰岛素信号转导的分子机制,从而为运动疗法在临床实践中的运用提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 主要试剂 链脲佐菌素(Sigma 公司),Trizol 试剂(上海普洛麦格公司),逆转录试剂盒(加拿大 Biobasic 公司,上海生工分装),PCR 扩增试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司),无水乙醇(分析纯,国产),RNA 酶抑制剂(河南华美公司),*Taq* DNA 聚合酶(河南华美公司),DNA Marker(100 ~ 1 000 bp,美国 Promega 公司),InsR 引物和 β-actin 引物(上海生工生物工程技术服务有限公司),胰岛素放射免疫试剂盒(北京科美东雅生物技术有限公司),超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和丙二醛(MDA)含量的测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.1.2 主要仪器 722 紫外光分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),低温高速离心机(德国倍肯公司),核酸蛋白质分析仪(德国倍肯公司),PCR 仪和电泳仪(美国 Biometra 公司),天能凝胶成像分析系统(Gis-2000,上海天能科技有限公司),One Touch Ⅱ型血糖仪(美国强生公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组 健康普通级 Sprague-Dawley 大鼠 40 只(第二军医大学实验动物中心提供),体质量为(200 ± 10)g,雌雄不拘,适应性饲养 7 d。以抽签法随机抽取 6 只作为对照组(A 组,$n=6$),其余大鼠先制备成 2 型糖尿病模型,然后选择造模成功的糖尿病大鼠 24 只以抽签法随机分为 4 组,即非运动组(B 组)、小强度运动组(C 组)、中等强度运动组(D 组)和大强度运动组(E 组),每组 6 只。

1.2.2 糖尿病模型制备方法 将 SD 大鼠给予高糖高脂饮食(10% 猪油、20% 蔗糖、2.5% 胆固醇、1% 胆酸钠)喂养,4 周后空腹 12 h,按 30 mg/kg 链脲佐菌素(STZ,溶于 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液内,pH 4.5,新鲜配置)单次腹腔注射,72 h 后经尾静脉采血测空腹血糖,以禁食后血糖水平≥7.8 mmol/L 为标准,确定为 2 型糖尿病模型[7]。糖尿病大鼠成模后继续以高糖高脂饲料喂养。正常对照组大鼠用普通饲料喂养 4 周,腹腔注射等量的柠檬酸缓冲液。

1.2.3 糖尿病大鼠运动强度的设定 建模成功的糖尿病大鼠在动物跑台(杭州段氏 PT98)上进行适应性训练 3 d,休息 1 d 后,正式开始进行训练。根据文献[8]报道及预实验的结果设定运动强度,小强度、中等强度、大强度运动组跑台速度分别为 10、20、35 m/min,坡度均为 0°。运动持续时间为 30 min,运动频率 1 次/d,每周运动 6 d,休息 1 d,持续 6 周结束。实验动物自由进食、饮水,环境温度 18 ~ 22 ℃,湿度 45% ~ 50%,自然采光。

1.2.4 检测指标及方法

1.2.4.1 血清生化指标测定 各组大鼠在运动前安静状态下称体质量,然后取一侧股动脉血 5 ml,静置 30 min 后,3 000 r/min 离心 5 min,分离血清,于 -70 ℃冰箱中保存待测。6 周运动训练结束后,各组大鼠隔夜断食 48 h,再次称体质量,然后以戊巴比妥钠麻醉后去头取血。检测指标:空腹血糖(FBG)、空腹血清胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数[HOMA-IR = (FBG × FINS)/22.5[9]]、SOD、GSH-Px、MDA。严格按照试剂盒要求进行操作。

1.2.4.2 骨骼肌组织 InsR mRNA 表达水平的检测 每组大鼠快速分离右后腿骨骼肌,用预冷的生理盐水洗净,于液氮冷冻后转移至 -70 ℃冰箱保存。按 Trizol 说明书方法提取组织总 RNA,经核酸蛋白测定仪测定 RNA 浓度后,将 mRNA 逆转录为 cDNA,逆转录产物进行 β-actin、InsR 基因扩增。各基因引物序列如下。β-actin(303 bp)正义链:5′-GCCATGTACGTAGCCATCCA-3′,反义链:5′-AACCGCTCATTGCCGATAGT-3′;InsR 引物(138 bp)正义链:5′-CTGGAGAACTGCTCGGTCATT-3′,反义链:5′-GGCCATAGACACGGAAAAGAAG-3′。反应条件:95 ℃预变性 3 min,95 ℃变性 1 min,55 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1.5 min,共 30 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min,终止反应。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶成像分析系统对各组间 mRNA 表达进行处理和灰度比较,结果均经 β-actin 校正。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件对数据进行多组间的方差分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 各组大鼠实验前后 FBG、FINS、HOMA-IR 检测结果

B、C、D、E 4 组大鼠经高糖、高脂饮食喂养 4 周,腹腔注射 STZ 后,血糖较 A 组显著升高,达到糖尿病模型标准,造模成功;血清胰岛素、胰岛素抵抗指数均较 A 组明显升高,出现胰岛素抵抗。实验前 B、C、D、E 4 组 FBG、FINS 和 HOMA-IR 组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。6 周运动后,C、D、E 3 组大鼠血糖较运动前和 B 组均见明显下降($P<0.01$),C、D 2 组胰岛素抵抗指数较运动前显著降低($P<0.01$),胰岛素水平运动前后无明显改变($P>0.05$,表 1)。

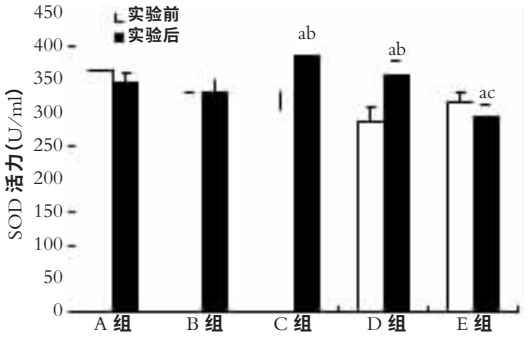
表 1 不同强度运动对大鼠空腹血糖、血清胰岛素和胰岛素抵抗指数的影响($n=6$,$\bar{x} \pm s$)

组别	FBG (mmol/L)		FINS(mU/L)		HOMA-IR	
	实验前	实验后	实验前	实验后	实验前	实验后
A 组	5.30 ± 0.34	4.38 ± 0.33	8.79 ± 1.50	9.47 ± 1.24	2.14 ± 0.86	1.95 ± 0.82
B 组	11.81 ± 2.51^{b}	13.47 ± 1.83^{b}	11.33 ± 1.12^{b}	11.82 ± 1.06^{a}	5.42 ± 1.17^{b}	6.56 ± 0.98^{b}
C 组	14.23 ± 2.91^{b}	5.86 ± 1.70^{de}	11.68 ± 1.02^{a}	10.15 ± 1.68	7.06 ± 1.68^{b}	2.32 ± 0.75^{de}
D 组	11.64 ± 2.01^{b}	6.68 ± 1.09^{ade}	12.35 ± 1.89^{b}	11.86 ± 1.87^{a}	6.95 ± 1.22^{b}	3.06 ± 0.84^{de}
E 组	10.68 ± 1.83^{b}	8.22 ± 1.34^{bde}	11.62 ± 1.10^{a}	12.75 ± 1.21^{a}	5.82 ± 1.65^{b}	4.94 ± 1.05^{bc}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 A 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 B 组比较;e:$P<0.01$,与实验前比较

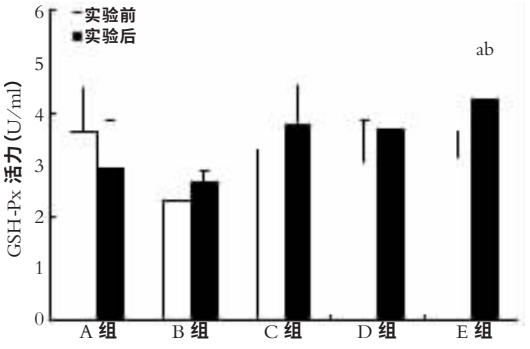
2.2 各组大鼠实验前后血清SOD、GSH-Px、MDA的变化

运动结束后，C、D组与A、B组及运动前相比，SOD活性均显著增加（$P<0.01$），E组与A、B组及运动前相比则明显降低（$P<0.01$，$P<0.05$，图1）；大强度运动组GSH-Px活性较A、B组及运动前显著增加（$P<0.05$，图2）；C组和D组MDA含量较运动前明显下降（$P<0.01$），E组MDA有所增高，但差异无统计学意义（$P>0.05$），与A、B组相比，C组运动后MDA含量明显下降（$P<0.05$），E组则明显升高（$P<0.05$，图3）。



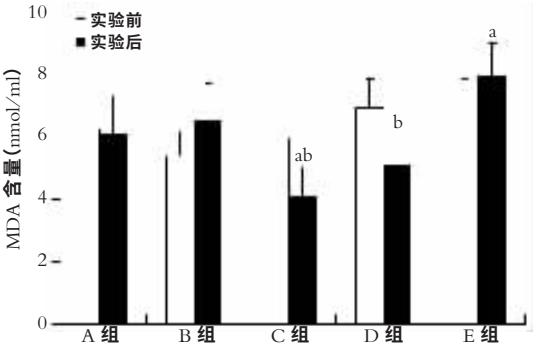
a：$P<0.01$，与A、B组实验后比较；b：$P<0.01$，c：$P<0.05$，与自身实验前比较

图1 不同强度运动对大鼠SOD活性的影响



a：$P<0.05$，与A、B组实验后比较；b：$P<0.05$，与自身实验前比较

图2 不同强度运动对大鼠GSH-Px活性的影响

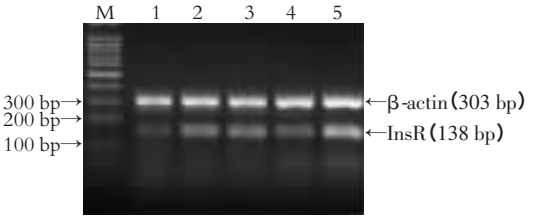


a：$P<0.05$，与A、B组实验后比较；b：$P<0.01$，与自身实验前比较

图3 不同强度运动对大鼠MDA含量的影响

2.3 各组大鼠骨骼肌组织InsR mRNA表达水平

A、B、C、D、E 5组大鼠骨骼肌组织InsR mRNA表达分别为（0.62±0.06）、（0.46±0.08）、（0.55±0.05）、（0.53±0.04）、（0.41±0.05）。InsR mRNA的RT-PCR产物凝胶电泳见图4，在各组中均有表达。InsR mRNA的表达在所有糖尿病组（B、C、D、E组）均低于A组，但C、D组与A组相比差异无统计学意义（$P>0.05$）。与B组比较，InsR mRNA表达量随运动强度不同而发生相应改变，即小强度运动组表达量最高（$P<0.05$），中等强度组次之（$P<0.05$），而大强度组最小。



M：DNA标准；1：E组；2：D组；3：C组；4：B组；5：A组

图4 不同强度运动对大鼠骨骼肌InsR mRNA表达的影响

3 讨论

糖尿病是目前危害人类健康的慢性疾病之一，控制血糖是治疗和防治其并发症的关键。2型糖尿病系外周细胞对胰岛素敏感性降低，血糖升高，体内胰岛素代偿性增加，导致糖代谢紊乱。本研究中，实验大鼠高糖高脂饮食诱导后注射小剂量STZ，血糖、血清胰岛素、胰岛素抵抗指数均较正常对照组明显升高，符合2型糖尿病的特征。经过6周不同强度的运动，与糖尿病对照组相比，3个糖尿病运动组的血清胰岛素水平变化不明显，提示6周跑台运动不能对大鼠胰岛β细胞产生明显的影响；血糖和胰岛素抵抗指数较运动前及糖尿病对照组均显著下降，说明适量、规律的运动，改善糖代谢，胰岛素敏感性增加，实现了运动对糖代谢的有益作用，这与国内外的研究[8,10]相一致。Henriksen[10]认为，有氧运动能明显降低血糖，其分子机制主要是耐力运动可以增加骨骼肌中调节糖代谢的某些重要蛋白的表达和活性。

随着分子生物学的发展，对运动影响葡萄糖转运过程中胰岛素信号转导的研究十分活跃。胰岛素在细胞水平的生物作用是通过与靶细胞膜上的胰岛素受体结合，继而启动PI3-K途径和Ras-MAPK途径中一系列的信号转导完成。这一转导过程中某些关键蛋白（如InsR、IRS1、IRS2、GLUT4、PI3-K、PKB）的活性和表达的变化是影响胰岛素敏感性的重要机制，被证明与胰岛素抵抗有关[2,11,12]。以往研究多集中于运动对胰岛素受体数目和信号转导通路中相关蛋白的影响[12-14]，缺乏从分子水平上观察胰岛素受体基因转导的变化，探讨运动增加胰岛素敏感性的受体机制。本研究观察了不同强度运动对骨骼肌InsR mRNA表达的影响，结果表明骨骼肌InsR mRNA随运动强度不同而改变，中、小强度的跑台运动对InsR mRNA表达的

促进作用较为明显,而大强度运动则对 InsR mRNA 的表达没有产生促进作用。运动可以上调胰岛素受体的表达,但是运动强度并不是越大越好,中、小强度的运动训练可使骨骼肌产生良好的适应性,这种适应可能是由胰岛素信号分子的表达所介导,活化胰岛素信号向糖代谢方向传递的相关蛋白分子,使骨骼肌细胞中一些重要的信号分子参与运动适应,共同促进胰岛素信号转导能力的提高。国内的相关研究也证实了这一点[15]。

近年来,氧化应激在糖尿病发生和发展中的作用逐渐引起人们的重视。本研究发现氧化应激的变化同样受运动强度的影响。实验结果显示,中、小强度运动组血浆中 MDA 含量较运动前明显下降($P<0.01$),SOD 活性显著增加($P<0.01$),GSH-Px 活性的增加在大强度运动组中变化较为明显。MDA 作为脂质过氧化的代表产物,中、小强度运动组其含量的降低表明体内产生自由基减少,抗氧化能力增强。本研究观察了2种抗氧化酶的活性,其中 SOD 是评价机体抗氧化能力的经典指标,GSH-Px 是谷胱甘肽抗氧化系统中重要的抗氧化酶。同为抗氧化酶的 SOD 和 GSH-Px 在不同运动强度下变化不同步,可以认为,中、小强度的运动可诱导抗氧化酶活性提高,以拮抗自由基对机体的损伤作用。大强度运动中,机体由于缺氧,糖酵解加强,生成大量乳酸并在体内堆积,乳酸还原使细胞质中 NADH 和 NADPH 浓度大大下降,抑制了体内抗氧化酶的活性,使活性氧(reactive oxygen species, ROS)在体内不断积累,从而破坏了机体氧化和抗氧化的平衡状态。大强度运动组 GSH-Px 活性增强也可能是代偿性增加的结果,为了对抗氧自由基的过氧化作用,SOD 被过度消耗,因此导致 SOD 活性明显下降,这正是大运动强度导致机体氧化应激失衡的表现。结合不同运动强度下胰岛素受体基因表达和氧化应激变化分析,大强度运动下,过量的 ROS 可作为功能性信号分子激活应激敏感信号通路,干扰细胞内胰岛素受体信号转导,影响胰岛素受体的表达[16,17]。可见,胰岛素受体基因表达和氧化应激变化存在着内在的统一性,即中、小强度运动训练可增加 InsR mRNA 的表达,与机体的抗氧化能力增强有关;大强度运动破坏了氧化应激平衡,削弱了运动对胰岛素受体基因表达的上调作用。本研究结果充分提示,运动对糖代谢产生的有益作用与运动强度有一定的关系,这对糖尿病运动处方的制定有重要的参考意义。

参考文献:

[1] Ohsugi M, Cras-Meneur C, Zhou Y, *et al*. Reduced expression of the insulin receptor in mouse insulinoma (MIN6) cells reveals multiple roles of insulin signaling in gene expression, proliferation, insulin content, and secretion[J]. J Biol Chem, 2005, 280(6): 4992-5003.

[2] Chibalin A V, Yu M, Ryder J W, *et al*. Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(1): 38-43.

[3] 刘聪, 吴波, 李玲, 等. 运动对高脂血症大鼠肝脏胰岛素受体底物-2表达的影响[J]. 上海医学, 2008, 31(6): 422-425.

[4] Yu M, Blomstrand E, Chibalin A V, *et al*. Exercise-associated differences in an array of proteins involved in signal transduction and glucose transport[J]. J Appl Physiol, 2001, 90(1): 29-34.

[5] Houstis N, Rosen E D, Lander E S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance[J]. Nature, 2006, 440(7086): 944-948.

[6] Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D. Involvement of oxidative stress and the JNK pathway in glucose toxicity[J]. Rev Diabet Stud, 2004, 1(4): 165-174.

[7] 闫纪强, 刘东方, 周厚地, 等. 福辛普利对糖尿病大鼠胰腺组织氧化应激的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(2): 160-162.

[8] 翁锡全, 徐国琴, 林文弢, 等. 不同运动强度对糖尿病大鼠血清骨代谢生化指标的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2009, 28(5): 522-525.

[9] Bonora E, Targher G, Alberiche M, *et al*. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity[J]. Diabetes Care, 2000, 23(1): 57-63.

[10] Henriksen E J. Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance[J]. J Appl Physiol, 2002, 93(2): 788-796.

[11] Vichaiwong K, Henriksen E J, Toskulkao C, *et al*. Attenuation of oxidant-induced muscle insulin resistance and p38 MAPK by exercise training[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(5): 593-599.

[12] Zierath J R. Invited review: Exercise training-induced changes in insulin signaling in skeletal muscle[J]. J Appl Physiol, 2002, 93(2): 773-781.

[13] 王丹, 吴毅, 胡永善, 等. 耐力运动对2型糖尿病大鼠骨骼肌葡萄糖运载体4基因表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(5): 391-394.

[14] 刘霞, 曾凡星, 叶鸣. 低氧运动对骨骼肌胰岛素受体亲和力的影响[J]. 北京体育大学学报, 2007, 30(5): 633-635, 638.

[15] 胡瑞萍, 吴毅, 胡永善. 运动对大鼠骨骼肌胰岛素信号转导蛋白表达和活性的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(6): 409-411.

[16] Meigs J B, Larson M G, Fox C S, *et al*. Association of oxidative stress, insulin resistance, and diabetes risk phenotypes: the Framingham Offspring Study[J]. Diabetes Care, 2007, 30(10): 2529-2535.

[17] 李兰芳, 黎健. 氧化应激诱导胰岛素抵抗的分子机制[J]. 中国糖尿病杂志, 2008, 16(11): 697-698.

(**收稿**:2009-11-12;**修回**:2010-01-15)

(编辑 王 红)