基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0485-03

膜糖蛋白 CD36 缺失对小鼠胰岛素抵抗的影响

陈 显[1],柳 青[1],雷 寒[2],赵 蕾[3],刘 宏[1],陈压西[3],阮雄中[3]

(1.重庆医科大学附属第一医院临床研究中心,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院心血管内科学,重庆 400016;
3. 重庆医科大学脂质代谢研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究膜糖蛋白 CD36 缺失对 C57BL/6 小鼠胰岛素抵抗(Insulin resistance,IR)的影响。方法:14 周高脂饮食喂养的野生型 C57BL/6 小鼠和 CD36 基因敲除(CD36 KO)小鼠,每组 7 只,分别进行糖耐量,胰岛素耐量和胰岛素释放试验,以及血清中甘油三酯(Triglyceride,TG)和游离脂肪酸(Free fat acid,FFA)的测定。结果:与野生型 C57BL/6 相比,CD36 KO 小鼠血糖水平增高,糖耐量实验异常,胰岛素释放曲线延迟,血清中 TG((80 ± 28.74) vs (36 ± 18.88) mg/dl,$P<0.05$)和 FFA((13.61 ± 1.08) vs (0.8 ± 0.06) mmol/L,$P<0.05$)水平增加。结论:CD36 缺失可以促进小鼠 IR。

【关键词】CD36;C57BL/6 小鼠;CD36 基因敲除小鼠;胰岛素抵抗

【中国图书分类法分类号】R736.6;R730.231 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-02

Membrane glycoprotein CD36 deficiency promotes insulin resistance in C57BL/6 mice

CHEN Xian, et al

(*Department of Clinical Center, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore whether CD36 deficiency promotes insulin resistance in the C57BL/6 mice. *Methods*: Mice were fed with a high-fat diet(n=7)for 14 weeks. Intravenous glucose tolerance tests, insulin release and tolerance tests were performed. Triglyceride and free fat acid levels in serum were measured. *Results*: Compared with the C57BL/6 mice, blood levels of glucose, insulin, triglyceride and free fatty acid were increased in the CD36 knockout mice. *Conclusion*: The CD36 deficiency indeed promotes insulin resistance in the C57BL/6 mice.

【Key words】CD36; C57BL/6 mice; CD36 knockout mice; Insulin resistance

随着肥胖人口的增加,我国胰岛素抵抗(Insulin resistance,IR)的发病率显著上升。IR 是指胰岛素作用的靶器官、靶组织(主要是肝脏、脂肪及肌肉组织)对一定量胰岛素的生物学效应低于正常水平,导致胰岛素靶器官对葡萄糖的摄取和利用能力降低,从而引起一组致代谢紊乱的病症群。胰岛素抵抗的病因非常复杂,包括了遗传,饮食,代谢紊乱等多种因素,越来越多的证据表明脂肪酸的代谢紊乱在 IR 的发生和发展中起着重要作用。

CD36,又称脂肪酸转移酶,是一种广泛存在于各种组织细胞的膜糖蛋白,属于 B 类清道夫受体。CD36 不仅参与长链脂肪酸的跨膜转运[1],且与胰岛素分泌等密切相关。临床观察发现:CD36 在罗格列酮改善机体胰岛素敏感性作用中扮演着非常重要的角色[2]。另外大约有 3%的日本人存在 CD36 基因缺陷,且该基因缺陷同胰岛素抵抗和脂质代谢异常包括游离脂肪酸(Free fat acid,FFA)转运等有着紧密的联系[3]。同样有研究证实[4]CD36 缺陷的自发性高血压大鼠(SHR 鼠)表现为胰岛素抵抗和脂质代谢紊乱,但是将 CD36 基因转入 SHR 鼠之后,其胰岛素抵抗和脂质代谢异常情况均得到改善。SHR 鼠是一种天然缺陷小鼠,但是关于无缺陷野生型小鼠的相关性研究,目前尚未有报道说明。本实验通过对比野生型 C57BL/6 小鼠[5,6]和 CD36 基因敲除小鼠,探讨 CD36 缺失对 2 种小鼠糖脂代谢以及其胰岛素抵抗的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和方案 14 周[7]雄性 C57BL/6 和 CD36 KO (Dr Maria Febbraio, Lerner Research Institute, USA 惠赠)小鼠,20 ~ 35 g,分笼饲养在 22℃ ~ 28℃的重庆医科大学动物房里,明暗周期各 12 h。自由饮水,每只小鼠每天供给食物 3.5 g。

作者介绍:陈 显(1984-),男,硕士,
研究方向:分子遗传,内分泌基础。

通讯作者:柳 青,女,研究员,E-mail:qingliu5566@yahoo.cn。

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)前期研究专项(编号:2008CB517309);国家自然科学基金项目资助(编号:30670869)。

两组小鼠均给予高脂饲料喂养（胆固醇和黄油含量分别为1.25%和25%）[8]。

1.1.2 主要仪器和设备 血糖仪（Roche 公司），血糖试纸（Roche 公司），胰岛素试剂盒（Linco 公司），甘油三酯（Triglyceride，TG）试剂盒（东瓯公司），FFA 试剂盒（普利莱公司），比色计（Bio 公司）。

1.2 方法

1.2.1 葡萄糖耐量实验，胰岛素耐量实验和胰岛素释放实验

第 12 周时测量 2 组小鼠的糖耐量水平，每只小鼠禁食 12 h 后，腹腔注射葡萄糖 0.75 mg 进行葡萄糖耐量实验，分别收集 0、15、30、60、120 min 时间点其尾部末梢血液，观察其血糖和胰岛素水平。同时在第 12 周进行小鼠的胰岛素耐量实验，每只小鼠禁食 12 h 后腹腔注射胰岛素 1.5 U/kg，分别观察小鼠在 0、15、30、60、120 min 时间点血液的血糖水平。

1.2.2 血清 TG 和 FFA 测量 于 14 周处死小鼠，获取血液样本和肝脏组织。血液样本离心后取上清，用一步法测量血清中 TG 以及 FFA 含量。

1.2.3 统计学处理 采用 SAS 9.1 软件进行统计分析，所有数据均以（$\bar{x} \pm s$）表示。对 2 组小鼠不同时间点血糖水平比较，采用重复测量设计方差分析，其余指标两组间比较采用 t 检验。

2 结 果

2.1 糖耐量实验

2 组小鼠进行糖耐量实验，血糖结果提示两组小鼠血糖水平在 15 min 时达到峰值，CD36 KO 组与 C57BL/6 对照组相比，5 个时间点血糖水平均较对照组升高，且在 15、30 min 2 个时间点差别有统计学意义（$P<0.05$）。见图 1。

2.2 胰岛素耐量实验

2 组小鼠进行胰岛素耐量实验，在给予小鼠注射胰岛素后，血糖水平持续降低，在 60 min 时达到最低值，之后血糖浓度缓慢上升。整个过程 CD36 KO 组血糖水平均高于野生型对照组，且在 30 min 这个时间点差异有统计学意义（$P<0.05$）。见图 2。

2.3 胰岛素释放实验

CD36 KO 与 C57BL/6 两组小鼠的胰岛素测定结果显示其峰值出现在 30 min 这个时间点，实验全程 CD36 KO 组小鼠胰岛素水平相对 C57BL/6 明显升高，且在 30 min 和 60 min 2 个时间点差异有统计学意义（$P<0.05$），具体见图 3。

2.4 血清指标检测

对 2 组小鼠血清 TG 和 FFA 进行检测，结果显示 CD36 KO 组小鼠血清中 TG 和 FFA 浓度要显著高于对照组小鼠，结果有统计学差异（$P<0.05$）。见表 1。

表 1 两组小鼠血清指标检测

组别	TG（mg/dl）	FFA（mmol/L）
C57BL/6	36.00 ± 18.88	0.80 ± 0.06
CD36 KO	80.00 ± 28.74*	13.61 ± 1.08*

与 C57BL/6 组比较，*$P<0.05$

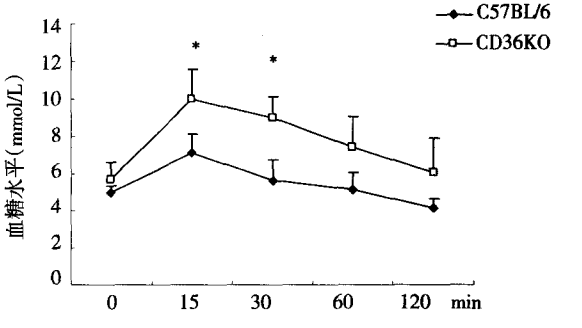


图 1 CD36 基因敲除和 C57BL/6 野生型小鼠糖耐量实验与 C57BL/6 组比较（*$P<0.05$）

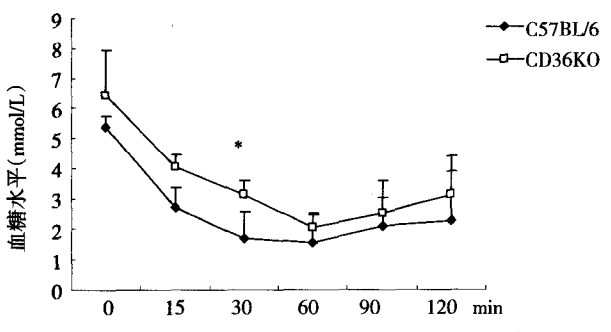


图 2 CD36 基因敲除和 C57BL/6 野生型小鼠胰岛素耐量实验与 C57BL/6 组比较（*$P<0.05$）

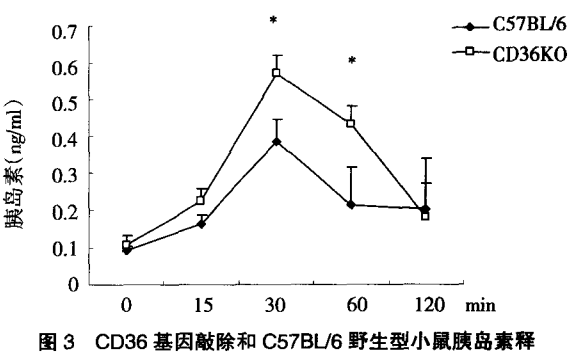


图 3 CD36 基因敲除和 C57BL/6 野生型小鼠胰岛素释放实验与 C57BL/6 组比较（*$P<0.05$）

3 讨 论

脂肪酸既是维持机体正常生命活动所必须的一种非常重要的能源物质，同时也是重要的生物信使。肥胖和 2 型糖尿病患者，由于脂肪组织分解加速，释放大量的 FFA 入血，导致血中 FFA 的水平显著升高，血液循环中大多数脂肪酸是同血清蛋白结合，被运送到各组织细胞，然后被细胞表明的脂肪酸的跨膜转运蛋白转运到细胞内被利用。目前有多种细胞表面的跨膜转运蛋白已被鉴定，CD36 是其中的一种。

CD36 是一个多配体清道夫受体，广泛分布于多种不同的细胞表面，作为介导脂肪酸跨膜转运的重要载体蛋白，在体内脂肪酸的跨膜转运中起重要作用。有研究表明[9,10]，CD36 基因敲除小鼠的心肌，骨骼肌和脂肪组织脂肪酸的转运相比于正常对照组分别减少了 50% ~ 80%、40% ~ 75%、60% ~ 70%，而利用转基因技术将 CD36 基因重新导入小鼠体内，可

使脂肪酸的转运恢复至正常水平[11]。同时,CD36 过表达的小鼠和人类细胞,脂肪酸的摄入和氧化则增加。CD36 在细胞浆合成,被运送到细胞表面并参与脂肪酸的跨膜转运。Coort 等[12]研究分析了肥胖 Zucker 大鼠和正常 Zucker 大鼠心肌脂肪酸的摄取率同 CD36 分布的关系,结果显示肥胖 Zucker 大鼠心肌细胞内 TG 的堆积与细胞膜 CD36 转位的增加有着密切的关系。同时,在对肥胖以及 2 型糖尿病患者的研究时也得到了相似的结果。分析可能是由于细胞内 CD36 运输小泡循环障碍,转位至细胞膜的 CD36 增多,其结果是脂肪酸向细胞内的转运增加,从而最终导致 TG 堆积。以上这些数据说明 CD36 表达增高和细胞表面的转移,在 FFA 的跨膜转运中起重要作用。

我们的研究表明:CD36 基因敲除小鼠与野生型 C57BL/6 小鼠相比,血 FFA 水平显著升高。其机制可能是在高脂饮食的背景下,CD36 基因敲除小鼠,其外周组织细胞(主要是肌肉和脂肪组织)不能有效的摄取脂肪组织释放的 FFA,这样会导致血 FFA 的增加。另一方面,正常生理状态下肝脏的 CD36 表达很低,肝细胞表面其他的 FFA 转移蛋白参与脂肪酸得转运,这样,在高脂饮食背景下,既使在 CD36 敲除后,仍然有一定量的 FFA 被转运到肝脏,导致肝脏 TG 合成增加,最后导致血 TG 水平也显著上升。以上可能是 CD36 基因敲除小鼠血 FFA 和 TG 升高的机制。

胰岛素是维持血糖在正常水平的主要激素之一,同时可以促进细胞摄取葡萄糖,加强糖原、脂肪的合成,使得糖向脂质转化。正常情况下,胰岛素可以通过抑制脂解限速酶来抑制 TG 分解产生 FFA,同时胰岛素还可以促进血糖进入脂肪细胞进行代谢从而增加脂肪组织中 TG 的生成,有利于 FFA 的酯化,减少 FFA 释放入血,使得血清中 FFA 维持在正常水平。当胰岛素分泌减少或者在胰岛素抵抗的状态下,机体的胰岛素不能发挥正常的生理功能,导致脂肪组织分解加速,血中的 FFA 会显著增高,容易导致脂质在组织器官内异常沉积并引起组织损伤。升高的血 FFA 还可以时间和浓度依耐性的抑制外周葡萄糖的利用[13,14],同时 FFA 可以促进肝脏糖异生。Clore 等[15]在对 12 名健康男性志愿者的研究中发现 FFA 对糖异生有明显的刺激作用。同时,升高的血 FFA 可以促进胰岛素 β 细胞的凋亡,影响胰岛素的合成和分泌,最终影响胰岛素的信号传导和胰岛素的清除,导致胰岛素抵抗。血 FFA 是连接胰岛素抵抗和Ⅱ型糖尿病以及其他代谢综合症成分的连接点,且胰岛素敏感性与血浆中脂肪酸呈负相关。我们胰岛素耐量实验检测结果表明,在给予小鼠注射一定剂量的胰岛素之后,CD36 基因敲除小鼠对胰岛素反应较为迟钝。同时糖耐量和胰岛素检测结果表明,CD36 基因敲除小鼠血糖和胰岛素浓度较之野生型升高,并有统计学意义。这些数据说明:CD36 缺失确实可以诱导 C57BL/6 小鼠产生胰岛素抵抗。

综上所述,CD36 作为一种重要的脂肪酸转运蛋白,其缺失可以通过减少外周组织细胞对 FFA 的摄取和利用,导致其血 FFA 水平增加,增高的血 FFA 最终诱导小鼠产生胰岛素抵抗。因此,对 CD36 进行深入的研究将有助于增加对胰岛素抵抗等多种代谢性疾病发病机制的理解,同时,CD36 将有可能成为防治胰岛素抵抗发生潜在的新靶点,从而对临床治疗产生较为深远的影响。

参 考 文 献

[1] Laura K, Gabriela Cosio, Andrew J, et al. CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria[J]. Immunol, 2009, 183(10): 6452-6459.

[2] Seda O, Kazdova L, Krenova D, et al. Rosiglitazone fails to improve hypertriglyceridemia and glucose tolerance in CD36-deficient BN.SHR4 congenic rat strain[J]. Physiological Genomics, 2003, 12(11): 73-78.

[3] Miyaoka K, Kuwasako T, Hirano K, et al. CD36 deficiency associated with insulin resistance[J]. Lancet, 2001, 357(5): 686-687.

[4] Pravenec M, Landa V, Zidek V, et al. Transgenic Expression of CD36 in the spontaneously hypertensive rat is associated with amelioration of metabolic disturbances but has no effect on hypertension[J]. Physiol Res, 2003, 52(6): 681-688.

[5] Hancock C R, Han D H, Chen M, et al. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(22): 7815-7820.

[6] Schrauwen P. High-fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance[J]. Proc Nutr Soc, 2007, 66(1): 33-41.

[7] Kim E, Tolhurst A T, Qin LY, et al. CD36/Fatty acid translocase, an inflammatory mediator, is involved in hyperlipidemia-induced exacerbation in ischemic brain injury[J]. Neurobiology of Disease, 2008, 28(18): 4661-4670.

[8] Winzell M S, Ahren B. The high-fat diet fed mouse: A model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2004, 53(3): S215-S219.

[9] Cobum C T, Knapp F F, Febbraio M, et al. Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice[J]. J Biol Chem, 2000, 275(7): 32523-32529.

[10] Hirano K, Kuwasako T, Nakagawa-Toyama Y, et al. Pathophysiology of human genetic CD36 deficiency[J]. Trends Cardiovasc Med, 2003, 13(4): 136-141.

[11] Benton C R, Han X X, Fabraio M, et al. Inverse relationship between PGC-1α protein expression and triacylglycerol accumulation in rodent skeletal muscle[J]. J Appl Physiol, 2006, 100(7): 377-383.

[12] Coort S L, Hasselbaink D M, Koonen D P, et al. Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese zucker rats[J]. Diabetes, 2004, 53(7): 1655-1663.

[13] Boden G, Chen X H, Ruis J, et al. Mechanism of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake[J]. J Clin Invest, 1994, 93(6): 2438-2446.

[14] Bonadoma R C, Zych K, Bone C, et al. Time dependent of the interaction between lipid and glucose in humans[J]. Am J Physol, 1989, 257(1): 49-56.

[15] Clore J N, Glickman P S, Nestler J E, et al. In vivo evidence for hepatic autoregulation during FFA-stimulated gluconeogenesis in normal humans[J]. Am J Physiol, 1991, 261(4): 425-431.

(责任编辑:冉明会)