DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.001
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)18-1607-04

论著

缺氧习服大鼠骨骼肌葡萄糖转运体特点的研究

黄 缄,黄庆愿,高钰琪,陈 健,范有明,廖卫公 (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 探讨缺氧习服后组织葡萄糖转运体的变化特点及葡萄糖摄取变化机制。方法 将缺氧组大鼠置模拟海拔5 000 m低压舱内,30 d后取双后肢骨骼肌测定组织葡萄糖水平、葡萄糖摄取率,并分离细胞膜、细胞内质膜,用同位素标记的葡萄糖进行Scatchard分析测定葡萄糖转运体密度及其亲和力,通过免疫印迹测定葡萄糖转运体1、4的表达。对照组大鼠在平原进行,其它操作及条件与缺氧组相同。结果 缺氧组大鼠骨骼肌葡萄糖含量增加、葡萄糖摄取率增强,骨骼肌细胞膜、细胞内质膜上葡萄糖转运体密度均非常显著地高于对照组。葡萄糖转运体1、4在细胞膜、细胞内质膜上的表达量较对照组显著增加。缺氧组葡萄糖转运体4 mRNA显著高于对照组,葡萄糖转运体1 mRNA水平变化不显著。结论 表达增强,细胞膜与细胞内质膜上转运体密度均增加是缺氧习服后大鼠骨骼肌葡萄糖转运体的变化特点,是缺氧习服后骨骼肌葡萄糖摄取能力增强的重要原因之一。

关键词:缺氧;葡萄糖转运体;习服;葡萄糖
中图法分类号:R322.74;R329.25;R364.4 文献标识码:A

Characterization of glucose transporters in skeletal muscle after acclimatization to hypobaric hypoxia

HUANG Jian, HUANG Qing-yuan, GAO Yu-qi, CHEN Jian, FAN You-ming, LIAO Wei-gong (Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of changes of glucose uptaking in the skeletal muscle during acclimatization to hypobaric hypoxia. Methods Wistar rats in the hypoxia group were exposed to hypobaric hypoxia chamber simulating 5 000 m high altitude for 30 d (23 h per day). Rats in the control group stayed outside of the chamber. The arterial blood and the skeletal muscle from the hind leg were collected from animals in both groups in the hypobaric hypoxic chamber. ^{3}H-D-glucose was used to assay the glucose uptake rate (GUR) in the skeletal muscle. The intracellular and plasma membranes of the skeletal muscle were separated by discontinuous sugar gradient (25%, 35%). The maximal binding sites (Bmax) and Kd of glucose transporters on the membranes were analyzed by Scatchard. The expression of protein and mRNA of GLUT1 and GLUT4 in the skeletal muscle membrane were detected by Western blotting and RT-PCR, respectively. Results Compared with that in the control group, the glucose level in the skeletal muscle of rats in the hypoxic group increased significantly. GUR in the skeletal muscle in rats in the hypoxic group was higher than that in the control group. Bmax of glucose transporters on the skeletal muscle cell plasma and intracellular membranes in rats in the hypoxia group increased as compared with that in rats in the control group, but no significant change of Kd of the glucose transporters was found during acclimatization to hypoxia. Expressions of GLUT1 and GLUT4 in the skeletal muscle plasma membrane in rats in the hypoxic group were higher than those in rats in the control group. The level of GLUT4 mRNA increased in hypoxia, but no significant change of GLUT1was found. Conclusion After acclimatization to hypobaric hypoxia, increased GLUT4 and GLUT1 expressions are found in the skeletal muscle plasma membranes and intracellular membranes, which may play an important role in the increase of glucose uptake.

Key words: hypoxia; glucose transporter; acclimatization; glucose

基金项目:国家自然科学基金资助重大项目(30393131),国家自然科学基金资助重点项目(39730190),国家自然科学基金资助面上项目(30200130)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30393131, 39730190, 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,发表论文5篇。电话:(023)68752339-8204
通信作者:高钰琪,电话:(023)68752331;E-mail:gaoy66@yahoo.com
收稿日期:2004-02-18;修回日期:2004-05-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

维持能量平衡是细胞代谢在缺氧习服过程中主要的适应性改变。在高原缺氧情况下必须对能源物质进行选择性利用,提高用氧效率,节约用氧。因此葡萄糖利用能力调整可能是缺氧习服的重要机制。葡萄糖跨细胞膜转运是绝大多数细胞和组织中葡萄糖代谢的限速步骤,成为各种刺激因素影响葡萄糖代谢的作用环节。因此,深入研究缺氧习服过程中葡萄糖摄取的变化规律及机制对阐明高原缺氧习服适应的本质具有重要意义。细胞对葡萄糖的摄取是通过细胞膜上的葡萄糖转运体(glucose transporter, GLUT)来完成的。但是对缺氧习服时细胞葡萄糖转运体表达变化的特点研究尚不深入。本研究观察分析了经过缺氧习服后,大鼠骨骼肌葡萄糖转运体在细胞膜、细胞内质膜的密度、亲和力、表达等方面的特点,以深入探讨缺氧习服后组织细胞葡萄糖摄取能力变化的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与动物

猪胰岛素(sigma), D-[U-^{14}C] 葡萄糖(248 Ci/mol, 中国医学科学院分院), ^{3}H-2-脱氧葡萄糖(^{3}H-2-deoxygen glucose, ^{3}H-2-DG)(20 Ci/g, 中国科学院原子能研究所)。实验对象为成年Wistar大鼠20只,体质量(180±10)g,雌雄各10只(我校实验动物中心提供)。GLUT1、4单克隆抗体(Santa 公司)。PCR引物由上海生工公司合成。

GLUT1: 5′-GCCTGAGACCAGTTGAAAGCAC-3′; 5′-CTGCTTAG-GTAAAGTTACAGGAG-3′

GLUT4: 5′-CAGATCGGCTCTGAAGATGG-3′; 5′-CTGAGTAG-GCGCCAATGAG-3′

1.2 分组及动物缺氧

将动物随机分为对照组(control)、缺氧组(hypoxia),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低压氧舱内饲养。对照组大鼠在平原动物房内(海拔305 m)饲养。30 d后分在模拟海拔5 000 m高度和305 m的低压舱内从缺氧组和对照组颈总脉取血测血糖,取大鼠双后肢骨骼肌测定葡萄糖含量、葡萄糖摄取率,并分离细胞膜与细胞内质膜。

1.3 离体葡萄糖摄取实验

参照许霖水[1]及 Rodniges 等[2]的方法,将取得的骨骼肌撕成肌丝置于Krebs-Ringer碳酸盐缓冲液(KRBB),pH7.5的保温瓶内,37 ℃振摇预温30 min。肌肉转移到含有新鲜KRBB中保温2 h,随后各管加入^{3}H-2-脱氧葡萄糖(^{3}H-2-deoxygen glucose, ^{3}H-2-DG)孵育30 min。各管加入3.0 ml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。用每分钟每克肌肉组织摄取脱氧葡萄糖的分子数表示葡萄糖摄取率(glucose uptake rate, GUR)。

1.4 骨骼肌细胞膜(plasma membranes, PM)与细胞内质膜(intracellular membranes, IM)的分离

采用改良Klips方法[3, 4]。取冻存组织浸入0 ℃溶液(250 mmol/L蔗糖,50 mmol/L Tris, 0.2 mmol/L EDTA)中,剔除血管、脂肪及筋膜后,剪碎,匀浆。匀浆液以1 200× g 高速离心10 min(4 ℃),保留上清。沉淀如上法再匀浆、离心。两次上清以190 000× g 超速离心1 h,取沉淀(粗制膜)铺于25%、30%、35%的蔗糖梯度上。150 000× g 超速离心16 h,0 ℃。

于25%蔗糖层上得到细胞膜,35%蔗糖层上得到细胞内质膜。

1.5 葡萄糖结合试验

采用 ludvigsenC[4] 及许霖水等[3]的方法。取不同量 D-[U-^{14}C] 葡萄糖与粗膜或亚组分膜在1 mmol/L D-葡萄糖存在下,30 ℃温育10 min,立即加入等体积的10%三氯醋酸终止反应。充分混匀,静置5 min,离心取沉淀溶解后液闪测定。以加热变性膜放射性作非特异性结合。进行 Scatchard 作图分析,求出葡萄糖转运体最大结合位点数(Bmax,以nmol ^{14}C葡萄糖/mg蛋白膜表示)及解离常数(kd)。

1.6 GLUT1、4表达量测定

蛋白水平测定采用 Western blot 法结果以相对灰度(%)表示。mRNA水平测定采用 RT-PCR 法,95 ℃预热4 min,30个循环(95 ℃ 60 s,退火90 s,72 ℃ 90 s),72 ℃温育10 min,4 ℃结束反应。GLUT1、3、4退火温度分别为:55、56、62 ℃。结果以β-actin为参考,用相对灰度(%)表示。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用SPSS8.0进行统计学分析,各组间经方差分析后采用SNK法进行均数间差别显著性检验。

2 结果

2.1 缺氧对血糖,骨骼肌葡萄糖及葡萄糖摄取率的影响

在缺氧组血糖较平原组有显著增加,其骨骼肌中葡萄糖水平以及葡萄糖摄取率均非常显著地高于对照组,见表1。

表1 缺氧对血糖、骨骼肌葡萄糖及葡萄糖摄取率的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of hypoxia on glucose in blood and skeletal muscle ($\bar{x}\pm s$)

Index	Blood glucose (mmol/L)	Glucose in skeletal musde (μmol/g)	GUR (pmol·g^{-1}·min^{-1})
Control	5.38±0.61	2.84±0.19	2.32±0.62
Hypoxia	6.08±0.42 *	3.58±0.14 **	4.22±1.11 **

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

2.2 缺氧对骨骼肌葡萄糖转运体结合位点的影响

缺氧组细胞膜及细胞内质膜上最大葡萄糖结合位点非常显著高于对照组($P<0.01$),两种膜组分葡萄糖转运体与葡萄糖结合的解离常数在缺氧组与对照组之间的差别不显著($P>0.05$),见表2。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　缺氧对骨骼肌葡萄糖转运体密度及亲和力的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of hypoxia on density and affinity of glucose transporters in skeletal muscle ($\bar{x}\pm s$)

	PM		IM	
	Bmax (nmol/mg)	Kd (nmol/L)	Bmax (nmol/mg)	Kd (nmol/L)
Control	7.41±1.91	100.68±10.19	9.50±1.48	132.05±12.51
Hypoxia	42.96±5.21 **	99.51±7.35	31.17±4.61 **	153.10±11.51

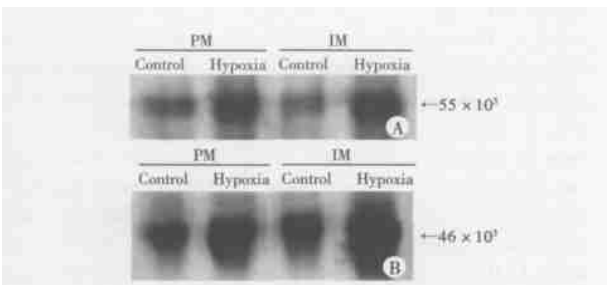
**: $P<0.01$, *vs* control

2.3　缺氧对GLUT1、4 蛋白表达的影响

结果如表 3, 图 1 所示, 缺氧组骨骼肌细胞膜和细胞内质膜上GLUT1、GLUT4 的表达量均高于对照组, 并具有非常显著性统计学意义($P<0.01$)。

2.4　缺氧对GLUT1、4 mRNA 水平的影响

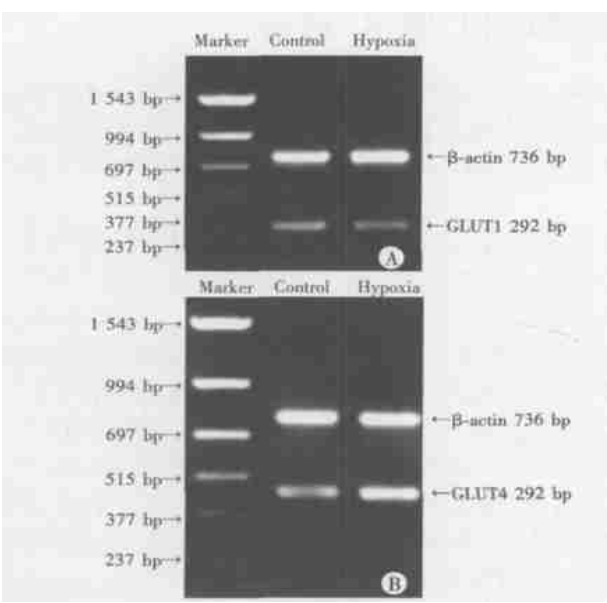
缺氧组骨骼肌组织中 GLUT1 mRNA 水平高于对照组(表 3, 图 2 所示), 但是没有显著的统计学意义($P>0.05$)。而 GLUT4 mRNA 水平显著高于对照组($P<0.05$)。



A: GLUT1; B: GLUT4

图 1　缺氧对骨骼肌 GLUT1、4 的蛋白表达的影响

Fig 1　Expressions of GLUT1 and GLUT4 in PM and IM in skeletal muscle



A: GLUT1; B: GLUT4

图 2　缺氧对骨骼肌 GLTU1、4 mRNA 水平的影响

Fig 2　Effects of hypoxia on mRNA levels of GLUT1 and GLUT4

表 3　缺氧对葡萄糖转运体蛋白表达的影响 [($\bar{x}\pm s$)%]

Tab 3　Effects of hypoxia on expression of GLUT1 and GLUT4 in skeletal muscle [($\bar{x}\pm s$)%]

	GLUT1		GLUT4	
	PM	IM	PM	IM
Control	100.00±0.000	113.774±11.234	100.00±0.000	131.823±13.723
Hypoxia	143.306±15.999 **	158.315±24.708 **	149.153±17.173 **	152.910±8.621 **

**: $P<0.01$, *vs* control

表 4　缺氧对骨骼肌 GLTU1、4mRNA 水平的影响[($\bar{x}\pm s$)] %

Tab 4　Effects of hypoxia on mRNA levels of GLUT1 and GLUT4 [($\bar{x}\pm s$)%]

	GLUT1	GLUT4
Control	67.662±11.087	71.271±12.136
Hypoxia	79.764±9.071	86.024±6.507 *

*: $P<0.01$, *vs* control

3　讨论

葡萄糖的优先利用可以在产生相同分子数 ATP 时节约用氧, 在缺氧习服过程中, 围绕"氧/ATP"这一矛盾, 机体进行复杂而有序的代谢调整, 以适应缺氧环境。本实验结果表明, 缺氧组骨骼肌组织中葡萄糖含量高于对照组, 并具有非常显著性统计学意义。骨骼肌组织中葡萄糖来源于细胞外和糖异生。经过 30 d 缺氧习服后, 骨骼肌葡萄糖含量增加的原因可能在于葡萄糖摄取的速度高于葡萄糖的分解。经过缺氧习服后, 呼吸系统、循环血液系统的代偿使组织的氧供得以改善, 在氧供充分的情况下, 细胞中的能量代谢的调整中心转回至以"底物与 ATP"这一矛盾, 脂类的热价高于葡萄糖, 因而葡萄糖代谢回降, 但是此时葡萄糖摄取并没有完全恢复, 实验结果证实了这一点, 缺氧组骨骼肌葡萄糖摄取率是对照组的 1.82 倍, 其差异非常显著($P<0.01$)。由于葡萄糖摄取率是在离体环境下检测的, 虽然不足以说骨骼肌组织在体时葡萄糖摄取的情况, 但是这一指标的变化反映了组织葡萄糖摄取能力在缺氧习服后增强, 这一能力的增强对于在更高程度缺氧时组织优先利用葡萄糖, 缓解氧/ATP 矛盾, 增强组织耐缺氧能力具有重要意义。

跨细胞葡萄糖转运的过程十分复杂。通过分析葡萄糖转运体的密度发现, 缺氧组在骨骼肌细胞膜与细胞内质膜上葡萄糖结合位点数均显著高于对照组, 而解离常数在缺氧组与对照组之间没有显著性差异。介导葡萄糖转运的葡萄糖转运体家族成员近年来随研究的深入得到较大的扩展。不同的转运体具有不同的底物特异性、亲和特性和组织分布特异性。目前根据结构与功能分为两大类: 一类为"钠依赖的葡萄糖共转运体(Na^+-dependent glucose co-transporters)", 主要分布于小肠和肾小管[5]; 另一类为"易化性非钠依赖性的葡萄糖转运体(Na^+-inde-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

pendent glucose transporter)", 其成员目前增至 13 个, 广泛分布于机体各种组织, 在不同组织分布特点不同[6,7]。在骨骼肌组织中主要分布有 GLUT1、4、11、12 等[8,9], 其中 GLUT1、4 起主要作用。

Western blot 法测定的细胞膜上 GLUT1、4 表达量结果直接说明了缺氧习服后组织细胞葡萄糖转运体数量的变化特点。缺氧组的 GLUT1、4 在骨骼肌细胞膜、细胞内质膜上的表达量均较对照组显著增加。GLUT1 主要负责基础状态下的葡萄糖摄取。缺氧组细胞内池中 GLUT1 增加可能是由于缺氧刺激后基因表达加强所至, 但是其 mRNA 水平在缺氧组与平原组之间没有显著性差异, 提示缺氧习服后 GLUT1 表达量增加可能与转录后调节有关。细胞内池中 GLUT1 表达量增多的意义在于增加葡萄糖摄取能力的贮备。GLUT4 在静息状态下, 主要贮存于细胞内微粒体等小囊泡的膜上, 当机体处于应激状态时, 细胞内池中的 GLUT4 将转位于细胞膜表达, 介导葡萄糖摄取。本研究结果指出缺氧组细胞膜上 GLUT4 较平原组有显著增加, 其 mRNA 水平也显著增加, 前者增加至对照组的 1.49 倍, 后者增加至 1.2 倍。可见, GLUT4 在细胞膜上表达量增加的原因与其基因表达增强有关, 另外, GLUT4 在细胞膜上的表达量还处决于从细胞内池向细胞膜转位过程。GLUT4 在细胞内质膜上的表达量显著高于对照组是组织缺氧习服的又一重要特点, 说明缺氧习服后机体在葡萄糖转运体介导的葡萄糖摄取能力方面有了更多的贮备, 当机体处于更严重程度缺氧时, 机体可以动员这一部分贮备, 使其转位于细胞膜。但是这一转位过程的详细胞机制有待于深入研究。

参考文献:

[1] 许霖水, 吴喜贵, 董燕麟. 重度烧伤大鼠骨骼肌胰岛素抵抗的研究[J]. 创伤杂志, 1990, 6(2): 87-90.

[2] 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, 18(3): 419.

[3] 许霖水, 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.

[4] Klip A, Ramlal T, Young D A, *et al*. Insulin-induced translocation of glucose transporters in rat hindlimb muscles[J]. FEBS Lett, 1987, 224(1): 224-230.

[5] Wright E M. Renal Na^+-glucose cotransporters[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2001, 280(1): F10-18.

[6] Mueckler M. Facilitative glucose transporters[J]. Eur J Biochem, 1994, 219(3): 713-725.

[7] Joost H G, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review)[J]. Mol Membr Biol, 2001, 18(4): 247-256.

[8] Doege H, Bocianski A, Scheepers A, *et al*. Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle[J]. Biochem J, 2001, 359(Pt 2): 443-449.

[9] Rogers S, Macheda M L, Docherty S E, *et al*. Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002, 282(3): E733-738.

(编辑 张大春)

欢迎订阅《中国药学文摘》编辑部期刊、图书、资料

《中国药学文摘》、中国药学文摘数据库网络版、光盘(2005 年)中国药学文献数据网络系统即《中国药学文摘》刊物、数据库网络版、数据库光盘是国家科技部重点扶植、国家食品药品监督管理局主管的我国药学文献大型检索和查询系统。该系统于 1981 年创建, 主要收载国内外公开发行的 700 余种医药学及相关学科期刊中的药学文献, 以文摘、简介、题录等形式进行报道。

该系统内容涵盖药学各个领域, 共设 12 个栏目: 药学理论与发展动态、生药学和中药材、药物化学、药物生产技术、药剂学和制剂技术、药理学和毒理学、生物药剂学、药物分析、临床应用与药物评价、药品管理、制药设备和工厂设计及包装、药品和新药介绍等。该系统拥有近 32 万多条数据, 本数据库每年以 3 万多条数据递增, 且内容丰富, 查询方便, 可为医药生产、科研、教学、流通、医院药房、药店、情报和管理机构服务。该系统采用全新的系统结构和快速检索的新标引法, 实现了对大容量、大范围全文本信息资料的零等待智能快速查询。根据实际工作需要, 实现了库、刊、网为一体的服务系统, 大大提高了查全率和查准率, 即可全文检索, 又可从文献类型、主题词、关键词等 12 个入口检索、查询。读者可分别从网络、光盘、文本 3 种途径查到所需要的文献。该系统曾获国家科技进步三等奖, 文本版即国内外公开发行的杂志《中国药学文摘》曾多次获得有关部委的奖励(国家科委、国防科工委、中国科学院、中国科协、国家自然科学基金会五大部委的全国科技信息系统优秀成果二等奖、全国科技检索期刊一等奖、第二届全国优秀科技期刊评比三等奖、全国医药情报成果二等奖、第二届国家期刊奖百种重点期刊奖)。

地 址: 北京市海淀区文慧园南路甲 2 号《中国药学文摘》编辑部

联系人: 郭媛媛 刘 琪 邮 编: 100088

电 话: (010)62214715, 62214665, 68313344-3803 传 真: (010)68313344-3803, 62214866

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net