DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.024
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

文章编号:1000-5404(2004)06-0533-04

论著

钒酸钠治疗增加实验性糖尿病大鼠骨骼肌GLUT4表达的研究

张 平[1],梁自文[1],王海慧[1],蔡红卫[1],汪恕萍[2],张素华[2] ([1]第三军医大学西南医院内分泌科,重庆 400038;[2]重庆医科大学附属一院内分泌科,重庆 400010)

提 要:目的 探讨钒酸钠类胰岛素作用及骨骼肌GLUT4(葡萄糖转运蛋白4)在其作用中机制。方法 Wistar大鼠40只,体质量180~250 g,随机分为2组,一组应用链脲佐菌素(55 mg/kg)腹腔内注射,5 d后血糖大于13.5 mmol/L定为糖尿病大鼠,另一组为正常对照鼠,然后将正常对照组与糖尿病组大鼠各随机分为2组。加钒组隔日管饲0.4%钒酸钠水稀释液,对照组饮用0.9%生理盐水,观察基本指标变化,持续2周后在麻醉情况下迅速分离提取骨骼肌及血液标本,应用Western blot和RT-PCR技术测定GLUT4的蛋白和基因表达。结果 钒酸钠治疗糖尿病大鼠PG、TG、INS降低,糖尿病大鼠GLUT4蛋白和GLUT4mRNA表达与正常对照组比较降低明显,钒酸钠治疗糖尿病大鼠GLUT4蛋白和GLUT4mRNA表达增加接近正常对照组水平。结论 钒酸钠治疗糖尿病大鼠在不增加胰岛素释放的情况下具有明显改善糖脂代谢的效果,使降低GLUT4水平恢复接近正常,说明钒酸钠增加糖尿病大鼠骨骼肌GLUT4表达使周围组织葡萄糖摄取利用紊乱增加可能是降低血糖机制之一。

关键词:钒酸钠;糖尿病;类胰岛素作用;葡萄糖转运蛋白4
中图法分类号:R587.1;R965;R977.5 文献标识码:A

Vanadium increases GLUT4 expression in skeletal muscles of streptozotocin-induced diabetic rats

ZHANG Ping[1], LIANG Zi-wen[1], WANG Hai-hui[1], CAI Hong-wei[1], WANG Shu-ping[2], ZHANG Su-hu[2] ([1]Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the insulin-mimetic effects and the mechanism of the effects of glucose transport protein 4 (GLUT4) expression in the skeletal muscles of the streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats after vanadium treatment. Methods Male Wistar rats (180 - 250 g) were divided randomly into two groups. Rats in the first group received intraperitoneal injection at a single dose of STZ (55mg/kg), but those in the second group received vehicle. At 5 d following STZ injection (plasma glucose > 13.5 mmol/L), diabetic rats received treatment of 0.4% vanadium (DT), but rats in the other group remained untreated (D). Control rats received 0.4% vanadium treatment (CT), but those in the other group remained untreated (C). After four weeks of treatment, rats were sacrificed, and then skeletal muscles and blood samples were quickly isolated and collected. Expressions of GLUT4 protein and mRNA were determined by Western blot and RT-PCR techniques. Results The expression levels of GLUT4 protein and GLUT4 mRNA were significantly lower than those in the normal control. After treatment with vanadium, levels of plasma glucose, triglyceride, and insulin in diabetic rats decreased, but GLUT4 protein and GLUT4 mRNA expressions increased, and were similar to those in the normal control group. Conclusion Vanadium can significantly ameliorate the metabolic disorder of glucose and lipid without increasing insulin secretion and markedly increase GLUT4 expression in the diabetic rats, suggesting that vanadium induced increase of GLUT4 gene expression in the skeletal muscles of diabetic rats may be one of the mechanisms in the improvement of glucose uptake and utilization in the peripheral tissues.

Key words: vanadium; diabetes mellitus; insulin-mimetic effect; glucose transport protein 4

作者简介:张 平(1953-),女,河南省夏邑市人,博士研究生,主任医师,教授,主要从事钒酸钠与胰岛素抵抗方面的研究。电话:(023)68754638
收稿日期:2003-11-15;修回日期:2004-01-05
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

钒酸钠(Va)有效的降低血糖和具有类胰岛素作用已引起广泛关注,但其降糖作用的确切机制尚未阐明。在离体研究显示Va增加胰岛素信号旁路酶活性,但在整体尚未复制出相同的结果[1]。葡萄糖转运蛋白(GLUT)在血糖内环境调节中具有重要作用,糖尿病表现高血糖主要是由于葡萄糖产生增加和利用减少,而骨骼肌是摄取和利用血中葡萄糖重要位点。Defronzo研究表明:体内葡萄糖代谢70%~75%处理在骨骼肌,骨骼肌既是胰岛素作用重要靶组织也是胰岛素抵抗的主要部位[2]。GLUT4是存在于骨骼肌中葡萄糖转运蛋白,其数目和转运速度的变化直接影响糖代谢,现在认为GLUT4不仅是转运子也是整体葡萄糖代谢的调节因子[3]。

GLUT4功能缺陷被认为是胰岛素抵抗、2型糖尿病和代谢综合征的重要特征[4]。我们前期研究显示Va明显增加糖尿病鼠外周组织(骨骼肌)葡萄糖摄取利用,但对其细胞膜受体数目和亲和力影响不明显[5]。本研究旨在探讨钒酸钠增加葡萄糖摄取利用是否与受体后GLUT4表达有关。

1 材料与方法

1.1 实验材料

链脲佐菌素(Stroptozocin)Sigma公司产品;山羊抗GLUT4多克隆抗体Santa Cruz公司产品;GLUT4引物由上海生工合成

1.2 实验动物

体质量180~250 g雄性Wister大鼠40只(第三军医大学实验动物中心提供)随机分为两组,每组20只:糖尿病模型组腹腔内注射STZ(溶于0.1 mmol/L柠檬酸缓冲液,pH 4.5)55 mg/kg,5 d后血糖>13.5 mmol/L为糖尿病大鼠,对照组一次性腹腔注射等体积的柠檬酸缓冲液。上述每组大鼠在各分为两组,每组10只:糖尿病组(D组)、糖尿病加钒酸钠组(DV组)、正常对照组(C组)、正常加钒酸钠组(CV组)。加钒组隔日管饲0.4%钒酸钠水稀释液,观察基本指标变化,持续2周后上午8时在麻醉情况下迅速分离提取骨骼肌及血液标本作各项指标测定。

1.3 Western blotting分析GLUT4蛋白表达

1.3.1 骨骼肌膜蛋白提取 取每组骨骼肌0.88 g放入盛有液氮的研钵中研粹,悬浮于4 ml匀浆缓冲液(20 mmol/L HEPES,250 mmol/L Sucrose, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L benzamidine, 1 μmol/L aprotinin A, 1 μmol/L pepstatin, 1 μmol/L leupeptin, 1 mmol/L PMSF, pH 7.4),内切式匀浆器匀浆,13 500 r/min, 3 s×3次。然后4 ℃,2 000× g,离心10 min,吸取上清放入另一离心管中在4 ℃,9 000× g,离心20 min,吸取上清放高速离心管中在4 ℃,180 000× g,离心90 min。弃掉上清,用含有蛋白酶抑制剂洗涤和稀释膜蛋白沉淀。

1.3.2 蛋白质浓度测定 按Lowry比色法,以BSA为标准蛋白,用Eppendorf Biophotometer仪测定样品蛋白浓度。

1.3.3 Wester blotting 分别取各不同组分蛋白30 μl样品,加入等量载样SDS缓冲液,100 ℃煮沸5 min,经7.5%SDS-PAGE电泳后电转移转膜,5% Skimmed Milk的pH 7.2 PBS中封闭,室温震荡1 h,分别加入稀释后的山羊抗GLUT4多克隆抗体室温震荡2 h,置4 ℃冰箱过夜。加入特异性二抗及3%BSA室温孵育1 h,然后用混合等体积Bottle 1和2与PVDF膜共孵育1 min,将PVDF膜与X线片放入暗盒内曝光3~10 min,显影后清水漂洗,定影。

1.4 RT-PCR反应

取每组份骨骼肌组织共90 mg放入Tripure液中,抽提总RNA按Tripure说明书操作进行,总RNA比色定量,各取1 μg总RNA按One step RNA PCR Kit (TaKaRa)说明书在50 μl反应体积中进行一步法RT-PCR反应。反应条件为:50 ℃ 30 min,94 ℃ 2 min,30个循环(94 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s)。取10 μl产物于2%琼脂糖电泳。网上检索目的基因GLUT4全长DNA序列,根据基因序列设计一对引物,特异性扩增GLUT4一个片段(392 bp)。

上游:5′-CACTGGTCCTTGCTGTATTC-3′

下游:5′-CTGATGTTAGCCCTGAGTG-3′

1.5 其它项目测定

血糖采用One Touch Ⅱ血糖仪测定;甘油三酯用酶法测定;血清胰岛素用放免法测定。

1.6 统计学处理

所有数据均以$\bar{x}\pm s$表示。应用SPSS10.0统计软件进行两组间比较用t检验。

2 结果

2.1 动物一般情况(表1)

表1 各组的体质量、饮水量、摄食量、血糖、血脂和胰岛素水平

Tab 1 Levels of body weight, water intake, food intake, plasma glucose, triglyceride, and insulin in different groups

	n	Body weight (g)	Food intake (g/day)	Fluid intake (ml/day)	Plasma glucose (mmol/L)	Plasma insulin (MIU/ml)	Plasma triglyceride (mmol/L)
C	10	271.70±18.20	23.20±2.70 #	34.34±3.52 #	4.66±0.44	71.73±4.64	0.75±0.38 #
CV	10	246.70±12.50	25.30±1.60 #	47.78±8.22 #	4.47±0.75	46.90±3.45 *	0.58±0.05 *#
D	9	240.20±22.30	48.60±7.10 *	163.00±49.01 *	22.79±3.94 *	55.23±3.64 *	4.16±0.021 *
DV	9	191.80±35.60 *#	26.70±8.30 #	96.00±16.70 *	5.56±1.15 *#	21.24±0.94 *#	0.98±0.004 *#

*: $P<0.05$, *vs* C; #: $P<0.05$, *vs* D

从表中显示D组与C组比较,摄食及饮水量显著增加,血糖、甘油三酯显著增高,胰岛素水平降低,体质量降低明显。DV组与D组比较摄食及血糖血脂均明显下降,恢复接近正常水平。胰岛素水平和体质量增加不明显。

2.2 骨骼肌总膜GLUT4蛋白表达

免疫印迹结果显示,D组与C组比较骨骼肌GLUT4蛋白表达水平降低明显,密度测定显示减少35%,DV组与D组比较骨骼肌GLUT4蛋白表达升高接近正常对照组水平。C组与CV组比较无明显差别,见图1、2。

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

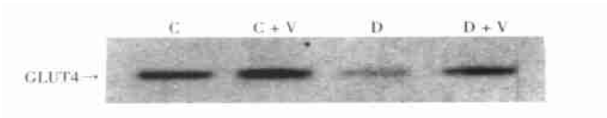


图1　免疫印迹检测骨骼肌总膜 GLUT4 蛋白的表达

Fig 1　GLUT4 protein expression in the total membrane fraction of skeletal muscles by Western blotting

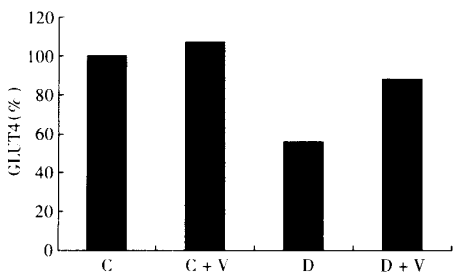


图2　骨骼肌总膜 GLUT4 蛋白表达的免疫印迹密度检测

Fig 2　Densitometric measurement of the GLUT4 protein expression in the total membrane fraction of skeletal muscles of Wistar rats by Western blotting

2.3　骨骼肌总膜GLUT4 mRNA 变化

RT-PCR 结果显示, D 组与 C 组比较骨骼肌 GLUT4mRNA 表达水平降低明显, 密度测定显示减少 63%, DV 组与 D 组比较骨骼肌GLUT4mRNA 表达升高达正常对照组水平, 见图 3、4。



图3　RT-PCR 检测骨骼肌总膜 GLUT4 mRNA 的表达

Fig 3　RT-PCR detection of GLUT4 mRNA expression in the total membrane fraction of skeletal muscles

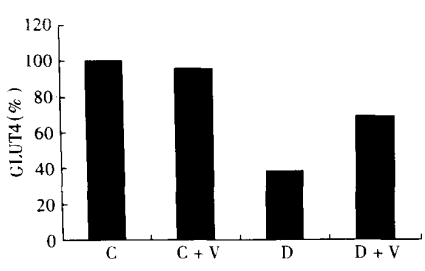


图4　RT-PCR 检测骨骼肌总膜 GLUT4 mRNA 的密度显示

Fig 4　Densitometric measurement of GLUT4 mRNA in the total membrane fraction of skeletal muscles of Wistar rats by RT-PCR

3　讨论

本实验表明链脲佐菌素引起的糖尿病大鼠(D 组)存在高血糖、高血脂和低胰岛素血症, 经钒酸钠治疗后糖尿病大鼠(DV 组)血糖、血脂均恢复正常, 但胰岛素水平仍持续降低, 说明钒酸钠在不增加胰岛素分泌的情况下, 具有明显改善糖脂代谢紊乱作用与我们前期研究一致[5]。与前期不同的是将每日自由饮用钒酸钠现改为隔日胃饲给药方法, 既固定了药物用量也减少药物副作用。

尽管已证实钒酸钠具有类胰岛素作用, 但对真正的其作用机制仍然不清楚, 在离体研究提示钒酸钠增加胰岛素信号通路酶的活性是其类胰岛素作用的可能机制, 但在整体研究未得出相同的结论[1]。近年来人们对葡萄糖转运蛋白(GLUT)表现出极大的关注, 认为 GLUT 在葡萄糖代谢中起着重要的作用。骨骼肌是摄取和利用血中葡萄糖重位点, 它含有丰富的 GLUT4, 胰岛素的作用机制之一就是使细胞内高尔基氏体囊泡池中GLUT4转运至细胞膜, 从而促进葡萄糖进入细胞[6]。Shulman 等[7] 使用非入侵 C13 研究发现在胰岛素抵抗病人骨骼肌葡萄糖浓度是降低的, 认为这与 GLUT4 浓度及活性降低有关。有作者利用基因敲除杂合子 GLUT4 的鼠仅表现为中等度葡萄糖耐量异常, 而GLUT4 纯合子基因敲除鼠却表现中度高血糖及心脏和脂代谢异常以及寿命的缩短。因此, 现在认为 GLUT4 不仅是葡萄糖转运子也是整体葡萄糖代谢的重要调节因子[8,9]。

我们前期研究显示 STZ-糖尿病大鼠骨骼肌 2-DG 摄取显著降低, 钒酸钠治疗可使糖尿病大鼠降低的 2-DG 摄取值增加近 3 倍, 说明钒酸钠可显著地改善糖尿病大鼠骨骼肌葡萄糖摄取障碍, 使周围组织葡萄糖利用增加, 从而恢复血糖正常。而这种作用既不是通过内源性胰岛素分泌增加, 也不是胰岛素受体数目改变的影响[5], 是否与 GLUT4 的转运和表达有关？从本实验显示 D 组与 C 组比较骨骼肌总膜GLUT4 蛋白表达减少 35%, DV 组与 D 组比较GLUT4 增高接近正常水平, 说明 STZ-糖尿病大鼠存在骨骼肌 GLUT4 表达减少, 而这种减少可使 GLUT4 转运葡萄糖能力下降, 经钒酸钠治疗后使 STZ-糖尿病大鼠 GLUT4 的表达恢复达正常对照组水平, 骨骼肌GLUT4 蛋白表达的增加作用, 可能直接影响葡萄糖转运使 STZ-糖尿病大骨骼肌葡萄糖的摄取利用增加。

我们知道糖尿病大鼠 GLUT4 表达减少既可以发生在蛋白转运步骤也可以发生在mRNA 翻译水平,

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

Pessin 等[10] 研究发现链脲佐菌素引起糖尿病大鼠 GLUT4 mRNA 水平降低，而在高脂饲养肥胖鼠也有相同报道。本研究表明 D 组与 C 组比较 GLUT4 mRNA 降低达 63%，这种显著降低可能是引起骨骼肌总膜蛋白 GLUT4 水平的降低的原因，经钒酸钠治疗后 GLUT4 mRNA 升高达正常对照组水平，说明钒酸钠治疗恢复糖尿病大鼠 GLUT4 蛋白表达可能是在 GLUT4 mRNA 翻译水平，这与近期发现钒酸钠作为酪氨酸磷酸酶抑制剂可增加 GLUT4mRNA 水平表达，与胰岛素作用相似一致[11,12]。

本实验表明钒酸钠通过增加 STZ-D 大鼠骨骼肌 GLUT4 基因表达使周围组织葡萄糖摄取利用增加可能部分解释其降血糖机制，而这种独特改善糖脂代谢作用为糖尿病、特别是胰岛素抵抗的 2 型糖尿病治疗提供新的契机。近年来有作者已经将硫酸氧钒(VOSO4)应用临床 2 型糖尿病的治疗，发现 VOSO4 具有纠正葡萄糖代谢紊乱和改善肝脏和骨骼肌对胰岛素的敏感性的作用，而对单纯性肥胖作用不明显[13]。Cusi 等[14] 在 11 例 2 型糖尿病病人给予 150 mg/d 治疗 6 周，并使用正常血糖胰岛素钳夹技术结合给予[3-(3)H] 葡萄糖，治疗后观察显示；空腹血糖(FBG)、糖化血红蛋白、果糖和胰岛素调节内源性葡萄糖产生(EGP)与治疗前相比均下降明显，EGP 下降与 FBG 的减少相关，说明 VOSO4 具有降低血糖和增加胰岛素调节葡萄糖处理作用。

尽管 VOSO4 和钒酸钠具有类胰岛素作用，但由于钒类化合物是无机化合物，其脂溶性小，生物利用度低，活性不高而需剂量大，具有一定毒副作用。积极寻找有机配基增加钒类化合物脂溶性，降低钒的毒性已成为研究的热点，目前认为有机配基麦芽酚氧钒(BMOV)具有明显纠正葡萄糖代谢紊乱的作用[15]，是有较好应用前景药物之一。

参考文献：

[1] Mohammad A, Sharma V, McNeill J H. Vanadium increases GLUT4 in diabetic rat skeletal muscle[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2002, 233(1—2): 139—143.

[2] Defrono R A. The triumvirate: β-cell, muscle, liver A collusion responsible for NIDDM[J]. Diabetes, 1988, 37(6): 667—687.

[3] Zisman A, Peroni O D, Abel E D. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle cause insulin resistance and glucose intolerance[J]. Nature Med, 2000, 6(8), 924—928.

[4] Andrew J. Krentz, Insulin Resistance[M]. New York: Blackwell Science Ltd, 2002. 12.

[5] 张 平，张忠辉. 钒酸钠降糖作用与胰岛素受体、葡萄糖摄取研究[J]. 第三军医大学学报，1995, 17(6): 499—501.

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

[7] Shulman G I. Cellular mechanisms of insulin resistance[J]. J Clin Invest, 2000, 106(2): 171—176.

[8] Katz E B, Burcelin R, Tsao T S, *et al*. The metabolic consequences of altered glucose transporter expression in transgenic mice[J]. Mol Med, 1996, 74(11): 563—652.

[9] Charron M J, Karz E B, Olson A L. GLUT4 gene regulation and manipulation[J]. J Biol Chem, 1999, 274(6): 3253—3256.

[10] Richardson J M, Balon T W, Treadway J L, *et al*. Differential regulation of glucose transporter activity and expression in red and white skeletal muscle[J]. J Biol Chem, 1991, 266(19): 12690—12694.

[11] Kanzaki M, Watson R T, Khan A H, *et al*. Insulin stimulates action comet tails on intracellular GLUT4 containing compartments in differentiated 3T3L1 adipocytes[J]. J Biol Chem, 2001, 28(52): 49331—49336.

[12] 袁敏生，余斌杰，梁奕铨，等. 过氧钒烟酸对糖尿病大鼠葡萄糖载体的影响[J]. 中华医学杂志，1997, 77(3): 208—211.

[13] Cohen N, Halberstam M, Shlimovich P, *et al*. Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin-dependant diabetes mellitus in rats[J]. J Clin Invest, 1995, 95(6): 2501—2509.

[14] Cusi K, Cukier S, Defronzo R A, *et al*. Vanadyl sulfate improves hepatic and muscle sensitivity in type 2 diabetes[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(3): 1410—1417.

[15] Marzban L, Rahimian R, Brownsey R M. Mechanisms by which bis(maltolato)oxovanadium normalizes phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase expression in diabetic rats *in vivo*[J]. J Endocrinology, 2002, 143(12): 4636—4645.

(编辑 陈聪连)

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》，本刊实行三位分节法(即从小数点算起，向左向右每 3 位分一节，节间留出一定空隙)，废除千分撇分节法(如 2,431 改为 2 431)。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字，凡属计数数值，一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部

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