

二甲双胍及有氧运动对肥胖大鼠骨骼肌脂联素和葡萄糖转运体 4 的影响

童俊露¹,王佑民^{2,3},邓大同³

(1. 泰康仙林鼓楼医院,江苏南京 210046;2. 安徽医科大学内分泌与代谢病研究所,安徽合肥 230022;
3. 安徽医科大学第一附属医院内分泌科,安徽合肥 230022)

摘要:目的 探讨二甲双胍及有氧运动对高脂饲料喂养的肥胖大鼠骨骼肌中脂联素(APN)和葡萄糖转运体 4(GLUT4)的影响,以及 APN 和 GLUT4 之间的关系。**方法** 4 周龄 50 只雄性 SD 大鼠采用随机数字表法分为普通对照组(NC 组)和高脂饮食组(HD 组),NC 组予普通饲料饲养,HD 组高脂饲料喂养。12 周后,HD 组采用随机数字表法分为:二甲双胍组(MT 组)、游泳运动组(SE 组)和高脂肥胖组(HF 组)。SE 组大鼠每日游泳运动,MT 组给予二甲双胍(每日 200 mg·kg⁻¹)灌胃,共 6 周,空腹取血测相关代谢指标,分离骨骼肌组织测 APN 和 GLUT4 的表达。**结果** HF 组大鼠体重(BW)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TCH)、空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)水平、HOMA-IR 指数均明显高于 NC 组($P < 0.05$),骨骼肌 APN 和 GLUT4 的表达较 NC 组明显下调($P < 0.05$)。运动、二甲双胍干预后能降低体重($P < 0.05$),降低血糖、血脂($P < 0.05$),改善胰岛素抵抗($P < 0.05$)。运动干预同时上调骨骼肌中 APN 和 GLUT4 的表达($P < 0.05$),二甲双胍干预后骨骼肌中 GLUT4 的表达明显上调($P < 0.05$),APN 表达变化不明显($P > 0.05$)。**结论** 有氧运动可上调骨骼肌组织中 APN 及 GLUT4 的表达,二甲双胍可上调骨骼肌中 GLUT4 的表达,但对 APN 的表达无明显改善作用。

关键词:二甲双胍;脂联素;葡萄糖转运体 4 型;肥胖症;运动;大鼠,Sprague-Dawley

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.10.005

Effects of metformin and exercise on adiponectin and GLUT4 in skeletal muscles of obese rats

TONG Junlu¹,WANG Youmin^{2,3},DENG Datong³

(1. Taikang Xianlin Drum-tower Hospital, Nanjing, Jiangsu 210046, China; 2. Institute of Endocrinology and metabolic diseases of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China; 3. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of metformin and aerobic exercise on adiponectin (APN) and glucose transporter 4 (GLUT4) in skeletal muscle of obese rats fed with high fat diet, and the relationship between APN and GLUT4. **Methods** Fifty male Sprague-Dawley (SD) rats aged 4 weeks were randomly assigned into normal control group (group NC) and high fat diet group (group HD). Group NC was given normal feeding, while group HD was fed with high-fat diet. After 12 weeks, group HD was assigned into metformin group (group MT), swimming group (group SE) and high fat group (group HF). Rats of group EC were daily swimming exercise, group MT received gavage of metformin (200 mg·kg⁻¹) for 6 weeks, fasting blood was taken to measure the metabolic indexes, the expression of APN and GLUT4 were determined by the separation of skeletal muscle tissue. **Results** The body weight (BW), blood lipids

[13] WANG Y, XU A, LIU P, et al. Effects of Fuzhuan Brick-Tea Water Extract on Mice Infected with *E. coli* O157: H7 [J]. *Nutrients*, 2015, 7(7):5309-5326.

[14] HE LX, ZHANG ZF, SUN B, et al. Sea cucumber (*Codonopsis pilosula*) oligopeptides: immunomodulatory effects based on stimulating Th cells, cytokine secretion and antibody production [J]. *Food & Function*, 2016, 7(2):1208-1216.

[15] WANG X, LI X, YOSHIYUKI K, et al. Comprehensive Mechanism Analysis of Mesoporous-Silica-Nanoparticle-Induced Cancer Immunotherapy [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2016, 5(10):1169-1176.

[16] REN D, WANG M, SHEN M, et al. In vivo assessment of immunomodulatory activity of hydrolysed peptides from *Corylus heterophylla* Fisch [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(10):3508-3514.

[17] BAO L, WEI G, GAN H, et al. Immunogenicity of varicella zoster virus glycoprotein E DNA vaccine [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2016, 11(5):1788-1794.

[18] JIANG Y, QI X, GAO K, et al. Relationship between molecular weight, monosaccharide composition and immunobiologic activity of Astragalus polysaccharides [J]. *Glycoconjugate Journal*, 2016, 33(5):755-761.

(收稿日期:2017-05-08,修回日期:2018-07-18)

(TG), total cholesterol (TCH), fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS) level and HOMA in rats of high fat diet (group HF) were significantly higher than those in group NC ($P < 0.05$), the expression of APN and GLUT4 in skeletal muscle were significantly lower than that in group NC ($P < 0.05$). Both exercise and metformin can significantly reduce the body weight, blood glucose and blood lipid, and improve insulin resistance (all $P < 0.05$). Swimming exercise intervention can significantly upregulate the expression of APN and GLUT4 in skeletal muscle ($P < 0.05$). The expression of GLUT4 in skeletal muscle was significantly up-regulated by metformin ($P < 0.05$), and the expression of APN was not significantly changed ($P > 0.05$). **Conclusions** Aerobic activity can up-regulate the expression of APN and GLUT4 in skeletal muscle tissue. Metformin can up-regulate the expression of GLUT4 in skeletal muscle, but it has no obvious improvement on the expression of APN.

Key words: Metformin; Adiponectin; Glucose transporter type 4; Obesity; Exercise; Rats, Sprague-Dawley

近年来,随着生活日益改善,肥胖、2型糖尿病、代谢综合征等内分泌代谢病的发病率明显增加,胰岛素抵抗是这些疾病共同的发病机制。脂联素(APN)作为脂肪因子可调节脂肪酸氧化和葡萄糖代谢,目前作为骨骼肌因子的研究正在探索中。葡萄糖转运体4(GLUT4)是骨骼肌以及脂肪细胞中最重要的葡萄糖转运体,亦可调节糖脂代谢。二甲双胍及运动是最常用的改善胰岛素抵抗的方法。本研究通过高脂饮食建立肥胖及胰岛素抵抗模型,了解二甲双胍及运动干预对骨骼肌中APN和GLUT4表达产生的影响,探讨APN及GLUT4在骨骼肌糖代谢中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性4周龄清洁级SD大鼠50只,购自安徽医科大学动物实验室。本研究符合一般动物实验伦理的要求。本研究起止时间为2013年1月至2016年9月。

1.2 饲料 普通饲料(动物中心配制),成分配比为:豆粕30%、高粱10%、玉米30%、标准粉10%、鱼粉10%、骨粉2.5%、酵母2.5%、黄豆5%;高脂饲料成分配比为:普通饲料55%、猪油12%、麻油3%、鸡蛋10%、花生5%、蔗糖5%、奶粉8%、食盐2%。

1.3 试剂及仪器 鼠胰岛素放免试剂盒(北京北方生物研究所);BCA蛋白浓度试剂盒(碧云天生物研究所);兔抗鼠APN(Acrp30)抗体、兔抗鼠GLUT4抗体(均为美国BIOWORLD公司)、 β -actin一抗(美国Santa Cruz公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗及兔抗鼠二抗(均为北京中杉金桥生物有限公司);盐酸二甲双胍肠溶片(施贵宝公司提供);全自动生化分析仪(瑞士Roche Modular DPP公司)。

1.4 大鼠饲养及干预分组 50只SD雄性大鼠适应性喂养1周后,采用随机数字表法,分为普通对照组(NC组,11只)和高脂饲料组(HD组,39只)。NC组给予普通饲料继续喂养,HD组大鼠换为高脂饲料喂养,定期称重,12周后,筛选36只造模成功的肥胖大鼠(体质量高于NC组20%认为造模成

功)采用随机数字表法分为游泳运动组(SE组,10只)、二甲双胍组(MT组,11只)、高脂肥胖组(HF组,11只),另有7只大鼠在实验过程中因溺水、灌胃呛咳等原因死亡。SE组大鼠每天下午3点进行游泳运动,泳池为高1.5 m,直径2 m的圆柱形容容器,运动时维持水温在 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,每周6天,第1周每天20 min,之后每周每天增加15 min,直至每天1 h。MT组大鼠每只每天给予 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的二甲双胍溶液灌胃,二甲双胍溶液为注射用水新鲜配制的混悬液,每只大鼠灌胃体积2 mL左右。所有大鼠均可自由进食,自由进水,生活环境温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,共干预6周。

1.5 血清指标检测 禁食8 h过夜,10%水合氯醛麻醉,称量体质量(BW),下腔静脉采血, $2\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,分离血清, -80°C 冰箱中保存以备测定各项代谢指标。分离腓肠肌组织,液氮中冻存。

使用全自动生化仪测各项指标:空腹血糖(FBG)、三酰甘油(TG)、胆固醇(TCH)。空腹胰岛素(FINS)水平使用鼠胰岛素放免试剂盒测定。

计算胰岛素抵抗指数:(HOMA-IR) = $\text{FBG} (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}) \times \text{FINS} (\text{mIU} \cdot \text{L}^{-1}) / 22.5$ 。

1.6 骨骼肌组织中APN、GLUT4的蛋白表达的程度 取约100 mg的腓肠肌组织,冰上匀浆后加入细胞裂解液充分裂解, 4°C $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液,使用BCA试剂盒测定蛋白含量,标记后置于 -80°C 保存。取等量蛋白沸水煮5~10 min变性后加样,SDS-PAGE电泳分离,转移至NC膜上,TBST封闭,分别加入APN(Acrp30)一抗(1:300)、GLUT4一抗(1:1 000)及 β -actin一抗(1:1 000), 4°C 孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000)孵育2 h,ECL曝光、显影、定影,蛋白质印迹法所得条带使用凝胶处理软件扫描成图片,分析目标条带灰度值。骨骼肌中的APN、GLUT4的灰度值与 β -actin的灰度值比值为蛋白的相对表达量,进行统计学分析。

表1 各组大鼠代谢相关指标的测定/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	BW/g	FBG/mmol · L ⁻¹	TG/mmol · L ⁻¹	TCH/mmol · L ⁻¹	FINS/mIU · L ⁻¹	HOMA-IR 指数
A:NC	11	420.49 ± 61.70	6.67 ± 1.08	0.40 ± 0.20	1.30 ± 0.30	31.37 ± 6.95	9.15 ± 1.87
B:HF	11	573.45 ± 31.33 ^a	11.05 ± 2.14 ^a	0.68 ± 0.24 ^a	1.81 ± 0.21 ^a	45.11 ± 12.24 ^a	20.42 ± 1.33 ^a
C:SE	10	473.91 ± 36.67 ^{ab}	5.64 ± 0.92 ^b	0.48 ± 0.11 ^b	1.18 ± 0.19 ^b	22.74 ± 7.91 ^{ab}	6.48 ± 2.43 ^{ab}
D:MT	11	451.99 ± 34.06 ^b	7.82 ± 1.22 ^{bc}	0.65 ± 0.15 ^{ac}	1.58 ± 0.27 ^{abc}	25.27 ± 6.71 ^b	8.28 ± 3.97 ^b
F 值		25.944	29.766	5.874	14.531	14.113	67.188
P 值		0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000

注:整体分析为单因素方差分析;多重比较为 HSD-*t* 检验,角标 a、b、c 分别为与 A、B、C 组比较, $P < 0.05$

1.7 统计学方法 使用 SPSS 19.0 软件进行统计学相关分析处理。观测资料均为计量数据,均通过正态性检验,以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。多组间差异比较用单因素方差分析(ANOVA),多重比较用 HSD-*q* 检验。 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清学指标 两两比较并结合主要数据分析:与正常对照(NC 组)相比较,HF 组大鼠的 BW、FBG、TG、TCH、FINS、HOMA-IR 指数均明显增高($P < 0.05$)。与 HF 组相比,SE、MT 组 BW、FBG、TCH、HOMA-IR 指数下降($P < 0.05$),SE 组血 TG 下降($P < 0.05$),MT 组血中 TG 虽有所下降但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

2.2 各组大鼠骨骼肌组织中 APN、GLUT4 的蛋白表达 两两比较并结合主要数据分析:与 NC 组相比,HF 组骨骼肌中 APN、GLUT4 的蛋白表达量明显降低($P < 0.05$);与 HF 组比较,SE 组及 MT 组骨骼肌组织中 GLUT4 的表达均明显增加($P < 0.05$);与 HF 组相比,SE、MT 组骨骼肌组织中 APN 的表达明显增加($P < 0.05$);SE 组、MT 组之间 GLUT4 的表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1、表 2。

表2 各组间大鼠骨骼肌组织 APN、GLUT4 蛋白表达比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	APN	GLUT4
A:NC	11	1.02 ± 0.11	1.20 ± 0.18
B:HF	11	0.63 ± 0.07 ^a	0.59 ± 0.09 ^a
C:SE	10	0.67 ± 0.05 ^a	0.84 ± 0.13 ^{ab}
D:MT	11	0.84 ± 0.06 ^{abc}	0.94 ± 0.04 ^{ab}
F 值		59.875	46.278
P 值		0.000	0.000

注:整体分析为单因素方差分析;多重比较为 HSD-*t* 检验,角标 a、b、c 分别为与 A、B、C 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

胰岛素抵抗是指机体对胰岛素的敏感性下降,是 2 型糖尿病、代谢综合征等内分泌相关疾病主要的发病机制,改善胰岛素抵抗,是多种疾病防治的

核心。高脂饮食诱导大鼠肥胖及胰岛素抵抗的发生与人类肥胖及胰岛素抵抗的发病过程相类似,通常用于建立动物模型。本实验研究亦采用了这种方法造模,与普通对照大鼠相比,高脂饲料喂养的大鼠体质量增加大于 20%,HOMA-IR 指数明显增高,FBG、TG、TCH 增高,FINS 水平增加,提示肥胖及胰岛素抵抗大鼠造模成功。

APN 最早在脂肪组织中发现,作为脂肪因子与脂联素受体结合可降低 FBG、TG 水平,调节糖脂代谢,具有改善胰岛素敏感性、抗动脉粥样硬化等保护作用^[1]。近年来,在骨骼肌中也发现 APN 的表达,骨骼肌中 APN 的表达和调节是目前研究新方向。Esfahani 等^[2]多位学者在大鼠及人类的骨骼肌组织中均发现了 APN 的存在,有学者证实骨骼肌可以通过分泌 APN,上调脂肪酸的氧化应激,减少三酰甘油含量,促进骨骼肌细胞中葡萄糖氧化,改善胰岛素敏感性。骨骼肌细胞膜 GLUT4 介导的葡萄糖转运是糖代谢中的限速步骤,在糖尿病 SD 大鼠模型中,GLUT4 的高表达明显降低其空腹血糖^[3]。体外实验显示,在高胰岛素的环境中骨骼肌细胞 GLUT4 的表达明显降低,且同时伴发转位障碍^[4]。GLUT4 在骨骼肌细胞膜中的转位途径有两种类型:(1)胰岛素依赖型途径:胰岛素及胰岛素类似物与胰岛素受体结合,激活 GLUT4 发生膜转位;(2)非胰岛素依赖性途径:由于运动、缺血、缺氧等因素,直接激活 GLUT4 膜转位过程^[5-7]。高脂喂养的 SD 大鼠骨骼肌组织中,胰岛素信号转导途径中受体水平缺陷,使得 GLUT4mRNA 表达明显下降和 GLUT4 蛋白含量降低,从而导致葡萄糖转运、摄取、利用的减少及胰岛素抵抗的发生^[8]。本研究结果得出类似结论,高脂饲料喂养的肥胖胰岛素抵抗大鼠的血糖、血脂较正常对照组明显增加,骨骼肌中 APN 及 GLUT4 明显降低,证实了 APN 和 GLUT4 的下调与胰岛素抵抗及糖脂代谢紊乱相关。

运动锻炼是临床中最常见改善胰岛素抵抗的生活调节方式。运动可以直接增加机体骨骼肌中

GLUT4 的表达和蛋白质的合成,促进 GLUT4 跨膜转运过程;增加骨骼肌细胞膜上胰岛素受体数量,使得胰岛素与受体结合增加,促进骨骼肌细胞 GLUT4 的膜转运,使 GLUT4 的含量提高;在运动锻炼肌肉收缩过程中,增加了细胞内钙离子含量,从而激活了钙调蛋白激酶活性来增加 GLUT4 的表达;同时运动过程中由于体内的 ATP 大量消耗,AMP 的增加激活了 AMPK 介导的信号转导途径, GLUT4 的膜转位增加,肌肉组织摄取和利用葡萄糖增加,从而改善胰岛素抵抗^[9-11]。在本实验中,SE 组较 HF 组 FBG、TG、TCH 下降,HOMA 指数降低,骨骼肌中 GLUT4 的表达明显增高,进一步证实运动可以增加 GLUT4 的表达。目前针对运动对 APN 水平的影响尚有争议,有学者发现运动不能改变 APN 的水平,可能不是运动改善胰岛素敏感性的因子之一;国内另有研究发现,运动对血清及骨骼肌中 APN 均有上调作用^[12]。在本研究中,SE 组骨骼肌中 APN 表达较 HF 组明显增高,血脂、血糖降低,胰岛素抵抗改善,具体机制尚不明确,考虑可能与运动激活 AMPK 等信号通路有关,进一步促进 GLUT4 的转位。

二甲双胍是临床上最常用于改善胰岛素抵抗的药物,可以抑制糖异生,增加外周组织对葡萄糖的摄取和利用,提高胰岛素敏感性。二甲双胍可增加糖尿病模型中骨骼肌中 GLUT4 mRNA 和蛋白表达,促进胰岛素介导的骨骼肌 GLUT4 跨膜转运,增加外周组织对葡萄糖摄取促进。本研究在肥胖大鼠胰岛素抵抗模型中亦得到上述结论,二甲双胍干预的 MT 组大鼠骨骼肌组织中 GLUT4 的表达较 HF 组明显增加,作用机制可能为二甲双胍在改善胰岛素抵抗的同时可能直接促进 GLUT4 的表达。有关二甲双胍对组织 APN 表达的影响尚存不同的观点。Zulian 等^[13]通过体内、体外实验证明二甲双胍可增加脂肪细胞和脂肪组织中 APN 的表达。有研究认为,二甲双胍对血清 APN 无明显改善作用^[14],但国内有学者研究发现,二甲双胍可升高 2 型糖尿病患者中血清 APN 的水平^[15]。二甲双胍对骨骼肌细胞和组织中的 APN 的表达作用目前报道较少。

本实验中发现二甲双胍可增加骨骼肌 GLUT4 的表达,改善胰岛素抵抗和糖脂代谢,但并未显著增加骨骼肌 APN 的表达,具体机制目前尚不十分明确,但由于本实验干预时间短,样本量较小,二甲双胍及运动对骨骼肌 APN 的作用有待今后进一步探讨研究。

(本文图 1 见插图 10-1)

参考文献

- [1] YADAV A, KATARIA M A, SAINI V, et al. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance[J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 417: 80-84.
- [2] ESFAHANI M, MOVAHEDIAN A, BARANCHI M, et al. Adiponectin: an adipokine with protective features against metabolic syndrome[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2015, 18(5): 430-442.
- [3] ZHAO L, CHAI W, FU Z, et al. Globular adiponectin enhances muscle insulin action via microvascular recruitment and increased insulin delivery[J]. *Circ Res*, 2013, 112(9): 1263-1271.
- [4] 陈冬, 孙宏, 陈明卫, 等. 脂联素影响骨骼肌胰岛素抵抗模型中葡萄糖转运蛋白 4 表达的研究[J]. *安徽医药*, 2014, 18(9): 1638-1641.
- [5] LACOMBE VA. Glucose metabolism in insulin-sensitive tissue: from health to disease and glucose transport in adipose tissue: novel insights into the pathogenesis of insulin resistance[J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2011, 31(10): 578-581.
- [6] 郭仪, 石岩. 葡萄糖转运蛋白 4 转位与胰岛素抵抗[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2007, 9(4): 63-64.
- [7] 王萍, 戚琛晔, 席守民, 等. 2 型糖尿病大鼠氧化应激与骨骼肌细胞葡萄糖转运蛋白 4 转位相关性的研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32(15): 1428-1431.
- [8] 金实, 刘聪, 任剑明, 等. GLUT4mRNA 在糖尿病大鼠骨骼肌及脂肪组织中的表达及意义[J]. *山东医药*, 2011, 51(23): 27-28.
- [9] BRYANT NJ, GOVERS R, JAMES DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4 [J]. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2002, 3(4): 267-277.
- [10] DOHM GL. Invited review: Regulation of skeletal muscle GLUT-4 expression by exercise. [J]. *Journal of Applied Physiology*, 2002, 93(2): 782-787.
- [11] 白震民, 王安利, 李胜志. 运动对胰岛素抵抗模型大鼠骨骼肌 GLUT4 和 PKB β mRNA 表达的影响[J]. *北京体育大学学报*, 2010(6): 44-46.
- [12] 刘霞, 金其贯, 罗强. 运动和膳食控制对 2 型糖尿病大鼠脂联素-AMPK-GLUT4 通路的影响[J]. *北京体育大学学报*, 2013, 36(1): 55-58.
- [13] ZULIAN A, CANCELLO R, GIROLA A, et al. In vitro and in vivo effects of metformin on human adipose tissue adiponectin[J]. *Obesity Facts*, 2011, 4(1): 27-33.
- [14] KITA Y, TAKAMURA T, MISU H, et al. Metformin prevents and reverses inflammation in a non-diabetic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e43056. DOI: 10.1371/journal.pone.0043056.
- [15] 潘斌斌, 马建华, 袁璐, 等. 格列吡嗪和/或二甲双胍对 2 型糖尿病患者血清脂联素水平影响的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2013, 21(4): 293-295.

(收稿日期: 2017-09-20, 修回日期: 2018-06-29)