

基础研究

慢性间歇性缺氧对大鼠骨骼肌葡萄糖转运蛋白4表达的影响

谭 健,莫海兰,李 洁,吴应玲,何晓丽,李 兵

重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科,重庆 400016

摘要:目的 探讨慢性间歇性缺氧所致炎症因子以及复氧对大鼠糖代谢及骨骼肌葡萄糖转运蛋白4(GLUT-4)表达的影响。方法 24只SD雄性大鼠,分为空白组(UC组)、慢性间歇性缺氧组(CIH组)和复氧组(RH组);所有大鼠在模型建立后,分别用氧化酶-过氧化物酶法、放射免疫法、ELISA检测血糖、血清胰岛素及炎症因子的变化;Western blotting检测骨骼肌GLUT-4蛋白的表达。结果 大鼠空腹血糖,CIH组高于UC组和RH组($P<0.05$),RH组高于UC组($P<0.05$);血清胰岛素及胰岛素抵抗指数,CIH组高于UC组和RH组($P<0.05$)。各组大鼠血清炎症指标TNF- α 、IL-6,CIH组显著高于UC组和RH组($P<0.05$),RH组高于UC组($P<0.05$)。大鼠骨骼肌GLUT4蛋白,CIH组显著低于UC组和RH组($P<0.05$),RH组低于UC组($P<0.05$)。结论 慢性间歇性缺氧可引起大鼠体内炎症因子增加及胰岛素抵抗;大鼠胰岛素抵抗与炎症因子所致的骨骼肌GLUT-4蛋白量降低有关。

关键词:睡眠呼吸紊乱;慢性间歇性缺氧;炎症因子;糖代谢;胰岛素抵抗;葡萄糖转运蛋白4

Effects of chronic intermittent hypoxia on glucose transporter 4 expression in rat skeletal muscles

TAN Jian, MO Hailan, LI Jie, WU Yingling, HE Xiaoli, LI Bing

Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To study the effect of chronic intermittent hypoxia-induced inflammatory cytokines and reoxygenation on glucose transporter 4 (GLUT-4) expression in rat skeletal muscles. **Methods** Twenty-four male Sprague-Dawley rats were randomly assigned to blank control group, chronic intermittent hypoxia (CIH) group, and reoxygenation group. At the end of the experiment, fasting blood glucose (FBG), fasting blood insulin (FINS) and serum inflammatory cytokine levels were measured with glucose oxidase-peroxidase, insulin radioimmunoassay and ELISA, respectively. Homeostasis model assessment (IRI) was used to evaluate insulin resistance in the rats, and GLUT-4 protein expression in the skeletal muscles was measured with Western blotting. **Results** Compared with the blank control group, CIH resulted in significantly increased fasting blood glucose, blood insulin levels and insulin resistance index (IRI) ($P<0.05$); fasting blood glucose was significantly elevated in reoxygenation group ($P<0.05$). Inflammatory cytokines levels (IL-6 and TNF- α) were significantly higher in CIH group than in the blank control and reoxygenation groups ($P<0.05$), and were higher in reoxygenation group than in the blank control group. GLUT-4 expression in the skeletal muscles was significantly reduced after CIH ($P<0.05$) but increased after subsequent reoxygenation ($P<0.05$). **Conclusions** CIH can cause increased release of inflammatory cytokines to lower GLUT-4 protein expression in the skeletal muscles, which contributes to insulin resistance in adult rats.

Key words: sleep-disordered breathing; chronic intermittent hypoxia; inflammation; glucose metabolism; insulin resistance; glucose transporter 4

睡眠呼吸疾病包括睡眠状态下的各种呼吸障碍性疾病,如阻塞性睡眠呼吸暂停、中枢性睡眠呼吸暂停和周期性呼吸等^[1]。临床上以阻塞性睡眠呼吸暂停(OSA)最常见,其以睡眠中频繁出现呼吸不畅和呼吸中断为特征,睡眠中长期反复发生的间歇缺氧和睡眠结构紊乱导致患者多系统和多器官的损害,成为多种全身性

疾病的独立危险因素,为国内外医学界高度重视^[2-3]。近来人们在对睡眠呼吸疾病的研究中发现,睡眠呼吸疾病与糖代谢紊乱有着密切的关系,其中睡眠呼吸紊乱引起的胰岛素抵抗(IR)起着核心作用。流行病学调查及临床实验研究表明,睡眠呼吸疾病是糖耐量异常及2型糖尿病发病的独立危险因素,夜间低氧的严重程度与糖耐量异常及IR程度密切相关^[4-6]。对于外周组织来说,IR与葡萄糖转运蛋白(GLUT)密切相关。葡萄糖转运蛋白4(GLUT-4)主要存在于肌肉和脂肪组织中,是主要的葡萄糖运载体,其所介导的葡萄糖转运是骨骼肌糖代谢的主要限速步骤。因此,GLUT-4对于全身血糖内稳态

收稿日期:2014-02-21

基金项目:国家临床重点专科建设项目经费基金资助(卫办医政函[2012]649号);重庆市卫生局重点科研项目(2012-1-059)

作者简介:谭 健,硕士,E-mail: tanjian805@sina.com

通信作者:李 兵,教授,研究生导师,E-mail: dclibing@sina.com

的调控具有重要意义^[7]。本研究通过建立慢性间歇性缺氧的动物模型,研究慢性间歇性缺氧对大鼠糖代谢及骨骼肌 GLUT-4 表达的影响,以期为临床睡眠呼吸疾病患者糖代谢紊乱的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

葡萄糖测定试剂盒购于上海荣盛生物药业有限公司;胰岛素检测试剂盒购于北京北方生物技术研究所;ELISA 试剂盒购于上海百沃生物科技有限公司;兔抗大鼠 GLUT-4 抗体购于美国 Immunoway 公司;通用型二抗、山羊血清等免疫组化试剂购于武汉博士德生物公司;兔抗大鼠 β -actin 一抗购于北京康为世纪公司;山羊抗兔二抗、增强化学发光法(ECL)试剂盒购于碧云天公司。

1.2 动物分组与模型建立

24 只雄性 6 周龄 SD 大鼠购于重庆医科大学动物实验中心,适应性喂养 1 周后,随机分为 3 组:空白组(UC)、慢性间歇性缺氧组(CIH)和慢性间歇性缺氧后复氧组(RH),每组 8 只。UC 组室内空气正常饲养 4 周,CIH 组和 RH 组参照 Fletcher^[8]、Polotsky^[9]、王璋^[10]等的方法并加以改进建立间歇缺氧动物模型。实验期间,CIH 组和 RH 组每天 9:00~17:00 放入间歇缺氧舱内,关闭舱门,向间歇缺氧舱循环充入氮气和压缩空气,每一循环 60 s,30 s 充入氮气,随之 30 s 充入压缩空气。由氧气检测仪监测间歇性低氧舱的氧浓度,调节气体流量,使每一循环缺氧舱内的最低氧浓度达到 5%~8%,持续时间 5~7 s,然后再逐渐恢复至 21%,大鼠动脉最低血氧饱和度值为 60%~80%^[8]。缺氧共持续 4 周,RH 组缺氧结束后复氧(常规饲养)2 周。

1.3 血清指标检测

实验结束时,大鼠禁食 10 h 后从尾静脉采血,检测空腹血糖值(FBG)及血清胰岛素(FINS)水平,血糖值用葡萄糖氧化酶法检测,胰岛素值用放免法检测;血清 IL-6、TNF- α 用 ELISA 法检测。均严格按说明书操作。根据稳态模型法计算胰岛素抵抗指数(IRI), $IRI = (FBG \times FINS) / 22.5$ 。

1.4 Western blotting 检测骨骼肌 GLUT-4 蛋白的表达

采用 Western blotting 方法检测骨骼肌 GLUT-4 蛋白水平。取各组大鼠骨骼肌组织,提取骨骼肌总蛋白,取各组样品蛋白质,行 SDS-PAGE 电泳。采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上,用 TBST 配制的 5% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 2 h,之后敷 GLUT-4、 β -actin 一抗,4 °C 孵育过夜;洗膜后加二抗,37 °C 孵育 2 h,洗膜后用 ECL 显影。用 QuantityOne 软件进行光密度积分值分析,计算出 GLUT4 分别与内参照 β -actin 的光密度积分值之比作为

GLUT4 的相对含量值。

1.5 统计学分析

应用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示。采用单因素方差分析,在此之后 3 组间比较采用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FBG、FINS 及 IRI

大鼠糖代谢相关指标结果见表 1。实验开始各组大鼠体质量 160~175 g,实验结束后各组大鼠体质量无统计学差异。FBG、FINS 及 IRI 在 3 组间有统计学差异($P < 0.01$)。3 个指标组间比较,CIH 组 FBG 高于 UC 组与 RH 组($P < 0.05$),RH 组高于 UC 组($P < 0.05$);CIH 组 FINS 和 IRI 高于 UC 组与 RH 组($P < 0.05$),RH 组与 UC 组比较无统计学差异($P > 0.05$)。

表 1 各组空腹血糖值、胰岛素及胰岛素抵抗指数

Tab.1 Comparison of FBG, FINS and IRI in each group (Mean $\pm$ SD, $n=8$)

Group	FBG (mmol/L)	FINS (μ U/ml)	IRI
UC	5.42 $\pm$ 0.80	9.46 $\pm$ 1.91	2.25 $\pm$ 0.41
CIH	7.01 $\pm$ 0.44*	17.01 $\pm$ 2.40*	5.34 $\pm$ 1.05*
RH	6.11 $\pm$ 0.57 [#]	11.05 $\pm$ 1.60	3.01 $\pm$ 0.60

* $P < 0.05$ vs UC group and RH group, [#] $P < 0.05$ vs UC group.

2.2 血清炎症指标

各组大鼠血清炎症指标 TNF- α 、IL-6 统计结果见表 2。3 组间有统计学差异($P < 0.01$),CIH 组各炎症指标显著高于 UC 组与 RH 组($P < 0.05$),RH 组高于 UC 组($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠血清炎症因子比较

Tab.2 Comparison of serum IL-6 and TNF- α in each group (Mean $\pm$ SD, $n=8$, pg/ml)

Group	IL-6	TNF- α
UC	70.69 $\pm$ 5.63	39.90 $\pm$ 3.78
CIH	114.65 $\pm$ 9.31*	82.51 $\pm$ 5.32*
RH	89.21 $\pm$ 10.86 [#]	58.31 $\pm$ 4.71 [#]

* $P < 0.05$ vs UC group and RH group, [#] $P < 0.05$ vs UC group.

2.3 骨骼肌 GLUT-4 蛋白表达水平

各组大鼠骨骼肌 GLUT-4 蛋白的表达水平见图 1。3 组间比较有统计学差异($P < 0.01$)。组间比较,CIH 组骨骼肌 GLUT-4 蛋白显著低于 UC 组与 RH 组($P < 0.05$),RH 组低于 UC 组($P < 0.05$)。

3 讨论

慢性间歇性缺氧与糖耐量减低、空腹血糖受损及胰岛素抵抗关系密切,然而,目前慢性间歇性缺氧导致睡

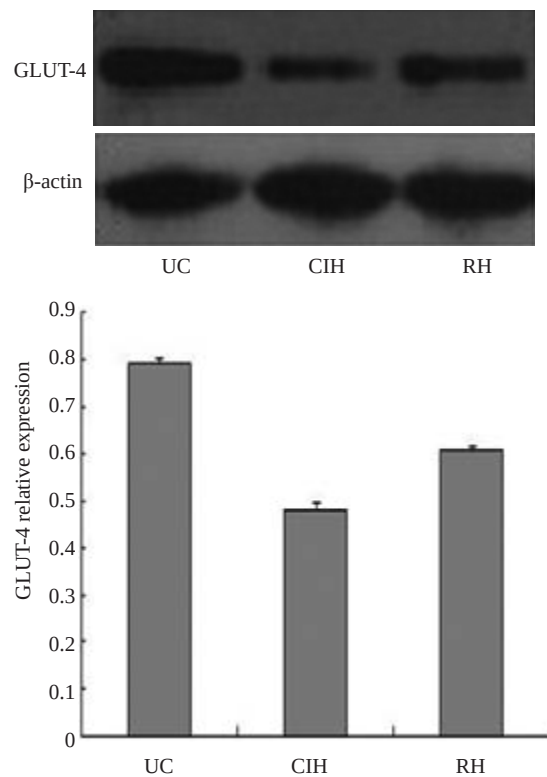


图1 骨骼肌GLUT-4蛋白的表达

Fig.1 Effects of chronic intermittent hypoxia on GLUT-4 protein levels in rat skeletal muscles. GLUT-4 protein expression in the skeletal muscles was significantly reduced after CIH ($P<0.05$) and increased after reoxygenation ($P<0.05$).

睡眠呼吸疾病患者代谢紊乱的相关机制仍知之甚少^[11-12]。我们的研究发现,大鼠在经历慢性间歇性缺氧后,CIH组FBG、FINS及IRI高于UC组,提示慢性间歇性缺氧参与大鼠胰岛素抵抗的发生发展;同时,CIH组大腿骨骼肌GLUT-4蛋白表达量低于对照组及复氧组,提示慢性间歇性缺氧对GLUT-4蛋白的表达产生了影响。胰岛素刺激的骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取主要是通过诱导GLUT-4蛋白从细胞内储存网点易位到细胞膜^[13]。胰岛素抵抗主要表现为外周糖代谢组织(如骨骼肌、肝脏、脂肪组织)对葡萄糖的摄取和利用障碍,损伤GLUT-4的表达、易位和(或)胰岛素信号,将导致胰岛素抵抗和高血糖^[14]。大鼠骨骼肌GLUT-4表达降低,可影响骨骼肌对葡萄糖的摄取和利用,这是胰岛素抵抗的一个直接反应。在去除慢性间歇性缺氧因素后,RH组FBG、FINS、IRI以及骨骼肌GLUT-4蛋白较CIH组改善。我们认为,这样的变化可能肝脏和脂肪组织中同时存在,在经历慢性间歇性缺氧后大鼠肝脏、脂肪及肌肉等组织氧含量都发生了起伏^[15-16],慢性间歇性缺氧能导致大鼠胰岛素抵抗,这与外周糖代谢组织中GLUT-4表达降低有关。

临床研究显示,睡眠呼吸紊乱能增加循环中

TNF- α 、IL-6水平,睡眠呼吸疾病患者血浆中IL-6和TNF- α 水平比正常人高^[17]。本研究结果显示,CIH组大鼠血清中TNF- α 、IL-6明显高于RH和UC组,提示慢性间歇性缺氧能增加循环中炎症因子水平。白色脂肪组织中的巨噬细胞是TNF- α 、IL-6的重要来源,代谢综合征患者这些促炎因子都是升高的^[18]。慢性间歇性缺氧过程中,反复的低氧和再充氧,促进了活性氧的生成并诱导氧化应激。活性氧不仅是物质代谢的毒性副产物,同时也是代谢产物的调节信号,并能通过NF- κ B及活化蛋白1途径激活多重炎症因子,如IL-6、TNF- α 、IL-8等^[19-20],增加白细胞和内皮细胞粘附分子的表达以及白细胞和脂肪细胞释放的TNF- α 水平,氧化应激激活了炎症免疫反应,炎症反应又加剧氧化应激,形成恶性循环,进而促进代谢紊乱^[21]。临床研究发现,予以睡眠呼吸疾病患者持续正压通气治疗后,患者体内IL-6、TNF- α 水平下降,降低患者胰岛素抵抗^[22]。本研究中大鼠在去除缺氧因素后,RH组大鼠血清的炎症因子及IRI较CIH组明显改善,进一步验证了慢性间歇缺氧能导致体内炎症因子的产生增加,同时提示解除慢性间歇性缺氧能降低体内炎症因子水平,改善糖代谢紊乱。

本研究显示慢性间歇性缺氧导致了大鼠胰岛素抵抗,伴随着大鼠循环水平炎症因子的增加及骨骼肌GLUT-4蛋白表达量的降低。CIH组大鼠血清中TNF- α 、IL-6明显高于RH和UC组,骨骼肌GLUT-4蛋白表达量低于RH和UC组;复氧后,大鼠体内炎症因子改善的同时,大鼠对胰岛素敏感性及骨骼肌GLUT-4蛋白表达有所改善,提示炎症因子与大鼠胰岛素抵抗及GLUT-4蛋白表达量相关。胰岛素在糖代谢的信号传递过程中,首先与胰岛素受体(InsR)结合,通过胰岛素受体底物(IRS)激活磷脂酰肌醇(3)-激酶(PI3-K),PI3-K再通过其下游信号分子调节GLUT-4对葡萄糖的转运^[23]。TNF- α 通过激活JNK,增加IRS-1丝氨酸307位磷酸化,进而负性调节胰岛素与胰岛素受体的相互作用,及其下游IRS-1分子酪氨酸的磷酸化,TNF- α 能够显著增加IL-6 mRNA和蛋白的分泌。IL-6和TNF- α 一样,都能降低IRS-1和GLUT-4表达,进而减少胰岛素刺激的葡萄糖转运^[24-25]。

综上所述,慢性间歇性缺氧可引起大鼠体内炎症因子增加及外周胰岛素抵抗;大鼠胰岛素抵抗与炎症因子所致的骨骼肌GLUT-4蛋白量降低有关,去除缺氧因素后,大鼠IRI、炎症因子、GLUT-4蛋白等都改善。睡眠呼吸疾病能够导致或加剧代谢紊乱,其与2型糖尿病之间在临床、流行病学和公共卫生上有着重要联系,已逐渐成为冠心病一级或二级预防的治疗目标^[1]。及时正确的预防和治疗睡眠呼吸疾病患者糖代谢紊乱,对于防治睡眠呼吸疾病患者心、脑血管等并发症至关重要。本

研究为临床通过持续正压通气、腭咽成型手术等解除慢性间歇性缺氧及炎症因子控制等方式治疗睡眠呼吸疾病患者糖代谢紊乱提供了新的实验依据。

参考文献:

- [1] Shaw JE, Punjabi NM, Wilding JP, et al. Sleep-disordered breathing and type 2 diabetes A report from the International Diabetes Federation Taskforce on Epidemiology and Prevention[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008, 81(1): 2-12.
- [2] Young T, Palta M, Dcmpey J. The occurrence of sleep disordered breathing among middle-aged adults[J]. N Engl J Med, 1993, 328(17): 1230-5.
- [3] Tian JL, Zhang Y, Chen BY. Sleep apnea hypopnea syndrome and liver injury[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(1): 89-94.
- [4] Pamidi S, Aronsohn RS, Tasali E. Obstructive sleep apnea: Role in the risk and severity of diabetes[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2010, 24(5): 703-15.
- [5] Kim NH. Obstructive sleep apnea and abnormal glucose metabolism [J]. Diabetes Metab J, 2012, 36(4): 268-72.
- [6] Fenik VB, Singletary T, Branconi JL, et al. Glucoregulatory consequences and cardiorespiratory parameters in rats exposed to chronic-intermittent hypoxia: effects of the duration of exposure and losartan[J]. Front Neurol, 2012, 3: 51.
- [7] Gould GW, Holman GD. The glucose transporter family-structure, function and tissue-specific expression [J]. Biochem J, 1993, 295(2): 329-41.
- [8] Fletcher EC. Invited review: physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure [J]. J Appl Physiol, 2001, 90: 1600-5.
- [9] Polotsky VY, Rubin AE, Balbir A, et al. Intermittent hypoxia causes REM sleep deficits and decreases EEG delta power in NREM sleep in the C57BL/6J mouse[J]. Sleep Med, 2006, 7(1): 7-16.
- [10] 王 璋, 司良毅, 廖友斌. 大鼠睡眠呼吸暂停综合征动物模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(1): 40-3.
- [11] Punjabi NM, Shahar E, Redline S, et al. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance-The Sleep Heart Health Study[J]. Am J Epidemiol, 2004, 160(6): 521-30.
- [12] Drager LF, Jun JC, Polotsky VY. Metabolic consequences of intermittent hypoxia: relevance to obstructive sleep apnea[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2010, 24(5): 843-51.
- [13] Lee W, Ryu J, Souto RP, et al. Separation and partial characterization of three distinct intracellular GLUT4 compartments in rat adipocytes. Subcellular fractionation without homogenization[J]. J Biol Chem, 1999, 274: 37755-62.
- [14] Watson RT, Pessin JE. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation [J]. Recent Prog Horm Res, 2001, 56: 175-93.
- [15] Chen L, Cao ZL, Han F, et al. Chronic intermittent hypoxia from pedo-stage decreases glucose transporter 4 expression in adipose tissue and causes insulin resistance [J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(4): 463-70.
- [16] Reinke C, Bevens-Fonti S, Drager LF, et al. Effects of different acute hypoxic regimens on tissue Oxygen profiles and metabolic outcomes[J]. J Appl Physiol, 2011, 111(3): 881-90.
- [17] Kent BD, Ryan S, McNicholas WT. Obstructive sleep apnea and inflammation: Relationship to cardiovascular co-morbidity [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2011, 178(3, SI): 475-81.
- [18] Calvin AD, Albuquerque FN, Lopez-Jimenez F, et al. Obstructive sleep apnea, inflammation, and the metabolic syndrome [J]. Metab Syndr Relat Disord, 2009, 7(4): 271-8.
- [19] Mccord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress [J]. Am J Med, 2000, 108: 652-9.
- [20] Haddad JJ. Pharmacoredox regulation of cytokinerelated pathways: From receptor signaling to pharmacogenomics [J]. Free Ra Biol Med, 2002, 33(7): 907-26.
- [21] Lavie L, Polotsky V. Cardiovascular aspects in obstructive sleep apnea syndrome-molecular issues, hypoxia and cytokine profiles [J]. Respiration, 2009, 78(4): 361-70.
- [22] Kohler M, Ayers L, Pepperell JC, et al. Effects of continuous positive airway pressure on systemic inflammation in patients with moderate to severe obstructive sleep apnoea: a randomised controlled trial[J]. Thorax, 2009, 64: 67-73.
- [23] Bhattacharya S, Dey D, Roy SS. Molecular mechanism of insulin resistance[J]. Diabet Med, 2007, 32(2): 405-13.
- [24] Rui LY, Aguirre V, Kim JK, et al. Insulin/IGF-1 and TNF alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser(307) via distinct pathways[J]. J Clin Invest, 2001, 107(2): 181-9.
- [25] Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- α , over expressed in human fat cells from insulinresistant subjects[J]. J Biol Chem, 2003, 278(46): 45777-84.

(编辑:黄开颜)