

苏子油对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌胰岛素敏感性相关基因表达的影响

解现星, 张涛, 赵爽, 安星兰, 马兰芝, 定明, 刘源

(中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 探究富含 n-3 多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 的苏子油高脂饮食对胰岛素抵抗大鼠胰岛素敏感性及其相关基因表达的影响。方法 将胰岛素抵抗模型大鼠随机分为 2 组: 高脂组 (high fat group, HF) 和苏子油组 (perilla oil group, PO), PO 为苏子油替代 HF 中猪油比例的 20%, 4 周后测定大鼠胰岛素敏感性; 气相色谱法检测苏子油及大鼠血清 α -亚麻酸 (α -linolenic acid, ALA) 含量; Western blot 方法检测骨骼肌葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 和胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substrate-1, IRS-1) 蛋白表达; real time PCR 方法检测骨骼肌 *Glu4*、*Irs-1* mRNA 表达。结果 苏子油干预 4 周后, 与 HF 组相比, 随着 PO 组大鼠 ALA 摄入量及血清 ALA 含量升高, GLUT4 蛋白和 mRNA 表达量均显著升高, 而 IRS-1 蛋白和 mRNA 表达均显著降低; 高胰岛素-正常血糖钳夹实验结果显示两组大鼠胰岛素敏感性没有明显差异。结论 ALA (0.556 g/d) 高脂饮食干预可以调节骨骼肌 GLUT4、IRS-1 表达, 但不能改善胰岛素抵抗大鼠胰岛素敏感性。

【关键词】 α -亚麻酸; 胰岛素抵抗; 大鼠; 葡萄糖转运蛋白 4; 胰岛素受体底物-1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 12-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.12.001

Effects of perilla oil on the insulin sensitivity-related gene expression in skeletal muscle in insulin resistant rats

XIE Xian-xing, ZHANG Tao, ZHAO Shuang, AN Xing-lan, MA Lan-zhi, DING Ming, LIU Yuan
(Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

【Abstract】 **Objective** This study aims to investigate the effects of high-fat diet rich in perilla oil on the insulin sensitivity-related gene expression in skeletal muscle in insulin resistant rats. **Methods** The insulin resistant (IR) rat models were randomly divided into 2 groups, including high fat group (HF) and perilla oil (PO) intervention group fed with 20% substitution of lard energy in the HF. The insulin sensitivity of rats was measured after 4 weeks. The α -linolenic acid (ALA) content of PO in the rat plasma were analyzed by gas chromatograph. Real-time PCR was applied to measure glucose transporter 4 (GLUT4) and insulin receptor substrate-1 (IRS-1) mRNA, and Western blot assay was used for detecting the expression of GLUT4 and IRS-1 in the skeletal muscle. **Results** At the gene and protein levels, PO remarkably reduced the level of IRS-1 and upregulated the level of GLUT4 with increasing intake of ALA and serum ALA content in IR rats. The results of hyperinsulinemic-euglycemic clamp test showed no significant difference between the two groups. **Conclusions** The results of our study suggest that consumption of n-3 PUFA at levels that can typically be found

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (NO. 31272386)。

[作者简介] 解现星 (1990 -), 男, 硕士, 研究方向: 实验动物营养及代谢异常动物模型。E-mail: xxx_ryl@163.com。

[通讯作者] 刘源, 研究员, 主要从事实验动物营养及代谢异常动物模型研究。E-mail: bj_liuyuan@163.com。

in the diet fed to IR rats in the form of ALA (0.556 g/d) may not improve insulin sensitivity, even though regulating the expression of GLUT4 and IRS-1 in the skeletal muscle.

[Key words] α -Linolenic acid; Insulin resistance; Rats; Glucose transporter 4; Insulin receptor substrate-1

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是指胰岛素维持正常血糖的能力下降,其产生的生物学效应低于正常水平,或组织对胰岛素的反应性下降^[1]。胰岛素抵抗主要发生在骨骼肌、肝脏、脂肪等胰岛素的靶器官,其中骨骼肌是利用葡萄糖和维持血糖平衡的重要组织,约 80% 的胰岛素刺激所致葡萄糖摄取是由骨骼肌完成的^[2]。骨骼肌是机体发生胰岛素抵抗的重要靶组织。葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 介导的葡萄糖转运是骨骼肌糖代谢的主要限速步骤^[3]。大量研究显示 GLUT4 表达失常是胰岛素抵抗的重要因素。

胰岛素抵抗的机制十分复杂,近年研究认为胰岛素抵抗主要是因受体后信号传导障碍所致。胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS) 蛋白处于胰岛素信号通路的枢纽位置,通过自身磷酸化作用招募并结合下游的许多信号转导分子,将胰岛素信号传递、发散到下级网络,在维持细胞正常的生理功能上起到重要的作用^[4]。应用 RNAi 技术同时下调 IRS-1 和 IRS-2 基因表达,小鼠出现胰岛素抵抗、肝脏 TG 蓄积,出现肝脏脂肪变性^[5]。有研究表明,敲除 IRS-1 基因的小鼠表现出生长发育缓慢以及一定的胰岛素抵抗现象,而敲除 IRS-2 基因的小鼠出生后即表现为高血糖症状^[6,7]。IRS 在胰岛素作用方面有不同分工,IRS-1 主要作用场所是在骨骼肌,功能是调控糖原合成,IRS-2 主要调控肝脏脂质合成。

研究指出,n-3 多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 在降低血脂、改善胰岛素抵抗、抗炎症、抗动脉粥样硬化等领域有积极意义^[8]。 α -亚麻酸 (α -linolenic acid, ALA) 是结构最简单的 n-3PUFA,在动物体内不能合成。ALA 普遍存在于植物油脂中,来源较为广泛,食用油脂中的 ALA 以苏子油中含量最高。苏子油主要成分有棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸以及 ALA,其中 ALA 含量最高,约为 50% ~ 70%,本研究中添加的苏子油中 ALA 含量约占脂肪酸的 60%。目前,大多数的研究都集中于 n-3PUFA 的另外两个成员 EPA 和 DHA,而对于 ALA 的研究并不多。为此,我们研究了在摄入总热量不变的情况下,用 ALA 替代部分饱和脂肪酸,对高脂饮食引起的 IR 及其对骨骼肌 IRS-1 和 GLUT4

蛋白表达的影响,旨在为通过饮食结构的调整改善 IR 提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 (160 ± 10) g,由军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号为 SCXK(军)2012-004。实验动物饲养于军事医学科学院实验动物中心屏障环境中,合格证号为 SYXK(军)2012-005,温度控制在 (23 ± 1) °C,湿度为 (40 ± 5) %,明暗周期 12 h (6:00 ~ 18:00),动物可以自由采食、饮水。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 实验动物饲料:普通饲料:蛋白质、碳水化合物、脂肪能量比分别为 20.2%、69.49%、10.31%,能量含量为 15.7 kJ/g。高脂饲料:蛋白质、碳水化合物、脂肪能量比分别为 19.67%、34.59%、45.73%,能量含量为 19.35 kJ/g。苏子油饲料为苏子油代替高脂饲料中脂肪提供热量的 20%,能量含量和能量比与高脂饲料相同。

1.1.3 实验分组:将 48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 2 组进行胰岛素抵抗造模:对照组 (normal control group, NC) 12 只、高脂组 (high fat group, HF) 36 只。当高脂组大鼠出现胰岛素抵抗后,将出现胰岛素抵抗的 24 只高脂组大鼠随机分为 2 组:持续高脂组 (high fat group, HF)、苏子油组 (perilla oil group, PO),每组 12 只。参照 Taouis M^[9] 的研究设定干预时间为 4 周,4 周后安乐死,取骨骼肌组织液氮冷冻保存。

1.1.4 主要仪器与试剂:反转录试剂盒 (TaKaRa DRR037A, 大连); Trizol (Invitrogen 公司, 美国); Bio-Rad IQ5 real-time PCR 仪;兰格微量注射泵 (型号 LSP01-2A); RIPA 裂解液 (博迈德生物公司); BCA 试剂 (Beyotime); 蛋白酶抑制剂 Cocktail Tablets (Roche 公司, 瑞士); β -actin 一抗 (ab8227, Abcam, 英国); 小鼠 GLUT4 一抗 (ab65267, Abcam, 英国); 兔 IRS-1 一抗 (sc-559, Santa Cruz, 美国); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗 (sc-2005, Santa Cruz, 美国); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (sc-2004, Santa Cruz, 美国); Western blotting 发光

检测试剂盒 (Thermo, 美国); X 光胶片、显影液、定影液 (Kodak, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 高胰岛素-正常血糖钳夹实验:大鼠提前禁食 14 h (18:00 ~ 8:00), 肌内注射麻醉, 麻醉后进行右颈静脉及左颈动脉插管。实验过程中大鼠进行保温, 静脉输注通道并建立三通管, 一端连接于胰岛素注射泵, 一端连接于葡萄糖注射泵。动脉通道输注并封存肝素 (10 U/mL) 做留置导管便于取血, 每次取血后, 都要快速注射少量肝素以防止凝血。基础血糖需连续测定 3 次, 每次间隔为 5 min, 血糖稳定后的血糖值设为基础血糖。以恒定速率 4 mU/kg·min 输注胰岛素, 血糖测定间隔为 5 min, 根据所测的血糖值进行调整葡萄糖输注率, 使血糖值稳定在 (基础血糖 \pm 0.5) mmol/L, 稳定状态的判定标准为血糖值连续 3 次均在上述范围内。输注时间为 120 min (从输注胰岛素计), 大鼠胰岛素敏感性的评价指标取 60 ~ 120 min 的葡萄糖输注率 (glucose infusion rate, GIR) 的平均值。

1.2.2 气相色谱法检测苏子油及大鼠血清 ALA 含量: 用气相色谱仪测定苏子油和大鼠血清 ALA 含量 (GC-2010; Shimadzu, 日本)^[10]。脂肪酸甲酯化样品经 GC/MS 分析, 通过标准品对照, 按峰面积归一法对各组分进行定量。

1.2.3 实时定量 PCR: 取 10 ~ 20 mg 大鼠骨骼肌组织于离心管中, 分别运用 Trizol 法和 TaKaRa 试剂盒来提取总 RNA 和反转录, 反转录条件: 37°C 15 min, 85°C 5 s, 操作均按照说明书进行。实时定量部分采用 TaKaRa 荧光染料试剂盒。加入 cDNA 模板后, 再分别加入目的基因 (GLUT4 或 IRS-1)、内参 β -actin 的引物, 进行实时定量, 每个样品设置 3 个重

复。所需引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成。GLUT4 上游: 5'-GGGCTGTGAGTGAGTGCTTTC-3'; GLUT4 下游: 5'-CAGCGAGGCAAGGCTAGA-3'; 产物长度为 96 bp。IRS-1 上游: 5'-TGGACAAACGGAGTAGGG-3'; IRS-1 下游: 5'-CTGGTGAAGAGGAGAA-3'; 产物长度为 197 bp。 β -actin 上游: 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'; β -actin 下游: 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'; 产物长度为 150 bp。

1.2.4 Western-blot 检测: 提取骨骼肌组织蛋白, BCA 法测蛋白浓度。HF、PO 总蛋白量一致的情况下进行 SDS-PAGE 凝胶电泳实验, 电转膜后以 5% 脱脂奶粉封闭, 再分别与 GLUT4、IRS-1 和 β -actin 抗体反应, 继而与二抗作用, 再用增强化学发光法显示蛋白条带, β -actin 作为内参。显影片上的条带用 Image J 软件进行蛋白灰度分析, 各组与 actin 蛋白量比值作相对含量计数。

1.3 统计学方法

实验数据均以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示, 数据进行统计分析软件为 SAS 9.0, 统计分析方法为成组设计定量资料 *t* 检验。

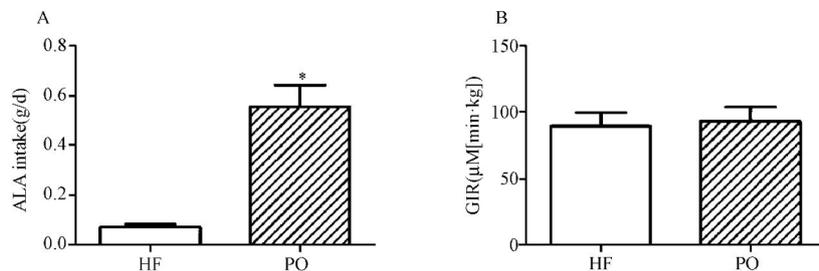
2 结果

2.1 高胰岛素-正常血糖钳夹实验结果

造模期结束后, 高胰岛素-正常血糖钳夹实验结果显示, 高脂组 GIR 显著低于对照组 ($P = 0.0086$), 高脂组大鼠产生胰岛素抵抗, 说明造模成功。

2.2 ALA 摄入量与血清 ALA 含量及胰岛素敏感性

气相色谱法检测与大鼠采食量运算得出的 ALA 摄入量说明, PO 组大鼠 ALA 摄入量显著高于



注: 实验数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示, 每组有 6 只大鼠。图中“*” ($P < 0.05$) 代表与 HF 组差异有显著性。A, ALA 摄入量; B, 葡萄糖灌注率。HF, 高脂组; PO, 苏子油组。

图 1 ALA 摄入量与胰岛素敏感性

Note. Data are mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ rats per diet. * $P < 0.05$ indicates a significant different vs. the HF group. A, ALA intake; B, GIR. HF, high fat group; PO, perilla oil group.

Fig. 1 ALA intake and insulin sensitivity in the rats

HF 组 ($P < 0.0001$), 见图 1A。与此相对应的是, HF 组大鼠血清并未检测出 ALA 存在, 而 PO 组大鼠血清 ALA 含量为 $0.575 \times 10^{-3} \pm 0.00034$ mg/mL。高胰岛素-正常血糖钳夹实验结果显示, 与 HF 组相比, PO 组大鼠胰岛素敏感性没有明显变化 ($P = 0.3246$), 见图 1B。

2.3 实时定量 PCR 分析 GLUT4 和 IRS-1 表达差异

实时定量 PCR 结果显示, 与 HF 组相比, PO 组大鼠骨骼肌 *Glut4* mRNA 表达量显著升高 ($P = 0.0094$)。与此结果相反的是, 模型大鼠骨骼肌 *Irs-1* mRNA 表达量在 PO 干预下显著降低 ($P = 0.0032$), 见表 1。

2.4 Western blot 检测 GLUT4 和 IRS-1 蛋白表达

结果表明, 与 HF 组相比, PO 组大鼠骨骼肌 IRS-1 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.0001$), 见图 2A。而 PO 可以显著促进胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 GLUT4 蛋白的表达 ($P < 0.0001$), 见图 2B。

3 讨论

摄入大量脂肪被认为是 IR 形成的一个主要因素。本实验采用脂肪供能占日粮总能量 45% 的高脂饮食饲养 SD 大鼠, 12 周后, 大鼠产生了明显的 IR, 与人类发病情况较接近。作为诸多代谢性疾病

的共同病理基础, 目前在临床上非药物性干预是治疗 IR 的一个重要手段。柳红芳等^[11]的研究发现 n-3 PUFA 可以预防高脂饮食诱发大鼠胰岛素抵抗, 但并未研究 n-3 PUFA 对模型大鼠是否存在治疗作用, 且该日粮中添加的是 EPA/DHA, 并非 ALA。我们旨在保持日粮能量含量不变的情况下, 以富含 ALA 的苏子油代替高脂日粮中猪油含量的 20%, 探究 n-3 PUFA 对高脂诱导胰岛素抵抗大鼠胰岛素敏感性的影响及分子基础。

有研究表明, 高脂饮食诱发的胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 GLUT4 蛋白表达量显著降低^[12]。GLUT4 分子含有 509 个氨基酸残基, 是目前已知的 14 种促进跨膜已糖转运体葡萄糖转运体 (GLUT) 家族成员之一^[3]。选择性基因敲除小鼠骨骼肌中 GLUT4 基因, 会导致严重的胰岛素抵抗和葡萄糖耐受不良, 说明 GLUT4 的表达或活性下降所导致的骨骼肌和脂肪细胞对葡萄糖摄取、利用的减少是胰岛素抵抗产生的重要分子基础^[13,14]。而通过转基因的方式来提升 GLUT4 基因敲除小鼠骨骼肌 GLUT4 的表达, 又可以改善胰岛素抵抗和葡萄糖耐受不良^[3]。目前, 促进 GLUT4 表达已然成为治疗胰岛素抵抗的一个重要研究方向。Jacob 等发现 ALA (30 mg/kg·day) 灌胃干预 10 d 对肥胖大鼠骨骼肌 GLUT4 表达没有显著影响^[15]。而 Taouis 等发现, 富含 ALA 的菜籽

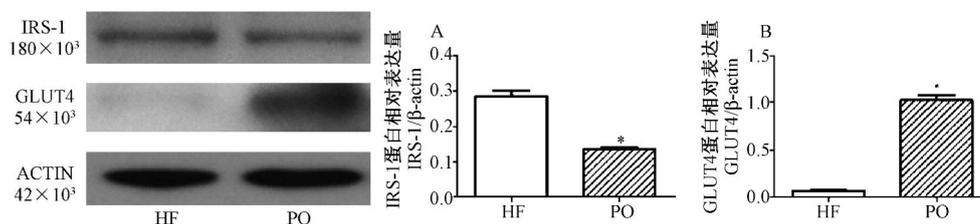
表 1 基因相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.1 Relative gene expression levels ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

基因 Genes	相对表达量 Relative expression		
	高脂组 HF	苏子油组 PO	P
葡萄糖转运蛋白 4 (<i>Glut4</i>)	0.658 ± 0.141 ^a	1.011 ± 0.125 ^b	0.0094
胰岛素受体底物-1 (<i>Irs-1</i>)	0.689 ± 0.186 ^a	0.301 ± 0.095 ^b	0.0032

注: 字母相同表示没有显著性差异。

Note. The same letter denotes that the difference is statistically not significant.



注: 图中“*” ($P < 0.05$) 代表与 HF 组差异有显著性。A, IRS-1 蛋白相对表达量;

B, GLUT4 蛋白相对表达量。HF, 高脂组; PO, 苏子油组。

图 2 GLUT4 和 IRS-1 的蛋白表达量

Note. “*” $P < 0.05$ indicates a significant difference vs. the HF group. A, Relative expression of IRS-1/ β -actin;

B, Relative expression of GLUT4/ β -actin. HF, high fat group; PO, perilla oil group.

Fig.2 Expression of GLUT4 and IRS-1 proteins in the rats

油高脂饮食干预 4 周,ALA (0.882 g/d) 可以显著提升大鼠骨骼肌 GLUT4 表达^[9]。这可能与饲料中添加 ALA 的量及干预时间不同有关。我们的研究发现,通过给予胰岛素抵抗大鼠富含 ALA (0.556 g/d) 的高脂饮食干预 4 周后,随着模型大鼠血清 ALA 含量升高, GLUT4 蛋白和 mRNA 表达量均显著升高。

IRS-1 是最先发现的胰岛素受体底物,其发挥功能的主要场所在骨骼肌。在胰岛素代谢效应方面,IRS-1 功能是促进肌肉组织摄取利用葡萄糖^[16]。研究证明,IRS-1 基因剔除小鼠出现胰岛素抵抗症状,同时,经过高脂膳食诱发的胰岛素抵抗大鼠,其骨骼肌 IRS-1 蛋白表达显著降低^[7,17]。有研究发现,给予肥胖大鼠 ALA (30 mg/kg·day) 饮食 15 d 后,肥胖大鼠骨骼肌 IRS-1 蛋白表达量显著升高^[18]。而我们的研究发现,ALA 饮食干预 4 周之后,模型大鼠骨骼肌 IRS-1 蛋白和 mRNA 表达均显著降低。这可能是我们实验中 ALA 干预后大鼠胰岛素敏感性没有明显改善的一个重要原因。ALA 改善胰岛素抵抗可能与剂量、时间存在相关性,有待进一步的实验研究。

综上所述,ALA 饮食干预可以促进胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 GLUT4 蛋白和 mRNA 的表达,但降低 IRS-1 蛋白和 mRNA 的表达。ALA (0.556 g/d) 高脂饮食干预没有改善胰岛素抵抗大鼠胰岛素敏感性。

参考文献:

- [1] 张智慧,张梅. 胰岛素抵抗的研究进展 [J]. 医学综述, 2007, 13 (24): 1997-1998.
- [2] 刘传道,江钟立,朱红军,等. 不同强度的耐力运动对糖尿病大鼠骨骼肌 GLUT4 mRNA 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(4): 244-247.
- [3] Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter [J]. Cell Metab, 2007, 5(4): 237-252.
- [4] White MF, Kahn CR. The insulin signaling system [J]. J Biol Chem, 1994, 269(1): 1-4.
- [5] Taniguchi CM, Ueki K, Kahn CR. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism [J]. J Clin Invest, 2005, 115: 718-727.
- [6] Araki E, Lipes MA, Patti ME, et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene [J]. Nature, 1994, 372: 186-190.
- [7] Withers DJ, et al. Disruption of IRS-2 causes type2 diabetes in mice [J]. Nature, 1998, 391(6670): 900-904.
- [8] Angheliescu I. Omega-3 fatty acids for CHD with depression [J]. JAMA, 2010, 303(9): 836-836.
- [9] Taouis M, Dagou C, Ster C, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002, 282(3): E664-E671.
- [10] 罗伟强. 气相色谱法测定葵花籽油的脂肪酸 [J]. 食品工业科技, 2003, 24(6): 79-80.
- [11] 柳红芳,陆菊明,母义明,等. n-3 多不饱和脂肪酸对高脂诱导胰岛素抵抗大鼠肝脏和骨骼肌胰岛素受体及葡萄糖转运蛋白 4 的作用 [J]. 中华糖尿病杂志 (1006-6187), 2005, 13(3): 192-195.
- [12] 宋春宇,毕会民. 高脂饮食喂养对大鼠骨骼肌细胞膜 GLUT4 含量的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(10): 1866-1870.
- [13] Erik AR, Mark H. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake [J]. Physiol Rev, 2013, 93(3): 993-1017.
- [14] 唐海双,王清松,焦炳华,等. GLUT4 在胰岛素调控葡萄糖转运中的作用 [J]. 生命的化学, 2014, 34(2): 285-290.
- [15] Jacob S, Streeper RS, Fogt DL, et al. The antioxidant α -lipoic acid enhances insulin-stimulated glucose metabolism in insulin-resistant rat skeletal muscle [J]. Diabetes, 1996, 45(8): 1024-1029.
- [16] Schmitz - Peiffer C, Whitehead J. IRS-1 regulation in health and disease [J]. IUBMB Life, 2003, 55(7): 367-374.
- [17] 许国喜,沈飞. 运动对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 IRS-1 与 Tyr 磷酸化及氧化应激的影响 [J]. 西安体育学院学报, 2012, 29(1): 89-93.
- [18] Saengsirisuwan V, Kinnick TR, Schmit MB, et al. Interactions of exercise training and lipoic acid on skeletal muscle glucose transport in obese Zucker rats [J]. J Appl Physiol, 2001, 91(1): 145-153.

[修回日期] 2015-09-16