

· 论 著 ·

罗格列酮对肥胖大鼠骨骼肌脂质及其相关蛋白表达的影响

毛锦宁¹, 周波^{2△}

(1. 苏州大学附属第二医院心内科 215004; 2. 重庆医科大学附属第一医院内分泌科 400016)

摘要:目的 探讨罗格列酮对肥胖大鼠骨骼肌脂质含量和脂滴相关蛋白磷酸化周脂素和小凹蛋白-3 表达的影响。方法 建立肥胖大鼠模型并以罗格列酮进行干预, 14 周后测量体质量、身长, 检测生化指标, 并对其进行正葡萄糖-高胰岛素钳夹试验; 处死大鼠后提取骨骼肌, 生化方法检测骨骼肌脂质含量、Western blot 检测骨骼肌脂滴相关蛋白的表达水平。结果 肥胖大鼠骨骼肌细胞内脂质沉积明显增加、磷酸化周脂素和小凹蛋白-3 分别较对照组增加 42% 和 26%, 与胰岛素抵抗相关, 而罗格列酮干预后可以显著降低肥胖大鼠的骨骼肌脂质含量、增加胰岛素敏感性, 上调磷酸化周脂素和小凹蛋白-3 的表达水平。结论 罗格列酮增加胰岛素敏感性, 上调磷酸化周脂素和小凹蛋白-3 的表达水平与格列酮类改善脂质溢出、调节脂滴脂质构成, 直接下调 DAG 等反应性脂簇有关。

关键词:肥胖; 胰岛素抵抗; 罗格列酮; 脂滴相关蛋白

中图分类号: R365.589

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)08-0914-03

Effect of rosiglitazone on lipid content and expression of lipid droplets related proteins in skeletal muscle of obese rat

MAO Jin-ning¹, ZHOU Bo^{2△}

(1. Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215004, China;

2. Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the effect of obesity on lipid and expression of lipid droplets related proteins in skeletal muscle, and to discuss the effect of rosiglitazone intervention on expression of lipid droplets related proteins in skeletal muscle. **Methods** The animal model was established with Wistar rats and after 14 weeks follow-up, their weights, body lengths, plasma biochemical parameters were measured and then hyperinsulinemic-euglycemic clamp to assess insulin sensitivity of rats was proceeded. Then, the rats were sacrificed for detecting the levels of skeletal muscle lipid and expressions of lipid related proteins. Skeletal muscle triglyceride (TG), diacylglycerol (DAG) were investigated by biochemical methods. The expressions of phosphorylated perilipin and caveolin-3 were measured by western blotting. **Results** In obese states, lipid content in skeletal muscle was increased as well as expression of lipid droplets related proteins phosphorylated perilipin and caveolin-3 upregulated by 42% and 26%, which were associated with insulin sensitivity. Rosiglitazone can decrease lipid content and upregulate the expressions of phosphorylated perilipin and caveolin-3 in skeletal muscle of the obese rats, while the whole body had better insulin sensitivity. **Conclusion** Rosiglitazone can increase insulin sensitivity and upregulate the expressions of phosphorylated perilipin and caveolin-3 in skeletal muscle, which may be a defencing mechanism by downregulating lipid content especially DAG to protect skeletal muscle when there is lipid overspill.

Key words: obesity; insulin resistance; rosiglitazone; lipid droplets related proteins

近年来, 肥胖患者体脂研究正从总体脂、局域脂肪向异位脂质演变。研究证实人类或遗传性肥胖大鼠骨骼肌细胞内脂质沉积 (intra-myocellular lipids, IMCL) 明显增加, 且此脂滴含量独立于体质指数、腰围与胰岛素抵抗 (IR) 相关联^[1]。脂滴又称作脂质小体 (lipid body), 是人们逐渐发现的在细胞内一些由单层磷脂覆盖的三酰甘油和少量胆固醇脂构成的中性颗粒^[2]; 其核心和单层磷脂上分布和镶嵌着多种蛋白, 被称作脂滴相关蛋白, 参与细胞内脂滴的形成和代谢^[3], 在细胞内脂质代谢的动态平衡和囊泡转运及信号级联传递过程中起重要作用^[4]。罗格列酮是人工合成的过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptors- γ , PPAR γ) 配体激动剂, 在骨骼肌中有独立于脂肪细胞外增加胰岛素敏感性的作用^[5-6], 因此, 作者推测罗格列酮可调节骨骼肌脂滴相关蛋白表达而影响肥胖大鼠胰岛素敏感性。为此, 本文构建了胰岛素抵抗肥胖大鼠模型, 探讨罗格列酮对肥胖大鼠骨骼肌脂质含量和脂滴相关蛋白磷酸化周脂素和小凹蛋白-3 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备 Wistar 大鼠 32 只, 清洁级, 健康, 雄性, 6 周龄, 体质量 150~170 g。适应性喂养 1 周后, 随机分组: 对照组 (Cont 组, $n=8$) 喂养普通饲料; 肥胖组 (Obes 组, $n=24$) 喂养高脂饲料。高脂喂养后, 高脂组不限制食物摄入量, 普通喂养组每天每只喂养 23 g, 每周称体质量 1 次, 观察变化。12 周后, Obes 组随机分为 2 组: 罗格列酮组 (Rosi 组, $n=12$) 高脂喂养的同时给予罗格列酮灌胃 ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 干预 2 周; Obes 组剩余 12 只继续给予高脂喂养并灌注生理盐水与 Rosi 组对照。

1.2 体质量和生化指标测定 14 周末, 空腹麻醉前测尾静脉血糖。以 3% 的戊巴比妥钠 ($0.15 \text{ mL}/100 \text{ g}$) 腹腔麻醉, 测量鼻尖到肛门的长度作为身长, 以 Lee 指数 [$1000 \times \text{体质量}(\text{g})^{1/3} / \text{体长}(\text{cm})$] 作肥胖判别指标。取动脉血测空腹胰岛素 (FINS)、游离脂肪酸 (FFA)。处死前, 从心脏取血 1 mL 测定总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、游离脂肪酸 (FFA)、胰岛素 (INS)。

△ 通讯作者, E-mail: zhoubo915@126.com。

1.3 正葡萄糖-高胰岛素钳夹试验^[7] 两组大鼠股静脉、股动脉插管,微量泵以恒定的速度($10 \mu\text{u} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)从股静脉输注短效胰岛素和 20% 的葡萄糖,根据血糖调整胰岛素输注率,使血糖控制在 5~6 mmol/L,直到 120 min 为止。

1.4 分离提取骨骼肌并进行 TG 和 DAG 的测定^[8-9] 分离并提取骨骼肌组织,分别按照参考文献[8]与[9]进行骨骼肌组织中 TG 和 DAG 提取与测定。

1.5 脂滴相关蛋白的测定 (1)免疫沉淀:取新鲜骨骼肌与裂解缓冲液孵育,置入 Eppendorf 管,低温离心 14 000 r/min 沉淀 10 min,取上清液,加入抗周脂素抗体(1:100)旋匀 2 h。加入 50 μL protein-A sephrose(150 mg/mL),4 $^{\circ}\text{C}$ 旋匀 2 h。弃上清液,沉淀用缓冲液 II 洗涤 2 次,溶于 30 μL SDS 样本缓冲液中。(2)免疫印迹:①SDS-PAGE,5% 浓缩胶,10% 分离胶,取骨骼肌组织加入上样缓冲液中,加热变性后,75 V 电泳至分离胶换 3 W 强度,电泳 3~4 h;②转膜,采用电转移装置 200 mA 转移 2 h;③免疫反应,一抗为小凹蛋白抗体和抗丝氨酸-苏氨酸抗体。滤膜置于 ECL 化学发光液,曝光显色,图像分析系统进行吸光度扫描,结果以条带吸光度-背景吸光度与面积乘积定量。

1.6 统计学方法 采用 SAS8.2 软件进行统计学分析。正态分布 $\bar{x} \pm s$ 表示,偏态分布变量(FFA、TG、INS)经对数转换后进行统计学处理。3 组组间计量资料的比较用单因素方差分析,各组之间两两比较用 SNK 法(student-newman-keuls),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 形态学及生化指标比较 Obes 组和 Cont 组基础体质量差异无统计学意义。Obes 组能量摄入是 Cont 组的 1.2 倍,从喂养第 3 周起 Obes 组体质量开始明显高于 Cont 组,12 周时 Obes 组体质量均高于 Cont 组平均体质量 20% 以上,肥胖模型成功。14 周时 Obes 组体质量比 Cont 组体质量增高 30%,体长、Lee 指数较 Cont 组显著增加。Obes 组腹膜脂肪、腹膜后脂肪分别是 Cont 组的 1.9、2.9 倍;FINS、TG、FFA 明显升高,而空腹血糖(FBG)、TC 与 Cont 组差异无统计学意义。罗格列酮干预前后 Rosi 组和 Obes 组体质量及 Lee 指数差异无统计学意义。但干预 2 周后 Rosi 组附睾脂肪、腹膜后脂肪、血浆 FINS、TG 和 FFA 均较 Obes 组减少,见表 1。

表 1 3 组大鼠体质量、能量摄取、身体脂肪及血代谢指标比较($\bar{x} \pm s$)

指标	Cont 组(n=8)	Obes 组(n=12)	Rosi 组(n=12)
基础体质量(g)	225.60±12.70	221.80±9.30	218.40±9.40
12 周时体质量(g)	276.80±12.30	396.30±13.20*	387.40±12.40
14 周时体质量(g)	298.50±36.40	398.40±34.30*	388.80±300.90
每天食物摄入(g)	22.7	19.3	—
每天能量摄入(kcal)	73.4	87.9	—
鼻-肛长度(cm)	21.82±0.96	23.42±0.52*	23.52±0.65
Lee 指数	302.32±9.60	323.34±9.12*	314.36±8.74
附睾脂肪/100 g 体质量	1.12±0.34	8.22±0.56**	1.76±0.32#
腹膜后脂肪/100 g 体质量	1.06±0.56	3.26±0.86**	2.54±0.59#
空腹血糖(mmol/L)	4.60±0.56	5.60±0.82	4.80±0.78
空腹胰岛素(u/L)	16.40±4.6	28.70±6.2*	18.30±6.7#
总胆固醇(mmol/L)	1.36±0.43	1.42±0.38	1.40±0.34
三酰甘油(mmol/L)	0.97±0.43	1.66±0.52*	1.12±0.46#
游离脂肪酸(mmol/L)	0.35±0.05	0.53±0.08**	0.38±0.06#

与 Cont 组比较,* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$; 与 Obes 组比较,# : $P < 0.05$, ## : $P < 0.01$ 。

2.2 各组胰岛素敏感性及骨骼肌脂肪含量检测 钳夹稳态期,Obes 组大鼠葡萄糖输注率(GIR)仅为 Cont 组的 34%。测定骨骼肌 TG 和 DAG 含量,发现 Obes 组较 Cont 组分别增加 184% 和 35%,给予罗格列酮干预后,大鼠 GIR、骨骼肌 TG 和 DAG 含量较 Obes 组显著改善,与 Cont 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠骨骼肌脂质含量及 GIR 比较($\bar{x} \pm s$)

项目	Cont 组(n=8)	Obes 组(n=12)	Rosi 组(n=12)
骨骼肌 TG($\mu\text{g/g}$)	23.13±8.54	65.41±9.63*	38.14±8.58#
骨骼肌 DAG($\mu\text{mol/g}$)	6.23±0.48	8.54±0.62*	6.46±0.52#
葡萄糖输注率(GIR) ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	14.30±1.28	4.87±1.24*	12.80±1.49#

与 Cont 组比较,* : $P < 0.05$; 与 Obes 组比较,# : $P < 0.05$ 。

2.3 骨骼肌脂滴相关蛋白检测 肥胖大鼠骨骼肌磷酸化周脂素和小凹蛋白-3 分别较 Cont 组增加 42% 和 26%,罗格列酮干预 2 周后磷酸化周脂素和小凹蛋白-3 的表达水平进一步增加,分别是 Cont 组 182% 和 173%,见表 3,图 1、2。

表 3 Western blot 检测骨骼肌磷酸化周脂素和小凹蛋白-3 的表达水平

项目	Cont 组(1)	Obes 组(2)	Rosi 组(3)
磷酸化周脂素(%cont)	100	142±32*	182±48*
小凹蛋白-3(%cont)	100	126±28	173±39*

与 Cont 组比较,* : $P < 0.05$; 与 Obes 组比较,* : $P < 0.05$ 。

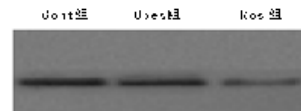


图 1 骨骼肌磷酸化周脂素的表达水平

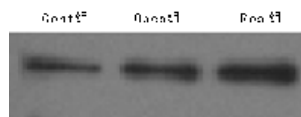


图 2 骨骼肌小凹蛋白-3 的表达水平

3 讨 论

骨骼肌感受 and 整合环境刺激并作出应答的内分泌器官,是整体条件下胰岛素介导的葡萄糖摄取的关键靶位之一。已有研究证实脂滴是骨骼肌细胞内脂质沉积形式,由 TG 和少量的胆固醇构成,在机体营养过剩时储备起来,在骨骼肌收缩时因其能量密度高于糖原而作为能源底物迅速提供能量。本文构建肥胖大鼠模型,不仅发现肥胖鼠骨骼肌脂质沉积较正常对照组显著增高,而且正葡萄糖-高胰岛素钳夹试验也提示肥胖组大鼠存在显著的 IR,同时还发现肥胖大鼠经过 2 周的罗格列酮干预后,血浆 FFA、TG/HDL-C 水平较肥胖鼠显著下降,骨骼肌脂质含量亦减少且伴机体胰岛素敏感性增加。此与相关研究结果一致^[10]。提示肥胖环境下骨骼肌存在明显能源底物摄取和代谢差异,并且其差异可能与胰岛素敏感性相关联。

最近,国外学者却发现长期进行耐力训练的运动员骨骼肌细胞内脂质含量虽然亦增加,而运动员的胰岛素敏感性却比较高^[11]。显然,骨骼肌 IR 可能不是脂滴含量直接作用的结果,而主要跟骨骼肌细胞内脂滴代谢有关,其参与调解脂滴形成或

者水解的酶或蛋白质分子以及细胞器可能与胰岛素受体及其受体后信号转导有着某种作用^[12]。周脂素,是最早发现的脂滴相关蛋白对脂滴的水解起着双重调控作用。基础状态下,未被磷酸化的周脂素在脂滴表面形成“屏障”,阻止激素敏感脂酶(HSL)接触到脂滴从而抑制脂滴的水解,当周脂素发生磷酸化修饰反应以后,“分子屏障”被打开,从而允许磷酸化的 HSL 转移到脂滴的表面导致脂滴水解^[13-14]。本文结果显示肥胖组骨骼肌磷酸化周脂素表达较对照组显著上调,与国外研究结果相符^[15],提示脂滴分解代谢参与了 IR 的发生。小凹蛋白是细胞质膜表面有富含胆固醇的疏水性泡沫状内陷微区表面的标记蛋白,与周脂素和蛋白激酶催化亚基形成复合物,协同参与脂质代谢的分子调控。研究发现大鼠骨骼肌小凹蛋白-3 基因敲除后体质量明显大于野生型,其骨骼肌中葡萄糖摄取和糖原合成量分别下降 20% 和 40%,并呈现出餐后高胰岛素血症、机体 IR 和糖耐量下降。但本研究却显示肥胖大鼠骨骼肌小凹蛋白-3 表达较对照组显著上调。不仅如此,另一方面本研究还发现 Rosi 组大鼠骨骼肌中磷酸化周脂素和小凹蛋白-3 的表达水平较 Obes 组进一步增加,但却伴胰岛素敏感性改善。同样上调磷酸化周脂素和小凹蛋白-3 的表达 Rosi 组和 Obes 组胰岛素敏感性却不一样。

DAG 是细胞内重要的信息脂质,可通过调节蛋白激酶 C (PKC) 的调节亚单位而使 PKC 移位激活。大量研究已证实 PKC 可作用于胰岛素受体或受体底物 1、2 介导胰岛素抵抗的发生。本研究发现 Obes 组骨骼肌 DAG 含量较 Cont 组显著增加,而罗格列酮干预则可下调 DAG 水平,说明 DAG 是肥胖 IR 的关键调控分子。DAG 既可来源于脂滴的分解,又可来源于脂质的从头合成。已有研究显示大的脂滴在 HSL 分解时,可产生 DAG 等大量中间代谢产物。而罗格列酮干预,使血浆 FFA 减少,骨骼肌脂滴变小,HSL 分解完全,从而使 DAG 含量减少,胰岛素敏感性增加。以上研究结果表明,当营养过度时脂肪组织的储存容量饱和而脂质溢出(overspill),启动了骨骼肌等非脂肪组织脂质沉积对营养过剩的内源性保护作用,但骨骼肌与脂肪组织不同,贮脂能力有限,导致脂滴相关蛋白表达变化、脂滴水解增加,形成了以 DAG 为代表的反应性脂簇的积聚,而后者可以加重 IR。因此,肥胖相关性 IR 可以被看作是机体对营养过度一系列防御反应到缺陷性反应的结果。本研究显示 Rosi 组周脂素及小凹蛋白-3 的表达均较 Obes 组上调而胰岛素敏感性较 Cont 组改善,可能与格列酮类改善脂质溢出、调节脂滴脂质构成,直接下调 DAG 等反应性脂簇等关系密切。

参考文献:

- [1] Brown DA. Lipid droplets: protein floating on a pool of fat[J]. *Curr Biol*, 2001, 11: 446.
- [2] Cohen AW, Combs TP, Scherer PE, et al. Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 48(6): 1151.
- [3] Capozza F, Combs TP, Cohen AW, et al. Caveolin-3 knockout mice show increased adiposity and whole body insulin resistance, with ligand-induced insulin receptor instability in skeletal muscle[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288(6): 1317.
- [4] 周波,毛锦宁,李启富. 肥胖对大鼠骨骼肌脂滴相关蛋白表达的影响及意义[J]. *中国糖尿病杂志*, 2009, 17(1): 56.
- [5] Li S, Okamoto T, Chun M, et al. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 15693.
- [6] Carlson BM, Carlson JA, Dedkov EI, et al. Concentration of caveolin-3 at the neuromuscular junction in young and old rat skeletal muscle fibers[J]. *J Histochem Cytochem*, 2003, 51(9): 1113.
- [7] DeFronzo R, Tobin J, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance[J]. *Am J Physiol*, 1979, 237: 214.
- [8] Kriketos AD, Furler SM, Gan SK, et al. Multiple indexes of lipid availability are independently related to whole body insulin action in healthy humans[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88: 793.
- [9] Ikeda Y, Olsen GS, Ziv E, et al. Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance in *Psammomys Obeusus*: overexpression of protein kinase C ϵ in skeletal muscle precedes the onset of hyperinsulinemia and hyperglycemia[J]. *Diabetes*, 2001, 50(3): 584.
- [10] Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, et al. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acid in muscle phospholipids[J]. *Diabetes*, 1991, 40(2): 280.
- [11] Malenfant P, Joannisse DR, Thériault R, et al. Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects[J]. *International Journal of Obesity*, 2001, 25(9): 1316.
- [12] van Loon LJ, Koopman R, Manders R, et al. Intramyocellular lipid content in type 2 diabetes patients compared with overweight sedentary men and highly trained endurance athletes[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 287(3): 558.
- [13] Virkamäki A, Korshennikova E, Seppälä-Lindroos A, et al. Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle[J]. *Diabetes*, 2001, 50(10): 2337.
- [14] Prats C, Donsmark M, Qvortrup K, et al. Decrease in intramuscular lipid droplets and translocation of HSL in response to muscle contraction and epinephrine[J]. *J Lipid Res*, 2006, 47(11): 2392.
- [15] Londos C, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, et al. Perilipin: proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells[J]. *Biochem Soc Trans*, 1995, 23: 611.