

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.22.003

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190924.1727.006.html>(2019-09-25)

胃肠转流术改善糖尿病大鼠胰岛素抵抗和增加 外周脂肪和肌肉组织中 GLUT-4 基因表达*

左莹¹, 刘菊华^{1,2}, 严宗逊¹, 雷震^{1△}

(1. 川北医学院附属医院内科, 四川南充 637000; 2. 成都中医药大学, 成都 610000)

[摘要] **目的** 观察并分析胃肠转流术对 2 型糖尿病(T2DM)大鼠血糖、胰岛素抵抗指数及葡萄糖转运蛋白 4(GLUT-4)基因表达的影响及可能机制。**方法** 通过高脂饮食及腹腔注射链脲佐菌素制备 T2DM 大鼠模型, 成模后分为 T2DM 胃肠转流术组(DRO 组)和 T2DM 假手术组(DSO 组), SD 大鼠胃肠转流术组(NRO 组)和 SD 大鼠假手术组(NSO 组)。测定术前、术后 4 周、术后 8 周各组空腹血糖(FBG)、空腹血清胰岛素(Fins)及胰岛素抵抗指数(IR); 术后 8 周处死大鼠, 取外周脂肪和肌肉组织检测 GLUT-4 基因表达。**结果** DRO 组 FBG 及 HOMA-IR 术后 4 周较术前下降, 但差异无统计学意义($P>0.05$), 术后 8 周较术前明显下降($P<0.05$), 同时显著低于同时时间点 DSO 组($P<0.05$), DRO 组 FBG 仍高于 NRO 及 NSO 组($P<0.05$), 但 HOMA-IR 与 NRO 及 NSO 组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。术后 8 周, DRO 组外周脂肪及肌肉组织中 GLUT-4 基因表达较 DSO 组明显增加($P<0.01$), 与 NRO 及 NSO 组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。Pearson 相关性分析提示术后 8 周外周脂肪及肌肉组织中 GLUT-4 基因表达与 FBG 及 HOMA-IR 呈负相关($P<0.01$)。**结论** 胃肠转流术可改善 T2DM 大鼠的胰岛素抵抗、降低血糖, 其机制可能与术后脂肪组织和肌肉组织中 GLUT-4 基因表达增高相关。

[关键词] 2 型糖尿病; 胃肠转流术; 血糖; 胰岛素抵抗; 葡萄糖转运蛋白 4 基因

[中图法分类号] R587.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)22-3790-04

Gastric bypass surgery improves insulin resistance and increases GLUT-4 gene expression of peripheral adipose and skeletal muscle tissue in diabetic rats*

ZUO Ying¹, LIU Juhua^{1,2}, YAN Zongxun¹, LEI Zhen^{1△}

(1. Department of Internal Medicine, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610000, China)

[Abstract] **Objective** To observe and analyze the influence of gastric bypass surgery on blood glucose, insulin resistance index and glucose transporter 4 (GLUT-4) gene expression in type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats and its possible mechanism. **Methods** The T2DM rat model was prepared by high fat diet and intraperitoneal injection of streptozotocin. After modeling, the T2DM rats were divided into the T2DM gastric bypass surgery group (DRO group) and T2DM sham operation group (DSO group), while the SD rats were also divided into the gastric bypass surgery group (NRO group) and SD rats sham operation group (NSO group). Fasting plasma glucose (FBG), fast plasma insulin (Fins) and the insulin resistance index (HOMA-IR) were measured before operation and at postoperative 4, 8 weeks. The rats were killed at postoperative 8 weeks, the peripheral adipose and skeletal muscle tissues were taken for detecting the expression of GLUT-4 gene. **Results** FBG and HOMA-IR at postoperative 4 weeks in the DRO group was decreased compared with those before operation, but the difference had no statistical significant ($P>0.05$), which at postoperative 8 weeks were significantly decreased compared with those before operation, meanwhile was significantly lower than those at the same time point in the DSO group ($P<0.01$), FBG in the DRO group was still higher than that in the NRO group and NSO group ($P<0.05$), but HOMA-IR had no statistical difference between the NRO group and NSO group ($P>0.05$). At postoperative 8 weeks, the expression GLUT-4 gene in adipose and skeletal muscle tissues of the DRO group was significant increased compared with DSO group ($P<0.05$), but which had no statistical difference between the NRO group and NSO group ($P>0.05$). The Pearson correlation

* 基金项目: 四川省卫生计生科研项目(120455); 川北医学院科研项目(CBY-11-A-QN17); 南充市市校合作科研项目(18SXHZ0301)。作者

简介: 左莹(1976—), 博士, 副主任医师, 主要从事内分泌与代谢性疾病研究。△ 通信作者, E-mail: 272775406@qq.com。

analysis demonstrated that the expression of GLUT-4 gene in adipose and skeletal muscle tissues was negatively correlated with FBG and HOMA-IR ($P<0.01$). **Conclusion** The gastric bypass surgery can improve the insulin resistance and decrease blood glucose in T2DM rats, its mechanism may be correlated with the increase of GLUT-4 gene expression in postoperative adipose and muscle tissues.

[Key words] type 2 diabetes mellites; gastric bypass surgery; blood glucose; insulin resistance; GLUT-4 gene

糖尿病是一个全球性健康问题,至少 1.5 亿人口深受其困扰,预计 2025 年这一数目将增长两倍,而其中 2 型糖尿病(T2DM)患者占 86%^[1]。胰岛素抵抗是 T2DM 葡萄糖利用障碍的主要原因,表现为外周组织对胰岛素介导的葡萄糖摄取功能障碍,胰岛素介导葡萄糖进入外周组织最重要的载体是胰岛素依赖性葡萄糖转运蛋白 4(GLUT-4),增加外周脂肪肌肉细胞中 GLUT-4 基因的表达或转运成为治疗糖尿病改善糖代谢障碍的靶位点^[2-4]。

目前对 T2DM 的治疗主要包括药物改善胰岛素抵抗,增加胰岛素分泌及胰岛素替代治疗,但是传统的治疗方案并不能显著改善糖尿病患者的预后同时需要终身用药。近年研究发现胃肠转流术可以改善肥胖型 T2DM 患者的胰岛素抵抗,降低患者血糖,80%以上的患者术后降糖药物的用量明显减少,约半数以上的患者术后甚至不用药物也可控制血糖^[5]。2018 年美国糖尿病协会(ADA)糖尿病诊疗指南指出对于体质量指数大于 30 kg/m² 的肥胖性 T2DM 患者可采用胃肠转流术改善患者糖代谢紊乱^[6]。目前胃肠转流术改善胰岛素抵抗,降低血糖的具体机制尚不明确,本实验拟通过对 T2DM 大鼠行胃肠转流术,观察术后血糖及胰岛素抵抗指数的变化,分析其与术后外周脂肪及肌肉组织中 GLUT-4 基因表达的相关性,探讨胃肠转流术改善胰岛素抵抗降低血糖的机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立及分组 正常健康 6 周龄雄性 SD 大鼠 60 只,购自川北医学院动物实验中心,实验动物生产许可证号[scxk(川)2008-18]。适应性喂养 1 周后,将大鼠分为 T2DM 组($n=40$)及 SD 大鼠组($n=20$),SD 大鼠组继续喂养普通饮食,T2DM 组参考 VATANDOUST 等^[7]实验方法采用高脂饮食联合腹腔注射链脲佐菌素制备 T2DM 大鼠模型,空腹血糖(FBG)测量时间为大鼠禁食但不禁饮 12 h 后测量。T2DM 大鼠成模标准:高脂喂养加注射链脲佐菌素后隔日 1 次采用 One Touch Ultra 血糖试纸(美国强生)监测血糖,持续 1 周 FBG 稳定且大于或等于 7.0 mmol/L,最终成模 T2DM 大鼠 35 只。

将 SD 大鼠分为 SD 大鼠真手术组(NRO, $n=10$),SD 大鼠假手术组(NSO, $n=10$),T2DM 大鼠分为 T2DM 真手术组(DRO, $n=20$)及 T2DM 假手术组(DSO, $n=15$)。均以 2.5%戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉大鼠,真手术组参考 RUBINO 等^[8]报道的手术

方式行胃空肠转流术,假手术组于真手术组相应胃肠段行原位离断后再行原位吻合术。手术完成后继续喂养 8 周,处死大鼠,分离右后肢股四头肌及附睾旁脂肪组织-90℃冰箱待用。

1.2 检测项目 分别检测手术前、术后 4 周及术后 8 周各组大鼠的 FBG、空腹血浆胰岛素(Fins)。以稳态模型评估法(HOMA)计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),公式 $HOMA-IR = (Fins \times FBG) / 22.5$, $HOMA-IR > 6.0$ 则存在胰岛素抵抗。

1.3 GLUT-4 基因表达的检测 脂肪及肌肉组织中 GLUT-4 基因表达采用 RT-PCR 试剂盒测定,购自成都博瑞克生物技术有限公司(中国)。应用 HP1AS 2000 型图像分析系统测定吸光度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示(偏态分布用中位数±四分位间距表示),各组间均数比较采用方差分析,组间两两比较采用独立样本 t 检验;计数资料用率表示,率的比较采用四格表 χ^2 检验,采用 Pearson 相关分析 GLUT-4 基因与 FBG 及 HOMA-IR 的相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组大鼠术前、术后 FBG 水平比较 至实验结束,NRO 组存活大鼠 7 只,NSO 组 9 只,DRO 组 9 只,DSO 组 8 只。术前 SD 大鼠 FBG (5.86 ± 1.13) mmol/L, T2DM 组大鼠 FBG (21.21 ± 5.39) mmol/L,两组相比差异均有统计学意义($P < 0.01$)。术后 4 周,DRO 组 FBG 较术前下降约 14%,但与术前比较差异无统计学意义($P > 0.05$),术后 8 周,DRO 组 FBG 较术前下降约 58%,与术前比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。术后 8 周,DRO 组的 FBG 明显低于相应时间点 DSO 组($P < 0.01$),但仍高于同时间点 NRO 及 NSO 组($P < 0.05$);DSO 组、NRO 组、NSO 组术前与术后 FBG 变化均差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 4 组大鼠术前、术后 HOMA-IR 比较 术前 SD 大鼠 HOMA-IR 4.76 ± 1.08 ,糖尿病组大鼠 HOMA-IR 21.38 ± 7.07 ,两组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。术后 4 周 DRO 组 HOMA-IR 较术前下降约 27%,但与术前比较差异无统计学意义($P > 0.05$),至术后 8 周 HOMA-IR 较术前下降约 68%,与术前比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。术后 8 周,DRO 组 HOMA-IR 明显低于相应时间点 DSO 组($P <$

0.01),与同时间点 NRO 组及 NSO 组比较差异无统计学意义($P>0.05$);DSO 组、NRO 组、NSO 组术前与术后 HOMA-IR 均差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 1	4 组大鼠术前、术后 FBG 水平变化($\bar{x}\pm s$,mmol/L)			
时间	DRO 组	DSO 组	NRO 组	NSO 组
术前	21.53±4.41	22.10±3.68	5.90±1.15	5.83±1.18
术后 4 周	17.46±5.63	21.80±2.62	5.66±0.76	5.72±1.01
术后 8 周	8.98±2.65 [*]	22.00±2.25 [#]	5.74±1.12 [#]	5.64±1.21 [#]

^{*}: $P<0.05$ 与本组术前比较;[#]: $P<0.05$,术后 8 周与 DRO 组比较

表 2	4 组大鼠术前、术后 HOMA-IR 水平变化($\bar{x}\pm s$)			
时间	DRO 组	DSO 组	NRO 组	NSO 组
术前	21.62±7.85	21.12±6.11	4.83±1.12	4.71±1.11
术后 4 周	15.75±7.27	21.92±5.61	4.51±0.59	4.62±0.92
术后 8 周	6.93±2.67 [*]	22.35±4.67 [#]	4.71±1.20	4.60±1.11

^{*}: $P<0.05$ 与本组术前比较;[#]: $P<0.05$,术后 8 周与 DRO 组比较

2.3 4 组大鼠术后 8 周脂肪组织 GLUT-4 基因表达及其与 FBG 及 HOMA-IR 的相关性分析 术后 8 周,DRO 组脂肪组织 GLUT-4 基因表达(0.88 ± 0.17)较 DSO 组(0.58 ± 0.09)增加($P<0.01$),与 NRO 组(0.98 ± 0.16)及 NSO 组(0.99 ± 0.12)比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1。相关性分析显示术后 8 周,脂肪组织中 GLUT-4 基因表达与 FBG 呈负相关($r=-0.89,P<0.01$),与 HOMA-IR 呈负相关($r=-0.88,P<0.01$)。

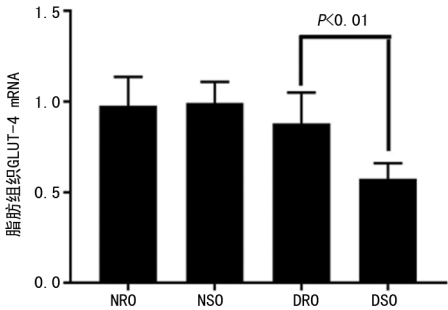


图 1 各组大鼠脂肪组织组织中 GLUT-4 基因表达

2.4 4 组大鼠术后 8 周肌肉组织 GLUT-4 基因表达及其与 FBG 及 HOMA-IR 的相关性分析 术后 8 周,DRO 组肌肉组织 GLUT-4 基因表达(2.49 ± 0.21)较 DSO 组(1.41 ± 0.42)增加($P<0.01$),与 NRO 组(2.59 ± 0.18)及 NSO 组(2.60 ± 0.19)比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2。相关性分析显示术后 8 周,大鼠肌肉组织中 GLUT-4 基因表达与 FGB 呈负相关($r=-0.95,P<0.01$),与 HOMA-IR 呈负相关($r=-0.98,P<0.01$)。

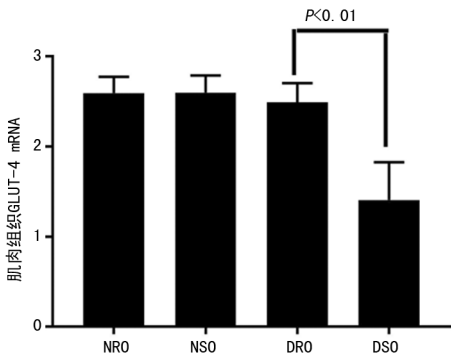


图 2 各组大鼠肌肉组织组织中 GLUT-4 基因表达

3 讨 论

本实验证实胃肠转流术后 8 周,T2DM 大鼠 FBG 下降,胰岛素敏感性增加,甚至可以恢复到正常大鼠水平,外周肌肉和脂肪组织中 GLUT-4 基因表达增加,且与 FBG 及胰岛素抵抗指数呈负相关,因此胃肠转流术改善 T2DM 大鼠糖代谢的机制可能与术后脂肪组织和肌肉组织中 GLUT-4 基因表达增高相关。

GLUT-4 属于葡萄糖转运蛋白超家族中的一员,在胰岛素的刺激下,GLUT-4 从细胞内的存储囊泡转移到细胞膜表面,促进组织对葡萄糖的摄取,同时这也是外周脂肪及肌肉组织摄取葡萄糖的限速步骤,其表达或者转位异常均可以引起胰岛素抵抗^[9]。在糖尿病患者的皮下脂肪中,GLUT-4 基因表达较健康者明显下降,并且与患者的胰岛素抵抗指数呈负相关^[10]。改善外周组织中 GLUT-4 的表达或者活性可以提高组织对葡萄糖的摄取能力,降低胰岛素抵抗,达到治疗糖尿病的目的。在传统治疗糖尿病的药物中,PPAR γ 受体激动剂可通过 PPAR γ 信号通路上调组织中 GLUT-4 的基因及蛋白表达,改善机体胰岛素抵抗发挥降糖作用^[11]。二甲双胍作用于离体培养的 3T3-L1 脂肪细胞 24 h,GLUT-4 基因增加 4.2 倍,蛋白表达增加 2.6 倍,同时细胞对葡萄糖的摄取率增加 2 倍^[12];在离体培养糖尿病患者外周淋巴细胞的培养液中加入磺脲类药物,12 周后细胞对葡萄糖的摄取能力增加近 6 倍,表达 GLUT-4 的淋巴细胞从 2.7% 增加到 15.5%^[2]。有研究证实,胃肠转流术后 28 d,大鼠肌肉组织中 GLUT4 的总蛋白含量及细胞膜表面的蛋白含量均显著增加,而脂肪组织中 GLUT4 的总蛋白含量虽然没有明显改变,但细胞膜表面的 GLUT4 蛋白含量却显著增加^[13]。本实验进一步证实胃肠转流术后 8 周 T2DM 大鼠外周脂肪和肌肉组织中 GLUT-4 基因表达增加,外周脂肪及肌肉组织中 GLUT-4 基因表达与 FBG 及 HOMA-IR 呈负相关,因此胃肠转流术改善糖代谢的具体机制与术后外周脂肪及肌肉组织中 GLUT-4 基因的表达改变相关。

胃肠转流术增加 GLUT-4 基因表达的具体机制可能与术后胃肠激素及脂肪因子的含量改变相关。目前普遍接受的观点是胃肠转流术后初期,糖代谢障

碍改善的主要原因是肠-胰岛素轴的变化,其中最主要的是 GLP-1 分泌增加^[14-15]。采用 GLP-1 治疗伴有胰岛素抵抗的 T2DM 大鼠,大鼠脂肪组织中 GLUT-4 蛋白及基因表达均显著增加,同时伴有血糖和 HOMA-IR 下降^[16-17]。而肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 可通过影响 GLUT-4 表达的转录因子活性降低 GLUT-4 基因表达^[18],胃肠转流术后 TNF- α 基因表达可显著下降^[19]。此外有研究证实,胃肠转流术增加 GLUT-4 基因的表达可能与术后 PPAR γ 蛋白表达增加,胰岛素信号通路中 PI3K 的活性增强相关^[19]。

综上所述,胃肠转流术可降低 T2DM 大鼠胰岛素抵抗,改善糖代谢障碍,其机制可能与术后脂肪及肌肉组织中 GLUT-4 基因表达增加相关,而具体的信号通路有待于进一步研究证实。

参考文献

- [1] YANG S H, DOU K F, SONG W J. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(25):2425-2426.
- [2] CZECH A, PIATKIEWICZ P, TATON J. Cellular glucose transport and glucotransporter 4 expression as a therapeutic target: clinical and experimental studies[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2009, 57(6):467-473.
- [3] NAZARIAN-SAMANI Z, SEWELL D E, LORIGOOINI Z, et al. Medicinal plants with multiple effects on diabetes mellitus and its complications: a systematic review[J]. *Curr Diab Rep*, 2018, 18(10):72.
- [4] GOVERNA P, BAINI G, BORGONETTI V, et al. Phytotherapy in the management of diabetes: A review[J]. *Molecules*, 2018, 23(1):105.
- [5] MAKARY M A, CLARK J M, SHORE A D, et al. Medication utilization and annual health care costs in patients with type 2 diabetes mellitus before and after bariatric surgery[J]. *Arch Surg*, 2010, 145(8):726-731.
- [6] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Obesity management for the treatment of type 2 diabetes: standards of medical care in diabetes-2018[J]. *Diabetes Care*, 2018, 41 (Suppl 1):65-72.
- [7] VATANDOUST N, RAMI F, SALEHI A R, et al. Novel high-fat diet formulation and streptozotocin treatment for induction of prediabetes and type 2 diabetes in rats[J]. *Adv Biomed Res*, 2018, 7(1):107.
- [8] RUBINO F, MARESCAUX J. Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes: a new perspective for an old disease[J]. *Ann Surg*, 2004, 239(1):1-11.
- [9] KANZAKI M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics[J]. *Endocr J*, 2006, 53 (3):267-293.
- [10] KOUIDHI S, BERRHOUMA R, ROUISSI K, et al. Human subcutaneous adipose tissue GLUT4 mRNA expression in obesity and type 2 diabetes[J]. *Acta Diabetol*, 2013, 50(2):227-232.
- [11] HIDALGO-FIGUEROA S, NAVARRETE-VAZQUEZ G, ESTRADA-SOTO S, et al. Discovery of new dual PPAR-gamma-GPR40 agonists with robust antidiabetic activity: design, synthesis and in combo drug evaluation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90(1):53-61.
- [12] GRISOUARD J, TIMPER K, RADIMERSKI T M, et al. Mechanisms of metformin action on glucose transport and metabolism in human adipocytes[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(11):1736-1745.
- [13] BONHOMME S, GUIJARRO A, KESLACY S, et al. Gastric bypass up-regulates insulin signaling pathway [J]. *Nutrition*, 2011, 27(1):73-80.
- [14] STANO S, ALAM F, WU L, et al. Effect of meal size and texture on gastric pouch emptying and glucagon-like peptide 1 after gastric bypass surgery[J]. *Surg Obes Relat Dis*, 2017, 13(12):1975-1983.
- [15] EVANS S, PAMUKLAR Z, ROSKO J, et al. Gastric bypass surgery restores meal stimulation of the anorexigenic gut hormones glucagon-like peptide-1 and peptide YY independently of caloric restriction[J]. *Surg Endosc*, 2012, 26(4):1086-1094.
- [16] MORENO P, NUCHE-BERENGUER B, GUTIERREZ-ROJAS I, et al. Normalizing action of exendin-4 and GLP-1 in the glucose metabolism of extrapancreatic tissues in insulin-resistant and type 2 diabetic states[J]. *J Mol Endocrinol*, 2012, 48(1):37-47.
- [17] VILLANUEVA-PENACARRILLO M L, PUENTE J, REDONDO A, et al. Effect of GLP-1 treatment on GLUT2 and GLUT4 expression in type 1 and type 2 rat diabetic models[J]. *Endocrine*, 2001, 15(2):241-248.
- [18] FERNANDEZ-VELEDO S, HERNANDEZ R, TERUEL T, et al. Ceramide mediates TNF-alpha-induced insulin resistance on GLUT4 gene expression in brown adipocytes[J]. *Arch Physiol Biochem*, 2006, 112(1):13-22.
- [19] LI J, WANG Y, ZHOU Y, et al. Gastric bypass surgery alters the mechanisms of insulin resistance in the adipose tissue of GK rats[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(5):1111-1116.

(收稿日期:2019-03-14 修回日期:2019-06-02)