

间歇低氧对大鼠胰岛素抵抗及骨骼肌细胞 GLUT4、Akt2 的影响

汤玮娜 任寿安

【摘要】 目的 检测不同间歇低氧暴露时间对骨骼肌葡萄糖转运蛋白 (GLUT)4 与蛋白激酶 B (PKB/Akt)2 表达的影响,探讨二者在间歇低氧导致胰岛素抵抗中的作用。**方法** 选取健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 40 只,按照随机数字表法分为 5 组:常氧对照组 (NC 组),间歇低氧 2 周组 (IH2 组),间歇低氧 4 周组 (IH4 组),间歇低氧 6 周组 (IH6 组),间歇低氧 8 周组 (IH8 组),每组 8 只。IH2 组、IH4 组、IH6 组、IH8 组每天给予 8 h 间歇低氧暴露 (9:00 ~ 17:00),NC 组室内环境正常饲养。检测各组空腹血糖和空腹胰岛素水平,计算稳态模型评估-胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)。采用免疫组织化学法检测大鼠骨骼肌 GLUT4 及 Akt2 蛋白的表达,蛋白表达量用平均灰度值表示,并分析 GLUT4 与 Akt2 的相关性。**结果** 与 NC 组相比,IH2 组、IH4 组、IH6 组、IH8 组空腹血糖、HOMA-IR 升高,骨骼肌 GLUT4 与 Akt2 灰度值升高,并且随间歇低氧暴露时间的延长而升高明显 ($F = 87.67 \sim 288.63$, P 均 < 0.05);与 NC 组相比,IH2 组、IH4 组、IH6 组、IH8 组空腹胰岛素升高,其中 IH2 组、IH4 组、IH6 组,随间歇低氧暴露时间的延长而升高明显,IH8 组较 IH6 组下降 ($F = 86.04$, $P < 0.01$)。Pearson 相关分析显示 GLUT4 与 Akt2 的表达呈正相关 ($r = 0.895$, $P < 0.05$)。**结论** 随着间歇低氧暴露时间的延长胰岛素抵抗程度增加,GLUT4 与 Akt2 蛋白表达水平下降,二者在间歇低氧导致胰岛素抵抗的过程中起协同作用。

【关键词】 间歇低氧;葡萄糖转运蛋白 4;蛋白激酶 B2;胰岛素抵抗

基金项目:山西省自然科学基金资助项目 (2013011048-4)

Effects of intermittent hypoxia on insulin resistance and expression of GLUT4 and Akt2 in skeletal muscle cells of rats Tang Weina*, Ren Shou'an. * Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Ren Shou'an, Email: renshouan@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of different time of exposure to intermittent hypoxia on the expression of glucose transporter (GLUT) 4 and protein kinase B (PKB/Akt) 2, and their roles in insulin resistance induced by intermittent hypoxia. **Methods** Forty male Sprague-Dawley rats were divided into 5 groups by random number table method: normal control group (NC group), group of intermittent hypoxia for 2 weeks (IH2 group), group of intermittent hypoxia for 4 weeks (IH4 group), group of intermittent hypoxia for 6 weeks (IH6 group) and group of intermittent hypoxia for 8 weeks (IH8 group), with 8 rats in each group. Rats in IH2 group, IH4 group, IH6 group and IH8 group were exposed to intermittent hypoxia each day, from 9 a. m. to 5 p. m., while rats in NC group were exposed to room air. Fasting blood glucose and fasting blood insulin were measured, and homeostatic model assessment of insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated. The expression of GLUT4 and Akt2 protein in muscles of rat were analyzed by immunohistochemistry and quantified by the average gray value. The correlation between GLUT4 and Akt2 was analyzed. **Results** Compared with NC group, fasting blood glucose, HOMA-IR, GLUT4 and Akt2 in IH2, IH4, IH6, IH8 group were higher, and were increased with the exposure time of intermittent hypoxia ($F = 87.67 \sim 288.63$, all $P < 0.05$). Compared with NC group, fasting insulin was elevated in IH2, IH4, IH6 and IH8 group, and was increased along with the duration of intermittent hypoxia and then decreased in IH8 group ($F = 86.04$, $P < 0.01$). Pearson correlation analysis showed that the expression of GLUT4 was positively correlated with Akt2 ($r = 0.895$, $P < 0.05$). **Conclusion** The degree of insulin resistance increases and the expression of GLUT4 and Akt2 decrease with duration of intermittent hypoxia. GLUT4 and Akt2 play synergistic effects in insulin resistance induced by intermittent hypoxia.

[Key words] Intermittent hypoxia; Glucose transporter 4; Protein kinase B2; Insulin resistance

Fund program: Natural Science Foundation of Shanxi Province of China (2013011048-4)

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征 (OSAHS) 是一种常见疾病,在中年男性人群中发病率为 4%,女性为 2%,且有逐渐升高的趋势^[1]。OSAHS 是 2 型糖尿病 (T2DM) 的独立危险因素,中重度 OSAHS 患者具有更高的 T2DM 发病风险^[2]。间歇低氧是 OSAHS 重要的病理生理基础,可诱发机体产生胰岛素抵抗,从而发展为 T2DM^[3-4]。胰岛素抵抗的特点之一是胰岛素敏感组织对葡萄糖摄取、利用障碍,其中骨骼肌是胰岛素作用的主要靶器官之一,对于维持血糖平衡起重要作用。而葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 介导的葡萄糖跨膜转运又是葡萄糖利用和存储的主要限速步骤,蛋白激酶 B (Akt) 2 是促进 GLUT4 囊泡易位到胞膜的重要信号分子^[5-6]。本实验通过构建不同暴露时间的间歇低氧大鼠模型,评估各实验组的胰岛素抵抗水平,并检测骨骼肌胰岛素信号通路蛋白 GLUT4 与 Akt2 的变化,探讨间歇低氧导致胰岛素抵抗的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康成年雄性清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只 [许可证号: SCXK (晋) 2009-0001], 体重 180 ~ 200 g, 由山西医科大学实验动物中心提供, 实验期间实验动物饲养于山西医科大学呼吸实验室, 标准饲养, 自由饮食, 室温 25℃。按照随机数字表法分为 5 组, 每组 8 只: 常氧对照组 (NC 组), 间歇低氧 2 周组 (IH2 组), 间歇低氧 4 周组 (IH4 组), 间歇低氧 6 周组 (IH6 组), 间歇低氧 8 周组 (IH8 组)。

1.2 方法

1.2.1 间歇低氧模型建立 将间歇低氧组大鼠置于有机玻璃舱 (65 × 50 × 45 cm³) 内, 由单片机控制系统 (山西医科大学第一医院与太原理工大学联合研制) 控制气体输入时间, 先输入氮气 60 s, 使低氧舱内氧浓度由 21% 逐渐降至最低氧浓度 8%, 持续 10 s 后再通入氧气 40 s, 使低氧舱内浓度逐渐恢复至 21%, 整个循环共持续 110 s, 每天在间歇低氧舱内饲养 8 h (9:00 ~ 17:00), 分别于第 2, 4, 6, 8 周后结束间歇低氧暴露。舱内氧浓度由便携式测氧仪 (建德市新安江分析仪器二厂) 实时监控, 舱内 CO₂ 及水分由生石灰吸收。常氧对照组大鼠在室内空气环境中饲养。

1.2.2 标本采集 间歇低氧组大鼠分别于暴露第 2, 4, 6, 8 周后禁饮食 8 h, 腹腔注射 20% 乌拉坦

(5 ml/kg) 麻醉, 将其在动物实验台上仰卧位固定, 鼠尾常规消毒, 手术剪剪去 0.5 cm 尾尖, 医用血糖试纸收集尾静脉血用于检测血糖值。然后沿腹中线剪开腹壁, 暴露腹主动脉, 收集血液, 离心机离心 5 min (3 000 r/min, r = 190 mm), 取上清液 -80℃ 保存, 用于检测胰岛素含量。剥离大鼠腓肠肌浸于中性甲醛固定 48 h 后常规石蜡包埋、切片。

1.2.3 空腹血糖、空腹胰岛素 (FINS) 测定及胰岛素抵抗评估 空腹血糖由便携式血糖仪 (美国强生医疗器械公司) 直接测量; FINS 用大鼠胰岛素 ELISA 检测试剂盒 (武汉博士德试剂公司) 采用双抗酶联免疫法检测。计算稳态模型评估-胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) = 空腹血糖 × FINS / 22, 空腹血糖单位为 mmol/L, FINS 单位为 μIU/L。

1.2.4 免疫组织化学法检测 GLUT4 与 Akt2 骨骼肌组织切片常规脱蜡至水化, 枸橼酸盐缓冲液高压修复 2 min, 在 3% 过氧化氢甲醇液作用 5 min, 以清除内源性过氧化酶; 牛血清白蛋白 (BSA) 室温下封闭 15 min, 滴加兔抗大鼠 GLUT4、Akt2 一抗 (抗体浓度均为 1:100), PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照, 4℃ 冰箱过夜, PBS 漂洗, 按 SABC 试剂盒说明操作。DAB 室温显色, PBS 洗剂, 苏木素复染, 脱水、透明, 中性树胶封片。切片在显微镜下观察、拍照, 利用 Image-Pro Plus 图像软件进行灰度定量分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用最小显著性差 (LSD) 法, 相关性分析采用 Pearson 线性相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 间歇低氧对血清胰岛素、血糖及胰岛素抵抗的影响 与 NC 组相比, IH2 组、IH4 组、IH6 组、IH8 组在相应的间歇低氧暴露终点时空腹血糖水平、HOMA-IR 均升高, 并且均随着暴露时间的延长而升高 (P 均 < 0.05); 同时, FINS 水平亦升高, 其中在 IH2 组、IH4 组、IH6 组随着暴露时间的延长而升高明显 ($P < 0.05$), 但 IH8 组较 IH6 组有所下降 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 GLUT4 与 Akt2 免疫组化结果 两种蛋白均在骨骼肌细胞质中表达, 显微镜下观察为棕黄色颗粒, 各组切片显色见图 1 (封 3)。经图像扫描分析以灰度值代表蛋白表达含量, 灰度值越大蛋白表达越少,

表 1 各组血糖、胰岛素及 HOMA-IR 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	空腹血糖 (mmol/L)	胰岛素 (μ IU/L)	HOMA-IR
NC 组	8	4.88 \pm 0.27	11.86 \pm 1.88	2.58 \pm 0.50
IH2 组	8	5.38 \pm 0.23 ^a	14.29 \pm 1.84 ^a	3.41 \pm 0.44 ^a
IH4 组	8	5.99 \pm 0.44 ^{ab}	22.09 \pm 1.11 ^{ab}	5.86 \pm 0.30 ^{ab}
IH6 组	8	6.36 \pm 0.40 ^{am}	24.89 \pm 1.95 ^{ac}	7.01 \pm 0.37 ^{ac}
IH8 组	8	7.99 \pm 0.41 ^{ad}	21.23 \pm 1.50 ^{ad}	7.52 \pm 0.49 ^{am}
F 值		87.67	86.04	211.85
P 值		0.000	0.000	0.000

注: NC 组: 常氧对照组; IH2 组: 间歇低氧 2 周组; IH4 组: 间歇低氧 4 周组; IH6 组: 间歇低氧 6 周组; IH8 组: 间歇低氧 8 周组; HOMA-IR: 稳态模型评估-胰岛素抵抗指数; 与 NC 组相比, ^a $P < 0.01$; 与 IH2 组相比, ^b $P < 0.01$; 与 IH4 组相比, ^c $P < 0.01$; 与 IH6 组相比, ^d $P < 0.01$; 与 IH4 组相比, ^m $P < 0.05$; 与 IH6 组相比, ^a $P < 0.05$

反之亦然。结果显示, 与 NC 组相比各间歇低氧组 GLUT4 与 Akt2 平均灰度值升高具有统计学意义($P < 0.05$), 并且随着间歇低氧暴露时间的增加 GLUT4 与 Akt2 平均灰度值升高更显著($P < 0.05$), 见表 2。Pearson 相关分析显示 GLUT4 与 Akt2 平均灰度值呈正相关($r = 0.895, P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠骨骼肌 GLUT4、Akt2平均灰度值的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	GLUT4	Akt2
NC 组	8	178.37 \pm 1.21	181.77 \pm 1.66
IH2 组	8	182.52 \pm 1.32 ^a	191.48 \pm 2.43 ^a
IH4 组	8	189.14 \pm 2.20 ^{ab}	198.60 \pm 1.24 ^{ab}
IH6 组	8	197.86 \pm 1.92 ^{ac}	200.98 \pm 1.50 ^{am}
IH8 组	8	201.74 \pm 1.36 ^{ad}	203.13 \pm 2.58 ^{am}
F 值		288.63	155.61
P 值		0.000	0.000

注: NC 组: 常氧对照组; IH2 组: 间歇低氧 2 周组; IH4 组: 间歇低氧 4 周组; IH6 组: 间歇低氧 6 周组; IH8 组: 间歇低氧 8 周组; GLUT4: 葡萄糖转运蛋白 4; Akt2: 蛋白激酶 B2; 与 NC 组相比, ^a $P < 0.01$; 与 IH2 组相比, ^b $P < 0.01$; 与 IH4 组相比, ^c $P < 0.01$; 与 IH6 组相比, ^d $P < 0.01$; 与 IH4 组相比, ^m $P < 0.05$; 与 IH6 组相比, ^a $P < 0.05$

3 讨论

近年来 OSAHS 对 T2DM 的影响越来越受到重视, 研究发现 T2DM 发病率随着 OSAHS 的严重程度升高而升高, 呼吸暂停低通气指数 (AHI) > 30 次/h 组与 AHI < 5 次/h 组相比, 发生 T2DM 的 OR 值可达 3.48, 而 AHI > 15 次/h 组与 AHI < 5 次/h 组相比, OR 值仅为 2.30^[7]。目前建立间歇低氧动物模型是研究 OSAHS 与 T2DM 的主要研究模式, 模型中间歇低氧循环周期多低于 120 s/次以模拟重度 OSAHS (AHI > 30 次/h), 大量研究证实在此重度间歇低氧动物模型中可存在胰岛素抵抗、糖代谢紊乱^[8]。但鲜有文献探讨间歇低氧暴露时间对胰岛素抵抗的累积作用。

在本研究中以两周间歇低氧暴露为一个时间节

点, 结果发现间歇低氧能够引起空腹血糖升高及胰岛素抵抗增强, 并且随着暴露时间的延长血糖升高明显, 胰岛素抵抗增强明显, 可以推测间歇低氧的暴露时间是胰岛素抵抗的一个重要危险因素。亦有文献报道 2 周的间歇低氧就足以引起产生胰岛素抵抗^[9]。提示临床工作中应对 OSAHS 患者进行早期干预, 及早阻断间歇低氧的时间累积效应。但是 IH8 组与 IH6 组相比, FINS 水平并没有相应升高。这可能由于长期的间歇低氧对胰岛 β 细胞已产生了功能性甚至器质性损害。根据血糖水平反馈的胰岛素的分泌依赖于组织正常供氧, 持续的低氧会引起胰岛素分泌水平严重下降, 在慢性间歇低氧小鼠中可以看到胰岛 β 细胞的死亡及胰岛素分泌水平的下降^[10-11]。间歇低氧过程中产生的氧化应激产物活性氧簇也参与了胰腺的损伤^[12]。由此推测长时间的间歇低氧暴露可能造成不可逆的胰岛素分泌紊乱, 这也提示在临床工作中应重视 OSAHS 合并糖尿病患者的间歇低氧的纠正, 否则后期可能会加大血糖控制的难度。

那么间歇低氧是如何导致胰岛素抵抗的呢? 作为主要的胰岛素敏感器官之一, 骨骼肌负责 80% ~ 90% 胰岛素介导的葡萄糖摄取, 破坏小鼠的 GLUT4 基因可导致严重的胰岛素抵抗和糖耐量减低^[13]。Carreras 等^[14]发现间歇低氧可以影响 GLUT4 由胞质到胞膜的易位过程, 使胞膜 GLUT4 含量下降, 从而影响骨骼肌摄取葡萄糖, 导致胰岛素抵抗。另外有研究发现慢性间歇低氧暴露 (10% ~ 21%, 8 h/d, 4 周) 严重阻碍了 Akt 的磷酸化^[15]。Akt 包括 3 种亚型, 其中 Akt2 在胰岛素介导的葡萄糖摄取过程中起作用。胰岛素与细胞膜上的胰岛素受体结合促使 Akt2 磷酸化, 然后经磷脂酰肌醇 3 激酶途径激活 GLUT4 进行葡萄糖跨膜转运, 因此猜测 GLUT4 与 Akt2 在间歇低氧导致胰岛素抵抗的过程中可能具有相关性。本研究结果显示, 与 NC 组相比, GLUT4 与 Akt2 蛋白表达水平在间歇低氧组均明显下降 ($P < 0.05$), 并且随着间歇低氧暴露时间的延长 GLUT4、Akt2 蛋白表达水平下降更为明显, 相关性分析显示 GLUT4 的表达水平与 Akt2 的水平呈正相关 ($r = 0.895, P < 0.05$), 提示间歇低氧可能通过下调 GLUT4、Akt2 的表达水平导致胰岛素抵抗。但间歇低氧是分别直接作用于两个受体, 还是通过减少 Akt2 继而引起 GLUT4 表达下调, 或是通过降低 GLUT4 的表达进一步引起 Akt2 的表达减少, 还有待于进一步研究证实。

综上所述,间歇低氧可以导致胰岛素抵抗,并且间歇暴露时间越长胰岛素抵抗越严重,这可能与间歇低氧降低了骨骼肌细胞 GLUT4 与 Akt2 的表达水平有关,二者在间歇低氧导致胰岛素抵抗过程中具有相关性。通过干预 GLUT4 与 Akt2 的表达可能为 OSAHS 合并糖尿病患者的治疗的一个新思路。本研究以间歇低氧暴露时间为切点,研究间歇低氧对胰岛素抵抗的影响,但是间歇低氧的其他特征如低氧严重程度(最低氧饱和度)、每个间歇低氧循环的时间、每天的间歇低氧循环次数及相关的二氧化碳水平等与胰岛素抵抗的关系还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Jordan AS, McSharry DG, Malhotra A. Adult obstructive sleep apnoea[J]. Lancet, 2014, 383(9918): 736-747. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60734-5.
- [2] Wang X, Bi Y, Zhang Q, et al. Obstructive sleep apnoea and the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies[J]. Respirology, 2013, 18(1): 140-146. DOI: 10.1111/j.1440-1843.2012.02267.x.
- [3] Iiyori N, Alonso LC, Li J, et al. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175(8): 851-857.
- [4] 陆甘, 姜青林, 张玉林, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征与胰岛素抵抗的临床研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006(04): 273-274. DOI: 10.3760/j.issn.1001-0939.2006.04.018.
- [5] Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance[J]. J Clin Invest, 2000, 106(2): 165-169.
- [6] Takenaka N, Izawa R, Wu J, et al. A critical role of the small GTPase Rac1 in Akt2-mediated GLUT4 translocation in mouse skeletal muscle[J]. FEBS J, 2014, 281(5): 1493-1504. DOI: 10.1111/febs.12719.
- [7] Reichmuth KJ, Austin D, Skatrud JB, et al. Association of sleep apnea and type II diabetes: a population-based study[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172(12): 1590-1595.
- [8] 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): 463-470.
- [9] Polak J, Shimoda LA, Drager LF, et al. Intermittent hypoxia impairs glucose homeostasis in C57BL6/J mice: partial improvement with cessation of the exposure[J]. Sleep, 2013, 36(10): 1483-1490; 1490A-1490B. DOI: 10.5665/sleep.3040.
- [10] Yokoe T, Alonso LC, Romano LC, et al. Intermittent hypoxia reverses the diurnal glucose rhythm and causes pancreatic beta-cell replication in mice[J]. J Physiol, 2008, 586(3): 899-911.
- [11] Xu J, Long YS, Gozal D, et al. Beta-cell death and proliferation after intermittent hypoxia: role of oxidative stress[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 46(6): 783-790. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.026.
- [12] Wang N, Khan SA, Prabhakar NR, et al. Impairment of pancreatic β -cell function by chronic intermittent hypoxia[J]. Exp Physiol, 2013, 98(9): 1376-1385. DOI: 10.1113/expphysiol.2013.072454.
- [13] Zisman A, Peroni OD, Abel ED, et al. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance[J]. Nat Med, 2000, 6(8): 924-928.
- [14] Carreras A, Kayali F, Zhang J, et al. Metabolic effects of intermittent hypoxia in mice: steady versus high-frequency applied hypoxia daily during the rest period[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012, 303(7): R700-R709. DOI: 10.1152/ajpregu.00258.2012.
- [15] Wang Q, Sun X, Li X, et al. Resveratrol attenuates intermittent hypoxia-induced insulin resistance in rats: involvement of Sirtuin 1 and the phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase/AKT pathway[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(1): 151-158. DOI: 10.3892/mmr.2014.2762.

(收稿日期:2016-07-31)

• 消息 •

2016 年第 2 期部分文题介绍

1. 乙酰辅酶 A 羧化酶在内分泌代谢性疾病中的作用 2. 维生素 D 结合蛋白研究进展 3. 肠促胰素类降糖药物对体重作用的研究进展 4. 妊娠糖尿病诊疗的争议与共识 5. 糖尿病患者合并甲状腺功能异常的机制及其影响 6. 2 型糖尿病患者血戊糖素水平与椎体骨折的研究 7. 糖尿病结肠动力障碍大鼠结肠 Cajal 间质细胞凋亡和间隙连接蛋白 43 的研究 8. 南京市城区 40 岁以上人群超重、肥胖特点调查分析 9. 3 种不同食物交换份法对于妊娠期糖尿病患者营养治疗的效果比较

本刊编辑部