

# 运动提高糖尿病大鼠骨骼肌 GLUT4 基因表达的信号机制

张红学

(郑州大学 体育学院, 河南 郑州 450044)

**摘 要:**为研究运动激活的 CaMK II 对糖尿病大鼠骨骼肌 MEF2 和 GLUT4 结合活性及 GLUT4 基因表达量的调节作用, 以了解运动提高糖尿病大鼠 GLUT4 基因表达的可能机制。将健康 SD 大鼠 100 只, 40 只作为正常对照, 其余 60 只建立糖尿病大鼠模型, 建模成功 35 只。正常对照和糖尿病大鼠再按体重各自随机分为 5 组: 安静对照组、一次性运动组、一次性运动+KN93 组、耐力训练组、耐力训练+KN93 组, 共 10 组。跑台速度 20 m/min, 运动时间 1 h。一次性运动组大鼠 1 次运动后 3 h 取材。耐力训练组采用同样跑台速度和运动时间, 训练 1 周, 并于最后 1 次训练后 12 h 取材。结果得到, 糖尿病大鼠耐力训练组, 骨骼肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 的结合活性及骨骼肌 GLUT4 基因表达量虽然均显著低于正常对照大鼠耐力训练组, 但与糖尿病大鼠安静对照组相比均显著升高; 耐力训练+KN93 组, 骨骼肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 的结合活性与安静对照组相比差异没有显著性, 但骨骼肌 GLUT4 基因表达量与安静对照组相比却显著升高。结果显示: 虽然运动通过激活糖尿病大鼠骨骼肌 CAMK II 而提高其骨骼肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 的结合活性, 虽然 MEF2 和 GLUT4 的结合活性参与调解了正常大鼠骨骼肌 GLUT4 基因表达, 但并不是影响糖尿病大鼠骨骼肌 GLUT4 基因表达的唯一因素。

**关 键 词:** 运动生物化学; 钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II; 肌细胞增强因子 2; 葡萄糖载体 4; 糖尿病大鼠

中图分类号: G804.7 文献标志码: A 文章编号: 1006-7116(2013)02-0124-06

## The signaling mechanism of exercising enhancing the expression of gene GLUT4 in skeletal muscle of diabetic rats

ZHANG Hong-xue

(School of Physical Education, Zhengzhou University, Zhengzhou 450044, China)

**Abstract:** In order to study the role played by CaMKII activated by exercising in adjusting the activity of combination of MEF2 and GLUT4 and the level of expression of gene GLUT4 in skeletal muscle of diabetic rats, so as to probe into any possible mechanism of exercising enhancing the expression of gene GLUT4 of diabetic rats, the author divided 100 healthy SD rats into a normal control group which contains 40 rats and a diabetic rat model establishment group which contains remaining 60 rats, 35 of which were successfully model established. Normal control rats and diabetic rats were randomly divided into 5 groups respectively by weight: a calm control group, a one-time exercising group, a one-time exercising+KN93 group, an endurance training group, an endurance+KN93 group; there were 10 groups totally. The treadmill speed was 20m/min; the exercising time was 1 h. The rats in the one-time exercising groups were sample taken 3h after one-time exercising. The rats in the endurance training groups were trained for 1 week using the same treadmill speed and exercising time, and sample taken 12 h after the last training. The author revealed the following findings: the activity of combination of MEF2 and GLUT4 inside skeletal muscle cells and the level of expression of gene GLUT4 in skeletal muscle of the rats in the diabetic rat endurance training group were all significantly lower than

收稿日期: 2012-03-29

基金项目: 河南省科技厅科技发展项目(122300410257), 河南省科技厅科技计划基金项目(120400450006)。

作者简介: 张红学 (1970-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向: 运动人体科学。

those of the rats in the normal control rat endurance training group, but significantly higher than those of the rats in the rats in the diabetic rat calm control group; the activity of combination of MEF2 and GLUT4 inside skeletal muscle cells of the rats in the endurance training + KN93 group was not significantly different from that of the rats in the calm control group, but the level of expression of gene GLUT 4 in skeletal muscle of the rats in the endurance training + KN93 group was significantly higher than that of the rats in the calm control group. The findings indicate the followings: although exercising enhances the activity of combination of MEF2 and GLUT4 inside skeletal muscle by activating skeletal muscle CaMK II of diabetic rats, and the activity of combination of MEF2 and GLUT4 participates in regulating the expression of gene GLUT4 in skeletal muscle of normal rats, it is not the only factor that affects the expression of gene GLUT4 in skeletal muscle of diabetic rats.

**Key words:** sports biochemistry; CaMKII; MEF2; GLUT4; diabetic rat

大量研究表明运动可以提高骨骼肌葡萄糖载体 4(glucose transporter 4, GLUT4)的表达<sup>[1-3]</sup>, 这对治疗以胰岛素抵抗为主要病因的糖尿病有重要作用<sup>[4-5]</sup>, 但机制尚不清楚。凝胶迁移(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)实验, 显示了 GLUT4 启动子区域存在肌细胞增强因子 2(myocyte enhancer factor 2, MEF2)的结合位点<sup>[6]</sup>。Thai 等<sup>[7]</sup>的研究进一步发现, 糖尿病大鼠骨骼肌 MEF2 和 GLUT4 结合活性及 GLUT4mRNA 表达量均显著低于正常大鼠, 而用胰岛素刺激糖尿病大鼠骨骼肌细胞之后, 发现 MEF2 和 GLUT4 结合活性及 GLUT4 表达量均恢复到正常大鼠水平, 提示了 MEF2 和 GLUT4 结合活性的变化是影响糖尿病大鼠 GLUT4 表达失常的重要环节<sup>[8]</sup>。虽然我们以往的研究结果也显示了运动通过提高骨骼肌 MEF2 和 GLUT4 结合活性而提高 GLUT4 基因表达<sup>[10]</sup>, 但此机制未在糖尿病患者中得到证实。Mukweho<sup>[9]</sup>的研究发现利用细胞钙离子调节子 Caffeine 孵育激活 C2C12 肌细胞钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II(calcium-calmodulin dependent protein kinase II, CAMKII), 可以引起肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 结合活性显著增加, 且这种增加伴随着 GLUT4 基因和蛋白的表达量的提高。运动能够激活 CAMKII<sup>[11]</sup>, 提示了运动可能通过激活 CaMKII 而提高糖尿病大鼠 MEF2 和 GLUT4 结合活性和 GLUT4 表达的增加。值得注意的是, 离体研究结果并不一定能真实反映在体的真实状况。因此本实验通过 KN93(CaMK II 的特异性抑制剂)抑制运动对糖尿病大鼠骨骼肌 CAMK II 的激活作用, 研究在体运动情况下 CAMK II 对糖尿病大鼠 MEF2 和 GLUT4 结合活性和 GLUT4 表达的调节作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

本实验以 100 只 12~14 周龄, 健康清洁级 SD 大鼠为研究对象, 河南省实验动物中心提供。试验期间,

室内温度保持在 20~25 °C, 相对湿度保持在 50%~70%, 每天光照 12 h。正常饲养的 1 周时间内所有大鼠自由进食(普通饲料)和饮水。

### 1.2 糖尿病大鼠模型的建立

SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 随即选出 40 只作为正常对照, 继续以普通饲料饲养。其余 60 只拟建立糖尿病大鼠模型。方法如下<sup>[12]</sup>: 以高质饲料(碳水化合物和脂肪各占 41%, 蛋白质占 18%, 均为质量比)饲养 4 周, 并禁食 12 h(晚上)后, 腹腔下注射链脲佐菌素(streptozotocin, STE), 注射质量分数为 30 mg/kg(柠檬酸钠-柠檬酸盐缓冲液配置, pH=4.2), STE 购于 Sigma 公司。注射后继续给予高脂饲料, 自由饮水。72 h 后测定空腹血糖浓度(测血糖浓度之前禁食 12 h), 凡血糖浓度大于 6.7 mmol/L 者视为造模成功, 成功共 35 只。

### 1.3 运动方案和取材

实验安排在第 6 周进行, 实验前 1 d 进行 1~2 次适应性跑台练习, 并于当天晚上 24:00 禁食(耐力训练组不禁食)。实验当天根据体重正常对照大鼠和糖尿病组大鼠各自随机分为 5 组: 安静对照(control, C)、一次性运动组、一次性运动+KN93 组、耐力训练组、耐力训练+KN93 组。正常对照大鼠每组 8 只, 糖尿病大鼠每组 7 只。

安静对照组和一次性运动组大鼠, 分别于取材前和运动前 0.5 h 腹腔注射生理盐水。一次性运动+KN93 组大鼠运动前 0.5 h 腹腔注射 KN93。注射质量分数为 5 mg/kg, KN93 购于 Sigma 公司。一次性运动组大鼠采用坡度为 10° 的跑台运动, 跑台速度为 20 m/min(根据 Armstrong<sup>[13]</sup>的公式  $y=1.25x+47.7$ ( $y$  为  $VO_{2max}$  百分比;  $x$  为跑台速度), 本研究采用的相对强度是 72% $VO_{2max}$  强度), 运动时间 1 h。耐力训练组大鼠采用同样的跑台运动方式, 每天 1 h, 持续 1 周。根据预实验结果一次性运动组大鼠运动后 3 h 取材, 耐力训练组大鼠最后一次训练后 12 h 取材, 乙醚麻醉后取右侧股四头肌, 迅速投入液氮, 再转移至 -80 °C 冰箱保存。

#### 1.4 指标测定方法

##### 1)CaMK II 磷酸化水平。

取大鼠股四头肌 100 mg, 液氮研磨, 移入离心管并加入 1 mL 蛋白裂解液, 冰上静置 30 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 1 h, 取上清。蛋白含量采用 pierce 公司的 BCA 蛋白定量试剂盒测定。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离目标蛋白(P-CaMKII 和  $\beta$ -actin), 再将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂奶粉封闭。一抗(P-CaMKII,  $\beta$ -actin) 4 °C 孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h。曝光前加入发光液, 暗处反应 1 min, 暗室压片曝光。生物电泳图像分析软件拍照, Image J 软件读取蛋白的积分灰度值, 结果以积分灰度值的比值表示。

##### 2)GLUT4 mRNA 表达。

大鼠股四头肌 100 mg, 液氮研磨后, 1 mL Trizol 冰上静置 10 min, 0.2 mL 氯仿冰上静置 5 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 等体积异丙醇室温静置 10 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 1 mL 体积分数为 75%酒精, 4 °C 7 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 10  $\mu$ L EDPC 水溶解 mRNA。逆转录的反应条件: 75 °C 5 min, 42 °C 1 h, 70 °C 15 min。实时定量部分采用 ABI 公司荧光染料反应混合体系试剂盒。加入目的基因的 cDNA 模板后, 再分别加入 GLUT4 的引物和  $\beta$ -actin 的引物, 进行实时定量。所需引物由上海生工合成。实时定量数据由 ABI 实时定量 7500 PCR 仪测得, 数据由仪器自带分析软件分析完成。mRNA 表达结果以比较 CT 法相对定量<sup>[14]</sup>。

##### 3)MEF2 和 GLUT4 结合活性。

EMSA 法测定 MEF2 和 GLUT4 结合活性。Pierce 核蛋白提取试剂盒提取核蛋白, Pierce 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量。聚丙烯酰胺凝胶电泳 20 min 后, 配置 10  $\mu$ L 上样体系(4  $\mu$ L 三蒸水、2  $\mu$ L 细胞核蛋白、2  $\mu$ L 标记探针、2  $\mu$ L 5X EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液)。加入标记探针后, 混匀, 室温放置 20 min, 再加入 2  $\mu$ L EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液, 混匀后立即上样。电泳电压按照 10 V/cm 设置。电泳至上样缓冲液中的蓝色染料溴酚蓝至胶下 1/4 处。Western 所使用的电转膜装置, 0.5XTBE 为转膜液, 把胶上的探针或蛋白以及探针和蛋白的复合物转移到尼龙膜上。紫外交联仪 254 nm 紫外波长交联 45~60 s。封闭液封闭 15 min, 加入一定量抗生物素蛋白链菌素+辣根过氧化物酶复合物, 摇床上摇动 15 min, 并洗涤 4 次后, 暗室曝光。生物电泳图像分析软件拍照, ImageJ 软件读取蛋白的积分灰度值。结果以积分灰度值的比值表示。

#### 1.5 数据统计

统计分析使用 SPSS 13.0 统计学分析软件完成。所

有数据均以平均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。同一指标之间比较采用单因素方差分析。显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 试验结果及分析

### 2.1 CaMK II 磷酸化水平

由图 1、图 2 看出, 正常对照及糖尿病大鼠一次性运动组, CaMK II 磷酸化水平与安静对照组相比分别升高了 96%和 140%( $P < 0.05$ )。正常对照及糖尿病大鼠一次运动+KN93 组, CaMK II 磷酸化水平与一次性运动组相比分别降低了 37%和 48%( $P < 0.05$ ), 且与安静对照组相比差异均没有显著性( $P > 0.05$ )。

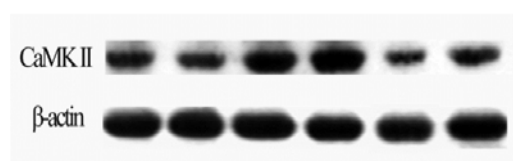
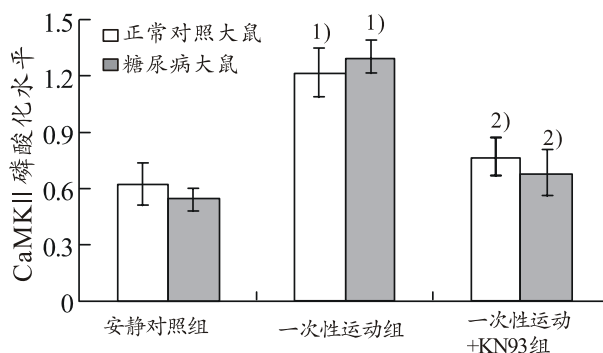


图 1 P-CaMK II 蛋白表达图谱

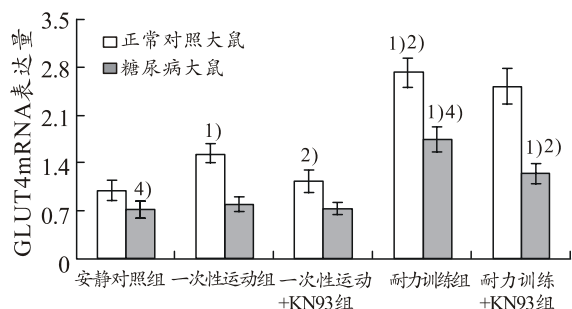


与安静对照组相比, 1) $P < 0.05$ ; 与一次性运动组相比, 2) $P < 0.05$

图 2 CaMK II 磷酸化水平

### 2.2 GLUT4 基因表达量

由图 3 看出, 正常对照大鼠一次性运动组及耐力训练组, 骨骼肌 GLUT4 基因表达量与安静对照组相比分别升高了 54%和 172%( $P < 0.05$ )。一次运动+KN93 组, 骨骼肌 GLUT4 基因表达量与一次性运动组相比降低了 27%( $P < 0.05$ ), 耐力训练+KN93 组, 骨骼肌 GLUT4 基因表达量与耐力训练组相比没有显著差异( $P > 0.05$ )。糖尿病大鼠一次性运动组, 骨骼肌 GLUT4 基因表达量与安静对照组相比没有显著差异( $P > 0.05$ ), 耐力训练组, 骨骼肌 GLUT4 基因表达量与正常对照大鼠耐力训练组相比低了 36%( $P < 0.05$ ), 但与安静对照组相比升高了 145%( $P < 0.05$ )。耐力训练+KN93 组, 骨骼肌 GLUT4 基因表达量与耐力训练组相比降低了 29%( $P < 0.05$ ), 但与安静对照组相比仍升高了 74%( $P < 0.05$ )。

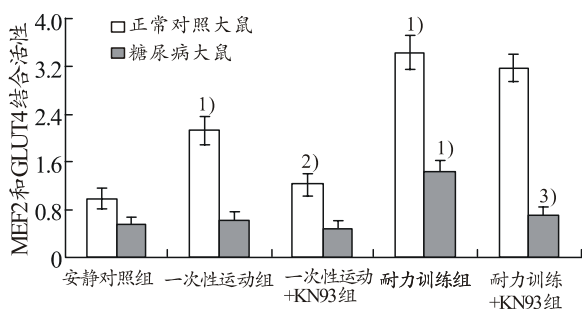


与安静对照组相比, 1) $P<0.05$ ; 与一次性运动组相比, 2) $P<0.05$ ; 与耐力训练组相比, 3) $P<0.05$ ; 与正常对照大鼠相比, 4) $P<0.05$

图 3 GLUT4 基因表达量(相对值)

### 2.3 MEF2-GLUT4 结合活性

由图 4 看出, 正常对照大鼠一次性运动组及耐力训练组, 骨骼肌 MEF2 和 GLUT4 结合活性与安静对照组相比分别升高了 113%和 244%( $P<0.05$ )。一次运动+KN93 组, 骨骼肌 MEF2 和 GLUT4 结合活性与一次性运动组相比降低了 42%( $P<0.05$ ), 耐力训练+KN93 组, 骨骼肌 MEF2 和 GLUT4 结合活性与耐力训练组相比没有显著差异( $P>0.05$ )。糖尿病大鼠一次性运动组, 骨骼肌 MEF2 和 GLUT4 结合活性与安静对照组相比没有显著差异( $P>0.05$ ), 耐力训练组, 骨骼肌 MEF2 和 GLUT4 结合活性与安静对照组相比升高了 157%( $P<0.05$ )。耐力训练+KN93 组, 骨骼肌 MEF2 和 GLUT4 结合活性与耐力训练组相比降低了 51%( $P<0.05$ ), 且与安静对照组相比没有显著差异( $P>0.05$ )。



与安静对照组相比, 1) $P<0.05$ ; 与一次性运动组相比, 2) $P<0.05$ ; 与耐力训练组相比, 3) $P<0.05$ 。

图 4 MEF2 和 GLUT4 结合活性(相对值)

## 3 讨论

GLUT4 作为骨骼肌中葡萄糖跨膜转运的重要转运蛋白, 研究显示它的表达量失常是胰岛素抵抗的重要原因。而对于糖尿病患者来说, 胰岛素抵抗是其中的重要环节<sup>[15-16]</sup>。运动可以提高 GLUT4 基因和蛋白的表达, 那么运动对胰岛素抵抗的糖尿病患者骨骼肌

GLUT4 含量会产生什么影响呢。本实验发现糖尿病大鼠 1 h 跑台运动后, 其骨骼肌 GLUT4 基因表达量并没有显著升高, 而 1 周耐力训练之后, 其骨骼肌 GLUT4 基因表达量虽然显著低于正常对照大鼠耐力训练组, 但与糖尿病大鼠安静对照组相比已经显著升高, 提示了虽然单纯的一次性运动可能并不能改善糖尿病大鼠骨骼肌 GLUT4 表达的缺陷, 但经过一定时期的训练完全可以起到改善糖尿病大鼠 GLUT4 基因表达的作用, 这对预防和治疗胰岛素抵抗有重要作用<sup>[17-18]</sup>, 但机制尚不清楚。

MEF2 是最早在骨骼肌管核发现的一种能识别基因启动子、增强子或特定序列而调控基因表达的蛋白质。近年来大量离体和在体的研究均显示转录因子 MEF2 和 GLUT4 启动子区域 MEF2 结合位点结合, 为 GLUT4 蛋白转录所必须<sup>[6-7]</sup>。虽然利用了两种不同的蛋白质和 DNA 结合活性测试方法, Smith 等<sup>[8, 10]</sup>的研究均显示了运动后 MEF2 和 GLUT4 结合活性显著提高。提示了运动通过提高 MEF2 和 GLUT4 的结合活性而提高骨骼肌 GLUT4 的表达。对于糖尿病大鼠来说, 本实验发现一周耐力训练之后, 其骨骼肌 GLUT4 表达提高的同时同样伴随着骨骼肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 结合活性的显著提高, 提示了运动同样通过提高糖尿病大鼠骨骼肌 MEF2 和 GLUT4 结合活性而提高骨骼肌 GLUT4 的表达。而试验中糖尿病大鼠 1 次性跑台运动后, MEF2 和 GLUT4 结合活性及 GLUT4mRNA 表达量均与安静对照组无显著性差异, 可能为此推测提供了进一步的证据。

CAMK 是一类广泛分布的丝/苏氨酸蛋白激酶家族, 研究显示 CAMK II 活性与 THR286 位点的磷酸化水平呈高度正相关<sup>[20]</sup>。本实验中大鼠一次性跑台运动后, 骨骼肌 CaMK II THR286 位点磷酸化水平显著升高, 与以往研究的结果运动可以提高 CaMK II 活性相一致<sup>[20]</sup>。本试验中, 运动+KN93 组大鼠一次性跑台运动后, 骨骼肌 CaMK II 活性显著低于跑台运动组, 说明了 KN93 抑制了运动对 CaMK II 的激活作用<sup>[21-22]</sup>。Smith 等<sup>[8]</sup>的研究发现高表达具有稳定 CAMK II 活性(constitutively active)的肌管细胞, 其 MEF2 和 GLUT4 结合活性显著高于高表达显性 CAMK II 失活(dominant negative)的肌管细胞。Mukweho 等<sup>[9]</sup>的研究也发现, 利用 Caffeine 孵育激活 C2C12 肌管细胞 CAMK II 活性, 可以引起肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 结合活性显著增加, 而如果预先在培养基中加入 CAMK II 活性抑制剂 KN93, 这种变化消失, 提示了 CaMK II 可能参与调节运动诱导的 MEF2 和 GLUT4 结合活性和 GLUT4 表达的增加。本实验中正常对照大鼠, 1 次性跑台运动

+KN93 其骨骼肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 的结合活性及骨骼肌 GLUT4 基因表达量均显著低于 1 次性跑台运动组, 与实验假设及以往研究结果<sup>[8-9]</sup>相一致。

Zheng 等<sup>[23]</sup>利用 GLUT4 氯霉素酰基转移酶报告基因转染小鼠骨骼肌细胞, 发现转染包含位于 GLUT4 启动子区域 MEF2 结合位点序列, 并利用腺苷酸活化的蛋白激酶(5' -AMP activated protein kinase, AMPK) 的药理激活剂 AICAR(5' -aminoimidazole-4carboxamide -riboside)刺激小鼠骨骼肌细胞后, 发现 GLUT4 氯霉素酰基转移酶报告基因活性显著增加。进一步的 EMSA 实验也发现 AICAR 刺激组小鼠骨骼肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 结合活性也显著高于生理盐水组<sup>[23-24]</sup>。由于 AICAR 并不是 AMPK 的特异性激活剂<sup>[25]</sup>, 我们以往的研究利用转基因技术制造出 AMPK 高表达转基因小鼠, 发现由于 AMPK  $\alpha 2$  的高表达, 1 h 跑台运动后, AMPK  $\alpha 2$  高表达转基因鼠骨骼肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 结合活性及 GLUT4 基因表达量, 均比野生鼠增加更为显著<sup>[19]</sup>。据此我们推测, CAMK II 和 AMPK 可能均参与调节了运动后 MEF2 和 GLUT4 结合活性及 GLUT4 基因表达的增多, 当其中一个通路长期受到抑制时, 另外一个通路可能被激活从而代偿了受抑制通路对 MEF2 和 GLUT4 结合活性及 GLUT4 基因表达的调节作用。我们以往的实验结果 AMPK  $\alpha 2$  基因敲除小鼠 4 周耐力后, 骨骼肌 MEF2 和 GLUT4 结合活性及 GLUT4 基因表达量与野生鼠差异均没有显著性<sup>[19]</sup>; 本实验中耐力训练+KN93 组大鼠, 其骨骼肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 的结合活性及骨骼肌 GLUT4 基因表达量与耐力训练组均没有显著差异, 可能为此推测提供了进一步的证据。

对于糖尿病大鼠来说, 实验发现耐力训练+KN93 组糖尿病大鼠骨骼肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 的结合活性显著低于耐力训练组, 提示了运动同样通过激活糖尿病大鼠骨骼肌 CAMK II 而提高其骨骼肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 的结合活性。而值得注意的是虽然耐力训练+KN93 组糖尿病大鼠骨骼肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 的结合活性与安静对照组相比没有显著差异, 但其骨骼肌 GLUT4 基因表达量与安静对照组相比却显著升高, 提示了对于糖尿病大鼠来说, MEF2 和 GLUT4 的结合活性并不是影响其 GLUT4 表达的唯一因素, 与正常大鼠实验结果不一致。Thai<sup>[7]</sup>的研究也发现, 敲除 GLUT4 启动子区域上 MEF2 结合位点序列, 虽然 GLUT4 mRNA 表达会有所减低, 但仍高于糖尿病大鼠 mRNA 表达水平, 提示了 GLUT4 启动子区域还存在着未知的转录因子结合位点, 未知的转录因子与此位点结合而调节 GLUT4 基因的转录。通过 DNA 序

列同源性分析, Oshel<sup>[26]</sup>的研究发现, 位于 GLUT4 启动子区域, 长度为 60 对 (-712/-772) 碱基片段, 具有 90% 以上的同源性, 推测此区域可能存在转录因子结合位点。通过进一步的 DNase I 足迹实验分析发现, -742/-712 碱基序列对应部位有蛋白质与之结合, Oshel 把此段序列命名为 Domain 1 区域。利用 GLUT4 萤火虫酶报告基因转染 C2C12 肌细胞, 发现转染 Domain 1 区域碱基片段时, 荧光素酶活性显著增加, 说明其片段对于 GLUT4 的表达有着重要作用。随后 Oshel 利用酵母单杂交技术筛选到与 Domain 区域序列的结合蛋白, 并根据此蛋白功能命名为 GLUT4 增强因子(Glut4 enhance factor, GEF)。事实上, 近年来 GEF 对 GLUT4 表达的调节作用研究不是很多, 再加上本实验研究并没有测定骨骼肌细胞核内 GEF 和 GLUT4 的结合活性, 所以我们只能推测 GEF 可能参与调节了训练引起糖尿病大鼠 GLUT4 基因表达的提高, 并以此来解释耐力训练+KN93 组大鼠骨骼肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 的结合活性与安静对照组相比没有显著差异, 而其骨骼肌 GLUT4 基因表达量与正常对照组却显著升高, 具体机制有待进一步研究。

运动通过激活糖尿病大鼠骨骼肌 CAMK II 而提高其骨骼肌细胞核内 MEF2 和 GLUT4 的结合活性, 虽然 MEF2 和 GLUT4 的结合活性参与调节了正常大鼠骨骼肌 GLUT4 基因表达, 但并不是影响糖尿病大鼠骨骼肌 GLUT4 基因表达的唯一因素。

#### 参考文献:

- [1] Gulve E A, Spina R J. Effect of 7-10 days of cycle ergometer exercise on skeletal muscle GLUT4 protein content [J]. *J Appl Physiol*, 1995, 79: 1562-1566.
- [2] Kraniou Y, Cameron-Smith D, Misso M, et al. Effects of exercise on glut4 and glycogenin gene expression in human skeletal muscle[J]. *J Appl Physiol*, 2000, 88(2): 794-796.
- [3] Kraniou G N, Carmeron-Smith D, Hargreaves M. Effect of short-term training on glut4 mRNA and protein expression in human skeletal muscle[J]. *Exp Physiol*, 2004, 89(5): 559-563.
- [4] Ren J M, Marshall B A, Gulve E A, et al. Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(22): 16113-16115.
- [5] Dohm G L. Invited review: Regulation of skeletal

- muscle GLUT4 expression by exercise[J]. *J Appl Physiol*, 2002, 93(2): 782-787.
- [6] Liu M L, Olson A L, Edgington N P, et al. Myocyte enhancer factor-2 (Mef2) binding-site is essential for C2C12 myotube-specific expression of the rat Glut4 muscle-adipose facilitative glucose-transporter gene[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 28514-28521.
- [7] Thai M V, Guruswamy S, Cao K T, et al. Myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-binding site is required for GLUT4 gene expression in transgenic mice. Regulation of MEF2 DNA binding activity in insulin-deficient diabetes [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 14285-14292.
- [8] Smith J A, Collins M, Grobler L A, et al. Exercise and CaMK activation both increase the binding of MEF2A to the Glut4 promoter in skeletal muscle in vivo [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292: E413-E420.
- [9] Mukwevho E, Kohn T A, Lang D, et al. Caffeine induces hyperacetylation of histones at the MEF2 site on the Glut4 promoter and increases MEF2A binding to the site via a CaMK-dependent mechanism [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294: E582-E588.
- [10] 张红学. CaMK II 参与调解运动诱导的 MEF2/GLUT4 DNA 结合活性及 GLUT4 表达研究[J]. *北京体育大学学报*, 2011, 34(9): 51-54.
- [11] Rose A G, Hargreaves M. Exercise increases  $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase II activity in human skeletal muscle [J]. *J Physiol*, 2003, 553: 303-309.
- [12] Wu Y, Qu-Yang J P, Wu K, et al. Hypoglycemic effect of Astragalus polysaccharide and its effect on PTP1B[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2005, 26(3): 345-352.
- [13] Armstrong R B, Laughlin M H, More L, et al. Metabolism of rats running up and down an incline[J]. *J Appl Physiol*, 1983, 55(2): 518-521.
- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ddCT method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [15] Zisma A, Peroni O D, Abel E D, 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.
- [16] Abel E D, Peroni O, Kim J K, et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver[J]. *Nature*, 2001, 409(6821): 672-673.
- [17] Lecturque A, Loizeau M, Vaulont S, et al. Improvement of insulin action in diabetic transgenic mice selectively overexpressing GLUT4 in skeletal muscle[J]. *Diabetes*, 1996, 45(1): 23-27.
- [18] Tsao T S, Burcelin R, Katz E B, et al. Enhanced insulin action due to targeted GLUT4 overexpression exclusively in muscle[J]. *Diabetes*, 1996, 45(1): 28-36.
- [19] 龚豪杰, 谢谨, 张楠, 等. 不同强度运动对 AMPK $\alpha$ 2 三种不同基因状态鼠 MEF2/GLUT4 DNA 结合活性的影响[J]. *体育科学*, 2011, 31(2): 55-62.
- [20] Rose A G, Hargreaves M. Exercise increases  $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase II activity in human skeletal muscle[J]. *J Physiol*, 2003, 553: 303-309.
- [21] Hudmon A, Schulman H. Neuronal  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function[J]. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 473-510.
- [22] Sumi M, Kiuchi K, Ishikawa T, et al. The newly synthesized selective  $Ca^{2+}$ /calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 181: 968-975.
- [23] Zheng D, MacLean P S, Pohnert S C, et al. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase[J]. *J Appl Physiol*, 2001, 91: 1073-1083.
- [24] Holmes B F, Sparling D P, Olson A L, et al. Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 289: E1071-E1076.
- [25] Young M E, Radda G K, Leighton B. Activation of glycogen phosphorylase and glycogenolysis in rat skeletal muscle by AICAR-an activator of AMP-activated protein kinase[J]. *FEBS Lett*, 1996, 382: 43-47.
- [26] Oshel K M, Knight J B, Cao K T, et al. Identification of a 30-base pair regulatory element and novel DNA binding protein that regulates the human GLUT4 promoter in transgenic mice[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(31): 23666-23673.