

# 运动对 Fetuin-A 诱导的胰岛素抵抗鼠骨骼肌 IR 和 IRS1 磷酸化的影响

张明军

(惠州学院 体育系, 广东 惠州 516007)

**摘 要:** 为了解运动对 Fetuin-A 诱导的胰岛素抵抗鼠骨骼肌 IR 和 IRS1 磷酸化的影响。运用牛 fetuin-A 注射建立胰岛素抵抗鼠模型。将小鼠分为一次性运动组(Acute exercise group, AE)、8 周运动组(Exercise group, E)、安静对照组(Control group, C)。结果: 与 C 组比较, AE 组和 E 组胰岛素抵抗指数均非常显著下降( $P<0.01$ ); AE 组骨骼肌 IRS1(Tyr612)磷酸化非常显著增加( $P<0.01$ ); E 组骨骼肌 IR(Tyr1150)磷酸化和 IRS1(Tyr612)磷酸化均非常显著增加( $P<0.01$ ); AE 组和 E 组骨骼肌 GLUT4mRNA 表达和骨骼肌葡萄糖摄取率均非常显著增加( $P<0.01$ )。结果说明: 运动能够非常显著改善 Fetuin-A 诱导的胰岛素抵抗, 8 周有氧运动机制与增加骨骼肌 IR(Tyr1150)、IRS1(Tyr612)磷酸化和 GLUT4 mRNA 表达有关。急性运动与增加骨骼肌 IRS1(Tyr612)磷酸化和 GLUT4 mRNA 表达有关。

**关 键 词:** 运动生物化学; Fetuin-A 蛋白; 胰岛素抵抗; IR(Tyr1150)磷酸化; IRS1(Tyr612)磷酸化; 小鼠  
**中图分类号:** G804.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1006-7116(2014)02-0141-04

## Effects of exercising on IR and IRS1 phosphorylation of the skeletal muscle of Fetuin-A induced insulin resistance mice

ZHANG Ming-jun

(Department of Physical Education, Huizhou University, Huizhou 516007, China)

**Abstract:** In order to understand the effects of exercising on IR and IRS1 phosphorylation of the skeletal muscle of Fetuin-A induced insulin resistance mice, the author established an insulin resistance mouse model by applying bovine Fetuin-A intraperitoneal injection, divided the mice into an acute exercising group (AE), an 8-week exercising group (E) and a calm control group (C). Results: as compared with the mice in group C, the insulin resistance indexes of the mice in groups AE and E decreased very significantly ( $P<0.01$ ); IRS1 (Tyr612) phosphorylation of the skeletal muscle of the mice in group AE increased very significantly ( $P<0.01$ ); IR (Tyr1150) and IRS1 (Tyr612) phosphorylation of the skeletal muscle of the mice in group E increased very significantly ( $P<0.01$ ); the GLUT4mRNA expression and glucose intake rate of the skeletal muscle of the mice in groups AE and E increased very significantly ( $P<0.01$ ). The results indicated the followings: exercising can improve Fetuin-A induced insulin resistance very significantly; the 8-week exercising mechanism is related to the increasing of IR (Tyr1150) and IRS1 (Tyr612) phosphorylation and GLUT4mRNA expression of skeletal muscle; acute exercising is related to the increasing of IRS1 (Tyr612) phosphorylation and GLUT4mRNA expression of skeletal muscle.

**Key words:** sports biochemistry; protein Fetuin-A; insulin resistance; IR (Tyr1150) phosphorylation; IRS1 (Tyr612) phosphorylation; mouse

收稿日期: 2013-05-31

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2011J01151), 广东教育科研十一五规划 2011 年度项目(2011TJK297)。

作者简介: 张明军(1968-), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 运动生理学。E-mail: zmj@hzu.edu.cn

Fetuin-A(又名 a<sub>2</sub>-Heremans-Schmid 糖蛋白, AHSG)是一种含量丰富的血清蛋白,主要由肝脏、胎盘合成,其作用广泛,涉及胰岛素抵抗的发生、血管钙化、骨代谢和蛋白酶活性调节等<sup>[1-3]</sup>。Fetuin-A 能够抑制胰岛素信号传导,诱导胰岛素抵抗产生<sup>[4-7]</sup>。血浆 Fetuin-A 水平与损害的葡萄糖耐受、胰岛素抵抗、代谢综合征、脂肪肝、动脉粥样硬化和脂代谢紊乱密切相关<sup>[8-10]</sup>。运动减体重、药物以及饮食干预均能够通过降低成年人<sup>[11-13]</sup>、儿童<sup>[14]</sup>Fetuin-A 水平,改善胰岛素抵抗。

鉴于 Fetuin-A 通过抑制细胞胰岛素受体的酪氨酸磷酸化,影响胰岛素信号传导,导致胰岛素抵抗,并与全身性胰岛素抵抗的发生关系密切,而运动和减体重能够降低血清 Fetuin-A 水平,改善胰岛素抵抗,推测其机制可能与运动调节 Fetuin-A 抑制的胰岛素信号传导过程有关,而胰岛素信号传导过程中的关键信号蛋白变化则可以解释本机制,因此,为了在分子水平揭示运动改善 Fetuin-A 诱导的胰岛素抵抗作用机制,本研究拟采用高生理剂量的 Fetuin-A 腹腔注射实验鼠,建立 Fetuin-A 诱导的胰岛素抵抗模型,研究胰岛素抵抗的发生、骨骼肌胰岛素信号传导蛋白中胰岛素受体(IR)、胰岛素受体底物 1(IRS1)和葡萄糖转运的变化情况,以及运动干预后变化特征,尝试揭示运动改善 Fetuin-A 诱导的胰岛素抵抗机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

多克隆抗 IR 酪氨酸磷酸化抗体(tyrosine1150)、抗 IRS1 酪氨酸磷酸化抗体(IRS1 tyrosine612)以及胰岛素放射免疫试剂盒(Biosource)、牛 Fetuin-A(纯度 95%)购自厦门慧嘉生物公司。

### 1.2 方法

#### 1)造模和动物分组及运动干预。

选用 SPF 级 KM 小鼠,8 周龄,体重(44.5±2.3)g。胰岛素抵抗模型制备:实验鼠予纯度为 95%的牛 Fetuin-A 腹腔注射,每公斤体重剂量为 0.75 mg<sup>[11]</sup>。8 h 后检测血液和各项生化指标。以胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)判定 Fetuin-A 诱导的胰岛素抵抗模型是否造模成功。胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)=空腹胰岛素(IU·L<sup>-1</sup>)×空腹血糖(mmol·L<sup>-1</sup>)÷22.5。8 h 后检测 HOMA-IR, Fetuin-A 腹腔注射导致胰岛素抵抗产生(Fetuin-A 注射组(24.6±1.4)与对照组(11.1±1.6)比较,  $P<0.01$ )。对照组给予等量的生理盐水。

造模成功的小鼠随机分为安静对照组(Control group, C)、一次性运动组(Acute exercise group, AE)和 8 周运动组(Exercise group, E)3 组,每组 6 只。AE 组

和 E 组在跑台上进行有氧运动干预,跑台速度 15 m/min, 60 min/d, 5 d/周,运动强度约为 70%~75%最大摄氧量<sup>[15]</sup>。AE 组进行 1 次运动;E 组运动持续 8 周,同时执行牛 Fetuin-A 腹腔注射,1 次/d。

#### 2)试验指标检测。

(1)禁食 12 h,运动结束后 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,心脏取血,断头处死后取腓肠肌组织备用。空腹血糖以京都血糖仪检测。放射免疫法依照说明书检测空腹胰岛素。

(2)RT-PCR 法检测 GLUT4mRNA:提取总 RNA,检测 RNA 纯度和完整性,依照试剂盒说明书进行逆转录。内参  $\beta$ -actin 上游引物:5'-AGATAG ACGT GCAC AGGAAG-3',下游引物:5'-GCTGGCGAACCGCCAG AGCT-3'; GLUT4 上游引物 5'-CGTGCCTGACATTAA AGAG-3',下游引物 5'-CTGGAAGGTGGACAGTGAG-3'。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳成像,凝胶成像分析系统分析,待测基因的相对表达量:待测基因用  $\beta$ -actin 表示。

(3)胰岛素(10 nmol/L)刺激腓肠肌经 20 min 后,液闪计数器测定腓肠肌细胞葡萄糖摄取率(pmol/(mg·min))<sup>[17]</sup>。

(4)免疫共沉淀检测蛋白磷酸化。各组细胞予胰岛素刺激后,细胞裂解取上清。100  $\mu$ g 细胞溶解物 SDS-PAGE 蛋白分离、转膜,予抗 IR 和 IRS1 抗体,加 100  $\mu$ L 质量分数 10% A-Sepharose 沉淀,免疫沉淀复合物洗涤,上样缓冲液煮沸、离心,取上清,电泳、转膜、封闭过夜,分别加 IR 和 IRS1 抗磷酸酪氨酸抗体,洗膜,加辣根过氧化物酶标记的 II 抗;曝光,洗涤后与 ECL 反应,光密度定量分析采用 LeicaQ 图像分析仪(德国)。

#### 3)统计学处理。

各组实验数据均采用均数±标准差表示,统计采用 SPSS16.0 统计软件。各组的各变量进行单因素方差分析, LSD 检验。显著性水平和非常显著性水平分别取  $P<0.05$  和  $P<0.01$ 。

## 2 结果及分析

### 2.1 胰岛素抵抗性和骨骼肌 GLUT4mRNA 表达

胰岛素抵抗指数 AE 组(19.1±0.8)和 E 组(17.8±1.5)比 C 组(24.8±2.4)降低,差异具有非常显著性意义( $P<0.01$ )。骨骼肌 GLUT4mRNA 表达 AE 组(0.73±0.20)和 E 组(0.70±0.20)比 C 组(0.37±0.10)增加,差异具有非常显著性意义( $P<0.01$ )。

### 2.2 骨骼肌 IR、IRS1 磷酸化和葡萄糖摄取率

与 C 组相比,AE 组 IR(Tyr1150)磷酸化增加,差异没有显著性意义( $P>0.05$ );E 组 IR(Tyr1150)磷酸化增

加, 差异具有非常显著意义( $P < 0.01$ ); AE 组和 E 组 IRS1(Tyr612)磷酸化增加, 差异都具有非常显著性意义( $P < 0.01$ )(见图 1)。

骨骼肌葡萄糖摄取率 AE 组( $58.9 \pm 4.1$ )和 E 组( $61.7 \pm 2.2$ )比 C 组( $20.1 \pm 1.2$ )增加, 差异具有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。

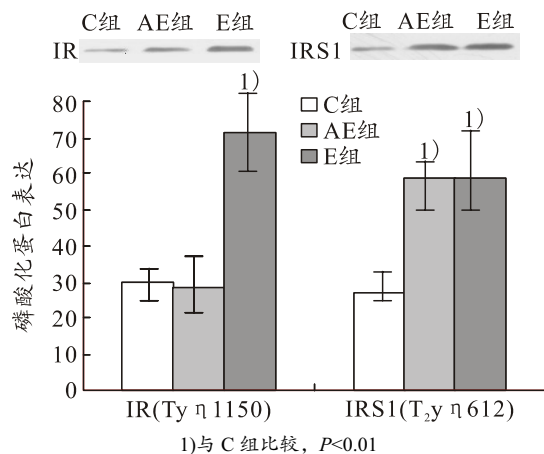


图 1 各组小鼠骨骼肌 IR(Tyr1150)、IRS1(Tyr612) 磷酸化

### 3 讨论

为了研究运动影响 Fetuin-A 诱导的胰岛素抵抗机制, 必须制备 Fetuin-A 诱导的胰岛素抵抗模型, 从而排除其它致胰岛素抵抗的因素干扰。参考 Hennige A M<sup>[1]</sup> 的研究, 本研究采取牛 Fetuin-A(纯度 95%, 0.75 mg/g 体重)腹腔注射的方法建立 Fetuin-A 诱导的胰岛素抵抗模型, 检测模型鼠胰岛素抵抗指数, 比正常对照组显著增加, Fetuin-A 诱导的胰岛素抵抗模型造模成功。

Fetuin-A 在 1944 年被发现是血液中一种含量较丰富的糖蛋白, 作用广泛, 主要由肝脏细胞合成并分泌到血液中<sup>[7]</sup>。最近有关 Fetuin-A 与肥胖、糖尿病、胰岛素抵抗关系的研究成为了热点。对 3 710 例调查对象的检测显示: 独立于性别、种族或心血管疾病因子, 高血清 Fetuin-A 与老年人 2 型糖尿病的发病率密切相关, 而且年龄超过 75 周岁, 这种相关性的程度将更加显著<sup>[8]</sup>。欧洲人癌症和营养展望调查显示, 独立于现有的其它相关风险因素, 循环 Fetuin-A 将预示未来 7 年的 2 型糖尿病发病几率<sup>[9]</sup>。针对健康、老年和体成分的研究也显示: 独立于其它胰岛素抵抗的风险因素, 血清 Fetuin-A 水平与随后 6 年的 II 型糖尿病发病几率密切相关<sup>[8]</sup>。针对运动、饮食干预和手术减重的研究也发现了 Fetuin-A 变化与胰岛素抵抗之间的关系。322 名实验者经过 2 年的饮食干预减重后, 随着体重减轻, 血清 Fetuin-A 水平降低, 胰岛素抵抗、血脂和其它代谢指标也出现了良性改变<sup>[20]</sup>。而胃肠道手

术后体重的减轻可以降低肥胖者血清 Fetuin-A、胰岛素抵抗, 预计将使这些对象未来 10 年罹患糖尿病的几率降低约 70%<sup>[11, 21]</sup>。针对胰岛素信号蛋白的研究也部分揭示了 Fetuin-A 诱导胰岛素抵抗机制, Fetuin-A 与 IR 酪氨酸磷酸酶结合, 抑制胰岛素信号向下游的传导, 导致胰岛素抵抗的产生<sup>[7]</sup>。重组 Fetuin-A 孵育的纤维母细胞中胰岛素刺激的 IR 自磷酸化被抑制了 80%, 胰岛素刺激的 IR $\beta$ 亚单位的酪氨酸磷酸化被抑制了 40%, 出现胰岛素抵抗。

本研究中模型鼠在接受了 Fetuin-A 腹腔注射后, 出现严重的胰岛素抵抗, 随即分别给予一次急性运动和 8 周有氧运动干预, 结果显示: 急性运动组和 8 周有氧运动组鼠的胰岛素抵抗指数分别比安静对照组非常显著降低( $P < 0.01$ )。提示急性运动和 8 周有氧运动均能够改善 Fetuin-A 诱导的胰岛素抵抗, 但是其中机制尚不清楚。进一步研究发现, 与安静对照组比较, 急性运动组免疫共沉淀法检测的骨骼肌 IR(Tyr1150)磷酸化未发生显著变化( $P > 0.05$ ), IRS1(Tyr612)磷酸化则非常显著增加( $P < 0.01$ )(见图 1)。而 8 周有氧运动组则呈现了与急性运动组不同的变化特征, 与安静对照组比较, 运动组骨骼肌 IR(Tyr1150)和 IRS1(Tyr612)磷酸化均非常显著增加( $P < 0.01$ )(见图 1)。作为胰岛素信号传导的效应, 骨骼肌细胞内功能蛋白 GLUT4 承担着葡萄糖转运的功能, 协助将葡萄糖摄入细胞内, 实现葡萄糖的跨膜转运。本研究中, 与安静对照组比, 急性运动组和 8 周有氧运动组 RT-PCR 法检测的骨骼肌 GLUT4mRNA 表达和液闪仪测定的骨骼肌葡萄糖摄取率均呈现了相似的非常显著增加趋势( $P < 0.01$ )。

综上所述, Fetuin-A 对骨骼肌胰岛素信号蛋白 IR 和 IRS1 均产生了抑制作用, 诱导了胰岛素抵抗的产生, 研究结果与以往的研究结果一致。运动则能够改善 Fetuin-A 胰岛素抵抗, 机制与运动解除了 Fetuin-A 对 IR 和 IRS1 的抑制有关, 但是急性运动和 8 周有氧运动的具体作用位点呈现差异, 即急性运动仅仅能够解除 IRS1(Tyr612)磷酸化的抑制, 而 8 周有氧运动则能够解除 IR(Tyr1150)和 IRS1(Tyr612)磷酸化的双重抑制。运动恢复了 Fetuin-A 影响的胰岛素信号传导功能, 最终增加了骨骼肌 GLUT4mRNA 的表达, 使得骨骼肌葡萄糖转运和摄取功能增强, 改善了胰岛素抵抗。

本研究的不足之处在于仅仅分析了骨骼肌胰岛素信号蛋白中 IR 和 IRS1 磷酸化变化情况, 而 Fetuin-A 对胰岛素抵抗的影响必然涉及大量信号蛋白和相关调节酶, 因此本研究也必然存在较大的局限性, 有待于在后续的研究中不断补充和完善。

## 参考文献:

- [1] Hennige A M, Staiger H, Wicke C, et al. Fetuin-A induces cytokine expression and suppresses adiponectin production[J]. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1765.
- [2] Mori K, Emoto M, Inaba M. Fetuin-A: a multi-functional protein[J]. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 2011, 5(2): 124-146.
- [3] Ou H Y, Wu H T, Hung H C, et al. Endoplasmic reticulum stress induces the expression of fetuin-A to develop insulin resistance[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(7): 2974-2984.
- [4] Mathews S T, Srinivas P R, Leon M A, et al. Bovine fetuin is an inhibitor of insulin receptor tyrosine kinase[J]. *Life Sci*, 1997, 61(16): 1583-1592.
- [5] Yang S J, Homg H C, Choi H Y, et al. Effects of a three-month combined exercise programme on fibroblast growth factor 21 and fetuin-A levels and arterial stiffness in obese women[J]. *Clinical Endocrinology*, 2011, 75(4): 464-69.
- [6] Srinivas P R, Wagner A S, Reddy L V, et al. Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level[J]. *Mol Endocrinol*, 1993, 7(11): 1445-1455.
- [7] Ix J H, Sharma K. Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(3): 406-412.
- [8] Ix J H, Wassel C L, Kanaya A M, et al. Fetuin-A and incident diabetes mellitus in older persons[J]. *JAMA*, 2008: 300(2): 182-188.
- [9] Mori K, Emoto M, Yokoyama H, et al. Association of serum fetuin-A with insulin resistance in type 2 diabetic and nondiabetic subjects[J]. *Diabetes Care*, 2006, 29(2): 468-471.
- [10] Ix J H, Shlipak M G, Brandenburg V M, et al. Association between human fetuin-A and the metabolic syndrome: data from the Heart and Soul Study[J]. *Circulation*, 2006, 113(14): 1760-1767.
- [11] Brix J M, Stingl H, Hollerl F, et al. Elevated Fetuin-A concentrations in morbid obesity decrease after dramatic weight loss[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(11): 4877-4881.
- [12] Jenkins N T, McKenzie J A, Hagberg J M, et al. Plasma fetuin-A concentrations in young and older high- and low-active men[J]. *Metabolism*, 2011, 60(2): 265-271.
- [13] Reinehr T, Roth C L. Fetuin-A and its relation to metabolic syndrome and fatty liver disease in obese children before and after weight loss[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(11): 4479-4485.
- [14] Chan D C, Watts G F, Gan S K, et al. Effect of ezetimibe on hepatic fat, inflammatory markers, and apolipoprotein B-100 kinetics in insulin-resistant obese subjects on a weight loss diet[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(5): 1134-1139.
- [15] Thomas D P, Zimmerman S D, Hansen T R, et al. Collagen gene expression in rat left ventricle: interactive effect of age and exercise training[J]. *J Appl Physiol*, 2000, 89(4): 1462-1468.
- [16] Fang R P, Zhou X. Hyperglycemia- and hyperinsulinemia-induced alteration of adiponectin receptor expression and adiponectin effects in L6 myoblasts[J]. *J Mol Endocrinol*, 2005, 35: 465-476.
- [17] Ix J H, Chertow G M, Shlipak M G, et al. Fetuin-A and kidney function in persons with coronary artery disease--data from the Heart and Soul Study[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21(8): 2144-2151.
- [18] Ix J H, Biggs M L, Mukamal K J, et al. Association of fetuin-a with incident diabetes mellitus in community-living older adults : the cardiovascular health study[J]. *Circulation*, 2012, 125(19): 2316-2322.
- [19] Stefan N, Fritsche A, Weikert C, et al. Plasma fetuin-A levels and the risk of type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2008, 57(10): 2762-2767.
- [20] Bluher M, Rudich A, Kloting N, et al. Two patterns of adipokine and other biomarker dynamics in a long-term weight loss intervention[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(2): 342-349.
- [21] Sjostrom L, Narbro K, Sjostrom C D, et al. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(8): 741-752.