

同型半胱氨酸对骨骼肌细胞 GLUT4 表达和分布的影响

王雅楠¹⁾, 顾玉¹⁾, 黄尤光²⁾, 韩毅³⁾, 王芳¹⁾, 李树德^{2, 4)}

(1) 昆明医学院病理学教研室, 云南昆明 650500; 2) 昆明医学院生物化学教研室, 云南昆明 650500;
3) 昆明医学院生理学教研室, 云南昆明 650500; 4) 昆明医学院生物医学工程研究中心,
云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 研究高同型半胱氨酸血症对骨骼肌细胞 GLUT4 表达和膜分布的改变, 探讨同型半胱氨酸对葡萄糖摄取的影响. **方法** 20 只 6 周健康小鼠随机分为对照组 (10 只) 和高同型半胱氨酸血症组 (10 只), 含 1.5% 的蛋氨酸饮水 3 个月制造高同型半胱氨酸血症模型; 测定空腹状态下血糖和胰岛素; HE 染色观察骨骼肌组织形态改变; 免疫组织化学和 Western Blot 检测骨骼肌细胞 GLUT4 表达和细胞膜上分布. **结果** 高同型半胱氨酸血症组与对照组比较空腹血糖和空腹胰岛素增加 ($P < 0.05$), 骨骼肌组织结构完整, 细胞膜上 GLUT4 分布降低, GLUT4 蛋白质表达无明显差异 ($P > 0.05$). **结论** 在骨骼肌组织中, 同型半胱氨酸可能通过抑制 GLUT4 在细胞膜上分布, 降低骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取.

[关键词] 高同型半胱氨酸血症; 骨骼肌细胞; GLUT4; 葡萄糖

[中图分类号] R591.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 01 - 0016 - 04

Effect of Homocysteine on the Expression and Distribution of GLUT4 in Skeletal Muscle Cells

WANG Ya - nan¹⁾, GU Yu¹⁾, HUANG You - guang²⁾, HAN Yi³⁾, WANG Fang¹⁾, LI Shu - de^{2, 4)}

(1) Dept. of Pathology; 2) Dept. of Biochemistry; 3) Dept. of Physiology; 4) Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Key words] **Objective** To study the variations in the expression and distribution of Glucose transporter 4 (GLUT4) in skeletal muscle cells in hyperhomocysteinemia animal model, to explore effect of hyperhomocysteinemia on glucose uptake. **Methods** Twenty healthy mice, six weeks of age, were randomly divided into control group (n = 10) and hyperhomocysteinemia group (n = 10). Normal food was fed in control group; Normal food and 1.5 % (mass fraction) methionine were fed in hyperhomocysteinemia group. After the feed in the hyperhomocysteinemia group and the control group were fed for three months, the levels of blood glucose and blood insulin were determined in the fasting. The expression and distribution of GLUT4 were observed with Immunohistochemistry and Western Blot in skeletal muscle cells. **Results** The fasting plasma glucose and plasma insulin levels in the hyperhomocysteinemia group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). Structure of skeletal muscle tissue were intact. The quantity of GLUT4 distribution in the cytomembrane was decreased in the herpyhomocysteinemia group compared with the control group. However, there were no significant difference in expression of the GLUT4 between the control group and herpyhomocysteinemia group ($P > 0.05$). **Conclusion** Homocysteine may suppress distribution of GLUT4 in the cytomembrane in skeletal muscle cells, resulting in

[基金项目] 云南省科技厅 - 昆明医学院联合专项基金资助项目 (2009CD213, 2010CD223); 云南省应用基础研究面上资助项目 (2010CD075, 2007CO70M); 云南省教育厅基金资助项目 (2010C148)

[作者简介] 王雅楠 (1987 ~), 女, 内蒙古呼和浩特市人, 在读硕士研究生, 主要代谢性疾病研究工作.

[通讯作者] 王芳. E-mail:wangfang_01@126.com, 李树德. E-mail:shudeli006@vip.sina.com

reducing glucose uptake in skeletal muscle cells.

[Key words] Hyperhomocysteinemia; Skeletal muscle cell; Glucose transporter 4; Glucose

同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 作为体内一种含硫的非必需氨基酸, 是蛋氨酸代谢的中间产物, 高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia, HHcy) 是动脉粥样硬化的独立的危险因素. 近年的研究报道, HHcy 与多囊综合征、骨质疏松症和糖尿病等多种疾病密切相关. 流行病学的调查发现, 在糖尿病及并发症患者中 Hcy 的含量增加^[1-3]. 同时在 HHcy 的动物模型中, 血糖浓度和胰岛素增加, 导致胰岛素抵抗^[4]. 骨骼肌是体内利用葡萄糖最主要的器官, 葡萄糖转运蛋白 4 (Glucose transporter 4, GLUT4) 是胰岛素信号通路中骨骼肌细胞摄取葡萄糖的关键分子, 但在骨骼肌细胞中, Hcy 是否通过调节 GLUT4 的表达和分布, 从而影响对葡萄糖的摄取仍然不清楚. 本研究的目的是建立 HHcy 的动物模型, 探讨 GLUT4 在骨骼肌细胞的表达和分布, 揭示 Hcy 对骨骼肌细胞摄取葡萄糖的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

蛋氨酸购自美国 Sigma 公司, 血糖测定试剂盒和胰岛素测定试剂盒购自南京建成生物公司, 兔多隆抗体 GLUT4 和 ECL 化学发光试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司.

1.2 HHcy 动物模型建立

20 只小鼠随机分为 HHcy 组和对照组, 各组 10 只. HHcy 组在饮用水中加入甲硫氨酸 (浓度为 1.5%), 对照组正常饮食, 3 个月后, 用 ELESA 法测定空腹血液同型半胱氨酸的浓度, HHcy 组的 Hcy 浓度为对照组的 4.3 倍, 确定模型建立成功.

1.3 血糖和胰岛素测定

饲养 3 个月后, 空腹状态下 2 组分别从眼眶取抗凝血, 4 000 r/min, 离心 5 min, 取血浆. 根据葡萄糖氧化酶法测定试剂盒和胰岛素化学发光法测定试剂盒的使用说明书, 分别测定血糖和胰岛素浓度.

1.4 骨骼肌的 HE 染色

饲养 3 个月后, 空腹状态下麻醉处死小鼠, 取骨骼肌组织, 一部分 10% 的甲醛固定, 石蜡包埋; 一部分 -80 °C 保存备用. 石蜡包埋组织切片常规进行 HE 染色.

1.5 免疫组织化学检测 GLUT4 表达

石蜡切片脱蜡水化, 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶, 微波热处理修复抗原, 正常小牛血清封闭非特异性抗原, 分别加入兔抗小鼠 GLUT4 (1:100), 4 °C 孵育过夜后加入生物素化二抗, 室温下孵育 30 min, 滴加 DAB 显色液, 苏木素复染, 常规脱水透明封片. 用 PBS 代替一抗, 做阴性对照, 棕褐色为阳性着色.

1.6 Western Blot 检测 GLUT4 的表达

取骨骼肌组织用组织细胞裂解液制作匀浆, BCA 法测定蛋白质含量, 取各样本 80 μg 进行 SDS-PAGE 电泳, 半干转移法将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 的脱脂牛奶封闭后分别加入兔多隆抗体 GLUT4 一抗过夜孵育, 洗膜后加入 HRP 标记的二抗孵育, 洗涤后与 ECL 反应, 曝光洗片, 扫描图片后用 Quantity one 4.40 计算各条带的荧光强度值及其与 β-actin 的比值. 每组实验至少重复 3 次.

1.7 统计学处理

采用 SPSS 软件分析, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用配对 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 Hcy 增加血糖和胰岛素浓度

通过氧化酶法和化学发光法分别测定空腹状态下血糖和胰岛素浓度的浓度, 在 HHcy 组中, 血糖浓度明显增加, 较对照组上升约 1.35 倍; 胰岛素浓度增加, 较对照组上升约 1.63 倍 (见图 1). 结果提示, Hcy 可能通过抑制骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取, 使外周血糖浓度增加; 同时 Hcy 使胰岛素的含量增加, 可能与胰岛素抵抗有关.

2.2 骨骼肌组织的 HE 染色

对照组和 HHcy 组 HE 染色后显示, 肌纤维呈带状, 大小均匀, 深蓝色的长卵圆形核位于肌纤维的周边. 但 HHcy 组中肌纤维间隙较对照组增大, 两组间未见明显的肌纤维萎缩和坏死现象 (见图 2).

2.3 Hcy 诱导骨骼肌细胞的 GLUT4 细胞膜的分布减少

HHcy 组与对照组比较, GLUT4 在骨骼肌细胞膜上的分布明显较低 (见图 3), 结果提示, Hcy

抑制骨骼肌细胞 GLUT4 细胞膜的分布，影响胰岛素信号通路对葡萄糖的摄取。

2.4 GLUT4 的表达水平

Western Blot 发现，与对照组比较，在 HHcy 组 GLUT4 蛋白质的表达下调，但无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果提示，Hcy 影响骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取可能主要是通过抑制 GLUT4 蛋白质从细胞的胞浆转移到胞膜上，从而影响骨骼肌细胞的胰岛素信号通路 (见图 4)。

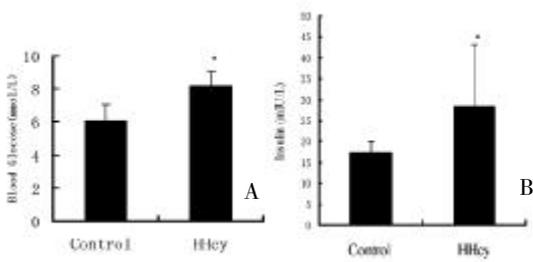
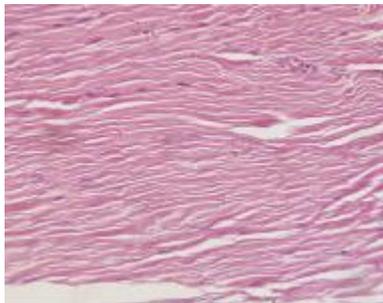


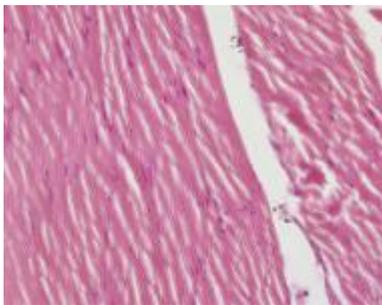
图 1 空复血糖和胰岛素水平

Fig. 1 Levels of the fasting blood glucose and blood insulin

A: 血糖; B 胰岛素.
与正常组比较, * $P < 0.05$.



A

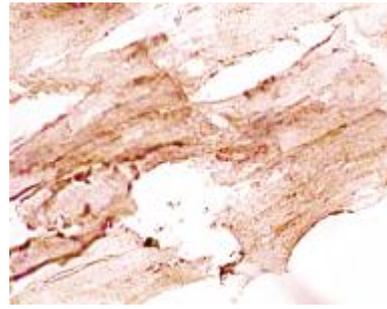


B

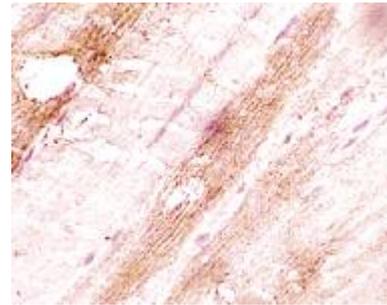
图 2 小鼠骨骼肌组织 (HE × 400)

Fig. 2 HE staining of skeletal muscle tissue of mice (HE × 400)

A: 对照组; B: HHcy 组.



A



B

图 3 小鼠骨骼肌细胞 GLUT4 的表达和细胞膜的分布 (SP × 200)

Fig. 3 Expression and distribution in the cytomembrane of GLUT4 in skeletal muscle cells of mice (SP × 200)

A: 对照组; B: HHcy 组.

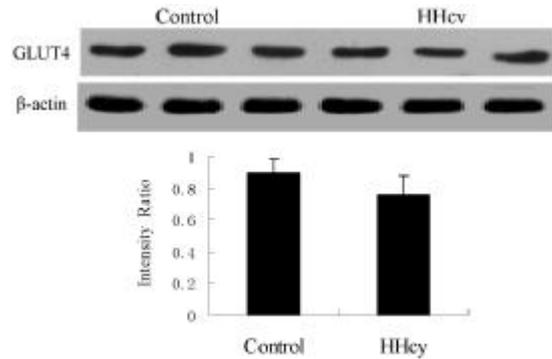


图 4 GLUT4 在小鼠骨骼肌的表达水平

Fig. 4 Expression of GLUT4 in skeletal muscle tissue of mice

3 讨论

Hcy 是体内的危险因素之一，研究表明，蛋氨酸过量会导致 HHcy，损伤机体的内皮细胞，导致动脉粥样硬化^[5,6]。目前，大量文献已经证实，HHcy 与心脑血管病的发生密切相关^[7,8]，近期的研究报道发现，糖尿病及其并发症的发生往往伴随 HHcy，Hcy 可通过降低 PPAR- γ ，诱导氧化应激加剧糖尿病患者的心脏损伤^[9]。同时也有学者认为，

HHcy 可导致外周血糖和胰岛素增加, 诱发胰岛素抵抗, 与糖尿病发病机理有关. 在 HHcy 的动物和细胞模型中, Li Y 等发现 Hcy 可通过上调抵抗素的表达影响胰岛素信号通路, 抑制脂肪细胞对葡萄糖的摄取和利用, 导致外周的高血糖和胰岛素抵抗^[10]; 在肝脏细胞中, Liu W J 等研究揭示, Hcy 通过抑制糖原的合成和促进糖异生作用, 增加葡萄糖的输出, 使外周血糖浓度增加^[11]. 本研究发现, 在 HHcy 的动物模型中, 空腹血糖和胰岛素增加.

骨骼肌是体内利用葡萄糖的主要组织, 骨骼肌细胞萎缩和坏死会影响对葡萄糖的利用, 严重糖尿病患者骨骼肌纤维出现断裂和坏死现象. 本研究在 HHcy 的动物模型未发现骨骼肌细胞的形态改变, 这可能与同型半胱氨酸作用时间和剂量有关.

正常情况下, 骨骼肌细胞摄取和利用大部分的葡萄糖, 该细胞对葡萄糖的摄取主要依靠 GLUT4 的表达和膜上的分布. GLUT4 主要分布在对胰岛素敏感的脂肪、心肌和骨骼肌组织. 在胰岛素抵抗时, GLUT4 的蛋白质水平不改变, 但在骨骼肌细胞膜上的分布降低^[12,13]. 但最近的研究提出, 在胰岛素抵抗严重的糖尿病患者中, GLUT4 的蛋白质表达降低, 这一结果可能与样本量较少有关^[14]. 有学者研究显示, 在 3T3-L1 脂肪细胞中 TNF- α 不仅能使 GLUT4 的 mRNA 水平下降, 而且使 GLUT4 总蛋白以及细胞膜上分布增加^[15,16]. 然而 Hcy 是否影响骨骼肌细胞的 GLUT4 的蛋白质水平及细胞膜上的分布仍然不清楚. 本研究发现 GLUT4 的蛋白质水平无统计学意义, 但在细胞膜上的分布增多. 综上所述, HHcy 导致血糖和胰岛素增加可能与 GLUT4 在骨骼肌细胞膜上的分布减少相关.

[参考文献]

- [1] 陆菊明, 谷伟军. 同型半胱氨酸—糖尿病血管病变的新型危险因素[J]. 军医进修学院学报, 2009, 30(3): 249 - 250.
- [2] 毕其华, 叶雄伟, 胡勤辛, 等. 血清同型半胱氨酸与糖尿病及其并发症的关系心脑血管病防治[J]. , 2009, 9(3), 207 - 208.
- [3] 杨国庆, 陆菊明, 潘长玉. 血浆同型半胱氨酸浓度与 2 型糖尿病视网膜病变的关系[J]. 中华内科杂志, 2002, 41(1): 34 - 37.
- [4] GOLBAHAR J, AMINZADEH M A, KASSAB S E, et al. Hyperhomocysteinemia induces insulin resistance in male sprague-dawley rats [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007, 76(1): 1 - 5.
- [5] YAN T T, LI Q, ZHANG X H, et al. Homocysteine impaired endothelial function through compromised vascular endothelial growth factor/Akt/endothelial nitric oxide synthase signalling [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(11): 1 071 - 1 077.
- [6] HLAVODEC J, SOMMEROVA Z, PISARIKOVA A, et al. Homocysteinemia and Endothelial damage after methionine load[J]. Thromb Res, 1997, 88: 361 - 364.
- [7] KLOPPENBORG R P, NEDERKOORN P J, VAN DER G-RAAF Y, et al. Homocysteine and cerebral small vessel disease in patients with symptomatic atherosclerotic disease [J]. The SMART-MR Study Atherosclerosis, 2011, 216(2): 461 - 466.
- [8] KARDESOGLU E, UZ O, ISILAK Z, et al. Homocysteine as a new risk factor for cardiovascular events in heart failure [J]. Int J Cardiol, 2011, 146(1): 126 - 127.
- [9] MISHRA P K, TYAGI N, SEN U, et al. Synergism in hyperhomocysteinemia and diabetes: role of PPAR gamma and tempol[J]. Cardiovasc Diabetol, 2010, 9: 49.
- [10] LI Y, JIANG C, XU G, et al. Homocysteine upregulates resistin production from adipocytes in vivo and in vitro [J]. Diabetes, 2008, 57(4): 817 - 827.
- [11] LIU W J, MA L Q, LIU W H, et al. Inhibition of hepatic glycogen synthesis by hyperhomocysteinemia mediated by TRB3[J]. Am J Pathol, 2011, 178(4): 1 489 - 1 499.
- [12] PEDERSEN O, BAK J F, ANDERSEN P H, et al. Evidence against altered expression of GLUT1 or GLUT4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM [J]. Diabetes, 1990, 39: 865 - 870.
- [13] CIARALDI TP, MUDALIAR S, BARZIN A, et al. Skeletal muscle GLUT1 transporter protein expression and basal leg glucose uptake are reduced in type 2 diabetes [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90: 352 - 358.
- [14] ULLA K, BRITT C, THOMAS S N, et al. GLUT4 and UB-C9 protein expression is reduced in muscle from type 2 diabetic patients with severe insulin resistance [J]. PLOS ONE, 2011, 6(11): 27 - 54.
- [15] STEPHENS J M, LEE J, PILCH P F, et al. Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction [J]. J Biol Chem, 1997, 272(2): 971 - 976.
- [16] 林晓仪, 郭颖, 丁鹤林, 等. 核因子- κ B 对 TNF- α 诱导的脂肪细胞葡萄糖转运蛋白 4 表达的影响 [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2009, 30(1): 21 - 25.

(2011 - 12 - 3 收稿)