

Caveolin-3 在白藜芦醇改善高脂诱导骨骼肌胰岛素抵抗中的作用

邵明明¹, 苏嘉¹, 陈泽楷¹, 杜雨末¹, 金希¹, 谈智^{2*}
(中山大学中山医学院 1. 2008 级临床医学专业; 2. 生理教研室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】在高脂诱导的胰岛素抵抗大鼠模型上, 探讨微囊蛋白 3(CAV-3)在白藜芦醇改善骨骼肌胰岛素抵抗中的作用及机制。【方法】实验大鼠分 3 组: 正常饮食组(NORM), 高脂饮食组(HFD), 高脂饮食加白藜芦醇干预组(HFD+ RSV)。通过空腹血糖、胰岛素浓度、计算胰岛素敏感指数、腹腔葡萄糖耐量试验以及 2-脱氧-[³H] 葡萄糖的摄取, 从整体上探讨白藜芦醇对胰岛素抵抗的保护作用。再通过免疫印迹检验微囊蛋白 3(CAV-3)与葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)在以上过程中的表达情况。【结果】HFD 能显著诱导胰岛素抵抗, 补充 RSV 能抑制高脂的诱导作用。离体骨骼肌实验证实, RSV 的保护作用与其促进胰岛素诱导的葡萄糖摄取有关。免疫印迹证实 RSV 能够增加骨骼肌 CAV-3 蛋白表达, 促进 GLUT4 向细胞膜的转运。【结论】白藜芦醇能改善高脂诱导的胰岛素抵抗, 其保护作用与其上调 CAV-3 蛋白表达, 促进 GLUT4 向细胞膜转运, 改善骨骼肌葡萄糖的摄取有关。

关键词: 白藜芦醇; 胰岛素抵抗; 微囊蛋白; 葡萄糖转运蛋白 4

中图分类号: R331.36 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)02-0163-05

Role of Caveolin-3 in Resveratrol Protection against High-fat Diet-induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle

SHAO Ming-ming¹, SU Jia¹, CHEN Ze-kai¹, DU Yu-mo¹, JIN Xi¹, TAN Zhi^{2*}

(1. 2008 Clinical Medical Science, 2. Department of Physiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】 In the high-fat-induced insulin resistance rat model, the role of caveolin-3 (CAV-3) in the effect of resveratrol (RSV) on insulin resistance in skeletal muscles was studied.【Methods】 Rats were divided into three groups: normal diet group (NORM), high-fat diet group (HFD), high-fat diet plus resveratrol group (HFD + RSV). The protective effect of resveratrol on insulin resistance were studied by measuring fasting glucose, fasting serum insulin, insulin sensitive index (ISI), intraperitoneal glucose tolerance test, and 2-deoxy-[³H] glucose uptake in vitro soleus muscles. Expression of caveolin-3 (CAV-3) and glucose transporter 4 (GLUT4) in the above processes were measured by Western blot analysis.【Results】 RSV has protective effect on high-fat diet-induced insulin resistance. RSV elevated insulin-stimulated glucose uptake in isolated soleus muscle in vitro by enhancing GLUT4 translocation to the plasma membrane rather than increasing GLUT4 protein expression. RSV increased CAV-3 protein expression, which contributed to GLUT4 translocation.【Conclusion】 The results showed that RSV ameliorates insulin resistance by increasing glucose uptake in skeletal muscles through a CAV-3-dependent pathway, and the mechanism was that RSV up regulates CAV-3 protein expression and enhances GLUT4 translocation to plasma membrane.

Key words: resveratrol; insulin resistance; caveolin-3; glucose transporter 4

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(2):163-167]

胰岛素抵抗不仅是 2 型糖尿病的发病基础, 更是贯穿多种代谢相关疾病的共同病理生理基

础。胰岛素抵抗加速了 2 型糖尿病的发生和发展, 也增加了患心血管系统疾病的危险性^[1]。因此, 如

收稿日期: 2011-12-12

基金项目: 中山大学 2011 年学生暑期科研项目(NO.7)

作者简介: 邵明明, 本科生, E-mail: ming_11235@qq.com; * 通信作者: 谈智, 博士, 讲师, 研究方向: 心血管生理, E-mail: tanzhi@mail.sysu.edu.cn

何防治胰岛素抵抗十分重要。最近的调查表明,白藜芦醇(resveratrol, RSV)对高脂诱导的胰岛素抵抗综合征^[2]具有保护作用,但分子机制仍不清楚。骨骼肌是机体主要的胰岛素靶器官,胰岛素介导的葡萄糖摄取,75%以上由骨骼肌细胞负责^[3]。我们以往的研究表明,雌激素可通过上调骨骼肌细胞微囊蛋白-3(caveolin-3, CAV-3)的表达,促进葡萄糖摄取^[4]。已知 RSV 的分子结构和药理性质与雌二醇类似,所以它拥有雌激素的许多作用^[5]。因此,我们推测,CAV-3 可能参与白藜芦醇对胰岛素抵抗影响过程。本研究在高脂诱导的胰岛素抵抗模型上,探讨 RSV 补充对骨骼肌细胞 CAV-3 表达及葡萄糖摄入的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

200~250 g 的清洁级雌性 SD 大鼠(由中山大学实验动物中心提供)。白藜芦醇(resveratrol, RSV)、考马斯亮蓝、Tris、亮氨酸(leupeptin)、抑肽酶(aprotinin)、苯甲基磺酰氟(PMSF)购自 Sigma 公司。Caveolin-3、GLUT4 和 β -actin 抗体为 Santa Cruz 公司产品。2-脱氧-[³H]葡萄糖购自 Amersham 公司。其它试剂为国产分析纯。大鼠在 23±2 °C, 12 h 光/暗周期循环(早 7 点开始给予光照)条件下饲养。饲养 1 周后在乙醚麻醉下切除大鼠双侧卵巢。2 周恢复期后,大鼠随机分为 3 组(每组 6~8 只),正常饮食组(NORM),给予正常饮食、高脂饮食组(HFD,高脂高糖饲料配制方案:10.0%猪油,20.0%葡萄糖,2.5%胆固醇,1.0%胆酸和 66.5%常规饲料)和高脂饮食加白藜芦醇干预组(HFD+RSV, RSV 每天 10 mg/kg)。各组饲养共 16 周。

1.2 代谢参数的测量

在给予不同的饮食喂养 16 周后,大鼠禁食过夜(16 h),经尾静脉采集血液样本。空腹血糖使用 LIFESCAN 单键超血糖仪(强生公司,美国)测定。空腹血清胰岛素使用超灵敏大鼠胰岛素 ELISA 试剂盒(Mercodia AB,瑞典乌普萨拉)测定。然后按照 2 g/kg 的剂量腹腔注射葡萄糖溶液进行腹腔内糖耐量试验(IPGTT),分别于注射后 0, 15, 30, 60, 90 和 120 min 测量血糖。

1.3 2-脱氧-[³H]葡萄糖的摄取

分离得到比目鱼肌,迅速放入持续灌注体积

分数 95%O₂ 和 5% CO₂ 的 KRB 缓冲液(pH 7.4, 8 mmol/L 葡萄糖)37 °C 孵育 60 min。随后,肌肉组织分别在有胰岛素(100 nmol/L)和无胰岛素的 KRB 缓冲液中孵育 30 min。接着使用 KRB 缓冲液冲洗肌肉组织,并在含有 3.7×10⁴ Bq 2-脱氧-[³H]葡萄糖的 2 mL KRB 缓冲液中 37 °C 孵育 30 min。取出组织,使用无同位素标记的 KRB 缓冲液冲洗,加 1 mmol/L 的 NaOH 作用 2 h。使用放射性液体闪烁计数器测得 CPM 值。

1.4 免疫印迹

将全细胞裂解液或质膜放入 10% 的 SDS-PAGE 中分离,并在含有 200 mL/L 甲醇的 Tris-甘氨酸缓冲液中转移至 PVDF 膜(Amersham),PVDF 膜用 TBST 洗涤,10%脱脂牛奶封闭 1 h,并与一抗(CAV-3, GLUT4 和 β -actin)孵育。之后用 TBST 缓冲液清洗 PVDF 膜,用耦合辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h,并使用增强化学发光试剂盒(Amersham)显色。

1.5 统计分析

运用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,数据均以平均值±标准差表示。采用单因素方差分析,组间多重比较使用 SNK-T 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 白藜芦醇对高脂饮食诱导的胰岛素抵抗起保护作用

如图 1A, B 显示,经过 16 周的不同饮食,高脂饮食组相比正常饮食组,其空腹血糖和胰岛素浓度显著上升;而给予白藜芦醇后,明显抑制了血糖和胰岛素浓度的上升。同时通过计算胰岛素敏感指数(ISI), $ISI=1/(\text{空腹血糖} \times \text{空腹胰岛素})$,证实了 ISI 在高脂饮食组明显下降,补充白藜芦醇能逆转这种下降。此外,我们通过 IPGTT 试验表明,与正常饮食组相比,高脂饮食组注射葡萄糖 30 min 血中的葡萄糖浓度明显升高,白藜芦醇处理组能明显降低注射葡萄糖 60 min 后的血糖浓度(图 1C)。以上结果表明,对已摘除双侧卵巢的大鼠给予白藜芦醇能够改善高脂饮食诱导的胰岛素抵抗。

2.2 白藜芦醇增加胰岛素刺激的骨骼肌葡萄糖摄取

接下来,我们探讨了在离体的比目鱼肌中白藜芦醇对葡萄糖摄入所起的作用。如图 2 所示,各

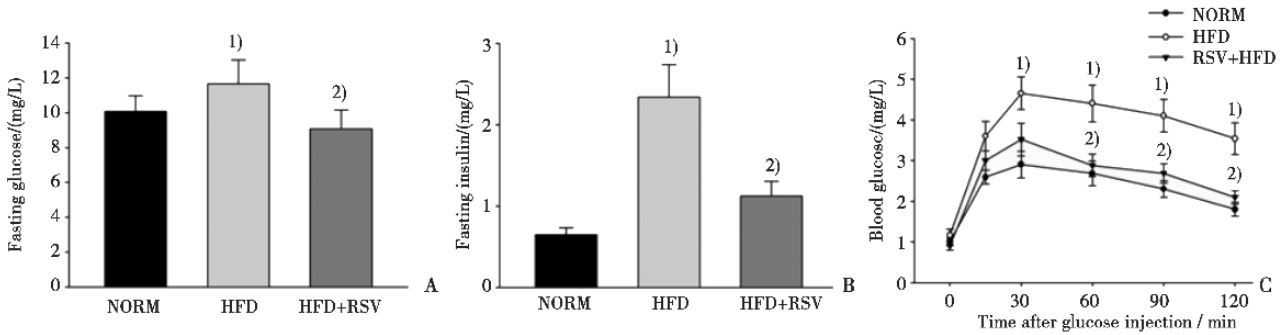


图 1 白藜芦醇对高脂饮食诱导的胰岛素抵抗起保护作用

Fig.1 Resveratrol (RSV) protects against HFD-induced insulin resistance in ovariectomized rats

(A–C) At the end of the different 16-week diet, rats were fasted overnight and fasting blood glucose (A), fasting serum insulin (B) were measured. (C) An intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was then performed at time 0, 15, 30, 60, 90, and 120 min after injection with glucose load (i.p. 2 g/kg body wt). 6–8 rats were analyzed in each group. NORM: the normal diet group; HFD: the high fat diet group; HFD + RSV: the high-fat diet supplemented with RSV group. 1) $P < 0.05$, vs. NORM and 2) $P < 0.05$, vs. HFD.

组比目鱼肌基础状态下葡萄糖摄取量无显著差异。高脂饮食引起骨骼肌胰岛素刺激下的葡萄糖摄取量显著下降，而补充白藜芦醇后能使葡萄糖摄取量上升，表明白藜芦醇能促进骨骼肌摄取葡萄糖。

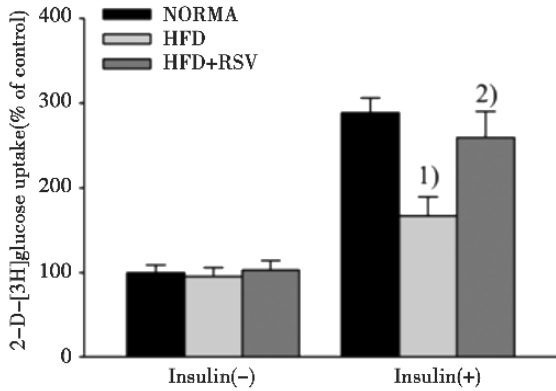


图 2 白藜芦醇增加胰岛素刺激的骨骼肌葡萄糖摄取

Fig.2 RSV promotes glucose uptake

After 16 weeks of diet feeding, soleus muscles were isolated from the three different groups and used to measure 2-Deoxy- $[^3\text{H}]$ glucose uptake. 1) $P < 0.05$, vs. NORM and 2) $P < 0.05$, vs. HFD.

2.3 白藜芦醇促进 GLUT4 向细胞膜转移

胰岛素刺激下的 GLUT4 转移至细胞膜是调节葡萄糖摄入的关键步骤^[6]。因此我们下一步研究在胰岛素刺激的情况下，白藜芦醇对骨骼肌中 GLUT4 蛋白的影响。如图 6 所示，不论是否有胰岛素的刺激情况下，不同饮食的各组比目鱼肌中 GLUT4 的总量是不变的(图 3A)。但是，在胰岛素

刺激的情况下，HFD 组骨骼肌细胞膜中所含 GLUT4 蛋白明显下降，而给予白藜芦醇能抑制这

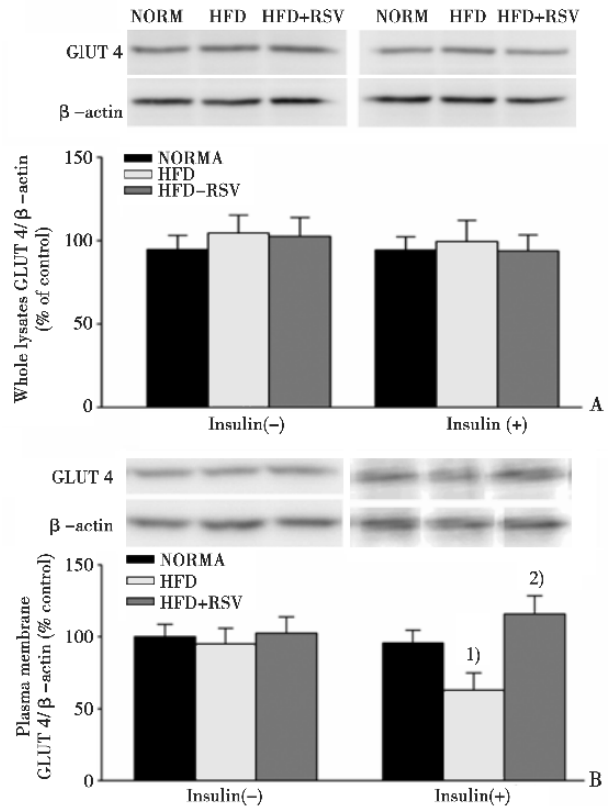


图 3 白藜芦醇促进 GLUT4 向细胞膜转移

Fig.3 RSV enhances GLUT4 translocation to plasma membrane

Effects of RSV on GLUT4 protein expression in whole tissue lysates (A) or in plasma membrane fractions (B) under basal or insulin-stimulated conditions. 1) $P < 0.05$, vs. NORM and 2) $P < 0.05$, vs. HFD.

种下降(图 3B), 这表白了白藜芦醇通过影响 GLUT4 向细胞膜的转运而不是 GLUT4 的表达, 来影响葡萄糖的摄入。

2.4 白藜芦醇上调骨骼肌中 CAV-3 蛋白的表达

研究表明 CAV-3 能影响 GLUT4 的转移, 对骨骼肌胰岛素抵抗形成具有重要作用。我们接下来探讨白藜芦醇的胰岛素抵抗保护作用是否与 CAV-3 有关。免疫印迹结果显示, HFD 抑制 CAV-3 蛋白表达, 而白藜芦醇能逆转 HFD 对 CAV-3 蛋白表达的影响(图 4)。

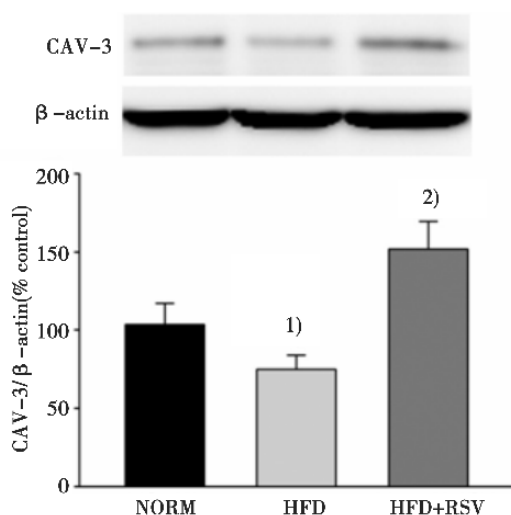


图 4 白藜芦醇上调骨骼肌中 CAV-3 蛋白的表达

Fig.4 RSV up-regulates CAV-3 expression in HFD-induced insulin resistant soleus muscles

CAV-3 protein expression was measured in soleus skeletal muscles isolated from NORM, HFD or HFD supplied with RSV groups after 16-week different diet. 1) $P < 0.05$, vs. NORM and 2) $P < 0.05$, vs. HFD.

3 讨论

我们通过检测空腹血糖、胰岛素浓度, 计算胰岛素敏感指数以及腹腔葡萄糖耐量试验证实, 补充白藜芦醇可以改善高脂诱导的胰岛素抵抗。进一步离体骨骼肌葡萄糖摄入实验提示, 白藜芦醇的胰岛素抵抗保护作用与其促进葡萄糖摄入有关。免疫印迹结果显示, 白藜芦醇能够上调骨骼肌 CAV-3 蛋白表达, 促进 GLUT4 向骨骼肌细胞膜转移。以上结果显示, 白藜芦醇的胰岛素抵抗保护作用, 与其上调骨骼肌 CAV-3 蛋白表达, 促进 GLUT4 转运, 加快葡萄糖转运有关。

白藜芦醇是一种植物雌激素, 它在分子结构

上与雌激素相近, 可与雌激素受体相互作用^[5]。最近的多个研究发现, 对绝经后高脂饮食的妇女进行随机分组后, 雌激素治疗能降低糖尿病的发病风险^[7-9]。因此在目前的研究中, 我们首次采用双侧卵巢切除的大鼠来研究白藜芦醇的作用与其在影响葡萄糖摄取和胰岛素抵抗中的机制。我们的实验结果表明, 将白藜芦醇提供给双侧卵巢切除的大鼠后, 可以抑制血清葡萄糖的升高与胰岛素浓度, 说明了白藜芦醇可以延缓胰岛素抵抗的发展。这个结果与之前研究显示白藜芦醇可以在 2 型糖尿病病人^[10]和高脂饮食的大鼠^[2]中增加胰岛素敏感性相一致。由于雌激素替代疗法有可能引起乳腺及子宫的癌变, 因此, 拟雌激素类的药物白藜芦醇就有可能用于临床上治疗 2 型糖尿病, 尤其是绝经后高脂饮食的妇女。

骨骼肌是机体摄取葡萄糖最主要的组织之一, 葡萄糖跨膜转运是骨骼肌利用葡萄糖的首要步骤。葡萄糖跨膜进入骨骼肌需要细胞膜上 GLUT4 的协助扩散, GLUT4 在维持体内葡萄糖自稳态中起着非常重要的作用^[6]。我们的结果显示, 白藜芦醇处理后能够增加骨骼肌的葡萄糖转运, 提示白藜芦醇可能对 GLUT4 具有作用。进一步实验结果显示, 白藜芦醇对于骨骼肌总 GLUT4 的表达没有影响, 但是却能够增加细胞膜上的 GLUT4 的含量。提示白藜芦醇促进骨骼肌葡萄糖摄入的主要原因是促进 GLUT4 转位至细胞膜。是哪种因素导致 GLUT4 的转移增加? 目前研究表明细胞表面结构微囊(caveolae)对葡萄糖转运过程具有重要的调控作用, 胰岛素受体和 GLUT-4 就位于微囊上。CAV-3 是骨骼肌细胞膜表面微囊的关键结构蛋白, 与葡萄糖的转运密切相关。研究显示, CAV-3 基因敲除的小鼠表现出骨骼肌的胰岛素抵抗^[11-12], 同时在胰岛素刺激情况下, GLUT4 在微囊中表达升高^[13]。我们最近的研究表明了雌激素可以通过上调骨骼肌细胞内 CAV-3 表达来促进葡萄糖的摄取^[4]。因此我们假设, 白藜芦醇可能通过上调 CAV-3 的表达, 促进 GLUT4 向细胞膜转移, 从而促进葡萄糖的摄入。免疫印迹实验证实与其他两组相比, 白藜芦醇处理组 CAV-3 的表达明显增加, 表明白藜芦醇可以促进 CAV-3 蛋白表达。但白藜芦醇是通过何种途径, 如转录、翻译还是降解途径来增加 CAV-3 蛋白表达还需进一步细胞实验来证实。此外有研究结果表明, 在糖尿病心脏病大

鼠心肌细胞内,白藜芦醇可以促进 CAV-3 与 GLUT4 相互作用,通过 AMPK/Akt/eNOS 信号通路诱导 GLUT4 向细胞膜转移^[14]。因此,本研究初步提示,白藜芦醇可通过上调 CAV-3 表达,促进与 GLUT4 相互作用来增加葡萄糖转运。

综上所述,我们首次在双侧卵巢切除大鼠模型上证实,白藜芦醇可以改善高脂诱导的胰岛素抵抗。白藜芦醇的保护作用与其上调骨骼肌 CAV-3 蛋白表达,促进 GLUT4 向细胞膜转移,改善骨骼肌葡萄糖摄入有关。本研究为临床上使用白藜芦醇治疗绝经后 2 型糖尿病妇女提供了初步的实验依据。

参考文献:

- [1] Reaven GM. Pathophysiology of insulin resistance in human disease [J]. *Physiol Rev*, 1995, 75(3): 473-486.
- [2] Deng JY, Hsieh PS, Huang JP, et al. Activation of estrogen receptor is crucial for resveratrol-stimulating muscular glucose uptake via both insulin-dependent and -independent pathways [J]. *Diabetes*, 2008, 57(7): 1814-1823.
- [3] DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, et al. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization [J]. *Diabetes*, 1981, 30(12): 1000-1007.
- [4] Mu P, Tan Z, Cui Y, et al. 17-beta-Estradiol attenuates diet-induced insulin resistance and glucose intolerance through up-regulation of caveolin-3 [J]. *Ir J Med Sci*, 2011, 180(1): 221-227.
- [5] Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, et al. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(10): 3657-3667.
- [6] Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4 [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(4): 267-277.
- [7] Rossi R, Origliani G, Modena MG. Transdermal 17-beta-estradiol and risk of developing type 2 diabetes in a population of healthy, nonobese postmenopausal women [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(3): 645-649.
- [8] Andersson B, Mattsson LA, Hahn L, et al. Estrogen replacement therapy decreases hyperandrogenicity and improves glucose homeostasis and plasma lipids in postmenopausal women with noninsulin-independent diabetes mellitus [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(2): 638-643.
- [9] Margolis KL, Bonds DE, Rodabough RJ, et al. Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial [J]. *Diabetologia*, 2004, 47(7): 1175-1187.
- [10] Brasnyo P, Molnar GA, Mohas M, et al. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients [J]. *Br J Nutr*, 2011, 106(3): 383-389.
- [11] Capozza F, Combs TP, Cohen AW, et al. Caveolin-3 knockout mice show increased adiposity and whole body insulin resistance, with ligand-induced insulin receptor instability in skeletal muscle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288(6): C1317-C1331.
- [12] Oshikawa J, Otsu K, Toya Y, et al. Insulin resistance in skeletal muscles of caveolin-3-null mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(34): 12670-12675.
- [13] Scherer PE, Lisanti MP, Baldini G, et al. Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles [J]. *J Cell Biol*, 1994, 127(5): 1233-1243.
- [14] Penumathsa SV, Thirunavukkarasu M, Zhan L, et al. Resveratrol enhances GLUT-4 translocation to the caveolar lipid raft fractions through AMPK/Akt/eNOS signalling pathway in diabetic myocardium [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(6A): 2350-2361.

(编辑 孙慧兰)