

· 基础研究 ·

电针治疗对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌葡萄糖转运蛋白 4 及蛋白激酶 B_β mRNA 表达的影响

白震民 唐强 李曦 陈世龙

【摘要】 目的 观察电针对胰岛素抵抗(IR)大鼠胰岛素信号转导途径中葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 及蛋白激酶 B_β (Akt2) 表达的影响。方法 共选取 24 只健康 Wistar 雄性大鼠, 采用随机数字表法将其分为正常对照组、模型组及电针组, 每组 8 只。采用高脂膳食喂养将模型组及电针组大鼠制成 IR 模型, 电针组于制模成功后给予电针背俞穴治疗。于电针治疗 2 周后检测各组大鼠胰岛素敏感性指数 (ISI); 选用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 对各组大鼠骨骼肌细胞 GLUT4 及 Akt2 mRNA 表达进行定量分析。结果 模型组大鼠血浆胰岛素 (FINS) 较正常对照组明显升高 ($P < 0.05$), ISI 较正常对照组显著降低 ($P < 0.05$); 电针组大鼠经电针治疗 2 周后, 发现其 FINS 较模型组明显降低 ($P < 0.05$), ISI 则显著升高 ($P < 0.05$); 并且电针组骨骼肌细胞中 GLUT4 及 Akt2 mRNA 表达均显著强于模型组水平 ($P < 0.05$)。结论 电针治疗能改善 IR 模型大鼠病情, 其治疗机制可能与电针促进胰岛素磷脂酰肌醇-3 激酶途径通路中 GLUT4 转位有关。

【关键词】 电针; 胰岛素抵抗; 胰岛素信号转导途径; 葡萄糖转运蛋白 4; 蛋白激酶 B_β

The influence of electroacupuncture on the expression of glucose transporter 4 and protein kinase B_β in the skeletal muscle cells of insulin-resistant rats BAI Zhen-min*, TANG Qiang, LI Xi, CHEN Shi-long. * Sport Rehabilitation Department, Beijing Sports University, Beijing 100084, China

【Abstract】 Objective To explore the effects of electroacupuncture on the expression of glucose transporter 4 (GLUT4) and protein kinase B_β (Akt2) in the skeletal muscles of insulin-resistant (IR) rats. **Methods** Twenty-four male Wistar rats were randomly divided into a normal control group, a model group and an electroacupuncture (EA) group. The rats of the model group and the EA group were fed with high fat diets to establish a model of insulin resistance. The rats in the EA group were then treated with electroacupuncture for 2 weeks, while those in the model group were not. Blood samples were collected to evaluate fasting insulin (FINS) and fasting blood glucose (FBG) to calculate the insulin sensitivity index (ISI). GLUT4 and Akt2 mRNA in the skeletal muscles were determined with reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCRs) after 2 weeks of EA treatment. **Results** Compared with the control group, the FINS in the model group increased significantly, and ISI decreased significantly. Compared with the model group, the FINS in the EA group decreased significantly and ISI increased significantly. The expression of GLUT4 and Akt2 mRNA in the model group was significantly lower than in the control group or the EA group. **Conclusion** Electroacupuncture might improve the condition of IR rats, probably by enhancing the transposition of GLUT4 in the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase signaling pathway.

【Key words】 Electroacupuncture; Insulin resistance; Insulin signal transduction pathway; Glucose transporter 4; Protein kinase B_β

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是糖尿病、肥胖、心脑血管疾病发生和发展的重要危险因素, 针对 IR 相关疾病的康复治疗已成为当前临床研究的重要内容之一。有大量研究证实, 电针能有效治疗高血脂、脂肪肝、肥胖等 IR 相关疾病^[1-3]; 但在分子生物学水平

探讨电针治疗 IR 的相关机制目前鲜见报道。基于上述背景, 本研究通过高脂膳食喂养制作 IR 大鼠模型, 以反映 IR 水平的血液生化指标以及与骨骼肌糖代谢密切相关的葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter-4, GLUT4)、蛋白激酶 B_β (protein kinase B_β, Akt2) 作为观察对象, 初步探讨电针治疗对机体胰岛素信号传导通路-磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3-K) / Akt 系统的影响。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及分组

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.12.005

基金项目: 黑龙江省教育厅研究生创新科研项目 (YJSCX2007-0168HLJ)

作者单位: 100084 北京, 北京体育大学运动康复系 (白震民); 黑龙江中医药大学附属第二医院康复医学科 (唐强); 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 (李曦); 江苏淮阴卫生高等职业技术学校 (陈世龙)

共选取健康 Wistar 雄性大鼠 24 只, 体重 200 ~ 220 g, 由黑龙江中医药大学实验动物中心提供, 大鼠经适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表法分为模型组、电针组及正常对照组, 每组 8 只。

二、IR 模型制作及电针治疗

1. IR 模型制作: 所有大鼠经适应性喂养 1 周, 期间均自由摄食、饮水, 保持饲养室内温度、湿度恒定。将模型组及电针组大鼠制成 IR 模型, 制模方法参考文献[4], 给予高脂膳食喂养持续 4 周, 高脂膳食配方: 脂肪热比为 59% (其中猪油占 39%), 蛋白质热比为 21% (其中酪蛋白占 31%), 碳水化合物热比为 20% (其中玉米淀粉占 30%), 此外附加必需维生素及矿物质。正常对照组则喂饲普通饲料(由黑龙江中医药大学实验动物中心提供)。于造模 4 周后对电针组及模型组大鼠进行随机抽样检查(采眼眶血), 并计算胰岛素敏感性指数(insulin sensitivity index, ISI), 判断造模大鼠是否出现明显 IR。

2. 电针治疗: 电针组大鼠于制模成功后给予电针治疗, 首先将大鼠固定于实验台上, 大鼠经膈穴定位参照实验动物穴位图谱^[5], 针具选用 0.25 mm × 15 mm 医用毫针, 取大鼠双侧脾俞、肾俞加胰俞, 直刺 5 mm, 然后连接上海产 G6805-2 型电针治疗仪, 选择连续疏波电刺激, 频率为 4 Hz, 电流强度为 2 mA, 输出电压为 2 ~ 4 V, 以大鼠局部肌肉轻微抖动为度, 刺激时间为每次 30 min, 每日针刺 1 次, 连续治疗 2 周。正常对照组及模型组大鼠均于相同时间点给予制动处理, 于电针组治疗结束后解除制动。各组大鼠实验期间均继续给予高脂膳食喂养。

三、大鼠 ISI 检测

于电针治疗 2 周后, 各组大鼠均禁食 12 h 过夜, 于次日空腹从眼眶静脉窦内采血, 采血结束后立即脱颈椎处死, 迅速分离双侧后肢骨骼肌并放入小玻璃瓶内, 标号封存后置于液氮罐中并送至 -70 °C 冰箱内保存备用。空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)测定采用日立全自动生化分析仪, 血浆胰岛素(fasting serum insulin, FINS)测定采用放射免疫分析法, 放免试剂盒由北京华英生物技术研究所提供, ISI 计算方法参考文献[6], 即 $ISI = \ln[1/(FBG \times FINS)]$ 。

四、大鼠 GLUT4、Akt2 mRNA 检测

采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测各组大鼠 GLUT4、Akt2 mRNA 水平, 首先取各组大鼠骨骼肌样本约 100 mg, 选用美国 OMEGA 公司 mRNA 提取试剂盒(mRNA Enrichment kit), 根据其附带说明操作事项依次提取总 RNA 及 mRNA, 然后进行逆转录聚合酶链反应。GLUT4 上游引物序列为: 5'-CAC TGG TCC TTG

CTG TAT TC-3' 20nt, 下游引物引物序列为: 5'-CTG ATG TTA GCC CTG AGT G-3' 19nt; Akt2 上游引物序列为: 5'-ATG GTA GCC AAC AGT CTG AAG C-3' 22nt, 下游引物序列为: 5'-TTG CCG AGG AGT TTG AGA TAA T-3' 22nt。PCR 反应参数如下: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 反应 45 s, 55 °C 反应 45 s, 72 °C 反应 1 min, 共 30 个循环; 于 72 °C 延伸 10 min, 然后将扩增产物转至 1% 琼脂糖凝胶中电泳。

五、统计学分析

本研究所得数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 SPSS 11.5 版统计学软件包进行数据分析, 计量资料比较采用单因素方差分析, 组间均数比较采用 *q* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠 ISI 检测结果比较

对各组大鼠 ISI 检测结果比较后发现, 各组大鼠经高脂膳食喂养后, 其 FBG 水平均升高, 组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组大鼠 FINS 较正常对照组明显升高 ($P < 0.05$), 而 ISI 却显著降低 ($P < 0.05$), 提示制模成功(即模型组大鼠存在典型 IR 表现); 电针组大鼠经电针治疗 2 周后, 发现其 FINS 较模型组明显降低 ($P < 0.05$), ISI 则显著升高 ($P < 0.05$), 表明电针治疗能改善实验大鼠 IR 病情, 促其糖代谢功能趋于正常, 具体数据详见表 1。

表 1 各组实验大鼠 FBG、FINS 及 ISI 结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	FBG (mmol/L)	FINS (mU/L)	ISI
正常对照组	8	5.12 ± 0.41	13.18 ± 1.89	-4.20 ± 0.11
模型组	8	5.98 ± 1.04	21.63 ± 4.06 ^a	-4.83 ± 0.27 ^a
电针组	8	5.39 ± 0.72	17.51 ± 3.22 ^{ab}	-4.52 ± 0.23 ^{ab}

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

二、各组大鼠骨骼肌中 GLUT4 及 Akt2 mRNA 表达比较

对各组实验大鼠骨骼肌细胞中 GLUT4 mRNA 检测后发现, 模型组 GLUT4 mRNA 表达较正常对照组明显降低 ($P < 0.05$), 提示 IR 模型大鼠骨骼肌具有 GLUT4 mRNA 表达偏低等特征; 经电针治疗 2 周后, 发现电针组大鼠骨骼肌 GLUT4 mRNA 表达明显高于模型组, 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示电针治疗能促进 IR 大鼠骨骼肌 GLUT4 基因转录, 使 GLUT4 蛋白表达增强, 有助于提高大鼠骨骼肌细胞转运及利用葡萄糖的能力, 具体情况详见图 1 及图 2。另外本研究还观察了电针治疗对大鼠骨骼肌细胞 Akt2 mRNA 表达的影响, 发现模型组大鼠经高脂膳食喂养后, 其骨骼肌中 Akt2 mRNA 表达较正常对照组显

著降低 ($P < 0.05$) ; 而电针组大鼠经电针治疗 2 周后, 随着其 IR 病情改善, 骨骼肌中 Akt2 mRNA 表达虽未达到正常对照组水平, 但较模型组大鼠显著升高, 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 具体情况详见图 2 及图 3。

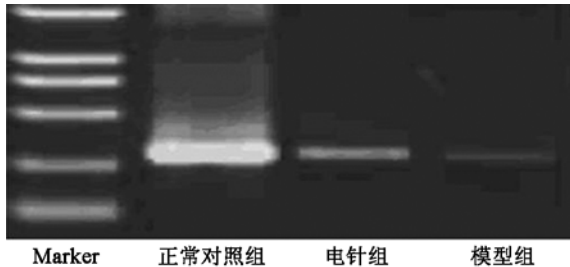
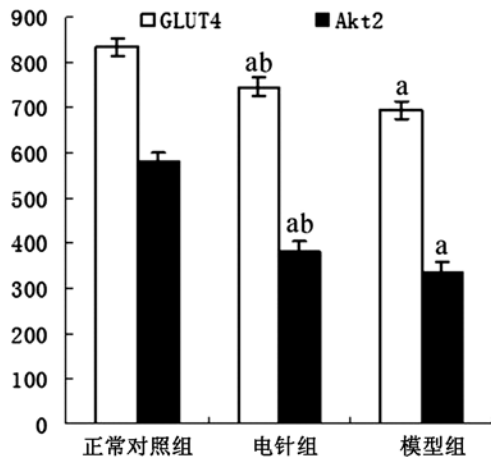


图 1 各组大鼠骨骼肌 GLUT4 基因 RT-PCR 扩增结果比较



注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

图 2 各组大鼠骨骼肌 GLUT4 及 Akt2 基因表达比较

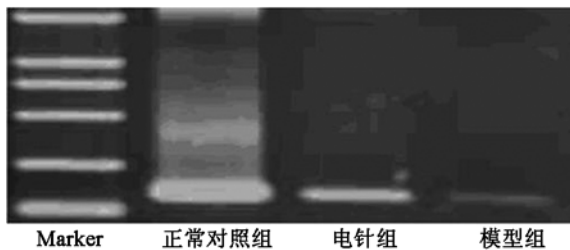


图 3 各组大鼠骨骼肌 Akt2 基因 RT-PCR 扩增结果比较

讨 论

目前有大量研究证明, IR 发生与机体胰岛素信号传导通路 PI3-K/Akt 途径密切相关^[7], 其中 PI3-K 是介导葡萄糖进入靶细胞内的关键酶之一, 当其蛋白或偶联受体发生点突变或其它变异时, 将严重干扰胰岛素在细胞内信号的传导, 是诱导 IR 发生的重要分子病理学基础^[8]。通过蛋白饮食干预性实验及胰岛素增敏剂药理学实验发现, 减轻或逆转机体 Akt 受损状态, 恢复其磷酸化水平及活性, 可促使其下游 GLUT4 膜转

位、糖原合成酶 3 磷酸化等活动增加, 提高机体葡萄糖摄取、糖原合成功能, 加速异常糖代谢状态改善^[9-10]。Casabon 等^[11]研究发现, 2 型糖尿病肥胖症 IR 患者在不同剂量胰岛素作用下, 机体骨骼肌中参与葡萄糖转换的信号传导途径各不相同, 在次于最大剂量胰岛素作用下, PI3-K/Akt 信号途径发挥了重要作用; Cho 等^[12]通过研究 Akt2 缺陷小鼠时发现, Akt2 信号传导中断将干扰机体胰岛素信号传导, 使胰岛素降低血糖的能力严重受损, 进而机体出现 IR, 并表现出类似人类 2 型糖尿病的迹象。

电针作为一种传统治疗手段, 目前已在临床各科中广泛应用。相关研究发现, 采用电针作用脊柱周围腧穴(如背俞穴、夹脊穴等)可刺激相应神经节段及其周围组织, 同时针感的传导效应通过神经、体液调节机制, 可影响机体交感神经末梢并释放相应化学介质, 从而达到调节机体平衡的功能^[13-14]。目前有学者认为, 人体部分重要经络穴位经低频(2~4 Hz)、低强度(1.5~3.0 mA)连续疏波电针刺激后, 能对机体内分泌系统产生显著双向良性调节作用, 但其作用机制目前尚未明确^[15]。

大量研究已证实, 骨骼肌细胞中 GLUT4 mRNA 含量降低是机体存在 IR 的重要标志^[16]; 有动物实验发现, 电针治疗能增强 2 型糖尿病大鼠股四头肌 GLUT4 基因表达^[17], 从而使 IR 病情得到缓解。基于上述背景, 本研究于 IR 大鼠制模后介入背俞穴电针治疗, 发现能显著改善 IR 大鼠 ISI, 与上述研究结果基本一致; 为进一步探讨电针治疗 IR 的相关机制, 本研究对 IR 大鼠经电针治疗后其骨骼肌中 GLUT4 及 Akt2 mRNA 表达进行了观察, 发现电针治疗能促进 IR 模型大鼠 GLUT4 基因转录, 促进 GLUT4 蛋白合成, 使外周组织细胞转运及利用葡萄糖的能力增强; 同时电针治疗还可促进 IR 大鼠 Akt2 表达增强, 有助于胰岛素 PI3-K/Akt 途径信号通路中 GLUT4 转位, 从而改善 IR 大鼠外周组织对胰岛素的抵抗, 降低高胰岛素血症水平, 推测电针促进 IR 大鼠骨骼肌中 GLUT4 基因表达可能与增强 Akt2 表达有关, 如能对上述信号转导途径进行深入研究, 那么对阐明电针治疗 IR 及相关疾病的具体机制将具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 张红星, 黄国付, 周利, 等. 电针丰隆穴治疗高脂血症患者的疗效观察. 中华物理医学与康复杂志, 2007, 29: 581-583.
- [2] 曾志华, 曾明慧, 冯雯琪, 等. 电针阻断胰岛素抵抗及过氧化反应治疗非酒精性脂肪肝的实验研究. 第三军医大学学报, 2008, 30: 1055-1057.
- [3] 符佳, 陆志明, 张彩荣, 等. 电针改善肥胖大鼠胰岛素抵抗作用及其机制研究. 四川中医, 2008, 26: 34-36.

- [4] 都健,赵玉岩,谢辉,等. 喂养型胰岛素抵抗动物模型的建立与评价. 中国医科大学学报,2002,31:343-346.
- [5] 华兴邦,李辞蓉,周浩良,等. 大鼠穴位图谱的研制. 实验动物与动物实验,1991,10:1-5.
- [6] 李光伟,潘孝任,Lillionja S,等. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数. 中华内科杂志,1993,32:656-660.
- [7] Whiteman EL,Cho H,Birnbaum MJ. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. Trends Endocrinol Metab,2002,13:444-451.
- [8] 闫妙娥,吴效科,侯丽辉,等. 磷脂酰肌醇 3 激酶抑制剂诱导猪卵巢颗粒细胞胰岛素抵抗的研究. 中华妇产科杂志,2008,43:54-56.
- [9] Tremblay F,Lavigne C,Jacques H,et al. Dietary cod protein restores insulin-induced activation of phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and GLUT4 translocation to the T-tubules in skeletal muscle of high-fat-fed obese rats. Diabetes,2003,52:29-37.
- [10] Kausch C,Krützfeldt J,Witke A,et al. Effects of troglitazone on cellular differentiation,insulin signaling and glucose metabolism in cultured human skeletal muscle cells. Biochem Biophys Res Commun,2001,280:264-267.
- [11] Casaubon L,Sajan MP,Rivas J,et al. Contrasting insulin dose-dependent defects in activation of atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt in muscles of obese diabetic humans. Diabetologia,2006,49:3000-3008.
- [12] Cho H,Mu J,Kim Jk,et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2. Science,2001,292:1728-1731.
- [13] 张红星,魏巍,徐祖森,等. 夹脊电针配合火针治疗急性期带状疱疹的临床观察. 中国康复医学杂志,2010,25:691-693.
- [14] 赵亚伟,葛兆希. 电针背俞穴治疗功能性消化不良 35 例疗效观察. 新中医,2009,41:98-99.
- [15] 张朝晖,崔毓桂. 电针对下丘脑-垂体-性腺轴的调节. 国外医学计划生育生殖健康分册,2007,26:14-17.
- [16] Lee JS,Bruce CR,Tunstall RJ,et al. Interaction of exercise and diet on GLUT4 protein and gene expression in type 1 and type 2 rat skeletal muscle. Acta Physiol Scand,2002,175:37-44.
- [17] 袁爱红,魏群利,刘志诚,等. 电针对实验性 2 型糖尿病大鼠股四头肌 GLUT4 基因的影响. 中国中医急症,2009,18:953-955.

(修回日期:2010-07-20)

(本文编辑:易浩)

· 短篇论著 ·

康复训练辅助治疗慢性踝关节外侧不稳疗效观察

徐建侃

踝关节损伤是日常生活和运动中常见的关节损伤,其中 85% 以上是踝关节外侧扭伤,一部分患者因在损伤的急性期没有得到正确的诊断及治疗,踝关节外侧韧带及关节囊撕裂后松弛导致踝关节反复扭伤,伴有踝关节肿胀疼痛,即慢性踝关节外侧不稳(chronic ankle lateral instability,CALI)^[1]。长期的踝关节不稳定可导致关节软骨变性,最终继发踝关节创伤性关节炎,对患者的日常生活和工作造成不便。本研究通过康复训练治疗 CALI,疗效满意,现报道如下。

一、资料与方法

选择 2005 年 3 月至 2009 年 3 月在我院门诊就诊的 CALI 患者 36 例。纳入标准:①有外踝损伤病史,病程 > 3 个月,有踝关节疼痛、行走不便等功能障碍;②踝关节外侧肿胀、压痛,踝前抽屉试验(+),踝强迫内翻试验(+);③踝关节正位 X 线片显示踝外侧关节间隙增宽,内翻加压 X 线片显示踝关节失稳,内翻角 > 15°^[2]。排除标准:腓骨长短肌腱脱位、内外踝骨折(腓骨下端小撕脱骨折例外)、跟骨和距骨骨折、髌或膝关节严重损伤和疾病。

将患者按编码随机抽取法分成对照组和观察组,每组 18 例。对照组中,男 10 例,女 8 例;年龄 17~55 岁,平均 26.5 岁;病程 3~36 个月,平均 12.5 个月;病变位于左侧 7 例,右侧 11 例。观察组中,男 9 例,女 9 例;年龄 16~52 岁,平均 25.2 岁;

病程 3~33 个月,平均 13.1 个月;病变位于左侧 8 例,右侧 10 例。2 组性别、年龄、病程、病变侧别等比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。治疗开始前向全部患者详细说明情况,签署知情同意书。

对照组采用电针和微波治疗。针刺主穴取阿是穴,常用穴位取丘墟、申脉、昆仑、悬钟、阳陵泉穴,用一次性消毒的 30 号 1.5 寸毫针,进针得气后留针 20 min,再连接上海产 G6805-II 型电针仪,采用疏密波,频率为 4 Hz,电流强度以患者能耐受为宜,每次通电 15 min,每日 1 次,每周 4 次。微波治疗应用南京产 AMT-B 型微波治疗机,频率为 2450 MHz,波长 12.25 cm,治疗时选用连续脉冲波,功率 50 W,探头距离外踝面 15 cm,每次治疗时间 15 min,每日 1 次,每周 4 次。以上治疗 6 周为 1 个疗程。

观察组在上述治疗的基础上同时进行康复训练。①踝关节活动度训练:a. 踝关节主动屈伸和内外翻训练,如仰卧位缓慢、用力、最大限度地向上伸直足背;坐位下缓慢、用力、最大限度地进行踝内翻和外翻训练;b. 患足悬空写数字 0~9。以上训练每日 2 次,每次 5 min。②踝关节肌力和控制能力训练:a. 负重踝关节屈伸、内外翻训练(患足套医院自制 2.5 或 5 kg 环状沙袋)。b. 患足前(后)向和侧向跨步训练,双足与肩同宽,患足向前(后、侧向)跨一大步,逐渐转移体重至患足,并缓慢屈膝支撑,再缓慢用力伸直患腿至起始位,要求足跟不离地、动作缓慢、上体不晃动。20 次为 1 组,每日 2 组。c. 提踵训练,用足尖站立,分为足尖正向前、足尖内八字和外