

铝暴露对大鼠肝脏葡萄糖转运蛋白 4 表达的影响^①

韦喜¹, 杨现莉¹, 何明杰¹, 吴标良², 李东², 韦华²

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000 E-mail: afude@qq.com;

2. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 研究铝暴露对大鼠肝脏葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 表达的影响。 **方法** 将 30 只大鼠随机分成两组, 即空白对照组 (15 只) 和实验组 (15 只)。实验组予腹腔注射 8 mg/(kg · d⁻¹) AlCl₃ 溶液 (AlCl₃ 溶液用蒸馏水配制并高压灭菌) 制成铝暴露大鼠模型, 对照组给予腹腔注射等体积生理盐水 (2 ml/只), 连续注射 3 d, 休息 1 d 再注射, 全程共 30 d。于第 10 d、20 d、30 d 取大鼠血清检测空腹血糖 (FBG)、空腹胰岛素 (FINS), 采用稳态模式评估法 (Homa) 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR), 采用实时荧光定量 PCR 技术检测肝脏组织中 GLUT4 mRNA 的表达, 免疫组化法检测肝脏组织中 GLUT4 蛋白表达的情况。 **结果** 与对照组比较, 实验组的 FBG 于第 10 d、20 d 高于对照组 ($P < 0.05$); 随着染铝时间的延长, FINS 表达呈下降趋势, 于第 10 d、20 d 时明显高于对照组 ($P < 0.05$), 第 30 d 时反而低于对照组 ($P < 0.05$)。实验组的 HOMA-IR 随着暴露时间的延长, 于第 10 d、20 d 时明显高于对照组 ($P < 0.05$), 第 30 d 时降低, 与对照组比较差异无统计学意义。与对照组比较, 实验组各时点的 GLUT4 mRNA 及蛋白表达量明显降低 ($P < 0.05$)。 **结论** 铝暴露可降低大鼠肝脏 GLUT4 的表达水平, 影响机体血糖代谢。

关键词: 铝暴露; 胰岛素抵抗; 葡萄糖转运体 4 型

中图分类号: R343.31

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2017)05-0345-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.05.002

The influences of aluminum exposure on the expression of glucose transporter 4 in rat's liver

Wei Xi¹, Yang Xianli¹, He Mingjie¹, Wu Biaoliang², Li Dong², Wei Hua²

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China

E-mail: afude@qq.com;

2. Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To study the influences of aluminum exposure on the expression of glucose transporter protein 4 in rat's liver. **Methods** Totally 30 rats were randomly divided into two groups: the control group (15 rats) and the experimental group (15 rats). The rat models of aluminum exposure of the experimental group were established by intraperitoneal injection with 8 mg/(kg · d⁻¹) AlCl₃ solution (AlCl₃ solution was prepared with distilled water and sterilized by high pressure). Every rat model of the control group received intraperitoneal injection with same dosage of 2 ml NS. This experiment lasted for 30 days; continual injection for 3 days, rest 1 day, then repeated injection. On day 10, day 20 and day 30, the rat serum fasting blood-glucose (FBG) and fasting insulin (FINS) were measured and the insulin resistance index (Homa-IR) was calculated and analyzed with Homeostasis Model Assessment (Homa). The level of GLUT4 mRNA in liver was detected by Real-time Quantitative PCR technique, and the protein expression of GLUT4 was detected by Immunohistochemistry. **Results** The levels of FBG in experimental group rats were higher than those of the control group at day 10 and day 20 ($P < 0.05$). The level of FINS decreased with the prolongation of the rats exposure to aluminum. The rat FINS in the experimental group was significantly higher than those of the control group at day 10 and day 20 ($P < 0.05$), but lower than that of the control group at day 30 ($P < 0.05$). HOMA-IR of the experimental group was significantly higher than that of the control group at day 10 and day 20 ($P < 0.05$) with the prolongation of exposure, but it decreased at day 30. The differences between experimental group and control group were not statistically significant. The expression levels of GLUT4 mRNA and protein in rat's liver in experimental group at every time point were significantly lower than those in control group ($P < 0.05$).

① 基金项目: 2016 年广西研究生创新教育计划项目 (201601010); 2014 年广西自然科学基金项目 (2014GXNSFAA118216)

Conclusion Aluminum exposure can reduce the expression level of GLUT4 in rat's liver and affect blood glucose metabolism.

Key words: aluminum exposure; insulin resistance; glucose transporter type 4

机体糖代谢取决于细胞对葡萄糖的摄取,但葡萄糖无法自由通过细胞膜脂质双层结构进入细胞,细胞对葡萄糖的摄入需要借助细胞膜上的葡萄糖转运蛋白(glucose transporters, GLUT)转运功能才能得以实现。目前已有 14 种 GLUT 被鉴定,分别命名为 GLUT1~14,其中 GLUT4 是胰岛素信号传递的重要介质,在胰岛素信号转导途径中处于胰岛素受体后的关键信号分子,是胰岛素信号向调节糖代谢方向转化的关键蛋白,承载了体内大部分的葡萄糖转运量,对维持机体血糖稳态发挥着重要作用。肝脏是调节血糖浓度的主要器官,肝脏参与糖的代谢过程,在机体的贮存、分布和血糖的调节上具有重要的意义。目前,随着百色地区铝工业的发展,人们接触和摄入铝的机会也在增多,越来越多的研究表明铝暴露可引起机体糖代谢紊乱^[1],但其机制尚未阐明。因此,我们推测,铝分子可能通过影响 GLUT4 的表达,导致机体糖代谢紊乱。本实验研究铝暴露对大鼠肝脏组织中 GLUT4 表达的影响,探讨其影响血糖变化的部分机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 Wistar 大鼠,体重 180~225 g,由右江民族医学院动物实验中心提供,动物生产许可证(SCXK 桂 2012-0003)和使用许可证(SYXK 桂 2011-0010)。

1.1.2 试剂 GLUT4 兔抗大鼠一抗购自 Abcam 生物公司;生物素标记的羊抗兔二抗和兔 SP 试剂盒购自中杉金桥生物技术有限公司;PCR 相关试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;结晶氯化铝分析纯购自广州和为化工有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 分组及造模 雄性 Wistar 大鼠 30 只(体重 180~225 g),大鼠分笼饲养,每笼 5 只,普通饲料喂养,自由进食及饮水。适应性喂养 1 周后,随机分成 2 组,即空白对照组(15 只)和实验组(15 只)。参照文献的方法^[2],实验组予 8 mg/(kg·d⁻¹) AlCl₃ 溶液进行腹腔注射(AlCl₃ 溶液用蒸馏水配制并高压灭菌),对照组给予腹腔注射等体积生理盐水(2 ml/只)。连续注射 3 d,休息 1 d 再注射,全程共 30 d。

1.2.2 空腹血糖(fasting blood-glucose, FBG)、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)水平测定 建模结束后用 7%水合氯醛(0.30 ml/100 g)腹腔注射麻醉,待大鼠镇静后开胸腹取血主动脉,取血量为 3~4 ml,置于

无抗凝剂生化管中,1 h 内送检验科测定 FBG 及 FINS 水平,由检验科技术人员进行操作。采用稳态模式评估法(Homa)计算胰岛素抵抗指数(insulin resistance index, HOMA-IR),即 $(HOMA-IR = FBG \times FINS / 22.5)$,及胰岛 β 细胞功能(Homa beta cell function index, HOMA- β),即 $HOMA-\beta = 20 \times FINS / (FBG - 3.5)$ 。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 技术检测 GLUT4 mRNA 表达 采用 Trizol 法提取肝脏组织总 RNA,逆转录成 cDNA 进行实时荧光定量 PCR,引物序列:GLUT4 上游:5'-GCTTTGTGGCCTTCTTTGAG-3';下游:5'-AGGTCCAGTTGGAGAAACCA-3'。PCR 总反应体系为 20 μ l,扩增条件:95 $^{\circ}$ C,15 min 预变性,95 $^{\circ}$ C,10 s 变性,60 $^{\circ}$ C,20 s 退火/延伸,共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参,所得结果用 Ct 值(Ct 为循环数)表示,根据 Ct 值依次计算基因的相对表达量,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算结果。

1.2.4 免疫组织化学法检测肝脏 GLUT4 蛋白表达

麻醉后取肝脏组织,福尔马林 48 h 固定,常规石蜡包埋,切片,脱蜡至水,采用生物素—链霉卵白素—过氧化物酶复合物法进行染色,一抗为 GLUT4,为兔多克隆抗体(稀释浓度为 1:100),参照试剂盒具体步骤进行,阴性对照以 PBS 缓冲液代替一抗。显色结果采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行半定量分析,用平均光密度值表示。在高倍镜视野($\times 400$)下观察肝脏组织中 GLUT4 蛋白表达,每张切片随机拍摄 5 张照片进行分析,取每份标本的平均值进行统计分析。

1.2.5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,符合正态分布数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示;两组比较采用两样本 t 检验;各时点间比较采用单因素方差分析(ANOVA)进行检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 铝暴露对大鼠 FBG、FINS、HOMA-IR 水平的影响 与对照组比较,实验组的 FBG 于第 10 d、20 d 高于对照组($P < 0.05$);随染铝时间的延长,FINS 表达呈下降趋势,于第 10 d、20 d 时明显高于对照组($P < 0.05$),第 30 d 时反而低于对照组($P < 0.05$)。HOMA-IR 随着暴露时间的延长,于第 10 d、20 d 时明显高于对照组($P < 0.05$),第 30 d 时降低,与对照组比较差异无统计学意义,见表 1。

表 1 各组大鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 检测结果 ($\bar{x}\pm s$)

时间	FBG(mmol/L)		FINS(mIU/L)		HOMA-IR	
	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组
	(<i>n</i> = 15)	(<i>n</i> = 15)	(<i>n</i> = 15)	(<i>n</i> = 15)	(<i>n</i> = 15)	(<i>n</i> = 15)
第 10 d	6.74±0.44	11.42±1.99 ^a	3.65±0.15	4.17±0.36 ^a	1.10±0.11	2.10±0.24 ^a
第 20 d	6.94±0.11	10.30±1.37 ^a	3.64±0.06	3.88±0.09 ^a	1.15±0.05	1.79±0.21 ^a
第 30 d	7.62±0.29	9.40±1.87	3.86±0.11 ^{bc}	3.07±0.28 ^{abc}	1.31±0.08 ^{bc}	1.28±0.22 ^{bc}

注:与对照组比较,a: $P<0.05$;与第 10 d 比较,b: $P<0.05$;与第 20 d 比较,c: $P<0.05$

2.2 各组大鼠肝脏组织 GLUT4 mRNA 水平的比较

与对照组比较,实验组各时点的 GLUT4 mRNA 表达量明显下降($P<0.05$),且各时点比较差异均具有统计学意义,即随着铝暴露时间的延长,GLUT4 mRNA 合成减少越明显。见表 2、图 1。

2.3 各组大鼠肝脏组织 GLUT4 蛋白表达水平比较

GLUT4 蛋白主要表达于细胞浆和细胞膜,呈棕色或棕黄色颗粒。与正常对照组比较,实验组各时点 GLUT4 蛋白表达均明显降低($P<0.05$),且随着时间延长呈下降趋势,与第 10 d、20 d 比较,第 30 d GLUT4 蛋白表达水平降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2 和图 1、图 2 所示。(因各时点的对照组综合评分无差异,不再进行每个时点与对照组比

较)。

表 2 各组大鼠肝脏组织 GLUT4 mRNA 及蛋白表达水平的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	GLUT4 mRNA	GLUT4 蛋白
对照组	1.00±0.00	87.83±9.90
实验组		
第 10 d	0.82±0.04 ^a	69.38±4.56 ^a
第 20 d	0.60±0.10 ^{ab}	64.24±15.54 ^a
第 30 d	0.48±0.06 ^{abc}	43.16±11.00 ^{abc}

注:与对照组比较,a: $P<0.05$;与第 10 d 比较,b: $P<0.05$;与第 20 d 比较,c: $P<0.05$

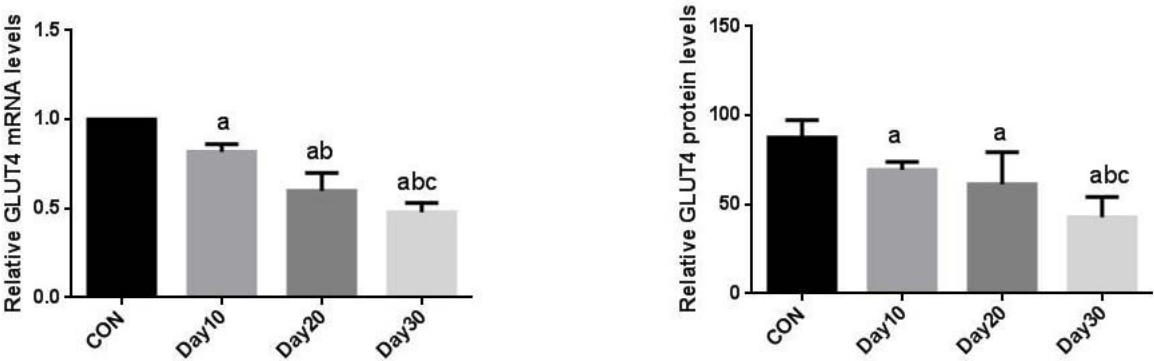


图 1 各组大鼠肝脏组织 GLUT4 mRNA 及蛋白表达水平的比较

注:CON:对照组;Day10:第 10 d;Day20:第 20 d;Day30:第 30 d;与对照组比较,a: $P<0.05$;与第 10 d 比较,b: $P<0.05$;与第 20 d 比较,c: $P<0.05$

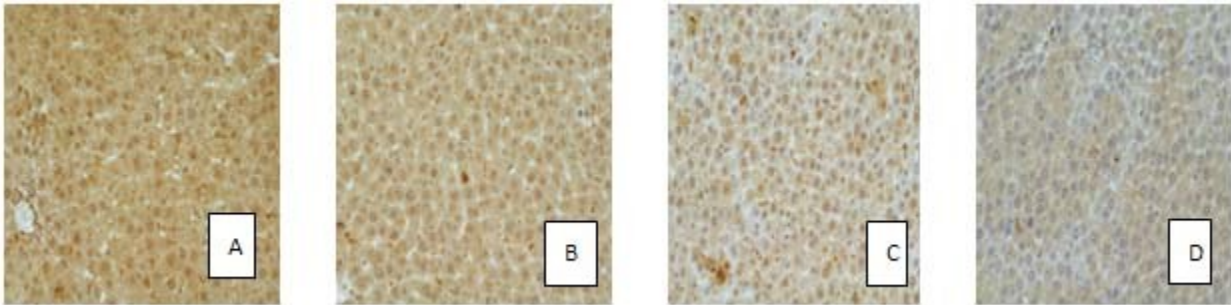


图 2 各组大鼠肝脏组织 GLUT4 蛋白表达水平的比较

注:A:对照组;B:第 10 d;C:第 20 d;D:第 30 d

3 讨论

铝元素是地壳中含量最丰富的金属元素,但在体内的含量小于 0.01% 体重,被称为微量元素。机体内的铝主要来源于日常生活用水、食物、餐具等,其经过呼吸道、消化道进入机体,在体内累积到一定量便对肝、肾、骨组织及神经、免疫、血液系统等组织及系统造成损害^[3-5]。动物实验中发现铝离子可以拮抗胰岛素促进葡萄糖的分解利用^[6],临床调查发现,接触氧化铝的退休工人糖尿病的发生率明显高于正常人群^[7],我们前期研究亦发现,生活于铝工业区特别是铝作业的工人糖代谢紊乱发生率明显高于其它非铝工业区居民^[8]。

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是胰岛素作用的靶组织(肌肉、脂肪和肝脏)对胰岛素的敏感性降低,导致正常量的胰岛素产生的生理效应不能满足需要,是糖尿病的主要发病机制之一,并伴随着糖尿病发生、发展的全过程。IR 本质就是胰岛素的生物效应降低,当机体血糖升高时,胰岛 β 细胞要产生多于正常量的胰岛素才能发挥正常的降糖效能,从而表现为高胰岛素血症。IR 主要原因是胰岛素受体缺陷和信号传递障碍,目前研究发现,与胰岛素信号途径相关的主要通路有 PI3K/AKT 和 MAPK 信号通路,而 GLUT4 在这些胰岛素信号转导途径中属于胰岛素受体后的关键信号分子,是胰岛素信号向调节糖代谢方向转化的关键蛋白,主要表达在骨骼肌、脂肪及心肌等对胰岛素较敏感的组织,与 GLUT 家族其他成员不同,在无胰岛素刺激时,GLUT4 分布在细胞胞浆中的囊泡内;当体内胰岛素分泌增多,此时,胰岛素与其受体结合,囊泡转移到表面与质膜融合,致使质膜上的 GLUT4 数目增加,从而发挥胰岛素的生物活性,调节肝细胞、骨骼肌细胞和脂肪细胞对葡萄糖的摄取,其表达和转运与机体胰岛素抵抗及葡萄糖摄取障碍密切相关,在维持机体血糖平衡中发挥着至关重要的作用^[9-10]。

肝脏作为糖脂代谢的重要部位,同时也是糖尿病慢性并发症经常累及的重要器官之一,由于自身代偿能力较强以及早期症状不明显,以致发展到后期的不可逆性损害。因此,探讨肝脏胰岛素信号转导途径中关键因子的表达亦是研究的重点。本实验采用 PCR 及免疫组化法检测铝暴露对肝组织中的 GLUT4 表达的影响,并对相应时相大鼠胰岛素抵抗情况进行了测定。结果说明,随着铝暴露时间的延长,IR 于第 10 d、20 d 时明显高于对照组,第 30 d 时降低;随着铝暴露时间的延长,大鼠肝组织内 GLUT4 的表达减少。在早期,GLUT4 的表达减少导致转运葡萄糖的能力下

降,肝细胞对葡萄糖摄取及利用发生障碍,致使机体血糖升高,机体通过负反馈机制,使胰岛素分泌增加,在第 10 d、20 d 时出现高胰岛素血症,引发胰岛素抵抗,于第 30 d 时,胰岛分泌反而减少。出现这种现象的原因主要考虑为:①实验过程中发现,实验组大鼠每天进食量少于对照组,而饮水量较多,第 30 d 实验组大鼠体重明显低于对照组,考虑铝分子可能与抑制机体新陈代谢或降低营养吸收效率相关。②铝为金属元素,性质比较活泼,易失去电子,从而易造成氧化应激^[11],且胰腺作为机体抗氧化能力最弱的组织,在应对应激时受损最为严重,因此铝暴露可损伤胰腺组织,在早期尚有代偿能力,表现为机体血糖升高时胰岛素分泌增多,出现高胰岛素血症,但随着有害因素的持续作用,胰岛细胞发生不可逆性损害,占胰岛细胞大部分的 β 细胞分泌胰岛素能力下降,导致机体血糖紊乱,但此机制仍需进一步研究。

本实验的研究结果显示,GLUT4 通过对 IR 的影响,在铝暴露对大鼠糖代谢影响过程中起到重要的作用。鉴于铝对机体的不良影响,高铝地区监管部门应做好监督和检测工作;铝工业应提高生产技术,减少冶炼过程中废气废液的排放,同时居民们减少与铝的接触,定期健康体检,做好防护。

参考文献:

- [1] 覃晓洁,吴标良,王民登.高铝暴露对胰岛素分泌功能及部分炎症因子的影响[J].中国医药导报,2015,12(15):67-69.
- [2] 李秋营,杨艳旭,张太强,等.实验性大鼠铝中毒模型建立[J].山西医药杂志,2002,31(2):113-115.
- [3] 陆翔,唐乾利,王小超,等.高铝暴露再生障碍性贫血患者临床特征与免疫功能改变特点[J].免疫学杂志,2014,30(11):987-991,1002.
- [4] Zhu Y, Xu F, Yan X, et al. The suppressive effects of aluminum chloride on the osteoblasts function[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2016,48:125-129.
- [5] 胡红柳,宾慧婷,蓝贤英,等.慢性铝暴露 AD 大鼠学习记忆功能障碍及绿茶多酚的干预作用研究[J].右江民族医学院学报,2016,38(3):262-264.
- [6] Nampoothiri M, Kumar N, Ramalingayya GV, et al. Effect of insulin on spatial memory in aluminum chloride-induced dementia in rats[J]. Neuroreport, 2017,28(9):540-544.
- [7] 阎飞.1337 名氧化铝退休工人健康状况调查分析[J].医学信息(中旬刊),2011,24(7):2901.

(下转第 356 页)

危险分层管理,控制糖化血红蛋白水平,警惕其心脑血管不良事件发生。另一方面,本实验结果提示低密度脂蛋白水平与颈动脉斑块积分呈负相关,提升了在降低糖尿病相关大血管疾病风险的综合治疗中,降低低密度脂蛋白治疗的重要性。

参考文献:

[1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 年版)[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(10): 893-942.

[2] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010[J]. 中华心血管病杂志, 2011, 39(7): 579-616.

[3] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II[J]. Circulation, 2003, 108(15): 1772-1778.

[4] 刘兰, 黄岚, 朱小虎, 等. 原发性高血压患者颈动脉内膜中层厚度及斑块特征与冠心病的关系[J]. 重庆医学, 2006, 35(6): 526-527.

[5] Standards of medical care in diabetes-2015: summary of revisions[J]. Diabetes Care, 2015, 38(Supplement): S4.

[6] Eeg-Olofsson K, Cederholm J, Nilsson PM, et al. New aspects of Hb A1c as a risk factor for cardiovascular diseases in type 2 diabetes: an observational study from the Swedish National Diabetes Register (NDR)[J]. J Intern Med, 2010, 268(5): 471-482.

[7] 张木坤, 刘露, 张逸, 等. 2 型糖尿病患者糖化血红蛋白、空腹血糖与视网膜病变关系的研究[J]. 右江民族医学院学报, 2006, 28(1): 13-15.

[8] Choi SW, Shin MH, Yun WJ, et al. Association between hemoglobin A1c, carotid atherosclerosis, arterial stiffness, and peripheral arterial disease in Korean type 2 diabetic patients[J]. J Diabetes Complications, 2011, 25(1):

7-13.

[9] Temelkova-Kurktschiev TS, Koehler C, Leonhardt W, et al. Increased intimal-medial thickness in newly detected type 2 diabetes: risk factors[J]. Diabetes Care, 1999, 22(2): 333-338.

[10] 石春晖, 王尧. 2 型糖尿病患者糖化血红蛋白, 1,5-脱水葡萄糖醇与颈动脉内膜中层厚度的关系[J]. 糖尿病新世界, 2015, 18(10): 229-231.

[11] 吕琳, 于佩, 苏悦, 等. 不同类型高血压间 2 型糖尿病患者动脉硬化的变化[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(3): 631-634.

[12] 刘结, 王海宁, 王峥嵘, 等. 老年高血压和糖尿病患者动脉僵硬度的影响因素分析[J]. 中华老年医学杂志, 2012, 31(1): 25-28.

[13] Hu Y, Liu W, Huang R, et al. Postchallenge plasma glucose excursions, carotid intima-media thickness, and risk factors for atherosclerosis in Chinese population with type 2 diabetes[J]. Atherosclerosis, 2010, 210(1): 302-306.

[14] Monnier L, Mas E, Ginet C, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes[J]. JAMA, 2006, 295(14): 1681-1687.

[15] O'Sullivan CJ, Hynes N, Mahendran B, et al. Haemoglobin A1c (Hb A1c) in non-diabetic and diabetic vascular patients. Is Hb A1c an independent risk factor and predictor of adverse outcome? [J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2006, 32(2): 188-197.

[16] Selvin E, Wattanakit K, Steffes MW, et al. Hb A1c and peripheral arterial disease in diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities study [J]. Diabetes Care, 2006, 29(4): 877-882.

收稿日期: 2017-07-20; 修回日期: 2017-09-26

(上接第 348 页)

[8] 韦华, 王民登, 蒙连新, 等. 桂西铝工业基地居民血清微量元素含量及其与糖代谢异常关系研究[J]. 现代预防医学, 2012, 39(4): 946-947, 950.

[9] Zhou T, Meng X, Che H, et al. Regulation of Insulin Resistance by Multiple MiRNAs via Targeting the GLUT4 Signalling Pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(5): 2063-2078.

[10] Leem KH, Kim MG, Hahm YT, et al. Hypoglycemic

Effect of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Is Due to Enhanced Peripheral Glucose Uptake through Activation of AMPK/p38 MAPK Pathway[J]. Nutrients, 2016, 8(12): pii: E800.

[11] Kumar V, Gill KD. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: a review[J]. Neurotoxicology, 2014, 41: 154-166.

收稿日期: 2017-08-06; 修回日期: 2017-10-17