

文章编号 1006-8147(2019)03-0201-04

论 著

## iNOS 调节 Rab8 参与肥胖诱导的胰岛素抵抗

李瀚琪, 牛文彦

(天津医科大学基础医学院免疫学系, 天津 300070)

**摘要** 目的:探究诱导型一氧化氮合酶(iNOS)对 Rab8 的调节与胰岛素抵抗的关系。方法:用普通饮食和高脂饮食分别喂养野生型和 iNOS<sup>-/-</sup>小鼠 12 周,在第 12 周进行腹腔注射葡萄糖耐量实验和胰岛素耐量实验,测定体质量、附睾脂肪质量,Western blot 检测骨骼肌中 Rab8 蛋白表达。结果:高脂饮食诱发小鼠肥胖和胰岛素抵抗。相比于野生型小鼠,iNOS<sup>-/-</sup>小鼠的体质量、附睾脂肪质量均显著降低,分别降低 10.36 g 和 0.29 g(均  $P<0.001$ ),胰岛素抵抗有显著改善,而骨骼肌 Rab8 蛋白水平显著升高,增高 2.14 倍( $P<0.0001$ )。结论:iNOS 可能通过调节 Rab8 参与高脂饮食诱导的胰岛素抵抗。

**关键词** iNOS;胰岛素抵抗;Rab8;糖尿病

中图分类号 R392.1

文献标志码 A

### iNOS participates in obesity-induced insulin resistance by regulating Rab8

LI Han-qi, NIU Wen-yan

(Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To investigate the relationship between the regulation of Rab8 by iNOS and insulin resistance. **Methods:** Wild-type and iNOS<sup>-/-</sup> mice were fed with chow diet and high-fat diet for 12 weeks, respectively. Intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed separately at the 12th week. Body weight and epididymal adipose weight were measured. The protein level of Rab8 in skeletal muscle was detected by Western blot. **Results:** High-fat diet induced insulin resistance and obesity in mice. Compared with wild-type mice, iNOS<sup>-/-</sup> mice had significantly lower body weight, epididymal adipose weight decreased by 10.36 g and 0.29 g ( $P<0.001$ ), and insulin resistance was significantly improved while Rab8 protein levels in skeletal muscle were significantly increased, increased by 2.14 times. **Conclusion:** iNOS may regulate Rab8 in insulin resistance induced by high fat diet in mice.

**Key words** iNOS; insulin resistance; Rab 8; diabetes

胰岛素抵抗是 2 型糖尿病和其他多种代谢性疾病病因,其特点为胰岛素靶组织对胰岛素敏感性降低,导致胰岛素促进外周组织如骨骼肌摄取葡萄糖减少从而血糖升高<sup>[1]</sup>。葡萄糖转运子 4(Glucose transporter 4, GLUT4)是骨骼肌中的胰岛素信号分子,胰岛素通过 IR-IRS-PI3K-Akt-AS160-Rab8 信号通路促进 GLUT4 从胞浆转位到细胞膜上转运葡萄糖, GLUT4 与 2 型糖尿病相关<sup>[2]</sup>。胰岛素抵抗状态下,胰岛素促进 GLUT4 从胞内储存囊泡到细胞膜的转位作用减弱<sup>[3]</sup>。Rab 蛋白属于小 G 蛋白家族,其主要作用是调节细胞内囊泡运输,如内吞、膜循环和分泌途径。Rab8 是胰岛素促进 GLUT4 从胞内转位到细胞膜上的关键蛋白<sup>[4]</sup>,诱导型一氧化氮合酶胰岛素抵抗时 Rab8 的水平变化未见报道。巨噬细胞在炎

症期间产生诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)<sup>[5]</sup>, iNOS 的表达是炎症反应的重要部分之一, iNOS 引起线粒体损伤和线粒体呼吸抑制等,是影响细胞的生存和细胞转导的关键蛋白<sup>[6]</sup>。肥胖表现为慢性炎症,炎症是肥胖诱发骨骼肌及周身胰岛素抵抗的重要因素。胰岛素抵抗时, iNOS 是否调节 Rab8 未见报道。本研究应用全身敲除 iNOS 的 iNOS<sup>-/-</sup>小鼠,高脂饮食诱导胰岛素抵抗,探讨 iNOS 对 Rab8 的调节与高脂诱导的骨骼肌胰岛素抵抗的关系。

### 1 材料与方法

1.1 实验材料 野生型小鼠(军事医学科学院实验动物中心), iNOS<sup>-/-</sup>小鼠(天津医科大学胡立志教授赠送),高脂饲料和普通饲料(美国 Research Diets 公司),血糖仪、血糖试纸(瑞士 Roche 公司), Rab8 和 GAPDH 抗体(美国 CST 公司)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 小鼠喂养 SPF 级 6 周龄雄性野生型小鼠 10 只,经适应性饲养 5 d 后随机分为高脂饮食组

基金项目 国家自然科学基金面上项目资助(81670731, 81870547, 81170740);天津市科委应用基础研究重点项目资助(15JCZD-JC35500);天津市卫计委重点攻关项目资助(15KG102)

作者简介 李瀚琪(1992-),女,硕士在读,研究方向:免疫学;通信作者:牛文彦, E-mail: wniu@tmu.edu.cn。

(WT, HFD,  $n=5$ ) 和普通饮食组 (WT, Chow,  $n=5$ ); SPF 级 6 周龄  $iNOS^{-/-}$  小鼠 10 只经适应性饲养 5 d 后随机分为高脂饮食组 ( $iNOS^{-/-}$ , HFD,  $n=5$ ) 和普通饮食组 ( $iNOS^{-/-}$ , Chow,  $n=5$ )。分别用高脂饲料和普通饲料喂养 12 周, 小鼠自由地摄食饮水。饲养温度为  $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $(55\pm 10)\%$ , 12 h 照明/非照明循环房间。

**1.2.2 腹腔注射葡萄糖耐量实验** 小鼠经 12 周的普通饲料和高脂饲料喂养以后, 饥饿 6 h 后, 腹腔注射葡萄糖 2 g/kg, 测定注射葡萄糖后 0、30、60、90、120 min 的血糖浓度。

**1.2.3 胰岛素耐量实验** 小鼠经 12 周普通饲料和高脂饲料喂养以后, 饥饿 12 h 后, 腹腔注射胰岛素 0.75 IU/kg, 测定注射胰岛素后 0、30、60、90、120 min 的血糖浓度。

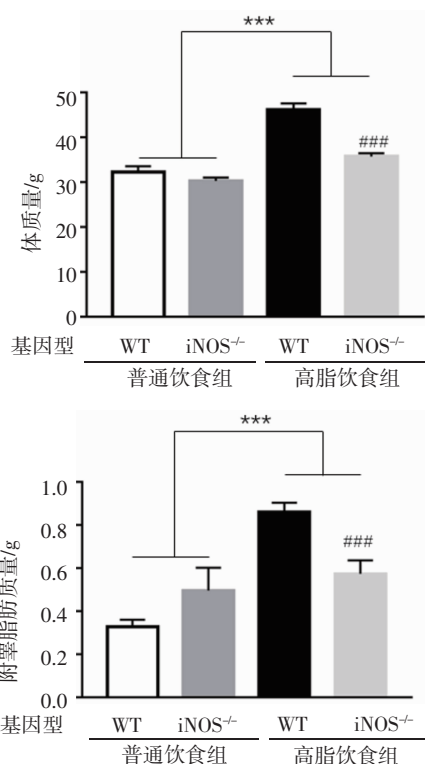
**1.2.4 测量小鼠体质量和附睾脂肪质量** 处死小鼠后取双侧附睾脂肪, 观察其形态, 称重并记录。

**1.2.5 Western blot** 向新鲜提取的骨骼肌组织加入含有蛋白酶抑制剂 (1 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0.5 mmol/L NaF, 200  $\mu\text{mol/L}$  PMSF, 1:500 加入 PIC) 的 RIPA 裂解液, 使用组织匀浆仪将组织制备成匀浆, 立即置于  $4^{\circ}\text{C}$  垂直旋转仪旋转 20 min, 使蛋白充分裂解。 $4^{\circ}\text{C}$ , 12 000 r/min, 离心 20 min, 收集上清。BCA Protein Assay Kit 测定蛋白浓度后再与 5 $\times$ LSB 缓冲液按 4:1 的比例混合, 沸水浴 15 min, 10% (v/v) SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品, 转到 PVDF 膜上, 用 3% 牛奶封闭 2 h, 再分别用各自一抗  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 二抗使用偶联 HRP 的山羊抗兔 IgG 孵育 2 h, 蛋白条带用增强化学发光法检测。GAPDH 为内参, Image J 软件定量。

**1.3 统计学方法** 采用 Graph Pad Prism 统计软件进行统计学分析, 实验数据均以  $\bar{x}\pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠体质量和附睾脂肪质量** 普通饮食组野生型小鼠与  $iNOS^{-/-}$  小鼠体质量分别为  $(32.23\pm 2.92)\text{g}$  和  $(30.24\pm 1.69)\text{g}$ , 两组没有显著差异 ( $P=0.31$ ); 附睾脂肪质量分别为  $(0.33\pm 0.07)\text{g}$  和  $(0.49\pm 0.23)\text{g}$ , 两组没有显著差异 ( $P=0.053$ )。高脂饮食组两种小鼠体质量分别为  $(46.06\pm 3.24)\text{g}$  和  $(35.70\pm 1.62)\text{g}$ , 附睾脂肪质量分别为  $(0.86\pm 0.10)\text{g}$  和  $(0.57\pm 0.14)\text{g}$ , 均显著高于各自的普通饮食组 (均  $P<0.001$ )。高脂饮食喂养的  $iNOS^{-/-}$  小鼠与野生型小鼠相比体质量、附睾脂肪质量明显减轻 (均  $P<0.001$ ), 见图 1。



\*\*\* $P<0.001$ , ### $P<0.001$

图 1 小鼠体质量和附睾脂肪质量

Fig 1 Mice body and epididymal adipose tissue weight

**2.2 腹腔注射葡萄糖耐量实验血糖水平** 普通饮食组野生型小鼠注射葡萄糖后各个时间点的血糖水平 0 min 为  $(4.30\pm 1.17)\text{mmol/L}$ , 30 min 为  $(14.55\pm 1.98)\text{mmol/L}$ , 60 min 为  $(10.44\pm 1.62)\text{mmol/L}$ , 90 min 为  $(6.42\pm 1.18)\text{mmol/L}$ , 120 min 为  $(4.2\pm 1.25)\text{mmol/L}$ , 普通饮食组  $iNOS^{-/-}$  小鼠注射葡萄糖后各个时间点的血糖水平 0 min 为  $(4.4\pm 0.18)\text{mmol/L}$ , 30 min 为  $(14.86\pm 2.07)\text{mmol/L}$ , 60 min 为  $(9.72\pm 1.35)\text{mmol/L}$ , 90 min 为  $(6.81\pm 0.19)\text{mmol/L}$ , 120 min 为  $(4.01\pm 1.35)\text{mmol/L}$ , 两组各个时间点均无显著性差异。高脂饮食组野生型小鼠注射葡萄糖后各个时间点的血糖水平 0 min 为  $(5.9\pm 1.45)\text{mmol/L}$ , 30 min 为  $(23.4\pm 1.99)\text{mmol/L}$ , 60 min 为  $(19.2\pm 2.06)\text{mmol/L}$ , 90 min 为  $(14.7\pm 1.52)\text{mmol/L}$ , 120 min 为  $(9.3\pm 1.62)\text{mmol/L}$ , 高脂饮食组  $iNOS^{-/-}$  小鼠注射葡萄糖后各个时间点的血糖水平 0 min 为  $(6.2\pm 1.35)\text{mmol/L}$ , 30 min 为  $(16.9\pm 1.45)\text{mmol/L}$ , 60 min 为  $(11.8\pm 1.62)\text{mmol/L}$ , 90 min 为  $(9.20\pm 2.06)\text{mmol/L}$ , 120 min 为  $(6.80\pm 1.09)\text{mmol/L}$ , 高脂饮食组  $iNOS^{-/-}$  小鼠各个时间点血糖显著低于野生型小鼠 ( $P<0.001$ ), 下降较野生型小鼠更迅速。高脂饮食组各组小鼠各个时间点的血糖水平均显著高于各自的普通饮食组 ( $P<0.001$ ), 见图 2。

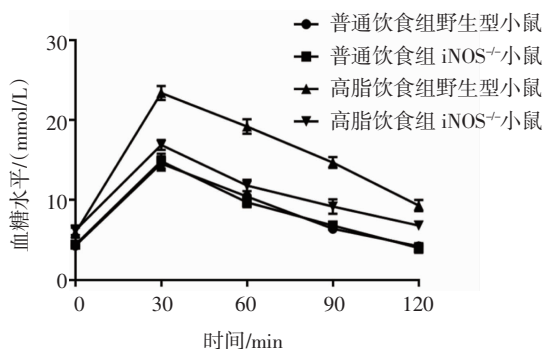


图2 小鼠腹腔注射葡萄糖耐量实验血糖水平

Fig 2 Mice IpGTT glucose level

2.3 胰岛素耐量实验血糖水平 普通饮食组野生型小鼠注射胰岛素后各个时间点的血糖水平 0 min 为  $(10.60 \pm 1.63)$  mmol/L, 30 min 为  $(4.91 \pm 2.56)$  mmol/L, 60 min 为  $(2.92 \pm 1.78)$  mmol/L, 90 min 为  $(4.65 \pm 1.56)$  mmol/L, 120 min 为  $(5.2 \pm 2.07)$  mmol/L, 普通饮食组  $iNOS^{-/-}$  小鼠注射胰岛素后各个时间点的血糖水平 0 min 为  $(10.5 \pm 1.46)$  mmol/L, 30 min 为  $(4.42 \pm 2.07)$  mmol/L, 60 min 为  $(3.12 \pm 1.06)$  mmol/L, 90 min 为  $(4.22 \pm 2.01)$  mmol/L, 120 min 为  $(4.41 \pm 1.55)$  mmol/L, 两组各个时间点均无显著性差异。高脂饮食组野生型小鼠注射胰岛素后各个时间点的血糖水平 0 min 为  $(12.01 \pm 1.46)$  mmol/L, 30 min 为  $(7.80 \pm 1.65)$  mmol/L, 60 min 为  $(6.71 \pm 2.15)$  mmol/L, 90 min 为  $(7.23 \pm 2.78)$  mmol/L, 120 min 为  $(7.52 \pm 1.87)$  mmol/L, 高脂饮食组  $iNOS^{-/-}$  小鼠注射胰岛素后各个时间点的血糖水平 0 min 为  $(11.86 \pm 1.96)$  mmol/L, 30 min 为  $(5.20 \pm 2.01)$  mmol/L, 60 min 为  $(4.31 \pm 1.25)$  mmol/L, 90 min 为  $(5.00 \pm 2.12)$  mmol/L, 120 min 为  $(5.40 \pm 1.06)$  mmol/L, 高脂饮食组  $iNOS^{-/-}$  小鼠相较于野生型小鼠血糖值下降快, 降幅大, 各个时间点血糖显著低于野生型小鼠 ( $P < 0.001$ )。高脂饮食组相较于普通饮食组血糖值下降缓慢, 降幅小, 各组小鼠各个时间点血糖显著高于普通饮食组 ( $P < 0.001$ ), 见图 3。

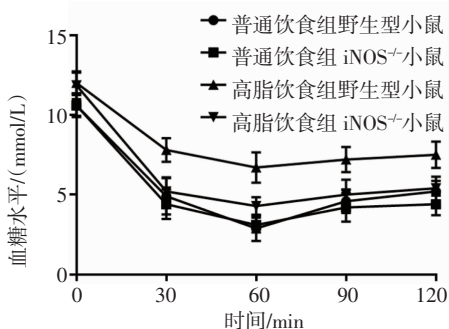
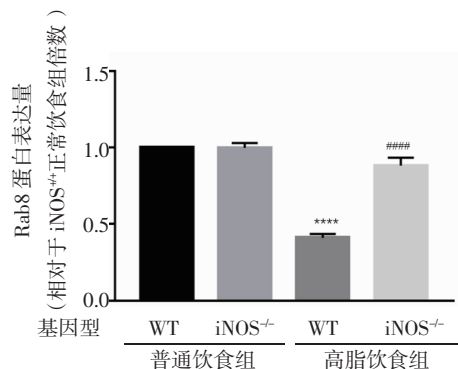
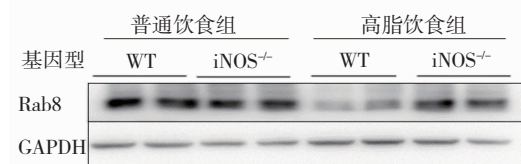


图3 小鼠胰岛素耐量实验血糖水平

Fig 3 Mice ITT glucose level

2.4 骨骼肌 Rab8 蛋白水平 普通饮食组野生型与  $iNOS^{-/-}$  小鼠骨骼肌的 Rab8 蛋白水平无差异。高脂饮食组两种小鼠 Rab8 蛋白水平均显著低于各自的普通饮食组 ( $P < 0.0001$ ), 高脂饮食组的  $iNOS^{-/-}$  小鼠 Rab8 蛋白水平显著高于野生型小鼠 ( $P < 0.0001$ ), 见图 4。



\*\*\*\* $P < 0.0001$ , #### $P < 0.0001$

图4 骨骼肌 Rab8 蛋白水平

Fig 4 Level of Rab8 protein in mice skeletal muscle

### 3 讨论

骨骼肌组织表达 3 种一氧化氮合酶(NOS)即神经型一氧化氮合酶 (nNOS)、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)<sup>[7]</sup>。在生理条件下, nNOS 和 eNOS 产生低水平的 NO, 而 iNOS 仅在病理生理条件下显著增加<sup>[8]</sup>, 故而普通饮食组的两种小鼠骨骼肌中 Rab8 没有显著性差异。肌肉低水平 NO 对于维持代谢完整性至关重要, 而高 NO 水平被认为破坏细胞组分并干扰代谢过程<sup>[9]</sup>。2 型糖尿病患者骨骼肌大量表达 iNOS, 而在健康的人群中无此现象<sup>[10]</sup>, 2 型糖尿病与骨骼肌中 NO 代谢的改变相关<sup>[11]</sup>。笔者用高脂饮食诱导小鼠胰岛素抵抗, 发现  $iNOS^{-/-}$  小鼠体质量和附睾脂肪质量显著低于野生型小鼠, 且  $iNOS^{-/-}$  小鼠胰岛素抵抗的改善情况也显著优于野生型小鼠, 提示 iNOS 参与胰岛素抵抗的发生和发展, 敲除 iNOS 可改善糖脂代谢和胰岛素抵抗。

骨骼肌是摄取膳食葡萄糖的主要组织, 受胰岛素调节, 维持血糖稳态<sup>[12]</sup>。骨骼肌摄取葡萄糖由细胞膜上的 GLUT4 转运, GLUT4 处于从胞浆泡吐到细胞膜上和从细胞膜上内吞到胞浆的动态过程<sup>[13]</sup>, 胰



胰岛素主要通过促进携带 GLUT4 囊泡的胞吐,从而增加细胞膜上 GLUT4 的数量,转运更多的葡萄糖进入细胞,达到降血糖的作用<sup>[14]</sup>。Rab 蛋白是调节细胞内囊泡运输的重要分子开关,胰岛素激活的 Rab8 将 GLUT4 囊泡动员至细胞膜<sup>[15-16]</sup>。本研究发现高脂饮食诱导的野生型胰岛素抵抗小鼠骨骼肌 Rab8 蛋白水平显著低于普通饮食喂养的小鼠,这与胰岛素促进 GLUT4 转位到细胞膜上的作用减弱,摄取葡萄糖减少导致的胰岛素抵抗现象一致<sup>[17]</sup>,提示 Rab8 参与肥胖诱导的骨骼肌胰岛素抵抗。本研究还发现高脂饮食诱导胰岛素抵抗时,iNOS<sup>-/-</sup>小鼠骨骼肌的 Rab8 蛋白水平显著高于野生型小鼠,提示更多的 GLUT4 转位至细胞膜,转运葡萄糖进入细胞,起到了缓解胰岛素抵抗的作用。综上所述,iNOS 参与胰岛素抵抗的发生,其机制可能涉及下调胰岛素信号分子 Rab8 的表达。

#### 参考文献:

- [1] Li C G, Ni C L, Yang M, et al. Honokiol protects pancreatic  $\beta$  cell against high glucose and intermittent hypoxia-induced injury by activating Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97:1229
- [2] Wei Y, Gao J, Qin L, et al. Tanshinone I alleviates insulin resistance in type 2 diabetes mellitus rats through IRS-1 pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93:352
- [3] Boden G, Homko C, Barrero C A, et al. Excessive caloric intake acutely causes oxidative stress, GLUT4 carbonylation, and insulin resistance in healthy men[J]. Sci Transl Med, 2015, 7(304): 304re7
- [4] Chen Y, Wang Y, Zhang J, et al. Rab10 and myosin-Va mediate insulin-stimulated GLUT4 storage vesicle translocation in adipocytes[J]. J Cell Biol, 2012, 198(4): 545
- [5] Lu G, Zhang R, Geng S, et al. Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6676
- [6] 李园园, 徐文清. 诱导性一氧化氮合酶抑制剂的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2017(6): 10
- [7] Boettger M K, Uceyler N, Zelenka M, et al. Differences in inflammatory pain in nNOS-, iNOS- and eNOS-deficient mice[J]. Eur J Pain, 2007, 11(7): 810
- [8] Liu B, Kuang L, Liu J. Bariatric surgery relieves type 2 diabetes and modulates inflammatory factors and coronary endothelium eNOS/iNOS expression in db/db mice[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2014, 92(1): 70
- [9] Eghbalzadeh K, Brixius K, Bloch W, et al. Skeletal muscle nitric oxide (NO) synthases and NO-signaling in "diabesity" - What about the relevance of exercise training interventions[J]. Nitric Oxide, 2014, 37: 2
- [10] Salvadó L, Barroso E, Gómez-Foix A M, et al. PPAR $\beta/\delta$  prevents endoplasmic reticulum stress-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism[J]. Diabetologia, 2014, 57(10): 2126
- [11] Zhu D, Wang H, Zhang J, et al. Irisin improves endothelial function in type 2 diabetes through reducing oxidative/nitrative stresses[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 87:138
- [12] McConell G K, Bradley S J, Stephens T J, et al. Skeletal muscle nNOS protein content is increased by exercise training in humans[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 293(2): R821
- [13] Bolado-Carrancio A, Riancho J A, Sainz J, et al. Activation of nuclear receptor NR5A2 increases Glut4 expression and glucose metabolism in muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(2): 614
- [14] Samovski D, Su X, Xu Y, et al. Insulin and AMPK regulate FA translocase/CD36 plasma membrane recruitment in cardiomyocytes via Rab GAP AS160 and Rab8a Rab GTPase[J]. J Lipid Res, 2012, 53(4): 709
- [15] Arora D K, Syed I, Machhadieh B, et al. Rab-geranylgeranyl transferase regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells[J]. Islets, 2012, 4(5): 354
- [16] Chadt A, Immisch A, de Wendt C, et al. Deletion of both rab-GTPase-activating proteins TBC1D1 and TBC1D4 in mice eliminates insulin- and AICAR-stimulated glucose transport[J]. Diabetes, 2015, 64: 746
- [17] Ishikura S, Klip A. Muscle cells engage Rab8A and myosin Vb in insulin-dependent GLUT4 translocation[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 295(4): C1016

(2018-10-31 收稿)

欢迎投稿

欢迎订阅