

恩他卡朋联合运动对肥胖小鼠下丘脑FTO及肝脏GLUT4表达的影响研究

韩贺龙¹, 黄伟伟¹, 任佳宝¹, 何恩鹏^{2*}, 李艳红¹

(1. 新疆师范大学 生命科学学院 新疆特殊环境物种多样性应用与调控实验室 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017; 2. 新疆师范大学 体育学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: 文章探索恩他卡朋及运动干预对肥胖小鼠下丘脑肥胖相关基因(FTO)及肝脏葡萄糖转运蛋白(GLUT4)表达的影响。利用高脂饮食诱导肥胖小鼠模型, 将40只小鼠随机均分为4组, 依次为高脂组(HFD)、恩他卡朋组(ENT)、运动训练组(EX)和恩他卡朋+运动训练组(ENT-EX), 另取10只同龄正常小鼠作为空白对照(CON)。实验进行5周后, 分别检测小鼠空腹血糖变化, 采用Real-time PCR、Western blot技术检测下丘脑FTO和肝脏GLUT4基因及蛋白表达, 使用m⁶A甲基化试剂盒检测下丘脑m⁶A甲基化水平。与CON组相比, HFD组小鼠空腹血糖、FTO mRNA和蛋白表达显著升高, GLUT4 mRNA和蛋白表达显著降低; 与HFD组相比, ENT-EX和EX组小鼠空腹血糖、FTO mRNA和蛋白表达显著下降, GLUT4 mRNA和蛋白表达显著升高且ENT-EX组效果优于单独EX组; 各组间下丘脑m⁶A甲基化水平无显著性差异。并得出结论: ENT-EX和EX干预可能会通过抑制下丘脑FTO表达调节肥胖小鼠肝脏GLUT4对血糖的摄取和利用来有效缓解肥胖小鼠糖耐量异常。

关键词: 恩他卡朋; 运动训练; 肥胖小鼠; FTO表达; GLUT4表达

中图分类号: Q591

文献标识码: A

文章编号: 1008-9659(2025)03-0023-06

随着社会快速发展和人民生活水平持续提高, 肥胖逐渐成为人们关注的重要健康问题。研究表明, 过去30年间, 全球肥胖和超重人群迅速增加, 并且呈不断上升趋势^[1], 肥胖已成为全球最为严峻的公共卫生挑战之一。肥胖是一种代谢性疾病, 其形成受基因、饮食、运动等多种因素综合影响。肥胖所带来的生理损害包括代谢紊乱、心肺功能下降、发育问题等。肥胖还可能引发社会适应能力差和自我意识受损等心理问题, 增加成年后再次肥胖的风险, 进一步提高心血管疾病和糖尿病等慢性疾病的发生概率。

肥胖作为引起代谢性疾病的主要因素, 常伴随高血糖等并发症。血糖的升高主要由胰岛素敏感器官(如肝脏)的胰岛素抵抗造成^[2]。全基因组关联分析发现, 肥胖相关基因(Fat mass and Obesity-associated, FTO)是导致肥胖的主要驱动因素^[3-4], 其蛋白通过对靶RNA的m⁶A去甲基化作用在神经元和脂肪介导的能量稳态中发挥重要调节作用^[5]。研究发现, 肥胖小鼠下丘脑FTO过表达^[6]和肝脏葡萄糖转运蛋白(Glucose Transporter 4, GLUT4)低表达^[7]会导致小鼠糖耐量异常以及能量消耗速率降低。若肝脏脂质堆积得到缓解, 骨骼肌和脂肪中未被利用的过量葡萄糖会重定向到肝脏, 被GLUT4摄入肝细胞转化为糖原和甘油三酯, 以维持血糖稳态^[8]。因此, 对下丘脑FTO和肝脏GLUT4表达的研究具有重大意义。

研究表明, 运动训练会抑制肥胖小鼠下丘脑FTO表达以及增强胰岛素敏感性, 改善机体糖耐量异常^[9-11]。运动训练作为有效的短期减重方式在许多国家的肥胖治疗指南中被提及^[12], 具有显著的减重、降糖和缓解皮下脂肪葡萄糖代谢紊乱的作用^[13-14]。恩他卡朋是一种儿茶酚-O-甲基转移酶抑制剂, 与左旋多巴

[收稿日期] 2024-07-11

[修回日期] 2024-10-10

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2022D01A100; 2021D01A120); 2023年新疆维吾尔自治区高校科研计划项目(XJEDU2023J031)。

[作者简介] 韩贺龙(1999-), 男, 硕士研究生, 主要从事应用生物化学方面研究, E-mail: 2856553988@qq.com.

* [通讯作者] 何恩鹏(1983-), 男, 教授, 主要从事运动促进健康方面研究, E-mail: 82031905@qq.com.

联用在治疗帕金森病的同时,能够提高患者体内超氧化物歧化酶及还原型谷胱甘肽水平^[15]。Peng 等人研究发现,恩他卡朋在缓解抑郁症的同时,能够有效降低肥胖小鼠空腹血糖水平^[16]。

恩他卡朋联合运动训练是否能够通过对下丘脑 FTO 表达的抑制来促进肝细胞 GLUT4 摄取血糖以达到降糖的目的,尚未见报道。因此,本研究利用高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型,探究恩他卡朋联合运动训练对肥胖小鼠血糖变化、下丘脑 FTO 和肝脏 GLUT4 基因及蛋白表达的影响,能够为肥胖并发高血糖的防治提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

50 只 4 周龄雄性 KM 小鼠(新疆医科大学动物实验中心),生产许可号:SCXK(新)2018-0002。

1.2 试验试剂

恩他卡朋(美国,MCE);血糖测定试剂盒(江苏,鱼跃);PRIPA 裂解液(江苏,康为世纪);Trizol(北京,金沙);反转录试剂盒(北京,全式金);RT-qPCR 试剂盒(北京,天根);BCA 总蛋白检测试剂盒(南京,建成);PVDF 膜(美国,Sigma);兔抗鼠 FTO 多克隆抗体、兔抗鼠 GLUT4 单克隆抗体、 β -actin 抗体和羊抗兔 IgG-HRP(上海,碧云天);m⁶A 甲基化试剂盒(美国,EpigenTek);引物(上海,生工)(表 1)。

表 1 Real-time PCR 检测所需引物序列

基因名称	引物序列	长度(pb)
FTO	正向引物:5'-CAGTTCCTGGTTTCAAGGCAATC-3'	102
	反向引物:5'-TGTCATGCTCTCCATCTTCTTC-3'	
GLUT4	正向引物:5'-GTGACTGGAACACTGGTCCTA-3'	126
	反向引物:5'-CAGCCACGTTGCATTGTAG-3'	
β -actin	正向引物:5'-ATGTGGATCAGCAAGCAGGA-3'	99
	反向引物:5'-AAGGGTGTAACGACGCTCA-3'	

1.3 动物模型建立及试验分组

小鼠适应性饲养 1 周后,40 只用于肥胖模型的建立,高脂饲喂 8 周,小鼠肥胖度 $\geq 20\%$ 则认为建模成功。建模成功后将小鼠随机分为 4 组,分别为:(1)高脂喂养+生理盐水组(HFD 组,400 mg/kg·d, $n=10$);(2)高脂喂养+恩他卡朋组(ENT 组,400 mg/kg·d, $n=10$);(3)高脂喂养+恩他卡朋+运动组(ENT-EX 组,400 mg/kg·d, $n=10$);(4)高脂喂养+运动+生理盐水组(EX 组,400 mg/kg·d,反向引物)。运动干预中跑台参数设定为坡度 8°,速度为 14 m/min,持续时长为 1h;每周训练 6 d。另 10 只饲喂普通饲料和生理盐水,作为空白对照组(CON 组, $n=10$)。

实验干预 5 周后,所有小鼠禁食 12 h,测定其空腹血糖浓度。以 40 mg/kg 剂量的戊巴比妥钠麻醉小鼠,脱臼处死后,分别摘取下丘脑及肝脏,-80℃冰箱冻存,用于基因及蛋白相对表达量的检测。

1.4 Real-time PCR 检测 FTO 及 GLUT4 基因的表达

采用 Trizol 法提取小鼠下丘脑和肝脏组织的总 RNA,以 β -actin 为内参,Real-time PCR 检测 FTO、GLUT4 的 mRNA 表达水平,采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算基因的相对表达量。

1.5 Western-blot 检测 FTO 及 GLUT4 蛋白的表达

提取小鼠下丘脑及肝脏组织总蛋白,试剂盒测定总蛋白浓度,经 SDS-PAGE 电泳分离、转印、封闭、一抗和二抗孵育后,进行蛋白条带可视化显影与量化分析。

1.6 下丘脑 m⁶A 甲基化水平检测

按照 m⁶A 甲基化试剂盒说明书,对提取的小鼠下丘脑中总 RNA 的甲基化水平进行检测。

1.7 统计学处理

采用SPSS 20.0对实验数据进行分析,GraphPad Prism 8.0绘图。所有数据以“平均值 $\pm$ 标准差”来表示。利用单因素方差分析和Dunnett's test对组间数据的差异显著性进行分析。 $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 恩他卡朋联合运动训练对肥胖小鼠空腹血糖的影响

与CON组相比,HFD组空腹血糖显著升高;与HFD组相比,ENT干预组空腹血糖含量升高,EX和ENT-EX干预组空腹血糖浓度降低(图1)。这说明,运动及恩他卡朋联合运动干预均能有效降低高脂饮食诱导的肥胖小鼠空腹血糖浓度的升高。

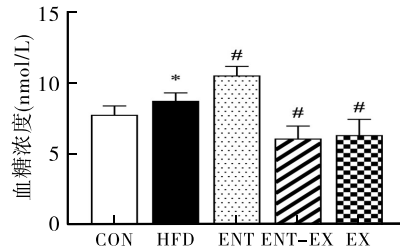


图1 不同处理组小鼠空腹血糖变化

注:* $P<0.05$,与CON组相比;# $P<0.05$,与HFD组相比。

2.2 恩他卡朋联合运动训练对下丘脑FTO基因表达的影响

利用Real-time PCR对小鼠下丘脑FTO mRNA表达水平进行检测。与CON组相比,肥胖小鼠下丘脑FTO mRNA的表达显著上调;与HFD组相比,ENT、EX和ENT-EX均能下调FTO mRNA的表达,其中ENT-EX的作用效果最明显(图2)。

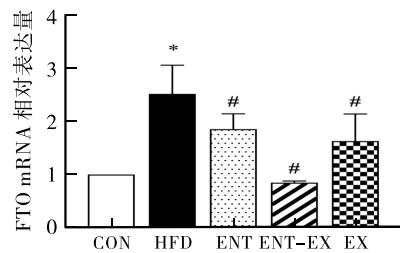
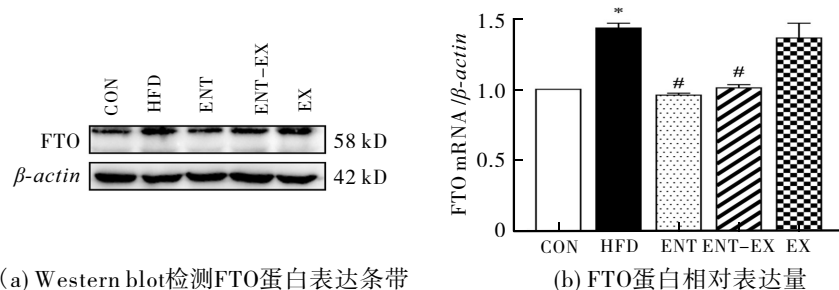


图2 不同处理组小鼠下丘脑FTO mRNA表达量变化

注:* $P<0.05$,与CON组相比;# $P<0.05$,与HFD组相比。

2.3 恩他卡朋联合运动训练对下丘脑FTO蛋白表达量的影响

利用Western blot对小鼠下丘脑FTO蛋白表达进行检测。结果显示,与CON组相比,HFD组下丘脑FTO蛋白表达量显著增加;与HFD组相比,ENT处理显著降低了高脂诱导的肥胖小鼠下丘脑FTO蛋白表达,EX处理对下丘脑FTO无影响,ENT-EX显著降低FTO表达(图3)。



(a) Western blot检测FTO蛋白表达条带

(b) FTO蛋白相对表达量

图3 不同处理组小鼠下丘脑FTO蛋白表达量变化

注:* $P<0.05$,与CON组相比;# $P<0.05$,与HFD组相比。

2.4 恩他卡朋联合运动训练对肝脏 GLUT4 基因表达量的影响

对小鼠肝脏 GLUT4 mRNA 表达水平进行检测。结果显示,与 CON 组相比,高脂诱导能显著下调肝脏 GLUT4 的表达;与 HFD 组相比,ENT、EX 和 ENT-EX 均能上调肝脏 GLUT4 mRNA 的表达,且 ENT-EX 的作用效果最明显(图4)。

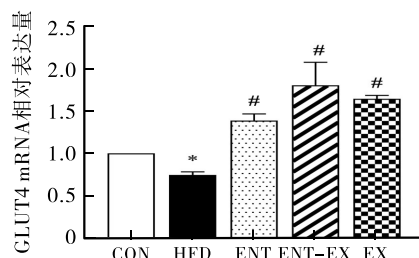


图4 不同处理组小鼠肝脏 GLUT4 mRNA 表达量变化

注: * $P < 0.05$, 与 CON 组相比; # $P < 0.05$, 与 HFD 组相比。

2.5 恩他卡朋联合运动训练对肝脏 GLUT4 蛋白表达量的影响

对小鼠肝脏中 GLUT4 蛋白的表达量进行检测。结果显示,与 CON 组相比, GLUT4 蛋白表达水平在 HFD 组中显著降低;与 HFD 组相比, GLUT4 蛋白的表达在 ENT 中无显著变化,而 EX、ENT-EX 显著升高 GLUT4 蛋白的表达(图5)。

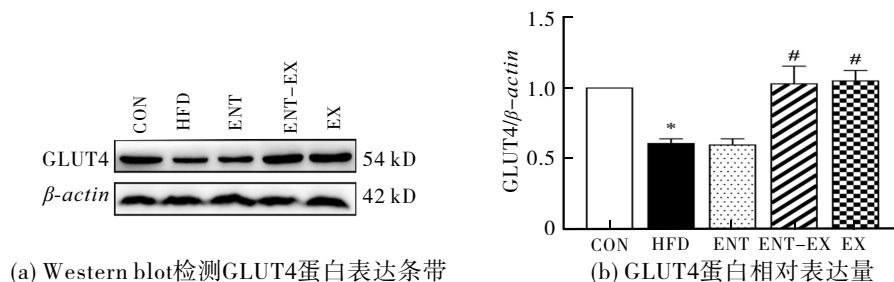


图5 不同处理组小鼠肝脏 GLUT4 蛋白表达量变化

注: * $P < 0.05$, 与 CON 组相比; # $P < 0.05$, 与 HFD 组相比。

2.6 恩他卡朋联合运动训练对下丘脑 m⁶A 甲基化水平的影响

对下丘脑 m⁶A 甲基化水平进行检测。结果显示,各实验处理组小鼠下丘脑的 m⁶A 甲基化水平均无显著性差异(图6)。

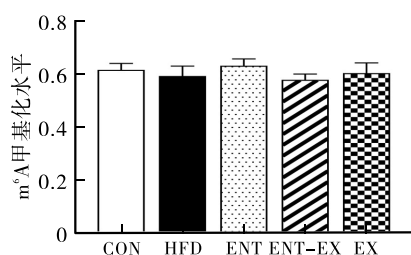


图6 不同处理组小鼠下丘脑 m⁶A 甲基化变化

3 讨论

高血糖症是肥胖的并发症之一,与肥胖具有共同的生理病理机制,在肥胖的前期诊断中具有一定的参考作用。本研究显示,高脂诱导的肥胖小鼠血糖水平显著上升,给予 ENT-EX 与 EX 干预后肥胖小鼠血糖恢复正常水平,其中 ENT-EX 作用效果更明显。值得注意的是,ENT 单独干预与 Peng 等人^[16]的研究结果相反,即恩他卡朋进一步促进肥胖小鼠空腹血糖浓度的升高,出现这一结果的原因可能是使用的恩他卡朋纯度不高、所研究的小鼠模型不同以及实验饲养环境不同。总之,以上结果说明,运动训练除单独降低肥胖小鼠空腹血糖浓度外,与恩他卡朋联用不仅可以缓解肥胖小鼠的高血糖水平,还能够进一步抑制恩他卡朋对血糖升高的促进作用。

GLUT4作为一种跨膜蛋白,在维持机体的血糖稳态中发挥重要作用。研究表明,有规律的运动可以增强胰岛素的敏感性^[17]。对肥胖小鼠进行运动干预后的结果显示,运动组小鼠的GLUT4蛋白表达水平较未运动组有明显的升高趋势^[18]。GLUT4作为胰岛素依赖型葡萄糖转运蛋白,在肝脏等胰岛素敏感组织的葡萄糖摄取和利用中起着限速作用^[19]。相较于野生型小鼠,ob/ob小鼠肝脏出现脂肪堆积和GLUT4表达量显著下降,而当胰高血糖素样肽-1受体激动剂(Exendin-4)干预后小鼠肝脏GLUT4表达量的增加使其胰岛素敏感性增强,会进一步刺激肝细胞加强葡萄糖摄取^[20]。在研究中,与模型组相比,ENT、ENT-EX、EX的干预均能使GLUT4的基因水平恢复正常,具有显著改善作用,其中,恩他卡朋联合运动的效果最好。在蛋白水平上,ENT-EX、EX的干预效果最好,ENT的效果与模型组并无差异,推测可能是单独恩他卡朋的干预通过其他途径改善了血糖水平。总之,恩他卡朋联合运动训练可以提高GLUT4的基因和蛋白表达水平,从而维持肥胖小鼠血糖稳态。

FTO基因与肥胖的关联在众多实验研究中被证实。当小鼠摄入高脂饲料时,FTO的表达水平会显著提高^[21]。FTO基因敲除的小鼠模型中,与正常组相比,体重和脂肪含量也表现出了减少的特点^[22]。本研究发现,高脂诱导的肥胖小鼠会上调下丘脑FTO基因的表达,这与前人的研究结果一致。FTO除基因与肥胖症具有强关联外,其蛋白作为一类核酸去甲基酶广泛表达于全身多处器官,特别是在下丘脑中表达最丰富,主要通过RNA的m⁶A去甲基化作用参与机体能量稳态的调节^[3,5,23]。有研究指出,高脂喂养的肥胖小鼠体内FTO过表达与其血糖含量成正相关,FTO过表达会导致m⁶A水平降低,进一步引起糖耐量异常^[6,24]。在本研究中,通过对FTO蛋白表达的检测,与模型组相比,单独的恩他卡朋作用以及联合运动均可降低FTO蛋白表达水平,而单独运动组并未表现出显著性的降低,这可能是由于运动训练的干预方式或时间不同。有趣的是,5组处理间的m⁶A未表现出明显差异,因此,恩他卡朋联合运动训练对FTO蛋白表达水平的改变可能不依赖于m⁶A甲基化的水平。

综上所述,推测恩他卡朋和运动干预可能通过提高GLUT4的表达从而降低肥胖小鼠的血糖水平,还可以抑制下丘脑FTO表达从而改善肥胖小鼠的症状,但FTO表达水平的改变与m⁶A甲基化修饰无关。

参考文献:

- [1] NG M, FLEMING T, ROBINSON M, et al. Global, Regional, and National Prevalence of Overweight and Obesity in Children and Adults During 1980–2013: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study[J]. *Lancet*, 2014, (03): 15–25.
- [2] WELLEN KE, HOTAMISLIGIL GS. Inflammation, Stress, and Diabetes[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(05): 1111–1119.
- [3] RIVERA M, COHEN-WOODS S, KAPUR K, et al. Depressive Disorder Moderates the Effect of the FTO Gene on Body Mass Index[J]. *Mol Psychiatry*, 2012, 17(06): 604–611.
- [4] 肖志华, 郭武华, 张吉翔. FTO基因与肥胖关系的研究进展[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(05): 1025–1028.
- [5] ZHAO X, YANG Y, SUN B F, et al. FTO and Obesity: Mechanisms of Association[J]. *Curr Diab Rep*, 2014, 14(05): 486.
- [6] CHURCH C, MOIR L, MCMURRAY F, et al. Overexpression of FTO Leads to Increased Food Intake and Results in Obesity[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(12): 1086–1092.
- [7] 宋正伟, 夏平, 黎黎, 等. 淫羊藿苷介导 AMPK/PGC-1 α /GLUT4 通路对高脂诱导的大鼠非酒精性脂肪肝损伤和脂代谢的调节作用[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(16): 1702–1707.
- [8] KARIM S, ADAMS D H, LALOR P F. Hepatic Expression and Cellular Distribution of the Glucose Transporter Family[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2012, 18(46): 6771–6781.
- [9] 苑红, 牛燕媚, 刘彦辉, 等. mTOR/S6K1 信号通路与有氧运动改善小鼠高脂饮食诱导胰岛素抵抗间的关系[J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(04): 297–302, 286.
- [10] 牛燕媚, 苑红, 张宁, 等. mTOR/S6K1 信号通路与胰岛素抵抗的关系及有氧运动对其影响的研究[J]. *中国应用生理学杂志*, 2010, 26(04): 399–403, 523.
- [11] LIU S J, CAI T H, FANG C L, et al. Long-term Exercise Training Down-regulates M(6) a RNA Demethylase FTO Expression in the Hippocampus and Hypothalamus: An Effective Intervention for Epigenetic Modification[J]. *BMC Neurosci*, 2022, 23(01): 54.
- [12] KUMAR R B, SRIVASTAVA G, REID T J, et al. Understanding the Pathophysiologic Pathways that Underlie Obesity and Options for Treatment[J]. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 2021, 16(06): 321–338.
- [13] 李冰. 长期有氧运动对肥胖青少年血糖、血脂及体重的影响[J]. *科学技术与工程*, 2017, 17(04): 154–157, 62.
- [14] GOPALAN V, YALIGAR J, MICHAEL N, et al. A 12-week Aerobic Exercise Intervention Results in Improved Metabolic

- Function and Lower Adipose Tissue and Ectopic Fat in High-fat Diet FED Rats[J]. Biosci Rep, 2021, 41(01): BSR2021707.
- [15] HAASIO K, SOPANEN L, VAALAVIRTA L, et al. Comparative Toxicological Study on the Hepatic Safety of Entacapone and Tolcapone in the Rat[J]. J Neural Transm (Vienna), 2001, 108(01): 79–91.
- [16] PENG S, XIAO W, JU D, et al. Identification of Entacapone as a Chemical Inhibitor of FTO Mediating Metabolic Regulation through FOXO1[J]. Sci Transl Med, 2019, 11(488): eaau7116.
- [17] HEIJDEN EG, TOFFOLO G, MANESSO E, et al. Aerobic Exercise Increases Peripheral and Hepatic Insulin Sensitivity in Sedentary Adolescents[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(11): 4292–4299.
- [18] 王宁宇. 青春期肥胖小鼠的运动及饮食干预研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2018.
- [19] ZHAO FQ, KEATING AF. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters[J]. Curr Genomics, 2007, 8(02): 113–128.
- [20] KIM S, JUNG J, KIM H, et al. Exendin-4 Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Regulating Glucose Transporter 4 Expression in ob/ob Mice[J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2014, 18(04): 333–339.
- [21] CHEN J, ZHOU X, WU W, et al. FTO-dependent Function of N6-methyladenosine is Involved in the Hepatoprotective Effects of Betaine on Ado-lescent Mice[J]. J Physiol Biochem, 2015, 71(03): 405–413.
- [22] FISCHER J, KOCH L, EMMERLING C, et al. Inactivation of the FTO Gene Protects from Obesity[J]. Nature, 2009, 458: 894–898.
- [23] GERKEN T, GIRARD CA, TUNG YC, et al. The Obesity-associated FTO Gene Encodes a 2-oxoglutarate-dependent Nucleic Acid Demethylase[J]. Science, 2007, 318(5855): 1469–1472.
- [24] YANG Y, SHEN F, HUANG W, et al. Glucose is Involved in the Dynamic Regulation of m⁶A in Patients with Type 2 Diabetes[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2019, 104(03): 665–673.

Effects of Entacapone Synergistic Exercise on Hypothalamic FTO and Hepatic GLUT4 Expression in Obese Mice

HAN He-long¹, HUANG Wei-wei¹, REN Jia-bao¹, HE En-peng^{2*}, LI Yan-hong¹

(1. Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology, Xinjiang Key Laboratory of Special Environment Species Biodiversity Application and Regulation, School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang, 830017, China; 2. Institute of Physical Education, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang, 830054, China)

Abstract: To explore the effect of entacapone synergistic exercise intervention on the expression of hypothalamus obesity-related gene (FTO) and liver glucose transporter (GLUT4) in obese mice. 40 obese mice induced by high-fat diet were randomly divided into 4 groups, namely high-fat group (HFD), entacapone group (ENT), exercise training group (EX) and entacapone + exercise training group (ENT-EX), and another 10 normal mice of the same age were used as blank control (CON). After 5 weeks of the experiment, the changes of fasting blood glucose in the mice were detected, Real-time PCR and Western blot were used to detect the expression of FTO in the hypothalamus and the expression of GLUT4 gene and protein in the liver, and the m⁶A methylation kit was used to detect the m⁶A methylation level in the hypothalamus. The results showed that, compared with the HFD group, the fasting blood glucose, FTO mRNA and protein expressions in the ENT-EX and EX groups were significantly decreased, and the GLUT4 mRNA and protein expressions were significantly increased, and the effect of the ENT-EX group was better than that of the EX group alone. There was no significant difference in m⁶A methylation level in hypothalamus. The results showed that ENT-EX and EX interventions regulated the uptake and utilization of blood glucose by liver GLUT4 in obese mice to effectively reverse impaired glucose tolerance by inhibiting FTO expression in the hypothalamus.

Keywords: Entacapone; Exercise; Obese mice; FTO expression; GLUT4 expression