

饱和脂肪酸对 AMPKa 表达和活性的影响

刘毅, 高聆, 完强, 孙英, 赵家军

(山东大学山东省立医院, 山东 济南 250021)

【摘要】 目的 探讨饱和脂肪酸对大鼠骨骼肌蛋白激酶(AMPKa)亚基表达及活性的影响, 确定其在脂毒性发生中的地位和作用, 为有效预防和控制脂毒性提供科学依据。方法 雄性 Wistar 大鼠随机分为 3 组, 每组 10 只, 即对照组、高脂组和高脂加 AMPKa 激活剂组[二甲双胍 50 mg/(kg·d), $n = 10$]。喂养 20 周后, 测定大鼠空腹和服糖后 2 h 血糖; 用体外骨骼肌糖摄取试验评价大鼠骨骼肌胰岛素敏感性, Western blot 法测定大鼠骨骼肌中 AMPKa 亚基和磷酸化 AMPKa 亚基蛋白水平。结果 (1) 与对照组比较, 高脂组大鼠空腹血糖增加 21.5% ($P < 0.05$), 服糖后 2 h 血糖增加 28.3% ($P < 0.05$), 骨骼肌基础和胰岛素刺激后的糖摄取分别下降 37.2% ($P < 0.05$) 和 57.89% ($P < 0.01$); (2) 高脂组大鼠骨骼肌 P-AMPKa 和总 AMPKa 亚基蛋白水平分别下降 46.1% ($P < 0.05$) 和 79.4% ($P < 0.05$); (3) 与高脂组比较, 二甲双胍显著上调 AMPKa 亚基的表达 ($P < 0.05$) 和活性增加 ($P < 0.05$)。结论 饱和脂肪酸通过下调 AMPKa 亚基表达和活性诱导大鼠胰岛素抵抗。

【关键词】 饱和脂肪酸; AMP 活化蛋白激酶; 胰岛素抵抗; 大鼠

Effects of high saturated fatty acid diet on the expression and activity of AMPKa

LIU Yi, GAO Ling, WAN Qiang, SUN Ying, ZHAO Jia-jun

(Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan Shandong 250021, China)

【Abstract】 **Objective** To study the role of AMPKa in high saturated fatty acid diet-induced insulin resistance. **Methods** Male Wistar rats were randomly divided into three groups. They were control group (NC, $n = 10$), high-fat diet group (HF, $n = 10$) and metformin-treated group (HF + Met, $n = 10$). Metformin was administrated orally with the dose of 50 mg/(kg·d). After feeding for 20 weeks, fasting and glucose-loaded 2 h blood glucose levels were measured. The ability of glucose uptake of rat skeletal muscle was detected. Protein levels of total AMPKa subunit or P-AMPKa subunit of rats' skeletal muscle were measured using Western blot. **Results** (1) Compared with control group, high-fat diet elevated both fasting and glucose-loaded 2 h blood glucose levels ($P < 0.05$), accompanied with decreased basal ($P < 0.05$) and insulin-stimulated ($P < 0.01$) glucose uptake in isolated skeletal muscle. (2) High-fat diet impaired both the protein expression ($P < 0.05$) and activity ($P < 0.05$) of AMPKa subunit. (3) Compared with HF group, administration of metformin could increase both the expression and activity of AMPKa, accompanied with amelioration of insulin sensitivity. **Conclusion** High saturated fatty acid diet impairs both the expression and activity of AMPKa. The alternations of AMPKa expression and activity might contribute to, at least partly, the pathophysiology of insulin resistance.

【Key words】 Saturated fatty acid; AMPKa; Insulin resistance; Rat

基金项目: 山东省卫生厅计划课题资助(2005-63)

作者简介: 刘毅, 博士研究生, 研究方向: 代谢毒理学。

通讯简介: 赵家军, 男, 博士生导师, 研究方向: 代谢毒理学。

(上接第 12 页) responses and reproductive toxicity of the effluent from a Chinese large sewage treatment plant in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Chemosphere, 2005, 59: 281-288.

[4] Scholtz S, Gutzeit HO. 17 β -ethynylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). Aquat Toxicol, 2000, 50: 363-373.

[5] Länge R, Hutchinson TH, Croudace CP, et al, Effects of the

synthetic estrogen 17 α -ethynylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environ Toxicol Chem, 2001, 20: 1216-1227.

[6] Blázquez M, Zanuy S, Carillo M, et al. Structural and functional effects of early life exposure to estradiol-17 β and 17 α -ethynylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost (*Dicentrarchus labrax*). Fish Physiol Biochem, 1998, 18: 37-47.

(收稿日期: 2005-08-10)

高脂饮食是诱导胰岛素抵抗的独立危险因素,即脂毒性。细胞内脂肪酸 β 氧化不足是脂毒性发生的重要的病理生理基础^[1],然而具体机制一直未能阐明。AMP 活化的蛋白激酶(AMPK α)是新近发现的一种脂肪酸 β 氧化的调节因子,它可使乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)失活,下调胞浆内丙二酰辅酶 A 的含量,促进细胞内脂肪酸的 β 氧化^[2]。有研究证实,高糖环境诱导的胰岛素抵抗伴有 AMPK α 活性的降低^[3]。高脂环境是否会通过影响 AMPK α 的表达或活性,进而诱导胰岛素抵抗发生目前还不清楚。本研究拟通过观察高脂饮食对大鼠骨骼肌 AMPK α 的影响,探讨 AMPK α 在脂毒性发生中的地位和作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 Wistar 大鼠 30 只,体重 180 ~ 200 g,由山东省卫生防疫站提供。适应性饲养 1 周,随机分为 3 组,每组 10 只。对照组:给予大鼠食用的标准饲料;高脂组(HF)和高脂加 AMPK α 激活剂组(二甲双胍 HF + Met);给予高脂饮食,脂肪热卡占 59%,以饱和脂肪酸为主;各组大鼠每日膳食热量控制在 310 kJ/只,喂养 5 个月。

1.2 药品 AMPK α 激活剂选用二甲双胍(剂量 50 mg/(kg·d));Real-Time PCR 试剂盒购自大连宝生物 Qiagen 公司;AMPK α 和 P-AMPK α 一抗及相应二抗均购自美国 Cell Signaling 公司;蛋白测定试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司; β -actin 一抗购自美国 Ambion 公司。

1.3 血糖和体重的监测 大鼠处死前,禁食、禁水 12 h,测体重、断尾取血测空腹血糖后,经胃管灌入质量分数为 50% 的葡萄糖(剂量 1 g/kg),测定 2 h 后血糖。

1.4 体外骨骼肌糖摄取试验及内脏脂肪含量的测定

体积分数为 10% 的水合氯醛 3 ml/kg 腹腔内注射麻醉大鼠,迅速分离腓肠肌进行体外骨骼肌糖摄取试验,余腓肠肌迅速置于液氮中保存,用以 Western blot。经心脏取血处死大鼠,取附睾、肠系膜和反折腹膜处的脂肪称重,并计算内脏脂肪重量占体重的百分比。骨骼肌糖摄取能力测定方法如文献^[4]所述。

1.5 Western blot 方法 液氮冻存的腓肠肌剪碎,裂解,4 °C,12 000 r/min 离心 10 min,取上清,测定蛋白浓度。变性,上样 50 μ g,电泳 3 h。转膜,封闭。分别加入 AMPK α 和 P-AMPK α 一抗 4 °C 振荡过夜,二抗常温振荡孵浴 1 h,ECL 法显影,凝胶影像分析仪测定蛋白浓度,计算各蛋白条带和内参的比值。Western blot 参照文献^[5-6]进行。

1.6 统计学方法 上述各项试验至少重复 2 次。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 10.0 软件处理数据,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

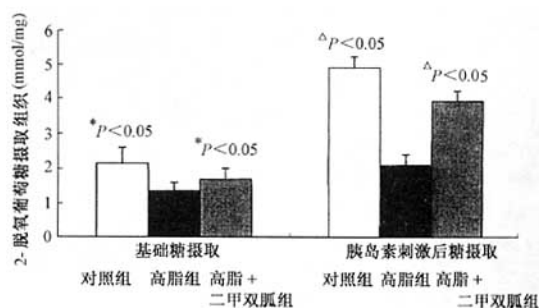
2.1 血糖及内脏脂肪含量 高脂喂养 5 个月后,大鼠空腹血糖、服糖后 2 h 血糖、体重和内脏脂肪占体重百分比分别增加 21.5% ($P < 0.05$)、28.3% ($P < 0.05$)、51.1% ($P < 0.01$)和 106.6% ($P < 0.01$)。与高脂组相比,加用 AMPK α 激活剂二甲双胍可显著降低大鼠体重 ($P < 0.05$)、内脏脂肪含量 ($P < 0.05$)和服糖后 2 h 血糖 ($P < 0.05$),而空腹血糖改变不明显(表 1)。

表 1 喂养 20 周后,各组大鼠血糖、体重和内脏脂肪含量($\bar{x} \pm s$)

组别	空腹血糖 (mmol/L)	服糖后 2 h 血糖(mmol/L)	体重 (g)	内脏脂肪含量 /体重(%)
高脂组	3.05 \pm 0.26 [#]	4.08 \pm 0.31 [#]	476 \pm 31 [#]	8.16 \pm 0.86 [#]
高脂 + 二甲双胍	2.68 \pm 0.19	3.43 \pm 0.18 [*]	364 \pm 27 [*]	5.12 \pm 0.73 [*]
对照组	2.51 \pm 0.21	3.18 \pm 0.23	315 \pm 28	3.95 \pm 0.64

高脂组与对照组比较,[#] $P < 0.05$;高脂 + 二甲双胍组与高脂组比较,^{*} $P < 0.05$; $n = 10$ 。

2.2 骨骼肌糖摄取变化 由图 1 可见:高脂喂养 5 个月后,大鼠骨骼肌基础状态下和胰岛素刺激后的糖摄取分别下降 37.2% ($P < 0.05$)和 57.8% ($P < 0.01$);与高脂组相比,加用 AMPK α 激活剂二甲双胍使大鼠骨骼肌基础状态和胰岛素刺激后的糖摄取分别增加 24.4% ($P < 0.05$)和 89.8% ($P < 0.01$)。



与对照组比,^{*} $P < 0.05$;与高脂组比,^Δ $P < 0.05$

图 1 大鼠骨骼肌基础状态下和胰岛素刺激后的糖摄取能力

2.3 大鼠骨骼肌 AMPK α 表达和活性的改变 Western blot 分析胞浆内 AMPK α 活性形式即 P-AMPK α 蛋白水平^[5-6],同时测定胞浆总 AMPK α 表达水平。结果显示,与对照组相比,高脂组大鼠 P-AMPK α 水平降低 46.1%

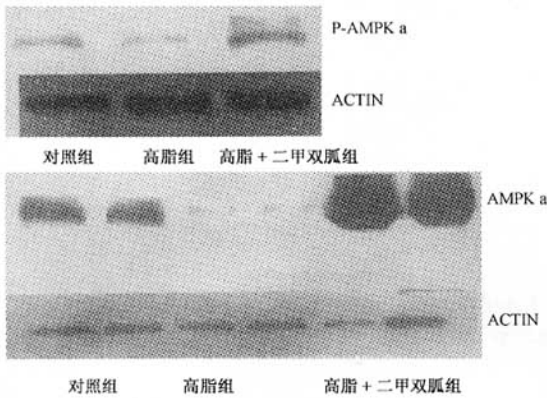


图 2 大鼠骨骼肌中 P-AMPK α , AMPK α 水平

($P < 0.05$), 总 AMPK α 蛋白水平降低 79.4% ($P < 0.05$, 图 2)。二甲双胍显著上调 AMPK α 的活性 ($P < 0.05$) 与表达 ($P < 0.05$)。

3 讨论

高脂饮食是诱导胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的危险因素之一^[1]。我们的研究发现, 高脂喂养 5 个月后, 大鼠体重和内脏脂肪含量显著增加, 表现出明显糖耐量异常, 作为在体外较好评价胰岛素敏感性的骨骼肌糖摄取能力显著下降^[3], 这与国内外的相关研究结论是一致的。脂毒性的发生与脂肪酸在细胞内 β 氧化不足有关^[1]。而脂肪酸的 β 氧化与胰岛素敏感性关系密切: 抑制脂肪酸 β 氧化的关键酶 (CPT1) 可诱导小鼠胰岛素抵抗发生^[7]; 而 CPT1 过表达的动物模型表现出明显的胰岛素敏感性增强^[8]。研究证实, 高脂环境可抑制 CPT1 的活性^[9]。本研究用蛋白定量的方法发现^[5-6]: 高脂喂养可显著下调大鼠骨骼肌 AMPK α 亚基 (催化亚基) 的表达及活性, 提示 AMPK α 亚基表达及活性的下降是高脂环境下 CPT1 活性被抑制的可能机制。AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleoside) 和二甲双胍是目前已知的两种 AMPK α 的激活剂^[10-11], 前者有较强的肝毒性不适用于长期的实验研究。我们选用二甲双胍作为 AMPK α 的激活剂, 首先验证了其 AMPK α 的激活作用。结果显示, 大鼠服用剂量 50 mg/(kg·d) 的二甲双胍 5 个月后, 骨骼肌 AMPK α 亚基的表达和活性显著增加。进一步我们发现与高脂组相比, 加用二甲双胍后, 大鼠骨骼肌胰岛素刺激后糖摄取能力显著增强, 机体水平糖耐量改善, 从而证实 AMPK α 亚基表达和活性的降低至少部分地参与了脂毒性的发生。

综上所述, 高脂喂养诱导的大鼠胰岛素抵抗伴有 AMPK α 亚基表达和活性的降低, AMPK α 激活可上调 AMPK α 表达和活性, 显著改善胰岛素抵抗。提示 AMPK α 参与了脂毒性的发生。

参考文献:

- [1] McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*, 2002, 51:7-18.
- [2] Rutter GA, Da SXC, Leclerc I. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK α) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J*, 2003, 375:1-16.
- [3] Itani SI, Saha AK, Kurowski TG, et al. Glucose autoregulates its uptake in skeletal muscle: involvement of AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, 2003, 52:1635-1640.
- [4] 完强, 高聆, 刘毅, 等. 乙醇对大鼠骨骼肌胰岛素信号传递分子表达的影响. *毒理学杂志*, 2005, 19:35-37.
- [5] Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, et al. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31:162-168.
- [6] Kelly M, Keller C, Avilucea PR, et al. AMPK α activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320:449-454.
- [7] Dobbins RL, Szczepaniak LS, Bentley B, et al. Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. *Diabetes*, 2001, 50:123-130.
- [8] Perdomo C, Commerford SR, Richard AM, et al. Increased beta-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation. *J Biol Chem*, 2004, 279:27177-27186.
- [9] Kim CH, Kim MS, Youn JY, et al. Lipolysis in skeletal muscle is decreased in high-fat-fed rats. *Metabolism*, 2003, 52:1586-1592.
- [10] Raynald B, Stephen F, Cline GW, et al. Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. *Diabetes*, 2001, 50:1076-1082.
- [11] Hawley SA, Cadalla AE, Olsen GS, et al. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes*, 2002, 51:2420-2425.

(收稿日期: 2005-05-20)