

腺苷酸活化蛋白激酶与 LKB1 在 肥胖大鼠脂肪组织中的表达及其对糖脂代谢的影响

程 媛¹, 王佑民²

[摘要]目的:探讨腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)与 LKB1 在肥胖大鼠脂肪组织的表达及其对糖脂代谢的影响。方法:将 30 只 6 周龄雄性 S-D 大鼠随机分为普通饮食组(NC 组)和高脂饮食组(HF 组),各 15 只,分别予普通饲料喂养和高脂饲料喂养。喂养 16 周后, HF 组大鼠体重高于 NC 组 20% 者为成功建立模型。所有大鼠过夜禁食后,麻醉状态下测量体重(BW),取静脉血测定血清游离脂肪酸(FFA)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TCH)、空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FINS)。处死大鼠后,采用 Western blot 法测定各组大鼠骨骼肌组织中 AMPK α 、磷酸化 AMPK(P-AMPK α)和磷酸化 LKB1 蛋白(P-LKB1)的表达。计算 AMPK 活性。结果:与 NC 组比较, HF 组大鼠 BW、FFA、TG、FPG、FINS 均升高($P < 0.05 \sim P < 0.01$),脂联素水平降低($P < 0.05$),骨骼肌组织中 P-AMPK α 和 P-LKB1 蛋白表达降低, AMPK 活性降低($P < 0.05$)。结论:高脂饮食诱导大鼠营养性肥胖,降低 LKB1 和 AMPK 的活性,从而导致 TG 和 TCH 的合成增加,血糖升高,形成胰岛素抵抗。

[关键词] 肥胖; 脂肪组织; 腺苷酸活化蛋白激酶; LKB1; 表达; 大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 589.2

[文献标识码] A

The expressions of AMP-activated protein kinase and LKB1 in adipose tissues in obese rats and their impact on glucose and lipid metabolism

CHENG Yuan¹, WANG You-min²

(1. Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui 230601;

2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expressions of AMP-activated protein kinase (AMPK) and LKB1 in adipose tissues of normal-fed rats and high-fat-fed rats, and explore the impact of AMPK and LKB1 on the metabolism of glucose and lipid. **Methods:** Thirty male six-week age Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: 15 were fed with normal control diet as NC group, the rest 15 were fed with a high-fat diet as HF group. After 16 weeks, the average body weight (BW) in HF group were over 20% higher than in NC group. All rats were weighed under anesthesia. The levels of free fatty acid (FFA), triglyceride (TG), total cholesterol (TCH), fasting plasma glucose (FPG) and fasting insulin (FINS) in serum were measured. After all rats were killed, the protein levels of AMPK α , P-AMPK α and P-LKB1 in adipose tissues were analyzed with Western blot. **Results:** Compared with NC group, the levels of BW, FFA, TG, FPG and FINS in HF group were significantly higher ($P < 0.05$). In adipose tissues, the expressions of P-AMPK α and P-LKB1 in HF group were lower than those in NC group ($P < 0.05$). **Conclusions:** High-fat nutrition diet induces the activities of LKB1 and AMPK, promotes the synthesis of TG, increases blood glucose, induces obesity and insulin resistance in rats.

[Key words] obesity; adipose tissue; AMP-activated protein kinase; LKB1; expression; rats

腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是动物细胞能量平衡的重要感受器,广泛存在于骨骼肌、肝脏、胰腺和脂肪组织中^[1]。AMPK 的活性调节机制非常复杂,可通过变构效应激活,也可以受其上游激酶激活。脂联素、瘦素、抵抗素等多种脂肪细胞因子及二甲双胍、噻唑烷二酮类降糖药物等均能调

节 AMPK 的活性。其中研究^[2]证实有 2 条信号通路: LKB1-AMPK 通路和 Ca²⁺-CaMKK 途径。LKB1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,能在多种细胞内磷酸化和活化 AMPK,调节机体代谢和细胞增殖。本研究观察高脂饮食诱导肥胖大鼠的脂肪组织 LKB1、AMPK 活性和相关生化指标的变化,旨在探讨 LKB1、AMPK 活性对糖脂代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物喂养及模型建立 30 只 6 周龄 S-D 大鼠,雄性,购自安立实验动物中心,体重 136 ~ 170 g,合格证号: 041117043。均自由进食及饮水,环境温度(25 ± 1) °C,自然光照,适应性喂养 1 周后,随机均分为普通饮食组(NC 组)和高脂饮食组

[收稿日期] 2011-06-27

[基金项目] 安徽省自然科学基金资助项目(070413080)

[作者单位] 1. 安徽医科大学第二附属医院 内分泌科,安徽 合肥 230601; 2. 安徽医科大学第一附属医院 内分泌科,安徽 合肥 230031

[作者简介] 程 媛(1980-),女,硕士,主治医师。

[通讯作者] 王佑民,博士,硕士研究生导师,主任医师,教授。

(HF 组)。NC 组予普通饲料喂养,饲料由安徽医科大学实验动物中心配制,配方为豆粕 30.0%、黄豆 5.0%、玉米 30.0%、酵母 2.5%、鱼粉 10.0%、骨粉 2.5%、高粱 10.0%、标准粉 10.0%。HF 组予高脂饲料喂养,配方为普通饲料 55%、猪油 12%、蔗糖 5%、奶粉 8%、花生 5%、鸡蛋 10%、麻油 3%、食盐 2%。3~4 天定期称重。喂饲 5 周后, HF 组大鼠体重(BW) 高于 NC 组; 饲养 16 周后, HF 组大鼠 BW 高于 NC 组 20%, 15 只均成功建立模型。

1.2 生化指标测定 16 周喂养结束后, 将大鼠过夜禁食 8 h 后, 10% 水合氯醛麻醉后准确测量 BW。下腔静脉取血 3 000 r/min 离心 5 min 分离血清, 测定游离脂肪酸(FFA)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TCH)、空腹胰岛素(FINS)、空腹血糖(FPG)。放血处死后解剖大鼠, 收集腹部皮下脂肪等组织, 滤纸吸干水分, 分装于冻存管中, 置于液氮罐中备用。其中, FFA 测定采用铜试剂法, 试剂盒购自南京建成生物公司; TG、TCH、FPG 测定采用氧化酶法, 均在 Roche Modular DPP 型全自动生化分析仪上测得; FINS 测定采用放射免疫分析法, 试剂盒购自美国 Linco 公司。

1.3 AMPK、LKB1 蛋白表达水平及其活性的测定

1.3.1 脂肪组织蛋白提取 从液氮中取出脂肪组织, 称重, 剪碎, 每 20 mg 组织加入 100 μ l Western blot 细胞裂解液, 静置后冰上匀浆, 至充分裂解, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清蛋白装入 EP 管, -20 $^{\circ}$ C 保存。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定脂肪组织的蛋白含量。

1.3.2 Western blot 法测定 AMPK α 、P-AMPK α 、P-LKB1 表达 2 μ l 上样缓冲液(62.5 mmol/L Tris-HCl 2% SDS, 10% 甘油, 50 mmol/L DTT, 0.01% 溴

酚蓝) 与 6.6 μ g 蛋白混匀后置于 95 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 半干电转移仪器将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 室温下在 Western 封闭液中封闭 3 h, 漂洗 3 次, 每次 5 min, 分别在单克隆 AMPK α 抗体、P-AMPK α 抗体、P-LKB1 抗体中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第 2 天再予 TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min, 室温下与辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(1:1 600) 孵育 2 h。孵育后用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。最后进行 ECL 化学发光显影, 暗室压片。显影完成后, 将硝酸纤维素膜先后置于双蒸水、一抗二抗去除液中各振荡 5 min, 再用双蒸水振荡漂洗 1 h, 洗去结合的抗体, 即可重新进行封闭等后续步骤测定 β -actin, 方法同目的条带的 Western blot 方法, 其中使用的是 1:250 兔抗大鼠 β -actin 一抗和 1:1 600 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗。其中 AMPK α 抗体、P-AMPK α (Thr172) 抗体和 P-LKB1 抗体均购自 Cell Signaling Technology, β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗和一抗二抗去除液均购自碧云天生物技术研究。

1.3.3 蛋白表达量计算 Western blot 所得条带采用 Band Scan 5.0 数码凝胶图像分析系统软件进行灰度分析。分别以 AMPK α 蛋白、P-AMPK α 蛋白及 P-LKB1 蛋白条带灰度值与相对应的 β -actin 条带灰度比值作为各自的相对表达量, 以 P-AMPK α /AMPK α 值代表 AMPK 的活性。

1.4 统计学方法 采用 *t* 检验和直线相关分析。

2 结果

2.1 2 组大鼠 BW 和代谢指标比较 16 周喂养结束时, HF 组的 BW、FFA、TG、FPG、FINS 均于高于 NC 组($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见表 1)。

表 1 2 组大鼠 BW 及代谢指标的比较($n_i = 15; \bar{x} \pm s$)

分组	BW (g)	FFA (μ mol/L)	TG (mmol/L)	TCH (mmol/L)	FPG (mmol/L)	FINS (mIU/L)
NC 组	452.87 \pm 38.91	411.63 \pm 70.19	0.40 \pm 0.09	1.28 \pm 0.18	4.97 \pm 0.85	57.53 \pm 37.60
HF 组	546.13 \pm 53.09	639.26 \pm 71.51	0.62 \pm 0.19	1.18 \pm 0.26	6.19 \pm 0.23	89.97 \pm 42.43
<i>t</i>	5.49	8.80	4.05	1.22	5.37	2.22
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01	<0.05

2.2 大鼠脂肪组织中 AMPK 活性及 P-LKB1 表达的比较 Western blot 检测结果显示, 与 NC 组相比, HF 组大鼠脂肪组织中 AMPK α 表达差异无统计学意义($P > 0.05$); P-AMPK α 表达降低($P < 0.01$); P-AMPK α /AMPK α 值亦降低($P < 0.01$); P-LKB1 蛋白水平明显降低($P < 0.01$) (见图 1 和表 2)。

2.3 AMPK 活性与糖脂代谢生化指标、P-LKB1 的相关性分析 大鼠脂肪组织中 AMPK 活性与 FPG ($r = -0.853$)、FFA ($r = -0.712$)、TG ($r = -0.798$) 均呈负相关关系($P < 0.05$), 与 FINS ($r = -0.479$)、TCH ($r = 0.081$) 均无相关关系($P > 0.05$), 与 P-LKB1 ($r = 0.906$) 表达呈正相关关系($P < 0.01$)。

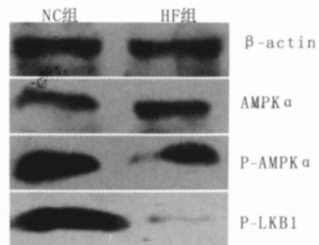


图1 大鼠脂肪组织AMPK α 、P-AMPK α 和P-LKB1的表达

表2 2组大鼠脂肪组织中AMPK α 和P-AMPK α 活性、P-AMPK α /AMPK α 比值及P-LKB1表达的比较($n_i = 15$; $\bar{x} \pm s$)

分组	AMPK α	P-AMPK α	P-AMPK α /AMPK α	P-LKB1
NC组	1.00 \pm 0.06	0.71 \pm 0.05	0.70 \pm 0.07	0.93 \pm 0.10
HF组	1.02 \pm 0.08	0.44 \pm 0.03	0.43 \pm 0.05	0.62 \pm 0.08
<i>t</i>	0.77	17.93	12.16	9.38
<i>P</i>	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

脂肪组织不仅是储存和释放脂肪的场所,而且是一种具有内分泌功能的组织,这是近年内分泌学领域的重大发现和研究热点。脂肪细胞分泌的脂肪因子在肥胖和胰岛素抵抗中的作用也逐渐明了。

AMPK能够调节机体的能量代谢,维持能量的供求平衡,是细胞能量平衡的重要感受器。它由 α 、 β 、 γ 3个亚单位构成,其中 α 为催化亚基,活性受AMP/ATP比值调控,当细胞受到运动、缺氧、长期的饥饿等任何引起ATP生成减少与消耗增加的刺激,AMP/ATP比值增加,AMPK α 则被激活为P-AMPK α (AMPK α 172位Thr的磷酸化)^[3]。另有研究^[4]表明,乙酰CoA羧化酶(ACC)和肉碱脂酰转移-1(CPT-1)分别是脂肪酸合成与氧化的关键酶,丙二酰辅酶A对CPT-1有抑制作用。活化的AMPK能够使ACC磷酸化,ACC活性降低,从而降低丙二酰辅酶A的浓度进而抑制脂肪酸的合成,促进脂肪酸氧化。AMPK活化还能够通过促进TORC2蛋白(一种调节转录因子活性蛋白)磷酸化、诱导葡萄糖转运蛋白4(GLUT4)向浆膜转移和增加GLUT4基因的表达等途径,抑制糖原合成、促进外周组织摄取葡萄糖、促进糖酵解^[5]。LKB1是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。AMPK α 亚单位172位苏氨酸残基可以被LKB1磷酸化。LKB1能在多种细胞内磷酸化和活化AMPK,调节机体代谢和细胞增殖^[3,6]。

本研究结果显示,NC组大鼠BW、FFA、TG、FPG、FINS均显著低于HF组大鼠;HF组大鼠FINS升高的同时,FPG也明显升高,提示HF组大鼠出现

了血糖及血脂升高,且HF组大鼠虽然胰岛素分泌增加,却不能发生调节血糖的作用,存在胰岛素抵抗。此外,HF组大鼠脂肪组织中AMPK表达虽然无显著降低,但P-AMPK α 表达、AMPK活性及P-LKB1表达显著降低,提示长期高脂饲养降低了脂肪组织中P-LKB1表达及AMPK活性。

相关性分析还显示,AMPK活性与FPG、FFA、TG呈负相关关系,AMPK活性与P-LKB1表达呈正相关关系。目前已有研究^[7]证实,LKB1是AMPK的上游激酶之一,在各种应激下,LKB1可促进AMPK的磷酸化,进而影响糖脂代谢。故我们推测,产生上述现象是由于高脂饮食下调LKB1的表达,进而引起AMPK活性下降,从而ACC磷酸化减少,一方面使得脂肪酸合成增加,另一方面通过升高丙二酰辅酶A的水平使其对CPT-1抑制作用加强,进而减少脂肪酸的氧化,促使大鼠体内脂质沉积、形成肥胖。脂肪酸含量增多或TG过度聚集可引起或加重胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能损害,启动或促进2型糖尿病的发生^[8]。

[参考文献]

- [1] Violl E, Fortez M, Guigas B, *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders[J]. *J Physiol* 2006, 574(Pt 1): 41-53.
- [2] Suter M, Riek U, Tuerk R, *et al.* Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation and deactivation of AMP-activated protein kinase[J]. *J Biol Chem* 2006, 281(43): 32207-32216.
- [3] Sakamoto K, McCarthy A, Smith D, *et al.* Efficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction[J]. *EMBO J* 2005, 24(10): 1810-1820.
- [4] 周爱儒,何旭辉. 医学生物化学[M]. 北京: 北京大学医学出版社 2008: 210-212.
- [5] Kukidome D, Nishikawa T, Sonod K, *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Diabetes* 2006, 55(1): 120-127.
- [6] McGee SL, Mustard KJ, Hardie DG, *et al.* Normal hypertrophy accompanied by phosphorylation and activation of AMP-activated protein kinase alpha following overload in LKB1 knockout mice[J]. *J Physiol* 2008, 586(6): 1731-1741.
- [7] Imai K, Inukai K, Ikegami Y, *et al.* LKB1, an upstream AMPK kinase, regulates glucose and lipid metabolism in cultured liver and muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 351(3): 595-601.
- [8] Cool B, Zinker B, Chiou W, *et al.* Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome[J]. *Cell Metab* 2006, 3(6): 403-416.

(本文编辑 刘璐)