

文章编号 1006-8147(2018)02-0097-04

论 著

## AMPK 对 Rab-GAP 的调节作用研究

廖健文, 岳莹莹, 牛文彦

(天津医科大学免疫学系, 天津 300070)

**摘要** 目的: 检测激活型 AMPK 对 Rab-GAP 的调节作用, 明确它们之间的上下游关系。方法: 激活型 AMPK 腺病毒 (Ad-AMPK-CA) 感染 C2C12 小鼠骨骼肌细胞, 通过细胞成像系统测定细胞中的荧光强度, 明确 AMPK-CA 在 C2C12 细胞中表达。MTS 试验确定没有细胞毒性的腺病毒浓度, Western blot 检测 AMPK 底物 ACC 和两个 Rab-GAP (TBC1D1 和 TBC1D4) 的磷酸化。结果: AMPK-CA 显著升高 ACC 的磷酸化, 并磷酸化 TBC1D1 Thr590 和 TBC1D4 Ser318。结论: AMPK 直接磷酸化 TBC1D1 和 TBC1D4。

**关键词** 单磷酸腺苷激活蛋白激酶; TBC1D1; TBC1D4; 磷酸化

**中图分类号** R392.1

**文献标志码** A

### Study on the regulation of Rab-GAP by AMPK

LIAO Jian-wen, YUE Ying-ying, NIU Wen-yan

(Department of Immunology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** **Objective:** To examine the effect of constitutive active AMPK on Rab-GAP phosphorylation to elucidate the signal relationship. **Methods:** Mouse C2C12 skeletal muscle cells were infected with constitutive active AMPK adenovirus (Ad-AMPK-CA). The expression of AMPK in C2C12 cells was observed by cell fluorescence imaging system. Cytotoxicity of the adenovirus was determined by MTS. Phosphorylations of AMPK substrate ACC and two Rab-GAPs (TBC1D1 and TBC1D4) were detected by Western blot. **Results:** AMPK-CA significantly elevated the phosphorylations of ACC and TBC1D1 Thr590 and TBC1D4 Ser318. **Conclusion:** AMPK directly could regulate TBC1D1 and TBC1D4.

**Key words** AMPK; TBC1D1; TBC1D4; phosphorylation

糖尿病是一种常见的以糖代谢紊乱、血糖水平增高为特征的代谢内分泌疾病<sup>[1]</sup>。90%的糖尿病是2型糖尿病,其特征是胰岛素抵抗<sup>[1]</sup>,通过非胰岛素依赖途径提高组织器官对葡萄糖的摄取是预防和治疗2型糖尿病的关键。单磷酸腺苷激活蛋白激酶(AMPK)是细胞能量变化的感受器<sup>[2]</sup>,当AMPK被激活,通过调节下游的信号通路,例如,直接磷酸化乙酰-CoA 羧化酶(ACC)和3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGCR),能抑制合成代谢并促进分解代谢。激活AMPK能增加骨骼肌对葡萄糖的摄取,增强胰岛素敏感性<sup>[3]</sup>,运动/肌肉收缩可激活AMPK<sup>[4]</sup>。TBC1D1和TBC1D4(又称AS160)是小G蛋白Rab的GTP酶活化蛋白(Rab-GAP),通过调节其下游的Rab参与GLUT4从细胞内储存囊泡到细胞膜的转位<sup>[5-7]</sup>。TBC1D1和TBC1D4都包含一个Rab-GAP结构域和多个磷酸化位点。迄今发现TBC1D1的磷

酸化位点有Ser237、Ser263、Ser507、Ser565、Thr590和Thr596<sup>[8]</sup>,TBC1D4的磷酸化位点有Ser318、Ser341、Ser570、Ser588、Ser591、Ser666、Ser704、Ser751、Thr642、Thr649<sup>[9]</sup>。运动收缩激活AMPK,磷酸化TBC1D1和TBC1D4,促进骨骼肌细胞葡萄糖转运蛋白4(GLUT4)向细胞膜转位转运葡萄糖进入细胞<sup>[7,9]</sup>,但AMPK是否位于TBC1D1和TBC1D4的上游,直接调节它们的磷酸化,特别是AMPK对TBC1D1 Thr590和TBC1D4 Ser318的调节作用尚不清楚。本研究应用激活型AMPK腺病毒(Ad-AMPK-CA)感染骨骼肌细胞,检测AMPK对TBC1D1 Thr590和TBC1D4 Ser318的直接作用,明确它们之间的上下游关系。

### 1 材料和方法

1.1 实验材料 小鼠骨骼肌细胞株C2C12(美国ATCC公司),HEK293β5细胞和激活型AMPK腺病毒重组质粒(Ad-AMPK-CA)由厦门大学林圣彩教授实验室赠与,DMEM培养基(美国GIBCO公司),胎牛血清(以色列Bioind公司),抗磷酸化ACC、TBC1D1、TBC1D4和β-actin抗体(美国CST公司),偶联HRP的山羊抗兔抗体(美国JacksonImmuno

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81170740);高等学校博士学科点专项基金资助项目(20121202110014);天津市科委应用基础研究重点项目(15JCZDJC35500);天津市卫计委重点攻关项目(15KG102)

作者简介 廖健文(1989-),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。

Research 公司),增强化学发光底物检测试剂盒(美国 Millipor 公司),Tanon-5200 化学发光成像系统(北京原平皓生物技术有限公司)。

## 1.2 实验方法

1.2.1 Ad-AMPK-CA 扩增和提取 将 HEK293 细胞接种在 6 孔板中,待细胞密度长至 70%~80%,加入含腺病毒的上清液,感染 48~72 h,出现细胞变圆、漂浮、破裂的病变现象。当孔底只剩下 50%贴附细胞时,收集细胞,液氮速冻后 37 ℃水浴溶解,反复操作 3 次,离心收集上清,分装冻存于-80 ℃。

1.2.2 细胞培养 C2C12 小鼠骨骼肌细胞分别用含 10%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM 高糖培养基接种于 6 孔板中,在 37 ℃,5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待细胞密度达 100%时分别加入 0、40、80、160、320、750 μL 的腺病毒,孵育 12 h 后弃去培养基,加入新鲜的含 10%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM 高糖培养基分别孵育 0、24、48、72 h。

1.2.3 细胞内荧光分布检测 细胞成像系统对 C2C12 小鼠骨骼肌细胞进行荧光检测分析,确定腺病毒在细胞内表达。

1.2.4 MTS 实验 检测 0、40、80、160、320、750 μL 的腺病毒作用于 C2C12 细胞 48 h 对细胞生存率的影响,MTS 法测定细胞生存率的改变。

1.2.5 Western blot 检测蛋白磷酸化 用含蛋白酶抑制剂(1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>,0.5 mmol/L NaF,200 μmol/L PMSF,1 μmol/L PIC)的细胞裂解液裂解细胞后,4 ℃ 12 000 r/min 离心 20 min,收集上清。按照 BCA Protein Assay Kit 说明书测定蛋白浓度,再与 5×LSB 缓冲液按 4:1 的比例混合,沸水浴 5 min,10%(v/v) SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品,转到 PVDF 膜上,用 5%牛奶蛋白封闭 1.5 h,再分别用各自一抗 4 ℃孵育过夜,二抗使用偶联 HRP 的山羊抗兔 IgG 孵育 1.5 h,蛋白条带用增强化学发光法检测。β-actin 为内参,Image J 软件定量。

1.3 统计学方法 采用 GraphPad Prism6 统计软件进行统计学分析,实验数据均以  $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$  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 不同浓度的腺病毒在 C2C12 细胞中的表达 腺病毒质粒中带有绿色荧光蛋白 GFP,可通过细胞成像系统检测腺病毒在 C2C12 细胞的表达。分别加入 0、40、80、160、320、750 μL 的腺病毒感染 C2C12 细胞 48 h。如图 1 所示,腺病毒均在 C2C12 中表达,说明腺病毒已转染到 C2C12 细胞中。

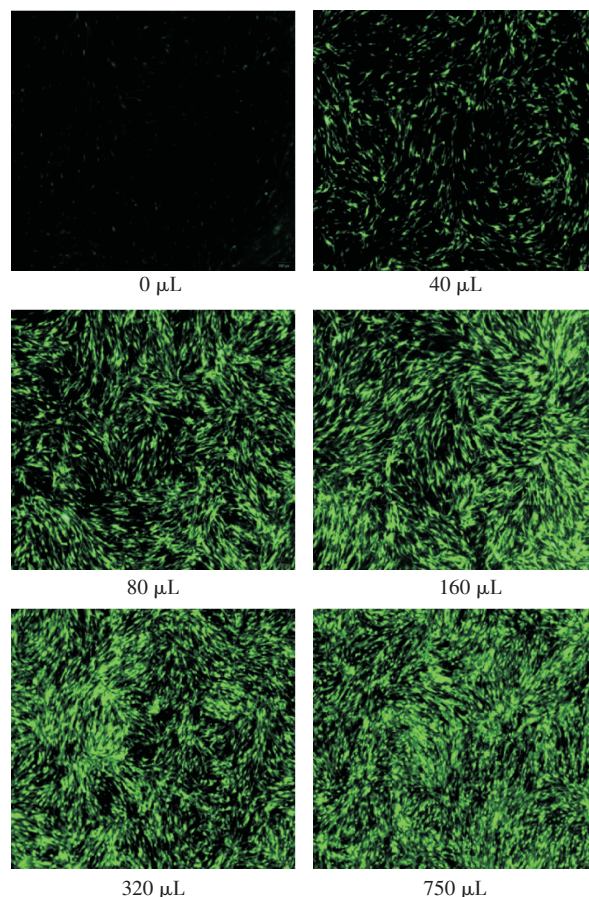


图 1 不同浓度的 Ad-AMPK-CA 在 C2C12 细胞中的表达

Fig 1 Expressions of Ad-AMPK-CA in different concentrations in C2C12 cells

2.2 感染不同时间后腺病毒在 C2C12 细胞中的表达 加入 80 μL 的腺病毒分别感染 C2C12 细胞 0、24、48、72 h。如图 2 所示,在 C2C12 细胞中,腺病毒均有表达,48 h 达高峰,72 h 后减弱。

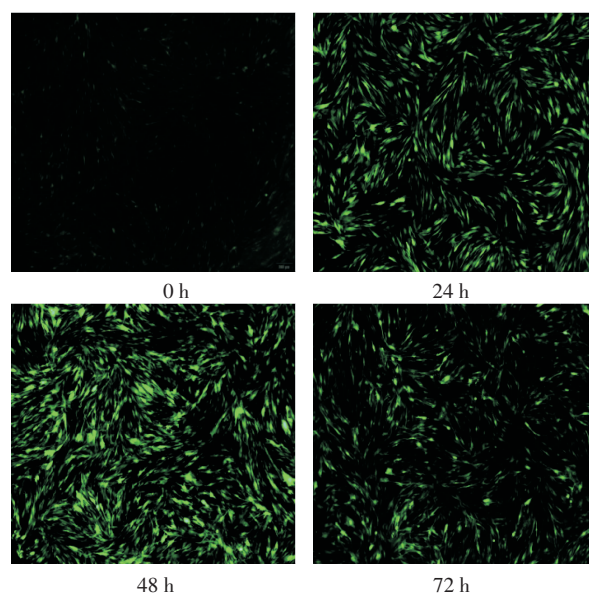
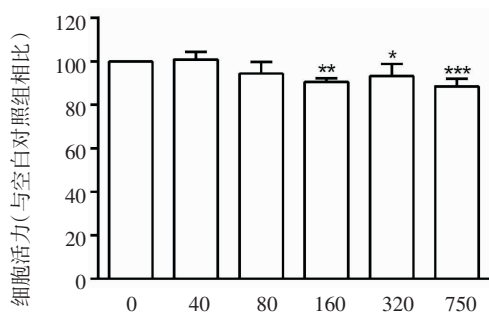


图 2 C2C12 感染 Ad-AMPK-CA 不同时间后在细胞内的表达

Fig 2 Expressions of Ad-AMPK-CA in different time after infection in C2C12 cells



2.3 MTS法检测腺病毒对C2C12细胞活性的影响 分别加入40、80、160、320、750  $\mu\text{L}$ 的腺病毒感染C2C12细胞48h。如图3所示,40、80、160、320、750  $\mu\text{L}$ 处理组的细胞存活率分别为对照组(0  $\mu\text{L}$ )的100.95%、94.23%、90.64% ( $P<0.01$ )、93.25% ( $P<0.05$ )、88.56% ( $P<0.001$ ),说明腺病毒在160、320、750  $\mu\text{L}$ 时对C2C12细胞具有明显的细胞毒性,而在低于80  $\mu\text{L}$ 时则未表现出细胞毒性,后续实验应用80  $\mu\text{L}$ 腺病毒感染细胞48h。

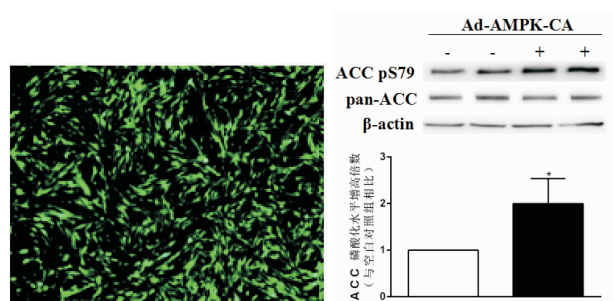


图中数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,40、80、160、320、750  $\mu\text{L}$ 处理组的细胞存活率分别为对照组的(100.95±3.46, 94.23±5.40, 90.64±1.74, 93.25±5.60, 88.56±3.94)倍。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.005$ ,  $***P<0.001$

图3 Ad-AMPK-CA对C2C12细胞生存率的影响

Fig 3 The effect of Ad-AMPK-CA on the viability of C2C12 cells

2.4 Western blot 检测 ACC S79 磷酸化 通过检测 AMPK 下游蛋白分子 ACC 的磷酸化明确 AMPK 的活性。如图4所示,80  $\mu\text{L}$  Ad-AMPK-CA 感染细胞48h后,感染效率约为90%,ACC磷酸化水平升至对照组的(1.99±0.31)倍( $*P<0.05$ ),表明腺病毒发挥作用。

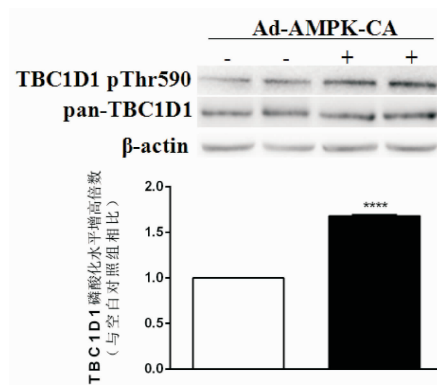


$*P<0.05$

图4 C2C12细胞ACC的磷酸化

Fig 4 Phosphorylation of ACC in C2C12 cells

2.5 Western blot 检测 TBC1D1 和 TBC1D4 的磷酸化 如图5所示,80  $\mu\text{L}$  Ad-AMPK-CA 感染48h后,TBC1D1 Thr590和TBC1D4 Ser318分别升至对照组的(1.68±0.01)倍和(1.71±0.11)倍,表明AMPK可以直接磷酸化这两个Rab-GAP。



$**P<0.01$ ,  $****P<0.0001$

图5 C2C12细胞TBC1D1和TBC1D4的磷酸化

Fig 5 Phosphorylation of TBC1D1 and TBC1D4 in C2C12 cells

### 3 讨论

AMPK是丝氨酸/苏氨酸激酶,其信号通路是治疗2型糖尿病的靶点<sup>[10-11]</sup>。AMPK包括 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 3种亚基, $\beta$ 和 $\gamma$ 亚基起调节作用, $\alpha$ 亚基起催化作用,主要代表AMPK的活性。 $\alpha$ 亚基又分为 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 两个亚型, $\alpha 1$ 亚型广泛表达, $\alpha 2$ 亚型高表达于肝脏、骨骼肌和心肌细胞中<sup>[12]</sup>。AMPK在不同组织中的调节方式不同,在骨骼肌等外周组织,AMPK激活后,通过增加葡萄糖摄取降低血糖;在肝组织中,激活的AMPK主要通过抑制肝脏葡萄糖的异生和脂质的合成,促进脂质氧化而降低血糖;在脂肪组织中激活AMPK减少脂质生成。总之,AMPK在上述不同的组织中均广泛表达,降低了机体中葡萄糖和脂肪酸水平,减少了脂质过度堆积,从而改善骨骼肌、脂肪和肝脏的胰岛素抵抗,提高胰岛素敏感性<sup>[13]</sup>。AMPK感受细胞能量的变化,细胞内AMP浓度升高激活AMPK,本实验通过检测AMPK下游信号分子ACC的磷酸化判断AMPK的活性。

小G蛋白Rab是一类GTP酶,有与GTP结合的活化形式和与GDP结合的失活形式,作用于特定细胞器使囊泡依次出芽、移动,然后与细胞膜融合等,调节囊泡内吞和外排。TBC1D1和TBC1D4是

Rab 的 GTP 酶激活蛋白,其主要功能为通过调节 Rab 的活性调节 GLUT4 囊泡向细胞膜的转位,调节骨骼肌细胞葡萄糖转运<sup>[7,9]</sup>。TBC1D1 和 TBC1D4 磷酸化水平升高,其 GAP 活性被抑制,相关的 Rabs 被解除抑制,从而促进 GLUT4 转位。TBC1D1 和 TBC1D4 有多个磷酸化位点。

胰岛素和运动是促进葡萄糖转运的两个重要生理因素<sup>[14]</sup>。TBC1D1 和 TBC1D4 受胰岛素调节,参与 GLUT4 转位。TBC1D4 Thr642、Ser341、Ser704 位点在运动和胰岛素作用下均能被磷酸化<sup>[15]</sup>。AMPK 是运动的信号分子,很多研究显示运动/骨骼肌收缩激活 AMPK 是引起 TBC1D4 磷酸化的重要中间信号分子<sup>[16-17]</sup>。小鼠离体骨骼肌收缩可导致 TBC1D4 Ser588、Ser591、Thr642 磷酸化水平升高<sup>[18]</sup>。有研究者提出,AMPK 可能是 TBC1D1 磷酸化的触发器,磷酸化的 TBC1D1 通过加强与 14-3-3 蛋白结合使 Rab-GAP 活性下降,从而导致 GLUT4 转位<sup>[9]</sup>。本研究发现,激活型 AMPK 直接磷酸化 TBC1D1 Thr590 和 TBC1D4 Ser318,提示 AMPK 是 TBC1D1 和 TBC1D4 的上游激酶,可调节 TBC1D1 Thr590 和 TBC1D4 Ser318。

综上所述,AMPK 是两个 Rab-GAP(TBC1D1 和 TBC1D4)的上游激酶,可直接磷酸化 TBC1D1 和 TBC1D4。

#### 参考文献:

- [1] Brøns C, Grønnet L G. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: skeletal muscle lipotoxicity in insulin resistance and type 2 diabetes: a causal mechanism or an innocent bystander[J]. *Eur J Endocrinol*, 2017, 176(2): R67
- [2] Krabbe K S, Nielsen A R, Krogh-Madsen R, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2007, 50(2): 431
- [3] 刘倩,胡芳,牛文彦.AMPK 腺病毒载体在小鼠骨骼肌中的表达和作用[J].*天津医科大学学报*, 2016, 22(1): 1
- [4] Onh M, Ms J S, Cj D J. AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(38): 16092
- [5] Peck G R, Chavez J A, Roach W G, et al. Insulin-stimulated phosphorylation of the Rab GTPase-activating protein TBC1D1 regulates GLUT4 translocation[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(44): 30016
- [6] Roach W G, Chavez J A, Miinea C P, et al. Substrate specificity and effect on GLUT4 translocation of the Rab GTPase-activating protein Tbc1d1[J]. *Biochem J*, 2007, 403(2): 353
- [7] Li Z, Yue Y, Hu F, et al. Electrical pulse stimulation induces GLUT4 glucose transporter translocation in C2C12 myotubes that depends on Rab8A, Rab13 and Rab14[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2017, [Epub ahead of print]
- [8] Chen S, Murphy J, Toth R, et al. Complementary regulation of TBC1D1 and AS160 by growth factors, insulin and AMPK activators[J]. *Biochem J*, 2008, 409(2): 449
- [9] 王倩,傅力.TBC1D1/4 在有氧运动促进骨骼肌细胞葡萄糖转运中的作用[J].*中国运动医学杂志*, 2016, 35(8): 770
- [10] Chen M B, Mcainch A J, Macaulay S L, et al. Impaired activation of AMP-kinase and fatty acid oxidation by globular adiponectin in cultured human skeletal muscle of obese type 2 diabetics[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(6): 3665
- [11] Brusq J M, Ancellin N, Grondin P, et al. Inhibition of lipid synthesis through activation of AMP kinase: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine[J]. *J Lipid Res*, 2006, 47(6): 1281
- [12] Niesler C U, Myburgh K H, Moore F. The changing AMPK expression profile in differentiating mouse skeletal muscle myoblast cells helps confer increasing resistance to apoptosis[J]. *Exp Physiol*, 2007, 92(1): 207
- [13] 周雯. 委陵菜黄酮衍生物抗糖尿病活性及其作用机制研究[Z]. 博士论文, 2013
- [14] Richter E A, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake[J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(3): 993
- [15] Kramer H F, Witzczak C A, Taylor E B, et al. AS160 regulates insulin- and contraction-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(42): 31478
- [16] Treebak J T, Glund S, Deshmukh A, et al. AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits[J]. *Diabetes*, 2006, 55(7): 2051
- [17] Cartee G D, Wojtaszewski J F. Role of Akt substrate of 160 kDa in insulin-stimulated and contraction-stimulated glucose transport[J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2007, 32(3): 557
- [18] Treebak J T, Taylor E B, Witzczak C A, et al. Identification of a novel phosphorylation site on TBC1D4 regulated by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 298(2): C377
- [19] Cartee G D, Funai K. Exercise and insulin: Convergence or divergence at AS160 and TBC1D1[J]. *Exerc Sport Sci Rev*, 2009, 37(4): 188

(2017-10-20 收稿)