

文章编号 1006-8147(2019)01-0001-04

论 著

短链脂肪酸对 C2C12 小鼠骨骼肌细胞 AMPK 的作用研究

吕晓婷¹, 洪宇桁², 牛文彦¹

(1.天津医科大学免疫学系, 天津 300070; 2.天津医科大学医学影像学院, 天津 300203)

摘要 目的:探讨短链脂肪酸对 C2C12 小鼠骨骼肌细胞 AMPK 的作用。方法:分别用不同浓度的乙酸钠、丙酸钠和丁酸钠孵育 C2C12 细胞 24 h, MTS 试验检测细胞活力, Western blot 检测 AMPK 磷酸化水平。结果:与对照组相比, 1 mmol/L 和 4 mmol/L 乙酸钠, 4 mmol/L 丙酸钠以及 4 mmol/L、8 mmol/L 和 16 mmol/L 丁酸钠升高 AMPK 磷酸化水平, 但不影响其总蛋白水平。结论:短链脂肪酸激活 C2C12 小鼠骨骼肌细胞 AMPK。

关键词 骨骼肌; 短链脂肪酸; AMPK

中图分类号 R392.1

文献标志码 A

Effect of short-chain fatty acids on AMPK in mouse C2C12 skeletal muscle cells

LV Xiao-ting¹, HONG Yu-heng², NIU Wen-yan¹

(1.Department of Immunology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.School of Medical Imaging, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of SCFAs on AMPK in mouse C2C12 skeletal muscle cells. **Methods:** C2C12 cells were incubated with different concentrations of sodium acetate, sodium propionate and sodium butyrate for 24 hours, respectively. The cell viability was measured by MTS assay. The phosphorylation of AMPK was detected by western blot. **Results:** Compared with the control group, the phosphorylation of AMPK increased under treatments with 1 mmol/L and 4 mmol/L sodium acetate, 4 mmol/L propionate and 4 mmol/L, 8 mmol/L, and 16 mmol/L butyrate, respectively. The total protein level of AMPK was not affected. **Conclusion:** SCFAs phosphorylate AMPK in mouse C2C12 skeletal muscle cells.

Key words skeletal muscle; SCFAs; AMPK

糖尿病是因胰岛素绝对或相对不足以及靶组织细胞对胰岛素敏感性降低引起的代谢综合征, 高血糖为其主要标志^[1]。骨骼肌是机体摄取餐后葡萄糖的主要器官, 摄取 80% 餐后升高的血糖, 对维持血糖稳态发挥重要作用。运动时骨骼肌收缩, 促进葡萄糖摄取, 增加胰岛素敏感性, 改善胰岛素抵抗, 是预防和治疗 2 型糖尿病的有效方式^[2]。单磷酸腺苷激活蛋白激酶 (Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 是由一个催化亚基 (α) 和两个调节亚基 (β , γ) 组成的异三聚体酶, 是细胞能量感受器^[3-5]。运动时肌肉收缩消耗能量, 激活骨骼肌 AMPK, 进而调节能量代谢^[6]。近年来, 肠道菌群在肥胖、2 型糖尿病和非酒精性脂肪肝等代谢疾病中的作用成为研究热点, 已证实肠道菌群可通

过调节机体的能量代谢影响 2 型糖尿病的发生发展^[6]。有报道产丁酸菌对胰岛素抵抗具有改善作用, 短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFAs) 是肠道产丁酸菌的代谢终产物, 其中乙酸、丙酸和丁酸占 95%, 短链脂肪酸在维持肠道水电解质平衡、调节肠道的菌群平衡、改善肠道功能、抗肿瘤和调控基因等方面发挥重要作用^[7]。生理情况下, 短链脂肪酸经乙状结肠和直肠吸收, 经下腔静脉到达全身循环, 作用于外周组织。短链脂肪酸也有改善机体葡萄糖稳态和胰岛素敏感性的作用, 有助于预防肥胖及相关代谢疾病的发生, 但其对骨骼肌糖代谢的作用机制仍需探究^[7]。已有文献支持乙酸钠 (NaAce)、丙酸钠 (NaPro) 和丁酸钠 (NaBut) 作用于 C2C12 小鼠骨骼肌细胞^[8], 因此本研究分别应用乙酸钠、丙酸钠和丁酸钠孵育 C2C12 小鼠骨骼肌细胞, 探讨短链脂肪酸对 C2C12 小鼠骨骼肌细胞 AMPK 的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料 小鼠骨骼肌细胞株 C2C12 (美国 ATCC 公司), DMEM 培养基 (美国 GIBCO 公司),

基金项目 国家自然科学基金面上项目 (81670731); 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 吕晓婷 (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。

MTS 试剂盒 (美国 Promega 公司), 牛血清白蛋白 (中国鼎国生物技术公司), 抗磷酸化 AMPK 抗体 (美国 CST 公司), 抗 β -actin 抗体 (中国 Absin 公司), 偶联 HRP 的山羊抗兔抗体 (美国 Jackson Immuno Research 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 C2C12 细胞用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 高糖培养基接种于板中, 在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞密度到 80% 时, 用 10% FBS DMEM 高糖培养基分别配置 1 mmol/L, 2 mmol/L, 4 mmol/L, 8 mmol/L, 16 mmol/L 的乙酸钠、丙酸钠和丁酸钠, 孵育 C2C12 细胞 24 h。

1.2.2 MTS 实验 分别用 0 mmol/L, 1 mmol/L, 2 mmol/L, 4 mmol/L, 8 mmol/L, 16 mmol/L 的乙酸钠、丙酸钠和丁酸钠孵育 C2C12 细胞 24 h, MTS 法检测细胞生存率。

1.2.3 Western blot 配置 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂 Na₃VO₄ 1 mmol/L, NaF 0.5 mmol/L, PIC 1 μ mol/L 和 PMSF 200 μ mol/L)。弃去细胞上清液, 用冷 1×PBS 缓冲液洗两次, 用细头吸管吸净, 加入 RIPA 裂解液, 置于冰上 20 min, 并收集。预冷离心机至 4 °C, 13 000 r/min, 离心 20 min, 取上清。将 5×LSB 缓冲液与上清液按 1:4 的比例混匀, 金属浴 100 °C 煮 10 min。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品, 转到 PVDF 膜上, 用 3% 牛血清白蛋白封闭 2 h, 孵育一抗 4 °C 过夜, 二抗使用偶联辣根过氧化物酶 HRP 的山羊抗兔 IgG 孵育 2 h, 条带用 ECL 发光液孵育并用曝光机检测。 β -actin 为内参, Image J 软件定量分析。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism6 统计软件进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 实验数据均以 mean \pm SEM 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的乙酸钠、丙酸钠和丁酸钠对 C2C12 细胞活力的影响 分别用不同浓度的乙酸钠、丙酸钠和丁酸钠孵育 C2C12 细胞 24 h。如图 1 所示, 1 mmol/L, 2 mmol/L, 4 mmol/L, 8 mmol/L, 16 mmol/L 的乙酸钠处理后细胞存活率分别为对照组的 100.73% \pm 0.07、98.76% \pm 0.03、101.12% \pm 0.05、107.15% \pm 0.05 和 103.11% \pm 0.08 倍, 与对照组相比均无统计学差异, 说明乙酸钠在浓度为 1 mmol/L, 2 mmol/L, 4 mmol/L, 8 mmol/L 和 16 mmol/L 时对 C2C12 细胞没有细胞毒性; 1 mmol/L, 2 mmol/L, 4 mmol/L, 8 mmol/L, 16 mmol/L 的丙酸钠处理后细胞存活率分别为对照组的 102.88% \pm 0.03、104.13% \pm 0.02、102.71% \pm 0.06、99.55% \pm 0.02 和 101.23% \pm 0.02 倍, 与对照组相比均无统计学差异,

说明丙酸钠在浓度为 1 mmol/L, 2 mmol/L, 4 mmol/L, 8 mmol/L 和 16 mmol/L 时对 C2C12 细胞没有细胞毒性; 1 mmol/L, 2 mmol/L, 4 mmol/L, 8 mmol/L, 16 mmol/L 的丁酸钠处理后细胞存活率分别为对照组的 104.05% \pm 0.05、102.18% \pm 0.02、101.91% \pm 0.05、106.60% \pm 0.03 和 95.38% \pm 0.03 倍, 与对照组相比均无统计学差异, 说明丁酸钠在浓度为 1 mmol/L, 2 mmol/L, 4 mmol/L, 8 mmol/L 和 16 mmol/L 时对 C2C12 细胞没有细胞毒性, 均可用于后续实验。

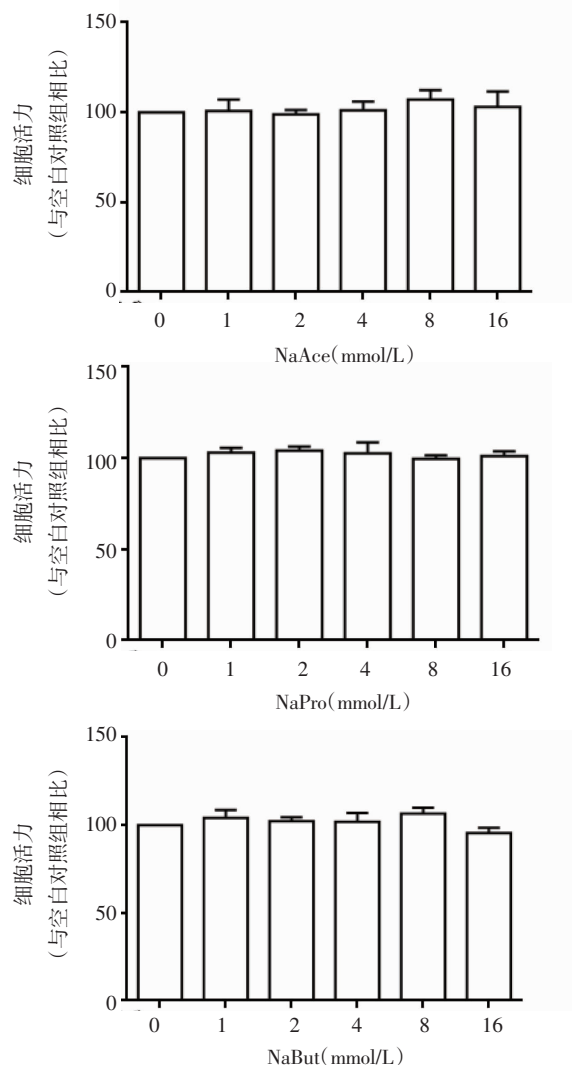
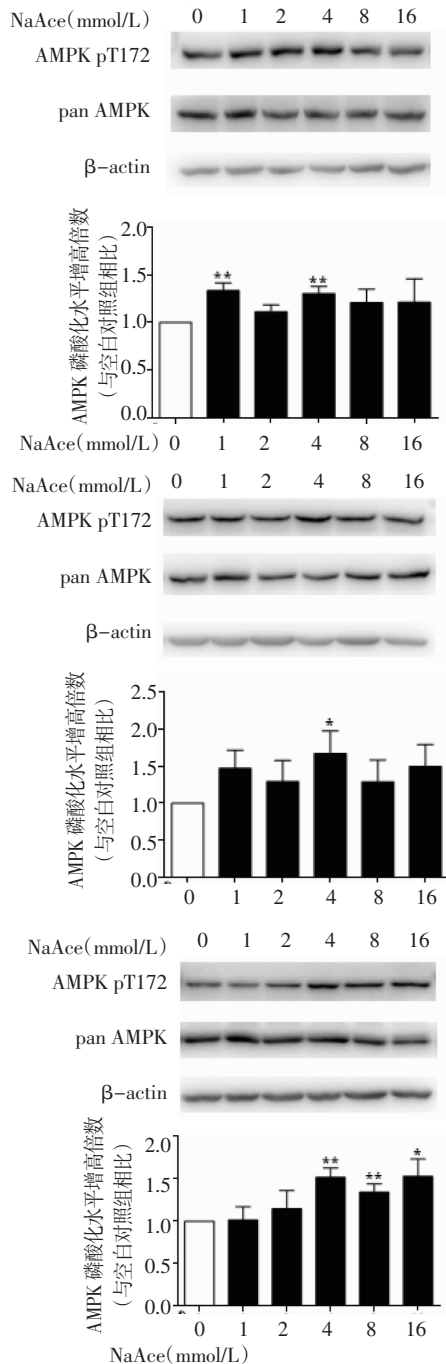


图 1 不同浓度的乙酸钠、丙酸钠和丁酸钠对 C2C12 细胞生存率的影响

Fig 1 Effects of different concentrations of sodium acetate, sodium propionate and sodium butyrate on the viability of C2C12 cells

2.2 乙酸钠、丙酸钠和丁酸钠对 AMPK 的影响 用不同浓度 (0 mmol/L, 1 mmol/L, 2 mmol/L, 4 mmol/L, 8 mmol/L, 16 mmol/L) 的乙酸钠、丙酸钠和丁酸钠分别孵育 C2C12 细胞 24 h, Western blot 检测 AMPK 磷酸化和总蛋白。以横坐标为乙酸钠、丙酸钠和丁酸钠的浓度, 以纵坐标为 pAMPK/ β -actin 的比值, 如图 2 所示, 与对照组相比, 1 mmol/L 和 4 mmol/L 乙

酸钠孵育后,AMPK 磷酸化水平分别是对照组的 1.34 ± 0.08 倍 ($P < 0.01$) 和 1.30 ± 0.08 倍 ($P < 0.01$), AMPK 总蛋白没有变化;4 mmol/L 丙酸钠孵育后, AMPK 磷酸化水平是对照组的 1.68 ± 0.30 倍 ($P < 0.05$), AMPK 总蛋白没有变化;4 mmol/L, 8 mmol/L 和 16 mmol/L 丁酸钠孵育后,AMPK 磷酸化水平分别是对照组的 1.52 ± 0.11 倍 ($P < 0.01$)、 1.34 ± 0.10 倍 ($P < 0.01$) 和 1.53 ± 0.20 倍 ($P < 0.05$),AMPK 总蛋白没有变化,提示乙酸钠、丙酸钠和丁酸钠均激活 AMPK 且不影响 AMPK 总蛋白。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 2 C2C12 细胞中 AMPK pT172 的磷酸化水平

Fig 2 The phosphorylation of AMPK pT172 in C2C12 cells

3 讨论

AMPK 是机体维持代谢平衡所需分子,其活化在糖脂代谢方面发挥重要作用^[9]。AMPK 在真核生物中普遍表达,其 α 亚基起催化作用,主要代表 AMPK 的活性, β 和 γ 亚基在维持三聚体稳定性和作用底物特异性方面起重要作用,每个亚单位都存在 2~3 种基因所编码的异构体($\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2, \gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$)^[10]。 α 亚单位中的 8 个位点(苏氨酸 172、苏氨酸 258 和丝氨酸 485 等)均可被磷酸化,其中苏氨酸 172 位点的磷酸化对 AMPK 活性起重要作用,该位点的磷酸化提示 AMPK 的活化。AMPK 活性主要受细胞中 AMP/ATP 比值的调节,生理情况下,为了维持基本的代谢需要,细胞中维持着高浓度的 ATP 水平,运动时肌肉收缩,骨骼肌能量消耗增加可达 100 倍,ATP 转化为 AMP,AMP/ATP 比值升高,AMPK 被激活,促进葡萄糖转运^[4, 11-12]。

肠道菌群寄居于人胃肠道内,它们能抵御感染和降低自体免疫疾病的患病风险,还能影响体重和消化能力^[13]。将健康人的肠道微生物群转移到代谢综合征患者肠道内可提高代谢综合征患者的胰岛素敏感性^[7]。丁酸菌等肠道微生物群发酵食物时由于缺乏合适的酶而不完全水解,产生短链脂肪酸,进入体循环直接影响外周组织的代谢和功能^[14-15]。在肥胖小鼠中,补充丁酸盐可增加胰岛素敏感性并减轻体质量,可见短链脂肪酸在糖尿病等代谢疾病中发挥作用^[16]。在肝细胞和脂肪细胞中,乙酸钠、丙酸钠和丁酸钠通过激活 AMPK 防止高脂饮食诱导的肥胖^[8]。本研究发现,在小鼠骨骼肌细胞中,乙酸钠、丙酸钠和丁酸钠均激活 AMPK,提示短链脂肪酸可通过 AMPK 信号通路促进骨骼肌葡萄糖摄取。有文献报道,GPR41(G 蛋白偶联受体 41)和 GPR43(G 蛋白偶联受体 43)是短链脂肪酸的受体,分布于骨骼肌和肝脏等器官中,短链脂肪酸可能通过 GPR41/GPR43 介导的机制增加骨骼肌葡萄糖摄取^[7]。有研究指出,丁酸改善大鼠骨骼肌线粒体功能,促进 PGC-1 α (过氧化物酶体增殖物激活受体 C 辅助激活因子-1 α)的表达,在能量代谢中发挥作用^[17],而增加 PGC-1 α 的表达可激活小鼠骨骼肌 AMPK,推测丁酸可能通过 PGC-1 α 途径激活 AMPK^[17]。

综上所述,笔者发现短链脂肪酸磷酸化小鼠骨骼肌细胞 AMPK,有助于进一步研究其改善胰岛素抵抗的详细机制,以及通过调节肠道菌群改善胰岛素抵抗。

参考文献:

- [1] Kasangana P B, Nachar A, Eid H M, et al. Root bark extracts of Myri-

- anthus arboreus P. Beauv. (Cecropiaceae) exhibit anti-diabetic potential by modulating hepatocyte glucose homeostasis[J]. J ethnopharmacol, 2018, 211:117
- [2] Bryan K, McGivney B A, Farries G, et al. Equine skeletal muscle adaptations to exercise and training: evidence of differential regulation of autophagosomal and mitochondrial components [J]. BMC genomics, 2017, 18(1): 595
- [3] 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
- [4] Friedrichsen M, Mortensen B, Pehmoller C, et al. Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: role in glucose uptake and insulin sensitivity [J]. Mol cell endocrinol, 2013, 366(2): 204
- [5] Xie W, Wang L, Dai Q, et al. Activation of AMPK restricts coxsackievirus B3 replication by inhibiting lipid accumulation [J]. J mol cell cardiol, 2015, 85:155
- [6] Maruvada P, Leone V, Kaplan L M, et al. The human microbiome and obesity: moving beyond associations[J]. Cell Host Microbe, 2017, 22(5): 589
- [7] Canfora E E, Jocken J W, Blaak E E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity[J]. Nat rev Endocrinol, 2015, 11(10): 577
- [8] den Besten G, Bleeker A, Gerding A, et al. Short-Chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a PPARgamma-dependent switch from lipogenesis to fat oxidation[J]. Diabetes, 2015, 64(7): 2398
- [9] Zhang B B, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome[J]. Cell metab, 2009, 9(5): 407
- [10] 廖健文, 岳莹莹, 牛文彦. AMPK 对 Rab-GAP 的调节作用研究 [J]. 天津医科大学学报, 2018, 24(2): 97
- [11] Hardie D G. AMPK-sensing energy while talking to other signaling pathways[J]. Cell metab, 2014, 20(6): 939
- [12] Lantier L, Fentz J, Mounier R, et al. AMPK controls exercise endurance, mitochondrial oxidative capacity, and skeletal muscle integrity[J]. FASEB J, 2014, 28(7): 3211
- [13] Lin Y H, Chen Y, Smith T C 2nd, et al. Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) alter metabolic and virulence attributes of *Borrelia burgdorferi*[J]. Infect immun, 2018, 86(9): pii: e00217-18. doi: 10.1128/IAI.00217-18. Print 2018 Sep
- [14] Andersson U, Branning C, Ahrne S, et al. Probiotics lower plasma glucose in the high-fat fed C57BL/6J mouse[J]. Benef microbes, 2010, 1(2): 189
- [15] Membrez M, Blancher F, Jaquet M, et al. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice[J]. FASEB J, 2008, 22(7): 2416
- [16] Gao Z, Yin J, Zhang J, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice[J]. Diabetes, 2009, 58(7): 1509
- [17] Palacios-Gonzalez B, Zarain-Herzberg A, Flores-Galicia I, et al. Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1841(1): 132

(2018-06-28 收稿)

欢迎投稿 欢迎订阅