

AICAR 和二甲双胍对产蛋鸡肝细胞 AMPK 活性及脂质代谢的影响

陈晓春, 陈代文*, 张克英, 张金伟

(四川农业大学动物营养研究所, 雅安 625014)

摘要: 以产蛋鸡肝细胞为材料, 研究添加腺苷一磷酸激活的蛋白激酶(AMPK)激活剂 AICAR 和治疗二型糖尿病药物——二甲双胍对产蛋鸡肝细胞 AMPK、 β -羟基- β -甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(HMGR)、乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)和细胞脂质代谢的影响。试验分 4 个处理: 基础培养液组(对照组)、基础培养液组中分别加入 0.5 mmol/L AICAR、0.5 mmol/L 二甲双胍、1 mmol/L 二甲双胍。结果表明, 肝细胞培养 100 min 时, AICAR 和二甲双胍均可激活 AMPK($P < 0.05$), 且二甲双胍激活 AMPK 具有一定的浓度依赖性; AICAR 和二甲双胍均可不同程度抑制脂肪酸和胆固醇合成的关键酶 ACC 和 HMGR 的活性, AMPK 活性与 HMGR、ACC 活性呈一定的负相关; 添加 AICAR 和二甲双胍抑制产蛋鸡肝细胞甘油三酯和胆固醇合成, AMPK 活性与肝细胞甘油三酯和总胆固醇含量也呈一定的负相关。因此, 可通过调控产蛋鸡肝脏 AMPK 活性变化从而调节产蛋鸡脂肪和胆固醇的合成。

关键词: 产蛋鸡; 肝细胞; AMPK; AICAR; 二甲双胍

中图分类号: S831.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)08-0769-05

Effects of AICAR and Metformin on AMPK Activity and Lipid Metabolism in Laying Hens' Primary Cultured Hepatocytes

CHEN Xiao-chun, CHEN Dai-wen*, ZHANG Ke-ying, ZHANG Jin-wei

(Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The effects of 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside (AICAR) and the antidiabetic drug metformin on AMP-activated protein kinase (AMPK) activity and its downstream effector, acetyl-CoA carboxylase (ACC), β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) activities in laying hens' primary cultured hepatocytes were studied. Four treatments were employed in this experiment. AICAR (0.5 mmol/L), metformin (0.5 mmol/L), and metformin (1 mmol/L) were added respectively into the standard culture medium (control). At 100 min after incubation, AICAR or metformin activated AMPK significantly ($P < 0.05$), inactivated ACC and HMGR which are the major enzymes involved in fatty acid and cholesterol biosyntheses. AMPK regulated ACC and HMGR activities negatively. AICAR or metformin decreased hepatic lipid and cholesterol contents by activating AMPK. AMPK negatively regulated hepatic lipid and cholesterol contents. These findings suggest that the regulation of hepatic lipid and the cholesterol metabolism of primary hepatocytes in laying hens can be mediated by AMPK.

Key words: laying hen; hepatocyte; AMP-activated protein kinase (AMPK); 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside (AICAR); metformin

收稿日期: 2005-09-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371047)

作者简介: 陈晓春(1973-), 女, 四川平武人, 博士生, 主要从事动物营养与分子生物学研究; E-mail: chenxiaochun163@163.com

* 通讯作者: 陈代文, 教授, 博士生导师

产蛋鸡脂类代谢不仅影响产蛋鸡的生产性能和鸡蛋品质,而且与人的健康密切相关,人体摄入过量的胆固醇易引起动脉粥样硬化和冠心病。商品鸡蛋胆固醇含量高已成为限制鸡蛋消费的主要因素之一。产蛋鸡体内脂类代谢特点和寻求降低鸡蛋胆固醇含量的方法一直是营养学研究的重要内容。近年来研究发现,一种由腺苷一磷酸(AMP)激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)在能量代谢,特别是在脂肪代谢中起了重要作用:影响乙酰辅酶A羧化酶(ACC)与脂肪酸合成^[1];影响 β -羟基- β -甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶(HMGR)与胆固醇合成^[2];影响甘油磷酸脂酰转移酶(GPAT)与甘油三酯合成,促进脂肪酸氧化^[3,4]。目前对AMPK的研究主要集中在大鼠和小鼠等试验动物上,常以其肝细胞为主要研究对象。家禽的脂肪代谢不同于哺乳动物,肝脏是家禽脂肪合成的主要场所,约占脂肪合成量的90%以上。肝脏合成的甘油三酯和胆固醇,以载脂蛋白为载体,组装形成脂蛋白后,分泌进入血液,然后转运到肝外组织。现已发现,在应激条件下蛋鸡肝脏AMPK活性升高^[5]。但有关AMPK活性变化与产蛋鸡脂质代谢的研究尚未见报道。

本研究以产蛋鸡肝细胞为材料,研究添加AMPK专一激活剂5-氨基-4-咪唑羧基酰胺核苷(5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside, AICAR)和治疗二型糖尿病的药物——二甲双胍(metformin)对产蛋鸡肝细胞AMPK活性和细胞脂质代谢的影响,为深入研究AMPK与产蛋鸡脂质代谢的关系和实现营养调控鸡蛋胆固醇含量提供一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验选用210日龄健康的新罗曼产蛋鸡肝细胞为材料。AICAR、二甲双胍购于Sigma公司。

1.2 试验设计

采用单因子设计,分为4处理,基础培养液组(对照组)、基础培养液组中分别加入0.5 mmol/L AICAR、0.5 mmol/L 二甲双胍、1 mmol/L 二甲双胍。

1.3 主要试剂

[³²P]ATP、[³⁻¹⁴C]HMG-CoA 购于 Amersham 公司; Carnitine、L-Glutamine、L-Carnitine、Dexamethasone、Insulin、Aprotinin、Leupeptin、An-

titrypsin、Sodium Oleate 等购于 Sigma 公司; DMEM、FBS 购于 HyClone 公司; collagenase(II) 购于 Amersco 公司; D-mannitol、Tris-HCl、EDTA、 β -mercaptoethanol、penicillin-streptomycin 等其他试剂为进口分装或国产分析纯试剂。

1.4 方法

1.4.1 肝细胞分离和培养 采用简化 Seglen 二步胶原酶灌注法分离肝细胞。分别用 37 °C 水浴预热的前灌注液和胶原酶灌注液灌注 15 min 和 10 min, 灌注速度保持在 30~40 mL/min。将消化好的肝细胞,制成肝细胞悬浮液备用,计数并检测成活率。将细胞按 2.1×10^6 /mL 接种于 50 mL 三角瓶中,每瓶 10 mL,于 37 °C 悬浮培养,60~62 r/min。基础培养液为低糖型 DMEM,另含 10% FBS、10 mmol/L HEPES、24 mmol/L NaHCO₃、4 mmol/L L-Glutamine、1.0 mmol/L L-Carnitine、100 U/mL Penicillin、100 μ g/mL Streptomycin、100 nmol/L Dexamethasone、100 nmol/L Insulin、0.1 mmol/L BSA (essential fatty-acid-free)、0.4 mmol/L Sodium Oleate。处理组分别加入 AICAR 和二甲双胍。

1.4.2 检测指标和方法 每个处理 12 瓶,依次计时,待每个处理培养完成后分别计数和观察细胞形态及成活率,其中:取 4 瓶在 4 °C、50 \times g 离心 5 min,收集上清液,细胞用 4 mL AMPK 样品缓冲液悬浮后,于 -70 °C 保存用于 AMPK、ACC 的分离测定;取 4 瓶在 4 °C、50 \times g 离心 5 min,收集上清液,细胞用 4 mL HMGR 样品缓冲液悬浮后,于 -70 °C 保存,用于 HMGR 的分离测定;最后 4 瓶将培养液和细胞的混合物经 1 min 间断超声波破碎后分装, -20 °C 保存,测定甘油三酯(TG)和总胆固醇(TC)。

采用试剂盒方法测定各处理组的培养液中的谷丙转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH-L)、尿酸(UA),试剂盒购于四川迈克科技有限责任公司,分析仪器为日立 7020 型自动生化分析仪。

AMPK 活性测定方法为:加 10 μ L AMPK 反应缓冲液,底物 SAMS 肽液 10 μ L,及 γ -³²P ATP 混合液 10 μ L,30 °C 恒温水浴锅中预热 5 min,加 10 μ L AMPK 酶液于 30 °C 反应 15 min。反应结束时,迅速取 35 μ L 反应液滴加在 1 cm² 磷酸纤维离子交换滤纸(Whatman P81),晾干后放入 500 mL 0.5% 磷酸中振荡,用磷酸洗液洗 4 次(5 min/次),再用 200 mL 丙酮洗涤一次,风干后放入闪烁瓶,加入 5 mL 闪烁液立刻用 PACKARD TRI-CARB 2000CA

型液闪计数器测定。AMPK 活性单位为 1 个单位酶活在 30 ℃ 条件下, 每分钟将 1 nmol 磷催化转入 SAMS 的酶量。

ACC 活性测定: 方法参见 Carlson 和 Winder^[1], 即反应液终体积 200 μL , 含 10 mmol/L 柠檬酸、50 mmol/L HEPES, pH 7.5 1.5 mmol/L MgSO_4 、2 mmol/L 二硫苏糖醇、0.125 mmol/L acetyl-CoA、4mmol/L ATP、12.5 mmol/L KHCO_3 、2 μCi H^{14}C O_3 和 0.75 mg/mL fatty acid-free bovine serum albumin 及 40 μL ACC 酶液。于 37 ℃ 条件下反应 10 min。反应结束时, 立即加入 50 μL 5 mol/L HCl 终止反应。反应产物 2 000 \times g 离心 15 min, 取 150 μL 上清液用滤纸吸附, 将滤纸放入闪烁瓶中, 加 5 mL 闪烁液, 摇匀后静置过夜, 用 PACKARD TRI-CARB 2000CA 型液闪计数器计数。AAC 的活性单位为 1 个单位酶活在 37 ℃ 条件下每分钟将 1 nmol ^{14}C 整合进入丙二酸单酰辅酶 A 的酶量。

HMGR 活性测定: 取 0.2 mL 制备的酶蛋白, 加入 0.2 mL 反应缓冲液, 总体积为 0.4 mL。缓冲液主要成分为 25 mmol/L 葡萄糖-6-磷酸, 0.174 U 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 70 mmol/L NaCl, 3 mmol/L NADP, 15 mmol/L 二硫苏糖醇, 0.2 mg 胰蛋白酶抑制剂, 0.04 mol/L KH_2PO_4 , 0.05 mol/L KCl, 0.25 mol/L 蔗糖, 50 mmol/L KF, 0.03 mol/L EDTA, pH7.2。混合液于 37 ℃ 水浴振荡 10 min, 随后加入 0.1 μCi ^{14}C HMG-CoA, 反应 30 min, 立即加入 0.06 mL 浓盐酸终止反应。空白组一开始(0 min)就终止反应, 反应液加入 2 mg 甲羟戊酸

内酯作为内标继续振荡 30 min。结束后冷却到室温, 在反应液中加入 0.5 g 无水 Na_2SO_4 , 摇匀, 加入 0.5 mL 乙醚萃取, 反复两次, 取有机层用氮气吹干, 残余溶解在丙酮中, 硅胶 G 薄层层析板上展开, 展开剂为苯-丙酮(1V/1V)。风干后用 DCF 显色剂显色, 并在紫外线下确定甲羟戊酸所对应的区域, 用刮棒刮下对应区域放入闪烁瓶, 用 Beckman 闪烁计数器检测放射性。HMGR 的活性单位为在 37 ℃ 条件下每 mg 微粒体蛋白每分钟形成 1 pmol 甲羟戊酸为 1 个活性单位。

1.5 数据处理和统计分析

结果用平均数 \pm SE 表示, 采用 SPSS 软件(11.0)对数据进行方差分析, 并用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果

2.1 细胞分离和培养

采用改良 Seglen 半原位两步胶原酶灌注法, 分离蛋鸡肝细胞, 分离到肝细胞总数 2.0×10^9 , 台盼蓝拒染检测表明, 蛋鸡肝细胞存活率达 89.7%, 培养结束时各组成活率也均在 89% 以上。

不同处理对细胞生化参数的影响见表 1。细胞培养液中加入 AICAR 和二甲双胍对蛋鸡肝细胞培养液中 ALT、LDH 无显著影响, ALT 和 LDH 是反应细胞完整性和功能的重要参数, 同时尿酸合成是家禽细胞活率的一个敏感指标, 从试验结果可见, 各组间差异不显著($P > 0.05$), 说明不同处理对细胞活率、完整性及其功能无不良影响。

表 1 AICAR 和二甲双胍对肝细胞培养液生化参数的影响

Table 1 Effect of AICAR and metformin on biochemical parameters in culture medium of hepatocytes (n=4)

处理 Treatment	对照 Control	0.5 mmol/L AICAR	0.5 mmol/L 二甲双胍 0.5 mmol/L metformin	1.0 mmol/L 二甲双胍 1.0 mmol/L metformin
谷丙转氨酶 ALT/(U/L)	7.75 \pm 0.63	7.75 \pm 1.80	8.00 \pm 0.41	8.25 \pm 1.60
乳酸脱氢酶 LDH-L/(U/L)	136.75 \pm 6.07	143.25 \pm 9.66	141.75 \pm 10.60	148.50 \pm 16.21
尿酸 UA/(mmol/L)	91.50 \pm 3.28	94.75 \pm 5.92	94.25 \pm 2.02	95.25 \pm 3.04

2.2 AICAR 和二甲双胍对产蛋鸡肝细胞 AMPK 活性的影响

细胞培养液中加入 AICAR 和二甲双胍均可激活 AMPK 活性, 见表 2。100 min 时 AICAR 组 AMPK 活性为 3.362 nmol/(g \cdot min), 为对照

1.375 nmol/(g \cdot min) 的 2.445 倍($P < 0.01$)。不同浓度的二甲双胍均可激活 AMPK, 二甲双胍对 AMPK 的激活作用较 AICAR 弱, 0.5 mmol/L 的二甲双胍组 AMPK 活性为 1.889 nmol/(g \cdot min), 较对照组提高 37.4% ($P < 0.05$); 而 1 mmol/L 的

二甲双胍组 AMPK 活性为对照组的 1.99 倍 ($P < 0.01$), 表明二甲双胍激活 AMPK 具有一定的浓度依赖性。

2.3 AICAR 和二甲双胍对产蛋鸡肝细胞 ACC、HMGR 活性的影响

细胞培养液中加入 AICAR 和二甲双胍均可不同程度抑制 ACC、HMGR 活性, 见表 2。100 min

时 AICAR 组 ACC 活性降低为对照的 26% ($P < 0.01$), HMGR 活性降低为对照的 80.9% ($P < 0.05$)。二甲双胍组 HMGR 和 ACC 的酶活均降低, 0.5 mmol/L 的二甲双胍组 HMGR 降低 5.76% ($P > 0.05$), ACC 降低 23.3% ($P > 0.05$); 1.0 mmol/L 的二甲双胍组 HMGR 降低 20.8% ($P < 0.05$), ACC 降低 58.1% ($P < 0.01$)。

表 2 AICAR 和二甲双胍对产蛋鸡肝细胞 AMPK、ACC 和 HMGR 活性的影响

Table 2 Effects of AICAR and metformin on AMPK, ACC, HMGR activities in laying hens' cultured hepatocytes (n=4)

处理 Treatment	HMGR / pmol/(mg · min)	ACC / nmol/(g · min)	AMPK / nmol/(g · min)
对照 Control	1 030.0 ± 45.9 ^a	101.3 ± 13.5 ^a	1.375 ± 0.094 ^a
0.5 mmol/L AICAR	833.7 ± 62.0 ^b	26.3 ± 1.4 ^b	3.362 ± 0.223 ^d
0.5 mmol/L 二甲双胍 0.5 mmol/L metformin	970.7 ± 135.2 ^a	77.6 ± 12.4 ^a	1.889 ± 0.177 ^b
1.0 mmol/L 二甲双胍 1.0 mmol/L metformin	815.5 ± 65.5 ^b	42.5 ± 5.0 ^b	2.739 ± 0.06 ^c

同列肩注字母不同者差异显著 ($P < 0.05$)。下同

Data with different letters in the same column differ significantly ($P < 0.05$), the same as below

2.4 AICAR 和二甲双胍对产蛋鸡肝细胞脂质代谢的影响

添加 AICAR 和二甲双胍抑制产蛋鸡肝细胞脂质合成, 见表 3。AICAR 组甘油三酯合成较对照组减少 31.5% ($P < 0.05$), 0.5 mmol/L 的二甲双胍组甘油三酯合成较对照组减少 16.2% ($P > 0.05$), 1.0 mmol/L 的二甲双胍组甘油三酯合成较对照组减少 23.4% ($P < 0.05$)。

AICAR 组胆固醇合成较对照组减少 54.3% (P

< 0.01), 0.5 mmol/L 的二甲双胍组胆固醇合成较对照组减少 26.1% ($P < 0.05$), 1.0 mmol/L 的二甲双胍组胆固醇合成较对照组减少 28.3% ($P < 0.05$)。

2.5 AMPK 活性与细胞甘油三酯和总胆固醇合成量的相关分析

AMPK 活性与 ACC、HMGR 活性呈一定的负相关, 与细胞甘油三酯和总胆固醇含量也呈一定的负相关, 见表 4、5。

表 3 AICAR 和二甲双胍对产蛋鸡肝细胞甘油三酯和胆固醇合成的影响

Table 3 Effects of AICAR and metformin on triacylglycerol and cholesterol in laying hens' cultured hepatocytes (n=4)

处理 Treatment	对照 Control	0.5 mmol/L AICAR	0.5 mmol/L 二甲双胍 0.5 mmol/L metformin	1.0 mmol/L 二甲双胍 1.0 mmol/L metformin
TG	0.277 5 ± 0.011 1 ^b	0.190 0 ± 0.016 8 ^a	0.232 5 ± 0.017 ^{ab}	0.212 5 ± 0.036 4 ^a
TC	0.115 0 ± 0.002 9 ^c	0.052 5 ± 0.004 8 ^a	0.085 ± 0.006 ^b	0.082 5 ± 0.002 5 ^b

表 4 AMPK 与 ACC、HMGR 活性变化的相关性

Table 4 Correlation analysis between AMPK and ACC, HMGR (n=16)

	ACC		HMGR	
	相关系数 Coefficient	P 值 P value	相关系数 Coefficient	P 值 P value
AMPK	-0.696	0.01	-0.317	0.162

表 5 AMPK 与甘油三酯、胆固醇合成量的相关性

Table 5 Correlation analysis between AMPK and TG, TC (n=16)

	TG		TC	
	相关系数 Coefficient	P 值 P value	相关系数 Coefficient	P 值 P value
AMPK	-0.448	0.032	-0.493	0.017

3 讨 论

AMPK 是一类监控细胞能量变化的蛋白激酶级联系统的中心组分, AMPK 激活可使机体代谢方向朝着抑制耗能的合成代谢、促进产能的分解代谢方向进行。目前在实验动物研究中, AICAR 作为 AMPK 的特异性激活剂, 已被广泛用于 AMPK 的研究之中, 在细胞培养中, AICAR 浓度为 0.5 mmol/L, 作用时间 100 min 效果较好, 本试验也表明, 添加 AICAR 能使产蛋鸡肝细胞 AMPK 激活, 该现象已在大鼠和小鼠等哺乳动物大量的活体和离体试验中被证实^[7]。

最近研究发现, 二甲双胍有激活 AMPK 的作用, 而且效果显著, 认为二甲双胍是先通过激活 AMPK, 再通过 AMPK 抑制下游相关酶的活性来调节糖和脂肪的代谢。二甲双胍作用机制不同于 AICAR^[8,9], 在哺乳动物细胞研究中已证实, 二甲双胍也可作为 AMPK 的激活剂用于 AMPK 的研究。本试验表明二甲双胍可激活产蛋鸡肝细胞 AMPK, 且具一定的浓度依赖性, 与 Zhou 等^[10]在鼠上的研究一致, 说明在家禽中二甲双胍也可作为 AMPK 的激活剂用于 AMPK 的研究。

研究表明, AMPK 活性发生变化后会使得体内一系列参与脂质代谢的酶 (ACC、HMGR、FAS 等) 的活性或相关基因的表达发生改变, 从而影响脂质代谢的效率和方向。其中 HMGR 和 ACC 是 AMPK 的重要底物, HMGR 是胆固醇合成的限速酶, ACC 则是脂肪酸合成的限速酶。本试验也表明, AMPK 激活后对 ACC 的抑制作用大于 HMGR, 说明 HMGR 对 AMPK 的活性变化敏感性不如 ACC 高。AMPK 可能通过两种途径来抑制 HMGR 活性, 一种是直接磷酸化 HMGR; 另外一种则是通过抑制固醇调节元件结合蛋白 (SREBP) 活性, 降低 HMGR 的基因表达, 使 HMGR 合成量减少, 最终达到减少胆固醇合成的目的。产蛋鸡是否是通过上述两种途径或其它途径参与胆固醇的代谢有待进一步研究。

本试验表明, 通过 AICAR 和二甲双胍可激活产蛋鸡肝细胞 AMPK, 影响胆固醇和甘油三酯合成的相关酶 HMGR 和 ACC, 影响细胞胆固醇和甘油三酯的合成, 提示可通过调控产蛋鸡 AMPK 活性, 调节产蛋鸡胆固醇的合成。

参考文献:

- [1] Carlson C L, Winder W W. Liver AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase during and after exercise [J]. *J Appl Physiol*, 1999, 86: 669~674.
- [2] Henin N, Vincent M F, Gruber H E, *et al.* Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase [J]. *FASEB J*, 1995, 9: 541~546.
- [3] Park H, Kaushik V K, Constant S, *et al.* Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(36): 32 571~32 577.
- [4] Muoio D M, Seefeld K, Witters L A, *et al.* AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle; evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. [J]. *Biochem J*, 1999, 338: 783~791.
- [5] 秦玉辉. 蛋鸡体内 AMPK 酶活分布及应激对 AMPK 酶活影响研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2003.
- [6] Seglen P O. Preparation of isolated rat liver cells [J]. *Methods Cell Biol*, 1976, 13: 29~83.
- [7] Iglesias M A, Furler S M, Cooney G J, *et al.* AMP-activated protein kinase activation by AICAR increases both muscle fatty acid and glucose uptake in white muscle of insulin-resistant rats *in vivo* [J]. *Diabetes*, 2004, 53(7): 1 649~1 654.
- [8] Hawley S A, Gadalla A E, Olsen G S, *et al.* The anti-diabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism [J]. *Diabetes*, 2002, 51(8): 2 420~2 425.
- [9] Zou M H, Kirkpatrick S S, Davis B J, *et al.* Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin *in vivo*. Role of mitochondrial reactive nitrogen species [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(42): 43 940~43 951.
- [10] Zhou G R, Myers R, Li Y, *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(8): 1 167~1 174.