

肌肉生长抑制素前肽基因干预对高脂饮食诱导的肥胖小鼠脂代谢的影响

张莎莎 孟杰杰 沈桂芬 汪培华 汪道文 蒋建刚

【摘要】 目的 探讨肌肉生长抑制素前肽(MPRO)基因对高脂饮食诱导的肥胖小鼠脂代谢的影响及其分子机制。**方法** 60只雄性C57BL/6J小鼠按照随机数字表法分为4组(每组15只):正常对照组(NC组),高脂饮食组(HF组),高脂饮食+绿色荧光蛋白组(HF+GFP组)及高脂饮食+MPRO组(HF+MPRO组)。高脂饮食诱导肥胖小鼠模型,以重组腺相关病毒(rAAV)为载体介导MPRO基因或对照基因GFP在小鼠体内表达,观察并检测小鼠体重、皮下及内脏脂肪、血及肝脏甘油三酯水平的变化。Western印迹法检测肝脏AMP活化蛋白激酶 α (AMPK α)、乙酰辅酶A羧化酶(ACC)、肉碱棕榈酰基转移酶-1(CPT-1)的表达情况。**结果** HF组体重、皮下及内脏脂肪、血及肝脏甘油三酯水平较NC组显著升高($t=9.033\sim35.459$, P 均 <0.05),HF+MPRO组体重、皮下及内脏脂肪、血及肝脏甘油三酯水平较HF组显著降低($t=5.233\sim21.500$, P 均 <0.05)。Western印迹法显示HF组肝脏AMPK α 、ACC磷酸化水平及CPT-1的表达较NC组显著降低($t=16.630\sim23.671$, P 均 <0.05);HF+MPRO组肝脏AMPK α 、ACC磷酸化水平、CPT-1的表达较HF组显著升高($t=8.143\sim10.314$, P 均 <0.05)。**结论** MPRO基因可能通过激活AMPK通路,明显改善肥胖小鼠的脂代谢紊乱。

【关键词】 肌肉生长抑制素前肽;肌肉生长抑制素;高脂饮食;肥胖

Effects of myostatin propeptide gene intervention on dyslipidemia in high fat diet-induced obese mice

Zhang Shasha*, Meng Jiejie, Shen Guifen, Wang Peihua, Wang Daowen, Jiang Jiangang. * Department of Internal Medicine and Gene Therapy Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: Jiang Jiangang, Email: jiangjg618@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects and the associated molecular mechanism of myostatin propeptide (MPRO) gene intervention on dyslipidemia in high fat diet-induced obese mice.

Methods Sixty C57BL/6J mice were divided into four groups according to the random number table (15 mice in each group): normal control group (NC group), high fat diet group (HF group), high fat diet + green fluorescent protein group (HF + GFP group) and high fat diet + MPRO group (HF + MPRO group). Mice were fed with high fat diet to induce obesity and dyslipidemia. Recombinant adeno-associated virus (rAAV) mediated MPRO or GFP gene were introduced to the mice, and their body weight, subcutaneous and visceral fat, as well as triglyceride in plasma and liver were measured. The expression of AMP-activated protein kinase α (AMPK α), acetyl-CoA carboxylase (ACC) and carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) were detected by Western blot. **Results** Compared with NC group, body weight, subcutaneous and visceral fat, triglyceride in plasma and liver were significantly increased in HF group ($t=9.033\sim35.459$, all $P<0.05$). However, these were lower in HF + MPRO group than those in HF group ($t=5.233\sim21.500$, all $P<0.05$). Western blot demonstrated that compared with NC group, the phosphorylation

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2014.06.001

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(30900694);教育部留学服务中心回国基金项目(JYBHG201005)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院心血管内科,高血压病研究所(张莎莎,孟杰杰,汪培华,汪道文,蒋建刚),风湿免疫科(沈桂芬);孟杰杰现在沧州市人民医院心血管内科

通信作者:蒋建刚,Email:jiangjg618@hotmail.com

of AMPK α and ACC as well as the expression of CPT-1 were lower in HF group ($t = 16.630-21.502$, all $P < 0.05$). However, these were higher in HF + MPRO group than those in HF group ($t = 8.143-10.314$, all $P < 0.05$). **Conclusion** MPRO gene intervention attenuates dyslipidemia in obese mice partly through AMPK pathway.

【Key words】 Myostatin propeptide; Myostatin; High fat diet; Obesity

(Int J Endocrinol Metab, 2014, 34: 361-364)

肌肉生长抑制素(Myostatin, MSTN)又称生长分化因子-8,属于转化生长因子- β 超家族的一员。MSTN可以抑制成肌细胞的增殖,是肌肉生长发育的负性调控因子^[1-2]。研究证实,MSTN基因缺陷型小鼠骨骼肌的肌肉质量显著增加,脂肪积聚情况改善,从而抵抗高脂饮食或基因突变引起的肥胖^[3]。在机体内,MSTN前肽(MPRO)与MSTN结合从而抑制其生物学活性。有研究表明,将MPRO基因导入高脂饮食诱导的小鼠体内,不仅可以增加骨骼肌的肌肉质量,而且可有效改善高脂饮食引起的脂肪组织的蓄积,但其具体的分子机制尚不清楚^[4]。本研究利用重组腺相关病毒(rAAV)介导的MPRO基因干预高脂饮食诱导的肥胖小鼠,探讨MPRO基因在改善小鼠肥胖及脂代谢异常中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 4周龄健康雄性C57BL/6J小鼠60只(SPF级),体重(20.12 ± 1.50)g(华阜康实验动物中心,北京)。

1.1.2 主要试剂 甘油三酯检测试剂盒(中北控生物科技股份有限公司,北京),病毒包装所需的HEPES、CaCl₂、Na₂HPO₄(Sigma公司,美国),AMP活化蛋白激酶 α (AMPK α)、磷酸化AMPK α (p-AMPK α)、乙酰辅酶A羧化酶(ACC)、磷酸化ACC(p-ACC)及 β -actin抗体(Santa Cruz公司,美国),肉碱棕榈酰基转移酶-1(CPT-1)抗体(abcam公司,英国),RIPA裂解液(普利莱基因技术有限公司,北京),聚偏二氟乙烯膜(Dassel公司,德国),Western印迹显影用增强化学发光试剂(Pierce公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 包装并检测rAAV-MPRO及rAAV-GFP病毒

利用三质粒钙磷共转染法包装携带有MPRO基因的rAAV-MPRO病毒及作为对照的rAAV-GFP病毒,纯化测定病毒(滴度约为 1×10^{11} pfu \cdot ml⁻¹)后进行下一步实验。

1.2.2 动物模型的建立与分组 所有动物适应性喂养1周后,使用随机数字表法将小鼠随机分为4

组(每组15只):正常对照组(NC组),高脂饮食组(HF组),高脂饮食+GFP组(HF+GFP组)及高脂饮食+MPRO组(HF+MPRO组)。NC组给予普通饲料喂养,其余3组予以高脂饮食饲养。每周检测小鼠体重、血甘油三酯水平,以体重超过(\bar{x} 对照组体重+2s)作为肥胖标准^[5]。建模成功后给予病毒干预,HF+GFP组及HF+MPRO组小鼠分别经尾静脉给予rAAV-GFP及rAAV-MPRO干预,并继续监测体重、血甘油三酯的变化。实验结束后,处死动物,取肝脏、脂肪等组织用液氮速冻,于-80℃保存备用。

1.2.3 小鼠体重及脂肪组织的测量 小鼠每周称重1次,实验结束后,迅速摘取肾脏周围、附睾周围及腹部皮下的脂肪组织,称取湿重。

1.2.4 小鼠血及肝脏组织甘油三酯水平的检测 各组小鼠尾静脉取血,3 000 r/min($r = 7$ cm)离心10 min,分离血清,甘油三酯检测采用酶比色法。检测肝脏中甘油三酯含量,称取肝脏组织,加入氯仿甲醇(2:1,v/v)溶液后匀浆器匀浆,震荡抽提24 h,3 000 r/min($r = 7$ cm)离心10 min,采用同样方法测定肝脏甘油三酯。

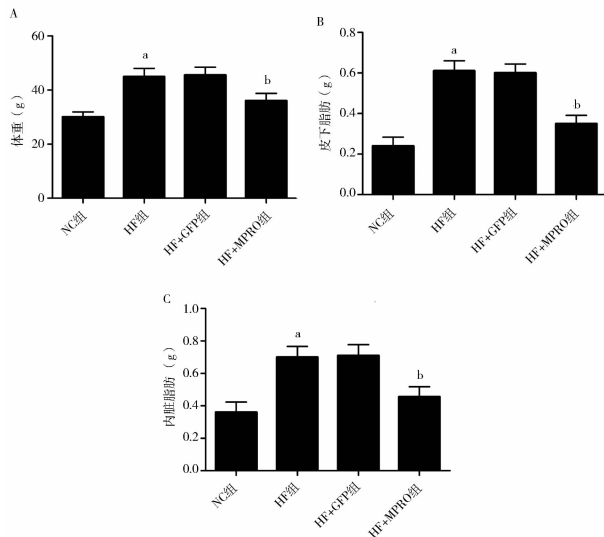
1.2.5 Western印迹法检测小鼠肝脏组织AMPK α 、ACC、CPT-1的蛋白表达 称取肝脏组织剪碎,加入RIPA裂解液于4℃裂解30 min,匀浆器匀浆后于4℃12 000 g离心30 min弃沉淀。BCA法测定组织蛋白浓度,等量蛋白(20 μ g)样品经10%SDS-PAGE垂直电泳分离,转膜,室温摇床上封闭3 h,加入对应一抗工作液(1:1 000)4℃孵育过夜,TBST洗膜1 h,加入相应二抗室温摇床孵育2 h,TBST漂洗后增强化学发光试剂显影曝光。采用Quantity One软件对蛋白条带进行灰度分析。AMPK α 蛋白水平以p-AMPK α 与AMPK α 的蛋白条带灰度值的比值表示,ACC蛋白水平以p-ACC与ACC的蛋白条带灰度值的比值表示,CPT-1蛋白水平以CPT-1与 β -actin蛋白条带灰度值的比值表示。

1.3 统计学处理 应用SPSS 17.0统计软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,两组间均数比较采用 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差

分析,以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 体重、皮下及内脏脂肪重量的比较 HF 组体重、皮下及内脏脂肪的重量与 NC 组相比显著升高(t 值分别为 10.027, 13.597 和 9.033, P 均 < 0.05)。HF + MPRO 组体重、皮下及内脏脂肪的重量较 HF 组均明显降低,且差异有显著统计学意义(t 值分别为 5.233, 9.699 和 6.532, P 均 < 0.05)。此外, HF + GFP 组与 HF 组相比上述指标无明显差别(t 值分别为 0.343, 0.184 和 0.260, P 均 > 0.05 , 图 1)。



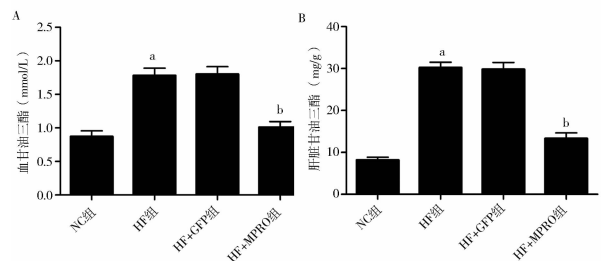
注:与 NC 组相比,^a $P < 0.05$;与 HF 组相比,^b $P < 0.05$; NC 组:正常对照组;HF 组:高脂饮食组;HF + GFP 组:高脂饮食 + 绿色荧光蛋白组;HF + MPRO 组:高脂饮食 + MPRO 组

图 1 各组小鼠体重、皮下脂肪及内脏脂肪重量的比较

2.2 血及肝脏甘油三酯的比较 HF 组血及肝脏甘油三酯水平较 NC 组明显升高,且差异有统计学意义(t 值分别为 15.953 和 35.459, P 均 < 0.05)。HF + MPRO 组血及肝脏甘油三酯水平较 HF 组明显降低,且差异有统计学意义(t 值分别为 13.565 和 21.500, P 均 < 0.05)。但 HF + GFP 组与 HF 组血及肝脏甘油三酯的差异无统计学意义(t 值分别为 0.334 和 0.473, P 均 > 0.05 , 图 2)。

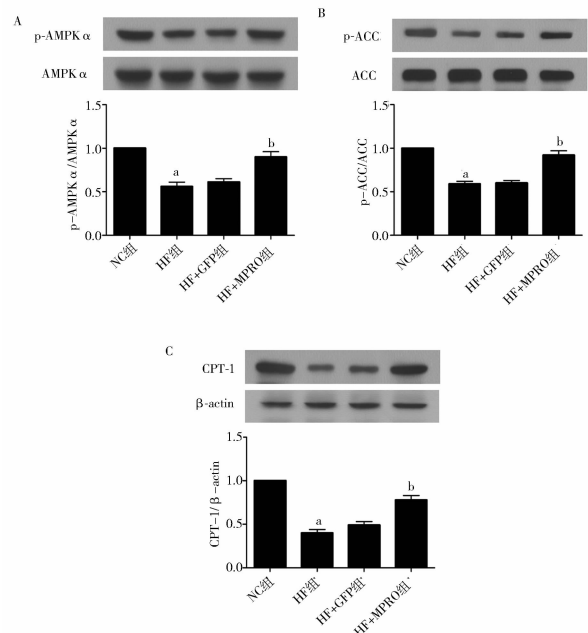
2.3 MPRO 对线粒体氧化相关分子的影响 HF 组肝组织中 AMPK、ACC 的磷酸化水平及 CPT-1 的表达较 NC 组明显降低,且差异有统计学意义(t 值分别为 16.630, 23.671 和 21.502, P 均 < 0.05)。HF + MPRO 组肝组织 AMPK、ACC 的磷酸化水平及 CPT-1 的表达水平较 HF 组明显升高,且差异有统计学意义(t 值分别为 8.143, 10.314 和 9.648, P 均 < 0.05)。但 HF + GFP 组与 HF 组上述指标差

异无统计学意义(t 值分别为 1.485, 0.590 和 2.043, P 均 > 0.05 , 图 3)。



注:与 NC 组相比,^a $P < 0.05$;与 HF 组相比,^b $P < 0.05$; NC 组:正常对照组;HF 组:高脂饮食组;HF + GFP 组:高脂饮食 + 绿色荧光蛋白组;HF + MPRO 组:高脂饮食 + MPRO 组

图 2 各组小鼠血及肝脏甘油三酯水平的比较



注:与 NC 组相比,^a $P < 0.05$;与 HF 组相比,^b $P < 0.05$; NC 组:正常对照组;HF 组:高脂饮食组;HF + GFP 组:高脂饮食 + 绿色荧光蛋白组;HF + MPRO 组:高脂饮食 + MPRO 组;AMPK α :AMP 活化蛋白激酶 α ;ACC:乙酰辅酶 A 羧化酶;CPT-1:肉碱棕榈酰基转移酶-1; β -actin: β -肌动蛋白

图 3 各组小鼠肝脏组织线粒体氧化相关分子的蛋白表达情况

3 讨论

肥胖与高血压、高血脂、糖尿病密切相关,以体内脂肪堆积过多和(或)分布异常为主要表现,是威胁人类健康的重要危险因素之一^[6]。有研究表明,给予小鼠长期高脂饮食,可以使小鼠体重显著增加,并伴有严重的脂代谢异常(血糖、甘油三酯、胆固醇、胰岛素的水平显著升高)^[7]。本研究通过长期高脂饮食建立 C57BL/6 小鼠的肥胖模型。实验结

束时, HF 组体重及皮下、内脏脂肪重量显著增加, 血及肝脏中甘油三酯水平较 NC 组亦显著升高, 提示肥胖小鼠脂代谢紊乱的发生。

MSTN 是骨骼肌生长发育的负性调控因子, 主要在骨骼肌中特异性表达^[2,8]。在体内, MPRO 可以与 MSTN 结合从而抑制其生物学活性。有研究表明, 与高脂饮食诱导的肥胖小鼠相比, MSTN 基因敲除小鼠高脂饮食引起的脂肪积聚明显改善, 其机制可能与增加外周组织的 β 氧化有关^[9]。另有研究表明, 将 MPRO 基因转入高脂饮食诱导的糖尿病小鼠体内, 不仅可以增加小鼠的骨骼肌质量, 还可以改善小鼠的肥胖及胰岛素抵抗情况, 但其涉及的分子机制尚不清楚^[3]。本实验通过高脂饮食诱导肥胖小鼠模型, 给予 rAAV 介导的 MPRO 干预小鼠, 实验结束后, 小鼠体重、内脏及皮下脂肪重量、血及肝脏中甘油三酯含量较 HF 组明显降低, 表明 MPRO 可以明显改善肥胖小鼠的脂代谢紊乱。

AMPK 被称为机体的“代谢感受器”, 在调节能量代谢中发挥着重要作用^[10]。AMPK 是一种异源三聚体的蛋白激酶, 由催化亚单位 α ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$) 和调节亚单位 β ($\beta 1$ 、 $\beta 2$)、 γ ($\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$) 构成, 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族^[11-12]。有研究证实, ACC 及 CPT-1 分别是脂肪酸合成及氧化的关键酶^[13]。激活 AMPK 信号通路可以磷酸化 ACC 抑制其活性, 降低丙二酰辅酶 A 的活性, 从而增加 CPT-1 的表达, 最终抑制脂肪酸的合成并增强线粒体对脂肪酸的氧化和利用^[1]。本研究结果显示高脂饮食可以降低小鼠肝脏组织 AMPK、ACC 的磷酸化水平, 降低 CPT-1 蛋白的表达, 提示持续的高脂饮食可以导致 C57BL/6 小鼠脂肪酸的氧化障碍, 从而促使小鼠体内一系列脂类代谢异常及肥胖的发生^[11,14]。而给予 rAAV 介导的 MPRO 基因干预可以增强 AMPK 及 CPT-1 蛋白的表达, 降低 ACC 蛋白的表达, 从而促进脂肪酸的氧化, 最终改善高脂饮食诱导的小鼠肥胖和脂代谢异常。

综上所述, rAAV 介导的 MPRO 基因干预可以降低高脂饮食诱导的肥胖小鼠的皮下及内脏脂肪重量, 降低其血及肝脏甘油三酯水平, 其机制可能与激活 AMPK 通路从而抑制 ACC 活性, 增加 CPT-1 的表达, 最终增加脂肪酸的 β 氧化有关。MPRO 基因治疗有可能成为改善肥胖的一个新手段。

参 考 文 献

- [1] Lee SJ, Mcpherron AC. Myostatin and the control of skeletal muscle mass: Commentary[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9(5): 604-607.
- [2] Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, et al. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct[J]. *J Cell Physiol*, 1999, 180(1): 1-9.
- [3] Guo T, Jou W, Chanturiya T, et al. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity[J]. *PLoS One*, 2009, 4(3): e4937.
- [4] Zhao B, Wall RJ, Yang J. Transgenic expression of myostatin propeptide prevents diet-induced obesity and insulin resistance[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(1): 248-255.
- [5] 郭啸华, 刘志红, 李恒, 等. 实验性 2 型糖尿病大鼠模型的建立[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2000, 9(4): 351-355.
- [6] 李娟娟, 凌文华. AMPK 与肥胖[J]. *国际内科学杂志*, 2007, 34(11): 649-653.
- [7] 王芄芄, 黄磊, 伍晓雄, 等. 高脂饮食对小鼠脂质代谢和 leptin 基因表达水平的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(1): 40-44.
- [8] Ji S, Losinski RL, Cornelius SG, et al. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation[J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(4 Pt 2): R1265-R1273.
- [9] Zhang C, Mcfarlane C, Lokireddy S, et al. Inhibition of myostatin protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation and promoting a brown adipose phenotype in mice[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(1): 183-193.
- [10] Thomson DM, Winder WW. AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009, 196(1): 147-154.
- [11] Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control[J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(1): 18-24.
- [12] Kemp BE, Mitchelhill KI, Stapleton D, et al. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase[J]. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24(1): 22-25.
- [13] Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 23): 5479-5487.
- [14] Kahn BB, Alquier T, Carling D, et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism[J]. *Cell Metab*, 2005, 1(1): 15-25.

(收稿日期: 2014-04-29)