

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.12.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210531.1707.012.html\(2021-06-01\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210531.1707.012.html(2021-06-01))

二甲双胍对骨骼肌异位脂肪沉积的作用机制研究

郑 晖,全军承,程 绩,周人杰[△]

(陆军军医大学第二附属医院急诊科,重庆 400037)

[摘要] **目的** 探讨二甲双胍是否通过调控围脂滴蛋白(PLIN)信号通路改善高脂诱导的骨骼肌异位脂肪沉积。**方法** C57BL/6J 小鼠 24 只分为对照组(ND 组)、高脂组(HF 组)、高脂+二甲双胍组(HF+Met 组),每组 8 只。检测各组血清中糖、脂代谢相关指标[空腹血糖(FBG)、空腹血胰岛素(FINS)、胰岛素(INS)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和游离脂肪酸(FFA)],骨骼肌中脂滴(LD)、TG 水平、PLINs mRNA 表达及过氧化物酶体增殖物激活受体 δ (PPAR δ)、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、PLIN2 和 PLIN5 蛋白表达。**结果** 与 ND 组比较,HF 组中小鼠体重、血清中糖代谢相关生化指标(FBG、FINS)及脂代谢相关生化指标(TG、TC、LDL-C 和 FFA)水平升高,骨骼肌中脂滴(LD)的数量增多,TG 水平升高,PLIN2、PLIN5 mRNA 和蛋白表达明显升高,p-AMPK、PPAR δ 蛋白表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);二甲双胍干预后,体重、血清中 FBG、FINS、TG、TC 和 FFA 等指标较 HF 组明显降低,骨骼肌中 LD 和 TG 水平明显降低,PLIN2 mRNA 和蛋白表达明显降低,p-AMPK 和 PPAR δ 蛋白表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 二甲双胍可能通过 AMPK-PPAR δ -PLINs 通路改善高脂诱导的骨骼肌异位脂肪沉积。

[关键词] 二甲双胍;脂肪异位沉积;胰岛素抵抗;围脂滴蛋白

[中图法分类号] R589.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)12-2002-05

Mechanism of metformin on ectopic lipid deposit in skeletal muscle

ZHENG Hui,QUAN Juncheng,CHENG Ji,ZHOU Renjie[△]

(Department of Emergency, Second Afflicted Hospital of Army Military
Medical University,Chongqing 400037,China)

[Abstract] **Objective** To explore whether metformin improving high fat induced ectopic lipid accumulation in skeletal muscle via regulating PLIN signal pathway. **Methods** Twenty-four C57BL/6J mice were divided into the control group (ND),high fat group (HF) and high fat + metfomin group (HF+Met),8 cases in each group. The levels of glucose and lipid metabolism related indicators [FBG,FINS,INS,TG,TC,LDL-C,HDL-C and free fatty acid (FFA)] were detected in each group. The lipid droplet and TG levels in skeletal muscle were detected. The expressions of perilipin (PLIN) mRNA and peroxidosome proliferators activate receptors δ (PPAR δ),AMP-activated protein kinase (AMPK),perilipin2 (PLIN2) and 5 (PLIN5) protein were detected. **Results** Compared with the ND group,the body weight of mice,levels of serum glycometabolic related biochemical indicators (FBG,FINS) and lipid metabolic related indictors (TG,TC,LDL-C and FFA) in the HF group were elevated,the LD number in skeletal muscle was increased,TG level was increased,mRNA and protein levels of PLIN2 and PLIN5 were increased significantly,whereas the protein expression levels of p-AMPK/AMPK and PPAR δ were significantly decreased,and the differences were statistically significant ($P<0.05$). After metformin intervention,the body weight, serum FBG,FINS,TG and FFA levels were significantly decreased compared with the HF group,while the LD and TG levels in skeletal muscle were significantly decreased,the PLIN2 mRNA and protein expressions were significantly decreased, the protein expression levels of p-AMPK/AMPK and PPAR δ were significantly increased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Metformin improves the high fat induced ectopic lipid deposit in skeletal muscle via AMPK-PPAR δ -PLINs pathway.

[Key words] metformin;ectopic lipid accumulation;insulin resistance;perilipin

骨骼肌异位脂肪沉积是机体发生糖脂代谢紊乱、胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的重要原因^[1-2]。围脂滴蛋白(perilipin, PLIN)是最具代表性的脂滴包被蛋白,它直接或间接参与骨骼肌的脂质代谢,与脂滴的动态平衡、脂质代谢稳态及靶器官胰岛素敏感性关系密切^[3-5]。有研究证实,PLINs 的表达受腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)^[6]和过氧化物酶体增殖物激活受体 δ (PPAR δ)信号通路的调控^[7]。二甲双胍是临床上防控糖尿病的一线药物,它能激活 AMPK 信号通路,增强骨骼肌的胰岛素敏感性。因此,本研究旨在探讨二甲双胍是否通过 AMPK-PPAR δ -PLINs 信号通路抑制骨骼肌异位脂肪沉积,从而改善胰岛素抵抗。

1 材料与方法

1.1 材料

8 周龄 C57BL/6J 小鼠 24 只由陆军军医大学实验动物中心提供,分笼饲养在 SPF 级动物房,自由饮水觅食、恒温。标准饲料和 60%高脂饲料购自北京华阜康生物科技有限公司。二甲双胍购自美国 Sigma 公司;欧姆龙血糖仪、配套血糖试纸,以及胰岛素(INS)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和游离脂肪酸(FFA)检测试剂盒购自上海酶联生物有限公司;一抗 PLIN2 和 PLIN5 购自英国 Abcam 公司,一抗 AMPK、PPAR δ 、p-AMPK 购自美国 Cell Signaling 公司;DNA 提取试剂盒购自凯杰公司;PCR 和逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。PLIN1:上游引物 TGGAACTGAGGAGAACAAG,下游引物 ATGTCACAGCCGAGATGG; PLIN2:上游引物 GAACTGAGGAGAACACATCA,下游引物 TGT-CACGACATCAGCCA; PLIN3:上游引物 TATTG-GATCCGTACAGCCCAG,下游引物 TATTA-AGCTTGCCCCACGAC; PLIN4:上游引物 TAAC-CCTATTATCTCTCCCT,下游引物 GGTGTTT-TAGGATTGACAT; PLIN5:上游引物 GGTGA-CATCAGCCAAGGATACAG,下游引物 TCCAC-CAGCTTCTCCGACTT; 18s RNA:上游引物 CG-CAAATTACCCACTCCCGAC,下游引物 GTAAC-CTCCCGTTTCAGACCAC。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

本研究经陆军军医大学第二附属医院伦理委员会审查批准实验。将小鼠分为对照组(ND 组)、高脂组(HF 组)、高脂+二甲双胍组(HF+Met 组),每组 8 只。ND 组喂养标准饲料, HF 和 HF+Met 组喂养高脂饲料。二甲双胍溶于水,每日按照 250 mg/kg 的计量给予 HF+Met 组小鼠灌胃。每周称重 1 次,

持续喂养 16 周,空腹隔夜后剪鼠尾取血检测血糖。乙醚麻醉心脏取血,颈椎脱臼处死小鼠,取材做如下实验。

1.2.2 ELISA 检测血清脂代谢相关生化指标水平

心脏取血,静置 2 h 后 3 000 r/min 离心 10 min,吸取上层血清分装入新的 EP 管中,按照 INS、TG、TC、LDL-C、HDL-C 和 FFA 检测试剂盒说明书检测其水平。

1.2.3 骨骼肌油红 O 染色

比目鱼肌切成 1 cm $\times$ 1 cm 的方块于 OCT 包埋剂中,放入液氮中急冻 20 s,冰冻切片成 16 μ m 厚切片,在 4%多聚甲醛溶液中固定 10 min,清水冲洗载玻片。将载玻片浸泡在 60%异丙醇中 30 s,在油红 O 溶液中室温孵育 15 min。60%异丙醇洗 2 次,清水洗 2 min,苏木精复染 30 s 后用水清洗过量的苏木精。索尼数码相机光镜 400 倍,取油红 O 染色比目鱼肌照片。

1.2.4 骨骼肌内 TG 水平测定

取比目鱼肌组织 50 mg,加入 200 μ L 的 PBS,组织匀浆机尽量破碎组织,4 $^{\circ}$ C 3 000 r/min 离心 15 min。提取上清液按照试剂盒说明书检测。

1.2.5 PCR 检测 PLINs mRNA 表达

提取比目鱼肌组织 RNA,取 1 μ L 检测 RNA 的浓度和纯度,检测 PLINs mRNA 表达,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.2.6 Western blot 检测 AMPK、PPAR δ 、p-AMPK、PLIN2 和 PLIN5 表达

取比目鱼肌组织 20 mg,加入蛋白裂解液 300 μ L,冰上匀浆裂解 30 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 20 min,提取上层清液测定蛋白浓度,煮沸 10 min 变性蛋白。上样、电泳、转膜结束后,放入 10%脱脂牛奶中封闭 2 h,加入 AMPK、PPAR δ 、p-AMPK、PLIN2 和 PLIN5 一抗过夜。加入相应二抗,曝光后 Image J 进行灰度值分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

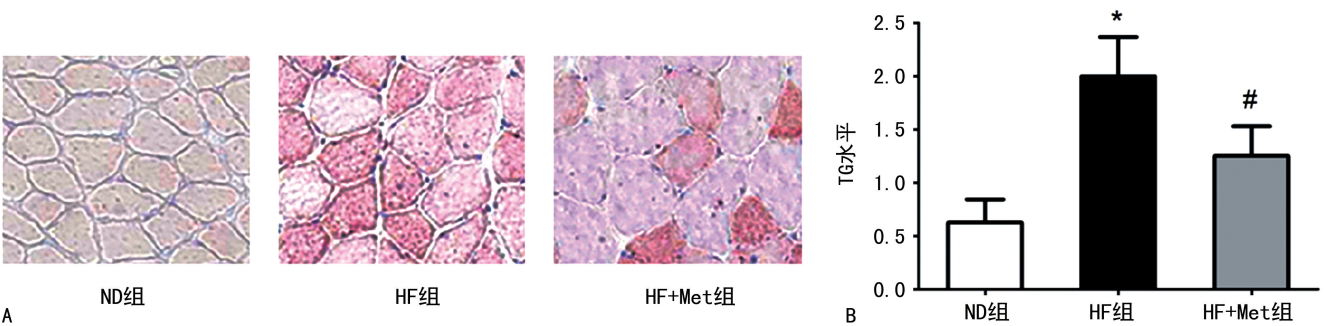
2 结果

2.1 各组血清糖、脂代谢相关生化指标比较

与 ND 组比较, HF 组中小鼠体重、血清中糖代谢相关生化指标[空腹血糖(FBG)与空腹血胰岛素(FINS)]及脂代谢相关生化指标(TG、TC、LDL-C 和 FFA)水平明显升高($P<0.05$),二甲双胍干预后,体重、FBG、FINS、TG、TC 和 FFA 等指标较 HF 组明显降低($P<0.05$),见表 1。

2.2 各组骨骼肌脂滴(LD)和 TG 水平比较

HF 组中红色 LD 的数量明显增多($P<0.05$), TG 水平明显升高($P<0.05$),二甲双胍干预后 LD 和 TG 水平明显降低($P<0.05$),见图 1。



A:油红 O 染色($\times 400$);B:TG 水平;*: $P<0.05$,与 ND 组比较;#: $P<0.05$,与 HF 组比较。

图 1 各组骨骼肌 LD 和 TG 水平比较

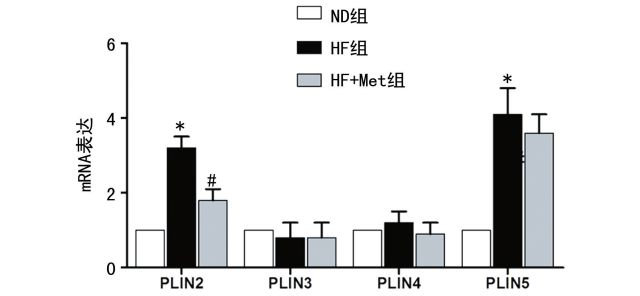
表 1	各组糖、脂代谢相关生化指标比较($\bar{x}\pm s$)		
项目	ND 组	HF 组	HF+Met 组
体重(g)	28.83±2.03	38.25±2.64 *	30.31±1.86 #
FBG(mmol/L)	4.63±1.02	8.24±1.76 *	5.36±1.47 #
FINS(mIU/L)	11.32±2.14	18.43±2.65 *	13.68±1.89 #
TG(mmol/L)	7.32±0.73	9.48±0.85 *	7.95±0.67 #
TC(mmol/L)	5.48±0.53	8.34±0.94 *	5.08±1.45 #
LDL-C(mmol/L)	0.83±0.35	2.34±0.83 *	1.68±0.74
HDL-C(mmol/L)	3.26±0.68	3.85±0.56	3.57±0.49
FFA(mmol/L)	0.74±0.14	1.34±0.17 *	0.68±0.35 #

*: $P<0.05$,与 ND 组比较;#: $P<0.05$,与 HF 组比较。

2.3 各组 PLINs 表达比较

PLIN1 在比目鱼肌组织不表达;各组 PLIN3、PLIN4 mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$); HF 组中 PLIN2、PLIN5 mRNA 和蛋白表达明显高于 ND 组($P<0.05$);二甲双胍干预后,PLIN2 mRNA

和蛋白表达明显降低($P<0.05$),而 PLIN5 表达未见明显变化($P>0.05$),见图 2、3。

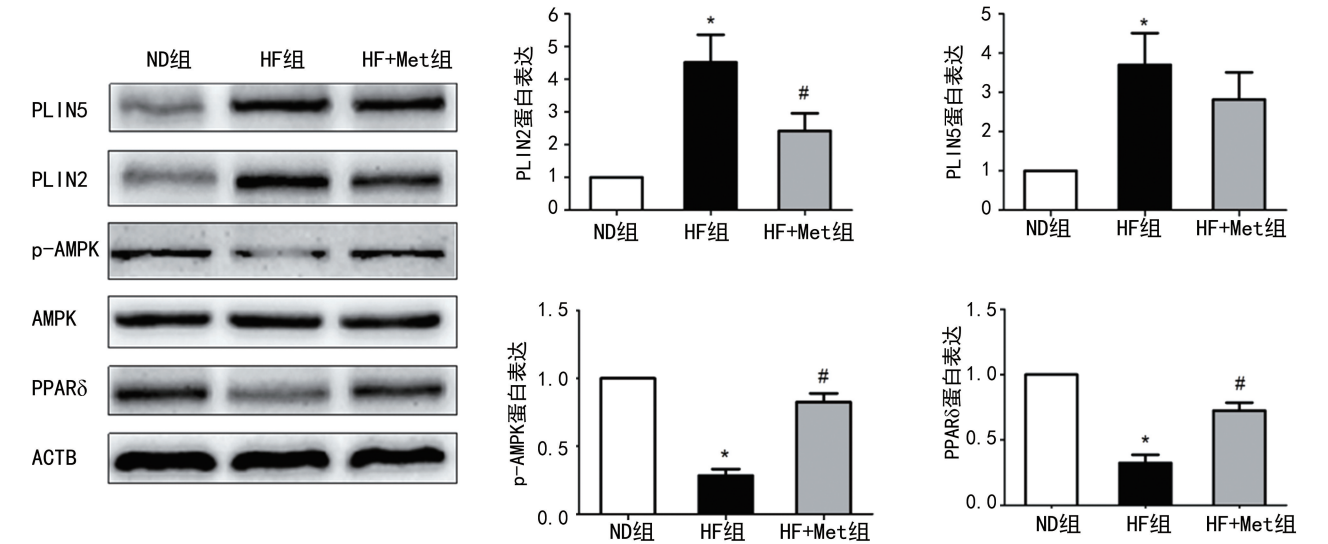


*: $P<0.05$,与 ND 组比较;#: $P<0.05$,与 HF 组比较。

图 2 各组骨骼肌中 PLINs mRNA 表达比较

2.4 各组 AMPK、PPAR δ 蛋白表达比较

与 ND 组比较,HF 组 p-AMPK、PPAR δ 蛋白表达明显降低($P<0.05$),二甲双胍干预后,p-AMPK 和 PPAR δ 蛋白表达明显升高($P<0.05$),见图 3。



*: $P<0.05$,与 ND 组比较;#: $P<0.05$,与 HF 组比较。

图 3 各组 AMPK、PPAR δ 、PLIN2、PLIN5 蛋白表达比较

3 讨 论

肥胖已成为全球性的重大公共卫生问题,我国肥胖形势不容乐观,平均肥胖率高达 12%,并且呈现出年轻化趋势^[8]。肥胖一方面将过剩的能量以 TG 的形式储存于脂肪组织中,另一方面过多的 FFA 进入到其他非脂肪组织中,引起异位脂肪沉积,其中骨骼肌异位脂肪沉积在胰岛素抵抗的发生、发展中起着至关重要的作用^[1-2]。因此,如何有效地防止骨骼肌异位脂肪沉积已成为防治胰岛素抵抗,甚至 2 型糖尿病的重点。本文通过高脂诱导建立小鼠肥胖模型,发现二甲双胍逆转了在高脂诱导下小鼠糖、脂代谢异常,骨骼肌中 LD 增多,TG 水平和 PLIN2 mRNA、蛋白表达升高,p-AMPK、PPAR δ 蛋白表达降低。高脂诱导下 PLIN5 mRNA 和蛋白表达明显升高,而二甲双胍干预后它的表达水平有所下降,但无明显变化。

PLINs 是典型的脂滴包被蛋白,家族中 5 个亚型都不同程度地参与 LD 的合成、生长、转运及降解。但是 5 个亚型的表达具有组织特异性。PLIN1 主要表达在脂肪和类固醇细胞中,在骨骼肌中不表达^[9]。PLIN2 在脂肪细胞和骨骼肌细胞中高表达,它的表达量与骨骼肌中 LD 呈明显的正相关,并且能与脂肪分解的限速酶相互作用^[10]。研究表明胫骨前肌过表达 PLIN2 增加了肌肉中 TG 水平及 LD 的大小、数量,在培养的肌管细胞中 PLIN2 的下调阻止了油酸诱导的 LD 储存,这些证据推测 PLIN2 可能参与了 LD 的合成和生长^[11]。本研究发现,在高脂模型的比目鱼肌组织中的 TG 水平、LD 数量、PLIN2 mRNA 和蛋白表达明显升高,二甲双胍干预后 PLIN2 表达随着 TG 水平和 LD 数量减少而降低。但是值得思考的是,到底是由于 LD 的变化导致 PLIN2 变化还是由于 PLIN2 变化引起 LD 变化,二者的因果关系还需今后进一步的实验研究。本研究发现,PLIN3 在骨骼肌中表达,但是在高脂模型和高脂+二甲双胍干预模型下 PLIN3 表达水平并无明显变化。而之前有证据显示,在 AMPK 的激动剂作用下,股四头肌中 PLIN3 表达水平明显升高^[12]。二甲双胍作为 AMPK 的激活剂,在本研究中并未表现出刺激 PLIN3 的作用,这可能与实验的肌肉取材相关,比目鱼肌主要是以慢肌纤维为主,而股四头肌是混合型肌纤维,肌纤维类型的差别导致了 PLIN3 表达的差异性。

PLIN5 主要在肝脏、脂肪、心脏和骨骼肌等氧化代谢高的组织中^[13]。BOSMA 等^[14]发现骨骼肌中过表达 PLIN5 导致了肌内 TG 水平升高,推测其可能作为脂质屏障,保护 LD 不受脂肪酶水解活性的影响。本研究同样发现在高脂模型下,骨骼肌内 TG 和 LD

升高,PLIN5 mRNA 和蛋白表达也明显升高。二甲双胍干预后,肌内 TG 和 LD 降低,但是 PLIN5 表达并无明显变化。前期研究显示,PLIN5 不仅定植于 LD 表面,还定位在细胞质和线粒体中,并且它的转录活性受 PPAR δ 调控。BINDESBØLL 等^[15]发现 PLIN5 的基因结构域中存在 PPAR 功能性结合位点,并且证实 PLIN5 可作为 PPAR δ 在肌肉组织中的直接作用靶点,长链脂肪酸诱导 PLIN5 转录活性增加依赖 PPAR δ 的表达。LAURENS 等^[13]推测,在骨骼肌氧化代谢需求增强时,PLIN5 作为 LD 和线粒体之间沟通的桥梁,促进脂肪酸转运入线粒体,增强脂肪分解代谢。因此,笔者认为在高脂诱导下,LD 表面的 PLIN5 表达升高协同 PLIN2 促进过多的 FFA 以 TG 的形式储存在肌细胞中,而二甲双胍作为 AMPK 激活剂,当氧化代谢增强时,细胞质和线粒体 PLIN5 表达升高促进脂肪酸有氧氧化。本课题组后续将针对 PLIN5 的定位变化深入研究。

综上所述,二甲双胍可能通过 AMPK-PPAR δ 信号通路调控 PLIN2、5 表达和定位,抑制骨骼肌中 LD 生成和 TG 水平,进而改善胰岛素抵抗。

参考文献

- [1] GRUNDY S M. Overnutrition, ectopic lipid and the metabolic syndrome[J]. J Investig Med, 2016, 64(6):1082-1086.
- [2] ABILDGAARD J, DANIELSEN E R, DORPH E, et al. Ectopic lipid deposition is associated with insulin resistance in postmenopausal women[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2018, 103(9):3394-3404.
- [3] XU S, ZHANG X, LIU P. Lipid droplet proteins and metabolic diseases[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(5 Pt B): 1968-1983.
- [4] BOSMA M. Lipid droplet dynamics in skeletal muscle[J]. Exp Cell Res, 2016, 340(2): 180-186.
- [5] KAUSHIK S, CUERVO A M. AMPK-dependent phosphorylation of lipid droplet protein PLIN2 triggers its degradation by CMA[J]. Autophagy, 2016, 12(2):432-438.
- [6] WOLINS N E, QUAYNOR B K, SKINNER J R, et al. OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid u-

- tilization[J]. *Diabetes*, 2006, 55(12): 3418-3428.
- [7] TAN Y, XIN X, MING Q. Prevalence and characteristics of overweight and obesity among Chinese youth aged 12-18 years: a multistage nationwide survey [J]. *Public Health*, 2018, 155:152-159.
- [8] CHEN M, WANG H, LI X, et al. PLIN1 deficiency affects testicular gene expression at the meiotic stage in the first wave of spermatogenesis[J]. *Gene*, 2014, 543(2):212-219.
- [9] MACPHERSON R E, RAMOS S V, VANDENBOOM R, et al. Skeletal muscle PLIN proteins, ATGL and CGI-58, interactions at rest and following stimulated contraction[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013, 304(8):R644-650.
- [10] BOSMA M, HESSELINK M K, SPARKS L M, et al. Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels [J]. *Diabetes*, 2012, 61(11):2679-2690.
- [11] KLEINERT M, PARKER B L, CHAUDHURI R, et al. mTORC2 and AMPK differentially regulate muscle triglyceride content via Perilipin 3[J]. *Mol Metab*, 2016, 5(8):646-655.
- [12] RAMOS S V, TURNBULL P C, MACPHERSON R E, et al. Changes in mitochondrial perilipin 3 and perilipin 5 protein content in rat skeletal muscle following endurance training and acute stimulated contraction[J]. *Exp Physiol*, 2015, 100(4):450-462.
- [13] LAURENS C, BOURLIER V, MAIRAL A, et al. Perilipin 5 fine-tunes lipid oxidation to metabolic demand and protects against lipotoxicity in skeletal muscle[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:38310.
- [14] BOSMA M, SPARKS L M, HOOVELD G J, et al. Overexpression of PLIN5 in skeletal muscle promotes oxidative gene expression and intramyocellular lipid content without compromising insulin sensitivity[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(4):844-852.
- [15] BINDESBØLL C, BERG O, ARNTSEN B, et al. Fatty acids regulate perilipin5 in muscle by activating PPAR δ [J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(7):1949-1963.
- (收稿日期:2020-08-15 修回日期:2021-03-12)
-
- (上接第 2001 页)
- with acute kidney injury-a case report[J]. *Crit Care*, 2017, 21(1):129.
- [8] 王宁宁, 魏晓宇, 尚津宇, 等. 噬菌体治疗细菌感染的机制及现状[J]. *吉林医药学院学报*, 2019, 40(6):437-439.
- [9] SCHOOLEY R T, BISWAS B, GILL J J, et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant acinetobacter baumannii infection[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(10):e00954- e00917.
- [10] FAZZINO L, ANISMAN J, CHACNSF J M, et al. Phage cocktail strategies for the suppression of a pathogen in a cross-feeding coculture[J]. *Microb Biotechnol*, 2020, 13(6):1997-2007.
- [11] TIWARI B R, KIM S, RAHMAN M, et al. Antibacterial efficacy of lytic *Pseudomonas* bacteriophage in normal and neutropenic mice models[J]. *Microbiology*, 2011, 49(6):994-999.
- [12] 王小亭, 李亚辉, 靳静等. 6 种常用消毒剂对 28 株噬菌体杀菌作用影响的研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2016, 11(6):545-549, 561.
- [13] 彭帆, 童贻刚, 柏长青. 多耐药鲍曼不动杆菌噬菌体 IME-AB6 的分离、生物特性及保存方法研究[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(5):641-644.
- (收稿日期:2020-08-18 修回日期:2021-01-02)