

2 型糖尿病患者骨骼肌乙酰 CoA 羧化酶的表达及活性研究*

胡淑国¹,王丽慧¹,宋光耀²,杨洋¹,宋国桥³,常湛¹

(1. 河北省石家庄市第二医院内分泌科 050051; 2. 河北省人民医院内分泌科/河北省内分泌代谢病研究所, 石家庄 050000; 3. 河北省石家庄市第二医院骨科 050051)

[摘要] **目的** 观察 2 型糖尿病患者骨骼肌乙酰 CoA 羧化酶(ACC)的表达和活性的变化,探讨其在骨骼肌脂质堆积和胰岛素抵抗中的作用。**方法** 于 2012 年 6 月至 2013 年 6 月在石家庄市第二医院骨科住院择期行髋关节及下肢手术患者中,选取 2 型糖尿病病程 5 年之内的患者 10 例为糖尿病组(DM 组),另选取 10 例非糖尿病患者为对照组(NC 组)。采集静脉血检测空腹血糖(FBG)、血脂、游离脂肪酸(FFA)等,计算胰岛素敏感性指数(ISI)。骨科手术中留取骨骼肌标本,测定骨骼肌三酰甘油(TG)、总的长链脂酰辅酶 A(LCACoA)水平。骨骼肌 ACC、磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶(P-ACC)蛋白表达用蛋白质印迹法(Western blotting)测定。**结果** DM 组 FBG、空腹胰岛素(FINS)、FFA 及血清 TG 水平高于 NC 组($P<0.05$),而 ISI 低于 NC 组($P<0.01$)。DM 组骨骼肌 TG 及 LCACoA 水平高于 NC 组($P<0.05$)。两组骨骼肌 ACC 蛋白表达比较差异无统计学意义($P>0.05$),DM 组骨骼肌 P-ACC 蛋白水平低于 NC 组($P<0.05$)。**结论** ACC 活性的改变可能在 2 型糖尿病患者骨骼肌脂质堆积和胰岛素抵抗发生中起了一定作用。

[关键词] 糖尿病, 2 型; 胰岛素抗药性; 肌, 骨骼; 脂肪酸类; 乙酰 CoA 羧化酶**[中图分类号]** R589 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)35-4945-03**Study on the expression and activity of acetyl-coenzyme A carboxylase in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes mellitus***Hu Shuguo¹, Wang Lihui¹, Song Guangyao², Yang Yang¹, Song Guoqiao³, Chang Zhan¹

(1. Department of Endocrinology, the Second Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang, Hebei 050051, China;

2. Department of Endocrinology, Hebei People's Hospital/Hebei Institute of Endocrine and

Metabolic Diseases, Shijiazhuang, Hebei 050000, China; 3. Department of Orthopedics,

the Second Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang, Hebei 050051, China;)

[Abstract] **Objective** To observe the expression and activity of acetyl-CoA carboxylase(ACC) in skeletal muscle and investigate its role in lipid accumulation in skeletal muscle and insulin resistance in type 2 diabetes. **Methods** A total of 20 cases with or without T2DM who received selective surgery between June 2013 and June 2014 were enrolled from department of orthopaedics. These patients were divided into two groups; DM group and NC group. Blood pressure was calculated and blood samples were drawn from an antecubital vein for measurement of plasma glucose, insulin, lipid and FFA. Insulin sensitivity index(ISI) was calculated. Skeletal muscle was frozen in liquid nitrogen during orthopaedics surgery and was kept at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until assay. The skeletal muscle samples were taken during surgery, and levels of triglyceride(TG) and LCACoAs in skeletal muscle tissues were detected. The expression of P-ACC(P-ACC, the phosphorylation state of ACC, which represented non-activity form of ACC) was used to assess ACC activity. The expression levels of ACC and P-ACC in skeletal muscle were measured by using SDS-PAGE and Western blotting techniques. The data of the two groups were compared with *t*-test. **Results** (1) Fasting blood glucose, fasting insulin (FINS), free fatty acid and TG were higher in the DM group than those in the NC group(all $P<0.05$). However, ISI was lower in the DM group than that in the NC group(-4.89 ± 0.62 vs. -3.67 ± 0.49 , $P<0.01$). (2) Skeletal muscle TG and LCACoAs were higher in DM group than those in NC group [(6.03 ± 1.62) $\mu\text{mol/g}$ vs. (4.49 ± 1.63) $\mu\text{mol/g}$, (3.12 ± 1.12) $\mu\text{mol/g}$ vs. (2.13 ± 0.96) $\mu\text{mol/g}$, all $P<0.05$]. (3) No significant difference in protein level of ACC in skeletal muscle was detected between DM group and NC group($P>0.05$). Protein level of P-ACC in skeletal muscle was decreased in DM group compared with NC group(0.49 ± 0.10 vs. 0.58 ± 0.09 , $P<0.05$). **Conclusion** Changes in ACC activity may play a role in the development of skeletal muscle lipid accumulation and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus.

[Key words] diabetes mellitus, type 2; insulin resistance; muscle, skeletal; fatty acids; acetyl-CoA carboxylase

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是 2 型糖尿病的重要发病机制之一。骨骼肌是胰岛素的主要靶组织,是机体葡萄糖、脂质摄取和利用的重要器官。一些动物研究表明,骨骼肌脂肪酸代谢异常导致脂质堆积与 IR 密切相关,而骨骼肌丙二酰 CoA(malonyl-CoA, MCA)是脂肪酸代谢的关键调节者。

MCA 水平通过乙酰 CoA 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)的合成及丙二酰 CoA 脱羧酶(malonyl-CoA decarboxylase, MCD)的降解而调节^[1]。因此,ACC 在骨骼肌脂肪酸代谢方面起了非常重要的作用。2 型糖尿病患者 IR 的发生是否与骨骼肌 ACC 表达及活性的改变导致组织脂质堆积有关,尚缺

表 1 两组患者临床资料比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	年龄(岁)	BMI(kg/m ²)	HbA1c(%)	收缩压(mm Hg)	舒张压(mm Hg)
DM 组	62.00±10.21	26.30±1.73	8.15±1.63	135.50±14.80	76.00±10.75
NC 组	63.40±8.66	24.87±1.65	5.53±0.38	129.50±15.36	72.50±10.85
<i>t</i>	-0.33	1.88	4.96	0.89	0.62
<i>P</i>	>0.05	>0.05	<0.01	>0.05	>0.05

表 2 两组患者血浆代谢参数及胰岛素敏感性的比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	FBG(mmol/L)	FINS(mU/L)	ISI	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	FFA(mmol/L)
DM 组	8.90±2.48	14.97±4.62	-4.89±0.62	3.32±1.74	5.92±1.38	0.87±0.23
NC 组	5.29±0.55	11.15±2.63	-3.67±0.49	2.09±0.56	5.07±0.81	0.67±0.17
<i>t</i>	4.50	2.28	-6.71	2.12	1.68	2.15
<i>P</i>	<0.01	<0.05	<0.01	<0.05	>0.05	<0.05

乏相关报道。本研究选取以 IR 为发病机制之一的 2 型糖尿病患者为研究对象,观察 2 型糖尿病患者骨骼肌脂肪代谢及 ACC 表达及活性的变化,探讨 ACC 在骨骼肌脂质堆积和 IR 中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 于 2012 年 6 月至 2013 年 6 月在石家庄市第二医院骨科住院择期行髋关节及下肢手术患者中,选取 2 型糖尿病病程 5 年之内的患者 10 例为糖尿病组(DM 组),其中男 6 例,女 4 例,年龄 40~68 岁。另选取 10 例非糖尿病患者为对照组(NC 组),男 7 例,女 3 例,年龄 40~70 岁。研究获石家庄市第二医院伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。排除标准:(1)口服二甲双胍或(和)噻唑烷二酮类降糖药物者;(2)糖尿病合并急性并发症,所有受试者除外感染、发热、外伤及其他内分泌疾病;(3)高血压、脑血管病、冠心病、慢性心功能不全及高尿酸血症、乳糜血患者等;(4)近 1 周内剧烈运动者。

1.2 方法

1.2.1 标本留取 所有受试者经过 10 h 过夜空腹,并休息 20 min 后由专人测量血压,测量身高、体质量并计算体质量指数(BMI)。抽静脉血测空腹血糖(FBG)、糖化血红蛋白(HbA1c),并分离血清于-70℃保存,同批测定胰岛素、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)和游离脂肪酸(FFA)等。骨科手术中留取骨骼肌标本,迅速放入液氮冷冻,之后转入-70℃冰箱保存待测,肌肉中 TG、长链脂酰辅酶 A(long chain acyl-CoA, LCACoA)和骨骼肌 ACC、磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶(P-ACC)的蛋白表达水平,ACC 活性通过测定 P-ACC 蛋白表达水平来评价。

1.2.2 血液生化指标、骨骼肌 TG 及 LCACoAs 水平测定 FBG 用葡萄糖氧化酶法,HbA1c 用高效液相色谱法,胰岛素用放射免疫法,血清 TG 和 TC 采用氧化酶法在 Beckman X20 全自动生化分析仪上测定,FFA 采用铜显色法测定(南京建成生物试剂公司试剂盒)。胰岛素敏感性指数(ISI)以 FBG 与胰岛素乘积的倒数表示。骨骼肌 TG 经氯仿/甲醇抽提后用全自动生化分析仪测定,用荧光分光光度计测定骨骼肌总的 LCACoAs 水平,以每克肌肉组织所含的物质的量表示。

1.2.3 蛋白质印迹法(Western blotting)测定骨骼肌 ACC 和 P-ACC 蛋白表达 冷冻的骨骼肌标本称质量,加入组织裂解液提取蛋白并定量。取 30 μg 进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE,10%分离胶)分离蛋白后,用电转移法转移至 PVDF 膜,封闭液室温封闭 1 h 后加入 ACC 和 P-

ACC 多克隆抗体(购于 Santa Cruz 公司及 Cell signaling 公司)4℃摇床过夜,洗膜后再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(购于北京中杉金桥生物公司),室温孵育 1 h,二氨基联苯胺(DAB)显色。将显色的 PVDF 膜在凝胶成像仪上照相,机载 Labworks 软件分析。同样的方法测定了 GAPDH 的蛋白表达。ACC 和 P-ACC 蛋白表达结果用样品中二者的积分吸光度值(IA 值)与 GAPDH 的 IA 值的比值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。ISI 为非正态分布,分析时取其自然对数。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者临床资料及血液生化指标的比较 两组患者年龄、BMI、血压比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。DM 组 HbA1c、FBG、空腹胰岛素(FINS)、血清 TG 和 FFA 高于 NC 组($P < 0.05$),两组 TC 比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而 DM 组 ISI 低于 NC 组($P < 0.05$),见表 1、2。

2.2 两组患者骨骼肌 TG、LCACoAs 水平及骨骼肌 ACC、P-ACC 蛋白表达的比较 DM 组骨骼肌 TG、LCACoAs 水平均高于 NC 组($P < 0.05$),见表 3。骨骼肌 ACC 蛋白表达在两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$);DM 组骨骼肌 P-ACC 蛋白表达低于 NC 组($P < 0.05$),见图 1、表 4。

表 3 两组患者骨骼肌 TG 和 LCACoAs 水平比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	TG(μmol/g)	LCACoAs(μmol/g)
DM 组	6.03±1.62	3.12±1.12
NC 组	4.49±1.63	2.13±0.96
<i>t</i>	2.13	2.11
<i>P</i>	<0.05	<0.05

表 4 两组患者骨骼肌 ACC 和 P-ACC 的蛋白表达的比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	ACC/GAPDH	P-ACC/GAPDH
DM 组	0.59±0.13	0.49±0.10
NC 组	0.62±0.12	0.58±0.09
<i>t</i>	-0.49	-2.17
<i>P</i>	>0.05	<0.05

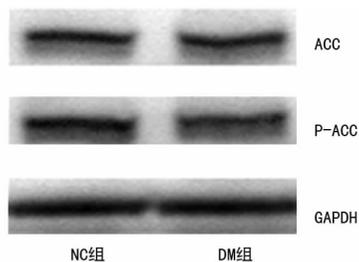


图 1 两组患者骨骼肌 ACC 和 P-ACC 的蛋白表达水平

3 讨论

IR 是指肝脏、肌肉和脂肪等组织对胰岛素生物效应的反应性下降,以葡萄糖和脂肪酸代谢异常为特征。有很多证据支持脂质过度供应和脂质异位堆积是导致这些组织功能异常的常见原因。2 型糖尿病是以 IR 为主要病理机制的疾病之一。本研究结果发现,2 型糖尿病患者和非糖尿病患者相比存在明显的 IR,除 FBG、FINS 升高之外,还存在血浆和骨骼肌脂肪酸代谢异常,如 TG 和 FFA 水平高于 NC 组。骨骼肌是葡萄糖代谢的重要组织及胰岛素发挥作用的主要靶器官,本研究发现 2 型糖尿病患者除血液中脂质增高外,骨骼肌 TG 及 LCA-CoAs 水平也是增加的。脂质贮存最安全的地方是白色脂肪组织,但是当其贮存能力达到饱和后,过多的脂质则堆积到骨骼肌、肝脏等非脂肪组织,引起细胞慢性功能失调和损伤,被称为“脂毒性”^[2]。近年,脂毒性在 IR 发病机制中的作用日益受到重视。骨骼肌脂肪酸水平与 IR 的相关性在啮齿动物和人类都得到证实,但是骨骼肌脂质堆积的具体机制还未完全阐明,有动物实验或体外研究发现骨骼肌脂肪酸氧化能力的降低和由此引起的脂质堆积是 IR 的可能机制^[3]。因此,2 型糖尿病患者骨骼肌脂质水平的增加也可能与骨骼肌细胞脂肪酸代谢的某些环节发生异常有关。

近年研究认为,ACC 与脂肪酸代谢和 IR 有着密切的关系^[4-6]。在骨骼肌表达的 ACC 通过其包含 20 个疏水氨基酸的独特 N 末端附着于线粒体外膜表面,通过催化乙酰 CoA 羧化生成 MCA。在线粒体表面合成的 MCA 作用于肉碱脂酰转移酶-1(carnitine palmitoyltransferase 1, CPT-1)相应结合区域并抑制 CPT-1 的活性,从而抑制脂肪酸进入线粒体进行 β 氧化^[7]。因此,ACC 通过调节细胞脂肪酸氧化可能影响骨骼肌脂质水平,但这方面的研究多基于动物实验。本研究以 2 型糖尿病及非糖尿病个体为研究对象,探讨糖尿病患者骨骼肌脂质堆积的可能机制,结果发现骨骼肌 ACC 蛋白表达在两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),但 P-ACC 蛋白表达在 DM 组低于 NC 组。P-ACC 代表 ACC 的非活性形式,说明 2 型糖尿病患者骨骼肌 ACC 活性升高,并且随着 ACC 活性的增高,骨骼肌 TG 和 LCACoAs 水平明显增加。由此推测,2 型糖尿病患者骨骼肌 ACC 活性的增高可能通过增加其产物 MCA 水平而抑制了脂肪酸进入线粒体进行 β 氧化,导致组织脂质堆积。

本研究发现,ACC 可能在 2 型糖尿病患者骨骼肌脂肪酸代谢方面起调节作用,为 IR 的治疗提供了重要靶点。ACC 基因敲除小鼠模型可进一步验证 ACC 在脂肪酸代谢中的重要性。有研究发现,ACC2 基因敲除小鼠表现出组织 MCA 水平的降低及骨骼肌脂肪酸氧化的增加^[8]。此结果提示,如果能用某些药物抑制 ACC 的活性可能增加骨骼肌脂肪酸氧化,减少

骨骼肌脂质堆积,降低脂毒性。作者前期的动物实验研究发现罗格列酮干预增加了 IR 大鼠骨骼肌 P-ACC 表达,并且伴随 P-ACC 表达增加(也就是 ACC 活性的下降)骨骼肌脂质水平下降,胰岛素敏感性提高。还需要在 IR 的患者中进一步证实这些降糖药的作用机制,进而寻找新的 ACC 活性抑制剂,以达到减少骨骼肌脂质堆积,改善 IR 的目的。

总之,本研究发现 2 型糖尿病患者骨骼肌 TG 和 LCA-CoAs 升高,存在着骨骼肌脂质堆积和 IR。ACC 活性的增高可能通过增加其下游产物 MCA 水平影响了脂肪酸进入线粒体进行 β 氧化,在这些组织脂质异位堆积的病理生理中起了一定作用。如果在 2 型糖尿病患者的治疗中,以 ACC 为切入点,进一步寻找 ACC 的抑制剂可能减少脂质异位堆积,改善 IR。还需扩大病例数及在各种类型 IR 患者中进一步研究证实 ACC 对脂肪酸代谢的影响。

参考文献

- [1] Pender C, Trentadue AR, Pories WJ, et al. Expression of genes regulating malonyl-CoA in human skeletal muscle [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 99(3): 860-867.
- [2] Van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity [J]. *Physiol Behav*, 2008, 94(2): 231-241.
- [3] Sparks LM, Bosma M, Brouwers B, et al. Reduced incorporation of fatty acids into triacylglycerol in myotubes from obese individuals with type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2014, 63(5): 1583-1593.
- [4] Marcinko K, Steinberg GR. The role of AMPK in controlling metabolism and mitochondrial biogenesis during exercise [J]. *Exp Physiol*, 2014, 99(12): 1581-1585.
- [5] Huerlimann R, Steinig EJ, Loxton H, et al. The effect of Nitrogen limitation on acetyl-CoA carboxylase expression and fatty acid content in *Chromera velia* and *Isochrysis aff. galbana*(TISO) [J]. *Gene*, 2014, 543(2): 204-211.
- [6] Kampe K, Sieber J, Orellana JM, et al. Susceptibility of podocytes to palmitic acid is regulated by fatty acid oxidation and inversely depends on acetyl-CoA carboxylases 1 and 2 [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306(4): 401-409.
- [7] Liu Y, Zalameda L, Kim KW, et al. Discovery of acetyl-coenzyme A carboxylase 2 inhibitors: comparison of a fluorescence intensity-based phosphate assay and a fluorescence polarization-based ADP Assay for high-throughput screening [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2007, 5(2): 225-235.
- [8] O'neill HM, Lally JS, Galic S, et al. AMPK phosphorylation of ACC2 is required for skeletal muscle fatty acid oxidation and insulin sensitivity in mice [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(8): 1693-1702.