L6细胞中稳定敲除*AMPKα1*对抗糖尿病药物发挥作用的影响

赵平[a],田贵林[a],杨新洲[b]
(中南民族大学 a.生命科学学院; b.药学院,湖北 武汉 430074)

摘 要 肌肉细胞对于葡萄糖的消耗是关乎体内血糖水平高低的关键步骤.单磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine 5′-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK)作为糖尿病药物治疗的关键通路,可以在被磷酸化激活后促进肌肉细胞中的葡萄糖摄取.为了探讨AMPKα亚基在糖尿病治疗中的关键作用,在L6大鼠骨骼肌细胞中使用规律成簇的间隔短回文重复系统(CRISPR/Cas9)敲除AMPKα1蛋白,以探究L6细胞中AMPKα1亚基的缺失对于糖尿病药物的治疗影响.结果表明,与对照相比,当AMPKα缺失后,二甲双胍促进的AMPKα亚基的磷酸化完全消失,并且二甲双胍在正常细胞中促进葡萄糖摄取的作用在敲除细胞中呈现降低趋势.研究揭示了AMPKα1亚基在糖尿病药物作用中的关键地位,为精准靶向药物治疗及药物机制探究提供了重要实验模型.

关键词 单磷酸腺苷活化蛋白激酶;葡萄糖摄取;规律成簇的间隔短回文重复系统(CRISPR/Cas9);单磷酸腺苷活化蛋白激酶α1亚基
中图分类号 Q786 **文献标志码** A **文章编号** 1672-4321(2026)04-0483-06
doi:10.20056/j.cnki.ZNMDZK.20260707

Effect of stable knockout of *AMPKα1* on anti-diabetic medication function in L6 cells

Zhao Ping[a], Tian Guilin[a], Yang Xinzhou[b]
(South-Central Minzu University, a. School of Life Sciences; b. School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan 430074, Hubei China)

Abstract The consumption of glucose by muscle cells is a key step in determining the level of blood sugar in the body. Adenosine 5′-monophosphate-activated protein kinase (AMPK), a key pathway in diabetes adenosine monophosphate, promotes glucose uptake in muscle cells when activated by phosphorylation. In order to explore the key role of AMPKα subunit in the treatment of diabetes, AMPKα1 protein in L6 rat skeletal muscle cells was knocked out by using regularly clustered interspaced short palindromic repeats (CRISPR/Cas9) to explore the effect of AMPKα1 subunit deletion in L6 cells on the treatment of diabetes. The results showed that the metformin-promoted phosphorylation of AMPKα subunit completely disappeared when AMPKα was deleted, and the effect of metformin on glucose uptake in normal cells showed a decreasing trend in knockout cells. It reveals the key position of AMPKα1 subunit in the action of diabetic drugs, and provides an important experimental model for precise targeted drug therapy and drug mechanism exploration.

Keywords AMPK; glucose uptake; CRISPR/Cas9; AMPKα1

单磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine 5′-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK)是生物系统发育中保守的丝氨酸/苏氨酸激酶[1],可在体内外激活多个靶标蛋白.AMPK对细胞

收稿日期 2024-12-24
作者简介 赵平(1979-),副教授,研究方向:民族药药物药理,E-mail:p.zhao@scuec.edu.cn
基金项目 国家自然科学基金资助项目(82474138);湖北省自然科学基金资助项目(2023AFC011);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(CZY23021)

内腺嘌呤核苷酸水平的变化较为敏感,当细胞内的AMP/ADP增加时AMPK被激活从而增加ATP的产生[2]. AMPK蛋白复合物由三个亚基α、β及γ亚基组成的复合物,其大小分别为63、38以及35 kDa[3]. 哺乳动物中存在两种类型的α亚基(α1和α2),其编码基因分别为*PRKAA1*和*PRKAA2*[3]. 在α亚基上存在苏氨酸172(Thr172)的激活环,当其被磷酸化后被激活[4],为保证AMPK活性所必须. 糖尿病患者体内血糖水平较高,对于糖尿病治疗的先决条件是血糖水平的降低. 肌肉细胞在机体运动及生活中需要提供大量的能量,因此肌肉细胞的葡萄糖消耗的提升是机体血糖降低的关键[5]. 而AMPK信号通路的激活可以促进葡萄糖转运蛋白4(glucose transporter 4, GLUT4)的基因表达及向细胞质膜的转运[6],这将提高细胞对于葡萄糖的摄取.

AMPK作为能量感知的关键,能够调节哺乳动物雷帕霉素靶标(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路促进脂肪酸进入线粒体氧化并抑制*SREBP-1c*基因减少脂肪合成[7-9]. 在肌肉细胞中AMPK的激活可以促进葡萄糖摄取,但是对于AMPK缺失的探究都仅细胞自噬中[10-11],而AMPK缺失后肌肉细胞的葡萄糖摄取变化的探究并不多. 本文使用CRISPR/Cas9系统对L6细胞中AMPKα1蛋白进行了敲除,旨在探究AMPKα1蛋白缺失对L6细胞葡萄糖摄取水平变化的影响.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大鼠L6细胞;LentiCRISPRv2质粒、感受态细菌Stbl3、10× T4 Ligation Buffer、T4连接酶(美国赛默飞);T4 PNK、10× Taq Buffer、dNTP、rTaq(大连宝生物);*Bsm*B I(美国纽英伦)、逆转录试剂盒(翌圣生物);质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒(美国Omega);α-MEM培养基(美国Gibco);Lipofectamine 8000(美国英杰);BCA蛋白浓度测定试剂盒、PMSF、SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒、Tween-20、BeyoECL Plus、上样缓冲液(碧云天);Protein Ladder(美国赛默飞);Anti-AMPKα、Anti-p-AMPKα(美国CST);Anti-β-actin(碧云天)、HRP-goat anti mouse IgG(康为世纪CW0102S);引物合成及基因测序(武汉擎科).

核酸凝胶成像系统、蛋白凝胶成像系统(美国BIO-RAD);细胞培养箱(力康生物);流式细胞仪(BD公司);DYY-6C型电泳仪(北京六一仪器);冷冻离心机(德国艾本德);酶标仪(Infinite200型,TECAN); Real-Time PCR System (美国赛默飞).

1.2 敲除细胞系的构建

1.2.1 sgRNA序列的设计

在NCBI上检索大鼠源*Prkaa 1*的基因序列,后CRISPR在线设计工具网站http://crispr.mit.edu/,选择评分最高的sgRNA,根据LentiCRISPRv2载体上*Bsm*B Ⅰ限制酶的酶切位点,在选定的sgRNA序列5′端添加CACCG,对应互补链的5′端添加AAAC,3′端添加C. sgRNA序列见表1.

表1 AMPKα1 sgRNA及菌落PCR序列

Tab. 1 AMPK α1 sgRNA and colony PCR sequences

引物名称	引物序列
AMPKα1-Y1-F	CACCGAAGATCGGCCACTACATCCT
AMPKα1-Y1-R	AAACAGGATGTAGTGGCCGATCTTC
AMPKα1-Y2-F	CACCGCATCAAGCAGGACGTTTTC
AMPKα1-Y2-R	AAACGAAAACGTCCTGCTTGATGC
LentiCRISPRv2-F	CAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGAC
LentiCRISPRv2-R	CGTTCACGGCGACTACTGC

1.2.2 LentiCRISPRv2-sgRNA表达载体的构建和鉴定

*Bsm*B I过夜,56 ℃酶切质粒,得到线性的LentiCRISPRv2载体,切胶回收后测其浓度. 将合成的成对的sgRNA退火为双链,再与线性化的LentiCRISPRv2载体使用T4连接酶连接,接着在42 ℃,热击45 s将连接产物转化至stbl3感受态细胞中,涂布于氨苄青霉素抗性平板上,37 ℃过夜培养,将长出来的菌落挑选单菌落,使用表1中引物序列进行菌落PCR验证,载体引物与sgRNA的PCR产物大小为500 bp左右,验证后,220 r/min摇菌,保种. 送测序公司测序以鉴定是否构建成功.

1.2.3 病毒包装及细胞转染

使用10% FBS-α-MEM培养基将293T细胞培养到状态良好,将状态良好的293T细胞接种在6孔板中,待其生长至80%~90%开始转染. 转染前换液,每孔1 mL 10% FBS-α-MEM,后每孔加入转染体系. 转染体系含2 μg质粒(1 μg V2载体+0.75 μg PSPAX2+0.25 μg PMD2.G)和6 μL lipo8000转染试剂. 转染12 h后换入病毒收集液(15% FBS-α-MEM,10 mM HEPES),每孔2 mL. 转染48 h后收病毒,吸取上清液后过0.22 μm的滤膜. 在收病毒之前L6细胞接种到六孔板, 4~6 h后转染,取病毒液1 mL,直接加入

细胞上清中. 感染24 h后换液为完全培养基.

1.2.4　单克隆细胞筛选

感染后4~5 d加2 μg/mL嘌呤霉素筛选，连续筛选7~10 d后筛选单克隆，并将筛选后的细胞，使用胰酶消化细胞后细胞计数，将其稀释到10个/μL后，以100 μL/孔加入到96孔板中，37 ℃恒温培养箱中生长.

1.3　敲除细胞系的鉴定

1.3.1　基因组提取及测序

细胞生长14 d后转到12孔板中生长至密度为80%时，将细胞收集，使用基因组提取试剂盒提取细胞基因组，使用表2中引物进行PCR扩增基因片段后测序.

表2　基因组测序引物

Tab. 2　Genome sequencing primers

引物名称	引物序列
cxAMPKα1-Y1-F	CGCAGACTCAGTTCCTGGAG
cxAMPKα1-Y1-R	TCCTAAAAGCAAGGCAGCGA
cxAMPKα1-Y2-F	AAACACGCCCAGATTCAGGT
cxAMPKα1-Y2-R	TGCAGAGTGGGTTTCTGGTC

1.3.2　Real-time PCR检测mRNA水平

NCBI网站中查找大鼠源AMPKα1蛋白编码基因的CDs序列，https://www.primer3plus.com/网站设计引物序列，序列见表3. RNA提取试剂盒提取总RNA，接着逆转录为cDNA.

反应体系：5× Real-time PCR mix 10 μL，Primer-R 0.5 μL，Primer-F 0.5 μL，cDNA 2 μL，ddH_2O 7 μL. Real-time PCR仪检测.

表3　Real-time PCR引物序列

Tab. 3　Real-time PCR primer sequences

引物名称	引物序列
AMPKα1-F	CGCAGACTCAGTTCCTGGAG
AMPKα1-R	TGGACCACCATATGCCTGTG
β-actin-F	CCACCATGTACCCAGGCATT
β-actin-R	CGGACTCATCGTACTCCTGC

1.3.3　Western Blot检测蛋白水平

待野生型L6细胞与AMPKα1蛋白敲除细胞株生长达到90%的汇合率时，提取细胞总蛋白，SDS-PAGE电泳后，转膜. TBST配制的5%的BSA封闭液封闭1 h，TBST洗3次后，一抗4 ℃孵育过夜，TBST洗3次，二抗4 ℃孵育1 h，TBST洗3次，后PBS洗两次，最后ECL显影观察结果.

1.4　敲除细胞系葡萄糖摄取水平的评价

将L6细胞和AMPKα1蛋白敲除细胞株分别接种于96孔板中，两种细胞各接种5列，每个组别都有6个孔重复，每孔加入100 μg/mL二甲双胍作用30 min，阴性对照组加入二甲双胍相同体积的DMSO. 使用葡萄糖氧化酶试剂盒检测葡萄糖摄取水平. 酶标仪检测505 nm吸光度，测量96孔板中每个孔中的数值并计算.

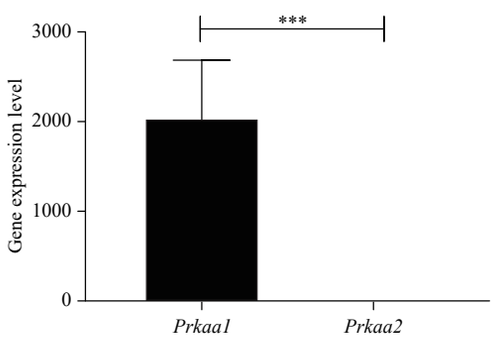
1.5　统计分析

Origin 9.0和Adobe Illustrator 2022绘图，*t*-test统计数据，$P<0.05$表明组间差异具有统计学意义（*：$P<0.05$；**：$P<0.01$；***：$P<0.001$）.

2　结果

2.1　*Prkaa1*与*Prkaa2*的表达水平

L6细胞中存在两种类型的AMPKα亚基，其编码基因分别为*Prkaa1*和*Prkaa2*，L6细胞转录组测序结果显示，L6细胞中仅有*Prkaa1*基因表达较高而*Prkaa2*则在L6细胞中表达极低，如图1所示. 因此，本研究仅针对*Prkaa1*基因进行后续实验.



L6细胞中AMPK两种α亚基的mRNA水平，***：$p<0.001$.

图1　L6细胞中两种AMPKα亚型的表达水平

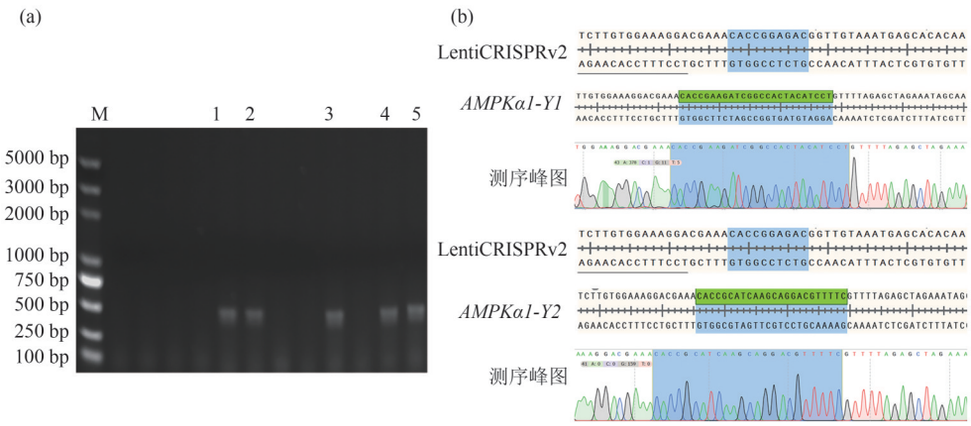
Fig. 1　Expression levels of two AMPK α isoforms in L6 cells

2.2　LentiCRISPRv2-*AMPKα1*重组质粒构建

如图2（a）所示，泳道1、2 LentiCRISPRv2-*AMPKα1-Y1*转化子在500 bp处有正确大小的产物条带，泳道3、4和5 LentiCRISPRv2-AMPKα1-Y2转化子也出现正确大小的产物条带. 在图2（b）中测序结果也显示sgRNA连接成功. 因此，初步检测LentiCRISPRv2-*AMPKα1-Y1*和LentiCRISPRv2-*AMPKα1-Y2*重组载体构建成功.

2.3　*AMPKα1*突变细胞基因组鉴定

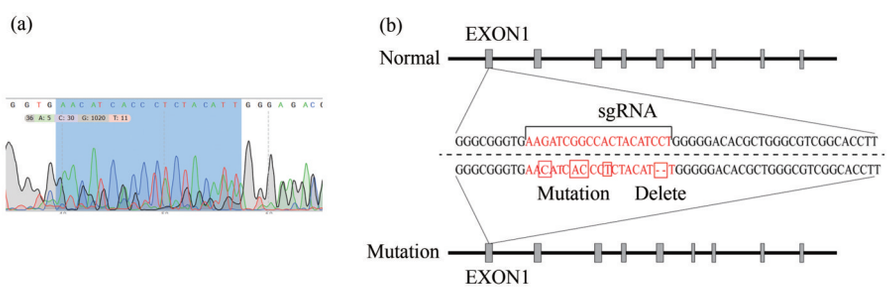
在图3（a）测序峰图结果中，sgRNA位置存在碱基的突变. 而在图3（b）中示意*AMPKα1*突变细胞在第一个外显子上第一个sgRNA序列中产生4个点突变以及两个碱基的缺失，这可能将阻断AMPKα1蛋



(a) 阳性菌落PCR;(b) 阳性菌落测序结果

图2 重组质粒DNA凝胶及测序结果

Fig. 2 Recombinant plasmid DNA gel and sequencing results



(a) 细胞测序峰图;(b) 突变细胞测序结果与野生型序列比对

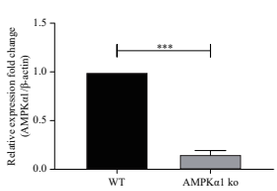
图3 突变细胞与野生型对比

Fig. 3 Comparison of mutant cells with wild type

白的表达.这说明AMPKα1蛋白编码基因的sgRNA位置发生突变,从而导致AMPKα1蛋白的敲除.

2.4 *AMPKα1* 突变细胞转录水平鉴定

RT-PCR检测*AMPKα1*基因表达水平的变化结果(图4)表明,与野生型细胞相比,在突变细胞中*AMPKα1*的mRNA量减少85.1%,这表明敲除细胞中*AMPKα1*编码基因序列的突变导致其mRNA量减少,初步表明*AMPKα1*的敲除从转录水平抑制其表达.



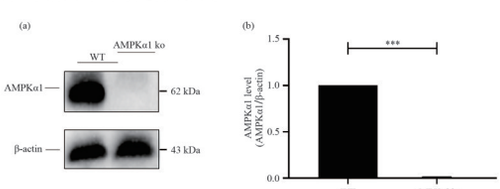
***:p<0.001.

图4 突变细胞与野生型中*AMPKα1*mRNA水平

Fig. 4 *AMPKα1* mRNA levels in in mutant cells and wild type cells

2.5 *AMPKα1* 突变细胞蛋白水平鉴定

如图5(a)所示,与野生型相比,*AMPKα1*突变细胞中AMPKα1蛋白的表达水平显著下降,并且图5(b)的West Blot实验统计结果显示AMPKα1蛋白的表达显著下降,其水平减少99.3%.这表明*AMPKα1*的敲除细胞系构建完成.



***:p<0.001.

(a) 突变细胞与野生型细胞的AMPKα1蛋白表达水平;(b) 统计图

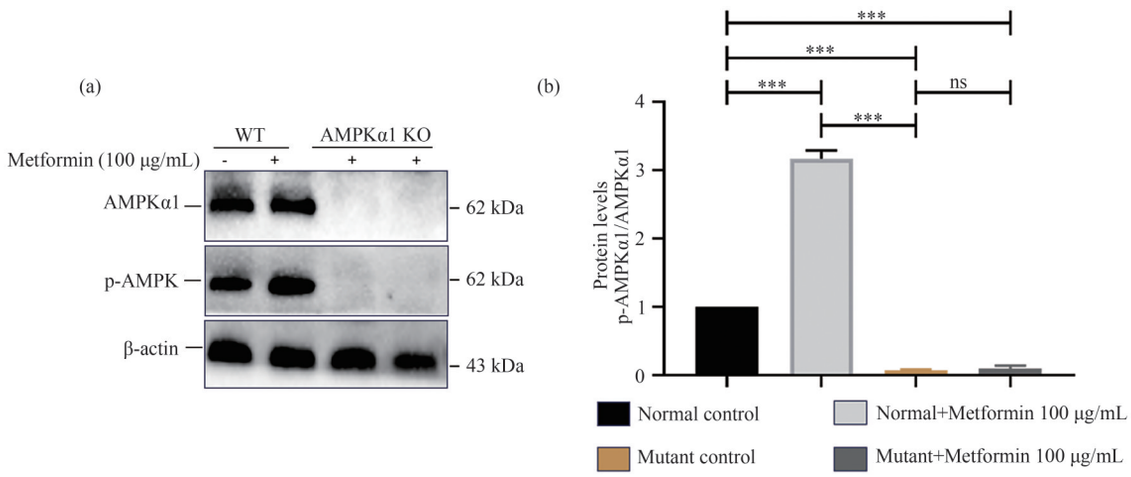
图5 突变型与野生型细胞的AMPKα1蛋白水平

Fig. 5 AMPKα1 levels in mutant cells and wild type cells

2.6 *AMPKα1* 突变细胞抗糖尿病药物的作用发挥的变化

在α亚基上存在Thr172的激活环,磷酸化后被激活[4],这是保证AMPK活性必须的.为了验证AMPKα1的缺失对于抗糖尿病药物二甲双胍发挥作用的影响,通过West Blot实验检测AMPKα1和其磷酸化水平的变化,如图6(a)所示.与对照相比,二甲双胍作用后,野生型细胞p-AMPKα1水平呈现上升的趋势,而在*AMPKα1*突变细胞中AMPKα1的蛋白水平完全消失,p-AMPKα1水平与非磷酸化水平变化一致.与对照相比,二甲双胍作用后野生型p-AMPKα1的水平增加了3.17倍,而在*AMPKα1*突

变细胞中并没有出现这种变化（图 6(b)）. 这表明 AMPKα1 对于抗糖尿病药物治疗糖尿病的作用中是不可或缺的.



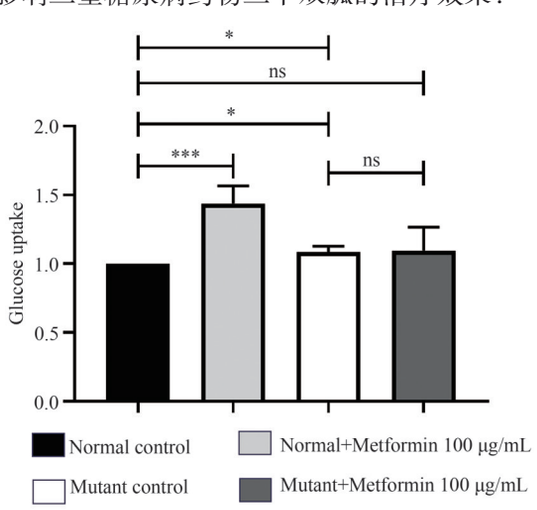
ns：P>0.005；***：P<0.001.

（a）p-AMPKα1 水平；（b）统计图

图 6　突变细胞与野生型细胞 p-AMPKα1 水平及统计

Fig 6　The level of p-AMPKα1 in mutant cells and wild type cells

肌肉细胞在机体运动及生活中需要提供大量的能量，肌肉细胞的葡萄糖消耗的提升是机体血糖降低的关键[5]. 突变细胞与野生型细胞在二甲双胍作用后的葡萄糖摄取水平如图 7 所示，加入二甲双胍后，与野生型细胞相比，在 AMPKα1 敲除细胞葡萄糖摄取水平下降 23.7%，这表明 AMPKα1 的缺失将影响二型糖尿病药物二甲双胍的治疗效果.



ns：P>0.005；*：P<0.05；***：P<0.001.

图 7　突变细胞与野生型细胞葡萄糖摄取水平

Fig. 7　Glucose uptake levels in mutant and wild-type cells

3　讨论

AMPK 信号转导的激活发生在能量较低的压力条件下，α 亚基具有催化活性，其在苏氨酸 172（T172）位点的磷酸化诱导 AMPK 信号转导激活[12]. 代谢应激能够通过提高 AMP 水平和降低 ATP 水平来触发 AMPK 信号传导. 达格列净刺激 AMPK 磷酸化来降低哺乳 mTOR 水平，从而导致自噬诱导并减少细胞凋亡[13]. AMPK 诱导的自噬在非酒精性脂肪性肝病（non-alcoholic fatty liver disease，NAFLD）治疗中也发挥很大作用. 犬尿喹啉酸通过上调 AMPK 刺激自噬以减轻 NAFLD[14].

糖尿病治疗的问题之一是血液中的高血糖水平. 因此，可以采用降低血液中葡萄糖水平的策略来改善糖尿病. 糖尿病患者的肌肉细胞会产生胰岛素抵抗，它们不能消耗糖尿病患者体内中的葡萄糖[6]. AMPK 可以独立于 AMP 水平被激活，因此糖尿病药物的治疗可以通过非 AMP 水平来诱导 T172 磷酸化，从而导致 GLUT4 上调. 迷迭香提取物已被证明参与增强具有胰岛素抵抗的肌肉细胞对葡萄糖的摄取能力，其增强肌肉细胞对葡萄糖摄取的机制是通过诱导 AMPK 磷酸化. 然后，AMPK 提高 GLUT4 的水平以刺激肌肉细胞摄取葡萄糖[15].

为了验证 AMPKα 亚基在糖尿病药物治疗中的具体作用，在转录组测序结果中发现，L6 细胞中存在两种类型的 AMPKα 亚基，其编码基因分别为 *Prkaa1* 和 *Prkaa2*，L6 细胞转录组测序结果显示，L6 细胞中仅有 *Prkaa1* 基因表达较高而 *Prkaa2* 则在 L6 细胞中表达极低. 因此，构建了 AMPKα1 的 LentiCRISPRv2-sgRNA 重组质粒，将其包装为病毒液后转染 L6 细胞，经单克隆筛选得到一株 AMPKα1

编码基因突变的细胞系.使用RT-PCR检测到突变细胞系中AMPKα1编码基因转录水平与野生相比下降85.1%. West Blot结果显示*AMPKα1*突变细胞系中AMPKα1蛋白的表达量与野生型相比下降99.3%.

AMPKα亚基的磷酸化是二甲双胍治疗糖尿病的关键,二甲双胍作用野生型细胞后p-AMPKα1增加了3.17倍,但是这种增加在*AMPKα1*突变细胞中并没有出现.并且在葡萄糖摄取实验中,与野生型细胞加入二甲双胍相比,在*AMPKα1*敲除细胞中加入二甲双胍后,葡萄糖摄取水平下降23.7%.这表明AMPKα亚基的缺失对于糖尿病治疗药物的影响较大.AMPKα1亚基的缺失导致二甲双胍通过磷酸化激活AMPK信号通路增加的葡萄糖摄取能力完全消失.因此,AMPKα1在抗糖尿病药物的治疗作用中是不可或缺的,这为糖尿病药物的开发和使用提供了方向.

参 考 文 献

[1] Hardie D G, Carling D, Halford N. Roles of the Snf1/Rkin1/AMP-activated protein kinase family in the response to environmental and nutritional stress [J]. Seminars in Cell Biology, 1994, 5(6): 409-416.

[2] Carling D. AMPK signalling in health and disease [J]. Current Opinion in Cell Biology, 2017, 45: 31-37.

[3] Stapleton D, Mitchelhill K I, Gao G, et al. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(2): 611-614.

[4] Hawley S A, Davison M, Woods A, et al. Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(44): 27879-27887.

[5] Entezari M, Hashemi D, Taheriazam A, et al. AMPK signaling in diabetes mellitus, insulin resistance and diabetic complications: A pre-clinical and clinical investigation [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 146: 112563.

[6] Shamshoum H, Vilavcheski F, Macpherson R E K, et al. Rosemary extract activates AMPK, inhibits mTOR and attenuates the high glucose and high insulin-induced muscle cell insulin resistance [J]. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, 2021: 1-9.

[7] Bassett A R, Liu J L. CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila* [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2014, 41(1): 7-19

[8] Ramalingam S, Annaluru N, Chandrasegaran S. A CRISPR way to engineer the human genome [J]. Genome Biology, 2013, 14(2): 107.

[9] 薛璐, 欧阳聪, 孙宁远, 等. 基于CRISPR/Cas9技术建立敲除*Plac9*基因的人胚肾细胞株[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2019, 38(2): 189-192.

[10] Ma Y, Zhang L, Huang X. Genome modification by CRISPR/Cas9 [J]. The FEBS Journal, 2014, 281(23): 5186-5193.

[11] Mali P, Yang L, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering *via* Cas9 [J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826.

[12] Steinber G R, Kemp B E. AMPK in health and disease [J]. Physiological Reviews, 2009, 89(3): 1025-1078.

[13] Arab H H, Al-Shorbagy M Y, SAAD M A. Activation of autophagy and suppression of apoptosis by dapagliflozin attenuates experimental inflammatory bowel disease in rats: Targeting AMPK/mTOR, HMGB1/RAGE and Nrf2/HO-1 pathways [J]. Chemico-Biological Interactions, 2021, 335: 109368.

[14] Pyun D H, Kim T J, Kim M J, et al. Endogenous metabolite, kynurenic acid, attenuates nonalcoholic fatty liver disease *via* AMPK/autophagy- and AMPK/ORP150-mediated signaling [J]. Journal of Cellular Physiology, 2021, 236(7): 4902-4912.

[15] Baron D C, Marko D M, Tsiani E, et al. Rosemary extract increases neuronal cell glucose uptake and activates AMPK [J]. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, 2021, 46(2): 141-147.

(责编&校对 姚春娜)