

CaMK 和 AMPK 信号通路能共调收缩信号 诱导的骨骼肌细胞 GLUT4 基因转录 *

李良刚^{1, 2)} 陈槐卿^{1)**}

(¹⁾ 四川大学华西医学中心生物医学工程研究室, 成都 610041; ²⁾ 成都体育学院运动医学系, 成都 610041)

摘要 钙/钙调素依赖性蛋白激酶(calmodulin dependent protein kinase, CaMK)和腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)所介导的信号通路均能调节运动诱导的骨骼肌细胞葡萄糖转运蛋白 4(glucose transporter 4, GLUT4)基因表达, 但不清楚这两条通路的相互关系. 运用咖啡因(Caffeine)和 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核糖核苷酸(AICAR)能模拟肌肉收缩信号并分别激活 CaMK 和 AMPK, 首次观察由 Caffeine 和 AICAR 引起的 GLUT4 基因表达过程中这两条通路的内在联系. 原代培养肌细胞被分为对照、AICAR、Caffeine、AICAR/Caffeine、Caffeine+Compound C、AICAR/Caffeine+Compound C、AICAR+KN93、AICAR/Caffeine+KN93 组. 实验显示, AICAR 和 Caffeine 能分别上调 GLUT4 mRNA 约 2 倍和 3 倍($P < 0.05$), AMPK 抑制剂 Compound C 能够明显减少由 Caffeine 引起的 GLUT4 mRNA 的增长($P < 0.05$), 也能够明显降低由 AICAR/Caffeine 复合刺激引起的 GLUT4 mRNA 的表达($P < 0.05$), 与此一致的是, Caffeine 能引起肌细胞 AMPK α 1 蛋白磷酸化增加($P < 0.05$), 但不影响 AMPK α 2 的磷酸化, Compound C 能够抑制由 Caffeine 引起的 AMPK α 1 蛋白磷酸化($P < 0.05$). 相反 CaMK 特异的抑制剂 KN93 能完全抑制由 Caffeine 引起的 GLUT4 mRNA 增长, 但 KN93 却不能交叉抑制由 AICAR 所诱导的 GLUT4 mRNA 的增长($P < 0.05$), 也不能阻止由 AICAR/Caffeine 复合刺激所引起的 GLUT4 mRNA 的表达($P < 0.05$). 上述结果提示, CaMK 和 AMPK 在调节肌细胞 GLUT4 基因中并不是完全相互独立的, 而是彼此密切联系共同作用, AMPK 可能位于 CaMK 途径的下游来调节收缩肌细胞 GLUT4 mRNA 的表达.

关键词 葡萄糖转运蛋白 4, 基因调节, 钙/钙调素依赖性蛋白激酶, 腺苷酸活化蛋白激酶

学科分类号 R8, Q4

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00614

糖尿病是威胁人类健康的重大疾病之一. 其主要发病机制是外周组织特别是骨骼肌组织不能够有效地摄取葡萄糖所引起的胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)^[1~4]. 研究表明, 由葡萄糖转运蛋白(glucose transporter, GLUT)负责的将细胞外葡萄糖跨膜转运入细胞内是骨骼肌细胞摄取葡萄糖的关键限速步骤^[5]. 在 GLUT 家族中的成员 GLUT4 是最重要的转运蛋白, 唯有它能够既应答胰岛素刺激又能应答肌肉收缩刺激, 损坏 GLUT4 负责的糖转运就会导致严重的胰岛素抵抗^[3, 5]. GLUT4 基因的表达从根本上决定了 GLUT4 蛋白表达水平及其转运葡萄糖的能力^[6, 7], 在转基因鼠骨骼肌细胞内仅因过量表达 GLUT4 就能够直接全面改善和逆转糖尿病鼠胰岛素抵抗的多项症状^[8~10].

具有重大意义的是, 运动/肌肉收缩能强烈上调骨骼肌细胞 GLUT4 基因表达^[11], 且通过不同于

经典的胰岛素介导的 PI3-K 信号途径^[12], 即不需要胰岛素的信号途径. 这为仅依赖于胰岛素的 I 型糖尿病和因胰岛素-PI3-K 信号传导障碍所致的 II 型糖尿病的治疗和药物设计开辟了一条新途径. 事实上仅一次耐力训练就能引起 GLUT4 基因的显著变化^[13~15], 经常体育运动就能够引起机体产生多种与 GLUT4 基因密切相关且对消除糖尿病有利的代谢适应^[16]. 例如有效地降低对胰岛素的抵抗性^[16, 17]、提高对胰岛素的敏感性^[18, 19]、刺激骨骼肌对葡萄糖摄取和利用^[13, 20]、加强对胰岛素的分泌^[18]和提高对

* 国家留学基金委资助项目(CSC3034)和四川省科技厅应用基础研究资助项目(07ZY029-097).

** 通讯联系人.

Tel: 028-85093009, E-mail: chen_huaiqing@sohu.com

收稿日期: 2008-09-04, 接受日期: 2008-11-01

葡萄糖的耐受力^[16, 21, 22]等. 普遍认为这些代谢适应主要是因为运动所致的、以 GLUT4 为主的基因长期表达累积的结果. 鉴于“运动诱导性 GLUT4 基因表达”所致的对治疗糖尿病有利的种种益处, 研究调节该基因表达的信号途径就十分重要.

研究^[23]显示, 钙/钙调素依赖性蛋白激酶 (calcium-calmodulin dependent protein kinase, CaMK) 和腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 所介导的信号通路, 均能有效地调节运动/肌肉收缩引起的骨骼肌细胞 GLUT4 的基因表达. 但不清楚这两条信号通路在调节 GLUT4 基因过程中的相互关系. 由于这两条信号通路所需的起始刺激信号不同, 普遍认为这两条信号通路在调节 GLUT4 基因表达过程中是相互独立的. 但近几年对骨骼肌细胞葡萄糖摄取的研究来看, CaMK 能够通过激活 AMPK 来调节肌细胞葡萄糖摄取. 本研究假设骨骼肌细胞通过相似的信号传导机制来调节运动/肌肉收缩诱导的 GLUT4 基因表达. 在离体条件下, 咖啡因 (Caffeine) 和 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核糖核苷酸 (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranosyl-5-monophosphate, AICAR) 能够分别模拟运动时肌肉收缩引起肌细胞钙 (Ca^{2+}) 增加和一磷酸/三磷酸腺苷 (AMP/ATP) 比值的变化, 而激活 CaMK 和 AMPK 所介导的信号通路. 基于此, 本研究首次观察 CaMK 和 AMPK 信号通路在调节由肌肉收缩模拟信号 Caffeine 和 AICAR 刺激引起的骨骼肌细胞 GLUT4 基因表达过程中这两条信号途径之间的内在联系. 这为设计和研发出疗效确切、副作用少、具有类似于运动疗效的糖尿病化学药物提供依据, 具有重要现实意义.

1 材料与方法

1.1 试剂

Hams F-10 培养基、抗生素 (Antibiotics)、两性霉素 B (Fungizone)、0.05% Trypsin/EDTA (1 $\times$)、L-谷氨酰胺 (100 $\times$)、DMEM with GLUTAMAX-I、Alpha MEM、DMSO 购于美国 GIBCO 公司, SkGM 购于 Clonetics 公司. 反转录酶试剂盒 (Promega AMV Reverse Transcription Kit) 购于 Promega 公司. 抗 AMPK α 1 和 AMPK α 2 蛋白抗体, 抗 AMPK α 磷酸化抗体购于 Abcam 公司. Compound C 购于 Merck 公司; ECM、AICAR、Caffeine、KN93、其他试剂均购于 Sigma 公司.

1.2 骨骼肌细胞培养

1.2.1 骨骼肌细胞分离和培养. 获取 SD 大鼠后肢骨骼肌组织放入 20 ml 体积预冷的 Hams F-10 培养液. 在 10 ml Hams F-10 培养液中漂洗 3 次, 每漂洗完后, 换 10 ml 新 Hams F-10 培养液. 显微镜下尽量去除脂肪、神经、血管和肌腱等结缔组织的非肌肉组织. 将漂洗后肌肉组织放入盘中, 加入 5 ml 0.05% 胰蛋白酶/EDTA, 应该覆盖肌肉组织, 并使用大解剖刀片将肌肉组织分离成若干细小的肌束, 剪成 1 mm³ 左右的肌肉碎屑. 将切碎的肌肉组织和培养液一起转移到一个经消毒的培养瓶 (50~100 ml), 加入 10~20 ml 的 0.05% Trypsin/EDTA 到培养瓶 (20~50 mg 肌肉组织, 使用 10 ml; 50 mg 肌肉组织, 20 ml). 将上述培养瓶放在摇台上, 室温下, 以低速度摇摆 20~30 min. 收集上清液. 另加入 10~20 ml 的 0.05% Trypsin/EDTA, 重复此步骤. 将两次收集到的上清液 (30~50 ml), 加入 FBS, 并使得 FBS 的终浓度为 10%. 使用 100 μ m 的细胞过滤器过滤上清液, 去掉结缔组织. 室温下, 将过滤后的上清液进行 1 600 g, 7 min 的离心. 去掉上清液, 使用 5 ml SkGM 悬浮细胞沉淀. 将细胞种在未涂层的 25 cm² 培养瓶中, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 25 min. 将包含有成肌细胞 (myoblasts) 的 5 ml 培养液转入已经 ECM 涂层的 25 cm² 培养瓶中. 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养细胞. 在第 2 天更换培养液, 以后一周更换 2 次. 对于 25 cm² 培养瓶, 加入 2 ml SkGM, 75 cm² 培养瓶, 加入 12 ml SkGM. 细胞增殖到 60%~70% 时传代.

1.2.2 平板克隆形成试验. 把 6 个样本的细胞按照同一个样本的细胞分为 Control、AICAR、Caffeine、AICAR/Caffeine、AICAR+Compound C、Caffeine+Compound C、AICAR/Caffeine+Compound C、Caffeine+KN93、AICAR+KN93、AICAR/Caffeine+KN93 组, 使用 6 孔板培养用于 GLUT4 mRNA 的检测, 而其中 Control、Caffeine 和 Caffeine+Compound C 组需另使用单孔平板进行培养用于蛋白质的检测. 细胞分化后 AICAR、Caffeine 和 AICAR/Caffeine 组分别加入 2 mmol/L AICAR 和不引起肌细胞收缩的 3 mmol/L Caffeine 分别孵育 2 h 后中止, 12 h 后收集细胞. 抑制剂 Compound C 各组在分别加入 AICAR、Caffeine、AICAR/Caffeine 之前先使用 20 μ mol/L Compound C 孵育 30 min 后再分别孵育这些刺激子 2 h, 12 h 后收集细胞. 抑

制剂 KN93 各组在分别加入 AICAR、Caffeine 和 AICAR/Caffeine 之前先使用 10 $\mu\text{mol/L}$ KN93 预孵育 30 min, 其他步骤与抑制剂 Compound C 各组一样. 单孔平板培养的 Control、Caffeine 和 Caffeine+Compound C 组分别被处理后需即刻收集细胞.

1.3 样品检测

1.3.1 细胞总 GLUT4 mRNA 提取和检测.

使用 Ambion 公司的试剂盒提取细胞总 GLUT4 mRNA. 弃培养基后, 按照培养细胞的面积每 10 cm^2 加入不低于 1 ml 的 RNAwiz 收集细胞, 记录 RNAwiz 的量作为起始体积, 并充分混合. 室温下孵育匀浆液 5 min 使得细胞核蛋白分离. 加入 0.2 $\times$ 起始体积的氯仿. 室温下摇动 20 s 和孵育 10 min. 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 以 1 000 g 离心 15 min, 使混合物分为三相. 小心吸取上清相, 并转移到无 RNA 酶的 2 ml 管中. 加入 0.5 $\times$ 起始体积无 RNA 酶的水. 加入 1 $\times$ 起始体积异丙醇充分混合, 室温下孵育 10 min. 再一次在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 以 1 000 g 离心 15 min, 获得 RNA 沉淀. 使用至少 1 $\times$ 起始体积冷乙醇清洗 RNA 沉淀, 离心去上清. 待 RNA 沉淀室温下自然晾干 10 min 后, 加入无 RNA 酶的水, 混合后为待测样品.

定量 PCR 检测 GLUT4 mRNA. 使用反转录酶试剂盒(Promega AMV Reverse Transcription Kit)合成 cDNA. 从 PubMed 的 GenBank 检索 GLUT4 mRNA 序列. 引物设计: GLUT4 cDNA 正义引物, 5' GCCAGCCTACGCCACCATA 3', 反义引物, 5' ACCCATAGCATCCGCAAC 3'; β -actin cDNA 引物, 设计方法同上, 正义引物, 5' CACGATGGA GGGGCCGACTCATC 3', 反义引物, 5' TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT 3'. PCR 包括三步: 在 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共循环 32 次. 使用序列检测仪完成实时 PCR. 通过内参 β -actin 把 GLUT4 mRNA 表达水平标准化.

1.3.2 细胞核蛋白提取. 将培养细胞加入用冰预冷的 500 μl 缓冲液 A(250 mmol/L 蔗糖, 10 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 2 μl 用于组织的蛋白酶抑制剂混合物), 匀浆后置于冰上 30 s. 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 500 g 离心 5 min. 弃上清液, 保留沉淀, 并用预冷的 500 μl 缓冲液 B(50 mmol/L Tris pH 7.5, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 50 mmol/L NaF, 5 mmol/L 焦磷酸钠(Na pyrophosphate), 50 mmol/L MgCl_2 , 10%

甘油, 1% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF 和 1 $\mu\text{l}/20\text{ mg}$ 细胞的蛋白酶抑制剂混合物)溶解沉淀物, 置于冰上 10 min 并混合 2~3 次. 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 3 000 g 离心 5 min. 上清部分为核蛋白. 本实验中细胞核蛋白提取物纯化鉴别以测定细胞核提取物 β -tublin.

1.3.3 免疫沉淀. 将提取的细胞核蛋白约 500 μg , 加入免疫沉淀缓冲液(50 mmol/L Tris、pH 7.5、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L EGTA、10% 甘油、1% Triton X-100、50 mmol/L NaF、5 mmol 焦磷酸钠、1 mmol/L DTT 和 1 mmol/L PMSF). 样品用 50 μl 蛋白 A 琼脂糖微球进行预洗涤后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下样品用 2 μl α 1-AMPK 抗体进行孵育过夜. 样品再一次与 50 μl 蛋白 A 琼脂糖微球在 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转条件下孵育 2 h. 与微球结合的免疫复合物通过离心沉淀, 并用 1 ml 免疫沉淀缓冲液洗涤 4 次, 获得免疫复合物. 使用 α 2-AMPK 抗体免疫沉淀 α 2-AMPK, 步骤相同.

1.3.4 蛋白质检测. 把细胞总蛋白装到 8%丙烯酰胺凝胶中, 然后在 150 V 进行 75 min 电泳. 采用湿转移法在 100 V 和 100 min 将胶中蛋白转移到 PVDF 膜上. 膜使用封闭缓冲液(Tris- 缓冲盐液和 0.25%的 Tween 处理后 5%奶粉)封闭 1h. 加入一抗并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜. 加入辣根过氧化物酶标记二抗, 在封闭缓冲液中的浓度为 1/10 000, 室温下进行 60min 结合. 抗体结合用 enhanced chemiluminescence substrate 显影, 定量计算 α 1-AMPK 蛋白的相对变化. 使用 α 1-AMPK 磷酸化抗体检测 AMPK α 1 蛋白磷酸化水平. 细胞核 AMPK α 1 蛋白以 β -tublin 为内参把目的蛋白表达水平标准化. 使用 α 2-AMPK 磷酸化抗体, α 2-AMPK 磷酸化的检测步骤与 α 1-AMPK 磷酸化相同.

1.3.5 实验结果的统计学处理. 所有数据运用 SPSS 10 统计软件进行统计分析, 每组样本均为 6 例. 采用均数 t 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 实验结果

2.1 AICAR、Caffeine 和 AICAR+Caffeine 刺激下骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 的表达水平

AICAR、Caffeine 和 AICAR+Caffeine 组与对照组相比, 骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 分别是对照组的(3.02 $\pm$ 0.56)、(4.42 $\pm$ 1.3)和(3.47 $\pm$ 0.86)倍, 分别比对照组高 2.02、3.42 和 2.47 倍. 其显著性检验均是 $P < 0.05$, $n=6$. 实验结果见图 1.

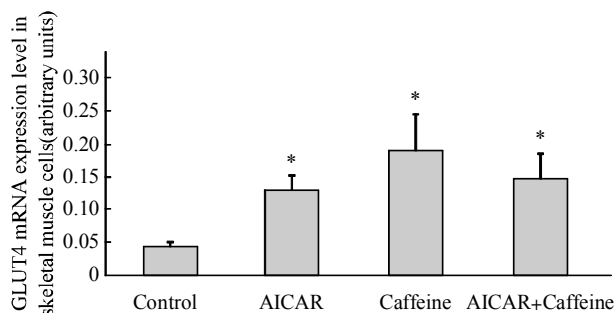


Fig. 1 Expression level of GLUT4 mRNA in the groups of Control, AICAR, Caffeine, AICAR/Caffeine

All quantitative values of GLUT4 mRNA in these groups are reported as the $\bar{x} \pm s$, $n=6$. * $P < 0.05$, compared with control.

2.2 Compound C 对 Caffeine 和 AICAR/Caffeine 所引起的骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 表达的影响

Caffeine +Compound C 和 AICAR/Caffeine + Compound C 组分别与 Caffeine 和 AICAR/Caffeine 组相比, 其骨骼肌细胞的 GLUT4 mRNA 表达减少了 2.46 和 1.91 倍, 统计检验均为, $P < 0.05$, $n=6$, 见图 2. 说明 Compound C 能够有效抑制由 Caffeine 和复合刺激 AICAR/Caffeine 诱导的骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 的表达.

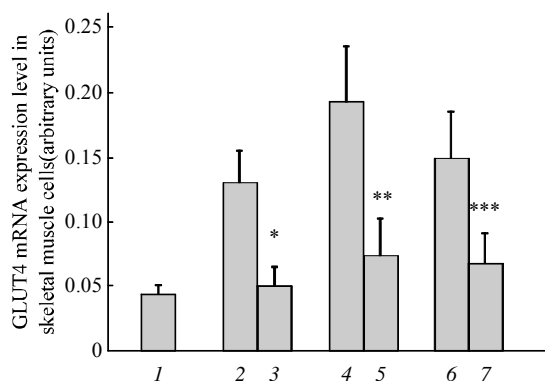


Fig. 2 Expression level of GLUT4 mRNA in groups of Control, AICAR, AICAR+Compound C, Caffeine, Caffeine+Compound C, AICAR/Caffeine and AICAR/Caffeine+Compound C

All quantitative values of GLUT4 mRNA in these groups are reported as the $\bar{x} \pm s$, $n=6$. *, **, *** $P < 0.05$, compared with AICAR, Caffeine, and AICAR/Caffeine respectively. 1: Control; 2: AICAR; 3: AICAR+Compound C; 4: Caffeine; 5: Caffeine+Compound C; 6: AICAR/Caffeine; 7: AICAR/Caffeine+Compound C.

2.3 KN93 对 Caffeine、AICAR 和 AICAR + Caffeine 所引起的骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 表达的影响

Caffeine + KN93、AICAR + KN93 和 AICAR/Caffeine + KN93 组分别是对照组的 (1.07 ± 0.35) 、 (3.07 ± 0.77) 、 (3.24 ± 0.95) 倍, 分别比对照组高 0.07、2.07 和 2.3 倍. 其显著性检验分别为 $P > 0.05$, $P < 0.05$ 和 $P < 0.05$, $n=6$, 见图 3.

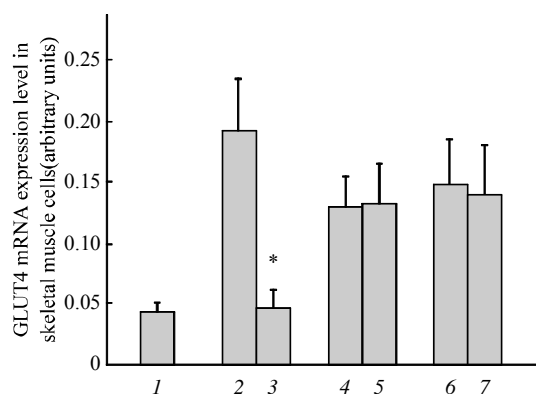


Fig. 3 Expression level of GLUT4 mRNA in groups of Control, Caffeine, Caffeine+KN93, AICAR, AICAR+KN93, and AICAR/Caffeine, AICAR/Caffeine+KN93

All quantitative values of GLUT4 mRNA in these groups are reported as the $\bar{x} \pm s$, $n=6$. * $P < 0.05$, compared with Caffeine. 1: Control; 2: Caffeine; 3: Caffeine + KN93; 4: AICAR; 5: AICAR + KN93; 6: AICAR/Caffeine; 7: AICAR/Caffeine+KN93.

2.4 CaMK 激活子 Caffeine 和 AMPK 抑制剂 Compound C 对 α -AMPK 蛋白的影响

与对照组相比, Caffeine 所引起的骨骼肌细胞 $\alpha 1$ -AMPK 蛋白磷酸化水平是对照组的 (1.26 ± 0.52) 倍, $P < 0.05$, 而 AMPK- $\alpha 2$ 的磷酸化水平是对照组的 (1.12 ± 0.21) 倍, $P > 0.05$, 说明 Caffeine 能够激活 $\alpha 1$ -AMPK, 但不能影响 $\alpha 2$ -AMPK 的磷酸化水平. 使用 AMPK 抑制剂 Compound C 孵育骨骼肌细胞后, 其 Caffeine+Compound C 组的 $\alpha 1$ -AMPK 蛋白磷酸化水平比 Caffeine 组减少了 51% 倍, $P < 0.05$, $n=6$, 见图 4.

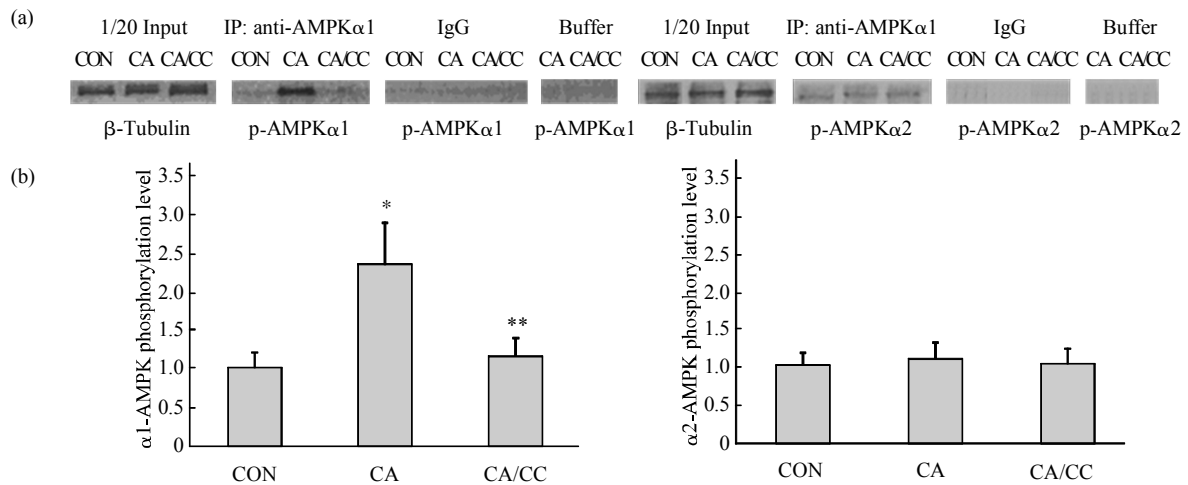


Fig. 4 The level of α 1-AMPK and α 2-AMPK protein phosphorylation under different groups

(a) Protein blotting results after immunoprecipitation. All quantitative values in (b) were reported as the $\bar{x} \pm s$, $n=6$. *, ** $P < 0.05$, compared with control and Caffeine respectively. CON: Control; CA: Caffeine; CC: Compound C.

3 讨 论

3.1 AICAR、Caffeine 单一刺激和 AICAR + Caffeine 复合刺激对骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 的影响

肌肉收缩能增加骨骼肌细胞内 AMP 浓度而引起细胞内 AMP/ATP 比值的变化, 该变化作为信号刺激能够激活蛋白激酶 AMPK. AICAR 在骨骼肌细胞内能被代谢为 AMP 的类似物, 因此 AICAR 既是 AMPK 特异的激活子, 也是运动刺激的模拟信号, 所以在离体条件下 AICAR 能够模拟由肌肉收缩时所引起 AMP/ATP 比值的变化. AICAR 孵育骨骼肌细胞就会增大骨骼肌细胞内 AMP/ATP 比值而激活蛋白激酶 AMPK. 研究表明, AMPK 在调节肌肉收缩引起的 GLUT4 基因表达过程中起着重要作用^[24]. 在静息状态下 α 2-AMPK 主要定位在细胞浆, 受到 AICAR 所引起 AMP/ATP 比值升高的信号刺激后, α 2-AMPK 的 Thr172 位点被磷酸化而值得整个激酶被激活, 然后转位到细胞核内, 激活核内的关键性调节蛋白来调节 GLUT4 基因的表达^[25]. 本实验中观察到 AICAR 组骨骼肌细胞的 GLUT4 mRNA 比对照组高 2 倍, 表明运动刺激的模拟信号 AICAR 能够上调骨骼肌细胞 GLUT4 基因的表达, 这一结果支持 AMPK 所介导的信号通路是调节 GLUT4 基因表达的重要途径.

研究证明, CaMK 介导的信号通路也是调节收缩骨骼肌细胞 GLUT4 基因表达的重要信号途径^[26]. 骨骼肌细胞内 Ca^{2+} 浓度升高能够激活 CaMK 蛋白激酶. Caffeine 孵育骨骼肌细胞就能够提高细胞

Ca^{2+} 的浓度, 所以 Caffeine 能够模拟运动时肌肉收缩所引起的细胞 Ca^{2+} 变化的效果, 而激活 CaMK. 在 CaMK 家族中, II 型 CaMK (CaMK II) 是由 4 个类似的但是由不同基因(α 、 β 、 γ 和 δ)编码的蛋白激酶, 能够高度感受骨骼肌细胞内钙浓度变化. Rose 等^[26]的肌肉活检研究显示, 骨骼肌细胞 CaMK II 在安静时不具活性, 而在细胞钙增加时变得活跃, 运动 5 min 和 40 min 时 CaMK II - δ/γ (Thr287) 的活性分别是运动前的 $(67 \pm 12)\%$ 和 $(52 \pm 14)\%$, 表明运动能激活人骨骼肌细胞 CaMK II. David 等在肌肉收缩引起的葡萄糖摄取实验中也发现肌肉收缩刺激能够磷酸化骨骼肌细胞 CaMK II 的 Thr287 位点^[27]. 此外 Antipenko 和 Fluck 等^[28, 29]的研究也证实鼠肌肉收缩刺激能上调细胞 Ca^{2+} 并能够激活骨骼肌 CaMK II. 所以肌肉收缩更可能使 Ca^{2+} 升高激活 CaMK II. 本实验中观察到运动刺激的模拟信号 Caffeine 能够刺激正常葡萄糖浓度组骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 比对照组高 3.4 倍. 表明细胞 Ca^{2+} 调节子 Caffeine 能够上调骨骼肌细胞 GLUT4 基因的表达, 支持 CaMK 介导的信号通路在调节收缩骨骼肌细胞 GLUT4 基因表达中起着重要作用.

AICAR 和 Caffeine 是完全不同的肌肉收缩刺激信号, 并独立激活完全不同蛋白激酶, 所以多数学者认为, 由骨骼肌细胞内 AMP/ATP 比值增大而激活的蛋白激酶 AMPK 与由肌肉收缩引起的细胞内 Ca^{2+} 变化而激活的蛋白激酶 CaMK 是完全独立的两条信号途径. 但是在本实验中, 我们使用 AICAR 和 Caffeine 同时孵育骨骼肌细胞时, 并没

有观察到骨骼肌细胞内 GLUT4 mRNA 的表达出现叠加效应, 即 AICAR+Caffeine 复合刺激时骨骼肌细胞内的 GLUT4 mRNA 表达水平与使用单一的 AICAR 或 Caffeine 刺激时的水平无显著性差异. 所以我们推测蛋白激酶 AMPK 和 CaMK 介导的信号通路在调节骨骼肌细胞内 GLUT4 mRNA 表达过程中可能相互联系.

3.2 AMPK 抑制剂 Compound C 对 Caffeine 引起的肌细胞 GLUT4 mRNA 和 α -AMPK 蛋白的影响

Compound C 是 AMPK 的竞争性抑制剂. 在 AMPK 催化位点上它与 ATP 竞争, 但并不抑制与 AMPK 相关的蛋白激酶, 例如 PKC, PKA 等. 此外也不干扰 AMPK 上游激酶的活性^[30]. Compound C 能够在不同条件下阻断不同类型细胞 AMPK 的生物效应^[30]. 为了弄清 AMPK 信号通路在调节骨骼肌细胞内 GLUT4 mRNA 表达过程中的作用和 CaMK 信号通路的关系, 我们使用 AMPK 抑制剂 Compound C 分别与以上三组(Caffeine 和 AICAR+Caffeine 组)共孵育, 检查 Compound C 对 Caffeine 和 AICAR+Caffeine 所引起的骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 表达的影响.

尽管先前的许多研究显示, 在 Caffeine 诱发的骨骼肌细胞葡萄糖摄取中观察不到 Caffeine 引起 $\alpha 2$ (Thr172)-AMPK 磷酸化变化, 但最近 Jensen 等^[31]的研究发现, Caffeine 不仅能够增加小鼠和大鼠比目鱼肌的 $\alpha 1$ -AMPK 活性, 而且能够使 $\alpha 1$ -AMPK 磷酸化, 而这并不改变 $\alpha 2$ -AMPK 磷酸化, 也不改变 $\alpha 2$ -AMPK 活性. 使用 CaMK 直接下游蛋白激酶 CaMKK 的选择性抑制剂 STO-609 以及 CaMK 的特异性抑制剂 KN93 和 Ca^{2+} 抑制剂丹曲洛林(dantrolene)都能够完全阻断由 Caffeine 诱导的 $\alpha 1$ -AMPK 磷酸化和 $\alpha 1$ -AMPK 活性^[31]. Jensen 等^[32]的另一项肌肉收缩实验研究还证实, CaMK 的抑制剂 KN93 能够在肌肉作 2 min 低强度强直收缩后, 有效地抑制鼠慢肌、比目鱼肌(soleus muscle)和鼠快肌伸趾长肌(extensor digitorum longus, EDL) AMPK 磷酸化和活性, 同时观测到肌肉收缩 2 min 后, KN93 能够强烈抑制肌肉收缩引起的葡萄糖摄取. 与 KN-93 相似, STO-609 孵育收缩肌肉能够强烈减少肌肉收缩引起 AMPK 磷酸化水平和 AMPK 的活性. 用 STO-609 预处理骨骼肌细胞就能够有效抑制由肌肉收缩引起的葡萄糖摄取. 另外, 在鼠比目鱼肌细胞中过量表达无功能的激酶 AMPK (A kinase-dead AMPK)就能够显著减少由

Caffeine 引起的葡萄糖摄取^[32], 而在小鼠肌肉细胞中过量表达无功能激酶 AMPK, 则 KN-93 和 STO-609 不能够对减少葡萄糖摄取产生影响, 这提示 KN-93 和 STO-609 抑制由肌肉收缩引起的葡萄糖摄取需要抑制 AMPK 的活性^[32]. 这些结果说明, 在调节骨骼肌细胞葡萄糖转运和葡萄糖摄取过程中, CaMK 的激活子 Caffeine 和低强度强直收缩都能够通过细胞 Ca^{2+} 机制交叉激活 AMPK, 即引起 AMPK 磷酸化和增加 AMPK 活性, 而使用 CaMK 信号通路的抑制剂就能够抑制由 Caffeine 和低强度强直收缩所诱导的 AMPK 磷酸化和活性. 此外, Jørgensen 等^[33]对敲除 α -AMPK 的研究也证明这一点: AICAR 能增加野生型骨骼肌细胞葡萄糖摄取, 敲除 $\alpha 2$ -AMPK, 就能够废除由 AICAR 刺激引起的葡萄糖摄取, 但不能废除由肌肉收缩引起的葡萄糖摄取. 而在肌肉收缩刺激中, 肌肉收缩能增加野生型骨骼肌细胞 $\alpha 1$ -AMPK 和 $\alpha 2$ -AMPK 的活性, 无论是敲除 $\alpha 1$ -AMPK 还是敲除 $\alpha 2$ -AMPK, 其肌肉收缩刺激所引起的整个 AMPK 活性与野生型肌细胞的 AMPK 活性相当^[33]. 这提示 AMPK 的两个催化亚基 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 在肌肉收缩刺激中能够相互替代以保持整个 AMPK 具有高活性, 在 $\alpha 2$ -AMPK 敲除的骨骼肌细胞中肌肉收缩刺激信号可能通过 $\alpha 1$ -AMPK 调节骨骼肌细胞葡萄糖摄取.

从本实验对 GLUT4 mRNA 表达调节的研究结果来看, AICAR 是 AMPK 特异的激活子, 所以本实验能够观测到由 AICAR 引起的骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 的增长完全被 Compound C 抑制. 值得关注的是, AMPK 抑制剂 Compound C 还能够明显地抑制由 Caffeine 引起的骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 增长. 不仅如此, Compound C 也能够明显地抑制由 AICAR/Caffeine 复合刺激所引起的 GLUT4 mRNA 的表达. 与激活和抑制 GLUT4 基因表达结果一致的是骨骼肌细胞中 $\alpha 1$ -AMPK 蛋白磷酸化水平的变化: 在 Caffeine 诱导的骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 表达中, 观察到 Caffeine 能够引起骨骼肌细胞 $\alpha 1$ -AMPK 蛋白磷酸化水平增加 1.26 倍, 但 Caffeine 不影响 $\alpha 2$ -AMPK 的磷酸化水平, 而使用 AMPK 抑制剂 Compound C 就能够抑制由 Caffeine 引起的 $\alpha 1$ -AMPK 蛋白磷酸化水平的增加 (图 4). 这些在调节 GLUT4 基因表达中的结果与 $\alpha 1$ -AMPK 蛋白在葡萄糖摄取中的研究结果一致, 因此本实验结果从另一方面支持前人的研究结果^[31, 32]. 同时, 该结果提示, 在细胞 Ca^{2+} 信号上调

节 GLUT4 mRNA 过程中 AMPK 的抑制剂能够交叉抑制 CaMK 的信号传递, 即 CaMK 信号能够通过 AMPK 信号通路传递. 实验结果说明, CaMK 和 AMPK 这两条信号通路在调节收缩信号诱导的骨骼肌细胞 GLUT4 基因表达过程中并不是完全相互独立的, 而是彼此密切联系共同作用调节骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 的表达.

3.3 CaMK 抑制剂 KN93 对 AICAR 引起的骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 的影响

考察 CaMK II 特异的抑制剂 KN93 是否能够抑制由 AICAR 所引起的骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 表达, 以便进一步明确 AMPK 和 CaMK 两条信号通路之间的关系. 本实验观察到, 使用 KN93 能够抑制由 Caffeine 引起的骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 增长, 但是 KN93 却不能够交叉抑制由 AMPK 的激活子 AICAR 所诱导的骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 的 2 倍增长, KN93 也不能够阻止由 AICAR/Caffeine 复合刺激所引起的 GLUT4 mRNA 的表达. 此基因表达研究的结果能够得到 Jensen 等^[33]最近在骨骼肌细胞葡萄糖摄取研究结果的支持, 即使用 KN-93 和 STO-609 两种抑制剂均不能够阻断由 AICAR 引起的 AMPK 磷酸化和骨骼肌细胞葡萄糖摄取. 根据本实验结果, AMPK 的抑制剂 Compound C 能够单向抑制由 Caffeine 引起的骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 增长, 而 CaMK 抑制剂 KN93 不能够交叉抑制由 AICAR 所诱导的骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 的增长. 这进一步提示, AMPK 是位于 CaMK 途径的下游, 即 CaMK 介导的信号通路位于 AMPK 的上游, 肌肉收缩产生的刺激信号可能级联激活 CaMK, 再瀑布激活 AMPK 来调节骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 的表达, 此推论能够得到以下几项相关研究结果的支持.

Woods 等^[34]的研究证实, AMPK 能够被 CaMKK (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase) 激活. 在哺乳动物细胞过量表达 CaMKK- β 就能够激活 AMPK, 而使用 CaMKK 抑制剂能够几乎废除 AMPK 的活性; 从鼠大脑细胞中提取出的 CaMKK- β 或将 CaMKK- β 表达在大肠杆菌均能够磷酸化 AMPK 而激活 AMPK^[34]; Snf1 是酵母中 AMPK 蛋白激酶, 在 Snf1 上游三种蛋白激酶失活的酵母中, 表达 CaMKK- β 就能够激活 Snf1^[34]. 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(LKB1)是 AMPK 的上游蛋白激酶, Hurley 等^[35]使用缺乏 LKB1 的细胞进行研究, 在三个细胞系上 (HeLa, A549, and murine

embryo fibroblasts)还证实蛋白激酶 CaMK 能够激活缺乏 LKB1 细胞中的 AMPK. Hawley 等^[36]的研究显示, CaMKK- β 和 CaMKK- α 均能够激活 AMPK, 但 CaMKK- β 能够更快地激活 AMPK. 另外 K 离子去极化能够增加细胞内 Ca^{2+} 水平, 但不引起腺苷酸水平的改变, 这种细胞 Ca^{2+} 升高能够激活 AMPK^[36]. 表明 AMPK 在 Ca^{2+} 调节的信号通路中起着重要作用. 值得关注的是可能有多个化学分子都能够通过 Ca^{2+} 调节的信号通路 CaMK 来激活 AMPK. α -硫辛酸(alpha-Lipoic acid, ALA)是一种抗糖尿病物质, 普遍存在于食物中. Shen 等^[37]观察到在 C2C12 细胞中 ALA 能够通过加强 CaMK 的激酶 CaMKK 来激活 AMPK. 使用选择性抑制剂 STO-609, 能够废除由 ALA 刺激引起的 AMPK 激活. 使用 RNA 干扰能够沉默 CaMKK, 继而由 ALA 引起的 AMPK 激活就能够被废除. ALA 还能够加强 AMPK 与 CaMKK 的联系, 这更进一步说明了 CaMKK 在激活 AMPK 中的作用. 另外 Stahmann 等^[38]发现, 在内皮细胞中凝血酶(thrombin)能够通过 Ca^{2+} 机制激活 AMPK, 使用对 CaMK 的激酶特异的抑制剂 STO-609 抑制 CaMK 的激酶, 或使用 RNA 干扰技术下调 CaMKK- β , 均能够明显减少 AMPK 的活性, 表明 CaMK 的上游蛋白激酶和 Ca^{2+} 是 AMPK 上游激活子.

4 结 论

基于本文和其他相关研究结果可以推断, 在调节收缩诱导性骨骼肌细胞 GLUT4 基因表达过程中 CaMK 和 AMPK 这两条信号通路并不是完全独立的, 而是彼此联系, CaMK 和 AMPK 两条信号通路可能共同作用调节收缩诱导性骨骼肌细胞 GLUT4 基因表达. 另外, AMPK 位于 CaMK 途径的下游, 肌肉收缩产生的刺激信号可能级联激活 CaMK, 然后瀑布激活 AMPK 途径来调节收缩诱导性骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 的表达.

参 考 文 献

- 1 Garvey W, Maianu L, Zhu J, *et al.* Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest*, 1998, **101**(11): 2377~2386
- 2 Cline G W, Petersen K F. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 1999, **341**(4): 240~246
- 3 Defronzo R A, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, Obesity, hypertension, Dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes*

- Care, 1991, **14**(3): 173~194
- 4 Baron A D, Laakso M, Brechtel G, *et al.* Reduced capacity and affinity of skeletal muscle for insulin dependent diabetic subjects. Effects of Insulin Therapy. *J Clin Invest*, 1991, **87**(4): 1186~1194
 - 5 Ren J M, Marshall B A, Gulve E A, *et al.* Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 1993, **268** (22): 16113~16115
 - 6 Kern M, Wells J A, Stephens J M, *et al.* Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (GLUT-4) protein level. *Biochem J*, 1990, **270**(2): 397~400
 - 7 Dohm G L. Invited review: Regulation of skeletal muscle GLUT-4 expression by exercise. *J Appl Physiol*, 2002, **93**(2): 782~787
 - 8 Lecturque A, Loizeau M, Vaulont S, *et al.* Improvement of insulin action in diabetic transgenic mice selectively overexpressing GLUT4 in skeletal muscle. *Diabetes*, 1996, **45**(1): 23~27
 - 9 Hansen P A, Gulve E A, Marshall B A, *et al.* Skeletal muscle glucose transport and metabolism are enhanced in transgenic mice overexpressing the Glut4 glucose transporter. *J Biol Chem*, 1995, **270**(4): 1679~1684
 - 10 Tsao T S, Burcellin R, Katz E B, *et al.* Enhanced insulin action due to targeted GLUT4 overexpression exclusively in muscle. *Diabetes*, 1996, **45**(1): 28~36
 - 11 Kranioy Y, Cameron-Smith D, Misso M, *et al.* Effects of exercise on GLUT4 and glycogenin gene expression in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2000, **88**(2): 794~796
 - 12 Awanaka K, Higuchi M, Ohmori H, *et al.* Muscle contractile activity modulates GLUT4 protein content in the absence of insulin. *Horm Metab Res*, 1996, **28**(2): 75~80
 - 13 Dohm G L. Invited review: Regulation of skeletal muscle GLUT4 expression by exercise. *J Appl Physiol*, 2002, **93**(2): 782~787
 - 14 Holloszy J O, Hansen P A. Regulation of glucose transport into skeletal muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1996, **128**: 99~193
 - 15 Left T. AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31**(1): 224~227
 - 16 Goodyear L J, Kahn B B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med*, 1998, **49**: 235~261
 - 17 Henriksen E J. Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J Appl Physiol*, 2002, **93**(2): 788~796
 - 18 Zierath J R. Invited review: Exercise training-induced changes in insulin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2002, **93**(2): 773~781
 - 19 Fisher J S, Gao J, Han D H, *et al.* Activation of AMP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, **282**(1): E18~23
 - 20 Musi N, Goodyear L J. AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. *Acta Physiol Scand*, 2003, **178**(4): 337~345
 - 21 Holloszy J O. A forty-year memoir of research on the regulation of glucose transport into muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, **284**(3): E453~E467
 - 22 Goodyear L J. AMP-activated protein kinase: a critical signaling intermediary for exercise-stimulated glucose transport?. *Exerc Sport Sci Rev*, 2000, **28**(3): 113~116
 - 23 Ojuka E O, Jones T E, Nolte L A, *et al.* Regulation of GLUT4 biogenesis in muscle: evidence for involvement of AMPK and Ca^{2+} . *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, **282**(5): E1008~E1013
 - 24 Jorgensen S B, Treebak J T, Viollet B, *et al.* Role of AMPK α 2 in basal, training-, and AICAR-induced GLUT4, hexokinase II, and mitochondrial protein expression in mouse muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, **292** (1): E331~E339
 - 25 McGee S L, Howlett K F, Starkie R L, *et al.* Exercise increases nuclear AMPK α 2 in human skeletal muscle. *Diabetes*, 2003, **52** (4): 926~928
 - 26 Rose A J, Hargreaves M. Exercise increases Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II activity in human skeletal muscle. *J Physiol*, 2003, **553**(pt1): 303~309
 - 27 Wright D C, Hucker K A, Holloszy J O, *et al.* Ca^{2+} and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. *Diabetes*, 2004, **53**(2): 330~335
 - 28 Antipenko A, Frias J A, Parra J, *et al.* Effect of chronic electrostimulation of rabbit skeletal muscle on calmodulin level and protein kinase activity. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, **31**(2): 303~310
 - 29 Fluck M, Waxham M N, Hamilton M T, *et al.* Skeletal muscle Ca^{2+} -independent kinase activity increases during either hypertrophy or running. *J Appl Physiol*, 2000b, **88**(1): 352~358
 - 30 Corradetti M N, Inoki K, Bardeesy N, *et al.* Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev*, 2004, **18**(13): 1533~1538
 - 31 Jensen, Rose A J, Hellsten Y, *et al.* Caffeine-induced Ca^{2+} release increases AMPK-dependent glucose uptake in rodent soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, **293**(1): E286~E292
 - 32 Jensen, Rose A J, Jørgensen S B, *et al.* Possible CaMKK-dependent regulation of AMPK phosphorylation and glucose uptake at the onset of mild tetanic skeletal muscle contraction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, **292**(5): E1308~E1317
 - 33 Jørgensen S B, Viollet B, Andreelli F, *et al.* Knockout of the α 2 but not α 1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside but not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 2004, **279**(2): 1070~1079
 - 34 Woods A, Dickerson K, Heath R, *et al.* Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*, 2005, **2**(1): 21~33
 - 35 Hurley R L, Anderson K A, Franzoni J M, *et al.* The Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem*, 2005, **280**(32): 29060~29066
 - 36 Hawley S A, Pan D A, Mustard K J, *et al.* Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab*, 2005, **2**(1): 9~19
 - 37 Shen Q W, Zhu M J, Tong J, *et al.* Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase is involved in AMP-activated protein kinase activation by α -lipoic acid in C2C12 myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, **293**(4): C1395~C1403
 - 38 Stahmann N, Woods A, Carling D, *et al.* Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells *via* a pathway involving Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *Mol Cell Biol*, 2006, **26**(16): 5933~5945

Coordinate Regulation of Contraction Signal-Induced GLUT4 Transcription by CaMK and AMPK Signaling Pathways in Cultured Skeletal Muscle Cells*

LI Liang-Gang^{1,2)}, CHEN Huai-Qing^{1)**}

⁽¹⁾Institute of Biomedical Engineering, West China Center of Medical Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

⁽²⁾Department of Sports Medicine, Chengdu Sport University, Chengdu 610064, China)

Abstract Glucose transporter 4 (GLUT4), a major contributor to glucose transport in skeletal muscle, is closely related to diabetic treatment. Exercise regulates apparently GLUT4 gene expression which produces many beneficial metabolic adaptations for diabetic patients. Study has shown that both AMPK (AMP-activated protein kinase) and CaMK (calcium-calmodulin dependent protein kinase) signaling pathways are involved in regulation of exercise-induced GLUT4 gene expression in skeletal muscles, but the relationship between these two signaling pathways in regulating the GLUT4 gene is unclear. The purpose of the following study was to investigate the relationship of these two pathways in Caffeine- and AICAR-stimulated skeletal muscle cells GLUT4 gene expression. Muscle contractile activity results in increases in both cytosolic Ca^{2+} and AMPK activity. To mimic this response, primary cultured rat skeletal muscle cells were treated with Caffeine to raise cytosolic Ca^{2+} and with AICAR to activate AMPK. The muscle cells were divided into different groups (Control, AICAR, Caffeine, AICAR/Caffeine, Caffeine+Compound C, AICAR/Caffeine+Compound C, AICAR+KN93, AICAR/Caffeine+KN93), which were used for experiments of stimulation by AICAR and Caffeine, inhibition by AMPK inhibitor, Compound C and CaMK inhibitor, KN93 respectively. The results showed that both AICAR and Caffeine induced about 2- and 3-fold increases respectively ($P < 0.05$, AICAR *vs.* Control; $P < 0.05$, Caffeine *vs.* Control) in GLUT4 mRNA in muscle cells, but the effect of GLUT4 mRNA induced by the combined stimulation of raising cytosolic Ca^{2+} and activating AMPK was not additive. Moreover, the Compound C, an AMPK inhibitor, decreased the Caffeine-induced increases in GLUT4 mRNA ($P < 0.05$, Caffeine+Compound C *vs.* Caffeine), and also attenuated an increase in GLUT4 mRNA induced by the combined stimulation of AICAR and Caffeine ($P < 0.05$, AICAR/Caffeine+Compound C *vs.* AICAR/Caffeine). Similarly, the Caffeine induced an increase in $\alpha 1$ -AMPK phosphorylation ($P < 0.05$, Caffeine *vs.* Control) and furthermore the Compound C reduced apparently such an increase ($P < 0.05$, Caffeine+Compound C *vs.* Caffeine); however, KN93, a CaMK inhibitor, was completely able to inhibit the Caffeine-induced increase in GLUT4 mRNA, but failed to inhibit the AICAR-induced 2-fold increases in GLUT4 mRNA ($P < 0.05$, AICAR+KN93 *vs.* Control) and also failed to block an increase in GLUT4 mRNA induced by the combined stimulation of AICAR and Caffeine ($P < 0.05$, AICAR+Caffeine+KN93 *vs.* Control). These results demonstrate that the CaMK and AMPK signaling pathways are not complete independent, but are cooperative in the regulation of Caffeine-induced GLUT4 gene expression in cultured skeletal muscle cells. Collectively, based on our results and the other results this paper suggests that the GLUT4 gene expression in contracting skeletal muscle cells may be regulated through a CaMK-AMPK signaling pathway.

Key words GLUT4, gene regulation, CaMK, AMPK

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00614

*This work was supported by grants from China Scholar Council(CSC3034) and Sichuan Scientific and Technology Bureau (07ZY029-097).

**Corresponding author.

Tel: 86-28-85093009, E-mail: huaiqing_chen@sohu.com

Received: September 4, 2008 Accepted: November 1, 2008