

苯丙氨酸对 C2C12 细胞葡萄糖摄取能力的影响及与 mTOR-p70S6K 通路的关系探讨*

杜蓉¹, 杜涓¹, 田浩明¹, 陈涛^{1△}, 高赞¹, 龙洋², 刘丹¹

1. 四川大学华西医院 内分泌代谢科 (成都 610041); 2. 西南医科大学附属医院 (泸州 646000)

【摘要】 目的 观察苯丙氨酸对小鼠成肌细胞系 C2C12 葡萄糖摄取能力的影响,以及刺激后细胞内哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)-p70S6K 信号通路分子的变化。**方法** 体外培养 C2C12 细胞,分化诱导为多核的肌管细胞后进行饥饿处理,然后分别用不同浓度苯丙氨酸(1.25、2.5、5、10、20 mmol/L)处理细胞,以 KRB 平衡液作为对照。通过检测 2-NBDG 评价细胞葡萄糖摄取能力。用 Western blot 方法检测细胞内 mTOR、p70S6K、胰岛素受体底物(IRS)-1、蛋白激酶 B(Akt)的表达情况。**结果** 与 KRB 平衡液对照相比,5 mmol/L 亮氨酸使 C2C12 细胞的葡萄糖摄取能力下降了约 30% ($P=0.001$),5 mmol/L 苯丙氨酸使 C2C12 细胞摄取葡萄糖的能力上升了约 40% ($P<0.01$),且苯丙氨酸的这种促进作用随浓度增大有逐渐增强的趋势。苯丙氨酸对细胞内 mTOR Ser2448 磷酸化水平无明显影响。除 1.25 mmol/L 外,其它浓度苯丙氨酸均能抑制 p70S6K Thr389 的表达。亮氨酸使 IRS-1 Ser636/639 磷酸化水平表达增高 ($P<0.01$),除 1.25 mmol/L 外,其它浓度的苯丙氨酸均有抑制 IRS-1 Ser636/639 表达的趋势,但与对照相比差异无统计学意义 ($P=0.381$)。高浓度短时间的苯丙氨酸刺激对 C2C12 细胞内的 Akt Ser473 表达无明显影响。**结论** 苯丙氨酸可能通过减少 p70S6K 的磷酸化,继而减少 p70S6K 对 IRS-1 的刺激作用而使细胞葡萄糖摄取能力增强。但苯丙氨酸对 mTOR-p70S6K 通路的抑制作用不通过 Akt 的激活。

【关键词】 苯丙氨酸 胰岛素抵抗 mTOR-p70S6K 2-NBDG C2C12 细胞

Effects of Phenylalanine on Glucose Uptake in Mouse Myoblast Cell Line C2C12 and Its Relationship with mTOR-p70S6K Pathway DU Rong¹, DU Juan¹, TIAN Hao-ming¹, CHEN Tao^{1△}, GAO Yun¹, LONG Yang², LIU Dan¹.

1. Department of Endocrinology and Metabolism, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

△ Corresponding author, E-mail: dr.chentao@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the influence of phenylalanine (Phe) on glucose uptake in mouse myoblast cell line C2C12 and to explore its relationship with mTOR-p70S6K pathway. **Methods** C2C12 cells were cultured to promote formation of multinucleated myotubes *in vitro*. The cells were deprived and incubated with Phe at different concentrations (1.25, 2.5, 5, 10, 20 mmol/L). Krebs-Ringer buffer (KRB) was used as control. The 2-NBDG was used to measure glucose uptake of C2C12. The expression of mTOR, p70S6K, IRS-1, and Akt protein were evaluated by Western blot. **Results** Compared with KRB treatment, glucose uptake of the cells incubated with 5mmol/L leucine (Leu) was decreased by 30% ($P=0.001$), while a 40% increase was detected in the cells incubated with 5 mmol/L Phe ($P<0.01$). The promotion of glucose uptake was Phe concentration-dependent. Phe stimulation had no effect on the phosphorylation of mTOR at Ser2448. Phosphorylation of p70S6K at Thr389 was inhibited in the cells incubated with Phe at concentration higher than 1.25 mmol/L, but the difference was not significant ($P=0.815$). Leu stimulated but Phe over 1.25 mmol/L inhibited phosphorylation of IRS-1 at Ser636/639, although the difference was not significant ($P=0.381$). Neither Leu nor Phe affected the expression of phospho-Akt (Ser473) significantly. **Conclusion** Phenylalanine inhibits phosphorylation of IRS-1 at Ser636/639 possibly through inhibiting the activation of p70S6K. The effect of Phe on mTOR-p70S6K pathway is Akt-independent.

【Key words】 Phenylalanine Insulin resistance mTOR-p70S6K 2-NBDG C2C12

氨基酸作为三大营养物质之一,不仅是蛋白质

的结构基础,同样也是细胞生理过程中重要的信号分子。有研究提示氨基酸代谢的改变先于葡萄糖稳态的改变^[1]。2 型糖尿病患者机体内的胰岛素抵抗环境影响着氨基酸和蛋白质代谢过程^[2]。

* 国家自然科学基金(No. 30971129)资助

△ 通信作者, E-mail: dr.chentao@qq.com

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是一种在进化过程中较完整保留、高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[3]。近年来研究发现,支链氨基酸可通过激活 mTOR-p70S6K 通路,使胰岛素受体底物 1(IRS-1)Ser636/639 残基磷酸化,对 IRS-1 的降解有一定影响^[4-5],并能降低胰岛素诱导的磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, or Akt)等下游分子的活性,进而促进胰岛素抵抗^[5]。

但在外源补充氨基酸混合物来观察胰岛素抵抗的变化情况的研究中,发现因为氨基酸的组成不同会产生不同的结论^[6-7]。目前的研究发现亮氨酸(leucine, Leu)具有很强的激活 mTOR 信号通路的作用,亮氨酸单独刺激即可增加 C2C12 成肌细胞内的 p70S6k 磷酸化程度。与亮氨酸不同,苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)体外刺激对 mTOR 的激活并不明显,但是可以轻度激活 p70S6k^[8]。WANG 等^[1]的前瞻性研究提示血浆苯丙氨酸水平可以预测胰岛素抵抗的发生以及 2 型糖尿病发生的风险。但苯丙氨酸是否通过 mTOR-p70S6k 通路影响骨骼肌细胞的胰岛素抵抗,仍有待证实。

本实验以 C2C12 成肌细胞为研究对象,拟观察苯丙氨酸对 C2C12 成肌细胞葡萄糖摄取能力的影响,并探讨苯丙氨酸刺激 C2C12 细胞与 mTOR-p70S6k 通路的关系。

1 材料和方法

1.1 实验对象

C2C12 细胞获赠于四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室干细胞与组织工程研究室。

1.2 主要试剂和仪器

L-亮氨酸(Sigma-Aldrich 公司);L-苯丙氨酸(Sigma-Aldrich 公司);2-NBDG 葡萄糖摄取试剂盒(Cayman 公司);CCK-8 试剂盒(碧云天公司);Pierce BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Thermo 公司);IRS-1 抗体(CST 公司);mTOR 抗体(CST 公司);p70S6 Kinase(p70S6k)抗体(Epitomics 公司);Akt 抗体(Epitomics 公司);IRS-1 Ser636/639 抗体(CST 公司);mTOR Ser2448 抗体(CST 公司);p70S6k Thr389 抗体(CST 公司);Akt Ser473 抗体(Epitomics 公司)。

荧光/化学发光分析测试仪(Thermo 公司);全波长酶标测试仪(Thermo 公司);化学发光成像系统(BIO-RAD 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 C2C12 细胞培养 使用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基对 C2C12 细胞在 37℃、体积分数 5%CO₂ 孵箱中进行培养,每 2d 更换 1 次培养基。细胞融合达 80%左右时进行细胞传代,平均 3~4 d 传代一次。进行细胞计数后使用 2%马血清对 C2C12 细胞进行分化处理,每 2d 更换一次细胞分化培养基,4 d 后使其分化为多核的肌管细胞。完成分化后进行饥饿处理,先用不含血清的高糖 DMEM 培养基饥饿 4 h,再更换为 KRB 平衡液饥饿 2 h。

1.3.2 实验分组及处理 细胞饥饿处理后弃去培养瓶内的 KRB 液,用 PBS(GIBCO 公司, pH7.4)清洗 2 次,分为 7 组,分别加入 KRB 液,5 mmol/L 亮氨酸,1.25 mmol/L、2.5 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L 苯丙氨酸刺激 1 h。

1.3.3 葡萄糖摄取能力测定 通过检测 2-NBDG 荧光强度评价细胞葡萄糖摄取能力,将 C2C12 细胞消化计数,以约 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ /孔的个数接种黑色透明底 96 孔板,分化 4 d 后,按上述过程进行细胞饥饿及分组刺激,刺激液每孔 100 μ L,每次实验每组做 3 个复孔,刺激结束后加入 150 μ g/mL 2-NBDG继续培养 30 min 离心,用 KRB 平衡液清洗,然后在荧光/化学发光分析仪中测量各孔的荧光强度,最后再通过 CCK-8 方法检验每孔细胞的数量,对荧光测值进行校正,得到 2-NBDG 荧光强度与 CCK-8 检验每孔细胞数量的比值表示 C2C12 成肌细胞摄取葡萄糖的能力。

1.3.4 Western blot 检测 各组细胞内 mTOR、p70S6K、IRS-1、Akt、GAPDH 的表达 按上述过程进行细胞饥饿及分组刺激后,用 PBS 清洗 2 遍。用 RIPA 裂解液提取细胞内蛋白。每瓶细胞加入 200 μ L 含 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟化物(PMSF,碧云天公司)的 RIPA 裂解液,将细胞全部刮下移至预冷的 EP 管内。冰上放置 10 min 等待细胞裂解。以 15 000 r/min 在 4℃离心 10 min。抽取上清至预冷的 EP 管内,此上清液即为蛋白,可冻存储备用。用 BCA 法测定蛋白浓度。取出提取的已测量浓度的蛋白质,按蛋白样品:5×SDS 上样缓冲液为 4:1 的体积比将两者混合,于沸水中煮 10 min,使蛋白充分变性。按 70 μ g 蛋白量上样,于 SDS-PAGE 凝胶电泳液中电泳,结束后取下凝胶浸泡于 1×转膜缓冲液中转膜,转膜后移至封闭液中于摇床上缓慢摇 3 h 封闭。将膜放入含 5%脱脂奶粉的 TBST 稀

释的一抗。置于 4℃ 冰箱中过夜孵育。次日晨置于摇床上快速摇清洗 3 次(共 15 min)后孵育二抗,置于摇床上缓慢摇 2 h。孵完二抗的膜使用 1×TBST 置于摇床快摇清洗 3 次(共 15 min)。于 Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ 成像仪曝光显影。凝胶图像分析使用 Bio-Rad 公司的 1D 凝胶分析软件 Quantity One 保存图像并分析各蛋白条带的平均灰度值,以各条带灰度值与内参蛋白 GAPDH 灰度值的比值代表该蛋白的相对表达量。以磷酸化蛋白与总蛋白的相对表达量的比值表示该蛋白的磷酸化水平。

1.4 统计学方法

校正后的 2-NBDG 荧光强度用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间 2-NBDG 值及灰度值采用单因素方差分析(One-way ANOVA),用最小显著差异法(LSD)进行多组间的两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 C2C12 细胞摄取葡萄糖的情况

见图 1。与 KRB 组(空白对照组)相比,5 mmol/L 亮氨酸使 C2C12 细胞的葡萄糖摄取能力下降约 30% ($P = 0.001$),相反 5 mmol/L 苯丙氨酸使 C2C12 细胞摄取葡萄糖的能力上升约 40% ($P < 0.01$),与 KBS 对照相比,除 1.25 mmol/L ($P = 0.330$),其它浓度苯丙氨酸均明显促进了葡萄糖摄取($P < 0.01$)。苯丙氨酸对葡萄糖摄取的促进作用随浓度增大有逐渐增强的趋势,苯丙氨酸 1.25、

2.5、5、10 mmol/L 各组之间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。但 10 mmol/L 和 20 mmol/L 两组之间 2-NBDG 摄取水平无明显差别($P = 0.637$)。

2.2 苯丙氨酸刺激对 C2C12 细胞的 mTOR 信号通路的影响

如图 2A 所示,与 KRB 对照相比,各浓度苯丙氨酸对细胞内 mTOR Ser2448 磷酸化水平没有明显影响。虽然 5 mmol/L 亮氨酸对此位点有稍强的激活作用,但差异没有统计学意义($P = 0.234$)。如图 2B 所示,与 KRB 对照相比,5 mmol/L 亮氨酸能明显激活 mTOR 下游的 p70S6K Thr389 磷酸化位点($P = 0.003$),但随着苯丙氨酸浓度增加细胞内 p70S6K Thr389 磷酸化水平有被抑制的趋势。与 KRB 对照相比,除了 1.25 mmol/L 外($P = 0.815$),其它浓度苯丙氨酸均能抑制 p70S6K Thr389 的表达($P < 0.01$)。

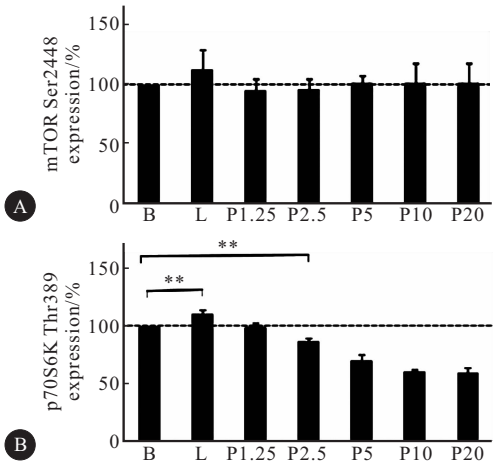


图 2 不同浓度苯丙氨酸刺激对 mTOR 信号通路的影响
Fig 2 The effect of mTOR-p70S6K pathway stimulated with different levels of Phe

A: Influence of different levels Phe and Leu on phosphorylation of mTOR Ser2448 pathway; B: Influence of different levels Phe and Leu on phosphorylation of p70S6K Thr389, * * $P < 0.01$

2.3 苯丙氨酸刺激后 C2C12 细胞的 IRS-1 丝氨酸位点 IRS-1 Ser636/639 磷酸化水平

如图 3 所示,与 KRB 对照相比,亮氨酸使 IRS-1 Ser636/639 磷酸化水平表达增高($P < 0.001$),1.25 mmol/L 苯丙氨酸有抑制 IRS-1 Ser636/639 表达的趋势,但是差异没有统计学意义($P = 0.381$),其他高浓度苯丙氨酸均明显抑制其表达($P < 0.01$)。当苯丙氨酸浓度大于 10 mmol/L 以后这种抑制趋势逐渐减弱,10 mmol/L 与 20 mmol/L 苯丙氨酸刺激下 IRS-1 Ser636/639 磷酸化位点的

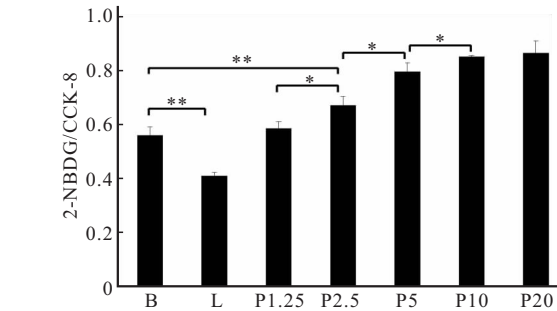


图 1 KRB 缓冲液、5 mmol/L 亮氨酸及不同浓度苯丙氨酸刺激后 C2C12 细胞的葡萄糖摄取能力
Fig 1 Glucose uptake ability of C2C12 cells stimulated with KRB, 5 mmol/L leucine (Leu) and different levels of phenylalanine (Phe)

B: Blank control (KRB) group; L: 5 mmol/L Leu group; P1.25: 1.25 mmol/L Phe group; P2.5: 2.5 mmol/L Phe group; P5: 5 mmol/L Phe group; P10: 10 mmol/L Phe group; P20: 20 mmol/L Phe group. * * $P < 0.01$, * $P < 0.05$

表达没有明显差异($P=0.859$)。

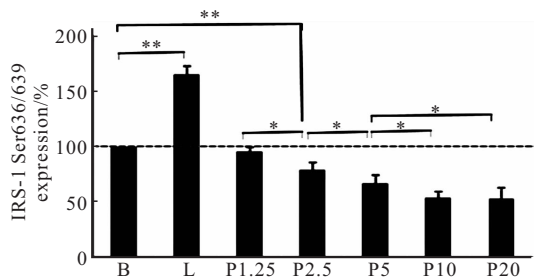


图 3 不同浓度苯丙氨酸对 IRS-1 Ser636/639 磷酸化水平表达的影响

Fig 3 Influence of different levels Phe and Leu on phosphorylation of IRS-1 Ser636/639

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.4 苯丙氨酸刺激对 C2C12 细胞 Akt 信号的作用

如图 4 所示,与 KRB 对照相比,苯丙氨酸、亮氨酸的刺激对 C2C12 细胞内的 Akt Ser473 表达均无明显的影响,各组间差异亦无统计学意义。

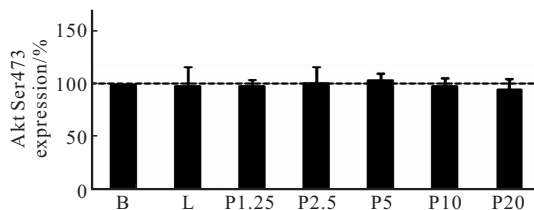


图 4 不同浓度苯丙氨酸对 Akt Ser473 磷酸化水平表达的影响

Fig 4 Influence of different levels Phe and Leu on phosphorylation of Akt Ser473

3 讨论

本实验中选用 5 mmol/L 亮氨酸及 1.25、2.5、5、10、20 mmol/L 不同浓度的苯丙氨酸。之前 TREMBLAY 等^[4]的研究以 400 μ mol/L 苯丙氨酸刺激 L6 肌细胞后葡萄糖摄取能力无明显增强或减弱。ATHERTON 等^[8]以 2 mmol/L 苯丙氨酸刺激 C2C12 细胞后发现其能轻度增加 p70S6K 磷酸化水平,但对 Akt Ser473、mTOR Ser2448 的表达没有明显影响。ARETA 等^[9]的研究发现不同浓度(1.5、3.2、5、6.5 mmol/L)亮氨酸呈浓度依赖性增加 p70S6k thr389 磷酸化,5 mmol/L 增加明显,16.5 mmol/L 和之相比有增加,但差异无统计学意义。可能由于是体外实验,单个氨基酸在生理浓度能对信号通路产生的影响十分有限,只有升高浓度或者使用生理浓度的氨基酸混合物才能表现出它的生理作用^[10]。与 TREMBLAY 等^[4]和 ATHERTON 等^[8]之前的研究一致,本研究中用作

对照的亮氨酸,抑制了细胞的葡萄糖摄取,增加了 p70S6K 的磷酸化表达,但苯丙氨酸表现出几乎与亮氨酸完全相反的作用。本实验发现不同浓度苯丙氨酸对 C2C12 细胞的葡萄糖摄取能力及 mTOR 信号通路的影响是不同的,在低浓度(1.25 mmol/L)苯丙氨酸对 C2C12 细胞的葡萄糖摄取及 mTOR 信号通路并没有明显影响。随着浓度的升高,苯丙氨酸对 C2C12 细胞葡萄糖摄取的促进及 mTOR 通路的抑制作用呈上升趋势,达到 10 mmol/L 这一影响力就趋于平稳,这与 ARETA 等^[9]的研究相似,在体外肌肉细胞模型中,氨基酸诱导 mTOR 介导的信号磷酸化可能存在一个临界阈值,一旦超过这一阈值,就会出现合成信号平台。

已有研究证实,支链氨基酸可通过激活 mTOR-p70S6K 通路,使 IRS-1Ser636/639 残基磷酸化,对 IRS-1 的降解有一定影响^[2],并能减少调节 PI3K 的 p85 亚基,降低胰岛素诱导的 PI3K/Akt 等下游分子的活性,促进胰岛素抵抗^[5]。我们直接测量了经过苯丙氨酸刺激的 C2C12 细胞中 IRS-1 Ser636/639 的磷酸化水平,发现与 KRB 对照组相比其磷酸化水平受到了抑制,与对细胞的葡萄糖摄取能力影响基本一致。而可能调节 IRS-1 Ser636/639 磷酸化的 mTOR-p70S6K 通路中,虽然 mTOR 本身磷酸化水平受苯丙氨酸影响并不大,但是苯丙氨酸刺激能够使 mTOR 下游的活性因子 p70S6K 磷酸化表达受到抑制,这种作用也与苯丙氨酸刺激浓度有关。我们猜测,苯丙氨酸可以抑制 mTOR-p70S6K 信号通路,并能减少其使 IRS-1 丝氨酸位点磷酸化。这种作用可能并不完全需要通过 mTOR Ser2448。这与 COPP 等^[11]发现 Ser2448 位点突变并不影响精氨酸激活 mTORC1 一致。

mTOR 接受两大通路的信号:PI3K/Akt 通路和接受能量信号的抑癌基因 LKB1 介导的结节性硬化复合物(tuberous sclerosis complex, TSC)通路。Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,受 PI3K 调控,在受胰岛素及其他生长因子激活 mTOR-p70S6K 中有重要的作用。但已有研究表示多种氨基酸对 mTOR 通路的激活并不经由 Akt 的激活^[12]。氨基酸刺激并不能调节 Akt 的活性,而且抑制 PI3K/Akt 通路的活性也不能影响必需氨基酸对 mTORC1 的激活^[13]。为了验证苯丙氨酸对 mTOR-p70S6K 的影响是否通过 Akt 通路,我们检测了受苯丙氨酸刺激以后 C2C12 细胞内 Akt 磷酸化水平。结果显示,苯丙氨酸并不影响 Akt 磷酸化水平,提

示虽然 Akt 是调节 mTORC1 活性的重要上游信号分子,但苯丙氨酸对 mTOR-p70S6K 通路的抑制作用并没有通过 Akt。调节 mTORC1 的上游信号通路非常复杂,所以苯丙氨酸抑制 mTORC1 的可能途径也较多。比如氨基酸通过 Rag GTPase 对 mTORC1 间的联系以及对 GTP 的易位等作用,影响人 GTP 结合蛋白 Rheb 的活性,从而调节 mTORC1 的活性^[14]; Vps34 (Vacuolar Protein Sorting 34)能感受来自氨基酸和葡萄糖的刺激,并将信号传递至 mTORC1^[15]。苯丙氨酸对 mTOR-p70S6K 通路影响的途径还需要进一步实验来探究。

本实验中发现的苯丙氨酸对 mTOR 信号通路的作用与 ROZAS 等^[16]发现的谷氨酰胺的作用类似。该实验发现,谷氨酰胺与亮氨酸作用相反,使 mTOR Ser2448 磷酸化水平减少进一步减少了下游 p70S6K 和 4E-BP1 的磷酸化水平,并且谷氨酰胺与亮氨酸都没有对 Akt 活性产生影响。我们猜想,尽管苯丙氨酸与谷氨酰胺属于不同类型的氨基酸,但有可能通过同样的途径对 mTOR/p70S6K 通路产生作用。虽然细胞实验中谷氨酰胺对 mTOR 通路产生抑制,但是与亮氨酸混合使用时,使亮氨酸引起 mTOR 通路激活的所需浓度降低,使生理水平的亮氨酸激活 mTOR 的能力增强;该作用的机制可能是由于谷氨酰胺在细胞内外协助亮氨酸转运,使亮氨酸更容易进入细胞^[17]。这可能也是苯丙氨酸的潜在作用。但是体外实验虽然能通过精确的设计探讨各通路间的关系,毕竟与体内环境不同,不同的氨基酸的作用及它们混合物的作用如果要开展更广泛的应用,未来还需要更多的临床试验。

综上所述,本研究发现:苯丙氨酸可提高 C2C12 细胞摄取葡萄糖的能力;苯丙氨酸对 mTOR 的磷酸化没有明显影响,但可抑制 p70S6K 的磷酸化水平;苯丙氨酸抑制了受 mTOR-p70S6K 调控的 IRS-1 的丝氨酸磷酸化位点的磷酸化水平;苯丙氨酸对 PI3K/Akt 通路没有明显的影响。

参 考 文 献

- [1] WANG TJ, LARSON MG, VASAN RS, *et al.* Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med*, 2011, 17(4): 448-453.
- [2] LYNCH CJ, ADAMS SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(12): 723-736.
- [3] DIBBLE CC, MANNING BD. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(6): 555-564.
- [4] TREMBLAY F, MARETTE A. Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, 2001, 276(41): 38052-38060.
- [5] YOON MS. The emerging role of branched-chain amino acids in insulin resistance and metabolism. *Nutrients*, 2016, 8(7): 405[2017-04-03]. <http://www.mdpi.com/2072-6643/8/7/405>. doi:10.3390/nu8070405.
- [6] SOLERTE SB, FIORAVANTI M, LOCATELLI E, *et al.* Improvement of blood glucose control and insulin sensitivity during a long-term (60 weeks) randomized study with amino acid dietary supplements in elderly subjects with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*, 2008, 101(11A): 82E-88E.
- [7] KREBS M, KRSSAK M, BERNROIDER E, *et al.* Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. *Diabetes*, 2002, 51(3): 599-605.
- [8] ATHERTON PJ, SMITH K, ETHERIDGE T, *et al.* Distinct anabolic signalling responses to amino acids in C2C12 skeletal muscle cells. *Amino Acids*, 2010, 38(5): 1533-1539.
- [9] ARETA JL, HAWLEY JA, YE JM, *et al.* Increasing leucine concentration stimulates mechanistic target of rapamycin signaling and cell growth in C2C12 skeletal muscle cells. *Nutr Res*, 2014, 34(11): 1000-1007.
- [10] GANNON NP, SCHNUCK JK, VAUGHAN RA. BCAA metabolism and insulin sensitivity—dysregulated by metabolic status? *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(6): e1700756 [2018-02-03]. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700756>.
- [11] COPP J, MANNING G, HUNTER T. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res*, 2009, 69(5): 1821-1827.
- [12] PATTI ME, BRAMBILLA E, LUZI L, *et al.* Bidirectional modulation of insulin action by amino acids. *J Clin Invest*, 1998, 101(7): 1519-1529.
- [13] DEBOER ML, MARTINSON KM, PAMPUSCH MS, *et al.* Cultured equine satellite cells as a model system to assess leucine stimulated protein synthesis in horse muscle. *J Anim Sci*, 2018, 96(1): 143-153.
- [14] KIM J, KIM E. Rag GTPase in amino acid signaling. *Amino Acids*, 2016, 48(4): 915-928.
- [15] RUNDQVIST HC, LILJA MR, ROOYACKERS O, *et al.* Nutrient ingestion increased mTOR signaling, but not hVps34 activity in human skeletal muscle after sprint exercise. *Physiol Rep*, 2013, 1(5): e00076 [2017-04-11]. <https://doi.org/10.1002/phy2.76>.
- [16] ROZAS NS, REDELL JB, PITA-ALMENAR JD, *et al.* Intrahippocampal glutamine administration inhibits mTORC1 signaling and impairs long-term memory. *Learn Mem*, 2015, 22(5): 239-246.
- [17] NICKLIN P, BERGMAN P, ZHANG B, *et al.* Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*, 2009, 136(3): 521-534.

(2017-11-10 收稿, 2018-03-30 修回)

编辑 汤洁