

高密度脂蛋白对脂肪细胞腺苷酸激活蛋白激酶的调节作用*

李振 宋国华 肖强 秦树存**

(泰山医学院动脉粥样硬化研究所, 山东省高校动脉粥样硬化重点实验室, 泰安 271000)

摘要 高密度脂蛋白(HDL)保护血管的主要活性成分载脂蛋白 A I 和磷酸鞘氨醇 1 的细胞表面受体皆存在于脂肪组织, 而参与 HDL 重构的脂质转运蛋白亦在脂肪组织高表达, 提示 HDL 可以通过上述成分调节脂肪细胞能量代谢. 相关分子机制研究发现, 健康人体内和重组的 HDL 颗粒皆可活化脂肪细胞腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK), 并抑制脂肪酸氧化, 而体外和体内实验均证明 HDL 可能通过其主要活性成分的多个受体途径协调激活 AMPK 活性, 从而参与调节脂肪细胞能量代谢. 期待 HDL 对脂肪细胞 AMPK 的调节作用研究能为防治脂肪代谢异常所致肥胖性疾患提供新的治疗靶点.

关键词 高密度脂蛋白, 脂肪细胞, 腺苷酸激活蛋白激酶
学科分类号 R34

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0114

脂肪组织通过释放参与胰岛素敏感性和代谢的作用底物和激素在能量代谢中发挥关键作用^[1-2]. 脂肪组织中腺苷酸(AMP)对蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)的激活可以通过禁食和运动而获得^[2-3]. 而瘦素、脂联素和降低甘油三酯的药物也可激活 AMPK. 这种激活作用可能涉及 AMP 和 ATP 比值的改变以及上游激酶 serine-threonine kinase 11(STK11 或 LKB1)的改变^[3-4]. 因此人们推测通过激活 AMPK、限制脂肪细胞脂肪酸的流出、增加局部脂肪酸的氧化, 有可能实现抗肥胖. 然而下游多个效益基因激活带来的副作用限制了单纯激活 AMPK 策略的效用^[3]. 而高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)构成成分的多样性使其在心血管保护作用以外也发挥多靶点有益作用, 人们期待 HDL 在脂肪细胞代谢中作用机制的探讨为抗肥胖研究带来新视角^[5].

1 AMPK 可调控脂肪组织的能量代谢

AMPK 在真核细胞生物中广泛存在, 属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是由 α 、 β 、 γ 3 个亚基构成

的异三聚体蛋白^[1]. AMPK 是细胞重要的能量感受器, 能感知细胞能量代谢状态的改变, 并通过影响细胞物质代谢的多个环节维持细胞能量供求平衡^[1, 3]. 当代谢应激时, ATP 生成减少(如葡萄糖和氧缺乏)而消耗增加(如肌肉收缩), 细胞内 AMP:ATP 的比值升高, AMPK 即被激活, 作为对 AMP 增加的应答, AMPK 打开产生 ATP 的分解代谢通路而关闭消耗 ATP 的过程, 例如生物合成、细胞生长及增殖^[2-3], 使能量平衡恢复稳态. 治疗 2 型糖尿病的一线药物二甲双胍和罗格列酮分别被发现可以在肌肉组织中激活 AMPK^[2-3]. 经 PubMed 检索关键词为 Adipocyte 和 AMPK 的文章, 自 1990 年起到现在共有 606 篇. 其中绝大部分研究集中在 AMPK 结构特点及与胰岛素抵抗和糖脂代谢之间

* 国家自然科学基金(81170785)和山东省泰山学者工程专项基金(200867)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0538-6222986, E-mail: Shucunqin@hotmail.com

收稿日期: 2015-04-23, 接受日期: 2015-07-23

的关系. 近年来研究显示, AMPK 同样参与了以瘦素、脂联素为代表的脂肪细胞因子生理作用的发挥^[4,6]. Lihn^[4]和 Orci^[6]分别以人脂肪组织为材料, 先后证实瘦素和脂联素能通过激活 AMPK 调节糖脂代谢. 经腺病毒转染, 使大鼠肝脏过表达瘦素, 体内证实瘦素能激活 AMPK 并导致乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)的磷酸化^[4]. 同时 AMPK 激活亦可影响脂肪细胞因子的分泌. 在人脂肪组织, 作为 AMPK 激动剂的 AICAR 能增加胰岛素敏感的激素脂联素的表达^[4,6], 抑制两种前炎症因子, 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)和白介素 6(interleukin-6, IL-6), 表达和分泌^[7-10]. 因此脂肪细胞 AMPK 调控机制的研究将为治疗肥胖、糖尿病和代谢综合征提供新的靶点. AMPK 是众多靶器官内分泌代谢功能调节过程中重要的激酶, 在能量平衡中发挥了重要作用^[4,11]. 脂肪组织作为活跃的内分泌器官所分泌的脂肪细胞因子对机体物质能量代谢有重要的作用, 脂肪细胞因子可通过调节 AMPK 活性发挥作用^[2-3], 同时 AMPK 活性的改变也能影响脂肪细胞因子的合成和分泌^[7,9], 因此发现新的 AMPK 调节因子, 并阐明其下游的效应机制, 将有可能找到有效的预防或逆转肥胖、胰岛素抵抗和糖尿病新的药物作用靶点.

2 HDL 部分构成成分参与脂肪细胞 AMPK 的分子调控

HDL 通过对血浆胆固醇和血管壁炎症因子、舒张因子等的调控作用发挥其众所周知的抗动脉粥样硬化作用^[5]. 已知 HDL 通过对肌细胞和内皮细胞的能量感受器 AMPK 的激活作用参与糖代谢和细胞生长的活动, 但 HDL 对在能量代谢中发挥重要作用的脂肪细胞 AMPK 活性的影响人们却知之甚少. Drew 等^[5]发表文章提出重组的 HDL 颗粒可能通过激活脂肪组织的 AMPK 和升高血浆中的胰岛素水平发挥调节 II 型糖尿病人脂肪酸代谢的作用. 众所周知 HDL 由多种蛋白质、酶类和各种脂质成分构成(图 1). Jiang 等^[12]的研究表明, HDL 中的载脂蛋白 A- I (apoA- I)和具有某些酶学特性的脂质转运蛋白(如磷脂转运蛋白(PLTP)和胆固醇酯转运蛋白(CETP), 以及具有生物活性的磷酸鞘氨醇 1(S1P)等)不仅对血管壁内皮系统和动脉硬化产生重要影响, 还与脂肪细胞代谢和肥胖有重要联系^[13-16]. 另外, 脂肪组织既是包括甘油三酯和胆固醇的主要储存库, 又是两个对 HDL 功能发挥重要作用的脂质转运蛋白 PLTP 和 CETP 的主要表达和产生部位^[13].

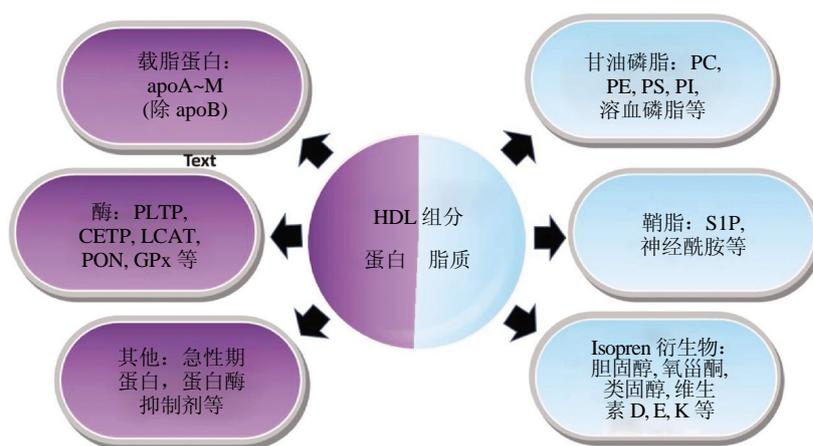


Fig. 1 The subfraction of HDL and its' compositions

图 1 HDL 亚组分及其构成成分

2.1 脂肪细胞体外实验证明 HDL 颗粒及其部分主要成分对 AMPK 的激活作用

3T3-L1 前脂肪细胞是目前广泛用于脂肪细胞分化和脂质代谢领域的细胞系之一. 该细胞系具有培养简单方便、传代稳定性好等特点. 人 Lisa-2 细胞是未分化的多形性脂肪瘤细胞, 在特定培养条件

下能分化为成熟的脂肪细胞, 能表达脂肪酸合酶、激素敏感酯酶等多种分化脂肪细胞特异表达的基因, 并对脂解刺激因子敏感. 人 Lisa-2 细胞系比传统人 PAZ6 棕色脂肪细胞系在脂质代谢水平更接近分离的脂肪细胞. apoA- I 是 HDL 颗粒的主要组成蛋白, 而 S1P 是人血浆中 HDL 主要结合的活性磷

脂类成分. Jiang 实验室和我们的前期工作已证明^[12-14], HDL 的主要蛋白成分 apoA- I 的缺乏可导致小鼠腹腔脂肪组织蓄积; apoA- I 可通过对脂肪细胞 AMPK 的调节参与脂肪组织中脂肪酸的代谢活动. 而 HDL 的鞘脂活性成分 S1P 亦参与脂肪细胞的能量代谢. CETP 在小鼠脂肪组织内的选择性表达对减少脂肪细胞内的胆固醇和甘油三酯含量产生重要影响^[14]. PLTP 缺乏则明显影响摄入食物的脂肪成分的小肠吸收^[15]. 多个临床报告认为肥胖患者伴有 PLTP 活性升高, 而减肥后则血浆 PLTP 活性亦下降^[16]. 但这些 HDL 的主要成分和与其代谢密切相关的转运蛋白是否对脂肪组织的能量代谢产生影响? 如何参与脂肪代谢过程? 以及对脂肪细胞分化成熟和细胞因子的生成分泌是否发挥作用? 迄今尚无答案. 有文章证明, HDL 可能通过 apoA- I 和其受体 SR-B I 途径、通过 S1P 和其受体 S1P1、S1P2、S1P3 途径对内皮细胞的 AMPK 通路及其下游基因的激活产生影响^[17]. 因此若能够证明 HDL 亦可影响脂肪细胞 AMPK 的激活, 并能找出借此通路的调节脂肪酸代谢的具体途径, 将为通过 HDL 调控能量代谢进而影响肥胖和与之相关的动脉硬化性疾病的防治提供新的有效靶点.

2.2 在体实验证明内源性 HDL 主要成分的过度表达影响 AMPK 的激活作用和脂肪组织含量及其内分泌功能

人和小鼠 HDL 主要由 apoA- I 组成, 其占 HDL 总蛋白含量的 70% 和 HDL 总质量的 30%. 人 HDL 颗粒包含几个大小不同的亚类, 而近交系 C57BL/6 小鼠只含有一个亚类. 含人 apoA- I 基因的转基因 C57BL/6 小鼠则能表达两种 HDL 亚类, 类似于人 HDL2b 和 HDL3a. 而且此种转基因小鼠的总 apoA- I 含量和血浆 HDL-c 浓度能增加 2 倍, 小鼠自身 apoA- I 含量减少 95%. 目前国内外相关研究大多关注脂肪组织代谢对脂蛋白(包括 HDL 代谢)的影响, 脂肪组织代谢对 HDL 血浆水平的重要作用已有比较详细的阐述^[18]. 但脂蛋白代谢, 尤其是血浆 HDL 代谢, 对脂肪细胞的产生, 特别是多余脂肪组织的形成, 具有哪些作用迄今仍然不明. 但在以往为数不多的文献中仍然给我们提供了一定意义的参考. 临床数据显示 HDL 和 apoA- I 除了抗动脉粥样硬化功能外, 还与肥胖的发生呈明显的负相关^[19]; 著名的 4 260 例 Framingham 青年人调查表明肥胖与血浆 apoA- I 的低水平密切相关^[20]; 而腹腔内部肥胖患者的低 HDL 水平部分与 apoA- I

清除速率过高有关^[18]; apoA- I 基因多态性可以作为高血压和肥胖的危险因素^[19]; 多个动物实验也已经显示 apoA- I 缺乏小鼠的脂肪含量增加^[21-23], 最近的文章更明确证明腹腔给肥胖小鼠注射 apoA- I 模拟肽可显著减少脂肪组织^[24]. 而国内涉及到 HDL 和其成分 apoA- I 对脂肪细胞和组织的影响的研究极少. 其中中南大学赵水平课题组发现以升高 HDL 血浆水平为主要调脂特征的烟酸对脂肪细胞胆固醇流出到 HDL 产生直接促进作用; 而来自上海生命科学院的一个肿瘤信号通路研究课题组发现高表达 apoA- I 小鼠的能量消耗增强导致脂肪组织减少, 初步实验表明可能与刺激棕色脂肪的 AMPK 磷酸化和增加 UCP1 表达有关^[22].

2.3 参与 HDL 重构和功能改变的脂质转运蛋白 CETP 和 PLTP 对在体脂肪细胞和组织的脂肪酸代谢和内分泌功能的影响及其作用机制

Jiang 实验室和我们的前期工作通过基因重组技术控制两种脂质转运蛋白 CETP 和 PLTP 在小鼠体内的表达, 发现这两种转运蛋白对血浆 HDL 的重构、代谢、含量和功能均可产生重要影响^[14, 25-26]. 通过人 CETP 对脂肪细胞选择性转移技术^[14], 在只有脂肪细胞表达人 CETP 的小鼠血浆中, 发现含量超过人血浆浓度 3 倍的具有活性的 CETP, 并且 HDL 胆固醇降低 75%, 同时脂肪组织中胆固醇和甘油三酯含量亦明显下降. 说明 CETP 的脂肪细胞选择性表达不仅影响血浆脂质代谢, 而且影响脂肪细胞的脂质代谢. 另外, 人类血浆 PLTP 活性与 HDL 水平呈负相关. 在小鼠过渡表达人的 PLTP 会导致血浆 HDL 胆固醇下降 30%~40%. 在我们发表的研究结果中, 发现脂肪组织产生的 PLTP 也可进入血液循环系统, 影响 PLTP 活性和 HDL 脂质水平, PLTP 不仅对血浆中该蛋白的活性发挥重要作用, 而且对脂肪组织的胆固醇流出具有促进作用^[27].

3 HDL 调控脂肪细胞 AMPK 需要解决的科学问题和假说

亟待解决的科学问题是: HDL 哪些成分影响脂肪细胞和组织的脂肪酸代谢? HDL 成分激活 AMPK 具体途径和分子机制如何? 根据文献资料 and 我们的前期实验结果分析提出如下假说(图 2): HDL 可通过 apoA- I 和 S1P 参与脂肪细胞和组织的能量代谢活动; 而 apoA- I 和 S1P 则通过各自细胞受体途径调节脂肪细胞能量感受器 AMPK 的活

性, 从而介导 HDL 对脂肪细胞代谢的调节作用; 脂质转运蛋白 PLTP 和 CETP 的表达可通过改变 HDL 成分或直接调控脂肪细胞内的胆固醇和甘油三酯代谢; 包括 apoA- I、SIP 和脂质转运蛋白这些 HDL 颗粒的主要构成成分可能通过作用于脂肪细胞多个受体信号通路的单一或多个靶点影响脂肪细胞和组织的能量代谢. 支持该假说的证据首先是在脂肪细胞存在 HDL 的结合位点^[22-25]; 其次人 apoA- I 转基因鼠的在体实验和 HDL 处理细胞的体外实验均表明可以对脂肪细胞的分化产生影响^[22-25]; 另外业已证明人 apoA- I 转基因鼠的 apoA- I 过表达会影响脂肪组织的脂肪酸和甘油三酯的代谢^[24-25]. apoA- I 的表达缺乏会导致 AMPK 参与的小鼠腹腔脂肪组织蓄积的现象使人们有理由相信 HDL 很可能通过脂肪细胞能量感受器 AMPK 途径参与脂肪组织的代谢^[21, 24]. Run 等^[22]初步观察了人 apoA- I 转基因鼠升高的 HDL 水平可影响脂肪细胞的甘油三酯代谢, 并通过体外给部分分化的脂肪细胞补充 HDL 证实 HDL 确实直接参与了脂肪细胞的脂肪酸代谢. 该文章描述 apoA- I 转基因鼠和模拟肽 D4F 对棕色脂肪的直接作用, 并记载了对 AMPK 的激活作用. 但同样没有回答 HDL 的量效和时效问题、HDL 作用途径问题和 HDL 如何影响 AMPK 活性的问题. 新近有研究发现脂肪组织 PLTP 的表达可以对血浆脂蛋白代谢产生作用. 在脂肪组织特异 PLTP 敲低小鼠磷脂转运活性降低 22%, HDL 血浆水平降低 20%. 同时发现外源和内源的 PLTP 均可促进 apoA- I 介导的脂肪细胞胆固醇流出^[27].

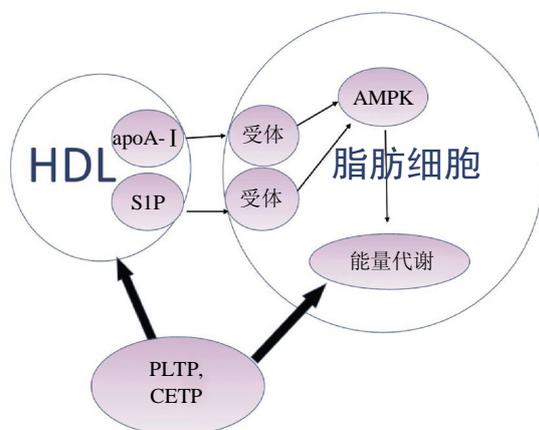


Fig. 2 Hypothesis about the pathways of activating the AMPK by the components of HDL and its molecular mechanism

图 2 HDL 成分激活 AMPK 的具体途径和分子机制假说

总之, 人们通过探索 HDL 对脂肪细胞脂质代谢和内分泌功能调控的分子基础和细胞机制, 将确定 HDL 颗粒对脂肪细胞 AMPK 有激活作用的主要成分, 确定 HDL 颗粒对激活 AMPK 相关的脂肪细胞受体通路、作用靶点和下游信号以及效益基因, 确定脂质转运蛋白 CETP 和 PLTP 是否对脂肪细胞的脂质代谢、脂肪组织重构、分泌脂肪因子的功能以及对 AMPK 的激活产生影响. 从而将为防治脂肪代谢异常所致肥胖性疾病提供新的干预理论和药物靶点.

参考文献

- [1] Hardie D G, Hawley S A, Scott J W. AMP-activated protein kinase—development of the energy sensor concept. *The Journal of Physiology*, 2006, **574**(1): 7–15
- [2] Shibata R, Sato K, Pimentel D R, *et al*. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nature Medicine*, 2005, **11** (10): 1096–1103
- [3] Fruebis J, Tsao T S, Javorschi S, *et al*. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(4): 2005–2010
- [4] Lihn A S, Jessen N, Pedersen S B, *et al*. AICAR stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 2004, **316** (3): 853–858
- [5] Drew B G, Carey A L, Natoli A K, *et al*. Reconstituted high-density lipoprotein infusion modulates fatty acid metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal Of Lipid Research*, 2011, **52**(3): 572–581
- [6] Orzi L, Cook W S, Ravazzola M, *et al*. Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(7): 2058–2063
- [7] Gan L, Yan J, Liu Z, *et al*. Adiponectin prevents reduction of lipid-induced mitochondrial biogenesis via AMPK/ACC2 pathway in chicken adipocyte. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2015, **116**(6): 1090–1100
- [8] Hong S W, Lee J, Park S E, *et al*. Activation of AMP-Activated Protein Kinase Attenuates Tumor Necrosis Factor- α -Induced Lipolysis via Protection of Perilipin in 3T3-L1 Adipocytes. *Endocrinology And Metabolism (Seoul, Korea)*, 2014, **29** (4): 553–560
- [9] Poudel B, Lim S W, Ki H H, *et al*. Dioscin inhibits adipogenesis through the AMPK/MAPK pathway in 3T3-L1 cells and modulates fat accumulation in obese mice. *International Journal of Molecular Medicine*, 2014, **34**(5): 1401–1408
- [10] Wang L, Di L, Noguchi C T. AMPK is involved in mediation of erythropoietin influence on metabolic activity and reactive oxygen

- species production in white adipocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2014, **54**(9): 1–9
- [11] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 2003, **423**(6941): 762–769
- [12] Jiang X C, Zhou H W. Plasma lipid transfer proteins. *Current Opinion In Lipidology*, 2006, **17**(3): 302–308
- [13] McGown C, Biredinc A, Younossi Z M. Adipose tissue as an endocrine organ. *Clinics In Liver Disease*, 2014, **18**(1): 41–58
- [14] Zhou H, Li Z, Hojjati MR, *et al.* Adipose tissue-specific CETP expression in mice: impact on plasma lipoprotein metabolism. *Journal Of Lipid Research*, 2006, **47**(9): 2011–2019
- [15] Liu R, Iqbal J, Yeang C, *et al.* Phospholipid transfer protein-deficient mice absorb less cholesterol. *Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology*, 2007, **27**(9): 2014–2021
- [16] Tzotzas T, Dumont L, Triantos A, *et al.* Early decreases in plasma lipid transfer proteins during weight reduction. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 2006, **14**(6): 1038–1045
- [17] Kimura T, Tomura H, Sato K, *et al.* Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**(7): 4387–4397
- [18] Rashid S, Genest J. Effect of obesity on high-density lipoprotein metabolism. *Obesity(Silver Spring, Md.)*, 2007, **15**(12): 2875–2888
- [19] Vajo Z, Terry J G, Brinton E A. Increased intra-abdominal fat may lower HDL levels by increasing the fractional catabolic rate of Lp A- I in postmenopausal women. *Atherosclerosis*, 2002, **160** (2): 495–501
- [20] Van Gaal L F, Mertens I L, De Block C E, Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 2006, **444** (7121): 875–880
- [21] Chen E S, Mazzotti D R, Furuya T K, *et al.* Apolipoprotein A1 gene polymorphisms as risk factors for hypertension and obesity. *Clinical and Experimental Medicine*, 2009, **9**(4): 319–325
- [22] Ruan X, Li Z, Zhang Y, *et al.* Apolipoprotein A- I possesses an anti-obesity effect associated with increase of energy expenditure and up-regulation of UCP1 in brown fat. *Journal of Cellular And Molecular Medicine*, 2011, **15**(4): 763–772.
- [23] Han R, Lai R, Ding Q, *et al.* Apolipoprotein A- I stimulates AMP-activated protein kinase and improves glucose metabolism. *Diabetologia*, 2007, **50**(9): 1960–1968
- [24] Peterson S J, Drummond G, Kim D H, *et al.* L-4F treatment reduces adiposity, increases adiponectin levels, and improves insulin sensitivity in obese mice. *Journal of Lipid Research*, 2008, **49**(8): 1658–1669
- [25] Villena J A, Viollet B, Andreelli F, *et al.* Induced adiposity and adipocyte hypertrophy in mice lacking the AMP-activated protein kinase-alpha2 subunit. *Diabetes*, 2004, **53**(9): 2242–2249
- [26] Qin S, K Kawano, C Bruce, *et al.* Phospholipid transfer protein gene knock-out mice have low density lipoprotein levels, due to hypercatabolism, and accumulate apoA-IV -rich lamellar lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 2000, **41**(2): 269–276
- [27] Jiang H, Yazdanyar A, Lou B, *et al.* Adipocyte phospholipid transfer protein and lipoprotein metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, **35**(2): 316–322

The Regulatory Effects of HDL on AMP-Activated Protein Kinase in Adipocytes*

LI Zhen, SONG Guo-Hua, XIAO Qiang, QIN Shu-Cun**

(Key Laboratory of Atherosclerosis in Universities of Shandong and Institute of Atherosclerosis, Taishan Medical University, Taian 271000, China)

Abstract The receptors of apolipoprotein A I and sphingosine 1-phosphate, two main factors mediating the protective effects of high-density lipoprotein (HDL) on blood vessels, are located in adipose tissues. Also, the lipid transfer proteins which mediate HDL remodeling are highly expressed in adipose tissues, suggesting HDL may regulate adipocyte energy metabolism through its components. It is known HDL particles isolated from healthy subjects or recombinant HDLs activate AMP-activated protein kinase (AMPK) in adipocytes and inhibit the oxidation of fatty acids. Further, *in vitro* and *in vivo* experiments confirm that the active components in HDL may activate AMPK activity by their receptor pathway, which may contribute to the regulating effects of HDL on adipocyte energy metabolism. It will be expected that studies in the effect of HDL on adipocyte AMPK may provide a new therapeutic target for prevention and treatment of obesity caused by abnormal fat metabolism.

Key words high density lipoprotein, adipocytes, AMP-activated protein kinase

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0114

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81170785) and Taishan Scholars Foundation of Shandong Province (200867).

**Corresponding author.

Tel: 86-538-6222986, E-mail: shucunqin@hotmail.com

Received: April 23, 2015 Accepted: July 23, 2015