

一个新的脂肪因子——脂联素的结构与功能的研究进展

毕楠 综述, 陈保生 审校

(中国医学科学院基础医学研究所 协和医科大学基础医学院分子生物学国家重点实验室, 北京市 100005)

[关键词] 分子生物学; 脂联素的结构与功能; 综述; 脂肪因子; 糖脂代谢

[摘要] 脂联素是脂肪组织特异分泌的一个具有重要功能的细胞因子, 在血浆中以多种形式存在, 在能量代谢和糖代谢等生理过程中发挥重要的调节作用。本文介绍有关脂联素的分子生物学、结构与功能、特异受体的发现及其与肥胖、胰岛素抵抗和动脉粥样硬化等关系研究的新进展。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

传统观点认为脂肪组织的作用是单一的、被动的。但随着1987年第一个脂肪细胞分泌的蛋白质——adipsin被发现; 尤其是1994年脂肪细胞特异分泌蛋白瘦素的基因被成功克隆, 并发现瘦素与肥胖密切相关之后, 其重要的分泌功能引起越来越多的关注。迄今为止, 已从脂肪组织分离出adiponin、leptin、resistin等20余种生物活性物质, 包括细胞因子、生长因子、酶、激素、补体因子、基质蛋白等多种类型, 统称为脂肪因子或脂肪细胞因子。实验表明, 脂肪因子通过不同的分泌途径作用于多个器官, 在一些重要的生理过程中发挥关键的调控作用, 包括糖脂代谢、造血、炎症、补体激活、血栓形成等, 因此与许多疾病如肥胖及胰岛素抵抗等相关疾病的发生有着密不可分的关系^[1]。本文将对脂联素——一个新发现的具有重要功能的脂肪因子的相关研究进行综述, 探讨其与疾病相关的分子基础和应用前景。

1 脂联素的发现和结构

Scherer等^[2]通过筛选消减文库的方法在小鼠3T3-L1脂肪细胞中成功克隆出一个新基因, 因其编码蛋白的结构与补体因子C1q相似且变性聚丙烯酰胺电泳检测分子量为30 kDa而命名为脂肪细胞补体相关蛋白30(adipocyte complement-related protein 30, Acrp30)。在3T3-L1前脂肪细胞分化成熟过程中Acrp30 mRNA水平显著上调, 并在成熟脂肪细胞中大量表达。Acrp30也被称为AdipoQ、脂联素(adiponectin)、apM1(adipose most abundant gene transcript 1)、GBP28(gelatin binding protein), 习惯上将前两者和后三者分别指小鼠和人的同源基因, 本文以使用范围最广的脂联素称之。

人脂联素基因位于3q27, 长约17 kb, 包含3个外显子和2个内含子。脂联素基因编码一个244个氨基酸的分泌蛋白, 包含4个结构域: 氨基端的信号序列、一段非同源序列、

由22个Gly-X-Pro或Gly-X-X重复单位组成的胶原结构域和羧基端的球形结构域。脂联素在一级结构和三级结构上与可溶性防御胶原蛋白超家族高度同源, 该家族成员包括C1q、collectins mannose-binding lectin(MBL)、肺表面蛋白A(SprA)、肺表面蛋白D(SprD)、conglutinin等。晶体结构研究发现Acrp30的球形结构域呈三聚体存在^[3], 与肿瘤坏死因子 α (TNF- α)家族的三聚体细胞因子非常相似。而有趣的是二者的一级结构同源性非常低, 通过序列分析比较发现4个保守的氨基酸残基, 可能在维持这种独特的四级结构中发挥重要的作用。脂联素存在三种翻译后修饰: ①二硫键。电镜显示两个脂联素单体通过各自C端22位的胱氨酸(C22)形成的二硫键相连^[4]。二硫键对三聚体的形成和稳定并非必需, 但对六聚体和HMW的形成起重要作用。C22突变后只能形成三聚体, 六聚体和HMW二者无法形成, 且突变后的蛋白活性大大下降。④羟基化。脯氨酸和赖氨酸的羟基化是胶原类的普遍特征。Wang等^[5]将脂联素蛋白胶原尾的四个赖氨酸突变为精氨酸, 切断其羟基化途径, 结果生成的蛋白失去生物活性。④糖基化。Sato等^[6]证明脂联素分子中存在一个 α 2,8二唾液酸残基修饰的O-糖苷键。功能分析显示, 糖基化的真核表达的全长脂联素蛋白的胰岛素致敏活性要远远高于重组的未糖基化的细菌表达产物。以上结果说明翻译后修饰对维持脂联素的生物活性具有重要的意义。

血清中脂联素的浓度范围在5~30 μ g/L, 占总血清蛋白的0.05%以上, 以不同形式存在, 主要为高分子量(HMW)形式(>80%), 还存在六聚体(<10%)和三聚体(<10%)^[7]。交联反应和蔗糖梯度离心实验显示, 高分子量寡聚体由2~6个三聚体装配。电镜显示, 三聚体呈球柄状结构, 三个单体中的两个通过C端22位的胱氨酸(C22)形成的二硫键相连; 六聚体则由两个相邻的三聚的球形结构域和一个单一的胶原柄组成^[4]。Acrp30的球形结构域本身也可形成同源三聚体, 但不能形成高分子量的寡聚体。快速改变血糖浓度可明显降低HMW的浓度, 而对六聚体的浓度影响不大^[8]。细胞试验中不同形式激活的下游信号系统亦有所不同, 三聚体可激活AMPK α , 六聚体和HMW则作用于NF- κ B途径, 提示不同形式的脂联素其功能可能有所不同。

[收稿日期] 2004-05-21 [修回日期] 2004-11-12

[作者简介] 毕楠, 博士研究生, 研究方向为脂蛋白与载脂蛋白的结构、功能和代谢及与心血管疾病关系的分子生物学研究, E-mail为gxbnbn1977@yahoo.com.cn。陈保生, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为脂蛋白与载脂蛋白的结构、功能和代谢及与心血管疾病关系的分子生物学, E-mail为bschen@pumc.edu.cn。

2 脂联素的受体

Yamauchi 等^[9]成功克隆了脂联素受体基因的 cDNA 全长。他们将转染了人类骨骼肌 cDNA 文库的 Ba/F3 肌细胞先与红色荧光探针标记的球形脂联素共同孵育, 三轮筛选后将阳性细胞再与绿色荧光探针标记的球形脂联素共孵育, 筛选得到的阳性细胞即表达特异的脂联素受体, 测序插入的 cDNA 片段, 发现了两个新的基因, 分别命名为脂联素受体 1 (Adipo R1) 和脂联素受体 2 (Adipo R2)。表达这两个基因可增强球形和全长脂联素的结合。而 RNA 干扰抑制其表达可明显减少这种结合。

人类 Adipo R1 基因位于 1p36. 13-q41, 主要在骨骼肌中表达; 而 Adipo R2 基因位于 12p13. 31, 主要在肝脏表达。SWISS-PROT 蛋白结构分析预测两种受体均有七个跨膜结构域, 可形成同源或异源多聚体, N 端位于胞外而 C 端在细胞内, 明显不同于 G 蛋白偶联受体家族 (GPCR)。Scatchard 斑点分析显示 Adipo R1 是球形脂联素的高亲和受体, 但对脂联素全长的亲和力很低; Adipo R2 则对球形和全长脂联素有中等的亲和力。脂联素与 Adipo R1 结合可激活 PPAR α 、AMPK 和 p38MAPK 途径, 前者主要涉及脂联素引起的脂肪酸氧化, 与糖摄取无关; 后两者则与这两种重要生理功能均有关。

3 脂联素的生物学效应和作用机制

作为脂肪组织分泌最多的脂肪因子, 众多迹象表明脂联素在能量代谢、胰岛素抵抗和动脉粥样硬化的形成等生理及病理过程中发挥重要的调节作用(图 1)。

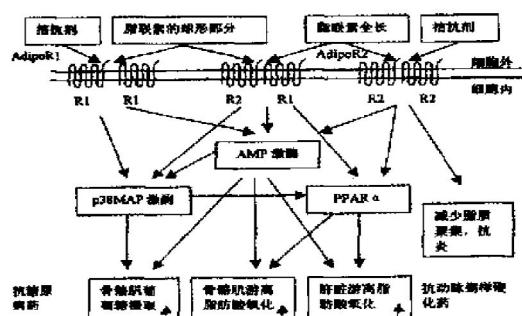


图 1. 脂联素作用的分子机制

3.1 脂联素与肥胖

脂联素参与能量调节的第一个证据是其在 ob/ob 肥胖小鼠脂肪组织中的表达显著下调^[10], 而肥胖者血浆中脂联素水平明显低于体重正常者^[11]。注射重组脂联素经蛋白酶裂解生成的球形结构域部分可使肥胖动物的体重减轻而对其食欲无明显抑制^[12]。重组脂联素加速脂肪代谢, 表现为血浆甘油三酯(TG)水平下降, 肝和肌肉中贮存的 TG 减少, 与脂肪酸氧化、清除相关蛋白表达水平上调^[13]。

3.2 脂联素与胰岛素抵抗

大量的证据证明脂联素与胰岛素抵抗存在十分密切的关系。Berg 等^[14]将真核表达的全长脂联素通过腹腔注入禁食的野生型小鼠和两种 1 型糖尿病小鼠模型, 观察到急性应用脂联素可导致血糖的一过性下降。由于不同的动物模型

体内胰岛素水平有明显的差别, 而且实验前后动物体内的胰岛素水平变化不大, 因此推测脂联素可能不是通过刺激胰岛素的分泌来发挥降血糖的作用。Yamauchi 等^[13]应用脂联素的球形部分治疗肥胖、糖尿病和脂质营养不良的小鼠模型也观察到了类似的结果。氨甲磺环己腺——高胰岛素钳实验^[15]证实无论在动物模型或是人体内, 循环中脂联素水平的急性升高均可明显改善胰岛素诱导的肝脏生糖抑制。

绿猴易于自发地形成肥胖, 并伴有进行性胰岛素抵抗, 最终发展成高血糖症, 是研究肥胖及糖尿病发病机制很好的动物模型。研究发现脂联素水平的下降出现在肥胖和胰岛素抵抗早期, 早于肥胖顶峰以及高血糖和葡萄糖耐受等症状的发生, 其下降趋势与病程进展呈平行关系^[16]。值得注意的是在疾病晚期, 当餐后胰岛素水平显著下降时, 脂联素水平依然持续下降, 提示高胰岛素血症可能并非引起低脂联素血症的直接原因, 至少不是唯一的原因。Bogan 等^[17]证明磷酸肌醇激酶 3 (PI-3K) 途径在 3T3-L1 脂肪细胞的脂联素分泌过程中发挥重要的作用, 抑制此酶的活性可显著减少脂联素的分泌。PI-3K 是胰岛素引起的信号传递过程的环节之一, 而且在 2 型糖尿病患者中观察到胰岛素刺激后所引起的胰岛素受体底物 (IRS-1) 偶连的 PI-3K 的激活被明显抑制。以上结果说明 2 型糖尿病患者体内 PI-3K 活性的下降可能是低脂联素水平的直接原因, 但需要进一步的实验来验证。

基因敲除实验的结果也为证明胰岛素敏感性和葡萄糖稳态需要脂联素的维持提供了直接的证据。杂合小鼠表现为轻度的胰岛素抵抗^[18], 而纯合脂联素缺陷鼠表现为中度的胰岛素抵抗、葡萄糖耐受、易于产生高脂高糖饮食诱导的胰岛素抵抗。虽然脂联素与胰岛素抵抗有关比较明确, 但糖尿病患者体内脂联素水平的下降究竟是紊乱的代谢状态所致的结果还是引起这种代谢异常的原因, 尚无法确定。

3.3 脂联素与动脉粥样硬化

众所周知, 单核细胞粘附至受损的血管内皮并分化成为巨噬细胞和泡沫细胞是动脉粥样硬化形成的关键环节。Ouchi 等^[19]发现脂联素可以抑制单核细胞对内皮细胞的粘附、粒细胞的分化、巨噬细胞因子的产生和胞吞作用。Ouchi 等^[20]还证明脂联素可下调 A 型清道夫受体基因的表达, 减少胆固醇酯的聚集, 抑制巨噬细胞生成泡沫细胞, 因此脂联素很可能是转变成巨噬细胞和泡沫细胞过程的一个调节因子。此外, 脂联素还可抑制生长因子诱导的人主动脉平滑肌细胞的增殖和迁移。最新的一项实验发现脂联素可通过 PI-3K 途径直接刺激内皮细胞产生一氧化氮 (NO), 从而促进血管舒张^[21]。这些体外实验为脂联素具有潜在的抗动脉粥样硬化作用提供了理论依据。

动物试验进一步证明脂联素具有抗动脉粥样硬化作用。Kubota 等^[22]在球囊扩张损伤的动脉壁中观察到脂联素的免疫活性。脂联素缺陷小鼠因血管内皮损伤引起的内膜增生程度比野生型高 2 倍。通过腺病毒局部表达脂联素蛋白可明显减轻这种增生^[23]。这是第一个体内实验的证据证明脂联素是脂肪组织和血管系统之间的一个重要的连接桥梁。载脂蛋白 E 缺陷小鼠表现为高胆固醇血症, 具有自发形成严

重动脉粥样硬化的倾向。Yamauchi 等^[24]对载脂蛋白 E 缺陷小鼠模型进行脂联素球形部分的转基因治疗,明显抑制粥样斑块的形成,并下调清道夫受体 A 和 TNF- α 的水平,首次证明了脂联素对动脉粥样硬化具有明确的保护作用。虽然脂联素水平与许多已知的动脉硬化易感因素相关,包括性别、体重、血糖、血脂、血浆低密度脂蛋白水平和高密度脂蛋白水平等,但以上指标在转基因组和对照组没有显著差别,说明这种保护作用并不是由于改变这些经典的粥样硬化危险因素而发生的继发性改变,而是球形脂联素的直接作用。

此外,脂联素还具有抗炎作用,通过调节 cAMP 依赖的 NF- κ B 的信号途径改变内皮细胞对炎性刺激的反应,抑制骨髓粒单前体细胞的增殖,诱导粒单细胞的凋亡。

4 需要解决的问题和临床应用前景

作为人体血清中大量存在的一种分泌蛋白,毋庸置疑脂联素在糖脂代谢和炎症过程中具有重要的生物活性。但其具体的主要功能、作用机制尚不清楚,许多问题有待进一步的研究加以明确。如脂联素的循环浓度是如何被调节的?到底什么原因导致了肥胖和胰岛素抵抗的下调?三聚体是脂联素的活性形式吗?血浆中的脂联素如何进行激活与失活形式之间的转换?脂联素的一级作用对象究竟是糖代谢还是脂代谢?或许其在上述两个过程中均发挥重要的作用?相信在不久的将来,这些问题均可找到满意的答案。

脂联素具有广阔的临床应用前景。基因扫描将 2 型糖尿病、代谢综合征和冠心病的易感基因均定位于 3q27,正是脂联素基因所在区域。流行病学实验证明脂联素基因的突变可引起低脂联素血症,并增加 2 型糖尿病、代谢综合征和冠心病的患病风险。因此对血浆脂联素水平的检测对 2 型糖尿病、代谢综合征和冠心病危险人群的预防和监控具有重要的意义。此外,重组脂联素为临床对肥胖症、2 型糖尿病和动脉粥样硬化的预防和治疗提供了一个新的思路 and 手段。与目前的治疗药物相比,它具有以下优点:可同时发挥降糖、降脂和抗炎的作用,尤其适于治疗代谢综合征患者。④由于脂联素是唯一一个在肥胖患者体内水平下调的脂肪因子,因此不存在抵抗的问题,而这正是瘦素等临床治疗肥胖及其相关疾病的效果不佳的重要原因之一。但重组脂联素的疗效研究还仅停留在动物实验的水平,尚须将其对人类上述疾病的具体治疗作用和不良影响进行客观的评估。

[参考文献]

- [1] 曾武成,陈保生. 胆固醇转运蛋白与动脉粥样硬化的关系. 中国动脉硬化杂志, 2002, **37**: 262-264
- [2] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*, 1995, **270** (45): 26 746-749
- [3] Shapiro L, Scherer PE. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol*, 1998, **8**: 335-338
- [4] Tsao TS, Tomas E, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Ruderman NB, et al. Role of disulfide bonds in Acrop30 Adiponectin structure and signaling specificity: Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem*, 2003, **278** (50): 50 810-817

- [5] Wang Y, Xu A, Knight C, Xu LY, Cooper GJ. Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J Biol Chem*, 2002, **277** (22): 19 521-529
- [6] Sato C, Yasukawa Z, Honda N, Matsuda T, Kitajima K. Identification and adipocyte differentiation-dependent expression of the unique disialic acid residue in an adipose tissue specific glycoprotein, AdipoQ. *J Biol Chem*, 2001, **276** (31): 28 849-856
- [7] Tsao TS, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF. Oligomerization state-dependent activation of NF- κ B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrop30). *J Biol Chem*, 2002, **277** (33): 29 359-362
- [8] Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schultness T, et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrop30/adiponectin. *J Biol Chem*, 2003, **278** (11): 9 073-085
- [9] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 2003, **423** (6941): 762-769
- [10] Hu E, Liang P, Spiegelman BW. AdipoQ is a novel adipocyte-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 1 0697-703
- [11] Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **257**: 79-83
- [12] Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increase fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (4): 2 005-010
- [13] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*, 2001, **7** (8): 941-946
- [14] Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrop30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*, 2001, **7** (8): 947-953
- [15] Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrop30. *J Clin Invest*, 2001, **108** (12): 1 875-881
- [16] Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, et al. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*, 2001, **50** (5): 1 126-133
- [17] Bogan JS, Lodish HF. Two compartments for insulin-stimulated exocytosis in 3T3-L1 adipocytes defined by endogenous ACRP30 and GLUT4. *J Cell Biol*, 1999, **146** (3): 609-620
- [18] Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis and Thrombosis Vascular Biology*, 2000, **20**: 1 595-599
- [19] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*, 1999, **100** (25): 2 473-476
- [20] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*, 2001, **103** (8): 1 057-063
- [21] Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 2003, **278** (45): 45 021-026
- [22] Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, et al. Distribution of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem*, 2002, **277** (29): 25 863-866
- [23] Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis: the missing link of adipose-vascular axis. *J Biol Chem*, 2002, **277** (40): 37 487-491
- [24] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shinozawa N, Hioki K, et al. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem*, 2003, **278** (4): 2 461-468

(此文编辑 文玉珊)