

本文引用: 左惠演, 黄秀清, 沈涛, 等. 游离脂肪酸抑制 AMPK 信号通路促进小鼠巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(3): 205-211. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.03.004.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-03-0205-07

· 代谢重编程与动脉粥样硬化专栏 ·

## 游离脂肪酸抑制 AMPK 信号通路促进小鼠巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化

左惠演, 黄秀清, 沈涛, 唐蔚青, 马佳睿, 徐芳芷, 黎健, 窦琳

(北京医院 国家老年医学中心 国家卫生健康委北京老年医学研究所 国家卫生健康委北京老年医学重点实验室  
中国医学科学院老年医学研究院, 北京市 100730)

**[摘要]** **[目的]** 探讨游离脂肪酸对小鼠巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化的影响, 从巨噬细胞代谢重编程和 M1 极化阐明非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的发病机制, 为 NASH 的防治提供新的思路。**[方法]** 以油酸/棕榈酸(O/P)处理 RAW264.7 细胞建立游离脂肪酸处理巨噬细胞模型; 转染 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)特异 siRNA 抑制 AMPK 表达; 使用阿卡地新(AICAR)激活 AMPK 活性。采用 qPCR 检测巨噬细胞 M1 型分子标志物(TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 MCP-1)、M2 型分子标志物(CD206 和 IL-10)以及葡萄糖酵解相关基因(PGM1、PGK1、GPII、LDHA、ALDOA、GLUT1 和 HK2)mRNA 水平, 采用 Western blot 检测 p-mTOR/mTOR、p-Raptor/Raptor、p-Akt/Akt、p-AMPK 和 AMPK 蛋白水平。**[结果]** O/P 处理 RAW264.7 细胞后, p-mTOR/mTOR 和 p-Akt/Akt 蛋白水平升高( $P < 0.05$ ), p-Raptor/Raptor、p-AMPK 和 AMPK 蛋白水平降低( $P < 0.05$ ), 葡萄糖酵解相关基因 PGM1、PGK1、GPII、LDHA、ALDOA、GLUT1 和 HK2 mRNA 水平升高( $P < 0.05$ ), 促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 MCP-1 mRNA 水平升高( $P < 0.05$ ), 抑炎因子 CD206 和 IL-10 mRNA 水平降低( $P < 0.05$ )。抑制 RAW264.7 细胞中 AMPK 表达后, p-mTOR/mTOR 和 p-Akt/Akt 蛋白水平升高( $P < 0.05$ ), p-Raptor/Raptor、p-AMPK 和 AMPK 蛋白水平降低( $P < 0.05$ ), 葡萄糖酵解相关基因 PGM1、PGK1、GPII、LDHA、ALDOA、GLUT1 和 HK2 mRNA 水平升高, 促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 MCP-1 mRNA 水平升高( $P < 0.05$ ), 抑炎因子 CD206 和 IL-10 mRNA 水平降低( $P < 0.05$ )。激活 AMPK 活性可逆转 O/P 对巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化的影响。**[结论]** 在 RAW264.7 细胞中游离脂肪酸通过抑制 AMPK 信号通路促进葡萄糖酵解和 M1 型极化。

**[关键词]** AMP 活化蛋白激酶; 巨噬细胞极化; 糖酵解; 非酒精性脂肪性肝炎; 游离脂肪酸

**[中图分类号]** R363;R5

**[文献标识码]** A

## Free fatty acid promotes glycolysis and M1 polarization via inhibiting AMPK pathway in mouse macrophages

ZUO Huiyan, HUANG Xiuqing, SHEN Tao, TANG Weiqing, MA Jiarui, XU Fangzhi, LI Jian, DOU Lin

(Beijing Hospital & National Geriatrics Center & Beijing Institute of Geriatrics of the National Health Commission & Beijing Key Laboratory of Geriatrics of the National Health Commission & Institute of Geriatrics of the Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

**[ABSTRACT]** **Aim** To explore the effect of free fatty acid on the M1 polarization and glycolysis in mouse macrophages. The mechanism of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) pathogenesis is clarified from the perspective of metabolism reprogramming and polarization in macrophages, which will provide a new way for prevention and treatment of NASH.

**Methods** Oleic acid/palmitate acid (O/P) was used to treat RAW264.7 cells to establish cell model. AMPK-specific siRNA was transfected into RAW264.7 cells to knockdown AMPK protein expression. Acadesine (AICAR) was used to stimulate the activation of AMPK. The mRNA levels of M1 type molecular markers (TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1), M2 type

**[收稿日期]** 2022-06-29

**[修回日期]** 2022-12-29

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81600618, 81770858 和 81770228); 北京市自然科学基金项目(7182144)

**[作者简介]** 左惠演, 硕士研究生, 主要研究方向为非酒精性脂肪性肝病的发病机制, E-mail: zuohy85@126.com。通信作者 窦琳, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要研究方向为非酒精性脂肪性肝病和动脉粥样硬化的发病机制, E-mail: doulin4623@bjhmoh.cn。

molecular markers (CD206 and IL-10) and glycolysis related genes (PGM1, PGK1, GPII, LDHA, ALDOA, GLUT1 and HK2) were detected by qPCR, and the protein levels of p-mTOR/mTOR, p-Raptor/Raptor, p-Akt/Akt, p-AMPK and AMPK were detected by Western blot.

**Results** After treatment of RAW264.7 cells with O/P, the protein levels of p-mTOR/mTOR and p-Akt/Akt increased ( $P < 0.05$ ), the protein levels of p-Raptor/Raptor, p-AMPK and AMPK decreased ( $P < 0.05$ ), the mRNA levels of glucose glycolysis related genes PGM1, PGK1, GPII, LDHA, ALDOA, GLUT1 and HK2 increased ( $P < 0.05$ ), the mRNA levels of pro-inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1 increased ( $P < 0.05$ ), while the mRNA levels of anti-inflammatory factors CD206 and IL-10 decreased ( $P < 0.05$ ). After inhibiting AMPK expression in RAW264.7 cells, the protein levels of p-mTOR/mTOR and p-Akt/Akt increased ( $P < 0.05$ ), the protein levels of p-Raptor/Raptor, p-AMPK and AMPK decreased ( $P < 0.05$ ), the mRNA levels of glucose glycolysis related genes PGM1, PGK1, GPII, LDHA, ALDOA, GLUT1 and HK2 increased ( $P < 0.05$ ), the mRNA levels of pro-inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1 increased ( $P < 0.05$ ), while the mRNA levels of anti-inflammatory factors CD206 and IL-10 decreased ( $P < 0.05$ ). Activation of AMPK activity could reverse the effect of O/P on macrophage polarization and glycolysis.

**Conclusion** Free fatty acid promotes M1 polarization and glycolysis via inhibiting AMPK pathway in mouse macrophages.

[**KEY WORDS**] AMP-activated protein kinase; macrophage polarization; glycolysis; non-alcoholic steatohepatitis; free fatty acid

随着经济发展和人民生活水平的提高,代谢相关脂肪性肝病(metabolic associated fatty liver disease, MAFLD)已成为21世纪全球最重要的公共健康问题之一,给人类健康和社会经济发展带来了巨大负担<sup>[1]</sup>。MAFLD也增加了2型糖尿病和心脑血管疾病的患病几率<sup>[2]</sup>。MAFLD以肝脏中脂质蓄积为主要特征,同时至少合并超重/肥胖、2型糖尿病、代谢功能障碍三者之一的临床病理综合征,包括单纯性脂肪肝和非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)<sup>[3]</sup>。大约1/3的单纯性脂肪肝会不可逆地发展为NASH,后者10年内肝硬化发生率为15%,其中30%~40%将会死于肝癌、肝衰竭和移植后复发。单纯性脂肪肝发展为NASH是MAFLD进展的关键阶段。肝脏巨噬细胞激活是推动NASH发展的重要因素之一<sup>[4]</sup>。血液中游离脂肪酸浓度升高是MAFLD的重要病理特征之一,可影响肝脏中巨噬细胞功能<sup>[5]</sup>。血液中的游离脂肪酸可激活单核细胞,促使其浸润进入肝脏并分化成为M1型巨噬细胞,增大肝脏炎症反应,加速NASH进展<sup>[3]</sup>。

巨噬细胞的激活同代谢重编程密切相关。巨噬细胞通过代谢重编程提供其激活炎症反应所需要的能量。AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)通路是调节细胞能量代谢、炎症反应的重要调节通路。AMPK包含 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 三个亚基,抑制机体脂肪酸合成,促进肝脏中脂肪酸氧化,保护脂肪组织线粒体功能<sup>[6]</sup>。激活AMPK信号通路能够减缓MAFLD进程<sup>[7]</sup>。此外,AMPK信号通路也是巨噬细胞代谢重编程和炎症通路的重要调节因子<sup>[8]</sup>。在巨噬细胞中抑制AMPK活性能够激活MAPK信

号通路(p38、JNK和ERK1/2),促进巨噬细胞极化为M1型,上调糖酵解水平<sup>[9]</sup>。本课题组前期研究发现,高脂喂养的小鼠肝脏巨噬细胞和骨髓巨噬细胞均呈现M1极化<sup>[10]</sup>。本研究旨在探讨AMPK信号通路在游离脂肪酸诱导的巨噬细胞葡萄糖代谢重编程和M1极化中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞及主要材料来源

小鼠巨噬细胞株RAW264.7购自中国医学科学院细胞库。细胞总RNA提取试剂Trizol和H-DMEM培养基购自Invitrogen公司;胎牛血清购自Gibico公司;油酸、棕榈酸、BSA和AMPK激活剂阿卡地新(acadesine, AICAR)购自Sigma公司;反转录酶MMLV购自NEB公司;qPCR试剂盒SYBR Green、dNTP(10 mmol/L)和通用引物oligo dT购自TaKaRa公司;p-mTOR、mTOR、p-Raptor、Raptor、p-Akt、Akt、GAPDH、AMPK、p-AMPK和 $\beta$ -actin抗体及细胞裂解液RIPA购自CST公司;一抗稀释液购自Invitrogen公司;HRP标记的山羊抗兔二抗购自中杉金桥公司;化学发光试剂盒ECL、PVDF膜购自Millipore公司;AMPK $\alpha$ 1特异性siRNA及其阴性对照片段均由上海吉玛科技有限公司合成。

### 1.2 RAW264.7细胞的培养

RAW264.7细胞使用含10%胎牛血清、1%双抗H-DMEM培养基于37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱(Thermo公司)内培养,每48h更换培养基1次,当细胞生长至80%~90%丰度时,使用0.25%胰蛋白

酶(北京索莱宝生物科技有限公司)消化,并按照 1 : 4 进行传代。

1.3 油酸/棕榈酸处理细胞

使用无水乙醇分别配制 0.25 mol/L 油酸和 0.25 mol/L 棕榈酸储液,使用 PBS 配制 5% BSA。将油酸、棕榈酸和 BSA 储液置于 60 ℃ 水浴中孵育 10 min;在 20 mL 5% BSA 液体中加入 640 μL 油酸储液和 320 μL 棕榈酸储液以配制油酸/棕榈酸工作液(含 8 mmol/L 油酸和 4 mmol/L 棕榈酸)。等体积乙醇加入 5% BSA 用于处理对照组细胞。最终使用 300 μmol/L 油酸/棕榈酸(oleic acid/palmitate acid,O/P)处理 RAW264.7 细胞 24 h。

1.4 RAW264.7 细胞转染

转染前一天,将 RAW264.7 接种于 6 孔板中,待细胞生长至 50% ~ 60% 丰度后,按照 Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂说明进行转染,48 h 后收集细胞,提取总蛋白和总 RNA 进行检测。AMPK 特异性 siRNA 片段序列如表 1 所示。

表 1. AMPK 特异性 siRNA 片段序列

Table 1. The sequences of AMPK-specific siRNA fragments

名称	序列
阴性对照(NC)	5'-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3'
si-827	5'-GGGAACACGAGUGGUUUAATT-3'
si-1250	5'-GCCGACCCAAUGAUCAUUTT-3'
si-1337	5'-GCCUGACGAAGGAAAGAAUTT-3'

1.5 炎症因子和糖酵解相关基因 mRNA 水平检测

收集 RAW264.7 细胞,使用 Trizol 试剂提取总 RNA,以 1 μg RNA 为模板使用 MMLV 反转录合成 cDNA。加入 90 μL ddH<sub>2</sub>O 将 cDNA 进行 10 倍稀释,以 1 μL cDNA 为模板,按照 SYBR Green 说明书配置荧光定量 PCR 反应液,使用荧光定量 PCR 仪(Thermo 公司)进行检测。采用 ΔCt 法处理所得数据,计算各个基因相对表达量,即 2<sup>-ΔΔCt</sup>。PCR 引物序列如表 2 所示。

1.6 Western blot 检测 AMPK 信号通路相关蛋白水平

使用 300 μmol/L O/P 处理 RAW264.7 细胞 24 h,或同时使用 1 mmol/L AICAR 和 300 μmol/L PA 处理 RAW264.7 细胞 24 h,收集细胞,使用 RIPA 提取总蛋白,取 15 μg 总蛋白以 12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,300 mA 恒流转印 PVDF 膜,于 10% 脱脂牛奶(配制于 TBS-T)室温孵育 2 h,用 1 : 1 000 一抗(配制于一抗稀释液)于 4 ℃ 孵育过

夜,TBS-T 洗膜 3 次,每次 15 min;使用 1 : 5 000 HRP 标记的山羊抗兔二抗(配制于 TBS-T)室温孵育 2 h;TBS-T 洗膜 3 次,每次 15 min;使用化学发光液检测条带。

表 2. PCR 引物序列

Table 2. The sequences of PCR primers

名称	序列
TNF-α	F:5'-CACAGAAAGCATGA TCCGCG-3' R:5'-ACTGATGAGAGGGAGGCCAT-3'
IL-6	F:5'-AGCCAGATCCTTCAGAGAGA-3' R:5'-TGGTATTGGTCCTTAGCCAC-3'
MCP-1	F:5'-GTCTGTGCTGACCCC-3' R:5'-AAGGCATCACAGTCCGAGTC-3'
IL-10	F:5'-CAGAGAAGCATGGCCCAGAA-3' R:5'-GCTCCACTGCCTTG CTCTTA-3'
CD206	F:5'-TTGCACTTTGAGGGAAGCGA-3' R:5'-CCTT GCCTGATGCCAGGTTA-3'
GLUT1	F:5'-CCTATGGCCAAGGACACACT-3' R:5'-CTGGTCTCAGGCAAGGAAAG-3'
HK2	F:5'-GGGTAGCCACGGAGTACAAA-3' R:5'-TGGATTGAAAGCCAACCTCC-3'
GPII	F:5'-GTGGTCAGCCATTGGACTTT-3' R:5'-CTGGAATAGGCAGCAAAGC-3'
ALDOA	F:5'-AGCAGAATGGCATTGTACCC-3' R:5'-GGCAATCTCCTCATTGGAAA-3'
PGK	F:5'-GCACCAGGAACCCTTAAACA-3' R:5'-GCCATGCTGAG TCAAGAACA-3'
PGM1	F:5'-TGCATCATCCGAAAAATCAA-3' R:5'-AAACTGCTGCTTTCCAGAA-3'
LDHA	F:5'-CCGTTACCTGATGGGAGAGA-3' R:5'-GTAGGCACTGTCCACCACCT-3'
AMPK	F:5'-AGAGGGCCGCAATAAAAGAT-3' R:5'-TGTTGTACAGGCAGCTGAGG-3'
18s	F:5'-GGAAGGGCACCACCAGGAGT-3' R:5'-TGCAGCCCCGGACATCTA-3'

1.7 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理,采用 *t* 检验和单因素方差分析进行统计学分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 O/P 引起 AMPK 信号通路活化,促进小鼠巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化

与对照组相比,O/P 处理后 p-mTOR/mTOR 和 p-Akt/Akt 蛋白水平升高 (*P* < 0.05), p-Raptor/

Raptor、p-AMPK 和 AMPK 蛋白水平降低 ( $P<0.05$ ), 糖酵解相关基因 PGM1、PGK1、GPII、LDHA、ALDOA、GLUT1 和 HK2 mRNA 水平升高 ( $P<0.05$ ), M1 极化标志物 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 MCP-1 mRNA 水平

升高 ( $P<0.05$ ), M2 极化标志物 CD206 和 IL-10 mRNA 水平降低 ( $P<0.05$ ; 图 1)。由此推测, 游离脂肪酸通过 AMPK 信号通路促进巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化。

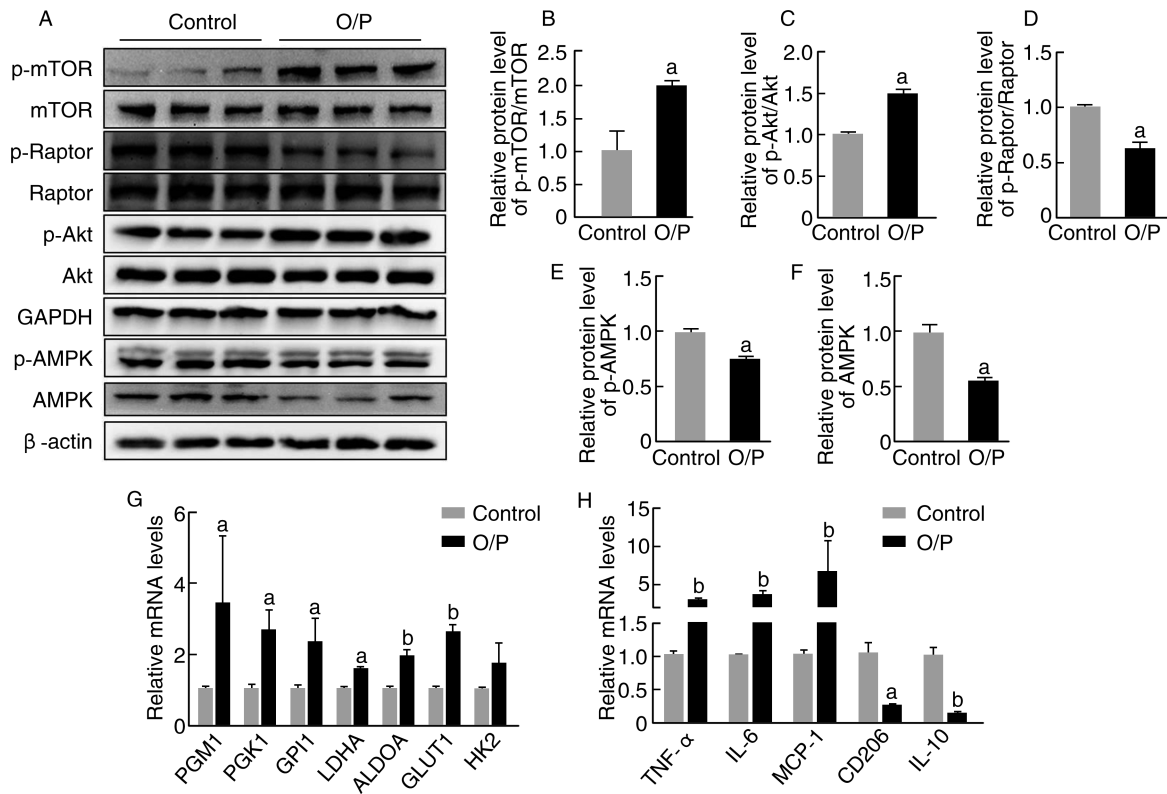


图 1. O/P 通过 AMPK 信号通路促进小鼠巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化

A 为 O/P 处理巨噬细胞后 AMPK 信号通路活性检测, B 为 O/P 处理巨噬细胞后 p-mTOR/mTOR 蛋白水平, C 为 O/P 处理巨噬细胞后 p-Akt/Akt 蛋白水平, D 为 O/P 处理巨噬细胞后 p-Raptor/Raptor 蛋白水平, E 为 O/P 处理巨噬细胞后 p-AMPK 蛋白水平, F 为 O/P 处理巨噬细胞后 AMPK 蛋白水平, G 为 O/P 处理巨噬细胞后葡萄糖酵解相关基因 mRNA 水平, H 为 O/P 处理巨噬细胞后 M1、M2 极化相关基因 mRNA 水平。n=3。a 为  $P<0.05$ , b 为  $P<0.01$ , 与对照组比较。

Figure 1. O/P promotes glycolysis and M1 polarization via AMPK pathway in mouse macrophages

## 2.2 筛选有效抑制 AMPK 表达的 siRNA 片段

为了有效抑制 AMPK 表达, 本研究设计了三条 siRNA, 转染 RAW264.7 细胞 48 h, 检测 AMPK mRNA

和蛋白水平。结果显示, 三条 siRNA 均可抑制 AMPK mRNA 和蛋白表达, 其中 si-1250 和 si-1337 干扰效果最好, 可用于后续实验中 (图 2)。

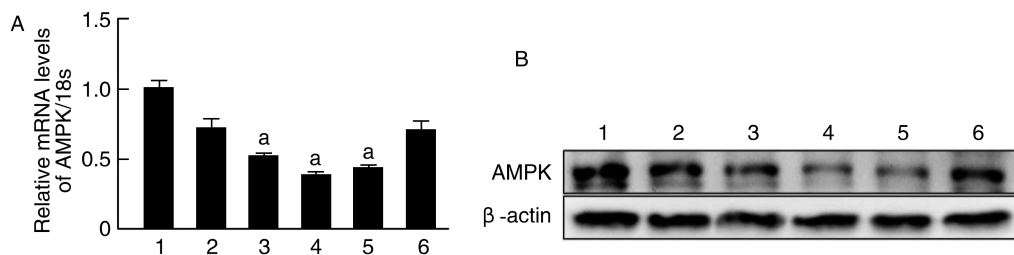


图 2. 筛选有效的 siRNA 抑制 AMPK 表达

1 为阴性对照, 2 为 si-827, 3 为 si-1250, 4 为 si-1337, 5 为 si-1250+si-1337, 6 为 si-827+si-1250+si-1337; A 为 AMPK mRNA 水平检测, B 为 AMPK 蛋白水平检测。n=3。a 为  $P<0.01$ , 与阴性对照组比较。

Figure 2. Screening effective siRNA to inhibit AMPK expression

### 2.3 抑制 AMPK 促进小鼠巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化

与阴性对照组相比,转染 AMPK 特异性 siRNA 后 p-mTOR/mTOR 和 p-Akt/Akt 蛋白水平升高( $P < 0.05$ ), p-Raptor/Raptor、p-AMPK 和 AMPK 蛋白水平降低( $P < 0.05$ ),糖酵解相关基因 PGM1、PGK1、

GPI1、LDHA、ALDOA、GLUT1 和 HK2 mRNA 水平升高( $P < 0.05$ ),且 M1 型极化标志物 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 MCP-1 mRNA 水平升高( $P < 0.05$ ),M2 型极化标志物 CD206 和 IL-10 mRNA 水平降低( $P < 0.05$ ;图 3)。由此推测,抑制 AMPK 信号通路促进葡萄糖酵解和巨噬细胞 M1 极化。

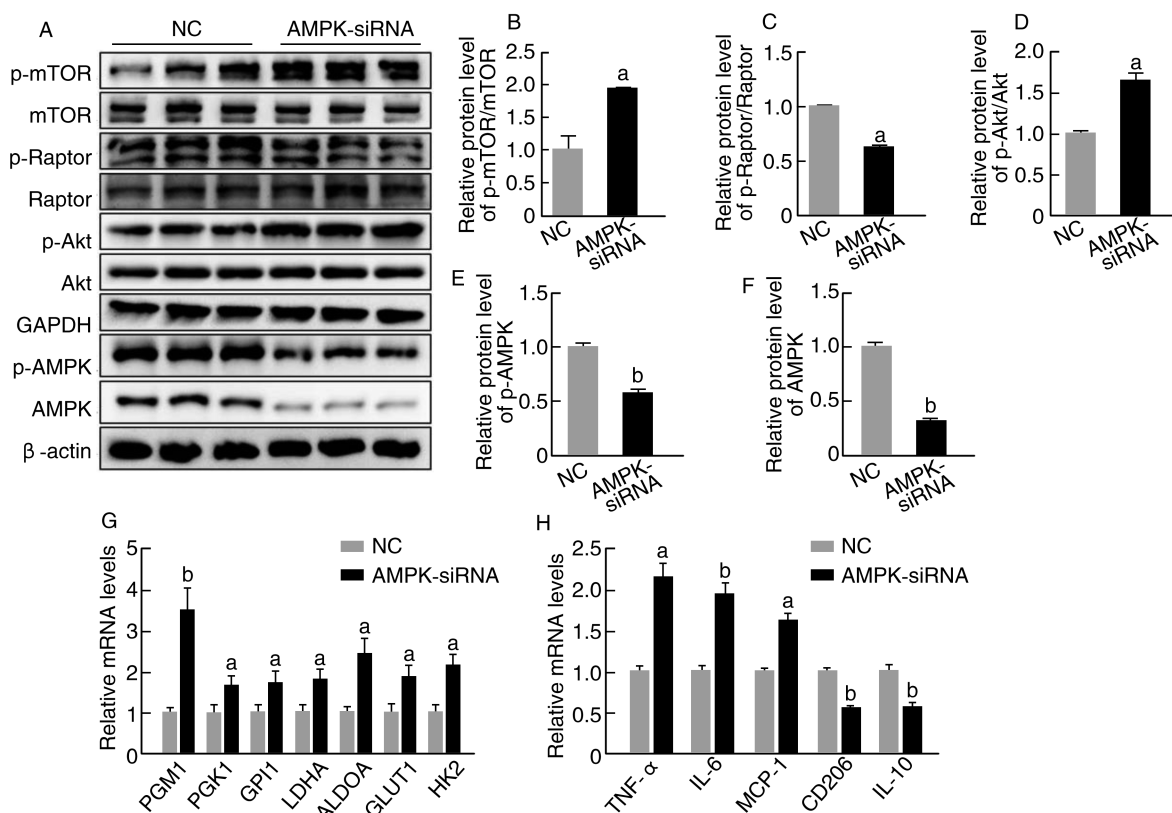


图 3. 抑制 AMPK 促进小鼠巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化

A 为转染 AMPK-siRNA 后 AMPK 信号通路活性检测,B 为转染 AMPK-siRNA 后 p-mTOR/mTOR 蛋白水平,C 转染 AMPK-siRNA 后为 p-Raptor/Raptor 蛋白水平,D 转染 AMPK-siRNA 后为 p-Akt/Akt 蛋白水平,E 为转染 AMPK-siRNA 后 p-AMPK 蛋白水平,F 为转染 AMPK-siRNA 后 AMPK 蛋白水平,G 为转染 AMPK-siRNA 后葡萄糖酵解相关基因 mRNA 水平,H 为转染 AMPK-siRNA 后巨噬细胞 M1、M2 极化相关基因 mRNA 水平。 $n=3$ 。a 为  $P < 0.05$ ,b 为  $P < 0.01$ ,与阴性对照组比较。

Figure 3. Inhibiting AMPK promotes glycolysis and M1 polarization in mouse macrophages

### 2.4 激活 AMPK 可逆转 O/P 诱导巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化

使用 AICAR 单独处理 RAW264.7 细胞,结果显示, p-mTOR/mTOR 和 p-Akt/Akt 蛋白水平降低( $P < 0.05$ ), p-Raptor/Raptor、p-AMPK 和 AMPK 蛋白水平升高( $P < 0.05$ )。为了进一步证明 O/P 通过 AMPK 信号通路促进巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化,使用 AICAR 和 O/P 同时处理 RAW264.7 细胞,结果显示,糖酵解相关基因 PGM1、PGK1、GPI1、LDHA、ALDOA、GLUT1 和 HK2 mRNA 水平降低( $P < 0.05$ ),M1 型极化标志物 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 MCP-1 mRNA 水平降低( $P < 0.05$ ),M2 型极化标志物

CD206 和 IL-10 mRNA 水平升高( $P < 0.05$ ;图 4)。由此推测,激活 AMPK 可逆转 O/P 诱导巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化。

## 3 讨论

NASH 是 MAFLD 进展的关键阶段。肝脏内巨噬细胞的炎症反应加速了 NASH 进程<sup>[11]</sup>。肝脏内巨噬细胞主要分为两类:驻留型巨噬细胞(Kupffer 细胞)和浸润型巨噬细胞。血液中的游离脂肪酸可招募外周血单核细胞浸润进入肝脏,并迅速转变为与 Kupffer 细胞功能相似的巨噬细胞,统称为肝脏内

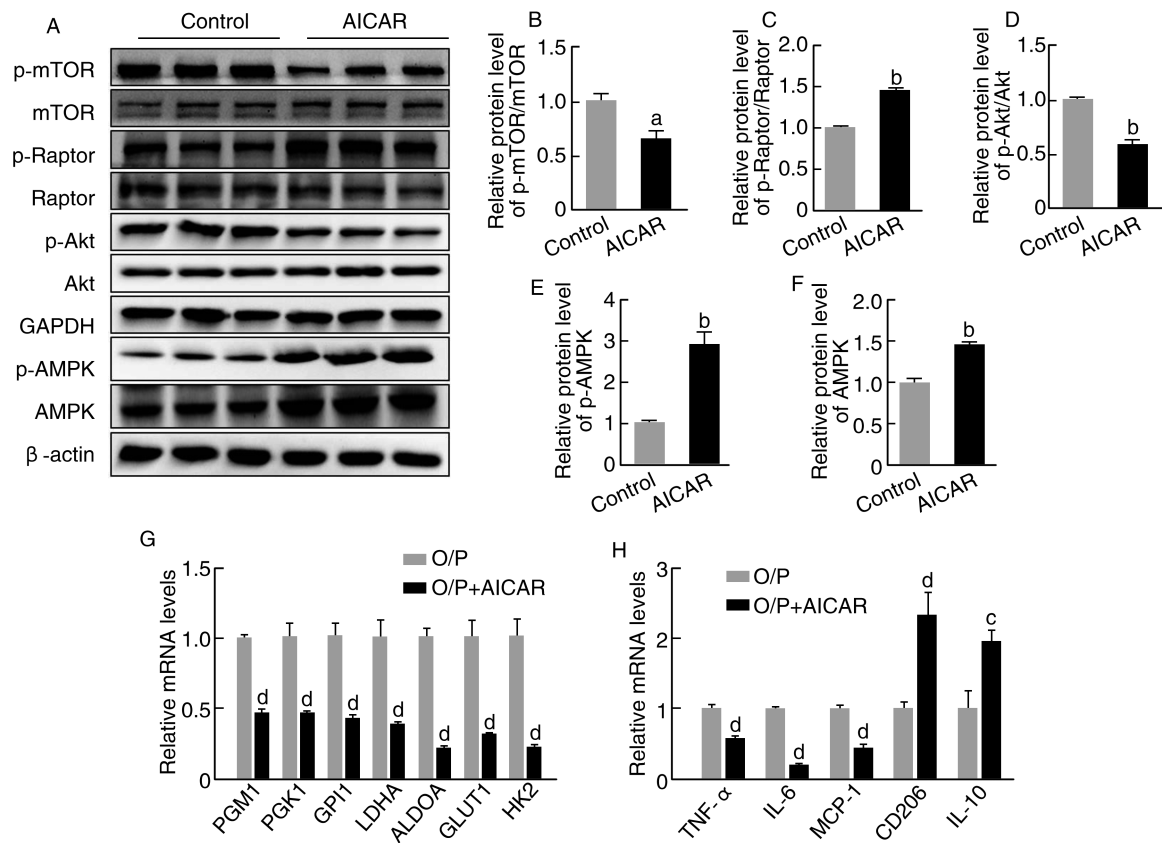


图 4. 激活 AMPK 可逆转 O/P 诱导的巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化

A 为 AICAR 单独处理巨噬细胞后 AMPK 信号通路活性检测, B 为 AICAR 单独处理巨噬细胞后 p-mTOR/mTOR 蛋白水平, C 为 AICAR 单独处理巨噬细胞后 p-Raptor/Raptor 蛋白水平, D 为 AICAR 单独处理巨噬细胞后 p-Akt/Akt 蛋白水平, E 为 AICAR 单独处理巨噬细胞后 p-AMPK 蛋白水平, F 为 AICAR 单独处理巨噬细胞后 AMPK 蛋白水平, G 为 AICAR 和 O/P 共同处理巨噬细胞后葡萄糖酵解相关基因 mRNA 水平, H 为 AICAR 和 O/P 共同处理巨噬细胞后 M1、M2 极化相关基因 mRNA 水平。  
n=3。a 为  $P<0.05$ , b 为  $P<0.01$ , 与对照组比较; c 为  $P<0.05$ , d 为  $P<0.01$ , 与 O/P 组比较。

Figure 4. Activation of AMPK could reverse O/P induced macrophage glycolysis and M1 polarization

巨噬细胞<sup>[12]</sup>。肝脏内巨噬细胞是引起肝脏炎症反应的重要群体。它们在游离脂肪酸的刺激下迅速转化为 M1 表型, 释放炎症因子, 加速单纯性脂肪肝向 NASH 进展。小鼠血液中的单核细胞主要包括两类: 来源于骨髓的 Ly6C<sup>+</sup> 高表达 (Ly6C<sup>high</sup>) 单核细胞和来源于脾脏的 Ly6C<sup>+</sup> 低表达 (Ly6C<sup>low</sup>) 单核细胞。在 MAFLD 早期, 大量 Ly6C<sup>high</sup> 单核细胞通过 CCR2 与 CCL2 结合浸润进入肝脏并分化为巨噬细胞<sup>[13]</sup>。因此, 骨髓来源的巨噬细胞在 NASH 进程中起着重要的作用。本研究以小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 为研究对象, 通过 O/P 处理 RAW264.7 细胞模拟 MAFLD 疾病模型中血液游离脂肪酸对巨噬细胞的影响。本研究发现 O/P 可促进巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 型极化, 且降低 AMPK 活性; 为了验证 AMPK 信号通路对巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 型极化的调节作用, 转染 AMPK 特异性 siRNA 抑制其 mRNA 和蛋白表达, 结果发现, 抑制 AMPK 可促进

巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 型极化; 激活 AMPK 活性可逆转 O/P 对巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化的促进作用。

AMPK 信号通路是调节细胞能量代谢、炎症反应的重要调节通路<sup>[14]</sup>。在巨噬细胞中 AMPK 是代谢重编程和炎症通路 (p38、JNK 和 ERK1/2) 的重要调节因子<sup>[7]</sup>。在脂多糖激活的 M1 型巨噬细胞中, AMPK 活性降低, 糖酵解水平升高, 炎症通路激活, 释放大量促炎症因子; 在 IL-4 激活的 M2 型巨噬细胞中, AMPK 活性升高, 氧化磷酸化水平升高, 释放大量抑炎因子。本研究也得到相似的结果, 游离脂肪酸处理促进巨噬细胞 M1 极化, 炎症因子表达水平升高, 糖酵解相关基因表达增加, 且游离脂肪酸可抑制 p-AMPK 和 AMPK 水平。通过抑制 AMPK 蛋白水平和激活其活性两种方式, 进一步验证了 AMPK 参与了游离脂肪酸介导的巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化。

PI3K/Akt/mTORC1 参与脂多糖诱导的巨噬细胞 M1 转型和代谢重编程。PI3K/Akt 激活可上调糖酵解相关基因 GLUT1 和 HK2 表达水平<sup>[15]</sup>。mTORC1 是调节细胞炎症和代谢的重要通路,由 mTOR 和 Raptor 亚基调节。PI3K/Akt 通过磷酸化 TSC1/2 亚基激活 mTORC1。除此之外,Raptor 亚基是 mTORC1 的调节因子。Raptor 亚基 792 位丝氨酸磷酸化可使之失活<sup>[16]</sup>。mTORC1 通过 HIF-1 $\alpha$  调节巨噬细胞代谢重编程。本研究发现,O/P 处理可抑制 AMPK 活性,下调 Raptor 磷酸化水平,激活 mTORC1,且抑制 AMPK 可通过调节 Akt 上调 mTORC1 活性,最终促使巨噬细胞 M1 转型和代谢重编程。巨噬细胞的激活需要代谢重编程以满足其所需要的能量和生物合成代谢<sup>[15]</sup>。葡萄糖是肝脏中重要的能量物质,其代谢方式主要包括氧化磷酸化和糖酵解。氧化磷酸化是细胞内高效的 ATP 生产途径,维持细胞能量供给,可将葡萄糖代谢生成的丙酮酸转化为乙酰辅酶 A,通过 TCA 循环生成大量 ATP。糖酵解是将葡萄糖转化为丙酮酸、乳酸等产物的代谢途径,产生 ATP 的效率较低。在 M1 型巨噬细胞中,氧化磷酸化途径(oxidative phosphorylation, OXPHS)受到抑制,琥珀酸脱氢酶和柠檬酸脱氢酶表达下调,导致柠檬酸和琥珀酸蓄积;糖酵解途径被激活,相关酶类表达水平升高,代谢产物乳酸蓄积<sup>[16]</sup>。已有研究证明,糖酵解途径促进巨噬细胞向 M1 型极化,激活炎症通路,释放炎症相关因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等)<sup>[17]</sup>。本研究也发现,当巨噬细胞 M1 极化时,葡萄糖酵解相关基因表达升高;当巨噬细胞 M2 极化时,葡萄糖酵解相关基因表达降低。这些结果提示,游离脂肪酸可能通过葡萄糖酵解促进巨噬细胞 M1 极化。

本研究证明了游离脂肪酸通过 AMPK 信号通路促进巨噬细胞葡萄糖酵解和 M1 极化,为 NASH 的治疗提供新的思路。

#### [参考文献]

- [1] HUANG J F, OU W J, WANG M F, et al. MAFLD criteria guide the subtyping of patients with fatty liver disease[J]. Risk Manag Healthc Policy, 2021, 14: 491-501.
- [2] YANG Q P, ZHANG L S, LI Q, et al. Characterization of microbiome and metabolite analyses in patients with metabolic associated fatty liver disease and type II diabetes mellitus[J]. BMC Microbiol, 2022, 22(1): 105.
- [3] MANNE V, HANDA P, KOWDLEY K V. Pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis[J]. Clin Liver Dis, 2018, 22(1): 23-37.
- [4] KAZANKOV K, JØRGENSEN S M D, THOMSEN K L, et al. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(3): 145-159.
- [5] LU Q R, TIAN X Y, WU H, et al. Metabolic changes of hepatocytes in NAFLD[J]. Front Physiol, 2021, 12: 710420.
- [6] HERZIG S, SHAW R J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(2): 121-135.
- [7] STRZYŻ P. AMPK against NASH[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(4): 181.
- [8] 李挺, 王德奖, 徐颖怡, 等. 二甲双胍通过激活 AMPK/STAT3 通路调控巨噬细胞分化抑制小鼠动脉粥样硬化形成[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(4): 287-294.
- LI T, WANG D J, XU Y Y, et al. Metformin regulates macrophage differentiation and inhibits formation of atherosclerosis by activating AMPK/STAT3 pathway in mice[J]. Chin J Arterioscler, 2022, 30(4): 287-294.
- [9] CHAN K L, PILLON N J, SIVALOGANATHAN D M, et al. Palmitoleate reverses high fat-induced proinflammatory macrophage polarization via AMP-activated protein kinase (AMPK)[J]. J Biol Chem, 2015, 290(27): 16979-16988.
- [10] LI L F, ZUO H Y, HUANG X Q, et al. Bone marrow macrophage-derived exosomal miR-143-5p contributes to insulin resistance in hepatocytes by repressing MKP5[J]. Cell Prolif, 2021, 54(12): e13140.
- [11] PIERANTONELLI I, SVEGLIATI-BARONI G. Nonalcoholic fatty liver disease: basic pathogenetic mechanisms in the progression from NAFLD to NASH[J]. Transplantation, 2019, 103(1): e1-e13.
- [12] XU L Y, LIU W, BAI F X, et al. Hepatic macrophage as a key player in fatty liver disease[J]. Front Immunol, 2021, 12: 708978.
- [13] BREMPERIS K J, CRISPE I N. Infiltrating monocytes in liver injury and repair[J]. Clin Transl Immunology, 2016, 5(11): e113.
- [14] DAY E A, FORD R J, STEINBERG G R. AMPK as a therapeutic target for treating metabolic diseases[J]. Trends Endocrinol Metab, 2017, 28(8): 545-560.
- [15] CHANG M, HAMILTON J, SCHOLZ M, et al. Glycolytic control of adjuvant-induced macrophage survival: role of PI3K, MEK1/2, and Bcl-2[J]. J Leukoc Biol, 2009, 85: 947-956.
- [16] LAPLANTE M, SABATINI D M. mTOR signaling in growth control and disease[J]. Cell, 2012, 149(2): 274-293.
- [17] LIU J, GAO M, YANG Z, et al. Macrophages and metabolic reprogramming in the tumor microenvironment[J]. Front Oncol, 2022, 12: 795159.

(此文编辑 文玉珊)