

AMPK在胰岛素信号转导通路中的作用

黄德强^{1*} 罗凌玉¹ 王丽丽² 罗时文¹ 吕农华¹ 罗志军³

(¹南昌大学第一附属医院消化疾病研究所, 南昌 330006; ²南昌大学第一附属医院超声科, 南昌 330006; ³美国波士顿大学医学院生物化学系, 波士顿 02118)

摘要 单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)作为一种细胞能量调节器, 当细胞经历代谢应激反应时, 伴随着细胞内AMP水平或AMP与ATP的比例升高, AMPK被AMP激活, 其活化的结果导致脂肪酸氧化的增加以产生更多ATP; 同时, 抑制ATP消耗, 综合效应是帮助细胞度过急性损伤, 暂时保障细胞的存活。因为一些治疗2型糖尿病的药物通过激活AMPK而发挥作用, 故AMPK被认为是各种潜在的和有效的抗糖尿病药物的靶效应器。5-氨基-4-氨甲酰咪唑核苷(5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside, AICAR), 进入细胞后被磷酸化变成ZMP, 后者类似AMP也能够激活AMPK。因此, 我们采用AICAR激活AMPK, 观察活化的AMPK对脂肪细胞能量代谢及胰岛素信号途径的作用。结果显示, 脂肪细胞中的AMPK被激活后, 丙酰辅酶A (malonyl-CoA, 一种脂肪酸氧化作用的抑制剂及脂肪酸合成的前体中间产物)浓度下降80%; 在已分化的3T3-F442a脂肪细胞中, AICAR通过激活AMPK, 增强胰岛素对Akt/PKB的激活和GSK3的磷酸化。相反, 在AICAR预处理的细胞中, 胰岛素对mTOR的激活能力被降低; 同时, mTOR下游效应器(如p70S6K、S6及4E-BP1)的磷酸化也降低。结果还显示, AMPK可在体外直接磷酸化mTOR, 并抑制其自身的磷酸化活性。与此相应, 2-双脱氧葡萄糖诱导的AMPK活化可导致TSC2缺乏的MEF细胞中mTOR的抑制。以上研究结果表明, AMPK在多个方面调节mTOR, 并首次揭示AMPK直接磷酸化mTOR, 导致其酶活性的改变。总之, AMPK全面参与了调节脂肪细胞的能量代谢: 抑制脂肪酸及蛋白质的合成、刺激脂肪酸的氧化作用。

关键词 AMPK; 5-氨基-4-氨甲酰咪唑核苷; Akt; mTOR

AMPK是由催化亚基 α 亚基($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$)、 β 亚基($\beta 1$ 、 $\beta 2$)和调节亚基 γ 亚基($\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$)组成的三聚体($\alpha\beta\gamma$)蛋白激酶复合物。AMPK的 β 、 γ 亚基与5'-AMP结合后, AMPK被激活, 进而引发结构性改变。通过上游的激酶如LKB1和CaMKK, AMPK催化亚基活性中心的Thr172发生磷酸化。现有研究表明, 在低氧、糖缺乏和肌肉活动时, AMPK活性增高, 这一改变与细胞的能量状态变化和AMP/ATP比率有一定的联系。另外, AMPK活性受激素脂联素(adiponectin)和瘦素(leptin)刺激而增加^[1], 某些药物也可以影响使其上调, 如AICAR^[2]、二甲双胍和噻唑烷二酮类药物。这些药物已应用于实验动物模型或人的2型糖尿病及胰岛素抵抗性(isulin resistance, IR)的治疗^[3]。事实上, AMPK被证明介导一些抗糖尿病药物的治疗效应, 由此被认为是抗糖尿病药物的热门靶效应器^[4-5]。

AMPK在细胞能量代谢中发挥多种功能, 一方面, 它通过促进血糖吸收、降低血糖和血脂水平, 增

加胰岛素敏感性和改善胰岛素抵抗性; 另一方面, AMPK增加脂肪酸氧化, 抑制脂肪和蛋白质合成, 有明显对抗胰岛素的作用, 而且通常发生在细胞出现能量危机时。在分子水平, AMPK与胰岛素信号通路间存在复杂的关系。例如, AMPK能够上调或下调与IRS-1(胰岛素受体底物-1)相结合的PI3K和Akt/PKB的活性, 而胰岛素和Akt能够下调AMPK的活性^[6]。

mTOR是胰岛素调节蛋白质合成的重要调节因子, 属于磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)相关家族成员, 但发挥专门的蛋白激酶活性。mTOR以两种复合物形式存在, TORC1和TORC2。TORC1作为PI3K/Akt的下游效应器, 在氨基酸充足的环境中, 受胰岛素和分裂素刺激活化; 而TORC2通过磷酸化Akt的S473使之活化。活化的mTOR可以调节蛋白质合成, 例如激

收稿日期: 2011-05-18 接受日期: 2011-08-08

*通讯作者。Tel: 0791-8692507, E-mail: hdq0515@gmail.com

活核糖体蛋白p70S6激酶1 (p70S6K1)和抑制启动因子4E-BP1。相反,当细胞感觉营养缺乏和其它压力时,细胞内的mTOR活性受到抑制,蛋白质合成减慢,以便分配更多的ATP用于应付生存危机。TSC2和Raptor是两个对TORC1具有相反作用的蛋白, TSC2通过降低Rheb的活性以抑制TORC1的活性, Raptor结合TORC1并成为维持酶活性的必需蛋白。活化的AMPK通过磷酸化这两个蛋白以抑制mTOR活性。一方面, TSC2被磷酸化所激活,引起mTOR的激活因子Rheb处于GDP结合状态,从而抑制mTOR的活化;另一方面, Raptor的磷酸化导致TORC1激酶活性受抑制^[7]。活化的mTOR直接地或经p70S6K间接地磷酸化IRS-1并抑制其活性,由此形成对胰岛素信号转导的负反馈抑制^[8]。反之, AMPK对mTOR的抑制有可能增强细胞对胰岛素的敏感性。

由此可见,对同样的细胞能量状态变化, AMPK与mTOR作出了相反的反应。事实上,先前的研究已经显示AMPK活化会导致mTOR的抑制^[3,7]。为了深入探讨其中的机制,我们对AMPK与胰岛素信号的内在联系和AMPK抑制mTOR的机制进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 TSC2^{-/-} MEF细胞由Dr. David J Kwiatkowski惠赠。

1.1.2 试剂 检测Akt、S6K1、S6、AMPK的磷酸化试剂盒购自Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 3T3-F442a成纤维细胞培养和分化按照参考文献[9-10],选取分化后8~12天的细胞进行实验。

1.2.2 丙酰辅酶A的检测 采用放射性同位素技术,按照参考文献[11],测量被吸收进入脂肪的³H-乙酰辅酶A。

1.2.3 Western blot 裂解所收获细胞,收集上清,蛋白定量,取等量蛋白进行SDS-PAGE,转移至膜上,进行免疫印迹试验。

1.2.4 AMPK分析 以SAMS多肽作为底物,取细胞提取物(500 μg)经与抗-α1抗体进行免疫沉淀,充分洗涤。总反应体系50 μL,取25 μL的终产物,点样于p81滤纸,5%三氯醋酸+1%焦磷酸钠洗涤,液态闪

烁计数检测放射标志。

1.2.5 AMPK磷酸化mTOR 用红细胞凝聚素抗原决定簇(HA)标记的重组mTOR瞬时转染于HEK293T细胞,与抗HA单克隆抗体免疫沉淀。AMPK被编码入GST融源蛋白pEBG载体,表达于HEK293T细胞中,用谷胱甘肽琼脂糖凝胶4B纯化,再洗脱谷胱甘肽以获得纯化的AMPK。纯化的AMPK用于mTOR免疫沉淀试验。

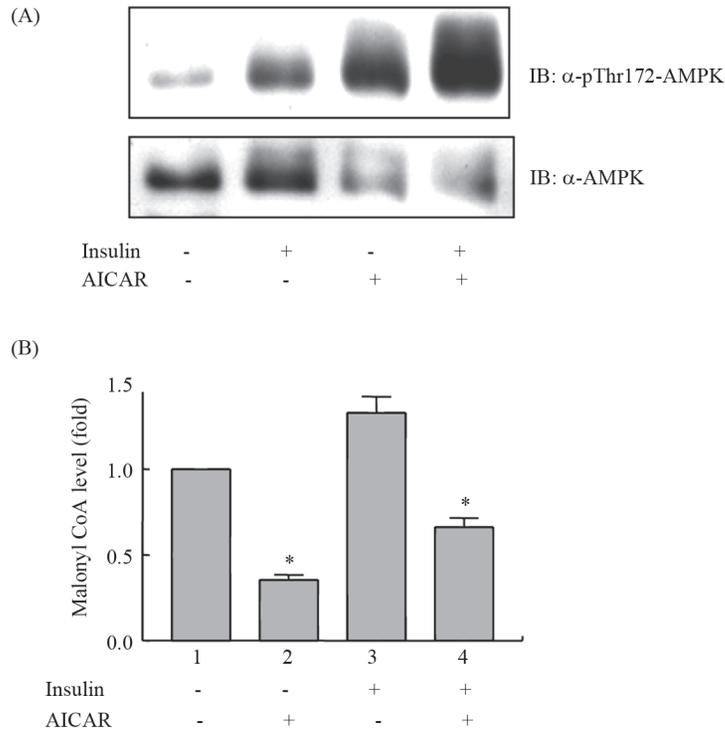
2 结果

2.1 胰岛素刺激脂肪细胞中AMPK的磷酸化

为探讨胰岛素对AMPK的激活效应,我们单独应用胰岛素、ACAIR或联合使用胰岛素和ACAIR刺激脂肪细胞,用Western blot检测AMPK催化区的Thr172磷酸化。如图1A所示,不同处理所引起的Thr172-AMPK磷酸化的强度依次为: AICAR联合胰岛素最强,单独的AICAR其次,而胰岛素最弱。我们对胰岛素增强Thr172的磷酸化感到困惑,因为Akt作为胰岛素下游的一个关键效应分子,通常它磷酸化AMPK并引起其活性抑制^[12]。为了解缘何Thr172磷酸化水平的增加与AMPK激酶的活性变化相一致,我们测定了细胞内丙酰辅酶A的含量。它是体内AMPK活性的标志物,当AMPK磷酸化乙酰辅酶A羧化酶(acetyl CoA carboxylase)时,可导致其活性下降,致使其催化产物丙酰辅酶A (malonyl CoA)水平的降低。因此,选择体内丙酰辅酶A浓度以代表AMPK活性。图1B显示:胰岛素对乙酰辅酶A羧化酶的作用与AICAR正好相反; AICAR使丙酰辅酶A浓度下降,而胰岛素使其浓度增加,这一结果与先前的报道一致^[13]。并且发现AICAR能降低胰岛素升高丙酰辅酶A的能力。我们的结果表明胰岛素虽然促进Thr172磷酸化,但并没有改变AMPK蛋白激酶的活性。因此, AMPK激酶活性变化与AMPK的Thr172磷酸化没有必然的联系,这可能取决于磷酸化事件综合效应。换句话说,虽然胰岛素通过Thr172磷酸化可引起AMPK的活化,但其对AMPK其它位点的磷酸化则可能产生抑制效应。

2.2 AMPK活性对胰岛素诱导的Akt磷酸化的影响

为观察AMPK对胰岛素信号转导的作用,首先在3T3-F442a脂肪细胞培养液中加入AICAR,再加入胰岛素,然后检测Akt磷酸化水平。发现预先加入



A: 经1 mmol/L AICAR预处理30 min的F442a脂肪细胞, 分为两组, 一组细胞中加入100 nmol/L胰岛素, 另一组细胞不加胰岛素, 15 min后结束实验, 收获细胞。用Western blot分别检测细胞提取物中Thr172的磷酸化和总AMPK; B: 检测F442a细胞提取物中丙酰辅酶A的浓度以代表AMPK活性。以上实验重复三次(means±SD), *t*-test, **P*<0.05, 分组2与分组1比较, 分组4与分组3比较。

A: cells were incubated with or without 100 nmol/L insulin for 15 min after pre-treatment with 1 mmol/L AICAR (30 min). Extracts were blotted with antibodies against phospho-Thr172 and total AMPK, respectively; B: Malonyl-CoA was measured to represent the activity of AMPK. The experiments were repeated three times. Values are means±SD; student *t*-test, **P*<0.05, column 2 vs 1 and column 4 vs 3.

图1 AICAR和胰岛素对F442a脂肪细胞中AMPK的Thr172磷酸化的刺激作用

Fig.1 AICAR and insulin both stimulate phosphorylation of AMPK at Thr172 in F442a adipocytes

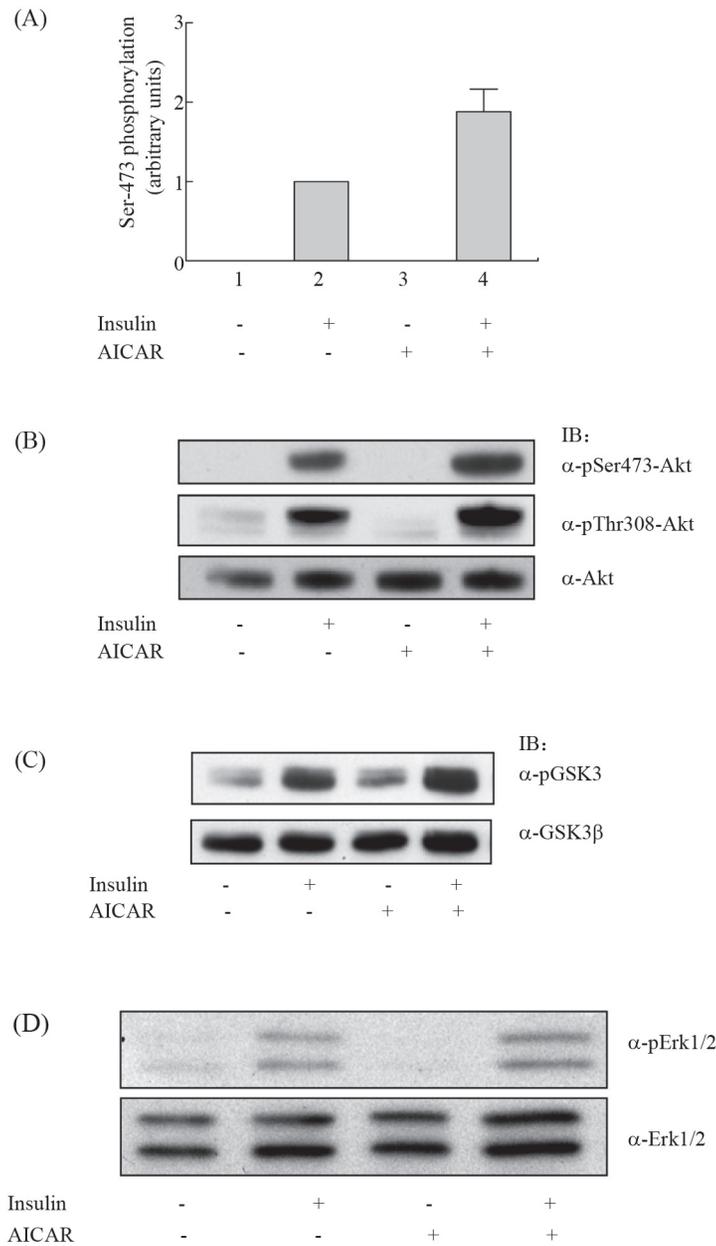
AICAR能增强胰岛素刺激Thr308和Ser473的Akt磷酸化达90%, 并伴有GSK3磷酸化增强(图2A~图2C)。相反, AICAR仅能轻微程度地增强ERK磷酸化水平(图2D)。

2.3 AMPK抑制mTOR

如上所述, AMPK能激活TSC2, 从而抑制mTOR^[14]。为了检测脂肪细胞中mTOR活性是否直接接受AMPK抑制, 我们在3T3-F442a脂肪细胞培养液中加入AICAR, 用一种抗特异磷酸化位点的抗体检测Ser2481位点的自身磷酸化水平, 以反映mTOR的活性水平^[15]。如图3A所示, 单独的胰岛素明显激起mTOR-Ser2481位点磷酸化, 而在AICAR处理后的细胞中胰岛素刺激效果不明显。Rapamycin是公认的mTOR抑制剂, AICAR的mTOR抑制效果几乎与Rapamycin相同。胰岛素的两个直接底物p70S6K和4E-BP-1以及p70S6K的底物S6的磷酸

化, 这些效果均被AICAR所抵消(图3B)。

为探讨AMPK是否直接调控mTOR活性, 经瞬时性转染, 在HEK293T细胞表达带有HA抗原表位簇的mTOR重组蛋白, 免疫沉淀后, 与纯化的重组AMPK全酶、ATP和5'-AMP共同孵育。如图4A所示, AMPK对无激酶活性的mTOR突变体的磷酸化呈剂量性递增。在体外共同孵育实验中, 野生型mTOR经AMPK磷酸化后, mTOR的Ser2481位点的磷酸化随mTOR磷酸化的增加而降低。我们的结果表明, AMPK通过对mTOR的磷酸化而抑制其活性(图4B)。这一结果与体内实验一致(图3A)。为了证明细胞内存在AMPK对mTOR的另一种调节, 即TSC2非依赖性的调节机制, 我们在敲除TSC2的MEF细胞中观察mTOR/p70S6K能否被AMPK所抑制。在MEF细胞培养液中加入不同剂量的2-DOG或1 mmol/L AICAR, 再检测p70S6K的Thr389的磷酸化。如图5A所示, 在



A: 活化的AMPK抑制因胰岛素刺激而产生的乙酰辅酶A, 细胞实验如同图1B, 丙酰辅酶A的检测采用放射性同位素方法, 方法参照实验过程。实验结果来自两个独立实验, 均值采用means±SD, *P<0.05, 分组2与分组1比较, 分组4与分组3比较; B~D: AICAR对胰岛素诱导三种磷酸化(Akt/PKB磷酸化、GSK3β磷酸化、Erk1/2磷酸化)的作用。采用Western blot检测细胞裂解液中各蛋白的表达。Akt的表达如图A所示, 为浓度均值, 来自4个不同的抗-Ser473 blots。

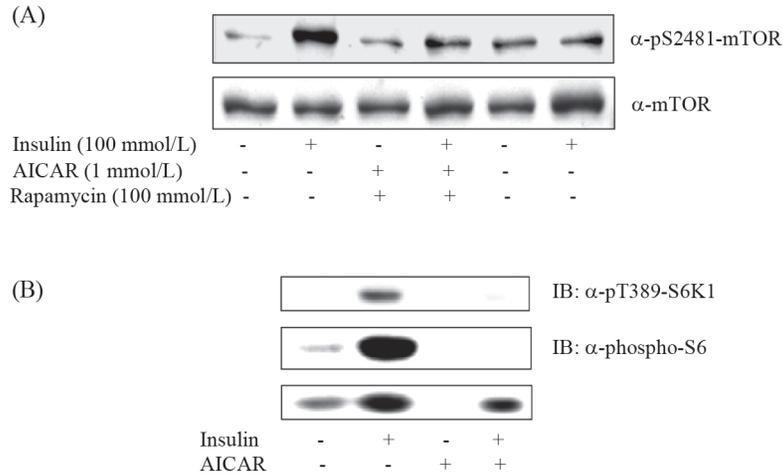
A: AMPK activation inhibits insulin-stimulated production of malonyl CoA. Cells were treated as for Fig.1B. Malonyl-CoA was measured by the radioisotopic method described under "Material and Methods". Results are obtained from two independent experiments. Values are means±SD; *P<0.05, column 2 vs 1 and column 4 vs 3; B~D: the effects of AICAR on insulin-stimulated phosphorylation of Akt/PKB, GSK3 and Erk1/2. The cell lysates were resolved onto SDS-PAGE and blotted with antibodies, as indicated. Representative blots for Akt are shown here. Graph represents averages of scan densitometric units (means±SD) from four independent anti-Ser473 blots.

图2 活化的AMPK对脂肪酸氧化和胰岛素功能的作用

Fig.2 Effect of AMPK activation on fatty acid oxidation and insulin action in F442a adipocytes

10 mmol/L的2-DOG时, Thr389磷酸化开始受到抑制; 在25 mmol/L的2-DOG时, Thr389的磷酸化完全被抑

制, 与Rapamycin作用相似; 但没有发现AICAR的明显抑制作用。本次实验中AICAR引起的AMPK激活

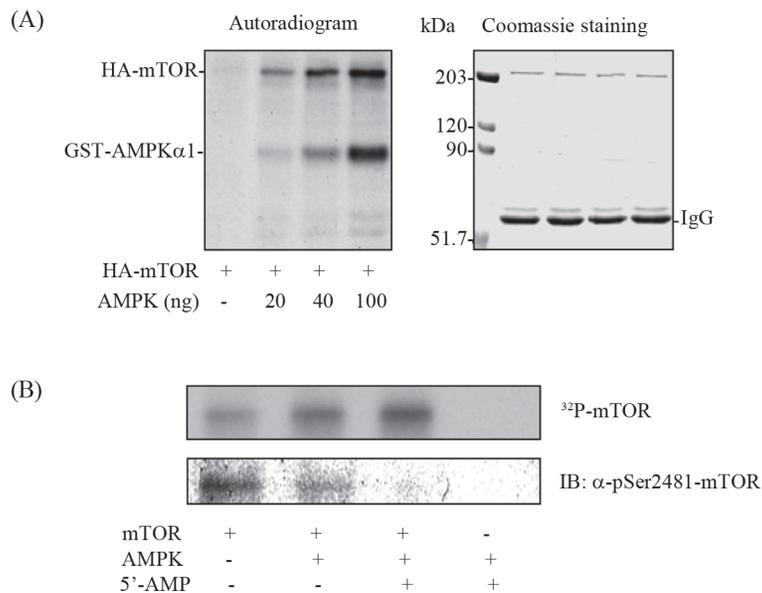


A: 细胞被AICAR和Rapamycin处理30 min后,再用胰岛素处理30 min,采用抗Ser2481抗体,Western blot检测细胞裂解液中自动磷酸化水平; B: 细胞处理如同图1,分别检测细胞裂解液中的S6K1 (Thr389)蛋白、S6蛋白和4E-BP1蛋白的磷酸化水平。

A: the cells were treated with AICAR or rapamycin for 30 min, followed by insulin for additional 30 min. Lysates were blotted with anti-Ser2481 antibody for assessing the autophosphorylation; B: lysates from cells treated as Fig.1 were blotted with anti-phospho-S6K1 (Thr389), anti-phospho-S6 protein, and anti-phospho-4E-BP1 antibodies.

图3 AICAR在F442a脂肪细胞内对胰岛素诱导的mTOR激活的作用

Fig.3 Effect of AICAR on mTOR activation by insulin in F442a adipocytes

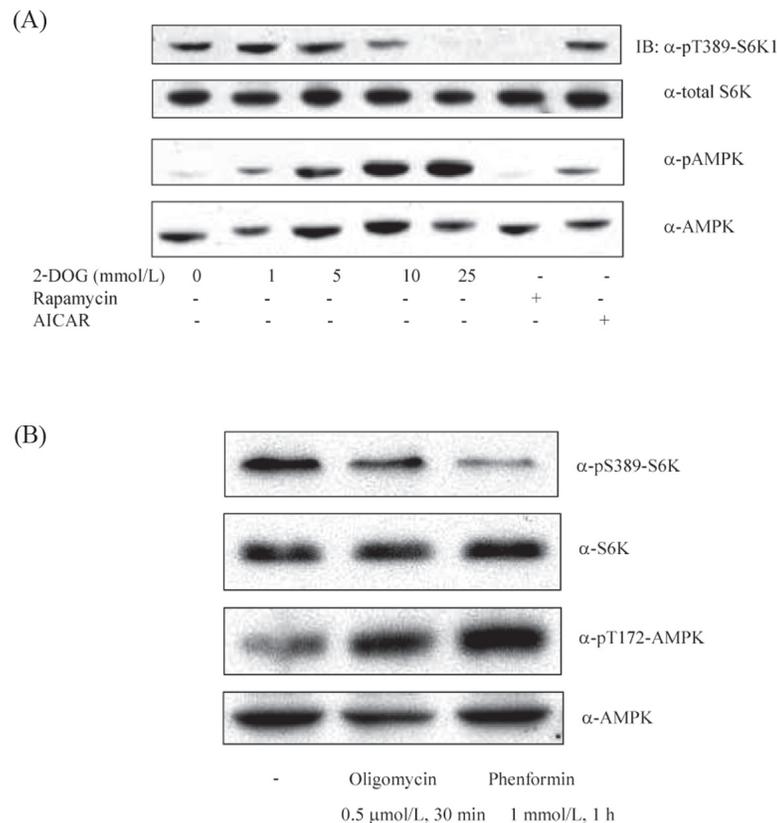


A: mTOR的激酶失活突变,用HA多态标记,表达于HEK293T细胞,用抗HA单克隆抗体沉淀,沉淀与纯化的GST-AMPK ($\alpha 1$)、AMP和 32 P- γ -ATP进行自动放射测量; B: 野生型HA-mTOR的纯化和分析与A部分相同,野生型HA-mTOR分别与AMPK、5'-AMP和AMPK+5'-AMP反应。这个反应混合物,通过电转到Immobilon膜上,进行免疫印迹试验,抗体为抗mTOR Ser2481磷酸化抗体,A图左侧为自放射照片。

A: the kinase negative mutant of mTOR tagged with hemagglutinin (HA) epitope was expressed in HEK293T cells and precipitated with anti-HA monoclonal antibody. The precipitates were incubated with purified GST-AMPK ($\alpha 1$), AMP and 32 P- γ -ATP and subjected to autoradiographic analysis; B: wild-type HA-mTOR was purified and assayed, as described for A, in the presence or absence of purified AMPK and 5'-AMP as indicated. The reaction mixture was electrophoretically transferred to Immobilon membrane and blotted with anti-mTOR phospho-Ser2481 antibody. The top panel is an autoradiogram.

图4 AMPK作用下的mTOR磷酸化水平

Fig.4 Phosphorylation of mTOR by AMPK



A: 不同剂量的2-DOG、10 nmol/L Rapamycin、1 mmol/L AICAR处理MEF细胞, 收集细胞提取物进行Western blot检测磷酸化Thr389-S6K、actin、磷酸化Thr172和AMPK; B: 寡霉素和苯乙双胍处理MEF细胞, 检测磷酸化Thr389-S6K、S6K、磷酸化Thr和AMPK。

A: MEF cells were incubated with different doses of 2-deoxy glucose (2-DOG), Rapamycin (10 nmol/L) or AICAR (1 mmol/L), as indicated. The cell extracts were immunoblotted with antibodies against phospho-Thr389-S6K, actin, phospho-Thr172 and AMPK, respectively; B: MEF cells were treated with Oligomycin and Phenformin, and the extracts were immunoblotted with antibodies against phospho-Thr389-S6K, phospho-Thr172 and AMPK.

图5 AMPK抑制TSC2敲除的MEF细胞的mTOR

Fig.5 AMPK inhibits mTOR in MEFs deficient of TSC2

水平与1 mmol/L 2-DOG相似, 而此剂量的2-DOG无法抑制mTOR。AICAR的作用微弱可能是因为它对MEF细胞膜的渗透性低。然而, 我们的资料表明当敲除TSC2时, TORC1对AMPK的刺激产生耐受性, 少量的AMPK激活不见明显效应, 直到AMPK被极度活化才能观察到TORC1的抑制。为了验证这种可能性, 我们加入另外两种药物, 寡霉素(oligomycin)和苯乙双胍(phenformin)。如图5B所示, S6K磷酸化的抑制程度与AMPK活性高低有关。总之, 这些资料提示AMPK的抑制作用是由TSC2和mTOR共同作用而引起的。

3 讨论

我们已探讨过脂肪细胞中AMPK与胰岛素之间的内在联系, 首先, 胰岛素能增加AMPK Thr172的磷

酸化, 但并不伴有AMPK活性的增加; 其次, 脂肪细胞内的AMPK被AICAR激活后, 丙酰辅酶A的浓度减少80%; 第三, AICAR增强胰岛素刺激Akt/PKB活性和GSK3磷酸化的能力, 而削弱胰岛素激活mTOR(蛋白质合成中的关键激酶)的能力; 最后, AMPK可以直接磷酸化mTOR, 并在体外抑制它的激酶活性, 如在TSC2缺失的MEF细胞中, 2-DOG激活的AMPK可以抑制mTOR活性。总之, 以上结果提示AMPK在多个水平调控mTOR。

以往的研究表明胰岛素能引起AMPK活性下降, 其中Akt所致AMPK的Ser485/491磷酸化是关键步骤^[16]。本研究中, 我们发现胰岛素能增强AMPK催化亚基Thr172的磷酸化, 该结果与3T3-F442a脂肪前体纤维细胞有所不同^[6], 但我们未发现AICAR和胰岛素对Thr172磷酸化的协同作用, 这种差异可能

是由于不同的细胞类型、表达不同的信号转导蛋白所致。这一假说与最近Pellatt等^[17]发表的结果相吻合,他们发现,二甲双胍和胰岛素无法单独引起卵泡细胞的AMPK磷酸化,但二者联合时,可以发挥效应。我们测量丙酰辅酶A含量以代表AMPK活性,结果显示AMPK未被胰岛素所激活,提示Thr172的磷酸化和AMPK的激活无必然联系,AMPK的激活可能还依赖于整个分子的综合磷酸化水平。比如,PI3K下游其它激酶也参与了AMPK的调节。我们发现胰岛素诱导Thr172磷酸化能被Wortmannin (PI3K抑制剂)所抵消,而不受MEK抑制剂PD98059的影响^[6]。Zou等^[18]的研究发现,PKC能磷酸化和激活LKB1,因此,PKC激酶的活性效果可能被抑制性激酶(如Akt)所抵消。因为细胞内两种相反效应激酶都能被胰岛素激活,以致对AMPK的综合效应没有明显变化。

胰岛素对AMPK的综合效应是复杂的,与细胞类型和微环境有密切关系。例如,Tzatsos等^[19]报道AMPK的激活能诱导IRS-1的Ser794位点磷酸化,导致PI3K/Akt信号的抑制;另外一个位点的Ser789的磷酸化引起相反的作用,Jakobsen等^[20]研究显示AMPK引起Ser789的磷酸化,可以导致ISR-1相关的PI3K活性增加。相反,Qiao等^[21]发现Ser789的磷酸化能够抑制与胰岛素抵抗密切相关的PI3K活性。这些相互矛盾的研究结果可能来自不同位点磷酸化的综合效应,例如,胰岛素耐受中IRS-1许多的丝氨酸/苏氨酸残基被磷酸化;在C2C12肌管,AMPK增强胰岛素的作用,主要通过抑制IRS-1的Ser302和Ser636/639的磷酸化。而这些位点磷酸化由活化的p70S6K所驱动,并引起信号的负反馈抑制。因此,AMPK可以借此增强胰岛素对Akt的激活效果。另外,Longnus等^[22]研究显示AICAR可抑制胰岛素对与IRS-1相结合的PI3K的激活,但能促进胰岛素对Akt的活化。这种信号分裂的根本原因尚不清楚,但我们的结果表明在脂肪细胞中预先加入AICAR能增强胰岛素刺激的Akt活性。

许多研究表明,活化的AMPK能抑制mTOR^[6-7]。AMPK通过磷酸化并激活TSC2,活化的TSC2与TSC1形成一个具有GTP酶活性的复合物,抑制mTOR的激活剂Rheb活性。我们的研究有一个全新的发现,在体外mTOR能直接被AMPK磷酸化,并伴有

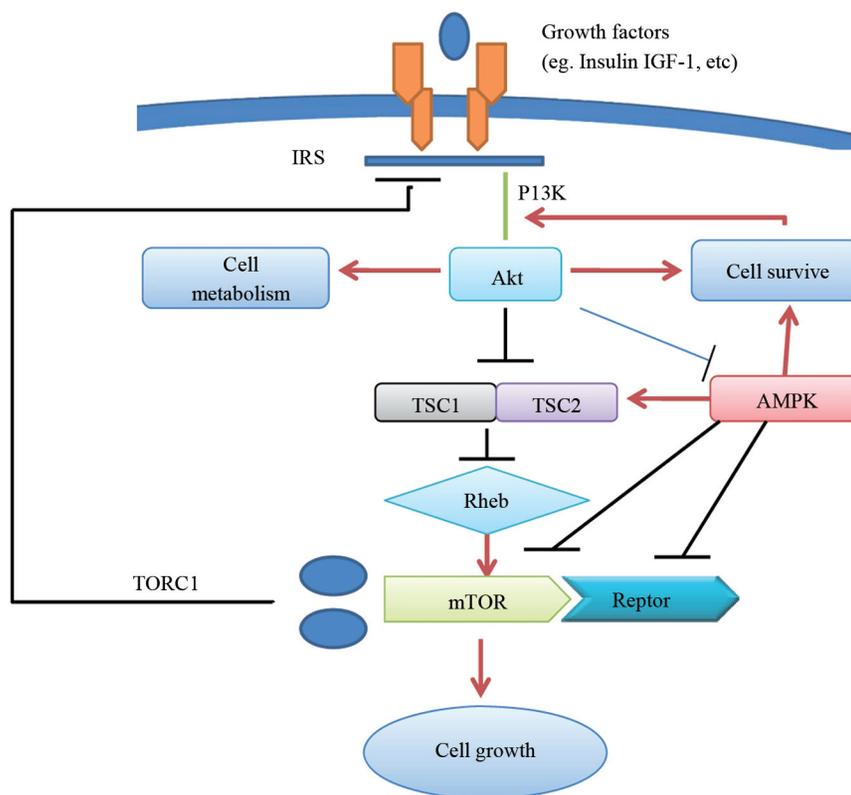
Ser2481位点自动磷酸化的下降。我们尝试体外分析mTOR对p70S6K激活,但没有成功。原因可能是mTOR纯化过程中丢失了该蛋白复合物的部分关键成份。然而,在缺乏TSC2的MEF细胞中加入2-DOG进行培养,我们仍能观察到p70S6K的抑制作用,因此提示脂肪细胞中还存在其他的AMPK调控mTOR的途径,与我们的细胞外实验即mTOR被AMPK磷酸化结果相吻合。Cheng等^[23]的报道与我们的结果类似,他们发现,AMPK磷酸化mTOR的Thr2446位点,而Akt可以磷酸化mTOR的Thr2448位点。用寡肽作底物时,这两个位点被这两种不同的蛋白激酶磷酸化,相互排斥。然而,他们的研究没有揭示这两个位点磷酸化的对mTOR本身酶活性和生物学意义。因此,将Thr2446位点突变成丙氨酸,再评估AMPK对它磷酸化及对mTOR活性的影响,将是我们未来的研究计划。并且,将这一突变体导入缺乏TSC2的MEF细胞,以观察它对AICAR刺激的反应,将是我们探讨的问题。

一个值得思考的问题是:假如AMPK直接磷酸化mTOR可以导致它的激酶活性抑制,为什么它不能抑制胰岛素引起的Ser473磷酸化?详细的原因尚不清楚,可能这种磷酸化仅引起TORC1酶活性抑制,而不影响TORC2。另一个值得注意的问题是,我们在TSC2^{-/-}MEF细胞实验中的结果不能排除另外一种可能性,即AMPK磷酸化Raptor,引起TORC1抑制,正如Gwinn等^[7]的结果所述。

总之,我们已经证明AMPK对胰岛素有双向作用,能增强Akt活性和抑制mTOR。两方面的效果都有利于胰岛素功能。因此,在2型糖尿病和代谢性综合征治疗中,AMPK极有可能是一种有效的胰岛素增效药物。综合已发表的和我们本次的结果,AMPK可通过三种不同的机制对mTOR产生抑制效应(图6),即磷酸化TSC2、Raptor和我们本次报道的对mTOR的直接磷酸化。鉴于mTOR信号转导通路在很多肿瘤细胞中呈持续性激活,AMPK对mTOR的抑制在肿瘤防治中也有广阔的前景。

致谢

感谢Dr. Joseph Avruch在mTOR实验方面的帮助,感谢Dr. David J Kwiatkowski赠送的TSC2^{-/-}MEF细胞。



对Akt的正性调节和对mTOR的负反馈调节, 增加胰岛素的敏感性, 有利于糖尿病和代谢综合征的改善和治疗。通过三种不同机制抑制mTOR, 有助于防治糖尿病和肿瘤。

AMPK increase insulin sensitivity by enhancing Akt activation and inhibiting mTOR, and then improve the therapies and recovery of diabetes and metabolic diseases. The three mechanisms that inhibit mTOR are beneficial to cure and prevent diabetes and carcinoma.

图6 AMPK对胰岛素转导通路的作用

Fig.6 Effects of AMPK on the insulin signal transduction pathway

参考文献 (References)

- Fang X, Fetros J, Dadson KE, Xu A, Sweeney G. Leptin prevents the metabolic effects of adiponectin in L6 myotubes. *Diabetologia* 2009; 52(10): 2190-200.
- Zakikhani M, Blouin MJ, Piura E, Pollak MN. Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 123(1): 271-9.
- Luo Z, Saha AK, Xiang X, Ruderman NB. AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26(2): 69-76.
- Kahn BB, Soltys CL, Barr AJ, Shiojima I, Walsh K, Dyck JR. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 2005; 1(1): 15-25.
- Hardie DG. AMP-activated protein kinase: A cellular energy sensor with a key role in metabolic disorders and in cancer. *Biochem Soc Trans* 2011; 39(1): 1-13.
- Tao R, Gong J, Luo X, Zang M, Guo W, Wen R, *et al.* AMPK exerts dual regulatory effects on the PI3K pathway. *J Mol Signal* 2010; 5(1): 1.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008; 30(2): 214-26.
- Valentinis B, Navarro M, Zanicco-Marani T, Edmonds P, McCormick J, Morrione A, *et al.* Insulin receptor substrate-1, p70S6K, and cell size in transformation and differentiation of hemopoietic cells. *J Biol Chem* 2000; 275(33): 25451-9.
- Frost SC, Lane MD. Evidence for the involvement of vicinal sulfhydryl groups in insulin-activated hexose transport by 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1985; 260(5): 2646-52.
- Djian P, Phillips M, Green H. The activation of specific gene transcription in the adipose conversion of 3T3 cells. *J Cell Physiol* 1985; 124(3): 554-6.
- McGarry JD, Stark MJ, Foster DW. Hepatic malonyl-CoA levels of fed, fasted and diabetic rats as measured using a simple radioisotopic assay. *J Biol Chem* 1978; 253(22): 8291-3.
- Kovacic S, Soltys CL, Barr AJ, Shiojima I, Walsh K, Dyck JR. Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem* 2003; 278(41): 39422-7.

- 13 Brown JD, Fillmore N, Condon BM, Kim HJ, Barrow JR, *et al.* LKB1 and the regulation of malonyl-CoA and fatty acid oxidation in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293(6): e1572-9.
- 14 Lacher MD, Pincheira R, Zhu Z, Camoretti-Mercado B, Matli M, Warren RS, *et al.* Rheb activates AMPK and reduces p27Kip1 levels in Tsc2-null cells via mTORC1-independent mechanisms: Implications for cell proliferation and tumorigenesis. *Oncogene* 2010; 29(50): 6543-56.
- 15 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): 1821-7.
- 16 Rider MH. The ubiquitin-associated domain of AMPK-related protein kinases allows LKB1-induced phosphorylation and activation. *Biochem J* 2006; 394(Pt3): e7-9.
- 17 Pellatt LJ, Rice S, Mason HD. Phosphorylation and activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) by metformin in the human ovary requires insulin. *Endocrinology* 2011; 152(3): 1112-8.
- 18 Xie Z, Dong Y, Zhang M, Cui MZ, Cohen RA, Riek U, *et al.* Activation of protein kinase C zeta by peroxynitrite regulates LKB1-dependent AMP-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 2006; 281(10): 6366-75.
- 19 Tzatsos A, Tsihchlis PN. Energy depletion inhibits phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling and induces apoptosis via AMP-activated protein kinase-dependent phosphorylation of IRS-1 at Ser-794. *J Biol Chem* 2007; 282(25): 18069-82.
- 20 Hardie DG, Morrice N, Tornqvist HE. 5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. *J Biol Chem* 2001; 276(50): 46912-6.
- 21 Qiao LY, Zhande R, Jetton TL, Zhou G, Sun XJ. *In vivo* phosphorylation of insulin receptor substrate 1 at serine 789 by a novel serine kinase in insulin-resistant rodents. *J Biol Chem* 2002; 277(29): 26530-9.
- 22 Longnus SL, Wambolt RB, Parsons HL, Brownsey RW, Allard MF. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis by allosteric mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284(4): R936-44.
- 23 Cheng SW, Fryer LG, Carling D, Shepherd PR. Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *J Biol Chem* 2004; 279(16): 15719-22.

The Role of AMPK in Regulation of the Insulin Signal Transduction Pathway

Huang Deqiang^{1*}, Luo Lingyu¹, Wang Lili², Luo Shiwen¹, Lü Nonghua¹, Luo Zhijun³

(¹Research Institute of Digestive Diseases, Nanchang 330006, China; ²Department of Ultrasonography, the First Hospital of Nanchang University School of Medicine, Nanchang 330006, China; ³Department of Biochemistry, Boston University School of Medicine, Boston MA 02118, USA)

Abstract The AMP-activated protein kinase (AMPK) serves as a fuel gauge activated under metabolic stresses which is usually accompanied by increasing intracellular levels of AMP or the ration of AMP to ATP. As a result, AMPK stimulates fatty acid oxidation to generate more ATP and inhibits ATP-consuming processes in coping with stresses and assuring acute cell surviving programs. Since several clinically used anti-diabetic drugs activate AMPK, it is regarded as a promising and effective drug target for type 2 diabetes. Using 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1-D-ribose nucleoside (AICAR), a cell permeable agent that is phosphorylated inside cells and converted to ZMP, an analog of AMP and a canonical pharmacological AMPK activator, we explored the effect of AMPK on energy metabolism and the insulin signaling pathway in adipocytes. Our results showed that when AMPK was activated, the concentration of malonyl-CoA, an inhibitor of fatty acid oxidation and an intermediate in fatty acid synthesis, diminished by 80%. They also showed that AICAR activated AMPK in differentiated 3T3-F442a adipocytes and enhanced insulin stimulated Akt/PKB activation as well as GSK3 β phosphorylation. In contrast, the ability of insulin to activate mTOR, a critical kinase for protein synthesis, was impaired by preincubation of cells with AICAR. This led to a decrease in the phosphorylation of downstream effectors of mTOR, including p70S6K, S6 and 4E-BP1. Furthermore, our results revealed that AMPK directly phosphorylated mTOR and inhibited its auto-kinase activity *in vitro* and that AMPK activation by 2-deoxide glucose caused an inhibition of mTOR in MEF cells deficient in *TSC2*. Thus, our results for the first time demonstrate that AMPK phosphorylates mTOR which leads to the inhibition of its kinase activity and indicate that AMPK regulates mTOR at multiple levels. Collectively, these studies suggest that AMPK exerts a global effect on energy metabolism in adipocytes in which it inhibits both fatty acid and protein synthesis and stimulates fatty acid oxidation.

Key words AMPK; AICAR; insulin; Akt; mTOR

Received: May 18, 2011 Accepted: August 8, 2011

*Corresponding author. Tel: 86-791-8692507, E-mail: hdq0515@gmail.com