

封面：

分类号\_\_\_\_\_

密级\_\_\_\_\_

U D C\_\_\_\_\_

编号\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

葡萄糖饥饿引起的不依赖 AMP 的 AMPK 激活

张宸崧

工作完成日期 2015 年 10 月至 2017 年 8 月

报告提交日期 2017 年 9 月

厦门大学

年 月

题名页

葡萄糖饥饿引起的不依赖 AMP 的 AMPK 激活

Glucose-starvation induced AMP-independent activation of AMPK

博 士 后 姓 名 张宸崧

流动站（一级学科）名称 化学

专 业（二级学科）名称 化学生物学

研究工作起始时间 2015 年 10 月

研究工作期满时间 2017 年 8 月

厦 门 大 学

年 月

# 厦门大学博士后研究工作报告

## 著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（ ）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

## 摘要

葡萄糖不仅是生物体能量的主要来源和合成生物分子的主要碳源,其浓度也作为一种“状态信号”调控包括 AMPK 和 mTOR 在内的信号通路。之前我们发现了 AXIN 介导 LKB1 在溶酶体上激活 AMPK 和同时抑制 mTOR 的通路,揭示了合成代谢与分解代谢的切换方式。进一步的工作还发现了细胞感受葡萄糖浓度是通过醛缩酶来介导的,即葡萄糖浓度下降导致的醛缩酶底物果糖-1,6-二磷酸水平的下降是 AMPK 激活的真正原因。我们发现葡萄糖饥饿并不通过提高 AMP 浓度来激活 AMPK,引发了对 AMPK 调控模式的重大范式改变。

关键词: AMPK; 醛缩酶; 溶酶体; 葡萄糖感应

## Abstract

Glucose is not only the main source for cellular energy and biosynthesis of biomolecules, but also serves as a “status signal” that can modulate key signaling pathways for control of metabolic homeostasis, including the master kinases AMPK and mTOR. We previously showed that AXIN acts as a scaffold for LKB1 to activate AMPK on the surface of lysosome, which concomitantly inhibits mTOR signaling, uncovering the switch mechanism between anabolism and catabolism. More recently, we found that glucose starvation-induced AMPK activation is mediated by aldolases, i.e. it is the decline of the aldolase substrate fructose-1,6-bisphosphate as a result of shortage of glucose that causes the activation of AMPK. The unoccupied aldolases “physically” participate in AMPK activation. Surprisingly, the glucose-starvation-induced AMPK activation is independent of changes of AMP levels. This has caused a major shift of paradigm in the mechanism of AMPK activation.

Keywords: AMPK; aldolase; lysosome; glucose sensing

# 目 次

1 前言	8
1.1 研究背景与意义	8
1.1.1 AMPK 是机体内最重要的调节代谢稳态的分子	8
1.1.2 葡萄糖是调节 AMPK 的重要因素	10
1.1.3 现有 AMPK 激活机制的缺陷和不足	12
1.1.4 已有的机体对葡萄糖的感应机制	15
1.1.5 现有的葡萄糖作为“状态信号”的理论依据	16
1.2 材料与方法	18
1.2.1 研究方法	18
1.2.2 关键技术说明	20
2 结果与讨论	24
2.1 AMPK 激活的溶酶体途径	24
2.2 葡萄糖饥饿不影响能量状态	25
2.3 果糖 1,6-二磷酸是葡萄糖饥饿条件下激活 AMPK 的信使分子	27
2.4 醛缩酶是葡萄糖饥饿激活 AMPK 的感知者	30
2.5 小结与讨论	32
参考文献	34
致谢	45
博士生期间发表的学术论文、专著	46
博士后期间发表的学术论文、专著	47
个人简历	48
联系地址	49

## 说 明

博士后研究工作报告的排版以全国博士后管理委员会办公室制定的统一格式为准（参见以上排版范例），研究报告封面统一以彩色羊皮卡纸制作，颜色不限，内页用纸为普通 A4 打印纸，单面或双面打印不限，正文字体为宋体小四。

为更好地保护博士后研究报告的著作权，请各位博士后在博士后研究工作报告中文摘要前加做《厦门大学博士后研究报告著作权使用声明》（具体格式见附件 2），并在该声明中明确保密年限。

出站时，提交 1 份研究报告至厦门大学图书馆，2 份给厦门大学人事处博士后管理办公室（学校定期提交给国家图书馆）。

# 1 前言

## 1.1 研究背景与意义

### 1.1.1 AMPK 是机体内最重要的调节代谢稳态的分子

代谢是有机体最基本、最重要的活动之一。机体要通过感应系统随时监测代谢过程中的物质和能量状态，并不断地通过机体内的代谢调控途径来维持其稳态。如果这些手段失调，机体代谢就会发生异变，导致如糖尿病，心血管疾病，乃至肿瘤等多种人类重大疾病的发生，并影响发育、生长、繁殖、衰老等其他生命过程。同时，代谢稳态的调控涉及的信号转导通路又错综复杂，深入了解调节代谢稳态的关键因子是阐明代谢与疾病的重要的切入点，也是预防代谢型疾病和提供研发代谢型疾病的药物的重要前提。

AMP 激活的蛋白质激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK), 是机体和细胞内感应能量水平并调节代谢稳态的最重要的分子。AMPK 是由  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  三个亚基构成的一个异源三聚体，当细胞内处于能量缺乏状态时，AMPK 被其上游激酶磷酸化而激活，进而磷酸化多种底物蛋白质分子，启动一系列下游反应<sup>[1-4]</sup>。该结果直接导致了多条信号通路的抑制或激活，从而引起一系列的生理变化，包括促进脂肪细胞中甘油三酯的水解<sup>[5]</sup>、促进肝脏摄取血液中的脂肪酸并氧化<sup>[6]</sup>、抑制脂肪酸和胆固醇的生成以及甘油三酯的形成<sup>[7, 8]</sup>，促进肌肉中的脂类氧化和葡萄糖的摄取以及分解<sup>[9, 10]</sup>、抑制胰岛  $\beta$  细胞分泌胰岛素以及糖原的合成<sup>[11]</sup>、抑制蛋白质的合成并促进自噬作用<sup>[4, 12, 13, 14]</sup>和酮体生成作用<sup>[15]</sup>等。这些作用的结果是增加体内的产能代谢，减少体内的耗能代谢，从而达到稳定体内能量水平的作用、维持能量稳态的作用，保证细胞的正常生命活动。

生物体无时无刻不在面临各种导致能量缺失的因素和压力，许多生理过程更是伴随着能量缺失这种情况的发生。AMPK 在应对这些不利情况，维持基本生理过程中起到了重要的作用。例如，胚胎发育中需要经历多种能量胁迫时期，敲除小鼠的 AMPK  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$ ，导致完整的胚胎不能形成<sup>[16]</sup>。而在心脏移植手术中，患者必须经历心肌缺血（期间进行手术）——再灌注的过程，该过程导致心肌缺氧，氧化磷酸化被扰乱，引起严重的能量缺乏<sup>[17]</sup>。AMPK 在这一过程中能够被激活从

而维持心肌的能量水平，保护心肌细胞不受损害<sup>[17, 18]</sup>。在手术过程中使用 AMPK 的激活剂能够大大减轻心肌细胞的坏死和机能衰竭，预防心肌梗塞从而大大提升手术的成功率<sup>[19-21]</sup>。在中枢神经系统的下丘脑中，AMPK 在饥饿状态下被激活，通过神经传递和调节，促进机体的进食，以维持机体的能量平衡。

许多疾病的发生和代谢紊乱有着密切的联系。肿瘤以及肿瘤微环境与正常组织相比的一个重要特征就是其代谢过程的不同，而后者进一步促进了肿瘤的发生和发展<sup>[22, 23]</sup>。由于肿瘤组织的快速增殖消耗大量营养，肿瘤微环境是一个营养匮乏的环境，这将引起肿瘤组织中的 AMPK 的激活<sup>[23]</sup>。在细胞水平上，已经有大量的研究表明 AMPK 的激活可以通过诸如抑制 mTORC1 复合体抑制肿瘤细胞的合成代谢，从而阻止其增殖<sup>[1, 4, 24]</sup>，还可以通过促进 p53 的活力引起肿瘤细胞的生长阻滞和凋亡，从而抑制肿瘤细胞的生长<sup>[25-27]</sup>。因此，在多种肿瘤组织，如黑色素瘤、乳腺癌、结肠癌和肺癌组织中，AMPK 的表达或者活性被强烈抑制，这进一步打破了这些组织中原有的合成代谢和分解代谢的平衡，加剧了肿瘤的发展<sup>[4, 23, 28-29]</sup>。肿瘤微环境对免疫细胞中的 AMPK 的激活则反过来阻止了促炎症免疫细胞的分化和发育以及相关免疫因子的释放，使之处于休眠状态不能被激活并发挥效应，从而抑制了免疫反应对肿瘤组织的识别和杀灭，使得肿瘤的生长更加不受控制<sup>[30]</sup>。除了肿瘤，糖尿病也是一种糖脂代谢稳态失调、紊乱的疾病。人们已经发现，在肥胖小鼠和 II 型糖尿病病人的外周组织中，AMPK 的活力明显被抑制<sup>[31, 32]</sup>。而 AMPK 的激活能够促进肌肉中的葡萄糖转运蛋白 GLUT4 转移到细胞膜上<sup>[33, 34]</sup>，增加肌肉对血液中葡萄糖的吸收和分解代谢，从而降低血糖<sup>[35]</sup>。同时，AMPK 的激活还能够促进肥胖小鼠的脂肪水解和脂肪酸氧化<sup>[5, 6]</sup>。在肝脏中，AMPK 可以通过磷酸化 CRTC2 的方式促进后者的出核，或者通过磷酸化去乙酰化酶 HDAC4/5/7 的方式，促进 FOXO1 的出核，这两种方式的结果都是抑制肝脏的糖异生途径，降低血糖<sup>[36-38]</sup>。可喜的是，人们已经针对 AMPK 这个治疗糖尿病的重要靶点“对症下药”，并取得了一定的进展<sup>[39]</sup>。如对糖尿病小鼠注射 AMPK 的激活剂 AICAR 可以显著增强上述过程，减轻糖尿病病症<sup>[39, 40]</sup>。治疗 II 型糖尿病中被最为广泛使用的药物——二甲双胍能够通过激活 AMPK 缓解脂肪肝并降低并发症风险<sup>[41]</sup>。

生物体的衰老也伴随着一系列代谢平衡的打破和改变<sup>[42]</sup>，人们期待改变衰老的进程，延年益寿。而事实也表明，AMPK 和生物体的寿命密切相关<sup>[43]</sup>。药物激

活 AMPK 能够显著延长多种实验动物的寿命<sup>[44, 45]</sup>。相反, 在酵母中敲除 AMPK  $\beta$  的同源物 Sip2p 会导致酵母寿命的缩短<sup>[46]</sup>。此外, 目前被广泛接受的延长寿命的方式——“卡路里限制 (caloric restriction)”, 即“少吃”的一个主要的机制就是通过 AMPK 调节机体的能量代谢而延长寿命<sup>[42, 43, 47, 48]</sup>。

由此可见, AMPK 是机体内最重要的能量稳态的调节者, 它的功能和人类的生存与健康密切相关。研究 AMPK 的调节不仅能够深刻了解机体能量代谢稳态的调控机制, 还有助于理解甚至操控与之相关的重要生理过程和病理过程, 最终为战胜威胁人类健康的重大疾病贡献力量。

### 1.1.2 葡萄糖是调节 AMPK 的重要因素

如上所述, AMPK 能在机体能量缺乏的状态下被激活。在生理条件下, 能量缺乏状态的一个经典代表就是葡萄糖水平的下降。葡萄糖是生物界最基本、最主要的供能物质, 故水平和机体的能量代谢状态本身就具有紧密的联系。此外, 葡萄糖代谢的中间产物又是几乎所有合成代谢途径最重要的原材料来源。可见, 感受这一物质的水平并随时作出相应的反应是生物体维持代谢平衡的基本功能。AMPK 能够响应机体葡萄糖水平的变化, 并在其水平下降的时候被激活——该机制在各种表达有 AMPK 的真核生物中高度保守, 从酵母到哺乳动物都已被发现<sup>[49]</sup>, 是进化上少有的经典表型。现在, 无论是细胞学还是生理学实验, 但凡涉及到葡萄糖水平变化的情况, 大多都会以检测 AMPK 的激活作为阳性对照; 同理, 但凡涉及到和 AMPK 激活相关的功能性实验, 都会进行葡萄糖缺失或饥饿处理来观察表型以进一步验证其结论, 这从侧面反映了葡萄糖是调节 AMPK 的经典上游。作为 AMPK 的上游, 葡萄糖水平的变化不但经典, 而且常见。饥饿、运动等生理过程都会导致整体或某个器官的葡萄糖水平的变化。在葡萄糖水平下降的时候, 激活的 AMPK 能够通过前述一系列方式维持代谢平衡和机体的正常生理功能。例如, 饥饿能够引起血液和组织液中的葡萄糖水平的下降, AMPK 在这时被激活, 进而促进如肝脏等组织中的  $\beta$ -氧化, 使之转换为利用脂肪酸以代替葡萄糖<sup>[6]</sup>; 与此同时, AMPK 还能促进肝脏生成酮体 (ketones)<sup>[15]</sup>, 后者通过血液供给脑部等不能利用脂肪酸的器官, 以满足这些组织的能量需求。许多生物的生活有昼夜节律 (circadian rhythms), 这就导致了活动和睡眠的周期性, 引起了机体内葡

葡萄糖水平的周期性变化<sup>[50]</sup>。AMPK 能够响应这种变化并维持机体能量稳态<sup>[51]</sup>。近年来，人们利用 AMPK 和葡萄糖之间的密切联系，发明了许多药物来模拟葡萄糖缺失的情况来激活 AMPK，如无法被代谢的葡萄糖类似物 2-DG，5-TG 等<sup>[52, 53]</sup>，这些药物能够通过阻断葡萄糖代谢来达到激活 AMPK 的目的，并已应用某些肿瘤的前期实验中<sup>[54]</sup>。

综上所述，葡萄糖水平的感应用于 AMPK 的激活至关重要，是打开代谢稳态维持机制之门的“钥匙”。然而，AMPK 是如何感应机体葡萄糖水平并被激活机制还很不明朗，甚至存在重大的误区。如下文研究现状所提示的，目前人们的普遍认识是：葡萄糖水平降低就表示“能量缺失”，对于葡萄糖水平降低所引起的效应还停留在其阻断能量即 ATP 的产生上——在这样的情况下，机体内的 ADP 发生积累，促进体内的腺苷酸激酶（adenylate kinase）催化 ADP 生成 ATP 和 AMP，ATP 可用于供能并被进一步消耗成 ADP 而被转化，而 AMP 则进一步积累，引起 AMPK 的激活。

然而，这些结论都基于体外实验甚至生活经验上的推测，实际的生理情况如何尚不清楚。如下文所提示的，我们的前期工作发现，葡萄糖缺失并不能引起细胞和机体内 AMP 水平的上升——说明葡萄糖水平的降低无关于“能量缺失”，而是通过一种新的信号、一条独立于能量代谢的通路调控 AMPK 的激活。我们之前已经发现了一条响应葡萄糖缺失并激活 AMPK 的溶酶体途径（lysosomal pathway），首次揭示了内源 AMPK 的激活过程，在这一领域打下了坚实的基础<sup>[55, 56]</sup>。在这样的基础上，我们进一步研究 AMPK 是如何感受、响应葡萄糖水平而被激活的。我们成功地鉴定出了传递葡萄糖水平的“信使”——果糖 1,6-二磷酸（Fructose-1,6-bisphosphate, FBP），并找到了感应这一“信使”的“感受器”——醛缩酶（aldolase）。依靠这一套完整的“信号系统”，葡萄糖就能够作为一种具体的信号，调节 AMPK 的激活乃至整个机体的代谢稳态。

我们据此提出，葡萄糖水平是机体的一种“状态信号”，通过调节 AMPK 从而调节机体代谢的总平衡。在本项目中，我们将在生理水平和病理水平进一步验证这一理论，研究果糖 1,6 二磷酸作为“葡萄糖信使”的功能，了解醛缩酶作为“葡萄糖感应器”的生理意义和表现，为今后的实际应用提供更具体、更深入的理论依据。我们还将以醛缩酶——果糖 1,6 二磷酸为中心，继续鉴定能够激活

AMPK 的葡萄糖感受器和信号分子，从而拓展并完善葡萄糖感应的具体机制和过程。这些工作不但对全面了解代谢稳态维持的分子机制、糖代谢和相关应激反应的细胞乃至生理、病理进程有重要意义，还将有助于为人类重大疾病的防治提供有效的靶点，为药物设计提供理论基础。

### 1.1.3 现有 AMPK 激活机制的缺陷和不足

AMPK 既然有着如此重要的功能，其激活的机制研究自然也就是领域内的一大热点。“AMPK”这个名字其实已经表明了这个蛋白激酶的激活是依赖于 AMP 的。然而，必须要说明的是，这一结论是由其发现的历史决定的，并不一定代表其生理情境下激活的情况。回顾历史我们可以看到，AMPK 的发现和鉴定就是和 AMP 形影不离的：早期的研究发现，向大鼠的肝脏匀浆中加入 ATP 或 ADP，可以有效地抑制两种脂肪酸合成中的关键酶——3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶（HMG-CoA reductase）和乙酰辅酶 A 羧化酶（acetyl-CoA carboxylase, ACC）的活力从而强烈抑制肝脏的脂肪合成<sup>[57-59]</sup>。进一步的研究表明，这一抑制作用实际上是由 AMP 起到的，且依赖于某个未知的蛋白激酶的催化反应<sup>[60]</sup>。为了找到这个未知的蛋白激酶，苏格兰邓迪大学的 D. Grahame Hardie 实验室对大鼠肝脏匀浆进行了分离和纯化，并对能够响应 AMP 抑制 ACC 的组分进行了近 4 年的细致分析，终于在 1989 年取得突破性进展，得到了一个由命名为  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  的三个大小分别为 63, 38 和 35 kDa 的亚基组成的异源三聚体，并根据其编码的蛋白能够被 AMP 激活的特性命名为 AMPK<sup>[61]</sup>。由此可见，AMPK 的发现史就是一段和 AMP 形影不离的历史。而之后的研究也揭示了 AMP 的确能够在体外调节 AMPK 的事实。AMPK 的  $\alpha$  是催化亚基， $\beta$  和  $\gamma$  则是调节亚基。 $\alpha$  亚基激酶结构域的 C 端紧邻着 AID 结构域，该结构域的作用是通过结合激酶结构域，抑制  $\alpha$  亚基的激酶活性，该功能称之为自抑制（autoinhibitory）<sup>[62, 63]</sup>。AMP 能够结合于 AMPK 的  $\gamma$  亚基，并引起该亚基的变构，后者通过  $\alpha$  亚基 C 末端的 RIM1 和 RIM2 结构域影响 AID 结构域的构象，使  $\alpha$  亚基上的苏氨酸 172 位点（T172）位点暴露出来，在体外就能够观察到其更易被上游激酶 LKB1（liver kinase B1）磷酸化<sup>[63-67]</sup>，相反，ATP 的结合则能够抑制这一过程<sup>[67]</sup>。LKB1 对 T172 位的磷酸化使得 AMPK 的活力提高 100 倍以上<sup>[68]</sup>，因而是激活 AMPK 的关键步骤和标志，常常用于表示

AMPK 的激活水平。被磷酸化后的 AMPK 还可以进一步地被 AMP 别构调节：在体外加入 AMP 可以进一步引起磷酸化的 AMPK 的 4-5 倍的活力升高<sup>[67, 68]</sup>，还可以阻止 T172 位的去磷酸化<sup>[69]</sup>，从而保持 AMPK 的高激活水平。

正是因为 AMP 对于 AMPK 激活具有如此重要而经典的地位，它一直以来便作为 AMPK 唯一的激活信号，并深入人心，根深蒂固。然而从上文的叙述我们可以看到，由于历史原因，这些结论多是基于早年在体外所进行的生化实验得出的。近年来的研究表明，生理条件下 AMPK 激活的机制还远没有弄清，这主要有如下两个方面的问题：

第一，AMPK 在体内被激活不只需要 AMP。2009 年，Bruce E. Kemp 实验室首次发现，在细胞内，AMP 促进的 LKB1 对 AMPK 的磷酸化与后续的激活需要  $\beta$  亚基第二位的甘氨酸上的豆蔻酰化 (myristoylation) 修饰与膜定位。缺失豆蔻酰化的 AMPK 不能响应葡萄糖饥饿而被激活<sup>[66]</sup>。我们实验室发现的溶酶体途径揭开了 AMPK 在体内被激活的“路线图”：在 2013 年，我们发现，在体内，葡萄糖饥饿条件下 AMPK 的激活需要架构蛋白 AXIN 的参与，缺失了 AXIN 则此情况下 AMPK 不能被激活。体外实验进一步证明，AMP 能自主地诱导 AMPK 加强与 AXIN 的相互作用，该作用促使与 AXIN 相结合的 LKB1，也就是 AMPK 的上游激酶能够磷酸化并激活 AMPK<sup>[55]</sup>。这之后在 2014 年，我们又通过酵母双杂交的方式得到了和 AXIN 相互作用的蛋白 LAMTOR1，并且证明该蛋白也是能量缺乏情况下 AMPK 的激活所必需。LAMTOR1 是一个锚定在溶酶体膜表面的蛋白复合体 Ragulator 的重要成员，在缺乏 LAMTOR1 的小鼠/细胞中，葡萄糖饥饿不能引起 AMPK 的激活。我们进一步发现，在葡萄糖缺乏的情况下，同样也是定位在溶酶体膜上的感知者 v-ATPase 发生变构，通过与其相互作用的 Ragulator 复合体发生进一步的变构变构，共同促进 AXIN 和与之相互作用的 LKB1 迁移到溶酶体膜上并与 Ragulator 结合，最后在此激活 AMPK<sup>[56]</sup>。此外，Dario R. Alessi 实验室发现，LKB1 第 433 位的半胱氨酸的法尼烯基化 (farnesylation) 对于其激活 AMPK 具有至关重要的作用，该修饰可能介导了 LKB1 膜定位，拉近了与其同样定位在膜上的 AMPK，从而促进了 LKB1 对 AMPK 的磷酸化<sup>[70]</sup>，这与 Bruce E. Kemp 实验室以及我们实验室对 AMPK 激活需要细胞膜结构的参与的结论十分吻合。可见，生理条件下 AMPK 的激活远不止需要 AMP 的参与。

第二，生理条件下，激活 AMPK 所谓的“能量缺失”状态，不能等同于 AMP 的升高。如上所述，AMPK 响应的是“能量缺失”的状态并被激活。尽管在体外外加 AMP 能够显著地激活 AMPK，该实验方法对应着什么样的生理情况还不得而知——人们惯性地认为，“能量缺失”将导致的 ATP 的产出减少，ADP 发生积累，从而通过腺苷酸激酶导致 AMP 的积累从而引起 AMPK 的激活。这一结论从理论上来看是十分合理的，因为相比较于 ADP 和 ATP，AMP 水平的变化要灵敏得多，因此从情理上，AMP 确实可以作为“能量缺失”的有力代表<sup>[1, 71]</sup>。然而事实却并非如此。以葡萄糖缺失这一“能量缺失”的经典代表为例，我们的前期工作就发现，饥饿或葡萄糖水平降低并不能引起细胞乃至机体内的 AMP 水平上升——显然，AMPK 在这种响应“能量缺失”的情况下的激活不能等同于 AMP 的直接调节。还有一些已有的结果也支持这个结论，比如，运动被认为是一种引起局部能量缺失的经典生理条件，并能够直接导致 AMPK 的激活。然而这一结论的得出是通过测量运动后的肌肉中的 AMPK 和脂肪酸合成的活力得到的，也就是在既定 AMPK 被激活就代表着 AMP 水平升高得到的间接证据，并未对肌肉中的 AMP 水平进行直接测量<sup>[72, 73]</sup>；相反地，有研究直接测量了肌肉中的核苷酸水平，表明运动完全不能够引发肌肉组织内的 AMP 的水平上升<sup>[74]</sup>。不妨再举一个 AMPK 激活剂的例子：二甲双胍被认为是经典的通过造成“能量缺失”引起 AMPK 激活的药物——体外实验证明二甲双胍确实可以抑制复合体 I 的活力，据此推测，这将导致 ATP 产出的减少<sup>[75, 76]</sup>。但是，之后的研究发现，对细胞进行二甲双胍处理，在引起 AMPK 激活的同时，并不引起 ATP/AMP 的水平变化<sup>[77, 78]</sup>；生理模型上也表明，模拟糖尿病人服药的条件，在高脂诱导的小鼠中长期进行二甲双胍处理，在引起 AMPK 激活、病症缓解的同时，并不引起 ATP/AMP 的水平变化<sup>[79]</sup>；最后人们发现，在体外二甲双胍抑制复合体 I 的现象只是因为使用了远超药理浓度的二甲双胍造成的人为假象<sup>[80]</sup>。可见，“能量缺失”不能想当然地理解成提升 AMP 的水平，生理条件下 AMPK 的激活不一定和 AMP 有关系。

此外，进化上的证据也间接地支持这个观点：尽管 AMPK 在物种间高度保守，AMP 对 AMPK 的调节却并不保守——这与 AMPK 响应葡萄糖被激活的极度保守形成了鲜明对比。经典的例子包括酵母中的 AMPK 同源物 Snf1 和植物中的同源物 SnRK1，这两种蛋白都不能受到 AMP 的调节<sup>[81, 82]</sup>。换句话说，响应 AMP 的调节并

不是 AMPK 的普遍功能，AMPK 激活的机制还远没有弄清。

以上的例子充分说明，AMPK 的激活的并不如体外实验一样简单而直接，而有着更为复杂的机制。人们对“能量缺失”的理解也还处于相当初步的阶段：这个概念究竟包含了哪些信号分子的变化？如何传导到 AMPK？究竟应当被用于形容哪种生理状况？该生理状况又具有如何的特征？——如果不弄清楚这些基本的问题，我们就无法从根本上了解、掌握代谢调控的原理，更无法解决实际的问题。本文将从葡萄糖这一经典的 AMPK 上游信号入手，解析“能量缺失”这一信号的真正含义和传递途径，重新定义 AMPK 激活的生理过程。

#### 1.1.4 已有的机体对葡萄糖的感应机制

如上所述，机体感应葡萄糖对于维持整个机体的代谢稳态具有根本的、至关重要的作用，因而对于其机制的研究也成为目前生物学领域的一大热点。然而必须要说明的是，尽管葡萄糖的感受机制如此关键，相比较于氨基酸、脂类物质的感受机制而言，对于它的研究，尤其是和 AMPK 相关的感受低葡萄糖水平的机制研究，还尚属初步阶段。这方面目前仅阐明了一条途径，即前面介绍的通过 v-ATPase-Ragulator 激活 AMPK 的溶酶体途径，需要说明的是该途径的另一个下游是 mTORC1。和 AMPK 一样，mTORC1 也是经典的响应葡萄糖水平并被调节的分子<sup>[83]</sup>。除了被 AMPK 直接抑制以外，mTORC1 也有其独特的，不依赖于 AMPK 的响应葡萄糖水平被激活的方式，也就是通过前述的溶酶体上的 v-ATPase-Ragulator 复合体而被调节。2012 年，David M. Sabatini 实验室首次发现，葡萄糖缺失可以引起 mTORC1 从溶酶体向细胞质的、不依赖于 AMPK 的迁移并被抑制<sup>[84]</sup>。根据已有的关于氨基酸感受机制的研究基础，推测为葡萄糖缺失引起了 v-ATPase 进而通过 Ragulator 调节 RAGs 这一维持 mTORC1 定位在溶酶体上并保持活力的关键分子，最终导致 mTORC1 离开溶酶体并被抑制<sup>[85]</sup>。如上文所述，我们实验室在这条途径激活 AMPK 方面做了相当坚实的工作。我们发现了 v-ATPase-Ragulator 同时也是 AMPK 在葡萄糖缺失的情况下激活所必需的因子。当葡萄糖缺失的时候，v-ATPase 发生变构，其和 Ragulator 的相互作用增强，二者共同作为一个“平台”，介导了 AXIN 和与 AXIN 有相互作用的 LKB1 的结合，并进一步促进 v-ATPase-Ragulator-AXIN-LKB1 复合体的组装，该复合体进一步激活分布在溶

酶体附近的 AMPK。我们也发现 v-ATPase-Ragulator 不但能够响应葡萄糖水平的降低引起 AXIN-LKB1 的结合以及对 AMPK 的磷酸化,还能够通过 AXIN 的结合,进一步地抑制 Ragulator 对 RAGs 的 GEF 活力从而加快该情况下 mTORC1 的抑制,揭示了合成代谢与分解代谢转换的机制<sup>[56]</sup>。在本项目中,我们将聚焦在溶酶体途径的上游——感应葡萄糖的过程上,阐明葡萄糖是通过何种信号、何种途径作用并影响 v-ATPase-Ragulator 的,又是影响了 v-ATPase-Ragulator 的哪种性质,从而进一步调节 AMPK 乃至 mTORC1 的。

#### 1.1.5 现有的葡萄糖作为“状态信号”的理论依据

传统的认识上,葡萄糖和其它两大类营养物质一样,被看做是一种代谢原料,通过各个代谢途径生成各种中间代谢产物和衍生物,行使其供能、供给合成代谢的功能。然而,近年来在肿瘤代谢领域的研究赋予了葡萄糖作为信号分子,通过细胞中的信号感应中枢,传递代谢重塑乃至细胞增殖速率改变等的新功能——在这其中,葡萄糖代谢途径中的代谢酶或者某个能够结合葡萄糖代谢中间产物及其衍生物的蛋白则是葡萄糖水平这一“状态信号”的直接感应器。比如,糖酵解途径上的甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 在许多肿瘤组织中高表达,它能够在葡萄糖含量较高的情况下结合 mTORC1 的重要调节因子 RHEB,并激活 RHEB 从而促进 mTORC1 的激活<sup>[86]</sup>。这一机制是解释不少肿瘤组织中,有氧糖酵解或者 Warburg effect 通过 mTORC1 进一步加剧有氧糖酵解的“恶性循环”的一个重要的原因。另一个例子是关于丙酮酸激酶的 M2 形式 (即 Pyruvate kinase isozymes M2, PKM2) 的,该酶是目前唯一已知的在所有肿瘤类型中都上调表达的代谢酶,甚至可以作为肿瘤组织的标志,对肿瘤组织的生长至关重要<sup>[87]</sup>。研究表明,该酶不但能够通过提高糖酵解中间代谢产物的流动速率的方式加剧 Warburg effect,还能够被 ERK1 磷酸化,并在葡萄糖含量较高的情况下被果糖 1,6-二磷酸结合而进一步活化、入核行使促进如 HIF1 等癌基因的转录的功能,从而直接加剧肿瘤的发展<sup>[88]</sup>。由此可见,葡萄糖在肿瘤组织中的功能绝不仅是一种代谢原料那样简单,而是涉及到复杂的信号传导和调控。本项目所涉及的醛缩酶在肿瘤代谢的调节中也占有一席之地:醛缩酶能够结合 actin,后者将引起醛缩酶活力的下降;在正常组织中,醛缩酶并非是

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库