

脂质运载蛋白-2 的研究新进展

王 晔(综述) 包玉倩[△](审校)
(上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科 上海 200233)

【摘要】 脂质运载蛋白-2(lipocalin-2)是主要由脂肪组织分泌的脂肪细胞因子之一。目前许多研究表明该分子是一种炎症因子,并与胰岛素抵抗、肥胖及其并发症的发生密切相关。虽然目前脂质运载蛋白-2 在肥胖的相关代谢异常中的具体作用方式尚未明了,但是该分子可能成为肥胖相关代谢以及心血管疾病的治疗靶点。
【关键词】 脂质运载蛋白-2; 脂肪细胞因子; 肥胖; 胰岛素抵抗
【中图分类号】 R 587.1 **【文献标志码】** B

Recent advances in the study of lipocalin-2

WANG Ye, BAO Yu-qian
(Department of Endocrinology & Metabolism, The 6th People's Hospital,
Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China)

【Abstract】 Lipocalin-2 is an adipocytokine secreted mainly by adipose tissue. Increasing lines of evidence suggest that lipocalin-2 is an inflammatory factor associated with insulin resistance, obesity and its complications. The precise mechanism of the development of obesity-related disorders induced by lipocalin-2 is not very clear, however, it may be a useful target in drug therapy for obesity-related metabolic and cardiovascular diseases.
【Key words】 lipocalin-2; adipocytokine; obesity; insulin resistance

肥胖是2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)、高血压、血脂异常及心血管疾病的高风险因素^[1]。近年来的研究表明,白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT)分泌的脂肪细胞因子与肥胖状态下的慢性低度炎症及上述肥胖相关并发症有密切关系^[2]。对脂肪细胞因子的深入研究,将肥胖(尤其是内脏肥胖)、胰岛素抵抗、大血管病变以及全身的低度炎症反应联系了起来。脂质运载蛋白-2(lipocalin-2)是近期研究新发现的脂肪细胞因子,该分子可能参与肥胖-炎症-代谢综合征(胰岛素抵抗、糖耐量减低、血脂异常、内皮功能异常和动脉粥样硬化)这一通路。该分子的发现,为目前脂肪细胞因子的研究提供了新视角,脂质运载蛋白-2 或许可成为肥胖患者2型糖尿病以及心血管疾病发生风险的预测因子,并且可能成为肥胖、代谢综合征、2型糖尿病及心血管病治疗的新靶点。本文将就其研究现状进行综述。

脂质运载蛋白-2 概述

脂质运载蛋白-2 的发现与命名 1993 年 Kjeldsen^[3]等利用免疫沉淀法及免疫印迹法在中性粒细胞中发现该蛋白,并将其成功分离,因其与明胶酶 B,即 MMP-9 功能密切相关,故将其命名为嗜中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白

(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)。由于脂质运载蛋白-2 是脂质运载蛋白 lipocalin 家族的 2 号成员,因此也被称为 lipocalin-2。

脂质运载蛋白-2 的结构特征及组织分布 脂质运载蛋白-2 是由 178 个氨基酸残基组成的分泌型糖蛋白,其相对分子质量为 25 000。同源分析显示,该蛋白与大鼠的 α_2 -微球蛋白相关性蛋白,以及小鼠 24p3 蛋白分别具有 63.5%、62% 的同源性^[3]。有研究发现, α_2 -微球蛋白相关性蛋白在大鼠胚胎乳腺、软骨、骨骼肌、心肌发育过程中表达上调^[4]。而小鼠的 24p3 蛋白(其基因定位于 24p3)在炎症反应时表达上调,类固醇激素、某些生长因子以及肿瘤促进因子亦可使其 mRNA 升高^[3]。在人类, lipocalin 家族各成员之间的同源性序列只有 20%,但包括脂质运载蛋白-2 在内的各个成员都有一个由高度保守基因片段决定的三级结构,此结构是由 8 个反向平行的 β 折叠围成的疏水结合袋,使该家族各成员都具有充当载体蛋白的功能。脂质运载蛋白-2 亦具有疏水结合袋,其配体为铁载体^[5],许多细菌通过铁载体从宿主处吸收铁,而脂质运载蛋白-2 通过其疏水结合袋结合铁载体,从而切断了细菌的铁来源,抑制细菌生长,发挥其在先天免

科技部重大科学研究计划课题(2007CB914702)
[△]Corresponding author E-mail:byq522@163.com

疫应答中的作用^[6]。

脂质运载蛋白-2 广泛分布于人体各种组织,包括肺,肝脏,胸腺,肾脏,小肠,脂肪细胞以及巨噬细胞^[7]。Yan 等^[8]通过 Northern 分析的方法比较了各组织间脂质运载蛋白-2 表达的水平的差异,发现白色脂肪组织是野生雄性小鼠该分子的主要表达部位。目前还发现它与细胞凋亡相关^[9],并且能够诱导胚胎期的肾脏细胞分化,保护肾脏免受缺血性损伤^[10]。

脂质运载蛋白-2 的表达调控

(1) 影响脂质运载蛋白-2 基因转录的因素

脂质运载蛋白-2 基因的转录受多种核因子调控,白介素-1(IL-1)能够激活核因子(NF)- κ B,后者则结合于脂质运载蛋白-2 基因-179~-170 位点处的启动子,从而迅速诱导腹腔巨噬细胞其基因转录^[11]。动脉粥样硬化时,IL-1 可以通过上述途径诱导该基因的表达,同时还发现,损伤情况下血管平滑肌细胞亦通过激活 NF- κ B 途径诱导其 mRNA 的表达^[12]。

Yan^[8]等利用微阵列实验证明肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和地塞米松(DEX)可诱导脂质运载蛋白-2 基因在脂肪细胞中的表达,前者可使其表达水平增加 30 倍,后者使其表达水平增加 80 倍,而胰岛素增敏剂罗格列酮的作用则相反。

(2) 脂质运载蛋白-2 在脂肪细胞分化过程中的变化

在 3T3-L1 前脂肪细胞分化成为成熟脂肪细胞的过程中,经定量 PCR 测定,脂质运载蛋白-2 mRNA 在分化过程的第 1 天就迅速升高,持续至第 7 天其表达水平仍在持续增加。进一步研究发现,大鼠,以及人类脂质运载蛋白-2 基因的上游可能存在 C/EBP 家族(CCAAT/增强子结合蛋白家族)结合位点,该位点与小鼠的同源基因上游-218 位点处的启动子具有高度相似性,这提示了脂质运载蛋白-2 基因的表达水平可能与转录因子 C/EBP 家族有关^[8],而 C/EBP 家族中的 C/EBP α 是促进脂肪细胞分化的重要转录因子^[13],然而在脂肪细胞分化成熟过程中脂质运载蛋白-2 表达水平的增高是否与 C/EBP α 有关,仍需进一步实验证实。在前脂肪细胞分化过程中,地塞米松对诱导其表达的作用最大,其次为甲基异丁基黄嘌呤(Mix)。在单独添加罗格列酮时,其 mRNA 表达水平仍然会达到与添加地塞米松诱导后相仿的水平,只是要达到这一表达水平较单独添加地塞米松所需要的时间延长。这一现象与成熟脂肪细胞中罗格列酮的作用相矛盾,可能与罗格列酮促进脂肪形成的过程从而间接促进了脂质运载蛋白-2mRNA 的表达有关^[8]。

脂质运载蛋白-2 的生物学功能

脂质运载蛋白-2 与肥胖 Yan 等^[8]为了探究脂质运载蛋白-2 表达与肥胖的关系,进行了一系列动物实验,将实验动物分为肥胖组(ob/ob 小鼠),高脂饲养组,糖尿病组(db/db 小鼠)以及非肥胖组。结果发现肥胖(ob/ob)小鼠脂肪组织中的脂质运载蛋白-2 水平明显高于非肥胖组,高脂膳食组的白色脂肪组织中其浓度亦明显高于非肥胖组。为了进一步研究脂肪组织增多是否会使循环脂质运载蛋白-2 浓度升高,研究者又取 4 组小鼠的血清对其浓度进行了比较,发现在正常的饲养状态下,3 组肥胖小鼠模型的血清脂质运载蛋白-2 浓度均明显高于非肥胖组,即使在禁食的情况下,仍见

到 db/db 小鼠的血清脂质运载蛋白-2 水平要高于对照组。

Lin 等^[14]利用 ob/ob 小鼠进行实验,发现肥胖小鼠肝脏中脂质运载蛋白-2 表达水平升高,而在脂肪组织中该分子的表达水平则低于正常。然而最近的一项研究结果却与之不同,该实验利用实时定量 PCR 技术,将雄性 db/db 小鼠以及年龄、性别与之相匹配的非肥胖小鼠进行对照研究发现,db/db 小鼠的肝脏以及脂肪组织的脂质运载蛋白-2mRNA 表达明显高于非肥胖小鼠,经过 2 周的罗格列酮干预后则发现肥胖小鼠其 mRNA 表达显著降低。然而该基因在两组小鼠肺、肾脏、脾脏的表达水平在罗格列酮治疗前后均相仿,这提示肝脏以及脂肪组织可能是肥胖状态下循环中过多的 lipocalin-2 的主要来源^[15]。上述两项实验中出现的不同结果是否与动物模型的不同有关,需要进一步实验予以验证。

Wang 等^[15]利用体内免疫分析的方法对 229 例中国人的血清脂质运载蛋白-2 水平进行了检测,全部检测对象的血清脂质运载蛋白-2 浓度在 20.9~182.5 μ g/L 之间,与年龄正相关,在校正性别因素后,仍然具有相关性。性别间比较发现,无论肥胖组还是非肥胖组,男性的血清脂质运载蛋白-2 浓度均高于女性。而在肥胖组,该分子的血清水平则明显的高于非肥胖组。此外,血清脂质运载蛋白-2 浓度与体重指数(BMI)成正相关。校正年龄、性别因素后,仍与腰臀比(WHR)、腰围、脂肪百分比、动脉收缩压、血糖水平以及血三酰甘油水平成正相关,而与高密度脂蛋白(HDL)水平则成负相关。上述实验结果均提示,体脂增加者血清脂质运载蛋白-2 浓度升高,并且可能与肥胖相关的代谢异常有关。但升高的脂质运载蛋白-2 的确切来源仍需要更多的动物以及临床实验加以研究。

脂质运载蛋白-2 与胰岛素抵抗 研究发现,脂质运载蛋白 lipocalin 家族的另一成员——视黄醇结合蛋白 4(RBP4)与肥胖及胰岛素抵抗存在密切联系,脂质运载蛋白-2 与 RBP4 具有相似结构^[16,17]。Yan 等^[8]将纯化的脂质运载蛋白-2 直接添加到成熟 3T3-L1 脂肪细胞培养液中,检测胰岛素诱导的葡萄糖摄取量,但是无论脂质运载蛋白-2 是脱辅基的状态,还是结合了铁离子的状态,都未能影响葡萄糖的摄取,推测这一现象的产生可能与培养液中脂质运载蛋白-2 浓度过量有关。于是,利用逆转录病毒将短发夹 RNA(hsRNA)导入脂肪细胞,这种 hsRNA 可以将脂质运载蛋白-2 的表达降低 90%以上,力图通过这种方式证明降低脂质运载蛋白-2 的表达可以提高胰岛素的作用。结果发现,表达该 hsRNA 的脂肪细胞无论在基础状态下,还是在胰岛素刺激状态下都较对照组的葡萄糖摄取量显著升高。而且该类脂肪细胞在胰岛素刺激作用下的葡萄糖摄取较基础状态亦明显升高,这一证据更直接的反应了降低脂质运载蛋白-2 的表达可以直接使得胰岛素敏感性升高。

Wang 等^[15]发现脂质运载蛋白-2 浓度与空腹血糖水平以及用稳态模型测得的胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)水平成负相关。在校正了性别、年龄、体脂含量等因素后此关联性仍然具有统计学意义。以上体外和临床研究均提示了脂质运载蛋白-2 可能具有促进胰岛素抵抗的作用,可能是导致空腹血糖升高以及胰岛素抵抗的独立危险因素,然而目前对于脂质运载蛋白-2 引发胰岛素抵抗的分子机制仍不甚明了,需

进一步研究加以解释。

脂质运载蛋白-2与糖尿病及代谢综合征 Wang^[15]等在其研究中发现,校正BMI后,血清脂质运载蛋白-2水平与空腹血糖成正相关。同时研究者发现,2型糖尿病患者血清脂质运载蛋白-2浓度高于非糖尿病患者($P=0.039$),但是这一差异在校正了BMI之后消失($P=0.122$)。在对32名T2DM患者使用胰岛素增敏剂罗格列酮干预8周后,虽然患者的BMI、腰围以及血三酰甘油水平等并未改变,但其空腹血糖、空腹胰岛素、以及用稳态模型测得的胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)水平明显下降,并且伴有脂质运载蛋白-2浓度下降,脂质运载蛋白-2浓度的变化值与胰岛素抵抗指数变化值相关($r=0.527, P=0.002$)。同时分别比较了具有1、2、3以及大于等于4种代谢综合征主要成分患者的血清脂质运载蛋白-2浓度,结果均高于正常水平,但是其浓度与代谢综合征成分的个数并无相关性。

脂质运载蛋白-2与慢性炎症 慢性低度炎症状态与肥胖及其相关的代谢异常之间的关系已经引起了人们高度重视。大量流行病学研究结果证实,血高敏感性C反应蛋白(hsCRP)升高与胰岛素抵抗参数密切相关,并且其血清浓度的升高是心梗、卒中以及2型糖尿病发生的独立危险因素^[18]。Wang^[15]等进行的临床实验中观察到循环脂质运载蛋白-2浓度与hsCRP水平成高度正相关,在校正了性别、年龄、脂肪量等因素后,此相关性仍然存在。并且在使用罗格列酮治疗之后,血清脂质运载蛋白-2的变化值与hsCRP的变化值具有良好的相关性,说明该蛋白可能也是造成肥胖情况下慢性低度炎症状态的脂肪细胞因子之一。然而,它是否能够通过引发慢性炎症从而导致肥胖及其相关疾病的发生,目前尚不明确,通过进一步研究脂质运载蛋白-2的作用机制,将有助于解释该蛋白浓度的升高是否为肥胖及肥胖相关疾病的病理生理变化的诱发因素,或者仅仅是肥胖代谢异常引发的一种旁效应。

脂质运载蛋白-2与血管病变 脂质运载蛋白-2与基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的复合物已被认定为是一种相对分子质量较高的金属蛋白酶^[19],而后者可能与腹主动脉瘤、动脉粥样硬化以及粥样斑块破裂有关^[20]。Hemdahl^[21]等的动物实验发现,动脉粥样硬化小鼠的血脂质运载蛋白-2浓度高于对照组,在低氧应激以及心肌梗死的状态下,其mRNA表达水平显著上调。免疫组化分析见到,心梗小鼠的粥样斑块处有脂质运载蛋白-2与MMP-9复合物聚集的现象,并且该复合物表现出很高的生物学活性。实验证明,浓集的脂质运载蛋白-2/基质金属蛋白酶-9(lipocalin2/MMP-9)复合物是由小鼠的巨噬细胞分泌的。提示该复合物可能参与了血管炎症反应、心肌缺血的应答过程以及心肌缺血后重建的过程,并且能够影响粥样斑块的稳定性。然而,脂质运载蛋白-2在粥样硬化的形成以及发展过程中究竟起到怎样的作用及其作用机制仍有待于进一步实验加以证实。

一项来自韩国的临床实验着重研究了脂质运载蛋白-2与冠心病之间的关系,该研究共选取91例样本,其中49名为冠脉造影证实的冠心病(CAD)患者,另外42名为性别、年龄相匹配的对照组。研究者比较了两组样本的血清脂质运载蛋白-2浓度,发现在CAD组其浓度要明显高于对照组。

同时,研究结果显示血清脂质运载蛋白-2浓度与血清高密度脂蛋白(HDL)水平成负相关($r=-0.30; P=0.016$)。利用多因素Logistic回归分析的方法,分别比较了动脉收缩压、胰岛素抵抗指数、以及血清脂质运载蛋白-2水平与CAD的关系,发现以上三者皆与CAD具有独立的相关性^[22]。以上结果提示,血清脂质运载蛋白-2浓度的升高可能与血管慢性炎症有关,其浓度升高可能是CAD发生的危险因素,可能对后天性心脏病(AHD)有预测价值。

综上所述,肥胖状态下过多的脂质运载蛋白-2可能在脂肪代谢、慢性低度炎症、胰岛素抵抗以及与之密切相关的2型糖尿病、心血管疾病的发生、发展过程中起到了重要作用。但是由于目前缺乏对其作用机制的研究,故其生理、病理作用及与代谢综合征的关系尚不明了。肥胖时增高的脂质运载蛋白-2的确切来源、在慢性低度炎症及胰岛素抵抗状态下其确切的病理生理作用及其作用机制、在血管炎症反应中扮演了怎样的角色、该分子是否与脂质运载蛋白 lipocalin 家族的另一成员视黄醇结合蛋白-4具有相似的生物学功能等问题仍有待于进一步的研究。随着对其研究的不断深入,脂质运载蛋白-2或许可成为肥胖患者2型糖尿病以及心血管疾病发生风险的预测因子,并且可能成为肥胖、代谢综合征、2型糖尿病及心血管病治疗的新靶点。

参 考 文 献

- [1] Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes; estimates for the year 2000 and projections for 2030 [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(5): 1 047 - 1 053.
- [2] Trayhurn P, Wood IS. Adipokines; inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue [J]. *Br J Nutr*, 2004, 92(3): 347 - 355.
- [3] Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, et al. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(14): 10 425 - 10 432.
- [4] Zerega B, Cermelli S, Michelis B, et al. Expression of NRL/NGAL (neu-related lipocalin/neutrophil gelatinase-associated lipocalin) during mammalian embryonic development and in inflammation [J]. *Eur J Cell Biol*, 2000, 79(3): 165 - 172.
- [5] Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function [J]. *Biochem J*, 1996, 318(pt 1): 1 - 14.
- [6] Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron [J]. *Nature*, 2004, 432(7 019): 917 - 921.
- [7] Friedl A, Stoesz SP, Buckley P, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues: cell type-specific pattern of expression [J]. *Histochem J*, 1999, 31(7): 433 - 441.
- [8] Yan QW, Yang Q, Mody N, et al. The adipokine lipocalin-2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2007, 56(10): 2 533 - 2 540.
- [9] Tong Z, Wu X, Kehrer JP. Increased expression of the lipocalin 24p3 as an apoptotic mechanism for MK886 [J]. *Biochem J*, 2003, 372(pt 1): 203 - 210.

- [10] Mori K, Lee HT, Rapoport D, *et al.* Endocytic delivery of lipocalin-siderophore iron complex rescue the kidney from ischemia-reperfusion injury[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(3), 610–621.
- [11] Fujino RS, Tanaka K, Morimatsu M, *et al.* Spermatogonial cell-mediated activation of an IkappaBzeta-independent NF-kappaB pathway in sertoli cells induces transcription of the lipocalin-2 gene[J]. *Mol Endocrinol*, 2006, 20(4):904–915.
- [12] Bu DX, Hemdahl AL, Gabrielsen A, *et al.* Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in vascular injury via activation of nuclear factor- κ b[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(6):2 245–2 253.
- [13] Johnson PF. Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors[J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(pt 12):2 545–2 555.
- [14] Lin Y, Rajala MW, Berger JP, *et al.* Hyperglycemia-induced production of acute phase reactants in adipose tissue[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(45):42 077–42 083.
- [15] Wang Y, Lam KS, Kraegen EW, *et al.* Lipocalin-2 is an inflammatory maker closely associated with obesity, insulin resistance, hyperglycemia in humans[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(1):34–41.
- [16] Graham TE, Yang Q, Bluher M, *et al.* Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(24):2 552–2 563.
- [17] Van Dam RM, Hu FB. Lipocalins and insulin resistance: etiological role of retinol-binding protein 4 and lipocalin-2? [J]. *Clin Chem*, 2007, 53(1):5–7.
- [18] Tsimikas S, Willerson JT, Ridker PM. C-reactive protein and other emerging blood biomarkers to optimize risk stratification of vulnerable patients [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(8 Suppl):C19–C31.
- [19] Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, *et al.* The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(40):37 258–37 265.
- [20] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis; the good, the bad, and the ugly [J]. *Circ Res*, 2002, 90(3):251–262.
- [21] Hemdahl AL, Gabrielsen A, Zhu C, *et al.* Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(1):136–142.
- [22] Choi KM, Lee JS, Kim EJ, *et al.* Implication of lipocalin-2 and visfatin levels in patients with coronary heart disease[J]. *Eur J Endocrinol*, 2008, 158(2):203–207.

(收稿日期:2009-03-27;编辑:张秀峰)

(上接第 778 页)

- [22] Yeo W, Wong N, Wong WL, *et al.* High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in tumor and plasma of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Int*, 2005, 25: 266–272.
- [23] Zhang YJ, Wu HC, Shen J, *et al.* Predicting hepatocellular carcinoma by detection of aberrant promoter methylation in serum DNA[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13:2 378–2 384.
- [24] Boland CR, Goel A. The silence of the genes: Matching mismatch repair defects with tumors [J]. *Cancer*, 2003, 98: 2 091–2 094.
- [25] Wang G, Zhao Y, Liu XM, *et al.* Allelic loss and gain, but not genomic instability, as the major somatic mutation in primary hepatocellular carcinoma[J]. *Gene Chromosomes Cancer*, 2001, 31:221–227.
- [26] Chang YC, Ho CL, Chen HHW, *et al.* Molecular diagnosis of primary liver cancer by microsatellite DNA analysis in the serum[J]. *Brit J Cancer*, 2002, 87:1 449–1 453.
- [27] Maris JM, Mosse YP, Bradfield JP, *et al.* Chromosome 6p22 locus associated with clinically aggressive neuroblastoma[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358:2 585–2 593.
- [28] Marsh JW, Finkelstein SD, Demetris AJ, *et al.* Genotyping of hepatocellular carcinoma in liver transplant recipients adds predictive power for determining recurrence-free survival[J]. *Liver Transpl*, 2003, 9:664–671.
- [29] Umansky SR, Tomei LD. Transrenal DNA testing: progress and perspectives [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2006, 6: 153–163.

(收稿日期:2008-11-17;编辑:王蔚)