

矢车菊素-3-葡萄糖昔对骨骼肌细胞脂蛋白脂肪酶活性的影响

卫晓怡¹, 白晨^{1,*}, 唐立伟¹, 陆红², 张靖伟¹

(1. 上海商学院旅游与食品学院, 上海 200235; 2. 复旦大学生命科学学院, 上海 200433)

摘要: 富含矢车菊素-3-葡萄糖昔(Cy-3-g)的花色昔提取物可抑制肥胖, 但其作用机制不明。骨骼肌细胞脂蛋白脂肪酶(LPL)活性与肥胖相关, LPL使骨骼肌中的 β -脂肪酸氧化增强, 从而加速清除体内循环的甘油三酯(TG), 抑制TG流向脂肪组织积聚而导致肥胖。本实验建立稳定的骨骼肌细胞分离培养方法, 通过花色昔Cy-3-g干预骨骼肌细胞, 研究Cy-3-g对细胞LPL活性的影响及其作用机制。结果表明: Cy-3-g通过激活一磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)上调骨骼肌细胞LPL活性, 提示Cy-3-g具有潜在的调节机体脂代谢作用, 与含Cy-3-g的花色昔提取物的肥胖抑制作用密切相关。

关键词: 矢车菊素-3-葡萄糖昔; 骨骼肌细胞; 脂蛋白脂肪酶; 一磷酸腺苷激活的蛋白激酶

Cyanidin-3-O- β -glucoside Induces Lipoprotein Lipase Activity Following the Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Skeletal Muscle Cells

WEI Xiao-yi¹, BAI Chen^{1,*}, TANG Li-wei¹, LU Hong², ZHANG Jing-wei¹

(1. Department of Tourism and Food Science, Shanghai Business School, Shanghai 200235, China;

2. School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Cyanidin-3-O- β -glucoside (Cy-3-g)-rich foods have been reported to inhibit the onset of obesity, but the underlying mechanism has remained unclear. The induction of LPL activity in skeletal muscle will facilitate the hydrolysis of triglyceride (TG) by β -oxidation, which can result in the decrease of TG store in adipose and the inhibition of obesity. In the present study, the isolation and culture method for skeletal muscle cells was established. The aim of our present study was to explore the effect of Cy-3-g on LPL activity in the skeletal muscle cells isolated from rats. The results demonstrated that Cy-3-g induced the activation of LPL in skeletal muscle cells due to the activation of pAMPK, suggesting that Cy-3-g may have a potential role against obesity through the regulation of lipid metabolism.

Key words: cyanidin-3-O- β -glucoside; skeletal muscle cells; lipoprotein lipase; AMP-activated protein kinase

中图分类号: R151.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)05-0246-05

花色昔(anthocyanin)是一种广泛分布在植物中的黄酮类(flavonoid)植物化学物^[1], 从食物或植物中提取的花色昔往往含有不同的花色昔元, 如矢车菊素(cyanidin)、天竺葵素(pelargonidin)、芍药素(petunidin)、锦葵素(malvidin)等, 花色昔也可以分为单糖昔、双糖昔、三糖昔等结构, 这些不同结构的单体花色昔具有不同的生理活性。

花色昔有诸多疗效, 如抗氧化^[2-3]、抗动脉粥样硬化^[4]、抗胰岛素抵抗^[5]、调节血脂^[6-7]等, 其中矢车菊素-3-葡萄糖昔(cyanidin-3-O- β -glucoside, Cy-3-g)是其主要活性成分。最新研究报道^[8]显示, 紫玉米花色昔可以抑制高脂诱导肥胖小鼠的体质量增长, 但其有效成分和作用机

制尚不明确, 推测是紫玉米花色昔中含量为7%的Cy-3-g起了主要作用。

脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)是一种甘油三酯(triglyceride, TG)的限速性水解酶, 水解血浆中的TG, 使TG的1位和3位酯键断裂, 释放出游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)。同时, LPL在骨骼肌和脂肪组织中具有组织特异性, 是FFA进入脂肪细胞储存或是进入骨骼肌细胞氧化利用的关键性酶, 与肥胖的发生密切相关。

肌肉组织通过LPL产生FFA, FFA氧化分解提供能量。增加骨骼肌中LPL活性, 可以使骨骼肌中的 β -脂肪酸氧化增强, 从而加速清除体内循环的TG。脂肪组织的一

收稿日期: 2012-02-06

基金项目: 上海市教育委员会科研创新项目(10YZ212); 上海商学院启明星项目(QMX2012-11)

作者简介: 卫晓怡(1979—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为营养与食品卫生。E-mail: weixy@sbs.edu.cn

*通信作者: 白晨(1969—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品营养。E-mail: baichen@fudan.edu.cn

个主要功能就是储存脂肪。降低脂肪组织中的LPL，可以减少脂肪组织利用LPL水解TG产生的FFA合成脂肪，使FFA转移到其他具有高氧化分解作用的组织，如肌肉组织进行氧化分解。高的脂肪/肌肉LPL比，意味着使食物中摄入的脂肪更易积聚在脂肪组织；低的脂肪/肌肉LPL比，则意味着循环中的TG会更多的流向骨骼肌氧化利用，而不是流向脂肪组织积聚，利于抑制脂肪在脂肪组织中的储存，减轻体质量^[9-10]。LPL在肌肉和脂肪组织中的活性，以及它们的活性比率，是机体调节膳食摄入的脂肪用于供能还是储存的关键^[11]。例如，进食后脂肪组织的LPL活性会升高，肌肉组织降低^[12]；反之，禁食可引起脂肪组织LPL活性降低，肌肉组织升高^[13-14]。这种LPL在肌肉和脂肪中截然相反的变化，可以使机体在食物充足时，最大限度地储存能量；在食物稀缺时，为肌肉组织提供能量。

花色苷提取物可抑制小鼠肥胖^[8]，但其作用机制仍不明确。本实验前期研究及相关实验结果表明，花色苷Cy-3-g通过激活成熟脂肪细胞一磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)抑制LPL活性^[15]。然而，Cy-3-g对骨骼肌细胞LPL的作用及其机制仍不明确，有待研究。本研究以花色苷Cy-3-g干预骨骼肌细胞，就Cy-3-g对细胞LPL活性的影响及其机制进行探讨，阐明Cy-3-g通过AMPK激活骨骼肌细胞LPL活性，调节TG代谢的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

雄性SD大鼠(SPF级)，体质量180~200g。

矢车菊素-3-葡萄糖苷(Cy-3-g) 芬兰Polyphenols AS公司；4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、胶原酶、二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)、蛋白裂解液(RIPA) 美国Sigma公司；杜尔伯科改良伊格尔培养基(DMEM)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸-克-林二氏重碳酸盐溶液(HEPES-KRBH缓冲液)、抗生素(青霉素/链霉素)、Trizol Reagent、SYBR Green、First Strand cDNA Synthesis Kit、大鼠LPL引物合成、大鼠 β -actin引物合成 美国Invitrogen公司；胰酶、胎牛血清(FBS) 美国Gibco公司；Anti-LPL Polyclonal Antibody、Anti- β -actin Monoclonal Antibody 美国Santa Cruz Biotechnology公司；Anti-pAMPK Polyclonal Antibody、AMPK Polyclonal Antibody 美国Cell Signaling Technology公司；LuminGLO[®]发光试剂盒 美国Thermo Scientific公司。

1.2 仪器与设备

微孔滤器(0.22 μ m) 德国Millipore公司；滤网 广州展晨生物技术有限公司；细胞培养板(瓶) 美国

Corning公司；倒置显微镜 瑞士Leica公司；低温高速离心机(Universal 16R)、冷冻离心机 德国Hettich Zentrifugen公司；电泳仪(POWER/PAC200) 美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 骨骼肌细胞分离培养

取雄性SD大鼠(180~200g)，断颈法处死，无菌条件下取骨骼肌(后腿)，PBS洗3次，剔除脂肪、结缔组织，剪碎，静置1min，弃去上层液及漂浮组织。37℃用1 μ g/mL胰酶的DMEM消化，每5min摇动或吹打1次离心管，然后加入培养基终止消化。4℃、2000r/min离心5min，沉淀物用含10%的胎牛血清DMEM重悬，80 μ m尼龙滤网过滤。血细胞计数板进行计数，细胞2×10⁶接种于35mm的培养皿中，差速贴壁去除成纤维细胞。置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养，每日更换培养基。

1.3.2 Cy-3-g对细胞毒性、增殖的测定

收集对数生长期的细胞，在96孔板以1×10⁴细胞/孔接种细胞。用浓度1、10、20、50、100 μ mol/L Cy-3-g作用于细胞24h后，收集细胞培养液，吸取培养液上清进行测定。采用2,4-二硝基苯肼比色法检测Cy-3-g对骨骼肌细胞细胞毒性，即对乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放的影响，于540nm波长处测定吸光度。采用MTT法检测Cy-3-g对骨骼肌细胞增殖的影响。

1.3.3 Cy-3-g对细胞的干预处理

以DMSO为溶剂，配制成100mmol/L的Cy-3-g高浓度母液，使用时，将DMEM培养基稀释为一定比例浓度。细胞以终浓度为1、10、20、50、100 μ mol/L Cy-3-g干预3h，或者以100 μ mol/L Cy-3-g浓度干预1、2、3、4、5h，其中，对照样细胞加入0.1% DMSO。

1.3.4 细胞LPL活性测定

骨骼肌细胞1×10⁴个/mL接种于培养皿。10%甲醛钙固定，行细胞非特异脂肪酶染色^[16]。根据LPL能水解酯键的原理，用吐温-60孵育液(0.05mol/L Tris-HCl 90mL+5%吐温-60 4mL+10%氯化钙4mL)与细胞一起37℃孵育12h，分解出的脂肪酸与钙结合沉淀于脂肪酶所在位置，加2%硝酸铅处理10min，以铅置换钙，经1%硫化铵液作用，形成棕色至棕黑色的硫化铅细胞，经苏木精复染细胞核5min，光镜下每张片取12个视野，平行重复3次，计细胞总数和脂肪酶染色阳性细胞数。

1.3.5 实时荧光定量RT-PCR

按Trizol试剂的使用操作步骤提取总RNA，按试剂盒使用说明配制反应体系，进行RT-PCR实验，平行重复3次，并设空白对照。各基因引物序列为：LPL (Gene Accession NO: BC003305)，(F): 5'-CCAATCGTTAGCATTCTGTTGAG-3'，(R): 5'-TTGCGCAGTGCAGAATTGA-3'，

β -actin (Gene Accession NO: NM_031144)(F): 5'-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCAAG-3', (R): 5'-CTCTTGATGTCACGCACGATTTC-3'。RT-PCR扩增条件: 94℃预变性1min后, 进行96℃变性50s, 59℃退火45s, 74℃延伸45s, 共35个循环。

1.3.6 Compound C抑制细胞pAMPK

骨骼肌细胞加入AMPK抑制剂Compound C 40 μ mol/L预处理1h后, 以100 μ mol/L Cy-3-g干预3h为干预组, 加入溶剂0.1% DMSO为对照组。

1.3.7 蛋白质免疫印迹(Western Blotting)

Western Blotting法检测骨骼肌细胞pAMPK(Thr172)以及LPL蛋白表达。Cy-3-g干预细胞结束后, 用PBS洗涤细胞3遍, 取适量的RIPA蛋白裂解液4℃振荡孵育10min充分裂解。收集至1.5mL离心管中, 12000×g离心5min, 取上清。使用10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 抗体使用: LPL抗体, pAMPK (Thr 172)抗体, β -actin抗体用于测定, 采用LuminGLO[®]发光试剂盒荧光显色。

1.4 数据处理及统计分析

采用SPSS16.0软件建立数据库, 并进行统计分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数进行方差齐性检验(homogeneity of varirnces)和单因素方差分析(one-way ANOVA); 各组间两两比较采用Tukey's honestly法, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 骨骼肌细胞的形态学观察

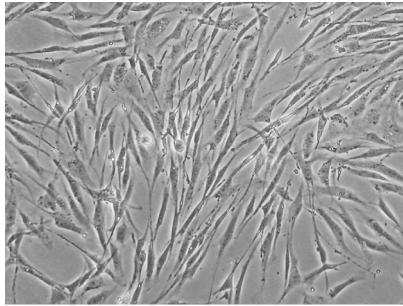


图1 原代骨骼肌细胞($\times 100$)

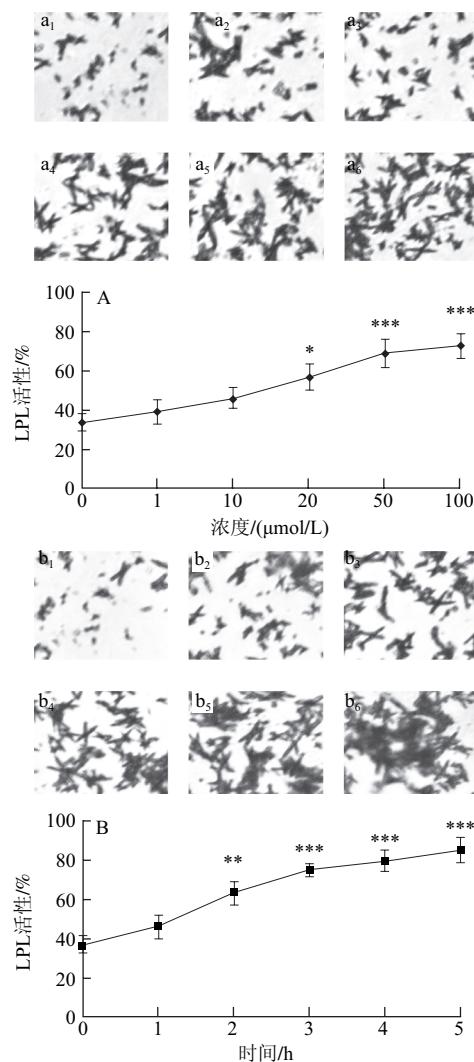
Fig.1 Skeletal muscle cells isolated from rat hind leg ($\times 100$)

用显微镜对细胞进行形态学观察并进行拍摄, 见图1。刚分离的骨骼肌细胞呈圆球状, 体积较小, 胞体透亮, 形态完整, 分散度较好, 折光性强。细胞培养2h后开始出现贴壁现象; 12h后, 大约有90%以上的细胞贴壁生长。培养24h后, 贴壁的细胞其形态上发生明显改变, 细胞逐渐延展成梭形, 随着培养时间的延长, 细胞增殖、迁移并逐渐规律性地沿一个方向排列, 自动收缩。

2.2 Cy-3-g对细胞毒性、增殖的影响

LDH是反映细胞膜完整性的一个重要指标。MTT法主要是反映线粒体的功能, MTT法显色深浅与培养板孔内活细胞数量成正比, 即吸光度随活细胞的增加而升高。用1、10、20、50、100 μ mol/L的Cy-3-g分别与骨骼肌细胞培养24h, 骨骼肌细胞各组间LDH释放、MTT吸光度无显著性差异($P > 0.05$, 结果略), 说明实验涉及的各Cy-3-g浓度对骨骼肌细胞无毒性及增殖影响。

2.3 Cy-3-g对骨骼肌细胞LPL活性的影响



a₁与b₁分别为相对对照组; a₂~a₆ Cy-3-g浓度分别为1、10、20、50、100 μ mol/L; b₂~b₆ Cy-3-g作用时间为1、2、3、4、5h。*.与对照组相比, 差异显著($P < 0.05$); **.与对照组相比, 差异极显著($P < 0.01$); ***.与对照组相比, 差异高度显著($P < 0.001$)。图3同。

图2 Cy-3-g对骨骼肌细胞LPL活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.2 Effect of Cy-3-g on LPL activity in the skeletal muscle cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

骨骼肌细胞的LPL活性以脂肪酶染色阳性细胞数占细胞总数的百分比表示。由图2可知, Cy-3-g上调骨骼肌细胞LPL活性, 具有剂量和时间效应。

2.4 Cy-3-g对细胞LPL表达的影响

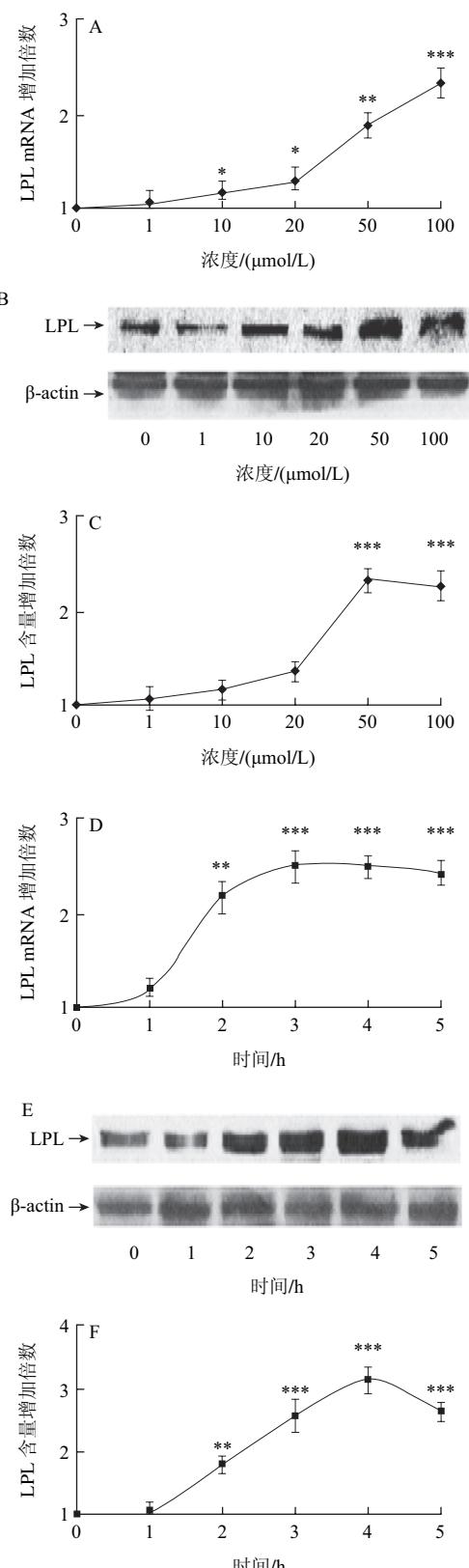
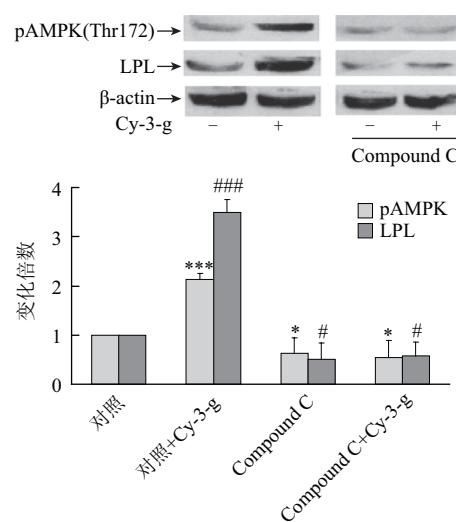
图3 Cy-3-g对骨骼肌细胞LPL mRNA以及蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, n=3)

Fig.3 Effect of Cy-3-g on LPL mRNA and mass expression in the skeletal muscle cells ($\bar{x} \pm s$, n=3)

由图3可知, Cy-3-g上调骨骼肌细胞LPL mRNA以及蛋白表达, 具有剂量和时间效应。

2.5 pAMPK在Cy-3-g调节细胞LPL中的作用

为明确pAMPK在Cy-3-g调节骨骼肌细胞LPL中的作用, 利用pAMPK抑制剂Compound C阻断pAMPK后, 用Western Blotting检测Cy-3-g对骨骼肌细胞LPL的影响。结果显示, 骨骼肌细胞用100 $\mu\text{mol/L}$ Cy-3-g干预3h, 可以激活AMPK($P<0.001$), 同时增加LPL蛋白表达($P<0.001$)。用AMPK抑制剂 Compound C可以阻断Cy-3-g对骨骼肌细胞AMPK的激活, 同时LPL蛋白表达不增加, 见图4。结果表明, Cy-3-g通过激活AMPK来上调细胞的LPL活性, pAMPK是Cy-3-g调节骨骼肌细胞LPL活性的上游调控因子。



*.与pAMPK对照相比, 差异显著($P<0.05$); **.与pAMPK对照相比, 差异高度显著($P<0.001$); #.与LPL对照相比, 差异显著($P<0.05$); ##.与LPL对照相比, 差异高度显著($P<0.001$)。

图4 pAMPK对Cy-3-g减少骨骼肌细胞LPL表达的影响($\bar{x} \pm s$, n=3)

Fig.4 Modulation of Cy-3-g on LPL through pAMPK activation in the skeletal muscle cells ($\bar{x} \pm s$, n=3)

3 结论

本实验建立了稳定的骨骼肌细胞分离培养方法。肌肉组织增殖能力强, 一般可分离培养原代骨骼肌细胞。骨骼肌细胞分离, 可以采用组织块法或酶消化法进行原代培养。本实验采用酶消化法, 能够较大量地分离出骨骼肌细胞。采样大鼠骨骼肌应注意去除附着的脂肪组织, 用PBS清洗数次, 去除含血细胞及破碎组织。初分离的大鼠骨骼肌细胞中, 会伴随生长成纤维细胞, 可以在细胞贴壁后, 利用成纤维细胞极易为0.25%胰酶所消化而从培养瓶壁上脱落, 而骨骼肌细胞贴壁牢固的特点, 通过多次短时间胰酶消化, 去除成纤维细胞, 纯化骨骼肌细胞。

实验结果表明,骨骼肌细胞LPL的活性以及mRNA、蛋白表达则均受Cy-3-g的上调,具有剂量和时间效应;并以pAMPK抑制剂Compound C阻断Cy-3-g对AMPK的激活,结果显示Cy-3-g对骨骼肌细胞LPL的上调是通过激活AMPK产生的,pAMPK是Cy-3-g调节LPL活性的上游调控因子。

目前,有报道^[17]称黄酮类物质可以调节肌肉组织中LPL,从山楂叶中提取的山楂黄酮(纯度>94%),剂量按4、8、6mg/kg体质量灌胃,干预高脂血症ICR小鼠8周,可以升高肌肉组织LPL含量。花色苷是一种黄酮类化合物,然而由于其碳环带有阳性氧离子、极性较强、很少以苷元的形式存在、不同的pH值条件下化学结构易发生改变等特征,提示花色苷具有一些不同于其他黄酮类物质的理化特性。本研究结果表明,Cy-3-g可上调骨骼肌细胞LPL活性以及mRNA、蛋白表达。

机体肌肉组织和脂肪组织对LPL活性的反向调节与肥胖密切相关。比如,身体锻炼可以通过升高肌肉组织的LPL活性,使得FFA氧化供能增强,从而降低脂肪组织的LPL活性,减少体质量^[14]。前期及本研究结果表明,Cy-3-g在骨骼肌细胞中上调LPL以促进FFA氧化利用,在成熟脂肪细胞中下调LPL^[15]以抑制其利用FFA合成脂肪并积聚,产生低脂肪/肌肉LPL比,有利于抑制机体肥胖。

AMPK作为“细胞能量的感受器”,是调节脂肪-骨骼肌之间脂代谢的纽带。AMPK激活下游靶蛋白酶,开启分解代谢,关闭合成代谢,使ATP产生增多^[18]。在脂肪组织、肝脏等部位,AMPK通过抑制乙酰CoA羧化酶亚型1(acetyl CoA carboxylase, ACC-1)来抑制脂肪的合成;在肌肉、心肌等部位,AMPK通过抑制ACC-2和增强肉毒碱棕榈酰转移酶1(carnitine palmitoyl transferase 1, CPT1)的活性来促进FFA的氧化^[18-19]。在其作用下,糖酵解加强,肝脏糖异生减少,葡萄糖转运蛋白的表达和转位增强,细胞对葡萄糖摄取增加;脂肪酸氧化增强,脂肪合成抑制^[20]。前期及本研究结果^[14]表明,Cy-3-g可以激活骨骼肌细胞和成熟脂肪细胞AMPK,提示Cy-3-g通过AMPK调节脂肪-骨骼肌之间脂代谢。

有研究表明^[21],在肌细胞中AMPK是LPL的上游调控因子。二甲双胍(metformin)、AMPK激动剂AICAR(5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucleotide, 5-氨基-4-咪唑甲酰胺核苷酸)可以激活L6骨骼肌细胞AMPK,并通过pAMPK上调LPL。本细胞实验通过对pAMPK的阻断,证明pAMPK是Cy-3-g调节骨骼肌细胞LPL的上游调节因子,与上述研究结果一致。

本研究结果表明,花色苷Cy-3-g通过激活AMPK上调骨骼肌细胞LPL活性,提示Cy-3-g具有潜在的调节机体脂代谢作用,与含Cy-3-g的花色苷提取物的肥胖抑制作用密切相关。

参考文献:

- [1] OZGA J A, SAEED A, WISMER W, et al. Characterization of cyanidin- and quercetin-derived flavonoids and other phenolics in mature saskatoon fruits (*Amelanchier alnifolia* Nutt.)[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(25): 10414-10424.
- [2] KIM S H, JOO M H, YOO S H. Structural identification and antioxidant properties of major anthocyanin extracted from Omija (*Schizandra chinensis*) fruit[J]. *J Food Sci*, 2009, 74(2): 134-140.
- [3] STEED L E, TRUONG V D. Anthocyanin content, antioxidant activity, and selected physical properties of flowable purple-fleshed sweetpotato purees[J]. *J Food Sci*, 2008, 73(5): 215-221.
- [4] MAURAY A, FELGINES C, MORAND C, et al. Bilberry anthocyanin-rich extract alters expression of genes related to atherosclerosis development in aorta of apo E-deficient mice[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2012, 22(1): 72-80.
- [5] INAGUMA T, HAN J, ISODA H. Improvement of insulin resistance by Cyanidin 3-glucoside, anthocyanin from black beans through the up-regulation of GLUT4 gene expression[J]. *BMC Proc*, 2011, 5(Suppl 8): 21.
- [6] GUO H, LING W, WANG Q, et al. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa L. indica*) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats[J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2007, 62(1): 1-6.
- [7] QIN Y, XIA M, MA J, et al. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects[J]. *Am J Clin Nutr*, 2009, 90(3): 485-492.
- [8] TSUDA T, HORIO F, UCHIDA K, et al. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice[J]. *J Nutr*, 2003, 133(7): 2125-2130.
- [9] HAEMMERLE G, ZIMMERMANN R, STRAUSS J G, et al. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice changes the plasma lipid profile by affecting the tissue-specific expression pattern of lipoprotein lipase in adipose tissue and muscle[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(15): 12946-12952.
- [10] PREISS-LANDL K, ZIMMERMANN R, HAMMERLE G, et al. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2002, 13(5): 471-481.
- [11] COSTABILE G, ANNUZZI G, di MARINO L, et al. Fasting and post-prandial adipose tissue lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in obesity and type 2 diabetes[J]. *J Endocrinol Invest*, 2011, 34(5): 110-114.
- [12] DONAHOO W T, STOB N R, AMMON S, et al. Leptin increases skeletal muscle lipoprotein lipase and postprandial lipid metabolism in mice[J]. *Metabolism*, 2011, 60(3): 438-443.
- [13] ONG J M, KERN P A. Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue[J]. *J Clin Invest*, 1989, 84(1): 305-311.
- [14] BESSESEN D H, ROBERTSON A D, ECKEL R H. Weight reduction increases adipose but decreases cardiac LPL in reduced-obese Zucker rats[J]. *Am J Physiol*, 1991, 261(2): 246-251.
- [15] KIM S J, NIAN C, MCINTOSH C H. Activation of lipoprotein lipase by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in adipocytes. A role for a protein kinase L, LKB1, and AMP-activated protein kinase cascade[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(12): 8557-8567.
- [16] LEONHARDT U, RITZEL U, OTTLEBEN M, et al. Circulating human hepatic lipase mRNA in patients with hepatocellular carcinoma and healthy controls[J]. *Eur J Surg*, 1999, 165(6): 539-542.
- [17] FAN C, YAN J, QIAN Y, et al. Regulation of lipoprotein lipase expression by effect of hawthorn flavonoids on peroxisome proliferator response element pathway[J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 100(1): 51-58.
- [18] HARDIE D G, ROSS F A, HAWLEY S A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(4): 251-262.
- [19] JANOVSKA A, HATZINIKOLAS G, STAIKOPOULOS V, et al. AMPK and ACC phosphorylation: effect of leptin, muscle fibre type and obesity[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 284(1/2): 1-10.
- [20] YEO W K, LESSARD S J, CHEN Z P, et al. Fat adaptation followed by carbohydrate restoration increases AMPK activity in skeletal muscle from trained humans[J]. *J Appl Physiol*, 2008, 105(5): 1519-1526.
- [21] AN D, PULINILKUNNIL T, QI D, et al. The metabolic “switch” AMPK regulates cardiac heparin-releasable lipoprotein lipase[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288(1): 246-253.