

高脂饲养大鼠脂肪组织抵抗素、脂联素及其受体的表达

李春霖¹, 龚燕平¹, 田 慧¹, 陆菊明², 母义明², 李明², 肖或君², 潘长玉²

(中国人民解放军总医院 1. 老年内分泌科; 2. 内分泌科, 北京市 100853)

[关键词] 病理学与病理生理学; 高脂对脂肪细胞因子的影响; 逆转录聚合酶链反应; 高脂饲养; 脂联素; 脂联素受体; 抵抗素

[摘要] 目的 阐明抵抗素、脂联素及其受体在胰岛素抵抗发生中的作用。方法 30 只 Wistar 雄性大鼠随机分为对照组和高脂组。用逆转录聚合酶链反应和 Southern blot 方法分析抵抗素、脂联素和脂联素受体表达的改变。结果 高脂组大鼠体重明显增加, 空腹血糖、低密度脂蛋白胆固醇、总游离脂肪酸、胰岛素和 HOMA 胰岛素抵抗指数明显高于对照组, 高密度脂蛋白胆固醇明显低于对照组, 糖耐量和胰岛素耐量明显下降($P < 0.01$)。高脂组脂肪组织抵抗素和脂联素的表达均明显下降($P < 0.01$); 脂联素受体 1 的表达呈下降趋势, 但与对照组相比无统计学意义($P > 0.05$)。结论 抵抗素和脂联素表达的下降低在高脂饮食导致的胰岛素抵抗的发生中起着重要作用, 脂联素受体 1 水平的降低可能是脂联素敏感性降低的重要原因之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression Change of Resistin, Adiponectin and Adiponectin Receptor in High Fat-Fed Wistar Rats

LI Chur-Lin, GONG Yarr-Ping, TIAN Hui, LU Jur-Ming, MU Yr-Ming, LI Ming, XIAO Yr-Jun, and PAN Chang-Yu

(Department of Old Endocrinology, the PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

[KEY WORDS] High Fat-Fed; Adiponectin; Adiponectin Receptor; Resistin; Insulin Resistance; Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression change of resistin, adiponectin and adiponectin receptor of adipose tissue in high fat-fed Wistar rats, and to clarify the action of resistin, adiponectin with its receptor on the development of insulin resistance.

Methods 30 Wistar male rats were randomly distributed into 2 groups: control and high fat-fed group. After they were treated for 11 weeks, total RNA, was extracted, reverse transcription(RT), polymerase chain reaction(PCR) was executed and enlarged the isolated cDNA and half quantitative analysis was used.

Results In high fat fed group weight increased obviously than control group, as well as fasting blood glucose, low density lipoprotein cholesterol(LDL), total free fat acid, insulin and HOMA-insulin resistance(IR), while HDL(high density lipoprotein cholesterol) decreased($P < 0.01$). The glucose and insulin tolerance reduced greatly($P < 0.01$); the expression of adiponectin and resistin of high fat-fed group dropped markedly($P < 0.01$), whereas the expression of adiponectin receptor 1 (R1) only showed the tendency to reduce, but didn't achieve significant statistic differences.

Conclusions The decrease expression of adiponectin and resistin play an important role in the high fat-fed induced insulin resistance. Reduced expression of R1 may possibly associate the resistance of adiponectin with the high fat-fed induced insulin resistance.

脂肪细胞不仅是储能器官,而且具有重要的内分泌功能。一方面,在高脂饮食导致体重和内脏脂肪含量明显增加的情况下,脂肪细胞分化异常,引起游离脂肪酸水平增加并异位沉积,从而导致全身各

组织细胞膜结构、代谢和功能改变。另一方面,在代谢状态改变及受外来刺激时,脂肪细胞能分泌和释放大量的脂肪因子,如脂联素(adiponectin)、抵抗素(resistin)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)和纤维蛋白溶酶原激活物抑制剂 1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)等。这些脂肪因子参与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)的发生,其中抵抗素和脂联素与胰岛素的敏感性密切相关。为阐明抵抗素和脂联素在 IR 发生中的作用,我们对高脂饲养的 Wistar 胰岛素抵抗大鼠进行了脂肪组织抵抗素、脂联素以及脂联素受体表达的研究。

[收稿日期] 2004-12-17 [修回日期] 2005-10-10

[基金项目] 十五全军医药卫生科研基金重点课题(010Z033)

[作者简介] 李春霖, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为糖尿病及其大血管病变的防治, 联系电话为 010-66939493, E-mail 为 lcl301@yahoo.com.cn。龚燕平, 硕士, 住院医师, 研究方向为脂肪细胞因子与胰岛素抵抗, E-mail 为 gypmrp@yahoo.com.cn。田慧, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为代谢综合征的早期诊断与防治, E-mail 为 Tian5302@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 试剂

胰岛素 (insulin) 测定试剂盒购于 Linco 公司。Trizol reagent、逆转录试剂盒购于 Invitrogen 公司。Taq 酶购于 Takara 公司。醋酸纤维素膜购于 Amersham 公司。

1.2 动物和分组

30 只体重 160 g 左右、5~6 周龄的 Wistar 雄性大鼠购自中国医学科学院实验动物研究所, 适应性喂养 2 天后 (2 只/笼) 随机分为对照组和高脂组。对照组给予普通饲料 (3.594 kcal/g, 其中脂肪提供热量占 13.5%, 蛋白质占 21.1%, 碳水化合物占 65.4%)。高脂组给予高脂饲料 (4.742 kcal/g, 其中脂肪提供热量占 58.5%, 蛋白质占 15.2%, 碳水化合物占 26%), 各组均喂饲 11 周。

1.3 一般情况及生物化学指标的检测

实验开始后, 大鼠每周测体重 1 次 (上午 8 点), 并记录 24 h 摄食量。最后一次进食后禁食 12 h, 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 开胸取主动脉血, 在 -70 °C 保存血清, 各测血糖、基础胰岛素 (INS) (放射免疫法) 和游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) (高效液相色谱法)。胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) = $\ln(\text{FPG} \times \text{FINS} / 22.5)$ 。

1.4 葡萄糖耐量的测定

各组动物喂食 11 周时, 禁食 5~7 h, 尾静脉取血测空腹血糖 (fasting blood sugar, FBS) 后, 用葡萄糖 2 g/kg 灌胃, 分别于灌胃后 30 min、60 min 和 120 min 取尾静脉血测血糖, 并计算血糖曲线下面积 (AUC_{glu})。

1.5 胰岛素耐量的测定

在葡萄糖耐量测定 3 天后, 各组动物禁食 4 h, 尾静脉取血测空腹血糖, 皮下注射胰岛素 0.4 IU/kg, 分别于注射后 30 min、60 min 和 120 min 取尾静脉血测血糖, 计算血糖曲线下面积 (AUC_{glu})。

1.6 提取脂肪组织总 RNA

分离脂肪组织 100 mg, 剪碎并匀浆, 加入 Trizol 液 1 L/50 g, 充分震荡, 移入 appendof 管, 每管 1 mL。加入氯仿 0.2 mL, 12 500 r/min 离心 20 min 取上清液。同样加入 0.5 mL 异丙醇离心沉淀 RNA, 倒去上清液。75% 酒精 1 mL 离心洗涤 2 次, 晾干溶于 DE-PC 处理水。

1.7 逆转录聚合酶链反应

取 2 µg RNA 依次加入 1 µL Oligo (dT) 500 mg/L、1 µL 10 mmol/L dNTP Mix, 蒸馏水补充体积至 13

µL。混匀将混合液加热至 65 °C, 5 min 后迅速至于冰上冷却 1 min 以上, 高速离心数秒。每管加入 4 µL 5×First-Stand 缓冲液, 2 µL 0.1 mmol/L DTT, 加热至 42 °C 维持 2 min, 最后加入 1 µL (200 u) Superscript™ (四) 42 °C 维持 50 min, 70 °C 维持 15 min, 即生成大鼠脂肪细胞 cDNA。取 1 µL cDNA 依次加入 3 µL 含 Mg 的 10×PCR Buffer、0.5 µL 10 mmol/L dNTP 混合液、各 0.5 µL 的 10×正义/反义引物、0.5 µL 的 Taq 酶和 24 µL 去离子水, 反应体积共 30 µL。PCR 参数为: 94 °C 30 s → 55 °C 30 s → 72 °C 40 s, 共 26 个循环。

引物序列为: 抵抗素上游引物 5'-TCC TTT TCT TCC TTG TCC-3', 下游引物 5'-CTG TCC AGT CTA TGC TTC G-3'; 脂联素上游引物 5'-AAT GAC AGG AGC GGA AGG-3', 下游引物 5'-TTC CCC ATA CAC TTG GAG G-3', 脂联素受体 1 上游引物 5'-AAC TGG ACT ATT CAG GGA-3', 下游引物 5'-CTG ATG AGA CTG GAA CCA-3'。

1.8 Southern blot 检测抵抗素、脂联素和脂联素受体的表达

取 10 µL 聚合酶链反应扩增后的 cDNA 产物, 在含 1% 琼脂糖、不含 EB 的凝胶中电泳, 向上的毛细管转移法 (paper-town) 隔夜转移至带电荷的醋酸纤维素膜。膜在杂交炉中经预杂交液处理 4 h 后, 用含 ³²P 标记的杂交液处理隔夜。杂交液成分为: 6×SSC、5×Dehardt、0.01 mol/L EDTA (pH 8.0)、0.5% SDS 和 100 mg/L 变性鲑精 DNA 片段。最后杂交膜经洗涤后进行放射自显影定量。根据引物不同, 设计各探针序列如下: 抵抗素为 5'-ACA CTG TCC TAC ATT GCT GGT CAG TCT CCT-3', 脂联素为 5'-GTG TAC ATG AAG GAT GTG AAA GTG AGC CTC-3', 脂联素受体 1 为 5'-CCT GCT ACA TGG CCA CAG ACC ACC T-3'。

1.9 统计学处理

处理组和对照组之间数据的比较采用 Stata 7.0 软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组一般情况及生物化学指标的比较

入选时两组大鼠的体重、血糖、基础胰岛素和游离脂肪酸水平相似。高脂组大鼠体重从第 4 周开始直到第 11 周均明显高于对照组 ($P < 0.01$)。第 11 周时高脂组的空腹血糖、游离脂肪酸、基础胰岛素和 HOMA-IR 也明显高于对照组 ($P < 0.01$) (表 1, Table 1)。

表 1. 11 周时两组大鼠一般指标的比较($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Table 1. Comparison of clinical and biochemical data in 2 groups

指 标	对照组	高脂组
体重(g)	412 ± 5	442 ± 6 ^a
血糖 (mmol/L)	5.11 ± 0.12	5.36 ± 0.51
LDL(mg/L)	0.43 ± 0.23	0.45 ± 0.02
HDL(mg/L)	0.47 ± 0.02	0.57 ± 0.01
游离脂肪酸 (mg/L)	349 ± 170	395 ± 150 ^a
基础胰岛素 (μg/L)	0.29 ± 0.13	1.08 ± 0.80 ^a
HOMA-IR	0.32 ± 0.03	0.38 ± 0.03 ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组相比。

2.2 各组大鼠糖耐量的比较

高脂组 FBS 和糖负荷 30 min、60 min、120 min 时的血糖均比对照组明显升高 (P 均 < 0.01); 高脂组

表 2. 高脂诱导 Wistar 胰岛素抵抗大鼠糖耐量的改变($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Change of glucose tolerance in high-fat induced IR wistar rats

分 组	n	血糖 (mmol/L)				AUC _{glu}
		0 min	30 min	60 min	120 min	
对照组	15	4.79 ± 0.41	5.6 ± 0.40	5.99 ± 0.44	5.36 ± 0.34	670.17 ± 27.75
高脂组	15	5.64 ± 0.34 ^a	6.21 ± 0.48 ^a	6.66 ± 0.46 ^a	6.46 ± 0.49 ^a	765.83 ± 29.74 ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组相比。

表 3. 高脂诱导 Wistar 胰岛素抵抗大鼠胰岛素耐量的改变($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Change of insulin tolerance in high-fat induced IR wistar rats

分 组	n	血糖 (mmol/L)				AUC _{glu}
		0 min	30 min	60 min	120 min	
对照组	15	3.7 ± 0.30	2.35 ± 0.51	1.83 ± 0.45	1.83 ± 0.53	279.53 ± 42.83
高脂组	15	4.07 ± 0.44 ^b	3.58 ± 0.47 ^a	3.01 ± 0.73 ^a	3.17 ± 0.81 ^a	410.17 ± 60.99 ^a

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, 与对照组相比。

AUC_{glu}也明显大于对照组 ($P < 0.01$) (表 2, Table 2)。

2.3 各组大鼠胰岛素耐量的改变

高脂组空腹血糖和皮下注射胰岛素后 30 min、60 min、120 min 时血糖均明显高于对照组 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), AUC_{glu}明显高于对照组 ($P < 0.01$) (表 3, Table 3)。

2.4 各组抵抗素、脂联素和脂联素受体的表达

对照组抵抗素、脂联素、脂联素受体 1 表达的灰度比分别为 1.89 ± 0.38、2.92 ± 0.41 和 1.18 ± 0.86; 高脂组则分别为 0.20 ± 0.10、0.50 ± 0.16 和 0.12 ± 0.05。与对照组相比, 高脂组抵抗素、脂联素的表达均明显下降 ($P < 0.01$)。脂联素受体 1 的表达在高脂组也呈下降趋势, 但与对照组相比无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 1, Figure 1)。

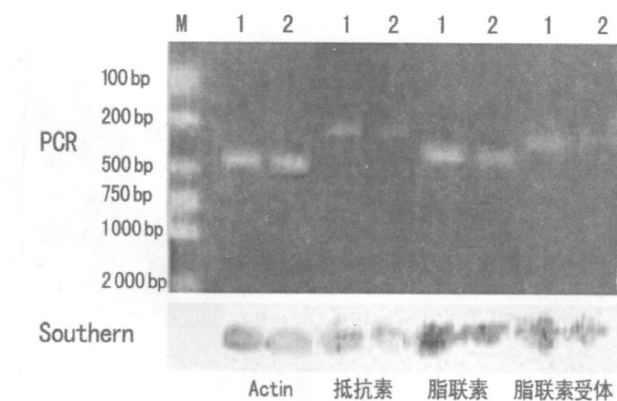


图 1. 对照组和高脂组大鼠抵抗素、脂联素及其受体的表达
1 为对照组, 2 为高脂组。

Figure 1. Expression of resistin, diponectin and adiponectin receptor in 2 groups

3 讨论

建立 IR 动物模型是研究 IR 机制的基础。目前 IR 大鼠模型主要分为 3 类: 遗传性肥胖模型、特殊药物模型和特殊膳食喂养模型。特殊膳食喂养法^[1]主要有高脂肪和高果糖两种饲料, 其中高脂肪饲料喂养法因具有可靠性强、饲养方便且价格相对较低等优点常常被研究者采用。本实验采用占摄入热卡 58.5% 的高脂饮食(主要为饱和脂肪酸的动物脂肪)饲养 Wistar 大鼠, 喂养 11 周后, 大鼠的体重明显增加, 出现高胰岛素、高脂血症, 同时大鼠的胰岛素抵抗指数升高、糖耐量和胰岛素耐量出现异常, 表明高脂饮食 11 周成功诱发了大鼠 IR。众多因素参与了 IR 的发生, 其中脂肪细胞分泌的抵抗素和脂联素是目前研究的热点之一。

Steppan 等^[2]发现,小鼠的脂肪细胞中含有一种蛋白质激素,具有直接对抗胰岛素的作用,故命名为抵抗素。随着对抵抗素研究的深入,出现了两种截然相反的观点。一些研究显示抵抗素可以直接抑制脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖摄取;抵抗素在遗传性肥胖的脂肪组织高度表达;注射重组抵抗素可使正常鼠发生糖耐量减低和 IR;使用抗体中和抵抗素的作用后肥胖鼠的高血糖状况可明显改善^[3]。但另一些研究显示在多种肥胖鼠(ob/ob, db/db)及 IR 的大鼠模型中,抵抗素表达下降,使用二甲双胍可以使 db/db 大鼠的抵抗素表达上调^[4]。因此,抵抗素与 IR 之间的关系还有待进一步阐明。我们的研究显示与正常饮食组比较,高脂组大鼠抵抗素的表达明显减少($P < 0.01$),这与后一种观点一致,提示抵抗素表达水平的降低与高脂导致的 IR 发生相关。

脂联素也是脂肪细胞特异性分泌的蛋白。1995 年, Scherer 等^[5]首先从诱导分化的鼠脂肪细胞中克隆出一种新 DNA,称为 Acrp30 或 AcrpQ 类似物,即脂联素。脂联素在人体的血浆浓度为 5~30 mg/L,为其他常见激素的 3 倍,且女性高于男性,无昼夜节律的变化。脂联素与体质指数、体脂百分比、血糖及空腹胰岛素水平呈负相关,与胰岛素敏感性、高密度脂蛋白水平呈正相关。脂联素水平在正常人、IGT 及 2 型糖尿病患者体内逐渐减少,且存在显著差异,发生 2 型糖尿病后脂联素进一步下降,脂联素水平的降低与胰岛素敏感性的下降相平行^[6,7]。本实验显示 IR 大鼠脂联素的表达水平明显降低,与对照组存在显著差异($P < 0.01$),提示游离脂肪酸的增加可能导致了大鼠体内脂肪细胞的增多和分泌功能失调。其中,脂联素的下降可能直接或间接的促进了全身以及局部 IR 的发生。

脂联素受体的改变是否参与了高脂导致的 IR 的发生呢? Diez 等^[8]于 2003 年 2 月首次克隆出人和小鼠各两类脂联素受体基因,其中 R1 表达广泛,而 R2 主要表达于小鼠的肝脏。我们的研究显示在 Wistar 大鼠 R1 表达广泛,以脂肪细胞表达最为丰富, R2 只存在于肝脏、肾脏和骨骼肌组织,且肝脏 R2 的表达最为丰富^[9]。本研究显示 IR 大鼠 R1 表达明显低于正常组,但未达到统计学差异,可能的原因有: 游离脂肪酸通过某种途径抑制了脂联素的

生成,而非通过脂联素受体表达的改变介导机体胰岛素敏感性的降低。④R1 也参与了大鼠 IR 的发生。游离脂肪酸很可能通过降低脂联素受体的数量,减少脂联素与受体的结合,降低了细胞对脂联素的敏感性,进而导致了脂肪细胞分化、代谢的异常,从而间接的促进了 IR 的发生。但脂联素受体表达的下降低并未表现出显著统计学差异,可能是由于 FFA 的血浓度差不够大,或高脂饲养的时间不够长,在加大高脂组的饱和脂肪酸含量,延长喂食时间等更严格的试验条件下,受体表达的改变可能会更加明显。⑤我们的研究已经证实肝细胞脂联素受体 R2 在 FFA 介导的 IR 中发挥着重要作用, R2 可能是肝脏胰岛素敏感性和糖代谢改变的关键通道^[10]。

综上所述,抵抗素、脂联素水平的下降在高脂饮食诱导的 IR 的发生中起着重要的作用。低抵抗素、脂联素血症与肥胖、高 FFA 血症、IR 密切相关。同时, R1 水平的降低也可能介导了高游离脂肪酸导致 IR 过程中脂联素敏感性的降低。

[参考文献]

- [1] Storlien LH, Oakes ND, Pan DA, Kusunoki M, Jenkins AB. Syndrome of insulin resistance in rats. Inducement by diet and amelioration with benfluorex. *Diabetes*, 1993, **42** (3): 457-462
- [2] Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 2001, **409** (6818): 307-312
- [3] Kim KH, Zhao L, Moon Y, Kang C, Sul HS. Dominant inhibitory adipocyte-specific secretory factor (APSF)/resistin enhances adipogenesis and improves insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (17): 6780-785
- [4] Fujita H, Fujishima H, Morii T, Koshimura J, Narita T, Kakei, et al. Effect of metformin on adipose resistin expression in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **298** (3): 345-349
- [5] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Codish HF. A novel serum protein similar to c1q, produced exclusively in adipocyte. *J Biol Chem*, 1995, **270** (45): 26746-749
- [6] 龚燕平, 李春霖, 田慧, 金文胜, 陆菊明, 潘长玉. 老年糖耐量异常人群脂联素水平的改变及其影响因素. *天津医药*, 2005, **33** (6): 331-334
- [7] 王淑芳, 催莹, 赵家军. 脂联素及其分泌调节. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (2): 242-244
- [8] Diez JJ, Iglesias Pedro. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *European J Endocrinology*, 2003, **148** (3): 293-300
- [9] 李春霖, 龚燕平, 田慧, 陆菊明, 李明, 肖或君, 等. 脂联素受体在正常 Wistar 大鼠各组织的分布和表达. *解放军医学杂志*, 2005, **30** (8): 718-719
- [10] 龚燕平, 李春霖, 母义明, 田慧, 陆菊明, 潘长玉. 脂肪酸对 HepG2 肝细胞脂联素受体表达的影响. *北京医学*, 2005, **27** (5): 289-290

(此文编辑 朱雯霞)