

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.35.002

# 罗格列酮对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞脂联素、瘦素及抵抗素的分泌及 mRNA 表达的影响\*

孙殿静, 刘晴晴, 耿建林

(衡水市哈励逊国际和平医院内分泌科, 河北衡水 053000)

**[摘要]** **目的** 研究罗格列酮对胰岛素抵抗(IR)3T3-L1 脂肪细胞脂联素、瘦素及抵抗素的分泌及 mRNA 表达的影响。**方法** 将 3T3-L1 脂肪细胞分为 5 组:A 组为对照组,B、C、D、E 组为不同水平罗格列酮处理的 IR 组,分别给予终浓度为 0、0.1、0.5、1.0  $\mu\text{mol/L}$  的罗格列酮。检测各组细胞培养液的葡萄糖消耗量,分别采用酶联免疫吸附试验(ELISA)及实时荧光定量聚合酶链式反应(Q-RT-PCR)检测瘦素、脂联素及抵抗素的分泌及 mRNA 表达水平。**结果** 与 B 组比较,D、E 组细胞分泌的瘦素及抵抗素水平及其 mRNA 表达水平均降低,分泌的脂联素及其 mRNA 表达水平与葡萄糖消耗量均升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。B 组与 C 组细胞分泌的瘦素、脂联素及抵抗素水平比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 罗格列酮可以通过调节瘦素、脂联素及抵抗素的表达及分泌减轻脂肪细胞的 IR。

**[关键词]** 罗格列酮;胰岛素抵抗;脂联素;瘦素;抵抗素

**[中图分类号]** R587.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)35-4901-03

## The influence of rosiglitazone on the secretion and mRNA expression of adiponectin, leptin and resistin in 3T3-L1 adipocytes with insulin resistance\*

Sun Dianjing, Liu Qingqing, Geng Jianlin

(Department of Endocrinology, Harrison International Peace Hospital, Hengshui, Hebei 053000, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the influence of rosiglitazone on the secretion and mRNA expression of adiponectin, leptin and resistin in 3T3-L1 adipocytes with insulin resistance(IR). **Methods** 3T3-L1 adipocytes were divided into 5 groups:group A was the control group,group B,C,D and E were the IR groups treated with different concentrations of rosiglitazone. The group B,C,D and E were given 0,0.1,0.5,1.0  $\mu\text{mol/L}$  rosiglitazone, respectively. The consumption of glucose was detected, while the secretion and mRNA expression of leptin, adiponectin and resistin were detected by using ELISA and Q-RT-PCR respectively. **Results** Compared with the group B, the secretion and mRNA expression of leptin and resistin in group D and E were decreased, while the secretion and mRNA expression of adiponectin and the consumption of glucose were increased, these differences were statistically significant( $P < 0.05$ ). The secretion of leptin, adiponectin and resistin had no significant difference between group B and group C( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Rosiglitazone could alleviate the IR in adipocytes by regulating the expression and section of leptin, adiponectin and resistin.

**[Key words]** rosiglitazone; insulin resistance; adiponectin; leptin; resistin

2 型糖尿病(T2DM)是最常见的内分泌疾病之一,随着生活水平的逐渐提高和饮食结构的改变,T2DM 的发病率逐年升高<sup>[1]</sup>,胰岛素抵抗(IR)是患者的重要生理病理变化之一<sup>[2]</sup>。脂肪组织不仅是内分泌器官,也是免疫器官。随着研究的深入,脂肪组织被证实具广泛的分泌谱,可分泌大量的生物活性物质如脂肪酸、脂蛋白酯酶、类固醇激素、生长因子、血管紧张素原及前列腺素,也可分泌大量细胞因子及类细胞因子样分子,其分泌的脂联素、瘦素、抵抗素等因素在 IR 的发生、发展中发挥重要作用<sup>[3-4]</sup>。罗格列酮属噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂,已广泛应用于 T2DM 的治疗,可改善 IR 作用,但其对脂肪细胞因子的影响尚缺乏相关报道<sup>[5]</sup>。本研究旨在探讨罗格列酮对 IR 3T3-L1 脂肪细胞脂联素、瘦素及抵抗素的分泌,以及 mRNA 表达的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 细胞来源** 3T3-L1 细胞株购自赛齐(上海)生物工程有

限公司。

**1.2 仪器与试剂** 奥林巴斯显微镜 CX41(上海西努光学科技有限公司),QQ-80A-II 型二氧化碳(CO<sub>2</sub>)培养箱(上海启前电子科技有限公司),3-18R 高速冷冻离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司),DG5033A 酶标仪(南京华东电子集团医疗装备有限责任公司),Image-Pro Insight 图像分析软件(广州市明美光电技术有限公司)。主要试剂见表 1。

### 1.3 方法

**1.3.1 3T3-L1 脂肪细胞的培养及诱导分化** 3T3-L1 前脂肪细胞接种于 6 孔培养板,于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待细胞融合后接触抑制 48 h,换用含 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、1  $\mu\text{mol/L}$  地塞米松、10 mg/L 胰岛素的培养基培养 48 h,再换用含 10 mg/L 胰岛素的培养基培养 48 h,随后换用 DMEM 培养基继续培养,每 2 天换液 1 次,培养 4 d,90%前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞。

\* 基金项目:河北省衡水市科技支撑计划资助项目(15024)。 作者简介:孙殿静(1981—),主治医师,本科,主要从事糖尿病相关性研究。

表 1 主要试剂

名称	厂家	批号	纯度(%)
罗格列酮	大连美仑生物技术有限公司	20150207	95.00
无水乙醇	上海碧云天生物技术有限公司	20150208	99.00
地塞米松	上海士锋生物科技有限公司	20150109	99.99
胰岛素	上海辰玺生物科技有限公司	20141103	98.00
DMEM 高糖培养基	美国 GIBCO 公司	20150301	99.99
Cellmax 澳洲胎牛血清	赛澳美细胞技术(北京)有限公司	20150811	98.00
0.25%胰蛋白酶	杭州沃森生物技术有限公司	20150412	98.00
葡萄糖测试盒	上海士锋生物科技有限公司	20140914	95.00
瘦素、脂联素及抵抗素酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒	上海睿时生物科技有限公司	20141204	99.99
mRNA 引物合成	上海麦诺森生物科技股份有限公司	20150105	99.99

**1.3.2 IR 模型的建立及分组** 按每毫升  $3 \times 10^5$  个的密度将 3T3-L1 脂肪细胞悬液接种于 96 孔板培养,置于无血清培养基中处理 12 h 同步化进行分组,每组 12 孔。其中,A 组为对照组,B、C、D、E 组为不同水平罗格列酮处理的 IR 组。IR 组细胞均添加  $1 \mu\text{mol/L}$  地塞米松制作 IR 模型<sup>[6]</sup>。C~E 组细胞分别添加终浓度为 0.1、0.5、1.0  $\mu\text{mol/L}$  罗格列酮+无水乙醇溶液,A、B 组均加入等量的无水乙醇。

**1.3.3 葡萄糖消耗量的测定** 所有细胞培养 24 h 后给予 100 nmol/L 胰岛素,刺激 15 min 后取培养基,以葡萄糖测试盒检测并计算培养基中葡萄糖消耗量,严格按照说明书进行操作,评价 IR 程度。

**1.3.4 脂联素、瘦素及抵抗素的测定** 细胞培养 24 h 后分别收集各组细胞的培养液,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测脂联素、瘦素及抵抗素水平,操作严格按照说明书进行。

**1.3.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(Q-RT-PCR)检测 mRNA 表达水平** 细胞培养 24 h 后分别检测各组细胞的脂联素、瘦素及抵抗素的 mRNA 表达水平。按照 Trizol™ 试剂盒说明书提取总 RNA,测定 RNA 水平及纯度,取  $1 \mu\text{g}$  总 RNA 逆转录合成 cDNA,取  $5 \mu\text{L}$  cDNA 稀释 4 倍后,取  $2 \mu\text{L}$  为模板,分别以 p27、增殖细胞核抗原(PCNA)、Bcl-2、Bax、细胞外调节蛋白激酶(ERK)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)及三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的引物进行定量 PCR,反应条件:95 °C 变性 3 s;95 °C 变性 10 s;60 °C 退火/延伸 30 s,重复 40 个循环;65~95 °C 每增加 0.5 °C 进行 5 s 读板,形成溶解曲线。所有样品均设置 3 个平行管,基因表达量以平行管平均循环阈值(cycle-threshold,Ct)表示,应用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算脂联素、瘦素及抵抗素的相对表达量。

**1.4 观察指标** 各组葡萄糖消耗量,脂联素、瘦素及抵抗素分泌水平,脂联素、瘦素及抵抗素 mRNA 表达水平。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验,各组细胞培养液中各项指标的相关性分析采用 Pearson 相关性分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组细胞培养液各项检测指标水平比较** 各组细胞的葡萄糖消耗量、瘦素、脂联素及抵抗素水平比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );D、E 组的上述各项指标水平与 B 组比较,差

异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 各组细胞培养液各项检测指标水平比较( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

组别	葡萄糖消耗量 (mmol/L)	瘦素 (ng/mL)	脂联素 (ng/mL)	抵抗素 (ng/mL)
A 组	7.58±0.32	0.74±0.13	1.51±0.21	0.76±0.07
B 组	2.41±0.19*	1.98±0.14*	0.38±0.02*	1.54±0.19*
C 组	2.62±0.14*	1.85±0.15*	0.55±0.27*	1.25±0.31*
D 组	4.46±0.17*#	1.46±0.21*#	0.85±0.21*#	1.17±0.22*#
E 组	5.90±0.15*#	1.03±0.16*#	1.14±0.18*#	0.89±0.06*#
F	7.985	6.375	7.326	6.432
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

\*:  $P < 0.05$ ,与 A 组比较;#:  $P < 0.05$ ,与 B 组比较。

**2.2 各组细胞培养液各项检测指标的相关性分析** 葡萄糖消耗量与脂联素水平呈正相关( $r=1.241, P=0.005$ ),与瘦素、抵抗素水平呈负相关( $r$  值分别为  $-1.082, -1.764, P$  值分别为  $0.018, 0.000$ );瘦素与脂联素水平呈负相关( $r=-1.524, P=0.000$ ),与抵抗素水平呈正相关( $r=1.175, P=0.012$ );脂联素与抵抗素水平呈负相关( $r=1.184, P=0.010$ )。

**2.3 各组细胞瘦素、脂联素及抵抗素 mRNA 相对表达水平比较** 各组细胞的瘦素、脂联素及抵抗素 mRNA 表达水平比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );C、D、E 组的上述各项指标 mRNA 表达水平与 B 组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 各组细胞的瘦素、脂联素及抵抗素 mRNA 相对表达水平比较( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

组别	瘦素	脂联素	抵抗素
A 组	1.36±0.15	7.73±0.65	1.48±0.19
B 组	4.47±0.58*	0.11±0.04*	4.82±0.75*
C 组	2.99±0.42*#	0.68±0.12*#	3.14±0.52*#
D 组	2.31±0.44*#	3.41±1.17*#	2.45±0.56*#
E 组	1.70±0.35*#	6.05±1.24*#	1.82±0.31*#
F	8.854	13.867	8.983
P	<0.05	<0.05	<0.05

\*:  $P < 0.05$ ,与 A 组比较;#:  $P < 0.05$ ,与 B 组比较。

### 3 讨 论

目前研究认为,IR 是 T2DM 的主要发病机制之一,IR 常伴有高胰岛素血症,发生 IR 时,胰岛素的脂肪合成作用增强,脂肪贮存增多,而腹内脂肪的增加远远大于皮下脂肪,形成内脏或中央型肥胖<sup>[7-8]</sup>。

近些年研究发现,脂肪组织不仅是储存能量的器官,而且是全身较为重要的内分泌器官。脂肪组织可分泌多种蛋白,包括瘦素、脂联素、抵抗素、肿瘤坏死因子、纤溶酶原激活物抑制剂-1、白细胞介素等多种细胞因子,这些细胞因子统称为脂肪因子。脂肪因子通过自分泌、旁分泌、内分泌的途径参与各种复杂的代谢过程,在 T2DM 发病机制中发挥重要作用<sup>[9-10]</sup>。诸多脂肪因子中,瘦素是肥胖基因(ob)的编码产物,也是迄今为止研究最深入的脂肪细胞因子。瘦素作为一种饱食因子,与其受体结合后可以抑制增加食欲肽(如神经肽 Y、甘丙肽、增食欲素)的分泌,和(或)促进减少食欲肽(如前阿片黑素细胞皮质激素、可卡因-安非他明调节的转录物、胰升血糖素样肽 1 及神经降压素等)的分泌,通过上述机制共同参与食欲和能量代谢调节<sup>[11]</sup>。瘦素受体广泛存在于包括脂肪组织在内的多种外周组织,参与血压调节、脂质代谢及内环境的稳定,影响血管、大脑及骨的生成。瘦素与胰岛素同为人体能量代谢的重要调节因子,其功能紊乱与糖尿病的发生、发展密切相关,主要表现为机体对瘦素的抵抗,患者外周瘦素水平明显升高<sup>[12]</sup>。脂联素也称脂肪细胞补体调节蛋白、脂肪中最丰富的基因转录物之一、相对分子质量为  $28 \times 10^3$  的凝胶结合蛋白,是脂肪细胞的特异性分泌蛋白,参与体内葡萄糖和脂质代谢调节。研究发现,脂联素具有增强胰岛素敏感性、抗炎及抗动脉粥样硬化的作用<sup>[13]</sup>。抵抗素存在于血浆中,属于抵抗素样分子家族成员,是脂肪细胞分泌的富含半胱氨酸的多肽类激素。有研究表明,抵抗素可以作用于胰岛素信号转导途径,导致 IR<sup>[14]</sup>。本研究中,与对照组相比,IR 组细胞的瘦素及抵抗素分泌及 mRNA 表达水平均明显上升,而葡萄糖消耗量及脂联素水平降低,胰岛素脂肪细胞上述因子的合成及分泌功能均受损。对上述指标进行相关性分析,脂联素水平与葡萄糖消耗呈正相关,瘦素及抵抗素与葡萄糖消耗呈负相关。这一结果说明 T2DM 患者的 IR 与脂肪细胞因子的异常改变相关。

既往研究发现,罗格列酮可以通过与过氧化物酶体系激活受体结合而上调其应答基因的表达,从而促进葡萄糖转运体 4 (GLUT4) 的表达及周围细胞对葡萄糖的摄取,降低血糖并改善患者的 IR<sup>[15]</sup>。本次研究分别利用不同水平罗格列酮处理 IR 脂肪细胞,0.5 及 1.0  $\mu\text{mol/L}$  罗格列酮均可以抑制瘦素及抵抗素的表达与分泌,促进脂联素的表达与分泌,并通过上述机制促进脂肪细胞对糖的利用;0.1  $\mu\text{mol/L}$  罗格列酮仅可以调节脂肪细胞因子的表达,而对脂肪细胞因子的分泌及葡萄糖的利用无明显影响。这一结果说明罗格列酮对脂肪细胞的作用呈剂量依赖性。

综上所述,罗格列酮可以通过调节瘦素、脂联素及抵抗素的表达及分泌,减轻脂肪细胞的 IR。

### 参考文献

- [1] Eschwege E, Basdevant A, Crine A, et al. Type 2 diabetes mellitus in France in 2012: results from the ObEpi survey [J]. *Diabetes Metab*, 2015, 41(1): 55-61.
- [2] 王媛媛, 陈玉芳, 高晓宁, 等. 诱发胰岛素抵抗基因与中国汉族人群 2 型糖尿病易感性的研究进展 [J]. *现代预防医学*, 2015, 42(2): 305-309.
- [3] 严婷, 李玲玲, 王怀明, 等. 2 型糖尿病患者脂肪细胞因子与代谢综合征的关系 [J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(2): 275-278.
- [4] 徐芬, 林倍思, 周银莉, 等. 胰岛素对 2 型糖尿病状态下脂肪细胞色素上皮衍生因子表达的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(38): 2992-2995.
- [5] 郭鸿, 刘丽平, 张斌, 等. 罗格列酮对脓毒症大鼠高血糖与胰岛素抵抗的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(3): 300-304.
- [6] 谢洁, 杨瑞仪. 地塞米松体外诱导胰岛素抵抗细胞模型的建立 [J]. *科技通报*, 2015, 31(10): 31-33.
- [7] 王铭婕, 闫朝丽. 蛋白质组学在肥胖和胰岛素抵抗及 2 型糖尿病中的应用研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2014, 17(21): 2524-2527.
- [8] Song DK, Hong YS, Lee H, et al. Increased epicardial adipose tissue thickness in type 2 diabetes mellitus and obesity [J]. *Diabetes Metab J*, 2015, 39(5): 405-413.
- [9] 陈维煜, 方玲. 脂肪细胞因子与胰岛素抵抗的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(11): 3199-3202.
- [10] 包艳春, 关秀军, 刘云涛. 老年 2 型糖尿病患者血液脂肪细胞因子与代谢综合征的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(10): 2667-2669.
- [11] 董国庆, 钟丽华, 陆喜燕, 等. 肥胖儿童血清脂联素与胰岛素抵抗的关系 [J]. *广东医学*, 2013, 34(18): 2821-2823.
- [12] 方士强, 孔德勇, 梅芬, 等. 2 型糖尿病患者血清内脂素和瘦素表达水平及临床意义 [J]. *重庆医学*, 2014, 43(27): 3565-3566, 3569.
- [13] 高丽萍, 罗建平, 张国成, 等. 不同人群血清脂联素、瘦素水平与胰岛素抵抗的关系 [J]. *医学临床研究*, 2010, 27(4): 582-585.
- [14] 廖向彬, 李常青, 李小翠, 等. 荔枝核有效部位群改善 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗作用及机制 [J]. *中药材*, 2014, 37(7): 1247-1250.
- [15] 吴良燕, 刘玲娇, 王珊, 等. 二甲双胍马来酸罗格列酮改善肥胖及非肥胖多囊卵巢综合征患者胰岛素抵抗及高雄激素血症 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2014, 30(12): 1092-1096.