

· 研究快报 ·

抵抗素在肥胖小鼠脂肪组织中的表达及其对小鼠肌肉组织葡萄糖摄取率的影响

李雅慧^{2*}, 黎怀星¹, 董诗源², 姜雨², 马莉³

(1. 中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所, 上海 200031; 2. 国家食品药品监督管理局保健食品审评中心, 北京 100061; 3. 第二军医大学长征医院营养科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**观察抵抗素基因(Retn 基因)在肥胖小鼠脂肪组织中的表达,及其蛋白(resistin 蛋白)对小鼠肌肉组织葡萄糖摄取率的影响,探讨肥胖、抵抗素与胰岛素抵抗可能的相关性。**方法:**用高脂肪和高能量型的小鼠饲料喂养 C57BL/6J 小鼠,诱导其产生肥胖伴胰岛素抵抗模型,22 周后测定小鼠的 Lee's 指数(即体质指数,BMI)以及血糖和血浆胰岛素的浓度,然后进行葡萄糖耐量试验,并与正常小鼠作对照,以评价肥胖小鼠是否出现了胰岛素抵抗和葡萄糖耐量损伤。实时荧光定量 RT-PCR 比较肥胖组小鼠($n=10$)与正常组小鼠($n=5$)白色脂肪细胞 Retn 基因的表达。最后将抵抗素蛋白与小鼠骨骼肌细胞共培养,测定其对肌肉组织葡萄糖摄取率的影响。**结果:**采用高脂饲料成功地诱导出了肥胖伴胰岛素抵抗的小鼠模型;肥胖小鼠的白色脂肪组织内 Retn 基因的表达显著高于正常小鼠($P<0.01$);将抵抗素蛋白与小鼠肌肉组织在体外共培养,不论是否有胰岛素刺激,均能显著抑制小鼠肌肉组织对葡萄糖的摄取率($P<0.05$)。**结论:**肥胖小鼠体内 Retn 基因的高表达可能是导致骨骼肌对葡萄糖的摄取率降低,进而诱发胰岛素抵抗的因素之一。

[关键词] 抵抗素;基因,Retn;小鼠,肥胖;葡萄糖摄取;肌

[中图分类号] R 587 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)12-1351-04

Resistin expression in adipose tissues of diet-induced obese mouse model and its influence on skeletal muscle glucose uptake

LI Ya-hui^{2*}, LI Huai-xing¹, DONG Shi-yuan², JIANG Yu², MA Li³ (1. Institute for Nutritional Sciences, Shanghai Institute for Biological Science, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China; 2. Center for Health Food Evaluation, State Food and Drug Administration Bureau, Beijing 100061; 3. Department of Clinical Nutrition, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of resistin (Retn) gene in the adipose tissues of obese mouse and its influence on the skeletal muscle glucose uptake, in an effort to understand the correlation between obese, resistin, and insulin resistance. **Methods:** The obese and insulin resistance model was induced with high-fat diet in C57BL/6J mice. Twenty-two weeks later the Lee's index (BMI) and the concentrations of blood glucose and plasma insulin were determined. Glucose tolerance test was carried out to verify the appearance of insulin resistance and the impair to glucose tolerance, with normal mice taken as control. Retn mRNA expression in the adipose tissues of model mice ($n=10$) and control mice ($n=5$) was detected by Real-time RT-PCR. The resultant resistin protein was co-cultured with mouse skeletal muscle to assess its influence on glucose uptake. **Results:** An obese and insulin resistance mouse model was successfully induced with high fat diet. The Retn gene expression in adipose tissues was significantly higher in the obese mice than that in normal control mice ($P<0.01$). The resultant resistin protein had a significant inhibitory effect on the glucose uptake by skeletal muscle with or without insulin ($P<0.05$). **Conclusion:** It is suggested that the overexpression of Retn gene might be one of the reasons responsible for the decrease of glucose uptake by skeletal muscle and the subsequent insulin resistance in the diet-induced obese mice.

[KEY WORDS] resistin; genes, retn; mice, obese; glucose uptake; muscles

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(12):1351-1354]

抵抗素(resistin)是一种脂肪细胞因子,属于 C 末端富含半胱氨酸的分泌型蛋白家族的成员之一^[1,2]。有研究^[3~5]表明抵抗素与胰岛素抵抗和血浆葡萄糖水平升高相关。但是抵抗素到底是通过增加肝葡萄糖的生成还是通过抑制骨骼肌对血糖的摄取而达到诱导胰岛素抵抗的,目前尚不清楚。为此,

本研究根据国际哺乳动物饲料标准配方配置了一种高脂肪、高能量型的小鼠饲料,并给小鼠喂饲该饲料

[基金项目] 国家自然科学基金(30370802)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30370802)。

[作者简介] 李雅慧,博士,副主任医师。

* Corresponding author. E-mail: tlyahui661021@yahoo.com.cn

制备肥胖小鼠模型,检测小鼠各种血液生化指标,分析胰岛素抵抗情况。同时采用常规及实时荧光定量 RT-PCR 比较该肥胖小鼠与正常小鼠体内 Retn 基因表达的差异;提取抵抗素蛋白,将其与小鼠肌肉组织共培养,观察其对肌肉组织葡萄糖摄取能力的影响,探讨胰岛素抵抗与抵抗素蛋白的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 DMEM 培养基和胎牛血清购自 Invitrogen 公司;胰岛素、地塞米松、3-甲基-异丁基黄嘌呤 (IBMX)、Flag-Agrose 购自 Sigma 公司;小牛血清购自 Hyclone 公司;谷氨酰胺购自上海生工生物工程有限公司;RNA 抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;血浆胰岛素试剂盒购自上海生物制品研究所;2-脱氧-D-[1-³H]-葡萄糖(2-deoxy-D [1-³H]-glucose, ³H-DG) 购自 Amersham Life Science 公司;牛血清白蛋白(BSA)购自 BM 公司;Real-time RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;Real-time RT-PCR 特异性引物和探针由上海 CASAR-RAY 公司合成。

1.2 小鼠肥胖模型的制备

1.2.1 小鼠的喂养 40 只清洁级健康雄性断乳 C57BL/6J 小鼠,平均体质量为(14.11±3.85) g,由第二军医大学实验动物中心提供。小鼠采用昼夜交替 12 h 饲养。饲养环境平均温度为(22.5±5.0)°C,平均相对湿度为(45±5)%,每日光照 10 h,小鼠自由取食和饮水。所有的小鼠先给予正常膳食,4~5 d 后将小鼠随机分为肥胖组($n=30$)和正常对照组($n=10$),肥胖组饲以高脂饲料,正常对照组饲以含正常脂肪量的饲料。共喂饲 22 周,小鼠自由饮水和采食,每周称量体质量(W)、体长(H)和进食量,按公式计算 Lee's 指数(W/H^2), H 为从小鼠鼻尖至尾尖的长度(cm),放血后剥离腹腔内全部脂肪称重。

高脂肪膳食和正常脂肪量膳食配方中只有淀粉量(分别为 237 和 435 g/kg)和猪油量(分别为 198 和 0 g/kg)不同,其余营养素含量(g/kg)相同(酪蛋白 200,蛋氨酸 3,麦芽糊精 120,蔗糖 100,大豆油 45,纤维素 50,氯化胆碱 2,复合无机盐 35,复合维生素 10)。高脂肪膳食组中脂肪占总热能的 45.3%,碳水化合物占 37.9%,蛋白质占 16.8%,热能 4.83 kcal/g。正常脂肪量膳食组中脂肪占总热能的 10.6%,碳水化合物占 68.3%,蛋白质占 21%,热能

3.84 kcal/g(1 cal=4.187 J)。

1.2.2 葡萄糖耐量试验 在连续饲养 21 周后,按照 2 g/kg 剂量注射葡萄糖溶液(实验前禁食 12 h),然后分别测定 0、30、60、90、120 min 时的血糖水平。

1.2.3 生化指标测定 全部实验鼠饲养 22 周后禁食过夜,断头取血,用于检测血浆胰岛素、血糖指标。采用双抗体放射免疫分析法测定血浆胰岛素(上海生物制品研究所提供试剂盒),所有操作均按试剂盒说明书进行。用罗氏公司 ACCU-CHEK ADVANTAGE 血糖仪测定血浆葡萄糖。

1.3 实时荧光定量 RT-PCR 测定肥胖小鼠白色脂肪组织 Retn 基因的表达 按常规方法抽提小鼠白色脂肪组织的总 RNA(上海华舜生物工程有限公司生产的试剂盒),然后采用 Real-time 荧光 RT-PCR 分析其中 Retn 基因的表达。Retn 基因上游引物为 5'-CCT TGC ACA CTG GCA GTG ACA-3',下游引物为 5'-CCA GAA GGC ACA GCA GTC TTG-3',TaqMan 探针为 5'-TGT GGC TCG TGG GAC ATT CGT GAA G-3'。PCR 反应条件:92°C 2 min,1 个循环;92°C 15 s,65°C,1 min,40 个循环;40°C 5 s,1 个循环。计算 50 ng 总 RNA 中 Retn 基因 mRNA 的拷贝数,每个反应重复 3 次,取平均数。

1.4 小鼠抵抗素重组蛋白的表达纯化 将高表达小鼠 Retn 基因的 3T3-L1 细胞系^[6]复苏,培养于含 3T3-L1 生长培养基的培养皿内,当细胞生长至 100%汇合时,继续培养 2 d,然后置换含有 10%胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、10 μg/ml 胰岛素、0.5 mmol/L IBMX、0.25 μmol/L 地塞米松的 DMEM 分化培养基中诱导分化,经过 8~14 d 的诱导后 3T3-L1 细胞便完全分化为脂肪细胞。分批收集已经分化为脂肪细胞的培养液,用 SDS-PAGE 电泳进行鉴定,用 Flag-Agarose 法常规纯化 His-Resistin 融合蛋白,定量后冻存备用。

1.5 抵抗素蛋白对小鼠骨骼肌葡萄糖摄取率的影响 按照文献^[7,8]所述的方法分离肥胖组和正常组小鼠的比目鱼肌,分别测定其对葡萄糖的摄取率。即分别将 10 只实验组肥胖小鼠和 10 只对照组小鼠饥饿 12 h 后断头处死,分离出小鼠的比目鱼肌,并去除血管、神经和筋膜成分,肌肉撕分至 100 mg 作为一个肌肉样本,每只小鼠取 4 个肌肉样本分别放入每孔盛有 1 ml Krebs-Ringer 磷酸盐缓冲液(含 1% BSA 和 2 mmol/L 丙酮酸,pH 7.3)的 24 孔板

的相应孔内,并在其中的 5 个对照组小鼠的肌肉样本中分别加入 600 ng 抵抗素重组蛋白,放入含 95% O₂和 5%CO₂的孵箱中 37℃孵育 30 min。然后吸去缓冲液,分别加入 1 ml 新鲜的 Krebs-Ringer 磷酸盐缓冲液和 0.5 μCi(1 Ci=3.7×10¹⁰ Bq) 2-脱氧-D-[1-³H]-葡萄糖(pH 7.3),每只小鼠的两个样本孔内分别加入终浓度为 174 nmol/L 的胰岛素,而另外两个样本孔则不加。再放入含 95%O₂和 5%CO₂的孵箱中 37℃继续孵育 30 min。最后取出肌肉样本经过 PBS 清洗以后分别放入到液闪瓶中,加高氯酸和双氧水 80℃消化 3~4 h 至液体清亮,室温冷却,再在各管中加入助溶剂(乙二醇乙醚)和闪烁液(0.5 g/L PPO+200 mg/L POPOP,甲苯为溶剂),暗室过夜后离心,取上清液 800 μl 用全自动液闪仪测定放射性,同时取 20 μl 孵育液和 780 μl 蒸馏水做对照。

1.6 统计学处理 采用 *t* 检验进行组与组之间的比较分析, $P<0.05$ 时差异具有统计意义。

表 1 22 周两组小鼠体质量、体脂重、体长、尾长和 Lee's 指数的比较

Tab 1 Comparison of body weight, fat weight, body length, tail length, and Lee's index in 2 group after 22 weeks

($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	N	Body mass (m _B /g)	Fat mass (m _B /g)	Body length (l/cm)	Tail length(l/cm)	Lee's index
Obese	10	46.6±2.56**	3.894±0.28**	17.39±0.50	7.68±0.37	0.154±0.009*
Control	5	28.7±2.11	0.958±0.14	16.80±0.58	7.68±0.41	0.101±0.009

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group

2.1.2 小鼠血糖测定和葡萄糖耐量实验结果 22 周时随机抽取 10 只肥胖组小鼠和 5 只对照组小鼠测定血糖、血浆胰岛素水平,结果发现肥胖组小鼠血糖水平(mg/L)高于对照组(100.0±1.9 vs 52.8±5.4, $P<0.05$),血浆胰岛素水平也显著高于对照组(63.257±4.358 vs 27.251±6.869, $P<0.01$)。而葡萄糖耐量实验表明肥胖组小鼠注射葡萄糖 120 min 后,血糖仍未恢复到正常值,说明肥胖组小鼠的糖耐量出现损伤(图 1)。

2.2 小鼠白色脂肪组织中 Retn 基因 mRNA 表达水平的测定 本研究对 10 只肥胖组小鼠和 5 只对照组小鼠的脂肪组织中 Retn 基因 mRNA 表达水平进行了实时荧光定量 RT-PCR 分析。结果表明对照组小鼠 Retn 基因 mRNA 的拷贝数的均值为(4 550±311)个/50 ng,而肥胖组小鼠 Retn 基因 mRNA 的拷贝数的均值为(15 240±482)个/50 ng,为对照组的 3.35 倍($P<0.01$)。结果表明,肥胖小

2 结果

2.1 小鼠肥胖模型的建立情况

2.1.1 身体指数指标测定 实验结束时,正常组小鼠存活 10 只,肥胖组存活 26 只。在 1~9 周内肥胖组和对照组小鼠体质量增加无显著差异;第 10 周开始,肥胖组小鼠体质量逐渐高于对照组小鼠,并达到统计显著性差异($P<0.01$);19 周后肥胖组小鼠体质量增长趋势逐渐稳定。以超重(与对照组比)20% 作为肥胖标准,成活下来的 26 只小鼠中有 24 只为肥胖小鼠,肥胖小鼠诱导的成功率为 92%。然后随机抽取的其中的 10 只肥胖小鼠和 5 只对照组小鼠在体质量、体脂质量、体长、尾长和 Lee's 指数等方面的比较结果见表 1。由表 1 可见,肥胖小鼠的平均体质量是正常对照组小鼠平均体质量的 1.6 倍,平均体脂质量是正常组小鼠的 4.1 倍, Lee's 指数比正常组小鼠高 52.5%,而体长和尾长与正常对照组没有明显的区别。

鼠脂肪组织内 Retn 基因的表达显著上调。

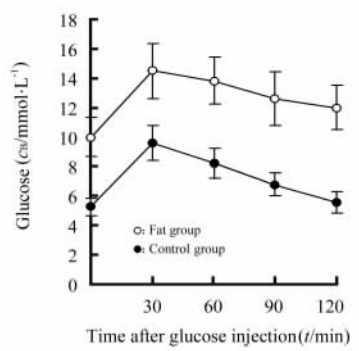


图 1 小鼠葡萄糖耐量实验

Fig 1 Mouse glucose tolerance test

$n=10$ (fat group) or $n=5$ (control group), $\bar{x} \pm s$

2.3 肥胖和抵抗素蛋白对小鼠肌肉组织摄取葡萄糖的影响 为了分析肥胖和抵抗素蛋白是否会影响小鼠肌肉组织对葡萄糖摄取的影响,本研究对基础

状态和加胰岛素时 10 只肥胖组小鼠和 5 只对照组小鼠肌肉组织的葡萄糖摄取率进行了分析比较。结果(图 2)表明,在不加胰岛素时对照组和肥胖组小鼠的肌肉组织葡萄糖摄取率($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)的均值分别为($4\ 880 \pm 222$)和($3\ 320 \pm 176$),肥胖组小鼠肌肉组织的葡萄糖摄取率显著低于对照组($P < 0.01$);加入胰岛素后,两组小鼠肌肉组织的摄取率均升高,但肥胖组仍显著低于对照组($5\ 230 \pm 287$ vs $7\ 680 \pm 326$, $P < 0.01$)。

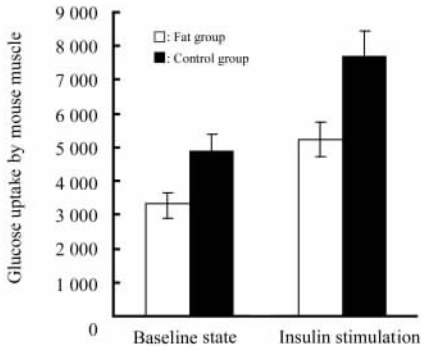


图 2 基础状态及胰岛素刺激下小鼠肌肉组织对葡萄糖的摄取率

Fig 2 Glucose uptake of mouse skeletal muscle under baseline state and insulin stimulation
n=10(fat group), n=5(control group), $\bar{x} \pm s$

进一步观察抵抗素蛋白对正常小鼠肌肉组织的葡萄糖摄取率($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)的影响,基础状态下 $3\ 410 \pm 181$,基础状态+抵抗素蛋白 $2\ 860 \pm 126$,添加胰岛素 $5\ 140 \pm 269$,添加胰岛素+抵抗素蛋白 $4\ 260 \pm 197$ 。结果表明不论是否有胰岛素刺激,抵抗素蛋白均能够显著地抑制正常小鼠肌肉组织对葡萄糖的摄取率($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 肥胖小鼠的制备 喂饲高脂肪和高能量饲料是诱导肥胖小鼠常用的方法之一。本实验根据国际哺乳动物饲料标准配方给小鼠饲以高脂肪和高能量饲料,结果表明实验结束时肥胖组小鼠的平均体质量是正常对照组小鼠的 1.6 倍,平均体脂质量是对照组小鼠的 4.1 倍,而体长和尾长上没有明显的区别。这说明肥胖组小鼠体质量的增加与其体长和尾长没有关系,而是由于其体内脂肪的大量累积产生肥胖的结果。为验证所获得的肥胖小鼠体内是否出现了胰岛素抵抗,本研究进一步检测了小鼠血糖、血浆胰岛素浓度,并进行了葡萄糖耐量实验。结果表明与正常组相比,肥胖组小鼠血糖浓度高 1.9 倍,血

浆胰岛素浓度高 2.3 倍;肥胖组小鼠口服葡萄糖耐量实验 2 h 后,血糖未恢复至正常。因此,可以认为该肥胖小鼠体内已经出现了胰岛素抵抗。

3.2 抵抗素对小鼠骨骼肌葡萄糖摄取率的影响

体外研究表明抵抗素蛋白的表达可以导致脂肪细胞出现胰岛素抵抗,导致脂肪细胞的葡萄糖摄取率降低。为探讨在肥胖小鼠模型体内出现胰岛素抵抗是否与抵抗素的高表达有关,本研究测定了肥胖小鼠体内 Retn 基因的表达水平,然后分析了 Retn 基因的表达变化是否与该肥胖小鼠肌肉组织的葡萄糖摄取率的改变相关。结果发现,肥胖组小鼠脂肪组织内 Retn 基因的 mRNA 表达水平是对照组小鼠的 3.35 倍,而肥胖小鼠骨骼肌对葡萄糖的摄取率则显著地低于对照组。这表明 Retn 基因的过表达与肥胖小鼠骨骼肌对葡萄糖摄取率的降低有一定的相关性。

为了解抵抗素能否直接影响肌肉组织对葡萄糖的摄取,本研究利用抵抗素重组蛋白处理正常小鼠的骨骼肌组织,然后观察这些骨骼肌组织对葡萄糖的摄取率的变化。结果发现抵抗素重组蛋白与小鼠的骨骼肌共同孵育(30 min)导致小鼠骨骼肌细胞对葡萄糖摄取能力的显著下降。

综上所述,肥胖小鼠可能由于其 Retn 基因和抵抗素蛋白过表达,降低了骨骼肌组织对葡萄糖的摄取率,从而发生了胰岛素抵抗。

[参考文献]

- [1] Juan CC, Au LC, Fang VS, et al. Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289: 1328-1333.
- [2] Moore GB, Chapman H, Holder JC, et al. Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 286: 735-741.
- [3] Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, et al. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 25651-25653.
- [4] Muse ED, Obici S, Bhanot S, et al. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance[J]. J Clin Invest, 2004, 114: 232-239.
- [5] Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, et al. Regulation of fasted blood glucose by resistin[J]. Science, 2004, 303: 1195-1198.
- [6] 李雅慧,黎怀星,吴丹,等.建立高表达小鼠 Retn 基因的 3T3-L1 细胞系的研究[J].第二军医大学学报, 2004, 25: 892-894.
- [7] 王占科,胡新勇,许霖水,等. TNF- α 对严重烫伤小鼠骨骼肌摄取葡萄糖作用的研究[J].现代诊断与治疗, 2002, 13: 140-142.
- [8] Nagaev I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 285: 561-564.

[收稿日期] 2006-04-30

[修回日期] 2006-11-11

[本文编辑] 贾泽军