

在体外培养的人内脏脂肪组织中抵抗素诱导 脂肪分解并抑制脂联素分泌

陈能¹ 谭欣¹ 张子详² 徐加英³ 秦立强¹ 万忠晓^{1*}

(1. 苏州大学公共卫生学院营养与食品卫生学; 2. 苏州大学第一附属医院普通外科; 3. 苏州大学放射医学与防护学院)

摘要 背景: 抵抗素是由脂肪组织分泌的脂肪细胞因子之一。它可能通过与其他器官的交互作用或者影响脂肪组织本身的功能而在肥胖和胰岛素抵抗方面发挥作用。但目前就脂联素是否可以影响脂肪组织分解和脂联素分泌尚未阐明。**方法:** 我们从肠外科手术患者中选取 14 例成年男性分离获得其肠系膜脂肪组织。将肠系膜脂肪组织进行培养并给与不同的干预: 即抵抗素 (100ng/ml)、抵抗素 + H89 (1 μ M)、抵抗素 + P 培养基 D98059 (25 μ M)、抵抗素 + SB201290 (20 μ M), 并收集干预后 12、24hr 培养基。用 ELISA 法测定脂联素水平, 用蛋白印迹方法测定干预处理的蛋白表达。**结果:** 抵抗素诱导甘油 (3.62 \pm 0.57 vs. 5.30 \pm 1.11mmol/ml/g tissue, p <0.05) 和脂肪酸 (5.99 \pm 1.06 vs. 8.48 \pm 1.57 mmol/ml/g tissue, p <0.05) 分泌。PKA 和 PD98059 部分抑制由抵抗素诱导的甘油和脂肪酸的释放。蛋白印迹数据证实, 抵抗素可以诱导 HSL 在 serine563 位点、PKA 在 62kDa 及 ERK1/2 的磷酸化。抵抗素能够降低脂联素 (38.16 \pm 10.43 vs. 21.81 \pm 4.21ng/ml/g tissue, p <0.05) 分泌。**结论:** 此次研究结果提示, 抵抗素可能通过影响脂肪组织功能而在各种肥胖相关综合症中发挥重要作用。

关键词 脂肪分解; 脂联素; 脂肪组织; PKA; ERK1/2

1 引言

脂肪组织是重要的内分泌器官^[1,2]。抵抗素是脂肪组织分泌的脂肪因子之一, 它在肥胖和胰岛素抵抗方面发挥重要作用^[3]。在肥胖和胰岛素抵抗的动物模型中循环的抵抗素水平会上升^[4,5], 在体重减轻的时候则明显下降^[6]。脂联素还可能是导致系统炎症反应的主要原因之一^[7,8]。抵抗素能够抑制肝脏、骨骼肌中 AMPK 的磷酸化水平^[9-11]。而 AMPK 是公认的在能量代谢和平衡中发挥重要作用的丝氨酸苏氨酸激酶^[12]。

抵抗素也积极参与并影响脂肪组织本身的生理机能。脂肪细胞分化时抵抗素表达上调, 噻唑烷二酮类分子则降低抵抗素表

达^[13,14]。在 3T3-L1 脂肪细胞中, 抵抗素上调 TNF- α ^[15]、纤溶酶原激活物抑制剂-1 (PAI-1)^[16] 的表达。在 3T3-L1 脂肪细胞中, 通过 siRNA 抑制抵抗素将导致脂质生成被抑制, 而脂肪酸 β 氧化被激活。这表明, 在脂肪细胞成熟过程中, 抵抗素可能会影响到脂质的新陈代谢^[17]。

在供能不足条件下, 甘油三酯 (TG) 分解供能是脂肪组织的主要功能之一^[18,19]。在这种条件下, 儿茶酚胺结合到 β 肾上腺素受体上, 从而使腺苷酸环化酶活化, 导致细胞内的 cAMP 水平上升及 PKA 活化。活化的 PKA 磷酸化脂滴蛋白和 HSL, 从而促进 TG 的水解^[20,21]。ERK1/2 (胞外调节蛋白激酶 1/2) 是与脂类代谢有关的另一个重要的信

号分子^[22]。脂肪细胞中的脂类分解也可以被自分泌、旁分泌因子局部调节^[23,24]。但是目前并没有抵抗素影响脂肪组织甘油三酯分解的报道。因此此项研究的第一个目的是探讨抵抗素怎样影响脂肪组织甘油三酯分解。

脂联素是由脂肪组织分泌的最重要的脂肪因子之一^[25]，它具有提高胰岛素敏感性^[26]、抗炎^[27]、保护心肌^[27]等作用。脂联素在脂肪细胞新陈代谢的调节中也发挥着至关重要的作用^[28]。TNF- α ^[29]、内质网应激^[30]能够抑制脂联素的表达及其分泌。因此，此项研究的第二个目的是探讨抵抗素是否能够影响脂肪组织脂联素的分泌。

2 实验材料和方法

2.1 实验材料

重组人抵抗素购自 PeproTech China。人脂联素酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自 R&D system。细胞内信号分子的特异性抑制剂：SB202190、PD98059、H89 购自 Cayman Chemicals。Medium 199 购自 Life Technologies。甘油测定试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司。脂肪酸测定试剂盒购自 Wako。SDS-PAGE 试剂盒购自碧云天。Immobilon western 化学发光 HRP 底物购自 Millipore。抗 p-HSLser563、HSL、p-ERK1/2、ERK1/2、p-p38、p38、p-PKA、tubulin、beta-Actin 抗体购自 Cell Signaling。

2.2 脂肪组织培养

由 14 个进行外科手术的成年男性 (54 ± 6 yr, BMI 23.59 ± 0.44 kg/m²) 获得肠系膜脂肪组织。受试者被告知并同意后，我们才可获得实验样品。此项研究已经过苏州大学人类研究伦理委员会的批准。

对于甘油三酯分解实验，脂肪组织被切碎成每片 5~10mg，并于培养箱中培养过夜。第二天早上，更换新鲜的 M199，并分别给予以下处理：抵抗素 (100ng/ml)、抵抗素+H89 (1 μ M, PKA 的抑制剂)、抵抗素+PD98059 (25 μ M, ERK1/2 的抑制剂)、抵抗

素+SB202190 (20 μ M, p38 的抵抗剂)。在 12hr, 24hr 时分别取样，分析培养液中甘油和脂肪酸的含量。并用 ELISA 检测培养液中脂联素水平。

对于研究信号分子的实验，脂肪组织被切割成碎块培养过夜。第二天，更换新鲜的培养基，然后用抵抗素 (100ng/ml) 处理，并收集脂肪组织碎块用于蛋白印迹分析。

2.3 脂肪分解的测定

用试剂盒采用比色法测定培养基中脂肪酸和甘油的分泌水平。

2.4 蛋白印迹分析

将收集到好的脂肪组织进行裂解提取蛋白、定量并进行蛋白电泳，转膜、封闭、二抗孵育，最后加入化学发光 HRP 底物，于化学发光成像仪进行分析。

2.5 统计分析

所有结果以平均值 \pm 标准差表示。运用 t 检验法分析比较抵抗素对甘油、脂肪酸及脂联素分泌的影响；运动单因素方差分析比较抑制剂对抵抗素诱导的甘油和脂肪酸分泌的影响。 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 抵抗素诱导体外培养的人内脏脂肪组织细胞的脂肪分解

抵抗素显著诱导甘油分泌 (3.62 ± 0.57 vs. 5.30 ± 1.11 mmol/L/g 组织, 24hr)。同时，抵抗素能够显著诱导脂肪酸在 12hr 和 24hr 释放 (5.11 ± 0.56 vs. 6.32 ± 0.91 mmol/L/g tissue, 12hr; 5.99 ± 1.06 vs. 8.48 ± 1.57 mmol/L/g tissue, 24hr)。Western blotting 结果进一步表明抵抗素能够诱导脂肪组织 HSL 在丝氨酸 563 位点的磷酸化。

3.2 抵抗素通过 PKA 和 ERK1/2 信号通路诱导脂肪分解

H89 和 PD98059 能够抑制抵抗素诱导的甘油和脂肪酸释放，然而 SB202190 则无此作用。抵抗素诱导 PKA 和 ERK1/2 的磷酸

化, 而对 p38MAPK 的磷酸化无影响。我们对 p-PKA 在~62kDa 进行定量, 这个分子重量与脂滴蛋白非常相近。

3.3 在体外培养的人内脏脂肪组织中抵抗素抑制脂联素的分泌

通过 ELISA 检测, 在人内脏脂肪组织中, 抵抗素显著抑制了脂联素的分泌 (38.16 ± 10.43 vs. 21.81 ± 4.21 ng/mL/g tissue)。

4 讨论

人抵抗素主要由单核细胞释放^[25]。在肥胖和胰岛素抵抗的动物模型中脂联素水平会上升^[28,33], 在体重减轻的时候则明显下降^[32]。甘油三酯分解供能是脂肪组织的主要功能之一^[1], 但是长期慢性脂肪酸的上升将会导致胰岛素抵抗及其他代谢紊乱^[18]。我们目前的研究结果提示肥胖状况下升高的抵抗素分泌可能通过影响脂肪组织脂解途径而导致循环系统脂肪酸水平上升。

在儿茶酚胺类刺激的脂肪分解过程中, PKA 是一个关键的分子信号。我们现阶段的研究发现, 抵抗素可显著诱导 HSL 在丝氨酸 563 的磷酸化和 PKA 在~62kDa (即与脂滴包被蛋白的分子量相近) 的磷酸化。同时, H89, 大家熟知的 PKA 抑制剂^[10], 可部分抑制抵抗素诱导的甘油和 NEFA 的释放。因此, 在培养的人内脏脂肪组织中的, 抵抗素通过影响 PKA-HSL 活化信号通路来诱导脂肪分解。

ERK1/2 也参与了由 TNF- α 或脂多糖刺激的脂肪分解。在人的冠状动脉内皮细胞^[23]和大脑^[19]中, 抵抗素能够活化 ERK1/2。我们现阶段的研究提示抵抗素也能够诱导培养的人脂肪组织 ERK1/2 的磷酸化, 而且 ERK1/2 信号通路也参与了抵抗素诱导的脂肪分解。

我们现阶段的研究表明, 抵抗素抑制脂肪组织脂联素的分泌。这进一步提示抵抗素可能通过影响脂联素的分泌而在肥胖及其相

关综合症中发挥作用。然而, 这些假设需要利用抵抗素基因敲除小鼠或将抵抗素注入活体后, 来做进一步的阐述。我们的研究进一步证实脂肪因子间可以相互影响来改善脂肪组织功能。

总之, 我们发现, 在培养的人内脏脂肪组织中抵抗素通过刺激 PKA 和 ERK1/2 通路而抑制脂联素的分泌。抵抗素在脂肪分解应答时, 会加剧脂肪酸和甘油从脂肪细胞流向血浆, 这会导致脂毒性、血脂异常等; 同时抵抗素能够抑制脂联素分泌。

参考文献

- [1] Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. 2010; Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316: 129-39.
- [2] Wan Z, Mah D, Simtchouk S, Klegeris A, Little JP. 2014; Globular adiponectin induces a pro-inflammatory response in human astrocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 446: 37-42.
- [3] Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, Matalas AL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. 2003; Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1730-6.
- [4] Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ. 2005; Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* 111: 932-9.
- [5] Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gomez JM, Gutierrez C, Simon I, Soler J, Richart C. 2004; Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res* 12: 962-71.
- [6] Valsamakis G, McTernan PG, Chetty R, Al Daghri N, Field A, Hanif W, Bar-

nett AH, Kumar S. 2004; Modest weight loss and reduction in waist circumference after medical treatment are associated with favorable changes in serum adipocytokines. *Metabolism* 53: 430–4.

[7] Lehrke M, Reilly MP, Millington SC, Iqbal N, Rader DJ, Lazar MA. 2004; An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS Med* 1: e45.

[8] Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. 2005; Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 174: 5789–95.

[9] Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE, Stephan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. 2004; Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303: 1195–8.

[10] Qi Y, Nie Z, Lee YS, Singhal NS, Scherer PE, Lazar MA, Ahima RS. 2006; Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes* 55: 3083–90.

[11] Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM. 2004; Adenovirus-mediated chronic “hyper-resistinemia” leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J Clin Invest* 114: 224–31.

[12] Fullerton MD, Steinberg GR, Schertzer JD. 2013; Immunometabolism of AMPK in insulin resistance and atherosclerosis. *Mol Cell Endocrinol* 366: 224–34.

[13] Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. 2001; A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 276: 11252–6.

[14] Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. 1995; An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR

gamma) . *J Biol Chem* 270: 12953–6.

[15] Fernandez CM, del Arco A, Gallardo N, Aguado L, Rodriguez M, Ros M, Carrascosa JM, Andres A, Arribas C. 2010; S-resistin inhibits adipocyte differentiation and increases TNFalpha expression and secretion in 3T3-L1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1803: 1131–41.

[16] Ikeda Y, Tsuchiya H, Hama S, Kajimoto K, Kogure K. 2014; Resistin regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 448: 129–33.

[17] Ikeda Y, Tsuchiya H, Hama S, Kajimoto K, Kogure K. 2013; Resistin affects lipid metabolism during adipocyte maturation of 3T3-L1 cells. *FEBS J* 280: 5884–95.

[18] Wan Z, Thrush AB, Legare M, Frier BC, Sutherland LN, Williams DB, Wright DC. 2010; Epinephrine-mediated regulation of PDK4 mRNA in rat adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C1162–70.

[19] Ahmadian M, Duncan RE, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. 2007; Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future Lipidol* 2: 229–37.

[20] Tansey JT, Huml AM, Vogt R, Davis KE, Jones JM, Fraser KA, Brasaemle DL, Kimmel AR, Londos C. 2003; Functional studies on native and mutated forms of perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols. *J Biol Chem* 278: 8401–6.

[21] Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK, Wek SA, Moos MC, Jr., Londos C. 1992; Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8537–41.

[22] Greenberg AS, Shen WJ, Muliro K, Patel S, Souza SC, Roth RA, Kraemer FB. 2001; Stimulation of lipolysis and hormone

-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem* 276: 45456-61.

[23] Wedellova Z, Dietrich J, Siklova-Vitkova M, Kolostova K, Kovacikova M, Dus-kova M, Broz J, Vedral T, Stich V, Polak J. 2011; Adiponectin inhibits spontaneous and catecholamine-induced lipolysis in human adipocytes of non-obese subjects through AMPK-dependent mechanisms. *Physiol Res* 60: 139-48.

[24] Qiao L, Kinney B, Schaaek J, Shao J. 2011; Adiponectin inhibits lipolysis in mouse adipocytes. *Diabetes* 60: 1519-27.

[25] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. 1995; A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270: 26746-9.

[26] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. 2001; The fat-derived hormone adiponectin reverses

insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 7: 941-6.

[27] Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, Pedersen AA, Kalthoff C, Tullin S, Sams A, Summer R, Walsh K. 2010; Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J Biol Chem* 285: 6153-60.

[28] Asterholm IW, Scherer PE. 2010; Enhanced metabolic flexibility associated with elevated adiponectin levels. *Am J Pathol* 176: 1364-76.

[29] Chazenbalk G, Trivax BS, Yildiz BO, Bertolotto C, Mathur R, Heneidi S, Azziz R. 2010; Regulation of adiponectin secretion by adipocytes in the polycystic ovary syndrome; role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Endocrinol Metab* 95: 935-42.

[30] Mondal AK, Das SK, Varma V, Nolen GT, McGehee RE, Elbein SC, Wei JY, Ranganathan G. 2012; Effect of endoplasmic reticulum stress on inflammation and adiponectin regulation in human adipocytes. *Metab Syndr Relat Disord* 10: 297-306.