

文章编号 1006-8147(2015)06-0484-04

论 著

罗格列酮干预糖尿病大鼠脂肪组织 CMKLR1 及 Chemerin 基因表达

李冰¹, 冯凭²

(1.天津市儿童医院 ICU, 天津 300134; 2.天津医科大学总医院代谢病科, 天津 300052)

摘要 目的:通过检测罗格列酮干预后 CMKLR1 及 Chemerin 在自发性 2 型糖尿病大鼠脂肪组织中表达水平,探讨 Chemerin-CMKLR1 通路在肥胖、胰岛素抵抗及 2 型糖尿病发病机制中的作用。方法:4 周龄大鼠 30 只,经相关实验至 30 周证实造模成功 2 型糖尿病大鼠 20 只,再随机分为罗格列酮干预组和模型组各 10 只,进行相关实验室指标检测,以实时荧光定量法检测脂肪组织 CMKLR1 及 Chemerin 基因的表达水平。结果:罗格列酮干预后大鼠各实验室指标明显改善,干预组大鼠网膜组织 CMKLR1 的表达明显低于模型组($P<0.01$),干预后网膜及皮下脂肪组织中 Chemerin 的表达明显低于模型组($P<0.01$)。罗格列酮干预后网膜脂肪细胞平均最大直径明显缩小($P<0.01$),而皮下脂肪细胞平均最大直径无明显变化($P>0.05$)。结论:Chemerin-CMKLR1 通路成为治疗肥胖、胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的新靶点。

关键词 罗格列酮;糖尿病;大鼠;Chemerin-CMKLR1;基因表达

中图分类号 R587.1

文献标志码 A

Effect of rosiglitazone on the expression of CMKLR1 and Chemerin mRNA in the adipose tissue of diabetic rat

LI Bing¹, FENG Ping²

(1.Department of Intensive Care Unit, Tianjin Children Hospital, Tianjin 300134, China; 2.Department of Metabolism, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To investigate the expression of CMKLR1 and Chemerin mRNA in subcutaneous and visceral adipose tissue of rats and discuss the intervention of Chemerin-CMKLR1 to involve in the pathogenesis of obesity, insulin resistance and type 2 diabetes. **Methods:** Thirty male rats of 4 weeks were selected. Twenty rats were proved with diabetes through experimental methods after 30 weeks. Models were separated into rosiglitazone group and diabetes group with ten rats in each group. Experiment dates were detected. The mRNA levels of CMKLR1 and Chemerin in adipose tissue were detected by real-time PCR. **Results:** Experiments dates were improved after the intervention of rosiglitazone. The mRNA levels of CMKLR1 in visceral adipose tissue of rats in rosiglitazone group were lower than those in diabetes group ($P<0.01$). The mRNA levels of Chemerin of subcutaneous and visceral adipose tissue of rats in rosiglitazone group were lower than those in diabetes group ($P<0.01$). Maximum diameter in visceral adipocyte in rosiglitazone group decreased compared with that in diabetes group ($P<0.01$). Maximum diameter was no difference in subcutaneous tissue between two groups ($P>0.05$). **Conclusion:** The intervention of the expression of CMKLR1 and Chemerin mRNA become new treatment target of obesity and insulin resistance and type 2 diabetes by rosiglitazone.

Key words rosiglitazone; diabetes; rat; Chemerin-CMKLR1; gene expression

Owman 等^[1]从人 B 淋巴细胞 cDNA 文库中鉴定出一个新 cDNA 序列,其编码蛋白质与 G 蛋白耦联受体 (GPCRs) 家族高度同源,命名为 CMKLR1 (chemokine-like receptor 1)。Chemerin 作用于受体 CMKLR1,此信号通路经旁分泌途径作用于中性粒细胞、单核巨噬细胞和未成熟的树突状细胞等炎症细胞,对脂肪组织及脂质代谢产生一系列影响。多项研究也提示 Chemerin-CMKLR1 系统有趋化抗原呈递细胞 (APC) 和 NK 细胞等在炎症或损伤组织聚集的作用^[2],对脂肪组织及脂质代谢产生一系列影

响。本研究以自发性 2 型糖尿病大鼠为研究对象,旨在观察罗格列酮对 Chemerin-CMKLR1 系统基因表达水平的影响,从而研究其在脂肪细胞中的调节作用,进而探讨其在肥胖、胰岛素抵抗和 2 型糖尿病发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型建立 30 只 4 周龄大鼠定期行口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT)。实验前隔夜禁食 15 h、不禁水,按 2 g/kg 予 30% 葡萄糖溶液灌胃。于空腹及糖负荷后 30、60、90、120 min 取血,监测血糖峰值 >16.7 mmol/L 和负荷后 120 min 血糖 >11.1 mmol/L 诊为糖尿病,具备

作者简介 李冰 (1983-),女,医师,硕士,研究方向:儿内科学;通信作者:冯凭, E-mail: duaiyong@sina.cn。

上述1条者为糖耐量减低^[9],至30周时证实造模成功的OLETF大鼠20只,再随机分为干预组和糖尿病模型组各10只。干预组从30周龄起以罗格列酮3 mg/(kg·d)灌胃,干预前后每4周行1次OGTT,糖尿病组给同体积的蒸馏水灌胃,喂养至42周龄时分别行OGTT、胰岛素释放试验(insulin release test, INS)和高胰岛素-正葡萄糖钳夹试验(hyperinsulinaemic-euglycaemic clamp),并留取脂肪组织标本。

1.2 主要试剂与仪器 焦碳酸二乙酯;Trizol试剂;DNA凝胶回收试剂盒;逆转录试剂盒;Taq耐热DNA聚合酶;PCR试剂盒;SYBR® Green试剂盒;胰岛素放免试剂盒。SORVALL LEGEND RT台式高速冷冻离心机及SORVALL pico台式高速离心机;PCR扩增仪;DNA Thermal Cycler 480扩增仪;PTC-200梯度PCR仪;DH-2000凝胶图像采集分析系统;紫外透射仪;BioPhotometer分光光度计;实时荧光定量PCR仪;电泳仪;全自动生化分析仪。

1.3 标本采集 术前禁食14 h,2%的戊巴比妥钠(40 mg/kg体质量)腹腔麻醉,取血,离心取血清,密封-70℃冻存。42周处死大鼠,开腹分别取网膜及皮下脂肪组织,液氮冻存备用;取部分新鲜网膜脂肪和皮下脂肪组织(0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm),浸泡于10%中性甲醛中固定,石蜡包埋,切片(6 μm),水化,漂洗,封闭,HE染色,光镜观察。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 OGTT及INS OGTT如1.1,42周OGTT时,同步目内眦取血,测定胰岛素。胰岛素测定采用专人同批的放免法。胰岛素、血糖曲线下面积计算(AUC):采用近似梯形的计算公式,0~120 min血糖(胰岛素)AUC=1/2 (0 min值+120 min值)+30 min值+60 min值+90 min值。

1.4.2 高胰岛素正葡萄糖钳夹实验 大鼠隔夜禁食不禁水,称重后以2%戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉,先恒定输注短效猪胰岛素[输注速率为8 mU/(kg·min),临用时胰岛素用0.5%牛血清白蛋白稀释],再输注浓度为20%葡萄糖,调整葡萄糖输注速度(即葡萄糖输注率,GIR),使血糖值控制在基础值±0.5 mmol/L的范围左右,直至达到稳定状态,将钳夹的处于稳态的3个GIR值求平均值。

1.4.3 脂肪组织Chemerin及CMKLR1的基因表达测定 Chemerin的引物序列为sense:5'-GGAGATCGGTGTGGACAGTG-3',anti-sense:5'-GGGTCCAGTTTATGTCAGG-3',产物大小为174 bp;CMKLR1的引物序列为sense:5'-CATCGTCTTCAAGTTGCAGC-3',anti-sense:5'-AGCAGGTAGAGTGTGTGGTAG

G-3',产物大小为174 bp;GAPDH的引物序列为sense:5'-ACAGCAACTCCCATTCTT-3',anti-sense:5'-TCCAGGGTTTCTTACTCC-3',产物大小为160 bp。按照Trizol说明书操作提取脂肪组织总RNA,用260/280 nm吸光度值测定RNA浓度和纯度,置-80℃冰箱备用。按照说明书操作加样cDNA第一链合成(反应体系25 μL,65℃反应5 min,37℃反应2 min,37℃反应50 min,70℃15 min终止反应)。基因测序结果证实PCR扩增产物的片段为目的基因片段。SYBR GREEN实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),采用宝生物公司的SYBR Green PCR试剂盒,反应体系为20 μL(循环参数94℃预变性20 s;94℃10 s,58℃10 s,72℃10 s,进行45个循环。温度变化速度为20℃/s,在每个循环的延伸末检测荧光信号。缓慢升温的程序:95℃0 s,65℃15 s,95℃0 s,温度变化速度为0.1℃/s)。

1.5 统计学方法 采用SPSS16.0统计软件处理实验数据,所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,服从正态分布的两组间均数比较用配对 t 检验,相关性用One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test分析,非正态分布的数据经数据转换为正态后进行统计。

2 结果

2.1 实验动物一般情况 实验期间取血及意外死亡动物:模型组大鼠1只,干预组大鼠2只。

2.2 30周至42周OGTT及INS 实验过程发现模型组血糖逐渐升高,干预组自38周起血糖逐渐下降,模型组血糖AUC逐渐上升,干预组AUC自38周起逐渐下降,实验结束时,干预组AUC低于模型组($P<0.01$)(表1)。42周时干预组各时点胰岛素水平变化明显,胰岛素曲线下面积增加($P<0.05$),胰岛素分泌指数明显上调($P<0.01$)(表2)。

表1 30~42周OGTT各时点血糖(mmol/L)及AUC[mmol/(min·L)]变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The plasma glucose levels and AUC during OGTT at 42th week in various groups($\bar{x}\pm s$)

| 分组 | 0 min | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min | AUC of Glu |
|-------|---------|----------|----------|----------|----------|------------|
| 模型组 | | | | | | |
| 30周 | 6.3±0.7 | 17.3±3.3 | 16.4±2.9 | 14.9±2.1 | 11.5±1.9 | 57.9±7.6 |
| (n=9) | | | | | | |
| 34周 | 6.9±0.5 | 19.1±3.3 | 18.3±4.1 | 16.5±2.8 | 13.2±2.8 | 63.6±9.1 |
| 38周 | 7.2±0.8 | 20.2±5.9 | 18.6±4.3 | 17.3±3.3 | 13.3±2.7 | 66.9±7.4 |
| 42周 | 7.6±0.3 | 21.1±4.4 | 22.3±3.7 | 19.5±2.1 | 16.2±3.8 | 78.2±11.9 |
| 干预组 | | | | | | |
| 30周 | 6.5±0.7 | 17.6±2.4 | 16.2±3.9 | 15.1±2.9 | 12.8±1.9 | 58.1±6.3 |
| (n=8) | | | | | | |
| 34周 | 6.4±0.5 | 18.1±3.1 | 16.6±2.8 | 14.9±1.9 | 13.1±0.9 | 60.3±8.5* |
| 38周 | 6.3±0.4 | 17.3±3.3 | 16.3±2.8 | 14.6±3.4 | 13.7±2.2 | 57.1±9.2** |
| 42周 | 6.1±0.6 | 16.5±2.9 | 14.8±1.9 | 12.9±2.9 | 11.9±2.1 | 51.8±8.8** |

AUC同周龄比较,与模型组比较 ** $P<0.01$,* $P<0.05$

表 2 42 周 OGTT 各时点胰岛素 (ng/mL)、AUC[ng/(min·mL)] 及胰岛素分泌指数 ($\Delta I_{30}/\Delta G_{30}$)(ng/mmol)变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The insulin levels and AUC OGTT and insulin secretion index at 42th week in various groups($\bar{x}\pm s$)

| 分组 | n | 0 min | 30 min | 60 min | 90 min |
|-----|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 模型组 | 9 | 2.29±0.46 | 3.77±0.69 | 4.57±1.21 | 4.33±0.84 |
| 干预组 | 8 | 2.03±0.87 | 4.67±1.62 | 5.22±0.77 | 4.51±1.51 |

| 分组 | n | 120 min | AUC of Ins | $\Delta I_{30}/\Delta G_{30}$ |
|-----|---|-----------|-------------|-------------------------------|
| 模型组 | 9 | 3.09±1.11 | 15.21±2.21 | 98.6±16.9 |
| 干预组 | 8 | 3.02±0.79 | 17.95±2.57* | 264.1±47.7** |

$\Delta I_{30}/\Delta G_{30}$: 30 min 胰岛素增加值与血糖增加值的比值,与模型组比较,** $P<0.01$;AUC 与模型组比较 * $P<0.05$

2.3 高胰岛素正葡萄糖钳夹实验 干预组 GIR 较模型组升高 ($P<0.01$)[(17.67±4.24)mg/(kg·min)vs (8.85±2.76)mg/(kg·min)]。

2.4 两组脂肪组织 Chemerin 基因表达水平 干预组网膜及皮下脂肪组织中 Chemerin 的表达明显低于模型组($P<0.01$),模型组网膜脂肪 Chemerin 的表达高于皮下脂肪($P<0.01$)(表 3)。

表 3 两组脂肪组织 Chemerin 表达水平($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 mRNA expression of Chemerin in the subcutaneous and visceral adipose tissues($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | 模型组 | 干预组 | t |
|------|---|---------------------------|---------------|--------|
| 网膜脂肪 | 9 | 2.881±0.635 | 1.070±0.558** | -8.591 |
| 皮下脂肪 | 8 | 1.504±0.882 ^{##} | 0.887±0.451** | -3.146 |

与模型组比较 ** $P<0.01$,网膜脂肪与皮下脂肪比较 ^{##} $P<0.01$

2.5 两组脂肪组织 CMKLR1 基因表达水平 干预组网膜组织 CMKLR1 的表达明显低于模型组($P<0.01$),模型组网膜脂肪 CMKLR1 的表达高于皮下脂肪($P<0.05$)(表 4)。

表 4 两组脂肪组织 CMKLR1 表达水平($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 mRNA expression of CMKLR1 in the subcutaneous and visceral adipose tissues($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | 模型组 | 干预组 | t |
|------|---|--------------------------|---------------|---------|
| 网膜脂肪 | 9 | 0.301±0.022 | 0.239±0.035** | -2.753 |
| 皮下脂肪 | 8 | 0.158±0.141 [#] | 0.142±0.102 | -11.563 |

与模型组比较 ** $P<0.01$,网膜脂肪与皮下脂肪比较 [#] $P<0.05$

2.6 两组大鼠网膜及皮下脂肪细胞形态学变化 在同一视野下照相,采用 Image-Pro Plus Vol.6.0 计算单位视野脂肪细胞的平均最大直径相对值,标尺 1:50。罗格列酮干预后网膜脂肪细胞平均最大直径 49.11±1.414 小于模型组平均最大直径 55.95±

2.081($P<0.01$),而皮下脂肪细胞平均最大直径无统计学差异。

3 讨论

肥胖、胰岛素抵抗及 2 型糖尿病等病理改变伴有慢性低度炎症反应,多种脂肪因子参与这种慢性炎症的过程,有证据表明脂肪源性的信号分子的分泌和体内炎症反应导致以上疾病的发生^[4]。Bozaoglu 等^[5]研究饮食诱导 Psammomys obesus 鼠脂肪组织及 Ernst^[6]研究肥胖 ob/ob 鼠血浆均发现 Chemerin 水平升高,Roh 等^[7]亦发现高脂喂养 c57bl/6j 小鼠的皮下、附睾、肠系膜、肾周脂肪 CMKLR1 及 Chemerin 表达高于普通饲料喂养小鼠,而关于自发性 2 型糖尿病鼠中 CMKLR1 及 Chemerin 表达的探讨,目前报道资料尚少。本研究所用的 OLETF 大鼠是已证实的理想的胰岛素抵抗和 2 型糖尿病模型,其各不同阶段的病理生理变化与临床 2 型糖尿病患者的病理表现极为相似^[8]。此实验证实干预组自 38 周至第 42 周大鼠血糖 AUC 明显低于模型组,第 42 周时胰岛素分泌及曲线下面积高于模型组,干预组胰岛素分泌指数明显上调,与 Lee 等^[9],Han 等^[10]的研究结果相一致。

本研究发现模型组大鼠网膜脂肪组织中 CMKLR1 及 Chemerin 表达水平高于皮下脂肪组织,说明网膜脂肪是体内 CMKLR1 及 Chemerin 的主要产生组织,由于 Chemerin 本身是趋化因子^[11],募集表达有 CMKLR1 的单核巨噬细胞和树突状细胞,向炎症反应部位聚集,经 Chemerin-CMKLR1 相互作用实现对局部免疫炎症反应^[12],同时释放肿瘤细胞坏死因子- α 、IL-6、IL-1 β 等炎症因子^[13],这些炎症因子能够加速脂肪细胞的脂解,促使游离脂肪酸从细胞溢出,从而参与肥胖及胰岛素抵抗的发生,故本研究也证实网膜脂肪在 2 型糖尿病的发生、发展中起重要作用,与 Goralski 等^[4]研究 ob/ob 小鼠(喂养 11 周)内脏及皮下脂肪组织,发现瘦鼠与肥胖鼠 Chemerin 表达无差异的结果不同。Esteghamati 等^[14]在吡格列酮及二甲双胍治疗 2 型糖尿病患者的研究中,证明减少血浆 Chemerin 水平可以改善胰岛素抵抗及高血糖。本实验发现 PPAR- γ 激动剂罗格列酮干预后能够抑制网膜脂肪组织 Chemerin 及 CMKLR1 的表达水平,使网膜脂肪细胞直径明显减少($P<0.01$),但皮下脂肪细胞直径无明显变化,表明网膜脂肪组织成为罗格列酮抑制两基因表达的主要组织,PPAR- γ 是促进前脂肪细胞分化所必需的(尤 PPAR- γ 2 在脂肪细胞特异性表达),对脂肪细

胞分化起正向调节作用,增加网膜内小脂肪细胞的数量,促进网膜脂肪向皮下脂肪分化,说明 PPAR- γ 与两基因表达有关,可能是罗格列酮与核因子 NF- γ kB 共用许多辅助因子,而在糖尿病的病理生理改变下,经 Chemerin-CMKLR1 通路的刺激,使 PPAR- γ 的活性受抑制,故 PPAR- γ 激动剂在解除糖毒性和脂毒性的前提下,使 Chemerin 及 CMKLR1 的致肥胖、胰岛素抵抗的作用减弱,并增强脂肪细胞的胰岛素敏感性,故 Chemerin 与 CMKLR1 mRNA 的表达可能受到脂肪细胞分化相关性转录因子(PPAR- γ)的调控^[7],从而达到改善并治疗胰岛素抵抗、2 型糖尿病的作用。

综上,Chemerin 既是脂肪细胞因子,又是趋化因子,通过自分泌途径作用于 CMKLR1,且通过旁分泌途径作用于中性粒细胞、单核巨噬细胞和未成熟的树突状细胞等炎症细胞。Chemerin-CMKLR1 信号通路 with PPAR- γ 激动剂相互作用关系的研究尚处于初始阶段,因此需要进一步研究此信号通路及药物作用位点,使其在肥胖、胰岛素抵抗及糖尿病相关的炎症反应中发挥重要作用^[15],为药物治疗的新靶点提供依据和途径。

参考文献:

- [1] Owman C, Nilsson C, Lolait S J. Cloning of cDNA encoding a putative chemoattractant receptor[J]. *Genomics*, 1996,37(2):187
- [2] Zabel B A, Allen S J, Kulig P, et al. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades [J]. *J Biol Chem*, 2005,280(41):34661
- [3] Mori S, Kawano K, Hirashima T, et al. Relationships between diet control and the development of spontaneous type II diabetes and diabetic nephropathy in OLETF rats[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 1996, 33(3):145
- [4] Goralski K B, McCarthy T C, Hanniman E A, et al. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism[J]. *J Biol Chem*, 2007,282(38):28175
- [5] Bozaoglu K, Bolton K, Mcmillan J, et al. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome [J]. *Endocrinology*, 2007,148(10):4687
- [6] Ernst M C, Issa M, Goralski K B, et al. Chemerin exacerbates glucose intolerance in mouse models of obesity and diabetes [J]. *Endocrinology*, 2010,151(5):1998
- [7] Roh S G, Song S H, Choi K C, et al. Chemerin—a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007,362(4):1013
- [8] Yoshikawa H, Kihara Y, Taguchi M, et al. Role of TGF- β 1 in the development of pancreatic fibrosis in Otsuka Long -Evans Tokushima Fatty rats[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282(3):G549
- [9] Lee D H, Park D B, Lee Y K, et al. The effects of thiazolidinedione treatment on the regulations of aquaglyceroporins and glycerol kinase in OLETF rats[J]. *Metabolism*, 2005,54(10):1282
- [10] Han S J, Kang E S, Hur K Y, et al. Rosiglitazone inhibits early stage of glucolipotoxicity-induced β -cell apoptosis[J]. *Horm Res*, 2008, 70 (3):165
- [11] Wittamer V, Grégoire F, Robberecht P, et al. The C-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency[J]. *J Biol Chem*, 2004,279(11):9956
- [12] Zabel B A, Silverio A M, Butcher E C. Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood[J]. *J Immunol*, 2005, 174(1):244
- [13] Hao F, Mu J W, Zhang H J, et al. Damage to vascular endothelial cells by high insulin levels is associated with increased expression of ChemR23, and attenuated by PPAR- γ agonist, rosiglitazone [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2015,36(1):
- [14] Esteghamati A, Ghasemiesfe M, Mousavizadeh M, et al. Pioglitazone and metformin are equally effective in reduction of chemerin in patients with type 2 diabetes[J]. *J Diabetes Investig*, 2014,5(3):327
- [15] Lefterova M I, Lazar M A. New developments in adipogenesis [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2009,20(3):107

(2015-03-20 收稿)