

过氧化物酶体增植物激活受体- α 激动剂对高脂 喂养大鼠脂肪因子表达的影响

李 焱[#], 黄 滨, 程 桦, 梁 真, 刘珊英

(中山大学 附属第二医院内分泌科, 广州 510120)

摘要: **目的** 探讨过氧化物酶体增植物激活受体- α (PPAR- α) 激动剂非诺贝特对高脂饮食诱导的肥胖 SD 大鼠胰岛素敏感性和部分脂肪因子表达的影响。**方法** 随机将大鼠分为 3 组 ($n = 10$): 高脂饮食喂养加非诺贝特治疗组 (简称治疗组)、高脂饮食喂养组 (简称高脂组) 和标准饮食对照组 (简称对照组)。高脂饮食喂养 SD 大鼠 6 周后, 以非诺贝特 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃治疗 4 周, 以 RT-PCR 法半定量测定脂肪组织部分脂肪因子 [肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)、血管紧张素原 (AGT)、血管紧张素 II 型受体 (AT1R) 及脂联素] mRNA 的表达, 同时检测血游离脂肪酸 (FFA)、甘油三酯 (TG), 并用稳态模式评估法 (HOMA) 评价胰岛素抵抗 (IR) 指数。**结果** 非诺贝特治疗 4 周后, 高脂组、治疗组、对照组的血 FFA 分别为 (2.37 ± 0.60) 、 (1.59 ± 0.30) 、 $(1.33 \pm 0.34) \text{ mmol/L}$, TG 分别为 (0.48 ± 0.11) 、 (0.30 ± 0.04) 、 $(0.36 \pm 0.07) \text{ mmol/L}$, HOMA-IR 指数分别为 12.30 ± 3.97 、 5.03 ± 1.88 、 4.17 ± 1.27 ; 脂肪组织 TNF- α 的 mRNA 半定量值分别为 1.726 ± 1.408 、 0.713 ± 0.711 、 0.593 ± 0.382 , 脂联素分别为 0.660 ± 0.192 、 0.949 ± 0.35 、 0.936 ± 0.130 ; 上述各指标治疗组与高脂组比较差异均有显著性 ($P < 0.05$), 治疗组与对照组比较差异均无显著性 ($P > 0.05$); 3 组间的 AGT、AT1R 和 IL-6 的 mRNA 表达差异均无显著性 ($P > 0.05$)。**结论** PPAR- α 激动剂非诺贝特具有改善高脂饮食诱导的脂质异常、提高胰岛素敏感性以及调节脂肪因子表达的作用。

关键词: 过氧化物酶体增植物激活受体- α ; 激动剂; 脂肪因子; 游离脂肪酸; 胰岛素抵抗

中图分类号: R589.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2006)06-0761-05

Effect of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Agonist on Adipokines Expression in Rats Fed with High-fat Diet

LI Yan[#], HUANG Bin, CHENG Hua, LIANG Zhen, LIU Shan-ying

(Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effect of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) agonist fenofibrate on adipokines expression in high-fat diet fed SD rats and its relationship to insulin resistance (IR). **Methods** Rats were randomized into three groups ($n = 10$): HD group, fed with high-fat diet; HDF group, fed with high fat diet and treated with fenofibrate; and control group, fed with normal diet. Animals were sacrificed after 4-week follow-up. Plasma lipids, fasting plasma insulin, free fatty acids (FFA), and insulin sensitivity were detected. Reverse transcription-polymerase chain reaction was used to semi-quantitatively determine the mRNA expression of adipokines including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), angiotensinogen (AGT), angiotensin II type 1 receptor (AT1R), and adiponectin in brown fat. **Results** The plasma level of FFA, TG, and homeostatic model approach-IR index were (2.37 ± 0.60) vs (1.59 ± 0.30) vs $(1.33 \pm 0.34) \text{ mmol/L}$, (0.48 ± 0.11) vs (0.30 ± 0.04) vs $(0.36 \pm 0.07) \text{ mmol/L}$, and 12.30 ± 3.97 vs 5.03 ± 1.88 vs 4.17 ± 1.27 in the HD group, HDF group, and control

[#] Corresponding author Tel: 020-81332286, E-mail: liyan19642002@yahoo.com

group after 4 weeks of treatment with fenofibrate, respectively. The mRNA expressions of TNF- α and adiponectin were 1.726 ± 1.408 vs 0.713 ± 0.711 vs 0.593 ± 0.382 and 0.660 ± 0.192 vs 0.949 ± 0.35 vs 0.936 ± 0.130 in these three groups, which showed significant difference between HD group and HDF group ($P < 0.05$), while no significant difference between HDF group and control group ($P > 0.05$). The mRNA expressions of AGT, AT1R, and IL-6 had no significant difference among these three groups ($P > 0.05$). **Conclusion** PPAR- α agonist fenofibrate may reverse high-fat diet induced lipid abnormalities, improve insulin sensitivity, and regulate the mRNA expressions of TNF- α and adiponectin in adipose tissues.

Key words: peroxisome proliferator-activated receptor- α ; agonist; adipokines; free fatty acid; insulin resistance

Acta Acad Med Sin, 2006, 28(6):761–765

代谢综合征的基础是肥胖以及相关的胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)、血游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 升高, 脂肪组织炎症因子分泌增多 (“肥胖炎”) 是胰岛素抵抗发生的重要因素^[1]。过氧化物酶体增殖物激活受体- α (peroxisome proliferator-activated receptor- α , PPAR- α) 激动剂非诺贝特具有降低血 FFA 和 TG 浓度、改善胰岛素抵抗的作用。近年研究显示, 非诺贝特具有调节脂肪组织炎症因子分泌的作用, 可能也是其改善胰岛素抵抗的重要机制^[2]。本研究观察非诺贝特对高脂饮食喂养大鼠的血脂及胰岛素敏感性的影响, 以及脂肪组织肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、血管紧张素原 (angiotensinogen, AGT)、血管紧张素 II 1 型受体 (angiotensin II type 1 receptor, AT1R) 及脂联素 mRNA 水平的变化, 探讨非诺贝特改善胰岛素抵抗的可能机制。

材料和方法

实验动物及分组 8 周龄雄性 SD 大鼠 30 只, 购自广州市岭南科研动物养殖场, 体重 200 g 左右。适应性喂养 1 周后随机分为高脂饮食喂养加非诺贝特治疗组 (简称治疗组)、高脂饮食喂养组 (简称高脂组) 和标准饮食对照组 (简称对照组), 每组 10 只。标准大鼠饲料购自广东省实验动物中心, 脂肪含量 44.3 g/kg, 脂肪供能 9.9%。高脂饲料以标准大鼠饲料按 20% (Wt/Wt) 比例添加猪油配制而成, 脂肪含量 235 g/kg, 脂肪供能 45.05%。

实验设计 高脂组和治疗组给予高脂饲料, 对照组给予标准大鼠饲料喂养 6 周后, 治疗组动物予微粒化非诺贝特 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃 4 周; 高脂组 and 对照组以生理盐水 $5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃作对

照。于实验开始及第 6、10 周末分别称重 (g), 股静脉取血测量空腹血糖后分离血清, -20°C 保存。测定血脂, 包括总胆固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、TG (本院检验科生化分析室); FFA (酶化学法, 试剂购自英国 Randox 公司); 胰岛素 (放射免疫法, 试剂购自美国 Linco research inc.)。根据空腹血糖、空腹胰岛素浓度按稳态模式法 (homeostatic model approach, HOMA) 计算 IR 指数 (HOMA-IR)。

脂肪组织取材 非诺贝特治疗 4 周后, 麻醉大鼠, 取大鼠附睾脂肪垫脂肪组织 (100 mg 左右) 置于 2 ml 冻存管中, 迅速放入液氮中冷冻, 转至 -80°C 冰箱中待测。

脂肪因子 mRNA 水平检测 采用 RT-PCR 半定量技术, 以 β -actin 为内参照。

引物设计: 从 Pubmed 中检索出大鼠 TNF- α 、脂联素等基因的 cDNA 序列, 采用 Primer 5.0 软件设计引物。TNF- α 引物序列: 上游 5'-CCAACAAGGAG-GAGAAGTTCC-3', 下游 5'-TGGGAGTAGATAAGGTACAGCC-3', 扩增产物为 249 bp; 对应的 β -actin 引物序列: 上游 5'-CTATCGGCAATGAGCGGTTC-3', 下游 5'-CTTAGGAGTTGGGGTGGCT-3', 扩增产物为 734 bp。IL-6 引物序列: 上游 5'-AACGAAAGTCAACTCCATCTGC-3', 下游 5'-CACAAACTCCAGGTAGAAACGG-3', 扩增产物为 418 bp; 对应的 β -actin 引物序列: 上游 5'-TGTCGTACCACTGGCATTGTG-3', 下游 5'-TGA-CCT-GACCGTCAGGCATCTC-3', 扩增产物为 308 bp。脂联素引物序列: 上游 5'-ATCACTCAGCATTTCAGCGTAGG-3', 下游 5'-ATACACTTGGAGCCAGACTTGG-3', 扩增产物为 317 bp; 对应的 β -actin 引物序列与 IL-6 相同。AGT 引物序列: 上游 5'-ACCCCTTTCATCTCCTCTACT-3'

'，下游 5'-GGGTGTCTGGCTGCTGCTTCC-3'，扩增产物为 488 bp；对应的 β-actin 引物序列：上游 5'-CTATCG-GCAATGAGCGGTTTC-3'，下游 5'-CTTAGGAGTT-GGGGGTGGCT-3'，扩增产物为 734 bp。AT1R 引物序列：上游 5'-TGTTTTATGGCTTTCTGGGG-3'，下游 5'-CAGTGGCTTTGCTCCAATTT-3'，扩增产物为 418 bp；对应的 β-actin 引物序列与 AGT 相同。

RNA 提取：采用 Trizol 试剂盒（Invitrogen 公司）提取总 RNA。

逆转录反应：反应体系中含总 RNA 1 μg，5 × 逆转录缓冲液 5 μl，dNTP（TaKaRa 公司，各 10 mmol/L）5 μl，随机引物（TaKaRa 公司）2 μl，RNA 酶抑制剂（TaKaRa 公司）25 U，MMLV（Promega 公司）200 U，加灭菌无 RNA 酶水至总体积 25 μl。反应混合物置 Biometra（T_{GRADIENT}）热循环仪中以 37℃ 反应 1 h，再 95℃ 5 min 灭活 MMLV，产物用于 PCR。

PCR 反应条件：反应体系含逆转录产物 5 μl，10 × PCR 缓冲液 5 μl，MgCl₂（23 mmol/L）3 μl，dNTP（各 2.5 mmol/L）4 μl，上、下游引物（20 μmol/L，博亚生物工程有限公司合成）各 1 μl，β-actin 上、下游引物（20 μmol/L）各 1 μl，Taq 酶（TaKaRa 公司）2 U，加灭菌纯水至 50 μl，置 Biometra（T_{GRADIENT}）热循环仪中反应。TNF-α、AGT、AT1R 与相应 β-actin 反应参数：95℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 1 min，57℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 1.5 min，共进行 33 个循环，最后 1 个循环结束后以 72℃ 再延伸 10 min。IL-6 和脂联素与各自相应 β-actin 反应参数：95℃ 预变性 5 min，加入 Taq 酶，94℃ 变性 1 min，60℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 1.5 min，共进行

35 个循环，末次循环后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物进行测序（上海博亚生物有限公司），然后与基因库的对应基因核对，确定扩增产物为目标基因。

PCR 产物的半定量：PCR 产物 5 μl 置 2% 琼脂糖凝胶以 5V/cm 电泳（样品预先加入 SYBR Green I 染料）后照相，用 AlphaImager 2200 软件对电泳条带进行密度扫描，以面积 × 密度表示条带的丰度，以目标基因/β-actin 比值代表目标 mRNA 的量。以上实验均在同等条件下重复 3 次。

统计学处理 结果数据经正态分布和方差齐性检验后以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析并进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

结 果

高脂喂养对 FFA、血脂和 HOMA-IR 的影响 基础状态下 3 组大鼠体重、空腹血糖（fasting blood glucose, FBG）、空腹胰岛素（fasting blood insulin, FINS）、血脂（包括 TC、HDL-C、LDL-C、TG 和 FFA）和 HOMA-IR 差异均无显著性（表 1）。高脂喂养 6 周后，治疗组和高脂组体重、FBG、FINS、TC、TG、FFA 和 HOMA-IR 均显著高于对照组（ $P < 0.05$ ）；3 组间 HDL-C 和 LDL-C 差异无显著性（表 2）。

非诺贝特对 FFA、血脂和 HOMA-IR 的影响 非诺贝特治疗 4 周后，即第 10 周末，治疗组的体重、FBG、FINS 和 HOMA-IR，以及 FFA、TG、TC 和 LDL-C 均较高脂组下降（ $P < 0.05$ ），治疗组和对照组间上述指标差异无显著性（ $P > 0.05$ ）；3 组间 HDL-C 差异无显著性（ $P > 0.05$ ）（表 3）。

表 1 SD 大鼠基础状态生化指标检测结果
Table 1 Results of basic levels of biochemical indicator in SD rats of three groups (n = 10)

Index	HDF		HD		ND	
Wt(g)	215.50	± 11.41	218.00	± 13.98	211.50	± 14.15
FBG (mmol/L)	4.51	± 0.52	4.54	± 0.40	4.65	± 0.46
FINS (mmol/L)	0.0041	± 7.52	0.0043	± 5.3	0.0041	± 7.6
TC (mmol/L)	0.99	± 0.11	0.97	± 0.15	1.02	± 0.17
HDL-C (mmol/L)	0.0054	± 5.6	0.0056	± 6.8	0.0059	± 6.4
TG (mmol/L)	0.00301	± 6.9	0.36	± 0.14	0.38	± 0.13
LDL-C (mmol/L)	0.0024	± 6.9	0.0022	± 8.4	0.0021	± 8.0
FFA (mmol/L)	0.884	± 0.28	1.0	± 0.25	0.80	± 0.25
HOMR-IR	2.04	± 0.34	2.14	± 0.326	2.05	± 0.423

HDF: high-fat diet plus fenofibrate group; HD: high-fat diet group; ND: normal diet control group; Wt: body weight; FBG: fasting blood glucose; FINS: fasting blood insulin; TC: total cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; TG: triglyceride; FFA: free fatty acids; HOMA-IR: homeostatic model approach-insulin resistance

表 2 SD 大鼠高脂喂养 6 周后各组间生化指标检测结果

Table 2 Biochemical indicators among three groups after 6 weeks of high fat diet (n = 10)

Index	HDF	HD	ND
Wt(g)	289.40 ± 42.59 *	310.9 ± 35.00 *	263.8 ± 44.64
FBG (mmol/L)	5.87 ± 0.75 *	5.89 ± 0.74 *	5.03 ± 0.78
FINS (mmol/L)	1.28 ± 0.37 *	1.21 ± 0.31 *	0.59 ± 0.17
TC (mmol/L)	1.12 ± 0.15 *	1.12 ± 0.19 *	0.90 ± 0.24
HDL-C (mmol/L)	0.0049 ± 4.4	0.0050 ± 2.6	0.0046 ± 8.2
TG (mmol/L)	0.48 ± 0.15 *	0.47 ± 0.11 *	0.0036 ± 8.0
LDL-C (mmol/L)	0.0022 ± 3.8	0.0024 ± 7.6	0.0021 ± 4.7
FFA (mmol/L)	1.71 ± 0.39 *	1.80 ± 0.37 *	1.29 ± 0.42
HOMR-IR	8.49 ± 3.32 *	8.01 ± 2.55 *	3.35 ± 1.08

* P < 0.05 compared with ND group

表 3 SD 大鼠非诺贝特治疗 4 周后各组间生化指标检测结果

Table 3 Biochemical indicators among three groups after 4 weeks of treatment with fenofibrate (n = 10)

Index	HDF	HD	ND
Wt(g)	318.80 ± 35.53	372.6 ± 22.80 ^{#*}	302.1 ± 56.44
FBG (mmol/L)	4.94 ± 0.33	5.85 ± 0.66 ^{#*}	5.51 ± 1.01
FINS (mmol/L)	0.911 ± 0.31	1.87 ± 0.51 ^{#*}	0.68 ± 0.18
TC (mmol/L)	1.11 ± 0.10	1.33 ± 0.30 ^{#*}	1.08 ± 0.23
HDL-C (mmol/L)	0.0052 ± 7.9	0.0045 ± 8.6	0.0050 ± 7.1
TG (mmol/L)	0.30 ± 0.04	0.48 ± 0.11 ^{#*}	0.36 ± 0.07
LDL-C (mmol/L)	0.0022 ± 3.9	0.0033 ± 9.8 ^{#*}	0.0026 ± 6.3
FFA (mmol/L)	1.59 ± 0.30	2.37 ± 0.60 ^{#*}	1.33 ± 0.34
HOMR-IR	5.03 ± 1.88	12.30 ± 3.97 ^{#*}	4.17 ± 1.27

P < 0.05 compared with HDF group; * P < 0.05 compared with ND group

非诺贝特对部分脂肪细胞因子表达的影响 非诺贝特治疗组的脂肪组织 TNF-α 的 mRNA 表达低于高脂组,脂联素 mRNA 表达高于高脂组 (P < 0.05),治疗组和对照组差异无显著性 (P > 0.05);3 组间 AGT、AT1R 和 IL-6 的 mRNA 表达差异无显著性 (P > 0.05) (表 4)。

表 4 非诺贝特治疗对大鼠脂肪组织脂肪因子表达的影响

Table 4 Effect of fenofibrate on mRNA expression of adipose factor in rat adipose tissue (n = 10)

Adipose factor	HDF	HD	ND
TNF-α	0.713 ± 0.711	1.726 ± 1.408 ^{#*}	0.593 ± 0.382
Adiponectin	0.949 ± 0.35	0.660 ± 0.192 ^{#*}	0.936 ± 0.130
IL-6	0.409 ± 0.32	0.709 ± 0.29	0.618 ± 0.55
AGT	1.489 ± 1.318	3.337 ± 2.431	2.245 ± 1.741
AT1R	1.995 ± 2.642	2.627 ± 1.884	1.060 ± 1.371

TNF-α: tumor necrosis factor-α; IL-6: interleukin-6; AGT: angiotensinogen; AT1R: angiotensin II type 1 receptor

P < 0.05 compared with HDF group; * P < 0.05 compared with ND group

讨 论

肥胖及其相关胰岛素抵抗是代谢综合征的重要

发病机制,肥胖导致血游离脂肪酸升高是骨骼肌、肝脏发生胰岛素抵抗的重要因素。近年研究显示 FFA 通过增加二脂酰甘油含量,激活蛋白激酶 C,使胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substrate-1, IRS - 1) 产生异常的丝氨酸/苏氨酸磷酸化,干扰正常的酪氨酸磷酸化,最终减弱胰岛素受体后的信号传导,使葡萄糖转运子-4 (glucose transporter-4, GLUT-4) 向细胞膜的转位及活性减弱,导致骨骼肌等组织发生胰岛素抵抗^[3]。本研究高脂饮食 4 周即诱导 SD 大鼠出现胰岛素抵抗,表现为 HOMA-IR 升高,并且伴随血 FFA、TG 浓度升高。作为 PPAR-α 特异性激动剂的非诺贝特可以显著改善胰岛素抵抗,这种作用伴随血 FFA、TG 浓度降低,进一步证实非诺贝特改善胰岛素抵抗与降低 FFA、TG 的相关关系^[4]。

本研究提示,非诺贝特也可能通过调节脂肪组织的分泌功能参与改善胰岛素抵抗的作用。脂肪组织分泌的 TNF-α 在激活核因子-κB 抑制物激酶后增加 IRS - 1 丝氨酸磷酸化,降低 IRS-1 的酪氨酸磷酸化,也可引起胰岛素抵抗^[5]。本研究显示非诺贝特可降低脂肪组织 TNF-α 的 mRNA 含量,提示可能降低周围

血 TNF- α 的水平,这和文献报道^[2]结果相似。脂联素是脂肪组织分泌的拮抗炎症因子,改善胰岛素抵抗的脂肪因子^[6]。本研究非诺贝特治疗可提高脂肪组织脂联素的 mRNA 水平,提示脂联素也可能参与非诺贝特改善胰岛素抵抗作用。

脂肪组织分泌的 IL-6 通过增强细胞因子信号抑制物(suppressors of cytokine signaling,SOCS)的作用导致胰岛素抵抗。SOCS 是细胞因子激活途径的负反馈调节物,它竞争性抑制 IRS-1 酪氨酸磷酸化、加速 IRS-1 的降解^[7]。本研究显示非诺贝特不影响脂肪组织的 IL-6 mRNA 水平,非诺贝特是否通过 SOCS 途径改善胰岛素抵抗有待进一步研究。

脂肪组织具有完整的肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system,RAS),血管紧张素 II 是强烈的炎症激活物,又具有抑制脂肪细胞分化的作用,是导致脂肪组织胰岛素抵抗的重要因素^[8]。本研究中非诺贝特未影响脂肪组织血管紧张素原和血管紧张素 II 受体 1 的 mRNA 水平,提示非诺贝特可能未通过影响 RAS 改善胰岛素抵抗。

综上,PPAR- α 激动剂非诺贝特改善胰岛素抵抗的机制可能包括降低血 FFA,调节脂肪组织的脂肪因子分泌,在代谢综合征的临床治疗中起重要作用。

参 考 文 献

1 Garber AJ. The metabolic syndrome. Med Clin North Am,2004,

88(4):837-846.

2 Choi KC, Ryu OH, Lee KW, *et al.* Effect of PPAR-alpha and -gamma agonist on the expression of visfatin, adiponectin, and TNF-alpha in visceral fat of OLETF rats. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 336(3):747-753.

3 Dresner A, Laurent D, Marcucci M, *et al.* Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. J Clin Invest, 1999, 103 (2):253-259.

4 Srivastava RA, Jahagirdar R, Azhar S, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha selective ligand reduces adiposity, improves insulin sensitivity and inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. Mol Cell Biochem, 2006, 285(1-2):35-50.

5 Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, *et al.* Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkb. Science, 2001, 293(5535):1673-1677.

6 Ahima RS. Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin. Obesity (Silver Spring), 2006, 14(Suppl 1):9S-15S.

7 Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. Int J Obes, 2003, 27 (Suppl 3):S53-S55.

8 Velloso LA, Folli F, Sun XJ, *et al.* Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. PNAS, 1996, 93 (22):12490-12495.

(2006-07-04 收稿)