

BVT.2733 影响饮食诱导肥胖小鼠中 Visfatin 表达的研究

谢 宇¹, 姜 敏¹, 尹震宇¹, 丁国宪², 王 春^{1*}

(¹ 南京大学医学院附属鼓楼医院老年医学科, 江苏 南京 210008; ² 南京医科大学第一附属医院老年医学科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 构建高脂饮食诱导肥胖小鼠模型, 观察 BVT.2733 在改善胰岛素抵抗中的作用及对 Visfatin 表达的影响。方法: 构建高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型, 分为肥胖对照组和 BVT.2733 治疗组, 肥胖对照组给予安慰剂、治疗组给予 BVT.2733 灌胃 2 周, 同时设正常饮食的小鼠为正常对照组。放射免疫法测小鼠空腹胰岛素水平, 生化法检测血糖, 实时定量 RT-PCR 检测内脏脂肪组织 Visfatin 的 mRNA 表达。观察各组小鼠脂肪组织的形态学变化。结果: 与正常对照组相比, 肥胖对照组小鼠脂肪细胞明显增大, 体重增加, 空腹血糖、血清胰岛素水平升高 ($P < 0.05$)。与肥胖对照组相比, BVT.2733 治疗组小鼠脂肪细胞体积减小, 空腹血清胰岛素水平明显下降 ($P < 0.01$), 脂肪组织 Visfatin mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$)。结论: BVT.2733 能够降低体重, 减少脂肪组织, 并且降低 Visfatin 的表达水平。

[关键词] BVT.2733; Visfatin; 饮食诱导肥胖小鼠; 胰岛素抵抗

[中图分类号] R589.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)07-933-04

Effects of BVT.2733 on the expression of Visfatin in mice with diet-induced obesity

XIE Yu¹, JIANG Min¹, YIN Zheng-yu¹, DING Guo-xian², WANG Chun^{1*}

(¹ Department of Geriatrics, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008; ² Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of BVT.2733 on the expression of Visfatin and insulin resistance in the diet-induced obese (DIO) mice model. **Methods:** The C57BL/6J mice were randomly divided into the normal diet group and high-fat diet (HFD) group. After 20 weeks, the obese mice were randomly divided into obese control group and BVT.2733 treatment group. And they were orally administered placebo and BVT.2733, respectively, for two weeks. The levels of plasma glucose and serum insulin were measured by biochemistry technology and radioimmunity. The visfatin mRNA expression in adipose tissue were analyzed by real-time quantitative PCR. And the morphology changes of adipocyte were also observed. **Results:** Comparing to normal controls, the weight, plasma glucose and serum insulin levels increased in HFD group ($P < 0.05$), and the size of adipocyte in HFD group was big. Comparing to obese controls, in BVT.2733 treatment group, the serum insulin significantly decreased ($P < 0.01$) and the adipocyte sizes reduced, while the mRNA expression of Visfatin down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion:** BVT.2733 could reduce body weight significantly, ameliorate insulin resistance, and down-regulate the expression of Visfatin.

[Key words] BVT.2733; Visfatin; the diet-induced obese mice; insulin resistance

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 933-936]

在现代社会, 代谢综合征已经成为世界性的健康难题, 现有的治疗手段很难有效预防和控制代谢综合征^[1-2]。11 β -羟化类固醇脱氢酶 1 (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1, 11 β -HSD1), 作为调节局部糖皮质激素代谢的关键酶, 在胰岛素抵抗和代谢综合征发生中起关键作用^[3-4]。作为新的潜在的治疗靶

点, 11 β -HSD1 抑制剂日益引起人们的重视^[5]。既往研究表明, 11 β -HSD1 抑制剂能够改善饮食诱导肥胖小鼠和 2 型糖尿病鼠的胰岛素抵抗及逆转代谢综合征^[6]。BVT.2733 是一种新型的高选择性的 11 β -HSD1 抑制剂, 它通过结合多肽 CKGGRAKDC, 能够特异性地作用于内脏脂肪组织^[7-8]。本研究通过构建高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型, 运用 BVT.2733 进行干预, 观察相关胰岛素抵抗指标及脂肪细胞因子内脏脂肪素 (Visfatin) 表达的变化情况, 从而探讨

[基金项目] 南京市医学科技发展项目 (YKK11102)

*通讯作者, E-mail: jmin1212@hotmail.com

BVT.2733 在改善胰岛素抵抗及代谢综合征中的作用机制及其对 Visfatin 表达的影响。

1 材料和方法

1 材料

1.1.1 仪器和试剂

低温超速离心机(德国 Eppendorf Centrifuge 5810R), 紫外分光光度仪(美国 Amersham Biosciences 公司), 荧光定量 PCR 仪(Rotor Gene 3000, 澳大利亚 Corbett Research 公司)。TRIzol、逆转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司), QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix(日本 Toyobo 公司), 胰岛素放免测定试剂盒(美国 Linco 公司), ELISA 试剂盒(美国 Linco 公司)。其他试剂均为市售分析纯。

1.1.2 实验动物

C57BL/6 小鼠, 雄性, 4~6 周, 体重 15 g 左右(购自上海斯莱克实验动物有限公司), 在江苏省实验动物中心饲养。

1.1.3 饲料

基础饲料: 碳水化合物 65%、脂肪 20%、蛋白质 15%; 高脂饲料: 碳水化合物 20%、脂肪 60%、蛋白质 20%(购自江苏省实验动物中心)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立^[9]

将 C57BL/6 小鼠分笼饲养, 适应环境 3 d 后, 称重, 随机分为正常饮食组(17 只)和高脂饮食诱导肥胖组(40 只)。正常饮食组继续喂养基础饲料, 高脂饮食诱导肥胖组改喂高脂饲料, 每周记录体重。高脂饲料喂养后第 20 周将高脂饮食诱导肥胖组随机分为肥胖对照组(20 只)和 BVT.2733 治疗组(20 只)。对正常饮食组和肥胖对照组灌胃给予安慰剂, 对 BVT.2733 治疗组给予 BVT.2733 100 mg/(kg·d) 灌胃, 14 d 后, 小鼠隔夜禁食, 眼球采血后处死, 全血高速离心 10 min 后分离血清, -70℃冻存, 备测各血清学指标。取小鼠附睾脂肪组织, -70℃冻存。

1.2.2 脂肪组织 HE 染色

取小鼠附睾脂肪组织 (0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm), 10%福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片(6 μm), 水化, 漂洗, 封闭, HE 染色, 光镜观察。

1.2.3 空腹胰岛素、血糖的检测

采用放射免疫法测定小鼠空腹血清胰岛素水平, 血糖采用生化法测定。

1.2.4 组织总 RNA 抽提及 cDNA 转录

取冻存的脂肪组织 100 mg 融化后加入 TRIzol

1 ml, 超声高速匀浆破碎组织, 按试剂盒方法进行 RNA 抽提及 cDNA 转录。

1.2.5 脂肪组织中脂肪细胞因子 Visfatin 的检测

以上述小鼠脂肪组织的 cDNA 为模板, 用相关引物进行实时定量 PCR 扩增。Visfatin 引物上游: 5'-ACATAGGACACCAGCG-3', 下游: 5'-AAACACGAA-CCCACAC-3'。β-actin 引物上游: 5'-CACGATG-GAGGGGCCGACTCATC-3', 下游: 5'-TAAAGAC-CTCTATGCCAACACAGT-3'。实时定量 PCR 总反应体系为 25 μl, 反应条件: 95℃预变性 10 min, 94℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 40 s, 80℃读板 5 s, 44 个循环, 72~94℃, 制备熔解曲线。以 β-actin 基因作为内参照, 对各组小鼠脂肪组织中标志基因的表达进行统计分析。

1.3 统计学分析

所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 运用 SPSS10.0 软件进行组间比较, 经方差齐性检验后采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常饮食饲养小鼠与高脂饮食饲养小鼠的体重变化

高脂饮食饲养前各组小鼠体重的差异无统计学意义($P > 0.05$)。高脂饮食饲养 20 周用药前, 诱导肥胖组小鼠体重高于正常饮食组, 差异具有统计学意义($P < 0.01$, 图 1A)。用药后, 与肥胖对照组相比, BVT.2733 治疗组小鼠用药后体重均显著降低($P < 0.01$, 图 1B)。

2.2 3 组小鼠脂肪细胞形态变化

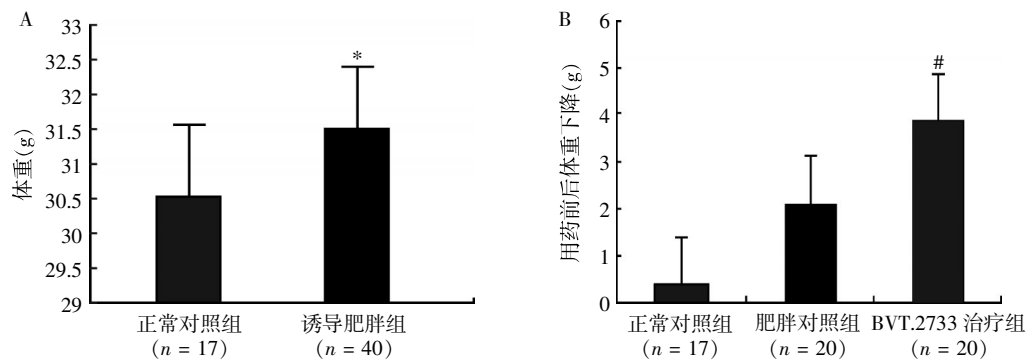
采用 HE 染色观察 3 组小鼠脂肪细胞形态变化。在 200 倍光镜下观察 3 个视野中脂肪细胞并计数, 计算平均值。与正常饮食组相比, 肥胖对照组小鼠的脂肪细胞显著增大, BVT.2733 治疗组脂肪细胞比肥胖对照组明显缩小(图 2, 表 1)。

2.3 3 组小鼠空腹血清胰岛素和血糖的变化

采用放免法、生化法分别检测各组小鼠空腹血清胰岛素和血糖水平。结果表明, 与正常饮食组相比, 肥胖对照组的血糖和血清胰岛素水平升高($P < 0.01$)。与肥胖对照组相比, 给予 BVT.2733 干预后, 小鼠血清胰岛素水平明显下降($P < 0.01$, 图 3A), 而血糖虽下降, 但差异未具有统计学意义(图 3B)。

2.4 3 组小鼠脂肪组织中 Visfatin mRNA 的表达

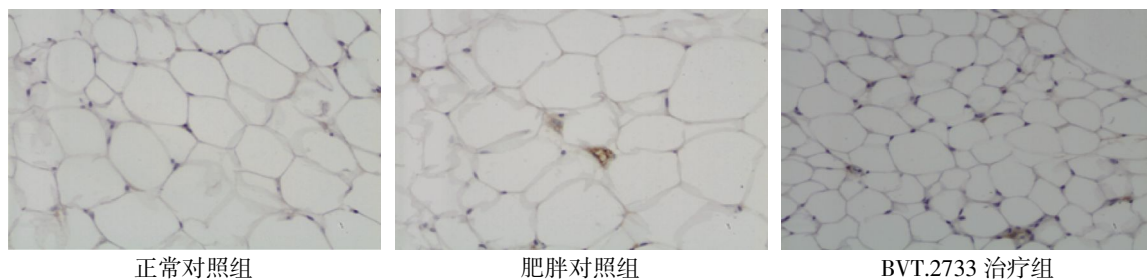
采用实时荧光定量 PCR 技术检测脂肪细胞因子 Visfatin mRNA 的表达情况。结果表明, 与正常饮



A: 用药前正常对照组和高脂饮食诱导肥胖组体重情况; B: 用药前后 3 组小鼠体重变化情况。与正常对照组相比, * $P < 0.01$; 与肥胖对照组相比, # $P < 0.01$ 。

图 1 小鼠体重及用药前后变化情况

Figure 1 The weight changes of mice in each group after treatment



正常对照组 肥胖对照组 BVT.2733 治疗组
与正常饮食组相比, 肥胖对照组小鼠的脂肪细胞显著增大, BVT.2733 治疗组脂肪细胞比肥胖对照组明显缩小。

图 2 3 组小鼠脂肪细胞的形态改变(HE 染色, $\times 200$)

Figure 2 The morphology of adipocyte among three groups of mice (HE staining, $\times 200$)

表 1 3 组小鼠脂肪细胞计数

组 别	脂肪细胞计数(个)
正常饮食组	220.67 \pm 12.42
肥胖对照组	103.33 \pm 28.59*
BVT.2733 治疗组	208.67 \pm 9.29#

与正常饮食组相比, * $P < 0.01$, 与肥胖对照组相比, # $P < 0.01$ 。

食组相比, 肥胖对照组小鼠脂肪组织 Visfatin mRNA 的表达显著升高($P < 0.05$), 而给予 BVT.2733 干预后其表达显著降低($P < 0.05$, 图 3C)。

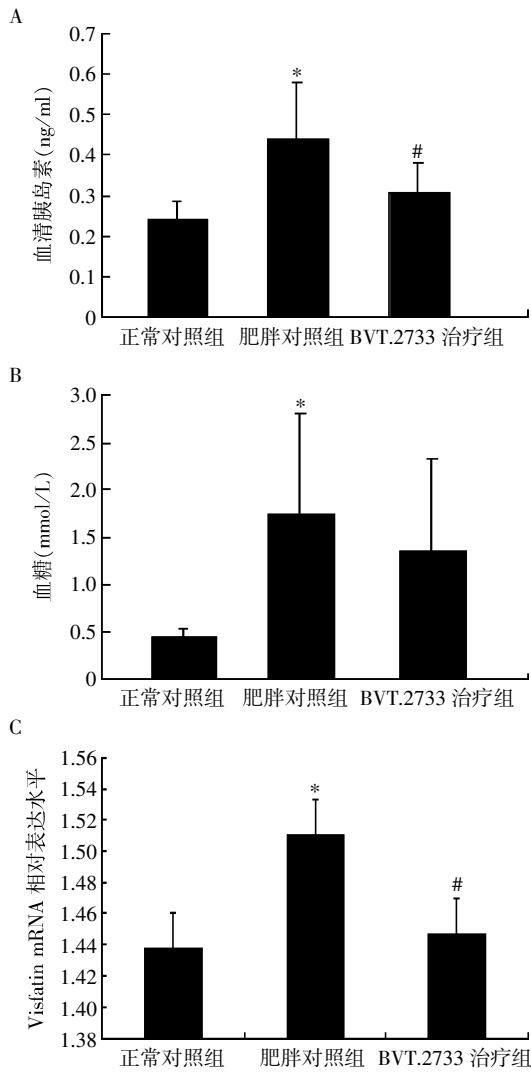
3 讨 论

近来, 11β -HSD1 作为治疗肥胖及代谢综合征的新靶点, 正成为人们研究的热点^[10-11]。 11β -HSD1 广泛表达于各种组织, 其表达及功能具有组织特异性, 脂肪组织 11β -HSD1 的表达, 在肥胖及代谢综合征的发病过程中起着重要作用。转基因鼠模型表明, 特异性高表达 11β -HSD1 的转基因小鼠表现出明显的代谢综合征症状, 而 11β -HSD1 基因敲除小鼠对胰岛素敏感性增强^[6]。亦有研究证实 11β -HSD1 抑制剂可改善肥胖者和 2 型糖尿病患者的胰岛素抵抗, 部分逆转代

谢综合征^[12-13]。已有研究表明 BVT.2733 是一种高选择性的 11β -HSD1 抑制剂, 能够降低血糖, 显著降低体重, 改善肥胖及胰岛素抵抗^[14]。对其深入研究有望为临床治疗肥胖及代谢综合征开辟新的途径。

本研究经过 20 周高脂饮食饲养, 成功建立饮食诱导肥胖小鼠模型。肥胖小鼠具有明显的肥胖和高胰岛素血症。肥胖小鼠的体重明显增加, 空腹胰岛素水平和血糖显著升高, HE 染色可见肥胖小鼠脂肪细胞体积较对照组明显增大。对肥胖小鼠给予 BVT.2733 灌胃 14 d 后, 与肥胖对照组相比, 用药后 BVT.2733 治疗组小鼠体重显著降低, 空腹胰岛素水平明显下降, 脂肪细胞体积明显缩小, 表明 BVT.2733 能够改善肥胖及胰岛素抵抗。与既往研究结果一致的是肥胖小鼠的内脏脂肪组织中 Visfatin mRNA 的表达上调^[15], 而给予 BVT.2733 干预后, Visfatin mRNA 的表达较肥胖对照组显著下降。提示 BVT.2733 也可能通过影响有关脂肪细胞因子的表达, 改善胰岛素抵抗。

综上所述, 本研究通过构建高脂饮食诱导肥胖小鼠模型, 证实了高选择性的 11β -HSD1 抑制剂 BVT.2733 能够显著改善胰岛素抵抗及肥胖, 并能下



与正常对照组相比, * $P < 0.01$; 与肥胖对照组相比, # $P < 0.01$ ($n = 10$)。
图 3 3 组小鼠空腹血清胰岛素、血糖和 Visfatin mRNA 的表达
Figure 3 The levels of blood glucose and serum insulin, and mRNA expressions of Visfatin among three groups of mice

调肥胖小鼠中脂肪细胞因子 Visfatin 的表达。为针对肥胖及代谢综合征的新药研究提供了新的靶点,可能具有重要的发展前景。

[参考文献]

[1] Leroith D. Pathophysiology of the metabolic syndrome; implications for the cardiometabolic risks associated with type 2 diabetes[J]. *Am J Med Sci*, 2012, 343(1): 13-16
 [2] Ginsberg HN, MacCallum PR. The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic; Part I. Increased cardiovascular disease risk and the importance of atherogenic dyslipidemia in persons with the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus [J]. *J Cardiometab Syndr*, 2009, 4(2): 113-119
 [3] Tomlinson JW, Stewart PM. Modulation of glucocorticoid

action and the treatment of type-2 diabetes[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2007, 21(4): 607-619
 [4] Pereira CD, Azevedo I, Monteiro R, et al. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1; relevance of its modulation in the pathophysiology of obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2012; .doi: 10.1111/j.1463-1326.2012.01582.x. [Epub ahead of print]
 [5] Sun D, Wang M, Wang Z. Small molecule 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors [J]. *Curr Top Med Chem*, 2011, 11(12): 1464-1475
 [6] Morton NM, Holmes MC, Fiévet C, et al. Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (44): 41293-41300
 [7] Hult M, Shafqat N, Elleby B, et al. Active site variability of type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase revealed by selective inhibitors and cross-species comparisons [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 248(1-2): 26-33
 [8] Alberts P, Engblom L, Edling N, et al. Selective inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 decreases blood glucose concentrations in hyperglycaemic mice [J]. *Diabetologia*, 2002, 45(11): 1528-1532
 [9] 胡 淼, 刘 娟, 王 龙, 等. 四格列酮对肥胖小鼠棕色脂肪功能的影响 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2011, 31(5): 689-693
 [10] Zhou HY, Hu GX, Lian QQ, et al. The metabolism of steroids, toxins and drugs by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 [J]. *Toxicology*, 2012, 292(1): 1-12
 [11] Richards S, Sorensen B, Jae HS, et al. Discovery of potent and selective inhibitors of 11beta-HSD1 for the treatment of metabolic syndrome [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(24): 6241-6245
 [12] Hollis G, Huber R. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition in type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2011, 13(1): 1-6
 [13] Wang M. Inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in antidiabetic therapy [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2011, 203: 127-146
 [14] Liu J, Wang L, Zhang A, et al. Adipose tissue-targeted 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor protects against diet-induced obesity [J]. *Endocr J*, 2011, 58 (3): 199-209
 [15] Kamińska A, Kopczyńska E, Bronisz A, et al. An evaluation of visfatin levels in obese subjects [J]. *Endokrynol Pol*, 2010, 61(2): 169-173

[收稿日期] 2012-04-06