

## 吡格列酮对小鼠皮下、内脏脂肪棕色化的差异作用

李玉洁, 刘娟, 毕建华, 丁国宪\*

(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:探讨吡格列酮对小鼠皮下、内脏脂肪棕色化不同作用及其机制。方法:取 C57BL/5J 小鼠皮下及内脏前脂肪细胞原代培养,诱导分化同时加吡格列酮刺激直至分化成熟后,RT-PCR 检测棕色脂肪相关功能基因的 mRNA 表达水平。结果:在皮下脂肪中吡格列酮组较对照组棕色脂肪功能基因均明显表达上调( $P < 0.05$ ),而内脏脂肪对照组和吡格列酮组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:吡格列酮可促进小鼠皮下脂肪棕色化改变,但对内脏脂肪无作用。

**[关键词]** 吡格列酮;皮下脂肪;内脏脂肪;棕色化

**[中图分类号]** R723.14

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)08-1049-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130805

## The different roles of Pioglitazone in fat browning

Li Yujie, Liu Juan, Bi Jianhua, Ding Guoxian\*

(Department of Geratology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:**To explore the role of Pioglitazone in the browning of both subcutaneous and visceral adipose tissue. **Methods:**Primary subcutaneous and visceral adipocytes were isolated from C57BL/5J mice and induced for differentiation. The primary cells were stimulated with 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Pioglitazone or vehicle throughout the whole induction period. Then the expression of either white fat or brown fat relative genes were observed by RT-PCR. **Results:**Pioglitazone could cause a significant increase of brown fat marker genes in the subcutaneous adipose tissue instead of the visceral adipose. **Conclusion:**Pioglitazone can promote a “white to brown” change in the subcutaneous adipose tissue instead of the visceral adipose.

**[Key words]** Pioglitazone; subcutaneous adipocyte; visceral adipocyte; white to brown

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(8): 1049-1054]

“2002 年中国居民营养与健康状况调查”结果显示,我国超重和肥胖人口近 3 亿,其中 18 岁及以上成年人肥胖率为 7.1%,较 1992 年上升 1 倍<sup>[1]</sup>。而肥胖发病率的增高,导致与其相关的 2 型糖尿病、高血压、脂质代谢紊乱等疾病也相应增加,肥胖已经成为不容忽视的健康杀手之一。

脂肪组织有两种:白色脂肪组织(WAT)和棕色脂肪组织(BAT),前者胞内含有大而少的脂滴,是体内能量贮存的形式,摄入的能量越多其细胞体积和数量越多;后者则含有小而多的脂滴和大量线粒体,其主要功能是燃烧白色脂肪将能量转换成热量,是能量消耗的部位,其与体型苗条、体质健康关

系较为密切,但这一功能主要在新生儿和啮齿动物中呈现,成年人体中的棕色脂肪仅具有少量生物学活性<sup>[2-4]</sup>,因此,诱导 WAT 向 BAT 转化并获得类似棕色脂肪功能成为更加可行有效的减肥途径。已有研究表明,在 WAT 中表达 UCP-1(BAT 的特异性功能基因)的转基因小鼠确实可有效预防高脂饮食诱导的肥胖<sup>[5]</sup>。

Ohlson 等<sup>[6]</sup>通过对 792 例 54 岁男子为期长达 13.5 年的追踪观察后发现糖尿病的发病率同腰臀比呈正相关,即“苹果型”肥胖较“梨型”肥胖更易发生糖尿病,提示脂肪组织的差异分布对糖尿病的发生发展具有重要影响,后续的研究发现,位于大网膜、肾周、附睾旁等部位的内脏白色脂肪(visceral WAT)较位于大腿、臀部等的皮下白色脂肪(subcutaneous WAT)同腹型肥胖、胰岛素抵抗、糖尿病等心血管的

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金资助(3090504)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: Dinggx@njmu.edu.cn

危险因素都更加相关<sup>[7-9]</sup>。脂肪组织的形态和部位多样性使肥胖的治疗变得更加复杂及重要。

噻唑烷二酮类(TZDs)为临床上广泛使用的糖尿病治疗药物,主要包括罗格列酮、吡格列酮、曲格列酮等,其通过与PPAR- $\gamma$ 特异性结合增强胰岛素敏感性,从而降低血糖。既往已有大量研究表明,PPAR- $\gamma$ 是促进白色脂肪分化的关键核转录因子,不仅如此,进一步研究表明PPAR- $\gamma$ 更显著促进皮下白色脂肪分化,Miyazaki等<sup>[10]</sup>研究发现,2型糖尿病患者服用吡格列酮16周后,皮下脂肪面积由310 cm<sup>2</sup>增加到342 cm<sup>2</sup>,内脏脂肪面积却由144 cm<sup>2</sup>减少到131 cm<sup>2</sup>,这一发现提示着吡格列酮能够促进脂肪重新分布,从而可能降低腹型肥胖、胰岛素抵抗、糖尿病等相关的心血管疾病风险。吡格列酮也能显著促进棕色脂肪的分化和功能<sup>[11]</sup>,同时最新研究显示罗格列酮刺激后,肥胖小鼠心包脂肪中棕色脂肪标志基因UCP-1、PRDM16等明显升高<sup>[12]</sup>,Qiang等<sup>[13]</sup>则发现过表达SirT1可通过在PPAR- $\gamma$ 的Lys268和Lys293两个位点上脱乙酰作用引起皮下脂肪棕色化改变,但吡格列酮和PPAR- $\gamma$ 对皮下内脏脂肪棕色化的作用差异尚不明确。

本研究着眼于吡格列酮对小鼠原代皮下及内脏脂肪棕色化的影响差异,为吡格列酮在2型糖尿病和肥胖治疗中的应用寻找新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

原代皮下及内脏前脂肪细胞取自C57BL/6J小鼠(雄性,4周龄,南京大学生物模式中心),2型胶原酶(美国Sigma公司),DMEM高糖培养基、胎牛血清、0.05% Trypsin-EDTA(美国Gibco公司),吡格列酮(美国福瑞康泽医药有限公司),TRIzol、RNA提取试剂盒及引物(美国Invitrogen公司),逆转录试剂盒(美国Promega公司),PCR试剂盒(日本Toyobo公司)。紫外分光光度计(美国Amersham Biosciences公司),Rotor-Gene3000荧光定量PCR仪(澳大利亚Corbett公司)。脂肪组织消化液配方为:2型胶原酶1.5 g/L + 牛血清白蛋白20 g/L + HEPES 1.2 g/L溶于含钙、镁的PBS,调整pH至7.4,-20℃冻存,使用前置于37℃水浴预热;小鼠皮下前脂肪细胞培养液为DMEM高糖培养基 + 10%胎牛血清。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 皮下及内脏前脂肪细胞原代分离<sup>[14]</sup>

4周龄C57BL/6J小鼠拉颈处死,无菌超净台中

取腹股沟处皮下脂肪组织及附睾旁内脏脂肪组织,剪碎,胶原酶消化1 h后200目筛网过滤,收集滤液离心,弃上清,每只小鼠加入12 ml DMEM培养液重悬沉淀物,2 ml/孔转移至6孔板中,轻晃使之混匀后放入37℃培养箱培养,4~6 h后换液。之后每2 d换液1次。

#### 1.2.2 前脂肪细胞诱导分化

待原代皮下及内脏前脂肪细胞长满并出现接触抑制后(d0)开始三联诱导:IBMX 0.5 mmol/L + 地塞米松 2 mmol/L + 胰岛素 10  $\mu$ g/ml加入含10% FBS的DMEM培养液中;2 d后(d2)加入只含10  $\mu$ g/ml Insulin的10%FBS DMEM培养液,再过2 d后(d4)换成10%FBS DMEM培养液,至d8细胞完全分化成熟。

#### 1.2.3 药物处理

设置吡格列酮浓度梯度,在原代皮下及内脏前脂肪细胞三联诱导分化同时(d0)加入不同浓度吡格列酮药物刺激,待分化完全后(d8)提取细胞总RNA,通过RT-PCR检测UCP-1基因表达,选择升高最明显组所用的药物浓度2.5  $\mu$ mol/L作为后续实验所用药物浓度(约为0.89 mg/L,远小于临床推荐剂量浓度)。对照组则使用同等体积的溶剂(灭菌三蒸水)。加药时间在三联诱导(d0)的同时开始加药直至收获细胞(d8)。实验独立重复3次,每次实验每组样本数目>3。

#### 1.2.4 油红O染色

细胞分化成熟后,吸弃培养板中的培养基,PBS漂洗,加用10%中性福尔马林固定1 h后吸弃液体,室温使其干燥后加用油红O染色液染色10 min,用双蒸水冲洗3遍后显微镜下拍照。

#### 1.2.5 总RNA提取及实时荧光定量PCR

细胞完全分化成熟后(d8),即可收获细胞提取总RNA;将培养板从培养箱中取出,吸弃孔中培养液,每孔加入1 ml PBS漂洗,吸弃孔中剩余液体,每孔加入1 ml TRIzol充分裂解细胞,按试剂盒方法进行细胞总RNA提取及cDNA逆转录。以逆转录的cDNA为模板,加入正确引物进行RT-PCR扩增。实时定量PCR总反应体系为25  $\mu$ l,反应条件为:95℃预变性10 min,95℃变性15 s,60℃退火延伸60 s,40个循环,72℃~94℃,每升高0.5℃读取1次制备熔解曲线。以 $\beta$ -actin基因作为内参对目的基因的表达量进行分析。

### 1.3 统计学方法

应用SPSS10.0统计软件进行统计分析,实验独

立重复 3 次,数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,经方差齐性检验方差齐后进行  $t$  检验, $P \leq 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

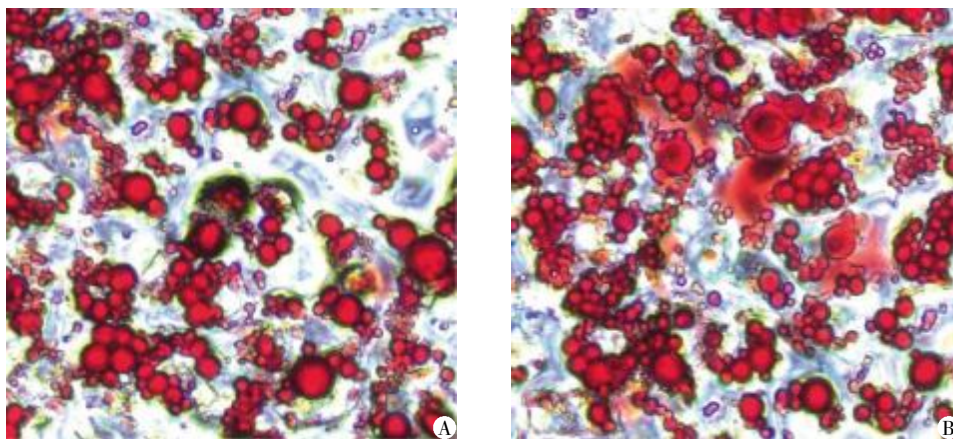
### 2.1 成功建立原代细胞模型

为了证明实验所取原代细胞为实验所需细胞,我们采取了脂肪细胞特异性的油红 O 染色方法对细胞进行鉴定。在高倍显微镜下观察细胞,可见带

有被染色脂滴的细胞占细胞总数的 80% 以上(图 1),说明最终所获得的原代成熟脂肪细胞占总细胞的 80% 以上,原代细胞模型建立成功。

### 2.2 小鼠皮下、内脏前脂肪细胞功能差异

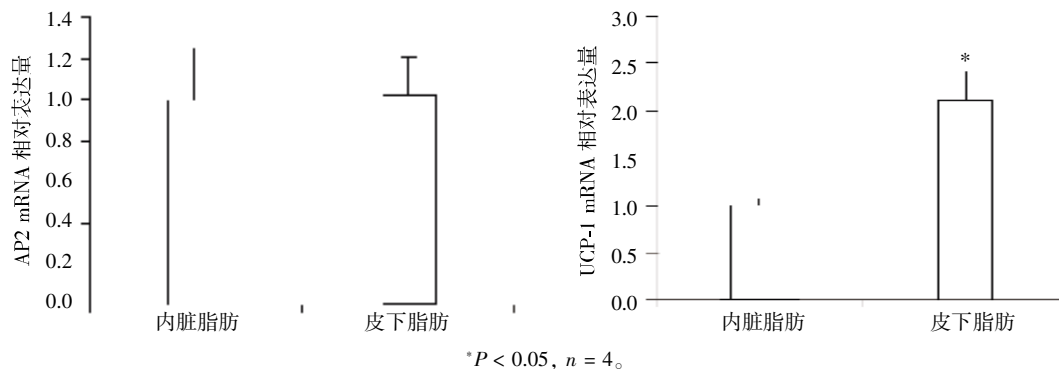
在小鼠原代皮下、内脏前脂肪细胞分化成熟后,实时定量 PCR 检测发现白色脂肪分化标志基因 AP2 的表达差异无统计学意义( $P = 0.27, n = 4$ ),而棕色脂肪标志基因 UCP-1 在皮下脂肪较内脏脂肪表达较高( $P = 0.021, n = 4$ ,图 2)。



A:皮下;B:内脏。

图 1 皮下及内脏前脂肪细胞原代培养分化成熟后油红染色( $\times 100$ )

Figure 1 The oil red O stain of differentiated primary cultured cells( $\times 100$ )



\* $P < 0.05, n = 4$ 。

图 2 定量 PCR 检测皮下及内脏前脂肪细胞原代培养分化后 AP2 及 UCP-1 基因表达水平

Figure 2 mRNA level of AP2 and UCP-1 analyzed by real-time PCR in primary cultured subcutaneous or visceral adipocytes

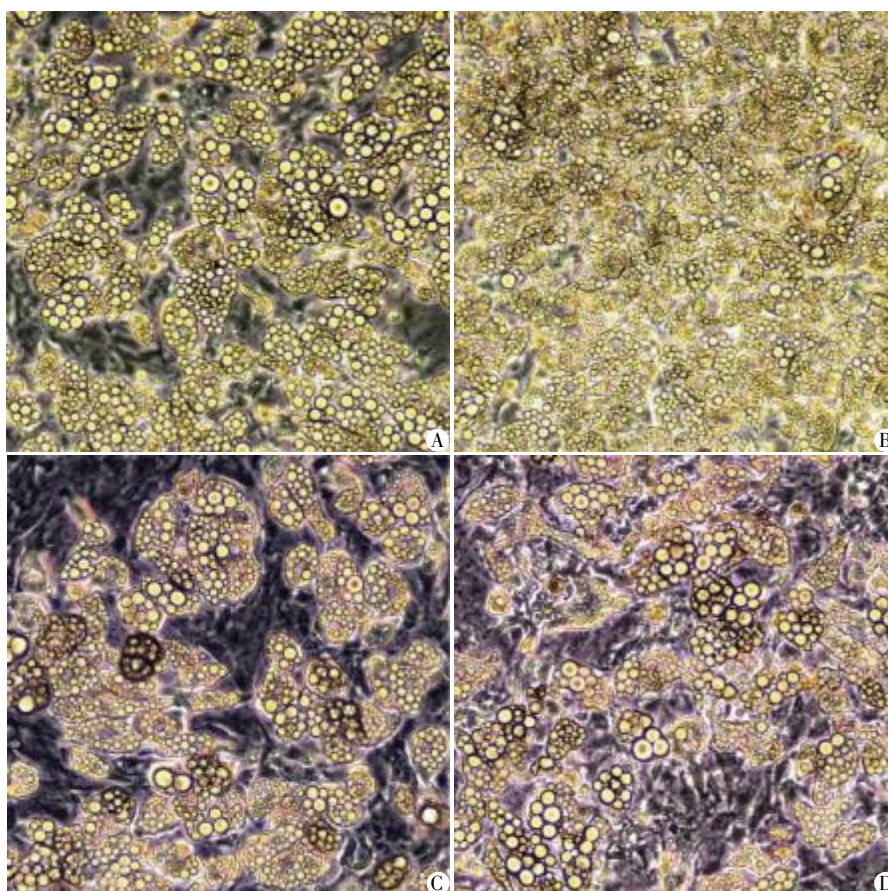
### 2.3 吡格列酮促进小鼠皮下脂肪棕色化改变

在原代皮下前脂肪细胞三联诱导分化同时(d0)加入浓度为  $2.5 \mu\text{mol/L}$  的吡格列酮刺激,待分化完全后,光学显微镜下观察细胞形态,可见吡格列酮组成熟脂肪细胞较对照组明显增多(图 3A、B),胞内出现多而小的脂滴,变成类似棕色脂肪细胞的结构。RT-PCR 结果提示吡格列酮组棕色脂肪功能基因包括:细胞死亡诱导 DNA 片段因子 a 样感受器蛋白(CIDEA)、细胞色素 C 氧化酶 8b 亚单位(COX8B)、长链脂肪酸

延长蛋白 3(ELOVL3),以及转录因子 PRDM16 等均较对照组明显上调( $P < 0.05, n = 4$ ,图 4A)。

### 2.4 吡格列酮对内脏脂肪棕色化无明显作用

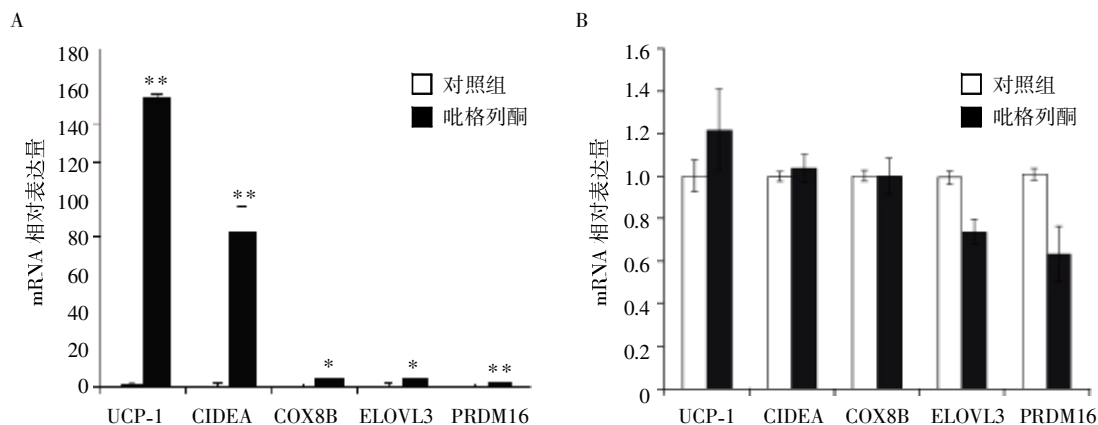
在原代内脏前脂肪细胞三联诱导分化同时(d0)加入浓度为  $2.5 \mu\text{mol/L}$  的吡格列酮刺激,待分化完全后,光学显微镜下观察细胞形态,可见吡格列酮组成熟脂肪细胞形态结构较对照组无明显改变(图 3C、D)。RT-PCR 结果提示吡格列酮组与对照组棕色脂肪功能基因的表达均无统计学差异( $P > 0.05, n = 4$ ,图 4B)。



A:皮下前脂肪组织正常诱导分化;B:皮下前脂肪组织诱导分化同时加入 2.5 μmol/L 的吡格列酮刺激; C:内脏前脂肪组织正常诱导分化; D:内脏前脂肪组织诱导分化同时加入 2.5 μmol/L 的吡格列酮刺激。

图3 前脂肪细胞诱导分化成熟形态观察(×100)

Figure 3 Differentiation of the primary cells under microscope(×100)



A:皮下脂肪组织;B:内脏脂肪组织。与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ , $n = 4$ 。

图4 Real-time PCR 检测皮下及内脏脂肪对照组和吡格列酮组 UCP-1、CIDEA、COX8B、ELOVL3 基因水平

Figure 4 The mRNA level of UCP-1,CIDEA,COX8B and ELOVL3 analyzed by real-time PCR in both groups

### 3 讨论

肥胖的高发病率及对健康的危害使之得到越来越多的重视,而机体的能量摄入增加和(或)能量消

耗减少是肥胖产生的关键及根本原因,因此任何可以扭转这一能量失衡的因素均是治疗肥胖的重要靶点。棕色脂肪以其可消耗能量的特性得到研究者的垂青,但棕色脂肪在成年人机体中含量远小于白色

脂肪,故将白色脂肪转化成有活性的棕色脂肪成为更加可行的潜在治疗途径。然而近年来,Seale 等<sup>[15]</sup>最新研究发现,棕色脂肪其实和骨骼肌具有相同组织来源,而并非是与白色脂肪同源,在分子开关——PRDM16 的作用下两者可以相互转换,这一发现无疑否定了白色、棕色脂肪之间直接转换的可能,但该作者在其随后的研究中又发现,PRDM16 可引起皮下白色脂肪出现一种“类棕色脂肪化”改变,呈现出棕色脂肪所特有的部分功能特性,并促进小鼠的整体耗能增加,因此“白色脂肪棕色化”成为了抵抗肥胖的一个新型有效手段。然而,Seale<sup>[16]</sup>进一步研究却惊奇地发现“白色脂肪棕色化”效应仅在皮下脂肪存在,在内脏脂肪中并无该现象。有趣的是,皮下脂肪和内脏脂肪在糖尿病、胰岛素抵抗、肥胖、心血管疾病病理生理过程中的差异作用早已得到广泛研究<sup>[7-9,17]</sup>,Taksali 等<sup>[18]</sup>的研究更提示内脏脂肪较多而皮下脂肪较少的肥胖青少年属于代谢综合征高危人群。提示白色脂肪棕色化在皮下内脏脂肪中的差异化作用很可能同上述一系列疾病的病理生理机制相关,具有极大的研究价值。

本实验中小鼠原代皮下内脏前脂肪细胞分化后检测 AP2 无明显差异,UCP-1 表达在皮下脂肪中较内脏脂肪明显增多,AP2 为白色脂肪分化标志性基因,而 UCP-1 是棕色脂肪特异性基因,可通过线粒体呼吸链氧化磷酸化解偶联而产生热。这些结果提示皮下脂肪和内脏脂肪在功能方面存在显著性差异,这也可能正是内脏肥胖的患者更易出现代谢紊乱及心血管并发症的重要原因。

PPARs 是配体激活的转录因子核受体超家族成员,其亚型 PPAR- $\gamma$  不仅同白色脂肪分化密切相关,在棕色脂肪分化和脂肪酸代谢过程中也起重要作用<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,在吡格列酮药物干预下,小鼠原代皮下前脂肪细胞分化成熟后,棕色脂肪标志基因 UCP-1 明显升高,但在内脏脂肪中并无类似作用;提示 PPAR- $\gamma$  不仅同白色脂肪和棕色脂肪分化相关,还在白色脂肪类棕色化中起重要作用。此外本实验同时检测了其他棕色脂肪功能相关基因如 CIEDA、COX8B、ELOVL3 等,均得到类似结果,再次证明 PPAR- $\gamma$  在原代皮下及内脏脂肪棕色化中的差异作用。在最近的国外研究中已证明 PRDM16 为棕色脂肪的关键调控基因,在骨骼肌前体细胞中过表达 PRDM16 可诱导其向棕色脂肪细胞分化<sup>[15]</sup>。本研究发现使用吡格列酮干预后,皮下脂肪中 PRDM16 表达显著升高而内脏脂肪中无变化,推测 PPAR- $\gamma$

在原代皮下内脏脂肪棕色化中的差异作用可能正是通过调控 PRDM16 这一关键基因而实现,此结果为治疗肥胖和 2 型糖尿病提供了新的思路,其具体机制值得进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 马冠生,李艳平,武阳丰,等. 1992 至 2002 年间中国居民超重率和肥胖率的变化 [J]. 中华预防医学杂志, 2005,39(5):311-316
- [2] Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source [J]. Cell, 2007, 131(2):242-256
- [3] Park KW, Halperin DS, Tontonoz P. Before they were fat: adipocyte progenitors [J]. Cell Metab, 2008, 8(6):454-457
- [4] Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults [J]. New Engl J Me, 2009, 360(15):1518-1525
- [5] Kopecky J, Clarke G, Enerbäck S, et al. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity [J]. J Clin Inv, 1995, 96(6):2914
- [6] Ohlson LO, Larsson B, Svärdsudd K, et al. The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus: 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913 [J]. Diabetes, 1985, 34(10):1055-1058
- [7] Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences [J]. Obesity Rev, 2010, 11(1):11-18
- [8] Samaras K, Botelho NK, Chisholm DJ, et al. Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes [J]. Obesity, 2010, 18(5):884-889
- [9] Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments association with metabolic risk factors in the Framingham heart study [J]. Circulation, 2007, 116(1):39-48
- [10] Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, et al. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(6):2784-2791
- [11] 胡 森, 刘 娟, 王 龙, 等. 吡格列酮对肥胖小鼠原代棕色脂肪细胞分化 and 功能基因表达的影响 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2011, 27(11):947-949
- [12] Distel E, Penot G, Cadoudal T, et al. Early induction of a brown-like phenotype by rosiglitazone in the epicardial adipose tissue of fatty Zucker rats [J]. Biochimie, 2012, 94(8):1660-1667

- [13] Qiang L, Wang L, Kon N, et al. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppar $\gamma$  [J]. *Cell*, 2012, 150(3):620-632
- [14] Hausman DB, Park HJ, Hausman GJ. Isolation and culture of preadipocytes from rodent white adipose tissue[M]. New York: Humana Press, 2008:201-219
- [15] Seale P, Bjork B, Yang W, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch [J]. *Nature*, 2008, 454(7207): 961-967
- [16] Seale P, Conroe H M, Estall J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice[J]. *J Clin Inv*, 2011, 121(1):96
- [17] Miyazaki Y, DeFronzo RA. Visceral fat dominant distribution in male type 2 diabetic patients is closely related to hepatic insulin resistance, irrespective of body type [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2009, 8(1):44
- [18] Taksali SE, Caprio S, Dziura J, et al. High visceral and low abdominal subcutaneous fat stores in the obese adolescent A determinant of an adverse metabolic phenotype [J]. *Diabetes*, 2008, 57(2):367-371
- [19] Festuccia WT, Blanchard PG, Turcotte V, et al. The PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake [J]. *Am J Physiol-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2009, 296(5):R1327-R1335

[收稿日期] 2012-12-13

## 科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每3位分成1组,组间留空隙(约为一个汉字的1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如453 000 000可写成45 300万或4.53亿或4亿5 300万,但不能写成4亿5千3百万;三千元写成3 000元或0.3万元,但不能写成3千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如10%~20%, $(2\sim6)\times 10^3$ 或 $2\times 10^3\sim 6\times 10^3$ ,30~40 km。

(本刊编辑:接雅俐)