

S100A16 在饮食诱导肥胖大鼠中的作用

黄琼,刘梦兰,李璐,张日华,刘云*

(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 S100A16 蛋白对体重增加过程的影响,进一步研究 S100A16 蛋白在肥胖及肥胖相关疾病的发生发展过程中的作用。方法:正常 8 周龄大鼠随机分为正常饮食组(NF, $n = 10$)和高脂饮食组(HF, $n = 10$),建立饮食诱导的肥胖(DIO)大鼠模型,喂食 14 周时进行腹腔葡萄糖耐量试验(IPGTT)及胰岛素释放试验(IRT),喂食 16 周处死后称量皮下及内脏脂肪重量,采用 HE 染色方法(hematoxylin and eosin staining, HE)观察肝脏脂肪变性程度,放射免疫分析法检测血糖、血清胰岛素、尿酸等血清生化指标,同时应用 Western blot 方法检测脂肪组织中 S100A16 及糖脂代谢相关转录因子的蛋白表达。结果:DIO 组大鼠的体重、内脏脂肪明显高于正常组,血清总胆固醇和尿酸 DIO 组高于正常组但糖耐量和胰岛素释放低于正常组,Western blot 显示 DIO 组大鼠脂肪和肝脏组织中 S100A16、PPAR- γ 、C/EBP- α 的蛋白表达均高于正常组。结论:高脂饮食可上调 S100A16 及相关转录因子的表达;S100A16 的高表达可促进脂质生成及肥胖发生,并对机体的胰岛素敏感性产生负性影响。

[关键词] 胰岛素敏感性;肥胖;大鼠模型;S100A16;转录因子

[中图分类号] R589.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)01-007-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140102

The role of S100A16 in rats with diet-induced obesity

Huang Qiong, Liu Menglan, Li Lu, Zhang Rihua, Liu Yun*

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of S100A16 on weight gain process and development of obesity and obesity related diseases. **Methods:** Rats aged 8 weeks were randomly divided into normal diet group (NF, $n = 10$) and high-fat diet group (HF, $n = 10$) to establish a diet induced obesity (DIO) rat model. After feeding for 14 weeks, intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) and insulin release test (IRT) were performed in rats. After feeding for 16 weeks, rats were sacrificed and subcutaneous and visceral fat weights were measured. Then, HE staining method was used to observe the degree of liver steatosis, and radiation immunity analysis was used to detect serum biochemical indicators, such as blood sugar, insulin, serum uric acid. Western blot was performed to detect the expression of S100A16 and glucolipid metabolism related protein expression of transcription factors in adipose tissue. **Results:** The weight and visceral fat of rats in the DIO group were significantly higher than those in the normal group. The serum total cholesterol and uric acid in the DIO group was higher than normal glucose tolerance, and insulin release was lower than that of the normal group. Western blot showed that in liver and fat tissue of the DIO group, S100A16, PPAR- γ and C/EPB- α expression were significantly higher than those of the normal group. **Conclusion:** High fat diet can increase the expression of S100A16 and related expression of transcription factors; S100A16 over expression can promote lipid production and obesity, and result in a negative impact on insulin release and insulin sensitivity.

[Key words] Insulin sensitivity; obese; rat model; S100A16; transcription factor

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(01):007-011]

[基金项目] 国家自然科学基金(81270952, 81070684);江苏省科技支撑项目(BE2011802);南京医科大学第一附属医院创新团队工程

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

肥胖是由于食物摄入与能量消耗之间的不平衡导致脂肪组织增多,肥胖引起的高血脂、高血压等一系列并发症给个人、家庭及社会带来了沉重的负担^[1]。目前临床上并没有治疗肥胖的有效手段,所以近年来从能量代谢途径寻找方法防治肥胖及相关

并发症已成为医学热点^[2]。S100蛋白家族是EF手型(EF-hand)钙结合蛋白超家族中最大的亚群,参与细胞生长、细胞周期调节、转录及翻译等多种胞内活动^[3-4]。由于它们广泛表达于大多数肿瘤组织中,S100蛋白已被作为肿瘤的生物标记物^[5]。S100蛋白表达的上调或下调在其他多种人类疾病(如胰岛素抵抗、血脂异常、高血压等)中起重要作用^[6]。S100A16作为S100家族中的新成员,被发现于核仁内,在Ca²⁺的刺激下转移至胞内^[7]。在本课题组前期研究中发现S100A16蛋白表达增强可促进脂肪细胞分化,提示其与肥胖相关^[8]。然而,关于S100A16在组织的特异性生理功能仍不是很清楚。为进一步探讨S100A16基因在肥胖中的作用及其可能机制,我们建立了饮食诱导的肥胖大鼠模型,旨在揭示S100A16在肥胖中的作用,为肥胖的防治提供新的线索。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠(江苏省实验动物中心);正常饮食购自江苏省实验动物中心(实验动物配合饲料GB14924.3-2001),总热能3 850 kcal,含蛋白质19.2%,碳水化合物67.3%,脂肪4.3%;高脂饮食(Research Diets公司,美国),总热能4 730 kcal,含蛋白质24%,碳水化合物41%,脂肪24%;血糖检测仪及试纸(Bayer公司,德国);S100A16抗体(S100A16-Ab)根据文献由本实验室制备^[9]。过氧化物酶体增生物激活受体- γ (PPAR- γ)抗体(Sigma公司,美国);CCAAT/增强子结合蛋白- α (C/EPB- α)抗体(CST公司,美国);羊抗兔IgG抗体(Santa Cruz公司,美国),其他常规试剂为国产分析试剂。

1.2 方法

1.2.1 建立大鼠DIO模型

取20只雄性8周龄SD大鼠,体重(250±21)g,随机分为实验组与对照组,分别给予16周高脂饮食(high-fat diet,HFD)和正常饮食(normal-fat diet,NFD),每周称量体重,持续16周。

1.2.2 葡萄糖耐量试验(IPGTT)和胰岛素释放试验(IRT)

SD大鼠喂食14周后,大鼠于夜间禁食10 h后眼眶内眦采静脉血测定基础血糖值和基础血清胰岛素水平,随后向大鼠腹腔注射葡萄糖溶液(50%,2 g/kg),于15、30、60、120 min时取眼眶静脉血测定

血糖值和血清胰岛素水平。

1.2.3 糖脂代谢指标测定

SD大鼠喂食16周后,麻醉心脏穿刺取血,冰上静置15 min后,以4℃,3 500 r/min离心20 min后取上清,采用全自动生化分析仪(Olympus公司,日本)测定血糖(GLU)、血清甘油三酯(TG)、血清总胆固醇(TC)、血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、尿酸(UA)等糖脂代谢相关指标。

1.2.4 脂肪组织称重

SD大鼠喂食16周后晚间禁食10 h,麻醉后处死,分别取腹部脂肪及皮下脂肪,称取重量。

1.2.5 HE染色观察肝脏组织形态学变化

取实验组和对照组大鼠肝脏组织标本,制成石蜡切片。HE染色后显微镜下观察肝脏组织的病理改变。

1.2.6 Western blot检查脂肪和肝脏组织中S100A16和糖脂代谢相关转录因子的蛋白表达

取脂肪和肝脏组织,加入RIPA裂解液进行裂变,离心后取上清95℃变性5 min后进行SDS-PAGE电泳,后将蛋白转到PVDF膜上。封闭后放进一抗中4℃孵育过夜,TBST洗涤3次,室温下放进二抗中孵育1 h,洗涤后ECL发光显色,并使用ImageJ软件对电泳条带进行蛋白表达相对值分析。

1.3 统计学方法

所得数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用Excel 2007统计软件,采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高脂饮食对大鼠体重及内脏脂肪重量的影响

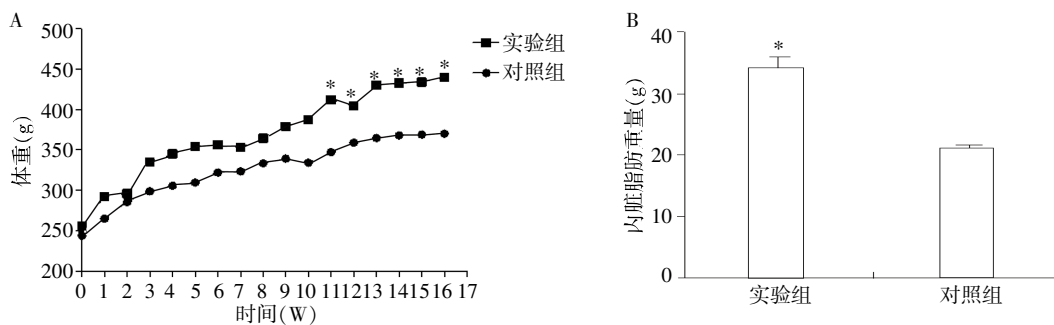
称量两组SD大鼠的原始体重后分别开始喂食高脂饮食和普通饮食,每周称重以观察体重变化。实验组(HFD)大鼠体重增长明显超过对照组(NFD)大鼠(图1A)。处死大鼠后,取内脏脂肪,称取其重量。实验组大鼠内脏脂肪重量同样明显大于对照组(图1B)。

2.2 高脂饮食对糖脂代谢相关生化指标的影响

实验组大鼠TG和UA明显高于对照组差异有统计学意义($P < 0.05$);而TC、GLU和HDL-C各组无显著差异($P > 0.05$,表1)。

2.3 饮食诱导的肥胖对糖耐量及胰岛素敏感性的影响

IPGTT和IRT的结果显示腹腔注射高浓度葡萄



A: 大鼠体重变化情况; B: 大鼠内脏脂肪重量。与对照组比较, * $P < 0.05$ ($n = 10$)。

图 1 高脂饮食对 SD 大鼠体重及内脏脂肪重量的影响

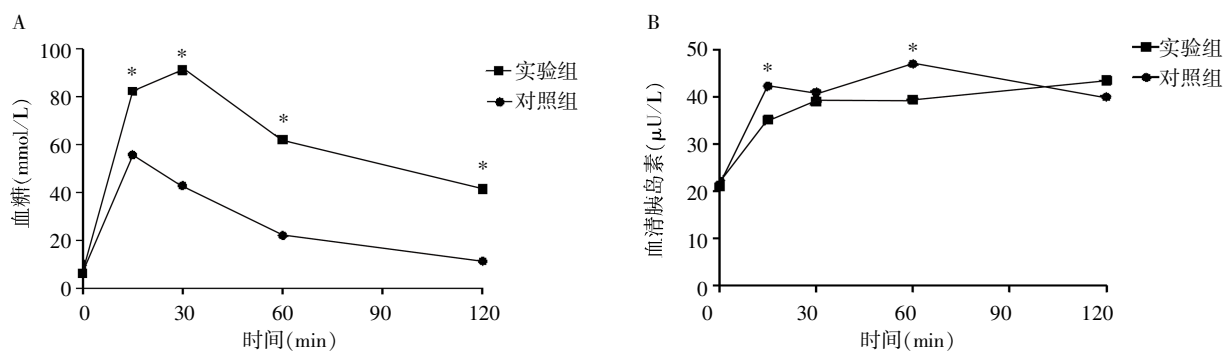
Figure 1 Effect of HF diet on body weight and visceral adipocyte lipid accretion

表 1 高脂饮食对糖脂代谢相关生化指标的影响

Table 1 Effect of HF diet on glycolipid metabolism related biochemical indicators ($\bar{x} \pm s$)

生化指标	对照组	实验组
TC (mmol/L)	2.16 ± 0.26	2.23 ± 0.28
GLU (mmol/L)	14.40 ± 4.67	15.60 ± 5.15
HDL-C (mmol/L)	1.43 ± 0.21	1.54 ± 0.25
TG (mmol/L)	0.67 ± 0.22	1.41 ± 0.21*
UA (mmol/L)	44.86 ± 1.96	90.51 ± 2.40*

与对照组比较, * $P < 0.05$ 。



A: 大鼠 IPGTT 结果; B: 大鼠 IRT 结果。与对照组比较, * $P < 0.05$ ($n = 10$)。

图 2 饮食诱导的肥胖对糖耐量及胰岛素敏感性的影响

Figure 2 Effect of DIO on IPGTT and IRT

说明实验组大鼠的肝脏脂肪变性的程度大于对照组 (图 3A)。

2.5 大鼠肝脏组织中 S100A16 及糖脂代谢相关因子的蛋白表达情况

为了检测肝脏组织中 S100A16 及糖脂代谢相关转录因子的蛋白表达情况,取肝脏组织进行 Western blot 检测,结果发现,实验组大鼠肝脏组织 S100A16 蛋白表达高于对照组。PPAR- γ 和 C/EBP- α 在肝脏中的表达量同样实验组高于对照组(图 3B)。

2.6 大鼠脂肪组织中 S100A16 及糖脂代谢相关因子的蛋白表达情况

取脂肪组织检测脂肪组织中 S100A16 蛋白的表达情况,结果显示,实验组大鼠脂肪组织中

糖溶液后,两组大鼠的血糖值均在 15~30 min 后达到血糖高峰。但是,实验组大鼠的血糖高峰值明显高于对照组 ($P < 0.05$,图 2A)。实验组大鼠的血清胰岛素释放水平在血糖高峰时也明显高于对照组 ($P < 0.05$,图 2B)。

2.4 大鼠肝脏组织的病理学改变

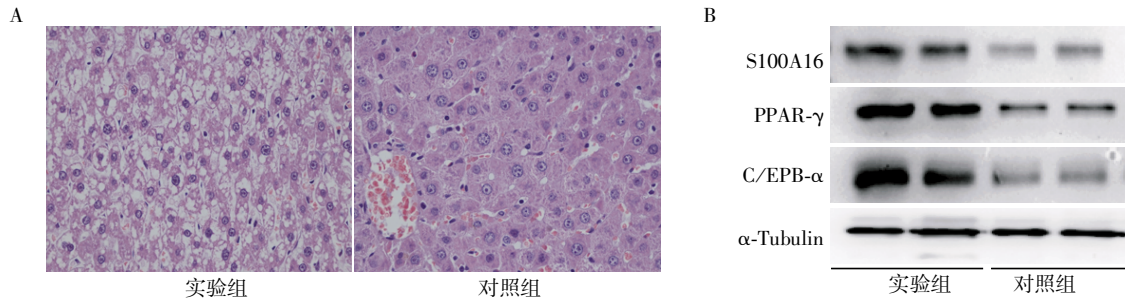
通过对比两组大鼠的 HE 染色切片后可以看出,实验组大鼠肝脏组织的空泡数明显多于对照组,

S100A16 蛋白的表达量较对照组有明显增高。糖脂代谢相关的重要转录因子 PPAR- γ 、C/EBP- α 在脂肪组织中的表达情况,与 S100A16 蛋白的表达趋势一致(图 4)。

3 讨论

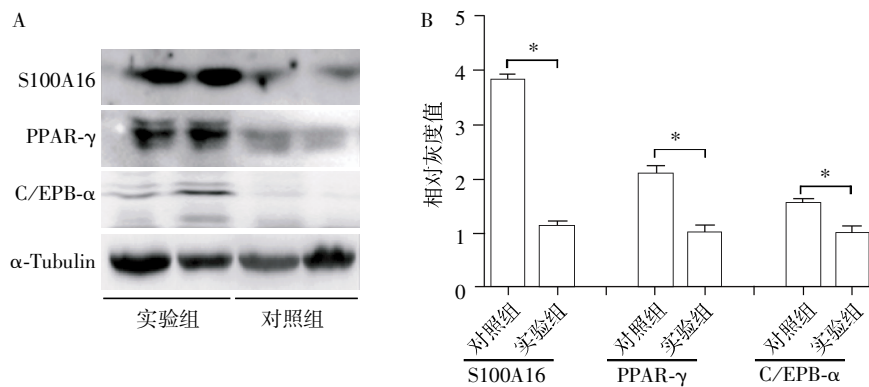
据统计全球的肥胖人口已超过 3 亿,伴随肥胖带来的一系列相关疾病,如 2 型糖尿病、高血压、高血脂、冠心病等,不仅严重影响人们的生活质量,也造成了巨大的社会负担。近年来从能量代谢途径寻找防治肥胖相关并发症的有效手段成为医学热点^[2]。

钙结合蛋白 S100 家族在细胞迁移、分化、增生与凋亡及肿瘤发生发展中都发挥了重要作用^[10]。



A:大鼠肝脏组织 HE 染色切片;B:大鼠肝脏组织中 S100A16 及糖脂代谢相关蛋白的表达。
图 3 DIO 大鼠肝脏组织的病理学改变,S100A16 及糖脂代谢相关因子的蛋白表达

Figure 3 HF diet increased adipogenesis in liver



A: Western blot 检测蛋白表达情况;B:蛋白表达的相对灰度值,* $P < 0.05$ ($n = 10$)。

图 4 DIO 大鼠脂肪组织中 S100A16 及糖脂代谢相关因子的蛋白表达情况

Figure 4 Expression of S100A16,PPAR-γ and C/EBP-α in adipose tissue of DIO

S100A16 作为家族中的新成员,在人体各组织器官中广泛表达^[5]。本课题组早先的研究表明 S100A16 蛋白的表达量随着小鼠前体脂肪细胞 3T3-L1 的分化过程而增加,并且 3T3-L1 细胞中高表达的 S100A16 蛋白,可明显地促进脂质生成和胰岛素刺激下的葡萄糖摄取,从而引起胰岛素抵抗^[8]。

本研究中,实验组大鼠的体重、内脏脂肪重量及血清生化指标检测结果表明 DIO 大鼠模型造模成功。IPGTT 结果显示 DIO 大鼠较正常大鼠血糖高峰后延且胰岛素水平升高,说明实验组大鼠已发生胰岛素抵抗(图 2)。

Gaggini 等^[11]的研究认为,肝脏的非酒精性脂肪变性(NAFLD)可导致胰岛素抵抗,并且两者共同作用可引起代谢疾病及心血管疾病的发生发展。Liu 等^[8]的研究提出,S100A16 蛋白可促使 3T3-L1 细胞的胰岛素敏感性下降。本实验中实验组大鼠肝脏较对照组发生了明显的 NAFLD,并且实验组大鼠的肝脏组织中 S100A16 蛋白的表达量明显高于对照组,提示 S100A16 与肝脏 NAFLD 和胰岛素敏感性降低有密切关系。

研究证实,脂质生成要经历细胞增殖和脂肪细胞分化两个过程^[12],有多种转录因子在脂肪细胞的分化过程中发挥重要作用,其中 PPAR-γ 和 C/EBP-α 的作用最为显著^[12]。PPAR-γ 和 C/EBP-α 可调控细胞由增殖生长向脂肪细胞分化的转变并可作为胰岛素抵抗的标志基因^[13-14]。本课题组前期的体外实验中发现,高浓度钙可使钙结合蛋白 S100A16 由核内向胞质内转移,通过激活 S100A16 介导的钙离子信号通路促进 3T3-L1 细胞的脂质生成和葡萄糖的摄取,但其具体分子机制尚不清楚^[7]。有相关文献报道,钙离子信号通路不仅可通过 PPAR-γ 和 C/EBP-α 促进脂肪细胞分化^[15-16],还参与对 PPAR-γ 内源性配体生成的调控,调节胰岛素敏感性^[17]。本实验中,实验组大鼠的肝脏和脂肪组织中 PPAR-γ 和 C/EBP-α 的表达量均高于对照组,与 S100A16 在肝脏和脂肪组织中的表达一致。结果说明,钙离子结合蛋白 S100A16 参与调节脂肪细胞分化,从而参与脂质形成和胰岛素抵抗。

综上所述,本研究的结果提示,钙离子结合蛋白 S100A16 与肥胖是密切相关的,它对脂肪细胞的分

化起到重要作用,是一种脂质生成的促进因子,并且对胰岛素敏感性产生不良影响。当然,S100A16 蛋白作用于肥胖的具体分子机制仍有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Paterson JM, Morton NM, Fievet C, et al. Metabolic syndrome without obesity; Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(18): 7088-7093
- [2] Herr CE, Zur Nieden A, Kopka I, et al. Assessment of somatic complaints in environmental health [J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2009, 212(1): 27-36
- [3] Heizmann CW. The multifunctional S100 protein family [J]. *Methods Mol Biol*, 2002, 172(1): 69-80
- [4] Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology [J]. *Front Biosci*, 2002, 7: d1356-1368
- [5] Sturchler E, Cox JA, Durussel I, et al. S100A16, a novel calcium-binding protein of the EF-hand superfamily [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(50): 38905-38917
- [6] Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 322(4): 1111-1122
- [7] Zhang R, Zhu W, Du X, et al. S100A16 mediation of weight gain attenuation induced by dietary calcium [J]. *Metabolism*, 2012, 61(2): 157-163
- [8] Liu Y, Zhang R, Xin J, et al. Identification of S100A16 as a novel adipogenesis promoting factor in 3T3-L1 cells [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(3): 903-911
- [9] 薛 一, 孙 静, 黄 琼, 等. S100A16 基因的原核表达和多克隆抗体制备 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(10): 1376-1380
- [10] Yao R, Lopez-Beltran A, MacLennan GT, et al. Expression of S100 protein family members in the pathogenesis of bladder tumors [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(5A): 3051-3058
- [11] Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease [J]. *Nutrients*, 2013, 5(5): 1544-1560
- [12] Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. Regulation of adipocyte development [J]. *Annu Rev Nutr*, 1994, 14: 99-129
- [13] Evertts AG, Coller HA. Back to the origin: reconsidering replication, transcription, epigenetics, and cell cycle control [J]. *Genes Cancer*, 2012, 3(11-12): 678-696
- [14] Kadowaki T, Hara K, Kubota N, et al. The role of PPARgamma in high-fat diet-induced obesity and insulin resistance [J]. *J Diabetes Complications*, 2002, 16(1): 41-45
- [15] Chbicheb S, Yao X, Rodeau JL, et al. EGR1 expression: a calcium and ERK1/2 mediated PPARgamma-independent event involved in the antiproliferative effect of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones in breast cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(9): 1087-1097
- [16] He YH, He Y, Liao XL, et al. The calcium-sensing receptor promotes adipocyte differentiation and adipogenesis through PPARgamma pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 361(1-2): 321-328
- [17] Katsuhiko F, Haowei S, Li Y, et al. Muscle lipogenesis balances insulin sensitivity and strength through calcium signaling [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(3): 1229-1240

[收稿日期] 2013-07-04