

# 胰升糖素样肽 1 通过 PKA 途径促进 3T3-L1 脂肪细胞内脂素的表达

刘瑞 彭永德 董维平 张爱芳 王熠非 丁晓颖

**【摘要】** 目的 检测胰升糖素样肽 1 (GLP-1) 是否调节内脂素的合成,并探讨其作用机制。方法 以 3T3-L1 分化成熟脂肪细胞为模型, GLP-1 干预后, 提取总 RNA 定量检测内脂素转录水平, 收集培养液酶联免疫法检测内脂素分泌水平; PKA 通路抑制剂 H89 预处理 30 min, 检测内脂素的转录水平。结果 GLP-1 呈剂量依赖性增加 3T3-L1 细胞表达内脂素,  $10^{-10}$  mol/L 时显著提高 ( $P < 0.05$ ),  $10^{-9}$  mol/L 时达峰值 ( $P < 0.01$ ); 并呈时间依赖性, 作用 18 h 时内脂素显著升高 ( $P < 0.05$ )。H89 部分阻断 GLP-1 刺激的内脂素表达。结论 GLP-1 通过 PKA 途径提升脂肪细胞表达内脂素, 进而可能提升胰岛功能和周围组织胰岛素敏感性。

**【关键词】** 胰升糖素样肽 1; 内脂素; 脂肪细胞; 糖尿病

**Glucagon like peptide-1 increases visfatin expression in 3T3-L1 adipocytes via PKA pathway** LIU Rui, PENG Yong-de, DONG Wei-ping, ZHANG Ai-fang, WANG Yi-fei, DING Xiao-ying. Department of Endocrinology, Shanghai First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China  
Corresponding author: PENG Yong-de, Email: pengyongde09081@126.com

**【Abstract】 Objective** To test whether glucagon like peptide-1 (GLP-1) would regulate the expression of visfatin in adipocytes, and to explore the mechanism of this effect. **Methods** Fully differentiated 3T3-L1 adipocytes were treated with GLP-1. Total RNA was extracted for analyzing the level of visfatin mRNA by quantitative RT-PCR. The media were collected for measuring the level of visfatin protein by enzyme linked immuno-assay (ELISA). In order to test the involvement of PKA pathway, the adipocytes were pretreated with a specific pharmacological PKA inhibitor H89 for 30 min before GLP-1 was added. **Results** GLP-1 increased visfatin expression in a time- and dose-dependent manner. The level of visfatin significantly increased at the concentration of  $10^{-10}$  mol/L GLP-1 ( $P < 0.05$ ), and reached the peak at  $10^{-9}$  mol/L ( $P < 0.01$ ). After incubation for 18 hours, GLP-1 dominantly increased the level of visfatin ( $P < 0.05$ ). Inhibition of PKA pathway by H89 partially blocked the effect of GLP-1 on visfatin expression. **Conclusions** GLP-1 may enhance the expression of visfatin in 3T3-L1 adipocyte via the PKA pathway, which might contribute to the improvement in glucose homeostasis.

**【Key words】** Glucagon like peptide-1; Visfatin; Adipocyte; Diabetes

(Chin J Endocrinol Metab, 2013, 29; 977-980)

胰升糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 是由肠黏膜内分泌 L-细胞受进食营养素刺激而分泌的多肽类激素<sup>[1]</sup>。GLP-1 能增加糖依赖性的胰岛素分泌, 抑制胰升糖素分泌和改善外周胰岛素抵抗<sup>[1,2]</sup>。外源给予 GLP-1 可以减轻 2 型糖尿病患者的高糖血症<sup>[3]</sup>。因此, GLP-1 类似物已成为目前最有潜力的糖尿病治疗新型药物。

脂肪组织既是能量储存场所, 也分泌大量的细胞因子。内脂素是 Fukuhara 等<sup>[4]</sup>发现的一个脂肪因子, 因其在内脏脂肪中高表达而得名。内脂素具有胰岛素

样作用<sup>[5-7]</sup>。GLP-1 除了可以增加脂肪组织的胰岛素敏感性外, 对脂肪细胞的内分泌功能也有直接作用。GLP-1 可以增加脂联素表达<sup>[8]</sup>, 抑制白细胞介素 (IL)-6 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  表达<sup>[8,9]</sup>。因此, 本研究的目的是检测 GLP-1 是否调节内脂素的合成, 并探讨其作用机制。

## 材料和方法

### 一、实验细胞及主要试剂

小鼠源性脂肪细胞 3T3-L1 细胞株为实验室保存。细胞培养液、小牛血清、胎牛血清、DNase I、TRIzol 购自 Life Technologies 公司。GLP-1、H89、内质网特异诱导剂 thapsigargin (Tg) 购买于 Sigma Chemical 公司。内脂素酶联免疫检测试剂盒购于上海江莱生物科技有限公

DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2013.11.015

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81070682, 81200622); 上海卫生局面上项目 (20124263)

作者单位: 200080 上海交通大学附属第一人民医院内分泌科

通信作者: 彭永德, Email: pengyongde09081@126.com

司。逆转录试剂 TaKaRa PrimeScript™ RT 和荧光定量 PCR 试剂盒 TaKaRa SYBR premix Ex Taq 购于 TaKaRa Bio. 公司。

### 二、3T3-L1 细胞的培养和诱导分化

3T3-L1 细胞培养在含有 10% 小牛血清, 100 U 青霉素/ml 和 100 mg 链霉素/ml 的 DMEM 高糖培养基 (完全培养基) 中。3T3-L1 细胞的分化: 细胞汇合度达 100% 后, 完全培养基继续培养 2 d; 更换培养基为含有 10% 胎牛血清、0.5 mmol/L IBMX、1 μmol/L 地塞米松和 1.7 μmol/L 胰岛素的完全培养基培养 2 d; 更换培养基为含有 10% 胎牛血清和 1.7 μmol/L 胰岛素的完全培养基培养 2 d; 之后细胞维持培养在含有 10% 胎牛血清的完全培养基中 5 ~ 7 d, 80% ~ 90% 的细胞分化为成熟脂肪细胞。

### 三、总 RNA 的提取和 RT-PCR 检测

脂肪细胞总 RNA 的提取按照 TRIzol 操作说明进行。取 2 μg 总 RNA 使用 KaRa PrimeScript™ RT 逆转录, 生成第一链 cDNA, 稀释 10 倍后用做 PCR 模板。内脂素上游引物为 5'-TTGTCAGTCCTGGTATCC-3', 下游引物为 5'-ATTCCCGCCACAGTATC-3'; 内参 18S 核糖体 RNA 上游引物为 5'-TCAAGAACGAAAGTCGG-AGG-3'; 下游引物为 5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'。PCR 混合体系经 95℃ 预变性 10 min 后, 扩增 40 个循环, 每个循环包括 95℃ 变性 15 s 和 60℃ 退火 1 min。熔解曲线用于判断扩增反应的特异性, 扩增曲线得到的 ΔΔCt 用于相对定量内脂素的表达水平。

### 四、内脂素酶联免疫分析 (ELISA)

检测脂肪细胞分泌到培养基中的内脂素水平, 按照小鼠内脂素 ELISA 检测试剂盒的说明书操作。简述为: 收集细胞培养上清, 3 000 转/min 离心 20 min; 包被有抗小鼠内脂素多克隆抗体的检测板中, 依次加入标准品和样品 100 μl, 4℃ 孵育过夜; 之后加入 HRP 标记的抗小鼠内脂素多克隆抗体室温孵育 1 h; 最后加入底物反应 15 min, 在 450 nm 处检测吸光度。每个样品中的内脂素浓度通过标准曲线进行定量。

### 五、统计学处理

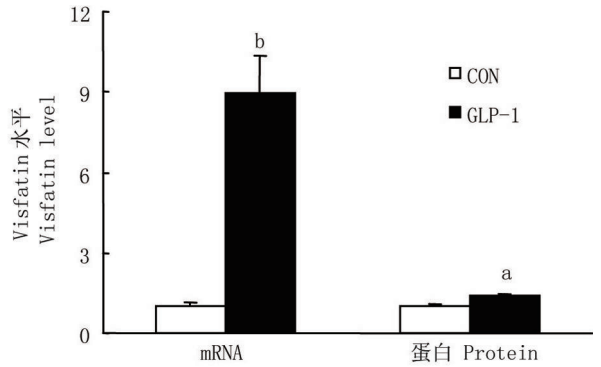
所有的数据都表示为  $\bar{x} \pm s$ 。2 组之间的比较使用非配对 Students' *t* 检验, 超过 2 组之间的比较使用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、GLP-1 促进脂肪细胞内脂素的表达

分化成熟的脂肪细胞, 经 GLP-1 孵育 24 h, 提取总 RNA 检测内脂素的转录水平, 收集培养液检测内脂素

的分泌水平。结果显示, GLP-1 孵育后, 内脂素的转录水平提高了近 8 倍, 分泌水平升高了近 1.3 倍 (图 1)。

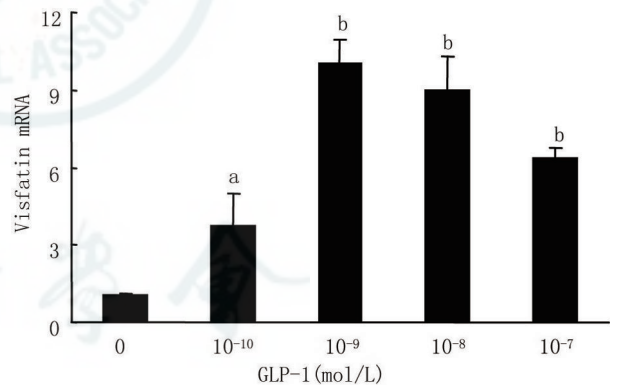


注: CON: 对照组 Control group; GLP-1: 胰升糖素样肽 1 Glucagon-like peptide-1; 与 CON 组比较 vs Control group, <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01

图 1 GLP-1 增加 3T3-L1 脂肪细胞内脂素的表达和分泌  
Fig 1 GLP-1 increased visfatin secretion and mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes.

### 二、GLP-1 促进脂肪细胞内脂素合成呈剂量依赖性

分化成熟的脂肪细胞, 使用不同浓度的 GLP-1 孵育 24 h, 提取总 RNA 检测内脂素的转录水平。结果显示, GLP-1 呈剂量依赖性地增加脂肪细胞表达内脂素, 在 GLP-1 浓度为 10<sup>-10</sup> mol/L 时内脂素的表达显著提高, 在 GLP-1 浓度为 10<sup>-9</sup> mol/L 时内脂素水平达到峰值 (图 2)。

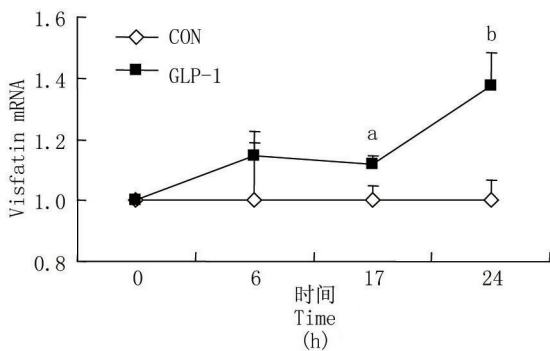


注: 略语同图 1 The abbreviations are the same as Fig 1; 与对照组比较 vs Control group, <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01

图 2 GLP-1 提升内脂素表达呈剂量依赖性  
Fig 2 Visfatin expression was up-regulated by GLP-1 in a dose-dependent manner

### 三、GLP-1 促进脂肪细胞内脂素合成呈时间依赖性

分化成熟的脂肪细胞, 使用浓度为 10<sup>-9</sup> mol/L 的 GLP-1 孵育不同时间, 收集培养液检测内脂素的分泌水平。结果显示, GLP-1 呈时间依赖性增加脂肪细胞表达内脂素, 随着孵育时间的延长, 内脂素的水平持续升高, GLP-1 孵育 18 h 时内脂素的表达显著提高, 24 h 时进一步升高 (图 3)。



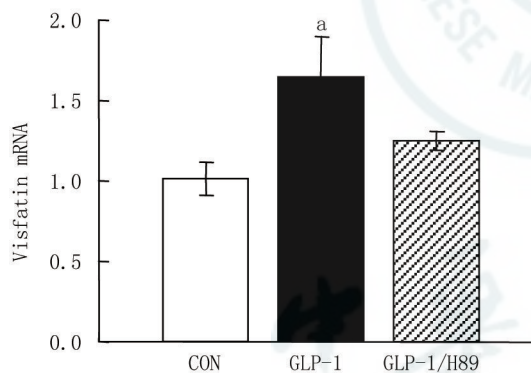
注:略语同图 1 The abbreviations are the same as Fig 1; 与 CON 组比较 vs Control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 3 GLP-1 提升内脂素表达呈时间依赖性

Fig 3 Visfatin expression was up-regulated by GLP-1 in a time-dependent manner

#### 四、GLP-1 对内脂素的作用通过 PKA 途径

GLP-1 受体是一个激活型 G 蛋白耦联受体, cAMP-PKA 是其经典通路。因此,本研究检测 PKA 通路是否也参与 GLP-1 对内脂素的表达调控。分化成熟的脂肪细胞,使用 PKA 特异抑制剂 H89 (20  $\mu\text{mol/L}$ )<sup>[8]</sup> 预处理 30 min,加入  $10^{-8}$  mol/L GLP-1 和 20  $\mu\text{mol/L}$  H89 孵育 5 h,提取总 RNA 定量检测内脂素水平。结果显示,GLP-1 提升内脂素表达约 1.6 倍,加入 H89 后内脂素的水平基本与未处理组持平,提示 PKA 途径参与 GLP-1 对内脂素的作用(图 4)。



注:略语同图 1 The abbreviations are the same as Fig 1; 与对照组比较 vs Control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$

图 4 PKA 途径参与 GLP-1 对内脂素的作用

Fig 4 Effect of GLP-1 on visfatin expression was blocked by PKA inhibitor

## 讨 论

本研究证实 GLP-1 促进脂肪细胞内脂素的表达。最近的研究已经证实,GLP-1 通过多条通路影响血糖平衡,包括通过调节细胞因子释放改善脂肪和肝脏细胞的胰岛素信号通路<sup>[10,11]</sup>。GLP-1 对内脂素表达的刺激作用很可能是 GLP-1 促进周围组织胰岛素敏感性的一个重要途径。内脂素又名烟酰胺磷酸核糖转移酶 (nicotinamide phosphoribosyltransferase)<sup>[12]</sup> 和前 B 细胞集落增强因子 1 (pre-B-cell-colony-enhancing factor

1)<sup>[13]</sup>,组织分布广泛,包括脂肪组织、大脑、肾脏、肺脏、脾脏、睾丸和血管内皮细胞等。调节内脂素表达也呈现组织特异性,IL-6 在血管内皮细胞提升内脂素的表达<sup>[14]</sup>,而在脂肪细胞却降低内脂素的表达。已有文献报道,在脂肪细胞 10 nmol/L 的 GLP-1 可以促进前脂肪细胞的增殖<sup>[15]</sup>,抑制间充质干细胞向成熟脂肪细胞分化<sup>[16]</sup>。本研究首先选用了 10 nmol/L 的 GLP-1 干预脂肪细胞,发现内脂素的合成和分泌均增加,进一步的研究结果证实 GLP-1 对脂肪细胞表达内脂素的促进作用呈时间和剂量依赖性。

GLP-1 受体广泛存在于胰腺管周细胞、肾脏、心脏、胃和大脑组织中<sup>[17]</sup>。GLP-1 受体特异抑制剂 EX9 可以阻断 GLP-1 受体拮抗剂 EX4 促进脂联素表达的作用<sup>[9]</sup>。GLP-1 受体属于激活型 G 蛋白耦联受体,与 G<sub>s</sub> 相耦联,并能激活腺苷酸环化酶,促进 ATP 转化为 cAMP。在胰岛  $\beta$  细胞中,GLP-1 可以激活蛋白激酶 (PK) A、p44/42MAPK、PKB、Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白调节蛋白激酶、PI-3 激酶和 PKC,促进  $\beta$  细胞增殖和存活<sup>[18]</sup>。在脂肪细胞,GLP-1 通过 PKA 通路促进脂联素的表达<sup>[8]</sup>,而 PKB、PKC、MEK 和 MAPK 参与了 GLP-1 对前脂肪细胞的增殖和分化的调控<sup>[15,16]</sup>。H89 是 PKA 的特异抑制剂,H89 可阻断 GLP-1 刺激的内脂素表达,提示 GLP-1 提升脂肪细胞内脂素表达的作用是通过 PKA 途径实现的。最近的研究在人羊膜内皮细胞中证实 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 是调节内脂素表达的转录因子<sup>[19]</sup>,通过分析 PKA 下游分子和内脂素的启动子区,本组将在以后的工作中进一步探索参与 GLP-1/PKA/内脂素信号通路中的转录因子。

## 参 考 文 献

- [1] Todd JF, Wilding JP, Edwards CM, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): a trial of treatment in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*, 1997, 27:533-536.
- [2] Wang Q, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia*, 2002, 45: 1263-1273.
- [3] Rosenstock J, Balas B, Charbonnel B, et al. The fate of taspoglutide, a weekly GLP-1 receptor agonist, versus twice-daily exenatide for type 2 diabetes: the T-emerge 2 trial. *Diabetes Care*, 2013, 36:498-504.
- [4] Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, 2005, 307:426-430.
- [5] Xie H, Tang SY, Luo XH, et al. Insulin-like effects of visfatin on human osteoblasts. *Calcif Tissue Int*, 2007, 80:201-210.
- [6] Brown JE, Onyango DJ, Ramanjaneya M, et al. Visfatin regulates insulin secretion, insulin receptor signalling and mRNA expression of diabetes-related genes in mouse pancreatic beta-cells. *J Mol Endocrinol*, 2010, 44:171-178.
- [7] Revollo JR, Komer A, Mills KF, et al. Namp1/PBEF/Visfatin

regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab*, 2007,6:363-375.

- [8] Kim Chung IT, Hosaka T, Yoshida M, et al. Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, directly induces adiponectin expression through protein kinase A pathway and prevents inflammatory adipokine expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009,390:613-618.
- [9] Lee YS, Park MS, Choung JS, et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits adipose tissue macrophage infiltration and inflammation in an obese mouse model of diabetes. *Diabetologia*, 2012,55:2456-2468.
- [10] Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, et al. Insulin resistance-inducing cytokines differentially regulate SOCS mRNA expression via growth factor- and Jak/Stat-signaling pathways in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol*, 2004,181:129-138.
- [11] Ognjanovic S, Bao S, Yamamoto SY, et al. Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *J Mol Endocrinol*, 2001,26:107-117.
- [12] Samal B, Sun Y, Stearns G, et al. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol*, 1994,14:1431-1437.
- [13] Rongvaux A, Shea RJ, Mulks MH, et al. Pre-B-cell colony enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur J Immunol*, 2002,32:3225-3234.
- [14] Ognjanovic S, Bao S, Yamamoto SY, et al. Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *J Mol Endocrinol*, 2001,26:107-117.
- [15] Sanz C, Vázquez P, Blázquez C, et al. Signaling and biological effects of glucagon-like peptide 1 on the differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010,298:E634-E643.
- [16] Challa TD, Beaton N, Arnold M, et al. Regulation of adipocyte formation by GLP-1/GLP-1R signaling. *J Biol Chem*, 2012,287:6421-6430.
- [17] Brubaker PL, Drucker DJ. Structure-function of the glucagon receptor family of G protein-coupled receptors; the glucagon, GIP, GLP-1, and GLP-2 receptors. *Receptors Channels*, 2002,8:179-188.
- [18] Holz GG. Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes*, 2004,53:5-13.
- [19] Kendal CE, Bryant-Greenwood GD. Pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF/Visfatin) gene expression is modulated by NF-kappaB and AP-1 in human amniotic epithelial cells. *Placenta*, 2007,28:305-314.

(收稿日期:2013-02-18)

(本文编辑:陈文辉)

CHINESE MEDICAL ASSOCIATION  
1915  
中华医学学会