

NYGGF4 基因过表达对脂肪细胞胰岛素敏感性及分泌功能的影响

张春梅,邱洁,陈小慧,王玢,张敏,郭锡熔

(南京医科大学附属南京市妇幼保健院,江苏 南京 210004)

[摘要] 目的 观察肥胖相关新基因 *NYGGF4* 过表达对脂肪细胞的胰岛素敏感性及分泌功能的影响。方法 体外培养稳定转染 *NYGGF4* 基因(*NYGGF4*-pcDNA3.1)的 3T3-L1 前体脂肪细胞,以转染空载体(pcDNA 3.1)的 3T3-L1 细胞为对照,胰岛素加地塞米松加 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤(MDI)方案诱导细胞分化成熟,液闪仪测定 3H 标记的葡萄糖摄取率,Western blot 检测葡萄糖转运体 4 (GLUT4)的表达及转位;采用 ELISA 双抗体夹心法检测培养上清中 TNF- α 、IL-6、脂联素、抵抗素 4 种细胞因子的水平。结果 *NYGGF4* 过表达显著降低胰岛素刺激的葡萄糖摄取率($P < 0.05$)。*NYGGF4* 过表达对总的 GLUT4 的表达量没有影响,但明显降低胰岛素刺激的 GLUT4 由细胞浆向细胞膜的转位($P < 0.05$)。过表达 *NYGGF4* 的脂肪细胞其培养上清中 TNF- α 、IL-6、脂联素及抵抗素的分泌水平与对照组相比差异无显著性($P > 0.05$)。结论 *NYGGF4* 基因过表达通过下调胰岛素刺激的 GLUT4 的转位而减少脂肪细胞的葡萄糖摄取率,提示脂肪细胞对胰岛素的敏感性降低,而对脂肪细胞的分泌功能无明显影响。

[中国当代儿科杂志,2009,11(10):846-849]

[关键词] 肥胖; *NYGGF4*; 葡萄糖转运体 4; 3T3-L1 脂肪细胞
[中图分类号] R335 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)10-0846-04

Effects of *NYGGF4* gene over-expression on the insulin sensitivity and secretory function of adipocytes

ZHANG Chun-Mei, QIU Jie, CHEN Xiao-Hui, WANG Bin, ZHANG Min, GUO Xi-Rong. Nanjing Maternal and Child Health Care Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China (Guo X-R, Email: xrguo@njmu.edu.cn)

Abstract: Objective To study the effect of a new obesity-related gene *NYGGF4* on the insulin sensitivity and secretory function of adipocytes. **Methods** 3T3-L1 preadipocytes transfected with either an empty expression vector (pcDNA3.1; control group) or an *NYGGF4* expression vector (*NYGGF4*-pcDNA3.1) were cultured *in vitro* and differentiated into the matured adipocytes with the standard insulin plus dexamethasone plus 3-isobutyl-methylxanthine (MDI) induction cocktail. 2-deoxy-D-[3H] glucose uptake was determined by liquid scintillation counting. Western blot was performed to detect the protein content and translocation of glucose transporter 4 (GLUT4). The supernatant concentrations of TNF- α , IL-6, adiponectin and resistin were measured using ELISA. **Results** *NYGGF4* over-expression in 3T3-L1 adipocytes reduced insulin-stimulated glucose uptake. *NYGGF4* over-expression impaired insulin-stimulated GLUT4 translocation without affecting the total protein content of GLUT4. The concentrations of TNF- α , IL-6, adiponectin and resistin in the culture medium of 3T3-L1 transfected with *NYGGF4* were not significantly different from those in the control group. **Conclusions** *NYGGF4* over-expression impairs the insulin sensitivity of 3T3-L1 adipocytes through decreasing GLUT4 translocation and had no effects on the secretory function of adipocytes.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (10):846-849]

Key words: Obesity; *NYGGF4*; GLUT4; 3T3-L1 adipocyte

肥胖是一种病因复杂的能量代谢性疾病,目前认为遗传因素在肥胖发病中的作用占 40% ~ 70%^[1]。随着分子生物学和分子遗传学的快速发展,迄今为止已有两百多个与肥胖发生相关的基因被克隆和报道^[2]。*NYGGF4* 是本研究小组于 2006 年首次发现并克隆到的一条人类肥胖相关全长新基因,该基因特异表达于肥胖与健康者腹膜后脂肪组

织,且在肥胖儿童脂肪组织中的表达显著上调^[3,4]。初步研究还发现,*NYGGF4* 基因在体外过表达能明显促进 3T3-L1 前体脂肪细胞的增殖,但不影响脂肪细胞的分化进程^[5]。
近年来脂肪组织在肥胖发生发展中的作用受到普遍重视。越来越多的证据表明脂肪组织不仅是能量代谢的场所,还是一个功能活跃的内分泌器官,分

[收稿日期]2009-03-27;[修回日期]2009-05-04
[基金项目]国家自然科学基金(编号:30571978);江苏省医学领军人才项目(LJ200624)。
[作者简介]张春梅,女,博士研究生。主攻方向:儿童肥胖症。
[通讯作者]郭锡熔,男,主任医师,南京医科大学儿科医学研究所,邮编:210029。

泌多种细胞因子,不仅调控体内能量平衡,而且参与胰岛素抵抗、糖尿病和动脉粥样硬化的发生^[5-7]。鉴于 *NYGGF4* 是新发现的在肥胖者脂肪组织中高表达的基因,其确切的生物学功能仍然未知,本研究拟通过测定过表达 *NYGGF4* 的脂肪细胞的葡萄糖摄取率及葡萄糖转运体 4 (GLUT4) 的转位,以评价其对脂肪细胞胰岛素敏感性的影响;并检测培养上清中细胞因子的含量,从细胞因子水平探讨 *NYGGF4* 改变胰岛素敏感性的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

稳定转染 *NYGGF4* 基因的 3T3-L1 脂肪前体细胞株 (*NYGGF4*-pcDNA3.1myc/his-3T3-L1) 及转染空载的对照 (pcDNA3.1myc/his-3T3-L1) 细胞由本实验室王玢博士构建^[8]。达尔伯改良伊格尔培养基 (DMEM) 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, G418 购自美国 Invitrogen 公司,胰岛素、地塞米松和 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX) 购自美国 Sigma 公司, 2-脱氧-[3H]葡萄糖购自中国同位素公司(北京),膜蛋白抽提试剂盒购自美国 Pierce 公司,兔抗 GLUT4 多克隆抗体购自美国 Cell Signalling 公司,小鼠 TNF- α 、IL-6、脂联素、抵抗素 ELISA 试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司。

1.2 细胞培养及诱导分化

根据 3T3-L1 细胞培养和诱导分化方案^[9],将 *NYGGF4*-pcDNA3.1myc/his-3T3-L1 和对照 pcDNA3.1myc/his-3T3-L1 脂肪前体细胞接种于 6 孔板,用完全培养液(含 4.5 g/L 高糖 DMEM、10% 胎牛血清、G418 400 mg/L),在 37℃、50 mL/L CO₂ 培养箱中培养,换液每两天 1 次。待细胞生长至完全融合后 2 d (第 0 天)时开始诱导分化,将培养液换成含 0.5 mmol/L MIX、1 μ mol/L 地塞米松和 10 mg/L 胰岛素的完全培养液。48 h 后,换用含 10 mg/L 胰岛素的完全培养液。2 d 后换液,撤去胰岛素,使用不含有任何诱导剂的完全培养基,以后每两天换液 1 次,直至第 10 天,95% 以上 3T3-L1 细胞分化为成熟的脂肪细胞。

1.3 葡萄糖摄取实验

取诱导分化成熟(第 10 天)的细胞,血清饥饿 4 h, PBS 洗两遍后,用含 1% BSA 的 KRB 缓冲液 (30 mmol/L HEPES, pH 7.4, 10 mmol/L NaHCO₃, 120 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KH₂PO₄, 1 mmol/L

MgSO₄, 1 mmol/L CaCl₂) 孵育 1 h。将细胞随机分为加胰岛素组和不加胰岛素组,加入终浓度为 100 nmol/L 的胰岛素继续孵育 30 min,每孔加入 2-脱氧-[3H]葡萄糖 (2 μ Ci/mL) 37℃ 孵育 10 min,用含 10 mmol/L 葡萄糖的冰 PBS 终止反应并洗涤细胞 3 次,吸去洗涤液,室温干燥后每孔加入 400 μ L 1 mol/L 的 NaOH 裂解细胞,收集裂解液,1 000 转/min 离心 10 min 后吸取上清,液闪计数器读数。

1.4 Western blot

取诱导分化成熟(第 10 天)的细胞,每组随机分为加胰岛素组和不加胰岛素组。血清饥饿 4 h,加入终浓度为 100 nmol/L 的胰岛素孵育 30 min 后, PBS 洗两遍,提取总蛋白和膜蛋白^[10],用 BCA 法测定蛋白质浓度。100℃煮沸变性 5 min 后,等量蛋白 (20 μ g) 上样。10% SDS-PAGE 电泳后,转膜。3% BSA 室温封闭 1 h 后,加入一抗 (1:800) 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加二抗 (1:2 000) 室温孵育 1 h,洗膜。加 ECL 试剂反应,显像,成像。

1.5 ELISA 法检测培养上清中细胞因子浓度

在细胞分化成熟(第 10 天)换用不含血清的 DMEM 培养基培养 24 h,收集上清。ELISA 双抗体夹心法检测细胞培养上清中 TNF- α 、IL-6、脂联素、抵抗素的含量。步骤:上清和标准品一起加入相应孔中,各设 3 个复孔,孵育 120 min 后洗板 5 次,加入生物素化抗体工作液孵育 60 min,洗板后加入酶结合物工作液孵育 30 min,再加入显色剂避光显色 10~15 min 后加终止液,酶联免疫检测仪测 A450 值。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 11.5 软件进行分析,结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,统计分析采用单因素方差分析和成组 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著性意义。

2 结果

2.1 *NYGGF4* 过表达对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖摄取的影响

脂肪细胞在没有胰岛素作用的基础状态下对葡萄糖仅有低水平摄取, *NYGGF4* 过表达对其没有明显影响。胰岛素刺激使转染空载体的对照组细胞葡萄糖摄取较基础水平增加 4 倍;而 *NYGGF4* 过表达组胰岛素刺激的葡萄糖摄取水平较基础水平仅增加 2 倍左右,单因素方差分析, $F = 512.36$, $P < 0.05$ 。 *NYGGF4* 过表达使胰岛素刺激的葡萄糖摄取较对照组明显下降 ($P < 0.05$),提示细胞发生了胰岛素抵抗(图 1)。

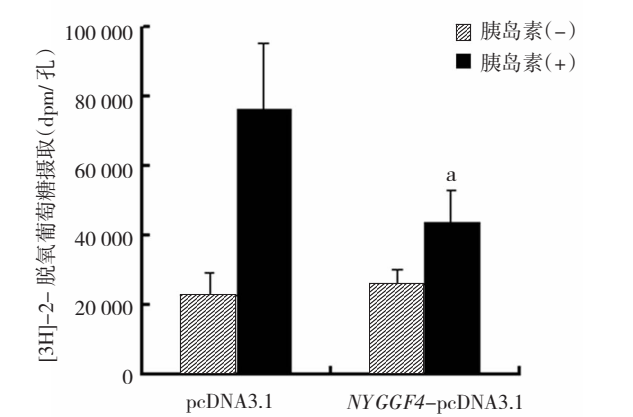


图1 NYGGF4 对成熟脂肪细胞葡萄糖摄取的影响
a:与胰岛素刺激的转染空载体(pcDNA3.1)对照组比较, $P<0.05$ 。

2.2 NYGGF4 过表达对 GLUT4 的表达及转位的影响

脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖摄取主要是依靠对胰岛素敏感的葡萄糖转运体 4 的转位来实现的^[11,12]。NYGGF4 过表达对脂肪细胞内总 GLUT4 的表达量没有影响。在基础状态下, GLUT4 大部分位于胞质内, 细胞膜上 GLUT4 的含量在两组细胞间无显著性。胰岛素刺激后, NYGGF4 过表达组的细胞膜上 GLUT4 的含量较对照组明显减少, 提示 NYGGF4 过表达降低了 GLUT4 由细胞浆内向细胞膜的转位(图 2)。

2.3 NYGGF4 过表达对 3T3-L1 脂肪细胞内分泌功能的影响

采用 ELISA 双抗体夹心法检测了成熟脂肪细胞 24 h 培养上清中 TNF- α 、IL-6、脂联素和抵抗素

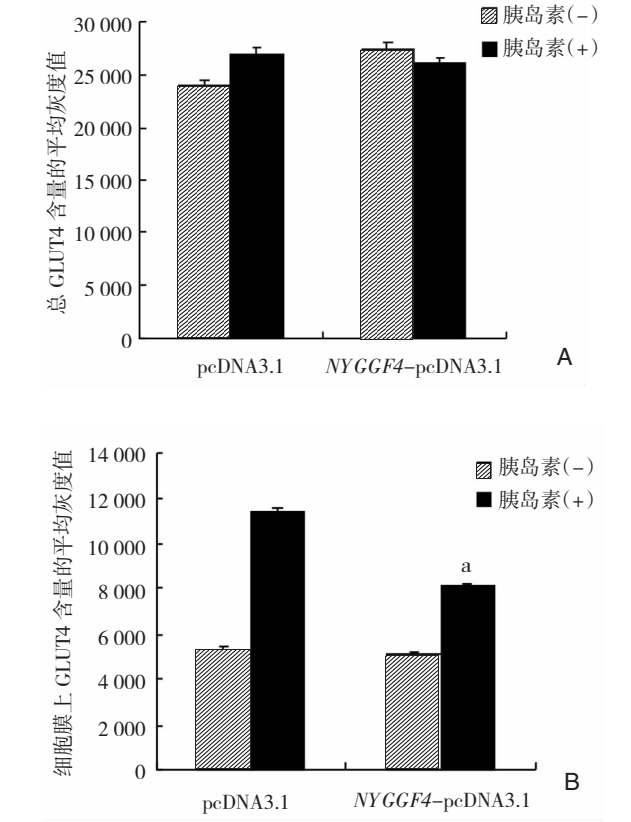


图2 NYGGF4 对成熟脂肪细胞 GLUT4 的表达量及转位的影响 A:细胞内总 GLUT4 含量的平均灰度值; B:细胞膜上 GLUT4 含量的平均灰度值。a:与胰岛素刺激的转染空载体(PcDNA3.1)对照组比较, $P<0.05$

4 种细胞因子的分泌水平, 如表 1 所示: NYGGF4 过表达的细胞培养上清中上述 4 种因子的含量与对照组相比差异无显著性。

表 1 细胞 24 h 培养上清中 TNF- α 、IL-6、脂联素和抵抗素的分泌水平					(n=8, $\bar{x} \pm s$)	
组别	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	脂联素 (ng/mL)	抵抗素 (pg/mL)		
NYGGF4-pcDNA3.1 myc/his-3T3-L1	63 $\pm$ 8	53 $\pm$ 7	16.3 $\pm$ 2.5	44 $\pm$ 5		
pcDNA3.1 myc/his-3T3-L1	60 $\pm$ 8	50 $\pm$ 7	17.9 $\pm$ 2.7	42 $\pm$ 5		
t 值	0.945	0.936	-1.206	0.938		
P 值	0.361	0.365	0.248	0.364		

3 讨论

肥胖、2 型糖尿病等疾病正在迅速发展成为全球流行性疾病, 胰岛素抵抗是它们所共有的病理生理特征。在先前研究中, 本实验小组以抑制性差减杂交技术筛选肥胖与正常人腹膜后脂肪组织中的差异表达基因, 筛选获得一条在肥胖患儿脂肪组织中高表达的新基因 NYGGF4 (GenBank 登陆号

AY317148)。为进一步研究其生物学功能, 本实验室成功建立了 NYGGF4 过表达的 3T3-L1 细胞株^[8]。在此基础上, 本研究观察了 NYGGF4 过表达对成熟脂肪细胞葡萄糖摄取的影响, 发现该基因过表达对基础状态的葡萄糖摄取无影响, 但显著减少胰岛素刺激的葡萄糖摄取, 表明该基因过表达降低了脂肪细胞对胰岛素的敏感性, 细胞产生了胰岛素抵抗, 该结果提示 NYGGF4 在肥胖者脂肪组织中的高表达可能与肥胖所导致的胰岛素抵抗的形成有关。已知在

成熟的脂肪细胞,胰岛素刺激的葡萄糖摄取主要是依靠 GLUT4 的转位来实现^[11,12]。本研究进一步发现 *NYGGF4* 过表达不影响细胞内总 GLUT4 的蛋白表达量,但明显下调了胰岛素刺激的 GLUT4 由胞浆向胞膜的转位,进而使葡萄糖由细胞外进入细胞内的转运率降低,细胞摄取葡萄糖减少。

近年来的研究发现,脂肪组织不仅是能量代谢的场所还是重要的内分泌器官。脂肪组织可分泌多种脂源性细胞因子,如 TNF- α 、IL-6、脂联素、抵抗素等通过局部(自分泌)和远处(内分泌)的方式调节外周组织及脂肪组织自身对胰岛素的敏感性^[6~8]。为了解 *NYGGF4* 过表达是否通过改变脂肪细胞的分泌功能而诱发细胞产生胰岛素抵抗,本研究检测了过表达 *NYGGF4* 的成熟脂肪细胞培养上清中 TNF- α 、IL-6、脂联素、抵抗素的水平,结果发现与对照组相比,这4种细胞因子的含量差异无显著性,说明 *NYGGF4* 降低脂肪细胞胰岛素敏感性不依赖对其内分泌功能的改变。

综上所述,本研究初步探讨了肥胖相关新基因 *NYGGF4* 的生物学功能,发现该基因对脂肪细胞的内分泌功能无影响,其通过降低胰岛素刺激的 GLUT4 由胞浆向胞膜的转位从而诱发脂肪细胞产生胰岛素抵抗。由于针对 *NYGGF4* 的生物信息学分析已预测其蛋白 C 端有一 PTB 结构域^[4],且该结构域与胰岛素受体底物 1(IRS1)中 PTB 结构域的结构相似,推测 *NYGGF4* 可能通过参与胰岛素信号途径的调节进而调控 GLUT4 的转位,该分析结论有待进一步验证。

[参 考 文 献]

(本文编辑:吉耕中)

[1] Comuzzie AG, Allison DB. The search for human obesity genes

[J]. Science, 1998, 280(5368):1374-1377.

[2] Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The human obesity gene map; the 2005 update [J]. Obesity (Silver Spring), 2006, 14(4):529-644.

[3] Qiu J, Ni YH, Gong HX, Fei L, Pan XQ, Guo M, et al. Identification of differentially expressed genes in omental adipose tissues of obese patients by suppression subtractive hybridization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 352(2):469-478.

[4] 邱洁, 郭锡熔, 李晓南, 王玢, 倪毓辉, 张敏, 等. 新基因 *NYGGF4* 在肥胖患儿脂肪组织中的表达验证及生物信息学分析 [J]. 实用儿科临床杂志, 2008, 23(7):495-497.

[5] Chiba T, Yamaza H, Komatsu T, Nakayama M, Fujita S, Hayashi H, et al. Pituitary growth hormone suppression reduces resistin expression and enhances insulin effectiveness; relationship with caloric restriction [J]. Exp Gerontol, 2008, 43(6):595-600.

[6] Kaddai V, Jager J, Gonzalez T, Najem-Lendom R, Bonnafous S, Tran A, et al. Involvement of TNF-alpha in abnormal adipocyte and muscle sortilin expression in obese mice and humans [J]. Diabetologia, 2009, 52(5):932-940.

[7] Wang P, Mariman E, Renes J, Keijzer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue [J]. J Cell Physiol, 2008, 216(1):3-13.

[8] Wang B, Zhang M, Ni YH, Liu F, Fan HQ, Fei L, et al. Identification and characterization of *NYGGF4*, a novel gene containing a phosphotyrosine-binding (PTB) domain that stimulates 3T3-L1 preadipocytes proliferation [J]. Gene, 2006, 379:132-140.

[9] Bergman RN, Kim SP, Catalano KJ, Hsu IR, Chiu JD, Kabir M, et al. Why visceral fat is bad; Mechanism of the metabolic syndrome [J]. Obesity (Silver Spring), 2006, 14 (Suppl):S16-S19.

[10] Fan HQ, Gu N, Liu F, Fei L, Pan XQ, Guo M, et al. Prolonged exposure to resistin inhibits glucose uptake in rat skeletal muscles [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2007, 28(3):410-416.

[11] Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4 [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(4):267-277.

[12] Kanzaki M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics [J]. Endocr J, 2006, 53(3):267-293.