

水通道蛋白7对蛋白激酶B的影响

潘 伟¹ 沈飞霞^{1*} 谷雪梅¹ 叶 菁¹ 顾雪疆¹ 倪连松¹ 李卫平²

(¹温州医学院附属第一医院内分泌科, 温州 325000; ²汕头大学医学院第一附属医院内分泌科, 汕头 515000)

摘要 该文旨在探讨水通道蛋白7(AQP7)在3T3-L1脂肪细胞不同分化阶段的表达以及其对胰岛素信号通路中蛋白激酶B(PKB)的影响。通过培养3T3-L1前体脂肪细胞, 诱导分化为成熟的脂肪细胞, 用荧光定量PCR、Western blot、酶学方法分析显示, 随3T3-L1脂肪细胞分化过程, AQP7与PKB磷酸化水平同步上升, 同时培养基中释放的甘油浓度伴随AQP7的表达平行增加。以TNF- α 处理分化成熟的脂肪细胞构建胰岛素抵抗模型, AQP7与PKB磷酸化水平均下降, 转染高表达AQP7基因的重组腺病毒载体(Ad-AQP7)之后, 随着AQP7表达上调, 胰岛素刺激下的PKB磷酸化水平提高, 并且葡萄糖代谢能力增强。由此可见, AQP7水平随3T3-L1脂肪细胞分化过程逐渐上升, 其高表达可能通过增加PKB磷酸化水平改善胰岛素敏感性, 提示AQP7可能成为治疗肥胖的一个重要作用靶点。

关键词 水通道蛋白7; 蛋白激酶B; 胰岛素敏感性

The Effect of Aquaglyceroporin 7 on Protein Kinase B Signaling Pathway

Pan Wei¹, Shen Feixia^{1*}, Gu Xuemei¹, Ye Jing¹, Gu Xuejiang¹, Ni Liansong¹, Li Weiping²

(¹Department of Endocrinology and Metabolism, First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China;

²Department of Endocrinology and Metabolism, First Affiliated Hospital, Medical College, Shantou University, Shantou 515000, China)

Abstract Aquaglyceroporin 7 (AQP7) is a water transporting protein which also regulates the glycerol efflux in adipocytes. The study of AQP7 might shed new light on the prevention and control of obesity. In this study, we aimed to analyze expression profiles of AQP7 in the different differentiation phase of adipocytes and the relationship between AQP7 and PKB in the insulin pathway. 3T3-L1 preadipocyte cells were induced fully differentiated. Insulin resistance in differentiated adipocytes was induced by TNF- α . Adenovirus overexpression AQP7 (Ad-AQP7) was constructed and transfected to adipocytes. The expression levels of AQP7 and phosphorylated PKB (p-PKB) were measured. The glycerol release from adipocytes and the change of glucose concentration in the culture medium were also tested. The AQP7 levels were gradually up-regulated along with the differentiation phase of 3T3-L1 preadipocytes, which was consistent with the expression levels of p-PKB. Overexpression of AQP7 by transfecting Ad-AQP7 to insulin resistant adipocytes could improve insulin sensitivity and glucose utilization, in accordance with the level of p-PKB expression. The expression of AQP7 correlated with phosphorylation of PKB. Overexpression of AQP7 contributed to improve insulin resistance in adipocytes.

Key words aquaglyceroporin 7(AQP7); PKB; insulin sensitivity

收稿日期: 2012-08-19 接受日期: 2012-11-05

浙江省自然科学基金(批准号: Y2080418)和国家自然科学基金青年(批准号: 81000356)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-88078243, E-mail: sfx301@163.com

Received: August 19, 2012

Accepted: November 5, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.Y2080418) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81000356)

*Corresponding author. Tel: +86-577-88078243, E-mail: sfx301@163.com

肥胖、2型糖尿病是由多种原因引起的代谢性疾病,其发病率逐年迅速增加,目前已成为影响全球范围的公共卫生问题,而胰岛素抵抗是它们共有的病理生理表现,其中脂肪组织胰岛素敏感性下降是胰岛素抵抗的显著特征之一。人们逐渐意识到除了生活方式的改变之外,遗传基因的易感性同样起到至关重要的作用^[1-2]。研究发现,水通道蛋白7(aquaglyceroporin 7, AQP7)在脂肪组织大量表达,参与脂肪细胞甘油转运过程而影响脂肪代谢,并且与胰岛素的敏感性密切相关,若AQP7功能下降或缺失会使脂肪细胞中甘油堆积,进而促进甘油三酯的合成,引起糖脂代谢紊乱,最终可能导致肥胖和/或2型糖尿病的发生^[3-4]。我们知道,胰岛素的代谢效应主要与胰岛素信号传导介导的磷脂酰肌醇-3-激酶(PI-3K)途径有关,PKB作为此信号通路中的关键分子,可以介导葡萄糖转运等多种生物学效应,故可作为评价胰岛素敏感性的一个重要指标^[5]。AQP7对甘油的运输作用使人们对肥胖有了新的认识,从而对肥胖的研究进入一个全新的领域^[6]。目前,AQP7在脂肪组织的表达及其功能尚未阐明,而且关于AQP7与PKB之间的研究鲜有报道,故本文旨在探讨AQP7在3T3-L1脂肪细胞不同分化阶段的表达以及对胰岛素敏感性的影响,从而对肥胖的防治具有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

3T3-L1脂肪细胞株购于中国科学院上海细胞库,DMEM、抗生素、新生小牛血清(CBS)、Trizol为Gibco产品,胎牛血清(FBS)为Biocrom产品;胰岛素(INS)、1-甲基-3-异丁基黄嘌呤(IBMx)、地塞米松(DXM)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、牛血清白蛋白(BSA)为Sigma产品;抗AQP7多克隆抗体为Abcam产品,抗蛋白激酶B(PKB)和抗磷酸化(Ser473)抗体为Cell Signaling Technology产品,抗 β -actin抗体、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗和ECL检测试剂均为碧云天产品;荧光定量PCR试剂为Takara产品;葡萄糖检测试剂购于南京建成生物研究所。

1.2 方法

1.2.1 3T3-L1前脂肪细胞的培养 与Kishida等^[3,7]研究方法一致,先将3T3-L1前体脂肪细胞接种到6孔板内,用10% CBS的DMEM培养基在37℃、5% CO₂条件下培养,待细胞融合2 d后,加入含有0.5 mmol/L IBMx、1 μ mol/L DXM、5 μ g/mL INS的10% FBS DMEM培

养基培养48 h,更换含5 μ g/mL INS的培养基培养48 h,之后用10% FBS的DMEM培养基继续培养,2 d换液一次,至细胞分化为成熟的脂肪细胞;以10 ng/mL TNF- α 作用24 h建立胰岛素抵抗模型。

1.2.2 Ad-AQP7重组腺病毒载体的构建和转染 参考李来邦等^[8]构建Ad-AQP7重组腺病毒载体,转染293细胞扩增并纯化。根据Orlicky等^[9]的研究方法,在含有病毒液的培养基中加入0.5 μ g/mL多聚赖氨酸作用3T3-L1细胞48~96 h,以不含AQP7基因的空载腺病毒作为阴性对照。

1.2.3 免疫印记分析 培养于六孔板内的脂肪细胞经0.2% BSA作用3 h,经100 nmol/L胰岛素溶液刺激15 min后吸弃培养基,用预冷PBS洗涤细胞2次后,每孔加入细胞裂解液充分消化细胞,离心20 min(4℃、12 000 r/min),吸取上清置于-80℃冰箱保存、备用。各取40 μ g蛋白上样10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后转到PVDF膜上,5%脱脂牛奶室温摇床封闭1 h,一抗4℃孵育过夜。次日与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育1 h后,加ECL试剂反应,显像、成像。

1.2.4 Real-time PCR检测 用Trizol法抽提脂肪细胞总RNA,经ND2000测定浓度后逆转录为cDNA。AQP7的上下游引物分别为:5'-TCG GTG TCA ACT TGG GTT TTG-3', 5'-GAG ATG CCG CCT GCT ACA T-3'(64 bp); β -actin的上下游引物为:5'-CTT CTT TGC AGC TCC TTC G-3', 5'-TTC TGA CCC ATT CCC ACC-3'(198 bp)。反应条件:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火30 s,共进行40个循环。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示处理组相对于正常对照组的变化倍数,实验重复3次。

1.2.5 甘油释放浓度检测 3T3-L1脂肪细胞经肾上腺素浓度为 1×10^{-6} mol/L的培养基作用1 h后收集上清,根据甘油检测试剂盒在570 nm处测量吸光度。

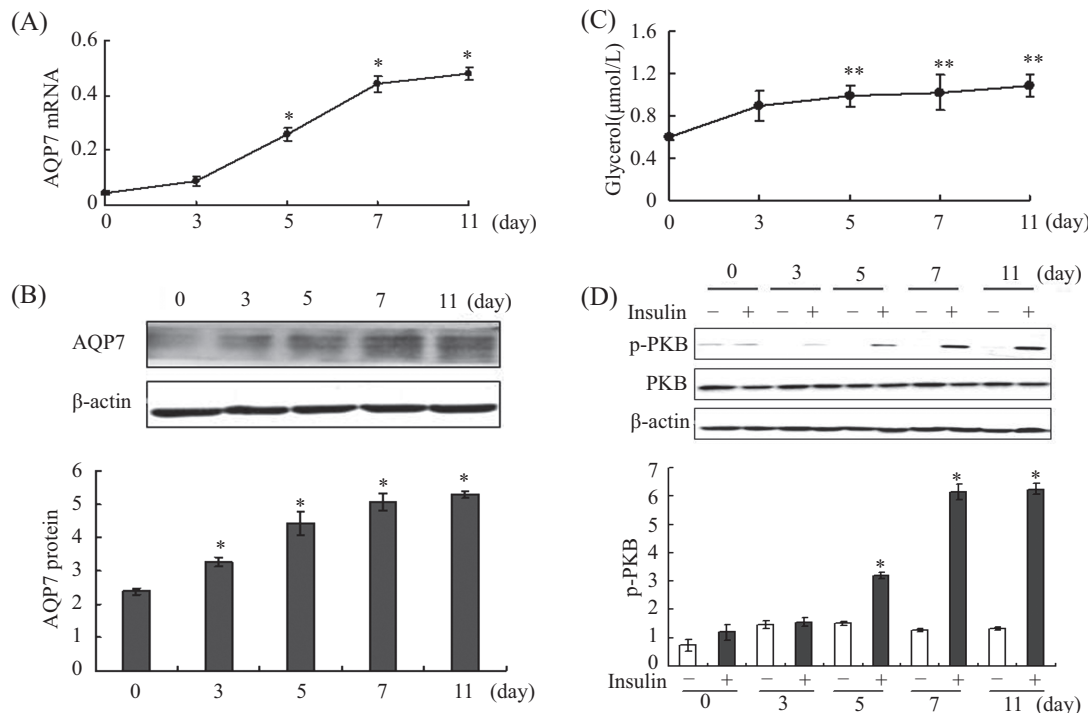
1.2.6 培养基葡萄糖浓度检测 收集细胞上清液,按照试剂盒方法检测葡萄糖浓度,37℃孵箱10 min,500 nm处测吸光度。

1.2.7 统计学分析 应用SPSS13.0统计软件分析,实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3T3-L1脂肪细胞不同分化阶段 AQP7、p-PKB表达水平和甘油释放浓度变化

3T3-L1脂肪细胞中在前体状态下无论mRNA



A: AQP7 mRNA水平; B: AQP7蛋白水平; C: 甘油释放浓度; D: 100 nmol/L胰岛素溶液作用15 min后p-PKB蛋白水平的变化。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与前体脂肪细胞相比。

A: mRNA level of AQP7; B: protein level of AQP7; C: glycerol concentration; D: 3T3-L1 adipocytes during differentiation period were treated with 100 nmol/L insulin for 15 min and then phosphorylation of PKB was measured by Western blot. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with preadipocyte cells.

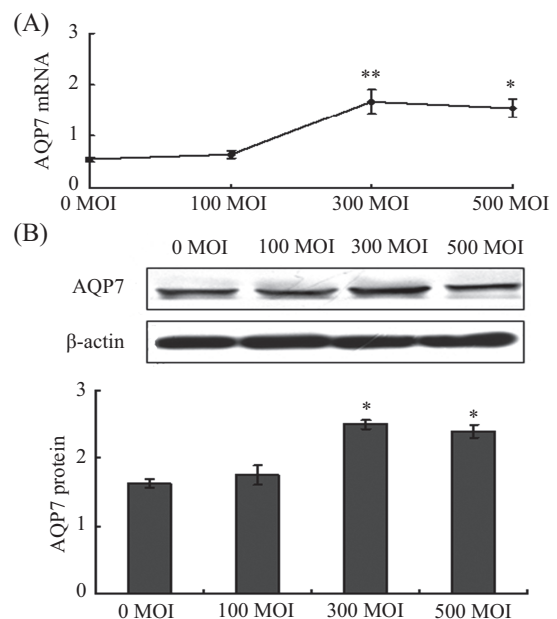
图1 3T3-L1分化不同阶段的时间效应

Fig.1 Time course during differentiation of 3T3-L1 cells

或者蛋白含量均较低, 进入分化阶段后可以观察到明显的AQP7表达。随着分化进程AQP7含量逐渐上升, 至分化后期达到峰值后维持稳定不变(图1A和图1B)。检测培养基中甘油浓度发现, 伴随AQP7表达的上调, 脂肪细胞甘油释放水平也平行增加。可以看到, 分化第5天甘油水平明显高于前体脂肪细胞, 在第7天甘油浓度上升达到平台期(图1C)。同时, 在分化第5天, 胰岛素刺激下的p-PKB水平明显升高, 在分化后期表达继续增加, 至第11天细胞完全分化成熟之时PKB磷酸化水平上升到最高点, 与AQP7变化趋势相符, 而基础状态下的PKB磷酸化水平则没有明显变化(图1D)。

2.2 AQP7重组腺病毒在成熟脂肪细胞中的表达

细胞分化至第10天转染Ad-AQP7重组腺病毒, 相比空载病毒对照组, 300 MOI时转染效率最佳, 即AQP7基因和蛋白表达均在较高水平(图2A和图2B); 同时在时间效应上可以看到, 以300 MOI转染72 h AQP7升高最明显(图3A), 而且此时培养基中的甘油浓度也明显增加, 表明随着AQP7的高表达甘油转运能力也协同增强(图3B)。除此之外, 可以发现在转染

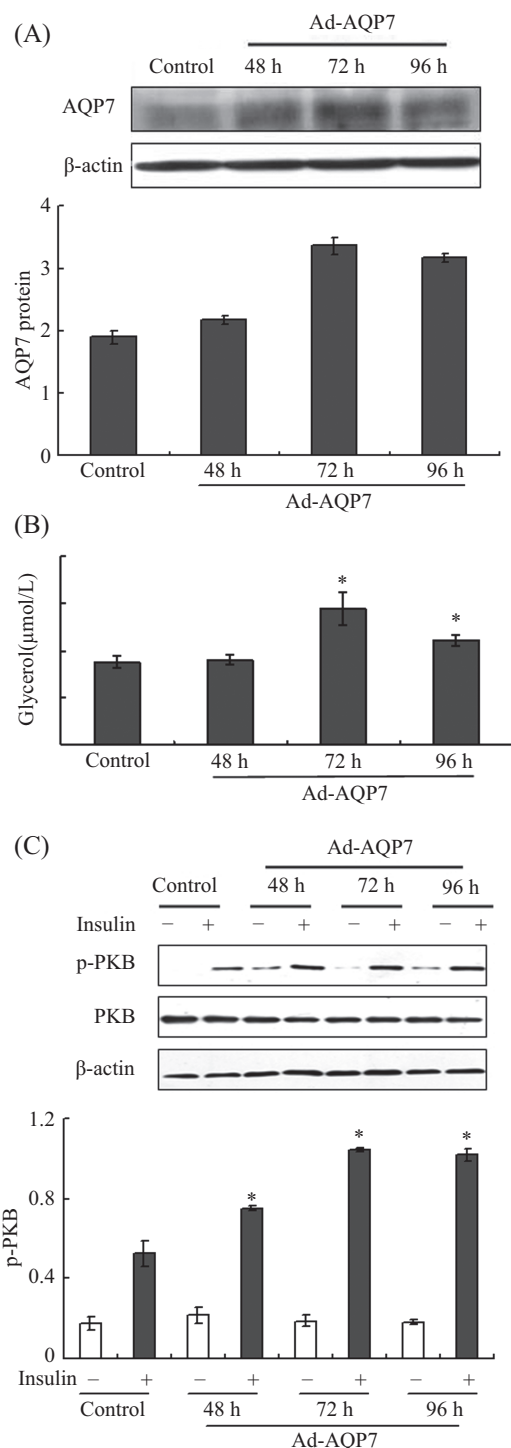


成熟分化的3T3-L1脂肪细胞分别以0, 100, 300, 500 MOI转染Ad-AQP7。A: AQP7 mRNA水平; B: AQP7蛋白水平; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与空载腺病毒转染组相比。

Fully differentiated 3T3-L1 cells were transfected with Ad-AQP7 vector (0, 100, 300, 500 MOI). A: mRNA level of AQP7; B: protein level of AQP7. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with control adenovirus transfected adipocytes.

图2 腺病毒转染剂量效应

Fig.2 Dosage effect when transfection of adenovirus

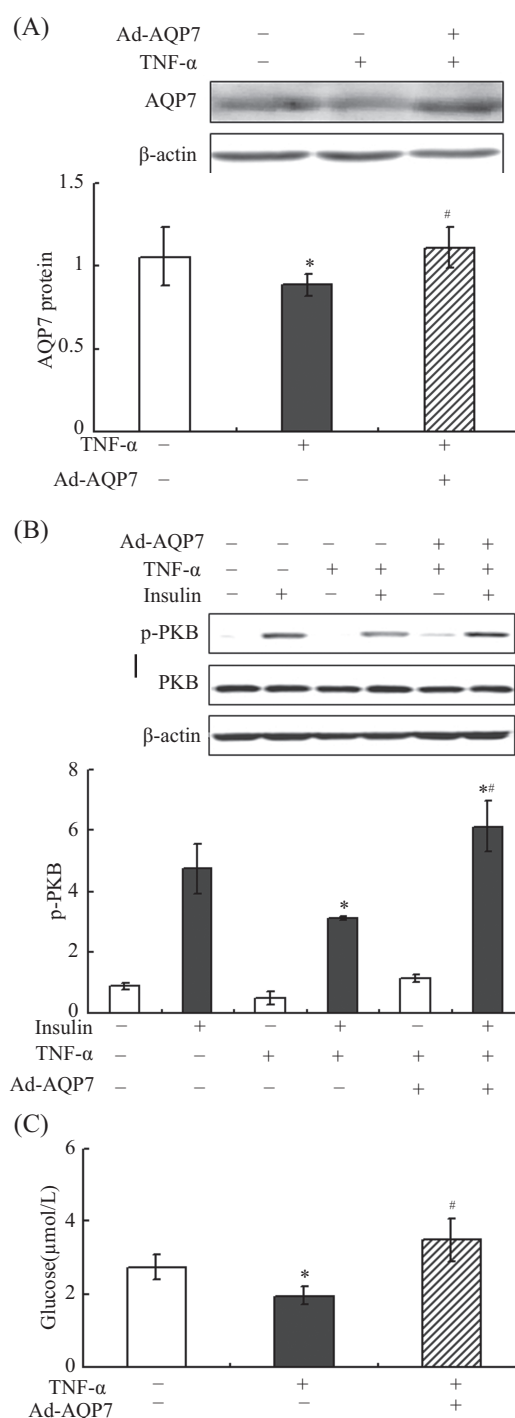


成熟分化的3T3-L1脂肪细胞分别转染Ad-AQP7(300 MOI) 48, 72, 96 h。A: AQP7 蛋白水平; B: 甘油释放浓度; C: 以100 nmol/L胰岛素溶液作用15 min后p-PKB蛋白水平的变化。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与空载腺病毒转染组相比。

Fully differentiated 3T3-L1 cells were transfected with Ad-AQP7(300 MOI) at 48, 72, 96 h. A: protein level of AQP7; B: glycerol concentration; C: mature 3T3-L1 adipocytes were treated with 100 nmol/L insulin for 15 min and then phosphorylation of PKB was measured. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with control adenovirus transfected adipocytes.

图3 腺病毒转染时间效应

Fig.3 Time effect when transfection of adenovirus



10 ng/mL TNF- α 作用成熟脂肪细胞24 h之后转染Ad-AQP7。A: AQP7 蛋白水平; B: 以100 nmol/L胰岛素溶液作用15 min后p-PKB蛋白水平的变化; C: 葡萄糖消耗水平。* $P<0.05$, 与正常分化组相比; # $P<0.05$, 与TNF- α 干预组相比。

Fully differentiated cells were treated with 10 ng/mL TNF- α at 24 h and then transfected with Ad-AQP7; A: protein level of AQP7; B: the adipocytes were treated with 100 nmol/L insulin for 15 min and then phosphorylation of PKB was measured; C: glucose utilization. * $P<0.05$, compared mature adipocytes group; # $P<0.05$, compared with TNF- α treated group.

图4 高表达AQP7对胰岛素敏感性的影响

Fig.4 The relationship between overexpression of AQP7 and insulin sensitivity

Ad-AQP7腺病毒之后, 48 h时胰岛素刺激下的p-PKB水平呈上升趋势, 72 h之后其表达含量明显增加(图3C)。

2.3 高表达AQP7对胰岛素抵抗的影响

TNF- α 可以导致胰岛素抵抗^[10-11], 以10 ng/mL TNF- α 作用脂肪细胞24 h构建胰岛素抵抗模型, p-PKB表达下降, 葡萄糖代谢能力减弱; 转染Ad-AQP7之后随着AQP7水平升高PKB磷酸化水平恢复, 同时葡萄糖代谢能力增强, 表明高表达AQP7有助于改善胰岛素抵抗(图4A-4C)。

3 讨论

AQP7作为水通道蛋白家族的一员, 普遍存在于真核生物和原核生物细胞膜上, 不仅可以选择性运输水分子, 还可以运输一些小分子物质, 尤其是甘油, 因此又被称为水甘油通道。在目前发现的13种水通道蛋白中, AQP7在脂肪组织中大量表达, 而且被认为是介导脂肪细胞甘油输出的重要通道蛋白^[12]。与Kishida等^[3]报道一致, 本实验结果显示, 在3T3-L1前体脂肪细胞中, AQP7水平较低, 但随着分化进程AQP7表达明显增加。多项研究表明, 在肾上腺素刺激的脂肪分解过程中, AQP7从胞浆向胞膜表面运输, 使水解产生的甘油通过AQP7释放入血^[3,13]。可以看到在分化过程中, 伴随AQP7表达的上调, 培养基中释放的甘油浓度也平行增加; 转染腺病毒之后不仅AQP7表达水平升高其功能也得到验证, 甘油水平进一步提高, 从而可以推测AQP7通过调节脂肪细胞甘油的通透性进而影响脂肪细胞内甘油三酯的积累^[14], 从而达到缩小脂肪细胞体积的目的。

AQP7作为近年来发现的肥胖相关基因成为研究热点之一, 基因敲除小鼠模型的建立为AQP7功能研究带来了极大的便利。Matsumura等^[15]发现, 敲除AQP7基因的小鼠虽然没有出现糖耐量异常, 但胰岛体积减小并出现高胰岛素血症, 另外, Hibuse等^[4]的研究结果显示, 缺乏AQP7基因的小鼠表现出与年龄相关的肥胖表型, 而且还存在与肥胖相关的严重的胰岛素抵抗, 上述多项研究结果揭示了AQP7的表达与胰岛素的敏感性密切相关。

胰岛素的信号是通过其跨膜受体与细胞内的胰岛素受体底物(IRS)结合引起后者酪氨酸位点磷酸化向下传递的。其中, 经PI3K介导的PKB级联反应发挥重要作用, 参与糖原合成、葡萄糖转运、糖酵解蛋白合成、糖异生抑制等作用, 故PKB是维持血糖内

环境稳定的重要调节因素^[16], 上述环节的受损将导致胰岛素抵抗。Cho^[17]等的实验证明, 缺乏PKB基因的小鼠胰岛素降低血糖的能力严重受损, 表现为胰岛素抵抗及糖尿病症状。而且有动物实验结果显示, 肥胖时白色脂肪组织、肝脏和骨骼肌在胰岛素刺激下PKB磷酸化水平明显减少^[18-19]。本实验结果在细胞水平上显示PKB磷酸化水平与AQP7表达一致, 不仅在分化过程中协同增加, 而且在TNF- α 诱导的胰岛素抵抗之后表达水平同步下调, 这与Fasshauer等^[20]报道TNF- α 可引起AQP7 mRNA下降结果一致, 可以推测AQP7的减少可能参与了胰岛素抵抗的发生。

段玉敏等^[21]观察到自发2型糖尿病大鼠随着肥胖和糖尿病病情加重, 皮下和肾周脂肪组织AQP7 mRNA表达呈先升高后下降趋势, 与血甘油变化一致, 推测在肥胖早期AQP7代偿性增加以减少脂肪细胞的体积, 后期表达减少因而导致了脂肪的积聚促进了肥胖的发展; 而AQP7表达升高不仅可以促进脂肪细胞分解能力并利于提高胰岛素敏感性^[7,22]。本文通过利用腺病毒载体高表达AQP7, 不仅可以促进脂肪细胞的水解, 增加甘油的释放, 还可恢复胰岛素抵抗下PKB磷酸化水平, 有利于改善葡萄糖代谢能力, 从而提示了高表达AQP7有利于改善胰岛素抵抗。

综上所述, AQP7作为调节脂肪细胞甘油代谢的通道蛋白, 随3T3-L1脂肪细胞分化过程逐渐上升, 在胰岛素抵抗状态下表达下降, 其高表达可能通过调节胰岛素信号通路中的PKB磷酸化水平改善胰岛素敏感性, 对其深入研究可能为治疗肥胖提供一个崭新的方向, 但其中仍然存在许多问题需要解决。肥胖是一种复杂的代谢性疾病, 不仅仅与一种蛋白的变化有关, 近年来有研究报道, 同样存在其他代谢相关基因的异常^[23-24], 因此对其功能及调节机制仍需进一步的研究, 从而可以更好地认识AQP7的作用, 为肥胖的防治带来新的突破。

参考文献 (References)

- 1 Moreno-Aliaga M, Santos J, Marti A, Martinez J. Does weight loss prognosis depend on genetic make-up? *Obes Rev* 2005; 6(2): 155-68.
- 2 Hainer V, Zamrazilova H, Spalova J, Hainerova I, Kunesova M, Aldhoon B, *et al.* Role of hereditary factors in weight loss and its maintenance. *Physiol Res* 2008; 57(Suppl 1): S1-15.
- 3 Kishida K, Kuriyama H, Funahashi T, Shimomura I, Kihara S, Ouchi N, *et al.* Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J Biol Chem* 2000; 275(27): 20896-902.

- 4 Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, Yamamoto K, Nagasawa A, Mizunoya W, *et al.* Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(31): 10993-98.
- 5 Hajdich E, Litherland GJ, Hundal HS. Protein kinase B (PKB/Akt)-a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett* 2001; 492(3): 199-203.
- 6 段玉敏, 袁振芳, 张婷婷, 陈程, 姚军, 郭晓蕙. 自发2型糖尿病模型OLETF大鼠脂肪组织水通道蛋白7表达水平的研究. *中国糖尿病杂志*(Duan Yumin, Yuan Zhenfang, Zhang Tingting, Chen Cheng, Yao Jun, Guo Xiaohui. Study of aquaporin 7 expression in adipose tissue of OLETF rats. *Chin J Diabetes*) 2011; 19(3): 216-20.
- 7 Kong CS, Kim JA, Bak SS, Byun HG, Kim SK. Anti-obesity effect of carboxymethyl chitin by AMPK and aquaporin-7 pathways in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem* 2010; 22(3): 276-81.
- 8 李来邦, 李立, 冉江华, 赵永恒, 张生宁, 刘静, 等. 大鼠 galectin-9 基因重组腺病毒载体的构建和鉴定. *中国普外基础与临床杂志*(Li Laibang, Li Li, Ran Jianghua, Zhao Yongheng, Zhang Shengning, Liu Jing, *et al.* Construction and identification of recombinant adenovirus vector of rat Galectin-9 gene. *Chin J Bases Clin General Surg*) 2011; 18(2): 131-36.
- 9 Orlicky DJ, Schaack J. Adenovirus transduction of 3T3-L1 cells. *J Lipid Res* 2001; 42(3): 460-6.
- 10 Hyun CK, Kim IY, Frost SC. Soluble fibroin enhances insulin sensitivity and glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 2004; 134(12): 3257-63.
- 11 Iwata M, Haruta T, Usui I, Takata Y, Takano A, Uno T, *et al.* Pioglitazone ameliorates tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance by a mechanism independent of adipogenic activity of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Diabetes* 2001; 50(5): 1083-92.
- 12 Wintour EM, Henry BA. Glycerol transport: An additional target for obesity therapy? *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17(3): 77-8.
- 13 Rodríguez A, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, García-Navarro S, Rotellar F, Valentí V, *et al.* Insulin- and leptin-mediated control of aquaglyceroporins in human adipocytes and hepatocytes is mediated via the PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(4): E586-97.
- 14 Rodríguez A, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G. Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice. *FEBS Lett* 2006; 580(20): 4771-76.
- 15 Matsumura K, Chang BH, Fujimiya M, Chen W, Kulkarni RN, Eguchi Y, *et al.* Aquaporin 7 is a β -cell protein and regulator of intracellular glycerol content and glycerol kinase activity, β -cell mass, and insulin production and secretion. *Mol Cell Biol* 2007; 27(17): 6026-37.
- 16 Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13(10): 444-51.
- 17 Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB 3rd, *et al.* Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science* 2001; 292(5522): 1728-31.
- 18 Shao J, Yamashita H, Qiao L, Friedman JE. Decreased Akt kinase activity and insulin resistance in C57BL/KsJ-Leprdb/db mice. *J Endocrinol* 2000; 167(1): 107-15.
- 19 Carvalho E, Rondinone C, Smith U. Insulin resistance in fat cells from obese Zucker rats-evidence for an impaired activation and translocation of protein kinase B and glucose transporter 4. *Mol Cell Biochem* 2000; 206(1/2): 7-16.
- 20 Fasshauer M, Klein J, Lossner U, Klier M, Kralisch S, Paschke R. Suppression of aquaporin adipose gene expression by isoproterenol, TNF α , and dexamethasone. *Horm Metab Res* 2003; 35(4): 222-7.
- 21 段玉敏, 袁振芳, 郭晓蕙. 自发2型糖尿病模型OLETF大鼠不同病程脂肪组织水通道蛋白7 mRNA 的表达. *山东医药*(Duan Yumin, Yuan Zhenfang, Guo Xiaohui. Expression of Aquaporin 7 mRNA in different duration of diabetes stage adipose tissue of Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Shandong Medical Journal*) 2010; 50(49): 22-4.
- 22 Kishida K, Shimomura I, Nishizawa H, Maeda N, Kuriyama H, Kondo H, *et al.* Enhancement of the aquaporin adipose gene expression by a peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J Biol Chem* 2001; 276(51): 48572-9.
- 23 Tinahones FJ, Garrido-Sanchez L, Miranda M, Garcia-Almeida JM, Macias-Gonzalez M, Ceperuelo V, *et al.* Obesity and insulin resistance-related changes in the expression of lipogenic and lipolytic genes in morbidly obese subjects. *Obes Surg* 2010; 20(11): 1559-67.
- 24 Miranda M, Escote X, Ceperuelo-Mallafre V, Alcaide MJ, Simon I, Vilarrasa N, *et al.* Paired subcutaneous and visceral adipose tissue aquaporin-7 expression in human obesity and type 2 diabetes: Differences and similarities between depots. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95 (7): 3470-9.