

曲格列酮对人网膜前脂肪细胞分化过程中基因表达和脂肪细胞因子分泌的影响

阴津华¹ 杨静¹ 黎明^{2*}

(¹山西医科大学第一医院, 太原 030001; ²中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院, 北京 100730)

摘要 采用胶原酶消化法分离培养人大网膜前脂肪细胞。曲格列酮干预细胞, 油红O染色鉴定分化状态, ELISA测定脂肪细胞因子分泌水平, RT-PCR观察分化转录因子和脂肪细胞因子 mRNA表达, 以期从内脏脂肪的储脂和内分泌功能角度探讨噻唑烷二酮类药物的作用机制。结果发现, 曲格列酮能促进人前脂肪细胞分化, 提高脂肪细胞储脂能力; 显著增加脂联素分泌; 调节瘦素分泌; 抑制抵抗素分泌, 提示噻唑烷二酮类药物可通过调节脂肪细胞因子谱改善机体胰岛素抵抗和炎症状态。其作用机制可能主要通过促进 PPAR γ 2、C/EBP α 和脂蛋白酯酶(Lipoprotein lipase, LPL)等基因的表达。脂肪细胞的增加和瘦素分泌的改变可能部分解释噻唑烷二酮类药物增加体重的负面效应。

关键词 曲格列酮; 前脂肪细胞; 分化; 脂肪细胞因子; 转录因子

肥胖, 尤其以内脏脂肪增多为主的中心性肥胖, 是胰岛素抵抗及其相关的2型糖尿病、动脉粥样硬化和代谢综合征等疾病的危险因素。肥胖在细胞水平是由脂肪细胞数量过度增多和体积异常增大所致^[1], 因此研究内脏脂肪细胞的增殖和分化以及在细胞水平进行干预是靶向治疗肥胖和胰岛素抵抗的关键环节^[2]。目前认为脂肪组织不仅是储脂器官而且也是内分泌器官, 分泌的众多脂肪细胞因子, 各具不同的重要生理功能, 参与维护机体内环境的稳定。内脏脂肪细胞内分泌功能失调是连接中心性肥胖、胰岛素抵抗与其相关疾病的基础^[3]。

噻唑烷二酮类(TZDs)药物为胰岛素增敏剂, 通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)增加胰岛素敏感性, 广泛应用于治疗2型糖尿病和胰岛素抵抗相关疾病^[4], 但其作用机制仍有待深入研究。PPAR γ 有两个N-末端不同的异构体, PPAR γ 1和PPAR γ 2, 属于同一基因选择性剪切的结果, 两者在脂肪组织内均表达丰富。但PPAR γ 2基本上是脂肪组织专一性表达, 而PPAR γ 1则在骨骼肌和肝脏细胞中等各种组织中均有低水平表达^[5]。因此, 噻唑烷二酮类药物主要作用于脂肪细胞, 也作用于骨骼肌和其它胰岛素敏感组织。

曲格列酮是第一个噻唑烷二酮类药物, 具有代表性。我们前期工作通过建立人前脂肪细胞培养模型^[6], 初步观察到曲格列酮对人大网膜前脂肪细胞的

增殖和分化都有影响^[7,8]。本文进一步探讨曲格列酮对人大网膜前脂肪细胞分化相关基因表达和脂肪细胞因子分泌的影响, 从调节内脏脂肪储脂和内分泌功能角度探讨噻唑烷二酮类药物的作用机制。

1 材料与方法

1.1 原代培养和鉴定

选择择期开腹知情同意的手术病人, 无全身代谢及内分泌疾病, 无服用干预糖及脂肪代谢的药物史, 年龄<50岁, 体重指数<25。切取新鲜的大网膜脂肪组织约5~10g, 采用本实验室已建立的方法^[6]: 剪脂肪组织为0.5 mm³~1 mm³的小块, 加含有2 g/L I型胶原酶5 ml, 37℃水浴振荡消化1 h。消化液用孔径200目的筛网过滤, 滤液200 g离心5 min后弃上清。沉淀细胞用含15%FCS的DMEM/F12(1:1)基础培养基混悬接种。通过增殖培养和诱导分化可以观察到细胞浆内出现脂质聚集, 符合经典前脂肪细胞鉴定的3个标准^[9]。本课题组在系列的研究中亦证实所培养的前脂肪细胞可分化诱导成为具有完整内分泌功能的成熟脂肪细胞^[10]。

收稿日期: 2010-03-02 接受日期: 2010-07-30

卫生部专项基金(No.2001-162)和北京市自然科学基金(No.7072011)资助项目

* 通讯作者。Tel: 13911559218, E-mail: lmpeking@yahoo.com.cn

Table 1 PCR primer, annealing temperature and number of amplification turns

Genes	Upstream primer (5'-3')	Downstream primer (5'-3')	Amplification fragment(bp)	Annealing temperature(°C)	Turns
Leptin	ACC CTG TGC GGA TTC TTG TGG CTC TGT	CTC TGT GGA GTA GCC TGA AGC	417	55	35
Adiponectin	CTG GGA GCT GTT CTA CTG C	GTC TCC AAT CCC ACA CTG A	353	56	35
Resistin	ATG AAA GCT CTC TGT CTC CTC	GCA CTG CGC GCG ACC TCA	341	68	40
PPAR γ 2	GCG ATT CCT TCA CTG ATA CAC	TAA TAA GGT GGA GAT GCA GGC	307	60	32
C/EBP α	GCA AGG CCA AGA AGT CCG TGG AC	TGC CCA TGG CCT TGA CCA AGG AG	252	70	35
LPL	ACA CAG CTG AGG ACA CTT GC	CAC TGG GTA ATG CTC CTG AG	227	59	35
β -actin	GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA	CTT CCT TAA TGT CAC GCA CGA TTT C	540	56	26

1.2 曲格列酮对人前脂肪细胞分化的影响

原代培养的细胞以 10^5 个/ml 的密度接种于 24 孔培养板, 设对照组(D-MEM/F-12 分化培养基含 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 胰岛素、 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 地塞米松、 $0.2 \mu\text{mol/L}$ T3、 $33 \mu\text{mol/L}$ 生物素、 $17 \mu\text{mol/L}$ 泛酸钙和 10mg/L 转铁蛋白)和三组干预组(分化培养基分别含 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 、 $1 \mu\text{mol/L}$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$ 曲格列酮)。前 3 天均以 0.5mmol/L 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤(IBMx)诱导启动分化。以上主要试剂均购自 Sigma。分组干预至第 18 天, 倒置相差显微镜(IX-71, Olympus, 日本)下观察并照相, 油红 O 染色抽提法^[6]测定吸光度值(测定波长 490nm)。实验重复 3 次($N=3$), 每次取 4 孔均值($n=4$)。

1.3 曲格列酮对人前脂肪细胞分化过程中分泌脂肪细胞因子的影响

1.3.1 实验设计 原代培养的细胞以 10^5 个/ml 的密度接种于 24 孔培养板, 设对照组 1(D-MEM/F-12 的基础培养基)、对照组 2(分化培养基)和干预组(含 $10 \mu\text{mol/L}$ 曲格列酮的分化培养基)。在诱导细胞分化过程中, 从第三天隔日取上清 -80°C 冻存, 至 21 天诱导完成后同期同批测定脂联素、瘦素和抵抗素水平。实验重复 3 次, 每组设 5 孔重复($N=3, n=5$)。

1.3.2 瘦素、脂联素和抵抗素 ELISA 瘦素测定采用北京协和医院内分泌科建立的 BA-ELISA^[11], 灵敏度为 $0.03 \mu\text{g/L}$, 批内和批间变异系数分别为 $<7\%$ 和 $<9\%$ 。脂联素测定采用美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司试剂盒(EK-ADI-01), 灵敏度为 $0.15 \mu\text{g/L}$, 批内和批间变异系数分别为 $<3\%$ 和 $<8\%$ 。抵抗素测定采用美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司试剂盒(EK-028-36), 灵敏度为 $0.016 \mu\text{g/L}$, 批内和批间变异系数分别为 $<3\%$ 和 $<10\%$ 。

1.4 曲格列酮对已分化脂肪细胞表达转录因子和脂肪细胞因子 mRNA 的影响及脂肪细胞因子蛋白

分泌的变化

1.4.1 实验设计 原代培养的细胞以 10^6 个/ml 的密度接种于 6 孔培养板, 分化诱导至第 16 天, 收集细胞上清 -80°C 冻存, 用无血清 D-MEM/F-12(1:1)的基础培养基冲洗细胞, 设基础培养基为对照组, 含终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 曲格列酮的基础培养基干预组, 干预细胞 24 h 后收集上清 -80°C 冻存, 同期同批测定上清中脂联素、瘦素和抵抗素的蛋白含量。同时提取干预后细胞内 RNA, RT-PCR 分析 PPAR γ 2、LPL、C/EBP α 、脂联素、瘦素和抵抗素的 mRNA 表达。实验重复 3 次, 每组设 3 孔重复($N=3, n=3$)。

1.4.2 半定量反转录 PCR 采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。逆转录反应体系为 $20 \mu\text{l}$, 其中 $10\times$ Buffer RT $2 \mu\text{l}$ 、 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 的 dNTP $2 \mu\text{l}$ 、OligodT($10 \mu\text{M}$) $2 \mu\text{l}$ 、总 RNA $2 \mu\text{g}$ 、RNase inhibitor($10 \text{U}/\mu\text{l}$) $2 \mu\text{l}$ 和 Omniscript Reverse Transcriptase $1 \mu\text{l}$ 。PCR 反应采用的特异引物、扩增片断、相应退火温度和循环圈数见表 1。基本反应条件: 94°C 预变性 5min , 94°C 变性 50s , 特异退火温度 50s , 72°C 延伸 1min , 循环相应圈数后 72°C 延伸 8min 。PCR 反应体系为 $25 \mu\text{l}$, 含 cDNA $1 \mu\text{g}$, 目的片段及内参照基因上下游引物各 $25 \mu\text{mol/L}$ (上海生物工程服务有限公司合成), $2\times$ Pfu PCR MasterMix $12.5 \mu\text{l}$ 。PCR 反应结束后, 取 $5 \mu\text{l}$ 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳, 经紫外凝胶图像扫描仪(UVI 公司, 英国)扫描。PCR 产物送上海生物工程服务有限公司测序验证。

1.5 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 采用 spss13.0 软件, 采用独立样本 t 检验和单向方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 曲格列酮对人前脂肪细胞分化的影响

与对照组相比, 不同浓度的曲格列酮均促进细

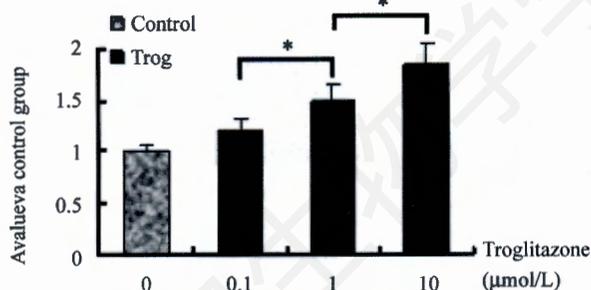


Fig.1 Effect of troglitazone on human preadipocyte differentiation, * $P < 0.05$.

胞内脂质聚集增加, 油红O染色后A值示1.1~1.8倍增加; 组间比较提示曲格列酮促分化作用有剂量依赖性(图1)。

2.2 曲格列酮对人网膜前脂肪细胞分化过程中分泌脂肪细胞因子的影响

人前脂肪细胞可以分泌瘦素, 即在用基础培养基的一组可以检测到低水平的蛋白量, 但其分泌量随时间的延长几无变化。在用分化培养基诱导的一组, 随细胞分化成熟, 瘦素分泌量逐渐增多。含 $10 \mu\text{mol/L}$ 曲格列酮的干预组, 瘦素分泌量随分化进程逐渐增加, 后期阶段呈现下降趋势。

人前脂肪细胞不能分泌脂联素, 即用基础培养基的一组上清收集液中未能检测到脂联素蛋白分泌。在用分化培养基诱导的一组, 脂联素需待分化诱导到第7天才可以检测到低水平的分泌, 此时显微镜下已可观察到有内含脂滴的脂肪细胞出现, 第17天分泌量达最高峰, 在分化终末阶段似有下降趋势。含 $10 \mu\text{mol/L}$ 曲格列酮的干预组, 脂联素分泌量随分化进程显著升高, 从第7天起, 各时段的分泌量较分

化组有增加, 之后差别显著且呈高分泌状态。

抵抗素仅由前脂肪细胞分泌, 随诱导分化成熟, 蛋白分泌量从 $75 \pm 2.11 \text{ pg/ml}$ 迅速下降, 到分化第7天至21天不能检测到。在相同条件下, $10 \mu\text{mol/L}$ 曲格列酮组抵抗素下降趋势更明显(图2)。

2.3 曲格列酮对已分化脂肪细胞表达转录因子和脂肪细胞因子 mRNA 的影响

干预组与对照组比较, 能促进PPAR γ 2、LPL、C/EBP α 和脂联素的mRNA表达, 抑制瘦素mRNA表达, 未检测到抵抗素mRNA表达(图3)。

2.4 曲格列酮对已分化脂肪细胞分泌脂肪细胞因子的影响

前脂肪细胞分化诱导至第16天, 将板中细胞分为对照组与 $10 \mu\text{mol/L}$ 曲格列酮干预组, 测定两组间细胞上清液的瘦素与脂联素水平, 组间无明显差别, 提示组间具有可比性; 未检测到抵抗素分泌。不同组间干预细胞24 h后, 同期同批测定上清中脂联素、瘦素和抵抗素的蛋白含量, 结果提示: $10 \mu\text{mol/L}$ 曲格列酮干预已分化脂肪细胞24 h, 瘦素分泌量较对照组降低(* $P < 0.05$), 脂联素分泌较对照组明显增加(* $P < 0.01$), 未检测到抵抗素分泌(图4)。

3 讨论

曲格列酮是第一个噻唑烷二酮类代表药物, 在体外研究中发现其促进人前脂肪细胞分化。此现象使我们联想到临床服用药物后患者有体重增加的不利结果, 但值得注意的是患者服药后肥胖的程度轻微且无肥胖相关的胰岛素抵抗, 因此, 此类药物仍以胰岛素增敏的疗效广泛应用于临床。可能机制在于: (1) 最近研究^[12,13]提出, 内脏型肥胖引起的2型糖尿

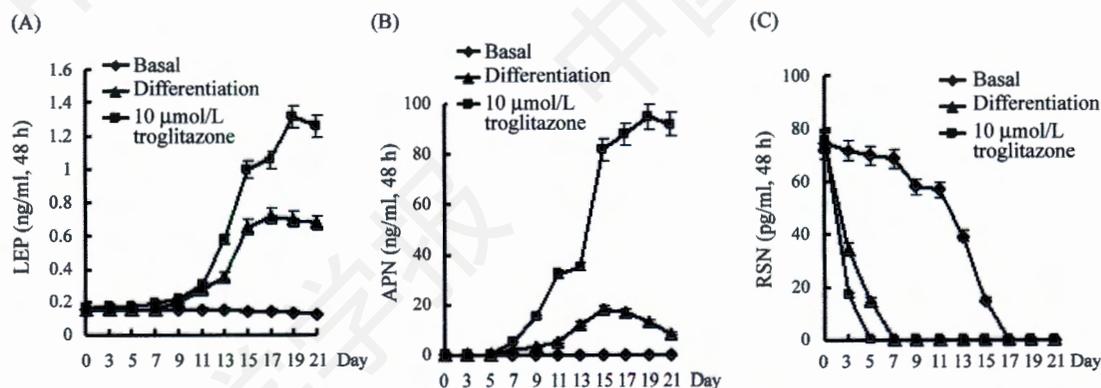


Fig.2 Effect of troglitazone on adipocytokines secretion during the process of preadipocytes differentiation

A: leptin (LEP); B: adiponectin (APN); C: resistin (RSN).

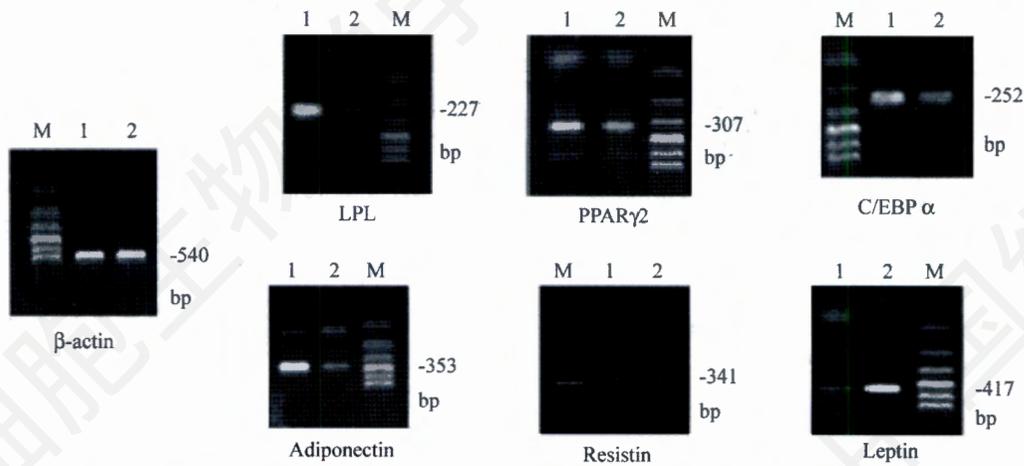


Fig.3 Effect of troglitazone on PPAR γ 2, LPL, C/EBP α , leptin, adiponectin and resistin mRNA expression

1: electrophoresis lane of 10 μ mol/L troglitazone group; 2: control group; M: 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp marker.

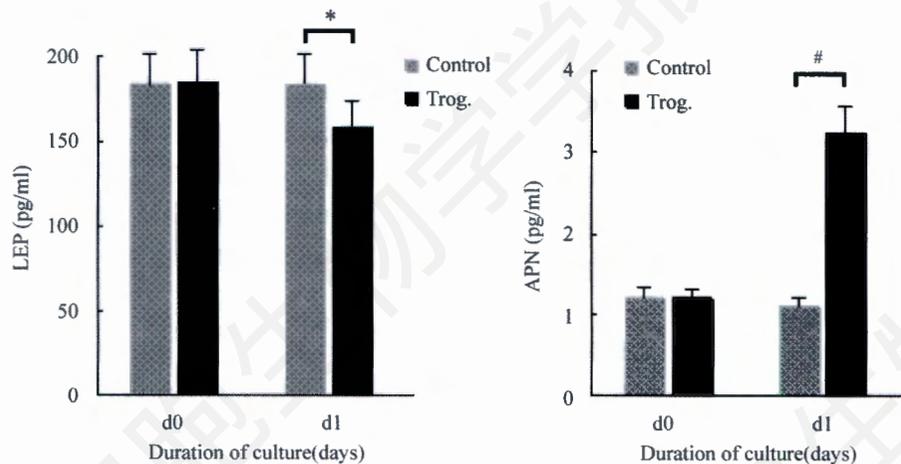


Fig.4 The amount of protein secretion of leptin and adiponectin (ELISA)

* $P < 0.05$; # $P < 0.01$.

病很可能并不完全是由于脂肪细胞分化过度引起,而是由于脂肪细胞分化不良所致,即由于脂肪组织分化障碍导致不能产生足够数量的成熟脂肪细胞来容纳过多的能量,从而导致脂肪细胞体积增大,引起脂肪细胞胰岛素抵抗;血浆非酯化脂肪酸(FFA)“溢出”增多,使储脂压力转移至肝、肌肉等其它器官,造成脂肪的异位沉积,进而诱发全身胰岛素抵抗。本研究提示曲格列酮可通过促进增殖分化增加内脏脂肪细胞储脂能力,从而参与改善胰岛素抵抗。(2) FFA和细胞内脂质积聚不仅通过葡萄糖-脂肪酸循环导致经氧化和非氧化途径的糖代谢障碍,还直接抑制葡萄糖刺激胰岛 β 细胞分泌胰岛素的能力,加快 β 细胞凋亡,抑制胰岛素在骨骼肌和肝脏的效应,以上环节被称为“脂质毒性作用”^[14]。本研究发现曲格列酮可

诱导前脂肪细胞分化成熟,从而可以减少 FFA 外溢,阻断“脂毒性效应”。

脂肪细胞不仅仅是传统的脂肪存储库,更重要的是具有多种复杂的内分泌功能。瘦素可通过中枢和外周两条途径对机体的胰岛素敏感性起双向调控作用。下丘脑是瘦素作用的重要中枢位点。在外周肝脏组织,瘦素刺激肝糖原分解和脂肪组织中脂肪酸的 β 氧化,增加了肝糖和 FFA 的输出。在胰腺组织,瘦素可直接抑制胰岛素分泌和胰岛素原 mRNA 的表达^[15]。内脏脂肪对瘦素存在高敏感性,更易释放出游离脂肪酸(FFA)引起胰岛素抵抗^[16]。脂联素不仅可以直接调节糖、脂代谢,还有抗炎和对血管的保护作用。目前把脂联素水平看作是一种衡量全身胰岛素敏感性的整合指标(integrator),甚至可视为与

HbA1c 相当的蛋白分子作为一种广泛用于流行病学研究的诊断工具^[17]。有证据提示, 抵抗素是一种前炎性细胞因子^[18]。Ohmori 等^[19]证实抵抗素是伴随冠心病的独立危险因子, 提示了抵抗素在动脉粥样硬化性疾病的发病过程中起重要作用。Kintscher 等^[20]最近报道噻唑烷二酮类药物可以保证来源于脂肪组织的脂肪细胞因子分泌产物的平衡和足量。本研究在前脂肪细胞分化成熟过程中给予曲格列酮干预, 观察上述重要脂肪细胞因子分泌的变化。结果发现: 早期阶段, 曲格列酮显著减少抵抗素分泌; 中期阶段, 曲格列酮同时促进脂联素和瘦素的分泌, 但脂联素分泌增加的量更多; 分化成熟阶段, 在分化组脂联素水平已下降的情况下, 曲格列酮组脂联素水平仍维持高分泌状态; 在分化组瘦素水平仍维持平均水平的前提下, 曲格列酮组瘦素分泌已下降。因此本文研究提示曲格列酮在促进前脂肪细胞分化同时, 还可以调整抵抗素、脂联素与瘦素等脂肪因子的分泌模式, 从而发挥调节脂肪组织内分泌功能的作用。

为探讨曲格列酮对已分化的人脂肪细胞储脂和内分泌功能的作用机制, 我们用无血清无分化诱导剂的基础培养基将曲格列酮配制为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度, 短暂作用于已分化的脂肪细胞 24 h。结果发现: (1) 曲格列酮促进 PPAR γ 2 和 C/EBP α mRNA 的表达。PPAR γ 2 和 C/EBP α 是调控脂肪细胞分化的主要转录因子^[21]。PPAR γ 2 最具脂肪组织特异性, C/EBP α 在脂肪细胞分化中起着关键性作用, 能够促进 PPAR γ 2 的高表达, 保持分化细胞的表型^[22]。因此, 噻唑烷二酮类药物可通过促进 PPAR γ 2 和 C/EBP α mRNA 的表达促进人前脂肪细胞分化为储脂功能完善的成熟脂肪细胞。(2) 曲格列酮促进 LPL mRNA 表达。LPL 是内源性甘油三酯(TG)代谢的关键酶之一, 能加速 TG 分解。有研究发现, 血浆 LPL 浓度与心血管疾病风险显著负相关^[23]。在 2 型糖尿病患者中, 应用 TZDs 药物可改善其血脂异常, 血浆 HDL-c 水平升高, TG 和 FFA 水平降低^[24]。因此, TZDs 药物可通过调节 LPL mRNA 表达发挥调节脂质代谢、降低心血管疾病风险的作用。(3) 在脂肪因子分泌方面, 曲格列酮直接促进脂联素 mRNA 表达, 抑制瘦素 mRNA 表达, 蛋白分泌检测结果与之相符。但在诱导前脂肪细胞分化成熟过程中检测到曲格列酮增加瘦素蛋白分泌, 似乎与其直接抑制分化的脂肪细胞瘦素 mRNA 表达不符。考虑可能与诱导分化培养基中含有高浓度的胰岛素和地塞米松等因子有关, 这些因子的整合

作用可能在诱导脂肪细胞分化的同时瘦素分泌也增加^[25~28]。在去除这些因素后, 曲格列酮则直接抑制分化的脂肪细胞瘦素表达和分泌。瘦素是经典的饱食信号^[29], 鉴于其在能量稳态中的作用, 对瘦素的抑制作用可能部分解释 TZDs 药物促进食欲的负面效应。对于已分化的脂肪细胞我们未检测到抵抗素 mRNA 表达, 这也与在分化的脂肪细胞上清中未检测到抵抗素蛋白相符。当曲格列酮作用 24 h 后, 仍未检测到抵抗素 mRNA 表达和蛋白的分泌, 提示 TZDs 药物至少不促进人抵抗素表达和分泌, 这与在啮齿类动物 TZDs 药物显著抑制抵抗素的表达不同^[30]。(4) 关于影响脂肪因子的分泌机制: 已有文献报道 PPAR γ 2 的激活是脂联素基因转录所必需的, 在脂联素的启动子区存在 PPRE^[31]; C/EBP α 是脂联素基因转录完全激活的一个关键因子^[32]; 抵抗素基因表达的正调控机制是由于 C/EBP α , 激活 P300 和 CBP, 提高了抵抗素启动子的组蛋白乙酰化。罗格列酮在成熟脂肪细胞内减少组蛋白乙酰化和 C/EBP α 的结合, 从而降低抵抗素 mRNA 表达^[33]。C/EBP α 参与介导瘦素启动子区的转录, 是瘦素 mRNA 表达的调控因子^[34]。因此, TZDs 药物可通过促进 PPAR γ 2 和 C/EBP α mRNA 的表达促进人前脂肪细胞分化为内分泌功能完善的成熟脂肪细胞。

综上所述, TZDs 类药物可以通过增加内脏脂肪细胞储脂能力和改善脂肪细胞因子谱发挥缓解内脏胰岛素抵抗和机体炎症状态等作用。其机制可能主要在于促进 PPAR γ 2、C/EBP α 和 LPL 基因的表达。同时, 脂肪细胞的增加和瘦素分泌的减少可能部分解释 TZDs 类药物增加体重的负面效应。

参考文献(References)

- 1 Prins JB, ORahilly S. Regulation of adipose cell number in man. *Clin Sci* 1997; 92(1): 3-11.
- 2 Roncari DA. Abnormalities of adipose cells in massive obesity. *Int J Obes* 1990; 14(Suppl 3): 187-92.
- 3 Erin EK, Jeffrey SF. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocr Metab* 2000; 89(6): 2548-56.
- 4 Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 2001; 104(4): 517-29.
- 5 Vidal H. PPAR receptors: recent data. *Ann Endocrinol* 2005; 66(2 Pt 2): 1S5-9.
- 6 阴津华, 黎明, 杨静, 吴从愿. 人网膜前脂肪细胞原代培养及其生物学特性研究. *中华医学杂志* 2007; 87(12): 838-41.
- 7 宋彬, 杨静. 曲格列酮对人前脂肪细胞增殖分化的影响. *山西医科大学学报* 2007; 38(10): 890-2.
- 8 阴津华, 杨静, 徐岐山. 噻唑烷二酮类药物对脂肪细胞增

- 殖分化的影响及其临床应用。中西医结合心脑血管病杂志 2007; 5(8): 705-6.
- 9 Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 1998; 78(3): 783-809.
- 10 黎明, 阴津华, 张 葵, 吴从愿, 邓洁英. 原代培养的人网膜前脂肪细胞分化过程中基因表达和脂肪因子分泌的特征. *中华内分泌代谢杂志* 2010; 26(1): 57-61.
- 11 黎明, 阴津华, 张 葵, 吴从愿. 高灵敏酶联免疫分析法测定人脂肪细胞瘦素分泌. *中华医学杂志* 2008; 88(46): 3293-7.
- 12 赵 黄, 罗 敏. 脂肪细胞分化的调控及与 2 型糖尿病的关系. *国外医学内分泌学分册* 2004; 24(1): 49-51.
- 13 Jiao K, Liu H, Chen J, Tian D, Hou J, Kaye AD. Roles of plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha and FFA and TG in the development of insulin resistance induced by high-fat diet. *Cytokine* 2008; 42(2): 161-9.
- 14 Lionetti L, Mollica MP, Lombardi A, Cavaliere G, Gifuni G, Barletta A. From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; 19(2): 146-52.
- 15 Ookuma M, Ookuma K, York DA. Effects of leptin on insulin secretion from isolated rat pancreatic islets. *Diabetes* 1998; 47(2): 219-23.
- 16 Müller G, Ertl J, Gerl M, Preibisch G. Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 1997; 272(16): 10585-93.
- 17 Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, *et al.* Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 2001; 50(5): 1126-33.
- 18 Filková M, Haluzík M, Gay S, Senolt L. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immunol* 2009; 133(2): 157-70.
- 19 Ohmori R, Momiyama Y, Kato R, Taniguchi H, Ogura M, Ayaori M, *et al.* Associations between serum resistin levels and insulin resistance, inflammation, and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(2): 379-80.
- 20 Kintscher U, Law RE. PPARgamma-mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288(2): E287-91.
- 21 Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, *et al.* C/EBP alpha induces adipogenesis through PPARgamma: A unified pathway. *Genes Dev* 2002; 16(1): 22-6.
- 22 Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: Structure, function and regulation. *Biochem J* 2002; 365(Pt 3): 561-75.
- 23 Rip J, Nierman MC, Wareham NJ, Luben R, Bingham SA, Day NE, *et al.* Serum lipoprotein lipase concentration and risk for future coronary artery disease: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(3): 637-42.
- 24 Peters Harmel AL, Kendall DM, Buse JB, Boyle PJ, Marchetti A, Lau H. Impact of adjunctive thiazolidinedione therapy on blood lipid levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Curr Med Res Opin* 2004; 20(2): 215-23.
- 25 Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, Boden G, Nolan JJ, Henry R, *et al.* Acute and chronic effect of insulin on leptin production in humans: Studies *in vivo* and *in vitro*. *Diabetes* 1996; 45(5): 699-701.
- 26 Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, Christoffersen CT, Englaro P, Heinze E, *et al.* Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 1996; 45(10): 1435-8.
- 27 Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology* 1997; 138(10): 4463-72.
- 28 Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Friedman JM, Ailhaud G, *et al.* Expression of ob gene in adipose cells: regulation by insulin. *J Biol Chem* 1996; 271(5): 2365-8.
- 29 Kanoski SE, Walls EK, Davidson TL. Interoceptive "satiety" signals produced by leptin and CCK. *Peptides* 2007; 28(5): 988-1002.
- 30 Moore GB, Chapman H, Holder JC, Lister CA, Piercy V, Smith SA, *et al.* Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286(4): 735-41.
- 31 Gustafson B, Jack MM, Cushman SW, Smith U. Adiponectin gene activation by thiazolidinediones requires PPAR gamma 2, but not C/EBP alpha-evidence for differential regulation of the Ap2 and adiponectin genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308(4): 933-9.
- 32 Qiao L, Maclean PS, Schaack J, Orlicky DJ, Darimont C, Pagliassotti M, *et al.* C/EBP-alpha Regulates Human Adiponectin Gene Transcription through an Intronic Enhancer. *Diabetes* 2005; 54(6): 1744-56.
- 33 Hartman HB, Hu X, Tyler KX, Dalal CK, Lazar MA. Mechanisms regulating adipocyte expression of resistin. *J Biol Chem* 2002; 277(22): 19754-61.
- 34 Hollenberg AN, Susulic VS, Madura JP, Zhang B, Moller DE, Tontonoz P, *et al.* Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferators-activated receptor gamma on the leptin promoter. *Biol Chem* 2007; 272(8): 5283-90.

Effect of Troglitazone on Gene Expression and Secretion of Adipocytokines during Human Omental Preadipocytes Differentiation

Jin-Hua Yin¹, Jing Yang¹, Ming Li^{2*}

(¹First Affiliated Hospital, Shanxi University of Medical, Taiyuan 030001, China; ²Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

Abstract Omental preadipocytes were primarily cultured and interfered by collagenase digestion. Troglitazone intervention cells, oil red O staining differentiation, ELISA determination of the level of secretion of adipocytokines, RT-PCR observation for the differentiation transcription factors and fat cell factor mRNA expression, the purpose is to study mechanism of thiazolidinediones from the perspective of the visceral fat storage lipid and endocrine. The results showed that troglitazone increased the human preadipocyte differentiation, improved visceral adipose tissue storage lipid capacity; it can significantly increase adiponectin secretion; regulate leptin secretion; inhibit resistin secretion. This suggested that thiazolidinediones improved insulin resistance and inflammation in the body by regulating adipocytokines spectrum. The main mechanism is to promote PPAR γ 2, C/EBP α and lipoprotein lipase (LPL) of mRNA. The increase in fat cells and changes in leptin secretion may partly explain the negative effects of thiazolidinediones in increasing body weight.

Key words troglitazone; preadipocyte; differentiation; adipocytokines; transcription factors

Received: March 2, 2010 Accepted: July 30, 2010

This work was supported by the Special Fund of Department of Health(No.2001-162) and Beijing Natural Science Foundation (No.7072011)

*Corresponding author. Tel: 13911559218, Fax: 86-351-4084775, E-mail: lmpeking@yahoo.com.cn