

脂联素过表达对小鼠炎性因子的影响*

郝 坡¹, 孟凡萍^{2△} (1. 重庆三峡医药高等专科学校医学技术系, 重庆 404120; 2. 重庆三峡中心医院检验科, 重庆 404000)

【摘要】 目的 用携带小鼠脂联素的基因过表达质粒转染小鼠, 研究小鼠血浆脂联素及炎性因子分泌的影响。**方法** 用本课题组前期构建好的小鼠 pcDNA3.1-Acrp30 基因过表达质粒经股四头肌注入 C57BL/6J 小鼠体内, 72 h 后检测小鼠血浆脂联素表达情况, 并测定其血浆白细胞介素-2、白细胞介素-3、白细胞介素-6、白细胞介素-8 和肿瘤坏死因子- α 的分泌水平。**结果** pcDNA3.1-Acrp30 过表达载体转染小鼠后, 其血浆脂联素水平显著增高, 血浆炎性因子分泌则显著下调。**结论** 构建的小鼠 Acrp30 基因过表达载体能有效地增强脂联素在小鼠体内的表达, 并能拮抗炎性因子的分泌。

【关键词】 脂联素; 过表达; 炎性因子

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.17.012 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)17-2513-02

Influence of adiponectin overexpression on mice inflammation factors* HAO Po¹, MENG Fan-ping^{2△} (1. Department of Medical Technology, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Three Gorges Hospital, Chongqing 404000, China)

【Abstract】 Objective To transfect into mice with plasmid carrying adiponectin gene overexpression for researching its influence on the plasma adiponectin expression and inflammation factors secretion. **Methods** The constructed mice pcDNA3.1-Acrp30 gene overexpression plasmid was transfected into the C57BL/6J mice body by quadriceps femoris and the plasma adiponectin expression after 72 h and the secretion levels of IL-2, IL-3, IL-6, IL-8 and TNF- α were detected. **Results** After transfecting the pcDNA3.1-Acrp30 overexpression vector into mice, the plasma level of adiponectin was significantly increased and the levels of plasma inflammatory factor IL-2, IL-3, IL-6, IL-8 and TNF- α were significantly down-regulated. **Conclusion** The constructed Acrp30 gene overexpression vector can effectively increase the expression of adiponectin in mice and antagonize the secretion of inflammatory factors.

【Key words】 adiponectin; overexpression; inflammatory factor

脂肪组织作为一个新近发现的内分泌器官, 可分泌多种细胞因子。这些因子在胰岛素抵抗及 2 型糖尿病 (T2DM) 发病机制中起着重要作用。脂联素 (Acrp30) 也由脂肪组织分泌, 在抗动脉粥样硬化调节糖脂代谢、改善胰岛素抵抗等方面具有广泛的生理功能, 与糖尿病有密切的关系。本研究着重探讨其抗炎作用, 首先将构建的小鼠 Acrp30 基因过表达质粒导入 C57BL/6J 小鼠体内, 观察后者血浆 Acrp30 的水平, 并检测其对小鼠炎性因子分泌的影响, 旨在进一步探讨 Acrp30 在脂代谢紊乱发生和发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 Acrp30 基因过表达载体为本课题组前期构建并保存; C57BL/6J 小鼠购自重庆医科大学实验动物中心; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 小鼠 Acrp30 检测试剂盒购自德国 Phoenix 公司; 炎性因子检测试剂购自美国 BD 公司。

1.2 动物分组及处理 C57BL/6J 小鼠 20 只, 8 周龄, 随机分为 pcDNA3.1 (+) 空质粒注射组 (NC 组, $n=10$), pcDNA3.1-Acrp30 重组真核表达质粒注射组 (PA 组, $n=10$), 空载及表达质粒 (1 mg/kg) 注射于小鼠股四头肌。于注射前及注射后 72 h 采集空腹尾静脉血, 分离血浆。

1.3 小鼠血浆 Acrp30 测定 采用 ELISA 法测定小鼠血浆

Acrp30 水平, 操作按照 ELISA 试剂盒说明书进行。以系列水平 Acrp30 标准品绘制 A450 标准曲线, 根据标准曲线计算 Acrp30 水平。

1.4 小鼠血浆炎性因子水平测定 采用流式细胞法测定小鼠血浆白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-3 (IL-3)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-8 (IL-8) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平, 操作按照 BD 公司炎性因子测定试剂盒说明书进行。

1.5 统计学处理 数据处理应用 SPSS18.0 软件, 采用配对样本 t 检验做统计学分析, 各项数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠血浆 Acrp30 分泌水平变化 小鼠血浆 Acrp30 ELISA 测定结果, 见表 1。质粒注射后 PA 组血浆 Acrp30 水平较注射前均升高 ($P < 0.05$), 而 NC 组在注射前后差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 小鼠血浆 Acrp30 分泌水平变化情况 ($\bar{x} \pm s$, A_{450} , $n=20$)

组别	注射时间	血浆 Acrp30 (mg/L)	t	P
PA 组	注射前	3.13 ± 0.50	-7.705	0.000
	注射后	4.68 ± 0.38		

* 基金项目: 重庆市卫生和计划生育委员会医学科技计划项目 (2011-2-411), 重庆市万州区科技计划项目 (201203060)。

作者简介: 郝坡, 男, 硕士, 讲师/主管检验师, 主要从事医学检验方面的教学与研究工作。 △ 通讯作者, E-mail: menyfei2132@aliyun.com。

续表 1 小鼠血浆 Acrp30 分泌水平变化情况($\bar{x}\pm s, A_{450}, n=20$)

组别	注射时间	血浆 Acrp30(mg/L)	<i>t</i>	<i>P</i>
NC 组	注射前	3.04±0.34	-0.398	0.700
	注射后	3.07±0.22		

表 2 小鼠血浆炎症因子分泌水平变化情况($\bar{x}\pm s, n=20$)

检测指标	NC 组				PA 组			
	注射前(μg/L)	注射后(μg/L)	<i>t</i>	<i>P</i>	注射前(μg/L)	注射后(μg/L)	<i>t</i>	<i>P</i>
IL-2	2.07±0.35	2.07±0.34	-0.557	0.591	2.07±0.26	1.31±0.22	11.891	0.000
IL-3	1.57±0.51	1.56±0.51	0.198	0.847	1.61±0.30	0.85±0.35	13.861	0.000
IL-6	1.75±0.42	1.75±0.45	-0.057	0.959	1.74±0.28	1.10±0.53	3.859	0.004
IL-8	1.69±0.57	1.70±0.56	-0.635	0.541	1.72±0.33	1.08±0.45	5.515	0.000
TNF-α	1.47±0.51	1.49±0.45	-0.930	0.377	1.54±0.34	0.83±0.44	8.500	0.000

3 讨 论

肥胖、糖尿病、代谢综合征等代谢性疾病患者都伴随炎症反应,作为内分泌器官,脂肪细胞可以分泌大量的细胞因子,其中包括 Acrp30,这些细胞因子接受外界信号并对之产生反应,从而调节食欲、胰岛素敏感性、炎症反应等过程。

Acrp30 是一种与胰岛素抵抗密切相关的细胞因子,主要由脂肪细胞分泌,与受体(AdipoR1、AdipoR2)结合后具有增强胰岛素敏感性、抗高血糖、抗动脉粥样硬化等生物作用^[1-3]。另有研究表明,低 Acrp30 血症是动脉粥样硬化发生的独立危险因素,随着动脉粥样硬化的发展,血浆 Acrp30 水平呈进行性下降趋势^[4]。对人体的研究发现,Acrp30 水平能预示 T2DM 和冠心病的发展,并在临床试验中表现出抗糖尿病、抗动脉粥样硬化和炎症反应的潜力^[4-5]。Acrp30 通过激活蛋白激酶 A(PKA)信号通路,使 TNF-α 介导的核因子-κB(NF-κB)的活化受到抑制,从而减轻内皮细胞的炎症反应^[6]。对体质量指数(BMI)正常和异常人群中 IL-6、IL-10、TNF-α 与 Acrp30 关系的研究表明,BMI 高的人群 Acrp30 表达显著降低,IL-6 和 TNF-α 水平则升高,相反,IL-10 水平则显著下降^[7]。可以抑制人的白细胞产生 IL-10,下调巨噬细胞中前炎症细胞因子干扰素-γ(IFN-γ)的产生^[8]。Matsubara 等^[9]研究发现,低 Acrp30 血症与超敏 C 反应蛋白血症存在负相关,提示 Acrp30 可能具有抗炎作用,以上研究提示 Acrp30 是炎症反应中重要的调节因子。

为了进一步评价 Acrp30 和炎症因子的相互作用,本研究利用构建的 Acrp30 真核表达载体 pcDNA3.1-Acrp30 转入 C57BL/6J 小鼠,成功上调了小鼠血浆 Acrp30 水平,并发现血浆炎症因子 IL-2、IL-3、IL-6、IL-8 和 TNF-α 水平却显著受抑。结果证明,Acrp30 的过表达可拮抗小鼠分泌炎症因子,从而拮抗炎性反应过程。

参考文献

[1] Ye R,Scherer PE. Adiponectin,driver or passenger on the road to insulin sensitivity[J]. Mol Metab, 2013, 2(3):

2.2 小鼠血浆炎症因子分泌水平变化 小鼠血浆 IL-2、IL-3、IL-6、IL-8 及 TNF-α 流式细胞仪测定结果,见表 2。质粒注射后 PA 组血浆 5 项指标水平较注射前均降低($P<0.05$),而 NC 组在注射前后差异无统计学意义($P>0.05$)。

133-141.

[2] Okada-Iwabu M,Yamauchi T,Iwabu M,et al. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity[J]. Nature,2013,503(7477):493-499.

[3] Yamauchi T,Kadowaki T. Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases [J]. Cell Metab,2013,17(2):185-196.

[4] Mohammadzadeh G,Ghaffari MA. Additional effect of diabetes mellitus type 2 on the risk of coronary artery disease;role of serumadiponectin[J]. Iran Red Crescent Med J,2014,16(1):e8742.

[5] Yoshida S,Fuster JJ,Walsh K. Adiponectin attenuates abdominal aortic aneurysm formation in hyperlipidemic mice [J]. Atherosclerosis,2014,235(2):339-346.

[6] Sun X,Feng R,Li Y,et al. Histidine supplementation alleviates inflammation in the adipose tissue of high-fat diet-induced obese rats via the NF-κB-and PPARγ-involved pathways[J]. Br J Nutr,2014,15(3):1-9.

[7] Oranski SP,Eliseeva LN,Khanfetian RA. Body structure and serum concentration of adiponectin and cytokines (IL-6,-10 and TNF-alpha) in rheumatoid arthritis combined with obesity[J]. Vopr Pitan,2013,82(4):10-14.

[8] Cheng X,Folco EJ,Shimizu K,et al. Adiponectin induces pro-inflammatory programs in human macrophages and CD4+ T cells[J]. J Biol Chem, 2012, 287(44):36896-36904.

[9] Matsubara T,Naruse K,Arakawa T,et al. Impact of pitavastatin on high-sensitivity C-reactive protein and adiponectin in hypercholesterolemic patients with the metabolic syndrome: the PREMIUM study [J]. J Cardiol, 2012,60(5):389-394.