

利拉鲁肽对肥胖大鼠脂肪组织内质网应激的影响

栗红蕊*, 崔岩, 王姣, 孙高洁, 王守俊*(郑州大学第一附属医院内分泌及代谢病科, 郑州 450052)

中图分类号 R965;R589.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)21-1946-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.09

摘要 目的:研究利拉鲁肽对肥胖大鼠脂肪组织内质网应激的影响。方法:取大鼠分别用基础饲料和高脂饲料喂养8周后,分为正常对照组、肥胖组、肥胖-利拉鲁肽组,前2组大鼠腹腔注射0.9%氯化钠注射液,肥胖-利拉鲁肽组大鼠腹腔注射利拉鲁肽100 μg/kg,每日2次,连续8周。末次给药后隔夜禁食处死大鼠,称体质量,取肾周及肾周脂肪组织,计算脂体比,检测脂肪组织中类蛋白质激酶激活的双链RNA的内质网激酶(PERK)、肌醇需求激酶1-α(IRE1-α)、C/EBP同源蛋白(CHOP)mRNA的表达和葡萄糖转运蛋白78(GRP78)的表达。结果:与正常对照组比较,肥胖组大鼠体质量、脂体比和脂肪组织中PERK、IRE1-α、CHOP mRNA及GRP78蛋白表达均明显升高($P<0.01$);与肥胖组比较,肥胖-利拉鲁肽组大鼠上述指标均明显降低($P<0.01$)。结论:利拉鲁肽可显著减轻肥胖大鼠体质量及内脏脂肪组织过度累积,并可缓解脂肪组织内质网应激。

关键词 肥胖;大鼠;利拉鲁肽;内质网应激

Effects of Liraglutide on Endoplasmic Reticulum Stress of Fatty Tissue in Obese Rats

LI Hong-rui, CUI Yan, WANG Jiao, SUN Gao-jie, WANG Shou-jun (Dept. of Endocrinology and Metabolic Disease, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of liraglutide on endoplasmic reticulum stress of fatty tissue in obese rats. METHODS: 48 rats were divided into normal control group, obesity group and obesity-liraglutide group after given basal feed and high-fat diet for 8 weeks. The first 2 groups were given 0.9% Sodium chloride injection intraperitoneally, and obesity-liraglutide group was given intraperitoneal injection of liraglutide 100 μg/kg twice a day for consecutive 8 weeks. All rats were fasting overnight and sacrificed after last administration. Each rat of three groups was weighted, and the fatty tissue around kidney and epididymis were removed to calculate lipid ratio. The expressions of PERK, IRE1-α, CHOP mRNA and GRP78 protein in fatty tissue were measured. RESULTS: Compared with normal control group, the body weight, lipid ratio and the expressions of PERK, IRE1-α, CHOP mRNA and GRP78 protein in fatty tissue of obesity group were increased significantly ($P<0.01$); compared with obesity group, the above index of obesity-liraglutide group were decreased significantly ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Liraglutide may ameliorate the body weight gain in obese rats and excessive accumulation of visceral adipose tissue, and significantly relieve endoplasmic reticulum stress in the fatty tissue.

KEYWORDS Obesity; Rats; Liraglutide; Endoplasmic reticulum stress

随着人们生活水平的提高,肥胖呈出现高患病率趋势。世界卫生组织的报告指出,肥胖正在以惊人的速度增长,全球约有15亿肥胖及超体质量人口^[1]。肥胖常合并2型糖尿病、心血管疾病、代谢综合征等。阐明肥胖和相关代谢性疾病的发病机制,找出其防治措施是十分必要的。新型降糖药物利拉鲁肽(Liraglutide)是胰高血糖素样肽1(GLP-1)长效类似物,不仅具有葡萄糖浓度依赖性促进胰岛素释放、保护胰岛B细胞的功能,也具有延缓胃排空、增加中枢饱足感、减轻体质量等作用^[2]。因此对2型糖尿病合并肥胖的治疗很有意义。此外,肥胖患者常伴有细胞应激和炎症信号通路的激活,其中内质网应激(ERS)占重要地位。研究指出,GLP-1有改善ERS的作用^[3]。本研究观察不同干预条件下各组大鼠脂体比、ERS标志性因子类蛋白质激酶激活的双链RNA的内质网激酶(PERK)、肌醇需求激酶1-α(IRE1-α)、C/EBP同源蛋白(CHOP)mRNA^[4]的表达和葡萄糖转运蛋白78(GRP78)^[5]的表达的变化,旨在探讨GLP-1受体激动药利拉鲁肽对高脂诱导肥胖大鼠体质量、内脏脂肪组织累积和脂肪组织ERS的作用,进一步探讨利拉

鲁肽减肥功能的可能机制。

1 材料

1.1 仪器

低温冰箱(-80℃,日本Sanyo公司);低温高速离心机(德国Eppendorf公司);美国UVP凝胶成像分析系统、电泳仪和电泳槽(北京六一仪器厂)。

1.2 药品与试剂

利拉鲁肽注射液(丹麦诺和诺德制药公司,批号:DP50185,规格:3 ml:18 mg);基础饲料和高脂饲料(河南省动物实验中心);Trizol新型总RNA抽提试剂[宝生物工程(大连)有限公司];反转录和聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(全式金生物技术有限公司);引物均由上海生工生物技术有限公司合成;兔抗大鼠GRP78抗体(美国Cell Signaling Technology公司);β-肌动蛋白(β-actin)抗体(北京博奥森公司);辣根过氧化物酶标记二抗(美国Bio-rad公司)。

1.3 动物

5周龄健康清洁级SD大鼠48只,♂,体质量130~160 g,由河南省动物实验中心提供,许可证号:SCXK(豫)2010-0002。大鼠2只/笼饲养,自由摄食及饮水,明暗周期为12 h/12 h,温度控制在(22±2)℃,相对湿度为(50±10)%。

* 硕士研究生。研究方向:内分泌及代谢性疾病。电话:0371-66295062。E-mail:542360301@qq.com

通信作者:主任医师,博士。研究方向:内分泌及代谢性疾病。电话:0371-66295062。E-mail:wangshoujun02@126.com

2 方法

2.1 模型制备及分组^[5-7]

将48只大鼠适应性喂养1周后,随机数字表法分为基础饲料组($n=8$)和高脂饲料组($n=40$),喂养8周。以基础饲料喂养的大鼠为正常对照组,将体质量大于正常对照组大鼠平均体质量+1.96倍标准差的高脂饲料喂养大鼠分为肥胖组和肥胖-利拉鲁肽组,正常对照组和肥胖组大鼠腹腔注射0.9%氯化钠注射液(生理盐水),肥胖-利拉鲁肽组大鼠腹腔注射利拉鲁肽100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,每日2次,连续8周。

2.2 标本采集

于实验前和实验开始第8、16周,观察各组大鼠活动、饮食情况和体质量。16周末,各组大鼠隔夜禁食12 h后断头处死大鼠,快速取出大鼠附睾及肾周脂肪组织,称质量并记录数值,标记后立即置于液氮中保存待测。计算脂体比:脂体比(%)=(附睾脂肪组织+肾周脂肪组织)/大鼠体质量 $\times 100\%$ 。

2.3 脂肪组织中PERK、IRE1- α 、CHOP mRNA检测

取各组大鼠脂肪组织约100 mg,震荡匀浆,采用Trizol法提取总RNA,用分光光度计检测RNA浓度及纯度。分别取总RNA 1 μg 反转录得到cDNA,置PCR仪上扩增。上下游引物分别为内参 β -actin: 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'、5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3',扩增片段长度:349 bp; PERK: 5'-CTCCTGTCTTGGTTGGGTCTG-3'、5'-CTTCTTGGCGATGTTCTTGCT-3',扩增片段长度:218 bp; IRE1- α : 5'-GACGGACAGAATACACCATCAC-3'、5'-CCAC-CACAGGAGAGGCATAG-3',扩增片段长度:213 bp; CHOP: 5'-GGCAGCGACAGAGCCAAA-3'、5'-CAGCTGGACACTGTCTCAAAGG-3',扩增片段长度:111 bp。基因扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;循环参数:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,退火30 s (PERK 59.6 $^{\circ}\text{C}$, IRE1- α 59 $^{\circ}\text{C}$, CHOP 56.4 $^{\circ}\text{C}$),72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸20 s,共35个循环;最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳、成像,用目的条带与 β -actin条带的灰度比值进行结果分析。

2.4 相关蛋白检测

取各组大鼠脂肪组织100 mg,置于高通量组织匀浆机匀浆,加入1 ml细胞裂解液[苯甲基磺酰氟(PMSF)-细胞组织快速裂解液(RIPA)=1:99(现用现配)],冰浴静置15 min后取上清,BCA蛋白定量法测定蛋白浓度。取待测蛋白样品40 μg ,100 $^{\circ}\text{C}$ 5 min使蛋白变性,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,封闭,加入兔抗大鼠GRP78抗体(1:1 000)摇床4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST缓冲液洗膜5 min 3次,加辣根过氧化物酶标记二抗(1:5 000)孵育1 h。洗涤后磷酸盐缓冲液(PBS)显色,Image Studio Ver 2.0软件测灰度值。

2.5 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件对所得数据进行分析,实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两独立样本比较采用 t 检验;多组间均数比较采用方差分析,两两比较采用LSD- t 检验。

3 结果

3.1 建模情况

实验前,基础饲料组大鼠平均体质量(168.75 \pm 7.025) g、高脂饲料组大鼠平均体质量(165.58 \pm 12.926) g,差异无统计学意义。8周末,基础饲料组大鼠平均体质量(379.63 \pm 17.171) g,高脂饲料组大鼠中共筛选出体质量[(430.94 \pm 10.662) g]大于基础饲料组大鼠平均体质量+1.96倍标准差的肥胖大鼠17只(肥胖发生率为42.5%),分为肥胖组($n=8$)和肥胖-利拉鲁肽组($n=9$),肥胖组和肥胖-利拉鲁肽组大鼠体质量

与正常对照组(基础饲料组)大鼠比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。

3.2 16周末各组大鼠体质量和脂体比变化

16周末,与正常对照组比较,肥胖组和肥胖-利拉鲁肽组大鼠体质量和脂体比均升高,差异具有统计学意义($P<0.01$),提示高脂饲料能显著促进大鼠内脏脂肪组织的积累;与肥胖组比较,肥胖-利拉鲁肽组大鼠体质量和脂体比均降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),提示利拉鲁肽可部分改善高脂饲料诱导的体质量增加及内脏脂肪组织积累,结果见表1。

表1 各组大鼠体质量和脂体比变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Change of body weights and ratio of fat to body weight in different groups($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体质量,g	脂体比
正常对照组	8	505.50 \pm 11.686	2.076 \pm 0.209
肥胖组	8	546.00 \pm 10.677*	3.533 \pm 0.427*
肥胖-利拉鲁肽组	9	525.63 \pm 8.815**	2.855 \pm 0.219**

与正常对照组比较:* $P<0.01$;与肥胖组比较:** $P<0.01$

vs. normal control group:* $P<0.01$;vs. obesity group:** $P<0.01$

3.3 脂肪组织中PERK、IRE1- α 、CHOP mRNA表达

与正常对照组比较,肥胖组和肥胖-利拉鲁肽组大鼠脂肪组织中PERK、IRE1- α 、CHOP mRNA表达均升高,差异具有统计学意义($P<0.01$);与肥胖组比较,肥胖-利拉鲁肽组大鼠脂肪组织中上述指标均降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),电泳图见图1,结果见表2。

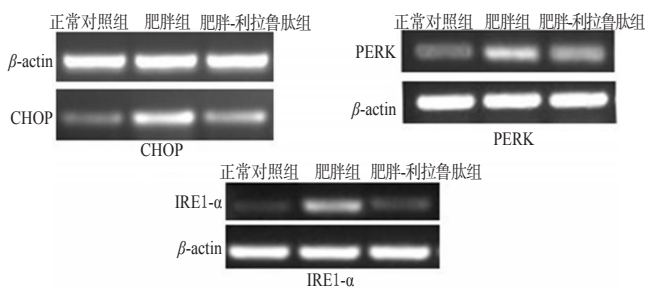


图1 各组大鼠脂肪组织中PERK、IRE1- α 、CHOP mRNA表达的电泳图

Fig 1 Electrophoretogram of the expressions of PERK, IRE1- α and CHOP mRNA in fatty tissue of rats in different groups

表2 各组大鼠脂肪组织中PERK、IRE1- α 、CHOP mRNA及GRP78蛋白的表达($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The expressions of PERK, IRE1- α , CHOP mRNA and GRP78 protein in different groups($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CHOP mRNA/ β -actin	PERK mRNA/ β -actin	IRE1- α mRNA/ β -actin	GRP78/ β -actin
正常对照组	8	0.197 \pm 0.079	0.172 \pm 0.120	0.193 \pm 0.023	0.295 \pm 0.097
肥胖组	8	0.783 \pm 0.081*	0.533 \pm 0.248*	0.674 \pm 0.034*	0.848 \pm 0.066*
肥胖-利拉鲁肽组	9	0.331 \pm 0.058**	0.328 \pm 0.132**	0.392 \pm 0.034**	0.679 \pm 0.063**

与正常对照组比较:* $P<0.01$;与肥胖组比较:** $P<0.01$

vs. normal control group:* $P<0.01$;vs. obesity group:** $P<0.01$

3.4 相关蛋白检测结果分析显示

与正常对照组比较,肥胖组和肥胖-利拉鲁肽组大鼠脂肪组织中GRP78蛋白表达均升高,差异具有统计学意义($P<0.01$);与肥胖组比较,肥胖-利拉鲁肽组大鼠脂肪组织中GRP78蛋白表达均降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),电泳图见图2,结果见表2。



图2 各组大鼠脂肪组织中 GRP78 蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretogram of the expressions of GRP78 protein in fatty tissue of rats in different groups

4 讨论

肥胖是许多慢性疾病的基础疾病。肥胖状态下慢性炎症、氧化应激和营养过剩等刺激因素持续作用,促使脂肪细胞合成和释放大脂肪因子和细胞因子,为满足需求,脂肪细胞内质网发生扩张和功能增强。大量研究指出,肥胖状态下,机体多组织器官出现ERS^[8-10],有3种内质网应激蛋白[肌醇需求激酶1(IRE-1)、类PKR的内质网激酶(PERK)和转录激活因子6(ATF-6)]介导的未折叠蛋白反应(UPR)旨在恢复内质网稳态^[11-12]。分子伴侣GRP78在未应激状态下与以上3种应激蛋白结合,其表达升高是ERS的标志之一^[13]。持续性的ERS可导致细胞凋亡^[14]。CHOP是由ERS诱导凋亡时产生的一种转录因子^[15]。在糖尿病模型小鼠中,胰岛B细胞敲除CHOP后,可保护胰岛B细胞免于凋亡,促进细胞存活,减轻糖尿病严重程度^[16]。Sharma S等^[17]研究结果表明,GLP-1受体激动药Exendin-4可以维持脂肪肝细胞中分子伴侣GRP78的高表达,降低CHOP的表达,提示肝脏内质网折叠能力增强,ERS反应降低。

GLP-1是进食后肠道L细胞分泌的一种多肽,有葡萄糖浓度依赖性促进胰岛素分泌的作用,在体内受体广泛。有研究指出,对于2型糖尿病和心血管疾病的高风险人群,GLP-1类似物利拉鲁肽具有限制热量摄入、减轻体重、改善胰岛素抵抗与降低收缩压、血糖、甘油三酯的作用^[18]。Liu J等^[6]指出利拉鲁肽对大鼠糖尿病心肌病变ERS减缓效果明显。目前关于GLP-1能否缓解肥胖状态下脂肪组织ERS反应的研究较少。

本研究结果提示,高脂饲料可诱导肥胖,可显著激活大鼠脂肪组织ERS信号通路,利拉鲁肽干预对肥胖大鼠脂肪组织内质网应激信号通路的激活具有显著的缓解作用,使脂肪组织内质网折叠水平较肥胖状态有显著改善。这是否与利拉鲁肽干预时间长短有关,有待进一步探讨。

肥胖状态下机体多器官组织出现ERS,脂肪细胞表现为数量与体积增大的综合。有研究证实,在肥胖小鼠体内检测到多个ERS反应标志物的激活,包括GRP78表达增加、PERK和eIF2 α 磷酸化水平增加、IRE1- α 磷酸化增强等,尤其是在肝脏和脂肪组织^[19]。此外,Zhao LL等^[14]研究指出,利拉鲁肽可以减轻胰岛细胞的ERS;Liu J等^[6]研究指出,利拉鲁肽能通过抑制ERS减轻糖尿病大鼠心血管病变。以上研究均提示,肥胖可以引起脂肪组织发生ERS,而GLP-1可以缓解内质网应激,这与本实验研究结果一致。

综上所述,GLP-1激动药利拉鲁肽可显著减轻肥胖大鼠体质量及内脏脂肪组织过度累积,并可缓解脂肪组织ERS。

参考文献

[1] Medanić D, Pucarín-Cvetković J. Obesity-a public health problem and challenge[J]. *Acta Med Croatica*, 2012, 66(5):347.
 [2] 李敬华,张红,候雯莉.肠促胰岛素生理作用及应用研究进展[J].武警医学院学报,2011,20(7):597.
 [3] Cunha DA, Ladrière L, Ortis F, et al. GLP-1 agonists protect pancreatic β -cells from lipotoxic endoplasmic reticulum stress through upregulation of BiP and JunB[J]. *Diabetes*, 2009, 58(12):2851.

[4] Chen J, Guo H, Zheng G, et al. Region-specific vulnerability to endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death in rat brain after status epilepticus[J]. *J Biosci*, 2013, 38(5):877.
 [5] Teodoro-Morrison T, Schuiki I, Zhang L, et al. GRP78 overproduction in pancreatic beta cells protects against high-fat-diet-induced diabetes in mice[J]. *Diabetologia*, 2013, 56(5):1057.
 [6] Liu J, Liu Y, Chen L, et al. Glucagon-like peptide-1 analog liraglutide protects against diabetic cardiomyopathy by the inhibition of the endoplasmic reticulum stress pathway[J]. *J Diabetes Res*, 2013:630-637.
 [7] 王晓珂.炎症反应与高脂饮食诱导的肥胖和胰岛素抵抗关系的研究[D].武汉:华中科技大学,2011:22-36.
 [8] Lee J, Ozcan U. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(3):1203.
 [9] Han J, Murthy R, Wood B, et al. ER stress signalling through eIF2 α and CHOP, but not IRE1 α , attenuates adipogenesis in mice[J]. *Diabetologia*, 2013, 56(4):911.
 [10] Chen YQ, Chen MJ, Wu ZH, et al. Ox-LDL induces ER stress and promotes the adipokines secretion in 3T3-L1 adipocytes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):e81379.
 [11] Engin F, Nguyen T, Yermalovich A, et al. Aberrant islet unfolded protein response in type 2 diabetes[J]. *Scientific Reports*, 2014:4054.
 [12] Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease[J]. *Cell*, 2010, 140(6):900.
 [13] Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, et al. Vasp is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex[J]. *Diabetes*, 2012, 61(11):2823.
 [14] Zhao LL, Guo H, Chen H, et al. Effect of liraglutide on endoplasmic reticulum stress in diabetes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(1):133.
 [15] Yamamoto K, Sato T, Matsui T, et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1[J]. *Dev Cell*, 2007, 13(3):365.
 [16] Song B, Scheuner D, Ron D, et al. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(10):3378.
 [17] Sharma S, Mells JE, Fu PP, et al. GLP-1 analogs reduce hepatocyte steatosis and improve survival by enhancing the unfolded protein response and promoting macroautophagy[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e25269.
 [18] Mundil D, Cameron-Vendrig A, Husain M. GLP-1 receptor agonists: a clinical perspective on cardiovascular effects[J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2012, 9(2):95.
 [19] Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease[J]. *Cell*, 2010, 140(6):900.

(收稿日期:2013-12-30 修回日期:2014-03-04)