

抵抗素对 3T3- L1 脂肪细胞葡萄糖摄取的影响

李芳萍, 李焱, 傅玉如, 严励, 傅祖植
(中山大学附属第二医院内分泌科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】构建载有小鼠抵抗素(resistin)基因及其反义核酸的重组真核表达质粒,探讨抵抗素对 3T3- L1 脂肪细胞葡萄糖摄取的影响。【方法】用 RT- PCR 技术从小鼠脂肪组织扩增抵抗素基因 cDNA, A/T 克隆于 pGEM- T 载体,再亚克隆于 pcDNA3.1⁽⁺⁾和 pcDNA3.1⁽⁻⁾真核表达载体,构建载有小鼠抵抗素(resistin)基因及其反义核酸的重组真核表达质粒 pcDNA3.1⁽⁺⁾-resistin 和 pcDNA3.1⁽⁻⁾-resistin⁽⁻⁾。将 pcDNA3.1⁽⁺⁾-resistin⁽⁺⁾ 转染小鼠 3T3- L1 脂肪细胞,通过 G418 筛选稳定表达的细胞株。3T3- L1 脂肪细胞分为对照、瞬时、载体和稳定 4 个细胞组(每组 n=6),用 ³H- 2- 脱氧葡萄糖进行非胰岛素和胰岛素介导的葡萄糖摄取试验。【结果】插入 pcDNA3.1⁽⁺⁾的 DNA 片段的核苷酸序列与小鼠抵抗素基因 mRNA 编码区序列完全一致,且方向正确;插入 pcDNA3.1⁽⁻⁾的 DNA 片段的核苷酸序列与抵抗素基因 mRNA 编码区核苷酸序列完全一致,且方向相反。对照组、瞬时组、载体组和稳定组的 3T3- L1 脂肪细胞非胰岛素和胰岛素介导的葡萄糖摄取率的无显著性差别(P > 0.05)。【结论】成功构建了载有抵抗素基因和载有抵抗素基因反义核酸的重组真核表达质粒。抵抗素对 3T3- L1 脂肪细胞的葡萄糖摄取均无明显影响。

关键词 抵抗素;脂肪细胞;葡萄糖摄取

中图分类号 R341

文献标识码 A

文章编号 :1672- 3554 (2007)04- 0387- 06

Effects of Resistin on Glucose Uptake in 3T3- L1 Adipocytes

LI Fang-ping, LI Yan, FU Yu- ru, YAN Li, FU Zu- zhi

(Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat- sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To construct respectively the eukaryotic expression plasmids containing a sense and an antisense resistin gene, and study the effects of resistin on glucose uptake in 3T3- L1 adipocytes. 【Methods】 Synthesis of resistin cDNA was performed using RT- PCR. The purified PCR product was ligated to pGEM- T vector by T₄ DNA ligase. Resistin cDNA subcloned into pcDNA3.1⁽⁺⁾ or pcDNA3.1⁽⁻⁾ eukaryotic expression vector. The recombination expression plasmids were analyzed nucleotide sequences. The recombinant plasmids pcDNA3.1⁽⁺⁾-resistin⁽⁺⁾ and pcDNA3.1⁽⁻⁾-resistin⁽⁻⁾ were transfected into 3T3- L1 adipocytes; the stable transfection cell line was screened by the culture medium containing G418. 3T3- L1 adipocytes were divided into control, transient, vector, and stable groups (n=6), and were experimented glucose uptake with ³H labeled glucose. 【Results】 DNA fragment nucleotide sequence inserted pcDNA3.1⁽⁺⁾ was consistent with the resistin gene mRNA coding sequence. DNA fragment nucleotide sequence inserted pcDNA3.1⁽⁻⁾ was consistent with the resistin gene antisense mRNA coding sequence. There were no significant difference of glucose uptake in both basic state and insulin stimulated among four cell groups (P > 0.05). 【Conclusion】 The sense and antisenses resistin gene expression plasmids have been successfully cloned. Resistin does not affect glucose uptake in 3T3- L1 adipocytes.

Key words: resistin; adipocytes; glucose uptake

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2007, 28(4):387- 392]

抵抗素(resistin)是 2001 年发现的存在于血浆中富含半胱氨酸的分泌性蛋白质。在啮齿类动

物其主要由脂肪细胞特异性分泌,可损害机体的糖耐量,影响组织对胰岛素的敏感性^[1],被认为是

收稿日期 2007-02-25

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30570886);教育部出国留学人员启动基金资助项目(D002003008)

作者简介 李芳萍(1963-)女,江西南昌人,博士,副主任医师,硕士生导师, E-mail: Amiy36@hotmail.com

一种将肥胖与 2 型糖尿病联系起来的重要信号分子^[2]。已明确抵抗素基因及蛋白质的分子结构,抵抗素基因表达受胰岛素^[3]、肿瘤坏死因子^[4]等多种因素调控,抵抗素可能与肥胖、胰岛素抵抗及 2 型糖尿病的关系密切^[5],可能直接影响血管内皮细胞功能,参与动脉粥样硬化的形成^[6,7]。为开展抵抗素生物功能研究,我们拟构建载有小鼠抵抗素基因及其反义核酸的真核表达质粒。抵抗素基因反义核酸的真核表达质粒转染 3T3-L1 脂肪细胞,试图让抵抗素基因反义核酸抑制 3T3-L1 脂肪细胞抵抗素基因的表达,观察抵抗素对脂肪细胞葡萄糖摄取的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

pGEM-T Vector system I (Promega 公司), pcDNA3.1 (+) 和 pcDNA3.1 (-) 真核表达质粒 (Invitrogen 公司), 3T3-L1 前体脂肪细胞 (由北京医院老年研究所细胞室提供), SuperFect Transfection Reagent (QIAGEN 公司), G418 (购自 GIBCO BRL 公司), Complete, Mini 复方蛋白酶抑制剂片 (Roche 公司) β -异丁基 1-甲基黄嘌呤 (Sigma 公司), 短效胰岛素 (Humulin R, 美国礼来公司), 地塞米松 (中国浙江医药股份有限公司), 豚鼠抗小鼠抵抗素抗体 (一抗, Guinea pig anti-mouse resistin, Linco 公司), 辣根过氧化物酶结合的抗豚鼠 IgG (H+L) (晶美公司), 细胞松弛素 B (Sigma 公司), ³H-2-脱氧葡萄糖 (放射性比活度 200 GBq/mmol, 中国同位素总公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据文献报道的小鼠抵抗素基因 mRNA 序列 (基因库的登录号为 AF323080), 用计算机软件设计扩增抵抗素基因 mRNA 编码区序列的特异引物, 上游引物: 5'-CGGAATTC ATGAAGAACCTTTTCATTTCC-3' (下划线的部分为 EcoR 酶切位点), 下游引物: 5'-CTAGTCTAGATCAGGAAGCGACCTGCAGCT-3' (下划线的部分为 Xba 酶切位点)。上、下游引物的 5 端分别引入 EcoR 和 Xba 酶切位点, 以便扩增的目的 cDNA 插入载体, 扩增片段理论长度为 363 bp。

1.2.2 抽提总 RNA 取 16 周龄正常雄性 BALB/C 小鼠附睾周围及网膜的脂肪组织, 置于 TRIzol

中, 用电动匀浆器磨碎成匀浆, 按 TRIzol Reagent 操作说明抽提小鼠脂肪组织总 RNA。凝胶电泳鉴定总 RNA 的质量, 紫外分光光度法检测总 RNA 纯度和浓度。

1.2.3 RT-PCR 合成抵抗素 cDNA 0.5 μ g/ μ L 总 RNA, 2 μ L、10 倍逆转录反应缓冲液 2 μ L、10 mmol/L dNTP Mix 2 μ L、50 mmol/L MgCl₂ 2 μ L、17 pmol/ μ L 序列特异性下游引物 1.5 μ L、50 U/ μ L RNA 酶抑制剂 1 μ L、20 U/ μ L AMV 逆转录酶 1 μ L, 加 DEPC 处理的水使反应体积达 20 μ L, 42 孵育 1 h 进行逆转录反应, 99 5 min 使酶失活。在一个 50 μ L 的反应体系中进行 PCR, 并对反应体系中 cDNA、引物和 MgCl₂ 量、退火温度、退火时间、延伸时间以及反应的循环次数进行了优化, 最终反应体系中包含 10 倍 PCR 反应缓冲液 5 μ L、10 mmol/L dNTP Mix 1 μ L、50 mmol/L MgCl₂ 2 μ L、17 pmol/ μ L 上下游引物各 1 μ L、逆转录反应产物 5 μ L、5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 加 DEPC 处理的水使反应体积达 50 μ L, 热循环参数: 96 预变性 2 min, 96 变性 30 s, 52 退火 1 min, 72 延伸 50 s, 共进行 35 循环, 末次循环后 72 延伸 7 min, 4 扩增产物凝胶电泳后照相。

1.2.4 PCR 产物 A-T 克隆于 pGEM-T 载体 PCR 产物凝胶电泳, 用 Qiaquick Gel Extraction Kit 凝胶回收纯化, 纯化的 PCR 产物通过 T₄DNA 连接酶 A-T 连接于 pGEM-T 载体, 重组质粒转化 JM109 感受态菌, 蓝白斑筛选阳性菌落, 挑选单个白色菌落, 加入 2 mL LB 液体培养基中 (含氨苄青霉素), 37 振荡增殖转化菌。用 Qiaprep Spin Miniprep Kit 抽提质粒。重组质粒经 EcoR 和 Xba 双酶切鉴定。

1.2.5 抵抗素 cDNA 亚克隆于 pcDNA3.1 (+) 或 pcDNA3.1 (-) 真核表达载体 用 EcoR 和 Xba 内切酶分别对重组 pGEM-T-resistin 质粒、pcDNA3.1 (+) 和 pcDNA3.1 (-) 载体进行双酶切, 按 Qiaquick Gel Extraction Kit 推荐的方法分别进行凝胶回收抵抗素 cDNA、切开的 pcDNA3.1 (+) 和 pcDNA3.1 (-) 载体 DNA, T₄DNA 连接酶连接抵抗素 cDNA 和切开的 pcDNA3.1 (+) 或 pcDNA3.1 (-) 载体 DNA, 重组质粒转化 JM109 感受态菌, 氨苄青霉素筛选阳性菌落, 挑选 3 个菌落, 加入含氨苄青霉素 2 mL LB 液体培养基中, 37 振荡增殖转化菌, 用 Qiaprep Spin Miniprep Kit 从菌液中抽提质粒, 送

测序鉴定。

1.2.6 pcDNA3.1(+) - resistin(+) 转染 3T3-L1 前体脂肪细胞并诱导分化为脂肪细胞 3T3-L1 前体脂肪细胞以 5×10^5 接种于 6 孔板中, 培养至 60%~70% 融合, 按 SuperFect Transfection Reagent 说明进行操作, 通过脂质体 pcDNA3.1(+) - resistin(+) 转染 3T3-L1 前体脂肪细胞, 并用含终浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 培养液筛选将转染阳性细胞克隆。3T3-L1 前体脂肪细胞按 SuperFect Transfection Reagent 说明进行转染, 并把细胞分为下列 4 组: 对照组(未转染)、瞬时组(瞬时转染 pcDNA3.1(+) - resistin(+))、载体组(瞬时转染 pcDNA3.1(+)) 和稳定组(稳定转染 pcDNA3.1(+) - resistin(+))。4 组 3T3-L1 前体脂肪细胞在含 0.5 mmol/L 3-异丁基 1-甲基黄嘌呤、1.7 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 胰岛素、1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 地塞米松和 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液培养以诱导分化为脂肪细胞。

1.2.7 Western blot 方法检测四组细胞抵抗素蛋白质的表达 四组脂肪细胞生长达 90% 融合, 收集至 1.5 mL EP 管加细胞裂解液提取总蛋白, 按 Bio-Rad 蛋白检测试剂说明以紫外分光光度计测定蛋白浓度, 并稀释调整浓度。电泳前加入 2 \times SDS 上样缓冲液煮沸备用。制备 20% SDS 聚丙烯酰胺分离凝胶及 5% SDS 聚丙烯酰胺浓缩凝胶, 上样后恒压电泳。以 PVDF 膜转膜后, 室温封闭 1 h。用稀释为 1:1000 豚鼠抗小鼠抵抗素抗体(一抗)孵育 45 min, TBST 洗膜, 稀释为 1:5000 的辣根过氧化物酶结合的抗豚鼠 IgG(二抗)孵育 1 h, ECL 化学发光试剂曝光 X 片检测蛋白条带, 图像分析软件系统分析条带灰度。

1.2.8 抵抗素对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖摄取的影响 葡萄糖摄取试验按上述分为对照组、瞬时组、载体组和稳定组共四个细胞组, 此 4 组又分为加 100 nmol/L 短效胰岛素或不加胰岛素 2 个亚组, 每种试验条件均重复 6 次进行。细胞转染后 3 h 诱导 3T3-L1 前体脂肪细胞分化为脂肪细胞, 第 6 天 90% 的 3T3-L1 前体脂肪细胞分化为脂肪细胞, 进行葡萄糖摄取的检测^[8], 每孔加 100 nmol/L 或不加短效胰岛素, 在室温下放置 30 min。每孔加入 37 kBq [^3H] 脱氧葡萄糖, 在室温下放置 10 min。每孔立即加入 10 μL 浓度为 0.48 mg/mL 细胞松弛素 B(终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 以终止葡萄糖摄取。细胞用冰冷的 PBS 冲洗 2 次, 每孔加入 0.5

g/L 氢氧化钠 0.2 mL, 在室温放置 20 min, 使细胞裂解。吸全部溶液点于 whatman 层析纸上。层析纸置于液体闪烁瓶中, 加入 3 mL 闪烁液, 液体闪烁计数器检测样品的放射活性。

葡萄糖摄取量是根据 ^3H -2-脱氧葡萄糖放射性比活度及所测的每分钟衰变数 (disintegrations per minute, dpm) 值换算, 以每 10 min 10^6 细胞葡萄糖摄取的 pmol 数表示, 6 孔板每孔细胞数以 2×10^6 计算, 细胞的葡萄糖摄取即为测得的 dpm/[200 GBq/(mmol \times 细胞数)]。数据以均数 \pm 标准差表示, 组间比较用方差分析, 显著性水准为小于 0.05。

2 结果

2.1 总 RNA 的质量和浓度的检测

提取的小鼠脂肪组织总 RNA 经凝胶电泳后, 紫外灯下呈现清晰的 28S、18S 和 5S 三条带, 且 28S 与 18S 条带比例约为 2:1, 表明总 RNA 无降解。A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.9, 表明总 RNA 纯度高。总 RNA 浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2.2 PCR 产物凝胶电泳分析

PCR 产物凝胶电泳后, 紫外灯下可见一清晰的条带位于 250 bp 与 500 bp 之间, 与欲扩增抵抗素 cDNA 理论长度 363 bp 相符(图 1)。

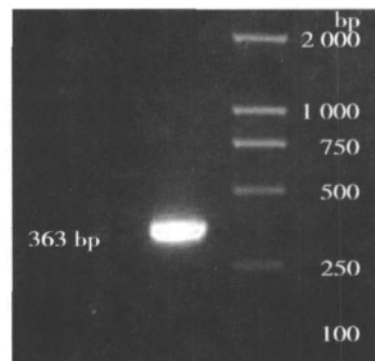


图 1 RT-PCR 产物
Fig.1 RT-PCR product
1: resistin cDNA; 2: Marker

2.3 重组质粒 pGEM-T-resistin 酶切鉴定

重组质粒被 EcoR 和 Xba 内切酶切为两条带, 片段的大小与理论值 pGEM-T 3000 bp 和插入的 PCR 产物 355 bp 相符, 表明 PCR 产物已插入 pGEM-T 载体(图 2)。

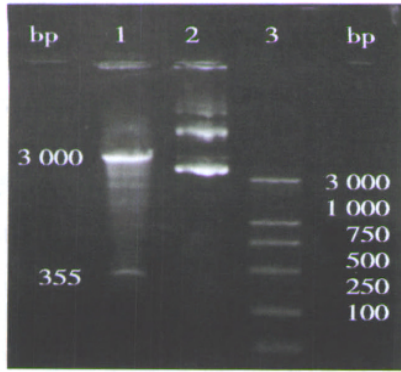


图 2 重组 pGEM - T - resistin EcoR 和 Xba 双酶切鉴定图

Fig.2 The recombinant pGEM - T - resistin was verified using EcoR and Xba digestion

1: pGEM- T - resistin were digested into pGEM- T vector 3000 bp and inserted DNA 355 bp; 2: The recombinant pGEM- T - resistin; 3: Marker

2.4 重组真核表达质粒 pcDNA3.1 (+) - resistin 的鉴定

重组质粒经双酶切反应,凝胶电泳,紫外灯下可见重组质粒被切成个片段,大小与 pcDNA3.1 (+)理论值 5 400 bp 和插入的抵抗素 cDNA 理论值 355 bp 相符 (图 3)。核苷酸序列分析结果显示:插入 pcDNA3.1 (+)的 DNA 片段的核苷酸序列与小鼠抵抗素基因 mRNA 编码区序列一致,且方向正确,表明已成功构建载有小鼠抵抗素基因的重组真核表达质粒 pcDNA3.1 (+) - resistin。

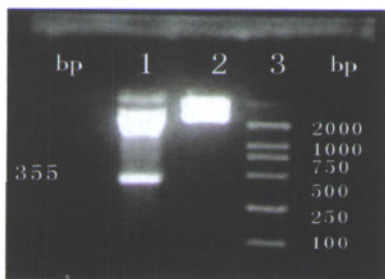


图 3 重组质粒 PcDNA3.1 (+) - resistin 用 EcoR 和 Xba 双酶切

Fig.3 Recombination plasmids PcDNA3.1 (+) - resistin were verified using EcoR and Xba digestion

1: PcDNA3.1 (+) - resistin were digested into two fragments by EcoR and Xba ; 2: no digestion PcDNA3.1 (+) - resistin; 3: Marker

2.5 重组真核表达质粒 pcDNA3.1 (-) - resistin (-) 的鉴定

抽提的重组质粒,凝胶电泳,紫外灯下可见在

约 5 755 bp 处有 DNA (图 4),核苷酸序列分析结果显示:插入 pcDNA3.1 (-)的 DNA 片段的核苷酸序列与抵抗素基因 mRNA 编码区核苷酸序列一致,且方向相反,表明已成功构建载有小鼠抵抗素基因反义核酸的重组真核表达质粒 pcDNA3.1 (-) - resistin (-)。

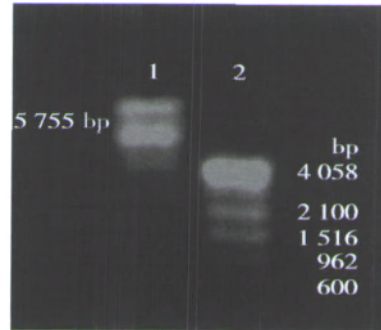


图 4 重组质粒 pcDNA3.1 (-) - resistin (-)电泳图

Fig.4 The recombination expression plasmids pcDNA3.1 (-) - resistin (-)

1:The recombination expression plasmids pcDNA3.1 (-) - resistin (-); 2 :Marker

2.6 3T3- L1 前体脂肪细胞诱导分化为脂肪细胞

3T3- L1 前体脂肪细胞诱导分化第 6 天,苏丹染色后,镜下见 90%以上的细胞内出现脂肪颗粒,表明已分化为脂肪细胞(图 5)。

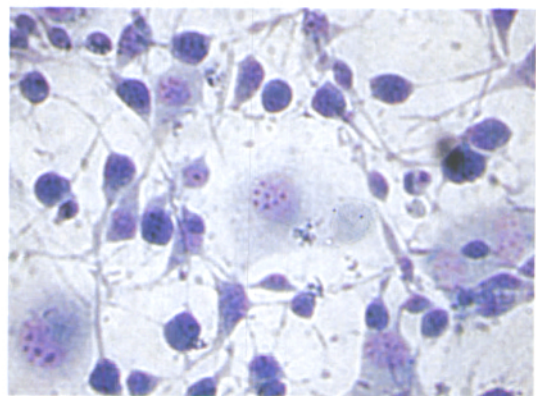


图 5 3T3- L1 脂肪细胞

Fig.5 3T3- L1 adipocytes (Sudan, x200)

2.7 Western blot 检测抵抗素蛋白表达

3T3- L1 脂肪细胞:对照组、瞬时组、载体组和稳定组的细胞均表达抵抗素蛋白,条带灰度的均值分别为 282 ±75、201 ±49、256 ±86 和 196 ±52,四组间的差别有显著性 (P < 0.05,图 6),瞬时组和稳定组的细胞抵抗素蛋白表达明显低于对照组和载

体组的细胞,表明 pcDNA3.1⁽⁺⁾-resistin⁽⁻⁾已成功转染瞬时组和稳定组的细胞,并在细胞内抑制了抵抗素蛋白的表达。

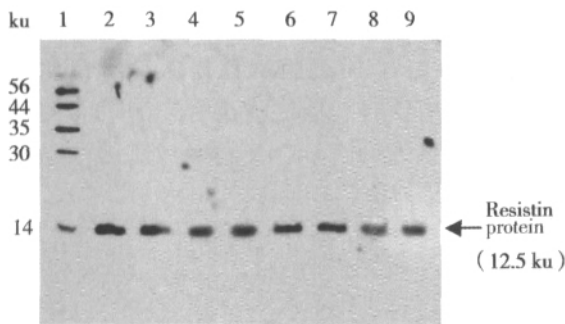


图 6 Western blot 检测 3T3-L1 脂肪细胞抵抗素蛋白表达
Fig.6 Western blot of resistin in 3T3-L1 adipocytes

1: Marker; 2,3: control group; 4,5: transient group; 6,7: vector group; 8, 9: stable group

2.8 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖摄取的检测

对照组、瞬时组、载体组和稳定组四组间,细胞基础状态和胰岛素刺激的葡萄糖摄取的差别均无显著性 ($P > 0.05$),表明抵抗素对 3T3-L1 脂肪细胞基础状态和胰岛素刺激的葡萄糖摄取无明显影响(表 1)。

表 1 各组 10^6 个 3T3-L1 脂肪细胞每分钟葡萄糖摄取量
Table 1 Glucose uptake in 10^6 3T3-L1 adipocytes in every group ($n = 6$, pmol)

	Basal	Insulin
Control group	3.6 ± 0.5	7.9 ± 1.7
Transient group	3.3 ± 0.5	8.6 ± 1.0
Vector group	3.4 ± 0.5	8.5 ± 2.2
Stable group	3.5 ± 0.4	7.5 ± 1.9
F	0.305	0.327
P	0.821	0.806

3 讨论

小鼠抵抗素基因 mRNA 全长 591 个碱基,编码区由 84 位至 428 位共 345 碱基组成^[1],用计算机核苷酸序列酶切位点分析软件分析抵抗素 mRNA 序列,得知其未含有 pcDNA3.1⁽⁺⁾或 pcDNA3.1⁽⁻⁾多克隆酶切位点上的 EcoR 和 Xba 酶切位,故在上、下游引物的 5 端分别引入 EcoR 和 Xba 酶切位点,以便合成的抵抗素 cDNA 插入 pcDNA3.1⁽⁺⁾或 pcDNA3.1⁽⁻⁾真核表达质粒。

据报道,小鼠抵抗素基因仅在脂肪组织中大量表达,且小鼠成年后较出生时抵抗素 mRNA 表达增高^[9]。小鼠 6-9 周性发育成熟,即进入成年期。本研究挑选 16 周的成年雄性小鼠,其脂肪组织抵抗素 mRNA 表达丰度高,有利于用 RT-PCR 方法成功扩增抵抗素 cDNA。

真核细胞的总 RNA 中含有 1%~5%的 mRNA。本实验的 RT 反应是以总 RNA 中 mRNA 为模板,所以 mRNA 的完整性和纯度对合成 cDNA 至关重要。本研究提取的脂肪组织总 RNA 凝胶电泳鉴定的结果表明总 RNA 无降解。紫外分光光度法鉴定的结果 A_{260}/A_{280} 为 1.9,表明总 RNA 纯度高。这为下一步逆转录反应提供了良好的条件。

PCR 产物凝胶电泳鉴定,扩增出一特异性条带,扩增出 DNA 的大小在 250 bp 与 500 bp 之间,小鼠抵抗素基因 mRNA 编码区大小为 345 bp,上游引物 5 端的上游 CGGAATTTC 8 个碱基和下游引物 5-CTAGTCTAGA 10 个碱基,所以 PCR 产物理论大小为 $345+8+10=363$ bp。

由于 PCR 产物直接进行双酶切反应,难以判断酶切成功与否,盲目进行下一步连接反应,易造成时间和试剂的浪费。因此,本研究选用 T 载体 pGEM-T 作为过渡。因 Taq 聚合酶具有在 PCR 产物 3 端加 A 碱基的功能,而 T 载体是人工改良的两头 3 末端加有 T 碱基开环的质粒,PCR 产物与 T 载体经 T₄DNA 连接酶 A-T 连接,可大大提高连接效率。pGEM-T 质粒是专门用于“A/T 克隆”高拷贝数的 T 载体,大小为 3 000 bp,带有 LacZ 基因,可行蓝白斑筛选阳性菌落。带有氨苄青霉素抗性基因,使转化菌可在氨苄青霉素的环境下生长,防止转入的质粒丢失。多克隆酶切位点,使插入的 DNA 片段可通过 2 个限制性内切酶进行酶切反应再切出。

本研究 pGEM-T-resistin 被 EcoR 和 Xba 内切酶切为两段 DNA 片段,载体 pGEM-T 约 3 000 bp,插入的目的 DNA 片段大小应 355 bp(抵抗素基因 cDNA 345 bp 加 EcoR 酶切位点剩下的 5 个碱基和 Xba 酶切剩下的 5 个碱基),表明 RT-PCR 产物已连于 pGEM-T 载体。重组 pGEM-T 质粒的核苷酸序列分析显示,插入 pGEM-T 的 DNA 片段的核苷酸序列与报道的小鼠抵抗素基因 mRNA 编码区序列完全一致。表明成功克隆抵抗素基因 cDNA,为构建抵抗素基因及其反义核酸的

原核或真核表达体系提供了物质基础。

pcDNA3.1⁽⁺⁾和 pcDNA3.1⁽⁻⁾是一对仅多克隆酶切位点方向相反的真核表达质粒,由 pcDNA3.0 改良而来,大小为 5.4 kb,携带有巨细胞病毒(ρ CMV)加强型启动子,能在许多哺乳动物的细胞中高效表达,携带有新霉素抗性基因,可用 G418 筛选稳定转染的细胞株。带有氨苄青霉素抗性基因,用于筛选转化的阳性菌。

双酶切重组 pGEM-T-resistin 质粒和 pcDNA3.1⁽⁺⁾或 pcDNA3.1⁽⁻⁾载体,用 Qiaquick Gel Extraction Kit 凝胶回收欲插入的抵抗素 cDNA 和切开的 pcDNA3.1⁽⁺⁾或 pcDNA3.1⁽⁻⁾载体 DNA,构建重组真核表达质粒 pcDNA3.1^{(+)-resistin} 和 pcDNA3.1^{(-)-resistin}。重组真核表达质粒双酶切鉴定及核苷酸序列分析表明成功构建载有抵抗素基因和载有 resistin 基因反义核酸的重组真核表达质粒。

这一对重组真核表达质粒的构建成功为今后在细胞或动物高表达或抑制表达抵抗素基因,研究抵抗素蛋白质的功能打下了物质基础。

本研究 3T3-L1 前体脂肪细胞经用含 3-异丁基 1-甲基黄嘌呤、胰岛素、地塞米松和 10%FBS 的 DMEM 培养液诱导分化,细胞由梭形逐渐转变为圆而大,充满了脂滴的脂肪细胞,表明已分化为脂肪细胞。

3T3-L1 脂肪细胞本身表达抵抗素基因,被 pcDNA3.1^{(-)-resistin}瞬时和稳定转染后,抵抗素蛋白质的表达降低,表明 pcDNA3.1^{(-)-resistin}成功转染 3T3-L1 脂肪细胞,pcDNA3.1^{(-)-resistin}在细胞中表达的抵抗素基因反义核酸部分封闭了抵抗素基因,使抵抗素蛋白质的表达降低。

进行本研究时尚未有商品化的有生物活性的小鼠抵抗素蛋白质购买,试验是采用了反义技术,即用载有抵抗素基因反义核酸的重组真核表达质粒 pcDNA3.1^{(-)-resistin}转染 3T3-L1 脂肪细胞,细胞分为对照组、瞬时组、载体组和稳定组,此四组又分为加 100 nmol/L 短效胰岛素或不加胰岛素 2 个亚组,探讨抵抗素对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖摄取的影响,结果显示抵抗素对 3T3-L1 脂肪细胞基础状态和胰岛素刺激的葡萄糖摄取均无明显影响。Steppan 等^[1]报道 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖摄取率,被纯化重组的抵抗素降低 37%,而被抵抗素抗体升高 42%。本研究结果

与 Steppan 研究结果不一致。推测其原因可能为 3T3-L1 前体脂肪细胞诱导分化为脂肪细胞后高表达抵抗素,转染抵抗素基因的反义核酸只是部分封闭抵抗素基因的表达,不足以对 3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖摄取功能产生明显影响;也可能抵抗素对 3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖摄取功能无影响或影响作用较弱。抵抗素是否影响机体的葡萄糖摄取有待于可采用 siRNA 技术或基因敲除技术等方法进一步研究证实。

参考文献:

- [1] STEPPAN C M, BROWN E J, WRIGHT C M, et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(2): 502-506.
- [2] SENIOR K. Looking at the molecular explanation for obesity [J]. *Lancet*, 2001, 357(9265): 1344.
- [3] KAWASHIMA J, TSURUZOE K, MOTOSHIMA H, et al. Insulin down-regulates resistin mRNA through the synthesis of protein(s) that could accelerate the degradation of resistin mRNA in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Diabetologia*, 2003, 46(2): 231-240.
- [4] FASSHAUER M, KLEIN J, NEUMANN S, et al. Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288(4): 1027-1031.
- [5] RANGWALA S M, RICH A S, RHOADES B, et al. Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia [J]. *Diabetes*, 2004, 53(8): 1937-1941.
- [6] KAWANAMI D, MAEMURA K, TAKEDA N, et al. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314(2): 415-419.
- [7] 李志臻, 黎锋, 严励, 等. 抵抗素诱导脐静脉内皮细胞功能异常 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2006, 27(3): 258-261.
- [8] HAUSDORFF S F, FINGAR D C, MORIOKA K, et al. Identification of wortmannin sensitive targets in 3T3-L1 adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(35): 24677-24684.
- [9] MORASH B A, WILLKINSON D, UR E, et al. Resistin expression and regulation in mouse pituitary [J]. *FEBS Lett*, 2002, 526(1-3): 26-30.

(编辑 张恩健)