文章编号:1000-5404(2014)10-1059-05

论著

瘦素增强脂蛋白酯酶和肝脂酶表达加速胰岛素抵抗肝细胞模型内脂肪代谢

王 敏,吴晓华,李 真 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院妇产科)

[摘要] **目的** 在体外模型中探讨胰岛素抵抗情况下,瘦素(leptin)对脂代谢的影响及途径。**方法** 用1 μmol/L胰岛素诱导LO2(人正常肝细胞)细胞,构建肝细胞胰岛素抵抗模型,并用0、50、100、250 μg/L瘦素以及2 μmol/L瘦素拮抗剂(leptin-A)分别处理细胞。实时定量PCR检测细胞中肝脂酶(hepatic lipase, HL)和脂蛋白酯酶(lipoprotein lipase, LPL) mRNA表达;蛋白质免疫印迹法检测细胞中HL和LPL蛋白表达;油红O染色观测细胞内油脂的堆积程度。**结果** ①高浓度胰岛素处理LO2细胞后,处理组细胞对一定浓度胰岛素的响应比对照组有显著下降,其代谢葡萄糖效率显著下降,细胞产生胰岛素抵抗。②胰岛素抵抗细胞中HL和LPL mRNA和蛋白水平明显低于对照组细胞。瘦素处理胰岛素抵抗细胞24 h后,HL和LPL mRNA和蛋白水平有明显回升,细胞内油脂堆积明显减少。③瘦素拮抗剂能明显抑制瘦素诱导的HL和LPL mRNA和蛋白的上调,导致细胞内油脂明显堆积。**结论** 肝细胞胰岛素抵抗模型中瘦素通过增强HL、LPL mRNA和蛋白水平的表达加速细胞内脂肪的代谢。

[关键词] 胰岛素抵抗;瘦素;脂蛋白酯酶;肝脂酶
[中图法分类号] R587.1;R589.2;R977.6 [文献标志码] A

Leptin accelerates lipid metabolism by increasing lipoprotein lipase and hepatic lipase expression in insulin-resistant liver cell model

Wang Min, Wu Xiaohua, Li Zhen (Department of Obstetrics and Gynecology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the relationship between leptin and the intracellular fat metabolism in insulin-resistant liver cell models. **Methods** Insulin-resistant liver cell models (LO2-I) were generated from LO2 cells with long-term treatment of 1 μmol/L insulin. The LO2-I cells were then treated with leptin (0, 50, 100, and 250 μg/L) and/or 2 μmol/L leptin antagonist (leptin-A). The transcription of hepatic lipase (HL) and lipoprotein lipase (LPL) genes was determined by real-time PCR. The protein expression of HL and LPL was evaluated by Western blotting. Oil red-O staining was used to observe intracellular lipid accumulation in LO2-I cells. **Results** LO2 cells with long-term treatment of 1 μmol/L insulin showed a significant decrease in insulin treatment response, indicating insulin resistance. LO2-I cells had an expression decrease of HL and LPL on both mRNA and protein levels, as compared to LO2 cells. The mRNA and protein levels of HL and LPL were increased significantly after being treated with leptin for 24 h in the LO2-I cells. Meanwhile, the intracellular accumulation of lipid was also significantly reduced. Leptin antagonist inhibited the leptin-induced HL and LPL expression up-regulation and caused obvious intracellular lipid accumulation. **Conclusion** Leptin accelerates lipid metabolism by increasing LPL and HL expression at both mRNA and protein levels in gestational diabetes liver cell model.

[**Key words**] insulin resistance; leptin; hepatic lipase; lipoprotein lipase

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973203). Corresponding author: Li Zhen, drlizhen@sina.cn

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是指在妊娠期首次发生或发现不同程度的糖耐量异常,是妊娠期常见严重危害母儿健康的并发症之一[1]。GDM易造成巨大儿,死胎新生儿呼吸窘迫综合征,低血糖等,子代将来儿童期肥胖,神经心理失调等风险性也明显增加[2]。但是引起该症的原因至今还

[基金项目] 国家自然科学基金(30973203)
[通信作者] 李 真,E-mail: drlizhen@sina.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140327.1737.006.html(2014-3-27)

未完全了解清楚[3]。

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是一种因组织细胞不能对胰岛素产生正常响应而产生的生理现象,是妊娠期糖尿病的重要标志[4]。胰岛素抵抗的细胞对循环系统中脂质摄入减少,而甘油三酯的水解则会加快,从而使游离脂肪酸浓度增高,而游离脂肪酸经过三羧酸循环更促进了血糖浓度的进一步提高[4]。

瘦素(leptin)是肥胖基因(ob)编码的产物,由脂肪组织分泌。其主要生理作用是促进糖原和脂肪的分解,参与糖脂代谢,从而调控机体的能量代谢平衡[5],是近年来研究的热点。瘦素和胰岛素的关系密切,目前所知,只有这两种激素被认为是肥胖信号,标志机体的脂肪含量[6]。在怀孕期间,瘦素水平会显著提高[7],但关于瘦素水平的提高是否是导致GDM的原因这一问题,虽然不乏报道,但一直还存在争论[8-13]。这些报道大多专注于比较妊娠人群中GDM患者与正常人的瘦素水平的差异,但人群和环境等因素都会对结果产生影响,而关于瘦素作用的研究也往往直接探讨瘦素与疾病之间的关系而忽视胰岛素抵抗的状态[5, 14],这可能是相关研究,尤其是瘦素和GDM之间的关系目前仍没有定论的原因之一。综上所述,我们认为:①在包括GDM在内的胰岛素抵抗相关疾病中,IR引起脂代谢的紊乱,与糖代谢紊乱相互促进;②瘦素是人体内脂代谢过程的重要参与者,参与脂代谢,与胰岛素关系密切。③要明确瘦素与胰岛素抵抗引起的GDM的关系,必须首先了解瘦素在胰岛素抵抗状态下对细胞的作用。因此,本实验旨在研究瘦素在胰岛素抵抗的情况下对脂代谢有怎样的影响。

肝细胞作为机体三大营养物质代谢的重要细胞,其合成的酶类是调控三大营养物质代谢的关键分子。其中肝脏细胞合成的脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)和肝脂酶(hepatic lipase, HL)是调节脂类代谢的关键酶,催化甘油三酯的水解。血清中LPL、HL含量或活性的降低可使脂质清除能力下降,导致TG升高及代谢紊乱。本实验利用高浓度胰岛素处理人肝细胞系LO2细胞,诱导细胞胰岛素抵抗[15-18],通过研究瘦素对胰岛素抵抗的肝细胞LPL和HL关键酶的作用,研究瘦素在胰岛素抵抗的情况下对脂代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

细胞培养用无酚红的RPMI1640培养液和胎牛血清购自美国Life technology公司;人胰岛素(货号#I3536)购自美国Sigma-Aldrich公司;GOD-POD试剂盒购自美国Roche公司;瘦素(leptin,货号#300-27)购自美国Peprotech公司;瘦素拮抗剂(瘦素的竞争性抑制剂,leptin-A, 货号#CYT-702)购自以色列ProSpec公司;Trizol™RNA提取试剂盒购自美国Life technology公司;反转录试剂盒购自中国全式金生物技术公司;SYBR预混RT-PCR试剂购自美国Bio-Rad公司;鼠单克隆抗LPL抗体(货号#ab21356)购自美国Abcam公司;兔多克隆抗HL抗体(货号#sc-21007)购自美国Santa Cruz公司;HRP标记的山羊抗小鼠IgG和山羊抗兔IgG抗体购自中国中杉金桥公司。

1.2 人肝细胞胰岛素抵抗模型的建立

人肝细胞株LO2购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。LO2细胞置于含10%胎牛血清的无酚红RPMI1640培养液中,于37 ℃,5% CO_2下培养。

用高浓度胰岛素诱导细胞的胰岛素抵抗[15-18],简单来说,按2×10^5细胞每孔的密度接种于6孔细胞培养板中,分为胰岛素诱导组和对照组,并设平行组培养。24 h后向胰岛素诱导组每孔加入2 mL新配制的含有1×10^{-6} mol/L人胰岛素的培养液,对照组加入不含胰岛素的培养液,继续培养48 h后。分别更换含0、1、10、50、100、200 ng/mL人胰岛素的培养液,培养30 min,加入葡萄糖5.6 mmol/L,继续培养2 h。取培养液上清,用GOD-POD法测定培养上清中的残留的葡萄糖含量:根据操作说明书将配制测量工作液,并平衡至室温,从6孔板中每孔取10 μL培养上清入1.0 mL工作液;同时设空白和标准样本。标准曲线样本用PBS按倍比稀释法稀释。37 ℃保温5~10 min,于490 nm处测各孔光密度值。

1.3 实时定量PCR(Real-time quantitative PCR)法检测LO2和LO2-I细胞中LPL和HL mRNA的表达

将LO2和胰岛素抵抗的LO2细胞(LO2-I)接种于6孔板中,其中LO2-I保持胰岛素诱导条件。24 h后弃去培养基,分别用0、50、100、250 μg/L浓度瘦素和2 μmol/L瘦素拮抗剂处理LO2-I细胞24 h后,用Trizol法提取细胞总RNA。逆转录试剂盒将RNA逆转为cDNA。用SYBR法实时定量PCR检测基因表达。扩增程序为:2 min,95 ℃预变性,94 ℃变性15 s,55 ℃退火15 s,68 ℃延伸30 s,从第二步起共进行40个循环,最后65 ℃制备溶解曲线。扩增的引物如下:LPL:5′-AGTAGCAGAGTCCGTGGCTA-3′(正向),5′-ATAAACCGGGCCACATCCTG-3′(反向);HL:5′-CCCCCAGCAATCGTCTTTCT-3′(正向),5′-TGCAGCAAGGAGTCGATGAA-3′(反向);GAPDH:5′-CCTCAAGATTGTCAGCAAT-3′(正向),5′-CCATCCACA-GTCTTCTGAGT-3′(反向)。

1.4 Western blot检测LO2和LO2-I细胞中LPL和HL的表达

在6孔板中接种LO2和LO2-I细胞,其中LO2-I保持胰岛素诱导条件。分别用0、50、100、250 μg/L瘦素和2 μmol/L瘦素拮抗剂处理LO2-I细胞24 h后提取总蛋白。BCA法检测蛋白浓度,并加入上样缓冲液100 ℃煮沸蛋白备用。将总蛋白50 μg于预先配制好的10%聚丙烯酰胺凝胶上样孔中进行分离。通过"三明治"湿法转印将已经分离好的蛋白转印于预先活化好的PVDF膜上。转印完成后的PVDF膜用5%的脱脂奶粉摇床上封闭2 h。随后鼠单克隆LPL(1∶1 000)和兔多克隆HL(1∶500)4 ℃孵育过夜,PBST洗3次/10 min,用合适的二抗常温孵育2 h,PBST洗3次/10 min后显色拍照分析。

1.5 油红 O 染色

采用油红 O 染色法，显微镜下观测 LO2-I、leptin 处理的 LO2-I 细胞、leptin 和 leptin-A 共同处理的 LO2-I 细胞以及普通 LO2 细胞等各组细胞内脂肪堆积的程度：将无菌的细胞玻片提前置于 24 孔板中，种植 LO2 和 LO2-I 细胞于 24 孔板中，其中 LO2-I 保持胰岛素诱导条件。细胞贴壁 24 h 后，弃去培养基，分别对细胞进行适当的处理，24 h 后取出带有细胞的细胞玻片，用 PBS 轻微冲洗细胞玻片 3 次，50% 异丙醇固定 1 min，油红 O 染色 10 min，蒸馏水冲洗 3 次，0.1 蒸馏水冲洗 3 次，苏木精染色 5 min，0.1% 盐酸分离染色封片后在显微镜（olympus，Japan）下采集细胞图片。采集时，选取 5 个视野，分别为：左上，左下，右上，右下以及居中的视野进行观察，视野下油脂颜色呈红色。用 ImageJ 软件计算图中红色所占区域面积。

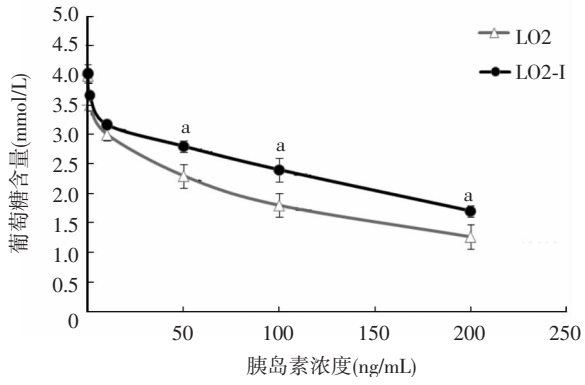
1.6 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法（GOD- POD）法鉴定细胞模型

从图 1 可见，两组培养液中残存葡萄糖含量都随着胰岛素浓度的升高而降低，但胰岛素诱导组（LO2）的降低幅度显著（$P<0.01$）低于对照组。实验结果证明胰岛素诱导组细胞表现出 IR，与 GDM 时胰岛素抵抗增强相似，细胞模型建立成功。



a：$P<0.01$，与 LO2 比较

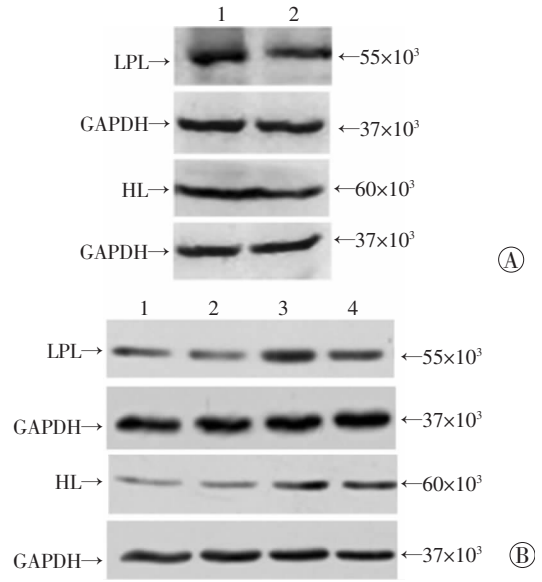
图 1　GOD- POD 检测 2 组 LO2 细胞内培养液中葡萄糖的残留量

2.2 LO2 和 LO2-I 细胞中 LPL 和 HL mRNA 的表达变化

实时定量 PCR 检测发现 LPL 和 HL 在 LO2 细胞中的表达量分别是 LO2-I 中的 1.89 倍和 2.12 倍，且具有显著性差异（$P<0.01$）。此外，50、100、250 μg/L 处理 LO2-I 细胞后，LPL 的 mRNA 含量分别为 0 μg/L 瘦素组的 1.1、3.4 和 1.9 倍，HL 的 mRNA 含量分别为 0.98、2.15 和 1.63 倍；其中 100 μg/L 和 250 μg/L 瘦素处理组与 0 μg/L 处理组的差异显著。

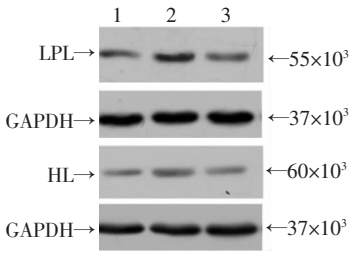
2.3 LO2 和 LO2-I 细胞中 LPL 和 HL 蛋白表达变化

Western blot 检测发现与正常 LO2 细胞相比，LPL 和 HL 蛋白在高浓度胰岛素诱导的 LO2-I 细胞中表达明显降低（图 2）。瘦素处理 LO2-I 细胞 24 h 可以逆转由胰岛素诱导引起的 LO2 细胞 LPL 和 HL 蛋白的降低。瘦素增强 LO2-I 细胞 HL 和 LPL 蛋白的表达。2 μmol/L 瘦素拮抗剂能明显的拮抗瘦素诱导的 LO2-I 细胞 HL 和 LPL 蛋白的上调（图 3）。



A：LO2、LO2-I 细胞内 LPL 和 HL 的表达　1：LO2；2：LO2-I；B：不同浓度瘦素对 LO2-I 细胞内 HL 和 LPL 表达变化的影响　1：0 μg/L；2：50 μg/L；3：100 μg/L；4：250 μg/L

图 2　Western blot 检测 LO2 和 LO2-I 细胞中 LPL 和 HL 蛋白表达



1：对照组；2：瘦素组；3：瘦素＋瘦素拮抗剂组

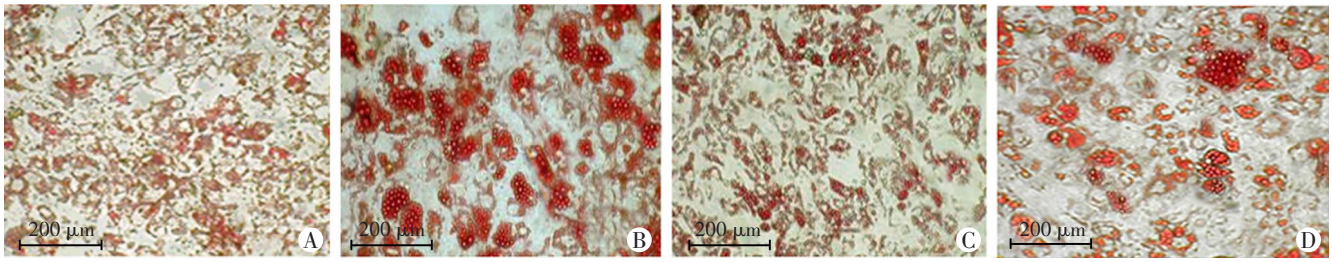
图 3　Western blot 检测瘦素拮抗剂对瘦素诱导的 LPL 和 HL 蛋白的表达

2.4 胰岛素诱导后的 LO2 细胞内油脂含量明显增高，瘦素能明显抑制 LO2-I 细胞内油脂堆积

油红 O 油脂染色结果显示，与正常 LO2 细胞相比，胰岛素诱导后的 LO2 细胞内油脂含量（红色面积）明显增高（$P<0.01$）。100 μg/L 的瘦素处理 LO2-I 细胞 24 h 后油脂量较 LO2-I 细胞组有明显减少（$P<0.01$）。2 μmol/L 瘦素拮抗剂与瘦素共同处理的细胞中，油脂含量与 leptin 单独处理组有显著差异（$P<0.05$），但与未加瘦素处理的 LO2-I 细胞相比没有显著差异（图 4）。

3 讨论

我们的研究证实了在胰岛素抵抗的细胞模型中，瘦素通过 HL 和 LPL 参与胰岛素抵抗条件下的脂代谢过程，为进一步探讨瘦素与妊娠期糖尿病与 2 型糖尿病之间的关系提供了细胞学意义上的理论基础，虽然如此，我们的模型只能诱导胰岛素抵抗，并不能完全模拟病理条件下的体内环境，因此这些发现还有待体内研究的进一步证实。



A:LO2;B:LO2-I;C:LO2-I + leptin;D:LO2-I + leptin + leptin-A

图4 油红O染色检测LO2细胞和胰岛素诱导后的LO2细胞内油脂的含量变化

妊娠期糖尿病与2型糖尿病在对胰岛素的响应机制方面基本相同,都以IR为重要标志[4]。肝脏内胰岛素敏感性的降低会导致肝脏内葡萄糖含量上调,高胰岛素血症,增加胰岛β细胞应激,产生高血糖症[19]。动物模型研究证实肝脏内的IR在糖尿病的发生中起着重要作用[20]。在细胞模型中Yang等[21]用胰岛素和葡萄糖诱导肌肉细胞IR模型,发现细胞中会出现脂肪堆积。本实验利用胰岛素和葡萄糖诱导LO2肝细胞IR模型[15],LO2-I出现葡萄糖耐受以及脂肪堆积的现象与前人研究结果一致。

瘦素被认为作为胰岛素的反馈调节激素在肥胖和能量分配以及在大脑发育中起着重要的作用[22]。妊娠期间妇女血清内瘦素的明显增高主要来源于胎盘绒毛滋养细胞的分泌[23]。研究早已发现瘦素与胰岛素水平在子宫内部存在着相互调节[24-25]。一方面胰岛素能刺激脂肪组织产生瘦素,另一方面瘦素又可直接作用于胰岛细胞的瘦素受体抑制胰岛素的分泌[26]。胰岛素能明显的降低脂肪酶的合成,减少脂肪分解,加速脂肪堆积。Kralisch[27]发现胰岛素能降低体外培养3T3L1脂肪细胞内脂肪酶mRNA的含量,且呈时间和剂量依赖性。

前人的研究发现血清瘦素水平与胰岛素的基础分泌水平相关,而血清瘦素水平取决于皮下脂肪数量[28]。近年来许多学者对瘦素与胰岛素的关系进行了深入的研究并提出脂肪胰岛素内分泌轴的概念目前已被众多的试验所证实[29]。胰岛素有利于葡萄糖的利用和转化,使脂肪的合成增加。瘦素作用于下丘脑的瘦素受体,导致摄食减少能量消耗增加,脂肪贮存减少,并能通过激活胰岛细胞上的三磷腺苷依赖的钾离子通道而抑制胰岛素的分泌,从而减轻高胰岛素血症,然后减少自身的分泌[26]。高浓度的瘦素在体外几乎完全抑制了胰岛素对脂肪细胞的作用,去除瘦素数小时之后,脂肪细胞又重新获得了对胰岛素的敏感性[30]。虽然对瘦素能影响脂肪代谢这一观点已经早为学界所认知接受,但是其机制却不甚明了。脂蛋白酶以及脂肪酶主要是分解脂肪行程游离的脂肪酸[31]。Liang等[32]研究发现肥胖小鼠肝脏中的HL和LPL mRNA含量和功能明显降低,通过瘦素治疗后能明显增加HL mRNA和LPL mRNA的表达[33]。这些研究均提示瘦素对脂肪的分解作用可能是基于对HL和LPL表达的调节上,增加HL和LPL的表达以达到水解油脂的目的。

本研究同样发现,胰岛素能降低LO2肝细胞内HL和LPL mRNA和蛋白表达,加速细胞内脂肪堆积。而在胰岛素抵抗的肝细胞模型中,瘦素能恢复甚至增加HL和LPL mRNA和蛋白的含量。瘦素拮抗剂能明显的抑制瘦素诱导的HL和LPL蛋白的表达。油脂染色证明瘦素能明显降低LO2-I细胞中的脂肪堆积,这提示LO2-I模型中瘦素对脂肪的分解作用是基于对HL和LPL的调节。临床研究发现血清中甘油三酯含量的增加是胰岛素抵抗的结果,也是胰岛素敏感性受损的主要致病因素[34]。据此,我们可以推测,高浓度胰岛素诱导瘦素的产生,增加瘦素将导致HL和LPL mRNA的表达上调,合成增加,上调的HL和LPL通过水解脂肪加了血清中甘油和脂肪酸的含量,为糖类合成提供了原料,从而进一步加重GDM。

总之,本研究通过建立胰岛素抵抗的肝细胞模型,发现瘦素在胰岛素抵抗的情况下能通过增加HL和LPL的mRNA以及蛋白水平缓解胰岛素抵抗产生的脂肪堆积。然而,这种作用可能也是GDM患者体内游离脂肪酸和甘油含量增加和GDM血糖升高的原因之一。本研究表明了瘦素与胰岛素抵抗间可能存在相互调控的关系,而胰岛素抵抗是GDM的重要标志。此外,我们证实瘦素通过HL和LPL参与胰岛素抵抗条件下的脂代谢过程中,HL和LPL是否能成为今后瘦素与妊娠期糖尿病关系的研究中的新的测量指标,还需要进一步的研究。

参考文献:

[1] Persson B, Hanson U. Neonatal morbidities in gestational diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 1998, 21(Suppl 2): B79-B84.

[2] Mayhew T M, Sampson C. Maternal diabetes mellitus is associated with altered deposition of fibrin-type fibrinoid at the villous surface in term

placentae[J]. Placenta, 2003, 24(5): 524 - 531.
[3] Seely E W, Solomon C G. Insulin resistance and its potential role in pregnancy-induced hypertension[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(6): 2393 - 2398.
[4] Szanto I, Kahn C R. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(5): 2355 - 2360.
[5] Perez-Perez A, Maymo J L, Gambino Y P, *et al*. Activated translation signaling in placenta from pregnant women with gestational diabetes mellitus: possible role of leptin[J]. Horm Metab Res, 2013, 45(6): 436 - 442.
[6] Benoit S C, Clegg D J, Seeley R J, *et al*. Insulin and leptin as adiposity signals[J]. Recent Prog Horm Res, 2004, 59: 267 - 285.
[7] Henson M C, Castracane V D. Leptin in pregnancy: an update[J]. Biol Reprod, 2006, 74(2): 218 - 229.
[8] Kautzky-Willer A, Pacini G, Tura A, *et al*. Increased plasma leptin in gestational diabetes[J]. Diabetologia, 2001, 44(2): 164 - 172.
[9] Gao X L, Yang H X, Zhao Y. Variations of tumor necrosis factor-alpha, leptin and adiponectin in mid-trimester of gestational diabetes mellitus[J]. Chin Med J (Engl), 2008, 121(8): 701 - 705.
[10] McLachlan K A, O'Neal D, Jenkins A, *et al*. Do adiponectin, TNFalpha, leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2006, 22(2): 131 - 138.
[11] Festa A, Shnawa N, Krugluger W, *et al*. Relative hypoleptinaemia in women with mild gestational diabetes mellitus[J]. Diabet Med, 1999, 16(8): 656 - 662.
[12] Simmons D, Breier B H. Fetal overnutrition in polynesian pregnancies and in gestational diabetes may lead to dysregulation of the adipoinsular axis in offspring[J]. Diabetes Care, 2002, 25(9): 1539 - 1544.
[13] Mokhtari M, Hashemi M, Yaghmaei M, *et al*. Evaluation of the serum leptin in normal pregnancy and gestational diabetes mellitus in Zahedan, southeast Iran[J]. Arch Gynecol Obstet, 2011, 284(3): 539 - 542.
[14] Toyoshima Y, Gavrilova O, Yakar S, *et al*. Leptin improves insulin resistance and hyperglycemia in a mouse model of type 2 diabetes[J]. Endocrinology, 2005, 146(9): 4024 - 4035.
[15] Li Q, Wang J H, Wang X, *et al*. Establishment and identification of insulin-resistant LO2 cell model induced with insulin[J]. Modern Preventive Medicine, 2007, 34(22): 4233 - 4235.
[16] Zhou L, Meng Q, Qian T, *et al*. Ginkgo biloba extract enhances glucose tolerance in hyperinsulinism-induced hepatic cells[J]. J Nat Med, 2011, 65(1): 50 - 56.
[17] Hu X, Wang M, Bei W, *et al*. The Chinese herbal medicine FTZ attenuates insulin resistance *via* IRS1 and PI3K *in vitro* and in rats with metabolic syndrome[J]. J Transl Med, 2014, 12: 47.
[18] Garvey W T, Olefsky J M, Marshall S. Insulin receptor down-regulation is linked to an insulin-induced postreceptor defect in the glucose transport system in rat adipocytes[J]. J Clin Invest, 1985, 76(1): 22 - 30.
[19] Biddinger S B, Kahn C R. From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes[J]. Annu Rev Physiol, 2006, 68: 123 - 158.
[20] Haas J T, Biddinger S B. Dissecting the role of insulin resistance in the metabolic syndrome[J]. Curr Opin Lipidol, 2009, 20(3): 206 - 210.
[21] Yang C, Aye C C, Li X, *et al*. Mitochondrial dysfunction in insulin resistance: differential contributions of chronic insulin and saturated fatty acid exposure in muscle cells[J]. Biosci Rep, 2012, 32(5): 465 - 478.
[22] Bouret S G, Draper S J, Simerly R B. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding[J]. Science, 2004, 304(5667): 108 - 110.
[23] Linnemann K, Malek A, Sager R, *et al*. Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(11): 4298 - 4301.
[24] Zimmet P Z, Collier G R. Of mice and (wo)men: the obesity (ob) gene, its product, leptin, and obesity[J]. Med J Aust, 1996, 164(7): 393 - 394.
[25] Koistinen H A, Koivisto V A, Andersson S, *et al*. Leptin concentration in cord blood correlates with intrauterine growth[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1997, 82(10): 3328 - 3330.
[26] Vitoratos N, Salamalekis E, Kassanos D, *et al*. Maternal plasma leptin levels and their relationship to insulin and glucose in gestational-onset diabetes[J]. Gynecol Obstet Invest, 2001, 51(1): 17 - 21.
[27] Kralisch S, Klein J, Lossner U, *et al*. Isoproterenol, TNFalpha, and insulin downregulate adipose triglyceride lipase in 3T3-L1 adipocytes [J]. Mol Cell Endocrinol, 2005, 240(1/2): 43 - 49.
[28] Caro J F, Kolaczynski J W, Nyce M R, *et al*. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance[J]. Lancet, 1996, 348(9021): 159 - 161.
[29] Ategbo J M, Grissa O, Yessoufou A, *et al*. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(10): 4137 - 4143.
[30] Muller G, Ertl J, Gerl M, *et al*. Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes[J]. J Biol Chem, 1997, 272(16): 10585 - 10593.
[31] Ma Y, Henderson H E, Liu M S, *et al*. Mutagenesis in four candidate heparin binding regions (residues 279-282, 291-304, 390-393, and 439-448) and identification of residues affecting heparin binding of human lipoprotein lipase[J]. J Lipid Res, 1994, 35(11): 2049 - 2059.
[32] Liang C P, Tall A R. Transcriptional profiling reveals global defects in energy metabolism, lipoprotein, and bile acid synthesis and transport with reversal by leptin treatment in ob/ob mouse liver[J]. J Biol Chem, 2001, 276(52): 49066 - 49076.
[33] Huynh F K, Neumann U H, Wang Y, *et al*. A role for hepatic leptin signaling in lipid metabolism *via* altered very low density lipoprotein composition and liver lipase activity in mice[J]. Hepatology, 2013, 57(2): 543 - 554.
[34] Moro E, Gallina P, Pais M, *et al*. Hypertriglyceridemia is associated with increased insulin resistance in subjects with normal glucose tolerance: evaluation in a large cohort of subjects assessed with the 1999 World Health Organization criteria for the classification of diabetes [J]. Metabolism, 2003, 52(5): 616 - 619.

(**收稿**:2014-01-15;**修回**:2014-03-04)
(编辑 吴培红)