论 著

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001065

自噬相关基因在肥胖患者及肥胖小鼠脂肪组织中的研究

李 璇,向小姣,刘露路,高茹菲,彭 川,杨淑敏,龚莉琳,李启富
(重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:观察肥胖患者及肥胖小鼠脂肪组织中自噬相关基因的变化情况,初步探讨自噬在肥胖中的作用。**方法**:将 C57 雄性小鼠随机分为正常饮食组(n=6)及高脂饮食组(n=6),分别给予正常或高脂饮食喂养 8 周后处死小鼠,收集其附睾及腹股沟脂肪组织。另收集年龄及性别匹配的非肥胖与肥胖患者大网膜脂肪组织。RT-PCR 法检测人脂肪组织中自噬相关基因 Beclin、ATG1 的表达。Western blot 方法检测小鼠与人脂肪组织中自噬相关基因 LC3、P62 的表达水平。**结果**:①高脂组小鼠体质量、腹股沟脂肪质量/体质量、附睾脂肪质量/体质量均较对照组显著增加,提示肥胖小鼠模型构建成功;②与正常饮食组相比,高脂饮食小鼠脂肪组织中 LC3 蛋白表达明显增高(t=2.638,P=0.020),P62 蛋白水平降低(t=2.264,P=0.047);③肥胖患者脂肪组织中 Beclin(t=1.933,P=0.029)、ATG1(t=0.864,P=0.039)的 mRNA 表达水平及 LC3(t=2.847,P=0.015)蛋白表达水平均较正常者明显增高,而 P62(t=2.571,P=0.026)蛋白水平显著降低。**结论**:在肥胖小鼠与肥胖患者脂肪组织中,自噬基因表达明显改变,提示自噬可能参与了肥胖相关的脂肪代谢紊乱。

【关键词】自噬;肥胖;LC3;P62
【中图分类号】R978.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-07-15

Activated autophagy and inflammation of adipose tissue is involved in obesity

Li Xuan, Xiang Xiaojiao, Liu Lulu, Gao Rufei, Peng Chuan, Yang Shumin, Gong Lilin, Li Qifu
(*Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the autophagy and inflammatory cytokine expression of adipose tissue in high-fat diet induced obese mice and obesity human. ***Methods***: Sixteen male C57 mice were randomly divided into chow diet(CD,n=6) group and high-fat diet(HFD,n=6) group. Mice epididymal and inguinal adipose tissues were collected. Omental adipose tissue was obtained from lean (n=9) and obese(n=9) subjects undergoing laparoscopic cholecystectomy; the two groups of participants were age- and sex-matched, with available clinical parameters. The mRNA levels of Beclin and ATG1 were determined by RT-PCR. Western blot was used to detect the protein expression levels of LC3 and P62 in adipose tissue of each sample. ***Results***: After 8 weeks, mice in HFD group displayed higher weight than control group. Compared with control group, HFD-induced obese mice displayed significant higher protein levels of LC3 and significant lower level of P62 in adipose tissue. The mRNA levels of Beclin(P=0.029) and ATG1(P=0.039) were significant higher in the obesity human adipose tissue than in the lean group. The protein expression levels of LC3 were also significantly higher in obesity group than in control group(P=0.015). ***Conclusion***: Autophagy could be involved in obesity-related adipose tissue dysfunction.

【Key words】autophagy; obesity; LC3; P62

肥胖是人体过剩能量转化为多余脂肪并积聚在皮下或内脏中的一种状态,20 世纪 60 年代起肥胖就开始影响着人们的健康[1]。大量流行病学调查显示,肥胖常伴有糖、脂代谢的异常,增加糖尿病、高血压、冠心病、高脂血症等疾病的发病率,肥胖俨然已经成为全球性的公共健康问题[2-4]。过去数十年,脂肪组织已经被证实为一种重要的内分泌器官,能够分泌多种激素、生长因子和炎症因子[5],脂肪组织的内分泌功能在维持机体稳态中发挥着重要的作用。肥胖往往伴随着一种机体慢性炎症状态。已有研究报道,肥胖人群血清中炎症因子的水平明显升高[6]。

作者介绍:李 璇,Email:535964296@qq.com,
研究方向:代谢性疾病的研究和治疗。
通信作者:李启富,Email:liqifu@yeah.net。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81300310);国家临床重点专科建设经费资助项目(编号:2011-170);重庆市卫生计生委医学科研资助项目(编号:20142006);重庆市基础科学与前沿技术研究专项(编号:cstc2015jcyjBX0096)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161118.1114.030.html (2016-11-18)

自噬是真核生物普遍存在的自稳机制。细胞在应激情况下，启动细胞自噬通路，清除细胞内受损的蛋白质、细胞器或入侵的病原体，通过溶酶体途径进行降解并回收利用降解产物以应对不利环境[7]。然而在肥胖状态下，自噬是否影响脂肪代谢尚不清楚。本研究拟检测肥胖人群及肥胖小鼠脂肪组织中自噬相关基因的表达水平，初步探讨自噬是否参与了肥胖相关的脂代谢紊乱。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

RNA 提取试剂 Trizol 购于 invintrogen 公司，PrimeScript RT reagent kit 及 SYBR Premix Ex Taq ™Ⅱ均为日本 Takara 产品；PCR 引物由 Primer Premier 5.0 软件设计，由生工生物工程（上海）股份有限公司合成；BCA 法蛋白定量试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司；DEPC 水购于北京鼎国公司；β-actin 鼠多克隆抗体购于北京中杉金桥生物技术有限公司，LC3、P62 兔多克隆抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。动物饲料购自美国 Harlan 公司。

1.2 研究对象与方法

1.2.1 实验动物与分组 健康 4 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 16 只，适应性饲养 1 周后，体质量为（15.84 ± 0.81）g，由重庆医科大学实验动物中心提供。动物饲养在清洁级动物房[温度：（20 ± 2）℃，湿度：（60 ± 5）%，12 h/12 h 昼夜交替光照]。所有动物实验的操作规程和协议都按照重庆医科大学动物保护和使用委员会颁布的实验动物使用和保护指导守则进行。随机分为 2 组：①正常饮食组（n=6）；②高脂饮食组（n=6）。2 组共喂养 8 周，各组实验小鼠自由饮食、饮水，每周测量体质量 1 次。

1.2.2 动物标本采集 在实验 8 周末，断颈处死小鼠，分离双侧附睾、双侧腹股沟脂肪并进行组织称量，计算两侧附睾脂肪和腹股沟脂肪之和占体质量的比例（g/g）。

1.2.3 人群纳入与标本采集 2014 年 10 至 12 月，在某医院肝胆外科收集人大网膜脂肪组织样本。纳入标准：非肥胖者（BMI<24 kg/m²）、肥胖者（BMI≥24 kg/m²），年龄（18~70）岁，均行择期腹腔镜胆囊切除术（无急性炎症状态、无精神类药物使用史）。经卡方检验 2 组间性别无统计学差异，t 检验显示 2 组间年龄无统计学差异。收集患者原始病例资料，包括姓名、性别、身高、年龄、体质指数（body mass index，BMI）、腰围（waist circumference，WC）、臀围（hip circumference，HC）及腰臀比。术前于空腹 10~12 h 后取静脉血测定空腹血糖（fasting plasma glucose，FPG），并测定餐后 2 h 血糖（2 hour postprandial plasma glucose，2hPG），本研究所遵循的程序经我院伦理委员会审核及批准，并已取得受试对象或其亲属的知情同意。

1.2.4 RT-PCR 检测 取适量脂肪组织加入 TRIzol 总 RNA 提取液匀浆，提取脂肪组织总 RNA，按照 Takara 反转录试剂盒说明书将 RNA反转录为 cDNA；以 GAPDH 为内参进行实时荧光定量 PCR。进行两步法逆转录反应，逆转条件为：第 1 步 37 ℃ 15 min；第 2 步 85 ℃ 5 s，将逆转录的 cDNA 置于-20 ℃ 保存。以 GAPDH 作为内参进行实时荧光定量 PCR，检测目的 mRNA 的表达，引物序列见表 1。扩增反应条件为：95 ℃ 30 s 预变性；95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，40 个循环。RT-PCR 的结果根据 C_t 值计算比较：ΔC_t=C_t（目的）-C_t（GAPDH）；$\Delta\Delta C_t$=处理组 ΔC_t-对照组 ΔC_t；目的基因 mRNA 表达记为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab.1 Sequences of primers for RT-PCR

基因	正向引物（5'-3'）	反向引物（5'-3'）
Murine		
MCP-1	AGAGCCAGACGGGAGGAAG	GCATGCTGGTGGAGGAAGAG
TNF-α	TCTCATTCCTGCTTGTGG	ACTTGGTGGTTTGCTACG
GAPDH	GCCTTCCGTGTTCCTACCC	TGCCTGCTTCACCACCTTC
Human		
IL-6	TTCGGTCCAGTTGCCTTC	TCGTTCTGAAGAGGTGAGTG
TNF-α	CATCTACTCCCAGGTC-CTCTTCA	CTGGCAGGGGCTCTTGATG ACTGCCTCCTGT-
Beclin	AGCTGCCGTTATACTGTTCTG	GTCTTCAATCTT
ATG1	TTCTGTCTACCTGGTTATGG	GATGATGCCTTTGCTGTG
GAPDH	CACCCACTCCTCCACCTTTGA	CCACCCTGTTGCTGTAGCCA

1.2.5 Western blot 取适量脂肪组织加入裂解缓冲液振荡混匀，冰上放置 30 min，间或振荡；4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min。吸取上清液，用 BCA 法进行蛋白定量，分装后-80 ℃ 保存备用。各组分别取 80 μg 蛋白，加入 5×SDS 上样缓冲液，65 ℃煮沸 5 min 使蛋白变性，进行 SDS-PAGE，然后电转移至 0.22 μm 的 PVDF 膜上。5%的 BSA 封闭 2 h，稀释后的LC3 及 P62 单克隆一抗 4 ℃孵育过夜，生物素标记二抗及辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素孵育后，DAB 显色，扫描图像后用 Quantity One 软件对条带进行灰度值分析，以目的蛋白与内参 β-actin 灰度比值代表目的蛋白表达水平。

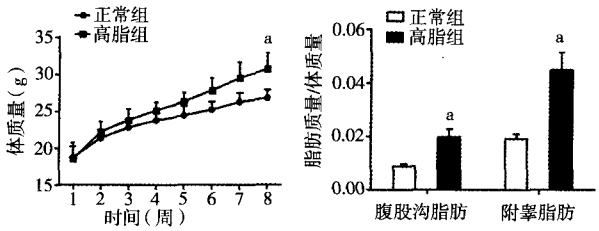
1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计分析软件，数据设计方案采用不同检验方法，包括卡方检验和 t 检验。所有数据均采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 成功构建肥胖小鼠模型

2 组小鼠在实验前体质量无统计学差异，饲养 8 周后，与正常饮食组比较，高脂饮食组小鼠体质量（t=6.840，P=0.000）、腹股沟脂肪质量/体质量（t=3.997，P=0.007）、附睾脂肪质量/体质量（t=5.052，P=0.000）明显上升（图 1）。



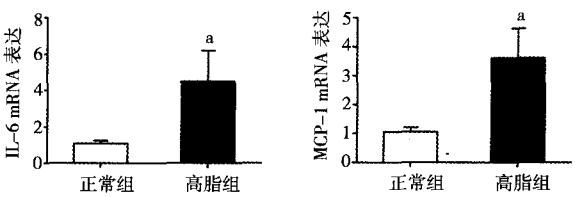
a：与正常组相比，$P<0.05$

图 1 小鼠体质量及脂肪质量/体质量的变化情况（$n=6$）

Fig.1 The body weight and fat/weight percentage of two group mice（$n=6$）

2.2 肥胖小鼠脂肪组织中炎症相关因子 mRNA 水平表达增加

与正常饮食组相比，肥胖小鼠脂肪组织中炎症相关因子 IL-6（$t=3.520$，$P=0.016$）、MCP-1（$t=2.489$，$P=0.013$）的 mRNA 表达明显增加（图 2），提示肥胖小鼠脂肪组织中炎症水平明显增高。



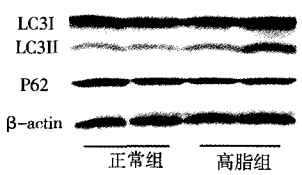
a：与正常组相比，$P<0.05$

图 2 小鼠脂肪组织中炎症因子的 mRNA 表达（$n=6$）

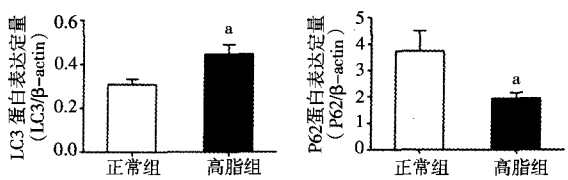
Fig.2 The IL-6 and MCP-1 mRNA expression in the adipose tissue of mice detected by Real-Time PCR（$n=6$）

2.3 肥胖小鼠脂肪组织中自噬相关蛋白表达增加

与正常饮食组相比，高脂组的肥胖小鼠脂肪组织中自噬相关蛋白 LC3I 及 LC3II 表达明显增加（$t=2.638$，$P=0.015$），而 P62 蛋白水平表达明显降低（$t=2.264$，$P=0.026$），如图 3 所示，提示高脂饮食喂养的肥胖小鼠脂肪组织中自噬紊乱。



A. Western blot 检测小鼠脂肪中自噬相关蛋白表达



B. 对图 A 进行半定量分析　　C. 对图 A 进行半定量分析

a：与正常组相比，$P<0.05$

图 3 小鼠脂肪组织中自噬相关蛋白表达（$n=6$）

Fig.3 LC3 and P62 protein expression in mouse adipose detected by Western blot（$n=6$）

2.4 肥胖人群体内存在明显的代谢紊乱

肥胖组 BMI（$t=6.317$，$P=0.000$）、腰围（$t=4.066$，$P=0.000$）、臀围（$t=4.200$，$P=0.000$）、FPG（$t=2.464$，$P=0.027$）、2 h PG（$t=2.279$，$P=0.040$）在基线时均高于非肥胖组，表明肥胖人群体内存在明显的代谢紊乱。其中男性 8 人，女性 8 人，见表 2。

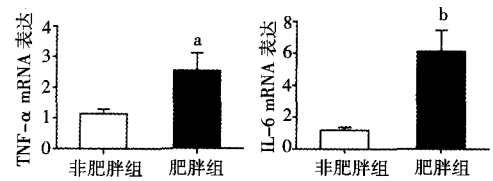
表 2 2 组人群基线时的代谢指标（$n=8$）

Tab.2 Baseline characteristics of lean and obesity subjects（$n=8$）

代谢指标	对照组	肥胖组	P 值
年龄（岁）	50.75 ± 3.62	56.75 ± 3.43	0.249
BMI（kg/m²）	20.58 ± 0.86	27.21 ± 0.61	0.000
腰围（cm）	77.19 ± 2.18	88.86 ± 1.68	0.000
臀围（cm）	89.38 ± 1.83	101.13 ± 2.12	0.000
腰臀比	0.86 ± 0.01	0.89 ± 0.01	0.072
FPG（mmol/L）	4.80 ± 0.21	5.93 ± 0.41	0.027
2 h PG（mmol/L）	6.06 ± 0.35	7.99 ± 0.72	0.040

2.5 肥胖人群脂肪组织中炎症因子的表达明显增加

与非肥胖者相比，肥胖者腹膜脂肪组织中 TNF-α（$t=2.553$，$P=0.016$）、IL-6（$t=3.520$，$P=0.001$）的 mRNA 表达水平明显增高，提示肥胖者脂肪组织中炎症水平明显上升（图4）。



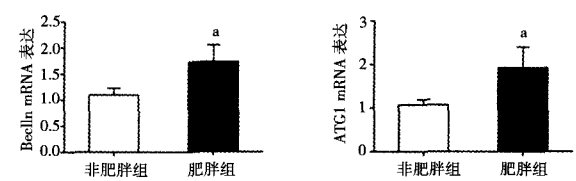
a：与非肥胖组相比，$P<0.05$；b：与非肥胖组相比，$P<0.01$

图 4 人脂肪组织中 TNF-α、IL-6 的 mRNA 表达（$n=8$）

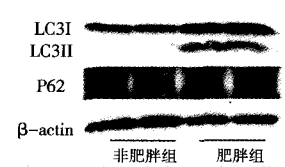
Fig.4 The TNF-α and IL-6 mRNA expression in the adipose tissue of in lean and obese subjects detected by real-time PCR（$n=8$）

2.6 肥胖人群脂肪组织中自噬相关基因的表达明显增加

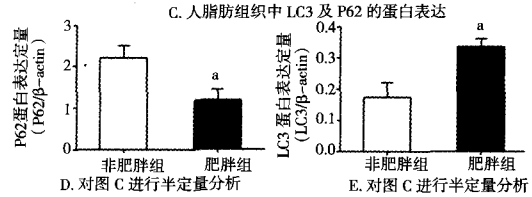
相较于非肥胖者，肥胖者脂肪组织中自噬相关蛋白 Beclin（$t=1.933$，$P=0.027$）、ATG1（$t=0.864$，$P=0.039$）的基因转录水平及 LC3（$t=2.847$，$P=0.015$）蛋白表达水平明显增高，P62（$P=0.026$，$t=2.571$）蛋白水平明显降低（图 5），提示肥胖者脂肪组织中存在自噬紊乱。



A. 人脂肪组织中 Beclin 的 mRNA 水平　　B. 人脂肪组织中 ATG1 的 mRNA 水平



C. 人脂肪组织中 LC3 及 P62 的蛋白表达



D. 对图 C 进行半定量分析　　E. 对图 C 进行半定量分析

a：与非肥胖组相比，$P<0.05$

图 5 肥胖人脂肪组织中自噬相关基因的表达（$n=8$）

Fig.5 Autophage genes expression in lean and obese subjects detected by real-time PCR and Western blot（$n=8$）

3 讨 论

随着生活水平的提高，肥胖的发病率逐年上升，目前肥胖已经成为全球性的公众卫生问题。因此研究其发病机制及有效的预防、治疗措施是科学界关注的热点。越来越多的研究证实肥胖与慢性炎症有密切关系[8-10]。本研究发现，肥胖小鼠脂肪组织中IL-6、MCP-1 的 mRNA 水平较对照组明显增高；肥胖人群内脏脂肪组织中 IL-6 及 TNF-α 的基因转录也显著增强，这与之前的研究报道相一致。

自噬作为机体维持细胞内环境自稳的一种自我保护机制，在组织细胞中发挥着重要作用。脂肪组织是脂代谢中最重要的器官之一，然而自噬在脂肪组织中的研究甚少，目前已知在脂肪组织中自噬可通过调节脂肪细胞分化而调节脂质平衡[11]。自噬激活，诱导脂肪祖细胞向储存脂质为主的白色脂肪细胞分化；抑制自噬，则促使脂肪祖细胞向降解脂肪酸供能为主的棕色脂肪细胞分化[12]。另一方面，自噬途径可能在脂肪细胞的正常生成和更新并维持其正常功能中起着十分重要的作用。值得关注的是，自噬的过度激活可能导致脂肪组织的功能异常。然而目前针对肥胖患者脂肪组织中自噬相关基因的研究还较少，本研究利用高脂饮食构建的肥胖小鼠模型和肥胖患者腹膜脂肪组织进行研究。本研究发现，相对于正常饮食组，高脂饮食喂养的小鼠脂肪组织中 LC3 蛋白水平增加，P62 蛋白水平降低；肥胖患者体内脂肪组织中 ATG1、Beclin 的 mRNA 水平及 LC3 蛋白水平增高、P62 蛋白水平降低，结果提示肥胖小鼠及肥胖人群脂肪组织中均存在自噬紊乱。肥胖状态下体内的炎症因子表达增多，同时自噬激活以负性调控炎症，但自噬的激活使脂肪祖细胞向白色脂肪组织分化、肥胖程度进一步增加从而一定程度上造成了恶性循环，这种情况可能涉及如下机制：炎症反应的引发主要通过固有免疫系统利用模式识别受体来识别病原相关分子模式（pathogen-associated molecular pattern，PAMP）或损伤相关分子模式。细胞通过 Toll 样受体（toll-like receptor，TLR）和 NOD 样受体识别外源性或内源性的配体，导致受体活化，引起多蛋白的信号转导级联反应从而进一步分泌促炎因子，激活适应性免疫应答。研究显示[13]，多种 TLR 的配体 PAMP 在诱发炎症反应的同时，能够诱导细胞自噬的发生，而细胞自噬对 TLR 信号和炎症反应有明显的负反馈作用，自噬相关基因的表达水平变化与炎症性疾病的发生有密切关联。

综上所述，本研究在肥胖小鼠及肥胖人群脂肪组织中观察到炎症因子及自噬相关基因表达的紊乱，提示炎症及自噬可能在肥胖引起的脂代谢紊乱中发挥重要的调控作用，但其中涉及的分子机制有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] James PT. Obesity:the worldwide epidemic[J]. Clinics in Dermatology,2004,22(4):276-280.

[2] Sowers JR. Obesity as a cardiovascular risk factor[J]. American Journal of Medicine,2003,115(s8A):37-41.

[3] Hamer M,Stamatakis E. Metabolically healthy obesity and risk of all-cause and cardiovascular disease mortality[J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,2012,97(7):2482-2488.

[4] Lee AJ,Han BJ,Ra M,et al. Prediction of future risk of insulin resistance and metabolic syndrome based on Korean boy's metabolite profiling[J]. Obesity Research & Clinical Practice,2015,9(4):336-345.

[5] Ouchi N,Parker JL,Lugus JJ,et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease[J]. Nature Reviews Immunology,2011,11(2):85-97.

[6] Tordjman J,Guerre-Millo M,Clément K. Adipose tissue inflammation and liver pathology in human obesity[J]. Diabetes & Metabolism,2008,34(2):658-663.

[7] Mizushima N,Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation[J]. Nature Cell Biology,2010,12(9):823-830.

[8] Iantorno M,Campia U,Di DN,et al. Obesity,inflammation and endothelial dysfunction[J]. Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents,2014,28(2):169-176.

[9] Kredel LI,Siegmund B. Adipose-tissue and intestinal inflammation-visceral obesity and creeping fat[J]. Frontiers in Immunology,2014,5(5):462-462.

[10] Van de VJ,Boydens C,Pauwels B,et al. Perivascular adipose tissue,inflammation and vascular dysfunction in obesity[J]. Current Vascular Pharmacology,2014,12(3):403-411.

[11] Singh R,Xiang Y,Wang Y,et al. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice[J]. Journal of Clinical Investigation,2009,119(11):3329-3339.

[12] Baerga R,Zhang Y,Chen PH,et al. Targeted deletion of autophagy-related 5(atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice[J]. Autophagy,2009,5(8):1118-1130.

[13] Jones SA,Mills KHG,Harris J. Autophagy and inflammatory diseases[J]. Immunology & Cell Biology,2013,91(3):250-258.

（责任编辑：唐秋姗）