

# 脂肪酸受体 GPR120 影响胰岛素受体底物-1 的表达

刘丹丹 王丽 史兴晔 张慧娟 姜晓艳

**【摘要】 目的** 研究在 3T3-L1 脂肪细胞中 G 蛋白耦联受体 120(GPR120)与胰岛素受体底物-1(IRS-1)的关系。**方法** 利用经典“鸡尾酒法”诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化,以未诱导组作为阴性对照,通过油红 O 染色法检测细胞内脂滴的形成情况,从而确定前脂肪细胞分化为脂肪细胞,再利用实时 PCR 方法检测 GPR120 mRNA 的表达水平。采用 siRNA 技术下调 3T3-L1 前脂肪细胞中 GPR120 的表达,以无关干扰组为阴性对照,干扰 24 h 后诱导细胞分化,诱导后于 3T3-L1 脂肪细胞培养液中加入软脂酸孵育 24 h,分别用实时 PCR 和 Western 印迹方法检测 3T3-L1 脂肪细胞中 IRS-1 的表达水平。**结果** 诱导分化的 3T3-L1 脂肪细胞中,GPR120 mRNA 表达量较未诱导组明显升高( $P < 0.05$ );干扰 GPR120 表达后 3T3-L1 脂肪细胞中脂滴体积和数量明显减小。另外,GPR120 表达的量降低后,IRS-1 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ )。**结论** GPR120 参与胰岛素信号通路中 IRS-1 的表达调控。

**【关键词】** 游离脂肪酸;胰岛素受体底物-1;G 蛋白耦联受体 120;胰岛素抵抗

**Regulation of fatty acid receptor GPR120 on the expression of insulin receptor substrate-1** Liu Dandan\*, Wang Li, Shi Xingye, Zhang Huijuan, Jiang Xiaoyan. \* Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Corresponding author: Jiang Xiaoyan, Email: jiangxy1963@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the correlation between G protein-coupled receptor 120 (GPR120) and insulin receptor substrate-1 (IRS-1) in 3T3-L1 cells. **Methods** A classic "cocktail" method was applied for induction of preadipocyte differentiation, and cells without induction were selected as a negative control. To determine the differentiation of preadipocyte to adipocyte, oil red O method was used to test the content of lipid droplet in cells. Real-time PCR was used to assess the expression of GPR120 mRNA. A specific siRNA was used to intervene the expression of GPR120 in 3T3-L1 preadipocyte, and no interfering group was used as a negative control. After interfering for 24 hours, 3T3-L1 preadipocyte was incubated with palmitic acid for another 24 hours to induce the differentiation. Real-time PCR and Western blot were used to detect the expression of IRS-1 mRNA and protein. **Results** The mRNA level of GPR120 was up-regulated in differentiated 3T3-L1 preadipocyte compared with control group ( $P < 0.05$ ). The volume and quantity of lipid droplet in 3T3-L1 adipocyte were significantly decreased after interfering the expression of GPR120 expression. Furthermore, IRS-1 mRNA and protein levels were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** GPR120 plays a regulatory role in the expression of IRS-1 in insulin signaling pathway.

**【Key words】** Free fatty acids; Insulin receptor substrate-1; G protein-coupled receptor 120; Insulin resistance

(Int J Endocrinol Metab, 2014, 34: 371-374)

游离脂肪酸(FFA)作为能量代谢和细胞内信号

转导物质的前体物质,对于细胞生物功能有重要意义<sup>[1-3]</sup>。近年来的研究发现,胰岛素敏感性和血清及组织中 FFA 水平有直接关系。高 FFA 血症是引起胰岛素抵抗和糖尿病的主要因素之一<sup>[4]</sup>。最近一些 G 蛋白耦联受体(GPR)被证实为 FFA 受体,GPR120 为其中的一员。GPR120 可以被长度为 C14 ~ 18 的饱和脂肪酸及 C16 ~ 22 的不饱和脂肪酸活

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2014.06.003

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511240)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第一医院内分泌科(刘丹丹,史兴晔,张慧娟,姜晓艳);150001 哈尔滨,中国农业科学院哈尔滨兽医研究所(王丽)

通信作者:姜晓艳,Email: jiangxy1963@126.com

化<sup>[5]</sup>。脂肪组织是机体胰岛素介导的葡萄糖摄入的主要场所之一。在胰岛素抵抗发病机制研究中有重要地位。大量体内和体外研究表明,FFA 能明显抑制肝脏、骨骼肌、脂肪等组织的胰岛素受体、胰岛素受体底物(IRS)-1 的酪氨酸残基磷酸化水平,从而干扰胰岛素信号的正常转导,参与胰岛素抵抗的发生<sup>[6]</sup>。本实验研究脂肪酸受体 GPR120 与胰岛素信号通路中 IRS-1 的关系,进一步揭示胰岛素抵抗的发生机制。

## 1 材料与方法

**1.1 3T3-L1 前脂肪细胞培养及诱导分化** 3T3-L1 细胞购于中国科学院细胞库。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 3T3-L1 细胞,待细胞汇合度达 70%~80% 时,把 siRNA-GPR120 转入细胞,以无关干扰组为阴性对照。24 h 后(此时记为第 0 天),换为诱导培养基 I[DMEM + 10% 胎牛血清 + 0.5 mmol/L isobutylmethylxanthine, 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) (Sigma) + 10 μg/ml 胰岛素 (Sigma) + 1.0 μmol/L 地塞米松 (Sigma)],培养 2 d 后换为诱导培养基 II[DMEM + 10 μg/ml 胰岛素 + 10% 胎牛血清继续培养 2 d,第 4 天换成含 10% 胎牛血清,软脂酸 (Sigma) 0.5 mmol/L 的 DMEM] 培养 24 h,第 5 天换成含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养,以后每 2 天换液 1 次。

**1.2 GPR120 siRNA 转染** 荧光标记的靶向小鼠 GPR120 基因 mRNA (NM\_181748.2) 的 siRNA 寡核苷酸由上海吉玛公司化学合成,siRNA 寡核苷酸序列 (GPR120-siRNA) 如表 1 所示,靶向 mRNA 的位点为: 1116-1134, siRNA 阴性对照寡核苷酸 (Negative control siRNA 或 NC-siRNA) 购自上海吉玛公司。待 3T3-L1 细胞生长至 70%~80% 时,进行转染实验。把 siRNA-GPR120 转入细胞。40 μg siRNA 溶于 160 μl 的 DEPC 水中。然后按照 X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent 的说明书进行转染。转染效果用实时 PCR 测定。

**1.3 油红 O 染色** 取转染 siRNA 后诱导分化第 8 天的细胞,弃去培养液经 PBS 洗 3 次后,10% 的福尔马林固定液固定 30 min, PBS 洗 2 次,油红 O 工作液 (0.5 g 油红 O 粉末溶于 100 ml 98% 的异丙醇) 染色 8 min, 60% 异丙醇分色 10~20 s, 蒸馏水冲洗。显微镜下观察。

**1.4 实时 PCR** siRNA 转染 3T3-L1 细胞后 24 h, 细胞诱导分化,第 4 天 0.5 mmol/L 软脂酸孵育 24 h 后,向软脂酸处理后的细胞中加入胰岛素使终浓度

为 100 nmol/L, 37℃ 孵育 15 min。第 5 天提取 3T3-L1 细胞 RNA (Omega 试剂盒)。RNA 反转录成 cDNA (TaKaRa PrimeScript™ RT-PCR Kit), 然后按照 LightCycler480 SYBR Green I Master (Roche) 说明书进行。各基因引物如表 1 所示。

表 1 siRNA 及引物列表

名称	序列
GPR120-siRNA	上游引物 5'-GUGCAUGUAAAGGGAGUUATT-3' 下游引物 5'-UAACUCCUUUACAUGCACCTT-3'
NC-siRNA	上游引物 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' 下游引物 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'
β-actin	上游引物 5'-ACCAACTGGGACGATATGGAGAAGA-3' 下游引物 5'-TACGACCAGAGGCATACAGGGACAA-3'
GPR120	上游引物 5'-GATTGGCCCAACCGCATAG-3' 下游引物 5'-CTCGGATCTGCTGCTCTCA-3'
IRS-1	上游引物 5'-ATTGCTGGACAGTCTCTCTC-3' 下游引物 5'-CTTTTCTTCACGAATGTCC-3'

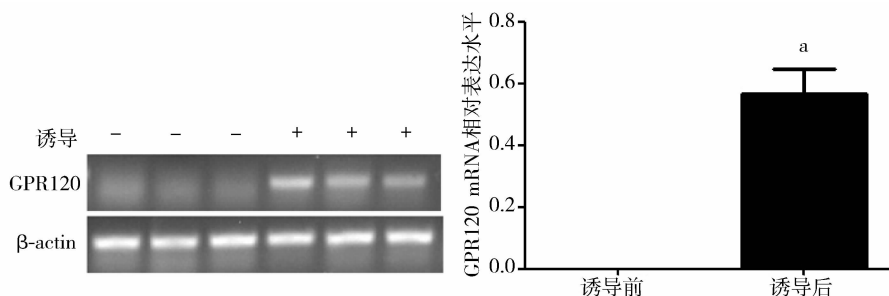
注: GPR120: G 蛋白耦联受体 120; IRS-1: 胰岛素受体底物-1

**1.5 Western 印迹** GPR120 干扰组和无关干扰组的 3T3-L1 前脂肪细胞经诱导分化和脂肪酸处理后, 第 5 天收集细胞, SDS-PAGE 胶电泳 (分离胶 15%、浓缩胶 5%), 电泳完毕后进行转膜, 转膜条件为 100 mA 60 min。转膜完毕后应用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 用 15 ml PBST 洗涤 1 次, 5 min。将 GPR120 抗体、IRS-1 抗体 (R&D Systems, USA)、β-actin 抗体 (Lab Vision, USA) 分别用 PBST 按 1: 1 000 稀释, 室温孵育 2 h。PBST 洗涤 5 次, 5 min。再用 1: 10 000 稀释的 HRP 标记二抗室温孵育 1 h。二抗孵育结束后, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。用增强型 ECL 显色液 (HaiGene, M2301) 孵育 1 min 后进行暗室曝光。

**1.6 统计学处理** 本研究所有试验均进行 3 次重复, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 利用 JMP4.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) 软件对实验数据进行 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 诱导 3T3-L1 细胞分化促进 GPR120 mRNA 表达** 油红 O 染色的结果表明, 3T3-L1 前脂肪细胞于诱导后第 5 天出现大量脂滴, 分化为脂肪细胞。分别提取未诱导分化的 3T3-L1 前脂肪细胞和诱导分化后第 5 天的 3T3-L1 脂肪细胞的总 RNA, 用实时 PCR 方法检测其 GPR120 mRNA 的表达, 结果显示, 3T3-L1 细胞诱导前 GPR120 mRNA 不表达, 诱导分化第 5 天后可检测到 GPR120 mRNA 表达 (*P* < 0.05, 图 1)。



注: \*  $P < 0.05$ ; GPR120: G 蛋白耦联受体 120

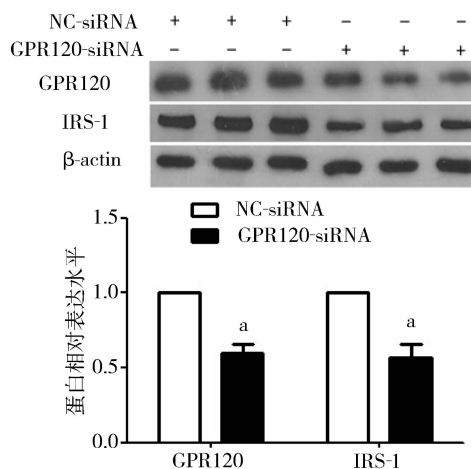
图 1 3T3-L1 细胞诱导分化过程中 GPR120 mRNA 水平增加

## 2.2 干扰 GPR120 表达引起脂肪细胞中脂质减少

3T3-L1 细胞转染荧光标记的 GPR120-siRNA 后, 在蓝色激发光下可见明显的绿色荧光, 说明 GPR120-siRNA 具有较高的转染效率(图 2, 封 3)。转染 NC-siRNA 的细胞, 诱导后第 8 天油红 O 染色发现很多细胞内充满红色的脂滴, 脂滴围绕细胞核排列, 一些小脂滴融合成较大的脂滴(图 3B, 封 3)。而转染 GPR120-siRNA 的细胞脂滴数量明显变少, 体积明显变小(图 3A, 封 3)。

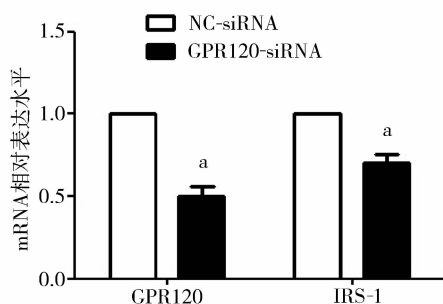
## 2.3 干扰 GPR120 表达引起 IRS-1 表达减少

NC-siRNA 和 GPR120-siRNA 转染 3T3-L1 细胞, 24 h 后对细胞进行诱导, 3T3-L1 细胞诱导 5 d 后, 发现转染 GPR120-siRNA 的细胞 GPR120 mRNA 和蛋白表达水平显著减少( $P < 0.05$ )。另外, IRS-1 mRNA 和蛋白的表达水平也明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图 4, 5。



注: \*  $P < 0.05$ ; GPR120: G 蛋白耦联受体 120; IRS-1: 胰岛素受体底物-1

图 5 转染 GPR120-siRNA 的 3T3-L1 细胞中 GPR120 与 IRS-1 蛋白表达水平变化



注: \*  $P < 0.05$ ; GPR120: G 蛋白耦联受体 120; IRS-1: 胰岛素受体底物-1

图 4 转染 GPR120-siRNA 的 3T3-L1 细胞中 GPR120 与 IRS-1 mRNA 表达水平变化

## 3 讨论

GPR120 作为长链脂肪酸受体, 在介导 FFA 信号并改变脂肪细胞的分化和糖、脂代谢效应等方面可能具有重要作用。本实验显示, 前脂肪细胞中不

表达 GPR120, 而在脂肪细胞中 GPR120 有表达。当通过 RNA 干扰使 GPR120 的表达下调后, 3T3-L1 前脂肪细胞在诱导分化后的第 8 天, 经油红 O 染色后脂滴数量明显变少, 体积明显变小。提示 GPR120 也参与影响了 3T3-L1 细胞的分化和代谢。

胰岛素信号通路是介导细胞摄取利用葡萄糖的主要途径。胰岛素与靶细胞表面胰岛素受体结合, 使受体的  $\beta$  亚单位磷酸化并激活酪氨酸激酶, 使 IRS 酪氨酸残基磷酸化, 磷酸化的 IRS 与磷脂酰肌醇 3 激酶的 p85 调节亚单位结合, 催化 p110 进而激活磷脂酰肌醇 3 激酶, 然后使蛋白激酶 B 的丝氨酸残基磷酸化, 引起葡萄糖转运蛋白-4 从细胞内向胞膜移位, 从而实现葡萄糖的利用。此通路任何环节异常都可能导致胰岛素抵抗。

IRS-1 在胰岛素作用的所有外周组织中均有分布, IRS-1 缺乏会引起外周胰岛素抵抗。Goodyear

等<sup>[7]</sup>报道,肥胖患者的骨骼肌 IRS-1 表达量较正常人低 54%,而肥胖患者恰恰较易发生胰岛素抵抗。同时有研究指出,脂肪细胞中 IRS-1 的低表达,与胰岛素抵抗和 2 型糖尿病有密切关系<sup>[8]</sup>。胰岛素信号的正常转导依赖于一定数量的 IRS-1。若 IRS-1 水平降低可影响胰岛素信号的转导,进而发生胰岛素抵抗<sup>[9]</sup>。

Gao 等<sup>[10]</sup>证实,高浓度脂肪酸可以诱导脂肪细胞胰岛素抵抗的发生,而胰岛素抵抗发生即胰岛素信号通路转导障碍。GPR120 作为脂肪酸的受体,是联系脂肪酸与脂肪细胞之间作用的桥梁,那么它是如何与胰岛素信号通路关联的呢?本实验显示,3T3-L1 脂肪细胞中 GPR120 的表达下调后,IRS-1 的 mRNA、蛋白水平表达均降低。GPR120 的水平影响了 IRS-1 的表达,或者说 GPR120 调控了 IRS-1 的表达,从而与胰岛素信号通路建立关系,进而推测 GPR120 与 IRS-1 之间的关系是 GPR120 联系胰岛素信号通路的方式之一。GPR120 对胰岛素信号通路中其余基因的表达是否还有影响,将在今后的研究中一一揭晓。

#### 参 考 文 献

- [1] Rui LY. Energy metabolism in the liver[J]. Compr Physiol, 2014,4(1):177-197.

- [2] Bastien M, Poirier P, Lemieux I, et al. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2014,56(4):369-381.
- [3] Toledo K, Aranda M, Asenjo S, et al. Unsaturated fatty acids and insulin resistance in childhood obesity[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2014,27(5-6):503-510.
- [4] Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance[J]. J Clin Invest, 2000,106(2):165-169.
- [5] Hirasawa A, Hara T, Katsuma S. Free fatty acid receptors and drug discovery[J]. Biol Pharm Bull, 2008,31(10):1847-1851.
- [6] Yi P, Lu F E, Xu LJ, et al. Berberine reverses free-fatty-acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through targeting IKKbeta[J]. World J Gastroenterol, 2008,14(6):876-883.
- [7] Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, et al. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects[J]. J Clin Invest, 1995,95(5):2195-2204.
- [8] 洪靖, 李光伟. IRS-1 基因与肥胖、2 型糖尿病[J]. 中日友好医院学报, 2003,17(2):107-109.
- [9] White MF, Kahn CR. The insulin signaling system[J]. J Biol Chem, 1994,269(1):1-4.
- [10] Gao Z, Zhang X, Zuberi A, et al. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes[J]. Mol Endocrinol, 2004,18(8):2024-2034.

(收稿日期:2014-08-27)

## · 消息 ·

### 2015 年《国际内分泌代谢杂志》征稿暨征订启事

《国际内分泌代谢杂志》原刊名《国外医学内分泌学分册》,是由中华人民共和国国家卫生与计划生育委员会主管,中华医学会、天津医科大学主办的国内外公开发行的国家级医学学术期刊,是中华医学会系列杂志之一。本刊为中文核心期刊,中文科技核心期刊。主要栏目设有述评、专家论坛、临床热点话题、综述、论著、报道与交流、临床病例讨论、争鸣园地、短篇报道、新药介绍、网上快讯、会议精粹等。

除综述类文章,本刊还欢迎具有独创性和包含重大研究成果的论著文章。已在国外核心期刊发表的研究成果可以中文形式在本刊二次发表,以促进国内研究人员对该研究工作的深入了解。另外,如果您有内分泌方面的常见但易于误诊、误治或疑难、罕见病例,也欢迎您投稿。

《国际内分泌代谢杂志》中国标准连续出版物号:CN 12-1383/R,ISSN 1673-4157。

本杂志印刷版为大 16 开 72 页,双月刊,逢单月 20 日出版,每册定价 12 元,全年 6 期,共计 72 元。国外代号:BM6694。国内邮发代号:6-53,全国邮局均可订阅,也可直接向编辑部订阅。

地址:300070 天津市和平区气象台路 22 号天津医科大学内《国际内分泌代谢杂志》编辑部

电话:022-83336730

本刊编辑部