

成纤维细胞生长因子 21 在抵抗素引发胰岛素抵抗的肝细胞模型中的糖代谢调节作用*

刘 淼 王文飞 刘铭瑶 赵景壮 白 银 郭 茉 任桂萍 李德山**

(东北农业大学生命科学学院生物制药教研室, 哈尔滨 150030)

摘要 抵抗素是 2001 年 Steppan 等发现的一种与胰岛素抵抗有密切联系的细胞因子。本研究探讨了成纤维细胞生长因子 21 (FGF-21) 在抵抗素过表达导致胰岛素抵抗的肝细胞中的糖代谢调节作用。构建人抵抗素真核表达载体, 转染 HepG2 细胞, 利用流式细胞仪筛选出过表达抵抗素的 HepG2 模型细胞, 分别用不同浓度的胰岛素和 FGF-21 刺激细胞, 用 GOD-POD 法检测细胞的葡萄糖摄取情况, 利用实时荧光定量 PCR 方法检测抵抗素转染后及 FGF-21 处理后细胞 GLUT1、PPAR- γ mRNA 表达的变化。PCR 鉴定结果表明过表达抵抗素的 HepG2 模型细胞构建成功。GOD-POD 法检测结果证明, 模型细胞对胰岛素敏感性降低, 但 FGF-21 仍能有效调节模型细胞的葡萄糖摄取, 且呈现剂量依赖关系。实时荧光定量 PCR 方法检测发现, 抵抗素转染后 HepG2 细胞 GLUT1 mRNA 表达增加, 经 FGF-21 刺激后模型细胞与对照细胞相比 GLUT1 mRNA 的表达仍有上升趋势, PPAR- γ 的变化不显著。上述结果表明, 抵抗素过表达的肝细胞, 对胰岛素敏感性降低, 产生胰岛素抵抗, 但 FGF-21 仍能有效调节其葡萄糖代谢。

关键词 抵抗素, 成纤维细胞生长因子 21(FGF-21), 胰岛素抵抗, HepG2

学科分类号 Q7, Q81

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00462

抵抗素(resistin)是 2001 年发现的机体内重要的活性因子, 可能参与炎症、糖尿病等疾病的发生发展^[1]。Ort 等^[2]应用实时定量 PCR 检测方法证实, 除脂肪细胞、胎盘血液的单核细胞和骨髓组织外, 抵抗素在肝脏的表达有时序性, 在胎儿时期, 肝脏表达抵抗素, 成年后则不表达。在啮齿类动物的研究表明, 抵抗素能损害肝脏的胰岛素敏感性, 发生葡萄糖代谢障碍, 其机制可能是增加了葡萄糖输出, 而外周葡萄糖代谢未受影响^[3-5]。

成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor-21, FGF-21) 是人体内一个重要的糖代谢调节因子, 其调节糖吸收的表象与机制皆不同于胰岛素。FGF-21 起效较慢, 但持续性好, 而且 FGF-21 刺激糖吸收的执行单位是葡萄糖转运载体 1 (glucose transporter 1, GLUT1), 受高浓度胰岛素刺激而导致胰岛素抵抗的细胞仍能对 FGF-21 做出有效应答, 证明该蛋白有可能是解决胰岛素抵抗时机体血糖调节失衡的潜在蛋白质药物^[6]。胰岛素抵抗是一个复杂的生物学现象, 造成胰岛素抵抗原因

很多, 本研究通过构建过表达人抵抗素的胰岛素抵抗肝细胞模型, 检测该细胞对 FGF-21 信号的应答, 希望可以进一步了解 FGF-21 在胰岛素抵抗的病理过程中所起的生物学作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与质粒. 肝细胞株 HepG2, 真核表达载体 Peedual, pMD18-T-H-Resistin 均由东北农业大学生命中心基因部保存。

1.1.2 主要试剂与仪器. 流式细胞仪 (BD FACS Aria™ Cell Sorter 334078); 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司 7500 型); T4 DNA 连接酶、限制性内

* 黑龙江省发展和改革委员会重大前期项目(黑发改项目[2011]1570 号)和东北农业大学博士启动基金(2010RCB52)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0451-55190645, E-mail: deshanli@163.com

收稿日期: 2012-09-17, 接受日期: 2012-10-30

切酶购自 Takara 公司; AxyPrep 质粒 DNA 提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; 去内毒素质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司; 高糖 DMEM 培养、新生牛血清(NCS)购自 GIBCO 公司; 牛血清白蛋白(BSA)、胰蛋白酶购自北京原平皓生物技术有限公司; 重组人胰岛素购自 Sigma 公司; 人 FGF-21 由本实验室纯化获得; 葡萄糖检测试剂

盒(GOD-POD 法)购自四川迈克科技有限责任公司; RNA 酶抑制剂(RNasin, RNase inhibitor)、逆转录酶 (M-MuLV)、RNA 提取试剂 Trizol、1kb Plus DNA Ladder 购自 Invitrogen 公司; Oligo(dT)₁₅ 购自 Takara 公司. 其他化学试剂均为分析纯.

1.1.3 引物. 实时荧光定量 PCR 引物由 Invitrogen 公司合成.

Table 1 Characteristics of the primers used for Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
Resistin(human)	GTAAAGCTCTCTGTCTCCTC	GGAATGCTGCTTATTGCCCT
GLUT1(human)	GCGGAATTCAATGCTGATGAT	CAGTTTCGAGAAGCCCATGAG
PPAR- γ (human)	GCAGGAGCAGAGCAAAGAGGTG	AAATATTGCCAAGTCGCTGTCATC
β -Actin (human)	GAGCGGGAAATCGTGC GTGAC	GCCTAGAAGCATTGCGGTGGAC

1.2 真核表达载体的构建

将 Peedual 和 pMD18-T-H-Resistin 载体经 PCR、酶切、连接、转化的方法得到真核表达载体 Peedual-H-Resistin.

1.3 细胞培养

将冻存的 HepG2 细胞复苏后转入 100 ml 培养瓶中, 用含 10%灭活新生牛血清的 DMEM 培养液在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养. 当细胞形成细胞单层后, 用 0.25%胰蛋白酶按 1 : 3 比例传代, 细胞密度为 1×10⁶, 取对数生长期的细胞用于后续实验.

1.4 细胞转染

取生长状况良好的 HepG2 细胞, 用不含双抗的培养基按每孔 2×10⁵ 个细胞接种 6 孔板, 待细胞融合度达到 70%, 用 Lipofectamin2000 将载体转染至 HepG2 细胞, 构建 HepG2-G(转入 Peedual 空载体的细胞)、HepG2-R(转入 Peedual-H-Resistin 真核表达载体的细胞) 2 种细胞系, 转染方法参照 Invitrogen 公司试剂盒说明书.

1.5 阳性细胞株的筛选

转染的细胞连续扩增后, 利用 Peedual 载体上的绿荧光蛋白(GFP)筛选标记对转染后的细胞进行流式细胞仪分选, 分选后细胞继续进行连续培养及流式细胞仪分选, 直至筛选出稳定转染的细胞系.

1.6 抵抗素过表达模型细胞的鉴定

用 Trizol 法分别提取 HepG2、HepG2-G、HepG2-R 三种细胞的总 RNA, 以总 RNA 为模板, Oligo(dT)₁₅ 为引物合成 cDNA. 利用实时荧光定量

PCR 方法检测三种细胞内抵抗素的表达变化. 按照 Thermal Cycler Dice™ Real Time PCR 的使用说明书进行实验操作, 同时扩增内参 resistin 目的基因. 反应体系为 20 μ l: 2.0 μ l cDNA 模板, 10.0 μ l SYBR Premix Ex Taq™ (2 $\times$), 0.4 μ l PCR 正反引物(10mol/L), 0.4 μ l ROX Reference Dye II (50 $\times$), 灭菌三蒸水补足 20 μ l. 反应条件为 95℃ 30 s, 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环. 每次扩增均设由三蒸水代替模板的空白对照, 每个样品至少重复 3 次. 使用相对定量分析方法(2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法)对目的基因进行相对定量.

1.7 葡萄糖消耗实验

1.7.1 模型细胞基础糖吸收对胰岛素敏感性的检测. 利用微量化的 GOD-POD 法检测培养基中葡萄糖含量, 将 HepG2、HepG2-G、HepG2-R 三种细胞分别用 0.25%胰酶消化后, 用低糖 DMEM 培养液配成单个细胞悬液, 按每孔细胞浓度为 5×10⁴ 个/ml 接种于 96 孔培养板, 每孔体积为 200 μ l, 在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件的培养箱中培养 1 天, 去掉培养液, 用无血清培养基继续培养 12 h 后, 换成含胰岛素终浓度为 1 000 nmol/L、100 nmol/L 的培养液及无胰岛素的培养液, 继续培养细胞 24 h 后, 取培养基中的上清液 2 μ l 于葡萄糖检测液中测定葡萄糖的含量, 与未接种细胞空白复孔的葡萄糖含量均值相减, 算出各孔细胞的葡萄糖消耗率, 将加入胰岛素刺激的实验组减去未刺激的空白组的葡萄糖消耗率, 计算出不同浓度胰岛素刺激细胞葡萄糖消耗的增加比率, 每种细胞每个浓度至少设 3

个独立的重复组,用统计学分析实验结果.

1.7.2 FGF-21 对模型细胞糖吸收的影响. 取 HepG2、HepG2-G、HepG2-R 三种细胞,实验组分别加入 FGF-21 终浓度为 1 000 nmol/L、100 nmol/L 的培养液处理细胞 24 h,对照组为未加任何处理的培养基培养的三种细胞,用 GOD-POD 法检测不同处理组细胞对培养基中葡萄糖的消耗情况,将加入 FGF-21 刺激的实验组减去对照组的葡萄糖消耗率,计算出不同浓度 FGF-21 刺激细胞葡萄糖消耗的增加比率,并做统计学分析.

1.8 HepG2 细胞 GLUT1、PPAR- γ mRNA 表达的变化

1.8.1 抵抗素基因转染对 HepG2 细胞 GLUT1、PPAR- γ 表达的影响. 用 Trizol 法分别提取 HepG2、HepG2-G、HepG2-R 三种细胞的总 RNA, Oligo(dT)₁₅ 为引物合成 cDNA. 利用实时荧光定量 PCR 方法检测细胞内 GLUT1、PPAR- γ 的表达变化. 具体方法同 1.6.

1.8.2 FGF-21 对抵抗素基因转染阳性细胞 GLUT1、PPAR- γ 表达的影响. HepG2-R 细胞用无血清培养基培养 12 h 后,用 100 nmol/L 的 FGF-21 培养细胞,以未加任何处理的细胞为对照,培养 6 h 后收获细胞,用 Trizol 法提取细胞的总 RNA, Oligo(dT)₁₅ 为引物合成 cDNA. 利用实时荧光定量 PCR 方法检测细胞内 GLUT1、PPAR- γ 的表达变化. 具体方法同 1.6.

2 实验结果

2.1 抵抗素表达载体的构建

将 Peedual、pMD18-T-H-Resistin 载体经 PCR、

酶切、连接、转化的方法得到真核表达载体 Peedual-H-Resistin. Peedual 载体上带有绿色荧光蛋白(GFP)报告基因. 构建的抵抗素表达载体图谱如图 1 所示.

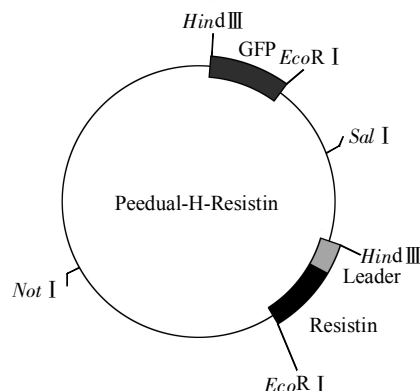


Fig. 1 The profiles of resistin eukaryotic expression vector

2.2 稳定转染细胞株的筛选

2 种载体转染细胞后,进行流式细胞仪筛选,以未转染的 HepG2 细胞为阴性对照,将其检测的荧光强度设置在 P2 门作为参照,将转染的两种细胞进行检测,分选荧光强度高于对照的细胞. 分选后细胞继续培养,当细胞数达到 10⁸ 个后进行下一轮分选,经过 4 轮分选后,得到稳定转染细胞株 HepG2-G、HepG2-R,结果显示荧光强度主峰明显移动,且阳性率均达到 90% 以上. 图 2 为 4 轮分选后三种细胞流式检测结果比较.

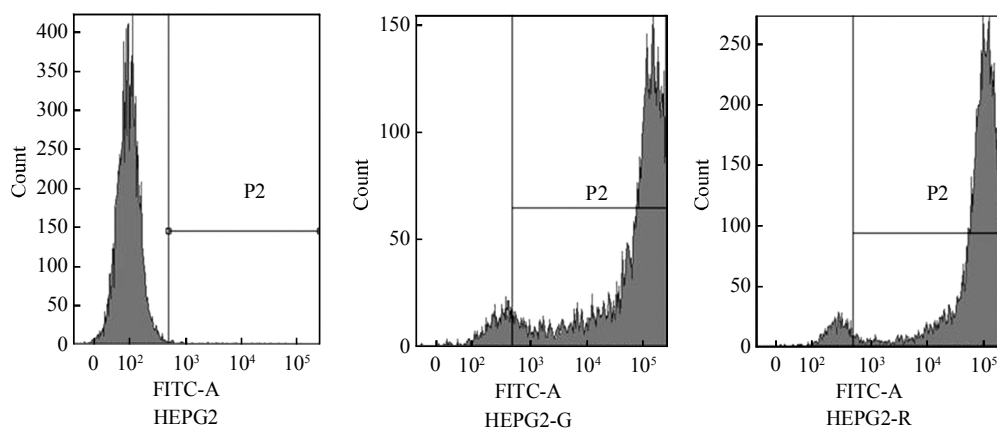


Fig. 2 Comparison of each kinds of transfected cells by flow cytometry

The cells were washed by PBS twice, after that they were suspended with PBS, the cells were sorted by flow cytometry at 488 nm.

2.3 抵抗素基因转染阳性细胞的鉴定

应用实时荧光定量 PCR 方法检测 HepG2、HepG2-G、HepG2-R 三种细胞内抵抗素的表达变化。结果见图 3。由图 3 可知,转染空质粒的细胞 HepG2-G 与 HepG2 细胞比差异不显著,而 HepG2-R 细胞抵抗素表达量明显高于 HepG2、HepG2-G 细胞,且差异显著,说明过表达抵抗素模型细胞建立成功。

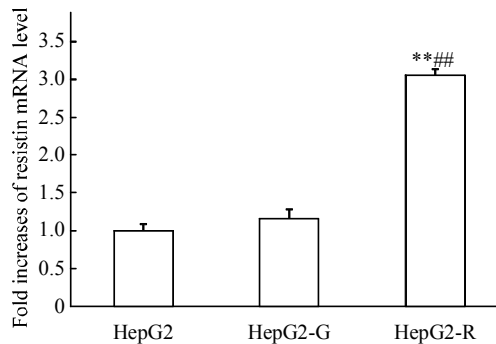


Fig. 3 Quantitative mRNA expression of resistin in HepG2, HepG2-G and HepG2-R cells

Quantitative mRNA expression of resistin in three cell lines were measured by real-time PCR. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. *** $P < 0.01$ compared with normal HepG2 cells, # $P < 0.01$ compared with HepG2-G cells.

2.4 模型细胞对胰岛素敏感性的检测

将 HepG2、HepG2-G、HepG2-R 三种细胞用不含血清的培养基饥饿处理 12 h,再加入不同浓度的胰岛素分别刺激 24 h 后,经微量化的 GOD-POD 法检测培养基中葡萄糖含量,与无细胞的培养基中葡萄糖含量相减计算出细胞的葡萄糖消耗率,将实验组与空白组葡萄糖消耗率作差值后计算葡萄糖消耗增加比率,进行统计学分析。结果表明(图 4),过表达抵抗素的模型细胞葡萄糖消耗增值比率明显低于正常细胞及空质粒转染细胞,差异显著($P < 0.05$),由此可见,过表达抵抗素模型细胞对胰岛素的敏感性降低,产生胰岛素抵抗。

2.5 FGF-21 对过表达抵抗素模型细胞糖吸收的影响

用不同浓度的 FGF-21 分别处理 HepG2、HepG2-G、HepG2-R 三种细胞 24 h 后,经微量化的 GOD-POD 法检测培养基中葡萄糖含量,与无细

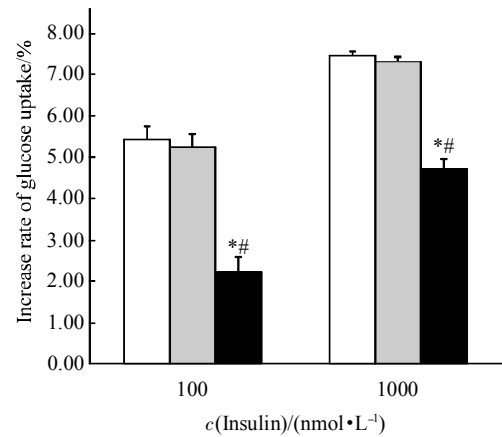


Fig. 4 Increase rate of glucose uptake in three cell lines treated with different concentrations of insulin

The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.05$ compared with normal HepG2 cells, # $P < 0.05$ compared with HepG2-G cells. □: HepG2; ▒: HepG2-G; ■: HepG2-R.

胞的培养基中葡萄糖含量相减计算出细胞的葡萄糖消耗率,实验组与空白组葡萄糖消耗率做差值后计算出葡萄糖消耗增加比率,进行统计学分析。结果表明,FGF-21 对 HepG2-R 模型细胞的促进作用与 HepG2 和 HepG2-G 相比,差异不显著(图 5),且高剂量的 FGF-21 刺激 HepG2-R 后,葡萄糖消耗的增加比率与 HepG2 和 HepG2-G 相比有增高趋势,由此可见,细胞过表达抵抗素后,FGF-21 仍可有效调节糖代谢。

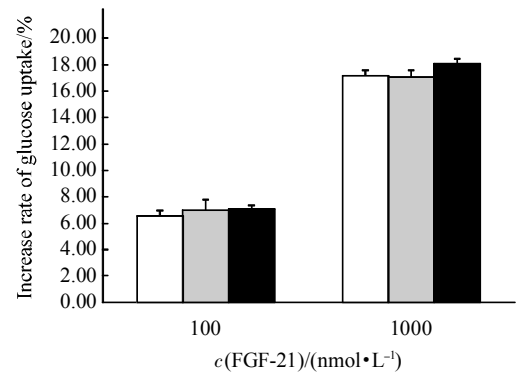


Fig. 5 Glucose consumption increase rate of three cell lines treated with different concentrations of FGF-21

The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. □: HepG2; ▒: HepG2-G; ■: HepG2-R.

2.6 抵抗素基因转染对 HepG2 细胞 GLUT1、PPAR- γ 表达的影响

用 Trizol 法分别提取 HepG2、HepG2-G、HepG2-R 三种细胞的总 RNA, Oligo(dT)₁₅ 为引物合成 cDNA. 利用实时荧光定量 PCR 方法检测细胞内 GLUT1、PPAR- γ 的表达变化. 每次扩增均设由三蒸水代替模板的空白对照, 每个样品至少重复 3 次. 使用相对定量分析方法(2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法)对目的基因进行相对定量. 结果显示, 过表达抵抗素的模型细胞 HepG2-R 的 GLUT1 表达量与 HepG2、HepG2-G 相比, 提高了约 3 倍多, 并且差异显著(图 6), 而模型细胞 PPAR- γ 表达量与 HepG2、HepG2-G 相比有下降趋势, 但差异不显著(图 7).

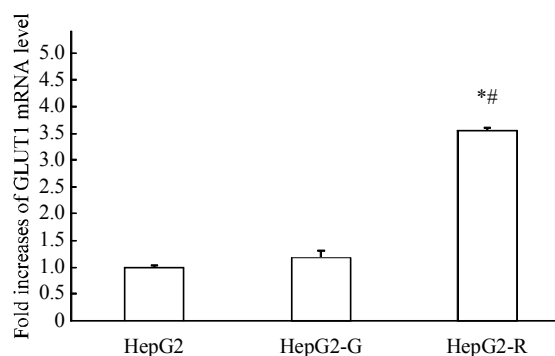


Fig. 6 Quantitative mRNA expression of GLUT1 in HepG2, HepG2-G and HepG2-R cells

Quantitative mRNA expression of GLUT1 in three cell lines were measured by Real-time PCR. Total RNA were extracted by Trizol method. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.05$ compared with normal HepG2 cells, # $P < 0.05$ compared with HepG2-G cells.

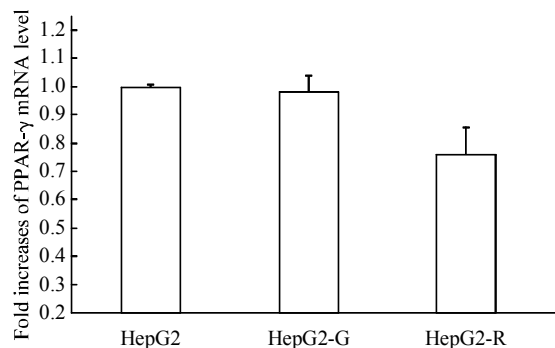


Fig. 7 The expression of PPAR- γ in HepG2, HepG2-G and HepG2-R cells

Quantitative mRNA expression of PPAR- γ in three cell lines were measured by Real-time PCR. Total RNA were extracted by Trizol method. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements.

2.7 FGF-21 对过表达抵抗素模型细胞 GLUT1、PPAR- γ 表达的影响

由于检测过表达抵抗素的模型细胞 GLUT1 表达量显著增加, 为进一步探讨 FGF-21 对模型细胞代谢的影响, 本研究进一步检测了 FGF-21 对模型细胞 GLUT1、PPAR- γ 表达的影响. 将过表达抵抗素模型细胞 HepG2-R 用 100 nmol/L 的 FGF-21 处理 6 h 后, 收获细胞提取细胞总 RNA, 以反转录后的 cDNA 为模板, 用特异性引物进行实时荧光定量 PCR 扩增, 检测模型细胞经 FGF-21 处理后 GLUT1、PPAR- γ 的表达变化, 以未处理的模型细胞为对照, 结果表明经 FGF-21 处理后, 模型细胞 GLUT1 的表达量显著增加(图 8), 说明抵抗素过表达模型细胞对 FGF-21 的刺激仍能有效的应答, 而 PPAR- γ 的表达量无显著变化(图 9).

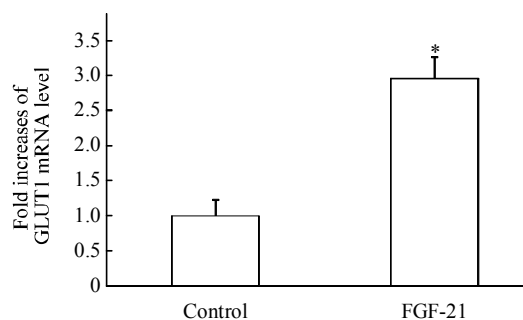


Fig. 8 The expression of GLUT1 in HepG2-R cells treated with 100 nmol/L FGF-21

Total RNA were extracted by Trizol method and levels of GLUT1 mRNA were measured by Real-time PCR. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.05$ compared with no stimulation control.

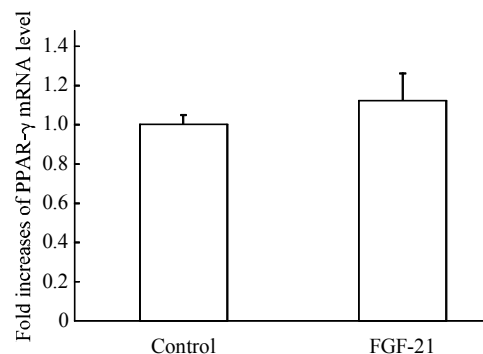


Fig. 9 The expression of PPAR- γ in HepG2-R cells treated with 100 nmol/L FGF-21

Total RNA were extracted by Trizol method and levels of PPAR- γ mRNA were measured by Real-time PCR. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements.

3 讨 论

胰岛素抵抗是许多代谢类疾病发生和发展的重要机制之一,肝脏因其具有合成和分解糖原、糖异生等作用,是人体内重要的血糖调控器官,也是发生胰岛素抵抗的主要器官,有文章报道,糖尿病等代谢疾病患者体内抵抗素含量提高。当抵抗素作用于肝脏后,会通过促进糖异生关键酶表达和肝糖原分解,使肝糖输出增加,从而参与肝脏胰岛素抵抗的形成^[7-8],进而削弱胰岛素对机体血糖的调控能力。因此,解决胰岛素抵抗时期机体的糖代谢紊乱一直是糖尿病研究的热点。

FGF-21 是除胰岛素之外,人体内另外一个重要的代谢调节因子。肝脏是 FGF-21 发挥生物学活性的重要靶器官。HepG2 细胞源于人肝细胞,保留了肝细胞的许多特性,本研究构建了人抵抗素过表达的 HepG2 细胞,通过实时荧光定量 PCR 的方法证明,与基准水平相比该细胞抵抗素水平提高了 3 倍。利用微量化的 GOD-POD 法^[6-9]检测细胞葡萄糖消耗率,结果表明,过表达抵抗素模型细胞对胰岛素敏感性降低,产生胰岛素抵抗,证实我们成功构建了过表达抵抗素并呈现胰岛素抵抗状态的 HepG2 细胞。而经 FGF-21 刺激后,过表达抵抗素模型细胞的葡萄糖消耗与正常 HepG2 细胞及空质粒转染的细胞相比,均有良好的促进作用,由此可见,FGF-21 能有效调节过表达抵抗素引发的胰岛素抵抗细胞的葡萄糖消耗。

目前已有研究证明,FGF-21 通过上调 GLUT1 的表达来转运葡萄糖分子向细胞内转移^[6-10]。有报道认为过表达抵抗素的 HepG2 细胞内 GLUT1 分子表达量变化差异不显著^[3]。Simone 等^[11]认为,在不同浓度下,抵抗素对 GLUT1 表达的影响不同,在一定浓度下(10 $\mu\text{g/L}$),抵抗素能显著上调 GLUT1 表达,而当抵抗素浓度超过 50 $\mu\text{g/L}$ 时 GLUT1 表达显著降低,目前已证实 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗状态下,血清抵抗素含量高于健康对照组,且含量在 10 $\mu\text{g/L}$ 左右^[12-14]。在本研究中,通过荧光定量 PCR 检测,结果表明,过表达抵抗素的细胞中 GLUT1 的表达量显著高于两种对照细胞,我们认为其原因可能是由于过表达抵抗素的细胞对胰岛素敏感性降低,产生胰岛素抵抗,造成细胞葡萄糖调节障碍,由此引发了自身的代偿反应,从而导致 GLUT-1 的表达上调,但这有待于进一步的实验证实。在加入 FGF-21 刺激后,过表达抵抗素模型细

胞的 GLUT1 表达量与未刺激的模型细胞相比较仍显著上调,说明 FGF-21 能有效调节抵抗素过表达细胞 GLUT1 表达量,进而有效调节细胞的葡萄糖代谢。此外,我们还检测了 FGF-21 发挥生物学作用中另一个重要的细胞核表面受体 PPAR- γ 的变化,发现该因子变化不显著,但是过表达抵抗素的模型细胞 PPAR- γ 的表达量有下降趋势。PPAR- γ 与配体的结合可以改善胰岛素敏感性,因此其表达量下调可能是抵抗素过表达引发胰岛素抵抗的原因之一,在加入 FGF-21 刺激后 PPAR- γ 表达有所上升但差异不显著。

综上所述,我们认为抵抗素过表达不会影响 FGF-21 的作用,FGF-21 能有效调节抵抗素引发胰岛素抵抗的肝细胞糖代谢。因此 FGF-21 有望应用于治疗肥胖、2 型糖尿病等胰岛素抵抗相关疾病,本实验为今后临床治疗由抵抗素引发胰岛素抵抗的疾病提供了理论基础。

参 考 文 献

- [1] Stepan C M, Bailey S T, Bhat S, *et al*. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 2001, **409**(18): 307-312
- [2] Ort T, Arjona A A, MacDougall J R, *et al*. Recombinant human FIZZ3/resistin stimulates lipolysis in cultured human adipocytes, mouse adipose explants, and normal mice. *Endocrinology*, 2005, **146**(5): 2200-2209
- [3] 盛春华. 人抵抗素体外基因转染对葡萄糖摄取的影响及其机制. 吉林: 吉林大学, 2008
Sheng C H. Effects and mechanisms of human resistin gene transfection *in vitro* on glucose uptake. Jilin: Jilin University, 2008
- [4] Muse E D, Lam T K T, Scherer P E, *et al*. Hypothalamic resistin induces hepatic insulin resistance. *J Clin Invest*, 2007, **117**(6): 1670-1678
- [5] Rajala M W, Obici S, Scherer P E, *et al*. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule- β selectively impair insulin action on glucose production. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003, **111**(2): 225-230
- [6] 刘铭瑶, 王文飞, 于艺雪, 等. 成纤维细胞生长因子(FGF-21)改善胰岛素抵抗肝细胞对葡萄糖的吸收和肝糖原的合成. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(10): 1327-1333
Liu M Y, Wang W F, Yu Y X, *et al*. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(10): 1327-1333
- [7] 李 焱, 何 娟, 李芳萍, 等. 抵抗素在肝脏胰岛素抵抗中的作用及其机制. *中国病理生理杂志*, 2009, **25**(4): 688-692
Li Y, He J, Li F P, *et al*. *Chin J Pathophysiology*, 2009, **25**(4): 688-692
- [8] Yang Y, Xiao M F, Mao Y Q, *et al*. Resistin and insulin resistance in hepatocytes: Resistin disturbs glycogen metabolism at the protein level. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2008, **63**(2009): 366-374
- [9] 杨桂枝, 高小平, 晏菊芳, 等. GOD-POD 法微量测定方法的建

- 立及其在 3T3-L1 脂肪细胞和 HepG2 细胞糖摄取中的应用. 四川解剖学杂志, 2003, **11**(1): 12-15
- Yang G Z, Gao X P, Yan J F, *et al.* Sichuan J Anatomy, 2003, **11**(1): 12-15
- [10] 孙国鹏, 叶贤龙, 任桂萍, 等. 成纤维细胞生长因子 21 对 1 型糖尿病动物模型的肝糖代谢影响及机制研究. 生物化学与生物物理进展, 2011, **38**(10): 953-960
- Sun G P, Ye X L, Ren G P, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2011, **38**(10): 953-960
- [11] Simone N D, Nicuolo F D, Marziani D, *et al.* Resistin modulates glucose uptake and glucose transporter-1 (GLUT-1) expression in trophoblast cells. J Cell Mol Med, 2009, **13**(2): 388-397
- [12] 郝小林. 血清抵抗素与糖尿病的相关性研究. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, **8**(8): 997-998
- Hao X L. Chin J Integr Med Cardio-/Cerebrovasc Disease, 2010, **8**(8): 997-998
- [13] 张艳红, 王立, 杨伟, 等. 老年 2 型糖尿病患者血清抵抗素水平与胰岛素抵抗的相关性研究. 疑难病杂志, 2011, **10**(5): 342-344
- Zhang Y H, Wang L, Yang W, *et al.* Chinese Journal of Difficult and Complicated Cases, 2011, **10**(5): 342-344
- [14] 胡红琳, 王长江, 王佑民, 等. 2 型糖尿病患者血清抵抗素水平的变化研究. 中国综合临床, 2005, **21**(11): 1011-1013
- Hu H L, Wang C J, Wang Y M, *et al.* Clin Med Chin, 2005, **21**(11): 1011-1013

The Effect of FGF-21 on Glucose Metabolism in The Resistin-induced Insulin Resistance Liver Cells*

LIU Miao, WANG Wen-Fei, LIU Ming-Yao, ZHAO Jing-Zhuang,
BAI Yin, GUO Mo, REN Gui-Ping, LI De-Shan**

(Northeast Agricultural University, College of Life Science, Harbin 150030, China)

Abstract Resistin was a cytokine associated with insulin resistance. The objective of the study is to investigate the impact of fibroblast growth factor (FGF)-21 on glucose metabolism in resistin-induced insulin resistant liver cells. A stable HepG2 cell line expressing human resistin was developed. The cell line was treated with different concentrations of insulin or FGF-21. The glucose uptake of the treated cells was measured by the method of GOD-POD, and the mRNA expression of GLUT1 and PPAR- γ of the FGF-21-treated cells were examined by real-time PCR. We successfully developed the HepG2 line which stably expressed human resistin. The results of glucose uptake showed that the sensitivity of the cell line to the insulin treatment significantly decreased, but FGF-21 could effectively stimulate the glucose uptake by the same cell line. The mRNA expression of GLUT1 was elevated in the cell line, and the GLUT1 mRNA level of the cells significantly increased after treatment by FGF-21. The expression of PPAR- γ had no significant change. The cell line in which resistin was highly expressed has a reduced susceptibility to insulin. Although the high level of resistin makes cells insulin resistance, FGF-21 can regulate the glycometabolism effectively in the cells.

Key words resistin, FGF-21, insulin resistance, HepG2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00462

*This work was supported by grants from Major Prophase Project of Heilongjiang Development and Reform Commission ([2011]1570), Northeast Agricultural University (2010RCB52).

**Corresponding author.

Tel: 86-451-55190645, E-mail: deshanli@163.com

Received: September 17, 2012 Accepted: October 30, 2012