

运动对 RBP4 诱导的脂代谢异常鼠肝脏 ACC1 表达和脂肪合成的影响

张明军，魏丽香

(惠州学院 体育系，广东 惠州 516007)

摘要：目的：研究运动对 RBP4 诱导的脂代谢异常鼠肝脏 ACC1 表达和脂肪合成的影响。方法：重组人 RBP4 注射建立脂代谢异常鼠模型。设一次性运动组 (RBP4 One-time exercise group, ROE 组)、8 周有氧运动组 (RBP4 aerobic exercise group, RAE 组) 和安静对照组 (RBP4 control group, RC 组)。结果：ROE 组血清 RBP4 水平与 RC 组相比显著降低 ($P < 0.05$)，血清 TG 和肝脏 TG 含量无显著改变 ($P > 0.05$)。RAE 组血清 RBP4、TG 和肝脏 TG 含量与 RC 组和 ROE 组相比均显著降低 ($P < 0.01$)。与 RC 组相比，ROE 组和 RAE 组肝脏 ACC1mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.01$)。与 RC 组相比，ROE 组 ACC1 蛋白表达无显著改变 ($P > 0.05$)。与 RC 组和 ROE 组相比，RAE 组 ACC1 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.01$)。结论：高 RBP4 显著增加小鼠肝脏 ACC1 基因和蛋白表达增加，促进肝脏脂肪合成。8 周有氧运动抑制了 RBP4 在肝脏的脂肪合成促进作用，改善脂代谢，机制涉及降低 RBP4 水平、减少肝脏 ACC1 基因和蛋白表达以及 TG 的合成。

关键词：运动；视黄醇结合蛋白 4；乙酰辅酶 A 羧化酶 1；脂肪合成；脂肪代谢

中图分类号：G804

文献标志码：A

文章编号：1008-3596 (2017) 01-0054-06

脂肪因子视黄醇结合蛋白 4 (RBP4) 能够诱导胰岛素抵抗的产生，还能够调节机体能量平衡，根据机体能量摄取和消耗变化，调节脂肪合成、分解过程，影响脂代谢平衡，是肝脏中脂肪含量的标志物之一^[4]。Xia M 等^[5]发现：RBP4 能够诱导小鼠发生脂代谢紊乱，提高血甘油三酯 (TG) 水平，机制涉及增加肝脏乙酰辅酶 A 羧化酶 1 (ACC1) 基因和其他脂肪生成基因表达，促进肝脏脂肪合成和循环 TG 的释放。ACC 是肝脏脂肪合成的主要限速酶，催化脂肪酸 (Fatty acid) 生成所必需的丙二酰辅酶 A (malonyl CoA) 的合成过程，促进脂肪酸和 TG 合成释放，ACC 家族中 ACC1 调节长链脂肪酸合成的能力显著超过 ACC2^[6-8]。研究还发现：运动能

够降低肥胖、2 型糖尿病和代谢综合征鼠和患者增高的血清 RBP4，改善脂代谢异常，血脂组份 TG、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白 (LDL-C) 水平均显著降低^[9-11]。

鉴于 RBP4 能够诱导脂代谢紊乱，升高血 TG 等指标，机制与增加肝脏 ACC1 和脂肪生成基因表达、促进肝脏脂肪合成和 TG 释放入血有关；而运动能够降低 RBP4、TG、TC 和 LDL-C 水平，改善脂代谢异常，推测其机制可能与运动抑制 RBP4 诱导的肝脏 ACC1 高表达、脂肪合成以及 TG 释放过程有关。因此，为了探索运动改善 RBP4 诱导脂代谢紊乱的机制，本文制备 RBP4 诱导的脂代谢紊乱小鼠模型，给予不同运动处方干预，观察肝脏 ACC1 表达、TG 含量变

收稿日期：2016-10-01

基金项目：福建省自然科学基金项目 (2011J01151)；广东省哲学社会科学规划项目 (GD15XTY10)

作者简介：张明军 (1968—)，男，安徽滁州人，副教授，博士，研究方向为运动生理学。

化以及血 RBP4、TG 水平, 探讨运动改善 RBP4 诱导的脂代谢紊乱机制, 为肥胖、2型糖尿病和代谢综合征等高 RBP4 血症者的脂代谢异常运动处方治疗提供理论依据和实践指导。

1 材料与方法

1.1 动物造模

实验鼠采用 SPF 级 KM 小鼠 [SCXK(粤)2013—0020], 广州中医药大学(大学城)实验动物中心购买, 均为雄性 6 周龄, 体重 18—22 g, 喂养鼠粮为标准鼠粮, 自由饮水摄食。

KM 小鼠随机分为脂代谢紊乱组和对照组。脂代谢紊乱组造模采用 RBP4 腹腔注射的方法制备脂代谢紊乱模型^[6]。具体实施方案:选用重组人 RBP4, 配置成为 80 μg/ml 的注射液, 分别对造模组 KM 小鼠进行腹腔注射, 每只 KM 小鼠剂量为 1 mL, 每日注射一次, 共持续注射 14 天。同时给予对照组 KM 小鼠腹腔注射 1 mL 生理盐水, 共注射 14 天。第 14 天完成注射后检测 KM 小鼠空腹血 TG (mmol/L) 水平, 采血部位为眼眶静脉丛。脂代谢紊乱造模组 KM 小鼠空腹血 TG 浓度显著高于生理盐水注射对照组(脂代谢紊乱组: 1.71±0.03, 对照组: 1.02±0.01, $P<0.01$), RBP4 诱导的脂代谢紊乱鼠模型制备成功。

1.2 脂代谢紊乱鼠分组及运动方案

对 RBP4 诱导的脂代谢紊乱模型鼠进行随机分组, 设 2 组运动组和 1 组安静对照组, 即一次性运动组 (RBP4 One-time exercise group, ROE 组)、8 周有氧运动组 (RBP4 aerobic exercise group, RAE 组) 和安静对照组 (RBP4 control group, RC 组), 每组 6 只。RAE 组运动处方参照 Ploug T^[10] 的方案执行:首先进行适应性游泳训练, 持续 3 日, 第 4 日开始执行 5 次/周的训练方案, 每次游泳训练时间为 60 min, 均为无负重。ROE 组取材前执行一次相同时间的无负重游泳训练方案。RC 组不执行任何运动训练方案。同时还设置没有进行 RBP4 腹腔注射的正常安静对照组 (normal control group, NC 组), 共 6 只。

1.3 指标检测

RAE 组实验鼠于第 8 周最后一次运动后休

息过夜, 第二日取材。ROE 组亦于第二日执行相同运动处方后, 即刻取材, NC 组和 RC 组亦同时取材。所有实验鼠取材前禁食 12 h, 腹腔注射 10% 水合氯醛, 心脏取血, 取肝组织备用。

ELISA 检测小鼠 KM 血清 RBP4 水平; 酶法测定血 TG 含量。肝脏 TG 含量 (ummol/g 肝组织) 检测采用自动生化分析仪, 取定量肝脏组织预先进行匀浆, 提取组织液中脂质, 再进行离心, 检测离心后上清液, 得出肝脏 TG 含量^[12]。试剂均购买自厦门慧嘉生物公司。

RT-PCR 法检测 ACC1mRNA 表达。一步法提取总 RNA, 内参 β-actin 上游引物: 5'-AGAT-AGACGTGCACAGGAAG-3', 下游引物: 5'-GCTGGCGAACGCCAGAGCT-3'; ACC1 上游引物: 5'CAGGCCGGATGCAGGAGAAG3', 下游引物: 5' GAGATGTGCTGGTCATGTGGAC 3'。逆转录依试剂盒说明书进行。凝胶分析系统分析琼脂糖凝胶电泳结果, 目标基因与内参基因表达的比值为 ACC1mRNA 相对表达量。

免疫组化法检测肝脏 ACC1 蛋白表达。肝组织甲醛固定 24 h, 石蜡切片, 脱蜡、水化和抗原恢复, 内源性过氧化物酶经过封闭液处理, 阻断活性。依次加入一抗、二抗(均采购自厦门慧嘉生物公司), 37 °C 孵育 4 h, PBS 反复冲洗, DBA 显色。目标蛋白的平均光密度值 (OD) 做半定量表达统计, 图像分析系统观测单张切片上任意 5 个视野。

1.4 统计学处理

数据以均数±标准差表示, 各组小鼠的数据之间进行单因素方差分析, LSD 检验。组间数据差异具有显著统计学意义、非常显著统计学意义分别取 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 。数据录入、处理采用 SPSS16.0 统计软件。

2 结果

游泳运动干预第 8 周后, RBP4 处理的各组小鼠血清 RBP4、TG 含量, 肝脏 ACC1mRNA 和蛋白表达与 NC 组相比均显著增加, 差异均具有非常显著意义 ($P<0.01$) (表 1、表 2)。

2.1 一次性运动后血 RBP4、血 TG、肝脏 ACC1 表达和肝脏 TG 变化

与 RC 组相比, ROE 组小鼠血 RBP4 和肝

脏 ACC1mRNA 表达均显著降低，差异均具有非常显著意义 ($P<0.01$) (表 1、图 1 和表 2)。

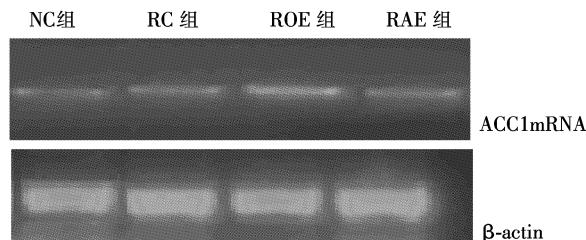


图 1 小鼠肝脏 ACC1mRNA 表达

ROE 组小鼠血 TG、肝脏 ACC1 蛋白表达、肝脏 TG 含量与 RC 组相比，差异均不具有显著性 ($P>0.05$) (表 1、图 2 和表 2)。

2.2 8 周有氧运动后血 RBP4、血 TG、肝脏 ACC1 表达和肝脏 TG 变化

与 RC 组、ROE 组相比，RAE 组小鼠血 RBP4、血 TG、肝脏 TG 含量和肝脏 ACC1 蛋白表达分别显著降低，差异均具有非常显著意义 ($P<0.01$) (表 1、图 2 和表 2)。

表 1 小鼠血清 RBP4、TG 含量变化 ($n=6$)

	NC 组	RC 组	ROE 组	RAE 组
血清 RBP4(mg/dl)	20.44 ± 0.15	$93.10 \pm 2.96^{1)}$	$72.08 \pm 1.90^{1)2)}$	$47.01 \pm 3.17^{1)2)3)}$
血清 TG(mmol/L)	1.00 ± 0.03	$1.69 \pm 0.01^{1)}$	$1.75 \pm 0.04^{1)}$	$1.35 \pm 0.04^{1)2)3)}$

注：与 NC 组相比，1) $P<0.01$ ；与 RC 组相比，2) $P<0.01$ ；与 ROE 组相比，3) $P<0.01$ 。下表同。

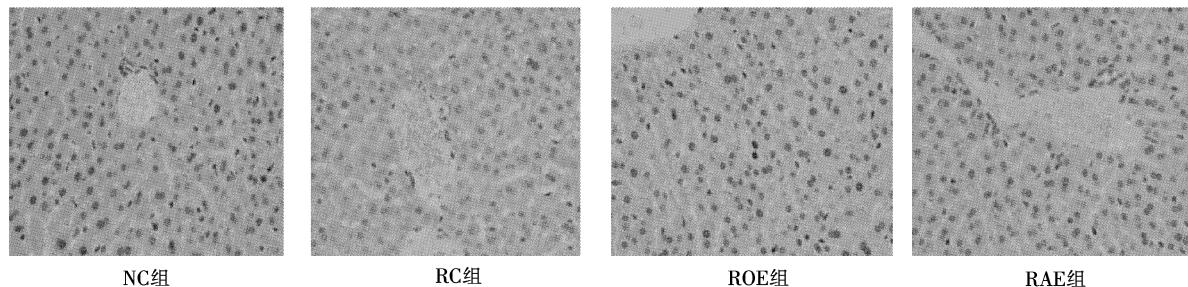


图 2 实验肝脏 ACC1 蛋白表达， $\times 400$

表 2 小鼠肝脏 ACC1mRNA 和蛋白表达变化 ($n=6$)

	NC 组	RC 组	ROE 组	RAE 组
ACC1mRNA 表达	0.22 ± 0.10	$0.89 \pm 0.05^{1)}$	$0.62 \pm 0.04^{1)2)}$	$0.41 \pm 0.02^{1)2)3)}$
ACC1 蛋白表达	0.16 ± 0.01	$0.76 \pm 0.07^{1)}$	$0.75 \pm 0.02^{1)}$	$0.31 \pm 0.03^{1)2)3)}$
肝脏 TG(ummol/g)	10.60 ± 0.50	$50.01 \pm 3.02^{1)}$	$50.70 \pm 4.23^{1)}$	$35.88 \pm 1.87^{1)2)3)}$

3 讨论

3.1 RBP4 与脂代谢紊乱的关系

为了便于研究运动影响 RBP4 诱导的脂代谢紊乱机制，必须排除其他致脂代谢紊乱的因素，建立 RBP4 诱导的脂代谢紊乱模型。本研究参照 Xia M^[5] 等的方法建模，采用了高生理剂量的 RBP4 (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理实验鼠。前期研究报道，典型的代谢综合征的 RBP4 血浆浓度在 20—90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间，2 型糖尿病和肥胖者的 RBP4 血浆浓度在 40—90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间^[9,13,14]，

因此，本研究中 RBP4 的浓度具备了诱导脂代谢异常的条件。研究结果显示：与未经过 RBP4 处理的对照组相比，实验组血 TG 水平显著增加 ($P<0.01$)，诱导产生了脂代谢紊乱，建模成功，为后续运动干预研究奠定了基础。

以往的研究虽然没有揭示 RBP4 与脂代谢紊乱之间的因果关系，但是发现了两者间存在的显著相关性，RBP4 水平和脂代谢指标升高同时存在于肥胖、2 型糖尿病以及代谢综合征者和动物。Xia M^[5] 等则首次揭示了 RBP4 与脂代谢紊乱之间的因果关系，通过体外肝细胞培养和活体

研究发现, 高生理剂量的RBP4能够显著增加C57BL/6J小鼠肝脏脂肪合成调节基因ACC1的表达和活性, 促进肝脏脂肪合成和聚集, 最终导致肝脏TG含量增加, 肝脏VLDL-C向血液分泌量增加, 作为血脂组份的TG水平也显著升高。

3.2 运动对RBP4诱导的脂代谢紊乱鼠血TG的影响

本研究中RBP4诱导的脂代谢紊乱鼠血TG显著增加, 经过运动干预后, 各组实验鼠血TG水平平均没有完全恢复到正常生理水平($P>0.05$)。与未运动的脂代谢紊乱对照组相比, 一次性运动干预也未对脂代谢紊乱鼠的血TG水平产生显著影响($P>0.05$)。然而与未运动的脂代谢紊乱对照组相比, 8周有氧运动则显著降低了血RBP4和血TG水平($P<0.01$), 结果与以往的研究一致^[15-19]。然而其中的机制尚不十分清楚。

以往大量的研究均报道了运动能够调整脂代谢, 降低血TG, 改善血脂异常。与肥胖、代谢综合征、酒精等导致脂代谢异常的传统诱因不同, RBP4是一种新近发现的导致脂代谢异常的因素。肝脏和脂肪均是RBP4主要的分泌来源, 肝脏又是RBP4发挥作用的靶器官, RBP4分别通过自分泌和内分泌作用在肝脏中发挥脂肪合成的调节功能, RBP4通过过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活子1b(PGC-1b)途径激活肝脏脂肪生成路径上的关键应答基因ACC1, 促进肝脏脂肪合成和VLDL-C分泌增加, 血TG水平升高, 导致脂代谢紊乱^[19-21]。

3.3 运动对RBP4诱导的脂代谢紊乱鼠肝脏ACC1表达和脂肪合成的影响

结果显示, 运动能够降低ACC的表达, 改善脂肪合成, 降低血脂水平。16周转轮运动能够显著增加肥胖大鼠肝脏ACC磷酸化水平(非活性蛋白), 减少活性ACC蛋白, 降低TG含量^[20]。7周的跑台训练能够显著增加肥胖性胰岛素抵抗大鼠骨骼肌ACC磷酸化, 抑制骨骼肌的脂肪合成^[21]。而本研究中肝脏ACC1基因和蛋白的异常表达则是由RBP4诱导的, 与他人研究报道中ACC表达升高的肥胖诱因不同。

本研究观察了肝脏脂肪合成的关键应答基因ACC1表达和肝脏TG情况, 来进一步探究运动影响RBP4诱导的脂代谢紊乱机制。研究结果显示, 与未经过RBP4处理的正常对照组相比, 无论是一次性运动还是8周有氧运动干预均未能完全逆转RBP4诱导的脂代谢紊乱鼠肝脏ACC1表达和脂肪合成的病理改变(表1和表2)。然而与未运动的RBP4诱导的脂代谢紊乱鼠相比, 运动还是表现出了一些显著的干预效果, 且一次性运动和8周有氧运动呈现了不同的变化特征。

一次性运动仅仅降低RBP4诱导的脂代谢紊乱鼠肝脏ACC1基因表达($P<0.01$), 未能降低实际发挥脂肪合成促进作用的ACC1蛋白表达($P>0.05$), 因而肝脏脂肪合成过程并未受到实质性的影响, 肝脏TG含量和释放到循环中的TG量也均未发生显著变化($P>0.05$); 8周有氧运动能够显著降低RBP4诱导的脂代谢紊乱鼠肝脏ACC1基因和蛋白表达($P<0.01$), 肝脏TG含量和释放到循环中的TG量均显著降低($P<0.01$)。提示: 8周有氧运动干预后, 受到RBP4自分泌和内分泌联合作用的肝脏脂肪合成过程发生了改变, 尤其是脂肪合成关键调节物ACC1蛋白表达的减少, 是运动改善RBP4诱导的脂代谢紊乱鼠肝脏脂肪合成的主要机制。综合他人有关运动对肥胖ACC表达影响的研究结果, 提示长期有氧运动对于多种原因导致的高ACC1性脂肪合成和脂代谢异常均有较理想的干预效果。

4 结语

高RBP4显著增加实验鼠血TG水平, 作用方式是增加肝脏ACC1基因、蛋白表达和TG的合成, 循环TG释放增加。8周有氧运动能够降低RBP4诱导的脂代谢紊乱鼠血TG水平, 改善脂代谢, 机制是抑制了肝脏ACC1基因和蛋白表达, 降低了TG的合成和含量, 循环TG释放减少。

肝脏的脂肪合成过程复杂, 涉及众多脂肪合成调节因子。本研究仅通过观察肝脏ACC1和TG含量来反映肝脏的脂肪合成过程, 因而尚存在一定的局限性, 有待在后续的研究中不断完善。

参考文献：

- [1] Yang Q , Graham T E , Mody N, et al. Serum retinol binding protein4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2005, 436(7049): 356-362.
- [2] Fitzsimmons R L, Lau P, Muscat G E. Retinoid-related orphan receptor alpha and the regulation of lipid homeostasis[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2012, 130(3-5): 159-168.
- [3] Romanowska A, Lebentsjein D M, Skiba E, et al. Retinol binding protein-4 as a serum biomarker of intrahepatic lipid content in obese children--preliminary report[J]. *Acta Biochim Pol*, 2011, 58(1): 35-38.
- [4] Asha G V, Raja G R M, Mahesh M, et al. Male mice are susceptible to high fat diet-induced hyperglycaemia and display increased circulatory retinol binding protein 4 (RBP4) levels and its expression in visceral adipose depots[J]. *Arch Physiol Biochem*, 2016, 122(1): 19-26.
- [5] Xia M, Liu Y, Guo H, et al. Retinol binding protein 4 stimulates hepatic sterol regulatory element-binding protein 1 and increases lipogenesis through the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1beta-dependent pathway[J]. *Hepatology*, 2013, 58(2): 564-575.
- [6] Vavvas D, Apazidis A, Saha A K, et al. Contraction-induced changes in acetyl-CoA carboxylase and 5'-AMP-activated kinase in skeletal muscle[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(20): 13255-13261.
- [7] Kim K H. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase[J]. *Annu Rev Nutr*, 1997 (17): 77-99.
- [8] Wang Y G, Han X G, Yang Y, et al. Functional differences between AMPK $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits in osteogenesis, osteoblast-associated induction of osteoclastogenesis, and adipogenesis[J]. *Sci Rep*, 2016 (6): 771-779.
- [9] Abahusain M A. Retinol-Binding Protein 4 and Insulin Resistance in Lean, Obese, and Diabetic Subjects[J]. *NEJM*, 2006, 354(24): 2552-2563.
- [10] Soo L, Sung H C, In-Kyong J, et al. Insulin-Sensitizing Effects of Exercise on Adiponectin and Retinol-Binding Protein-4 Concentrations in Young and Middle-Aged Women [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(6): 2263-2268.
- [11] Yu Z, Ye X, Wang J, et al. Associations of physical activity with inflammatory factors, adipokines, and metabolic syndrome in middle-aged and older Chinese people[J]. *Circulation*, 2009, 119 (23): 2969-2977.
- [12] 曾涛, 张翠丽. 氯仿甲醇匀浆测定肝脏甘油三酯含量[J]. *卫生研究*, 2008(5): 550-552.
- [13] Broch M, Vendrell J, Ricart W, et al. Circulating retinol-binding protein-4, insulin sensitivity, insulin secretion, and insulin disposition index in obese and nonobese subjects[J]. *Diabetes Care*, 2007, 30(7): 1802-1806.
- [14] Cho Y M , Youn B S, Lee H, et al. Plasma retinol-binding protein-4 concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes [J]. *Am Diabetes Assoc*, 2006, 29(11): 2457-2461.
- [15] Muenzner M, Tuvia N, Deutschmann C, et al. RBP4 and its Membrane Receptor STRA6 Control Adipogenesis by Regulating Cellular Retinoid Homeostasis and RARalpha Activity[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 39(10): 57-64.
- [16] Berry D C, Noy N. Signaling by vitamin A and retinol-binding protein in regulation of insulin responses and lipid homeostasis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(1): 168-176.
- [17] Ahima R S, Osei S Y. Adipokines in obesity[J]. *Front Horm Res*, 2008, 36(1): 182-197.
- [18] 张明军. RBP4 对游泳训练大鼠脂肪细胞 IR 和 IRS-1 蛋白表达和磷酸化的影响[J]. *天津体育学院学报*, 2010, 25(1): 38-40.
- [19] Comerford K B, Buchan W, Karakas S E. The Effects of Weight Loss on FABP4 and RBP4 in Obese Women with Metabolic Syndrome [J]. *Horm Metab Res*, 2013, 11(5): 68-75.
- [20] Rector R S, Thyfault J P, Morris R T, et al. Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 294(3): 619-626.
- [21] Sriwijitkamol A, Ivy J L, Christ-Roberts C, et al. LKB1-AMPK signaling in muscle from obese insulin-resistant Zucker rats and effects of training[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 290(5): 925-932.

Effects of Exercise on ACC1 Expression and Fat Synthesis of Liver in RBP4-induced Dyslipidemia Mice

ZHANG Ming-jun, WEI Li-xiang

(Department of Physical Education, Huizhou University, Huizhou 516007, China)

Abstract: *Objective:* To study effects of exercise on ACC1 expression and fat synthesis of liver in RBP4-induced dyslipidemia Mice. *Method:* RBP4-induced dyslipidemia mice model established by RBP4 intraperitoneal injection. Model rats are divided in RBP4 One-time exercise group (ROE, 8-weeks RBP4 aerobic exercise group (RAE), and RBP4 control group (RC). *Results:* Serum RBP4 decreases more in group ROE than group RC ($P<0.05$). There are no significant differences in serum TG and liver TG between group ROE and group RC ($P>0.05$). Serum RBP4, TG, and liver TG decreases more in group RAE than group RC and group ROE respectively ($P<0.01$). Liver ACC1mRNA expression decreases more in group ROE and group RAE than group RC ($P<0.01$). There are no significant differences in ACC1 protein expression between group RC and group ROE ($P>0.05$). Liver ACC1 protein expression decreases more in group RAE than group RC and group ROE respectively ($P<0.01$). *Conclusions:* RBP4 increases dramatically ACC1mRNA expression in mice liver, and facilitates liver fat synthesis. 8-weeks aerobic exercise could suppress liver fat synthesis, and improve lipid metabolism. The mechanism involves in lowering RBP4, reducing liver ACC1 expression, and TG synthesis after 8-weeks aerobic exercise.

Key words: exercise; RBP4; ACC1; fat synthesis; fat metabolism