

【基础研究】

作者简介:李凤丽(1983-),女,河南开封人,硕士,主治医师,研究方向:糖尿病、骨代谢。

pathway-related proteins such as PI3K, phosphorylated-PI3K (p-PI3K), AKT, phosphorylated-AKT (p-AKT) in cells of each group were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the relative content of autophagic vacuoles, the proportion of LC3 positive cells, the relative expressions of LC3-II and Beclin-1 proteins was lower ($P < 0.05$), while the relative expressions of p62, p-PI3K and p-AKT proteins were higher in the Adropin group ($P < 0.05$); the relative content of autophagic vacuoles, the proportion of LC3 positive cells, the relative expressions of LC3-II and Beclin-1 proteins in the autophagy agonist group were higher ($P < 0.05$), while the relative expressions of p62, p-PI3K and p-AKT proteins were lower ($P < 0.05$). There was no significant difference in the relative content of autophagic vacuoles, the proportion of LC3 positive cells and the relative expressions of LC3-II, Beclin-1, p62, p-PI3K and p-AKT proteins between the Adropin + autophagy agonist group and the control group ($P > 0.05$). Compared with the Adropin group, the relative content of autophagic vacuoles, the proportion of LC3 positive cells, the relative expressions of LC3-II and Beclin-1 proteins in the autophagy agonist group and Adropin + autophagy agonist group were higher ($P < 0.05$), while the relative expressions of p62, p-PI3K and p-AKT proteins were lower ($P < 0.05$). Compared with the autophagy agonist group, the relative content of autophagic vacuoles, the proportion of LC3 positive cells, the relative expressions of LC3-II and Beclin-1 proteins in the Adropin + autophagy agonist group were lower ($P < 0.05$), while the relative expressions of p62, p-PI3K and p-AKT proteins was higher ($P < 0.05$). There was no significant difference in the relative expressions of PI3K and AKT proteins between the any two groups ($P > 0.05$).

Conclusion Adropin can inhibit autophagy of adipocytes, and its mechanism may be involve in activating PI3K/AKT pathway.

Key words: Adropin; adipocytes; phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B; autophagy

随着生活水平的提高,我国居民高能量食物的摄入不断增加,机体摄入的过剩糖类、脂质等转化为脂类物质过量积累,导致肥胖发生率越来越高,进而引起代谢性疾病的发生,如糖尿病、高血压、脂肪肝和冠状动脉粥样硬化性心脏病等,严重威胁人类健康^[1-2]。Adropin 是由能量平衡基因 (energy homeostasis associated gene, Enho) 编码的分泌性蛋白,在不同种属间具有高度同源性,其主要表达于胰腺、肝脏、肾脏、冠状动脉、脐动脉和脑组织等^[3]。研究显示,Adropin 可抑制脂类生成及肝脏中脂肪的合成,可能是影响机体肥胖的重要因素之一^[4]。Adropin 不仅具有调节脂类代谢、改善胰岛素抵抗的作用,同时,还能通过调节葡萄糖介导的胰岛素释放而调节蛋白质和碳水化合物的代谢^[5-7]。研究发现,脂类可以参与细胞自噬,而自噬可调控脂质代谢,纠正肥胖导致的代谢紊乱,进而治疗肥胖^[8-9],因此,Adropin 可能通过调控自噬治疗肥胖。但目前 Adropin 对脂肪细胞自噬的影响尚不明确。磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 通路参与介导细胞自噬,miR-138 可通过靶向抑制人黑色素瘤 A2058 细胞中 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1) 蛋白的表达而抑制 PI3K/AKT/雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路,进而促进细胞自噬,诱导细胞凋亡; Adropin 可通过下调细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal regulated kinase 1 and 2, Erk1/2) 表达及上调 PI3K/AKT 通路而抑制人主动脉平滑肌细胞的迁移和增殖^[10-11]; 因此考虑, Adropin 可能通过调节 PI3K/AKT 通路而介导脂肪细胞自噬。本研究以 Adropin 处理成熟脂肪细胞,旨在探讨其对脂肪细胞自噬及 PI3K/AKT 通路的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞 小鼠胚胎成纤维前脂肪细胞株 3T3-L1 (前体脂肪细胞) 购自上海酶研生物科技有限公司,保存于郑州市自身免疫性内分泌疾病重点实验室。

1.2 主要试剂与仪器 Adropin 购自美国 Selleck 公司,西罗莫司购自美国 MedChemexpress 公司,异丁基-甲基-黄嘌呤、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-di-amidino-2-phenylindole, DAPI) 购自上海生工生物工程股份有限公司,地塞米松、油红 O 购自上海恒斐生物科技有限公司,胰岛素购自上海研卉生物科技有限公司,达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、胎牛血清、胰蛋白酶、青链霉素购自美国 Gibco 公司,细胞自噬染色检测试剂盒购自北京雷根生物技术有限公司,抗微管相关蛋白轻链 3 (anti-microtubule-associated protein 1 light chain3, Anti-LC3)、Anti-Beclin1、Anti-P62、Anti-PI3K、抗磷酸化 PI3K (anti-phosphorylated-PI3K, Anti-p-PI3K)、Anti-AKT、抗磷酸化 AKT (anti-phosphorylated-AKT, Anti-p-AKT)、Anti-GAPDH、Alexa Fluor 488 标记的羊抗兔二抗购自美国 Abcam 公司,二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒、蛋白裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司,单丹磺酰尸胺 (monodansylcadaverine, MDC) 染色试剂盒购自北京雷根生物技术有限公司; Olympus CKX41 显微镜、CKX53 倒置相差显微镜、BX63 自动荧光显微镜购自日本 Olympus 公司, Centrifuge 5424R 低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司, 1659001 蛋白电泳仪、Trans-Blot SD 半干转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 培养基配置 500 mL 高糖 DMEM 中加入体积分数 10% 胎牛血清 50 mL、 $100 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青链霉

素 5 mL,震荡混匀后即为完全培养基;向 500 mL 完全培养基中加入 0.25 mmol 异丁基-甲基-黄嘌呤、5 μmol 地塞米松、5 μg 胰岛素,即为诱导分化培养基 A;向 500 mL 完全培养基中加入 5 μg 胰岛素即为诱导分化培养基 B。

1.4 细胞培养、诱导分化及分组 取原装细胞瓶中保存的 3T3-L1 细胞,接种于含有 5 mL 完全培养基的 25 cm^2 培养瓶中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 的恒温培养箱中培养,2 d 换完全培养基 1 次,待细胞在瓶底铺至 70% ~ 80% 时,用胰蛋白酶消化,然后接种于 24 孔板中,待细胞铺满培养孔,参照文献[12]方法进行诱导分化:将 24 孔板中的完全培养基更换为诱导分化培养基 A,培养 48 h 后更换为诱导分化培养基 B,继续培养 48 h,弃去诱导分化培养基 B,更换为完全培养基,继续培养 10 d,每 2 d 更换 1 次,诱导分化结束后弃去培养基,采用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗 3 次,使用 40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛 1 mL 固定 2 h,加入体积分数 0.3% 油红 O 染液 250 μL ,室温染色 1 h,吸去染液,加入体积分数 60% 异丙醇 250 μL 处理 5 min,在 200 倍光学显微镜下观察脂滴着色情况,观察到细胞中有红色脂滴即表示脂肪细胞分化成熟。取诱导分化成熟的脂肪细胞,经胰蛋白酶消化后接种于 3 个 24 孔板中,随机分为对照组、Adropin 组、自噬激动剂组及 Adropin + 自噬激动剂组;对照组细胞不予特殊处理,Adropin 组细胞加入 Adropin(终浓度为 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[13],自噬激动剂组加入西罗莫司(终浓度为 100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[14],Adropin + 自噬激动剂组细胞加入 Adropin(终浓度为 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和西罗莫司(终浓度为 100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$),继续培养 2 h,以备后续实验使用。

1.5 MDC 染色检测各组细胞自噬空泡 取 1 个 24 孔板的细胞,弃去培养基, PBS 漂洗,使用 MDC 染色试剂盒染色,具体操作步骤参照说明书进行,荧光显微镜进行观察,细胞中的自噬空泡被染为绿色。每组细胞随机选取 5 个视野,计数自噬空泡数目,得出各组细胞自噬空泡相对含量,以对照组自噬空泡数为参照,设定为 100%,实验组细胞自噬空泡相对含量 = 实验组自噬空泡数/对照组自噬空泡数 $\times 100\%$,实验重复 3 次,取均值。

1.6 免疫荧光染色检测各组细胞中微管相关蛋白轻链 3 (microtubule associated protein light chain 3, LC3) 表达 取 1 个 24 孔板的细胞,以 PBS 漂洗,40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛固定,牛血清白蛋白(含有体积分数 0.5% TritonX-100)封闭,然后经 LC3 一抗、Alexa Fluor 488 标记的羊抗兔二抗、DAPI 染料分别避光孵育后,在荧光显微镜下观察细胞着色情况,DAPI 着色于细胞核,细胞核为蓝色;LC3 着色于细胞质,LC3 阳性细胞的细胞质为红色。每组随机选

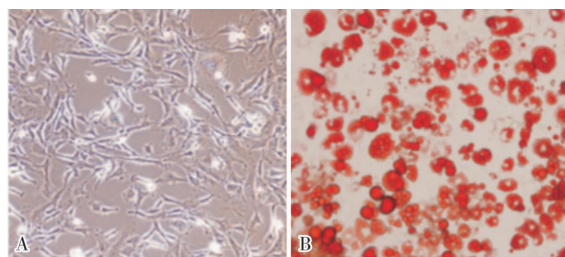
取 5 个视野,分别计数总细胞数(即 DAPI 阳性细胞)、LC3 阳性细胞数,计算各组 LC3 阳性细胞所占比例,LC3 阳性细胞比例 = LC3 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。实验重复 3 次,取均值。

1.7 Western blot 法检测各组细胞自噬相关蛋白及 PI3K/AKT 通路蛋白表达 取 1 个 24 孔板的细胞,胰蛋白酶消化处理后,收集各组细胞,加入 200 μL 蛋白裂解液,4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解后提取总蛋白,以 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度,具体操作步骤参照说明书进行。蛋白置于水浴锅中煮沸 5 min,根据测定结果,各组分别取含 20 μg 蛋白的样品液在电泳仪中进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后将蛋白转移至聚偏氟乙烯膜上,以脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,依据目的蛋白相对分子质量截取蛋白条带置于小盒中,加入相应一抗(Beclin-1、LC3-I、LC3-II、p62、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT,以 GAPDH 作为内参,1:1 000 比例稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;加入二抗(1:5 000),室温孵育 1~2 h,采用增强化学发光法显色,以 Tanon 软件拍摄图像并分析 Beclin-1、LC3-II、p62、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT 蛋白的相对表达量。实验重复 3 次,取均值。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差异法 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3T3-L1 细胞诱导分化结果 结果见图 1。3T3-L1 细胞形态为梭形,贴壁生长。诱导分化 10 d 后,油红 O 染色,细胞中出现红色脂滴,表明细胞已分化为成熟脂肪细胞。



A: 3T3-L1 细胞; B: 成熟脂肪细胞。

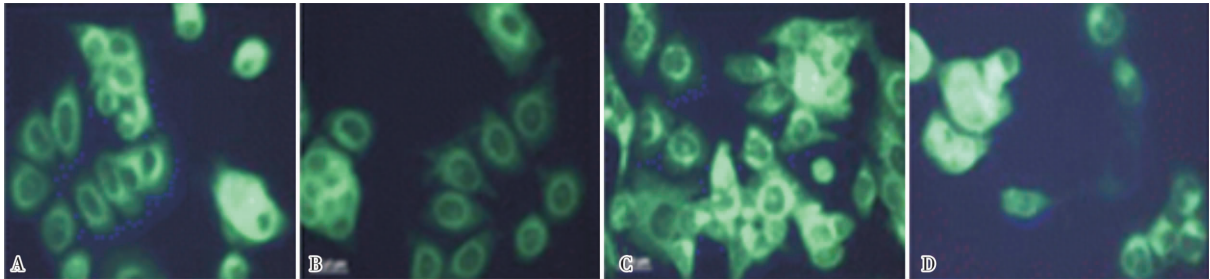
图 1 3T3-L1 细胞诱导分化成熟脂肪细胞的鉴定(油红 O 染色, $\times 200$)

Fig. 1 Identification of mature adipocytes induced by 3T3-L1 cells (Oil red O staining, $\times 200$)

2.2 各组细胞中自噬空泡相对含量比较 结果见图 2。对照组、Adropin 组、自噬激动剂组、Adropin + 自噬激动剂组细胞中自噬空泡相对含量分别为 $(100.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(23.63 \pm 5.21)\%$ 、 $(207.59 \pm 51.33)\%$ 、 $(92.78 \pm 20.22)\%$ 。与对照组比较,Adropin 组细胞中自噬空泡相对含量降低,自噬

激动剂组细胞中自噬空泡相对含量升高,差异有统计
学意义($P<0.05$);Adropin + 自噬激动剂组与对照组
细胞自噬空泡相对含量比较差异无统计学意义($P>$
 0.05)。与 Adropin 组比较,自噬激动剂组、Adropin +

自噬激动剂组细胞中自噬空泡相对含量显著升高,差
异有统计学意义($P<0.05$)。与自噬激动剂组比较,
Adropin + 自噬激动剂组细胞中自噬空泡相对含量显
著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。



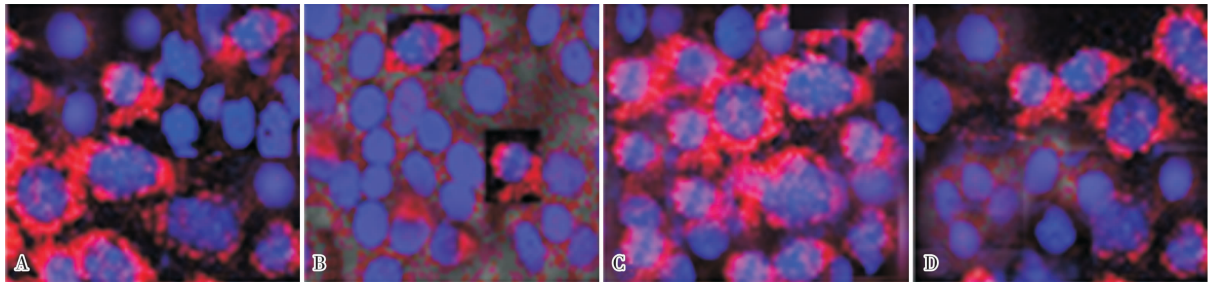
A: 对照组;B: Adropin 组;C: 自噬激动剂组;D: Adropin + 自噬激动剂组。

图 2 各组细胞中自噬空泡表达结果 (MDC 染色, $\times 400$)

Fig.2 expression of autophagy vacuole in the cells of each group (MDC staining , $\times 400$)

2.3 各组细胞 LC3 阳性细胞比例比较 结果见图
3。对照组、Adropin 组、自噬激动剂组、Adropin + 自
噬激动剂组 LC3 阳性细胞比例分别为 ($28.93 \pm$
 5.13)%、(10.03 ± 2.23)%、(66.57 ± 7.79)%、
(26.08 ± 4.92)%。与对照组比较,Adropin 组细胞
LC3 阳性细胞比例显著降低,自噬激动剂组细胞
LC3 阳性细胞比例显著升高,差异有统计

学意义($P<0.05$);Adropin + 自噬激动剂组与对照组细胞
LC3 阳性细胞比例比较差异无统计学意义($P>$
 0.05)。与 Adropin 组比较,自噬激动剂组、
Adropin + 自噬激动剂组细胞 LC3 阳性细胞比例显
著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与自噬激
动剂组比较,Adropin + 自噬激动剂组细胞 LC3 阳性
细胞比例显著降低,差异有统计



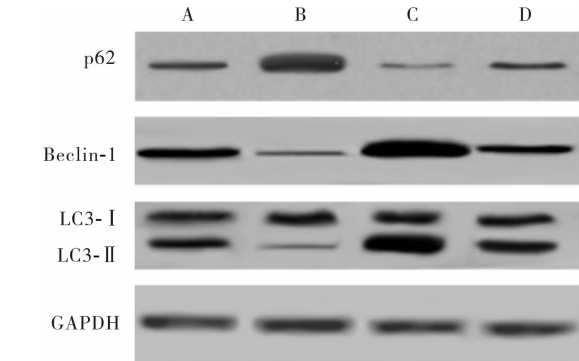
A: 对照组;B: Adropin 组;C: 自噬激动剂组;D: Adropin + 自噬激动剂组。

图 3 各组细胞 LC3 阳性细胞染色结果 (免疫荧光染色, $\times 400$)

Fig.3 Results of LC3 positive cell staining in each group(immunofluorescence staining , $\times 400$)

2.4 各组细胞中自噬相关蛋白相对表达量比较
结果见图 4 和表 1。与对照组比较,Adropin 组
细胞中 Beclin-1、LC3- II 蛋白相对表达量显著降
低,p62 蛋白相对表达量显著升高,自噬激动剂组
细胞中 Beclin-1、LC3- II 蛋白相对表达量显著升
高,p62 蛋白相对表达量显著降低,差异均有统计
学意义($P<0.05$);Adropin + 自噬激动剂组与对
照组细胞中 Beclin-1、LC3- II、p62 蛋白相对表
达量比较差异无统计

学意义($P>0.05$)。与 Adropin 组比较,自噬激动剂组、Adropin + 自噬激
动剂组细胞中 Beclin-1、LC3- II 蛋白相对表达量
显著升高,p62 蛋白相对表达量显著降低,差异有
统计



A: 对照组;B: Adropin 组;C: 自噬激动剂组;D: Adropin + 自噬激动剂组。

图 4 各组细胞中自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3、p62 的表达
Fig.4 Expression of autophagy-related proteins Beclin-1,
LC3 and p62 in cells of each group(Western blot)

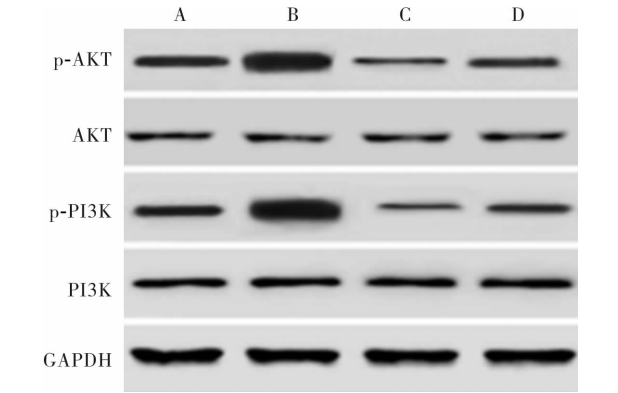
表 1 4 组细胞中自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3-II、P62 相对表达量比较

Tab.1 Comparison of relative expression of autophagy-related proteins Beclin-1, LC3-II and p62 in the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LC3-II	Beclin-1	p62
对照组	3	1.03 ± 0.31	0.92 ± 0.19	0.69 ± 0.07
Adropin 组	3	0.17 ± 0.03 ^a	0.13 ± 0.02 ^a	1.27 ± 0.29 ^a
自噬激动剂组	3	2.01 ± 0.39 ^{ab}	1.59 ± 0.23 ^{ab}	0.14 ± 0.04 ^{ab}
Adropin + 自噬激动剂组	3	1.01 ± 0.32 ^{bc}	0.88 ± 0.21 ^{bc}	0.64 ± 0.15 ^{bc}

注:与对照组比较^a $P < 0.05$;与 Adropin 组比较^b $P < 0.05$;与自噬激动剂组比较^c $P < 0.05$ 。

2.5 各组细胞中 PI3K/AKT 通路相关蛋白相对表达量比较 结果见图 5、表 2。与对照组比较, Adropin 组细胞中 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达量显著升高,自噬激动剂组细胞中 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达量显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Adropin + 自噬激动剂组与对照组细胞中 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 Adropin 组比较,自噬激动剂组、Adropin + 自噬激动剂组细胞中 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达量显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与自噬激动剂组比较,Adropin + 自噬激动剂组细胞 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达量显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。4 组细胞中 PI3K、AKT 蛋白相对表达量两两比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。



A:对照组;B:Adropin 组;C:自噬激动剂组;D:Adropin + 自噬激动剂组。
图 5 各组细胞中 PI3K/AKT 通路蛋白 p-PI3K、PI3K、AKT、p-AKT 的表达 (Western blot)

Fig. 5 Expression of PI3K/AKT pathway proteins p-PI3K, PI3K, AKT and p-AKT in cells of each group (Western blot)

表 2 4 组细胞中 PI3K/AKT 通路蛋白 p-PI3K、PI3K、AKT、p-AKT 相对表达量比较

Tab.2 Comparison of relative expression of PI3K/AKT pathway proteins p-PI3K, PI3K, AKT and p-AKT in cells among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-PI3K	PI3K	p-AKT	AKT
对照组	3	0.98 ± 0.12	0.53 ± 0.11	1.92 ± 0.14	0.46 ± 0.13
Adropin 组	3	1.54 ± 0.25 ^a	0.51 ± 0.13	2.96 ± 0.61 ^a	0.44 ± 0.15
自噬激动剂组	3	0.38 ± 0.05 ^{ab}	0.54 ± 0.12	0.69 ± 0.03 ^{ab}	0.45 ± 0.12
Adropin + 自噬激动剂组	3	0.91 ± 0.23 ^{bc}	0.52 ± 0.11	1.40 ± 0.38 ^{bc}	0.47 ± 0.14

注:与对照组比较^a $P < 0.05$;与 Adropin 组比较^b $P < 0.05$;与自噬激动剂组比较^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

肥胖与多种代谢性疾病如 2 型糖尿病、脂肪肝和心血管疾病等的发生相关,因此,对肥胖及代谢紊乱相关疾病的研究具有重要临床意义^[15]。Adropin 参与体内脂质代谢,敲除小鼠 Enho 基因可使小鼠脂肪组织增加 50%,引起小鼠肥胖;过表达 Enho 基因或以 Adropin 治疗后可减少脂肪合成,减轻其体质量;因此,Enho 基因编码的 Adropin 可能具有调节脂肪细胞的作用^[16]。机体内的能量物质氨基酸、葡萄糖与脂滴等可通过不同途径参与细胞自噬,研究发现,敲除小鼠自噬相关基因 7 可使脂肪组织的自噬活性降低,脂肪组织减少,提示自噬对调节机体脂质代谢平衡至关重要^[17]。

3T3-L1 是一种胚胎成纤维细胞,可诱导分化为成熟脂肪细胞,因此又称为前体脂肪细胞,是研究脂肪细胞分化调控机制的经典模型细胞,3T3-L1 需要经过 2 个细胞周期的增殖后再在成脂分化诱导下经过 2 次诱导分化才能培养为成熟脂肪细胞。本研究以 3T3-L1 诱导分化的成熟脂肪细胞作为研究对象,将 3T3-L1 经过 2 次诱导分化培养基的培养,结果显示,多数 3T3-L1 细胞中出现被油红 O 着色的小液滴,表明大多数细胞已经可以形成脂滴,分化为成熟脂肪细胞,因此,3T3-L1 诱导分化 10 d 后即可进行后续实验。

MDC 是一种嗜酸性染色剂,可以染色自噬空泡结构,用于检测自噬体的形成。LC3 是自噬体上表达的蛋白,可作为自噬体的检测标志物,其包含 2 种蛋白亚基,即 LC3-I 和 LC3-II;内质网合成的前体 LC3 被 Atg4B 剪切为 LC3-I,自噬发生过程中,LC3 蛋白由 LC3-I 转为 LC3-II,LC3-II 主要定位于自噬小体膜结构上,稳定表达于自噬体膜上,其与自噬小体的形成密切相关^[18-19]。本研究结果显示,与对照组比较,Adropin 组细胞中自噬空泡相对含量、LC3 阳

性细胞比例、LC3-II 蛋白相对表达量显著降低,自噬激动剂组细胞中自噬空泡相对含量、LC3 阳性细胞比例、LC3-II 蛋白相对表达量显著升高;与 Adropin 组比较,自噬激动剂组、Adropin + 自噬激动剂组细胞中自噬空泡相对含量、LC3 阳性细胞比例、LC3-II 蛋白相对表达量显著升高;与自噬激动剂组比较,Adropin + 自噬激动剂细胞中自噬空泡相对含量、LC3 阳性细胞比例、LC3-II 蛋白相对表达量显著降低;此结果表明,Adropin 干预不仅可降低自噬空泡相对含量,同时也可降低 LC3 阳性细胞比例和 LC3-II 蛋白表达,提示 Adropin 干预可能对自噬小体形成具有一定的抑制作用。但是,单独分析 2LC3-II 含量不能有效反映自噬作用,同时,由于细胞中的酸性物质不只包括自噬空泡,所以,本研究通过检测细胞 Beclin-1、p62 蛋白相对表达情况,进一步分析 Adropin 干预对脂肪细胞自噬的影响。

Beclin-1 是酵母 ATG6 的同系物,也是哺乳动物参与自噬的特异性基因,可与 III 型 PIK3 形成复合体,介导自噬相关蛋白 ATG 定位于自噬泡,从而促进自噬,Beclin-1 基因表达减少或活性降低均会对自噬产生抑制作用,因此,多位学者认为其可作为反映自噬的指标^[20-21]。p62 是一种由应激诱导产生的细胞内蛋白,可连接 LC3 与聚泛素化蛋白,通过泛素信号途径将受损的线粒体、聚合的蛋白及细菌等转运到自噬小体,被自噬溶酶体降解;当自噬激活时,自噬囊泡中 p62 蛋白水平降低;当自噬被抑制时,自噬囊泡中 p62 蛋白水平升高^[22]。本研究结果显示,与对照组比较,Adropin 组细胞中 Beclin-1 蛋白相对表达量显著降低,p62 蛋白相对表达量显著升高;与对照组比较,自噬激动剂组细胞中 Beclin-1 蛋白相对表达量显著升高,p62 蛋白相对表达量显著降低;与 Adropin 组比较,自噬激动剂组、Adropin + 自噬激动剂组细胞中 Beclin-1 蛋白相对表达量显著升高,p62 蛋白相对表达量显著降低;与自噬激动剂组比较,Adropin + 自噬激动剂组细胞中 Beclin-1 蛋白相对表达量显著降低,p62 蛋白相对表达量升高。此结果表明,Adropin 可减少 Beclin-1 蛋白表达,增加 p62 蛋白表达,从而抑制脂肪细胞自噬。

AKT 是 PI3K 下游的丝/苏氨酸蛋白激酶,AKT 几乎在所有组织中均有表达,可保护细胞应对损伤,若敲除 AKT 基因,则细胞保护作用将会被抑制,最终导致细胞凋亡^[23]。PI3K/AKT 通路是调节细胞自噬的主要通路之一,该通路被激活后可抑制人前列腺癌细胞自噬,进而促使其凋亡^[24]。有研究显示,敲除小鼠 Enho 基因可降低其血清中 Adropin 水平,降低 AKT 磷酸化,引起小鼠肺损伤^[25]。因而推测,Adropin 可调节 PI3K/AKT 信号活性,且可能是 Adropin 抑制脂肪细胞自噬的作用机制。本研究结

果显示,与对照组比较,Adropin 组细胞中 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达量升高,自噬激动剂组细胞中 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达量显著降低;与 Adropin 组比较,自噬激动剂组、Adropin + 自噬激动剂组细胞中 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达量显著降低;与自噬激动剂组比较,Adropin + 自噬激动剂细胞 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达量升高;而 4 组细胞中 PI3K、AKT 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义。以上结果表明,Adropin 可激活 PI3K/AKT 信号,揭示 PI3K/AKT 信号通路激活可能是 Adropin 抑制脂肪细胞自噬的作用机制。

综上所述,外源性 Adropin 可抑制脂肪细胞自噬,其作用机制可能与激活 PI3K/AKT 信号通路有关。但与自噬相关的通路及机制还有许多,Adropin 是否通过其他通路或分子协同调控脂肪细胞自噬尚不清楚,将是下一步研究的重点。

参考文献:

[1]

ČURIĆ M, KLOBUČARMAJANOVIĆ S, DETEL D, *et al.* Endocrine disruptors and obesity[J]. *Curr Obes Rep*, 2017, 6(1): 18-27.

[2]

DUAN W, WANG Z. Dispositional mindfulness promotes public health of the obesity population by reducing perceived discrimination and weight stigma concerns[J]. *J Public Health*, 2019, 27(2): 195-202.

[3]

AYDIN S, EREN M N, YILMAZ M, *et al.* Adropin as a potential marker of enzyme-positive acute coronary syndrome[J]. *Cardiovasc J Afr*, 2017, 28(1): 40-47.

[4]

SALTIEL A R, OLEFSKY J M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(1): 1-4.

[5]

CELIK A, BALIN M, KOBAT M A, *et al.* Deficiency of a new protein associated with cardiac syndrome X, called adropin[J]. *Cardiovasc Ther*, 2013, 31(3): 174-178.

[6]

AKCILAR R, KOC AK F E, SIMSEK H, *et al.* Antidiabetic and hypolipidemic effects of adropinin streptozotocin-induced type 2 diabetic rats[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2016, 116(2): 100-105.

[7]

ZHANG Y N, LI A R, CHEN X D, *et al.* Research progress and clinical significance of adropin peptide[J]. *Med Recapitulate*, 2016, 22(1): 20-23.

[8]

VAN NIEKERK G, DU TOIT A, LOOS B, *et al.* Nutrient excess and autophagic deficiency: explaining metabolic diseases in obesity[J]. *Metabolism*, 2018, 82(1): 14-21.

[9]

MAIXNER N, BECHOR S, VERSHININ Z, *et al.* Transcriptional dysregulation of adipose tissue autophagy in obesity[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2016, 31(4): 270-282.

[10]

MENG F, ZHANG Y, LI X, *et al.* Clinical significance of miR-138 in patients with malignant melanoma through targeting of PDK1 in the PI3K/AKT autophagy signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1655-1662.

[11]

SATO K, YAMASHITA T, SHIRAI R, *et al.* Adropin contributes to anti-atherosclerosis by suppressing monocyte-endothelial cell adhesion and smooth muscle cell proliferation[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1293.

[12]

张韶君, 遆红燕, 郭亚莉, 等. 锌 α2 糖蛋白通过调节脂肪细胞自噬增强胰岛素信号通路表达的作用及机制研究[J]. *中国药物与临床*, 2018, 18(12): 2120-2122.

2017,37(3):495-500.

[7] SHENG Z,XU Y,LI F, *et al.* CSN5 attenuates Ang II-induced cardiac hypertrophy through stabilizing LKB1 [J]. *Exp Cell Res*, 2019,376(1):11-17.

[8] TANAKA Y,OBATA K,OHMORI T, *et al.* Angiotensin II induces automatic activity of the isolated guinea pig pulmonary vein myocardium through activation of the IP3 receptor and the Na⁺-Ca²⁺ exchanger[J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(7):E1768.

[9] YU X J,HUANG Y Q,SHAN Z X, *et al.* MicroRNA-92b-3p suppresses angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy via targeting HAND2[J]. *Life Sci*,2019,232:116635.

[10] DONG Z X,WAN L,WANG R J, *et al.* (-)-Epicatechin suppresses angiotensin II-induced cardiac hypertrophy via the activation of the SPI1/SIRT1 signaling pathway[J]. *Cell Physio Biochem*,2017,41(5):2004-2015.

[11] PARIZADEH S M,JAFARZADEH-ESFEHANI R,GHANDEHARI M, *et al.* Circulating and tissue microRNAs as biomarkers for ovariancancer prognosis[J]. *Curr Drug Targets*,2019,20(14):1447-1460.

[12] CHENG J Z,CHEN J J,WANG Z G, *et al.* MicroRNA-185 inhibits cell proliferation while promoting apoptosis and autophagy through negative regulation of TGF-β/mTOR axis and HOXC6 in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Biomark*, 2018,23(1):107-123.

[13] LI L,WANG X,LIU D. MicroRNA-185 inhibits proliferation, migration and invasion in human osteosarcoma MG63 cells by targeting vesicle-associated membrane protein 2 [J]. *Gene*, 2019, 696:80-87.

[14] JIANG X,NING Q,WANG J. Angiotensin II induced differenti-

ally expressed microRNAs in adult rat cardiac fibroblasts[J]. *J Physiol Sci*,2013,63(1):31-38.

[15] WANG X,YANG C,LIU X, *et al.* Ghrelin alleviates angiotensin II-induced H9c2 apoptosis; impact of the miR-208 family[J]. *Med Sci Monit*,2018,24:6707-6716.

[16] 柳培雨,田毅. 血管紧张素转换酶抑制剂与心肌缺血再灌注的细胞凋亡[J]. *医学与哲学*,2010,31(9):41-43.

[17] ZHANG D,LEE H,CAO Y, *et al.* miR-185 mediates lung epithelial cell death after oxidative stress[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2016,310(7):700-710.

[18] KIM J O,KWON E J,SONG D W, *et al.* miR-185 inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by targeting Na⁺/H⁺ exchanger-1 in the heart[J]. *BMB Rep*,2016,49(4):208-213.

[19] NAGATA S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells[J]. *Annual Rev Immunol*,2018,36(1):489-517.

[20] WEI Q,DENG H,CUI H, *et al.* A mini review of fluoride-induced apoptotic pathways[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*,2018, 25(34):33926-33935.

[21] MAILLET M,LYNCH J M,SANNA B, *et al.* Cdc42 is an antihypertrophic molecular switch in the mouse heart[J]. *J Clin Invest*,2009,119(10):3079-3088.

[22] LIU Y,WANG J,LI J, *et al.* Deletion of Cdc42 in embryonic cardiomyocytes results in right ventricle hypoplasia [J]. *Clin Transl Med*,2017,6(1):40.

[23] XU X,KONG L,SONG X, *et al.* Effect of Cdc42 on myocardial ischemia-reperfusion of rats[J]. *Cell Mol Biology*,2017,63(7):31-34.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:杨 博)

(上接第 1023 页)

[13] GAO S,MCMILLAN R P,ZHU Q, *et al.* Therapeutic effects of adropin on glucose tolerance and substrate utilization in diet-induced obese mice with insulin resistance[J]. *Mol Metab*,2015,4(4):310-324.

[14] NIU H,WANG J,LI H, *et al.* Rapamycin potentiates cytotoxicity by docetaxel possibly through downregulation of Survivin in lung cancer cells[J]. *J Exp Clin Canc Res*,2011,30(1):28.

[15] BAÑOS R M,OLIVER E,NAVARRO J, *et al.* Efficacy of a cognitive and behavioral treatment for childhood obesity supported by the ETIOBE web platform[J]. *Psychol Health Med*,2019,24(6):703-713.

[16] 刘群,陈莎莎,刘守胜,等. Adropin 在非酒精性脂肪性肝病中的研究进展[J]. *中国肝病杂志:电子版*,2018,10(2):12-16. DOI: 10.3969/j. issn. 1674-7380. 2018. 02. 002.

[17] 柏雪,王建萍,丁雪梅,等. 氨基酸缺乏诱导细胞自噬的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 C1 信号通路机制研究进展[J]. *动物营养学报*,2017,29(3):28-33.

[18] ZHANG Q,WANG D,ZHANG H, *et al.* Detection of autophagy processes during the development of nonarticulated laticifers in *Euphorbia kansui* Liou[J]. *Planta*,2018,247(4):845-861.

[19] 李蓉,杜军辉,姚杨,等. 血管内皮细胞生长因子抑制剂对视网膜血管内皮细胞自噬的促进作用[J]. *眼科新进展*,2018, 38(10):935-939.

[20] 杨万霞,苏强,邢爱华,等. 饥饿对 Beclin-1 依赖的 Ana-1 细胞自噬和凋亡的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*,2018,44(4):18-22.

[21] MAEJIMA Y,ISOBE M,SADOSHIMA J. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*. 2016,95(1):19-25.

[22] 魏砚明. 多种细胞自噬调节剂对自噬标记物 LC3 II 及 p62 表达的影响[J]. *中国药科大学学报*,2018,49(3):341-347.

[23] ZHANG Y,GENG Y,HE J, *et al.* Tanshinone II A induces apoptosis and autophagy in acute monocytic leukemia via downregulation of PI3K/Akt pathway[J]. *Am J Transl Res*,2019,11(5):2995-3006.

[24] KIM K Y,PARK K I,KIM S H, *et al.* Inhibition of autophagy promotes salinomycin-induced apoptosis via reactive oxygen species-mediated PI3K/AKT/mTOR and ERK/p38 MAPK-dependent signaling in human prostate cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*,2017, 18(5):1088.

[25] GAO F,FANG J,CHEN F, *et al.* Enho mutations causing low adropin: a possible pathomechanism of MPO-ANCA associated lung injury[J]. *Ebiomedicine*,2016,9:324-335.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:杨 博)