

妊娠糖尿病患者血清、脐血及胎盘组织中 Visfatin 和 Chemerin 的表达与胰岛素抵抗发生机制的研究

王伟¹, 张静¹, 浦春² (1. 阜阳市人民医院检验科, 安徽阜阳 236004; 2. 皖南医学院, 安徽芜湖 241000)

摘要: **目的** 探讨妊娠糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 患者血清、脐血及胎盘组织中的内脏脂肪组织 (Visfatin)、脂肪因子趋化素 (Chemerin) 的表达变化及与患者发生胰岛素抵抗的关系。**方法** 选取阜阳市人民医院 2018 年 12 月 ~ 2020 年 4 月妊娠分娩的 GDM 孕妇 100 例作为 GDM 组、糖耐量正常孕妇 100 例作为 NGT 组。统计分析两组的一般资料、血糖指标、血脂指标, 检测两组研究对象血清、脐血、胎盘组织中的 Visfatin, Chemerin 表达水平, 分析 Visfatin, Chemerin 表达与胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 的相关性; 通过重组慢病毒载体构建 Visfatin, Chemerin 过表达的 3T3-L1 脂肪细胞, 分析 Visfatin, Chemerin 过表达对 3T3-L1 脂肪细胞增殖、葡萄糖消耗量、Akt 及 pAkt 蛋白表达的影响。**结果** GDM 组的 FPG (5.84 ± 0.52 mmol/L), Fins (18.96 ± 3.75 μ U/ml), HbA1c ($6.42\% \pm 0.89\%$), HOMA-IR (2.48 ± 0.66), TC (5.22 ± 0.57 mmol/L) 和 TG (2.41 ± 0.43 mmol/L) 测定值均高于 NGT 组 (4.61 ± 0.40 mmol/L, 12.53 ± 2.20 μ U/ml, $5.31\% \pm 0.70\%$, 1.51 ± 0.42 , 4.86 ± 0.49 mmol/L 和 2.18 ± 0.34 mmol/L), 差异具有统计学意义 ($t=18.749$, 14.789 , 9.803 , 12.399 , 4.789 , 4.196 , 均 $P < 0.05$); GDM 组和 NGT 组的 HDL-C (1.64 ± 0.22 mmol/L vs 1.70 ± 0.24 mmol/L), LDL-C (3.23 ± 0.67 mmol/L vs 3.10 ± 0.54 mmol/L) 和 ALB (37.84 ± 3.02 g/L vs 38.44 ± 3.30 g/L) 测定值比较, 差异均无统计学意义 ($t=-1.843$, 1.511 , -1.341 , 均 $P > 0.05$); GDM 组的血清、脐血、胎盘组织中的 Visfatin (10.55 ± 2.41 pg/ml, 9.87 ± 2.26 pg/ml, 0.421 ± 0.093 / β actin) 和 Chemerin (233.0 ± 47.6 ng/ml, 438.1 ± 95.0 ng/ml, 1.338 ± 0.207 / β actin) 测定值均高于 NGT 组 (6.39 ± 1.05 pg/ml, 6.11 ± 0.94 pg/ml, 0.235 ± 0.074 / β actin; 155.7 ± 30.6 ng/ml, 218.7 ± 76.8 ng/ml, 0.905 ± 0.152 / β actin), 差异具有统计学意义 ($t=13.660 \sim 17.960$, 均 $P < 0.05$); GDM 组的血清、脐血和胎盘组织中的 Visfatin 和 Chemerin 水平与 HOMA-IR 测定值均呈显著的正相关关系 ($r=0.357 \sim 0.583$, 均 $P < 0.05$); 在细胞实验中, Chemerin 过表达组与 Visfatin 过表达组的 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量均低于 Chemerin 空载组、Visfatin 空载组 ($t=-12.175$, 5.319 , 均 $P < 0.05$); Chemerin 过表达组和 Visfatin 过表达组的 3T3-L1 脂肪细胞增值 A 值高于 Chemerin 空载组与 Visfatin 空载组 ($t=-13.765$, 6.034 , 均 $P < 0.05$); Chemerin 过表达组和 Visfatin 过表达组 Akt 与 pAkt 蛋白相对表达强度低于 Chemerin 空载组和 Visfatin 空载组 ($t=-15.938 \sim -10.352$, 均 $P < 0.05$)。**结论** GDM 患者血清、脐血和胎盘组织中的 Visfatin 和 Chemerin 表达水平显著升高, 并且与胰岛素抵抗有正相关性, 其作用机制可能与下调 Akt 和 pAkt 蛋白表达有关。

关键词: 妊娠糖尿病; 内脏脂肪组织; 脂肪因子趋化素; 胰岛素抵抗

中图分类号: R714.256; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 01-021-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2022.01.005

Expression of Visfatin and Chemerin in Serum, Umbilical Blood and Placenta of Patients with Gestational Diabetes Mellitus and the Mechanism of Insulin Resistance

WANG Wei¹, ZHANG Jing¹, PU Chun²

(1. Department of Laboratory Medicine, Fuyang People's Hospital, Anhui Fuyang 236004, China; 2. Wannan Medical College, Anhui Wuhu 241000, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression changes of visceral adipose tissue (Visfatin) and adipokines (Chemerin) in serum, cord blood and placental tissue of patients with gestational diabetes mellitus (GDM) and their relationship with insulin resistance. **Methods** 100 pregnant women with GDM in Fuyang People's Hospital from December 2018 to April 2020 were selected as GDM group and 100 pregnant women with normal glucose tolerance (NGT group). The general data, blood glucose indexes, and blood lipid indexes of the two groups were statistically analyzed. Detected the expression levels of Visfatin

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (2008085QH422)。

作者简介: 王伟 (1977-), 男, 本科, 副主任技师, 研究方向: 生化、发光免疫, E-mail: wangw197707@163.com。

通讯作者: 浦春 (1963-), 男, 硕士, 主任技师, 研究方向: 临床免疫学和分子诊断学。

and Chemerin in the serum, cord blood, and placental tissues of the two groups of study subjects, and analyzed the correlation between Visfatin and Chemerin expression and insulin resistance index (HOMA-IR). Constructed Visfatin by recombinant lentiviral vector, Chemerin overexpression 3T3-L1 adipocytes, and analyzed the effect of Visfatin and Chemerin overexpression on 3T3-L1 adipocyte proliferation, glucose consumption, Akt and pAkt protein expression. **Results** The measured values of GDM group FPG (5.84 ± 0.52 mmol/L), Fins ($18.96 \pm 3.75 \mu$ U/ml), HbA1c ($6.42\% \pm 0.89\%$), HOMA-IR (2.48 ± 0.66), TC (5.22 ± 0.57 mmol/L), TG (2.41 ± 0.43 mmol/L) were higher than those of NGT group (4.61 ± 0.40 mmol/L, $12.53 \pm 2.20 \mu$ U/ml, $5.31\% \pm 0.70\%$, 1.51 ± 0.42 , 4.86 ± 0.49 mmol/L 和 2.18 ± 0.34 mmol/L), the differences were statistically significant ($t=18.749, 14.789, 9.803, 12.399, 4.789, 4.196$, all $P < 0.05$). There was no statistically significant difference between the measured values of HDL-C (1.64 ± 0.22 mmol/L vs 1.70 ± 0.24 mmol/L), LDL-C (3.23 ± 0.67 mmol/L vs 3.10 ± 0.54 mmol/L) and ALB (37.84 ± 3.02 g/L vs 38.44 ± 3.30 g/L) in the GDM group and the NGT group ($t=-1.843, 1.511, -1.341$, all $P > 0.05$). The Visfatin (10.55 ± 2.41 pg/ml, 9.87 ± 2.26 pg/ml, $0.421 \pm 0.093 / \beta$ actin) and Chemerin (233.0 ± 47.6 ng/ml, 438.1 ± 95.0 ng/ml, $1.338 \pm 0.207 / \beta$ actin) measured values in serum, cord blood, and placenta tissue of the GDM group were higher than those of the NGT group (6.39 ± 1.05 pg/ml, 6.11 ± 0.94 pg/ml, $0.235 \pm 0.074 / \beta$ actin; 155.7 ± 30.6 ng/ml, 218.7 ± 76.8 ng/ml, $0.905 \pm 0.152 / \beta$ actin), the difference was statistically significant ($t=13.660 \sim 17.960$, all $P < 0.05$). The levels of Visfatin and Chemerin in serum, cord blood, and placental tissues of the GDM group were significantly positively correlated with the measured values of HOMA-IR ($r=0.357 \sim 0.583$, all $P < 0.05$). In cell experiments, the levels of Chemerin overexpression group and Visfatin overexpression group Glucose consumption of 3T3-L1 adipocytes was lower than Chemerin no-load group and Visfatin no-load group ($t=-12.175, 5.319$, all $P < 0.05$); 3T3-L1 adipocytes proliferation A value of Chemerin overexpression group and Visfatin overexpression group were higher than Chemerin no-load group, Visfatin no-load group ($t=-13.765, 6.034$, all $P < 0.05$); Chemerin overexpression group, Visfatin overexpression group Akt, the relative expression intensity of pAkt protein was lower than Chemerin no-load group, and Visfatin no-load group ($t=-15.938 \sim -10.352$, all $P < 0.05$). **Conclusion** The expression levels of Visfatin and Chemerin in serum, cord blood, and placental tissues of GDM patients were significantly increased, and were positively correlated with insulin resistance. The mechanism of action may be related to down-regulation of Akt and pAkt protein expression.

Keywords: gestational diabetes mellitus; visceral adipose tissue; adipokine chemokine; insulin resistance

妊娠糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 是在妊娠过程中发生或首次发现的不同程度的葡萄糖耐量异常, 导致妊娠期间高血压、羊水过多和自然流产的发生率增加, 异常胎儿发育、新生儿低血糖和死产的发生率显著增加^[1]。部分 GDM 患者在分娩后 5 ~ 13 年内患上 2 型糖尿病^[2]。目前, 关于 GDM 的发病机理的研究相对较少。近年来, 关于 GDM 发病机理的研究取得了重大进展。孕妇妊娠期间的胰岛素敏感性会降低, 并且人体的胰岛 β 细胞储备不足以弥补这一不足, 产生的胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 导致葡萄糖和脂质代谢紊乱, 诱发 GDM^[3]。研究发现^[4], GDM 的发生和发展与某些炎症因子和脂肪细胞因子有关。在人体中, 脂肪组织可以分泌内脏脂肪素 (Visfatin)、瘦素、内脂素、脂肪因子趋化素 (chemerin) 等许多脂肪细胞因子, 其可以通过自分泌或旁分泌方法参与炎症、代谢疾病和心血管疾病的发生^[5]。本研究主要探讨 GDM 患者血清、脐血及胎盘组织中的 Visfatin, Chemerin 的表达变化及与患者发生胰岛素抵抗的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2018 年 12 月 ~ 2020 年 4 月

阜阳市人民医院妊娠分娩的 GDM 孕妇 100 例作为 GDM 组、糖耐量正常孕妇 100 例作为 NGT 组。GDM 组的年龄 22 ~ 38 岁, 平均年龄 27.5 ± 2.8 岁; 孕前体质质量指数 (BMI) 21.86 ± 1.90 kg/m²; 分娩时 BMI 31.09 ± 2.47 kg/m²; 身高 162.8 ± 4.0 cm; 分娩孕周 39.5 ± 1.1 周; 收缩压 122.8 ± 6.9 mmHg; 舒张压 73.6 ± 5.0 mmHg。NGT 组的年龄 22 ~ 38 岁, 平均年龄 27.8 ± 3.1 岁; 孕前体质质量指数 (BMI) 21.78 ± 2.04 kg/m²; 分娩时 BMI 30.55 ± 2.20 kg/m²; 身高 163.2 ± 3.8 cm; 分娩孕周 39.3 ± 1.4 周; 收缩压 123.3 ± 6.1 mmHg; 舒张压 75.0 ± 5.7 mmHg。两组上述基线资料比较, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

纳入标准: ① GDM 的诊断标准参考中华医学会推荐标准, 以口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 作为基础: 三项中的任何一项即可诊断 GDM: (1) 两次以上空腹血糖 ≥ 5.8 mmol/L; (2) OGTT 试验中有 2 项数据 ≥ 5.8 mmol/L; (3) 50g 葡萄糖负荷试验 ≥ 11.1 mmol/L 及空腹血糖 > 5.18 mmol/L 即可诊断。② 两组研究对象均在我院接受产前检查及分娩。③ 本研究涉及的检查项目及个人隐私资料均注意保密, 均与研究对象签署知情同意书。④ 研究对

象的年龄范围 22 ~ 38 岁。排除标准：①生殖系统肿瘤；②生殖系统感染性疾病；③凝血功能疾病；④肝肾脏疾病；⑤妊娠期高血压；⑥单支预计综合征；⑦自身免疫性疾病；⑧多胎妊娠；⑨吸毒、酗酒；⑩甲状腺功能异常。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器及设备：内切式均浆器（IKA 公司，USA，型号：T10），台式低温离心机（Eppendorf 公司，USA，型号：5404R），分光光度计（BIO-RAD 公司，USA，型号：Smart SpecTM plus spectrophotometer）。

1.2.2 主要试剂：氯仿（分析纯，天津市化学试剂六厂，批号：20160322）；异丙醇（分析纯，天津市化学试剂六厂，批号：20170423）；TRIZOL（Invitrogen，15596-026）；无水乙醇（分析纯，天津市化学试剂六厂，批号：20180116）；Oligo(dT)18（宝生物生物工程有限公司，货号：D511）；RNA 酶抑制剂（invitrogen，货号：10777-019）；d NTP 混合物（invitrogen，货号：18427-088）；EcoRI-HF（NEB 公司产品，货号：R3101）；BamHI-HF（NEB 公司产品，货号：R3136）；DNA 分子量标准（DL2000 plus，北京全式金公司产品）；Polybrene（sigma，货号：H9268）；实验细胞 [3T3-L1 脂肪细胞（上海歌凡生物细胞库）]，高糖 DMEM，新生小牛血清（new calf serum，NCS），0.25g/ml 胰酶，Penicillin-Streptomycin（双抗）（10 000 U/ml）购自美国 Gibco 公司；胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购自美国 Hyclone 公司；3-异丁基-1-甲基黄嘌呤（3-isobutyl-1-methylxanthine，IBMX），胰岛素，地塞米松购自德国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 血糖、血脂指标检测：两组研究对象分娩前清晨抽取患者空腹静脉血 5 ml，3 000 r/min 离心 10min，分离血清。葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖（FPG）（日立 7600 全自动生化分析仪）；Roche Cobase601 自动电化学发光免疫分析系统可检测空腹胰岛素（Fins）；糖化血红蛋白检测系统 [爱科来医疗电子（上海）有限公司，型号 HA-8180 / 11204033] 检测 HbA1c；日立 7600 自动生化分析仪检测总胆固醇（total cholesterol, TC）、三酰甘油（triglyceride, TG）、高密度脂蛋白胆固醇（high density lipoprotein cholesterol, HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（low density lipoprotein cholesterol, LDL-C）水平；抗胰岛素性稳态模式评估法（homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR）= FPG × Fins / 22.5，

1.3.2 血清、脐血、胎盘组织中的 Visfatin，Chemerin 检测：脐带血获取：新生儿断脐后收集脐带血，离心取上清液，并保存在 -80℃。双抗体夹心酶联免疫吸附试验（ELISA）测定血清和脐血 Visfatin 和 Chemerin 表达水平，严格按照操作说明进行。Western blot 检测胎盘 Visfatin，Chemerin 蛋白水平；在胎盘娩出后 5min 内，无菌选择母体面中央 1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm 的新鲜、未钙化的胎盘组织，用生理盐水冲洗，在玻璃匀浆器中压碎，在冰浴下加入裂解液 30min，转移到离心管中，以 10 000 r/min 在 4℃ 下离心 5min，取上清，BCA 法确定蛋白质浓度。蛋白通过 SDS-PAGE 电泳分离，然后转移到 PVDF 膜上，用 TBST 冲洗，在室温下使用 5g/dl 脱脂奶粉封闭 1 h，添加兔抗人-抗工作液（抗 Visfatin，Chemerin），并在 4℃ 条件下孵育过夜，加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗工作溶液，并在 37℃ 下孵育 1h，TBST 漂洗，显影。

1.3.3 3T3-L1 脂肪细胞培养：3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化。小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞在含有 10%（v/v）NCS 和 100 U/ml 双抗的 DME 培养液中培养。当细胞密度达到 90% 传代接种到 6 孔板，调整密度 5×10^5 ，接触抑制 2 天，计为诱导分化 0 天。替换为新鲜培养液 DMEM + 10%FBS（2.5 ml/孔），分组加入诱导剂 A（IBMX 0.5 mmol/L，胰岛素 10 mg/L，地塞米松 1.0 μmol/L），混匀，3 天后换诱导剂 B（胰岛素 10mg/L），继续培养 2 天，换基础培养基 DMEM+10%FBS，培养至 11 天，诱导分化为成熟脂肪细胞。

3T3-L1 前脂肪细胞在 37℃，5ml/dl CO₂ 的恒温培养箱中培养，根据细胞的生长情况定期更换培养液，将 3T3-L1 前脂肪细胞培养 3 ~ 4 天，融合率将达到 80% 以上，胰蛋白酶消化进行传代培养。

1.3.4 3T3-L1 脂肪细胞的生长观察：采取对数生长期生长细胞系，胰酶消化后，在 24 孔培养板中每孔接种 5×10^3 个细胞，并置于 5ml/dl CO₂，37℃ 恒温培养箱中；每 24h 随机选择 3 孔细胞，消化后对其进行计数，并连续计数 8 天，每天获取细胞数的平均值，以细胞数为纵坐标，以天数为横坐标，绘制细胞生长曲线。

1.3.5 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗实验：将 3T3-L1 脂肪细胞接种到 96 孔板中，诱导分化至第 8 天后分别添加 Visfatin，Chemerin 过表达及其空载体对照慢病毒培养 5 天，通过葡萄糖氧化酶法分别测定各孔的葡萄糖含量，测定 510nm 处的吸光度值（A 值）。①从空白孔（无细胞接种的孔）中的糖含量平均值中减去培养液中葡萄糖含量的平均值以获得葡萄糖消耗。在一瓶葡萄糖工作剂中加入 100ml 去

离子水并充分混合;②用1ml工作溶液取几支试管,分别从标准液及96孔板的每个孔取8 μ l培养液加入含有1ml工作液的试管中混合均匀,置于37℃恒温水浴20min;从每个试管中取100 μ l混合溶液加入96孔板中;③计算测试溶液的葡萄糖浓度。葡萄糖浓度(mmol/L)=(待测液A值/标准液A值) \times 5.5mmol/L;葡萄糖消耗率(%)=干预组消耗葡萄糖/对照组消耗葡萄糖 \times 100%,重复相同实验3次,取平均值。

1.3.6 3T3-L1脂肪细胞增殖的MTT法:3T3-L1前脂肪细胞接种到96孔培养板中,接种密度为 1×10^4 个/孔。细胞进入对数生长期后,计数每孔的细胞数,添加Visfatin,Chemerin过表达及其空载体对照慢病毒进行MTT实验。吸弃原培养液,用1 \times PBS洗涤,加入5mg/ml MTT溶液10 μ l/孔,37℃孵育4h,吸出上清液,并向每个孔中加入150 μ l二甲亚砜。检测490nm波长处的A值。

1.3.7 Western-blot检测Akt及pAkt(Ser 473)蛋白:提取细胞的总蛋白:吸出培养瓶中的培养液,在每个孔中加入在4℃预冷的Hank's溶液0.5ml洗涤细胞三次。每10 μ l 100mmol/L PMSF加入1ml裂解缓冲液,并在冰上摇匀。向每个孔中加入500 μ l含

PMSF的裂解缓冲液冰上裂解30min,在4℃的冰箱中以12 000r/min离心5min,分离上清,并保存在-20℃的冰箱中备用。BCA法确定蛋白质浓度。蛋白通过SDS-PAGE电泳分离,然后转移到PVDF膜上,用TBST冲洗,在室温下使用5g/dl脱脂奶粉封闭1h,添加兔抗人-抗工作液TBST稀释(Akt 1:1 000, pAkt 1:1 000),并在4℃条件下孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗工作液(1:4 000),并在37℃下孵育1h, TBST漂洗,显影。

1.4 统计学分析 统计学分析采用SPSS 21.0软件,两组的FPG, Fins, HbA1c, HOMA-IR, TC, TG测定值等数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间对比采用 t 检验;Visfatin, Chemerin水平与HOMA-IR测定值的相关性分析采用Pearson法;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GDM组和NGT组的血糖、血脂代谢指标比较 见表1。GDM组的FPG, Fins, HbA1c, HOMA-IR, TC和TG测定值均高于NGT组,差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$);GDM组和NGT组的HDL-C, LDL-C, ALB测定值比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表1 GDM组和NGT组的血糖、血脂代谢指标比较($\bar{x} \pm s$)

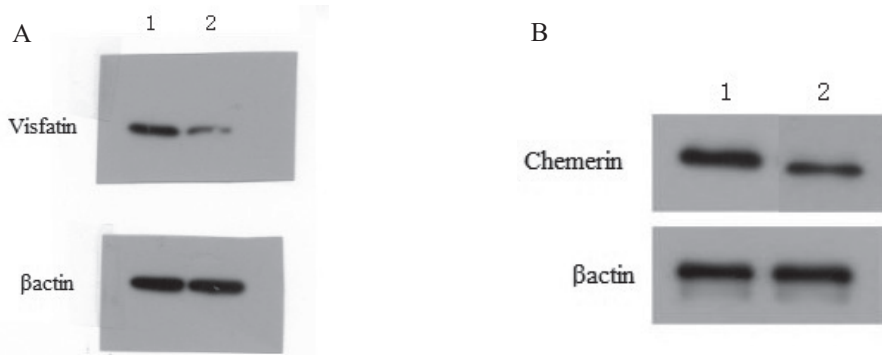
指标	GDM组($n=100$)	NGT组($n=100$)	t 值	P 值
FPG (mmol/L)	5.84 \pm 0.52	4.61 \pm 0.40	18.749	<0.001
Fins (μ U/ml)	18.96 \pm 3.75	12.53 \pm 2.20	14.789	<0.001
HbA1c (%)	6.42 \pm 0.89	5.31 \pm 0.70	9.803	<0.001
HOMA-IR	2.48 \pm 0.66	1.51 \pm 0.42	12.399	<0.001
TC (mmol/L)	5.22 \pm 0.57	4.86 \pm 0.49	4.789	<0.001
TG (mmol/L)	2.41 \pm 0.43	2.18 \pm 0.34	4.196	<0.001
HDL-C (mmol/L)	1.64 \pm 0.22	1.70 \pm 0.24	-1.843	0.067
LDL-C (mmol/L)	3.23 \pm 0.67	3.10 \pm 0.54	1.511	0.132
ALB (g/L)	37.84 \pm 3.02	38.44 \pm 3.30	-1.341	0.181

2.2 GDM组和NGT组的血清、脐血、胎盘组织中的Visfatin, Chemerin测定值比较 见表2,图1。GDM组的血清、脐血、胎盘组织中的Visfatin,

Chemerin测定值均高于NGT组,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

表2 GDM组和NGT组的血清、脐血、胎盘组织中的Visfatin, Chemerin测定值比较($\bar{x} \pm s$)

样本	指标	GDM组($n=100$)	NGT组($n=100$)	t 值	P 值
血清	Visfatin (pg/ml)	10.55 \pm 2.41	6.39 \pm 1.05	15.825	<0.001
	Chemerin (ng/ml)	233.0 \pm 47.6	155.7 \pm 30.6	13.660	<0.001
脐血	Visfatin (pg/ml)	9.87 \pm 2.26	6.11 \pm 0.94	15.361	<0.001
	Chemerin (ng/ml)	438.1 \pm 95.0	218.7 \pm 76.8	17.960	<0.001
胎盘组织	Visfatin (/ β actin)	0.421 \pm 0.093	0.235 \pm 0.074	15.650	<0.001
	Chemerin (/ β actin)	1.338 \pm 0.207	0.905 \pm 0.152	16.861	<0.001



A. 为胎盘组织 Visfatin 免疫印迹检测结果, 1 为 GDM 组、2 为 NGT 组。B. 为胎盘组织 Chemerin 免疫印迹检测结果, 1 为 GDM 组、2 为 NGT 组。

图 1 GDM 组和 NGT 组的血清、脐血、胎盘组织中的 Visfatin, Chemerin 免疫印迹检测结果

2.3 GDM 组血清、脐血、胎盘组织中的 Visfatin, Chemerin 测定值与 HOMA-IR 的相关性 GDM 组的血清、脐血、胎盘组织中的 Visfatin($r=0.401$, $P<0.001$; $r=0.386$, $P=0.001$; $r=0.357$, $P=0.003$), Chemerin($r=0.0357$, $P=0.007$; $r=0.583$, $P<0.001$; $r=0.496$, $P<0.001$) 水平与 HOMA-IR 测定值均呈显著正相关 ($P<0.05$)。

2.4 Chemerin, Visfatin 过表达与 3T3-L1 脂肪细

表 3 Chemerin、Visfatin 过表达与 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量、细胞增殖的关系 ($\bar{x} \pm s$)

	过表达指标	Chemerin 过表达组	Chemerin 空载组	t 值	P 值
Chemerin	葡萄糖消耗量 (mmol/L)	3.38 ± 1.04	5.72 ± 1.57	-12.175	<0.001
	3T3-L1 脂肪细胞增殖 (A 值)	1.104 ± 0.347	0.865 ± 0.271	5.319	<0.001
Visfatin	葡萄糖消耗量 (mmol/L)	3.14 ± 0.98	5.80 ± 1.62	-13.765	<0.001
	3T3-L1 脂肪细胞增殖 (A 值)	1.122 ± 0.316	0.875 ± 0.247	6.034	<0.001

2.5 Chemerin, Visfatin 过表达与 3T3-L1 脂肪细胞中 Akt, pAkt 蛋白表达情况比较 见表 4。在细胞实验中, Chemerin 过表达组、Visfatin 过表达组

胞葡萄糖消耗量、细胞增殖的关系 见表 3。在细胞实验中, Chemerin 过表达组、Visfatin 过表达组的 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量均低于 Chemerin 空载组、Visfatin 空载组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); Chemerin 过表达组、Visfatin 过表达组的 3T3-L1 脂肪细胞增殖 A 值高于 Chemerin 空载组、Visfatin 空载组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

Akt, pAkt 蛋白相对表达强度低于 Chemerin 空载组、Visfatin 空载组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 4 Chemerin, Visfatin 过表达与 3T3-L1 脂肪细胞中 Akt, pAkt 蛋白表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$, / β actin)

类 别		Chemerin 过表达组	Chemerin 空载组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
Chemerin	Akt 蛋白	1.319 ± 0.208	1.649 ± 0.233	-10.352	<0.001
	pAkt 蛋白	1.028 ± 0.211	1.421 ± 0.265	-11.367	<0.001
Visfatin	Akt 蛋白	1.284 ± 0.195	1.628 ± 0.202	-12.005	<0.001
	pAkt 蛋白	1.007 ± 0.186	1.443 ± 0.193	-15.938	<0.001

3 讨论

3.1 GDM 研究现状 目前 GDM 的发病机制仍不清楚, 有学者认为, IR 和妊娠期胰岛 β 细胞功能的不足可能是 GDM 发病机制中的两个关键因素^[7-8]。GDM 和肥胖症具有许多相似的病理生理特征, 例如脂肪营养不良、葡萄糖耐受降低和高凝性。这种生理变化与脂肪细胞分泌的某些因素有关, 研究脂肪细胞因子可对进一步探讨 GDM 的发病机制有所帮助。

3.2 GDM 与血糖、血脂代谢指标的关系 本研究结果显示, FPG, Fins, HbA1c, HOMA-IR, TC,

TG 指标与 GDM 有一定的联系, 对 GDM 的诊断具有重要的临床价值。FINS 与孕妇的血糖水平和胰岛功能有直接关系, 也可以反映胰岛素抵抗, 其水平越高, 胰岛素抵抗越强, 不利于人体对高血糖水平的有效调节, 引起血脂和血糖代谢紊乱, 这很容易发生 GDM。HbA1c 是糖尿病监测最佳指标之一, 是葡萄糖和血红蛋白在体内通过不可逆和非酶促反应结合而成的糖蛋白, 与人体血糖水平呈正相关, 可以有效反映血糖水平, 灵敏度高^[9]。HOMA-IR 是评估胰岛素敏感性的指标。

3.3 Chemerin, Visfatin 过表达与 3T3-L1 脂肪细

胞葡萄糖消耗量、细胞增殖的关系 本研究中, GDM组的血清、脐血和胎盘组织中的Visfatin, Chemerin测定值均明显高于NGT组。推测Visfatin和Chemerin可能参与胎儿宫内生长发育的调节, 并且Visfatin和Chemerin可能作为保护因子, 是机体对高血糖应激状态的代偿反应, 在胰岛素缺乏的情况下, Visfatin和Chemerin水平增加可能对GDM患者具有保护作用。Chemerin是一种以非活性的pro-chemerin前体形式分泌的蛋白质, pro-chemerin的生物学活性非常低, 需要被细胞外凝血酶、纤溶酶和炎症级联反应裂解, 以形成具有生物活性的16kDa Chemerin发挥生物学功能^[10]。研究表明^[11], Chemerin与受体结合后它可以在调节脂肪分化、产生和代谢、参与炎症、先天免疫和调节糖代谢方面发挥生物学作用。研究表明^[12], Visfatin可以由孕妇、胎儿组织和胎儿附属物产生和分泌, 这是妇女在怀孕期间适应性变化和胎儿生长发育的重要调节剂。关于Visfatin在胎盘组织中表达的研究相对较少。在正常妊娠中, Visfatin在羊膜上皮细胞、间充质细胞、绒毛膜滋养细胞和胎膜顶蜕膜中表达, 并随着胎龄的增加其表达也增加^[13], Visfatin和Chemerin参与胰岛素抵抗的过程, 胰岛素抵抗与肥胖密切相关。Visfatin和Chemerin的增加可能是机体的代偿性增加以适应全身性代谢紊乱, 而其水平的增加可以帮助改善胰岛素抵抗。妊娠糖尿病的发病机理尚未完全了解, 目前认为胰岛素抵抗和慢性低水平炎症在妊娠糖尿病的发病机理中起着非常重要的作用^[14]。脂肪组织是人体的主要能量储备器官和体内最大的内分泌器官, 参与肥胖、糖和脂类代谢, 是发生胰岛素抵抗的关键环节^[15]。脂肪细胞功能缺陷导致胰岛素抵抗的发生, 3T3-L1前脂肪细胞是具有单个分化潜能的细胞系, 可以在体外诱导分化为成熟的脂肪细胞, 可以更好地模拟脂肪细胞的分化^[16-17]。因此, 3T3-L1前脂肪细胞株广泛用于与糖和脂质代谢有关的研究。在该实验中, 成功培养了3T3-L1前脂肪细胞, 为下一步Visfatin, Chemerin对3T3-L1前脂肪细胞的干预及进一步的机理研究奠定了基础。葡萄糖消耗是指整个细胞在正常生理活动的一定时期内将葡萄糖转化为其他物质的能力, 可以用于评价所有与葡萄糖转运和代谢有关的蛋白质功能^[18]。本研究显示, Visfatin, Chemerin可能导致脂肪细胞葡萄糖利用减少, 发生胰岛素抵抗, 但与脂肪细胞葡萄糖的利用、干扰胰岛素信号通路的关系需要进一步研究。本实验通过建立细胞生长曲线, 观察3T3-L1脂肪细胞增殖生长情况, 发现Chemerin, Visfatin可能具有促进前脂肪细胞增殖的作用, 验证本研究的猜想。

3.4 Chemerin, Visfatin过表达与3T3-L1脂肪细胞中Akt, pAkt蛋白表达情况的分析 胰岛素与相应的受体结合后, 可以激活下游信号^[19], 参与葡萄糖转运、糖异生抑制、糖原合成、糖酵解、蛋白质合成等过程^[20]。AKT通过调节葡萄糖转运蛋白的转运来介导细胞对葡萄糖的吸收, 通过调节糖原合酶激酶3来促进糖原合成^[21]。因此, AKT活性的调节将对细胞葡萄糖代谢产生重要影响。在细胞实验中, Chemerin过表达组、Visfatin过表达组Akt, pAkt蛋白相对表达强度明显低于Chemerin空载组和Visfatin空载组。提示Visfatin和Chemerin可能通过调控胰岛素信号通路中Akt的表达水平导致胰岛素抵抗。相应机制可能是pAkt的降低导致其下游葡萄糖转运蛋白GLUT4向细胞膜的转运减少, 糖原合酶激酶3(GSK3)丝氨酸位点磷酸化降低, 活性增强, 肝糖原合成抑制, 转录因子PGC-1 α 的磷酸化降低, 增加糖原输出。

本研究首次联合Visfatin, Chemerin水平变化与胰岛素抵抗、肥胖的关系进行研究, 探讨二者在妊娠糖尿病发病中的作用及机制, 并且本研究证实Visfatin, Chemerin可能通过调节Akt, pAkt蛋白表达影响3T3-L1脂肪细胞的增殖及糖脂代谢, 这为后期GDM患者胰岛素抵抗的发生及早期预测提供了参考, 有利于诊断和治疗, 具有较好的研究价值。但本研究存在一定的不足, 样本量较少可能影响研究结果, 可以进一步加大样本进行验证。

综上所述, GDM患者血清、脐血、胎盘组织中Visfatin, Chemerin表达水平显著升高, 并且与胰岛素抵抗有正相关性, 其作用机制可能与下调Akt, pAkt蛋白表达有关。

参考文献:

- [1] 赵欣媛, 郑雪绒, 张建华. 妊娠期糖尿病患者血清Vaspin, Chemerin及CRP水平表达及临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2018,33(15): 3375-3378. ZHAO Xinyuan, ZHENG Xuerong, ZHANG Jianhua. Expression levels and clinical significance of serum Vaspin, Chemerin, and CRP in patients with gestational diabetes mellitus [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2018,33(15): 3375-3378.
- [2] 张曙晴, 李洪彬, 张骆军, 等. 2型糖尿病患者糖化血红蛋白水平与胰岛素分泌及胰岛素抵抗的关系[J]. 现代检验医学杂志, 2016,31(2): 108-111. ZHANG Shuqing, LI Hongbin, ZHANG Luojun, et al. Correlation between insulin secretion, insulin resistance and glycosylated hemoglobin levels in patients with type 2 diabetic [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016,31(2): 108-111.
- [3] 冯霖, 朱香清, 乔玉芳, 等. 妊娠糖尿病患者血清脂联素表达及与炎症因子、胰岛素抵抗关系[J]. 中国计划生育学杂志, 2019,27(2): 210-212, 217.

- FENG Lin, ZHU Xiangqing, QIAO Yufang, et al. The expression of serum APN of pregnant women with gestational diabetes mellitus and its relationship with inflammatory factors level and insulin resistance [J]. Chinese Journal of Family Planning, 2019,27 (2): 210-212, 217.
- [4] 杨磊. 妊娠期糖尿病内脏脂肪素水平与糖脂代谢关系的研究 [J]. 实用糖尿病杂志, 2019, 15 (2): 33-34.
- YANG Lei. A research on correlation between serum visfatin and glucose and lipid metabolism among women with gestational diabetes mellitus [J]. Journal of Practical Diabetology, 2019, 15 (2): 33-34.
- [5] 焦书文, 周亚茹, 张晓阳, 等. 血清脂联素水平和内脏脂肪厚度与妊娠糖尿病的相关性研究 [J]. 中国临床医生杂志, 2019,47 (11): 1333-1336.
- JIAO Shuwen, ZHOU Yaru, ZHANG Xiaoyang, et al. Correlation between serum adiponectin level and visceral fat thickness and gestational diabetes mellitus [J]. Chinese Journal for Clinicians, 2019,47 (11): 1333-1336.
- [6] 沈小波, 李盛, 陈伟, 等. 妊娠期糖尿病患者血清 FABP4, Nesfatin-1, Chemerin 水平变化及临床意义 [J]. 中国妇幼保健, 2019,34 (1): 59-62.
- SHEN Xiaobo, LI Sheng, CHEN Wei, et al. Changes and clinical significance of serum FABP4, nesfatin-1 and Chemerin levels in patients with gestational diabetes mellitus [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2019,34 (1): 59-62.
- [7] 魏菊红. 妊娠期糖尿病患者血清 FABP4, Chemerin, Nesfatin-1 水平变化及临床意义 [J]. 国际医药卫生导报, 2019,25 (22): 3735-3738.
- WEI Juhong. Changes and clinical significance of serum FABP4, Chemerin and nesfatin-1 levels in patients with gestational diabetes mellitus [J]. International Medicine and Health Guidance News, 2019,25 (22): 3735-3738.
- [8] 霍琰, 刘素新, 李红艳, 等. Vaspin, IL-6 在妊娠期糖尿病患者胎盘组织中的表达 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2018, 10(11):79-83.
- HUO Yan, LIU Suxin, LI Hongyan, et al. Expression of vaspin and IL-6 in placental tissues of patients with gestational diabetes mellitus [J]. Chinese Journal of Family Planning & Gynecotokology, 2018, 10 (11): 79-83.
- [9] 王莹, 白凤琴, 周尧. 妊娠期糖尿病患者血清胎球蛋白 A、胰岛素抵抗指数水平及其临床意义研究 [J]. 中国妇幼保健, 2019,34 (9): 1986-1988.
- WANG Ying, BAI Fengqin, ZHOU Yao. Levels of serum fetuin A and insulin resistance index in patients with gestational diabetes mellitus and their clinical significance [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2019,34 (9): 1986-1988.
- [10] ZHOU Zhongwei, CHEN Hongmei, JU Huixiang, et al. Circulating chemerin levels and gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis[J]. Lipids in Health and Disease, 2018, 17(1): 169.
- [11] ROWAN J A, RUSH E C, PLANK L D, et al. Metformin in gestational diabetes mellitus: the offspring follow-up (MiG TOFU): body composition and metabolic outcomes at 7-9 years of age[J]. BMJ Open Diabetes Research & Care, 2018, 6(1): e000456.
- [12] PENG Hangya, LI Haicheng, LIN Shuo, et al. Caveolin-1 was required for glargine to improve insulin sensitivity and activate PI3K/AKT pathway in visceral adipose tissue of type 2 diabetic mice [J]. Diabetes, 2018, 67(1): 2423-PUB.
- [13] JAYABALAN N, LAI A, ORMAZABAL V, et al. Adipose tissue exosomal proteomic profile reveals a role on placenta glucose metabolism in gestational diabetes mellitus [J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2019, 104(5): 1735-1752.
- [14] CRUSELL M K W, HANSEN T H, NIELSEN T, et al. Gestational diabetes is associated with change in the gut microbiota composition in third trimester of pregnancy and postpartum[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 89.
- [15] 雷婷, 涂珺. 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型研究现状 [J]. 江西中医药大学学报, 2018, 30(3):106-109.
- LEI Ting, TU Jun. Research status on the insulin resistance model of 3T3-L1 adipocytes [J]. Journal of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2018, 30 (3): 106-109.
- [16] PETRY C J, ONG K K, HUGHES I A, et al. Temporal trends without seasonal effects on gestational diabetes mellitus incidence relate to reductions in indices of insulin secretion: the Cambridge Baby Growth Study[J]. Nutrients, 2019, 11(11): 2822.
- [17] ROCHA A D S, BERNARDI J R, MATOS S, et al. Maternal visceral adipose tissue during the first half of pregnancy predicts gestational diabetes mellitus at the time of delivery—a cohort study[J]. PLoS One, 2020, 15(4): e232155.
- [18] RANCOURT R C, OTT R, ZISKA T, et al. Visceral adipose tissue inflammatory factors (TNF-Alpha, SOCS3) in gestational diabetes mellitus (GDM): epigenetics as a Clue in GDM pathophysiology[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(2): 479.
- [19] LI Zhifang, ZHOU Guiju, JIANG Longfan, et al. Effect of STOX1 on recurrent spontaneous abortion by regulating trophoblast cell proliferation and migration via the PI3K/AKT signaling pathway[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2018, 120(5): 8291-8299.
- [20] SARWAR M, SYED KHAJA A S, ALESKANDARANY M, et al. The role of PIP5K1 α /pAKT and targeted inhibition of growth of subtypes of breast cancer using PIP5K1 α inhibitor[J]. Oncogene, 2019, 38(3): 375-389.
- [21] KUGISHIMA Y, YASUHI I, YAMASHITA H, et al. Risk factors associated with the development of postpartum diabetes in Japanese women with gestational diabetes mellitus [J]. BMC Pregnancy and Childbirth, 2018, 18(1): 19.

收稿日期: 2021-04-09

修回日期: 2021-09-01