

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.28.001

脂肪因子 Chemerin 体外表达与妊娠期糖尿病胰岛素抵抗研究*

潘宝龙, 马润玫[△]

(昆明医科大学研究生部 650031)

[摘要] 目的 探讨脂肪因子 Chemerin 与妊娠期糖尿病(GDM)胰岛素抵抗(IR)的内在联系。方法 复苏、传代及诱导分化 GDM 前脂肪细胞,构建 Chemerin 过表达载体,进行载体转化、培养和提取;以 3 个过表达梯度(1.0 μg、2.5 μg、5.0 μg)转染传代脂肪细胞,以无转染组为对照;Q-PCR 检测 Chemerin、胰岛素受体底物-1(IRS-1)、IRS-2 磷脂酰肌醇-3 激酶[PI3K(P85a)] mRNA 表达,Western blot 检测 Chemerin、IRS-1、IRS-2、PI3K 蛋白表达及 IRS-1、IRS-2 酪氨酸磷酸化水平,[³H]-2-脱氧-D-葡萄糖摄取测定法检测不同浓度转染组细胞葡萄糖摄取率的变化。结果 (1)Chemerin mRNA 及蛋白表达随转染浓度梯度升高而表达量增加,所构建 Chemerin 过表达载体有效;(2)随 Chemerin 表达增加,IRS-1/2、PI3K mRNA 及蛋白表达未出现明显变化,但存在 IRS-1 磷酸化程度稍有增加,IRS-2 磷酸化程度变化不明显;(3)脂肪细胞葡萄糖摄取率与 Chemerin 过表达浓度变化无明显关系。结论 Chemerin 在 GDM 血清及网膜脂肪组织中的高表达与 GDM 胰岛素抵抗的发生无必然联系。

[关键词] 妊娠;Chemerin;胰岛素抗药性;动力传导,细胞

[中图分类号] R714.24

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)28-3889-04

Study on the relationship between expression of Chemerin in vitro and GDM insulin resistance*

Pan Baolong, Ma Runmei[△]

(Graduate School, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate inner relationship between Chemerin and gestational diabetes mellitus(GDM)insulin resistance. **Methods** Recovered, extended and differentiated the GDM preadipocyte cells, built Chemerin overexpression carrier, transformed, cultivated and extracted the plasmid, using 3 overexpression levels(1.0, 2.5, 5.0 μg) to transfect and extend the fat cells, with no transfection group as contrast; the mRNA expression of Chemerin, insulin receptor substrate-1/2(IRS-1/2), phosphatidy inositol 3 kinase(PI3K) were detected by Q-PCR, protein expression of Chemerin, IRS-1/2, PI3K and IRS-1/2 phosphorylation levels were detected by Western blot, with [³H]-2- deoxidation-D-glucose uptake assay to detect glucose uptake rates in different concentration of plasmid transfection. **Results** (1)The expression of mRNA Chemerin and protein increased with the increase of the concentration gradient, which was effective to construct the Chemerin vector. (2)With the Chemerin expression increased, the mRNA and protein expression of IRS-1/2 and PI3K had no significant changes, IRS-2 tyrosine phosphorylation level had no obvious change but the IRS-1 phosphorylation was slightly increased. (3)Glucose uptake rate of fat cells had no obvious correlation with Chemerin. **Conclusion** High expression of Chemerin in GDM serum and omental adipose tissue has no obvious link with the insulin resistance of GDM.

[Key words] gestational; Chemerin; insulin resistance; mechanotransduction, cellular

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是在妊娠期首次发生或发现的糖尿病,严重威胁孕妇及其子代健康。至今为止 GDM 的病因尚不清楚,众多研究一致认为 GDM 是多种因素引起的一种代谢性疾病^[1-2]。胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)及由其带来的糖脂代谢紊乱是目前公认的 GDM 发病的病理生理基础之一,被认为是 GDM 的始发因素,而胰岛素信号通路的异常是发生 IR 的主要原因^[3-4]。近年来,来源于脂肪组织的脂肪因子(adipokines)与 GDM 的关系备受关注,已成为新的研究热点^[5]。课题组前期研究中,发现脂肪因子 Chemerin 在 GDM 患者血清及体内网膜脂肪组织中明显高表达^[6],为进一步探讨这种高表达的现象与 GDM IR 之间是否存在必然的因果关系,课题组在前期研究基础上,以体外培养 GDM 脂肪细胞为载体,检测 Chemerin 不同程度过表达状态下,脂肪细胞中胰岛素受体下游信号分子胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate, IRS-1)、IRS-2、磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidy inositol-3 kinase, PI3K)mRNA 及蛋白表达,IRS-

1、IRS-2 酪氨酸磷酸化水平的变化,以及细胞葡萄糖摄取率的变化,从胰岛素经典信号传导通路(IRS-1、IRS-2、PI3K)探讨 Chemerin 与 GDM IR 的内在联系,为研究 GDM 发病机理和治疗策略提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料 高糖杜尔液体培养基(HG-DMEM)及 6 孔细胞培养板(美国 Hyclone 公司),蛋白酶抑制剂(美国 Merckm Li-pore 公司),蛋白上样缓冲液(上海 Beyotime 公司),聚偏二氟乙烯(PVDF, 0.45 μm, 德国 Millipore 公司)膜,人源 Chemerin 过表达载体(广州复能基因公司)。Thermo CO₂ 培养箱, AIRTECH 超净工作台,上海菁华紫外分光光度计(752),美国 ABI RT-PCR 仪,ABI 96 孔定量 PCR 板, Bio-RAD 电泳仪(164-5050)。

1.2 人前脂肪细胞的复苏及传代培养 将之前冻存细胞进行复苏和传代,具体操作方法见课题组报道文献^[6]。GDM 大网膜前脂肪细胞的获取,符合人体试验伦理学标准,经昆明医科

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160082)。 作者简介:潘宝龙(1973-),副主任技师,在读博士,主要从事临床围产医学研究。

△ 通讯作者, Tel:(0877)2025320; E-mail: pbl6916@163.com。

大学伦理委员会批准,获得患者的知情同意。

1.3 人源 Chemerin 过表达载体构建 由广州复能基因公司协助构建,制作感受态细胞,Chemerin 质粒转染大肠杆菌,筛选阳性克隆及扩大培养,抽提无内毒素级别质粒,最终得到 Chemerin 质粒浓度为:0.573 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

1.4 Chemerin 过表达载体转染体外培养的脂肪细胞 将 Chemerin 过表达载体分别按照 0、1.0、2.5、5.0 μg 4 个浓度梯度转染 GDM 人源第 3 代传代脂肪细胞(分组为 0 μg 组、1.0 μg 组、2.5 μg 组、5.0 μg 组),每个浓度转染 6 孔,文中所有检测均为 6 孔同时检测,以均值表示结果。

1.5 Q-PCR 检测细胞中 Chemerin、IRS-1、IRS-2、PI3K mRNA 表达 转染 48 h 后,提取细胞总蛋白和总 RNA,Q-PCR 检测 Chemerin、IRS-1、IRS-2、PI3K 的 mRNA 表达。各引物信息为:Chemerin 上游 5'-CTG ATT GTA AGC CAT GAA G-3',下游 5'-AGA ATT GGC CAG TGG ACT A-3';GAPDH 上游 5'-CGA CAG TCA GCC GCA TCT-3',下游 5'-ATG AGT CCT CCA CGA TAC CAA-3';PI3K 上游 5'-GGC TGC TAG CCT GCT CTG-3',下游 5'-CTT CCT IAA GTC ACG CAC GAT-3';IRS-2 上游 5'-AAA ACG ACC ACA GTC CTA CCT C-3',下游 5'-CAC CTC CCA CAC CCA ATA CA-3';IRS-1 上游 5'-AAT GTC TGT TGT AAA GAG TGG AGC-3',下游 5'-GAA CTC AGC TCA ACA TCA GGT AT-3'。结果判读: $2^{-(\Delta\Delta\text{ct})}$ 计算各样本相对拷贝值。

1.6 Western blot 检测细胞中蛋白表达 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定样品中蛋白含量,进行电泳、转膜、孵育抗体及显影。检测细胞中 Chemerin、IRS-1、IRS-2、PI3K 的蛋白表达。文中所有 Western blot 检测图中上为待测条带,下为 β -actin。Western blot 检测不同浓度 Chemerin 过表达组中 IRS-1、IRS-2 酪氨酸磷酸化水平。

1.7 [3H]-2-脱氧-D-葡萄糖摄取测定法检测 Chemerin 不同浓度质粒转染细胞后葡萄糖的摄取率 $[3\text{H}]-2$ -脱氧-D-葡萄糖摄取率=计数分钟衰变数 $\times 2$ /蛋白浓度

2 结果

2.1 不同浓度 Chemerin 过表达组细胞中 Chemerin mRNA 及蛋白表达 Chemerin mRNA 及蛋白表达均随过表达浓度升高而升高,所构建 Chemerin 过表达载体有效,见图 1~2。

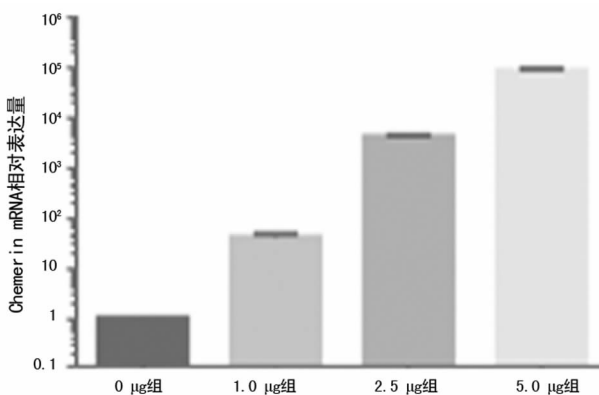


图 1 不同组别 Chemerin mRNA 表达分析图

2.2 不同浓度 Chemerin 过表达组 IRS-1、IRS-2、PI3K mRNA 表达情况 随 Chemerin 表达增加,IRS-1、IRS-2 及 PI3K mRNA 均未见明显变化,见表 1 及图 3~5。

2.3 不同浓度 Chemerin 过表达组 IRS-1、IRS-2、PI3K 蛋白表达 随 Chemerin 表达增加,IRS-1、IRS-2、PI3K 蛋白表达无明显变化,见表 2 及图 6。

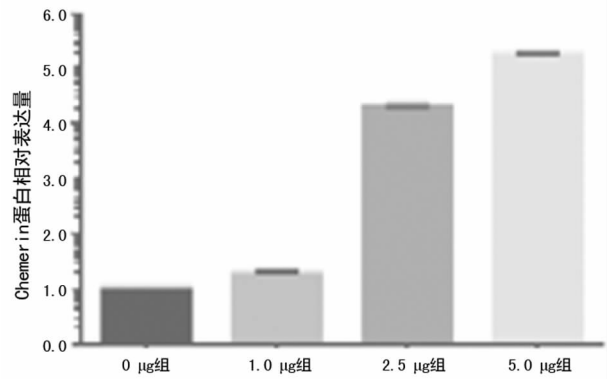


图 2 不同组别 Chemerin 蛋白表达分析图

表 1 不同浓度 Chemerin 过表达组 IRS-1、IRS-2、PI3K mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

项目	0 μg 组	1.0 μg 组	2.5 μg 组	5.0 μg 组
IRS-1	1.00	0.93 \pm 0.07	0.98 \pm 0.04	0.96 \pm 0.08
IRS-2	1.00	0.90 \pm 0.04	0.97 \pm 0.03	0.97 \pm 0.04
PI3K	1.00	0.93 \pm 0.09	0.85 \pm 0.05	0.94 \pm 0.11

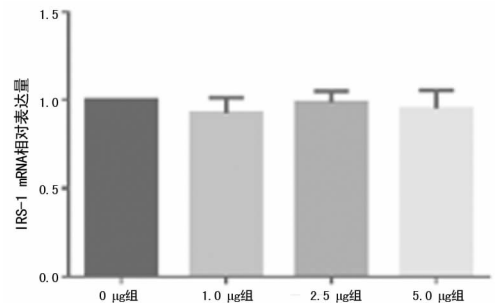


图 3 不同组别 IRS-1 mRNA 表达分析图

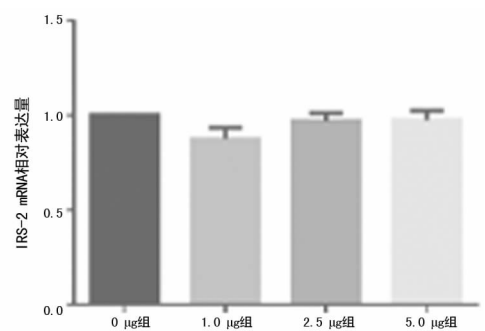


图 4 不同组别 IRS-2 mRNA 表达分析图

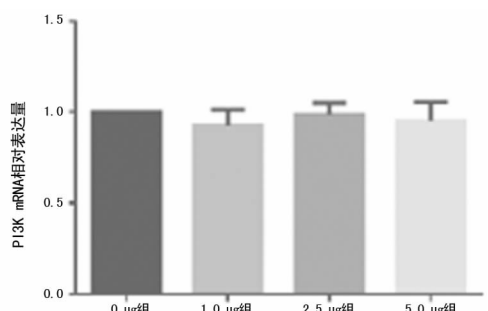


图 5 不同组别 PI3K mRNA 表达分析图

2.4 不同浓度 Chemerin 过表达组 IRS-1、IRS-2 酪氨酸磷酸化水平 随 Chemerin 表达增加,IRS-1 酪氨酸磷酸化程度有所增加,5.0 μg 组 IRS-1 磷酸化程度达 0 μg 组的 120%;IRS-2

磷酸化程度变化不明显。见表 3、图 7。

表 2 不同浓度 Chemerin 过表达组 IRS-1、IRS-2、PI3K 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

项目	0 μg 组	1.0 μg 组	2.5 μg 组	5.0 μg 组
IRS-1	0.96 \pm 0.19	0.92 \pm 0.15	0.94 \pm 0.21	0.97 \pm 0.24
IRS-2	0.70 \pm 0.16	0.76 \pm 0.13	0.75 \pm 0.09	0.74 \pm 0.11
PI3K	1.44 \pm 0.21	1.39 \pm 0.27	1.43 \pm 0.14	1.49 \pm 0.19

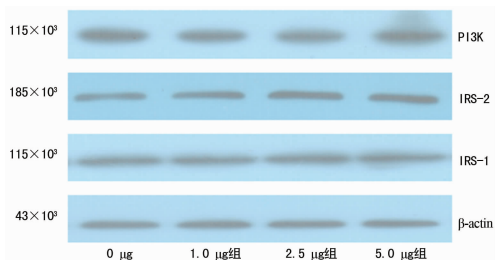


图 6 不同浓度 Chemerin 过表达组 IRS-1、IRS-2 及 PI3K 蛋白表达图

表 3 不同浓度 Chemerin 过表达组 IRS-1、IRS-2 磷酸化水平 ($\bar{x} \pm s$)

项目	0 μg 组	1.0 μg 组	2.5 μg 组	5.0 μg 组
IRS-1	1.28 \pm 0.16	1.31 \pm 0.17	1.40 \pm 0.21	1.55 \pm 0.24
IRS-2	0.62 \pm 0.09	0.56 \pm 0.07	0.51 \pm 0.08	0.57 \pm 0.06

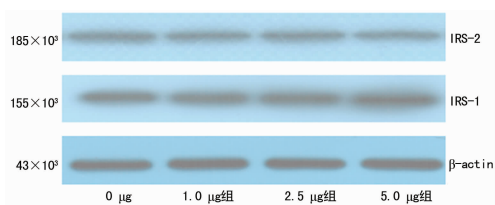


图 7 不同浓度 Chemerin 过表达组 IRS-1/2 磷酸化水平

2.5 [3H]-2-脱氧-D-葡萄糖摄取测定检测不同浓度 Chemerin 过表达组脂肪细胞的葡萄糖摄取率 随 Chemerin 表达增加,脂肪细胞葡萄糖摄取率变化不明显,各组与 0 μg 组比值分别为:1.0 μg 组 0.97,2.5 μg 组 0.97,5.0 μg 组 1.01,见图 8。

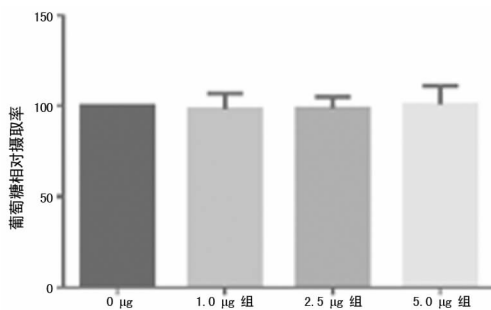


图 8 不同浓度 Chemerin 过表达组细胞葡萄糖摄取率分析图

3 讨论

GDM 被认为是早期的 2 型糖尿病 (T2DM),其短期影响往往是孕妇羊水过多、新生儿低血糖、巨大儿、产后大出血、难产等的危险性增加,其长期影响则表现为 GDM 孕妇首诊之后 10~15 年内患 T2DM 的概率高达 50%~60%,尤其集中于产后前 5 年,是中老年女性 T2DM 患者的主要来源,其子代极易出现生长速度过快、青春期肥胖、糖耐量受损或糖尿病等,严重威胁孕妇及其子代健康^[7]。近年来,全球 GDM 发病率持续升

高,包括我国在内的发展中国家形势更为严峻,我国已经成为世界第一糖尿病大国,患病人数已达 1.5 亿,GDM 发病率已上升至妊娠妇女的 17.5%^[8]。且随着我国“全面二胎”政策的放开,高龄孕妇的增加,预计 GDM 的发病率将进一步上升,GDM 对母体和子代带来的短期和长期影响及不断上升的 GDM 患病率,将会成为困扰中国女性健康及优生优育的严重问题之一。探索 GDM 发病机制,从病因学上寻找 GDM 防治的关键靶点,为 GDM 治疗策略提供依据,具有极其重要的价值和意义。

课题组前期研究中发现 Chemerin 在 GDM 患者血清及体内网膜脂肪组织中都出现了明显的高表达,血清 Chemerin 水平与 GDM 患者血脂类指标 (TC: $r=0.402, P<0.05$;TG: $r=0.400, P<0.05$) 及炎症指标 (hs-CRP: $r=0.325, P<0.05$) 呈正相关,说明 GDM 与 Chemerin 之间存在一定的联系。血清 Chemerin 水平可以反映和提示患者的高脂血症 (脂肪蓄积、肥胖) 和慢性炎症状态,血清 Chemerin 值越高,这表明高脂血症和慢性炎症程度就越重。提示临床可将 Chemerin 血清学水平检测作为一种常规检测,来判断患者糖脂代谢紊乱程度及慢性炎症程度,而这二者均为 GDM 发生的高危因素,及早预防和治疗将大大降低孕妇的 GDM 患病风险。

前期局限于血清和人体内组织学的研究,只是揭示了 Chemerin 与 GDM 之间存在的这种表象,同时,带来了新的问题,即 Chemerin 与 GDM 的 IR 是否存在因果关系,如果存在,那么是 Chemerin 的升高导致了 GDM IR 的发生,还是 GDM IR 的发生导致了 Chemerin 的升高? 为进一步研究其内在联系,课题组采用了体外表达实验研究。因涉及医学伦理学问题,目前对于基因表达与疾病的关系研究多以体外实验方式进行,常见的是细胞培养和动物模型。学术界针对脂肪展开的生物学研究,多数实验样本均采用啮齿类动物脂肪细胞^[9-10]。尤其对于人脂肪细胞的研究,更多是采用了小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞。不可忽视的一个影响因素是,啮齿类动物与人类存在明显的遗传学差异,且两者之间的代谢途径也迥然不同,因而,将其作为实验样本往往难以避免潜在的实验缺陷问题,从而影响数据和结论的科学性。相对而言,作为一种特异化的前体细胞,人体中的前脂肪细胞具有增殖和向脂肪细胞定向分化的能力,在人的一生中均存在并持续作用,且与糖尿病、肥胖、动脉硬化等代谢类疾病的关系较为密切^[11]。本课题在前期工作中,成功建立了 GDM 网膜脂肪细胞原代培养及增殖分化模型,以人源细胞作为研究载体,进行后续有关 GDM 方面的研究,更具科学性。并且,以取自 GDM 网膜组织而培养传代的前脂肪细胞,可能更多地保留了 GDM 其他的一些基因信息,更真实地模拟地 GDM 基因环境,使结果更具有说服力。这也是本课题得以顺利进行的基础条件和特点之一。

本研究中,课题组采用了大肠杆菌表达系统,将所构建 Chemerin 过表达载体转化大肠杆菌,筛选阳性克隆及扩大培养后,抽提无内毒素级质粒,对得到的过表达载体直接以 Q-PCR 验证相应 mRNA 表达,分别以低 (1.0 μg),中 (2.5 μg),高 (5.0 μg) 3 个过表达载体浓度梯度转染 GDM 脂肪细胞,发现 mRNA 水平随着过表达载体浓度增加而增加,充分说明: (1) 所构建 GDM 网膜脂肪细胞原代培养及增殖分化模型真实有效,具有正常生理功能和表达能力; (2) 所构建 Chemerin 过表达载体有效,随梯度增加而表达增加。

目前众多研究理论认为,IR 主要由受体后信号传导的异常引起。胰岛素受体的信号传导主要经过两个途径,即 PI3K 途径和 Ras-丝分裂原激活的蛋白激酶 (Ras-MAPK) 途径。PI3K 途径是胰岛素受体信号传导的经典途径,也是胰岛素对

代谢调节的主要途径,主要作用于葡萄糖摄取,糖原合成和降解的调节;Ras-MAPK 途径主要与基因转录的调控有关,主要作用于细胞生长和分化的调节^[12]。两条途径相互独立,在一定条件下,也能相互激活。其中,IRS 是胰岛素信号通路的关键物质。目前已发现的 IRS 家族成员有 4 个(IRS-1、IRS-2、IRS-3、IRS-4)。IRS-1 是胰岛素信号传导的“船坞”蛋白,目前研究认为 IRS-1 的表达可能与具有 T2DM 家族史的患者密切相关,IRS-1 表达不足或者磷酸化异常可导致 IR,而 IRS-2 在 IR、T2DM 的发生中起着极其重要的作用,一旦 IRS-2 的表达出现异常,机体将很快出现糖尿病样症状^[13]。

基于上述理论,本次研究选取的是 Chemerin 与 GDM 胰岛素 PI3K 信号传导途径的关系研究,通过对 Chemerin 不同过表达浓度梯度在体外培养 GDM 脂肪细胞中胰岛素信号传导通路 IRS-1、IRS-2、PI3K mRNA 及蛋白表达检测,Chemerin 不同过表达浓度梯度 IRS-1、IRS-2 磷酸化水平检测,发现在所培养的脂肪细胞内:(1)随 Chemerin 表达增加,IRS-1 mRNA 及蛋白表达未出现明显变化,但存在 IRS-1 磷酸化程度有所增加,5 μg 组 IRS-1 磷酸化程度达 0 μg 组的 120%;(2)随 Chemerin 表达增加,IRS-2 mRNA、蛋白表达及酪氨酸磷酸化程度变化不明显;(3)PI3K mRNA 及蛋白表达随 Chemerin 过表达浓度增加无明显变化。结果提示,Chemerin 与 IRS-1、IRS-2、PI3K 并不存在明显关联,Chemerin 的表达增强,并不会导致胰岛素受体下游信号分子 IRS-1、IRS-2、PI3K 的变化,即 Chemerin 与 GDM IR PI3K 经典途径基本不存在关系,Chemerin 的升高不会导致 GDM 的 IR,不存在因果关系。课题组随后的不同过表达组脂肪细胞葡萄糖摄取率实验发现,随着 Chemerin 过表达载体浓度增加,脂肪细胞的葡萄糖摄取率无明显变化,说明 Chemerin 对脂肪细胞不具有胰岛素增敏作用,也证实了这一观点。

有理论认为脂肪的蓄积及脂肪细胞体积的增大可使脂肪细胞 Chemerin 的合成及分泌增多,Chemerin 可促进脂肪细胞的分化成熟及脂代谢,如此反复可引起更高水平 Chemerin 的表达,肥胖及 Chemerin 的高表达促进系统性炎症的发生,加剧肥胖及脂代谢紊乱的发生,高 TG 则可促进脂肪组织分泌更高水平 Chemerin^[14]。体外实验发现,胰岛素可促进离体脂肪组织 Chemerin 的分泌,生理胰岛素水平却对脂肪组织 Chemerin 的分泌无影响,长期高胰岛素血症可促进机体脂肪组织 Chemerin 的分泌并使血清 Chemerin 显著升高^[15]。课题组先前研究发现 Chemerin 与 GDM 脂代谢紊乱及慢性炎症状态有关,结合本次研究结果,笔者认为 Chemerin 在 GDM 血清及网膜脂肪组织中的高表达,很可能仅是一种肥胖、GDM 慢性炎症状态及 IR 的补偿机制,是 GDM 机体存在的脂肪蓄积、高脂血症及慢性炎症状态与 Chemerin 的一种交互影响的结果,临床上可以此作为一种衡量孕妇脂代谢紊乱程度和是否存在慢性炎症状态的“生物学标志”,但与 GDM 的 IR 的发生无必然的联系。

尽管如此,Chemerin 与 GDM 之间是否存在其他途径的内在联系?本研究中发现的随 Chemerin 表达增加,IRS-1 mRNA 及蛋白表达基本未见变化,但 IRS-1 磷酸化程度有所增加如何解释?如果 Chemerin 在 GDM 血清及网膜脂肪组织中的高表达仅是一种肥胖、GDM 慢性炎症状态及 IR 的补偿机制,那么这种补偿机制更深层次的内在机制是什么?抑制 GDM 中 Chemerin 的表达,会不会是 GDM 治疗的一种新的思路?这些问题都有待于学术界的共同努力和进一步深入探讨。

参考文献

- [1] Murphy A, Shamshirsaz A, Markovic D, et al. Urinary excretion of myo-Inositol and D-chiro- inositol in early pregnancy is enhanced in gravidas with gestational diabetes Mellitus[J]. *Reprod Sci*, 2016, 23(3): 365-371.
- [2] 杜明钰,尹蓉,马润玫,等. 昆明地区妊娠期糖尿病发生的民族差异[J]. *重庆医学*, 2015, 44(27): 3824-3826.
- [3] Perez-Perez A, Guadix P, Maymo J, et al. Insulin and leptin signaling in placenta from gestational diabetic subjects [J]. *Horm Metab Res*, 2016, 48(1): 62-69.
- [4] Ren C, Zhang Y, Cui W, et al. A polysaccharide extract of mulberry leaf ameliorates hepatic glucose metabolism and insulin signaling in rats with type 2 diabetes induced by high fat-diet and streptozotocin [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 72(4): 951-959.
- [5] Ma Q, Fan J, Wang J, et al. High levels of chorionic gonadotrophin attenuate insulin sensitivity and promote inflammation in adipocytes [J]. *J Mol Endocrinol*, 2015, 54(2): 161-170.
- [6] 李晓红. 脂肪组织 Omentin, Vaspin, Chemerin 与 GDM 胰岛素抵抗的研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2014.
- [7] Liu H, Zhang S, Wang L, et al. Fasting and 2-hour plasma glucose, and HbA1c in pregnancy and the postpartum risk of diabetes among Chinese women with gestational diabetes [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2016, 112(1): 30-36.
- [8] Wei YM, Yan J, Yang HX, et al. Identification of severe gestational diabetes mellitus after new criteria used in China [J]. *J Perinatol*, 2016, 36(2): 90-94.
- [9] 聂绪强, 杨建文, 史海霞, 等. IR-3T3-L1 脂肪胰岛素抵抗细胞的建立 [J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(1): 103-108.
- [10] Wang C, Wang L, Li W, et al. Irisin has no effect on lipolysis in 3T3-L1 adipocytes or fatty acid metabolism in HepG2 hepatocytes [J]. *Endocrine*, 2015, 49(1): 90-96.
- [11] Kitahara A, Takahashi K, Moriya R, et al. Ghrelin augments the expressions and secretions of proinflammatory adipokines, VEGF120 and MCP-1, in differentiated 3T3-L1 adipocytes [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(1): 199-209.
- [12] Inoue H. Central insulin-mediated regulation of hepatic glucose production [J]. *Endocr J*, 2016, 63(1): 1-7.
- [13] Patel TP, Rawal K, Bagchi AK, et al. Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes [J]. *Heart Fail Rev*, 2016, 21(1): 11-23.
- [14] Van Poppel MN, Zeck W, Ulrich D, et al. Cord blood Chemerin: differential effects of gestational diabetes mellitus and maternal obesity [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2014, 80(3): 65-72.
- [15] Cabia B, Andrade S, Carreira MC, et al. A role for novel adipose tissue-secreted factors in obesity-related carcinogenesis [J]. *Obes Rev*, 2016, 17(4): 361-376.