

Leptin 对猪原代脂肪细胞脂解及其关键脂酶 mRNA 表达的影响

李玉成, 郑雪莉, 杨公社

西北农林科技大学动物科技学院 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌 712100

摘要: Leptin 是由脂肪组织分泌的内源因子, 在调节机体能量平衡过程中起重要作用。Leptin 促进脂解的研究由来已久, 但其作用机理尚不完善。本研究旨在通过系统检测关键脂酶 mRNA 的表达变化来探讨 Leptin 促进脂解的分子机理。运用形态学观察、油红 O 染色和 RT-PCR 鉴定培养的猪原代脂肪细胞; 甘油测定试剂盒和游离脂肪酸(FFA)测定试剂盒分别检测甘油和 FFA 的释放; 半定量 RT-PCR 检测关键脂酶 mRNA 的表达。结果显示: 100 nmol/L 的 Leptin 可显著上调 ATGL、TGH-2、HSL、MGL 和 LPL mRNA 的表达($P<0.01$), 但同时下调 Perilipin mRNA 的表达($P<0.01$); Leptin 呈浓度依赖性促进甘油的释放($P<0.01$), 但对 FFA 的释放影响不显著($P>0.05$)。以上结果提示, Leptin 可能主要通过上调 ATGL、MGL、LPL 和下调 Perilipin 的表达促进猪原代脂肪细胞的脂解; 同时推测, FFA 释放的相对稳定可能是由 Leptin 通过上调 UCPs 的表达而增加 FFA 的消耗引起的。

关键词: Leptin, 脂解, 猪, 原代脂肪细胞, 脂解关键脂酶

Effects of Leptin on Porcine Primary Adipocytes Lipolysis and mRNA Expression of Key Lipolytic Enzymes

Yucheng Li, Xueli Zheng, and Gongshe Yang

Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, College of Animal Sciences and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: Leptin, a cytokine predominantly secreted from fat tissue, plays an important role in regulating organism energy balance. Leptin can stimulate lipolysis, but the mechanism is unclear. In order to study the molecular mechanism of leptin stimulating lipolysis, we systemically studied the mRNA expression of key lipolytic enzymes. Morphological observation, Oil Red O staining and RT-PCR were used to identify pig primary adipocytes; commercial kits were used to measure the glycerol and FFA release; Semiquantitative RT-PCR was used to detect the mRNA expression of key lipolytic enzymes. The results showed that 100 nmol/L leptin up-regulated the mRNA expression of ATGL, TGH-2, HSL, MGL and LPL ($P<0.01$), but down-regulated the Perilipin mRNA expression ($P<0.01$). At the same time, leptin promoted the glycerol release in a dose dependent manner ($P<0.01$), but had no effect on the FFA release ($P>0.05$). These indicate that leptin may mainly stimulate lipolysis in pig primary adipocytes by up-regulating the expression of ATGL, MGL, LPL and down-regulating the expression of Perilipin. The unchanged FFA release may be resulted from Leptin promoting UCPs mRNA expression and increasing FFA expenditure.

Received: January 30, 2008; **Accepted:** April 8, 2008

Supported by: the National High Technology Research and Development Program (863 Program) of China (No. 2006AA10Z138).

Corresponding author: Gongshe Yang. Tel: +86-29-87092430; Fax: +86-29-87092430; E-mail: gsyang999@hotmail.com

国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(No. 2006AA10Z138)资助。

Keywords: leptin, lipolysis, pig, primary adipocytes, key lipolytic enzymes

甘油三酯在体内能量代谢中发挥重要作用。脂肪细胞中甘油三酯的脂解是一系列有序调控的过程,在不同的过程中有不同的酶参与^[1-4](如图 1),一旦出现紊乱,就会引起肥胖、胰岛素抵抗和 II 型糖尿病等多种代谢疾病。

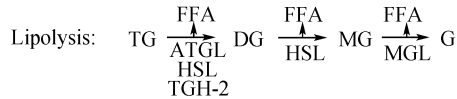


图 1 甘油三酯的脂解过程及主要的脂肪酶

Fig. 1 The major functional lipases and the process of triacylglycerol lipolysis

Adipose triglyceride lipase (ATGL) and Triacylglycerol hydrolase-2 (TGH-2) predominantly perform the initial step in triacylglycerol (TG) hydrolysis resulting in the formation of diacylglycerols (DG) and free fatty acids (FFA). Hormone sensitive lipase (HSL) hydrolyses triacylglycerols, diacylglycerols and monoacylglycerols (MG) at a ratio of 1:10:1. Monoacylglycerol lipase (MGL) is believed to represent the rate-limiting enzyme for monoacylglycerol hydrolysis to form glycerol (G) and fatty acid

甘油三酯的脂解在机体内受到多种细胞因子的调控,其中,Leptin 作为一种脂源细胞因子受到更多关注。Leptin 是 ob(肥胖)基因表达产物,主要由脂肪组织分泌。作为神经内分泌激素,能够提供调节信号,通过抑制食物摄取、提高代谢效率和促进脂肪分解来限制脂肪的储存,在能量平衡中起着重要作用。多项研究证实,Leptin 可以提高脂肪细胞的脂肪分解^[5-7]。目前已有一些研究从脂解关键脂酶 HSL、lipoprotein lipase(LPL)和 Perilipin 的表达来探讨 Leptin 促脂解的机理^[8-11],但这些对机理的探讨主要局限于对 HSL、LPL 和 Perilipin 的表达,没有对 ATGL、TGH-2、MGL 等其他关键脂酶的表达展开研究,尤其还没有从多个脂解基因的表达着手进行系统分析。因而本研究以猪原代脂肪细胞为实验材料,通过 Leptin 处理后系统研究脂解关键脂酶的表达变化来探讨 Leptin 促进脂解的潜在分子机理,为控制人类肥胖及相关代谢疾病的研究提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 试验动物

12 只 2 日龄雄性健康长白仔猪,购自陕西杨凌光明猪场。

1.1.2 主要试剂

DMEM/F12 培养基(Gibco), I 型胶原酶(Sigma), 胎牛血清(民海), Leptin(PeproTech), TRIzol (天根), 反转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶(MBI),甘油测定试剂盒(北京普利莱), FFA 测定试剂盒(北京普利莱), 引物由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 猪脂肪细胞原代培养和处理

无菌状态下采集 2 日龄仔猪脂肪组织,用 I 型胶原酶消化分离前体脂肪细胞,以 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种于 6 孔培养板中,加适量有血清培养基,置 37°C 、5% CO_2 培养箱培养。1 天后去除含有血清的培养基,加入分化诱导液(100 nmol/L 重组牛胰岛素、50 ng/mL 氰化可的松、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 转铁蛋白,无血清培养基配制),3 d 后换为有血清培养基,此后每 2 天换 1 次培养基。在诱导分化的第 7 天,将培养基换成无血清培养基,培养 16 h 后分别以终浓度 50 nmol/L、100 nmol/L 和 150 nmol/L 的 Leptin 处理 3 h。

1.2.2 油红 O 染色鉴定猪脂肪细胞

取培养至第 3 天长满细胞的盖玻片,PBS 冲洗 3 次,10%甲醛固定 30 min,PBS 冲洗 3 次,油红 O 染色 10 min,60%异丙醇分色 20 s,三蒸水冲洗,甘油明胶封片。显微镜观察照相。

1.2.3 培养基中甘油释放测定

收集的培养基在 70°C 加热 10 min,灭活培养基中残余酶的活性。比色法测定培养基中甘油的释放量。将 40 μL 培养基、60 μL 蒸馏水加入 100 μL 甘油测定工作液中,室温静置 30 min 后于 500 nm 比色。利用标准曲线求相应的甘油释放。

1.2.4 培养基中 FFA 释放测定

将 50 μL 的培养基加入 1.5 mL 的抽提剂中,再加入 0.25 mL 铜试剂 Cu Reagent,旋涡震荡 30 s,室温放置 10 min。2000 g 离心 5 min 后,取 1.2 mL 上层相转移到新管,加 0.5 mL 显色试剂 Colour reagent,混匀,室温孵育 30 min 后,用 1-cm 光径玻璃比色杯读取 550 nm OD 值。用标准曲线求相应的 FFA 释放。

1.2.5 总 RNA 提取

收集 0、50 nmol/L、100 nmol/L 和 150 nmol/L

处理 3 h 的脂肪细胞, 按 TRIzol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 琼脂糖电泳检测 RNA 质量, 紫外分光光度计测定其浓度。

1.2.6 半定量 RT-PCR 分析

(1) 反转录(RT): 反应总体积为 20 μ L。取 1~3 μ g 总 RNA 根据反转录试剂盒说明以随机六聚体为引物合成 cDNA 第一链。

(2) PCR: 根据 NCBI 数据库提供的序列设计基因引物(表 1)。反应总体积为 25 μ L。反应体系为:

18.3 μ L ddH₂O, 2.5 μ L 10 \times Buffer, 2.0 μ L MgCl₂, 0.5 μ L dNTPs, 0.5 μ L 上游引物, 0.5 μ L 下游引物, 0.5 μ L cDNA, 0.2 μ L Taq 酶。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 4 min, 95 $^{\circ}$ C 1 min, X $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, Y 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min 终止反应。1%的琼脂糖凝胶检测。电泳分离的 DNA 片断在 Wealtec 凝胶成像系统拍照, 并用 Dophin-1D 凝胶分析软件分析(Wealtec Corp.), 结果用特异基因和 β -actin 电泳带吸光度的相对比值表示。每组实验至少重复 3 次。

表 1 RT-PCR 引物
Table 1 RT-PCR Primers

Genes	cDNA Sequence	Primers (5'-3')	Product sizes (bp)	Annealing times temperature T_m ($^{\circ}$ C)	
				X	Y
ATGL	EF567018	S TCATCATAACCCGCTTCGC	749	56.7	29
		A GCCTGTCTGCTCCTTTATCCA			
HSL	AY686758	S GTCTTTGCGGGTATTCCG	498	53.3	29
		A GCCTGTTTCATTGCGTTTG			
TGH-2	BP442724	S TGAAGAACACCACCTCCTACC	314	57.3	34
		A CCCTGTGCTGAAGAATCCC			
Perilipin	AY973170	S CCCTGGTGGCGTCTGTATG	349	60.4	29
		A GCGGCAIATTCAGCAGTGTC			
LPL	NM_214286	S AACTGTGGCTGCCCTAT	367	51.8	29
		A GACCCTCTGGTGAATGTG			
MGL	DT334398	S TCCAGGTGTTCTGTCAGGG	420	57.3	34
		A GCAGGAAGGCAAGGTCA			
PPAR γ	AB097930	S TTATTGACCCAGAAAGCG	597	48.0	34
		A TGATGGCGTTATGAGACA			
β -actin	J00691	S ACTGCCGCATCCTCTTCCTC	399	55.7-60	29
		A CTCCTGCTTGCTGATCCACATC			

1.2.6 统计分析

检测结果以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。采用 One-Way ANOVA(SPSS11.5)统计软件进行方差分析和显著性检验。

2 结果

2.1 猪脂肪细胞的鉴定

接种 1 d 后的多数细胞形态呈长梭形或星形, 少数呈不规则三角形(图 2A); 在诱导分化的第 3 天, 细胞中有脂滴出现(图 2B), 经油红 O 染色, 可见脂滴被亲脂的油红 O 着色而呈橘红色(图 2C); 用 RT-PCR 检测脂肪细胞的特异性基因 *LPL* 和 *PPAR γ* , 均有目的条带出现(图 2D)。结果表明, 培养的细胞为脂肪细胞。

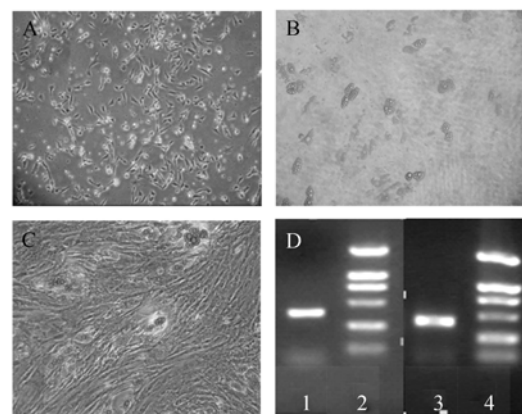


图 2 猪脂肪细胞的鉴定

Fig. 2 Identification of pig adipocytes

A: the cells on day 1 culture; B: the cells on the day 3 of induced differentiation; C: oil red O staining of the cells on the day 3 of induced differentiation; D: RT-PCR of the adipocyte special genes *LPL* and *PPAR γ* respectively, 2 and 4 are both DL-2000 marker

2.2 不同浓度 Leptin 对甘油释放的影响

为了检测 Leptin 对猪原代脂肪细胞脂解的影响, 本实验用甘油测定试剂盒检测培养基中的甘油释放。结果如图 3 所示, 与对照组相比, 50、100 和 150 nmol/L 的 Leptin 均可显著促进甘油的释放 ($P < 0.01$), 并且 Leptin 呈浓度依赖性促进甘油的释放, 其中促进最大甘油释放的浓度为 150 nmol/L。结果表明, Leptin 促进了猪原代脂肪细胞的脂解。

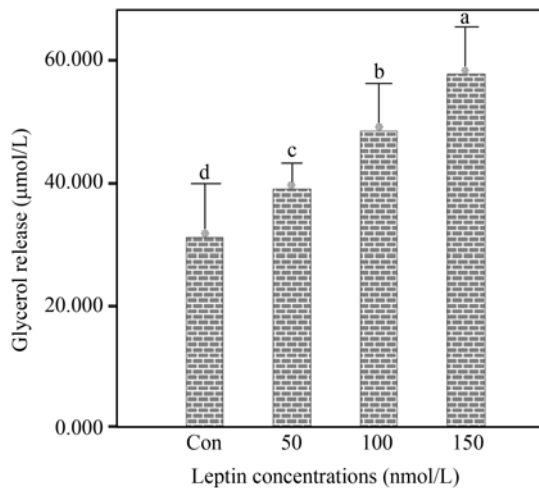


图 3 Leptin 呈浓度依赖性促进猪原代脂肪细胞的甘油释放

Fig. 3 Leptin promotes the glycerol release of pig primary adipocytes in a dose dependent manner

The adipocytes on the 7th day after induced were incubated 16 h in serum-free cultures. Later the cultures were treated with different dose of Leptin for 3 h, then collected, and glycerol release was measured using commercial kit. Data are means±S.D. from three experiments. Different letters show significant differences ($P < 0.01$)

2.3 不同浓度 Leptin 对 FFA 释放的影响

本实验采用 FFA 测定试剂盒检测猪原代脂肪细胞培养基中 FFA 的释放。结果如图 4 所示, 与对照组相比, 50、100 和 150 nmol/L 的 Leptin 均可降低 FFA 的释放, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 不同浓度 Leptin 对脂解关键酶 mRNA 表达的影响

2.4.1 Leptin 对 ATGL mRNA 表达的影响

用 RT-PCR 检测 ATGL mRNA 的表达。结果如图 5B 所示, 50 nmol/L 的 Leptin 可促进 ATGL mRNA 的表达, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 100 和 150 nmol/L 的 Leptin 均可显著促进 ATGL mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 以 150 nmol/L 的 Leptin 处理最显著。以上结果表明, Leptin 可促进 ATGL mRNA 的表达, 并

呈现出浓度依赖性。

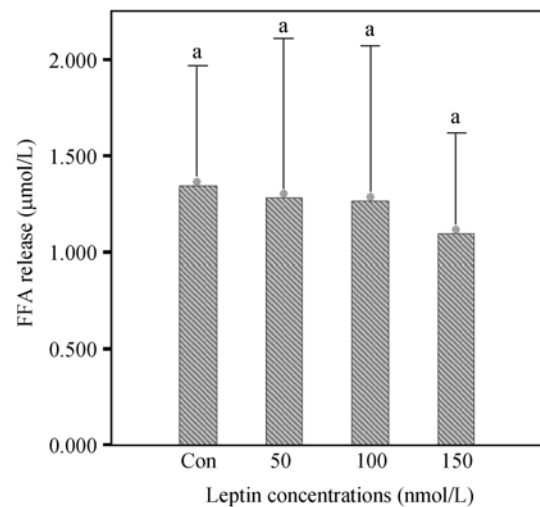


图 4 不同浓度的 Leptin 对猪原代脂肪细胞游离脂肪酸释放的影响

Fig. 4 The effect of different concentration Leptin on the FFA release of pig primary adipocytes

The adipocytes on the 7th day after induced were incubated 16 h in serum-free cultures. Later the cultures were treated with different dose of Leptin for 3 h, then collected, and FFA release was measured using commercial kit. Data are means±S.D. from three experiments. Same letters show there is no significant differences ($P > 0.05$)

2.4.2 Leptin 对 TGH-2 mRNA 表达的影响

如图 5C 所示, RT-PCR 检测结果表明, 与对照组相比, 100 nmol/L 的 Leptin 可显著促进 TGH-2 mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 但 50 和 150 nmol/L 的 Leptin 对 TGH-2 mRNA 的表达影响不显著 ($P > 0.05$)。100 nmol/L 的 Leptin 与 50 nmol/L 的 Leptin 相比, 可显著提高 TGH-2 mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 但与 150 nmol/L 的 Leptin 相比, 虽然可促进 TGH-2 mRNA 的表达, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.4.3 Leptin 对 HSL mRNA 表达的影响

如 Fig. 5D 所示, RT-PCR 检测结果表明, 50 nmol/L 的 Leptin 可促进 HSL mRNA 的表达, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 100 和 150 nmol/L 的 Leptin 均可显著促进 HSL mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 以 100 nmol/L 的 Leptin 处理最显著。

2.4.4 Leptin 对 MGL mRNA 表达的影响

如图 5F 所示, RT-PCR 检测结果表明, 50、100 和 150 nmol/L 的 Leptin 均可显著促进 MGL mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 并且 Leptin 呈浓度依赖性促进 MGL mRNA 的表达, 其中以 150 nmol/L 处理组的表达最高。

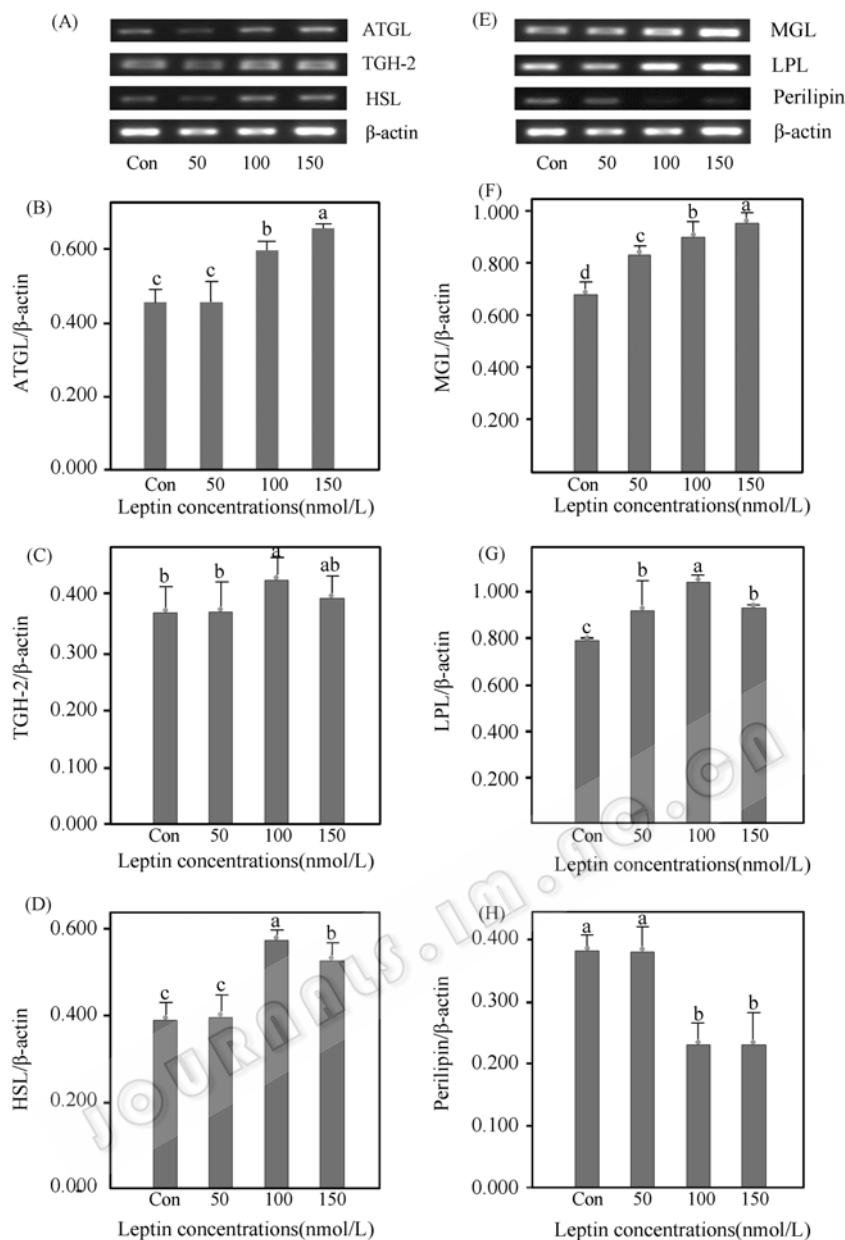


图 5 不同浓度的 Leptin 对脂解关键酶 mRNA 表达的影响

Fig. 5 The effects of different concentration Leptin on the mRNA expression of key lipolytic enzymes

The adipocytes on the 7th day after induced were incubated 16 h in serum-free cultures. Later the cultures were treated with different dose of Leptin for 3 h, then total RNA was isolated, and mRNA expression was measured using semi-quantitative reverse-transcription PCR.

Intensities of PCR products were measured for ATGL (B), TGH-2 (C), HSL (D), MGL (F), LPL (G), Perilipin (H). Data are means \pm S.D. from three experiments. Different letters show significant differences ($P < 0.01$), same letters show there is no significant differences ($P > 0.05$)

2.4.5 Leptin 对 LPL mRNA 表达的影响

如图 5G 所示, RT-PCR 检测结果表明, 50、100 和 150 nmol/L 的 Leptin 均可显著促进 LPL mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 其中以 100 nmol/L 的 Leptin 处理最显著; 50 nmol/L 的 Leptin 和 150 nmol/L 的 Leptin 两个处理组对 LPL mRNA 的表达的影响不显著 ($P > 0.05$)。

2.4.6 Leptin 对 Perilipin mRNA 表达的影响

如图 5H 所示, RT-PCR 检测结果表明, 50 nmol/L 的 Leptin 可降低 Perilipin mRNA 的表达, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 100 和 150 nmol/L 的 Leptin 均可显著降低 Perilipin mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 但 100 nmol/L 和 150 nmol/L 的 Leptin 处理之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

甘油三酯经过一系列复杂的过程分解成甘油和 FFA。通常将甘油释放作为衡量脂解的标准,而 FFA 由于作为能量物质被消耗,只将其作为衡量脂解的一个辅助指标。因此,我们首先检测了 Leptin 对甘油释放的影响。结果表明,与对照组相比,50、100 和 150 nmol/L 的 Leptin 均可显著促进甘油的释放 ($P<0.01$),并且 Leptin 呈浓度依赖性促进甘油的释放。已有的报道显示,Leptin 可以显著提高大鼠脂肪细胞的甘油释放^[5-6],也可以显著提高体外培养的脂肪组织的甘油释放^[7]。这与这些报道一致,表明 Leptin 可以促进甘油的释放。其次,我们检测了 FFA 的释放。本研究发现,50、100 和 150 nmol/L 的 Leptin 均不能显著 ($P>0.05$) 影响 FFA 的释放。Michio Shimabukuro 等(1997)在大鼠下丘脑中导入外源的 Leptin 后,发现血浆中 FFA 的水平并没有显著升高^[12];随后 May-Yun Wang 等(1999)和 Daisuke Tajima 等(2005)分别在细胞和活体上研究 Leptin 对 FFA 释放的影响,也得到了与本研究一致的结果^[5,8]。但 Natsuyo Kawaji(2001)等研究发现,0.0001、0.001、0.1 和 1 nmol/L 的 Leptin 均可以提高培养的小鼠脂肪块的 FFA 的释放^[13]。Leptin 可以通过提高 UCPs 的表达促进 FFA 的氧化^[8,14,15]。因而我们推测,Leptin 在促进甘油释放的同时,也促进了 FFA 的释放,但 Leptin 通过上调 UCPs 的表达提高氧化能力进而消耗更多的脂肪细胞释放的 FFA,进行产热和提供能量。综上所述,本研究通过对甘油和 FFA 的释放研究表明:Leptin 通过提高甘油的释放和 FFA 的消耗来促进甘油三酯的水解。

Leptin 的促脂解作用是通过调控很多脂解相关基因来实现的。脂解相关基因表达的变化是反映脂解作用的一个有效指标。

ATGL 和 TGH-2 的主要作用是启动脂解,将甘油三酯水解成甘油二酯和 FFA。ATGL 在脂肪组织中高表达,特异性水解甘油三酯的第一酯键,是甘油三酯水解的限速酶^[1,2]。TGH-2 与 TGH 同源性非常高,都能够水解甘油三酯,并且都主要在脂肪组织中分布,但与 TGH 相比,TGH-2 在脂肪组织中的表达量要高得多,它在脂解中也起着更重要的作用^[3]。本研究发现,100 和 150 nmol/L 的 Leptin 均可显著促

进 ATGL mRNA 的表达 ($P<0.01$),而只有 100 nmol/L 的 Leptin 可显著促进 TGH-2 mRNA 的表达 ($P<0.01$),50 和 150 nmol/L 的 Leptin 则对 TGH-2 mRNA 的表达影响都不显著 ($P>0.05$)。这些结果提示,Leptin 在促进甘油三酯水解成甘油二酯的过程中,ATGL 比 TGH-2 发挥着更大的作用。

HSL 是甘油二酯分解成甘油一酯的限速酶。本研究发现,100 和 150 nmol/L 的 Leptin 均可显著促进 HSL mRNA 的表达 ($P<0.01$)。这些发现与 Leptin 可以呈浓度依赖性来提高巨嗜细胞 HSL 的活性^[16] 及大鼠用 Leptin 短期处理后可促进 HSL mRNA 的表达^[8] 相一致。同时发现,100 nmol/L 的 Leptin 使 HSL mRNA 的表达最高,150 nmol/L 较 100 nmol/L 的 Leptin 处理使 HSL mRNA 的表达有所下降。Gregory R. Steinberg 等(2002)用 Leptin 长期注射小鼠发现,HSL 的蛋白水平并没有发生变化^[17]。因而推测,Leptin 的促脂解并非通过调控 HSL mRNA 和蛋白的表达,而可能是通过调控 HSL 的酶活来实现的。

MGL 能特异性地将甘油一酯水解为甘油和 FFA^[4,18],使甘油三酯的水解最终完成。本研究发现,Leptin 呈浓度依赖性地促进 MGL mRNA 的表达。先前的 ATGL、TGH-2 和 HSL 在 Leptin 的诱导下使脂肪细胞生成了更多的甘油一酯,但他们对甘油一酯的水解能力非常有限,因此,高丰度的 MGL 为 Leptin 促进脂解提供了可能。

LPL 在甘油三酯代谢中也起着重要的作用^[19,20]。虽有研究报道,Leptin 对 LPL 表达没有任何直接的影响^[21],但更多的研究表明,Leptin 可以提高 LPL mRNA 的表达^[9,10]。本研究与后者结果一致,50、100 和 150 nmol/L 的 Leptin 均可显著促进 LPL mRNA 的表达 ($P<0.01$),结果提示我们,LPL 在 Leptin 促进脂解的过程中可能起着重要的作用。

Perilipin 作为一种分子开关,在基础状态下,阻止脂肪水解酶与脂滴接触,抑制脂解^[22,23];在刺激状态下,被 PKA 磷酸化后,协同 HSL 和 ATGL 促进脂解^[24,25]。本研究表明,100 和 150 nmol/L 的 Leptin 均可显著降低 Perilipin mRNA 的表达 ($P<0.01$),这与 Yaohuang Ke 等(2003)报道的超表达 Leptin 的转基因鼠显著降低了 Perilipin mRNA 的表达^[11] 一致。以上结果提示,在 Leptin 的作用下,Perilipin 表达下降,进而促进 HSL 与脂滴接触,同时提高 ATGL 的水解

活性, 最终提高脂解。

综上所述, 本研究表明 Leptin 呈浓度依赖性促进甘油的释放, 但对 FFA 的释放没有显著影响; Leptin 上调 ATGL、TGH-2、HSL、MGL、LPL 的表达, 并同时下调 Perilipin 的表达。我们推测 Leptin 可能主要通过上调 ATGL、MGL、LPL 和下调 Perilipin 的表达促进猪原代脂肪细胞的脂解; Leptin 在促进脂解的同时, 也促进了 FFA 的释放, 但同时它通过上调 UCPs 的表达增加 FFA 的消耗而使 FFA 的释放处于动态平衡之中。

REFERENCES

- [1] Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 2004, **306**: 1383–1386.
- [2] Kershaw EE, Hamm JK, Verhagen LA, *et al.* Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes*, 2006, **55**: 148–157.
- [3] Okazaki H, Igarashi M, Nishi M, *et al.* Identification of a novel member of the carboxylesterase family that hydrolyzes triacylglycerol: a potential role in adipocyte lipolysis. *Diabetes*, 2006, **55**: 2091–2097.
- [4] Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase and monoacyl-glycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986, **876**: 288–293.
- [5] Wang MY, Lee Y, Roger UH. Novel form of lipolysis induced by leptin. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 17541–17544.
- [6] Ramsay TG. Porcine leptin alters insulin inhibition of lipolysis in porcine adipocytes *in vitro*. *J Anim Sci*, 2001, **79**: 653–657.
- [7] Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, *et al.* Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest*, 1997, **100**: 2858–2864.
- [8] Tajima D, Masaki T, Hidaka S, *et al.* Acute central infusion of leptin modulates fatty acid mobilization by affecting lipolysis and mRNA expression for uncoupling proteins. *Exp Biol Med*, 2005, **230**: 200–206.
- [9] Maingrette F, Renier G. Leptin increases lipoprotein lipase secretion by macrophages: involvement of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes*, 2003, **52**: 2121–2128.
- [10] Scarpace PJ, Matheny M. Leptin induction of UCP1 gene expression is dependent on sympathetic innervation. *Am J Physiol*, 1998, **275**: E259–E264.
- [11] Ke Y, Qiu J, Ogas S, *et al.* Overexpression of leptin in transgenic mice leads to decreased basal lipolysis, PKA activity, and perilipin levels. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **312**: 1165–1170.
- [12] Shimabukuro M, Koyama K, Chen GX, *et al.* Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *PNAS*, 1997, **94**: 4637–4641.
- [13] Kawajia N, Yoshida A, Motoyashiki T, *et al.* Anti-leptin receptor antibody mimics the stimulation of lipolysis induced by leptin in isolated mouse fat pads. *J Lipid Res*, 2001, **42**: 671–677.
- [14] Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, *et al.* Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *PNAS*, 1997, **94**: 4637–4641.
- [15] Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, *et al.* Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP activated protein kinase. *Nature*, 2002, **415**: 339–343.
- [16] O'Rourke L, Yeaman SJ, Shepherd PR. Insulin and leptin acutely regulate cholesterol ester metabolism in macrophages by novel signaling pathways. *Diabetes*, 2001, **50**: 955–961.
- [17] Steinberg GR, Bonen A, Dyck DJ. Fatty acid oxidation and triacylglycerol hydrolysis are enhanced after chronic leptin treatment in rats. *Am J Physiol-Endoc M*, 2002, **282**: E593–E600.
- [18] Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, *et al.* cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 27218–27223.
- [19] Nicklas BJ, Rogus EM, Berman DM, *et al.* Responses of adipose tissue lipoprotein lipase to weight loss affect lipid levels and weight regain in women. *Am J Phys*, 2000, **279**: E1012–1019.
- [20] Berman DM, Nicklas BJ, Ryan AS, *et al.* Regulation of lipolysis and lipoprotein lipase after weight loss in obese, postmenopausal women. *Obes Res*, 2004, **12**: 32–39.
- [21] Ranganathan S, Ciaraldi TP, Henry RR, *et al.* Lack of effect of leptin on glucose transport, lipoprotein lipase, and insulin action in adipose and muscle cells. *Endocrinology*, 1998, **139**: 2509–2513.
- [22] Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, *et al.* Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 38486–38493.
- [23] Martinez-Botas J, Anderson JB, Tessier D, *et al.* Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in Lepr(db/db) mice. *Nat Genet*, 2000, **26**: 474–479.
- [24] Hideaki M, Sandra SC, Zhang HH, *et al.* Perilipin promotes hormone sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 2006, **281**: 15837–15844.
- [25] Miyoshi H, Perfield JW, Souza SC, *et al.* Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated Lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem*, 2007, **282**: 996–1002.