

网络出版时间: 2023-03-28 15:32:22 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20230328.1031.010.html>

CTRP9 对冷刺激诱导的小鼠棕色脂肪组织脂质代谢的影响

关 华^{1,2}, 常换换³, 李向宇², 王 雪⁴, 郝 扬⁴, 郝军军⁴, 郭锋伟⁴, 师 桃⁴

摘要 目的 探究过表达 C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9 (CTRP9) 对冷刺激诱导后小鼠棕色脂肪组织脂质代谢相关基因和蛋白的表达调控。方法 C57BL/6J 雄性小鼠分为对照组 (Ad-GFP 组)、实验组 (Ad-CTRP9 组), 分别注射 Ad-GFP、Ad-CTRP9 腺病毒。两组小鼠经普通饮食饲喂 7 d 后再置于 4 °C 环境中冷刺激 10 h, 利用 Real-time PCR 和 Western blot 技术检测棕色脂肪组织标志基因和蛋白表达。结果 在冷刺激诱导下过表达 CTRP9 棕色脂肪组织中碘化甲状腺腺氨酸脱碘酶 2 (Dio2) 的 mRNA 水平升高 ($P < 0.01$), 棕色脂肪组织标志基因 (UCP-1、PGC-1 α 、PRDM16 和 AR β 3)、脂质合成与分解相关基因 (PPAR γ 、HSL 和 ATGL) 表达水平无显著性差异。Western blot 结果显示, 与 Ad-GFP 组相比, 经冷刺激诱导后 Ad-CTRP9 组解偶联蛋白 1 (UCP-1) 蛋白表达升高, 而脂肪分解相关蛋白脂肪三酰甘油脂肪酶 (ATGL) 表达下降 ($P < 0.05$)。结论 在寒冷环境下, 过表达 CTRP9 促进 UCP-1 蛋白在棕色脂肪组织中蓄积, 上调甲状腺激素信号相关基因 Dio2 表达, 并抑制三酰甘油水解以维持体温恒定。

关键词 冷刺激; CTRP9; 棕色脂肪; UCP-1; ATGL

中图分类号 Q 95-33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)04-0577-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.010

棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT) 线粒体内富含的解偶联蛋白 1 (uncoupling protein 1, UCP-1) 通过非颤抖性产热抵御寒冷^[1]。研究^[2]表明, 在 4 °C 环境中 BAT 相关基因表达增加, 冷诱导

产热和 BAT 的质量及活动性之间有相关性, 并且冷诱导产热量与 BAT 活动性呈正相关。因此, 冷刺激是诱导棕色脂肪分化的强烈刺激因子。

补体 C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9 (C1q/TNF-related proteins 9, CTRP9) 于 2009 年由 Wong et al^[3] 首次鉴定并克隆得到, 与脂联素 (adiponectin, APN) 具有高度同源性^[4]。过表达 CTRP9 可以减少食物的摄入和增加基础能量代谢。标准喂食条件下, CTRP9 基因敲除小鼠的肥胖率远高于对照组^[5]。Wolf et al^[6] 发现肥胖患者代谢手术后, CTRP9 水平较术前下降明显。然而, 在冷刺激诱导下, CTRP9 对小鼠 BAT 中脂质代谢相关基因和蛋白的表达调控仍不清楚。该研究主要采用腺病毒过表达及 Western blot 等分子生物学技术, 探索 CTRP9 在寒冷刺激后对小鼠 BAT 脂质代谢的影响, 为将来临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 本研究中用到的雄性 C57BL/6J 小鼠 20 只, 6 周龄, 购买自北京维通利华实验动物技术有限公司 [北京 SYXK(京) 2017-0033]。动物 3 只 1 笼, 饲养环境为清洁级, 室内温度保持在 (22 ± 2) °C、光照 12 h 明/12 h 暗、噪声等均符合国际要求 (GB14925-2010), 自由饮水和采食。研究方法和伦理审查通过西安交通大学实验动物管理委员会批准 (编号: 2022-4323), 遵循美国国立卫生研究院出版的《实验动物护理和使用指南》(2011 年第 8 版) 规定执行。

1.2 材料

1.2.1 主要试剂 RT-PCR Mix、逆转录试剂盒和 SYBR Green 试剂 (日本 TaKaRa 公司); 蛋白提取试剂盒 (广州 Omega 公司); β -actin 抗体 (美国 Abcam 公司); UCP-1 抗体、APN (美国 R&D 公司); 脂肪三酰甘油脂肪酶抗体 (fatty triglyceride lipase, ATGL) (上海 Abmart 公司); Perilipin2 抗体 (美国 Protein-tech 公司)。本实验中纯化腺病毒-绿色荧光蛋白 (adenovirus green fluorescent protein, Ad-GFP) 和腺病毒-C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9 (adenovirus

2023-02-06 接收

基金项目: 陕西省教育厅科学研究计划项目 (编号: 22JS031); 陕西省科学技术厅科技计划项目 (编号: 2022SF-472、2022SF-019); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (编号: 2021JQ-785); 西安医学院大学生创新创业计划 (编号: 121520027)

作者单位: ¹ 西安交通大学心血管研究中心脂代谢与动脉粥样硬化研究室, 西安 710061

² 西安医学院基础与转化医学研究所, 西安 710021

³ 西安交通大学附属西安市儿童医院耳鼻喉科, 西安 710003

⁴ 西安交通大学第一附属医院心血管外科, 西安 710061

作者简介: 关 华, 女, 博士, 讲师;

师 桃, 女, 博士, 副主任医师, 责任作者, E-mail: shi2009tao@163.com

Clq/TNF-related proteins 9, Ad-CTRP9) 购自上海吉玛基因有限公司。病毒纯化试剂盒购自美国 Sartorius 公司。

1.2.2 主要仪器 荧光定量 PCR 仪(型号: Step One Plus ABI) 购于美国 Thermo 公司; 微量核酸蛋白紫外分析仪(型号: Genove Nano) 购于英国 JENWAY 公司; 化学发光凝胶成像系统(型号: XRS + 1708265) 购于美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与处理 6 周龄 C57BL/6 野生型小鼠共 20 只, 随机分为对照组和实验组。其中对照组小鼠肩胛注射 Ad-GFP 腺病毒, 实验组小鼠肩胛注射 Ad-CTRP9 腺病毒, 利用腺病毒载体达到过表达 CTRP9 的目的, 两组小鼠病毒注射量均为 1×10^{10} vp/只。随后, 小鼠经普通饮食饲喂 7 d 后再置于 4 °C 环境中冷刺激 10 h。将小鼠安乐死, 取肩胛 BAT, 提取总 RNA 和总蛋白后, RT-PCR 和 Western blot 分析 CTRP9 调控棕色脂肪形成过程中基因和蛋白表达。

1.3.2 RNA 制备和定量 PCR 检测 利用 TRIzol 法分别提取小鼠 BAT 总 RNA, 逆转录酶合成 cDNA 后, 依据 NCBI 序列设计引物, Real-time PCR 分别检测棕色脂肪细胞标志基因。

1.3.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 用组织裂解液裂解组织提取总蛋白, BCA 法测定蛋白质浓度。将蛋白样品加入上样孔, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 再经过 PVDF 膜湿转法转膜、5% 脱脂牛奶封闭, 在 4 °C 冰箱中摇床上用特异性的一抗孵育过夜。孵育与之对应的二抗, 持续 2 h。洗膜 3 次后, 用 ECL 发光液发光显影。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析(ANOVA), 两组之间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CTRP9 蛋白过表达的鉴定 Western blot 方法检测 CTRP9 蛋白的表达, 结果显示, 与 Ad-GFP 组相比, Ad-CTRP9 组 CTRP9 蛋白表达水平升高($t = 2.869$, $P < 0.01$), 表明小鼠肩胛部 BAT 中 CTRP9 蛋白过表达模型构建成功。见图 1。

2.2 冷刺激对于过表达 CTRP9 小鼠的相关脂肪因子 mRNA 表达的影响 采用 RT-PCR 检测相关

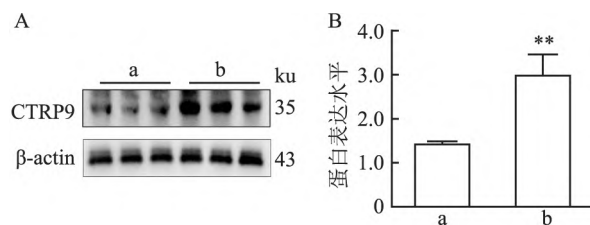


图1 BAT 中 CTRP9 蛋白表达

A: Western blot 检测 CTRP9 蛋白表达; B: CTRP9 蛋白表达统计直方图; a: Ad-GFP 组; b: Ad-CTRP9 组; 与 Ad-GFP 组比较: ** $P < 0.01$

脂肪因子 mRNA 的表达。结果显示, 与 Ad-GFP 组相比, Ad-CTRP9 组小鼠 BAT 中脂滴形成蛋白碘甲状腺原氨酸脱碘酶 2 (iodothyronine deiodinase 2, Dio2) 基因表达水平升高(图 2) ($t = 4.793$, $P < 0.01$)。而其他基因, 如 UCP-1、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活子-1 α (PGC-1 α)、PR 结构域锌指蛋白 16 (PRDM16)、激素敏感型脂肪酶 (HSL)、ATGL 及肾上腺素受体 $\beta 3$ (AR $\beta 3$) 表达未见明显增高, 差异无统计学意义。见图 2。

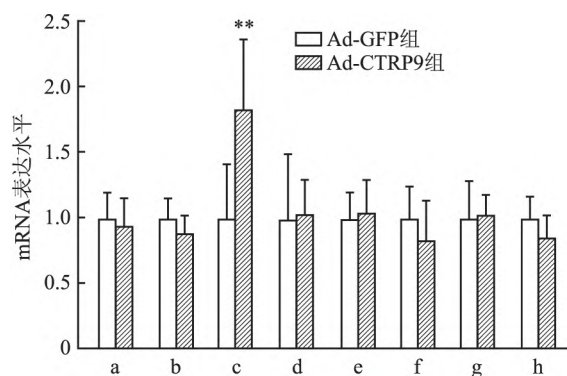


图2 棕色脂肪脂质代谢相关基因 mRNA 表达

a: AR $\beta 3$; b: HSL; c: Dio2; d: PGC-1 α ; e: ATGL; f: PRDM16; g: UCP-1; h: PPAR γ ; 与 Ad-GFP 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 冷刺激对于过表达 CTRP9 小鼠的 BAT 中相关脂肪因子蛋白表达水平的影响 Western blot 方法检测冷刺激后过表达 CTRP9 的 C57BL/6 小鼠相关脂肪因子蛋白表达水平, 结果显示, 与 Ad-GFP 对照组相比, 冷刺激后 Ad-CTRP9 组小鼠 BAT 中的 UCP-1 蛋白表达水平上调($t = 5.081$, $P < 0.05$)。而过表达 CTRP9 之后, 冷刺激诱导脂肪分解相关蛋白 ATGL 表达水平下降($t = 2.869$, $P < 0.05$)。此外, 与对照组相比, Ad-CTRP9 组小鼠过表达 CTRP9 促进脂联素蛋白 (Adiponectin) 表达水平轻微升高, 而

脂滴包被蛋白 2(Perilipin2) 蛋白有所下降,但两者统计学差异不显著($t=2.284$ $P>0.05$)。见图 3。

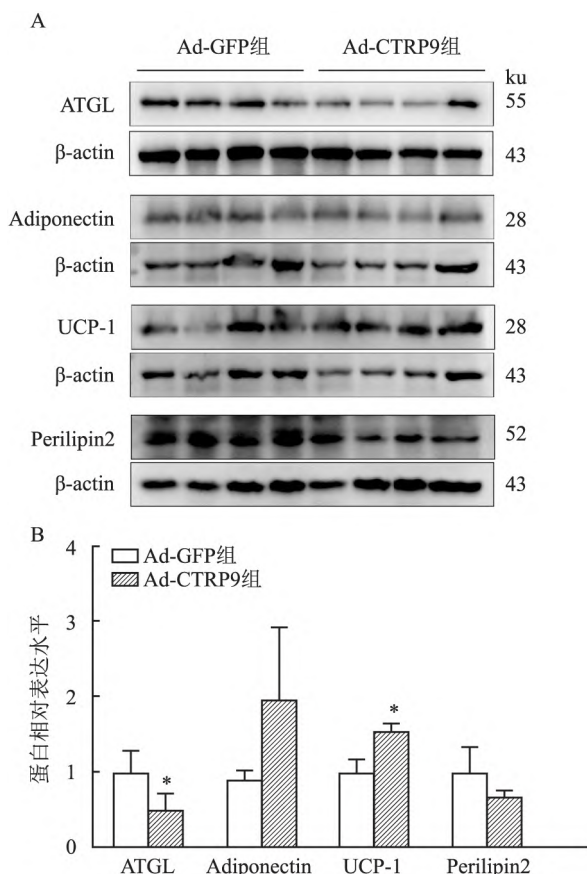


图3 Western blot 检测 BAT 脂质代谢相关蛋白表达

A: Western blot 检测 ATGL、UCP-1 和 Perilipin2 蛋白表达水平;

B: 蛋白表达统计直方图; 与 Ad-GFP 组比较: * $P<0.05$

3 讨论

既往研究表明,CTRP9 在脂质代谢^[7-8]、葡萄糖转运^[9]及肌肉脂肪酸氧化过程中发挥重要作用^[10]。如 CTRP9 转基因小鼠骨骼肌细胞内脂肪酸氧化相关基因表达是对照组的 3 倍,体内总胆固醇(total cholesterol, TC)水平显著降低,由此缓解了肥胖与 2 型糖尿病的发生发展^[10]。因此,CTRP9 可成为调控脂质代谢、预防代谢性相关疾病的新靶点。在本研究中,利用冷刺激诱导探索 CTRP9 在 BAT 中对棕色脂肪脂质代谢相关基因和蛋白表达的调控,结果显示,脂肪分解相关蛋白 ATGL 表达显著下调,而棕色脂肪标志蛋白 UCP-1 表达上调,推测 CTRP9 通过抑制棕色脂肪分解、线粒体电子传递活跃以提高非颤抖性产热,由此维持寒冷环境中小鼠体温恒定。

冷暴露是一种非颤抖性产热的强刺激因子,在

冷暴露诱导的条件下开展的实验研究是探索脂肪激活产热的经典方法。在 4℃ 条件下 BAT 中 Janus 激酶 2(JAK2)与 UCP-1 的蛋白水平上调,冷刺激激活的棕色脂肪将三酰甘油转至胞内,迅速清除血浆中的三酰甘油^[8]。本研究结果显示,BAT 中过表达 CTRP9 蛋白的小鼠,冷刺激诱导下 UCP-1 蛋白表达较对照组明显增加,与之前的报道相一致^[8],而 UCP-1 mRNA 却未见明显升高,推测可能与蛋白转录后修饰有关。

研究表明,BAT 组织特异性 *Dio2* 敲除小鼠,在 4℃ 条件下核心体温下降约 2.3℃,其适应性产热能力明显下降^[11]。上述结果提示,*Dio2* 在 BAT 中作为维持体温的关键基因发挥重要功能。本研究显示,冷刺激条件下过表达 CTRP9 小鼠 BAT 中的 *Dio2* 基因表达较对照组明显增加,提示过表达 CTRP9 促进 BAT 产热。脂肪细胞脂滴内贮存的三酰甘油可以被水解产生游离脂肪酸(FFAs)为周围组织供能^[12]。冷刺激时 ATGL 敲除小鼠无法动员脂质分解产生游离脂肪酸导致产热不足出现核心体温下降^[13]。因此,本研究冷刺激条件下过表达 CTRP9 抑制 ATGL 表达,可能是由于 ATGL 蛋白表达降低抑制 BAT 中脂肪分解以维持体温恒定。

综上所述,该研究主要采用腺病毒过表达及 Western blot 等分子生物学技术,探索 CTRP9 在寒冷刺激后对小鼠 BAT 脂质代谢的影响。结果表明,在寒冷环境下,过表达 CTRP9 促进 UCP-1 蛋白在 BAT 中蓄积,上调甲状腺激素信号相关基因 *Dio2* 表达,并抑制三酰甘油水解以维持体温恒定。

参考文献

- [1] Chouchani E T, Kazak L, Spiegelman B M. New advances in adaptive thermogenesis: UCP1 and beyond[J]. Cell Metab, 2019, 29(1): 27-37.
- [2] Scheele C, Wolfrum C. Brown adipose crosstalk in tissue plasticity and human metabolism[J]. Endocr Rev, 2020, 41(1): 53-65.
- [3] Wong G W, Krawczyk S A, Kitidis-Mitrokostas C, et al. Identification and characterization of CTRP9, a novel secreted glycoprotein, from adipose tissue that reduces serum glucose in mice and forms heterotrimers with adiponectin[J]. FASEB J, 2009, 23(1): 241-58.
- [4] 刘鲁倩,陈玲,秦叙青,等. 脂联素对脓毒症小鼠心肌损伤的保护作用及其机制[J]. 安徽医科大学, 2022, 57(1): 36-40.
- [5] Wei Z, Lei X, Petersen P S, Aja S, et al. Targeted deletion of C1q/TNF-related protein 9 increases food intake, decreases insulin sensitivity, and promotes hepatic steatosis in mice[J]. Am J

- Physiol Endocrinol Metab ,2014 ,306(7) : E779 – 90.
- [6] Wolf R M , Steele K E , Peterson L A , et al. C1q/TNF-related protein-9 (CTRP9) levels are associated with obesity and decrease following weight loss surgery [J]. *J Clin Endocrinol Metab* ,2016 , 101(5) : 2211 – 7.
- [7] Kambara T , Ohashi K , Shibata R , et al. CTRP9 protein protects against myocardial injury following ischemia-reperfusion through AMP-activated protein kinase (AMPK) -dependent mechanism [J]. *J Biol Chem* ,2012 ,287(23) : 18965 – 73.
- [8] Su H , Yuan Y , Wang X M , et al. Inhibition of CTRP9 , a novel and cardiac-abundantly expressed cell survival molecule , by TN- α -initiated oxidative signaling contributes to exacerbated cardiac injury in diabetic mice [J]. *Basic Res Cardiol* ,2013 , 108 (1) : 315.
- [9] 薛亚军,黄文华,杜雅彦,等. 冠心病心外膜脂肪组织中 KLF7 促进炎症反应及脂肪分化成熟 [J]. *安徽医科大学学报* ,2022 , 57(2) : 197 – 202.
- [10] Oi N , Itoh M , Tobimatsu Y , et al. Glucose uptake is decreased in affected lower leg muscles of hemiparetic persons during level walking [J]. *Tohoku J Exp Med* ,2015 , 237(4) : 307 – 15.
- [11] Galton V A , Martinez E , Hernandez A , et al. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed in the rat uterus and induced during pregnancy [J]. *Endocrinology* ,2001 , 142(5) : 2123 – 8.
- [12] Bartelt A , Bruns O T , Reimer R , et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance [J]. *Nat Med* ,2011 , 17(2) : 200 – 5.
- [13] Rutkowski J M , Stern J H , Scherer P E. The cell biology of fat expansion [J]. *J Cell Biol* ,2015 , 208(5) : 501 – 12.

Effect of CTRP9 on lipid metabolism in brown adipose tissue of mice induced by cold stimulation

Guan Hua^{1 2} , Chang Huanhuan³ , Li Xiangyu² , Wang Xue⁴ , Gao Yang⁴ , Hao Junjun⁴ , Guo Fengwei⁴ , Shi Tao⁴
(¹Laboratory for Lipid Metabolism and Atherosclerosis , Xi'an Jiaotong University Cardiovascular Research Center , Xi'an 710061; ²Institute of Basic and Translational Medicine of Xi'an Medical University , Xi'an 710021;
³Dept of Otolaryngology , Xi'an Children's Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University , Xi'an 710003;
⁴Dept of Cardiovascular Surgery , The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University , Xi'an 710061)

Abstract Objective To explore the effect of C1q/tumor necrosis factor-related protein 9 (CTRP9) on the expression of genes and proteins related to lipid metabolism of brown adipose tissue (BAT) in mice after cold stimulation. **Methods** C57BL/6J male mice were injected with adenovirus Ad-GFP (control group) or Ad-CTRP9 (experience group) into the scapular region and kept for 7 days. After cold stimulation at 4 °C for 10 hours , the expression levels of BAT marker genes and proteins were detected by real time PCR and Western blot. **Results** Overexpression of CTRP9 induced by cold stimulation significantly increased the mRNA level of iodothyronine deiodinase 2 (*Dio2*) in BAT ($P < 0.01$). Additionally , there was no significant difference in the expression of BAT marker genes (*UCP-1* , *PGC-1 α* , *PRDM16* and *AR β 3*) , and liposynthesis and lipolysis related genes (*PPAR γ* , *HSL* and *ATGL*) . Uncoupling protein 1 (UCP-1) protein expression was upregulated in Ad-CTRP9 compared to the Ad-GFP control group , while the expression of lipolysis related protein adipose triglyceride lipase (ATGL) decreased significantly ($P < 0.05$) . **Conclusion** In cold environment , overexpression of CTRP9 promotes the accumulation of UCP-1 protein in BAT , upregulates the expression of thyroid hormone signal related gene *Dio2* , and inhibits triglyceride hydrolysis to maintain a constant body temperature.

Key words cold stimulation; CTRP9; brown adipose tissue; UCP-1; ATGL