

## 干预 GPR1 通路对实验性小鼠脂肪累积的影响\*

田小飞<sup>1, 2)\*\*</sup> 马玮娟<sup>1)\*\*</sup> 方光光<sup>3)\*\*</sup> 肖天霞<sup>1)</sup> 陈杰<sup>1)</sup> 张键<sup>1)\*\*\*</sup>

<sup>(1)</sup> 中国科学院深圳先进技术研究院生殖健康实验室, 深圳 518055; <sup>(2)</sup> 中国科学技术大学纳米学院, 苏州 215123;

<sup>(3)</sup> 深圳市第二人民医院, 深圳 518039)

**摘要** 一直以来, 肥胖是令人担忧和烦恼的健康问题, 可导致包括 2 型糖尿病在内的代谢综合征发生. 与肥胖相关疾病的发病机制是多因子影响的结果, 但是, 越来越多的证据表明, 脂肪组织分泌的细胞因子(脂联素、瘦素、TNF- $\alpha$  等)的改变, 以及局部的炎症反应对于这些疾病的发生具有重要作用. Chemerin(也被称为他扎罗汀诱导基因 2 或者视黄酸受体反应子 2), 是近年来发现的一种脂肪细胞因子, 是 G 蛋白偶联受体 1(GPR1)的配体, 在调节代谢、先天免疫等方面具有重要的作用. 为了研究 Chemerin 及其受体 GPR1 对小鼠脂肪累积的影响, 本课题组通过高脂饲料喂养, 成功建立小鼠肥胖模型, 利用 siRNA 干扰技术沉默小鼠和分化前 3T3-L1 细胞中 Chemerin 或 GPR1 基因的表达发现: a. Chemerin 及其受体 GPR1 在高脂饲料喂养小鼠的腹股沟脂肪以及肩胛下脂肪中的表达高于正常饲料组; b. 沉默 C57BL/6 小鼠体内 Chemerin 或 GPR1 基因的表达后, 肝脏以及腹股沟脂肪组织中脂质的累积受到抑制; c. 3T3-L1 细胞在体外分化成熟过程中, Chemerin 和 GPR1 也呈高表达的趋势, 沉默分化前 3T3-L1 细胞中 Chemerin 或 GPR1 基因的表达后, 3T3-L1 细胞向脂肪细胞的分化受到影响, 降低了脂肪细胞中脂质的累积以及与脂质代谢相关基因的表达, 改变了成熟脂肪细胞中新陈代谢功能. 这些结果提示, Chemerin 及其受体 GPR1 可能在小鼠脂肪累积中具有调控作用. 综上所述, Chemerin/GPR1 可能是一种调节脂肪组织中脂质累积的潜在信号通路, 为肥胖症等代谢紊乱疾病的治疗提供了可能的作用靶点.

**关键词** 脂肪细胞, Chemerin, GPR1, siRNA 干扰技术

**学科分类号** Q26, Q26

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2015.0030

脂肪组织是调节能量平衡的储能器官<sup>[1]</sup>, 初期是由围绕着成纤维前脂肪细胞、纤维细胞、上皮细胞、神经和免疫细胞的脂肪细胞组成. 近年来的研究表明, 脂肪组织除了具有储能功能外, 还具有分泌脂肪细胞因子的功能<sup>[2]</sup>, 例如分泌肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、脂联素、瘦素、IL-6、Chemerin 等. 脂肪细胞因子通过旁分泌或者自分泌的作用, 在调节脂肪细胞分化、新陈代谢和局部炎症方面具有重要的作用<sup>[3-4]</sup>. 同时, 脂肪细胞因子通过大脑、肝脏、肌肉的内分泌在调节全身脂质和血糖代谢方面也有重要的作用<sup>[5-7]</sup>. 其中, 细胞因子 Chemerin (也被称为他扎罗汀诱导基因 2 或视黄酸受体反应子 2)是 2007 年被确定的一种新型脂肪细胞因子<sup>[8]</sup>, 据目前的研究发现, 与之对应的 G 蛋白偶联受体有: 孤儿 G 蛋白偶联受体趋化因子样受体 1 (chemokine-like receptor 1 CMKLR1)、C-C 趋化因子样受体 2(C-C chemokine receptor-like CCRL2)和

G 蛋白偶联受体 1 (G-protein coupled receptor 1 GPR1)<sup>[9-10]</sup>. 分子质量 18 ku 的 Chemerin 是一个没有生物活性的复合蛋白, 被称为 chemerin 前体 (prochemerin), 其 C 端部分经胞外丝氨酸蛋白酶的裂解可以转变为具有 16 ku 高生物活性的 chemerin 蛋白<sup>[11-13]</sup>. 由于 Chemerin 的受体之一——CMKLR1, 早于 GPR1 受体被发现, 所以, 迄今为止, Chemerin/CMKLR1 信号通路的生物学功能方面研究较多, 包括免疫<sup>[14]</sup>、炎症<sup>[15]</sup>、代谢<sup>[16]</sup>、癌症<sup>[17]</sup>及生殖<sup>[18]</sup>, 而有关 Chemerin/GPR1 信号通路在脂肪细

\* 中国科学院百人计划(Y14401), 深圳市国际合作项目(GJHZ20130417171414743, GJHZ20130412153906741)和深圳市战略新兴产业发展项目(cxzz20130329101949981)资助.

\*\* 共同第一作者.

\*\*\* 通讯联系人.

Tel: 0755-86392290, E-mail: jian.zhang@siat.ac.cn

收稿日期: 2015-01-27, 接受日期: 2015-03-12

胞分化及肥胖病中的作用, 国内外尚无报道. GPR1 与 CMKLR1 在系统发生树中亲源关系非常接近, 同时, GPR1 与 CMKLR1 一样, 都与 Chemerin 具有高亲和性, 具有一定的生物活性功能<sup>[19]</sup>. 已有研究显示, Chemerin 及其受体 GPR1 在白色脂肪组织中高表达, GPR1 基因缺失与能量代谢相关<sup>[20]</sup>, 因此, 探索 Chemerin/GPR1 信号通路在脂质累积中的作用是十分有必要的.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物、细胞及试剂

C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物中心; 3T3-L1 小鼠前脂肪细胞购自上海中国科学院细胞库; DMEM 高糖培养基, 胎牛血清(FBS), 磷酸盐缓冲液(PBS)均购自 Hyclone 公司; 0.25%胰酶, 青、链霉素购自 Gibco 公司; RNA 提取液 Trizol, Neon™ Transfection System 电转仪购自

Invitrogen 公司; PCR 引物都由 Invitrogen 公司合成; 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤(IBMx), 胰岛素, 油红 O, 苏木精染液购自 Sigma 公司; 地塞米松磷酸钠注射液(DEX)购自天津药业集团新郑股份有限公司; Toyobo 逆转录试剂盒, QuantiFast SYBR Green PCR 定量 PCR 试剂盒购自 Qiagen 公司; 甘油三酯(TG), 血清总胆固醇(TC), 谷丙转氨酶(ALT), 谷草转氨酶(AST)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 苦味酸(2, 4, 6- 三硝基酚)购于广州化学试剂厂; 甲醛购于国药集团化学试剂有限公司; 冰乙酸购于上海凌峰化学试剂有限公司; 无水乙醇购于国药集团化学试剂有限公司; 二甲苯购于西陇化工股份有限公司; 伊红染色购于广州市秀威贸易有限公司; 封片胶(Fisher Scientific-Permount), 盖玻片(CITOGLS 世泰 - 高品质显微镜盖玻片 -100 片装), Chemerin 和 GPR1 对应的 siRNA 序列由吉玛公司设计并合成, 具体质粒序列见表 1.

Table 1 Sequence for siRNA

| Genes      | Forward(5'→3')            | Reverse(5'→3')           |
|------------|---------------------------|--------------------------|
| siGPR1     | CCACUCUUUGGUUCCUCAA-dTdT  | UUGAGGAACCAAAGAGUGG-dTdT |
| siChemerin | CUUCCUACCUUGGACAGUUU-dTdT | AAACUGUCCAGGUAGGAAG-dTdT |

#### 1.1.2 培养基配方

3T3-L1 完全培养基: DMEM 高糖培养基, 10%胎牛血清; 3T3-L1 诱导分化培养基: DMEM 高糖培养基, 10%胎牛血清, 0.5 mmol/L 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤(IBMx), 1.0 μmol/L 地塞米松磷酸钠注射液(DEX), 5 mg/L 胰岛素; 3T3-L1 分化维持培养基: DMEM 高糖培养基, 10%胎牛血清, 5 mg/L 胰岛素.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 C57/BL6 小鼠高脂喂养模型的建立及采样

C57/BL6 小鼠的喂养程序符合国家和中国科学院深圳先进技术研究院制订的有关实验动物福利的规则和制度. 6 周 C57/BL6 小鼠随机分成 4 组, 每组 6 只并记录初始体重. Chow-NC 组喂食含 5.9% 能量的正常饲料(chow), 其余 3 组喂食含有 45% 能量的高脂饲料(HFD), 每周称量小鼠体重, 并分别以每天尾静脉注射 100 μl 非特异 siRNA(NC)、GPR1-siRNA 和 Chemerin-siRNA, 连续 4 周. 分为 HFD-NC 组、HFD-siGPR1 组和 HFD-siChemerin 组.

喂养 4 周后, 采用眼球摘除法取血, 处死小鼠后取腹股沟脂肪, 肝脏, 称重记录. 腹股沟白色脂肪组织分 2 份, 分别置于波恩试剂(苦味酸: 甲醛: 冰乙酸=15: 5: 1)室温固定以进行石蜡包埋和 RNA 提取液 Trizol 中, -80℃ 保存以提取 RNA; 肝脏组织处理同上; 血浆分离血清(2 000 g, 4℃, 10 min)冻存于-80℃.

#### 1.2.2 小鼠肝脏与白色脂肪组织 H&E 染色

小鼠肝脏和脂肪组织石蜡包埋、切片、脱蜡(二甲苯 I, 二甲苯 II 溶液各 10 min), 复水(梯度浓度 100%、90%、80%、70%、50%乙醇, 各 5 min), 漂洗(双蒸水 10 min), 苏木素染核(3 min), 漂洗(双蒸水, 2 min), 氨水返蓝(40 ml 双蒸水, 200 μl 氨水, 1 min), 双蒸水漂洗, 盐酸中(40 ml 双蒸水, 1~2 滴浓 HCl, 10 s)切片变为红色或粉红色时立即停止. 双蒸水漂洗, 氨水返蓝 3 min, 梯度乙醇脱水(50%、70%、80%、90%, 各 1 min, 100%乙醇, 3 s), 伊红染色 3 s, 脱水(100%乙醇, 2 min×2), 透明(二甲苯), 中性树脂封片.

1.2.3 细胞培养, 转染及诱导分化

用完全培养基体外培养 3T3-L1 小鼠脂肪细胞 (CO<sub>2</sub> 浓度 5%, 37℃ 恒温培养箱), 每 2 天换液. 待细胞生长达到 80%左右时, 胰蛋白酶消化 (0.25%), 用加入含有 10%血清的细胞培养基终止消化, 收集细胞(1 000 r/min 5 min, PBS 清洗, 重复 1 次)用适量的 Buffer R 重悬细胞, 使细胞密度达到 1 ×10<sup>7</sup>/ml, 分组加入适量的 siGPR1、siChemerin 质粒和非特异 siRNA(NC), 点击座上加入 3 ml Buffer E, (Neon™ Transfection System 电转仪, 250V, 20 ms), 转染后的细胞以 2×10<sup>5</sup> 个 / 孔铺于加入完全培养基于 37℃ 培养箱预热的 12 孔板中, 培养 24 h, 待细胞生长至单层, 诱导培养基培养 24 h, 换分化维持培养基进行培养并于 24 h 后和 48 h 后分别收集上清, RNA 提取液 Trizol 收集细胞, -80℃ 冻存. 所用 siGPR1、siChemerin 质粒

序列见表 1.

1.2.4 油红 O 染色

诱导结束后, 1×PBS 洗细胞培养板 3 次, 多聚甲醛室温固定(4%, PBS 配制, 30 min)1×PBS 洗细胞培养板 2 次, 油红 O 染色(0.3%, 37℃ , 15 min), 用 PBS 清洗后, 正置显微镜拍照记录; 并通过比色定量分析检测 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中胞浆脂质的堆积.

1.2.5 RT-qPCR(实时荧光定量 PCR)

按照 Tokara 公司 Trizol 法, 从肝脏组织、白色脂肪组织、3T3-L1 细胞中提取 RNA 进行 RT-qPCR(Toyobo 逆转录试剂盒、QuantiFast SYBR Green PCR 试剂盒、Roche Light Cycler 480 II), 反应体系: 95℃ 5min、95℃ 10 s、60℃ 30 s、72℃ 20 s、扩增 40 个循环. 所用引物序列见表 2.

Table 2 Primers for RT-qPCR

| Genes    | Forward(5'→3')             | Reverse(5'→3')              |
|----------|----------------------------|-----------------------------|
| β-actin  | GTATCCATGAAATAAGTGGTTACAGG | GCAGTACATAATTTACACAGAAGCAAT |
| Chemerin | TACAGGTGGCTCTGGAGGAGTTC    | CTTCTCCCGTTTGGTTTGATTG      |
| GPR1     | AATGCCATCGTCATTTGGTT       | CAACTGGGCAGTGAAGGAAT        |
| TNF-α    | ATGCTGGGACAGTGACCTGG       | CCTTGATGGTGGTGCATGAG        |
| IL-6     | TTCCATCCAGTTGCCTTCTTG      | GAAGGCCGTGGTTGTCACC         |
| PPARγ    | TCTGGGAGATTCTCCTGTTGA      | GGTGGGCCAGAATGGCATCT        |
| C/EBP α  | AGCAACGAGTACCGGGTACG       | TGTTTGGCTTTATCTCGGCTC       |
| FABP4    | AAGGTGAAGAGCATCATAACCCCT   | TCACGCCTTTCATAACACATTCC     |

1.2.6 血清中 TG、TC、ALT、AST 浓度检测

按照购自南京建成生物工程研究所甘油三酯 (TG)、血清总胆固醇(TC)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)试剂盒内说明书要求, 一一检测小鼠血清中 TG、TC、ALT、AST 的浓度.

1.2.7 统计分析

用 Prism5.0 软件处理实验数据, 所有实验结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 对实验结果进行 Student *t*-test 检验, 当 *P* < 0.05 时则称具有统计学意义.

2 结 果

2.1 小鼠脂肪组织中 Chemerin 和 GPR1 mRNA 的表达水平

Chemerin mRNA 在正常饲料喂养的小鼠腹股沟白色脂肪组织、肠系膜脂肪组织和肩胛下棕

色脂肪组织中的表达水平高于其他部位的脂肪组织 (图 1a); GPR1 mRNA 在正常饲料喂养的小鼠腹股沟白色脂肪组织和肩胛下棕色脂肪组织中的表达高于其他组织(图 1b); 高脂饲料喂养 4 周后, 与正常饲料喂养相比, Chemerin 和 GPR1 mRNA 在小鼠腹股沟白色脂肪组织和肩胛下棕色脂肪组织中的表达明显增加.

2.2 Chemerin 和 GPR1 基因沉默对小鼠体重、脂质代谢和肝功能的影响

HFD-NC 组小鼠 TC、TG 水平均显著高于 Chow-NC 组; HFD-siChemerin 组和 siGPR1-HFD 组小鼠体重较 HFD-NC 组降低但无统计学意义, 这两组 TC 和 TG 水平分别显著高于 Chow-NC 组; ALT 和 AST 在各组均不具有显著性差异, 说明 Chemerin 或 GPR1 基因的沉默对于小鼠肝功能没

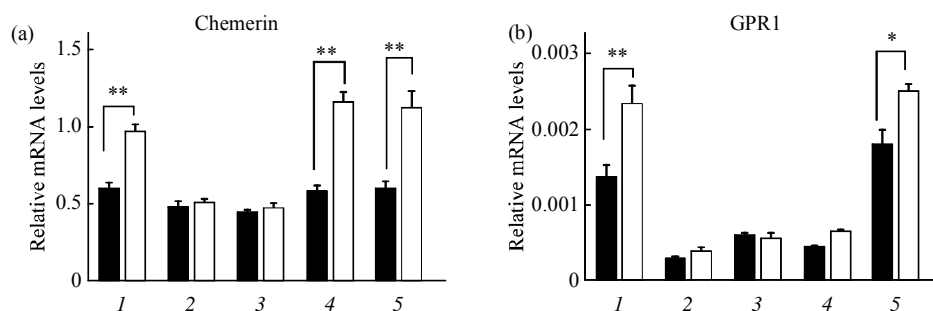


**Fig. 1 Chemerin and GPR1 mRNA expression in white adipose tissue in Chow and HFD group**

Relative expression of chemerin (a) and GPR1 (b) were determined in Chow or HFD mouse tissues by real time quantitative PCR. The corresponding data is presented as the  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ . 1: Inguinal; 2: Epididymal; 3: Renal; 4: Mesentery; 5: Subscapular. ■: Chow; □: HFD.

有影响; HFD-NC 组、HFD-siChemerin 组和 HFD-siGPR1 肝脏重量均显著高于 Chow-NC 组(表 3, 图 2a, b). HFD-NC 组小鼠肝脏较 Chow-NC 组增

大, HFD-siChemerin 和 HFD-siGPR1 组肝脏较 HFD-NC 组减小(图 2c).

**Table 3 Serum concentrations of parameters of lipid metabolism and liver function**

| Group          | TC(mmol/L)                | TG(mmol/L)                | ALT(U/L)    | AST(U/L)    |
|----------------|---------------------------|---------------------------|-------------|-------------|
| Chow-NC        | 3.52 ± 0.17               | 1.03 ± 0.11               | 25.69 ± 2.1 | 21.22 ± 1.7 |
| HFD-NC         | 4.32 ± 0.16 <sup>a)</sup> | 1.43 ± 0.14 <sup>a)</sup> | 35.26 ± 3.8 | 23.09 ± 1.6 |
| HFD-siChemerin | 3.69 ± 0.21 <sup>b)</sup> | 1.21 ± 0.08 <sup>b)</sup> | 33.17 ± 3.1 | 22.39 ± 1.9 |
| HFD-siGPR1     | 3.84 ± 0.25 <sup>c)</sup> | 1.29 ± 0.09 <sup>c)</sup> | 34.24 ± 3.8 | 22.39 ± 1.9 |

Serum concentrations of parameters of lipid metabolism and liver function in negative control Chow or HFD group and siChemerin or siGPR1 HFD group. <sup>a)</sup> Means HFD-NC compares with Chow-NC,  $P < 0.05$ . <sup>b)</sup> Indicates siChemerin HFD compares with Chow-NC,  $P < 0.05$ . <sup>c)</sup> Shows siGPR1 HFD compares with Chow-NC,  $P < 0.05$ .

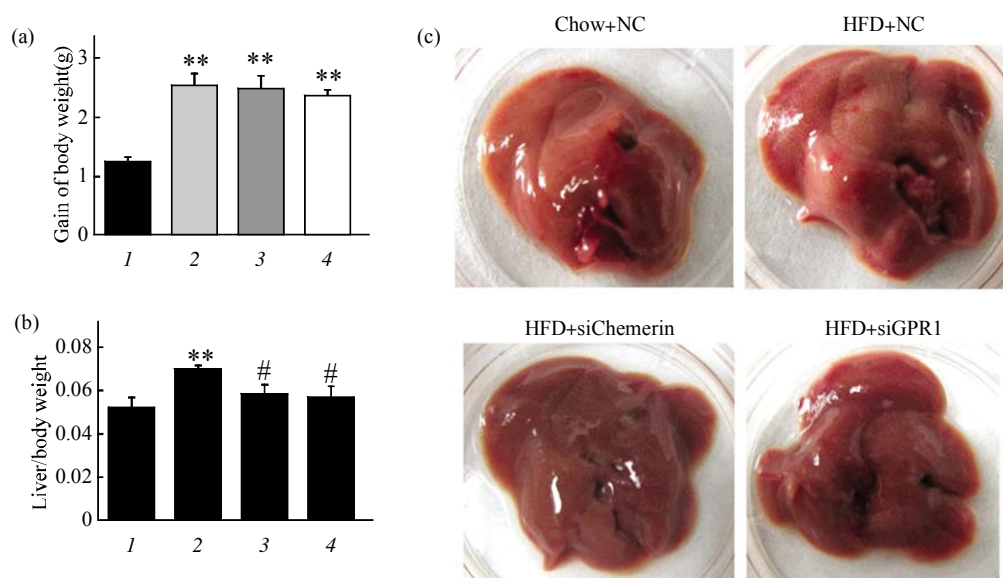


**Fig. 2 Mouse body weight and liver changes in Chow-NC, HFD-NC, HFD-siChemerin and HFD-siGPR1 groups**

(a) The gain of body weight in all groups. ( $**P < 0.01$ ). (b) The liverweight in all groups. HFD-NC compared with Chow-NC ( $**P < 0.01$ ), siChemerin or siGPR1 compared with HFD-NC ( $\#P < 0.05$ ). 1: Chow+NC; 2: HFD+NC; 3: HFD+siChemerin; 4: HFD+siGPR1. (c) The images of liver in experimental and negative control groups. The data is presented as the  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ .

2.3 Chemerin 和 GPR1 基因沉默影响小鼠肝脏和脂肪组织脂质累积

小鼠肝脏组织形态见图 3a, Chow-NC 组小鼠, 肝窦清晰、肝索排列整齐、细胞结构清晰、细胞质丰富、细胞核位于细胞中央、肝细胞未发生脂肪变性; HFD-NC 组, 肝细胞核大小不一、肝细胞发生大泡性和小泡性混合脂肪变性、出现大量脂滴形成的脂肪空泡; 而与 HFD-NC 组相比, HFD-siChemerin 和 HFD-siGPR1 组细胞结构清晰、

细胞核位于细胞中央清晰可见、肝细胞脂肪变性程度明显降低、脂滴形成的空泡明显减少。通过测定肝脏中脂肪含量百分比可以定量看出(图 3b), HFD-NC 组小鼠肝脏中脂肪含量是 Chow-NC 组肝脏中脂肪含量的 30 倍, 而与 HFD-NC 组相比, HFD-siChemerin 和 HFD-siGPR1 组小鼠肝脏中的脂肪含量明显降低, 说明 Chemerin 和 GPR1 的基因沉默可以降低小鼠肝脏中脂质的累积。

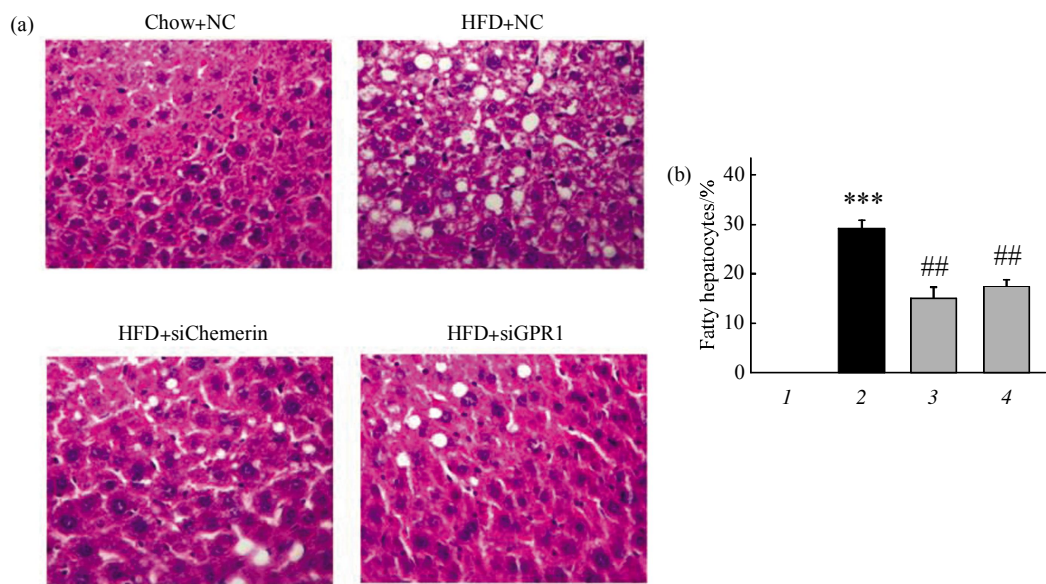


Fig. 3 The morphology of mouse liver with HE stain and percentage of fatty hepatocytes in Chow+NC, HFD+NC, HFD+siChemerin and HFD+siGPR1 group

(a) The morphology of mouse liver with HE stain displayed the different fat storage, the higher one in HFD +NC, the less one in Chow+NC, and moderate one in the other two. (b) Percentage of fatty hepatocytes in all groups. Compare with chow+NC group (\*\*\* $P < 0.001$ ), compare with HFD+NC group (## $P < 0.01$ ). The data is presented as the  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ . Magnification:  $\times 40$ . 1: Chow+NC; 2: HFD+NC; 3: HFD+siChemerin; 4: HFD+siGPR1.

小鼠腹股沟白色脂肪组织形态学分析(图 4a), Chow-NC 组, 脂肪细胞直径小、排列紧密、细胞核均匀分布在脂肪细胞周围; HFD-NC 组脂肪细胞直径明显增大、细胞核受肥大脂肪细胞挤压、不易被观察; 与 HFD-NC 组相比, HFD-siChemerin 和 HFD-siGPR1 组小鼠脂肪细胞直径明显降低、细胞排列紧凑、细胞核分布均匀清晰可见。每个实验组随机选取 4 个视野测定 150 个腹股沟脂肪细胞直径, 计算平均值(图 4b), HFD-NC 组脂肪细胞平均直径是 Chow-NC 组的 2 倍, HFD-siChemerin 和 HFD-siGPR1 组脂肪细胞平均直径明显小于 HFD-NC 组, 说明 Chemerin 或者 GPR1 的基因沉

默在一定程度上抑制了 C57BL/6 小鼠肝脏和脂肪组织中脂质的累积。

2.4 3T3-L1 小鼠前脂肪细胞分化过程中 Chemerin 和 GPR1 mRNA 的表达水平

Chemerin 和 GPR1 mRNA 的表达水平随着 3T3-L1 小鼠前脂肪细胞(Pre-diff)分化程度的加剧而呈现逐渐上升的趋势(图 5a)。与转染非特异性 siRNA 对照组(NC)相比(图 5b), 转染 Chemerin siRNA(siChemerin) 2 天后, 实验组 Chemerin 和转染 GPR1 siRNA(siGPR1) 2 天后, 实验组 GPR1 的 mRNA 水平明显降低。

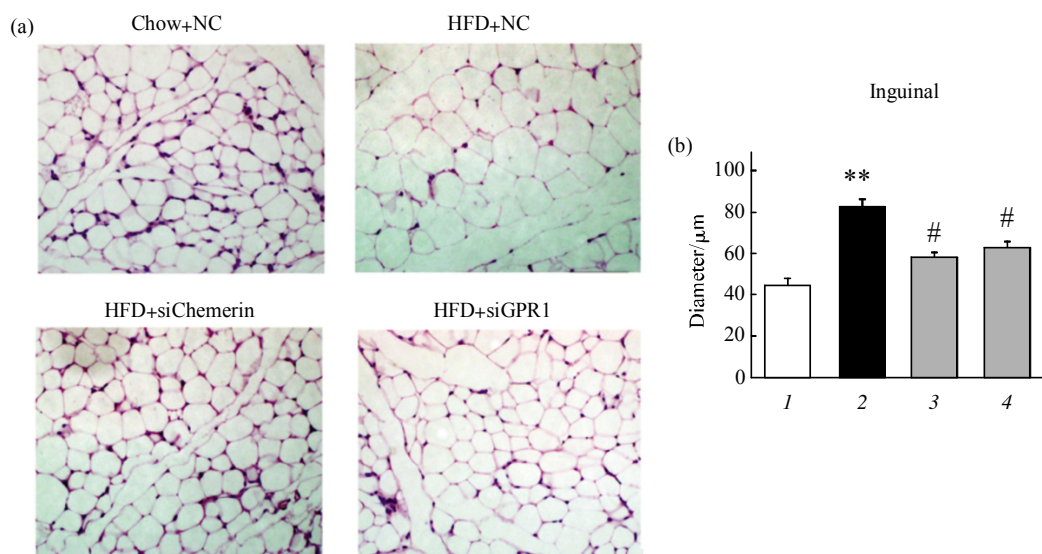


**Fig. 4 The morphology of mouse inguinal adipose tissue and diameter of adipocyte in Chow+NC, HFD+NC, HFD+siChemerin and HFD+siGPR1 group**

(a) The morphology of adipose tissue using eosin methylene blue dye. (b) The average diameters of inguinal adipocyte. Compare with Chow+NC group (\*\* $P < 0.01$ ), compare with HFD+NC group (# $P < 0.05$ ). The data is presented as the  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ . Magnification:  $\times 40$ . 1: Chow+NC; 2: HFD+NC; 3: HFD+siChemerin; 4: HFD+siGPR1.

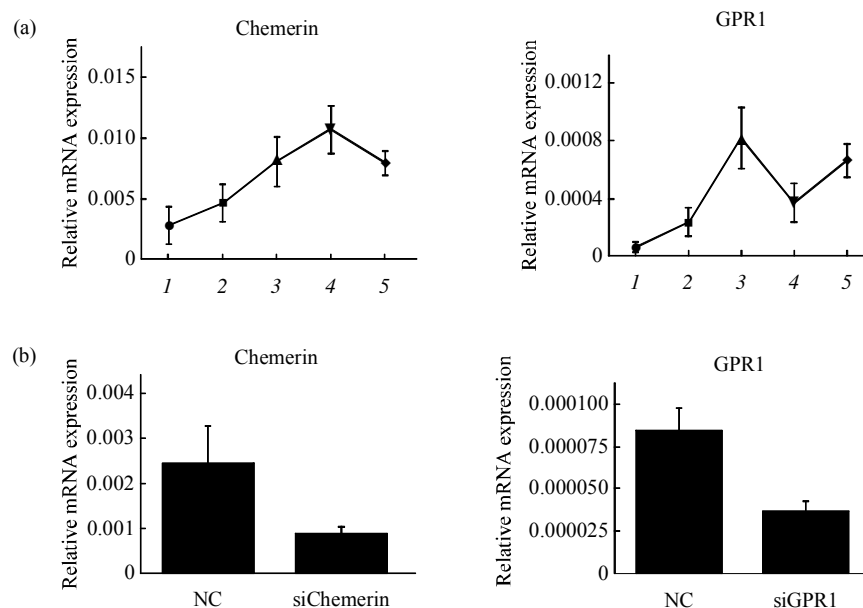


**Fig. 5 Chemerin and GPR1 mRNA expression level in 3T3-L1 adipocytes**

Chemerin and GPR1 mRNA were measured by RT-qPCR in pre-differentiate day (pre-diff), post-differentiate day 1(post1), day 3(post3), day 5(post5) and day 7(post7). (a) Chemerin and GPR1 mRNA are expressed increasingly with adipogenesis of 3T3-L1 adipocytes. 1: Pre-diff; 2: Post1; 3: Post3; 4: Post5; 5: Post7. (b) Chemerin and GPR1 expression level after transfecting pre-differentiated 3T3-L1 adipocytes with siChemerin or siGPR1. The data is presented as the  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ .

## 2.5 Chemerin 和 GPR1 基因敲弱对 3T3-L1 小鼠前脂肪细胞分化的影响

各实验组 3T3-L1 脂肪细胞油红染色发现, 与 Pre-diff 组相比, NC 组出现大量脂滴聚集;

siChemerin 和 siGPR1 组较 NC 组脂滴聚集明显减少(图 6a)。比色定量分析显示: NC 组脂肪含量是 Pre-diff 组 4 倍, 与 NC 组相比, siChemerin 和 siGPR1 组脂肪含量明显降低。

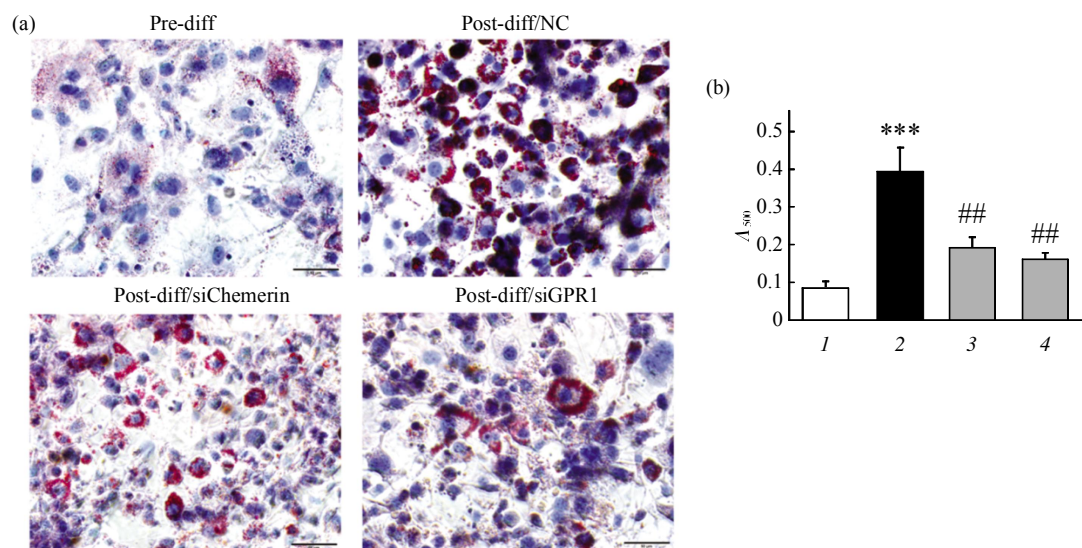


**Fig. 6 Pre-differentiation knockdown of Chemerin or GPR1 alter the lipid accumulation during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes**

(a) Oil red O staining of adipocyte lipid demonstrates post-differentiation negative control group accumulates more lipid than pre-differentiation of 3T3-L1. Post-differentiation siChemerin or siGPR1 group shows that less lipid was accumulated than post-differentiation negative control group. (b) The quantitative colorimetric assay indicates more lipid was accumulated in post-differentiation negative control group compared with pre-differentiation group (\*\* $P < 0.001$ ), and post-differentiation siChemerin or siGPR1 group less lipid was accumulated than post-differentiation negative control group (\*\* $P < 0.01$ ). The data is presented as the  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ . pre-diff means pre-differentiate 3T3-L1 dipocyte and post-diff means post-differentiate 3T3-L1 adipocyte. 1: Pre-diff; 2: Post-diff/NC; 3: Post-diff/siChemerin; 4: Post-diff/GPR1.

为了进一步探索上述实验现象, 在 3T3-L1 小鼠前脂肪细胞未分化前敲弱 Chemerin 或者 GPR1 基因, 诱导其分化后检测成脂关键转录因子、重要调节蛋白以及炎症因子的 mRNA 水平(图 7a, b). 3T3-L1 小鼠前脂肪细胞分化前, siChemerin 组和 siGPR1 组分别与 NC 组相比, 成脂关键转录因子 C/EBP $\alpha$ 、成脂标记基因 PPAR $\gamma$ 、脂肪酸结合蛋白 (FABP4) 以及炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 表达水平均无显著性差异; 3T3-L1 小鼠前脂肪细胞分化后第一天 (post1) 和第二天 (post2), NC 组、siChemerin 组和 siGPR1 组的 C/EBP $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、FABP4、TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 表达都明显上调, 并且在 post2 的水平高于 post1. 其中在 post1 期、siChemerin 组 C/EBP $\alpha$  和 FABP4 的表达高于 NC 组, PPAR $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 则低于 NC 组; C/EBP $\alpha$  和 TNF- $\alpha$  与 Pre-diff 相比无统计学差异, 其余均具有显著统计学意义; 而在 post2 期, 均表现为显著低于 NC 组. siGPR1 组 TNF- $\alpha$  在 post2 期表达高于 NC 组但无统计学差异, 其余在 post1 和 post2 期表达均低于 NC 组, 与 Pre-diff 相比均

具有显著性差异.

## 4 讨 论

近年来的研究报道显示, 脂肪组织作为一个调节能量平衡的器官, 不仅具有储能的功能, 而且作为一个内分泌器官在机体的能量平衡中也发挥着至关重要的作用<sup>[1]</sup>. 脂肪组织的生长一般同时伴随着脂肪细胞数量的增多、体积的增大以及前脂肪细胞不断分化为成熟的脂肪细胞<sup>[21]</sup>. 脂肪细胞的增多、分化的异常会导致脂肪的过多堆积, 进而导致肥胖、胰岛素抵抗等能量代谢的紊乱<sup>[22]</sup>, 目前, 这些已经成为影响人类健康的重要问题, 并且是二型糖尿病、卵巢癌、心脏病等人类致死性疾病的共同危险因素. 脂肪细胞分化的分子机制和成脂机理的研究一直以来都是国际上研究的热点, 了解体内脂肪细胞的产生过程, 明确脂肪细胞分化中的分子机理, 对解决一系列肥胖相关疾病具有重要的现实意义<sup>[23]</sup>.

目前, 对于小鼠脂质累积研究较多的信号通路有 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路<sup>[24]</sup>、Chemerin/CMKLR1

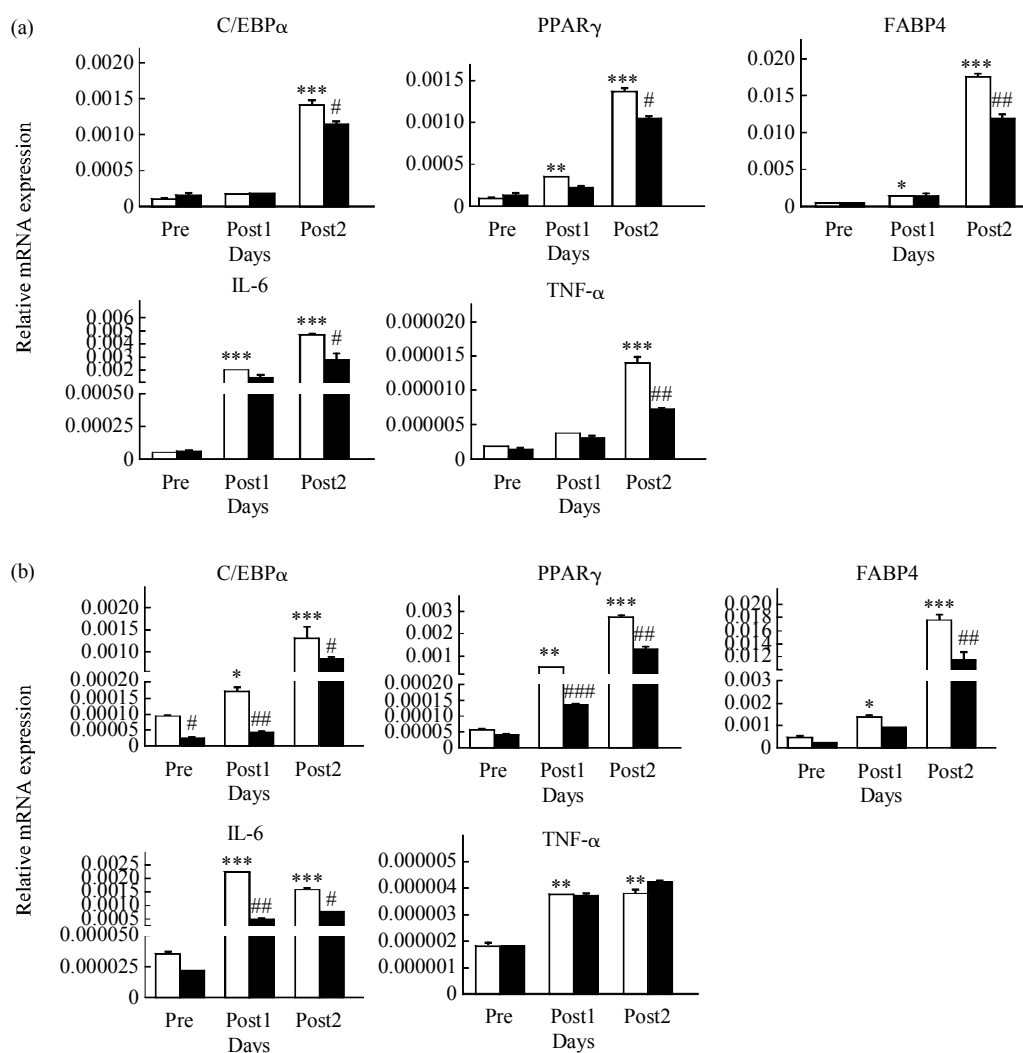


**Fig. 7 Pre-differentiation knockdown of chemerin or GPR1 alters the expression of adipocyte genes**

The C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , FABP4, IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA expression were measured by RT-qPCR in siChemerin (a) and siGPR1 (b) group in pre-differentiate day (pre), post-differentiate day 1 (post1) and day 2 (post2). The relative mRNA expression is shown as the mean of 3~5 replicates pooled from three experiments. The data is presented as the  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ . \*: Compared with pre-differentiate NCgroup. #: Compared with siChemerin or siGPR1 in post1 and post2 day separately. (a) □: NC; ■: siChemerin. (b) □: NC; ■: siGPR.

信号通路<sup>[25]</sup>等, 而 Chemerin/GPR1 信号通路对于小鼠脂质累积影响的研究国内外尚无报道。然而, Barnea 等<sup>[10]</sup>发现, Chemerin 的受体 GPR1 与其另一受体 CMKLR1 亲源关系非常接近, 并证明了 GPR1 与 CMKLR1 都是 Chemerin 的高亲和性受体, 且具有生物活性功能。所以 Chemerin/GPR1 信号通路对于脂质在小鼠体内的累积可能具有同样潜在的影响。本实验利用 siRNA 干扰技术, 沉默 C57BL/6 小鼠体内 Chemerin 或者 GPR1 基因的表达, 通过一系列生物技术手段, 检测小鼠肝脏以及白色脂肪组织中脂质的累积情况; 实验结果显示, Chemerin 和 GPR1 高表达于小鼠白色脂肪组织中,

肥胖小鼠白色脂肪组织中表达更为明显, 这与 Bozaoglu 等<sup>[6]</sup>的报道结果一致。我们在沉默 C57BL/6 小鼠体内 Chemerin 或者 GPR1 基因后, 发现小鼠肝脏和白色脂肪组织中脂质的堆积明显被抑制, 这与已有的报道<sup>[26]</sup>Chemerin 或者 CMKLR1 基因缺失小鼠较正常小鼠肝脏中脂质累积减少结果相类似。

目前, 转录因子 CAAT 增强子结合蛋白  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ )和过氧化物酶增殖物活化受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )被认为是调控 3T3-L1 小鼠前脂肪细胞成脂分化最关键的转录因子<sup>[27-28]</sup>。同时, Kajimoto 等<sup>[29]</sup>研究发现, 脂肪酸结合蛋白(FABP4), 是脂肪细胞分化晚

期表达上调的重要蛋白之一, FABP4 基因表达的上调, 不仅可以加速泡沫细胞中胆固醇和甘油三酯的积累, 而且会影响脂代谢相关基因的表达; 肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白介素 6 (IL-6)<sup>[14, 30]</sup> 是由脂肪细胞、单核巨噬细胞等产生的炎症因子, 与糖脂代谢、胰岛素抵抗密切相关; Chae 等<sup>[31]</sup> 研究揭示 TNF- $\alpha$  表达有利于抑制脂肪细胞增殖及肥胖发生。然而, 与正常人相比, 肥胖症患者脂肪组织中常表达更多的 TNF- $\alpha$ , 导致机体产生 TNF- $\alpha$  抵抗。肥胖患者体脂含量增加时, 机体会反馈性增加 TNF- $\alpha$  的表达和分泌, 加重这种抵抗状态; IL-6 作为一种炎症因子, 大量分泌会促进 B 淋巴细胞分化和 T 淋巴细胞过度激活, 与其他细胞因子和效应细胞产生的细胞毒素结合, 可以引起胰岛  $\beta$  细胞死亡, 加重胰岛素抵抗; 同时 IL-6 还可以增加葡萄糖摄取, 降低胰岛素敏感性, 抑制脂肪分解, 导致脂质累积, 肥胖程度加剧<sup>[32]</sup>。实验结果显示, 在 3T3-L1 小鼠前脂肪细胞分化的过程, Chemerin 和 GPR1 与脂肪分化相关, 沉默 Chemerin 或者 GPR1 基因能显著减少脂质堆积, 抑制 C/EBP $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  mRNA 以及 FABP4 和炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 的表达。提示在 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中, 一方面 Chemerin/GPR1 可能通过干扰 C/EBP $\alpha$  的表达, 进而影响下游 PPAR $\gamma$  和 FABP4 激活而导致脂肪细胞分化被抑制, 另一方面 Chemerin/GPR1 可能通过抑制炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 的表达从而增强 TNF- $\alpha$  和胰岛素的敏感, 进而改善因 TNF- $\alpha$  和胰岛素抵抗引起的代谢紊乱, 减少脂肪细胞内脂质的积聚, 抑制脂肪细胞的分化。

综上所述, 本课题组关于 Chemerin/GPR1 信号通路对于影响小鼠脂肪细胞中脂质累积的研究, 可能为脂肪细胞的分化机制提供了新的见解, 从而深化了对脂肪细胞分化机制的理解, 为肥胖症等代谢紊乱性疾病的治疗提供可能的作用靶点。

## 参 考 文 献

- [1] Galic S, Oakhill J S, Steinberg G R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, **316** (2): 129-139
- [2] Cinti S. The adipose organ at a glance. *Disease Models & Mechanisms*, 2012, **5**(5): 588-594
- [3] Wellen K E, Hotamisligil G S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, **112**(12): 1785-1788
- [4] Cianflone K, Xia Z, Chen L Y. Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2003, **1609**(2): 127-143
- [5] Klok M D, Jakobsdottir S, Drent M L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity Reviews*, 2007, **8**(1): 21-34
- [6] Lago F, Gomez R, Gomez-Reino J J, *et al.* Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 2009, **34**(10): 500-510
- [7] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*, 2002, **8** (11): 1288-1295
- [8] Goraliski K B, McCarthy T C, Hanniman E A, *et al.* Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282** (38): 28175-28188
- [9] Yoshimura T, Oppenheim J J. Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (CCRL2); Two multifunctional receptors with unusual properties. *Experimental Cell Research*, 2011, **317**(5): 674-684
- [10] Barnea G, Strapps W, Herrada G, *et al.* The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(1): 64-69
- [11] Warne J P. Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. *Journal of Endocrinology*, 2003, **177**(3): 351-355
- [12] Meder W, Wendland M, Busmann A, *et al.* Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23. *FEBS Letters*, 2003, **555**(3): 495-499
- [13] Wittamer V, Franssen J D, Vulcano M, *et al.* Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *Journal of Experimental Medicine*, 2003, **198**(7): 977-985
- [14] Wittamer V, Bondue B, Guillaubert A, *et al.* Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity. *Journal of Immunology*, 2005, **175**(1): 487-493
- [15] Zabel B A, Allen S J, Kulig P, *et al.* Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *J Biol Chem*, 2005, **280**(41): 34661-34666
- [16] Bozaoglu K, Bolton K, Mcmillan J, *et al.* Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology*, 2007, **148**(10): 4687-4694
- [17] Pachynski R K, Zabel B A, Kohrt H E, *et al.* The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses. *Journal of Experimental Medicine*, 2012, **209**(8): 1427-1435
- [18] Garces M F, Sanchez E, Acosta B J, *et al.* Expression and regulation of chemerin during rat pregnancy. *Placenta*, 2012, **33**(5): 373-378
- [19] Roh S G, Song S H, Choi K C, *et al.* Chemerin—A new adipokine that modulates adipogenesis *via* its own receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, **362**(4): 1013-1018
- [20] Huang J, Zhang J, Lei T, *et al.* Cloning of porcine chemerin,

- ChemR23 and GPR1 and their involvement in regulation of lipogenesis. *Bmb Reports*, 2010, **43**(7): 491–498
- [21] Ibrahim M M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews*, 2010, **11**(1): 11–18
- [22] Nguyen M T, Satoh H, Favelyukis S, *et al.* JNK and tumor necrosis factor- $\alpha$  mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 2005, **280**(42): 35361–35371
- [23] Sun K, Kusminski C M, Scherer P E. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*, 2011, **121**(6): 2094–2101
- [24] Prestwich T C, Macdougald O A. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in adipogenesis and metabolism. *Current Opinion in Cell Biology*, 2007, **19**(6): 612–617
- [25] Roman A A, Parlee S D, Sinal C J. Chemerin: a potential endocrine link between obesity and type 2 diabetes. *Endocrine*, 2012, **42**(2): 243–251
- [26] Rourke J L, Dranse H J, Sinal C J. Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. *Obesity Reviews*, 2013, **14**(3): 245–262.
- [27] Kliewer S A, Sundseth S S, Jones S A, *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(9): 4318–4323
- [28] Shen S M, Yu Y, Wu Z X, *et al.* Apoptosis-inducing factor is a target gene of C/EBP $\alpha$  and participates in adipocyte differentiation. *FEBS Lett*, 2011, **585**(14): 2307–2312
- [29] Kajimoto K, Takayanagi S, Sasaki S, *et al.* RNA interference-based silencing reveals the regulatory role of fatty acid-binding protein 4 in the production of IL-6 and vascular endothelial growth factor in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*, 2012, **153**(11): 5629–5636
- [30] Castro-Muñozledo F, Beltrán-Langarica A, Kuri-Harcuch W. Commitment of 3T3-F442A cells to adipocyte differentiation takes place during the first 24–36 h after adipogenic stimulation: TNF- $\alpha$  inhibits commitment. *Experimental Cell Research*, 2003, **284**(2): 161–170
- [31] Chae G N, Kwak S J. NF- $\kappa$ B is involved in the TNF- $\alpha$  induced inhibition of the differentiation of 3T3-L1 cells by reducing PPAR  $\gamma$  expression. *Experimental and Molecular Medicine*, 2003, **35**(5): 431–437
- [32] Pini M, Rhodes D H, Castellanos K J, *et al.* Role of IL-6 in the resolution of pancreatitis in obese mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 2012, **91**(6): 957–966

## The Effects of Experimental Mice Adipose Accumulation by Targeting GPR1 Pathway\*

TIAN Xiao-Fei<sup>1,2)\*\*</sup>, MA Wei-Juan<sup>1)\*\*</sup>, FANG Guang-Guang<sup>3)\*\*</sup>, XIAO Tian-Xia<sup>1)</sup>, CHEN Jie<sup>1)</sup>, ZHANG Jian<sup>1)\*\*\*</sup>

<sup>(1)</sup> Laboratory for Reproductive Health, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China;

<sup>(2)</sup> Nano Science and Technology Institute, University of Science and Technology of China, Suzhou 215123, China;

<sup>(3)</sup> Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518039, China)

**Abstract** Obesity is considered to be a trouble and risk factor to interfere health and it's a potential risk for type II diabetes, cardiovascular diseases, and hypertension. Although the pathologic mechanisms of those diseases related to obesity are resulted from multifactor, increasing evidence demonstrated that altered adipokines (adiponectin, leptin, TNF- $\alpha$ ) secreted by adipose tissue, and local inflammatory responses play important role in pathogenesis of the disease. The Chemerin (RARRES2 or TIG2), an adipokine has been discovered recently, serves as a ligand for the G protein-coupled receptor1 (GPR1) and has a significant role in metabolism and innate immunity. To investigate the effect of Chemerin and its receptor GPR1 in lipid accumulation of mice, we established obesity mice model successfully by given high-fat diet. Knockdown of Chemerin or GPR1 expression in C57BL/6 mice and pre-differentiation 3T3-L1 cells by siRNA interfering technology, we discovered that Chemerin and its receptor GPR1 were expressed in inguinal fat tissue and subscapular fat tissue. Meanwhile, the lipid accumulation in liver and inguinal fat tissue was inhibited by knockdown of Chemerin or GPR1 expression in C57BL/6 mice. Cultured 3T3-L1 adipocytes secrete Chemerin, which recruits GPR1 signaling in adipocytes and stimulates chemotaxis of GPR1-expressing cells. Small interfering RNA (siRNA) targeted knockdown of Chemerin or GPR1 expression in 3T3-L1 cells impaired differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes, reduced the lipid accumulation in adipocytes and the expression of adipocyte genes and altered metabolic functions in mature adipocytes. So, Chemerin and its receptor may play an important role in regulating lipid accumulation. In summary, Chemerin/GPR1 may be a potential signal pathway that regulates lipid accumulation in adipocytes, and provides a potential therapeutic target for metabolism disorder disease linking obesity.

**Key words** adipocyte, Chemerin, GPR1, siRNA interfering technology

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2015.0030

---

\*This work was supported by grants from Hundred Talents Program (Y14401), Shenzhen Inovation Program-International Cooperation Fund (GJHZ20130417171414743, GJHZ20130412153906741) and Shenzhen Strategic Emerging Industries Program (CXZZ20130329101949981).

\*\*These authors contributed equally to this work.

\*\*\*Corresponding author.

Tel: 86-755-86392290, E-mail: jian.zhang@siat.ac.cn

Received: January 27, 2015 Accepted: March 12, 2015