

CTRP6基因缺失对小鼠白色脂肪组织“棕色化”的影响

孔唯力^{1#} 黄鑫^{1,2#} 徐珂^{1,2} 吉苗^{1,2} 李媛¹ 陆海伦¹ 李世慧¹ 毋文静^{1*} 张瑾^{1*}

(¹嘉兴学院生物与化学工程学院, 嘉兴 314000; ²河北科技师范学院农学与生物科技学院, 秦皇岛 066000)

摘要 补体C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白6(CTRP6)是一种新型脂肪分泌因子, 在动物脂代谢中发挥重要作用。作者前期研究发现, 利用慢病毒敲减CTRP6能够保护小鼠免于发生饮食诱导型肥胖。该文以CTRP6缺失的杂合子(KO)小鼠为材料, 结合冷刺激手段, 来确认CTRP6对小鼠体重和白脂“棕色化”的影响。首先通过Real-time PCR分析KO小鼠CTRP6表达水平, 与野生型(WT)小鼠相比, KO小鼠各组织中CTRP6表达显著降低。然后, 取4周龄雄性KO小鼠, 随机分为两组(5只/组): 4 °C冷刺激组和25 °C室温组, 分别以WT小鼠为对照。6周后对小鼠体重、体脂进行分析。与WT小鼠相比, 两个温度下KO小鼠体重和白色脂肪的质量均显著下降, 棕色脂肪的质量显著上升。对脂肪组织基因表达分析发现, KO小鼠白色脂肪的UCP1、PGC1、PRDM16(棕色脂肪标志基因)以及Cyt c、NRF1、TFAM(线粒体标志基因)的表达显著升高。上述数据表明, CTRP6缺失能够抑制小鼠白色脂肪积累, 促进白色脂肪“棕色化”。该研究为揭示CTRP6基因生物学功能奠定了基础, 为人类肥胖及其相关代谢疾病的治疗提供了理论借鉴。

关键词 CTRP6; 基因敲除鼠; 白色脂肪; 棕色脂肪; 棕色化

Allele Deficiency of CTRP6 Affects the Browning of White Adipose Tissue in Mice

Kong Weili^{1#}, Huang Xin^{1,2#}, Xu Ke^{1,2}, Ji Miao^{1,2}, Li Yuan¹, Lu Hailun¹, Li Shihui¹, Wu Wenjing^{1*}, Zhang Jin^{1*}

(¹College of Biological Chemical Sciences and Engineering, Jiaxing University, Jiaxing 314000, China;

²College of Agronomy and Biotechnology, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066000, China)

Abstract The C1q/TNF-related protein 6 (CTRP6) is an adipokine, which plays an important role in lipids metabolism of animals. Previously we reported that knockdown of CTRP6 via intraperitoneal injection of the CTRP6-shRNA lentivirus protected mice from diet-induced obesity. This study aimed to confirm the involvement of CTRP6 in body weight and browning of white adipose tissue with CTRP6^{+/-} mice (KO mice) under cold exposure. In KO mice, CTRP6 mRNA expression was significantly downregulated to the level of that of wild type mice (WT mice). Then 4-week old male KO mice were randomly divided into two groups (5 mice/group), cold exposure group (4 °C) and room temperature group (25 °C). The body weight and fat weight of mice were measured after the cold stimulation for 6 weeks. Compared with WT mice, the body weight and white fat weight of KO mice decreased significantly in both cold exposure group and room temperature group, whereas the weight of brown fat increased sig-

收稿日期: 2018-08-03 接受日期: 2018-09-30

浙江省青年基金(批准号: LQ18C170002、LY17C170003)、嘉兴学院启动科研经费(批准号: 70516055)和嘉兴学院校级重点SRT计划项目(批准号: A05)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0573-83643695, E-mail: wuwenjing19851020@163.com; zhangjin7688@163.com

Received: August 3, 2018 Accepted: September 30, 2018

This work was supported by the Zhejiang Natural Scientific Foundation (Grant No.LQ18C170002, LY17C170003), the Initial Scientific Research Fund of Young Teachers in Jiaxing University (Grant No.70516055) and the Project of Jiaxing University College Student Research Training (SRT) (Grant No.A05)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-573-83643695, E-mail: wuwenjing19851020@163.com; zhangjin7688@163.com

网络出版时间: 2018-11-29 14:03:28

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181129.1403.002.html>

nificantly. Additionally, the brown fat markers, such as *UCP1*, *PRDM16* and *PGC1 α* were found to be upregulated in the white and brown adipose tissue of the WT mice. Mechanistically, *CTRP6* knockout also upregulated expression of mitochondrial metabolic factors *NRF1*, *TFAM* and *Cyt c*. The results suggested that *CTRP6* knockout could inhibit white adipose tissue accumulation and promote browning of white adipose tissue. Therefore, this research established foundation to reveal *CTRP6* physiological functions, which provides a theoretical reference for the treatment of human obesity and related metabolic diseases.

Keywords *CTRP6*; knockout mice; white adipose tissue; brown adipose tissue; browning

动物体内的脂肪组织分为两种类型: 白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT)和棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)^[1]。当机体摄入能量大于消耗能量时, 通常会以WAT的形式贮存起来。当WAT过度积累时, 会导致肥胖, 进而诱发代谢类疾病^[1]。BAT与WAT不同, 是一种非颤抖性产热组织, 对于维持动物的体温和能量平衡起重要作用^[2]。BAT细胞内含有大量血红蛋白和高水平的血红素卟啉, 细胞呈棕色, 在人类新生儿、啮齿类动物和冬眠的动物中普遍存在。棕色脂肪细胞形态上为多个囊泡样小脂滴, 含有丰富的血管、神经以及大量的线粒体, 其线粒体的内膜表达解耦联蛋白1(uncoupling protein 1, UCP1), 使线粒体的氧化磷酸化解耦联, 即呼吸链完成电子传递所释放的能量不以ATP的形式存储, 而是以热能的形式释放^[3]。所以, 虽然同为脂肪组织, WAT用于储存能量, 而BAT用于消耗能量。因此, 发现WAT转换成BAT的方法, 有助于治疗肥胖症及由肥胖引起的代谢类疾病。研究表明, 冷刺激或PPAR γ 激动剂等外界因子能够诱导啮齿类动物部分WAT细胞表达UCP1, 并且能够通过线粒体的氧化磷酸化解耦联来产热, 这种现象被称为白色脂肪组织“棕色化”^[4]。虽然相关的分子机理还未完全解析, 但其生理作用已经得到确认: 白色脂肪组织“棕色化”能够缓解机体肥胖、增加胰岛素敏感性、提高血糖稳态^[4-5]。

补体C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白(complement-C1q/tumor necrosis factor-related protein, CTRP)是一类脂肪细胞分泌因子, 与脂联素结构相似, 具有4个蛋白结构域: N-端信号肽、短的可变区、胶原结构域和C-端球型域^[6-7]。迄今共发现15个CTRP家族的成员^[8], 它们在调控糖、脂代谢中发挥重要作用^[9-11]。*CTRP6*发现于2004年, 其在脂肪组织中的表达水平受到罗格列酮(PPAR γ 强效激动剂)的调控^[12]。本实验室研究发现, *CTRP6*在脂肪组织中表达并具有促

进脂肪细胞分化的作用^[14]。利用RNA干扰技术敲减*CTRP6*的表达, 能够抑制前体脂肪细胞分化, 减少胞内甘油三酯的积累^[13-14]。此外, 通过给小鼠注射*CTRP6*-shRNA慢病毒, 敲减活体动物体内*CTRP6*的表达, 能够保护小鼠免于发生饮食诱导型肥胖, 并且发现白色脂肪“棕色化”的倾向^[15]。综上所述, *CTRP6*对脂肪组织生长发育发挥重要的调控作用。

为了明确*CTRP6*对小鼠白色脂肪“棕色化”的影响, 本实验室构建了*CTRP6*缺失的杂合子(KO)小鼠。通过冷刺激(4 °C)诱导白色脂肪“棕色化”, 对比分析KO与野生型(WT)小鼠之间的差异, 推断*CTRP6*在白色脂肪“棕色化”过程中的作用。结果表明, 与WT小鼠相比, KO小鼠的体重和白色脂肪的质量显著下降, 白色脂肪“棕色化”加强。本研究为进一步探索*CTRP6*调控白色脂肪“棕色化”和棕色脂肪的激活提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验室委托苏州大学-剑桥基因组中心, 以C57BL/6J小鼠为材料, 获得杂合子*CTRP6*^{+/-}小鼠, 并且将这些小鼠饲养于嘉兴学院医学院SPF级鼠房内。饲养条件为(25 \pm 1) °C, 40%~60%相对湿度, 12 h明暗循环照明。小鼠出生后第22天停止哺乳, 喂以普通饲料(含4%脂肪和0.07%胆固醇等), 自由摄取水、食。选取4周龄雄性*CTRP6*^{+/-}小鼠(KO小鼠) 10只, 随机分为两组(5只/组), 其中一组在25 °C下饲养(KO 25 °C组), 另一组为冷刺激组(KO 4 °C组), 即每天将小鼠置于4 °C下12 h, 其余12 h在25 °C下饲养, 各组分别以5只WT小鼠做对照(WT 25 °C组和WT 4 °C组), 冷刺激6周。上述动物实验均遵照《中华人民共和国实验动物管理条例》的相关规定, 并已通过嘉兴学院医学院动物实验及实验动物伦理委员会审查批准。

1.2 试剂及仪器

Trizol试剂购自Invitrogen公司; 反转录试剂盒购自TaKaRa公司; PCR反应液购自康为世纪生物科技有限公司; SYBP Green试剂购于Vazyme公司; DEPC购自Sigma公司; TG测定试剂盒购自南京建成生物工程学院; 葡萄糖购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 胰岛素购自丹麦诺和诺德公司。

实时定量PCR仪购于Thermo公司; 血糖仪购自三诺生物传感股份有限公司; 电子秤购自Ohaus公司; 普通PCR仪购自Eppendorf公司。

1.3 血脂测试

采用TG测定试剂盒, 按照试剂盒的操作步骤检测血清TG含量。

1.4 RNA提取和反转录

取腹股沟脂肪、附睾脂肪和棕色脂肪于离心管中, 加入1 mL Trizol, 冰浴充分匀浆, 室温静置30 min, 使细胞充分裂解。4 °C、12 000 r/min离心10 min, 吸取上清液至新EP管中, 完全除去沉淀物。向上清液中加入200 μ L氯仿, 剧烈震荡。室温放置5 min后, 4 °C、12 000 r/min离心15 min。收集上层无色水相于新EP管(勿吸出白色中间层)。加入等体积的异丙醇, 颠倒混匀, -80 °C静置30 min。4 °C、12 000 r/min离心10 min, 管底有RNA沉淀。弃上清, 沿管壁缓慢加入1 mL 75%乙醇(DEPC水配制), 洗涤沉淀, 4 °C、7 500 r/min离心5 min, 弃上清。倒置于滤纸上晾干, 加

无RNase的DEPC水, -20 °C过夜溶解, -80 °C保存^[16]。

1.5 Real-time quantitative PCR(Real-time qPCR)

根据GenBank中小鼠*CTRP6*、 *β -actin*等基因的mRNA序列, 应用Primer Premier 5.0设计PCR扩增引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列及参数见表1。

用Trizol法提取细胞总RNA, Nanodrop ND-1000定量后, 按照TaKaRa反转录试剂盒操作说明, 反转录出cDNA第一链。以cDNA为模板, 采用Bio-Rad IQ5实时定量PCR仪检测各基因表达量。具体操作按照TaKaRa说明书条件进行。采用25 μ L体系: SYBR Premix Ex Taq™(2 \times) 12.5 μ L, 上游引物(10 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物(10 μ mol/L) 1 μ L, cDNA模板 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。采用两步法PCR反应程序: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 60 °C退火30 s, 共45个循环。每个基因均重复3次。基因相对表达量采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算, 以 *β -actin*作为内参基因^[17]。

1.6 葡萄糖耐受实验(GTT)

在实验前一天下午17点将小鼠换入干净笼子, 禁食16 h。次日上午9点, 开始葡萄糖耐受实验。具体操作如下。称取每只小鼠的体重, 并标记, 以便在实验过程中能快速辨认所测小鼠。将小鼠从笼子中取出, 轻放于铁丝网格上, 用剪刀剪去小鼠尾巴末端1~2 mm, 轻轻挤压小鼠尾巴, 让血液富集成一滴, 用血糖仪测定空腹血糖, 测定值认定为0 min的血糖。

表1 实时定量PCR的引物序列及参数

Table 1 The primer sequences and parameters used for Real-time qPCR

基因 Gene	登录号 Accession number	引物序列 Primer sequence	产物大小(bp) Production length (bp)
<i>CTRP6</i>	DQ002399.1	S: CAG GGA AGC CAG GCA AGA AT A: GGA AGT TCT CGC TGC TGT GC	159
<i>UCP1</i>	NM_009463.3	S: GGC ATT CAG AGG CAA ATC AGC T A: CAA TGA ACA CTG CCA CAC CTC	151
<i>PGC1α</i>	NM_008904.2	S: AGC CGT GAC CAC TGA CAA CGA G A: GCT GCA TGG TTC TGA GTG CTA AG	168
<i>PRDM16</i>	NM_027504.3	S: CGG AAG AGC GTG AGT ACA AAT G A: TCC GTG AAC ACC TTG ACA CAG T	133
<i>Cyt c</i>	NM_007808.4	S: AAA TCT CCA CGG TCT GTT CG A: TGC CCT TTC TCC CTT CTT C	187
<i>NRF1</i>	AF098077.1	S: GCA CCT TTG GAG AAT GTG GT A: GGG TCA TTT TGT CCA CAG AGA	157
<i>TFAM</i>	NM_009360.4	S: GTC GCA TCC CCT CGT CTA TC A: TTC TGG TAG CTC CCT CCA CA	197
<i>β-actin</i>	NM_007393.5	S: GGA CTT CGA GCA GGA GAT GG A: AGG AAG GAG GGC TGG AAG AG	138

开始腹腔注射20%葡萄糖。注射的剂量为0.01 mL/g体重。从注射完毕开始计时。在15 min、30 min、60 min、90 min、120 min测定每只小鼠各个时间点的血糖值^[15]。

1.7 胰岛素敏感性实验(ITT)

实验前一天上午9点将小鼠换入干净笼子,禁食4 h。下午1点开始胰岛素敏感性实验。具体操作如下。将小鼠从笼子中取出,轻放于铁丝网格上,用剪刀剪去小鼠尾巴末端1~2 mm,轻轻挤压小鼠尾巴,让血液富集成一滴,用血糖仪测定空腹血糖,测定值认定为0 min的血糖值。让小鼠适应30 min后,开始腹腔注射0.05 U/mL胰岛素。注射剂量为0.01 mL/g体重。从注射完毕开始计时。在15 min、30 min、60 min、90 min、120 min测定每只小鼠各个时间点的血糖值^[15]。

1.8 数据分析

实验数据以“平均值±标准误(mean±S.E.M.)”表示,采用SPSS 13.0统计分析软件One-Way ANOVA

进行方差分析,采取Student's *t*-test检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

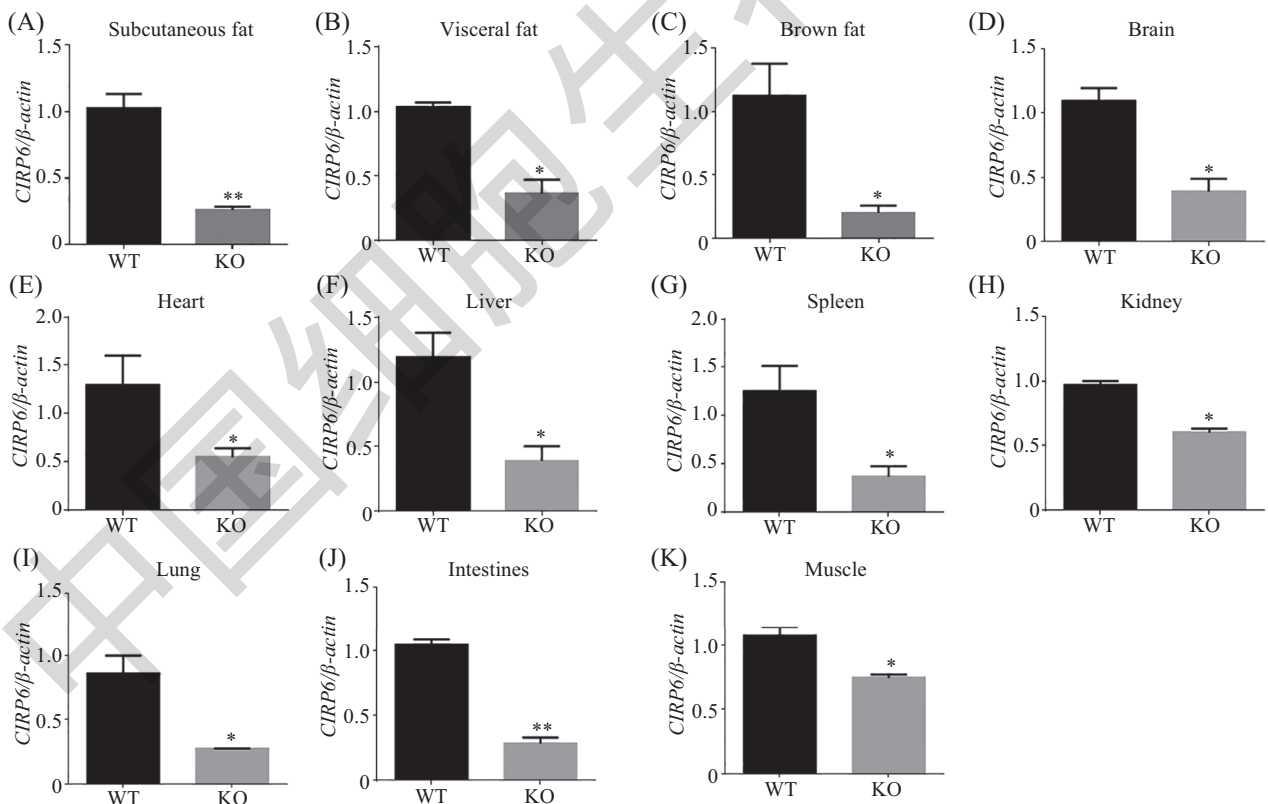
2 结果

2.1 KO小鼠CTRP6表达水平分析

分别提取KO和WT小鼠的皮下脂肪组织、内脏脂肪组织、棕色脂肪组织、脑、心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、肠和肌肉的总RNA,反转录后,通过Real-time qPCR分析各组织中*CTRP6*的mRNA丰度。结果表明,与WT小鼠相比,KO小鼠的各个组织中*CTRP6* mRNA表达量显著下降(图1)($n=5$)。

2.2 KO小鼠体重和脂肪积累的分析

为了明确*CTRP6*基因与小鼠体重及白色脂肪“棕色化”的关系,分别在4 °C和25 °C饲养KO和WT小鼠。每天记录采食量,每周记录体重。结果表明,KO与WT小鼠在4 °C组的体重均低于25 °C组,说明冷刺激具有抑制小鼠体重增加的作用。此外,两种温度下,KO小鼠从第二周开始至实验结束,体重均

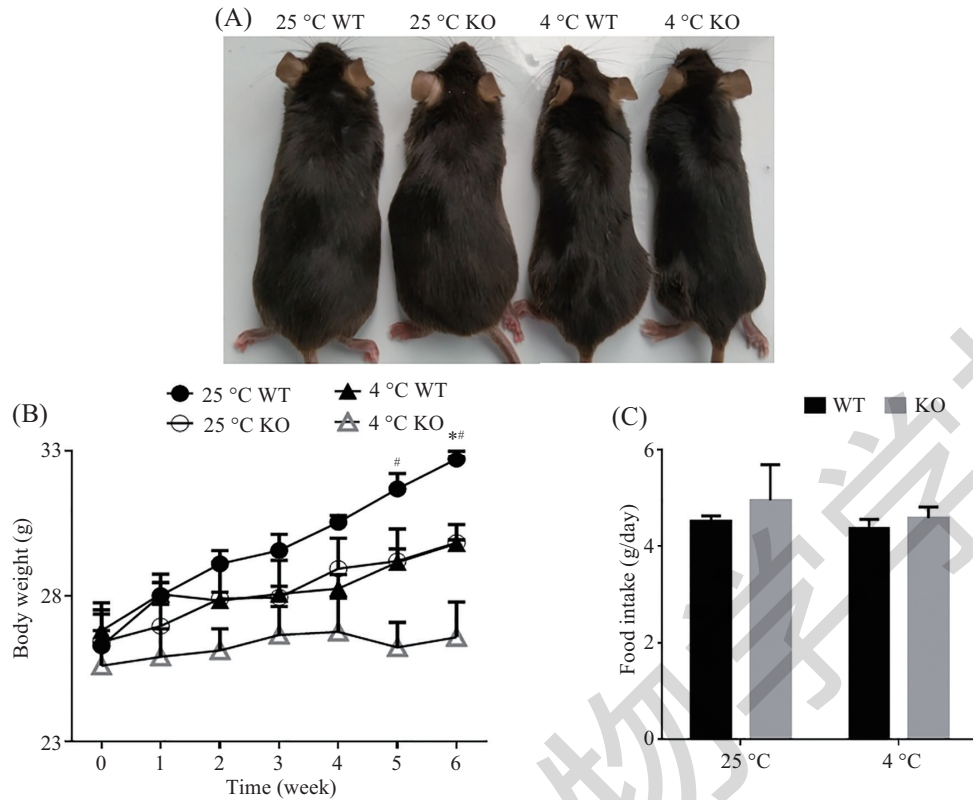


WT和KO小鼠皮下脂肪组织(A)、内脏脂肪组织(B)、棕色脂肪组织(C)、脑(D)、心脏(E)、肝脏(F)、脾脏(G)、肺(H)、肾脏(I)、肠(J)和肌肉(K)中*CTRP6* mRNA的表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,与WT组比较。

Expression of *CTRP6* in subcutaneous fat (A), visceral fat (B), brown fat (C), brain (D), heart (E), liver (F), spleen (G), lung (H), kidney (I), intestine (J) and muscles (K) of WT and KO mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with WT group.

图1 *CTRP6*基因敲除小鼠的验证

Fig.1 Identification of *CTRP6* knockout mice



A: 敲除 $CTRP6$ 对小鼠形态的影响; B: 敲除 $CTRP6$ 对小鼠体重的影响; C: 敲除 $CTRP6$ 对小鼠摄食量的影响。 $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, 与4 °C WT组比较; $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, 与25 °C WT组比较。

The effect of knockout $CTRP6$ on mice morphology (A), body weight (B) and food intake (C). $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ compared with 4 °C WT group; $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ compared with 25 °C WT group.

图2 $CTRP6$ 基因敲除小鼠形态、体重和摄食量

Fig.2 Morphology, body weight and food intake of $CTRP6$ knockout mice

低于WT小鼠, 在第6周差异显著(图2A和2B)。摄食量分析发现, 四组小鼠的摄食量差异不显著(图2C)。

将小鼠处死解剖后, 分析各组小鼠脂肪积累的情况。观察发现, 无论是在4 °C还是在25 °C环境下, 从外观上看, KO小鼠的皮下脂肪组织和内脏脂肪组织均明显小于WT小鼠(图3A)。对各组脂肪组织称重发现, KO小鼠的皮下脂肪组织和内脏脂肪组织质量显著低于WT小鼠(图3B和图3C)。对棕色脂肪分析发现, 外观上KO组要大于WT组(图3A)。称重结果表明, KO组棕色脂肪质量大于WT组(图3D)。

2.3 KO小鼠胰岛素敏感性、葡萄糖耐受性和血清TG含量分析

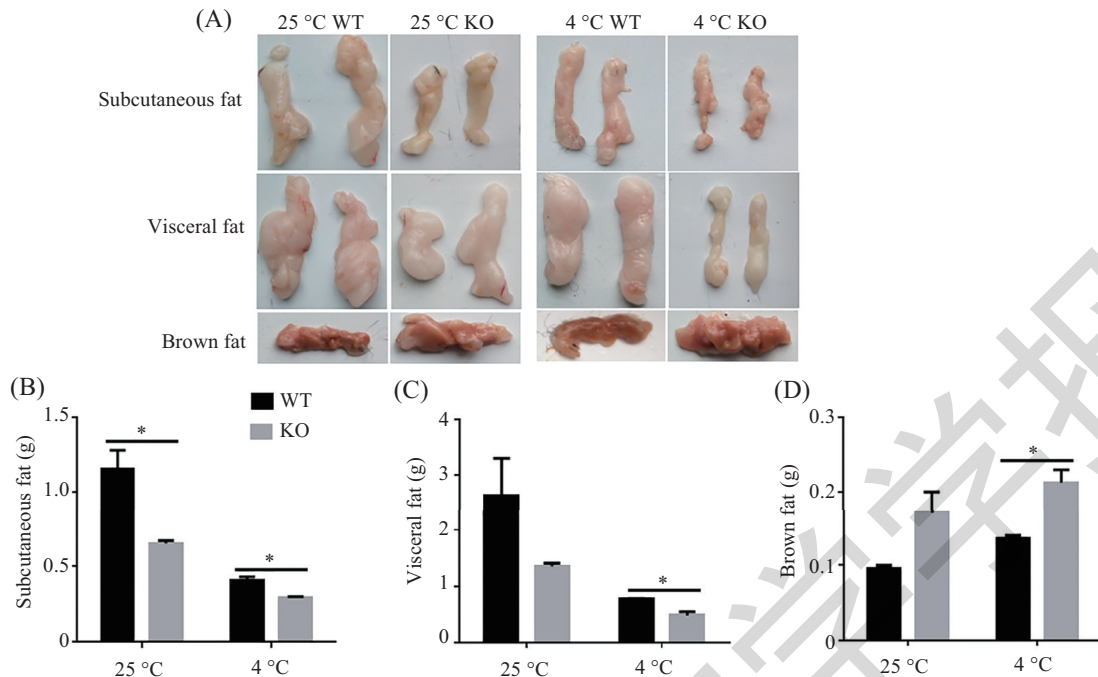
将小鼠禁食6 h后, 按照0.5 U/kg的剂量注射胰岛素, 于注射15 min、30 min、60 min、90 min和120 min后, 取尾静脉血液, 检测血糖浓度。结果显示, 在25 °C和4 °C环境下, KO小鼠的血糖浓度分别在15 min和30 min时显著低于WT小鼠(图4A)。结果表明, 敲除 $CTRP6$ 可以显著提高小鼠的胰岛素敏感性。

为了进一步验证此结果, 对小鼠葡萄糖耐受性进行检测。将小鼠禁食12 h后, 注射50%葡萄糖(2 g/kg), 于注射15 min、30 min、60 min、90 min和120 min后, 取尾静脉血液, 检测血糖浓度。结果发现, 在25 °C和4 °C环境下, KO小鼠的血糖浓度也分别在15 min和30 min时显著低于WT小鼠(图4B)。结果提示, 敲除 $CTRP6$ 可显著增加小鼠葡萄糖的耐受性。

酶法检测WT组和KO组小鼠血清中TG含量。结果显示, 与WT组小鼠相比, KO小鼠血清中的TG含量显著性降低(图4C)。

2.4 KO小鼠白色脂肪“棕色化”分析

利用Real-time qPCR分析了WT和KO小鼠脂肪组织中棕脂标志基因和线粒体标志基因的表达。结果显示, 在4 °C冷刺激条件下, KO小鼠白色和棕色脂肪组织中棕脂标志基因 $UCP1$ 、 $PGC1\alpha$ 和 $PRDM16$ mRNA的表达量比WT鼠显著增加(图5)。同时, KO小鼠脂肪组织中线粒体标志基因 $Cyt c$ 、 $NRF1$ 和 $TFAM$ 的表达量也显著上升(图6)。在25 °C正常室温

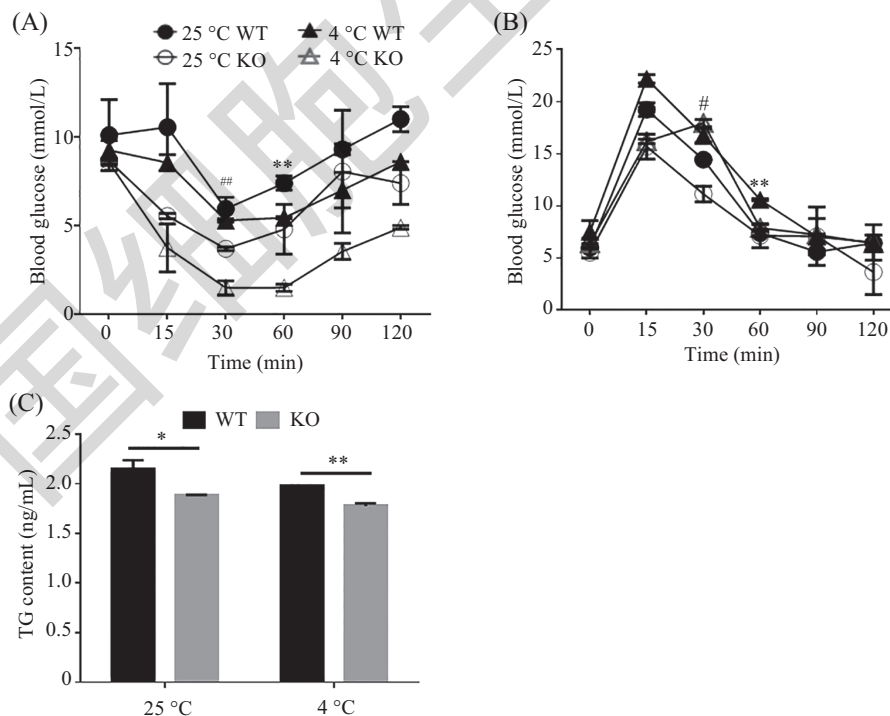


A: 敲除*CTRP6*对小鼠皮下脂肪、内脏脂肪和棕色脂肪形态的影响; B: 敲除*CTRP6*对小鼠皮下脂肪质量的影响; C: 敲除*CTRP6*对小鼠内脏脂肪质量的影响; D: 敲除*CTRP6*对小鼠棕色脂肪质量的影响。* $P<0.05$ 。

The effect of knockout *CTRP6* on adipose tissue morphology (A), inguinal fat weight (B), epididymal fat weight (C), and brown fat weight liver weight (D) in *CTRP6* knockout mice. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图3 *CTRP6*基因敲除小鼠各个脂肪组织的质量

Fig.3 Weight of fat tissue in the *CTRP6* knockout mice

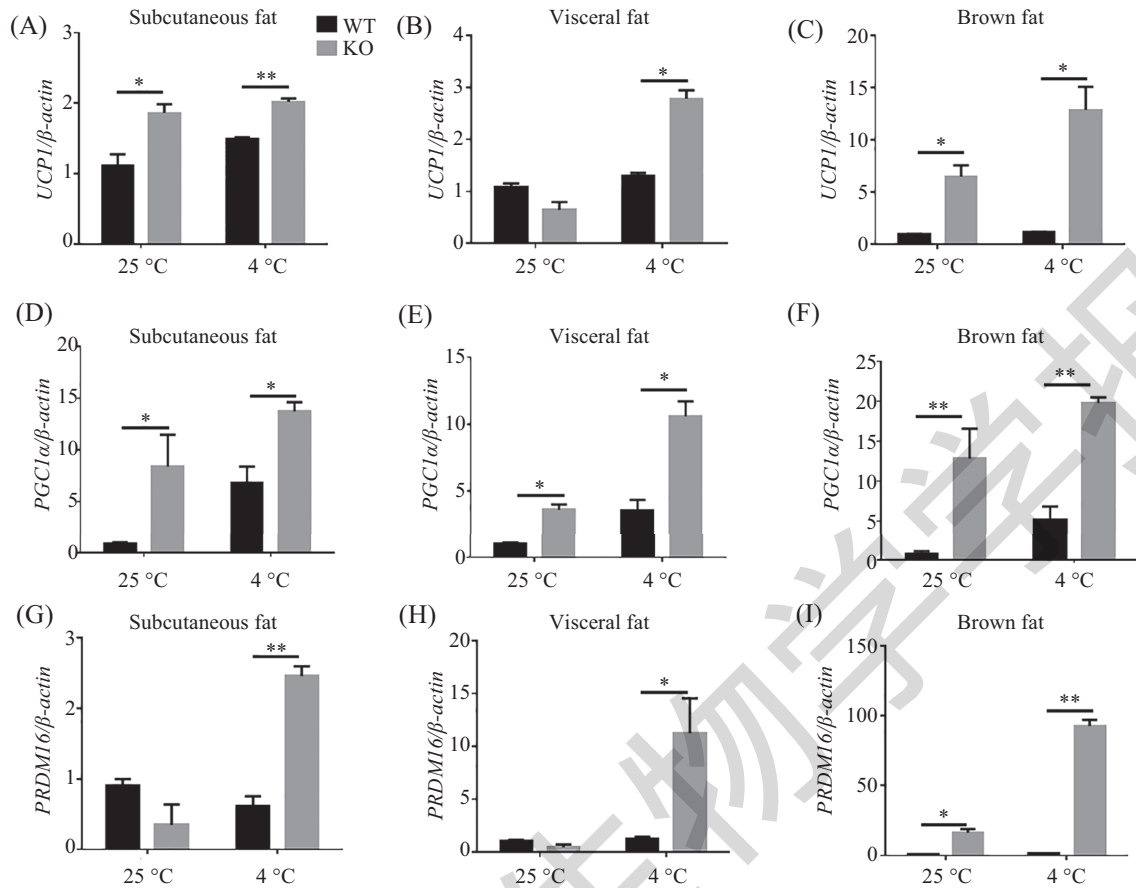


敲除*CTRP6*对小鼠胰岛素敏感性(A)、小鼠葡萄糖耐受性(B)和血清中甘油三酯含量(C)的影响。# $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与4 °C WT组比较; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与25 °C WT组比较。

Effects of *CTRP6* knockout on insulin sensitivity (A), glucose tolerance (B) and serum triglyceride content (C) in mice. # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with 4 °C WT group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with 25 °C WT group.

图4 *CTRP6*基因敲除小鼠的胰岛素敏感性、葡萄糖耐受性和血清中TG含量

Fig.4 Insulin sensitivity, glucose tolerance, and TG in *CTRP6* knockout mice



敲除 $CTRP6$ 后, 棕脂标志基因 $UCPI$ (A-C)、 $PRDM16$ (D-F)和 $PGC1\alpha$ (G-I) mRNA在皮下脂肪、内脏脂肪和棕色脂肪中的表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与WT组比较。

The expression of $UCPI$ (A-C), $PRDM16$ (D-F) and $PGC1\alpha$ (G-I) in subcutaneous fat, visceral fat and brown fat were detected. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with WT group.

图5 $CTRP6$ 基因敲除小鼠各个脂肪组织中棕脂标志基因的表达

Fig.5 Expression of brown fat marker genes in adipose tissue of $CTRP6$ knockout mice

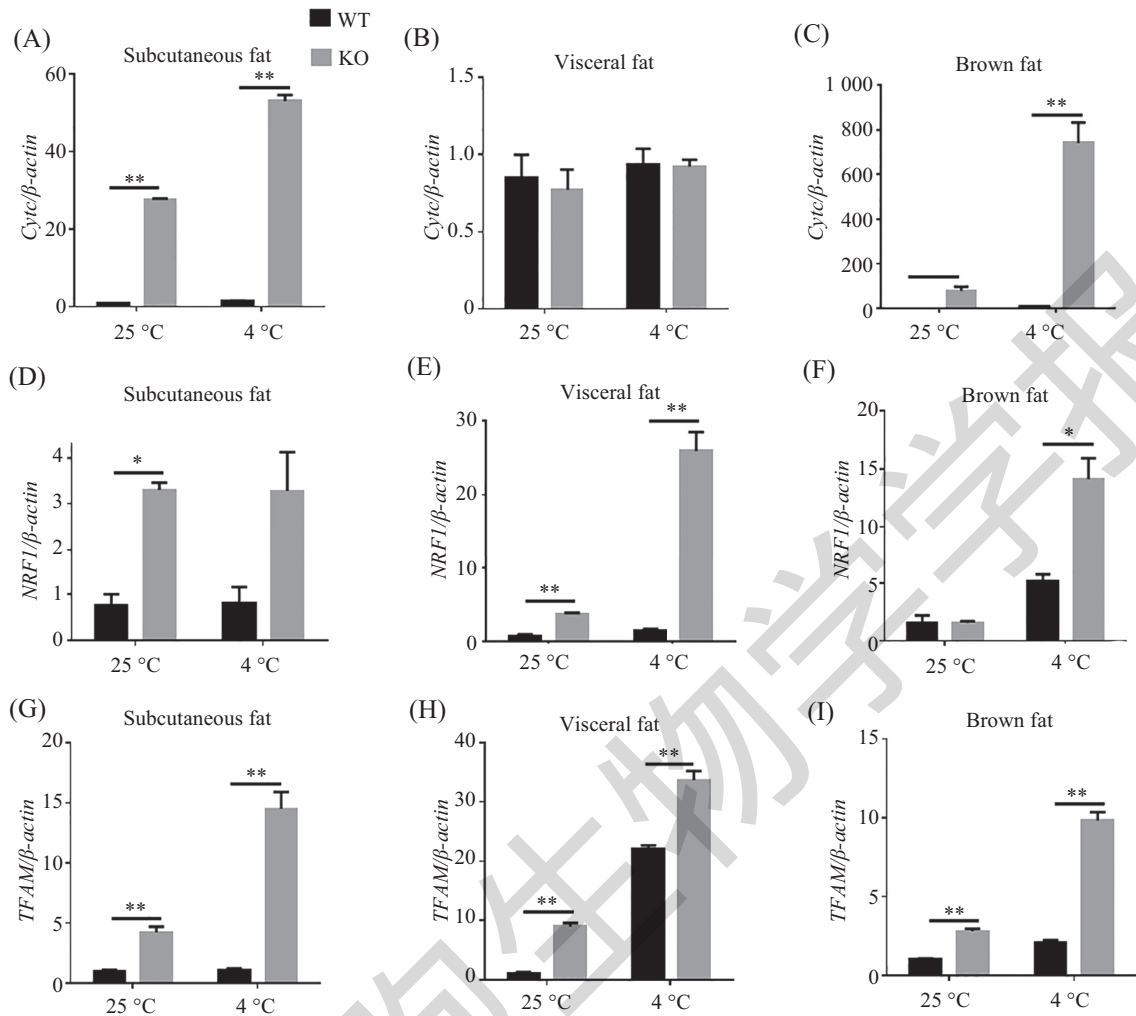
下, 敲除 $CTRP6$ 可以显著上调皮下脂肪和棕色脂肪中棕脂标志基因 $UCPI$ 、 $PGC1\alpha$ 和 $PRDM16$ 的mRNA丰度(图5)以及线粒体标志基因 $Cyt\ c$ 、 $NRF1$ 和 $TFAM$ 的mRNA丰度(图6)。

3 讨论

随着社会的发展, 肥胖问题越来越严重。研究表明, 肥胖可引发多种疾病, 如高脂血症、2型糖尿病、代谢综合征、心脑血管疾病、呼吸系统疾病、抑郁和多种癌症等, 已成为一个严重的公共卫生问题^[18]。寻找对脂类代谢具有调控性的靶点, 对于开发相关疾病的治疗药物具有重要意义。 $CTRP6$ 作为一种脂肪分泌因子, 对脂类代谢具有重要的调控作用。利用RNA干扰技术敲减细胞中 $CTRP6$ 的表达, 可抑制脂肪细胞的分化和肌细胞的异位成脂, 降低胞内甘油三酯的含量^[13,15]。在细胞培养基中外加

$CTRP6$ 重组蛋白, 可促进脂肪细胞分化和胞内甘油三酯积累, 提高脂肪细胞分化标志基因 $PPAR\gamma$ 、 $aP2$ 的表达^[14]。这些研究说明, $CTRP6$ 与脂肪细胞分化、脂肪沉积存在着密切联系, 但其确定的生理功能至今不明。

通过基因修饰ES细胞制备基因敲除动物, 为基因功能的研究开拓了重要途径^[19]。本研究的 $CTRP6$ 基因敲除策略是采用囊胚注射法, 用显微操作针将 $CTRP6$ 基因修饰的ES细胞注入囊胚腔制备嵌合体。该法的优点是可根据形态学标准对单个ES细胞进行挑选, 选择形态质量较好的ES细胞进行囊胚注射, 保证了基因敲除小鼠制备的质量^[20-21]。本实验中, 全身敲除 $CTRP6$ 基因不影响小鼠的生长发育, 未出现胚胎及出生后早期死亡现象。此外, $CTRP6$ 敲除小鼠各个组织中 $CTRP6$ mRNA水平的检测也证实 $CTRP6$ 敲除是成功的。因此, 本研究构建的全身性



敲除*CTRP6*后, 线粒体标志基因*Cyt c* (A~C)、*NRF1* (D~F) 和 *TFAM* (G~I) mRNA 在皮下脂肪、内脏脂肪和棕色脂肪中的表达。结果表示为平均值 \pm 标准误, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

The expression of *Cyt c* (A-C), *NRF1* (D-F) and *TFAM* (G-I) in subcutaneous fat, visceral fat and brown fat were detected. Results are expressed as the mean \pm S.E.M.. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6 *CTRP6*基因敲除小鼠各个脂肪组织线粒体标志基因的表达

Fig.6 Expression of mitochondrial marker genes in adipose tissue of *CTRP6* knockout mice

*CTRP6*敲除小鼠模型可进行后续研究。

本研究利用*CTRP6*敲除小鼠模型发现, 降低小鼠体内*CTRP6*的表达可显著降低小鼠体重及白色脂肪组织的重量, 然而棕色脂肪组织重量却显著增加。白色脂肪组织不仅是动物体内存储能量的主要器官, 还可以通过释放激素和细胞因子参与调节内分泌代谢和胰岛素抵抗状态^[22]。和白色脂肪组织相比, 棕色脂肪组织因表达解偶联蛋白1(UCPI)和细胞内存在较多的线粒体而拥有非战栗产热的能力^[23]。除了UCPI外, 棕色脂肪组织中标志基因*PGC1 α* 是线粒体氧化代谢和生物合成中有力的启动子, 能够导致棕色脂肪细胞UCPI的高表达, 在诱导棕色脂肪组织产热过程中发挥重要作用^[24]。*PRDM16*是决定棕

色脂肪细胞形成的关键调控因子。在成纤维细胞中, *PRDM16*表达的上升会导致成纤维细胞分化为棕色脂肪细胞, 该细胞中棕脂分化相关基因表达量显著上升。在转染*PRDM16*的白色脂肪细胞中, UCPI表达量会显著上升, 进而使得白色脂肪细胞转变为“多室”的“棕色脂肪细胞样”细胞^[25]。本研究利用*CTRP6*基因敲除鼠, 证实*CTRP6*可以显著抑制正常及冷应激刺激下白色脂肪和棕色脂肪中UCPI、*PRDM16*和*PGC1 α* 的表达量。这暗示了*CTRP6*敲除小鼠体重和白色脂肪组织重量下降的原因是由于白色脂肪“棕色化”和棕色脂肪的活化。

线粒体是细胞内脂肪酸氧化的核心细胞器, 在传统概念中, 线粒体是脂肪消耗的主要场所, 但近几

年研究发现, 线粒体与脂肪沉积也有一定关系。在本研究中, 我们检测了线粒体呼吸链上的一个重要电子传递体Cyt *c*在*CTRP6*基因敲除鼠脂肪组织中的表达情况^[26], 结果表明, *CTRP6*基因的敲除可以促进Cyt *c* mRNA的表达。为进一步证明*CTRP6*对线粒体功能的影响, 我们检测了脂肪组织中核呼吸因子1(*NRF1*)和线粒体转录因子A(*TFAM*)表达的变化。*NRF1*具有调控线粒体DNA转录和复制的作用, 可通过磷酸化丝氨酸来激活Cyt *c*和*TFAM*编码基因启动子的活性^[27-28]。*TFAM*参与维持线粒体DNA的拷贝数, 改善线粒体功能以及调控肌浆网钙ATP酶表达^[29-30]。研究结果表明, *CTRP6*基因敲除鼠脂肪组织中*NRF1*和*TFAM*表达量均明显升高, 此结果一方面暗示*CTRP6*基因敲除鼠脂肪组织中线粒体量的增加, 另一方面也预示着线粒体氧化呼吸作用的增强。

在卵巢癌细胞中, *CTRP6*可阻断IL-8/VEGF通路从而抑制癌细胞的增殖和迁移^[31]。*CTRP6*通过激活PI3K/Akt/MMP2信号通路, 促进血管平滑肌细胞迁移及血管再狭窄的发生^[32]。*CTRP6*可以通过TGF- β 1/Smad3信号通路来抑制皮肤成纤维细胞的增殖^[33]。此外, *CTRP6*通过抑制Erk1/2信号通路和促进p-p38的表达调控猪肌内和皮下脂肪细胞的分化。在肌内脂肪细胞中, AdipoR1是*CTRP6*的受体^[15]。然而在小鼠体中, *CTRP6*调控白脂“棕色化”和棕脂活性的机制还需要进一步探讨。

综上所述, 敲除*CTRP6*不仅可以显著促进小鼠白色脂肪组织“棕色化”, 还可提高机体胰岛素敏感性和葡萄糖耐受性, 降低血清中TG的含量。本研究结果提示, *CTRP6*基因可能是调控体脂生成的关键基因, 是控制体脂沉积改善肥胖症及相关代谢疾病的新靶点。

参考文献 (References)

- Brewis A, SturtzSreetharan C, Wutich A. Obesity stigma as a globalizing health challenge. *Global Health* 2018; 14(1): 20.
- Heeren J, Scheja L. Brown adipose tissue and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2018; 29(3): 180-5.
- Wang W, Seale P. Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17(11): 691-702.
- Kissig M, Shapira SN, Seale P. SnapShot: brown and beige adipose thermogenesis. *Cell* 2016; 166(1): 258-258.e1.
- Lapid K, Lim A, Berglund ED. Estrogen receptor inhibition enhances cold-induced adipocyte beiging and glucose sensitivity. *bioRxiv* 2017; 1011(10): 229591.
- Wong GW, Wang J, Hug C, Tsao TS, Lodish HF. A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(28): 10302-7.
- Schäffler A, Buechler C. CTRP family: linking immunity to metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23(4): 194-204.
- Wong GW, Krawczyk SA, Kitidis-Mitrokostas C, Revett T, Gimén R, Lodish HF. Molecular, biochemical and functional characterizations of C1q/TNF family members: adipose-tissue-selective expression patterns, regulation by PPAR- γ agonist, cysteine-mediated oligomerizations, combinatorial associations and metabolic functions. *Biochem J* 2008; 416(2): 161-77.
- Compton SA, Cheatham B. CTRP-3: blocking a toll booth to obesity-related inflammation. *Endocrinology* 2010; 151(11): 5095-7.
- Enomoto T, Shibata R, Ohashi K, Kambara T, Kataoka Y, Uemura Y, *et al.* Regulation of adiponin/CTRP12 cleavage by obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 428(1): 155-9.
- Petersen PS, Lei X, Wolf RM, Rodriguez S, Tan SY, Little HC, *et al.* CTRP7 deletion attenuates obesity-linked glucose intolerance, adipose tissue inflammation, and hepatic stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2017; 312(4): E309-25.
- Seldin MM, Tan SY, Wong GW. Metabolic function of the CTRP family of hormones. *Rev Endocr Metab Disord* 2014; 15(2): 111-23.
- Wu W, Mo D, Zhao CZ, Zhao C, Chen YS, Pang WJ, *et al.* Knockdown of CTRP6 inhibits adipogenesis via lipogenic marker genes and Erk1/2 signalling pathway. *Cell Biol Int* 2015; 39(5): 554-62.
- Wu W, Zhang J, Zhao C, Sun Y, Pang W, Yang G. CTRP6 regulates porcine adipocyte proliferation and differentiation by the AdipoR1/MAPK signaling pathway. *J Agric Food Chem* 2017; 65(27): 5512-22.
- Wu W, Zhang J, Zhao C, Sun Y, Yin Y, Peng Y, *et al.* Lentivirus-mediated CTRP6 silencing ameliorates diet-induced obesity in mice. *Exp Cell Res* 2018; 367(1): 15-23.
- Wu W, Sun Y, Zhao C, Chen X, Zhao C, Wang G, *et al.* Lipogenesis in myoblasts and its regulation of CTRP6 by AdipoR1/Erk/PPAR γ signaling pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2016; 48(6): 509-19.
- Zhao C, Yao X, Chen X, Wu W, Xi F, Yang G, *et al.* Knockdown of ubiquitin D inhibits adipogenesis during the differentiation of porcine intramuscular and subcutaneous preadipocytes. *Cell Prolif* 2018; 51(2): e12401.
- Van Gaal LF, Mertens IL, Christophe E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006; 444(7121): 875-80.
- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, *et al.* Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 1999; 97(6): 689-701.
- Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Ibata M, *et al.* Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 2010; 142(5): 787-99.
- Tong C, Li P, Wu NL, Yan Y, Ying QL. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 2010; 467(7312): 211-3.
- Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* 2009;

- 54(9): 1847-56.
- 23 Spontoni CH, Kajimura S. Multifaceted roles of beige fat in energy homeostasis beyond UCP1. *Endocrinology* 2018; 159(7): 2545-53.
- 24 Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, *et al.* A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; 481(7382): 463-8.
- 25 Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Scime A, *et al.* PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 2008; 454(7207): 961-7.
- 26 Garrido C, Galluzzi ML, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 2006; 13(9): 1423-33.
- 27 Herzig RP, Scacco S, Scarpulla RC. Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J Biol Chem* 2000; 275(17): 13134-41.
- 28 Piantadosi CA, Suliman HB. Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor-1. *J Biol Chem* 2006; 281(1): 324-33.
- 29 Kang D, Kim SH, Hamasaki N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion* 2007; 7(1): 39-44.
- 30 Uchiumi T, Kang D. The role of TFAM-associated proteins in mitochondrial RNA metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(5): 565-70.
- 31 Wang L, Liu Z, Duan L, Ma B, Sun Z. C1q tumor necrosis factor-related protein 6 (CTRP6) inhibits the proliferation and migration of ovarian cancer cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2015; 31(12): 1664-8.
- 32 Dong X, Hu H, Fang Z, Cui J, Liu F. CTRP6 inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Biomed Pharmacother* 2018; 103: 844-50.
- 33 Fan R, Zhu X, Sun YW, Peng HZ, Wu HL, Gao WJ. CTRP6 inhibits fibrogenesis in TGF- β 1-stimulated human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 475(4): 356-60.

勘 误

因编辑工作失误,本刊2018年第7期和第11期有两处错误,更正如下:

1. 2018年(第40卷)第7期1101页脚注部分更正为: 收稿日期: 2018-01-11; 接受日期: 2018-04-18。国家自然科学基金(批准号: 81376289、81572475)资助的课题。*通讯作者。Tel: 0512-67972109, E-mail: zhouyouxin@suda.edu.cn。Received: January 11, 2018; Accepted: April 18, 2018. This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81376289, 81572475). *Corresponding author. Tel: +86-512-67972109, E-mail: zhouyouxin@suda.edu.cn.

2. 2018年(第40卷)第11期中文目录中研究论文《四氧化三铁-阿霉素纳米复合物对小鼠乳腺癌的靶向治疗效果》第一作者“代银海”更正为“代引海”; 第1833、1835、1837页眉处“代银海”更正为“代引海”。