

Chemerin敲除在有氧运动改善高脂喂养小鼠非酒精性脂肪肝中的作用及机制

张荣荣 王雯靖 曲静 王晓慧*

(上海体育大学, 运动健康学院, 上海 200438)

摘要 该文利用两种敲除小鼠研究脂肪因子在基础和运动状态对高脂喂养小鼠非酒精性脂肪肝(NAFLD)的影响及其机制。通过cre-loxp系统构建脂肪敲除adipo-^{-/-}小鼠和全身性敲除^{-/-}小鼠。将雄性野生型(WT)、adipo-^{-/-}和^{-/-}小鼠进行12周饮食干预,分为普通饮食(ND)和高脂饮食(HFD)组。此外,将高脂喂养6周的上述三组小鼠进行6周中等强度的跑台运动干预,即WT+E、adipo-^{-/-}+E和^{-/-}+E组。检测小鼠体质量、肝质量,血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)含量、血脂四项、肝组织病理学形态,以及多个肝脏的脂肪代谢调控蛋白和关键酶的蛋白水平。结果显示,(1)与ND相比,HFD的WT小鼠肝质量增加,血脂异常,血清ALT、AST含量升高,肝脏出现大、黄、油特征,表现出NAFLD表型。(2)HFD+adipo-^{-/-}小鼠NAFLD减轻、肥胖率下降($P<0.05$);而HFD+^{-/-}小鼠NAFLD恶化、肥胖率升高($P<0.05$)。在机制上,HFD+adipo-^{-/-}小鼠的脂肪酸转位酶(CD36)、甾醇调节元件结合蛋白1(SREBP-1)和硬脂酰辅酶A去饱和酶1(SCD1)的蛋白水平下调,肉碱棕榈酰基转移酶1(CPT1)蛋白水平上调($P<0.05$);HFD+^{-/-}组小鼠CD36、SREBP-1蛋白水平上调($P<0.05$)。 (3)敲除脂肪增强了运动对NAFLD的改善作用,体现在TC下降、肝脏CPT1表达水平升高、CD36和SCD1的蛋白水平减少(均 $P<0.05$);但敲除全身却减弱了运动的改善效应,表现为运动对血清TG、LDL调控作用消失,对AST下降幅度减小,且对肝脏SREBP-1、SCD1、CPT1的调控作用消失(均 $P<0.05$)。该研究得出,敲除脂肪可改善雄性HFD小鼠的NAFLD、增强运动对NAFLD的改善作用,但敲除全身却加重其NAFLD、减弱运动的改善效应。该作用与水平降低(敲除脂肪)和缺失(敲除全身)分别增强和减弱对肝脏脂代谢关键酶的调控作用有关。

关键词 chemerin; 有氧运动; 非酒精性脂肪肝; 脂代谢关键酶

Roles of Chemerin Knockout in Aerobic Exercise-Induced Improvement of Nonalcoholic Fatty Liver in High Fat Diet Mice and Its Mechanisms

ZHANG Rongrong, WANG Wenjing, QU Jing, WANG Xiaohui*

(School of Health and Exercise, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China)

Abstract This study was to investigate the roles of adipokine chemerin in regulating NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease) in mice fed with high fat diet at basic and motor states using two kinds of knockout mice, adipose specific- knockout (adipo-^{-/-}) mice and global knockout (^{-/-})

收稿日期: 2023-07-22

接受日期: 2023-10-08

国家自然科学基金(批准号: 31872801)和上海市人类运动能力开发与保障重点实验室(上海体育学院)(批准号: 11DZ2261100)资助的课题

*通讯作者。 Tel: 021-65507509, E-mail: wangpan96@126.com

Received: July 22, 2023

Accepted: October 8, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31872801) and the Shanghai Key Lab of Human Performance (Shanghai University of Sport) (Grant No.11DZ2261100)

*Corresponding author. Tel: +86-21-65507509, E-mail: wangpan96@126.com

mice. Cre-loxp system were employed to generate adipo-chemerin^{-/-} and chemerin^{-/-} mice. Then male wild-type (WT) mice, adipo-chemerin^{-/-} mice and chemerin^{-/-} mice were undertaken diet intervention, fed with 12-week ND (normal diet) or HFD (high-fat diet). In addition, 6-week HFD feeding mice of the above three groups adopted 6-week moderate intensity running intervention, composing WT+E, adipo-chemerin^{-/-}+E and chemerin^{-/-}+E groups. The body weight, liver weight, serum ALT (alanine aminotransferase) and AST (aspartate aminotransferase), blood lipid, liver gross specimen and histopathological analysis, and the protein levels of multiple liver lipid metabolism enzymes and key proteins such as CD36 (cluster of differentiation 36), PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α), CPT1 (carnitine palmitoyltransferase 1), SREBP-1 (sterol regulatory element binding protein 1) and SCD1 (stearoyl coenzyme A desaturase 1) were determined. The results show that (1) compared with WT mice fed with ND, HFD feeding WT mice had NAFLD, represented as heavier liver weight, higher serum ALT and AST contents, dyslipidemia, and large, yellow and oil liver as well as increases of lipid droplets and fat vacuole area under the microscope ($P<0.05$); (2) in HFD+adipo-chemerin^{-/-} mice, compared with HFD+WT mice, the obesity rate was decreased and NAFLD was improved, while the opposite results were found in HFD+chemerin^{-/-} including increased obesity rate and worsen NAFLD ($P<0.05$). As for the mechanisms, the protein levels of CD36, SREBP-1 and SCD1 were down-regulated and CPT1 were up-regulated in adipo-chemerin^{-/-} mice ($P<0.05$). On the contrary, the protein levels of CD36 and SREBP-1 were up-regulated in chemerin^{-/-} mice. (3) Adipo-specific *chemerin* knockout further enhanced the improving effect of exercise on NAFLD and the lipid metabolism enzymes, reflected as the decrease of TC content, the increase of liver CPT1, and the further decreases of liver CD36 and SCD1. While global *chemerin* knockout attenuated exercise-induced improvements in NAFLD and the lipid metabolism enzymes, including the disappears of exercise-induced regulations on serum TG and LDL as well as on liver SREBP-1, SCD1 and CPT1, and the attenuation of exercise-induced decrease of AST ($P<0.05$). The study concluded that adipo-specific *chemerin* knockout improved NAFLD of male HFD mice and enhanced the improving effect of exercise on NAFLD while global *chemerin* knockout aggravated NAFLD and weakened the improving effect of exercise, which were likely to be related to the promotion and inhibition on liver multiple lipid metabolism key enzymes and protein induced by chemerin decrease (adipo-specific *chemerin* knockout) and chemerin deficiency (global *chemerin* knockout), respectively.

Keywords chemerin; aerobic exercise; nonalcoholic fatty liver; lipid metabolism enzymes

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种常见的慢性代谢性疾病,其特征为非长期大量饮酒和其他明确损肝因素所引起的、以甘油三酯为主的脂质在肝细胞中蓄积导致肝脏病理改变的代谢性疾病^[1]。基于肝脏脂肪变性的证据,NAFLD诊断的新标准包括超重/肥胖、2型糖尿病或代谢紊乱^[2]。NAFLD患病率在男性中为30%~40%,在女性中为15%~20%^[3],在2型糖尿病患者中高达70%^[4],NAFLD由单纯性脂肪变性发展到以炎症或纤维化为特征的非酒精性脂肪性肝炎^[5],最后发展为肝硬化或肝癌^[6]。

Chemerin是由维甲酸受体应答基因2(retinoic acid receptor responder 2, *Rarres2*)编码的脂肪因子,参与炎症反应,调节脂肪发生和脂肪细胞代谢。在

肥胖与肥胖相关疾病的发生发展中发挥重要作用。Chemerin主要与其受体趋化因子样受体1(chemokine like receptor-1, CMKLR1)结合调控糖脂代谢过程,与NAFLD的发生发展密切相关^[7]。研究表明NAFLD患者^[8]或NAFLD的大鼠^[9]、小鼠^[10],其血清chemerin水平显著增高,且增加程度与肝脏脂肪变性程度一致。敲除CMKLR1可减轻脂质积累,抑制脂肪组织发育^[11]、调节肠道微生物组成^[12],从而维持代谢稳态、改善肥胖和肥胖相关疾病的代谢紊乱。外源补充chemerin能增强糖尿病小鼠葡萄糖不耐受性,降低组织对葡萄糖的摄取量,逆转运动的改善作用^[13]。因此,chemerin/CMKLR1异常增高可能与肥胖相关的NAFLD发生、发展有关。

运动和限制饮食是唯一被批准的NAFLD治疗

方案, 众多文献已报道, 运动调控肝脏的脂代谢关键酶活性、促进肝脏脂肪氧化分解^[14]、减少肝内脂肪合成^[15]和转运^[16], 是改善NAFLD的重要途径。运动、饮食干预或减重手术治疗NAFLD的同时, 伴随着血清chemerin水平的下降^[17]。本课题组前期研究也发现, 有氧运动所致chemerin减少可以通过影响糖脂代谢关键酶来改善糖脂代谢紊乱^[18]。但chemerin减少能否调控高脂饮食(high fat diet, HFD)和运动小鼠的NAFLD发生发展且该作用是否也与脂肪代谢调控蛋白和相关酶有关, 目前仍未被阐明。因此, 本研究利用两种chemerin敲除小鼠来研究chemerin对HFD小鼠在基础和运动状态下NAFLD的影响, 并进一步探讨肝脏多个脂肪代谢调控蛋白和关键酶的作用, 包括过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α)、脂肪酸转位酶(fatty acid translocase, FAT/CD36)、肉碱棕榈酰基转移酶 1(carnitine palmitoyltransferase 1, CPT1)、甾醇调节元件结合蛋白 1(sterol regulatory element binding protein 1, SREBP-1)和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(stearoyl coenzyme A desaturase 1, SCD1)。本研究为以chemerin为靶点的NAFLD早期诊断与防治奠定必要的理论基础与实践依据。

1 材料与方法

1.1 Chemerin敲除小鼠的建立

委托上海南方模式生物技术公司采用Cre-loxp系统构建脂肪特异性chemerin敲除小鼠和全身性chemerin敲除小鼠。简言之, 在chemerin第1~3号外显子两端插入loxp序列构建基因敲除的flox(flanked by loxp)小鼠, 后与全身性敲除和脂肪特异性敲除Cre工具鼠(分别是DDx4-Cre和adiponectin-Cre)杂交得到chemerin^{-/-}小鼠和adipo-chemerin^{-/-}小鼠。待小鼠2周龄时, 剪取鼠尾0.4 cm加入鼠尾裂解液和蛋白酶K, 抽提DNA, 用下列引物进行PCR扩增, 扩增flox的上下游引物序列分别为5'-GGG TCC TCC TAA AGA AAC TT-3', 5'-TCA CCA GTA TAA TCC AGT CT-3'; adiponectin-Cre的上、下游引物序列分别为5'-TCG ATG CAA CGA GTG ATG AG-3', 5'-TCC ATG AGT GAA CGA ACC TG-3'; DDx4-Cre的上、下游引物序列分别为5'-TCA CTT AGG ATG CGG ACC TC-3', 5'-GTG CCT GCG TTA ATG TGC AA-3'。根据PCR结果筛选出脂肪chemerin敲除小鼠和全

身性chemerin敲除小鼠。

1.2 材料和仪器

CD36、CPT1、SREBP-1和PPAR α 的一抗购于英国Abcam公司; SCD1和GAPDH的一抗、HRP偶联的抗山羊和抗小鼠的二抗购于美国Santa Cruz公司; HRP偶联的抗兔二抗购于北京爱必信生物技术有限公司; DSTP-202型段氏动物跑台购自中国杭州钱江科工贸公司; Step One PlusTM PCR仪购自美国Life Technology公司; 垂直电泳仪购自美国Bio-Rad公司; 激光共聚焦显微镜(LSM7000)购自德国Carl Zeiss公司。

1.3 Chemerin敲除小鼠的分组

将8周龄雄性野生型(WT)小鼠、敲除脂肪chemerin的纯合子小鼠adipo-chemerin^{-/-}和敲除全身chemerin的纯合子小鼠chemerin^{-/-}随机分为普通饮食(ND)组和高脂饮食(HFD)组, 进行12周饮食干预。ND组喂以普通饲料(含10%脂肪、20%蛋白质, 3.85 kcal/g), HFD组喂以高脂饲料(含60%脂肪、20%蛋白质, 5.24 kcal/g)。此外, 将高脂喂养6周的上述三组小鼠进行6周中等强度递增负荷跑台运动干预, 即WT+E、adipo-chemerin^{-/-}+E和chemerin^{-/-}+E组。运动小鼠每周训练6天, 每天训练1次, 每次1 h。其中, adipo-chemerin^{-/-}小鼠的每周跑速分别是11 m/min、11 m/min、12 m/min、13 m/min、14 m/min、15 m/min, 而chemerin^{-/-}小鼠的每周跑速分别是12 m/min、13 m/min、14 m/min、15 m/min、18 m/min、18 m/min(chemerin^{-/-}小鼠的运动强度比adipo-chemerin^{-/-}小鼠的大, 是因为HFD的chemerin^{-/-}小鼠肥胖、NAFLD加重, 为实现运动的改善作用采用了更大的中等运动强度)。

1.4 组织样本采集

饮食干预组小鼠在12周普通或高脂饲料喂养后禁食16 h, 运动组小鼠在最后一次跑台运动结束36 h后也禁食16 h, 水合氯醛麻醉小鼠, 采血后取出肝脏称重, 剪取左上部肝组织于多聚甲醛中室温固定, 以备形态学实验, 剩余组织放入液氮中速冻, 后移入-80 °C保存, 以备分子生物学实验, 本研究所涉及的动物实验均获得上海体育大学科学研究动物伦理委员会授权(批准号: 102772021DW009)。

1.5 小鼠肝脏组织油红O染色

冰冻切片机设置切片厚度为10 μ m, 将切好的组织切片用多聚甲醛室温固定10 min, 滴上油红O工作液染色10 min, 苏木素复染细胞核, 置于显微镜

(Olympus)下观察并采集图像。

1.6 小鼠肝脏组织HE染色

经梯度酒精(75%、85%、95%酒精和无水酒精)脱水4 h, 二甲苯透明1.5 h, 浸入石蜡4.5 h, 包埋后制成组织蜡块。切片机将组织蜡块切成5 μm 厚度的石蜡切片, 石蜡切片经二甲苯脱蜡10 min和酒精梯度(无水乙醇、95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇, 各5 min)脱去二甲苯后用苏木素染细胞核, 伊红(HE)染细胞质, 中性树脂封片, 置于显微镜(Olympus)下观察并采集图像。

1.7 小鼠血脂指标检测

采用化学发光法测定检测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的水平。

1.8 血清AST、ALT含量检测

按照南京建成生物工程研究所的AST、ALT试剂盒说明书操作。酶标仪测定各孔 D 值, 做标准曲线, 求得各样本的相应酶活力。

1.9 Western blot检测小鼠肝脏脂代谢相关指标的蛋白水平

取30 mg小鼠肝脏组织, 提取蛋白, 参照BCA试剂盒说明书测定蛋白浓度。进行聚丙烯酰胺凝胶电泳; 恒流250 mA、60 min转膜; 5%脱脂牛奶封闭2 h; 一抗(除内参GAPDH的一抗1:10 000稀释外, 其余蛋白的一抗均1:1 000稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育摇床过夜。TBST漂洗三次后, 加二抗(稀释比例1:1 000)室温孵育1 h; 置于自动发光仪中显影拍摄。用ImageJ软件处理目的蛋白和对应内参蛋白的灰度值, 并统计分析。

1.10 统计学处理

实验数据采用SPSS 26.0统计学软件包进行数据处理, 饮食干预小鼠间的比较采用单因素方差分析, 高脂喂养的运动小鼠间比较采用双因素方差分析, 所有数据均以 $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

2 结果

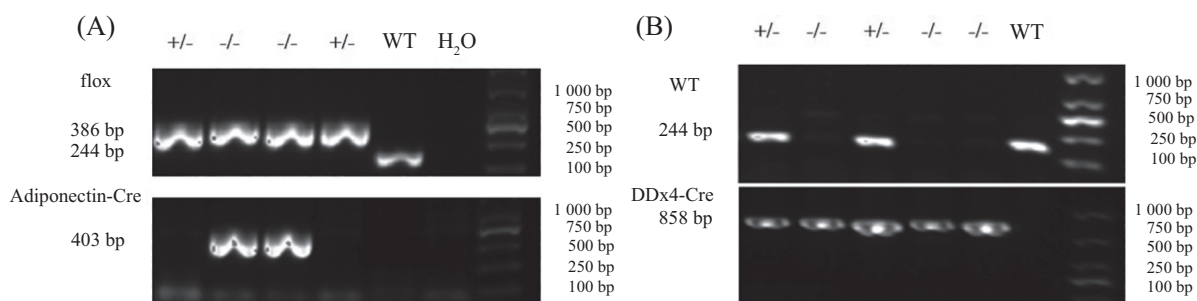
2.1 Chemerin基因敲除小鼠的构建

用flox、adiponectin-Cre和DDx4-Cre引物进行PCR扩增的产物长度分别是386 bp(若flox未插入, 则产物为244 bp)、403 bp和858 bp, 因此, 如图1所示, 若琼脂糖凝胶电泳结果在386 bp和403 bp处各有一条带, 为adipo-chemerin^{-/-}小鼠; 若仅在858 bp处有一条带, 表明是chemerin^{-/-}小鼠; 若仅在244 bp处有一条带, 则为WT小鼠。

2.2 敲除chemerin对ND/HFD雄性小鼠NAFLD的影响

与WT-ND组相比, WT-HFD小鼠肝质量升高, 血清ALT、AST含量升高, 血脂异常, 肝脏出现大、黄、油特征, 伊红和油红O染色显示脂滴数量增多和脂肪空泡面积增大, 表现出NAFLD的重要表型(图2)。

敲除chemerin对ND小鼠无显著影响。但在HFD喂养下, 与WT小鼠相比, adipo-chemerin^{-/-}小鼠肥胖率下降(66% vs 83%), 肝质量与体质量比值下降、血清ALT、AST、TG、TC含量显著下降($P < 0.05$)(图2A、图2B、图2D), 脂肪肝减轻; 而chemerin^{-/-}小鼠的肥胖率升高(100% vs 83%)、脂肪空泡数量增多并出现气球样变性, 肝脏脂肪变性恶化($P < 0.05$)(图2C)。

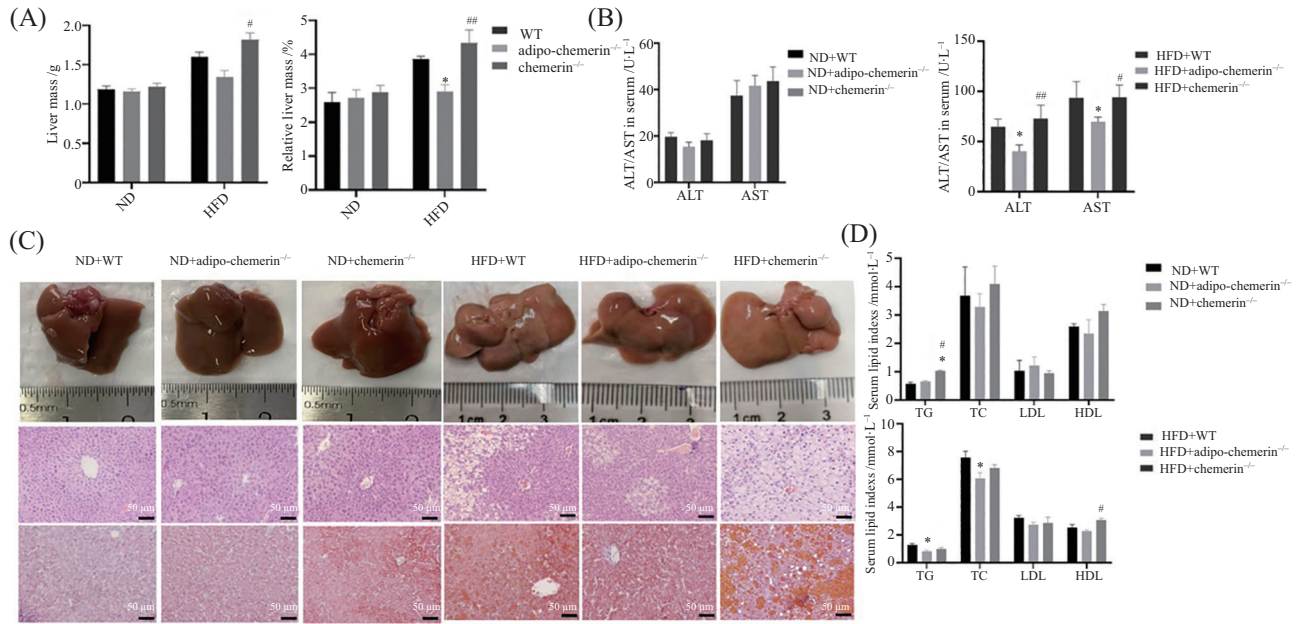


A: adipo-chemerin^{-/-}小鼠鉴定图。WT小鼠有一条244 bp的条带, adipo-chemerin^{-/-}小鼠在386 bp和403 bp处各有一条带; B: chemerin^{-/-}小鼠的鉴定图。WT小鼠有一条244 bp的条带, chemerin^{-/-}仅在858 bp处有一条带。

A: genotyping of adipo-chemerin^{-/-} mice. WT mice have one band at 244 bp, and adipo-chemerin^{-/-} mice have two bands at 386 bp and 403 bp; B: genotyping of chemerin^{-/-} mice. WT mice have one band at 244 bp, and adipo-chemerin^{-/-} mice have one band at 858 bp.

图1 构建chemerin基因敲除小鼠

Fig.1 Construction of chemerin knockout mice



A: 小鼠肝脏质量和相对肝脏质量; B: 小鼠血清肝功能酶水平; C: 小鼠肝脏病理变化(苏木精和伊红染色; 油红O染色), 以上图片为六张切片的代表图; D: 小鼠血脂四项水平。n=6。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs WT组; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs *adipo-chemerin*^{-/-}组。

A: liver mass and relative liver mass of mice; B: levels of liver function enzymes in mice; C: hepatic pathological changes in mice (hematoxylin and eosin staining; oil red O staining), the images above are representative of six slices; D: level of blood lipid in mice. n=6. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs WT group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs *adipo-chemerin*^{-/-} group.

图2 *chemerin*基因敲除对正常或高脂饮食喂养小鼠NAFLD的影响

Fig.2 Influences of *chemerin* knockout on NAFLD in mice fed with normal or high fat diet

2.3 敲除*chemerin*对ND/HFD小鼠肝脏脂肪代谢关键酶的影响

Western blot结果显示, 脂肪特异性*chemerin*和全身性*chemerin*敲除对ND小鼠肝脏脂肪代谢相关酶的表达无明显影响; 但与*adipo-chemerin*^{-/-}小鼠相比, *chemerin*^{-/-}小鼠的脂肪合成蛋白酶SCD1蛋白表达上调($P<0.05$)(图3A)。对于HFD组, 与WT相比, *adipo-chemerin*^{-/-}小鼠的脂肪酸转位酶CD36、脂肪合成蛋白SREBP-1和SCD1的表达水平均显著下调($P<0.05$), 氧化分解限速酶CPT1的表达水平上调($P<0.05$); 与*adipo-chemerin*^{-/-}小鼠相反, *chemerin*^{-/-}小鼠与WT相比, CD36、SREBP-1表达上调($P<0.05$)。此外, *chemerin*^{-/-}小鼠与*adipo-chemerin*^{-/-}小鼠相比, CD36、SREBP-1、SCD1蛋白表达水平显著上调($P<0.01$)、CPT1表达水平下降($P<0.05$)(图3B)。

2.4 有氧运动对HFD喂养的雄性*chemerin*敲除小鼠NAFLD的影响

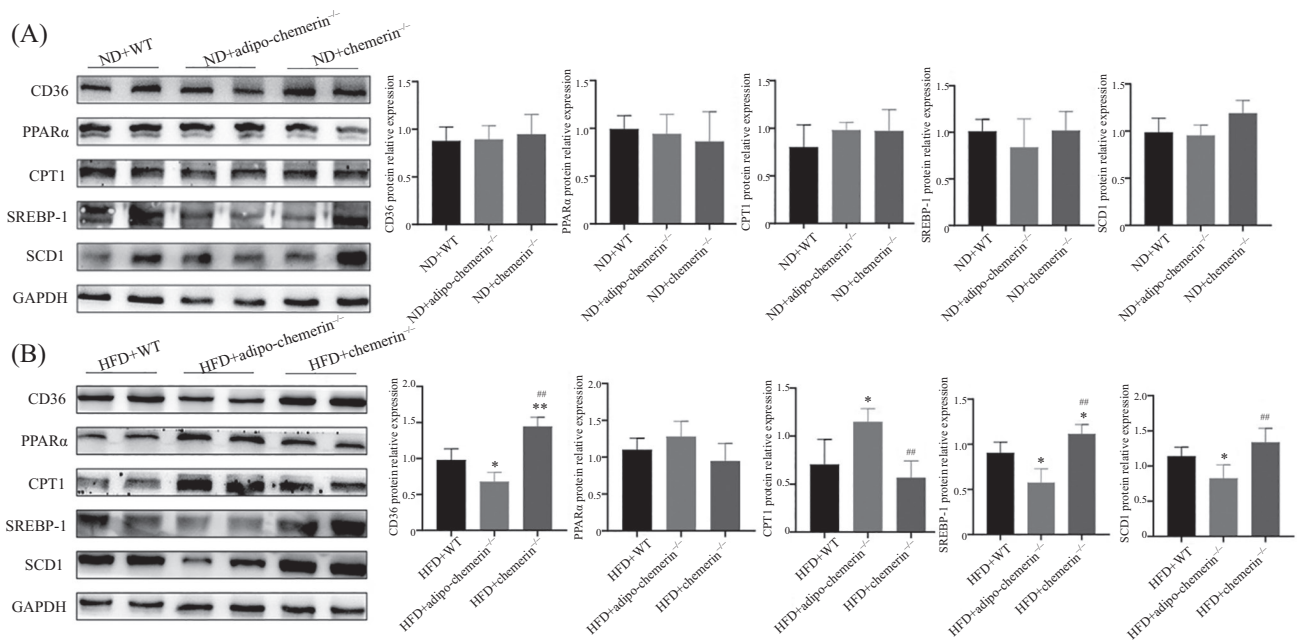
6周有氧运动显著降低了HFD喂养的WT小鼠和*chemerin*^{-/-}小鼠的肝质量、肝脏脂肪空泡和脂滴数量($P<0.05$)(图4A和图4B), 以及血清ALT($P<0.05$)和AST含量($P<0.01$, $P<0.05$), 但运动降低AST的程

度在*chemerin*^{-/-}小鼠中要显著低于WT小鼠(图4C)。此外, 6周有氧运动降低HFD喂养WT小鼠血清TG、LDL水平($P<0.05$), 但对HFD喂养*chemerin*^{-/-}小鼠的血脂无改善作用(图4D)。

此外, 6周有氧运动减少了HFD喂养的WT和*adipo-chemerin*^{-/-}小鼠肝脏的脂质堆积(图5A和图5B), 降低了HFD喂养WT小鼠的血清ALT和AST含量($P<0.05$, $P<0.01$)以及HFD喂养*adipo-chemerin*^{-/-}小鼠的血清AST含量($P<0.01$)和血清TC含量($P<0.05$)(图5C和图5D)。

2.5 有氧运动对HFD喂养的*chemerin*敲除小鼠肝脏脂肪代谢关键酶的影响

Western blot结果显示, 6周有氧运动降低了HFD喂养WT小鼠肝SREBP-1、SCD1($P<0.05$)、CD36表达水平($P<0.01$), 升高了CPT1水平($P<0.05$), 但运动仅降低了HFD喂养*chemerin*^{-/-}小鼠CD36水平($P<0.01$), 对其余代谢酶的蛋白水平无显著影响(图6A)。6周有氧运动进一步降低了HFD喂养*adipo-chemerin*^{-/-}小鼠的CD36和SCD1蛋白水平, 升高了CPT1水平($P<0.01$)(图6B)。以上结果提示, 敲除全身*chemerin*减弱运动对HFD小鼠NAFLD的改善作用,

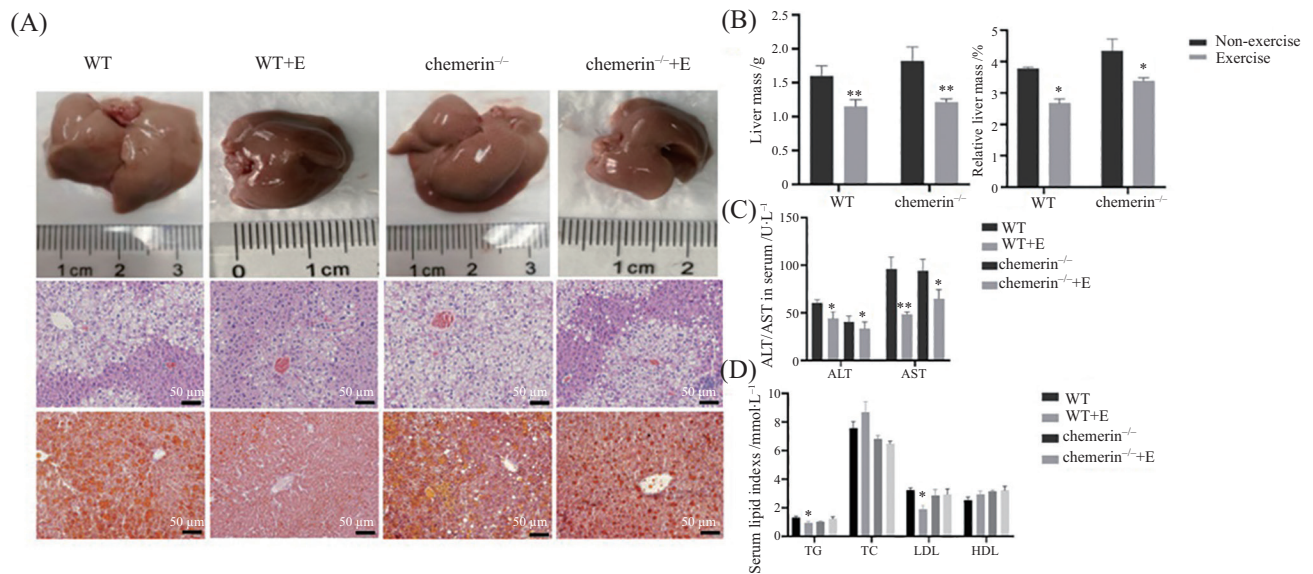


A: 正常饮食小鼠肝脏脂代谢酶的蛋白水平; B: 高脂饮食小鼠肝脏脂代谢酶的蛋白水平。**P*<0.05, ***P*<0.01 vs WT组; #*P*<0.05, ##*P*<0.01 vs adipo-chemerin^{-/-}组。

A: protein levels of lipid metabolism key enzymes in mice fed with normal diet; B: protein levels of lipid metabolism key enzymes in mice fed with high fat diet. **P*<0.05, ***P*<0.01 vs WT group; #*P*<0.05, ##*P*<0.01 vs adipo-chemerin^{-/-} group.

图3 正常或高脂饮食喂养的雄性chemerin^{-/-}和adipo-chemerin^{-/-}小鼠肝脏脂代谢关键酶的蛋白水平

Fig.3 The protein levels of lipid metabolism key enzymes in the livers of male chemerin^{-/-} and adipo-chemerin^{-/-} mice fed with normal diet or high fat diet

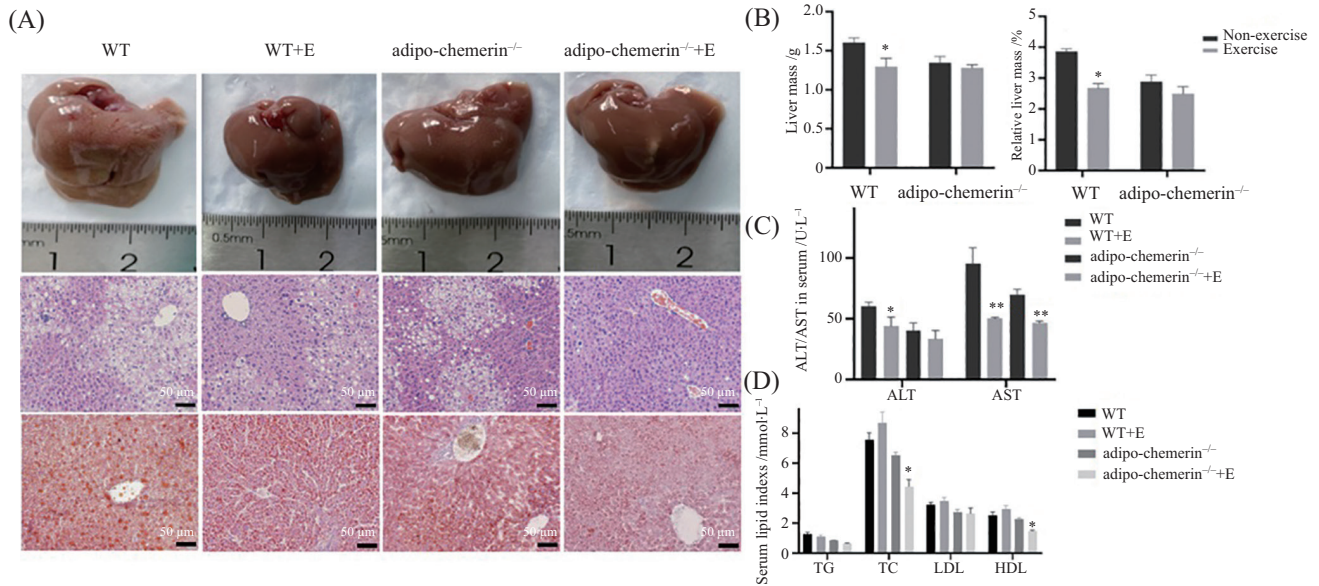


A: 小鼠肝脏病理变化(苏木精和伊红染色; 油红O染色), 以上图片为六张切片的代表; B: 小鼠肝脏质量和相对肝脏质量; C: 小鼠血清肝功能酶水平; D: 小鼠血脂水平。**P*<0.05, ***P*<0.01, 与各组非运动组比较。

A: hepatic pathological changes of mice (hematoxylin and eosin staining; oil red O staining), the images above are representative of six slices; B: liver mass and relative liver mass of mice; C: levels of liver function enzymes in mice; D: level of blood lipid in mice. **P*<0.05, ***P*<0.01 vs the sedentary group.

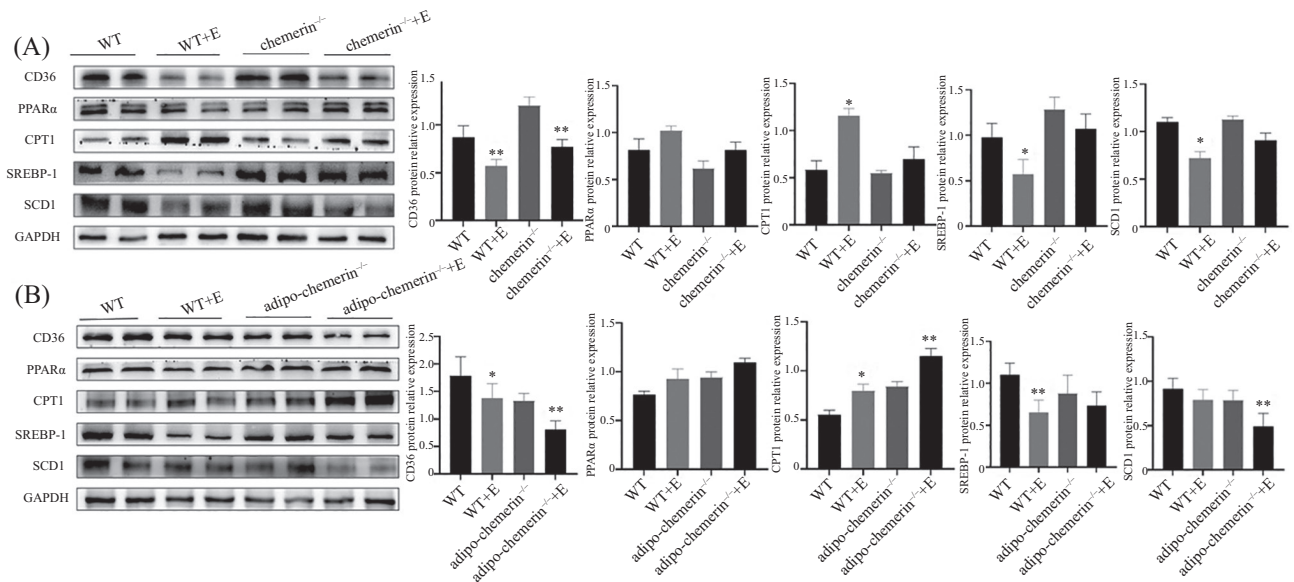
图4 有氧运动对chemerin^{-/-}小鼠NAFLD的影响

Fig.4 Influences of aerobic exercise on NAFLD of chemerin^{-/-} mice



A: 小鼠肝脏病理变化(苏木精和伊红染色; 油红O染色), 以上图片为六张切片的代表; B: 小鼠肝脏质量和相对肝脏质量; C: 小鼠血清肝功能酶水平; D: 小鼠血脂水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与各组非运动组比较。
 A: hepatic pathological changes in mice (hematoxylin and eosin staining; oil red O staining), the images above are representative of six slices; B: liver mass and relative liver mass of mice; C: levels of liver function enzymes in mice; D: level of blood lipid in mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the sedentary group of each group.

图5 有氧运动对adipo-chererin^{-/-}小鼠NAFLD的影响
 Fig.5 Influences of aerobic exercise on NAFLD of adipo-chererin^{-/-} mice



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与各组非运动组比较。
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the sedentary group of each group.

图6 有氧运动对adipo-chererin^{-/-}小鼠和chererin^{-/-}小鼠肝脏脂代谢关键酶的影响

Fig.6 Effects of aerobic exercise on lipid metabolism key enzymes in the livers of adipo-chererin^{-/-} mice and chererin^{-/-} mice

可能与其减弱或阻断运动对肝脏脂代谢关键酶的调控作用有关; 而敲除脂肪chererin增强运动对HFD小鼠NAFLD的改善作用, 也可能与其增强运动对肝脏脂代谢关键酶的调控作用有关。

3 讨论

目前对于chererin的研究大多为全身性敲除chererin或CMKLR1的小鼠, 也有肝特异性敲除chererin小鼠的研究报道, 发现全身性敲除chererin

小鼠或肝脏chemerin缺失小鼠出现糖耐量异常^[19]。鉴于脂肪和肝脏是内源性chemerin的两个主要来源,且有氧运动对脂肪组织chemerin和CMKLR1蛋白水平的抑制作用显著强于对其他外周代谢组织^[20],所以本课题组建立了脂肪特异性chemerin敲除小鼠(未见相关报道)和全身性chemerin敲除小鼠,以开展相关研究。

3.1 Chemerin影响高脂喂养小鼠的NAFLD

Chemerin作为一种较新的脂肪因子,与炎症和代谢功能障碍有关。NAFLD患者的组织和血清中chemerin水平异常升高,且升高程度与疾病的严重程度正相关^[7]。降低chemerin水平可改善糖脂代谢,如短期运动干预后肥胖患者腰围、身体质量指数(body mass index, BMI)、血清AST和ALT水平均显著降低,这与chemerin减少有关^[21];小檗碱通过降低chemerin/CMKLR1信号通路来减轻非酒精性脂肪性肝炎^[22];PI3K通过下调HFD小鼠CMKLR1和炎性小体NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)的表达水平来抑制肝脏脂肪变性和炎症反应^[23]。

有研究报道敲除全身chemerin使高脂喂养小鼠的体质量明显增加,皮下脂肪组织和内脏脂肪组织体积明显增大,且葡萄糖耐量降低、胰岛素敏感性受损^[24]。敲除肝脏chemerin也会导致高脂喂养小鼠出现糖耐量异常和胰岛 β 细胞功能受损,其原因与肝chemerin缺失导致肝脏糖异生增加、胰岛素分泌受损以及胰岛 β 细胞功能受损有关^[19];而用腺病毒感染小鼠致肝脏chemerin过表达则会降低巨噬细胞浸润和炎症因子水平,对非酒精性脂肪性肝炎具有保护作用^[25]。可见敲除全身chemerin和敲除肝chemerin都会导致胰岛功能受损、糖耐量异常,甚至使小鼠出现NAFLD。

我们的研究发现,敲除全身chemerin会加重高脂喂养小鼠的NAFLD(与上述研究报道类似),但敲除脂肪chemerin则出现与敲除全身chemerin完全不同的改变,其NAFLD改善而非加重(表现为肝脏形态结构改善、脂肪变性减轻,以及血清ALT、AST、TG、TC的含量降低)。分析其原因,我们认为与以下几个因素有关。(1) chemerin水平不同。生理剂量chemerin有重要生理功能,它对于脂肪细胞和脂肪组织的发育至关重要并能调节脂肪形成和机体代

谢,而敲除全身chemerin后可导致机体chemerin水平过低,影响了其对脂肪合成和脂肪代谢的正常调控作用。而敲除脂肪chemerin只是使高脂喂养所致异常升高的chemerin减少,鉴于chemerin水平与糖脂代谢紊乱和NAFLD的正相关关系,因此降低chemerin将改善糖脂代谢和NAFLD。(2) chemerin组织来源不同。尽管脂肪来源chemerin和肝脏来源chemerin均对炎症、能量平衡、代谢稳态有一定的调节作用,但chemerin组织来源不同,发挥的生物学功能也可能不同。例如,敲除肝脏chemerin使脂肪组织中巨噬细胞的浸润增加、肝糖异生和胰岛素分泌受损,影响葡萄糖稳态^[19],而敲除脂肪chemerin却使小鼠脂肪组织巨噬细胞浸润减少、葡萄糖耐量改善,以及胰岛素抵抗得到缓解^[24]。这从高脂喂养的敲除脂肪chemerin小鼠和敲除肝chemerin小鼠的糖耐量和胰岛 β 细胞功能改变不同就可看出,前者是改善、后者是恶化。此外,敲除脂肪chemerin和敲除全身chemerin对脂肪组织生成的影响不同,前者促进皮下脂肪组织(其拥有更多的线粒体和产热相关基因,其脂肪酸氧化的速率高、胰岛素敏感性高,可促进全身能量代谢和糖脂代谢的平衡^[26])生成增多、降低内脏脂肪组织(与代谢性疾病密切相关)占比,从而促进机体的脂质消耗,而后者可造成与血糖血脂紊乱相关的内脏脂肪增多,导致脂代谢恶化。综上,不同水平和不同组织来源的chemerin在调控小鼠NAFLD中的作用有差异,chemerin含量过低或过高均可导致糖脂代谢紊乱和NAFLD的发生。

3.2 Chemerin减少改善高脂喂养小鼠NAFLD的机制

NAFLD的典型特征是甘油三酯在肝内的大量积聚。肝内脂质来源有脂肪的从头合成、脂肪酸转运,脂质去路包括脂肪酸氧化分解、极低密度脂蛋白输送回血液,其中某一途径或多个途径的异常均会促进NAFLD的发生发展^[27]。肝脏有25%脂肪酸来源于肝脏自身脂肪的合成,抑制脂肪合成的主要转录调节因子SREBP-1和其下游关键代谢酶是改善NAFLD的重要途径之一^[28]。脂肪组织胰岛素抵抗可导致脂解作用失调、血液游离脂肪酸增多,诱发肝脏转运蛋白CD36水平升高,加速游离脂肪酸转运至肝脏^[29]。肝细胞中脂肪酸消耗主要通过线粒体 β -氧化,其过程受关键限速酶CPT1的调控;当 β -氧化的过程减弱时,脂肪酸可以促进脂毒性物质的形成,

并诱发肝细胞损伤和脂质的过度积聚^[30]。

有研究报道, 肝脏内脂代谢相关蛋白的水平异常和NAFLD发生发展密切相关。例如, 桑叶总黄酮通过激活PPAR α /CPT1途径促进脂肪酸氧化分解, 加速肝脏脂质的分解利用, 从而有效降低了2型糖尿病大鼠的血糖、血脂水平, 并改善了肝脏脂质代谢紊乱^[31]; 乙型肝炎病毒调节蛋白(hepatitis B virus X protein, HBx)可促进脂质代谢的重要调节因子SREBP-1、乙酰辅酶A羧化酶(acetyl coenzyme A carboxylase, ACC)、SCD1的蛋白水平显著升高, 从而促进肝癌细胞系HepG2细胞的脂质堆积^[32]; 以及CD36敲除小鼠增强了全身胰岛素敏感性, 降低了血清IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子的水平^[33]。与上述的研究结果一致, 本研究在adipo-*chemerin*^{-/-}小鼠中也发现SREBP-1、SCD1和CD36的水平显著下降, CPT1水平上升, 并伴有血脂改善、肝脏脂肪空泡和脂滴数量减少、脂肪变性减轻。与adipo-*chemerin*^{-/-}小鼠的改变相反, *chemerin*^{-/-}小鼠的SREBP-1、SCD1和CD36蛋白水平却上升, 肝脏脂肪变性加重。以上结果提示, 高脂喂养的adipo-*chemerin*^{-/-}小鼠NAFLD改善、*chemerin*^{-/-}小鼠NAFLD恶化, 与*chemerin*调节肝脏脂代谢密切相关的脂代谢相关酶(包括脂肪合成及转运相关蛋白、脂肪氧化关键蛋白)有关。

3.3 Chemerin减少在运动改善高脂喂养小鼠NAFLD中的作用及机制

Chemerin减少在运动调控NAFLD中也发挥了重要的作用。以往的研究报道了有氧运动改善肥胖相关血脂异常、缓解代谢紊乱的作用与其抑制*chemerin*/CMKLR1信号通路有关。例如, 8周有氧运动显著降低肥胖男性血清*chemerin*水平, 降低BMI和缩小腰围^[34]; 运动降低高脂喂养大鼠的肥胖程度和糖脂代谢紊乱, 以及降低血清*chemerin*水平^[35]; 有氧运动降低肥胖小鼠*chemerin*水平, 减轻体质量、改善糖耐量和胰岛素抵抗。我们课题组前期研究也发现, 运动改善肥胖、糖尿病和动脉粥样硬化大鼠血糖血脂紊乱的作用与其降低血清和组织*chemerin*水平有关^[36]。本研究发现, 6周有氧运动可显著改善高脂喂养的野生型小鼠NAFLD, 但运动的改善作用在*chemerin*^{-/-}小鼠中被削弱, 却在adipo-*chemerin*^{-/-}小鼠中增强(体现在运动对血脂的改善作用在*chemerin*^{-/-}小鼠中消失, 运动对血清AST的降低幅度、对脂滴数量的减少作用和对肝脏气球样变性的缓解程度在

chemerin^{-/-}小鼠中减轻; 但运动对血清AST、TC含量的降低作用和对肝脏脂肪变性的改善作用在adipo-*chemerin*^{-/-}小鼠中增强)。分析其原因, 可能是由于敲除全身*chemerin*导致小鼠血清*chemerin*水平过低, 使运动继续降低*chemerin*的作用有限, 从而使运动效应被减弱甚至阻断; 而敲除脂肪*chemerin*使*chemerin*水平适度降低, 运动可进一步降低*chemerin*水平, 从而改善小鼠的NAFLD。以上结果表明, *chemerin*减少是运动改善NAFLD的重要机制之一。

在运动通过减少*chemerin*改善NAFLD作用机制的探索上, 我们发现6周有氧运动降低了高脂喂养野生型小鼠的肝脏脂肪酸转位酶CD36、脂肪合成蛋白SREBP-1和合成酶SCD1的表达水平, 从而减少了肝脏内脂肪的从头合成; 同时使脂肪氧化分解蛋白CPT1的含量升高, 从而加速了脂肪代谢消耗, 最终改善了NAFLD。通过比较野生型、*chemerin*^{-/-}和adipo-*chemerin*^{-/-}小鼠的运动效应, 发现与野生型小鼠相比, 敲除全身*chemerin*使运动对高脂喂养小鼠肝脏脂肪合成蛋白SREBP-1、SCD1和氧化分解蛋白CPT1的抑制作用消失, 而敲除脂肪*chemerin*却相反, 使运动对CD36、SCD1和CPT1的调节作用进一步增强, 这提示*chemerin*参与运动对高脂小鼠NAFLD的调控作用也可能是通过调控肝脏脂代谢关键酶和蛋白实现的。

综上, 敲除脂肪*chemerin*可改善雄性高脂喂养小鼠的NAFLD, 增强运动对NAFLD的改善作用, 但敲除全身*chemerin*却加重其NAFLD、减弱运动的改善效应, 提示*chemerin*可能成为治疗NAFLD的一个新靶点。*Chemerin*的上述作用与*chemerin*水平降低(敲除脂肪*chemerin*)和过低(敲除全身*chemerin*)分别增强和减弱对肝脏脂代谢关键酶(SREBP-1、SCD1、CD36、CPT1)的调控作用有关。

参考文献 (References)

- [1] WANG H, MEHAL W, NAGY L E, et al. Immunological mechanisms and therapeutic targets of fatty liver diseases [J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(1): 73-91.
- [2] ESLAM M, NEWSOME P N, SARIN S K, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement [J]. J Hepatol, 2020, 73(1): 202-9.
- [3] BURRA P, BIZZARO D, GONTA A, et al. Clinical impact of sexual dimorphism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. Liver Int, 2021, 41(8): 1713-33.

- [4] LEE C H, LUI D T, LAM K S. Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes: an update [J]. *J Diabetes Investig*, 2022, 13(6): 930-40.
- [5] POWELL E E, WONG V W, RINELLA M. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Lancet*, 2021, 397(10290): 2212-24.
- [6] MUNDI M S, VELAPATI S, PATEL J, et al. Evolution of NAFLD and its management [J]. *Nutr Clin Pract*, 2020, 35(1): 72-84.
- [7] REN Q, WANG H, ZENG Y, et al. Circulating chemerin levels in metabolic-associated fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lipids Health Dis*, 2022, 21(1): 27.
- [8] PESCHEL G, GRIMM J, GÜLOW K, et al. Chemerin is a valuable biomarker in patients with HCV infection and correlates with liver injury [J]. *Diagnostics*, 2020, 10(11): 974.
- [9] 张莉, 高旭峰, 王玉环. 非酒精性脂肪肝并糖尿病前期chemerin表达及西格列汀对其表达的影响[J]. *中华医学杂志(ZHANG L, GAO X F, WANG Y H. The expression of chemerin and the influence of sitagliptin on its expression in non-alcoholic fatty liver disease rats complicated with prediabetes [J]. Chin Med J, 2018, 98(30): 2407-13.*
- [10] HABERL E M, POHL R, REIN-FISCHBOECK L, et al. Chemerin in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis and hepatocarcinogenesis [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(5): 2649-57.
- [11] HUANG B, ZHAO H, HUANG C, et al. CMKLR1 deficiency attenuates androgen-induced lipid accumulation in mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2020, 318(3): 371-80.
- [12] DRANSE H J, ZHENG A, COMEAU A M, et al. The impact of chemerin or chemokine-like receptor 1 loss on the mouse gut microbiome [J]. *PeerJ*, 2018, 6: e5494.
- [13] 林小晶, 王晓慧. 炎症因子chemerin在肥胖及其相关疾病中的作用及运动对chemerin调控的研究进展[J]. *生理科学进展(LIN X J, WANG X H. Role of the inflammatory factor chemerin in obesity and its related diseases and progress in the regulation of chemerin by exercise [J]. Progress in Physiological Sciences, 2017, 48(5): 383-7.*
- [14] DINIZ T A, DE LIMA JUNIOR E A, TEIXEIRA A A, et al. Aerobic training improves NAFLD markers and insulin resistance through AMPK-PPAR- α signaling in obese mice [J]. *Life Sci*, 2021, 266: 118868.
- [15] YANG J, SÁINZ N, FÉLIX-SORIANO E, et al. Effects of long-term DHA supplementation and physical exercise on non-alcoholic fatty liver development in obese aged female mice [J]. *Nutrients*, 2021, 13(2): 501.
- [16] DOS SANTOS G F, VERAS A S C, DE FREITAS M C, et al. Strength training reduces lipid accumulation in liver of obese Wistar rats [J]. *Life Sci*, 2019, 235: 116834.
- [17] ASHTARY-LARKY D, LAMUCHI-DELI N, KASHKOOL I S, et al. The effects of exercise training on serum concentrations of chemerin in individuals with overweight and obesity: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of 43 clinical trials [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2023, 129(5): 1012-27.
- [18] LIN X, YANG Y, QU J, et al. Aerobic exercise decreases chemerin/CMKLR1 in the serum and peripheral metabolic organs of obesity and diabetes rats by increasing PPAR γ [J]. *Nutr Metab*, 2019, 16: 17.
- [19] TAKAHASHI M, OKIMURA Y, IGUCHI G, et al. Chemerin regulates beta-cell function in mice [J]. *Sci Rep*, 2011, 1: 123.
- [20] 林小晶. chemerin在运动改善小鼠糖脂代谢紊乱中的作用及机制[D]. 上海: 上海体育学院, 2020.
- [21] SIEGRIST M, HEITKAMP M, BRAUN I, et al. Changes of omentin-1 and chemerin during 4 weeks of lifestyle intervention and 1 year follow-up in children with obesity [J]. *Clin Nutr*, 2021, 40(11): 5648-54.
- [22] LU Z, LU F, WU L, et al. Berberine attenuates non-alcoholic steatohepatitis by regulating chemerin/CMKLR1 signalling pathway and Treg/Th17 ratio [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2021, 394(2): 383-90.
- [23] ZHANG W, LIU Y, WU M, et al. PI3K inhibition protects mice from NAFLD by down-regulating CMKLR1 and NLRP3 in Kupffer cells [J]. *J Physiol Biochem*, 2017, 73(4): 583-94.
- [24] HUANG C L, XIAO L L, XU M, et al. Chemerin deficiency regulates adipogenesis in depot different through TIMP1 [J]. *Genes Dis*, 2021, 8(5): 698-708.
- [25] POHL R, FEDER S, HABERL E M, et al. Chemerin overexpression in the liver protects against inflammation in experimental non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(1): 132.
- [26] KHALAFI M, MOHEBBI H, SYMONDS M E, et al. The impact of moderate-intensity continuous or high-intensity interval training on adipogenesis and browning of subcutaneous adipose tissue in obese male rats [J]. *Nutrients*, 2020, 12(4): 925.
- [27] TACKE F, WEISKIRCHEN R. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH)-related liver fibrosis: mechanisms, treatment and prevention [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(8): 729.
- [28] LU Y, ZHANG C, SONG Y, et al. Gallic acid impairs fructose-driven de novo lipogenesis and ameliorates hepatic steatosis via AMPK-dependent suppression of SREBP-1/ACC/FASN cascade [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 940: 175457.
- [29] FENG Y, SUN W, SUN F, et al. Biological mechanisms and related natural inhibitors of CD36 in nonalcoholic fatty liver [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 3829-45.
- [30] WANG Y, NAKAJIMA T, GONZALEZ F J, et al. PPARs as metabolic regulators in the liver: lessons from liver-specific PPAR-null mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 2061.
- [31] 段钰卉, 代泓钰, 安永铖, 等. 基于PPAR- α /CPT-1信号通路的桑叶总黄酮调控T2DM大鼠肝脏脂代谢作用及其机制[J]. *中国实验方剂学杂志(DUAN Y X, DAI H Y, AN Y C, et al. Regulation of hepatic lipid metabolism in T2DM rats by total flavonoids of *Morus alba* based on PPAR- α /CPT-1 signaling pathway and its mechanism [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(15): 61-9.*
- [32] 张欣, 张玺, 张娟娟, 等. HBx蛋白通过C/EBP α /SREBP-1通路调节脂代谢促进肝癌细胞增殖[J]. *中华肝病杂志(ZHANG X, ZHANG X, ZHANG J J, et al. HBx protein promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation by regulating lipid metabolism through the C/EBP α /SREBP-1 pathway [J]. Chin J Hepatol, 2020, 28(12): 1036-41.*
- [33] WILSON C G, TRAN J L, ERION D M, et al. Hepatocyte-specific disruption of CD36 attenuates fatty liver and improves insulin sensitivity in HFD-fed mice [J]. *Endocrinology*, 2016, 157(2): 570-85.
- [34] NAM J S, AHN C W, PARK H J, et al. Semaphorin 3C is a novel adipokine representing exercise-induced improvements of metabolism in metabolically healthy obese young males [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 10005.

- [35] 宋巍巍, 柏友萍, 苏敏, 等. 运动结合甲鱼油对老年肥胖大鼠 chemerin 的影响[J]. 中国应用生理学杂志(SONG W W, BAI Y P, SU M, et al. Effect of exercise combined with turtle oil on chemerin in aged obese rats [J]. Chin J Appl Physiol), 2018, 34(3): 215-7,22.
- [36] 林小晶, 杨宏芳, 王晓慧. 有氧运动与饮食控制对2型糖尿病大鼠肝chemerin及其受体CMKLR1的影响[J]. 中国应用生理学杂志(LIN X J, YANG H F, WANG X H. Effects of aerobic exercise and dietary control on hepatic chemerin and its receptor CMKLR1 in type 2 diabetic rats [J]. Chin J Appl Physiol), 2017, 33(5): 426-30,35.