

AMPK 信号通路介导了 CTRP3 增加 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达的研究

李新 孙家忠 孙苏欣 杨杪 吴玉文

【摘要】 目的 探讨 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)信号通路在 C1q/ 肿瘤坏死因子相关蛋白 3 (CTRP3)调节 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达中的作用。**方法** 将 3T3-L1 脂肪细胞分为对照组、CTRP3 (250 $\mu\text{g/L}$)干预组及 CTRP3(250 $\mu\text{g/L}$)+ Compound C(10 $\mu\text{mol/L}$ 预处理 1 h)干预组。以酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞培养上清中脂联素含量,实时定量 PCR 检测脂联素 mRNA 相对表达水平,Western 印迹检测 AMPK(thr172)蛋白相对表达量。**结果** 与对照组相比,CTRP3 干预组脂联素 mRNA 表达及蛋白分泌分别增加 53.0%($q=15.09, P<0.01$)及 63.3%($q=8.11, P<0.01$),AMPK(thr172)表达增加 43.0%($q=14.64, P<0.01$);与 CTRP3 干预组相比,CTRP3+Compound C 干预组 AMPK(thr172)蛋白的表达降低 57.3%($q=27.92, P<0.01$),脂联素 mRNA 表达及蛋白分泌分别下降 26.1%($q=11.39, P<0.01$)及 54.1%($q=11.31, P<0.01$)。**结论** AMPK 信号通路参与了 CTRP3 对 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达的调控过程。

【关键词】 CTRP3;3T3-L1 脂肪细胞;脂联素;AMPK

Study of AMPK signal transduction mediated the expression of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes increased by CTRP3 Li Xin, Sun Jiazhong, Sun Suxin, Yang Miao, Wu Yuwen. Department of Endocrinology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China

【Abstract】 Objective To investigate the role of AMP activated protein kinase (AMPK) signal in the modulation of C1q/TNF related protein 3 (CTRP3) on the expression of adiponectin in adipocytes. **Methods** The 3T3-L1 adipocytes were divided into control group, CTRP3 (250 $\mu\text{g/L}$) intervention group and CTRP3 (250 $\mu\text{g/L}$)+ Compound C (10 $\mu\text{mol/L}$ pretreated for 1 h) intervention group. The content of adiponectin in supernatant was detected by enzyme linked immunosorbent assay. The relative expression of adiponectin mRNA was detected by real-time polymerase chain reaction. The relative expression of AMPK (thr172) was detected by Western blot. **Results** Compared with control group, expression of adiponectin mRNA and protein increased 53.0% ($q=15.09, P<0.01$) and 63.3% ($q=8.11, P<0.01$) respectively, the expression of AMPK(thr172) increased 43.0% ($q=14.64, P<0.01$) in CTRP3 intervention group. Compared with CTRP3 intervention group, the expression of AMPK(thr172) in CTRP3+ Compound C intervention group decreased 57.3% ($q=27.92, P<0.01$), expression of adiponectin mRNA and protein decreased 26.1% ($q=11.39, P<0.01$) and 54.1% ($q=11.31, P<0.01$) respectively. **Conclusion** AMPK signal participates in the modulation of CTRP3 on the expression of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes.

【Key words】 CTRP3;3T3-L1 adipocytes; Adiponectin; AMPK

(Int J Endocrinol Metab, 2014, 34: 15-17)

C1q/ 肿瘤坏死因子相关蛋白 3(CTRP3)是新近发现的一个脂肪因子,与脂联素同属 C1q/ 肿瘤坏死因子超家族,具有降糖、抗炎、抑制肝糖异生、促进内皮细胞增殖与迁移等效应^[1-4]。近来研究发现 CTRP3 具有诱导脂联素表达的作用,但机制尚不清楚^[5]。目前认为,脂联素的表达及分泌主要受过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (PPAR γ)调控,而 CTRP3 诱导脂肪细胞脂联素表达与 PPAR γ 无关^[5]。新近研究发现,AMP 活化蛋白激酶(AMPK)信号通路参与了白

藜芦醇上调脂肪细胞脂联素表达的过程,成为独立于 PPAR γ 信号通路之外调控脂联素表达的重要机制之一^[6]。但是 CTRP3 诱导的脂联素表达是否与 AMPK 信号通路有关,目前尚未见相关报道。因此,本研究通过体外培养 3T3-L1 脂肪细胞,给予重组 CTRP3 蛋白干预,观察其对 AMPK(thr172)表达水平的影响;并且通过 Compound C 抑制 AMPK 活性,观察其对 CTRP3 诱导脂联素表达的影响,从而明确 AMPK 信号通路在 CTRP3 诱导脂肪细胞脂联素表达中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞(本课题组留存),DMEM 高糖培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Sigma 公司),牛血清白蛋白(BSA, Sigma 公司),0.25%

胰蛋白酶、青/链霉素、异丁基-甲基-黄嘌呤(IBM, Sigma 公司),地塞米松,KRP 缓冲液(131.2 mmol/L NaCl, 4.71 mmol/L KCl, 2.47 mmol/L CaCl₂, 2.48 mmol/L NaPO₄, 1.24 mmol/L MgSO₄, 10 mmol/L HEPES, pH 7.4, 油红 O(Sigma 公司),重组人胰岛素(诺和公司),重组 CTRP3 蛋白(Abcam 公司),Compound C(Calbiochem 公司),小鼠脂联素检测试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司),兔抗小鼠 AMPK(thr172)抗体及 β -actin(1-19)抗体(Santa Cruz 公司),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体(北京中山公司),ECL 试剂盒(Pierce 公司),Trizol(Promega 公司),荧光定量 PCR 试剂盒(Invitrogen 公司)。

1.2 细胞培养及诱导分化 37℃ 及 5% CO₂, 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液培养 3T3-L1 前脂肪细胞,待细胞融合 48 h 后,加入含有 0.5 mmol/L IBMX、0.25 μ mol/mL 地塞米松及 1 μ mol/L 重组人胰岛素的培养液,48 h 后换为含 1 μ mol/L 重组人胰岛素的培养液继续培养 48 h,再换为含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液继续培养,每 48 h 换液 1 次,诱导分化 8~12 d,约 90% 的细胞呈脂肪细胞表型,可用于后续实验。

1.3 分组 将上述细胞分为:(1)对照组:以 DMEM 高糖培养液培养 12 h。(2)CTRP3 干预组:以含 250 μ g/L 重组 CTRP3 蛋白的 DMEM 高糖培养液培养 12 h。(3)CTRP3+Compound C 干预组:先以 10 μ mol/L 的 Compound C 预处理 1 h,再以含 250 μ g/L 重组 CTRP3 蛋白的 DMEM 高糖培养液培养 12 h。

1.4 检测

1.4.1 脂联素蛋白分泌量 取上述细胞培养液,以酶联免疫吸附(ELISA)法检测上清中脂联素的含量,按照说明书进行操作。

1.4.2 脂联素基因表达水平 以实时定量 PCR 法检测。Trizol 法提取总 RNA,实时定量 PCR 扩增目的基因。PCR 引物由上海赛百盛公司合成,序列如下:(1)脂联素:上游引物 5'-TTG GTC CTA AGG GAG ACA TC-3';下游引物 5'-CAG TGG AGC CAT CAT AGT GG-3',目的片段长度 315 bp。(2) β -actin:上游引物 5'-ACA CCC GCC ACC AGT TCG C-3';下游引物 5'-TCT CCC CCT CAT CAC CCA CAT-3'。反应参数:预变性 95℃,15 s;三步法 PCR:变性 95℃,15 s;退火 58℃,10 s,扩增 45 个循环;延伸 72℃,45 s。反应结束后做溶解曲线,验证产物特异性。基因分析采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 相对定量法,所有样本以 β -actin 作为内参照校正,将对照组基因相对表达量设为 1,干预组结果表示为与对照组相比的相对值。

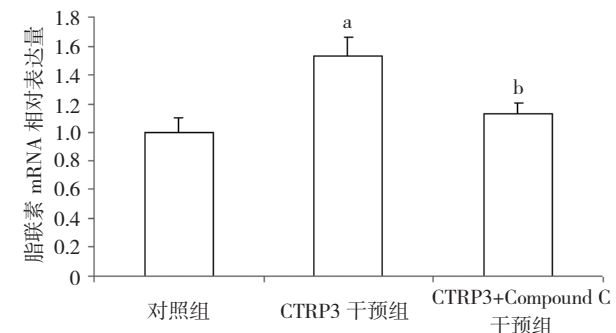
1.4.3 AMPK(thr172)蛋白表达水平检测 采用 Western 印迹法检测 AMPK(thr172)蛋白表达。提取细胞总蛋白,取 15 μ l 样品经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电

泳分离,转移到 PVDF 膜上,将转印后的 PVDF 膜用兔抗小鼠 AMPK(thr172)磷酸化抗体和抗 β -actin 抗体孵育,4℃ 摇床上过夜;然后以 0.2% 吐温 /PBS 洗涤膜 3 次,每次 10 min;再以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体(二抗)孵育膜,37℃ 摇床震荡 1 h,用 0.2% 吐温 /PBS 洗涤膜 3 次,每次 10 min;然后将膜浸于 ECL 中,将膜蛋白面朝下与此混合液充分接触,1 min 后,将膜移至另一保鲜膜上,去尽残液,包好放入 X 光片夹中,在暗室中曝光、显影和定影。对胶片进行扫描,用凝胶图像处理系统分析目标带的灰度值,以目的条带与 β -actin 条带的灰度值之比表示目的蛋白的相对表达量。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 软件包进行分析,组间比较采用单因素方差(ANOVA)分析,两组间进一步比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

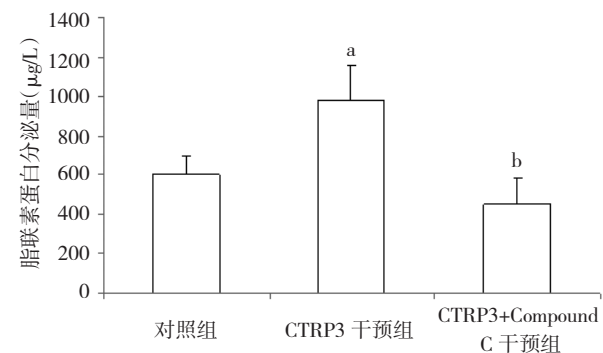
2 结果

2.1 CTRP3 增加 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达及蛋白分泌 与对照组相比,250 μ g/L CTRP3 干预 12 h 后 3T3-L1 脂肪细胞脂联素 mRNA 表达增加 53.0% ($q=15.09, P<0.01$),脂联素蛋白分泌量增加了 63.3% ($q=8.11, P<0.01$)(图 1,2)。



注:与对照组相比,^a $P<0.01$;与 CTRP3 干预组相比,^b $P<0.01$; CTRP3:C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 3

图 1 3T3-L1 脂肪细胞脂联素 mRNA 的表达

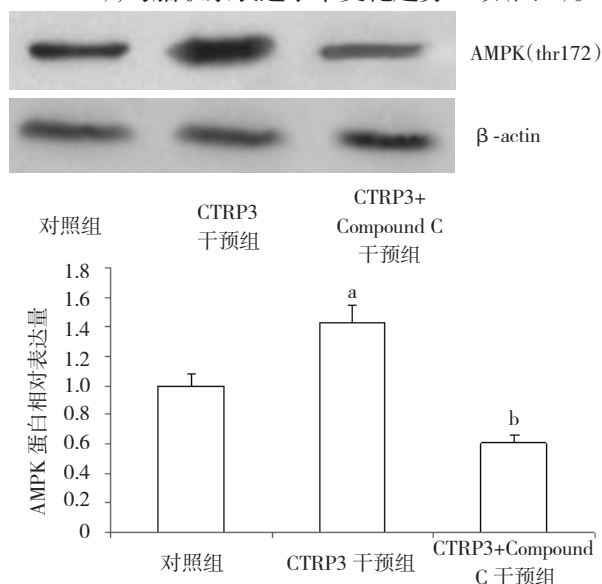


注:与对照组相比,^a $P<0.01$;与 CTRP3 干预组相比,^b $P<0.01$; CTRP3:C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 3

图 2 3T3-L1 脂肪细胞脂联素蛋白的分泌变化

2.2 CTRP3 增加 3T3-L1 脂肪细胞 AMPK(thr172)蛋白的表达 与对照组相比,CTRP3 干预组 3T3-L1

脂肪细胞 AMPK(thr172)表达增加 43.0%($q=14.64$, $P<0.01$),与脂联素表达水平变化趋势一致(图 3)。



注:与对照组相比,^a $P<0.01$;与 CTRP3 干预组相比,^b $P<0.01$; CTRP3:C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 3;AMPK:AMP 活化蛋白激酶

图 3 3T3-L1 脂肪细胞 AMPK(thr172)蛋白的表达

2.3 Compound C 抑制 CTRP3 诱导的 3T3-L1 脂肪细胞脂联素 mRNA 及蛋白的表达以及 AMPK 的表达 应用 AMPK 特异抑制剂 Compound C 预处理 3T3-L1 脂肪细胞后发现,与 CTRP3 干预组相比,CTRP3+Compound C 干预组 AMPK(thr172)表达降低 57.3%($q=27.91$, $P<0.01$),脂联素 mRNA 表达及蛋白分泌分别下降 26.1%($q=11.39$, $P<0.01$)及 54.1%($q=11.31$, $P<0.01$)(图 1-3)。

3 讨论

CTRP3 具有调节其他脂肪因子表达的作用,如增加脂联素的表达^[5]。而脂联素具有增加胰岛素敏感性、抗炎、抗动脉粥样硬化等作用,提示 CTRP3 可能通过调节其他脂肪因子表达进而发挥降糖、抗炎等效应。本研究发现 250 $\mu\text{g/L}$ 的 CTRP3 干预 12 h 可使 3T3-L1 脂肪细胞脂联素基因表达及蛋白分泌量增加,与其他文献报道类似^[5]。但是,CTRP3 增加脂肪细胞脂联素表达的机制并不清楚。

脂联素表达调控的确切机制尚不明确,目前认为 PPAR γ 是调节脂联素表达及分泌的主要因子^[7]。但是相关研究表明 CTRP3 干预并不增加 3T3-L1 脂肪细胞 PPAR γ 蛋白表达水平,说明 CTRP3 并非通过 PPAR γ 途径增加脂肪细胞脂联素表达^[5]。近来有研究发现,AMPK 激动剂可以显著增加 3T3-L1 脂肪细胞脂联素及二硫键 A 氧化还原酶样蛋白(DsbA-L)的表达,而后者是新近发现的脂联素相互作用蛋白,具有增加脂联素稳定性及促进脂联素多聚化的作用^[8]。使用 AMPK 抑制剂可显著抑制白藜芦醇对 3T3-L1 脂肪细胞脂联素及 DsbA-L 表达的上

调^[6]。提示 AMPK 信号通路在调节脂联素表达及多聚化中具有重要作用,但是该通路是否参与了 CTRP3 对脂肪细胞脂联素表达的上调效应,目前尚无相关研究报道。

本研究结果发现,CTRP3 干预使 3T3-L1 脂肪细胞 AMPK(thr172)蛋白表达增加,而抑制 AMPK 的表达后,3T3-L1 脂肪细胞脂联素基因及蛋白表达均降低,提示 AMPK 信号通路参与了 CTRP3 对 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达的调控过程。此外,本研究发现抑制 AMPK 对脂联素基因表达的影响程度相对较小。推测 AMPK 信号通路可能仅是 CTRP3 增加脂肪细胞脂联素表达的机制之一,还存在其他非 PPAR γ 、非 AMPK 的信号通路介导了脂联素基因表达的上调;而 AMPK 信号通路除了介导脂联素基因表达上调以外,还可能通过上调 DsbA-L 以增加脂联素的稳定性及多聚化,从而从多个层面增加脂联素的表达。

总之,本研究发现新的脂肪因子 CTRP3 通过 AMPK 信号通路增加 3T3-L1 脂肪细胞脂联素的表达,这可能是 CTRP3 发挥抗炎、降糖等作用的间接机制之一。但是 CTRP3 活化 AMPK 的信号机制,AMPK 如何增加脂肪细胞脂联素的表达,以及是否还存在其他信号通路介导 CTRP3 对脂肪细胞脂联素表达的调控等,还需要进一步研究明确。

参考文献

- [1] Peterson JM, Wei Z, Wong GW. C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3), a novel adipokine that regulates hepatic glucose output[J]. J Biol Chem, 2010, 285(51): 39691-39701.
- [2] Kopp A, Bala M, Buechler C, et al. C1q/TNF-related protein-3 represents a novel and endogenous lipopolysaccharide antagonist of the adipose tissue[J]. Endocrinology, 2010, 151(11): 5267-5278.
- [3] Kopp A, Bala M, Weigert J, et al. Effects of the new adiponectin paralogous protein CTRP-3 and of LPS on cytokine release from monocytes of patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Cytokine, 2010, 49(1): 51-57.
- [4] Yoo HJ, Hwang SY, Hong HC, et al. Implication of progranulin and C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3) on inflammation and atherosclerosis in subjects with or without metabolic syndrome[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55744.
- [5] Wölfling B, Buechler C, Weigert J, et al. Effects of the new C1q/TNF-related protein (CTRP-3) "cartonectin" on the adipocytic secretion of adipokines[J]. Obesity (Silver Spring), 2008, 16(7): 1481-1486.
- [6] Wang A, Liu M, Liu X, et al. Up-regulation of adiponectin by resveratrol: the essential roles of the Akt/FOXO1 and AMP-activated protein kinase signaling pathways and DsbA-L[J]. J Biol Chem, 2011, 286(1): 60-66.
- [7] Liu M, Liu F. Up- and down-regulation of adiponectin expression and multimerization: mechanisms and therapeutic implication[J]. Biochimie, 2012, 94(10): 2126-2130.
- [8] Liu M, Xiang R, Wilk SA, et al. Fat-specific DsbA-L overexpression promotes adiponectin multimerization and protects mice from diet-induced obesity and insulin resistance[J]. Diabetes, 2012, 61(11): 2776-2786.

(收稿日期:2013-08-05)