

# 上调 *CTRP4* 基因表达通过抑制炎症因子调控食欲调节相关蛋白的表达

李悦劫, 黄礼义, 虞乐华, 吴丹冬\*

(重庆医科大学附属第二医院康复科, 重庆 400010)

**摘要** 上调中枢补体 C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 4 (complement-C1q/tumor necrosis factor-related protein 4, *CTRP4*) 可以改变下丘脑食欲调节相关蛋白的表达, 抑制小鼠摄食且降低其体重。然而, *CTRP4* 如何调控食欲调节相关蛋白的表达尚不清楚。本研究通过上调小鼠神经母细胞瘤细胞(N2a)中的 *CTRP4*, 探讨 *CTRP4* 调控食欲调节相关蛋白的潜在作用机制。通过对 N2a 细胞未做干预、转染绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 重组腺病毒和 *CTRP4* 过表达重组腺病毒, 将其分为空白对照组 (Control 组)、阴性对照组 (Ad-GFP 组) 及 *CTRP4* 过表达组 (Ad-*CTRP4* 组)。干预 72 h 时, 用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测细胞 *CTRP4* mRNA 表达, 采用 Western 印迹检测细胞 *CTRP4*、*Pomc*、*Npy*、p-STAT3/t-STAT3、TNF- $\alpha$ 、IL-6、SOCS3 在蛋白质水平的表达。结果显示, 与对照组相比, Ad-*CTRP4* 组的 *CTRP4* mRNA 水平 ( $26\ 258.44 \pm 10\ 403.47$  vs.  $1.81 \pm 0.79$  vs.  $1.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.01$ ) 及蛋白质水平显著增加 ( $10.44 \pm 7.99$  vs.  $0.64 \pm 0.62$  vs.  $1.00 \pm 0.75$ ,  $P < 0.01$ )。Ad-*CTRP4* 组的 p-STAT3/t-STAT3 ( $3.38 \pm 1.70$  vs.  $0.86 \pm 0.57$  vs.  $1.00 \pm 0.63$ ,  $P < 0.01$ ) 和 *Pomc* ( $1.81 \pm 0.19$  vs.  $1.15 \pm 0.18$  vs.  $1.00 \pm 0.22$ ,  $P < 0.01$ ) 表达均显著增高; SOCS3 ( $0.69 \pm 0.15$  vs.  $1.00 \pm 0.12$  vs.  $1.00 \pm 0.07$ ,  $P < 0.01$ ), IL-6 ( $0.40 \pm 0.19$  vs.  $1.03 \pm 0.17$  vs.  $1.00 \pm 0.16$ ,  $P < 0.01$ ), TNF- $\alpha$  ( $0.39 \pm 0.27$  vs.  $1.05 \pm 0.46$  vs.  $1.00 \pm 0.29$ ,  $P < 0.05$ ) 及 *Npy* ( $0.55 \pm 0.14$  vs.  $1.21 \pm 0.38$  vs.  $1.00 \pm 0.24$ ,  $P < 0.05$ ) 表达均显著下降。上述结果提示, 在 N2a 细胞中, 上调 *CTRP4* 可能通过抑制炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6, 降低负性调节因子 SOCS3 的表达, 增加 STAT3 磷酸化表达水平, 从而调控食欲调节相关蛋白的表达。

**关键词** 补体 C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 4 (*CTRP4*); 信号转导和转录激活子 3 (STAT3); 炎症因子; 重组腺病毒; 食欲调节相关蛋白

中图分类号 R589.9

## Upregulation of *CTRP4* Regulates Appetite-regulating Proteins Expression by Inhibiting Inflammatory Factors

LI Yue-Jie, HUANG Li-Yi, YU Le-Hua, WU Dan-Dong\*

(Department of Rehabilitation, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**Abstract** Upregulation of complement-C1q/tumor necrosis factor-related protein 4 (*CTRP4*) gene expression could change the expression of the appetite-regulating proteins in the hypothalamus, which lead

收稿日期: 2018-10-22; 修回日期: 2018-11-24; 接受日期: 2018-12-05

国家青年科学基金 (No. 81600615) 资助

\* 通讯作者 Tel: 13696416773; E-mail: 418783476@qq.com

Received: October 22, 2018; Revised: November 24, 2018; Accepted: December 5, 2018

Supported by National Science Foundation for Young Scientists of China (No. 81600615)

\* Corresponding author Tel: 13696416773; E-mail: 418783476@qq.com

to inhibit feeding and reduce body weight of mice. However, it is not clear how *CTRP4* regulates the expression of the appetite-regulating proteins. To investigate the molecular mechanisms through which *CTRP4* regulates appetite-regulating protein expression in mouse neuroblastoma cells (N2a). The N2a cells were divided into blank group (control group), negative group (Ad-GFP group), and *CTRP4* overexpression group (Ad-*CTRP4* group). After infection with green fluorescent protein (GFP) recombinant adenovirus or *CTRP4* overexpressed recombinant adenovirus for 72 hours, RT-PCR was performed to determine the mRNA levels of *CTRP4*. Western blot was performed to determine the protein levels of *CTRP4*, TNF- $\alpha$ , SOCS3, p-STAT3/t-STAT3, *Pomc* and *Npy*. The results showed that compared with the control group, the levels of *CTRP4* mRNA ( $26258.44 \pm 10403.47$  vs.  $1.81 \pm 0.79$  vs.  $1.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.01$ ) and protein ( $10.44 \pm 7.99$  vs.  $0.64 \pm 0.62$  vs.  $1.00 \pm 0.75$ ,  $P < 0.01$ ) were significantly increased in N2A cells of *CTRP4* overexpression group. The levels of p-STAT3/t-STAT3 ( $3.38 \pm 1.7$  vs.  $0.86 \pm 0.57$  vs.  $1.00 \pm 0.63$ ,  $P < 0.01$ ) and *Pomc* ( $1.81 \pm 0.19$  vs.  $1.15 \pm 0.18$  vs.  $1.00 \pm 0.22$ ,  $P < 0.01$ ) were markedly increased in Ad-*CTRP4* group. The expression levels of SOCS3 ( $0.69 \pm 0.15$  vs.  $1.00 \pm 0.12$  vs.  $1.00 \pm 0.07$ ,  $P < 0.01$ ), IL-6 ( $0.40 \pm 0.19$  vs.  $1.03 \pm 0.17$  vs.  $1.00 \pm 0.16$ ,  $P < 0.01$ ), TNF- $\alpha$  ( $0.39 \pm 0.27$  vs.  $1.05 \pm 0.46$  vs.  $1.00 \pm 0.29$ ,  $P < 0.05$ ) and *Npy* ( $0.55 \pm 0.14$  vs.  $1.21 \pm 0.38$  vs.  $1.00 \pm 0.24$ ,  $P < 0.05$ ) were obviously decreased. The findings suggest that increased *CTRP4* level in N2a cells could inhibit inflammatory factors such as TNF- $\alpha$  and IL-6, reduce the expression of negative regulator SOCS3, and increase p-STAT3/t-STAT3 level, to regulate appetite-regulating proteins.

**Key words** complement-C1q/tumor necrosis factor-related protein 4 (*CTRP4*); signal transducer and activator of transcription (STAT3); inflammatory cytokines; recombinant adenovirus; appetite-regulating proteins

肥胖症是严重威胁人类健康的主要问题之一,其产生与摄食密切相关<sup>[1]</sup>。下丘脑弓状核(arcuate nucleus, ARC)是关键的摄食调控核团,其含有两类瘦素敏感的神经元亚群,促进摄食的神经肽 Y (neuropeptide Y, *Npy*) 神经元和抑制摄食的人阿黑皮素原(proopiomelanocortin, *Pomc*) 神经元<sup>[2]</sup>。研究发现,瘦素(leptin)作为一种调节机体摄食的脂肪因子,其发挥作用主要通过 *LepRb*/JAK2/STAT3 经典信号通路,上调 *Pomc* 表达和下调神经肽 Y 表达来抑制摄食<sup>[3]</sup>。细胞因子信号抑制物(suppressor of cytokine signaling, SOCS3)是瘦素信号通路的经典“负向调节因子”。下调中枢 SOCS3 可抵抗摄食引起的肥胖<sup>[4-5]</sup>。中枢神经系统炎性相关介质(IL-6、TNF- $\alpha$ )过度激活是肥胖的另一个重要因素<sup>[6]</sup>。抑制中枢炎症可作为治疗肥胖的一种途径。

补体 C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白(complement-C1q/tumor necrosis factor-related protein, *CTRP*)是由 Harvey Lodish 等发现的蛋白质超家族,目前已发现其拥有 15 个家族成员(*CTRP1-15*)<sup>[7-8]</sup>。*CTRP4* 是 *CTRP* 家族中结构特殊的一员。近年发现,*CTRP4* 在炎症和肿瘤的发生发展、代谢和心血管疾病等方面具有重要的调节作用<sup>[9-11]</sup>。同时,Byerly 等发现,侧脑室输注重组 *CTRP4* 蛋白可降低下丘脑神经肽 Y 的表达,抑制小鼠摄食并降低其体重<sup>[12]</sup>。但对于

*CTRP4* 通过哪种途径调控摄食蛋白的表达尚不清楚。有研究发现,*CTRP4* 在人肿瘤细胞中能够激活 STAT3<sup>[13]</sup>。同时,*CTRP4* 能够抑制炎症因子(TNF- $\alpha$ , IL-6)表达<sup>[14-15]</sup>。但是,SOCS3、STAT3 和炎症因子 TNF- $\alpha$ /IL-6 是否参与 *CTRP4* 对摄食蛋白的调控过程尚不清楚。小鼠神经嵴源性细胞 N2a 可用于中枢代谢相关研究<sup>[16-17]</sup>。本研究通过上调 N2a 细胞中的 *CTRP4* 基因表达,研究其对 STAT3 信号通路、炎症因子以及摄食相关蛋白的影响,探讨 *CTRP4* 调控机体摄食的潜在机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和主要试剂

N2a 细胞购于武汉普诺赛生命科技有限责任公司。MEM 培养基(Gibco, 美国);胎牛血清(MRC, 新西兰);polymix 转染试剂(德诺和生物);SOCS3 兔多克隆抗体(#2932, Cell Signaling, 美国);STAT3 小鼠单克隆抗体(#6774, Cell Signaling, 美国);Phospho-STAT3(Tyr705)兔单克隆抗体(#9145, Cell Signaling, 美国);TNF- $\alpha$  兔单克隆抗体(#11948, Cell Signaling, 美国);IL-6 兔单克隆抗体(#12912, Cell Signaling, 美国);*Pomc* 兔单克隆抗体(ab210605, Abcam, 美国);*Npy* 兔单克隆抗体(#11976, Cell Signaling, 美国);山羊抗兔 IgG 二抗、山

羊抗小鼠 IgG 和 IgM 二抗均购于美国 Proteintech 公司;RNA 提取试剂盒,逆转录试剂盒,SYBR Premix Ex Taq II 染料均购于日本 TaKaRa 公司;RT-PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒,BCA 蛋白浓度测试盒等 Western 印迹相关试剂均购于上海碧云天生物工程有限公司。

1.2 Ad-CTRP4 过表达重组腺病毒的构建、包装及扩增

PCR 扩增 *CTRP4* 基因 cDNA 片段,将其与重组穿梭质粒 pShuttle 经酶切,回收和纯化,构建 pShuttle-CTRP4。T4 DNA 连接酶进行连接后转化为感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,氨苄青霉素筛选。*Pme* I 酶切线性化 pShuttle-CTRP4,胶回收后,电穿孔转入 BJ5183-Adeasy-1 电转感受态细胞,LB 卡那霉素抗性筛选阳性菌落,小量提取质粒。酶切鉴定阳性克隆,转化入 XL10-Gold 超感受态细胞扩增,再次小量提取质粒。酶切和测序鉴定后大量提取质粒,获得重组子 pAd-CTRP4。*Pac* I 消化重组腺病毒质粒,按 Lipfectamine 2000 推荐的优化条件转染 293 细胞。5~7 d 出现细胞病变反应(CPE)时收集病毒,获得过表达腺病毒 pAd-CTRP4。

在 10 cm<sup>2</sup> 平皿中接种密度约 70%~80% 的 293 系细胞。4~6 h 待细胞贴壁添加腺病毒液 1~30  $\mu$ L。72 h 时将 293 细胞从培养皿内吹落。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,留约 500  $\mu$ L 培养基吹散细胞沉淀,转移细胞悬液至 1.5 mL EP 管。将装有细胞悬液的 EP 管,置于-80  $^{\circ}$ C 冰箱至完全冻结,再将其置于 37  $^{\circ}$ C 水浴箱内完全融化。再迅速放至-80  $^{\circ}$ C 冰箱再次冻结。如此反复 3 次。4  $^{\circ}$ C,7 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,加入等体积的腺病毒冻存液,置于-80  $^{\circ}$ C 冰箱长期保存。

1.3 细胞培养

将 N2a 细胞置于含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基中,于 37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,当细胞生长至 70% 左右时,按 1:3~1:6 进行传代。

1.4 细胞感染

1.4.1 重组腺病毒滴度测试 将 N2a 细胞均匀铺于 24 孔板内,接种密度约 50%~80%。每孔培养基 1 mL,于 37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 4~6 h,待细胞呈刚贴壁状态时,朝孔内添加梯度体积重组腺病毒

(依次为 1、2、4、8、16、32  $\mu$ L),同时每 1 mL 培养基中添加 1  $\mu$ L polymix。转染 48 h 后荧光显微镜下观察荧光,记录最适病毒感染量(Table 1)。根据细胞总量和培养皿底面积倍数增加病毒使用量。

1.4.2 细胞感染 将 N2a 细胞按 50%~80% 密度铺于 6 cm 培养皿中,于 37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 4~6 h,分别按病毒最适感染量,向以下 3 组中添加相应腺病毒:Control 组 0  $\mu$ L;Ad-GFP 组:28  $\mu$ L;Ad-CTRP4 组:56  $\mu$ L。同时每个培养皿分别加入 5  $\mu$ L polymix。

Table 1 The optimal amount of adenovirus infection

Adenovirus	Optimal amount of infection
Ad-CTRP4	4 $\mu$ L
Ad-GFP	2 $\mu$ L

1.5 Western 印迹检测

提取各处理组细胞总蛋白质,使用 BCA 试剂盒检测各组蛋白质浓度。蛋白质 30~50  $\mu$ g 经 SDS-PAGE 分离,电转移至 PVDF 膜。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭 2 h;分别在 STAT3、p-STAT3、SOCS3、TNF- $\alpha$ 、IL-6、Pomc 和 Npy 的一抗溶液(抗体用一抗专用稀释液 1:1 000~1:2 000 稀释)中,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 缓冲液漂洗膜 3 次,每次 10 min;在相应的羊抗兔、羊抗小鼠二抗溶液(抗体用含 TBST 缓冲液 1:6 000 稀释)中,室温孵育 1 h, TBST 缓冲液漂洗膜 3 次,每次 5 min;ECL 检测试剂盒显带与曝光。实验重复 3 次。Image Lab 软件进行结果分析,用  $\beta$ -肌动蛋白或 GAPDH 进行蛋白质校正。

1.6 实时荧光定量 PCR

按照 RNA 提取试剂盒使用说明书,从 N2a 细胞中提取总 RNA,采用反转录试剂盒合成 cDNA,以特异性引物(引物序列见 Table 2)进行实时荧光定量 PCR 反应。RT-PCR 利用 SYBR Premix Ex Taq II 染料在 CFX96 荧光 PCR 仪上检测基因的表达。反应体系为:上游引物 0.4  $\mu$ L;下游引物 0.4  $\mu$ L;cDNA 0.8  $\mu$ L;灭菌水 3.4  $\mu$ L;SYBR Premix Ex Taq II 5  $\mu$ L;总反应体系 10  $\mu$ L。反应条件:95.0  $^{\circ}$ C 预变性 90 s,95.0  $^{\circ}$ C 变性 15 s,61.0  $^{\circ}$ C 退火 20 s,68.0  $^{\circ}$ C 延伸 45 s。40 个循环。反应完成后,获得所有标本的扩增曲线、溶解曲线和 Ct 值(threshold cycle)。每 1 份标本均设立 3 个复孔检测,取其平均值计算其相对表达水平。实验重复 3 次。

**Table 2    The primers used for real-time PCR**

Primer name	Primer 1	Primer 2
<i>CTRP4</i>	5'-TTAGCCACGATCACGATGGCT-3'	5'-TGTACTTGCCGTGGTTGCTGT-3'
β-Actin	5'-GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG-3'	5'-ATGCCACAGGATTCCATACC-3'

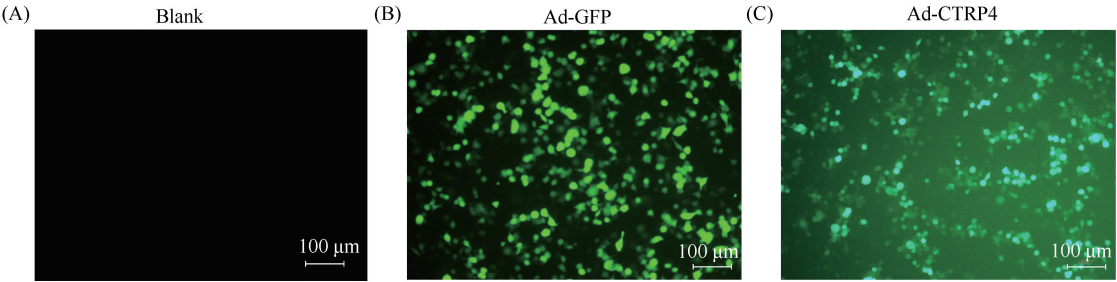
1.7    统计学分析

使用 SPSS 25.0 进行统计分析。所得数据用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,各组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 Tukey 检验。 $P<0.05$  被认为组间差异有统计学意义。

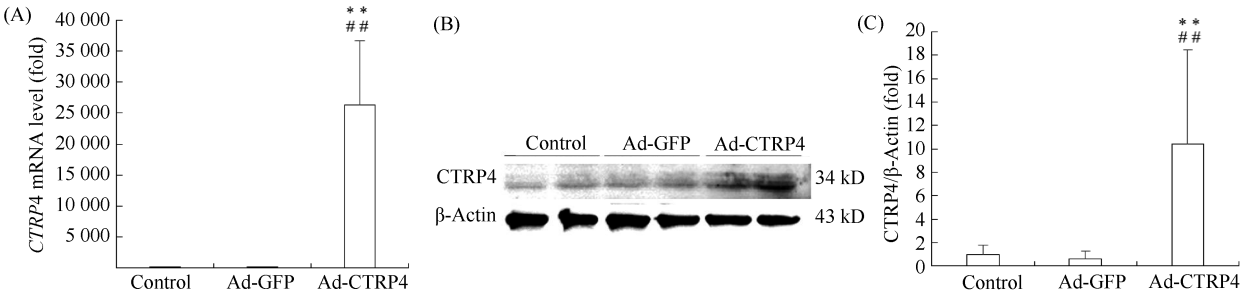
2    结果

2.1    *CTRP4* 过表达腺病毒转染 N2a 细胞上调 *CTRP4* 的表达水平

腺病毒转染 N2a 细胞 48 h 时,荧光显微镜下观察到 Ad-CTRP4 组和 Ad-GFP 组有适宜荧光表达量,而 Control 组无荧光表达 (Fig.1)。RT-PCR 及 Western 印迹检测显示,Ad-CTRP4 组的 *CTRP4* 基因在 mRNA 和蛋白质水平的表达均显著高于 Control 组和 Ad-GFP 组 (Fig.2,  $P<0.01$ ),而 Control 组和 Ad-GFP 组的 *CTRP4* 的 mRNA 和蛋白质水平均无明显差异 (Fig.2,  $P>0.05$ )。以上结果表明,Ad-CTRP4 重组腺病毒成功上调 N2a 细胞内 *CTRP4* 基因表达。



**Fig.1    Representative fluorescent images of N2a cells infected with recombinant adenovirus**    N2a cells were infected with control reagent (blank), Ad-GFP or Ad-CTRP4, respectively. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . (A) Fluoroscopic images of N2a cells infected with control reagent (blank). (B) Fluoroscopic images of N2a cells infected with Ad-GFP. (C) Fluoroscopic images of N2a cells infected with Ad-CTRP4

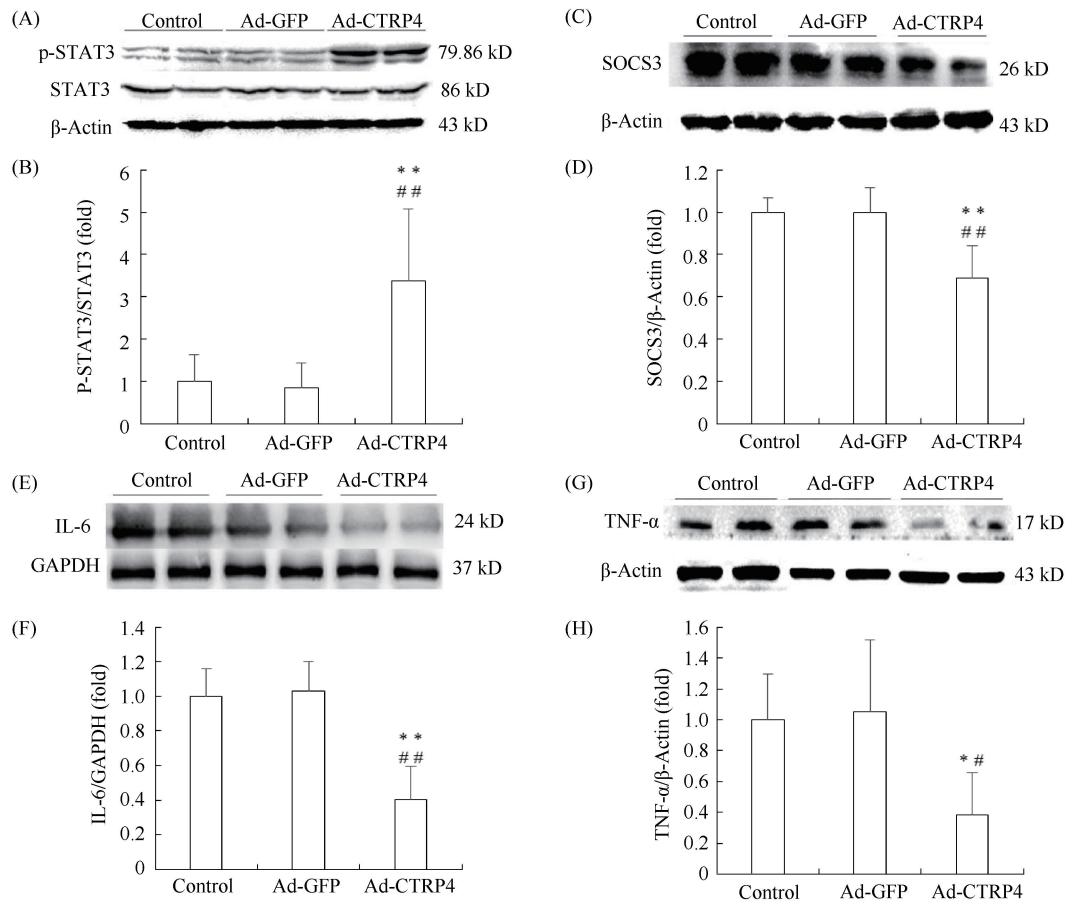


**Fig.2    The expression of *CTRP4* was up-regulated by adenovirus mediated overexpression of *CTRP4* in N2a cell**    Total RNA and protein were extracted from control group, Ad-GFP group and Ad-CTRP4 group, respectively. (A) Relative mRNA level of *CTRP4* was detected by real time qPCR. Data were calculated by  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  and expressed as  $\bar{x}\pm s$  of three independent experiments. (B) The expression of *CTRP4* at the protein level was detected by Western blot.  $\beta$ -Actin was used as a loading control. The image shown is representative of three independent experiments. (C) Relative protein level of *CTRP4*. The data are expressed as  $\bar{x}\pm s$  based on grayscale analysis of three independent experiments. \*\*  $P<0.01$  compared with control group. ##  $P<0.01$  compared with Ad-GFP group

2.2    *CTRP4* 基因上调可改变 P-STAT3/STAT3、SOCS3、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达

Western 印迹结果显示,Ad-CTRP4 组的 STAT3

蛋白质磷酸化水平显著高于 Control 组和 Ad-GFP 组 (Fig.3A, 3B,  $P<0.01$ )。而 Control 组和 Ad-GFP 组的 STAT3 蛋白质磷酸化水平无显著差异,且 3 组



**Fig.3 The up-regulation of *CTRP4* gene altered the expression of P-STAT3/STAT3, SOCS3, IL-6, and TNF-α in N2a cells** Proteins were extracted from control group, Ad-GFP group and Ad-CTRP4 group, respectively. Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and detected with corresponding antibodies. β-Actin or GAPDH were used as loading control. The images shown are representative of three independent experiments. Data are  $\bar{x} \pm s$  based on grayscale analysis of three independent experiments. (A) The expression of p-STAT3 at the protein level was detected by Western blot. (B) Relative protein level of p-STAT3. (C) The expression of SOCS3 at the protein level was detected by Western blot. (D) Relative protein level of SOCS3. (E) The expression of IL-6 at the protein level was detected by Western blot. (F) Relative protein level of IL-6. (G) The expression of TNF-α at the protein level was detected by Western blot. (H) Relative protein level of TNF-α. \*\* $P < 0.01$  compared with Control group. ## $P < 0.01$  compared with Ad-GFP group. \* $P < 0.05$  compared with Control group. # $P < 0.05$  compared with Ad-GFP group

间 t-STAT3 表达量无明显差异 (Fig. 3A, 3B,  $P > 0.05$ )。Ad-CTRP4 组的 SOCS3、IL-6 及 TNF-α 蛋白质水平较 Control 组和 Ad-GFP 组均显著下降 (Fig. 3C ~ H,  $P < 0.05$ ), 而 Control 组和 Ad-GFP 组的 SOCS3、IL-6 及 TNF-α 蛋白质水平无显著差异 (Fig. 3C ~ H,  $P > 0.05$ )。

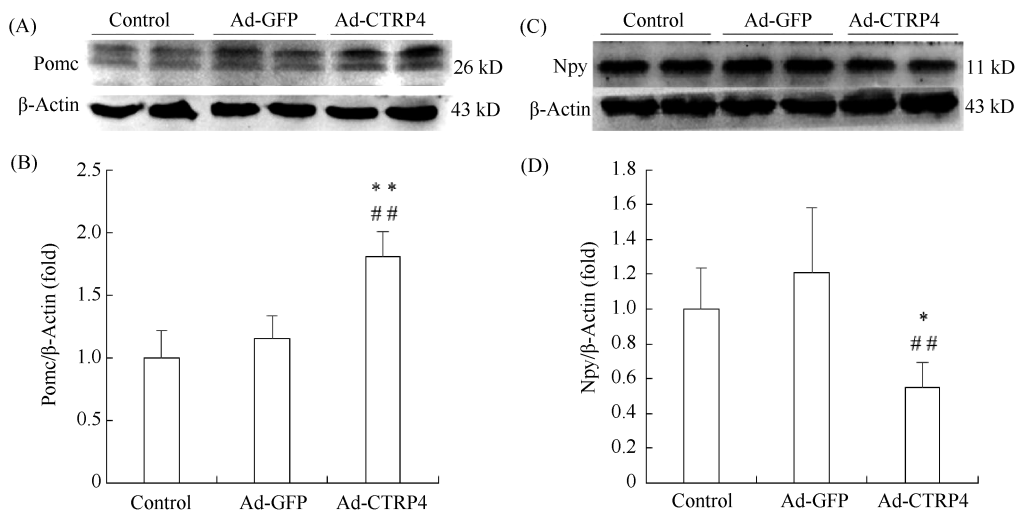
**2.3 CTRP4 基因上调可改变 Pomc 和神经肽 Y 的表达**

进一步测定 N2a 细胞内 *CTRP4* 基因表达上调对摄食调控蛋白表达的影响。Western 印迹结果显示, Ad-CTRP4 组的 Pomc 蛋白质水平较 Control 组和 Ad-GFP 组显著增高 (Fig. 4A, 4B,  $P < 0.01$ ), 而神经肽 Y 蛋白水平则显著低于 Control 组和 Ad-GFP

组 (Fig. 4C, 4D,  $P < 0.05$ ), Control 组和 Ad-GFP 组的 Pomc 和神经肽 Y 蛋白表达量均无明显差别 (Fig. 4,  $P > 0.05$ )。

**3 讨论**

CTRPs 是一组与脂联素结构相似的分泌性蛋白质。以往研究报道, CTRPs 在炎症、代谢和肿瘤形成过程中发挥着重要调节作用<sup>[7-8]</sup>。CTRP4 作为 CTRPs 家族中结构特殊的一员, 其功能引起了研究者们越来越多的关注。有研究者发现, 侧脑室输注 CTRP4 重组蛋白能够抑制小鼠的摄食且降低体重, 并且与下丘脑中的 *NPY* 和 *AgRP* 基因表达减少相关<sup>[12]</sup>。然而, CTRP4 如何调控食欲调节相关蛋白的



**Fig.4 Up-regulation of *CTRP4* gene altered the expression of *Pomc* and *Npy* in N2a cells** Proteins were extracted from control group, Ad-GFP group and Ad-CTRP4 group, respectively. Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and detected with corresponding antibodies. β-Actin was used as a loading control. Images shown are representative of three independent experiments. Data are  $\bar{x} \pm s$  based on grayscale analysis of three independent experiments. (A) The expression of *Pomc* at the protein level was detected by Western blot. (B) Relative protein level of *Pomc*. (C) The expression of *Npy* at the protein level was detected by Western blot. (D) Relative protein level of *Npy*. \*\* $P < 0.01$  compared with control group. ## $P < 0.01$  compared with Ad-GFP group. \* $P < 0.05$  compared with control group

表达,其相应的分子机制鲜有报道。

本课题组前期研究发现,N2a 细胞中 *CTRP4* 基因表达水平低,转染携带靶向 *CTRP4* 短发卡状干扰 RNA 的重组腺病毒之后,并未明显抑制 *CTRP4* 基因表达。由此,本研究将通过上调 N2a 细胞中的 *CTRP4* 基因来探讨其调控食欲调节相关蛋白质的分子机制。

本研究发现,Ad-CTRP4 组的抑食欲蛋白 *Pomc* 的表达量显著增高,而促食欲蛋白神经肽 Y 的表达量明显降低,验证 *CTRP4* 可在体外调控中枢食欲调节蛋白的表达。既往研究表明,瘦素作为机体调节摄食的关键激素,通过与下丘脑弓状核和室旁核的瘦素受体 (LRb) 相结合,激活 Jak2 酪氨酸激酶 (JAK2)-STAT3 通路,继而增加 *Pomc* 表达,降低小鼠基因相关蛋白 (agouti gene-related protein, AgRP) 与神经肽 Y 的表达,从而发挥抑制摄食的作用<sup>[18]</sup>。已有研究证实,在人肿瘤细胞中,*CTRP4* 蛋白可激活 STAT3 通路<sup>[13]</sup>。本研究发现,Ad-CTRP4 组的 p-STAT3/t-STAT3 蛋白质磷酸化水平显著高于对照组。推测 *CTRP4* 调控摄食蛋白可能是通过激活 STAT3 信号通路发挥作用。SOCS3 是瘦素信号转导通路中的负性调节因子,其通过与 LepRb 上的特定酪氨酸残留物结合或去磷酸化 JAK2,抑制瘦素 JAK2-STAT3 的信号转导<sup>[19]</sup>。本研究发现,过表达

*CTRP4* 可显著减少 SOCS3 的表达。由此可推断,在 *CTRP4* 作用下,降低了 SOCS3 对 JAK-STAT3 的抑制效果,从而促进了瘦素信号转导。

以往研究发现,高脂饮食的肥胖动物下丘脑炎症因子 TNF-α、IL-6 等表达增加,可引起 SOCS3 表达上调,从而造成瘦素抵抗,进一步加重机体摄食紊乱及体重增加。而抑制中枢炎症因子激活,可缓解瘦素抵抗,使机体摄食减少<sup>[20-23]</sup>。有研究发现,由肥胖引起的神经炎症并不局限于下丘脑,而是影响整个中枢神经系统,包括神经元和星形胶质细胞<sup>[6]</sup>。近年有研究提出,*CTRP4* 是一个新的炎症抑制因子,重组人 *CTRP4* 蛋白可抑制巨噬细胞受 LPS 刺激产生的炎症因子 IL-6 和 TNF-α<sup>[15]</sup>。另有研究发现,在 *CTRP4* 转基因小鼠结肠中,IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的分泌减少,可以明显减轻葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导的结肠炎症状<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,*CTRP4* 高表达降低了 N2a 细胞中 TNF-α 和 IL-6 炎症因子的表达,推断 *CTRP4* 可能通过抑制 N2a 细胞中炎症因子表达,减少 SOCS3 表达,从而增加 JAK-STAT3 信号通路转导。然而,炎症刺激是否会影响 *CTRP4* 的表达,还需要进一步研究探讨。

综上所述,*CTRP4* 可能通过抑制炎症因子表达,激活 STAT3 信号通路,促进抑食欲蛋白 *Pomc* 的

表达,抑制促食欲蛋白神经肽 Y 的表达,从而对机体产生抑制摄食的作用。然而,上述结论还需进一步在体内验证。

参考文献 (References)

[ 1 ] Ziauddeen H, Alonso-Alonso M, Hill JO, *et al.* Obesity and the neurocognitive basis of food reward and the control of intake[J]. *Adv Nutr*, 2015, **6**(4): 474-486

[ 2 ] Oh TS, Cho H, Cho JH, *et al.* Hypothalamic AMPK-induced autophagy increases food intake by regulating NPY and POMC expression[J]. *Autophagy*, 2016, **12**(11): 2009-2025

[ 3 ] Farooqi IS, O’Rahilly S. 20 years of leptin: human disorders of leptin action[J]. *J Endocrinol*, 2014, **223**(1): T63-70

[ 4 ] Pedrosa JA, Silveira MA, Lima LB, *et al.* Changes in leptin signaling by SOCS3 modulate fasting-induced hyperphagia and weight regain in mice [J]. *Endocrinology*, 2016, **157**(10): 3901-3914

[ 5 ] do Carmo JM, da Silva AA, Freeman JN, *et al.* Neuronal suppressor of cytokine signaling 3: role in modulating chronic metabolic and cardiovascular effects of Leptin[J]. *Hypertension*, 2018, **71**(6): 1248-1257

[ 6 ] Guillemot-Legris O, Muccioli GG. Obesity-induced neuroinflammation: beyond the hypothalamus [J]. *Trends Neurosci*, 2017, **40**(4): 237-253

[ 7 ] Seldin MM, Tan SY, Wong GW. Metabolic function of the CTRP family of hormones [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2014, **15**(2): 111-123

[ 8 ] Schäffler A, Buechler C. CTRP family: linking immunity to metabolism [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, **23**(4): 194-204

[ 9 ] 谭伟峰, 王兰兰, 李琦, 等. 人类新基因 CTRP4 的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. *细胞与分子免疫学杂志* (Tan WF, Wang LL, Li Q, *et al.* Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of human novel gene CTRP4[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*), 2012, **28**(6): 614-617

[ 10 ] Huang H, Wu X, Cao L, *et al.* Preparation and Identification of Monoclonal Antibody Against C1q/TNF-Related Protein 4 [J]. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2016, **35**(6): 280-284

[ 11 ] Wang L. CTRP4: a new member of the adipocytokine family[J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, **14**(10): 868-870

[ 12 ] Byerly MS, Petersen PS, Ramamurthy S, *et al.* C1q/TNF-related protein 4 (CTRP4) is a unique secreted protein with two tandem C1q domains that functions in the hypothalamus to

modulate food intake and body weight [J]. *J Biol Chem*, 2014, **289**(7): 4055-4069

[ 13 ] Li Q, Wang L, Tan W, *et al.* Identification of C1qTNF-related protein 4 as a potential cytokine that stimulates the STAT3 and NF- $\kappa$ B pathways and promotes cell survival in human cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2011, **308**(2): 203-214

[ 14 ] Luo Y, Wu X, Ma Z, *et al.* Expression of the novel adipokine C1qTNF-related protein 4 (CTRP4) suppresses colitis and colitis-associated colorectal cancer in mice [J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, **13**(5): 688-699

[ 15 ] 罗阳, 马壮, 谭伟峰, 等. C1Q/TNF 相关蛋白家族 4 (CTRP4): 一个新的炎症抑制因子 [C]. 中国科学技术协会 2014 年会 (Luo Y, Ma Z, Tan WF, *et al.* CTRP4: A New Inflammatory Inhibit Factor [C]. *China Association for Science and Technology*), 2014, **230**(3): 9-16

[ 16 ] Hurtado-Carneiro V, Roncero I, Blazquez E, *et al.* PAS kinase as a nutrient sensor in neuroblastoma and hypothalamic cells required for the normal expression and activity of other cellular nutrient and energy sensors [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, **48**(3): 904-920

[ 17 ] Stratigopoulos G, LeDuc CA, Cremona ML, *et al.* Cut-like homeobox 1 (CUX1) regulates expression of the fat mass and obesity-associated and retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein-1-like (RPGRIPL) genes and coordinates leptin receptor signaling [J]. *J Biol Chem*, 2011, **286**(3): 2155-2170

[ 18 ] Zhou Y, Rui L. Leptin signaling and leptin resistance [J]. *Front Med*, 2013, **7**(2): 207-222

[ 19 ] Liu Z, Gan L, Zhou Z, *et al.* SOCS3 promotes inflammation and apoptosis via inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway in 3T3-L1 adipocyte [J]. *Immunobiology*, 2015, **220**(8): 947-953

[ 20 ] Huang G, Yuan M, Zhang J, *et al.* IL-6 mediates differentiation disorder during spermatogenesis in obesity-associated inflammation by affecting the expression of Zfp637 through the SOCS3/STAT3 pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 28012

[ 21 ] Anusree SS, Sindhu G, Preetha Rani MR, *et al.* Insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes by TNF- $\alpha$  is improved by punicic acid through upregulation of insulin signalling pathway and endocrine function, and downregulation of proinflammatory cytokines [J]. *Biochimie*, 2018, **146**: 79-86

[ 22 ] Milanski M, Arruda AP, Coope A, *et al.* Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver [J]. *Diabetes*, 2012, **61**(6): 1455-1462

[ 23 ] Wu Y, Yu Y, Szabo A, *et al.* Central inflammation and leptin resistance are attenuated by ginsenoside Rb1 treatment in obese mice fed a high-fat diet [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(3): e92618