

【基础研究】

通信作者:吴建新(1964-),男,北京人,硕士,研究员,主要从事儿童遗传与代谢性疾病相关机制研究;E-mail: cipbiolab@163.com。

体级 C57BL/6 雄性小鼠 20 只,体质量 16 ~ 18 g,购于北京华阜康华生物科技股份有限公司。脂肪间充质干细胞 (adipose-derived mesenchymal stem cell, ADSC) 购于广州赛业生物科技股份有限公司,为来源于小鼠脂肪组织的干细胞,具有多向分化潜能。

1.2 主要试剂及仪器 油红 O 染液购于广州赛业生物科技股份有限公司;Mouse CXCL1 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购于美国 R&D 公司;高脂饲料购于北京华阜康华生物科技股份有限公司;反转录试剂盒购于美国 Promega 公司;Ultra SYBR Mixture 试剂购于北京康为世纪生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与模型构建 将 20 只小鼠随机分为普通饲料喂养组和高脂饲料喂养组,每组 10 只。处理前小鼠先在动物房给予普通饲料喂养 1 周,以适应环境;之后分别给予普通饲料和高脂饲料喂养 10 周,每周称体质量,监测体质量变化。10 周后处理小鼠,腹腔注射戊巴比妥钠进行麻醉,行心腔灌洗后取附睾脂肪组织,在液氮中冷冻后转至 -80 ℃ 冰箱保存备用。

1.3.2 实时荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测小鼠脂肪组织中 CXCL1 mRNA 表达 Trizol 法提取总 RNA,用蛋白核酸测定仪检测总 RNA 的浓度及吸光度 (A_{260}/A_{280}) 值,计算各组总 RNA 浓度。各基因引物序列由上海捷瑞公司设计和合成, CXCL1: 上游为 5'-AAATGGT-GAAGGTCGGTGTGAAC-3'; 下游为 5'-AAATGGT-GAAGGTCGGTGTGAAC-3'。 GAPDH: 上游为 5'-GCTTGAAGGTGTTGCCCTCAG-3'; 下游为 5'-

AGAAGCCAGCGTTCACCAGAC-3'。运用反转录试剂盒反转录成 cDNA, Ultra SYBR Mixture 试剂进行 PCR 反应。PCR 扩增条件为: 95 ℃ 预变性 10 min; 95 ℃ 10 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 共 40 个循环; 最后进行溶解曲线检测, 结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak 法)。

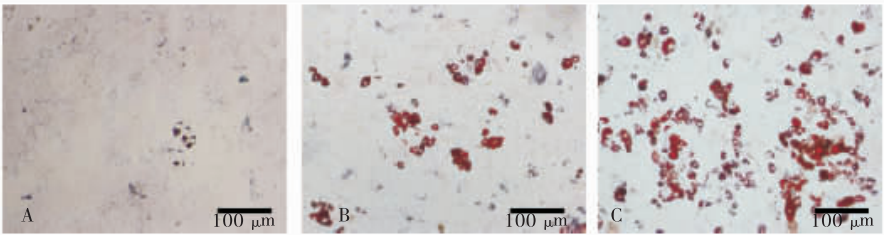
1.3.3 ELISA 检测细胞培养上清液中 CXCL1 表达 先进行 ADSC 培养, 待 ADSC 100% 融合后, 加入成脂诱导培养基 A 液, 诱导 3 d, 换 B 液, 培养 1 d, 共 3 ~ 5 个循环。应用 Mouse CXCL1 ELISA 试剂盒检测细胞培养上清液中 CXCL1 水平。所有标本做复孔检测, 并完全按照试剂盒说明书提供的操作方法和流程完成。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析, 符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组小鼠附睾脂肪组织中 CXCL1 mRNA 表达水平比较 高脂饲料喂养组小鼠附睾脂肪组织中 CXCL1 mRNA 表达水平较普通饲料喂养组小鼠显著增高 (3.28 ± 0.89 vs 1.30 ± 0.35), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 CXCL1 在脂肪细胞分化过程中表达变化 ADSC 培养第 5 天, 出现较少脂滴, 至培养第 10 天, 可见明显脂滴形成 (图 1); 培养第 5、7、10 天, 培养上清液中 CXCL1 表达分别为 (141.56 ± 8.41)、(241.15 ± 2.19) 和 (274.35 ± 1.77) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 其水平随培养时间的延长而显著增加 ($P < 0.05$)。



A: 成脂诱导第 5 天; B: 成脂诱导第 7 天; C: 成脂诱导第 10 天。

图 1 脂肪细胞分化过程油红 O 染色 (×100)

Fig. 1 Oil red O staining of adipose cell differentiation (×100)

3 讨论

趋化因子作为肥胖患者体内白细胞浸润脂肪组

织时的炎性递质, 可能对启动和延续前炎症状态有重要作用, 后者可促进 2 型糖尿病和心血管疾病的发生^[7]。CXCL1 属于趋化因子家族, 巨噬细胞、嗜

中性粒细胞和上皮细胞中均表达 CXCL1 ,CXCR2 是 CXCL1 的受体,与 CXCL1 结合后表现出趋化作用^[8]。趋化因子 CXCL1 及其受体 CXCR2 信号通路不仅能够趋化中性粒细胞,调节炎症反应,而且能够引起肿瘤细胞增殖、血管及淋巴管生成,促进肿瘤侵袭和脉管转移等。CXCL1 及其受体参与多种肿瘤细胞的发生和转移。阻断 CXCR2 的小鼠模型,肿瘤相关的新血管生成及肿瘤的转移均得到了明显抑制;肿瘤形成早期,与 CXCR2 结合的趋化因子通过衰老机制抑制肿瘤生长^[9]。在疱疹性角膜炎中,CXCL1 通过促进中性粒细胞的浸润发挥关键作用^[10]。研究发现,在脂多糖诱导的组织感染和损伤过程中,肥大细胞和巨噬细胞产生的 CXCL1 参与早期阶段组织中性粒细胞的招募^[11];在血管损伤后内皮恢复过程中,CXCL1 通过 CXCR2 依赖机制促进血管新生^[12-13];MIYAKE 等^[14]发现,CXCL1 通过调节表皮生长因子和细胞外信号调节激酶 1/2 影响新生血管发生,说明 CXCL1 介导炎症反应性疾病中的细胞分化过程。

本研究采用高脂饲料喂养诱导小鼠肥胖模型,探讨 CXCL1 在肥胖小鼠脂肪组织中的表达及意义,结果发现,饮食诱导的肥胖小鼠附睾脂肪组织中 CXCL1 mRNA 表达水平升高;成脂诱导 BMSC 细胞,培养上清液中 CXCL1 表达水平升高;由此说明,CXCL1 在肥胖形成过程中可能发挥了关键作用。

综上所述,趋化因子 CXCL1 及受体 CXCR2 在多种疾病中起作用,但其作用机制尚不明确,本研究显示,CXCL1 与肥胖的形成密切相关,CXCL1/CXCR2 作为多种疾病治疗的新靶点,在防治与治疗方面有着广阔的临床应用前景。然而,其介导肥胖形成的具体机制尚不完全清楚,有待进一步研究,以 CXCL1 为靶点控制肥胖形成的治疗措施将为肥胖人群提供新的出路。

参考文献:

[1] ROSEN E D,SPIEGELMAN B M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis [J]. *Nature*, 2006, 444 (7121):847-853.

[2] MATTER C M,HANDSCHIN C. RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), inflammation, obesity, and the metabolic syndrome[J]. *Circulation*,2007,115(8):946-948.

[3] XU L,KITADE H,NI Y,*et al.* Roles of chemokines and chemokine receptors in obesity-associated insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Biomolecules*,2015,5(3):1563-1579.

[4] CHAVEY C,LAZENNEC G,LAGARRIGUE S,*et al.* CXC ligand 5 is an adipose-tissue derived factor that links obesity to insulin resistance[J]. *Cell Metab*,2009,9(4):339-349.

[5] KIM D,KIM J,YOON J H,*et al.* CXCL12 secreted from adipose tissue recruits macrophages and induces insulin resistance in mice [J]. *Diabetologia*,2014,57(7):1456-1465.

[6] 李辉,宗心南,季成叶,等. 中国 2 ~ 18 岁儿童青少年超重和肥胖筛查体重指数界值点的研究[J]. *中华流行病学杂志*,2010,31(6):616-620.

[7] HERDER C,SCHNEITLER S,RATHMANN W,*et al.* Low-grade inflammation, obesity, and insulin resistance in adolescents[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2007,92(12):4569-4574.

[8] ADDISON C L,DANIEL T O,BURDICK M D,*et al.* The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR + CXC chemokine-induced angiogenic activity [J]. *J Immunol*, 2000,165(9):5269-5277.

[9] ACOSTA J C,GIL J. A role for CXCR2 in senescence, but what about in cancer? [J]. *Cancer Res*,2009,69(6):2167-2170.

[10] WEST D M,DEL R C,YIN X T,*et al.* CXCL1 but not IL-6 is required for recurrent herpetic stromal keratitis[J]. *J Immunol*, 2014,192(4):1762-1767.

[11] DE FILIPPO K,DUDECK A,HASENBERG M,*et al.* Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation[J]. *Blood*,2013,121(24):4930-4937.

[12] ORAL H,KANZLER I,TUCHSCHEERER N,*et al.* CXC chemokine KC fails to induce neutrophil infiltration and neoangiogenesis in a mouse model of myocardial infarction[J]. *J Mol Cell Cardiol*,2013,60:1-7.

[13] BOLITHO C,HAHN M A,BAXTER R C,*et al.* The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor[J]. *Endocr Relat Cancer*,2010,17(4):929-940.

[14] MIYAKE M,GOODISON S,URQUIDI V,*et al.* Expression of CXCL1 in human endothelial cells induces angiogenesis through the CXCR2 receptor and the ERK1/2 and EGF pathways[J]. *Lab Invest*,2013,93(7):768-778.

(本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕)