

## MR 对小鼠原代棕色脂肪细胞功能的影响

毕建华, 孔小岑, 刘娟, 丁国宪\*

(南京医科大学第一附属医院老年医学科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 使用小鼠原代棕色脂肪细胞, 研究盐皮质激素受体(mineralocorticoid receptor, MR)对其功能的影响。方法: 使用 MR 激动剂醛固酮、MR 拮抗剂螺内酯、糖皮质激素可的松分别作用于小鼠原代棕色脂肪细胞, 观察棕色脂肪细胞相关基因的改变。结果: MR 的配体(盐皮质激素)可显著增加其功能基因非偶联蛋白 1(uncoupling protein-1, UCP1)、细胞死亡诱导 DNA 碎片因子- $\alpha$ -样效应结合区域蛋白(the cell death-inducing DNA fragmentation factor- $\alpha$ -like effector domain-containing protein, CIDEA)、过氧化酶增殖活化受体  $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PGC1 $\alpha$ ) 的表达, 同时也促进分化基因脂肪酸结合蛋白 4(fatty acid binding protein 4, FABP4) 的表达, 相反 MR 的拮抗剂可抑制棕色脂肪细胞功能基因的表达。另一方面, 盐皮质激素还可以协同糖皮质激素共同调节棕色脂肪细胞功能基因 UCP1 的变化。结论: MR 是调控原代棕色脂肪细胞功能的重要因子。

**[关键词]** 原代棕色脂肪细胞; 盐皮质激素受体

**[中图分类号]** R589.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)05-616-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20130510

## Role of MR in the function of primary brown adipocyte in mouse

Bi Jianhua, Kong Xiaochen, Liu Juan, Ding Guoxian\*

(Department of Geratology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role of mineralocorticoid receptor (MR) in regulating the function of mouse primary brown adipocyte. **Methods:** The primary brown adipocytes were separated from C57BL/5J mice and induced for differentiation. The expression of genes related to brown fat function, including uncoupling protein-1 (UCP1), the cell death-inducing DNA fragmentation factor- $\alpha$ -like effector, domain-containing protein (CIDEA), peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PGC1 $\alpha$ ) and fatty acid binding protein 4 (FABP4) were observed in MR ligands (aldosterone), MR antagonist (spironolactone) and glucocorticoids (cortisone) treated cells, respectively. **Results:** Mineralocorticoid could significantly increase the expressions of UCP1, PGC1 $\alpha$  and FABP4. Conversely, the expression of UCP1 was suppressed by MR antagonists. Moreover, MR regulated the brown adipocyte function with the interaction of glucocorticoid. **Conclusion:** MR plays an important role in the function of primary brown adipocyte.

**[Key words]** primary brown adipocyte; MR

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 616-620]

目前肥胖已成为全球流行性疾病, 随着肥胖发病率的增高, 肥胖相关的代谢性疾病也相应增加, 包括胰岛素抵抗、2 型糖尿病、高血压、脂质代谢紊乱等, 严重危害人类健康<sup>[1-2]</sup>。据调查, 在美国、欧洲等地增加更为迅速。据最新数据, 美国有 2/3 的成人超重, 约 31% 的人口的 BMI > 30。在欧洲, 35~65 岁

的人群中, 至少有半数超重或者肥胖<sup>[3-4]</sup>。这使得减少肥胖发生率迫在眉睫, 而传统的通过减少食物摄取和能量消耗来抵抗肥胖的方法不仅难以实现且难以坚持。研究发现棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)可以增加能量的耗损, 抵抗肥胖, 而 BAT 功能障碍则减少产热作用导致肥胖。因此, BAT 研究已成为一个新的热点。

研究发现, 盐皮质激素受体(mineralocorticoid receptor, MR)与肥胖密切相关, 人体研究显示, MR 与 BMI 指数呈正相关, 即 BMI 指数越大, MR 的表

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金(30900504)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: Dinggx@njmu.edu.cn

达量越高<sup>[5]</sup>,提示 MR 可能是促进肥胖的重要因素。醛固酮是 MR 的天然配体,实验表明,在高醛固酮血症患者的白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT)中,其胰岛素受体表达量及亲和力下降<sup>[6]</sup>;体外实验亦证实,生理剂量的醛固酮能降低胰岛素受体的表达量及胰岛素的敏感性。相反,MR 拮抗剂螺内酯通过下调 WAT 中 MR 的表达,增加胰岛素受体表达及胰岛素的敏感性<sup>[3]</sup>。因此,MR 是影响 WAT 功能的重要因子,对 WAT 的分化及胰岛素敏感性都起到关键作用。

已知健康成人体内除了有大量 WAT 存在,还存在着 BAT,它对人体的代谢、肥胖等起到重要的调节作用。而目前 MR 在 BAT 中的研究却知之甚少。本文旨在研究 BAT 中 MR 的作用,以便更好地控制肥胖及其相关疾病的发生发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养基、2 型胶原酶、牛血清白蛋白(美国 Gibco 公司);含 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> PBS 溶液(上海基然公司);HEPES (美国 Biosharp 公司);PCR 引物、Trizol (美国 Invitrogen);RT-PCR 试剂盒、RNA 酶抑制剂、M-MLV、dNTP 等(美国 Promega 公司);螺内酯、醛固酮(美国 Sigma 公司);荧光 PCR 仪(日本 Toyobo 公司)。

#### 1.1.2 BAT 消化液及棕色脂肪细胞培养液

消化液:含牛血清白蛋白 20 g/L、2 型胶原酶 1.5 g/L、HEPES 1.2 g/L,使用含 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>的 PBS 定容,过滤,-20℃保存;培养液:DMEM 高糖培养液 + 10%胎牛血清 + 1%(链霉素、青霉素) + 胰岛素 20 nmol/L。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 原代细胞提取

将 3 周龄雄性 C57 小鼠(购南京大学模式动物中心)脱颈处死后,取肩胛间和肩胛下 BAT,剪碎消

化,离心后去上清,用红细胞裂解液重悬 5 min 后再次离心去上清,PBS 洗涤离心,最后用 BAT 细胞铺板,4 h 后洗涤换液。2~3 d 后,细胞融合时,给予加药处理。分别给予 MR 激动剂醛固酮、MR 拮抗剂螺内酯、糖皮质激素可的松或联合处理,观察相关基因表达的变化。

#### 1.2.2 RNA 抽取及 cDNA 转录

用 TRIzol 按照试剂盒说明抽提总 RNA,并进行浓度测定。以 2 μg RNA,2 μl 随机引物(oligoDT)、5 μl M-MLV、5 × Buffer、200 U M-MLV、1.25 μl dNTP、28 U RNA 酶抑制剂、6.05 μl DEPC 水的反应体系进行 cDNA 逆转录。

#### 1.2.3 实时定量 RT-PCR

以上述制备的 cDNA 为模板,用相关引物进行 RT-PCR 扩增(表 1)。实时定量 PCR 总反应体系为 20 μl,反应条件:95℃预变性 10 min;94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,80℃读板 5 s,40 个循环,72~94℃制备熔解曲线。 $\beta$ -actin 基因作为内参,对原代 BAT 细胞相关基因非偶联蛋白 1(uncoupling protein-1,UCP1)、细胞死亡诱导 DNA 碎片因子- $\alpha$ -样效应结合区域蛋白(the cell death-inducing DNA fragmentation factor- $\alpha$ -like effector domain-containing protein,CIDEA)、过氧化酶增殖活化受体  $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PGC1 $\alpha$ )和脂肪酸结合蛋白 4(fatty acid binding protein 4,FABP4)的表达进行统计分析。

### 1.3 统计学方法

实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,SPSS11.0 统计软件进行数据分析,两组间比较用 *t* 检验,多组间比较用方差分析。*P*  $\leq$  0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

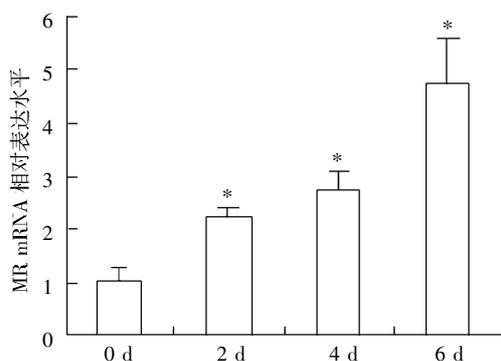
### 2.1 原代 BAT 分化成熟过程中 MR 的表达情况

前期研究发现:原代 BAT 细胞铺板后 2~3 d,细胞长至融合。以此作为细胞分化的 0 d,分化 4 d 时,

表 1 实时定量 PCR 引物序列  
Table 1 Real-time RT-PCR primer sequences

| 目的基因           | 上游引物(5'→3')              | 下游引物(5'→3')              |
|----------------|--------------------------|--------------------------|
| $\beta$ -actin | TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT | CACGATGGAGGGCCCGACTCATC  |
| UCP1           | AGGCTTTGTGGCTTCTTTTC     | TGTTTGGTTTTATTCTGTGGT    |
| CIDEA          | TCCTCGGCTGTCTCAATG       | GGCTGCTCTTCTGTATCG       |
| PGC1 $\alpha$  | TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT  | CCACTTCAATCCACCCAGAAAG   |
| FABP4          | ACACCGAGATTCCTTCAAACCTG  | CCATCTAGGTTATGATGCTCTTCA |

棕色化功能基因 UCP1 表达达到最高,6 d 则是细胞分化的终点。在 BAT 细胞分化过程中,分别在 0、2、4、6 d 检测 MR 的表达量,发现随着时间增加,MR 的表达量增加,表明 MR 参与了原代 BAT 细胞分化成熟的过程(图 1)。



与 0 d 比较, \* $P < 0.001$ ,  $n = 4$ 。

图 1 MR 在原代棕色脂肪细胞分化过程中的表达变化

Figure 1 The expression changes of MR during primary brown adipocytes differentiation

## 2.2 MR 激动剂/拮抗剂对 BAT 的功能产生影响

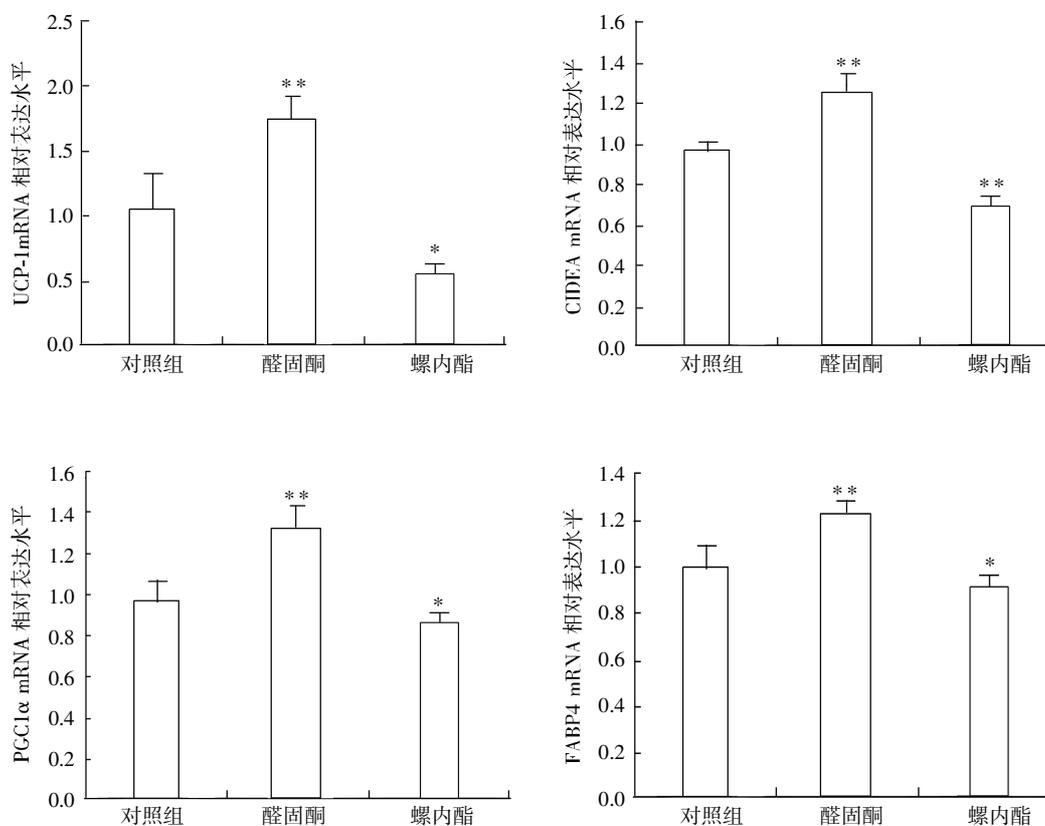
当 MR 天然配体醛固酮(10 nmol/L)作用于原代 BAT 细胞 4 d 后,其功能基因 UCP1、CIDEA、PGC1 $\alpha$  均显著增高,并且脂肪分化基因 FABP4 亦明显升高。相反,当 MR 拮抗剂螺内酯(5  $\mu$ mol/L)作用 4 d 后,这些功能基因和分化基因的表达量均明显被抑制(图 2)。提示 MR 的确在原代 BAT 细胞的分化过程中有重要作用,是促进 BAT 分化及功能的重要因子。

## 2.3 糖皮质激素抑制原代 BAT 细胞功能基因的表达

MR 的配体不仅有盐皮质激素,糖皮质激素也可以通过 MR 发挥作用。给予糖皮质激素可的松(1 mmol/L)刺激小鼠原代 BAT 细胞 4 d 后,棕色化功能基因 UCP-1 表达量明显降低,表明糖皮质激素下调了棕色化功能基因(图 3)。

## 2.4 糖皮质激素能拮抗醛固酮的作用

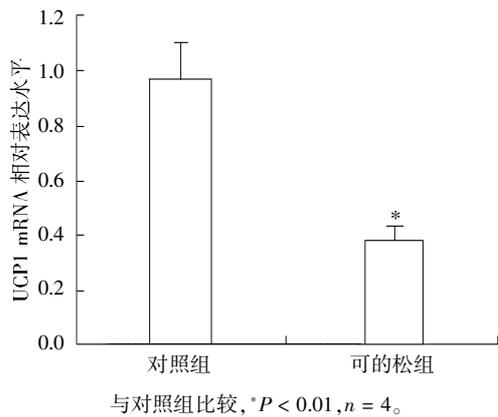
本研究发现盐皮质激素能够促进 BAT 功能基因的表达,糖皮质激素则起相反的作用。当盐皮质激素醛固酮和糖皮质激素可的松共同作用于原代



与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 4$ 。

图 2 MR 激动剂醛固酮和拮抗剂螺内酯影响原代棕色脂肪功能基因表达

Figure 2 Influence of agonist and antagonist of MR-aldosterone and spironolactone on the function genes expression of primary brown adipocytes



与对照组比较, \* $P < 0.01$ ,  $n = 4$ 。

图 3 可的松抑制原代棕色脂肪细胞 UCP1 表达  
Figure 3 Inhibition role of cortisone on the expression of UCP1 in primary brown adipocytes

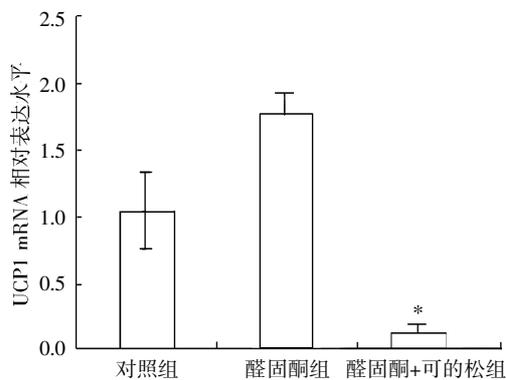
BAT 细胞时, 醛固酮的促进作用则被可的松拮抗(图 4)。

### 2.5 糖皮质激素与盐皮质激素拮抗剂作用相互叠加, 进一步下调棕色化功能基因

如图 5 所示, 在 BAT 细胞中, 单纯给予 MR 拮抗剂螺内酯作用 4 d, UCP-1 表达明显下调; 单纯给予糖皮质激素可的松, UCP1 的表达也下降。在螺内酯的基础上给予可的松后, 发现 UCP-1 表达下降得更明显, 说明可的松与螺内酯抑制 BAT 功能基因表达的作用相互叠加。

## 3 讨论

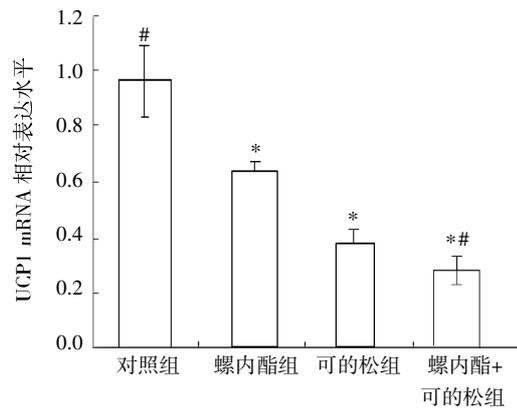
与 WAT 贮存能量的功能恰恰相反, BAT 能够促进能量消耗。既往研究发现, 有一种特殊的转基因小鼠会出现典型的肥胖、代谢紊乱表现, 2009 年



与醛固酮组比较, \* $P < 0.001$ ,  $n = 4$ 。

图 4 可的松抑制醛固酮升高原代棕色脂肪细胞 UCP1 表达的能力  
Figure 4 Inhibition role of cortisone on the ability of aldosterone in raising UCP1 expression of primary brown adipocytes

研究人员才发现正是由于缺乏棕色脂肪作用, 转基因鼠虽然摄食量不增加却也表现为 WAT 蓄积、血脂紊乱<sup>[7]</sup>。与此相反, 另外有一种转基因小鼠, 因为其骨骼肌束中存在大量异位的 BAT 细胞, 所以表现为对高脂饮食诱导的肥胖、高脂血症、胰岛素抵抗等代谢紊乱状态抵抗<sup>[8]</sup>。因此, BAT 能够促进能量消耗, 减少 WAT 蓄积, 减轻体重, 改善代谢。此外, 另有大量研究表明, BAT 能够有效地降低肥胖、2型糖尿病、胰岛素抵抗等疾病的发生发展<sup>[9-11]</sup>。



与对照组比较, \* $P < 0.01$ ,  $n = 4$ 。与螺内酯组比较, \* $P < 0.01$ 。

图 5 螺内酯与可的松对原代棕色脂肪细胞 UCP1 表达的叠加作用  
Figure 5 Overlay role of spironolactone and cortisone on the expression of UCP1 in primary brown adipocytes

研究人员才发现正是由于缺乏棕色脂肪作用, 转基因鼠虽然摄食量不增加却也表现为 WAT 蓄积、血脂紊乱<sup>[7]</sup>。与此相反, 另外有一种转基因小鼠, 因为其骨骼肌束中存在大量异位的 BAT 细胞, 所以表现为对高脂饮食诱导的肥胖、高脂血症、胰岛素抵抗等代谢紊乱状态抵抗<sup>[8]</sup>。因此, BAT 能够促进能量消耗, 减少 WAT 蓄积, 减轻体重, 改善代谢。此外, 另有大量研究表明, BAT 能够有效地降低肥胖、2型糖尿病、胰岛素抵抗等疾病的发生发展<sup>[9-11]</sup>。

MR 在 WAT 的分化过程中有着重要作用。Caprio 等<sup>[12]</sup>发现短暂敲除 MR 后, 3T3-L1 细胞的成脂分化能力明显被抑制。临床上亦有证据表明, 在肥胖所致的高血压患者中, MR 的活性明显增强<sup>[13]</sup>。然而 MR 在 BAT 细胞中的研究却甚少。

本研究发现, 在原代 BAT 细胞的分化成熟过程中, MR 的表达量随时间延长而逐渐增加, 提示 MR 在原代 BAT 中可能有着重要作用。给予 MR 激动剂醛固酮刺激后发现, 棕色化功能基因 UCP1 明显增强; 相反, 给予 MR 拮抗剂螺内酯刺激后, UCP1 的表达则明显减弱, 这进一步证明了 MR 在原代 BAT 细胞中有着重要作用。

众所周知, MR 的配体不仅有盐皮质激素, 糖皮质激素也能与其结合, 且有活性的糖皮质激素对 MR 的亲和力比糖皮质激素受体要高 10 倍, 而生理剂量糖皮质激素的浓度是盐皮质激素的数百倍<sup>[14]</sup>。本研究发现, 可的松能够明显降低原代 BAT 细胞的 UCP1 的表达, 提示糖皮质激素也参与了原代 BAT 细胞的分化过程。进一步研究还发现, 可的松不仅能够拮抗醛固酮的作用, 它与螺内酯还有叠加作用。这

些证据表明糖皮质激素主要通过 MR 抑制了原代 BAT 细胞棕色化功能基因的表达,并且它的作用强于盐皮质激素。

综上所述,MR 是调控 BAT 的关键因素,MR 的配体——醛固酮可以显著促进棕色功能基因表达,相反 MR 的拮抗剂明显抑制了棕色功能基因表达。不仅如此,本研究结果还发现,糖皮质激素也是调控 BAT 功能的重要因子,活性糖皮质激素可以显著抑制 BAT 功能。另一方面,在 BAT 细胞中,糖皮质激素是更重要的 MR 配体,可以与 MR 拮抗剂协同作用进一步抑制 BAT 功能。这提示,在脂肪组织中设法调控盐皮质激素和糖皮质激素通过 MR 所发挥的作用有可能成为防治肥胖及其相关代谢性疾病的新途径。

[参考文献]

[1] Baretic M. Targets for medical therapy in obesity[J]. Dig Dis, 2012, 30(2):168-172

[2] Panazzolo DG, Sicuro FL, Clapauch R, et al. Obesity, metabolic syndrome, impaired fasting glucose, and microvascular dysfunction; a principal component analysis approach[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2012, 13; 12(1): 102

[3] Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, et al. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(24): 14211-14216

[4] Ogden CL, Carroll MD, Kit BK. Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010[J]. JAMA, 2012, 307(5):483-490

[5] Hirata A, Maeda N, Nakatsuji H. Contribution of glucocor-

ticoid-mineralocorticoid receptor pathway on the obesity-related adipocyte dysfunction[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 419(2):182-187

[6] Thakur V, Richards R, Reisin E. Obesity, hypertension, and the heart[J]. Am J Med Sci, 2001, 321(4):242-248

[7] Keisuke Tateishi, Yuki Okada, Eric M, et al. Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance[J]. Nature, 2009, 458(7239):757-761

[8] Almind K, Manieri M, Sivitz WI, et al. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(7):2366-2371

[9] Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, et al. Human BAT possesses molecular signatures that resemble Beige/Brite cells [J]. PLoS One, 2012, 7(11):e49452

[10] Medina-Gómez G. Mitochondria and endocrine function of adipose tissue[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2012, 26(6):791-804

[11] Roy T, Lloyd CE. Epidemiology of depression and diabetes: A systematic review[J]. J Affect Disord, 2012, 142(Suppl):S8-21

[12] Caprio M, Fève B, Claës A, et al. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis[J]. FASEB J, 2007, 21(9):2185-2194

[13] Zennaro MC, Caprio M, Fève B. Mineralocorticoid receptors in the metabolic syndrome[J]. Trends Endocrinol Metab, 2009, 20(9):444-451

[14] Marzolla V, Armani A, Zennaro MC et al. The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism [J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 350(2):281-288

[收稿日期] 2012-12-14

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆  
<http://jnm.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件  
 审理情况。