

P19 激活 GPR56 的 Gq 通路促进米色脂肪棕色化

王腾威^{1,2}, 林慧², 张明祥^{1,2}, 孙金鹏², 张道来¹

(1. 滨州医学院药学院, 山东 烟台 264003; 2. 山东大学基础医学院, 山东 济南 250012)

摘要:目的 探究 GPR56 的 Stachel peptide (P19) 对米色脂肪组织棕色化的影响及其分子机制。方法 利用 qPCR 和 Western blotting 方法检测 GPR56 在米色脂肪组织中的表达水平。用 ELISA 方法检测 50 $\mu\text{mol/L}$ P19 激活小鼠米色脂肪组织中 GPR56 的 Gq 通路而导致的下游 3-磷酸肌醇 (inositol triphosphate, IP_3) 水平变化。随后, 在诱导原代米色脂肪细胞棕色化分化过程中, 通过 qPCR 方法检测棕色化标志基因和产热标志基因的表达水平, 对 P19、YM-254890 (YM) 和沉默 *Gpr56* 基因的表达对分化进程的影响进行综合分析。结果 GPR56 在米色脂肪组织中高表达。P19 可以使棕色化标志基因 (*Tbx* 和 *Tmem26*) 和产热标志基因 (*Ppargc1a*、*Cox7a1* 和 *Cidea*) 表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外, 当加入 YM 或沉默 *Gpr56* 基因的表达时, 这些棕色化标志基因和产热标志基因的表达水平出现了反转。结论 P19 能够通过激活 GPR56 的 Gq 通路来促进米色脂肪组织的棕色化过程。**关键词:** GPR56; P19; 黏附类 G 蛋白偶联受体; 信号转导通路; 脂肪分化

中图分类号: Q54

文献标志码: A

P19 activates the Gq pathway of GPR56 to promote browning of beige adipose

WANG Tengwei^{1,2}, LIN Hui², ZHANG Mingxiang^{1,2}, SUN Jinpeng², ZHANG Daolai¹

(1. School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, Shandong, China;

2. Department of Basic Medical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influence of GPR56 Stachel peptide (P19) on the browning of beige adipose tissue and its molecular mechanisms. **Methods** qPCR and Western blotting techniques were used to assess the expression levels of GPR56 in beige adipose tissue. ELISA assay was used to investigate the impact of 50 $\mu\text{mol/L}$ P19 on the downstream IP_3 level changes caused by activation of GPR56 Gq pathway in mouse beige adipose tissue. Subsequently, during the induction of browning differentiation in primary beige adipocytes, the expression levels of browning marker genes and thermogenic marker genes were evaluated using qPCR. A comprehensive analysis was performed to elucidate the effects of P19, YM-254890 (YM), and *Gpr56* gene silencing on the differentiation process. **Results** GPR56 was highly expressed in beige adipose tissue. P19 can increase the expression levels of browning marker genes (*Tbx* and *Tmem26*) and heat production marker genes (*Ppargc1a*, *Cox7a1* and *Cidea*) with statistically significant differences ($P < 0.05$). Moreover, when YM was added or *Gpr56* expression was silenced, a reversal in the expression levels of these browning and thermogenic marker genes was observed. **Conclusion** P19 can promote the browning process of beige adipose tissue through the activation of the Gq pathway.

Key words: GPR56; P19; Adhesion G protein-coupled receptors; Signal transduction pathway; Adipose differentiation

黏附类 G 蛋白偶联受体 (adhesion G protein-coupled receptors, aGPCRs) 是 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR) 超家族的一个重要亚类,广泛参与器官发生、大脑发育以及离子水稳态等生理过程的调控^[1-4]。aGPCRs 具有独特的 N 端胞外结构域,其中包含一个 GPCR 自身蛋白水解诱导结构域,在 GAIN 结构域内存在一个高度保守的 GPCR 蛋白水解位点。该位点发生自水解反应后,会形成氨基端片段 (N-terminal fragment, NTF) 和羧基端片段 (C-terminal fragment, CTF)^[5-6]。NTF 在和 CTF 解离后暴露出的 Stachel 序列具有激活受体本身的独特能力^[4]。此外,模拟 Stachel 序列的合成肽被称为每个 aGPCR 受体的 Stachel peptide,并已被证明可以激活相应的 aGPCR^[7-9]。

GPR56 作为 aGPCRs 的重要成员,可被其自身的 Stachel 序列所激活^[10]。目前,GPR56 在众多组织中的研究已经取得了显著的进展^[11-13],尤其是在脂肪组织中的研究也逐渐受到关注^[14]。研究表明,GPR56 与 3T3-L1 前体细胞形成脂肪的过程密切相关,而脂肪在体内的分化维持了不同种类脂肪间的动态平衡^[15-16]。脂肪棕色化分化是脂肪细胞分化的一种重要形式,与白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT) 储存能量的功能相比,棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT) 数量或活性的增加可以增加能量的消耗,在能量代谢和肥胖等疾病的发生发展中具有重要意义^[17]。近年来,尽管对于脂肪棕色化分化的研究已经取得了一定的进展,但是 BAT 形成的生理信号和具体的分子调控机制仍不完全清楚^[18-19]。本文将从 P19 激活 GPR56 下游信号通路的角度,研究 P19 对脂肪棕色化分化的影响及其相关的分子调控机制,为其未来应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6~8 周龄雄性健康 C57BL/6J 小鼠,体质量为 18~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。每笼 4~6 只,饲养于山东大学趵突泉校区模式动物研究中心 (SPF 级),温度 22 °C~26 °C,湿度 40%~70%,按 12 h:12 h 的明暗循环饲养,小鼠可自由获得灭菌处理的水和饲料。所有动物实验均经过山东大学基础医学院伦理委员会审核通过 (ECSBMSSDU 2022-2-66)。

1.1.2 主要试剂

Anti-mouse GPR56 抗体 (sc-390192) 购自美国 Santa Cruz 公司。ATP1A1 多克隆抗体 (14418-1-AP) 购自美国 Proteintech 公司。ECL 化学发光超敏显色试剂盒购自上海翌圣生物科技股份有限公司。TRIzol Reagent、DMEM/F-12 培养基购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。胎牛血清、DMEM 高糖培养基购自武汉普诺赛公司。青霉素-链霉素双抗购自上海道鹏生物科技有限公司。P19 多肽由中国南京杰肽生物有限公司合成,纯度 > 95%。YM-254890、胰岛素、IBMX、地塞米松、罗格列酮、三碘甲状腺原氨酸和吡啶美辛等试剂均购自美国 MCE 公司。3-磷酸肌醇 (inositol triphosphate, IP3) ELISA 试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司。SYBR green 购自瑞士 Roche 公司。Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 生命技术有限公司。siRNA 由中国上海吉玛基因合成。qPCR 引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

1.1.3 主要仪器

细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司),微孔板式多功能分析仪 (美国 BioTek 公司),实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司),电泳仪、化学发光成像系统 (上海 Tanon 公司)。

1.2 方法

1.2.1 qPCR 检测 *Gpr56* 基因表达水平

为了检测 *Gpr56* 在脂肪组织中的 mRNA 表达水平,本研究设置了实验组 (BAT 和米色脂肪组织) 和对照组 (肝脏)。取新鲜的 BAT、米色脂肪组织和肝脏组织,每 50 mg 组织加入 1 mL TRIzol,充分研碎组织,室温静置 5 min 使其充分裂解。4 °C、12 000 r/min,离心 10 min,上清转移至新的 1.5 mL EP 管,加入 1/5 TRIzol 体积的氯仿,充分混匀后室温静置 5 min,4 °C、12 000 r/min,离心 15 min,小心转移上层水相至新的 1.5 mL EP 管中。加入等体积异丙醇,颠倒混匀后于 -20 °C 静置 1 h。4 °C、12 000 r/min,离心 10 min,小心弃上清,加入 75% 乙醇 (DEPC 水配置) 洗涤沉淀,然后 4 °C、12 000 r/min,离心 10 min,弃干净上清,室温晾干 3 min,加入 100 μL DEPC 水,充分溶解 RNA 并检测浓度。37 °C、15 min 进行逆转录反应,随后 98 °C、5 min 进行酶失活,得到 cDNA 进行 qPCR,β-actin 为内参基因,无菌双蒸水 (double distilled water, DDW) 为空白对照组,检测 *Gpr56* 的 mRNA 表达水平,qPCR 引物序列见表 1。

表1 qPCR引物序列
Table 1 Primer sequence of qPCR

引物	序列(5'-3')
mGPR56-F	TCCAGAAACAGGAGCAGAGC
mGPR56-R	CTTGGCAGCCTTTTGAGGGT
mGAPDH-F	TCACCACCATGGAGAAGGC
mGAPDH-R	GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA
mTbx1-F	GACCCGTTTCGGCCCTC
mTbx1-R	CATTCGTCTGCCTGCCTTGG
mTmem26-F	AACCGGTCTGGACCTTAGGA
mTmem26-R	AGAGTAGGGTTGGTTCTGACA
mPpargc1a-F	CCCTGCCATTGTTAAGACC
mPpargc1a-R	TGCTGCTGTTCTCTGTTTC
mCox7a1-F	CAGCGTCATGGTCAGTCTGT
mCox7a1-R	AGAAAACCGTGTGGCAGAGA
mCidea-F	GCCGTGTTAAGGAATCTGCTG
mCidea-R	TGCTCTTCTGTATCGCCAGT

1.2.2 Western blotting 检测 GPR56 蛋白表达水平

Western blotting 方法检测 GPR56 在 BAT 和米色脂肪组织上的蛋白表达水平。分为实验组(米色脂肪组织和 BAT)和对照组(肝脏)。取新鲜的 BAT、米色脂肪组织和肝脏组织,每 100 mg 组织加入 1 mL 膜成分裂解液(75 mmol/L Tris-HCl pH = 7.4, 5 mmol/L EDTA, 蛋白酶抑制剂),充分研磨,然后转入 1.5 mL EP 管,4 °C、1 800 r/min 离心 10 min,从而去除未破碎的细胞和细胞核,取上清于新的高速离心管中,然后 4 °C、17 000 r/min 高速离心 1 h,吸弃上清,加入 50 μL NP-40 裂解液(含蛋白酶抑制剂)重悬沉淀,4 °C 垂直混悬仪裂解 1 h 后,4 °C、12 000 r/min 离心 30 min,取上清得到膜成分蛋白样品。BSA 法测定蛋白浓度,定量 40 μg 后加入 3×SDS,用 1×SDS 补齐至相同体积,室温变性 30 min,上样后进行电泳。电压设置浓缩胶为 90 V,分离胶为 120 V,溴酚蓝电泳至最底层时电泳结束。然后 PVDF 膜用甲醇活化 2 min,进行转膜,300 mA 转膜 2 h,保持低温。转膜结束后,将 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉(1×TBST 配置)室温封闭 1 h,1×TBST 洗膜 3 次,每次间隔 10 min。在 4 °C 条件下,分别孵育 GPR56 一抗和内参 ATP1A1 一抗 16 h,1×TBST 洗膜 3 次,每次间隔 10 min。在 5% 脱脂奶粉(用 1×TBST 配置)中,将相应浓度的二抗与 PVDF 膜在室温下孵育 1.5 h,然后用 1×TBST 洗膜 3 次,每次间隔 10 min。最后,使用超敏 ECL 进行发光检测。

1.2.3 ELISA 检测 P19 刺激米色脂肪组织中的 IP₃ 水平

当 GPR56 下游的 Gq 信号通路被激活后,会引

起胞内 IP₃ 水平升高^[20]。为了检测 P19 对米色脂肪组织中 GPR56 下游 Gq 通路的激活情况,用 ELISA 方法检测米色脂肪组织中的 IP₃ 水平。以是否以 P19(50 μmol/L)处理进行分组,未经 P19 处理组命名为 P19⁻组,为空白对照组;经 P19 处理组命名为 P19⁺组,为实验组。首先,将新鲜的米色脂肪组织在 DMEM/F-12 培养基中饥饿 20 min,然后用 DMEM/F-12 培养基等比例稀释 P19 和空白溶剂。将饥饿后的米色脂肪组织转移至含 P19 或空白溶剂的 DMEM/F-12 培养基中,37 °C 刺激 15 min。接下来将组织在 0.5 mol/L HCl(加入碱性磷酸酶抑制剂)中充分研磨,室温裂解 30 min,用 100 mmol/L NaOH 终止反应。4 °C、4 000 r/min 离心 20 min,弃沉淀保留上清。ELISA 试剂盒恢复至室温后,将冻干标准品 10 000×g 离心 1 min,加入标准品 & 样品稀释液 1.0 mL 至冻干标准品中,旋紧管盖,静置 10 min,上下颠倒数次,待其充分溶解后,轻轻混匀,配成 1 000 pg/mL 的标准品工作液。依次稀释为 1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.63、0 pg/mL。每个反应孔加入 50 μL 标准品工作液及检测样本,然后每个反应孔中立即加入 50 μL 生物素标记 IP₃ 抗体工作液,封板后于 37 °C 孵箱孵育 45 min,洗涤,弃去液体,甩干,每个反应孔中加入 350 μL 洗涤液,浸泡 1~2 min,甩干洗涤液,重复 4 次。每个反应孔中加入 100 μL HRP 标记链霉亲和素工作液,封板后于 37 °C 孵箱孵育 30 min。洗涤,每个反应孔中加入 300 μL 洗涤液,间隔 30 s,甩干洗涤液,重复 4 次。每个反应孔加入 90 μL 显色剂(避光),封板后于 37 °C 避光显色 15 min 左右,加入 50 μL 终止液,即刻用酶标仪于 450 nm 波长处检测 OD 值,以标准品浓度为横坐标,吸光度 OD 值为纵坐标,用“四参数 Logistics 模型”绘制标准曲线,计算样品孔的 IP₃ 水平。

1.2.4 原代米色脂肪细胞分离培养

颈椎脱臼处死小鼠后,用 75% 乙醇浸泡 15 min 进行消毒,背部剪开小鼠皮肤至小鼠的腹股沟处,在小鼠大腿外侧即为米色脂肪组织,剪下米色脂肪组织,置于 PBS 中清洗 5 遍,灭菌剪刀剪碎 15 min,加入消化液(DMEM/F-12、1 mg/mL 胶原酶 I、1% BSA、1% 青霉素-链霉素)5 mL,37 °C 消化 25 min,摇晃,加入 DMEM/F-12(20% FBS,1% 青霉素-链霉素)终止消化。消化后的混合体系经过 100 μm 滤网过滤,去除未消化的大组织块;然后再经过 70 μm 的滤网过滤,原代米色脂肪细胞存在于滤液中。4 °C、1 500 r/min 离心 8 min 后,弃掉上层油脂和液体,

20 mL PBS 重悬细胞沉淀进行清洗,4 °C、1 500 r/min 离心 8 min,DMEM/F-12 (20% FBS,1% 青霉素-链霉素)培养基重悬细胞。根据细胞数量进行铺板,标记为 P0 代,24 h 后更换培养基,4~5 d 后细胞长满可以传代,以 1 传 3 的比例进行传代培养。

1.2.5 诱导原代米色脂肪细胞棕色化与标志基因检测

原代脂肪细胞传代到 P2 代,接触抑制 48 h 后,DMEM 高糖培养基配置分化培养基,胰岛素(5 μg/mL)+IBMX(500 μmol/L)+地塞米松(1 μmol/L)+罗格列酮(1 μmol/L)+三碘甲状腺原氨酸(1 nmol/L)+吡啶美辛(125 μmol/L)联用诱导接触抑制的细胞分化 2 d,然后用 DMEM 高糖培养基+胰岛素(5 μg/mL)+三碘甲状腺原氨酸(1 nmol/L)配置成的维持液再培养 5 d,每 2 d 更换一次维持液。

1.2.6 诱导分化过程中加入 P19 处理与标志基因检测

按照 1.2.5 中方法诱导原代米色脂肪细胞棕色化分化,在分化过程中,以是否在分化培养基和维持液中加入 P19(50 μmol/L)进行编组,未加入 P19 组命名为 P19⁻组,为空白对照组;加入 P19 组命名为 P19⁺组,为实验组。诱导分化周期结束后,按照 1.2.1 中的 qPCR 技术对棕色化标志基因(*Tbx* 和 *Tmem26*)和产热标志基因(*Ppargc1a*、*Cox7a1* 和 *Cidea*)的表达水平进行检测^[21-22],以 β-actin 为内参基因,DDW 为空白对照组,qPCR 引物序列见表 1。

1.2.7 YM-254890(YM)对原代米色脂肪细胞分化的影响与标志基因检测

按照 1.2.5 中方法诱导原代米色脂肪细胞棕色化分化,以是否在分化培养基和维持液中加入 P19(50 μmol/L)或 YM(100 nmol/L)进行编组。未加入 P19 和 YM 组命名为 P19⁻YM⁻组,为空白对照组;加入 P19 但未加入 YM 组命名为 P19⁺YM⁻组,为正对照组;加入 P19 和 YM 组命名为 P19⁺YM⁺组,为实验组。诱导分化结束后以 1.2.1 的方法进行 qPCR 检测,以 β-actin 为内参基因,DDW 为空白对照组,检测分化标志基因的 mRNA 表达水平,qPCR 引物序列见表 1。

1.2.8 siRNA 沉默 *Gpr56* 基因表达与标志基因检测

原代脂肪细胞传代铺板至 24 孔板,当细胞融合度达到 60%时,进行 siRNA 转染,siRNA 序列见表 2。以转染 NC 的 siRNA 为空白对照组,命名为 siCon 组;以转染靶向 *Gpr56* 基因的 siRNA 为实验组,分为 siRNA1⁺siRNA2⁻组、siRNA1⁻siRNA2⁺组、siRNA1⁺siRNA2⁺组。首先用 800 μL SFM(无血清

DMEM/F-12)培养基换液,放回 37 °C 培养箱稳定。用 100 μL SFM 分别轻柔混匀 Lipofectamine 2000 和 siRNA,室温静置稳定 5 min,然后混合 Lipofectamine 2000 和 siRNA,轻柔混匀,室温静置稳定 20 min。之后,将混合物加入 24 孔板中的原代米色脂肪细胞中,37 °C 培养箱转染 6 h 后,更换 DMEM/F-12 培养基(含 20% FBS,1% 青霉素-链霉素)。再继续培养 48 h 后,进行 qPCR 检测 *Gpr56* 基因的沉默效率。得到沉默效率较好的两条 siRNA 后,联合应用对原代米色脂肪细胞进行转染,命名为 siGPR56 组。以 1.2.5 所示的方法进行诱导分化,以是否在分化培养基和维持液中加入 P19(50 μmol/L)进行编组,未加入 P19 组分别命名为 siConP19⁻组和 siGPR56P19⁻组,为空白对照组;加入 P19 组分别命名 siConP19⁺组、siGPR56P19⁺组,为实验组。诱导分化结束后以 1.2.1 描述的方法进行 qPCR 检测,以 β-actin 为内参基因,DDW 为空白对照组,检测分化标志基因的 mRNA 表达水平,qPCR 引物序列见表 2。

表 2 siRNA 序列
Table 2 Sequence of siRNA

引物	序列(5'-3')
siRNA1-S	CCUCCACUAUGAUCAAUCUT
siRNA1-AS	AGAUUGAUCAUAGUGGAGGTT
siRNA2-S	GCUACAAUCUCUACCGACUTT
siRNA2-AS	AGUCGGUAGAGAUUGUAGCTT

1.3 统计学处理

采用 Graphpad Prism 8 软件,正态性检验采用 Shapiro-Wilk 检验,所有标志基因 mRNA 检测数据符合正态分布,以 3 次独立重复实验的均数±标准差表示。对于符合正态分布的资料,两独立样本间比较用 *t* 检验;对于符合正态分布并且方差齐性的资料,多组间比较($n \geq 3$)采用单因素方差分析(one-way ANOVA) Tukey 多重比较检验和 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GPR56 在米色脂肪组织中表达水平较高

在 mRNA 表达水平上,GPR56 在米色脂肪组织中的表达量是 BAT 的 6.2 倍[(2.917±0.414) vs (0.470±0.118), $F = 23.570$, $P = 0.001$](图 1A)。Western blotting 灰度分析结果显示,米色脂肪组织表达量是 BAT 的 10.4 倍[(1.427±0.030) vs (0.137±0.051), $F = 150.800$, $P = 0.001$],与 mRNA 检测结果趋势一致(图 1B)。

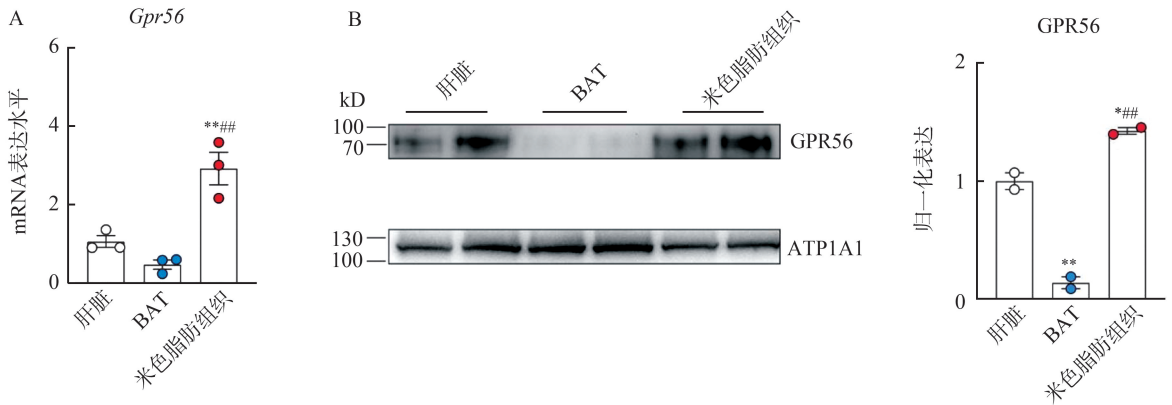


图1 GPR56在脂肪组织中的表达水平检测

A: *Gpr56*在WT小鼠肝脏、BAT和米色脂肪组织中mRNA表达水平。数据归一化为GPR56在WT小鼠肝脏中的表达水平;B: Western blotting(左图)以及灰度分析(右图)检测小鼠肝脏、BAT和米色脂肪组织中的GPR56的蛋白表达水平。数据归一化为GPR56在WT小鼠肝脏中的表达水平。 $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs 肝脏; $##P<0.01$ vs BAT。

Figure 1 The expression level of GPR56 in different tissues

A: The mRNA levels of *Gpr56* in liver, BAT and beige adipose tissues. Data were normalized to the expression level of *GPR56* in the liver of WT mice; B: Western blotting (left) and quantitative analysis (right) of endogenous protein expression levels of *GPR56* in liver, BAT and beige adipose tissues from WT mice. Data were normalized to the protein expression level of *GPR56* in the liver of WT mice. $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs liver; $##P<0.01$ vs BAT.

2.2 P19在脂肪组织中能够激活GPR56的Gq信号通路

$P19^+$ 组的米色脂肪组织[(2.172 ± 0.183) vs (1.000 ± 0.014), $F=166.000$, $P=0.003$]和原代米色脂肪细胞[(2.751 ± 0.243) vs (1.000 ± 0.077), $F=10.010$, $P=0.002$]的 IP_3 水平明显高于 $P19^-$ 组,差异有统计学意义。

2.3 P19可以促进原代米色脂肪细胞棕色化

$P19^+$ 组的棕色化标志基因*Tbx*[(1.632 ± 0.114) vs (1.000 ± 0.110), $F=1.064$, $P=0.017$]、*Tmem26*[(1.830 ± 0.088) vs (1.000 ± 0.148), $F=2.852$, $P=0.009$]和产热标志基因*Ppargc1a*[(1.901 ± 0.134) vs (1.000 ± 0.098), $F=1.877$, $P=0.006$]、*Cox7a1*[(1.953 ± 0.259) vs (1.000 ± 0.073), $F=12.440$, $P=0.024$]、*Cidea*[(2.067 ± 0.050) vs (1.000 ± 0.062),

$F=1.564$, $P<0.001$]的mRNA表达水平明显高于 $P19^-$ 组,差异均有统计学意义。

2.4 Gq蛋白抑制剂YM可以反转P19促进原代米色脂肪细胞棕色化分化

加入Gq蛋白抑制剂的 $P19^+YM^+$ 组的棕色化标志基因*Tbx*[(0.643 ± 0.133) vs (1.844 ± 0.165), $F=14.240$, $P=0.005$]、*Tmem26*[(1.576 ± 0.026) vs (2.333 ± 0.235), $F=20.220$, $P=0.026$]和产热标志基因*Ppargc1a*[(0.913 ± 0.043) vs (1.480 ± 0.105), $F=13.420$, $P=0.006$]、*Cox7a1*[(0.925 ± 0.140) vs (1.950 ± 0.264), $F=10.970$, $P=0.017$]、*Cidea*[(0.655 ± 0.115) vs (2.030 ± 0.160), $F=1.960$, $P=0.003$]的mRNA表达水平明显低于未加入Gq蛋白抑制剂的 $P19^+YM^-$ 组,差异有统计学意义。见图2。

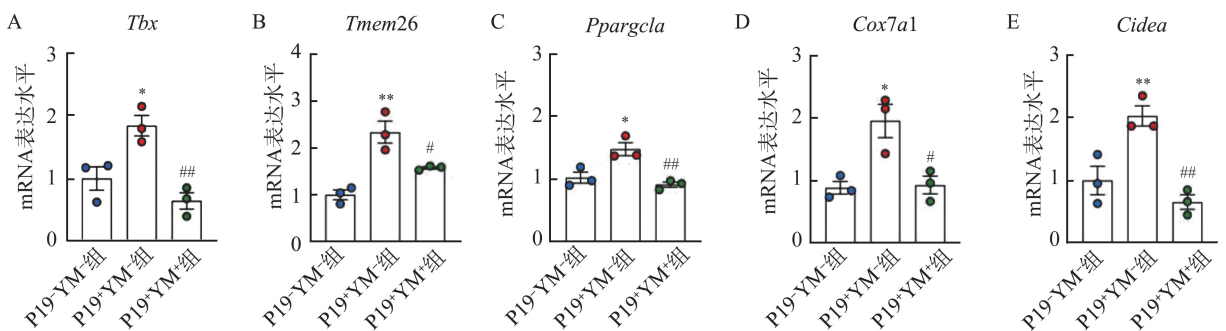


图2 100 nmol/L YM加入50 μ mol/L P19处理的原代米色脂肪细胞,棕色化标志基因*Tbx*(A)、*Tmem26*(B)和产热标志基因*Ppargc1a*(C)、*Cox7a1*(D)和*Cidea*(E)的mRNA表达水平的变化($*P<0.05$, $**P<0.01$ vs $P19^-YM^-$ 组; $#P<0.05$, $##P<0.01$ vs $P19^+YM^-$ 组)

Figure 2 Changes of mRNA expression levels of browning marker genes *Tbx* (A), *Tmem26* (B), and heat production marker genes *Ppargc1a* (C), *Cox7a1* (D), and *Cidea* (E) in primary beige adipocytes treated with 50 μ mol/L P19 after addition of 100 nmol/L YM ($*P<0.05$, $**P<0.01$ vs $P19^-YM^-$ group; $#P<0.05$, $##P<0.01$ vs $P19^+YM^-$ group)

2.5 siRNA 沉默原代米色脂肪细胞 *Gpr56* 基因的表达阻断了 P19 促进棕色化分化

两条 siRNA 联合运用,对 *Gpr56* 基因的沉默效率约为 75%(图 3A)。在沉默 *Gpr56* 基因表达后,siGPR56P19⁺组的棕色化标志基因 *Tbx* [(1.180 ± 0.167) vs (3.536 ± 0.355), $F = 27.260, P < 0.001$]、*Tmem26* [(1.342 ± 0.083) vs (2.344 ± 0.113), $F =$

28.010, $P = 0.002$] 和产热标志基因 *Pparg1a* [(1.314 ± 0.029) vs (2.575 ± 0.105), $F = 84.660, P < 0.001$]、*Cox7a1* [(1.809 ± 0.131) vs (5.498 ± 0.441), $F = 82.700, P < 0.001$]、*Cidea* [(1.180 ± 0.167) vs (3.536 ± 0.355), $F = 27.760, P < 0.001$] mRNA 表达水平明显低于 siConP19⁺组,差异有统计学意义(图 3B~3F)。

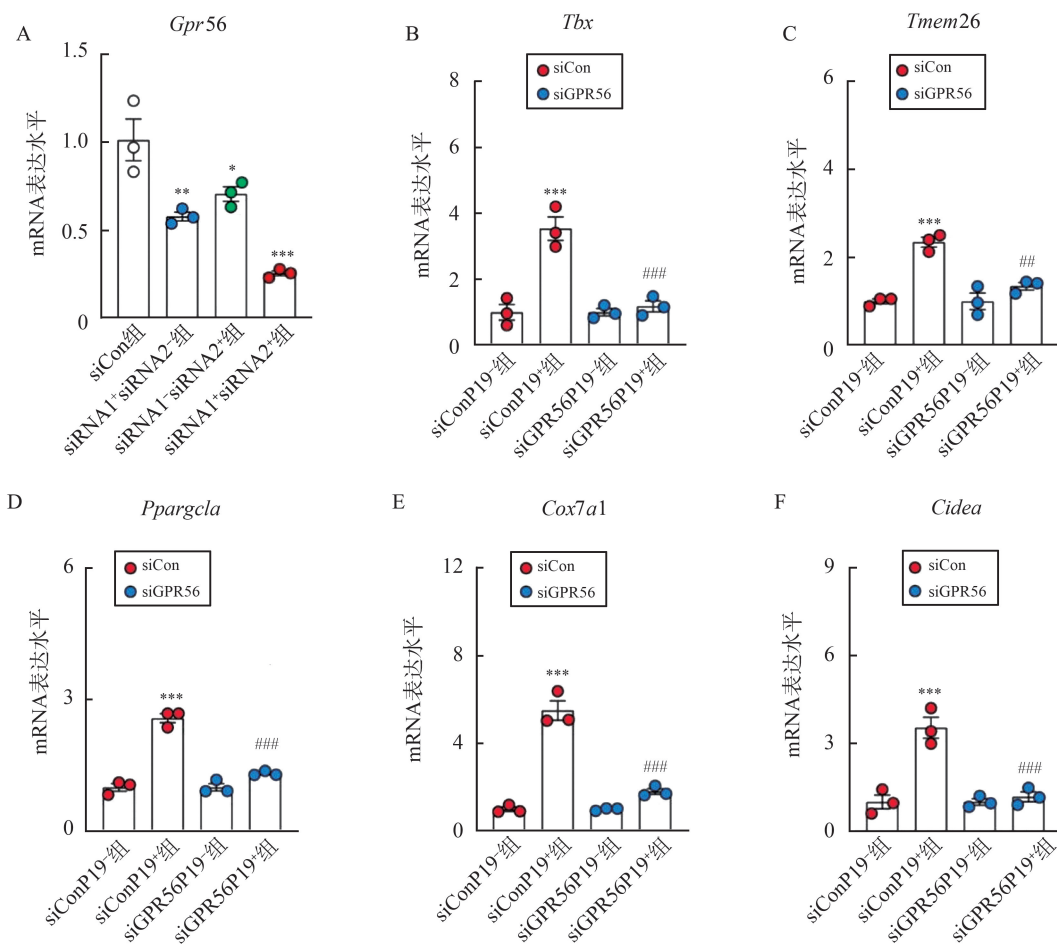


图 3 siRNA 技术沉默 *Gpr56* 基因表达后,P19 刺激下原代米色脂肪细胞棕色化分化标志基因 mRNA 表达水平的变化

A: siRNA-1 和 siRNA-2 单独和联用转染原代米色脂肪细胞后 *Gpr56* mRNA 表达水平。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs siCon 组; B~F: 沉默 *Gpr56* 基因表达后,分化过程中加入 50 $\mu\text{mol/L}$ P19 刺激,原代米色脂肪细胞棕色化标志基因 *Tbx*、*Tmem26* 和产热标志基因 *Pparg1a*、*Cox7a1*、*Cidea* mRNA 表达水平的变化。 $***P < 0.001$ vs siConP19⁻组; $\#P < 0.01$, $###P < 0.001$ vs siConP19⁺组。

Figure 3 The mRNA level of differentiation marker genes under 50 $\mu\text{mol/L}$ P19 stimulation in primary beige adipocytes after silencing GPR56 by siRNA

A: The mRNA level of *Gpr56* after transfection of primary beige adipocytes with siRNA-1 and siRNA-2 alone and in combination. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs siCon group; B-F: Detection of differentiation in mRNA levels of browning marker genes *Tbx*, *Tmem26* and thermogenic genes *Pparg1a*, *Cox7a1* and *Cidea* in primary beige adipocytes after silencing *Gpr56*. $***P < 0.001$ vs siConP19⁻ group; $\#P < 0.01$, $###P < 0.001$ vs siConP19⁺ group.

3 讨论

脂肪组织在生物体中种类繁多且发挥着不同的生物学功能。WAT 是最常见的脂肪组织,具有储能、保暖、缓冲等功能,主要分布在人体腹部、臀部和

大腿等位置,可以将能量转化为三酰甘油储存在脂肪细胞内,当身体需要时释放能量^[23]。BAT 是一种专门用于产热的脂肪组织,其中有大量的线粒体和丰富的血管网络,主要通过氧化脂肪提供热量^[24]。而米色脂肪组织为 WAT 和 BAT 的中间态,既具有 WAT 的储能功能,又同时含有更多的线粒

体,因而能产生更多的热量^[25]。本研究发现 GPR56 在米色脂肪组织中表达水平明显高于 BAT,提示 GPR56 可能参与了米色脂肪组织的某些重要功能。

而 GPR56 作为 aGPCRs 的重要成员,可以被 P19 所激活,这一特性突显了其在细胞信号转导和生理过程中的潜在作用^[10]。与两种天然小分子激动剂 collagen III 和组织转谷氨酰胺酶相比^[26-27],P19 作为 GPR56 体外的 Stachel peptide 合成模拟物,可以结合在 GPR56 受体的正构位点并发挥相应的生物学功能^[28]。相较于 GPR56 的天然小分子激动剂仅能激活裂解的 GPR56,P19 则显示出更广泛的激活作用,既能激活裂解受体,也能激活裂解缺陷受体,这一特性使得 P19 在研究 GPR56 的生物学功能和相关疾病机制中具有重要的价值^[28]。因此,本研究在第二信使水平上,确定了 P19 可以激活米色脂肪组织和原代米色脂肪细胞中 GPR56 下游的 Gq 通路,引起 IP₃ 水平升高,更深入地探究 P19 激活 GPR56 的分子机制。

目前,GPR56 在众多组织中的研究已经取得了显著的进展,其在多种生理和病理过程中的关键作用逐渐被揭示^[11-13]。GPR56 在脂肪组织中的研究也逐渐受到关注^[14]。研究表明,GPR56 与 3T3-L1 前体细胞形成脂肪的过程密切相关,在脂肪形成的过程中,3T3-L1 细胞中 GPR56 的转录本水平显著增加^[15-16]。然而,尽管这一发现为理解脂肪分化的机制提供了新的视角,但相关的调控分子机制仍不明确。而脂肪在生物体中的动态变化与生物体各项生命活动的正常进行密切相关^[29],尤其是米色脂肪向棕色脂肪分化的过程可以促进生物体消耗脂肪产生能量,无论是对生物体体温的维持还是对肥胖的治疗,都具有重要的生物学意义。本研究在诱导原代米色脂肪细胞棕色化分化的过程中加入了 P19 处理,分化周期结束后,检测了分化标志基因的 mRNA 水平,发现棕色化标志基因和产热标志基因的 mRNA 表达水平显著升高,证明 P19 对原代脂肪细胞的分化过程有促进作用。

本研究针对 P19 可以激活 GPR56 的 Gq 通路,进一步对 P19 促进原代米色脂肪细胞棕色化分化的分子机制进行了探究,在诱导分化过程中加入了 Gq 蛋白抑制剂 YM,抑制了 GPR56 下游的 Gq 活性,分化周期结束后检测了分化标志基因的 mRNA 水平,发现 P19 的促分化作用被 YM 反转了,进一步证明 P19 通过激活 GPR56 下游的 Gq 通路促进原代脂肪细胞分化。随后通过基因沉默技术,在原代米色脂肪细胞上沉默了 *Gpr56* 基因的表达,P19 对分化进

程的促进作用消失,说明 P19 作为一种促分化因子,是通过激活 GPR56 的 Gq 通路从而促进米色脂肪细胞棕色化进程。

综上所述,本研究发现,P19 通过激活 GPR56 下游的 Gq 信号通路从而促进米色脂肪组织棕色化分化,这为理解米色脂肪细胞的分化机制提供了新的视角,并可能为未来的肥胖及相关疾病治疗策略提供新的思路。然而,这一过程的详细机制仍需进一步探讨。此外,尽管本研究中观察到了 P19 对米色脂肪细胞分化的促进作用,但其在体内的效果和安全性仍需进行验证。

参考文献:

- [1] Guo L, Zhang Y, Fang G, et al. Ligand recognition and G protein coupling of the human itch receptor MRGPRX1 [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 5004. doi: 10.1038/s41467-023-40705-z.
- [2] Yang F, Guo L, Li Y, et al. Structure, function and pharmacology of human itch receptor complexes [J]. *Nature*, 2021, 600(7887): 164-169.
- [3] Zhang DL, Sun YJ, Ma ML, et al. Gq activity- and beta-arrestin-1 scaffolding-mediated ADGRG2/CFTR coupling are required for male fertility [J]. *Elife*, 2018, 7: e33432. doi: 10.7554/eLife.33432.
- [4] Ping YQ, Xiao P, Yang F, et al. Structural basis for the tethered peptide activation of adhesion GPCRs [J]. *Nature*, 2022, 604(7907): 763-770.
- [5] Ping YQ, Mao C, Xiao P, et al. Structures of the glucocorticoid-bound adhesion receptor GPR97-G_o complex [J]. *Nature*, 2021, 589(7843): 620-626.
- [6] Arac D, Boucard AA, Bolliger MF, et al. A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis [J]. *EMBO J*, 2012, 31(6): 1364-1378.
- [7] Liebscher I, Schon J, Peterson SC, et al. A tethered agonist within the ectodomain activates the adhesion G protein-coupled receptors GPR126 and GPR133 [J]. *Cell Rep*, 2014, 9(6): 2018-2026.
- [8] Stoveken HM, Hajduczuk AG, Xu L, et al. Adhesion G protein-coupled receptors are activated by exposure of a cryptic tethered agonist [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(19): 6194-6199.
- [9] Sun Y, Zhang D, Ma ML, et al. Optimization of a peptide ligand for the adhesion GPCR ADGRG2 provides a potent tool to explore receptor biology [J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100174. doi: 10.1074/jbc.RA120.014726.
- [10] 平玉奇. 黏附类 G 蛋白偶联受体内源性配体识别及激活机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2022.

- [11] Singh AK, Lin HH. The role of GPR56/ADGRG1 in health and disease[J]. *Biomed J*, 2021, 44(5): 534-547.
- [12] Huang KY, Lin HH. The activation and signaling mechanisms of GPR56/ADGRG1 in melanoma cell[J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 304. doi: 10.3389/fonc.2018.00304.
- [13] 马传顺,林慧,孙金鹏,等. GPCR-G 蛋白融合传感器检测 GPCR 与 G 蛋白相互作用的灵敏度[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2022, 60(9): 85-90.
MA Chuanshun, LIN Hui, SUN Jinpeng, et al. Sensitivity of GPCR-G protein fusion sensor to detect the interaction between GPCR and G protein[J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2022, 60(9): 85-90.
- [14] Wanjalla CN, McDonnell WJ, Barnett L, et al. Adipose tissue in persons with HIV is enriched for CD4(+) T effector memory and T effector memory RA(+) cells, which show higher CD69 expression and CD57, CX3CR1, GPR56 co-expression with increasing glucose intolerance[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 408. doi: 10.3389/fimmu.2019.00408.
- [15] Al Hasan M, Roy P, Dolan S, et al. Adhesion G-protein coupled receptor 56 is required for 3T3-L1 adipogenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2): 1601-1614.
- [16] Al Hasan M, Martin PE, Shu X, et al. Type III collagen is required for adipogenesis and actin stress fibre formation in 3T3-L1 preadipocytes[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 156. doi: 10.3390/biom11020156.
- [17] 赵伶俐,刘健,蔡皓,等. L-乳酸促进皮下脂肪细胞棕脂分化和产热[J]. *合肥工业大学学报(自然科学版)*, 2023, 46(10): 1409-1414.
ZHAO Lingli, LIU Jian, CAI Hao, et al. L-lactate promotes subcutaneous adipocyte browning and thermogenesis[J]. *Journal of Hefei University of Technology (Natural Science)*, 2023, 46(10): 1409-1414.
- [18] Kou Y, Liu Q, Liu W, et al. LIGHT/TNFSF14 signaling attenuates beige fat biogenesis[J]. *FASEB J*, 2019, 33(2): 1595-1604.
- [19] Miao Y, Qin H, Zhong Y, et al. Novel adipokine asprosin modulates browning and adipogenesis in white adipose tissue[J]. *J Endocrinol*, 2021, 249(2): 83-93.
- [20] Umemori H, Inoue T, Kume S, et al. Activation of the G protein Gq/11 through tyrosine phosphorylation of the alpha subunit[J]. *Science*, 1997, 276(5320): 1878-1881.
- [21] Wang Q, Li D, Cao G, et al. IL-27 signalling promotes adipocyte thermogenesis and energy expenditure[J]. *Nature*, 2021, 600(7888): 314-318.
- [22] Chaurasia B, Kaddai VA, Lancaster GI, et al. Adipocyte ceramides regulate subcutaneous adipose browning, inflammation, and metabolism[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(6): 820-834.
- [23] Santillana N, Astudillo-Guerrero C, D'Espessailles A, et al. White adipose tissue dysfunction: pathophysiology and emergent measurements[J]. *Nutrients*, 2023, 15(7): 1722. doi: 10.3390/nu15071722.
- [24] Wibmer AG, Becher T, Eljalby M, et al. Brown adipose tissue is associated with healthier body fat distribution and metabolic benefits independent of regional adiposity[J]. *Cell Rep Med*, 2021, 2(7): 100332. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100332.
- [25] Adachi Y, Ueda K, Nomura S, et al. Beiging of perivascular adipose tissue regulates its inflammation and vascular remodeling[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5117. doi: 10.1038/s41467-022-32658-6.
- [26] Xu L, Begum S, Hearn JD, et al. GPR56, an atypical G protein-coupled receptor, binds tissue transglutaminase, TG2, and inhibits melanoma tumor growth and metastasis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(24): 9023-9028.
- [27] Luo R, Jeong SJ, Jin Z, et al. G protein-coupled receptor 56 and collagen III, a receptor-ligand pair, regulates cortical development and lamination[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(31): 12925-12930.
- [28] Zhu B, Luo R, Jin P, et al. GAIN domain-mediated cleavage is required for activation of G protein-coupled receptor 56 (GPR56) by its natural ligands and a small-molecule agonist[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(50): 19246-19254.
- [29] Sakers A, De Siqueira MK, Seale P, et al. Adipose-tissue plasticity in health and disease[J]. *Cell*, 2022, 185(3): 419-446.

(编辑:相峰)