

Nutlin-3a 通过抑制 CIDEA 的表达调控小鼠脂肪功能

陈恩惠^{1,2}, 杨佳卉³, 赵微², 解相宏², 郭艳芳², 刘晓军², 闫莉^{1*}

中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 1. 病理生理学系;
2. 重大疾病共性机制研究全国重点实验室, 北京 100005;
3. 山西医科大学 基础医学院 微生物学与免疫学教研室, 山西 太原 030001

摘要:目的 探讨小鼠双微体同源基因 2 (*MDM2*) 抑制剂 Nutlin-3a 对小鼠脂肪脂代谢功能的影响。方法 建立 C57BL/6J 小鼠高脂饮食诱导肥胖 (DIO) 模型, 随机分为对照组; 腹腔注射 DMSO, 实验组; 腹腔注射顺式咪唑啉类类似物 3a (Nutlin-3a)。实验期间进行葡萄糖耐量 (GTT) 以及胰岛素耐量 (ITT) 实验。实验结束后, 分离小鼠附睾脂肪组织 (eWAT)、皮下脂肪组织 (iWAT) 与棕色脂肪组织 (BAT), 对白色脂肪组织进行苏木精-伊红 (HE) 染色, 观察脂肪细胞形态变化; RT-qPCR 和 Western blot 检测 eWAT 中脂代谢相关基因表达。结果 与对照组相比, 给予小鼠 Nutlin-3a 处理, 增加 DIO 小鼠的体质量 ($P < 0.001$); 对葡萄糖耐量和胰岛素敏感性没有影响; 脂肪细胞体积减小; 下调白色脂肪中脂滴结合蛋白诱导细胞凋亡 DFF45 样效应因子 C (CIDEA) 的表达。结论 Nutlin-3a 通过下调白色脂肪组织中 CIDEA 的表达抑制脂滴的形成。

关键词: Nutlin-3a; 脂肪代谢; 脂肪组织; 诱导细胞凋亡 DFF45 样效应因子 C (CIDEA)

中图分类号: R339.6 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2024.02.0154

Nutlin-3a regulates mouse adipose function by inhibition of CIDEA expression

CHEN Enhui^{1,2}, YANG Jiahui³, ZHAO Wei², XIE Xianghong², GUO Yanfang², LIU Xiaojun², YAN Li^{1*}

1. Department of Pathophysiology; 2. State Key Laboratory of Common Mechanism Research for Major Diseases, Institute of Basic Medical Sciences CAMS, School of Basic Medicine PUMC, Beijing 100005;

3. Department of Microbiology and Immunology, Basic Medicine College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Nutlin-3a, a mouse double minute 2 homolog (*MDM2*) inhibitor, on lipid metabolism of mouse adipose. **Methods** High-fat diet-induced obesity (DIO) C57BL/6J mice were randomly divided into a control group injected with DMSO and an experimental group injected with Nutlin-3a. Then we conducted glucose tolerance (GTT) and insulin tolerance (ITT) tests. The epididymal white adipose tissue (eWAT), inguinal white adipose tissue (iWAT) and brown adipose tissue (BAT) of animals were isolated and microscopy of WATs with hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe the morphological changes

收稿日期: 2023-09-23 修回日期: 2023-11-27

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFC2504002, 2022YFC2504003); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (CIFMS2021-I2M-1-016)

* 通信作者 (corresponding author): yanli@ibms.pumc.edu.cn

of adipocytes. The expression of lipid metabolism related gene cell death-inducing DFF45-like effector C (*CIDEc*) in eWAT were detected by qPCR and Western blot. **Results** Compared with the control group, Nutlin-3a was found to promote the body weight ($P < 0.001$), but no effect on glucose tolerance and insulin sensitivity in DIO mice. Nutlin-3a treatment decreased the size of adipocytes and fat deposition in adipose tissue and downregulated the mRNA and protein levels of *CIDEc* in eWAT. **Conclusions** Nutlin-3a inhibits the formation of lipid droplets by downregulating expression of *CIDEc* in white adipose tissue.

Key words: Nutlin-3a; fat metabolism; adipose tissue; *CIDEc*

脂肪组织调节机体内能量平衡与稳态^[1],当机体热量摄入超过消耗时,这种平衡被打破,往往会造成脂肪细胞肥大以及内脏脂肪组织的堆积^[2],从而造成肥胖,以致于引起一系列代谢相关疾病的发生,如糖尿病,动脉粥样硬化等^[3]。脂滴也称为脂质体,广泛分布于脂肪细胞中,主要的作用为储存脂类^[4],脂滴的一系列变化与肥胖引起的代谢性疾病密切相关^[5]。有研究表明,细胞死亡诱导 DFFA 样效应子 c (cell death-inducing DFF45-like effector C, *CIDEc*) 在脂肪组织中高表达^[6],且其定位于脂滴表面^[7],参与脂肪细胞能量代谢。在之前的研究证明了小鼠双微体同源基因 2 (murine double minute 2, *MDM2*) 与肥胖有关^[8-9],顺式咪唑啉类似物 3a (Nutlin-3a) 作为 *MDM2* 的抑制剂,已被证明是有效的抗癌剂^[10],然而 Nutlin-3a 在脂肪代谢中的作用及调节机制目前报道较少。

1 材料与方法

1.1 材料

动物:SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠(中国医学科学院基础医学研究所实验动物中心)。

主要试剂:葡萄糖粉末(Thermo 公司);胰岛素溶液(上海碧云天生物技术有限公司);高脂饲料(Research Diets 公司);RIPA 裂解液,PMSF(碧云天生物技术有限公司);蛋白酶抑制剂 Cocktail (Aqlabtech 公司);Tris,SDS,甘氨酸(AMRESCO 公司);Trizol (Invitrogen 公司);NovoScript Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix(近岸蛋白公司);Hieff UNICON Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix (Yeasen Biotechnology 公司);*CIDEc* 抗体 (Abclonal 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠的分组及给药:将 C57 小鼠随机分为对

照组和实验组,每组 6 只,对照组腹腔注射 DMSO,实验组腹腔注射 Nutlin-3a (10 $\mu\text{g/g}$) 每 2 天注射 1 次,使用电子秤进行小鼠体质量的称量并记录。

1.2.2 小鼠葡萄糖耐量实验与胰岛素敏感性实验:于实验当天上午将小鼠换入干净的笼子并禁食 6~8 h;禁食完成后,用血糖仪测定空腹初始血糖值,小鼠适应 30 min 之后,按 0.01 mL/g 给小鼠腹腔注射葡萄糖或胰岛素溶液。从注射完毕起开始计时,分别在第 15、30、60、90 和 120 min 测定每只小鼠的血糖值。

1.2.3 Western blot 检测 *CIDEc* 蛋白:在取材时所冻存的组织中加入配制好的蛋白裂解液 RIPA (含蛋白酶抑制剂 cocktail 和 PMSF),冰上匀浆后,4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 15 min,取蛋白上清到 1.5 mL 离心管中,加入 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混匀后金属浴 100 $^{\circ}\text{C}$, 10 min,冷却后开始上样,进行电泳,浓缩胶 70 V, 30 min,分离胶 100 V, 1 h;使用湿转法恒流 300 mA 进行转膜,完毕后使用 5% 的脱脂奶粉 (TBST 配制) 进行封闭 1 h;一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育后,在室温下用 TBST 洗膜 (100 r/min, 10 min/次,共 3 次),用相应的二抗在室温下旋转孵育 1 h 并再次洗膜,将 eECL-A 和 eECL-B 按照 1:1 的比例等体积混合,配制为化学发光检测底物工作液,使用天能化学发光仪进行曝光。

1.2.4 RT-qPCR 检测 *CIDEc* mRNA:将取材时所冻存的组织使用 Trizol 试剂提取脂肪组织总 RNA,并定量 2 μg 将其反转录为 cDNA,并使用 PCR 仪进行扩增,PCR 程序为:50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录反应 15 min, 75 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应 5 min;定量取 0.5 μL 的 cDNA 模板,并与 qPCR SYBR Green Master Mix 以及上下游引物,配制成 20 μL 的反应体系,在 PCR 仪上完成扩增及实时荧光定量检测,最终结果以相对定量

($2^{-\Delta\Delta C_q}$ 法)进行计算,得到目的基因相对于内参的相对表达水平。引物序列如下: β -actin 上游引物:5'-CCAGCCTTCCTTCTTGGGTAT-3',下游引物:5'-TGCTGGAAGGTGGACAGTGAG-3';鼠 *Cidec* 上游引物:5'-GTGTCCACTTGTGCCGTCTT-3',下游引物:5'-CTCGCTTGTTGTCTTGATT-3'; PCR 程序为:95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 10 sec,60 °C 退火/延伸 30 sec,循环 40 次。

1.3 统计学分析

均采用 GraphPad Prism8.0 软件来进行作图与统计学分析,所有数据结果均用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较均采用 *t* 检验。

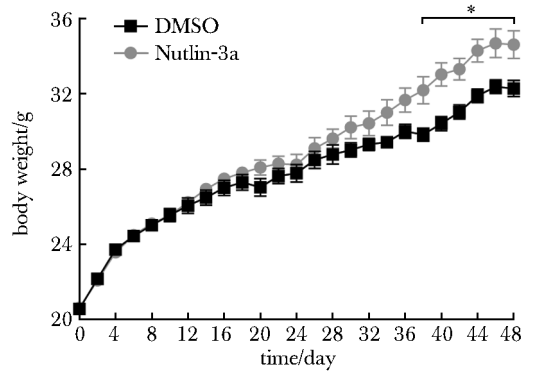
2 结果

2.1 Nutlin-3a 增加高脂饮食所诱导的肥胖

腹腔注射 Nutlin-3a 的高脂饮食小鼠,在 38 d 后,较对照组体质量有显著增加($P<0.001$)(图 1)。

2.2 Nutlin-3a 对小鼠葡萄糖耐量和胰岛素敏感性没有影响

在葡萄糖耐量和胰岛素敏感性实验中,小鼠注



* $P<0.001$ compared with DMSO group.

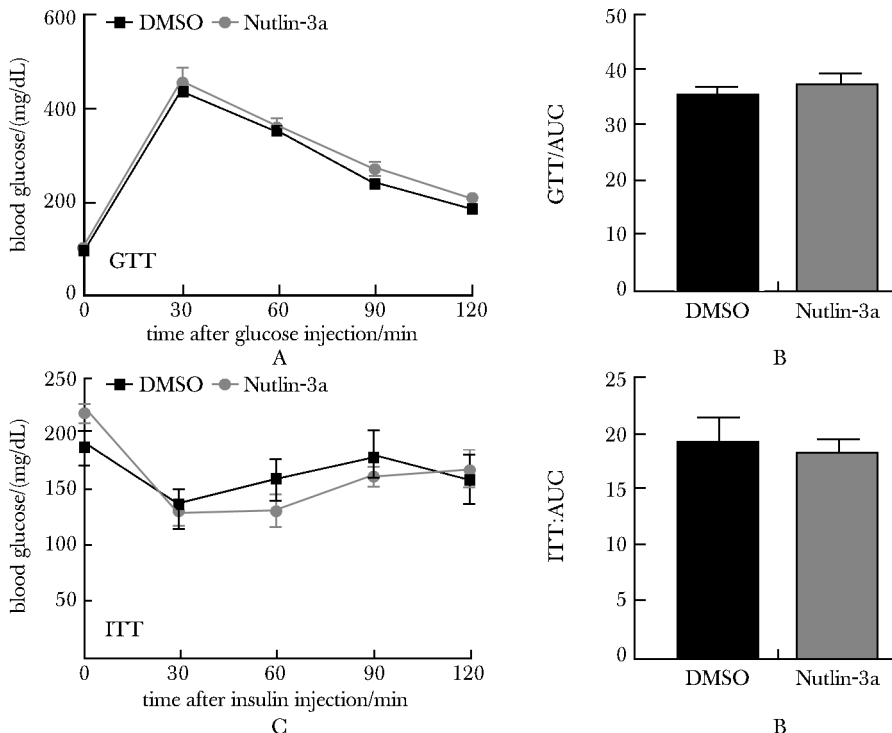
图 1 Nutlin-3a 促进高脂饮食小鼠体质量增加

Fig 1 Nutlin-3a promoted weight gain in high fat diet mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

射葡萄糖或胰岛素后,Nutlin-3a 组小鼠每个时间点的血糖和曲线下面积(area under the curve, AUC)较对照组均没有统计显著性差异(图 2)。

2.3 Nutlin-3a 诱导小鼠白色脂肪组织的质量无明显变化

高脂饮食诱导肥胖(diet-induced obesity, DIO)小鼠在 Nutlin-3a 处理 48 d 后,其肝脏质量没有变化,附

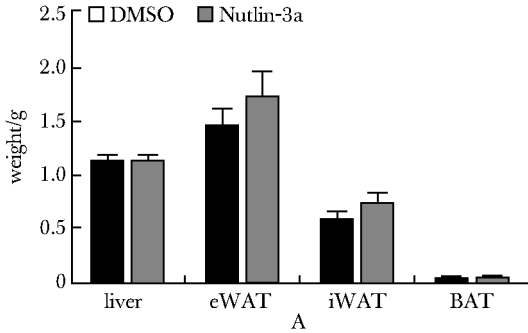


GTT. glucose tolerance test; AUC. area under the curve; IIT. insulin tolerance test. A. GTT in mice; B. AUC in GTT; C. IIT in mice; D. AUC in IIT.

图 2 Nutlin-3a 对小鼠葡萄糖耐量和胰岛素敏感性没有影响

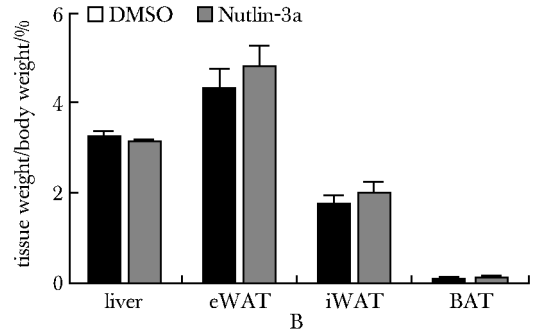
Fig 2 Nutlin-3a had no effect on glucose tolerance and insulin sensitivity in mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

辜白色脂肪组织 (epididymal white adipose tissue, eWAT) 与皮下白色脂肪组织 (inguinal white adipose tissue, iWAT) 的质量与占比无明显增加; 二者棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT) 无明显变化 (图 3)。



2.4 Nutlin-3a 减少了白色脂肪脂滴的形成

H&E 结果显示, Nutlin-3a 处理后白色脂肪组织的脂肪细胞体积明显变小, 且细胞数量明显增多 (图 4)。



eWAT. epigonadal white adipose tissue; iWAT. inguinal WAT; BAT. brown adipose tissue; A. liver, white and brown fat weights in mice; B. tissue/body weight ratio.

图 3 Nutlin-3 对小鼠脂肪组织质量无明显影响

Fig 3 Nutlin-3a had no effect on adipose tissue weight in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

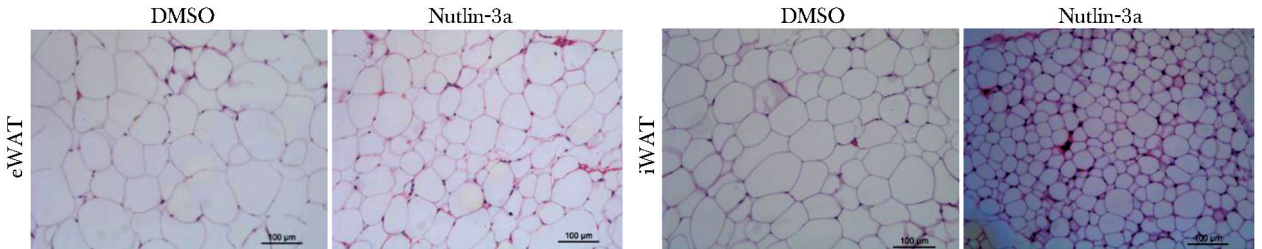


图 4 白色脂肪组织 HE 染色

Fig 4 HE staining of white adipose tissue

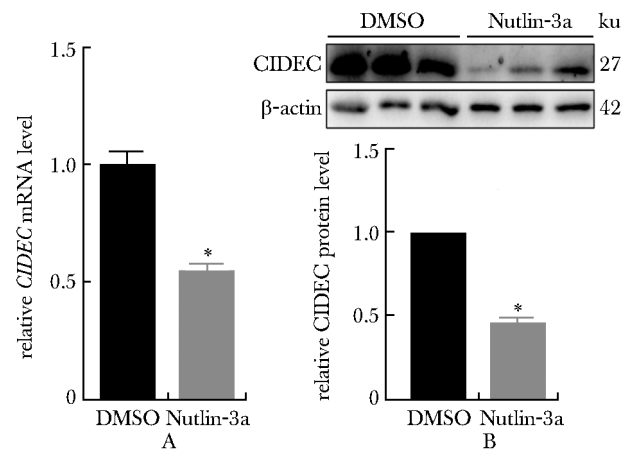
2.5 Nutlin-3a 抑制白色脂肪组织中 CIDEc 的表达

与对照小鼠相比, Nutlin-3a 组小鼠 eWAT 中诱导 CIDEc mRNA 和蛋白质的表达水平明显降低 ($P < 0.001$) (图 5)。

3 讨论

维持脂肪组织的功能正常对于平衡机体能量代谢是极其重要的。在正常情况下, 脂肪组织除了储存能量以外, 还可承担如调节体温、代谢、内分泌、免疫等多项生命功能, 保持机体稳态。长期慢性高脂饮食可诱导脂肪细胞中三酰甘油过多积累诱发脂代谢紊乱最终导致肥胖, 严重危害身体健康。

Nutlin-3a 是 Nutlin-3 的活性异构体, 是一种 MDM2 抑制剂。有研究表明 MDM2 的表达与营养



A. Nutlin-3a decreased CIDEc mRNA expression in eWAT; B. Nutlin-3a decreased CIDEc protein expression in eWAT; $*P < 0.001$ compared with DMSO group.

图 5 Nutlin-3a 抑制 eWAT 中 CIDEc 的表达

Fig 5 Nutlin-3a inhibited CIDEc expression in eWAT ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

状态相关,脂肪特异性过表达 *MDM2* 可加重高脂饮食诱导的脂肪组织功能紊乱^[9]。Nutlin-3a 可通过抑制 *MDM2* 和 p53 的相互作用稳定 p53 蛋白,因此可用来诱导细胞周期停滞和细胞凋亡。本研究利用高脂饮食诱导小鼠肥胖(DIO),同时腹腔注射 Nutlin-3a,与对照组相比,实验组小鼠的体质量在38 d后出现显著增加。肝质量在两组间无统计学差异,eWAT 和 iWAT 的质量与对照组相比,有增加的趋势但是无统计学差异,这可能需后续研究增加小鼠样本量进一步确定是否存在统计差异。同时病理切片结果显示,与对照组相比,实验组的脂肪细胞体积明显减小,细胞数量增加,表明 *MDM2* 抑制剂 Nutlin-3a 可能影响机体的白色脂肪组织功能。CIDE 家族蛋白是一类脂滴结合蛋白,包括 CIDEA, CIDEB 与 CIDE C,定位于脂滴表面,是维持脂质代谢稳态的重要调节因子^[11]。CIDE C 特异性表达于白色脂肪组织和棕色脂肪组织中,

主要功能是抑制脂质分解,促进细胞内脂质积累和单室脂滴形成。有研究表明,CIDE C 缺陷会显著减少 WAT 中的脂质储存,增加能量消耗^[12]。本研究中,小鼠腹腔注射 Nutlin-3a 导致 eWAT 中 CIDE C 的基因和蛋白水平表达下调,表明 Nutlin-3a 改善了饮食诱导的白色脂肪组织的脂滴增加。与对照组相比,实验组小鼠体质量增加但白色脂肪组织中细胞体积减小,脂滴含量减少,这是否提示发生脂肪重新分布和异位脂肪沉积,有待于进一步研究。同时脂肪细胞数量增加,这可能是机体为了维持脂肪高代谢率产生负反馈调控的结果。

综上所述,*MDM2* 抑制剂 Nutlin-3a 通过减少白色脂肪组织中 CIDE C 的表达来减少饮食诱导的脂滴增加,改善白色脂肪组织功能。本研究为 *MDM2* 抑制剂 Nutlin-3a 有可能在未来预防饮食诱导的肥胖症提供新思路。

参考文献:

- [1] Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance[J]. *Cell*, 2001, 104: 531-543.
- [2] Bays HE, Gonzalez-Campoy JM, Bray GA, *et al.* Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity[J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2008, 6: 343-368.
- [3] Tchkonina T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, *et al.* Fat tissue, aging, and cellular senescence [J]. *Aging Cell*, 2010, 9: 667-684.
- [4] Barbosa AD, Siniouoglou S. Function of lipid droplet-organelle interactions in lipid homeostasis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2017, 1864: 1459-1468.
- [5] Kohlwein SD, Veenhuis M, van der Klei IJ. Lipid droplets and peroxisomes; key players in cellular lipid homeostasis or a matter of fat--store 'em up or burn' em down[J]. *Genetics*, 2013, 193: 1-50.
- [6] Puri V, Konda S, Ranjit S, *et al.* Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 34213-34218.
- [7] Liang L, Zhao M, Xu Z, *et al.* Molecular cloning and characterization of CIDE-3, a novel member of the cell-death-inducing DNA-fragmentation-factor (DFF45)-like effector family[J]. *Biochem J*, 2003, 370: 195-203.
- [8] Liu Z, Jin L, Yang JK, *et al.* The dysfunctional *MDM2*-p53 axis in adipocytes contributes to aging-related metabolic complications by induction of lipodystrophy[J]. *Diabetes*, 2018, 67: 2397-2409.
- [9] Zhao W, Xu Q, Yang J, *et al.* Murine double minute 2 aggravates adipose tissue dysfunction through ubiquitin-mediated six-transmembrane epithelial antigen of prostate 4 degradation[J]. *iScience*, 2022, 25: 104544. doi: 10.1016/j.isci.2022.104544.
- [10] Lee J, An S, Choi YM, *et al.* TRIAD1 is a novel transcriptional target of p53 and regulates Nutlin-3a-induced cell death[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118: 1733-1740.
- [11] Gao G, Chen FJ, Zhou L, *et al.* Control of lipid droplet fusion and growth by CIDE family proteins[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862: 1197-1204.
- [12] Toh SY, Gong J, Du G, *et al.* Up-regulation of mitochondrial activity and acquirement of brown adipose tissue-like property in the white adipose tissue of fsp27 deficient mice [J]. *PLoS One*, 2008, 3: e2890. doi:10.1371/journal.pone.0002890.