

RNAi 介导的 SOCS3 基因沉默对高脂肥胖大鼠瘦素抵抗的影响

张 旭 刘正娟 翟 娜 吴 鸣 滕懿群 陈俊国 骆秋龙 陆 燕

摘 要 **目的** 研究 RNA 干扰(RNAi)介导的细胞因子信号转导抑制因子 3(SOCS3)基因沉默对高脂肥胖大鼠瘦素抵抗的影响。**方法** 选用 5 周的 SD 大鼠 60 只,随机分为 3 组,实验组:下丘脑注射 SOCS3 基因 RNA 干扰慢病毒(LV-shSOCS3),高脂饲料喂养;阴性组:下丘脑注射阴性序列慢病毒(LV-negative),高脂饲料喂养;对照组:下丘脑注射生理盐水,高脂饲料喂养。饲养 8 周末,检测血总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇,放射免疫法检测血清瘦素,利用荧光实时定量 PCR(real-time PCR)技术检测各组下丘脑内 SOCS3 和瘦素受体(OB-Rb)的 mRNA 表达水平。**结果** 实验组体重、瘦素、三酰甘油、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇低于阴性组和对照组($P < 0.05$)。实验组下丘脑的 SOCS3 mRNA 水平低于阴性组和对照组($P < 0.05$)。实验组下丘脑的 OB-Rb mRNA 水平高于阴性组和对照组($P < 0.05$)。而阴性组和对照组比较无差异($P > 0.05$)。**结论** 下调 SOCS3 基因可以减轻高脂肥胖大鼠瘦素抵抗,对肥胖症可能有预防和治疗作用。

关键词 肥胖 RNA 干扰 瘦素抵抗 瘦素受体 细胞因子信号转导抑制因子 3

Effects of RNAi-mediated SOCS3 Gene Silence on Leptin Resistance in Obese Rats Fed with High-fat Diet. Zhang Xu, Liu Zhengjuan, Zhai Na, Wu Ming, Teng Yiqun, Chen Junguo, Luo Qiulong, Lu Yan. Department of Pediatric, The Second Hospital of Jiaxing Municipal, Zhejiang 314000, China

Abstract **Objective** To study the effects of RNAi-mediated SOCS3 gene silence on leptin resistance in obese rats fed with high-fat diet. **Methods** Sixty five-week-old healthy male SD rats were divided into three groups randomly. In experiment group, the lentiviral vector expressing a short-hairpin RNA targeting SOCS3 gene(LV-shSOCS3) were stereotactically injected into the hypothalamus of rats which then fed with high-fat diet. In the negative group, the lentiviral vector expressing a short-hairpin RNA targeting an unrelated sequence(LV-negative) were stereotactically injected into the hypothalamus of rats which then fed with high-fat diet; In the control group, the normal sodium were stereotactically injected into the hypothalamus of rats which then fed with high-fat diet. At the end of 8 weeks, serum lipid levels including total cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein cholesterol and low density lipoprotein cholesterol were determined. Serum leptin levels were measured by radioimmunoassay. Real-time PCR were used to evaluate the level of SOCS3 mRNA and OB-Rb mRNA in the hypothalamus. **Results** The body weight of rats was decreased significantly in experiment group ($P < 0.05$). The concentrations of serum leptin, triglyceride, total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in experiment group were decreased obviously compared with control group and negative group ($P < 0.05$). The expression of SOCS3 mRNA in experiment group were decreased markedly compared with control group and negative group ($P < 0.05$). The expression of OB-Rb mRNA in experiment group were increased markedly compared with control group and negative group ($P < 0.05$). There were no significant differences in control group and negative group ($P > 0.05$). **Conclusion** The down-regulated expression of SOCS3 gene reduces leptin resistance in obese rats fed high-fat diet.

Key words Obesity; RNAi; Leptin resistance; OB-Rb; SOCS3

肥胖症是糖尿病、高血压、冠心病等疾病的主

要危险因素,严重威胁人类健康。瘦素抵抗是肥胖症发病的机制之一^[1]。SOCS3(suppressors of cytokine signaling 3)基因的过度表达可导致瘦素抵抗,在肥胖症的发病过程中起重要作用^[2-4]。本实验观察抑制 SOCS3 基因表达对高脂肥胖大鼠瘦素抵抗的影响。

材料与方法

1. 主要材料: LV-shSOCS3, LV-negative, 病毒效价为 1.0

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30771798);辽宁省自然科学基金资助项目(20072165)

作者单位:314000 浙江省嘉兴市第二医院儿科(张旭、吴鸣、滕懿群、陈俊国、骆秋龙、陆燕);116027 大连医科大学附属第二医院儿科(刘正娟);110041 沈阳市第一人民医院心内科(翟娜)

通讯作者:刘正娟,电子信箱:liuzj-1963@yahoo.com.cn

×10¹⁰TU/L,由本课题组前期构建。SD 大鼠 60 只健康,雌性,5 周龄体重 100~130g,由大连医科大学实验动物中心提供。ABI7500 全自动荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);大鼠中枢立体定位仪(成都泰盟科技有限公司);Trizol 试剂(Invitrogen 公司)。瘦素放射免疫试剂盒(中国人民解放军总医院科技开发中心)。

2. 方法:(1)实验动物分组:选用 5 周龄的健康雄性 SD 大鼠 60 只,体重 100~130g,随机分为 3 组,每组 20 只:①实验组:下丘脑注射 LV-shSOCS3,高脂饲料喂养;②阴性组:下丘脑注射 LV-negative,高脂饲料喂养;③对照组:下丘脑注射生理盐水,高脂饲料喂养。(2)动物模型的制作:大鼠禁食 12h 后用 10% 水合氯醛(3.5ml/kg)腹腔内注射麻醉,固定于中枢立体定位仪上。头部去除毛发,消毒,沿中线做 1.5cm 的切口,暴露颅骨,刮净骨膜,显露前囟,按照 SD 大鼠脑立体定位图谱,于前囟后 2.8mm,矢状缝右侧 0.4mm 处用骨钻钻一直径约 1mm 的骨孔,以小号针头刺破硬脑膜,5μl 微量注射器针头垂直插入颅骨表面下 9.5mm(下丘脑弓状核处)注射 2μl LV-shSOCS3(或 LV-negative 或生理盐水),速度 0.4μl/min,注射完毕后休息 5min,以 1mm/min 的速度退针。手术后缝合伤口,局部抗感染。所有动物均两只一笼喂养,予以高脂饲料(脂肪 66%,糖类 25%,蛋白质 9%),共喂养 8 周,期间自由饮水,不限饲料量,每周称重 1 次。其间有部分大鼠因打药不慎死亡,数据剔除。(3)标本收集与保存:大鼠喂养 8 周末,自由饮水,禁食 12h 后用 10% 水合氯醛(3.5ml/kg)腹腔内注射,麻醉成功后开胸心脏取血约 5ml,3000r/min 离心 10min,分离血清待检,同时迅速取出下丘脑,取一小块行冷冻切片,在荧光显微镜下观察注射位置是否在下丘脑,其余部分置于液氮中保存。(4)血脂和瘦素检测:血标本全部采集后,采用酶显色法检测血脂(血总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白胆固醇、低

密度脂蛋白胆固醇)浓度。利用放射免疫法检测血清瘦素水平。(5)荧光实时定量 PCR 检测下丘脑内瘦素受体(OB-Rb)、SOCS3mRNA 表达水平的测定:用 Trizol 提取下丘脑组织总 RNA。以等量 RNA 为起始模板,反转录合成 cDNA。SOCS3 上、下游引物:5'-ACCAGCGCCACTTCT TCACG-3',5'-GTGGAGCATCATACTGATCC-3',OB-Rb 上、下游引物:5'-AGAATTGTTCTCTGGGCACAAG-3',5'-ACACTCATCCT-CACAGGTTCC-3',内参 β-actin 上、下游引物 5'-CCTC-TATGCCAACACAGTGC-3',5'-GTACTCCTGCTTGCTGATCC-3'。在 ABI7500 全自动荧光定量 PCR 仪上进行 PCR,反应条件 SOCS3 为 95℃ 预变性 5min;95℃ 10s;57℃ 15s,72℃ 20s,共 35 个循环。OB-Rb 为 94℃ 预变性 3min;94℃ 30s;57℃ 30s;72℃ 30s,共 35 个循环。

3. 统计学方法:所得数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验进行两组间差异比较,利用 SPSS 15.0 进行统计分析,P<0.05 被认为组间差异有统计学意义。

结 果

1. 下丘脑注射慢病毒结果:高脂喂养 8 周后,剔除因下丘脑注射不慎死亡的大鼠,成模大鼠 45 只。荧光显微镜下观察到所有被注射 LV-shSOCS3 和 LV-negative 大鼠的下丘脑均有绿色荧光蛋白表达,说明注射位置正确;注射生理盐水的大鼠下丘脑未见有荧光蛋白表达。

2. 经 RNA 干扰后大鼠体重的变化:注射前,各组大鼠体重无明显差异。注射后予以高脂饲料喂养,实验组体重增长低于其他两组,喂养 8 周末,实验组平均体重明显低于其他两组(P<0.05),而阴性组和对照组之间无明显差异(P>0.05),详见表 1。

表 1 各组大鼠体重比较($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	0 周	2 周	4 周	6 周	8 周
对照组	111.33 ± 9.50	224.46 ± 18.92	323.93 ± 22.97	400.60 ± 23.99	450.87 ± 23.83
阴性组	112.93 ± 9.87 ^c	221.80 ± 22.06 ^c	316.07 ± 22.60 ^c	395.67 ± 21.98 ^c	443.80 ± 15.79
实验组	109.33 ± 10.70 ^{de}	186.66 ± 22.59 ^{ab}	251.27 ± 25.94 ^{ab}	295.60 ± 27.09 ^{ab}	337.40 ± 28.83 ^{ab}

与对照组比较,^aP<0.05,^cP>0.05,^dP>0.05;与阴性组比较,^bP<0.05,^eP>0.05

3. 血清瘦素、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的变化:实验组瘦素、TG、TC、LDL-C 均明显低于其他两组(P<0.05),对照组和阴性组之间

无明显差异(P>0.05);实验组 HDL-C 明显高于其他两组(P<0.05),对照组和阴性组之间无显著差异(P>0.05),详见表 2。

表 2 各组大鼠瘦素和血脂的比较($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	瘦素(ng/ml)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)
对照组	1.22 ± 0.30	0.64 ± 0.17	1.39 ± 0.25	1.27 ± 0.16	0.77 ± 0.12
阴性组	1.11 ± 0.13 ^c	0.65 ± 0.27 ^c	1.42 ± 0.28 ^c	1.29 ± 0.19 ^c	0.75 ± 0.16 ^c
实验组	0.63 ± 0.11 ^{ab}	0.38 ± 0.16 ^{ab}	1.14 ± 0.31 ^{ab}	1.77 ± 0.26 ^{ab}	0.57 ± 0.09 ^{ab}

与对照组比较,^aP<0.05,^cP>0.05;与阴性组比较,^bP<0.05

4. 大鼠下丘脑 SOCS3、OB - Rb 基因表达的变化:实验组 SOCS3 mRNA 明显低于其他两组 ($P < 0.05$), 对照组和阴性组之间无显著差异 ($P > 0.05$); 实验组 OB - Rb mRNA 明显高于其他两组 ($P < 0.05$), 对照组和阴性组之间无显著差异 ($P > 0.05$), 详见表 3。

表 3 各组大鼠下丘脑 SOCS3、OB - Rb 基因表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	SOCS3 mRNA	OB - Rb mRNA
对照组	1.43 $\pm$ 0.30	0.51 $\pm$ 0.20
阴性组	1.35 $\pm$ 0.25 ^c	0.59 $\pm$ 0.27 ^c
实验组	0.34 $\pm$ 0.19 ^{ab}	1.34 $\pm$ 0.39 ^{ab}

与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^c $P > 0.05$; 与阴性组比较, ^b $P < 0.05$

讨 论

肥胖症是由于长期能量摄入超过人体消耗, 使体内脂肪增多, 体重超过一定范围的一种营养障碍性疾病。随着肥胖发生率逐年递增, 由肥胖所带来的种种并发症如糖尿病、心脑血管疾病等严重危害人类的健康。瘦素是肥胖基因表达产物, 具有抑制食欲, 减少食物摄入, 增加能量消耗的作用, 使机体不至于过度肥胖^[5,6]。研究表明肥胖者血清瘦素并不降低反而表现为高瘦素血症, 提示肥胖者存在瘦素抵抗。多种原因均可引起瘦素抵抗, 而向饮食诱导的肥胖大鼠中枢注射瘦素并无疗效, 说明瘦素抵抗发生在受体及受体后转导水平^[7]。肥胖者 OB - Rb 的 mRNA 表达下调参与瘦素抵抗的发生机制^[8]。SOCS3 是由细胞因子和一些激素诱导的 SOCS 蛋白质家族的一个成员, 它主要通过抑制细胞因子或激素与其受体结合后胞内信号转导通路, 进而减弱细胞因子或激素的生理作用^[9]。动物实验表明高脂诱导的肥胖鼠下丘脑和白色脂肪组织中 SOCS3 基因表达明显增加并参与瘦素抵抗的发生, 进而参与了多种疾病的形成过程, 因此可以推测通过下调体内 SOCS3 基因的表达来减弱其抑制相关信号转导的作用, 在疾病治疗中具有一定的应用前景。RNA 干扰技术作为新兴的基因沉默技术具有明显优势, 它比反义核酸技术有效, 比基因敲除技术简单, 具有基因沉默高度特异性及高效性的优点。目前, RNA 干扰技术已基本成熟, 已被广泛应用于许多疾病的治疗研究中^[10,11]。

本研究将 SOCS3 RNAi 慢病毒液注射到大鼠下丘脑后, 实验组下丘脑的 SOCS3 mRNA 表达水平明显下降。在高脂喂养 8 周后, 该组大鼠体重、血清瘦素、三酰甘油、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇较其他两

组下降明显, 而高密度脂蛋白胆固醇则升高, 同时该组大鼠下丘脑 OB - Rb 的 mRNA 水平明显高于其他两组, 提示下调 SOCS3 基因后可缓解大鼠的高脂性肥胖及瘦素抵抗的程度。大鼠下丘脑注射慢病毒干扰液后, 慢病毒载体进入下丘脑神经细胞, 能将携带的目的基因整合到细胞基因组中, 实现 RNA 干扰, 此时予以大鼠高脂喂养 8 周, 由于慢病毒介导的 RNA 干扰可长期、稳定、高效地下调目的基因, 那么高脂喂养大鼠本该上调的 SOCS3 基因可被长期沉默。通过 RNAi 下调 SOCS3 基因后, SOCS3 抑制瘦素与 OB - Rb 结合后信号转导通路的作用减弱, 使瘦素能正常的发挥其降脂作用, 使高脂喂养的大鼠脂肪含量减少, 体重下降。大鼠体重的下降, 一方面, 抑制脂肪刺激瘦素的分泌; 另一方面, 促进 OB - Rb 基因的表达; 进而改善了肥胖大鼠的瘦素抵抗。

本研究在动物模型水平证实了抑制下丘脑 SOCS3 基因对肥胖大鼠瘦素抵抗和肥胖程度的改善作用, 为进一步研究人类瘦素抵抗和肥胖症的发生机制提供了极为有利的工具。

参考文献

- Shimizu H, Oh - I S, Okada S, *et al.* Leptin resistance and obesity [J]. *Endocr J*, 2007, 54 (1): 17 - 26
- Morris DL, Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297 (6): 1247 - 1259
- Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Region - specific leptin resistance within the hypothalamus of diet - induced obese mice [J]. *Endocrinology*, 2004, 145 (11): 4880 - 4889
- Lubis AR, Widia F, Soegondo S, *et al.* The role of SOCS - 3 protein in leptin resistance and obesity [J]. *Acta Med Indones*, 2008, 40 (2): 89 - 95
- Bjornholm M, Munzberg H, Leshan RL, *et al.* Mice lacking inhibitory leptin receptor signals are lean with normal endocrine function [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117 (5): 1354 - 1360
- Paracchini V, Pedottid P, Taioli E. Genetics of leptin and obesity: a Hu GE review [J]. *Am J Epidemiol*, 2005, 162 (2): 101 - 114
- Pal R, Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus during chronic central leptin infusion [J]. *Endocrinology*, 2003, 144 (9): 3789 - 3798
- Tsiotra PC, Pappa V, Raptis SA, *et al.* Expression of the long and short leptin receptor isoforms in peripheral blood mononuclear cells: implication for leptin's actions [J]. *Metabolism*, 2000, 49 (12): 1537 - 1541
- Larsen L, Ropke C. Suppressors of cytokine signalling: SOCS [J]. *APMIS*, 2002, 110 (12): 833 - 844
- Angaji SA, Hedayati SS, Poor RH, *et al.* Application of RNA interference in treating human diseases [J]. *J Genet*, 2010, 89 (4): 527 - 537
- Xu C, Lee SA, Chen X. RNA interference as therapeutics for hepatocellular carcinoma [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2011, 6 (1): 106 - 115

(收稿: 2011 - 07 - 20)

(修回: 2011 - 07 - 26)