

研究论文

成纤维细胞生长因子21抑制脂肪细胞瘦素基因表达的分子机制

陈 镒, 赵妍妍, 梁向艳, 张丽君, 魏兰兰, 谢 荣, 张小春, 苏兴利, 赵玉峰*

西安医学院基础医学部基础医学研究所, 西安 710021

摘要: 本研究旨在明确成纤维细胞生长因子21 (fibroblast growth factor 21, FGF21)调控脂肪细胞瘦素基因表达的分子机制。以3T3-F442A脂肪细胞为研究对象, 用荧光定量RT-PCR检测瘦素mRNA表达, 并用Western blot检测信号转导通路蛋白的磷酸化水平。结果显示, FGF21显著下调脂肪细胞瘦素mRNA表达水平, FGF21受体抑制剂BGJ-398完全阻断此作用。FGF21上调脂肪细胞ERK1/2和AMPK的磷酸化水平, ERK1/2抑制剂SCH772984和AMPK抑制剂Compound C分别可部分阻断FGF21抑制瘦素基因表达的作用, 二者联合应用可完全阻断FGF21的抑制作用。PI3K抑制剂LY294002和Akt抑制剂AZD5363对FGF21抑制瘦素基因表达的作用无明显影响。以上结果提示, FGF21可能通过FGF受体激活脂肪细胞ERK1/2和AMPK两条信号途径, 抑制瘦素基因表达。

关键词: 成纤维细胞生长因子21; 瘦素; 胞外信号激活蛋白激酶1/2; AMP激活蛋白激酶; 脂肪细胞

中图分类号: R335.9

The molecular mechanism of fibroblast growth factor 21-inhibited leptin expression in adipocytes

CHEN Di, ZHAO Yan-Yan, LIANG Xiang-Yan, ZHANG Li-Jun, WEI Lan-Lan, XIE Rong, ZHANG Xiao-Chun, SU Xing-Li, ZHAO Yu-Feng*

Institute of Basic Medical Sciences, Department of Basic Medical Sciences, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

Abstract: The present study was aimed to clarify the signaling molecular mechanism by which fibroblast growth factor 21 (FGF21) regulates leptin gene expression in adipocytes. Differentiated 3T3-F442A adipocytes were used as study object. The mRNA expression level of leptin was detected by fluorescence quantitative RT-PCR. The phosphorylation levels of proteins of signal transduction pathways were detected by Western blot. The results showed that FGF21 significantly down-regulated the mRNA expression level of leptin in adipocytes, and FGF21 receptor inhibitor BGJ-398 could completely block this effect. FGF21 up-regulated the phosphorylation levels of ERK1/2 and AMPK in adipocytes. Either ERK1/2 inhibitor SCH772984 or AMPK inhibitor Compound C could partially block the inhibitory effect of FGF21, and the combined application of these two inhibitors completely blocked the effect of FGF21. Neither PI3K inhibitor LY294002 nor Akt inhibitor AZD5363 affected the inhibitory effect of FGF21 on leptin gene expression. These results suggest that FGF21 may inhibit leptin gene expression by activating ERK1/2 and AMPK signaling pathways in adipocytes.

Key words: fibroblast growth factor 21; leptin; ERK1/2; AMPK; adipocytes

成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor 21, FGF21) 主要由肝脏和脂肪组织合成与分泌, 以内分泌和自分泌等方式发挥作用, 调节机体物质代

谢, 具有降低血糖、改善血脂、减轻体重等效应^[1,2]。脂肪细胞是 FGF21 的主要靶细胞^[3], FGF21 通过激活脂肪细胞的胞外信号激活蛋白激酶 1/2 (extra-

Received 2019-09-06 Accepted 2020-01-20

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81700370) and the Natural Science Foundation of Shaanxi Provincial Department of Education, China (No. 18JC028).

*Corresponding author. Tel: +86-29-86132665; E-mail: yufeng.zhao@xiyi.edu.cn

cellular signaling activated kinase 1/2, ERK1/2) 等信号分子调控糖脂代谢关键酶的表达, 参与物质能量代谢的调控^[4]。

已知脂肪细胞可分泌瘦素、脂联素、抵抗素以及细胞因子等多种生物活性因子, 调控机体内分泌、心血管和免疫等功能^[5, 6]。其中, 瘦素随甘油三酯在脂肪细胞的堆积而分泌增加, 作为能量物质贮存充足的信号, 作用于下丘脑, 抑制摄食, 并可通过增强交感神经活动等方式增加能量消耗, 抑制体重增加^[7, 8]。FGF21 是重要的代谢调节激素, 可改变脂肪细胞因子的表达而影响代谢。前期研究显示, 在高脂饲料诱导的肥胖模型小鼠和 ob/ob 肥胖小鼠持续给予 FGF21 2 周可显著抑制小鼠脂肪组织的瘦素基因表达^[1]。随后 Zhu 等研究显示, FGF21 在体外培养 3T3-L1 脂肪细胞中也可下调瘦素基因表达^[9]。不过, FGF21 抑制瘦素基因表达的分子机制尚不清楚。FGF21 可激活 ERK1/2、AMP 激活蛋白激酶 (AMP activated kinase, AMPK)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 和蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 等多种信号分子^[4, 10, 11]。本研究以小鼠 3T3-F442A 脂肪细胞为对象, 观察 ERK1/2、AMPK、PI3K、Akt 等信号分子的抑制剂对 FGF21 调节瘦素表达的影响, 以期探讨 FGF21 调节瘦素表达的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 小鼠前体脂肪细胞 3T3-F442A 购自欧洲动物细胞保藏中心 (ECACC)。FGF21 购自 Peptrotech 公司。胰岛素、地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、罗格列酮、AICAR、AMPK 抑制剂 Compound C 等试剂购自 Sigma 公司。FGF21 受体抑制剂 BGJ-398、ERK1/2 抑制剂 SCH772984、PI3K 抑制剂 LY294002、Akt 抑制剂 AZD5363 购自 MCE 公司。细胞培养用 DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自 Invitrogen 公司。RNA 提取试剂盒购自天根生化科技公司。荧光定量 RT-PCR 反转录试剂和荧光定量 PCR 试剂购自 TaKaRa 公司。兔抗小鼠 ERK1/2 和 pERK1/2、兔抗小鼠 AMPK 和 pAMPK、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔抗体购自 Cell Signaling Technology 公司, ECL 显色液和 BCA 蛋白测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂为 Roche 公司产品。

1.2 3T3-F442A 脂肪细胞培养 3T3-F442A 前体脂肪细胞传代分批保存, 应用 10 代以内细胞进行诱导分化。3T3-F442A 细胞在完全培养基 (DMEM+10% FBS) 中生长至接触抑制 2 d, 更换至分化诱导培养基 (DMEM+10% FBS+0.24 IU/mL 胰岛素 +2 g/mL 地塞米松 +0.5 mmol/L IBMX+50 μmol/L 罗格列酮) 培养 2 d, 随后换至维持培养基 (DMEM+10% FBS+0.24 IU/mL 胰岛素) 中生长 2 d, 随后用完全培养基 (DMEM+10% FBS) 培养 6~8 d, 当 80% 以上细胞出现脂滴沉积后, 细胞用于后续实验。

1.3 荧光定量 RT-PCR 技术 3T3-F442A 脂肪细胞经 FGF21 处理后, 去除上清, 依据细胞总 RNA 提取试剂盒的操作步骤提取 RNA。所获 RNA 用 Nanodrop 核酸定量仪测定浓度, 并取 1 μg 用于琼脂糖凝胶电泳, 根据 RNA 条带判断 RNA 质量。确定质量完好且无 DNA 污染后, 收取的 RNA 应用反转录试剂盒进行反转录处理 (反转录体系: 1 μg RNA 加入到 20 μL 反转录体系)。获得的 cDNA 用于荧光定量 PCR 检测。每个 PCR 体系包括: 10 μL 2 × SYBR Premix、1 μL 上游引物、1 μL 下游引物、2 μL cDNA、6 μL ddH₂O。PCR 参数设置如下: 95 °C 预变性 30 s 后进入循环扩增, 在 95 °C 变性 5 s、60 °C 退火及延伸 30 s 的程序中进行 40 个循环, 根据扩增曲线, 采用 2^{-ΔΔCt} 方法进行相对定量。小鼠瘦素的上游引物为 5'-CTC CAA GGT TGT CCA GGG TT-3'; 下游引物为 5'-AAA ACT CCC CAC AGA ATG GG-3'。内对照 β-actin 的上游引物为 5'-CTG TGG CAT CCA TGA AAC TA-3'; 下游引物为 5'-AGT ACT TGC GCT CAG GAG GA-3'。瘦素和 β-actin 扩增片段长度分别为 135 和 200 bp。

1.4 Western blot 3T3-F442A 脂肪细胞经 FGF21 处理后, 应用细胞总蛋白提取试剂盒 (Bio-Rad 公司) 收取细胞总蛋白, 裂解液中加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂。应用 BCA 法进行蛋白定量。取 50 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 随后应用半干转法转至 PVDF 膜上, 依次进行封闭液封闭, 一抗孵育、清洗、二抗孵育、清洗、化学发光检测等过程。兔抗小鼠 pERK1/2、ERK1/2、pAMPK、AMPK 抗体稀释比为 1:1 000, HRP 标记羊抗兔二抗稀释比为 1:1 000, 一抗孵育条件为 4 °C 过夜, 二抗孵育条件为室温 1 h。ECL 显色后, 应用 Image Lab 软件 (Bio-Rad 公司产品) 进行条带灰度分析。

1.5 统计分析 数据采用 mean ± SEM 表示。用

ANOVA 对多组间差异进行统计分析, 两两比较应用 SKN 检验, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FGF21抑制3T3-F442A脂肪细胞瘦素基因表达

用 FGF21 (0~1 000 ng/mL) 处理 3T3-F442A 脂肪细胞 24 h 后, 瘦素 mRNA 表达水平呈剂量依赖性下调; 300 ng/mL FGF21 的抑制作用达到最大, 抑制程度为 $(43.4 \pm 5.1)\%$ (图 1A)。FGF21 受体抑制剂 BGJ-398 (0.1 $\mu\text{mol/L}$) 与 FGF21 (300 ng/mL) 共同孵育 24 h, 则 FGF21 抑制瘦素基因表达的作用被完全阻断, 与 FGF21 处理组差异显著 ($P < 0.01$,

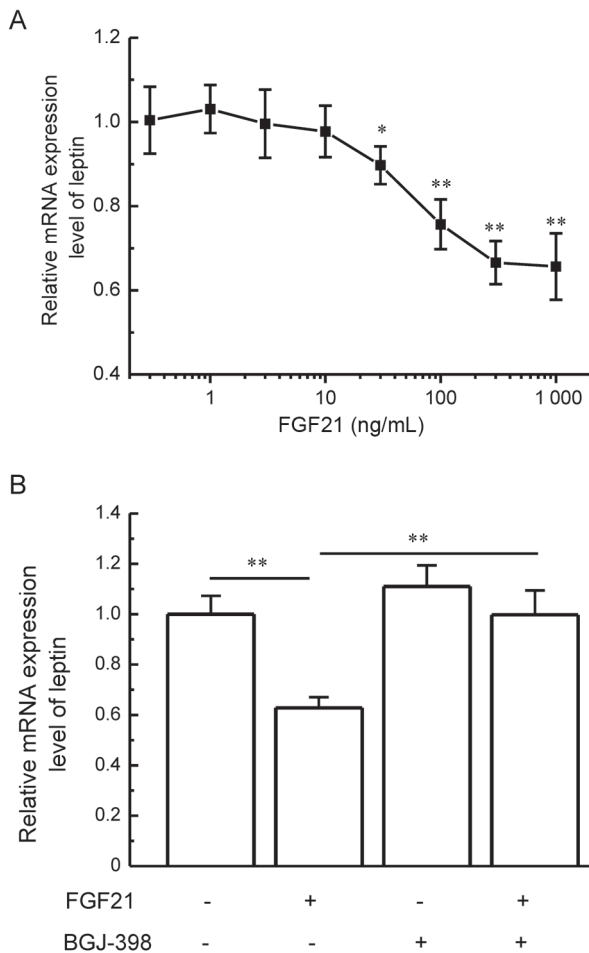


图 1. 成纤维细胞生长因子21 (FGF21)抑制3T3-F442A脂肪细胞瘦素mRNA表达

Fig. 1. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) inhibited leptin mRNA expression level in 3T3-F442A adipocytes. *A*: As shown by qRT-PCR, FGF21 dose-dependently inhibited leptin expression; *B*: As shown by qRT-PCR, FGF21 receptor inhibitor BGJ-398 fully blocked the effect of FGF21 on leptin mRNA expression. Mean \pm SEM, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

$n = 3$, 图 1B)。

2.2 ERK1/2在FGF21抑制瘦素基因表达中的作用

Western blot 检测结果显示, FGF21 (300 ng/mL, 6 h) 可显著上调 3T3-F442A 脂肪细胞 ERK1/2 磷酸化水平 ($P < 0.05$, $n = 3$, 图 2A)。和单独用 ERK1/2 抑制剂 SCH772984 (0.1 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 的细胞相比, SCH772984 (0.1 $\mu\text{mol/L}$) 联合 FGF21 (300 ng/mL) 处理 24 h 的细胞瘦素 mRNA 表达水平显著下调 ($P < 0.05$, $n = 3$, 图 2B); 但是相较于 FGF21 单独作用组, FGF21 与 SCH772984 联合处理的细胞瘦

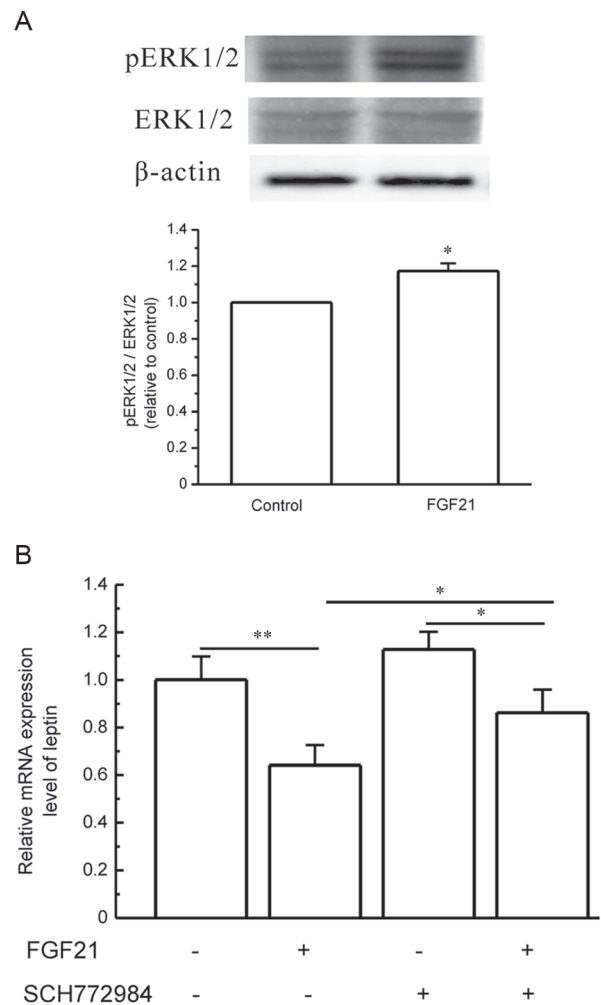


图 2. ERK1/2在成纤维细胞生长因子21 (FGF21)抑制瘦素基因表达中的作用

Fig. 2. The role of ERK1/2 in fibroblast growth factor 21 (FGF21)-inhibited leptin gene expression. *A*: As shown by Western blot, FGF21 significantly increased the phosphorylation level of ERK1/2 in 3T3-F442A adipocytes; *B*: As shown by qRT-PCR, ERK1/2 inhibitor SCH772984 significantly attenuated but not fully blocked the inhibitory effect of FGF21 on leptin mRNA expression level. Mean \pm SEM, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

素 mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.05$, $n = 3$, 图 2B), 以上结果表明 FGF21 的抑制作用可被 SCH772984 显著减弱, 而其它信号分子途径也可能参与 FGF21 调控瘦素基因表达的作用。

2.3 PI3K/Akt在FGF21抑制瘦素基因表达中的作用

FGF21 在多种细胞中可激活 PI3K/Akt 信号通路, 本研究观察了 PI3K 和 Akt 被抑制后对 FGF21 调控 3T3-F442A 脂肪细胞瘦素基因表达的影响。PI3K 抑制剂 LY294002 (1 $\mu\text{mol/L}$) 和 Akt 抑制剂 AZD5363 (1 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 对瘦素表达未见显著影响, 二者分别与 FGF21 联合处理 3T3-F442A 脂肪细胞 24 h, 对 FGF21 抑制瘦素基因表达的作用也无显著影响, 说明 PI3K/Akt 在脂肪细胞并不参与 FGF21 对瘦素基因表达的调节 (图 3)。

2.4 AMPK在FGF21抑制瘦素基因表达中的作用

本研究结果显示, FGF21 (300 ng/mL, 6 h) 处理后, 3T3-F442A 脂肪细胞的 AMPK 磷酸化水平显著升高 ($P < 0.05$, $n = 3$, 图 4A)。AMPK 激动剂 AICAR (0.5 mmol/L) 孵育 24 h 可显著下调瘦素 mRNA 表达水平。和 AICAR 单独处理的细胞相比, FGF21 和 AICAR 联合处理 24 h 的细胞瘦素 mRNA 表达水平可进一步显著下调 ($P < 0.01$, $n = 3$, 图 4B)。AMPK 抑制剂 Compound C (1 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 对细胞瘦素 mRNA 表达水平无显著影响。与 Compound C

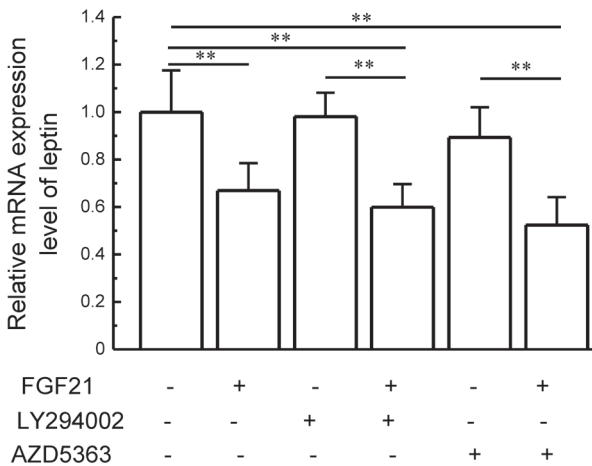


图 3. PI3K/Akt 在成纤维细胞生长因子 21 (FGF21) 抑制瘦素基因表达中的作用
Fig. 3. The role of PI3K/Akt in fibroblast growth factor 21 (FGF21)-inhibited leptin mRNA expression. As shown by qRT-PCR, neither PI3K inhibitor LY294002 nor Akt inhibitor AZD5363 affected FGF21-inhibited leptin gene expression. Mean \pm SEM, $n = 3$. ** $P < 0.01$.

(1 $\mu\text{mol/L}$) 联合应用 24 h, FGF21 虽仍可抑制瘦素基因表达, 但其抑制程度较 FGF21 单独处理明显减弱 ($P < 0.05$, $n = 3$, 图 4B)。应用 AMPK 抑制剂 Compound C 和 ERK1/2 抑制剂 SCH772984 同时处理 3T3-F442A 脂肪细胞后, FGF21 下调瘦素 mRNA 表达水平的作用被完全阻断 ($P < 0.01$, $n = 3$, 图 5), 说明 FGF21 通过 ERK1/2 和 AMPK 两条信号通路抑制瘦素基因表达。

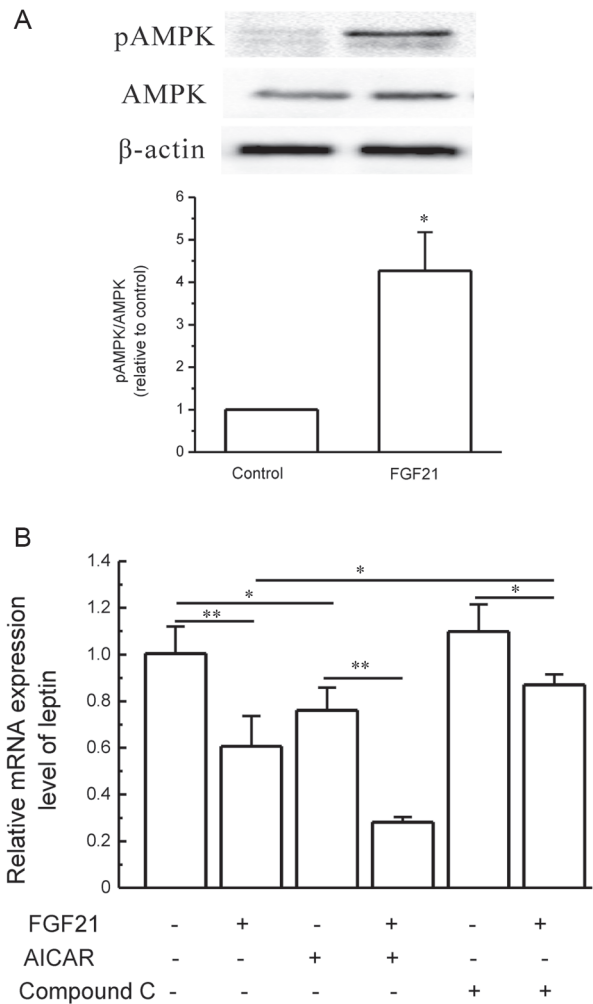


图 4. AMPK 在成纤维细胞生长因子 21 (FGF21) 抑制瘦素基因表达中的作用
Fig. 4. The role of AMPK in fibroblast growth factor 21 (FGF21)-inhibited leptin gene expression. A: As shown by Western blot, FGF21 significantly increased the phosphorylation level of AMPK in 3T3-F442A adipocytes; B: As shown by qRT-PCR, AMPK activator AICAR inhibited leptin mRNA expression, and FGF21 further inhibited leptin mRNA expression with AICAR. AMPK inhibitor Compound C significantly attenuated but not fully blocked the inhibitory effect of FGF21 on leptin mRNA expression. Mean \pm SEM, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

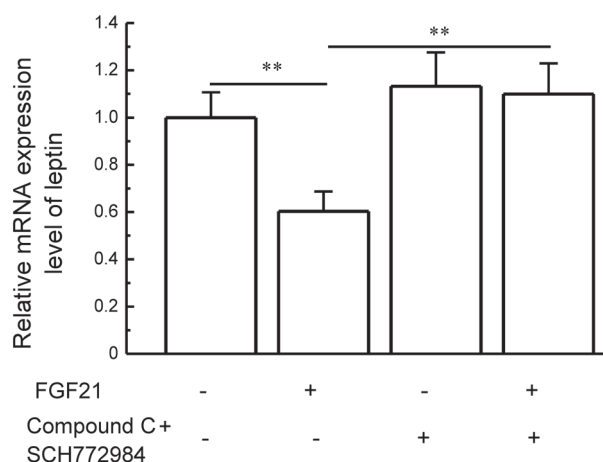


图 5. AMPK和ERK1/2抑制剂联用完全阻断成纤维细胞生长因子21 (FGF21)抑制瘦素基因表达的作用

Fig. 5. Combination of AMPK and ERK1/2 inhibitors completely blocked the effect of fibroblast growth factor 21 (FGF21) on leptin mRNA expression. Mean \pm SEM, $n = 3$. ** $P < 0.01$.

3 讨论

作为代谢调节激素, FGF21 可以通过受体激活多种细胞内多条信号分子途径。Ge 等研究显示, FGF21 可激活脂肪细胞 ERK1/2 信号分子^[4]。本研究显示, FGF21 在 3T3-F442A 脂肪细胞中可刺激 ERK1/2 磷酸化, 增强其活性。ERK1/2 抑制剂能够部分阻断 FGF21 对瘦素基因表达的抑制作用, 提示 ERK1/2 参与 FGF21 抑制瘦素基因表达的作用, 同时提示其它信号转导通路也参与 FGF21 抑制瘦素基因表达的作用。尽管有研究表明 FGF21 在血管和神经等其它细胞激活 PI3K/Akt^[11, 12], 不过也有研究显示 FGF21 在脂肪细胞中并不激活 PI3K/Akt。例如, Minard 等研究显示, FGF21 可激活脂肪细胞 PI3K/Akt 下游分子 mTORC1, 但这是通过丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 而非 PI3K/Akt 途径实现^[13]。本研究结果显示, PI3K/Akt 的阻断对 FGF21 调节瘦素基因表达无明显影响, 说明 PI3K/Akt 不参与 FGF21 调控脂肪细胞瘦素基因表达。我们进一步观察了 FGF21 对 AMPK 的作用, 发现 FGF21 可刺激脂肪细胞 AMPK 磷酸化。AMPK 磷酸化激活可调节脂肪细胞代谢相关基因表达^[14]。本研究结果显示, AMPK 激活抑制瘦素基因表达, 且 AMPK 抑制剂可部分阻断 FGF21 对瘦素基因表达的抑制作用, 提示 AMPK 参与 FGF21 对脂肪细胞瘦素基因表达的调控。同时抑制 AMPK 和 ERK1/2 的活性

后, FGF21 抑制瘦素基因表达的作用被完全阻断。上述结果表明, FGF21 通过 FGF 受体激活脂肪细胞 ERK1/2 和 AMPK 信号通路, 从而抑制瘦素基因表达。

Zhao 等研究显示, 从温郁金提取的抗癌成分 β -榄香烯可通过激活 ERK1/2 和 AMPK 两条信号通路, 调节 SP1 转录因子活性, 从而杀伤癌细胞^[15]。该研究提示, ERK1/2 和 AMPK 是细胞内两条独立的信号途径, 但是可作用于相同的转录因子而发挥效应。我们推测, FGF21 激活 ERK1/2 和 AMPK 也是通过两条并行的信号途径, 最终调节瘦素基因表达转录因子的活性, 抑制瘦素基因表达。

de la Brousse 等研究显示, 瘦素基因启动子含有 CCAAT 增强子结合蛋白 (C/EBP) 家族转录因子结合位点, C/EBP α 可刺激瘦素基因表达^[16]。另外, SP1 转录因子也可结合瘦素基因启动子, 调节瘦素基因表达^[17]。但是, 关于转录因子上游的信号分子在调控瘦素基因表达中作用的研究较少。本研究结果表明, ERK1/2 和 AMPK 是调节瘦素基因表达的两个信号分子, 介导 FGF21 抑制瘦素基因表达的作用。虽然有报道指出, ERK1/2 和 AMPK 激活可抑制 C/EBP α 表达^[18-20], 但是 ERK1/2 和 AMPK 调节瘦素表达的作用是通过 C/EBP α 抑或其他转录因子仍未知。本研究结果表明 FGF21 通过激活 ERK1/2 和 AMPK 抑制脂肪细胞瘦素基因表达, 但未能阐明 FGF21 如何激活 ERK1/2 和 AMPK 以及二者如何调节瘦素基因表达, 此部分工作仍有待今后深入研究。

参考文献

- 1 Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, Moller DE, Kharitononkov A. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 2008; 149(12): 6018-6027.
- 2 Gong Q (龚琦), Zhang FF, Han YM, Li Y. Metabolic actions of FGF21 and its clinical outcomes. *Chin J Cell Biol (中国细胞生物学学报)* 2015; 37(4): 460-468 (in Chinese with English abstract).
- 3 Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol* 2016; 78: 223-241.
- 4 Ge X, Chen C, Hui X, Wang Y, Lam KS, Xu A. Fibroblast growth factor 21 induces glucose transporter-1 expression through activation of the serum response factor/Ets-like protein-1 in adipocytes. *J Biol Chem* 2011; 286(40): 34533-34541.
- 5 Scheja L, Heeren J. The endocrine function of adipose

- tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat Rev Endocrinol* 2019; 15(9): 507–524.
- 6 Zhao YF, Chen C. Regulation of pancreatic β -cell function by adipocytes. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2007; 59(3): 247–252.
 - 7 Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism* 2015; 64(1): 24–34.
 - 8 Wang CJ (王春灵), Zhang Y, Guan YF, Yang JC. Leptin and the regulation of carbohydrate and lipid metabolism. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报) 2009; 25(10): 896–902 (in Chinese with English abstract).
 - 9 Zhu W (朱伟), Li L, Yang GY, Li K, Yan PJ, Li LH, Dong J, Wu DD. The effects of fibroblast growth factor-21 (FGF-21) on FGF receptors and adipokines in 3T3-L1 adipocytes. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志) 2011; 31(6): 968–971 (in Chinese with English abstract).
 - 10 Salminen A, Kauppinen A, Kaamiranta K. FGF21 activates AMPK signaling: impact on metabolic regulation and the aging process. *J Mol Med (Berl)* 2017; 95(2): 123–131.
 - 11 Ye L, Wang X, Cai C, Zeng S, Bai J, Guo K, Fang M, Hu J, Liu H, Zhu L, Liu F, Wang D, Hu Y, Pan S, Li X, Lin L, Lin Z. FGF21 promotes functional recovery after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats by activating the PI3K/Akt signaling pathway via FGFR1/ β -klotho. *Exp Neurol* 2019; 317: 34–50.
 - 12 Pan Y, Wang B, Zheng J, Xiong R, Fan Z, Ye Y, Zhang S, Li Q, Gong F, Wu C, Lin Z, Li X, Pan X. Pancreatic fibroblast growth factor 21 protects against type 2 diabetes in mice by promoting insulin expression and secretion in a PI3K/Akt signaling-dependent manner. *J Cell Mol Med* 2019; 23(2): 1059–1071.
 - 13 Minard AY, Tan SX, Yang P, Fazakerley DJ, Domanova W, Parker BL, Humphrey SJ, Jothi R, Stockli J, James DE. mTORC1 is a major regulatory node in the FGF21 signaling network in adipocytes. *Cell Rep* 2016; 17(1): 29–36.
 - 14 Ceddia RB. The role of AMP-activated protein kinase in regulating white adipose tissue metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 366(2): 194–203.
 - 15 Zhao S, Wu J, Zheng F, Tang Q, Yang L, Li L, Wu W, Hann SS. β -elemene inhibited expression of DNA methyltransferase 1 through activation of ERK1/2 and AMPK α signalling pathways in human lung cancer cells: the role of Sp1. *J Cell Mol Med* 2015; 19(3): 630–641.
 - 16 de la Brousse FC, Shan B, Chen JL. Identification of the promoter of the mouse obese gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(9): 4096–4101.
 - 17 Fukuda H, Iritani N. Transcriptional regulation of leptin gene promoter in rat. *FEBS Lett* 1999; 455(1–2): 165–169.
 - 18 Vingtdoux V, Chandakkar P, Zhao H, Davies P, Marambaud P. Small-molecule activators of AMP-activated protein kinase (AMPK), RSVA314 and RSVA405, inhibit adipogenesis. *Mol Med* 2011; 17(9–10): 1022–1030.
 - 19 He Y, Li Y, Zhao T, Wang Y, Sun C. Ursolic acid inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through LKB1/AMPK pathway. *PLoS One* 2013; 8(7): e70135.
 - 20 Fu YY, Hu BH, Chen KL, Li HX. Chemerin induces lipolysis through ERK1/2 pathway in intramuscular mature adipocytes of dairy bull calves. *J Cell Biochem* 2019; 120(2): 1122–1132.