

促酰化蛋白诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞分化的机制

卢慧玲¹, 王宏伟¹, Katherine Cianflone²

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科心血管研究室, 湖北省武汉市 430030;

2. 加拿大麦吉尔大学医学中心皇家维多利亚医院心血管脂代谢研究室, 加拿大)

[关键词] 细胞生物学; 促酰化蛋白诱导前脂肪细胞分化的机制; 逆转录聚合酶链反应; 促酰化蛋白; 脂肪细胞; 转录因子; 细胞分化

[摘要] 目的 初步探讨促酰化蛋白诱导前脂肪细胞分化的作用及其可能机制。方法 以 3T3-F442A 前脂肪细胞为研究对象, 分为促酰化蛋白组(促酰化蛋白诱导分化)和对照组(无诱导分化剂)。在不同的分化时间点比较两组细胞的形态学变化和分化率; 采用³H-油酸掺入法测定脂肪细胞甘油三酯合成率, 化学比色法测定细胞中甘油三酯的总量。在诱导分化第 0、1、2、4 和 6 天收获细胞, 采用逆转录聚合酶链反应检测转录因子过氧化物增殖物激活型受体 γ /C/EBP δ 和 C/EBP α mRNA 表达情况。结果 促酰化蛋白可诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞向成熟脂肪细胞的形态转变, 且分化率较高, 与对照组相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。促酰化蛋白促进 3T3-F442A 前脂肪细胞的甘油三酯合成, 并增加细胞甘油三酯的总量, 均明显高于对照组 ($P < 0.05$)。转录因子 C/EBP δ /C/EBP α 和过氧化物增殖物激活型受体 γ mRNA 的表达呈现一定的时间顺序, 其中 C/EBP δ mRNA 在 3T3-F442A 前脂肪细胞分化早期中表达水平急剧升高, 然后又迅速下降至很低; 而 C/EBP α mRNA 和过氧化物增殖物激活型受体 γ mRNA 的表达随着分化的进行而逐渐升高, 且在分化晚期始终保持高水平的表达。结论 新型脂源性激素促酰化蛋白具有诱导前脂肪细胞分化的生物学作用, 转录因子 C/EBP δ /C/EBP α 和过氧化物增殖物激活型受体 γ mRNA 的时序性表达, 可能是促酰化蛋白诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞分化的重要分子机制之一。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

A New Adipocytes Derived Protein, Acylation Stimulating Protein Inducing 3T3-F442A Preadipocytes to Differentiate

LU Hui-Ling¹, WANG Hong-Wei¹, and Katherine Cianflone²

(1. Laboratory for Children Cardiovascular Research, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Mike Rosenbloom Laboratory for Cardiovascular Research, McGill University Health Center, Montreal, Quebec, Canada)

[KEY WORDS] Acylation Stimulating Protein; Adipocytes; Transcription Factor; Differentiation; Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; 3T3-F442A Preadipocytes

[ABSTRACT] **Aim** To study the role of acylation stimulating protein for the differentiation of 3T3-F442A preadipocytes and explore the molecular mechanism of it. **Methods** There were two groups in this study: acylation stimulating protein (AsP) group (induced to differentiate by AsP) and control group (without inducers). The morphological changes were observed by Oil-Red O staining. Triglyceride (TG) synthesis and TG mass were assayed by chemical colorimetry. The cell were harvested on the 0th day, 1th day, 2th day, 4th day, 6th day after induced differentiation and total RNA of these cell were abstracted. The transcription factor peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ), C/EBP α , C/EBP δ mRNAs expression were assayed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** 3T3-F442A preadipocytes were induced to differentiate with AsP alone. Fat droplets were clearly visible in the cytoplasm of 3T3-F442A cell. The differentiation rate were high (80%) in AsP group. In AsP group TG synthesis and TG mass were significantly increased, both of them were higher than that of control group ($P < 0.05$). PPAR γ mRNA expression in the 3T3-F442A cell were low on 0th day of induced differentiation, and it was increase significantly on the 1th and 2th day induced by AsP ($P < 0.05$). It continued to increase significantly on the 4th and 6th day ($P < 0.05$). The C/EBP δ mRNA were expressed in low level on 0th day of differentiation induced by AsP and the expression level was increase significantly on the 1th and 2th day of differentiation ($P < 0.05$). But the expression of C/EBP δ mRNA was decreased on the 4th and 6th day, there were no significant difference compared with that of 0th day ($P > 0.05$). The expression of C/EBP α mRNA was very low on the 0th day of differentiation induced by AsP. It was increased on the 1th and 2th

[收稿日期] 2004-11-02 [修回日期] 2005-10-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30170442)

[作者简介] 卢慧玲, 博士, 主治医师, 研究方向为脂肪细胞分化、脂源性激素与胰岛素抵抗, 联系电话为 027-83663315, E-mail 为 luhuil-ing-2005@hotmail.com。王宏伟, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为脂肪细胞分化、缺血性心脏病的发病机制等, 联系电话为 027-83662684, E-mail 为 whwwang54@sina.com。

day of differentiation, compared with that of 0th day. It was continued to increase significantly on the 4th and 6th day of differentiation.

Conclusion As a new adipocytes derived protein, AsP has important biological role in the differentiation of preadipocytes. During the course of differentiation induced by AsP, transcription factor C/EBP δ , PPAR γ and C/EBP α mRNA were induced to express sequentially, which may be one of the important molecular mechanisms for the role of AsP to induce the 3T3-F442A preadipocytes to differentiate.

促酰化蛋白(acylation stimulating protein, AsP)具有促进甘油三酯合成和刺激葡萄糖转运的生物学效应,是参与机体能量代谢平衡的一种新型的脂源性激素^[1]。脂肪细胞的分化不仅是决定脂肪体积的重要因素,而且是脂肪代谢的关键问题之一。我们的前期研究已证实,AsP作为新型脂源性激素,具有促进3T3-L1前脂肪细胞分化的作用^[2]。本实验以3T3-F442A前脂肪细胞为研究对象,进一步验证AsP诱导前脂肪细胞分化的作用,并探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM/F12培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(购于美国Gibco公司)。HPIAs-1000高清晰度彩色图像测量系统进行油红O染色的图像分析。甘油三酯试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供。Oligo(dT) 15为引物M鼠源反转录酶(MMLV)、Taq酶和dNTP(脱氧核苷酸三磷酸)均购于美国Promega公司;PCR引物由北京赛百胜生物技术公司合成。PE-9600型PCR仪(美国PE公司),DDY-D型电泳仪(北京六一仪器厂),紫外分光光度计(美国Beckman公司),凝胶成像分析系统(美国UVP公司)。促酰化蛋白(AsP)、3T3-F442A前脂肪细胞株和³H-油酸由加拿大麦吉尔大学医学中心皇家维多利亚医院心血管脂代谢研究室提供。

1.2 脂肪细胞的培养和分组

3T3-F442A前脂肪细胞在含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基中培养,并加入100 kU/L青霉素和0.1 g/L链霉素。隔天换液1次,细胞汇合达70%~80%时,0.25%胰蛋白酶消化、传代至24孔板。当细胞完全汇合后2天(此时为诱导分化的第0天)加入AsP分化诱导刺激。各组基本培养条件相同,即含10%胎牛血清的DMEM/F12,根据诱导刺激的不同分为对照组(无分化刺激)和AsP组(含50 mg/L AsP);培养4天后,换成仅含有10%胎牛血清的DMEM/F12培养基,隔天换液,培养至收获细胞。每组6复孔,重复3次^[2]。

1.3 油红O染色

PBS冲洗细胞,在10%甲醛中固定2 h,0.35%油红异丙醇溶液用等体积的水稀释后,加入固定好

的细胞中,共同孵育2 h;然后冲洗,染色后观察并拍照,经计算机扫描后,进行图像分析,以红色所占的比例表示3T3-F442A前脂肪细胞的分化率。

1.4 甘油三酯合成率和甘油三酯总量的测定

采用³H-油酸掺入法,测定脂肪细胞甘油三酯合成率(TG synthetic rate)。将3T3-F442A细胞培养至诱导分化的第3、6和9天,在收获细胞的前4 h,向培养基中加入³H-油酸(1 uCi/mL),37℃孵育4 h后,弃培养基,用冷PBS冲洗细胞3次,胰酶消化、收集细胞。再用PBS冲洗3次,将细胞沉淀用蒸馏水溶解后,滴加于玻璃纤维膜上,吹干后进行液闪计数。以未加刺激因素的细胞为对照组,其³H-油酸的掺入量为100%,分别计算各组的平均值。化学比色法测定细胞中甘油三酯总量(TG mass),以每mg细胞总蛋白中所含的甘油三酯(mg)来表示。

1.5 总RNA提取和逆转录聚合酶链反应

严格按Trizol试剂说明书操作。取5 μ g RNA,加RNA酶抑制剂, Oligo(dT) 15,加DEPC处理过的水,70℃变性5 min,冰上冷却5 min,然后加入MMLV 5 \times 缓冲液、dNTP(2.5 mmol/L)、MMLV(200 u/ μ L),37℃逆转录90 min,95℃5 min灭活后冰上冷却5 min,-20℃保存。以 β -actin作为内参照相对定量检测表达。过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ)、C/EBP α 和C/EBP δ 的PCR引物由Primer 5.0引物设计软件设计,由北京赛百胜生物公司合成(表1, Table 1)。

表1. 聚合酶链反应引物序列

Table 1. The primer sequence for PCR

		引物序列	大小
PPAR γ	Sn	GCTGTTATGGGTGAAACTCTG	314 bp
	Asn	TGGTATTCTTGAGCCTCAGG	
C/EBP δ	Sn	GCCTTTGAGACTCTGAACG	211 bp
	Asn	TGTACCTTAGCTGCAATGG	
C/EBP α	Sn	GGCAAAAAGGGAACCATTTG	356 bp
	Asn	CTGTACTCCATGTCGTAAC	
β -actin	Sn	TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG	545 bp
	Asn	TTTGATGTCACGCACCATTTCC	

PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳。应用 UVP 凝胶成像分析系统进行成像和图形分析,测定各条带的光密度值。以 β -actin 为内参照,计算各泳道中目的基因的相对含量,结果以各条带占 β -actin 条带灰度百分比值(%)表示。

1.6 统计学处理

用 SPSS 10.0 软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 ANOVA 分析。

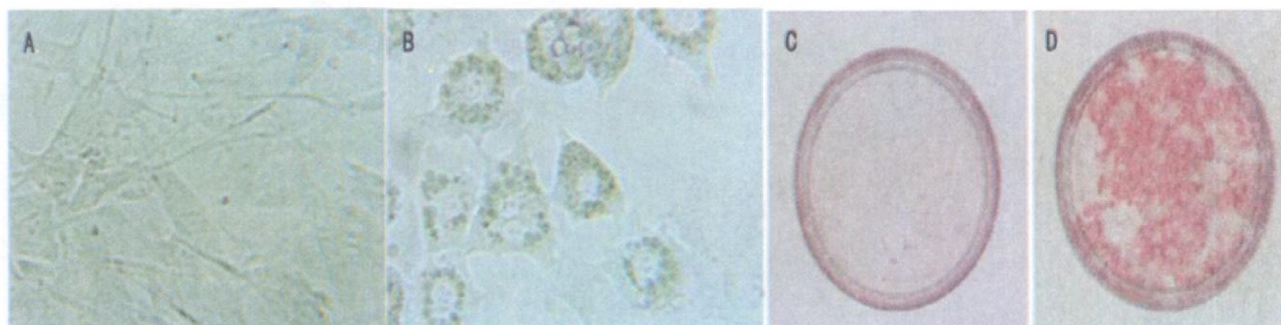


图 1. 促酰化蛋白对 3T3-F442A 前脂肪细胞形态的影响 A 为前脂肪细胞的形态($\times 200$), B 为促酰化蛋白诱导前脂肪细胞分化 9 天时的形态($\times 200$), C 为对照组油红染色, D 为促酰化蛋白组油红染色。

Figure 1. The comparison of the differentiation rate of 3T3-F442A cell on the 9th day induced by AsP

2.2 促酰化蛋白对甘油三酯合成率和甘油三酯总量的影响

促酰化蛋白诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞分化第 3 天和第 6 天时,甘油三酯合成率有一定程度的升高,但与对照组相比差异无显著性;在分化 9 天时,甘油三酯合成率明显升高,与对照组相比差异有显

2 结果

2.1 促酰化蛋白对前脂肪细胞形态的影响

3T3-F442A 前脂肪细胞为长梭形的成纤维细胞样,诱导分化 6 天时,细胞明显变大、变圆,胞浆内出现明显的脂滴,脂滴围绕胞核形成典型的“戒环”样结构;诱导分化 9 天时,更多的脂滴积累。油红染色进一步显示,胞浆内有大量脂滴积累,AsP 诱导前脂肪细胞的分化率可达 80% (图 1, Figure 1)。

著性($P < 0.05$); AsP 诱导分化第 3 天时, 3T3-F442A 前脂肪细胞中甘油三酯总量轻度升高,但与对照组差异无显著性($P > 0.05$);到分化 6 天和 9 天时,甘油三酯总量明显升高,与对照组相比差异均有显著性($P < 0.05$) (表 2, Table 2)。

表 2. 促酰化蛋白诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞分化过程中甘油三酯合成率和甘油三酯总量的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2. The change of TG synthetic rate and TG mass in 3T3-F442A adipocytes during the course of differentiation induced by AsP

分 组	甘油三酯合成率 (nmol/g protein)			甘油三酯总量 (g/g protein)		
	3 天	6 天	9 天	3 天	6 天	9 天
对照组	11.5 \pm 2.1	20.1 \pm 6.8	27.6 \pm 7.9	0.32 \pm 0.11	0.33 \pm 0.09	0.35 \pm 0.13
AsP 组	150.2 \pm 12.5 ^a	223.5 \pm 16.2 ^a	352.6 \pm 22.4 ^a	0.61 \pm 0.18 ^a	1.39 \pm 0.25 ^a	2.27 \pm 0.32 ^a

a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.3 各组过氧化体增殖物激活型受体 γ 、C/EBP δ 和 C/EBP α mRNA 表达的变化

过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 在诱导分化第 0 天时仅有低水平表达;诱导分化第 1 天表达明显升高($P < 0.05$),诱导分化第 2 天和第 4 天表达继续升高,分别是诱导分化第 1 天的 1.4 和 3.25 倍($P < 0.05$),诱导分化第 6 天,PPAR γ mRNA 表达保持较高的水平,与分化第 4 天相比,差异无显著性

($P > 0.05$)。C/EBP δ mRNA 在诱导分化第 0 天时有少量的表达,诱导分化第 1 天表达升高,约是第 0 天的 2.4 倍($P < 0.05$),诱导分化第 2 天表达明显升高,约是诱导分化第 1 天表达量的 4.4 倍($P < 0.05$),诱导分化第 4 天和第 6 天表达明显减少,与分化第 0 天相比差异无显著性($P > 0.05$)。C/EBP α mRNA 在诱导分化第 0 天时有低水平的表达,在诱导分化第 1 天表达升高,是诱导分化第 1 天的 2.2

倍($P < 0.05$), 分化第2天表达明显升高, 是诱导分化第1天的2.1倍($P < 0.05$), 在分化第4天时 C/EBP α mRNA 表达进一步升高, 是分化第2天表达量

的1.8倍($P < 0.05$), 在分化第6天仍保持高水平表达, 与分化第4天相比差异无显著性($P > 0.05$) (表3, Table 3)。

表3. 促酰化蛋白诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞分化过程中过氧化体增殖物激活型受体 γ 、C/EBP δ 和 C/EBP α mRNA 表达强度的时序性变化($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3. The sequential change of PPAR γ , C/EBP δ , C/EBP α mRNA expression during differentiation induced by AsP in 3T3-F442A preadipocytes

指标	分化0天	分化1天	分化2天	分化4天	分化6天
PPAR γ	0.19 \pm 0.17	0.5 \pm 0.08 ^a	0.71 \pm 0.11 ^{ab}	1.72 \pm 0.18 ^{abc}	1.96 \pm 0.13 ^{abc}
C/EBP δ	0.16 \pm 0.02	0.36 \pm 0.03 ^a	1.59 \pm 0.14 ^{ab}	0.21 \pm 0.05 ^{bc}	0.19 \pm 0.01 ^{bc}
C/EBP α	0.23 \pm 0.21	0.44 \pm 0.03 ^a	0.89 \pm 0.19 ^{ab}	1.47 \pm 0.16 ^{abc}	1.86 \pm 0.21 ^{abc}

a: $P < 0.05$, 与分化0天比较; b: $P < 0.05$, 与分化1天比较; c: $P < 0.05$, 与分化2天比较。

3 讨论

脂肪组织不仅是体内巨大的储能器官, 而且是最重要的内分泌器官, 不仅对机体能量代谢平衡至关重要, 还与胰岛素抵抗、心血管疾病的发生等有密切的联系^[3]。脂肪细胞的分化不仅是决定脂肪体积的重要因素, 还是脂肪代谢的关键问题之一。脂肪细胞增殖、分化失常, 可导致脂肪组织的过多堆积, 脂肪细胞内分泌功能的紊乱, 继而导致肥胖、糖尿病和冠心病等与胰岛素抵抗相关的疾病。因此, 脂肪细胞的分化成为目前国际上研究的热点。3T3-L1 和 3T3-F442A 前脂肪细胞株都是目前国际上常用的研究脂肪细胞分化的细胞模型。3T3-L1 前脂肪细胞需要在经典激素鸡尾酒激素诱导法(包括 insulin、IBMX 和 DEX)的作用下分化为成熟的脂肪细胞; 而 3T3-F442A 前脂肪细胞在胰岛素单独刺激下就可分化为成熟的脂肪细胞^[4]。

促酰化蛋白是 Cianflone 等于 1989 年从人血浆中分离出的一种小分子蛋白质, 具有促进游离脂肪酸酯化、促进甘油三酯合成和葡萄糖转运的作用, 与脂肪代谢密切相关, 并与肥胖、冠心病等疾病相关^[5,6]。本研究以 3T3-F442A 细胞为研究对象, 用 AsP 直接替代胰岛素诱导前脂肪细胞分化, 能够更直接的观察 AsP 的作用。本实验发现, AsP 可诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞的形态向成熟脂肪细胞转变, 并能够促进细胞甘油三酯的合成, 增加细胞的甘油三酯总量, 与胰岛素诱导分化的作用相比极为相似, 从而证明 AsP 可以诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞分化的生物学作用。

目前的观点认为, 激素、饮食及基因等影响脂肪细胞分化的因素, 最终都是通过调节转录因子的途

径诱导脂肪分化的, 其中主要的转录因子是 PPARs 和 C/EBPs 家族, 对脂肪细胞的分化起到关键性的作用。PPAR γ 介导的脂肪细胞的分化包括脂质累积和脂肪细胞特异性基因的表达^[7], C/EBP α 可激活与脂肪细胞分化相关基因的表达, 为促进其进入终末分化阶段创造特定的细胞环境。在脂肪细胞分化过程中加入 C/EBP δ , 可诱导 C/EBP α 和 PPAR γ 的进一步表达, 加快了分化进程^[8]。

转录因子的表达呈现一定的时间顺序, 其中 C/EBP δ mRNA 在 3T3-F442A 前脂肪细胞分化早期中表达水平急剧升高, 然后又迅速下降至很低; 而 C/EBP α mRNA 和 PPAR γ mRNA 的表达随着分化的进行而逐渐升高, 而且在分化晚期始终保持高水平的表达。故推测, 分化转录因子的时序性表达, 可能是 AsP 诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞分化的重要分子机制之一。

[参考文献]

- [1] May Faraj, LU HL, Cianflone K. Adipocyte lipid diabetes diabetes, lipids and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol*, 2004, **82** (1): 170-190
- [2] 卢慧玲, 王宏伟, 林汉华. 促酰化蛋白(AsP)诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化研究. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, **20** (3): 383-386
- [3] Jazet M, Pijl H, Meinders AE. Adipose tissue as an endocrine organ: impact on insulin resistance. *J Med*, 2003, **61** (6): 194-212
- [4] Otto TC, Lane MD, Cox MM. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2005, **40** (4): 229-242
- [5] 卢慧玲, 王宏伟, 赵华月, 林汉华. 冠心病患者血浆促酰化蛋白与血脂关系的研究. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (7): 629-631
- [6] 温宇, 卢慧玲, 王宏伟. 促酰化蛋白与促酰化蛋白受体. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (1): 106-107
- [7] Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, 2002, **51** (7): 2 045-055
- [8] Prustv D, Park BH, Davis KE, Farmer SR. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor γ and C/EBP α gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*, 2002, **277** (48): 46 226-232

(此文编辑 朱雯霞)