

[文章编号] 1000- 4718(2005) 11- 2243- 05

促酰化蛋白诱导的前脂肪细胞分化过程中 转录因子表达的时序性研究*

王宏伟¹, 卢慧玲¹, Katherine Cianflone², 林汉华¹¹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 武汉 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, 蒙特利尔, 加拿大)

[摘要] 目的: 观察促酰化蛋白(ASP)诱导 3T3- L1 前脂肪细胞的分化过程, 转录因子 PPAR γ 、C/EBP δ 、C/EBP α mRNA 表达的强度及时序性。方法: 以 3T3- L1 前脂肪细胞为实验对象, 用 ASP 代替经典激素鸡尾酒诱导刺激中的胰岛素, 即促酰化蛋白、1- 甲基- 3- 异丁基黄嘌呤和地塞米松(ASP+ IBMX+ DEX) 诱导 3T3- L1 前脂肪细胞分化, 分别在诱导分化 1 d、2 d、4 d、6 d、8 d 收获细胞, 采用 RT- PCR 法检测 ASP 诱导 3T3- L1 前脂肪细胞分化过程中转录因子 PPAR γ 、C/EBP δ 、C/EBP α mRNA 表达的情况。结果: PPAR γ mRNA 在诱导分化 1 d 时有低水平表达, 在诱导分化过程中表达逐步升高, 在终末分化阶段仍保持高水平表达。C/EBP δ mRNA 在诱导分化 1 d 时有中等水平表达, 在诱导分化 2 d 时表达水平最高, 诱导分化 4 d 时表达明显减少, 在诱导分化 6 d 和 8 d, 检测不到 C/EBP δ mRNA 的表达。C/EBP α mRNA 在诱导分化 1 d 仅有低水平表达, 在诱导分化过程中表达逐步升高, 在终末分化阶段仍保持高水平表达。IBMX+ DEX 诱导前脂肪细胞分化过程中, PPAR γ 、C/EBP δ 和 C/EBP α mRNA 分化早期也有一定升高, 但明显低于 ASP 诱导的转录因子的表达。结论: ASP 对转录因子 C/EBP δ 、C/EBP α 和 PPAR γ 表达的时序性影响, 可能是 ASP 诱导前脂肪细胞分化的重要分子机制之一。

[关键词] 促酰化蛋白; 脂肪细胞; 细胞分化; 转录因子

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Change of transcriptional factors PPAR γ , C/EBP δ , C/EBP α mRNA expressions during differentiation of 3T3- L1 preadipocyte induced by acylation stimulating protein

WANG Hong- wei¹, LU Hui- ling¹, Katherine Cianflone², LIN Han- hua¹¹Department of Pediatric, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China; ²Laboratory for Cardiovascular Research, Royal Victoria Hospital, McGill University, Montreal, Canada)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the expression of three kinds of transcriptional factors PPAR γ , C/EBP α and C/EBP δ mRNA during differentiation in 3T3- L1 preadipocytes induced by acylation stimulating protein. **METHODS:** There were three groups in the study divided by the difference differentiation inducer: (1) control group: incubating the cells without any inducer; (2) IBMX + DEX group: incubating the cells with IBMX and DEX; (3) ASP group: incubating the cells with ASP, IBMX and DEX. The insulin of the typical hormone cocktail method was taken place by ASP. 3T3- L1 preadipocytes were induced to differentiate by 50 mg/L ASP+ 0.5 mol/L IBMX+ 1.0 μ mol/L DEX. The cells were harvested on the first day, second day, 4th day, 6th day and 8th day after differentiation, then the total RNA of these cells were abstracted. The transcription factors PPAR γ , C/EBP α , and C/EBP δ mRNA expressions were assayed by RT- PCR. **RESULTS:** (1) During the differentiation induced by ASP group, PPAR γ mRNA expression in the 3T3- L1 cells were very low on the first day after inducing differentiation. The expression was increased lightly on the second and 4th day after inducing differentiation, and it was kept on the high level on the 6th and 8th day after induction. The C/EBP δ mRNA was expressed at low level on the first day after inducing differentiation. It was increased significantly on the second day and decreased significantly on the 4th day after induction. C/EBP δ mRNA was not be detected on the 6th and 8th day after ir-

[收稿日期] 2004- 04- 13 [修回日期] 2004- 07- 02

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30170442); 国际合作交流项目(No. 3031120163)

Tel: 027- 83663315; E- mail: luhuilng777@sohu.com

duction. The expression of C/EBP α mRNA was low on the first day after inducing differentiation. It was increased on the second and 4th day after induction and it was kept on high level on the 6th and 8th day after induction. (2) During the differentiation induced by IBMX+ DEX group, PPAR γ , C/EBP δ and C/EBP α mRNA expressions were increased at the beginning of differentiation, but the levels of expression were lower than those in ASP group. **CONCLUSION:** The sequential expression of these transcription factors induced by ASP may be the important mechanism for the role of ASP to induce the preadipocytes to differentiate.

[**KEY WORDS**] Acylation stimulating protein; Adipocytes; Cell differentiation; Transcription factors

促酰基化蛋白(acylation stimulating protein, ASP)是一种新型的脂源性激素,具有促进游离脂肪酸酯化,增加甘油三酯的合成作用,还可以促进葡萄糖的转运^[1]。最近的研究发现,ASP具有诱导前脂肪细胞分化的生物学作用^[2]。已知,特异性分化转录因子的表达对脂肪细胞分化具有关键作用,本研究观察ASP诱导前脂肪细胞分化过程中几种与分化有关的转录因子包括过氧化物酶体增殖物活化受体家族(peroxisome proliferator-activated receptor γ)、CCAAT/增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP)家族C/EBP α 和C/EBP δ mRNA表达的情况,旨在探讨ASP诱导前脂肪细胞分化的可能机制。

材 料 和 方 法

1 材料

DMEM/F12培养基、胰蛋白酶、胎牛血清和Trizol试剂(购于美国Gibco公司),分化诱导剂1-甲基3-异丁基黄嘌呤(1-methyl-3-isobutylxanthine, IBMX)、地塞米松(dexamethasone, DEX)、胰岛素(insulin)(均购于Sigma公司)。3T3-L1前脂肪细胞株购于美国ATCC公司;促酰基化蛋白(acylation stimulating protein, ASP)加拿大麦吉尔大学医学中心皇家维多利亚医院心血管研究室提供;RNasin酶(recombinant ribonuclease inhibitor, 重组RNA酶抑制剂)购自晶美生物公司;Oligo(dT)15、Money鼠白血病病毒(MMLV)反转录酶、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)。

2 方法

2.1 脂肪细胞的培养和实验分组 3T3-L1前脂肪细胞在含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基中培养,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6孔板。当细胞完全汇合后

24h(此时为诱导分化的第0d),加入分化诱导刺激。根据诱导分化剂的不同分为ASP组和IBMX+DEX组:ASP组加入50 mg/L ASP+0.5 mmol/L IBMX+1.0 μ mol/L DEX培养48 h,然后换用含50 mg/L ASP的生长液培养48 h,从分化第5d起仅用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养;IBMX+DEX组:加入0.5 mmol/L IBMX+1.0 μ mol/L DEX培养48 h,然后换用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养;在分化过程中观察细胞形态学的变化并拍照。分别在诱导分化第1d、2d、4d、6d、8d收获细胞并提取总RNA。

2.2 总RNA的提取和测定 严格按照Gibco公司Trizol试剂说明书的步骤和条件提取细胞的总RNA,测定其吸光度。RNA浓度(g/L) = $A_{260} \times 100 \times 40/1000$, $A_{260}/A_{280} = 1.8-2.0$,并进行琼脂糖凝胶电泳,检测所提取的RNA完整性。

2.3 逆转录和PCR反应 取5 μ g RNA,加0.5 μ L (2×10^7 U/L) RNA酶抑制剂,2.5 μ L (1 g/L) Oligo(dT)15,加DEPC处理过的水至13.8 μ L,70 $^{\circ}$ C变性5 min,冰上冷却5 min,然后加入MMLV 5 \times 缓冲液5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 5 μ L, MMLV 1.0 μ L (2×10^8 U/L), 37 $^{\circ}$ C逆转录90 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min 灭活后冰上冷却5 min, -20 $^{\circ}$ C保存。以 β -actin作为内参照,相对定量检测PPAR γ 、C/EBP α 、C/EBP δ mRNA。PPAR γ 引物序列上游为5'-GCT GTT ATG GGT GAA ACT CTG-3',下游为5'-TGG TAT TCT TGG AGC TTC AGG-3',扩增片段长度分别为314 bp; C/EBP δ 引物序列上游为5'-GCC TTT GAG ACT CTG AAC G-3',下游为5'-TGT ACC TTA GCT GCA ATG G-3',扩增片段长度分别为211 bp; C/EBP α 引物序列上游为5'-GGC AAA AAG GGA ACC ATT GAC G-3',下游为5'-CTG TAC TCC ATG TCG TAA C-3',扩增片段长度分别为356 bp;内参照 β -actin引物序列上游为5'-TGT GAT GCT GCG AAT CGC TCA G-3',下游为5'-TTT GAT GTC ACG CAC CAT TTC C-3',扩增片段长度分别为540 bp。PCR反应体系30 μ L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, Taq酶

2.5 U。反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 50 s, 65 °C 延伸 60 s, 72 °C 终延伸 5 min, 循环 30 次, 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分析, 测定各条带的吸光度值。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。

3 统计学处理

用 SPSS 10.0 软件进行统计分析, 实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组数据间的比较采用方差分析。

结 果

1 ASP 诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞的形态学观察

3T3-L1 前脂肪细胞表现为成纤维细胞样, 长梭形, 胞浆中无脂滴(图 1); ASP 诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化 6 d 时, 细胞变大、变圆, 并可见明显的脂滴, 脂滴围绕胞核形成典型的“戒环”样结构; 诱导分化 8 d 时, 更多的脂滴积累(图 2)。

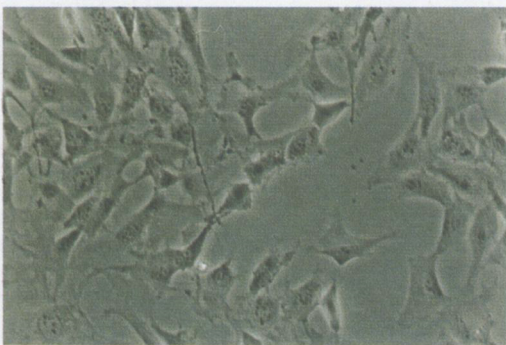


Fig 1 The form of 3T3-L1 preadipocytes ($\times 100$).
图 1 3T3-L1 前脂肪细胞分化前的形态

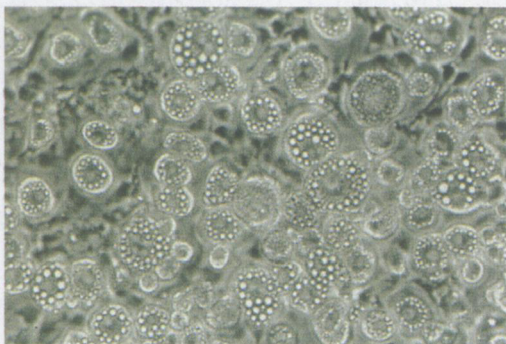


Fig 2 Morphological changes of 3T3-L1 adipocytes after induced differentiation by ASP group ($\times 100$).
图 2 ASP 诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化成熟后的形态变化

2 ASP 对分化过程中 PPAR γ mRNA 表达的影响

在诱导分化 1 d 时, PPAR γ mRNA 有低水平表达, 诱导分化 2 d 时表达升高, 是分化 1 d 表达量的 2

倍($P < 0.05$); 在诱导分化 4 d 表达继续升高, 是诱导分化 2 d 时表达量的 3.8 倍($P < 0.05$), 诱导分化 6 d 和 8 d, PPAR γ mRNA 持续高水平表达, 分别是诱导分化 2 d 时的 4.7 和 5.2 倍($P < 0.05$, $P < 0.05$), 与分化 4 d 相比具有显著差异($P < 0.05$)(图 3 和图 6)。

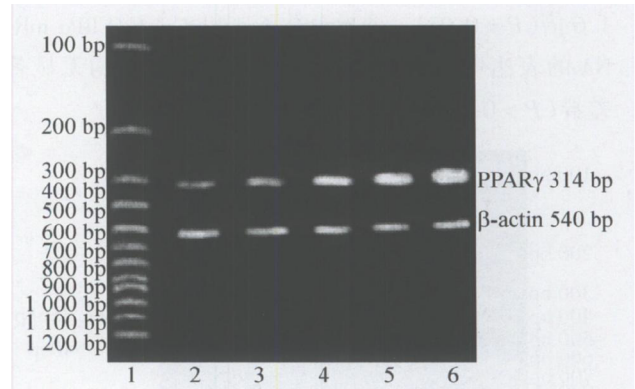


Fig 3 The expression of PPAR γ mRNA during differentiation induced by ASP group. 1: DNA marker; 2: 1 d after differentiation; 3: 2 d after differentiation; 4: 4 d after differentiation; 5: 6 d after differentiation; 6: 8 d after differentiation.

图 3 ASP 组诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中 PPAR γ mRNA 的表达

3 ASP 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中 C/EBP δ mRNA 表达的影响

C/EBP δ mRNA 在诱导分化 1 d 就有中度表达, 并在诱导分化 2 d 时显著升高, 是分化 1 d 时的表达水平的 2 倍($P < 0.05$)。诱导分化 4 d 时, C/EBP δ mRNA 表达急剧减少, 仅是分化 2 d 时的 1/6($P < 0.05$); 诱导分化 6 d 和 8 d, 检测不到 C/EBP δ mRNA 的表达(图 4 和图 6)。

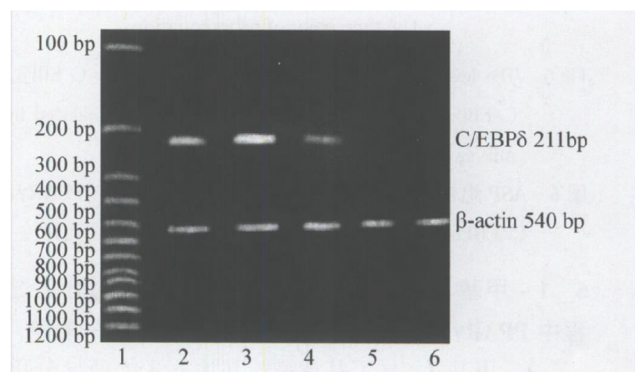


Fig 4 The expression of C/EBP δ mRNA during differentiation induced by ASP group. 1: DNA marker; 2: 1 d after differentiation; 3: 2 d after differentiation; 4: 4 d after differentiation; 5: 6 d after differentiation; 6: 8 d after differentiation.

图 4 ASP 组诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中 C/EBP δ mRNA 的表达

4 ASP 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中 C/EBPα mRNA 表达的影响

C/EBPα mRNA 在诱导分化 1 d 仅有低水平表达, 诱导分化 2 d 时开始升高, 是分化 1 d 时的 4 倍。在诱导分化 4 d, 表达水平明显升高, 是分化 2 d 时的 1.6 倍 ($P < 0.05$)。诱导分化 6 d 和 8 d, C/EBPα mRNA 的表达均保持高水平, 与分化 4 d 相比均无显著差异 ($P > 0.05$) (图 5 和图 6)。

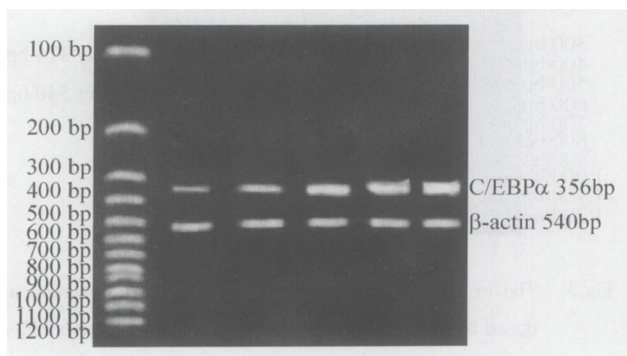


Fig 5 The expression of C/EBPα mRNA during differentiation induced by ASP group. 1: DNA marker; 2: 1 d after differentiation; 3: 2 d after differentiation; 4: 4 d after differentiation; 5: 6 d after differentiation; 6: 8 d after differentiation.

图 5 ASP 组诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中 C/EBPα mRNA 的表达

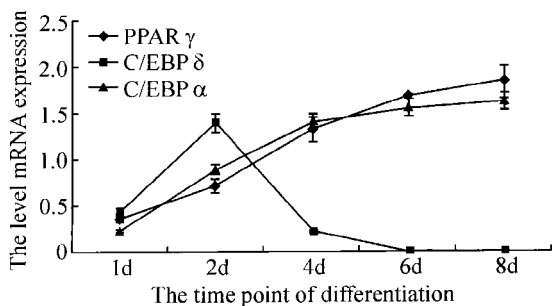


Fig 6 The levels and the sequence change of PPARγ, C/EBPδ, C/EBPα mRNA expression during differentiation induced by ASP group in 3T3-L1 adipocytes. $\bar{x} \pm s$. $n = 4$.

图 6 ASP 组诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中 PPARγ、C/EBPδ、C/EBPα mRNA 表达的强度和时序性变化

5 1- 甲基 3- 异丁基黄嘌呤和地塞米松对分化过程中 PPARγ、C/EBPδ、C/EBPα mRNA 表达的影响

1- 甲基 3- 异丁基黄嘌呤和地塞米松诱导分化过程中, PPARγ mRNA 在分化 2 d 时表达升高, 是分化 1 d 时表达的 2 倍 ($P < 0.05$)。分化 4 d 时, PPARγ mRNA 表达继续升高, 是分化 2 d 时的 1.5 倍 ($P < 0.05$)。分化 6 d 和 8 d 时, PPARγ mRNA 表达与分化 4 d 相比无显著差异 ($P > 0.05$)。C/EBPδ mRNA 仅

在诱导分化第 2 d 急剧升高, 是分化 1 d 时表达的 2.3 倍 ($P < 0.05$)。在分化 4 d 就恢复到分化 1 d 时的表达水平, 在分化 6 d 和 8 d 时检测不到 C/EBPδ mRNA 的表达。C/EBPα mRNA 在诱导分化 2 d 时表达升高, 是分化 1 d 时表达的 2 倍 ($P > 0.05$)。分化 4 d 时表达水平升高, 是分化 1 d 时表达的 3 倍 ($P > 0.05$)。分化 6 d 和 8 d 时 C/EBPα mRNA 表达与分化 4 d 时的表达水平相比无明显的变化 ($P > 0.05$) (图 7)。

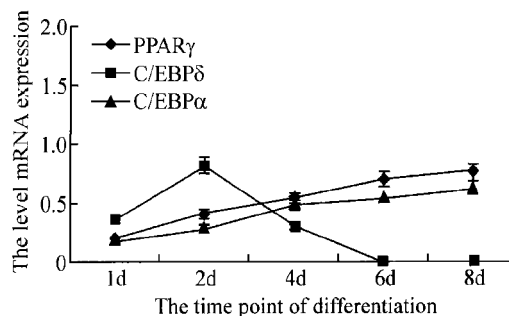


Fig 7 The levels and the sequence change of PPARγ, C/EBPδ, C/EBPα mRNA expression during differentiation induced by IBMX+DEX in 3T3-L1 adipocytes. $\bar{x} \pm s$. $n = 4$.

图 7 IBMX+DEX 诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中 PPARγ、C/EBPδ、C/EBPα mRNA 表达的强度和时序性变化

讨 论

最新的研究发现促酰基化蛋白 (acylation stimulating protein, ASP) 具有促进前脂肪细胞分化的生物学作用。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。脂肪细胞增殖、分化失常, 可引起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^[3]。因此, 脂肪细胞的分化成为目前国际上研究的热点。本研究组已证实 ASP 可以诱导 3T3-L1 前脂肪细胞从形态学上分化为成熟脂肪细胞, 并刺激 3T3-L1 细胞进行克隆增殖^[2]。

3T3-L1 前脂肪细胞是国际上公认的研究脂肪细胞分化的细胞株, 在经典激素鸡尾酒法 (包括 insulin、IBMX、DEX) 的诱导下最终分化为成熟的脂肪细胞。近年来脂肪细胞分化的分子机制的研究取得了较大的进展, 认为激素、饮食及遗传基因的作用, 最终都是通过调节特异性的脂肪分化转录因子的途径诱导脂肪细胞分化的, 其中主要的转录因子是

[参 考 文 献]

PPARs 和 C/EBPs 家族,对脂肪细胞的分化起到关键性的作用^[4]。ASP 这一新型脂源性激素具有诱导脂肪分化的作用,深入探讨 ASP 对脂肪细胞分化转录因子 PPAR γ , C/EBP α , C/EBP δ mRNA 表达的影响,对揭示生理和病理状态下脂肪细胞分化和能量代谢的规律具有重要意义,进而为肥胖症和胰岛素抵抗等相关疾病的防治开拓新途径。

本研究结果显示,用 ASP 替代经典鸡尾酒激素诱导方案中的胰岛素,诱导前脂肪细胞分化过程中,转录因子 PPAR γ 、C/EBP α 、C/EBP δ mRNA 表达呈现一定的时间顺序,其中 C/EBP δ mRNA 在 3T3-L1 前脂肪细胞中就有低水平的表达,并且在诱导分化第 1 d 表达就明显升高,之后开始下降,分化晚期无表达;C/EBP α 和 PPAR γ 与 C/EBP δ 相比,表达开始得较晚,随着分化的进行表达逐渐升高,并持续到终末分化期。已知,转录因子对脂肪细胞的分化具有重要意义,C/EBP δ 可以加快脂肪细胞的分化进程,并且是诱导 PPAR γ 产生的主要转录调节因子^[5],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^[6],C/EBP α 可诱导前脂肪细胞克隆增殖的停止,为促进其进入终末分化阶段创造特定的细胞环境,可以激活与脂肪分化相关基因的表达^[7]。可见 ASP 诱导前脂肪细胞分化过程中,对转录因子表达的强弱和时序性的影响,是 ASP 诱导前脂肪细胞分化的重要分子机制之一。

- [1] Cianflone K, Xia Z, Chen LY. Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1609(2): 127-143.
- [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[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, 20(3): 383-386.
- [3] Fortuno A, Rodriguez A, Gomez-Ambrosi J, et al. Adipose tissue as an endocrine organ: role of leptin and adiponectin in the pathogenesis of cardiovascular diseases [J]. *J Physiol Biochem*, 2003, 59(1): 51-60.
- [4] Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE. Molecular regulation of adipocyte differentiation [J]. *Cell Dev Biol*, 1999, 10(1): 3-10.
- [5] Kanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, et al. Defective adipocytes differentiation in mice lacking the C/EBP β and/or C/EBP δ gene [J]. *EMBO J*, 1997, 16(6): 7432-7443.
- [6] Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, et al. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Cell*, 1999, 4(1): 611-617.
- [7] Dardington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(20): 30057-30060.
- [8] Cianflone K, Maslowka M, Sniderman AD. Acylation stimulating protein (ASP), an adipocyte autocrine: new directions [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 1999, 10(1): 31-41.