

小鼠3T3-L1前脂肪细胞分化过程中过氧化物酶增殖物激活受体 γ 与CCAAT/增强子结合蛋白 α 的表达*

陈思凡, 孙 健, 郑 琳, 张子丽, 孙延双, 冯 翔

Expressions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and CCAAT/enhancer binding protein alpha during the differentiation process of mouse 3T3-L1 preadipocytes

Chen Si-fan, Sun Jian, Zheng Lin, Zhang Zi-li, Sun Yan-shuang, Feng Xiang

Abstract

BACKGROUND: Few studies were concerned about the molecular mechanisms in the process of adipocyte differentiation at present. The transcription factors of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) and CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) family can induce and promote the differentiation, but the mechanisms were rarely reported.

OBJECTIVE: To investigate PPAR γ and C/EBP α expression during the process of murine 3T3-L1 preadipocytes differentiating into mature adipocytes, and explore the mechanisms in the differentiation process of adipocytes.

METHODS: Murine 3T3-L1 preadipocytes was cultured *in vitro* and induced by using the classic hormone-cocktail method (1-methyl-3-butyl-anthine + dexamethasone + insulin). At 0, 2, 4, 6 and 8 days following induction, oil red O staining method and spectrophotography were applied to analyze the differentiation of adipocytes. Real time polymerase chain reaction (PCR) and Western blot methods were applied to detect the expression of PPAR γ and C/EBP α at different time points.

RESULTS AND CONCLUSION: In the process of cell differentiation, the difference of relative fat content, expression levels of PPAR γ and C/EBP α were significantly increased ($P < 0.01$). These indicated that PPAR γ and C/EBP α play a promoting effect in adipocyte differentiation from 3T3-L1 preadipocytes.

Chen SF, Sun J, Zheng L, Zhang ZL, Sun YS, Feng X. Expressions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and CCAAT/enhancer binding protein alpha during the differentiation process of mouse 3T3-L1 preadipocytes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(41): 7653-7656. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前关于脂肪细胞分化的分子作用机制的研究较少。过氧化物酶增殖物激活受体和 CCAAT/增强子结合蛋白家族的转录调控因子可诱导前脂肪细胞表达促进其分化成熟的多个转录因子, 但其作用机制却罕见报道。

目的: 观察小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞过程中过氧化物酶增殖物激活受体 γ 和 CCAAT/增强子结合蛋白 α 的表达, 以及在脂肪细胞分化过程中的变化。

方法: 体外培养 3T3-L1 前脂肪细胞, 采用经典激素鸡尾酒诱导法诱导细胞分化, 诱导剂为 1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤、地塞米松和胰岛素。诱导后 0, 2, 4, 6 和 8 d, 用油红 O 染色和染色比色法分析脂肪细胞的分化程度, 采用实时 PCR 和 Western blot 技术检测不同时间点的过氧化物酶增殖物激活受体 γ 和 CCAAT/增强子结合蛋白 α 的表达。

结果与结论: 在前体脂肪细胞的分化过程中, 随着时间的延长相对脂肪含量、过氧化物酶增殖物激活受体 γ 与 CCAAT/增强子结合蛋白 α 表达水平均明显升高($P < 0.01$)。说明在小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞过程中, 过氧化物酶增殖物激活受体 γ 与 CCAAT/增强子结合蛋白 α 对细胞分化可能起促进作用。

关键词: 脂肪细胞; 细胞培养; 细胞分化; 过氧化物酶增殖物激活受体 γ ; CCAAT/增强子结合蛋白 α
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.41.013

陈思凡, 孙健, 郑琳, 张子丽, 孙延双, 冯翔. 小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中过氧化物酶增殖物激活受体 γ 与 CCAAT/增强子结合蛋白 α 的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(41):7653-7656. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

脂肪组织不仅是被动的能量储存器官, 而且还可以分泌多种脂肪细胞因子^[1]。脂肪细胞分化异常可导致脂肪过度蓄积, 是代谢综合征的主要危险因素之一^[2]。因此有关脂肪细胞的分化机制及其调控的研究, 对于探讨上述疾病的预防与治疗具有重要意义。

过氧化物酶增殖物激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)是核激

素受体超家族中的一员, C/EBP是CCAAT增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP), 此二者被认为是脂肪细胞分化的早期标记物^[3]。过氧化物酶增殖物激活受体 γ (PPAR γ)和CCAAT/增强子结合蛋白 α 分别是此二者的家族成员之一, 但它们在脂肪细胞分化过程中的表达如何随时间变化? 蛋白表达变化与细胞的脂质积累在时间上是否具有同步性?

实验以体外培养的小鼠3T3-L1前脂肪细胞为研究对象, 从基因转录和蛋白表达水平分别

School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Chen Si-fan ★, Studying for master's degree, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China dishi1984@126.com

Correspondence to: Feng Xiang, Doctor, Associate professor, Master's supervisor, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China fengx@mail.sysu.edu.cn

Received: 2010-06-07
Accepted: 2010-09-08

中山大学公共卫生学院, 广东省广州市 510080

陈思凡 ★, 男, 1984 年生, 广东省梅州市人, 汉族, 中山大学公共卫生学院在读硕士, 主要从事营养与健康方面的研究。dish1984@126.com

通讯作者: 冯翔, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事营养与健康方面的研究。fengx@mail.sysu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)41-07653-04

收稿日期: 2010-06-07
修回日期: 2010-09-08
(20091209007/WJ-Q)

检测细胞分化过程中PPAR γ 和C/EBP α 的mRNA和蛋白表达变化, 为进一步探讨前脂肪细胞分化的作用机制提供理论依据。

1 材料和方法

设计: 细胞培养实验。

时间及地点: 于2009-03/09在中山大学公共卫生学院中心实验室完成。

材料: 3T3-L1细胞株购自中国科学院上海细胞库。

试剂、药品及仪器:

试剂、药品及仪器	来源
1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤, 地塞米松, 合成人胰岛素, 油红 O	美国 Sigma 公司
Trizol	美国 Invitrogen 公司
实时 PCR 试剂盒	日本 TaKaRa 公司
Sequence Detection System 软件	美国 ABI 公司
兔抗小鼠 PPAR γ 单克隆抗体	英国 abcam 公司
兔抗小鼠 C/EBP α 单克隆抗体	美国 CST 公司
兔抗小鼠 GAPDH 单克隆抗体	武汉 Boster 公司
BCA 试剂盒	上海 Beyotime 公司

实验方法:

3T3-L1前脂肪细胞的培养: 在高糖DMEM培养基中, 添加体积分数10%新生牛血清, 即为完全培养基(含青、链霉素)^[4]。3T3-L1前脂肪细胞用完全培养基在37 °C、体积分数为5%的CO₂、95%湿度的条件下培养。

3T3-L1前脂肪细胞的分化: 细胞按5×10⁷ L⁻¹的浓度接种于24孔培养板中, 500 μL/孔, 待细胞汇合后接触抑制48 h, 换用含0.5 mmol/L的1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤、1 μmol/L地塞米松和10 mg/L胰岛素的培养基培养48 h, 然后换用含10 mg/L胰岛素的培养基培养48 h, 随后再换用完全培养基继续培养, 每隔2 d换液1次, 连续培养4 d, 细胞密度达85%以上即可认为细胞已分化为成熟脂肪细胞^[5]。

实时PCR检测PPAR γ 和C/EBP α 的mRNA表达: 在细胞诱导分化的不同时间点, 用Trizol 抽提细胞总RNA^[6], 根据试剂盒的说明进行逆转录及实时PCR。扩增条件: 95 °C预变性30 s, 95 °C变性5 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 扩增40个循环。用Sequence Detection System软件分析各组的CT值, 通过计算2^{- $\Delta\Delta$ CT}得出各组基因的相对表达水平。

引物序列:

Prime	Sequence (5' -3')
PPAR γ	Forward: TGT CGG TTT CAG AAG TGC CTT G Reverse: TTC AGC TGG TCG ATA TCA CTG GAG
C/EBP α	Forward: TGC GCA AGA GCC GAG ATA AAG Reverse: TCA CGG CTC AGC TGT TCC AC
β -actin	Forward: CAT CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA Reverse: ATG GAG CCA CCG ATC CAC A

Western blot检测PPAR γ 和C/EBP α 蛋白质表达: 在细胞诱导分化的不同时间点收集细胞, 冰上裂解30 min, 每隔10 min振荡1次, 提取细胞总蛋白^[7], 采用BCA试剂盒进行蛋白定量。灌制体积分数10%的分离胶和体积分数5%的浓缩胶, 恒压120 V, 80 mA预电泳10 min, 按30 μL/孔上样, 进行SDS-PAGE电泳, 用PVDF膜进行半干式转膜。PBST配制的体积分数5%脱脂奶粉室温封闭1h, 加入兔抗小鼠PPAR γ 单克隆抗体(1 : 500)、兔抗小鼠C/EBP α 单克隆抗体(1 : 1 000)和兔抗小鼠GAPDH单克隆抗体(1 : 1 000)在4 °C下孵育过夜, 用HRP标记的羊抗兔抗体(1 : 5 000)室温孵育1 h, 暗房中滴加发光底物混合物2 mL于膜上, 用X射线片曝光、显影和定影。

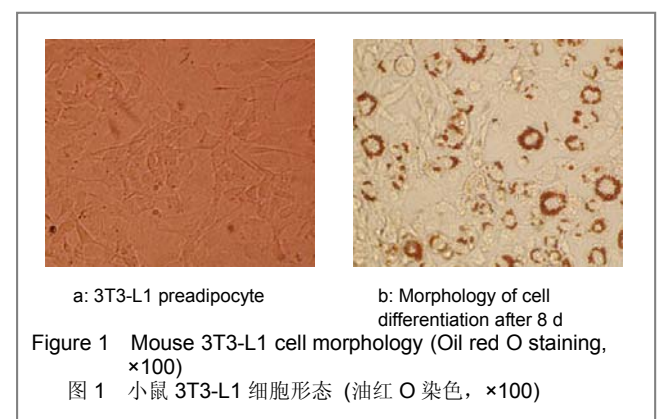
主要观察指标: 染色比色法分析脂肪细胞的分化程度: 以加入诱导分化液的时间为起点, 于0, 2, 4, 6和8 d后对细胞进行油红O染色, 每组平行排列3个复孔, 重复3次, 观察细胞形态变化, 用异丙醇处理染色后的细胞, 在490 nm波长下测定吸光度(A)值, 计算不同时间点相对脂肪含量的变化。

设计、实施、评估者: 实验的设计由通讯作者和第一作者完成, 实施由第一作者及其他作者合作完成, 评估由通讯作者完成。

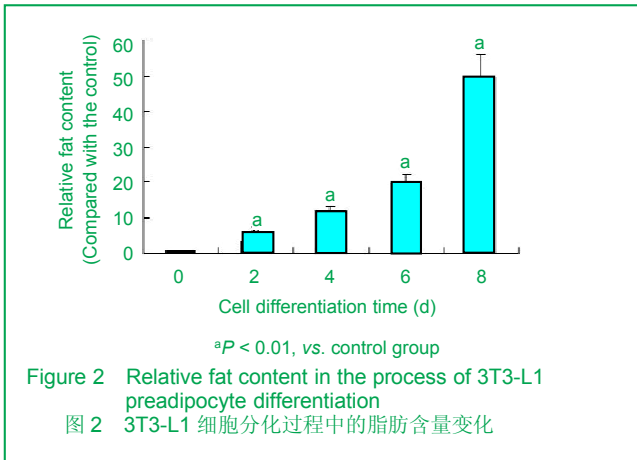
统计学分析: 实验计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 差表示, 采用SPSS 11.0统计学软件, 组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析法, 组内差异比较采用LSD-t法, P < 0.05表示差异有显著性意义。

2 结果

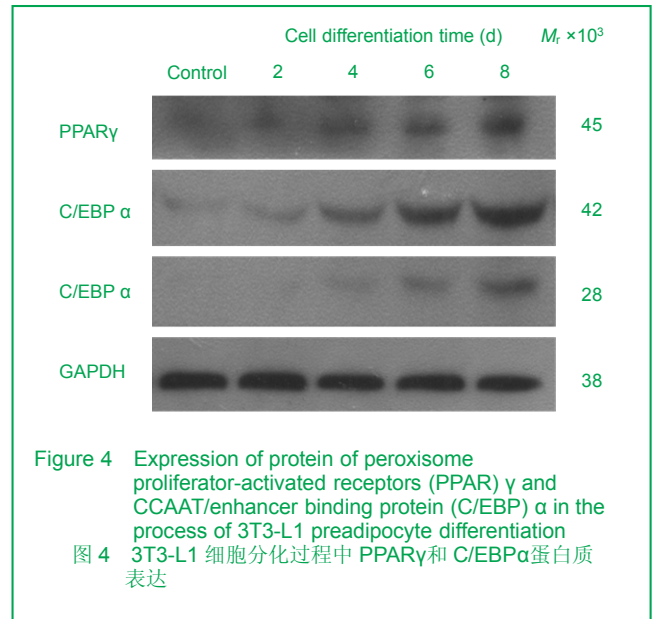
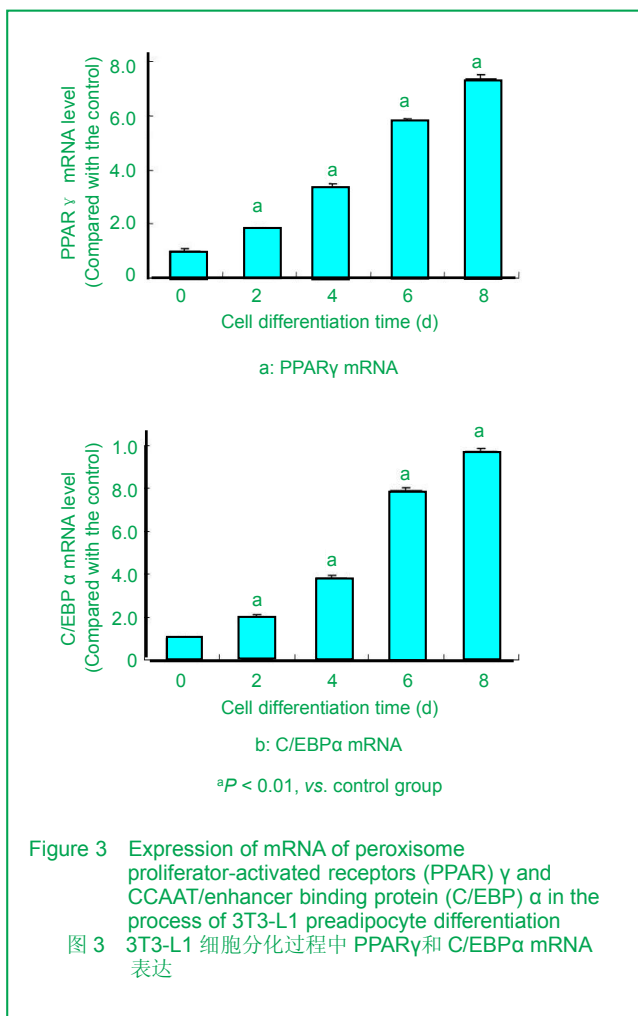
2.1 细胞分化过程中形态学变化 3T3-L1前脂肪细胞表现为成纤维细胞样外形, 多为梭形或多角形, 胞浆中无脂滴。经诱导分化后, 细胞内逐渐出现分散的脂质小滴, 随着分化的进展, 细胞变大、变圆, 胞内脂滴不断增多, 大小不等呈散状分布, 小脂滴逐渐大量融合成大脂滴, 脂滴充满胞浆, 将细胞核挤至边缘, 通过油红O染色可见染成红色的脂滴, 见图1。



2.2 细胞分化过程中相对脂肪含量变化 前体脂肪细胞经过生长抑制、克隆性增殖和一系列基因表达的变化, 逐渐分化为成熟的脂肪细胞, 分化过程中相对脂肪含量随着时间的延长明显升高($P < 0.01$), 见图2。



2.3 细胞分化过程中PPAR γ 和C/EBP α 表达水平变化 实时PCR结果显示, 与前脂肪细胞相比, 分化过程不同时间点PPAR γ 和C/EBP α mRNA表达水平上升($P < 0.01$), 呈剂量-反应关系, 见图3。Western blot检测结果与之变化趋势一致, 见图4。



3 讨论

脂肪组织或细胞可在机体能量平衡中发挥重要作用。前脂肪细胞在体内分化为成熟的脂肪细胞, 脂肪细胞数量的增多导致脂肪组织的生长^[8]。脂肪细胞增殖和分化异常可引起脂肪过多堆积, 继而导致肥胖其它代谢综合征的产生, 目前已成为人类健康的重要问题^[9]。关于脂肪细胞分化的调控机制的探讨是近年来的研究热点。

3T3-L1前脂肪细胞系是目前应用最为广泛的细胞系。随着分化过程的进行, 细胞经历形态学上的变化, 细胞形状从成纤维细胞形逐渐变成近圆形或圆形, 同时细胞出现大小不等的脂滴, 最后成为成熟的脂肪细胞。细胞形态的变化是分化过程中的必须过程, 而不仅仅是脂类积累的结果。通过实验阻断脂肪酸的合成, 减少脂质的积聚, 仍可以观察到细胞经历形态学上的变化^[10]。因此细胞形态的变化也是脂肪细胞分化的早期标记之一。实验通过“鸡尾酒”诱导法, 85%以上的前脂肪细胞可以分化为成熟的脂肪细胞, 细胞形态从梭形或多角形变为圆形或椭圆形, 显微镜下可清楚观察到细胞内的脂滴。采用油红O染色提取法相对定量测定细胞内脂肪含量的动态变化, 结果表明细胞培养第2天开始有脂肪的积聚, 分化4 d后积聚量明显增多, 8 d后脂肪积聚达到高峰, 此时3T3-L1前脂肪细胞分化为成熟的脂肪细胞。

前脂肪细胞的分化受多种激素和细胞因子的调节, 其中包括环腺苷酸、胰岛素、甲状腺素、糖皮质激素和胰岛素样生长因子1等可促进前脂肪细胞的分化^[11]。分化过程以多种蛋白质基因的表达为特征。这些激素和生长因子可诱导前脂肪细胞表达促进其分化成熟的多个

转录因子。研究发现, 脂蛋白脂酶的表达是脂肪细胞分化的早期标记, 脂蛋白脂酶的高表达提示着脂肪积累的开始^[12]。但脂蛋白脂酶的表达并不是脂肪细胞所特有的, 其他类型的间质细胞如心肌细胞和巨噬细胞也能合成和分泌脂蛋白脂酶, 说明脂蛋白脂酶并不是脂肪细胞分化的特异性标记。目前认为, 可以作为脂肪细胞分化的早期标记的是PPAR家族和C/EBP家族的转录调控因子。二者的主要异构体是脂肪组织或细胞中特有的, 在前脂肪细胞和成熟脂肪细胞中均可检测到^[13]。

PPAR 家族有 3 个成员: PPAR α , PPAR γ 和 PPAR δ ^[14]。其中, PPAR γ 可调控乙酰辅酶A羧化酶、脂肪酸合成酶和激素敏感脂肪酶等基因的表达, 这些基因都与脂肪代谢有关, PPAR γ 可通过作用于它们而最终促进脂肪的合成^[15]。研究发现, PPAR γ 纯合缺失小鼠在胚胎发育的10 d左右死亡, 10 d以内的小鼠胚胎还没有形成可检测到的脂肪, 而正常小鼠10 d以内的胚胎则可以检测到脂肪, 这表明PPAR γ 是体内脂肪合成所必需的^[16]。C/EBP属于亮氨酸拉链转录因子家族, 是另一类脂肪细胞分化的转录调节因子, 有3个成员: C/EBP α , C/EBP β 和C/EBP δ ^[17]。在分化早期出现的是C/EBP β 和C/EBP δ 的瞬时表达, 而后较晚阶段C/EBP α 增加表达^[18]。C/EBP α 的过表达可以加速前脂肪细胞的分化, 而反义RNA的表达则可以抑制此分化过程^[19]。C/EBP β 和C/EBP δ 也是诱导PPAR γ 产生的主要因子, PPAR γ 和C/EBP α 共同诱导脂肪细胞表达多种特异的基因, 从而使细胞得以最终分化^[20]。

实验结果显示在细胞分化过程中, PPAR γ 与C/EBP α 的mRNA水平逐渐升高, 8 d后达到高峰, 而PPAR γ 和C/EBP α 的蛋白水平则在分化第4天明显升高, 并逐渐增加, 到第8天达到高峰, 这些现象与细胞脂肪的积聚结果是一致的, 表明PPAR γ 与C/EBP α 参与了细胞分化, 对脂肪细胞的分化可能起到促进的作用。但PPAR γ 和C/EBP α 相互之间有无影响? PPAR γ 与C/EBP α 的反义RNA表达能否阻断前脂肪细胞的分化? 这些问题有待于进一步的研究。而PPAR γ 与C/EBP α 作为调控脂肪细胞分化的潜在位点, 对于开发治疗肥胖症的新药物和进一步探讨肥胖症的发病机制具有重要意义。

4 参考文献

[1] Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-846.
 [2] López-Miranda J, Pérez-Martínez P, Marin C, et al. Dietary fat, genes and insulin sensitivity. *J Mol Med*. 2007;85(3):213-226.
 [3] Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPAR γ . *Cell*. 2005;123(6):993-999.
 [4] Lequeux C, Auxenfans C, Mojallal A, et al. Optimization of a culture medium for the differentiation of preadipocytes into adipocytes in a monolayer. *Biomed Mater Eng*. 2009;19(4-5):283-291.

[5] Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 1974;3(2):127-133.
 [6] Mraz M, Malinova K, Mayer J, et al. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(1):1-4.
 [7] Scarlatti F, Maffei R, Beau I, et al. Role of non canonical Beclin 1 independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death and Differentiation*. 2008;15(8):1318-1329.
 [8] Svedman P. Mechanical homeostasis regulating adipose tissue volume. *Head Face Med*. 2007;3(1):34.
 [9] Pasarica M, Gowronska B, Burk D, et al. Adipose tissue collagen VI in obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(12):5155-5162.
 [10] Spiegelman BM, Farmer SR. Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell*. 1982;29(1):53-60.
 [11] Wang X, Liu XH, Shen L. Effect of insulin-like growth factor-1 on in vitro proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu Yu Linchuang Kangfu*. 2008;12(51):10121-10124.
 王鑫, 刘秀华, 沈俐. 3T3-L1前脂肪细胞的体外培养及胰岛素样生长因子1对其增殖、分化的作用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(51):10121-10124.
 [12] Gonzales AM, Orlando RA. Role of adipocyte-derived lipoprotein lipase in adipocyte hypertrophy. *Nutr Metab*. 2007;4:22.
 [13] Kudo M, Sugawara A, Urano A, et al. Transcription suppression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 gene expression by tumor necrosis factor alpha via an inhibition of CCAAT/enhancer-binding protein delta during the early stage of adipocyte differentiation. *Endocrinology*. 2004;145(11):4948-4956.
 [14] Daya S, Lough J, Macqueen A. Culture and differentiation of preadipocytes in two-dimensional and three-dimensional in vitro systems. *Differentiation*. 2007;75(5):360-370.
 [15] Prusty D, Park BH, Davis KE, et al. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*. 2002;277(48):46226-46232.
 [16] Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*. 1999;4(4):611-617.
 [17] Tanaka T, Yoshida N, Akira S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J*. 1997;16(24):7432-7443.
 [18] Tang QQ, Otto TC, Lane MD. CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(3):850-855.
 [19] Mauser W, Perwitz N, Meier B, et al. Direct adipotropic actions of atorvastatin: differentiation state-dependent induction of apoptosis, modulation of endocrine function, and inhibition of glucose uptake. *Eur J Pharmacol*. 2007;564(1):37-46.
 [20] Clarke SL, Robinson CE, Gimble JM. CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;240(1):99-103.

来自本文课题的更多信息--

致谢: 感谢广州市疾病预防控制中心对本课题组实验方面的指导和帮助。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: 课题通过检测 PPAR γ 和 C/EBP α 的 mRNA 和蛋白水平来探讨两者在脂肪细胞分化过程中的作用, 这对于研究肥胖、糖尿病、高血压等代谢综合征的预防与治疗具有重要意义。

设计或课题的倚倚与不足: 本实验观察到细胞分化过程 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达变化, 但未对两者进行过表达或 RNA 干扰, 尚不能完全明确它们在细胞分化过程中起促进作用, 而且 PPAR γ 和 C/EBP α 的上下游蛋白调节位点有待进一步探讨。

提供临床借鉴的价值: 本实验旨在探讨细胞分化过程中相关蛋白的表达变化, 并观察其与细胞脂质积累的关系, 这可为研究脂肪细胞分化的调控机制提供理论指导, 为临床上预防与治疗肥胖相关疾病奠定实验基础。