Ⅰ型胶原对脂肪细胞分化的影响及其分子机制初探

刘若冰　韩峻峰　徐　森　肖元元　陆俊茜　陆惠娟　魏　丽　包玉倩　贾伟平

摘　要　目的　观察不同浓度的Ⅰ型胶原(type Ⅰ collagen, Col Ⅰ)对3T3－L1前脂肪细胞诱导分化为成熟脂肪细胞的影响,初步分析其可能的作用机制。**方法**　3T3－L1前脂肪细胞诱导分化过程中加入不同浓度的Ⅰ型胶原:①采用MTT法检测3T3－L1前脂肪细胞的增殖;②油红O染色法观察分化成熟脂肪细胞形态学变化;③免疫印迹法测定脂肪细胞分化转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体γ(peroxisome proliferators－activated receptorγ, PPARγ)和CCAAT增强子结合蛋白α(CCAAT/enhancer－binding proteinα, C/EBPα)蛋白表达水平。**结果**　不同浓度Ⅰ型胶原干预后,各组3T3－L1前脂肪细胞的增殖与对照组比无显著变化。随着Ⅰ型胶原浓度升高,油红O染色逐渐变浅,提示分化成熟的脂肪细胞逐渐减少。脂肪细胞分化转录因子PPARγ和C/EBPα的蛋白表达水平逐渐降低,呈剂量依赖性,且浓度为10^{-5}mol/L和10^{-4}mol/L时与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　Ⅰ型胶原在本实验中不影响3T3－L1前脂肪细胞增殖,但呈剂量依赖性抑制其向成熟脂肪细胞分化,下调脂肪细胞分化转录因子PPARγ和C/EBPα的表达可能是其作用机制之一。

关键词　脂肪细胞分化　Ⅰ型胶原　PPARγ　C/EBPα

Effect of Type Ⅰ Collagen on the Differentiation of Adipocte and Its Underlying Molecular Mechanism.

Liu Ruobing, Han Junfeng, Xu Miao, Xiao Yuanyuan, Lu Junxi, Lu Huijuan, Wei Li, Bao Yuqian, Jia Weiping. Medical College of Suzhou University, Jiangsu 215006, China

Abstract　Objective　To study the effect of different concentration of type Ⅰ collagen (Col Ⅰ) on 3T3－L1 pre－adipocytes differentiated into mature adipocytes and the underlying molecular mechaninsms. **Methods**　During the process of 3T3－L1 pre－adipocytes differentiation, we added different concentration of type Ⅰ collagen. ①The proliferation of 3T3－L1 pre－adipocytes was detected by MTT methods. ②Through Oil Red O staining, we observed the morphological of mature adipocytes. ③We used western blot to detect the expression of transcription factors of peroxisome proliferators－activated receptorγ (PPARγ) and CCAAT/enhancer－binding protein α (C/EBPα) after 3T3－L1 pre－adipocytes differentiation. **Results**　Different concentration of type Ⅰ collagen did not affect the proliferation of 3T3－L1 preadipocytes compared with the control. With the increased concentration of type Ⅰ collagen, Oil Red O staing gradually became shallow suggesting that mature adipocytes gradually decreased. The expression of transcription factors PPARγ and C/EBPα were gradually decreased in a dose－dependent manner, and significantly when the concentrations of type Ⅰ Collagen were 10^{-5}mol/L and 10^{-4}mol/L respectively($P<0.05$). **Conclusion**　type Ⅰ collagen did not affect the proliferation of 3T3－L1 pre－adipocyte, but it could inhibit adipogenesis of 3T3－L1 preadipocytes with dose－dependent, manner and decrease the expression of PPARγ and C/EBPα protein levels.

Key words　Adipocyte differentiation; type Ⅰ Collagen; PPARγ; C/EBPα

目前,全球约有10亿人超重或肥胖,肥胖是由于脂肪细胞数目增多和(或)体积增大导致脂肪组织量增多引起,其核心环节在于脂肪细胞的过度增殖和分化[1,2]。

Aratani等[3]和Nakajima等[4]研究发现脂肪细胞分化受细胞外基质,基质硬度和密度的影响。细胞外基质包括纤维连接蛋白,骨结合素和Ⅰ型胶原(type Ⅰ collagen, Col Ⅰ)等。目前国内外尚无研究报道Ⅰ型胶原对脂肪细胞分化作用的影响。本文旨在研究Ⅰ型胶原是否参与调节3T3－L1前脂肪细胞分化进程,并且初步探讨其可能的作用机制。

材料与方法

1. 主要材料:3T3－L1前脂肪细胞购自ATCC(American Type Culture Collection)公司,DMEM高糖培养基、青链霉素、澳洲胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25%胰蛋白酶(Gibco美国),Ⅰ型胶原、噻唑蓝[3－(4,5－dimethylthiazol－2－yl)－2,5－diphenyl－Tetrazolium bromide, MTT]、地塞米松(dexamethasone, DX)、3－异丁基－1－甲基黄嘌呤(isobutylmethylxanthine, IBMX)(Sigma公司,美国)、BCA蛋白浓度测定

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670989);上海市自然科学基金资助项目(09ZR1424200)

作者单位:215006　苏州大学医学部(刘若冰);200233　上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科、上海市糖尿病研究所、上海市糖尿病临床医学中心(韩峻峰、徐森、肖元元、陆俊茜、陆惠娟、魏丽、包玉倩、贾伟平)

通讯作者:魏丽,电子信箱:weili63@hotmail.com

试剂盒(碧云天公司),胰岛素(礼来公司,美国),兔抗小鼠 PPARγ 单克隆抗体、兔抗小鼠 C/EBPα 多克隆抗体、兔抗小鼠 beta－肌动蛋白(β－actin)单克隆抗体(CST 公司,美国),二甲基亚砜(DMSO)(Sigma 公司,美国),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体(Promega 公司,美国)。

2. 3T3－L1 细胞增殖率测定(噻唑蓝 MTT 比色法):3T3－L1 细胞经过 0.25% 胰蛋白酶消化,用培养液稀释到 2000 个/孔,接种 96 孔细胞培养板常规培养 24h,加入不同浓度(0、10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}、10^{-4}mol/L)的Ⅰ型胶原培养。于加药后 72h 用 MTT 方法在酶标仪上比色。测定前 4h,用 PBS 冲洗后更换无血清 DMEM 培养液 100 微升/孔,同时加入 10 微升/孔 0.5% MTT(PBS 溶解配制,棕色瓶 4℃ 保存),培养箱孵育 4h 后加 100 微升/孔二甲基亚砜(DMSO),室温摇匀后在酶标仪上(波长 570)测定 OD 值(吸光度),表示细胞增殖功能。

3. 3T3－L1 前脂肪细胞株的培养和诱导分化:3T3－L1 前脂肪细胞生长于含 10% 胎牛血清,1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基中,置于 37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。待细胞长至汇合时换液,继续培养 48h 后定义为第 1 天,开始诱导分化,即加入含有 0.5mmol/L IBMX, 1μmol/L 地塞米松和 10mg/L 胰岛素的 10% FBS 的 DMEM 培养 48h,换以含有 10mg/L 胰岛素的培养液再培养 48h。可见少数细胞形态成圆形,并有脂滴出现。每隔 48h 更换培养液,诱导分化 8～12 天的细胞 90% 以上细胞质中含有丰富的脂滴,呈成熟脂肪细胞表型。按照上述诱导分化方法,我们的实验自诱导分化第 1 天开始按 0、10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}、10^{-4}mol/L 的不同浓度加入Ⅰ型胶原,直到细胞诱导分化成熟收集各组细胞进行相关指标测。

4. 油红 O 染色:油红 O 燃料经异丙醇溶解后过滤,置 4℃ 备用。3T3－L1 细胞分化成熟后弃培养液,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)洗 3 次,经 10% 甲醛固定液固定后,加油红 O 染液于细胞表面 10min。用 60% 异丙醇洗细胞 2 次,以去除多余的燃料,双氧水清洗,倒置显微镜下观察,拍照。

5. 免疫印迹技术(Western blot):收集各组分化成熟的脂肪细胞,用蛋白裂解液处理后离心取上清,分别取各组蛋白 30μg 行 10% SDS－PAGE 电泳后转移到 PVDF 膜上,用脱脂奶粉封闭 1h,孵育相应抗体 4℃ 过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10min,加入辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 1h,洗膜后以化学发光法(ECL)显影,成像。

6. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 软件分析数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. Ⅰ型胶原对 3T3－L1 细胞增殖及活力的影响:MTT 结果显示:当加入不同浓度的Ⅰ型胶原(0、10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}、10^{-4}mol/L)分别干预 72h 后,各组 OD 值与对照组比无统计学差异($P>0.05$)(图 1)。

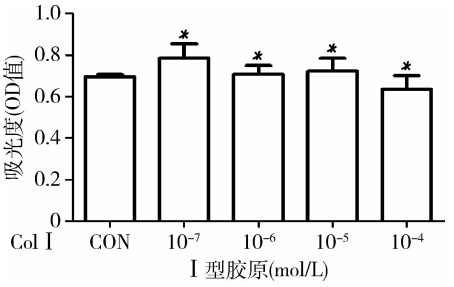

图 1　不同浓度Ⅰ型胶原干预 3T3－L1 前脂肪细胞后的增殖试验结果

与 CON 组(0mol/L)比较,* $P>0.05$

2. Ⅰ型胶原对脂肪细胞分化的影响——油红 O 染色:3T3－L1 细胞在分化进程中经不同浓度Ⅰ型胶原干预后,细胞质中的脂滴明显减少,经油红 O 染色后逐渐变浅,有剂量依赖关系。当Ⅰ型胶原浓度达到 10^{-5}mol/L 和 10^{-4}mol/L 时细胞淡染区明显扩大,提示脂肪细胞分化被显著性抑制(图 2)。

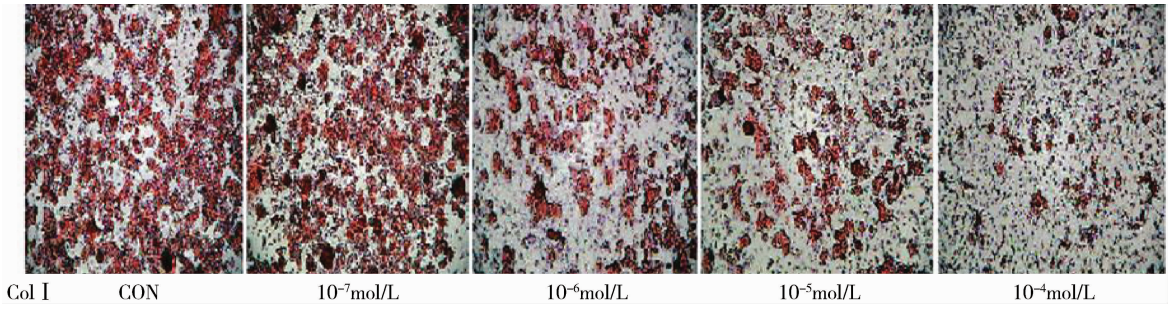

图 2　不同浓度Ⅰ型胶原干预 3T3－L1 前脂肪细胞分化成熟后油红 O 染色结果(×200)

3. Ⅰ型胶原对脂肪细胞分化转录因子 PPARγ 和 C/EBPα 的影响:Western blot 结果显示:3T3－L1 前脂肪细胞分化过程中给予不同浓度的Ⅰ型胶原处理诱导分化成熟后,随着Ⅰ型胶原浓度的升高,成熟脂肪细胞分化转录因子 PPARγ 和 C/EBPα 的表达逐渐降低,并且存在剂量依赖关系。当Ⅰ型胶原浓度为

10^{-5}和 10^{-4} mol/L 时 PPARγ 的表达显著性降低(1.16 ±0.04 和 1.12 ±0.01),差异存在统计学意义($P<0.05$)。但是当Ⅰ型胶原浓度升高到10^{-6}mol/L 时 C/EBPα 的表达开始明显降低(1.01 ±0.04),尽管其在 10^{-5}mol/L 时有所升高(1.04 ±0.04),但差异存在统计学意义($P<0.05$)(图 3)。

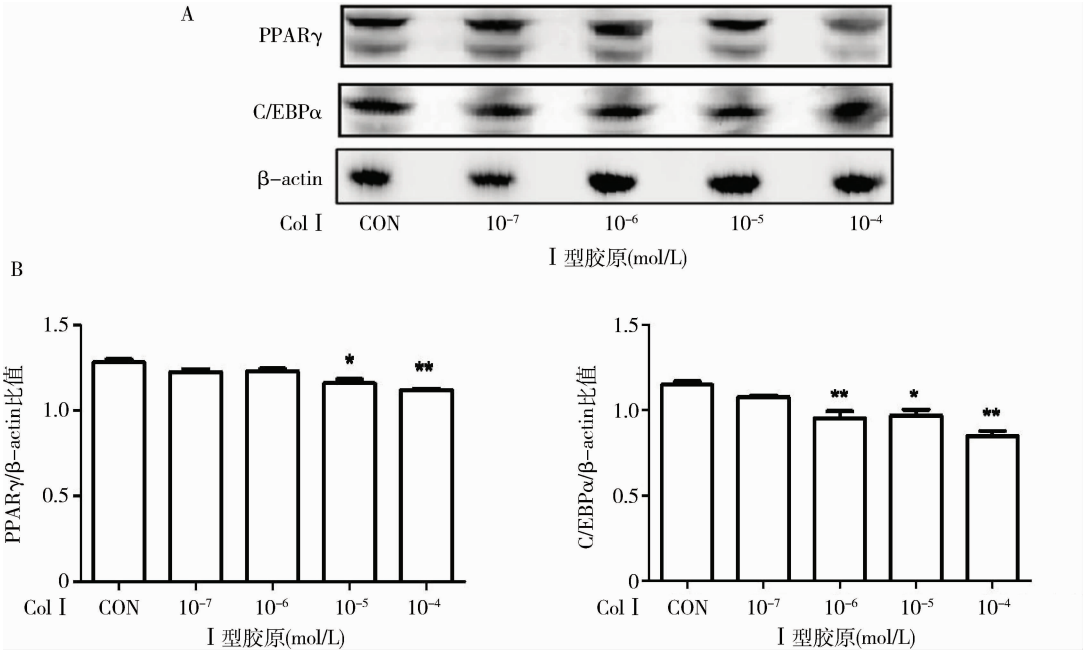

图 3　5 组 PPARγ、C/EBPα 蛋白表达(Western blot 法)

A. 3T3 - L1 前脂肪细胞分化过程中经不同浓度Ⅰ型胶原(0、10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}、10^{-4}mol/L)处理后 PPARγ 和 C/EBPα 蛋白表达水平; B. A 的量化图; 与 CON 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

讨　　论

细胞外基质不仅是连接组织的重要结构,而且发挥许多生物学功能,参与调节脂肪细胞分化,影响其代谢功能[5]。Spiegelman 等[6]早在 1983 年已发现 3T3 - F442A 细胞分化为脂肪细胞的过程可被纤维连接蛋白抑制。本课题组前期研究发现脂肪细胞分化过程中伴随Ⅰ型胶原表达降低的现象[7]。Ⅰ型胶原是细胞外基质成分之一,它是一种多糖蛋白,呈白色,含有少量的半乳糖和葡萄糖,目前发现有 28 种胶原蛋白,还包括Ⅱ型胶原、Ⅲ型胶原、Ⅳ型胶原等,它们参与构成人体蛋白质总量的 30%[8]。关于Ⅰ型胶原在脂肪细胞分化中的作用目前尚不清楚,本研究结果显示Ⅰ型胶原参与调节脂肪细胞分化,脂肪细胞分化进程中加入Ⅰ型胶原后油红 O 染色随着Ⅰ型胶原浓度的升高逐渐变浅,表明脂质聚集减少,脂肪细胞分化进程被抑制。同时 MTT 结果证实Ⅰ型胶原对 3T3 - L1 细胞增殖无抑制作用,从而排除了Ⅰ型胶原因影响细胞增殖而阻断脂肪细胞分化的可能性。笔者的这一研究结果和 Chun[9]的研究结果一致,即小鼠前脂肪细胞种植在富含Ⅰ型胶原的培养基上,与种植在软胶培养基上比,其脂肪细胞分化率明显降低。

Farmer 等[10]研究发现 CCAAT 结合蛋白增强子 α(CCAAT/enhancer - binding proteins, C/EBP α)在脂肪细胞分化过程中发挥重要作用。而且 Rosen[11]的研究发现当缺乏核转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(peroxisome proliferators - activated receptor, PPARγ)时脂肪细胞不能进行终末分化。这说明分化转录因子 C/EBPα 和 PPARγ 在脂肪细胞分化过程中发挥重要的作用。本课题组进一步对Ⅰ型胶原抑制脂肪细胞分化作用机制进行初步探索,发现Ⅰ型胶原干预后分化成熟脂肪细胞中分化转录因子 PPARγ 和 C/EBPα 蛋白表达呈剂量依赖性降低。尤其Ⅰ型胶原浓度为 10^{-5}和 10^{-4}mol/L 时,差异存在统计学意义($P<0.05$)。虽然Ⅰ型胶原浓度为 10^{-5} mol/L 时 C/EBPα 蛋白表达水平较浓度为 10^{-6}mol/L 时有所升高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。提示Ⅰ型胶原可能通过降低 PPARγ 和 C/EBPα 的表达抑制脂肪细胞分化,这一研究结果目前国内外尚无报

道。关于Ⅰ型胶原抑制脂肪细胞分化的具体机制及其影响因素尚需深入研究。

本研究首次发现Ⅰ型胶原抑制脂肪细胞分化进程，其机制可能与降低脂肪细胞分化转录因子 PPARγ 和 C/EBPα 的表达有关，是否存在其他机制共同作用，目前尚不明确，进一步深入探讨将为肥胖症的发病机制提供新的理论依据，并可能成为肥胖症治疗的新的药物靶点。

参考文献

1 Maquoi E, Munaut C, Colige A, *et al*. Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity[J]. Diabetes, 2002, 51(4): 1093 - 1101

2 Feldman BJ, Streeper RS, Farese RV, *et al*. Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(42): 15675 - 15680

3 Aratani Y, Kitagawa Y. Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3 - L1 cells and production of unorthodox laminin complex[J]. J Biol Chem, 1998, 263(31): 16163 - 16169

4 Nakajima I, Yamaguchi T, Ozutsumi K. Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation[J]. Differentiation, 1998, 63(4): 193 - 200

5 Huang G, Greenspan DS. ECM roles in the function of metabolic tissues[J]. Trends Endocrinol Metab, 2012, 23(1): 16 - 22

6 Spiegelman BM, Ginty CA. Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3 - adipocytes[J]. Cell, 1983, 35(3 Pt2): 657 - 666

7 Han J, Luo T, Gu Y, *et al*. Cathepsin K regulates adipocyte differentiation: possible involvement of type I collagen degradation [J]. Endocr J, 2009, 56(1): 55 - 63

8 Ricard - Blum S. The collagen family. Cold Spring Harb. Perspect [J]. Biol, 2011, 3(1): a004978

9 Chun TH. A pericellular collagenase directs the 3 - dimensional development of white adipose tissue[J]. Cell, 2006, 125(3): 577 - 591

10 Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation[J]. Cell Metab, 2006, 4(4): 263 - 273

11 Rosen ED. PPARγ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro[J]. Mol, Cell, 1999, 4(4): 611 - 617

（收稿日期：2013 - 03 - 11）
（修回日期：2013 - 04 - 01）

紫外 - 可见分光光度法测定巴豆中可溶性蛋白的含量

古炳明 曾 宝 熊艺花 易智彪 蔡海群 肖祖平 袁 捷

摘 要 目的 建立巴豆中可溶性蛋白含量的测定方法，为其质量评价提供理论依据。**方法** 采用紫外 - 可见分光光度（UV - VIS）法，检测波长为 593nm。**结果** 巴豆中可溶性蛋白在 0.0103 ~ 0.1030mg/ml 范围内线性关系良好（Y = 8.0871X + 0.1775，r = 0.9991，n = 6），平均回收率为 98.37%，RSD 为 1.01%。**结论** 本方法简单、方便、专属性强，可为巴豆药材的质量控制提供参考。

关键词 巴豆 紫外 - 可见分光光度法 可溶性蛋白

Soluble Protein Content in Croton TigliumL with Ultraviolet - Visible Spectrophotometry. *Gu Bingming, Zeng Bao, Xiong Yihua, Yi Zhibiao, Cai Haiqun, Xiao Zuping, Yuan Jie. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong 510006, China*

Abstract Objective Ultraviolet - Visible Spectrophotometry was established to determine the Soluble protein content in Croton tiglium L. **Methods** Reference standard method (λ = 593nm) was used to determine the content of Soluble protein in Croton tiglium L. **Results** The test of Soluble protein in croton tiglium L. was linear within the range of 0.0103 - 0.1030mg/ml (Y = 8.0871X + 0.1775, r = 0.9991, n = 6). The average recovery was 98.37%, RSD = 1.01%. **Conclusion** The method was simple and accurate. It can provide reference for croton tiglium L. materials quality control.

Key words Croton tiglium L.; Ultraviolet - visible spectrophotometry; Soluble protein

巴豆为大戟科植物巴豆（croton tiglium L.）的干燥成熟种子，味辛、性热、有大毒。内服泻下寒积、逐

基金项目：国家科技部重大新药创制专项基金资助项目（2009ZX09103 - 388）；广东省科技计划基金资助项目（2009A030100014）

作者单位：510006 广州中医药大学（古炳明、曾宝、熊艺花、易智彪、蔡海群、肖祖平、袁捷）；523808 东莞，广州中医药大学中医药数理工程研究院（熊艺花）

通讯作者：袁捷，研究员，硕士生导师，电子信箱：yuanjie16881688@vip.tom.com