

Obestatin 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖与分化

张 征¹, 邹大进^{1*}, 陈 月¹, 王 森¹, 吴 捷¹, 郭志福²

(1. 第二军医大学长海医院内分泌科, 上海 200433; 2. 长海医院心内科)

[摘要] **目的:** 观察 obestatin 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖分化的影响。**方法:** 应用不同浓度的 obestatin (10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} mmol/L) 和 10^{-10} mmol/L ghrelin 干预体外培养的 3T3-L1 前脂肪细胞, MTT 法观察其对细胞增殖的影响, 并与空白对照组比较; 分别应用 10^{-10} mmol/L obestatin 和 ghrelin 全程干预 3T3-L1 前脂肪细胞分化成熟过程(分化第 1~10 日), 采用油红 O 染色法鉴定脂肪细胞分化并测定分化成熟脂肪细胞的脂肪含量, RT-PCR 法检测分化过程中及成熟脂肪细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma 2$ (PPAR $\gamma 2$) mRNA 的表达水平, 并与对照组(加常规诱导剂)比较。**结果:** 与空白对照组相比, 不同浓度 obestatin 组细胞数量均明显降低($P < 0.05$); 10^{-10} mmol/L obestatin 连续作用 10 d 的 3T3-L1 前脂肪细胞与对照组相比, 脂肪产量明显减少($P < 0.05$); 脂肪细胞分化过程中 PPAR $\gamma 2$ 基因表达逐渐增多; 在成熟脂肪细胞中, 与对照组相比, obestatin 组 PPAR $\gamma 2$ 基因表达显著降低($P < 0.05$)。Ghrelin 的作用与之完全相反。**结论:** Obestatin 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖和分化。

[关键词] obestatin; ghrelin; PPAR $\gamma 2$ 基因; 3T3-L1 前脂肪细胞; 细胞增殖; 细胞分化

[中图分类号] R 589.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)09-0929-04

Obestatin inhibits proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes

ZHANG Zheng¹, ZOU Da-jin^{1*}, CHEN Yue¹, WANG Miao¹, WU Jie¹, GUO Zhi-fu² (1. Department of Endocrinology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of obestatin on proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. **Methods:** Obestatin (10^{-8} mmol/L, 10^{-9} mmol/L, 10^{-10} mmol/L, 10^{-11} mmol/L, and 10^{-12} mmol/L) and ghrelin (10^{-10} mmol/L) were used to treat 3T3-L1 preadipocytes. Cell proliferation was assessed by MTT assay and the results were compared with that of blank control group. The differentiation of 3T3-L1 preadipocytes (from day 1 to day 10) was interfered with obestatin or ghrelin (both at 10^{-10} mmol/L). Intracellular fat accumulation in differentiated adipocytes was determined by oil red O staining and the expression of PPAR $\gamma 2$ mRNA was detected by RT-PCR; the results were compared with that of control group (induced with routine inducer). **Results:** Compared with the blank control group, obestatin-treated groups (various concentrations of obestatin) had significantly less cells ($P < 0.05$). Oil red O staining revealed that, compared with control group, the formation of lipid droplets was significantly decreased after 10 days' of treatment with 10^{-10} mmol/L obestatin ($P < 0.05$). The expression of PPAR $\gamma 2$ gene increased with the progress of 3T3-L1 preadipocytes differentiation. PPAR $\gamma 2$ mRNA level in mature adipocytes of obestatin group was significantly lower than that in the cells of control group. The effect of ghrelin was contrary to that of obestatin. **Conclusion:** Obestatin can inhibit the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes.

[KEY WORDS] obestatin; ghrelin; PPAR $\gamma 2$ gene; 3T3-L1 preadipocyte; cell proliferation; cell differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(9): 929-932]

Obestatin 是研究人员新近在大鼠胃内发现的含 23 个氨基酸的多肽, 它由 ghrelin 前体原产生, ghrelin 基因编码产物经翻译后剪切和修饰, 其乙酰化产物为 ghrelin, 其 C 末端酰胺化产物为 obestatin。两者通过结合不同的 G 偶联蛋白受体亚型而发挥生物效应^[1]。外源性 ghrelin 可增加食物摄入及体质量, 降低能量消耗^[2], 而外源性 obestatin 则明显抑制其摄食量及体质量的增加, 且相同剂量的 obestatin 可以完全拮抗 ghrelin 促进小鼠摄食和增加体质量的作用; obestatin 可以明显延长小鼠的胃排空时间, 减少空肠收缩活动, 恰恰抵消了 ghrelin

在这两方面中的作用^[1]; obestatin 经中枢给药后促进大鼠睡眠, 而 ghrelin 则诱导大鼠觉醒^[3-4]。各种研究均提示来源相同的 obestatin 和 ghrelin 可能是调节机体食欲和体质量的一对正、反调节因子, 两者功能完全相反。有研究^[5]表明 ghrelin 促进脂肪细胞增殖和分化。但 obestatin 是否对脂肪细胞增殖

[基金项目] 国家自然科学基金(30700380)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30700380)。

[作者简介] 张 征, 硕士生, 主治医师。现在解放军第 411 医院内分泌科, 上海 200081。

* Corresponding author. E-mail: zwj22@medmail.com.cn

和分化有影响,与 ghrelin 的作用是否相反,都是值得探讨的问题。因此,本研究应用 obestatin 干预体外培养的 3T3-L1 前体脂肪细胞,观察 obestatin 对 3T3-L1 脂肪细胞增殖、分化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 3T3-L1 前脂肪细胞株由上海市瑞金医院内分泌科实验室惠赠;重组人普通胰岛素购自 Novo Nordisk 公司;obestatin 和 ghrelin 购自 Phoenix 制药公司;地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤购自 Sigma 公司;DMEM 细胞培养液购自 Gibco 公司;牛血清白蛋白(BSA)、小牛血清购自上海实生细胞技术有限公司;DMSO 为宜兴市化工厂产品。RT-PCR 实验试剂中,TRIzol 为美国 Invitrogen 公司产品。dNTP、Oligo(dT) Primer、M-MLV 逆转录酶为美国 Promega 公司产品,Taq 酶、DNA Marker DL2000 购自大连宝生物工程有限公司。二乙基焦碳酸乙酯(DEPC)、琼脂糖、RNasin 购自上海生工生物工程技术有限公司。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的测定 将复苏传代后的 3T3-L1 前脂肪细胞接种于 96 孔板中(5×10^3 /孔),用含 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养液,在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下培养。当细胞达到约 70% 融合时,换上含 0.2% BSA 的 DMEM 培养液培养 12 h,实验组再换以含 0.2% BSA 的含药培养液(含 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} mmol/L obestatin 或 10^{-10} mmol/L ghrelin),温育 48 h 后,换上 MTT 培养液 100 μ l,继续孵育 4 h,然后将培养液倒尽,吸干,每孔加入 200 μ l DMSO,混匀后置酶标仪 570 nm 处光密度值(D)。同时设空白对照组。

1.3 3T3-L1 前脂肪细胞的诱导分化 将复苏传代后的 3T3-L1 前脂肪细胞接种于培养板,用含 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养液,在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下培养。待细胞融合 2 d 后,加含 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、0.25 μ mol/L 地塞米松、10 μ g/ml 胰岛素和 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养 48 h,换以含 10 μ g/ml 胰岛素的培养液再培养 48 h,随后以 10% 小牛血清高糖 DMEM 继续培养,每 2 d 换培养液 1 次。自分化第 1 日起,实验组分别给予含 10^{-10} mmol/L obestatin 或 10^{-10} mmol/L ghrelin 的培养液全程干预细胞分化过程,对照组加常规诱导剂。在细胞分化过程(第 1~10 日)以及成熟时(第 10 日)分别收集细胞,-70℃冻

存备用。

1.4 3T3-L1 脂肪细胞的鉴定和脂肪含量的测定 应用油红 O 染色鉴定分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞。先用 0.01 mmol/L PBS 洗 3 次,10% 多聚甲醛固定细胞 10 min,PBS 洗净后将细胞晾干 20 min,加入油红 O 染液于细胞表面,静置 10 min 后用 60% 异丙醇洗细胞 2 次,以去除多余的染料。再以双蒸水洗 3~4 次后,用苏木精染细胞核 2 min。用水洗 5~10 min,倒置显微镜下观察结果,拍摄照片,鉴定脂肪细胞分化成熟。实验各组成熟脂肪细胞经油红 O 染色后,加异丙醇溶解油红 O,震荡摇匀 5 min,用 ELISA 酶标仪测定各孔的 D_{490} 。

1.5 3T3-L1 脂肪细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma 2$ (PPAR $\gamma 2$) 基因 mRNA 表达水平的测定 应用 TRIzol 试剂盒提取诱导分化过程中及成熟后的细胞总 RNA。用紫外分光光度计检测 RNA 浓度与纯度,要求 D_{260}/D_{280} 在 1.6~2.0 之间。应用 RT-PCR 法检测 PPAR $\gamma 2$ mRNA 的表达。RT:各样本取 5 μ g 的 RNA,加入 RNasin 0.5 μ l,加入 DEPC 水至总体积为 10 μ l,70℃ 水浴 5 min、冰上 5 min。再加入 5 \times RT Buffer 5 μ l,RNasin 0.5 μ l,MLV 1 μ l,100 mmol/L dNTP 0.5 μ l,Oligo(dT) 1 μ l,加入 DEPC 水至总体积为 25 μ l,40℃ 水浴 60 min,70℃ 水浴 15 min,冰上终止反应。PCR 反应:自行设计扩增基因引物,PPAR $\gamma 2$ 上游引物 5'-TGG AAT TAG ATG ACA GCG A CT TGG-3';下游引物 5'-CTG GAG CAG CTT GGC AAA CA-3',PCR 产物为 182 bp。 β -actin 上游引物 5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC-3';下游引物 5'-CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA-3',PCR 产物 228 bp。PCR 反应体系为 cDNA 1 μ l,10 \times PCR Buffer 2.5 μ l,dNTP 0.5 μ l,10 pmol/L PPAR $\gamma 2$ 、 β -actin 上下游引物各 0.5 μ l,Taq 酶 0.3 μ l,DEPC 水补足 25 μ l。扩增条件:94℃ 预变性 5 min,之后 94℃ 变性 30 s,57℃ 退火 30 s,72℃ 延长 30 s,扩增 30 个循环,最后 72℃ 延长 10 min,4℃ 终止反应。PCR 产物的检测:取 PCR 产物 5 μ l,加样于 1% 琼脂糖凝胶,0.5 \times TBE 为电泳缓冲液,100 V 恒压电泳 30 min,PCR 产物在紫外线透视仪显影拍照。Kodak digital science 310 分析电泳条带密度值,PPAR $\gamma 2$ 基因 mRNA 的表达水平以该基因条带密度占 β -actin 基因条带密度的百分数(%)表示。

1.6 统计学处理 计量资料且符合正态分布的以表示。组间计量资料比较采用方差分析,应用 SPSS 11.0 软件进行统计。

2 结果

2.1 3T3-L1 前脂肪细胞分化前后形态学的变化与比较 诱导分化前的 3T3-L1 脂肪细胞为典型的梭形,胞质中无脂滴,形态与成纤维细胞相似(图 1A)。当细胞完全汇合后,处于生长停滞,在多个视野下均未见处于明显分裂相的细胞,诱导分化第 10 日时,90%的 3T3-L1 前脂肪细胞都分化为成熟的脂肪细胞,表现为胞质丰富,含有大量的脂滴,脂滴分布于核周围,形成“戒环样”结构,为典型的成熟脂肪细胞形态,油红 O 染色后脂滴着红色,细胞核着蓝色(图 1B)。

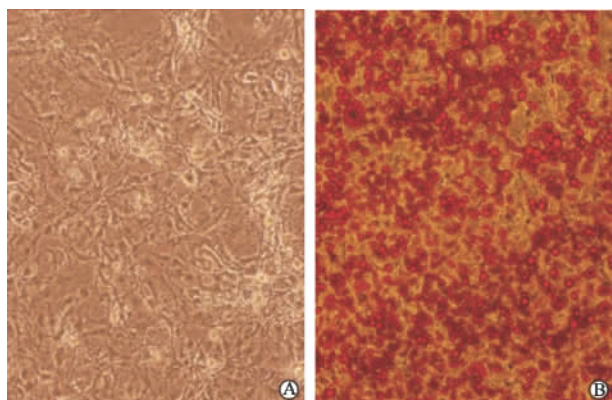


图 1 3T3-L1 前脂肪细胞分化前后油红 O 染色结果

Fig 1 Oil red O staining of differentiating 3T3-L1 preadipocytes ($\times 100$)

A: 3T3-L1 preadipocytes; B: Mature 3T3-L1 adipocytes

2.2 Obestatin 对前脂肪细胞增殖的影响 应用 obestatin 和 ghrelin 干预同批次 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖过程,不同浓度的 obestatin 组 (10^{-8} 、 10^{-10} 、 10^{-11} mmol/L) 细胞数量 (D_{570} 值分别为 0.490 ± 0.038 、 0.470 ± 0.078 、 0.476 ± 0.035) 较正常对照组 (D_{570} 值为 0.596 ± 0.041) 明显降低 ($P < 0.01$); 其他浓度的 obestatin 组 (10^{-9} 、 10^{-12} mmol/L) 细胞数量 (D_{570} 值分别为 0.519 ± 0.055 、 0.520 ± 0.045) 亦较正常对照组明显降低 ($P < 0.05$); 而 ghrelin 组 (10^{-10} mmol/L) 细胞数量 (D_{570} 值为 0.669 ± 0.013) 较对照组显著升高 ($P < 0.05$)。

2.3 Obestatin 对分化成熟脂肪细胞脂肪含量的影响 应用 10^{-10} mmol/L obestatin 全程干预 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程后,成熟脂肪细胞的脂肪含量 (D_{490} 值为 0.235 ± 0.006) 较对照组 (D_{490} 值为 0.295 ± 0.003) 显著降低 ($P < 0.05$); 应用相同浓度的 ghrelin 干预细胞后,脂肪含量 (D_{490} 值为 0.357 ± 0.040) 显著升高 ($P < 0.05$)。

2.4 Obestatin 对成熟脂肪细胞 PPAR γ 2 基因表达的影响 本研究表明,PPAR γ 2 mRNA 水平在 3T3-L1 前脂肪细胞中表达极低,随着诱导分化逐步成熟,其表达量逐步增加,至第 9~10 日其表达量最高,提示脂肪细胞分化完全成熟(图 2)。应用 10^{-10} mmol/L obestatin 和 ghrelin 干预后(图 3),与分化成熟(第 10 日)的脂肪细胞对照组 [(48.92 \pm 5.19)%] 相比,obestatin 组 PPAR γ 2 基因表达水平 [(32.24 \pm 5.31)%] 明显降低,ghrelin 组 [(67.06 \pm 9.67)%] 明显升高,均存在统计学差异 ($P < 0.05$)。

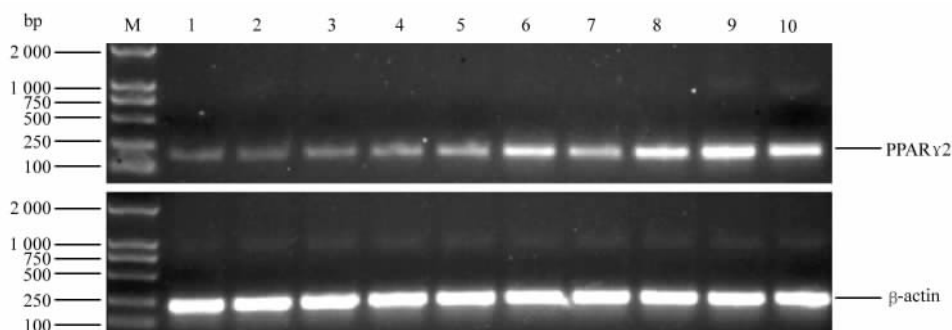


图 2 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中 PPAR γ 2 mRNA 表达的变化

Fig 2 Expression of PPAR γ 2 mRNA in differentiating 3T3-L1 preadipocytes

M: Marker; 1-10: 1-10 d during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, respectively

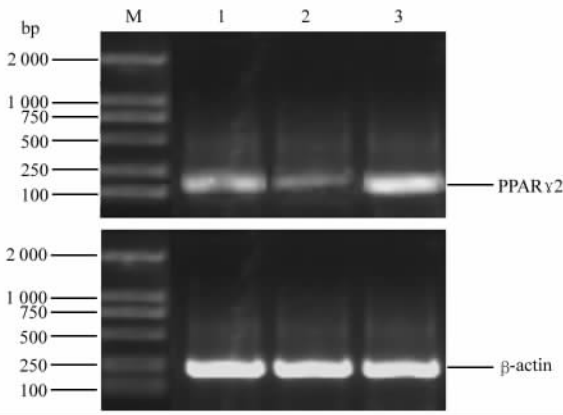


图3 Obestatin和ghrelin干预下成熟脂肪细胞中PPAR γ 2基因表达的变化

Fig 3 Expression of PPAR γ 2 mRNA in mature adipocytes in presence of obestatin and ghrelin
M; Marker; 1; Control; 2; Obestatin; 3; Ghrelin

3 讨论

肥胖患者由于体内脂肪细胞肥大和数量增多,脂肪堆积和分布异常,引起脂肪细胞因子的分泌紊乱,进而从不同层次影响胰岛素的效应,导致胰岛素抵抗(IR)。IR被视作肥胖、2型糖尿病、高血压、脂代谢紊乱、动脉粥样硬化等疾病的共同危险因素^[6]。因此,研究脂肪细胞调节对于防治肥胖及其相关疾病具有重大意义。Obestatin是新近Zhang等^[1]发现由前ghrelin原产生的多肽,在机体食欲和体质量调节中的作用与来源于同一基因和前体原的ghrelin完全相反。已有研究表明,ghrelin可以通过激活丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)和PI3K/Akt途径促进脂肪细胞增殖和分化^[5]。但目前尚未见有关obestatin对脂肪细胞增殖分化调节作用的研究。本研究应用obestatin干预3T3-L1前脂肪细胞,明确其在脂肪细胞的增殖和分化过程所起的作用。

脂肪细胞的分化由PPAR γ 2、CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP)及脂肪细胞分化决定因子1/固醇调控元件结合蛋白1(ADD1/SREBP1)共同调控。PPAR γ 2是脂肪合成转录通路的重要调控因子,PPAR γ 2基因的表达水平常作为反映脂肪细胞分化程度的重要标志^[7]。本研究发现obestatin不仅抑制3T3-L1前脂肪细胞的增生,降低分化成熟脂肪细胞的脂肪含量,而且下调脂肪细胞分化成熟过程中PPAR γ 2基因表达,提示其对脂肪细胞的分化存在抑制作用。与ghrelin的促进作用相反,obestatin抑制3T3-L1前脂肪细胞的增殖和分化,二者共同调节了脂肪细胞的增殖分化过程。

目前对于obestatin抑制脂肪细胞增生、分化的

具体机制尚不明确。Obestatin由ghrelin前体原产生后,结合孤儿G蛋白受体GPR39,后者是一种G蛋白偶联受体,属于G蛋白偶联受体超家族(GPCRs),该家族成员还包括ghrelin受体(促生长激素分泌素受体,GHSR)和胃动素(motilin)受体。研究发现,GPR39在大鼠全身各器官组织中广泛表达^[1]。Catalan等^[8]也发现人脂肪组织中表达GPR39,并且发现在2型糖尿病伴肥胖患者的脂肪组织中GPR39表达明显降低,提示obestatin信号转导与糖调节以及2型糖尿病的发生存在相关性。Kim等^[5]研究发现ghrelin作用于3T3-L1脂肪细胞后,与表达于脂肪细胞的ghrelin受体结合,引起MAPK信号通路激活,IRS-1相关的PI3K活性升高及Akt磷酸化增强,从而促进细胞增殖分化,抑制细胞凋亡。Obestatin与ghrelin作用完全相反,obestatin抑制脂肪细胞增生、分化功能的实现是否也是通过受体激活途径抑制MAPK和PI3K信号转导通路;MAPK和PI3K是胰岛素作用通路上重要的信号转导途径,obestatin与ghrelin这对细胞因子是否通过参与调节胰岛素信号转导通路,促进或缓解胰岛素抵抗,进而对糖调节和糖尿病发生产生影响,这些都有待进一步研究加以明确。

[参考文献]

- [1] Zhang J V, Ren P G, Avsian-Kretchmer O, et al. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake[J]. Science, 2005, 310:996-999.
- [2] Vivenza D, Rapa A, Castellino N, et al. Ghrelin gene polymorphisms and ghrelin, insulin, IGF-1, leptin and anthropometric data in children and adolescents[J]. Eur J Endocrinol, 2004, 151: 127-133.
- [3] Szentirmai E, Krueger J M. Obestatin alters sleep in rats[J]. Neurosci Lett, 2006, 404: 222-226.
- [4] Szentirmai E, Hajdu I, Obal F Jr, et al. Ghrelin-induced sleep responses in ad libitum fed and food-restricted rats[J]. Brain Res, 2006, 1088: 131-140.
- [5] Kim M S, Ycon C Y, Jang P G, et al. The mitogenic and anti-apoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18:2291-2301.
- [6] 杨凌辉, 邹大进. 肥胖致胰岛素抵抗的机制[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2002, 18: 244-246.
- [7] Gregoire F M, Smas C M, Sul H S. Understanding adipocyte differentiation[J]. Physiol Rev, 1998, 78:783-809.
- [8] Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rotellar F, et al. The obestatin receptor (GPR39) is expressed in human adipose tissue and is down-regulated in obesity-associated type 2 diabetes mellitus [J]. Clin Endocrinol, 2007, 66:598-601.

[收稿日期] 2007-01-24

[修回日期] 2007-07-02

[本文编辑] 曹 静