

[文章编号] 1000-4718(2005)02-0243-04

# 促酰化蛋白诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞分化的研究\*

卢慧玲, 王宏伟, 林汉华

(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 430032)

**[摘要]** 目的: 探讨新型脂源性激素促酰化蛋白(ASP)是否具有诱导前脂肪细胞分化的作用。方法: 以 3T3-F442A 前脂肪细胞为研究对象, 通过形态学观察、油红染色测定脂肪细胞分化率, 测定脂肪细胞甘油三酯合成率和甘油三酯总量, 采用 [<sup>3</sup>H]-胸腺嘧啶掺入法, 反映 ASP 诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞分化过程中克隆增殖的情况, 并与经典的诱导分化剂胰岛素比较。结果: (1) 单独的 ASP 刺激, 即可诱导 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, 与胰岛素刺激 3T3-F442A 前脂肪细胞分化相比, 无显著差异 ( $P > 0.05$ )。 (2) ASP 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 ( $P < 0.05$ ), 而与胰岛素组相比无显著差异 ( $P > 0.05$ )。 (3) 分化诱导 24 h, ASP 组 [<sup>3</sup>H]-胸腺嘧啶掺入率是对照组的 223% ( $P < 0.01$ ), 胰岛素组 [<sup>3</sup>H]-胸腺嘧啶掺入是对照组的 589% ( $P < 0.01$ )。结论: 新型的脂源性激素 ASP 具有诱导前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞的生物学作用。

**[关键词]** 促酰化蛋白; 脂细胞; 分化

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

促酰化蛋白 (acylation stimulating protein, ASP) 是 Cianflone 等<sup>[1]</sup>于 1989 年从人血浆中分离出的一种小分子蛋白质, 是目前所知除胰岛素以外的唯一一种促进甘油三酯合成的生物活性物质。ASP 是调节脂肪代谢新的生化途径, 并认为 ASP 是参与机体能量代谢平衡的一种新型的脂源性激素。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。ASP 作为新型脂源性激素, 是否具有促进前脂肪细胞分化的作用, 尚未见报道。本实验用 ASP 刺激 3T3-F442A 前脂肪细胞, 研究 ASP 对脂肪细胞分化的作用。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清 (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)。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。促酰化蛋白 (ASP) 3T3-F442A 前脂肪细胞株和 [<sup>3</sup>H]-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。

### 2 方法

**2.1 脂肪细胞的培养和实验分组** 3T3-F442A 前脂肪细胞在含 10% 的胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中培养, 并加入  $1 \times 10^5$  U/L 青霉素, 0.1 g/L 的链霉素。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 d (此时为诱导分化的第 0 d), 加入分化诱导刺激。各组的基本培养条件相同, 即含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12, 根据诱导刺激的不同分为 4 组: ①对照组: 无分化刺激; ②ASP 组: 含 50 mg/L ASP; ③insulin 组: 2 mg/L insulin; 隔天换液, 培养 72 h 后, 换成仅含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液, 隔天换液, 培养至收获细胞。每一组 4 复孔, 相同实验重复 3 次。

**2.2 油红 O 染色** PBS 冲洗细胞, 在 10% 甲醛中固定 2 h, 0.35% 的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, 再加入姬姆萨染料在 4 °C 放置过夜, 脂肪被特异性地染为红色。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。

**2.3 甘油三酯合成率 (TG synthetic rate) 和甘油三酯总量 (TG mass) 的测定** 采用 [<sup>3</sup>H] 油酸掺入法, 测

[收稿日期] 2003-07-08 [修回日期] 2003-09-17

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30170442)

Tel: 027-83663315; E-mail: luhuilin777@sohu.com

定脂肪细胞甘油三酯的合成率,参照 Baldo 等<sup>[2]</sup>的方法,简单叙述如下:将 3T3-F442A 细胞培养至诱导分化的第 3、6、9 d,在收获细胞的前 4 h,向培养液中加入 [<sup>3</sup>H]-油酸 ( $3.7 \times 10^7$  Bq/L), 37 °C 孵育 4 h 后,弃培养液,用冷 PBS 冲洗细胞 3 次,胰酶消化、收集细胞。再用 PBS 冲洗 3 次,最后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 [<sup>3</sup>H]-油酸的掺入量为 100%,分别计算各组的平均值。测定细胞中甘油三酯的总量,以每毫克细胞总蛋白中所含的甘油三酯(mg)来表示。

**2.4 3T3-F442A 前脂肪细胞 DNA 合成速率** 采用 [<sup>3</sup>H]-TdR 掺入法测定其掺入率,反映 DNA 合成速率。3T3-F442A 细胞在 24 孔培养至完全汇合 2 d,按照实验分组,分别加入 ASP 和胰岛素作用 24 h,于终止刺激前 6 h 加入  $3.7 \times 10^7$  Bq/L [<sup>3</sup>H]-TdR。将细胞收集于玻璃纤维滤膜上,进行液闪计数。每种刺激作 4 孔,同一实验重复 3 次。以对照组(仅含基础培养液,无任何分化刺激)的测定值为 100%,计算各组的 [<sup>3</sup>H]-TdR 掺入率。

**3 统计学处理**

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

**结 果**

**1 ASP 对前脂肪细胞形态的影响**

单独的 ASP 诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞分化 6 d 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 d 时,更多的脂滴积累。油红染色的结果进一步显示,胞浆内有大量的脂滴积累,ASP 诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞的分化率可达 80%,与 insulin 组(90%)相近。

**2 ASP 对前脂肪细胞分化过程中的 TG 合成率和 TG 总量的影响**

单独 ASP 诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞分化第 3 d 和第 6 d 时,甘油三酯合成率有一定程度的升高,但与对照组相比无显著差异;在分化 9 d,甘油三酯合成率明显升高,与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ),与胰岛素组相比无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 4)。

在 ASP 诱导分化第 3 d 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 ( $P > 0.05$ );到分化 6 d 和 9 d 时,甘油三酯总量明显升高,与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ),而与胰岛素组相比无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 5)。



Fig 1 The form of 3T3-F442A preadipocytes (×200).  
图 1 3T3-F442A 前脂肪细胞的形态



Fig 2 Morphological changes of 3T3-F442A cells on the 9th day after induced differentiation by ASP (×200).  
图 2 ASP 诱导 3T3-F442A 前脂肪细胞分化 9 d 时的形态



Fig 3 Differentiation rate of 3T3-F442A cells induced by difference inducer in red oil O staining.  
a: control group; b: ASP group; c: insulin group.

图 3 3T3-F442A 前脂肪细胞诱导分化 9 d 时,油红染色观察分化率

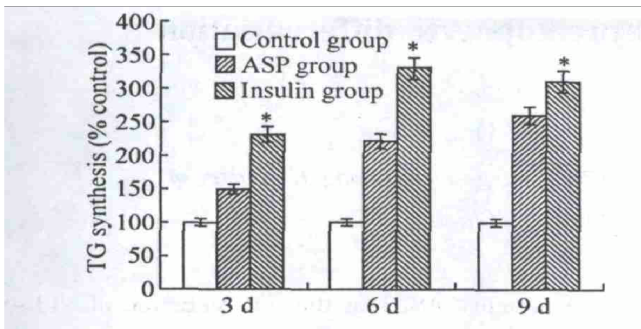


Fig 4 The effect of ASP on the TG synthetic rate in 3T3- F442A adipocytes during the course of differentiation.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ . \*  $P < 0.05$  vs control group.

图 4 ASP 诱导 3T3- F442A 前脂肪细胞分化过程中对 TG 合成率的影响

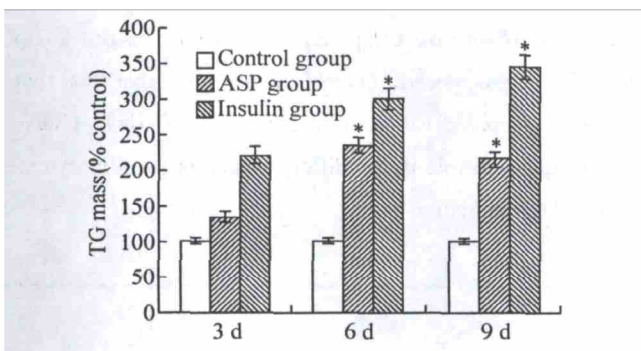


Fig 5 The effect of ASP on the TG mass accumulation in 3T3- F442A adipocytes during the course of differentiation.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ . \*  $P < 0.05$  vs control group.

图 5 ASP 诱导 3T3- F442A 前脂肪细胞分化过程中对 TG 总量的影响

### 3 ASP 对 3T3- F442A 前脂肪细胞分化过程中 DNA 合成的作用

ASP 和胰岛素作用 24h 均可显著增加 3T3- F442A 前脂肪细胞的 $[^3\text{H}]$ - TdR 掺入率, ASP 组 $[^3\text{H}]$ - TdR 掺入率比对照组高 223% ( $P < 0.01$ ), 胰岛素组 $[^3\text{H}]$ - TdR 掺入率比对照组高 589% ( $P < 0.01$ )。

## 讨 论

脂肪组织不仅是体内巨大的储能器官, 而且是很重要的内分泌器官, 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<sup>[3]</sup>。脂肪组织的总体积取决于两个方面: 脂肪细胞的数目和脂肪细胞的体积。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。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 前脂肪细胞株是国际上最常用的研究脂肪细胞分化的细胞模型。3T3- L1 前脂肪细胞的诱导分化较复杂, 需要在胰岛素、BMX 和 DEX 的共同刺激下, 才可分化成为成熟的脂肪细胞<sup>[4]</sup>; 而 3T3- F442A 前脂肪细胞仅在胰岛素单独刺激下就可分化为成熟的脂肪细胞。本实验以 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, 能够更直接地观察 ASP 的作用。结果发现, 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, 并增加分化过程中细胞 DNA 的合成, 促进细胞的增殖, 与胰岛素诱导分化的作用相比极为相似, 从而证明 ASP 具有诱导前脂肪细胞分化的生物学作用。

已有研究证实 ASP 与肥胖症、脂代谢紊乱、糖尿病以及冠心病等疾病有关<sup>[5,6]</sup>。本研究发现 ASP 具有促进脂肪细胞分化的新作用, 深化了生命科学界对 ASP 这一新型脂源性激素的认识, 为研究脂肪细胞分化机制开拓新的视野, 并为进一步研究与肥胖相关疾病的发病机制提供新的理论依据。

## [参 考 文 献]

- [1] Cianflone K, Maslowska M, Sniderman AD. Acylation stimulating protein (ASP), an adipocyte autocrine: new directions [J]. *Semin Cell Devel Biol*, 1999, 10(1): 31- 41.
- [2] Baldo A, Sniderman AD, St Luce S, et al. Signal transduction pathway of acylation stimulating protein: involvement of protein kinase C [J]. *J Lipid Res*, 1995, 36(7): 1415- 1426.
- [3] Shuldiner AR, Yang R, Gong DW. Resistin, obesity, and insulin resistance- the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ [J]. *N Engl Med*, 2001, 345(18): 1345- 1346.
- [4] Ailhaud G, Amri E, Bardon S, et al. Growth and differentiation of adipose tissue: molecular and hormonal mechanism [J]. *Int J Obes*, 1991, 15(1): 87- 90.
- [5] Maslowska M, Vu H, Phelis S, et al. Plasma acylation stimulating protein, adiposin and lipids in non- obese and obese populations [J]. *Eur J Clin Invest*, 1999, 29(8): 679- 686.
- [6] Ciaflone K, Maslowka M, Sniderman AD. Acylation stimulating protein(ASP), an adipocyte autocrine: new directions [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 1999, 10(1): 31- 41.

## Acylation stimulating protein induces preadipocyte differentiation

LU Hui-ling, WANG Hong-wei, LIN Han-hua

(Department of Pediatric, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430032, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To study the role of acylation stimulating protein (ASP) in the differentiation of 3T3-F442A preadipocytes. **METHODS:** Differentiation of 3T3-F442A preadipocytes was induced by ASP. The morphological changes were observed by Oil-Red O staining and the differentiation rate was compared. TG synthesis and TG mass in these cells were also assayed. DNA synthesis was measured by [<sup>3</sup>H]-TdR incorporation. A typical differentiation inducer, insulin, was used as a positive control to compare these results. **RESULTS:** (1) 3T3-F442A preadipocytes were induced to differentiate by ASP alone. Fat droplets were clearly visible in the cytoplasm of 3T3-F442A cells. The differentiation rate was high (90%), but no significant difference was observed, compared with that in insulin group (95%). (2) In ASP group, TG synthesis and TG mass were significantly increased, both of them were higher than that in control group ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference, compared with insulin group ( $P > 0.05$ ). **CONCLUSION:** As a new adipocytes hormone, ASP plays an important biological role in the differentiation of preadipocytes.

**[KEY WORDS]** Acylation stimulating protein; Adipocytes; Differentiation

---

(上接第 242 页)

部食宿及机票,并免除注册费;自由申请确实优秀且在大会发言者提供其食宿,并免除注册费;自由投稿及会议报告者不免注册费。目前已暂定 5 位大会特邀报告人,由唐佩弦和吴立玲与他们联系。

5. 会议通知及注册由武少源处长负责。暂定征文截稿日期为 2005 年 12 月 20 日;2006 年 1 月为审稿时间,2006 年 1 月底前将录用稿件通知发出。暂定注册费为 450 \$ (国际含港、澳、台人士)和 1 000 ¥(国内人士);提前注册交费可以减免至 350 \$ (国际含港、澳、台人士)。国内学生为 800 ¥。减免费注册截止日期为 2006 年 4 月 1 日。

有关 2006 年第五届国际病理生理学会议准备工作拟于新春联谊会时再议 1 次。

除了上述主要议题外,理事们还就 2005 年学会 50 周年暨《中国病理生理杂志》创刊 20 周年纪念活动、危重病学会跨学会活动、加强网站工作等问题进行了商讨。

张立克执笔

(2004. 12. 31)