

鸡脂肪细胞分化调控的研究进展

商周春, 王宇祥, 郭琳, 王宁, 李辉
(东北农业大学 动物科学技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

中图分类号: S858 31

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2011)02-0022-03

关键词: 鸡; 前脂肪细胞; 原代培养; 诱导分化

摘要: 脂肪细胞增殖与分化的异常会引发肥胖、胰岛素抵抗及 II 型糖尿病等多种疾病。目前, 对哺乳动物脂肪细胞分化的研究已经取得了一定的进展, 但是关于鸡脂肪细胞的相关报道还比较少见。鸡前脂肪细胞分化的分子调控机制与哺乳动物有所不同, 如对体外分化诱导剂的要求及分化过程中转录因子的表达时序等。本文综述了鸡前脂肪细胞的原代培养和体外诱导分化等方面的研究进展, 并比较了鸡前脂肪细胞与小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞在分化过程中分子调控的差异。

鸡不仅是全世界广泛饲养并具有重要经济价值的禽类, 而且还是生命科学研究极具价值的模式动物, 深入了解鸡脂肪细胞增殖与分化的生物学过程, 不仅对降低肉鸡腹脂沉积具有重要意义, 并且对于阐明人类肥胖及其并发症的分子机理具有很好的借鉴作用。

1 脂肪组织和脂肪细胞

脂肪组织中含有多种细胞类型, 包括脂肪细胞、血细胞、内皮细胞、巨噬细胞及不同分化程度的脂肪细胞前体等^[1]。目前, 脂肪细胞的起源还不明确。在哺乳动物多能干细胞系中的研究表明, 脂肪细胞来源于间充质干细胞, 经过多次的细胞代谢分化为前脂肪细胞、不成熟脂肪细胞, 最终形成成熟脂肪细胞。间充质干细胞具有多潜能性, 在合适的培养条件下能够分化为成软骨细胞、成骨细胞、成肌细胞和前脂肪细胞。体外培养的前脂肪细胞呈梭形, 能够表达分化早期的标志基因, 并且胞质内还没有积累三酰甘油。它经过终末分化形成充满小脂滴的未成熟脂肪细胞, 而后小脂滴逐渐汇合成大脂滴, 胞质内三酰甘油大量积聚, 形成典型的脂肪细胞^[2]。

2 鸡前脂肪细胞的体外培养

为了深入探究脂肪组织和脂肪细胞的功能及其增殖分化的调节机制, 需要获得体外培养的脂肪细胞。早在 1964 年, Rodbell 等^[3]通过胶原酶消化法从大鼠脂肪组织中成功分离了具有新陈代谢活性的

成熟脂肪细胞和脉管基质细胞 (SVF), 因为对分离得到的成熟脂肪细胞及脉管基质细胞没有进行体外培养, 所以仅能够在短时间内研究细胞对激素或其他因子刺激的反应。1971 年, 有人利用胶原酶从胖人和正常人脂肪组织中分离得到脉管基质细胞并进行了体外培养, 发现刚接种的脉管基质细胞是成纤维细胞样细胞, 而在体外培养 2 个月后, 其形态变圆并且胞质内沉积大量脂滴, 这一现象表明脉管基质细胞中含有能够向脂肪细胞分化的细胞类型。1977 年, Van R L 等将分离培养的鼠脂肪组织来源的脉管基质细胞与体外培养的成纤维细胞进行了比较, 发现脉管基质细胞和成纤维细胞的倍增时间都是 40~60 h。当用葡萄糖标记的培养基培养这两种细胞时, 脉管基质细胞的脂类沉积能力明显高于成纤维细胞, 从而确定脂肪组织来源的脉管基质细胞中含有大量具有增殖及分化潜能的前脂肪细胞。

鸡原代前脂肪细胞的体外培养研究始于 20 世纪 80 年代, Cryer J 等^[4]借鉴哺乳动物的研究方法, 利用胶原酶消化鸡脂肪组织, 经筛网过滤、离心后得到了脉管基质细胞, 并对其进行了体外培养, 成功获得了体外培养的鸡原代前脂肪细胞。

3 鸡前脂肪细胞分化的诱导剂

鸡前脂肪细胞体外分化的研究起步较晚, 至今没有一个被广泛接受的诱导方法。为了建立成熟、稳定的鸡前脂肪细胞体外诱导分化体系, 科研工作者通过调整诱导培养基的成分, 不断优化完善了鸡前脂肪细胞的体外诱导分化条件, 其中包括调整鸡血清的浓度、添加胰岛素、三碘甲状腺原氨酸 (T₃)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、地塞米松、激素混合物、脂肪酸、曲格列酮等。早前研究鸡前脂肪细胞体外诱导分化使用的是鸡血清和鸡原生质脂蛋白, 而后 Butterworth S C 等将巨噬细胞分泌的细胞因子加入含鸡血

收稿日期: 2010-05-11

基金项目: “863”国家高技术研究发展计划重大项目 (2006AA10A120) 子课题

作者简介: 商周春 (1984-), 女, 硕士研究生, shangzhouchun@yahoo.com.cn

通信作者: 李辉 (1963-), 男, 教授, 博士, 博士生导师。

清培养的原代前脂肪细胞中,发现脂肪细胞中脂类沉积量几乎增加了2倍。Ramsay T G等使用含低浓度鸡血清(2.5%)的DMEM/F12培养基培养鸡前脂肪细胞,研究了各种外源激素(胰岛素、 T_3 、地塞米松和肝磷脂)对细胞增殖和分化的影响,从而确定了在基础培养基(DMEM/F12)的基础上,添加胰岛素、肝磷脂、地塞米松和2.5%鸡血清的体外鸡前脂肪细胞诱导分化体系。然而,这些研究都是在鸡血清存在的情况下进行的。鸡血清中含有的成分较为复杂,无法具体阐明究竟是其中哪种因子对鸡脂肪细胞分化起到了直接诱导作用。由于鸡血清中含有许多不确定因素,不利于研究单一因素对鸡脂肪细胞分化的影响, Matsubara Y等将培养基中的鸡血清去除,并添加了细胞培养中常规使用的胎牛血清(FBS)来研究其他因子对鸡脂肪细胞分化的影响,结果表明应用于小鼠3T3-L1前脂肪细胞系的经典诱导剂并不能诱导鸡前脂肪细胞分化。但在经典诱导剂的基础上加入脂肪酸(油酸)后,发现体外培养的鸡前脂肪细胞内开始沉积脂滴,3-磷酸-甘油脱氢酶(GPDH)活性随着分化进程逐渐升高,同时过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)基因被诱导表达,48 h后细胞表现出明显的分化特征。2008年, Matsubara Y等人又利用脂肪酸混合物(棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、花生四烯酸等)在无血清培养条件下诱导原代鸡前脂肪细胞分化,经RT-PCR分析结果表明,脂肪酸诱导组与对照组相比,PPAR γ 的表达明显升高,这一结果再次表明了鸡脂肪细胞对脂肪酸诱导分化作用的特殊敏感性。鸡脂肪细胞分化的诱导剂不同于3T3-L1前脂肪细胞系,可能是因为不同的种属间脂类合成的位置不同。啮齿类动物脂类合成主要在肝脏和脂肪组织中,猪和反刍动物主要在脂肪组织,而禽的脂类合成90%在肝脏中完成^[5],鸡脂肪组织利用肝脏合成的脂类通过极低密度脂蛋白(VLDL)运输到脂肪组织中完成脂类的沉积,所以外源脂肪酸很可能对鸡脂肪细胞分化起关键的调节作用。

胰岛素作为3T3-L1前脂肪细胞系经典诱导剂的成分之一,对脂肪细胞分化有正向的促进作用。然而胰岛素在鸡脂肪细胞分化中的作用不同于哺乳动物。在低浓度鸡血清存在的培养条件下,胰岛素能够促进细胞内脂类的沉积,而在无血清条件下单独使用胰岛素并不能诱导鸡脂肪细胞分化,但是在胰岛素和脂肪酸共同存在的条件下,细胞内沉积了大量的脂滴,并且达到了终末分化程度。

4 鸡前脂肪细胞分化的分子调控

对哺乳动物的研究表明,脂肪细胞的分化涉及一系列转录调控因子及辅助因子的协同作用。前人的研究确定了许多前脂肪细胞向脂肪细胞分化过程中关键的转录调控因子,其中包括CAAT增强子结合蛋

白家族(C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ)、PPAR γ 、甾醇调节元件结合蛋白1基因(SREBP1)、GATA结合蛋白2等,它们在脂肪细胞分化过程中,通过表达量或活性的变化对脂肪细胞的分化起着重要的调控作用^[6]。

4.1 C/EBP β 和C/EBP δ 的调控作用

目前,关于脂肪细胞分化过程中分子调控的认识大部分是从小鼠3T3-L1前脂肪细胞系的研究结果中获得的。当小鼠3T3-L1前脂肪细胞被诱导分化后,C/EBP β 和C/EBP δ 的mRNA水平会立即升高,而后激活C/EBP α 和PPAR γ 的表达,从而引发小鼠3T3-L1脂肪细胞的分化。而这两个转录因子在鸡脂肪细胞分化过程中的表达模式不同于小鼠3T3-L1前脂肪细胞。在鸡前脂肪细胞加入诱导剂后,C/EBP β 和C/EBP δ 的表达量不会立即升高,而是随着分化的进程逐渐升高。同样,在新建立的小鼠前脂肪细胞系DFAT-D1中,C/EBP β 和C/EBP δ 的表达模式与小鼠3T3-L1前脂肪细胞的表达模式也是不同的^[7]。由此可见,C/EBP β 和C/EBP δ 在鸡脂肪细胞和小鼠3T3-L1前脂肪细胞系中的表达模式差异可能并非种属特异性所致。关于C/EBP β 和C/EBP δ 对鸡脂肪细胞分化调控的机理仍需进一步研究。

4.2 PPAR γ 和C/EBP α 的调控作用

在小鼠3T3-L1前脂肪细胞分化过程中,C/EBP α 在PPAR γ 之后被激活,并且受到PPAR γ 的正向调节,而后C/EBP α 和PPAR γ 协同调控脂肪细胞分化。这两个转录因子在鸡前脂肪细胞分化过程中的调控模式与哺乳动物相似。Matsubara Y等的研究表明,在鸡前脂肪细胞培养基中加入经典诱导剂和脂肪酸后,PPAR γ 的表达迅速升高,在9小时左右达到最高,而C/EBP α 的激活要晚于PPAR γ 。2008年, Matsubara Y等利用脂肪酸混合物诱导鸡前脂肪细胞分化,在培养基中加入脂肪酸混合物后,PPAR γ mRNA水平迅速上调,而C/EBP α 基因表达量的上调同样晚于PPAR γ 。尽管PPAR γ 和C/EBP α 对鸡脂肪细胞分化具体的调控机理还不明确,但有研究表明在鸡脂肪细胞分化过程中,PPAR γ 基因表达量的上调可以促进C/EBP α 基因的表达,然后两者协同作用共同促进鸡脂肪细胞分化。此外,有研究表明,给鸡饲喂曲格列酮(PPAR γ 配体)能够促进鸡腹部脂肪组织的沉积^[8],而给1日龄的雏鸡腹膜内注射曲格列酮,发现7日龄鸡腹部脂肪组织PPAR γ 、C/EBP α 和脂肪型脂肪酸结合蛋白(AFABP)的表达量明显高于对照组。研究表明,PPAR γ 与C/EBP α 的激活可能是鸡脂肪细胞诱导分化的第一步,并且这两个转录因子在调控鸡脂肪细胞分化过程中起关键作用。

4.3 PPAR β/δ 的调控作用

PPAR β/δ 是PPAR γ 家族(PPARs)中的一个亚型。在哺乳动物中,PPAR β/δ 能够促进脂肪酸氧化、

增加胞内脂类沉积而参与脂肪细胞分化。体外培养 PPAR β / δ 敲除鼠的脂肪细胞表现出分化受阻的现象^[9]。2009年, Sato K 等通过向培养基中加入 GW 501516 (PPAR β / δ 的配体)来研究 PPAR β / δ 在鸡脂肪细胞分化中的作用。结果表明, PPAR β / δ 基因在鸡脂肪细胞分化过程中并不具有关键的激活作用, 但是能够促进已经分化的脂肪细胞向成熟脂肪细胞转变。

4.4 SREBP1和 FAS的调控作用

SREBP1在小鼠 3T3-L1前脂肪细胞分化早期表达较高^[10], 并且可以促进 PPAR γ 配体的生成、激活脂肪酸合成酶 (FAS) 基因的表达。在鸡脂肪细胞分化过程中, SREBP1和 FAS基因的表达量随着分化的进程逐渐升高, 并且这两个基因表达量的变化与 C/EBP α 表达的变化相对应, 表明 SREBP1和 FAS参与鸡脂肪细胞的分化, 并且很可能受 C/EBP α 的调控。

4.5 AFABP和 LPL的调控作用

AFABP在哺乳动物中的功能是将细胞内长链脂肪酸转运入细胞核, 而且该基因被认为是体外研究脂肪细胞分化的中晚期标志, 但在鸡前脂肪细胞诱导分化后, AFABP基因 mRNA 表达量在分化早期就有了明显上升, 并且早于 C/EBP α 被激活。因此, 与哺乳动物不同 AFABP基因可能是鸡脂肪细胞分化的早期标志。在小鼠 3T3-L1前脂肪细胞分化的早期阶段, 细胞汇合时, 脂蛋白脂酶 (LPL)基因会高表达, 这一现象被认为是脂肪细胞分化早期的标志, 然而在鸡前脂肪细胞分化早期, LPL的表达量急速下降, 这一结果表明 LPL在鸡脂肪细胞分化体外研究中, 可能不适合作为分化早期的标志。至于它在鸡脂肪细胞分化早期表达量下降的原因有待进一步研究。

4.6 GLUT1和 GLUT8的调控作用

在哺乳动物中, 脂肪细胞需要葡萄糖作为原料来进行脂质沉积。葡萄糖转运蛋白 (GLUTs) 家族在运输葡萄糖方面起关键作用, 其中 GLUT4在哺乳动物脂肪细胞分化过程中非常重要, 但是鸡缺乏 GLUT4的同源序列。Matsubara Y 等研究表明, 随着鸡脂肪细胞的分化, GLUT1和 GLUT8的表达量逐渐上升。由此可见, 在鸡脂肪细胞分化过程中, GLUT1和 GLUT8可能代替 GLUT4 参与了鸡脂肪细胞的分化。

4.7 Pref-1/DLK1的调控作用

前脂肪细胞因子-1 (Pref-1或 DLK1)的 mRNA 在小鼠 3T3-L1前脂肪细胞中高表达, 随着分化进程其表达量逐渐减少, 而在成熟的脂肪细胞中则检测不到其表达。目前, 还没有研究报道 Pref-1基因在鸡脂肪细胞分化过程中表达变化的情况, 不过 Shin J 等研究表明, 随着日龄的增加 Pref-1基因在鸡脂肪组织中的表达量有下降的趋势, 而该基因在鸡脂肪组织来源的脉管基质细胞中的表达量明显高于成熟脂

肪细胞。这提示 Pref-1基因在鸡脂肪细胞分化过程中的作用可能与哺乳动物相似。

5 展望

脂肪细胞的分化是许多转录因子共同调控的复杂的生物学过程。哺乳动物脂肪细胞分化的分子机制研究已经有了长足进展, 但禽类相关的研究相对滞后。研究表明, 脂肪酸是鸡脂肪细胞分化所必需的, 但是脂肪酸在鸡脂肪细胞分化过程中的作用机制仍需要进一步的研究。近年来的研究发现, 除了转录因子、辅助因子、脂肪细胞分化的相关基因外, microRNA对脂肪细胞增殖和分化同样具有重要的调控作用。microRNA 通过与靶基因特异性的碱基互补配对, 而引起靶基因 mRNA 的降解或抑制靶基因的翻译, 在转录后基因表达调控过程中扮演着重要的角色。目前, 鸡脂肪细胞分化过程中 microRNA 的作用及其调控机制还是空白, 因此探究 microRNA 在鸡脂肪细胞分化中的作用及其调控机制将是下一步的研究重点。

参考文献:

- [1] GMBLE JM, KATZ A J, BUNNELL B A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine [J]. *Circulation Research*, 2007, 100(9): 1249-1260
- [2] GREGOIRE FM, SMAS CM, SULH S. Understanding adipocyte differentiation [J]. *Physiol Rev*, 1998, 78(3): 783-809.
- [3] ROBBELL M. Metabolism of isolated fat cells I effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis [J]. *Biol Chem*, 1964, 239: 375-380.
- [4] CRYER J, WOODHEAD B G, CRYER A. The isolation and characterization of a putative adipocyte precursor cell type from the white adipose tissue of the chicken (*Gallus Domestica*) [J]. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 1987, 86(3): 515-521.
- [5] DONALDSON W E. Lipogenesis and body fat in chicks: Effects of carrier-protein ratio and dietary fat [J]. *Poult Sci*, 1985, 64(6): 1199-1204.
- [6] MACX DOUGALD O A, LANEM D. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation [J]. *Annu Rev Biochem*, 1995, 64: 345-373.
- [7] YAGIKI, KONDO D, OKAZAKI Y, et al. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 321(4): 967-974.
- [8] SATO K, FUKAO K, SEKI Y, et al. Expression of the chicken peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene is influenced by aging, nutrition, and agonist administration [J]. *Poult Sci*, 2004, 83(8): 1342-1347.
- [9] MATSUSUE K, PETERS JM, GONZALEZ F J. PPARbeta/delta potentiates PPARgamma-stimulated adipocyte differentiation [J]. *FASEB*, 2004, 18(12): 1477-1479.
- [10] ERICSSON J, JACKSON S M, KM J B, et al. Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(11): 7298-7305.