

文章编号 1672-6634(2021)04-0095-08

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2021.04.012

PPP1R3C 基因在 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中的功能研究

崔 潇,李成萍,张海燕,刘雪燕,周国利

(聊城大学 生命科学学院,山东 聊城 252059)

摘 要 为研究小鼠的蛋白磷酸酶 1 调节亚基 3C(protein phosphatase 1 regulatory subunit 3C,PPP1R3C)基因在脂肪细胞分化中的功能,本研究以小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞为材料,通过基因过表达、干扰及实时定量 PCR 等实验,分析了 PPP1R3C 基因对成脂分化的影响,并初步探讨了它对成脂分化影响的机制。结果显示,在 3T3-L1 前脂肪细胞中,过表达 PPP1R3C 基因,可促进脂肪细胞分化和成脂标志基因的表达;而敲低 PPP1R3C 基因的表达,则抑制脂肪细胞的分化和成脂标志基因的表达。进一步研究发现在 3T3-L1 中敲低固醇调节元件结合转录因子 1(sterol regulatory element binding transcription factor 1,SREBP1)基因的表达,则 PPP1R3C 基因的表达也下调,提示 PPP1R3C 影响成脂分化可能是通过 SREBP1 对 PPP1R3C 的调控来实现的。以上结果表明,PPP1R3C 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化具有促进作用,PPP1R3C 是一个新的成脂分化调控因子。

关键词 脂肪细胞分化;PPP1R3C;SREBP1;3T3-L1

中图分类号 Q254

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Study on Function of PPP1R3C Gene during Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes

CUI Xiao,LI Cheng Ping,ZHANG Hai Yan,LIU Xue Yan,ZHOU Guo Li

(School of Life Science,Liaocheng University,Liaocheng 252059,China)

Abstract To study the function of protein phosphatase 1 regulatory subunit 3C (PPP1R3C) gene in mouse adipocytes differentiation, using by mouse 3T3-L1 preadipocytes as materials, we analyzed the effect of PPP1R3C gene on adipogenic differentiation through gain of function and loss of function experiments, and we preliminarily investigated the mechanism of its effect on adipogenic differentiation. The results showed that PPP1R3C was overexpressed in 3T3-L1 cells, which promoted adipocyte differentiation and up-regulated the expression of adipocyte marker genes. Knocking down the expression of PPP1R3C gene inhibited the differentiation of adipocytes and the expression of adipogenic differentiation marker gene. Further studies found that knocking down the expression of sterol regulatory element binding transcription factor 1 (SREBP1) gene in 3T3-L1 cells resulted in down-regulation of PPP1R3C gene expression, suggesting that the influence of PPP1R3C on adipogenic differentiation may be mediated through regulation of

收稿日期:2020-11-25

基金项目:国家自然科学基金项目(31571274);山东省自然科学基金项目(ZR2015CM025)资助

通讯作者:周国利,男,汉族,博士,副教授,研究方向:动物遗传学与功能基因调控,E-mail:genetic406@163.com。

SREBP1. It can be concluded that PPP1R3C promotes the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, and PPP1R3C is a new regulator of adipogenic differentiation during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes.

Key words adipocyte differentiation; PPP1R3C; SREBP1; 3T3-L1

0 引言

糖原和脂质是能量的主要储存形式,受到激素和代谢信号的严格调控。糖原是能量储存和利用的首选,它的代谢严格地被激素和营养状况调控,从而进一步通过多种途径调控糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase, GP)和糖原合成酶(glycogen synthase, GS)的活性^[1]。蛋白磷酸酶 1 调节亚基(protein phosphatase 1 regulatory subunit),也称糖原靶向调控亚基(G 亚基),通过将蛋白磷酸酶 1(protein phosphatase 1, PP1)的催化亚基靶向糖原颗粒来协调糖原合成^[2,3]。它们调节糖原代谢酶的活动,通过 PP1 介导的去磷酸化,主要是对糖原合成酶磷酸酶(glycogen synthase phosphatase, GSP)去磷酸化和激活 GS,进而刺激糖原生成。根据 GenBank 数据库,已知有 7 个基因编码 G 亚基(protein phosphatase 1 regulatory subunit 3a-3g, PPP1R3A-PPP1R3G)^[2]。

蛋白磷酸酶 1 调节亚基 3C(protein phosphatase 1 regulatory subunit 3C, PPP1R3C),也称为糖原靶向蛋白(protein targeting to glycogen, PTG),在许多组织中均有表达,小鼠的 PPP1R3C 杂合缺失可导致许多组织糖原水平降低,并伴有进行性葡萄糖耐受不良、高胰岛素血症和随着年龄增长的胰岛素抵抗^[4]。在肝脏中,PTG 和 GS 几乎以同等的水平表达^[5],它们共同作用加速肝糖原的代谢和储存。PTG 过表达显著增加糖原含量,因为 PP1 和 GS 重新分配到糖原中,同时 GS 活性和糖原合成显著增加^[6-10]。尽管 PTG 具有对糖原的代谢有很大的影响,但它是如何调控糖原代谢仍不清楚,一种可能的调节方式是在转录水平的。去甲肾上腺素和腺苷酸均可上调星形胶质细胞和肝细胞中 PTG 基因的转录水平,同时伴有糖原合成增加^[11]。转录因子叉头框蛋白 A2(forkhead box A2, FoxA2)在体外直接与 PTG 基因的启动子区域结合并激活它的转录,而且 PTG 启动子中的两个 SREBP/上游刺激因子结合元件也提示了 SREBP 潜在的转录调控作用^[12]。

在小鼠的脂肪组织中,使用脂肪酸结合蛋白 4(fatty acid binding protein 4, FABP4)启动子超表达 PPP1R3C,结果表明,脂肪组织中糖原水平比野生型小鼠高出 200-400 倍,显示脂肪细胞具有容纳高水平糖原的空间能力,糖原在脂肪沉积中的重要性被证实^[13]。目前的数据显示,在营养过剩期间,当糖原达到阈值水平时,能量储存会从糖原转移到脂质。这种能量存储模式的转变可能是由于哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)和其转录靶标 SREBP1 之间的正反馈回路造成的^[14]。但是 PPP1R3C 在 3T3-L1 前脂肪细胞分化中的功能尚不清楚,并且,它是否与 SREBP1 在脂肪细胞分化中具有协调作用还需进一步的分析。因此,本研究以 3T3-L1 前脂肪细胞为实验材料,通过对目的基因 PPP1R3C 的功能获得与缺失实验及相应的分子生物学技术,研究小鼠 PPP1R3C 基因在 3T3-L1 前脂肪细胞分化中的功能,并初步探讨 SREBP1 与 PPP1R3C 基因在脂肪细胞分化中的调控关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株。小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 药品与试剂。地塞米松、3-异丁基-1-甲基-黄嘌呤(IBMx)和胰岛素购自美国 Sigma 公司;胰蛋白酶、DMEM 高糖培养基购自美国 HyClone 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;RNAeasy™ Plus 动物 RNA 抽提试剂盒、BeyoRT™ cDNA 第一链合成试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;EcoRI 和 NotI 限制酶、SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒购自 NEB(北京)有限公司;siRNA 和阴性对照购自上海吉玛制药技术有限公司;油红 O 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及诱导分化。3T3-L1 前脂肪细胞接种在含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 培养基中,于 37℃ 5% CO₂ 的培养箱中培养,细胞汇合率达 85% 后,加胰蛋白酶消化,按 1:3 的比例传代培养。接触抑制 2 天(D0)后,向 DMEM 培养基中添加终浓度分别为 10 μg/mL 胰岛素、100 μM 地塞米松和 0.5 mM IBMx,

诱导分化 2 天(D2)后,培养基中只添加终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素继续维持分化,培养 2 d。然后更换为含 10% FBS 的 DMEM 培养基,隔天更换一次培养基进行培养。

1.2.2 油红 O 染色。吸去培养板中的培养基,用 PBS 清洗细胞 3 次;在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下,细胞用油红 O 染液着色 1 h,期间注意观察染色情况;双蒸水(ddH₂O)清洗残留油红 O 染液;染色完成后,通过倒置显微镜(ZEISS Axio Vert.A1)观察并拍照记录;记录完成后,染色的细胞用 ddH₂O 清洗,加入 100-200 μL 的异丙醇抽提,510 nm 波长测定 OD 值,对油红 O 染色进行定量分析。

1.2.3 引物设计。根据 NCBI 数据库中已公布的小鼠 PPP1R3C、SREBP1 以及成脂标志基因(PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP α 、FABP4)和 β -actin 的 mRNA 序列,利用 Primer 5.0 设计引物,引物由北京六合华大基因科技有限公司合成,引物序列信息详见表 1。

表 1 本研究中所用的引物序列

基因	上游 (5'-3')	下游 (5'-3')	用途
β -actin	GCACAGTCAAGGCCGAGCCT	GCCTTCTAGATGGTGGTGAA	定量分析
C/EBP α	CAAGAACAGCAACGAGTACG	GTCAGTGGATCACTCCAGCAC	定量分析
C/EBP β	GCAAGAGCCGCGAGTCG	GGCTCGGGCAGCTGCACG	定量分析
PPAR γ	GTGCCAGTTTCGCTAGTAGA	GGCCAGCATCGTGCACCTGA	定量分析
FABP4	ACACCGAGATACCTTCAAAGT	CCATCTAGGCAGATGATGCTCTTC	定量分析
PPP1R3C	GGCTCATTCACGGTCATG	CTCTGCGATAATCGACTG	定量分析
SREBP1	CCAGCATAGGTGGACAGCCG	GCCGTTGTGGGTAGAGGAGC	定量分析
PPP1R3C	<u>CGGAATTCCGATGAGCTGCAC</u> CAGAATGATC	<u>TTGCGGCCGCAATCATCGATAG</u> GAGGTCAAGTTC	构建表达载体

注:限制酶识别序列用下划线“_”标出,其中“GAATTC”和“GCGGCCGC”分别为 *EcoRI* 和 *NotI* 识别序列。

1.2.4 基因表达载体的构建。利用 RNAeasyTM Plus 动物 RNA 抽提试剂盒从 3T3-L1 中提取总 RNA,然后用 BeyoRTTM cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录,利用 cDNA 为模板,扩增 PPP1R3C 基因的 CDS 序列片段,然后将其克隆到带有 flag 标签的 pCMV 载体上的 *EcoRI* 和 *NotI* 之间,挑取阳性克隆进行测序验证,所用的引物见表 1。

1.2.5 实时定量 PCR。利用 RNAeasyTM Plus 动物 RNA 抽提试剂盒从 3T3-L1 不同分化时间点的细胞中提取总 RNA,再用 BeyoRTTM cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录,合成 cDNA。然后利用 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒,在 CFX96 定量 PCR 仪(伯乐,美国)上进行实时定量 PCR,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析各基因的相对表达量, β -actin 作为内参,所用的引物见表 1。

1.2.6 siRNA 合成、过表达载体及细胞转染。SREBP1、PPP1R3C 基因的干扰小 RNA(siRNA)和它们的阴性对照(scramble)序列信息见表 2。合成的 siRNA 在 3000 r/min 离心 1 分钟,再加入 125 μL DEPC 水配成浓度为 20 μM 溶液备用。

表 2 siRNAs 序列信息

名称	上游 (5'-3')	下游 (5'-3')
siPPP1R3C	GGGUCUAUAUGUUGGUAUCCTT	GGGUCCUCAUGUAGACCCTT
Scramble	UUCUCUGAACGCGUCAUAUTT	AUAUGACACGUUCGGAGCUTT
siSREBP1	GGAGAGAGCAGUACUGGAUTT	AUCCAGUACUGCUCUCUCCTT
Scramble	UUGGAAGAGUAACGAUGUTT	UCCAAUGUGCACCUCUCUCTT

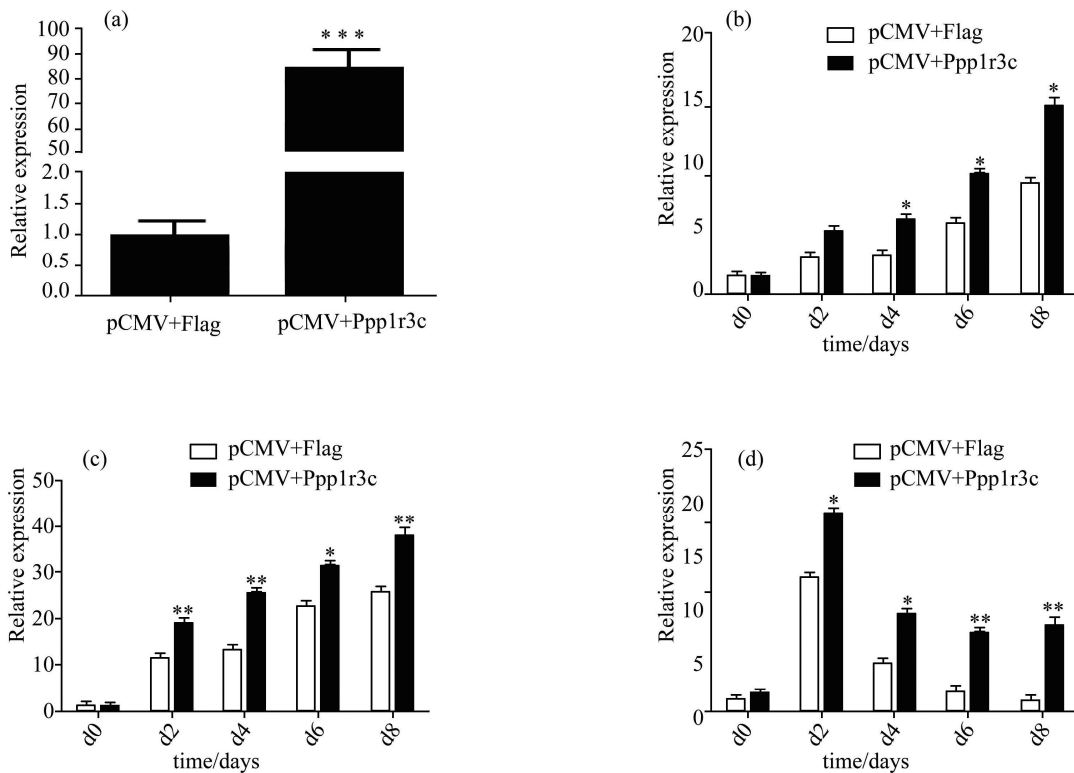
将 3T3-L1 前脂肪细胞与过表达载体或 siRNA 混匀于 500 μL 无血清培养基中,用 Gene Pulser Xcell 电穿孔仪(伯乐,美国)进行转染。转染条件为:方波、电压 220 V、电容 960 μF 。12 孔板中每孔转染质粒 6 μg ,siRNA 终浓度为 50 nM。

1.2.7 统计分析。通过 GraphPad Prism 7 软件作图并进行统计学分析,数据表示为平均数 \pm 标准差(Mean \pm SD),显著水平以 $p < 0.05$ (*)和 $p < 0.01$ (**)为标准。

2 结果与分析

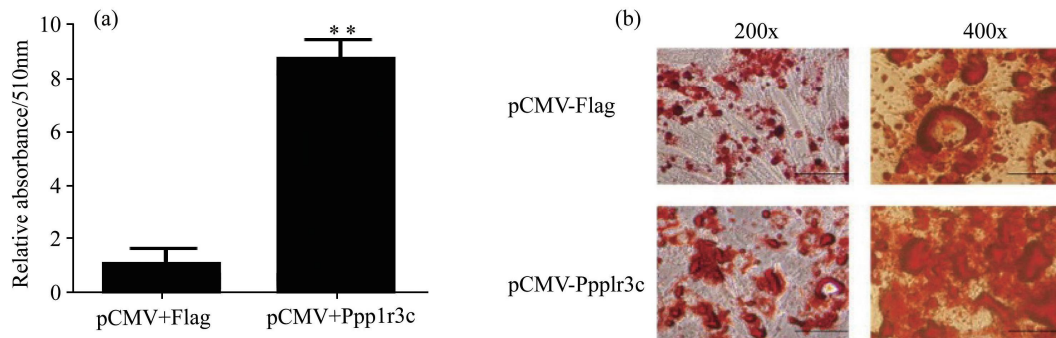
2.1 过表达 PPP1R3C 基因促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化

为分析 PPP1R3C 基因对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响,进行了 PPP1R3C 基因的过表达实验。首先,转染 24 h 后通过实时定量 PCR 检测 PPP1R3C 的表达量,以测定其转染效率,与对照组相比,转染组 PPP1R3C 的表达量显著高于对照组,说明转染效率良好(图 1(a))。检测了脂肪细胞分化标志基因 PPAR γ 、C/EBP α 和 C/EBP β 的表达谱。结果显示,与对照组(pCMV-Flag)相比,PPP1R3C 基因过表达导致 PPAR γ 、C/EBP α 和 C/EBP β 成脂分化标志基因的表达升高,PPAR γ 基因表达量在 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化的第 4 d、第 6 d 和第 8 d 差异显著($p < 0.05$,图 1(b));C/EBP α 基因表达量在诱导分化的第 2 d、第 4 d 和第 8 d 差异极显著($p < 0.01$),诱导分化第 6 d 差异显著($p < 0.05$,图 1(c));C/EBP β 基因表达量在诱导分化的第 2 d 和第 4 d 差异显著($p < 0.05$),第 6 d 和第 8 d 差异极显著($p < 0.01$,图 1(d))。诱导分化 8 d 后,通过油红 O 染色和定量分析表明,过表达 PPP1R3C 基因导致脂滴含量显著增加(图 2)。



注:(a) 转染 24 h 后 PPP1R3C 的过表达效率;(b) 诱导分化各时期 PPAR γ 基因的表达量;(c) 诱导分化各时期 C/EBP α 基因的表达量;(d) 诱导分化各时期 C/EBP β 基因的表达量; β -actin 为内参,*表示 $p < 0.05$,**表示 $p < 0.01$,***表示 $p < 0.001$ 。

图 1 过表达 PPP1R3C 上调成脂分化标志基因的表达



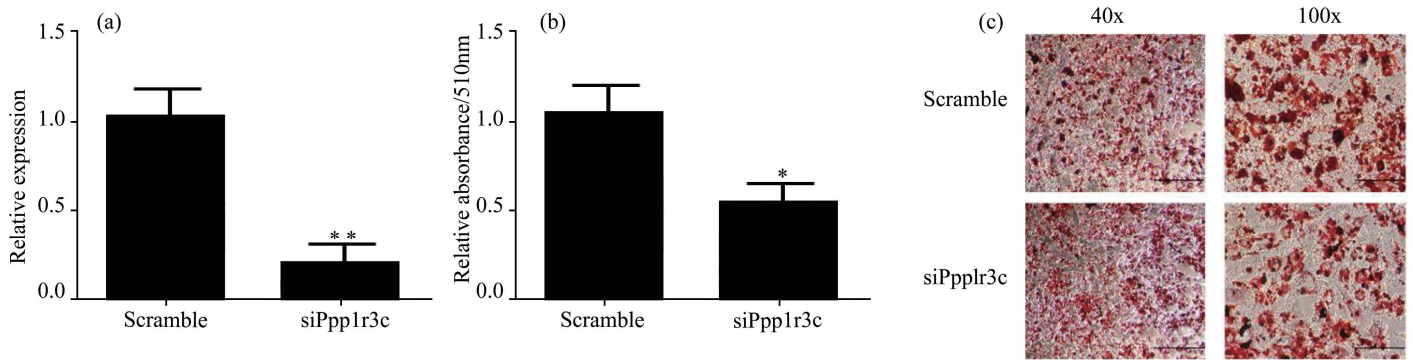
注:(a) 经过 8 d 的分化后,脂滴积累的定量结果,**表示 $p < 0.01$;(b) 脂滴的油红 O 染色结果,比例尺表示 100 μm 。

图 2 过表达 PPP1R3C 增加 3T3-L1 脂肪细胞的脂滴含量

2.2 敲低 PPP1R3C 基因的表达抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化

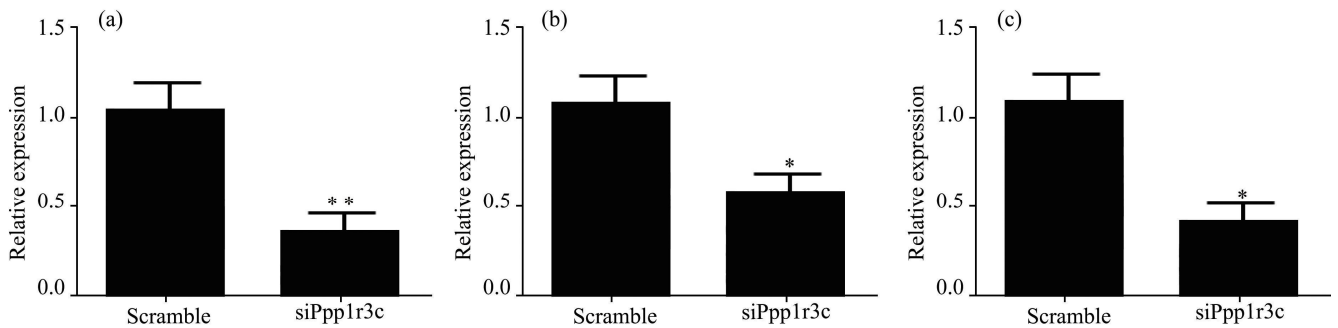
在 3T3-L1 前脂肪细胞中转染 siPPP1R3C,检测对前脂肪细胞分化的影响。转染 24 h 后,实时定量 PCR 分析结果显示,转染 PPP1R3C 特异性 siRNA(siPPP1R3C)可以显著降低 PPP1R3C 的 mRNA 表达水平($p < 0.05$;图 3(a))。利用油红 O 染色检测 3T3-L1 细胞脂肪生成过程中的脂滴积累。如图所示,油红 O

染色结果清晰地表明在诱导分化后第 8 d,干扰 PPP1R3C 的 3T3-L1 细胞中的脂滴积累明显减少(图 3(b), (c))。此外,干扰 PPP1R3C 显著降低了成脂分化标志基因的表达水平(图 4)。上述结果表明干扰 PPP1R3C 基因的表达会抑制 3T3-L1 细胞的成脂分化。



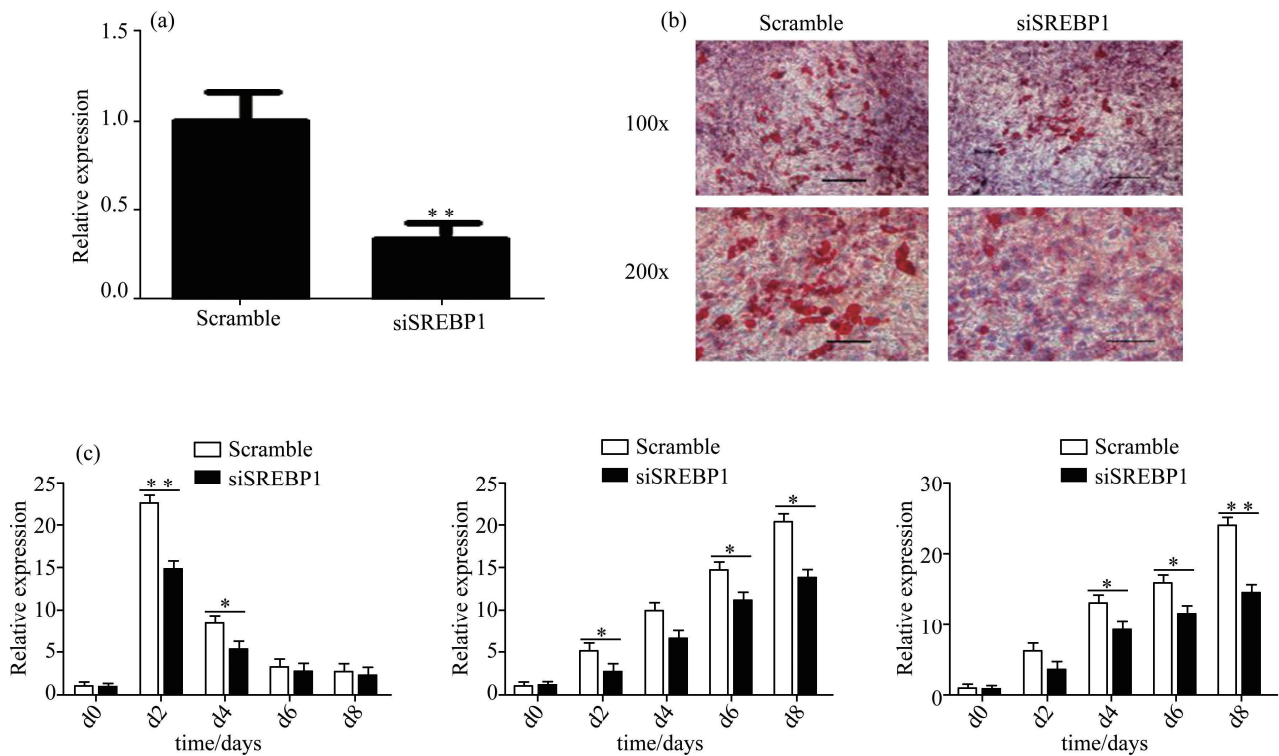
注:(a) 转染 24h 后 PPP1R3C 的过表达效率, β -actin 为内参, ** 表示 $p < 0.01$; (b) 经过 8 d 的分化后,脂滴积累的定量结果。* 表示 $p < 0.05$; (c) 脂滴的油红 O 染色结果,比例尺表示 $100 \mu\text{m}$ 。

图 3 敲低 PPP1R3C 的表达抑制 3T3-L1 脂肪细胞的脂滴积累



注:诱导分化后 8 d 的干扰组与对照组细胞的 PPAR γ (a);C/EBP α (b)和 FABP4(c)基因表达的实时定量 PCR 分析, β -actin 为内参,* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ 。

图 4 抑制 PPP1R3C 的表达下调成脂分化标志基因的表达



注:(a) 转染 24 h 后 SREBP1 的干扰效率, β -actin 为内参, ** 表示 $p < 0.01$; (b) 诱导分化 8 d 后,脂滴的油红 O 染色结果,比例尺表示 $100 \mu\text{m}$; (c) 诱导分化期间各时间段干扰组与对照组的 C/EBP β 、C/EBP α 、PPAR γ 基因表达的实时定量 PCR 分析, β -actin 为内参,* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ 。

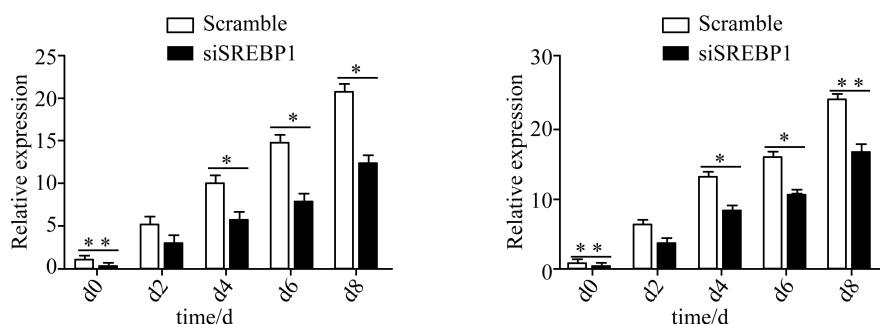
图 5 敲低 SREBP1 基因的表达抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化

2.3 敲低 SREBP1 基因的表达可抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化

首先检测了在 siSREBP1 转染 24 h 后 SREBP1 的表达,实验组显著低于对照组(图 5(a))。通过油红 O 染色(图 5(b))可以看到干扰 SREBP1 后,实验组脂滴积累明显少于对照组的脂滴积累。在转染的 3T3-L1 细胞脂肪生成过程中,分别检测了前期脂肪分化标志基因(C/EBP β)和后期标志基因(PPAR γ 和 C/EBP α)在分化各时期的表达谱(图 5(c)),结果表明,与对照组(Scramble)相比,干扰组(siSREBP1)中的 C/EBP β 基因表达量在诱导分化的第 2 d 差异极显著($p < 0.01$)、第 4 d 差异显著($p < 0.05$);C/EBP α 基因表达量在诱导分化的第 2 d、第 6 d 和第 8 d 差异显著($p < 0.05$);PPAR γ 基因表达量在诱导分化的第 4 d、第 6 d 差异显著($p < 0.05$)、第 8 d 差异显著($p < 0.01$)。

2.4 敲低 SREBP1 抑制 PPP1R3C 基因的表达

为了探究 SREBP1 基因对 PPP1R3C 基因的调控作用,干扰 SREBP1 基因后,利用实时定量 PCR 分别检测了 SREBP1 基因和 PPP1R3C 基因在 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中各时期的相对表达量(图 6)。



注:诱导分化时各时间点干扰组与对照组的 SREBP1 和 PPP1R3C 基因的实时定量 PCR 分析, β -actin 为内参,*表示 $p < 0.05$,**表示 $p < 0.01$ 。

图 6 敲低 SREBP1 基因的表达抑制 PPP1R3C 基因的表达

结果显示,利用 siRNA 干扰 SREBP1 基因的表达,可导致 PPP1R3C 的表达受到抑制,说明 PPP1R3C 和 SREBP1 之间存在一定的关联。在 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中,可能 SREBP1 基因参与调控 PPP1R3C 基因的表达,准确的调控机制还需要进一步分析。

3 讨论

脂肪细胞的成脂分化是由正、负调控因子严密调控的过程。但至今还没有发现在缺失 PPAR γ 的情况下,可发动脂肪细胞的成脂分化^[15]。除此以外,SREBP1、糖皮质激素、cAMP 应答元件结合蛋白和 C/EBP δ 对脂肪细胞的成脂分化都有促进作用;Wnts 通路、Krüppel 样因子家族部分成员、转录因子 E2F 家族、叉头转录因子家族的成员、C/EBP 同源蛋白等对成脂分化有负调控作用^[16]。我们前期对 3T3-L1 脂肪细胞分化过程中转录组的变化进行了研究,分析了 D0 和 D13 的差异表达基因,发现 PPP1R3C 基因在脂肪细胞分化过程中是上调的($\log_2\text{FoldChange} = 3.97$)^[17],暗示 PPP1R3C 基因在脂肪细胞分化中可能存在一定的功能。本研究结果显示,过表达 PPP1R3C 基因促进了 3T3-L1 分化的脂肪细胞中脂肪特异性基因的表达和脂滴的形成。

本研究也发现,在 3T3-L1 前脂肪细胞中敲低 PPP1R3C 基因的表达,导致脂肪生成和脂肪基因表达受到抑制,提示 PPP1R3C 可能在 3T3-L1 脂肪形成过程中起正向调控作用。糖原和甘油三酯是人体能量储存的两种主要形式,在食物缺乏的不同阶段提供能量。然而,糖原代谢是如何与脂肪组织中的脂肪沉积相联系的还没有明确的定论。在从禁食到进食状态的转变过程中,脂肪组织中形成了大量的糖原,人们推测:(1)脂肪组织可以合成糖原;(2)脂肪组织的糖原代谢是特异性调控的;(3)脂肪组织可能影响碳水化合物转化为脂肪;(4)脂肪组织在糖脂代谢中似乎发挥更积极的作用。人们还假设糖原沉积是碳水化合物转化为脂肪组织中的脂肪的先决条件,因为脂肪沉积发生在糖原沉积之后^[18]。通过缺失 PPP1R3G 的小鼠模型,与野生型相比,高脂肪饮食喂养后,PPP1R3G 缺失小鼠的体重和脂肪组成显著降低。高脂肪饮食引起的肝脏脂肪变性也因 PPP1R3G 的缺失而略有缓解。PPP1R3G 的缺失降低了脂肪组织中的糖原水平。PPP1R3G 的

过表达会导致糖原和甘油三酯水平的升高。研究表明,糖原积极参与脂肪组织的脂肪积累和高脂肪饮食的肥胖发展,PPP1R3G 是体内糖原代谢与脂质代谢相联系的重要分子^[19]。后来发现脂肪组织确实具有合成糖原的巨大能力。除了 PPP1R3G 外,PPP1R3B 是脂肪组织中表达的另一个 G 亚基基因^[6]。而本研究中的 PPP1R3C 基因与 PPP1R3G、PPP1R3B 基因同属一个家族,在脂肪细胞分化过程中也是上调的,而且过表达 PPP1R3C 基因促进成脂分化,敲低其表达抑制成脂分化,说明 PPP1R3C 基因与 PPP1R3G、PPP1R3B 基因在糖原和脂肪代谢中可能有相似的功能。

另外,PPP1R3C 基因受 SREBP1 基因的调控,PPP1R3C 基因和 SREBP1 基因同时作为胆固醇合成途径的重要组分,它们很有可能在调控脂肪生成的过程中存在协同作用^[14]。有趣的是,我们的研究结果显示,在 3T3-L1 前脂肪细胞中敲低 SREBP1 基因的表达,检测到 PPP1R3C 基因的表达也是下调的,提示 PPP1R3C 对脂肪生成的影响可能是通过 3T3-L1 中的 SREBP1 调控来实现的,进一步证实 SREBP1 是否通过结合到 PPP1R3C 基因的启动子上来调控其表达是必要的。

SREBPs 自发现及命名以来,就被作为固醇类和脂肪酸合成中的重要转录调节因子来研究^[20-23]。SREBP1 在甘油三酯和脂肪酸合成方面的调控作用显著,由于 SREBP1 基因过度表达会导致非脂肪组织脂质沉积聚合,从而造成组织病变^[24]。虽然有明确的证据表明 SREBP1 并非肥胖发育所必需的^[25]。然而,显性抑制 SREBP1 的异位表达可减弱脂肪细胞的分化。此外,SREBP1 过表达增强了 PPAR γ 的活性^[26],其他研究表明,SREBP1 参与了 PPAR γ 配体的产生^[15,27]。总之,在体外的研究支持 SREBP1 在成脂中的作用,而体内研究表明 SREBPs 并非脂肪组织产生或扩展所必需,因此进一步的研究是必要的。

PTG 基因敲除的小鼠肝糖原水平降低,肝脂质减少,mTORC1/SREBP1 减少,而且通过 RNA-seq 对转录组进行分析,发现 SREBP1 和许多参与脂肪生成的靶基因显著下调。这些现象也许反映了 PTG 对 mTORC1/SREBP1 和脂肪生成的反馈调节,从而介导糖原和脂质代谢之间的串话^[14]。此外,在膀胱癌细胞中也发现了 PPP1R3C 与 SREBP1 的调控关系^[28]。本研究初步证实在 3T3-L1 前脂肪细胞分化中 SREBP1 可能对 PPP1R3C 起到一定的调控作用。总之,本研究揭示了 PPP1R3C 对 3T3-L1 前脂肪细胞脂肪分化具有促进作用,而且发现敲低 SREBP1 基因的表达导致 PPP1R3C 基因下调表达,推测 PPP1R3C 可能受到 SREBP1 的调控,为进一步研究 PPP1R3C 在脂肪细胞分化及脂肪沉积中的分子机制提供了一定的基础。但在 3T3-L1 前脂肪细胞分化中,SREBP1 对 PPP1R3C 的具体调控机制还需进一步的分析。

参 考 文 献

- [1] ROACH P J,DEPAOLI-ROACH A A,HURLEY T D,et al.Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes[J].*Biochem J*,2012,441(3):763-787.
- [2] CEULEMANS H,BOLLEN M.Functional diversity of protein phosphatase-1,a cellular economizer and reset button[J].*Physiol Rev*,2004,84(1):1-39.
- [3] AGIUS L.Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism[J].*Biochem J*,2008,414(1):1-18.
- [4] CROSSON S M,KHAN A,PRINTEN J,et al.PTG gene deletion causes impaired glycogen synthesis and developmental insulin resistance [J].*J Clin Invest*,2003,111(9):1423-1432.
- [5] O'DOHERTY R M,JENSEN P B,ANDERSON P,et al.Activation of direct and indirect pathways of glycogen synthesis by hepatic over-expression of protein targeting to glycogen[J].*J Clin Invest*,2000,105(4):479-488.
- [6] PRINTEN J A,BRADY M J,SALTIEL A R.PTG,a protein phosphatase 1-binding protein with a role in glycogen metabolism[J].*Science*,1997,275(5305):1475-1478.
- [7] BRADY M J,PRINTEN J A,MASTICK C C,et al.Role of protein targeting to glycogen (PTG) in the regulation of protein phosphatase-1 activity[J].*J Biol Chem*,1997,272(32):20198-20204.
- [8] GASA R,JENSEN P B,BERMAN H K,et al.Distinctive regulatory and metabolic properties of glycogen-targeting subunits of protein phosphatase-1 (PTG,GL,GM/RGL) expressed in hepatocytes[J].*J Biol Chem*,2000,275(34):26396-26403.
- [9] YANG R,CAO L,GASA R,et al.Glycogen targeting subunits and glucokinase differentially affect pathways of glycogen metabolism and their regulation in hepatocytes[J].*J Biol Chem*,2002,277(2):1514-1523.
- [10] MAGISTRETTI P J,ALLAMAN I.Glycogen;a Trojan horse for neurons[J].*Nat Neurosci*,2007,10(11):1341-1342.

- [11] ALLAMAN I,PELLERIN L,MAGISTRETTI P J.Protein targeting to glycogen mRNA expression is stimulated by noradrenaline in mouse cortical astrocytes[J].*Glia*,2000,30(4):382-391.
- [12] CHENG A,ZHANG M,CROSSON S M,et al.Regulation of the mouse protein targeting to glycogen (PTG) promoter by the FoxA2 fork-head protein and by 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate in H4IIE hepatoma cells[J].*Endocrinology*,2006,147(7):3606-3612.
- [13] JURCZAK M J,DANOS A M,REHRMANN VR,et al.Transgenic overexpression of protein targeting to glycogen markedly increases adipocytic glycogen storage in mice[J].*Am J Physiol Endocrinol Metab*,2007,292(3):E952-E963.
- [14] LU Bin Bin,BRIDGES Dave,YANG Ye Men,et al,Metabolic crosstalk: molecular links between glycogen and lipid metabolism in obesity [J].*Diabetes*,2014,63(9):2935-48.
- [15] TONG Q,HOTAMISLIGIL G S.Molecular mechanism of adipocyte differentiation[J].*Endocrine & Metabolic Disorders*,2001,2(1):349-355.
- [16] WHITE U A,STEPHENS J M.Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue[J].*Mol Cell Endocrinol*,2010,318(1-2):10-14.
- [17] XIN You Zhi,LI Cheng Ping,GUO Yan,et al.RNA-Seq analysis reveals a negative role of MSMO1 with a synergized NSDHL expression during adipogenesis of 3T3-L1[J].*Biosci Biotechnol Biochem*,2019,83(4):641-652.
- [18] TUERKISCHER E,WERTHEIMER E.Glycogen and adipose tissue[J].*J Physiol*,1942,100(4):385-409.
- [19] ZHANG Y,GU J,LINW,et al.Ablation of PPP1R3G reduces glycogen deposition and mitigates high-fat diet induced obesity[J].*Mol Cell Endocrinol*,2017,439(1):133-140.
- [20] RAJAVASHISTH T B,TAYLOR A K,ANDALIBI A,et al.Identification of a zinc finger protein that binds to the sterol regulatory element[J].*Science*,1989,245(4918):640-643.
- [21] TONTONOZ P,KIM J B,GRAVES R A,et al.ADD1:a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation [J].*Mol Cell Biol*,1993,13(8):4753-4759.
- [22] SIMONS K,IKONEN E.Functional rafts in cell membranes[J].*Nature*,1997,387(6633):569-572.
- [23] BROWN M S,GOLDSTEIN J L.The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane bound transcription factor [J].*Cell*,1997,89(3):331-340.
- [24] YOKOYAMA C,WANG X,BRIGGS M R,et al.SREBP-1,a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene[J].*Cell*,1993,75(1):187-197.
- [25] YAHAGI N,SHIMANO H,HASTY A H,et al.Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty liver but not obesity or insulin resistance in *Lep(ob)/Lep(ob)* mice[J].*J Biol Chem*,2002,277(22):19353-19357.
- [26] KIM J B,SPIEGELMAN B M.ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism[J].*Genes Dev*,1996,10(9):1096-1107.
- [27] KIM J B,WRIGHT H M,Wright M,et al.ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand[J].*Proc Natl Acad Sci USA*,1998,95(8):4333-4337.
- [28] AUDET-WALSH É,VERNIER M,YEE T,et al.SREBF1 Activity Is Regulated by an AR/mTOR Nuclear Axis in Prostate Cancer[J].*Mol Cancer Res*,2018,16(9):1396-1405.