

## 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中自噬的发生与线粒体数目的改变

张 许<sup>1</sup>, 林海燕<sup>1</sup>, 尹 业<sup>1</sup>, 韩 晓<sup>1</sup>, 程 光<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学江苏省人类功能基因组学重点实验室, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>南京绿叶制药有限公司长效和靶向制剂国家重点实验室, 江苏 南京 210061)

**[摘要]** 目的:探索 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中自噬的发生与线粒体数目改变的关系。方法:培养 3T3-L1 前脂肪细胞,利用电子显微镜技术观察细胞分化过程中自噬小泡的形成与变化、线粒体数目的改变,同时运用 Western blot 检测 NRF1、mtTFA 的表达。结果:电镜结果显示:在 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中,自噬小泡出现在细胞分化的第 2 天,随后迅速增加,第 4 天自噬小泡的面积达到最大,第 6 天开始消失;线粒体数目在分化第 2 天显著下降,第 4 天开始逐渐增加,到第 6 天超过分化前的水平并在第 8 天恢复;在分化过程中的自噬小泡内,有被吞噬的线粒体。Western blot 结果则显示调控线粒体合成的转录因子 NRF1、mtTFA 的表达在分化第 2 天显著下降,第 4 天迅速升高,至分化末期再次下降。结论:3T3-L1 前脂肪细胞分化过程的早中期形成了大量的自噬小泡,包括一些线粒体自噬,这些线粒体自噬的发生可能是分化早期线粒体数目减少的原因之一。

**[关键词]** 自噬;脂肪细胞分化;线粒体

**[中图分类号]** Q257

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)12-1675-05

doi:10.7655/NYDXBNS20151201

## Appearance of autophagy and changes of mitochondria number in the process of 3T3-L1 preadipocyte differentiation

Zhang Xu<sup>1</sup>, Lin Haiyan<sup>1</sup>, Yin Ye<sup>1</sup>, Han Xiao<sup>1</sup>, Cheng Guang<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Jiangsu Province Key Lab of Human Functional Genomics, NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Nanjing Green leaf Pharmaceutical Co Ltd State Key Laboratory of Long-term and Targeted Agents, Nanjing 210061, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the relationship between the changes of autophagy and the number of mitochondria in the process of the differentiation of 3T3-L1 cells. **Methods:** (1) 3T3-L1 preadipocytes were cultured and then induced by media mixed with insulin, DEX, IBMX. Lipid droplets were observed on the fifth day. The peroxisome proliferation activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and CAAT Enhancer Binding Proteins  $\alpha$  (CEBP $\alpha$ ) protein were detected by Western blotting. (2) Autophagosome pictures were taken by transmission electron microscope (TEM) and LC3II level was detected by Western blotting. **Results:** The TEM showed that during the differentiation of 3T3-L1 preadipocyte, autophagy vesicles appeared on the second day, extended to greater range of cytoplasm on the fourth day, then gradually disappeared from the sixth day. While the expression of LC3 II began to increase in the second day, reached the highest on the fourth day, and then gradually declined. Furthermore, with the change of autophagy vesicles during the differentiation, the number of mitochondria increased after a decrease. **Conclusion:** There are a lot of autophagy vesicles in the early and middle stage of the differentiation of 3T3-L1, including some mitophagy, which may be one of the reasons for the decrease of the number of mitochondria in early stage of differentiation.

**[Key words]** autophagy; adipocyte differentiation; mitochondria

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(12): 1675-1679]

人和哺乳动物体内存在两种脂肪组织:白色脂肪组织(white adipocyte tissue, WAT)和棕色脂肪组

织(brown adipocyte tissue, BAT)。白色脂肪组织的主要作用是储存能量,棕色脂肪组织含有大量线粒体,对于维持机体能量平衡起重要作用<sup>[1]</sup>。目前已有研究表明白色脂肪组织的过度沉积与肥胖症、2型糖尿病、高血脂、心血管疾病以及乳腺癌等

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(H0704)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: cheng@luye.cn

疾病的发生密切相关<sup>[2]</sup>。在细胞水平,白色脂肪组织的过度沉积主要表现为单个脂肪细胞体积的增大和脂肪细胞数量的增多。早期研究认为成体内脂肪细胞数量是恒定的,体积增大是脂肪细胞在肥胖时的主要病理变化<sup>[3]</sup>。近年来,脂肪细胞在成年人体内更替状况的研究表明,成人脂肪细胞存在每年约 10% 的更新<sup>[4]</sup>,这提示成人脂肪组织中也存在前体细胞向成熟脂肪细胞的分化。临床研究表明:在糖尿病患者血清中脂肪前体细胞的标志分子 Pref1 的水平比相同体重指数(BMI)的人群高<sup>[5]</sup>,而 Pref1 的表达水平与脂肪细胞的分化呈负相关<sup>[6]</sup>。另外有研究表明:与具有相同 BMI 的普通人群相比,糖尿病患者等量腹部脂肪中含有的小号脂肪细胞数量下降,但其死亡数并未增加,说明糖尿病患者可能存在脂肪细胞发育障碍<sup>[7]</sup>。成体内脂肪细胞更新障碍可能是白色脂肪组织过度沉积及其引起一系列代谢相关疾病的重要病因。因此,对脂肪细胞发育分子机制的深入研究,将为代谢性疾病尤其是 2 型糖尿病的治疗和预防提供重要理论参考和靶点。

自噬是广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖性的降解途径,在饥饿条件下,它可以调节细胞内长寿命蛋白和细胞器降解,降解产物再被细胞重新利用<sup>[8]</sup>。近年来有研究发现,在小鼠前脂肪细胞 3T3-L1 中干扰 ATG-7 的表达会减少脂质沉积、降低分化相关标志分子的表达<sup>[9]</sup>;在 3T3-L1 中干扰 ATG-5 或者用药物抑制自噬会得到相似效应<sup>[10]</sup>;而脂肪组织特异性敲除 ATG-7 基因的小鼠则表现出消瘦、体脂减少和胰岛素敏感性增加<sup>[11]</sup>。这些结果表明,自噬是正常白色脂肪细胞生成所必需的。但是目前对于脂肪细胞分化过程中自噬的发生发展及其功能的研究还相对匮乏。

本文利用电子显微镜技术在培养的 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中监测自噬小泡的形成与改变,并发现在分化初期细胞内的线粒体数量有明显下降,进一步探究后发现有线粒体自噬的出现,提示 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中的线粒体自噬可能是线粒体数目减少的原因之一。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

DMEM 细胞培养液、小牛血清、胎牛血清(Gibco 公司,美国);细胞培养皿、细胞培养板(Greiner-Bio One 公司,德国);抗 Tubulin 抗体(Santa Cruz 公司,美国),抗 LC3、PPAR $\gamma$  抗体(Cell Signaling Technol-

ogy 公司,美国),抗 CEBP $\alpha$  抗体(Abcam 公司,美国);insulin、DEX、IBMX、油红 O 等试剂(Sigma 公司,美国);3T3-L1 细胞株(中科院上海生物化学与细胞生物研究所)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 3T3-L1 细胞培养、诱导分化及鉴定

3T3-L1 细胞株置于含 10% 小牛血清、50 g/mL 青霉素和 100 g/mL 链霉素的高糖 DMEM 全培养液中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养;3T3-L1 细胞培养至汇合度为 70%~80% 时,用含 0.01% EDTA、0.25% 胰蛋白酶的消化液消化,1:3 传代。3T3-L1 前脂肪细胞接种于 3.5 cm 培养皿,用含 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养液在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养,根据细胞状况每 2 d 换 1 次培养液。细胞融合后 2 d 开始三联诱导 (IBMX 0.5 mmol/L + DEX 1  $\mu$ mol/L + insulin 10  $\mu$ g/mL + 10% 胎牛血清高糖 DMEM),培养 48 h,换只含 10  $\mu$ g/mL 胰岛素的全培养液再培养 48 h,随后以 10% 小牛血清高糖 DMEM 继续培养至细胞成熟。

#### 1.2.2 Western blot

采用 Western blot 检测分化不同天数 LC3-II、线粒体调控相关转录因子的表达:分别在诱导分化的第 0、2、4、6、8 天收集细胞,用冰 PBS 洗涤细胞 2 次,并将残余液体吸净;3.5 cm 皿每孔加 0.08 mL 细胞裂解液,置于冰上 20 min;用橡皮刮刮下细胞,移入离心管;4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 20 min,取上清分装后 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。Biotek 公司的分光光度计中使用 750 nm 波长读取吸光度,根据标准曲线计算各样品蛋白浓度。配制浓缩胶和分离胶,100 V 恒压电压下 SDS、PAGE 凝胶电泳,100 V 恒压转膜,依次加一抗和二抗孵育、洗膜,化学法发光底物进行显影。

#### 1.2.3 透射电镜

将分化 0、2、4、6、8 d 的细胞收集成团,加入含 2.5% 戊二醛的固定液中预固定(4 $^{\circ}$ C,6 h)。标本经磷酸缓冲液(pH 7.4,0.1 mol/L,4 $^{\circ}$ C)冲洗 3 次,每次 15 min,置入 1% 锇酸溶液中,4 $^{\circ}$ C 固定 2 h,磷酸缓冲液(pH 7.4,0.1 mol/L,4 $^{\circ}$ C)冲洗 3 次,每次 5 min,标本经梯度丙酮逐级脱水至环氧丙烷。每个梯度 20 min,用环氧树脂 Epon812 浸透包埋,制备超薄切片,经醋酸双氧铀和枸橼酸染色后,FEI TECNAI SPIRIT G2 透射电镜观察。

#### 1.3 统计学方法

取透射电镜拍摄具有细胞核的完整细胞,进行线粒体计数,每组 7 张照片,利用 Photoshop 软

件进行细胞面积的计算,每个细胞的线粒体数目按细胞面积进行校正,两组数据之间的统计学差异采用双尾  $t$  检验计算  $P$  值。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

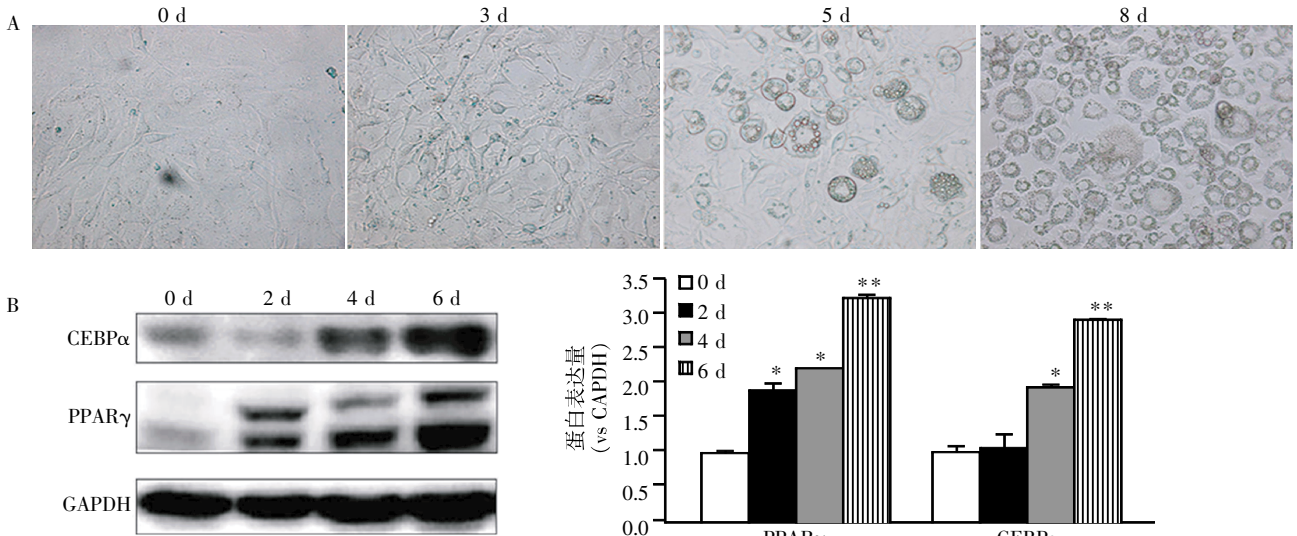
## 2 结果

### 2.1 诱导 3T3-L1 细胞分化为脂肪细胞

正常培养的 3T3-L1 细胞呈三角形或梭形,用三联诱导剂刺激后,细胞回缩,呈网格状;在分化第 3

天,换用只含 10 g/mL 胰岛素的完全培养液培养,细胞逐渐变大,变圆;在分化第 5 天,细胞内开始出现肉眼可见细小颗粒状的脂肪小滴,并随着脂肪细胞分化的进程,细胞内脂滴的数量不断增加,脂滴逐渐增大融合(图 1A)。在分化的不同时间收取蛋白检测分化相关标志分子,PPAR $\gamma$ 、CEBP $\alpha$  的表达都随着分化过程逐渐升高(图 1B)。

### 2.2 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中自噬小泡的形成及变化



A:3T3-L1 细胞分化第 0、3、5、8 天光镜照片( $\times 100$ );B:Western blot 检测 3T3-L1 细胞分化标志分子 PPAR $\gamma$  和 CEBP $\alpha$  表达水平(与 0 d 相比, \* $P \leq 0.01$ , \*\* $P \leq 0.001$ ,  $n=3$ )。

图 1 3T3-L1 细胞分化过程中的形态改变及标志分子的表达

Figure 1 Morphological change and marker gene expression in the process of 3T3-L1 cell differentiation

收取分化不同天数的 3T3-L1 细胞,固定后脱水、切片,利用透射电子显微镜拍照。在分化第 0 天(图 2A),细胞内未见自噬小泡,线粒体含量丰富;分化第 2 天(图 2B),细胞内出现自噬小泡,线粒体数目显著减少;到分化第 4 天(图 2C),细胞体积缩小,自噬小泡占整个细胞的面积加大;分化到第 6 天(图 2D),自噬小泡减少,线粒体数目达到顶峰;分化至第 8 天(图 2E),细胞内明显出现脂滴,自噬小泡基本消失,线粒体数目逐渐恢复。以上结果说明在 3T3-L1 细胞分化过程中确实发生了自噬,并且主要发生在分化的早中期。

### 2.3 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中线粒体数目改变

为了进一步明确线粒体数目的改变,取透射电镜拍摄具有细胞核的完整细胞,进行线粒体计数,每组 7 张照片,按细胞面积校正,取平均数。结果如图 3 所示:线粒体数目在分化第 2 天显著减少,在第 4 天开始增加且在分化第 6 天达到顶峰,至第 8 天则趋于正常水平,提示 3T3-L1 前脂肪细胞分化过

程中线粒体数目的减少可能与自噬小泡形成相关。

### 2.4 自噬小泡中含有线粒体

为了探索 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中线粒体数目的减少是否与自噬相关,进一步观察分化早中期自噬小泡的形态,结果发现:在细胞分化早中期形成的自噬小泡内,有被吞噬的线粒体,提示细胞分化早期线粒体的锐减可能有部分是通过线粒体自噬完成的(图 4)。

### 2.5 分化过程中 LC3-II、NRF1、mtTFA 的表达

LC3 是 Atg8 在哺乳动物细胞中的同源蛋白。在哺乳动物中,LC3 以前体形式合成,被切割后形成其胞浆形式 LC3-I。在细胞自噬时,Atg3 会切除其 C 端的 22 个氨基酸,从而形成 LC3-II,后者与磷脂结合后结合到细胞膜上<sup>[12]</sup>。由于 LC3-II 只特异性地结合到新合成的自噬体上,因此已成为现在较为有效、应用比较广泛的自噬体标记物<sup>[13]</sup>。检测分化过程中 LC3-II 的表达进一步探索自噬与线粒体的关系,结果如图 5 所示,LC3-II 在分化第 2 天开始上

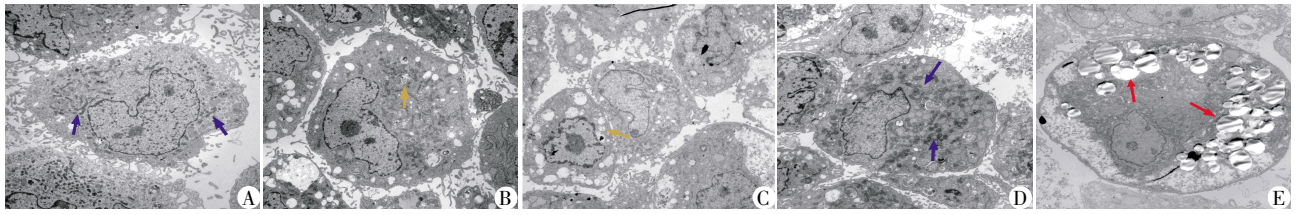
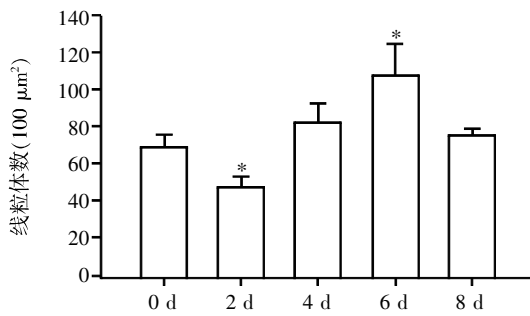


图2 分化过程中细胞的亚细胞形态  
透射电子显微镜拍摄 3T3-L1 细胞分化第0天(A)、第2天(B)、第4天(C)、第6天(D)、第8天(E)细胞形态。其中蓝色箭头标注线粒体、黄色箭头标注自噬小泡、红色箭头标注脂滴。

Figure 2 The subcellular morphology of cells during the differentiation



与0 d相比, \* $P \leq 0.05$ ,  $n=7$ 。

图3 细胞分化过程中线粒体数目的改变

Figure 3 Changes in the number of mitochondria in the process of cell differentiation

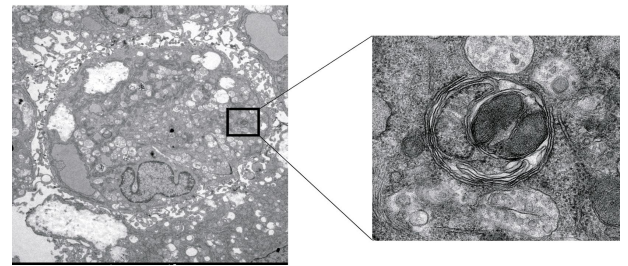
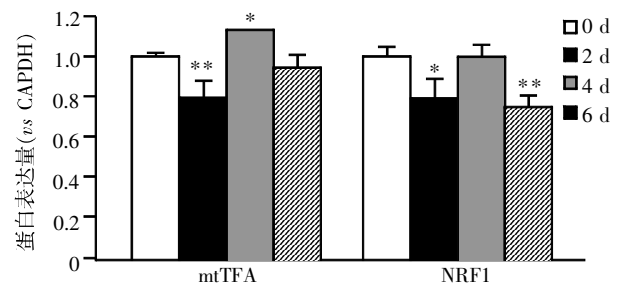
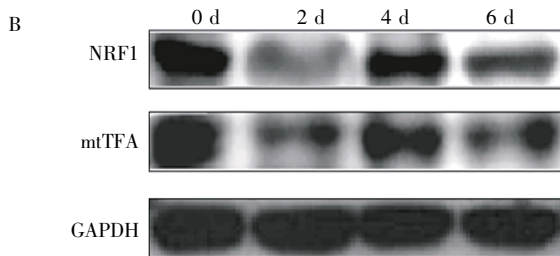
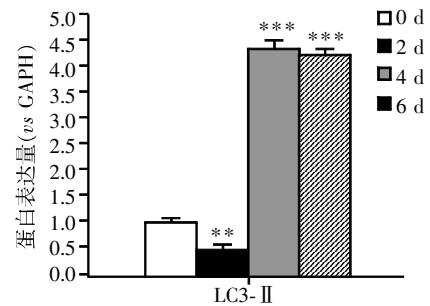
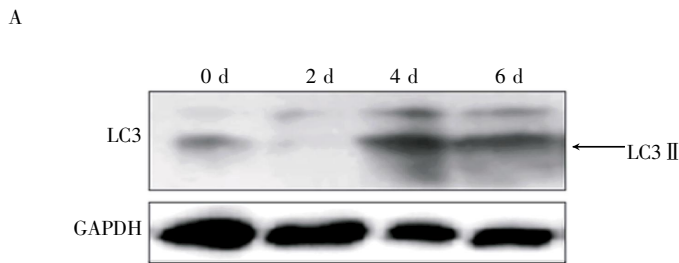


图4 3T3-L1 细胞分化过程中的线粒体自噬  
透射电子显微镜拍摄 3T3-L1 细胞分化过程中含线粒体的自噬小泡。

Figure 4 Mitophagy during the differentiation of 3T3-L1 cells



A: Western blot 检测自噬标志分子 LC3-II 表达水平; B: Western blot 检测调控线粒体基因表达的转录因子 mtTFA 和 NRF-1 表达水平。与0 d相比, \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ,  $n=3$ 。

图5 细胞分化过程中 LC3-II、mtTFA 和 NRF-1 的表达

Figure 5 Expression of NRF-1, mtTFA and LC3-II in the differentiation of 3T3-L1 cells

调、第4天达到顶峰并在第6天下降,这种改变与电镜图中自噬小泡的发生发展趋势一致;调控线粒体基因表达的转录因子 mtTFA, NRF-1 则在 3T3-L1 细胞分化的第2天有所下降,第4天则明显上调,

至第6天再次下降,这些基因的改变也与电镜图中所观察到的线粒体数目改变趋势一致。进一步说明在细胞分化早中期发生了自噬,同时也伴随着线粒体合成调控基因的改变。

### 3 讨 论

近年来几项独立研究表明,无论在体内还是体外,自噬对白色脂肪细胞的分化至关重要;蛋白质组学和转录组学的分析则表明分化过程中的脂肪细胞经历了剧烈的细胞质重构<sup>[14]</sup>;而在脂肪细胞中,线粒体既是脂肪酸氧化的主要场所,也是脂肪酸从头合成的重要媒介,由于他们在脂肪细胞代谢中的核心作用,在脂肪细胞新生过程中,线粒体网络是细胞质重构的重要靶标<sup>[15]</sup>。但是这两者之间是否存在关联,目前还缺乏直接证据。

本研究以小鼠胚胎成纤维细胞系 3T3-L1 为白色脂肪细胞分化模型,利用透射电子显微镜技术直接观察到:自噬小泡在分化早期开始出现,持续增多到分化中期达到顶峰,而在分化后期逐渐消失,自噬相关标志分子 LC3-II 的表达也与自噬小泡的出现相一致,这些为白色脂肪细胞分化过程中自噬的出现提供了直接证据。

电镜结果还显示:细胞分化过程中形成的自噬小泡中,存在一些线粒体自噬。并且伴随着自噬小泡的改变,细胞内线粒体数目经历着从分化早期的显著减少到中后期持续增多、再到晚期恢复正常的改变,这一改变与自噬小泡的发生此消彼长,因此可以推测,脂肪细胞分化早期出现的自噬担负着部分线粒体的重任,从而推动细胞分化过程中的线粒体重构。

本研究首次利用透射电镜技术监测了 3T3-L1 细胞分化过程中自噬小泡的形成与变化,并首次确定在脂肪细胞分化过程中存在线粒体自噬,为脂肪细胞分化过程中自噬的发生及其功能研究提供了直接依据,也为脂肪细胞分化的分子机制研究提供了新思路。

#### [参考文献]

[1] Betz MJ, Enerback S. Human brown adipose tissue: What we have learned so far[J]. *Diabetes*, 2015, 64(7): 2352–2360

[2] Feng B, Zhang T, Xu H. Human adipose dynamics and metabolic health [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2013, 1281: 160–177

[3] Czech MP. Cellular basis of insulin insensitivity in large

rat adipocytes[J]. *J Clin Invest*, 1976, 57(6): 1523–1532

[4] Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans[J]. *Nature*, 2008, 453(7196): 783–787

[5] Kavalkova P, Touskova V, Roubicek T, et al. Serum preadipocyte factor-1 concentrations in females with obesity and type 2 diabetes mellitus; the influence of very low calorie diet, acute hyperinsulinemia, and fenofibrate treatment[J]. *Horm Metab Res*, 2013, 45(11): 820–826

[6] Wang Y, Kim KA, Kim JH, et al. Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis[J]. *J Nutr*, 2006, 136(12): 2953–2956

[7] Pasarica M, Xie H, Hymel D, et al. Lower total adipocyte number but no evidence for small adipocyte depletion in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(5): 900–902

[8] Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions[J]. *J Cell Sc*, 2005, 118(Pt 1): 7–18

[9] Cecconi F, Levine B. The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death [J]. *Dev Cell*, 2008, 15(3): 344–357

[10] Baerga R, Zhang Y, Chen PH, et al. Targeted deletion of autophagy-related 5(atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice[J]. *Autophagy*, 2009, 5(8): 1118–1130

[11] Singh R, Xiang Y, Wang Y, et al. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(11): 3329–3339

[12] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2503–2518

[13] Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, et al. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy[J]. *Autophagy*, 2005, 1(2): 84–91

[14] Newton BW, Cologna SM, Moya C, et al. Proteomic analysis of 3T3-L1 adipocyte mitochondria during differentiation and enlargement[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(10): 4692–4702

[15] Wilson-Fritch L, Burkart A, Bell G, et al. Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(3): 1085–1094

[收稿日期] 2015-09-19