

# 钙信号调节小鼠前体脂肪细胞分化和脂质蓄积的机制

王丽<sup>1</sup>, 孙超<sup>1</sup>, 康靖全<sup>2</sup>

1 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100

2 西北农林科技大学生命科学学院, 杨凌 712100

**摘要:** 本试验用醋酸钙、p38 丝裂原激活蛋白激酶(p38 MAPK)抑制剂 SB203580 及钙通道阻滞剂和激动剂刺激小鼠前体脂肪细胞。通过实时定量 PCR 技术检测前体脂肪细胞分化标志基因和钙信号相关受体基因表达水平, 用油红 O 染色提取法和 Fura-2/AM 荧光法测定胞内脂质蓄积情况及胞浆游离  $Ca^{2+}$  浓度( $[Ca^{2+}]_i$ )变化, 以探讨钙信号调节前体脂肪细胞分化的潜在机制。结果表明: 钙通道阻滞剂和激动剂显著改变了脂蛋白脂酶(LPL), 过氧化物增殖激活受体  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )、脂肪酸合成酶(FAS)的表达水平, 且影响细胞内的脂质蓄积。与降低外钙摄入相比, 降低内钙释放能促进前体脂肪细胞分化( $P<0.01$ ), 而提高外钙摄入与提高内钙释放相比, 提高外钙摄入显著抑制前体脂肪细胞分化( $P<0.01$ )。SB203580 可降低胞浆 $[Ca^{2+}]_i$  浓度, 促进前体细胞分化和脂质蓄积( $P<0.01$ )。但钙信号并未影响维生素 D 受体(VDR)和细胞外钙感受体(CaSR)的表达水平。提示钙信号可能通过 p38 MAPK 通路影响前体脂肪细胞分化和脂质蓄积。

**关键词:** 钙信号, p38 MAPK, 小鼠, 前体脂肪细胞分化, 脂质蓄积

## The mechanism of calcium signal regulate preadipocyte differentiation and lipid accumulation in mice

Li Wang<sup>1</sup>, Chao Sun<sup>1</sup>, and Jingquan Kang<sup>2</sup>

1 College of Animal Science & Technology, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China

2 College of Life Sciences, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China

**Abstract:** We stimulated preadipocyte of mice with calcium acetate, p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) inhibitor SB203580, the paralyzers and excitomoters of calcium channel. Then we detected expression level of preadipocyte differentiation's marker genes and calcium signal related acceptor genes by real-time PCR, and determined intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) with Fura-2/AM, intracellular lipid accumulation by oil red O staining. Our aim was to investigate the potential mechanism between calcium signal and preadipocyte differentiation. The results indicated that the paralyzers and excitomoters of calcium channel changed the expression level of lipoprotein lipase (LPL), peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), fatty acid synthetase (FAS), and the lipid accumulation, markedly. Compared with exocellular  $Ca^{2+}$ 's decrease, inhibited intracellular  $Ca^{2+}$ 's liberation can promoted preadipocyte differentiation ( $P<0.01$ ), and compared with intracellular  $Ca^{2+}$ 's increase, promoted exocellular  $Ca^{2+}$ 's ingest inhibited preadipocyte differentiation ( $P<0.01$ ). SB203580 degraded  $[Ca^{2+}]_i$ , promoted differentiation marker genes' expression and lipid accumulation in preadipocyte ( $P<0.01$ ). But calcium signal didn't have effects to vitamin D

**Received:** December 23, 2008; **Accepted:** March 19, 2009

**Supported by:** National Nature Science Foundation of China (No. 30871785), Program for New Century Excellent Talents in Universities, Chinese Ministry of Education (No. NCET-06-0865), National Key Technology Research and Development Program in the 11th Five year Plan of China (No. 2006BAD04A11).

**Corresponding author:** Chao Sun. Tel: +86-29-87092164; E-mail: mdsys4439@hotmail.com

国家自然科学基金项目(No. 30871785), 教育部新世纪优秀人才计划(No. NCET-06-0865), 国家十一五科技支撑计划(No. 2006BAD04A11)资助。

receptor (*VDR*) and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor (*CaSR*)'s expression. It indicated that calcium signal may effect preadipocyte different and lipid accumulation by p38 MAPK pathway.

**Keywords:** calcium signal, p38 MAPK, mice, preadipocyte differentiation, lipid accumulation

钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )是功能广泛的信号分子,能够参与调节包括细胞增殖、分化以及死亡在内的各种细胞功能<sup>[1]</sup>。因此,对于许多细胞性活动而言,胞浆 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化都是重要的调节剂<sup>[2]</sup>。钙与脂代谢的研究是近年来的热点研究问题。Parra等给大鼠饲喂高钙饲料,发现大鼠的体脂量较低,且钙的摄入能帮助肥胖大鼠更快减重<sup>[3]</sup>。另外,膳食高钙还降低了血清胆固醇和甘油三酯的含量,抑制高脂膳食引起的大鼠肥胖<sup>[4]</sup>。相对于个体饲喂水平上的丰富研究,细胞水平上钙对脂代谢的研究则比较少。2004年, Jensen等<sup>[1]</sup>用不同浓度的细胞外钙( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ )处理3T3-L1细胞,发现用5 mmol/L以上的细胞外钙( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ )处理细胞可以缓解脂质蓄积和增加分化标志基因的表达。这些研究结果显示,钙能够调节脂肪代谢,影响脂肪细胞分化。

促分裂原活化的蛋白激酶(Mitogen activated protein kinase, MAPK)信号通路是近年来细胞信号转导方面最活跃的研究领域之一,能够参与细胞多种功能调控,其包括胞外信号调节激酶(Extracellular signal-regulated kinase, ERK)、p38、Jun氨基端激酶(Jun NH2 terminal kinase, JNK)3条主要信号通路<sup>[5]</sup>。1998年,Engelman等<sup>[6]</sup>首先发现p38 MAPK在脂肪形成中的抑制作用。而Takenouchi等<sup>[7]</sup>报道用SB203580(p38 MAPK抑制剂)处理3T3-L1细胞,p38活性与脂肪细胞分化有关。众多研究者的研究说明p38 MAPK通路是与脂代谢密切相关的一条信号通路。Han和Lee<sup>[8]</sup>指出SB203580能够阻碍胚胎干细胞中由胰岛素诱发的 $\text{Ca}^{2+}$ 吸收。程颢等<sup>[9]</sup>同时加入PD98059(ERK MAPK抑制剂)和SB203580,使得成纤维细胞内钙离子浓度迅速降低。故推断p38 MAPK通路可能通过改变细胞钙离子浓度而发挥生理作用。

目前,关于钙信号与脂代谢关系的研究较多,但主要集中在个体饲喂试验方面,未见到钙信号通过p38 MAPK通路影响脂代谢的相关研究。本试验以醋酸钙作为细胞外钙离子来源,选择外钙内流有关的L型电压门控钙通道阻滞剂Nifedipine、激动剂

Bay K8644,细胞内钙释放有关的蓝尼啶(Ryanodine, Rya)受体(RyR)通道阻滞剂钆红、激动剂咖啡因,以及p38 MAPK通路抑制剂SB203580,探讨不同来源钙信号对小鼠前体脂肪细胞分化和脂质蓄积的影响,研究钙信号调控脂代谢的作用通路。以期进一步了解钙信号调节脂代谢的分子机理,并为全面揭示成脂分化机制和脂代谢相关疾病的发病机制提供重要依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

I型胶原酶、油红O、DMEM、F-12培养基和EDTA(Invitrogen),胰酶和Triton X-100(Solarbio),胎牛血清(民海生物),牛血清白蛋白(Amersco公司),醋酸钙、SB203580和Fura-2/AM(碧云天生物技术有限公司),Nifedipine、Bay K8644、钆红和咖啡因(Sigma),RNA提取试剂盒Trizol(天根生化公司),反转录试剂盒RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas),Taq酶(Fermentas),dNTP(Wolsen),其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 小鼠前体脂肪细胞分离、培养

15日龄雄性昆明小鼠脱颈椎处死,无菌取腹股沟、附睾远端、肾脏周围的白色脂肪组织,剪碎,37°C下用1%的I型胶原酶消化50 min,依次过200目和600目细胞筛,离心,加红细胞裂解液破碎红细胞,然后再次离心,用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液重悬,获得细胞悬液后按照 $5 \times 10^4$ 个/cm<sup>2</sup>的密度接种到35 mm规格培养皿和24孔培养板中,置于37°C、5% CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中培养,每隔2 d换液1次。

### 1.3 细胞处理

处理药物为5 mmol/L的醋酸钙(Ca),10 μmol/L的SB203580(SB),10 μmol/L的Nifedipine(N), $10^{-7}$  mol/L的Bay k8644(B),10 μmol/L的钆红(L),10 mmol/L的咖啡因(C)。分为8个处理组,分别是空白对照组(Control)、Ca组、SB组、Ca+N、Ca+B、Ca+L、Ca+C和Ca+SB组。当培养的小鼠原代前体

脂肪细胞融合达到 85%以上后, 按照上述分组处理 48 h。

#### 1.4 油红 O 染色提取

细胞用 PBS 漂洗, 10%甲醛固定 30 min。PBS 漂洗后, 用油红 O 工作液染色 30 min, PBS 漂洗, 100%异丙醇萃取 15 min, 分光光度计 510 nm 波长比色, 记录吸光度值。

#### 1.5 RNA 提取及 cDNA 第一条链合成

RNA 提取按照 TRIpure Reagent 试剂盒进行, 1% 琼脂糖凝胶检测。按 Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒合成 cDNA 第一链: DEPC 水 6 μL, 总 RNA 5 μL, random hexamers primer(0.2 μg/μL) 1 μL, 70°C 孵育 5 min, 置冰上冷却后加试剂: 4 μL buffer (5 μL×), 2 μL dNTP mixture(10 mmol/L), 1 μL rnasinhibitor (20 U/μL), 25°C 孵育 5 min, 加 1 μL 反转录酶(200 U/μL), 总体积 20 μL; 25°C 孵育 10 min, 42°C 反应 60 min, 70°C 延伸 10 min 终止反应, 冰上冷却, -40°C 保存。

#### 1.6 引物设计

根据 GenBank 已发表的相关物种的  $\beta$ -actin、LPL、PPAR $\gamma$ 、FAS、VDR、CaSR 基因序列, 借助 Premier 5.0 软件, 设计各基因 PCR 引物, 送上海生物工程技术有限公司合成(表 1)。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 PCR parameter of primers

Gene	Primer sequences (5'-3')	Product length
$\beta$ -actin	F: ACTGCCGCATCCTCTTCCTC R: CTCCTGCTTGCTGATCCACATC	399
LPL	F: GCAGGAAGTCTGACCAATAAG R: GGTCTGGATGCCAATAC	183
PPAR $\gamma$	F: ACCACTCGCATTCTTTGAC R: CCACAGACTCGGCACTCAAT	261
FAS	F: AGTGTCCACCAACAAGCG R: GATGCCGTCAGGTTTCAG	280
VDR	F: CACGGGCTTCCACTTCA R: CGAGCAGGATGGCGATAA	317
CaSR	F: CAGAAGGCGTGAACCACA R: CGGAATCCACGGAAGTTAT	297

#### 1.7 实时定量 PCR 扩增

PCR 反应在 TP800 Real-time System (TaKaRa, Japan) 机器上操作, 反应总体积为 25 μL, 灭菌水 10.5 μL、SYBR Premix EX Taq (TaKaRa, Japan) 12.5 μL、上下游引物各 0.5 μL、cDNA 产物 1.0 μL。反应条件: 反应混合物 95°C 预变性 10 min; 然后 95°C 15 s; 60°C 1 min, 40 个循环。各基因 mRNAs 用

$\beta$ -actin 标准化, 用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  表示实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数。

#### 1.8 Fura-2/AM 的负载和荧光测定

##### 1.8.1 Fura-2/AM 的负载

PBS 清洗细胞, 然后加入 0.25%的胰酶消化 5 min, 终止消化, 离心, PBS 重悬后制成细胞悬液。悬液中加入 3 μmol/L Fura-2/AM 后在 37°C 下避光孵育 45 min, PBS 清洗细胞 3 次。

##### 1.8.2 荧光测定和钙离子浓度计算

荧光测定采用日立-850 型荧光分光光度计。测定时激发波长为 340 nm 和 380 nm, 发射波长为 510 nm, 分别测定  $F_{340}$  和  $F_{380}$ ,  $F$  为  $F_{340}/F_{380}$ 。  $F_{max}$  为最大荧光强度值, 即加入 0.1% Triton X-100 后所测得的荧光强度值比值;  $F_{min}$  为最小荧光强度值, 即在加入 Triton X-100 的基础上再加入 5 mmol/L EDTA 后所测得的荧光强度比值。然后按照以下公式计算胞浆钙浓度:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d (F - F_{min}) / (F_{max} - F) (\text{nmol/L})$$

式中:  $K_d$  为 Fura-2/AM 与  $Ca^{2+}$  反应的解离常数, 大小为 224 nmol/L。

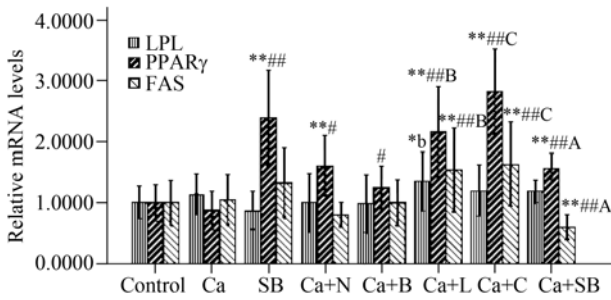
#### 1.9 统计分析

采用 SPSS13.0 软件进行单因素方差(ONE WAY ANOVA)分析和 LSD 多重比较, 结果以均数±标准差 ( $\bar{X} \pm S$ ) 表示。

## 2 结果

### 2.1 钙信号对小鼠前体脂肪细胞分化的影响

为反映小鼠前体脂肪细胞的分化状况, 检测了脂肪细胞分化早期标志基因 LPL、中期标志基因 PPAR $\gamma$  及分化晚期标志基因 FAS 的表达情况(图 1)。结果表明, Ca 组 LPL、FAS 和 PPAR $\gamma$  表达无显著变化; 与空白对照组相比较, SB 组的 PPAR $\gamma$  ( $P < 0.01$ ) 和 FAS ( $P < 0.05$ ) 的表达均被明显上调; 对于 Ca+SB 组而言, 各基因的表达均被明显改变, 尤其是 PPAR $\gamma$  ( $P < 0.01$ )。LPL 受到各处理因素的影响较小, 只有 Ca+L 组的 LPL 表达明显上调 ( $P < 0.05$ )。而各处理因子对 PPAR $\gamma$  表达的影响则非常明显。同时, 观察到 Ca+L 与 Ca+N 相比, 除 LPL 表达差异显著 ( $P < 0.05$ ) 以外, PPAR $\gamma$  和 FAS 的表达均差异极显著 ( $P < 0.01$ ); Ca+B 与 Ca+C 相比, PPAR $\gamma$  和 FAS 的表达均差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 说明相对于与外钙摄入有关



**图 1 LPL、PPARγ和 FAS mRNA 相对表达量**  
 Fig. 1 Relative level of LPL, PPARγ and FAS mRNA. Compare with control group, \**P*<0.05, \*\**P*<0.01; compare with Ca group, #*P*<0.05, ## *P*<0.01; compare with SB group, a means *P*<0.05, A means *P*<0.01; compare Ca+N group with Ca+L group, b means *P*<0.05, B means *P*<0.01; compare Ca+B group with Ca+C group, c means *P*<0.05, C means *P*<0.01.

的阻滞剂和激动剂，与细胞内钙释放有关的阻滞剂和激动剂对各基因的影响更为显著。

**2.2 钙信号对脂质蓄积的影响**

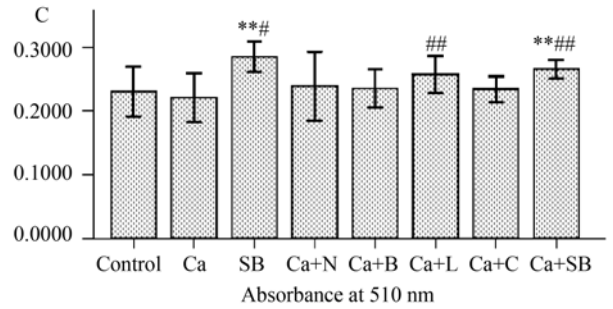
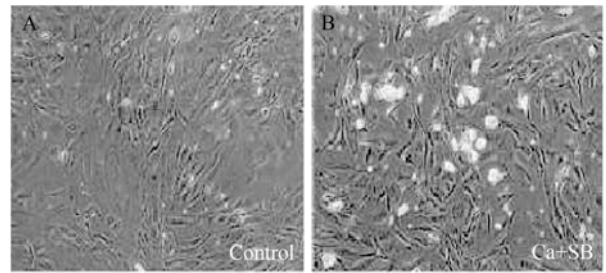
处理 48 h 后，显微镜下观察各组细胞蓄脂情况，发现除 Ca+SB 组有较明显的细胞蓄脂情况外(图 2 A 和 2B)，肉眼观察无法判断其他各组的脂滴蓄积差异，因此，采用油红 O 染色提取法，定量检测细胞脂质蓄积情况。由图 2C 可见，SB 组和 Ca+SB 组与空白对照组相比，吸光度值较高，差异极显著(*P*<0.01)，细胞蓄脂有所升高。此外，Ca+L 组与 Ca 组相比，吸光度也极显著升高(*P*<0.01)，说明胞内钙释放的抑制，明显促进了脂肪的蓄积。

**2.3 钙信号对细胞内钙离子浓度的影响**

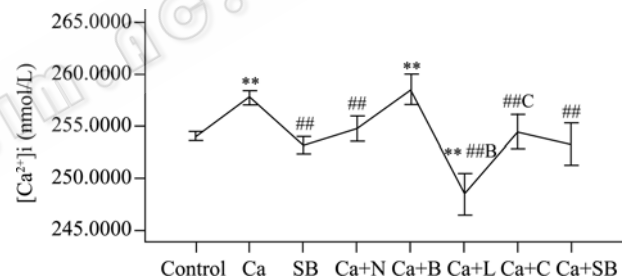
由图 3 可知，Ca 的添加引起胞浆[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的显著升高(*P*<0.01)；除 Ca+B 组以外，Ca+N、Ca+L、Ca+C 组与 Ca 组相比，[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>浓度差异极显著(*P*<0.01)，说明阻滞剂和激动剂的添加能够显著改变胞浆[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>水平；Ca+N 与 Ca+L 组、Ca+B 与 Ca+C 相比，差异极显著(*P*<0.01)；Ca+SB 组与 Ca 组相比，[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>降低，且差异极显著(*P*<0.01)。

**2.4 钙信号对其相关受体基因 mRNA 表达水平的影响**

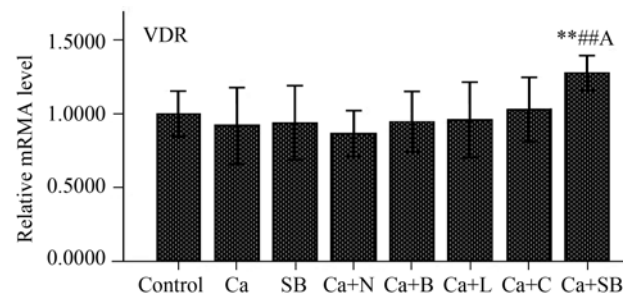
检测 VDR mRNA 表达情况，发现 Ca+SB 组与空白对照组、Ca 组、SB 组差异极显著(*P*<0.01)。Ca+N 组较空白对照组的 VDR 表达低，但没有达到统计学上的差异显著(图 4)，说明钙信号并没有明显影响 VDR mRNA 的表达情况。



**图 2 510nm 下吸光度值**  
 Fig. 2 The absorbance at 510 nm. Compare with control group, \**P*<0.05, \*\**P*<0.01; compare with Ca group, #*P*<0.05, ## *P*<0.01; compare with SB group, a means *P*<0.05, A means *P*<0.01; compare Ca+N group with Ca+L group, b means *P*<0.05, B means *P*<0.01; compare Ca+B group with Ca+C group, c means *P*<0.05, C means *P*<0.01.



**图 3 细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>水平**  
 Fig. 3 The [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> level. Compare with control group, \**P*<0.05, \*\**P*<0.01; compare with Ca group, #*P*<0.05, ## *P*<0.01; compare with SB group, a means *P*<0.05, A means *P*<0.01; compare Ca+N group with Ca+L group, b means *P*<0.05, B means *P*<0.01; compare Ca+B group with Ca+C group, c means *P*<0.05, C means *P*<0.01.



**图 4 VDR mRNA 相对表达水平**  
 Fig. 4 The relative level of VDR mRNA. Compare with control group, \**P*<0.05, \*\**P*<0.01; compare with Ca group, #*P*<0.05, ## *P*<0.01; compare with SB group, a means *P*<0.05, A means *P*<0.01; compare Ca+N group with Ca+L group, b means *P*<0.05, B means *P*<0.01; compare Ca+B group with Ca+C group, c means *P*<0.05, C means *P*<0.01.

为了检测 *CaSR* mRNA 的表达情况, 本试验以小鼠肌肉组织 RNA 作为 PCR 反应的阳性对照来检测引物对的有用性, 发现尽管能够在阳性对照中检测出 *CaSR* 的表达, 但是在小鼠前体脂肪细胞中却没有检测到 *CaSR* 的表达(图 5), 提示在小鼠前体脂肪细胞中, *CaSR* 并非钙信号的靶基因。

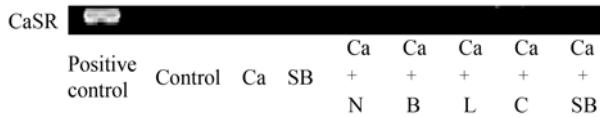


图 5 *CaSR* mRNA 相对表达量  
Fig. 5 Relative level of *CaSR* mRNA.

### 3 讨论

前体脂肪细胞分化过程中相关基因的分化时序已有广泛研究。一般认为, 脂肪细胞分化包括 4 个阶段: 第 1 阶段的标志基因有 *LPL*; 第 2 和第 3 阶段为 *PPAR $\gamma$* ; 第 4 阶段的标志基因是 *FAS*。 *LPL* 是脂肪细胞分化早期标志基因, 与脂肪酸合成代谢有关<sup>[10]</sup>。有研究表明, 随着脂肪分化的进行, *LPL*<sup>[11,12]</sup>、*PPAR $\gamma$* <sup>[12]</sup>和 *FAS*<sup>[12,13]</sup>的表达都是升高的。与空白对照组相比, 对于 Ca 组而言, *LPL*、*PPAR $\gamma$* 和 *FAS* 的表达量差异不显著, 说明 5 mmol/L 的 Ca 在基因水平上并没有明显抑制前体脂肪细胞的分化, 这与 Jensen 等<sup>[1]</sup>在 3T3-L 细胞中的研究不一致。对于 SB 组, *PPAR $\gamma$* 和 *FAS* 的表达升高, 则说明 SB203580 能够促进前体脂肪细胞分化。此外, 胞内 RyR 的阻滞剂和激动剂与相应的胞膜 L 型电压门控钙通道的阻滞剂和激动剂相比, 前者对前体脂肪细胞分化相关基因的影响更大。与此同时, 发现一个有趣的现象, Ca+B 组各基因的表达量都比 Ca+C 低, 且差异显著。有报道提到骨骼肌细胞和心肌细胞胞膜上的二氢吡啶受体(DHPR)通道被打开时, 会诱发 RyR 的打开, 使得短时间内胞浆[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 迅速上升<sup>[14]</sup>。本试验测定胞浆[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 时也发现 Ca+B 组比 Ca+C 组胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 显著高, 因此, 我们猜测可能正是基于这种机制, 当外钙流入启动的同时, 内钙释放也被启动, 导致短时的胞浆[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高, 继而降低了脂肪细胞分化标志基因的表达。Ca+N 组和 Ca+L 组脂肪细胞分化各标志基因的表达也呈现类似的趋势, 可能与该机制有关, 但是其具体作用机制还有待研究。

现已证实, 在促进脂肪细胞分化方面, *PPAR $\gamma$*

是脂肪细胞分化的必要条件, 它能促进脂肪细胞中脂质的积累<sup>[15]</sup>。油红 O 染色提取的结果, 也与前体脂肪细胞分化基因的表达状况大致吻合, *PPAR $\gamma$*  表达量较高的 SB 组和 Ca+L 组的胞内脂质的蓄积也更多。

张雅萍等发现血浆游离脂肪酸、甘油三酯显著高于对照组的代谢综合征大鼠脂肪组织 p38 MAPK 蛋白的表达也显著高于对照组, 故推测代谢综合征大鼠脂肪组织增生可能与 p38 MAPK 信号通路的激活有关<sup>[16]</sup>。本试验发现, 抑制 p38 MAPK 途径, 能够提高前体脂肪细胞的分化标志基因的表达, 增加脂质的蓄积。

很多研究都指出 p38 MAPK 信号通路与胞浆[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 浓度<sup>[7-9,17]</sup>有关。为了证实 p38 MAPK 信号通路是否能够影响小鼠前体脂肪细胞胞浆[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 浓度, 本试验采用 Fura-2/AM 荧光染料检测了胞浆[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 浓度。发现 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 显著降低了前体脂肪细胞内胞浆[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 浓度, 由此提示, p38 MAPK 信号通路可能通过改变胞浆[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 浓度而影响前体脂肪细胞分化和脂质蓄积。另外, Ca、Nifedipine、Bay K8644、钆红和咖啡因都对胞浆[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 浓度有影响。Ca+N 与 Ca+L 组、Ca+B 与 Ca+C 相比, 胞浆[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 浓度差异极显著又说明[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的来源对[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的影响不同。

为了探讨钙信号究竟是通过那些传感器发挥作用的, 本试验选择了钙信号相关受体基因维生素 D 受体(*VDR*)和细胞外钙感受体(*CaSR*)基因作为研究对象。*VDR* 是类固醇/甲状腺激素受体超家族的一类转录因子。通常 *VDR* 与钙活性相关, 并作为 RXR(维甲酸 X 受体)的专性受体与细胞增殖、分化和免疫调节有关, 最近还发现 *VDR* 与脂肪形成有关<sup>[3]</sup>。有研究者称, 在 3T3-L1 细胞分化 4~8 h 内, *VDR* 的表达急剧增加, 但是接下来, 直到分化 16 h 以前, 其表达又逐渐降低<sup>[18]</sup>。本试验中, 除 Ca+SB 组 *VDR* 表达显著增加外, 其他各组 *VDR* 的表达无统计学上的差异。而“传统的”甲状旁腺细胞 *CaSR* 是七次跨膜受体超家族的成员, 是一种 G 蛋白偶联受体, 它与磷脂酶 C 和腺嘌呤核苷环化酶通过鸟嘌呤核苷的异源三聚体调节蛋白(G-蛋白)的 Gq 和 Gi 亚基相连<sup>[1]</sup>, Parra 等认为, 脂肪细胞中 *CaSR* 的激活可以调节细胞内钙的增加, 触发信号级联, 影响脂肪细胞中脂

肪形成和甘油三酯的蓄积, *CaSR* 在脂肪细胞中可以降低细胞内钙水平<sup>[3]</sup>。但是本研究没有在小鼠前体脂肪细胞中检测到 *CaSR* 的表达。提示钙信号可能通过非 G 蛋白途径的其他传感器发挥作用, 但尚需进一步证实。

## REFERENCES

- [1] Jensen B, Farach-Carson MC, Kenaley E, *et al.* High extracellular calcium attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Exp Cell Res*, 2004, **301**: 280–292.
- [2] Berridge MJ. Calcium microdomains: Organization and function. *Cell Calcium*, 2006, **40**: 405–412.
- [3] Parra P, Bruni G, Palou A, *et al.* Dietary calcium attenuation of body fat gain during high-fat feeding in mice. *J Nutr Biochem*, 2008, **19**: 109–117.
- [4] Yang J, Wang F, Shi YL, *et al.* Interventional effects of dietary calcium on body weight of obese rats. *Chin J Clin Rehabil*, 2006, **10** (48): 101–103.  
杨瑾, 王枫, 史永亮, 等. 膳食钙对肥胖大鼠体质量的干预效应. *中国临床康复*, 2006, **10** (48): 101–103.
- [5] Zhou H, Cai GP. MAPK signal and adipocyte differentiation. *Chemistry of Life*, 2006, **26**(6): 505–507.  
周华, 蔡国平. MAPK 信号通路与脂肪细胞分化. *生命的化学*, 2006, **26**(6): 505–507.
- [6] Engelman JA, Lisanti MP, Scherer PE. Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *Biol Chem*, 1998, **273** (48): 32111–32120.
- [7] Takenouchi T, Takayama Y, Takezawa T. Co-treatment with dexamethasone and octanoate induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Cell Biol Int*, 2004, **28**(3): 209–216.
- [8] Han HJ, Lee YJ. Insulin stimulates  $Ca^{2+}$  uptake via PKC, cAMP, and p38 MAPK in mouse embryonic stem cells. *Life Sci*, 2005, **76**: 2903–2919.
- [9] Cheng B, Fu XB, Sheng ZY, *et al.* Effects of mitogen-activated protein kinase on free calcium in cultured human fibroblast. *Med J Chin PLA*, 2002, **27**(5): 380–382.  
程隼, 付小兵, 盛志勇, 等. 丝裂原活化蛋白激酶通路对成纤维细胞内游离钙的影响. *解放军医学杂志*, 2002, **27**(5): 380–382.
- [10] MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem*, 1995, **64**: 345–373.
- [11] Zhuang HL, Lin YQ, Yang GS. Vitamin C promotes proliferation and differentiation of porcine preadipocytes by modulating transcription of adipogenesis-related genes. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2007, **23** (6): 499–517.  
庄合林, 林亚秋, 杨公社. 维生素 C 通过调控脂肪形成相关基因的转录促进猪前体脂肪细胞的增殖与分化. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, **23** (6): 499–517.
- [12] Yu J, Liu J, Sun Y, *et al.* Effects and mechanisms of free fatty acid on adipocyte differentiation. *Acta Univ Med Nanjing (Natural Science)*, 2007, **27**(7): 661–665  
俞静, 刘娟, 孙岩, 等. 游离脂肪酸对脂肪细胞分化的影响. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2007, **27**(7): 661–665.
- [13] Chen FF, Yang GS, Lu JX. Transcription expression of six genes following differentiation of rat preadipocyte to adipocyte in primary culture. *Biotechnol Bulletin*, 2005, **6**: 73–76.  
陈粉粉, 杨公社, 卢建雄. 大鼠前体脂肪细胞分化过程中 6 种基因的表达时序研究. *生物技术通报*, 2005, **6**: 73–76.
- [14] Zou SB, Chen LY, Kang HG. Intracellular  $Ca^{2+}$  signaling. *Chemistry of Life*, 2000, **20**(6): 254–257.  
邹寿彬, 陈良怡, 康华光. 胞内钙信号系统. *生命的化学*, 2000, **20**(6): 254–257.
- [15] Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: The rapetuc targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci*, 2005, **26** (5): 244–251.
- [16] Zhang YP, Zhu ZM, Yan ZC, *et al.* Characteristics of obesity and role of ERK1/2 and p38MAPK in production of adipose tissue in rat with metabolic syndrome. *Med J Chin PLA*, 2006, **31**(8): 794–797.  
张雅萍, 祝之明, 闫振成, 等. 代谢综合征大鼠肥胖特征及 ERK1/2 和 p38MAPK 的作用研究. *解放军医学杂志*, 2006, **31**(8): 794–797.
- [17] Yoshiyuki Sakai, Hitoshi Hashimoto, Norihito Shintani, *et al.* Involvement of intracellular  $Ca^{2+}$  elevation but not cyclic AMP in PACAP-induced p38 MAP kinase activation in PC12 cells. *Regul Peptides*, 2002, **109**: 149–153.
- [18] Kong J, Li YC. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, **290**(5): 916–924.