

网络出版时间: 2025-03-17 10:09:12 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250314.1614.014>

支链氨基酸通过 Stat3 通路双向调控 3T3-L1 前脂肪细胞分化

蔡兴华^{1,2}, 高洁³, 徐媛颖³, 张会会³, 买热艳木·肉孜³, 沙雯君³, 鲁郡^{1,2,3}, 雷涛^{1,2,3}

(¹ 安徽医科大学上海普陀中心临床学院, 上海 200062; ² 安徽医科大学第五临床医学院, 合肥 230032;

³ 上海中医药大学附属普陀医院内分泌科, 上海 200062)

摘要 目的 探讨不同浓度支链氨基酸(BCAA)对3T3-L1前体脂肪细胞分化的作用及其机制。方法 将3T3-L1前体脂肪细胞分为空白对照(Control)组、分化介质(DM)组、低浓度BCAA组和高浓度BCAA组;CCK-8法检测不同浓度BCAA对前脂肪细胞存活率的影响;油红O染色观察各组脂肪细胞脂滴形成情况;酶法检测细胞内三酰甘油(TG)和总胆固醇(TC)含量;RT-qPCR和Western blot检测Stat3和脂肪细胞分化相关基因mRNA和蛋白表达情况。结果 CCK-8结果显示,当BCAA浓度 ≤ 10 mmol/L时,3T3-L1细胞的存活率不受BCAA的影响。与DM组相比,低浓度BCAA组(0.5、1.0 mmol/L)细胞内脂滴明显增大、脂滴数目明显增加,且细胞内TC(0.88 vs 0.68 mmol/g; 0.83 vs 0.68 mmol/g, $P < 0.01$)和TG水平(0.77 vs 0.40 mmol/g; 0.62 vs 0.40 mmol/g, $P < 0.01$)明显上升;而高浓度BCAA组(5.0、10.0 mmol/L)细胞分化较DM组明显下降。RT-qPCR和Western blot检测显示低浓度BCAA组PPAR γ 、C/EBP α 、Adiponectin、FABP4的mRNA和蛋白表达均明显上升,而高浓度BCAA组上述基因表达均明显下降($P < 0.01$)。此外,低浓度BCAA促进Stat3磷酸化水平,而高浓度BCAA抑制其磷酸化水平($P < 0.01$)。结论 BCAA通过Stat3双向调控前脂肪细胞脂肪分化,即低浓度BCAA可通过促进Stat3磷酸化水平诱导其向成熟脂肪细胞分化;而高浓度BCAA则抑制Stat3磷酸化及细胞分化。

关键词 BCAA; 3T3-L1; 脂肪细胞分化; Stat3; 脂肪生成; 肥胖

中图分类号 R 589.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)03-0494-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.03.015

2024-08-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81774083); 上海市普陀区卫生健康系统临床特色专科建设项目(编号: 2020tszk01); 上海市卫生健康委员会课题(编号: 202240309); 上海市普陀区卫生健康系统科技创新项目(编号: ptkwvs202003、ptkwvs202302)

作者简介: 蔡兴华,女,硕士研究生;

雷涛,男,博士,主任医师,博士生导师,通信作者, E-mail: taolei_12@sina.com;

鲁郡,男,博士,副主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: lujundocor@163.com

目前肥胖呈流行趋势,据报道,中国约20%的儿童和50%的成年人超重或肥胖^[1]。肥胖可引起多种疾病的发生和发展,如2型糖尿病、冠心病以及部分肿瘤。在细胞水平上,肥胖是由脂肪细胞数量和体积增加而引起的一种临床综合征。而3T3-L1作为一种前体脂肪细胞系,被广泛用于基础和临床研究。近年来,研究提示支链氨基酸(branched-chain amino acid, BCAA)具有调控脂肪细胞分化的作用。BCAA是人体必需氨基酸,包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。目前关于BCAA对脂肪细胞分化的

with CHR treatment group, CHR combined with Compound C treatment reversed the inhibitory effect of CHR on iNOS protein expression ($P < 0.05$). Western blot results showed that compared with the Control group, the CHR treatment group had significant increase in the protein expression levels of p-AMPK and PGC-1 α ($P < 0.001$). Compared with CHR treatment group, CHR combined with Compound C treatment significantly decreased the protein expression levels of p-AMPK and PGC-1 α ($P < 0.05$). **Conclusion** Chrysophanol may inhibit macrophage polarization to M1 by activating AMPK/PGC-1 α signaling pathway to promote mitochondrial biosynthesis.

Key words chrysophanol; AMPK/PGC-1 α signaling pathway; mitochondrial biosynthesis; macrophages; polarization

Fund programs Instructive Scientific and Technological Project of Xinjiang Production and Construction Corps (Nos. 2022ZD073, 2022ZD045)

Corresponding authors Wang Xinmin, E-mail: 1977602697@qq.com; Zhang Le, E-mail: 1257067540@qq.com

作用存在争议。一方面,基础剂量的 BCAA 能促进 3T3-L1 细胞分化和脂肪生成^[2];另一方面,加入更高剂量 BCAA 时反而能抑制脂肪细胞分化^[3],造成研究结果不一致的原因可能与实验采用的 BCAA 浓度不一致有关。3T3-L1 成脂分化是一个复杂的生理过程,主要由过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ) 及其下游的 CCAAT/增强子结合蛋白 α (CCAAT enhancer binding protein α , C/EBP α) 基因家族调控。多项证据表明,信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, Stat3) 通过调节 PPAR γ 和 C/EBP α 基因在脂肪形成中发挥关键作用^[4]。目前关于 BCAA 调控前体脂肪细胞分化的机制尚未十分清楚,且鲜有关于 BCAA 对 3T3-L1 细胞 Stat3 信号通路的双向作用机制报道。因此,该研究采用不同浓度的 BCAA 干预 3T3-L1 细胞,探究 BCAA 对前脂肪细胞分化的剂量效应及其分子机制,旨在为临床治疗肥胖及相关疾病提供新的靶点和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 小鼠胚胎成纤维细胞系 3T3-L1 (干细胞库标号: ZQ 0089) 购自上海中乔新舟生物科技有限公司。BCAA (河北华恒生物科技有限公司); DMEM 高糖完全培养基 (上海中乔新舟生物科技有限公司,货号 ZQ-107); 胰岛素 (货号 1860440)、罗格列酮 (货号 R 2408)、地塞米松 (货号 D 4902)、3-异丁基-4-甲基黄嘌呤 (IBMX) (货号 15879) 均购自美国 Sigma 公司; 油红 O 粉末 (美国 Sigma 公司,货号 O 0625-25 G); 三酰甘油 (triglyceride, TG)、总胆固醇测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; Western blot 抗体 PPAR γ (货号 ab 272718)、C/EBP α (货号 ab 40761)、Adiponectin (货号 ab 22554)、FABP4 (货号 ab 92501)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔二抗 (货号 ab6721) 和 HRP 标记的兔抗鼠二抗 (货号 ab6728) 均购自英国 abcam 公司; Western blot 抗体 Stat3 (货号# 9139) 和 P-stat3 (货号# 9145) 均购自美国 CST 公司; Western blot 抗体 Tubulin (小鼠单抗) (货号 AT 819) 购自上海碧云天生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞活力测定 采用 CCK-8 法测定 BCAA 对细胞活力的影响。以 1×10^4 个/孔的细胞数接种于 96 孔板,在添加 10% 胎牛血清的 DMEM 中孵育

12 h; 然后用不同浓度的 BCAA (1.25、2.5、5、10、20、30、40 mmol/l) 处理 3T3-L1 细胞 24、48 和 72 h; 更换培养液为含有 10% CCK-8 溶液的 DMEM 基础培养基继续避光孵育 2~3 h。在波长 490 nm 处测定光密度 (optical density, OD) 值,并计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = [(实验组 - 空白组) / (对照组 - 空白)] \times 100%。

1.2.2 3T3-L1 前脂肪细胞培养和分化诱导 3T3-L1 前体脂肪细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养。将 3T3-L1 细胞均匀接种于 6 孔板,待细胞密度达 85%~90% 时更换培养液继续培养,至细胞接触抑制 24~48 h (分化第 0 天, D 0) 加入分化介质 (differentiation media, DM) (含 5 μ g/ml 胰岛素、2 μ mol/L 罗格列酮、0.25 μ mol/L 地塞米松、0.5 mmol/L IBMX 的 DMEM 高糖完全培养基)。72 h 后更换维持介质 (含 5 μ g/ml 胰岛素的 DMEM 高糖完全培养基),之后每 2 天更换 1 次培养基直至第 9 天 (D 9)。

1.2.3 细胞分组及处理 观察 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化过程中 D 1、D 3、D 5、D 7 和 D 9 的脂滴情况并拍照记录。设置空白对照组 (Control 组)、分化介质组 (DM 组) (加入分化诱导剂)、0.5 mmol/L BCAA 组 (分化诱导剂 + 亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸各 0.5 mmol/L)、1 mmol/L BCAA 组 (分化诱导剂 + 亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸各 1 mmol/L)、5 mmol/L BCAA 组 (分化诱导剂 + 亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸各 5 mmol/L)、10 mmol/L BCAA 组 (分化诱导剂 + 亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸各 10 mmol/L),其中 0.5 mmol/L BCAA 和 1 mmol/L BCAA 为低浓度组,5 mmol/L BCAA 和 10 mmol/L BCAA 为高浓度组。实验在 D 0 至 D 9 分化期间进行。

1.2.4 油红 O 染色 新配油红原液 (2.5 g 油红粉末溶于 50 ml 异丙醇),油红 O 染色工作液按油红原液:去离子水 = 3:2 比例充分混合,过滤膜过滤后制备而成。采用 Oh et al^[5] 方法,在细胞分化 9 d 后,用 PBS 清洗细胞,然后用 4% 多聚甲醛在室温下固定细胞 30 min; 6 孔板每孔 1 ml 的油红 O 染色工作液染色 15~20 min; 60% 异丙醇清洗未结合染料 10 s,再用 PBS 清洗细胞并拍照记录; 最后用异丙醇 (500 μ l/孔) 萃取细胞中的油红染料并检测其 490 nm 处 OD 值。

1.2.5 TG 及总胆固醇的测定 诱导分化 9 d 后收集细胞和培养基,根据说明书使用 GPO-PAP 酶促试剂盒测定细胞内和细胞外的 TG、总胆固醇 (total

cholesterol ,TC) 含量。用 BCA 法测定细胞总蛋白浓度,最终的标准 TG、TC 浓度用总蛋白浓度归一化处理。

1.2.6 RT-qPCR 使用 EZBioscience(货号 B0004DP)的 RNA 提取试剂盒从培养 7 d 的 3T3-L1 细胞中提取细胞总 RNA,检测其完整性和纯度后逆转录为 cDNA。实时荧光定量 PCR(RT-PCR) 进行目的基因扩增(引物序列如表 1)。反应条件:在 95 °C 下预变性 30 s;在 95 °C 下退火 5 s;在 60 °C 下延伸 34 s;总共 40 个循环。每个样本重复 2 次,以 18 s 为内参,扩增倍数用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Primer names	Direction	Sequences (5'-3')
PPAR γ	F:	TGTCGGTTTCAGAAGTGCCTTG
	R:	TTCAGCTGGTCGATATCACTGGAG
C/EBP α	F:	CAAGAACAGCAACGAGTACCG
	R:	GTCACCTCGTCAACTCCAGCAC
Adiponectin	F:	GGCTCTGTGCTGCTCCATCT
	R:	AGAGTCGTTGACGTTATCTGCATAG
FABP4	F:	AATCACCGCAGACGACAGGA
	R:	CCAGCTTGTCACCATCTCGTT
18S	F:	GTAACCCGTTGAACCCCAT
	R:	CCATCCAATCGGTAGTAGCC

1.2.7 Western blot 用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液于冰上裂解细胞 15 min,后用细胞刮刀刮下培养 9 d 的各组细胞制备成细胞匀浆。BCA 法测定各组细胞浓度并定量。按分组顺序上样;SDS-PAGE 电泳后进行湿转法转膜;5% BCA 封闭 1 h;按 1 : 1 000 比例稀释一抗(包括 PPAR γ 、C/EBP α 、Adiponectin、FABP4、Stat3、P-stat3 和 Tublin),并于 4 °C 摇床孵育过夜;次日回收一抗,用 TBST 洗膜(8 ~ 12 min/次)3 次,按 1 : 10 000 比例稀释二抗并孵育 1 h,最后用 TBST 洗膜 3 次进行化学发光显影拍照。

1.3 统计学处理 所有数据应用 graphpad prism 9.0.0 软件进行统计学分析。计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验均至少重复 3 次。多组间比较采用单因素方差分析,任意两组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BCAA 对 3T3-L1 细胞存活率的影响 为了检测 BCAA 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响,首先检测其对 3T3-L1 细胞存活率的影响。用不同浓度

的 BCAA(1.25、2.5、5、10、20、30、40 mmol/l) 分别作用于 3T3-L1 细胞 24 h、48 h 和 72 h,以 BCAA 浓度为 0 mmol/l 作为对照,结果显示 1.25、2.5、5、10 mmol/l 的 BCAA 在 24 ~ 72 h 对 3T3-L1 细胞存活率均无显著影响;当 BCAA 浓度达到 40 mmol/l 时,48 h 培养即观察到 CCK-8 实验的 OD 值较对照组显著下降(0.74 ± 0.10 vs 1.00 ± 0.12 , $F = 8.0$, $P < 0.01$);而 72 h 培养提示 BCAA 浓度 ≥ 20 mmol/l 其 CCK-8 实验的 OD 值显著下降($P < 0.001$) (图 1)。由于 BCAA 浓度 ≥ 20 mmol/l 会明显抑制 3T3-L1 细胞活性,因此后续研究采用 BCAA 浓度均 ≤ 10 mmol/L。

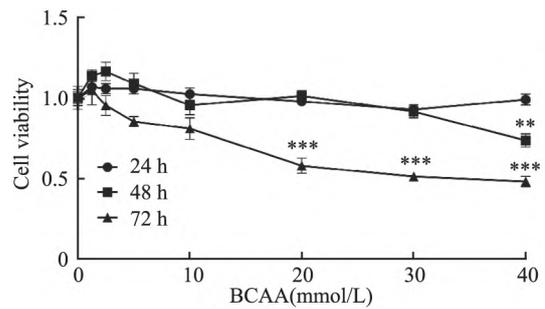


图 1 BCAA 对细胞存活率的影响

Fig.1 The effect of BCAA on cell viability

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 0 mmol/L BCAA.

2.2 不同浓度梯度 BCAA 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化和脂质积累的影响 如图 2 A 所示,在分化 9 d 时,加入诱导剂的 DM 组较 Control 组有明显的脂滴形成;与 DM 组相比,较低浓度的 BCAA(1×10^{-4} 、 5×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 5×10^{-3} 、0.01、和 0.1 mmol/l) 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化聚酯无显著影响;而当浓度 ≥ 0.5 mmol/l 时,BCAA 对成脂分化表现出双向效应:在 0.5、1.0 mmol/l 时,BCAA 显著促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化,而在 5.0、10.0 mmol/l 时 BCAA 显著抑制脂肪分化(图 2A)。在 1 ~ 9 d 的分化过程中,有明显的脂滴形成出现在第 5 天(D5)且 BCAA 的双向效应从 D5 持续到 D9(图 2B)。

2.3 低浓度和高浓度 BCAA 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响 如图 3A、B 所示,Control 组未见成熟脂肪细胞;DM 组的成熟脂肪细胞数量较多,较 Control 组油红 O 染色强度深;0.5、1.0 mmol/l 的 BCAA 组较 DM 组增加了油红 O 的染色强度,而 5.0、10.0 mmol/l 组较 DM 组则降低了油红 O 染色强度。油红 O 染色半定量也证实 BCAA 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的双向作用(图 3C) ($P < 0.001$)。

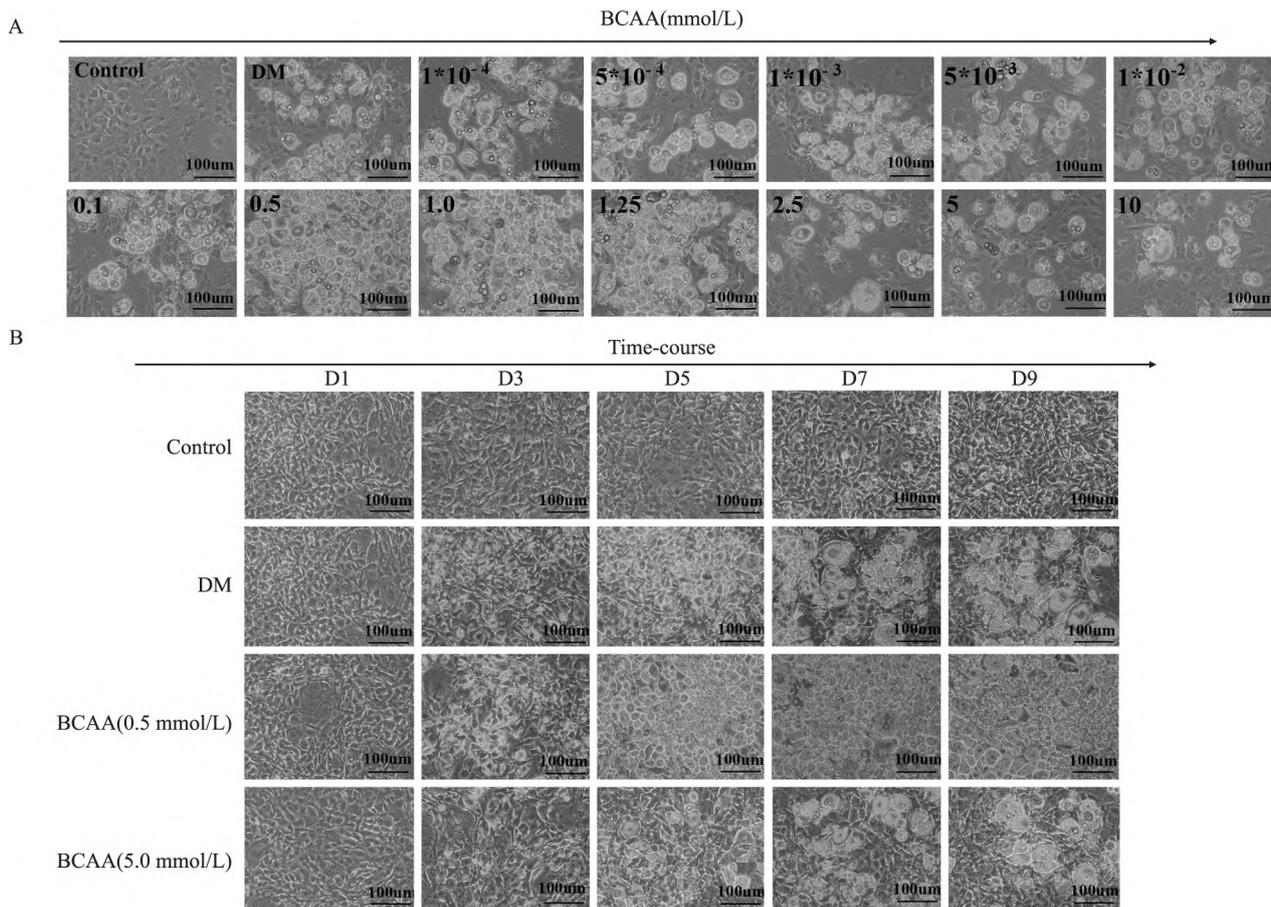


图2 不同浓度 BCAA 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响 ×200

Fig.2 Effects of BCAA at various concentrations on 3T3-L1 preadipocyte differentiation × 200

A: Effects of BCAA on adipogenesis were dose-dependent; 3T3-L1 preadipocytes were treated with DM and different doses of BCAA for 9 days as observed by a microscope; B: Time course of low or high concentrations of BCAA (0.5 or 5.0 mmol/L) on adipogenesis at D1, D3, D5, D7, and D9 as observed by microscope.

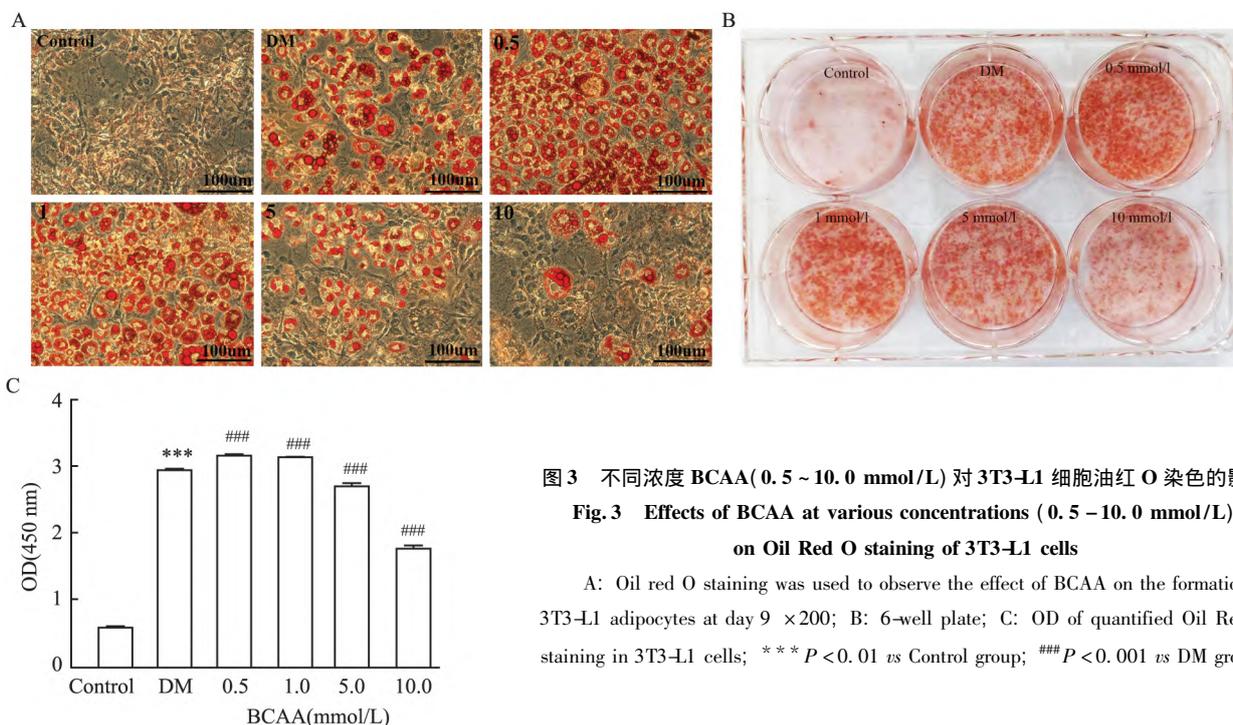


图3 不同浓度 BCAA (0.5 ~ 10.0 mmol/L) 对 3T3-L1 细胞油红 O 染色的影响
Fig.3 Effects of BCAA at various concentrations (0.5 ~ 10.0 mmol/L) on Oil Red O staining of 3T3-L1 cells

A: Oil red O staining was used to observe the effect of BCAA on the formation of 3T3-L1 adipocytes at day 9 ×200; B: 6-well plate; C: OD of quantified Oil Red O staining in 3T3-L1 cells; *** $P < 0.01$ vs Control group; ### $P < 0.001$ vs DM group.

此外,采用酶法检测细胞内和培养基中 TC 和 TG 含量。检测结果显示 0.5、1.0 mmol/l 的 BCAA 浓度组较 DM 组细胞内(图 4A) TC 和 TG 含量均增加,细胞外(图 4B) TC 和 TG 含量也增加($P < 0.001$); 5.0、10.0 mmol/l 的 BCAA 浓度组较 DM 组细胞内、外 TC 和 TG 含量均减少($P < 0.05$) (图 4)。

2.4 BCAA 对 3T3-L1 细胞成脂分化相关基因 mRNA 和蛋白表达的影响 RT-qPCR 显示(图 5), 较低浓度的 BCAA (0.5、1.0 mmol/l) 显著上调 PPAR γ 、C/EBP α 、Adiponectin、FABP4 的 mRNA 表达($P < 0.01$), Western blot(图 6) 证实以上基因的蛋白水平表达上升($P < 0.01$); 较高浓度的 BCAA (5.0、10.0 mmol/l) 则显著下调 PPAR γ 、C/EBP α 、Adiponectin、FABP4 的 mRNA 和蛋白表达($P < 0.01$)。

2.5 BCAA 对 Stat3、P-stat3 蛋白表达的影响 用不同浓度的 BCAA (0.5、1.0、5.0、10.0 mmol/l) 刺激 3T3-L1 细胞 9 d 后提取各组细胞总蛋白,用 Western blot 检测 Stat3 和 P-stat3。结果显示,与 Control 组相比,DM 组 P-stat3 表达显著增加(1.16 ± 0.12 vs 0.58 ± 0.52 , $F = 59.7$, $P = 0.001$); 与 DM 组相比,

低浓度(0.5、1.0 mmol/l) 的 BCAA 能上调 P-stat3 的表达($F = 10.1$, $P = 0.012$)、而高浓度(5.0、10.0 mmol/l) 的 BCAA 能下调 P-stat3 的表达($F = 18.1$, $P = 0.003$)。见图 7。

3 讨论

BCAA 占总蛋白摄入量的 15% ~ 25%, 在膳食中扮演着重要的角色。研究^[6-8]表明,循环 BCAA 水平与 TG 呈正相关,过量摄入 BCAA 可增加肝脏、胰腺、白色脂肪组织甚至肿瘤组织的脂质沉积。体外实验结果显示,培养基中 BCAA 浓度为 0.8 mmol/l 或 1.5 mmol/l 时,其能促进 3T3-L1 脂肪细胞分化和脂肪积累^[2,9]。而 Huang et al^[3]向 3T3-L1 细胞中加入 ≥ 3 mmol/l BCAA 时发现,BCAA 能够抑制 3T3-L1 脂肪细胞分化及脂质合成。本研究结果显示,低剂量 BCAA 可以促进前脂肪细胞分化和脂质积累,而高剂量则抑制前脂肪细胞分化和脂质积累。表明 BCAA 对前脂肪细胞分化可能存在双向调控的作用。

越来越多的证据^[10-11]表明,3T3-L1 前脂肪细

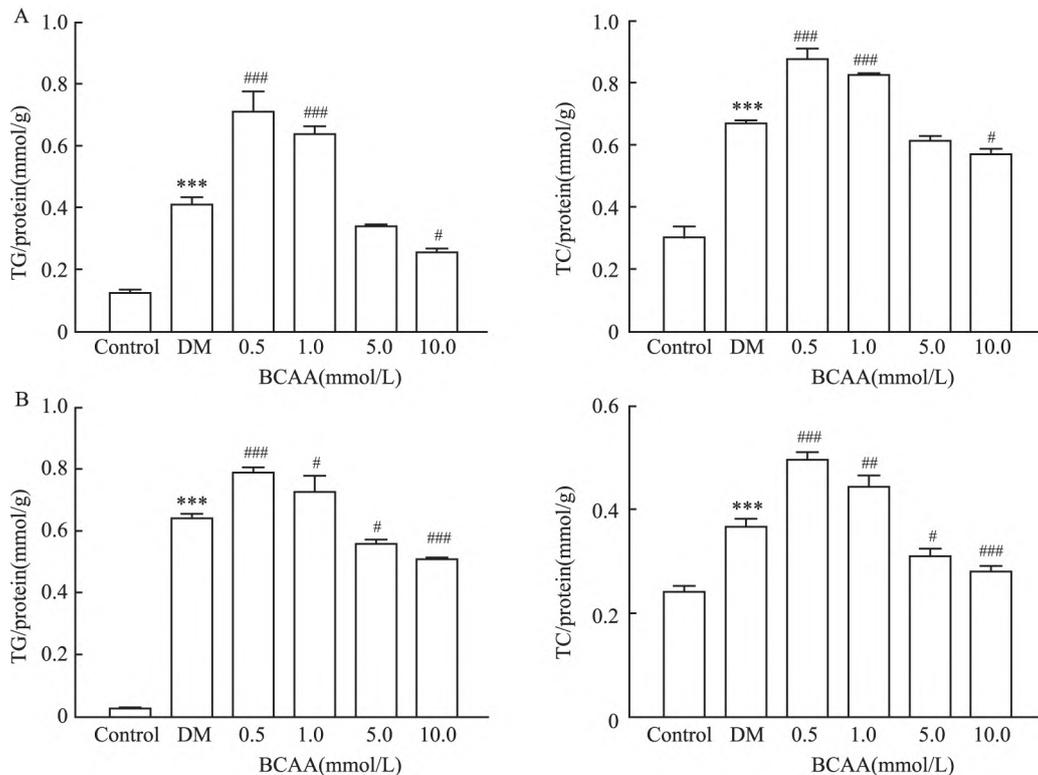


图 4 不同浓度 BCAA (0.5 ~ 10.0 mmol/L) 对 3T3-L1 细胞脂质积聚的影响

Fig. 4 Effects of BCAA at various concentrations (0.5 - 10.0 mmol/L) on Adipogenesis of 3T3-L1 cells

A: Intracellular TC and TG content; B: Extracellular TC and TG content; *** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs DM group.

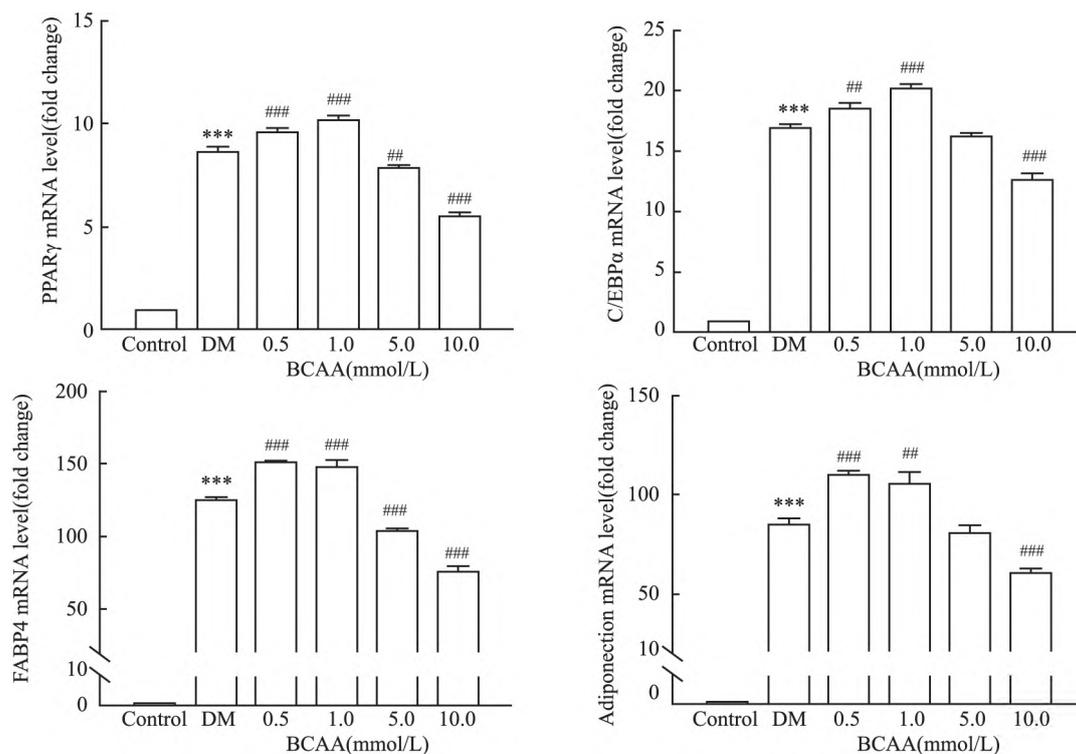


图5 不同浓度 BCAA(0.5 ~ 10.0 mmol/L) 对 3T3-L1 细胞中 PPAR γ 、C/EBP α 、Adiponectin 和 FABP4 mRNA 表达的影响

Fig. 5 Effects of BCAA at various concentrations (0.5 – 10.0 mmol/L) on the mRNA expression of PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, and FABP4 in 3T3-L1 cells

*** $P < 0.001$ vs Control group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs DM group.

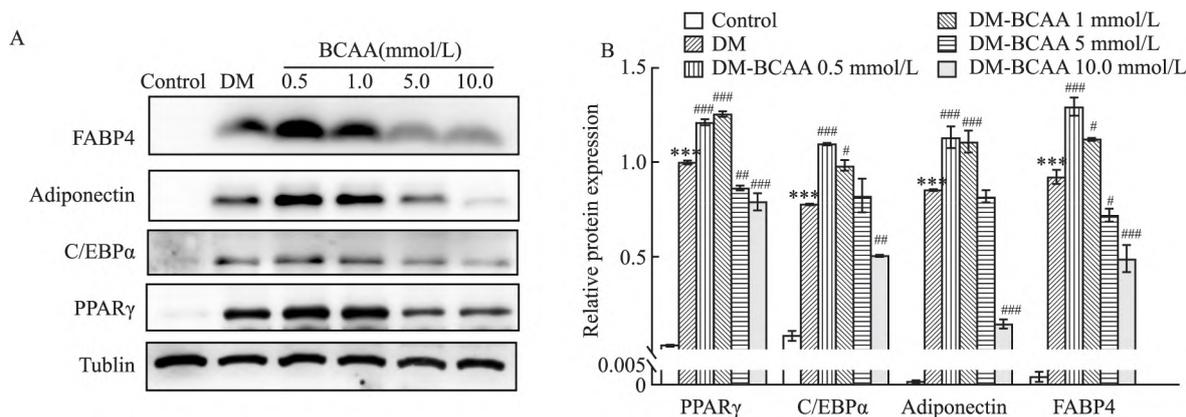


图6 不同浓度 BCAA(0.5 ~ 10.0 mmol/L) 对 3T3-L1 细胞中 PPAR γ 、C/EBP α 、Adiponectin 和 FABP4 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effects of BCAA at various concentrations (0.5 – 10.0 mmol/L) on the protein expression of PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, and FABP4 in 3T3-L1 cells

A: Protein expression in each group; B: Relative quantification of protein expression in each group; *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs DM group.

胞向脂肪细胞分化在很大程度上受脂肪生成转录因子家族的表达或者活性调控,包括 PPAR γ 、C/EBP α 、脂联素 (Adiponectin) 和脂肪酸结合蛋白 4 (FABP4) 等。此前有报道称,在小鼠肝脏/胰腺/白色脂肪组织/肿瘤组织中发现 BCAA 能促进

PPAR γ 、C/EBP α 等脂肪分化与合成相关基因的表达^[6-8], PPAR γ 和 C/EBP α 的序贯激活启动并最终促进脂肪细胞分化^[12-13]。本研究中低浓度 (0.5、1.0 mmol/l) BCAA 作用 3T3-L1 前脂肪细胞与以上结果相似。另有文献^[3,14] 显示 BCAA 可通过 NAD

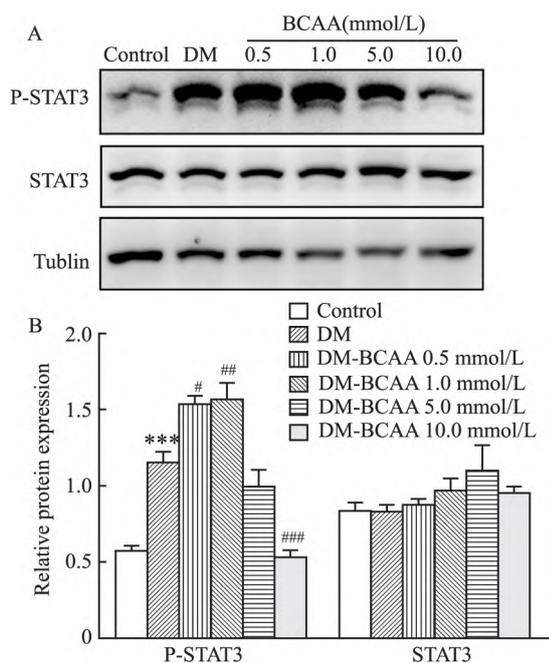


图7 不同浓度 BCAA(0.5 ~ 10.0 mmol/L) 对 3T3-L1 细胞中 Stat3 和 P-stat3 蛋白表达的影响

Fig.7 Effects of BCAA at various concentrations (0.5 – 10.0 mmol/L) on the protein expression of Stat3 and P-stat3 in 3T3-L1 cells

A: Protein expression in each group; B: Relative quantification of protein expression in each group; *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs DM group.

PH-FTO-m6A 协同方式,降低乙酰辅酶羧化酶 (Acc) 和脂肪酸合成酶(Fas) 的表达,增加单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK) 的表达,最终下调 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达来抑制脂肪细胞分化与脂质合成。而本研究表明高剂量(5.0、10.0 mmol/l) BCAA 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中 PPAR γ 、C/EBP α 、Adiponectin 和 FABP4 的 mRNA 和蛋白水平的表达,与以上结果相似。进一步研究发现,低剂量和高剂量 BCAA 可双向调控 Stat3 磷酸化。Stat3 是信号转导和转录激活因子(Stat) 家族的主要成员,参与调节细胞生长、分化和凋亡等多种生物学途径^[15]。Stat3 在 3T3-L1 前脂肪细胞分化的早期被激活,这对于分化中后期 PPAR γ 和 C/EBP α 的转录上调至关重要^[4]。因此,低浓度 BCAA 可能通过促进 Stat3 磷酸化介导的 3T3-L1 前脂肪细胞分化,而高浓度 BCAA 则对 Stat3 磷酸化具有抑制作用并影响前脂肪细胞分化成熟。

参考文献

[1] Wang Y , Zhao L , Gao L , et al. Health policy and public health

implications of obesity in China[J]. Lancet Diabetes Endocrinol , 2021 , 9(7) : 446 – 61. doi: 10.1016/S2213 – 8587(21) 00118 – 2.

[2] Green C R , Wallace M , Divakaruni A S , et al. Branched-chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis[J]. Nat Chem Biol , 2016 , 12(1) : 15 – 21. doi: 10.1038/nchembio.1961.

[3] Huang C , Luo Y , Zeng B , et al. Branched-chain amino acids prevent obesity by inhibiting the cell cycle in an NADPH-FTO-m6A coordinated manner [J]. J Nutr Biochem , 2023 , 122: 109437. doi: 10.1016/j.jnutbio.2023.109437.

[4] Zhang K , Guo W , Yang Y , et al. JAK2/STAT3 pathway is involved in the early stage of adipogenesis through regulating C/EBP β transcription [J]. J Cell Biochem , 2011 , 112(2) : 488 – 97. doi: 10.1002/jcb.22936.

[5] Oh M J , Lee H B , Yoo G , et al. Anti-obesity effects of red pepper (Capsicum annum L.) leaf extract on 3T3-L1 preadipocytes and high fat diet-fed mice [J]. Food Funct , 2023 , 14(1) : 292 – 304. doi: 10.1039/d2fo03201e.

[6] Lu J , Pan T , Gao J , et al. Reduced branched-chain amino acid intake improved high-fat diet-induced nonalcoholic fatty pancreas disease in mice [J]. Pancreas , 2024 , 53(2) : e157 – e163. doi: 10.1097/MPA.0000000000002281.

[7] Qu Y Y , Zhao R , Zhang H L , et al. Inactivation of the AMPK-GATA3-ECHS1 pathway induces fatty acid synthesis that promotes clear cell renal cell carcinoma growth [J]. Cancer Res , 2020 , 80(2) : 319 – 33. doi: 10.1158/0008 – 5472.CAN – 19 – 1023.

[8] Zhou X , Chen J , Sun B , et al. Leucine , but not isoleucine or valine , affects serum lipid profiles and browning of WAT in mice [J]. Food Funct , 2021 , 12(15) : 6712 – 24. doi: 10.1039/d1fo00341k.

[9] Crown S B , Marze N , Antoniewicz M R. Catabolism of branched chain amino acids contributes significantly to synthesis of odd-chain and even-chain fatty acids in 3T3-L1 adipocytes [J]. PLoS One , 2015 , 10(12) : e0145850. doi: 10.1371/journal.pone.0145850.

[10] 蒋皓冉,唐晓飞,吴界霖,等. β -石竹烯通过上调 PPAR γ /PGC-1 α /UCP1 通路促进肥胖小鼠白色脂肪棕色化作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2024 , 59(9) : 1591 – 8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 – 1492.2024.09.014.

[10] Jiang H R , Tang X F , Wu J L , et al. β -caryophyllene promotes white fat browning in obese mice through up-regulation of the PPAR γ /PGC-1 α /UCP1 pathway [J]. Acta Univ Med Anhui , 2024 , 59(9) : 1591 – 8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 – 1492.2024.09.014.

[11] Mandl M , Viertler H P , Hatzmann F M , et al. An organoid model derived from human adipose stem/progenitor cells to study adipose tissue physiology [J]. Adipocyte , 2022 , 11(1) : 164 – 74. doi: 10.1080/21623945.2022.2044601.

[12] Zaganjor E , Yoon H , Spinelli J B , et al. SIRT4 is an early regulator of branched-chain amino acid catabolism that promotes adipogenesis [J]. Cell Rep , 2021 , 36(2) : 109345. doi: 10.1016/j.

- celrep. 2021. 109345.
- [13] Muruganandan S, Ionescu A M, Sinal C J. at the crossroads of the adipocyte and osteoclast differentiation programs: future therapeutic perspectives[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2277. doi: 10.3390/ijms21072277.
- [14] Ma Q, Zhou X, Hu L, et al. Leucine and isoleucine have similar effects on reducing lipid accumulation, improving insulin sensitivity and increasing the browning of WAT in high-fat diet-induced obese mice[J]. *Food Funct*, 2020, 11(3): 2279–90. doi: 10.1039/c9fo03084k.
- [15] Liu Y, Liao S, Bennett S, et al. STAT3 and its targeting inhibitors in osteosarcoma[J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(2): e12974. doi: 10.1111/cpr.12974.

Dual effects of branched-chain amino acid on differentiation of 3T3-L1 preadipocytes through Stat3 pathway

Cai Xinghua^{1,2}, Gao Jie³, Xu Yuanying³, Zhang Huihui³, Maireyanmu Rouzi³,
Sha Wenjun³, Lu Jun^{1,2,3}, Lei Tao^{1,2,3}

(¹Shanghai Putuo Central School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Shanghai 200062;

²The Fifth School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032; ³Dept of

Endocrinology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062)

Abstract Objective To investigate the effects of branched-chain amino acid (BCAA) on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and its potential mechanism. **Methods** 3T3-L1 preadipocytes were divided into the Control, differentiation medium (DM), low-concentration BCAA, and high-concentration BCAA groups. A CCK-8 assay was utilized to evaluate pre-adipocyte survival under various BCAA concentrations. Oil-red O staining was used to observe the formation of lipid droplets in adipocytes. Intracellular triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) were detected by enzymatic method. RT-qPCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of Stat3 and adipocyte differentiation-related genes. **Results** CCK-8 results showed that the viability of 3T3-L1 cells was not affected when the BCAA concentration was ≤ 10 mmol/L. Compared with the DM group, the low-concentration BCAA groups (0.5 and 1.0 mmol/L) had significantly larger intracellular lipid droplets, increased number of lipid droplets, and elevated levels of the intracellular TC (0.88 vs 0.68 mmol/g; 0.83 vs 0.68 mmol/g, $P < 0.01$) and TG (0.77 vs 0.40 mmol/g; 0.62 vs 0.40 mmol/g, $P < 0.01$). Nevertheless, the cell differentiation in the high-concentration group (5.0 and 10.0 mmol/L) significantly decreased compared with that in the DM group. Further, levels of PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, and FABP4 mRNA and protein expression significantly increased in the low-concentration group, but significantly decreased in the high-concentration group than that in the DM group ($P < 0.01$). In addition, low concentrations of BCAA promoted stat3 phosphorylation, while high concentrations inhibited its phosphorylation ($P < 0.01$). **Conclusion** BCAA have a dual role in regulating the differentiation of preadipocytes through Stat3, i. e. low concentrations of BCAA induce cell differentiation by promoting Stat3 phosphorylation; whereas high concentrations of BCAA inhibit Stat3 phosphorylation and cell differentiation.

Key words BCAA; 3T3-L1; adipocyte differentiation; Stat3; adipogenesis; obesity

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81774083); Clinical Specialty Project of Shanghai Putuo District Health System (No. 2020tszk01); Scientific Research Project of Shanghai Health Commission (No. 202240309); Technology Innovation Project of Shanghai Putuo District Health System (Nos. ptkw-ws202003, ptkw-ws202302)

Corresponding authors Lei Tao, E-mail: taolei_12@sina.com; Lu Jun, E-mail: lujundocor@163.com