

敲低低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 抑制 C3H10T1/2 多潜能干细胞定向成脂*

陈婧文 郭 亮**

(复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系, 分子医学教育部重点实验室, 上海 200032)

摘要 C3H10T1/2 多潜能干细胞成脂过程分为定向和分化两个阶段, 骨形成蛋白 4(BMP4)可以诱导其定向成前脂肪细胞。已有的研究表明, 脂肪组织特异性敲除低密度脂蛋白受体相关蛋白 1(Lrp1)的小鼠体重减轻, 脂肪组织含量减少, 揭示此基因对成脂具有重要作用。然而, 目前尚不清楚 Lrp1 是否在成脂定向过程中发挥作用。采用小干扰 RNA 技术(RNAi), 在体外水平研究低密度脂蛋白 Lrp1 对 C3H10T1/2 多潜能干细胞成脂定向的作用。分别在 C3H10T1/2 成脂的定向期和脂滴成熟期敲低 Lrp1, 通过显微镜下观察、油红 O 染色、Western blotting 等实验证实, 定向期而非脂滴成熟期敲低 Lrp1 显著抑制 C3H10T1/2 多潜能干细胞成脂。BMP4 通过激活下游 Smad1/5/8 信号通路发挥作用, 而敲低 Lrp1 显著抑制 BMP4 诱导的 Smad1/5/8 磷酸化。这些结果说明: 敲低 Lrp1 通过下调 Smad 信号通路, 抑制 BMP4 诱导的 C3H10T1/2 多潜能干细胞成脂定向。

关键词 低密度脂蛋白受体相关蛋白 1(Lrp1), C3H10T1/2 多潜能干细胞, 成脂定向

学科分类号 Q257, Q34

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00594

多潜能干细胞, 具有发育成骨、肌、软骨、脂的多种潜能^[1]。多潜能干细胞成脂的过程分为两个阶段, 多潜能干细胞向前脂肪细胞定向的阶段与前脂肪细胞向脂肪细胞终末分化的阶段^[2]。C3H10T1/2 正是这样一种多潜能干细胞系。已有的研究表明, 在 10 μ g/L 骨形成蛋白 4(BMP4)处理下, 多潜能干细胞可以定向成前脂肪细胞; 经 0.5 mmol/L 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤(Mix), 1 μ mol/L 地塞米松(Dex), 1 mg/L 胰岛素(insulin, 即 MDI)的分化诱导, 它进一步分化为成熟的脂肪细胞^[3]。

低密度脂蛋白受体相关蛋白 1(Lrp1)是低密度脂蛋白受体家族的成员, 在脂蛋白代谢、蛋白酶降解等多种生物过程中发挥重要作用^[4-5]。Lrp1 的功能来源于它的 3 个重要特征: a. 可以识别 30 多种不同的配体; b. 能够与大量胞内蛋白结合, 通过磷酸化形式传递信号; c. 能够结合并调节其他的膜内受体, 如整合素及受体酪氨酸激酶^[6]。整体水平敲除 Lrp1 基因的小鼠致死, 显示出其在胚胎发育过程中的重要作用。组织特异性敲除 Lrp1 基因,

显示其在血管、中枢神经组织、巨噬细胞、肝脏等发育过程中发挥重要作用。脂肪组织特异性敲除 Lrp1 的小鼠体重减少, 脂肪组织体积减小, 说明 Lrp1 对于成脂有重要作用^[7]。然而, Lrp1 是否可以影响成脂定向从而改变多潜能干细胞定向命运尚不清楚。因此, 本文通过在 C3H10T1/2 多潜能干细胞定向期和脂滴成熟期分别敲低 Lrp1, 研究此基因在成脂定向中的作用, 并初步探索其影响成脂定向的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

C3H10T1/2 多潜能干细胞系购自美国 ATCC 细胞库(ATCC CCL-226)。

* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2006CB943704, 2009CB825604)。

** 通讯联系人。

Tel: 021-54237125, E-mail: 09211010062@fudan.edu.cn

收稿日期: 2011-12-12, 接受日期: 2012-02-29

1.2 主要试剂

骨形成蛋白 4(BMP4)购自 R&D 公司. 分化诱导剂: 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤 (3-isobutyl-1-methylxanthine)、地塞米松(dexamethasone)和胰岛素(insulin)购自 Sigma-Aldrich 公司(USA).

Lipofectamine™ RNAiMAX 购自 Invitrogen 公司.

Control RNAi 和 Lrp1 RNAi 由 Sigma-Aldrich 公司(USA)合成.

抗体: 422/aP2 多克隆抗体由美国 Johns Hopkins 大学生化系 Dr. Lane 惠赠; P-Smad1/5/8 抗体购自 Abcam 公司(USA); Hsp90 抗体购自 Santa Cruz 公司(USA); HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 及山羊抗兔 IgG 的二抗购自上海康成生物工程有限公司.

ECL 化学发光试剂盒购自 GE Healthcare 公司(USA).

1.3 方法

1.3.1 细胞培养. C3H10T1/2 多潜能干细胞生长在含有 10%小牛血清(CBS)的 DMEM 培养液中(含 8 g/L 生物素、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素). 诱导 C3H10T1/2 间充质干细胞向前脂肪细胞定向: 当细胞密度达到 30%~50%时给予 10 μg/L 骨形成蛋白 4(BMP4)处理, 药物维持至细胞接触抑制后 2 天, 用含有 10%胎牛血清(FBS)、0.5 mmol/L 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤(mix)、1 μmol/L 地塞米松(Dex)、1 mg/L 胰岛素(insulin)(即 MDI)的 DMEM 诱导. 2 天后换含有 10% FBS、1 mg/L 胰岛素的 DMEM 继续培养 2 天, 此后每隔一天更换含 10% FBS 的 DMEM 培养液.

1.3.2 实时定量 PCR. 用 Trizol 试剂按照说明书方法提取细胞的总 RNA. 各取 500 ng RNA, 反转录成 cDNA. Real time PCR 检测 Lrp1 基因的表达, 采用 18 S 基因作为参照. 所用引物序列如表 1.

Table 1 The sequence primers for real time PCR

Gene	Forward primer	Reversed primer
18s	CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT	CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG
Lrp1	CTGAAGGCTCCGAGTACCAG	GTAGGAGATTGTGCCGTGT

1.3.3 RNA 干扰. 根据小鼠 Lrp1 基因序列设计合成 RNAi 如下: CCAUGUUUGUGACCCGAAUdTdT. 按照 Invitrogen 公司 Lipofectamine™ RNAiMAX 转染操作说明书进行: 以 35 mm 培养皿为例, 铺板后第二天, 在无菌管内将 3 pmol RNAi(3 μl)溶于 250 μl 无血清、无抗生素、无生物素 DMEM 培养基中, 将 5 μl Lipofectamine™ RNAiMAX 稀释于 250 μl 无血清、无抗生素、无生物素 DMEM 培养基中, 轻轻混合上述两溶液并在室温孵育 10 min. 孵育时, 弃去细胞培养旧液, 换以新鲜的含 10% CBS 的无双抗 DMEM 培养液 2 ml. 孵育结束后将上述配置的 500 μl RNAi-Lipofectamine 复合物加入培养皿中, 混合均匀, 培养液中 RNAi 终浓度为 10 nmol/L. 24 h 后更换培养液.

1.3.4 Western blotting. 用加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液提取细胞蛋白质, 加入 5×上样缓冲液, 煮沸 10 min, 进行 SDS-PAGE, 转膜. 结束后, 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 加入一抗, 4℃孵育过夜. 一抗稀释度和反应条件如下: P-Smad1/5/8

(1:1 000), 422/aP2 (1:2 000), Hsp90(1:1 000). 次日, 1×TTBS 洗膜 5 次, 每次 10 min. 相应的 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, 1×TTBS 洗膜 5 次, 每次 10 min. TTBS 洗涤后 ECL 试剂化学发光, 曝光、显影.

1.3.5 油红 O 染色. C3H10T1/2 经分化诱导后第 8 天, 培养皿中的细胞用 PBS 洗涤 2 次, 然后用 3.7%中性福尔马林固定 10 min, 0.5%油红贮存液(溶于异丙醇)用水按 3:2 稀释, 滤纸过滤, 固定后的细胞用此稀释液室温孵育 3 h 后, 蒸馏水漂洗细胞 3 次, 倒置显微镜下拍照.

1.3.6 统计学处理. 数据用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 用 *t* 检验对平均值进行两两比较, *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义.

2 结 果

2.1 C3H10T1/2 成脂定向期敲低 Lrp1 方案

C3H10T1/2 接种至 3.5 cm 培养皿中, 接种第 2 天(即 Day -7)(图 1)进行 Lrp1 RNAi 实验, Day -6

给予细胞 10 $\mu\text{g/L}$ 骨形成蛋白 4(BMP4)处理, 药物维持至细胞接触抑制后 2 天(即 Day 0), 用含有 10% FBS、0.5 mmol/L 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤(Mix)、1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松(Dex)、1 mg/L 胰岛素(insulin, 即 MDI)的 DMEM 诱导 2 天后, 换含有

10% FBS、1 mg/L 胰岛素的 DMEM 继续培养 2 天, 更换含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液, 此后每隔一天更换含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 直至 Day 8 完成诱导分化全程。

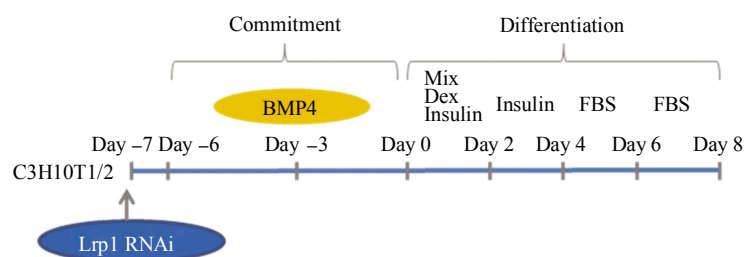


Fig. 1 Protocol of Lrp1 silencing in C3H10T1/2 cells commitment stage

We perform Lrp1 RNAi experiment at day-7, and then C3H10T1/2 cells are treated for 6 days with growth media or growth media further supplemented with BMP4. Cells are then induced for 8 days to differentiate into adipocytes using adipogenic induction and maintenance media.

2.2 Lrp1 RNAi 在 C3H10T1/2 成脂定向期有效敲低 Lrp1

分别提取第 0 天(Day 0)BMP4 处理的 Control RNAi 组和 BMP4 处理的 Lrp1 RNAi 组细胞总 RNA, 各取 500 ng 进行逆转录反应, 然后进行实时荧光定量 PCR 分析。实时荧光定量 PCR 分析表明, BMP4 处理的 Lrp1 RNAi 组的 Lrp1 mRNA 表达水平相对于 BMP4 处理的 Control RNAi 组明显下降(图 2), 从 mRNA 水平说明 RNAi 能够显著降低内源 Lrp1 表达。

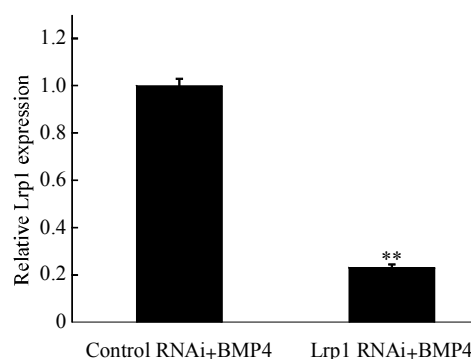


Fig. 2 Lrp1 RNAi inhibits Lrp1 expression during preadipocyte commitment

C3H10T1/2 cells are transiently transfected with control RNAi or Lrp1 RNAi and then treated with BMP4 until day 0. mRNA levels of Lrp1 are monitored by Realtime PCR at day 0(** $P < 0.01$).

2.3 敲低 Lrp1 改变 C3H10T1/2 定向期形态

成脂诱导的第 0 天在光学显微镜下观察细胞形态的变化, BMP4 处理组及 BMP4 处理的 Control RNAi 组的细胞密集、发亮、呈现出前脂肪细胞的形态。而 Lrp1 RNAi 组细胞虽然经历了 BMP4 诱导, 形态上却与 Control 组相似, 细胞扁平而稀疏, 没有成脂趋势(图 3)。

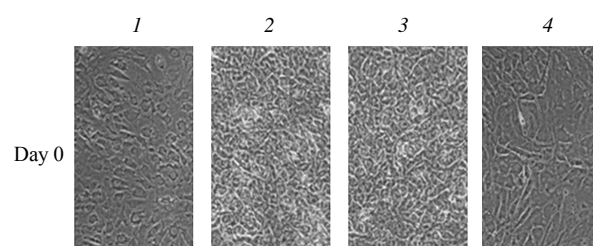


Fig. 3 Micrographs of committed C3H10T1/2 cells at day 0

Cells are treated for 6 days with growth media or growth media further supplemented with BMP4, BMP4 plus Control RNAi, or BMP4 plus Lrp1 RNAi. 1: Control; 2: BMP4; 3: Control RNAi+BMP4; 4: Lrp1 RNAi+BMP4.

2.4 定向期敲低 Lrp1 抑制成脂

定向期敲低 Lrp1 的细胞完成成脂诱导分化流程, 即在成脂诱导分化后第 8 天对细胞进行油红 O

染色实验, 分别在显微镜下和培养基整体水平观察 (图 4). BMP4 处理组和 BMP4 处理的 Control RNAi 组细胞脂滴被油红染成红色, 明显成脂. 而 BMP4 处理的 Lrp1 RNAi 组, 大部分细胞未被油红染成红色, 细胞成脂率很低. 在成脂诱导分化的第

8 天检测成脂标记蛋白表达变化情况, 发现 422/ap2 的表达情况在 BMP4 处理的 Lrp1 RNAi 组相比与 BMP4 处理的 Control RNAi 组和 BMP4 处理组都显著降低, BMP4 处理的 Lrp1 RNAi 组 422/ap2 表达情况趋近于未经 BMP4 处理的 Control 组.

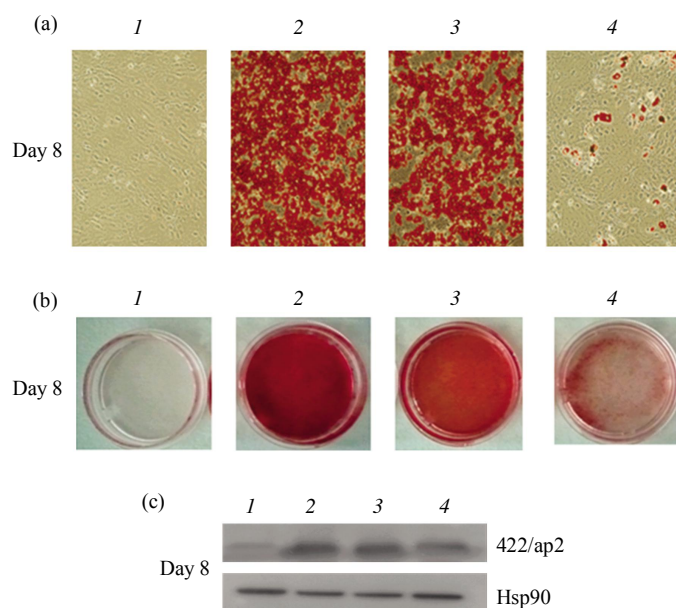


Fig. 4 Knock down of Lrp1 inhibits the commitment of C3H10T1/2 cells to adipocyte lineage

C3H10T1/2 cells are cultured in DMEM with 10% calf serum until postconfluence (day 0) and then induced to differentiate with standard differentiation protocol (MDI). (a) Micrographs of cytoplasmic triglyceride after Oil Red O staining on day 8. (b) Photograph of cytoplasmic triglyceride after Oil Red O staining at the same point. (c) The expression of adipocyte marker (422/ap2) is detected with cell extract on day 8. A representative experiment out of 3 is shown. 1: Control; 2: BMP4; 3: Control RNAi+BMP4; 4: Lrp1 RNAi+BMP4.

2.5 C3H10T1/2 脂滴成熟期敲低 Lrp1 方案

C3H10T1/2 接种至 10 cm 培养皿中, 接种第二天密度为 30% 左右时给予细胞 10 μ g/L 骨形成蛋白 4(BMP4)处理, 药物维持至细胞接触抑制后 2 天即第 0 天, 用含有 10% FBS、0.5 mmol/L 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤(Mix)、1 μ mol/L 地塞米松(Dex)、

1 mg/L 胰岛素(insulin, 即 MDI)的 DMEM 诱导 2 天后, 换含有 10% FBS、1 mg/L 胰岛素的 DMEM 继续培养 2 天, 一天后即 Day 4 换成无抗生素含有 10% CBS DMEM 培养基进行 RNA 敲低实验, 此后每隔一天更换含 10% FBS 的 DMEM 培养液(图 5).

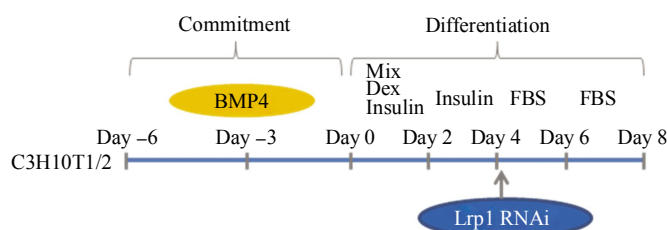


Fig. 5 Protocol of Lrp1 silencing in differentiating C3H10T1/2 cells

C3H10T1/2 cells are treated for 6 days with growth media, growth media further supplemented with BMP4. Cells are then induced for 4 days to differentiate into adipocytes using adipogenic induction and maintenance media. At day 4, RNAi experiment is performed with non-antibiotic media, and 24 h later the media is changed to FBS until day 8.

2.6 脂滴成熟期 Lrp1 RNAi 的敲低效果

脂滴成熟期, 进行 Lrp1 RNAi 实验(即 Day 4, 进行 Lrp1 RNAi 实验). 分别提取第 8 天 BMP4 处理的 Control RNAi 组和经过 BMP4 处理的 Lrp1 RNAi 组细胞总 RNA, 各取 500 ng RNA 进行逆转录反应, 然后进行实时荧光定量 PCR 分析. 实时荧光定量 PCR 分析表明, Lrp1 RNAi 组的 Lrp1 mRNA 表达水平明显下降(图 6), 从 RNA 水平说明脂滴成熟期 Lrp1 RNAi 能够明显降低内源 Lrp1 表达.

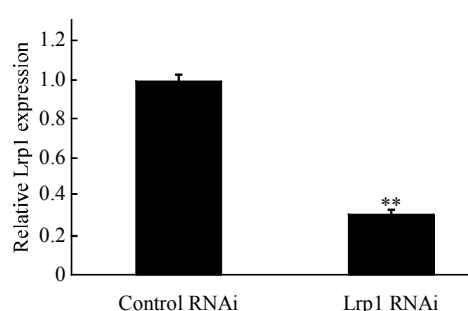


Fig. 6 Lrp1 RNAi inhibits Lrp1 expression during lipid formation

Silencing of Lrp1 is performed at day 4. C3H10T1/2 cells are transiently transfected with control RNAi or Lrp1 RNAi. Lrp1 mRNA expression is monitored by Realtime PCR (** $P < 0.01$) at day 8.

2.7 脂滴成熟期敲低 Lrp1 无法抑制成脂

根据脂滴成熟期 Lrp1 RNAi 方案, 脂滴成熟期敲低 Lrp1, 完成成脂诱导分化流程后, 即在成脂诱导分化后第 8 天对细胞进行油红 O 染色, Western blotting 实验. BMP4 处理的 Control RNAi 组和 BMP4 处理的 Lrp1 RNAi 组都明显成脂, 油红染色率相近, 422/ap2 表达情况相似(图 7). 说明脂滴成熟期敲低 Lrp1 无法抑制成脂.

2.8 敲低 Lrp1 抑制 Smad 信号通路磷酸化

为了研究敲低 Lrp1 抑制 BMP4 诱导 C3H10T1/2 间充质干细胞成脂的潜在分子机制, 通过 Western blotting 实验检测了 Smad1/5/8 信号通路的磷酸化. 发现 10 μ g/L BMP4 处理后 Smad1/5/8 磷酸化相对于未经处理的对照组明显增强. 而 BMP4 处理后 Lrp1 RNAi 组的 Smad1/5/8 信号通路磷酸化, 在相同的时间点, 明显受到抑制(图 8). 说明敲低 Lrp1 通过抑制 BMP4-Smad 信号通路磷酸化抑制成脂.

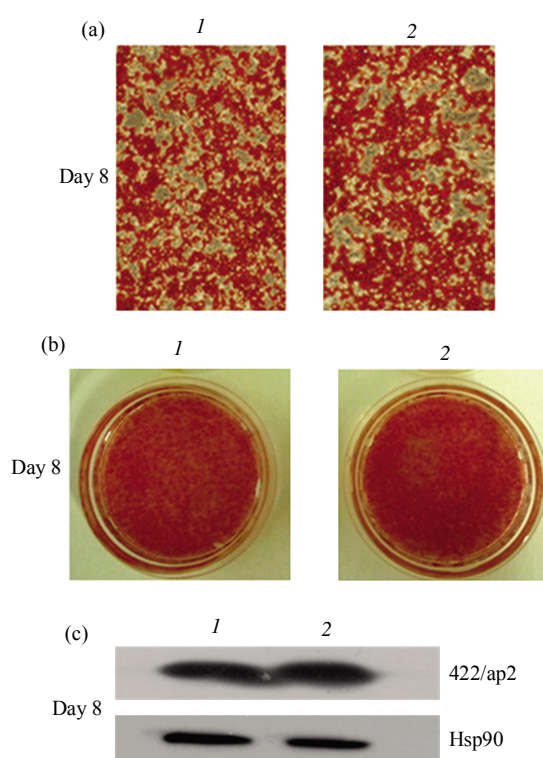


Fig. 7 Lrp1 silencing in differentiating adipocytes has no effect on adipogenesis

After commitment, C3H10T1/2 cells are maintained for 4 days in adipogenic differentiation medium, then are transfected with Control RNAi or Lrp1 RNAi. (a) Micrographs of cytoplasmic triglyceride after Oil Red O staining on day 8. (b) Photograph of cytoplasmic triglyceride after Oil Red O staining at the same point. (c) The expression of adipocyte marker (422/ap2) is detected with cell extract on day 8. A representative experiment out of 3 is shown. 1: Control RNAi+BMP4; 2: Lrp1 RNAi+BMP4.

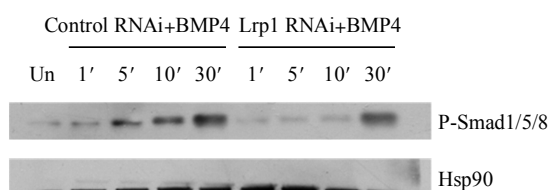


Fig. 8 Lrp1 RNAi inhibits BMP4-triggered Smad1/5/8 phosphorylation in C3H10T1/2 cells

Immunoblotting shows that BMP4 treatment induces the phosphorylation of Smad1/5/8, increases p-Smad1/5/8 at 5 min of BMP4 exposure relative to BMP4-untreated control (Un). These increases are significantly reduced with Lrp1 RNAi treatment.

3 讨 论

世界卫生组织公布的结果显示,患有肥胖症增加了一系列疾病的发病概率,包括2型糖尿病,心血管疾病,肝坏死和肝硬化,神经组织退化引发的老年痴呆症以及一些癌症^[8].脂肪组织增加是肥胖症的显著特征,来源于两个方面的原因:a.脂肪细胞体积增大,b.脂肪细胞数量增多^[9].脂肪细胞数量增多是由于脂肪组织血管基质组分中的多潜能干细胞定向成前脂肪细胞,进一步分化成脂肪细胞引起的^[10].多潜能干细胞具有向脂肪、肌肉、骨、软骨细胞定向的潜能^[1,9].越来越多的实验结果显示,一些基因的改变可以促使多潜能干细胞直接进入向某类细胞系定向的发育程序,从而决定细胞命运.辨别这些改变细胞定向命运的基因,阐明脂肪细胞定向分化过程中的分子机制,将有利于更好地理解肥胖症的发病机制,并可为肥胖的预防和治疗提供新的靶点.

C3H10T1/2 细胞系是1973年科学家由培养14~17天的C3H小鼠胚胎中分离出来的,它是研究多潜能干细胞定向的良好模型^[11].已有的研究表明,骨形成蛋白4,这一转移生长因子 β 家族的成员,可以诱导C3H10T1/2多潜能干细胞定向成前脂肪细胞,而后通过已经建立的分化方案诱导(即MDI诱导)可进一步形成成熟的脂肪细胞^[2].

Lrp1是低密度脂蛋白受体家族的成员,它首先在内质网中被合成一个600 ku的单链前体,而在高尔基体中经过剪切,加工成双链异二聚体成熟形式,包括胞外含有配体结合位点的515 ku肽链和胞内85 ku单次跨膜肽链^[12].Lrp1是一种多功能单次跨膜受体,它可以结合并内化多种配体,在脂蛋白代谢、蛋白酶降解等多种生物过程中发挥重要作用.研究表明,Lrp1可以结合载脂蛋白E,提示Lrp1可以通过载脂蛋白与乳糜微粒结合,作为乳糜微粒的受体在脂蛋白代谢过程中发挥作用^[13].Rohlmann等^[14]通过实验抑制了小鼠肝脏中Lrp1表达,发现此种小鼠血液中胆固醇富集的乳糜微粒聚集,再次证明Lrp1在脂蛋白代谢过程中发挥重要作用.已有的研究表明,Lrp1在脂肪细胞中大量表达,脂肪组织特异性敲除Lrp1的小鼠饭后血液

脂质清除速率减慢,脂肪组织体积减小及棕色脂肪细胞无脂滴,并导致敲除小鼠体重下降^[7].这些工作说明Lrp1对维持脂肪细胞的功能发挥重要作用.而Lrp1是否在成脂定向过程中就发挥了作用,改变此基因表达是否影响多潜能干细胞定向命运尚无所知.

本文研究中发现:经过BMP4处理的C3H10T1/2细胞在第0天,细胞形态密集,细胞边缘发亮;而未经BMP4处理的Control组细胞形态稀疏扁平;Lrp1 RNAi组的细胞,虽然经历了BMP4的定向诱导,第0天依旧不具备前脂肪细胞的典型形态特征,却类似于对照组细胞呈现稀疏扁平状.在第8天,敲低Lrp1可以显著下调成脂标记蛋白如422/ap2的表达.油红O染色实验表明,敲低Lrp1组的C3H10T1/2细胞系,虽然经过BMP4成脂诱导,大部分细胞依然未能被油红染成红色,即未能成脂.而在脂滴成熟期,敲低Lrp1结果却不同:脂滴成熟期敲低Lrp1后,经过油红O染色,敲低组细胞的成脂率与对照组相似,敲低Lrp1无法抑制成脂.以上实验说明Lrp1在C3H10T1/2向前脂肪定向期发挥作用,定向期敲低Lrp1可以抑制成脂.

已有的研究表明:通常BMPs通过下游Smad信号通路发挥作用.BMPs激活二型BMP受体,从而磷酸化一型BMP受体,这一过程进一步磷酸化Smad1/5/8并使它们与co-Smad(Smad4)相结合,Smad1/5/8-Smad4进入核内调控目的基因的转录活性从而调控成脂定向^[15].最近的研究指出,Smad和p38信号通路共同参与到BMP2/4诱导的间充质干细胞成脂定向.Smad1/5/8相对P38起到更加显著的作用^[3].在本研究中BMP4磷酸化Smad1/5/8,而这一磷酸化在Lrp1敲低情况下明显减弱,说明Lrp1 RNAi通过减弱Smad1/5/8信号通路磷酸化抑制成脂.

本研究结果提示Lrp1对于C3H10T1/2多潜能干细胞成脂定向是必需的,敲低Lrp1可以通过抑制Smad信号通路抑制C3H10T1/2多潜能干细胞成脂,进一步探讨可为肥胖症及其相关疾病的防治提供新的理论依据,并为开发新型减肥药物提供新线索.

参 考 文 献

- [1] Young H E, Mancini M L, Wright R P, *et al.* Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn*, 1995, **202**(2): 137-144
- [2] Tang Q Q, Otto T C, Lane M D. Commitment of c3h10t1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(26): 9607-9611
- [3] Huang H, Song T J, Li X, *et al.* Bmp signaling pathway is required for commitment of c3h10t1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(31): 12670-12675
- [4] Terrand J, Bruban V, Zhou L, *et al.* Lrp1 controls intracellular cholesterol storage and fatty acid synthesis through modulation of wnt signaling. *J Biol Chem*, 2009, **284**(1): 381-388
- [5] Laatsch A, Merkel M, Talmud P J, *et al.* Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (lrp1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis*, 2009, **204**(1): 105-111
- [6] Lillis A P, Van Duyn L B, Murphy-Ullrich J E, *et al.* Ldl receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev*, 2008, **88**(3): 887-918
- [7] Hofmann S M, Zhou L, Perez-Tilve D, *et al.* Adipocyte ldl receptor-related protein-1 expression modulates postprandial lipid transport and glucose homeostasis in mice. *J Clin Invest*, 2007, **117**(11): 3271-3282
- [8] Schulz T J, Tseng Y H. Emerging role of bone morphogenetic proteins in adipogenesis and energy metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, **20**(5-6): 523-531
- [9] Vaananen H K. Mesenchymal stem cells. *Ann Med*, 2005, **37**(7): 469-479
- [10] Hong K M, Burdick M D, Phillips R J, *et al.* Characterization of human fibrocytes as circulating adipocyte progenitors and the formation of human adipose tissue in scid mice. *FASEB J*, 2005, **19**(14): 2029-2031
- [11] Pinney D F, Emerson C J. 10t1/2 cells: an *in vitro* model for molecular genetic analysis of mesodermal determination and differentiation. *Environ Health Perspect*, 1989, **80**: 221-227
- [12] May P, Woldt E, Matz R L, *et al.* The ldl receptor-related protein (lrp) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Ann Med*, 2007, **39**(3): 219-228
- [13] Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, *et al.* The ldl-receptor-related protein, lrp, is an apolipoprotein e-binding protein. *Nature*, 1989, **341**(6238): 162-164
- [14] Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer R E, *et al.* Inducible inactivation of hepatic lrp gene by cre-mediated recombination confirms role of lrp in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest*, 1998, **101**(3): 689-695
- [15] Chen D, Zhao M, Mundy G R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 2004, **22**(4): 233-241

Knock Down of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1(Lrp1) by RNAi Inhibits The Commitment of C3H10T1/2 Pluripotent Stem Cells to Preadipocyte*

CHEN Jing-Wen, GUO Liang**

(Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Fudan University Shanghai Medical College, Shanghai 200032, China)

Abstract The adipocyte development process of C3H10T1/2 pluripotent stem cells includes two stages: the commitment stage and the differentiation stage. There are evidences that BMP4 commits C3H10T1/2 cells into preadipocytes. Previous studies have shown that mice lacking adipocyte Lrp1(adLrp1^{-/-}) displays reduced body weight and smaller fat stores which highlights the important role of Lrp1 in adipogenesis. However, little is known about the role of Lrp1 in preadipocyte commitment. RNAi was used to study the effect of low density lipoprotein receptor-related protein 1(Lrp1) on commitment of C3H10T1/2 to preadipocyte. Through microscopic examination, Oil red O staining, Western blotting, it is demonstrated that Lrp1 RNAi inhibits C3H10T1/2 adipogenesis in commitment stage, rather than in lipid maturation period. BMP4 signals through Smad1/5/8 and Lrp1 RNAi significantly suppresses the BMP4-triggered phosphorylation of Smad1/5/8. These data suggest that Lrp1 RNAi has inhibitory effects on the BMP4-induced of C3H10T1/2 preadipocyte commitment *via* down-regulating Smad signaling.

Key words low density lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1), C3H10T1/2, commitment

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00594

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2006CB943704, 2009CB825604).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-54237125, E-mail: 09211010062@fudan.edu.cn

Received: December 12, 2011 Accepted: February 29, 2012