



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Glucose and Lipid Metabolism—Article

硫化氢促进脂肪细胞分化、增生和肥大

Richa Verma^a, 傅明^{a,b}, 杨广东^a, 吴凌云^{a,b,*}, 王睿^{b,*}

^a Cardiovascular and Metabolic Research Unit, Laurentian University, Sudbury, ON P3E 2C6, Canada

^b Department of Biology, York University, Toronto, ON M3J 1P3, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2021

Revised 19 August 2022

Accepted 25 September 2022

Available online 28 October 2022

关键词

脂肪形成
脂肪细胞
气态递质
葡萄糖
硫化氢
胰岛素
脂质
肥胖症

摘要

硫化氢(H₂S)在脂肪细胞和脂肪组织中内源性产生并刺激脂肪形成。然而,H₂S对肥胖症发展的综合致病作用及其潜在机制尚不清楚。本研究发现降低的内源性H₂S水平降低了小鼠脂肪细胞中的脂质积累。在脂肪形成诱导6 d后,外源性H₂S处理显著增加了原代小鼠前脂肪细胞的脂肪生成。在脂肪生成的早期阶段,H₂S增加细胞增殖并为细胞增生做好准备。H₂S处理10 d后,前脂肪细胞的细胞表面积和直径明显增大,表明细胞肥大。虽然H₂S刺激脂质积累和脂肪生成,但H₂S对脂肪分解没有影响。随着营养过载和高葡萄糖/胰岛素孵化,H₂S进一步刺激葡萄糖消耗并恶化脂肪细胞肥大。H₂S上调增殖基因[CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBPβ)、细胞分裂周期25(Cdc25)、微染色体维持3(Mcm3)和细胞分裂周期(Cdc45)]和细胞周期蛋白依赖性激酶2蛋白(Cdk2),调节细胞增殖。H₂S还上调了胰岛素受体β(Irβ)激活的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和蛋白激酶B(Akt)通路,从而导致脂肪生成。总之,H₂S增加脂肪细胞分化、肥大和增生,提示它在肥胖症中起致病作用。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

硫化氢(H₂S)是一种气体递质,在各种细胞信号通路中发挥关键作用[1–3]。H₂S的生理功能包括舒张血管、降低血压[4–5]、抑制胃上皮细胞凋亡[6]、减轻炎症[7]和氧化应激[8]。另一方面,胰腺和周围组织中内源性H₂S水平的升高也会引起糖尿病及其并发症[9]。

据世界卫生组织(WHO)统计,2016年18岁及以上成年人中有39%超重,13%为肥胖[10]。脂肪组织和脂肪细胞是肥胖症的源头,因为它们体内储存和代谢脂质[11–12]。前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞,称为脂肪细

胞分化,这一过程一直是肥胖症相关细胞研究的焦点。目前,H₂S在3T3L1细胞中作为脂肪形成诱导剂的作用已被报道[13–14]。Yang等[15]观察到H₂S引起的过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPARγ)反式激活是通过PPARγ被硫酸基化修饰引起的,进而导致3T3L1的脂肪细胞分化增加。他们的研究还表明脂肪细胞分化启动子[胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)和地塞米松(DEX)]会增加胱硫醚γ-裂解酶(CSE)的表达,进而在分化前脂肪细胞时产生更多的H₂S。

脂肪细胞增生(如细胞数量增加)在肥胖症发展中所起的作用一直存在争议[16–18]。有报道提出具有较小脂

* Corresponding authors.

E-mail addresses: lwu2@laurentian.ca (L. Wu), ruiwang@yorku.ca (R. Wang).

2095-8099/© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2023, 20(1): 36–48

引用本文: Richa Verma, Ming Fu, Guangdong Yang, Lingyun Wu, Rui Wang. Hydrogen Sulfide Promotes Adipocyte Differentiation, Hyperplasia, and Hypertrophy. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.09.010>

肪细胞的增生可能具有保护作用[19]。脂肪组织的储存能力有限,更多脂肪细胞的存在可能会以脂质的形式储存多余的能量,从而降低脂毒性。其他研究表明,脂肪细胞增生的发生时间可能晚于脂肪细胞肥大(如细胞大小增加),并且可能与肥胖症相关代谢后果的严重程度和较低可逆性有关联[20–22]。在正能量平衡的慢性状态下,当肥大脂肪细胞达到临界细胞大小后其代谢变得不活跃,主要特征是脂质过载和胰岛素抵抗。此时,额外的脂肪前体细胞被招募用于改善代谢的变化[23]。在持续营养过剩的情况下,脂肪细胞增生导致脂肪组织扩张,新募集的脂肪细胞在能量过剩的情况下变得肥大。在这种恶性循环中,脂肪细胞的增生和肥大都会增加脂肪组织质量并引发肥胖症及相关的代谢并发症[24]。

迄今为止, H₂S 在肥胖症发展中的作用主要是利用 3T3L1 细胞进行研究的。然而,这种永生化的白脂肪细胞系并不能复制体内前脂肪细胞的生理特征,从而使这种细胞模型无法在脂肪组织水平和全身水平全面阐述肥胖症发展的复杂性[24]。此外,目前对 H₂S 在脂肪细胞肥大和增生中的作用依旧缺乏了解。因而,本文研究了外源性和内源性 H₂S 对小鼠前脂肪细胞和脂肪组织中脂肪细胞分化、肥大和增生的影响,及其潜在的机制。

2. 材料与方法

2.1. 脂肪组织中脂质的提取和 H₂S 产生率的测定

本研究选择的动物是具有 C57BL/6J × 129SvEv 混合遗传背景的野生型 (WT) 小鼠。纯合胱硫醚 γ -裂解酶敲除 (CSE-KO) 小鼠是将至少十代杂合 CSE-KO 小鼠与具有相同遗传背景的 WT 小鼠回交获得的[4]。实验中使用的 WT 和 CSE-KO 小鼠均通过基因分型进行了验证。每组 WT 和匹配的 CSE-KO 小鼠 (8 周龄, 雄性) 来自同一代。首先取出附睾和皮下脂肪组织脂肪垫, 然后采用 Bligh 和 Dyer 的方法[25–27]从组织中提取脂质, 并用脂肪组织质量归一化。所有动物实验均符合美国国立卫生研究院出版的《实验动物护理和使用指南》(NIH 出版号 85-23, 1996 年修订) 并经加拿大劳伦森大学动物护理委员会 (Animal Care Committee of Laurentian University) 批准。

如之前文献[15,28–29]所述, 测量了 WT 和 CSE-KO 脂肪组织的 H₂S 产生率。简而言之, 使用 50 mmol·L⁻¹ 冰磷酸钾缓冲液 (pH = 6.8) 分离并匀浆小鼠脂肪组织。然后将组织匀浆与 10 mmol·L⁻¹ L-半胱氨酸 (Sigma-Aldrich, 加拿大) 在 37 °C 下孵育。90 min 后, 加入三氯乙酸 (Sigma-Aldrich) 终止反应。使用 FLUOstar OPTIMA

微孔板分光光度计 (BMG LABTECH, 德国) 在 670 nm 的吸光度波长下检测 H₂S 与 N,N-二甲基对苯二胺硫酸盐 (Sigma-Aldrich) 相互作用产生的亚甲蓝水平。

2.2. 细胞培养

前脂肪细胞依照文献[30]从小鼠附睾脂肪垫分离得到。清除附着的血管后, 收集组织并用无菌 Krebs-Ringer 缓冲液 (118 mmol·L⁻¹ NaCl, 4.8 mmol·L⁻¹ KCl, 1.3 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 1.2 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 1.2 mmol·L⁻¹ MgSO₄, 24.8 mmol·L⁻¹ NaHCO₃) 清洗三次, 辅以 3% 牛血清白蛋白、5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖、100 单位·mL⁻¹ 青霉素和 0.1 mg·mL⁻¹ 链霉素。剪碎的组织在 37 °C 下用 3 mg·mL⁻¹ 的 II 型胶原酶消化 45 min, 同时轻轻搅拌。细胞悬浮液通过 250 μ m 过滤器过滤。丢弃剩余的未消化的组织碎片。过滤后的细胞悬浮液在室温下以 450g ($g = 9.8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$) 离心 10 min。弃去含有成熟脂肪细胞的底层液体, 再加入红细胞裂解液 (Sigma-Aldrich) 裂解红细胞。随后, 将细胞通过 40 μ m 筛网过滤并离心 (450g, 室温 10 min)。将所得基质血管细胞 (如前脂肪细胞) 沉淀重悬于含有 10% 胎牛血清 (FBS) 和抗生素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) 中。再用 0.4% 台盼蓝 (细胞活力大于 95%) 进行细胞计数后, 将细胞接种在多孔板中, 并在含 95% 空气和 5% CO₂ 的潮湿环境中于 37 °C 下培养 24 h。然后将细胞用胰蛋白酶消化并以每板 0.8×10^5 个细胞的密度接种在 12 孔板中。细胞汇合后, 将培养基替换为含有 IBMX (0.5 mmol·L⁻¹)、DEX (0.25 μ mol·L⁻¹) 和胰岛素 (10 μ g·mL⁻¹) 的脂肪形成培养基 (ADP)。连续 6 d 诱导细胞形成脂肪后, 再持续培养两天。在接下来的 4 d 里, 培养基被换成仅含有胰岛素 (10 μ g·mL⁻¹) 的 DMEM。为了研究营养过载的影响, 使用棕榈酸 (PA, 350 μ mol·L⁻¹) 作为营养物处理原代培养的前脂肪细胞 20 d。为研究能量失衡模型, 在含有或不含 NaHS (60 μ mol·L⁻¹) 的 ADP 条件下, 用高葡萄糖 (HG, 25 mmol·L⁻¹) 和高胰岛素 (HI, 50 μ g·mL⁻¹) 刺激前脂肪细胞 20 d。

在不同的实验中, ADP 诱导分化的前脂肪细胞经蛋白激酶 B (Akt) 抑制剂 capivasertib (5 μ mol·L⁻¹) [31–32] 处理 6 d, 或经细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (Cdk2) 抑制剂 3-[1-(3H)-Imidazol-4-yl)-meth-(Z)-ylidene]-5-methoxy-1,3-dihydro-indol-2-one (SU9516) (5 μ mol·L⁻¹) [33–34] 在脂肪形成诱导的前三天进行处理。

2.3. 油红 O 染色检测与甘油三酯定量

油红 O 染料能与甘油三酯结合从而检测成脂分化程

度。油红O工作溶液的制备：用4 mL蒸馏水稀释6 mL油红O溶液（O1391, Sigma-Aldrich）并经过0.22 μm 过滤器过滤。实验设计4个细胞处理组，分别进行0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHS处理。其中第1组作为对照，是DMEM培养的WT前脂肪细胞；第2组是在ADP中培养的WT前脂肪细胞；第3组是在ADP + DL-炔丙基甘氨酸（PPG）培养的WT前脂肪细胞，DL表示外消旋混合物；第4组是在ADP中培养的CSE-KO前脂肪细胞。脂肪生成诱导6 d后，用磷酸盐缓冲盐水（PBS）洗涤细胞三次，并用4%福尔马林溶液固定1 h。去除福尔马林后，用PBS洗涤细胞三次。接下来，将500 μL 的60%异丙醇添加到培养板中，然后快速移除。待细胞培养板完全干燥后，向细胞中加入500 μL 油红O工作液。加入油红O抚育20 min后，在显微镜下观察细胞的染色情况。如果染色没有被细胞吸收，可将细胞在油红O溶液中再保存10 min。然后用蒸馏水洗涤细胞以除去所有染色残留物并再次用显微镜观察。图像拍摄使用的是IX71倒置显微镜（Olympus，加拿大）。所有图像均使用DP2-BSW 2.1q版软件进行处理。

为了量化染色细胞中的甘油三酯，使用1 mL 100%异丙醇从细胞中提取油红O色剂，并通过上下吹打将细胞与异丙醇充分混合。使用FLUOstar OPTIMA微孔板分光光度计（BMG LABTECH）在510 nm处读取异丙醇中所得油红O提取物的吸光度。根据Ramirez-Zacarias等[35]的报道制备了三油酸甘油酯校准曲线。先把代表脂质积累水平的三油酸甘油酯以不同浓度溶解在氯仿中，然后用氮气吹扫蒸发溶剂并在通风橱中放置过夜。三油酸甘油酯在Eppendorf管中固化，并用油红O作溶液染色。20 min后油红O残留物用双蒸馏水洗涤3~5次。最后用异丙醇提取被三油酸酯吸收的油红O，并在510 nm处检测其吸光度。根据固定量的甘油三酯制作标准曲线，用于测定前脂肪细胞中未知的甘油三酯含量（mg）。

2.4. 非酯化游离脂肪酸含量

使用Elabscience（中国）NEFA比色测定试剂盒测定WT和CSE-KO小鼠的脂肪组织或前脂肪细胞的非酯化游离脂肪酸（FFA）含量[36–37]。组织或细胞的匀浆用于测量总游离脂肪酸含量。将总脂质积累同脂质含量与FFA浓度的比率进行比较，后者可以描述为：每毫克蛋白质的FFA释放量（ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）除以每毫克蛋白质的脂质含量（mg）。

2.5. 脂肪细胞直径和细胞表面积

使用ImageJ 1.52a软件（NIH，美国）测量油红O染

色细胞的直径和表面积并进行数字分析。

2.6. 小鼠脂肪细胞的葡萄糖消耗测定

脂肪形成诱导20 d后，先用PBS洗涤细胞，再用含有低葡萄糖水平（5.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）的无胎牛血清DMEM对细胞进行饥饿。24 h后用PBS重新洗涤细胞，将细胞置于含有10% FBS、25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖和50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胰岛素的DMEM培养液中培养12 h。收集培养基并使用美国Abcam公司的葡萄糖比色测定试剂盒（ab282922）检测葡萄糖浓度。葡萄糖消耗计算通过比较原始葡萄糖浓度（25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）与在培养基中孵育12 h后的浓度之间的差异得到。

2.7. 试剂与抗体

胰岛素和DEX购自Sigma-Aldrich公司，IBMX购自美国ACROS公司，NaHS购自美国Calbiochem公司。磷酸丝裂原活化蛋白激酶激酶抗体（MEK）（1：1000, sc-81503）、MEK（1：1000, sc-81504）、激素敏感性脂肪酶抗体（HSL）（1：1000, 4107）和p-HSL抗体（1：1000, 45804）购自美国Santa Cruz Biotechnology公司。磷酸化Akt抗体（1：1000, 9271）、Akt抗体（1：1000, 9272）、磷酸化胰岛素受体 β 抗体（Ir β Y1146）（1：500, 3023）、Ir β 抗体（1：500, 3025）、脂联素抗体（1：1000, 2789）、PPAR γ 抗体（1：1000, 95128）、CCAAT/增强子结合蛋白 β （C/EBP β ）抗体（1：1000, 3082）和甘油醛-3-磷酸脱氢酶抗体（GAPDH）（1：2000, 5174）购自英国Cell Signaling Technology公司。cavivasertib购自美国MedChem express公司，SU9516购自美国Selleck Chemicals LLC公司。

2.8. 蛋白质印迹法

首先用含有蛋白酶抑制剂混合物（Sigma-Aldrich）的RIPA缓冲液在冰上裂解细胞。将等量的变性蛋白质（每孔60 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ ）用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分离，然后转移至硝酸纤维素膜（Pall Corporation，美国）。此后，将膜用5%牛奶封闭，然后在振荡器上与一抗（1：1000）在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。使用过氧化物酶偶联的二抗（1：2000）进行孵育，并通过增强的化学发光（GE Healthcare，英国）显示特定的蛋白质条带。

2.9. 核糖核酸的提取和逆转录聚合酶链反应

为了进行核糖核酸（RNA）分离和逆转录聚合酶链反应（RT-PCR），使用TriReagent（Invitrogen，美国）从

细胞中分离总RNA。第一链互补脱氧核糖核酸 (cDNA) 是根据 New England Biolabs 公司 (加拿大) 的使用说明通过逆转录酶和随机寡核苷酸引物进行逆转录而制备的。基因引物信息如下: *C/EBPβ* 的引物是 5'-ACAGCGACGAG-TACAAGATCC-3' (上游) 和 5'-GACAGTTGCTCCACCTTCTTCT-3' (下游); 细胞分裂周期 45 基因 (*Cdc45l*) 的引物是 5'-AAGGGGAATCTGCGAGAAAT-3' (上游) 和 5'-GGCCAGGAATTTATGCTTGA-3' (下游); 微染色体维持 3 (*Mcm3*) 的引物是 5'-TGAGCAAGACTGTGGACCTG-3' (上游) 和 5'-CTTCCTCCTTTTCCGCTTCT-3' (下游); *go-ichi-ni-san1* (*Gins1*) 的引物是 5'-CTGGACGAGGGGATCTGATA-3' (上游) 和 5'-CCCATATTCCCACCTGAGTG-3' (下游); *Cdc25* 引物是 5'-CCATTCAGATGGAGGAGGAA-3' (上游) 和 5'-TTTAAGGCTCCCAGGATGTG-3' (下游)。使用 SYBR green (BioRad, 美国) 聚合酶链反应 (PCR) 预混液 (Bio-Rad, 加拿大) 对信使 RNA (mRNA) 表达水平进行定量。该反应使用的仪器和软件分别是 iCycler iQ5 装置 (Bio-Rad) 和 iCycler 光学系统软件 (版本 3.1)。通过使用 “ $2^{-\Delta\Delta CT}$ ” [38] 计算相对 mRNA 定量, 其中 ΔCT 是给定目标互补脱氧核糖核酸和内源性 β -肌动蛋白基因参考的阈值循环之间的差异。 $\Delta\Delta CT$ 是目标样本和对照样本之间的 ΔCT 差异, 对照样本是未经 ADP 处理的细胞的结果。

2.10. 统计分析

所有数据均以平均值 \pm 标准误差的形式呈现。统计分析通过单向方差分析 (ANOVA) 和 Dunnett 多重比较事后检验进行。 p 值低于 0.05 被认为具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 脂质含量和 H_2S 的产生率

CSE-KO 脂肪组织包括皮下和内脏脂肪, 与 WT 脂肪组织相比脂质含量和 H_2S 产生率都显著降低[图 1 (a)]。WT 和 CSE-KO 脂肪组织之间 FFA 浓度的差异不显著[图 1 (b)]。从 WT 和 CSE-KO 小鼠分离的脂肪细胞, 经 NaHS 处理, 细胞中的 FFA 浓度没有变化[图 1 (c)]。

HSL 被认为是脂肪组织中甘油三酯分解代谢为游离脂肪酸的主要酶[39]。HSL 的磷酸化激活在 WT 和 CSE-KO 脂肪组织中处于相同水平[图 1 (d)、(e)]。与之类似的是 WT 和 CSE-KO 原代脂肪细胞的磷酸化 HSL 水平之间没有显著差异, 它们根本不受 NaHS 的影响[图 1 (d)、(f)]。

WT 中脂肪形成标志物 PPAR γ 和 C/EBP β 的表达水平都比 CSE-KO 脂肪组织和原代脂肪细胞中的高[图 1 (d)、(g) 和 (h)]。经 NaHS 处理, 使得 WT 和 CSE-KO 小鼠的原代脂肪细胞中这两种标记物的表达增加[图 1 (d)、(h)]。

3.2. 小鼠前脂肪细胞的脂肪生成

用 NaHS 处理 (10~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 前脂肪细胞会使其脂质积累增加, 其中用 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHS 处理的前脂肪细胞中检测到的油红 O 染色结果最高。在没有分化培养基 (对照组) 的条件下, 用 10~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHS 处理不会影响 WT 小鼠前脂肪细胞的脂肪形成。用 CSE 抑制剂 PPG 孵育 WT 前脂肪细胞显著降低脂肪形成[图 2 (a)、(b)]。分化的 CSE-KO 前脂肪细胞 (KO + ADP) 的油红 O 染色结果明显低于 WT 前脂肪细胞组。在没有 NaHS 处理的情况下, CSE-KO + ADP、WT + ADP + PPG 和非分化对照组之间并没有显著差异。然而经 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaHS 处理, PPG 预处理组和 CSE-KO 前脂肪细胞组的细胞均发生分化。

3.3. NaHS 诱导的脂肪生成时间依赖性

图 3 (a) 描述的是 WT 小鼠前脂肪细胞成脂诱导 6 d 的实验设计。不同时期分化细胞也都经 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHS 处理[图 3 (b)]。NaHS 处理的前两天并没有引起分化细胞油红 O 染色的显著变化。延长 NaHS 处理时间到 4 d 和 6 d 后, 分化细胞中油红 O 染色和脂质积累的程度有显著的增加[图 3 (c)、(d)]。

3.4. NaHS 诱导的前脂肪细胞肥大

将 WT 小鼠前脂肪细胞培养 20 d 以诱导脂肪分化。单独使用 NaHS 处理的前脂肪细胞在孵育 10 d 后无法存活并死亡。在用 PA 或 HG/HI 诱导脂肪形成 20 d 后, 脂肪细胞和脂滴变得明显大于仅被 ADP 处理的细胞。NaHS 的处理进一步增强了棕榈酸 PA 和高葡萄糖 HG/高胰岛素 HI 的作用[图 4 (a)]。此外, 所有 NaHS 处理组的葡萄糖消耗量显著高于非 NaHS 处理组[图 4 (b)]。本实验使用 ImageJ 软件计算脂滴直径和细胞大小[图 4 (c)、(d)]。

3.5. NaHS 诱导的小鼠前脂肪细胞增生

分化前脂肪细胞经 NaHS 处理 (ADP + NaHS) 24 h 的实验结果显示, 有丝分裂克隆扩增 (MCE) 基因 (*C/EBPβ*、*Cdc45l*、*Mcm3* 和 *Cdc25*) 均有上调, 但 *Gins1* 除外[图 5 (a)]。溴脱氧尿苷 (BrdU) 测定数据证实, 10~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaHS 处理增加了 ADP 处理的分化细胞和

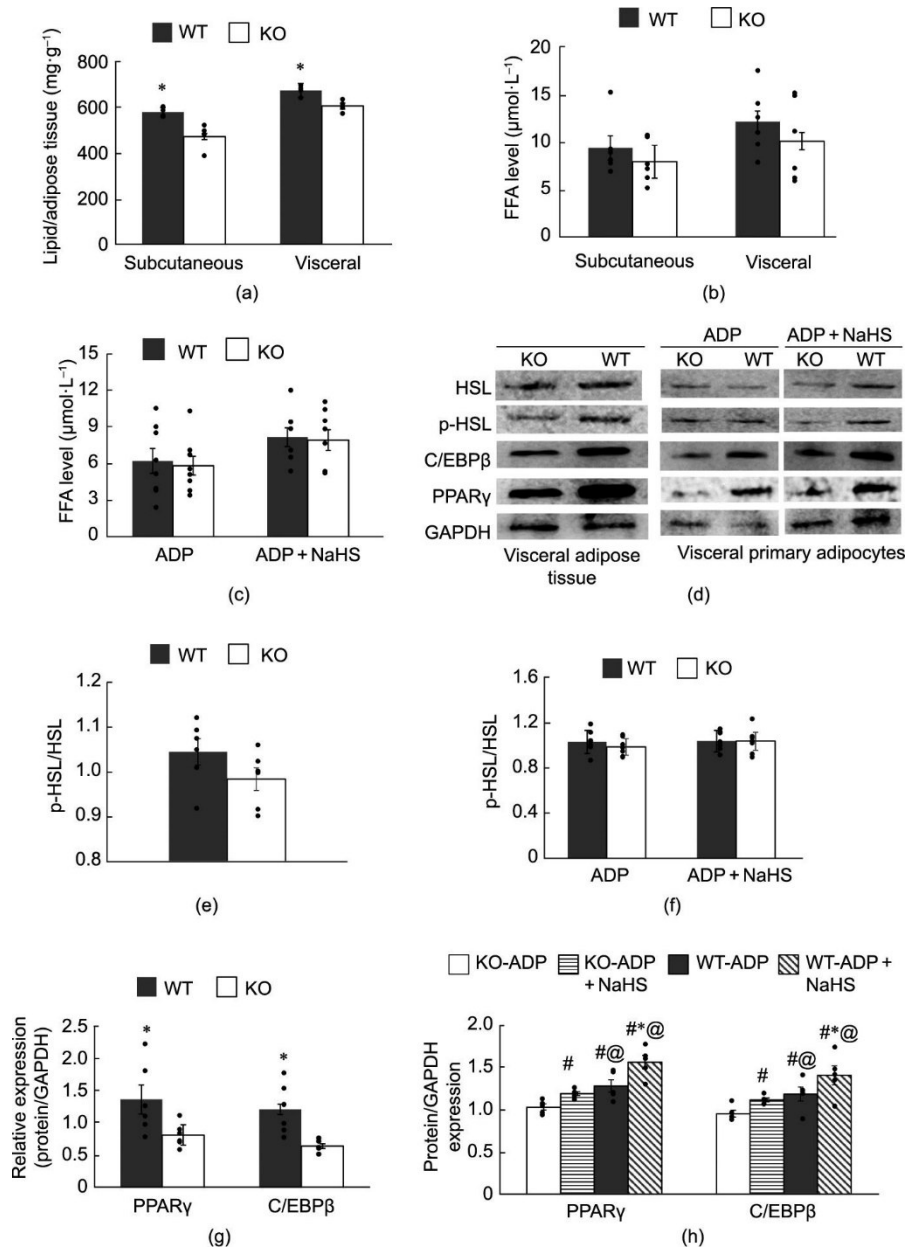


图 1. CSE-KO 和 WT 小鼠脂肪组织中的脂质积累和脂肪分解。(a) 皮下和内脏脂肪组织中的脂质含量 (* $p < 0.05$, 脂肪组织组间比较, $n = 6$)。 (b) 每毫克组织每毫克脂质的内脏和皮下脂肪组织的游离脂肪酸水平 (μmol) (每组 $n = 6$)。 (c) 从 WT 和 CSE-KO 小鼠中分离出的原代脂肪细胞中的 FFA 水平 (μmol), 即每 10^6 个细胞的每毫克脂质 ($n = 6$)。 (d) 内脏脂肪组织和小鼠原代内脏脂肪细胞中不同蛋白质的表达水平。 p-HSL/HSL 在内脏脂肪组织 (e) 和小鼠原代内脏脂肪细胞 (f) 中的表达水平 ($n = 6$)。 PPAR γ 和 C/EBP β 在内脏脂肪组织 (g) 和小鼠原代内脏脂肪细胞 (h) 中的表达水平 ($n = 6$)。 KO-ADP 和 WT-ADP 分别来自 CSE-KO 和 WT 小鼠的 ADP 诱导的脂肪细胞。 # $p < 0.05$ vs. KO-ADP; @ $p < 0.05$ vs. KO-ADP + NaHS; * $p < 0.05$ vs. WT-ADP。

非分化对照细胞的增殖[图 5 (b)]。 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 测定结果表明, 分化细胞经 NaHS 处理后活细胞的数量增加[图 5 (c)]。

接下来研究了 NaHS 对负责细胞周期从 G0 到 G1 的调节因子的影响。如图 5 (d) 所示, 与非分化对照细胞相比, 在 ADP 的培养条件下, 脂肪形成分化显著降低了 p27 (细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂) 的蛋白质表达水平,

但 Cdk2 的蛋白质表达水平没有降低。在 NaHS 处理 (ADP + NaHS) 的脂肪形成分化组中 p27 的表达进一步降低, 但 Cdk2 的表达有所增加。对比非分化对照细胞和用 NaHS 处理 (Ctrl + NaHS) 的非分化细胞, 尽管变化并不显著, 但分别观察到 Cdk2 和 p27 表达的增加和减少趋势。

3.6. NaHS 对 MAPK 和 PI3/Akt 通路的影响

NaHS 处理的非分化细胞, 不会使 Ir β 磷酸化[图 6 (a)]。然而, NaHS 处理 (ADP + NaHS) 的分化细胞,

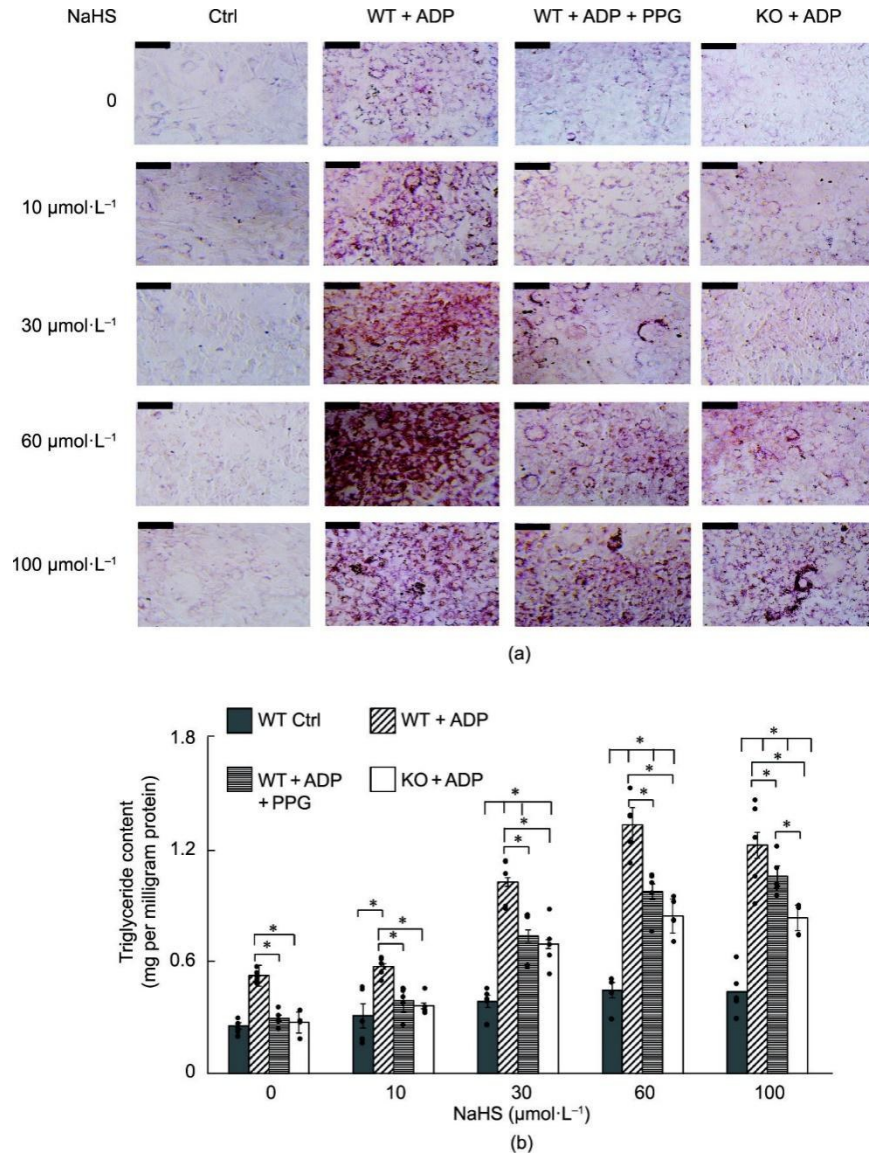


图2. 从WT和CSE-KO小鼠分离的前脂肪细胞的脂肪形成。(a) 细胞在不同条件下培养6 d; 它们的分化通过油红O染色显示 (Ctrl: 未经任何处理的WT细胞组; 比例尺代表200 μm)。 (b) 不同组小鼠脂肪细胞中甘油三酯的积累 (* $p < 0.05$; $n = 6$)。Ctrl代表对照组。

在最初的6 h后就发现Ir β 和MEK磷酸化增加[图6 (a)、(b)]。单独用ADP培养, 结果显示Ir β 的磷酸化以时间依赖性方式增加。通过ADP诱导或NaHS处理, MEK磷酸化在所有时间点 (即第6 h、12 h和24 h) 均有增加[图6 (b)]。

NaHS处理分化前脂肪细胞 (NaHS + ADP) 6 d后, 与单独使用ADP或NaHS处理相比, 前者显著增加了Akt的磷酸化和脂联素的表达[图6 (c) ~ (e)]。已有研究表明脂联素可促进脂肪生成并增加成熟前脂肪细胞中的脂质含量[16]。

3.7. 抑制Cdk2和Akt对小鼠脂肪细胞的影响

在前三天用或不用NaHS处理的前脂肪细胞分化过程

中使用SU9516抑制Cdk2。SU9516的处理显著抑制了NaHS处理组和未处理组的细胞增殖[图7 (a)]。SU9516自身对NaHS处理的分化前脂肪细胞的活力没有显著影响[图7 (a)]。在分化前脂肪细胞的全部6 d中持续使用Akt的抑制剂caspasertib, 如图7 (b)所示, NaHS对分化的脂肪细胞中脂质积累的刺激作用被消除。MTT测定结果证实了SU9516对前脂肪细胞活力具有抑制作用[图7 (c)]。油红O和脂质定量测定显示caspasertib抑制脂肪生成和脂质积累[图7 (d)]。

4. 讨论

脂肪细胞是特异型细胞, 在能量过剩期间积累大量甘

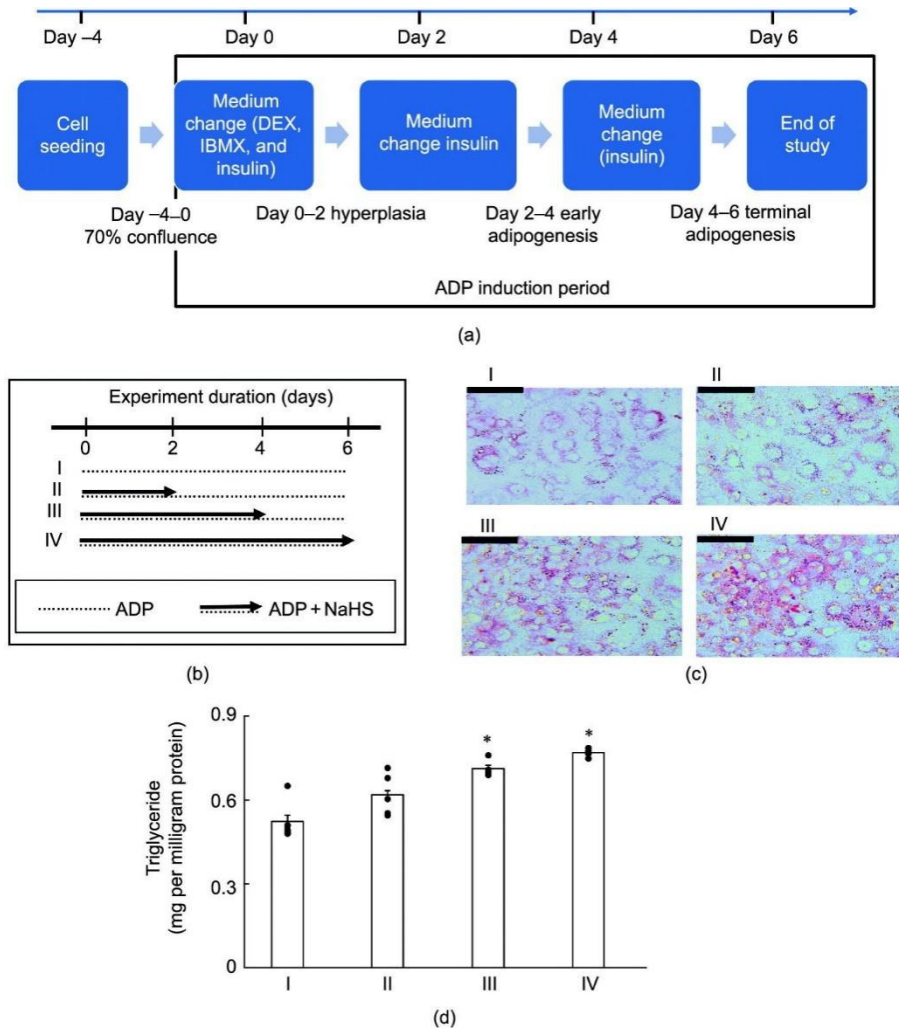


图3. NaHS 诱导的脂肪形成的时间线。(a) 脂肪生成诱导设计方案。(b) 不同实验组 (I 组、II 组、III 组、IV 组) 的 NaHS 处理方案。箭头表示 H₂S + ADP 处理的持续时间, 虚线仅表示 ADP 处理的持续时间。(c) 前脂肪细胞与 WT 小鼠脂肪组织的分化; 来自所有组 (I ~IV) 的细胞用油红 O 染色以表示脂肪形成分化 (比例尺代表 200 μ m; n = 6)。(d) 分化的小鼠前脂肪细胞组中甘油三酯的积累; 6 d 后使用三油酸甘油酯标准曲线对甘油三酯进行量化 (* $p < 0.05$ vs. I 组; n = 6)。

油三酯, 然后在能量不足时消耗储存的甘油三酯[40–41]。脂肪细胞的发育始于成为脂肪细胞谱系的间充质干细胞, 即前脂肪细胞[40–42]。脂肪形成是伴随着前脂肪细胞形状、大小和其他形态和生理特征的变化而发生的。已有报道显示大鼠主动脉周围、附睾、肾周和棕色脂肪组织会产生内源性 H₂S [42–43]。除了 CSE 之外, 另一种产生 H₂S 的酶是胱硫醚 β -合成酶 (CBS)。尽管已在大鼠脂肪组织中检测到 CSE 蛋白和 CBS 转录本, 但这些组织中 H₂S 生成的主要来源还是 CSE, 因为生成的 75%~80% H₂S 可以被 CSE 抑制剂 PPG 或 β -cyano-L-丙氨酸所抑制[44]。之前报道, 利用 RT-PCR 和蛋白质印迹方法, CBS 和 CSE 在 3T3L1 前脂肪细胞、小鼠白色脂肪组织 (附睾、肾周和肠系膜) 和棕色脂肪组织中表达, 其中 CBS mRNA 和蛋白质水平均低于 CSE [15]。在 3-巯基丙酮酸硫转移酶 (MST) 催化的作用下还存在一种 H₂S 生成途径。已有研

究表明, 胰岛素、地塞米松和 IBMX 的混合物可刺激脂肪生成, 并与 CBS、CSE 和 MST 的上调相关, 以及增加 3T3L1 细胞中的 H₂S 浓度[13,15,44]。由于 CSE 在内脏和皮下脂肪组织中的表达比 CBS 和 MST 更丰富[15], 因此 CSE 对脂肪组织中 H₂S 的产生贡献最大。

如果生长超过 70% 汇合度并随后进行传代, 3T3L1 细胞将失去在激素刺激下完全分化的能力[45–46]。而原代培养的前脂肪细胞表现出与特定组织相似的特征, 为研究脂肪组织的复杂性提供了生理学相关模型。此外, 对于来自脂肪基质细胞的前脂肪细胞, 可以长时间冷冻保存, 并使其增殖和分化能力的损失最小。进而原代培养的前脂肪细胞可以分离自具有不同遗传背景的 WT 或转基因动物, 这对于 3T3L1 等同质细胞系是不可能的[47]。

本研究使用的脂肪组织取自 5 周龄大的小鼠。在这个年龄段, 小鼠产生比成熟脂肪细胞更多的未分化前脂肪细

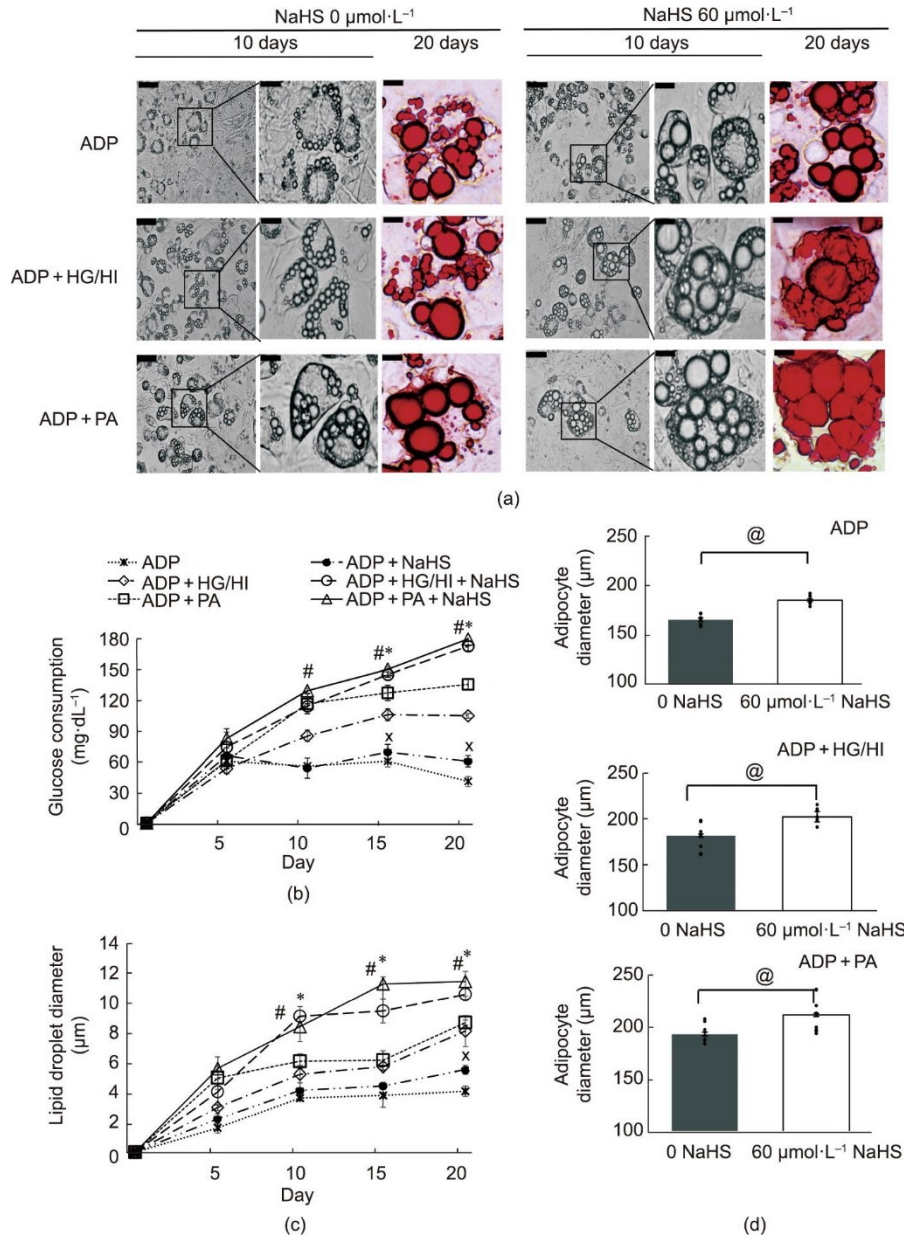


图 4. NaHS 诱导的 WT 小鼠脂肪组织分化的脂肪细胞肥大。小鼠原代前脂肪细胞被诱导 20 d。(a) 培养第 10 天 (灰色) 和第 20 天 (油红 O 染色) 的细胞图像。比例尺在两个 NaHS 处理组的左侧图中为 200 μm , 在中间和右侧图中为 50 μm 。(b) 用含有 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖的新鲜 DMEM 孵育脂肪细胞 12 h 后每毫克蛋白质的葡萄糖消耗量 ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) ($n=6$)。使用 ImageJ 软件测量脂肪滴直径 (c) 和脂肪细胞直径 (d) ($n=10$; * $p < 0.05$ vs. ADP + PA; # $p < 0.05$ vs. ADP+HG/Hi; \times $p < 0.05$ vs. ADP; @ $p < 0.05$)。HG: 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, HI: 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

胞[30]。原代前脂肪细胞培养中有两种类型的细胞污染：红细胞和内皮细胞。在消化之前，首先从脂肪组织中去除了所有可见的血管；然后，使用红细胞裂解缓冲液裂解红细胞。来自血管的内皮细胞在离心后聚集在一起，并使用 40 μm 孔径过滤器过滤掉。如果在培养过程中注意到任何异常细胞形状（相对于前脂肪细胞的纺锤形），则标记该区域并使用细胞刮刀刮擦。原代前脂肪细胞培养物显示没有内皮细胞污染，这会形成特征性的鹅卵石单层。成熟的脂肪细胞（即载脂细胞）存在于漂浮层中，在每次对消化的组织样本进行离心分离时，都会丢弃漂浮层。为了确

认脂肪细胞谱系，在分化过程结束时观察了脂肪细胞特异性生物标志物 PPAR γ 和脂肪酸结合蛋白 4 (FABP4) 的蛋白质表达[48]。冷冻保存只具有 PPAR γ 和 FABP4 表达的前脂肪细胞培养批次，并用于进一步研究。

CSE-KO 小鼠作为一种独特的模型可以用于评估 CSE 催化产生的内源性 H $_2$ S 在脂肪形成过程中的作用[4]。在本研究中，发现 CSE-KO 小鼠脂肪组织中的脂质积累显著降低，其内源性 H $_2$ S 水平显著低于 WT 小鼠的脂肪组织。作为首次报道的直接证据，结果表明内源性 H $_2$ S 有助于增加脂肪组织中的脂质积累。PPG 对 CSE 的抑制降低了脂肪

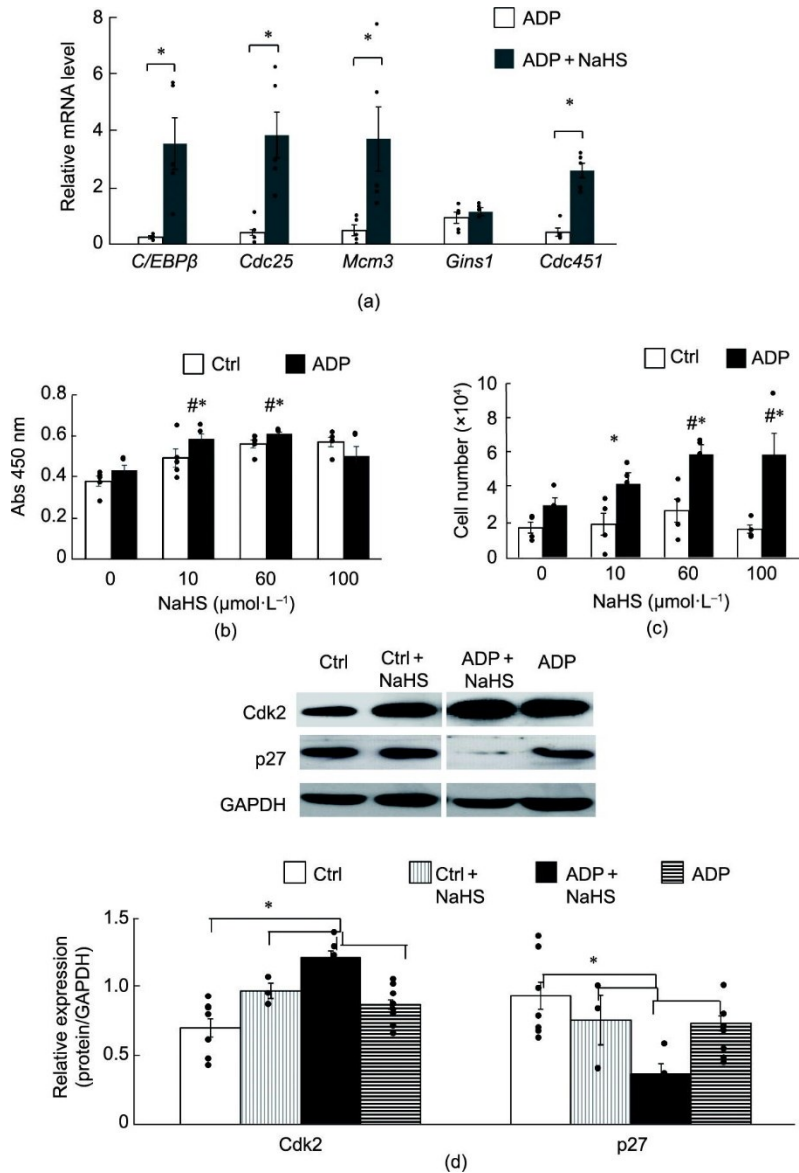


图5. 培养24 h后NaHS诱导的前脂肪细胞增殖。(a)在有或者无60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHS的情况下,检测前脂肪细胞中增殖基因的mRNA水平 ($n=5$)。 (b) BrdU测定不同条件下的细胞增殖 ($n=5$)。 (c) MTT测定不同条件下的细胞活力 ($n=4$)。 (d)通过蛋白质印迹法检测不同条件下前脂肪细胞中p27和Cdk2的蛋白质水平 ($n=6$)。GAPDH用作上样对照 (* $p < 0.05$ vs. Ctrl; # $p < 0.05$ vs. 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的NaHS)。

形成的程度,进一步说明CSE在脂肪形成过程中的作用(图2)。

本研究显示在脂肪形成刺激下,用外源性 H_2S (NaHS, 10~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理小鼠前脂肪细胞会显著增加脂肪形成和脂质积累。在CSE抑制剂PPG存在的情况下或CSE-KO前脂肪细胞中,WT前脂肪细胞在分化时表现出脂质积累减少,证明了CSE产生的内源性 H_2S 在脂肪生成中的作用。在上述条件下,NaHS形式的外源性 H_2S 也增加了脂肪形成(图2)。显然,本研究表明 H_2S 对脂肪形成的影响取决于脂肪形成诱导剂,因为在没有脂肪形成诱导剂的情况下,前脂肪细胞中没有观察到脂质积累。此外, H_2S 处理培养的脂肪细胞不会改变脂肪分解,因为它

不会改变FFA浓度或HSL磷酸化。这些观察结果表明 H_2S 刺激的脂肪生成和脂质积累与脂肪分解无关。

胰岛素是脂肪生成的主要激素诱导剂,它通过胰岛素受体(IR)激活磷脂酰肌醇3-激酶(PI3-K)/Akt通路,从而促进脂肪细胞分化。IBMX和地塞米松联合调节PPAR γ ,通过蛋白激酶A(PKA)通路促进脂肪生成。Xue等[49]报道了外源性 H_2S 通过增加IR敏感性激活血管和3T3L1细胞中的PI3K/AKT通路,从而改善体外和体内的葡萄糖摄取。胰岛素敏感性可以通过IR底物蛋白IRS1和IRS2的丝氨酸/苏氨酸磷酸化来调节。Akt是脂肪生成的重要下游介导蛋白。实验结果已表明,抑制Akt的活性会导致脂肪生成受抑制[图7(b)、(d)]。此外,抑制Akt

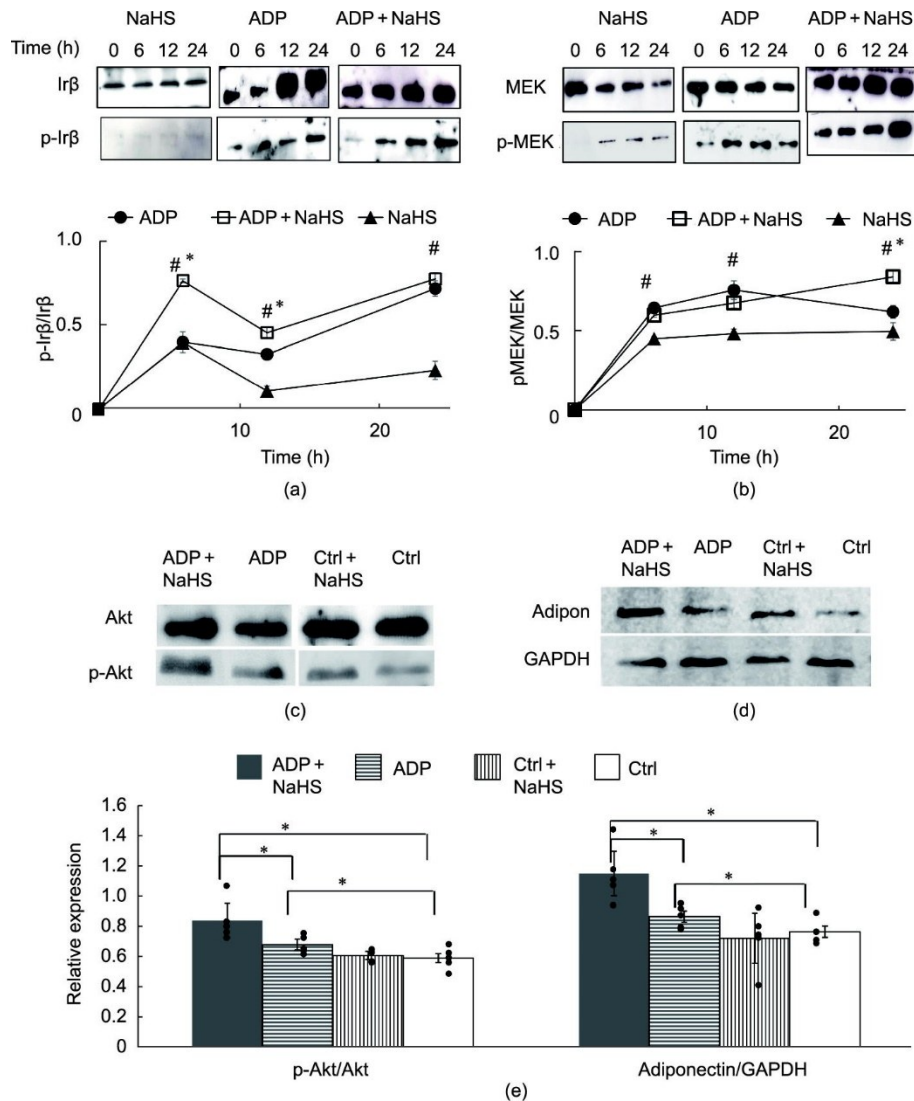


图6. NaHS激活的MEK/细胞外信号调节激酶(ERK)和Akt通路。用 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHS处理从WT小鼠分离的前脂肪细胞,并在指定时间用或不用ADP诱导。(a) Ir β (p-Ir β)蛋白的磷酸化。(b) MEK (p-MEK)蛋白的磷酸化。脂肪形成诱导6 d后的Akt磷酸化水平(c)和脂联素表达水平(d) ($n=6$; $*p<0.05$ vs. ADP; $\#p<0.05$ vs. NaHS)。(e) NaHS激活的MEK/ERK和Akt通路。

通路可降低NaHS诱导的前脂肪细胞中甘油三酯的积累。因此,研究证明NaHS刺激其下游Akt信号的传导,并诱导小鼠前脂肪细胞中的脂肪形成。

成脂分化有两个主要阶段:早期分化或MCE和终末分化。MCE是一个以C/EBP β 增加为标志的同步过程。当暴露于适当的环境和遗传诱因时,前脂肪细胞会经历MCE,增加DNA复制,形成克隆,并转化为脂肪细胞表型[50]。脂滴积累发生在终末期[40,42,50-53],与PPAR γ 上调相关。每个脂肪形成的阶段都表现为不同的转录和遗传变化和调节[52-54]。通过油红O染色和脂质积累的实验结果证明,在ADP培养条件下延长H₂S处理时间到4 d和6 d会导致小鼠前脂肪细胞中更大程度的脂肪形成。NaHS在成脂诱导下上调MCE基因(*Cdc45l*、*Mcm3*和*Cdc25c*)的表达和Cdk2蛋白的表达(图5)。H₂S还可以

通过磷酸化激活MEK(图6)。Akt和MEK磷酸化通过PPAR γ 反式激活为脂质积累和分化铺平道路[15],并以此标志为终末期。因此,H₂S通过作用于其早期和终末阶段来增加脂肪生成。

在之前的研究中阐述了H₂S会导致3T3L1细胞中的PPAR γ 巯基化[15]。本研究证实WT脂肪组织比CSE-KO脂肪组织具有更高的C/EBP β 和PPAR γ 表达。同样,在脂肪形成诱导的前两天,外源性H₂S会增加原代前脂肪细胞中C/EBP β 和PPAR γ 的表达。胰岛素等成脂诱导剂通过MAPK通路启动MCE,从而增强C/EBP β 的活性[6,55]。C/EBP β 是启动转录级联反应的关键因素,该级联反应最终导致PPAR γ 的表达[6]并诱导PPAR γ 的巯基化增加[15]和脂肪细胞分化。在脂肪形成诱导后24 h内,MAPK[MEK/细胞外信号调节激酶(ERK)]和Cdk2将Threo-

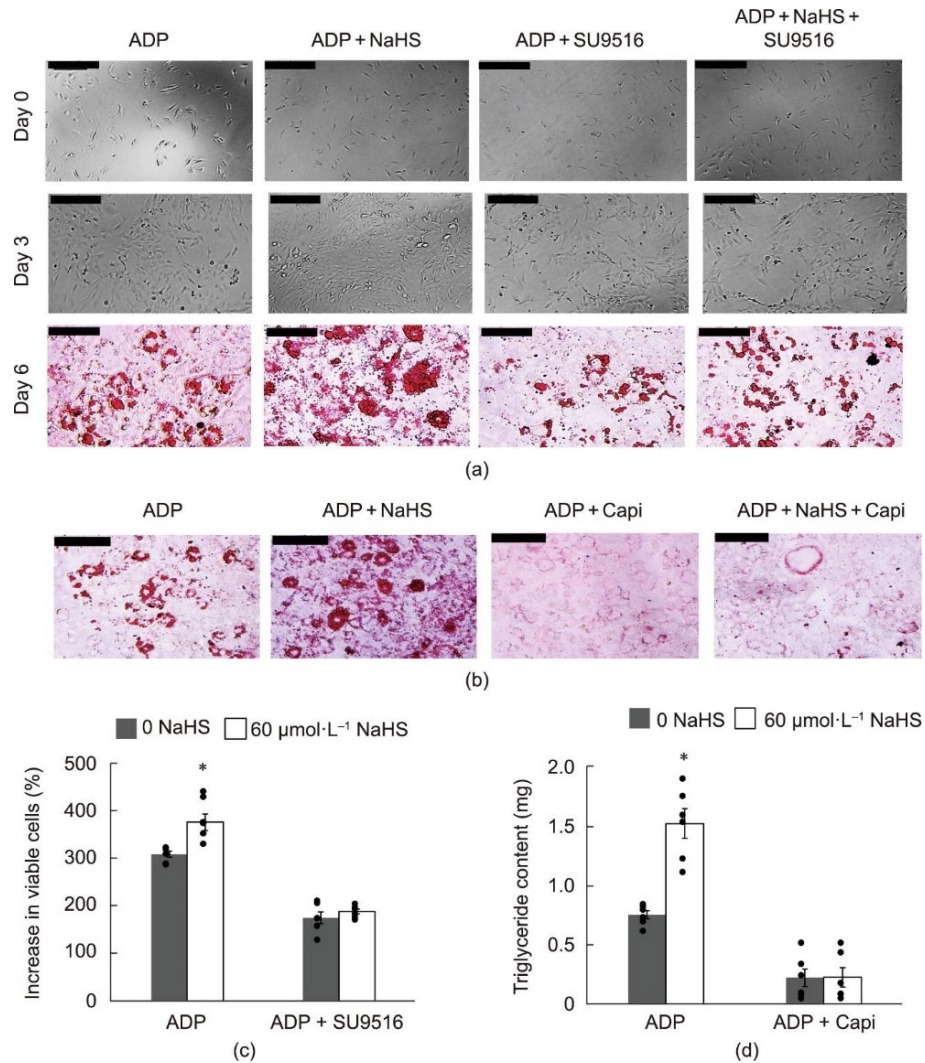


图7. Cdk2和Akt介导NaHS刺激的小鼠脂肪细胞增生和脂肪形成。(a) SU9516抑制Cdk2活性后脂肪细胞增生和脂质积累。(b) 油红O染色测量capiasertib抑制Akt活性后脂肪细胞中的脂质积累。(c) MTT方法检测Cdk2抑制剂(SU9516)对脂肪细胞活性的影响。使用以下公式计算细胞活力: 第3天/第0天 \times 100%。(d) Akt抑制剂capiasertib对不同组小鼠脂肪细胞中每毫克蛋白质甘油三酯积累(mg)的影响($n=6$; $*p<0.05$)。

nine-188磷酸化, C/EBP β 被激活[6,15,56]。H₂S处理显著上调分化细胞中Cdk2和MEK的表达,也使得C/EBP β 基因的表达上调[图5(a)]。此外, C/EBP β 可刺激有利于激活DNA解旋酶的克隆扩增基因,从而有助于DNA复制。

C/EBP β 的激活会增加重要的细胞周期基因*Cdc45l*、*Mcm3*、*Gins1*和*Cdc25c*的表达。这种情况下,前脂肪细胞中的DNA复制会被上调,进而使细胞增殖[54–55,57]。细胞周期基因通过DNA解旋酶发挥作用。复制性DNA解旋酶的核心由6种不同的多肽(Mcm2至Mcm7)组成。复制解旋酶的激活是通过与Cdc45和异四聚体Gins形成复合物,即Cdc45-Mcm2-7-Gins(CMG)复合物。Mcm3是Mcm2-7复合体的一个组成部分,而Gins1是Gins(go-ichi-ni-san)复合物亚基[22,58–59]。因此,CMG复合物可以调节真核染色体DNA复制。Cdc25是一种磷酸酪氨

酸磷酸酶,其作用是有助于细胞进入S期和M期。以上这些基因的敲除会导致3T3L1前脂肪细胞中MCE的抑制[22,58–60]。这种抑制作用证明上述基因是C/EBP β 促进MCE的关键下游效应子。

Cdk2是一种重要的细胞周期调节因子,可通过G1/S转换控制克隆扩增。使用Cdk2抑制剂(SU9516)阻断前脂肪细胞进入S期,在前三天抑制了前脂肪细胞的克隆扩增[图7(a)]。较低的克隆扩增导致脂肪细胞中甘油三酯的积累显著降低[图7(a)、(c)]。该实验证明,Cdk2调节的前脂肪细胞克隆扩增是脂肪细胞分化所必需的。

本研究证明H₂S能促进脂肪细胞分化早期的MCE进程,其中显著上调的Cdk2和被抑制的p27水平证明了这一点。此外,H₂S处理显著增加了除*Gins1*以外所有其他C/EBP β 靶基因的表达[图5(a)]。Gins、Cdc45与MCM2-7的结合所得复合物提高了对DNA的亲和力,并

使结合效果大于单独的MCM复合物[59]。虽然 *Gins1* 的表达在 H_2S 处理的分化细胞中没有变化，但由于 *Mcm* 和 *Cdc45* 基因引起的整体DNA解旋酶反应显著增加，从而增加DNA复制和MCE。

利用BrdU和MTT两种检测方法，发现 H_2S 增加分化和非分化前脂肪细胞的增殖[图5(b)]，从而证明 H_2S 可以诱导MCE。已有研究表明 H_2S 在间充质干细胞[28,61]和其他非脂肪细胞（如心肌细胞和脐静脉内皮细胞）中具有类似的促增殖作用[62–64]。有趣的是，MTT测定显示 H_2S 仅在脂肪形成诱导下增加活细胞数量[图5(c)]。这两个实验的不同点在于BrdU检测的是S期DNA复制的程度，但MTT检测的是细胞活力的终点。脂肪形成诱导可能会推动细胞通过细胞周期进程的所有检查点，并且 H_2S 会增加这些细胞的活力。

通过初始祖细胞重新分化，脂肪细胞肥大或增生可以形成脂肪量扩张[65]。在对细胞周期的研究中，发现 H_2S 通过增加细胞分裂募集额外的前脂肪细胞，进一步增加细胞的脂质质量。在MCE和增生之后，脂滴以多室模式积累和终末分化，其中脂肪细胞包含较大的脂滴。到最后，细胞体积增大，同时积累脂质空泡，脂质空泡聚结并最终充满细胞[40,42]。PI3-Akt通路调节脂肪细胞中的脂质积累和脂肪细胞分化（脂肪合成）[66–68]。在第2天到第6天的末期，随着时间的推移， H_2S 促进ADP诱导的脂肪形成（图3）。此外，发现 H_2S 可以作为细胞周期进程的启动因子影响胰岛素信号通路，从而有助于脂肪生成过程中启动MCE。胰岛素刺激还会导致Irβ的β亚基发生自身磷酸化[图6(a)]。 H_2S 还显著刺激ADP诱导的MEK和Akt激活[图6(b)、(c)]。这些结果强烈表明， H_2S 可以与ADP一起通过激活Irβ以及MAPK和Akt的下游信号来改善胰岛素信号通路。由于没有胰岛素，在没有ADP的情况下，单独的 H_2S 不能使Irβ磷酸化。本文研究结果与Manna等[69]的结果一致，其研究表明 H_2S 可以抵御3T3L1细胞中高血糖症的胰岛素抵抗。补充维生素D会增加CSE活性，同时产生更多的 H_2S 。然后CSE/ H_2S 系统激活PI3/Akt通路和葡萄糖转运蛋白4（GLUT4）易位，从而增加葡萄糖利用[69]。

总结本文研究结果（图8）， H_2S 可以通过增加脂肪细胞分化、肥大和增生来提高脂肪细胞扩张和小鼠脂肪细胞中的脂质积累。内源性和外源性 H_2S 均可以通过MEK和Akt调节的C/EBPβ/α和PPARγ活化，以及通过在MCE基因上调之后发生的C/EBPβ激活，增加小鼠脂肪细胞的分化。 H_2S 通过增加Cdk2和减少p27的表达，促进细胞周期进程和增生。最后， H_2S 还可以增加负责激活下游的其他

靶蛋白（如Akt）的Irβ磷酸化，导致小鼠脂肪细胞中积累更多的脂质和脂肪细胞肥大。

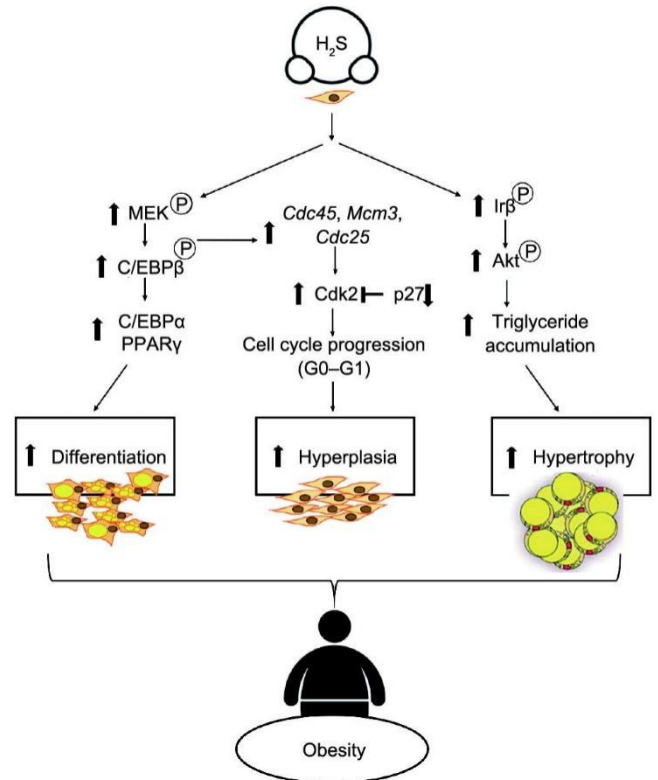


图8. H_2S 在脂肪生成、脂质积累和脂肪细胞扩张中的复杂和重要角色，以及潜在机制。

5. 结论

肥胖症是全世界死亡的主要原因之一，但由于与肥胖症相关的其他代谢紊乱，目前的治疗失败率很高。为了减少治疗失败，确定肥胖症的具体危险因素和致病关键点至关重要。本研究强调了CSE/ H_2S 系统在以脂肪细胞为中心的肥胖症发展中的作用。更好地了解 H_2S 的致肥特性，将有助于针对 H_2S 诱导的前脂肪细胞向脂肪细胞的转化（分化）、致病性脂肪细胞增大（肥大）和前脂肪细胞募集（增生）设计新颖且基于机制的安全治疗方案。未来的研究重点是探究 H_2S 在脂肪形成过程中对胰岛素敏感性的作用，以便更深入地了解 H_2S /CSE相关的肥胖症疗法。

致谢

本研究得到加拿大自然科学与工程研究会探索基金的支持。

Compliance with ethics guidelines

Richa Verma, Ming Fu, Guangdong Yang, Lingyun Wu, and Rui Wang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002;16(13):1792–8.
- [2] Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev* 2012;92(2):791–896.
- [3] Wallace JL, Wang R. Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14(5):329–45.
- [4] Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, et al. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. *Science* 2008;322(5901):587–90.
- [5] Sun Y, Huang Y, Zhang R, Chen Q, Chen J, Zong Y, et al. Hydrogen sulfide upregulates K_{ATP} channel expression in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *J Mol Med (Berl)* 2015;93(4):439–55.
- [6] Guo C, Liang F, Shah Masood W, Yan X. Hydrogen sulfide protected gastric epithelial cell from ischemia/reperfusion injury by Keap1 S-sulfhydration, MAPK dependent anti-apoptosis and NF- κ B dependent anti-inflammation pathway. *Eur J Pharmacol* 2014;725(725):70–8.
- [7] Du J, Huang Y, Yan H, Zhang Q, Zhao M, Zhu M, et al. Hydrogen sulfide suppresses oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-stimulated monocyte chemoattractant protein 1 generation from macrophages via the nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway. *J Biol Chem* 2014;289(14):9741–53.
- [8] Zheng J, Zhao T, Yuan Y, Hu N, Tang X. Hydrogen sulfide (H₂S) attenuates uranium-induced acute nephrotoxicity through oxidative stress and inflammatory response via Nrf2–NF- κ B pathways. *Chem Biol Interact* 2015;242:353–62.
- [9] Wu L, Yang W, Jia X, Yang G, Duridanova D, Cao K, et al. Pancreatic islet overproduction of H₂S and suppressed insulin release in Zucker diabetic rats. *Lab Invest* 2009;89(1):59–67.
- [10] WHO. Obesity and overweight [Internet]. Geneva: WHO; 2021 Jun 9 [cited on 14/11/2021]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- [11] Trayhurn P. Adipocyte biology. Clinical obesity in adults and children. 3rd edition. Singapore: Wiley-Blackwell; 2010. p. 103–14.
- [12] Lee MJ, Wu Y, Fried SK. A modified protocol to maximize differentiation of human preadipocytes and improve metabolic phenotypes. *Obesity* 2012;20(12):2334–40.
- [13] Tsai CY, Peh MT, Feng W, Dymock BW, Moore PK. Hydrogen sulfide promotes adipogenesis in 3T3L1 cells. *PLoS One* 2015;10(3):e0119511.
- [14] Cai J, Shi X, Wang H, Fan J, Feng Y, Lin X, et al. Cystathionine γ lyase-hydrogen sulfide increases peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by sulfhydration at C139 site thereby promoting glucose uptake and lipid storage in adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 2016;1861(5):419–29.
- [15] Yang G, Ju Y, Fu M, Zhang Y, Pei Y, Racine M, et al. Cystathionine gamma-lyase/hydrogen sulfide system is essential for adipogenesis and fat mass accumulation in mice. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2018;1863(2):165–76.
- [16] Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, et al. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol* 2009;29(6):1575–91.
- [17] Kim JI, Huh JY, Sohn JH, Choe SS, Lee YS, Lim CY, et al. Lipid-overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation. *Mol Cell Biol* 2015;35(10):1686–99.
- [18] Shepherd PR, Crowther NJ, Desai M, Hales CN, Ozanne SE. Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *Br J Nutr* 1997;78(1):121–9.
- [19] Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *Int J Mol Sci* 2019;20(9):2358.
- [20] Hirsch J, Fried SK, Edens NK, Leibel RL. The fat cell. *Med Clin N* 1989;73(1):83–96.
- [21] Björntorp P, Karlsson M, Pettersson P. Expansion of adipose tissue storage capacity at different ages in rats. *Metabolism* 1982;31(4):366–73.
- [22] De Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* 2008;54(6):945–55.
- [23] Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008;453(7196):783–7.
- [24] Pellegrinelli V, Carobbio S, Vidal-Puig A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia* 2016;59(6):1075–88.
- [25] Muir LA, Neeley CK, Meyer KA, Baker NA, Brosius AM, Washabaugh AR, et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: correlations with diabetes in human obesity. *Obesity* 2016;24(3):597–605.
- [26] Iverson SJ, Lang SL, Cooper MH. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* 2001;36(11):1283–7.
- [27] Manirakiza P, Covaci A, Schepens P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *J Food Compos Anal* 2001;14(1):93–100.
- [28] Yang G, Tang G, Zhang L, Wu L, Wang R. The pathogenic role of cystathionine γ -lyase/hydrogen sulfide in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Am J Pathol* 2011;179(2):869–79.
- [29] Yang R, Liu Y, Shi S. Hydrogen sulfide regulates homeostasis of mesenchymal stem cells and regulatory T cells. *J Dent Res* 2016;95(13):1445–51.
- [30] Hausman DB, Park HJ, Hausman GJ. Isolation and culture of preadipocytes from rodent white adipose tissue. In: *Adipose tissue protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2018. p. 201–19.
- [31] Waldhart AN, Dykstra H, Peck AS, Boguslawski EA, Madaj ZB, Wen J, et al. Phosphorylation of TXNIP by AKT mediates acute influx of glucose in response to insulin. *Cell Rep* 2017;19(10):2005–13.
- [32] Du Q, Zhang S, Li A, Mohammad IS, Liu B, Li Y. Astragaloside IV inhibits adipose lipolysis and reduces hepatic glucose production via Akt dependent PDE3B expression in HFD-fed mice. *Front Physiol* 2018;9:15.
- [33] Betzi S, Alam R, Martin M, Lubbers DJ, Han H, Jakkraj SR, et al. Discovery of a potential allosteric ligand binding site in CDK2. *ACS Chem Biol* 2011;6(5):492–501.
- [34] Lane ME, Yu B, Rice A, Lipson KE, Liang C, Sun L, et al. A novel CDK2-selective inhibitor, SU9516, induces apoptosis in colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2001;61(16):6170–7.
- [35] Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 1992;97(6):493–7.
- [36] Singh P, Garg R, Goand UK, Riyazuddin M, Reza MI, Syed AA, et al. Combination of pancreastatin inhibitor PSTi8 with metformin inhibits Fetuin-A in type 2 diabetic mice. *Heliyon* 2020;6(10):e05133.
- [37] Avinash RG, Kotresh AM, Anantha Krishna LR, Shambulingappa BE, Rudresh BH, Ramesh D, et al. Association studies on biochemical parameters and uterine health in crossbred cows of central dry zone of Karnataka. *J Pharm Innov* 2021;10(12):1740–3.
- [38] Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Bioinform Biomath* 2013;3(3):71–85.
- [39] Kraemer FB, Shen WJ. Hormone-sensitive lipase knockouts. *Nutr Metab* 2006;3(1):12.
- [40] Auwerx J, Martin G, Guerre-Millo M, Staels B. Transcription, adipocyte differentiation, and obesity. *J Mol Med* 1996;74(7):347–52.
- [41] Bost F, Aouadi M, Caron L, Binétruy B. The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie* 2005;87(1):51–6.
- [42] Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998;78(3):783–809.
- [43] Fang L, Zhao J, Chen Y, Ma T, Xu G, Tang C, et al. Hydrogen sulfide derived from periaortic adipose tissue is a vasodilator. *J Hypertens* 2009;27(11):2174–85.
- [44] Feng X, Chen Y, Zhao J, Tang C, Jiang Z, Geng B. Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;380(1):153–9.
- [45] Galmozzi A, Kok BP, Saez E. Isolation and differentiation of primary white and brown preadipocytes from newborn mice. *J Vis Exp* 2021;167(167):e62005.
- [46] Ruiz-Ojeda FJ, Rupérez AI, Gomez-Llorente C, Gil A, Aguilera CM. Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: a review. *Int J Mol Sci* 2016;17(7):1040.
- [47] Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med* 2013;

- 34(1):1–11.
- [48] Chu DT, Malinowska E, Gawronska-Kozak B, Kozak LP. Expression of adipocyte biomarkers in a primary cell culture models reflects preweaning adipobiology. *J Biol Chem* 2014;289(26):18478–88.
- [49] Xue R, Hao DD, Sun JP, Li WW, Zhao MM, Li XH, et al. Hydrogen sulfide treatment promotes glucose uptake by increasing insulin receptor sensitivity and ameliorates kidney lesions in type 2 diabetes. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19(1):5–23.
- [50] Patel YM, Lane MD. Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain-mediated turnover of p27. *J Biol Chem* 2000;275(23): 17653–60.
- [51] Drolet R, Richard C, Sniderman AD, Mailloux J, Fortier M, Huot C, et al. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int J Obes* 2008;32(2):283–91.
- [52] Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth. *PLOS Comput Biol* 2009;5(3):e1000324.
- [53] Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16(1):145–71.
- [54] Prusty D, Park BH, Davis KE, Farmer SR. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and C/EBP α gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 2002;277(48):46226–32.
- [55] Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(1):44–9.
- [56] Zhang YY, Li SF, Qian SW, Zhang YY, Liu Y, Tang QQ, et al. Phosphorylation prevents C/EBP β from the calpain-dependent degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;419(3):550–5.
- [57] Rangwala SM, Lazar MA. Transcriptional control of adipogenesis. *Annu Rev Nutr* 2000;20(1):535–59.
- [58] Cottineau J, Kottemann MC, Lach FP, Kang YH, Vély F, Deenick EK, et al. Inherited Gins1 deficiency underlies growth retardation along with neutropenia and NK cell deficiency. *J Clin Invest* 2017;127(5):1991–2006.
- [59] Seo YS, Kang YH. The human replicative helicase, the CMG complex, as a target for anti-cancer therapy. *Front Mol Biosci* 2018;5:26.
- [60] Guo L, Li X, Huang JX, Huang HY, Zhang YY, Qian SW, et al. Histone demethylase Kdm4b functions as a co-factor of C/EBP β to promote mitotic clonal expansion during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Cell Death Differ* 2012;19(12):1917–27.
- [61] Zhao Y, Wei H, Kong G, Shim W, Zhang G. Hydrogen sulfide augments the proliferation and survival of human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stromal cells through inhibition of BK $_{Ca}$. *Cytotherapy* 2013; 15(11):1395–405.
- [62] Bian JS, Yong QC, Pan TT, Feng ZN, Ali MY, Zhou S, et al. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316(2):670–8.
- [63] Pyriochou A, Papapetropoulos A, Olah G, Wintner E, Jeschke M, Branski L, et al. The hydrogen sulfide donor IK-1001 stimulates neovascularization and improves wound healing. *FASEB J* 2008;22(1):912–42.
- [64] Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, Yang G, Marazioti A, Zhou Z, et al. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(51):21972–7.
- [65] Shao M, Vishvanath L, Busbuso NC, Hepler C, Shan B, Sharma AX, et al. *De novo* adipocyte differentiation from Pdgfr β ⁺ preadipocytes protects against pathologic visceral adipose expansion in obesity. *Nat Commun* 2018;9(1):1–16.
- [66] Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001;414(6865):799–806.
- [67] Hernandez R, Teruel T, Lorenzo M. Akt mediates insulin induction of glucose uptake and up-regulation of *GLUT4* gene expression in brown adipocytes. *FEBS Lett* 2001;494(3):225–31.
- [68] Kotani K, Ogawa W, Matsumoto M, Kitamura T, Sakaue H, Hino Y, et al. Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 1998;18(12):6971–82.
- [69] Manna P, Jain SK. Vitamin D up-regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation and glucose utilization mediated by cystathionine- γ -lyase (CSE) activation and H $_2$ S formation in 3T3L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2012;287(50): 42324–32.