

特异性蛋白 1 调控脂肪细胞中弗林蛋白酶表达对白脂素分泌的影响及其机制

董振亚¹, 张鑫铭*, 邓娅娅*, 朱井玲¹, 菅辉玲², 张云华¹

(1. 新疆地方与民族高发病教育部重点实验室 石河子大学医学院生化教研室, 新疆 石河子 832002;
2. 新疆维吾尔自治区克拉玛依市中心医院检验科, 新疆 克拉玛依 834000)

[摘 要] **目的:** 探讨肥胖状态下脂肪组织弗林蛋白酶 (*Furin*) 基因的转录调控机制及其对脂肪因子白脂素分泌的影响。**方法:** 将 24 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为正常对照饲料 (NCD) 组和高脂饲料 (HFD) 组, 每组 12 只。连续喂养 12 周以构建饮食性肥胖模型。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测 2 组小鼠皮下白色脂肪组织 (WAT) (sWAT) 和附睾 WAT (eWAT) 中 *Furin*、原纤维蛋白 1 (*FN1*) 及候选转录因子特异性蛋白 1 (*SP1*) mRNA 表达水平。基于真核基因启动子收集与分析联合项目 (JASPAR) 数据库筛选 *Furin* 基因启动子区候选转录因子。在 293T 细胞中转染特异性蛋白 1 (SP1) 过表达质粒 (pcDNA-SP1 组) 和包含绿色荧光蛋白 (GFP) 的对照质粒 (pcDNA-GFP 组), 同时将含 *Furin* 启动子区的双荧光素酶报告载体与上述质粒共转染, 验证 SP1 与 *Furin* 启动子区之间的调控作用。分离 sWAT 的基质血管组分 (SVF) 细胞并诱导分化为成熟脂肪细胞, 通过腺病毒转导过表达 SP1 (Ad-SP1 组) 或 GFP 对照 (Ad-GFP 组)。采用 Western blotting 法和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法分别检测 Ad-GFP 组和 Ad-SP1 组细胞中 SP1 和 *Furin* 蛋白表达水平及细胞上清液中白脂素水平。**结果:** 与 NCD 组比较, HFD 组小鼠体质量、sWAT 和 eWAT 质量均明显升高 ($P < 0.001$)。与 NCD 组比较, HFD 组小鼠 sWAT 和 eWAT 中 *Furin* 和 *SP1* mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.001$)。JASPAR 数据库预测提示 SP1 是调控 *Furin* 转录的核心候选因子。双荧光素酶实验, 与 pcDNA-GFP 组比较, pcDNA-SP1 组 293T 细胞中荧光素酶活性明显升高 ($P < 0.001$)。与 Ad-GFP 组比较, Ad-SP1 组 SVF 来源的成熟脂肪细胞中 SP1 和 *Furin* 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.001$), 细胞上清液中白脂素水平明显升高 ($P < 0.001$)。**结论:** 肥胖小鼠 WAT 及脂肪细胞中 *SP1* mRNA 表达上调, SP1 可通过直接结合 *Furin* 启动子区增强其转录活性; SP1 过表达可上调脂肪细胞中 *Furin* 蛋白表达水平, 进而促进白脂素分泌。

[关键词] 肥胖; 弗林蛋白酶; 特异性蛋白 1; 白脂素; 转录调控

[中图分类号] R363.2 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2025-07-05

[录用日期] 2025-09-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82260126, 32460221); 新疆生产建设兵团科技局指导性科技计划项目 (2024ZD020); 新疆维吾尔自治区克拉玛依市中心医院院内项目 (20240101)

[作者简介] 董振亚 (1993—), 男, 湖北省洪湖市人, 在读硕士研究生, 主要从事代谢性疾病方面的研究。

[通信作者] 张云华, 副教授, 硕士研究生导师 (E-mail: yunhuazhang@shzu.edu.cn);

菅辉玲, 主管技师 (E-mail: 1521003011@qq.com)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Effect of Furin expression regulated by specific protein 1 on asprosin secretion in adipocytes and its mechanism

DONG Zhenya¹, ZHANG Xinge*, DENG Yaya*, ZHU Jingling¹, JIAN Huiling², ZHANG Yunhua¹

(1. Key Laboratory of Xinjiang Endemic & Ethnic Diseases, Ministry of Education, Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, Shihezi University, Shihezi 832002, China; 2. Department of Laboratory, Central Hospital, Karamay City, Xinjiang Uygur Autonomous Region, Karamay 834000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the transcriptional regulation mechanism of the *Furin* gene in adipose tissue under obesity conditions and its effect on the secretion of the adipokine asprosin. **Methods:** Twenty-four C57BL/6J mice were randomly divided into normal control diet (NCD) group and high-fat diet (HFD) group, with 12 mice in each group. The mice were fed for 12 consecutive weeks to establish the diet-induced obesity models. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of *Furin*, fibrillin 1 (*FBN1*), and the candidate transcription factor specificity protein 1 (*SP1*) mRNA in subcutaneous white adipose tissue (WAT) (sWAT) and epididymal WAT (eWAT) of the mice in two groups. Candidate transcription factors for the *Furin* gene promoter region were screened based on the JASPAR database. In the 293T cells, the SP1 over-expression plasmid (pcDNA-SP1 group) and its control plasmid containing green fluorescence protein (GFP) (pcDNA-GFP group) were transfected. Simultaneously, a dual-luciferase reporter vector containing the *Furin* promoter region was co-transfected with the aforementioned plasmids to verify the regulatory interaction between SP1 and the *Furin* promoter. The stromal vascular fraction (SVF) cells from sWAT were isolated and induced to differentiate into mature adipocytes. SP1 (Ad-SP1 group) or GFP control (Ad-GFP group) was overexpressed *via* adenoviral transduction. Western blotting method and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect the expression levels of SP1 and Furin proteins in cells in various groups and the levels of asprosin in the cell supernatant in Ad-GFP and Ad-SP1 groups, respectively. **Results:** Compared with NCD group, the body weight, sWAT weight, and eWAT weight of the mice in HFD group were significantly increased ($P < 0.001$). Compared with NCD group, the expression levels of *Furin* and *SP1* mRNA in sWAT and eWAT of the mice in HFD group were significantly increased ($P < 0.001$). JASPAR database prediction suggested that SP1 was a core candidate factor regulating *Furin* transcription. In the dual-luciferase experiment, compared with pcDNA-GFP group, the luciferase activity in 293T cells in pcDNA-SP1 group was significantly increased ($P < 0.001$). Compared with Ad-GFP group, the expression levels of SP1 and Furin proteins in SVF-derived mature adipocytes in Ad-SP1 group were significantly increased ($P < 0.001$), and the level of asprosin in the cell supernatant was significantly increased ($P < 0.001$). **Conclusion:** The expression of *SP1* mRNA in WAT and adipocytes of obese mice was up-regulated. SP1 can enhance the transcriptional activity of *Furin* by directly binding to its promoter region. SP1 overexpression may upregulate the expression level of Furin protein in adipocytes, promoting the secretion of asprosin.

KEYWORDS Obesity; Furin; Specificity protein 1; Asprosin; Transcriptional regulation

肥胖及其引发的代谢综合征已成为全球性的公共卫生挑战,其病理过程与脂肪组织内分泌功能紊乱密切相关^[1]。近年来,脂肪因子白脂素作为一种新型代谢调控因子备受关注,其在肥胖患者血清中的水平明显升高^[2]。白脂素由细胞外基质原纤蛋白

1 (fibrillin 1, FBN1) 经弗林蛋白酶 (Furin) 特异性剪切后释放入血^[3]。尽管已有研究^[4]证实Furin在肝脏和胰岛 β 细胞中参与胰岛素信号调控,但其在脂肪组织中的表达调控机制及其与白脂素分泌的关联尚不明确。

基质血管组分 (stromal vascular fraction, SVF) 是从脂肪组织中通过酶解或者机械分离获得的、具有干细胞特性的异质细胞群, 包含脂肪源性干细胞、前脂肪细胞和成纤维细胞等多种细胞。其中, 脂肪源性干细胞可在体外诱导分化为成熟脂肪细胞, 是研究脂肪生成、代谢调控或肥胖机制的常用模型^[5]。特异性蛋白1 (specificity protein 1, SP1) 作为脂代谢的关键调控因子^[6-7], 与氧化应激和炎症反应密切相关^[8], 但其是否参与肥胖状态下 *Furin* 的转录调控尚未可知。本研究探讨 *Furin* 在脂肪组织中的转录调控机制, 揭示 SP1 介导的分子调控网络与白脂素分泌的级联反应, 以期对肥胖相关代谢紊乱的机制研究提供新视角。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器 无特定病原体动物级 C57BL/6J 雄性小鼠 (6 周龄, 体质量 18~20 g) 购自北京斯贝福生物技术有限公司。动物生产许可证编号: SCXK (京) 2024-0001, 动物使用许可证编号: SYXK (新) 2024-0010。小鼠饲养于恒温 (22±1) °C、12 h 光暗循环环境, 自由饮水摄食。本实验方案经石河子大学实验动物伦理委员会批准 (伦理批件号: A2024-044)。人胚肾细胞 293T 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 胎牛血清购自苏州伊科赛生物科技有限公司, DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, 高脂饲料 (high fat diet, HFD) (批号: D12492) 和正常对照饲料 (normal control diet, NCD) (批号: D12450J) 均购自美国 Research Diets 公司, RNA 提取试剂盒购自上海翌圣生物科技股份有限公司, RNA 逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒均购自南京诺唯赞生物技术有限公司, 白脂素酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自艾比玛特医药科技 (上海) 有限公司, 油红 O 染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司, I 型胶原酶、胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (isobutylmethylxanthine, IBMX) 和地塞米松均购自美国 Sigma 公司。*Furin*、SP1 和 β 肌动蛋白 (beta-actin, β -actin) 抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司, 实验用引物、pcDNA-SP1 和 pGL3-*Furin* promoter 等质粒由北京睿博生物科技公司提供, 过表达 SP1 腺病毒由

山东维真生物科技有限公司包装。电泳仪和转膜仪均购自美国 Bio-Rad 公司, RT-qPCR 仪购自杭州博日科技股份有限公司; 化学发光检测仪购自美国 Promega 公司, 倒置荧光显微镜购自日本尼康公司, Odyssey 荧光成像系统购自美国 LI-COR 公司。

1.2 小鼠肥胖模型制备和白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT) 分离及处理 24 只小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为 2 组, 每组 12 只。NCD 组小鼠饲喂 D12450J 标准饲料, HFD 组小鼠饲喂 D12492 高脂饲料, 连续喂养 12 周。每周记录 2 组小鼠体质量和进食量。喂养结束后, 小鼠经腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (50 mg·kg⁻¹) 麻醉, 分离皮下 WAT (subcutaneous WAT, sWAT) 及附睾 WAT (epididymal WAT, eWAT)。组织样品用预冷的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 冲洗 3 次, 用滤纸吸干表面水分。采用刻度尺分别测量 2 组小鼠 sWAT 和 eWAT 长度和宽度, 对比其外观, 采用分析天平称量 WAT 质量。取部分组织置于 RNA 保存液, 于 -80 °C 保存, 用于后续 mRNA 表达分析。

1.3 RT-qPCR 法检测 2 组小鼠不同组织中 *Furin*、*FBN1* 和 *SP1* mRNA 表达水平 收集 2 组小鼠不同组织样本, 包括 sWAT、eWAT、下丘脑、棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT)、胃、空肠、肝脏和胰腺, 采用分析天平称量各组织 40 mg, 按照总 RNA 提取试剂盒说明书操作, 完成总 RNA 提取^[9]。采用分光光度计测定 RNA 浓度及纯度, 依据逆转录试剂盒说明将 RNA 逆转录为 cDNA 后进行 RT-qPCR 反应。反应体系总体积为 10.0 μ L, 包含 5.0 μ L 2×SYBR qPCR Master Mix, 正、反向引物 (10 μ mol·L⁻¹) 各 0.4 μ L, 2.0 μ L cDNA 模板及 2.2 μ L 无核糖核酸酶水。反应程序: 95 °C 预变性 20 s; 随后进行扩增反应, 共 40 个循环, 每个循环包括 95 °C 变性 10 s 和 60 °C 退火延伸 30 s; 扩增结束后, 按 95 °C、15 s, 60 °C、60 s, 95 °C、15 s 的程序采集熔解曲线。以 β -actin 为内参基因, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算目的基因 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

1.4 数据库筛选 *Furin* 启动子区的候选转录因子

通过 SwitchGear Genomics 数据库 (<https://switchgeargenomics.com/products/promoter-reporter-collection>) 检索基因 *Furin* 的启动子序列 (ID: s703372), 获取启动子序列信息。利用真核基因启

表1 RT-qPCR引物序列
Tab.1 Primer sequences of RT-qPCR

Gene	Sequences (5'—3')	NCBI refsequence
<i>FBN1</i>	F: GAGTTGGGGCAGAGACTGT	NM_007993.2
	R: TCCCTGCCTGTCTGGACTA	
<i>Furin</i>	F: ATTCGTATGGCTACGGGCTG	NM_001081454.2
	R: TTTGCCGATGTCCTTGGGTT	
<i>SP1</i>	F: GCCACCATGAGCGACCAAGA	NM_013672.2
	R: GAGTCTGAGAAAAGGCGGCA	
<i>β-actin</i>	F: GGCTGTATTCCCTCCATCG	NM_007393.5
	R: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	

动子收集与分析联合项目（Joint annotation and specificity prediction for array-ready, JASPAR）数据库（<http://jaspar.genereg.net/analysis>）对该启动子序列进行转录因子结合位点预测，设定筛选条件为相对亲和力评分 ≥ 0.95 ，筛选出潜在的转录因子结合位点，并针对相应的 *Furin* 启动子序列进行后续克隆和转染等验证实验。

1.5 双荧光素酶报告基因实验检测 *Furin* 启动子转录活性 为验证 *Furin* 基因启动子的转录活性及其受 SP1 调控的作用，将 *Furin* 目标启动子片段克隆至 pGL3-Basic 荧光素酶报告载体中，构建 pGL3-*Furin*-promoter 重组报告质粒。以表达绿色荧光蛋白（green fluorescence protein, GFP）的质粒为对照质粒。在 293T 细胞中进行以下分组和转染：pcDNA-SP1 组，共转染 pcDNA-SP1 过表达质粒和 pGL3-*Furin*-promoter 报告质粒；pcDNA-GFP 组，共转染 pcDNA-GFP 对照质粒和 pGL3-*Furin*-promoter 报告质粒。所有转染均使用脂质体法进行。转染 24 h 后裂解细胞，采用双荧光素酶报告系统检测 2 组细胞中荧光素酶活性^[10]。以转染的效率内参质粒 pRL-TK（表达海肾荧光素酶）提供的内参活性对报告基因（表达萤火虫荧光素酶）进行标准化，计算荧光素酶活性，代表 *Furin* 启动子的转录活性。荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性值。

1.6 小鼠 sWAT 中 SVF 细胞的分离 取小鼠 sWAT，剔除淋巴结等组织，PBS 缓冲液洗涤 2 次后加入 0.1% I 型胶原酶消化，并使用 0.6 mm 过滤筛过滤，收集滤液。滤液经 1 000 g 离心 5 min，弃上清，收集细胞沉淀^[11]。将细胞沉淀重悬于含 10% 胎牛血清的杜尔贝科改良伊格尔培养基/汉姆 F-12 营养混合物混合培养基（Dulbecco's modified eagle

medium/Ham's F-12 nutrient mixture, DMEM/F12），置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞融合后，更换成脂培养基诱导 48 h（含 0.5 mmol·L⁻¹ IBMX、1 μmol·L⁻¹ 地塞米松和 10 mg·L⁻¹ 胰岛素）。随后更换为仅含 10 mg·L⁻¹ 胰岛素的成脂维持培养基继续培养，每 2 d 更换 1 次培养基，诱导分化持续至第 8 天。分化完成后，采用油红 O 染色验证脂肪细胞分化效果。

1.7 油红 O 染色检查 SVF 来源细胞的成脂诱导分化 取成脂分化第 8 天的脂肪细胞，经 PBS 缓冲液清洗后，加入 4% 多聚甲醛室温固定 30 min。PBS 缓冲液漂洗 3 次后，加入 0.5% 油红 O 染色液，37 ℃ 避光孵育 15 min。弃去染液，加入 60% 异丙醇分色 15 s，PBS 缓冲液冲洗去除残留染料。加入苏木素复染细胞核 1 min，PBS 缓冲液返蓝。于倒置显微镜下观察脂滴形态，红色脂滴为分化成功的脂肪细胞^[12]。

1.8 成熟脂肪细胞的 SP1 转导、细胞分组和细胞上清液中白脂素水平测定 将成熟脂肪细胞分为 2 组，即转导过表达 SP1 重组腺病毒的 Ad-SP1 组和转导表达 GFP 对照腺病毒的 Ad-GFP 组。转导 72 h 后，收集 2 组细胞。同时，收集 2 组细胞培养上清液，严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作，检测 2 组细胞上清液中白脂素水平。

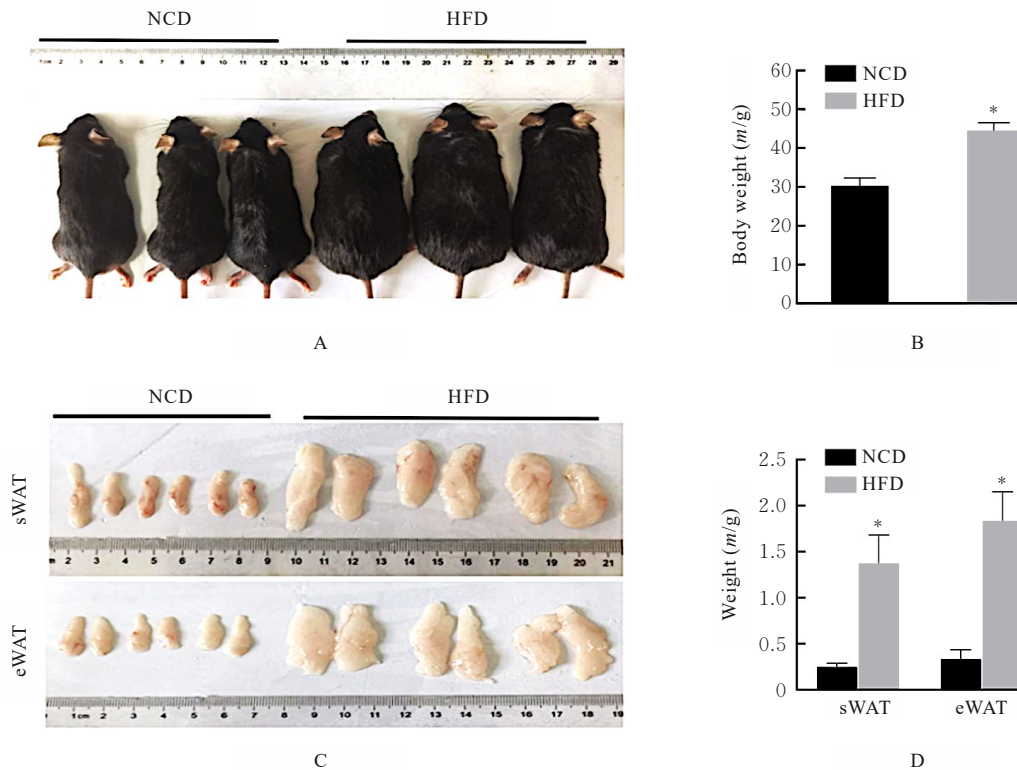
1.9 Western blotting 法检测 293T 细胞中 SP1 蛋白表达水平及成熟脂肪细胞中 SP1 和 *Furin* 蛋白表达水平 收集转染质粒后的 293T 细胞和转导腺病毒的成熟脂肪细胞，分别加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液。经蛋白浓度测定后，取 40 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）。转膜后加入 5% 脱脂牛奶常温封闭 1 h。加入特异性一抗（1:1 000 稀释），4 ℃ 过夜孵育。封闭后经 3 次 PBS 缓冲液漂洗，加入 IRDye 标记二抗（1:5 000 稀释），室温孵育 1 h。洗膜后加入发光液，通过荧光成像系统获取荧光信号^[12]。采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值，以 β-actin 为内参，计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值/β-actin 蛋白条带灰度值。

1.10 统计学分析 使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行作图和统计学分析。2 组小鼠体质量和 WAT 质量，各组织中 *Furin*、*FBN1* 和 *SP1* mRNA 表达水

平, pcDNA-SP1组和pcDNA-GFP组细胞荧光素酶活性, Ad-SP1组和Ad-GFP组细胞上清液中白脂素水平以及各组细胞中SP1和Furin蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2组间样本均数比较采用两独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组小鼠体质量和WAT质量 喂养小鼠12周后, 与NCD组比较, HFD组小鼠体型增大, 体质量明显升高($P < 0.001$); HFD组小鼠eWAT和sWAT外观膨大, 质量明显升高($P < 0.001$)。见图1。



* $P < 0.001$ compared with NCD group.

图1 2组小鼠体型和体质量(A、B)及WAT组织外观和质量(C、D)

Fig. 1 Sizes and weights of mice(A, B) and WAT tissues(C, D) of mice in two groups

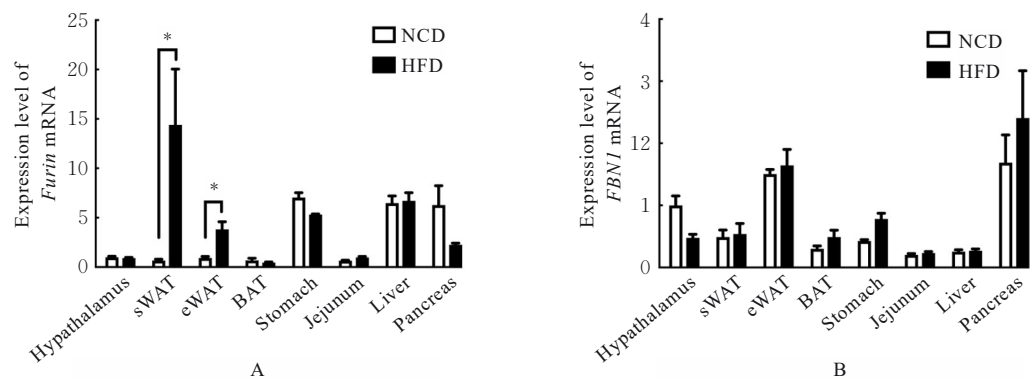
2.2 2组小鼠WAT中Furin和FBN1 mRNA表达水平 与NCD组比较, HFD组小鼠sWAT和eWAT中Furin mRNA表达水平明显升高($P < 0.001$)。2组小鼠下丘脑、BAT、胃、空肠、肝脏和胰腺中Furin mRNA表达水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。NCD组和HFD组小鼠上述组织中FBN1 mRNA表达水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图2。

2.3 数据库筛选结合Furin基因启动子区域的转录因子 为解析Furin基因在肥胖脂肪组织中高表达的调控机制, 本研究通过JASPAR数据库对Furin基因启动子区进行转录因子结合位点预测, 并成功筛选出9个候选转录因子, 包括锌指蛋白384 (zinc finger protein 384, ZNF384)、无调性同

系物1 (atonal homolog 1, Atoh1)、克鲁佩尔样转录因子5 (Kruppel-like factor 5, KLF5)、转录因子12 (transcription factor 12, Tcf12)和SP1等。见图3。其中, SP1结合位点在JASPAR评分系统中具有较高结合置信度(相对亲和力为0.968), 因此将其作为核心候选因子进行后续研究。

2.4 2组小鼠WAT中SP1 mRNA表达水平 与NCD组比较, HFD组小鼠sWAT和eWAT中SP1 mRNA表达水平明显升高($P < 0.001$); 2组小鼠其他组织中SP1 mRNA表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图4。

2.5 2组293T细胞中SP1蛋白表达水平和荧光素酶活性 为验证SP1对Furin基因的调控作用, 在293T细胞中转染SP1过表达质粒pcDNA-SP1组及



* $P < 0.001$ compared with NCD group.

图2 2组小鼠各组织中 *Furin*(A)和 *FBN1*(B) mRNA 表达水平

Fig. 2 Expression levels of *Furin*(A) and *FBN1*(B) mRNA in various tissues of mice in two groups

JASPAR2018

Home	MA1125.1	ZNF384	15.5406	0.979643232861	furin	367	378	+
About	MA1125.1	ZNF384	15.4851	0.978792621722	furin	335	346	+
Search	MA1125.1	ZNF384	15.4228	0.977839557736	furin	334	345	+
Browse JASPAR CORE	MA1125.1	ZNF384	15.3785	0.977161667002	furin	175	186	+
Browse Collections	MA0521.1	Tcf12	13.7583	0.972962827746	furin	591	601	+
Tools	MA1125.1	ZNF384	14.9907	0.9712262769	furin	173	184	+
RESTful API	MA0461.1	Atoh1	12.0646	0.970092819415	furin	259	266	+
Download Data	MA0599.1	KLF5	13.0281	0.968988763227	furin	882	891	+
Matrix Clusters	MA0079.3	SP1	14.8692	0.968211913033	furin	875	885	+
Genome Tracks	MA0461.1	Atoh1	11.772	0.965647272169	furin	430	437	+
	MA1125.1	ZNF384	14.296	0.960593747132	furin	183	194	+
	MA0461.1	Atoh1	11.3646	0.959457247113	furin	762	769	+
	MA1125.1	ZNF384	14.1236	0.957955487827	furin	184	195	+
	MA1125.1	ZNF384	14.0659	0.957071041996	furin	338	349	+
	MA0599.1	KLF5	11.9702	0.955530194434	furin	875	884	+
	MA0465.1	CDX2	13.4407	0.954982549196	furin	351	361	+
	MA1125.1	ZNF384	13.9186	0.954816875039	furin	333	344	+
	MA1100.1	ASCL1	15.0582	0.954604846732	furin	590	602	-
	MA1112.1	NR4A1	12.4577	0.950847720622	furin	112	121	+
	MA1111.1	NR2F2	12.8083	0.950474126367	furin	112	122	+

图3 JASPAR数据库筛选结合 *Furin* 基因启动子区域的转录因子

Fig. 3 Transcription factors binding with *Furin* promoter screened with JASPAR database

其对照质粒 pcDNA-GFP 组。Western blotting 法结果显示：与 pcDNA-GFP 组比较，pcDNA-SP1 组 293T 细胞中 SP1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.001$)。见图 5。与 pcDNA-GFP 组 (1.00 ± 0.11) 比较，pcDNA-SP1 组 293T 细胞中荧光素酶活性 (4.86 ± 0.52) 明显升高 ($P < 0.001$)。

2.6 SVF 来源细胞的成脂诱导分化 成熟脂肪细

胞呈现典型形态学特征，胞内可见透亮且体积较大的脂滴结构。油红 O 染色后，脂滴可被特异性染为红色，镜下可见明显脂滴形成。见图 6。

2.7 成熟脂肪细胞中 SP1 和 Furin 蛋白表达水平及细胞上清液中白脂素水平 与 Ad-GFP 组比较，Ad-SP1 组成熟脂肪细胞中 SP1 和 Furin 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.001$)。见图 7。与 Ad-GFP 组

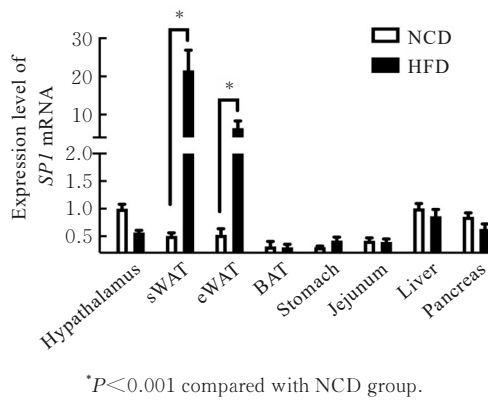
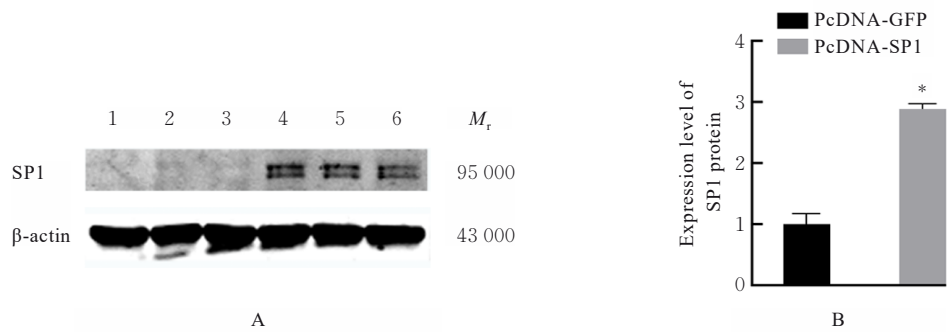


图4 2组小鼠各组织中SP1 mRNA表达水平
Fig. 4 Expression levels of SP1 mRNA in various tissues of mice in two groups

($216.6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1} \pm 63.5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$) 比较, Ad-SP1组细胞上清液中白脂素水平 ($515.0 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1} \pm 216.8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$) 明显升高 ($P < 0.001$)。

3 讨论

近年研究^[13]证实蛋白酶Furin在能量代谢调控网络中具有关键作用。机制研究^[14]表明: Furin可通过剪切前体蛋白激活脂肪细胞分化相关信号通路, 且其在小鼠肝脏中的异常表达可加剧胰岛素抵抗。本研究结果发现: 高脂饮食诱导的HDF组肥胖小鼠sWAT和eWAT中Furin mRNA表达水平均明显上调。然而, 细胞外基质关键成分FBN1在HDF组小鼠2种脂肪组织中均未发生明显表达改变, 提示肥胖状态对细胞外基质相关基因的调控具有高度选择性。虽然已有研究^[3]阐明FBN1蛋白经Furin特异性剪切后可释放具有代谢活性的白脂素, 但关于该剪切酶本身的表达调控机制尚未明确。临床研究^[15]显示肥胖人群血清中白脂素水平明显升高, 但本研究结果表明, 这种代谢异常并非源于前体蛋白FBN1的表达上调, 而主要归因于



Lane 1—3: PcDNA-GFP group; Lane 4—6: PcDNA-SP1 group. * $P < 0.001$ compared with pcDNA-GFP group.
图5 2组293T细胞中SP1蛋白表达电泳图(A)和直方图(B)
Fig. 5 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of SP1 protein in 293T cells in two groups

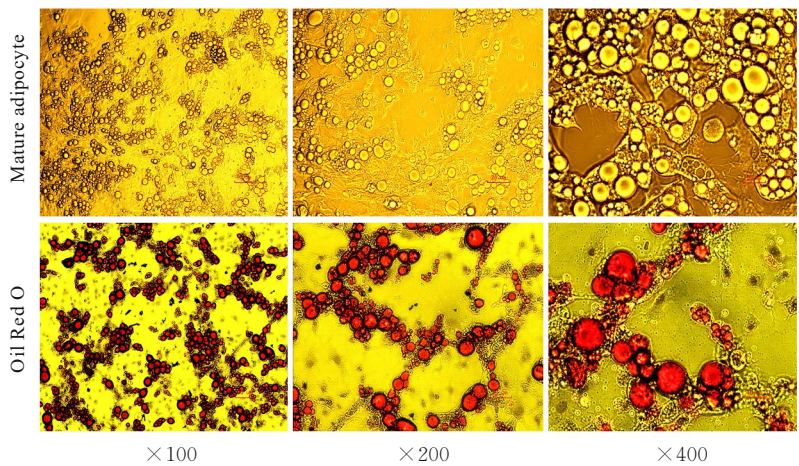
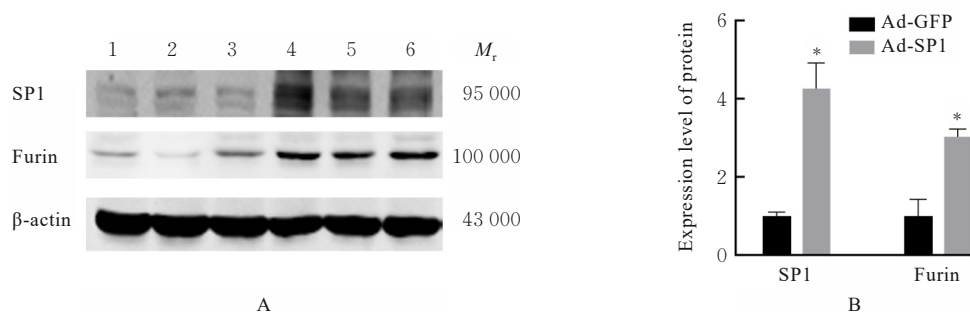


图6 小鼠SVF来源细胞的成脂诱导和分化
Fig. 6 Adipogenic induction and differentiation of cells derived from SVF of mice



Lane 1-3; Ad-GFP group; Lane 4-6; Ad-SP1 group. * $P < 0.001$ compared with Ad-GFP group.

图7 Western blotting法检测2组细胞中SP1和Furin蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 7 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of SP1 and Furin proteins in cells in two groups detected by Western blotting method

Furin介导的前体蛋白剪切作用增强。

转录因子SP1已被证实在脂代谢调控网络中占据关键地位^[16]。研究^[17]显示:SP1可通过与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, PGC-1 α) 协同作用,参与高脂饮食诱导的氧化应激调控,其表达水平与脂肪组织炎症程度呈正相关关系,且SP1可通过调控脂代谢相关基因参与肥胖进程。本研究通过JASPAR数据库生物信息学分析发现:*Furin*启动子区存在高亲和力的SP1结合位点。双荧光素酶报告基因实验结果证实:过表达SP1可明显增强*Furin*启动子的转录活性,表明SP1能够直接靶向结合*Furin*启动子区并激活其转录。这种靶向调控关系从分子机制上解释了肥胖状态下SP1与Furin蛋白表达水平同步升高的现象,提示SP1-Furin轴可能构成肥胖进程中的正向调控通路。基于生物信息学分析还筛选到ZNF384和KLF5等潜在调控因子,其与*Furin*启动子的相互作用及其机制值得后续深入研究。

白脂素作为新发现的脂肪因子,其异常分泌与肥胖相关代谢紊乱有密切关联^[18-19]。研究^[3]显示:Furin是白脂素前体蛋白FBN1的关键裂解酶,但其上游调控机制尚未阐明。本研究双荧光素酶实验结果显示:SP1可明显增强*Furin*启动子活性,在SVF细胞分化为成熟脂肪细胞后,表明SP1可直接结合*Furin*启动子并激活其转录。在诱导SVF细胞分化为成熟脂肪细胞后,SP1过表达可上调Furin蛋白表达并促进白脂素分泌,证实SP1通过促进Furin表达驱动白脂素分泌。上述证据共同表明SP1对Furin转录具有直接调控作用。本研究建立了SP1-Furin-白脂素级联调控通路,从分子机制

层面解释了肥胖患者血清白脂素升高的潜在原因。相较于肝脏中Furin主要参与胰岛素受体加工^[4, 20-21],本研究结果提示:脂肪组织中该酶可能通过特异性调控白脂素成熟,在系统性能量平衡调节中发挥独特作用。

综上所述,高脂饮食可通过诱导SP1表达特异性激活*Furin*转录,进而促进白脂素分泌。本研究发现了SP1-Furin-白脂素调控轴,为深入理解脂肪组织内分泌功能和肥胖相关代谢紊乱的机制提供了理论依据。

* 石河子大学临床医学院2022级临床医学专业

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

董振亚参与研究设计、实验操作和论文撰写,张鑫铭参与实验质量控制和统计学分析,邓娅娅参与数据收集和分析,朱井玲参与数据收集和实验质量控制,菅辉玲参与研究设计,张云华参与研究设计和论文审阅及修改。

[参考文献]

- [1] GURIA S, HOORY A, DAS S, et al. Adipose tissue macrophages and their role in obesity-associated insulin resistance: an overview of the complex dynamics at play[J]. Biosci Rep, 2023, 43(3): BSR20220200.
- [2] UGUR K, ERMAN F, TURKOGLU S, et al. Asprosin, visfatin and subfatin as new biomarkers of obesity and metabolic syndrome [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2022, 26(6): 2124-2133.
- [3] ROMERE C, DUERRSCHMID C, BOURNAT J, et al. Asprosin, a fasting-induced glucogenic protein hormone[J]. Cell, 2016, 165(3): 566-579.
- [4] COPPOLA I, BROUWERS B, MEULEMANS S,

- et al. Differential effects of furin deficiency on insulin receptor processing and glucose control in liver and pancreatic β cells of mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6344.
- [5] FERRERO R, RAINER P, DEPLANCKE B. Toward a consensus view of mammalian adipocyte stem and progenitor cell heterogeneity [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(12): 937-950.
- [6] LIU X, LU J C, NI X Y, et al. FASN promotes lipid metabolism and progression in colorectal cancer *via* the SP1/PLA2G4B axis[J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 122.
- [7] ZHOU J Q, LIN L, CAI H, et al. SP1 impacts the primordial to primary follicle transition by regulating cholesterol metabolism in granulosa cells[J]. *FASEB J*, 2023, 37(2): e22767.
- [8] FENG P, CHE Y, GAO C Y, et al. Profibrotic role of transcription factor SP1 in cross-talk between fibroblasts and M2 macrophages[J]. *iScience*, 2023, 26(12): 108484.
- [9] CHEN H, SUN L J, FENG L, et al. Intermittent fasting promotes type 3 innate lymphoid cells secreting IL-22 contributing to the beigeing of white adipose tissue[J]. *eLife*, 2024, 12: RP91060.
- [10] ZHANG Y H, ZHU Z M, SUN L J, et al. Hepatic G protein-coupled receptor 180 deficiency ameliorates high fat diet-induced lipid accumulation *via* the Gi-PKA-SREBP pathway[J]. *Nutrients*, 2023, 15(8): 1838.
- [11] ZHU Z M, YANG Y X, SUN L J, et al. GPR180 reduces adiposity by inhibiting lipogenesis and fatty acid uptake in adipocytes [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2025, 328(3): E410-E419.
- [12] LIANG Y, LUO C, SUN L J, et al. Reduction of specific enterocytes from loss of intestinal LGR4 improves lipid metabolism in mice [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 4393.
- [13] SHI S, WANG J C, GONG H, et al. PGC-1 α -coordinated hypothalamic antioxidant defense is linked to SP1-LanCL1 axis during high-fat-diet-induced obesity in male mice[J]. *Antioxidants*, 2024, 13(2): 252.
- [14] BROUWERS B, COPPOLA I, VINTS K, et al. Loss of *Furin* in β -cells induces an mTORC1-ATF4 anabolic pathway that leads to β -cell dysfunction [J]. *Diabetes*, 2021, 70(2): 492-503.
- [15] HONG T, LI J Y, WANG Y D, et al. High serum asprosin levels are associated with presence of metabolic syndrome[J]. *Int J Endocrinol*, 2021, 2021: 6622129.
- [16] JIANG J F, ZHOU Z Y, LIU Y Z, et al. Role of Sp1 in atherosclerosis[J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(10): 9893-9902.
- [17] WICHAIYO S, KOONYOSYING P, MORALES N P. Functional roles of furin in cardio-cerebrovascular diseases[J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2024, 7(3): 570-585.
- [18] YOU M, LIU Y S, WANG B W, et al. Asprosin induces vascular endothelial-to-mesenchymal transition in diabetic lower extremity peripheral artery disease[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2022, 21(1): 25.
- [19] SUMMERS K M, BUSH S J, DAVIS M R, et al. Fibrillin-1 and asprosin, novel players in metabolic syndrome[J]. *Mol Genet Metab*, 2023, 138(1): 106979.
- [20] QUAN C, ZHU S S, WANG R Z, et al. Impaired SERCA2a phosphorylation causes diabetic cardiomyopathy through impinging on cardiac contractility and precursor protein processing [J]. *Life Metab*, 2022, 1(1): 54-66.
- [21] MADHOUN AAL, MOHAMMAD A, ABU-FARHA M, et al. FURIN R81C variant: a link to type 2 diabetes *via* impaired enzymatic activity[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2025, 329(1): E179-E189.