

· 实验研究 ·

羊栖菜多糖对 3T3-L1 前脂肪细胞分化及其相关基因表达的影响※

● 杨旭东¹ 石 杰¹ 杨骄霞² 王桂云¹ 宋高臣¹ 张 杰^{1▲}

摘 要 目的:探讨羊栖菜多糖(Sargassum fusiforme polysaccharide, SFPS)在 3T3-L1 前脂肪细胞分化中的作用及其机制。方法:采用 MTT 法测定细胞增殖活性,采用油红 O 染色分析细胞分化程度,采用生化法检测甘油三酯(triglyceride, TG)的含量,蛋白印迹法检测过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (Peroxisome proliferator activator receptor γ , PPAR γ)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)的蛋白表达。结果:不同浓度 SFPS 组与对照组比较,3T3-L1 细胞的分化显著抑制,细胞中的脂质及甘油三酯含量显著降低,PPAR γ 、FAS 蛋白表达显著减少。结论:SFPS 可以抑制 3T3-L1 细胞分化,其机制可能与抑制 PPAR γ 、FAS 蛋白表达有关。

关键词 羊栖菜多糖;3T3-L1 细胞;分化;基因表达;脂代谢

脂肪细胞是人体中重要的能量储存库,现代研究表明,脂肪细胞的数目增加、过度分化及代谢紊乱,与糖尿病、冠心病、动脉粥样硬化、肿瘤等疾病密切相关^[1]。因此,如何控制脂肪细胞生长和分化已成为治疗相关疾病的作用研究靶点。羊栖菜是一种食用海藻,隶属于褐藻门、马尾藻科、马尾藻属。羊栖菜多糖(Sargassum fusiforme polysaccharide, SFPS)从海藻羊栖菜中提取,研究发现其具有降血脂、抗氧化、抗疲劳、抗衰老、增强免疫力等生物活性^[2-4],本课题组前期的实验研究发现,SFPS 具有降低糖尿病大鼠血脂、改善胰岛素抵抗等作用^[5-6],但 SFPS 对脂肪细胞的增殖分化的影响及其机制未见报道。本研究观察 SFPS 对 3T3-L1 前脂肪细胞是否具有抑制增殖分化的作用,

并研究其对相关基因表达的影响。

1 材料

1.1 材料与试剂 前脂肪细胞 3T3-L1 购自美国 ATCC 公司(批号:62996847);DMEM 高糖培养液购自美国 Gibco 公司(批号:1782825);Trizol 购自美国 Gibco 公司(批号:15596-026);MTT 购自索莱宝有限公司(批号:303H0524);胰蛋白酶购自上海生工(批号:825J041);PPAR γ 抗体购自英国 Abcam 公司(批号:ab24509);FAS 抗体购自美国 CST 公司(批号:31080T); β -actin 抗体购自美国 CST 公司(批号:4970T);HRP 标记 IgG 二抗购自英国 Abcam 公司(批号:ab45966);其他试剂为国产分析纯。

1.2 仪器和设备 RCO-3000T-5V CO₂ 恒温培养箱(美国 G.S. 公司);7500 ABI 荧光定量 PCR(美国 Bio-Rad 公司);UV-5200PC 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);Elx808 酶标仪(美国 Biotek 公司);DYJ-909 倒置显微镜(上海点应光学仪器有限公司);Universal HoodII 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

※基金项目 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(No.2018-KYYWFMY-0035)

▲通讯作者 张杰,女,副教授。研究方向:中药的药理与毒理。E-mail:zhangjie03mdj@126.com

• 作者单位 1.牡丹江医学院(黑龙江 牡丹江 157011);2.牡丹江医学院附属红旗医院(黑龙江 牡丹江 157011)

2 实验方法

2.1 SFPS的制备 经200目粉碎的干燥羊栖菜,先用水煮醇沉法提取^[7-8],经3次水煮,3倍体积的95%乙醇沉淀,得到羊栖菜粗多糖(深褐色),然后用Sevag法去除羊栖菜粗多糖中的蛋白成分得到初步纯化的多糖,通过Sephadex G200凝胶柱用双蒸水洗脱分离纯化SFPS。用苯酚-硫酸比色法测定多糖含量,以葡萄糖为标准品,测得羊栖菜粗多糖中多糖含量为55.13%。

2.2 细胞培养 根据参考文献^[9],3T3-L1细胞培养于DMEM高糖培养基(10%新生牛血清、100mg/L链霉素、100IU/L青霉素),5%CO₂培养箱,37℃培养。

2.3 MTT检测3T3-L1前脂肪细胞相对增殖率 3T3-L1前脂肪细胞中选取对数生长期的,以1×10⁴/mL的细胞浓度,接种于96孔板,培养12h后,将细胞分为对照组(Control Group)、SFPS 100 mg/L组(SFPS 100 mg/L Group)、SFPS 200 mg/L组(SFPS 200 mg/L Group)和SFPS 400 mg/L组(SFPS 400mg/L Group),每个剂量设6个平行孔。继续培养24h、48h、72h后,每孔加入20μL MTT(5g/L)(调零组除外),4h后,弃去上清,加入150μL二甲基亚砷(DMSO),振荡15min,结晶物完全溶解。酶标仪于570nm处比色,测定各孔光密度(OD)值。根据OD计算细胞相对增殖率(Relative Growth Rate, RGR),按下列公式计算RGR。RGR=实验组OD值/对照组OD值×100%。

2.4 3T3-L1细胞内总脂质及细胞分化抑制率的测定 3T3-L1前脂肪细胞以1×10⁴/mL的细胞浓度,接种于96孔板,将细胞分为对照组(Control Group)、SFPS 100 mg/L组(SFPS 100 mg/L Group)、SFPS 200 mg/L组(SFPS 200 mg/L Group)和SFPS 400 mg/L组(SFPS 400 mg/L Group),每个剂量设6个平行孔。待细胞生长融合后48h(开始诱导分化,诱导分化第0天),含10%胎牛血清的DMEM培养液中加入胰岛素(10μg/mL)、IBMX(0.5mmol/L)、地塞米松(1mmol/mL)诱导分化培养2d。弃上清,然后加入胰岛素(10mg/L)的DMEM培养液继续培养2d。更换DMEM培养液,继续培养9d,细胞分化基本完成,细胞胞浆中充满脂滴,形状接近圆形。另未分化细胞组(Undifferentiated cell group, UD Group)培养于DMEM高糖培养基(10%FBS),5% CO₂培养箱,37℃培养,隔天换液,继续培养9d。在分化第9d,细胞用多聚甲醛(4%)固定30min,加入油红O:去离子水=3:2的染料,染色60min, PBS清洗2次,显微镜下观察细胞内有红

染的脂滴,细胞分化成熟。加入异丁醇250μL,反复吹打振荡5min,溶解油红O染料,吸取150μL染料溶解液,酶标仪于510nm,测定各组OD值,半定量脂肪细胞中总脂质含量并计算细胞分化抑制率。细胞分化抑制率(%)=(OD对照组-OD药物组)/OD对照组×100%。

2.5 SFPS对3T3-L1细胞TG的影响 在分化第9d,收集分化成熟的细胞后,用细胞裂解液裂解细胞,离心取上清,按照TG测定试剂盒说明操作,测定TG含量。于500nm处测定吸光度值,吸光度值与TG浓度呈正比, TG单位为mmol/L。

2.6 SFPS对3T3-L1细胞中PPARγ、FAS蛋白表达的影响 按照上述方法诱导3T3-L1前脂肪细胞分化,在诱导分化开始,加入不同浓度的SFPS,每个剂量设6个平行孔。在分化第9d,收集分化成熟的细胞,测定PPARγ、FAS蛋白表达量。裂解细胞提取蛋白:加入100μL细胞裂解液,冰上裂解细胞10min,用细胞裂解液裂解细胞提取总蛋白,BCA法定量。电泳:每组取40μg蛋白,加样于10%SDS-PAGE中电泳分离。转膜封闭:电泳结束后,湿式转膜法280mA 70min转移蛋白至PVDF膜,5%脱脂奶封闭液,室温封闭2h。特定蛋白测定:分别加入对应的一抗,4℃孵育12h;TBST洗膜10min×3次,加入相应的辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,孵育2h后,弃去二抗;TBST洗膜10min×3次,加入显影剂ECL200mL,定影。用凝胶成像系统进行灰度值分析。

2.7 统计学分析 统计学处理采用SPSS 18.0软件,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较采用ANOVA检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 SFPS对3T3-L1前脂肪细胞相对增殖率的影响 不同浓度的SFPS处理3T3-L1前脂肪细胞24h、48h后,与对照组比较,各剂量组的细胞相对增殖率无统计学差异(P>0.05);而在72h后,与对照组比较,400 mg/L组的细胞相对增殖率显著下降(P<0.05)。表明SFPS在100~400 mg/L的剂量范围内,培养72h,对3T3-L1的增殖有抑制,但抑制作用不显著。见表1。

3.2 SFPS对3T3-L1细胞总脂质及分化抑制率的影响 与对照组比较,不同浓度SFPS作用后,分化成熟的脂肪细胞中总脂质含量显著降低(P<0.01),SFPS 400 mg/L组降低最明显,说明SFPS在脂肪细胞分化过

表1 SFPS对3T3-L1前脂肪细胞相对增殖率的影响($\bar{x} \pm s$, n=6)

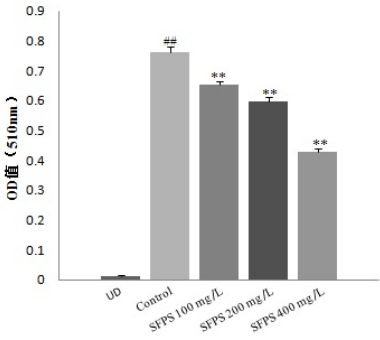
组别	细胞相对增殖率(%)		
	24 h	48 h	72 h
对照组	100.00	100.00	100.00
SFPS 100 mg/L组	99.12 ± 4.32	98.63 ± 4.63	95.93 ± 4.71
SFPS 200 mg/L组	98.35 ± 4.12	98.27 ± 4.26	93.16 ± 3.04
SFPS 400 mg/L组	98.24 ± 3.51	97.95 ± 3.07	85.10 ± 2.83*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

程中能够减少细胞中总脂质含量。并通过测定的OD值,计算出脂肪细胞分化抑制率,SFPS 100 mg/L组、SFPS 200 mg/L组和SFPS 400 mg/L组的细胞分化抑制率分别为14.51%、21.82%、44.11%。说明不同浓度SFPS均可抑制脂肪细胞的分化($P < 0.01$),SFPS 400 mg/L组抑制效果最显著($P < 0.01$)。见图1。

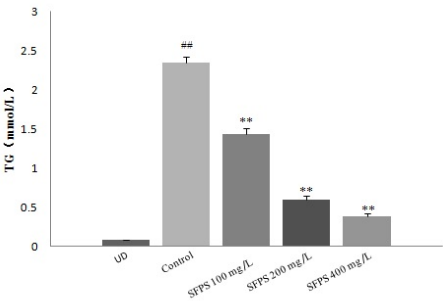
2.3 SFPS对3T3-L1细胞中TG含量的影响 与对照组比较,不同浓度SFPS作用后,分化成熟的脂肪细胞中TG含量显著降低($P < 0.01$),SFPS 400 mg/L组TG含量降低最明显,说明SFPS在脂肪细胞分化过程中能够减少细胞中TG含量。见图2。

3.4 SFPS对3T3-L1细胞中PPAR γ 、FAS蛋白表达的影响 与对照组比较,SFPS各剂量组PPAR γ 、FAS蛋白表达量均显著降低($P < 0.01$),且PPAR γ 、FAS蛋白表达量随着SFPS浓度的增高而逐渐降低。说明



注:与对照组相比,** $P < 0.01$;与未分化组相比,## $P < 0.01$

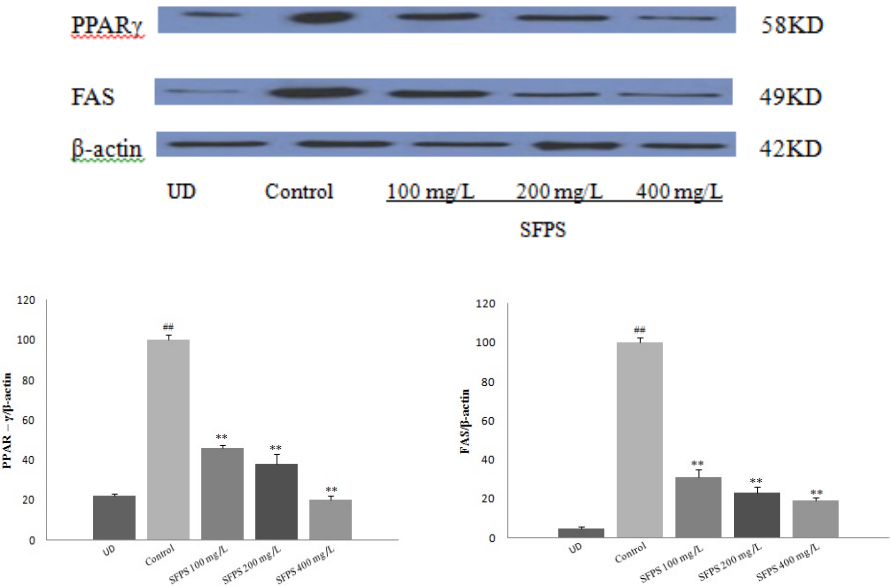
图1 SFPS对3T3-L1细胞中脂质含量的影响



注:与对照组相比,** $P < 0.01$;与未分化组相比,## $P < 0.01$ 。

图2 SFPS对3T3-L1细胞甘油三酯含量的影响

SFPS在脂肪细胞分化过程中,能够通过影响细胞中PPAR γ 、FAS蛋白表达量来抑制3T3-L1细胞分化。见图3。



注:与对照组相比,** $P < 0.01$;与未分化组相比,## $P < 0.01$ 。

图3 SFPS对3T3-L1细胞中PPAR- γ 、FAS蛋白表达的影响

4 讨论

SFPS是从褐藻门食用海藻羊栖菜中提取的多糖成分,主要包括褐藻淀粉、褐藻糖胶和褐藻酸。SFPS已被证实具有降血脂、抑制脂质沉积和保护脂肪变的肝细胞等作用^[10-11],本课题组前期的实验研究也进一步验证了其在脂代谢中的作用。肥胖、脂肪细胞的过度增殖分化及代谢紊乱与多种疾病相关^[12],因此,本实验进一步研究SFPS对3T3-L1前脂肪细胞分化是否具有抑制作用,并初步探讨其作用机制。

前脂肪细胞要经过融合前增殖、接触抑制、克隆扩增、扩增停止四个阶段分化为成熟的脂肪细胞^[13],此过程中需要多种转录因子诱导细胞转化,促进脂滴形成。PPAR γ 属于核内受体转录因子超家族,是众多脂肪分化因子中最关键的,可直接调控脂肪细胞分化,参与脂的代谢^[14-15],PPAR γ 与生理性或药理性配体结合后,改变构象,结合相关DNA上的PPAR γ 反应元件,从而调节相关基因的转录。PPAR γ 是脂肪细胞分化过程中必须的转录因子,可进一步调控脂代谢的相关酶的表达。为了研究SFPS对3T3-L1前脂肪细胞分化的影响,诱导分化开始,加入不同浓度的SFPS。实验结果显示,在分化第9d,不同浓度的SFPS各组细胞中PPAR- γ 蛋白的表达量显著减少。

FAS是脂肪酸合成的关键酶^[16],以乙酰辅酶A为原料催化生成链脂肪酸,并进一步形成甘油三酯储存于细胞中。实验研究表明,脂肪组织中FAS的mRNA表达量与肥胖是正相关的,抑制FAS的量可以减少脂滴的生成^[17-18]。PPAR γ 是前脂肪细胞分化关键的转录因子,而FAS出现在分化的中期、后期,属于PPAR γ 下游靶基因之一,调节脂类的合成、储存。实验结果显示,在分化第9d,不同浓度的SFPS各组细胞中FAS蛋白的表达量显著减少,表明SFPS可通过降低FAS蛋白的表达,抑制3T3-L1中脂质的生成。

本研究结果显示:①SFPS抑制3T3-L1前脂肪细胞分化,减少脂肪细胞中总脂质及TG的含量,浓度越大,抑制作用越明显。②SFPS可以明显下调3T3-L1细胞PPAR γ 蛋白的表达,降低FAS蛋白的表达。实验结果提示,SFPS抑制3T3-L1前脂肪细胞分化的分子机制可能与调控PPAR γ 和FAS蛋白的表达有关。

参考文献

[1] Wueest S, Item F, Lucchini F C, et al. Mesenteric fat lipolysis mediates

obesity-associated hepatic steatosis and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2016, 65(1): 140-148.

[2] 丁浩森,谢作亮,谢 琰,等. 羊栖菜活性多糖的提取与生物活性研究进展[J]. *药物生物技术*, 2015, 22(4): 369-372.

[3] 赵子慧,徐 曼,刘阿梅,等. 羊栖菜多糖通过激活 JNK/Nrf2/ARE 信号通路延缓小鼠衰老进程作用研究[J]. *中草药*, 2018, 49(23): 5600-5609.

[4] 陈柳君,宁亚静,康彩峰,等. 羊栖菜多糖提取及免疫活性初步探究[J]. *中国海洋药物*, 2017, 36(3): 81-88.

[5] 杨旭东,张 杰,崔荣军. 羊栖菜多糖改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的实验研究[J]. *中国海洋药物*, 2011, 30(4): 42-44.

[6] 杨旭东,张 杰,杨晓霞. 羊栖菜多糖对 2 型糖尿病大鼠脂肪分化相关蛋白表达的影响[J]. *中国食物与营养*, 2011, 17(6): 62-63.

[7] 高坛玉,刘思渊,林国荣,等. 羊栖菜多糖分离工艺的研究[J]. *农业科技与装备*, 2018, 40(6): 57-61.

[8] 蒋定文,沈先荣,贾福星,等. 羊栖菜多糖的提取及纯化[J]. *食品科学*, 2007, 28(12): 136-138.

[9] Montagut G, Blade C, Blay M, et al. Effects of a grapeseed procyanidin extract (GSPE) on insulin resistance [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2010, 21(10): 961-967.

[10] 姬云涛,王 娟,张 会,等. 羊栖菜多糖抑脂沉积及其机制研究[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2015, 24(1): 40-42.

[11] 吴利敏,夏盛隆,申苏建,等. L02 脂肪变模型中氧化应激的发生及羊栖菜多糖的干预作用[J]. *中国现代医生*, 2017, 55(34): 17-19.

[12] Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L, et al. Novel insights of dietary polyphenols and obesity [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2014, 25(1): 1-18.

[13] Lakind Judy S, Michael Goodman, Mattison Donald R. Bisphenol A and indicators of obesity, glucose metabolism/type 2 diabetes and cardiovascular disease: a systematic review of epidemiologic research[J]. *Critical reviews in toxicology*, 2014, 44(2): 120-150.

[14] 郝丹丹,张凤宁,张 垒,等. 过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 与肥胖及 2 型糖尿病的关系研究进展[J]. *中国全科医学*, 2013, 16(15): 1697-1701.

[15] Huang B, Yuan HD, kim DY, et al. Cinnamaldehyde prevents adipocyte differentiation and adipogenesis via regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) and AMP-activated protein kinase (AMPK) pathways[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59 (8): 3666-3673.

[16] 孙可丰,李 娜,时思毛,等. 中药异位宁对子宫内异位症大鼠 Bel-2、Fas、Caspase-3 信号传导通路的影响[J]. *中医药信息*, 2015, 32 (6): 44-46.

[17] 梁丽英,张国海,许瑞安. 脂肪酸合成酶抑制剂研究热点及其开发[J]. *中国现代应用药学*, 2010, 27(4): 300-303.

[18] Stuart Smith, Andrzej Witkowski, Joshi Anil K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase [J]. *Progress in Lipid Research*, 2003, 42(4): 289-317.

(收稿日期:2020-06-13)

(本文编辑:蒋艺芬)