

啤酒花提取物对原代棕色脂肪细胞功能的影响及其机制

陆鸿远^{1,2}, 李 想¹, 王常丽¹, 赵庆春^{1*}

1. 沈阳军区总医院 药剂科, 辽宁 沈阳 110840

2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

摘要: **目的** 探讨啤酒花提取物对原代棕色脂肪细胞增殖和功能的影响及潜在机制, 为 2 型糖尿病和肥胖症的治疗提供新依据。**方法** 体外培养新生鼠棕色脂肪前体细胞, 添加不同质量浓度啤酒花提取物, 用 MTT 法检测细胞的增殖; 诱导分化成熟后, 用油红 O 染色以染色比色法分析细胞脂滴消耗程度; 采用 Western blotting 技术检测相关蛋白表达水平, 包括解耦联蛋白 1 (UCP1)、p38 α 丝裂原激活蛋白激酶 (p38 α MAPK)、过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助活化因子 1 α (PGC1 α)。**结果** 啤酒花提取物对原代前棕色脂肪细胞的增殖没有影响; 与对照组比较, 随着质量浓度的增加, 啤酒花提取物可以显著提高脂滴消耗率; 啤酒花提取物能够使棕色脂肪细胞中 UCP1、p38 α MAPK 和 PGC1 α 蛋白表达水平上升。**结论** 啤酒花提取物可以提高棕色脂肪细胞产热功能, 加强能量代谢, 其可能机制是增强 p38MAPK-PGC1 α -UCP1 级联反应, 进而提高棕色脂肪特异性蛋白 UCP1 的表达。

关键词: 啤酒花; 棕色脂肪细胞; 肥胖症; 解耦联蛋白 1; p38 α 丝裂原激活蛋白激酶; 过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助活化因子 1 α

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)07-1374-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.07.019

Effects of *Humulus lupulus* extract on function of primary brown adipose tissue cells and its mechanisms

LU Hong-yuan^{1,2}, LI Xiang¹, WANG Chang-li¹, ZHAO Qing-chun¹

1. Department of Pharmacy, General Hospital of Shenyang Military Area Command, Shenyang 110840, China

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of *Humulus lupulus* extract on the function of primary brown preadipocyte and its mechanisms, and try to provide new treatment for obesity and type 2 diabetes. **Methods** Primary brown adipocytes in newborn rats were cultivated *in vitro*. After adding different doses of *H. lupulus* extract, MTT method was used to detect the cell proliferation, and oil red O staining method was used to analyze the lipid droplets consumption rate of *H. lupulus* extract on the brown adipocyte. The proteins expression of brown adipocytes (such as UCP1, p38 α MAPK, and PGC1 α) in different groups was detected by Western blotting. **Results** The cell proliferation of primary brown preadipocytes was not effected by *H. lupulus* extract. Compared with control group, with the increasing dose, the lipid droplets consumption rate of *H. lupulus* extract on the brown adipocyte was increased. The expression of UCP1, p38 α MAPK, and PGC1 α was upregulated compared with the control group. **Conclusion** *H. lupulus* extract may improve the heat production of brown adipocytes, and strengthen the energy metabolism. The possible mechanism may via enhancing p38MAPK-PGC1 α -UCP1 cascade reaction, sequentially increasing the expression of brown fat specificity protein UCP1.

Key words: *Humulus lupulus* L.; primary brown adipocytes; obesity; UCP1; p38 α MAPK; PGC1 α

随着人们生活水平的提高, 肥胖问题也日益显著。肥胖能使许多威胁人类生存的疾病危险性增加, 比如心血管疾病、代谢性疾病等。因此, 研发治疗肥胖以及肥胖带来的相关疾病的新手段至关重要。

人体内主要存在 2 种脂肪组织, 它们在能量调节中发挥的作用是截然相反的, 白色脂肪组织的主要功能是将多余的能量以三酰甘油 (TG) 的形式储存; 棕色脂肪组织则是能通过将能量转化为热量形式

收稿日期: 2016-10-03

基金项目: 后勤科研项目重大专项 (AWS14L008)

作者简介: 陆鸿远, 女, 硕士研究生, 从事临床药理的研究。E-mail: 13332413620@163.com

*通信作者 赵庆春, 男, 博士生导师, 研究方向为基于靶点的天然活性产物的发现及作用机制研究。Tel: (024)28856205 E-mail: Zhaoqingchun1967@163.com

而维持体温。因此,促进棕色脂肪组织的形成和激活它的功能,有可能通过增加能量消耗而实现控制肥胖的目的。

啤酒花 *Humulus lupulus* L., 又名忽布(英语名称 Hop 的音译)、香蛇麻花、酒花、野酒花,《本草纲目》上称为蛇麻花,是一种多年生草本蔓性植物^[1]。研究表明,啤酒花提取物及其复方制剂具有抗菌、抗肿瘤、抗氧化、镇静、雌激素样作用等多种生物活性。近年来,有研究报道,啤酒花提取物可以通过过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α) 的激活增加肝脏脂质过氧化及抑制肠内脂类吸收来预防饮食诱导的肥胖^[2]。进一步的研究表明,啤酒花提取物尤其是其中的苦味成分能够抑制饮食诱导的脂肪积累,其机制可能是通过提高棕色脂肪组织的产热功能来实现的^[3]。这些结果均提示啤酒花具有抵消体内脂肪积累的潜力。因此其对棕色脂肪细胞的能量消耗和产热功能的影响及作用机制值得进一步探讨。

本实验以体外培养的原代前棕色脂肪细胞为研究对象,并对其进行诱导分化,探究啤酒花提取物对其增殖和产热功能的影响,并观察相关通路及功能蛋白的表达水平的变化,为探讨啤酒花提取物对原代棕色脂肪细胞功能影响的作用机制提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

2 日龄以内新生 SD 大鼠,种鼠购自辽宁长生生物科技公司,实验动物生产许可证号 SCXK(辽)2010-0001。

1.2 药物与试剂

啤酒花提取物(含黄酮 4%,西安昌岳植物化工有限公司,批号 CYPJh20151006); DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)(美国 Hyclone 公司);胰岛素、地塞米松、3-异丁基-1-甲基次黄嘌呤、IBMX、II 型胶原酶、胰酶(美国 Sigma 公司);牛血清白蛋白、HEPES(美国 Biosharp 公司);红细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液、线粒体蛋白提取试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、蛋白标准、ECL 辣根过氧化物酶显色试剂盒、PMSF(碧云天生物技术有限公司);油红 O(HZB0673-5, 西亚试剂), p38 α 丝裂原激活蛋白激酶(p38 α MAPK)抗体(9218P, CST, 美国);解耦联蛋白 1(UCP1)抗体(14670S, CST, 美国);过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助活化因子 1 α

(PGC1 α) 抗体(wl02123, 沈阳万类生物科技有限公司)。

1.3 仪器

倒置生物显微镜(日本 Olympus 公司); Ex1 800 酶标仪(Bio-tek Instrument); XK96-3 型微量振荡器(江苏新康医疗器械有限公司); 台式低温高速离心机(Gene); CO₂ 培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司); 水平层流洁净工作台(上海上净净化设备有限公司); 数显恒温水浴锅(金坛市双捷实验仪器厂)。

2 方法

2.1 原代细胞培养

参照文献方法^[4],取 8 只 48 h 内新生 SD 大鼠置于 75%乙醇浸泡 5 min,于超净工作台中剪开新生鼠肩胛部皮肤,小心取出该部位“蝴蝶状”棕色脂肪组织,在无菌预冷的 PBS 中洗涤并剔除表面结缔组织和白色脂肪组织,将棕色脂肪组织剪碎成约 1 mm³ 的小块,转移至无菌 15 mL 离心筒中,加入组织消化液(II 型胶原酶 1.5 g/L、牛血清白蛋白 20 g/L、HEPES 1.2 g/L)后置于 37 °C 水浴锅中消化 30 min,间断摇晃使消化完全。随后分别经过 30 目筛网及 300 目筛网滤过,滤液 200 $\times$ g 离心 5 min,去除上清,用红细胞裂解液重悬细胞,室温裂解 5 min 后 200 $\times$ g 离心 5 min, DMEM 完全培养液洗涤沉淀后 200 $\times$ g 离心 5 min,随后以含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基重悬细胞接种于 60 mm² 培养皿中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。6~8 h 后用 PBS 冲洗悬浮细胞,同时更换新鲜培养液后继续培养。

2.2 原代前棕色脂肪细胞的诱导分化

参照文献方法^[4],上述得到的前脂肪细胞生长在含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基,接近单层融合(汇合度大于 90%)时更换为诱导分化液 I(DMEM 完全培养基加入 0.5 mmol/L IBMX、1 μ mol/L 地塞米松、10 μ g/mL 胰岛素),记为诱导分化第 0 天,继续培养;于诱导分化第 2 天,即 48 h 后将培养液换为诱导分化液 II(DMEM 完全培养基加入 10 μ g/mL 胰岛素),继续培养。以后每 2 天更换成 DMEM 培养液 1 次并在显微镜下观察细胞形态变化。实验重复 3 次。

2.3 细胞活力测定及形态学观察

将对数生长期的原代前棕色脂肪细胞以 1 $\times$ 10⁴ 个/孔接种于 96 孔板中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞密度至 80%以上,分别加入

终质量浓度为 100、50、25、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 的啤酒花提取物作用 24、36、48 h，对照组加入等体积培养液。作用完毕后，每孔加入 MTT (5 mg/mL) 继续培养 4 h。弃去培养液，加入 150 μL DMSO，置于微量振荡器上低速振荡 10 min，使结晶物充分溶解，在酶联免疫检测仪 490 nm 波长处测吸光度 (A) 值，计算存活率 (存活率 = 样品组 A 值的平均值/对照组 A 值的平均值)。同时倒置生物显微镜观察各组细胞生长情况。实验重复 3 次。

2.4 油红 O 染色和脂滴萃取定量

将对数生长期的原代前棕色脂肪细胞以 1×10^5 个/孔接种于 12 孔板中，1 mL/孔，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。待细胞接近单层融合 (汇合度大于 90%)，换用诱导分化液 I (同“2.2”项) 培养 48 h，然后换用诱导分化液 II (同“2.2”项) 培养 48 h，随后再换用完全培养基继续培养，每 2 天换液 1 次，培养 4 d，90% 以上细胞分化为成熟脂肪细胞。在诱导分化成熟后开始添加质量浓度梯度为 100、50、25、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 的啤酒花提取物，对照组培养液更换为 DMEM 完全培养液。对不同质量浓度啤酒花提取物作用 48 h 的棕色脂肪细胞进行油红 O 染色，弃培养液后用 10% 中性甲醛溶液室温固定细胞约 1 h，向固定好的细胞中加入 300 μL /孔配好的油红 O 应用液 (0.5 g 油红 O 溶于 100 mL 异丙醇)，染色 10 min。蒸馏水洗去多余染液，进行萃取定量，向拍照后的培养皿中每孔加入 1 mL 异丙醇萃取脂滴，于微量振荡仪振荡 10 min，在酶联免疫检测仪波长为 570 nm 处测 A 值。计算脂滴

消耗率 (脂滴消耗率 = $1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{对照}}$)。实验重复 3 次。

2.5 Western blotting 检测相关蛋白的表达

向诱导分化成熟后的棕色脂肪细胞中分别加入质量浓度为 100、50、25、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 的啤酒花提取物，培养 48 h 后，裂解细胞，提取细胞总蛋白，采用酶标仪进行蛋白定量。配制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳；上样，进行 SDS-PAGE 电泳；转膜，5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h；分别加入一抗 (UCP1、P38 α MAPK、PGC1- α ，1:1 000) 1 mL/ cm^2 ，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，TBST 洗涤 3 次，5 min/次；二抗 (UCP1、P38 α MAPK、PGC1- α ，1:10 000)，室温孵育 2 h，TBST 洗涤 3 次，5 min/次。以 ECL 试剂盒显色，X 光胶片成像，扫描记录。实验重复 3 次。

2.6 统计学分析

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 GraphPad Prism 5 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Tukey 多重检验。

3 结果

3.1 原代前棕色脂肪细胞的培养及诱导分化情况

接种细胞在数小时后贴壁为类圆形细胞，贴壁后 2 d 细胞逐渐伸展开，大多细胞呈梭形改变 (图 1)。进行诱导分化后，细胞生长停滞进入分化过程，胞内产生大量大小不等的环形小脂滴 (图 1)。油红 O 染色后细胞内出现红染颗粒证明镜下所见细胞内颗粒为脂滴 (图 1)。此为棕色脂肪特征性标志，表明所培养细胞为棕色脂肪细胞。

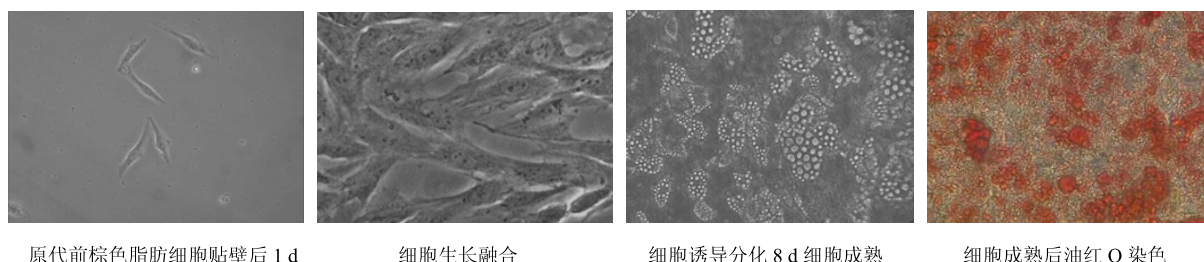


图 1 原代前棕色脂肪细胞及其分化成熟后的形态

Fig. 1 Morphology of primary brown preadipocyte and adipocyte

3.2 啤酒花提取物对原代前棕色脂肪细胞增殖的影响

100、50、25、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 啤酒花提取物处理原代前棕色脂肪细胞 24、36 或 48 h。与对照组相比，不同质量浓度啤酒花提取物作用不同时间对原代前棕色脂肪细胞增殖均无明显影响。说明啤酒花提取物对前棕色脂肪细胞增殖无抑制作用，结果见图 2。

3.3 油红 O 染色定量检测细胞脂滴消耗的情况

在显微镜下观察，油红 O 染色结果显示加药组的脂滴明显少于对照组，见图 3，油红 O 染色后应用酶标仪进行定量，加药组的脂滴有所消耗，并呈一定剂量依赖性。与对照组比较，50、100 $\mu\text{g/mL}$ 啤酒花提取物对脂滴的消耗程度明显增加，见图 4。

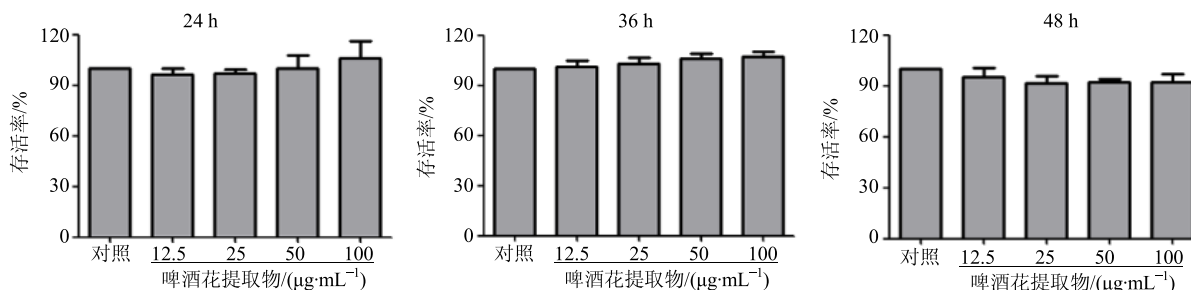


图 2 啤酒花提取物对原代前棕色脂肪细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of *H. lupulus* extract on cell viability of brown preadipocyte ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

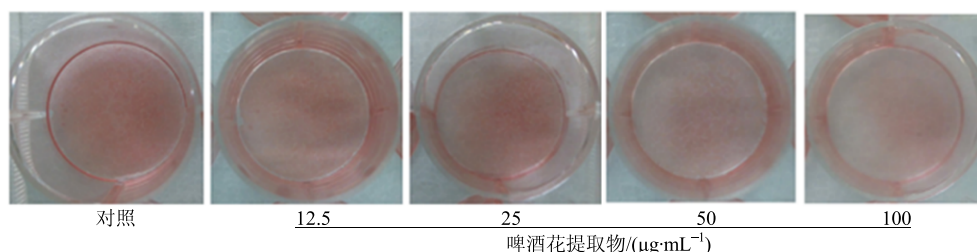
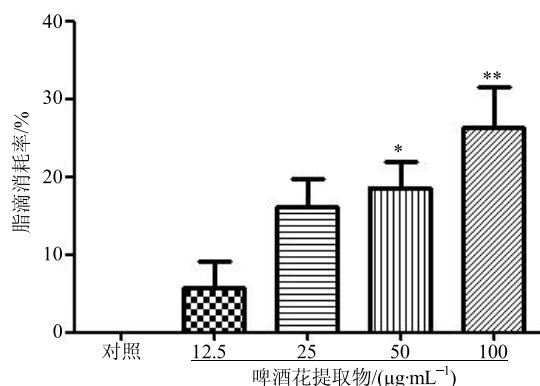


图 3 啤酒花提取物干预后棕色脂肪细胞油红 O 染色结果

Fig. 3 Oil red O staining result of brown adipocyte treated by *H. lupulus* extract



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 4 啤酒花提取物对棕色脂肪细胞的脂滴消耗率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Lipid droplets consumption rate of brown adipocyte treated by *H. lupulus* extract ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 Western blotting 检测蛋白表达及灰度分析

棕色脂肪细胞蛋白表达检测结果显示, 各质量浓度啤酒花提取物均可上调 UCP1、PGC1- α 和 p38 α MAPK 蛋白表达。与对照组相比, 在 12.5 μ g/mL 时, 给药组蛋白水平变化均无显著性差异, 但具有上升趋势; 其他质量浓度条件下, 各蛋白表达水平变化均具有显著差异, 其中质量浓度为 25 μ g/mL 时, UCP1 和 PGC1- α 的蛋白水平变化具有非常显著的差异 ($P < 0.001$), p38 α MAPK 蛋白水平变化

具有较为显著的差异 ($P < 0.01$)。结果见图 5。

4 讨论

成熟的棕色脂肪细胞是终末期分化细胞, 不再具有增殖和分化的能力, 体内研究棕色脂肪细胞的增殖与分化存在困难, 因此本实验采用原代前棕色脂肪细胞作为研究对象。研究结果表明, 不同质量浓度的啤酒花提取物在 24、36、48 h 时间点, 对原代前棕色脂肪细胞增殖均没有影响。在分化方面, 原代前棕色脂肪细胞可以成功分化为成熟的棕色脂肪细胞, 并不受啤酒花提取物的影响。并且通过油红 O 染色定量法检测细胞模型的棕色脂肪细胞产热功能, 发现啤酒花提取物可以呈剂量依赖性地促进成熟棕色脂肪细胞脂滴的消耗, 加强能量代谢。

棕色脂肪细胞的功能不仅有成脂的功能, 还有促进能量代谢的产热功能。棕色脂肪组织中含有大量的线粒体, 因此其颜色比较深, 呈棕色, 名字也由此得来。在过去, 棕色脂肪组织被认为只存在于啮齿动物及新生儿体内为了帮助他们快速适应冷环境, 最近研究表明成年人体也存在功能性棕色脂肪组织^[5-7], 因此, 促进棕色脂肪组织的形成和激活它的功能, 通过增加能量消耗可能实现控制肥胖的目的。不同于其他家族成员, 作为唯一存在棕色脂肪组织中的 UCP1, 主要参与产热调节和能量代谢^[8-9]。UCP1 存在于线粒体内膜上对棕色脂肪的产热功能

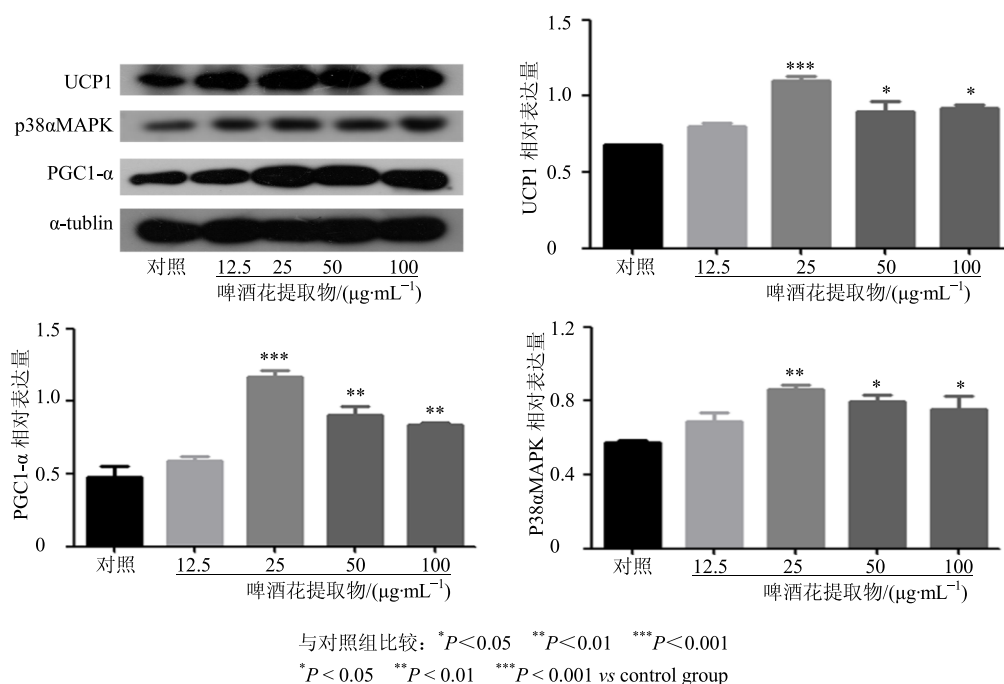


图 5 啤酒花提取物对棕色脂肪细胞中 UCP1、P38αMAPK 和 PGC1-α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of *H. lupulus* extract on protein expression of UCP1, P38αMAPK, and PGC1-α in brown adipocytes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

起着至关重要的作用,它可以通过线粒体呼吸链解耦联作用使能量转化为热量,而不产生 ATP^[10],所以 UCP1 被认为是调节产热、调控能量代谢和维持体质量的重要蛋白^[11]。棕色脂肪中的 UCP1 蛋白表达水平远远高于其他组织,是棕色脂肪的特异性蛋白。

本实验结果表明,给予啤酒花提取物组细胞的棕色脂肪特异性蛋白 UCP1 明显上调,这提示啤酒花提取物可有效提高棕色脂肪组织的产热功能。同时,实验结果显示加药组细胞的 PGC1-α 蛋白水平显著上调,而 PGC1-α 是调控 UCP1 表达的关键调节因子,这提示啤酒花提取物的作用可能是基于棕色脂肪组织,通过调控 UCP1 上游的 PGC1-α 表达水平使功能蛋白 UCP1 的表达水平升高。据报道, p38αMAPK 通过激动交感神经系统来诱导 UCP1 表达的^[12-13]。在体内和体外模型中,通过刺激 β-AR 可以诱发从 PKA 到 p38αMAPK 的激酶级联反应,从而磷酸化 PGC1α^[12-13],这个过程有助于线粒体生成和提高棕色脂肪细胞的整体产热能力。本研究发现,给药组的 p38αMAPK 和 PGC1α 的蛋白水平明显表达上调,提示啤酒花提取物升高棕色脂肪细胞功能蛋白 UCP1 表达的可能机制是通过引发 p38MAPK-PGC1α-UCP1 级联反应。值得注意的是,

p38MAPK、PGC1α 和 UCP1 这 3 个蛋白均在 25 μg/mL 时表达最高,这与油红 O 结果不一致。推测,啤酒花提取物在 25 μg/mL 就能使这 3 个关键蛋白大量表达,但是还有可能通过其他因素调控棕色脂肪的生成,这些将在后期实验中进一步研究验证。

综上所述,啤酒花提取物不影响原代前棕色脂肪细胞增殖及向成熟棕色脂肪细胞分化,而且可以促进棕色脂肪细胞的能量消耗,加强产热功能,显著提高棕色脂肪细胞功能。探讨其潜在机制,这可能与升高棕色脂肪细胞的功能蛋白 UCP1 表达水平有关,可能是通过 p38MAPK-PGC1α-UCP1 级联反应而发挥其作用。而激动 UCP1 增加能量代谢可能成为潜在治疗肥胖的新手段^[11]。目前的减肥药主要是通过控制能量的摄入达到减肥目的,例如抑制食欲和脂肪吸收率,但长期应用会导致抑郁或脂肪泻等副作用,减低患者的依从性。啤酒花是天然植物,毒副作用相对较小,并且是通过能量消耗达到减肥目的,具有很好的减肥调脂药物和保健食品的潜能。

参考文献

- [1] 谢宗万. 全国中草药汇编 (上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [2] Yajima H, Noguchi T, Ikeshima E, et al. Prevention of

- diet-induced obesity by dietary isomerized hop extract containing isohumulones in rodents [J]. *Int J Obes*, 2005, 29(8): 991-997.
- [3] Yumie M K, Kazuaki O, Chika T, *et al.* Matured hop bittering components induce thermogenesis in brown adipose tissue via sympathetic nerve activity [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0131042.
- [4] 刘娟, 王龙, 胡淼, 等. 小鼠棕色脂肪原代培养模型的建立 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2011, 31(12): 1752-1755.
- [5] Cypess A M, Lehman S J, Williams G P, *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans [J]. *New Engl J Med*, 2009, 360(15): 1509-1517.
- [6] Lichtenbelt W D, Vanhommerig J W, Smulders N M, *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men [J]. *New Engl J Med*, 2009, 360(15): 1500-1508.
- [7] Farmer S R. Obesity: Be cool, lose weight [J]. *Nature*, 2009, 458(7240): 839-840.
- [8] Matthias A, Ohlson K, Fredriksson B E, *et al.* Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(33): 25073-25081.
- [9] Azzu V, Brand M D. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35(5): 298-307.
- [10] Lee P S, Warbrick M M, Zhao J T, *et al.* Inducible brown adipogenesis of supraclavicular fat in adult humans [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(10): 3597-3602.
- [11] Boss O, Farmer S R. Recruitment of brown adipose tissue as a therapy for obesity-associated diseases [J]. *Front Endocrinol*, 2012, 9(3): 107-115.
- [12] Cao W, Medvedev A V, Daniel K W, *et al.* β -adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase [J]. *Biol Chem*, 2001, 276(29): 27077-27082.
- [13] Cao W, Daniel K W, Robidoux J, *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(7): 3057-3067.