

催产素对 3T3-L1 脂肪细胞糖脂代谢的影响

朱天一, 钱唯韵, 汤冰倩, 胡 浩, 俞淑琴, 孙文君, 袁国跃
江苏省人民医院, 江苏 南京 210029

摘要: **目的** 观察催产素对 3T3-L1 脂肪细胞糖脂代谢的影响。**方法** 3T3-L1 前脂肪细胞体外培养, 并诱导其分化成熟为脂肪细胞。研究催产素对脂肪细胞葡萄糖消耗量以及三酰甘油、游离脂肪酸和甘油的影响。采用实时荧光定量 PCR 法检测糖脂代谢相关基因 GLUT-1、GLUT-4、ATGT、HSL 的 mRNA 表达。**结果** 与对照组比较, 催产素 20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组葡萄糖消耗量有所增加, 且表现出剂量相关。催产素组较对照组的三酰甘油降低, 而甘油和游离脂肪酸增高。催产素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组中脂代谢相关基因 HSL 表达明显高于对照组, 糖代谢相关基因 GLUT-4 mRNA 表达水平增加。**结论** 催产素处理可减少 3T3-L1 细胞脂质合成、增加脂质分解作用, 并可明显改善脂质积聚。

关键词: 催产素; 3T3-L1 脂肪细胞; 葡萄糖消耗量; 脂肪代谢

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)11-1224-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.11.007

Effect of oxytocin on glucose and lipid metabolism of 3T3-L1 adipocytes

ZHU Tian-yi, QIAN Wei-yun, TANG Bing-qian, HU Hao, YU Shu-qin, SUN Wen-jun, YUAN Guo-yue
Jiangsu Province Hospital, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To study the effect of oxytocin on glucose and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes. **Methods** Preadipocytes from 3T3-L1 cell line were cultured *in vitro* and induced to differentiate to adipocytes. Mature adipocytes were treated with oxytocin. Glucose consumption, triglyceride, free fat acid, and glycerol levels were determined. The mRNA expression of differentiation marker genes such as GLUT-1, GLUT-4, ATGT, and HSL were evaluated by RT-PCR method. **Results** The glucose consumption in the oxytocin (20, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) groups were increased with dose-dependent relationship compared with control group. Triglyceride in the oxytocin group was lower than that in control group, while glycerol and free fatty acid decreased. There was significant increase of expression levels of lipid metabolism related gene HSL and sugar metabolism related gene GLUT-4 mRNA in the oxytocin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group compared with control group. **Conclusion** Treatment of oxytocin may reduce 3T3-L1 cell lipid synthesis, increase lipid decomposition, and obviously improve lipid accumulation.

Key words: oxytocin; 3T3-L1 adipocytes; glucose consumption; lipid metabolism

催产素是下丘脑分泌的一种多肽激素, 过去一直被广泛地用于催产引产和防止产后出血。近年来, 有研究报道催产素能够促进糖脂代谢, 改善肥胖。目前已有动物实验^[1]以及临床研究^[2]证实催产素能够降低体质量。因此本研究以诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞为对象, 观察催产素对细胞葡萄糖和脂质代谢的影响。

1 材料

3T3-L1 前脂肪细胞为上海交通大学内分泌研究所赠送; DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (质量分数 $\geq 99\%$)、地塞米松 (质量分数 $\geq 98\%$)、胰岛素、牛血清白蛋白购自 Sigma

公司; 葡萄糖氧化法定量检测试剂盒、甘油、游离脂肪酸测定试剂盒 (南京建成科技有限公司); 三酰甘油测定试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司); 缩宫素注射液 (商品名催产素, 规格 1 mL: 10 U, 上海禾丰制药有限公司), 吡格列酮 (江苏恒瑞医药公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

3T3-L1 前脂肪细胞株在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中培养, 待脂肪细胞单层融合后, 换为加有 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (115 ng/mL)、地塞米松 (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 和胰岛素 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 DMEM

培养基诱导细胞分化 48 h, 再换为含有 10% 牛血清白蛋白和胰岛素 (25 μg/mL) 的 DMEM 培养基继续培养, 直到 90% 以上的脂肪细胞为分化成熟的脂肪细胞。诱导分化的时间为 7~8 d。

2.2 油红 O 染色

前脂肪细胞在分化培养基中逐渐分化成为成熟的脂肪细胞, 细胞质内有脂滴聚集。油红 O 属于偶氮染料, 是很强的脂溶剂和染脂剂, 与三酰甘油结合呈小脂滴状, 溶于组织内的脂质 (如脂滴) 中, 使组织内的脂滴呈橘红色, 可用于脂肪细胞的鉴定。

2.3 葡萄糖消耗和脂质代谢试验

实验分为对照组、催产素 (10、20、50、100 μg/mL) 组和吡格列酮 (10 μg/mL) 组。在 96 孔板中, 将诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞以无血清的低糖 (5.5 mmol/L) DMEM 培养液同步化, 分别加入 10、20、50、100 μg/mL 催产素和 10 μg/mL 吡格列酮, 对照组加入等量 PBS, 孵育 48 h 后。葡萄糖氧化酶法检测每孔培养液中葡萄糖的量, 计算葡萄糖的消耗。同时检测培养液中脂肪合成有关指标三酰甘油、脂肪分解指标游离脂肪酸和甘油。检测方法严格按照试剂盒说明书进行。采用实时荧光定量 PCR 法检测催产素 (50 μg/mL) 组糖脂代谢相关基因 GLUT-1、GLUT-4、ATGT、HSL 的 mRNA 表达。

2.4 统计学处理

数据均来自 3 次重复实验, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 油红 O 染色

3T3-L1 前脂肪细胞株经诱导分化后, 200 倍光

镜下可见已由梭形转变为圆形, 胞浆内有大量透亮脂滴存在, 表明细胞已经转变为脂肪细胞。

3.2 催产素对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗的影响

3T3-L1 脂肪细胞在高糖高胰岛素培养条件下, 加不同浓度催产素和吡格列酮处理 48 h, 结果显示吡格列酮组葡萄糖消耗量较对照组有所增加; 当催产素剂量为 10 μg/mL 时, 葡萄糖消耗量与对照组比较差异无统计学意义; 当催产素剂量分别为 20、50、100 μg/mL 时, 葡萄糖消耗量均较对照组有所增加, 且表现出剂量相关性。见表 1。

表 1 催产素对葡萄糖消耗量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of oxytocin on glucose consumption in 3T3-L1 adipocytes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(μg·mL ⁻¹)	葡萄糖消耗量/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	3.39±0.22
吡格列酮	10	3.79±0.09*
催产素	10	3.38±0.19
	20	3.75±0.61*
	50	3.86±0.07*
	100	3.92±0.03*

与对照组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs control group

3.3 催产素对 3T3-L1 脂肪细胞脂质代谢的影响

3T3-L1 脂肪细胞在高糖高胰岛素培养条件下, 加不同浓度催产素处理, 48 h 后终止培养, 上清用于葡萄糖消耗的测定, 剩余细胞测定三酰甘油、游离脂肪酸和甘油含量。催产素组较对照组的三酰甘油降低, 而甘油、游离脂肪酸增高, 而吡格列酮组较对照组的三酰甘油降低, 甘油、游离脂肪酸增高, 均有统计学意义, 结果见表 2。

表 2 催产素对脂质代谢的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of oxytocin on lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(μg·mL ⁻¹)	三酰甘油/(μg·mg ⁻¹)	游离脂肪酸/(μmol·mg ⁻¹)	甘油/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	4.56±0.12	2.5±0.17	1.51±0.04
吡格列酮	10	3.88±0.14**	3.61±0.05	1.73±0.11*
催产素	10	4.03±0.07*	2.56±0.03	1.52±0.03
	20	3.77±0.04**	3.85±0.04*	1.68±0.04*
	50	3.43±0.17**	3.91±0.11*	1.72±0.15*
	100	3.27±0.09**	4.15±0.05**	1.91±0.03*

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

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

3.4 糖脂代谢相关基因 mRNA 水平的变化

糖代谢相关基因 GLUT-1 mRNA 相对表达量在对照组和 50 μg/mL 催产素干预组之间差异无统计学意义, 而 GLUT-4 的 mRNA 表达水平在催产素处

理组则明显高于对照组 (P<0.05)。脂代谢相关基因 HSL 的表达在催产素处理组高于对照组 (P<0.05), 而 ATGL 虽有上调趋势, 但在两组间无明显差异。见表 3。

表 3 催产素对糖脂代谢相关基因 mRNA 水平的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of oxytocin on mRNA levels of related genes
($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	mRNA 水平			
	ATGL	HSL	GLUT-1	GLUT-4
对照	3.37±0.09	3.43±0.18	2.86±0.03	6.86±0.07
催产素	3.38±0.12	3.84±0.12*	2.92±0.04	7.02±0.09*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

4 讨论

催产素是一种神经肽, 相对分子质量为 1 007, 该分子由 9 个氨基酸构成, 呈环状结构, 催产素由下丘脑的室旁核以及室上核的巨细胞合成^[3]。用免疫细胞化学和原位杂交方法发现催产素主要表达于中枢神经的下丘脑, 除此之外, 还分布在卵巢、睾丸、肾上腺、交感神经椎旁节等组织^[4]。既往关于催产素功能的研究多集中于其促进子宫收缩和参与泌乳的作用, 此外还发现催产素能够影响人类的社交和情绪, 如鼻喷催产素可以改善社交羞涩、自闭症^[5]。近年来, 研究者们逐渐关注到催产素在能量代谢方面的生理作用, 发现催产素能够通过抑制摄食行为以及影响脂质代谢来降低体质量、改善肥胖。

目前对催产素与能量代谢的研究多集中在临床以及动物研究, 而基础实验较少。本研究结果显示, 在糖代谢方面, 与对照组比较, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吡格列酮和 20~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 催产素刺激组葡萄糖消耗量明显增高, 提示催产素环境下脂肪细胞摄取葡萄糖增加。在脂质代谢方面, 予以催产素刺激可以引起脂肪细胞脂质分解, 具体表现为三酰甘油降低, 而游离脂肪酸和甘油增高, 说明催产素可以促进脂肪细胞代谢脂质逆转脂质积累。脂质积聚不但是肥胖发生发展的中心环节, 而且脂质积聚过程中常伴有脂质代谢的异常^[6-7]。可见环境中存在合适浓度的催产素有利于脂肪细胞的糖脂代谢, 与胰岛素增敏剂吡格列酮有着相似作用。

葡萄糖进入细胞内的代谢开始于葡萄糖转运和磷酸化, 而葡萄糖转运蛋白作为决定糖代谢第一步重要的蛋白分子对细胞摄取葡萄糖起着重要作用^[7]。因此在本研究中, 检测了该家族成员中 GLUT-1、GLUT-4 的 mRNA 表达水平。结果显示 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 催产素刺激组 GLUT-1 水平与对照组比较差异无统

计学意义, 而 GLUT-4 水平较对照组有明显增高。催产素对脂肪细胞有增加葡萄糖消耗的作用, 提示催产素的作用可能涉及 GLUT-4 葡萄糖转运体的转位。储存在脂肪组织或细胞中的三酰甘油的分解需要脂肪分解酶的参与, 而肥胖和胰岛素抵抗则是由于直接作用出现故障, 导致机体能量代谢失去平衡。HSL 和 ATGL 为两个重要的脂肪分解反应的限速酶^[8]。本研究发现, 催产素作用可使 HSL mRNA 表达明显上调, 但 ATGL 没有明显变化, 因此可以推测催产素可能是通过上调 HSL 来增强脂肪的分解作用。

综上所述, 在 3T3-L1 脂肪细胞中发现催产素能够增强葡萄糖消耗, 减少脂质合成以及增强脂肪分解作用, 并改善脂质积聚, 但其内在机制还需要更加深入的研究。

参考文献

- [1] Mason G A, Caldwell J D, Stanley D A, *et al.* Interactive effects of intracisternal oxytocin and other centrally active substances on colonic temperatures of mice [J]. *Regul Pept*, 1986, 14(3): 253-260.
- [2] Zhang H, Wu C, Chen Q, *et al.* Treatment of obesity and diabetes using oxytocin or analogs in patients and mouse models [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e61477.
- [3] Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81(2): 629-683.
- [4] 金亮. 催产素受体的研究和大鼠下丘脑大细胞神经元中神经递质的受体研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2004.
- [5] Donaldson Z R, Young L J. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality [J]. *Science*, 2008, 322(5903): 900-904.
- [6] Boden G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2003, 111(3): 121-124.
- [7] Boden G, Shulman G I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction [J]. *Eur J Clin Invest*, 2002, 32(s3): 14-23.
- [8] Lienhard G E, Slot J W, James D E, *et al.* How cells absorb glucose [J]. *Sci Am*, 1992, 266(1): 86-91.
- [9] Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, *et al.* Adipose triglyceride Lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(52): 40236-40241.