

胡黄连苷 I、II 通过调节 C/EBP-PPAR γ 通路抑制 3T3-L1 脂肪前体细胞的分化和脂肪合成

常华杰¹, 勾文峰², 郭江红², 许飞飞², 侯文彬^{2*}, 李祎亮^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 中国医学科学院放射医学研究所, 天津放射医学与分子核医学重点实验室, 天津 300192

摘要: 目的 探讨胡黄连主要有效成分胡黄连苷 I、II 对 3T3-L1 前脂肪细胞成脂分化的影响。方法 采用 MTT 法检测胡黄连苷 I、II 对 3T3-L1 细胞活力的影响, 确定给药浓度; 使用诱导分化培养基诱导 3T3-L1 细胞分化为成熟脂肪细胞, 通过油红 O 染色法观察胡黄连苷 I、II (20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对细胞脂肪蓄积的影响; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 3T3-L1 细胞脂肪合成相关的乙酰辅酶 A 羧化酶 1 (ACACA)、脂肪酸合酶 (FASN)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 (SCD1)、脂肪酸结合蛋白 (FABP4) 和调节脂肪合成的转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、固醇调节元件结合蛋白 1 (SREBP1) 的 mRNA 表达水平; Western blotting 实验检测 CCAAT/增强子结合蛋白 β (C/EBP β)、SCD1 和 PPAR γ 的蛋白表达。结果 浓度低于 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的胡黄连苷 I、II 处理不会影响细胞的存活率; 与对照组比较, 模型组在诱导分化后细胞形态变圆, 油红 O 染色显示细胞中有大量脂肪蓄积 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 胡黄连苷 I、II 显著减少了脂肪蓄积 ($P < 0.01$)。与对照组比较, 模型组 ACACA、FASN、SCD1、FABP4、PPAR γ 和 SREBP1 的 mRNA 表达均显著上调 ($P < 0.05$ 、0.01); 与模型组比较, 胡黄连苷 I、II 20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 均显著降低了 ACACA、SCD1、FASN、FABP4、SREBP1 mRNA 的表达 ($P < 0.05$ 、0.01), 胡黄连苷 I、II 仅在 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著抑制 SREBP1 mRNA 的表达 ($P < 0.05$ 、0.01)。Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 模型组 PPAR γ 、C/EBP β 和 SCD1 的蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 胡黄连苷 I、II 各浓度均显著降低了 SCD1 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 胡黄连苷 I 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和胡黄连苷 II 20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 PPAR γ 、C/EBP β 蛋白的表达显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。结论 胡黄连苷 I、II 均可以显著抑制 3T3-L1 细胞的脂肪分化, 并减少脂肪蓄积, 胡黄连苷 I 表现出更好的剂量相关性, 其作用机制可能与抑制 C/EBP β -PPAR γ 通路有关。

关键词: 胡黄连苷 I; 胡黄连苷 II; 3T3-L1 细胞; 成脂分化; 脂肪生成; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ); CCAAT/增强子结合蛋白 β (C/EBP β)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 06-1193-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.06.005

Picroside I and II inhibit differentiation and lipid synthesis of 3T3-L1 preadipocytes by regulating C/EBP-PPAR γ pathway

CHANG Huajie¹, GOU Wenfeng², GUO Jianghong², XU Feifei², HOU Wenbin², LI Yiliang²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Abstract: Objective To investigate the effects of picroside I and II, the main active components of *Picrorhiza scrophulariiflora*, on adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. **Methods** MTT assay was used to detect the effect of picroside I and II on the viability of 3T3-L1 preadipocytes, and to determine the concentration of drug administered. 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate into mature adipocytes by differentiation medium. The effects of picroside I and picroside II (20 and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on lipid accumulation were observed by oil red O staining. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of

收稿日期: 2023-01-17

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(3332022063); 国家自然科学基金资助项目(82202950); 国家自然科学基金资助项目(82104012); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目资助(2021-I2M-1-042)

第一作者: 常华杰, 男, 在读硕士, 研究方向为中药药理学作用机制研究。E-mail: chang1298678927@163.com

*共同通信作者: 李祎亮, 男, 研究员, 研究方向为药物化学及新药开发。E-mail: liyiliang@irm-cams.ac.cn

侯文彬, 男, 研究员, 研究方向为中药药理学研究及新药开发。E-mail: houwenbin@irm-cams.ac.cn

Acetyl-CoA carboxylase 1 (*ACACA*), fatty acid synthase (*FASN*), Stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*), fatty acid binding protein (*FABP4*), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPAR γ*), and sterol regulatory element binding protein 1 (*SREBP1*) mRNA expression levels in 3T3-L1 preadipocytes. Western blotting assay was used to detect the protein expression of CCAAT/enhancer binding protein β (*C/EBP β*), *SCD1*, and *PPAR γ* . **Results** The treatment of picoside I and II with concentration below $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ does not affect the cell survival rate. Compared with control group, the vast majority of 3T3-L1 preadipocytes in the model group became circular after induced differentiation, and oil red O staining showed that there was a large amount of lipid accumulation in the cells ($P < 0.01$). Compared with model group, lipid accumulation was significantly reduced in the picoside I and II administration groups. Compared with the control group, the mRNA expression of *ACACA*, *FASN*, *SCD1*, *FABP4*, *PPAR γ* and *SREBP1* in the model group was significantly up-regulated ($P < 0.05$). Compared with model group, picoside I and II 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly reduced the expression of *ACACA*, *SCD1*, *FASN*, *FABP4*, and *SREBP1* mRNA ($P < 0.05$, 0.01), while picoside I and II 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly reduced the expression of *SREBP1* mRNA ($P < 0.05$, 0.01). Western blotting results showed that, compared with control group, the protein levels of *PPAR γ* , *C/EBP β* , and *SCD1* in the model group were significantly up-regulated ($P < 0.01$). Compared with model group, each concentration of picoside I and II significantly reduced the expression of *SCD1* protein ($P < 0.01$), while the expression of *PPAR γ* and *C/EBP β* protein in picoside I 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and picoside II 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group was significantly reduced ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Both picoside I and II can inhibit the adipose differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, and reduce fat accumulation. Picoside I shows a better dose dependence, and their mechanism may be related to the inhibition of *C/EBP β -PPAR γ* pathway.

Key words: picoside I; picoside II; 3T3-L1 cell; adipogenic differentiation; adipogenesis; peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPAR γ*); CCAAT/enhancer binding protein β (*C/EBP β*)

20世纪80年代以来,中国肥胖的成年人数量增加了4倍多,成年人超重/肥胖率已超过50%,在儿童青少年中也已达到20%,并呈流行趋势,肥胖已成为中国乃至全球的重大公共卫生问题^[1]。肥胖是引发心脑血管疾病、高血压、糖尿病和脂肪肝等慢性疾病的主要危险因素之一,预防和控制肥胖是全社会共识^[2-3]。

肥胖的主要特征是脂肪组织的过度膨胀和积累。受遗传和不良生活方式的影响,前脂肪细胞可过度分化,脂肪细胞数量增加,体积增大,导致代谢异常,从而增加心脑血管疾病、脂肪肝和糖尿病等慢性病的发病率^[4]。前脂肪细胞向脂肪细胞的分化与肥胖发病密切相关,这一过程受多种蛋白调控,包括调控脂代谢的转录因子、脂肪细胞特异性基因和脂肪生成酶等。其中,CCAAT增强子结合蛋白家族(*C/EBP- α* 、*- β* 和*- δ*)和过氧化物酶体增殖物激活受体家族(*PPAR- α* 、*- β* 和*- γ*)脂肪分化和脂肪形成过程中起关键作用^[5-6]。在脂肪分化早期,*C/EBP- β* 和*C/EBP- δ* 被诱导,随后反式激活*PPAR γ* 和*C/EBP- α* 的表达^[7]。*PPAR γ* 被认为是脂肪形成的主要调节因子,*PPAR γ* 的表达和活性是脂肪形成所必需的,*C/EBP- α* 主要在脂肪分化末期诱导一些脂肪细胞特异性基因的激活^[8]。此外,固醇调节元件结合蛋白1(*SREBP-1*)是脂肪形成的重要转录调节因子,可通过调节脂肪合成基因如乙酰辅酶A羧化酶1(*ACACA*)、脂肪酸合酶(*FASN*)和硬脂酰辅

酶A去饱和酶(*SCD1*)的表达,调控脂肪酸和三酰甘油的合成^[9]。因此,通过调控*C/EBPs*、*PPARs*和*SREBP-1*等转录因子的表达,抑制脂肪细胞的分化,减少脂肪生成,被认为是预防和改善肥胖的有效途径。

3T3-L1前脂肪细胞是体外研究脂肪分化和脂质代谢常用的细胞系,通过含胰岛素、地塞米松和3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(*IBMX*)的MDI培养基诱导,可以实现向脂肪样细胞的分化^[10]。

胡黄连是传统常用中药,具有清虚热、退湿热的功效。药理研究表明,胡黄连具有保肝利胆、抗炎、调脂和调节免疫等多种作用^[11],其中环烯醚萜类被认为是其主要有效成分,研究最多的是胡黄连苷I、II^[12-14]。但针对胡黄连有效成分改善脂肪分化,抑制脂肪合成方面的研究还未见报道。本研究利用3T3-L1细胞脂肪分化模型,研究了胡黄连苷I、II对脂肪合成和分化的影响,并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 细胞

小鼠3T3-L1脂肪前体细胞,购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

1.2 主要药品与试剂

胡黄连苷I、胡黄连苷II均为实验室制备,质量分数>98%;*IBMX*购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;门冬胰岛素购自诺和诺德(中国)制药有限公司;DMEM培养基、0.25%胰酶、青霉素-链霉素

双抗、RNA Extraction Reagen(Trizol)均购自北京中科迈晨公司;胎牛血清购自美国Gibco公司;二甲基亚砜(DMSO)购自德国AppliChem公司;地塞米松、细胞裂解液、BCA蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;油红O和四甲基偶氮唑盐(MTT)购自北京索莱宝科技有限公司;逆转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒购自北京全式金生物技术股份有限公司;GAPDH一抗、辣根酶标记山羊抗兔和山羊抗鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司;PPAR γ 、C/EBP β 、FAS一抗购自美国Santa Cruz公司;SCD-1购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.3 主要仪器

伯乐电泳仪(美国Bio-Rad公司);Quantstudio 5实时荧光定量PCR(美国ABI公司);observer D1倒置显微镜(德国ZEISS公司);5810R冷冻离心机(德国Eppendorf公司);酶标仪(美国Promega公司);MCO-18AIC CO₂培养箱(日本SANYO公司);HFsafe-1800LC生物安全柜(上海力申公司);Tanon-5200全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司);WB20恒温水浴锅(瑞士SalvisLab公司);Diagenode SA超声波破碎仪(比利时Bioruptor公司)。

2 方法

2.1 MTT法检测胡黄连苷I、II对3T3-L1细胞活力的影响

取对数生长期的3T3-L1细胞,以每孔 5×10^3 的密度接种于96孔板内,过夜培养,弃去旧培养基,每孔加入含胡黄连苷I、II 0.5、1.0、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0、200.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的DMEM培养基100 μL ,对照组不加药,继续培养48 h,另设不接种细胞的空白组。每孔加入20 μL 质量浓度为5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的MTT,放入培养箱继续孵育4 h,弃去上清液,加入DMSO,每孔150 μL ,于摇床上振摇10 min,至甲臞沉淀充分溶解后用多功能酶标仪检测在570 nm处的吸光度(A)值,计算细胞相对存活率。

$$\text{细胞相对存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 3T3-L1细胞的培养、诱导分化及给药

3T3-L1细胞正常培养使用含10%胎牛血清和100 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素-链霉素的DMEM培养基。诱导分化时,将细胞以每皿 2×10^5 个的密度接种于6 cm细胞培养皿中,每48小时更换1次培养基直至细胞完全融合,更换为MDI分化DMEM培养基($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBMX + $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松 +

$10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胰岛素),培养分化48 h,然后用含有 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胰岛素的维持培养基培养,每48小时更换1次,观察细胞分化状态,在诱导分化的同时全程给药,分为对照组和胡黄连苷I、II(20 、 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组。3T3-L1细胞诱导分化实验过程的示意图见图1。

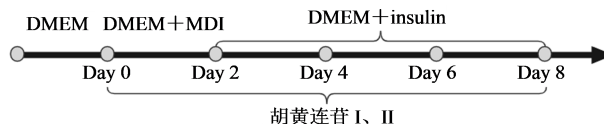


图1 3T3-L1细胞诱导分化实验方案

Fig. 1 Scheme of 3T3-L1 cell differentiation experiment

2.3 油红O染色

经过诱导给药处理后的3T3-L1细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次,用4%多聚甲醛固定30 min,超纯水洗去多余固定液,60%异丙醇润洗1次,然后加入60%油红O工作液,染色20 min,双蒸水清洗5次至没有多余油红O残留。显微镜观察染色情况并拍照。为了定量脂质堆积,各组加入等量的100%异丙醇,将油红O溶出,测量560 nm处A值,以模型组A值为100%,计算各组脂肪蓄积率。

2.4 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测相关基因转录水平

用Trizol试剂提取3T3-L1细胞总RNA,测定RNA的浓度,经逆转录合成cDNA。随后进行qRT-PCR,用20 μL 的聚合酶链式反应体系:10 μL 2 \times SYBR,1 μL 正向引物和反向引物,1 μL cDNA模板,8 μL ddH₂O,扩增40个循环,根据PCR扩增所得各组的基因和内参基因的C_t值,以2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目的基因的相对表达量。小鼠基因引物序列见表1。

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 Primers sequences of qRT-PCR

基因	序列(5'→3')
GAPDH	F-TGGCCTTCCGTGTTCTAC
	R-GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA
FASN	F-GGAGGTTGCTTGAAGAG
	R-CTGGATGTGATCGAATGCT
PPAR γ	F-CCGTAGAAGCCGTGCAAGAG
	R-GGAGGCCAGCATCGTGTAGA
SREBP	F-AGGTGTATTTGCTGGCTTGGT
	R-AGAGATGACTAGGGAAGTGTGT
SCD1	F-CCTTATCATTGCCAACACCATG
	R-TGTTTTCGCACAAGCAGCCAAC
脂肪酸结合蛋白4(FABP4)	F-GTAAATGGGGATTGGTCAC
	R-TATGATGCTCTTCACCTTCC

2.5 Western blotting 检测蛋白表达

经过诱导给药处理后的3T3-L1细胞加入RIPA(强)细胞裂解液,超声破碎3 s×2次,在冰上静置,继续裂解30 min,每10分钟涡旋混匀1次,然后12 000 r·min⁻¹、4 °C离心20 min,取上清液。用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,统一各组样品浓度,加入蛋白上样缓冲液,95 °C变性10 min制成蛋白样品。用8%~12%的SDS-PAGE电泳分离,使用半干转法转移到PVDF膜上,然后在5%的脱脂奶粉中封闭1 h,在4 °C下与要检测蛋白的一抗孵育过夜,用TBST清洗膜3次,共30 min,与HRP标记的二抗室温孵育1 h,TBST清洗,滴加ECL化学发光液曝光,用Image J软件分析各蛋白条带灰度值。

2.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用GraphPad Prism 8.0.1软件处理,多组间比较采用单因素方差分析,两组间

比较采用Unpaired-*t*检验。

3 结果

3.1 胡黄连苷I、II对3T3-L1细胞活力的影响

如图2所示,与对照组比较,不同浓度的胡黄连苷I、II处理3T3-L1细胞24 h,均未对细胞活力造成显著影响。处理48 h时,胡黄连苷I仅在200 μmol·L⁻¹浓度显著降低了3T3-L1细胞的活力($P < 0.01$);胡黄连苷II从50 μmol·L⁻¹浓度开始表现出了对细胞活力显著的抑制作用($P < 0.01$)。结果表明,浓度低于50 μmol·L⁻¹的胡黄连苷I、II处理不会影响细胞的存活率,因此,采用20、40 μmol·L⁻¹作为给药的低、高浓度进行后续实验研究。

3.2 胡黄连苷I、II对3T3-L1细胞脂质蓄积的影响

脂质蓄积是3T3-L1细胞脂肪化的重要指标^[15]。如图3所示,未经诱导分化和给药处理的对照组没有被油红O着色,表明没有向脂肪细胞分化,诱导后的模型组细胞形态不再是纤维形,表现

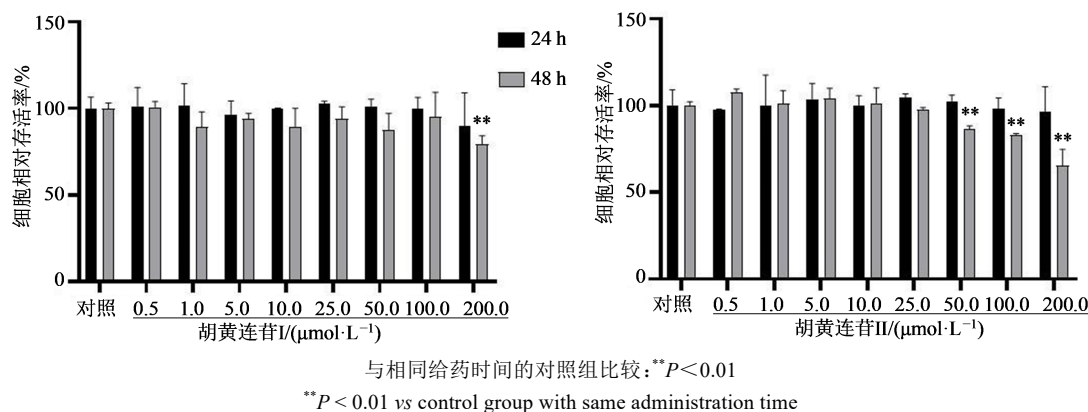


图2 胡黄连苷I、II对3T3-L1细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Effect of picroside I and II on 3T3-L1 cell viability ($\bar{x} \pm s, n=5$)

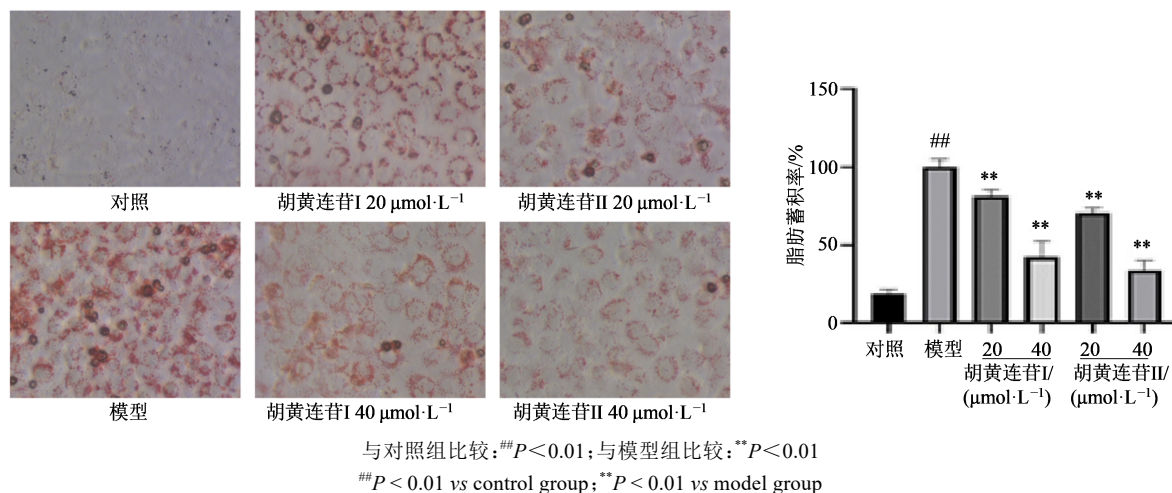


图3 胡黄连苷I、II对诱导分化的3T3-L1细胞脂肪蓄积的影响(×400)

Fig. 3 Effect of picroside I and II on fat accumulation in differentiated 3T3-L1 cells (×400)

为成熟脂肪细胞的圆形,油红O染色明显,表明细胞中有大量的脂肪蓄积。定量结果显示,与对照组比较,模型组脂肪蓄积率显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,不同浓度的胡黄连苷I、II均显著减少了3T3-L1细胞脂肪分化过程中脂肪蓄积率($P < 0.01$),且胡黄连苷II表现出比胡黄连苷I更强的作用。这些结果表明,胡黄连苷I、II具有很好的抗成脂作用。

3.3 胡黄连苷I、II对成脂基因mRNA表达的影响

如图4所示,与对照组比较,分化诱导后的模型组与脂肪生成相关的基因 *ACACA*、*SCD1*、*FASN* 和 *FABP4* 的mRNA表达均显著增加($P < 0.05$ 、 0.01);与模型组比较,胡黄连苷I、II均显著降低了 *ACACA*、*SCD1*、*FASN* 和 *FABP4* mRNA 的表达($P < 0.05$ 、 0.01),并且胡黄连苷I的不同浓度组之间表现出了明显的剂量相关性。

3.4 胡黄连苷I、II对脂肪合成相关转录调节因子mRNA表达的影响

如图5所示,与对照组比较,模型组的脂肪合成相关转录因子 *PPAR γ* 和 *SREBP1* 的mRNA表达显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,胡黄连苷I、II处理组的 *PPAR γ* 的mRNA表达均显著降低($P < 0.01$),

且表现出较好的剂量相关性;而对于 *SREBP1*,胡黄连苷I、II的抑制作用仅在 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时具有统计学意义($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.5 胡黄连苷I、II对3T3-L1细胞分化及脂肪生成相关蛋白表达的影响

如图6、7所示,与对照组比较,模型组 *PPAR γ* 、*C/EBP β* 和 *SCD1* 蛋白的表达显著增加($P < 0.01$),表明经诱导培养后,3T3-L1细胞向成熟脂肪细胞分化;与模型组比较,胡黄连苷I、II各浓度均显著降低了 *SCD1* 蛋白的表达($P < 0.01$),胡黄连苷I $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和胡黄连苷II 20 、 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 *PPAR γ* 、*C/EBP β* 蛋白的表达显著降低($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

随着健康生活理念的普及,越来越多的人开始关注肥胖问题对健康和生活质量的影响。对于肥胖的防治,首选是生活方式干预策略,通过控制饮食、体育锻炼和行为认知的改变达到减重的目的。但当生活方式干预效果不佳,特别是已存在胰岛素抵抗、血脂异常等危险因素时,适当的药物治疗是必要的。目前,可用于肥胖治疗的非处方药物只有奥利司他,作用机制为减少胃肠道对膳食脂肪的吸收,而对于脂肪的生成和脂代谢没有明显影响^[16]。

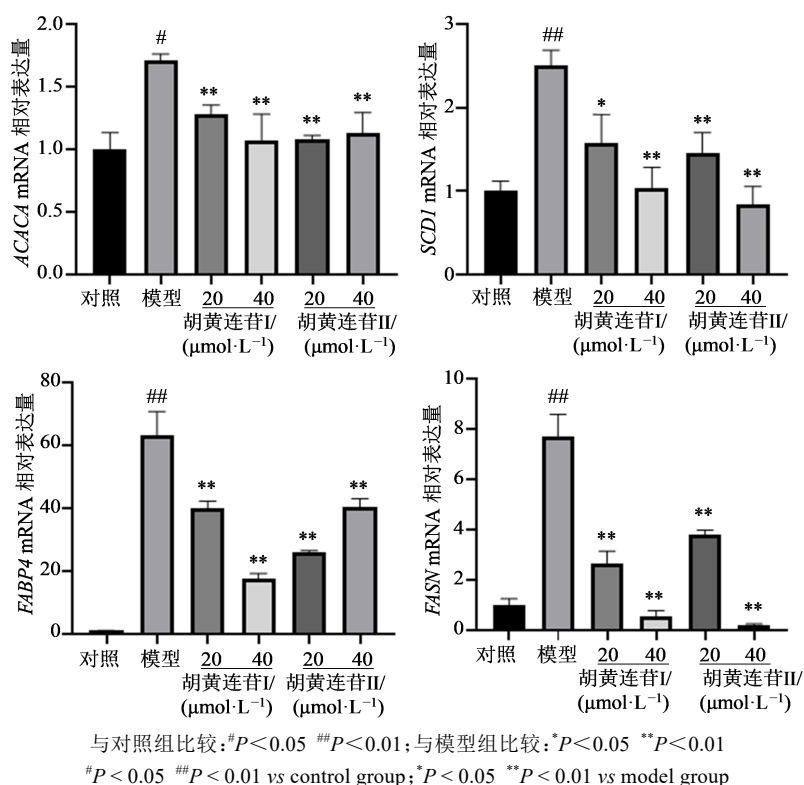
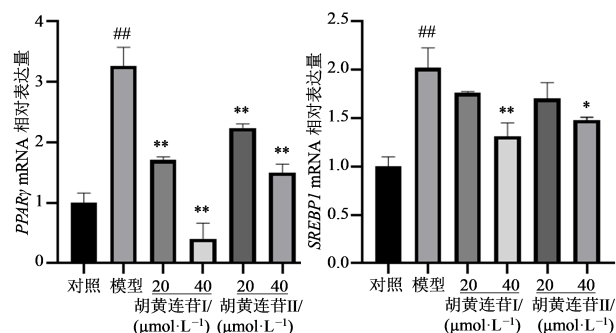


图4 胡黄连苷I、II对3T3-L1细胞脂肪生成相关的 *ACACA*、*SCD1*、*FABP4*、*FASN* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
 Fig. 4 Effect of picroside I and II on mRNA expression of *ACACA*, *SCD1*, *FABP4*, and *FASN* related to fat synthesis in 3T3-L1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较:## $P < 0.01$;与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图5 胡黄连苷I、II对3T3-L1细胞PPAR γ 和SREBP1 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of picoside I and II on mRNA expression of PPAR γ and SREBP1 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

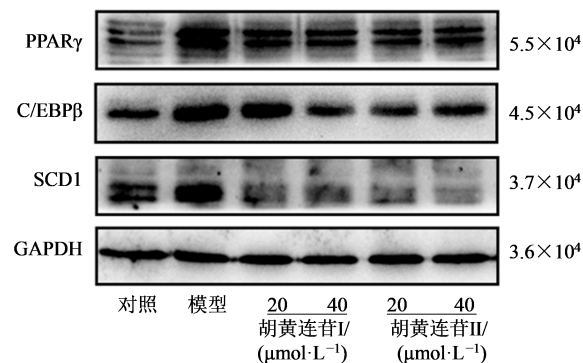
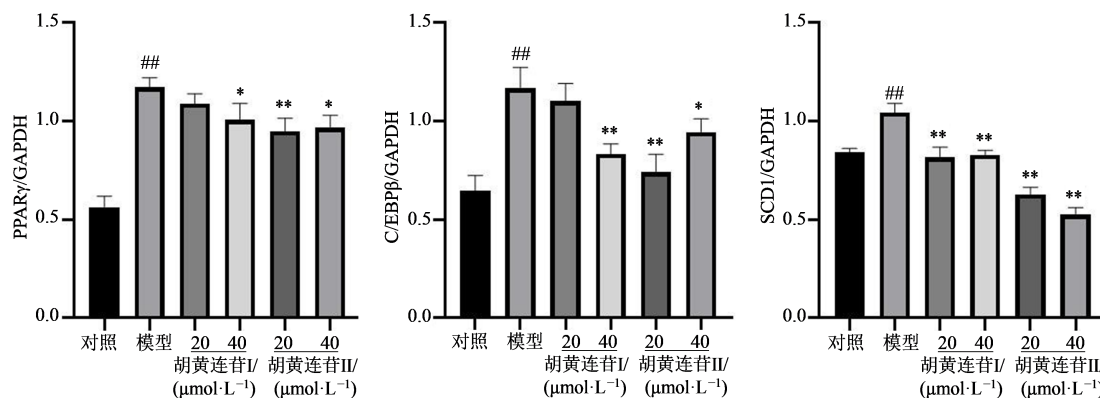


图6 胡黄连苷I、II对3T3-L1细胞脂肪合成相关蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of picoside I and II on expression of proteins related to fat synthesis in 3T3-L1 cells



与对照组比较:## $P < 0.01$;与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图7 3T3-L1细胞脂肪合成相关蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Expression of adipose synthesis related proteins in 3T3-L1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

过度的前脂肪细胞分化和过量脂肪生成造成的脂肪细胞膨胀与肥胖的发展密切相关,因此通过抑制前脂肪细胞分化,调节脂肪生成是治疗肥胖的潜在途径。本研究的MTT实验结果显示,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下的胡黄连苷I、II对正常生长状态的3T3-L1细胞活力没有显著影响,表明正常给药浓度的胡黄连苷I、II不会影响3T3-L1细胞的生长和增殖,且没有明显的细胞毒性。通过建立3T3-L1细胞脂肪分化模型,研究了胡黄连苷I、II对细胞分化和脂肪生成的影响。油红O染色结果表明,胡黄连苷I、II可显著减少3T3-L1细胞的脂肪生成和蓄积,且表现出显著的剂量相关性。

细胞的脂肪合成受到一系列造脂酶的调控,如FASN、ACACA、SCD1和FABP4等^[17-18]。FASN可催化长链饱和脂肪酸的从头生物合成,ACACA催化乙酰辅酶A羧化成丙二酰辅酶A,是从头合成脂肪酸的第一步和限速步骤^[19],SCD1催化饱和脂肪

酸产生单不饱和脂肪酸,在脂质生物合成中起重要作用,FABP4是脂肪细胞中的脂质转运蛋白^[20]。多项研究表明,胡黄连提取物及有效成分可以降低血脂,改善与肥胖相关的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和炎症等^[12,21]。Dhami-Shah等^[22]的研究发现,胡黄连苷II可抑制脂肪酸转运蛋白5(FATP5)、SREBP1和SCD1的表达,减少游离脂肪酸(FFAs)摄取和脂肪生成,从而抑制FFAs诱导的HepG2细胞的脂肪蓄积。本研究中的qRT-PCR结果显示,胡黄连苷I、II显著抑制了ACACA、FASN、SCD1和FABP4 mRNA的表达,表明胡黄连苷I、II通过抑制多个造脂酶的表达,从而抑制了脂肪的生成,并且胡黄连苷I表现出了较好的剂量相关性。胡黄连苷II对造脂酶ACCAC、FABP4 mRNA表达的抑制作用未表现出剂量相关性,可能是因为胡黄连苷II在20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时已表现出较强的抑制作用,因此低、高浓度组的药效相差较小,未能呈现出显著的剂量相

关性,另外,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的胡黄连苷II已表现出对3T3-L1细胞活力的抑制作用,长时间给药时可能存在一定的细胞毒性。

PPAR γ 在各种脂肪组织中高度表达,是脂肪细胞发育和脂肪形成的主要调节因子,大多数已知的调节脂肪形成的转录抑制因子和激活因子都是通过调节PPAR γ 的表达或活性来发挥作用^[23]。SREBP-1是脂肪合成的重要转录调节因子,主要调控ACACA、FASN、和SCD1等成脂基因的转录。有研究表明,SREBP1还通过诱导内源性PPAR γ 的表达来促进成脂分化^[24]。本研究检测了胡黄连苷I、II对PPAR γ 和SREBP1 mRNA表达的影响,发现胡黄连苷I、II均显著抑制PPAR γ mRNA的表达,高剂量组的SREBP1也有显著降低,Western blotting结果显示,胡黄连苷I、II显著下调了PPAR γ 蛋白的表达,表明胡黄连苷I、II通过抑制PPAR γ 的转录和表达,降低SREBP1的转录,调控3T3-L1细胞的脂肪分化和成脂基因的表达。

前脂肪细胞分化过程受多种转录因子组成的转录级联调控,其中C/EBP β 起着重要作用^[17]。处于接触抑制状态的3T3-L1细胞,受到激素的刺激后,C/EBP β 蛋白表达会立刻显著增加,同时会重新进入细胞周期,开始DNA复制和细胞增殖,这一过程被称为有丝分裂克隆扩张(MCE),是细胞脂肪分化所必需的,在MCE后,C/EBP β 才具有DNA结合活性,诱导细胞PPAR γ 和C/EBP α 的表达,随后表达产生脂肪细胞表型的基因,分化进入终末期。而当敲除或抑制C/EBP β 时,细胞则不会经历MCE,也不会再向脂肪细胞分化^[25-26]。本研究中,胡黄连苷I、II显著降低了C/EBP β 的蛋白表达,且胡黄连苷I表现出了较好的剂量相关性,表明胡黄连苷I、II可能通过抑制C/EBP β 表达阻止了3T3-L1细胞的脂肪分化。

本研究结果表明,胡黄连苷I、II均可以抑制3T3-L1细胞的脂肪生成,减少脂肪蓄积,胡黄连苷I表现出了较好的剂量相关性,胡黄连苷II在低剂量时作用显著,但没有表现出较好的剂量相关性。其作用机制可能是通过抑制C/EBP β 的蛋白表达,阻止3T3-L1细胞进入MCE,下调了PPAR γ 的转录表达,最终抑制了ACACA、FASN等造脂酶的转录,从而抑制了细胞的脂肪分化,减少脂肪生成和蓄积。但对于胡黄连苷I、II如何调控C/EBP β 的表达,对细胞周期的影响以及对C/EBP β 下游其他成脂转录因子的影响还需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang Y F, Zhao L, Gao L W, et al. Health policy and public health implications of obesity in China [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2021, 9(7): 446-461.
- [2] 中国居民营养与慢性病状况报告(2020年) [J]. 营养学报, 2021, 42(6): 521. Nutrition and chronic diseases in China (2020) [J]. Acta Nutr Sin, 2021, 42(6): 521.
- [3] 中国营养学会肥胖防控分会, 中国营养学会临床营养分会, 中华预防医学会行为健康分会, 等. 中国居民肥胖防治专家共识 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2022, 43(4): 619-631. Chinese Nutrition Society Obesity Prevention and Control Section, Chinese Nutrition Society Clinical Nutrition Section, Chinese Preventive Medicine Association Behavioral Health Section, et al. Expert consensus on obesity prevention and treatment in China [J]. J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci, 2022, 43(4): 619-631.
- [4] 吴正雪, 闫文月, 刘维, 等. 近10年中药治疗肥胖症作用机制的实验研究进展 [J]. 中医儿科杂志, 2022, 18(3): 95-100. Wu Z X, Yan W Y, Liu W, et al. Recent 10 years witnesses experimental study on mechanism of Chinese materia medica in the treatment of obesity [J]. J Pediatr Tradit Chin Med, 2022, 18(3): 95-100.
- [5] Sarjeant K, Stephens J M. Adipogenesis [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4(9): a008417.
- [6] Bahmad H F, Daouk R, Azar J, et al. Modeling adipogenesis: Current and future perspective [J]. Cells, 2020, 9(10): 2326.
- [7] Audano M, Pedretti S, Caruso D, et al. Regulatory mechanisms of the early phase of white adipocyte differentiation: An overview [J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(3): 139.
- [8] Moseti D, Regassa A, Kim W K. Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(1): 124.
- [9] Hua S F, Li Y Q, Su L J, et al. Diosgenin ameliorates gestational diabetes through inhibition of sterol regulatory element-binding protein-1 [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84: 1460-1465.
- [10] Kumagai M, Yoshida I, Mishima T, et al. 4 β -Hydroxy withanolide E and withanolide E from *Physalis peruviana* L. inhibit adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells through modulation of mitotic clonal expansion [J]. J Nat Med, 2021, 75(1): 232-239.

- [11] 吉海杰, 郝淑兰, 吕林, 等. 胡黄连葫芦烷型四环三萜类化合物及其生物活性的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4875-4881.
Ji H J, Hao S L, Lv L, et al. Research progress on cucurbitane-type tetracyclic triterpenes in *Picrorhizae Rhizoma* and their bioactivities [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(15): 4875-4881.
- [12] 陈玉, 张可佳, 李孝庆, 等. 胡黄连中环烯醚萜苷类成分体外抗非酒精性脂肪性肝炎活性研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(5): 846-851.
Chen Y, Zhang K J, Li X Q, et al. Anti-NASH activity of iridoid glycosides in *picrorhizae rhizoma in vitro* [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(5): 846-851.
- [13] Xiong K, Shi M G, Zhang T, et al. Protective effect of picroside I against hepatic fibrosis in mice via sphingolipid metabolism, bile acid biosynthesis, and PPAR signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110683.
- [14] Li T T, Xu L J, Zheng R Y, et al. Picroside II protects against cholestatic liver injury possibly through activation of farnesoid X receptor [J]. Phytomedicine, 2020, 68: 153153.
- [15] Lee H W, Rhee D K, Kim B O, et al. Inhibitory effect of sinigrin on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells: Involvement of AMPK and MAPK pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 102: 670-680.
- [16] 中国医疗保健国际交流促进会营养与代谢管理分会, 中国营养学会临床营养分会, 中华医学会糖尿病学分会, 等. 中国超重/肥胖医学营养治疗指南(2021) [J]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2021, 13(11): 1-55.
Nutrition and Metabolic Management Branch of China International Exchange and Promotive Association for Medical and Health Care, Chinese Nutrition Society Clinical Nutrition Section, Chinese Diabetes Society, et al. Guidelines for medical nutritional treatment of overweight/obesity in China (2021) [J]. Chin J Front Med Sci Elec Vers, 2021, 13(11): 1-55.
- [17] Guo L, Li X, Tang Q Q. Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: A central role for CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) B [J]. J Biol Chem, 2015, 290(2): 755-761.
- [18] Benchamana A, Mori H, MacDougald O A, et al. Regulation of adipocyte differentiation and metabolism by lansoprazole [J]. Life Sci, 2019, 239: 116897.
- [19] Hsiao W Y, Guertin D A. De novo lipogenesis as a source of second messengers in adipocytes [J]. Curr Diabetes Rep, 2019, 19(11): 1-13.
- [20] Hotamisligil G S, Bernlohr D A. Metabolic functions of FABPs: Mechanisms and therapeutic implications [J]. Nat Rev Endocrinol, 2015, 11(10): 592-605.
- [21] Xu X, Wang W T, Zhao Z Y, et al. Effects of total iridoid glycosides of *Picrorhiza scrophulariiflora* against non-alcoholic steatohepatitis rats induced by high-fat and high-sugar diet through regulation of lipid metabolism [J]. Chin Herb Med, 2020, 12(1): 67-72.
- [22] Dhama-Shah H, Vaidya R, Udipi S, et al. Picroside II attenuates fatty acid accumulation in HepG2 cells via modulation of fatty acid uptake and synthesis [J]. Clin Mol Hepatol, 2018, 24(1): 77-87.
- [23] Mota de Sá P, Richard A J, Hang H, et al. Transcriptional regulation of adipogenesis [J]. Compr Physiol, 2017, 7(2): 635-674.
- [24] Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: Implications for adipocyte differentiation and metabolism [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(8): 5495-5503.
- [25] Yeh W C, Cao Z, Classon M, et al. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins [J]. Genes Dev, 1995, 9(2): 168-181.
- [26] Tang Q Q, Otto T C, Lane M D. CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(3): 850-855.

[责任编辑 兰新新]