

二十二碳六烯酸对 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达的影响及其机制

张奕 林杰义 罗玮 黄少明 毛丽梅

(南方医科大学公共卫生与热带医学学院营养与食品卫生学系, 广州 510515)

摘要:目的 探讨二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 对 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达的影响及其机制。方法 不同浓度 DHA 处理体外培养成熟的 3T3-L1 脂肪细胞, 并选取一定浓度 DHA 加与不加过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 拮抗剂 GW-9662 处理脂肪细胞, 实时荧光定量 PCR 分析处理前后脂联素基因和 PPAR γ mRNA 表达水平的差异。结果 与对照组相比, 当 DHA 浓度为 50 μ mol/L、100 μ mol/L 时, 脂联素表达水平分别增加 71.89%、106.23% ($P < 0.05$), 随着浓度的增加脂联素表达降低, 当 DHA 浓度达到 400 μ mol/L 时, 脂联素表达水平最低 ($P < 0.05$)。当 DHA 浓度为 100 μ mol/L 时, 脂肪细胞 PPAR γ mRNA 表达增加 70.24% ($P < 0.05$)。与对照组相比, DHA 中加 GW-9662 处理组脂联素和 PPAR γ mRNA 表达水平分别降低 97.32%、90.90% ($P < 0.05$)。结论 在一定浓度范围内, DHA 对脂联素表达的影响呈剂量依赖关系, 推测 DHA 可能是通过 PPAR γ 途径调控脂肪细胞的脂联素表达。

关键词: 二十二碳六烯酸; 脂联素; 3T3-L1 脂肪细胞; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

Effect of Docosahexaenoic Acid on Adiponectin mRNA Expression and The Mechanism in 3T3-L1 Adipocytes

Zhang Yi Lin Jie-yi Luo Wei Huang Shao-ming Mao Li-mei

(Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To study the expression of adiponectin mRNA with different docosahexaenoic acid (22:6n-3; DHA) concentration in 3T3-L1 adipocytes. **Method** To examine this, 3T3-L1 adipocytes were incubated with 25 μ mol/L, 50 μ mol/L, 100 μ mol/L, 200 μ mol/L, 400 μ mol/L DHA, or with Bull Serum Albumin (BSA) alone (control) for 24 h. Adipocytes were also incubated for 24 h with DHA plus GW-9662, a PPAR γ antagonist, or with DHA alone. The mRNA expression of adiponectin and PPAR γ was assessed by real-time fluorescence quantitative PCR. **Result** Both 50 μ mol/L and 100 μ mol/L DHA increased ($P < 0.05$) the expression of adiponectin mRNA compared with the control (71.89% and 106.23%, respectively), the lowestest was in group 400 μ mol/L ($P < 0.05$). The mRNA level of PPAR γ in 100 μ mol/L group was significantly 70.24% higher as compared with the control ($P < 0.05$). Incubating with GW-9662 and DHA, decreases in the mRNA expression of adiponectin and PPAR γ were 97.32% and 90.90%, compared with the control respectively. **Conclusion** Our results demonstrate that DHA affects the expression of adiponectin mRNA in 3T3-L1 adipocytes concentration-dependently, possibly by a mechanism involving PPAR γ .

Keywords: docosahexaenoic acid; adiponectin; 3T3-L1 adipocytes; peroxisome proliferator-activated receptor- γ

脂联素 (Adiponectin) 作为近年来发现的一种由脂肪组织特异性表达和分泌的细胞因子, 具有降

血脂、降血糖、改善胰岛素敏感性和抗炎等作用^[1]。流行病学调查和动物实验研究显示^[2,3]: 膳食中 n-3

多不饱和脂肪酸 (n-3 PUFAs) 可以提高血清脂联素浓度, 对胰岛素抵抗和心血管疾病的发展具有保护作用, 但 n-3 多不饱和脂肪酸调控脂联素表达的机制仍不清楚。另有研究证明在脂联素基因的启动子上存在过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 的反应元件^[4], PPAR γ 激动剂可以诱导脂联素的表达。本实验选用不同浓度 DHA 处理 3T3-L1 脂肪细胞, 研究其对脂联素表达的影响, 并探讨 DHA 是否是通过 PPAR γ 对脂肪细胞脂联素表达进行调控。

1 材料和方法

1.1 实验材料

3T3-L1 前脂肪细胞株购于美国菌种保藏中心 (ATCC); DMEM 细胞培养液购自 Gibco 公司; 特级胎牛血清购于杭州四季清生物制品公司; 分化诱导剂 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤 (1-methyl-3-isobutylxanthine, IBMX)、地塞米松 (dexamethasone)、胰岛素 (insulin)、PPAR γ 激动剂 Pioglitazone、PPAR γ 拮抗剂 GW-9662 购自 Sigma 公司; 二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA)、Fatty acid-free BSA 购自 Sigma 公司; Trizol 购于 Invitrogen 公司; SYBR Green Real-time PCR Master Mix 购于 TAKARA 公司。

1.2 3T3-L1 前脂肪细胞培养和诱导分化

按照参考文献^[5]中的方法, 在 6 孔板用完全培养液 (DMEM + 10% FBS + 100U/mL 青、链霉素), 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 中培养细胞, 每 2d 换液 1 次。待细胞生长至完全融合后 2d (诱导分化第 0 天) 开始诱导分化, 具体步骤为: 将培养液换成含 0.5 mmol/L IBMX、1 μ mol/L 地塞米松和 10mg/L 胰岛素的完全培养液; 2d 后, 撤去 IBMX 和地塞米松, 使完全培养液中只含有 10mg/L 胰岛素; 再过 2d 后撤去胰岛素, 使用不含有任何诱导剂的完全培养基; 以后每 2d 换液 1 次, 直至第 8-10 天经油红 O 染色鉴定, 90% 以上细胞已分化为成熟的脂肪细胞, 即可进行试验。

1.3 DHA 的处理

1.3.1 DHA 溶液的配制。

采用蛋白吸附方法进行^[6]: 37 $^{\circ}$ C 摇动水浴中将 DHA 分别溶于无水乙醇, 制成 1.0mmol/L 的使用液; 37 $^{\circ}$ C 摇动水浴中将上述 DHA 使用液加入 2% fatty acid-free BSA 的 DMEM 培养液中, 使 DHA/BSA 的物质的量之比均为 3:1, 过滤除菌 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h 以上可用于实验。分化成熟的脂肪细胞 (诱导分化第 8-10 天), 先置于含 0.2% fatty acid-free BSA 的

不含血清的 DMEM 培养液培养 12 h, 然后更换无血清的含一定浓度 DHA-BSA (物质的量之比均为 3:1) 的 DMEM 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育至指定时间。加入 DHA 后, 细胞形态上未见明显皱缩、脱落等现象。

1.3.2 不同浓度的 DHA 对脂联素与 PPAR γ mRNA 表达的影响。

以相应条件下不加 DHA 的 3T3-L1 脂肪细胞为空白对照, 其余分别加入浓度为 25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L、200 μ mol/L、400 μ mol/L DHA 继续培养 24h, 收获细胞, 提取总 RNA。其中每组 3 孔, 每孔加入干预液 1mL。以下同。

1.4 Pioglitazone 与 GW-9662 的处理

1.4.1 Pioglitazone 与 GW-9662 的配制同 DHA 溶液的配制方法。作用终浓度为 100 μ mol/L。

1.4.2 加或不加 PPAR γ 拮抗剂 GW-9662 对脂联素 mRNA 表达的影响。

用已知的 PPAR γ 激动剂 Pioglitazone 作为阳性对照, 分别在浓度为 100 μ mol/L DHA 中加或不加 PPAR γ 拮抗剂 GW-9662 作用分化成熟的脂肪细胞 24h, 提取各条件下的细胞总 RNA。

1.5 总 RNA 提取

用 Trizol 法提取, 主要步骤为: 吸出培养液, 用 1mL 冷 PBS 溶液洗细胞 2 次, 加 1mL Trizol, 反复吹打 2min; 加 200 μ L 氯仿混匀, 室温静置 10min 后于 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 10min; 取上层水相, 加等体积异丙醇沉淀 RNA; 75% 乙醇 1mL 洗涤沉淀; 20 μ L DEPC 处理的双蒸水溶解 RNA; 测定 RNA 的浓度和纯度, 要求吸光度 D260nm/D280nm \geq 1.80。

1.6 cDNA 逆转录

逆转录 PCR 在 25 μ L 体系中进行, 取 0.5 μ g 总 RNA 和 0.5 μ g Olig (dT) 18, 72 $^{\circ}$ C 变性 5min 后置冰上, 加入 5 μ L 5 \times buffer (含 Mg²⁺), 2.5 μ L dNTPs (10 mmol/L), 20IU RNA 酶抑制剂和 100IU M-MLV 逆转录酶, 加 DEPC 水至 25 μ L。42 $^{\circ}$ C 逆转录 1 h 后, 95 $^{\circ}$ C 5 min 灭活逆转录酶。逆转录所得 cDNA 作为模板用于荧光定量 PCR。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测

引物序列由 invitrogen 公司合成, 以 β -actin 作为内参照。 β -actin 引物序列: 上游 5' - GATCATT-GCTCCTCTGAGC - 3', 下游 5' - ACATCTGCTG-GAAGGTGGAC - 3', 扩增产物片段长度 83bp。Adiponectin 引物序列: 上游 5' - GGAACCTGTGCAGGTT-GGAT - 3', 下游 5' - TCTCCAGGAGTGCCATCTCT -

3', 扩增产物片段长度 92bp。PPAR γ 引物序列: 上游 5' - ACAGACCTCAGGCAGATCGT - 3', 下游 5' - GGGTGAAGGCTCATGTCTGT - 3', 扩增引物片段长度 83bp。实时定量 PCR 总反应体系为 20 μ L, 应用 SYBR Green Real-time PCR Master Mix (TAKARA)。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 S, 60 $^{\circ}$ C 退火 30S, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 S, 40 个循环, 每次循环后 72 $^{\circ}$ C 采集荧光强度数据。60 $^{\circ}$ C - 95 $^{\circ}$ C, 每 0.5 $^{\circ}$ C 读板 1 次制备熔解曲线。结果采用比较 C (t) 值的相对定量法^[7], 表达水平以脂联素与内参 β -actin 的比值表示。所用定量 PCR 仪型号为 MxPro-Mx3005P。用仪器自带软件处理结果。

1.8 统计学处理

所得数据采用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用统计软件 SPSS 13.0 分析, 组间比较采用单因

素方差分析, 对各组进行描述性分析和方差齐性检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 3T3-L1 前脂肪细胞的分化与鉴定

诱导分化前, 3T3-L1 细胞胞浆内未见脂滴, 细胞呈梭形或纤维细胞形态, 细胞生长至接触抑制后, 处于生长停滞期。第 2 天到第 6 天, 细胞由梭形变成圆形, 胞体变大, 脂滴逐渐增多、增大。第 6 天时, 脂肪细胞进一步变大变圆, 小脂滴明显增多, 聚集在细胞核周围, 开始出现“戒环”样结构, 可见有 70% 以上的细胞已分化成熟。至第 8 天, 油红 O 染色发现, 视野里 90% 以上细胞含有亮红色脂滴, 部分小脂滴融合成大脂滴, 细胞体积大、形态圆 (图 1)。

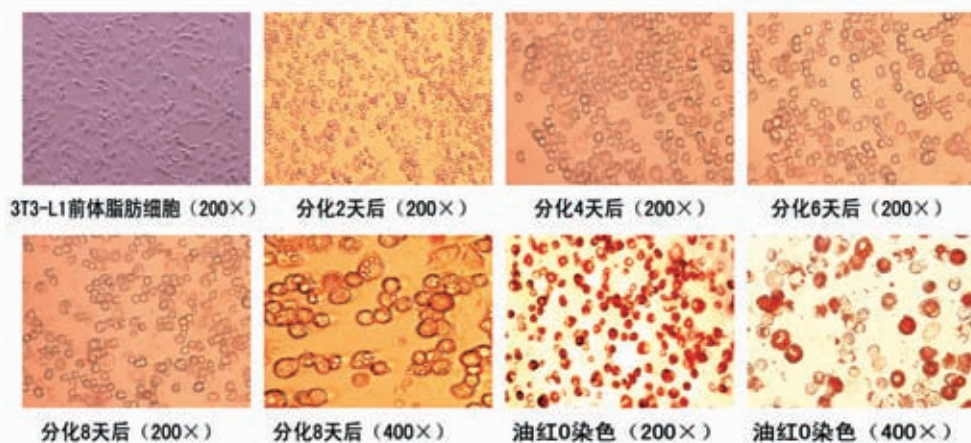


图 1 3T3-L1 脂肪细胞诱导分化过程

Fig. 1 The cell culture and differentiation procedure of 3T3-L1 adipocytes

2.2 实时荧光定量 PCR 熔解曲线

用实时荧光定量 PCR 反应, 熔解曲线分析发现脂联素、PPAR γ 和 β -actin 的 PCR 产物均呈较为锐利的单一峰, T_m 分别为 86 $^{\circ}$ C、83 $^{\circ}$ C、85 $^{\circ}$ C 左右, 此外熔解曲线中没有其它杂峰出现。说明实时定量 PCR 特异性强, 脂联素、PPAR γ 和 β -actin 的 PCR 产物均一, 无杂质污染。

2.3 不同浓度的 DHA 对脂联素 mRNA 表达水平的影响

以不同浓度 (25、50、100、200、400 μ mol/L) 的 DHA 分别处理 3T3-L1 脂肪细胞 24h, 每试验组重复 3 次。如图 2 所示, 与空白对照相比, 当浓度为 50 μ mol/L, 100 μ mol/L 时, 处理组脂联素 mRNA 的

表达分别增加 71.89%、106.23% ($P < 0.05$); 当 DHA 浓度为 200 μ mol/L 时, 脂联素 mRNA 表达略有增加, 但差异不具有显著性 ($P > 0.05$); 当 DHA 浓度为 400 μ mol/L 时, 脂联素 mRNA 的表达降低 68% ($P < 0.05$)。DHA 浓度在 25 μ mol/L 至 100 μ mol/L 时, 脂联素表达随 DHA 剂量依赖性增加; DHA 浓度在 100 μ mol/L 至 400 μ mol/L 时, 脂联素表达随 DHA 剂量依赖性降低。

2.4 不同浓度的 DHA 对 PPAR γ mRNA 表达水平的影响

以不同浓度 (25、50、100、200、400 μ mol/L) 的 DHA 分别处理 3T3-L1 脂肪细胞 24h, 每试验组重复 3 次。不同浓度 DHA 作用下, PPAR γ 表达水平变

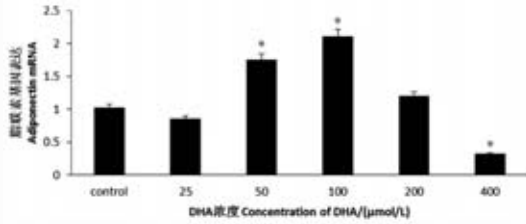


图2 不同浓度的DHA对脂联素 mRNA 表达水平的影响

Fig. 2 Effects of diferent DHA concentration on adiponectin mRNA

化见图3, 当DHA浓度为25μmol/L、100μmol/L时, 处理组PPAR γ mRNA表达分别增加131.46%、70.24%, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 随浓度的递增, PPAR γ mRNA表达水平降低, 当DHA浓度为400μmol/L, 处理组PPAR γ mRNA表达降低44.82%, 但差异不显著。

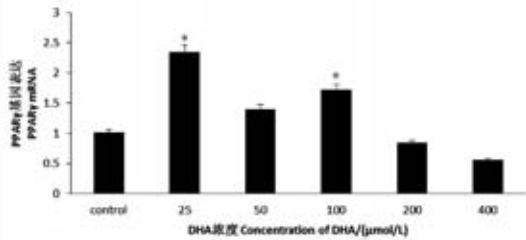


图3 不同浓度的DHA对PPAR γ mRNA 表达水平的影响

Fig. 3 Effects of diferent DHA concentration on PPAR γ mRNA

2.5 PPAR γ 拮抗剂 GW-9662 对 DHA 上调脂联素表达的阻断作用

2.5.1 DHA 中不加 PPAR γ 拮抗剂时 GW-9662 时脂联素和 PPAR γ mRNA 表达水平

用100μmol/L DHA 处理成熟脂肪细胞, 以100μmol/L PPAR γ 激动剂 Pioglitazone 处理为阳性对照, 干预24h, 各实验组重复3次。如图4所示, 与空白对照相比, Pioglitazone 与 DHA 分别可以使处理组脂联素 mRNA 增加 238.27%、106.23% ($P < 0.05$), PPAR γ mRNA 的表达增加 255.72%、70.23% ($P < 0.05$)。

2.6 DHA 中加入 PPAR γ 拮抗剂 GW-9662 时脂联素和 PPAR γ mRNA 表达水平

在100μmol/L DHA、100μmol/L Pioglitazone 中分别加入100μmol/L PPAR γ 拮抗剂 GW-9662 处理诱

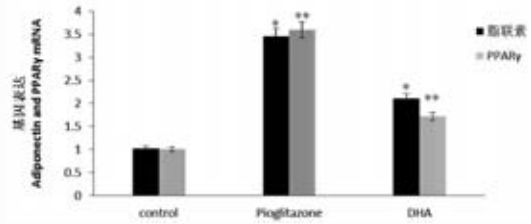


图4 100μmol/L DHA、Pioglitazone 对脂联素与 PPAR γ mRNA 表达水平的影响

Fig. 4 Effects of 100μmol/L DHA、Pioglitazone on adiponectin and PPAR γ mRNA

导成熟的脂肪细胞, 干预24h, 各实验组重复3次, 如图5显示, 与空白对照相比, DHA 处理组脂联素和 PPAR γ mRNA 表达水平分别降低 97.32%、90.90% ($P < 0.05$), Pioglitazone 处理组脂联素和 PPAR γ mRNA 表达水平分别降低 93.19%、95.24% ($P < 0.05$)。提示给予 PPAR γ 拮抗剂后可以消除 DHA 对 PPAR γ 表达的促进作用。

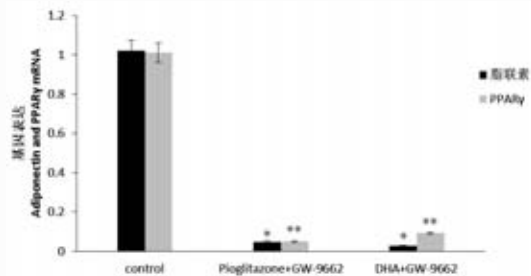


图5 PPAR γ 抑制剂 GW-9662 对脂联素与 PPAR γ mRNA 表达水平的影响

Fig. 5 Effects of antagonist (GW-9662) on adiponectin and PPAR γ mRNA

3 讨论

脂联素是迄今为止发现的唯一一种当脂肪细胞容积变大时其血浆浓度反而下降的脂肪细胞因子^[8], 与2型糖尿病、冠心病等肥胖相关疾病密切相关。DHA 在一般植物油中含量甚微, 在深海鱼类的鱼油、鱼内脏中含量丰富。Neschen 等^[9] 分别用含有27%鱼油和27%红花籽油的饲料喂养大鼠, 15日后发现, 鱼油喂养组大鼠血清脂联素浓度是红花籽油喂养组的2.7倍; 同时把红花籽油喂养组改为鱼油喂养7天后, 大鼠血清脂联素浓度上升为原来的2倍。上述动物实验结果说明, DHA 可促进脂联素的表达与分泌。也有细胞实验发现125μmol/L DHA 处理3T3-L1 脂肪细胞24h后, 脂联素蛋白分泌增

加^[5]。本研究观察到在 100 $\mu\text{mol/L}$ 的生理浓度范围内 DHA 作用于 3T3-L1 脂肪细胞 24h 可以明显提高脂联素 mRNA 的表达, 并呈剂量依赖性增加, 但当 DHA 达到一定浓度 (为生理浓度 2 倍以上时), 脂联素呈剂量依赖性下降。但也有相反的报道, 袁继红等^[10]发现选用 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用于 3T3-L1 脂肪细胞 48h, 脂联素蛋白表达与分泌减少, 随 DHA 浓度增加, 脂联素 mRNA 的表达下降更为显著。这说明 DHA 调节脂联素表达受时间和剂量影响。

PPAR γ 是脂肪分化和脂肪因子表达的主要调节因子, 它是一类由配体激活的核转录因子, 主要在脂肪组织表达^[11]。已有研究发现噻唑烷二酮类药物 TZDs (人工合成的 PPAR γ 激动剂, 如 pioglitazone) 能显著增加胰岛素抵抗患者和啮齿类动物血浆中脂联素的浓度, 并以时间、剂量依赖性方式增加 3T3-L1 脂肪细胞脂联素的表达和分泌^[12,13]。DHA 等多不饱和脂肪酸作为 PPAR γ 的天然配体, 是否通过 PPAR γ 途径来调节脂联素表达值得探讨。本研究发现, 体外培养条件下, 一定浓度 DHA 与 PPAR γ 激动剂 Pioglitazone 一样, 可以同时提高脂联素和 PPAR γ mRNA 表达水平, 而给予 PPAR γ 拮抗剂 GW-9662 可以阻断 DHA 对脂联素表达的促进作用, 与 Joneson 等的研究结果一致^[14], 故推测 DHA 可以通过激活 PPAR γ 来调节脂联素表达。

参考文献

- [1] Krasnodębski P, Opolski G, Karnafel W. Plasma adiponectin levels in acute myocardial infarction and during the postinfarction recovery period in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Kardiol Pol.* 2011; 69 (9): 924–30.
- [2] McLennan P, Howe P, Abeywardena M, Muggli R, et al. The cardiovascular protective role of docosahexaenoic acid [J]. *Eur J Pharmacol.* 1996 Apr 4; 300 (1–2): 83–9.
- [3] 黄文繁, 俞慕华, 戴传文等. 不同脂肪酸构成比食用调和油对高脂血症患者血脂代谢的影响 [J]. *现代预防医学*, 2004, (05).
- [4] HaroldMW, Clary BC. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor γ inhibits adipocyte differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2000; 275: 1873–1877.
- [5] Oster RT, Tishinsky JM, Yuan Z, et al. Docosahexaenoic acid increases cellular adiponectin mRNA and secreted adiponectin protein, as well as PPAR γ mRNA, in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2010 Dec; 35 (6): 783–9.
- [6] RAKAZI I, MUEI I ER H, RITZELER O. et al. Adiponectin counteracts cytokine-and fatty acid-induced apoptosis in the pancreatic beta-cell line INS-1 [J]. *Diabetologia*, 2004; 47 (2): 249–258.
- [7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta\text{CT}$ Method [J]. *Methods*, 2001; 25 (4): 402–408.
- [8] Gil-Campos M, Cañete RR, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity [J]. *Clin Nutr.* (2004).
- [9] Neschen S, Morino K, Rossbacher JC, et al. Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice [J]. *Diabetes.* 2006 Apr; 55 (4): 924–8.
- [10] 袁继红, 龙欢, 雷霆等. 成熟脂肪细胞中脂联素基因表达的脂肪酸应答调控 [J]. *华中农业大学学报*, 2009, (03).
- [11] Kang BY, Kleinhenz JM, Murphy TC, et al. The PPAR {gamma} Ligand, Rosiglitazone, Attenuates Hypoxia-Induced Endothelin Signaling In Vitro and In Vivo [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011 Sep 16.
- [12] FRUEBIS J, TSAO TS, JAVORSCHI S, et al. Proteolytic cleavage product of 30kd a adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice [J]. *Proc Natl Acad sci usa*, 2001; 98: 2005–2010.
- [13] Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, et al. Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut [J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 140 (2): 366–377.
- [14] Johnson C, Williams R, Wei JY, et al. Regulation of Serum Response Factor and Adiponectin by PPAR γ Agonist Docosahexaenoic Acid [J]. *Lipids.* 2011; 2011: 670479. Epub 2010 Sep 19.