

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.33.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 33-0024-05

杨梅素联合围脂滴蛋白对脂肪细胞脂解的影响*

张少华, 王君实, 董维鹏, 燕炯

(山西医科大学公共卫生学院 营养与食品卫生学教研室, 山西 太原 030001)

摘要: 目的 研究杨梅素 (Myric) 与围脂滴蛋白 (PLIN1) 联合作用对 3T3-L1 脂肪细胞脂解的影响。**方法** 常规培养及诱导分化 3T3-L1 前脂肪细胞, 筛选出 Myric 最佳干预浓度和时间。Myric 联合 sh-RNA 干扰载体对已诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞进行联合干预, 实验共分为四组: 联合干预组 (Myric+sh-RNA)、转染组 (sh-RNA)、杨梅素组 (Myric) 和空白组。采用油红 O 进行脂滴染色, 观察脂滴形态; 采用酶学方法检测细胞中三酰甘油 (TG) 和甘油含量, 了解细胞脂解情况; 采用 Western blot 检测脂肪细胞中 PLIN1A、三酰甘油脂肪酶 (ATGL) 和激素敏感性脂肪酶 (HSL) 的表达量。**结果** 以浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Myric 干预 72 h 时, 细胞内 TG 含量最低, 甘油含量最高, 脂解效果最佳, 与其他浓度和干预 24 h 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。联合干预后, 与 Myric 组和 sh-RNA 组比较, Myric+sh-RNA 组细胞内 TG 含量下降, 甘油含量升高, 脂滴形态变小, 数量减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时, Myric+sh-RNA 组 PLIN1A 蛋白表达量降低, ATGL 和 HSL 蛋白表达量升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** Myric 联合 PLIN1 可以更有效地降低 PLIN1 表达量, 提高 ATGL 与 HSL 的表达量, 从而提高脂解效率。

关键词: 脂肪细胞 / 肥胖症; 杨梅素; 围脂滴蛋白; 3T3-L1 脂肪细胞; 脂解

中图分类号: R34

文献标识码: A

Effect of PLIN1 and myricetin on lipolysis of 3T3-L1 adipocytes*

Shao-hua Zhang, Jun-shi Wang, Wei-peng Dong, Jiong Yan

(Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of PLIN1 and myricetin on lipolysis of 3T3-L1 adipocytes and potential mechanisms. **Methods** 3T3-L1 preadipocytes were routinely cultured and differentiated into adipocytes. Mature 3T3-L1 adipocytes were treated with Myric under gradient concentration and time duration for optimal situation. Mature 3T3-L1 adipocytes were treated with Myric and/or sh-RNA of PLIN1 and were divided into four groups: combined treatment group (Myric + sh-RNA), transfection group (sh-RNA), myricetin group (Myric), and blank control group. Oil red O staining was performed to observe the morphology of lipid droplets. Enzymatic method was utilized to determine the contents of intracellular TG and glycerol. Western blot analysis was employed for identification of expression of PLIN1A, ATGL and HSL. **Results** Myric concentration at 100 $\mu\text{mol/L}$ and the intervention time for 72 h suggested the best lipolysis effect. After treatment of Myric and sh-RNA, size of lipid droplets and TG content decreased significantly compared with those in myricetin group or transfection group ($P < 0.05$). The protein expression of PLIN1 downregulated while that of ATGL and HSL protein upregulated significantly in treatment group compared with those in myricetin group or transfection group ($P < 0.05$).

收稿日期: 2017-09-04

* 基金项目: 山西医科大学科技创新基金项目 (No: 01201504)

[通信作者] 燕炯, E-mail: yanjiong@126.com

Conclusions Combinant treatment decreases the expression of PLIN1, increases the expression of ATGL and HSL and accelerate the lipolysis of 3T3-L1 adipocytes.

Keywords: myricetin; perilipin 1; 3T3-L1 adipocytes; lipolysis

脂代谢紊乱和脂质合成分解障碍可致肥胖症的发生^[1]。脂滴已被证实是一种在脂代谢中起重要作用的细胞器, 主要成分是三酰甘油 (triglyceride, TG) 和胆固醇酯, 脂滴表面有多种功能蛋白^[2]。围脂滴蛋白 (perilipin 1, PLIN1) 作为 PAT 家族蛋白的一员, 主要定位于脂滴表面, 在脂肪分解代谢起屏障保护作用的一种可磷酸化蛋白^[3-5]。短发卡 RNA (small hairpin RNA, sh-RNA) 是 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术的一种, 可有效地降解同源序列的 mRNA, 进而抑制靶基因的表达^[6]。本课题组前期已成功构建 PLIN1 基因的 sh-RNA 高效干扰载体, 并已成功验证其可有效促进脂肪细胞的脂解作用^[7]。

黄酮类化合物广泛存在于蔬菜水果中, 具有强抗氧化性、抗肿瘤、调节血脂等生物学活性^[8]。杨梅素 (myricetin, Myric) 作为黄酮类植物化学物中比较具有代表性的的一种, 可以通过降低 PLIN1 表达、磷酸化激素敏感性脂肪酶 (hormone sensitive lipase, HSL), 进而加速脂肪分解, 降低 TG 和胆固醇^[9-10]。

本研究拟通过 Myric 与 PLIN1 基因 sh-RNA 高效干扰载体联合干预, 观察其对 3T3-L1 脂肪细胞脂解效率的影响, 并探讨其可能机制, 为今后肥胖症的防治提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

3T3-L1 前脂肪细胞系 (小鼠胚胎成纤维细胞) 由山西医科大学第一医院内分泌科惠赠, 胎牛血清、DMEM/F12 细胞培养基、胰蛋白酶溶液 (100 ml) 及青链霉素混合液 ($\times 100$) 购自武汉 Boster 生物工程有限公司, TG 检测试剂盒 (美国 Amresco 公司), 甘油检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所), Myric (上海阿拉丁试剂有限公司), Lipofectamine® LTX & Plus Reagent (美国 Invitrogen 公司), PLIN1A 抗体、HSL 抗体、ATGL 抗体和 β -Actin 抗体购自英国 Abcam 公司。

1.2 仪器和设备

Eon 型微孔板分光光度计 (美国 Bio-Tek 公司), DM3000B 型倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司),

JY92- II 型超声细胞粉碎仪 (宁波新芝器械研究所), DYCZ-40D 型电泳仪 (北京六一仪器厂), Neofuge 23R 型低温高速离心机 (上海 Heal Force 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的复苏、培养及诱导分化 从液氮中取出 3T3-L1 前脂肪细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养, 细胞长满时转移到 6 孔板中。

采用经典“鸡尾酒”方法对 3T3-L1 前脂肪细胞进行诱导分化为成熟的脂肪细胞^[11]。在细胞融合到 80% 左右时, 将完全培养基换成诱导分化培养基 I, 2 d 后换为诱导分化培养基 II 继续培养 2 d, 随后更换为基础培养基, 每 2 天换液 1 次, 诱导分化为成熟脂肪细胞成功后进行后续操作。

1.3.2 Myric 干预条件的筛选 在 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化为成熟脂肪细胞第 8 天后换成含 Myric 的培养基, 分为 6 组: 100、50、10、5、1 及 0 μ mol/L, 每组分别干预 48 和 72 h, 检测 TG 和甘油含量。

1.3.3 联合干预 诱导分化为成熟的脂肪细胞后, Myric 联合 sh-RNA 重组干扰载体进行干预实验, 共分 4 组: 联合干预组 (Myric+sh-RNA)、转染组 (sh-RNA)、Myric 组 (Myric) 和空白组。

根据本课题组前期优化后的细胞转染条件, 以质量体积比为 1 : 2 的方式将质粒与脂质体转染进脂肪细胞。转染 5 h 后, 对联合组和 Myric 组换成含有 Myric 的完全培养基继续培养 72 h; 对转染组和空白组换成正常的完全培养基继续培养 72 h。

1.3.4 脂肪细胞油红 O 染色 联合干预完成后, 每孔加入 1 ml 4% 多聚甲醛溶液, 室温下静置 2 h。用移液管吸掉, 加入油红 O 工作液 (现配现用)。1 h 后, 去离子水冲洗 2 遍, 镜下观察并拍照。

1.3.5 细胞中 TG 及甘油含量检测 Myric 干预后, 将细胞消化转移至 1.5 ml EP 管中, 冰水浴条件下进行超声破碎, TG 试剂盒检测, 于酶标仪上 546 nm 波长处测定 TG 含量。甘油测定时需将细胞裂解液放于 70℃ 水浴 10 min, 灭活脂肪酶, 甘油试剂盒检测, 于酶标仪 550 nm 处测定其吸光度, 用蛋白浓度对测定值进行校正。

1.3.6 Western blot 检测细胞中 PLIN1A、HSL 和 ATGL 蛋白表达 提取各组蛋白, 测定并调平浓度。

制备凝胶,每孔中加 50 μg 待测样品,样品两端的孔中加入 5 μl Marker。80 V 跑浓缩胶,120 V 跑分离胶,220 mA 恒定电流进行湿式转膜法转膜。转膜结束后,封闭 2 h。用封闭液对一抗进行稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。二抗孵育时 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 70 min。取出条带,加入 ECL 发光工作液,合上暗盒暗室曝光。Image J 软件对目的蛋白条带进行分析并测定灰度值,以 β -actin 条带灰度值进行校正。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Myric 不同浓度、不同干预时间对 TG 含量的影响

不同浓度 Myric 干预 48 和 72 h 后的 TG 含量比较,差异有统计学意义 ($F = 10.823$ 和 125.113 , 均 $P = 0.000$)。随着 Myric 干预浓度的提高,细胞内 TG 含量逐渐降低,干预浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞内 TG 含量为最小值。100 $\mu\text{mol/L}$ 时 48 和 72 h 比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同剂量的 Myric 及不同干预时间对 TG 含量的影响
[mmol/ (g · protein), $\bar{x} \pm s$]

组别	TG	
	48 h	72 h
0 $\mu\text{mol/L}$	0.1 730 \pm 0.0 099	0.1 867 \pm 0.0 034
1 $\mu\text{mol/L}$	0.1 712 \pm 0.0 110	0.1 857 \pm 0.0 046
5 $\mu\text{mol/L}$	0.1 607 \pm 0.0 033	0.1 623 \pm 0.0 058
10 $\mu\text{mol/L}$	0.1 580 \pm 0.0 041	0.1 555 \pm 0.0 033
50 $\mu\text{mol/L}$	0.1 470 \pm 0.0 060	0.1 406 \pm 0.0 017
100 $\mu\text{mol/L}$	0.1 393 \pm 0.0 030 ¹⁾	0.1 259 \pm 0.0 037 ¹⁾²⁾
F 值	10.823	125.113
P 值	0.000	0.000

注:1)与同时间其他浓度比较, $P < 0.05$;2)与同浓度 48 h 比较, $P < 0.05$

2.2 Myric 不同剂量、不同干预时间对甘油含量的影响

不同浓度 Myric 干预 48 和 72 h 后的甘油含量比较,差异有统计学意义 ($F = 107.296$ 和 99.920 , 均 $P =$

0.000)。Myric 干预后,细胞中甘油含量随着干预浓度的提高而逐渐升高,尤其当干预浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,甘油含量最高。100 $\mu\text{mol/L}$ Myric 干预 48 与 72 h 比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 Myric 与 sh-RNA 联合作用对 TG 和甘油含量的影响

4 组 TG 和甘油含量比较,差异有统计学意义 ($F = 384.875$ 和 102.557 , 均 $P = 0.000$)。其中 Myric+sh-RNA 组细胞内 TG 含量最低,甘油含量最高 ($P < 0.05$); 与空白组比较,sh-RNA 组和 Myric 组细胞内 TG 含量下降,甘油含量上升 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 Myric 与 sh-RNA 联合作用对脂滴形态及分布的影响

显微镜下观察:空白组脂滴密度极大,油红 O 染色颜色深,大脂滴数量多;sh-RNA 和 Myric 组脂滴

表 2 不同剂量 Myric 及不同干预时间对甘油含量的影响
[mmol/ (g · protein), $\bar{x} \pm s$]

组别	甘油	
	48 h	72 h
0 $\mu\text{mol/L}$	0.0 374 \pm 0.0 041	0.0 414 \pm 0.0 084
1 $\mu\text{mol/L}$	0.0 376 \pm 0.0 069	0.0 438 \pm 0.0 058
5 $\mu\text{mol/L}$	0.0 419 \pm 0.0 061	0.0 498 \pm 0.0 069
10 $\mu\text{mol/L}$	0.0 548 \pm 0.0 067	0.0 837 \pm 0.0 076 ²⁾
50 $\mu\text{mol/L}$	0.0 947 \pm 0.0 075	0.1 220 \pm 0.0 111 ²⁾
100 $\mu\text{mol/L}$	0.1 326 \pm 0.0 072 ¹⁾	0.1 737 \pm 0.0 132 ¹⁾²⁾
F 值	107.296	99.920
P 值	0.000	0.000

注:1)与同时间其他浓度比较, $P < 0.05$;2)与同浓度 48 h 比较, $P < 0.05$

表 3 Myric 与 sh-RNA 联合干预对 TG 和甘油含量的影响
[mmol/ (g · protein), $\bar{x} \pm s$]

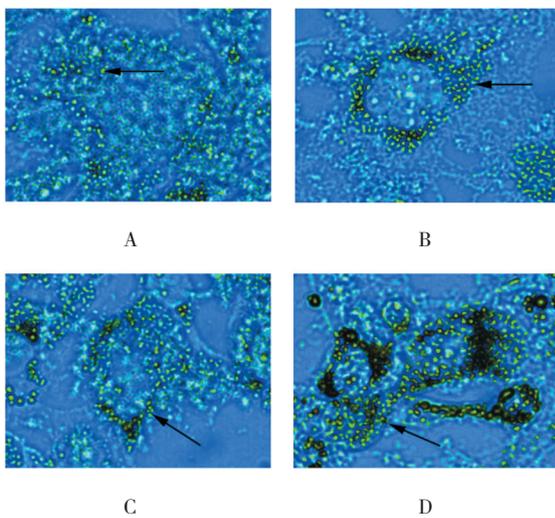
组别	TG	甘油
Myric+sh-RNA	0.0 873 \pm 0.0 048 ¹⁾²⁾	0.2 194 \pm 0.0 112 ¹⁾²⁾
sh-RNA	0.1 471 \pm 0.0 046 ¹⁾³⁾	0.1 190 \pm 0.0 059 ¹⁾
Myric	0.1 305 \pm 0.0 036 ¹⁾	0.1 724 \pm 0.0 101 ¹⁾
空白组	0.1 885 \pm 0.0 016	0.0 431 \pm 0.0 051
F 值	384.875	102.557
P 值	0.000	0.000

注:1)与空白组比较, $P < 0.05$;2)与 sh-RNA 组比较, $P < 0.05$;3)与 Myric 组比较, $P < 0.05$

呈戒环样结构围绕细胞核, 与空白组比较, 脂滴密度相对减小, 染色颜色变浅, 大脂滴数量减少; 联合干预组镜下脂滴数量进一步减少, 颜色进一步变浅, 无大脂滴存在。见图 1。

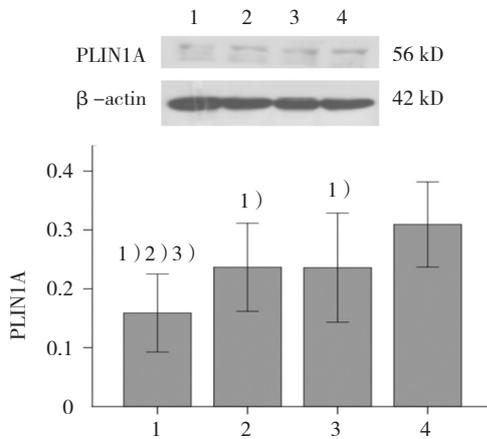
2.5 Myric 与 sh-RNA 联合作用对 PLIN1A 蛋白表达的影响

各组 PLIN1A 蛋白表达含量比较, 差异有统计学意义 ($F=46.010, P=0.000$)。Myric+sh-RNA 组 PLIN1A 蛋白表达含量较其他 3 组降低 ($P<0.05$); 与空白组比较, sh-RNA 组与 Myric 组 PLIN1A 蛋白表达量下降 ($P<0.05$)。见图 2。



A: Myric+sh-RNA 组; B: sh-RNA 组; C: Myric 组; D: 空白组。箭头指示为脂滴

图 1 脂滴油红 O 染色结果 (×400)

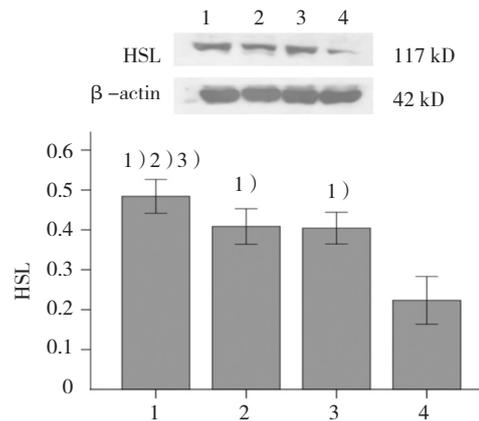


1: Myric+sh-RNA 组; 2: sh-RNA 组; 3: Myric 组; 4: 空白组。
1) 与空白组比较, $P<0.05$; 2) 与 sh-RNA 组比较, $P<0.05$; 3) 与 Myric 组比较, $P<0.05$

图 2 Myric 与 sh-RNA 联合作用对 PLIN1A 蛋白表达的影响

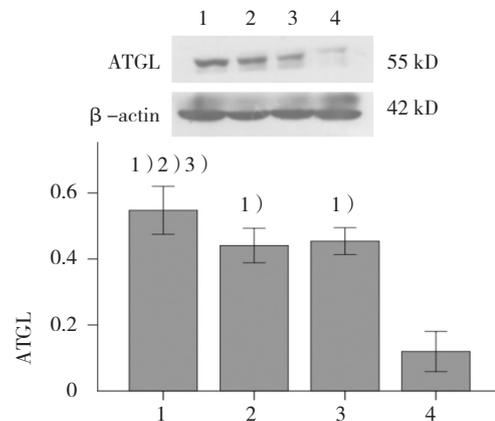
2.6 Myric 与 sh-RNA 联合作用对脂解酶 HSL 和 ATGL 蛋白表达的影响

各组 HSL 和 ATGL 蛋白表达含量比较, 差异有统计学意义 ($F=78.222$ 和 80.831 , 均 $P=0.000$)。与其他 3 组比较, 联合干预组 HSL 和 ATGL 蛋白表达量上升 ($P<0.05$); 与空白组比较, sh-RNA 组与 Myric 组 HSL 和 ATGL 蛋白表达量升高 ($P<0.05$)。见图 3、4。



1: Myric+sh-RNA 组; 2: sh-RNA 组; 3: Myric 组; 4: 空白组。
1) 与空白组比较, $P<0.05$; 2) 与 sh-RNA 组比较, $P<0.05$; 3) 与 Myric 组比较, $P<0.05$

图 3 Myric 与 sh-RNA 联合作用对 HSL 蛋白表达的影响



1: Myric+sh-RNA 组; 2: sh-RNA 组; 3: Myric 组; 4: 空白组。
1) 与空白组比较, $P<0.05$; 2) 与 sh-RNA 组比较, $P<0.05$; 3) 与 Myric 组比较, $P<0.05$

图 4 Myric 与 sh-RNA 联合作用对 ATGL 蛋白表达的影响

3 讨论

3T3-L1 前脂肪细胞是从小鼠分离出的具有特定分化潜能的细胞系, 其本身不具有脂肪细胞的特性, 但能被诱导分化为成熟的脂肪细胞, 常被作为理想的脂代谢、细胞分化模型^[12-13]。脂滴是 TG 在脂肪细胞中主要的储存形式。TG 的分解代谢主要在 ATGL 和

HSL 的作用下进行^[14-15]。

在脂肪细胞中, PLIN1 蛋白锚定于脂滴表面产生支持屏障作用, 将 TG 与脂肪水解酶隔断, 保护其不被分解。研究发现, 当下调 PLIN1 时, 其屏障作用减弱, 脂肪水解酶活性增强, 脂解速率加快, 脂滴变小, 细胞内 TG 含量降低^[16]。

Myric 干预条件的筛选实验结果显示, 随着 Myric 干预浓度的升高以及干预时间的延长, 细胞内 TG 含量逐渐降低, 甘油含量逐渐升高。通过细胞毒性实验发现当 Myric 干预浓度大于 100 $\mu\text{mol/L}$, 干预时间 72 h 时, 细胞存活率低于 80%; 当干预浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, 干预时间超过 72 h 时, 细胞存活率同样低于 80%, 均存在一定细胞毒性。因此, 结合文献查阅结果, 最终确定 Myric 最佳干预浓度和干预时间分别为 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 72 h, 这与 QIAN WANG 等^[9] 的研究结果相一致。

本研究结果显示, Myric+sh-RNA 联合干预组较其他 3 组细胞内 TG 含量降低, 甘油含量则升高, 几乎观察不到大脂滴的存在, 脂滴数量也减少。而联合干预组较单独干预组 PLIN1A 蛋白表达量更低, HSL 和 ATGL 蛋白表达量更高。因此本实验认为, Myric 与下调 PLIN1 基因联合作用比它们各自单独干预更能有效地促进脂肪分解, 杨梅素和 sh-PLIN1 干扰载体引起的脂解加快可能是通过降低 PLIN1A 蛋白表达, 上调脂肪酶 HSL、ATGL 的表达实现的。

参 考 文 献:

- [1] SCHMIDT A M. The growing problem of obesity: mechanisms, consequences, and therapeutic approaches[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(6): e19-23.
- [2] 张淑妍, 杜雅兰, 汪洋, 等. 脂滴 - 细胞脂类代谢的细胞器 [J]. *生物物理学报*, 2010, 26(2): 97-105.
- [3] ALAN R. KIMMEL, CAROLE SZTALRYD. The perilipins: Major cytosolic lipid droplet-associated proteins and their roles in cellular lipid storage, mobilization, and systemic homeostasis[J]. *Annu Rev Nutr*, 2016, 36(1): 471-509.
- [4] SONG W, YU H, LIN Y, et al. A functional variant in the exon 5 of PLIN1 reduces risk of central obesity by possible regulation of lipid storage[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 456(4): 896-900.
- [5] BICKEL P E, TANSEY J T, WELTE M A. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta Molecular & Cell Biology of Lipids*, 2009, 1791(6): 419-440.
- [6] AMBESAJIR A, KAUSHIK A, KAUSHIK J J, et al. RNA interference: A futuristic tool and its therapeutic applications[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2012, 19(4): 395-403.
- [7] 赵志武, 王君实, 马敏, 等. 下调 Perilipin 1 基因表达对 3T3-L1 细胞脂解的影响敲除小鼠脂肪组织纤维化研究 [J]. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(3): 17-22.
- [8] 魏良柱, 李筱玲. 黄酮类化合物药理活性研究进展 [J]. *陕西农业科学*, 2014, 60(12): 52-56.
- [9] WANG Q, WANG SH T, YANG X, et al. Myricetin suppresses differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and enhances lipolysis in adipocytes[J]. *Nutrition Research*, 2015, 4(35): 317-327.
- [10] LEONG C N, TAKO M, HANASHIRO I, et al. Antioxidant flavonoid glycosides from the leaves of *Ficus pumila* L[J]. *Food Chemistry*, 2008, 109(2): 415-420.
- [11] 郭秀玲, 徐民岗, 张秀丽, 等. 小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞培养与诱导分化方法的建立 [J]. *中国药物与临床*, 2013, 13(12): 1542-1544.
- [12] POULOS S P, DODSON M V, HAUSMAN G J. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2010, 235(10): 1185-1193.
- [13] KANG M C, KANG N, KO S C, et al. Anti-obesity effects of seaweeds of Jeju Island on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and obese mice fed a high-fat diet[J]. *Food & Chemical Toxicology*, 2016, 90(4): 36-44.
- [14] HAEMMERLE G, ZIMMERMANN R, HAYN M, et al. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(7): 4806-4815.
- [15] 黄文钰. 脂肪细胞三酰甘油分解代谢相关调节的研究进展 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33(3): 230-234.
- [16] KOZUSKO K, TSANG V, BOTTOMLEY W, et al. Clinical and molecular characterization of a novel PLIN1 frameshift mutation identified in patients with familial partial lipodystrophy[J]. *Diabetes*, 2015, 64(1): 299-310.

(王荣兵 编辑)