

红景天提取物对 3T3-L1 脂肪细胞增殖及细胞分化的影响

李新明, 高忠东, 李群, 田志芳, 郭志利 (山西省农业科学院加工所, 山西太原 030031)

摘要 [目的]应用 3T3-L1 前脂肪细胞株, 分析红景天提取物(*Rhodiola rosea* L. herb extract, RRLHE)对 3T3-L1 细胞增殖和分化的作用。[方法]使用油红 O 染色法对红景天提取物干预分化的细胞进行评估并定量分析脂肪细胞分化程度。通过逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)来检测脂肪细胞分化相关基因过氧化物体增殖剂活化受体 γ (PPAR γ)、CAAT/增强子结合蛋白 α (C/EBP α) mRNA 的表达。[结果]红景天提取物能显著抑制 3T3-L1 细胞增殖和向成熟脂肪细胞分化, 另外, 红景天提取物能显著提高 3T3-L1 前脂肪细胞的葡萄糖摄取和利用率, 红景天提取物明显抑制 PPAR γ 、C/EBP α mRNA 表达, 与对照组比较, 差异显著($P < 0.01$)。[结论]红景天提取物对 3T3-L1 细胞增殖和分化均有抑制作用, 并能提高 3T3-L1 前脂肪细胞的葡萄糖摄取和利用率, 其影响机制与钝化 PPAR γ 、C/EBP- α mRNA 的表达有关系。

关键词 红景天提取物; 3T3-L1; 细胞分化; PPAR γ mRNA

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)05-025-02

Effects of *Rhodiola rosea* L. Herb Extract on 3T3-L1 Proliferation and Differentiation

LI Xin-ming, GAO Zhong-dong, LI Qun et al (Processing Institute of Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan, Shanxi 030031)

Abstract [Objective] Preadipocyte 3T3-L1 was used to evaluate the effect of *Rhodiola rosea* L. herb extract (RRLHE) on preadipocyte 3T3-L1 proliferation and differentiation. [Method] Oil red O staining method was used for evaluation of effect of *Rhodiola rosea* L. herb extract (RRLHE) on preadipocyte 3T3-L1 proliferation and differentiation. Adipocyte differentiation related genes expression, peroxisome proliferation activator receptor γ (PPAR γ) and CAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) mRNA, were examined by using the reverse transcription polymerase chain reaction (Real time QPCR). [Result] RRLHE could significantly inhibit preadipocyte 3T3-L1 proliferation and differentiation toward mature adipocytes. In addition, RRLHE could significantly increase 3H glucose uptake rate in preadipocyte 3T3-L1. RRLHE could significantly inhibit PPAR γ and C/EBP α mRNA expression compared to control group. [Conclusion] RRLHE can inhibit preadipocyte 3T3-L1 proliferation and differentiation toward mature adipocytes, enhance 3H glucose uptake rate in preadipocyte 3T3-L1. The inhibitory effect has a relationship to deactivation of PPAR γ and C/EBP- α mRNA genes expression.

Key words *Rhodiola rosea* L. herb extract; 3T3-L1; Cell differentiation; PPAR γ mRNA

红景天是景天科(Crassulaceae)红景天属(*Rhodiola* L.)多年生草本或亚灌木植物。红景天中含有多种化学成分, 主要有黄酮类、醌醇、红景天苷、谷甾醇、有机酸、挥发油、多糖、脂肪、蛋白质等, 具有增强免疫功能, 保护心脑血管等功效^[1-2]。

笔者从与脂肪细胞分化密切相关的 2 个因子过氧化物体增殖剂活化受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor PPAR γ)和 CAAT/增强子结合蛋白 α (CAAT/enhancer binding protein C/EBP α)入手, 观察了红景天提取物对其 mRNA 表达的影响, 为深入探讨红景天提取物改善脂代谢的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 红景天提取物为山西省农业科学院制备。

3T3-L1 前脂肪细胞株购自 American Type Culture Collection (ATCC)。其他试剂为 Amresco 公司产品或购自 Sigma 公司。

1.2 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖及检测 前脂肪细胞(3T3-L1)分为对照组(不加药)和药物处理组。不同浓度前脂肪细胞(3T3-L1)接种在 96 孔板上, 参照 XTT 法描述, 测定吸光度值(A_{570}), 建立细胞数目曲线。然后再将 1.5×10^4 /ml 浓度的前脂肪细胞 3T3-L1 接种于 96 孔板, 每孔为 100 μ l 培养基, 在细胞贴壁后, 加变化浓度的 RRLHE (100、150、200

μ g/ml)进行干预培养, 分别检测各组细胞的 A_{570} 值, 通过“ A_{570} 值细胞数目”曲线计算每加药 24、48 和 72 h 的细胞数目。

1.3 红景天提取物对前脂肪细胞 3T3-L1 葡萄糖摄取率的影响 3T3-L1 前脂肪细胞经培养和诱导分化为成熟的脂肪细胞后。将成熟的脂肪细胞以含 0.2% 牛血清白蛋白(BSA)的 DMEM 培养基培养 12 h 后, 分为 4 组: 对照组(不加 RRLHE)、低中高(100、150、200 μ g/ml)剂量 RRLHE 处理组, 药物处理培养 24 h。按文献[3]所述方法测定³H-葡萄糖摄取率。

1.4 3T3-L1 前脂肪细胞的培养、诱导分化和定量检测 将 3T3-L1 前脂肪细胞按文献[4]所述方法进行诱导分化, 诱导分化 8~12 d 的 3T3-L1 细胞 85% 以上呈脂肪细胞表型。

设置空白对照组(normal control, CON 组)、红景天提取物干预组[RRLHE 组(100、150、200 μ g/ml)]及罗格列酮干预组(ROS 组), 在培养液中分别加入不同浓度的干预药物。罗格列酮为 10 μ mol/L, CON 组加等体积生理盐水。分化液与药同时加入, 同步更换药物与培养液。分化第 8 天开始油红 O 染色, 拍摄照片。异丙醇处理已染色的细胞, 在细胞裂解后通过酶标仪对脂滴着色程度进行比色, 检测 OD 值(570 nm 波长), 定量分析细胞的分化程度。

1.5 实时定量 PCR 检测 PPAR α 和 C/EBP α 基因在 3T3-L1 细胞中的表达 引物设计: PPAR γ 上游 5'-TTTCAAGGGTGCCAGTTT-3', 下游 5'-AGCCAGCATCGTG-TAG-3', C/EBP α 上游 5'-GGAAAGAAACGACTGGGAGC-3', 下游 5'-CGACTAGACGCTATTGTGATT-3', GAPDH 上游 5'-

ATGAGGTCCACCACCCTG-3', 下游 5'-TTGACCTCAACTA-CATGG-3';使用 Trizol 试剂从细胞中提取总 RNA,通过寡脱氧核苷酸和 MMLV 逆转录酶合成 cDNA,采用 Tag DNA 多聚酶 PCR 反应扩增 cDNA 产物,应用 ABIPRISM 7000 序列检测系统测定 mRNA 拷贝和循环数的线型关系,设定标准曲线。将正常对照组 mRNA 的表达量设为 1,计算各组 mRNA 的相对表达量。

1.6 数据处理 采用 SPSS12.0 软件进行数据分析,结果用 ($\bar{x} \pm SD$) 表示,并进行组间差异比较,当 $P < 0.05$ 时表明差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 红景天提取物对前脂肪细胞 3T3-L1 增殖的影响 在空白对照组,3T3-L1 前脂肪细胞数量在 24、48、72 h 呈倍数增长;与空白对照组比较,100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ RRLHE 作用后 (24、48、72 h),明显抑制了脂肪细胞的增值,且有一定的剂量依赖关系 (5.29 ± 0.17 、 4.72 ± 0.09 、 4.48 ± 0.11 vs 5.35 ± 0.12 ; 8.05 ± 0.13 、 7.66 ± 0.12 、 6.84 ± 0.15 vs 8.79 ± 0.07 ; 15.73 ± 0.43 、 15.47 ± 0.31 、 15.04 ± 0.29 vs 16.05 ± 0.34),即 RRLHE 浓度越高则抑制作用越明显,与对照组比较差异有统计学意义 (表 1, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 红景天提取物对前脂肪细胞 3T3-L1 增殖的影响

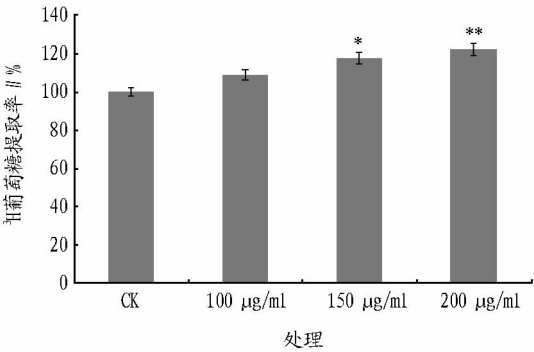
处理	24 h	48 h	72 h
CK(0)	5.35 ± 0.12	8.79 ± 0.07	16.05 ± 0.34
RRLHE (100 $\mu\text{g/ml}$)	5.29 ± 0.17	$8.05 \pm 0.13^*$	15.73 ± 0.43
RRLHE (150 $\mu\text{g/ml}$)	$4.72 \pm 0.09^*$	$7.66 \pm 0.12^{**}$	$15.47 \pm 0.31^*$
RRLHE (200 $\mu\text{g/ml}$)	$4.48 \pm 0.11^{**}$	$6.84 \pm 0.15^{**}$	$15.04 \pm 0.29^{**}$

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

油红 O 脂肪特异性染色结果发现,相比较对照组,RRLHE 处理组细胞内亮红色的脂滴显著减少,充脂细胞数和细胞体积也随之降低,相比较对照组,罗格列酮处理组 OD 值也显著增加,罗格列酮组分化成典型的成熟脂肪细胞形态,细胞圆而大,胞内充满了脂滴。意味着高浓度 RRLHE 可显著降低脂肪细胞内脂肪的生成量,对 3T3-L1 前脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化具有显著的抑制作用。

2.2 红景天提取物对前脂肪细胞 3T3-L1 ^3H 葡萄糖摄取率的影响 红景天提取物对前脂肪细胞 3T3-L1 ^3H 葡萄糖摄取率的影响见图 1,与对照组相比较 (Con 组葡萄糖摄取率当作参考对照基值 (100%)),其他药物处理组分别与 CK 组相比较当作各组的葡萄糖摄取率。),RRLHE 处理组细胞内 ^3H 葡萄糖摄取率随药物剂量的增加而显著增加 (108.8 ± 2.6 、 117.6 ± 4.1 、 122.1 ± 3.5 vs 100 ± 2.2),显示出明显的剂量依靠效应。

2.3 红景天提取物对前脂肪细胞 3T3-L1 中 PPAR γ 和 C/EBP α mRNA 表达的影响 RRLHE 对脂肪细胞 PPAR γ 和 C/EBP α mRNA 表达的影响见表 2,RRLHE 组 PPAR γ mRNA 和 C/EBP α mRNA 表达量显著低于对照组 (0.85 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.1 ; 0.83 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.1),与对照组相比,罗格列酮组的 PPAR γ mRNA 和 C/EBP α mRNA 表达量显著增



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 红景天提取物对前脂肪细胞 3T3-L1 ^3H 葡萄糖摄取率的影响 (加 (2.51 ± 0.09 vs 1.00 ± 0.1 ; 2.44 ± 0.11 vs 1.00 ± 0.1)) (表 2, $P < 0.01$)。

表 2 红景天提取物对前脂肪细胞 3T3-L1 中 PPAR γ 和 C/EBP α mRNA 表达的影响

处理	PPAR γ mRNA	C/EBP α mRNA
CK(0)	1.00 ± 0.1	1.00 ± 0.1
RRLHE (200 $\mu\text{g/ml}$)	$0.85 \pm 0.03^{**}$	$0.83 \pm 0.04^{**}$
ROS (10 $\mu\text{mol/L}$)	$2.51 \pm 0.09^{**}$	$2.44 \pm 0.11^{**}$

注: ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

红景天具有许多生物活性,如改善血液微循环、活血化瘀和缓解高原缺氧、促进体脂和胆固醇代谢,减轻高脂血症的作用。大量动物试验已经证明了红景天提取物降低动物高脂血症的效果^[5]。红景天提取物在临床上广泛应用于高脂血症的治疗^[6]。在目前的试验中,红景天提取物能够降低 3T3-L1 前脂肪细胞增殖和向成熟脂肪细胞分化,结果从细胞水平证明了红景天提取物能够调节脂代谢紊乱。另外,红景天提取物处理能够显著增加前脂肪细胞 3T3-L1 内 ^3H 葡萄糖摄取率,这一效果随药物剂量的增加而增加,表明红景天提取物在一定程度上能够减轻胰岛素抵抗效应。这表明红景天提取物可以提高葡萄糖摄取和利用,但不会增加体脂的堆积,从而不会引起体重的过度增加。

作为脂类代谢的重要调节因子,PPAR 在调控能量代谢方面起重要作用,能够调解脂肪酸吸收、脂肪沉积和形成、脂类代谢内环境和胰岛素抵抗^[7]。在脂肪组织、小肠上皮细胞、骨骼肌和淋巴等多种器官及组织中,PPAR γ 广泛表达^[7]。C/EBP α 属于亮氨酸拉链转录因子家族,可诱导成纤维细胞中的脂肪形成。活化的 C/EBP α 单独能增加自身的表达,同时还能够与 PPAR γ 协同诱导细胞分化^[8]。该研究表明,红景天提取物能够抑制 3T3-L1 前脂肪细胞中 PPAR γ mRNA 和 C/EBP α mRNA 的表达,这与罗格列酮的作用相反,推测红景天提取物作为 PPAR 的配体,激活和活化了 PPAR 受体,提高了肝脏 PPAR γ mRNA、PPAR α mRNA 的表达,进而启动了下游与脂质代谢有关酶的一系列基因转录,加速了脂肪氧化分解,从而改善了脂质代谢紊乱,这可能是红景天提取物改

(下转第 139 页)

表 3 氟环唑在稻田土壤中的消解动态方程

试验地区	方程	<i>R</i>	<i>T</i> _{1/2}
长沙	$C_t = 0.149\ 6e^{-0.055t}$	0.922 5	12.60
北京	$C_t = 0.160\ 1e^{-0.057\ 3t}$	0.875 4	12.09
杭州	$C_t = 0.197\ 2e^{-0.034\ 1t}$	0.849 8	20.32

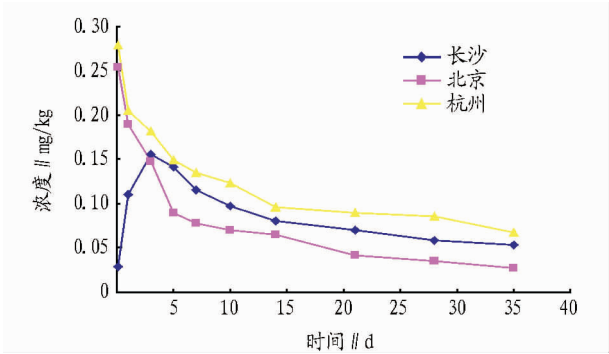


图 2 氟环唑在三地稻田土壤中的消解动态曲线

消解过程是一个快速降低的过程。在施药 14 d 后,氟环唑在植株中的消解率大部分在 90% 以上。氟环唑在植株中的平均的消解半衰期为 5.20 d (表 4)。对消解动态数据进行统计分析,消解动态曲线符合一级动力学方程 (图 3)。

表 4 氟环唑在水稻植株中的消解动态方程

试验地区	方程	<i>R</i>	<i>T</i> _{1/2}
长沙	$C_t = 3.566\ 7e^{-0.164\ 9t}$	0.889 1	4.20
北京	$C_t = 3.791\ 2e^{-0.28t}$	0.940 0	2.48
杭州	$C_t = 2.184\ 7e^{-0.101\ 8t}$	0.755 2	6.81

3 结论

建立了稻田田水、土壤和水稻植株样品中氟环唑的气相色谱分析方法,样品用有机溶剂提取,弗罗里硅土柱纯化,HP-5 色谱柱分离,ECD 检测器检测。分析方法通过添加回收

率试验,氟环唑的最小检出量为 5.0×10^{-11} g,最低检测浓度田水为 0.005 0 mg/kg、土壤为 0.012 5 mg/kg、植株为 0.025 0 mg/kg。当添加浓度在 0.025 ~ 1.000 mg/kg 时,氟环唑在不同样品中的平均回收率为 78.5% ~ 101.1%,标准偏差为 2.0% ~ 9.0%。

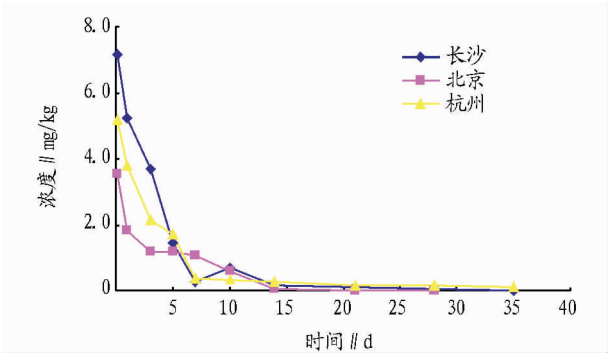


图 3 氟环唑在三地水稻植株中的消解动态曲线

研究了 125 g/L 氟环唑悬浮剂在水稻田环境中的消解动态规律,氟环唑在田水、稻田土壤和水稻植株中的消解遵循一级化学反应动力学方程 $C_t = C_0e^{-kt}$,平均消解半衰期分别为 3.55、15.00、4.50 d。可见,氟环唑在稻田田水、土壤、植株中消解均较快,属于易消解农药。

参考文献

[1] 陈振山,王素丽,刘丰茂. 氟环唑高效液相色谱分析[J]. 农药,2004,43 (12):557-558.

[2] 江才鑫,陈祖伟,杨琳荣. 氟环唑的合成综述[J]. 浙江化工,2006,37 (10):9-10.

[3] 杨扬,吕文硕. 生物活性的 N-取代 1,2,4-三唑类化合物的研究进展[J]. 化学通报,1996,25(10):6-13.

[4] 王进贤,译. 三唑类化合物的杀菌和植物生长调节作用[J]. 农药,1988, 27(5):50-55.

[5] 鲍雨林,金国强,朱敏华,等. 化学农药与农产品质量安全的思考[J]. 浙江柑橘,2010(10):12-16,27.

-928.

[4] 张征,邹大进,陈月,等. Obestatin 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖与分化[J]. 第二军医大学学报,2007,28(9):929-932.

[5] 孙永宁,张宏伟. 诺迪康胶囊治疗高脂血症 47 例[J]. 浙江中医学院学报,2003,27(4):48-99.

[6] EUN JU SHIN,HAENG JEON HUR,MI JEONG SUNG,et al. Ethanol extract of the Prunus mume fruits stimulates glucose uptake by regulating PPAR-γ in C2C12 myotubes and ameliorates glucose intolerance and fat accumulation in mice fed a high-fat diet [J]. Food Chemistry,2013,141 (4):4115-4121.

[7] SRIVASTAVA R A K. Evaluation of anti-atherosclerotic activities of PPAR-α, PPAR-γ, and LXR agonists in hyperlipidemic atherosclerosis-susceptible F1B hamsters [J]. Atherosclerosis,2011,214(1):86-93.

[8] JAE SUE CHOI,JI-HYE KIM,MD. YOUSOF ALI,et al. Coptis chinensis alkaloids exert anti-adipogenic activity on 3T3-L1 adipocytes by downregulating C/EBP-α and PPAR-γ [J]. Fitoterapia,2014,98:199-208.

(上接第 26 页)

善脂质代谢紊乱的作用机理之一。

推测红景天提取物通过降低 PPARγ、C/EBP-α mRNA 的表达来抑制脂肪细胞的分化,进而抑制脂质在脂肪细胞内的积聚和前脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化,增加葡萄糖的摄取和利用、抑制体脂的积聚,最终延缓体重的增加,从而其脂类和糖类代谢的改善作用。

参考文献

[1] 黄增艳,范书铎,张蟠,等. 红景天对鼠抗疲劳作用实验研究[J]. 中国医科大学学报,1996,27(2):123-124.

[2] 陈秋丽,邓伟国,王毅. 红景天皂苷对雌性大鼠蛋白质和脂肪代谢的影响[J]. 吉林大学学报,2003,29(4):411-413.

[3]. 王树海,王文健,汪雪峰,等. 黄芪多糖和小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞糖代谢及细胞分化的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2004,24(10):926