

齐墩果酸抑制 3T3-L1 脂肪细胞脂质堆积*

王石峰¹, 翟晨曦¹, 刘青¹, 张燕玲¹, 栗世铀^{2**}, 乔延江^{1**}

(1. 北京中医药大学中药学院 北京 100102; 2. 中国科学院北京基因组研究所 北京 100101)

摘要:目的:从 57 个中药化合物筛选具有抑制 3T3-L1 脂肪细胞脂质堆积的活性成分。方法:3T3-L1 细胞培养至融合后用化合物进行干预,并诱导使其分化,采用高内涵影像方法检测细胞中脂滴含量。对发现的活性成分用 ToxInsight 体外毒性检测方法评价其肝毒性。结果:发现并验证活性成分齐墩果酸(OA)具有显著的脂质形成抑制作用,其半数抑制浓度(IC₅₀)为 14.5 μmol·L⁻¹,且在 60 μmol·L⁻¹ 测试浓度范围内对 HepG2 细胞无显著损伤作用。结论:OA 具有显著的降低脂质形成作用,是潜在的降脂候选化合物。

关键词:齐墩果酸 3T3-L1 脂肪细胞 脂质形成

doi: 10.11842/wst.2014.06.026 中图分类号:R285.5 文献标识码:A

3T3-L1 脂肪细胞是目前应用较成熟的体外降脂模型,来源于小鼠胚胎组织,在激素诱导作用下可分化产生脂滴^[1]。脂滴是一种储存能量的细胞器,其大小、含量和分布与疾病的发生机制密切相关^[2]。脂质堆积易引起各类代谢类疾病,如肥胖症、高脂血症和糖尿病^[3]。并且,脂肪堆积也是诱发心脑血管疾病的危险因素,易造成动脉粥样硬化、冠心病、高血压等。随着我国人民物质生活水平的不断提升,人们摄入越来越多的高能量饮食,因脂质堆积造成的肥胖症患者人数正在不断增长,对降脂药物的需求量也将大大增加^[4]。

目前临床应用最广的降脂药物是他汀类药物,然而,他汀类药物不耐受的问题已经越来越突出,主要是肌痛,极少数情况下还可能发生横纹肌溶解。解决的途径之一是联合服用其他非他汀类的降脂药物,以减少不良反应^[5]。因此,发现新的降脂活性成分具有重要意义。本文以 3T3-L1 脂肪细胞为

模型,采用高内涵筛选方法,研究了 57 个中药化合物对脂滴形成的干预作用,并对发现的阳性化合物进行了体外肝毒性评价,以期发现安全有效的潜在降脂活性成分。

1 仪器与材料

1.1 仪器

CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司),超净工作台(苏州净化设备有限公司),倒置显微镜(日本 Olympus 公司),Cellomics ArrayScan[®] VTI HCS Reader(美国 Thermo 公司)。

1.2 材料

3T3-L1 前脂肪细胞株和 HepG2 细胞株均由中国科学院北京基因组研究所提供。齐墩果酸(Oleanolic Acid, OA, 批号:11122009)购自成都普瑞法科技开发有限公司;厚朴酚(批号:H05-130901)、黄芩素(批号:H06-130901)、毛蕊异黄酮(批号:M18-20120211)、肉桂酸(批号:R19-130901)和肉桂醇(批号:R18-130912)购自江西本草天工科技有限

收稿日期:2014-03-23

修回日期:2014-04-04

* 科学技术部国家科技支撑计划项目(2008BAI51B01):中药有效成分群辨识技术研究,负责人:张宏桂,北京中医药大学开放课题(2013-SYSK-FKT-04):中药基础与新药研究重点实验室,负责人:乔延江。

** 通讯作者:栗世铀,副研究员,主要研究方向:高通量筛选研究;乔延江,本刊编委,教授,主要研究方向:中药基本理论,中药信息学与中药质量控制。

公司;其他中药化合物均购自中国药品生物制品检定所^[6]。DMEM 高糖培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;胰岛素购自美国 Life technology 公司;胰酶、青霉素、链霉素、地塞米松、异丁基-3-甲基-黄嘌呤(IBMx)、罗格列酮、噻氯吡啶、Hoechst 33342 和尼罗红染料均购自美国 Sigma 公司;ToxInsight 肝毒性检测试剂盒由美国 Thermo 公司提供。

2 方法

2.1 3T3-L1 脂肪细胞诱导分化及化合物干预

3T3-L1 前脂肪细胞用含 10%胎牛血清、500 U·mL⁻¹青霉素和 500 μg·mL⁻¹链霉素的 DMEM 培养基于 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养 4 天。取对数生长期细胞进行实验。在化合物降脂活性评价中,3T3-L1 细胞经胰酶消化,采用血球计数法计数并稀释成 1.5×10⁴/mL 的细胞悬液,按每孔 200 μL 接种于 96 孔板(美国 Corning 公司)。培养 2 天使细胞达到融合,在第 3 天开始加化合物孵育。初筛实验中,化合物浓度为 10 μmol·L⁻¹,剂量效应曲线研究中,OA 给药浓度从 60 μmol·L⁻¹按 2 倍梯度连续稀释 7 个浓度。化合物孵育 24 h 后,对细胞进行诱导分化^[7]。诱导液组成为地塞米松 0.25 μmol·L⁻¹,IBMx 0.5 mmol·L⁻¹,胰岛素 1 μg·mL⁻¹,罗格列酮 2 μmol·L⁻¹。诱导液处理 2 天,再换为含 1 μg·mL⁻¹胰岛素的培养基培养 2 天,然后再用完全培养基培养 2 天。待测化合物连续作用 7 天,以未经诱导分化的前脂肪细胞为空白对照(Blank control);以 0.25% DMSO 处理的成熟脂肪细胞为阴性对照(Negative control);以 10 μmol·L⁻¹洛伐他汀处理的成熟脂肪细胞为阳性对照(Positive control),每组设 3 个复孔,重复 3 次。

2.2 荧光成像与脂滴含量分析

细胞培养至第 10 天,用 4%多聚甲醛将细胞在室温固定 30 min,再用 5 μg·L⁻¹尼罗红染液染色 5 min,用 10 μg·L⁻¹ Hoechst 33342 染色 10 min。固定和染色操作后均用 PBS 润洗 3 次,再用 Cellomics ArrayScan[®] VTI HCS Reader 采集细胞荧光图片。成像条件为:10 倍物镜,通道 1 采集 Hoechst 33342 标记的细胞核信号;激发波长 Ex=350 nm,发射波长 Em=461 nm,曝光时间为 0.2 s;通道 2 采集尼罗红标记的脂滴信号;激发波长为 Ex=504 nm,发射波长 Em=529 nm,曝光时间为 0.2 s。

阴性对照组(Negative control)脂滴含量为

100%,样本组脂滴百分含量计算方法为:100×[RFU_(s)-RFU_(blank control)]/[RFU_(negative control)-RFU_(blank control)],其中,RFU 为荧光强度,S 为受试物组。抑制率=100%-样本脂滴(%).

2.3 体外肝损伤评价

取生长状态良好的 HepG2 细胞,以 8 000 个/孔的浓度接种于 96 孔细胞培养板,每孔含培养基 180 μL,培养过夜。再加入 20 μL 含有齐墩果酸的培养基,最终浓度分别为 60、30、15、7.5 μmol·L⁻¹。以 0.25% DMSO 处理组为阴性对照,噻氯吡啶(Ticlopidine, TIC)浓度为 213 μg·mL⁻¹(最大血药浓度的 100 倍)^[8]处理组作为肝细胞损伤的阳性对照。孵育 24 h 后,根据 ToxInsight 毒性评价试剂盒所提供的方法进行细胞染色及成像分析。将细胞数量、活性氧自由基(Reactive Oxygen Species,ROS)、线粒体膜电位(Mitochondrial Membrane Potential, MMP)作为肝细胞损伤的指标^[9]。每个指标的效应强度归一化方法为:测试组/阴性对照组。

2.4 统计分析

初筛实验的抑制率用均值表示,脂滴含量分析数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,浓度效应关系图采用 GraphPad Prism 5.0 绘制,通过“浓度-脂滴量”曲线计算 IC₅₀ 值。数据统计分析采用 *t* 检验或单因素方差分析,*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 中药化合物对脂滴形成的影响

洛伐他汀为 HMG-CoA 抑制剂,能抑制 3T3-L1 脂肪细胞脂滴形成^[10],在本实验中用作阳性对照。初筛实验中化合物的测试浓度均为 10 μmol·L⁻¹。细胞融合第 1 天开始加入化合物孵育,融合第 2 天开始诱导,受试物连续作用于细胞 7 天后,检测细胞中脂滴含量。如图 1A 所示,洛伐他汀显著降低脂肪细胞中脂滴含量(*P*<0.01)。57 个受试物对脂滴的抑制率如图 1B 所示,OA 抑制率达到 50%(黑色实心圆所示),在本实验中被筛选出来作为活性成分。

3.2 齐墩果酸抑制脂滴形成的浓度效应关系

为了进一步确证 OA 的降脂作用,本研究研究了不同浓度的该化合物作用于诱导分化的 3T3-L1 脂肪细胞,处理方法与上述相同。不同条件处理后细胞荧光图片如图 2 所示,空白对照组中未经诱导的细胞几乎无脂滴形成,而阴性对照组中成熟脂肪

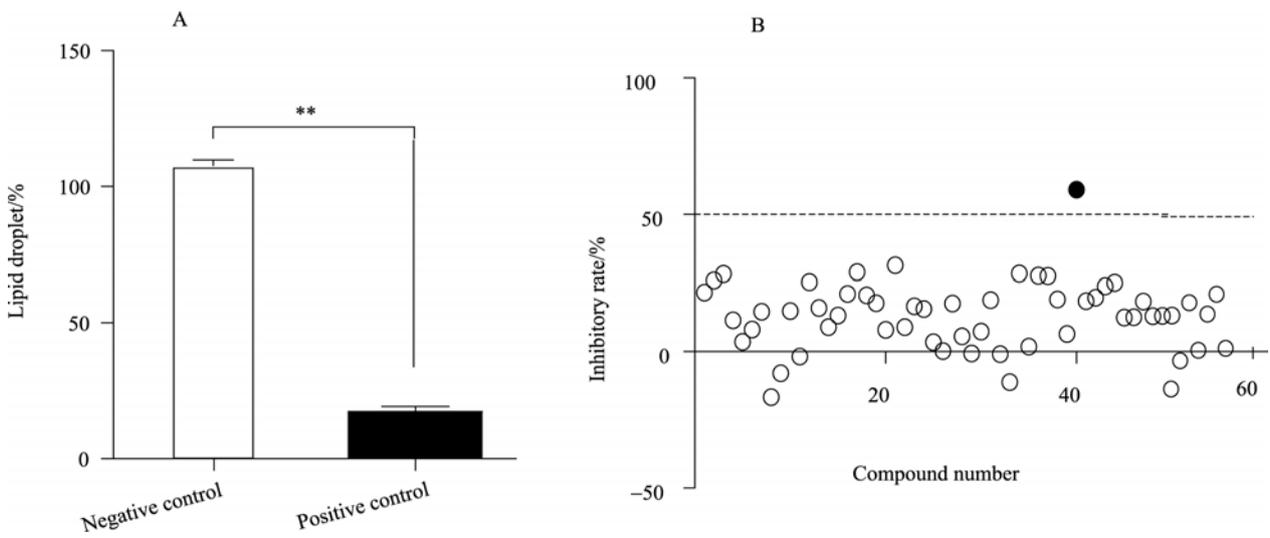


图1 57个中药化合物($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对脂质形成的抑制作用
注:A.洛伐他汀阳性对照,B.初筛化合物的抑制率,与阴性对照组比较, ** $P<0.01$ 。

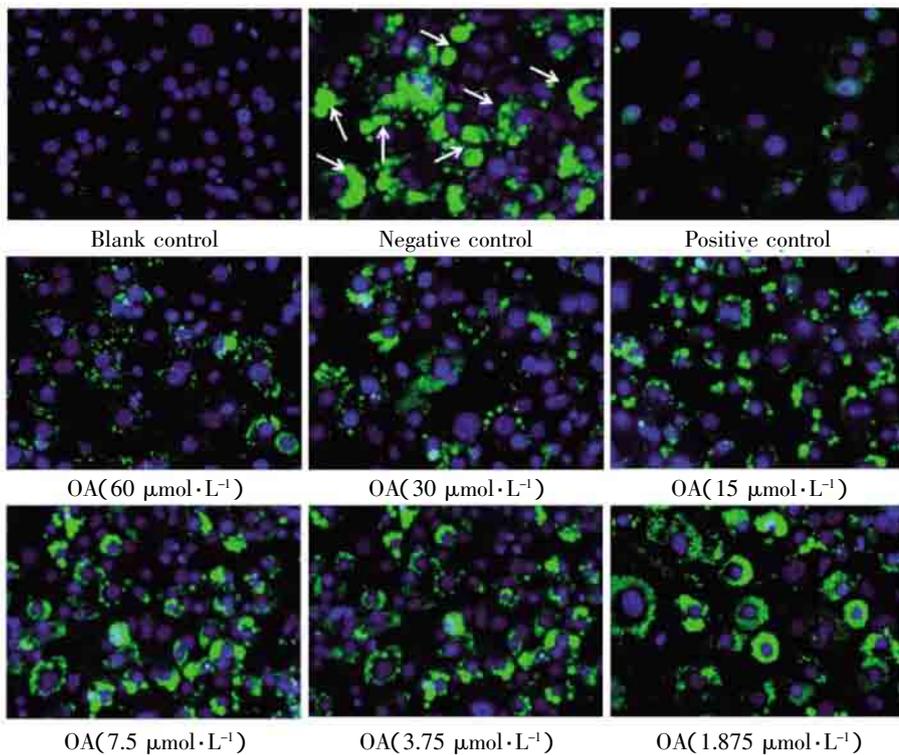


图2 3T3-L1 脂肪细胞荧光图片(x40)

细胞在细胞质中形成大量的脂滴(如箭头所示)。洛伐他汀处理组细胞脂质含量显著减少,无大颗粒脂滴。60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ OA 处理组的细胞脂滴形成量也显

著减少,体积显著减小。随着化合物浓度降低,堆积形成的脂质逐渐增加,化合物抑制作用逐渐减弱,呈现浓度依赖效应。

对各处理组中脂滴含量进行统计分析,以阴性对照组作为100%,OA 干预的细胞脂滴含量与浓度效应关系曲线如图 3A 所示,计算其 IC_{50} 值为 $14.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。为了进一步研究 OA 对脂肪细胞增殖的影响,本文采用 Hoechst 33342 标记脂肪细胞核,统计 OA 作用后脂肪细胞数变化。以阴性对照组为100%,结果如图 3B 所示,与阴性对照组比较,OA 处理组的脂肪细胞数无显著变化,表明 OA 对脂肪细胞增殖无显著抑制作用。洛伐他汀处理组脂肪细胞数量则显著降低 ($P<0.001$),表明洛伐他汀对脂肪细胞具有增殖抑制作用。

3.3 肝毒性评价

肝脏是脂质堆积的重要部位,也是解毒的主要靶器官,肝毒性是制约候选化合物开发成为药物的

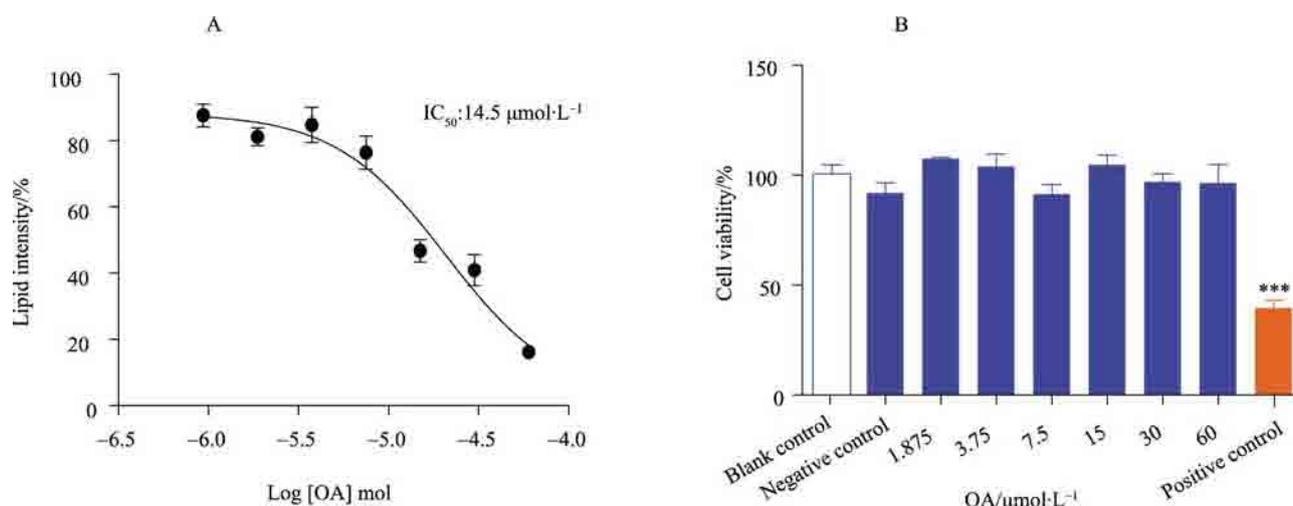


图3 齐墩果酸抑制 3T3-L1 脂肪细胞脂质形成

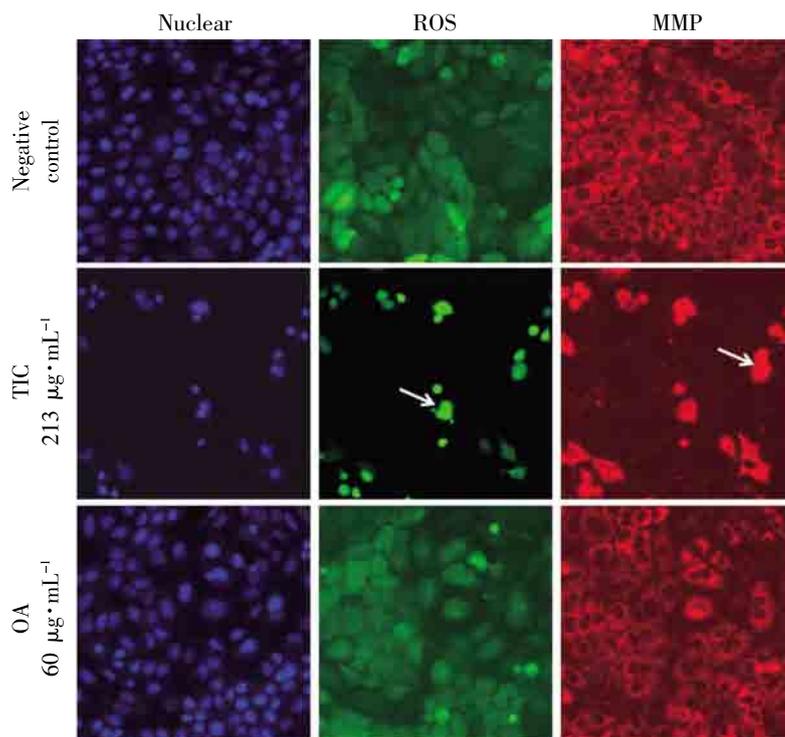
注:A.浓度效应曲线,B.脂肪细胞数量;与阴性对照组比较,*** $P<0.001$ 。

主要因素之一。为了评价活性成分 OA 的安全性,本文以 HepG2 细胞为效应细胞,按上述方法给予化合物处理,以 0.25% DMSO 处理组为阴性对照,213 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TIC 处理组为阳性对照。采集各组细胞核 (Nuclear)、ROS、MMP 荧光图片如图 4 所示,60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ OA 处理组细胞形态完整,与阴性对照组相比,未发生明显细胞表型变化,而阳性对照组则诱导了强烈的肝毒性。

以阴性对照组处理后各指标效应值为 1,OA 干预后细胞损伤强度结果如图 5A、B、C 所示,OA 组与阴性对照组比较,细胞数量、ROS 和线 MMP 均无统计学差异,表明 OA 在该测试浓度范围内无肝细胞损伤。与阴性对照组比较,阳性对照组 3 项指标中均有显著差异 ($P<0.01$),表明 TIC 诱导了细胞损伤,与上述荧光图片结果一致。

4 讨论

OA 属于五环三萜类化合物,来源于多种药用植物,如山楂、女贞子、人参等^[11,12]。本文采用细胞表型的评价方法,研究了中药来源的 57 个化合物对 3T3-L1 脂肪细胞脂滴形成的抑制作用,发现 OA 对

图4 化合物处理的 HepG2 细胞染色($\times 40$)

脂滴抑制活性最强,并进一步研究了其浓度效应曲线,确定其 IC_{50} 为 14.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 是参与脂质代谢的关键因子,也是脂肪细胞分化的标志

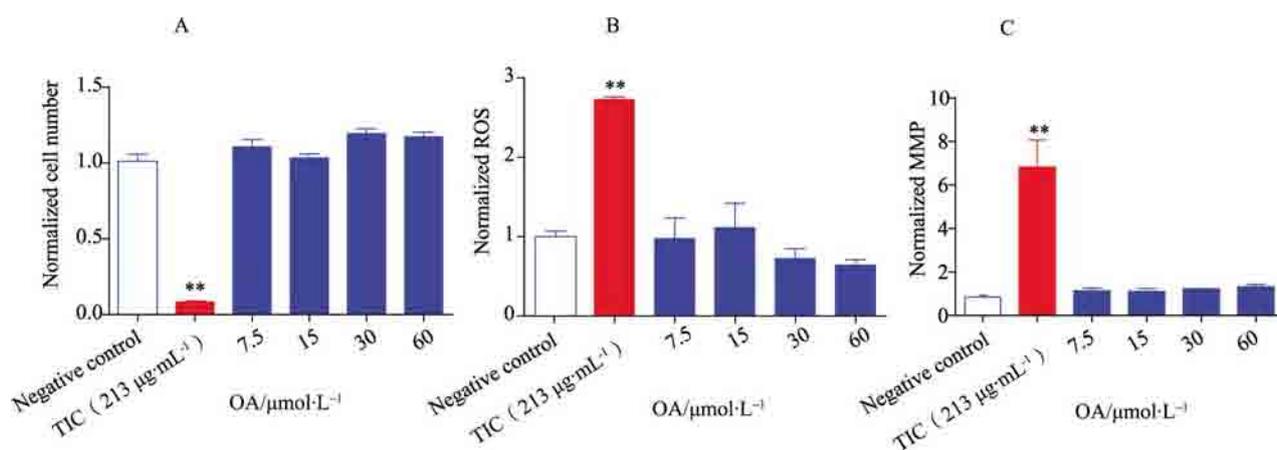


图5 齐墩果酸未诱导 HepG2 肝细胞损伤

注:A.细胞数量,B.活性氧自由基含量,C.线粒体膜电位;与阴性对照组比较,** $P<0.01$ 。

物^[13]。有研究表明,OA能抑制3T3-L1脂肪细胞分化,降低PPAR γ 表达^[14],而OA能否抑制PPAR γ 激动剂诱导的脂质堆积尚未见报道。本文采用OA对罗格列酮(PPAR γ 激动剂)诱导的成熟脂肪细胞进行干预,发现脂滴形成受到抑制,并呈现剂量依赖效应,表明OA能拮抗罗格列酮诱导的脂肪细胞分化和脂质堆积效应。

OA通过降低脂质堆积,调节血脂代谢,在一定程度上有利于保护血管和预防心血管疾病。Serra M L等^[15]研究表明,地中海食物预防高血脂和冠心病的主要活性成分是OA。在临床治疗高脂血症时,杨红霞等^[16]将OA与阿托伐他汀联用,发现疗效显著优于阿托伐他汀组。本文通过细胞表型实验证实了OA对脂滴形成的抑制作用,为富含OA的中药治疗高脂血症提供了科学依据。并且,通过体外安全性评价,确定OA在最大血药浓度范围内无肝损伤作用^[17],为该候选化合物开发成为新型天然降脂药物提供了研究基础。

参考文献

- 1 Gregoire F M, Smas C M, Sul H S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*, 1998, 78(3):783~809
- 2 Yang H, Galea A, Sytnyk V, et al. Controlling the size of lipid droplets: lipid and protein factors. *Curr Opin Cell Biol*, 2012, 24(4):509~516.
- 3 Schuster D P. Changes in physiology with increasing fat mass. *Semin Pediatr Surg*, 2009, 18(3):126~135.
- 4 Pencina M J, Navar-Boggan A M, D'Agostino R B Sr, et al. Ap-

plication of new cholesterol guidelines to a population-based sample. *N Engl J Med*, 2014, 370(15):1422~1431.

- 5 Raju S B, Varghese K, Madhu K, et al. Management of statin intolerance. *Indian J Endocr Metab*, 2013, 17(6):977~982.
- 6 Liu Q, Liu J J, Guo H L, et al. [6]-Gingerol: A novel AT(1) antagonist for the treatment of cardiovascular disease. *Planta Med*, 2013, 79(5):322~326.
- 7 Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, et al. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem*, 2012, 45(1):88~90.
- 8 Chatterjee S, Richert L, Augustijns P, et al. Hepatocyte-based in vitro model for assessment of drug-induced cholestasis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 274(1):124~136.
- 9 Tolosa L, Pinto S, Donata M T, et al. Development of a multiparametric cell-based protocol to screen and classify the hepatotoxicity potential of drugs. *Toxicol Sci*, 2012, 127(1):187~198.
- 10 Nishio E, Tomiyama K, Nakata H, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor impairs cell differentiation in cultured adipogenic cells (3T3-L1). *Eur J Pharmacol*, 1996, 301(1-3):203~206.
- 11 郭宇洁,任焯,葛争艳,等.正交实验法比较女贞子中齐墩果酸与特女贞苷的乙醇提取工艺. *中成药*, 2013, 35(2):277~281.
- 12 霍文兰,范小芹,赵天聪.超声法提取山楂果中熊果酸和齐墩果酸的工艺研究. *应用化工*, 2013, 42(10):93~96.
- 13 Semple R K, Chatterjee V K, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest*, 2006, 116(3):581~589.
- 14 Sung H Y, Kang S W, Kim J L, et al. Oleanolic acid reduces markers of differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Res*, 2010, 30(12):831~839.
- 15 Serra M L, Roman B, Estruch R. Scientific evidence of interventions using the Mediterranean diet: a systematic review. *Nutr Rev*, 2006, 64(2):27~47.

- 16 杨红霞, 龚慧琴, 蒋恒波. 齐墩果酸强化阿托伐他汀降脂效果的临床观察及初步机制. 中国动脉粥样硬化杂志, 2013, 21(6): 537~540.
- 17 Jeong D W, Kim Y H, Kim H H, *et al.* Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats. *Biopharm Drug Dispos*, 2007, 28(2):51~57.

Inhibitory Effect of Oleanolic Acid on Lipid Accumulation in Cytoplasm of 3T3-L1 Adipocyte

Wang Shifeng¹, Zhai Chenxi¹, Liu Qing¹, Zhang Yanling¹, Li Shiyong², Qiao Yanjiang¹

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: A collection of 57 natural compounds derived from Chinese herbal medicines were evaluated for their anti-adipogenic effects. The lipid droplets in differentiated 3T3-L1 adipocytes treated with tested substrate were detected by an image-based assay. The results demonstrated that oleanolic acid (OA) inhibited lipid droplets accumulation in 3T3-L1 adipocytes in a dose-dependent manner with the IC_{50} value of $14.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. In addition, ToxInsight assay showed that OA was free of liver injury for HepG2 cells within $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. It was concluded that OA, which had an obvious anti-adipogenic effect, can be a candidate for hyperlipidemia therapy.

Keywords: Oleanolic acid, 3T3-L1 adipocytes, lipid droplets accumulation

(责任编辑 李沙沙 张志华, 责任译审 汪 晶)