

网络出版时间: 2023-12-28 12:09:25 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231227.0758.018>

水飞蓟宾通过调节 MEK/ERK 通路和基质金属蛋白酶活性抑制小鼠 3T3-F442A 前脂肪细胞的成脂分化

刘爱萍, 李 佟, 程亚青, 张仁文, 葛雅琨, 张元新

摘要 目的 研究水飞蓟宾(Silibinin)对小鼠 3T3-F442A 前脂肪细胞分化的影响及作用机制。方法 采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)法检测 0~400 $\mu\text{mol/L}$ 的 Silibinin 在 24、48、72 h 对 3T3-F442A 脂肪细胞增殖的影响;通过油红 O 染色法观察 Silibinin 对 3T3-F442A 脂肪细胞脂肪生成的影响;采用 RT-qPCR 技术、Western blot 和 ELISA 实验检测 Silibinin 对 3T3-F442A 脂肪细胞分化相关转录因子 CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP) α 、C/EBP β 、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 和脂肪细胞蛋白 2(aP2)、脂肪生成相关血管内皮生长因子(VEGF)- α 和 VEGF 受体 2(VEGFR-2)、基质金属蛋白酶(MMP)-2 和 MMP-9、丝裂原活化蛋白激酶(MEK) 和磷酸化 MEK(p-MEK)、细胞外调节蛋白激酶(ERK) 和磷酸化 ERK(p-ERK) 表达的影响。结果 MTT 实验显示,与对照组相比,经过 100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin 处理后,3T3-F442A 前脂肪细胞的细胞增殖率下降($P < 0.001$);油红 O 染色实验显示,与对照组相比,160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin 实验组中的细胞红色脂滴堆积明显减少;RT-qPCR 实验显示,与对照组相比,经过 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin 处理后的 3T3-F442A 脂肪细胞 C/EBP α 、C/EBP β 、PPAR γ 、aP2、VEGF- α 、VEGFR-2、MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达量下调($P < 0.001$);Western blot 实验显示,与对照组相比,经过 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin 处理后的 3T3-F442A 脂肪细胞 C/EBP α 、C/EBP β 、PPAR γ 和 aP2 的蛋白表达量下调($P < 0.001$),p-MEK/MEK 和 p-ERK/ERK 蛋白的磷酸化水平下调($P < 0.001$);ELISA 实验显示,经过 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin 处理后的 3T3-F442A 脂肪细胞,细胞上清液中的 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白浓度下调($P < 0.001$)。结论 Silibinin 通过抑制 MEK/ERK 通路和 MMP 活性抑制 3T3-F442A 前脂肪细胞分化与脂肪生成。

关键词 水飞蓟宾;脂肪细胞;细胞分化;脂肪生成;转录因子;基质金属蛋白酶

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0111-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.018

2023-10-29 接收

基金项目:吉林省科技发展计划项目(编号:20210204026YY)

作者单位:吉林化工学院生物与食品工程学院,吉林 132022

作者简介:刘爱萍,女,硕士研究生;

张元新,男,博士,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

yxzhang@jlicet.edu.cn

肥胖是体内脂肪(triacylglycerol, TGs)过度蓄积所导致的慢性代谢性疾病,可以引起 II 型糖尿病、高血压、心血管、炎症等疾病^[1]。在体内脂肪堆积过程中,机体通过脂肪生成、血管生成和细胞外基质重塑等活动调节脂肪组织的代谢^[2]。尤其是,作为脂肪生成的主调节因子—过氧化物酶体增殖激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptors, PPAR γ) 启动前脂肪细胞的分化并影响脂肪的生成^[3]。此外,脂肪组织还可以促进毛细血管的生长,并通过血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)加速前脂肪细胞的分化^[4];基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)通过重塑细胞外基质影响脂肪组织发育和微血管成熟^[5]。

水飞蓟宾(Silibinin)是从水飞蓟的种子中提取出来的主要活性植物类黄酮,具有良好的保肝活性^[6]。体外的研究^[7-8]证实,Silibinin 通过在脂肪细胞分化的早期阶段上调 insig-1 和 insig-2 来抑制脂肪细胞分化。尤其是 Silibinin 在饮食诱导的肥胖模型中可以缓解脂肪组织炎症并逆转肥胖及其并发症^[8]。然而,目前关于 Silibinin 对脂肪细胞分化相关转录因子的蛋白表达和血管生成相关 MMP 活性的影响及其机制研究的文献甚少。该研究以 3T3-F442A 前脂肪细胞为模型,检测 Silibinin 对细胞分化和脂肪生成的影响及其作用机制,这为认识和探索 Silibinin 的作用机制提供了参考并为开发缓解和预防肥胖相关疾病的药物提供潜在新策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 3T3-F442A 细胞株购自中科院上海细胞库;水飞蓟宾(Silibinin)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)检测试剂盒购自美国 Sigma 公司;杜氏改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modification of Engle's me-

dium dulbecco , DMEM) 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清、胰蛋白酶购自天津市康源生物有限公司; PD98059 购自日本 FUJIFILM WAKO 公司; 逆转录 cDNA 检测试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 胰岛素、地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-Isobutyl-1-methylxanthine , IBMX) 购自北京索莱宝生物技术有限公司; 油红 O 染液购自福州飞净生物技术有限公司; TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; 酶联免疫吸附剂测定试剂盒(enzyme-linked immunosorbent assay , ELISA) 购自杭州联科生物技术股份有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase , GAPDH) 、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 一抗以及辣根酶标记山羊抗兔和山羊抗鼠 IgG 购自北京博奥森生物技术公司; 脂肪细胞蛋白 2(adipocyte protein 2 , aP2) 、CCAAT/增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein , C/EBP) α 、C/EBP β 一抗购自美国 Novus Biologicals 公司; 丝裂原活化蛋白激酶抗体(mitogen-activated protein kinase , MEK) 、磷酸化 MEK 抗体(phospho-MEK , p-MEK) 、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase , ERK) 抗体、磷酸化 ERK 抗体(phospho-ERK , p-ERK) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; BCA 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 超敏 ECL 化学发光试剂盒购自苏州新赛美生物科技有限公司。

超净工作台(型号: SW-CJ-2FD) 购自苏州泰安空气技术有限公司; CO₂ 培养箱(型号: LS-CO230) 购自美国 Thermo 公司; 倒置荧光显微镜(型号: Ti-S 734534) 、倒置显微镜(型号: TS200) 购自日本 Nikon 公司; 灭菌锅(型号: LS-200A) 购自上海博讯有限公司; 细胞成像微孔板检测系统(型号: 170524B) 购自美国 Biotek 公司; 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR , RT-qPCR) (型号: ABI 7500) 购自美国 Applied Biosystems 公司; 蛋白电泳仪(型号: Mini-PROTEAN) 购自美国 Bio-Red 公司; 化学发光成像系统(型号: 6300) 购自上海勤翔科技仪器有限公司。RT-qPCR 反应引物由生工生物工程(上海) 股份有限公司合成。RT-qPCR 基因引物序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 3T3-F442A 前脂肪细胞在 37 °C、5% CO₂ 浓度、95% 湿度的条件下使用 DMEM

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因类别	序列(5'-3')
GAPDH	F: TGGCCTTCCTGTTCTCTAC R: GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA
C/EBP β	F: CCGGGCAGCACCAGACTTCC R: CTTCCTGGCCTTGCTCTTGACCTG
C/EBP α	F: GGCTCCTAATCCCTTGCTTTT R: CTCTGTCTCCTACCACATGGCT
aP2	F: CATGATCATCAGCGTAAATG R: TCACCATCTCCTTTTCTCTT
PPAR γ	F: ACCCTGACCCAGAATACCAAG R: GTCAACAACCATAGGCGATTT
VEGF- α	F: TCTCACCGAAAGACCGAT R: CCCAAAGTGCTCCTCGAA
VEGFR-2	F: GATGCAGGAACTACACGGTCA R: GAGATCAAGGCTTTCTCACCGA
MMP-2	F: GGCCATGCCATGGGGCTGGA R: AGCATTACAGGCTAACACCAACT
MMP-9	F: AGGCTCTACAGACTCTTTG R: CAGTCCAACAAGAAAGGACG

完全培养基(DMEM + 10% FBS + 100 U/ml 青链霉素) 进行培养; 当细胞达到 70% ~ 80% 汇合度时 , 用 PBS 洗涤细胞 2 次 , 并通过胰蛋白酶培养箱中消化细胞 2 min 传代培养 , 培养基每 2 d 更换 1 次 , 取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 MTT 实验 将 3T3-F442A 前脂肪细胞 , 以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板内 , 当细胞达到 70% ~ 80% 汇合度时 , 细胞在含 0、25、50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin 的 100 μl DMEM 完全培养基继续培养 , 另设不接种细胞的空白组 , 每组设 3 个复孔。分别在加入 Silibinin 诱导 24、48、72 h 后 , 每孔加入 20 μl 5 mg/ml 的 MTT 溶液 , 37 °C 孵育 4 h , 弃去上清液 , 每孔加入 150 μl 的 DMSO , 37 °C 继续孵育 15 min , 用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 (absorbance , A) 值 , 最后计算细胞增殖率。细胞增殖率(%) = $(A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.2.3 细胞分化 将 3T3-F442A 前脂肪细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中 , 每 2 d 更换 1 次培养基。待细胞汇合接触抑制后 , 更换为 DMEM 分化培养基(2 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素、1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、0.5 mmol/L IBMX) 开始诱导分化 , 诱导分化 2 d 然后用含有 2 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素的维持培养基培养 4 d 后再换用完全培养基继续培养 2 d , 实验组在诱导分化的同时全程加入 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin。在 90% 以上细胞变圆分化为成熟脂肪细胞后 , 进行油红 O 染色。

1.2.4 油红 O 染色 配制油红 O 储存液(0.5 g 油

红 + 100 ml 异丙醇) 4 °C 过夜。按照油红 O 储存液: 超纯水 = 3 : 2 的比例稀释油红 O 储存液, 室温放置 20 min 后, 再用 0.45 μm 滤器过滤, 避光保存。将诱导成熟的 3T3-F442A 成熟脂肪细胞用 PBS 轻轻洗 3 次, 每次 5 min, 再用 10% 中性福尔马林室温固定 1 h, 超纯水洗 3 次, 然后加入油红 O 工作液, 室温避光染色 30 min, 超纯水清洗 3 次, 显微镜观察并拍照。

1.2.5 RT-qPCR 实验 将 3T3-F442A 前脂肪细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中, 每 2 d 更换 1 次培养基, 待细胞汇合度达到 80% 后开始诱导分化, 诱导方法同 1.2.3 项。待细胞诱导分化成熟后, 收集 5×10^6 个细胞, 加入 1 ml 的 TRIzol 试剂充分裂解后, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃沉淀; 加入 200 μl 三氯甲烷振荡混匀后室温放置 15 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min; 吸取上层水相 500 μl, 加入 500 μl 异丙醇, 混匀后室温放置 10 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 加入 1 ml 75% 乙醇, 悬浮沉淀, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 尽量弃去上清液; 洗涤并干燥获得的沉淀后, 加入不含 RNase 的焦碳酸二乙酯(DEPC) 水, 并使用酶标仪在 $A_{260/280}$ 处检测 RNA 纯度和浓度。为了获得 cDNA, 将 1 μg 检测合格的总 RNA 按照 SweScript RT II First cDNA Synthesis kit 说明逆转录成 cDNA。随后使用 ABI 7500 RT-qPCR 系统进行 RT-qPCR。采用 20 μl RT-qPCR 反应体系, 反应条件为: 94 °C 预变性 30 s, 94 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 扩增 40 个循环以获得 Ct 值。计算 mRNA 表达时, 使用 GAPDH 内参作为内部对照归一化的 Ct 值, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量。

1.2.6 Western blot 和 ELISA 实验 将 3T3-F442A 前脂肪细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中, 每 2 d 更换 1 次培养基, 待细胞汇合度达到 80% 后开始诱导分化, 诱导方法同 1.2.3 项。待细胞诱导分化成熟后, 进行 Western blot 和 ELISA 实验。对于脂肪细胞分化相关转录因子 C/EBP α 、C/EBP β 、PPAR- γ 和 aP2 在蛋白水平的检验, 采用 Western blot 实验。即细胞诱导分化成熟后, 每皿加入 1 ml 4 °C 预冷的 PBS 洗 3 次, 置于冰上; 加入 150 μl 的裂解液(1 ml 裂解液加入 10 μl 100 mmol/L 的苯甲基磺酰氟) 摇匀冰上裂解 30 min, 每 10 min 振荡 1 次; 裂解完后, 使用细胞刮刀快速将细胞裂解液刮于一侧, 转移至 1.5 ml 的离心管中; 4 °C 下 12 000

r/min 离心 10 min, 获取上清液; 用 BCA 试剂盒检测计算浓度, 将提取的蛋白浓度调整为 5 μg/μl; 按比例加入 5 × SDS 于 100 °C 煮沸 10 min, 进行蛋白变性; 煮沸后将样品冰浴 3 min, 4 °C 下 12 000 r/min 再离心 10 min, 制成蛋白样品。上样: 使用浓度为 12% 的分离胶, 样品蛋白上样量为 40 μg; 转膜: 60 V 转移 2 h 到 0.22 μm 的聚偏二氟乙烯(PVDF) 膜上; 封闭: 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min; 抗体杂交: 一抗 4 °C 过夜孵育, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min; ECL 显影液进行显影拍照。用 Image J 软件分析条带灰度值。

采用 ELISA 实验检测 MMP-2 和 MMP-9 其蛋白浓度。即细胞诱导分化成熟后, 收集上清液于 1.5 ml 的离心管中, 3 000 r/min 离心 10 min 去除沉淀物, 即刻按照 ELISA 试剂盒说明书进行检测。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件处理数据, 对于定量实验的各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验均独立重复 3 次, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间均数比较采用 ANOVA 单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Silibinin 对 3T3-F442A 前脂肪细胞增殖的影响 采用 MTT 法检测 Silibinin 对 3T3-F442A 前脂肪细胞增殖的影响, 见图 1。Silibinin 处理 24 h 后, 与对照组(0 μmol/L Silibinin) 相比, 25、50 μmol/L Silibinin 组的细胞增殖率差异无统计学意义($F = 5.97, P > 0.05$), 100、200、400 μmol/L Silibinin 组的细胞增殖率下降, 差异有统计学意义($F = 215.50, P < 0.001$)。Silibinin 处理 48 h 后, 与对照组(0 μmol/L Silibinin) 相比, 25 μmol/L Silibinin 组的细胞增殖率差异无统计学意义($F = 4.64, P > 0.05$); 50、100、200、400 μmol/L Silibinin 组的细胞增殖率下降, 差异有统计学意义($F = 98.23, P < 0.001$)。Silibinin 处理 72 h 后, 与对照组(0 μmol/L Silibinin) 相比, 25、50、100、200、400 μmol/L Silibinin 组的细胞增殖率下降, 差异有统计学意义($F = 409.90, P < 0.001$)。其中 72 h 的半抑制浓度为 156.89 μmol/L, 故选择 160 μmol/L 的 Silibinin 作为后续实验药物浓度。

2.2 Silibinin 对 3T3-F442A 前脂肪细胞分化的影响 采用油红 O 染色法观察 Silibinin 对 3T3-F442A

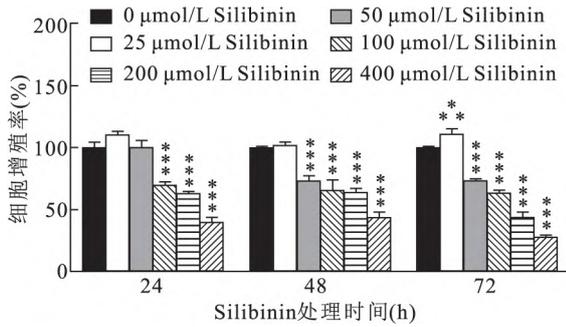


图1 Silibinin 对 3T3-F442A 细胞增殖的影响
与同一时间 0 μmol/L Silibinin 组比较: *** $P < 0.001$

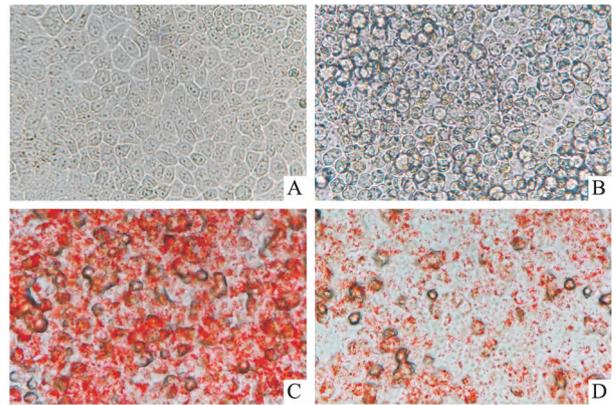


图2 Silibinin 对 3T3-F442A 细胞脂肪积累的影响 ×400

A: 未分化细胞形态图; B: 分化成熟细胞形态图; C: 对照组油红 O 染色图; D: 实验组油红 O 染色图

前脂肪细胞分化的影响。与未经过诱导分化的细胞相比,诱导分化成熟后的细胞形态明显变圆(图 2A、B);经过油红 O 染色,能观察到细胞里有大量的红色脂滴堆积(图 2C);与对照组(0 μmol/L Silibinin)相比,160 μmol/L Silibinin 实验组中的细胞红色脂滴堆积明显减少(图 2D)。以上结果表明 160 μmol/L Silibinin 有效抑制了 3T3-F442A 前脂肪细胞分化。

2.3 Silibinin 对 3T3-F442A 脂肪细胞分化相关转录因子的影响 与对照组(0 μmol/L Silibinin)相比,经过 160 μmol/L Silibinin 处理后的 3T3-F442A 脂肪细胞, *C/EBPα*、*C/EBPβ*、*PPARγ* 和 *aP2* 的 mRNA 表达量下调,差异有统计学意义($t = 15.03$ 、 16.50 、 33.60 、 27.60 , $P < 0.001$),见图 3A;与对照组(0 μmol/L Silibinin)相比,*C/EBPα*、*C/EBPβ*、*PPARγ* 和 *aP2* 的蛋白表达水平下调,差异有统计学意义($t = 49.95$ 、 68.10 、 50.60 、 35.69 , $P < 0.001$),见图 3B、C。上述结果表明 160 μmol/L Silibinin 能显著抑制 3T3-F442A 脂肪细胞分化相关转录因子的表达。

2.4 Silibinin 对 3T3-F442A 脂肪细胞 MEK/ERK 通路的影响 采用 Western blot 实验检测 Silibinin 对 3T3-F442A 脂肪细胞 MEK/ERK 通路的影响。与对照组(0 μmol/L Silibinin)相比,经过 160 μmol/L Silibinin 处理后的 3T3-F442A 脂肪细胞, p-MEK/MEK 和 p-ERK/ERK 蛋白的磷酸化水平分别下调,差异有统计学意义($t = 12.10$ 、 6.75 , $P < 0.001$);用 MEK1 抑制剂 PD98059 处理细胞后,与对照组(0 μmol/L Silibinin)相比, *C/EBPα*、*C/EBPβ*、*PPARγ* 和 *aP2* 的 mRNA 表达量下调,差异有统计学意义($t = 10.50$ 、 9.02 、 16.40 、 27.60 , $P < 0.001$)。上述结果表明 Silibinin 可能通过抑制 3T3-F442A 脂肪细胞 MEK/ERK 通路介导 *C/EBPα*、*C/EBPβ*、*PPARγ* 和 *aP2* 的表达来调控脂肪生成。见图 4。

2.5 Silibinin 对 3T3-F442A 脂肪细胞的 MMP 活性的影响 通过 RT-qPCR 实验检测 Silibinin 对 3T3-F442A 脂肪细胞的脂肪生成相关 VEGF 及受体

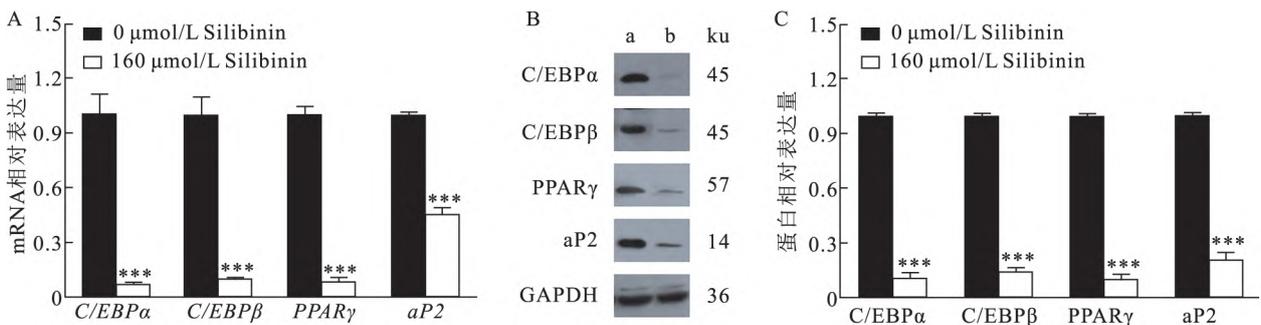


图3 Silibinin 对 3T3-F442A 细胞分化相关转录因子表达的影响

A: 分化相关转录因子的 mRNA 表达图; B: 分化相关转录因子的蛋白表达图; a: 对照组; b: 160 μmol/L Silibinin 实验组; 与对照组比较: *** $P < 0.001$

的影响。用 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin 处理 3T3-F442A 脂肪细胞, *VEGF- α* 、*VEGFR-2*、*MMP-2* 和 *MMP-9* 的 mRNA 表达量分别下调, 差异有统计学意义 ($t = 22.50, 46.70, 23.40, 28.40, P < 0.001$)。用 ELISA 实验检测 Silibinin 对 3T3-F442A 脂肪细胞的 MMP 活性的影响, 3T3-F442A 脂肪细胞上清液中 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白酶浓度分别下调, 差异有统计学意义 ($t = 5.23, 4.43, P < 0.001$)。上述结果表明, 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin 抑制了 3T3-F442A 脂肪细胞分泌到上清液中 MMP 的激活, 下调了 *VEGFR-2* 与 *VEGF- α* 的表达; 提示 Silibinin 也可能通过抑制 3T3-F442A 脂肪细胞中与血管生成相关的 MMP 的激活来抑制脂肪生成。见图 5。

3 讨论

肥胖是一个全球性问题, 导致非传染性疾病 (包括高脂血症、2 型糖尿病、癌症和心血管疾病) 患病率升高。肥胖的发展特征是脂肪细胞数量增加 (增生) 和大小增加 (肥大) 这受各种遗传、内分泌、代谢和营养因素的调节^[9]。脂肪细胞通过分泌脂

肪细胞因子执行内分泌功能, 这些脂肪细胞因子调节各种生理功能。在肥胖个体中, 脂肪组织增大导致脂肪细胞因子分泌失调, 此外, 脂肪细胞因子分泌失衡与肥胖相关疾病的发作有关。因此, 了解脂肪生成的调节机制对于控制肥胖很重要。

据报道^[10-11], 在脂肪细胞中, MEK/ERK 信号通路的激活, 诱导 *C/EBP β* 、*C/EBP δ* 、*C/EBP α* 和 *PPAR γ* 的表达并调节脂肪生成。还有研究表明, 脂肪生成与血管生成及胞外基质的重塑密切相关。Lijnen et al^[12]证实, 在脂肪组织中血管化程度高, 脂肪细胞都被丰富的毛细血管包围, 并从血管中获得脂肪细胞生长和分化所需的营养和氧气。Ferrara et al^[13]证实, *VEGFR-2* 的生物学效应通过 *VEGFR-2* 与 *VEGF- α* 的结合来介导 *VEGF- α* 的激活, 促进脂肪细胞的增殖分化。

近年来, 多种类黄酮已成为治疗疾病的焦点, 因为它们具有各种有益的健康作用, 并且似乎比商业化学药物具有更小的副作用。既往研究揭示了植物来源的类黄酮能够通过减少脂质积累来抑制脂肪生成以及抗炎作用^[14]。从水飞蓟获得的多酚类黄酮-

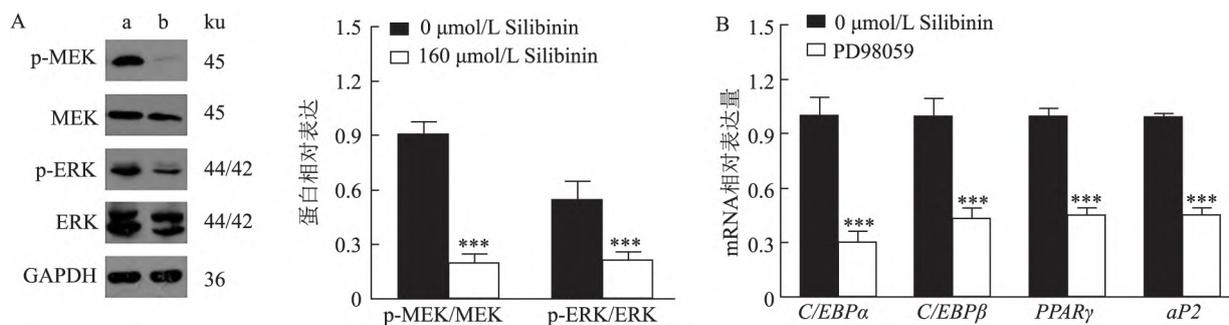


图 4 Silibinin 对 3T3-F442A 细胞中 MEK/ERK 通路的影响

A: MEK/ERK 通路相关蛋白激酶表达图; a: 空白对照组; b: 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin 实验组; B: 分化相关转录因子的 mRNA 表达图; 与对照组比较: *** $P < 0.001$

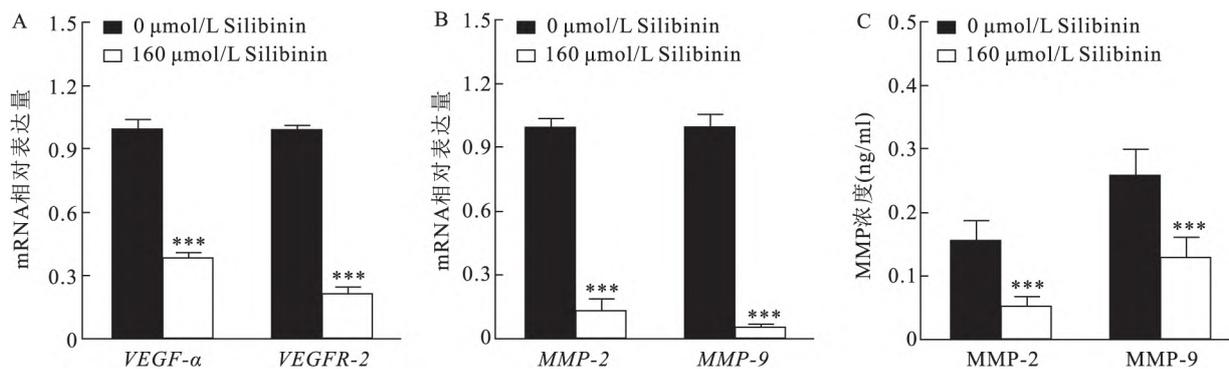


图 5 Silibinin 对 3T3-F442A 细胞中 MMP 活性的影响

A: VEGF 及受体的 mRNA 表达图; B: MMP 的 mRNA 表达图; C: 上清液中 MMP 浓度图; 与对照组比较: *** $P < 0.001$

Silibinin, 其药理活性已被广泛研究, 其保肝作用与抗氧化和抗炎作用有关^[15], 然而, 它在脂质生成及其作用机制方面研究有限。

本研究通过 RT-qPCR 和 Western blot 实验证实 Silibinin 下调脂肪细胞分化相关转录因子 (C/EBP α 、C/EBP β 、PPAR γ 和 aP2) 的表达水平, 抑制脂肪生成; 同时, 通过 Western blot、ELISA 实验, 发现 Silibinin 还降低了参与脂肪生成的 ERK 的磷酸化、脂肪细胞中脂肪生成相关 VEGF 及受体 (VEGF- α 和 VEGFR-2) 的 mRNA 表达以及 MMP-2、MMP-9 活性。

综上所述, 该研究表明, Silibinin 可能通过调节 MEK/ERK 通路和 MMP 活性, 抑制 3T3-F442A 前脂肪细胞的细胞增殖、分化和脂肪生成。后期可在肥胖动物模型中进一步评估这些结果。该研究结果可为开发缓解和预防肥胖相关疾病的药物提供潜在新策略。

参考文献

- [1] Feng R N, Zhao C, Wang C, et al. BMI is strongly associated with hypertension, and waist circumference is strongly associated with type 2 diabetes and dyslipidemia, in northern Chinese adults [J]. *J Epidemiol*, 2012, 22(4): 317–23.
- [2] Crandall D L, Hausman G J, Kral J G. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives [J]. *Microcirculation*, 1997, 4(2): 211–32.
- [3] Duncan R E, Ahmadian M, Jaworski K, et al. Regulation of lipolysis in adipocytes [J]. *Annu Rev Nutr*, 2007, 27: 79–101.
- [4] Nijhawans P, Behl T, Bhardwaj S, et al. Angiogenesis in obesity [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110103.

- [5] Shin S S, Yoon M. Regulation of obesity by antiangiogenic herbal medicines [J]. *Molecules*, 2020, 25(19): 4549.
- [6] Marmouzi I, Bouyahya A, Ezzat S M, et al. The food plant silybum marianum (L.) gaertn.: phytochemistry, ethnopharmacology and clinical evidence [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 265: 113303.
- [7] Ka S O, Kim K A, Kwon K B, et al. Silibinin attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes through a potential upregulation of the insig pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2009, 23(5): 633–7.
- [8] Alsaggar M, Bdour S, Ababneh Q, et al. Silibinin attenuates adipose tissue inflammation and reverses obesity and its complications in diet-induced obesity model in mice [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2020, 21: 8.
- [9] Attie A D, Scherer P E. Adipocyte metabolism and obesity [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50: S395–9.
- [10] Yamamoto M, Nagasawa Y, Fujimori K. Glycyrrhizic acid suppresses early stage of adipogenesis through repression of MEK/ERK-mediated C/EBP β and C/EBP δ expression in 3T3-L1 cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 346: 109595.
- [11] Prusty D, Park B H, Davis K E, et al. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and C/EBP α gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(48): 46226–32.
- [12] Lijnen H R. Angiogenesis and obesity [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(2): 286–93.
- [13] Ferrara N, Gerber H P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors [J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 669–76.
- [14] García-Barrado M J, Iglesias-Osma M C, Pérez-García E, et al. Role of flavonoids in the interactions among obesity, inflammation, and autophagy [J]. *Pharmaceuticals*, 2020, 13(11): 342.
- [15] 李光明, 李万平, 李晓冰, 等. 水飞蓟宾和卡托普利联合用药对大鼠酒精性肝病作用及机制的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(2): 276–80.

Silibinin inhibits lipogenic differentiation of 3T3-F442A adipocytes in murine through inhibition of MEK/ERK pathway and matrix metalloproteinase activity

Liu Aiping, Li Tong, Cheng Yaqing, Zhang Renwen, Ge Yakun, Zhang Yuanxin

(College of Biology & Food Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022)

Abstract Objective To study the effect and mechanism of action of Silibinin on the differentiation of 3T3-F442A preadipocytes in murine. **Methods** The effects of 0–400 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin on the proliferation of 3T3-F442A adipocytes at 24, 48 and 72 h were detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, and the effects of Silibinin on the adipogenesis of 3T3-F442A adipocytes were visualized by Oil Red O staining; RT-qPCR, Western blot and ELISA assays were used to detect the effects of Silibinin on 3T3-F442A adipocyte differentiation-associated transcription factor CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α , C/EBP β , peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), adipocyte protein 2 (aP2), adipose generation-associated vas-

网络出版时间: 2023-12-28 12:09:27 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231227.0759.019>

海马 CRHR1 调节慢性应激致老年前期小鼠学习记忆损伤的机制

屠心茹¹ 徐家雯¹ 刘锐¹ 陆雨琳² 王书³ 姚余有^{1,4}

摘要 目的 探究海马促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)受体1型(CRHR1)在慢性应激致老年前期小鼠学习记忆损伤中的作用机制。方法 12~14月龄的C57BL/6J小鼠根据性别、基因型以及是否予以慢性不可预测应激(CUS)进行分组,对应激组施加为期30d的CUS。使用聚合酶链式反应(PCR)、琼脂糖凝胶电泳和实时荧光定量PCR(RT-qPCR)对小鼠进行基因型鉴定。新物体识别实验和Morris水迷宫测定学习记忆能力。Golgi-Cox染色观察海马神经元树突受损情况,Western blot测定海马组织雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、p-mTOR(Ser2448)、核糖体蛋白S6激酶(p70S6K)、p-p70S6K(Thr389/Thr412)蛋白表达,ELISA检测血清CRH水平。结果 相较于慢性应激前,WT应激各组小

鼠慢性应激后的认知系数下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而KN应激各组小鼠慢性应激前后认知系数差异无统计学意义。与WT应激组相比,WT对照组小鼠逃避潜伏期均缩短($P < 0.05$)、穿越平台和目标象限次数上升($P < 0.01$)。KN各组小鼠上述差异无统计学意义。相较于WT对照组,WT应激组小鼠海马CA1、CA3、DG区神经元复杂性降低($P < 0.05$)。海马p-mTOR、p-p70S6K表达水平均降低($P < 0.05$)。而KN应激组与KN对照组相比,除雌性组小鼠海马p-mTOR表达水平降低外($P < 0.05$),其余均无显著性差异。此外,与对照组相比,应激各组小鼠血清CRH水平均上升,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 海马CRHR1调控慢性应激所致的老年前期小鼠的学习记忆损伤和神经元树突受损,其机制可能是慢性应激引起的高水平CRH无法与受体CRHR1结合,减轻了高水平CRH所抑制的mTOR/p70S6K信号通路表达。

关键词 慢性应激; 学习记忆损伤; CRHR1; p-mTOR; p-p70S6K

中图分类号 R 749.16

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0117-10
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.019

2023-10-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81773452); 安徽医科大学第三附属医院基础与临床合作提升计划培育专项(编号: 安徽医科大学处室文件 科字(2022)6号)

作者单位: 安徽医科大学¹ 公共卫生学院卫生检验与检疫学系、² 第一临床医学院, 合肥 230032

³ 安徽医科大学第三附属医院老年医学科, 合肥 230061

⁴ 人口健康与优生安徽省重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 屠心茹, 女, 硕士研究生;

姚余有, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 1988500004@ahmu.edu.cn

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的主要特征是大脑中神经元的逐渐丧失致认知功能受

cular endothelial growth factor (VEGF)- α and VEGF receptor 2 (VEGFR-2), matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, mitogen-activated protein kinase (MEK) and phosphorylated MEK (p-MEK), and extracellular regulated protein kinase (ERK) and phosphorylated ERK (p-ERK) expression. **Results** MTT assay showed that the cell proliferation rate of 3T3-F442A preadipocytes decreased after 100, 200, and 400 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin treatment compared with the control group ($P < 0.001$); Oil Red O staining assay showed that the accumulation of red lipid droplets of the cells in the 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin assay group significantly decreased; RT-qPCR assay showed that mRNA expression of *C/EBP α* , *C/EBP β* , *PPAR γ* , *aP2*, *VEGF- α* , *VEGFR-2*, *MMP-2*, and *MMP-9* was down-regulated in 3T3-F442A adipocytes treated with 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin compared with the control group ($P < 0.001$); Western blot assay showed that protein expression of *C/EBP α* , *C/EBP β* , *PPAR γ* and *aP2* was down-regulated in 3T3-F442A adipocytes treated with 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin ($P < 0.001$), and the phosphorylation level of p-MEK/MEK and p-ERK/ERK proteins was down-regulated compared with the control group ($P < 0.001$); ELISA assay showed that the protein concentrations of MMP-2 and MMP-9 in the cell supernatant were down-regulated ($P < 0.001$) in 3T3-F442A adipocytes treated with 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin. **Conclusion** Silibinin inhibited 3T3-F442A adipocyte differentiation and adipogenesis through inhibition of the MEK/ERK pathway and matrix metalloproteinase activity.

Key words Silibinin; adipocytes; cell differentiation; lipogenesis; transcription factor; matrix metalloproteinase