

二十二碳六烯酸对大鼠脂肪细胞增殖分化的影响

Effects of Docosahexaenoic Acid on Rat Adipocytes Proliferation and Differentiation

李惠侠 杨公社*

LI Hui-Xia and YANG Gong-She*

西北农林科技大学动物脂肪沉积与肌肉发育实验室 杨凌 712100

Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China

摘 要 体外培养大鼠脂肪细胞,分别以 0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组), 40 $\mu\text{mol/L}$ (低剂量组)和 160 $\mu\text{mol/L}$ (高剂量组)的二十二碳六烯酸(DHA)处理细胞。采用台盼蓝排斥试验和 MTT 比色法检测细胞活性及增殖状况,油红 O 染色化学比色法定量分析细胞内脂肪生成及细胞分化程度,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分析过氧化物酶增殖物激活受体 γ (PPAR γ) mRNA 表达情况,探讨 DHA 对前体脂肪细胞增殖分化的影响及其可能机制。结果显示,各组细胞活力及 MTT 测得的光密度值(OD 值)均低于对照组,160 $\mu\text{mol/L}$ 组在 60 ~ 72h 作用显著($P < 0.05$)。脂肪细胞经 DHA 处理后,160 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞油红 O 染色的 OD 值及 PPAR γ mRNA 表达量均显著下降($P < 0.01$)。以上结果说明,DHA 对脂肪细胞增殖分化均有一定抑制作用,高剂量 DHA(160 $\mu\text{mol/L}$)可显著减少细胞内脂肪的合成、抑制脂肪细胞分化,PPAR γ mRNA 表达量的下降可能是 DHA 抑制细胞分化的部分原因。

关键词 二十二碳六烯酸,脂肪细胞,增殖,分化

中图分类号 Q254 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0840-04

Abstract To investigate effects of docosahexaenoic acid (DHA) on proliferation and differentiation of rat adipocytes and to elucidate its potential mechanism, rat's primary preadipocytes in vitro were cultured. Treated adipocytes with 0 $\mu\text{mol/L}$ (control group), 40 $\mu\text{mol/L}$ (lower dose group) and 160 $\mu\text{mol/L}$ (higher dose group) DHA. Cell living rations and proliferation were analyzed by trypan blue exclusion and MTT assay. the degree of adipogenesis and differentiation were measured by Oil Red O staining extraction assay and the expression of peroxisome proliferation activated receptor- γ (PPAR γ) mRNA were detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). It was demonstrated that cells living ration and the optical density (OD) of MTT were all decreased, especially treated by 160 $\mu\text{mol/L}$ DHA at 60/72 hours ($P < 0.05$). The OD of Oil Red O staining and the expression of PPAR γ mRNA were all decreased after treated by 160 $\mu\text{mol/L}$ DHA ($P < 0.01$). It can be concluded that DHA can inhibite proliferation and differentiation of adipocytes in some degree. Higher dose of DHA can markedly decrease adipogenesis and prevent differentiation of adipocytes, which may be in part associated with its effect on decreasing the expression of PPAR γ mRNA.

Key words docosahexaenoic acid, adipocytes, proliferation, differentiation

Received: March 22, 2005; Accepted: May 25, 2005.

This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (No. 30471239).

* Corresponding author. Tel: 86-29-87092430; E-mail: Gsyang999@yahoo.com.cn

国家自然科学基金项目 (No. 30471239) 资助。

肥胖是一种复杂的代谢失常症。肥胖不仅影响整个机体的正常生理功能,还增加了Ⅱ型糖尿病和心血管等病的发生率^[1]。目前认为,体内脂肪的沉积是脂肪合成和降解两方面作用的综合结果,机体通过协调控制有关脂肪合成和分解的酶活性和基因表达来调节体脂的沉积。二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid,简称DHA)是一种重要的n-3型多不饱和脂肪酸(n-3 PUFA)。自从Wilson等^[2]发现日粮中添加PUFA对体内生脂酶的活性和蛋白基因的表达具有重要影响作用后,二十二碳六烯酸(DHA)作为PUFA最重要的成员之一而受到众多学者的关注。目前的研究主要集中在饲料级DHA对动物体脂沉积及肝脏生脂基因的影响上^[3,4,5],而DHA对脂肪细胞的作用及具体机制还不清楚。本研究以培养的大鼠前体脂肪细胞模拟脂肪细胞生长分化过程,探讨DHA对脂肪细胞增殖与分化及脂肪特异性基因PPAR γ 2的影响,为肥胖病的防治提供新的思路 and 理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物为20日龄二级雄性SD(Sprague-Dawley)大鼠,购自第四军医大学实验动物研究中心;顺式-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸为Sigma公司产品,用无水乙醇配制成0.328mol/L贮备液,保存于-20℃下备用;DMEM和I型胶原酶(collagenase I)为Gibco公司产品;胎牛血清(FBS)由杭州四季青生物有限公司生产;牛血清白蛋白(BSA)、油红O(Oil Red O)和胰蛋白酶(trypsin)为华美生物工程公司产品;总RNA提取试剂盒Trizol和RT-PCR试剂盒为Invitrogen公司产品;PPAR γ 2和 β -actin(作为内参)引物由上海生物工程公司合成,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 前体脂肪细胞分离和培养

断颈处死20日龄大鼠,用75%(V/V)酒精浸泡消毒,无菌状态下取出腹股沟、附睾、肾脏周围的脂肪组织,除去血管和其他结缔组织,剪碎。将剪好的脂肪组织块加入I型胶原酶消化液,消化60~70min(每5min振荡1次),然后依次过孔径为150目和600目不锈钢细胞筛,1000r/min离心10min,弃上清液,加红细胞裂解液,室温静置10min,离心5min,弃上清液,然后用无血清培养液洗3遍,加入10%血清的DMEM培养液吹打均匀,获得前体脂肪细胞悬液。以(5×10^4) cells/cm²密度将细胞接种于培养板中,置37℃、饱和湿度,5% CO₂培养箱中培养,每隔2d换液1次。

1.3 台盼蓝染色计数测细胞活力

待细胞贴壁后,分别加入终浓度为0 μ mol/L(对照)、40 μ mol/L和160 μ mol/L DHA培养液,使每孔容积为2000 μ L。60h后取出处理组及对照组细胞(每组3孔),PBS洗2次,加消化液(0.25%胰蛋白酶+0.04% EDTA)消化细胞,制成单个细胞悬液,取一洁净试管,将细胞悬液与0.4%台盼蓝染液按1:1混匀,用吸管取少许混合液加到计数板上盖玻片的一侧,显微镜下3~5min内计活细胞及死细胞数(死细胞呈蓝色,活细胞拒染),并用下列公式计算细胞活力:

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{\text{活细胞数}}{(\text{活细胞数} + \text{死细胞数})} \times 100\%$$

1.4 MTT比色

前体脂肪细胞接种于96孔培养板,每孔加少量培养液,培养板移入CO₂培养箱中培养,细胞贴壁后按预设浓度加入DHA培养液,每组3孔。分别于处理后24h、48h、72h和96h进行MTT比色测定。即每孔加入20 μ L新鲜配置的MTT溶液,37℃继续培养4h后终止培养,弃去孔内培养液,每孔加150 μ L DMSO,恒温摇床振荡10min。选择波长490nm,以经过相同处理的空白孔为调零值,在酶联检测仪上测各孔光密度值(OD值)。

1.5 油红O染色化学比色试验

分化第1天的脂肪细胞经DHA处理72h后,PBS洗涤细胞2次,10%甲醛固定30min,PBS洗2次,0.5%油红O染色20min,PBS洗3次,37℃下干燥细胞,显微镜下观察,细胞内脂质呈红色。每孔加2000 μ L的100%异丙醇,振荡萃取10min,紫外分光光度计在500nm下以空白对照调零,测各孔光密度值(OD)。

1.6 逆转录聚合酶链反应

收集各组细胞,用Trizol核酸提取试剂盒提取各组细胞中总RNA,紫外分光光度计测定RNA纯度。取2 μ L总RNA逆转录合成cDNA,再取逆转录产物2 μ L进行PCR扩增。PPAR γ 2(GenBank序列号:NM013124)引物序列:上游5'-CTGCTGCTGTTCTGTTCTC3',下游5'-GACGGATTGCCCTCATTT3',扩增条件为94℃预变性3min,94℃变性1min,54.2℃复性1min,72℃延伸1min,共34个循环,终末72℃延伸10min,产物长度为468bp。 β -actin引物序列:上游5'-TTGTGCCTTGATAGTTCGC3',下游5'-AGTCCTTCTGACCCATACCC3',扩增条件为94℃预变性3min,94℃变性1min,56.5℃复性1min,72℃延伸1min,共26个循环,终末72℃延伸7min,产物长度为261bp。取同样品的PPAR γ 2和 β -actin PCR产物各10 μ L,在同一块1.0%的琼脂糖上(含0.5 μ g/mL溴化乙锭)进行电泳。Dolphin-DOC凝胶分析系统摄像分析,分别测得两个扩增产物条带的光密度值,并计算PPAR γ 2与 β -actin的光密度比值。

1.7 数据统计与分析

试验所得数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用统计软件SPSS 11.5进行单因素方差分析与显著性检验。

2 结果与分析

2.1 DHA对前体脂肪细胞增殖的影响

台盼蓝染色细胞后,死细胞可被台盼蓝着色,显微镜下可见深蓝色的细胞,活细胞不被染色,镜下呈无色透明状。这样,很容易将活细胞和死细胞分开,用血球计数板分别计数活细胞和死细胞数,并根据公式计算细胞活力,结果见图1。由图1可知,前体脂肪细胞经DHA处理后,细胞活力降低,160 μ mol/L组与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。说明DHA以剂量依赖性抑制大鼠前体脂肪细胞的增殖,高剂量

组(160μmol/L)作用显著。

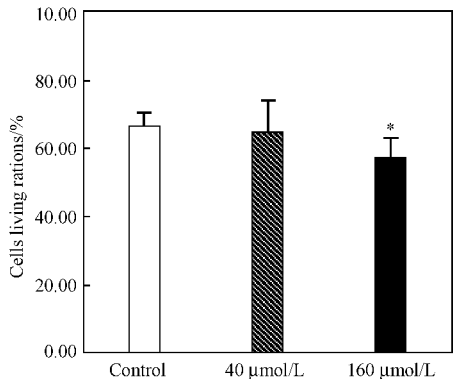


图1 台盼蓝染色检测 DHA 对前体脂肪细胞活力的影响

Fig.1 Effects of DHA on preadipocytes viability by trypan blue exclusion

MTT 测得的光密度值可间接反映细胞活力及增殖状况。为了进一步分析不同浓度 DHA 在不同时间点对前体脂肪细胞增殖的影响,分别于处理后 24h、48h、72h、96h 进行 MTT 检测。结果表明:在不同时间点,各处理组光密度值均低于对照组,160μmol/L DHA 在 72h 作用显著($P < 0.05$),进一步证明 DHA 对前体脂肪细胞的增殖有一定抑制作用,高浓度 DHA(160μmol/L)长时间处理细胞时抑增殖效果显著(表 1,图 2)。

表 1 MTT 检测 DHA 对前体脂肪细胞增殖的影响

Table 1 Effects of DHA on preadipocytes proliferation by MTT assay

| Time Groups | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
|----------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| Control | 0.153 ± 0.026 | 0.201 ± 0.024 | 0.294 ± 0.008 | 0.332 ± 0.016 |
| 40μmol/L | 0.151 ± 0.014 | 0.199 ± 0.047 | 0.290 ± 0.049 | 0.327 ± 0.030 |
| 160μmol/L | 0.132 ± 0.013 | 0.195 ± 0.017 | 0.237 ± 0.036* | 0.325 ± 0.031 |

* $P < 0.01$, vs control group

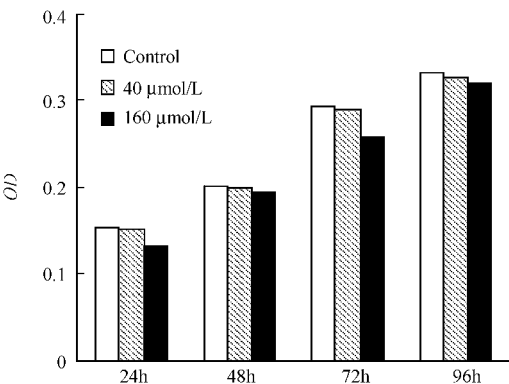


图2 DHA 对大鼠前体脂肪细胞增殖的影响

Fig.2 Effects of DHA on rat preadipocytes proliferation

2.2 DHA 对脂肪细胞分化的影响

在前体脂肪细胞分化第 1 天,分别用含 40μmol/L 和

160μmol/L DHA 的培养液孵育细胞 72 h 后,经油红 O 脂肪特异性染色发现,160μmol/L DHA 组细胞内被油红 O 染成亮红色的脂滴明显减少,充脂细胞数及细胞体积相应减小,而对照组细胞则分化成了典型的成熟脂肪细胞形态,细胞大而圆,胞内充满了脂滴(图 3)。采用油红 O 化学比色法(以 OD 值表示)定量分析细胞内脂肪(主要是甘油三酯)的生成量,结果见表 2。由表 2 可知,160μmol/L DHA 处理细胞 72 h,甘油三酯生成量明显减少,与对照组相比差异极显著($P < 0.01$),说明高浓度 DHA 可显著降低脂肪细胞内脂肪的生成量,对大鼠前体脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化具有较强的抑制作用。

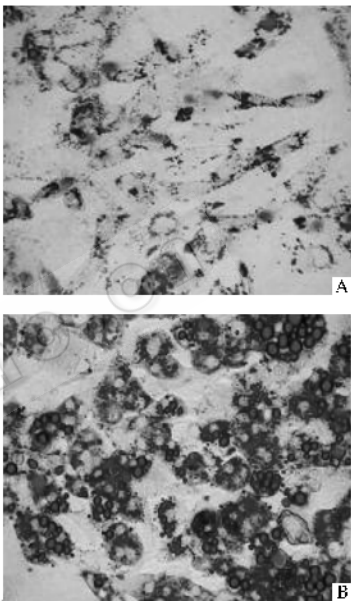


图3 油红 O 染色脂肪细胞(×100)

Fig.3 Oil red O staining adipocytes

A: preadipocytes treated 72 h by 160μmol/L DHA (×100);

B: control (×100).

表 2 DHA 对脂肪细胞分化的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of DHA on differentiation of adipocytes($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| Treatment | OD(72 h) |
|-----------|-----------------|
| Control | 0.345 ± 0.032 |
| 40μmol/L | 0.332 ± 0.024 |
| 160μmol/L | 0.206 ± 0.021** |

** $P < 0.01$, vs control group

研究认为,脂肪细胞分化的实质是一系列基因时序表达的结果,PPARγ 是诱导脂肪细胞特异性基因表达和调节脂肪细胞分化的重要核转录因子,许多影响脂肪细胞分化的因子都是通过脂肪特异性基因 PPARγ2 起作用的。为了证明 DHA 是否也影响脂肪特异性转录基因 PPARγ2,采用半定量 RT-PCR 检测脂肪细胞中 PPARγ2 mRNA 表达情况。结果显示,160μmol/L DHA 显著下调脂肪细胞中 PPARγ2 mRNA 的表

达(图4)。各组目的基因与 β -actin 基因光密度比值如图5所示:160 μ mol/L 组与 0、40 μ mol/L 组比较,PPAR γ 2 mRNA 表达量显著降低($P < 0.01$)。

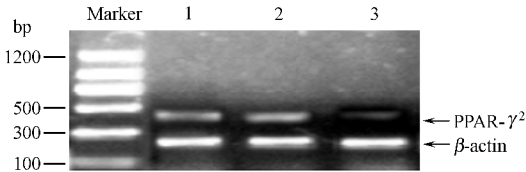


图4 PPAR γ 2 琼脂糖凝胶电泳

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of PPAR γ 2

1 : control ; 2 : 40 μ mol/L DHA treated ; 3 : 160 μ mol/L DHA treated.

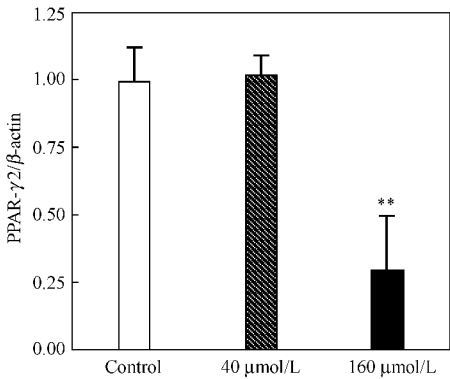


图5 各组脂肪细胞 PPAR γ 2 mRNA 的表达

Fig.5 Expression of PPAR γ 2 mRNA in adipocytes

3 讨论

前体脂肪细胞在分化诱导剂的刺激下,分化经历如下阶段:①前脂肪细胞汇合前的增殖;②细胞汇合后生长停止;③在激素刺激下进行2~3代克隆增殖;④克隆增殖终止,表达特异性分化转录因子如 PPAR γ 2,诱导脂肪细胞特异性功能基因的转录和翻译。这些基因产物包括实现能量贮存和能量动员所需的关键酶系、调节蛋白、激素受体、细胞骨架、基质结构和分泌性蛋白等。胞内三酰甘油大量积聚, β -磷酸甘油脱氢酶活性显著升高,形成典型的脂肪细胞。因此,无论在体内还是在体外,前体脂肪细胞向脂肪细胞的分化受诸多因素如激素、生长因子、细胞外基质、分化转录因子等影响,而分化转录因子及生长因子是继激素之后新的研究热点^[6,7]。

前体脂肪细胞的形态与成纤维细胞相似,经适当分化诱导,其细胞骨架和细胞外基质逐渐发生变化,细胞开始进入由不成熟脂肪细胞向成熟脂肪细胞转变。此时,细胞形态由椭圆型逐渐趋于圆形或类圆,胞体逐渐增大,胞质中开始出现小脂滴,标志脂质开始积累。小脂滴不断增多并融合为较大的脂滴,可经油红O 特殊染色呈红色,获得成熟脂肪细胞

的形态特征。一般来说,分化进展越好,脂质含量越高,使用油红O 染色时着色越多,再用100%异丙醇溶解着染的油红O 通过比色,可以测定油红O 的量,从而反映分化进行情况。本研究以大鼠原代前体脂肪细胞为研究对象,从细胞和分子水平上分析DHA 对脂肪细胞增殖、分化的影响。台盼蓝染色计数和MTT 结果均表明,DHA 对大鼠前体脂肪细胞活力有一定抑制作用,高剂量DHA 在60~72 h 作用显著,说明DHA 以剂量-时间性抑制前体脂肪细胞的增殖。油红O 染色比色表明,高剂量(160 μ mol/L)的DHA 可以显著降低细胞中脂肪的积聚,抑制细胞向成熟脂肪细胞转化。半定量RT-PCR 结果显示,高剂量(160 μ mol/L)的DHA 可显著下调PPAR γ 2 mRNA 表达量,表明DHA 可能是通过降低PPAR γ 2 基因的表达来抑制脂肪细胞分化。Ding 等^[8]用0、50、100 和300 μ mol/L 的DHA 处理猪前体脂肪细胞,经油红O 染色和RT-PCR 检测发现,DHA 并不影响猪脂肪细胞的分化,这可能是由于实验动物不同、取材部位不同所造成的。本研究结果提示,DHA 可能适合于治疗肥胖和胰岛素抵抗相关的代谢性疾病,这将为胰岛素抵抗的防治提供新的思路,但其确切机制及能量的去处尚有待于深入研究。

REFERENCES 参考文献)

[1] Chen MD(陈名道). Products of adipocytes and obesity / metabolic syndrome. *Chin J Endocrinol Metab* (中华内分泌代谢杂志), 2003 , **19** :161 – 163

[2] Wilson MD , Blake WL , Salati LM *et al.* Potency of polyunsaturated and saturated fats as short-term inhibitors of hepatic lipogenesis in rats. *J Nutr* , 1990 , **120** (6) :544 – 552

[3] Price PJ , Nelson CM , Clarke SD. Omega-3 polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Curr Opin Lipidol* , 2000 , **11** (1) :3 – 7

[4] Hsu JM , Wang PH , Liu BH *et al.* The effect of dietary docosahexaenoic acid on the expression of porcine lipid metabolism-related genes. *J Anim Sci* , 2004 , **82** (3) :683 – 689

[5] Ruzickova J , Rossmeisl M , Pruzak T *et al.* Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* , 2004 , **39** (12) :1177 – 1185

[6] Boone C , Mourt J , Gregoire F *et al.* The adipose conversion process : regulation by extracellular and intracellular factors. *Reprod Nutr Dev* , 2000 , **40** (4) :325 – 358

[7] Ren D , Collingwood TN , Rebar EJ. PPAR γ knockdown by engineered transcription factors re-exogenous PPAR γ 2 but not PPAR γ 1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev* , 2002 , **98** :5306 – 5311

[8] Ding ST , Wang JC , Mersmann HJ. Effect of unsaturated fatty acids on porcine adipocyte differentiation. *Nutr Res* , 2003 , **23** :1059 – 1069