

发酵大麦分离蛋白对 3T3-L1 细胞棕色化的影响

谷耀光, 肖香, 张家艳, 董英

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 采用实验室自主分离的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* dy-1)发酵大麦, 研究其提取物分离蛋白(LFBE-P)对 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化为米色脂肪细胞的作用。采用盐析、G25 凝胶柱层析和超滤等方法对发酵液中的蛋白质进行分离纯化和浓缩, 再用适当浓度的 LFBE-P 对 3T3-L1 进行诱导试验, 检测细胞葡萄糖消耗量和相关 mRNA 的相对含量。结果表明, 与未发酵大麦分离蛋白(RBE-P)相比, LFBE-P 可显著提高 3T3-L1 细胞葡萄糖消耗量和棕色化脂肪细胞特征基因的表达。对 LFBE-P 进一步进行纯化的研究结果显示, 相对分子质量为 3~20 ku 的蛋白质是诱导细胞棕色化反应的主要成分, 该范围的蛋白质可显著提高 3T3-L1 细胞中 *UCP1* 和 *PGC-1 α* 等与细胞降脂产热直接关联基因的表达。综上, LFBE-P 能够诱导 3T3-L1 细胞发生棕色化反应, 促使白色脂肪向米色脂肪转变。

关键词: 植物乳杆菌; 大麦; 米色脂肪; *UCP1* 基因

文章编号: 1673-9078(2018)07-35-41

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.7.006

Effect of *Lactobacillus Plantarum* Dy-1 Fermented Barley Protein on the Browning of 3T3-L1 Preadipocytes

GU Yao-guang, XIAO Xiang, ZHANG Jia-yan, DONG Ying

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: *Lactobacillus plantarum* dy-1 isolated from pickles was used for barley fermentation to obtain *Lactobacillus*-fermented barley extracted protein (LFBE-P), and the effect of LFBE-P on the browning of 3T3-L1 preadipocytes was investigated. Using salting out, gel filtration and ultrafiltration, the protein were purified and condensed. Glucose consumption and relative RNA expression of 3T3-L1 adipocytes were detected to support the browning effect of appropriate concentration of LFBE-P. Results showed that, compared with unfermented barley extracted protein(RBE-P), LFBE-P increased the glucose consumption and expression of the brown adipose tissue-specific genes including. Furthermore, LFBE-P was divided into different parts according to the molecular weight. It was found that LFBE-Ps with molecular weights between 3 ku and 20 ku were the key components inducing 3T3-L1 browning, which could improve the relative expression of uncoupling protein 1, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α and PR domain-containing 16. These genes were essential for cells to generate heat and reduce lipid. In conclusion, LFBE-P significantly increased the relative expression of brown-specific genes and glucose consumption of 3T3-L1 adipocytes, inducing 3T3-L1 adipocytes into beige adipocytes.

Key words: *Lactobacillus plantarum* dy-1; barley; beige adipose; *UCP1* gene

肥胖及其相关的代谢综合征已成为全球面临的挑战, 使人类承受着共同的压力与负担。研究发现棕色脂肪细胞可迅速将脂肪酸转化为热量从而消耗脂肪, 为缓解肥胖带来的一系列健康问题提供了新的思路^[1]。2009年, Cypess 等已经确定成年人体内存在棕色脂肪^[2], 棕色脂肪被激活后通过 UCP1 蛋白将脂肪转化为热量^[3]。但是在人体中, 棕色脂肪组织随着年龄

的增长会逐渐减少, 成年以后含量极低, 并且由于激活条件苛刻, 其功能难以展现。近年来, 不断有研究发现, 在长期寒冷环境或者某些药物的刺激下, 机体内的白色脂肪细胞经棕色化反应变为米色脂肪, 使其具有棕色脂肪细胞的形态和功能^[4]。但是米色脂肪的形成同样需要一定的激活条件。因此, 研究与开发促进白色脂肪棕色化的食源性成分, 具有重要的理论意义和应用前景。

课题组前期研究发现, 乳酸菌发酵大麦提取物(LFBE)能够抑制 3T3-L1 细胞的脂滴合成。史腊妮等人研究表明 LFBE 中蛋白质含量高于未发酵大麦提取物(RBE), 且 LFBE 能够显著下调脂肪细胞分化关

收稿日期: 2018-02-26

基金项目: 镇江市重点研发计划(现代农业)(NY2017009)

作者简介: 谷耀光(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程
通讯作者: 董英(1954-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品营养与安全

键基因 *C/EBPα*、*SREBP-1c* 的表达,上调 *GLUT4* 的表达,从而减少细胞中脂肪酸的累积,增强细胞对葡萄糖的代谢能力,抑制 3T3-L1 细胞脂滴合成^[5]。张家艳等人研究发现,LFBE 能显著降低营养型肥胖大鼠的体重,降低其血清和肝脏总甘油三酯(TG)及总胆固醇(TC)含量,并提高肥胖大鼠的糖耐受量^[6]。Aung 等发现脂肪组织分泌的爱帕琳肽(Apelin)是 G 蛋白偶联受体 APJ 的配体,属于内源性多肽类激素,Apelin 可以上调脂肪细胞 *PGC-1α* 和 *UCPI* 的表达,提高细胞耗氧量,促进线粒体增殖^[7]。LFBE 与 RBE 相比蛋白质含量明显升高,尤其是蛋白质大分子被分解成相对分子质量较小的蛋白质,很可能参与了抑制脂肪细胞分化等反应。

本文旨在初步分离纯化乳酸菌发酵大麦蛋白质,研究其与 3T3-L1 前脂肪细胞可能发生的棕色化反应,并初步探索其作用途径。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料

大麦品种为扬饲 3 号,购自盐城市双增农化科技有限公司;植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* dy-1, 菌株编号:CGMCCNo.601)实验室自行分离鉴定。

Millipore 超滤膜购自美国 Merck Millipore 公司;G-25 凝胶柱购自美国 GE Healthcare 公司。

3T3-L1 细胞,南京医科大学曹新教授赠送;DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 购自美国 Corning 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒购自碧云天公司;3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、胰岛素 (INS) 和地塞米松 (DEX) 购自上海创赛科学仪器有限公司;胰蛋白酶溶液购自 BBI Life Science 公司;青霉素-链霉素溶液购自生工生物工程(上海)股份有限公司;荧光定量 PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;荧光定量 PCR 相关试剂购自 Takara 公司;葡萄糖检测试剂盒,购自爱尔兰 Megazym 公司;其他生化试剂均为分析纯,购自国药集团上海化学试剂有限公司。

3T3-L1 细胞诱导液的配制:

基本培养基 (BM): DMEM 高糖培养基,含有 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素。

诱导培养基 I (DM I): 含有 10 μg/mL 胰岛素,0.5 mmol/L IBMX 和 1 μmol/L 地塞米松的 BM。

诱导培养基 II (DM II): 含有 10 μg/mL 胰岛素的 BM。

1.1.2 主要仪器与设备

冷冻离心机,美国 Beckman 公司;超滤器装置,美国 Merck Millipore 公司;AKTApurifier 蛋白纯化系统,美国 GE Healthcare 公司;垂直电泳仪,美国 BIO-RAD 公司;倒置显微镜,南京江南永新光学有限公司;FlexStation II 多功能酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;CFX96 荧光定量 PCR 仪,美国 BIO-RAD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵液的制备

大麦发酵液制备:将脱壳后的大麦用水洗净,37 °C 烘干表面水分,采用锤式磨粉机磨粉并过 100 目筛,按大麦粉(W):水(V)=1(kg):7(L)的比例在发酵罐中混合均匀。将 250 mL 菌液 8000 r/min 离心 15 min,弃上清,用水悬浮菌体,加入发酵罐,密封,31 °C、180 r/min 条件下发酵 24 h,8000 r/min 离心 20 min,收集上清液备用。

相同条件下制备 RBE-P 溶液,不加乳酸菌。

1.2.2 LFBE-P 的制备

向离心后的上清液中加入饱和硫酸铵溶液,使终浓度为 60%,4 °C 8000 r/min 离心 40 min,收集沉淀,用 PBS(pH=7.4)分别溶解沉淀,采用考马斯亮蓝法测量蛋白浓度,标准曲线如图 1。

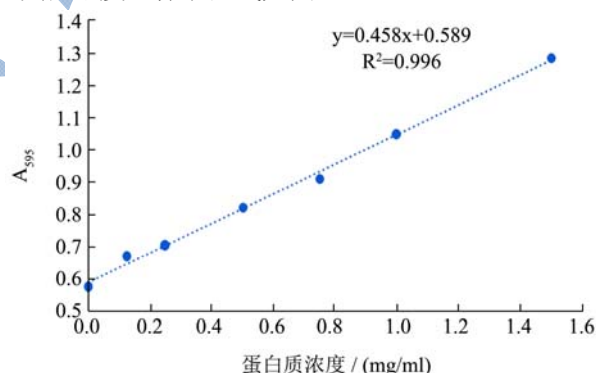


图 1 考马斯亮蓝法测量蛋白质浓度标准曲线

Fig.1 Standard curve for protein concentration via Bradford

将 PBS 溶解后的蛋白溶液过 0.22 μm 滤膜,将 GE Hitrap desalting 预装柱装载于 AKTApurifier 蛋白纯化系统,流速 5 mL/min,在线监测 280 nm 处吸光值和电导率,收集蛋白峰。脱盐后,将溶液置于相对分子质量 500 u 的透析袋,封口,用聚乙二醇掩埋透析袋,待脱去部分水后,收集浓缩后的蛋白溶液即为 LFBE-P,并测量蛋白浓度。

1.2.3 SDS-PAGE 蛋白质电泳

将蛋白质溶液和 loading buffer 按照 4:1 (V:V) 混合后,煮沸 5 min 使其变性。配制 10%分离胶和 5%

浓缩胶, 上样后初始电压 80 V, 直到样品被压成一道细线, 提高电压至 120 V 约 2 h, 取出凝胶, 考马斯亮蓝染色 1 h, 摇床脱色过夜, 采用凝胶成像系统扫描泳带。

1.2.4 LFBE-P 中三种相对分子质量范围蛋白质的制备

采用 Millipore 超滤装置, 3 ku 和 20 ku 超滤膜, 分别收集滤过液和截留液, 超滤完成后用 NaOH 和蒸馏水依次清洗超滤膜, 保存于福尔马林溶液。LFBE-P 按分子量分为三部分: 小于 3 ku, 3 ku~20 ku 和大于 20 ku。

1.2.5 3T3-L1 细胞培养

表 1 LEBE-P 对 3T3-L1 细胞的毒性实验

Table 1 Cytotoxicity test of LFBE-P for 3T3-L1 adipocytes

	调零组	空白组	实验组							
			1	2	3	4	5	6	7	
BM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3T3-L1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LFBE-P 终浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	0	5	10	20	40	80	160	320	

表 2 3T3-L1 细胞诱导分化步骤

Table 2 Procedure for 3T3-L1 adipocytes differentiation

	day 0	day 2	day 4	day 6	day 8
培养基类型	DM I	DM II	BM	BM	BM

1.2.7 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化

将对数期细胞接种于六孔板, 用 BM 培养细胞至完全融合, 继续培养 48 h, 此时为 day0。按照表 2 所示开始诱导分化。RBE-P 的终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (day0 to day8)。

1.2.8 细胞消耗葡萄糖量测定

采用葡萄糖氧化酶法, 即 Megazyme 的 D-GLUCOSE 试剂盒, 吸取 0.1 mL 标准葡萄糖溶液 (1 mg/mL) 于试管中, 加入 3 mL GOPOD 酶液, 50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 对样品稀释后做同样处理, 在 510 nm 处测量吸光值。

细胞消耗葡萄糖量的计算方法:

培养基中初始葡萄糖含量-培养后培养基中葡萄糖含量:

$$\text{葡萄糖含量}(\mu\text{g}/0.1 \mu\text{L})=100 \times (\Delta A_{\text{sample}} - \Delta A_{\text{blank}}) / (\Delta A_{\text{standard}} - \Delta A_{\text{blank}})$$

其中: 水的 OD 值为 ΔA_{blank} , 标准葡萄糖为 $\Delta A_{\text{standard}}$, 样品为 ΔA_{sample} 。计算后转化为 μmol 作图 ($M_{\text{glucose}}=180.16 \text{ g}/\text{mol}$), 其中培养基体积为 2.5 mL (六孔板)。

1.2.9 白色脂肪棕色化相关基因相对表达量的测定

采用 TAKARA RNA extraction kit 试剂盒法提取

用 BM 培养细胞, 控制培养箱的温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 浓度为 5%, 待细胞生长至 80% 时胰蛋白酶消化传代, 选取对数期细胞用于实验。

1.2.6 LFBE-P 的细胞毒性测定

将 3T3-L1 细胞以 5×10^4 个/mL 的浓度接种于 96 孔板, 每孔接种 100 μL , 培养箱中孵育 12 h,

待细胞贴壁后加入含指定蛋白浓度的培养基, 分为调零组, 空白组和实验组, 每组 6 个平行, 分组设置如表 1。

将 96 孔板在培养箱中孵育 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 继续孵育 2 h, 使用双波长法 (检测波长 450 nm, 参比波长 650 nm) 测定 OD 值。

诱导分化后的 3T3-L1 细胞总 RNA。提取 RNA 后按试剂盒步骤进行逆转录成 cDNA, 实时荧光定量 PCR 的扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 34 s, 共 40 个循环。基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。在 Geen bank 中查询小鼠的 mRNA 序列, 应用 primer3.0 设计引物, 相关基因的引物序列如表 3。

表 3 实时荧光定量 PCR 引物设计

Table 3 Gene-specific primers used for real-time PCR

基因	引物序列
Cidea	前引物 CGTGGTGGACACAGAGGAGTT
	后引物 CATTGAGACAGCCGAGGAAGT
Fgf21	前引物 CGTCTGCCTCAGAAGGACTC
	后引物 TCTACCATGCTCAGGGGGTTC
Prdm16	前引物 CCCCACATCCGCTGTGAT
	后引物 CTCGCAATCCTTGCCTCA
Ucp1	前引物 ACGGGGACCTACAATGCTTAC
	后引物 CAGCTTGGTACGCTTGGGTAC
Pgc-1 α	前引物 TGTTCCCGATCACCATATTCC
	后引物 AGCTGTCGTACCTGGGCCTAC

1.2.10 统计方法

采用统计软件 SPSS 21.0 对数据进行分析, Excel 软件进行作图, 各组数据以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ (平均值 \pm 标准偏差)

表示,采用单项方差分析,用 DPS 来确定数据间的显著性差异,显著性水平设定为 $p < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 LFBE-P 与 RBE-P 的比较分析

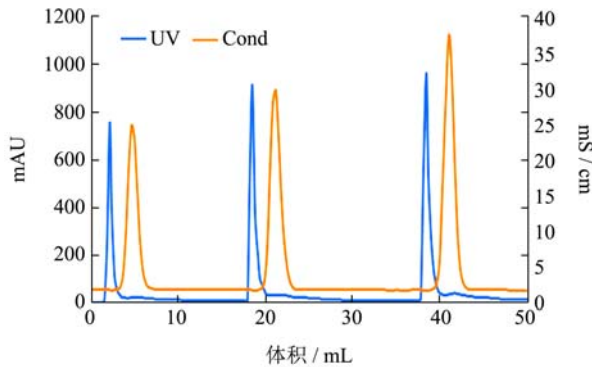


图 2 Hitrap desalting G-25 凝胶柱图谱

Fig.2 Hitrap desalting 25 gel filtration chromatogram

注: UV 为 280 nm 处紫外吸收, Cond 为电导率。

蛋白质沉淀复溶于 PBS 溶液中,由于含有高浓度的盐,需要对溶液进行脱盐处理。GE 的 Hitrap desalting G-25 凝胶柱具有高效的脱盐能力,脱盐结果见图 2。电导率峰位置在蛋白吸收峰之后,收集蛋白吸收峰并浓缩,即可得 LFBE-P 溶液。

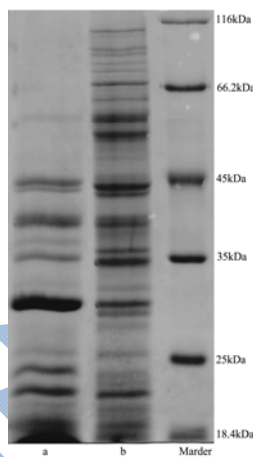


图 3 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺电泳图谱

Fig.3 SDS-PAGE Polyacrylamide gel electrophoresis

注: a: LFBE-P; b: RBE-P。

通过 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳,对 LFBE-P 和 RBE-P 进行分析,由图 3 可知,RBE-P 相对分子质量分布广泛,大分子蛋白质较多。经过乳酸菌发酵以后,分子量在 45 ku 以上的大分子蛋白几乎全部消失,表明大麦中的可溶性大分子蛋白质经过乳酸菌作用后被分解成相对分子质量较小的蛋白质。

同时,由电泳图谱 3 可知,发酵前后蛋白的种类均有很多,因此对 LFBE-P 功能活性的研究,需对其

进行初步的分离提纯。

2.2 LFBE-P 对 3T3-L1 细胞存活率的影响

3T3-L1 是前脂肪细胞,在一定刺激下会被诱导分化成成熟的脂肪细胞。对药物的作用浓度一般采用 MTT 法和 CCK8 法进行研究,由于乳酸菌发酵大麦产物能够与 MTT 反应,因此选择 CCK8 作为鉴定 LFBE-P 最佳作用浓度范围的方法。

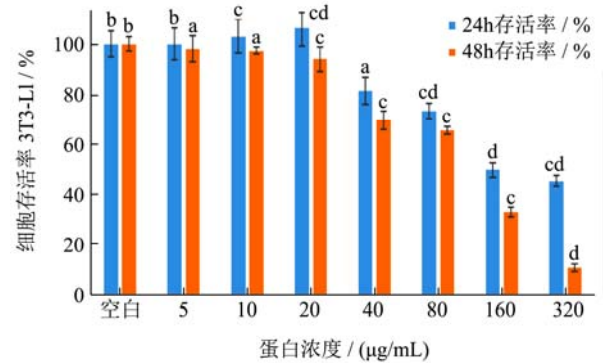


图 4 LFBE-P 对 3T3-L1 细胞增殖的影响

Fig.4 Effect of LFBE-P on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes

注: 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

图 4 表示了 LFBE-P 对 3T3-L1 细胞存活率的影响,由于细胞培养需要每隔 48 h 进行换液,以供细胞营养代谢所需,因此需要研究 48 h 以内的细胞毒性试验。由图 4 可知,低浓度 LFBE-P 对 3T3-L1 细胞的抑制率不明显,反而有略微的促进其生长的能力。当蛋白质浓度大于 40 $\mu\text{g/mL}$ 时,对细胞开始产生明显的抑制作用,此时的细胞存活率分别为 81% (24 h) 和 69% (48 h)。当蛋白质浓度继续升高,到 320 $\mu\text{g/mL}$ 时,3T3-L1 细胞经过 48 h 培养,存活率仅为 10.8%,表明大部分细胞已经死亡。在此基础上,最终选择 LFBE-P 作用浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$ 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 LFBE-P 诱导 3T3-L1 细胞棕色化的作用

2.3.1 LFBE-P 对 3T3-L1 细胞葡萄糖消耗量的影响

图 5 表示 RBE-P 和 LFBE-P 对 3T3-L1 细胞葡萄糖消耗量的影响。由图可知,在 24 h 以内,细胞对葡萄糖的消耗量,RBE-P 比空白提高了 28.7%,而 LFBE-P 在低浓度 (10 $\mu\text{g/mL}$) 下对葡萄糖消耗量低于 RBE-P,随着浓度升高,葡萄糖消耗量逐渐上升,20 $\mu\text{g/mL}$ 的 LFBE-P 相比空白提高了近一倍,比对照组提高了 80%。Yi Han 等人利用槲皮素诱导 3T3-L1 细胞棕色化,发现细胞的代谢水平提高,并且在胰岛素的作用下,细胞在分化早期对葡萄糖利用率迅速提

高^[8]。Laura 等人通过激活 G 蛋白偶联受体,使皮下白色脂肪组织细胞发生棕色化反应,线粒体迅速增殖,进而加强细胞的氧化呼吸和对葡萄糖消耗量^[9]。本研究中细胞在受到 LFBE-P 的刺激下,短期内即可迅速提高对葡萄糖的利用率,提高能量代谢效率,有明显的棕色化脂肪细胞的性状。在培养时间达 48 h 后,细胞对葡萄糖的消耗量趋于稳定,由于培养基中底物充足,可能是因为六孔板中细胞数量受限,相关酶的活力已趋于饱和。

综上,LFBE-P 相比 RBE-P 能够显著提高 3T3-L1 细胞对葡萄糖的利用率。

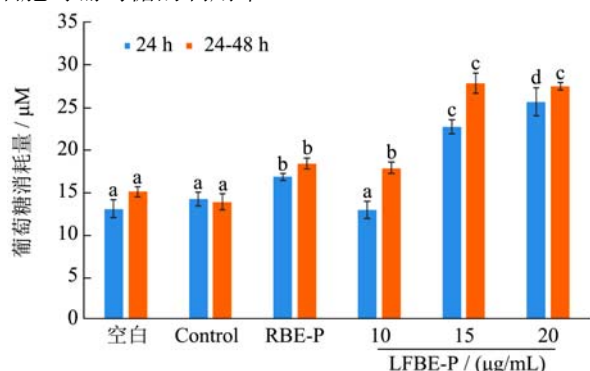


图5 RBE-P 和 LFBE-P 对 3T3-L1 细胞葡萄糖消耗量的影响

Fig.5 Effect of RBE-P and LFBE-P on glucose consumption of 3T3-L1 preadipocytes

注: Control 为成熟白色脂肪细胞; RBE-P 浓度为 20 µg/mL; 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

2.3.2 LFBE-P 对 3T3-L1 细胞棕色化特征基因表达的影响

以胰岛素诱导 3T3-L1 分化成脂肪细胞为对照,观察 RBE-P 和 LFBE-P 对其分化的影响。荧光定量 PCR 对 3T3-L1 细胞 mRNA 含量的分析结果如图 6 所示。

UCP1 是白色脂肪棕色化过程中最重要的蛋白质之一。Maria 等人研究发现棕色脂肪细胞的线粒体产热能力远高于白色脂肪细胞,棕色化脂肪细胞的主要特征表现为提高有氧呼吸速率,线粒体扩增,利用线粒体内膜的 UCP1 蛋白分解脂肪酸和葡萄糖产生热量^[10]。Ayalon 等人对比了肥胖和正常小鼠脂肪组织的 UCP1 表达量,发现前者 UCP1 含量低于后者,表明 UCP1 在白色脂肪细胞中的表达量比较低^[11]。UCP1 蛋白是棕色化脂肪细胞实现其功能的重要执行蛋白,因此其基因表达量可以间接反映细胞是否发生了棕色化。

由图 6a 可知,RBE-P 组与正常脂肪细胞的 UCP1 表达量基本相同,而 LFBE-P 仅仅在 10 µg/mL 的浓度时即可显著上调 UCP1 表达量,是 RBE-P 表达量的

1.5 倍。且 UCP1 基因表达量与 LFBE-P 浓度呈正相关,20 µg/mL 时基因上调接近 2 倍。

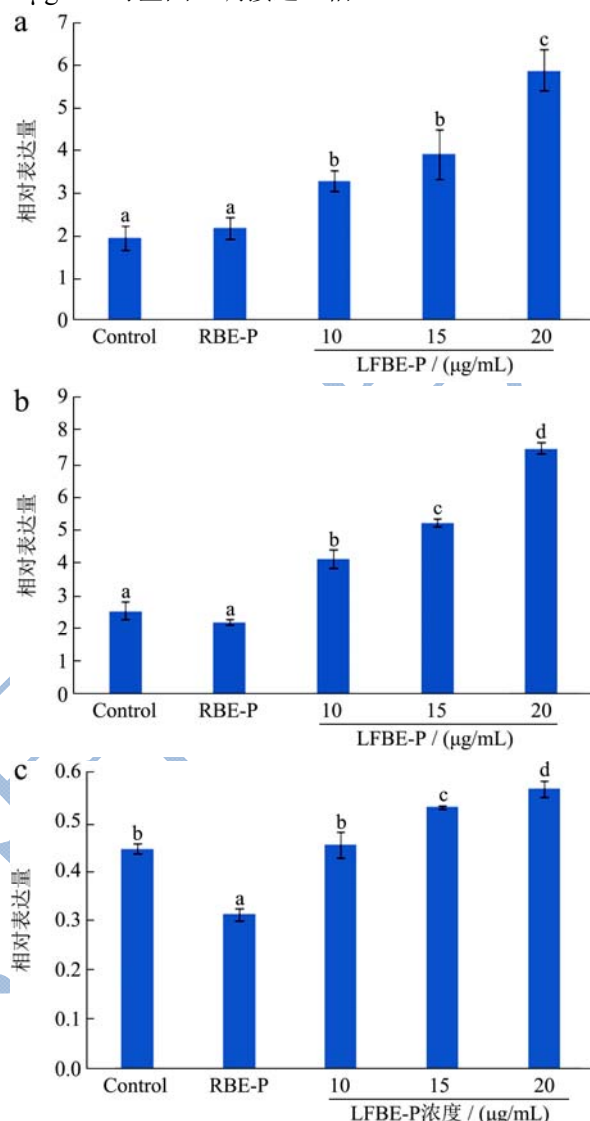


图6 RBE-P 和 LFBE-P 对 3T3-L1 细胞棕色化相关基因表达的影响

Fig.6 Effect of RBE-P and LFBE-P on brown-specific gene expression

注: Control 为成熟白色脂肪细胞; RBE-P 浓度为 20 µg/mL; 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。其中 a 为 UCP1; b 为 PGC-1α; c 为 PRDM16。

过氧化物酶体增殖激活受体 γ 的共激活剂 PGC-1 α 是细胞棕色化过程中的重要转录因子,PGC-1 α 涉及体内能量代谢,是线粒体增殖过程中的关键调节因子^[12],因此,其表达量与细胞内线粒体数量呈正相关,同时可以反映细胞的氧化呼吸能力的提升。Katarina 等人发现,抑制 Gq 蛋白可以提高米色脂肪的含量,引起 PGC-1 α 和 UCP1 表达量上升,最终导致细胞能量代谢得以增强^[13]。

由图 6b 可知,在 RBE-P 作用下 PGC-1 α 的表达

比对照组低 13%，说明 RBE-P 对 *PGC-1 α* 的表达具有抑制作用，不利于 3T3-L1 细胞的棕色化。LFBE-P 可提高 *PGC-1 α* 的表达量，增加幅度与 LFBE-P 的浓度相关，20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 *PGC-1 α* 的表达量是对照组的 2 倍，且三组不同浓度与对照组相比均差异显著 ($p < 0.05$)。

PRDM16 是一种锌指转录因子，在棕色脂肪细胞中含量丰富，有助于棕色脂肪细胞中产热基因 *UCPI* 和 *CIDEA* 的表达，激活细胞的产热程序，从而使细胞高效利用脂肪。Mirko 等人发现 miRNA-133 能够下调 *PRDM16* 的表达量，对 miRNA-133 的抑制可以提高 *PRDM16* 含量，进而促进棕色脂肪细胞分化^[14]。在白色脂肪细胞中 *PRDM16* 的表达有利于细胞分化成米色脂肪细胞，表现出类似于棕色脂肪产热的能力^[15]。

由图 6c 可知，低浓度的 LFBE-P 对 *PRDM16* 的调节作用不明显，浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，*PRDM16* 表达量上调 27%。而 RBE-P 对 *PRDM16* 有抑制作用，其表达量较对照组降低了 30%。因此，LFBE-P 能够在一定程度上促进 *PRDM16* 的表达，有利于 3T3-L1 细胞棕色化。

2.4 不同相对分子质量的 LFBE-P 诱导 3T3-L1

细胞棕色化

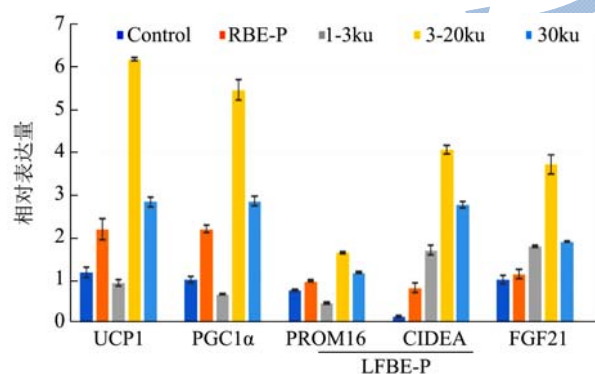


图 7 LFBE-P 不同相对分子质量对棕色化相关基因表达的影响

Fig.7 Effect of LFBE-P with different molecular weights on brown-specific gene expression

由于 LFBE-P 中含有很多杂蛋白，甚至可能含有抑制 3T3-L1 细胞棕色化的部分物质。因此，将其按照相对分子质量分为三部分：1~3 ku，3~20 ku 和大于 20 ku，分别进行试验。

由图 7 不难看出，成熟的 3T3-L1 脂肪细胞，对产热相关基因的表达均处于较低水平，可见白色脂肪细胞的产热能力很低。RBE-P 对棕色化相关基因的表达具有不同程度的微调。LFBE-P 中相对分子质量处于 3~20 ku 范围内的蛋白，能够明显提高 *UCPI* 和 *PGC-1 α* 的表达量，说明 LFBE-P 中的主要活性成分是

3~20 ku 的蛋白质。而分子量小于 3 ku 的蛋白，反而对棕色化相关基因的表达有抑制作用，不利于 3T3-L1 细胞的棕色化。

Fgf21 是一种成纤维细胞生长因子，在胰岛素的作用下会促进脂肪细胞对葡萄糖的摄取能力，Murielle 等人研究表明 Fgf21 能够提高细胞的能量消耗和脂肪利用率，并且不必依赖 *UCPI* 蛋白的产热功能，从而抑制肥胖^[16]。由图 7 可知，LFBE-P 中相对分子质量为 3~20 ku 的蛋白质可以显著促进 3T3-L1 细胞中 *Fgf21* 和 *Cidea* 的表达，进而提高细胞的脂解作用和产热能力。但是，基因表达水平只是 3T3-L1 细胞发生棕色化的主要证据之一，其具体的分子机制和相关的信号调节通路还需要进一步的研究。

3 结论

RBE-P 能够在一定程度上促进棕色化基因的表达，但是效果不明显。LEBE-P 可显著提高 3T3-L1 细胞产热基因如 *UCPI* 的表达，浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时即可使其表达量提高近 2 倍，在 24 h 内细胞对葡萄糖的利用率比空白组提高 80%。LFBE-P 中包含了相对分子质量不同的系列蛋白，其中相对分子质量 3~20 ku 的蛋白对提升 *UCPI*、*PGC-1 α* 和 *Fgf21* 表达量的幅度最大，即诱导白色脂肪细胞棕色化的作用最为明显，但其作用机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Chondronikola M, Volpi E, Børsheim E, et al. Brown adipose tissue activation is linked to distinct systemic effects on lipid metabolism in humans [J]. *Cell Metabolism*, 2016, 23(6): 1200-1206
 - [2] Cypess A M, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans [J]. *New England Journal of Medicine*, 2009, 360(15): 1509-1517
 - [3] Cypess A M, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans [J]. *New England Journal of Medicine*, 2009, 360(15): 1509-1517
 - [4] Wu J, Boström P, Sparks L M, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human [J]. *Cell*, 2012, 150(2): 366-376
 - [5] 史腊妮,董英,张家艳.发酵大麦提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞分化及脂代谢的影响[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(12):59-65
- SHI La-ni, DONG Ying, ZHANG Jia-yan. Effect of lactobacillus plantarum dy-1 fermented barley extract on the differentiation and lipid metabolism of 3T3-L1 preadipocytes

- [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(12): 59-65
- [6] 张家艳. 植物乳杆菌 dy-1 发酵大麦提取物干预胰岛素抵抗及其机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2017
- ZHANG Jia-yan. The effect and mechanisms of fermented barley extract with lactobacillus plantarum dy-1 on insulin resistance [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2017
- [7] Than A, He H L, Chua S H, et al. Apelin enhances brown adipogenesis and browning of white adipocytes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(23): 14679-14691
- [8] Han Y, Wu J Z, Shen J, et al. Pentamethylquercetin induces adipose browning and exerts beneficial effects in 3T3-L1 adipocytes and high-fat diet-fed mice [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1123
- [9] Velazquez-Villegas L A, Perino A, V Lemos, et al. TGR5 signalling promotes mitochondrial fission and beige remodelling of white adipose tissue [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 245
- [10] Chondronikola M, Volpi E, Børsheim E, et al. Brown adipose tissue activation is linked to distinct systemic effects on lipid metabolism in humans [J]. *Cell Metabolism*, 2016, 23(6): 1200-1206
- [11] Ayalon I, Shen H, Williamson L, et al. Sepsis induces adipose tissue browning in non-obese mice but not in obese mice [J]. *Shock*, 2018
- [12] Pfeifer A, Hoffmann L S. Brown, beige, and white: the new color code of fat and its pharmacological implications [J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2015, 55: 207-227
- [13] Klepac K, Kilić A, Gnad T, et al. The G q signalling pathway inhibits brown and beige adipose tissue [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10895
- [14] Trajkovski M, Ahmed K, Esau C C, et al. MyomiR-133 regulates brown fat differentiation through Prdm16 [J]. *Nature Cell Biology*, 2012, 14(12): 1330
- [15] Shao M, Ishibashi J, Kusminski C M, et al. Zfp423 maintains white adipocyte identity through suppression of the beige cell thermogenic gene program [J]. *Cell Metabolism*, 2016, 23(6): 1167-1184
- [16] Véniant M M, Sivits G, Helmering J, et al. Pharmacologic effects of FGF21 are independent of the “browning” of white adipose tissue [J]. *Cell Metabolism*, 2015, 21(5): 731-738