

多不饱和脂肪酸对小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞增殖和分化的影响

陈蓉¹, 郭莉霞², 殷钟意², 刘柏华¹, 郑旭煦^{1, 2}

(1. 重庆工商大学环境与生物工程学院, 重庆 400067)

(2. 重庆工商大学催化与功能有机分子重庆市重点实验室, 重庆 400067)

摘要: 本文利用 MTS 比色分析法、细胞形态学分析及诱导分化法结合油红染色比色分析法研究了 α -亚麻酸 (alpha-linolenic acid, ALA)、亚油酸 (linoleic acid, LA) 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖及分化的影响。MTS 结果显示, 在一定浓度范围内 ALA、LA 均能呈剂量依赖关系和时间依赖关系的抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖, 且 ALA 抑制增殖作用强于 LA; 细胞形态学分析结果显示, ALA、LA 在高浓度时均显示出细胞毒性作用; 倒置显微镜观察和油红染色检测结果显示, ALA、LA、ALA/LA 混合脂肪酸 (1:1, n/n) 在 12.5~200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内均能浓度依赖式的抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化, 且 ALA 抑制分化作用强于 LA, 但当浓度 >100 $\mu\text{mol/L}$ 时, ALA/LA 混合脂肪酸 (1:1, n/n) 的抑制分化作用强于同浓度的 ALA, 当浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 比较 ALA/LA 摩尔比为 1:4、1:2、1:1 的混合脂肪酸抑制分化效果发现, 比值为 1:1 的略强但相互之间效果差异不明显。

关键词: 多不饱和脂肪酸; 3T3-L1 细胞; 增殖; 分化

文章编号: 1673-9078(2014)7-16-22

Effect of n-3/n-6 Polyunsaturated Fatty Acid on the Proliferation and Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes

CHEN Rong¹, GUO Li-xia², YIN Zhong-yi², LIU Bai-hua¹, ZHENG Xu-xu^{1,2}

(1. Environmental and Biological Engineering Institute, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China) (2. Chongqing Key Lab of Catalysis & Functional Organic Molecules, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

Abstract: The effects of alpha-linolenic acid (ALA) and linoleic acid (LA) on the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes were investigated by MTS assay, cell morphology analysis and spectrometric method of induction differentiation combined with oil red O staining. MTS results showed that ALA and LA significantly inhibited proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in a dose- and time-dependent manner within a certain concentration range, and ALA inhibited proliferation more strongly than LA. Cell morphology analysis showed that ALA and LA were cytotoxic to 3T3-L1 preadipocytes because of high concentration of the fatty acids. The inverted electron microscope observing and oil red staining and detection results showed that ALA, LA and ALA/LA mixed fatty acid (1:1, n/n) significantly inhibited differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in a dose-dependent manner in the range of 12.5~200 $\mu\text{mol/L}$, and ALA inhibited differentiation more efficiently than LA, and the ALA/LA mixed fatty acid (1:1, n/n) showed the strongest inhibition effect on differentiation at the same concentration above 100 $\mu\text{mol/L}$. When the concentration was 200 $\mu\text{mol/L}$, the ALA/LA mixed fatty acid (1:1, n/n) showed slightly lower inhibition effect on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes than the ALA/LA mixed fatty acid (1:2, n/n) and the ALA/LA mixed fatty acid (1:4, n/n).

Key words: polyunsaturated fatty acid; 3T3-L1 preadipocytes; proliferation; differentiation

膳食脂肪摄入过量曾被认为是引起肥胖病及其相

收稿日期: 2014-01-02

基金项目: 重庆市科技攻关项目 (CSTC, 2011AB5007);

作者简介: 陈蓉(1988-), 女, 硕士, 主要从事环境生物工程研究

通信作者: 郑旭煦(1964-), 女, 博士, 教授, 主要从事生物资源与天然药物研究

关并发症的一个重要因素, 但据流行病学调查显示, 在过去半个世纪里, 欧美等发达国家人群的膳食脂肪摄入量逐渐下降, 但肥胖的发生率并未下降, 反而呈现快速增长的趋势。后来研究发现, 膳食脂肪酸包括饱和脂肪酸 (saturated fatty acids, SFAs)、单不饱和脂肪酸 (monounsaturated fatty acids, MUFAs) 及多不

饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs), 这些脂肪酸的摄入量及比值的变化在肥胖、血脂代谢等方面起着重要作用。另外, 调查研究显示, 爱斯基摩人患心血管疾病的概率很低, 血脂水平也很低, 然而其饮食中脂肪含量却很高, 究其原因是由于他们食用了大量含丰富 n-3 PUFAs 的海产鱼。多项研究表明, PUFAs 是所有细胞膜的重要成分, 具有改善脂质代谢^[1]、预防心血管疾病、促进生长发育、调节免疫系统、抗癌^[2]、延缓衰老、促进大脑和视力发育等重要作用。

根据甲基端第一个双键所连的碳原子编号, PUFAs 分为 n-3、n-6、n-7、n-9 等系列, 其中与人类健康密切相关且具有重要生物学意义的主要是 n-3 和 n-6 系列。n-3 系列主要有 α -亚麻酸(α -linolenic acid, ALA)、二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid, DPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)等; n-6 系列主要有 γ -亚麻酸(γ -linolenic acid, GLA)、亚油酸(linoleic acid, LA)、花生四烯酸(arachidonic acid, AA)等。n-3 系的 ALA 在体内转化为 EPA 和 DHA, n-6 系的 LA 在体内酶作用下代谢为 AA 类产物。n-3 和 n-6 系 PUFAs 为人体必需脂肪酸, 机体不能合成, 必须从食物中摄取, 所以食用富含 n-3 和 n-6 系 PUFAs 的食物是十分重要的。

大量研究显示, n-3 系和 n-6 系 PUFAs 在调节血脂、抗炎、抗肿瘤及免疫调节方面具有不同作用, 维持二者的膳食平衡对于人体健康非常重要, 绝对摄入量不足不能满足功能需要, 但并非是越多越好。PUFA 特别是 n-3 系 PUFAs 很容易发生氧化, 引起体内脂质过氧化, 若超过细胞防御体系的清除能力, 就可能损害生物膜的组成、结构和功能。动物实验研究显示, n-3 系 PUFAs (主要成分为 EPA 和 DHA) 在降低血脂水平方面强于 n-6 系 (主要成分为 LA), 而 n-3/n-6 PUFAs (1:1, m/m) 更能有效调节小鼠血脂水平^[3]。但关于 ALA、LA 及 ALA/LA (1:1, n/n) 在脂肪细胞增殖分化方面的研究较少, 为此, 本文采用小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞模型, 利用 MTS 比色分析法研究 ALA 及 LA 对 3T3-L1 增殖方面的浓度-效应关系和时间-效应关系, 并进一步采用经典鸡尾酒诱导法诱导分化前脂肪细胞, 在诱导过程中观察不同浓度的 ALA、LA 及 ALA/LA (1:1, n/n) 对分化的影响, 从增殖和分化两个方面探讨其在降脂方面的作用效果。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料与试剂

3T3-L1 前脂肪细胞购自中科院上海细胞库。

胎牛血清(FBS)、高糖DMEM培养基干粉、0.25%胰蛋白酶消化液(1 \times), 美国 hyclone 公司; 青霉素(1600 IU/mg)、链霉素(720 μ g/mg)、二甲基亚砜(DMSO)、磷酸盐缓冲剂(PBS, 0.01 M, pH 7.4), 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx), 德国 applichem 公司; 胰岛素(Insulin), 日本 wako 公司; 地塞米松(DEX), biosharp 公司; MTS, 普洛麦格(北京)生物技术有限公司; 油红 O 干粉, 北京经科宏达生物技术有限公司; α -亚麻酸(纯度为 \geq 99%), 美国 sigma 公司; 亚油酸(纯度为 99%), 阿拉丁试剂有限公司; 甲醛、异丙醇均为分析纯, 成都化学试剂厂。

1.1.2 试剂的配制

青霉素(1000 \times)、链霉素(1000 \times): 称取青霉素 0.625 g、链霉素 1.388 g 分别溶于 10 mL PBS, 配成 10^5 IU/mL 青霉素 1000 倍贮存液和 10^5 μ g/mL 链霉素 1000 倍贮存液, 过滤后小剂量分装储存于 -20 $^{\circ}$ C, 避免反复冻融。

α -亚麻酸母液(200 mmol/L)、亚油酸母液(200 mmol/L): 用 DMSO 溶解配制并于 -20 $^{\circ}$ C 避光保存。

IBMx: 称取一定量 IBMx 溶于 0.5 mol/L KOH 溶液使其终浓度为 50 mmol/L, 0.22 μ m 过滤后保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

INS: 称取一定量 INS 溶于 0.02 mol/L HCl 溶液使其终浓度为 1 mg/mL, 0.22 μ m 过滤后 -20 $^{\circ}$ C 长期保存备用。

DEX: 称取一定量 DEX 溶于无水乙醇配成终浓度为 10 mmol/L 的母液, -20 $^{\circ}$ C 保存; 用 PBS 稀释至 1 mmol/L 工作液, 过滤后 4 $^{\circ}$ C 保存。

诱导剂 I: 用 10% FBS/DMEM 高糖培养基配制终浓度为 0.5 mmol/L IBMx、1 μ g/mL INS、1 μ mol/L DEX 诱导剂。

诱导剂 II: 用 10% FBS/DMEM 高糖培养基配制终浓度为 1 μ g/mL INS 诱导剂。

油红 O: 称取 0.5 g 油红 O 粉末溶于 100 mL 异丙醇中配成 5 g/L 的母液, 置于 4 $^{\circ}$ C 避光长期保存, 用时以母液/水体积比为 6:4 稀释过滤后为工作液备用。

1.1.3 主要仪器

ECLIPSE TE2000-U 倒置显微镜, 日本尼康公司; S.SW-CJ-1FD 净化工作台, 上海跃进医疗器械厂; Heracell150 CO₂ 细胞培养箱, 德国 Thermo Scientific; TDL-50B 台式离心机, 上海安亭(anke)科学仪器厂; infinite M200 酶标仪, 瑞士 TECAN 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

将 3T3-L1 细胞置于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基 (100 IU/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素) 中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养, 细胞贴壁生长, 根据细胞生长状态每隔 2~3 d 换液, 当细胞汇合度达 70%~80%时消化传代。

1.2.2 MTS 法检测 PUFAs 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响

将处于对数生长期的细胞以 3×10^4 个/mL 密度接种到 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 待其生长至贴壁后开始干预处理, 设置了空白调零孔 (相同体积的培养基)、溶剂对照孔 (相同体积的细胞) 及实验孔 (相同体积的细胞, 之后加药物干预), 实验组每孔加入用培养基稀释过的 PUFA (ALA, LA) 10 μ L 使其终浓度达实验要求, 继续培养实验要求的时间, 然后每孔加入 MTS 22 μ L 在 5% CO₂ 孵箱 (37 $^{\circ}$ C) 中孵育 1~4 h, 直接于 490 nm 下测得吸光度 OD 值, 并用空白孔调零, 并按下式计算细胞增殖存活率/%。

$$\text{存活率}/\% = (\text{实验组 OD}_{490} / \text{对照组 OD}_{490}) \times 100$$

1.2.3 细胞形态学分析

取对数生长期的细胞制成 3×10^4 个/mL 的悬浮液接种于 96 孔板中, 每孔接种 100 μ L, 待其生长至贴壁后开始干预处理, 设置了溶剂对照孔和实验孔, 实验组每孔加入用培养基稀释过的 PUFA (ALA, LA) 10 μ L 使其终浓度达实验要求, 继续培养 24 h 后用倒置显微镜观察细胞形态。

1.2.4 3T3-L1 前脂肪细胞的诱导分化

将处于对数生长期的细胞以适宜密度接种到 24 孔板中, 常规培养至产生接触抑制 2 d 后换为诱导剂 I (重新记为第 0 d), 2 d 后换诱导剂 II 再培养 2 d, 之后换含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基, 隔天换液。在换诱导剂 I 和诱导剂 II 的同时对实验组加入用相应诱导剂配制的不同浓度的 PUFA 进行干预, 还设置了溶剂对照组, 每组每个浓度设 3 个复孔。

1.2.5 油红 O 染色

于诱导分化第 8 d, 弃去孔中培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 然后用含 3.7% 甲醛的 PBS 于 4 $^{\circ}$ C 固定 1 h。再水洗 2 次, 用 3 g/L 的油红工作液于室温下染色 2 h。水洗, 清除残留油红, 倒置显微镜下观察, 拍照。

1.2.6 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化过程中脂肪积聚的定量检测

油红 O 作为鉴定脂肪的特异性染料, 通过油红 O

染色后在 510 nm 波长下检测吸光度值, 可定量检测细胞内脂肪含量, 间接反应细胞分化情况。

已完成油红 O 染色的细胞, 加异丙醇萃取 10 min, 于 510 nm 波长下测其吸光度 OD₅₁₀ 值。将药物组与对照组的 OD₅₁₀ 按下式计算可得药物对 3T3-L1 细胞的相对分化率/%。

$$\text{相对分化率}/\% = (\text{实验组 OD}_{510} / \text{对照组 OD}_{510}) \times 100$$

1.2.7 统计方法

数据用平均值 \pm 标准偏差 (SD) 表示, n=3; 运用 SPSS 12.0 软件进行单因素方差分析, 与对照组进行比较, P<0.05 时表示差异显著 (*表示), P<0.01 时表示差异极显著 (**表示)。

2 结果与讨论

2.1 PUFAs 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响

2.1.1 ALA 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响

按照 1.2.2 的方法检测 ALA 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响, 实验结果见图 1。

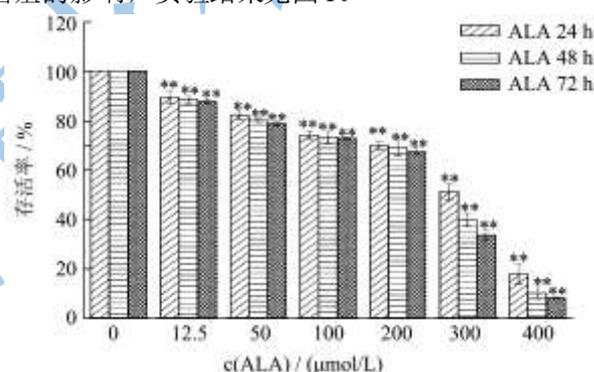


图 1 不同浓度 ALA 对前脂肪细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of ALA on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes

如图 1 所示, ALA 对 3T3-L1 前脂肪细胞有明显的抑制增殖的作用, 且随着浓度的升高 (12.5~400 μ mol/L), 抑制作用逐渐增强, 剂量效应关系明显; 不同浓度的 ALA 分别干预了 24 h、48 h、72 h, 各浓度均表现出了较强的抑制作用, 与对照组相比差异显著, 呈现出了很好的浓度依赖关系, 但随着时间的延长, 抑制作用增强不明显。与此同时, 由图 2 的细胞形态观察结果可得, ALA 浓度小于 200 μ mol/L 时, 细胞完整, 胞质均匀, 生长状况良好, 而当浓度大于 200 μ mol/L 时, 即在浓度为 300 μ mol/L 组和 400 μ mol/L 组中, 细胞相对分散, 细胞数量减少, 细胞间连接基本消失, 细胞内颗粒增多, 失去纤维状形态, 表现出典型的细胞凋亡形态特征, 表明在 ALA 浓度过高时显示出细胞

毒性作用。

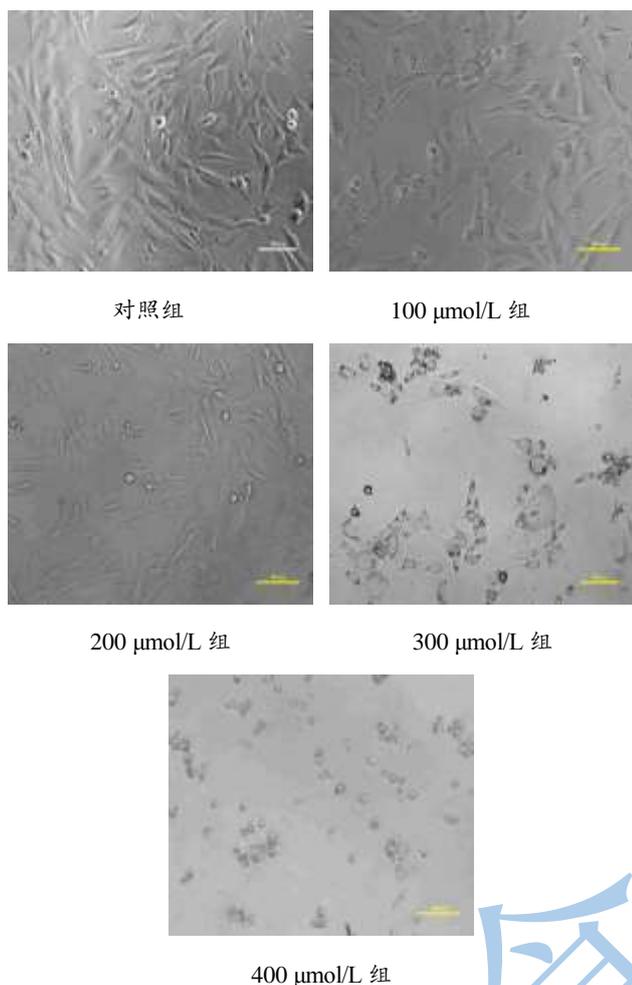


图2 不同浓度 ALA 干预的细胞形态 (100×)

Fig.2 Effect of different concentrations of ALA on the cell morphology of 3T3-L1 preadipocytes

2.1.2 LA 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响

按照 1.2.2 的方法检测 LA 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响, 实验结果见图 3。

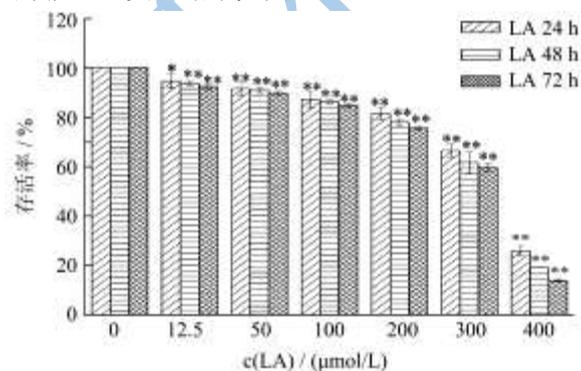


图3 不同浓度 LA 对前脂肪细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of LA on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes

如图 3 所示, LA 对 3T3-L1 前脂肪细胞有明显的抑制增殖的作用, 且随着浓度的升高 (12.5~400

μmol/L), 抑制作用逐渐增强, 剂量效应关系明显; 不同浓度的 LA 分别干预了 24 h、48 h、72 h, 各浓度均表现出了较强的抑制作用, 与对照组相比差异显著, 呈现出了很好的浓度依赖关系, 但随着时间的延长, 抑制作用增强不明显。同理, 由图 4 的细胞形态观察结果可知, 当 LA 浓度为 400 μmol/L 时呈现细胞凋亡形态特征, 表明 LA 浓度过高时也显示出细胞毒性作用。

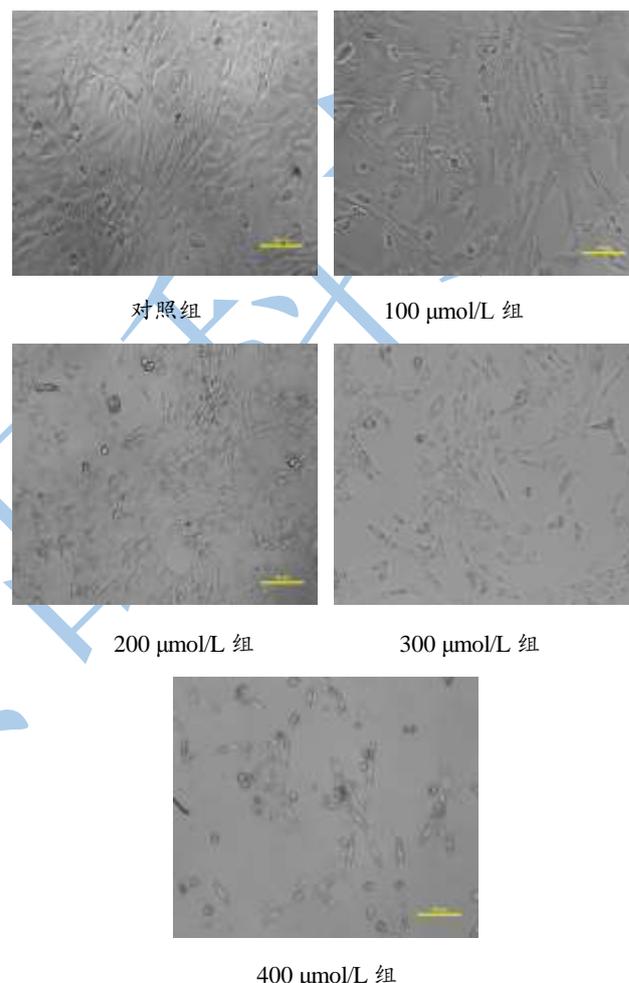


图4 不同浓度 LA 干预的细胞形态 (100×)

Fig.4 Effect of different concentrations of ALA on the cell morphology of 3T3-L1 preadipocytes

比较图 1 和图 3 可知, 相同浓度下, ALA 抑制 3T3-L1 细胞增殖的作用强于 LA; 综合二者细胞毒性作用浓度以及便于比较分析等原因, 拟选用 200 μmol/L 作为细胞分化实验中的最高浓度。

2.2 PUFA 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响

3T3-L1 前脂肪细胞为典型的梭形, 胞浆内无脂滴, 表现为成纤维细胞形态。当细胞生长至完全融合产生接触抑制, 细胞退出生长周期, 处于生长停滞状态, 此时在促分化诱导剂作用下, 细胞逐渐变大变圆, 胞

内有脂滴出现, 分布于核周围, 形成“戒环样”结构, 油红染色结果进一步显示成熟脂肪细胞内有大量脂滴聚集, 见图 5。

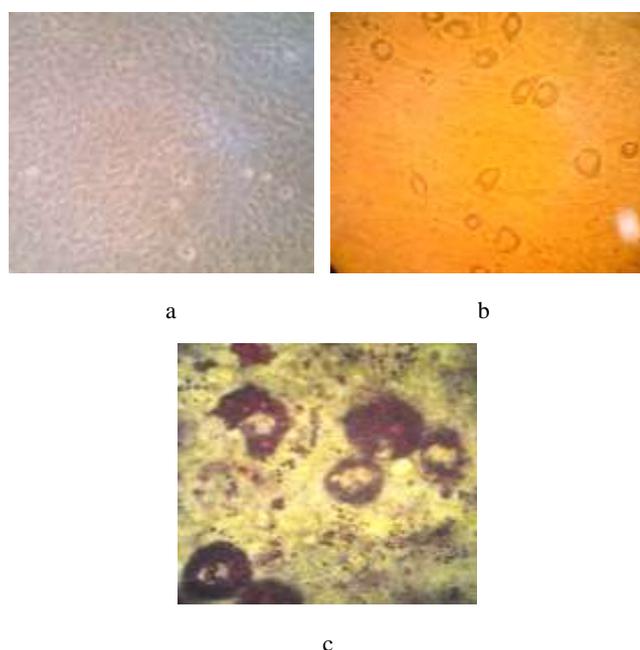


图 5 分化前脂肪细胞与分化后脂肪细胞

Fig.5 Morphological micrographs of 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes

注: a: 3T3-L1 前脂肪细胞(200×), b: 成熟脂肪细胞(200×), C: 成熟脂肪细胞油红染色(400×)。

油红 O 是一种对油脂的特异性染料, 而前脂肪细胞与分化成熟的脂肪细胞除了形态的区别, 就是成熟脂肪细胞能合成甘油三酯, 产生的油滴能与油红结合呈现红色, 而前脂肪细胞不能, 所以油红 O 染色后于 510 nm 下测得的吸光度值能间接反应细胞分化程度。

2.2.1 ALA 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响

按照 1.2.3 的方法检测 ALA 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响, 实验结果见图 6。

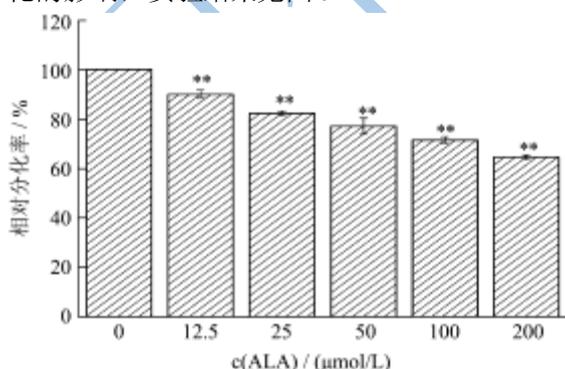


图 6 不同浓度 ALA 对前脂肪细胞分化的影响

Fig.6 Effect of different concentrations of ALA on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes

由图 6 可知, 经不同浓度 ALA 干预后, 各组细胞

分化被不同程度抑制。随着浓度的升高抑制作用逐渐加强, 呈现出很好的浓度依赖关系。与对照组相比, 各浓度抑制率均有显著差异

2.2.2 LA 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响

按照 1.2.3 的方法检测 LA 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响, 实验结果见图 7。

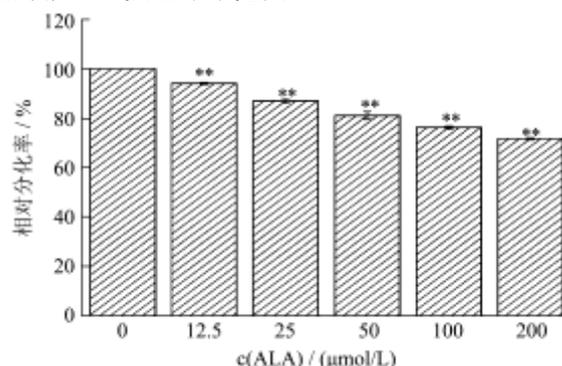


图 7 不同浓度 LA 对前脂肪细胞分化的影响

Fig.7 Effect of different concentrations of LA on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes

由图 7 可知, 经不同浓度 LA 干预后, 各组细胞分化被不同程度抑制。随着浓度的升高抑制作用逐渐加强, 呈现出很好的浓度依赖关系。与对照组相比, 各浓度抑制率均有显著差异。

比较图 6 和图 7 可知, 相同浓度下, ALA 抑制 3T3-L1 细胞分化的作用强于 LA。

2.2.3 ALA/LA 混合脂肪酸(1:1, n/n)对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响

按照 1.2.3 的方法检测 ALA/LA 混合脂肪酸 (1:1, n/n) 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响, 实验结果见图 8。

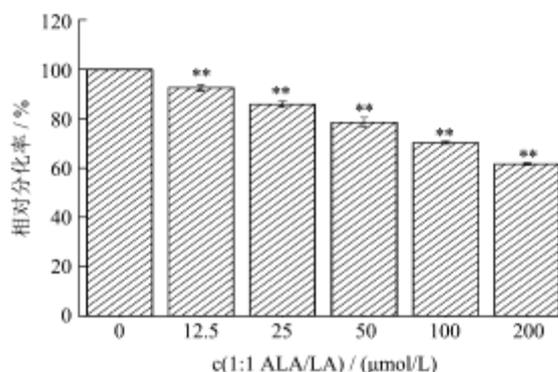


图 8 不同浓度 1:1 ALA/LA 对前脂肪细胞分化的影响

Fig.8 Effect of different concentrations of 1:1 ALA/LA on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes

由图 8 可知, 经不同浓度 1:1 ALA/LA 混合脂肪酸干预后, 各组细胞分化被不同程度抑制。随着浓度的升高抑制作用逐渐加强, 呈现出很好的浓度依赖关系。与对照组相比, 各浓度抑制率均有显著差异。而且,

在总浓度大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 下, 1:1 ALA/LA 的相对分化率比同浓度下 ALA 的相对分化率小, 表明 1:1 ALA/LA 的抑制分化的作用强于同浓度下 ALA 抑制分化的作用。

2.2.4 不同比值的 ALA/LA 混合脂肪酸对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响

按照 1.2.3 的方法检测浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的不同比值的 ALA/LA 混合脂肪酸对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响, 实验结果见图 9。

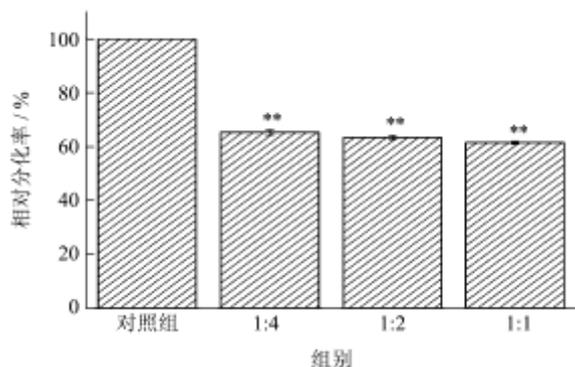


图 9 不同比值的 ALA/LA 混合脂肪酸对前脂肪细胞分化的影响

Fig.9 Effect of different ratios of ALA/LA on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes

由图 9 可知, 经同一浓度 ($c=200 \mu\text{mol/L}$) 不同比值的 ALA/LA 混合脂肪酸干预后, 各组细胞分化被不同程度抑制。与对照组相比, 各组抑制率均有极显著差异, 与同浓度下 ALA 相比也表现出更强的抑制分化作用效果。而不同比值之间抑制率相比较抑制分化作用效果差异不大, 摩尔比为 1:1 的 ALA/LA 混合脂肪酸抑制分化作用略强。

3 讨论

目前, 国内外学者在细胞水平上运用前脂肪细胞开展 n-3 系和 n-6 系 PUFAs 脂质代谢的研究报道较多。3T3-L1 细胞属小鼠源的成纤维细胞, 是前脂肪细胞, 经特殊诱导分化剂作用后, 可分化为成熟的脂肪细胞, 是目前国内外进行脂肪细胞功能和糖脂代谢研究中广泛使用的细胞株之一。脂肪细胞增殖分化异常, 可导致脂肪组织堆积、脂肪细胞内分泌功能紊乱, 继而引起肥胖、高脂血症、糖尿病等与胰岛素抵抗相关的疾病^[4], 因此抑制前脂肪细胞增殖和分化, 减少脂肪细胞脂肪合成, 是减肥和降脂的一个重要方法。刘品等^[5]采用 MTT 比色法和油红 O 染色提取法研究了 EPA 对草鱼前体脂肪细胞增殖和分化的影响, 结果表明 EPA 在一定时间内促进草鱼前体脂肪细胞增殖, 而到一定时间后促进增殖作用消失, 并开始表现抑制增殖的作用, 在诱导分化过程表现出抑制其分化的作用;

李惠侠等^[6]以体外培养的大鼠脂肪细胞为研究对象, 得到 DHA 可抑制大鼠前体脂肪细胞的增殖和分化; kim 等^[7]也发现 DHA 可抑制 3T3-L1 脂肪细胞分化, 促进脂肪细胞水解, 并诱导细胞凋亡; 徐琛玮等^[8]发现 DHA 可剂量和时间依赖性的抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖, 并在研究其可能机制时提到线粒体膜电位的降低、细胞凋亡调控因子 P53 蛋白表达增强、Bcl-2 蛋白含量及 Bcl-2/Bax 比值的降低均可能是 DHA 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的机理。本研究中的 ALA 和 LA 均能以剂量和时间依赖方式显著抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖, 由于其结构与 DHA 相似, 所以 ALA 和 LA 抑制增殖的机制也可能涉及线粒体膜电位及凋亡相关蛋白等方面, 具体机制有待进一步研究。

PUFAs 对细胞增殖的不同影响与细胞系种类、脂肪酸种类及干预浓度和作用时间有很大关系。细胞增殖是生物体的重要生命特征, 细胞增殖检测技术广泛应用于分子生物学、肿瘤生物学、药理和药代动力学等研究领域。检测细胞存活与增殖最常用的方法主要是 MTT 和 MTS 法。MTS 方法较 MTT 法更方便、准确, 且具有无放射性、快速、安全及特异性强等优点, 已广泛应用于细胞增殖的检测、药物敏感性试验、细胞毒性的检测等^[9]。本文在观察 ALA 和 LA 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响时, 采用了 MTS 比色法, 得出 ALA 和 LA 在一定浓度范围内均能显著抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的结论, 同时结合细胞形态学分析, 得到当浓度过高时其对细胞的毒性作用, 由此本文拟定出 ALA 和 LA 对 3T3-L1 细胞分化的影响实验的最高干预浓度为 200 μM 。

油红染色实验结果显示, ALA 和 LA 在一定浓度范围内均能显著减少细胞内甘油三酯的合成, 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化, 并呈现出较好的剂量依赖关系。而且, 本文研究结果表明, ALA 抑制前脂肪细胞增殖和分化的作用均强于 LA, 揭示了脂肪酸种类、不饱和度对前脂肪细胞增殖和分化的影响。江津等^[10]人选用油酸 (OA)、AA、EPA 和 DHA 干预被诱导分化后的脂肪细胞, 观察 PUFAs 对脂肪细胞分化过程中脂肪聚集的影响, 结果显示, PUFAs 具有可抑制 3T3-L1 细胞脂肪聚集的作用, 但未见 n-3 与 n-6 系 PUFAs 之间抑制作用的显著差异。本文实验结果与上述文献报道的 PUFAs 对 3T3-L1 脂肪细胞增殖和分化的影响尚存在分歧, 可能与细胞系、脂肪酸种类、干预浓度和作用时间等不同有关。

PUFAs 由于其结构特点而容易发生脂质过氧化, 氧化后不仅功效丧失, 还对机体产生危害, 禹晓等^[11]研究了不同 ALA 含量油脂对高脂模型大鼠脂质水平

及氧化损伤的影响,结果表明随着 ALA 含量增加降脂效果更为显著,但油脂中 ALA 含量过高(达 55% 时)便产生了脂质过氧化产物,对机体有一定的氧化损伤。于是人们在探究 PUFAs 降血脂功效的同时,开始考虑脂肪酸的适宜配比问题^[2]。时皎皎等人^[3]通过不同膳食动物模型探讨不同脂肪酸组成及配比对大鼠血脂水平的影响的结果显示,1:1 n-6/n-3 PUFAs 的脂肪酸摄入比例最能有效调节血脂水平,有利于预防心血管疾病的发生。膳食脂肪酸种类及摄入量讲究平衡,包括饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸之间的平衡,也包括多不饱和脂肪酸中 n-6 和 n-3 系列的摄入平衡。营养学家指出多不饱和脂肪酸中 n-6 系和 n-3 系 PUFAs 的比例小于 4:1 的比值是有益于保障人体健康的脂肪酸平衡模式。n-3 PUFAs 具有净化血液,防止动脉硬化,调节血脂等优点,当 n-6 PUFAs 相对于 n-3 PUFAs 过多时,会合成人体的炎症因子,而当 n-3 PUFAs 过多时会由于脂质过氧化产生过氧化产物,对细胞膜造成损失,对机体产生毒副作用^[4],所以探讨 n-3 系和 n-6 系 PUFAs 合适的摄入量及比值是很有意义的。本文探究了 ALA/LA 混合脂肪酸(1:1, n/n)的不同浓度对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响,在总浓度小于 100 $\mu\text{mol/L}$ 下,抑制分化效果主要是与其中 ALA 含量呈正相关关系;在总浓度大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 下,抑制分化效果比同浓度下 ALA 的抑制分化作用强。这可能与高浓度 ALA 更易发生脂质过氧化有关,但具体的作用机制还需进一步研究,可通过观察干预过程中细胞内丙二醛(malonaldehyde, MDA)含量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)等相关指标的动态变化,来研究脂质过氧化问题与 PUFAs 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖分化作用之间的关系。本文还比较了高浓度($c=200 \mu\text{mol/L}$)下不同摩尔比的 ALA/LA 混合脂肪酸对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响,摩尔比为 1:1 的 ALA/LA 混合脂肪酸抑制分化作用相对于另外两组略强,但相互之间效果差异不显著,可能与比值的选取范围不大有关,后续研究中应结合日常食用油脂中两者的比值进一步探讨不同比值的 n-3/n-6 系 PUFAs 对 3T3-L1 细胞增殖与分化的影响。

4 结论

增殖实验结果表明, α -亚麻酸(n-3 系 PUFA)和亚油酸(n-6 系 PUFA)均能抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖,在一定浓度范围内呈浓度-效应依赖关系,并在 24 h、48 h、72 h 内呈现出一定的时间-效应依赖关系,且 α -亚麻酸的抑制作用强于亚油酸。根据增殖实验结

果,选取 200 $\mu\text{mol/L}$ 作为分化实验中 PUFAs 最大干预浓度。分化实验结果表明,在 12.5~200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, α -亚麻酸、亚油酸及 α -亚麻酸/亚油酸混合脂肪酸(1:1, n/n)均能浓度依赖式的抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的分化,且 α -亚麻酸的抑制作用强于亚油酸;当浓度大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, α -亚麻酸/亚油酸混合脂肪酸(1:1, n/n)的抑制作用强于同浓度的 α -亚麻酸;当浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, α -亚麻酸/亚油酸混合脂肪酸(1:1, n/n)的抑制作用略强于摩尔比值为 1:2 和 1:4 的,但效果差异不明显。

参考文献

- [1] Asha K K, Suseela Mathew, Lakshmanan P T. Effect of PUFA from fish oil on lipid metabolism of heart in streptozotocin-induced diabetes in male albino rats [J]. *Journal of Biomedical Sciences*, 2012, 1(1)
- [2] Deshpande R, Mansara P, Suryavanshi S, et al. Alpha-linolenic acid regulates the growth of breast and cervical cancer cell lines through regulation of NO release and induction of lipid peroxidation [J]. *Journal of Molecular Biochemistry*, 2013, 2(3): 6-17
- [3] 时皎皎,糜漫天,韦娜,等.不同脂肪酸构成比对大鼠血脂影响的研究[J].第三军医大学学报,2007,29(9):824-827
SHI Jiao-jiao, MI Man-tian, WEI Na, et al. Effect of different fatty acid compositions on blood lipid of rats [J]. *Journal of Third Military Medical University*, 2007, 29(9): 824-827
- [4] Sun-sil C, Byung-yoon C, Kagami I, et al. Arteripillin C, as a PPAR γ ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2011, 81(7): 925-933
- [5] 刘品,吉红,李超,等.EPA 对草鱼前体脂肪细胞增殖分化的影响[J].水生生物学报,2013,37(3):418-424
LIU Pin, JI Hong, LI Chao, et al. Effects of EPA on the proliferation and differentiation of grass carp preadipocytes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(3): 418-424
- [6] 李惠侠,杨公社.二十二碳六烯酸对大鼠脂肪细胞增殖分化的影响[J].生物工程学报,2005,21(5):840-843
LI Hui-xia, YANG Gong-she. Effects of docosahexaenoic acid on rat adipocytes proliferation and differentiation [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, 21(5): 840-843
- [7] Kim H K, Della-Fera M A, Lin J, et al. Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Journal of Nutrition*, 2006, 13(6): 2965-2969
- [8] 徐琛玮,沈颖卓,龚清海,等.二十二碳六烯酸抑制 3T3-L1 前

- 脂肪细胞增殖的作用及其可能机制[J].营养学报,2010,32(5): 456-459
- XU Chen-wei, SHEN Ying-zhuo, GONG Qing-hai, et al. Effect of docosahexaenoic acid to inhibit proliferation of preadipocytes and the mechanism [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2010, 32(5): 456-459
- [9] O'Toole S A, Sheppard B L, McGuinness E P, et al. The MTS assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumours [J]. *Cancer Detect. Prev.*, 2003, 27(1): 47-54
- [10] 江津,樊超男,朱海燕,等.多不饱和脂肪酸对 3T3-L1 细胞分化过程中脂肪聚集的影响[J].实用儿科临床杂志,2009,24(7): 497-499
- JIANG Jin, FAN Chao-nan, ZHU Hai-yan, et al. Effects of polyunsaturated fatty acids on fat accumulation in differentiated 3T3-L1 cells [J]. *Journal of Applied Clinical Pediatrics*, 2009, 24(7): 497-499
- [11] 禹晓,邓乾春,黄凤洪,等.不同 α -亚麻酸含量油脂对高脂模型大鼠脂质水平及氧化损伤的影响[J].营养学报,2011,33(2): 129-133
- YU Xiao, DENG Qian-chun, HUANG Feng-hong, et al. Effect of oils containing different alpha-linolenic acid content on lipid level and oxidative damages in hyperlipidemic rats [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2011, 33(2): 129-133
- [12] Duan Y H, Li F N, Li L L, et al. n-6: n-3 PUFA ratio is involved in regulating lipid metabolism and inflammation in pigs [J]. *British Journal Nutrition*, 2013: 1-7
- [13] 郝颖,汪之和.EPA、DHA 的营养功能及其产品安全性分析[J].现代食品科技,2006,22(3):180-183
- HA Ying, WANG Zhi-he. Nutritive function and safety analysis of EPA and DHA [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2006, 22(3): 180-183