

# 发酵大麦提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞分化及脂代谢的影响

史腊妮, 董英, 张家艳

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

**摘要:** 研究乳酸菌发酵大麦提取物 (LFBE) 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化及其脂代谢的影响与作用途径。利用植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* dy-1) 发酵大麦获得 LFBE, 采用 Folin-Ciocalteu 法测定总酚含量; 凯氏定氮法测定蛋白质含量与苯酚硫酸法测定多糖含量; 采用 CCK-8 法检测细胞增殖能力和油红 O 染色法分析前脂肪细胞的分化程度; 采用 Realtime PCR 法检测 LFBE 对脂代谢关键基因转录水平的调控作用。结果表明, 与未发酵大麦提取物相比, LFBE 中总酚含量增加了 20.88%; LFBE 中蛋白质含量从发酵前的 13.93% 增加至 34.94%; 多糖含量从未发酵时的 64.94% 下降至 35.43%。与未发酵大麦提取物组相比, LFBE 能够有效地抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的生长, 其  $IC_{50}$  约为 560  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 与模型组和未发酵大麦提取物组相比, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LFBE 能够显著抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化, 抑制率达到 58.85%。与模型组相比, LFBE 能显著抑制脂代谢关键基因 C/EBP $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$ 、SREBP-1c、PTP1B 和 aP2 的 mRNA 表达水平, 上调 GLUT4 的 mRNA 表达水平 ( $p < 0.05$ )。LFBE 可有效抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖, 并通过调节脂代谢相关基因的转录水平抑制其分化, 表明其可能具有预防肥胖的作用。

**关键词:** 大麦; 发酵; 3T3-L1 脂肪细胞; 脂代谢; 植物乳杆菌

文章编号: 1673-9078(2016)12-59-65

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.010

## Effect of *Lactobacillus plantarum* dy-1 Fermented Barley Extract on the Differentiation and Lipid Metabolism of 3T3-L1 Preadipocytes

SHI La-ni, DONG Ying, ZHANG Jia-yan

(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 extract (LFBE), and the effect of this extract on 3T3-L1 preadipocyte differentiation and lipid metabolism was investigated. The protein content in the extract was determined by the Kjeldahl method, the total phenol content was measured by the Folin-Ciocalteu method, and the polysaccharide content was determined by the phenol-sulfuric acid method. The proliferation of 3T3-L1 preadipocytes was estimated using the CCK-8 assay and their differentiation was determined using oil red O staining. Furthermore, the regulatory effect of LFBE on the mRNA expression levels of adipogenic genes was measured using real time-polymerase chain reaction (RT-PCR). The total phenol content in the LFBE was higher by 20.88% than the unfermented extract, while the protein content increased from 13.93% to 34.94% after fermentation. However, fermentation caused the polysaccharide content to decrease from 64.94% to 35.43%. Hence, LFBE effectively inhibited the growth of 3T3-L1 preadipocytes in a dose-dependent manner, with an  $IC_{50}$  value of approximately 560  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . We found that 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of LFBE effectively inhibited the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, and the inhibitory rate achieved was 58.85% higher than that in the positive control. Apart from up-regulating the mRNA level of glucose transporter-4 (GLUT4), LFBE significantly inhibited the mRNA expression of key adipogenic genes including peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR- $\gamma$ ), ccaat-enhancer-binding protein-alpha (C/EBP $\alpha$ ), sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B), and adipocyte protein 2 (aP2). These results indicated that LFBE significantly suppressed adipocyte differentiation and lipid accumulation by inhibiting the transcription of genes related to lipid metabolism. Hence, LFBE has potential applications in the prevention and control of obesity.

**Key words:** barley; fermentation; 3T3-L1 adipocytes; lipid metabolism; *Lactobacillus plantarum* dy-1

收稿日期: 2015-12-28

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程项目; 江苏省产学研前瞻性联合研究项目 (BY2012172)

作者简介: 史腊妮 (1990-), 女, 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

由于现代生活方式与膳食结构的改变,以肥胖为核心的代谢综合征已成为影响人类健康最主要的非传染性慢性疾病之一<sup>[1]</sup>。肥胖的发生与多种因素相关,营养过剩和运动缺乏是最重要的环境因素,进而导致人体能量摄入和消耗的不平衡,即能量过剩。而能量过剩可造成脂肪细胞的病理生长,如前脂肪细胞的增殖分化和成熟脂肪细胞的过度肥大。因此,抑制成熟脂肪细胞形成及其脂滴生成是预防肥胖的两个重要途径<sup>[2]</sup>,研究与开发安全有效的调节脂代谢天然产物具有重要意义。

大麦是典型的“三高二低”(高蛋白、高纤维、高维生素、低脂肪和低糖)食物,是一种兼具食疗功效的粮食作物<sup>[3]</sup>。Mcintosh等证明长期食用全大麦食物能降低总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)<sup>[4]</sup>。发酵作为一种传统的食品加工及贮藏方法,在发酵过程中不仅可以降解食物原料中的有害物质、控制致病菌的生长,还可以通过生物转化产生多种营养素和功能活性物质,如维生素、多肽、氨基酸、有机酸和脂肪酸等,从而具有抗氧化、减少细胞中脂肪形成等作用<sup>[5]</sup>。乳酸菌作为人体重要的益生菌,在发酵食品工业中有广泛应用,但目前国内外关于乳酸菌发酵大麦的研究尚鲜见报道。

3T3-L1前脂肪细胞是小鼠胚胎来源、具有纤维母细胞形态的细胞株,在胰岛素(INS)、地塞米松(DEX)和3-异丁基-1-甲基-黄嘌呤(IBMx)的刺激下,具有分化为成熟脂肪细胞的能力,是目前国际上体外研究肥胖及脂代谢常用的细胞模型。本研究利用实验室自行分离鉴定的植物乳杆菌发酵大麦,研究其发酵大麦提取物(LFBE)对3T3-L1细胞脂肪生成及相关基因的调控作用,为基于大麦健康功能食品的研发提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 试验材料

脱壳大麦购自盐城市双增农化科技有限公司;植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* dy-1)实验室自行分离鉴定。

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 高糖培养液和胎牛血清购自美国 Gibco 公司; CCK-8 购自碧云天公司; DMSO 购自美国 Sigma 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; 油红 O 购自国药集团化学试剂有限公司; 胰蛋白酶溶液购自

BBI Life Science 公司; 青霉素-链霉素溶液购自生物工程(上海)股份有限公司; 荧光定量 PCR 引物于上海生工生物工程技术有限公司合成; 荧光定量 PCR 相关试剂盒购自 Takara 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。

#### 1.1.2 试剂的配制

未发酵大麦提取物(20 mg/mL)、发酵大麦提取物(20 mg/mL): 用蒸馏水溶解配制并于-20 °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 μm 过滤后保存于-20 °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 μm 过滤后-20 °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 0.1 mmol/L 的母液, 过滤后-20 °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、10 μg/mL INS、1 μmol/L DEX 诱导剂。

诱导剂II: 用 10% FBS/DMEM 高糖培养基配制终浓度为 10 μg/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 °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 仪器与设备

UV-9600 紫外可见分光光度计, 北京瑞丽分析仪器有限公司; CO<sub>2</sub> 恒温培养箱, 芬兰 Thermo 公司; 蔡司 Axiovert 40 倒置显微镜, 卡尔蔡司有限公司; 荧光定量 PCR, 美国 Bio-Rad 公司; FlexStationII 384 酶标仪, Molecular Devices 公司; 96 孔板和 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶, 美国 Corning 公司; 冷冻离心机 BR-4, 法国 JOUAN 公司; 真空冷冻干燥器, 德国 Marin Christ 公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 样品制备

(1) 未发酵大麦提取物(RBE): 称取筛分除杂后的新鲜大麦, 粉碎后过 100 目筛, 按谷物(W):水(V)=1:7 于烧杯中混合均匀, 搅拌 2 h, 9000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 冷冻干燥后即得。

(2) 植物乳杆菌发酵大麦提取物(LFBE): 称取筛分除杂后的新鲜大麦, 粉碎后过 100 目筛, 按谷物(W):水(V)=1:7 于锥形瓶中混合均匀。按 1×10<sup>7</sup> CFU/mL 接种已活化至对数期(活菌数达到 1×10<sup>9</sup> CFU/mL)的植物乳杆菌, 充分混匀后, 将锥形瓶用

纱布封口, 30 °C发酵 24 h, 9000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 冷冻干燥后即得。

### 1.2.2 总酚的测定

参考 Bouayed 等<sup>[6]</sup>的方法, 采用 Folin-Ciocalteus 法测定总多酚含量。

### 1.2.3 蛋白质的测定

准确称取 0.3 g 的待测样品加入定氮瓶中, 依次加入 0.5 g 硫酸铜粉末、3 g 硫酸钾以及 10 mL 硫酸溶液, 同时取相同量的上述试剂作为空白对照; 经消化的样品置于全自动凯氏定氮仪中进行检测。蛋白质含量计算公式如下:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 0.014}{m} \times F \times 100$$

式中: X-样品中蛋白质含量(%); V<sub>1</sub>-样品消耗盐酸标准液的体积(mL); V<sub>2</sub>-空白对照消耗盐酸标准液的体积(mL); N-盐酸标准液的当量浓度; 0.014-盐酸标准液与氮的换算系数(g/mL); m-样品质量(g); F-蛋白质换算系数(6.25)。

### 1.2.4 可溶性糖的测定

准确称取 0.05 g 待测样品, 定容至 100 mL 后取其 2 mL 移入试管中, 依次加入 5%苯酚 1.5 mL、浓硫酸 7.5 mL 混匀, 100 °C水浴 15 min, 冷却后于 490 nm 下测定吸光度值。以葡萄糖制作标准曲线, 并依此计算样品中的可溶性糖含量。

### 1.2.5 脂肪的测定

参考国标 GB/T 5512-2008<sup>[7]</sup>方法进行检测。

### 1.2.6 细胞培养

3T3-L1 前脂肪细胞用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 长至 80%时传代, 选取对数生长期的细胞用于实验。

### 1.2.7 细胞存活率的测定

以 2 × 10<sup>4</sup> 个/mL 的接种量将 3T3-L1 前脂肪细胞接种于 96 孔板, 分为正常组 (Control) 和试验组, 每组 6 个平行。正常组加入正常细胞培养液, 试验组分别加入含 250、400、500、750、1000、1500 和 2000 μg/mL 样品的细胞培养液, 孵育 24 h 后每孔加入 10 微升 CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 溶液, 继续孵育 2 h, 双波长法 (测定波长 450 nm, 参考波长 650 nm) 测定 OD 值。

$$\text{细胞存活率 (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{样品}450\text{nm}} - \text{OD}_{\text{样品}650\text{nm}}}{\text{OD}_{\text{对照}450\text{nm}} - \text{OD}_{\text{对照}650\text{nm}}} \times 100$$

### 1.2.8 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化

用含 10%胎牛血清的 H-DMEM 培养 3T3-L1 细胞, 待细胞生长至完全融合, 两天后 (第 0 d) 开始诱

导分化。将培养液换成含 10%胎牛血清、0.5 mmol/L IBMX、1.0 μmol/L DEX 的 DMEM 高糖培养液, 同时加入样品 (终浓度分别为 100 μg/mL、200 μg/mL 和 400 μg/mL), 阳性对照组加入 10 μg/mL INS。2 d 后 (第 2 d) 撤去 IBMX 和 DEX, 均换用只含 10 μg/mL INS、10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液培养 2 d (第 4 d), 之后每 2 d 换用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液, 至第 8 d 90% 3T3-L1 细胞呈脂肪细胞表型。仔细观察细胞诱导分化过程, 并用倒置显微镜拍照, 记录细胞分化情况。

### 1.2.9 油红 O 染色观察

细胞诱导至第 8 d, 去除培养液, PBS 洗 2~3 遍, 用 10%甲醛固定 30 min; 然后蒸馏水充分洗涤, 用油红 O 稀释液染色 30 min; 再用 60%异丙醇稍洗去多余染液, 然后用蒸馏水洗, 倒置显微镜拍照观察。

### 1.2.10 脂代谢相关基因转录水平的测定

采用 RNAiso Plus 试剂盒法提取不同浓度 LFBE 处理的 3T3-L1 细胞中的总 RNA。每个样本中的 RNA 按照试剂盒的步骤反转录生成 cDNA。荧光定量 PCR 的扩增条件一致为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 34 s, 共 40 个循环。用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 的方法计算 mRNA 的相对表达量。在 Gene bank 中寻找小鼠的 mRNA 序列, 应用 primer3.0 软件设计引物。引物序列分别为:

表 1 RT-PCR 特异基因引物序列表

Table 1 Gene-specific primers used for real-time RT-PCR

引物	引物序列
PPAR-γ	上游引物 5'-gagatgccattctgcccaccaccttcgg-3'
	下游引物 5'-tatcataaataagcttaacatcgatggttc-3'
SREBP-1c	上游引物 5'-atcgcgcggaagctgtcgggtagcgtc-3'
	下游引物 5'-actgtctgtgttgatgagctggagcat-3'
β-Actin	上游引物 5'-agccatgtacgtagccatcc-3'
	下游引物 5'-tcctctcagctgtggtggtgaa-3'
C/EBPa	上游引物 5'-ggtttctctctgattcttcc-3'
	下游引物 5'-cgaaaaaacccaacatccc-3'
aP2	上游引物 5'-agcatcaaaccttagatggcg-3'
	下游引物 5'-cataaacattccaccaccagc-3'
GLUT4	上游引物 5'-gattctgtcgccttctgtc-3'
	下游引物 5'-attggacgtctctctccaa-3'
PTP1B	上游引物 5'-cggaacaggtaccagatgt-3'
	下游引物 5'-gaagtccccacatgtttg-3'

### 1.2.11 统计方法

采用统计软件 Excel 及专业图像分析软件 Image-Pro Plus 对结果进行分析, 各组数据以  $\bar{x} \pm SD$  (平均值 ± 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, 显著水平设定为  $p < 0.05$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 主要成分分析

表 2 RBE 与 LFBE 主要成分分析

Table 2 Main components of RBE and LFBE

样品	总酚	蛋白质	可溶性糖	脂肪
RBE	0.91%±0.024 <sup>b</sup>	13.93%±0.33 <sup>b</sup>	64.94%±4.00 <sup>a</sup>	1.57%±0.28 <sup>a</sup>
LFBE	1.10%±0.061 <sup>a</sup>	34.93%±0.23 <sup>a</sup>	35.44%±1.57 <sup>b</sup>	1.44%±0.30 <sup>a</sup>

注: 不同字母表示差异显著( $p < 0.05$ )。

表 2 所示为 RBE 与 LFBE 中主要成分含量。从表中可以看出, LFBE 中总酚含量为 1.10%, 与未发酵提取物相比, 增加了 20.88%; LFBE 中蛋白质含量从发酵前的 13.93%增加至 34.94%, 而可溶性糖含量从未发酵前的 64.94%下降至 35.43%; 发酵前后提取物中脂肪含量无显著性变化。

### 2.2 RBE 与 LFBE 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响

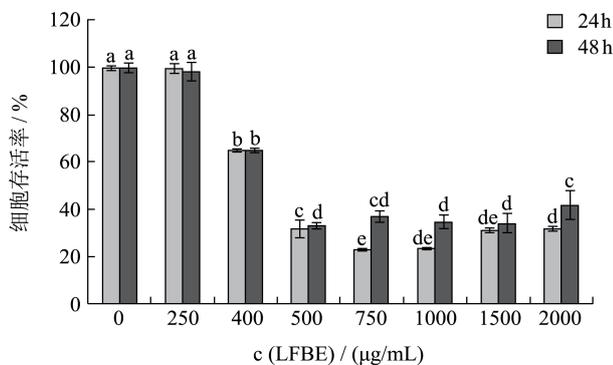
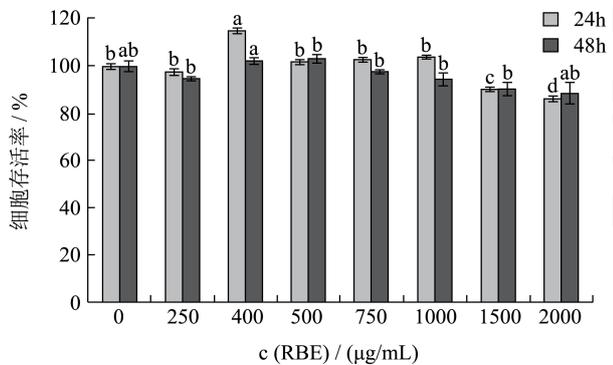


图 1 大麦发酵前后对前脂肪细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of RBE and LFBE on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes

注: 不同字母表示差异显著( $p < 0.05$ )。

图 1 显示了经 RBE 与 LFBE 分别处理 24 h 和 48 h

后, 3T3-L1 前脂肪细胞的存活率。从图中可知, 低浓度 RBE 能促进 3T3-L1 前脂肪细胞生长, 但当 RBE 浓度超过 1000 µg/mL 时, 对细胞增殖有显著的抑制作用; 而当 LFBE 浓度达到 500 µg/mL 时, 3T3-L1 前脂肪细胞的活力已显著降低, 与对照组相比差异显著 ( $p < 0.05$ ), 但随着时间的延长, 抑制作用无明显变化。通过线性回归计算得 RBE 和 LFBE 干预 24 h 及 48 h 的半致死浓度 (LC50) 分别为 2330.86±0.03 µg/mL 与 560.45±0.08 µg/mL、2244.74±0.05 µg/mL 与 606.81±0.09 µg/mL。在下面的试验中采用的样品浓度应小于 560 µg/mL。

### 2.3 RBE 与 LFBE 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响

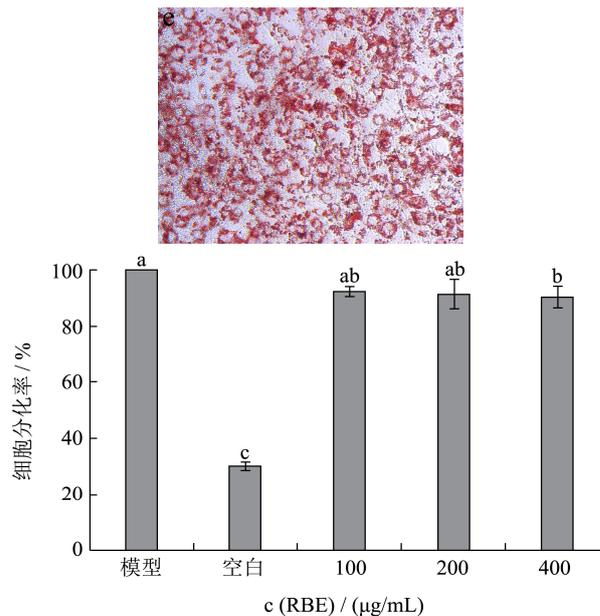
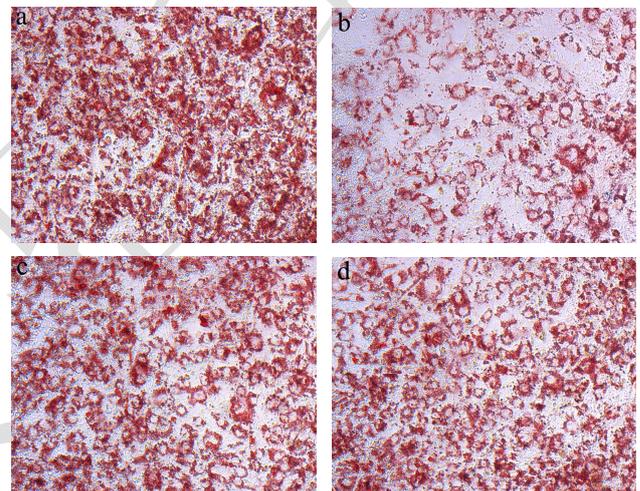


图 2 不同浓度 RBE 对前脂肪细胞分化的影响 (×200)

Fig.2 Effect of different concentrations of RBE on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes (200× magnification)

注：电镜图 a、b、c、d 和 e 分别为模型组、空白组、RBE 组 (100 μg/mL)、RBE 组 (200 μg/mL) 和 RBE 组 (400 μg/mL)，不同字母表示差异显著 ( $p > 0.05$ )。

3T3-L1 细胞在分化成熟后会在细胞内聚集大量脂滴，油红 O 染色可以直观反应脂肪细胞的分化程度。由图 2 可知，模型组细胞在诱导的第 8 d 90% 的细胞都分化为成熟的脂肪细胞，表现为细胞进一步增大，呈圆形，胞内布满红色脂滴，密集于核周，形成“指环样”结构，呈典型的成熟脂肪细胞的形态。经 RBE 处理 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化 8 d 后，与模型组细胞相比，中低浓度的 RBE 均未显著减少细胞内脂滴数量，400 μg/mL RBE 处理组细胞脂肪含量仍有模型组的 90%，表明 RBE 不能有效抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞。

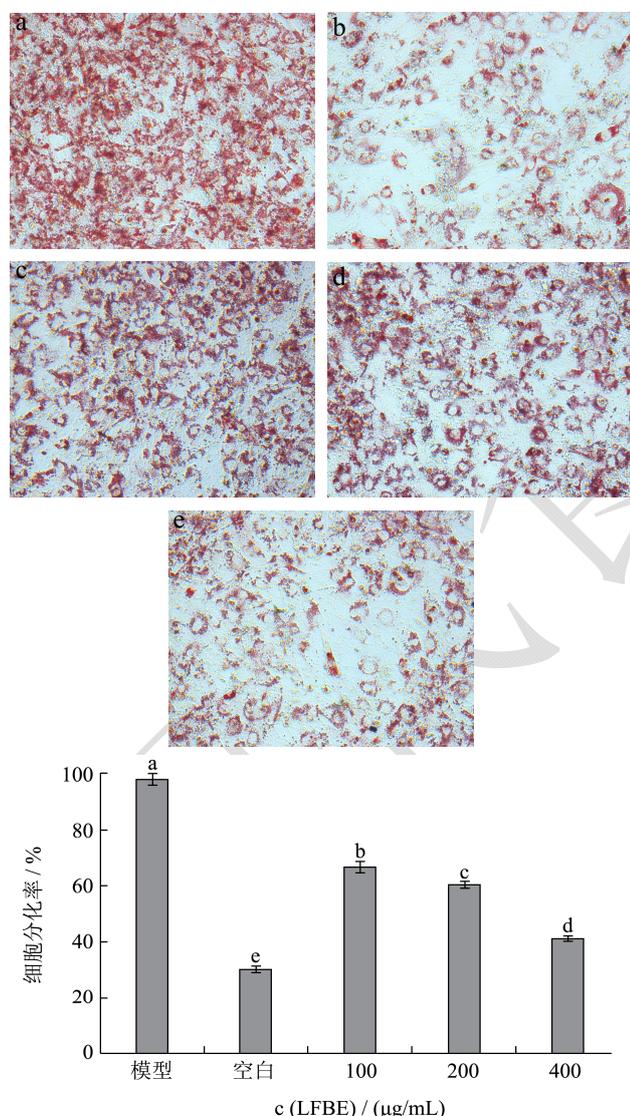


图 3 不同浓度 LFBE 对前脂肪细胞分化的影响 (×200)

Fig.3 Effect of different concentrations of LFBE on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes (200× magnification)

注：电镜图 a、b、c、d 和 e 分别为模型组、空白组、LFBE

组 (100 μg/mL)、LFBE 组 (200 μg/mL) 和 LFBE 组 (400 μg/mL)，不同字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

由图 3 可知，与模型组细胞相比，经 LFBE 处理 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化 8 d 后，低、中和高三个浓度的 LFBE 均能显著减少胞内脂滴数量。脂肪细胞的油红 O 染料定量结果 (图 3) 显示，LFBE 处理组可以显著减少 3T3-L1 前脂肪细胞内脂肪含量 ( $p < 0.05$ )，其中 400 μg/mL LFBE 组细胞内脂肪含量只占模型组的 41%，仅比空白组多 14%。以上结果表明 LFBE 能显著抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化，且其抑制作用并非由于细胞毒性所致。

在本研究中，与 RBE 相比，LFBE 能有效抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟的脂肪细胞，推测是由于植物乳杆菌发酵大麦过程中，一些大分子物质被分解成具有活性的小分子物质，或是将结合态活性物质以游离态形式释放出来<sup>[8]</sup>，使其具备了抑制细胞分化的功能，该活性物质和作用机制还有待进一步研究。

#### 2.4 LFBE 对 3T3-L1 细胞脂代谢相关基因转录水平的调控

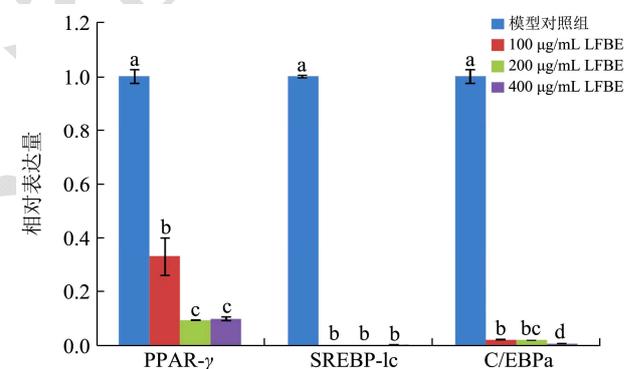


图 4 LFBE 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化相关转录因子基因表达的影响

Fig.4 Effect of LFBE on mRNA expression of genes associated with transcriptional regulation during differentiation of 3T3-L1 adipocytes

注：不同字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

过氧化物酶体增殖激活受体  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )、CAATT 增强子结合蛋白 (C/EBP $\alpha$ ) 和固醇调节元件结合蛋白 (SREBP-1c) 是前脂肪细胞分化的关键调节转录因子。图 4 显示的是利用 RT-PCR 检测 LFBE 对 3T3-L1 前细胞脂肪分化相关转录因子表达的影响。从图中可以看出，LFBE 可以显著下调 C/EBP $\alpha$  和 SREBP-1c 基因 mRNA 的表达量，100 μg/mL LFBE 处理组中，C/EBP $\alpha$  和 SREBP-1c 的表达量仅为模型组的 2% 和 1%，与模型对照组相比具有显著差异 ( $p < 0.05$ )；LFBE

还可以显著降低 PPAR- $\gamma$  的 mRNA 表达水平, 400  $\mu\text{g/mL}$  LFBE 处理组仅为模型组的 10%, 与模型对照组相比具有显著差异 ( $p < 0.05$ )。

脂肪细胞分化是一个精细反应过程, 需要多种转录因子的调控。其中, PPAR- $\gamma$ 、SREBP-1c 与 C/EBP $\alpha$  是脂肪细胞分化的关键调控因子<sup>[9]</sup>。C/EBP $\alpha$  和 PPAR- $\gamma$  的过表达可以诱导并加快脂肪细胞分化, 而 SREBP-1c 在前脂肪细胞分化早期发挥重要作用<sup>[10]</sup>。Popovich 等<sup>[11]</sup>研究表明 PPAR- $\gamma$  基因表达下调可能引起 3T3-L1 细胞内脂滴减少; Elberg G 等研究发现, C/EBP $\alpha$  与 PPAR- $\gamma$  具有相关性, 能相互激活转录, 当 C/EBP $\alpha$  缺乏时, 细胞中 PPAR- $\gamma$  的表达水平会降低, 从而无法形成脂肪细胞<sup>[12]</sup>。SREBP-1c 的表达也在一定程度上依赖于 PPAR- $\gamma$ <sup>[13]</sup>, SREBP-1c 可以通过加强 PPAR- $\gamma$  的转录活性, 增大被分化成脂肪细胞的比例<sup>[14]</sup>。研究结果表明, LFBE 可以显著抑制脂肪细胞中 C/EBP $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$  和 SREBP-1c 的 mRNA 表达, 从而一定程度抑制了前脂肪细胞的分化。

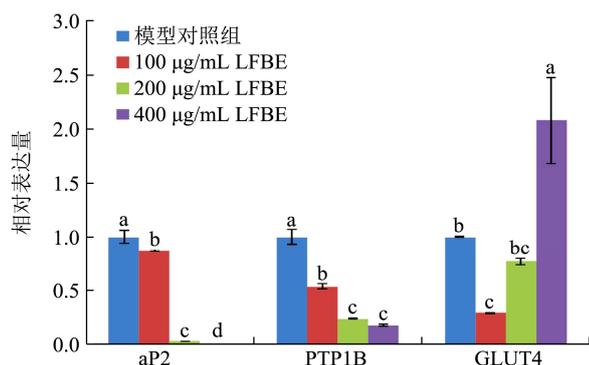


图5 LFBE对3T3-L1细胞脂肪代谢相关基因表达的影响

Fig.5 Effect of LFBE on mRNA expression of genes associated with lipid metabolism during differentiation of 3T3-L1 adipocytes

注: 不同字母表示差异显著( $p < 0.05$ )。

aP2 对饱和与不饱和长链脂肪酸具有很强的亲和力, 是 PPAR- $\gamma$  下游涉及到脂类储存并调节脂类代谢的靶基因, 与肥胖的发生密切相关<sup>[15]</sup>。如图5所示, 与模型对照组相比, 不同浓度 LFBE 均可显著下调细胞脂肪代谢相关基因脂肪酸结合蛋白 (aP2)、蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) mRNA 表达, 具有显著差异 ( $p < 0.05$ )。其中 200  $\mu\text{g/mL}$  LFBE 处理组能显著下调脂肪酸吸收基因 aP2 (为模型对照组的 3%) mRNA 表达水平; 400  $\mu\text{g/mL}$  LFBE 处理组对细胞脂肪代谢基因 PTP1B (为模型对照组的 17%) mRNA 表达具有显著抑制作用, 并能显著上调葡萄糖转运蛋白 GLUT4 (为模型对照组的 2 倍)mRNA 表达水平。因此, LFBE 能抑制脂肪酸吸收关键基因 aP2 的表达, 从而减少细胞对脂肪酸的吸收。

葡萄糖转运是糖异生、糖原合成和脂质合成的限速步骤, 而 GLUT4 是胰岛素敏感组织的主要葡萄糖转运蛋白, 主要存在于脂肪和肌肉组织, 在 2 型糖尿病、肥胖和胰岛素抵抗患者中均发现伴有 GLUT4 功能异常和葡萄糖转位障碍<sup>[16]</sup>。本研究发现, 与模型组相比, 400  $\mu\text{g/mL}$  LFBE 处理组能显著上调 GLUT4 mRNA 的表达量 ( $p < 0.05$ ), 表明高剂量 LFBE 能通过增加 GLUT4 mRNA 的表达来促进细胞中葡萄糖的转运, 改善胰岛素抵抗, 从而使细胞能量代谢正常进行, 最终减少脂肪的合成。

PTP1B 与胰岛素信号通路具有相关性, 它能使胰岛素信号衰减, 通过激活胰岛素受体以及胰岛素受体底物 (IRS)-1 脱磷酸两条途径负向调节胰岛素信号转导<sup>[17]</sup>。PTP1B 在细胞中的过度表达会抑制 GLUT4 的转位以及细胞对葡萄糖的摄取, 从而引发胰岛素抵抗。因此, 对 PTP1B 进行抑制有可能成为有效预防肥胖症的靶点。研究结果表明, LFBE 对 PTP1B 具有良好的抑制作用, 不同浓度的 LFBE 均能极显著下调 3T3-L1 前脂肪细胞中 PTP1B mRNA 的表达 ( $p < 0.05$ ), 激活胰岛素受体的信号通路, 促进 GLUT4 转位和细胞对葡萄糖的摄取, 减少成熟脂肪细胞内脂滴的数量, 从而使脂肪细胞缩小, 实现对肥胖的有效干预。

### 3 结论

LFBE 中总酚和蛋白质含量均显著高于 RBE。LFBE 能显著抑制 3T3-L1 细胞的分化, 减少前脂肪细胞分化关键基因 C/EBP $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  和 SREBP-1c 的 mRNA 表达量, 下调脂肪酸代谢基因 aP2 和 PTP1B 的 mRNA 表达, 上调 GLUT4 的 mRNA 表达。因而推测 LFBE 可通过调节脂代谢途径相关基因 mRNA 的表达, 减少脂肪细胞对脂肪酸的吸收及脂肪合成, 增强细胞对葡萄糖摄取与代谢, 从而抑制细胞内脂肪滴的生成。然而, LFBE 抑制前脂肪细胞分化的物质基础及其分子机制仍有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Sishi, Loos, Ellis, et al. Diet-induced obesity alters signalling pathways and induces atrophy and apoptosis in skeletal muscle in a prediabetic rat model [J]. *Experimental Physiology*, 2011, 96(2): 179-193
- [2] Ahn, Lee, Kim, et al. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 373(4): 545-549
- [3] Newman, Newman. Barley for food and health; science,

- technology, and products [M]. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc, 2008
- [4] Mcintosh, Whyte, McArthur, et al. Barley and wheat foods: influence on plasma cholesterol concentrations in hypercholesterolemic men [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1991, 5J: 1205-1209
- [5] Ahn, Do, Kim, et al. Antiobesity effect of kochujang (Korean fermented red pepper paste) extract in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2006, 9(1): 15-21
- [6] Bouayed, Hoffmann, Bohn. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: bioaccessibility and potential uptake [J]. *Food Chem.*, 2011, 128(1): 14-21
- [7] GB/T 5512-2008, 粮油检验粮食中粗脂肪含量测定[S]  
GB/T 5512-2008, Inspect of grain and oilseeds-determination of crude fat content in grain [S]
- [8] Hole, Rud, Grimmer, et al. Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus Reuteri* [J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60: 6369-6375
- [9] Kim, Choung. Inhibitory effects of aster spathulifolius extract on adipogenesis and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, 2015, 68(1): 107-118
- [10] Lefterova, Lazar. New developments in adipogenesis [J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2009, 20(3): 107-114
- [11] Popovich, Li Zhang. Bitter melon (*Momordica charantia*) triterpenoid extract reduces preadipocyte viability, lipid accumulation and adiponectin expression in 3T3-L1 cells [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(6): 1619-1626
- [12] Elberg, Gimble, Tsai. Modulation of the murine peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter activity by CCAAT/enhancer-binding proteins [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(36): 27815-27822
- [13] Ji, Doumit, Hill. Regulation of adipogenesis and key adipogenic gene expression by 1, 25-Dihydroxyvitamin D in 3T3-L1 cell [J]. *Plos One*, 2015, 10(7): 5495-5503
- [14] Xu, Wang, Chang, et al. Fucoidan from the sea cucumber *Acaudina molpadioides* exhibits anti-adipogenic activity by modulating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and down-regulating the SREBP-1c expression [J]. *Food & Function*, 2014, 5(7): 1547-1555
- [15] Zhou, Guo, Wang, et al. miR-20a regulates adipocyte differentiation by targeting lysine-specific demethylase 6b and transforming growth factor- $\beta$  signaling [J]. *International Journal of Obesity*, 2015, 39(8): 1-10
- [16] Liu, Li, Wu, et al. Vaspin promotes 3T3-L1 preadipocyte differentiation [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2015, 240(11): 885-892
- [17] Gum, Gaede, Koterski, et al. Reduction of protein tyrosine phosphatase IB increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice [J]. *Diabetes*, 2003, 52(1): 21-28