

# 桑椹及桑椹酒多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞增殖及分化的影响

游义琳, 盛启明, 张倩雯, 黄卫东, 战吉成

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘要:** 观察桑椹和桑椹酒多酚提取物对棕色脂肪细胞 BAT-cMyc 增殖的影响, 探讨桑椹和桑椹酒多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞棕色脂肪分化的效果。用不同浓度的桑椹和桑椹酒多酚提取物干预 BAT-cMyc 细胞 48 h。采用 MTT 比色法检测桑椹和桑椹酒多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞的生长抑制作用, 计算  $IC_{50}$ , 并实时荧光定量法测定细胞增殖相关基因 Ki67 及 PCNA 相对表达量。再通过桑椹和桑椹酒多酚提取物处理 BAT-cMyc 细胞, 直至分化第 6 d, 收集细胞。采用油红 O 染色法和实时荧光定量法对脂肪细胞分化效率进行分析。结果发现, 桑椹和桑椹酒多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞生长抑制的  $IC_{50}$  浓度分别为 186.37  $\mu\text{g/mL}$  和 158.78  $\mu\text{g/mL}$ , 且随着提取物浓度的升高对 BAT-cMyc 细胞的抑制增强。在浓度低于 10  $\mu\text{g/mL}$  时, 桑椹和桑椹酒多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞的增殖无影响, 却可以显著增加 BAT-cMyc 的脂肪细胞的分化和上调棕色脂肪细胞分化相关基因, 如 AP2 和 C/EBP $\delta$  等的表达。

**关键词:** 桑椹多酚提取物; 桑椹酒多酚提取物; BAT-cMyc 细胞; 增殖; 分化

文章编号: 1673-9078(2015)6-6-12

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.002

## The Effect of Mulberry Polyphenol Extract and Mulberry Wine Polyphenol Extract on Proliferation and Differentiation of BAT-cMyc Cells

YOU Yi-lin, SHENG Qi-ming, ZHANG Qian-wen, HUANG Wei-dong, ZHAN Ji-cheng

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** The effects of mulberry polyphenol extract (MPE) and mulberry wine polyphenol extract (MWPE) on the proliferation and differentiation of brown adipose tissue (BAT)-cMyc cells were investigated in this study. After treatment of BAT-cMyc cells with different concentrations of MPE and MWPE for 48 hours, the cells were collected, the growth inhibition effect of MPE and MWPE on BAT-cMyc cells was determined by MTT assay, and the  $IC_{50}$  values were calculated. The relative expressions of genes associated with cell proliferation, such as Ki67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), were detected by real-time polymerase chain reaction (PCR). BAT-cMyc cells were then treated with MPE and MWPE until the sixth day of differentiation. Cells were collected and the efficiency of adipocyte differentiation was measured by Oil Red O staining and real-time PCR. The results showed that the  $IC_{50}$  value of BAT-cMyc cells was 186.37  $\mu\text{g/mL}$  for MPE and 158.78  $\mu\text{g/mL}$  for MWPE. Furthermore, growth of BAT-cMyc cells was inhibited in a dose-dependent manner. MPE and MWPE had no effect on BAT-cMyc cell proliferation, but could significantly increase the efficiency of the differentiation of BAT-cMyc cells into adipocytes and upregulate the expression levels of brown adipocyte differentiation-related genes, such as AP2 and C/EBP $\delta$ , during brown adipogenesis.

**Key words:** mulberry polyphenol extract; mulberry wine polyph

桑椹(*Morus alba*), 又名桑椹子、桑果、桑子, 是桑科桑属植物的果实。它是一种既可鲜食, 又可入药的中国传统水果, 因此国家卫生部把桑椹列为“既是

收稿日期: 2014-08-30

基金项目: 公益性行业(农业部)科研专项(201303073); 国家“十二五”科技支撑计划(2012BAD31B07)

作者简介: 游义琳(1983-), 女, 博士研究生, 研究方向为果酒酿造与其功能成分分析

通讯作者: 战吉成(1972-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为葡萄栽培与酿造

食品又是药品”的农产品之一。现代食品营养学及药理学等研究证明, 桑椹果实除含有糖、氨基酸、维生素和矿物质等丰富的营养物质之外, 还含有多种有效活性物质, 如活性多糖、有机酸、生物碱、白藜芦醇、原花青素、花色苷等<sup>[1-2]</sup>。正是由于这些活性物质, 桑椹显示出多种对人体有益的药理作用, 如消除炎症、抗氧化应激、改善心血管功能、预防阿尔茨海默氏病、延缓衰老、抗癌、降血糖血脂和抗肥胖等功效<sup>[3-5]</sup>。

从解剖学角度来看, 人类和小型哺乳动物的脂肪组织可分为三种不同类型: 内脏白色脂肪组织、皮下

白色脂肪组织和棕色脂肪组织 (Brown adipose tissue, BAT)<sup>[6]</sup>。不同于储存能量的白色脂肪组织,棕色脂肪组织在人类婴儿和小型哺乳动物体内起着燃烧能量,保持体温稳定的作用<sup>[7]</sup>。此外,棕色脂肪还可以调节血糖和分泌一些棕色脂肪因子 Batokine 以调节全身的能量代谢<sup>[8]</sup>。据估计,在充分激活棕色脂肪时,仅仅 50 g 的棕色脂肪所消耗的能量占人体基础代谢能量达 20% 之多<sup>[9]</sup>。小鼠模型的实验结果表明,棕色脂肪活性的缺失会导致肥胖和胰岛素抵抗的发生<sup>[10]</sup>。肥胖个体较正常者棕色脂肪活性明显减少,该现象证实了棕色脂肪在人体代谢过程中起着重要作用<sup>[9]</sup>。

功能性棕色脂肪在成人体内的存在和其潜在的治疗作用激发了国内外研究者对棕色脂肪功能的激活及调控机制的研究热情。调控棕色脂肪激活的因素很多,而已知的方法都是采用增强体内棕色脂肪功能和活性的方法,但这可能会带来血压上升以及心率加快等多种副作用。因此寻找一个安全有效的激活棕色脂肪的方法成为研究热点。然而作为具有多种生理活性的桑椹多酚是否会对棕色脂肪的激活产生作用目前还未有研究报道,因此本研究将采用桑椹和桑椹酒多酚处理棕色脂肪细胞,采用 MTT 比色法、油红 O 染色法及对相关基因的实时荧光定量等方法来研究桑椹和桑椹酒多酚对棕色脂肪细胞增殖和分化的影响,进而为探求一个安全有效的激活棕色脂肪的方法提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

小鼠棕色脂肪细胞 BAT-cMyc 细胞由中国科学院动物研究所动物生态与保护重点实验室提供。本研究以桑椹果实和桑椹酒为原材料,经过醇提和过大孔树脂脱糖脱蛋白的方法而制备桑椹果实多酚和桑椹酒多酚,其中所用的桑椹果实均是产自江苏省句容市的桑果 1 号,且桑椹酒于中国农业大学葡萄酒科技发展中心实验室发酵酿制而成。

### 1.2 试验试剂与设备

#### 1.2.1 试验试剂

Amberlite XAD-7 大孔树脂、没食子酸(HPLC 级别)、四甲基偶氮唑蓝 (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT)、十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfonate, SDS)、二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、多聚甲醛、1-甲基-3-异丁基黄嘌呤(1-Methyl-3-Isobutylxanthine, IBMX)、地塞

米松(dexamethasone, DEX)、胰岛素、吲哚美辛(Indomethacin)、三碘甲状腺原氨酸(3,3',5'-Triiodo-L-thyronine, T<sub>3</sub>)、油红 O、DEPC 水等试剂为美国 Sigma 公司产品。DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)、青霉素/链霉素(100 U/mL)溶液、胰蛋白酶(0.25% *m/V*, 0.52 mM EDTA)为美国 Gbico 公司产品。TRIZOL、逆转录试剂盒购自上海英骏生物技术有限公司。SYBR Green Master Mix 为 Promega 公司产品。无水乙醇、浓硫酸、氯仿、异丙醇等均产自北京化学试剂厂。

#### 1.2.2 试验仪器

UV-1800 紫外分光光度计,日本岛津公司;全波长酶标仪,美国 Thermo Fisher 公司;细胞生化培养箱,日本 SANYO 公司;台式离心机,德国 Eppendorf 公司;PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;荧光定量 PCR 仪,美国 ABI 公司;荧光显微镜,德国 Leica 公司;NanoDrop 2000C 微量分光光度计,美国 Thermo Fisher 公司;高压蒸汽灭菌锅,北京发恩科贸有限公司;移液器,德国 Eppendorf 公司。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 桑椹和桑椹酒多酚提取物制备及纯化

桑椹多酚提取物制备及纯化:称取 200 g 新鲜桑椹果实,破碎,按料液比 1:10 加入 95%乙醇,并调整 pH 值为 3.5,于 100 Hz,35 °C 超声 30 min,然后用布氏漏斗抽滤,收集滤液。残渣继续添加 95%乙醇(料液比 1:10, pH 值为 3.5)进行超声萃取,残渣如此反复萃取 2 次,合并 3 次滤液。将滤液于台式离心机,2750 r/min 离心 20 min,收集上清液,40 °C 真空浓缩得浓缩液。将浓缩液上样于活化后的 XAD-7 大孔树脂,并用 pH 值为 3.5 的蒸馏水冲洗柱子,以脱除醇提取物中蛋白质和糖,再用 pH 值为 3.5 的无水乙醇洗脱下 XAD-7 大孔树脂吸附的桑椹多酚物质,经过 40 °C 真空浓缩和冷冻干燥得到桑椹多酚纯化物,储存于 -40 °C 备用。

桑椹酒多酚提取物制备及纯化:将 1 L 桑椹酒 2750 r/min 离心 20 min,收集上清液,40 °C 真空浓缩得桑椹酒浓缩液。然后将浓缩液经过 XAD-7 大孔树脂以去除蛋白质和糖,最后于 40 °C 真空浓缩和冷冻干燥得到桑椹酒多酚纯化物,储存于 -40 °C 备用。

### 1.3.2 桑椹和桑椹酒多酚提取物成分分析

总酚含量测定:采用 Folin-Ciocalteu 比色法测定桑椹和桑椹酒多酚提取物中总酚的含量,以没食子酸为标准品作标准曲线,样品的总酚以没食子酸的含量

表示, 单位为 mg/g。

总糖含量测定: 桑椹和桑椹酒多酚提取物中所含总糖的量的采用蒽酮-硫酸法, 以葡萄糖为标准品制作标准曲线, 样品的总糖含量以葡萄糖的含量表示, 单位为 mg/g。

蛋白质含量测定: 采用凯氏定氮法测定桑椹和桑椹酒多酚提取物中蛋白质含量, 以 mg/g 计。

油脂含量测定: 采用索氏抽提法测定桑椹和桑椹酒多酚提取物中油脂含量, 以 mg/g 计。

水分含量测定: 将桑椹和桑椹酒多酚提取物样品于  $103 \pm 2$  °C 下干燥 24 h, 后置于干燥器中冷却, 称重, 直至恒重后确定, 样品的失重即为水分含量, 以 mg/g 计。

### 1.3.3 桑椹和桑椹酒多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞毒性检测 (MTT 法)

#### 1.3.3.1 溶液配制

避光称取 MTT 充分溶解于 PBS 溶液中, 配制成 5 mg/mL 的 MTT 储备液, 锡纸包裹 4 °C 避光保存, 使用前储备液用细胞培养液 DMEM 稀释为 0.5 mg/mL 的 MTT-DMEM 溶液。

称取桑椹和桑椹酒多酚提取物, 用 DMSO 充分溶解, 然后用 DMEM 培养溶液将桑椹和桑椹酒多酚提取物稀释到浓度为 1000  $\mu\text{g/mL}$ , 经过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌后, 再进行试验。配置好的分别含有桑椹多酚和桑椹酒多酚的培养基在试验中直接加入培养板个孔中。

#### 1.3.3.2 MTT 试验

将对数生长期的 BAT-cMyc 细胞消化, 至终止胰蛋白酶反应, 轻柔地将培养皿中的细胞悬液吹打均匀, 制成细胞悬液。取 96 孔培养板, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液, 使每孔的 BAT-cMyc 细胞浓度均匀, 为  $1 \times 10^5$  个/mL。将 96 孔板置于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中进行贴壁培养。48 h 后弃去培养基, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  含有不同浓度的桑椹和桑椹酒多酚提取物的培养基 (12.5~1000  $\mu\text{g/mL}$ ), 以加入只含等体积的 DMSO 的培养基为对照组, 培养箱孵育 48 h。小心吸除培养液后, 加入 0.5 mg/mL MTT-DMEM 溶液避光孵育 4 h, 再加入 100  $\mu\text{L}$  10% SDS (含 0.1 M HCl) 避光孵育过夜, 以完全溶解出 MTT 紫色结晶产物。用酶标仪在 570 nm 处 (以 630 nm 为参考波长) 测定吸光度值。试验重复 3 次, 4 个平行测定。以 BAT-cMyc 细胞存活率与提取物浓度的对数进行直线回归并求出  $\text{IC}_{50}$  (半数抑制率, 细胞存活率为 50% 时所需要的提取物的浓度), 应注意需要选择可以使回归直线线性最好的 5 个点进行作图<sup>[12]</sup>。

$$\text{细胞存活率} / \% = (A_{\text{样品}570\text{nm}} - A_{\text{样品}630\text{nm}}) / (A_{\text{对照}570\text{nm}} - A_{\text{对照}630\text{nm}})$$

### 1.3.4 BAT-cMyc 细胞诱导分化

BAT-cMyc 细胞的分化方法参考 Fasshauer 等<sup>[13]</sup>的方法。BAT-cMyc 细胞以  $5 \times 10^4$  个/mL 的浓度接种在 12 孔板内, 每孔 1 mL。待细胞贴壁 2 d 后, 换为含有适量浓度的桑椹和桑椹酒多酚提取物的棕色脂肪分化培养基 (DMEM high+10% FBS +0.02  $\mu\text{M}$  insulin+ $1 \times 10^{-3}$   $\mu\text{M}$  T3)。2 d 后 (记为第 0 d), 换液为含有适量浓度的桑椹和桑椹酒多酚提取物的棕色脂肪诱导培养基 (DMEM high+10% FBS+0.02  $\mu\text{M}$  insulin+ $1 \times 10^{-3}$   $\mu\text{M}$  T3+0.125 mM indomethacin+0.5 mM IBMX+2  $\mu\text{g/mL}$  Dex)。两天后 (记为第 2 d), 换为含有适量浓度的桑椹和桑椹酒多酚提取物的棕色脂肪分化培养基, 并在第 4 d 再次换液。第 6 d, 倒置显微镜下观察细胞质内出现明显脂肪滴, 即分化完成。

### 1.3.5 油红 O 染色及脂肪测定

#### 1.3.5.1 油红 O 染色

待 BAT-cMyc 细胞分化棕色脂肪细胞的第 6 d, 观察细胞, 已出现明显脂肪滴, 且分化率已达 90% 以上, 进行油红 O 染色和拍照。

参照 Maeda 等<sup>[14]</sup>的方法对脂肪细胞进行油红 O 染色。取 0.7 g 油红 O 溶于 200 mL 异丙醇, 震荡均匀, 再经 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤, 配得油红 O 储备液, 于 4 °C 保存。取 30 mL 油红 O 储备液与 20 mL 蒸馏水混匀, 室温放置 20 min, 再经 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤, 得到油红 O 工作液。

将经过桑椹和桑椹酒多酚提取物处理分化好的棕色脂肪细胞进行油红 O 染色, 测定脂肪含量的变化。小心吸除培养液, 用 PBS 缓冲液润洗细胞层后, 加入 1 mL 4% 多聚甲醛溶液, 覆盖细胞层, 室温放置 5 min。除去溶液, 再用 1 mL 4% 多聚甲醛溶液固定细胞层, 37 °C 温箱孵育 1 h。吸除溶液, 用 60% 异丙醇溶液润洗细胞层, 室温放置直至溶液挥发完全。个孔加入 1 mL 油红 O 工作液, 室温放置 10 min。除去孔内的染色液, 并用蒸馏水充分洗净孔内及孔壁多余染色液, 室温放置培养板直至完全干燥, 于显微镜下观察并拍照。

#### 1.3.5.2 脂肪含量测定

提取 1.3.5.1 中脂肪细胞中的油红 O 色素, 测定其吸光度, 间接反映脂肪含量, 进而显示不同处理对 BAT-cMyc 细胞分化效果的影响。向各孔加入 1 mL 100% 异丙醇, 室温放置 10 min 以全部溶解出油红 O 色素, 于 500 nm 下测定溶液的吸光度。以 100% 异丙醇为孔板对照。

### 1.3.6 细胞总 RNA 的提取及逆转录合成

cDNA

1.3.6.1 总 RNA 提取

采用 Trizol 法提取 BAT-cMyc 细胞的总 RNA。

1.3.6.2 总 RNA 浓度及纯度的测定

取 1 μL 溶解好的 RNA 溶液，置于分光光度仪上测定 260 nm 吸光度值，同时测定 260 nm/280 nm 值，其比值应该保证在在 1.8~2.0 之间。

1.3.6.3 逆转录总 RNA 合成 cDNA

根据购自上海英骏生物技术有限公司的逆转录试剂盒程序合成 cDNA，保存于 -20 °C 冰箱。

1.3.7 实时荧光定量 PCR 反应 (qRT-PCR)

根据 NCBI 提供的基因序列，通过在线引物设计网站“NCBI Primer-BLAST”设计引物序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)，引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。并根据为美国 Promega 公司 SYBR Green Master Mix 试剂盒提供程序进行实时荧光定量 PCR 反应。分析扩增效率，根据 PCR 扩增曲线得到的 Ct 值，采用 2<sup>-ΔCt</sup> 法进行相对定量。以 CyclophilinA 作为内参基因，计算检测目的基因的 mRNA 的相对表达量。本文涉及的荧光实时定量的小鼠基因及其上下游引物序列如下表所示：

基因名称	上游引物序列	下游引物序列
CyclophilinA	CAAATGCTGGACCAACACA	GCCATCCAGCCATTCACTCT
Ki67	GTCCATAAAGACCTTTTCAGCCA	ATGTCCTCGTTTCCGATTATAGC
PCNA	TTTGAGGCACGCCTGATCC	GGAGACGTGAGACGAGTCCAT
AP2	GAAGACTGCGAGGACCTC	GAAGTGCCGTAATCCCCACAC
C/EBPα	GCGGGAACGCAACAACATC	GTCACTGGTCAACTCCAGCAC
C/EBPβ	TGACGCAACACACGTGTAAGT	AACAACCCCGCAGGAACAT
C/EBPδ	CGACTTCAGCGCCTACATTGA	GAAGAGGTCGCGAAGAGTT
PPARγ2	TCGCTGATGCACTGCCTATG	GAGAGGTCCACAGAGCTGATT

1.4 数据分析

每个试验重复 3 次，结果以  $\bar{x} \pm SD$  表示，方差分析和 Tukey's 相关性分析采用 SPSS 16.0 统计分析软件包，图表采用 EXCEL 2013 绘制。

2 结果与讨论

2.1 桑椹和桑椹酒多酚提取物成分分析

表 1 桑椹和桑椹酒多酚提取物中各组分含量

Table 1 Composition analysis of MPE and MWPE

成分名称	桑椹多酚提取物/(mg/g)	桑椹酒多酚提取物/(mg/g)
总酚	696.51±33.90	876.23±36.11
总糖	46.53±5.12	19.53±2.34
总蛋白质	10.11±1.30	31.52±3.83
油脂	11.43±1.51	3.40±0.73
水分	37.22±3.23	28.62±2.64

采用 Folin-Ciocalteu 方法测定桑椹和桑椹酒多酚提取物的总酚含量，利用 XAD-7 大孔树脂洗脱出提取物中的蛋白质和糖进行分析测定。桑椹和桑椹酒多酚提取物中含有的主要化学成分分析结果见表 1。如表所示，两种提取物中多酚是主要成分，其中桑椹和桑椹酒多酚提取物中所含多酚的量分别为 696.51 mg/g、876.23 mg/g，此外还含有少量的糖、蛋白质、

油脂以及水分。由表 1 还可知，虽然桑椹和桑椹酒多酚提取物所有的原材料均是同一产地、同一品种、同一批的桑椹果实，且提取方法和纯化方法也一致，但提取物的各组分比例有所差异，桑椹酒提取物中所含的总酚含量多于桑椹提取物，说明经过酵母代谢之后发生了改变。

2.2 桑椹和桑椹酒多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞的生长抑制

桑椹和桑椹酒多酚提取物均对 BAT-cMyc 细胞有明显的生长抑制作用，如图 1A 所示。由图可知，随着桑椹和桑椹酒多酚提取物浓度的升高，其对 BAT-cMyc 细胞的抑制能力越强，剂量效应关系明显，细胞存活率从 100% 降至 10% 以下。结果显示，桑椹提取物和桑椹酒多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞的毒性有一定的差异，在 12.5 μg/mL 的浓度以内，桑椹多酚提取物不但对 BAT-cMyc 细胞没有毒性，反而有促进其生长的趋势，而桑椹酒多酚提取物却没有表现出此效果。

以细胞存活率与提取物浓度的对数进行直线回归，并作图求出 IC<sub>50</sub>，如图 1B 所示。桑椹和桑椹酒多酚提取物与 BAT-cMyc 细胞存活率对数直线方程分别为， $y = -51.67x + 167.31$ ， $R^2 = 0.9359$ ， $y = -63.35x + 189.41$ ， $R^2 = 0.9699$ 。经计算，得桑椹

和桑椹酒多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞生长抑制的 IC<sub>50</sub> 浓度分别为 186.37 μg/mL 和 158.78 μg/mL, 由此可知, 桑椹多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞的生长抑制的 IC<sub>50</sub> 比桑椹酒多酚提取物高, 也说明桑椹多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞的毒性较桑椹酒多酚提取物低。

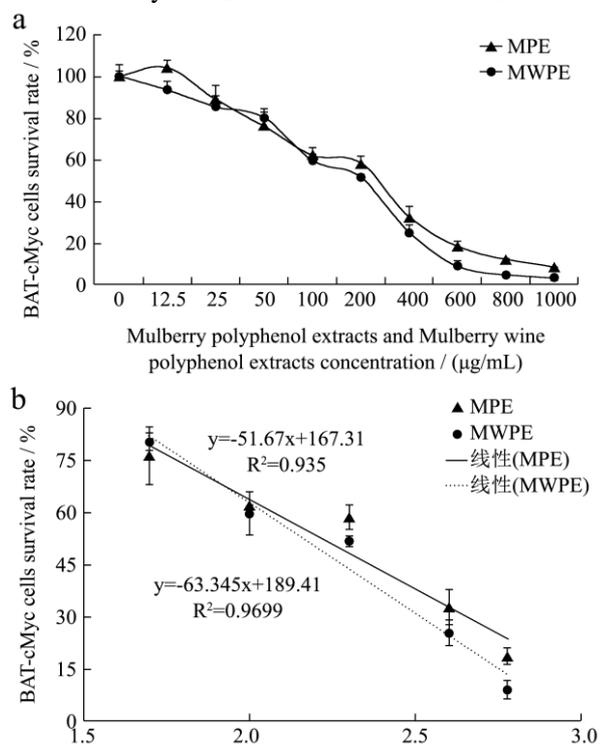


图1 桑椹和桑椹酒多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞生长抑制作用的剂量关系 (a) 及 BAT-cMyc 细胞存活率与桑椹和桑椹酒多酚提取物浓度对数的回归直线 (b)

Fig.1 Effect of MPE and MWPE on BAT-cMyc cell growth inhibition (a). Linear curve of BAT-cMyc cell viability against logarithm of MPE and MWPE concentration (b)

### 2.3 桑椹和桑椹酒多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞增殖的影响

Ki67 是一细胞增殖相关抗原, 自 1983 年 Gerdes 发现以来, 被证实与细胞增殖及肿瘤预后密切相关, 目前应用最广泛的增殖细胞标记之一。增殖细胞核抗原 (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA), 因其存在于增殖性细胞 (包括增殖细胞及癌细胞) 中而得名, 经研究发现 PCNA 与细胞 DNA 合成关系密切, 在细胞增殖的启动上起着作用。

通过 2.2 中的结果可知, 桑椹和桑酒多酚提取物均对 BAT-cMyc 细胞的生长有抑制作用, 为了探索这两种多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞增殖的影响, 以寻找后续试验的合适处理浓度, 于是采用不同浓度的桑椹和桑酒多酚提取物处理 BAT-cMyc 细胞, 然后在

BAT-cMyc 细胞生长对数期收集细胞, 通过实时荧光定量分析不同处理组的 BAT-cMyc 细胞 Ki67 和 PCNA 的 mRNA 相对表达量, 结果如图 2 所示。由图 2 的 A 和 B 可知, 与对照组相比, 在浓度为 10 μg/mL 以内, 桑椹和桑酒多酚提取物均对 BAT-cMyc 细胞的 Ki67 和 PCNA 两种基因的表达无显著影响 (p>0.05); 在 50 μg/mL 桑椹和桑椹酒多酚提取物处理的 2 组中, Ki67 和 PCNA 的表达与对照组相比虽然无显著差异, 然而已经显示出明显的下调趋势, 于是后续试验选用桑椹和桑椹酒多酚提取物浓度为 10 μg/mL。

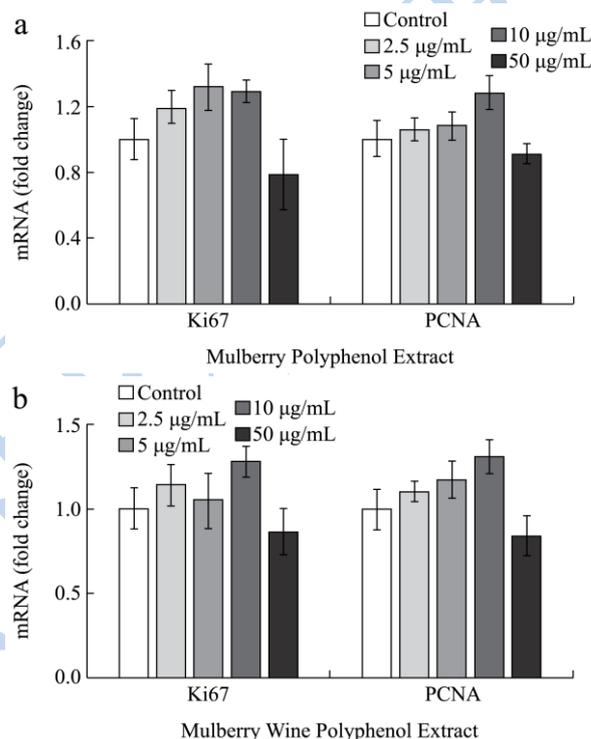


图2 桑椹和桑酒多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞增殖的影响  
Fig.2 Effect of MPE and MWPE on BAT-cMyc cell proliferation

### 2.4 桑椹和桑椹酒多酚提取物促进 BAT-cMyc 细胞的分化

细胞的分化

分别用 10 μg/mL 桑椹和桑酒多酚提取物处理 BAT-cMyc 细胞 (用等体积 DMSO 处理为对照), 进行棕色脂肪细胞分化, 第 6 d 进行油红 O 染色, 并拍照, 如图 3a 所示。从图 3a 可知, 经过桑椹和桑椹酒多酚提取物处理的 BAT-cMyc 细胞被染色的脂肪含量明显多于对照组。提取油红 O 色素并测定含量, 结果如图 3b 所示, 如图可知, 经过提取物处理的两组的吸光度在 0.31 左右, 均显著大于对照组的吸光度 0.26, 说明经过桑椹和桑椹酒多酚提取物处理的 BAT-cMyc 细胞内脂肪含量显著高于对照组 (p<0.05), 进一步表明桑椹和桑椹酒多酚提取物促进 BAT-cMyc 细胞的分

化。

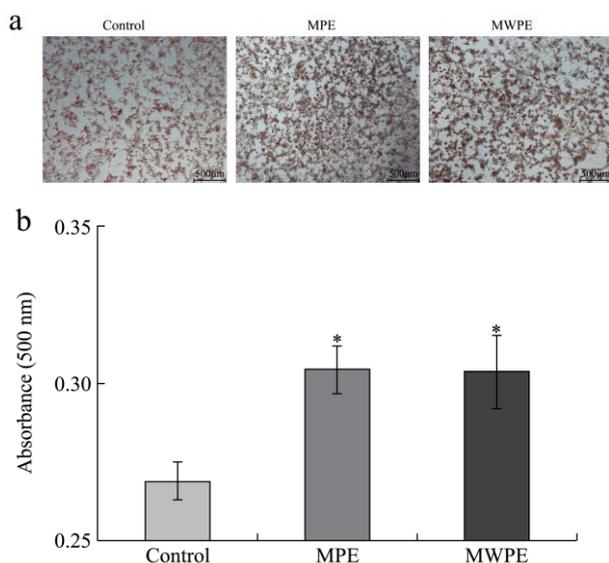


图3 BAT-cMyc 细胞油红 O 染色图 (a) 及桑椹和桑酒多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞脂肪含量的影响 (b)

Fig.3 Oil Red O staining map of BAT-cMyc cells (a). Effect of MPE and MWPE on lipid content in BAT-cMyc cells (b)

## 2.5 桑椹和桑椹酒多酚提取物上调 BAT-cMyc

细胞的分化相关基因的表达

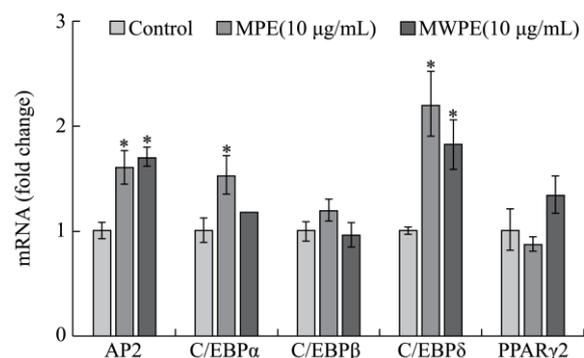


图4 桑椹和桑椹酒多酚提取物上调 BAT-cMyc 细胞分化相关基因的表达

Fig.4 MPE and MWPE upregulate the expression of differentiation-related genes during the differentiation of BAT-cMyc cells into mature adipocytes

通过油红 O 染色和测定其中脂肪含量的试验均表明桑椹和桑椹酒多酚提取物促进了 BAT-cMyc 细胞的棕色脂肪细胞的分化, 为了进一步证实桑椹和桑椹酒多酚提取物对棕色脂肪细胞分化的促进效果, 于是收集经过桑椹和桑椹酒多酚提取物处理且正处于 BAT-cMyc 细胞分化第 6 d 的细胞样品, 对其与棕色脂肪细胞分化程度呈正相关的五个基因 AP2、C/EBPα、C/EBPβ、C/EBPδ 及 PPARγ2 的 mRNA 相对表达量进

行分析, 结果如图 4 所示。由图 4 可知, 桑椹多酚提取物显著上调 BAT-cMyc 细胞的 AP2、C/EBPα 和 C/EBPδ 三个基因的表达 ( $p < 0.05$ ), 而对 C/EBPβ 和 PPARγ2 两个基因无显著影响; 而桑椹酒多酚提取物则显著上调 AP2 和 C/EBPδ 两个基因的表达 ( $p < 0.05$ ), 对 C/EBPα、C/EBPβ 和 PPARγ2 两个基因无显著影响。

## 2.6 讨论

调控棕色脂肪激活的因素较多且复杂, 目前已有研究报道的相关途径有寒冷暴露、交感神经输入、儿茶酚胺类神经递质、β-肾上腺素受体、甲状腺激素、细胞因子以及一些小分子化合物刺激等<sup>[7, 11]</sup>。且这些已有的能增强体内棕色脂肪功能和活性的方法都或多或少会给机体带来副作用。目前还未见植物多酚提取物对棕色脂肪影响的研究报道, 而经过本试验研究发现, 桑椹和桑椹酒多酚提取物的浓度低于 10 μg/mL 时, 对 BAT-cMyc 细胞的增殖无影响, 却可以显著增加 BAT-cMyc 的脂肪细胞的分化和上调棕色脂肪细胞分化相关基因, 如 AP2 和 C/EBPδ 等的表达 (如图 4 所示), 这表明桑椹和桑椹酒多酚可能会对棕色脂肪的功能和活性产生作用。已有文献表明桑椹提取物对肥胖、高血糖、高血压、高血脂、糖尿病及其代谢相关疾病有缓解作用, 然而一直以来桑椹多酚提取物的这些作用机制尚未可知<sup>[3~5]</sup>, 因此通过研究桑椹及桑椹酒多酚提取物对棕色脂肪增殖与分化的作用, 可以为确定这些有益的效果是否与棕色脂肪功能相关提供理论依据。

早在 1993 年, 国家卫生部已将桑椹列为“既是食品又是药品”的农产品之一。现代食品营养学及药理学等研究表明, 桑椹果实除含有糖、氨基酸、维生素和矿物质等丰富的营养物质之外, 还含有多种有效活性物质, 如活性多糖、有机酸、生物碱、白藜芦醇、原花青素、花色苷等<sup>[1-2]</sup>。尤其是其中的白藜芦醇已被多次研究报道具有抗癌、延缓衰老、改善高胰岛素血症和血脂异常等功能; 此外, 桑椹中富含矢车菊素-3-氧-葡萄糖苷和矢车菊素-3-氧-芸香苷等花色苷, 而这些花色苷也具有抗氧化、抗炎、抗癌、改善肥胖及对糖尿病和代谢相关疾病有缓解作用<sup>[4-5]</sup>。然而白藜芦醇、花色苷等多酚物质是否对棕色脂肪的分化有促进作用还未有研究报道, 且本试验所采用的桑椹和桑椹酒多酚提取物具体成分也未可知, 因此进一步需要对桑椹和桑椹酒多酚提取物中的单体、含量及这些单体对棕色脂肪分化、功能和活性进行研究。

## 3 结论

桑椹和桑椹酒多酚提取物上调 BAT-cMyc 细胞分化相关基因的表达, 促进其棕色脂肪细胞的分化。桑椹和桑椹酒多酚可能为安全有效的激活棕色脂肪提供新的方法, 然而桑椹和桑椹酒多酚提取物是否能增强体内棕色脂肪的功能和活性还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Ercisli S, Orhan E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits [J]. Food Chemistry, 2007, 103(4): 1380-1384
- [2] Pawlowska Am, Oleszek W, Braca A. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(9): 3377-3380
- [3] Tong H K, Jin Y H, Hyun B K, et al. Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia [J]. Neuroscience Letters, 2006, 39(1): 168-172
- [4] WU X, LIANG L, ZOU Y, et al. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) [J]. Food Chemistry, 2011, 129(2): 443-453
- [5] D A Villa G, Ianiro G, Mangiola F, et al. White mulberry supplementation as adjuvant treatment of obesity [J]. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 2014, 28(1): 141-145
- [6] Tseng Y H, Kokkotou E, Schulz T J, et al. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure [J]. Nature, 2008, 454(7207): 1000-1004
- [7] Orava J, Nuutila P, Lidell M E, et al. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin [J]. Cell Metabolism, 2011, 14(2): 272-279
- [8] Hondares E, Iglesias R, Giralt A, et al. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(15): 12983-12990
- [9] 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
- [10] Stanford K I, Middelbeek R J, Townsend K L, et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity [J]. Journal of Clinical Investigation, 2013, 123(1): 215-223
- [11] Diepvens K, Westerterp K R, Westerterp -Plantenga M S. Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin, and green tea [J]. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2007, 292(1): 77-85
- [12] LIU J, ZHANG W, JING H, et al. Bog bilberry (*Vaccinium uliginosum* L.) extract reduces cultured Hep-G2, Caco-2, and 3T3-L1 cell viability, affects cell cycle progression, and has variable effects on membrane permeability [J]. Journal of Food Science, 2010, 75(3): 103-107
- [13] Fasshauer M, Klein J, Kriauciunas K M, et al. Essential role of insulin substrate 1 in differentiation of brown adipocytes [J]. Molecular and Cellular Biology, 2001, 21(1): 319-329
- [14] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, et al. Fucoxanthin and its metabolite, fucoxanthinol, suppress adipocytes differentiation in 3T3-L1 cells [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2006, 18(1): 147-152