糖摄取也显著增加[8]。本课题组的细胞实验也表明，亮氨酸可显著增强原代培养大鼠骨骼肌细胞的葡萄糖摄取能力[10,11]。在亮氨酸干预的高脂小鼠，肝脏葡萄糖－6－磷酸酶（G6P）的表达及胰高血糖素的水平均较低，肝脏糖异生作用显著降低。因此，在本实验条件下，亮氨酸补充是否通过调控肝脏和骨骼肌的葡萄糖代谢从而改善胰岛素抵抗，具体机制如何，尚待进一步深入的研究。

参考文献

[1] Eckel, R. H., A new look at dietary protein in diabetes. Am J Clin Nutr, 2003. 78 (4): p. 671－2.

[2] Layman, D. K., Walker, D. A., Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. J Nutr, 2006. 136 (1 Suppl): p. 319S－23S.

[3] 赵剑虹，杨柳桦，李永新，et al.，柱前衍生－高效液相色谱法测定大熊猫血清中 18 种游离氨基酸．分析试验室，2007（11）：p. 15－19.

[4] Hinault, C., E. Van Obberghen, and I. Mothe-Satney, Role of amino acids in insulin signaling in adipocytes and their potential to decrease insulin resistance of adipose tissue. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2006. 17 (6): p. 374－378.

[5] Cota, D., Proulx, K, Smith, K. A., et al., Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. Science, 2006. 312 (5775): p. 927－30.

[6] Zhang, Y. G., K, LeBlanc, R. E., et al., Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. Diabetes, 2007. 56 (6): p. 1647－54.

[7] Balage, M., Dupont, J, Mothe-Satney, I., et al., Leucine supplementation in rats induced a delay in muscle IR/PI3K signaling pathway associated with overall impaired glucose tolerance. J Nutr Biochem, 2011. 22 (3): p. 219－26.

[8] Zeanandin, G. B., M, Schneider, S. M., et al., Differential effect of long-term leucine supplementation on skeletal muscle and adipose tissue in old rats: an insulin signaling pathway approach. Age (Dordr), 2011.

[9] Vodenik, B., J. Rovira, and J. M. Campistol, Mammalian Target of Rapamycin and Diabetes: What Does the Current Evidence Tell Us? Transplantation Proceedings, 2009. 41 (6): p. S31－S38.

[10] Martin Krssak, M. R., The Role of Lipid Accumulation in Liver and Muscle for Insulin Resistance. Intracellular Triglycerides and Insulin Action, 2004. 5: p. 127－134.

[11] 刘锐，郝丽萍，李想，et al. 亮氨酸对原代培养大鼠骨骼肌细胞葡萄糖摄取及胰岛素信号传导关键分子 AKT 表达的影响．2010. 营养学报．

不同脂肪酸对 3T3-L1 脂肪细胞脂联素及 PPARγ 基因表达的影响

林杰义　张　奕　罗　伟　查龙应　毛丽梅

（南方医科大学公共卫生与热带医学学院营养与食品卫生学系，广州 510515）

摘　要：目的　用不同种类、不同浓度的脂肪酸分别处理体外培养的 3T3-L1 成熟脂肪细胞，观察不同脂肪酸处理前后脂联素及 PPARγ 基因 mRNA 的表达水平，并观察其两者之间是否存在相互关系。**方法**　运用实时荧光定量 PCR 方法检测体外培养并诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞经一定浓度脂肪酸处理前后脂联素及 PPARγ 基因 mRNA 的表达水平。**结果**　棕榈酸（PA）在低浓度（25μmol/L）时能明显上调脂联素及

PPARγ mRNA 的表达，比对照组增加 53%（$P<0.05$），其余浓度均呈表达下降；油酸（OA）和亚油酸（LA）则在浓度为 25μmol/L 、50μmol/L、100μmol/L 时上调脂联素及 PPARγ mRNA 的表达，在 50μmol/L 时上调作用最为明显，随着浓度的继续增加脂联素的表达下降，呈剂量依赖关系，浓度越高，表达越低。**结论** 油酸和亚油酸在一定浓度范围内能上调 3T3-L1 脂肪细胞脂联素及 PPARγ 基因表达。棕榈酸主要表现为对脂联素表达的抑制作用，但在很低浓度（25μmol/L）时也上调脂联素表达；脂联素基因表达与 PPARγ 基因表达相关。

关键词：脂肪酸；脂联素；PPARγ；基因表达；脂肪细胞

Effects of different fatty acid on expression of adiponectin and PPARγ mRNA in 3T3-L1 adipocytes

Lin Jie-yi　Zhang Yi　Luo Wei　Zha Long-ying　Mao Li-mei

（Department of Nutrition and Food Hygiene，School of Public Health and Tropical Medicine，Southern medical Unicersity，Guangzhou 510515，China）

Abstract：**Objective** To study the effects of different fatty acid on the gene expression of adiponectin and PPARγ in 3T3-L1 adipocytes，and observe the possible relationship between adiponectin and PPARγ. **Methods** After induced into adipocytes and identified by Oil Red O staining，the 3T3-L1 adipocytes were treated for palmitic acid（PA），oleic acid（OA），linoleic acid（LA）at different concentration for 24h，and the gene expression of adiponectin mRNA and PPARγ mRNA was determined by real-time PCR. **Results** The mRNA expression of adiponectin and PPARγ in PA group were decreased in a dose-dependent manner，though there was a significant increased at 25μmol/L（$P<0.05$）. For OA and LA group，the expression of adiponectin and PPARγ increased at the levels of 25μmol/L，50μmol/L，100μmol/L，significantly at 50μmol/L（$P<0.05$）. By increasing the dose of fatty acid，the expression of adiponectin and PPARγ mRNA decreased in a dose-dependent manner. **Conclusion** Fatty acid can induce a dose-dependent manner at the gene expression of adiponectin and PPARγ mRNA in 3T3-L1 adipocytes. PA can also increase the gene expression of adiponectin and PPARγ at approximately low level of 25μmol/L，although it always shows off a depressant effect. The molecular mechanism of adiponectin gene expression might be correlated with a PPARγ activation signaling pathway，for there is a positive correlation between adiponectin and PPARγ.

Keywords：fatty acid；adiponectin；PPARγ；gene expression；adipocytes

脂联素是近年来发现的脂肪细胞特异性分泌因子[1]，具有调节糖脂代谢、胰岛素增敏及抗炎抗动脉粥样硬化等一系列作用。肥胖症、II 型糖尿病及心血管疾病患者血浆脂联素浓度明显低于正常人，并与胰岛素抵抗和高胰岛素血症成负相关[2,3]。现已知过氧化物酶体增殖物激活受体γ（PPARγ）是体内脂肪酸的感受器，在调控脂肪细胞分化、调节糖脂代谢中起关键作用。临床上采用的噻唑烷二酮（TZD）类抗糖尿病药物（如 pioglitazone 等）可通过激活 PPARγ 来上调脂联素的表达[6,9]。脂肪酸作为 PPARγ 的天然配体能否通过 PPARγ 来调节脂联素的表达是值得研究的问题。本实验主要观察不同种类的脂肪酸对脂联素基因表达的调节作用及与 PPARγ 基因表达的相互关系，为肥胖及相关疾病的预防和治疗提供新的思路和科学依据。

1　材料与方法

1.1　实验材料

3T3-L1 前脂肪细胞购自 ATCC。

DMEN 高糖培养基购自 Gibco 公司；胎牛血清购自杭州四季清公司；1－甲基－3－异丁基－黄嘌呤（IBMX）、地塞米松、胰岛素、棕榈酸（PA）、油酸（OA）、亚油酸（LA）、fatty acid-free BSA、吡格列酮（Pioglitazone）、GW9662 均购自 Sigma 公司；Trizol 购自 Invitrogen 公司；SYBR ® PrimeScript ® RT-PCR Kit II（Perfect Real Time）、SYBR ® Premix Ex Taq™ II（Perfect Real Time）购自 TaKaRa 公司。

1.2　3T3-L1 前脂肪细胞的培养及诱导分化

按常规细胞培养方法，用含 10% FBS 的高糖 DMEN 培养基在 37℃ 、5% CO_2 条件下培养细胞，

隔天换液。取对数生长期的 3T3-L1 前脂肪细胞均匀接种于 6 孔板中，待细胞生长至接触抑制后 2 天，换含 10% FBS、0.5mmol/L IBMX、10μg/ml 胰岛素、1μmol/L 地塞米松的高糖 DMEN 诱导培养基；2 天后换只含 10μg/ml 胰岛素的完全培养基继续培养；2 天后换完全培养基，隔天换液，培养 8～10 天。经油红 O 染色鉴定，90% 以上 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞，可用于下步实验[7-9]。

1.3 脂肪酸处理

棕榈酸（PA）、油酸（OA）、亚油酸（LA）储存液以每 100mg 溶于 1ml 无水乙醇进行溶解，置液氮保存。fatty acid-free 牛血清白蛋白 BSA 溶于三蒸水中配制成 10% 储备液，55℃助溶，过滤除菌。脂肪酸使用液的配置参照 Richard T 等[8,10,11]方法并加以改进，将上述脂肪酸使用液按所需浓度加入无血清的只含 1% BSA 的高糖 DMEN 中，于 37℃ 、5% CO_2 条件下培育至所需时间。PPARγ 激动剂吡格列酮[9]和 PPARγ 阻断剂 GW9662[13]以上述同样方法溶解、储存并使用，空白对照组则添加相同用量但不含脂肪酸的无水乙醇、NaOH 和 BSA 混合物。加入脂肪酸受试物后，细胞未见明显皱缩、脱落等现象。实验重复 3 次。

在相应条件下以不加脂肪酸的 3T3-L1 成熟脂肪细胞为空白对照，分别加入浓度为 25μmol/L、50μmol/L、100μmol/L、200μmol/L、400μmol/L 的棕榈酸(PA)、油酸(OA)、亚油酸(LA)，以 100μmol/L 吡格列酮和 100μmol/L GW9662 作为阳性对照和阴性对照，培养 24 小时，收获细胞，每组 3 孔。

1.4 总 RNA 提取

Trizol 法提取总 RNA（按 Trizol 试剂说明书进行操作）。

RNA 纯度与含量测定：取 2μlRNA 50 倍稀释后于核酸蛋白分析仪测定 RNA 纯度与浓度，纯度在 1.8－2.0 之间，用于后续试验。

1.5 mRNA 表达水平分析（qRT-PCR 法）

cDNA 逆转录：取 1μg 总 RNA 在 10μl 体系中进行逆转录，实验操作按试剂盒说明书进行，所得产物即为所需的模版 cDNA。

实时荧光定量 PCR 检测：在 GenBank 查得目的基因 mRNA 序列，由北京奥科生物技术有限公司合成并验证引物，以 β-actin 为内参。引物序列如下，adiponectin 上游引物序列（5′－GGAACTTGTGCAGGTTGGAT－′3），下游引物序列（5′－TCTCCAGGAGTGCCATCTCT－′3），产物长度为 92bp；PPARγ 上游引物序列（5′－ ACAGACCTCAGGCAGATCGT－′3），下游引物序列（5′－ GGGTGAAGGCTCATGTCTGT－′3），产物长度为 83bp；β-actin 上游引物序列（5′－GATCATTGCTCCTCCTGAGC－′3），下游引物序列（5′－ACATCTGCTGGAAGGTGGAC－′3），产物长度为 83bp。实时荧光定量 PCR 总反应体系为 25μl。反应条件为，95℃ 预变性 5min；95℃、5s，60℃、30s，40 个循环，每个循环结束检测荧光信号。结果采用 2－△△Ct 相对定量的方法[12]，以 β-actin 作为内参。所用定量 PCR 仪器型号为 STRATAGENE Mx3005p cycler。

1.6 统计学处理

所得数据采用平均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用统计软件 SPSS 13.0 分析，各组数据先进行正态性和方差齐性检验，组间比较及两两比较采用方差分析（ANOVA）及 LSD t-test 或 dunnett T-test，相关性分析采用 Pearson 相关分析。* $P < 0.05$ 表示为有统计学意义。

2 结果

2.1 3T3-L1 前脂肪细胞的诱导分化及鉴定

未分化的 3T3-L1 前脂肪细胞显微镜下观察呈类成纤维状，细胞成菱形或梭型，此时油红 O 不能着色（图 1－A）。前脂肪细胞在分化培养基中诱导分化第 2 天，细胞回缩，形态变圆、体积逐渐增大；分化第 4 天开始，胞内可见小脂滴，并随着分化的进展，胞质内脂滴迅速增多，并逐渐融合；分化第 8～10 天，90% 以上分化为成熟脂肪细胞，脂滴大量融合（图 1－B）。油红 O 染色，用于鉴定脂肪细胞。（图 1－C）

2.2 棕榈酸（PA）对脂联素及 PPARγ mRNA 表达的影响

以不同浓度（25μmol/L、50μmol/L、100μmol/L、200μmol/L、400μmol/L）的棕榈酸分别处理 3T3-L1 成熟脂肪细胞 24h，如图 2 所示，在浓度为 25μmol/L 时脂联素 mRNA 表达显著增加，比对照组增加 53%（$P < 0.05$）；其余浓度脂联素 mRNA 表达均下降，在 400μmol/L 时显著降低，比对照组降低 76%（$P < 0.05$）。

图 3 显示不同浓度棕榈酸对 PPARγ mRNA 表达的影响，在浓度为 25μmol/L、50μmol/L 时，PPARγ mRNA 表达显著增加，与对照组相比分别增加 67% 和 75%（$P < 0.05$）；其余浓度时表达均下降，在 400μmol/L 时，比对照组降低 74%（$P < 0.05$）。

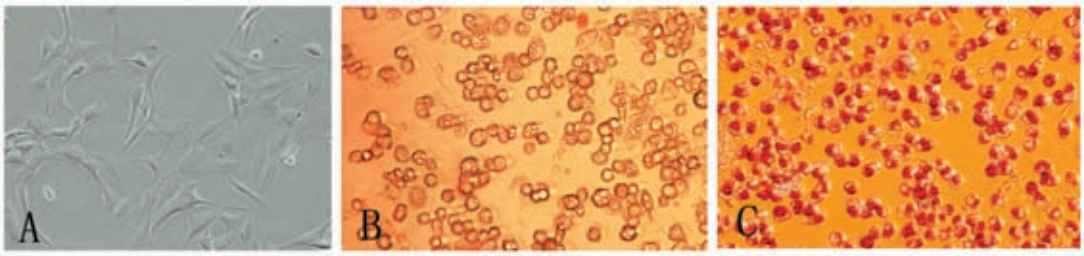

图 1　3T3-L1 脂肪细胞

A. 3T3-L1 前脂肪细胞（×400）　B. 成熟脂肪细胞（×200）　C. 3T3-L1 成熟脂肪细胞油红 O 染色（×200）

Fig. 1　3T3-L1 adipocytes

A. 3T3-L1 preadipocytes（×400）　B. 3T3-L1 matured adipocytes（×200）

C. 3T3-L1 matured adipocytes（Oil Red O，×200）

经 Pearson 相关分析，脂联素 mRNA 表达与 PPARγ mRNA 表达存在显著正相关关系。相关系数 $r=0.562$，$P=0.015$（$P<0.05$）。

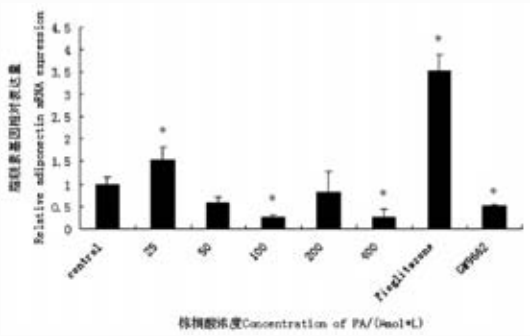

图 2　不同浓度棕榈酸对脂联素 mRNA 表达水平的影响（n=3 replicates）

Fig. 2　Effects of different concentration of PA on adiponectin mRNA expression

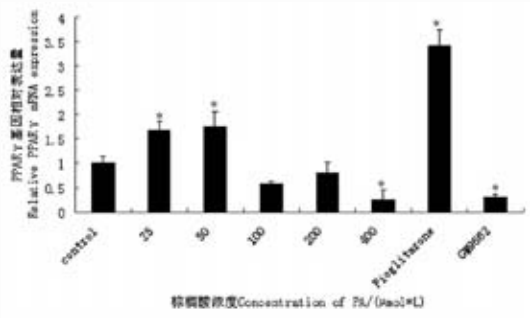

图 3　不同浓度棕榈酸对 PPARγ mRNA 表达水平的影响（n=3 replicates）

Fig. 3　Effects of different concentration of PA on PPARγ mRNA expression

2.3　油酸(OA)对脂联素及 PPARγ mRNA 表达的影响

以不同浓度（25μmol/L、50μmol/L、100μmol/L、200μmol/L、400μmol/L）的油酸分别处理 3T3-L1 成熟脂肪细胞 24h，如图 4 所示，在浓度为 25μmol/L、50μmol/L、100μmol/L 时，脂联素 mRNA 的表达均高于对照组，在 50μmol/L 时最为显著，比对照组增加 80%（$P<0.05$）；随着浓度的增加，脂联素 mRNA 表达下降，在 400μmol/L 时显著低于对照组，减少 55%（$P<0.05$）。

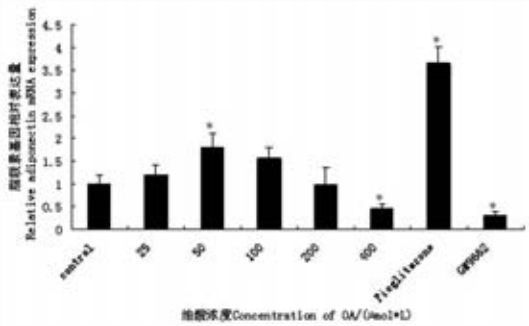

图 4　不同浓度油酸对脂联素 mRNA 表达水平的影响（n=3 replicates）

Fig. 4　Effects of different concentration of OA on adiponectin mRNA expression

图 5 显示不同浓度油酸对 PPARγ mRNA 表达水平的影响，在浓度为 25μmol/L、50μmol/L、100μmol/L 时，PPARγ mRNA 的表达增加，在 50μmol/L 显著增加，比对照组增加 39%（$P<0.05$）；随着浓度的继续增加，PPARγ mRNA 表达均下降，在 200μmol/L、400μmol/L 时，分别比对照组减少 39% 和 57%（$P<0.05$）。

经 Pearson 相关分析，脂联素 mRNA 表达与 PPARγ mRNA 表达存在显著正相关关系。相关系数 $r=0.893$，$P=0.000$（$P<0.01$）。

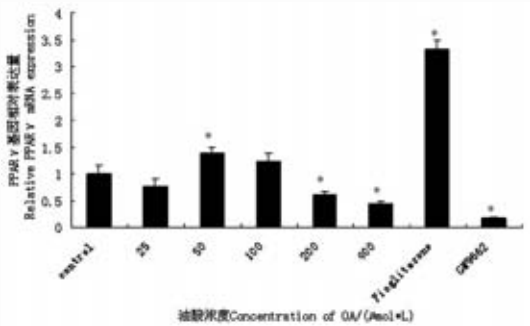

图 5　不同浓度油酸对 PPARγ mRNA 表达水平的影响（n=3 replicates）

Fig. 5　Effects of different concentration of OA on PPARγ mRNA expression

2.4　亚油酸（LA）对脂联素及 PPARγ mRNA 表达的影响

以不同浓度（25μmol/L、50μmol/L、100μmol/L、200μmol/L、400μmol/L）的亚油酸分别处理 3T3-L1 成熟脂肪细胞 24h，如图 6 所示，在浓度为 50μmol/L、100μmol/L 时脂联素 mRNA 的表达显著增加，分别比对照组增加 190% 和 110%（$P<0.05$）；

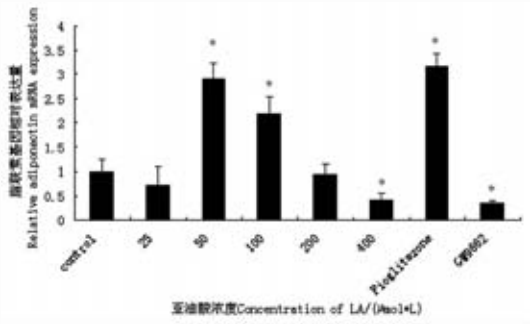

图 6　不同浓度亚油酸对脂联素 mRNA 表达水平的影响（n=3 replicates）

Fig. 6　Effects of different concentration of LA on adiponectin mRNA expression

当浓度为 400μmol/L 时，表达显著下降，比对照组减少 59%（$P<0.05$）。

图 7 显示不同浓度亚油酸对 PPARγ mRNA 表达水平的影响，在浓度为 25μmol/L、50μmol/L、100μmol/L 时，PPARγ mRNA 的表达增加并呈梯度上升，分别比对照组增加 117%、127%、180%（$P<0.05$）；当浓度为 200μmol/L、400μmol/L 时，PPARγ mRNA 表达下降，其中 400μmol/L 时显著低于对照组，减少 83%（$P<0.05$）。

经 Pearson 相关分析，脂联素 mRNA 表达与 PPARγ mRNA 表达存在显著正相关关系。相关系数 $r=0.681$，$P=0.002$（$P<0.01$）。

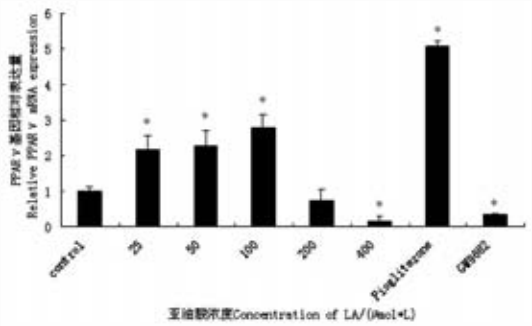

图 7　不同浓度亚油酸对 PPARγ mRNA 表达水平的影响（n=3 replicates）

Fig. 7　Effects of different concentration of LA on PPARγ mRNA expression

3　讨论

本研究以 3T3-L1 前脂肪细胞进行体外培养，经常规方法诱导分化成熟后用于实验。3T3-L1 前脂肪细胞是目前国际上研究脂肪细胞因子功能最常用的细胞株；诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞可高水平表达脂联素和 PPARγ 基因。

本研究观察了饱和脂肪酸棕榈酸（PA）、单不饱和脂肪酸油酸（OA）、多不饱和脂肪酸亚油酸（LA）在不同浓度情况下作用 24 小时对 3T3-L1 脂肪细胞脂联素和 PPARγ 基因表达的影响。发现棕榈酸只在浓度很低（25μmol/L）时能上调脂联素及 PPARγ 基因的表达，在其余浓度均表现为抑制作用；油酸和亚油酸在 25μmol/L～100μmol/L 浓度范围内均上调脂联素及 PPARγ 基因的表达，与袁继红等[17]在 50μmol/L 和 100μmol/L 剂量作用 48 小时油酸和亚油酸均下调脂联素表达的研究结果不同，提示脂联素的表达可能与脂肪酸作用时间有关。本实验还观察到当浓度继续增加时，油酸和亚油酸均下调脂联素及 PPARγ 基因的表达，且浓度越高下调作用越显著。现有研究证明氧自由基可下调脂联素表达[14]，而多不饱和脂肪酸易产生脂质过氧化，因此本实验所观察到高浓度时油酸和亚油酸下调脂联素表达是否与脂质过氧化有关值得进一步探讨。另外，经相关性分析发现，脂联素与 PPARγ 基因表达之间存在显著正相关关系，提示不同脂肪酸影响脂联素

的表达有可能通过激活或抑制 PPARγ 的表达来实现。

另外，以往多数研究均观察到饱和脂肪酸下调脂联素表达[15]，而本研究发现饱和脂肪酸棕榈酸在很低浓度（25μmol/L）时也能上调脂联素及 PPARγ 基因的表达，其机理有待探讨。本研究提示脂肪酸的种类、浓度和作用时间等都是影响脂联素表达的重要因素，有可能通过调整膳食脂肪酸种类、构成、数量等来增加脂联素的基因表达和分泌，发挥其有益作用。

参考文献

［1］MAEDA K，OKUBO K，SHIMOMURA I，et al. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor，apM1（adipose most abundant gene transcript 1）［J］. Biochem Biophys Res Commun，1996，221：286－289.

［2］ARITA Y，KIHARA S，OUCHI N，et al. Paradoxical decrease of an adipocyte-specific protein，adiponectin in obesity［J］. Biochem Biophys Res Commun，1999，257：79－83.

［3］HOTTA K，FUNAHASHI T，ARITA Y，et al. Plasma concentrations of a novel adipose-specific protein-adiponectin in type2 diabetic patients［J］. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2000，20；1595－1599.

［4］Issemann I，Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature，1990 347（6294）：645

［5］朱凌燕，刘建英．PPARγ 基因研究进展．［J］．江西医药．2011，7（46，6）：572－574.

［6］Susan A Phillips，Jacqueline T Kung. Mechanisms of adiponectin regulation and use as a pharmacological target.［J］. Current Opinion in Pharmacology. 2010，10：676－683.

［7］Sun-Sil Choi，Byung-Yoon Cha，Kagami Iida，Young-Sil Lee，et al. Artepillin C，as a PPARg ligand，enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells.［J］. Biochemical Pharmacology. 2011（81）：925－933.

［8］Richard T Oster，Justine M Tishinsky，Zongfei Yuan，Lindsay E Robinson. Docosahexaenoic acid increases cellular adiponectin mRNA and secreted adiponectin protein，as well as PPARγ mRNA，in 3T3-L1 adipocytes. NRC Research Press. Appl. Physiol. Nutr. Metab. 2010（35）：783－789.

［9］Akihiro Kudoh，Hiroaki Satoh，Hiroyuki Hirai，Tsuyoshi Watanabe. Pioglitazone upregulates adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes.［J］. Life Sciences. 2011（88）：1055－1062.

［10］Koji Komiya，Toyoyoshi Uchida，Takashi Ueno，Hirotaka Watada，et al. Free fatty acids stimulate autophagy in pancreatic b-cells via JNK pathway.［J］Biochemical and Biophysical Research Communications. 2010（401）：561－567.

［11］Lina Yang，Zhiyu Qian，Hui Ji，Ruhui Yang，Yuhuan Wang，Xiaoming Zhang，et al. Inhibitory effect on protein kinase Cθ by Crocetin attenuates palmitate-induced insulin insensitivity in 3T3-L1 adipocytes.［J］. European Journal of Pharmacology. 2010（642）：47－55.

［12］Kenneth J. Livak，Thomas D. Schmittgen. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-△△Ct Method.［J］. METHODS. 2001（25）：402－408.

［13］于杨，杜优优，陈曼华．过氧化物酶体增殖物活化受体在替米沙坦上调 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达中的作用．［J］．实用医学杂志．2010. 26（9）：1499－1501.

［14］陈宝莹，魏经国，王玮，于军．氧自由基对脂肪细胞中脂联素表达的下调作用［J］．心脏杂志．2008，20（2）：142－146.

［15］NADERALI E K，ESTADEIIA D，ROCHA M，et al. A fat-enriched glucose-enriched diet markedly attenuates adiponectin mRNA levels in rat epididymal adipose tissue.［J］. Clin Sci. 2003，105（4）：403－408.

［16］Michael J. Puglisi，Alyssa H. Hasty，Viswanathan Saraswathi. The role of adipose tissue in mediating the beneficial effects of dietary fish oil.［J］. Journal of Nutritional Biochemistry. 2011（22）：101－108.

［17］袁继红，龙 欢，雷 霆，陈小冬，杨在清．成熟脂肪细胞 中脂联素基因表达的脂肪酸应答调控［J］．Journal of Huazhong Agricultural University. 2009（6）：320－325.