

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.06.010

1,25-二羟基维生素 D₃ 对脂肪细胞脂滴代谢的影响向薇¹,程实¹,马玲^{2△}

(1. 新疆医科大学公共卫生学院,乌鲁木齐 830011;2. 西南医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室,四川泸州 646000)

[摘要] 目的 探索 1,25-二羟基维生素 D₃[1,25(OH)₂D₃]对棕榈酸(PA)诱导的分化后的 3T3-L1 细胞脂滴代谢的影响。方法 用“鸡尾酒法”对正常培养的 3T3-L1 细胞进行成脂诱导分化,8 d 后分别用 100、300、600、900 μmol/L PA 进行 24 h 造模干预,MTT 和三酰甘油(TG)水平的检测筛选最佳造模浓度。在模型基础上分别用 1、10、100 nmol/L 的 1,25(OH)₂D₃ 进行干预,24 h 后检测各组细胞 TG 水平,对细胞进行油红 O 染色,计算脂滴数量和平均直径,检测细胞脂滴代谢相关基因(PPAR-α、PPAR-γ、CIDE-a、CIDE-c、UCP-1 和 PLIN-1)mRNA 表达。结果 与模型组比较,10、100 nmol/L 的 1,25(OH)₂D₃ 明显降低脂滴平均直径,增加脂滴数量,上调了 PPAR-α 和 PLIN-1 mRNA 表达,下调 CIDE-a、CIDE-c mRNA 表达。1 nmol/L 的 1,25(OH)₂D₃ 在 24 h 的干预内并没有明显改变脂滴数量和平均直径,以及相关基因表达。结论 10、100 nmol/L 浓度的 1,25(OH)₂D₃ 可以缓解 PA 造成分化后的 3T3-L1 细胞肥大。

[关键词] 肥大细胞;骨化三醇;脂滴**[中图分类号]** R34**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)06-0937-05Effect of 1,25-dihydroxy vitamin D₃ on lipid droplet metabolism in lipocyteXIANG Wei¹, CHENG Shi¹, MA Ling^{2△}(1. College of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China;
2. Teaching and Researching Section of Nutrition and Food Health, College of Public Health,
Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of 1,25-dihydroxy vitamin D₃[1,25(OH)₂D₃] on the lipid droplet metabolism in differentiated 3T3-L1 cells induced by palmitic acid (PA). **Methods** The cocktail method was used to conduct the adipogenesis differentiation in normally cultured 3T3-L1 cells. The 24 h modeling intervention was conducted after 8 d by 100, 300, 600, 900 μmol/L PA. The control group was set. The best modeling concentration was screened by MTT and TG level detection. Under the model basis, the intervention was performed by 1, 10, 100 nmol/L 1,25(OH)₂D₃. The blank group and model group were set. Then The TG level in the cells of each group was detected after 24 h. The cells were stained by oil red, and the mean diameter and quantity of lipid droplets (LD) were calculated by using the Image-pro plus 6. 0. Then the mRNA expression of cell lipid droplet metabolic related genes(PPAR-α, PPAR-γ, CIDE-a, CIDE-c, UCP-1 and PLIN-1) were detected. **Results** Compared with model group, 10, 100 nmol/L concentrations of 1, 25(OH)₂D₃ decreased the average diameter of intracellular lipid droplet, increased the quantity of lipid droplet and related gene expression, up-regulated the mRNA expression levels of PPAR-α and PLIN-1, and down-regulated the mRNA expression levels of CIDE-a and CIDE-c. However, 1 nmol/L 1,25(OH)₂D₃ did not obviously alter the content and morphology of lipid droplet as well as the expression of related genes. **Conclusion** 10, 100 nmol/L 1,25(OH)₂D₃ can alleviate the hypertrophy of differentiated 3T3-L1 cells caused by PA.

[Key words] mast cells; calcitriol; lipid droplet

肥胖是全世界范围内重要的公共卫生问题^[1],从细胞层面看,肥胖发生的原因在于脂肪细胞体积肥大和增生所造成,而这些现象的主要原因之一就是细胞内脂肪过度的堆积^[2],其在形态上主要表现为中央超

大脂滴的形成。细胞形态的改变,脂滴作为脂肪细胞内一种特殊的细胞器,在调节细胞内脂质代谢过程中起到关键作用,其过度的膨大将会导致生物体脂质代谢紊乱^[3],是胰岛素抵抗、2 型糖尿病、非酒精性脂肪

肝病等疾病的重要特征之一^[4]。

1,25 二羟基维生素 D₃[1,25(OH)₂D₃]在骨骼中的作用早已被大量且深入的研究,而近些年,越来越多的证据表明 1,25(OH)₂D₃ 的缺乏是肥胖的独立危险因素^[5]。细胞研究也发现 1,25(OH)₂D₃ 可在体外培养的脂肪细胞中起到调节脂肪代谢的作用,并明显抑制脂肪生成,减少细胞内脂肪含量^[2]。虽然 1,25(OH)₂D₃ 对脂肪细胞脂质代谢的研究已有很多,但结果并不一致,且其对脂肪细胞脂滴融合能力影响的研究还未见报道。本研究观察其对细胞脂滴形态和脂肪细胞脂滴融合相关基因的影响,为其有效地防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 3T3-L1 细胞系购自美国 ATCC 公司,用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基,在 37 °C、5% CO₂ 的无菌培养箱中进行细胞培养,每隔 2 d 更换 1 次培养基。当细胞生长至 80%~90% 时进行传代。

1.1.2 主要试剂及仪器 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤 (IBMX)、地塞米松、1,25(OH)₂D₃ (美国 Sigma 公司),胰岛素注射液 (江苏万邦生化医药股份有限公司),二甲基亚砜 (DMSO, 上海生工生物工程股份有限公司),棕榈酸 (PA, 北京 Solarbio 公司),牛血清白蛋白 (BSA, 德国 Biofroxx 公司),油红 O、BCA 法蛋白检测试剂盒、三酰甘油 (TG) 试剂盒 (南京建成生物技术研究所); RNAiso Plus 和 SYBR Premix Ex TaqTM II (日本 TAKARA 公司),cDNA 反转录试剂盒 (美国 Applied Biosystems 公司),酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司),CO₂ 培养箱、离心机、超净工作台、PCR 仪 (美国 Thermo 公司),倒置显微镜 (日本 Olympus 公司),水浴锅 (北京永光明医疗仪器有限公司),电子天平 (上海天美天平仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 诱导液的配置 诱导液 I,在含 10% 胎牛血

清的高糖 DMEM 培养基中加入 0.5 mmol/L 的 IBMX、10 μg/mL 胰岛素、1 μmol/L 地塞米。诱导液 II,在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中加入 10 μg/mL 胰岛素。

1.2.2 不同浓度 PA 溶液 取 30% BSA 溶液,置于 55 °C 水浴中 30 min;将 PA 置于 0.01 mol/L 的 NaOH 溶液中配成 10 mmol/L 的 PA 储存液,于 70 °C 水浴中 30 min,在 70 °C 条件下分别取 330 μL 的 30% BSA 溶液迅速与 100、300、600、900 μL PA 储存液混合振荡,用 10% FBS 高糖 DMEM 定容于 10 mL,于超净台中过滤,分别得到 100、300、600、900 μmol/L 的 PA 培养液,现用现配。

1.2.3 诱导分化 采用“鸡尾酒法”,将细胞以每毫升 2×10⁵ 个接种于 6 孔板中,待细胞接触抑制 48 h 后,将细胞培养基换为诱导液 I (计为分化第 0 天),每 2 天换 1 次液。4 d 后换诱导液 II,每 2 天换 1 次液。至分化第 8 天时,90% 以上细胞分化为成熟脂肪细胞。

1.2.4 肥大脂肪细胞模型的建立 将细胞以每毫升 2×10⁴ 个接种于 96 孔板中,当细胞接触抑制后按上述方法进行诱导分化,待 3T3-L1 细胞分化为成熟脂肪细胞后,分别用 0、100、300、600、900 μmol/L 的 PA 培养液干预 24 h 后,进行 MTT 细胞活力检测。同样将细胞以每毫升 2×10⁵ 个接种于 6 孔板中,待细胞分化为成熟脂肪细胞后,用不同浓度的 PA 培养液干预 24 h 后,测细胞质 TG,根据试剂盒说明书进行。筛选出最佳干预浓度。

1.2.5 不同浓度 1,25(OH)₂D₃ 干预 将正常培养的 3T3-L1 细胞按照每毫升 2×10⁵ 个接种于 6 孔板中,当细胞接触抑制 48 h 后进行诱导分化。待细胞分化为成熟脂肪细胞后,根据筛选出的最佳 PA 浓度进行造模,造模 24 h 后分别用 1、10、100 nmol/L 的 1,25(OH)₂D₃ 对模型细胞干预 24 h,并设置分化成熟的脂肪细胞为对照组,PA 干预的为模型组,以及 3 个不同浓度的干预组。

表 1 引物设计和合成

项目	上游引物	下游引物
β-actin	5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GC-3'	5'-ATG TCA CGC ACG ATT TCC C-3'
PPAR-α	5'-GGA GGT CCG CAT CTT CCA CT-3'	5'-GCA GCA AAT GAT AGC AGC CAC A-3'
PPAR-γ	5'-GCC CTT TGG TGA CTT TAT GG-3'	5'-CAG GTT GTC TTG GAT GTC CTC-3'
CIDE-a	5'-CGG GAA TAG CCA GAG TCA CC-3'	5'-TGT GCA TCG GAT GTC GTA GG-3'
CIDE-c	5'-GCC CAG TTC CTT CCT TTC TG-3'	5'-AAC ACT CTC TCG CAC ACC TC-3'
UCP-1	5'-CAG GCT TCC AGT ACC ATT AG-3'	5'-CTT GGA CTG AGT CGT AGA GC-3'
PLIN-1	5'-AAG GAT CCT GCA CCT CAC AC-3'	5'-CCT CTG CTG AAG GGT TAT CG-3'

PPAR: 过氧化物酶体增殖物激活受体; CIDE: 细胞死亡诱导 DFF45 样效应物

1.2.6 油红染色 按照上述方法诱导分化 8 d 后,将培养基吸出,每孔加 1 mL 的 PBS 冲洗 2 次,每孔加 1 mL 的 4% 多聚甲醛固定 15~20 min。弃去多聚甲醛,PBS 冲洗后,加入油红染色 15 min,吸出染剂后加入 PBS 润洗,于倒置显微镜下观察各组脂滴形成情况。

1.2.7 脂滴数量和平均直径 采用 Image-pro plus 6.0 计算干预后各组脂滴数量和平均直径。

1.2.8 TG 水平 检测干预后各组 TG 水平。

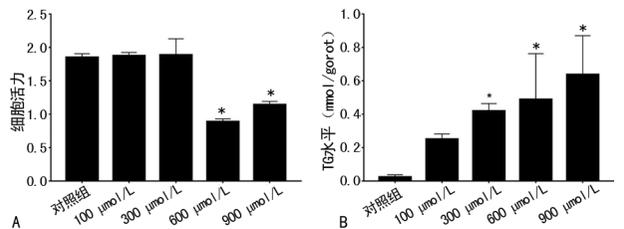
1.2.9 RT-qPCR 提取 RNA,反转录成 cDNA,稀释 5 倍后,RT-qPCR 检测 PPAR- α 、PPAR- γ 、CIDE-a、CIDE-c、UCP-1、PLIN-1 mRNA 表达情况。PCR 的反应条件为:95 $^{\circ}$ C 30 s,预热;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。上下游引物见表 1。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。对实验所得计量数据进行正态性检验,方差齐者多组间直接用单因素 ANOVA 分析组间整体差异,如有差异则用 Tukey 法进行两两比较;方差不齐者用 Brown-Forsythe 对单因素 ANOVA 结果进行校正,

如果有差异则用 Games-Howell 法进行两两比较。如果数据不符合正态性,则用非参数的秩和检验进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

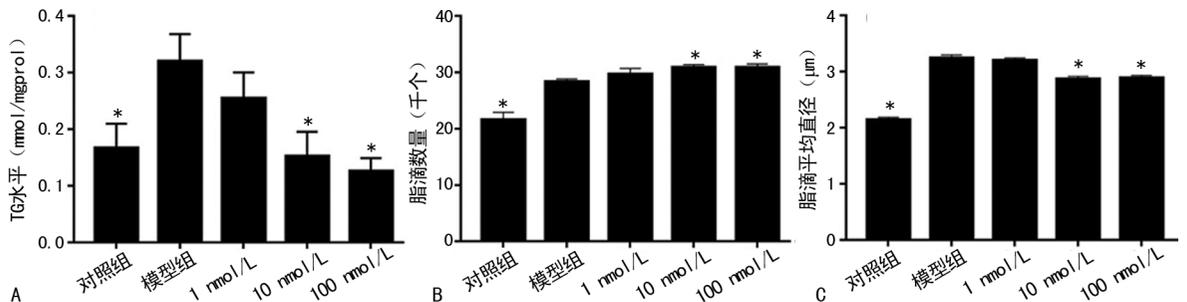
2 结果

2.1 筛选最佳 PA 浓度 MTT 检测结果表明,600 μ mol/L 和 900 μ mol/L PA 可使分化后的 3T3-L1 细胞活力下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),不作为最佳造模浓度。剩余组别中 300 μ mol/L 组细胞 TG 水平最高,差异有统计学意义($P < 0.05$),本研究最终选用 300 μ mol/L PA 浓度作为造模最佳浓度,见图 1。



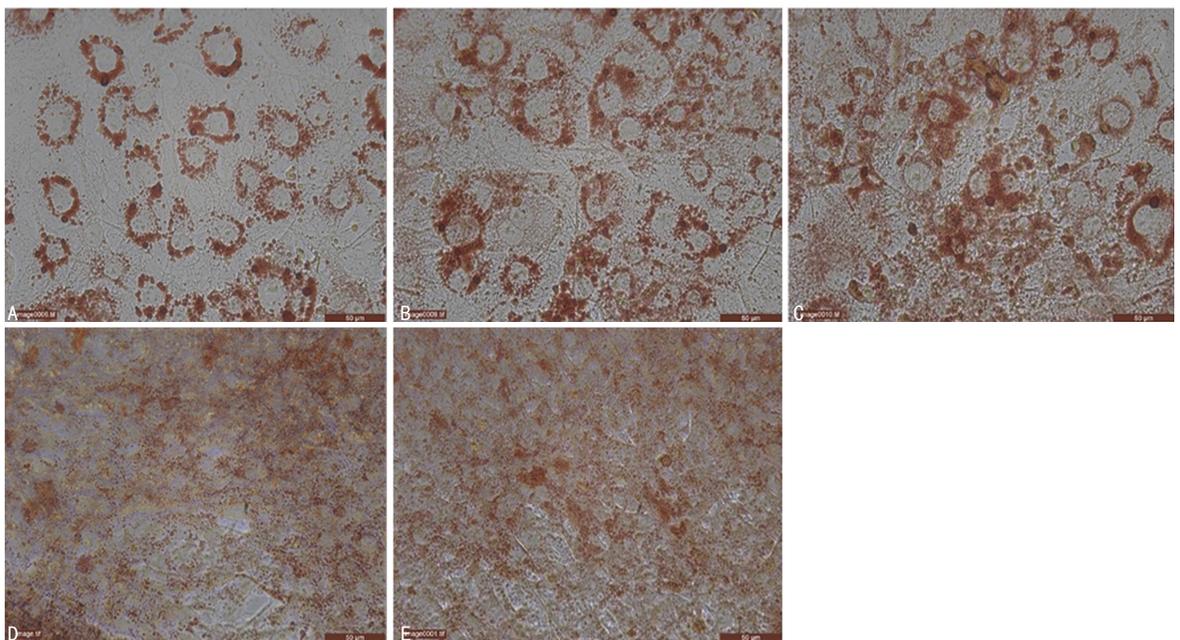
A:各浓度 PA 干预后细胞活力;B:各浓度 PA 干预后 TG 水平;*: $P < 0.05$,与对照组相比

图 1 筛选最佳 PA 浓度造模



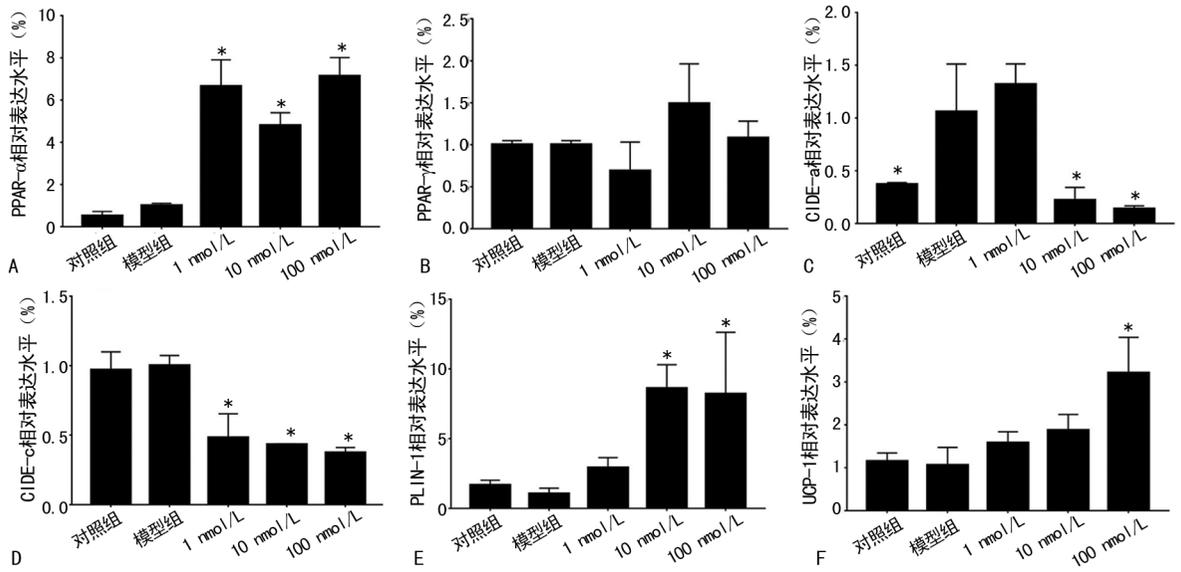
A:各组 TG 水平;B:各组脂滴数量;C:各组脂滴平均直径; * $P < 0.05$,与模型组比较

图 2 不同浓度 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 对细胞脂滴的影响



A:对照组;B:模型组;C:1 nmol/L 组;D:10 nmol/L 组;E:100 nmol/L 组

图 3 各组细胞油红染色($\times 200$)



A: PPAR- α ; B: PPAR- γ ; C: CIDE-a; D: CIDE-c; E: PLIN-1; F: UCP-1; * : $P < 0.05$, 与模型组比较

图 4 各组细胞脂滴代谢相关基因 mRNA 表达情况

2.2 脂滴直径和计数 用不同浓度 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 干预模型细胞后油红 O 染色结果显示,模型组脂滴数量明显多于对照组 ($P < 0.05$),脂滴平均直径大于对照组 ($P < 0.05$);与模型组相比,1 nmol/L 组无论是脂滴数量还是平均直径差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),10、100 nmol/L 组脂滴数量明显增加,脂滴平均直径明显减小 ($P < 0.05$);模型组 TG 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$),而 10、100 nmol/L 组 TG 水平明显低于模型组 ($P < 0.05$),见图 2、3。

2.3 脂滴相关基因 mRNA 表达情况 模型组 PPAR- α mRNA 表达与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 干预 24 h 后,高、中、低 3 个浓度组的 PPAR- α mRNA 表达均明显高于模型组 ($P < 0.05$)。PPAR- γ mRNA 表达各组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组 CIDE-a mRNA 表达明显高于对照组 ($P < 0.05$),而 1 nmol/L 组与模型组差异无统计学意义 ($P > 0.05$),10、100 nmol/L 组 CIDE-a mRNA 表达明显低于模型组 ($P < 0.05$)。CIDE-c mRNA 表达在对照组与模型组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 干预后的各浓度组均明显低于模型组 ($P < 0.05$)。UCP-1 mRNA 表达只在 100 nmol/L 组与模型组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。PLIN-1 mRNA 表达在对照组与模型组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),10、100 nmol/L 组与模型组差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4。

3 讨论

脂滴是一个动态的细胞器,其核心主要是由 TG 和胆固醇酯构成,在表面由单层磷脂包围,脂滴作为储存能量和代谢脂肪酸及固醇的细胞器,负责大量膜结构和激素的合成。脂滴在不同的细胞中有不同的表面蛋白,它们调节着脂滴的结构和功能,其中包括 PPAR 家族、CIDE 家族、PAT 家族等。

本研究中采用 $300 \mu\text{mol/L}$ PA 对诱导分化 8 d 的 3T3-L1 细胞进行肥大效果的模拟,虽然通过油红染色观察到细胞内形成了大量脂滴,但无论是分化后的对照组还是模型组,都没有观察到脂肪细胞典型的中央大脂滴出现。在其他学者对 3T3-L1 细胞成脂分化的研究中,分化后油红染色拍照的放大倍数一般在 40 倍甚至更小,不能观察到细胞内脂滴的形态^[6-7],而 BOSCHI 等^[8]用与本文相同的方法对 3T3-L1 细胞进行成脂诱导分化,8 d 后油红染色,显微放大倍数 400 倍的结果中并未发现中央大脂滴,对此疑问可能还需进一步研究探讨,体外研究用于诱导细胞成脂的方法可能还不够完善。通过软件对显微照片中脂滴量化后,模型组脂滴无论从数量还是平均直径上相较于对照组均明显增加。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对模型细胞进行干预后,10、100 nmol/L 组脂滴平均直径相比于模型组明显降低。而对于 1 nmol/L 浓度的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 从油红染色的照片中并未观察到与模型组脂滴明显的形态变化。

PPARs 在脂质代谢过程中的作用已经开展了大量研究^[9],其中 PPAR- α 是调节能量代谢和脂质氧化的关键因素,在脂类代谢调节中起着枢纽作用;而 PPAR- γ 是脂肪细胞分化和脂肪细胞因子表达的主要调节剂,参与脂肪细胞分化和糖脂代谢的调节^[10]。除 PPARs 近几年有关脂质合成代谢的研究发现 CIDE 是重要的调节蛋白,CIDE-a 和 CIDE-c 在脂肪细胞脂滴代谢的调控中都有重要作用^[11]。同时,PAT 家族中 PLIN-1 在脂肪细胞中高度表达,并调节脂质的分解过程。本研究中,10、100 nmol/L 组的 PPAR- α 和 PLIN-1 mRNA 表达明显高于模型组,而 CIDE-a 和 CIDE-c mRNA 表达相比模型组明显下降,提示 10、100 nmol/L 浓度 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 干预可以在一定程度上抑制 PA 对分化后 3T3-L1 细胞造成的脂肪堆积

作用,抑制脂滴融合,与 CHANG 等^[2]研究中产生促进脂肪分解效果的剂量相同。该研究只在 100 nmol/L 组 UCP-1 mRNA 表达与模型组有统计学差异,提示 100 nmol/L 浓度 1,25(OH)₂D₃ 能增加空热产生,促进脂代谢。虽然 1 nmol/L 组与模型组相比脂滴变化差异无统计学意义($P>0.05$),但 PPAR- α mRNA 表达相比模型组明显升高,CIDE-c mRNA 表达明显下降,提示 1 nmol/L 浓度的 1,25(OH)₂D₃ 浓度太低,在 24 h 的干预时间内还不足以对细胞脂滴的生物代谢产生明显的变化。而在 JI 等^[12]研究中发现 1 nmol/L 的 1,25(OH)₂D₃ 就可产生明显的效果,但还未见有用 1 nmol/L 浓度 1,25(OH)₂D₃ 干预成脂分化后 3T3-L1 细胞的报道。1,25(OH)₂D₃ 干预后,尤其是 10、100 nmol/L 浓度,包括 CIDE-a、CIDE-c、PLIN-1 等均出现明显的变化,提示其可能抑制了脂质在细胞内的堆积。PPAR- γ 是调节脂肪细胞脂质代谢的主要因子,主要表达在脂肪组织中,用于调节脂肪细胞的活动,脂质的代谢,应答胰岛素信号,并且与炎症相关^[10],但 PPAR- γ mRNA 表达在所有组之间差异均无统计学意义($P>0.05$),与 CHANG 等^[2]的研究结果不一致。而 BOLSONI-LOPES 等^[13]用 200 μ mol/L 的棕榈油酸干预成脂分化后的 3T3-L1 细胞,发现棕榈油酸可以增加脂肪细胞脂质的分解,并且此过程依赖于 PPAR- α 的激活,而非 PPAR- γ 。

综上所述,本研究发现 1,25(OH)₂D₃ 可以抑制 PA 造成的成脂分化后 3T3-L1 细胞的脂质堆积,10、100 nmol/L 浓度效果较为明显,脂滴体积变小,数目变多,脂滴融合受抑制,脂肪降解的速度加快,导致脂肪细胞储存脂肪的能力降低。1,25(OH)₂D₃ 可能通过激活 PPAR- α 来起到抑制脂肪堆积的效果,而 PPAR- γ 可能并不参与其中。

参考文献

- [1] 王烁,董彦会,王政和,等. 1985—2014 年中国 7~18 岁学生超重与肥胖流行趋势[J]. 中华预防医学杂志,2017,51(4):300-305.
- [2] CHANG E, KIM Y. Vitamin D decreases adipocyte lipid storage and increases NAD-SIRT1 pathway in 3T3-L1 adipocytes[J]. Nutrition, 2016, 32(6):702-708.
- [3] QI Y F, SUN L, YANG H Y. Lipid droplet growth and adipocyte development: mechanistically distinct processes connected by phospholipids[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017, 1862(10 pt B):1273-1283.
- [4] TAKAGI M, KIMURA K, NAKASHIMA K I, et al. Ameliorative effect of panaxynol on the reduction in high-molecular-weight adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes treated with palmitic acids[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 820(1):138-145.
- [5] 崔莹,冯正平. 维生素 D 与肥胖[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2017,10(2):194-200.
- [6] BASOLI V, SANTANIELLO S, CRUCIANI S, et al. Melatonin and vitamin D interfere with the adipogenic fate of adipose-derived stem cells[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5):410-421.
- [7] KIM J H, KANG S, JUNG Y N, et al. Cholecalciferol inhibits lipid accumulation by regulating early adipogenesis in cultured adipocytes and zebrafish[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 469(3):646-653.
- [8] BOSCHI F, RIZZATTI V, ZAMBONI M, et al. Models of lipid droplets growth and fission in adipocyte cells[J]. Exp Cell Res, 2015, 336(2):253-262.
- [9] BRUNMEIR R, XU F. Functional regulation of PPARs through post-translational modifications[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6):1738.
- [10] MATTIJSEN F, GEORGIADI A, ANDASARIE T, et al. Hypoxia-inducible lipid droplet-associated (HILPDA) is a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target involved in hepatic triglyceride secretion[J]. J Biol Chem, 2014, 289(28):19279.
- [11] SUN Z, GONG J, WU H, et al. Corrigendum: perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes[J]. Nat Commun, 2013, 4(3):1594.
- [12] JI S, DOUMIT M E, HILL R A. Correction: regulation of adipogenesis and key adipogenic gene expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D in 3T3-L1 cells[J]. PLoS One, 2015, 10(7):e0126142.
- [13] BOLSONI-LOPES A, FESTUCCIA W T, FARIAS T S, et al. Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocyte lipolysis and lipase content in a PPAR alpha-dependent manner[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013, 305(9):E1093-1102.

(收稿日期:2018-10-14 修回日期:2018-12-06)