

菊苣酸下调3T3-L1前脂肪细胞中PGC-1 α 及FoxO4蛋白表达

肖海芳^{1,2}, 袁莉¹, 王静¹, 刘学波^{1,*}

(1.西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100;

2.山东理工大学农业工程与食品科学学院, 山东淄博 255049)

摘要: 通过菊苣酸作用于3T3-L1前脂肪细胞, 检测其对PGC-1 α 及FoxO4蛋白表达的影响并探讨其作用机制。结果表明, 菊苣酸能够有效抑制细胞中PGC-1 α 及FoxO4蛋白的表达; PI3K/Akt抑制剂LY294002可增强菊苣酸对两种蛋白的影响。提示菊苣酸通过PI3K/Akt信号通路下调PGC-1 α 及FoxO4蛋白的表达。

关键词: 菊苣酸; 3T3-L1前脂肪细胞; PI3K/Akt; PGC-1 α ; FoxO4

Downregulation of PGC-1 α and FoxO4 Expressions by Chicoric Acid in 3T3-L1 Preadipocytes

XIAO Hai-fang^{1,2}, YUAN Li¹, WANG Jing¹, LIU Xue-bo^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. School of Agricultural and Food Engineering, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

Abstract: Chicoric acid, a naturally occurring polyphenolic compound, has been reported to have multiple bioactivities. Our previous study indicated that chicoric acid induced the apoptosis of 3T3-L1 preadipocytes. PGC-1 α and FoxO4 were two important apoptotic proteins in preadipocytes. However, the impact and underlying mechanism of chicoric acid on these proteins remain unknown. The purpose of this work was to investigate these issues. Our results revealed that chicoric acid down-regulated the expressions of PGC-1 α and FoxO4, and these effects were enhanced by the PI3K/Akt inhibitor LY294002. These data suggested that the down-regulatory effect of chicoric acid on the expressions of PGC-1 α and FoxO4 was achieved through PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: chicoric acid; 3T3-L1 preadipocytes; PI3K/Akt; PGC-1 α ; FoxO4

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)21-0297-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201321059

肥胖是指体内脂肪堆积过多或分布异常。随着生活水平及生活方式的变化, 全球肥胖发生率呈上升趋势。肥胖可增加心脑血管疾病、Ⅱ型糖尿病、冠心病、高血压、癌症及骨关节病等慢性病的发病风险。目前, 肥胖已发展成为全球性的公共卫生问题。在细胞水平上, 肥胖表现为脂肪细胞数目的增多及体积的增大, 脂肪细胞数目的增多取决于前脂肪细胞的增殖及分化, 脂肪细胞体积的增大取决于成熟脂肪细胞中甘油三酯的积聚。因此, 前脂肪细胞的增殖及脂肪细胞中脂肪形成在肥胖发生过程中起着关键作用。

细胞增殖和细胞凋亡都是生命的基本现象, 凋亡可维持体内细胞数目的平衡。线粒体凋亡途径是细胞凋亡的主要途径之一。而过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅

收稿日期: 2012-12-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000757); “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAH30F03)

作者简介: 肖海芳(1980—), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向为食品功能化学与营养。E-mail: xiaohaifang@163.com

*通信作者: 刘学波(1975—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品功能化学与营养。E-mail: xueboliu@yahoo.com.cn

助激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1, PGC-1 α)与线粒体功能及细胞凋亡信号通路有着密切的联系^[1]。FoxO4是调节细胞氧化应激、增殖、分化及凋亡的重要转录调节因子^[2]。大量研究表明, 多酚类化合物, 如儿茶素(表没食子儿茶素没食子酸酯)、没食子酸、柚皮素、芦丁、橙皮素、白藜芦醇及槲皮素等, 可诱导前脂肪细胞凋亡^[3-5]。

菊苣酸(chicoric acid)即二咖啡酰酒石酸, 为咖啡酸衍生物, 主要存在于紫锥菊、蒲公英、紫苏、莴苣、菊苣及猫须草等可食植物和蔬菜中^[6-11]。菊苣酸具有抗氧化^[12]、抗病毒^[13]及抗炎^[14]等生物活性。另外, 菊苣酸还可增强肌细胞对葡萄糖摄取, 并刺激胰岛分泌胰岛素^[15]。前期研究表明, 菊苣酸可通过线粒体途径诱导3T3-L1前脂肪

细胞凋亡^[16]。而目前PGC-1α和FoxO4蛋白在3T3-L1前脂肪细胞凋亡过程中的作用尚不明确。在前期研究的基础上,本实验拟通过菊苣酸诱导3T3-L1前脂肪细胞凋亡,探讨菊苣酸对细胞中PGC-1α和FoxO4蛋白表达的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

3T3-L1前脂肪细胞株 中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心; DMEM培养基、小牛血清 美国Hyclone公司; 菊苣酸 美国Sigma公司; 抗生素(青霉素/链霉素)、胰蛋白酶、PI3K抑制剂(LY294002) 江苏碧云天公司; Anti-PGC-1α Antibody、Anti-FoxO4 Antibody、Anti-β-actin Antibody、辣根过氧化物酶标记二抗美国Santa Cruz公司。

1.2 仪器与设备

AUY220万分之一电子天平 日本岛津公司; 微量移液枪、5417R高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司; 3110型细胞培养箱 美国Thermo Scientific公司; BCN-1360B生物洁净工作台 北京东联电子技术开发公司; VORTEX-5旋涡混合器 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司; SC-3610低速台式离心机 安徽科大中佳公司; NTT-2000恒温槽 东京理化器械株式会社; 165-8001垂直电泳槽、CHEMIDOC-XRS凝胶成像系统 美国伯乐公司; QYC110台式恒温振荡器 上海福玛公司; LX71倒置荧光显微镜 日本奥林巴斯株氏会社。

1.3 方法

1.3.1 3T3-L1前脂肪细胞的培养

将3T3-L1前脂肪细胞置于含10%小牛血清、100U/mL青霉素和100U/mL链霉素的DMEM培养基中,在37℃、5%CO₂的培养箱中培养,4h后细胞贴壁生长,每2d更换培养基1次。当细胞融合率达80%~90%时,对细胞进行传代。

1.3.2 菊苣酸对3T3-L1前脂肪细胞的处理

取对数生长期的3T3-L1前脂肪细胞,按1×10⁴个/mL密度接种于35mm×10mm培养皿中,每皿1mL,于37℃、5%CO₂培养箱过夜培养。当细胞融合率达80%时,弃去培养基,每皿分别加入1mL含有不同浓度菊苣酸(终浓度为0、10、50、100μmol/L)的无血清DMEM培养基处理24h,或每皿加入含有终浓度为100μmol/L菊苣酸的无血清DMEM培养基分别处理0、4、8、24、48h。

1.3.3 3T3-L1前脂肪细胞形态观察

取对数生长期的3T3-L1前脂肪细胞,按1×10⁴个/mL密度分别接种于6孔板中,每孔1mL,于37℃、5%CO₂培

养箱培养24h,然后弃去培养基。设对照组和处理组,每个处理设3个复孔。对照组加入无血清DMEM培养基,在前期MTT实验结果基础上^[16],处理组加入含有菊苣酸(终浓度为100μmol/L)的无血清DMEM培养基,各培养24h。最后将对照组和处理组细胞置于倒置显微镜下观察细胞形态。

1.3.4 LY294002对3T3-L1前脂肪细胞的处理

取对数生长期的3T3-L1前脂肪细胞,按1×10⁴个/mL密度分别接种于94mm×16mm培养皿中,每皿5mL,于37℃、5%CO₂培养箱培养。当细胞融合率达80%时,弃去培养基。设对照组、LY294002处理组(LY处理组)、菊苣酸处理组(CA处理组)和LY294002及菊苣酸处理组(LY+CA处理组)。对照组、LY处理组和CA处理组分别加入无血清DMEM培养基、含有LY294002(终浓度为20μmol/L)的无血清培养基及含有菊苣酸(终浓度为100μmol/L)的无血清DMEM培养基,各培养24h; LY+CA处理组加入含有LY294002(终浓度为20μmol/L)的无血清培养基孵育30min,然后向培养基中加入终浓度为100μmol/L的菊苣酸处理24h。

1.3.5 细胞蛋白提取

将处理好的细胞用4℃预冷的磷酸盐缓冲溶液(PBS)清洗3遍,吸干水分。向各培养皿中分别加入含有10%蛋白酶抑制剂(PMSF)的细胞裂解液(RIPA)140μL,裂解细胞10min后,刮铲刮取细胞碎片,收集于1.5mL离心管中。冷冻离心(4℃,15000r/min)10min,取上清液。采用BCA法测蛋白浓度,对样品进行不同程度稀释,以使各样品浓度一致。分别向稀释后各样品中加入上样缓冲液,95℃反应10min,冷却混匀,待用。

1.3.6 蛋白质免疫印迹(Western blotting)

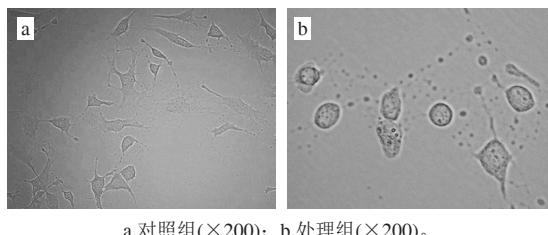
取等量处理后蛋白样品,使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离。然后将蛋白转印至PVDF膜上(0.45μm, Millipore),用5%脱脂乳25℃条件下封闭2h,用1×TTBS缓冲液(20mmol/L Tris, 166mmol/L NaCl, 0.05%吐温-20, pH7.5)洗膜3次,每次10min。将膜放入一抗(Anti-PGC-1α Antibody-TTBS(1:500, V/V); Anti-FoxO4 Antibody-TTBS(1:500, V/V); Anti-β-actin Antibody-TTBS(1:1000, V/V), 4℃孵育过夜。以1×TTBS缓冲液洗膜3次,每次10min,加二抗(1:2000, V/V)孵育2h后,1×TTBS缓冲液洗膜3次,每次10min。最后采用ECL发光试剂盒荧光显色,ChemiDox凝胶成像系统成像。蛋白相对表达量是相对对照组检测的表达量而言的。

1.4 数据处理及统计

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用DPS9.50软件Duncan新复极差法进行统计学分析,Origin8.0软件作图。

2 结果与分析

2.1 菊苣酸对3T3-L1前脂肪细胞形态的影响



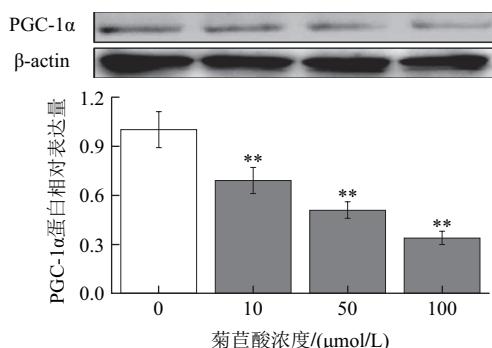
a.对照组($\times 200$)；b.处理组($\times 200$)。

图1 菊苣酸对3T3-L1前脂肪细胞形态的影响

Fig.1 Effect of chicoric acid on morphology of 3T3-L1 preadipocytes

如图1所示,对照组细胞完全贴壁,细胞均匀透亮,紧密相连;形态类似成纤维细胞,呈梭状或有多个突起的三角形。终浓度为 $100\mu\text{mol/L}$ 菊苣酸处理细胞24h后,细胞形状发生明显变化,多呈圆形,失去纤维状形态;细胞数目减少,体积变大;细胞间基本接触消失,并出现脱落现象。AO/EB及DAPI染色结果显示,菊苣酸处理后,细胞出现典型的凋亡特征^[16]。因此,3T3-L1前脂肪细胞形态的变化应由细胞凋亡引起。

2.2 菊苣酸对PGC-1 α 蛋白表达的影响



**.与对照组相比较,有极显著性差异($P<0.01$)。图3~5同。

图2 菊苣酸浓度对PGC-1 α 蛋白表达的影响($n=3$)

Fig.2 Effect of chicoric acid concentration on PGC-1 α expression ($n=3$)

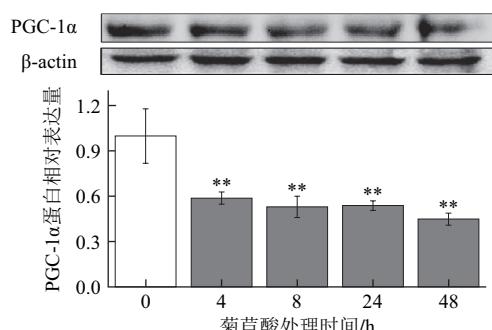
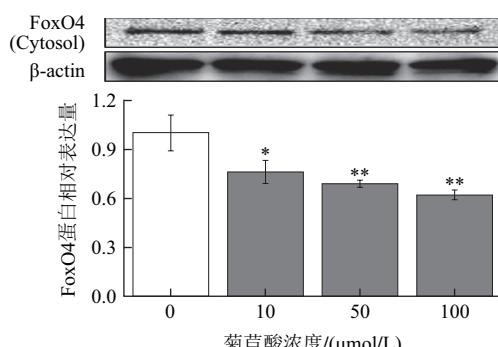


图3 菊苣酸处理时间对PGC-1 α 蛋白表达的影响($n=3$)

Fig.3 Effect of treatment time of chicoric acid on PGC-1 α expression ($n=3$)

由图2、3可见,菊苣酸对PGC-1 α 蛋白表达有明显的抑制作用。随着菊苣酸作用浓度($10\sim 100\mu\text{mol/L}$)的升高,PGC-1 α 蛋白表达逐渐下降,并呈浓度依赖关系(图2)。菊苣酸($100\mu\text{mol/L}$)处理3T3-L1前脂肪细胞4h后,细胞中PGC-1 α 蛋白表达与对照组相比明显下降;随着作用时间的延长,PGC-1 α 水平与4h处理组相比有不同程度的降低,但差异不明显(图3)。

2.3 菊苣酸对FoxO4蛋白表达的影响



*.与对照组比较,有显著性差异($P<0.05$)。

图4 菊苣酸浓度对FoxO4蛋白表达的影响($n=3$)

Fig.4 Effect of chicoric acid concentration on FoxO4 expression ($n=3$)

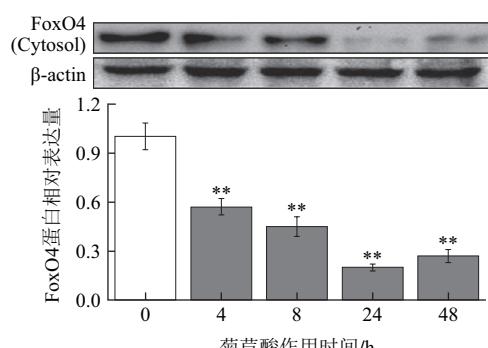


图5 菊苣酸作用时间对FoxO4蛋白表达的影响($n=3$)

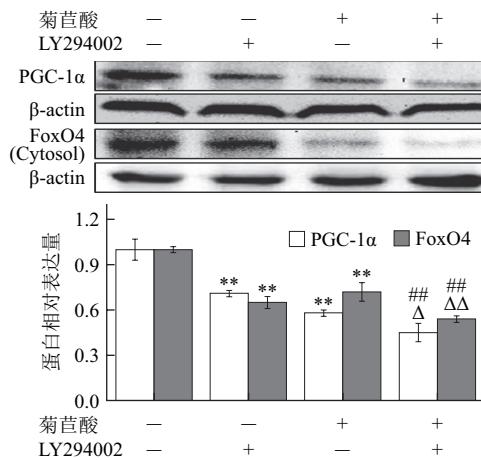
Fig.5 Effect of treatment time of chicoric acid on FoxO4 expression ($n=3$)

由图4、5可见,菊苣酸下调细胞质中FoxO4蛋白的水平。菊苣酸作用浓度越高,其对细胞质中FoxO4蛋白表达的抑制作用越明显(图4)。随着菊苣酸($100\mu\text{mol/L}$)对3T3-L1前脂肪细胞处理时间的延长($4\sim 24\text{h}$),细胞质中FoxO4蛋白表达水平越低,呈时间依赖关系;菊苣酸处理48h后,细胞质中FoxO4蛋白表达水平与24h处理组相比稍有升高,但差异不显著(图5)。

2.4 PI3K/Akt介导菊苣酸对PGC-1 α 和FoxO4蛋白水平的调节

为进一步探讨菊苣酸调节3T3-L1前脂肪细胞中PGC-1 α 和FoxO4蛋白表达的机制,明确PI3K/Akt信号通路是否在其中发挥作用,采用PI3K/Akt抑制剂LY294002阻断该信

号通路，降低Akt的磷酸化水平，在此基础上检测菊苣酸对PGC-1 α 和FoxO4蛋白表达的影响，结果如图6所示。



#与LY294002处理组相比较，有极显著性差异($P<0.01$)；

△与菊苣酸处理组相比较，有显著性差异($P<0.05$)；

△△与菊苣酸处理组相比较，有极显著性差异($P<0.01$)。

图 6 PI3K/Akt介导菊苣酸对PGC-1 α 和FoxO4蛋白水平的调节($n=3$)

Fig.6 Mediatory role of PI3K/Akt in the regulatory effect of chicoric acid on the expressions of PGC-1 α and FoxO4 ($n=3$)

由图6可见，LY294002可减少细胞中PGC-1 α 和FoxO4蛋白的表达，并增强菊苣酸对PGC-1 α 和FoxO4蛋白的下调。另外，菊苣酸可直接抑制PI3K/Akt信号通路^[16]。因此可推断，菊苣酸通过PI3K/Akt信号通路抑制3T3-L1前脂肪细胞中PGC-1 α 和FoxO4蛋白的表达。

3 讨论

诱导前脂肪细胞凋亡是天然食品因子干预肥胖的重要途径之一。有研究显示，富含花青素的笃斯越橘花青素提取物能够有效抑制3T3-L1前脂肪细胞的生长^[17]。本实验结果表明，天然多酚类化合物菊苣酸可明显改变3T3-L1前脂肪细胞的形态。另外，前期研究揭示，菊苣酸通过线粒体途径诱导3T3-L1前脂肪细胞凋亡。因此，推测菊苣酸具有抑制肥胖的生理活性及开发抗肥胖功能食品的潜力。

研究证明，PGC-1 α 与细胞凋亡有密切的联系。PGC-1 α 可刺激线粒体数目的增多及基因的表达，同时过表达的PGC-1 α 可减少由凋亡引起的线粒体膜电位差的改变，进而抑制凋亡刺激因子诱导的细胞凋亡^[1]。棕榈酸通过下调PGC-1 α 的mRNA表达诱导胰岛 β 细胞凋亡^[18]；过表达的PGC-1 α 通过促进脂肪酸氧化，减少氧化应激，进而抑制血管内皮细胞线粒体功能失调及凋亡^[19]。本研究证明，菊苣酸能够抑制3T3-L1前脂肪细胞中PGC-1 α 蛋白的表达，并呈浓度及时间依赖关系。菊苣酸可能通过下

调PGC-1 α 蛋白的表达，诱导3T3-L1前脂肪细胞线粒体功能失调，进而导致其凋亡，但这一推论有待于进一步证实。研究表明，PI3K/Akt抑制剂LY294002能够抑制PGC-1 α 在蛋白及mRNA水平上的表达^[20]。本实验结果表明，LY294002能够增强菊苣酸对PGC-1 α 蛋白水平的下调，证明PI3K/Akt信号通路是菊苣酸调节3T3-L1前脂肪细胞中PGC-1 α 水平的上游信号。

FoxO转录活性主要表现为对其磷酸化、乙酰化、亚细胞定位的调节。在Akt活性较低的情况下，FoxO主要在细胞核中，而磷酸化的Akt诱导FoxO从细胞核释放到细胞质中^[2]。实验结果显示，菊苣酸能够下调3T3-L1前脂肪细胞中FoxO4蛋白的水平。活化后的Akt可使细胞质中FoxO从细胞核释放到细胞质中。推测菊苣酸通过PI3K/Akt通路调节FoxO4的表达。本实验结果证实了这一推论，LY294002降低Akt活性后，菊苣酸对细胞质FoxO4蛋白的抑制作用增强。

综上所述，菊苣酸通过PI3K/Akt信号通路下调3T3-L1前脂肪细胞中PGC-1 α 和FoxO4蛋白表达。该研究为明确菊苣酸对3T3-L1前脂肪细胞的作用机制提供理论支持。然而，菊苣酸是否具有抗肥胖的生物活性，还有待于通过动物实验进一步证实。

参考文献：

- VALLE I, ALVAREZBARRIENTOS A, ARZA E, et al. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells[J]. *Cardiovascular Research*, 2005, 66(3): 562-573.
- ZHANG X, TANG N, HADDEN T J, et al. Akt, FoxO and regulation of apoptosis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2011, 1813(11): 1978-1986.
- WU B T, HUNG P F, CHEN H C, et al. The apoptotic effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes depends on the Cdk2 pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(14): 5695-5701.
- HSU C L, LO W H, YEN G C. Gallic acid induces apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes via a Fas-and mitochondrial-mediated pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(18): 7359-7365.
- HSU C L, YEN G C. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity[J]. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2006, 50(11): 1072-1079.
- LIU C Z, ABBASI B H, GAO M, et al. Caffeic acid derivatives production by hairy root cultures of *Echinacea purpurea*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(22): 8456-8460.
- SCHUTZ K, KAMMERER D R, CARLE R, et al. Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, 19(2): 179-186.
- LEE J, SCAGEL C F. Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves[J]. *Food Chemistry*, 2009, 115(2): 650-656.
- BAUR S, KLAIBER R G, KOBLO A, et al. Effect of different washing procedures on phenolic metabolism of shredded, packaged

- iceberg lettuce during storage[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(23): 7017-7025.
- [10] INNOCENTI M, GALLORI S, GIACCHERINI C, et al. Evaluation of the phenolic content in the aerial parts of different varieties of *Cichorium intybus* L.[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(16): 6497-6502.
- [11] OLAH N K, RADU L, MOGOSAN C, et al. Phytochemical and pharmacological studies on *Orthosiphon stamineus* Benth.(Lamiaceae) hydroalcoholic extracts[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 33(1): 117-123.
- [12] DALBY-BROWN L, BARSETT H, LANDBO A K R, et al. Synergistic antioxidative effects of alkamides, caffeic acid derivatives, and polysaccharide fractions from *Echinacea purpurea* on *in vitro* oxidation of human low-density lipoproteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(24): 9413-9423.
- [13] ROBINSON W E, REINECKE M G, ABDEL-MALEK S, et al. Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(13): 6326-6331.
- [14] PARK C M, JIN K S, LEE Y W, et al. Luteolin and chicoric acid synergistically inhibited inflammatory responses via inactivation of PI3K-Akt pathway and impairment of NF-κB translocation in LPS stimulated RAW 264.7 cells[J]. European Journal of Pharmacology, 2011, 660: 454-459.
- [15] TOUSCH D, LAJOIX A D, HOSY E, et al. Chicoric acid, a new compound able to enhance insulin release and glucose uptake[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 377(1):131-135.
- [16] XIAO Haifang, WANG Jing, YUAN Li, et al. Chicoric acid induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes through ROS-mediated PI3K/Akt and MAPK signaling pathways[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(7): 1509-1520.
- [17] 柳嘉, DAVID G P, 景浩. 笃斯越橘花青素提取物对3T3-L1前脂肪细胞生长的抑制作用[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 248-252.
- [18] 何婷婷. PGC-1 α 在胰岛细胞凋亡中的表达及其与NF-κB通路的关系[D]. 广州: 中山大学, 2009: 22-23.
- [19] KOH E H, KIM Y M, KIM H J, et al. Protective effect of PGC-1 on lipid overload-induced apoptosis in vascular endothelial cell[J]. The Journal of Korean Diabetes Association, 2006, 30(3): 151-160.
- [20] RAO Jingjing, LI Jing, LIU Yun, et al. The key role of PGC-1 α in mitochondrial biogenesis and the proliferation of pulmonary artery vascular smooth muscle cells at an early stage of hypoxic exposure[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2012, 367: 9-18.