

- Correlation of apomorphine and amphetamine- induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6- hydroxydopamine lesioned rats[J]. Brain Res , 1993 , 626(1- 2) : 167- 174.
- [5] 曹非, 骆芳, 陈涵, 等. 帕金森病大鼠发病过程中纹状体区乙酰胆碱水平动态变化及行为学观察[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(15): 3246- 3247.
- [6] Becker JB. Estrogen rapidly potentiates amphetamine- induced striatal dopamine release and rotational behavior during microdialysis [J]. Neurosci Lett , 1990 , 118(2) : 169- 171.
- [7] Bourque M , Dluzen DE , Di Paolo T. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease[J]. Front Neuroendocrinol , 2009 , 30(2) : 142- 157.
- [8] Simpkins JW , Yang SH , Liu R , et al. Estrogen- like compounds for ischemic neuroprotection [J]. Stroke , 2004 , 35(11) : 2648- 2651.
- [9] 裴新, 陆地, 周宇冠. 雌激素对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化应激的保护作用研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2010, 32(5): 608- 612.
- [10] Morale MC , Serra PA , L'episcopo F , et al. Estrogen , neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease : glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration [J]. Neuroscience , 2006 , 138 (3) : 869- 878.
- (责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

川芎嗪对 3T3- L1 增殖分化及分泌 Leptin、PAI- 1 的影响

刘新迎¹, 周联², 王培训²

1. 佛山市南海区罗村医院, 广州 佛山 528226; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

[摘要] 目的: 研究川芎嗪 (Tetramethylpyrazine, TMP) 对小鼠前脂肪细胞 3T3-L1 增殖分化和分泌瘦素 (Leptin)、纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-1) 的影响。方法: 培养 3T3-L1 细胞, 并分别用川芎嗪 5 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 3 个浓度进行干预, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 测定 3T3-L1 的增殖; 油红 O 进行染色以及染色比色法测定细胞分化程度; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定细胞培养上清中 Leptin、PAI-1 含量。结果: 川芎嗪 100 μg/mL 浓度组能明显抑制 3T3-L1 细胞的增殖, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 3 个浓度组对细胞分化均无明显影响; TMP 3 个浓度组对 Leptin 的分泌和 50 μg/mL、100 μg/mL 浓度组对 PAI-1 的分泌均有明显抑制作用, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 川芎嗪对脂肪细胞的调节作用以影响其分泌功能为主。

[关键词] 川芎嗪; 前脂肪细胞 (3T3-L1); 增殖分化; 瘦素 (Leptin); 纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-1)

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256- 7415 (2016) 09- 0230- 03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.09.100

Effect of Tetramethylpyrazine on Proliferation and Differentiation and Secreting Leptin and PAI-1 of Preadipocyte 3T3-L1

LIU Xinying , ZHOU Lian , WANG Peixun

Abstract : Objective : To research the effect of tetramethylpyrazine (TMP) on proliferation and differentiation and secreting Leptin and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI- 1) of preadipocyte 3T3- L1 in rats. Methods : Cultured 3T3- L1 cells , and intervene with TMP of 5 μg/mL , 50 μg/mL and 100 μg/mL. Proliferation of 3T3- L1 was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). Dying with Oil Red O and detected cell differentiated degree by staining and colorimetric method , detected levels of Leptin and PAI- 1 in cell culture supernatants by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Results : TMP with concentration of 100 μ g/mL could inhibit cell proliferation obviously , 3 groups of TMP with different concentrations had no obvious effect on

[收稿日期] 2016-03-26

[作者简介] 刘新迎 (1972-), 女, 副主任中医师, 研究方向: 中医临床。

cell differentiation. But 3 groups of TMP with different concentrations could inhibit Leptin secretion, and TMP with concentration of 50 μ g/mL, 100 μ g/mL could inhibit PAI-1 secretion obviously. Conclusion: The regulation of TMP on fat cell mainly affects secretion function.

Keywords: Tetramethylpyrazine (TMP); Preadipocyte 3T3-L1; Proliferation; Differentiation; Leptin; Plasminogen activator inhibitor type 1(PAI-1)

川芎嗪(TMP)是从活血化瘀类中药川芎中提取的一种生物碱单体,具有扩张血管,拮抗血小板凝集,清除氧自由基,加快血液循环等作用^[1-3],目前研究还发现,在脂肪颗粒移植方式隆胸手术中,川芎嗪对提高脂肪的成活率具有较明显的作用^[4]。前脂肪细胞(3T3-L1)是从小鼠胚胎的 Swiss3T3 细胞中诱导分化出来的,能特异性地分化成脂肪细胞,是目前被广泛应用于脂肪细胞研究的前脂肪细胞系。本试验以 3T3-L1 细胞为细胞模型探讨 TMP 对脂肪细胞增殖、分化、分泌功能等方面的影响。

1 实验材料

1.1 细胞株 小鼠前脂肪细胞 3T3-L1,来源于上海细胞研究所。

1.2 药物与试剂 TMP 来源于中国药品生物制品检定所;高糖 DMEM 培养基(H-DMEM), Gibco 公司产品;胎牛血清, PAA 公司产品;地塞米松, ICN 公司产品;合成人胰岛素, Novo Nordisk 公司产品;1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤 (IBMX), Sigma 公司产品;油红 O, AMRESCO 公司产品;小鼠 Leptin 检测试剂盒(ELISA), 武汉博士德生物工程有限公司产品;小鼠 PAI-1 检测试剂盒(ELISA), Uscn Life Science & Technology Company 公司产品。TMP 用纯水溶解,再用完全培养液分别稀释至 5 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL 三个浓度;完全培养液和诱导液配制参见文献[5]。

2 实验方法

2.1 3T3-L1 细胞的培养和诱导分化 参照文献[5]进行相关实验。

2.2 TMP 对 3T3-L1 细胞增殖的影响 将处于对数生长期的细胞按 1×10^3 个细胞/孔接种于 96 孔培养板中,每孔体积 200 μ L,待细胞完全贴壁后,分别加入 5 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL 三个浓度的 TMP,每个剂量设 3 个平行孔,同时分别设未加 TMP 的完全培养液组以及溶媒组作对照。加药培养后 96 h,以 MTT 法测定其增殖情况。

2.3 TMP 对 3T3-L1 细胞诱导分化的影响 在 3T3-L1 细胞完全融合 2 d 后换用诱导液开始诱导的同时,分别加入三个浓度的 TMP,直至实验结束,同时分别设未加 TMP 的完全培养液组、单纯诱导液组、以及溶媒组作对照。对诱导分化 8 d 的 3T3-L1 细胞进行油红 O 染色,于显微镜下观察用异丙醇处理染色的细胞,510 nm 波长检测吸光度值(OD 值),对分化程度

进行定量^[6]。

2.4 不同浓度 TMP 对 3T3-L1 细胞 Leptin、PAI-1 分泌的测定 将细胞按 1×10^5 个细胞/孔的密度接种于 24 孔培养板,1 mL/孔,5% CO₂ 孵育箱中培养,待细胞完全融合 2 d 后,换用诱导液培养 48 h,然后换以含 10 μ g/mL 胰岛素的完全培养液培养 48 h,随后再换用完全培养液继续培养,2 d 换培养液 1 次,培养 96 h,共诱导分化 8 d,85% 以上分化为成熟脂肪细胞,然后用含 0.5% FBS 培养液血清饥饿 12 h,用不同浓度的 TMP 继续培养 48 h,取上清液进行检测,同时设未加 TMP 的空白组和溶媒组作对照。用 ELISA 法测定细胞培养上清中 Leptin、PAI-1 含量,具体方法按试剂盒说明书操作。

2.5 统计学方法 实验结果数据用统计软件 SPSS11.0 进行处理,组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 不同浓度 TMP 对 3T3-L1 细胞增殖分化的影响 见表 1。TMP100 μ g/mL 浓度组能明显抑制细胞的增殖,与培养液组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),而其他两个浓度组对细胞增殖无明显影响;TMP 三个浓度组对 3T3-L1 细胞分化无明显影响。

表 1 不同浓度 TMP 对 3T3-L1 细胞增殖分化的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ μ g/mL	细胞增殖(A570nm)	细胞分化(A510nm)
培养液组	—	0.397 \pm 0.043	0.496 \pm 0.095 ^②
诱导液组	—	—	1.953 \pm 0.519
溶媒组	—	0.398 \pm 0.007	1.952 \pm 0.146
TMP	5	0.363 \pm 0.016	1.674 \pm 0.204
	50	0.344 \pm 0.024	1.580 \pm 0.031
	100	0.298 \pm 0.008 ^①	1.756 \pm 0.207

与培养液组比较,① $P < 0.01$;与诱导液组比较,② $P < 0.01$

3.2 不同浓度 TMP 对 3T3-L1 细胞分泌 Leptin、PAI-1 的影响 见表 2。TMP 在 5、50、100 μ g/mL 三个浓度均明显抑制 3T3-L1 细胞 Leptin 分泌,与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);TMP 在 50、100 μ g/mL 两个浓度对 PAI-1 分泌有明显抑制作用,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);溶媒对细胞 Leptin、PAI-1 分泌无影响。

表2 不同浓度TMP对3T3-L1细胞Leptin、PAI-1分泌的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Leptin(pg/mL)	PAI-1(ng/mL)
空白组	649.50±7.31	4.15±0.25
TMP5 μg/mL	602.91±6.23 ^②	4.09±0.59
TMP50 μg/mL	560.60±25.88 ^②	3.63±0.44 ^①
TMP100 μg/mL	521.09±23.45 ^②	3.37±0.13 ^②
溶媒组	644.06±6.85	4.17±0.08

与空白组比较, ① $P < 0.05$; ② $P < 0.01$

4 讨论

脂肪组织不仅仅是被动的能量储存器官,而且是能分泌多种蛋白质及细胞因子的内分泌器官,同时还具有重要的组织损伤修复功能,脂肪组织数量的平衡与稳定与机体的正常代谢密切相关^[7-8]。脂肪细胞在脂肪组织中占三分之一,脂肪细胞的数目和体积以及能量摄入及释放之间的平衡决定了生物体内脂肪组织的数量,脂肪细胞是一类特殊的细胞,其细胞内含有一个或多个脂滴,脂滴是细胞储存脂肪的一种形式。脂肪细胞在脂肪组织中非常活跃,其数目、形态、细胞内脂肪的含量以及细胞因子的分泌均处于动态变化过程中,脂肪细胞的增殖分化以及分泌功能异常是导致许多脂肪代谢紊乱性疾病的生物学基础。

Leptin是第一个分离的脂源性激素,主要由脂肪细胞合成分泌,Leptin的表达和分泌量与脂肪含量及肥胖程度相关,Leptin是经典意义上的蛋白质类内分泌激素,具有十分广泛的生理效应,脂肪代谢调节、机体内脂肪的沉积等都与Leptin密切相关。PAI-1是组织型纤溶酶原激活物(t-PA)和尿激酶型纤溶酶原激活物(u-PA)的特异性快速抑制剂,能抑制纤维蛋白溶解和细胞外基质降解,血浆中高浓度的PAI-1是血栓形成的危险因素,在糖尿病、心血管病变的发生中起重要作用。虽然许多细胞均能分泌PAI-1,但在肥胖、胰岛素抵抗时,脂肪组织被认为是其主要来源,循环中的PAI-1水平与腹型肥胖相关,被认为是联系肥胖、2型糖尿病和心血管事件的重要纽带。

川芎嗪是川芎中提取的有效生物碱四甲基吡嗪,具有多种生物学功效,如对心脏疾病的治疗效果,肝、肾损伤的修复保护作用,对肥胖性高血压症状的改善等^[9-12]。本研究发现川芎嗪对3T3-L1前脂肪细胞的增殖有明显抑制作用,而且对脂肪细胞分泌Leptin和PAI-1均有明显抑制作用,说明川芎嗪对脂肪细胞的调节作用以影响其分泌功能为主。本研究以脂肪细胞为切入点,探讨了川芎嗪的作用机制,但由于脂肪组织以及

内分泌调节网络的复杂性,其进一步的作用靶点和机制,有待于深入研究。

[参考文献]

- [1] 史大卓. 川芎嗪的药理作用谏议[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(5): 377-378.
- [2] 李元海, 李俊, 吕雄文, 等. 异丙酚和川芎嗪相互作用对大鼠肝脏缺血/再灌注损伤的影响[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(4): 452-456.
- [3] 李福龙, 李继红, 刘艳凯, 等. 川芎嗪、当归注射液对DIC大鼠血小板功能和器官血流量的影响[J]. 基础医学与临床, 2006, 26(8): 909-910.
- [4] 刘浩, 金光柱. 自体脂肪颗粒移植联合川芎嗪隆胸临床疗效研究[J]. 中国保健营养, 2013, 33(5): 2278.
- [5] 刘新迎, 周联, 梁瑞燕, 等. 柚皮苷对前脂肪细胞3T3-L1增殖和诱导分化的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(3): 176-179.
- [6] Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O[J]. Histochemistry, 1992, 97(6): 493-497.
- [7] Scherer PE. Adipose Tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ[J]. Diabetes, 2006, 55(6): 1537-1545.
- [8] 王葳, 姜燕, 王巍巍, 等. 黄芪甲苷孵育脂肪源性干细胞对顺铂诱导的肾小管上皮细胞损伤的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2013, 29(7): 520-524.
- [9] 赵润英, 郝伟, 孟祥军, 等. 阿魏酸川芎嗪对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及分子机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 230-234.
- [10] 马俊梅. 川芎嗪对肥胖性高血压大鼠症状的改善作用研究[J]. 中外医疗, 2014, 33(5): 21-22.
- [11] 孙玉芹, 高天芸, 周娟, 等. 川芎嗪对小鼠急性肝损伤性脂肪肝保护作用的研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(5): 540-543.
- [12] 廖于, 李龙辉, 左国庆, 等. 川芎嗪对体外诱导的酒精性脂肪肝细胞的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(8): 628-629.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)