

## 芦丁促进3T3-L1前脂肪细胞棕色化及其机制

吕迎兰<sup>1</sup>, 程龙<sup>1</sup>, 石璐<sup>1</sup>, 代泓钰<sup>1</sup>, 段钰卉<sup>1</sup>, 安永铖<sup>2</sup>, 李慧敏<sup>1</sup>, 王晨<sup>2</sup>,  
何昶昊<sup>1</sup>, 黄艳<sup>2</sup>, 张慧琳<sup>1</sup>, 付宛鑫<sup>2</sup>, 孟闫燕<sup>3\*</sup>, 赵保胜<sup>3\*</sup>

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488;

2. 北京中医药大学生命科学学院, 北京 102488;

3. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 100029)

**[摘要]** 目的:观察芦丁对3T3-L1前脂肪细胞棕色化效应的影响,并探讨其机制。方法:细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)法检测不同浓度芦丁(3.125、6.25、12.5、25、50、100、200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对3T3-L1细胞活性影响,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测不同浓度芦丁(12.5、25、50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对脂肪细胞产热相关蛋白解偶联蛋白1(UCP1)、PR结构域蛋白16(PRDM16)、过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 辅助激活因子-1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ )表达的影响。确定芦丁最佳浓度后,油红O染色观察芦丁对脂肪细胞中脂滴生成的影响,Western blot检测线粒体生物合成标志性蛋白核呼吸因子1(NRF1)、核呼吸因子2(NRF2)和线粒体转录因子A(TFAM)的表达。结果:与空白组比较,200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芦丁显著抑制3T3-L1细胞活性( $P<0.01$ );在12.5、25、50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芦丁显著促进产热蛋白(UCP1、PRDM16、PGC-1 $\alpha$ )表达( $P<0.01$ ),确定为最佳浓度。与空白组比较,芦丁50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 显著增加3T3-L1细胞线粒体UCP1蛋白的免疫荧光强度( $P<0.01$ )及线粒体生物合成标志性蛋白NRF1、NRF2和TFAM的表达( $P<0.01$ ),显著抑制3T3-L1脂肪细胞脂滴生成( $P<0.01$ )。结论:芦丁可抑制3T3-L1脂肪细胞脂滴沉积,增加产热相关蛋白(UCP1、PRDM16和PGC-1 $\alpha$ )及线粒体生物合成标志性蛋白(NRF1、NRF2和TFAM)的表达,从而诱导3T3-L1脂肪细胞棕色化,为开发安全调节白色细胞棕色化的药物提供实验室基础。

**[关键词]** 芦丁; 3T3-L1前脂肪细胞; 脂肪细胞棕色化; 肥胖; 线粒体生物合成

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)05-0137-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.202201727

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220720.1116.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-07-20 16:31:52

## Rutin Promotes Browning of 3T3-L1 Preadipocytes and Its Mechanism

LYU Yinglan<sup>1</sup>, CHENG Long<sup>1</sup>, SHI Lu<sup>1</sup>, DAI Hongyu<sup>1</sup>, DUAN Yuhui<sup>1</sup>, AN Yongcheng<sup>2</sup>,  
LI Huimin<sup>1</sup>, WANG Chen<sup>2</sup>, HE Changhao<sup>1</sup>, HUANG Yan<sup>2</sup>, ZHANG Huilin<sup>1</sup>,  
FU Wanxin<sup>2</sup>, MENG Yanyan<sup>3\*</sup>, ZHAO Baosheng<sup>3\*</sup>

(1. College of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

2. College of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

3. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of rutin on the browning of 3T3-L1 preadipocytes and the mechanism. **Method:** Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the effect of different concentration of rutin (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on 3T3-L1 cell activity, and Western blot to examine the effect of rutin (12.5, 25, 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on the expression of thermogenesis-associated

**[收稿日期]** 2022-04-24

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81973535, 82004167)

**[第一作者]** 吕迎兰,在读硕士,从事中医药防治代谢性疾病研究,E-mail:18340078211@163.com

**[通信作者]** \* 孟闫燕,博士,副研究员,从事中医药防治肺病的应用与基础研究,E-mail:myy21\_2001@163.com;

\* 赵保胜,博士,研究员,从事桑叶治疗2型糖尿病作用与机制研究,E-mail:zhaobs1973@163.com

proteins uncoupling protein 1 (UCP1), PR domain containing 16 (PRDM16) and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) in adipocytes. After the optimal concentration of rutin was determined, the effect of rutin on lipid droplet formation in adipocytes was observed based on oil red O staining, and the expression of nuclear respiratory factor 1 (NRF1), nuclear respiratory factor 2 (NRF2) and mitochondrial transcription factor A (TFAM), which were the landmark proteins of mitochondrial biosynthesis, was detected by Western blot. **Result:** Compared with the blank group, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  rutin inhibited 3T3-L1 cell activity ( $P<0.01$ ). Compared with the blank group, at the concentration of 12.5, 25, 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  rutin significantly promoted the expression of thermogenesis-associated proteins (UCP1, PRDM16, and PGC-1 $\alpha$ ) ( $P<0.01$ ), which was determined as the optimal concentration. Compared with the blank group, 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  rutin significantly increased the immunofluorescence intensity of mitochondrial UCP1 protein in 3T3-L1 cells ( $P<0.01$ ) and the expression of the markers of mitochondrial biosynthesis (NRF1, NRF2, and TFAM) ( $P<0.01$ ). In addition, 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  rutin significantly inhibited lipid droplet formation of 3T3-L1 adipocytes ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Rutin inhibited lipid droplet deposition in 3T3-L1 adipocytes and increased the expression of thermogenesis-related proteins (UCP1, PRDM16, and PGC-1 $\alpha$ ) and markers of mitochondrial biosynthesis (NRF1, NRF2, and TFAM), thereby inducing the browning of 3T3-L1 adipocytes. This lays a basis for the development of drugs that safely regulate the browning of white cells.

[**Keywords**] rutin; 3T3-L1 preadipocytes; adipocyte browning; obesity; mitochondrial biogenesis

肥胖已成为引发全球关注的健康问题,如果不进行有效干预,预计到2025年,将有10亿成年人(占世界人口的近20%)患有肥胖症<sup>[1]</sup>。肥胖常引起糖尿病、心脑血管病、脂肪肝等疾病的发生<sup>[2]</sup>,最近研究发现,肥胖会增加新冠肺炎患者患重症的风险<sup>[3]</sup>。肥胖引发的健康危机给医疗系统带来了巨大的压力。脂肪细胞功能和代谢异常是引起肥胖的主要原因之一,由于能量消耗少于能量摄入,过剩的能量以甘油三酯在白色脂肪组织(WAT)中过度沉积,使白色脂肪与棕色脂肪组织(BAT)比例失衡,大量WAT生成,最终导致肥胖发生<sup>[4]</sup>。哺乳动物有3种主要类型的脂肪细胞:白色脂肪细胞、米色脂肪细胞和棕色脂肪细胞。白色脂肪细胞用于储存能量,米色和棕色脂肪细胞是专门的生热细胞,能够以热量的形式消耗能量<sup>[3]</sup>。虽然白色脂肪与棕色脂肪有共同的特征,如脂质积累和内分泌功能,但棕色脂肪表现出更小的脂滴及多室结构,其功能主要是氧化甘油三酯水解产生的脂肪酸来产生热量,并以热量的形式散失,而白色脂肪则具有单室结构<sup>[4]</sup>。棕色脂肪组织在成年人体内存在,且功能活跃<sup>[5]</sup>,对2型糖尿病及心脏代谢具有重要贡献。白色脂肪棕色化和棕色脂肪产热能够促进多余的脂肪消耗。因此,增加产热脂肪组织的丰度和活性是提高能量消耗、对抗代谢性疾病和肥胖症的有效策略,研究开发安全调节棕色脂肪活性的药物对改善肥胖及相关代谢性疾病具有巨大市场潜力<sup>[6]</sup>。芦丁是黄酮

类天然化合物之一,作为毛细血管稳定剂临床应用多年,未发现明显不良反应<sup>[7]</sup>,具有抗糖尿病、抗炎、促进代谢等作用<sup>[8-10]</sup>。芦丁在改善肥胖方面有显著成效,不仅可诱导肥胖小鼠皮下脂肪组织中棕色样脂肪细胞的形成<sup>[7]</sup>,还可通过单磷酸腺苷激活蛋白激酶(AMPK)信号通路促进白色脂肪棕色化和棕色脂肪活化及促进高脂饮食诱导的肥胖大鼠肌肉线粒体生物合成<sup>[7,11]</sup>。3T3-L1前脂肪细胞是研究脂肪形成最常用的体外模型细胞之一<sup>[4]</sup>,近年来研究发现,肉桂<sup>[12]</sup>、姜黄素<sup>[13]</sup>、人参皂苷Rb<sub>1</sub><sup>[14]</sup>、丹参酮II<sub>A</sub><sup>[15]</sup>等多种中药、单体可促进3T3-L1细胞产生棕色化效应。但芦丁促进白色脂肪棕色化的机制尚不完全清楚,本研究观察芦丁对3T3-L1脂肪细胞脂滴形成、线粒体生物合成及产热相关蛋白表达的情况,并阐明其诱导脂肪棕色化的作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞系** 3T3-L1前脂肪细胞株,购于武汉普诺赛生命科技有限公司,编号9K0005DC0D,传至7代。

**1.2 药品与试剂** 芦丁(纯度为95%),3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为G21N11L131837、W27S11E126100);胎牛血清(FBS,浙江天杭生物科技股份有限公司,批号21040704);DMEM高糖培养基、0.25%胰蛋白酶、青链霉素(美国Corning公司,批号分别为30720021、04618004、30002297);地塞米松、胰岛素

(北京百瑞极生物科技有限公司,批号分别为20201102、W15J11E107428);饱和油红O、山羊血清、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、抗荧光淬灭封片剂(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为CR2102104、G5001、G1012、G1401);细胞增殖与毒性检测-8(CCK-8)试剂盒(北京翱擎生物科技有限公司,批号AQ308);蛋白Marker(美国Thermo Scientific公司,批号00787299);PVDF膜(0.45 μm)(德国Merck Millipore公司,批号R0BB30223);超敏ECL化学发光试剂盒(苏州新赛美生物科技有限公司,批号20210714);抗UCP1抗体(美国Santa Cruz Biotechnology公司,批号#A2320);山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G、PGC-1α抗体、UCP1抗体、山羊抗兔(英国Abcam公司,批号分别为ab150113、GR3245994-2、GR3329095-1、GR3315336-6);PRDM16抗体(美国Novus公司,批号B605-1404);NRF1抗体、NRF2/GABPA抗体、TFAM抗体、β-肌动蛋白(β-actin)、山羊抗鼠(美国Proteintech公司,批号分别为00022715、00042558、10011066、00091924、20000242)。

**1.3 仪器** HERACELL 150i型二氧化碳恒温培养箱、Nanodrop One型超微量紫外-可见分光光度计(美国Thermo Scientific公司);AE200型倒置显微镜(Motic麦克奥迪实业集团有限公司);CX23型正置光学显微镜(日本奥林巴斯公司);SP8型激光共聚焦显微镜(德国莱卡公司);BioTek Epoch型全波长酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);1658033型蛋白电泳系统及转膜仪(美国Bio-Rad公司);Amersham Imager 680型超灵敏多功能成像仪(美国Cellular Technology Ltd公司)。

**1.4 细胞培养基** 培养基I:含有10%胎牛血清、100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素和100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素的DMEM高糖培养基;培养基II:含有10%胎牛血清、100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素、100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素、5 mg·L<sup>-1</sup>胰岛素、1 μmol·L<sup>-1</sup>地塞米松和0.5 mmol·L<sup>-1</sup> IBMX的DMEM高糖培养基;培养基III:含有10%胎牛血清、100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素、100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素和5 mg·L<sup>-1</sup>胰岛素的DMEM高糖培养基。

## 2 方法

**2.1 CCK-8法检测芦丁对3T3-L1前脂肪细胞增殖活性** 将3T3-L1细胞接种至96孔板中,2×10<sup>4</sup>个/孔,分为8组,每组6个复孔。置于细胞培养箱孵育24 h,向8组分别加入不同浓度的芦丁10 μL,使8组终浓度分别为0、3.125、6.25、12.5、25、50、100、

200 μmol·L<sup>-1</sup>。孵育24 h,加入CCK-8溶液,10 μL/孔,继续孵育4 h。孵育结束后,酶标仪测定培养板中细胞450 nm处吸光度A,并计算细胞存活率。细胞存活率=(A<sub>药物组</sub>-A<sub>溶剂孔</sub>)/(A<sub>空白组</sub>-A<sub>溶剂孔</sub>)×100%。

**2.2 3T3-L1前脂肪细胞诱导分化与药物处理** 将3T3-L1前脂肪细胞按照1×10<sup>5</sup>个/孔于24孔板、1×10<sup>6</sup>个/孔于6孔板中进行诱导分化。首先以培养基I进行培养,培养至接触抑制后第2天,3T3-L1前脂肪细胞开始诱导分化,弃去培养基I,更换为培养基II,此日记为诱导分化的第0天。在第2天,弃去培养基II,更换培养基II继续培养;第3天,吸弃旧的培养基II,更换培养基III培养;第5天,弃去培养基III,更换培养基I培养。之后,每隔1 d,用培养基I换液,至第10天收集细胞测定。空白组处理如前所述。从第3天起,即更换培养基III开始用芦丁处理细胞,第3天和第4天将芦丁溶于培养基III处理细胞,从第5天开始将芦丁溶于培养基I处理细胞,隔天换液,至第10天收集细胞,进行下一步实验。根据药效学实验指标,选择最佳药效学剂量组,进行后续实验。

**2.3 油红O染色观察芦丁对3T3-L1脂肪细胞脂滴生成** 将3T3-L1前脂肪细胞接种于24孔板中,1×10<sup>5</sup>个/孔,诱导分化完成后吸弃旧的培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗2次,4%多聚甲醛固定细胞30 min,PBS漂洗,每孔加入油红O工作液500 μL,4℃过夜。弃去油红O,60%异丙醇洗去浮色,PBS漂洗,显微镜下观察拍照。图片采集完成后,弃去PBS,每孔加入异丙醇1 mL,于脱色摇床上震荡10 min,使细胞内与脂滴结合的油红O完全溶解,吸取100 μL至新的96孔板中,分为空白组和芦丁组,每组设置6个复孔,于490 nm处测定培养板中细胞A,测定3T3-L1脂肪细胞中脂滴的含量。此外,在显微镜下观察油红O染色后细胞内脂质累积情况,若出现“戒环状”排列脂滴,则证明诱导分化成功。

**2.4 免疫荧光染色观察芦丁对线粒体UCP1蛋白表达** 将3T3-L1前脂肪细胞按照1×10<sup>6</sup>个/孔接种至含有细胞爬片的6孔板,分为空白组和芦丁组。诱导分化完成后收集细胞进行线粒体UCP1蛋白免疫荧光染色。收集后的细胞经过固定、透化及封闭后加入一抗UCP1(1:200),4℃孵育过夜。次日弃去一抗,将细胞6孔板置脱色摇床上用PBS洗涤,用山羊抗兔IgG二抗(1:200)标记细胞,室温孵育1 h。爬片放置于PBS中在脱色摇床上洗涤,爬片甩干后滴加DAPI染液,室温避光孵育10 min。爬片放置

于PBS中在脱色摇床上洗涤,玻片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂进行封片。通过激光共聚焦荧光显微镜观察并采集图像,并通过Image Pro Plus 6.0软件计算积分吸光度,观察芦丁对3T3-L1前脂肪细胞线粒体UCP-1表达的影响。

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脂肪细胞相关蛋白表达** 将3T3-L1前脂肪细胞按照 $1 \times 10^6$ 个/孔接种至含有细胞爬片的6孔板,分为空白组和芦丁组。诱导分化完成后,加入RIPA裂解液400  $\mu\text{L}$ ,室温放置5 min,收集细胞于离心管,使用BCA法测定蛋白浓度。将制备好的SDS-PAGE胶装入电泳仪,加入SDS-PAGE电泳缓冲液,向加样孔中加入处理好的蛋白样品和Marker。恒压150 V电泳至Marker完全分离。通过电转将SDS-PAGE胶上的蛋白转移至PVDF膜上,电转时电压100 V,时间75 min。转膜后取出PVDF膜放入含有封闭液封闭1.5 h。加入一抗,其中UCP1、PGC-1 $\alpha$ 、PRDM16(1:1 000),NRF1、NRF2、TFAM(1:2 000), $\beta$ -actin(1:20 000),4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST洗涤PVDF膜,放入二抗(1:5 000)孵育1 h,用TBST洗涤。显影、曝光、拍照,测定蛋白条带灰度值,进行半定量分析。

**2.6 统计学处理** 采用SPSS 20.0软件进行统计,实验所得计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用Student's *t*分析,多组间数据比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 芦丁对3T3-L1细胞活性影响** 与空白组比较,200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芦丁组细胞活力显著下降( $P < 0.01$ )。见表1。为保证细胞活性状态,选取12.5、25、50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行细胞棕色化实验。

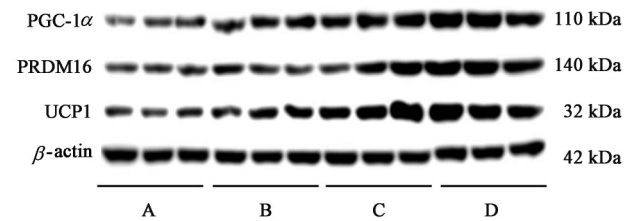
表1 芦丁对3T3-L1前脂肪细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1 Effect of different concentrations of rutin on viability of 3T3-L1 preadipocytes ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白组		100.00 $\pm$ 4.27
芦丁组	3.125	100.72 $\pm$ 2.68
	6.25	98.56 $\pm$ 3.67
	12.5	99.04 $\pm$ 3.45
	25	98.23 $\pm$ 2.64
	50	98.47 $\pm$ 4.23
	100	96.36 $\pm$ 2.54
	200	90.61 $\pm$ 3.06 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ (表3、表4同)

**3.2 芦丁对3T3-L1细胞棕色化的影响** 与空白组比较,芦丁(12.5、25、50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )可增加3T3-L1细胞产热相关蛋白UCP1、PGC-1 $\alpha$ 和PRDM16蛋白表达( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图1、表2。50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芦丁对3T3-L1细胞棕色化作用最佳,因此,选取芦丁50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行后续机制研究<sup>[16]</sup>。



注:A.空白组;B~D.芦丁组(12.5、25、50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

图1 芦丁作用3T3-L1前脂肪细胞后产热蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of rutin on expression of thermogenic proteins in 3T3-L1 preadipocytes

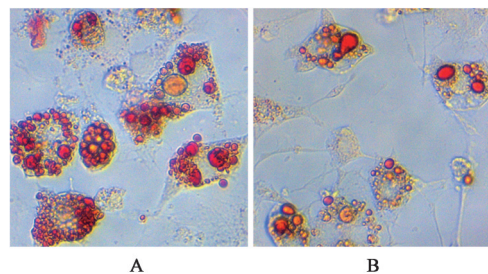
表2 芦丁对3T3-L1前脂肪细胞产热蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of rutin on expression of thermogenic proteins in 3T3-L1 preadipocytes ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PGC-1 $\alpha$ / $\beta$ -actin	PRDM16/ $\beta$ -actin	UCP1/ $\beta$ -actin
空白组		1.00 $\pm$ 0.34	1.00 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.15
芦丁组	12.5	1.81 $\pm$ 0.17 <sup>1)</sup>	1.17 $\pm$ 0.31	1.67 $\pm$ 0.30
	25	2.36 $\pm$ 0.52 <sup>2)</sup>	1.82 $\pm$ 0.91	3.02 $\pm$ 1.16 <sup>2)</sup>
	50	3.00 $\pm$ 0.49 <sup>2)</sup>	2.70 $\pm$ 0.30 <sup>2)</sup>	3.04 $\pm$ 0.68 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05, ^{2)}$  $P < 0.01$

**3.3 芦丁对3T3-L1前脂肪细胞脂质积累的影响** 空白组细胞中出现大量脂滴,且脂滴与油红O染料结合后呈“戒环状”排列;与空白组比较,芦丁组细胞中脂滴含量显著减少。见图2。表明芦丁可显著抑制脂肪细胞的脂质累积。



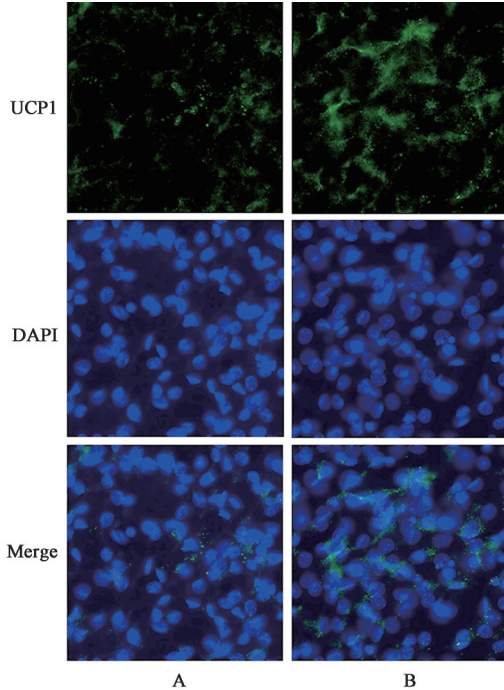
注:A.空白组;B.芦丁组(图3、图4同)

图2 芦丁对3T3-L1前脂肪细胞脂质积累的影响(油红O,  $\times 200$ )

Fig. 2 Effect of rutin on lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes (oil red O,  $\times 200$ )

**3.4 芦丁对3T3-L1细胞线粒体生物合成的影响** 与空白组比较,芦丁组显著增加3T3-L1细胞线粒体UCP1蛋白的免疫荧光强度( $P < 0.01$ )。见图3、

表3。芦丁组3T3-L1细胞线粒体NRF2蛋白表达显著增加( $P<0.01$ ), NRF1、TFAM蛋白表达也较空白组增加。见图4、表4。



注:A.空白组;B.芦丁组

图3 芦丁对3T3-L1前脂肪细胞UCP1蛋白的影响(免疫荧光,  $\times 200$ )

Fig. 3 Effect of rutin on UCP1 protein immunofluorescence in 3T3-L1 preadipocytes (immunofluorescence,  $\times 200$ )

表3 芦丁对3T3-L1前脂肪细胞UCP1蛋白免疫荧光的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Table 3 Effect of rutin on UCP1 protein immunofluorescence in 3T3-L1 preadipocytes ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	荧光强度/AU
空白组		0.41 $\pm$ 0.08
芦丁组	50	1.32 $\pm$ 0.22 <sup>1)</sup>

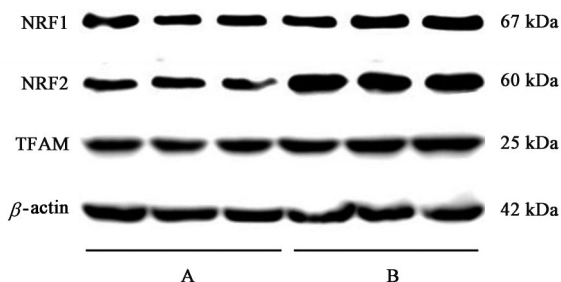


图4 芦丁作用3T3-L1细胞线粒体生物发生标志性蛋白表达电泳  
Fig. 4 Electrophoresis of rutin on expression of Hallmark proteins of mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 cells

#### 4 讨论

随时人们生活水平的提高和生活方式的改变,

表4 芦丁对3T3-L1细胞线粒体生物发生标志性蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Table 4 Effect of rutin on expression of Hallmark proteins of mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 cells ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	NRF1/ $\beta$ -actin	NRF2/ $\beta$ -actin	TFAM/ $\beta$ -actin
空白组		1.00 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.12
芦丁组	50	1.37 $\pm$ 0.28	1.95 $\pm$ 0.09 <sup>1)</sup>	1.40 $\pm$ 0.24

肥胖已成为全球性流行病,肥胖发生率逐年上升,严重威胁公众健康。肥胖的根本原因是能量消耗不足,过量的能量摄入会导致脂肪组织的扩张,包括脂肪细胞数量及脂肪细胞尺寸的增加。白色脂肪细胞的主要功能是在能量摄入超过消耗时将能量储存为脂肪,棕色或米色脂肪细胞则有助于在冷暴露或肾上腺素能刺激下进行非颤抖产热,从而促进能量消耗。BAT含有丰富的线粒体,通过氧化磷酸化的解偶联产生热量。研究表明,BAT有能力逆转与肥胖相关的代谢紊乱,并且作为一种内分泌器官,可能代表着肥胖及相关疾病的治疗靶点<sup>[17]</sup>。由于生热脂肪细胞的耗能特性,促进棕色或米色脂肪生成将是治疗肥胖的一种治疗策略<sup>[18-19]</sup>。近年来,研究人员一直试图通过调节脂肪生成来发现天然或合成的小分子化合物或生物分子来治疗肥胖或相关的代谢性疾病,许多天然化合物和中草药作为补充和替代药物越来越受到公众的关注,可以刺激棕色或米色脂肪的生成,并显示出抗肥胖的活性。芦丁因其药理活性而成为极具吸引力的植物化学物质之一<sup>[9]</sup>。有研究表明,芦丁通过激活SIRT1/PGC-1 $\alpha$ /TFAM信号通路,增加脂肪细胞线粒体数量和BAT活性,及能量消耗,从而显著改善肥胖<sup>[7]</sup>。

棕色和米色脂肪细胞最常用的分子标记是解偶联蛋白1(UCP1)的高表达,UCP1是一种线粒体膜蛋白,在BAT产热过程中起关键作用<sup>[15]</sup>,可将H<sup>+</sup>从蛋白通道流入线粒体基质,从而使氧化磷酸化与ATP合成解偶联,并伴随热释放<sup>[11]</sup>。研究发现,UCP1不仅在棕色脂肪细胞中表达,当机体受到如冷暴露和 $\beta$ -肾上腺素能药物刺激时,WAT中也可检测到表达UCP1具有产热能力与棕色脂肪细胞功能类似的多室脂肪细胞,该细胞被命名为米色脂肪细胞<sup>[5]</sup>。棕色和米色脂肪细胞虽然只占总脂肪组织的小部分,但由于他们参与产热的能力,可以对机体新陈代谢产生重要影响<sup>[3]</sup>。棕色脂肪细胞与米色脂肪细胞受热蛋白主要由UCP1、PGC-1 $\alpha$ 、PRDM16的表达诱导,PRDM16已被确定为决定棕色脂肪细胞

形成和功能的遗传开关<sup>[20]</sup>。产热转录反应的一个关键枢纽是过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 辅激活因子-1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ ),其在线粒体生物发生过程中起主要调节作用。PGC-1 $\alpha$ 被p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)磷酸化并激活,以响应 $\beta$ -肾上腺素能信号<sup>[3]</sup>。在棕色脂肪细胞中, $\beta$ -肾上腺素受体也是线粒体呼吸和适应性非颤抖产热机制的主要驱动力<sup>[21]</sup>。本实验结果表明,芦丁可促进UCP1、PGC-1 $\alpha$ 、PRDM16蛋白的表达。在上述基础之上,进一步检测了3T3-L1脂肪细胞脂滴聚集的情况,分化的3T3-L1细胞油红O染色结果表明,芦丁可显著抑制前脂肪细胞内脂滴积聚。

线粒体在维持代谢组织能量平衡方面起着关键作用<sup>[22]</sup>,肥胖和糖尿病患者的胰岛素抵抗与脂肪中的线粒体功能障碍密切相关<sup>[23-24]</sup>。此外,线粒体数量和活性的增加也是白色脂肪组织棕色化的特征,在棕色脂肪细胞的适应性产热中起着关键作用<sup>[25-26]</sup>。本研究中,芦丁显著增加3T3-L1脂肪细胞线粒体UCP1蛋白含量,表明芦丁增加了3T3-L1脂肪细胞线粒体数量和活性。TFAM是线粒体DNA复制、修复和基因转录的关键调节因子,TFAM过表达可增强能量消耗及更高的线粒体脂肪酸氧化能力,有助于减少脂肪积累和不完全脂肪氧化的代谢物<sup>[27-28]</sup>。PGC-1 $\alpha$ 作为一个关键的产热标记物可通过与NRF1/2相互作用调节TFAM,促进线粒体生物发生<sup>[29]</sup>。线粒体生物发生是由现有线粒体产生新的线粒体的过程,这一生物发生过程受PGC-1 $\alpha$ 调控,一旦被磷酸化或去乙酰化激活,PGC-1 $\alpha$ 就会激活NRF1和NRF2,然后激活TFAM,PGC-1 $\alpha$ -NRF-TFAM途径的激活导致线粒体DNA和蛋白质的合成及新线粒体的产生<sup>[30]</sup>。本研究中,芦丁增加了线粒体生物发生蛋白(NRF1、NRF2和TFAM)的表达水平。

综上所述,芦丁可抑制3T3-L1前脂肪细胞脂滴的沉积,促进棕色脂肪细胞标志性蛋白UCP1、PGC-1 $\alpha$ 、PRDM16表达及增加线粒体生物合成,增加产热,诱导3T3-L1前脂肪细胞棕色化。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] LOOS R J F, YEO G S H. The genetics of obesity: From discovery to biology [J]. *Nat Rev Genet*, 2022, 23(2): 120-133.
- [2] LINGVAY I, SUMITHRAN P, COHEN R V, et al.

Obesity management as a primary treatment goal for type 2 diabetes: Time to reframe the conversation [J]. *Lancet*, 2022, 399(10322): 394-405.

- [3] SAKERS A, DE SIQUEIRA M K, SEALE P, et al. Adipose-tissue plasticity in health and disease [J]. *Cell*, 2022, 185(3): 419-446.
- [4] AUDANO M, PEDRETTI S, CARUSO D, et al. Regulatory mechanisms of the early phase of white adipocyte differentiation: An overview [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(3): 139.
- [5] TRAYHURN P. Brown adipose tissue: A short historical perspective [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2448: 1-18.
- [6] BECHER T, PALANISAMY S, KRAMER D J, et al. Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health [J]. *Nat Med*, 2021, 27(1): 58-65.
- [7] SEO S, LEE M S, CHANG E, et al. Rutin increases muscle mitochondrial biogenesis with AMPK activation in high-fat diet-induced obese rats [J]. *Nutrients*, 2015, 7(9): 8152-8169.
- [8] HABTEMARIAM S, BELAI A. Natural therapies of the inflammatory bowel disease: The case of rutin and its aglycone, quercetin [J]. *Mini-Rev Med Chem*, 2018, 18(3): 234-243.
- [9] CHUA L S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(3): 805-817.
- [10] HABTEMARIAM S, LENTINI G. The therapeutic potential of rutin for diabetes: An update [J]. *Mini-Rev Med Chem*, 2015, 15(7): 524-528.
- [11] LYNGFELT L I, ERLANDSSON M C, NADALI M, et al. Impact of the uncoupling protein 1 on cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1131.
- [12] KWAN H Y, WU J, SU T, et al. Cinnamon induces browning in subcutaneous adipocytes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2447.
- [13] ZHAO D, PAN Y, YU N, et al. Curcumin improves adipocytes browning and mitochondrial function in 3T3-L1 cells and obese rodent model [J]. *R Soc Open Sci*, 2021, 8(3): 200974.
- [14] FAN Q, XI P, TIAN D, et al. Ginsenoside Rb<sub>1</sub> facilitates browning by repressing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Med Sci Monit*, 2021, 27: e928619.
- [15] MA L, ZHAO Z, GUO X, et al. Tanshinone II<sub>A</sub> and its derivative activate thermogenesis in adipocytes and

- induce "beiging" of white adipose tissue [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2022, 544: 111557.
- [16] CHENG L, SHI L, HE C, et al. Rutin-activated adipose tissue thermogenesis is correlated with increased intestinal short-chain fatty acid levels [J]. *Phytother Res*, 2022, 36(6): 2495-2510.
- [17] CAI J, JIANG S, QUAN Y, et al. Skeletal muscle provides a pro-browning microenvironment for transplanted brown adipose tissue to maintain its effect to ameliorate obesity in ob/ob mice [J]. *FASEB J*, 2022, 36(1): e22056.
- [18] YU J, CHEN X, ZHANG Y, et al. Antibiotic Azithromycin inhibits brown/beige fat functionality and promotes obesity in human and rodents [J]. *Theranostics*, 2022, 12(3): 1187-1203.
- [19] ZHAO J, ZHOU A, QI W. The potential to fight obesity with adipogenesis modulating compounds [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4): 2299.
- [20] YOO A, JUNG KIM M, AHN J, et al. Fuzhuan brick tea extract prevents diet-induced obesity via stimulation of fat browning in mice [J]. *Food Chem*, 2022, 377: 132006.
- [21] COLLINS S.  $\beta$ -adrenergic receptors and adipose tissue metabolism: Evolution of an old story [J]. *Annu Rev Physiol*, 2022, 84: 1-16.
- [22] LEE J H, PARK A, OH K J, et al. The role of adipose tissue mitochondria: Regulation of mitochondrial function for the treatment of metabolic diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4924.
- [23] LAHERA V, DE LAS HERAS N, LÓPEZ-FARRÉ A, et al. Role of mitochondrial dysfunction in hypertension and obesity [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2017, 19(2): 11.
- [24] HARTMAN M L, SHIRIHAI O S, HOLBROOK M, et al. Relation of mitochondrial oxygen consumption in peripheral blood mononuclear cells to vascular function in type 2 diabetes mellitus [J]. *Vasc Med*, 2014, 19(1): 67-74.
- [25] WANG G, MEYER J G, CAI W, et al. Regulation of UCP1 and mitochondrial metabolism in brown adipose tissue by reversible succinylation [J]. *Mol Cell*, 2019, 74(4): 844-857. e7.
- [26] PARRAY H A, YUN J W. Cannabidiol promotes browning in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 416(1/2): 131-139.
- [27] KOH J H, KIM Y W, SEO D Y, et al. Mitochondrial TFAM as a signaling regulator between cellular organelles: A perspective on metabolic diseases [J]. *Diabetes Metab J*, 2021, 45(6): 853-865.
- [28] KOH J H, JOHNSON M L, DASARI S, et al. TFAM enhances fat oxidation and attenuates high-fat diet-induced insulin resistance in skeletal muscle [J]. *Diabetes*, 2019, 68(8): 1552-1564.
- [29] WANG J, ZHANG L, DONG L, et al. 6-gingerol, a functional polyphenol of ginger, promotes browning through an AMPK-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(51): 14056-14065.
- [30] LI P A, HOU X, HAO S. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration [J]. *J Neurosci Res*, 2017, 95(10): 2025-2029.

[责任编辑 张丰丰]