

低剂量组效果明显,其降压机理可能与其干预肾素-血管紧张素-醛固酮系统,升高心钠素,调节脂质代谢及抗氧化系统有关。

参考文献:

- [1] 杨勤,赵朝伟. 丹参的药理作用研究现状[J]. 中国药业, 2003, 12(10): 78-80.
- [2] 杜冠华,张均田. 丹参水溶性有效成分-丹酚酸的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2000, 20(5): 394.
- [3] 王美凤,陈军辉,李磊,等. 高纯度丹酚酸 B 的制备工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(6): 476-478.
- [4] 王秀丽,赵保胜. 复方丹参注射液 II 中丹酚酸 B 在大鼠体内的 HPLC 测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 110-112.
- [5] 周才杰,黄鸣清,陈长青,等. 丹酚酸 B 改善 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 233-237.
- [6] 余振球,马长生,赵连友,等. 实用高血压学[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 81-90.
- [7] 梁晓慧,徐新娟,胡广梅,等. 新疆裕民县汉族、哈族女性高血压与 ANP 及电解质关系的研究[J]. 心血管康复医学杂志, 2010, 19(5): 493-496.
- [8] 唐艳芳,匡希斌. 心钠素、脑钠素与原发高血压[J]. 中华高血压杂志, 2007, 15(3): 186-188.
- [9] Nakayama T. The genetic contribution of the natriuretic peptide system to cardiovascular disease[J]. Endocr, 2005, 52: 11-21.
- [10] McGrath MF, deBold ML, deBold AJ. The endocrine function of the heart[J]. Trends Endocrin Metab, 2005, 16: 469-477.
- [11] Pacher R, Stanek B, Hulsman M, et al. Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 1998, 27(3): 633-634.
- [12] Britten MB, Zeiher AM, Schachinger V. Clinical importance of coronary endothelial Vasodilator dysfunction and therapeutic options[J]. Intern Med, 1999, 245: 315-327.
- [13] Tai MH, Wang LL, Wu KL, et al. increased superoxide anion in rostral ventrolateral medulla contributes to hypertension in spontaneously hypertensive rats via interactions with nitric oxide[J]. Free Radic Biol Med, 2005, 38: 450-462.

(编辑: 邓响潮)

三七总皂苷对 3T3-L1 细胞增殖分化与分泌功能的影响

刘新迎¹, 周 联², 王培训² (1. 佛山市南海区罗村医院, 广东 佛山 528226; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察三七总皂苷对 3T3-L1 细胞增殖、分化和分泌 Leptin、PAI-1 的影响, 探讨其调脂作用的可能机制。**方法** 培养 3T3-L1 细胞, 并用不同浓度的三七总皂苷(5, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)进行干预, 以四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖; 用油红 O 染色和染色比色法分析脂肪细胞的分化程度, 用逆转录多聚酶联反应(RT-PCR)检测脂肪细胞分化相关基因过氧化物酶增殖物激活受体 γ_2 (PPAR γ_2)、CCAAT/增强子结合蛋白 α (C/EBP α)mRNA 的表达; 用 ELISA 法检测细胞培养上清中 Leptin、PAI-1 的含量。**结果** 三七总皂苷低、中浓度组对模型细胞增殖无明显影响($P > 0.05$), 高浓度组能促进细胞的增殖($P < 0.05$); 中、高浓度组明显抑制模型细胞的分化, 并能抑制 PPAR γ_2 、C/EBP α 基因的表达($P < 0.01$); 药物对模型细胞分泌 Leptin、PAI-1 有明显抑制作用($P < 0.01$)。**结论** 三七总皂苷可能通过抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的分化和抑制其分泌因子而达到调脂作用, 以中剂量作用效果最好。

关键词: 三七总皂苷; 3T3-L1 细胞; 增殖分化; 分泌功能

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)04-0379-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.04.014

Effect of Panax Notoginsenosides on Proliferation, Differentiation and Secretion of 3T3-L1 Preadipocytes

LIU Xinying¹, ZHOU Lian², WANG Peixun² (1. Luocun Hospital of Nanhai District, Foshan 528226 Guangdong, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

收稿日期: 2012-12-10

作者简介: 刘新迎, 女, 博士, 副主任中医师, 研究方向: 中医临床。Email: _fsxinying@163.com。

Abstract: Objective To investigate the effect of Panax Notoginsenosides (PNS) on the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and their secretion of Leptin and PAI-1, and to explore the possible lipid-regulating mechanism. **Methods** Cultured 3T3-L1 cells were incubated with PNS at the concentrations of 5, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and then MTT method was used to detect the cell proliferation, oil red O staining method and spectrophotography were used to analyze the degree of cell differentiation. The expression of adipocytes differentiation-associated genes of peroxisome proliferator-activated receptor γ_2 (PPAR γ_2) and CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) mRNA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). ELISA technique was used to detect Leptin and PAI-1 contents in the culture supernatant of mature fat cells. **Results** Low- and middle-dose PNS had no effect on the proliferation of 3T3-L1, but high-dose PNS promoted the proliferation of 3T3-L1. Middle- and high-dose PNS inhibited the differentiation of 3T3-L1 and down-regulated the expression of PPAR γ_2 and C/EBP α mRNA. PNS obviously inhibited the secretion of Leptin and PAI-1 from the model cells. **Conclusion** PNS can regulate the lipid metabolism through inhibiting the differentiation of preadipocytes and inhibiting the secretion function of the cells, and middle dose has the best action.

Keywords: Panax Notoginsenosides; 3T3-L1 cells; Proliferation and differentiation; Secretion function

三七是传统的化瘀止血类药物,既能活血化瘀,又能止血,也是药典记载中常用的降脂中药,其有效成分三七总皂苷(Panax Notoginsenosides, PNS)的降脂效果也已被证实^[1-2]。3T3-L1细胞是从小鼠胚胎的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分化机制研究的前脂肪细胞系。本试验采用3T3-L1细胞,探讨三七总皂苷降脂机制是否与脂肪细胞的增殖、分化以及分泌功能等有关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 3T3-L1细胞株,购自中国科学院上海细胞研究所。

1.1.2 主要药物及试剂 PNS,中国药品生物制品检定所;高糖DMEM培养基(H-DMEM),Gibco公司;胎牛血清,PAA公司;地塞米松,ICN公司;合成人胰岛素,Novo Nordisk公司;1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤(IBMx),Sigma公司;油红O,AMRESCO公司;Trizol,Invitrogen公司;逆转录试剂盒,Fermentas公司;PCR试剂盒,TIANGEN公司;小鼠Leptin检测试剂盒(ELISA),武汉博士德生物工程有限公司;小鼠PAI-1检测试剂盒(ELISA),美国Usen Life Science & Technology Company。

1.1.3 药物配制^[3] PNS用纯水溶解,然后用完全培养液稀释至相应浓度;完全培养液:含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的H-DMEM培养液;诱导液:完全培养液中,加入地塞米松、合

成人胰岛素和IBMx,使终浓度分别为1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.1.4 RT-PCR反应引物 参考文献^[4-5]设计引物,引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 3T3-L1前脂肪细胞的培养和诱导分化 参照文献^[6]进行相关实验。

1.2.2 PNS对3T3-L1前脂肪细胞增殖的影响 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 μL ,待细胞完全贴壁后,加入PNS,使其终浓度分别为5, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,每个剂量设3个平行孔,同时设未加药物的培养液组为空白对照组,在加药培养后的96 h时,以MTT法测定其增殖情况。

1.2.3 PNS对3T3-L1前脂肪细胞诱导分化的影响 在3T3-L1前脂肪细胞完全融合2 d后换用诱导液开始诱导的同时加入不同浓度的PNS,直至实验结束,同时设诱导液组为空白对照组。对诱导分化8 d的3T3-L1细胞进行油红O染色,于显微镜下观察和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^[7]。

1.2.4 RT-PCR检测核转录因子 γ_2 (PPAR γ_2)、增强结合蛋白 α (C/EBP α)mRNA表达 细胞诱导分化及药物处理同1.2.3,并设细胞诱导分化前组、完全培养液组为对照组。用Trizol抽提细胞总RNA,根据试剂盒的说明进行逆转录,以1.5%的琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物,UV凝胶成像系统进行成像分析。

1.2.5 PNS对3T3-L1前脂肪细胞分泌脂肪细胞因子

(Leptin)、I 型纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-1)测定将处于对数生长期的细胞接种于 24 孔培养板中,进行诱导分化,待 85 %以上细胞分化为成熟脂肪细胞,用含有 0.5 %FBS 的培养液进行血清饥饿 12 h 后,换上含 0.5 %FBS 的培养液和不同浓度的 PNS 继续培养,于 48 h 取细胞上清进行检测,同时设未用药物的空白组和溶媒组为对照组。用 ELISA 法检测细胞培养上清中 Leptin、PAI-1 的含量,方法严格按检测试剂盒使用说明。

1.3 统计学处理方法 采用 SPSS For Windows 11.0 统计软件对实验结果进行统计分析,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 PNS 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖、分化的影响 见表 1。PNS 高浓度组促进细胞增殖较明显,与培养液组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),溶媒对细胞增殖无明显影响,与培养液组比较,差异无统计学意义($P > 0.01$)。PNS 中、高浓度组均明显抑制脂肪细胞的分化,与诱导液组比较,差异有统计学意

表1 PNS 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖、分化的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 The influence of PNS on 3T3-L1 proliferation and differentiation

组别	剂量 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	细胞增殖(570nm)	细胞分化(510nm)
培养液组		0.397 ± 0.043	—
诱导液组		—	1.953 ± 0.519
溶媒组		0.398 ± 0.007	1.952 ± 0.146
三七总皂苷组	5	0.399 ± 0.026	1.615 ± 0.224
	50	0.439 ± 0.024	$1.341 \pm 0.168^{\Delta\Delta}$
	100	$0.454 \pm 0.043^*$	$0.907 \pm 0.163^{\Delta\Delta}$

注:与培养液组比较, $^*P < 0.05$;与诱导液组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

义($P < 0.01$);溶媒对细胞分化无明显影响,与诱导液组比较,差异无统计学意义($P > 0.01$)。

2.2 PNS 对脂肪细胞 PPAR γ_2 和 C/EBP α mRNA 表达的影响 见图 1。RT-PCR 结果显示,3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中加入 PNS 干预,其 C/EBP α 、PPAR γ_2 表达量均明显降低,提示 PNS 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化的可能机制是通过抑制相关分化基因的表达。

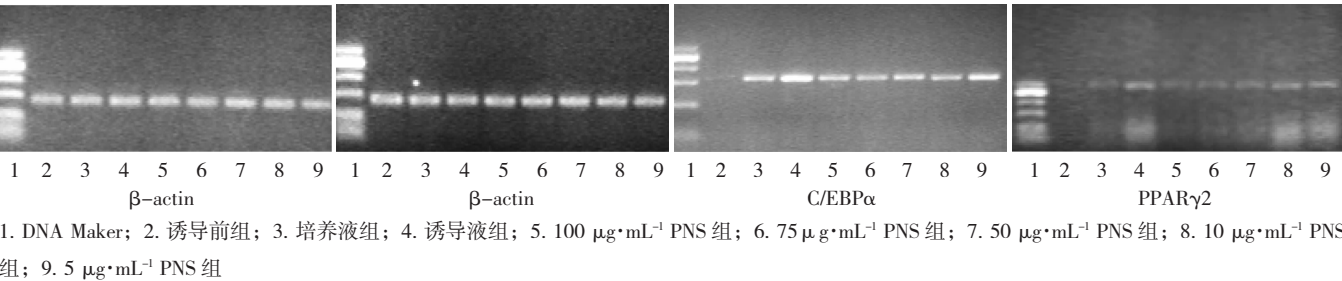


图1 PNS 对 3T3-L1 前脂肪细胞基因表达的影响

Figure 1 The influence on gene expression of adipocyte by PNS

2.3 PNS 对 3T3-L1 前脂肪细胞分泌 Leptin、PAI-1 的影响 见表 2、表 3。PNS 低、中、高 3 个剂量组(5、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)均明显抑制脂肪细胞 Leptin 的分泌,与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),在中、高剂量组对 PAI-1 的分泌也有显著抑制作用,纯水在溶解药物浓度范围内对细胞分泌 Leptin、PAI-1 无影响。

表2 PNS 对 3T3-L1 前脂肪细胞分泌 Leptin 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 The influence of PNS on adipocyte producing Leptin

组别	Leptin / $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$		
	5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
空白对照组	649.50 ± 7.31	649.50 ± 7.31	649.50 ± 7.31
三七总皂苷组	$570.50 \pm 16.73^{**}$	$508.92 \pm 21.57^{**}$	$455.92 \pm 16.38^{**}$
溶媒组	644.06 ± 6.85	644.06 ± 6.85	644.06 ± 6.85

注:与空白对照组比较, $^{**}P < 0.01$ 。

表3 PNS 对 3T3-L1 前脂肪细胞分泌 PAI-1 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 The influence of PNS on adipocyte producing PAI-1

组别	PAI-1 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$		
	5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
空白对照组	4.15 ± 0.25	4.15 ± 0.25	4.15 ± 0.25
三七总皂苷组	4.12 ± 0.20	$3.24 \pm 0.64^*$	$3.39 \pm 0.20^{**}$
溶媒组	4.17 ± 0.08	4.17 ± 0.08	4.17 ± 0.08

注:与空白对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

3 讨论

脂肪细胞的增殖分化以及细胞因子的分泌对于维持机体代谢的动态平衡具有重要的作用,其增殖分化、分泌功能失常将会直接导致脂质的过多堆积,引起肥胖、动脉粥样硬化、脂肪肝等疾病的发生和发展。三七是传统的化瘀止血类中药,具有广泛的生物学活性,也是在中风、冠心病等心、脑血管疾

病治疗中常用的中药, PNS 是三七的主要有效成分。

增殖和分化是细胞发育过程中的两个不同方向, 本研究结果发现, PNS 在低、中剂量作用时, 脂肪细胞的数量略有增加, 但差异无统计学意义, 说明 PNS 在低、中剂量下不影响脂肪细胞的增殖, 不会促进脂肪组织体积的增大, 但在高剂量组时, 能明显促进脂肪细胞的增殖, 细胞数量增加; 在细胞分化方面, PNS 低浓度时, 对细胞分化影响不明显, 中、高浓度组可有效的抑制细胞内脂滴的聚积, 抑制细胞的分化, 且随着浓度的增大, 其抑制作用增强。由此提示, 三七的降脂最佳作用剂量并不是剂量越高, 效果越好, 中浓度作用, 可能更有利于降脂功能的发挥。进一步观察其对抑制调控脂肪细胞分化的主要转录因子 PPAR γ 2 和 C/EBP α 基因的表达^[8]发现, PNS 可能通过抑制调控脂肪细胞分化相关基因的表达而抑制前脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化。

Leptin 和 PAI-1 是脂肪细胞分泌的两种重要激素, 其分泌异常将大大增加肥胖、2 型糖尿病和心血管事件发生, 本研究结果提示 PNS 一方面可以通过抑制成熟脂肪细胞的分化而减少 Leptin 和 PAI-1 的分泌, 另一方面可直接通过抑制脂肪细胞分泌 Leptin 和 PAI-1 而减少其在血浆中的水平。PNS 对脂肪细胞 Leptin 和 PAI-1 分泌的抑制作用将有利于降低导致心脑血管疾病发生的危险因素, 这在一定程度上也阐释了中药三七防治心脑血管疾病的部

分作用机制。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典 (一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 吕萍, 陈海峰. 三七叶苷降脂作用的实验研究[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(4): 235.
- [3] Joshi Venugopal, Kazuhiko Hanashiro, Zhong-Zhou Yang, et al. Identification and modulation of a caveolae-dependent signal pathway that regulates plasminogen activator inhibitor-1 in insulin-resistant adipocytes[J]. PNAS, 2004, 101(12): 17120-17125.
- [4] Tang QQ, Zhang JW, Daniel LM. Sequential gene promoter interactions of C/EBP beta, C/EBP alpha, and PPAR gamma during adipogenesis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 319(1): 235.
- [5] Hemati N, Ross SE, Erickson RL, et al. Signaling pathways through which insulin regulates CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP α) phosphorylation and gene expression in 3T3-L1 adipocytes[J]. J Biol Chem, 1997, 272: 25913-25919.
- [6] 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(5): 176-179.
- [7] Ramirez-Zacarias JL, Castro-munozledo F, Kuri Haruch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O[J]. Histochemistry, 1992, 97(6): 493-497.
- [8] Rosen ED, Hsu CH, Wang X, et al. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway[J]. Genes & Dev, 2002, 16(1): 22-26.

(编辑: 邓响潮)

淫羊藿对骨质疏松 MSCs 成脂分化 PPAR γ mRNA 表达的影响

刘海全¹, 秦佳佳², 吴倩²(1. 广州中医药大学附属骨伤科医院, 广东 广州 510240; 2. 暨南大学医学院, 广东 广州 510632)

摘要: **目的** 探讨淫羊藿含药血清在骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞 (MSCs) 成脂分化过程中对过氧化物酶体增殖物激活受体亚型 PPAR γ mRNA 表达的影响。**方法** 分离、培养骨质疏松大鼠 MSCs, 传至 3 代。将所获细胞随机分为模型组, 成脂诱导组, 西药组, 成脂诱导西药组, 中药组, 成脂诱导中药高、中、低剂量组。采用淫羊藿含药血清对 MSCs 进行干预, 并与尼尔雌醇含药血清进行对照, 观察各组 PPAR γ mRNA 表达的变化。**结果** 与模型组比较, 西药组、中药组 PPAR γ mRNA 表达明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与成脂诱导组比较, 成脂诱导西药组、成脂诱导中药高、中、低剂量组 PPAR γ mRNA 表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

收稿日期: 2013-03-11

作者简介: 刘海全, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 中医药防治骨质疏松症。Email: liuhaiq1977@163.com。通讯作者, 秦佳佳, 博士, 副教授, 研究方向: 中医药治疗和预防卵巢早衰发生机制研究。Email: acd0171@sina.com.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30901915); 广东省普通高校“中医女性生殖调节与安全性研究”重点实验室开放基金资助项目(ZA201112); 广东省自然科学基金资助项目(S2011010004277)。