

## 川木瓜醇提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖及其分化细胞的影响

陆飞燕<sup>1</sup>, 姜艳<sup>2</sup>, 潘冬<sup>3</sup>, 张钰婷<sup>3</sup>, 李容<sup>4</sup>

1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院科学实验中心, 广西 百色 533000;
3. 右江民族医学院 2015 级本科生, 广西 百色 533000;
4. 右江民族医学院药学院, 广西 百色 533000)

**摘要:**目的 观察川木瓜醇提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖及其分化细胞的影响。方法 提取制备川木瓜醇提取物;将提取物作用于 3T3-L1 前脂肪细胞,检测细胞活力变化。通过刺激剂诱导 3T3-L1 前脂肪细胞,诱变为脂肪细胞,并使用提取物干预,观察细胞形态和细胞活力情况;以及细胞外上清液中葡萄糖含量变化。结果 该提取物(25.0~200.0 ng/L)能降低 3T3-L1 前脂肪细胞。提取物(100.0~200.0 ng/L)可降低 3T3-L1 前脂肪细胞分化细胞活力;可使分化细胞悬浮,并明显聚缩为球形;且细胞外上清中葡萄糖含量明显升高。结论 川木瓜醇提取物可显著抑制 3T3-L1 前脂肪细胞和分化的脂肪细胞,致使细胞糖吸收降低,细胞外上清液中葡萄糖含量升高,为川木瓜具有消脂作用提供了初步的理论依据。

**关键词:**川木瓜; 3T3-L1 前脂肪细胞; 脂肪细胞; 增殖; 分化

中图分类号:R285 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2018)06-0545-04  
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.06.009

### Effects of Fructus Chaenomelis alcohol extract on the proliferation of 3T3-L1 preadipocyte and its differentiated cell

Lu Feiyan<sup>1</sup>, Jiang Yan<sup>2</sup>, Pan Dong<sup>3</sup>, Zhang Yuting<sup>3</sup>, Li Rong<sup>4</sup>

1. Graduate School of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
2. Scientific Experiment Center of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
3. Undergraduate Student of 2015, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
4. Department of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of Fructus Chaenomelis alcohol extract on the proliferation of 3T3-L1 preadipocyte and its differentiated cell. **Methods** The Fructus Chaenomelis alcohol extract was extracted and prepared. The 3T3-L1 preadipocytes were treated with the prepared Chaenomelis alcohol extract, and then the cell viability was detected. 3T3-L1 preadipocytes were induced into fat cells by using stimulating reagent and the induced fat cells were treated with extracts, then the cell morphology and viability as well as the glucose content changes in extracellular supernatants were observed. **Results** The Fructus Chaenomelis alcohol extract (25.0~200.0 ng/L) down regulated the viability of 3T3-L1 preadipocytes. The Fructus Chaenomelis alcohol extract (100.0~200.0 ng/L) lowered down the viability of 3T3-L1 preadipocytes

**基金项目:**广西自然科学基金项目(2015GXNSFBA139163);广西高校科学技术研究项目(KY2015YB226);2017年自治区级大学生创新创业训练计划立项项目(201710599043);2017年自治区级大学生创新创业训练计划立项项目(201710599043)

**第一作者简介:**陆飞燕(1994-),女,在读硕士研究生,研究方向:中药抗肿瘤研究,E-mail:792321838@qq.com

**通信作者简介:**李容(1981-),女,副教授,硕士,研究方向:从事天然产物有效成分提取分离及活性研究,E-mail:lr1218tt@

in differentiating cells so that the differentiated cells were suspended and contracted into spherical shapes, furthermore, the glucose content in the extracellular supernatant was significantly increased. **Conclusion** The Fructus Chaenomelis alcohol extract can significantly inhibit the viabilities of 3T3-L1 preadipocytes and differentiated adipocytes, resulting in decreased cell sugar uptake and increased glucose content in extracellular supernatant, which can provide the preliminary theory evidences for lipid-lowering effect of Fructus Chaenomelis.

**Key words:** Fructus Chaenomelis; 3T3-L1 preadipocytes; adipocytes; proliferation; differentiation

药用正品木瓜为皱皮木瓜,为蔷薇科植物贴梗海棠的干燥近成熟果实。皱皮木瓜按照产地主要分为川木瓜、宣木瓜、资丘木瓜 3 个品种,其中川木瓜的产量最大<sup>[1-2]</sup>。

川木瓜含有多种化学成分,如有机酸、酚类、黄酮类、酵素等多种有效成分<sup>[3-4]</sup>。药典记载木瓜具有健脾消食、舒筋活络和胃化湿的作用<sup>[5]</sup>。木瓜的健脾消食作用主要是木瓜中的蛋白酶,可将脂肪分解为脂肪酸。有研究报道<sup>[6]</sup>认为木瓜所含酵素能消化蛋白质,有利于对食物消化和吸收,固有健脾消食的功效。本文以川木瓜醇提取物作用 3T3-L1 前脂肪细胞及其分化细胞,观察该提取物对细胞活力及糖代谢的影响,以期能为川木瓜的使用提供一定的理论研究基础。

## 1 材料及方法

### 1.1 主要原料

1.1.1 材料 川木瓜鲜品,购于广西百色市凌云县,将鲜品切去除籽、切片、晾干、粉碎过筛备用。3T3-L1 前脂肪细胞,购自广州赛库生物,货号:CC9039。

1.1.2 主要试剂及耗材 DMEM 培养液(Gibco,货号 11995500BT)、胎牛血清(Gibco,货号 10099-141)、0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液(Gibco,货号 25200-056)、CCK-8 溶液(碧云天,C0038)、葡萄糖测试盒(南京建成,F006)。

1.1.3 主要仪器 多功能酶标仪(德国伯托,型号 LB941)、荧光倒置生物显微镜(徕卡,型号 DMIL-FL)。

### 1.2 实验方法及检测指标

1.2.1 川木瓜醇提取物的制备 称取 20 g 川木瓜粉末,加入 15 倍 85%乙醇,回流提取 3 h,过滤,滤渣再加入 10 倍 85%乙醇提取第二次,抽滤,合并两次滤液,旋转蒸发浓缩至呈膏状,置真空干燥箱低温烘干,得川木瓜醇提物,备用。

1.2.2 对 3T3-L1 前脂肪细胞活力的影响 将 3T3-L1 前脂肪细胞置于完全培养基中培养(90%的 DMEM 高糖培养基,10%胎牛血清),放置于培养箱中培养至对数生长期,消化,计数,接种于 96 孔板(接种密度为  $5 \times 10^3$ /孔)或 24 孔板中(接种密度为  $1 \times 10^4$ /孔)。

采用 CCK-8 试剂盒测定细胞活力。将 3T3-L1 前

脂肪细胞接种于 96 孔板中,100 微升/孔培养 24 h,分组为:空白组(只加 DMEM 高糖培养);川木瓜提取物(25.0 ng/L、50.0 ng/L、75.0 ng/L、100.0 ng/L、150.0 ng/L、200.0 ng/L)不同剂量组。相同组别设置 4 个孔,每个孔重复检测吸光度值 3 次。川木瓜醇提取物使用 DMEM 高糖培养液稀释溶解,药物干预后继续培养 24 h 后,每孔加入 3  $\mu$ l 的 CCK-8 溶液,培养箱中孵育 3 h,然后采用酶标仪于 450 nm 处,测定吸光度值。计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = [(A_{\text{实验组}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{blank}})] \times 100\%$$

1.2.3 3T3-L1 前脂肪细胞的分化 参考文献<sup>[7]</sup>所用 3T3-L1 前脂肪细胞的分化方法。首先,将 3T3-L1 前脂肪细胞接种于 24 孔板中,完全培养基培养 24 h 后,诱导分化,诱导剂含 10  $\mu$ g/ml 的胰岛素、0.5 mol/L 的 3-异丁基 1-甲基黄嘌呤和 1  $\mu$ mol/L 的地塞米松,诱导 48 h,更换含有 10  $\mu$ g/ml 胰岛素的完全培养基,继续诱导 48 h。随后用 DMEM 高糖培养基培养细胞,药物组同时给药,培养 48 h。细胞诱导后分组为:模型组,川木瓜提取物(100 ng/L、150 ng/L、200 ng/L)不同剂量组。相同组别设置 2 个孔,每个孔重复检测吸光度值 3 次。

1.2.4 川木瓜对分化细胞活力、细胞形态的影响及上清液中葡萄糖的检测 药物作用 48 h 后,细胞置于倒置显微镜下,拍照。收集细胞上清液,按照葡萄糖检测试剂盒操作,并于 560 nm 处测定 OD 值。细胞换用 DMEM 高糖培养基,每孔 cck-8 试剂 5  $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后,450 nm 处测定 OD 值,并计算细胞活力。

1.3 统计学方法 采用统计软件 SPSS 16.0 对数据进行分析,计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 川木瓜醇提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞活力的影响 与空白组比较,川木瓜醇提取物能显著降低 3T3-L1 前脂肪细胞的活力,且随着剂量的增加,作用更为明显,川木瓜醇提取物浓度为 25.0 ng/L 时,细胞活力为空白组的 85.1%;200.0 ng/L 时,细胞活力仅为空白组的 41.8%,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 1。

表1 川木瓜醇提取物对3T3-L1前脂肪细胞活力的影响 (n=12)

组别	剂量 (ng/L)	细胞活力 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )
空白组	—	100.00 ± 5.86
川木瓜提取物组	25.0	85.13 ± 3.86 <sup>a</sup>
	50.0	72.99 ± 3.47 <sup>a</sup>
	75.0	65.29 ± 6.27 <sup>a</sup>
	100.0	58.61 ± 4.59 <sup>a</sup>
	150.0	53.38 ± 3.48 <sup>a</sup>
	200.0	41.88 ± 2.37 <sup>a</sup>

注:与空白组比较,a: P < 0.01

2.2 川木瓜醇提取物对分化细胞活力、细胞形态的影响以及上清液中葡萄糖的检测 细胞活力结果显示,川木瓜醇提取物 100.0 ng/L 使细胞活力下降至 70.48%;200.0 ng/L 川木瓜醇提取物组细胞活力为 57.32%,川木瓜醇提取物三个剂量组均与模型组对比差异有统计学意义(P < 0.01)。3T3-L1 前脂肪细胞



图1 川木瓜醇提取物对分化细胞的形态的影响(×100)

注:a. 3T3-L1 前脂肪细胞;b. 模型组;c. 木瓜提取物 100 ng/L 组;d. 木瓜提取物 150 ng/L 组;e. 木瓜提取物 200 ng/L 组

表3 川木瓜醇提取物对分化细胞上清液中葡萄糖的影响 (n=6)

组别	剂量 (ng/L)	OD 值 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )
模型组	—	1.44 ± 0.05
川木瓜提取物组	100.0	1.61 ± 0.07
	150.0	1.66 ± 0.06 <sup>a</sup>
	200.0	1.72 ± 0.06 <sup>b</sup>

注:与模型组比较,a: P < 0.05,b: P < 0.01

### 3 讨论

目前,抗肥胖的重要研究思路是抑制脂肪细胞增殖、前脂肪细胞的增殖与分化。在分化为脂肪细胞的过程中,细胞数量增多、体积增大以及脂肪增多<sup>[8]</sup>。分化的脂肪细胞在糖和脂的代谢中具有重要的作用<sup>[9]</sup>。脂肪堆积是肥胖发展的关键步骤,控制这一步骤将能有效控制肥胖的进展,而且肥胖病理生理的核心过程就是脂肪的过度沉积<sup>[9]</sup>。3T3-L1 前脂肪细胞在体外诱导脂肪堆积<sup>[11-12]</sup>,分化为成熟的脂肪细胞,是目前国际上公认的研究脂肪沉积过程的细胞株,被广泛用于药物抗肥胖活性机制研究<sup>[13]</sup>。

形态规则,多呈长梭形;细胞诱导分化(模型组)后形态不一,细胞间颗粒增多;分化细胞经川木瓜醇提取物处理后,分化细胞聚缩成高亮颗粒,且提取物浓度越高,细胞成颗粒状越多,见图1。检测细胞外上清液中葡萄糖含量,川木瓜提取物组葡萄糖含量升高,模型组 OD 值仅为 1.44,而提取物浓度为 200.0 ng/L 时 OD 值升高到 1.72,差异具有统计学意义(P < 0.01)。见表3。

表2 川木瓜醇提取物对分化细胞活力的影响 (n=12)

组别	剂量 (ng/L)	细胞活力 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )
模型组	—	100.00 ± 6.74
川木瓜提取物组	100.0	70.48 ± 9.24 <sup>a</sup>
	150.0	60.40 ± 6.50 <sup>a</sup>
	200.0	57.32 ± 1.97 <sup>a</sup>

注:与模型组比较,a: P < 0.01

结合实验结果分析,川木瓜提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞均具有明显的抑制作用,对脂肪细胞的抑制作用表现为使细胞聚缩成球,并使细胞间隙增大,随着脂肪细胞被抑制,细胞外糖代谢吸收减少,从而致使细胞外上清液葡萄糖含量升高。前脂肪细胞在分化为脂肪细胞过程中,脂肪沉积是一个高度精细的调控过程,涉及多因子、多蛋白。本文仅研究川木瓜提取物对前脂肪细胞、脂肪细胞增殖及脂肪细胞糖代谢的影响,未深入探究药物发挥作用的关键化合物及作用机制<sup>[11,14-15]</sup>,这也是今后进一步研究川木瓜减肥降脂机制的关键。

综上所述,川木瓜提取物可抑制 3T3-L1 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞的增殖,抑制脂肪细胞的糖吸收。但其具体如何作用及作用机制、信号通路,有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 李容,吕佳窈,李振中,等. 酶-超声波辅助提取川木瓜总三萜工艺[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):258-261.
- [2] 李容,覃福礼,吕佳窈,等. 川木瓜多糖的提取及醇沉工艺研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):328-331.

- [3] 吴平妹,韦力心,周圆圆,等.微波法提取广西凌云特产新鲜川木瓜总酚的优化工艺[J].安徽农业科学,2015,43(24):235-237,240.
- [4] Nejib Guizani, Mostafa I Waly, Amanat Ali, et al. Papaya epicarp extract protects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human SH-SY5Y neuronal cells[J]. Experimental Biology and Medicine, 2011, 236(10):1205-1210.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:86-87.
- [6] 冯爱国,李春艳.木瓜的营养成分及功效价值[J].中国食物与营养,2008,(5):54-55.
- [7] Smith A, Yu X, Yin L. Diazinon exposure activated transcriptional factors CCAAT-enhancer-binding proteins  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and induced adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2018, 150:48-58.
- [8] 龙腾腾,王静凤,常耀光,等.海地瓜硫酸软骨素对3T3-L1前脂肪细胞增殖和分化的影响[J].中国药理学通报,2013,29(5):708-714.
- [9] 张伟云,王青,向云亚,等.芦丁对3T3-L1前脂肪细胞分化的作用[J].上海中医药杂志,2018,52(1):90-94.
- [10] 邱理红,王占洋,李雅娟,等.异甘草素对3T3-L1前脂肪细胞分化的抑制作用[J].食品科学,2016,37(1):157-162.
- [11] Ruixin Zhang, Xuze Qin, Ting Zhang, et al. Astragalus Polysaccharide Improves Insulin Sensitivity via AMPK Activation in 3T3-L1 Adipocytes[J]. Molecules, 2018, 23(10):E2711
- [12] Kumkarniana S, Suttisri R, Nimmannit U, et al. Anti-adipogenic effect of flavonoids from *Chromolaena odorata* leaves in 3T3-L1 adipocytes[J]. Journal of Integrative Medicine, 2018, 16(6):427-434.
- [13] 屈玮,陈彦光,吴祖强,等.苦瓜提取物抑制3T3-L1前脂肪细胞脂肪沉积研究[J].食品科学,2014,35(5):188-192.
- [14] Baek HJ, Jeong YJ, Kwon JE, et al. Antihyperglycemic and Antilipidemic Effects of the Ethanol Extract Mixture of *Ligularia fischeri* and *Momordica charantia* in Type II Diabetes-Mimicking Mice[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018;3468040.
- [15] Liang Y, Sasaki I, Takeda Y, et al. Benzyl isothiocyanate ameliorates lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes during adipocyte differentiation[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2018, 82(12):2130-2139.

收稿日期:2018-10-22;修回日期:2018-11-20

(上接第544页)

- [6] 冯巍巍,黎梨,黄赞松,等.苦参素通过调控MRP1表达提高多柔比星对人肝癌耐药裸鼠移植瘤的抑制作用[J].右江民族医学院学报,2018,40(1):8-12.
- [7] 翟宝进,邵泽勇,伍烽,等.人肝癌多药耐药裸鼠模型的建立及其生物学特性研究[J].中华实验外科杂志,2004,21(8):1013-1013.
- [8] 叶翩,张淑玲,揭盛华,等.人肝癌裸鼠移植模型的研究进展[J].世界华人消化杂志,2006,14(36):3500-3503.
- [9] Tandia M, Mhiri A, Paule B, et al. Correlation between clinical response to sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of P-glycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): monocentric study[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2017, 79(4):759-766.
- [10] 强光辉,余德才,丁希伟,等.ABCG2在人肝癌细胞株中的表达及其相关功能[J].中国普外基础与临床杂志,2012,19(2):146-150.
- [11] 康凯夫,张艳丽,欧阳合意.肝癌组织ABCG2和Jagged1表达临床意义的探讨[J].中华肿瘤防治杂志,2013,20(6):453-457.
- [12] 朱婷,万丽丽,刘丽桃,等.磁性纳米颗粒载ABCG2-siRNA逆转乳腺癌细胞对阿霉素耐药性的研究[J].癌变·畸变·突变,2017,29(3):199-204.
- [13] 刘亮,左静,郭建文,等.青蒿琥酯逆转Eca109/ABCG2细胞对阿霉素耐药的作用及机制[J].解放军医学杂志,2011,36(6):619-621.
- [14] 季伟,焦宏波,罗维欢,等.siRNA干扰ABCG2影响肝癌细胞的耐药及侵袭能力[J].肝胆外科杂志,2014,22(2):144-147.
- [15] 李涛,曾贵利,陈勇,等.抑制乳腺癌耐药蛋白基因逆转肝癌多药耐药的体内实验[J].中国生物制品学杂志,2009,22(12):1161-1163,1168.
- [16] Guo YY, Wu Y, Jia XW, et al. Augmenter of liver regeneration potentiates doxorubicin anticancer efficacy by reducing the expression of ABCB1 and ABCG2 in hepatocellular carcinoma[J]. Lab Invest, 2017, 97(12):1400-1411.
- [17] 黄桂柳,黎梨,黄赞松,等.苦参素促进肝癌HepG2细胞凋亡及其分子机制[J].右江民族医学院学报,2017,39(1):10-13.
- [18] 胡高裕,黄赞松,周喜汉,等.苦参碱增强顺铂抗人肝癌裸鼠移植瘤作用及其对survivin/caspase-3表达的影响[J].中华肝脏病杂志,2015,23(9):669-674.
- [19] 王伟,黄赞松,周喜汉,等.苦参素逆转人肝癌细胞株HepG2/ADM多药耐药的作用[J].世界华人消化杂志,2014,22(10):1409-1416.
- [20] 胥雄阳,何松.苦参碱逆转人肝癌细胞株QGY/CDDP多药耐药性的实验研究[J].重庆医科大学学报,2008,33(4):411-415.

收稿日期:2018-10-19;修回日期:2018-11-19