

白藜芦醇诱导大鼠原代脂肪细胞凋亡及机制

陈思凡¹, 周妮曼², 郑琳¹, 柯梁汝², 单智铭², 冯翔^{1*}
(中山大学 1. 公共卫生学院; 2. 中山医学院, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨白藜芦醇(Res)对大鼠原代脂肪细胞凋亡的影响及其机制。【方法】培养大鼠原代脂肪细胞,添加不同剂量的 Res 干预,用 Hoechst 33258 染色,在荧光显微镜下观察细胞核形态;用 DNA Ladder 实验观察 DNA 断裂的条带;检测各组培养基和细胞内的乳酸脱氢酶(LDH)含量,计算 LDH 漏出率;用流式细胞仪测定细胞凋亡率;Western blot 检测相关位点,包括沉默信息调节因子 1(Sirt1)、细胞色素 C(Cytochrome C)、半胱天冬氨酸酶家族(Caspase 9 和 Caspase 3)的蛋白质表达。【结果】经过 Res 干预后,细胞核染色质高度凝集,电泳后出现 180 ~ 200 bp 整数倍的寡核苷酸片段。细胞 LDH 漏出率升高,呈剂量-反应关系($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Res 作用后细胞凋亡率明显上升,呈剂量-反应关系($P < 0.01$)。Sirt1、Cytochrome C、活化的 Caspase 9 及 Caspase 3 表达水平上升,胞浆 Cytochrome C 释放也增加。【结论】Res 促进原代脂肪细胞凋亡,其机制可能是通过增加 Sirt1 表达,经由线粒体凋亡途径,作用于 Caspase 9 和 Caspase 3。

关键词: 白藜芦醇; 凋亡; 沉默信息调节因子 1; 细胞色素 C; 半胱天冬氨酸酶

中图分类号: Q5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)05-0619-05

Apoptotic Effect and Mechanism of Resveratrol in Rat Primary Adipocytes

CHEN Si-fan¹, ZHOU Ni-man², ZHENG Lin¹, KE Liang-ru², SHAN Zhi-ming², FENG Xiang^{1*}

(1. School of Public Health; 2. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To explore the effect and mechanism of resveratrol (Res) on apoptosis of rat primary adipocytes. 【Methods】Rat primary adipocytes were cultured and treated with resveratrol in different dosages. Adipocytes were stained by Hoechst 33258, and cell morphological transformation was examined with fluorescent microscope. DNA Ladder assay was used to further confirm cell apoptosis. The LDH content in medium and cells was measured to calculate the LDH leaking ratio. The number of apoptotic cells were assayed with flow cytometry. The expression of silent information regulator 1 (Sirt1), Cytochrome C, Cleaved Caspase 9, Cleaved Caspase 3 were examined using Western blot. 【Results】Res induced the apoptosis of rat primary adipocytes in a dose dependent manner. Nuclear fragmentation and condensation were observed by Hoechst 33258 staining and DNA Ladder assay. Res also increased the LDH leaking ratio, the number of apoptotic cells and the expression levels of Sirt1 and Cytochrome C, Cleaved Caspase 9, Cleaved Caspase 3. 【Conclusion】Res could induce the apoptosis of rat primary adipocytes. The underlying mechanisms may be enhancing expression of Sirt1, Cytochrome C, Cleaved Caspase 9 and Cleaved Caspase 3 which are related to cell apoptosis.

Key words: resveratrol; apoptosis; silent information regulator 1; cytochrome C; caspases

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(5):619-623]

既往研究认为,肥胖的形成与脂肪的合成或分解代谢紊乱密切相关,而新的研究显示,前脂肪细胞或脂肪细胞的凋亡,对于减少机体过度的脂肪堆积,改善胰岛素抵抗状态及预防与治疗代谢综合征都具有实际意义^[1]。白藜芦醇(Resveratrol,

Res)是一种多酚类化合物,存在于多种天然植物如葡萄、虎杖中,在新鲜葡萄皮中含量最高。Res 有广泛的生物学功能,在机体中有包括抗癌、抗炎症、保护心血管系统、清除自由基、改善胰岛素抵抗和抑制血小板凝集等作用。研究发现,Res 可以

收稿日期: 2010-04-26

基金项目: 广东省医学科研基金(A2010143)

作者简介: 陈思凡, 硕士, 研究方向: 营养与健康; * 通信作者, 冯翔, 博士, 副教授, 研究方向: 营养与健康, E-mail: fengx@mail.sysu.edu.cn

抑制多种癌细胞的增殖,并且促进其凋亡,具有肿瘤化学预防的作用^[2]。然而,目前有关 Res 对脂肪细胞凋亡作用的研究仍相对较少。沉默信息调节因子 1 (Silent information regulator 1, Sirt1) 是一种去乙酰基酶,在细胞凋亡过程中起重要作用。有研究发现,Res 可以通过增加 Sirt1 的表达,经由线粒体凋亡途径,激活 Caspase 家族的蛋白,进而促进肿瘤细胞的凋亡^[3]。本实验以大鼠原代脂肪细胞为研究对象,检测 Res 对其凋亡的影响及 Sirt1、Cytochrome C、Caspase 9、Caspase 3 的蛋白表达变化,为探讨 Res 对原代脂肪细胞凋亡的作用机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

白藜芦醇(用 DMSO 溶解,配置成 80 mmol/L 的储备液,DMSO 在培养基的终浓度低于 0.1%),DMSO, I 型胶原酶,Hoechst 33258,购自美国 Sigma 公司;高糖 DMEM 培养基,新生牛血清,购自美国 Gibco 公司;DNA marker,DNA Ladder 检测试剂盒,购自上海 Beyotime 公司;LDH 检测试剂盒,购自南京建成生物工程研究所;细胞凋亡测定试剂盒,购自美国 BD 公司;兔抗 Sirt1 单克隆抗体,购自英国 abcam 公司;兔抗 Cytochrome C、Cleaved Caspase 9、Cleaved Caspase 3 单克隆抗体,购自美国 CST 公司;兔抗 GAPDH 单克隆抗体,购自武汉 Boster 公司;细胞浆蛋白抽提试剂盒,BCA 试剂盒,HRP 标记的抗兔二抗,购自上海 Beyotime 公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠原代脂肪细胞的培养 雄性 SD 大鼠 10 只,体质量 160 ~ 180 g,购自广东省实验动物中心。原代脂肪细胞分离与培养实验过程:取大鼠 1 只,麻醉处死后无菌分离附睾脂肪组织,以眼科剪剪 200 ~ 300 次,剪碎至 1 mm³ 以下,用 1.5 g/L 的 I 型胶原酶消化细胞,放入水浴摇床,100 ~ 120 r/min,37 °C 水浴消化约 40 min,100 目的网过滤,静置于离心管约 5 min,脂肪细胞自然上浮,将成熟的脂肪细胞用培养基重复洗 2 次,在培养管中加入无酚红的 DMEM 培养基(100 mL/L 新生牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 IU/mL 链霉素),观察细胞状况。

取 3 只 SD 大鼠,按以上方法分离培养原代脂肪细胞,按照下面的实验方法添加不同剂量的 Res,在 37 °C、体积分数为 5%的 CO₂、95%湿度的细胞培养箱里进行细胞培养和干预试验。各实验重复 3 次。

1.2.2 Hoechst 33258 染色 细胞用 20、40、80 μmol/L 的 Res 作用 12 h,对照组添加相等量的 DMSO 作为参照,药物处理完毕后用 PBS 洗涤 2 次,用甲醇/冰醋酸(3:1)于 4 °C 固定 10 min,洗涤后用 Hoechst 33258(浓度为 5 mg/L)避光染色 15 min。用 PBS 洗涤 1 次。进行细胞计数后,取约 6 000 个细胞均匀涂在载玻片上,用甘油封片后在荧光显微镜下观察并拍照(激发波长 340 nm,发射波长 420 nm)。

1.2.3 DNA Ladder 实验 细胞经过 20、40、80 μmol/L 的 Res 干预 6 h 或 12 h 后,按照 DNA Ladder 试剂盒说明书,利用离心柱抽提法,抽提并纯化各组细胞的 DNA,取 20 μL 的 DNA 样品,加 6 × DNA 上样缓冲液(体积分数 30%甘油,0.25 % 溴酚蓝),在质量分数 1.5%的琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭)中进行电泳(40 V,电泳约 3 h),染料泳动至 2/3 处。在凝胶成像分析仪上对凝胶进行拍照,观察 DNA Ladder 的形成。

1.2.4 乳酸脱氢酶含量的检测 收集各组的培养基和细胞,细胞在 PBS 中重悬,通过超声裂解细胞,按照 LDH 检测试剂盒说明书,检测并计算各组培养基和细胞内的乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase,LDH)含量。 $LDH \text{ 漏出率}(\%) = \frac{c_{\text{培养基}}(LDH)}{c_{\text{培养基}}(LDH) + c_{\text{细胞内}}(LDH)}$ 。

1.2.5 流式细胞仪测定细胞凋亡率 细胞经 20、40、80 μmol/L 的 Res 干预 12 h 后,收集各组细胞,按照细胞凋亡率测定试剂盒的方法,分别添加 Annexin V 和 7-AAD,处理后在流式细胞仪上测定细胞凋亡率。

1.2.6 Cytochrome C、Cleaved Caspase 9、Cleaved Caspase 3 的蛋白表达 用 NP40 裂解细胞,提取细胞总蛋白,按照碧云天的试剂盒说明书抽提细胞浆蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量。灌制质量分数 10%的分离胶和 5%的浓缩胶,恒压 120 V、80 mA 预电泳 10 min,上样,进行 SDS-PAGE 电泳,半干式转移,质量分数 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗按照 1:1 000 的稀释度于 4 °C 下孵育过夜,二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,暗房中滴加发光

底物混合物 2 mL 于膜上,用 X 线片曝光、显影、定影。

1.3 统计学处理

每个组别设置 3 个平行对照组,每次实验重复进行 3 次。数据输入 SPSS 11.0 软件中,用方差分析方法(ANOVA)及 Bonferroni 法进行组间差异比较的统计分析。检验水准 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 代表两组差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞核形态学变化

细胞用 Hoechst 33258 染色,在荧光显微镜下观察发现,对照组的细胞核呈现弥散均匀的蓝色荧光,20、40 $\mu\text{mol/L}$ Res 组的细胞核形态与对照组相比无明显差异(图略),而 80 $\mu\text{mol/L}$ Res 组的细胞核染色质浓缩、边缘化,有部分细胞核裂解成碎块(图 1)。

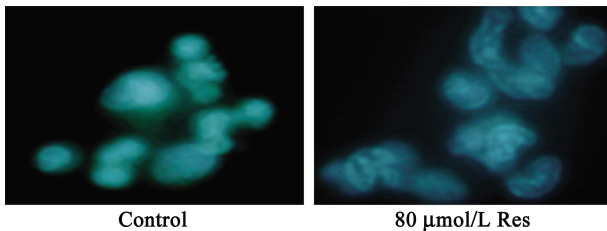


图 1 Res 对原代脂肪细胞细胞核形态的影响

Fig.1 Cell morphological transformation of rat primary adipocytes treated with Res stained by Hoechst 33258; 200 ×

2.2 DNA Ladder 电泳结果

DNA Ladder 电泳结果显示,不同剂量 Res 作用细胞 6 h 后,未出现明显的 DNA 小片段条带,而作用 12 h 后,40、80 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组则出现 180 ~ 200 bp 整数倍的 DNA 片段条带,表现为梯形电泳图谱(图 2),说明 Res 引起细胞核染色质 DNA 断裂,进一步证明 Res 促进细胞凋亡。

2.3 各组的 LDH 漏出率

用 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 Res 干预细胞 12 h 后,与对照组相比,DMEM 培养基中的 LDH 含量升高,细胞内的 LDH 含量下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 3A)。Res 组的 LDH 漏出率明显高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。随着剂量的增加,LDH 漏出率也升高(图 3B)。

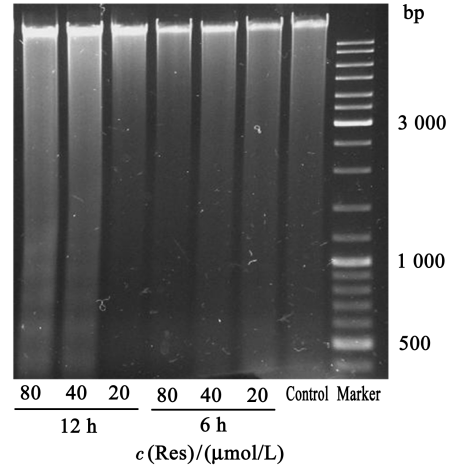


图 2 Res 对原代脂肪细胞 DNA Ladder 形成的影响
Fig.2 DNA Ladder of rat primary adipocytes treated with Res

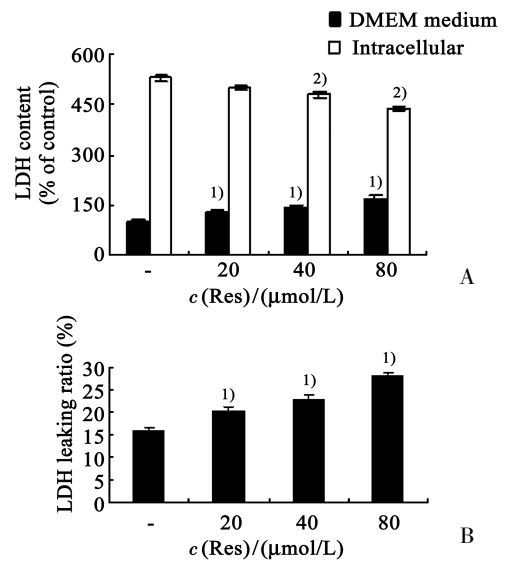


图 3 Res 对原代脂肪细胞 LDH 漏出率的影响
Fig.3 Effects of Res on LDH leaking ratio in rat primary adipocytes

1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ vs control

2.4 流式细胞仪测定各组细胞凋亡率

流式细胞仪测定结果显示,Res 作用 12 h 后,对照组细胞凋亡率为 7.5%,而 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 Res 组细胞凋亡率分别是 12.9%、19.4%、30.9%,与对照组相比明显增加,呈剂量依赖性($P < 0.01$),相应地,活细胞百分比从对照组的 91.8%分别下降到 85.4%、76.9%、63.7%,而坏死细胞率则较低,80 $\mu\text{mol/L}$ 组仅为 5.4%。这些结果说明 Res 促进原代脂肪细胞的凋亡作用。

2.5 有关因子或酶的蛋白表达

Western blot 结果显示,与对照组相比,Res 组

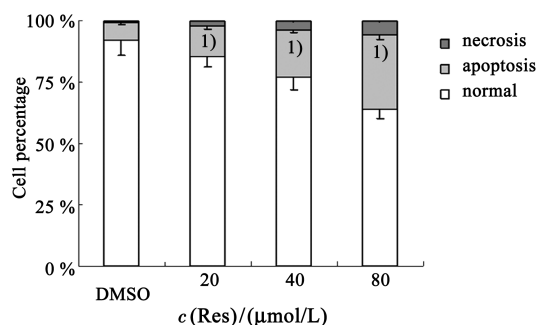


图 4 Res 对原代脂肪细胞凋亡率的影响 (12 h)

Fig.4 Effects of Res on the percentage of apoptotic cells at 12 h

1) $P < 0.01$ vs control

的 Sirt1、胞浆 Cytochrome C、Cleaved Caspase 9 和 Caspase 3 的蛋白表达水平上升, 细胞的总 Cytochrome C 表达水平也有一定程度的升高(图 5)。

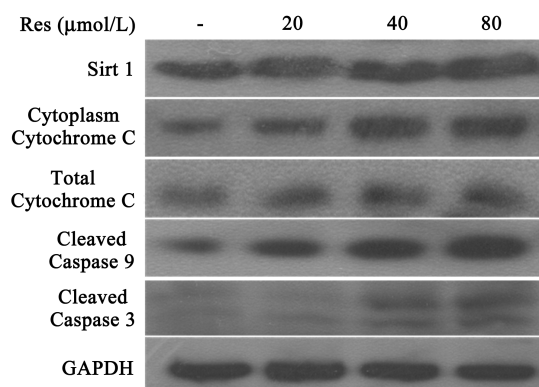


图 5 Res 对原代脂肪细胞 Sirt1、Cytochrome C、Cleaved Caspase 9 和 Caspase 3 蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of Res on the expression of Sirt1, Cytochrome C, Cleaved Caspase 9 and Caspase 3 in rat adipocytes

3 讨论

3.1 白藜芦醇促进大鼠原代脂肪细胞凋亡

研究发现,多种植物化学物质可促进脂质代谢,抑制脂质合成,抑制前脂肪细胞向脂肪细胞分化,促进前脂肪细胞和脂肪细胞的凋亡等,从而减少机体的脂肪堆积,这对于防治肥胖有重要意义^[4]。近年来,有关植物化学物质对于前脂肪细胞和脂肪细胞的凋亡作用的研究成为热点。作为一种植物化学物,Res 可以促进肿瘤细胞的凋亡,如通过对线粒体膜的破坏及 Caspase 家族相关蛋白的激活可导致 B 淋巴细胞性白血病细胞的凋

亡^[5],同时 Res 也能抑制肝癌细胞 HepG2 的生长增殖且促进其凋亡^[6]。在本实验中,我们证实 Res 可以促进大鼠原代脂肪细胞的凋亡。细胞凋亡时细胞核体积缩小,出现固缩,晚期核质高度浓缩融合成团,染色质发生边集并断裂成小分子的 DNA 片段。我们通过 Hoechst 33258 荧光染料染色发现,Res 处理过的脂肪细胞细胞核呈致密浓染的固缩形或碎块状荧光,部分细胞核碎裂,而 DNA Ladder 实验结果显示,Res 处理后电泳图上出现“梯形条带”,证实 Res 可促进细胞染色质 DNA 断裂。LDH 是存在于细胞浆内参与糖酵解最后一步即丙酮酸和乳酸相互转化时的一种催化酶。如果细胞膜受损,LDH 会从细胞内漏出,因此通过测定 LDH 漏出率可以间接评价细胞的凋亡程度。经 20、40、80 μmol/L 的 Res 作用后,脂肪细胞的 LDH 漏出率呈剂量依赖性升高,说明 Res 通过细胞凋亡作用破坏细胞膜的完整性。流式细胞仪测定的结果证实,Res 可剂量依赖地升高脂肪细胞的凋亡率,而且细胞坏死率相对较低,说明 Res 主要促进细胞凋亡而非坏死。

3.2 白藜芦醇诱导细胞凋亡可能的机制

线粒体凋亡途径在细胞凋亡中起着重要作用,而 Caspase 家族是诱发和执行细胞凋亡的关键信号分子^[7]。在细胞受到凋亡信号刺激时,线粒体膜电位下降,释放出细胞色素 C,进一步剪切活化 Caspase 9 和 Caspase 3,启动 Caspase 级联反应,导致细胞程序性死亡^[8]。研究证实,Res 可经由线粒体凋亡途径,活化 Caspase 家族而促进细胞凋亡: Res 可抑制胃癌 SGC7901 细胞的增殖,引起细胞周期阻滞,同时下调线粒体膜电位,增加 Caspase 3 的活性,促进细胞凋亡^[9];MCF-7 细胞经 Res 处理后,Bax 表达上调,Bcl-2 表达下调,Bcl-2/Bax 比值下降,线粒体膜电位也下降,诱导细胞出现凋亡,但却与 Caspase 家族的活化无关^[10]。用 Res 处理脑胶质瘤 U251 细胞,Caspase 3 活性增加,而且 Res 诱导的细胞凋亡能被选择性 Caspase 3 抑制剂 (Z-DEVD-FMK)阻断^[11]。本实验证实,经 Res 处理后细胞色素 C、Cleaved Caspase 9 和 Caspase 3 的蛋白表达都上升,说明 Res 可以经由线粒体凋亡途径,激活 Caspase 家族,从而导致脂肪细胞凋亡。

在大量实验研究中,Res 被发现可以增加细胞 Sirt1 的表达^[12]。Res 可作为 Sirt1 的特异性激活剂,剂量响应实验表明,11 μmol/L 的 Res 可以使 Sirt1

的去乙酰作用增加一倍,而在 100 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度可使 Sirt1 的去乙酰效应达到饱和^[13]。Sirt1 与基因转录沉默、细胞生长周期调节、能量代谢包括糖异生和脂质累积、胰岛素分泌、血管生成、神经保护、病毒感染以及寿命期限延长等细胞生物学功能都有着密切的关系^[14]。在影响细胞存活或凋亡方面,Sirt1 同样具有重要的作用。研究发现,Sirt1 主要定位于细胞核中,在凋亡信号刺激下,可通过去乙酰化作用于 p53 和 FOXO3,促进细胞存活,抑制细胞凋亡^[15]。而在一些肿瘤细胞中,Sirt1 也被观察到可在细胞浆中表达,细胞浆的 Sirt1 表达水平上升,可通过激活 Caspase 家族,促进细胞凋亡^[16]。研究表明,Res 通过增加 Sirt1 表达,抑制前脂肪细胞的分化,也可促进猪脂肪细胞的凋亡^[17-18]。本实验结果显示,Res 升高脂肪细胞的 Sirt1 表达,Sirt1 可能通过诱导线粒体的去极化,降低线粒体膜稳定性,增加其通透性,使线粒体中细胞色素 C 释放增加,从而逐步启动 Caspases 级联反应,促进和放大凋亡过程。但 Sirt1 如何作用于线粒体从而启动凋亡程序,Sirt1 的下游蛋白是什么? 这些机制有待进一步的探讨。

综上所述,Res 可诱导原代脂肪细胞的凋亡,从而减少脂肪在机体的堆积。

参考文献:

- [1] Vanda M, Rosa M, Diogo P, et al. Xanthohumol influences preadipocyte differentiation: implication of antiproliferative and apoptotic effects [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(24): 11631-11637.
- [2] Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. *Science*, 1997, 275(5297): 218-220.
- [3] Jia NL, Victor CH, Kun MR, et al. Resveratrol modulates tumor cell proliferation and protein translation via SIRT1-dependent AMPK activation [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(3): 1584-1592.
- [4] Lin J, Della F, Baile CA, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Obes Res*, 2005, 13(6): 982-990.
- [5] Dorrie J, Gerauer H, Wachter Y, et al. Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase 9 in acute lymphoblastic leukemia cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(12): 4731-4739.
- [6] 田雪梅,张展霞. 白藜芦醇抗肿瘤作用的体外实验研究 [J]. *中山大学学报:自然科学版*,2000,39(6):64-67.
- [7] Moon DO, Park SY, Choi YH. Melittin induces Bcl-2 and caspase 3-dependent apoptosis through down-regulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells [J]. *Toxicol*, 2008, 51(1): 112-120.
- [8] Slee EA, Harte MT, Kluck RM, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, 3, 6, 7, 8, and 10 in a caspase-9-dependent manner [J]. *J Cell Biol*, 1999, 144(2): 281-292.
- [9] 王学清,王贺玲,李岩,等. 白藜芦醇对胃癌细胞 SGC7901 增殖与凋亡的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(4):340-345.
- [10] Pozo E, Merino JM, Mulero NS, et al. Resveratrol induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB [J]. *Int J Cancer*, 2005, 115(1): 74-84.
- [11] Baatout S, Derradji H, Jacquet P, et al. Increased radiation sensitivity of an eosinophilic cell line following treatment with epigallocatechin-gallate, resveratrol and curcuma [J]. *Int J Mol Med*, 2006, 15(2): 337-352.
- [12] Wei Y, Yu C, Xiao H, et al. Effects of resveratrol on H₂O₂-induced apoptosis and expression of SIRT1s in H9c2 Cells [J]. *Cell Biochem*, 2009, 107: 741-747.
- [13] Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan [J]. *Nature*, 2003, 425(6954): 191-196.
- [14] Lavu S, Boss O, Elliott PJ, et al. Sirtuins novel therapeutic targets to treat age associated diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(10): 841-853.
- [15] Yang Y, Hou H, Haller EM, et al. Suppression of FOXO1 activity by FHL2 through SIRT1-mediated deacetylation [J]. *EMBO J*, 2005, 24(5): 1021-1032.
- [16] Jin Q, Yan T, Ge X, et al. Cytoplasm-localized SIRT1 enhances apoptosis [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(1): 88-97.
- [17] Bai L, Pang WJ, Yang YJ, et al. Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 307(12): 129-140.
- [18] Backesjo CM, Li Y, Lindgren U, et al. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(7): 993-1002.