

槲皮素对肉鸡脂肪细胞内分泌因子水平的影响

王明昊 李 垚* 赵 伟 欧阳文文 金 芳

(东北农业大学动物营养研究所, 哈尔滨 150030)

摘 要: 本试验旨在探讨槲皮素对爱拔益加(AA)肉鸡脂肪细胞内分泌因子水平的影响。取10日龄AA肉仔鸡腹部脂肪,采用机械破碎和酶消化相结合的方法分离脂肪细胞,并采用油红O染色和细胞中甘油三酯(TG)含量检测的方法鉴定所分离的细胞。将脂肪细胞随机分5组(每组6个重复),空白组为基础培养液,溶剂对照组在基础培养液中添加2‰二甲基亚砷,试验组分别添加10、20、40 mg/L槲皮素,于24、48、72 h收集细胞及培养液,利用酶法测定TG含量,放射性免疫法测定肿瘤坏死因子 α (TNF α)含量,酶联免疫吸附测定法测定脂联素(ADP)和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)蛋白含量,实时定量PCR法测定PPAR γ 基因mRNA表达。结果表明:1)对所取脂肪组织进行分离提纯后,显微镜下可见悬浮细胞存在。贴壁后细胞内存在可被油红O染成鲜红色的液滴,同时TG检测显示细胞中存在TG,由此鉴定所取细胞为脂肪细胞。2)基础培养液中添加10、20、40 μ g/mL槲皮素后,与空白组相比,脂肪细胞TG含量显著降低($P < 0.05$);脂肪细胞中TNF α 和ADP含量显著增加($P < 0.05$),且存在一定的剂量和时间依赖性;脂肪细胞PPAR γ 基因mRNA表达和蛋白含量受到抑制($P < 0.05$),其中对mRNA表达的影响存在时间和剂量依赖性,而蛋白含量的变化规律不明显。综上所述,槲皮素可通过调节脂肪细胞内分泌因子TNF α 、ADP和PPAR γ 的生成水平来降低脂肪细胞TG含量。

关键词: 槲皮素;脂肪细胞;甘油三酯;肿瘤坏死因子 α ;脂联素;过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

中图分类号:S816.7

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2013)03-0587-08

根据最新世界卫生组织(World Health Organization, WHO)报告,全球肥胖成年人人数已超过5亿,超重人数已达16亿之多。肥胖已被定义为目前世界上影响最严重的一种流行性疾病。摄入脂肪性食物过多无疑是导致肥胖的最重要原因之一。因此,通过选用可控制脂肪沉积的饲料添加剂,研制脂肪含量低、营养均衡的优质畜产品是畜牧业发展的方向。本课题组前期试验显示,沙棘黄酮可抑制动物脂肪细胞增殖、调控脂肪代谢的内分泌因子,最终达到降脂的目的^[1]。槲皮素是沙棘黄酮的主要有效成分之一,具有抗癌、抗菌、抗炎、抗病毒及保护心血管等多种生物学功

能^[2-6]。动物的脂肪组织不仅仅是储能仓库,同时也是重要的内分泌组织。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)、脂联素(adiponectin, ADP)和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)等细胞因子均是脂肪细胞的重要内分泌因子,这些脂肪细胞因子可控制脂肪细胞自身的能量储备,调节脂肪细胞体积,传递脂肪组织与其他组织器官之间的信息,对动物肥胖,尤其对腹脂沉积、糖尿病等有很大作用。本试验拟利用脂肪细胞体外培养技术,在前期试验的基础上,进一步研究沙棘黄酮主要成分之一——槲皮素对脂肪细胞内分泌因

收稿日期:2012-09-27

基金项目:哈尔滨市科学技术局科技创新人才研究专项资金(2011RFLXN015)

作者简介:王明昊(1986—),男,黑龙江肇州人,硕士研究生,从事动物分子营养与代谢调控研究。E-mail: wangmh_n@163.com

*通讯作者:李 垚,教授,博士生导师,E-mail: liyao1966@sina.com

子的作用,旨在明确槲皮素在脂肪组织最小单元上的作用效果,为开发新型饲料添加剂扩展思路,对减少畜禽脂肪过度沉积、改善肉品质、提高人类肉质食品的营养价值、控制肥胖的发生具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验动物:10 日龄爱拔益加 (Arbor Acres, AA) 肉仔鸡(购自哈尔滨市呼兰东旭种禽孵化养殖厂);试验样品:槲皮素(纯度 $\geq 98\%$,美国 Sigma 公司)。

1.2 试剂

试剂包括高糖 DMEM 无酚红培养液、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司)、胎牛血清(fetal calf serum, FBS, 杭州四季青公司)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、青霉素 G 钠盐、硫酸链霉素、二甲基亚砷(DMSO)、谷氨酰胺(美国 Amresco 公司)、Triton X-100 细胞裂解液(碧云天生物科技研究所)、甘油三酯(triglyceride, TG)试剂盒(北京北化康泰临床试剂有限公司)、酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海蓝基公司)、实时定量 PCR(RT-PCR)试剂盒(瑞士 Roche 公司)。

1.3 仪器

仪器包括超净工作台(苏州净化设备有限公司)、二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司)、离心机(上海安亭科学仪器厂)、高压干热灭菌箱(上海福玛)、立式高压蒸汽灭菌锅(上海博迅)、Model 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)、7500 Real-Time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)、UV2401PC 紫外分光光度计(美国 Thermo Electron Biomate)、倒置显微镜(德国 Leica 公司)、6 孔细胞培养板(美国 Costar 公司)。

1.4 试验设计与方法

1.4.1 AA 肉鸡脂肪细胞的分离、培养与鉴定

10 日龄 AA 肉仔鸡腹部脂肪组织经机械破碎、胶原酶 I 消化、裂解红细胞等步骤,分离并提纯细胞。将细胞以 2×10^5 个/mL 密度接种于 6 孔培养板,用 15% FBS 高糖 DMEM 无酚红培养液于 5% CO_2 、37 °C 条件下培养,隔天换液,待细胞在培养板中贴壁生长至完全汇合,用 0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)-0.25% 胰蛋白酶消化传代。第 4

代生长良好的细胞接种培养 24 h 后移去生长培养液,改由加入油酸盐的分化培养液继续培养,诱导分化后隔天换液。采用油红 O 染色鉴定和 TG 含量 2 种方法鉴定脂肪细胞。

1.4.2 槲皮素对 AA 肉鸡脂肪细胞 TG 沉积及内分泌因子的作用

每孔 2×10^5 个/mL 细胞贴壁后,随机分为 5 组,每组 6 个重复。空白组为基础培养液(含 5% FBS 的高糖 DMEM 无酚红培养液),溶剂对照组为含 2% DMSO 的基础培养液,试验组分别为含 10、20、40 mg/L 槲皮素的基础培养液。培养 24 h 后,吸取细胞培养液冻存于 EP 管中,用于 ADP 含量的测定。将孔中细胞消化后用含 FBS 的培养液终止消化,转移至 EP 管中,3 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用磷酸盐缓冲液(PBS)将沉淀吹起再次 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清,将细胞沉淀冻存,用于 $\text{TNF}\alpha$ 、PPAR γ 和 TG 含量的测定。TG 含量测定参照 TG 试剂盒说明书, $\text{TNF}\alpha$ 含量测定参照放射性免疫试剂盒说明书, ADP 及 PPAR γ 蛋白含量检测参照 ELISA 试剂盒说明书, PPAR γ 基因 mRNA 检测参照 RT-PCR 试剂盒说明书。

1.5 数据处理

试验结果均以平均值 \pm 标准差表示,试验数据采用 SPSS 18.0 软件的 one-way ANOVA 进行方差分析,采用 Duncan 氏法进行多重比较,以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准,以 $P < 0.01$ 作为差异极显著判断标准。

2 结 果

2.1 AA 肉鸡脂肪细胞的分离、培养与鉴定

刚接种的脂肪细胞呈圆形,悬浮于培养液中,2 h 后开始逐渐贴壁。在显微镜下观察可见贴壁的脂肪细胞呈不规则梭形、多角形或者三角形,细胞核较小,胞质丰富,胞内存有少量球状透明液滴。取诱导 24、72、120 h 的脂肪细胞进行油红 O 染色,细胞内透明液滴被染成鲜红色,随培养时间的延长,红色脂滴逐渐增多,体积和密度均变大(图 1)。TG 检测结果显示,培养 24 h 后脂肪细胞中即可检出 TG,且 TG 含量随时间延长而增多(表 1)。

表 3 槲皮素对 AA 肉鸡脂肪细胞 TNF α 含量的影响Table 3 Effects of quercetin on TNF α content in adipocytes of AA broilers

ng/mL

组别 Groups	24 h	48 h	72 h
空白 Blank	1.01 \pm 0.04 ^{Aa}	1.18 \pm 0.04 ^{Aa}	1.05 \pm 0.09 ^{Aa}
溶剂对照 Solvent control	1.00 \pm 0.17 ^{Aa}	1.10 \pm 0.14 ^{Aa}	0.92 \pm 0.12 ^{Aa}
10 μ g/mL 槲皮素 10 μ g/mL quercetin	0.65 \pm 0.06 ^{Aa}	1.93 \pm 0.25 ^{Bb}	5.80 \pm 0.29 ^{Bb}
20 μ g/mL 槲皮素 20 μ g/mL quercetin	1.34 \pm 0.20 ^{ABb}	3.08 \pm 0.46 ^{Cc}	9.78 \pm 1.20 ^{Cc}
40 μ g/mL 槲皮素 40 μ g/mL quercetin	1.52 \pm 0.22 ^{Bb}	2.50 \pm 0.37 ^{BCd}	5.02 \pm 0.19 ^{Bb}

表 4 槲皮素对 AA 肉鸡脂肪细胞 ADP 含量的影响

Table 4 Effects of quercetin on ADP content in adipocytes of AA broilers

ng/mL

组别 Groups	24 h	48 h	72 h
空白 Blank	1.98 \pm 0.12 ^a	2.45 \pm 0.12 ^{Aa}	2.51 \pm 0.31 ^{Aa}
溶剂对照 Solvent control	2.08 \pm 0.23 ^a	2.39 \pm 0.31 ^{Aa}	2.63 \pm 0.32 ^{ABab}
10 μ g/mL 槲皮素 10 μ g/mL quercetin	2.68 \pm 0.14 ^{ab}	2.68 \pm 0.21 ^{ABa}	2.98 \pm 0.12 ^{ABCbc}
20 μ g/mL 槲皮素 20 μ g/mL quercetin	2.78 \pm 0.24 ^{ab}	2.88 \pm 0.24 ^{ABab}	3.14 \pm 0.21 ^{BCcd}
40 μ g/mL 槲皮素 40 μ g/mL quercetin	3.14 \pm 0.15 ^b	3.35 \pm 0.26 ^{Bb}	3.43 \pm 0.23 ^{Cd}

2.2.4 槲皮素对 AA 肉鸡脂肪细胞 PPAR γ 基因 mRNA 表达的影响

由表 5 可知,与空白组相比,各时间点溶剂对照组 PPAR γ 基因 mRNA 表达均无显著变化 ($P >$

0.05), 10、20 μ g/mL 槲皮素组在 48、72 h 时 PPAR γ 基因 mRNA 表达显著降低 ($P <$ 0.05); 40 μ g/mL 槲皮素组 PPAR γ 基因 mRNA 表达在各时间点均显著降低 ($P <$ 0.05)。

表 5 槲皮素对 AA 肉鸡脂肪细胞 PPAR γ 基因 mRNA 表达的影响Table 5 Effects of quercetin on mRNA expression of PPAR γ gene in adipocytes of AA broilers

组别 Groups	24 h	48 h	72 h
空白 Blank	1.00 \pm 0.00 ^b	1.00 \pm 0.00 ^d	1.00 \pm 0.00 ^d
溶剂对照 Solvent control	0.95 \pm 0.00 ^b	1.04 \pm 0.09 ^d	1.02 \pm 0.09 ^d
10 μ g/mL 槲皮素 10 μ g/mL quercetin	1.20 \pm 0.00 ^b	0.70 \pm 0.08 ^c	0.68 \pm 0.01 ^c
20 μ g/mL 槲皮素 20 μ g/mL quercetin	1.12 \pm 0.02 ^b	0.81 \pm 0.01 ^b	0.52 \pm 0.01 ^b
40 μ g/mL 槲皮素 40 μ g/mL quercetin	0.24 \pm 0.01 ^a	0.54 \pm 0.03 ^a	0.24 \pm 0.00 ^a

2.2.5 槲皮素对 AA 肉鸡脂肪细胞 PPAR γ 蛋白含量的影响

由表 6 可知,与空白组相比,各时间点溶剂对

照组 PPAR γ 蛋白含量均无显著变化 ($P >$ 0.05); 10、20、40 μ g/mL 槲皮素组 PPAR γ 蛋白含量在 48、72 h 时均显著降低 ($P <$ 0.05)。

表 6 槲皮素对 AA 肉鸡脂肪细胞 PPAR γ 蛋白含量的影响Table 6 Effects of quercetin on PPAR γ content in adipocytes of AA broilers

ng/mL

组别 Groups	24 h	48 h	72 h
空白 Blank	0.012 0 \pm 0.000 5	0.042 1 \pm 0.002 1 ^a	0.032 1 \pm 0.000 9 ^a
溶剂对照 Solvent control	0.012 3 \pm 0.002 1	0.041 9 \pm 0.002 1 ^a	0.031 9 \pm 0.001 1 ^a
10 μ g/mL 槲皮素 10 μ g/mL quercetin	0.011 9 \pm 0.001 2	0.025 2 \pm 0.003 2 ^b	0.022 1 \pm 0.000 7 ^b
20 μ g/mL 槲皮素 20 μ g/mL quercetin	0.013 0 \pm 0.000 8	0.032 0 \pm 0.001 2 ^b	0.023 2 \pm 0.000 8 ^b
40 μ g/mL 槲皮素 40 μ g/mL quercetin	0.012 1 \pm 0.000 9	0.028 1 \pm 0.001 5 ^b	0.015 5 \pm 0.000 9 ^b

3 讨论

3.1 AA 肉鸡脂肪细胞的分离、培养与鉴定

利用体细胞分离技术,在目的动物身上提取原代细胞进行体外培养和试验,能够为科研试验提供纯度高、来源广、本体同一性强的原代细胞作为试验材料,是研究机体各种生物学作用的重要方法。本试验采用活体提取原代前脂肪细胞的方法,取 10 日龄 AA 肉鸡腹部脂肪进行分离、培养和鉴定,最终成功获得试验所需的 AA 肉鸡成熟脂肪细胞。

脂肪细胞的体外培养分有血清和无血清 2 种模式。高浓度的血清可提供给细胞更类似体内的环境,脂肪细胞在其中生长状态较好,但是血清中的多种不确定生物因子对体外试验结果会产生很大影响;而无血清培养中脂肪细胞生长所需因子不能全部供应,对细胞的自身成活能力要求较高。本试验采用对试验结果测定和脂肪细胞生长影响均较小的少量血清培养模式,采用高糖 DMEM 无酚红培养液为基础培养液,再加入 5%、15% 血清和 1% 双抗配制成培养液,其中 15% 血清为细胞接种和早期传代时所选,目的是让脂肪细胞更快贴壁和增殖,而 5% 血清为进入加药处理后所选用的浓度,目的是减少血清对脂肪细胞生长状态的影响,更突出地显示受试物槲皮素对脂肪细胞的作用。

一般对脂肪细胞的鉴定可通过形态学观察、染色和酶活性等方法,也可通过某些特征基因的表达来确定。本试验所得细胞显微镜下观察为典型的脂肪细胞形态,可初步由形态学观察鉴定其可能为脂肪细胞。油红 O 为亲脂物质,可将细胞内的脂滴染成红色,而没有脂滴的细胞则不会被染色。这种方法操作简单、结果直观且特异性好,是最常用的脂肪细胞鉴定手段,准确性与前脂肪细胞标志性酶甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GPDH)的测定相似。本试验在对所取细胞进行油红 O 染色后观察到细胞内出现红色液滴,随培养时间的延长,红色区域出现扩大、融合和加深等现象,由此可鉴定所取细胞为含脂滴的脂肪细胞且细胞中的脂滴正逐渐融合增多。另外,为了进一步加强脂肪细胞

鉴定的准确性,又进行了细胞中 TG 含量的测定。TG 是脂肪细胞脂滴的主要成分,也是鉴定脂肪细胞的重要指标之一。在 120 h 的培养过程中,均可检测到所取细胞中有 TG 存在,这也说明了所取细胞为脂肪细胞。

3.2 槲皮素对 AA 肉鸡脂肪细胞 TG 沉积及内分泌因子的作用

3.2.1 槲皮素对 AA 肉鸡脂肪细胞 TNF α 含量的影响

TNF α 是一种多效细胞因子,对脂质代谢也起作用。目前已证实,TNF α 能通过抑制动物的摄食和营养物质的吸收来增加机体产热;能通过抑制脂蛋白酯酶(lipoprotein lipase, LPL)的活性来降低脂肪酸合成关键酶基因 mRNA 表达水平,促进脂肪分解,抑制脂质合成;还能通过抑制动物脂肪细胞 PPAR γ 、葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、GPDH 等特异性基因的表达,抑制脂肪细胞分化;同时,还有试验证实 TNF α 可诱导脂肪细胞凋亡。

目前关于槲皮素对动物体内 TNF α 含量的影响未见报道,仅见采用山楂叶总黄酮的相关试验^[7]。部分总黄酮对 TNF α 的生成有抑制作用,但由于总黄酮的成分复杂,对槲皮素的生物学作用虽可提供一定的参考,但结果并不一定相同。本试验结果显示,10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素可促进 AA 肉鸡脂肪细胞中 TNF α 的生成,其中 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素作用效果最显著,且有时间依赖性。结合本试验中关于 TG 含量的测定结果来看,槲皮素在促进 TNF α 生成的同时,可抑制 TG 的沉积,在 TNF α 蛋白含量最高的 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素组 TG 含量最低,提示槲皮素可能通过促进 TNF α 的表达来调节 AA 肉鸡脂肪细胞 TG 的沉积,其中 TNF α 可以抑制 TG 沉积这一结果与以往研究结果一致。同时,结合 2.2.4 及 2.2.5 中的试验结果,可以猜测槲皮素可能通过促进 TNF α 的生成,进而抑制 PPAR γ 基因表达和蛋白含量,最终降低脂肪细胞中 TG 含量。另外,由于 TNF α 具有促进细胞凋亡的能力,槲皮素也可能通过促进 TNF α 的生成来诱导 AA 肉鸡脂肪细胞凋亡。

3.2.2 槲皮素对 AA 肉鸡脂肪细胞 ADP 含量的影响

ADP 是一种主要由脂肪组织分泌的特异性胶原样蛋白因子,可增加脂肪酸氧化,降低肌肉与肝脏 TG 含量,调节脂质代谢,发挥抗动脉粥样硬化等作用。它通过活化由腺苷酸所激活的蛋白激酶途径,对体内葡萄糖利用及脂肪酸氧化产生影响。ADP 可抑制乙酰辅酶 A 活性来促进棕榈酰肉碱转移酶,进而加速脂肪酸向细胞的线粒体转移,增强脂肪酸的 β 氧化。ADP 还能增加解偶联蛋白 2 和脂酰 CoA 氧化酶等基因的表达,这些分子参与体内的脂肪酸转运、氧化和能量释放等过程,进而减少血清 TG 含量和游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 浓度。

目前,关于槲皮素对动物体内 ADP 含量的影响也未见报道。在饲料中添加低浓度 (100 mg/kg) 和高浓度 (200 mg/kg) 的淫羊藿总黄酮饲喂患高血脂症的大鼠后发现,其血清 ADP 含量与对照组相比显著升高,且高浓度组比低浓度组显著提高^[8]。淫羊藿总黄酮在可显著提高患高血脂症大鼠血清 ADP 含量的同时,还可促进大鼠主动脉 ADP 受体 *AdipoR1* 和 *AdipoR2* 基因 mRNA 表达和蛋白水平增加^[9]。在对大豆异黄酮^[10] 和黄芪总黄酮^[11] 的研究中也得到相似结果。由于各种植物总黄酮的组分多样、含量也不同,对其作用机理影响的因素较多,因此,本试验研究了单体槲皮素对 AA 肉鸡脂肪细胞中 ADP 含量的影响。

本试验添加的槲皮素为沙棘黄酮的主要成分,试验所得结果与淫羊藿、黄芪等植物总黄酮的作用效果相似。10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素均可对体外培养的 AA 肉鸡脂肪细胞 ADP 含量起不同程度的促进作用。10 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素对 AA 肉鸡脂肪细胞 ADP 含量的影响只在培养 72 h 时表现显著效应。结合本试验中关于 TG 含量的测定结果来看,各浓度槲皮素组的 TG 含量均在 ADP 含量提高时降低,这与 ADP 的促进脂质氧化、减少 TG 沉积的生物学特性一致,且与以往试验结果相似。

3.2.3 槲皮素对 AA 肉鸡脂肪细胞 PPAR γ 含量的影响

PPAR γ 是机体脂肪组织发育和代谢的中心调

控剂,它的信号通路可影响细胞的脂肪代谢,在脂肪细胞分化中起关键的启动作用,可诱导前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞,使脂肪细胞脂质蓄积并诱导大量特异性基因表达,也可抑制 TNF α 生成。PPAR γ 的直接生物学功能是促进脂肪生成,以 PPAR γ 含量为检测指标可明确受试物在多条代谢调控通路中的作用效果。

在本课题组前期试验中,断奶东北民猪仔猪饲喂棘提取物后,仔猪腹脂与皮脂 PPAR γ 基因 mRNA 表达均显著下降^[1]。另有研究显示,紫萍黄酮中复合牡荆碱和荜草素可显著抑制 3T3-L1 细胞中脂质合成和减少 CCAAT 增强子结合蛋白 - α (CCAAT enhancerbinding protein- α , C/EBP- α) 和 PPAR γ 蛋白的生成水平^[12]。染料木黄酮和大豆苷元还可从脂肪细胞分化中期开始以剂量依赖方式抑制 AD-MSCs 细胞的成脂标记 PPAR γ 、固醇调节元件结合蛋白 1 (*SREBP-1*) 和 *GLUT4* 基因的表达^[13]。

在本试验中,作为沙棘黄酮的主要成分之一,槲皮素在转录和翻译水平上对 AA 肉鸡脂肪细胞 PPAR γ 表现出抑制作用。对于 24 h PPAR γ 基因 mRNA 表达和蛋白含量结果的差异,可能是由于基因从转录到翻译的时序性造成的。值得注意的是,在前几个指标中所体现的时间剂量依赖性,在 PPAR γ 蛋白含量中显示的并不突出,72 h 时各试验组的数据确实比 48 h 时要低,但在与 24 h 时的数据进行比较时则无这一规律。

总体而言,10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素对 AA 肉鸡脂肪细胞 PPAR γ 基因 mRNA 的表达和蛋白生成水平起抑制作用,这与本课题组沙棘黄酮的前期试验结果^[1]一致,也与紫萍黄酮^[12] 和染料木黄酮^[13] 的试验结果相似。结合本试验 TG 含量结果可知,TG 含量的降低与具有促成脂作用的 PPAR γ 含量减少相吻合。

4 结 论

① 本试验利用机械破碎和酶消化相结合的方法,从 AA 肉鸡腹部脂肪中获得了高纯度和高活性的 AA 肉鸡脂肪细胞。

② 槲皮素可以通过促进 AA 肉鸡脂肪细胞 TNF α 和 ADP 的生成、抑制 PPAR γ 基因的表达和

蛋白生成来促进脂肪分解,抑制脂质过度沉积。

参考文献:

- [1] 夏蕾,李垚,张志宏,等. 沙棘提取物对猪脂肪中部分脂肪代谢相关基因表达的影响[J]. 营养学报, 2009,31(2):177-180.
- [2] 秦晓蓉,张铭金,高绪娜,等. 槲皮素抗菌活性的研究[J]. 化学与生物工程,2009,26(4):55-57.
- [3] KAMARAJ S, VINODHKUMAR R, ANANDAKUMAR P, et al. The effects of quercetin on antioxidant status and tumor markers in the lung and serum of mice treated with benzo(a) pyrene[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2007,30(12):2268-2273.
- [4] 刘佳佳,羊建,邬于川,等. 中性粒细胞自发性凋亡及槲皮素对其影响的研究[J]. 医学研究杂志, 2007,36(1):66-67.
- [5] 吴扬,顾玉梅. 银杏叶提取物和槲皮素对心肌细胞肥大的防治作用及其机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2007,23(2):138-142.
- [6] 裴天仙,徐长庆,李滨,等. 槲皮素对阿霉素致小鼠心肌损伤的保护作用及其机制[J]. 药学学报, 2007,42(10):1029-1033.
- [7] 严茂祥,陈芝芸,高晓倩,等. 山楂叶总黄酮对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝组织 TNF- α 、Leptin 和 IL-8 表达的影响[J]. 中国中医药科技, 2010,17(6):519-521.
- [8] 蔡辉,赵智明,赵凌杰,等. 淫羊藿总黄酮对高脂血症大鼠血清脂联素水平的影响[J]. 中国中医急症, 2011,20(1):93-95.
- [9] 徐玉顺,沈思钰,蔡辉,等. 淫羊藿总黄酮对高脂血症大鼠主动脉脂联素受体表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010,18(8):594-598.
- [10] 陈世伟,张红敏,张立实,等. 大豆异黄酮对膳食诱导胰岛素抵抗大鼠脂联素基因表达的影响[J]. 卫生研究, 2006,35(1):46-49.
- [11] 李楠,范颖,贾旭明,等. 黄芪不同有效部位对糖尿病模型大鼠血清胰岛素、脂联素的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(5):162-164.
- [12] KIM J, LEE I, SEO J, et al. Vitexin, orientin and other flavonoids from *Spirodela polyrhiza* inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells[J]. *Phytother Research*, 2010,24(10):1543-1548.
- [13] KIM M H, PARK J S, SEO M S, et al. Genistein and daidzein repress adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via Wnt/ β -catenin signalling or lipolysis[J]. *Cell Proliferation*, 2010,43(6):594-605.

Quercetin: Effects on Endocrine Factor Levels in Adipocytes of Broilers

WANG Minghao LI Yao* ZHAO Wei OUYANG Wenwen JIN Fang

(*Institute of Animal Nutrition, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China*)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the effects of quercetin on endocrine factor levels in adipocytes of Arbor Acres (AA) broilers. The methods of mechanical disruption and enzymic digestion were performed to isolate adipocytes from abdominal adipose tissue of 10-day-old AA broilers. The adipocytes were identified by oil red O staining and triglyceride (TG) content. The adipocytes were randomly allocated to 5 groups with 6 replicates each. Adipocytes were cultured in a basal medium (control), and the basal medium with 2% DMSO or 10, 20 and 40 mg/L quercetin. The cells and medium were collected after 24, 48, and 72 h of incubation. Enzymatic method was performed to determine TG content in adipocytes; radioactive immune method was performed to determine tumor necrosis factor (TNF α) content; ELISA was performed to determine the protein content of adiponectin (ADP) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ); and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to determine *PPAR γ* gene mRNA expression. The results showed as follows: 1) there were abundant suspended cells in microscope through isolation of adipose tissue from AA broilers. The cells were identified as intracellular liquid drop stained by bright red and there was TG in cells. 2) Compared with control, TG content in adipocytes of AA broilers was significantly decreased when the basal medium supplemented with 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ quercetin ($P < 0.05$); the contents of TNF α and ADP in adipocytes were significantly increased by the supplementation of 10, 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ quercetin in dose-dependent and time-dependent manner; mRNA expression and protein content of PPAR γ were significantly inhibited by the supplementation of 10, 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ quercetin in time-dependent manner but not in dose-dependent manner. The results indicate that the supplementation of quercetin can reduce TG content in adipocytes via regulating the contents of TNF α , ADP and PPAR γ in adipocytes of AA broilers. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(3):587-594]

Key words: quercetin; adipocytes; TG; TNF α ; ADP; PPAR γ