

小檗碱对 C3H10T1/2 脂肪细胞自噬的影响

张晓燕 邓玉杰 杨键 吕鹏飞 杨颖

【摘要】 目的 探讨小檗碱对 C3H10T1/2 脂肪细胞自噬的影响。**方法** 诱导中胚层的多能干细胞株 C3H10T1/2 分化成脂肪细胞,用小檗碱处理,Western 印迹监测自噬标志蛋白 LC3 II/I 及自噬底物 P62 的变化;用小檗碱和溶酶体抑制剂氯喹共同处理,Western 印迹监测自噬通量变化;透射电子显微镜观察小檗碱处理后自噬体的数量变化。**结果** (1)小檗碱处理后,Western 印迹显示 LC3 II/I 降低,P62 增高,并呈时间与剂量依赖性($P<0.05$ 或 $P<0.01$);(2)氯喹处理后,Western 印迹显示 LC3 II/I 增高,与氯喹组相比,氯喹和小檗碱共同处理后,Western 印迹显示 LC3 II/I 降低($P<0.05$);(3)透射电子显微镜显示小檗碱处理后自噬体数量明显减少。**结论** 小檗碱能够抑制 C3H10T1/2 脂肪细胞的自噬。

【关键词】 小檗碱;自噬;脂肪细胞

Effects of berberine on autophagy in C3H10T1/2 adipocytes ZHANG Xiao-yan, DENG Yu-jie, YANG Jian, LÜ Peng-fei, YANG Ying. Shanghai Institute of Endocrine and Metabolic Diseases, Department of Endocrine and Metabolic Diseases, Shanghai Clinical Center for Endocrine and Metabolic Diseases, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China
Corresponding author: YANG Ying

【Abstract】 Objective To assess the effects of berberine on autophagy in C3H10T1/2 adipocytes. **Methods** C3H10T1/2 cells, a pluripotent stem-cell line of mesodermal origin, were induced to differentiate into mature adipocytes, and then were treated with berberine. The expression of autophagy marker protein LC3 II/I and autophagy substrate P62 was determined by Western blot; after treating C3H10T1/2 cells with berberine and lysosomal inhibitor, chloroquine, autophagy flux was assessed by Western blot. Autophagosome was observed by transmission electron microscopy after berberine treatment. **Results** (1) After berberine treatment, the expression of LC3 II/I in C3H10T1/2 adipocytes was reduced and P62 was increased in a time-and dose-dependent manner ($P<0.05$ or $P<0.01$); (2) Following treatment with chloroquine and berberine, the protein level of LC3 II/I was decreased ($P<0.05$); (3) The number of autophagosome was decreased apparently after berberine treatment. **Conclusions** Berberine inhibits autophagy in C3H10T1/2 adipocytes.

【Key words】 Berberine; Autophagy; Adipocytes

(Chin J Endocrinol Metab, 2013, 29: 890-894)

经济水平的提高、人们饮食结构的改变导致肥胖症的患病率迅速上升,肥胖症作为代谢综合征的主要组分之一,与多种疾病如 2 型糖尿病、血脂异常、高血压、冠心病密切相关,其实质是脂肪细胞数量的增多和体积的增大。自噬是机体为了应对各种外界刺激及内在变化而产生的细胞内自我更新、自我修复的机制,其控制蛋白质和细胞器的降解,并在机体的生存、分化和维持能量平衡中起重要作用。近年来研究发现自噬在肝脏和脂肪组织的脂质代谢方面发挥重要作用,为肥胖症的治疗提供了新的思路^[1]。脂肪是重要的能量代谢器官和内分泌器官,研究表明在脂肪细胞中,自噬

可以降解线粒体及胞质,调节脂肪细胞分化^[2]。小檗碱(berberine)是中药黄连的主要成分,药理学研究发现小檗碱具有降血糖、调血脂,改善胰岛素抵抗等作用。自噬途径是否参与小檗碱对脂质代谢的调节作用,尚无相关研究。本研究观察了小檗碱对脂肪细胞自噬的影响,以探讨小檗碱调血脂及改善胰岛素抵抗的可能机制。

材料和方法

一、材料

C3H10T1/2 细胞购自美国 ATCC;地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、吲哚美辛(indomethacin)、三碘甲状腺氨酸、罗格列酮(rosiglitazone)购自美国 Sigma 公司;重组人胰岛素(优泌林 R)购自美国礼来公司;11995 DMEM 培养基/胎牛血清购自美国 Gibco BRL 公司;细胞裂解液 RIPA 及 PMSF 购自上海申能博彩公

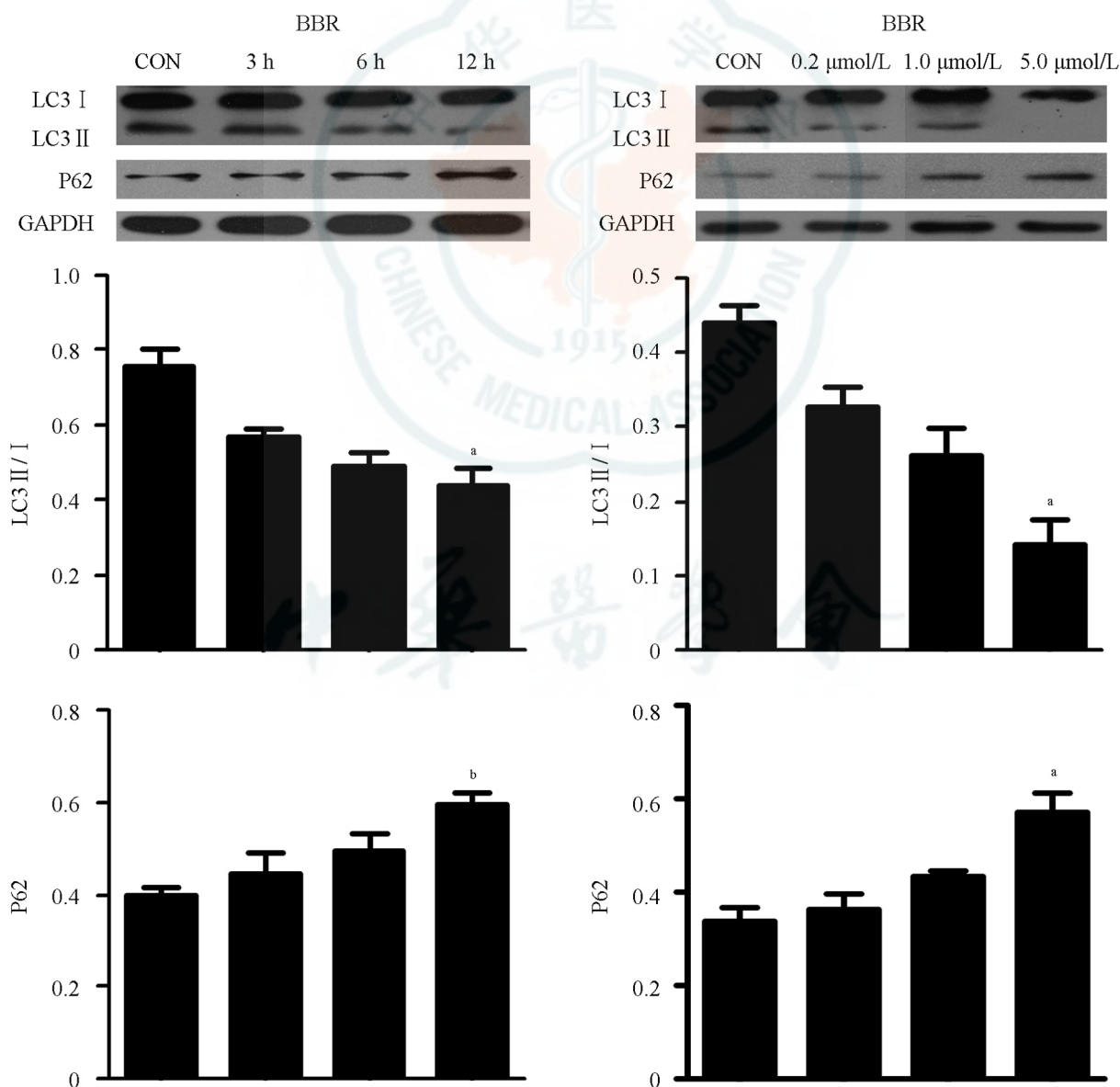
司;BCA 蛋白测定试剂盒来自美国 PIERCE 公司;ECL Plus 发光检测试剂盒购自 GE Healthcare 公司;LC3、p62 抗体购自 Cell Signaling Technology;GAPDH 抗体购自 KangCheng 生物科技有限公司。

二、实验方法

1. 细胞培养及诱导分化:C3H10T1/2 细胞常规培养于 10% FBS/DMEM 培养液中,置 5% CO₂,37℃ 培养箱孵育,待细胞达 80% ~90% 融合后用 0.25% 胰酶消化并按 1 : 4 比例传代培养,每 2 d 更换培养液 1 次。待培养板上的细胞长满后加入诱导液 A(正常培养液 10% FBS/DMEM 含重组人胰岛素 5 μg/ml,3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 0.5 mmol/L,地塞米松 1 μmol/L,吡啶美辛 125 nmol/L,三碘甲酰原氨酸 1 nmol/L,罗格列酮 1 μmol/L),2 d 后换成诱导液 B(正常培养液

10% FBS/DMEM 含重组人胰岛素 5 μg/ml,三碘甲酰原氨酸 1 nmol/L,罗格列酮 1 μmol/L),2 d 后换成正常培养液(10% FBS/DMEM),待 90% 以上细胞呈圆形并出现大量脂滴,即表示 C3H10T1/2 细胞已诱导成功,成为成熟的脂肪细胞。实验前用 0.2% BSA-DMEM 孵育 12 h,使细胞生长同步化,然后将细胞按实验设计分组加药处理。

2. Western 印迹检测蛋白表达:RIPA 裂解各组细胞后 13 000 转/min 离心 30 min,BCA 法测定蛋白浓度,取 20 μg 总蛋白行 12% SDS-聚丙烯酰胺电泳后转移到 0.2 μm 硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 2 h,抗体 LC3(1 : 1 000)或 p62(1 : 500)和 GAPDH(1 : 20 000)4℃ 孵育过夜。经 HRP 标记的兔或鼠二抗(1 : 1 000)室温孵育 1 h,ECL 化学发光法显



注:BBR:小檗碱 Berberine;CON:正常对照 Control;zs CON,^aP<0.05,^bP<0.01

图1 各组 C3H10T1/2 细胞 LC3 和 P62 蛋白表达

Fig 1 The expression of LC3 and P62 protein among various groups

影,IMAGEJ 分析,以目的蛋白与 GAPDH 条带灰度比值表示目的蛋白的相对表达量。

3. 电镜检测自噬体:将 C3H10T1/2 细胞接种到 75 mm 细胞培养瓶中,诱导分化成成熟脂肪细胞,分为阴性对照组(氯喹,CQ 组)、阳性对照组(雷帕霉素+氯喹,RAPA+CQ 组)、药物处理组(小檗碱+氯喹,BBR+CQ 组),药物作用所需时间后,用 37℃ 温 PBS 轻洗细胞 3 次,然后加入 2% 戊二醛固定液固定,送上海交通大学医学院电镜室观察。

三、统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件包进行统计分析。所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

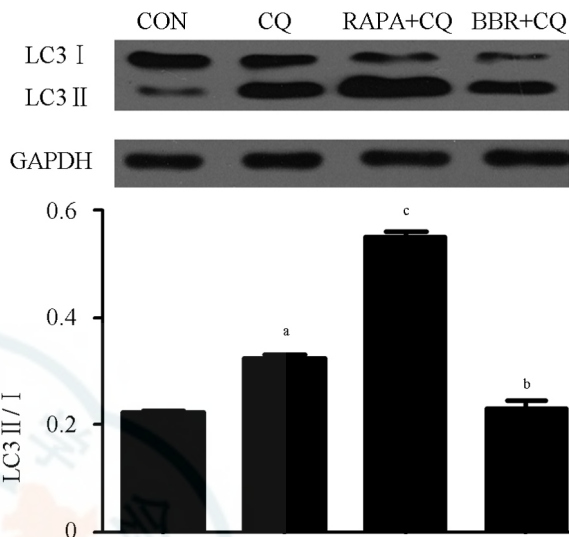
一、小檗碱对 C3H10T1/2 脂肪细胞自噬标志蛋白 LC3 及自噬底物 P62 的影响

C3H10T1/2 诱导分化为成熟脂肪细胞后,加入 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱作用不同时间(0、3、6、12 h),或者加入不同浓度的小檗碱(0、0.2、1.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$)作用 12 h,Western 印迹结果显示:小檗碱作用后:(1)自噬标志蛋白 LC3 II/I 随着小檗碱作用时间的延长而降低,自噬底物 P62 随着小檗碱作用时间的延长而增加,呈现时间依赖性,其中 12 h 组 LC3 II/I 表达显著降低 ($P < 0.05$),P62 表达显著升高 ($P < 0.01$,图 1);(2)自噬标志蛋白 LC3 II/I 随着小檗碱浓度的增高而降低,自噬底物 P62 随着小檗碱浓度的增高而增加,呈剂量依赖性,其中 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 LC3 II/I 表达显著降低 ($P < 0.05$),P62 显著升高 ($P < 0.05$,图 1)。

二、利用溶酶体抑制剂氯喹观察自噬通量变化

成熟的 C3H10T1/2 脂肪细胞分别加入氯喹、雷帕霉素+氯喹、小檗碱+氯喹作用 12 h 后,Western 印迹结

果显示:(1)与正常对照组相比,CQ 组自噬标志蛋白 LC3 II/I 显著升高 ($P < 0.01$);(2)与 CQ 组相比,作为阳性对照,RAPA+CQ 组自噬标志蛋白 LC3 II/I 显著升高 ($P < 0.01$),而 BBR+CQ 组自噬标志蛋白 LC3 II/I 显著降低 ($P < 0.05$,图 2)。



注:CON:正常对照 Control;CQ:氯喹 Chloroquine;RAPA+CQ:雷帕霉素+氯喹 Rapamycin and chloroquine;BBR+CQ:小檗碱+氯喹 Berberine and chloroquine;^a $P < 0.01$;^b $P < 0.05$;^c $P < 0.01$

图 2 各组 LC3 蛋白表达

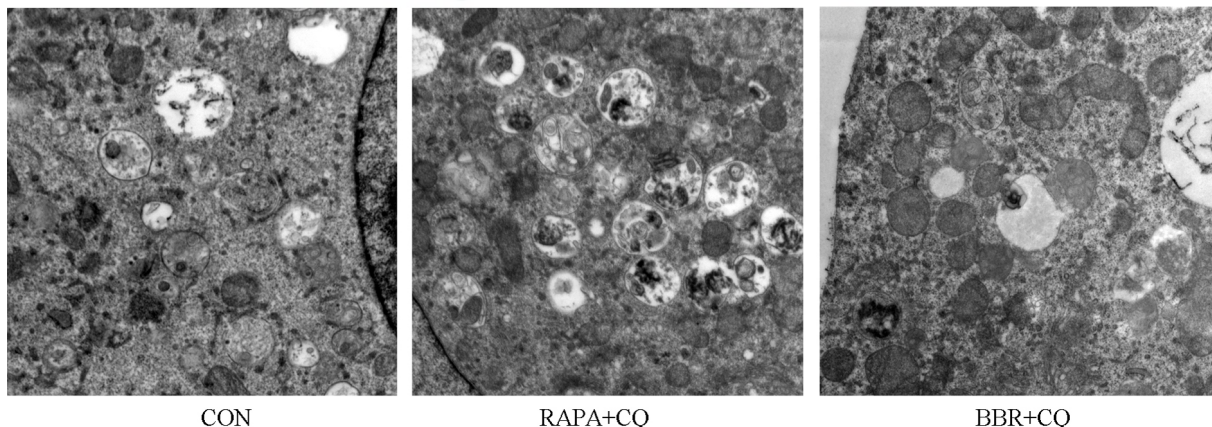
Fig 2 The expression of LC3 protein among various groups

三、透射电镜观察自噬体数量变化

透射电镜观察结果显示:自噬体呈双层膜或多层膜包裹的大小不一的泡状小体结构,里面包裹着尚未消化的胞质和细胞器,如线粒体、内质网等。与正常对照组相比,RAPA+CQ 组自噬体数量明显增多,而与 RAPA+CQ 组相比,BBR+CQ 组自噬体数量显著减少(图 3)。

讨 论

脂肪组织通过调节葡萄糖转运、贮存脂质和分泌



注:CON:正常对照 Control;RAPA+CQ:雷帕霉素+氯喹 Rapamycin and chloroquine;BBR+CQ:小檗碱+氯喹 Berberine and chloroquine

图 3 各组自噬体数量(电镜×30 000)

Fig 3 Numbers of autophagosome in various group (Transmission Electron Microscope×30 000)

脂肪因子调控糖脂代谢,肥胖时,脂肪组织的过度增多会导致脂肪功能障碍,进而引起胰岛素抵抗和其他肥胖相关并发症。近期研究表明自噬能调节脂肪组织的量和分化,抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的自噬能够阻断脂滴的形成,减少甘油三酯的蓄积,降低与脂肪分化相关的转录因子的表达^[3]。脂肪组织特异性敲除自噬相关基因 Atg7 的小鼠能够抵制高脂饮食诱导的肥胖,与野生型相比 Atg7^{-/-}小鼠白色脂肪的含量仅仅为野生型的 20%,并且 50% 突变的白色脂肪细胞为多腔脂滴,含大量的胞质和线粒体,呈棕色脂肪细胞性状。而棕色脂肪几乎不含甘油三酯,主要作用是增强脂肪酸的 β -氧化,产生热量,进而减轻体重,增加胰岛素敏感性^[4]。骨骼肌特异敲除 Atg7 的小鼠脂解增强,体重减轻,白色脂肪棕色化,同时自噬缺陷并发的线粒体功能障碍促进成纤维细胞生长因子 21 的表达,进一步增强 β -氧化,增加能量消耗,从而抵制饮食引起的肥胖,改善胰岛素抵抗^[5]。与这些研究一致,近段文献报道肥胖患者的脂肪组织中,自噬显著增加^[6,7]。与健康人相比,肥胖患者的皮下脂肪组织中自噬标志蛋白 LC3 II 明显增多,同样的,缺乏瘦素的肥胖小鼠与野生型相比也表现出 LC3 II 的显著增多,分析发现 LC3 II 的蛋白水平与体重指数呈正相关,胰岛素的敏感性与自噬活动水平呈负相关^[7]。这些发现提示自噬对白色脂肪尤其独特的单腔脂滴的形成起着重要的作用,因而抑制脂肪细胞的自噬可能为治疗肥胖、改善胰岛素抵抗提供潜在靶点。以往研究已经证实小檗碱具有很多药理作用,包括抗菌、抗肿瘤、降血糖,尤其是在肥胖的个体有明显的抗炎作用^[8]。最近的研究发现小檗碱通过作用于脂肪细胞,降低血胆固醇、甘油三酯,改善胰岛素抵抗^[9]。并且小檗碱能够抑制人网膜前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞,减少内脏脂肪的炎症反应,增加胰岛素敏感性,进而减少或消除内脏脂肪,减少代谢综合征患者的腹围和体重指数^[10],小檗碱及其衍生物有望被用于治疗合并高脂血症的 2 型糖尿病患者^[9]。

C3H10T1/2 细胞系是在 1973 年首次从 14 ~ 17 d 的 C3H 小鼠胚胎细胞分离出来,在功能上类似于间充质干细胞^[11]。已有文献证明 C3H10T1/2 能够被诱导定向分化成前脂肪细胞,然后被诱导分化为成熟脂肪细胞,表现为甘油三酯的蓄积和脂肪细胞标志蛋白的表达^[12,13]。为此本研究采用 C3H10T1/2 脂肪细胞来研究小檗碱对脂肪细胞自噬的影响。

目前监测稳态自噬和自噬通量的方法主要有:

(1) 电镜检测自噬小体和自噬溶酶体;(2) 共聚焦显微镜观察每个细胞内源性 LC3 或 GFP-LC3 的点状聚集;

(3) Western 印迹技术检测 LC3 I 向 LC3 II 的转变;(4) 检测对照组和用溶酶体抑制剂处理组的自噬通量变化;(5) Western 印迹检测自噬选择性底物(如 LC3, P62)的降解,GFP-LC3 的降解可以用流式细胞仪定量;(6) Western 印迹检测 GFP-LC3 降解产生的游离 GFP;(7) 用自噬抑制剂抑制自噬后,检测长寿蛋白质的降解^[14]。微管相关蛋白 1 的轻链 3(LC3)是酵母 Atg8 在哺乳动物细胞中的同源蛋白,细胞发生自噬时,LC3 I 会切除其 C 端的一段氨基酸,后者与磷脂酰乙醇胺(PE)结合后,结合到细胞膜上从而形成 LC3-PE(LC3 II)。LC3 II 是唯一一种可靠的与自噬相关的蛋白标记^[15]。在酵母中,自噬被诱导时 Atg8 的含量至少增加 10 倍^[16]。在哺乳动物细胞,自噬被诱导时,LC3 的总含量没有太大变化,但 LC3 I 向 LC3 II 转变增加。p62/SOSTM1 偶联于 LC3,作为自噬的底物,在晚期被降解,所以细胞内整体 p62 水平的表达与自噬活性呈负相关。因此,可用 Western 印迹的方法检测细胞内 LC3 的转化及 P62 的表达变化,来反应自噬的发生情况。本研究首先成功诱导多能干细胞 C3H10T1/2 分化成脂肪细胞^[13],以 Western 印迹观察小檗碱作用后自噬标志蛋白 LC3 II/I 的变化,结果显示小檗碱作用后 LC3 II/I 明显降低,P62 明显升高,并呈时间与剂量依赖性。氯喹是一种溶酶体抑制剂,能够阻断自噬体与溶酶体的融合过程,使自噬体不能降解而积聚,可以观察某一时段自噬水平高低,这是检测自噬通量的一种方法。本研究用氯喹处理 C3H10T1/2 脂肪细胞 12 h,Western 印迹检测显示:与对照组相比,LC3 II/I 水平明显升高,氯喹和小檗碱共同处理后,与氯喹组相比,LC3 II/I 比值明显降低。透射电子显微镜下观察到双层膜自噬体结构是确认自噬发生的金标准,由于正常状况下很少观察到自噬体,而成熟脂肪细胞具有单腔大脂滴,把线粒体等细胞器和核挤向周边,这一结构的特殊性使得透射电子显微镜下很难观察到典型的自噬体,所以本研究采用雷帕霉素作为阳性对照观察电镜下的自噬体,而雷帕霉素能够抑制 mTOR 通路作为自噬的激活剂已得到广泛的应用^[17],电镜结果显示:与雷帕霉素组相比,小檗碱与雷帕霉素共同处理后自噬体数量明显减少。

自噬在脂肪细胞的成熟与分化及脂质代谢过程中起着重要作用,但是自噬的增多会导致脂肪细胞的过度分化,脂滴的大量堆积,引起肥胖、胰岛素抵抗等相关并发症,抑制自噬可能为治疗肥胖提供新的方法,本研究证实小檗碱能够抑制自噬,自噬可能成为治疗肥胖的新的药物靶点。然而,小檗碱的临床应用及其效果,还有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 2009,458:1131-1135.
- [2] Goldman SJ, Zhang Y, Jin SK. Autophagic degradation of mitochondria in white adipose tissue differentiation. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14:1971-1978.
- [3] Singh R, Xiang YQ, Wang YJ, et al. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J Clin Invest*, 2009,119:3329-3339.
- [4] Zhang Y, Goldman S, Baerga R, et al. Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009,106:19860-19865.
- [5] Kim KH, Jeong YT, Oh H, et al. Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine. *Nat Med*, 2013,19:83-92.
- [6] Kovsan J, Bluher M, Tarnowski T, et al. Altered Autophagy in Human Adipose Tissues in Obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010,96:268-277.
- [7] Jansen HJ, van Essen P, Koenen T, et al. Autophagy activity is up-regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression. *Endocrinology*, 2012,153:5866-5874.
- [8] 尚文斌, 刘佳, 于希忠, 等. 小檗碱对肥胖小鼠炎症因子分泌和炎症信号通路的作用. *中国中药杂志*, 2010,35:1474-1477.
- [9] Kong W, Wei J, Abidi P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat Med*, 2004,10:1344-1351.
- [10] Yang J, Yin J, Gao H, et al. Berberine improves insulin sensitivity by inhibiting fat store and adjusting adipokines profile in human preadipocytes and metabolic syndrome patients. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012,2012:363845.
- [11] Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res*, 1973, 33:3231-3238.
- [12] Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101:9607-9611.
- [13] Seale P, Kajimura S, Yang W, et al. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab*, 2007,6:38-54.
- [14] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 2012,8:445-544.
- [15] Karim MR, Kanazawa T, Daigaku Y, et al. Cytosolic LC3 ratio as a sensitive index of macroautophagy in isolated rat hepatocytes and H4-II-E cells. *Autophagy*, 2007,3:553-560.
- [16] Huang WP, Scott SV, Kim J, et al. The itinerary of a vesicle component, Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/Cvt pathways. *J Biol Chem*, 2000,275:5845-5851.
- [17] Wu L, Feng Z, Cui S, et al. Rapamycin upregulates autophagy by inhibiting the mTOR-ULK1 pathway, resulting in reduced podocyte injury. *PLoS ONE*, 2013,8:e63799.

(收稿日期:2013-01-08)

(本文编辑:朱梅华)

CHINESE MEDICAL ASSOCIATION
1915
中 华 医 学 会