

发酵糙米乙醇提取物改善 3T3-L1 脂肪细胞糖脂代谢

宋家乐^{1,2}, 曾榛¹, 钱波¹, 桂中玉¹, 朴建荣², 谭兴勇³

(1. 桂林医学院公共卫生学院, 广西桂林 541100) (2. CHA 医科大学食品生命工学系及生物技术研究所, 韩国抱川 11160) (3. 桂林旅游学院休闲与健康学院, 广西桂林 541106)

摘要: 探讨发酵糙米乙醇提取物(FBREE)对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞糖脂代谢的影响。高浓度葡萄糖加胰岛素刺激诱导 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型。不同浓度 FBREE 处理细胞 24 h 后检测培养液中葡萄糖, 游离脂肪酸(FFA), 甘油, 甘油三酯(TG), 肿瘤坏死因子(TNF- α)和白介素 6(IL-6)水平。实时定量 PCR 检测细胞氧化酶体增殖激活受体 γ (PPAR γ), CAATT 增强子结合蛋白(C/EBP α), 固醇调节元件结合蛋白(SREBP1c), 葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4), 脂肪酸结合蛋白(aP2), 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B(PTP1B), 葡萄糖转运蛋白(GLUT-4), 激素敏感脂肪酶(HSL)和 TNF- α , IL-6, 单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和 C 反应蛋白(CRP)的 mRNA 表达。FBREE 具有促进细胞葡萄糖利用, 降低细胞内 TG 含量, 减少 FFA 及甘油溢出的能力。与模型组细胞相比, 高浓度 FBREE(100 μ g/mL)处理的细胞中 TG 和 FFA 水平分别下降 52.44% 和 37.83%。FBREE 同时能减少模型细胞 TNF- α 和 IL-6 的分泌, 高浓度 FBREE(100 μ g/mL)分别抑制 TNF- α (21.18%), IL-6(31.39%), MCP-1(40.09%)和 CRP(41.73%) mRNA 表达。此外, FBREE 有效降低细胞中 PPAR γ , C/EBP α , SREBP1c, PTP1B, aP2 和 HSL 的 mRNA 表达, 上调 GLUT-4 mRNA 表达。结果提示, FBREE 能有效促 3T3-L1 脂肪细胞消耗葡萄糖, 分解 TG, 减少 FFA 和甘油溢出; 调控细胞糖、脂代谢来改善胰岛素抵抗, 并降低胰岛素抵抗所致炎症水平的升高。

关键词: 发酵糙米乙醇提取物; 3T3-L1 脂肪细胞; 胰岛素抵抗; 糖代谢; 脂肪代谢

文章编号: 1673-9078(2020)07-1-10

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.0069

Ethanol Extract of Fermented Brown Rice Improves the Metabolism of Glucose and Lipids in 3T3-L1 Adipocytes

SONG Jia-le^{1,2}, ZENG Zhen¹, QIAN Bo¹, GUI Zhong-yu¹, PARK Kun-young², TANG Xing-yong³

(1.School of Public and Health, Guilin Medical University, Guilin 541100, China) (2.Department of Food Science and Biotechnology, and Institute of Biotechnology, CHA Medical University, Pocheon 11160, Korea)
(3.School of Leisure and Health, Guilin Tourism University, Guilin 541106, China)

Abstract: The effects of fermented brown rice ethanolic extracts (FBREE) on glucose and lipid metabolism in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes were investigated. The insulin-resistant model cells were established through the induction by high glucose concentration together with high insulin. The model cells were treated with different concentrations of FBREE for 24 h, and the levels of glucose, free fatty acid (FFA), glycerol, triglyceride (TG), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in the culture medium were determined. The mRNA expression levels of peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ), CAATT enhancer binding proteins α (C/EBP α), sterol regulatory element binding protein1c (SREBP1c), adipocyte fatty acid binding protein 2(aP2), protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B), glucose transporter 4 (GLUT4), hormone-sensitive triglyceride lipase (HSL), TNF- α , IL-6, monocyte chemotactic protein (MCP)-1 and C-reaction protein (CRP) were determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) assay. FBREE could promote cellular glucose utilization, decrease the

引文格式:

宋家乐,曾榛,钱波,等.发酵糙米乙醇提取物改善 3T3-L1 脂肪细胞糖脂代谢[J].现代食品科技,2020,36(7):1-10

SONG Jia-le, ZENG Zhen, QIAN Bo, et al. Ethanol extract of fermented brown rice improves the metabolism of glucose and lipids in 3T3-L1 adipocytes [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 1-10

收稿日期: 2020-01-19

基金项目: 桂林市科技计划项目(20190214-2); 广西壮族自治区国家级“大学生创新创业训练计划”项目(201811837001); 广西高等学校中青年骨干教师培育计划资助(桂教人[2018]18号); 人社部“高层次留学人才回国资助计划”(人社厅函[2019]160号); 桂林医学院引进人才科研启动基金(04010150001)

作者简介: 宋家乐(1983-),男,博士,副教授,研究方向:分子营养学和功能性食品学

通讯作者: 谭兴勇(1974-),男,硕士在读,高级实习指导教师,研究方向:烹饪标准化管理与养生膳食

cellular TG content and reduce the released FFA and glycerol in model cells. The high dose of FBREE (100 $\mu\text{g/mL}$) reduced the cellular TG (by 52.44%) and FFA (by 37.83%), compared with those of the model cells. FBREE also reduced the TNF- α and IL-6 secretion in model cells. A high dose of FBREE (100 $\mu\text{g/mL}$) also reduced the mRNA expression levels of TNF- α (by 21.18%), IL-6 (by 31.39%), MCP-1 (by 40.09%) and CRP (by 41.73%) compared with those in model cells. In addition, FBREE was able to reduce effectively the mRNA expressions of PPAR γ , C/EBP α , SREBP1c, PTP1B, aP2 and HSL, while up-regulating the mRNA levels of GLUT4. These results suggested that the FBREE treatment can promote effectively glucose consumption, TG decomposition, and reduction of FFA and glycerol release, as well as regulate the glucose and lipid metabolism to ameliorate insulin resistance and reduce the increase of inflammation caused by insulin resistance.

Key words: fermented brown rice ethanolic extracts; 3T3-L1 adipocytes; insulin resistance; glucose metabolism; lipid metabolism

糙米 (Brown rice) 是指稻谷经脱壳处理后, 不经加工或较少加工后所获得的全谷粒米, 富含膳食纤维、谷维素、谷胱甘肽、 γ -氨基丁酸、二十八烷醇、肌醇等多种健康因子, 相对普通白米而言较好的实现了稻米全营养成分的保留^[1]。研究发现, 糙米具有较好的抗氧化、抗肿瘤、改善肥胖和糖尿病等代谢性疾病及延缓衰老等功效^[2,3]。研究表明, 糙米及其相关发芽糙米, 发酵糙米等制品对肠道肿瘤具有显著的防治效果^[4]。糙米及米糠都是有益微生物 (如乳酸菌, 双歧杆菌以及米曲霉等) 发酵的良好材料, 通过这些有益微生物的适当发酵, 糙米以及米糠等的生物学活性能够大为提高^[5-9]。

慢性代谢性疾病, 诸如糖尿病, 肥胖, 非酒精性脂肪肝, 多囊卵巢综合征的发生均与机体内糖类、脂肪代谢异常及其引发的胰岛素抵抗存在密切联系^[10]。脂肪组织内脂类代谢的异常也是造成胰岛素抵抗的重要原因, 且脂肪组织和细胞内糖、脂代谢紊乱会加剧机体胰岛素抵抗^[11]。而高水平的胰岛素抵抗又能直接诱发患者体内的慢性炎症和氧化应激损伤^[12]。

本研究利用高浓度葡萄糖和高浓度胰岛素联合处理制备 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型。通过观察发酵糙米乙醇提取物对模型细胞糖、脂代谢水平的影响, 并从分子层面检测其对脂肪细胞分化因子氧化酶体增殖激活受体 γ (Peroxisome proliferator-activated receptors γ , PPAR γ), CAATT 增强子结合蛋白 (CAATT enhancer binding proteins α , C/EBP α), 固醇调节元件结合蛋白 (Sterol regulatory element binding protein 1c, SREBP1c); 糖脂代谢相关因子葡萄糖转运蛋白 4 (Glucose transporter 4, GLUT4), 脂肪酸结合蛋白 (adipocyte fatty acid binding protein 2, aP2), 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (Protein tyrosine phosphatase-1 B, PTP1B) 和激素敏感性甘油三酯脂肪酶 (hormone-sensitive lipase, HSL) 的 mRNA 表达调控影响。最后观察糙米乙醇提取物处理对胰岛素抵抗细

胞模型中炎症水平的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

植物乳酸菌联合酵母双重固态发酵糙米样品由韩国 Doobo 食品株式会社提供 (产地: 韩国 Youju 市, 生产年份: 2018 年 11 月)。DMEM 高糖型细胞培养液、青霉素-链霉素双抗、胰蛋白酶-EDTA 消化液、小牛血清 (fetal cow serum, FCS), 美国 Thermo Scientific 公司; Trizol 法总 RNA 提取试剂盒 (R1200-50T)、TaqMan 快速 RT-qPCR 试剂盒 (T2210-200T), 北京索莱宝生物技术公司; 地塞米松 (dexamethasone, Dex)、重组牛胰岛素 (insulin)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (3-Isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、罗格列酮 (rosiglitazone, Ros), 美国 Sigma 公司; 葡萄糖检测试剂盒 (F006-1-1)、甘油三酯测定试剂盒 (A110-1-1)、甘油测定试剂盒 (F005-1-1)、游离脂肪酸测定试剂盒 (A042-1-1), 南京建成生物工程研究所; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (P0006)、TNF- α ELISA 试剂盒 (PT512), 上海碧云天生物技术有限公司; IL-6 ELISA 试剂盒 (MM-035101), 江苏科特生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

EYELAN-1001S 真空旋转蒸发仪, 日本东京理化器械株式会社; Eppendorf 5424R 冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Quant StudioTM 6 Flex PCR 仪、Thermo 3111 二氧化碳细胞培养箱, 美国 Thermo Scientific 公司; ELx808 酶标仪, 美国 BioTek 公司。

1.3 实验细胞株

小鼠 3T3-L1 胚胎成纤维细胞株购自于中国科学院昆明细胞库 (KCB92010YJ)。

1.4 发酵糙米乙醇提取物的制备

取新鲜发酵糙米样品(1000 g)经真空冷冻干燥后,用小型中药材粉碎机磨粉后过筛(60 目)备用。糙米粉(100 g)加入乙醇(2000 mL)在室温下搅拌浸提 4 h,抽滤收集滤液后以 2000 r/min 转速离心 15 min,弃渣取上清。使用真空旋转蒸发器进行真空减压旋蒸(60 °C)制得发酵糙米提取物(收率为 40.33%,总多酚含量为 35.43 mg/100 g),-20 °C 储存待用。

1.5 实验方法

1.5.1 3T3-L1 前脂肪细胞的培养

在 5% CO₂、37 °C 饱和湿度的环境下,以含 10% FCS 的 DMEM 培养液培养 3T3-L1 前脂肪细胞至单层贴壁细胞(细胞密度≥90%)。Hanks'平衡盐溶液(Hanks' balanced salt solution, HBSS)润洗细胞后,适量胰酶消化液消化细胞,将细胞接种至 6 孔培养板(1×10⁵ 细胞/孔)中,待细胞生长完全汇合时,使用鸡尾酒法连续诱导其分化为脂肪细胞。

1.5.2 脂肪细胞的诱导分化和胰岛素抵抗模型建立

待分化的 3T3-L1 细胞用分化培养基(高糖 DMEM 培养基中含 0.5 mmol/L 的 IBMX, 1 μmol/L 的 Dex, 10 mg/L 胰岛素和 10% FCS)培养 2~3 d 后,换用含 10 mg/L 胰岛素和 10% FCS 的 DMEM 维持培养基将细胞继续培养至 95% 以上的细胞分化为出现显著脂滴的成熟脂肪细胞。分化好的细胞以含 Dex (11 μmol/L) 的 DMEM 培养基维持培养至 10 d 用于后续实验。

1.5.3 发酵糙米乙醇提取物对胰岛素抵抗细胞模型细胞的处理

将完全分化成功后的胰岛素抵抗细胞分为对照组、罗格列酮组(10 μmol/L Ros)和发酵糙米乙醇提取物组(10、25、100 μg/mL),同等条件下培养 24 h 后用于后续研究。所有样品均溶于 DMEM 培养基(含 10% FCS)。

1.5.4 脂肪细胞的油红 O 染色分析

分化后的脂肪细胞按照 1.5.3 中所述处理后,弃去培养基并用冷 PBS 清洗细胞两遍,用多聚甲醛溶液(4%)固定细胞 60 min。固定好的细胞参考快速油红 O 染液试剂盒要求(索莱宝, G1262-4)进行细胞染色(约 1 h),以 60% 的异丙醇清洗细胞 3 次除去未着色的油红 O 染液并进行拍照观察。观察结束后,裂解液(含 4% NP-40)裂解细胞并测定在 490 nm 处吸光

度。

1.5.5 细胞内葡萄糖,甘油,甘油三酯和游离脂肪酸水平测定

冰上收集样品处理后的细胞,低速离心除杂后收集培养上清液。按照试剂盒说明书要求,分别测定上清液中葡萄糖甘油和游离脂肪酸含量。对照组中葡萄糖浓度后减去样品处理组中葡萄糖浓度即为葡萄糖消耗水平。细胞刮收集剩余细胞后用液氮反复冻融使其充分裂解,加入磷酸盐缓冲液(PBS),1,000 r/min 离心 5 min 依照说明书测定细胞内甘油三酯水平(以细胞总蛋白量校正)。

1.5.6 细胞上清液中炎症因子 TNF-α 和 IL-6 分泌水平测定

同 1.5.4 中所述收集细胞培养上清液并做相应处理。按照 ELISA 试剂盒要求,分别测定上清液中 TNF-α 和 IL-6 水平。

1.5.7 qRT-PCR 法测定细胞中糖脂代谢及炎症相关因子 mRNA 的表达

细胞弃培养基后, PBS 冲洗并按照试剂盒要求提取细胞内总 RNA。经紫外分光法检测 RNA 样品纯度用于后续实验。按照 TaqMan 一步法快速 RT-qPCR 试剂盒说明书要求,在总反应体系中加入总 RNA 样品(2 μg), 25×One Step RT-qPCR RTase mix (1 μL)、5×One Step RT-qPCR Buffer (5 μL), 上游和下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, TaqMan Probe (0.2 μmol/L)并用 ddH₂O 水补足至总体积 25 μL。充分混匀后置于 QuantStudio™ 6 Flex PCR 仪中反应。扩增反应条件为反转录(50 °C, 20 min),变性(95 °C, 3min),以变性(95 °C, 10~20 sec),退火(56 °C, 20 sec),延伸(72 °C, 30 sec)实施 35 个循环反应。每个基因 cDNA 样本平行扩增 3 次,取 Ct 值均数,依据公式计算目的基因表达水平。

$$F = \frac{2^{\frac{\text{检测样品基因的Ct值}-\text{检测样品中持家基因的Ct值}}{\text{空白样品基因的Ct值}-\text{空白样品中持家基因的Ct值}}}$$

本研究中 *PPARγ*, *C/EBPα*, *SREBP1c*, *aP2*, *PTP1B* 引物序列^[13]; *GLUT4*、*HSL* 单核细胞趋化蛋白-1 (Monocyte chemotactic protein-1, *MCP-1*), C 反应蛋白 (C-reactive protein, *CRP*), 白介素 6 (interleukin, *IL-6*), 肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor-α, *TNF-α*) 以及 β-肌动蛋白 (β-actin) 引物序列^[14]由 Thermo Scientific 公司负责合成。

1.6 统计学处理

数据应用 SPSS22.0 统计软件分析,实验结果均以均数加减标准差表示(所有实验均重复 3 次),用单因

素方差分析(ANOVA)进行多组之间均数的差异性检验, $p < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 发酵糙米乙醇提取物对胰岛素抵抗

3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖消耗量影响

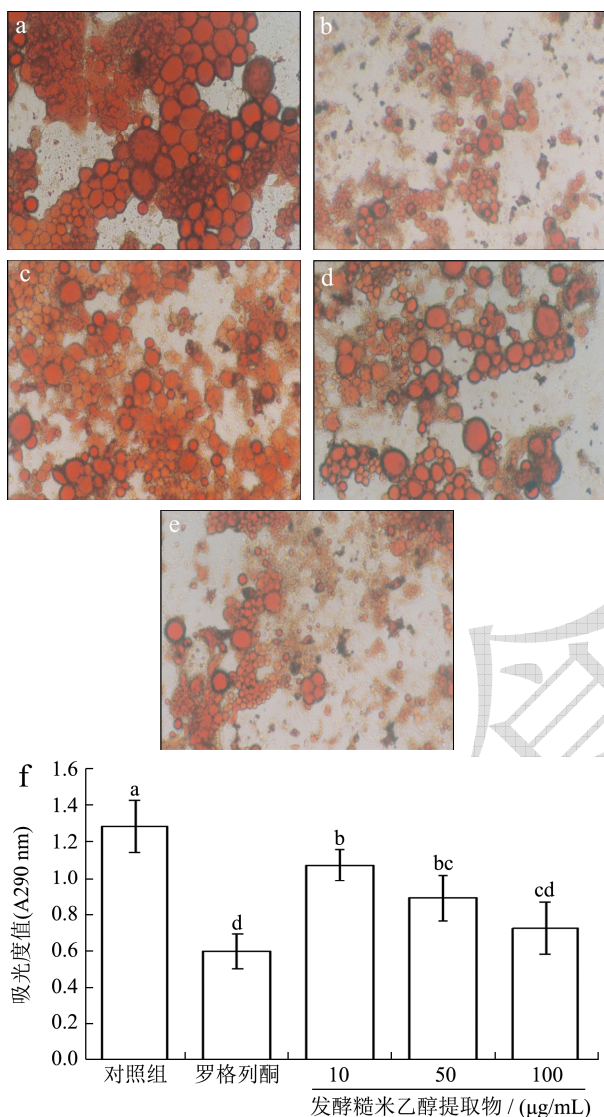


图1 发酵糙米乙醇提取物对 3T3-L1 脂肪细胞分化的影响

Fig.1 Effects of FBREE on differentiation in 3T3-L1 adipocytes

注: a: 对照组; b: 罗格列酮组 (10 μg/mL); c: 低剂量处理组 (10 μg/mL); d: 中剂量处理组 (25 μg/mL); e: 高剂量处理组 (100 μg/mL); f: 吸光度值柱状图上的不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$), 下同。

油红 O 染色是观察脂肪细胞分化程度的经典方法之一。如图 1 所示, 模型组细胞在经葡萄糖加胰岛素联合诱导后, 细胞内脂肪颗粒分化成熟并呈现红色脂滴样。而罗格列酮处理则能显著抑制脂肪细胞内脂肪

的分化。此外, 在不同浓度的 FBREE 处理模型细胞后, 细胞内的脂肪形成量逐渐减少 (即 A490 nm 处的吸光度值逐渐降低)。上述结果提示 FBREE 能够有效抑制 3T3-L1 前脂肪细胞向成熟的脂肪细胞的分化。而史腊妮等的研究报告也提示, 乳酸菌发酵后的大麦提取物能够有效的抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的分化^[13]。

2.2 发酵糙米乙醇提取物对胰岛素抵抗

3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖消耗量影响

如表 1 示, 罗格列酮组能明显提高 3T3-L1 细胞在有胰岛素或无胰岛素刺激的对葡萄糖的消耗 ($p < 0.05$)。经 FBREE 处理后, 模型细胞在有、无胰岛素刺激的对葡萄糖的消耗量都呈显升高趋势 ($p < 0.05$)。最高浓度的 FBREE (100 μg/mL) 能够分别提高无胰岛素条件下 (约 1.86 倍) 和有胰岛素条件下 (约 1.60 倍) 的胰岛素消耗量。但 FBREE 刺激模型细胞对葡萄糖消耗量水平要低于罗格列酮组。

表 1 发酵糙米乙醇提取物对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量的影响

Table 1 Effects of FBREE on glucose consumption in insulin resistance 3T3-L1 adipocytes

实验组	葡萄糖消耗量 / (mmol/L)	
	不含胰岛素	含胰岛素 / (20 mmol/L)
对照组	1.12±0.22 ^c	2.04±0.26 ^d
罗格列酮组 (10 μmol/L)	4.17±0.31 ^a	4.08±0.42 ^a
低剂量处理组 (10 μg/mL)	1.37±0.31 ^c	2.12±0.19 ^{cd}
中剂量处理组 (25 μg/mL)	1.98±0.16 ^b	2.63±0.26 ^{bc}
高剂量处理组 (100 μg/mL)	2.09±0.11 ^b	3.27±0.29 ^b

注: 同列不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

2.3 发酵糙米乙醇提取物对胰岛素抵抗

3T3-L1 脂肪细胞内甘油三酯 (TG)、游离脂肪

酸 (FFA) 和甘油 (Gly) 水平的影响

各类脂肪组织是机体能量的主要储存场所, 正常生理状态下脂肪细胞内部的甘油三酯在 HSL 和脂肪组织甘油三酯水解酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL) 的作用下被水解成非酯化的游离脂肪酸 (nonesterified free fatty acids, NEFA) 和 Gly 释放至外周血循环, 从而参与调控并维持机体能量平衡供应^[15]。脂肪细胞中 TG 分解代谢过程的紊乱而引发的机体外周血中的 FFA 异常升高又是肥胖、糖尿病以及多

囊卵巢综合症等一系列代谢性疾病重要发病因素胰岛素抵抗的重要因素^[16,17]。如图2示,对照组模型细胞中TG, FFA和Gly的水平都较罗格列酮组与FBREE处理组升高($p<0.05$)。罗格列酮处理后,细胞内TG和FFA水平分别较对照组降低58.68%和63.37%, Gly水平升高1.69倍。而经FBREE处理后,脂肪细胞内TG含量及其培养上清液中的FFA水平均呈显著下降趋势($p<0.05$)。特别是,高浓度的FBREE(100 $\mu\text{g/mL}$)处理后,模型细胞中的TG和FFA水平分别下降52.44%和37.83%。FBREE处理同时还能提升细胞培养上清液中的Gly水平,不同浓度的FBREE处理组中Gly水平分别较对照组升高2.04, 2.29和2.61倍。

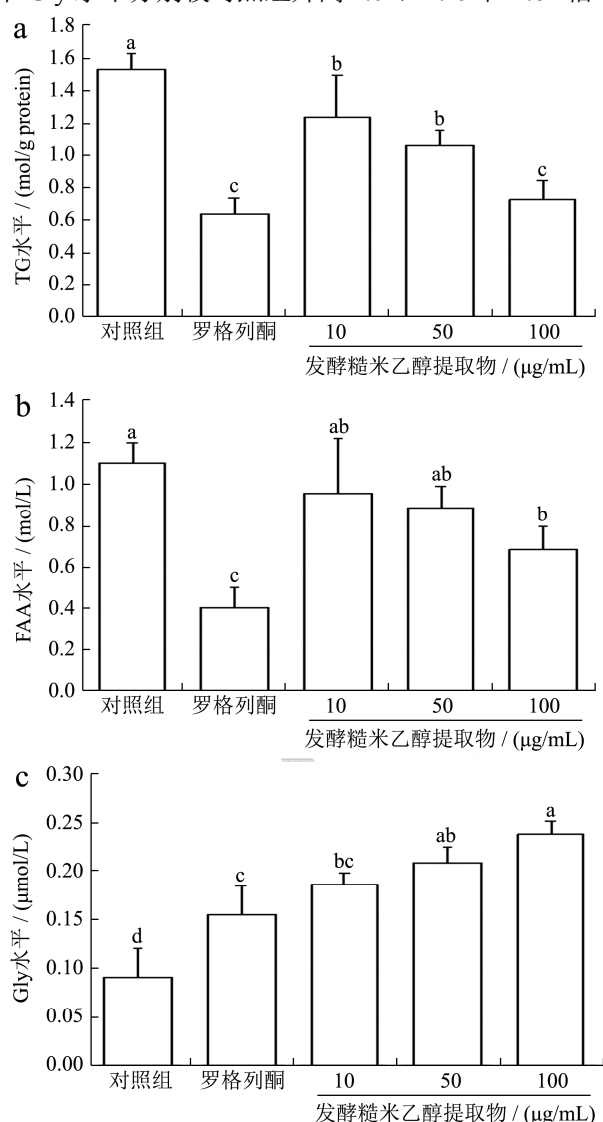


图2 发酵糙米乙醇提取物对胰岛素抵抗3T3-L1脂肪细胞内TG(a)、FFA(b)和Gly(c)水平的影响

Fig.2 Effects of FBREE on TG (a), FFA (b), Gly (c) levels in insulin resistance 3T3-L1 adipocytes

2.4 发酵糙米乙醇提取物对胰岛素抵抗

3T3-L1 脂肪细胞中 PPAR γ , C/EBP α 和

SREBP1c mRNA 水平的影响

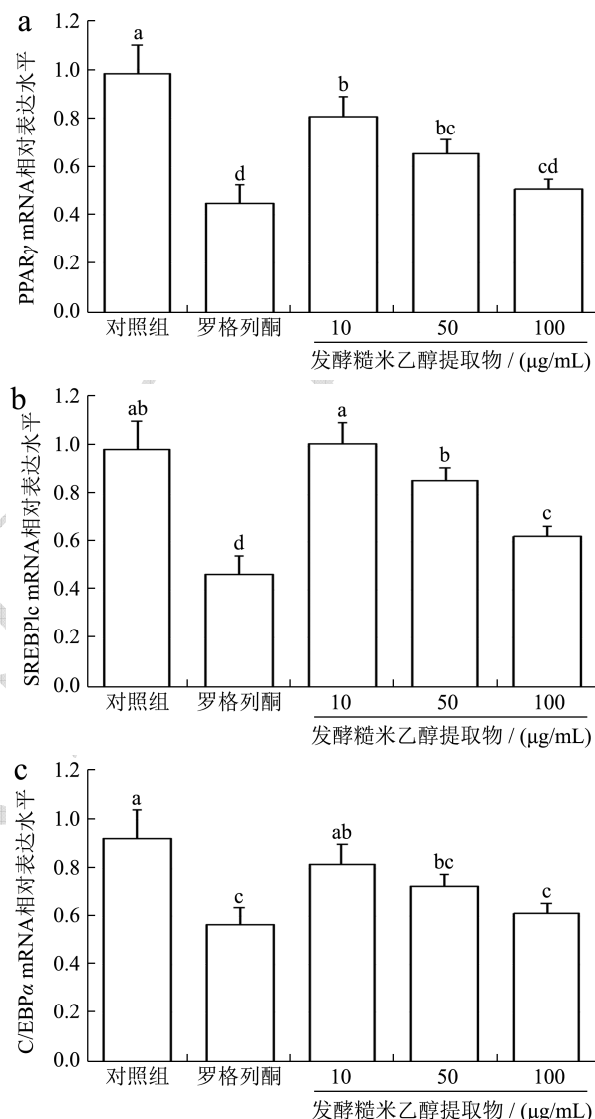


图3 发酵糙米乙醇提取物对胰岛素抵抗3T3-L1脂肪细胞中PPAR γ (a), C/EBP α (b)和SREBP1c (c)的mRNA转录水平的影响

Fig.3 Effects of FBREE on PPAR γ (a), C/EBP α (b) and SREBP1c (c) mRNA expression in insulin resistance 3T3-L1 adipocytes

前脂肪细胞经适当诱导向脂肪细胞分化为一个极为复杂的过程,转录因子PPAR γ , C/EBP α 和SREBP-1c在此分化过程中起关键性作用^[18]。在脂肪细胞分化的早期,PPAR γ 的表达早于C/EBP α 和SREBP-1c等脂肪分化因子。PPAR γ 和C/EBP α 通过激活细胞内糖代

谢相关基因的表达,促进细胞内部脂肪滴的形成与积累,从而直接参与前脂肪细胞向脂肪细胞的分化^[18]。SREBP1c 的活化能够通过促进 3T3-L1 前脂肪细胞中甘油三酯的合成^[19,20]。如图 3 所示,经不同浓度的 FBREE 处理后的 3T3-L1 脂肪细胞中 PPAR γ 的 mRNA 表达水平显著降低。与对照组相比,高浓度 FBREE (100 $\mu\text{g/mL}$) 能够降低模型细胞中 48.47% 的 PPAR γ 的 mRNA 表达水平。抑制 PPAR γ 的基因表达能够使 3T3-L1 细胞中脂滴显著减少^[21]。同时,我们也观察到 FBREE 的处理也能显著调控脂肪细胞内 C/EBP α 的 mRNA 表达水平。相比未经 FBREE 处理的对照组,不同剂量 FBREE 处理的脂肪细胞中 C/EBP α 的 mRNA 表达水平分别降低 11.03%、21.40% 和 33.53%。而在脂肪细胞的分化过程中, C/EBP α 与 PPAR γ 存在互为激活转录调控机制,当细胞内 C/EBP α 表达水平较低时,细胞中 PPAR γ 的表达水平也随之会降低,从而无法完成脂肪细胞的分化^[22]。激活 PPAR γ 能够增强 SREBP1c 的表达从而促进脂肪滴的形成,加速脂肪细胞的分化^[23,24]。此外,我们还观察到中、高两个浓度 FBREE 处理后的脂肪细胞中 SREBP1c 的表达也呈一定的降低趋势,较对照组分别降低 13.13% 和 36.59%。而低浓度的 FBREE 处理不能降低模型细胞内 SREBP1c 的 mRNA 表达。上述结果提示,FBREE 能够有效的抑制 PPAR γ , C/EBP α 和 SREBP1c 这三种重要转录因子的转录,从而发挥阻滞脂肪细胞分化的作用。

2.5 发酵糙米乙醇提取物对胰岛素抵抗

3T3-L1 脂肪细胞中 GLUT4、PTP1B、aP2 和

HSL mRNA 水平的影响

胰岛素在正常生理条件下能够通过与其位于靶细胞膜表面的胰岛素受体相结合从而激活下游的信号通路来实现调控代谢相关基因的表达参与糖脂代谢^[10,11]。而在代谢性疾病发生过程中,由于机体外周组织对胰岛素敏感度的下降造成生物体对葡萄糖利用度减少,从而造成外周高血糖水平,并引发机体发生胰岛素抵抗^[25,26]。相反,通过降低外周血糖水平,加速其利用转化能够有助于改善代谢相关疾病中胰岛素抵抗的发生^[27]。定位于脂肪细胞内囊泡中 GLUT4 是细胞利用葡萄糖的重要分子之一,其在外周胰岛素水平的调控下负责将细胞外葡萄糖转运至细胞内发挥生理作用^[28,29]。但在肥胖,糖尿病,非酒精性脂肪肝以及多囊卵巢综合症等慢性代谢疾病中均存在脂肪组织

中异常水平的 GLUT4 的表达^[30]。胰岛素抵抗状态下,脂肪细胞膜上的 GLUT4 表达持续减少,造成脂肪细胞对葡萄糖的正常摄取和转运利用障碍,从而导致代谢性疾病的发生^[28-30]。

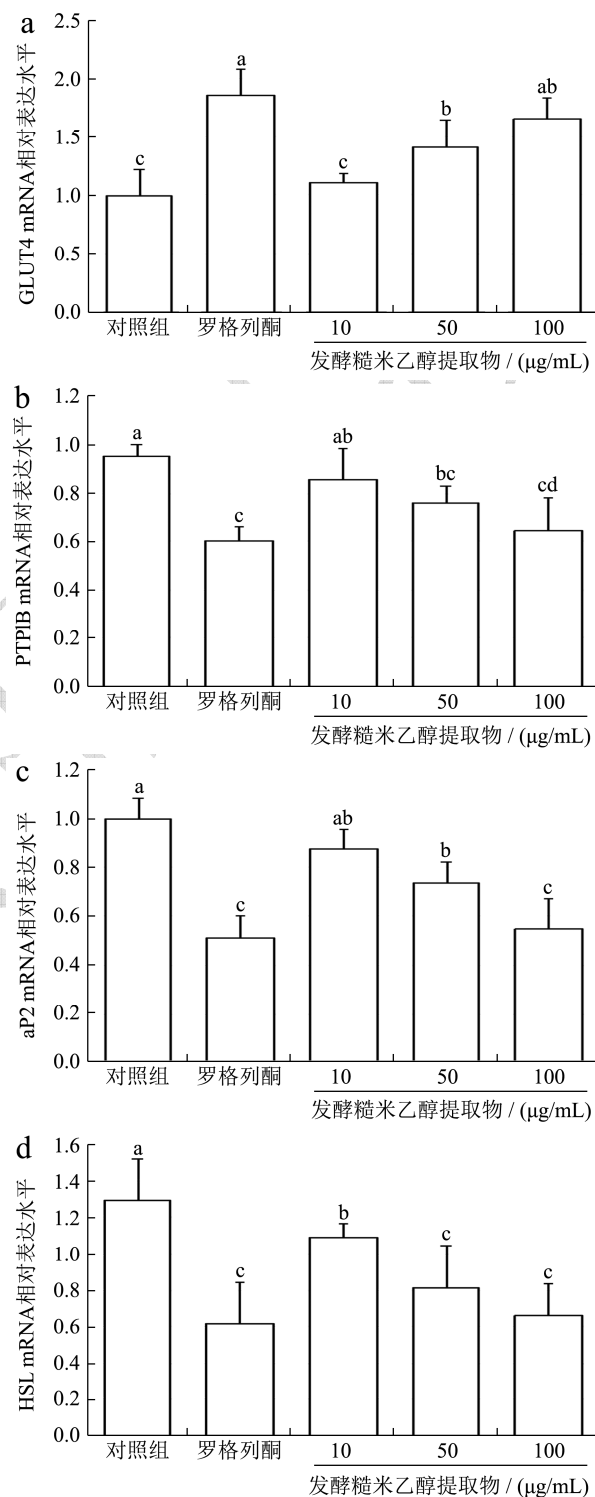


图4 发酵糙米乙醇提取物对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞中 GLUT4 (a), PTP1B (b), aP2 (c) 和 HSL (d) mRNA 转录水平的影响

Fig.4 Effects of FBREE on GLUT4 (a), PTP1B (b), aP2 (c) and HSL (d) mRNA expression in insulin resistance 3T3-L1 adipocytes

如图 4 示, 罗格列酮较对照组和 FBREE 处理组能显著提高脂肪细胞内 GLUT4 的转录 ($p<0.05$)。随着 FBREE 处理浓度的增高, 其对模型细胞内 GLUT4 mRNA 转录的调控水平也呈显著递增趋势 (分别增加 1.11, 1.42 和 1.66 倍)。

PTP1B 是一种定位于胞浆内质网上的非跨膜蛋白酪氨酸磷酸水解酶, 同时也是胰岛素信号通路中的关键负调节蛋白。PTP1B 的过度表达能够抑制 GLUT4 转位造成细胞摄取葡萄糖障碍, 引发胰岛素抵抗^[31]。而抑制 PTP1B 蛋白的活性能阻断胰岛素刺激下胰岛素受体的酪氨酸磷酸化, 通过影响胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate-1, IRS-1) 的磷酸化, 增加机体对类胰岛素和胰岛素的敏感性, 提高葡萄糖利用率, 降低外周血糖^[32]。较对照组而言, FBREE 处理后的脂肪细胞中的 PTP1B 基因表达水平显著降低了 10.07%、20.48%和 32.53%。

脂肪酸结合蛋白 aP2 是一种主要表达于脂肪细胞和巨噬细胞内的胞浆蛋白, 它能可逆性地结合饱和或不饱和脂肪酸, 促进脂肪酸的代谢与转运; 而伴随着其表达和活性的增强能显著促进脂肪细胞的分化^[33]。aP2 活化能够影响 GLUT4 的转位并诱发胰岛素抵抗。而抑制 aP2 的活性能增加胰岛素敏感性, 改善外周血中的胰岛素抵抗, 并恢复正常的葡萄糖和脂质代谢^[34]。较对照组而言, FBREE 处理的脂肪细胞中 aP2 mRNA 水平显著降低了 12.20%、26.23%和 45.17%。而研究发现, aP2 与 HSL 结合能够进一步促进脂肪水解^[35]。因此, 我们观察了 FBREE 处理对细胞中 HSL 的 mRNA 转录的影响。HSL 是一种受多种激素调控的脂肪分解反应限速酶。其在生理状态下能够被蛋白激酶 A 磷酸化激活后, 由细胞质向脂滴表面转位加速脂肪分解成为三酯甘油、二酯甘油、单酯甘油、胆固醇酯及其他脂质, 加速 FFA 释放^[15,36]。如图 4 示, FBREE 和罗格列酮均较对照组显著抑制 HSL 的 mRNA 转录 ($p<0.05$)。较对照组而言, FBREE 处理后的脂肪细胞中 HSL 的 mRNA 水平显著降低了 15.75%、37.68%和 49.11%。研究提示, 乳酸菌固态发酵后的大麦能够显著抑制 aP2, GLUT4 和 PTP1B 等因子的转录表达从而具有改善脂肪细胞中的糖脂代谢的作用^[13]。

2.6 发酵糙米乙醇提取物对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞分泌 TNF- α 和 IL-6 水平的影响

脂肪组织除发挥正常的能量储存与调控作用之外, 还兼具分泌功能。其中, TNF- α 是脂肪组织分泌

的主要细胞因子之一, 且其分泌水平与胰岛素抵抗发生密切相关。较正常人群而言, 肥胖伴胰岛素抵抗的患者体内 TNF- α 水平显著升高, 且抑制体内 TNF- α 分泌可明显改善胰岛素抵抗^[26]。IL-6 可促使胰岛素受体(IRS)-1 丝氨酸与苏氨酸残基发生磷酸化, 妨碍 IRS-1 正常的酪氨酸残基磷酸化引发 IRS 降解, 导致靶组织对胰岛素的利用率下降和造成 FFA 的释放, 间接引起胰岛素抵抗^[26,27]。

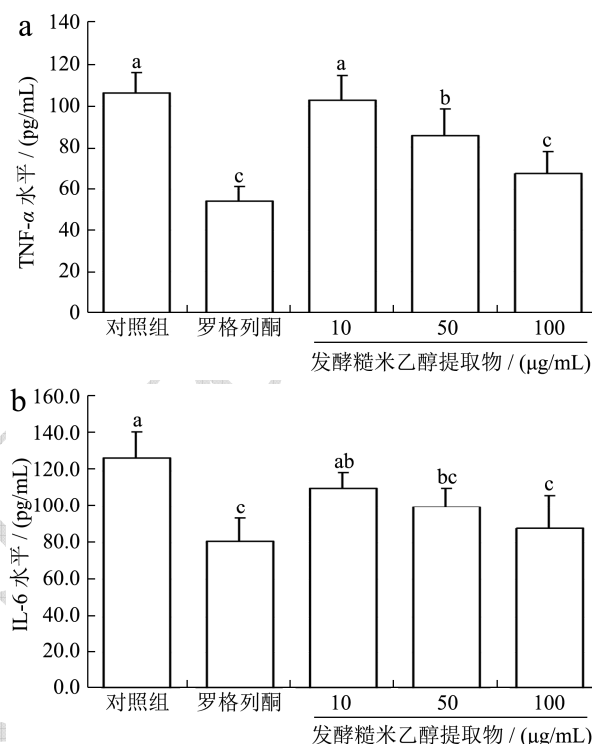


图 5 发酵糙米乙醇提取物对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞分泌 TNF- α (a) 和 IL-6 (b) 水平的影响

Fig.5 Effects of FBREE on TNF- α (a) and IL-6 (b) levels in insulin resistance 3T3-L1 adipocytes

如图 5 示, 对照组细胞培养液中含有最高水平的 TNF- α 和 IL-6 ($p<0.05$)。与对照组细胞相比, 低浓度 FBREE (10 μ g/mL) 对模型细胞所分泌 TNF- α 和 IL-6 没有显著的抑制效果 ($p>0.05$), 而高浓度 FBREE (100 μ g/mL) 则能够显著抑制模型细胞的 TNF- α (约 30.58%) 及 IL-6 (约 36.59%) 的分泌 ($p>0.05$)。而罗格列酮的处理能够显著的抑制模型细胞中 TNF- α 和 IL-6 的分泌 ($p<0.05$)。

2.7 发酵糙米乙醇提取物对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞 TNF- α 、IL-6、CRP 和 MCP-1 mRNA 转录水平的影响

高胰岛素血症、高三酯甘油血症等代谢相关综合

征患者体内存在较高度度的胰岛素抵抗,其血清中炎症因子 CRP 水平显著高于正常人水平并同时伴氧化应激损伤^[37]。机体中异常高水平的 CRP 会刺激脂肪组织分泌 TNF- α 、IL-6 等炎症细胞因子,从而阻碍胰岛素信号通路活化,造成代谢紊乱,加重胰岛素抵抗并诱发机体出现持续、低水平的慢性炎症^[38,39]。此外,胰岛素抵抗可致细胞分泌 MCP-1 从而促进脂肪分解,造成外周血中 FFA 水平的升高,最终加剧胰岛素抵抗及脂肪细胞的退变^[40,41]。

如图 6 示,罗格列酮处理能够显著抑制模型细胞中 4 种炎症因子的 mRNA 表达水平显著升高。而 FBREE 处理后的模型细胞中 TNF- α 、IL-6、CRP 和 MCP-1 的 mRNA 转录水平均明显低于未处理的对照组细胞 ($p<0.05$)。特别是高浓度的 FBREE (100 $\mu\text{g/mL}$) 分别抑制 TNF- α (约 21.18%), IL-6 (约 31.39%), MCP-1 (约 40.09%) 和 CRP (约 41.73%) 的 mRNA 转录水平。但在高浓度 FBREE (100 $\mu\text{g/mL}$) 与中浓度 (50 $\mu\text{g/mL}$) 在抑制 TNF- α 和 MCP-1 两种细胞因子 mRNA 的转录水平上的改变没有显著差异 ($p>0.05$)。

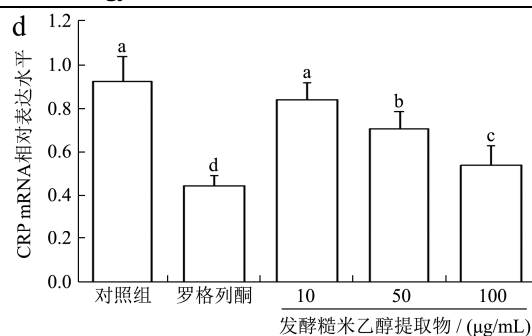
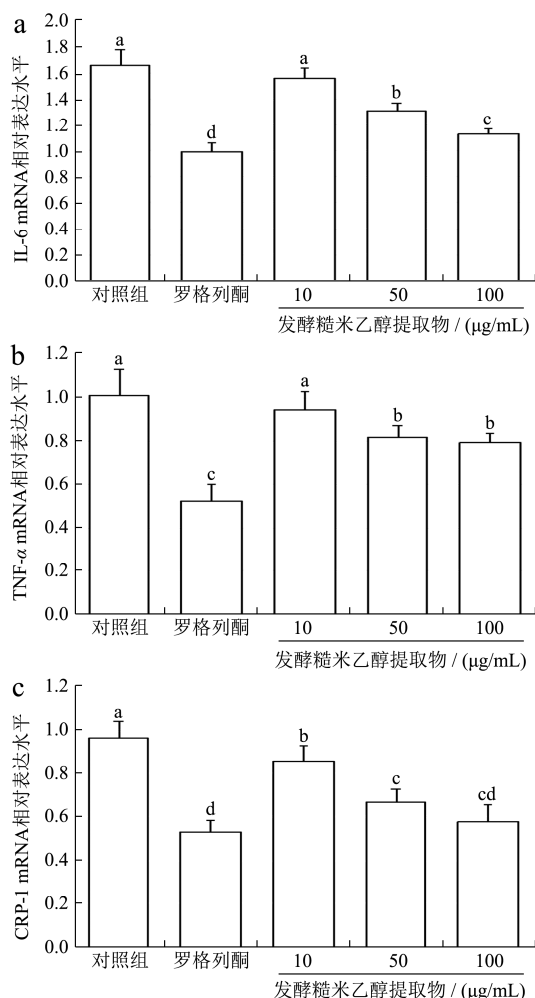


图 6 发酵糙米乙醇提取物对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞中 IL-6 (a), TNF- α (b), MCP-1 (c) 和 CRP (d) mRNA 转录水平的影响
Fig.6 Effects of FBREE on IL-6 (a), TNF- α (b), MCP-1 (c) and CRP (d) mRNA expression in insulin resistance 3T3-L1 adipocytes

3 结论

本研究发现,发酵糙米乙醇提取物可有效提高胰岛素抵抗模型细胞对葡萄糖的消耗量,降低细胞中 TG 含量,减少 FFA 和甘油的溢出。发酵糙米乙醇提取物能够有效地抑制转录因子 (PPAR γ , C/EBP α 和 SREBP1c) 的转录来影响脂肪细胞的分化。同时,发酵糙米乙醇提取物还可以通过上调 GLUT4 的基因转录,下调 PTP1B, aP2 和 HSL 等因子的 mRNA 水平转录来影响胰岛素抵抗细胞中的糖脂代谢过程。此外,发酵糙米乙醇提取物同时能抑制炎症细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的分泌,并抑制炎症介质 (TNF- α 、IL-6、MCP-1、CRP) 的 mRNA 转录来降低胰岛素抵抗发生时细胞内部的炎症水平。

参考文献

- [1] 周中凯,王晓凤,刁永佳,等.糙米中的生物活性成分及其对健康的影响[J].粮食与油脂,2016,29(4):1-4
ZHOU Zhong-kai, WANG Xiao-feng, DIAO Yong-jia, et al. The active compounds in brown rice and their influence on human health [J]. Cereals and Oils, 2016, 29(4): 1-4
- [2] 符琼,周文化,黄卫文,等.发芽糙米生物活性物质及生理功能研究进展[J].食品工业科技,2019,40(14):325-333
FU Qiong, ZHOU Wen-hua, HUANG Wei-wen, et al. Research progress on bioactive substances and physiological function of germinated brown rice [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(14): 325-333
- [3] Inagawa H, Saika T, Nishiyama N, et al. Dewaxed brown rice feed improves fatty liver in obese and diabetic model mice [J]. Anticancer Research, 2018, 38(7): 4339-4345
- [4] Borresen EC, Brown DG, Harbison G, et al. A randomized

- controlled trial to increase navy bean or rice bran consumption in colorectal cancer survivors [J]. *Nutrition and Cancer*, 2016, 68(8): 1269-1280
- [5] Saman P, Fuciños P, Vázquez J A, et al. Fermentability of brown rice and rice bran for growth of human *Lactobacillus plantarum* NCIMB [J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2011, 49: 128-132
- [6] Subhasree RS, Ramaiyan B, Dinesh Babu P. Evaluation of brown rice and germinated brown rice as an alternative substrate for probiotic food formulation using *Lactobacillus* spp. isolated from goat milk [J]. *International Food Research Journal*, 2013, 20: 2967-2971
- [7] Katayama M, Yoshimi N, Yamada Y, et al. Preventive effect of fermented brown rice and rice bran against colon carcinogenesis in male F344 rats [J]. *Oncology Reports*, 2002, 9(4): 817-822
- [8] Phutthaphadoong S, Yamada Y, Hirata A, et al. Chemopreventive effect of fermented brown rice and rice bran (FBRA) on the inflammation-related colorectal carcinogenesis in ApcMin/+ mice [J]. *Oncology Reports*, 2010, 23(1): 53-59
- [9] Onuma K, Kanda Y, Suzuki Ikeda S, et al. Fermented brown rice and rice bran with *Aspergillus oryzae* (FBRA) prevents inflammation-related carcinogenesis in mice, through inhibition of inflammatory cell infiltration [J]. *Nutrients*, 2015, 7(12): 10237-10250
- [10] Janus A, Szahidewicz-Krupska E, Mazur G, Doroszko A. Insulin resistance and endothelial dysfunction constitute a common therapeutic target in cardiometabolic disorders [J]. *Mediators of Inflammation*. 2016, 2016: 3634948
- [11] Wueest S, Item F, Lucchini FC, et al. Mesenteric fat lipolysis mediates obesity-associated hepatic steatosis and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2016, 65(1): 140-148
- [12] Farooq W, Farwa U, Khan FR. The metabolic syndrome and inflammation: role of insulin resistance and increased adiposity [J]. *Oman Medical Journal*, 2015, 30(2): 100-103
- [13] 史腊妮,董英,张家艳.发酵大麦提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞分化及脂代谢的影响[J].现代食品科技,2016,32(12):59-65
- SHI La-ni, DONG Ying, ZHANG Jia-yan. Effect of *Lactobacillus plantarum* dy-1 fermented barley extract on the differentiation and lipid metabolism of 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(12): 59-65
- [14] 宋家乐,钱波,桂中玉,等.猫豆乙醇提取物对 3T3-L1 脂肪细胞糖脂代谢的影响[J].现代食品科技,2017,33(10):7-12
- SONG Jia-le, QIAN Bo, GUI Zhong-yu, et al. Effects of *Mucuna pruriens* (Linn) ethanol extracts on glucose and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(10): 7-12
- [15] 黄文钰,李向平.脂肪细胞三酰甘油分解代谢相关调节的研究进展[J].国际病理科学与临床杂志.2013,33(3):230-234
- HUANG Wen-jie, LI Xiang-ping. Research progress in regulation of triglyceride hydrolysis in adipocytes [J]. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*, 2013, 33(3): 230-234
- [16] 王捷思,张雯.脂肪组织功能紊乱与肥胖和糖尿病[J].云南师范大学学报自然科学版,2013,33(6):21-28
- WANG Jie-si, ZHANG Wen. Dysfunction of adipose tissue in obesity and diabetes [J]. *Journal of Yunnan Normal University (Natural Sciences Edition)*, 2013, 33(6): 21-28
- [17] 方伟祯,蔡振华,何健,等.脂代谢紊乱及胰岛素抵抗对 2 型糖尿病病情的影响[J].山东医药,2015,44:69-70
- FANG Wei-zhen, CAI Zhen-hua, HE Jian, et al. Effects of dyslipidemia and insulin resistance on type 2 diabetes mellitus [J]. *Shandong Medical Journal*, 2015, 44: 69-70
- [18] Mota de Sá P, Richard AJ, Hang H, et al. Transcriptional regulation of adipogenesis [J]. *Comprehensive Physiology*, 2017, 7(2): 635-674
- [19] 王文浩,丁芳.禽类脂肪细胞分化调控的研究进展[J].中国畜牧杂志,2018,54(10):24-29
- WANG Wen-hao, DING Fang. Research progress on adipocyte differentiation in poultry [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2018, 54(10): 24-29
- [20] 周金星,刘文举,李升和.调控脂肪代谢及脂肪细胞分化的转录因子研究进展[J].卫生研究,2017,46(2):340-344
- ZHOU Jing-xin, LIU Wen-ju, LI Sheng-he. Research progress of transcription factors regulating fat metabolism and adipocyte differentiation [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2017, 46(2): 340-344
- [21] Popovich DG, Li Zhang. Bitter melon (*Momordica charantia*) triterpenoid extract reduces preadipocyte viability, lipid accumulation and adiponectin expression in 3T3-L1 cells [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(6): 1619-1626
- [22] Elberg G, Gimble J M, Tsai S Y. Modulation of the murine peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter activity by CCAAT/enhancer-binding proteins [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(36): 27815-27822
- [23] Ji S, Doumit ME, Hill RA. Regulation of adipogenesis and

- key adipogenic gene expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D in 3T3-L1 cell [J]. PLOS One, 2015, 10(7): 5495-5503
- [24] Xu H, Wang J, Chang Y, et al. Fucoidan from the sea cucumber *Acaudina molpadioides* exhibits anti-adipogenic activity by modulating the Wnt/ β -catenin pathway and down-regulating the SREBP-1c expression [J]. Food & Function, 2014, 5(7): 1547-1555
- [25] Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus [J]. World Journal of Diabetes, 2015, 6(3): 456-480
- [26] Polsky S, Ellis SL. Obesity, insulin resistance, and type 1 diabetes mellitus [J]. Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity, 2015, 22(4): 277-282
- [27] 胡彩虹,王文修,张涛,等. 2 型糖尿病患者血清中游离脂肪酸与血糖及胰岛素抵抗关系的探讨[J].中国卫生检验杂志, 2016,9:1288-1290
- HU Cai-hong, WANG Wen-xiu, ZHANG Tao, et al. The relationship between serum free fatty acid and blood glucose, insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2016, 9: 1288-1290
- [28] 唐海双,王清松,焦炳华,等. GLUT4 在胰岛素调控葡萄糖转运中作用[J].生命的化学,2014,34(2):285-290
- TANG Hai-shuang, WANG Qin-song, JIAO Bin-hua, et al. The mechanism of GLUT4 in insulin-regulated glucose transport [J]. Chemistry of Life, 2014, 34(2): 285-290
- [29] Dara L, Alan R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4 [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2012, 13: 383-396
- [30] Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus [J]. New England Journal of Medicine, 1999, 341(4): 248-257
- [31] Uysal K T, Scheja L, Wiesbrock S M, et al. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2 [J]. Endocrinology, 2000, 141(9): 3388-3396
- [32] Gum R J, Gaede L L, Koterski S L, et al. Reduction of protein tyrosine phosphatase IB increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice [J]. Diabetes, 2003, 52(1): 21-28
- [33] 宋波,帅素容.脂肪酸结合蛋白 A-FABP 和 E-FABP 的研究进展[J].畜牧与兽医,2017,49(10):135-139
- SONG Bo, SHUAI Su-rong. The progress in fatty acid binding protein A-FABP and E-FABP [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017, 49(10): 135-139
- [34] Furuhashi M, Tuncman G, Görgün C Z, et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2 [J]. Nature, 2007, 447(7147): 959-965
- [35] Kraemer FB, Shen WJ. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-) acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis [J]. J Lipid Res, 2002, 43(10): 1585-1594
- [36] Sekar R, Chow B K. Lipolytic actions of secretin in mouse adipocytes [J]. Journal of Lipid Research, 2014, 55(2): 190-200
- [37] Ahmadnezhad M, Arefhosseini S R, Parizadeh M R, et al. Association between serum uric acid, high sensitive C-reactive protein and pro-oxidant-antioxidant balance in patients with metabolic syndrome [J]. Biofactors, 2018, 44(3): 263-271
- [38] Rumińska M, Witkowska-Sędek E, Artemniak-Wojtowicz D, et al. Changes in leukocyte profile and C-reactive protein concentration in overweight and obese adolescents after reduction of body weight [J]. Central European Journal of Immunology, 2019, 44(3): 307-315
- [39] Alemi H1, Khaloo P1, Rabizadeh S, et al. Association of extracellular heat shock protein 70 and insulin resistance in type 2 diabetes; independent of obesity and C-reactive protein [J]. Cell Stress and Chaperones, 2019, 24(1): 69-75
- [40] Nio Y, Yamauchi T, Iwabu M, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) deficiency enhances alternatively activated M2 macrophages and ameliorates insulin resistance and fatty liver in lipoatrophic diabetic A-ZIP transgenic mice [J]. Diabetologia, 2012, 55(12): 3350-3358
- [41] Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, et al. Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL₂) in the regulation of metabolism [J]. Mediators of Inflammation, 2010, 2010 pii: 326580

(上接第 69 页)

- [17] 王福荣.酿酒分析与检测[M].化学工业出版社,2005
- WANG Fu-rong. Brewing Analysis and Detection [M]. Chemical Industry, 2005

- [18] Swiegers J H, Bartowsky E J, Henschke P A, et al. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2005, 11(2): 139-173