

# 吲哚美辛促白色脂肪细胞棕色化的作用研究

蒋琼<sup>1,2</sup> 黄起壬<sup>2</sup>

(1 九江市卫生学校 江西九江 332007; 2 南昌大学 江西南昌 330006)

**摘要:** 目的: 探究吲哚美辛对成熟的 3T3-L1 脂肪细胞棕色化的促进作用。方法: 采用经典的鸡尾酒诱导法将 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化为成熟的脂肪细胞, 接着采用 MTS 法筛选出 IDM 最佳处理浓度和时间; 采用 oil-red o staining 检测 IDM 对成熟的 3T3-L1 脂肪细胞甘油三酯积聚的作用; 采用 GOD 法检测细胞培养上清液中葡萄糖的水平; 采用 western blotting 测定 IDM 对棕色化相关蛋白的表达情况。结果: 当 IDM 的浓度为 100  $\mu\text{M}$  时, 细胞活力显著降低( $P < 0.01$ ), 因此将 10、25 和 50  $\mu\text{M}$  作为后续 IDM 处理实验的低、中、高剂量; 与 Ctrl 组相比, 50  $\mu\text{M}$  的 IDM 能够明显抑制成熟 3T3-L1 脂肪细胞甘油三酯积聚( $P < 0.01$ )。IDM 在 50  $\mu\text{M}$  时可显著增加脂肪细胞对葡萄糖摄取 ( $P < 0.01$ ); IDM 能够显著上调棕色化蛋白 (PGC-1 $\alpha$ 、PRDM16 和 UCP-1) 的表达( $P < 0.01$ ), 且具有浓度依赖性。结论: IDM 对白色脂肪细胞棕色化具有促进作用, 且具有浓度依赖性。

**关键词:** 吲哚美辛; 白色脂肪; 棕色化; 肥胖; UCP1

众所周知, 白色脂肪细胞在特定的条件下如冷刺激和  $\beta$ , 受体激活时很容易转化为棕色脂肪细胞, 这一过程称为白色脂肪细胞棕色化, 被认为是治疗肥胖的一个有效的方法[1-2]。吲哚美辛 (Indometacin, IDM) 又名消炎痛, 具有解热镇痛、减轻免疫反应的作用, 常用于治疗非特异性发热、痛经、风湿性及类风湿性关节炎等, 是目前抗炎作用最强的非甾体类药物之一[3-4]。IDM 的促成脂特性也得到普遍认可[5], 但其直接促进白色脂肪棕色化的研究尚没有出现过报道, 因此, 本研究旨在探讨 IDM 对白色脂肪细胞棕色化的影响, 为治疗肥胖及其相关代谢性疾病提供重要依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 3T3-L1 前脂肪细胞购自美国 ATCC 公司; H-DMEM (含 Glucose 4.5g/L)、GOD 测定试剂盒、饱和油红 O 购于 Solarbio 公司; 兔抗鼠一抗, 购于 CST 公司; 羊抗兔二抗, 购于博士德生物公司; PDVF 膜, 购于 Millipore 公司; qRT-PCR 试剂盒, 购于天根生物公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 MTS 法测定 IDM 对脂肪细胞存活率的影响

将成熟 3T3-L1 脂肪细胞接种于 96 孔板内, 将 IDM 分别配制成终浓度为 10、25、50、100、200  $\mu\text{M}$ , 待细胞长至 70-80% 时, 向 96 孔板中加入不同浓度的 IDM 培养液, 处理 48 h 后, 更换 MTS 溶液, 并将细胞进一步放置细胞培养箱中孵育 1-4 h (上述所有操作都需要避免光照)。最后, 通过酶标仪检测波长为 490 nm 时的吸光度值 (OD) 并记录数据。

**1.2.2 油红 O 染色鉴定脂肪细胞脂滴的积累** 将诱导培养了 8 天后的成熟 3T3-L1 脂肪细胞, 加入新配制的 10% 多聚甲醛固定 20 min; 后加入油红 O 染料, 染色 30 min; 移去染色液, 用 ddH<sub>2</sub>O 清洗两遍, 置于倒置显微镜下观察其染色情况, 拍照记录。然后用 100% 异丙醇洗脱细胞内的染料以进行定量, 通过紫外分光光度计 (Bio-Rad Laboratories) 测量 510 nm 处的吸光度值 (OD), 记录数据。

**1.2.3 GOD 检测 IDM 对脂肪细胞糖代谢的影响** 取诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞, 分为 Ctrl 组、IDM 低、中、高浓度组, IDM 处理 48 h, 采用 GOD 法测定收集的细胞上清液中葡萄糖的含量, 验证 IDM 对脂肪细胞糖代谢的影响。

**1.2.4 IDM 对脂肪细胞棕色化蛋白的影响** 分别提取 Ctrl 组,

IDM 低、中、高浓度组的细胞总蛋白, 配制体积分数为 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 凝胶中进行 120 mA 恒流电泳。电泳结束后进行湿转, 将蛋白转移至 PDVF 膜, 用含 8% 的脱脂牛奶进行封闭, 接着用含有 PGC-1 $\alpha$ 、PRDM16 和 UCP-1 和  $\beta$ -actin 的兔抗小鼠一抗进行免疫印迹。以 1:2000 稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗孵育, 孵育后用 TBST 缓冲液洗 5 次, 每次 10 分钟。使用 ECL 发光液在显影仪上进行显影得到目的条带。

**1.3 数据处理** 以均数  $\pm$  标准误 (Mean  $\pm$  S.E.M) 表示, 采用统计软件 SPSS 19 进行方差齐性检验、单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间比较用 LSD 法,  $P < 0.05$  为显著性差异。

## 2 结果

**2.1 IDM 对成熟的 3T3-L1 前脂肪细胞最佳作用浓度和时间的筛选** 结果表明, 当 IDM 的浓度为 100  $\mu\text{M}$  时, 细胞活力显著降低 ( $P < 0.01$ ) (见图 2.1 A)。然后我们验证了 50  $\mu\text{M}$  的 IDM 分别处理 6、12、24、48h 对细胞活性的影响, 结果显示对细胞无明显影响 (见图 2.1 B)。因此我们将 10、25 和 50  $\mu\text{M}$  作为我们后续 IDM 处理实验的低、中、高剂量。

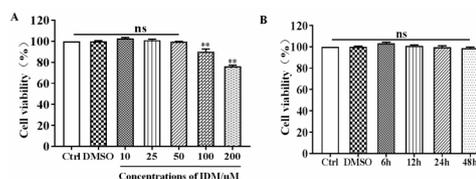


图 2.1 IDM 对成熟 3T3-L1 脂肪细胞的最佳浓度和时间筛选。 (Mean  $\pm$  S.E.M, n=3), \*\* $P < 0.01$ , vs Ctrl 组。

**2.2 IDM 对成熟的 3T3-L1 脂肪细胞脂滴聚集的影响** 染色结果表明, 50  $\mu\text{M}$  IDM 浓度组的 TG 聚集水平降低到 56.75%。这提示, IDM 能够抑制成熟的 3T3-L1 脂肪细胞脂滴聚集的水平。

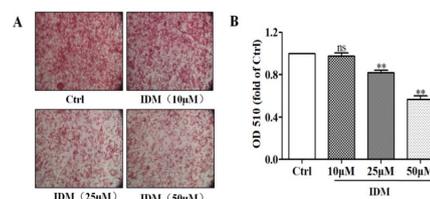


图 2.2 IDM 对脂滴聚集的影响。 (Mean  $\pm$  S.E.M, n=3), \*\* $P < 0.01$ , vs Ctrl 组; ns=no significance, Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ 。

2.3 IDM 处理对成熟的 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖摄取的影响柱状图显示, 与 Ctrl 组相比, IDM 随浓度升高, 脂肪细胞对葡萄糖的摄取能力逐渐增强( $P < 0.01$ )。这提示 IDM 能够促进成熟的 3T3-L1 脂肪细胞对葡萄糖摄取。

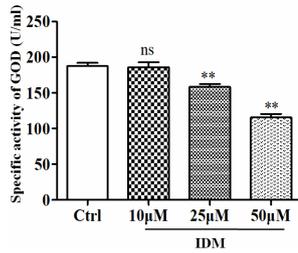


图 2.3 IDM 对成熟 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖摄取的影响。

\*\* $P < 0.01$ , vs Ctrl 组。

2.4 IDM 对成熟的 3T3-L1 脂肪细胞棕色化蛋白的影响 与 Ctrl 组相比, IDM 在 50 µM 时能够显著提高棕色化蛋白的表达水平( $P < 0.01$ ), 呈现浓度依赖性, 这提示 IDM 能够促进白色脂肪细胞棕色化。

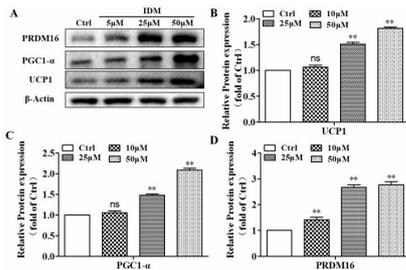


图 2.4 IDM 对成熟 3T3-L1 脂肪细胞棕色化蛋白的影响。

\*\* $P < 0.01$  vs. Ctrl 组, ns = no significance.

3 讨论 肥胖是一项世界性的健康问题。肥胖是与动脉粥样硬化 (AS)、高血压、2 型糖尿病 (T2DM) 和癌症等许多心脑血管和代谢性疾病的发病密切相关[6-7]。本研究通过细胞实验证明了不同

浓度的 IDM 对脂滴积聚和对糖摄取的影响, 并且实验结果表明, IDM 能够促进白色脂肪细胞棕色化, 并且具有一定的浓度依赖性。但是我们的实验仍然具有一定的缺陷, 我们并未探究 IDM 促进棕色化的作用机制以及从动物水平进行更加深入的探讨, 尽管我们的实验存在着这些局限性, 我们的研究仍为以吡喹酮等非甾体类抗炎药物开展新药研发以及临床上对于肥胖的研究提供坚实的基础。

参考文献

[1]D. T. Chu, B. Gawronska-Kozak. Brown and brite adipocytes: Same function, but different origin and response. *Biochimie*, 2017, 138: 102-105

[2]Y. Zou, P. Lu, J. Shiet al. IRX3 Promotes the Browning of White Adipocytes and Its Rare Variants are Associated with Human Obesity Risk. *EBioMedicine*, 2017, 24: 64-75

[3]W. Zhan, S. S. Tan, X. Hanet al. Indomethacin Enhances Fat Graft Retention by Up-Regulating Adipogenic Genes and Reducing Inflammation. *Plast Reconstr Surg*, 2017, 139 ( 5 ): 1093e-1104e

[4]V. Z. Rocha, P. Libby. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*, 2009, 6 ( 6 ): 399-409

[5]M. Styner, B. Sen, Z. Xie et al. Indomethacin promotes adipogenesis of mesenchymal stem cells through a cyclooxygenase independent mechanism. *J Cell Biochem*, 2010, 111 ( 4 ): 1042-1050

[6]J. E. Hall, Carmo JM Do, Silva AA Daet al. Obesity, kidney dysfunction and hypertension: mechanistic links. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15 ( 6 ): 367-385

[7]K. J. Nadeau, D. M. Maahs, S. R. Danielset al. Childhood obesity and cardiovascular disease: links and prevention strategies. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8 ( 9 ): 513-525