

doi: 10.7541/2013.38

EPA 对草鱼前体脂肪细胞增殖分化的影响

刘品¹ 吉红¹ 李超¹ 黄吉芹¹

Marijana Todorčević²

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100; 2. 挪威水产养殖、
渔业与食品综合研究所, 卑尔根 P.O. Box 5010)

摘要: 体外培养草鱼前体脂肪细胞, 并用不同浓度(0—100 $\mu\text{mol/L}$)二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic acid, EPA)进行处理, 噻唑兰比色法(Methyl thiazolte trazoliu, MTT)和油红 O 染色提取法检测 EPA 对细胞增殖及分化的影响, Real-time qPCR 检测过氧化物酶增殖激活受体家族(Peroxidase proliferation activated receptor, *PPARs*)、脂蛋白酯酶(Lipoprotein lipase, *LPL*)、过氧化物酶体增殖激活受体 γ 辅助活化因子 1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α , *PGC-1 α*)等基因的表达情况。结果显示, 不同浓度 EPA 在 2d 内均显著促进草鱼前体脂肪细胞增殖($P<0.05$); 不同浓度 EPA 处理 1d 后均显著抑制草鱼前体脂肪细胞分化($P<0.05$), 且 100 $\mu\text{mol/L}$ EPA 处理细胞 2d 可显著促进 *LPL* 和 *PGC-1 α* 基因的表达($P<0.05$)。研究表明, EPA 可促进草鱼前体脂肪细胞增殖, 抑制其分化, 该抑制作用与其调控 *PGC-1 α* 、*LPL* 等脂代谢基因的表达有关。

关键词: 草鱼; 前体脂肪细胞; EPA; 增殖; 分化

中图分类号: Q256 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)03-0418-07

高不饱和脂肪酸脂酸(Highly unsaturated fatty acid, HUFA)是指具有 20 个以上碳原子, 并含有两个或两个以上不饱和键的脂肪酸, 主要包括二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA)。诸多学者采用离体细胞培养体系进行研究, 发现 HUFA 可影响哺乳动物脂肪细胞发育^[1-4]。李惠侠等^[3]指出 DHA 可抑制大鼠前体脂肪细胞的增殖和分化, 并下调脂肪特异性分化转录因子—过氧化物酶体增殖激活受体 γ (Peroxisome proliferator activated receptor γ , *PPAR γ*) mRNA 的表达量。Kim, *et al.*^[4] 也发现 DHA 可抑制 3T3-L1 脂肪细胞分化, 促进脂肪细胞水解, 并诱导细胞凋亡。

尽管 HUFA 并非草鱼的必需脂肪酸, 但已有研究证实其对草鱼的脂质代谢有着显著的影响, 且该方面的研究多采用在体的方式^[5-9]。如吉红等^[8, 9]用富含 EPA 和 DHA 的日粮饲喂草鱼, 发现其可抑制

草鱼脂质合成并减少脂质向肝脏组织的转运, 最终降低肝脏脂肪及腹腔脂肪的沉积。近年来, 随着鱼类脂肪细胞培养体系的建立^[10-13], 采用离体模型进行脂质代谢的研究也逐渐增多^[14-17]。Todorčević, *et al.*^[14] 用不同脂肪酸处理大西洋鲑前体脂肪细胞发现, EPA 可显著降低脂肪细胞蓄积甘油三酯的能力。而 EPA 对草鱼脂肪细胞影响的研究尚未见报道。

为了深入探究 HUFA 对草鱼脂质代谢的影响及其机理, 在本实验室已建立的草鱼脂肪细胞培养体系基础上, 研究了 EPA 对体外培养的草鱼脂肪细胞增殖分化及相关基因表达的影响, 以期对草鱼 HUFA 营养机理研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验动物 体重 1 kg 左右健康草鱼, 购于杨凌康乐市场。

收稿日期: 2012-03-31; 修订日期: 2012-12-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31072223)资助

作者简介: 刘品(1983—), 女, 河北石家庄人; 博士研究生; 主要从事水生动物营养与饲料学研究。E-mail: liupinlara@163.com

通信作者: 吉红(1967—), 男, 河南灵宝人; 教授, 博士生导师; 主要从事水生动物营养与饲料学研究。E-mail: jihong0405@hotmail.com

主要试剂 DMEM/F12 固体培养基(Gibco), 胎牛血清(四季青)、I 型胶原酶(Gibco)、牛血清白蛋白(Gibco)、无脂肪酸牛血清白蛋白(北京经科宏达生物技术有限公司)、牛胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸钠、氯化可的松、油红 O、MTT、EPA 均购自 Sigma 公司, 碳酸氢钠、无水乙醇等化学试剂均为国产分析纯。反转录试剂盒及荧光定量试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2 试验方法

草鱼前体脂肪细胞获得及培养 试验鱼在水族箱中停食暂养 1d 左右。试验前将鱼敲晕后剪断鳃弓放血, 清洗干净并用 75%酒精擦拭鱼体进行消毒, 无菌环境中解剖取出腹腔肠系膜脂肪组织, 将其放入含 5%牛血清白蛋白的 PBS 缓冲液中, 并称量记录分离的脂肪组织总重量。

将取出的脂肪组织用 PBS 冲洗 3 次后放入烧杯, 加入等体积的 0.1% I 型胶原酶消化液, 剪碎组织的同时对组织进行消化, 15min 后用含有 20%胎牛血清的培养液终止消化反应。随后将混合液放于 50 mL 离心管, 800 g 离心 10min, 弃上层液体, 用不含胎牛血清的 DMEM/F12 培养基将沉淀的细胞重悬, 吹打均匀, 将细胞悬浮液通过 200 目的尼龙网过滤, 收集滤液, 800 g 离心 10min, 弃上层液体, 加入 20 mL 红细胞裂解液, 静置 5min, 800 g 离心 5min, 弃去上清。将获得的草鱼前体脂肪细胞用不含血清的培养液重悬清洗, 800 g 离心 5min, 重复两次后用含 20%胎牛血清的基础培养基将细胞重悬, 以 $10 \text{ g}/25 \text{ cm}^2$ 密度接种于预先用 1%明胶涂布板底的培养板内, 于 28°C , 5% CO_2 条件下进行培养, 隔天换液并观察细胞增殖发育情况。当细胞生长至汇合阶段(接种 6d), 给细胞换诱导培养基继续培养, 具体流程(图 1)。

MTT 法检测草鱼前体脂肪细胞增殖 按照前述方法获得草鱼前体脂肪细胞并培养, 待细胞贴壁后, 分别用加有 0、50、100 $\mu\text{mol/L}$ EPA 的基础培

养基进行处理, 处理 1、2、3 和 4 后通过 MTT 比色测定草鱼前体脂肪细胞增殖活性。每孔加入 20 μL 新鲜配制的 MTT 溶液, 28°C 继续培养 4h 后终止培养, 弃去孔内培养液, 每孔加 150 μL DMSO, 震荡 10min。波长 490 nm 处, 以经过相同处理的无细胞孔作为空白进行调零, 在全波长酶标仪(Gene, USA)上测定各孔 OD 值。

油红 O 染色提取法检测草鱼前体脂肪细胞分化 按照前述方法培养细胞, 待细胞增殖达到 80%以上汇合后, 将基础培养基换为诱导培养基, 并在诱导培养基中分别加入 0、50、100 $\mu\text{mol/L}$ EPA, 分别取诱导分化 1、3 和 5d 的细胞, 各孔细胞用 PBS 洗 3 次, 10%甲醛溶液固定 30min 后, 用 PBS 洗 2 次, 红油 O 染色液浸染 10min, PBS 洗 2 次, 异丙醇分色 20s, 倒置显微镜下观察细胞内脂滴染色情况并拍照。随后每孔加入 1 mL 异丙醇, 恒温摇床内震荡 10min 以萃取被染细胞中的油红 O, 以相同处理的无细胞孔作为空白调零, 紫外分光光度计(岛津 UVmini 1240, Japan)500 nm 波长处比色, 记录 OD 值。

Real-time qPCR 检测基因表达情况 当细胞增殖到 80%汇合时(接种 6d)分别用 0、100 $\mu\text{mol/L}$ EPA 处理。2d 后吸弃培养液, 室温下 PBS 洗涤 2—3 次, 提取 RNA, 取 1 μg 总 RNA 进行反转录, 方法参照 TakaRa 公司的 PrimeScript[®] RT reagent Kit (Perfect Real Time)说明书。实时定量检测采用 CFX-96 实时定量 PCR 检测系统(Bio-Rad, USA)进行, 反应体系为 20 μL , 包括: 10 mmol/ μL 的上下游引物各 0.6 μL 、1 μL cDNA、10 μL 2 $\times$ SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II S、7.8 μL 灭菌水。反应条件为: 95°C , 10s; 95°C , 15s; 57°C , 15s; 40 个循环。根据扩增曲线得到的 C_t 值(荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数), 计算出目标基因与内参基因 $\beta\text{-actin}$ C_t 值的差异 ΔC_t , 计算出不同样品相对于内参基因表达倍数 $2^{-\Delta C_t}$, 从而制作相对定量的图表。基因检测实时定量引物(表 1)。

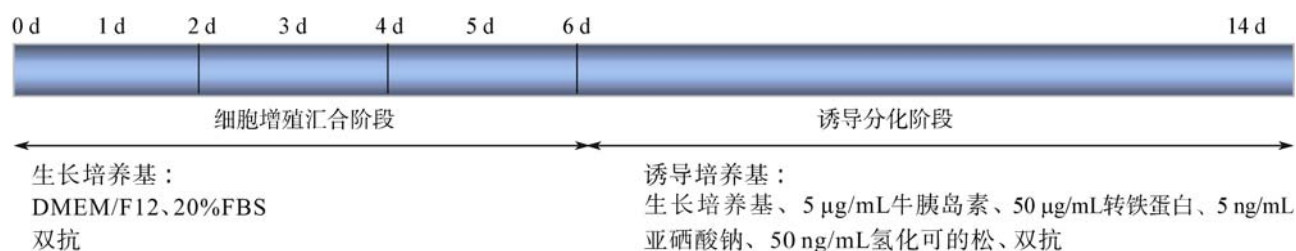


图 1 草鱼前体脂肪细胞体外培养模式图

Fig. 1 Summary of grass carp preadipocytes development

表 1 实时定量检测引物列表
Tab. 1 Primers used for quantitative real-time PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	产物大小 product size (bp)
PGC-1α	GATGTCAGTGACCTCGATGCA CAGCAAGTTGGCCTCATTTTC	57	143
PPARα	AGCAGAGAAGGACGTCAG TTCCTTCTCGGCATGCTG	57	187
PPARβ	TCTGAAGTCTCTCGCCAA GAGCTCCGTTAATCACCT	57	256
PPARγ	GATGGTTGGCATGTCACAC TTCCTGACAGTATGGCTC	57	205
LPL	ATTGTGGTGGACTGGTTG CTACATGAGCACCAAGACTG	57	192
β-actin	CGTGACATCAAGGAGAAG GAGTTGAAGGTGGTCTCAT	57	288

1.3 数据分析

所得数据用平均值±标准差(Mean±SD)表示。采用 SPSS13.0 软件中单因素方差分析(One-way ANOVA)和 *t* 检验对所得数据进行显著性检验分析,当 $P<0.05$ 时,认为差异显著。

2 结果

2.1 草鱼前体脂肪细胞发育过程

草鱼前体脂肪细胞接种第 1 天(图 2A),隔天换液,培养第 4 天可见贴壁细胞伸展呈梭形,并开始形成草鱼前体脂肪细胞增殖群落(图 2B),接种 6d 后,前体脂肪细胞大量增殖,可覆盖培养皿底面积 80%(图 2C),此时换成诱导培养液继续培养。接种 14d(诱导培养 8d)部分细胞分化完全,胞内形成若干大脂滴(图 2D)。

2.2 EPA 对草鱼前体脂肪细胞增殖的影响

从表 2 中可以看出,50 μmol/L EPA 处理脂肪细胞 2d 内可显著促进细胞的增殖($P<0.05$),但是从 3d 起其促进作用消失($P>0.05$),到第 4 天转为抑制作用($P<0.05$);100 μmol/L EPA 组在前 3 天始终对草鱼前体脂肪细胞的增殖起到显著的促进作用($P<0.05$),到第 4 天促进作用消失($P>0.05$)。

2.3 EPA 对草鱼前体脂肪细胞分化的影响

EPA 对草鱼前体脂肪细胞脂质蓄积能力的影响在草鱼前体脂肪细胞分化第 1 天,分别用含 50 μmol/L 和 100 μmol/L EPA 的培养液孵育处理细胞 1d 后,通过油红 O 脂滴特异染色后发现,细胞内被油红 O 染成亮红色的脂滴数与充脂细胞数减小较对照组减少(图 3)。油红 O 染色提取法比色法(以 OD 值表示)定量分析细胞内脂质的生成量,结果表明,EPA 处理 1d 可显著降低细胞内的脂质生成量($P<0.05$,图 4)。但是随着处理时间的延长,EPA 对草鱼前体脂肪细胞分化的抑制效果逐渐减弱,处理组脂滴数量与大小逐渐赶上对照组。并且,处理组脂质含量测定结果也与对照组相近($P>0.05$)(图 4)。

EPA 对草鱼前体脂肪细胞分化初期脂代谢相关基因表达的影响 如图 5 所示,100 μmol/L EPA 处理脂肪细胞 2d 后,显著促进了细胞 *LPL* 和 *PGC-1α* 基因的表达($P<0.05$),而对 *PPARs* 家族基因的表达无显著性影响($P>0.05$,图 5)。

3 讨论

脂肪组织发育的实质是脂肪细胞数目的增加和体积的增大,而脂肪细胞由不含大脂滴的前体脂肪

表 2 MTT 检测 EPA 对草鱼前体脂肪细胞增殖的影响
Tab. 2 Effects of EPA on preadipocytes proliferation of grass carp by MTT assay

时间 Time (d)	0 μmol/L	50 μmol/L	100 μmol/L
1	0.051±0.004 ^b	0.072±0.010 ^a	0.077±0.005 ^a
2	0.062±0.006 ^c	0.084±0.010 ^b	0.112±0.005 ^a
3	0.096±0.008	0.105±0.003	0.115±0.009
4	0.097±0.014 ^a	0.056±0.012 ^b	0.080±0.003 ^a

注:各处理组与 0 μmol/L 比较,平均数后上标不同表示差异显著($P<0.05$)
Note: The superscripts after the average values denote significant difference ($P<0.05$)

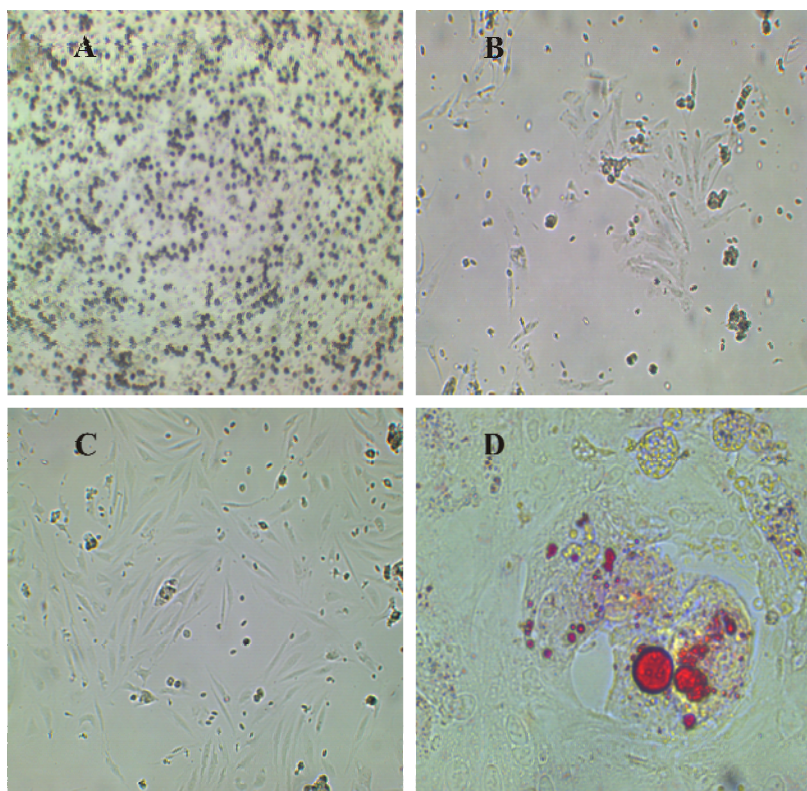


图 2 草鱼前体脂肪细胞发育过程图

Fig. 2 Morphology of grass carp preadipocytes development

A. 细胞接种图(100×) Seeding figure (0d); B. 接种 4d (100×) Seeding for 4 days; C. 接种 6d (100×) Seeding for 6 days; D. 接种 14d (诱导 8d 250×) Seeding for 14 days

细胞发育为储存脂质的成熟脂肪细胞受到许多因子调控。EPA 和 DHA 是鱼油中最主要的多不饱和脂肪酸,它们均具有抑制动物体甘油三酯合成的作用。研究表明,EPA 可改善肥胖及肥胖相关的疾病如胰岛素抵抗、II 型糖尿病和心血管疾病,提高脂肪组织、肝脏和肌肉组织的胰岛素敏感性,并促进葡萄糖利用^[18, 19]; DHA 可剂量和时间依赖性降低 3T3-L1 前体脂肪细胞和原代培养的大鼠前体脂肪细胞的增殖活力^[1, 2]。本研究则首次探讨了 EPA 在离体条件下对草鱼脂肪细胞发育的影响,发现 EPA 处理前 2d 可显著促进细胞增殖,但是到增殖的第 4 天 50 $\mu\text{mol/L}$ 处理组呈现出显著抑制作用,这一现象与 DHA 在 3T3-L1 及大鼠上的作用存在差异,表明不同种类脂肪酸对于脂肪细胞增殖的影响可能存在不同的调节机制。相关研究尚需进一步进行。

前体脂肪细胞分化是甘油三酯沉积的过程,涉及一系列的转录事件。PPARs 家族三个成员(PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ)在脂肪细胞脂肪酸代谢中发挥着重要的作用。PPAR α 主要在脂肪酸的氧化代谢中发挥重要作用,但是它在白色脂肪细胞中的表

达量较低; PPAR γ 则在细胞的脂质生成过程中发挥关键的作用,在白色脂肪细胞中得表达量较高; PPAR β 在脂肪组织代谢和能量的动态平衡发挥着重要作用^[20]。Chambrier, *et al.*^[21] 在人的脂肪细胞上研究发现 EPA 可显著促进 PPAR γ 表达,但 Yoshiyuki, *et al.*^[22] 对 3T3-L1 的研究发现了相反的结果,且没有对分化造成影响。Manickam, *et al.*^[23] 则指出 EPA 可显著降低脂肪细胞脂滴的大小以及脂质含量。在本研究中,EPA 没有影响 PPARs 家族 3 个成员的表达,但却在分化初期显著抑制了草鱼脂肪细胞蓄积甘油三酯的能力(图 4),与 Manickam, *et al.*^[23] 在 3T3-L1 上的研究结果一致。

另一方面,本研究发现 EPA 显著促进了脂质分解基因 *LPL* 和线粒体生成相关基因 *PGC-1 α* 的表达(图 5)。*LPL* 是脂肪细胞平衡脂质生成与分解的限制酶^[24]。Todorčević, *et al.*^[25] 研究发现 *LPL* 在大西洋鲑前体脂肪细胞发育过程中相对于接种第 1 天呈现先升高后

降低最后又升高的波动趋势,在细胞增殖过程中 *LPL* 表达升高,细胞汇合后至细胞分化中期 *LPL* 表达降低,细胞分化后期 *LPL* 表达升高。在本试验中,在草鱼前体脂肪细胞分化初期,EPA 促进了 *LPL* 的表达,表明 EPA 可能通过 *LPL* 促进了细胞的脂质分解从而降低了细胞脂质的蓄积能力。Manickam, *et al.*^[23] 的研究表明 EPA 可上调 3T3-L1 脂肪细胞 *LPL* 和 *HSL* 等基因的表达,并抑制脂肪细胞的分化。Mak-Soon, *et al.*^[26] 则发现 EPA 可通过上调脂质分解基因和下调脂质合成基因促进 3T3-L1 脂肪细胞的脂质分解。另一方面,也有研究表明摄入鱼油可促进人和小鼠脂肪组织 *LPL* 基因的表达^[27, 28], 本研究结果与之一致。以上结果表明,EPA 有可能通过促进脂肪细胞的脂质分解进而抑制脂肪细胞的脂质蓄积。

PGC-1 α 参与调控线粒体的生成^[29]、适应性产热、线粒体生成、肝脏脂肪酸 β 氧化、脂肪细胞分化等多种代谢过程^[30], 在调节能量代谢中发挥着重要的作用。PGC-1 α 在有高能量需求及线粒体丰富的组织中表达水平相对较高,而在白色脂肪细胞表达极少^[31]。Lu, *et al.*^[32] 研究发现 *PGC-1 α* 在猪的前体

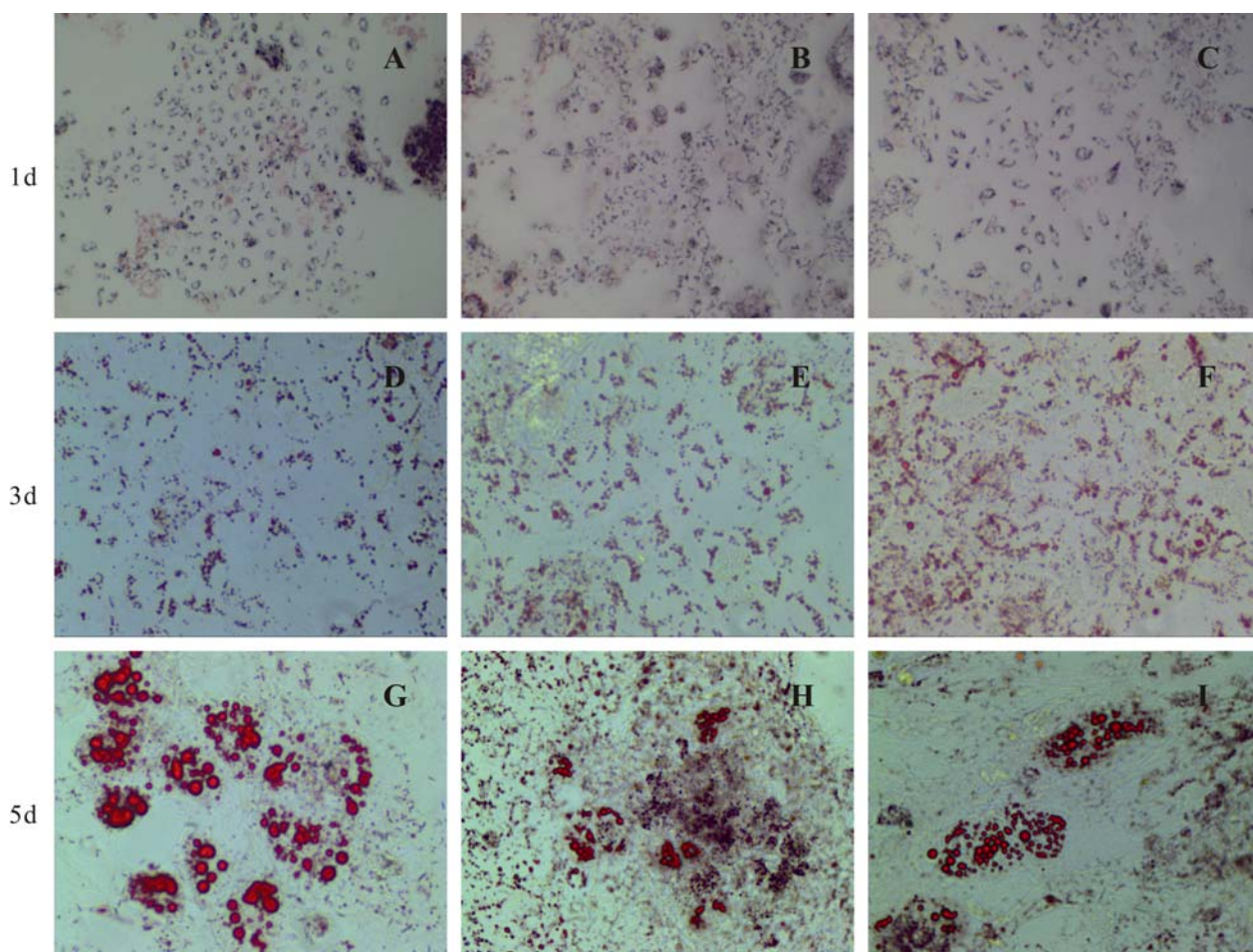


图3 EPA对草鱼脂肪细胞分化过程中形态的影响

Fig. 3 Morphological changes of grass carp adipocytes treated with EPA
A, D, G. 0 $\mu\text{mol/L}$ (100 $\times$); B, E, H. 50 $\mu\text{mol/L}$ (100 $\times$); C, F, I. 100 $\mu\text{mol/L}$ (250 $\times$)

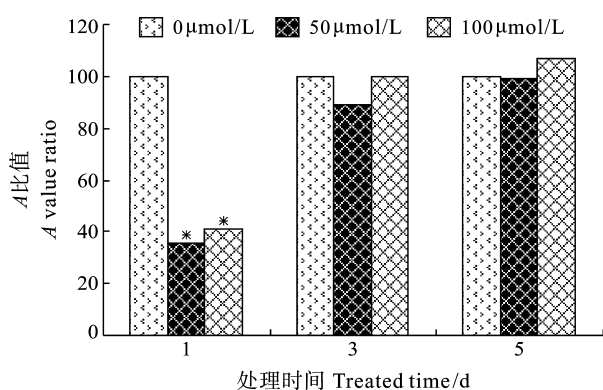


图4 EPA对草鱼前体脂肪细胞分化的影响

Fig. 4 Effects of EPA on differentiation of grass carp preadipocytes by Oil Red O extraction

*代表差异显著, 显著水平为 $P < 0.05$, 下同

Star indicate significant differences ($P < 0.05$), the same below

脂肪细胞增殖分化过程中表达变化不显著。Flachs, *et al.* [33] 则指出 DHA 和 EPA 能够促进小鼠白色脂肪组织的线粒体生成和 β 氧化, 并上调 *PGC-1 α* 和

氧化代谢基因核呼吸因子(Nuclear respiratory factor-1, *Nrf-1*)的表达。本实验室曾报道饲喂 HUFA 可显著促进草鱼肝脏 *PGC-1 α* 基因的表达 [34], 且肝脏脂质含量也显著下降。有学者在人的脂肪细胞中超

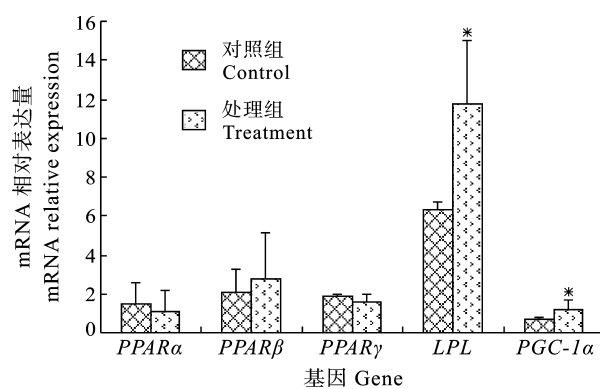


图5 EPA对草鱼脂肪细胞分化初期脂代谢相关基因表达的影响

Fig. 5 Effects of EPA on gene expression of grass carp preadipocytes in lipid metabolism

表达 *PGC-1 α* , 结果致使脂肪细胞储能作用变成能量耗散作用^[35]。在本实验中 EPA 促进了脂肪细胞 *PGC-1 α* 基因的表达, 同时发现 EPA 处理组细胞的脂质含量显著低于对照组, 推测 *PGC-1 α* 的表达升高促进了细胞线粒体的增殖发育, 进而促进细胞对脂肪酸的氧化分解, 最终通过抑制脂肪细胞脂质生成降低脂质蓄积。

参考文献:

- [1] Li H X, Yang G S. Effects of docosahexaenoic acid on rat adipocytes proliferation and differentiation [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21**(5): 840—843 [李惠侠, 杨公社. 二十二碳六烯酸对大鼠脂肪细胞增殖分化的影响. 生物工程学报, 2005, **21**(5): 840—843]
- [2] Xu C W, Shen Y Z, Gong Q H, *et al.* Effect of docosahexaenoic acid to inhibit proliferation of 3T3-L1 preadipocytes and the mechanism [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2010, **32**(5): 456—459 [徐琛玮, 沈颖卓, 龚清海, 等. 二十二碳六烯酸抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的作用及其可能机制. 营养学报, 2010, **32**(5): 456—459]
- [3] Li H X, Yang G S, Lu J X. Effects of Arachidonic Acid on Growth and Differentiation of Rat Preadipocytes [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, **21**(6): 743—747 [李惠侠, 杨公社, 卢建雄. 花生四烯酸对大鼠前体脂肪细胞生长与分化的影响. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, **21**(6): 743—747]
- [4] Kim H K, Della-Fera M A, Lin J, *et al.* Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Journal of Nutrition*, 2006, **136**(6): 2965—2969
- [5] Zhu L Y, Zhang X C, Song X J, *et al.* Advances in n-3 polyunsaturated fatty acids DHA and EPA [J]. *Marine Sciences*, 2007, **31**(11): 78—85 [朱路英, 张学成, 宋晓金, 等. N-3 多不饱和脂肪酸 DHA、EPA 研究进展. 海洋科学, 2007, **31**(11): 78—85]
- [6] Zhao H, Wang K N. Effect of polyunsaturated fatty acid (PUFA) on body fat deposition and its relative gene expression in animals [J]. *Acta Zoonutrimenta Sinica*, 2004, **16**(1): 1—5 [赵华, 王康宁. 多不饱和脂肪酸对动物体质沉积及其基因表达的影响. 动物营养学报, 2004, **16**(1): 1—5]
- [7] Madsen L, Petersen R K, Kristiansen K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acid [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, **1740**: 266—286
- [8] Ji H, Cao Y Z, Liu P, *et al.* Effect of dietary HUFA on the lipid metabolism in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(5): 881—889 [吉红, 曹艳姿, 刘品, 等. 饲料中 HUFA 影响草鱼脂质代谢的研究. 水生生物学报, 2009, **33**(5): 881—889]
- [9] Ji H, Li J, Liu P. Regulation of growth performance and lipid metabolism by dietary n-3 highly unsaturated fatty acids in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2011, **159**: 49—56
- [10] Vegusdal A, Sundvold H, GjØen T, *et al.* An in vitro method for studying the proliferation and differentiation of Atlantic salmon preadipocytes [J]. *Lipids*, 2003, **38**: 289—296
- [11] Oku H, Tokuda M, Okumura T, *et al.* Effect of insulin, triiodothyronine and fat soluble vitamins on adipocyte differentiation and LPL gene expression in the stromal-vascular cells of red sea bream, *Pagrus major* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2006, **144**(3): 326—333
- [12] Bouraoui L, Gutiérrez J, Navarro I. Regulation of proliferation and differentiation of adipocyte precursor cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Journal of Endocrinology*, 2008, **198**: 459—469
- [13] Ji H, Cao Y Z, Lin Y Q, *et al.* Primary culture of grass carp preadipocytes in vitro [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(6): 280—284 [吉红, 曹艳姿, 林亚秋, 等. 草鱼前体脂肪细胞的原代培养. 水生生物学报, 2009, **33**(6): 280—284]
- [14] Todorčević M, Vegusdal A, GjØen T, *et al.* Changes in fatty acids metabolism during differentiation of Atlantic salmon preadipocytes; Effects of n-3 and n-9 fatty acids [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, **1781**: 326—335
- [15] Oku H, Umino T. Molecular characterization of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their gene expression in the differentiating adipocytes of red sea bream *Pagrus major* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2008, **151**: 268—277
- [16] Oku H, Tokuda M, Umino T. The effects of 2-bromopalmitate on the fatty acid composition in differentiating adipocytes of red sea bream (*Pagrus major*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2009, **152**: 370—375
- [17] Todorčević M, Skugor S, Ruyter B. Alterations in oxidative stress status modulate terminal differentiation in Atlantic salmon adipocytes cultivated in media rich in n-3 fatty acids [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2010, **156**: 309—318
- [18] Mori TA, Bao DQ, Burke V, *et al.* Dietary fish as a major component of a weight-loss diet: effect on serum lipids, glucose, and insulin metabolism in overweight hypertensive subjects [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, **70**: 817—825
- [19] Mori Y, Murakawa Y, Yokoyama J, *et al.* Effect of highly purified eicosapentaenoic acid ethyl ester on insulin resistance and hypertension in Dahl salt-sensitive rats [J]. *Metabolism*, 1999, **48**: 1089—1095
- [20] Christodoulides C, Vidal-Puig A. PPARs and adipocyte function [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, **318**: 61—68
- [21] Chambrier C, Bastard J P, Rieusset J, *et al.* Eicosapentaenoic Acid Induces mRNA Expression of Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ [J]. *Obesity Research*, 2002, **6**(10): 518—525
- [22] Tanabe Y, Matsunaga Y, Saito M, *et al.* Involvement of Cyclooxygenase-2 in synergistic effect of cyclic stretching and eicosapentaenoic acid on adipocyte differentiation [J].

- Journal of Pharmacological Sciences*, 2008, **106**: 478—484
- [23] Manickam E, Sinclair A J, Cameron-Smith D. Suppressive actions of eicosapentaenoic acid lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2010, **9**(57): 1—8
- [24] Pang W J, Li Y, Lu R H, *et al.* Molecular events during adipocyte differentiation [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2005, **27**: 497—500 [庞卫军, 李颖, 卢荣华, 等. 脂肪细胞分化过程中的分子事件. 细胞生物学杂志, 2005, **27**: 497—500]
- [25] Todorčević M, Škugor S, Krasnov A, *et al.* Gene expression profiles in Atlantic salmon adipose-derived stroma-vascular fraction during differentiation into adipocytes [J]. *BMC Genomics*, 2010, **11**: 39
- [26] Lee M S, Kwun I S, Kim Y. Eicosapentaenoic acid increases lipolysis through up-regulation of the lipolytic gene expression and down-regulation of the adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Genes Nutrition*, 2008, **2**: 327—330
- [27] Khan S, Minihane A M, Talmud P J, *et al.* Dietary long-chain n-3 PUFAs increase *LPL* gene expression in adipose tissue of subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype [J]. *Journal of Lipid Research*, 2002, **43**(6): 979—985
- [28] Yoshida T, Gotoda T, Okubo M, *et al.* A Japanese patient with lipoprotein lipase deficiency homozygous for the Gly188Glu mutation prevalent worldwide [J]. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 2000, **7**(1): 45—49
- [29] Liang H Y, Bai Y D, Li Y F, *et al.* PGC-1 -induced mitochondrial alterations in 3T3 fibroblast cells [J]. *New York Academy of Sciences*, 2007, **1100**: 264—279
- [30] Puigserver P, Spiegelman B M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator [J]. *Endocrine Reviews*, 2003, **24**: 78—90
- [31] Picard F, Gehin M, Annicotte J S, *et al.* SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues [J]. *Cell*, 2002, **111**(7): 31—41
- [32] Lu R H, Ji H, Chang Z G, *et al.* Mitochondrial development and the influence of its dysfunction during rat adipocyte differentiation [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, **37**: 2173—2182
- [33] Flachs P, Horakova O, Brauner P, *et al.* Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat [J]. *Diabetologia*, 2005, **48**(11): 2365—2375
- [34] Ji H, Liu P, Li J, *et al.* Study on the PGC-1 α gene expression and the influence of dietary HUFA in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, **34**(9): 1327—1333 [吉红, 刘品, 李杰, 等. 草鱼 PGC-1 α 基因的表达及其饲喂 n-3HUFA 对其影响. 水产学报, 2010, **34**(9): 1327—1333]
- [35] Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, *et al.* Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**: 33370—33376

EFFECTS OF EPA ON THE PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF GRASS CARP PREADIPOCYTES

LIU Pin¹, JI Hong¹, LI Chao¹, HUANG Ji-Qin¹ and Marijana Todorčević²

(1. Department of Fishery Science, College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. Nofima, Norwegian Institute of Food, Fisheries and Aquaculture Research, Bergin P.O. Box 5010, Norway)

Abstract: We investigated the effects of eicosapentaenoic acid (EPA) on proliferation, differentiation and gene expression of lipid metabolism in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) preadipocytes. The developmental process of grass carp preadipocytes was observed at 0, 4, 6 and 14d after seeding. The proliferation of the preadipocytes was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay method. The differentiation degree of cell was detected by oil red O staining after treated with 0—100 $\mu\text{mol/L}$ EPA. The cell was treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ for two days after the cell confluence, and then RNA was isolated. The expression of peroxisome proliferation activated receptors (*PPARs*), lipoprotein lipase (*LPL*) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (*PGC-1 α*) were detected by real-time PCR. The results showed that grass carp preadipocytes could reach confluence on seeding for six days in growth medium. The proliferation of preadipocytes was significantly promoted after EPA treatment with various levels for two days ($P < 0.05$), and the promotion effect disappeared at 3d. In comparison with the control group, intracellular lipid accumulation was significantly decreased at 1d following the addition of EPA ($P < 0.05$). At the same time, the mRNA level of *LPL* and *PGC-1 α* were also significantly elevated after treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ EPA for two days ($P < 0.05$), but there was no significant difference of the gene expression of *PPARs* observed between groups. It could be concluded that EPA enhanced the proliferation and inhibited the differentiation of grass carp preadipocytes. The suppression function of EPA on adipocytes differentiation and lipid accumulation might be related to its regulation on the expression of the lipid-metabolism-related genes, such as *PGC-1 α* and *LPL*.

Key words: Grass carp; Preadipocyte; EPA; Proliferation; Differentiation