

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.06.029

# PPAR $\alpha$ 在雅安藏茶水提物降脂活性中的功能研究

褚剑轲, 曾 茂, 陈晓芳, 李 瑞, 杜 倩, 王 丹, 郝军莉

(成都医学院生物科学与技术学院, 成都 610500)

**摘 要:** 为探讨雅安藏茶水提物调控 PPAR $\alpha$  水平及降脂的分子机制, 构建 pET32a-PTD-PPAR $\alpha$  原核重组载体, 表达具有进入细胞能力的 PTD-PPAR $\alpha$  融合蛋白, 利用肝细胞 L02 构建高脂细胞模型. SDS-PAGE 和 Western blotting 结果显示 PTD-PPAR $\alpha$  融合蛋白纯度及特异性较高, 能自由进入 L02 细胞并降低 L02 高脂细胞中脂类沉积. L02 高脂细胞模型经藏茶水提物处理 24 h, 油红 O 染色表明细胞脂类沉积显著降低, Western blotting 表明 PPAR $\alpha$  蛋白水平显著增加, 并具有浓度梯度依赖性. 结果表明: 藏茶水提物可能通过促进 PPAR $\alpha$  蛋白水平抑制脂类在细胞中沉积, 调控脂类代谢.

**关键词:** 藏茶水提物; 降脂活性; PTD-PPAR $\alpha$ ; 融合蛋白

**中图分类号:** Q493.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)06-1177-05

## Study on the function of PPAR $\alpha$ in the lipid-lowering activity of Ya'an Tibetan tea aqueous extract

CHU Jian-Ke, ZENG Mao, CHEN Xiao-Fang, LI Rui, DU Qian, WANG Dan, HAO Jun-Li  
(Department of Biological Sciences and Technology, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

**Abstract:** To explore the molecular mechanism of the regulation of PPAR $\alpha$  level and lipid-lowering in Tibetan tea aqueous extract, the prokaryotic recombinant vector pET32a-PTD-PPAR was constructed to express PTD-PPAR $\alpha$  fusion protein with cell-entering ability, and constructed of a high-lipid cell model using hepatocyte Lo2 cell line. SDS-PAGE and Western blotting results indicated that PTD-PPAR $\alpha$  fusion protein had a high purity and specificity, and it could enter L02 cells and reduce lipid deposition in L02 high-fat cells. The L02 high-fat cell model was treated with Tibetan tea aqueous extract for 24 h, lipid deposition analyzed by Oil red O staining showed that cell lipid deposition was significantly decreased; western blotting also showed PPAR $\alpha$  protein levels increased significantly with a concentration-dependent manner. In conclusion, the results showed that the aqueous extract of Tibetan tea may inhibit the deposition of lipids in cells by regulating the level of PPAR $\alpha$  protein and regulate lipid metabolism.

**Keywords:** Tibetan tea aqueous extract; Lipid-lowering activity; PTD-PPAR $\alpha$ ; Fusion protein

## 1 引 言

雅安藏茶属黑茶系, 具有降血压、降胆固醇、抗

氧化、降糖和抗炎等功效<sup>[1-2]</sup>, 是藏族日常饮用酥油茶的重要成分<sup>[3-4]</sup>. 茶叶中有 35%~45% 的物质是溶于沸水的, 称为水浸出物, 对脂代谢调控具有重

收稿日期: 2019-02-05

基金项目: 四川省教育厅项目(17ZA0102, 16ZA0287); 四川省卫生厅项目(16PJ103; 18PJ586); 国家大创项目(201513705009); 成都医学院科研创新团队项目(CYTD16-04)

作者简介: 褚剑轲(1997-), 男, 山东省乐陵市人, 专业方向为生物制药. E-mail: 947545652@qq.com

通讯作者: 郝军莉. E-mail: haojunli00@163.com

要作用<sup>[5]</sup>。但目前,雅安藏茶水提物的降脂机制尚不明确,探究雅安藏茶水提物的降脂分子机制,有利于高脂血症患者调整饮食,改善生活方式。PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)是核受体超家族成员,包括 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta/\delta$  和 PPAR $\gamma$ 。PPAR 通过与类视黄醇 X 受体形成异二聚体,与靶基因中的 PPAR 反应元件相互作用调节脂代谢相关基因表达<sup>[6]</sup>, PPAR $\alpha$  主要通过激活线粒体和过氧化物酶体中脂肪酸  $\beta$  氧化调节脂质转运和代谢过程<sup>[7]</sup>。本实验旨在分析雅安藏茶水提物降脂的分子机制,通过引入标签 PTD (protein transduction domain of trans-activator of transcription, PTD)<sup>[8]</sup>, 表达具有进入细胞能力的 PTD-PPAR $\alpha$  重组融合蛋白,为进一步体内、外研究 PPAR $\alpha$  在藏茶水提物降脂功能的关键作用奠定基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 菌株、细胞株和质粒 *E. coli* ER2566、

DH5 $\alpha$ 、肝细胞 L02 及原核表达载体 pET-32a 均由实验室保存。

2.1.2 试剂 限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶均购自 Fermentas 公司;高保真 Taq DNA 聚合酶、2000 bp DNA marker、质粒抽提试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自成都擎科梓熙生物技术有限公司;PVDF 膜购自 Millipore;兔抗鼠 PPAR $\alpha$  抗体(AF5301)、HRP 标记的羊抗兔二抗(bs-0295G-HRP)、ECL 化学发光底物均购自北京博奥森生物技术有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自康为世纪科技有限公司;DMEM 培养基、胎牛血清购自 GIBCO 公司;Trizol、反转录试剂盒购自 Takara 公司;油红 O 染液(细胞专用)购自索莱宝生物科技有限公司,油酸(01383)购自 Sigma 公司。

2.1.3 PCR 引物 根据小鼠 PPAR $\alpha$  基因序列设计 PCR 上、下游引物,PPAR $\alpha$ -F-2 下划线序列引入 PTD 标签,编码含 11 个氨基酸的多肽序列 YGRKKRRQRRR<sup>[8]</sup>,引物均合成于生工生物工程(上海)股份有限公司,引物序列如表 1 所示。

表 1 用于 PCR 扩增的引物序列

Tab. 1 Sequence of oligonucleotide primers used for PCR amplification

引物名称	引物序列(5'-3')	备注
PPAR $\alpha$ -F-1	CGGGATCCATGGTGGACACAGAGAGCC	
PPAR $\alpha$ -F-2	CGGGATCC TATGCGCGTGC GGCGGCGCGC TCAGGCGCGTGC GATGGTGGACACAGA	标黑为 <i>Bam</i> H I 酶切位点,下划线标注为 PTD 标签序列
PPAR $\alpha$ -R	CCGCTCGAGTCAGTACATGTCTCTGTAG ATCTCT	标黑为 <i>Xho</i> I 酶切位点

### 2.2 方法

2.2.1 藏茶水提物制备 称取雅安藏茶 5 g 打成粉,加入煮沸的蒸馏水 50 mL,水温为 90~100 °C,静置 30 s,过滤茶渣收集茶水;向茶渣中再次加入煮沸蒸馏水 50 mL,静置 30 s,重复 3 次,将 3 次收集的茶水混合,藏茶水提物浓度为 33.3 mg/mL,使用前用新鲜培养基稀释成工作浓度<sup>[9]</sup>。

2.2.2 两次 PCR 法获得 PTD-PPAR $\alpha$  基因 利用 Trizol 法从小鼠肝脏中提取总 RNA,反转录试剂盒反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板,利用 Taq DNA 聚合酶和第一对引物 PPAR $\alpha$ -F-1、PPAR $\alpha$ -R 进行常规 PCR 扩增,将扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,胶回收试剂盒回收。以胶回收产物为模板,利用 Taq DNA 聚合酶和第二对引物 PPAR $\alpha$ -F-2、PPAR $\alpha$ -R 进行第二次 PCR 扩增反

应,PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,胶回收试剂盒回收。

2.2.3 pET32a-PTD-PPAR $\alpha$  原核表达载体的构建及鉴定 将第二次 PCR 扩增产物和原核表达载体 PET32a 分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切,回收、连结,获得 pET32a-PTD-PPAR $\alpha$  重组表达载体,并对其进行双酶切和测序鉴定。

2.2.4 PTD-PPAR $\alpha$  融合蛋白的诱导表达 将重组质粒 pET32a-PTD-PPAR $\alpha$  转化 *E. coli* ER2566,37 °C,220 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> = 0.6,加入诱导剂 0.5 mmol/L IPTG 诱导 6 h,离心收集菌体,重悬于 PBS 后超声破碎(功率 200 W,工作 5 s,停止 5 s,共超声 10 min),4 °C 8000 r/min 离心 10 min 收集上清液,取样品进行 SDS-PAGE 电泳分析。

2.2.5 目的蛋白的纯化与鉴定 采用 Anti-His-

tag 亲和层析柱对 PTD-PPAR $\alpha$  融合蛋白进行纯化, 详见纯化试剂盒说明书, 通过 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度, SDS-PAGE 和 Western blotting 对纯化目的蛋白进行鉴定。

**2.2.6 Western blotting 检测** 将 6 孔板中的 L02 细胞去除培养基, PBS 洗 3 遍, 加入 100  $\mu$ L 细胞裂解液 RIPA, 冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 加入 SDS 电泳上样缓冲液混匀, 煮沸上样, 电泳 3 h 后通过电转移系统将凝胶中分离的蛋白转印(恒压 100 V, 50 min)到 PVDF 膜上. PVDF 膜在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h, PPAR $\alpha$  一抗经含 5% 脱脂奶粉的 TBST 按照 1:1 000 稀释, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 经 TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 用 1:2 000 稀释的 HRP 标记的兔抗小鼠二抗室温孵育 2 h, 最后按 ECL 发光试剂盒的操作说明, 曝光显影<sup>[10]</sup>。

**2.2.7 细胞中脂类含量检测** 将油酸(oleic acid,

OA) 预处理 L02 细胞 3 h, 加入不同浓度藏茶水提物继续处理 21 h, 经油红 O 染色, 200 倍显微镜下观察细胞染色结果; 将油红 O 染色的细胞经异丙醇处理, OD 490 nm 下检测细胞脂类吸收<sup>[11]</sup>。

### 3 结果与分析

#### 3.1 藏茶水提物抑制细胞脂类沉积

将生长状态良好的 L02 细胞铺入 6 孔板中, 12~18 h 细胞汇合度约 60%, 加入油酸 600  $\mu$ mol/L 预处理 3 h, 再加入不同浓度的藏茶水提物(0.166、0.332 和 1.66 mg/mL)处理 21 h, 经油红 O 染色, 200 倍显微镜下观察(图 1A), 油酸处理显著增加了细胞中脂类水平(脂类被油红 O 染为红色), 藏茶水提物不同浓度处理 L02 细胞, 细胞中脂类水平显著降低, 并具有浓度依赖性. 通过异丙醇处理油红 O 染色细胞, 在 OD 490 nm 处检测细胞中总脂类水平(图 1B), 结果与油红 O 染色一致。

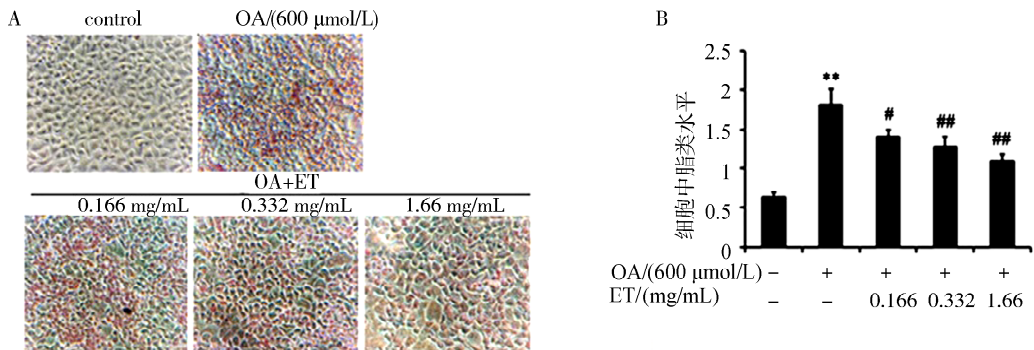


图 1 藏茶水提物的降脂效果分析

A: 200 $\times$ 显微镜观察 L02 油红 O 染色结果; B: A 中细胞经异丙醇处理后, OD490 nm 检测细胞总脂类水平. OA: 油酸; ET: 藏茶水提物.

\* 表示 OA 组 VS 空白对照组, \*\*  $P < 0.01$ ; # 表示油酸和藏茶水提物处理组 VS 油酸组, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

Fig. 1 Analysis of lipid-lowering effect of Tibetan tea aqueous extract

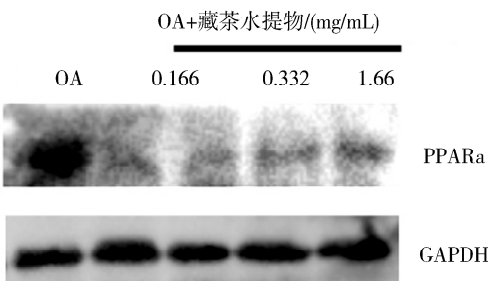


图 2 Western blotting 检测 PPAR $\alpha$  蛋白水平

Fig. 2 Detection of PPAR $\alpha$  protein levels by western blotting

#### 3.2 藏茶水提物促进 PPAR $\alpha$ 蛋白表达

将生长状态良好的 L02 细胞铺入 6 孔板中, 12~18 h 细胞汇合度约 60%. 加入油酸 600  $\mu$ mol/L 预处理 3 h, 再加入不同浓度的藏茶水提物(0.166、

0.332 和 1.66 mg/mL)处理 21 h, 收集细胞, Western blotting 检测细胞中 PPAR $\alpha$  蛋白水平(图 2), 结果显示油酸处理, 显著降低 L02 细胞中 PPAR $\alpha$  蛋白水平, 油酸联合藏茶水提物处理组较油酸单独处理组促进了 PPAR $\alpha$  蛋白水平, 并具有浓度依赖性。

#### 3.3 PTD-PPAR $\alpha$ 融合蛋白载体构建及表达

以小鼠 cDNA 为模板, 经第一次 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 产物大小约为 1400 bp, 与预期 PPAR $\alpha$  基因相符(图 3A). 利用胶回收产物为模板, 进行第二次 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的条带, 回收产物和 pET-32a 分别用 BamH I、Xho I 双酶切, 构建 pET32a-PTD-PPAR $\alpha$  原核表达载体, 并进行双酶切 BamH I、

*Xho*I 验证,1%琼脂糖凝胶电泳检测出现 2 条大小约为 6 000 bp 和 1 400 bp DNA 条带,分别为 PET32a 载体和 PTD-PPAR $\alpha$  基因片段,同预期分子量相符合(图 3B). 将 pET32a-PTD-PPAR $\alpha$  重组载体转入大肠杆菌表达菌株 ER2566 中,加入 0.5 mM IPTG 诱导 6 h(37 °C, 220 r/min),收集菌体进行超声破碎,SDS-PAGE 检测融合蛋白 PTD-PPAR $\alpha$  位于超声上清和沉淀中,分子量约为 58 kD,同预期分子量相符合,如图 3C 所示.

### 3.4 PTD-PPAR $\alpha$ 融合蛋白的纯化和鉴定

超声破碎上清液经镍柱亲和层析后,4 °C PBS 透析 3 次,每次 1 h,除去洗脱液中咪唑. 经超滤浓缩,取样进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 鉴定,纯化的目的蛋白在胶片上出现 1 条分子量为 58 kD 的蛋白条带,条带位置同预期分子量大小基

本相同(图 3C). 为进一步分析 PTD-PPAR $\alpha$  融合蛋白是否可以进入细胞,将纯化的 PTD-PPAR $\alpha$  融合蛋白按照 2  $\mu$ g/mL 和 5  $\mu$ g/mL 处理 L02 细胞,24 h 后裂解细胞,通过 Western blotting 检测 PPAR $\alpha$  蛋白水平,随着 PTD-PPAR $\alpha$  融合蛋白处理细胞浓度增加,进入细胞中的 PPAR $\alpha$  蛋白水平显著增加(图 3D).

### 3.5 PTD-PPAR $\alpha$ 融合蛋白的降脂活性测定

L02 细胞经 600  $\mu$ mol/L OA 处理 3 h,PTD-PPAR $\alpha$  融合蛋白按照 2  $\mu$ g/mL 和 5  $\mu$ g/mL 浓度梯度处理 21 h,经油红 O 染色,200 倍显微镜观察细胞脂类水平(图 4A),并定量分析细胞中脂类含量(图 4B),PTD-PPAR $\alpha$  融合蛋白处理显著改善了细胞中脂类沉积,并具有剂量依赖性.

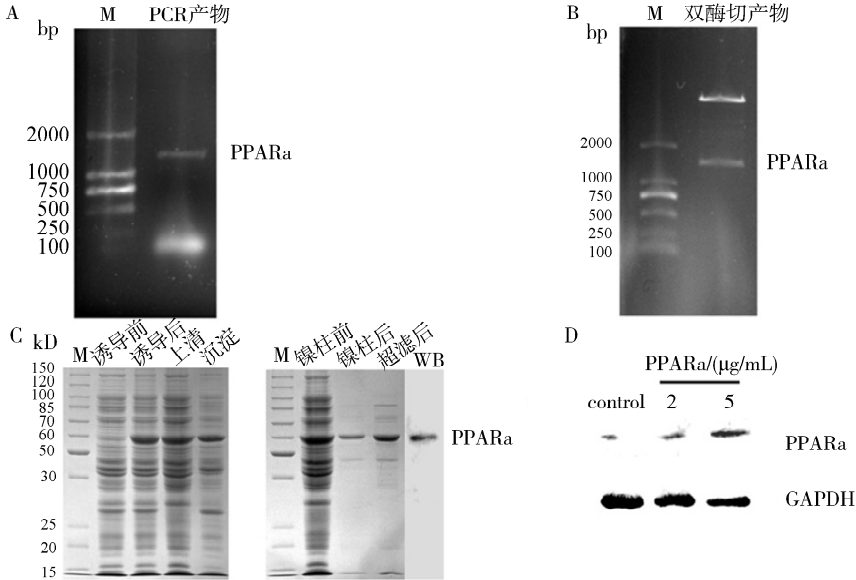


图 3 PTD-PPAR $\alpha$  融合蛋白的纯化、表达及鉴定

A:1%琼脂糖凝胶电泳分析第二次 PCR 产物, M:Marker 2 000 bp; B:1%琼脂糖凝胶电泳分析重组载体双酶切产物, M:Marker 2 000 bp; C:SDS-PAGE 分析融合蛋白 PTD-PPAR $\alpha$  表达及纯化蛋白的 Western blotting 鉴定; D:不同浓度的 PTD-PPAR $\alpha$  融合蛋白进入细胞的 Western blotting 检测.

Fig. 3 Purification, expression and identification of PTD-PPAR $\alpha$  fusion protein

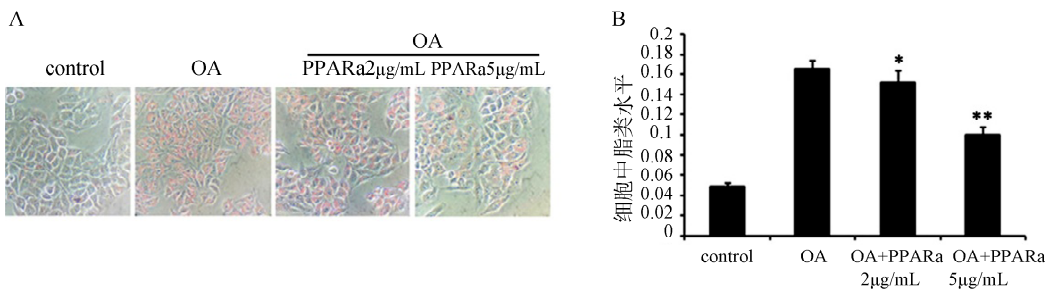


图 4 PTD-PPAR $\alpha$  融合蛋白的降脂活性

A: 200 倍显微镜观察油红 O 染色结果. B: A 中细胞经异丙醇处理后,OD 490 nm 检测细胞总脂类水平, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Fig. 4 Lipid-lowering activity analysis of PTD-PPAR $\alpha$  fusion protein

## 4 结 语

本研究发现雅安藏茶水提物能有效降低细胞脂类沉积,显著促进核受体 PPAR $\alpha$  蛋白水平,经两次 PCR 技术构建了 pET32a-PTD-PPAR $\alpha$  重组载体,采用大肠杆菌表达系统,经镍柱亲和层析、透析和超滤获得较高浓度和纯度的 PTD-PPAR $\alpha$  融合蛋白,经过截留相对分子质量为 10 kDa 膜进行超滤浓缩,目的蛋白纯度高达 95%,并通过 Western blotting 鉴定目的蛋白的特异性.融合蛋白 PTD-PPAR $\alpha$  在 N 端带有 11 个氨基酸的多肽,能自由进入细胞,经 Western blotting 检测,该融合蛋白具有进入细胞的能力,有效降低细胞中脂类水平,改善脂类沉积,并具有显著的剂量依赖性.

本实验通过油酸处理建立了细胞高脂模型,证明了藏茶水提物可能通过调控核受体 PPAR $\alpha$  水平,促进细胞中脂类分解,抑制脂类沉积和细胞总脂类水平,为进一步探究 PPAR $\alpha$  在雅安藏茶水提物降脂活性研究中的分子机制奠定基础.

### 参考文献:

- [1] Heber D,Zhang Y, Yang J P,*et al.* Green tea, black tea, and oolong tea polyphenols reduce visceral fat and inflammation in mice fed high-fat, high-sucrose obesogenic diets [J]. *J Nutr*, 2014, 144: 1385.
- [2] Pan H B,Gao Y,Tu Y Y,*et al.* Mechanisms of body weight reduction by black tea polyphenols [J]. *Molecules*, 2016, 21: 1659.
- [3] Liang Z,Zhang Z,Zhou Y,*et al.* Chinese dark teas;

- postfermentation, chemistry and biological activities [J]. *Food Res Int*, 2013, 53: 600.
- [4] Singh B N,Prateeksha,Rawat A K S,*et al.* Black tea: phytochemicals, cancer chemoprevention, and clinical studies [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57: 1394.
- [5] 甘甜,邓岳,聂远洋,等.雅安藏茶贮藏过程中滋味和风味成分的变化[J]. *中国测试*, 2017, 43: 50.
- [6] Blitek A,Szymanska M. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms are differentially expressed in peri-implantation porcine conceptuses [J]. *Theriogenology*, 2017, 101: 53.
- [7] Brocker C N,Patel D P,Velenosi T J,*et al.* Extrahepatic PPAR $\alpha$  modulates fatty acid oxidation and attenuates fasting-induced hepatosteatosis in mice [J]. *J Lipid Res*, 2018, 59: 2140.
- [8] Chu X,Wu B,Fan H,*et al.* PTD-fused p53 as a potential antiviral agent directly suppresses HBV transcription and expression[J]. *Antiviral Res*, 2016, 127: 41.
- [9] 唐皓迪,颜同文,罗晓琳,等.雅安藏茶水提物的降脂活性研究[J]. *中国测试*, 2018, 2: 62.
- [10] Hao J L,Yang M,Tao L,*et al.* The negative feedback loop of miR-122 and c-myc in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2016, 9: 5191.
- [11] Yeh Y T,Cho Y Y,Hsieh S C,*et al.* Chinese olive extract ameliorates hepatic lipid accumulation in vitro and in vivo by regulating lipid metabolism [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 1057.

### 引用本文格式:

中文:褚剑轲,曾茂,陈晓芳,等. PPAR $\alpha$ 在雅安藏茶水提物降脂活性中的功能研究[J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2019, 56: 1177.

英文:Chu J K,Zeng M,Chen X F,*et al.* Study on the function of PPAR $\alpha$  in the lipid-lowering activity of Ya'an Tibetan tea aqueous extract [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2019, 56: 1177.