



河南师范大学

NENAN NORMAL UNIVERSITY

# 读书报告

汇报人 于若梦

日期 2018.7.21

# 目录

## CONTENTS

1 研究背景

2 材料与方法

3 结果

4 结论与思考



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

## General and Comparative Endocrinology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ygcn](http://www.elsevier.com/locate/ygcn)



Research paper

**IF: 2.564**

Docosahexaenoic acid induces PPAR $\gamma$ -dependent preadipocytes apoptosis in grass carp *Ctenopharyngodon idella*

Ai Jin, Xiao-chen Shi, Yangyang Liu, Jian Sun, Hong Ji\*

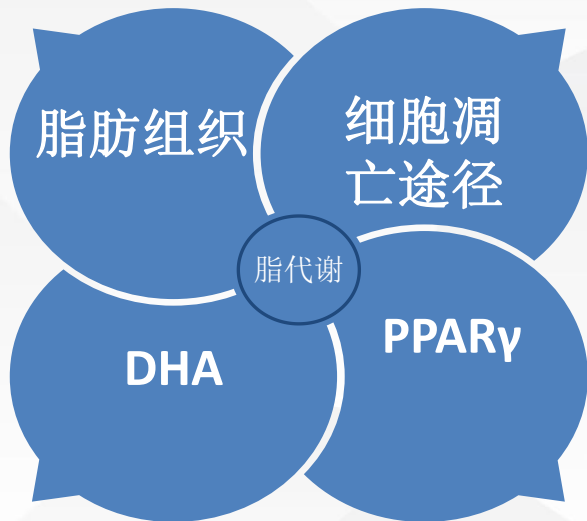
College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, PR China

在草鱼前脂肪细胞中，DHA可通过PPAR- $\gamma$ 诱导细胞凋亡

## 研究背景

由白色脂肪细胞组成，功能是储存甘油三酯；

研究结果显示DHA可抑制脂质沉积；



外源性  
内源性

脂肪细胞中高表达，对脂代谢有重大影响。

本文用DHA对草鱼前脂肪细胞进行体外处理，目的是研究DHA诱导脂肪细胞凋亡的潜在作用和机制。

## 研究背景-前脂肪细胞

- 前细胞即前脂肪细胞，或称脂肪间充质干细胞 (Mesenchymal adipose cell precursors ADSCs)，由Hausberger在1955年提出。其体积小，分化程度低，对创伤和缺氧的耐受力比成熟脂肪细胞好。前细胞与其他成体干细胞一样，具有自我更新、活力持久及多向分化潜能。
- 其体积小，分化程度低，对创伤和缺氧的耐受力比成熟脂肪细胞好。前细胞与其他成体干细胞一样，具有自我更新、活力持久及多向分化潜能。

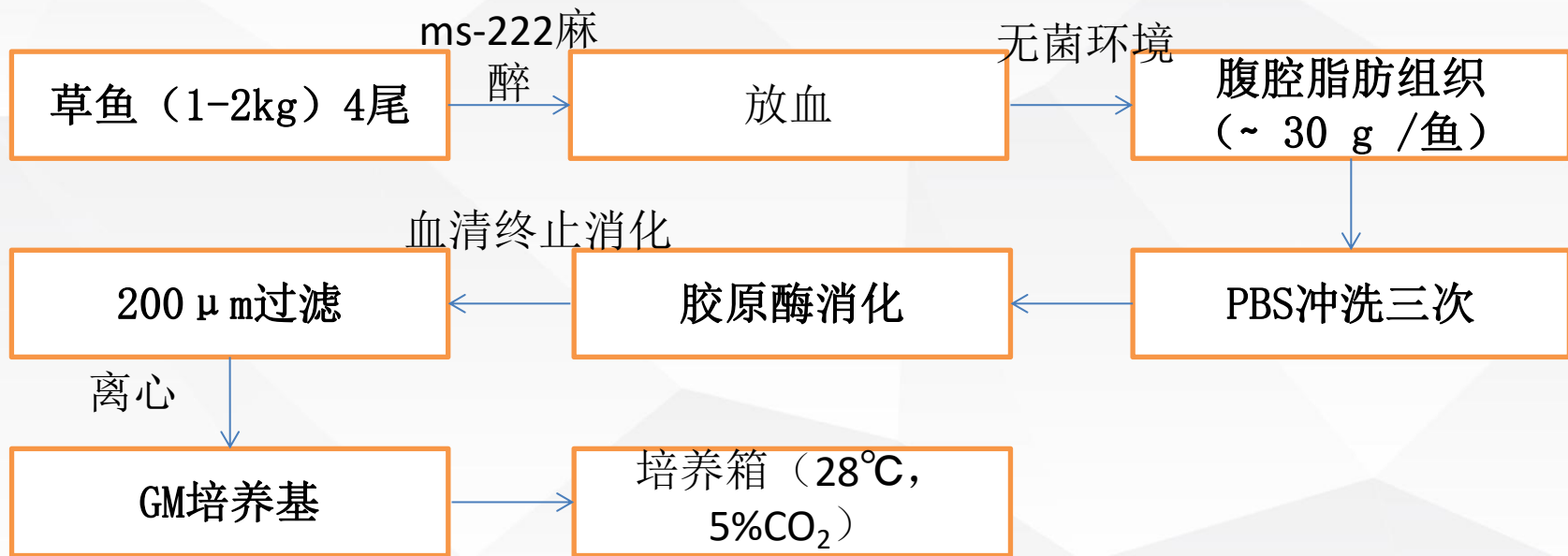
## 研究背景-Caspase家族

- Caspase全称为含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinylyl aspartate specific proteinase)。caspase是一组存在于细胞质中具有类似结构的蛋白酶。Caspase与真核细胞凋亡密切相关，并参与细胞的生长、分化与凋亡调节。
- 其中，caspase 1和caspase 11，以及可能还有caspase 4被认为不直接参与凋亡信号的转导，它们主要参与白介素前体的活化；而caspase 2，caspase 8，caspase 9和caspase 10参与细胞凋亡的起始；参与细胞凋亡执行的则是caspase 3，caspase 6和caspase 7，它们降解PARP，DFF-45（DNA fragmentation factor-45），导致DNA修复的抑制并启动DNA的降解。

## 材料与方法

- ◆ 试剂
- ◆ 实验动物
- ◆ 草鱼前脂肪细胞制备
- ◆ 细胞活性检测
- ◆ 细胞凋亡检测
- ◆ qPCR
- ◆ Western blot
- ◆ caspases 3, 8, and 9活性检测
- ◆ 数据分析

## 材料与方法-细胞制备



注：GM，含有DMEM，10%胎牛血清(FBS)，100 U/mL青霉素，100 U/mL链霉素。



## 材料与amp;方法-/细胞凋亡检查

### ◆ 细胞活性检测

Cell Counting Kit-8（CCK-8试剂盒）：是由日本同仁化学研究所（Dojindo）开发的检测细胞增殖、细胞毒性的试剂盒。

### ◆ 细胞凋亡检测

Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒：本试剂盒用于检测细胞凋亡早期的发生，其中Annexin V为胞内蛋白膜联蛋白家族成员，以钙离子依赖的方式选择性与磷脂酰丝氨酸(PS)结合。碘化丙啶（Propidium Iodide, PI）是一种可对DNA染色的细胞核染色试剂，在嵌入DNA后释放红色荧光。PI不能穿透完整的细胞膜，但可以穿透坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞。因此，将Annexin V与PI联合使用时，PI被排除在活细胞（Annexin V-/PI-）和早期凋亡细胞（Annexin V+/PI-）外，而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被FITC和PI结合染色呈现双阳性（Annexin V+/PI+）。

## 结果

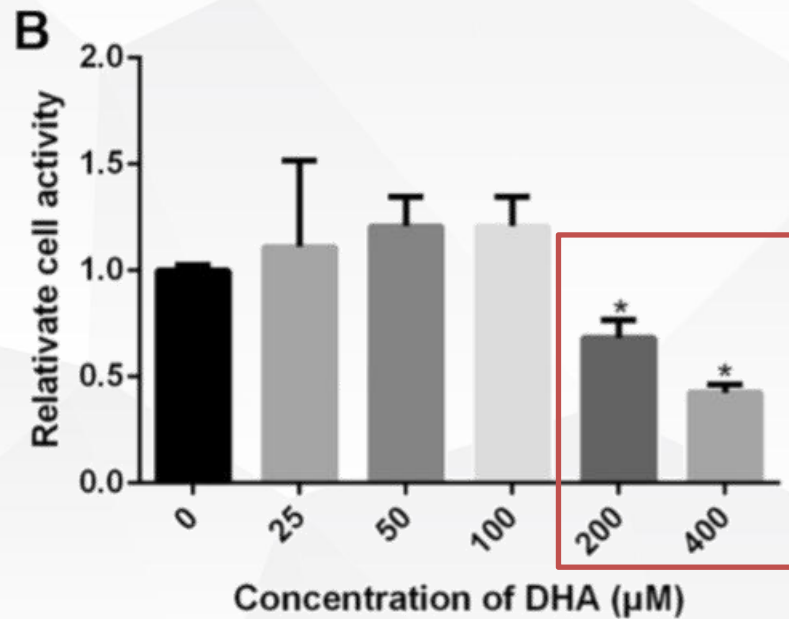
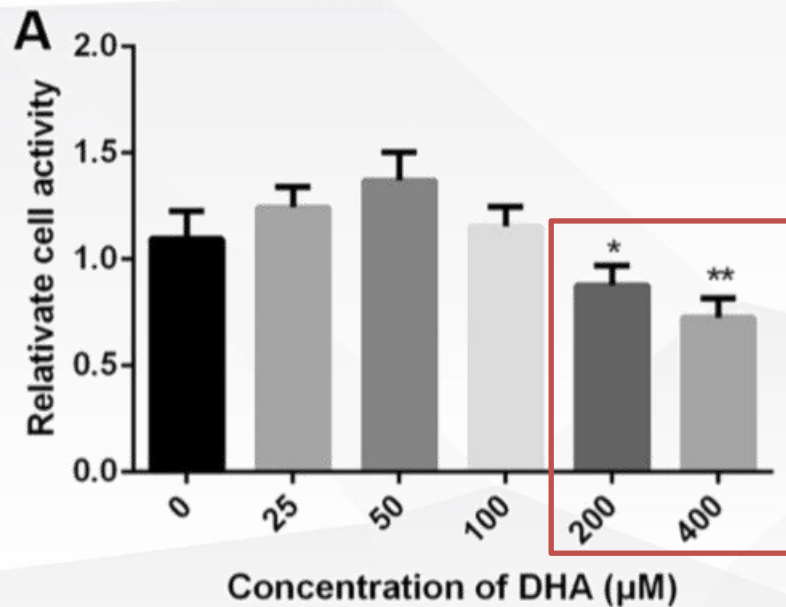
表 1.用于qPCR的引物

**Table 1**  
Primers used in real-time quantitative PCR.

Target gene	Accession number	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	PCR product (bp)
B-cell leukaemia 2 (Bcl-2)	JQ713862	AGATGGCGTCCCAGGTAGATAA	AGTCTCTCTGCTGACCGTACAA	129
Bcl-2-associated X protein (Bax)	JQ793788	GGAGATGAGCTGGATGGA	CACGCAAAGTAGAAAA	157
Peroxisome proliferator activated receptor $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )	EU847421	GCATCTGTACGAGTCCTATCT	GAGACTTCATGTCGTGGATAAC	116
$\beta$ -actin	M25013.1	TCCACCTCCAGCAGATGTGGATT	AGTTTGAGTCGGCGTGAAGTGGTA	115
Caspase-3a	KP145001	CTGATGGGGCATCTGGACTG	GTTGGTTCATGCCTGTCGTG	147
Caspase-3b	KP14500	GGAGGATCACAGTCAGTCG	GGAACAGTGCCTTCAGCT	107
Caspase-8	KP145003.1	GACTAGAAGAGCAAGCACTG	TGTA CTCCGGAGACACCTTTA	162
Caspase-9	KT239368.1	GGGATAGATGACCAGATGGA	TGTCCCTCCAAGAGACATAG	154

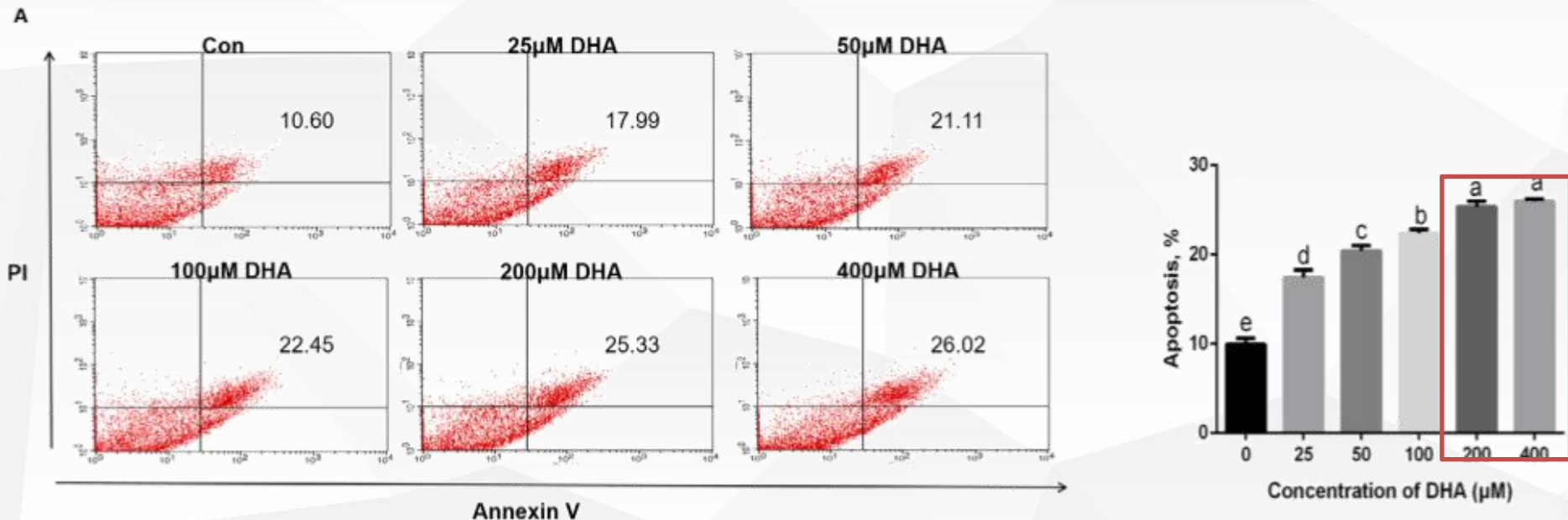
# 结果

图 1.检测细胞活力



## 结果

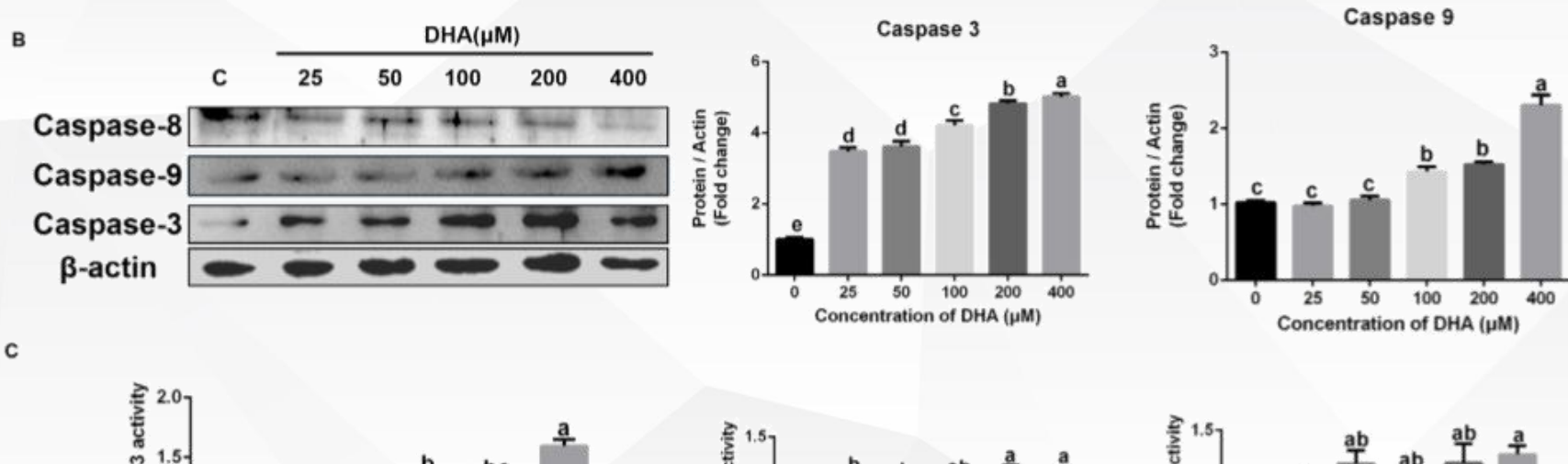
图 2.在草鱼中，DHA诱导前脂肪细胞凋亡



与对照组相比，DHA处理组显著增加细胞凋亡率，且剂量越高凋亡率越高( $P < 0.05$ )。

## 结果

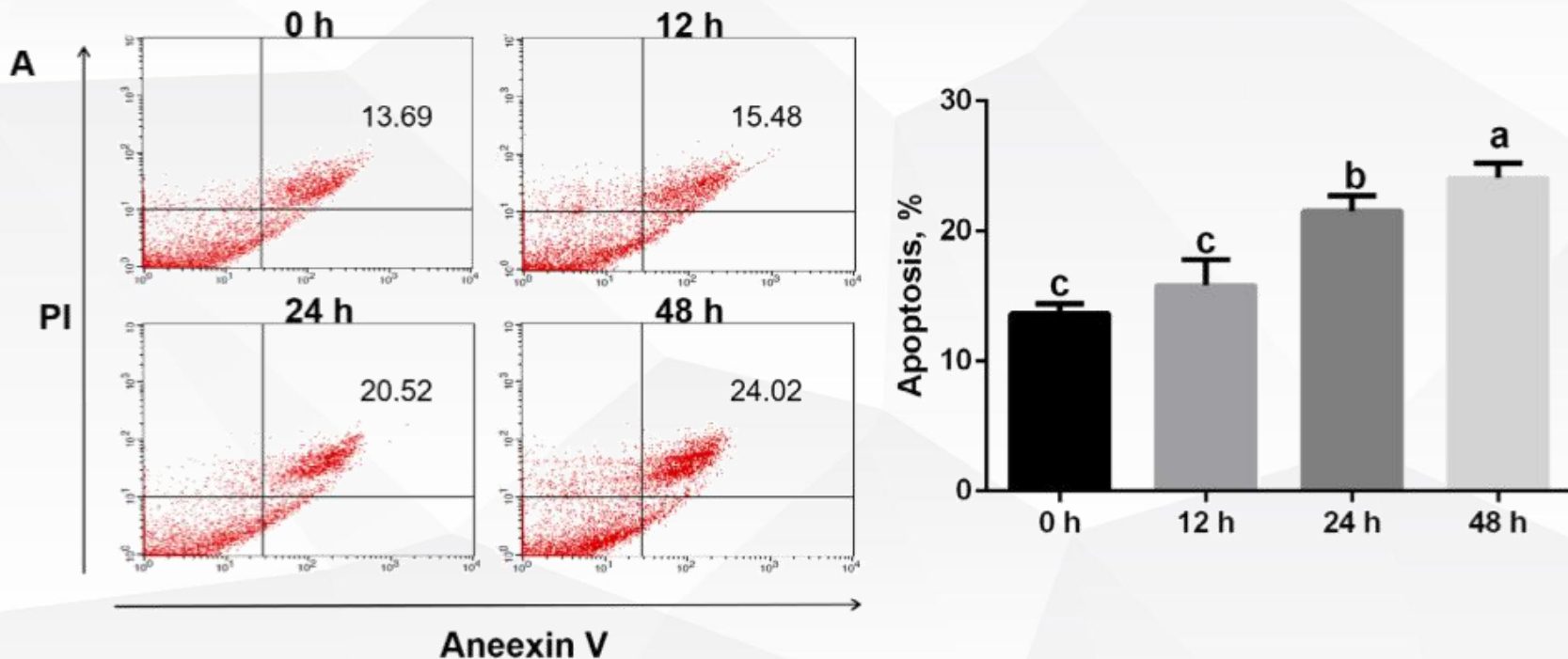
图 2.在草鱼中，DHA诱导前脂肪细胞凋亡



DHA还能显著提高酶蛋白水平，尤其是caspase 3和caspase 9( $P < 0.05$ )，但对caspase 8蛋白表达的thelevel无显著影响。此外，在DHA组中，caspase 3、caspase 8和caspase 9的酶活性显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

## 结果

图3.时间与DHA诱导细胞凋亡的关系

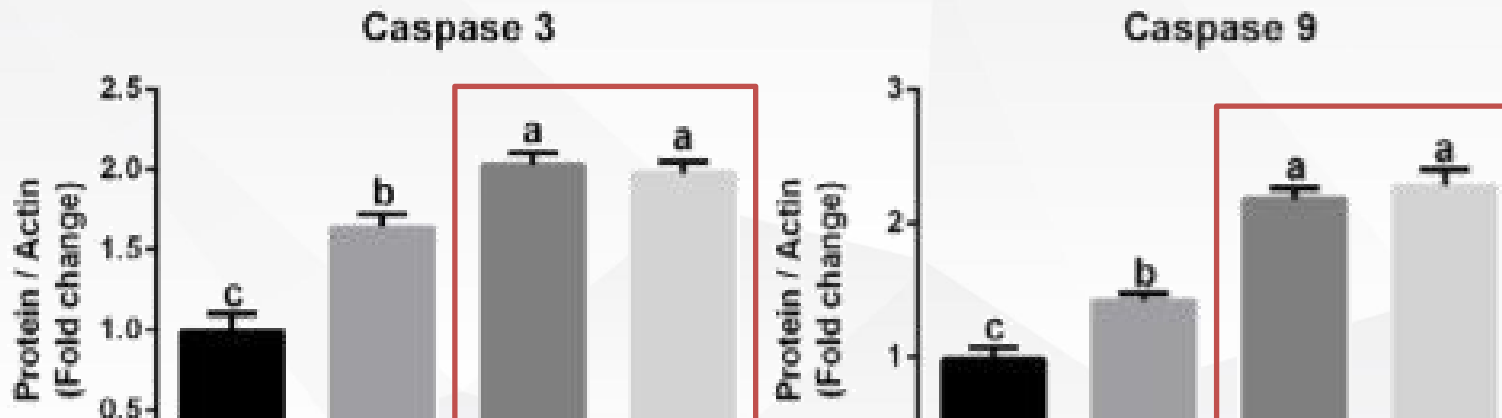
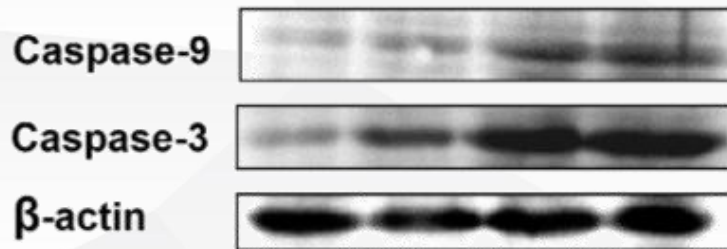


200 $\mu$ m DHA处理的细胞凋亡率明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

## 结果

图3.时间与DHA诱导细胞凋亡的关系

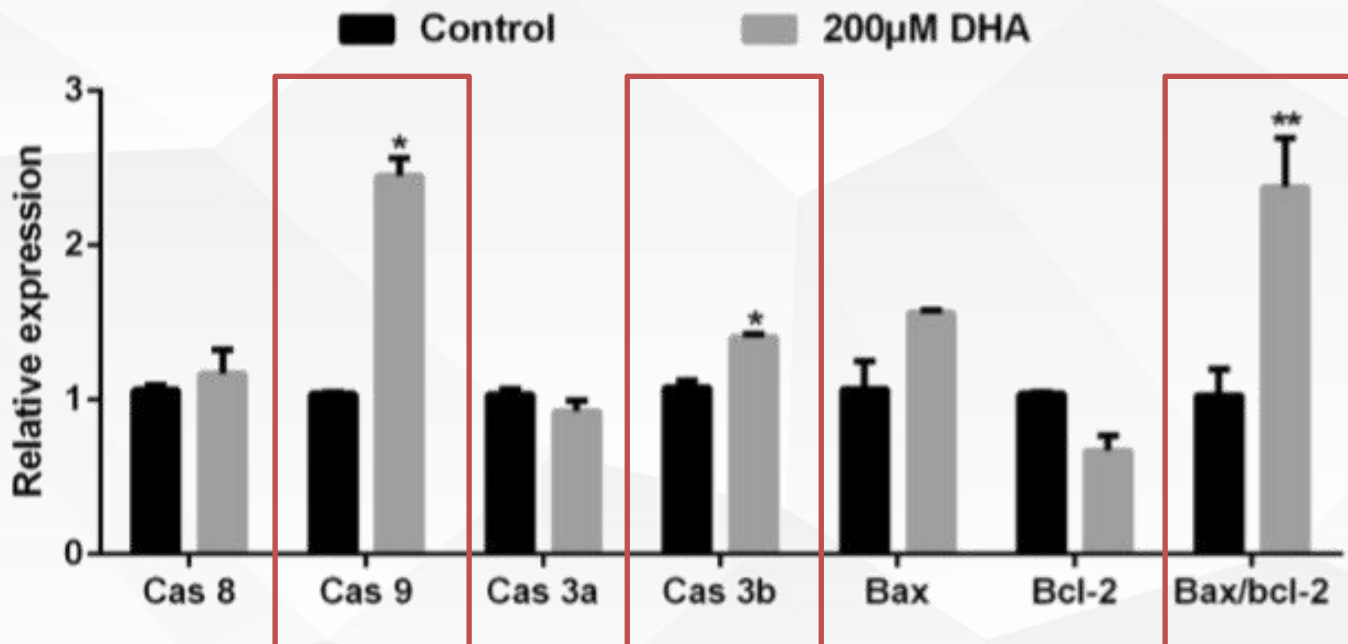
B



基于以上结果，我们选择了200 $\mu$ m DHA浓度，24小时的时间点进行下一步的实验。

## 结果

图 4.相关的mRNA表达水平



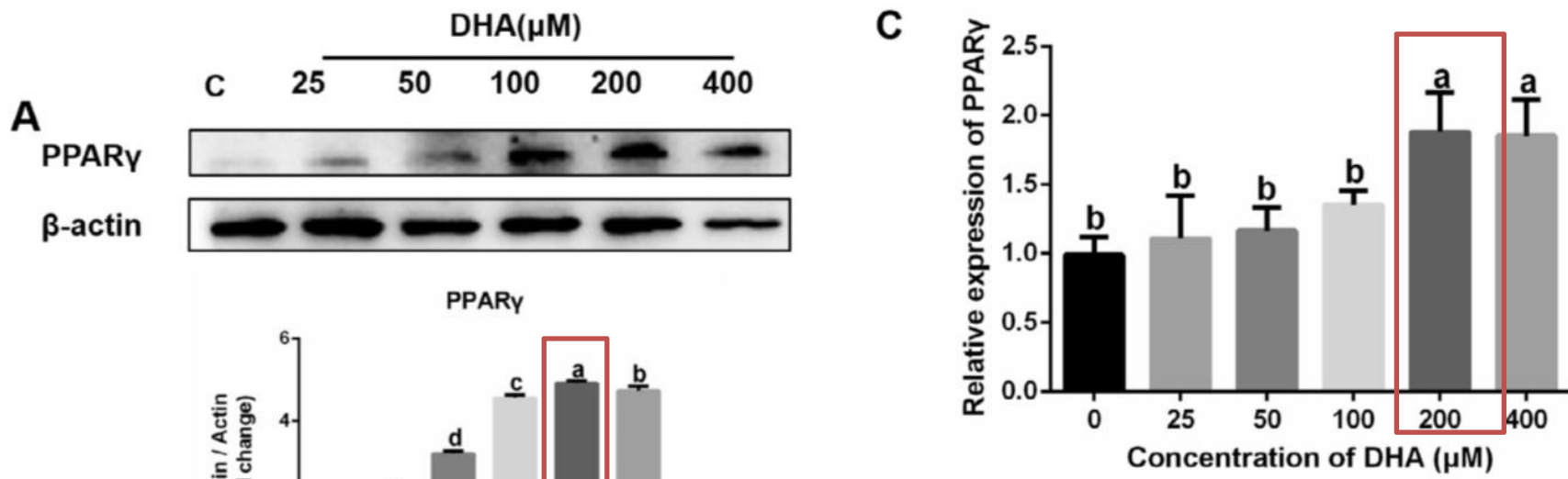
DHA能提高草鱼前脂肪细胞中caspase 3b/9的mRNA表达水平和Bax和Bcl-2的比值。

DHA是否能激活草鱼前脂肪细胞中的PPAR $\gamma$ ?



## 结果

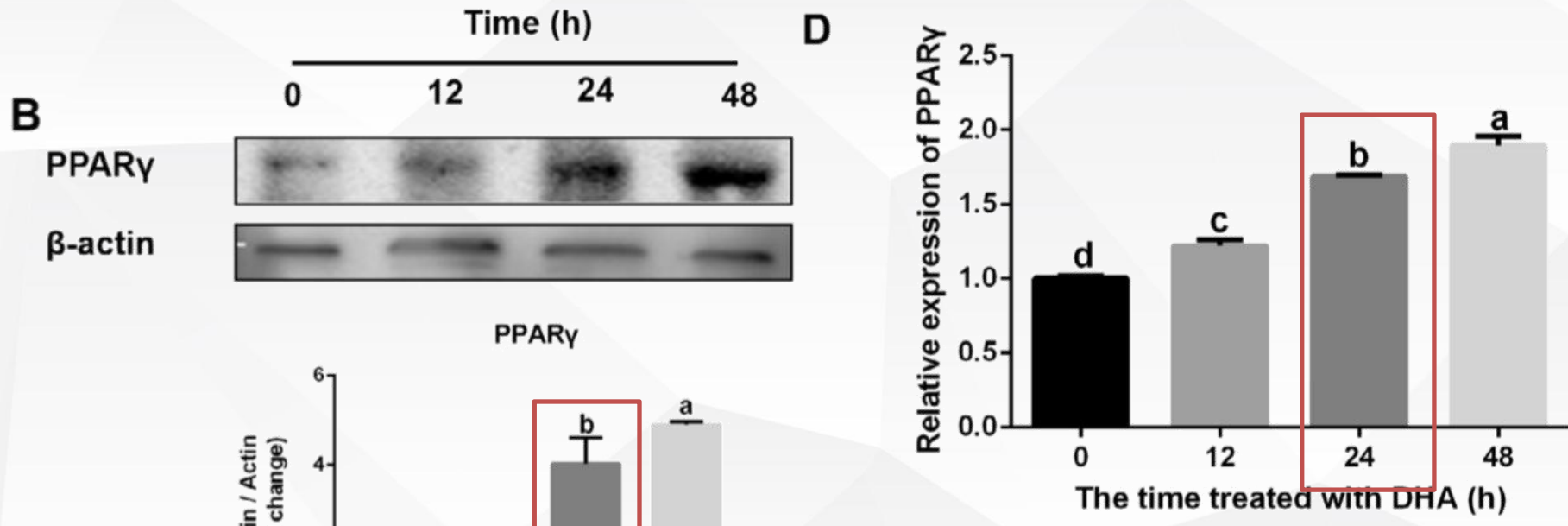
图 5.PPAR $\gamma$ 在草鱼前脂肪细胞中的表达分析



DHA诱导草鱼前脂肪细胞，其中PPAR $\gamma$ 蛋白和mRNA水平随着剂量增加而增加，在200 $\mu$ m时达到最大，PPAR $\gamma$ 表达增加4倍（ $P < 0.05$ ）。

## 结果

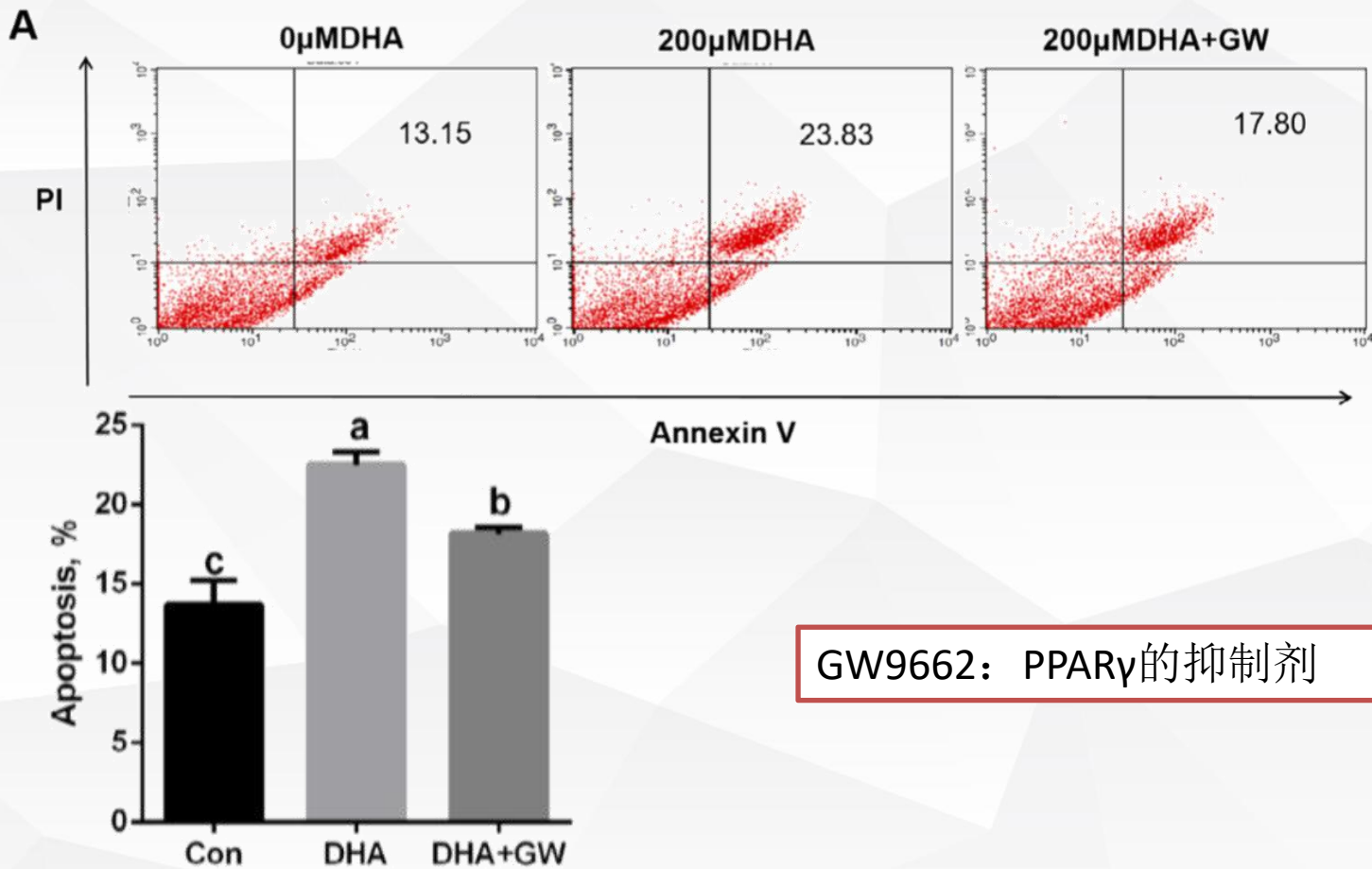
图 5.PPAR $\gamma$ 在草鱼前脂肪细胞中的表达分析



DHA促进PPAR $\gamma$ 的表达，在24h达到高峰（ $P < 0.05$ ），表明DHA以剂量和时间的方式上调草鱼前体细胞PPAR $\gamma$ 的表达。

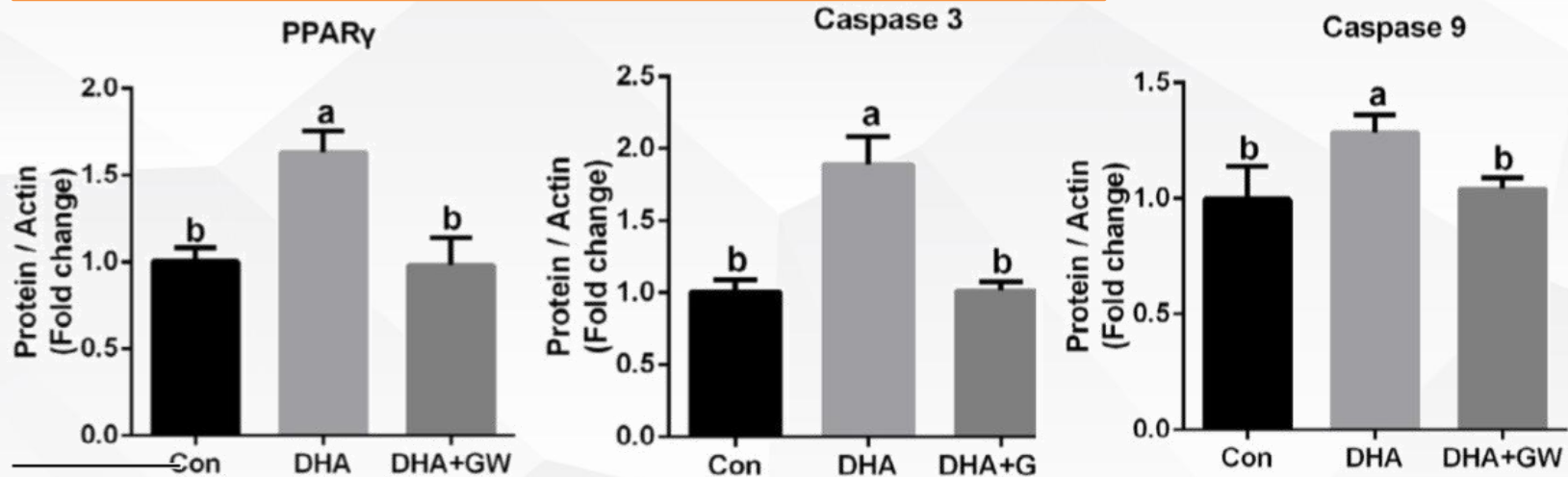
## 结果

图 6.DHA通过PPAR $\gamma$ 促进草鱼前脂肪细胞凋亡

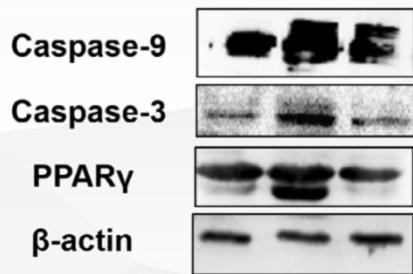


## 结果

图 6.DHA通过PPAR $\gamma$ 促进草鱼前脂肪细胞凋亡



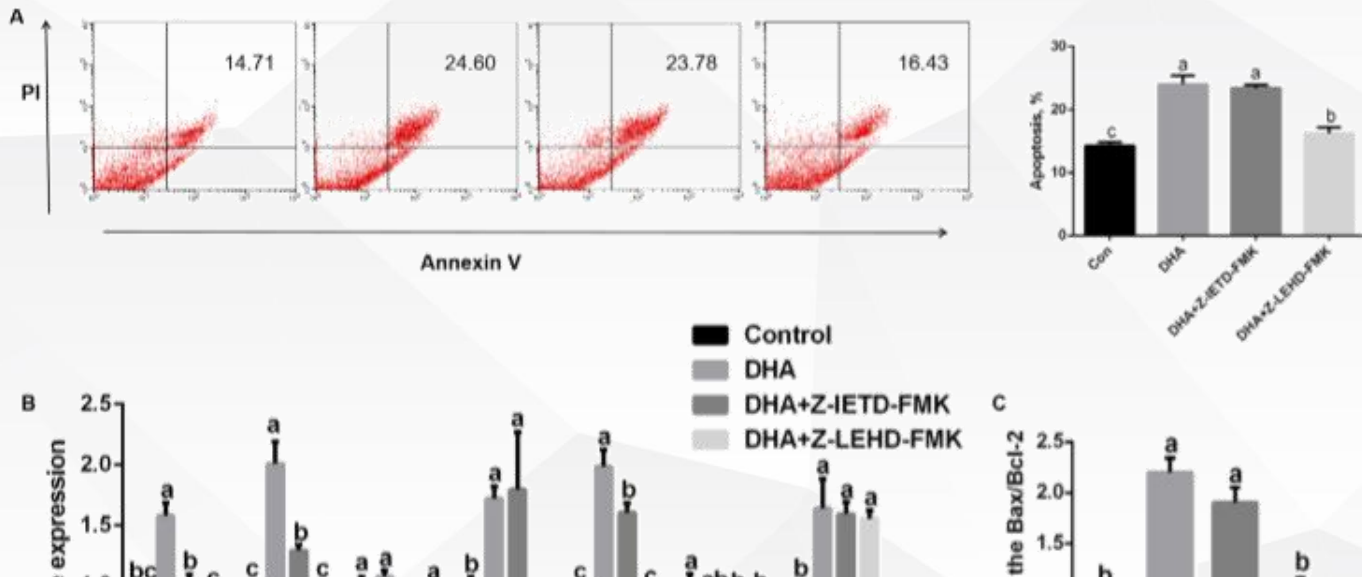
DHA    -    +    +  
GW    -    -    +



DHA显著增加PPAR $\gamma$ 基因和caspase 3和caspase 9的mRNA和蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ )；而添加GW9662则显著减弱了这些作用 ( $P < 0.05$ )。这表明PPAR $\gamma$ 在DHA诱导细胞凋亡的过程中起关键作用。

## 结果

图7.Caspase 8抑制剂Z-IETD-FMK和Caspase 9抑制剂Z-LeHD-FMK对DHA诱导草鱼前脂肪细胞凋亡的影响



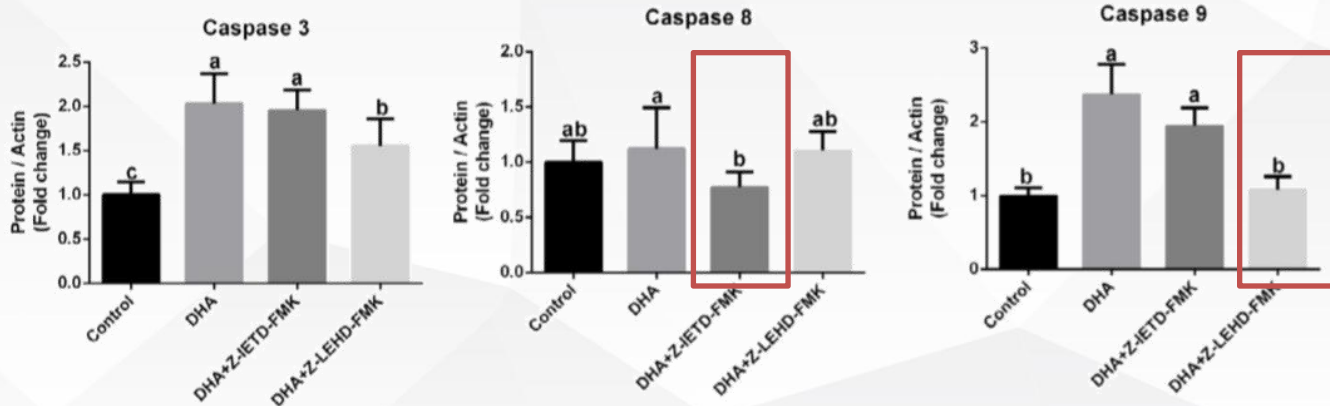
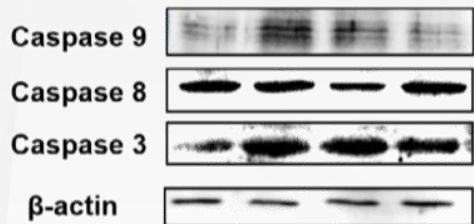
从细胞凋亡率、凋亡相关蛋白的mRNA水平和蛋白表达水平（如caspase 3、caspase 9）可以看出，与对照组相比，DHA显著促进草鱼前脂肪细胞凋亡（ $P < 0.05$ ）

## 结果

图7.Caspase 8抑制剂Z-IETD FMK和Caspase 9抑制剂Z-LeHD-FMK对DHA诱导草鱼前脂肪细胞凋亡的影响

C

DHA	-	+	+	+
Z-IETD-FMK	-	-	+	-
Z-LEHD-FMK	-	-	-	+



用Caspase 9抑制剂Z-LeHD-FMK预处理可阻断DHA引起的细胞凋亡 ( $P < 0.05$ )。然而, caspase 8抑制剂Z-IETD FMK对DHA诱导的细胞凋亡没有明显的抑制作用 ( $P > 0.05$ )。



### 结论与展望

01

DHA可通过调节剂量和时间方式诱导草鱼前脂肪细胞凋亡。DHA也可能激活PPAR $\gamma$ ，通过内在途径导致细胞凋亡。

02

草鱼前脂肪细胞中PPAR $\gamma$ 激活介导DHA对细胞凋亡的调节作用。

03

PPAR $\gamma$ 调控DHA诱导草鱼前脂肪细胞内源性凋亡的机制可能需要进一步探索。



河南师范大学

NENAN NORMAL UNIVERSITY

# THANKS

---

敬请各位老师同学批评指正

---