

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01181

3'-羟基染料木素对 3T3-L1 细胞增殖与分化的影响及其机制

陈莉^{1,2*}, 桑灏², 李觉²

1. 上海市徐汇区中心医院药械科, 上海 200031
2. 同济大学医学院预防医学教研室, 上海 200092

[摘要] **目的** 探讨 3'-羟基染料木素对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖、分化的影响及其机制。**方法** 培养 3T3-L1 细胞, 用 3'-羟基染料木素干预, 用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法和细胞计数法检测其对细胞增殖的影响, 用 5-溴脱氧尿嘧啶 (bromodeoxyuridine, BrdU) 掺入法检测其对前脂肪细胞内 DNA 合成的影响; 用油红 O 染色法检测其对前脂肪细胞分化过程中脂质的堆积的影响; 采用 RT-PCR 和蛋白免疫印迹技术检测过氧化物酶体增殖子活化受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ) 和 CAAT/增强子结合蛋白 α (CAAT/enhancer binding protein α , C/EBP α) 的 mRNA 以及蛋白的表达情况。**结果** 用 10~50 $\mu\text{mol/L}$ 3'-羟基染料木素分别处理前脂肪细胞 24、48 和 72 h, 能促进前脂肪细胞增殖 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈一定的量效关系; 3'-羟基染料木素能浓度依赖性地促进前脂肪细胞内 DNA 合成 ($P < 0.05$); 3'-羟基染料木素与噻唑烷二酮类药物罗格列酮 (rosiglitazone, ROZ) 相似, 在 10 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下能使前脂肪细胞的胞浆中出现大量的脂滴 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 3'-羟基染料木素处理组中 PPAR γ 和 C/EBP α 的 mRNA 与蛋白的表达增加 ($P < 0.01$)。**结论** 3'-羟基染料木素能够促进前脂肪细胞的增殖与分化, 增加脂肪细胞分化过程中脂质的堆积, 其机制可能与其促进 PPAR γ 和 C/EBP α 的 mRNA 与蛋白表达有关。

[关键词] 3'-羟基染料木素; 前脂肪细胞; 细胞增殖; 细胞分化; PPAR γ

[中图分类号] R 587 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)11-1181-05

Effects of 3'-hydroxygenistein on proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and the underlying mechanisms

CHEN Li^{1,2*}, SANG Hao², LI Jue²

1. Department of Pharmacy, Central Hospital of Xuhui District, Shanghai 200031, China
2. Department of Preventive Medicine, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200092, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of 3'-hydroxygenistein on the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and to elucidate the related mechanism. **Methods** 3T3-L1 preadipocytes were cultured and treated with different dosages of 3'-hydroxygenistein. Cell proliferation was analyzed by counting cell numbers and MTT assay; DNA synthesis of 3T3-L1 was investigated by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay; the degree of preadipocytes differentiation was evaluated by Oil red O staining; and the expressions of peroxisome proliferation activated receptor γ (PPAR γ) and CAAT/enhancer binding protein (C/EBP α) were detected at mRNA and protein level by real-time PCR and Western blotting analysis, respectively. **Results** Pretreatment with 3'-hydroxygenistein (10-50 $\mu\text{mol/L}$) for 24, 48 and 72 h markedly promoted 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation in a dose-effect manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). It also significantly facilitated the DNA synthesis in 3T3-L1 preadipocytes in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Similar to rosiglitazone (ROZ), 3'-hydroxygenistein (at 10 or 50 $\mu\text{mol/L}$) also resulted in more lipid droplets in 3T3-L1 preadipocytes ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Furthermore, 3'-hydroxygenistein greatly increased the mRNA and protein expression of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 preadipocytes ($P < 0.01$). **Conclusion** 3'-hydroxygenistein can promote the proliferation and DNA synthesis of 3T3-L1 preadipocytes; it can also enhance the accumulation of lipid drops and increase the terminal differentiation of preadipocytes, which might be associated with its ability to increase the expression of PPAR γ and C/EBP α .

[Key words] 3'-hydroxygenistein; preadipocyte; cell proliferation; cell differentiation; PPAR gamma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(11): 1181-1185]

[收稿日期] 2011-06-21 **[接受日期]** 2011-10-18

[基金项目] 上海市卫生局青年科研基金(2009Y069). Supported by Youth Foundation of Shanghai Public Health Bureau(2009Y069).

[作者简介] 陈莉, 博士, 讲师、药师.

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31270810, E-mail: mychenli@hotmail.com

胰岛素抵抗是肥胖和2型糖尿病的共同发病基础,在治疗肥胖、糖尿病等代谢疾病时严密监控脂肪细胞的增殖分化过程具有重要意义^[1]。据文献报道,过氧化物酶体增殖子活化受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ)和CAAT/增强子结合蛋白 α (CAAT/enhancer binding protein α , C/EBP α)在前脂肪细胞分化过程中起着十分关键的作用^[2]。分布于脂肪组织中的PPAR γ 能调节脂肪细胞的分化及对胰岛素敏感性^[3]。目前已开发出的噻唑烷二酮类(thiazolidinediones, TZDs)药物就是以PPAR γ 为作用靶点。TZDs能够增加PPAR γ 和C/EBP α 的表达,进而促进脂肪细胞分化及增加成熟脂肪细胞对胰岛素的敏感度,因此可逆转多种与胰岛素抵抗相关的代谢紊乱^[4]。

最近的研究证实,食用大豆异黄酮类物质可以改善2型糖尿病患者以及肥胖小鼠的胰岛素抵抗症状,降低三酰甘油水平^[5-6]。3'-羟基染料木素(3'-hydroxygenistein)是大豆异黄酮的代谢产物之一。体外配体竞争性结合实验以及转录激活实验发现3'-羟基染料木素具有很强的PPAR γ 结合活性和转录激活活性^[7],因此,我们推测3'-羟基染料木素可能与罗格列酮(rosiglitazone, ROZ)相似,能够促进前脂肪细胞增殖分化,改善胰岛素抵抗。

本研究首先考察3'-羟基染料木素对小鼠3T3-L1前脂肪细胞增殖和分化的影响,然后检测其对PPAR γ 和C/EBP α 的表达调控作用,为探讨大豆异黄酮类物质改善糖尿病以及肥胖患者胰岛素抵抗的作用机制提供理论依据,并为开发基于异黄酮类结构的新型PPAR γ 调节剂提供新的研究思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 3T3-L1细胞株,购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 试剂 3'-羟基染料木素(纯度>98%)购自云南西力生物技术有限公司。高糖DMEM细胞培养液购自Gibco公司,3-异丁基-1-甲基-黄嘌呤、地塞米松、油红O、胰岛素购自美国Sigma公司,TRIzol购自Invitrogen公司,Oligo(dT) Primer、M-MLV反转录酶、dNTP为美国Progema公司产品,DL2000、DNA marker和Taq酶购自大连宝生物工程有限公司,兔抗C/EBP α 单克隆抗体购自美国CST公司,兔抗PPAR γ 单克隆抗体购自英国AB-

Cam公司,HRP标记的抗兔二抗购自Beyotime公司,ROZ购自浙江天马医药化工有限公司,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 3T3-L1前脂肪细胞的培养 将3T3-L1前脂肪细胞种于用含有10%新生牛血清、 10^5 IU/L青霉素、 10^5 IU/L链霉素的高糖DMEM培养液中,于37℃、5%CO₂、95%湿度的培养箱中培养,取对数生长期的细胞用于实验。

1.3 3'-羟基染料木素对3T3-L1前脂肪细胞增殖的影响 MTT法:细胞按照 1.5×10^4 个/ml接种于96孔板,100 μ l/孔,培养12 h后分别加入不同浓度的3'-羟基染料木素(5、10、20、50 μ mol/L)干预培养,分别在3'-羟基染料木素干预24、48、72 h后,去掉培养液,用PBS洗2遍,加入含有0.2% BSA、0.5 mg/ml MTT的PBS,在37℃继续孵育4 h后吸干,每孔加入200 μ l DMSO,混匀后用酶标仪在570 nm光密度(D)值。

细胞计数法:将3T3-L1细胞接种于6孔板中,3'-羟基染料木素处理同前,将细胞消化下来,利用血球计数板对细胞计数。

1.4 3'-羟基染料木素对3T3-L1前脂肪细胞内DNA合成的影响 将3T3-L1细胞接种于6孔板中,培养12 h后分别加入不同浓度的3'-羟基染料木素(5、10、20、50 μ mol/L)干预培养24 h,往各组细胞中加入10 μ mol/L BrdU,37℃孵育24 h。取出培养板,PBS洗后,用4%多聚甲醛固定,0.4% Triton 透化,4 mol/L HCl使DNA变性,5%脱脂奶粉封闭,用小鼠抗BrdU单克隆抗体在4℃孵育过夜,PBS洗后用Alexa Fluor 568标记的山羊抗小鼠IgG室温孵育1 h,PBS洗3次,再用hochest对细胞核染色,确定总细胞数,在荧光显微镜下每组随机选取6个视野拍照,计算BrdU标记指数。

1.5 3'-羟基染料木素对3T3-L1前脂肪细胞分化的影响 待接种于培养板中的3T3-L1细胞生长融合2 d后,加含0.25 μ mol/L地塞米松、0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基-黄嘌呤和10 μ g/ml胰岛素和10%新生牛血清的高糖DMEM培养48 h,换以含10 μ g/ml胰岛素的培养液再培养48 h,随后以10%新生牛血清高糖DMEM继续培养,每2 d换液1次。自诱导分化第1天起,实验组分别给予含10、50 μ mol/L 3'-羟基染料木素或10 μ mol/L ROZ的培养液全程干预分化过程,对照组加常规诱导剂。分化第8天进行油红O染色,并用异丙醇处理染色的细胞,用酶

标仪在 570 nm 波长下测定 D 值。

1.6 3'-羟基染料木素对 3T3-L1 前脂肪细胞 PPAR γ 和 C/EBP α mRNA 表达的影响 药物处理同上, 分化第 8 天采用 TRIzol 试剂抽提细胞总 RNA, 使用紫外分光光度计在 260 nm 波长下测定 RNA 含量, 取 4 μ g RNA 进行反转录反应, 用 cDNA 进行 PCR 扩增。以 β -actin 作为对照。引物序列参考文献[8]: PPAR γ : 5'-TGA TGG AAG ACC ACT CGC AT-3' (forward), 5'-CCA TTG GGT CAG CTC TTG TG-3' (reverse); C/EBP α : 5'-GGT GCT GGA GTT GAC CAG TG-3' (forward), 5'-CGG AAT CTC CTA GTC CTG GC-3' (reverse); β -actin: 5'-GAC TAC CTC ATG AAG ATC-3' (forward), 5'-GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3' (reverse)。取 10 μ l DNA 扩增产物, 加 2 μ l 6 \times 上样缓冲液, 点样, 在含有 0.5 μ g/ml 溴乙啶、1% 琼脂糖凝胶板上 80 V 下进行电泳。用复日 FR200 紫外可见分析装置及 SmartView 图像处理系统进行扫描, 测定平均光密度。

1.7 3'-羟基染料木素对 3T3-L1 前脂肪细胞

PPAR γ 和 C/EBP α 蛋白表达的影响 同前方法对 3T3-L1 细胞进行分化培养和药物干预分组, 分化第 8 天弃培养液, 用预冷的 PBS 轻轻洗涤细胞后加入总蛋白抽提液, 置冰上使细胞完全裂解, 将细胞裂解液转入 Eppendorf 管中, 在 4 $^{\circ}$ C 10 000 $\times g$ 条件下高速离心 20 min, 取上清, 煮沸后置于 -80 $^{\circ}$ C 备用。紫外分光光度计在 280 nm 波长处测定标准和样本蛋白的 D 值, 根据标准曲线计算各样品蛋白浓度。采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白电泳, 转膜, 封闭, 依次与相应的一抗和二抗孵育, 最后显影定影。

1.8 统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间计量资料比较采用方差分析, 应用 SPSS 15.0 软件进行统计分析。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结 果

2.1 3'-羟基染料木素对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响 10~50 μ mol/L 的 3'-羟基染料木素在 24、48、72 h 各时间段能促进前脂肪细胞增殖, 且具有时间依赖性和浓度依赖性, 见表 1。

表 1 3'-羟基染料木素对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖作用的量效关系
Tab 1 Effects of 3'-hydroxygenistein on proliferation of 3T3-L1 preadipocytes

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	MTT method			Cell count ($\times 10^6$)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
3'-hydroxygenistein treated						
5 μ mol/L	0.22 \pm 0.04	0.43 \pm 0.06	0.70 \pm 0.11	0.73 \pm 0.10	1.08 \pm 0.09	1.98 \pm 0.20
10 μ mol/L	0.26 \pm 0.03	0.47 \pm 0.03*	0.76 \pm 0.07*	0.76 \pm 0.09	1.18 \pm 0.13*	2.09 \pm 0.11*
20 μ mol/L	0.28 \pm 0.03*	0.52 \pm 0.04**	0.81 \pm 0.08**	0.79 \pm 0.11*	1.29 \pm 0.12**	2.17 \pm 0.12**
50 μ mol/L	0.32 \pm 0.04**	0.58 \pm 0.05**	0.86 \pm 0.04**	0.85 \pm 0.12**	1.47 \pm 0.11**	2.29 \pm 0.15**
Control	0.21 \pm 0.03	0.40 \pm 0.03	0.62 \pm 0.05	0.68 \pm 0.05	1.00 \pm 0.11	1.91 \pm 0.16

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.2 3'-羟基染料木素对 3T3-L1 前脂肪细胞内 DNA 合成的影响 BrdU 掺入实验的结果表明对照组 BrdU 的标记指数为 (35.17 \pm 7.36)%, 3'-羟基染料木素组 (5、10、20、50 μ mol/L) 的标记指数分别为 (36.17 \pm 5.95)%, (39.83 \pm 2.32)%, (44.33 \pm 4.46)%, (46.00 \pm 4.73)%, 20、50 μ mol/L 组与对照组比较的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明 3'-羟基染料木素能浓度依赖性地促进 3T3-L1 前脂肪细胞内 DNA 合成。

2.3 3'-羟基染料木素对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响 对脂肪细胞油红 O 染色后并用异丙醇处理染色的细胞, 检测光密度 (D_{570}) 值, 定量检测细胞

内脂肪的含量, 判断细胞的分化程度, 结果显示 10 和 50 μ mol/L 3'-羟基染料木素组 D_{570} 值高于对照组 (0.61 \pm 0.06, 0.76 \pm 0.07 vs 0.45 \pm 0.08, $P < 0.05$, $P < 0.01$), 但 10 μ mol/L 3'-羟基染料木素组 D_{570} 值低于 10 μ mol/L ROZ 组 (0.86 \pm 0.08, $P < 0.01$)。提示 3'-羟基染料木素能促进细胞内脂质的聚集, 促进脂肪细胞分化, 但是相同剂量下, 3'-羟基染料木素对脂肪细胞的促分化作用低于 ROZ。

2.4 3'-羟基染料木素对 3T3-L1 细胞 PPAR γ 和 C/EBP α mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果显示, 对照组 PPAR γ mRNA 表达量为 0.17 \pm 0.06, 10 和 50 μ mol/L 3'-羟基染料木素组 PPAR γ mRNA 表达

量分别为 3.40 ± 0.19 和 6.44 ± 0.48 , 两者均高于对照组 ($P < 0.01$)。对照组 C/EBP α mRNA 表达量为 0.85 ± 0.14 , 10 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 3'-羟基染料木素组 C/EBP α mRNA 表达量分别为 1.60 ± 0.15 和 2.97 ± 0.17 , 两者也高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。10 $\mu\text{mol/L}$ ROZ 组 PPAR γ 和 C/EBP α mRNA 表达量分别是 7.29 ± 0.82 和 4.00 ± 0.25 , 10 $\mu\text{mol/L}$ 3'-羟基染料木素组 PPAR γ 和 C/EBP α mRNA 表达量低于 10 $\mu\text{mol/L}$ ROZ 组 ($P < 0.01$)。2.5 3'-羟基染料木素对 3T3-L1 细胞 PPAR γ 和 C/EBP α 蛋白表达的影响 蛋白印迹实验结果表明, 10 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 3'-羟基染料木素能促进 PPAR γ 蛋白表达 ($P < 0.01$), 使 C/EBP α 蛋白表达也增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。但是 10 $\mu\text{mol/L}$ 3'-羟基染料木素组 PPAR γ 和 C/EBP α 蛋白表达水平低于 10 $\mu\text{mol/L}$ ROZ 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 1。

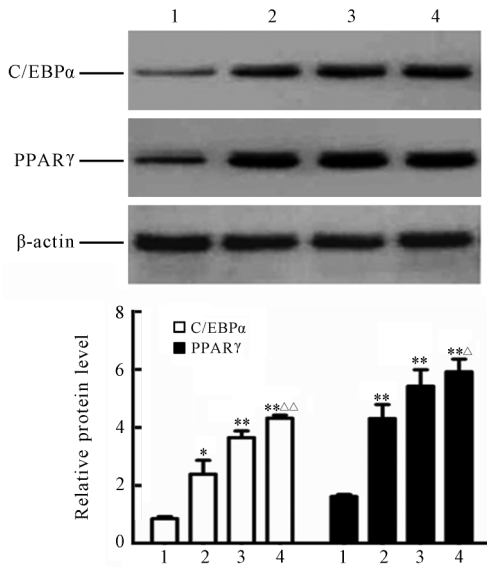


图 1 3'-羟基染料木素对 3T3-L1 细胞 PPAR γ 和 C/EBP α 蛋白表达的影响

Fig 1 Effects of 3'-hydroxygenistein on expressions of PPAR γ and C/EBP α proteins in 3T3-L1 preadipocytes

C/EBP α : CAAT/enhancer binding protein α ; PPAR γ : Peroxisome proliferator activated receptor γ . 1: Control; 2: 10 $\mu\text{mol/L}$ 3'-hydroxygenistein; 3: 50 $\mu\text{mol/L}$ 3'-hydroxygenistein; 4: 10 $\mu\text{mol/L}$ rosiglitazone. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs group 2; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

导致机体内脂肪蓄积以及由此产生的肥胖、高血压、高脂血症和糖尿病等疾病的根本原因是脂肪细胞分化异常。在治疗或预防肥胖和胰岛素抵抗

时,通常把抑制前脂肪细胞的增殖和分化、抑制脂肪蓄积作为策略之一,因此,近年来国内外许多研究者一直致力于寻找能够调控脂肪细胞分化、抑制脂肪蓄积的化合物。寻找对脂肪细胞的增殖及分化有调控作用的药物并探讨其机制,对于防治与肥胖和胰岛素抵抗密切相关的血脂紊乱、高血压、2型糖尿病、动脉粥样硬化等代谢性疾病的发病及减轻其危害具有重要意义。

脂肪细胞的增殖与分化受到激素、基因和信号转导通路的调控,是一个高度精细的过程。研究证实在脂肪细胞分化过程中有许多转录因子($\text{ap}2$ 、PPARs、C/EBPs、SREBP-1c、LPL等)参与,其中最主要的转录因子是 PPAR γ 和 C/EBP α [9]。PPARs 属于核受体超家族成员,PPARs 分为 α 、 β 、 γ 三种亚型,其中 PPAR γ 主要分布于脂肪组织,对脂肪细胞的分化起着重要作用。PPAR γ 被小分子配体激活后,与类维甲酸受体(RXR)形成异源二聚体,结合于靶基因启动子区域上的 DNA 元件,通过调节靶基因的转录而发挥多种重要的生理功能,最终促进脂肪细胞分化成熟[10-11]。C/EBPs 家族由 C/EBP α 、 β 、 γ 等成员构成,其中 C/EBP α 能促进 PPAR γ 高表达,使脂肪细胞保持分化细胞的表型,在脂肪细胞分化中起着关键性作用[12]。

目前上市的 PPAR γ 的调节剂包括噻唑烷二酮类的 ROZ、吡格列酮和曲格列酮,以及非噻唑烷二酮类的法格列扎等[13]。ROZ 是目前治疗胰岛素抵抗的代表药物,它促进 PPAR γ 表达增加和脂肪细胞的增殖分化,促进葡萄糖转运,增加脂肪组织胰岛素敏感性,然而长期服用此类药物,可能产生肥胖和水肿等现象[14]。因此,开发新型 PPAR γ 调节剂成为国际医药界努力的方向。

流行病学研究显示大豆异黄酮类物质可以增强对胰岛素的敏感性,人类摄取大豆异黄酮类物质越多,糖尿病的发病率越低[5-6]。体外实验也表明大豆异黄酮能调控 PPAR γ 的激活以及下游靶基因的转录[15-16]。由于这些研究中使用的大豆异黄酮含有多种不同的异黄酮类物质,发挥这些作用的确切的活性成分及其机制还不明确。

染料木素(genistein)和 大豆素(daidzein)是大豆异黄酮的两种主要成分,3'-羟基染料木素是染料木素的一种代谢产物[17]。有文献报道 3'-羟基染料木素具有 PPAR α 转录激活活性,它能抑制巨噬细胞分泌促炎细胞因子如 IL-6、TNF- α 等,减少 NF- κ B、

iNOS 和 COX-2 的表达^[18], 另外, 国外学者利用配体竞争性结合实验及转录激活实验发现 3'-羟基染料木素具有很强的 PPAR γ 结合活性和转录激活活性^[7]。本研究证实, 3'-羟基染料木素能够浓度依赖性和时间依赖性地促进前脂肪细胞增殖, 而且能促进细胞内脂质的积聚, 促进前脂肪细胞分化; 能够促进脂肪细胞分化关键因子 PPAR γ 和 C/EBP α 的 mRNA 和蛋白的表达, 表现出和噻唑烷二酮类药物 ROZ 类似的效应, 这可能是大豆异黄酮类物质增强胰岛素敏感性、降低糖尿病发病率的机制之一。我们的研究结果能为开发基于异黄酮类结构的新型 PPAR γ 调节剂提供有力的支持和依据。

志谢 衷心感谢华山医院药剂科李群益博士、施孝金和钟明康主任为本实验提供技术上的指导以及实验仪器方面的帮助。

[参 考 文 献]

- [1] Rayalam S, Della-Fera M A, Baile C A. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle[J]. *J Nutr Biochem*, 2008, 19: 717-726.
- [2] Gregoire F M. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001, 226: 997-1002.
- [3] Guo L, Tabrizchi R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance[J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 111: 145-173.
- [4] Scheen A J, Lefebvre P J. Troglitazone: antihyperglycemic activity and potential role in the treatment of type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 1999, 22: 1568-1577.
- [5] Jayagopal V, Albertazzi P, Kilpatrick E S, Howarth E M, Jennings P E, Hepburn D A, et al. Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2002, 25: 1709-1714.
- [6] Cederroth C R, Vinciguerra M, Gjinovci A, Kuhne F, Klein M, Cederroth M, et al. Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism[J]. *Diabetes*, 2008, 57: 1176-1185.
- [7] Mueller M, Jungbauer A. Red clover extract: a putative source for simultaneous treatment of menopausal disorders and the metabolic syndrome[J]. *Menopause*, 2008, 15: 1120-1131.
- [8] Sung H Y, Kang S W, Kim J L, Li J, Lee E S, Gong J H, et al. Oleanolic acid reduces markers of differentiation in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Nutr Res*, 2010, 30: 831-839.
- [9] Prusty D, Park B H, Davis K E, Farmer S R. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 46226-46232.
- [10] Blanquart C, Barbier O, Fruchart J C, Staels B, Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 85: 267-273.
- [11] Chawla A, Schwarz E J, Dimaculangan D D, Lazar M A. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation[J]. *Endocrinology*, 1994, 135: 798-800.
- [12] Ramji D P, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation[J]. *Biochem J*, 2002, 365: 561-575.
- [13] Bayes M, Rabasseda X, Prous J R. Gateways to clinical trials [J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2002, 24: 37-55.
- [14] Lebovitz H E. Differentiating members of the thiazolidinedione class: a focus on safety[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2002, 18 (Suppl 2): S23-S29.
- [15] Mezei O, Banz W J, Steger R W, Peluso M R, Winters T A, Shay N. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264. 7 cells[J]. *J Nutr*, 2003, 133: 1238-1243.
- [16] Dang Z, Lowik C W. The balance between concurrent activation of ERs and PPARs determines daidzein-induced osteogenesis and adipogenesis[J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19: 853-861.
- [17] Bursztyka J, Perdu E, Tulliez J, Debrauwer L, Delous G, Canlet C, et al. Comparison of genistein metabolism in rats and humans using liver microsomes and hepatocytes[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46: 939-948.
- [18] Mueller M, Hobiger S, Jungbauer A. Red clover extract: a source for substances that activate peroxisome proliferator-activated receptor alpha and ameliorate the cytokine secretion profile of lipopolysaccharide-stimulated macrophages [J]. *Menopause*, 2010, 17: 379-387.

[本文编辑] 尹 茶