

【研究報告】

分化誘導したマウス前駆脂肪細胞3T3-L1の サイトカイン分泌におけるベルベリンの作用

新本洋士・伊藤愛美・星崎玲奈・山口貴士・長縄康範

要約

本研究では、高グルコース培地を用いたマウス3T3-L1細胞の脂肪細胞分化誘導におけるベルベリンの作用を検討した。ベルベリンは脂肪細胞分化誘導初期にグルコース消費を亢進した。ベルベリンは細胞内の脂質合成に関する転写因子PPAR γ 発現を抑制し、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) 活性の発現も強く抑制した。14日間分化誘導した3T3-L1細胞にはトリグリセリドが蓄積したが、ベルベリン添加によってトリグリセリド蓄積は3分の1にまで減少した。アディポカインアレーを用いて培養上清中のサイトカイン分析を行ったところ、ベルベリンはレプチンおよびレジスチン分泌を強く抑制した。これらの結果から、ベルベリンは糖尿病を含むメタボリックシンドロームの改善に役立つ作用を有することが期待される。

キーワード：脂肪細胞、分化誘導、ベルベリン、アディポサイトカイン

緒言

マウス3T3-L1細胞は脂肪細胞への分化誘導に作用する化合物の探索にしばしば用いられる。デキサメタゾンと3-イソブチル-1-メチルキサンチンで刺激し、インスリン存在下でさらに培養することによって、細胞は細長く伸長した形態から球状の形態に変化し、顕微鏡下で細胞質に多数の脂肪滴を観察できるようになる。オイルレッドによるトリグリセリド染色、細胞内トリグリセリドの定量、あるいは細胞内グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) 活性の測定によって脂肪細胞への分化の度合いを知ることができる (関谷, 2000, Shoji et al., 2000, 三上・新本, 2007)。

筆者らは前報でマウス前駆脂肪細胞3T3-L1を従来用いられてきたダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) に替えて高グルコースのDMEM中で分化誘導することにより、分化誘導中に培地のグルコース枯渇を起こすことなく培養を継続できることを示した (新本ら, 2016)。この分化誘導の際、キハダ内皮やキンボウゲ科オウレンの根茎に含まれるベンジルイソキノリンアルカロイドのベルベリン (5, 6-Dihydro-9, 10-dimethoxy [1, 3] dioxolo [4, 5-g] isoquino [3, 2-a] isoquinolin-7-ium) (分

子量372)の強い脂肪細胞分化抑制作用を改めて示した。

ベルベリンは、健胃薬等に用いられる化合物である (奥田ら, 2002, 林, 1993, 指田, 2007)。筆者らの研究 (新本ら, 2005) とは別にベルベリンによる脂肪細胞の分化抑制が報告され (Huang et al., 2006, 屋敷, 2009)、肥満モデル動物やヒトにおける脂肪蓄積も抑制されることが明らかになるなど (Hu et al., 2012, Zhang et al., 2012, Yin et al., 2012, Pirillo et al., 2015) ベルベリンと脂質代謝に関する研究が進展している。本報告では高グルコース培地中での3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化における残存グルコース濃度、細胞内GPDH活性、細胞内トリグリセリド蓄積に与えるベルベリンの作用を前報の測定結果と比較するとともに、3T3-L1細胞から培地中へ分泌される10種類のサイトカイン濃度を測定した結果について述べる。

材料および方法

1. 試薬

インスリン、デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、および牛胎児血清 (FCS) はメルク (旧シグマ-アルドリッチ) より購入した。高グルコースダ

ルベッコ変法イーグル培地 (H-DMEM) および塩化ベルベリン水和物は富士フィルム和光純薬より購入した。

2. マウス前駆脂肪細胞3T3-L1の分化誘導および分化指標の測定

マウス前駆脂肪細胞3T3-L1は10% FCSを添加したH-DMEMを用いて低密度で継代培養した。脂肪細胞への分化にあたり、トリプシン処理で剥離した細胞をFCS添加H-DMEMに 1×10^4 cells/mLの密度に懸濁し、6穴プレートに3 mLずつ播種した。4日間培養して顕微鏡下で細胞がコンフレントに達したことを確認した後、培地を吸引除去し、デキサメタゾン (0.25 mmol/L) および3-イソブチル-1-メチルキサンチン (0.5 mmol/L) を含む FCS添加H-DMEM 3 mLを添加し、脂肪細胞への分化刺激を与えた (DM処理)。48時間培養後、培地を吸引除去し、インスリン (1 μ g/mL)、インスリン (1 μ g/mL) + ベルベリン (2.0 μ g/mL) を含むFCS添加H-DMEMを3 mL添加して分化誘導を開始した。この時点を経験0日目とした (図1)。それぞれの培地は2~3日ごと (培養2、5、7、9、12日目) に交換し、14日間培養した。培養上清は培養2、7、9日目 (培地交換前) に採取した。培養14日目にプレートから培地を吸引除去後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で細胞を2回洗浄した後、PBSを完全に吸引除去した。25 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を培養穴1穴あたり1 mL加えた後、スクレーパーを用いて細胞を剥離し、マイクロチューブに回収した。細胞は氷冷下で超音波破碎し、 -80°C に保存した (関谷, 2000, 三上・新本, 2007)。

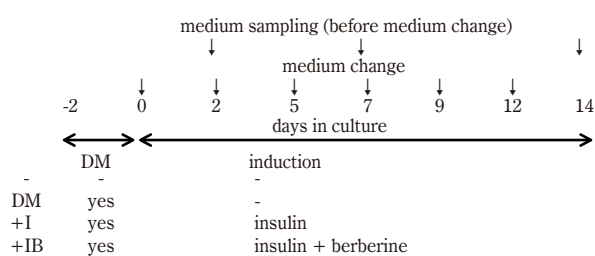


図1 3T3-L1細胞の脂肪細胞分化培養スケジュール

3. 培地中のグルコース、細胞破碎液のトリグリセリドおよびグリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) 活性の測定

培地中の残存グルコース濃度はグルコースC II-テストワコムタロターゼ・GOD法 (富士フィルム和光純薬) で測定した。細胞破碎液中のGPDH活性はGPDH活性測定キット (プライマリーセル) を用いて測定した。細

胞破碎液中のトリグリセリド濃度はラボアッセイ™ トリグリセライドキット (富士フィルム和光純薬) を用いて測定した。測定は3連 (3穴) で行い、結果は平均値および標準偏差で表した。

4. 培養上清中のサイトカインの測定

培養上清中に分泌されたアディポネクチン、インスリン様増殖因子結合タンパク質3型 (IGFBP-3)、レジスチン、レプチンなどのサイトカイン濃度はプロテオームプロファイラー・マウスアディポカインアレイキット (R&D Systems, Inc. U.S.A.) を用いて測定した (Sengupta et al., 2012)。分化誘導7日目の各培養群それぞれ3穴からの培養上清を等量混合したものを試料とし同一膜上の2カ所のスポット (n=2) で測定を行った。サイトカインに対する抗体をスポットしたニトロセルロースメンブレンをブロッキング処理した後、培養上清をメンブレンと反応させ、培養上清中のサイトカインをメンブレン上の抗体に結合させた。次にサイトカイン検出用ビオチン化抗体カクテルを反応させた後、ストレプトアビジン-西洋わさびペルオキシダーゼ (HRPO) 複合体を反応させた。メンブレンをよく洗浄後、発光基質を添加して各々のスポットの化学発光強度を測定した。化学発光はLumi Cube (株式会社リポニクス) および発光解析ソフトウェアJustTLC (株式会社リポニクス) を用いて測定した。同一メンブレン上の陽性コントロールの平均発光強度を1.000とした相対発光強度の平均値として表した。

5. ウェスタンブロット解析によるPPAR γ 発現の検出

培地5 mLを用い6 cm ディッシュ中で3T3-L1細胞の分化誘導を行った。培養7日目の培養器に付着した細胞をPBSで1回洗浄した後、SDS試料調製液 (非還元条件) 0.2 mLを加えてスクレーパーで細胞を剥離、マイクロチューブに回収した。これを沸騰水浴場で5分間加熱し、冷却後、プロテアーゼインヒビターカクテルPIC2 (フナコシ) を2 μ L添加して、 -80°C に保存した。

リニアグラジエントアクリルアミドゲル (ゲル濃度10-20%、オリエンタルインスツルメンツ) 試料スロットに上記細胞抽出試料8 μ Lをチャージして電気泳動後、PVDF膜 (アトー) に転写、スキムミルク (雪印メグミルク) 溶液でブロッキング後、抗PPAR γ 、あるいは抗 β アクチン (陽性コントロール) (いずれもウサギ抗体、CTSジャパン) と反応させた。PVDF膜を洗浄後さらにHRPO標識抗ウサギIgG抗体 (CSTジャパン) と反応さ

せた。PVDF膜を洗浄後、化学発光基質（ECLプライム、GEヘルスケア）を用い、PVDF膜に結合したHRPOによる発光をLumi Cubeを用いて撮影した。

結果および考察

1. 培養上清中のグルコース残存量

3T3-L1細胞の脂肪細胞分化誘導培養のスケジュールを図1に示す。6穴プレート中でコンフレントに達した3T3-L1細胞を48時間DM処理後、インスリンあるいはインスリン+ベルベリンを含む10% FCS添加H-DMEMで培養した。

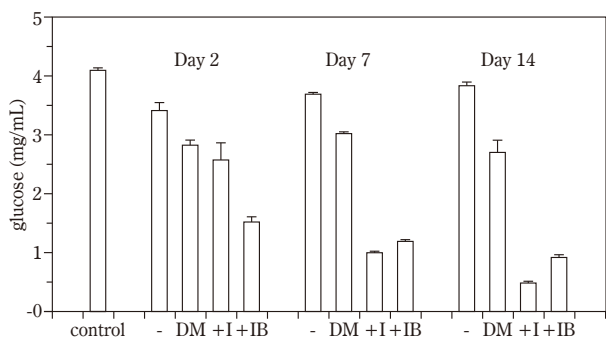


図2 高グルコース培地で分化誘導した3T3-L1細胞培養上清中のグルコース残存量

- : 無処理群, DM : デキサメタゾンおよび3-イソブチル-1-メチルキサンチンで48時間処理しみの群, +I : DM処理後インスリン存在下で培養したもの, +IB : DM処理後インスリンとベルベリン存在下で培養したもの。3穴の平均値および標準偏差を示した。

培養2、7および14日目の培養上清の残存グルコース濃度を測定した結果を図2に示す。いずれも直近の培地交換から48時間後のグルコース濃度である。培養2日目においては、DM処理していない3T3-L1細胞（無処理群）の培養上清のグルコース濃度の減少は小さく、DM処理のみの群（DM群）およびDM処理+インスリン添加培養群（インスリン群）ではグルコース濃度がわずかに減少していた。インスリンおよびベルベリンを添加して培養した群（インスリン+ベルベリン群）はDM群およびインスリン群の半分近くまでグルコース濃度が減少した。DM処理された3T3-L1細胞はインスリンとベルベリンとともに培養することにより、細胞へのグルコース取り込みが促進されると考えられた。

これに対して培養7日目には、インスリン群のグルコース濃度減少が著しかった。さらに分化が進んだ14日目のインスリン群では12日目に交換した培地中のグ

ルコースの8割以上が細胞に取り込まれたと考えられた。インスリン+ベルベリン群では無処理群、DM群と比較すると培地中の残存グルコース濃度は有意に減少したが、インスリン群と比較すると残存濃度が高かった。

以上の結果から、DM刺激された3T3-L1細胞をインスリンとともに培養すると、培地中のグルコース濃度の著しい減少が生じること、ベルベリンの添加は培養初期ではグルコース濃度減少を促進するが、培養中後期においては濃度減少を若干抑制することが判明した。

2. 3T3-L1細胞破碎液の脂肪細胞分化指標

培養14日目に回収した3T3-L1細胞破碎液中のトリグリセリド合成関連酵素GPDH活性および細胞内トリグリセリド測定値を図3に示す。GPDH活性および細胞内トリグリセリド量は類似した傾向を示した。無処理群およびDM群ではGPDH活性および細胞内トリグリセリド量はいずれも低かった。これに対してインスリン群では高値を示し、3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化誘導が認められた。これに対してインスリン+ベルベリン群ではGPDH活性はDM群レベルまで減少し、またトリグリセリド量はインスリン群の4割程度まで減少した。

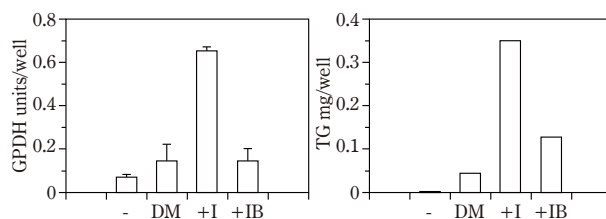


図3 分化誘導14日後の3T3-L1細胞破碎液のグリセロール-3-リン酸脱水素酵素活性および細胞内トリグリセリド蓄積量

- : 無処理群, DM : デキサメタゾンおよび3-イソブチル-1-メチルキサンチンで48時間処理しみの群, +I : DM処理後インスリン存在下で培養したもの, +IB : DM処理後インスリンとベルベリン存在下で培養したもの。3穴の平均値および標準偏差を示した。

以上の結果から、DM処理された3T3-L1細胞はインスリンによってグルコースの細胞への取り込みが亢進されること、およびGPDH活性が誘導され、細胞内にトリグリセリドが蓄積することが示された。ここにベルベリンを添加すると、グルコース消費にはあまり影響がないにもかかわらず（図2）、GPDH活性誘導を強く抑制し、細胞内トリグリセリド蓄積を抑制することが示された。

3. 3T3-L1細胞が分泌するアディポサイトカイン

3T3-L1細胞をDM処理後、分化誘導して培養7日目の

培養上清に含まれる主なアディポサイトカイン濃度（井原，2009，八巻，2010）を測定した結果を図4に示す。

アディポネクチンは小型の脂肪細胞から分泌されるサイトカインである（前田・下村，2011）。肥満、内臓脂肪蓄積時には低下し、体重減少によって増加する。筋肉のグルコース取り込みを促進、肝臓の糖新生を抑制し、インスリン抵抗性を改善する。DM処理によってアディポネクチンの分泌は著しく増加した。これに対し、インスリン群では3割以上分泌が減少したが、インスリン+ベルベリン群での減少は15%程度であった。

インスリン様増殖因子（IGF）IおよびIIは血液中でIGF結合タンパク質3型（IGFBP-3）と結合して存在し、さらに酸感受性サブユニットが結合した複合体として存在する（川地ら，2003）。IGFBP-3はIGFの血中半減期を延ばす働きがあるとともに、細胞表面のIGF受容体への結合を修飾する。IGFBP-3の分泌はDM処理細胞では増加したが、インスリン群、インスリン+ベルベリン群では減少した。また、リポタンパク質構成や食事コレステロールの吸収に関与するIGF結合タンパク質6型（IGFBP-6）も同様の傾向を示した（結果示さず）。

レプチンは脂肪細胞から分泌されるペプチドホルモンである。レプチンは食欲抑制作用およびエネルギー消費亢進作用を有する。レプチン分泌はインスリン群にのみ見られた。インスリン+ベルベリン群においてレプチン分泌が強く抑制されたことは、ベルベリンによって脂肪細胞分化が抑制されていることを示唆している。

モノサイト遊走誘導タンパク質（MCP-1）はC-Cモチーフケモカイン2（CCL2）としても知られるケモカインである（田村・春日，2007、伊藤ら，2008）。急性心筋炎患者血清中で増加し、多くの中枢神経系傷害においても増加する。DM処理なしでも分泌されており、DM処理によって分泌が増加した。インスリン群では若干分泌が減少したが、インスリン+ベルベリン群では分泌量変化は少なかった。

マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF、CSF-1とも呼ばれる）は脂肪組織に浸潤してきた単球を活性化されたマクロファージに分化誘導すると考えられている。その後マクロファージから分泌されるサイトカイン等によって単球や炎症性細胞の浸潤をさらに促進して、脂肪組織は慢性炎症の温床になる。DM処理によってやや増加したM-CSFはインスリン群でDM処理前の分泌濃度に減少した。インスリン群に比べ、インスリン+ベルベリン群ではかえってM-CSF分泌を増加させた。脂肪細胞分化が強く誘導されるインスリン群でM-CSFが

減少したことは興味深い。本研究で誘導した脂肪細胞は、脂肪細胞分化の初期の小型脂肪細胞の成長期であり、M-CSF分泌が抑制されているステージにあると考えられる。

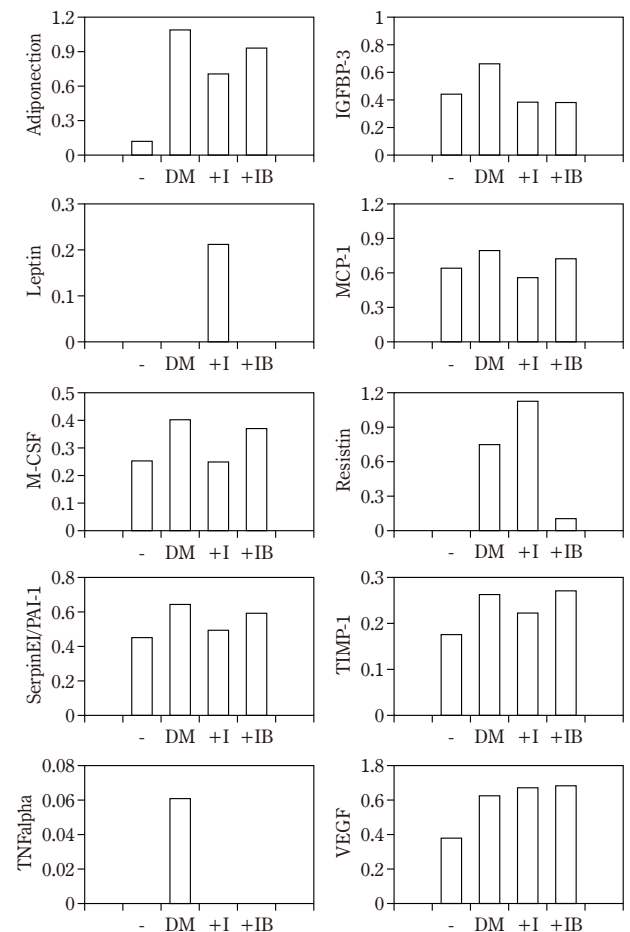


図4 3T3-L1細胞分化7日後の培養上清中のサイトカイン濃度

-：無処理群、DM：デキサメタゾンおよび3-イソブチル-1-メチルキサンチンで48時間処理しのみ群、+I：DM処理後インスリン存在下で培養したもの、+IB：DM処理後インスリンとベルベリン存在下で培養したもの。3穴の培養上清を等量混合したものを測定し、1試料2連測定の発光強度の平均値を示した。

3T3-L1の脂肪細胞分化過程でPPAR γ リガンドの作用によってレジスチン発現は抑制されることが報告されている。したがってレジスチンはマウスのインスリン抵抗性を引き起こす好ましくない因子とされている（大澤・牧野，2008）。DM処理によってレジスチンの分泌が誘導され、インスリン群ではさらに1.5倍に増加した。これに対してインスリン+ベルベリン群ではレジスチン分泌はインスリン群の10分の1以下に減少した。ベルベリンはインスリン抵抗性を強く抑制しメタボリックシンド

ロームを改善する作用を有することが期待される。

SerpinE1/PAI-1はセリンプロテアーゼインヒビタータンパク質であり、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子 (uPA)、および組織型プラスミノゲン活性化因子 (tPA) の阻害タンパク質で代謝リックシンドロームのマーカーでもある。分泌はDM処理によって増加したが、インスリン群でやや減少した。しかしインスリン+ベルベリン群ではほとんど減少しなかった。

メタロプロテアーゼ阻害剤1 (TIMP-1) はコラーゲン分解酵素マトリックスメタロプロテイナーゼの活性を阻害し、肝臓の線維化を促進する方向に働く。肝硬変のリスクファクターである。3T3-L1細胞のDM処理によって増加したTIMP-1分泌は、インスリン群、インスリン+ベルベリン群いずれにおいても大きな変化はなかった。

TNF α は細胞のグルコース取り込みを低下させ、糖・脂質代謝異常をもたらすと考えられている。アディポネクチンの発現を抑制する作用もあると報告されている。TNF α はDM群にのみ検出された。インスリン群、インスリン+ベルベリン群ではTNF α 分泌は検出されなかった。

血管内皮増殖因子 (VEGF) は血管新生の促進、血管透過性の亢進を誘導することから、脂肪組織への血管誘導に重要な役割を果たす。DM処理によって上昇したVEGF分泌はインスリン、インスリン+ベルベリン群のいずれにおいても変化しなかった。

4. 細胞内転写因子PPAR γ の発現

図1のスケジュールにしたがって6 cmディッシュ上で3T3-L1細胞を7日間培養した後、細胞内の脂質関連転写因子のひとつであるPPAR γ (ベルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ) (加門ら, 2003) の発現をウェスタンブロッティングにより解析した。PPAR γ および β アクチンの発現を図5に示す。

PPAR γ はDM処理により発現が上昇し、インスリン添加によってさらに強く発現がみられた。しかしベルベリン添加によって発現はDM処理前のレベルまで強く抑制された。これらのことからベルベリンはPPAR γ 発現を強く抑制し、一部の脂肪合成に関連するサイトカイン分泌を調節するとともにGPDH活性発現を抑制することによって、3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化を抑制していると考えられた。

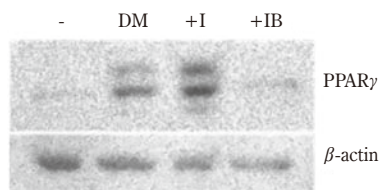


図5 分化誘導した3T3-L1細胞内のPPAR γ の発現

- : 無処理群, DM : デキサメタゾンおよび3-イソブチル-1-メチルキサンチンで48時間処理しのみ群, +I : DM処理後インスリン存在下で培養したもの, +IB : DM処理後インスリンとベルベリン存在下で培養したもの。細胞破砕液を電気泳動後タンパク質をPVDF膜に転写した。PVDF膜膜をブロッキング後、抗PPAR γ 抗体および西洋わさびベルオキシダーゼ標識二次抗体を反応させ、発光基質を用いてPPAR γ を検出した。

まとめ

マウス3T3-L1細胞は脂肪細胞分化のモデルとしてしばしば用いられる細胞株である。筆者らは3T3-L1細胞のインスリン存在下での脂肪細胞への分化をベルベリンが強く抑制することを見出した。本研究では、高グルコース培地を用いたマウス3T3-L1細胞の脂肪細胞分化誘導におけるベルベリンの作用についてさらに詳しく検討し、グルコース消費、脂質合成に関する転写因子、アディポサイトカインの分泌について検討した。

3T3-L1細胞は脂肪細胞分化が進むと培地中のグルコース残存量が減少したことから、脂肪合成に動員されるグルコースの細胞への吸収が亢進されることが示された。これに対してベルベリンは3T3-L1細胞の脂肪細胞分化誘導初期においてもグルコース消費を亢進した。ベルベリンには血糖値を下げる作用が期待される。

また、ベルベリンは細胞内の脂質合成に関する転写因子PPAR γ 発現を抑制し、中性脂肪合成のキーエンザイムであるGPDH活性の発現も強く抑制した。14日間分化誘導した3T3-L1細胞にはトリグリセリドが蓄積したが、ベルベリンによって3分の1にまで減少した。アディポカインアレーを用いた培養上清中のサイトカイン分析を行ったところ、ベルベリンはレプチンおよびレジスチン分泌を強く抑制した。これらの結果から、ベルベリンは糖尿病を含む代謝リックシンドロームの改善に役立つ作用を有することが期待される。

引用文献

Huang, C., Zhang, Y., Gong, Z., Sheng, X., Li, Z., Zhang, W., Qui, Y. (2006) Berberine inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPAR γ pathway. *Biochemical and Biophysical*

- Research Communication*, 348: 571-578.
- 林良興・樹木の成分と効用 キハダ. (1993) 森林総合研究所報 63: 6.
- Hu, Y., Ehli, E. A., Kittelsrud, J., Ronan, P. J., Munger, K., Downey, T., Bohlen, K., Callahan, L., Munson, V., Jahnke, M., Marshall, L. L., Nelson, K., Huizenga, P., Hansen, R., Soundy, T. J., and Davies, G. E. (2012) Lipid-lowering effect of berberine in human subjects and rats. *Phytomedicine*, 19: 861-867.
- 井原勇人. (2009) 脂肪細胞から分泌される生理活性物質アディポサイトカイン遺伝子発現制御. 比較生理生化学 26: 47-57.
- 伊藤綾香・菅波孝祥・亀井康富・小川佳宏. (2008) 脂肪細胞肥大化におけるMCP-1初発誘導とMKP-1の役割. 肥満研究 14: 183-186.
- 加門淳司・山内敏正・寺内康夫・窪田直人・門脇孝. (2003) PPAR γ とアディポネクチンによる糖・脂質代謝制御メカニズムの解明. 日本薬理学雑誌 122: 294-300.
- 川地慎一・武田則之・高見利恵子・小久保佳明・佐々木昭彦・高見和久・林慎・山北宜由・安田圭吾. (2003) 早期動脈硬化症における, インスリン様成長因子 (IGF-1) とインスリン様成長因子結合タンパク質-3 (IGFBP-3) の役割. 岐阜大学医学部紀要 51: 15-20.
- 前田法一・下村伊一郎. (2011) 肥満症とアディポサイトカイン. 日本内科学会雑誌 100: 911-916
- 三上一保・新本洋士. (2007) 脂肪前駆細胞分化誘導試験—前駆脂肪細胞株 (3T3-L1) を用いた脂質代謝改善機能評価法—. 食品機能性評価マニュアル集第I集. 食品機能性評価支援センター技術普及資料等検討委員会編. 日本食品科学工学会. 茨城. 115-122.
- 奥田拓男・奥田純子・川西和子・木村孟淳・富田裕・中西勤・吉田隆志. (2002) オウバク黄柏. 天然薬物・生薬学第3版. 奥田拓男編. 廣川書店. 東京. 43-44.
- 大澤春彦・牧野英一. (2008) レジスチン—ヒトのインスリン抵抗性における意義—. 臨床化学 37: 258-263.
- Pirillo, A., and Catapano, A. L. (2015) Berberine, a plant alkaloid with lipid- and glucose-lowering properties: From in vitro evidence to clinical studies. *Atherosclerosis*, 253: 449-461.
- 指田豊. 漢方薬に使われる植物 (38) キハダ. (2007) 都薬雑誌 29: 33-38.
- 関谷敬三. (2000) 前駆脂肪細胞 (3T3-L1) を用いた代謝機能評価. 食品機能研究法. 篠原和毅・鈴木建夫・上野川修一編. 光琳. 東京. 133-136.
- Sengupta, K., Mishra, A. T., Rao, M. K., Sarma, K. V. S., Krishnaraju, A. V., and Trimurtulu, G. (2012) Efficacy and tolerability of novel herbal formulation for weight management in obese subjects: a randomized double blind placebo controlled clinical study. *Lipids in Health and Disease*, 11: 122.
- 新本洋士・岩下恵子・小堀真珠子・木村俊之・山岸賢治・鈴木雅博. (2005) マウス3T3-L1細胞に対するキハダ抽出物のトリグリセリド蓄積抑制作用. 日本食品科学工学会誌 52: 535-537.
- 新本洋士・山口貴士・伊藤愛美・星崎玲奈・長縄康範. (2016) マウス前駆脂肪細胞3T3-L1の高グルコース培地中での分化誘導とベルベリンの分化抑制作用. 日本食品科学工学会誌 63: 474-477.
- Shoji, T., Kobori, M., Shinmoto, H., Yanagida, A., Kanda, T., and Tsushida, T. (2000) Inhibitory Effects of Apple Polyphenols on Differentiation of 3T3-L1 Cells into Adipocytes. *Food Science and Technology Research*, 6: 119-121.
- 田村義和・春日雅人. (2007) メタボリックシンドロームの分子基盤. 日本消化器病学会雑誌 104: 483-491.
- 八巻幸二. (2010) アディポカイン. 日本食品科学工学会誌 57: 319.
- 屋敷 (土肥) 圭子・木曾 昭典・周艶陽・岩崎大剛・神原敏光・水谷健二. (2009) オウレン抽出物とその主成分ベルベリンがヒト皮下由来脂肪細胞に及ぼす分化誘導抑制作用および脂肪分解促進作用. 日本化粧品技術者会誌 43: 274-280.
- Yin, J., Ye, J., and Jia, W. (2012) Effects and mechanisms of berberine in diabetes treatment. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2: 327-334.
- Zhang, X., Zhao, Y., Zhang, M., Pang, X., Xu, J., Kang, C., Li, M., Zhang, C., Zhang Z., Zhang, Y., Li, X., Ning, G., and Zhao, L. (2012) Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats. *PLoS One*, 7: e42529.

Changes in Adipocytokine Secretion of 3T3-L1 Pre-adipocytic Cells During Differentiation Cultured with Berberine

Hiroshi Shinmoto, Manami Ito, Rena Hoshizaki, Yoshihito Yamaguchi,
Yasunori Naganawa

Abstract

Mouse 3T3-L1 pre-adipocytic cells were cultured with high glucose-Dulbecco's modified Eagle's medium (H-DMEM) supplemented with 10% FCS and induced to adipocytes in the presence of insulin, or insulin and berberine. Berberine was shown to have strong anti-adipogenic activity with decreased cellular glycerol-3-phosphoryate dehydrogenase (GPDH) activity and decreased triglyceride accumulation of differentiated 3T3-L1 cells. Berberine also modulated leptin and resistin secretion. Those findings strongly suggested that berberine could be a potential candidate for the treatment of metabolic syndromes.

Keywords: berberine, glucose, adipocytes, cytokine, adipogenesis