

绿原酸对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的抑制作用

杨玉彬¹, 柯斌¹, 秦鉴^{2*}

(1. 中山大学附属第一医院, 广东 广州 510080; 2. 中山大学附属第七医院, 广东 深圳 518000)

摘要: **目的** 研究绿原酸对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的抑制作用。**方法** 第 1 天, 细胞培养皿中加入不同质量浓度绿原酸 (50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 以氯化锂为阳性对照。第 9 天, 油红 O 染色观察细胞内脂质沉积情况, 生化法检测细胞内甘油三酯 (TG) 水平, Western blot、RT-PCR 法测定 *PPAR γ 2*、*aP2*、*LPL* mRNA 和蛋白表达, 免疫荧光染色观察 *PPAR γ 2* 在细胞浆及细胞核中的表达, CCK-8 法分析绿原酸对 3T3-L1 细胞的细胞毒作用。**结果** 绿原酸无细胞毒作用。随着绿原酸质量浓度增加, 脂质沉积逐渐减少, TG 水平逐渐下降, 细胞核中 *PPAR γ 2* 蓝色荧光逐渐变淡。与诱导分化组比较, 绿原酸组 (50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) *PPAR γ 2*、*aP2*、*LPL* mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 并呈量效关系。**结论** 绿原酸可抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化, 可能是该成分抑制脂肪生成、安全有效减肥的机制。

关键词: 绿原酸; 3T3-L1 前体脂肪细胞; 分化

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)11-2380-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.11.004

Inhibition effects of chlorogenic acid on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes

YANG Yu-bin¹, KE Bin¹, QIN Jian^{2*}

(1. The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 2. The Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Shenzhen 518000, China)

ABSTRACT: AIM To study the inhibition effects of chlorogenic acid on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. **METHODS** Different concentrations of chlorogenic acid (50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added into cell culture plate on the 1st day, lithium chloride was taken as a positive control. On the 9th day, oil red O staining was applied to investigating intracellular lipid storage, biochemical method was used to detect intracellular triglyceride (TG) level, Western blot and RT-PCR methods were adopted in the (*PPAR γ 2*, *aP2* and *LPL*) mRNA and protein expression determination, immunofluorescence staining was used for observing *PPAR γ 2* expressions in cytoplasm and nucleus, and the cytotoxicity of chlorogenic acid on 3T3-L1 cells was analyzed by CCK-8 method. **RESULTS**

Chlorogenic acid exhibited no cytotoxicity. With the increase of chlorogenic acid concentration, gradually reduced lipid storage, gradually decreased TG level, and gradually diluted *PPAR γ 2* blue fluorescence in nucleus were found. Compared with the induced differentiation group, chlorogenic acid groups (50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) demonstrated significantly reduced *PAR γ 2*, *aP2* and *LPL* mRNA and protein expressions ($P < 0.05$) in a dose-effect relationship. **CONCLUSION** Chlorogenic acid can inhibit the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, which may be this constituent's mechanisms of inhibiting lipogenesis, and effectively, safely losing weight.

KEY WORDS: chlorogenic acid; 3T3-L1 preadipocytes; differentiation

收稿日期: 2018-04-29

基金项目: 广东省中医药管理局项目 (20181052); 广东省自然科学基金项目 (2018A030313411)

作者简介: 杨玉彬 (1981—), 女, 博士, 研究方向为中医药防治代谢内分泌及生殖内分泌疾病。Tel: (020) 87755766, E-mail: myxs32@126.com

* 通信作者: 秦鉴 (1966—), 男, 博士, 教授, 从事中医药防治代谢内分泌疾病。Tel: (0755) 81206999, E-mail: himybox@yeat.net

肥胖症是一种以体内脂肪堆积过多为主要特点的慢性代谢性疾病, 据统计目前美国肥胖患者占总人口的35% (近1亿), 预计这个数字将在2030年上升为1.25亿^[1]; 亚洲是肥胖重灾区, 尤其是儿童, 一项由WHO实施的调查发现, 将近有一半超重/肥胖儿童。根据中国成人超重和肥胖症预防与控制指南, 体质量指数(BMI) < 24 kg/m²为非超重, 24 ≤ BMI < 28 kg/m²为超重, BMI ≥ 28 kg/m²为肥胖^[2]。中青年肥胖率也已接近10%^[3]。肥胖对健康危害巨大, 其远期并发症包括冠心病、糖尿病、脑血管意外等^[4], 已成为21世纪全球最大的公共卫生问题, 目前治疗方案包括饮食控制、运动、口服药物、手术等, 但手术治疗创伤较大、费用高^[5]; 口服减肥西药有不同程度副作用, 如心血管病风险、胃肠道反应^[6]; 中医药在肥胖诊治方面有特殊优势, 如副作用相对较少、不易反弹、兼顾肥胖并发症等。

课题组前期采用中医复方一健脾化痰方治疗肥胖症, 取得良好疗效, 它能明显减轻患者体质量, 降低BMI, 减少内脏脂肪^[7]; 动物研究证实该方减轻大鼠体质量、减少内脏脂肪的作用机制可能与抑制脂肪细胞分化有关^[8]; 进一步药理研究发现, 该复方的主要成分之一为绿原酸, 是许多水果、蔬菜、中药材的有效成分, 具有多种生物活性, 如抑制肿瘤生长、降血脂、调节血糖、保护血管内皮功能、抗炎、抗氧化应激等^[9-10]。为进一步明确其作用机制, 本实验在前期研究基础上以3T3-L1前脂肪细胞为研究对象, 观察该成分对脂肪细胞分化的作用。

1 材料

大鼠3T3-L1前脂肪细胞株(广州速聚生物科技有限公司)。绿原酸(成都瑞芬思生物科技有限公司); 氯化锂(美国Sigma公司, #V900067)。CCK-8溶液(上海碧云天生物技术有限公司, C0037); DMEM高糖培养基(SH30022.01B)、链霉素(SH30010)、PBS磷酸盐缓冲液(SH30256.01B)(美国HyClone公司); 1640培养基(CCS30016.01)、0.25%胰酶-EDTA(CCS30031.02)(美国MRC公司); 胎牛血清(美国Gibco公司, 10270-106); 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(I-7018)、地塞米松(D1756)(美国Sigma公司); 胰岛素(以色列ProSpec公司, CYT-270)。SW-CJ-IFD洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); SC3614低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); CKX41/

M-CTR30-2倒置光学显微镜(日本Olympus公司); HERAcell 150i细胞恒温培养箱、Multiscan MK3酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司); DMI6000B倒置荧光显微镜(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 MDI诱导剂配制 将3-异丁基-1-甲基黄嘌呤用乙醇配制成111.1 mg/mL (0.5 mol/L), 将地塞米松用乙醇配制成1 mg/mL (2.5 mmol/L), 将10 mg胰岛素溶于1 mL 0.01 mol/L HCl中。诱导分化剂MDI的配方为10%胎牛血清, 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤, 1 μmol/L地塞米松, 5 μg/mL胰岛素。

2.2 细胞复苏及培养 将3T3-L1前脂肪细胞接种于培养板, 用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养液在37℃、5%CO₂条件下培养, 待细胞长满至80%~90%、融合2 d后开始诱导分化(第0天)并加入药物, 每2 d换液1次, 每次换液时重新加入。

2.3 细胞分组及诱导分化 将细胞分为对照组(只加10%胎牛血清高糖DMEM培养基, 不加诱导剂)、诱导分化组(加入诱导剂)、绿原酸50 μg/mL组(加入诱导剂和50 μg/mL绿原酸)、绿原酸100 μg/mL组(加入诱导剂和100 μg/mL绿原酸)、绿原酸200 μg/mL组(加入诱导剂和200 μg/mL绿原酸)、氯化锂组(加入诱导剂和20 mmol/L氯化锂)。同时, 再加入含终浓度0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、终浓度1 μmol/L地塞米松、终质量浓度10 μg/mL胰岛素的10%胎牛血清高糖DMEM培养48 h, 然后换含终质量浓度10 μg/mL胰岛素的10%胎牛血清高糖DMEM培养液继续培养48 h, 每2 d换液1次, 诱导分化第9天后结束实验。

2.4 指标检测

2.4.1 油红O染色 紫外分光光度法检测510 nm波长处的光密度(OD)值。

2.4.2 甘油三酯(TG) 参照TG试剂盒说明书操作步骤进行测定。

2.4.3 细胞增殖 采用CCK-8法。收集各时间点细胞(0、12、24、48 h), 加入CCK-8溶液。孵育4 h后, 酶标仪读板, CK-8检测读取OD_{450 nm}, 并计算增殖率和抑制率, 公式分别为增殖率=某时间点平均OD值/0 h平均OD值×100%(同一样品)、抑制率=(1-实验组平均OD值/对照组平均OD值)×100%(同一时间)。

2.4.4 PPAR γ 2、aP2、LPL 表达

2.4.4.1 mRNA 表达 (RT-PCR 法) 总 RNA 抽提后去基因组, 检测其纯度和完整性, 逆转录, 定量 PCR, 检测目标基因 (引物序列见表 1)。反应条件为 50 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 32 s, 40 个循环。融解曲线分析条件为温度 60~95 $^{\circ}\text{C}$, 每个样本重复 3 次, 反应结束后导出 Ct 值进行计算。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行数据分析, 公式为 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{干预组}} - \Delta\text{Ct}_{\text{对照组}}$, 扩增倍数 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, 其中对照组的数值均为 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因	方向	引物序列 (5'-3')	长度/bp
aP2	正向	GAGCATCATAACCCTAGATGG	21
	反向	GCTCATGCCCTTTCATAAAC	20
PPAR γ 2	正向	CCTTCAGTTCACCTCTCAGTAAG	22
	反向	CACACTCTATGTCACTCCATAC	21
Lpl	正向	GTAGTAGACTGGTTGTATCGG	21
	反向	GTAGTTAAACTCCTCTCCATC	22
GAPDH	正向	GGCCTCCAAGGAGTAAGAAA	20
	反向	GCCCTCCTGTTATTATGG	19

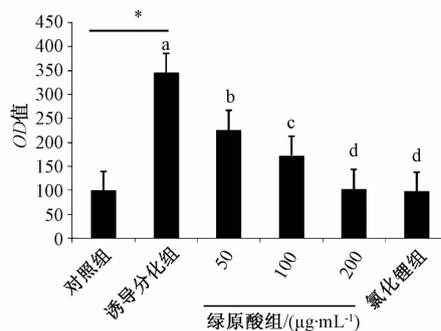
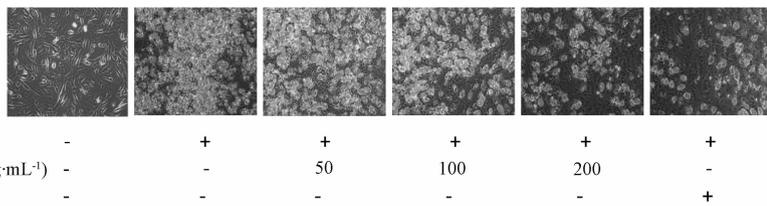
2.4.4.2 蛋白表达 (Western blot 法) 蛋白样品制备 \rightarrow 聚丙烯酰胺凝胶电泳 \rightarrow 制胶 \rightarrow 上样前样品处理 \rightarrow 转膜 \rightarrow 封闭 \rightarrow 孵育一抗 \rightarrow 洗膜 \rightarrow 孵育二抗 \rightarrow 洗膜 \rightarrow ECL 化学发光显影。

2.5 统计学分析 通过 SPSS 17.0 软件进行处理, 结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞形态学 第 9 天诱导分化组在显微镜下可见细胞大多呈成熟脂肪细胞表型, 视野中大约 90% 分化为典型的成熟脂肪细胞, 体积增大, 胞体变圆, 胞浆内脂滴明显, 部分融合成较大脂滴; 绿原酸组可见细胞体积较诱导分化组减小, 胞浆中脂滴变小, 以 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 最明显。

3.2 绿原酸对成脂分化的抑制作用 图 1 显示, 第 9 天诱导分化组脂质沉积最多, OD 值与对照组比较显著增加 ($P < 0.05$); 随着绿原酸质量浓度增加, 脂质沉积逐渐减少, 组间比较均有显著差异 ($P < 0.05$), 其中 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与氯化锂相当。图 2 显示, 诱导分化组 TG 水平最高, 与对照组比较有显著差异 ($P < 0.05$); 随着绿原酸质量浓度增加, TG 水平不断下降, 组间比较均有显著差异 ($P < 0.05$)。



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 不同字母代表两两比较均有显著差异

图 1 各组油红 O 染色

Fig. 1 Oil red O staining in various groups

3.3 细胞毒性 图 3~5 显示, 不同质量浓度绿原酸在不同时间点对 3T3-L1 前脂肪细胞均无明显细胞毒性。

3.4 绿原酸对 PPAR γ 2、LPL、aP2 表达的影响 图 6 显示, 诱导分化组 PPAR γ 2、LPL、aP2 mRNA 表达显著高于对照组 ($P < 0.05$), 经绿原

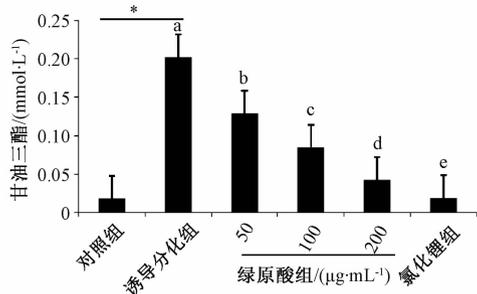


图2 各组TG浓度

Fig. 2 TG concentrations in various groups

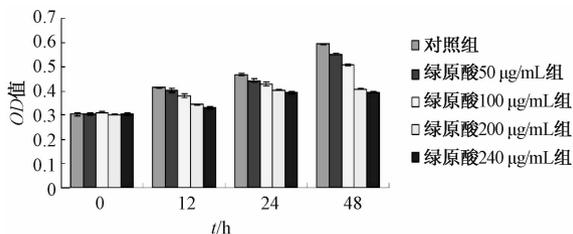
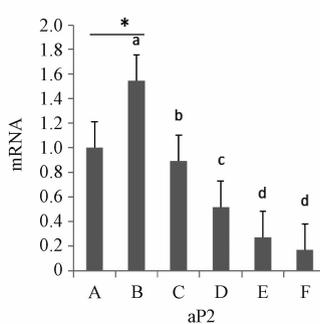
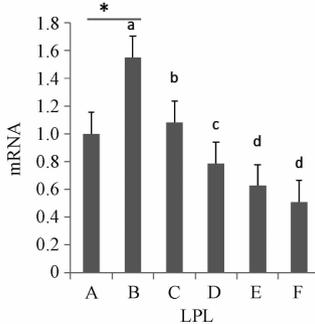
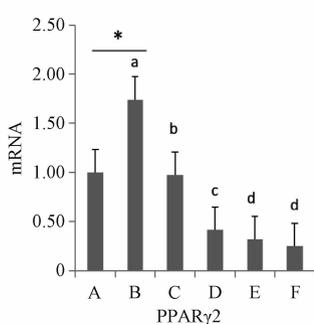
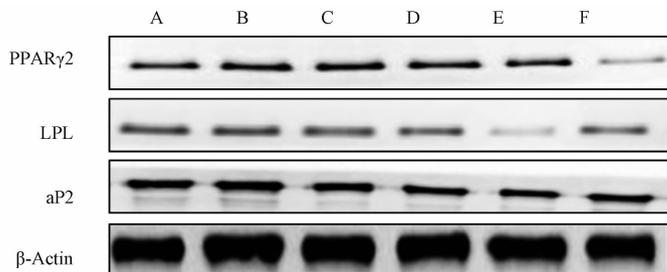


图3 各组细胞OD值

Fig. 3 Cell OD values in various groups



注：A~F分别为对照组，诱导分化组，绿原酸50、100、200 μg/mL组，氯化锂组。与对照组比较，* $P < 0.05$ ；不同字母代表两两比较均有显著差异

图6 各组PPAR γ 2、LPL、aP2 mRNA和蛋白表达

Fig. 6 PPAR γ 2, LPL, aP2 mRNA and protein expressions in various groups

3.5 PPAR γ 2在细胞浆、细胞核中的表达 图7显示，诱导分化组中PPAR γ 2染色最明显，细胞核中表达最强；加入绿原酸后，PPAR γ 2蓝色荧光随着该成分质量浓度增加而逐渐变淡。

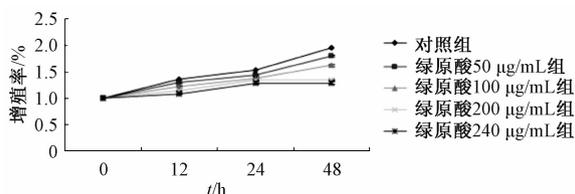


图4 各组细胞增殖率

Fig. 4 Cell proliferation rates in various groups

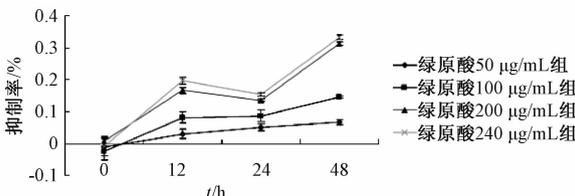


图5 各组细胞抑制率

Fig. 5 Cell inhibition rates in various groups

酸干预后显著降低 ($P < 0.05$), 并呈量效关系。Western blot也显示, PPAR γ 2、LPL、aP2蛋白表达在诱导分化组最强, 经绿原酸干预后有所下降, 其程度随着该成分质量浓度增加而更明显。

4 讨论

肥胖发病机制复杂, 涉及遗传、脂肪细胞分化、中枢摄食、胰岛素代谢等多个领域^[11-12], 细胞生物学认为它是脂肪细胞在数量上的异常增加和

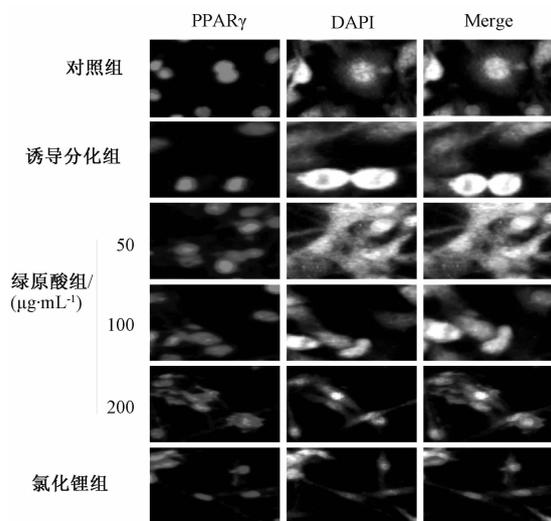


图7 各组 PPAR γ 2 表达 (免疫荧光染色)
Fig. 7 PPAR γ 2 expressions in various groups (immunofluorescence staining)

体积上的异常增大。脂肪细胞数量由脂肪组织中间充质干细胞定向分化为脂肪前体细胞的程度决定,具有多向分化潜能的间充质干细胞受适当刺激后,可定向分化为成骨、软骨、肌肉、脂肪、神经等细胞^[13]。正常情况下定向分化保持平衡,间充质干细胞分化为上述功能各异的细胞,发挥正常生理功能;当病理状态下这一平衡被打破后,脂肪细胞异常增殖分化将被启动^[14],脂肪组织沉积,最终形成肥胖。另外,脂肪细胞体积又由脂肪前体细胞向成熟脂肪细胞分化的程度决定^[15],其成熟度越高,体积越大,细胞内脂滴越多,因此抑制成脂分化成为肥胖研究的重要方向^[16]。

许多天然药用植物表现出多种药理作用,引起了广泛关注,也逐渐成为减肥领域的研究热点^[17]。绿原酸类衍生物是由咖啡酸类、奎宁酸类衍生物合成的缩酚酸类物质^[18],其中绿原酸又名咖啡鞣酸、咖啡单宁酸,在咖啡、绿茶、蔬菜、水果中含有量丰富,也是中草药中最常见的酚类化合物之一,药理作用广泛,近年来发现它有明确的减肥效果^[19]。3T3-L1 前脂肪细胞是研究成脂分化理想的细胞模型^[20],本实验从脂肪细胞分化角度对绿原酸作用进行初步探索,通过油红 O 染色发现诱导分化组 OD 值最高,显著高于对照组 ($P < 0.05$),经绿原酸干预后有所下降,量效关系明显 ($P < 0.05$),同时 TG 水平测定结果也与油红 O 染色一致,提示该成分能有效减少诱导分化的 3T3-L1 前脂肪细胞脂质沉积。然后,通过 CCK-8 法观察绿原酸对 3T3-L1 前脂肪细胞活力的影响,发现在 50、100、

200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下于不同时间点 (0、12、24、48 h) 均未出现明显细胞凋亡,提示该成分无细胞毒作用。

研究证实,氯化锂可通过激活经典 Wnt 信号通路来抑制脂肪细胞分化^[21]。本实验发现绿原酸抑制脂质生成,其中在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下的作用与氯化锂相当,推测该成分可能通过抑制脂肪细胞分化来调节脂质代谢。因此,又检测了脂肪细胞分化标记物 PPAR γ ,它是成脂分化的主要核转录因子,激活后可促进其他成脂分化蛋白表达,在脂肪细胞分化后期发挥着关键作用^[22],其中 PPAR γ 2 在脂肪组织特异性表达。本实验发现,诱导分化组 PPAR γ 2 mRNA、蛋白表达与对照组比较显著增加 ($P < 0.05$),绿原酸对其有抑制作用,并在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下最强,呈现量效关系,与前期报道^[23]一致。但一些研究发现,绿原酸可促进诱导分化 3T3-L1 前脂肪细胞的 PPAR γ 或 PPAR γ 2 表达^[24],其原因可能在于 3T3-L1 诱导分化方法不同,有的研究者检测的是 PPAR γ 1 或 PPAR γ ,与本研究检测 PPAR γ 2 不同,具体还有待进一步考察。

脂肪细胞特异性基因 LPL、aP2 是 PPAR γ 反向靶基因^[25],PPAR γ 通过诱导两者表达来决定成熟脂肪细胞表型,维持脂肪细胞后期分化成熟状态^[16],并且两者均被认为是脂肪细胞分化的标记物,与细胞内脂质合成密切相关,其中前者是脂质代谢的关键酶,可促进游离脂肪酸在细胞内合成甘油三酯^[26]。本实验发现,LPL、aP2 在诱导分化组呈高表达,表明脂肪细胞分化程度最高;绿原酸可抑制两者表达,并随着其质量浓度增加程度更明显,表明该成分有抑制脂肪细胞分化的效应,并呈量效关系。

综上所述,绿原酸对 3T3-L1 前脂肪细胞分化具有抑制作用,并呈量效关系。由于通过调控脂肪细胞分化特异性基因的表达来调节脂肪生成是肥胖治疗的策略和研究方向,故绿原酸有望开发成为治疗肥胖的有效成分。

参考文献:

- [1] Flegal K M, Kruszon-Moran D, Carroll M D, et al. Trends in obesity among adults in the United States, 2005 to 2014 [J]. *JAMA*, 2016, 315(21): 2284-2291.
- [2] Jensen M D, Ryan D H. New obesity guidelines: promise and potential [J]. *JAMA*, 2014, 311(1): 23-24.
- [3] 乔雪丽,王伟忠,刘薇,等.湖北省 15~24 岁居民超

- 重/肥胖状况及相关因素[J]. 现代预防医学, 2017, 44(23): 4263-4266.
- [4] Benjamin E J, Blaha M J, Chiuve S E, et al. Heart disease and stroke statistics-2017 update; a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2017, 135(10): e646-646.
- [5] Williams E P, Mesidor M, Winters K, et al. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem [J]. *Curr Obes Rep*, 2015, 4(3): 363-370.
- [6] 中华医学会内分泌学会肥胖学组. 中国成人肥胖症防治专家共识[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2011, 27(9): 711-717.
- [7] Yang Y B, Li Q, Chen S Q, et al. Effects of modified Lingguizhugan decoction combined with weekend fasting on metabolic syndrome[J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(1): 48-51.
- [8] Yang Y B, Qin J, Ke B, et al. Effect of Lingguizhugan Decoction on hyperlipidemia rats with intermittent fasting[J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(2): 250-252.
- [9] Liang N J, Kitts D. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions[J]. *Nutrients*, 2015, 8(1): 16.
- [10] 向舒, 唐宏伟, 周军, 等. 绿原酸抑制结肠癌HCT116细胞的机制研究[J]. 中草药, 2017, 48(23): 4952-4957.
- [11] Saeed S, Arslan M, Froguel P. Genetics of obesity in consanguineous populations; toward precision medicine and the discovery of novel obesity genes[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2018, 26(3): 474-484.
- [12] Cox A J, West N P, Cripps A W. Obesity, inflammation, and the gut microbiota[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015, 3(3): 207-215.
- [13] Chen Q, Shou P, Zheng C, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(7): 1128-1139.
- [14] Yuan Z Y, Li Q, Luo S H, et al. PPAR γ and Wnt signaling in adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2016, 11(3): 216-225.
- [15] Shao X R, Wang M Q, Wei X Q, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ : master regulator of adipogenesis and obesity[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2016, 11(3): 282-289.
- [16] Moseti D, Regassa A, Kim W K. Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(1): 124.
- [17] Santos A P, Rogero M M, Bastos D H M. Edible plants, their secondary metabolites and antiobesogenic potential[J]. *Recent Pat Food Nutr Agric*, 2010, 2(3): 195-212.
- [18] Clifford M N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health[J]. *Planta Med*, 2004, 70(12): 1103-1114.
- [19] Arçari D P, Santos J C, Gambero A, et al. The *in vitro* and *in vivo* effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis[J]. *Food Chem*, 2013, 141(2): 809-815.
- [20] Ruiz-Ojeda F J, Rupérez A I, Gomez-Llorente C, et al. Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: a review[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1040.
- [21] Galli C, Piemontese M, Lumetti S, et al. GSK3b-inhibitor lithium chloride enhances activation of Wnt canonical signaling and osteoblast differentiation on hydrophilic titanium surfaces [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2013, 24(8): 921-927.
- [22] Tamori Y, Masugi J, Nishino N, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes [J]. *Diabetes*, 2002, 51(7): 2045-2055.
- [23] Sánchez-Villavicencio M L, Vinqvist-Tymchuk M, Kalt W, et al. Fermented blueberry juice extract and its specific fractions have an anti-adipogenic effect in 3T3-L1 cells[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17: 24.
- [24] Sanchez M B, Miranda-Perez E, Verjan J C G, et al. Potential of the chlorogenic acid as multitarget agent: Insulin-secretagogue and PPAR α/γ dual agonist [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 169-175.
- [25] Muhlhauser B S, Morrison J L, McMillen I C. Rosiglitazone increases the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ target genes in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in the sheep fetus in late gestation[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(9): 4287-4294.
- [26] Walton R G, Zhu B B, Unal R, et al. Increasing adipocyte lipoprotein lipase improves glucose metabolism in high fat diet-induced obesity [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(18): 11547-11556.