

柽柳黄素对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的影响及 AMPK 信号通路的作用机制

伍明江¹, 张德芹^{2*}, 李盼², 石旭柳³, 刘璐⁴

¹遵义医药高等专科学校药学院, 遵义 563006; ²天津中医药大学 中医药研究院, 天津 301617; ³河北农业大学渤海校区理工学院, 黄骅 061100; ⁴北京中医药大学东方学院中药学院, 廊坊 065001

摘要:为探讨柽柳黄素对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的影响及 AMPK 信号通路的作用机制, 本研究利用地塞米松诱导 3T3-L1 脂肪细胞, 建立胰岛素抵抗模型, 通过给药后检测细胞对 Glu 的摄取量和细胞内 TG 的含量, 并采用 qRT-PCR 对 AMPK 信号通路中相关基因进行检测, 利用分子对接软件对 AMPK 信号通路中相关蛋白进行分子对接, 进一步采用 Western blot 进行蛋白检测。研究表明, 当柽柳黄素作用 48 h 后, 高低剂量组均显著增加细胞对 Glu 的摄取 ($P < 0.01$), 高剂量组显著降低细胞内 TG 含量 ($P < 0.05$); 作用机制显示柽柳黄素具有显著提高 AMPK ($P < 0.01$) 和降低 FAS ($P < 0.05$) 基因的表达, 能与 FAS 蛋白具有较好的分子对接, 可增加 P-AMPK、P-ACC、P-PKB 和 PPAR α 和抑制 FAS 蛋白的表达。该研究说明柽柳黄素可增强胰岛素抵抗模型 3T3-L1 脂肪细胞对 Glu 的摄取, 降低 TG 在细胞内的含量, 其作用机制可能与 AMPK 信号通路中相关基因和蛋白调节有关。

关键词:柽柳黄素; 胰岛素抵抗; 3T3-L1 脂肪细胞; AMPK 信号通路; 分子对接

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)6-0953-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.6.007

Effect of tamarixetin on insulin resistance of 3T3-L1 fat cells and the mechanism of AMPK signaling pathway

WU Ming-jiang¹, ZHANG De-qin^{2*}, LI Pan², SHI Xu-liu³, LIU Lu⁴

¹Department of Pharmacy, Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi 563006, China;

²Research Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin University of TCM, Tianjin 301617, China;

³Institute of Technology, Bohai Campus-Hebei Agricultural University, Huanghua 061100, China;

⁴College of TCM, Beijing University of Chinese Medicine Dongfang College, Langfang 065001, China

Abstract: In order to investigate the effect of tamarixetin on insulin resistance of 3T3-L1 fat cells and the mechanism of AMPK signaling pathway, the 3T3-L1 fat cells were induced by dexamethasone and insulin resistance model was established, then Glu uptake and TG content were detected after administration; Further, qRT-PCR was used to detect the related genes in AMPK signaling pathway, molecular docking was carried out for the related proteins by the docking software, and Western blot was used to protein detection. The results showed that when tamarixetin treated for 48 hours, the Glu uptake had significantly increased in the high and low dose groups ($P < 0.01$), the TG content had significantly decreased in the high dose group ($P < 0.05$); In addition, tamarixetin significantly increased the gene expression of AMPK ($P < 0.01$), decreased the gene expression of FAS ($P < 0.05$), had a good molecular docking with FAS protein, promoted the protein expression of P-AMPK, P-ACC, P-PKB and PPAR α , and inhibited the protein expression of FAS. This study provide that tamarixetin can increase the Glu uptake and decrease TG content, which may be related to the regulation of related genes and proteins in AMPK signaling pathway.

Key words: tamarixetin; insulin resistance; 3T3-L1 fat cells; AMPK signal pathway; molecular docking

收稿日期: 2019-12-24 接受日期: 2020-05-21

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09101212)

* 通信作者 Tel: 86-22-59596152; E-mail: deqin123@163.com

胰岛素抵抗是 2 型糖尿病主要的发病机制之一, 脂肪细胞作为胰岛素敏感的靶细胞之一, 在胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的发病中起着重要作用。腺苷

酸活化蛋白激酶(AMPK)是细胞内能量代谢重要的一种调节因子,是研究糖尿病及其他代谢相关疾病的核心,其参与机体胰岛素敏感性的调节,AMPK的激活能降低血糖、改善糖脂代谢紊乱和减轻胰岛素抵抗。

桉柳黄素是槲皮素甲基化代谢产物^[1,2],在番石榴叶^[3]、银杏^[4]、艾纳香^[5]等中药中具有分布。在我们前期研究中发现,桉柳黄素是槲皮素体内主要的甲基化代谢产物,主要存在于尿液和粪便中^[6]。槲皮素具有显著改善胰岛素抵抗作用^[7,8],而桉柳黄素作为槲皮素体内的主要代谢产物,研究其对胰岛素抵抗的影响很有必要。据报道,桉柳黄素具有抗炎^[9]、抗氧化^[10]、抗肿瘤^[11]、抗血栓^[12]、心肌保护^[13]等作用,但桉柳黄素在改善胰岛素抵抗及其作用机制的研究尚未见报道,为了阐明槲皮素体内主要甲基化代谢产物桉柳黄素对胰岛素抵抗的影响,本实验拟通过建立3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗模型,观察桉柳黄素对细胞增殖分化、Glu的摄取和细胞内TG的影响,并进一步探索AMPK信号通路中与糖脂代谢相关基因和蛋白在改善胰岛素抵抗中的作用机制。该研究为桉柳黄素在糖脂代谢紊乱性疾病方面的作用及其作用机制探讨奠定了一定的基础。

1 材料与amp方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株

小鼠3T3-L1脂肪前体细胞,购自于北京医学科学院基础医学研究所。

1.1.2 药物与试剂

桉柳黄素(天津万象恒远科技有限公司,批号20160828);地塞米松、MTT、噻唑蓝、罗格列酮、DMSO、油红O、IBMX(美国Sigma公司,批号分别为D1756、M2128、R2408、V900090、O0625、I5879);FastQuant cDNA第一链合成试剂盒,SYBR Green试剂盒(天根生化科技北京有限公司,批号分别为KR106-02和FP205-02);DMEM(高糖)(美国HyClone公司,批号SH30022.01);胎牛血清,胰蛋白酶(美国Gibco公司,批号分别为16000044、25210056);PS,Trizol Reagent(美国Invitrogen公司,批号分别为15070066、15596018);重组人源胰岛素(北京索莱宝科技有限公司,批号I8830);葡萄糖含量测定试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号E1010);甘油三酯含量测定试剂盒(北京诺博莱

德科技有限公司,批号0510A17);Phospho-AMPK α 抗体、Phospho-ACC抗体、Phospho-PKB抗体、Fatty Acid Synthase抗体、 β -Actin抗体(美国CST公司,批号分别为2531S、11818T、4060T、3180T、4970T);PPAR α 抗体(美国Abcam公司,批号ab24509);Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)HRP(美国Affinity公司,批号S0001);引物合成(上海生物工程技术服务有限公司)。

1.1.3 实验仪器

OLYMPUS CKX31型倒置相差显微镜(日本Olympus公司);IL-161HI型二氧化碳培养箱(施都凯仪器设备上海有限公司);ClightCycler480II型实时荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司);Varioskan Flash型全波长酶标仪(美国Thermo公司);Nanodrop型微量分光光度计(美国Thermo公司);SW-CJ-2D型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);JY300C型电泳仪及水平电泳槽(北京市六一仪器厂);MultiGel-21型多功能冷光荧光影像定量分析系统(台湾TOPBIO公司);ImageQuant 350型荧光化学发光成像仪(美国GE公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT法检测桉柳黄素对3T3-L1脂肪细胞存活率的影响

待96孔细胞培养板中细胞贴壁生长至覆盖板底70~80%左右,配制浓度分别为0、0.195、0.390、0.781、1.563、3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的待测样品,弃掉原培养液,加入样品,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内继续培养,48 h后按20 μL /孔加入5 \times MTT溶液,继续培养4 h,取出后吸去旧培养液,加入150 μL /孔DMSO,放于酶标仪中,振荡30 s,测定OD在492 nm处的吸收值。

1.2.2 3T3-L1脂肪细胞油红O染色鉴定

将培养液换成含有0.5 mmol/L IBMX、1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 地塞米松和10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素的高糖DMEM完全培养液进行诱导分化,培养48 h后,换为含10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素的高糖DMEM完全培养液培养,继续培养48 h后,换为高糖DMEM完全培养液维持培养,培养至第12天,约90%细胞分化为成熟脂肪细胞,收集,PBS洗3次,加10%中性甲醛固定30 min,油红O染料室温下孵育15 min,脱色液(60%异丙醇)洗3次,倒置显微镜下观察细胞分化情况。

1.2.3 3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗模型的建立

3T3-L1脂肪细胞诱导分化成功后,分别在高糖

DMEM 完全培养液(含 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松)中继续培养 24、48、72 h,按照葡萄糖含量测定试剂盒说明书检测细胞对葡萄糖摄取情况。

1.2.4 桉柳黄素对细胞 Glu 摄取量和细胞内 TG 含量的测定

1.2.4.1 细胞对 Glu 摄取量测定

诱导成功后,将培养液换成含有 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松的 DMEM(高糖)完全培养基孵育 24 h,使用含有 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松的 DMEM(高糖)完全培养基配制药物并进行细胞换液,孵育 48 h,根据葡萄糖含量测定试剂盒说明书检测细胞对葡萄糖摄取情况。

1.2.4.2 细胞内 TG 含量测定^[14]

按照“1.2.4.1”操作,根据甘油三酯含量测定试剂盒说明书测定细胞内甘油三酯含量。

1.2.5 qRT-PCR 检测 AMPK 信号通路相关基因的表

1.2.5.1 抽提总 RNA 及 cDNA 的合成

细胞诱导成功后,在高糖 DMEM 完全培养液(含 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松)中继续培养 24 h 后,使用含有 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松的 DMEM(高糖)完全培养液配制药物,设置正常对照组、模型对照组、罗格列酮组及药物组,继续培养 48 h 后,用 Trizol 法抽提细胞中的总 RNA,测定总 RNA 浓度及 OD 在 260 nm 和 280 nm 的比值,按 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒说明进行反转录,合成 cDNA。

1.2.5.2 引物设计及合成

根据 NCBI 公布的小鼠基因序列,设计上下游引物,引物序列见表 1。

1.2.5.3 qRT-PCR

根据 SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)试剂盒说明应用于实时荧光定量 PCR 仪进行实验,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算各基因相对含量,每组实验重复 3 次。

1.2.6 桉柳黄素与 AMPK 信号通路相关蛋白分子对接

结合 AMPK 信号通路,在 PDB 数据库(www.rcsb.org)中搜索相关蛋白,通过 Discovery Studio 4.5 软件对靶蛋白进行处理,使用 Chembio 3D 软件构建各化合物的三维结构,导入 Discovery Studio 4.5 软件。采用不同对接方法(CDOCKER、LibDock、LigandFit)将结晶复合物中小分子配体对接到蛋白结晶中,然后与原结晶复合物中的小分子进行均方根偏

差(RMSD)值比较,以此验证和选择对接方法。

表 1 AMPK 信号通路相关基因引物序列

Table 1 The primer sequence of AMPK signal pathway related genes

编号 No.	基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence
1	AMPK	上游:AAGCCGACCCAATGACATCA 下游:CTTCCTTCGTACACGCAAAT
2	ACC	上游:GAAGTCAGAGCCACGGCACA 下游:GGCAATCTCAGTTC AAGCCAGCTC
3	FAS	上游:ACAAAATGCACCCTGACCCAGA 下游:TGCTGGTTGCTGTGCATGGCT
4	Adiponectin	上游:GGTCTGCCTGTCCCATGAGTACC 下游:CATCTCGGCATGACTGGGCA
5	Leptin	上游:GGTACACGCTTCGCTGCGGC 下游:GCTGATGGCTTGCATCAGATCCATC
6	GLUT4	上游:CGAGCTGGACGACGGACTC 下游:AGACATAGCTCATGGCTGGAAC- CCG
7	IRS-1	上游:GGTCACGAAGAGCTGGTGCCT 下游:GAGCGCATCATGGAACACGG
8	IRS-2	上游:GCTCCCTGTTCTGCACGGG 下游:CAAAGGTGCCAGCCCTGGG
9	PKB	上游:ATCGTCGCCAAGGATGAGGT 下游:TCTCGTGGCTCTGTTGTAG
10	PPAR α	上游:CGATACTGTCTCTTGTATGA 下游:CGCGGTGTATAAAGCCATTG
	引物内参 Internal control	GAPDH 上游:AACTTTGGCATTGTGGAAGG 下游:GGATGCAGGGATGATGTTCT

1.2.7 Western blot 检测 AMPK 信号通路相关蛋白的表达

诱导成功后,在高糖 DMEM 完全培养液(含 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松)中继续培养 24 h 后,使用含有 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松的 DMEM(高糖)完全培养液配制药物,设置正常组、模型组、阳性对照组及药物组,继续培养 48 h 后,收集细胞,去培养液后用预冷的 PBS 冲洗 3 遍,加入配好的裂解液,刮下细胞后在 EP 管中冰上充分裂解 30 min,期间涡旋 3 次。4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 12 000 rpm 离心 10 min,用 BCA 检测试剂盒测蛋白质浓度,样品分别加 5 \times 缓冲液(稀释成 1 \times),涡旋,99 $^{\circ}\text{C}$ 煮 10 min,冷却到室温后-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。依次进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭及抗体孵育、发光及显影,采用 Image J 软件对条带进行灰度分析,每组实验重复 3 次。

1.2.8 数据处理

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS19.0 进行统计,用 One-way ANOVA 检验进行各组间比较,显著性水平以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 为

标准。分子对接采用北京创腾科技有限公司提供的 Discovery Studio 4.5 软件进行分析和处理。

2 结果

2.1 MTT 法检测柞柳黄素对 3T3-L1 脂肪细胞存活的影响

随着药物浓度的增加,柞柳黄素对细胞生长的抑制作用逐渐增强,通过计算,柞柳黄素 IC_{50} 为

$33.79 \pm 13.60 \mu\text{g/mL}$,结果见表 2。

2.2 油红 O 染色鉴定

诱导分化前 3T3-L1 细胞呈不规则梭形成纤维细胞形态,细胞内无脂滴;诱导分化后细胞呈椭圆形、圆形,并分化为成熟脂肪细胞,细胞内脂滴明显,分布于细胞核周围,油红 O 染色后,脂滴呈红色,鉴定结果见图 1。

表 2 柞柳黄素对 3T3-L1 脂肪细胞存活的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Survival effects of tamarixetin on 3T3-L1 fat cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	0.195	0.390	0.781	1.563	3.125	6.250	12.500	25.000	50.000
存活率 Survival rate(%)	107.8 ± 5.0	106.7 ± 10.7	91.8 ± 7.7	88.1 ± 9.6	85.1 ± 9.4	79.9 ± 8.5	74.9 ± 7.3	49.5 ± 5.8	42.7 ± 6.8

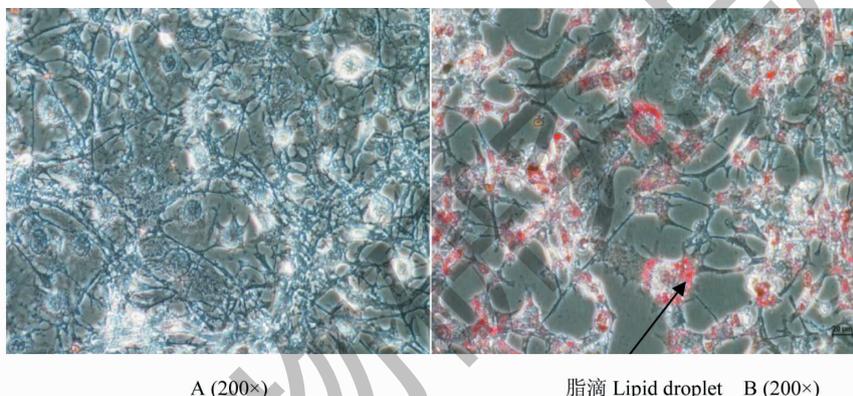


图 1 3T3-L1 脂肪细胞诱导前(A)和诱导后(B)显微图

Fig. 1 Micrograph of cells before (A) and after (B) on differentiation

2.3 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型的建立

3T3-L1 脂肪细胞的诱导分化成功后,在地塞米松中孵育 48 h,模型组细胞对葡萄糖的摄取较正常对照组显著降低($P < 0.05$);在地塞米松中孵育 72

h,模型组细胞对葡萄糖的摄取较正常对照组显著降低($P < 0.01$),表明诱导分化后 3T3-L1 脂肪细胞在地塞米松中孵育 48 ~ 72 h 后胰岛素抵抗模型建立成功,结果见表 3。

表 3 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗中的 Glu 摄取($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Glu uptake in the insulin resistance of 3T3-L1 fat cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	Glu 摄取量 Glu uptake(mmol/L)		
	24 h	48 h	72 h
正常组 Normal	0.677 ± 0.025	0.640 ± 0.016	0.707 ± 0.019
模型组 Model	0.602 ± 0.015	$0.470 \pm 0.012^*$	$0.401 \pm 0.009^{**}$

注:与正常组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.4 细胞对 Glu 的摄取

与模型组比较,柞柳黄素低、高两个剂量组均对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖的摄取显著增加($P < 0.01$),表明柞柳黄素具有促进 3T3-L1 脂肪细胞对

Glu 的摄取,结果见表 4。

2.5 细胞内 TG 的含量

与模型组比较,柞柳黄素高剂量组对 3T3-L1 脂肪细胞内甘油三酯有显著降低($P < 0.05$),表明柞

柳黄素具有降低 3T3-L1 脂肪细胞内 TG 的作用, 结果见表 5。

2.6 qRT-PCR 检测 AMPK 信号通路相关基因的表达

与模型组比较, 桉柳黄素显著提高 AMPK 基因的表达 ($P < 0.01$), 以及显著降低 FAS 基因的表达 ($P < 0.05$), 结果见表 6 和图 2。

2.7 桉柳黄素与 AMPK 信号通路相关蛋白分子对接

桉柳黄素与 AMPK、FAS、PPAR α 和 PKB 蛋白均具有一定的分子对接结合能力, 其中能与 FAS 蛋白上多个氨基酸残基靶点结合, 主要有范德华力、 π 键、氢键等结合键, 表明桉柳黄素与 FAS 蛋白对接较好, 桉柳黄素与 FAS 蛋白分子对接模拟图见图 3。

表 4 化合物对 3T3-L1 脂肪细胞 Glu 摄取的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of compounds on Glu uptake of 3T3-L1 fat cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Glu 摄取量 Glu uptake (mmol/L)
正常组 Normal	-	0.682 \pm 0.003
模型组 Model	-	0.444 \pm 0.013
罗格列酮组 Rosiglitazone	3.5	0.645 \pm 0.063 **
桉柳黄素低剂量组 Tamarixetin-L	0.5	0.620 \pm 0.015 **
桉柳黄素高剂量组 Tamarixetin-H	1.0	0.612 \pm 0.024 **

注: 与模型组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, ** $P < 0.01$.

表 5 化合物对 3T3-L1 脂肪细胞内 TG 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of compounds on TG of 3T3-L1 fat cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	TG 含量 TG content ($\mu\text{mol/L}$)
正常组 Normal	-	0.449 \pm 0.032
模型组 Model	-	0.493 \pm 0.025
罗格列酮组 Rosiglitazone	3.5	0.355 \pm 0.021 **
桉柳黄素低剂量组 Tamarixetin-L	0.5	0.458 \pm 0.034
桉柳黄素高剂量组 Tamarixetin-H	1.0	0.412 \pm 0.028 *

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

表 6 3T3-L1 脂肪细胞 AMPK 信号通路相关基因的 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Expression of mRNA of AMPK signaling pathway related genes in 3T3-L1 fat cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

基因 Gene	正常组 Normal	模型组 Model	罗格列酮组 Rosiglitazone (3.5 $\mu\text{g/mL}$)	桉柳黄素组 Tamarixetin (1.0 $\mu\text{g/mL}$)
AMPK	1.000	0.613 \pm 0.031	0.967 \pm 0.053 *	0.970 \pm 0.02 **
ACC	1.000	1.082 \pm 0.101	1.054 \pm 0.054	1.082 \pm 0.024
FAS	1.000	2.051 \pm 0.035	1.381 \pm 0.133 **	1.596 \pm 0.088 *
Adiponectin	1.000	0.690 \pm 0.002	0.801 \pm 0.004 **	0.727 \pm 0.024
Leptin	1.000	1.508 \pm 0.062	1.521 \pm 0.062	1.542 \pm 0.070
GLUT4	1.000	0.651 \pm 0.021	0.998 \pm 0.027 **	0.708 \pm 0.016
IRS-1	1.000	1.018 \pm 0.019	1.037 \pm 0.025	0.989 \pm 0.016
IRS-2	1.000	0.659 \pm 0.046	0.879 \pm 0.039 *	0.723 \pm 0.029
PKB	1.000	0.845 \pm 0.041	0.898 \pm 0.031	0.952 \pm 0.027
PPAR α	1.000	0.665 \pm 0.029	0.985 \pm 0.067 *	0.669 \pm 0.017

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

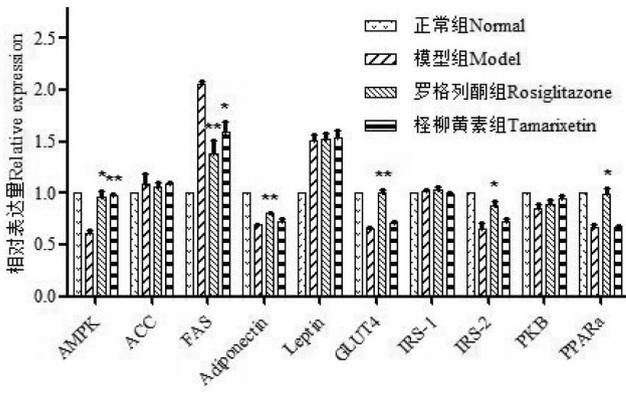


图2 桉柳黄素对 AMPK 信号通路相关基因的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of tamarixetin on AMPK signaling pathway related genes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

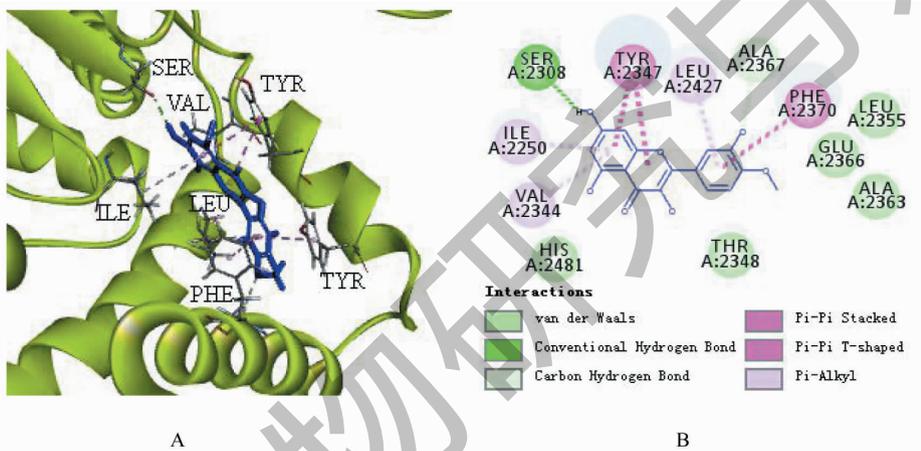


图3 桉柳黄素与 FAS 蛋白分子对接 3D(A) 和 2D(B) 模拟图

Fig. 3 Molecular docking model of tamarixetin with FAS

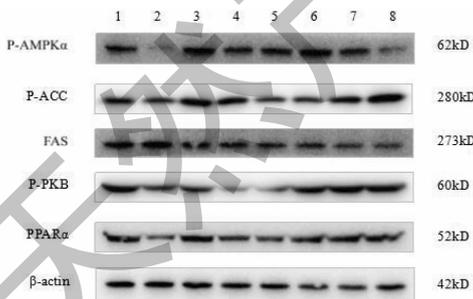


图4 桉柳黄素对 AMPK 信号通路相关蛋白的影响

Fig. 4 Effects of tamarixetin on AMPK signaling pathway related protein

注:1. 正常组;2. 模型组;3. 罗格列酮组;8. 桉柳黄素组;4~7 为本文未提到的化合物组。Note: 1. Normal; 2. Model; 3. Rosiglitazone; 8. Tamarixetin; 4-7 were other compound groups not mentioned in this article.

2.8 Western blot 检测 AMPK 信号通路相关蛋白的表达

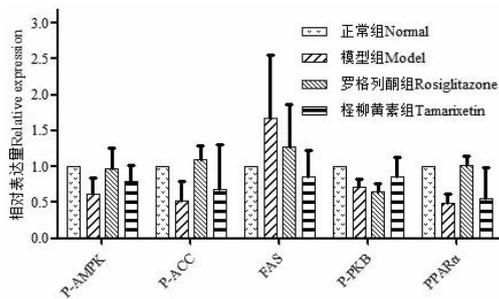
与模型组比较,桉柳黄素可增加磷酸化 AMPK (P-AMPK)、磷酸化 ACC (P-ACC)、磷酸化 PKB (P-PKB) 和 PPAR α 蛋白的表达,可抑制 FAS 蛋白的表达,但无显著性差异,结果见图 4、5 和表 7。

3 结论

桉柳黄素给予剂量增大到 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞存活下降;油红 O 染色法鉴定诱导分化前后 3T3-L1 脂肪细胞发现,细胞诱导分化后出现明显的红色脂滴;利用地塞米松孵育 48 ~ 72 h 后,模型细胞对葡萄糖的摄取量(或消耗量)明显减少 ($P < 0.01$),胰岛素抵抗模型建立;药效学研究考察发现桉柳黄素作用 48 h 后,细胞对 Glu 的摄取显著增加 ($P < 0.01$),

表 7 3T3-L1 前体细胞 AMPK 信号通路相关蛋白的相对表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 7 Expression of AMPK signaling pathway related proteins in 3T3-L1 fat cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

蛋白 Protein	正常组 Normal	模型组 Model	罗格列酮组 Rosiglitazone (3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	桉柳黄素组 Tamarixetin (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
P-AMPK	1.000	0.625 \pm 0.220	0.963 \pm 0.291	0.795 \pm 0.223
P-ACC	1.000	0.518 \pm 0.281	1.091 \pm 0.203	0.681 \pm 0.632
FAS	1.000	1.668 \pm 0.891	1.274 \pm 0.590	0.858 \pm 0.368
P-PKB	1.000	0.715 \pm 0.115	0.646 \pm 0.116	0.857 \pm 0.280
PPAR α	1.000	0.495 \pm 0.131	1.025 \pm 0.117	0.556 \pm 0.429

图 5 桉柳黄素对 AMPK 信号通路相关蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 5 Expression of tamarixetin to AMPK signaling pathway related proteins($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞内 TG 含量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 说明桉柳黄素具有一定的降糖调脂作用。

AMPK 是生物能量代谢调节的关键分子, 是研究糖脂代谢紊乱及其他相关代谢疾病的核心, 它表达于各种代谢相关器官中, 能被机体各种刺激激活, 对机体保持葡萄糖平衡起着重要的调节作用^[15]。磷酸化的 AMPK 能开启 GLUT4 的基因表达, 而 GLUT4 数量的增加, 促进了细胞对 Glu 的摄取; ACC 和 FAS 分别是脂肪酸合成的限速酶和合成酶, 它们的表达影响着脂肪的含量, AMPK 的活化能磷酸化 ACC 抑制其发挥作用, 同时还通过抑制 ACC 基因的表达限制脂肪酸的合成^[16], 激活 AMPK 导致 SREBP-1c 基因表达的降低, 从而抑制 FAS 基因的表达, 影响 TG 的生成^[17]; Adiponectin 能增加骨骼肌细胞脂肪酸氧化和糖吸收, 可以激活 AMPK, 而 Leptin 参与糖、脂肪及能量代谢的调节, 增加能量释放, 抑制脂肪细胞的合成^[18]; IRS-1、IRS-2 属于胰岛素底物受体, 其表达水平的降低可导致胰岛素信号转导障碍进而引发胰岛素抵抗^[19]; PKB 表达的降低, 会使胰岛素信号传递受阻, 导致葡萄糖摄取和糖原合

成减少^[20]; 而 PPAR α 的表达, 增加脂肪酸氧化, 减少细胞内 TG 的含量。

在进行桉柳黄素对 3T3-L1 脂肪细胞作用机制探讨中, 我们选择 AMPK 信号通路主要相关基因和蛋白进行研究, 这些基因或因子直接或间接影响 AMPK 的表达, 从而影响葡萄糖和脂肪水平。通过桉柳黄素对 10 个基因进行 qRT-PCR 的研究, 发现桉柳黄素显著提高 AMPK 基因的表达($P < 0.01$) 和显著降低 FAS 基因的表达($P < 0.05$), 可见, 桉柳黄素影响 AMPK 信号通路, 对 FAS 基因的表达具有显著抑制作用, 从而影响 TG 的生成; 在进行 Western blot 研究前, 将桉柳黄素与相关蛋白进行分子对接, 以此预测化合物与蛋白的结合能力^[21,22], 其中桉柳黄素与 FAS 蛋白结合较好; Western blot 检测结果显示桉柳黄素均可增加磷酸化 AMPK、磷酸化 ACC、磷酸化 PKB 和 PPAR α 蛋白和抑制 FAS 蛋白的表达, 但无显著性差异。

桉柳黄素作为槲皮素体内的主要代谢产物, 在对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的改善方面具有与槲皮素相似的作用。上述结果说明, 桉柳黄素具有增加 3T3-L1 脂肪细胞对 Glu 的摄取和降低细胞内 TG 含量, 其作用机制可能与 AMPK 信号通路中相关基因和蛋白表达有关, 具体机制还需进一步研究。该研究阐明了槲皮素体内代谢产物桉柳黄素具有调节糖脂代谢紊乱的作用, 为桉柳黄素降糖调脂方面的研究和开发奠定了基础。

参考文献

- Hayamizu K, Morimoto S, Nonaka M, et al. Cardiotoxic actions of quercetin and its metabolite tamarixetin through a digitalis-like enhancement of Ca^{2+} transients [J]. Arch Biochem Biophys, 2018, 637: 40-47.
- Li SY, Li Z, Wang LQ, et al. Transmembrane absorption and

- methylation metabolism of quercetin in Caco-2 monolayer cell model[J]. Chin J Pharm Toxicol(中国药理学与毒理学杂志),2019,33(4):273-280.
- 3 Shao M, Wang Y, Jian YQ, et al. Study on the chemical constituents of ethanol extract from *Guava leaves* [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志),2014,39:1024-1029.
 - 4 Ye XD. Inhibitory effect of *Ginkgo biloba* on human cytochrome P450[J]. World Notes Plant Med(国外医药:植物药分册),2005(6):263-263.
 - 5 Hu Y, Li YN, Li X, et al. Study on the flavonoids in *Blumea balsamifera* DC. and their antioxidant activity as well as α -glucosidase inhibitory activity[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:1898-1903.
 - 6 Wu MJ, Wu XL, Zhang DQ, et al. Metabolic profiling of quercetin in rats using ultra-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr,2017,31(12):1-9.
 - 7 Eseberri I, Miranda J, Lasa A, et al. Effects of quercetin metabolites on triglyceride metabolism of 3T3-L1 preadipocytes and mature adipocytes [J]. Int J Mol Sci,2019,20(2):1-13.
 - 8 Neisy A, Zal F, Seghatoleslam A, et al. Amelioration by quercetin of insulin resistance and uterine GLUT4 and ER α gene expression in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. Reprod Fertil Dev,2019,31:315-323.
 - 9 Park HJ, Lee SJ, Cho J, et al. Tamarixetin exhibits anti-inflammatory activity and prevents bacterial sepsis by increasing IL-10 production [J]. J Nat Prod,2018,81:1435-1443.
 - 10 Parajuli P, Pandey RP, Sohng JK. Regiospecific biosynthesis of tamarixetin derivatives in *Escherichia coli* [J]. Biochem Eng J,2018,133:113-121.
 - 11 Xu J, Cai X, Teng S, et al. The pro-apoptotic activity of tamarixetin on liver cancer cells via regulation mitochondrial apoptotic pathway [J]. Appl Biochem Biotechnol,2019,189:647-660.
 - 12 Stainer AR, Sasikumar P, Bye AP, et al. The metabolites of the dietary flavonoid quercetin possess potent antithrombotic activity, and interact with aspirin to enhance antiplatelet effects [J]. TH Open,2019,3(3):e244-e258.
 - 13 Fan C, Li Y, Yang H, et al. Tamarixetin? protects against cardiac hypertrophy via inhibiting NFAT and AKT pathway [J]. J Mol Histol,2019,50(4):343-354.
 - 14 Ma C, Li G, He Y, et al. Pronuciferine and nuciferine inhibit lipogenesis in 3T3-L1 adipocytes by activating the AMPK signaling pathway [J]. Life Sci,2015,136:120-125.
 - 15 Hardie DG. Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase [J]. J R Soc Interface,2018,doi:10.1098/rsif.2017.0774.
 - 16 Sambandam N, Steinmetz M, Chu A, et al. Malonyl-CoA decarboxylase (MCD) is differentially regulated in subcellular compartments by 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) Studies using H9c2 cells overexpressing MCD and AMPK by adenoviral gene transfer technique [J]. Eur J Biochem,2004,271:2831-2840.
 - 17 Diraison F, Parton L, Ferré P, et al. Over-expression of sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP1c) in rat pancreatic islets induces lipogenesis and decreases glucose-stimulated insulin release; modulation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) [J]. Biochem J,2004,378:769-778.
 - 18 Unger RH, Roth MG. A new biology of diabetes revealed by leptin [J]. Cell Metabolism,2015,21(1):15-20.
 - 19 Guo S. Molecular basis of insulin resistance; the role of IRS and Foxo1 in the control of diabetes mellitus and its complications [J]. Drug Discov Today Dis Mech,2013,10(1):27-33.
 - 20 Zhang Z, Liu H, Liu J. Akt activation: a potential strategy to ameliorate insulin resistance [J]. Diabetes Res Clin Pract,2019,doi:10.1016/j.diabres.2017.10.004.
 - 21 Maiti M, Chattopadhyay K, Verma M, et al. Curcumin protects against nicotine-induced stress during protein malnutrition in female rat through immunomodulation with cellular melioration [J]. Mol Biol Rep,2015,42:1623-1637.
 - 22 Li J, Dai CX, Sun H, et al. Protective effects and mechanisms of curcumin on podophyllotoxin toxicity *in vitro* and *in vivo* [J]. Toxicol Appl Pharmacol,2012,265:190-199.