

葛根素改善 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖摄取和胰岛素抵抗*

杨维波^{1**}, 韩福祥¹, 刘振明¹, 董红昌¹, 张建华²

(1. 山东省阳信县中医医院 阳信 251800; 2. 北京大学第一医院核医学科 北京 100034)

摘要:目的:探讨葛根素对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)模型葡萄糖利用和 IR 的影响及其作用机制。方法:诱导分化 3T3-L1 前脂肪细胞为成熟脂肪细胞;用地塞米松诱导建立 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型。成功建立模型后,将实验分为 5 组进行,分别为空白组、模型组、葛根素 10 mg·L⁻¹组、葛根素 100 mg·L⁻¹组、葛根素 200 mg·L⁻¹组;其中,空白组不建模,模型组建模但不药物干预,各葛根素组为在建立模型后,给予不同浓度的葛根素干预。用葛根素干预 24 小时后,以葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法测定细胞培养基中葡萄糖浓度,四甲基偶氮唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide, MTT]比色法检测细胞增值活力;然后分别用 Real time PCR、Western Blot 方法检测细胞葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter type 4, GLUT4)、磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/AKT)、腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ) mRNA 基因和蛋白表达。结果:葛根素干预后,细胞培养基中葡萄糖浓度均较模型组降低($P < 0.01$); GLUT4、PI3K、AKT、AMPK、PPAR γ mRNA 水平及蛋白表达较模型组均增加($P < 0.05$)。结论:葛根素能增加 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型葡萄糖利用、改善 IR,其作用机制可能与上调 PI3K、AKT、AMPK、PPAR γ 基因和蛋白表达,进而增加葡萄糖运转有关。

关键词:葛根素 3T3-L1 脂肪细胞 胰岛素抵抗 葡萄糖转运蛋白 4

doi: 10.11842/wst.2019.04.006 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

随着居民生活方式改变和老龄化进程的加速,我国糖尿病的患病率正在迅速增长,2002 年糖尿病的患病率为 2.7%^[1],2007 年增长到 9.7%^[2],2010 年一项涵盖全国 31 个省市自治区的 9.8 万 18 岁以上的人群调查显示,我国成人糖尿病患病率已上升到 11.6%,糖尿病前期患病率为 50.1%^[3],糖尿病已经成为继心脑血管、肿瘤后又一个严重危害人民健康的重要慢性非传染性疾病。糖尿病的主要类型是 2 型糖尿病,其主要病理生理机制为胰岛 β 细胞功能受损造成的胰岛素分泌不

足和胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)。

在祖国传统中医学中,糖尿病典型的临床症状属于“消渴病”的范畴,几千年来,中药在治疗“消渴病”的方面积累了很多宝贵经验。近些年来,从中药中提纯的药物有效成分应用于临床,在治疗糖尿病方面发挥了不可替代的作用,葛根素是中药葛根中活性物质异黄酮类物质的主要成分^[4],在临床实践中发现其有改善 2 型糖尿病患者糖代谢的作用。本实验旨在观察葛根素对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖摄取及对 IR 的影响,探讨其作用机制,为临床上治疗糖尿病提供新的思路。

收稿日期:2019-03-20

修回日期:2019-04-10

* 国家中医药管理局全国基层名老中医药专家传承工作室建设项目(2100409);韩福祥全国基层名老中医药专家传承工作建设,负责人:韩福祥。

** 通讯作者:杨维波,硕士研究生,主要研究方向:中医药治疗糖尿病。

表1 Real-time PCR引物序列

名称	上游引物	下游引物
GLUT4	5'-TCTCGGTGCTCTTAGTAG-3'	5'-CCAATCTCAAAGAAGGCCACAAA-3'
PI3K	5'-CAATACTTGATGTGGCTGAC-3'	5'-TGACGCAATGTTTGACTION-3'
AKT	5'-TTTATTGGCTACAAGGAACG-3'	5'-ACTCTGAATGGCGGTGGT-3'
AMPK	5'-GGTGGTTATCTGTATGCCCTTCT-3'	5'-TGTCTTGATACTTGTCTCGCTTC-3'
PPAR γ	5'-CTTTACCACGGTTGATTCTC-3'	5'-CAGGCTCTACTTTGATCCCA-3'
GAPDH	5'-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3'	5'-GCTCCTGGAAGATGCTGATGG-3'

1 材料与方法

1.1 实验材料

小鼠前脂肪细胞(3T3-L1)(中国科学院上海生命科学研究所);3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX, 美国Sigma公司);DMEM高糖培养基(赛默飞世尔生物化学制品有限公司);SDSPAGE凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术研究所);抗体 GLUT4、PI3K、AKT、AMPK、PPAR γ (Santa Cruz公司);葛根素标准品(中国药品生物制品检定所);Revertaid First Strand cDNA Synthesis Kit(美国Fermentas公司);引物和内参GAPDH(上海生工生物工程技术有限公司);Rotor-Gene荧光定量PCR仪(Corbett Research公司);凝胶成像分析系统(Bio-Rad);高速台式冷冻离心机(Thermo Fisher)。

1.2 实验方法

1.2.1 3T3-L1细胞的诱导分化

将3T3-L1前脂肪细胞置于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 培养,传至第三代细胞状态良好时,加入含0.5 mmol \cdot L $^{-1}$ IBMX、10 $^{-6}$ mol \cdot L $^{-1}$ 胰岛素、1 μ mol \cdot L $^{-1}$ 地塞米松、10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养48 h后,换为含10 μ g \cdot mL $^{-1}$ 胰岛素的培养基48 h,最后在10%胎牛血清的DMEM高糖培养基继续培养,每2天换培养液1次,诱导分化9天的3T3-L1细胞经油红O染色鉴定,90%以上呈脂肪细胞表型用于试验。

1.2.2 3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗模型建立

参照文献报道方法^[9]3T3-L1脂肪细胞诱导分化成熟后,给予1 μ mol \cdot L $^{-1}$ 地塞米松在10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中继续培养,以葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法分别在48、72、96、120 h测每孔培养液中葡萄糖的含量,与未接种细胞的空白孔葡萄糖相减,计算葡萄糖消耗量,当两组间葡萄糖的消耗量差异有统计学意义时($P < 0.05$),为造模成功。葡萄糖消耗差值比例

最大的时间点作为建立胰岛素抵抗模型最佳作用时间。

1.2.3 细胞分组

取诱导分化成熟的3T3-L1脂肪细胞,将其分为空白组、模型组、葛根素10 mg \cdot L $^{-1}$ 组、葛根素100 mg \cdot L $^{-1}$ 组和葛根素200 mg \cdot L $^{-1}$ 组。其中空白组不建模型,以含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养;模型组为建立模型但不加药物干预;其它3组为建立模型后分别用不同浓度的葛根素干预。

1.2.4 检测培养基上清中葡萄糖浓度及细胞活力测定

确定造模成功后,在葛根素干预组细胞培养体系中加入葛根素液180 μ L,使其终浓度分别为10、100、200 mg \cdot L $^{-1}$,空白组、模型组加入等体积的培养液,共同孵育24 h。分别取每组的上清液1 mL置于Eppendorf管中,高速离心,按葡萄糖测定试剂盒的操作说明书,用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法检测各组培养基上清中葡萄糖OD值。

各组按5 \times 10 4 /孔接种于96孔,每孔加入20 μ LMTT(5 g \cdot L $^{-1}$),孵育4 h,吸去上清,加入DMSO溶液150 μ L/孔,震荡10 min充分溶解结晶,用酶标仪测OD值,波长570 nm,以此代表细胞活力。

1.2.5 3T3-L1脂肪细胞RNA提取及Real time PCR分析

用1 mL TRIzol提取细胞总RNA,设计GLUT4、PI3K、AKT、AMPK、PPAR γ mRNA和3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物(表1),按照Real time PCR试剂盒说明书进行逆转录为cDNA,PCR反应条件为95 $^{\circ}$ C变性15 s,55 $^{\circ}$ C退火20 s,72 $^{\circ}$ C延伸20 s,共45个循环,反应结束后确认Real-Time PCR的扩增曲线和溶解曲线,以GAPDH为内参,计算mRNA相对表达量,进行均一化处理,再进行统计分析,引物序列(表1)。

1.2.6 Western blot法检测蛋白表达

用含1%PMSF的RIPA裂解细胞,离心取上清液,用BCA法检测蛋白浓度,取20 μ L蛋白样品,以10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)分离蛋

白,结束后转印至PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的TBST室温下封闭1h后,加入一抗,4℃孵育过夜后,PBST洗膜3次,每次10min;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温轻摇1h;用ECL法成像。

1.2.7 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的比较采用单因素方差分析,方差齐时采用SNK法,方差不齐时采用Dunnett's T3检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 地塞米松作用后不同时间细胞培养基上清葡萄糖浓度

脂肪细胞诱导分化成熟后,给予地塞米松作用,分别测48、72、96、120h空白组及模型组细胞培养基上清葡萄糖浓度,用模型组葡萄糖浓度与空白组葡萄糖浓度的差值反映细胞IR程度。结果显示,各点模型组葡萄糖浓度高于空白组($P < 0.01$),提示48h后可构建稳定的胰岛素抵抗模型;96h时差值显著高于其它时间组,证实96h时IR达最佳(表2)。

2.2 葛根素作用于胰岛素抵抗细胞后葡萄糖浓度测定

3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗模型诱导成功后,加入不同浓度的葛根素共同培养,测得各组细胞培养基上清葡萄糖含量(表3)。与空白组比较,模型组培养基上清葡萄糖OD值明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);葛根素干预后,模型组细胞葡萄糖利用增加,葡萄糖OD值与模型组比较明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。葛根素100 mg·L⁻¹组和葛根素200 mg·L⁻¹组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 葛根素对脂肪细胞活力及分化的影响

MTT结果显示,各组吸光度值与空白组相比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),提示各浓度的葛根素对3T3-L1脂肪细胞增殖活力无影响(表4)。

2.4 各组 GLUT4、PI3K、AKT、AMPK、PPAR γ mRNA Real-Time PCR 结果比较

结果显示,与空白组比较,模型组 GLUT4、PI3K、AKT、AMPK、PPAR γ mRNA 水平均降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,葛根素10 mg·L⁻¹、葛根素100 mg·L⁻¹、葛根素200 mg·L⁻¹组 GLUT4、PI3K、AKT、AMPK、PPAR γ mRNA 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);葛根素200 mg·L⁻¹组与葛根素100 mg·L⁻¹组比较 GLUT4、PI3K、AKT、AMPK、PPAR γ mRNA 水

表2 地塞米松作用后不同时间细胞上清葡萄糖浓度(OD)值

组别	n	48 h	72 h	96 h	120 h
空白组	6	1.581±0.003	1.332±0.004	1.072±0.003	0.898±0.003
模型组	6	2.032±0.004*	1.965±0.003*	1.930±0.003*	1.608±0.002*
模型组-空白组	6	0.458±0.003	0.627±0.005	0.858±0.008*	0.712±0.003

注:*与空白组比较, $P < 0.01$,*与48h、72h、120h比较, $P < 0.05$

表3 不同浓度葛根素对细胞培养基上清葡萄糖浓度的影响(OD值)

组别	n	葡萄糖浓度
空白组	6	0.835±0.003
模型组	6	1.498±0.002*
葛根素10mg·L ⁻¹	6	1.101±0.008*
葛根素100mg·L ⁻¹	6	0.901±0.007*
葛根素200mg·L ⁻¹	6	0.897±0.004* [△]

注:*与空白组比较, $P < 0.01$,*与模型组比较, $P < 0.01$,[△]与葛根素100 mg·L⁻¹组比较, $P > 0.05$ 。

表4 不同浓度葛根素对细胞增殖的影响(OD值)

组别	n	MTT
空白组	6	0.498±0.005
模型组	6	0.502±0.004*
葛根素10 mg·L ⁻¹	6	0.497±0.004*
葛根素100 mg·L ⁻¹	6	0.507±0.005*
葛根素200 mg·L ⁻¹	6	0.501±0.003*

注:*与空白组比较, $P > 0.05$

平无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表5)。

2.5 Western blot 法检测各组 GLUT4、PI3K、AKT、AMPK、PPAR γ 蛋白表达

结果比较显示,与空白组比较,模型组 GLUT4、PI3K、AKT、AMPK、PPAR γ 蛋白表达显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,葛根素10 mg·L⁻¹、葛根素100 mg·L⁻¹、葛根素200 mg·L⁻¹组 GLUT4、PI3K、AKT、AMPK、PPAR γ 蛋白表达升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),葛根素200 mg·L⁻¹组与葛根素100 mg·L⁻¹组比较, GLUT4、PI3K、AKT、AMPK、PPAR γ 蛋白表达无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表6,图1)。

3 讨论

中医认为,脾胃为后天之本,气血生化之源,饮食通过胃的受纳腐熟、脾的运化升清化生水谷精微,内养五脏六腑,外养四肢百骸、皮毛筋骨,如饮食不节、过食肥甘醇酒厚味、安逸少动,可损伤脾胃功能;脾失健运,脾不能升清、胃不降浊,气机不畅,不能散精上输于肺,

表5 各组 GLUT4、PI3K、AKT、AMPK、PPAR γ mRNA Real-Time PCR 结果比较

组别	n	GLUT4	PI3K	AKT	AMPK	PPAR γ
空白组	6	1.120±0.037	0.820±0.035	0.787±0.028	0.790±0.030	0.690±0.030
模型组	6	0.510±0.020 [△]	0.450±0.027 [△]	0.410±0.020 [△]	0.382±0.042 [△]	0.301±0.023 [△]
葛根素 10 mg·L ⁻¹	6	0.642±0.028*	0.612±0.038*	0.593±0.033*	0.518±0.032*	0.459±0.035*
葛根素 100 mg·L ⁻¹	6	0.722±0.024* [▲]	0.750±0.042* [▲]	0.688±0.038*	0.701±0.031* [▲]	0.595±0.040* [▲]
葛根素 200 mg·L ⁻¹	6	0.724±0.015*	0.752±0.035*	0.691±0.045*	0.705±0.040*	0.600±0.031*

注:△与空白组比较 $P < 0.01$, *与模型组比较 $P < 0.05$, ▲与葛根素 200 mg·L⁻¹组比较 $P > 0.05$ 。

表6 各组 GLUT4、PI3K、AKT、AMPK、PPAR γ 蛋白表达结果(蛋白灰度值)比较

组别	n	GLUT4	PI3K	AKT	AMPK	PPAR γ
空白组	6	1.150±0.015	0.660±0.018	0.791±0.021	0.591±0.030	0.612±0.025
模型组	6	0.690±0.020 [△]	0.410±0.017 [△]	0.480±0.020 [△]	0.382±0.042 [△]	0.341±0.023 [△]
葛根素 10 mg·L ⁻¹	6	0.842±0.028*	0.512±0.028*	0.603±0.033*	0.450±0.032*	0.451±0.025*
葛根素 100 mg·L ⁻¹	6	0.995±0.024* [▲]	0.580±0.032* [▲]	0.718±0.028*	0.509±0.031* [▲]	0.515±0.030* [▲]
葛根素 200 mg·L ⁻¹	6	1.004±0.025*	0.586±0.035*	0.715±0.025*	0.505±0.028*	0.520±0.030*

注:△与空白组比较, $P < 0.01$, *与模型组比较, $P < 0.05$, ▲与葛根素 200 mg·L⁻¹组比较, $P > 0.05$ 。

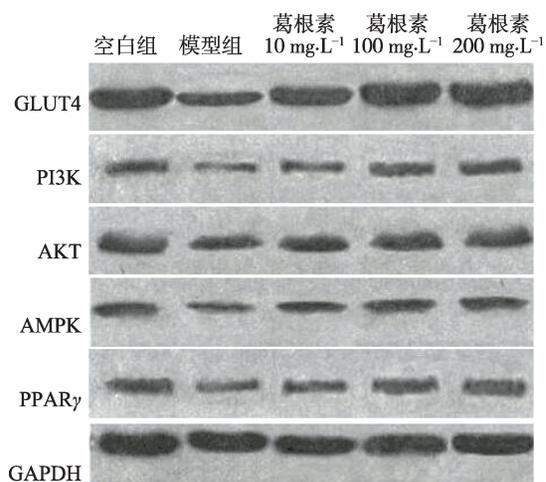


图1 Western blot 法检测各组蛋白表达

肺失津液则化燥,故口渴多饮,虚火内生,则消谷善饥。明代赵献可《医贯·消渴论》云:“脾胃既虚,则不能敷布津液故渴”,可见,糖尿病的发生于脾胃功能关系密切。

葛根为豆科植物野葛的干燥根,是调理脾胃功能的传统中药,其性味甘、辛、凉,归脾、胃经,具有解肌退热、生津止渴、升阳止泻之功效^[6],《神农本草经》记载葛根“主消渴,身大热,呕吐,诸痹,起阴气,解诸毒,葛谷,主下利”提示葛根有治疗“消渴病”的作用。以葛根为主药,配伍黄芩、黄连、甘草组成葛根芩连汤,临床上可用于治疗肥胖型2型糖尿病胃肠湿热证。有研究显

示^[7],葛根芩连汤激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ),从而上调脂联素和细胞葡萄糖转运蛋白4 (glucose transporter type 4, GLUT4)mRNA 和蛋白质表达水平,认为葛根芩连汤有调节糖尿病大鼠模型糖代谢改善脂肪 IR 的作用。

葛根素是中药葛根主要有效成分之一,近年来也有很多研究,杨蕾^[8]等用葛根素对链脲佐菌素诱导糖尿病模型小鼠干预4周后,发现葛根素降低了模型小鼠空腹葡萄糖。本实验用不同浓度的葛根素干预3T3-L1 细胞胰岛素抵抗模型后,细胞培养基中葡萄糖浓度均较模型组降低($P < 0.01$);提示葛根素有改善3T3-L1 细胞糖代谢的作用。

IR 是胰岛素作用的靶器官、组织(如肝脏、肌肉、脂肪组织等)对胰岛素的敏感性和反应性降低,是正常剂量的胰岛素产生低于正常生物学效应的一种状态^[9],是2型糖尿病的重要标志。2型糖尿病 IR 主要体现在以下3个水平^[10]:(1)受体前水平,包括胰岛素基因异常、胰岛素拮抗物质影响、胰岛素降解加速等;(2)受体水平,包括胰岛素受体基因突变、胰岛素丝氨酸/苏氨酸磷酸化、胰岛素受体抗体等;(3)受体后水平,包括胰岛素受体后信号转导和葡萄糖摄取各个环节障碍,如葡萄糖转运体合成和转运障碍等,其中以 GLUT4 尤为重要。

GLUT4 是主要的葡萄糖运载体,分布于胰岛素敏

感的骨骼肌、心肌和脂肪细胞,主要存在于细胞内,而细胞膜上的量很少,在胰岛素的刺激下细胞膜上的 GLUT4 大量增加而实现葡萄糖的运转,胰岛素刺激的 GLUT4 转运是通过 PI3K/Akt 信号通路实现的^[11]。

磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 所组成的异二聚体,有 I、II、III 型 3 个家族成员,具有磷脂酰肌醇激酶和 Ser/Thr(丝氨酸/苏氨酸)蛋白激酶的双重活性^[12]。调节亚基 p85 包含 1 个 SH3 区域、2 个富含脯氨酸区域、2 个被一非编码区分开的 Src 同源结构域(SH2)和 p110 与 p85 相互作用的非编码区,其中 2 个 SH2 可与磷酸化的酪氨酸残基结合,引起催化亚基的活化,从而传导酪氨酸激酶信号^[13]。研究表明^[14],如果采用基因敲除等技术,造成 PI3K 调节亚基 p85 和催化亚基 p110 的基因功能缺陷均可导致糖、脂代谢紊乱,说明 PI3K 对调节糖、脂代谢具有重要作用。

AKT 又称蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB),为 Ser/Thr 激酶,是 PI3K 信号通路下游的重要靶蛋白,目前发现 AKT 有 3 个亚型,由不同基因编码,具有 80% 的同源性,分布于不同组织。AKT 由 N 端 PH 结构域、中间催化域和 C 端调节结构域组成,PH 结构域介导脂质与蛋白质及蛋白质与蛋白质之间的相互作用,中间催化域可催化 Ser/Thr 残基磷酸化,C 端调节域含有磷酸化位点 Ser473,此位点是 AKT 完全活化所必需的^[15,16]。

当细胞外胰岛素与细胞膜胰岛素受体结合,引起酪氨酸蛋白激酶活化时,后者又使胰岛素受体底物发生磷酸化并与 PI3K 调节亚基 p85 的 SH2 结构域结合,招募并激活催化亚基 p110,从而催化质膜上磷脂酰肌醇磷酸化,与 AKT 的 PH 结构域结合并定位于磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 附近,活化的 AKT 从质膜转移至细胞质、线粒体和细胞核内,促使 GLUT4 囊泡前移与细胞膜融合,介导葡萄糖转运入细胞,增加葡萄糖摄取^[17];激活 PI3K 和 AKT 分子,可启动整个 PI3K/AKT 信号通路的传导,增加 GLUT4 转运,调控血糖,减少肝糖原的合成,减轻胰岛 β 细胞损伤^[18],如果胰岛素受体后 PI3K/AKT 信号通路障碍及下游靶蛋白功能异常均可引发糖、脂代谢障碍,继而导致 IR 的发生。

本实验结果显示:地塞米松诱导的 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型中 GLUT4、PI3K、AKT mRNA、蛋白表达较空白组下降,提示实验细胞模型有明显的糖代谢障碍和 IR;加入葛根素处理后以上指标明显升高,呈剂量依赖性,但 200 mg·L⁻¹ 组与 100 mg·L⁻¹ 相比差异

无统计学意义($P > 0.05$),推测葛根素能通过 PI3K/AKT 信号途径升高 GLUT4 表达,改善脂肪细胞 IR。

腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)途径也是胰岛素信号转导的重要通路,AMPK 是一种参与调节细胞机体能量代谢、信号转导的蛋白激酶,广泛存在于肝脏、骨骼肌和脂肪组织中。AMPK 一种异源三聚体蛋白,由 α 、 β 、 γ 3 个亚单位组成,AMPK 在调节肌体能量代谢的平衡方面起总开关作用,其活性受 AMP/ATP 比值调控,参与多种代谢过程,能调节糖、脂肪和蛋白质代谢,运动、组织缺血、缺氧等,都可以激活 AMPK 通路,活化的 AMPK 使脂肪酸氧化作用、肝糖原的转化、骨骼肌对葡萄糖的摄取增强,并通过诱导 GLUT4 向质膜转移,并通过磷酸化转录因子开启 GLUT4 基因的表达,增加脂肪组织中葡萄糖的利用,从而使得机体对葡萄糖的摄取增强^[19,20]。

PPAR γ 是核受体过氧化物酶体增殖物激活受体的一个亚型,人体很多组织都能分泌 PPAR γ ,但以脂肪组织最多,动物实验表明,激活脂肪细胞中 PPAR γ ,可诱导内脏和皮下大脂肪细胞较少,小脂肪细胞数目增加,从而增加胰岛素的敏感性^[21]。PPAR γ 激活后,主要通过以下方式提高胰岛素敏感性^[22],改善 IR:①促进白色脂肪细胞分化,使其数量增多、体积减小,并增加胰岛素受体的数目。抑制脂肪细胞的肥大和脂肪分解,诱导大脂肪细胞的凋亡;②调控脂肪细胞的分泌功能,增强脂联素等细胞因子的合成;③促进与胰岛素信号转导有关的多种基因的转录:通过上调 PI3K 亚单位 p85、CAP 增加 GLUT4 的表达,进而促进胰岛素信号转导;④激活 AMPK,通过非胰岛素依赖机制促进外周组织细胞的葡萄糖转运,抑制糖诱导的胰岛素释放,以改善葡萄糖代谢和高胰岛素血症。本实验检测到地塞米松诱导的 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型中 AMPK、PPAR γ mRNA、蛋白表达较空白组下降,加入葛根素处理后明显升高,推测葛根素改善脂肪细胞糖代谢和 IR 可能与 AMPK、PPAR γ 升高有关。

研究显示^[23],PI3K/AKT 和 AMPK 信号通路存在复杂的交互作用,一方面,AMPK 的激活可以促进 PI3K 和 AKT 等多种 PI3K/AKT 信号通路分子的活性增加,抑制胰岛素受体底物-1 调控的负反馈回路,还可以通过调节 PI3K 来激活 AKT;PPAR γ 活化也能促进 PI3K 的亚单位 P85 的表达,促进胰岛素信号转导;另一方

面, PI3K/AKT能调节 AMPK 活性,也可通过调节 C/EBP α 、PPAR γ 的表达,在 3T3-L1 前脂肪细胞的分化中发挥重要作用^[24]。

肥胖可引起 IR,进而引起糖尿病,目前的研究显示随着身体质量指数和脂肪组织增加,糖尿病的发病率会升高^[25]。脂肪组织是 IR 发生的重要的靶组织,增加脂肪细胞的胰岛素敏感度和葡萄糖摄取是治疗 2 型糖尿病的手段之一。3T3-L1 前脂肪细胞是 Swiss 小鼠

胚胎成纤维细胞,能在诱导剂作用下分化为脂肪细胞,被广泛应用于糖、脂代谢相关的基础和实验研究。本实验选择用地塞米松诱导建立 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型,从细胞水平研究葛根素对 IR 的作用机制,结果显示,3T3-L1 脂肪细胞发生 IR 后,葡萄糖摄取能力明显下降,而葛根素能增加其对葡萄糖的摄取,改善 IR,其机制可能与上调 P13K、AKT、AMPK、PPAR γ 基因和蛋白表达有关。

参考文献

- Liu S, Wang W, Zhang J, et al. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in Chinese adults. China National Nutrition and Health Survey, 2002. *J Prev Chronic Dis*, 2011, 8: A13.
- Yang W, Lu J, Weng J, et al. China National Diabetes and Metabolic Disorders Study Group. Prevalence of diabetes among men in China. *N Engl J Med*, 2010, 362: 1090-1101.
- 徐瑜, 毕宇芳, 王卫庆, 等. 中国成人糖尿病流行与控制现状——2010 年中国慢病监测暨糖尿病专题调查报告解读. *中华内分泌代谢杂志*, 2014, 30(3): 184-186.
- 李昕, 潘俊娟, 陈士国, 等. 葛根化学成分及药理作用研究进展. *中国食品学报*, 2017, 19(7): 189-195.
- 何彦峰, 李刚, 盖祥云, 等. 荜草素抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化及其改善胰岛素抵抗的作用研究. *中国药理学通报*, 2017, 33(9): 1221-1225.
- 陈光耀, 方锦颖, 郑思思, 等. 中药葛根对糖尿病的相关研究进展. *时珍国医国*, 2017, 28(17): 2716-2718.
- 罗新新, 朱水兰, 李冰涛, 等. 葛根苷连汤激活 PPAR γ 上调脂联素和 GLUT4 表达改善脂肪胰岛素抵抗. *中国中药杂志*, 2017, 42(23): 4641-4648.
- 杨蕾, 舒雯, 姚冬冬, 等. 葛根素对链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠降糖作用. *中国医院药学杂志*, 2014, 34(14): 1338-1342.
- Van DBG, Wouters P, Weekers F, et al. Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N Engl J Med*, 2001, 345(19): 1359-1367.
- 陈京昆. 葡萄糖转运体 4 的定位、分布及影响因素. *卫生研究*, 2018, 47(3): 507-511.
- 迟毓婧, 李晶, 管又飞, 等. PI3K-Akt 信号传导通路对糖代谢的调控作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26(10): 879-885.
- Breitbart H, Rotman T, Rubinstein S, et al. Role and regulation of PI3K in sperm capacitation and the acrosome reaction. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 314(2): 234-238.
- Jabbour E, Ottmann OG, Deininger M, et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematologic malignancies. *Haematologica*, 2014, 99(1): 7-18.
- Winnay JN, Dirice E, Liew CW, et al. p85 α Deficiency protects β -cells from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(3):1192-1197.
- Du K, Tschlis PN. Regulation of the Akt kinase by interacting proteins. *Oncogene*, 2005, 24 (50): 7401-7409.
- Xiao X, He Y, Li C, et al. Nicastrin mutations in familial acne inversa impact keratinocyte proliferation and differentiation through Notch and PI3K-AKT signaling pathways. *Br J Dermatol*, 2016, 174(3): 522-532.
- Wang H, Zhang Q, Wen Q, et al. Proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) : a novel downstream target of PI3k/Akt signaling pathway. *Cell Signal*, 2012, 24(1): 17-24.
- 迟毓婧, 李晶, 管又飞, 等. PI3K-AKT 信号传导通路对糖代谢的调控作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26(10): 879-885.
- Hinanack G, Defronso RA, Musi N. AMP-activated protein kinase: role in metabolism and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab*, 2006, 8(6): 591-602.
- 陈标, 满玉蓉, 高柳玲, 等. AMPK 调控能量代谢研究进展. *生物学报*, 2017, 34(5): 78-82.
- Lin CY, Gurlo T, Haataja L, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ by rosiglitazone protects human islet cells against human islet amyloid polypeptide toxicity by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(12): 6678-6686.
- 徐征鹏, 崔雪娜, 徐金娥. 过氧化物酶体增殖物激活受体在妊娠期糖尿病发病中的作用研究进展. *山东医药*, 2017, 57(19): 108-111.
- Bruss MD, Arias EB, LieIillard GE, et al. Increased phosphorylation of AKT substrate of 160 KDa(AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. *Diabetes*, 2005, 54(1): 41-50.
- 高金枝, 郑睿丹, 王成, 等. PI3K 抑制剂 LY294002 对鼠前脂肪细胞分化和 C/EBP α 及 PPAR γ 表达的影响. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(10): 823-825.
- 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版). *中华糖尿病杂志*, 2018, 10(1): 4-67.

Puerarin Improves the Glucose Uptake and Insulin Resistance of 3T3-L1 Adipocytes

Yang Weibo¹, Han Fuxiang¹, Liu Zhenming¹, Dong Hongchang¹, Zhang Jianhua²

(1. Shandong Yangxin County Traditional Chinese Medicine Hospital, Yangxin 251800, China;

2. Department of Nuclear Medicine, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

Abstract: Objective: To observe the effects of puerarin on glucose utilization and insulin resistance (IR) in 3T3-L1 adipocyte IR model, and to explore its mechanism. Methods: The induced differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into mature adipocytes was followed by the induction of dexamethasone to establish the insulin resistance model of 3T3-L1 adipocytes. After the successful establishment of the model, the experiment was divided into 5 groups: a blank group, a model group, a puerarin 10 mg·L⁻¹ group, a puerarin 100 mg·L⁻¹ group, and a puerarin 200 mg·L⁻¹ group. Among them, the blank group did not establish model. The model was constructed without drug intervention in the model group, and puerarin groups were given different concentrations of puerarin intervention after the model was established. After 24 hours of intervention with puerarin, glucose concentration in cell culture medium was determined by glucose oxidase-peroxidase method, and cell proliferation activity was detected by tetramethylazazole blue [MTT] colorimetric method. Then, the expressions of glucose transporter type 4 (GLUT4), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (PKB/AKT), denosine monophosphate activated protein kinase (AMPK), and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) mRNA were detected by Real time PCR and Western Blot. Results: After puerarin intervention, the glucose concentration in cell culture medium was decreased than that in the model group ($P < 0.01$). The mRNA levels and protein expressions of GLUT4, PI3K, AKT, AMPK and PPAR γ were all increased compared with the model group ($P < 0.05$). Conclusion: Puerarin can increase the utilization of glucose and improve IR in the insulin resistance model of 3T3-L1 adipocytes, and its mechanism may be related to the up-regulation of PI3K, AKT, AMPK, PPAR γ gene and protein expression, thus increasing glucose metabolism.

Keywords: puerarin; 3T3-L1 adipocytes; insulin resistance; glucose transporter type 4

(责任编辑:周哲琦,责任译审:王 昭)