

• 药理与临床 •

3'-羟基葛根素对脂肪细胞 3T3-L1 胰岛素抵抗的影响及其机制研究

王小康¹, 刘清霞², 叶开和¹, 魏崧丞¹, 马锦锦¹, 叶春玲^{1*}

1. 暨南大学药学院 药理学教研室, 广东 广州 510632

2. 顺德区伍仲珮纪念医院, 广东 佛山 528300

摘要: **目的** 探讨 3'-羟基葛根素改善胰岛素抵抗的作用及其机制。**方法** 采用 MTT 法检测 3'-羟基葛根素对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响; 油红 O 染色法检测其对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响。以地塞米松诱导分化成熟的脂肪细胞, 建立胰岛素抵抗模型, 分别采用葡萄糖氧化酶法和比色法检测细胞培养上清液中葡萄糖消耗量和游离脂肪酸 (FFA) 生成量; 实时荧光定量 PCR 法分析脂肪细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxysome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ) 和蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B) 的基因表达。采用嵌合蛋白基因试验检测 3'-羟基葛根素的 PPAR γ 配体结合活性和比色法检测其对 PTP1B 酶活性的影响。**结果** 与溶媒对照组相比, 1~10 $\mu\text{mol/L}$ 3'-羟基葛根素显著促进 3T3-L1 前脂肪细胞增殖及细胞分化 ($P < 0.05, 0.01$)。与模型组相比, 无论在基础状态还是胰岛素刺激状态, 3'-羟基葛根素均能显著增加胰岛素抵抗脂肪细胞葡萄糖利用率、减少 FFA 的产生 ($P < 0.05, 0.01$); 同时显著上调胰岛素抵抗脂肪细胞 PPAR γ 基因的表达, 但对 PTP1B 基因表达无明显影响 ($P > 0.05$)。与溶媒对照组相比, 3'-羟基葛根素在 0.1、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时能对 PPAR γ 产生激活作用 ($P < 0.05, 0.01$), 但对 PTP1B 酶活性没有明显抑制作用 ($P > 0.05$)。**结论** 3'-羟基葛根素能促进胰岛素抵抗脂肪细胞葡萄糖利用、抑制 FFA 产生, 从而改善胰岛素抵抗, 其机制可能与上调 PPAR γ 基因表达有关。

关键词: 3'-羟基葛根素; 3T3-L1 脂肪细胞; 胰岛素抵抗; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)16-2352-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.16.014

Effects of 3'-hydroxy puerarin on improving insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and their mechanisms

WANG Xiao-kang¹, LIU Qing-xia², YE Kai-he¹, WEI Song-cheng¹, MA Jin-jin¹, YE Chun-ling¹

1. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2. Shunde Wuzhongpei Memory Hospital, Foshan 528300, China

Abstract: Objective To investigate the effects of 3'-hydroxy puerarin on improving insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and their mechanisms. **Methods** The proliferation of 3T3-L1 preadipocytes was tested by MTT assay and the differentiation by oil red O staining. The insulin resistance model was induced by dexamethasone. Cellular glucose consumption was determined by GOD-POD assay and the concentration of FFA by colorimetric methods. The expression of PPAR γ and PTP1B genes in insulin resistant adipocytes was analyzed by qPCR. The PPAR γ -transactivation activity of 3'-hydroxy puerarin was examined by using a hybrid reporter gene assay and the activity of PTP1B by colorimetric methods. **Results** Compared with the medium control group, 3'-hydroxy puerarin significantly activated PPAR γ at 0.1 and 10 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05, 0.01$), but showed no effect on PTP1B ($P > 0.05$); increased the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes at 1—10 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05, 0.01$). Compared with model group, 3'-hydroxy puerarin enhanced cellular glucose consumption in insulin resistant adipocytes both in basic and insulin stimulation states, decreased the production of FFA, and up-regulated the expression of PPAR γ gene ($P < 0.01$), but showed no effect on the expression of PPAR γ gene ($P > 0.05$). **Conclusion** 3'-Hydroxy puerarin can improve the insulin resistance via up-regulating the expression of PPAR γ .

Key words: 3'-hydroxy puerarin; 3T3-L1 adipocytes; insulin resistance; peroxysome proliferator-activated receptor gamma; protein tyrosine phosphatase 1B

收稿日期: 2013-10-31

基金项目: 广东省高等学校科技创新重点项目 (cxzd1111)

作者简介: 王小康 (1989—) 男, 硕士研究生, 研究方向为内分泌药理学。E-mail: 372664470@qq.com

*通信作者 叶春玲 Tel: (020)85223843 E-mail: yechunling2005@163.com

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根^[1], 分布于我国除新疆、西藏外的广大地区。异黄酮类化合物是葛根的主要活性成分, 已有研究发现其具有抗糖尿病、调血脂、改善血液循环和增强免疫力等药理作用^[2]。3'-羟基葛根素 (3'-hydroxy puerarin) 是葛根异黄酮类化合物的重要组成成分, 且在葛根中的量较高。然而, 有关 3'-羟基葛根素药理作用的研究报道较少。本研究旨在通过观察 3'-羟基葛根素对前脂肪细胞 3T3-L1 增殖、分化以及胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞糖脂代谢的影响, 研究 3'-羟基葛根素的抗糖尿病作用; 同时通过探讨 3'-羟基葛根素对过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxysome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ) 和蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B) 活性的影响以及基因表达的变化, 分析其作用的分子机制。

1 材料

1.1 实验细胞

3T3-L1 前脂肪细胞株购于中国医学科学院细胞中心。人肝癌细胞株 HepG2 由中国医学科学院医药生物技术研究所以肿瘤室提供。

1.2 药品与试剂

3'-羟基葛根素 (质量分数 $\geq 97\%$, 批号 DP-0300) 购自上海榕柏生物技术生物有限公司; 马来酸罗格列酮 (简称罗格列酮, 批号 YY10901) 购自上海源叶生物科技有限公司; 正钒酸钠购自阿拉丁公司; 地塞米松 (批号 D1756)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (批号 101188683)、胰岛素 (批号 15500) 均购自 Sigma 公司; 葡萄糖测定试剂盒购自上海荣盛生物药业有限公司; 游离脂肪酸 (FFA) 测定试剂盒购自南京建成生物有限公司; MEM 培养基购自 Hyclone 公司; pGL3-promotor-GAL4 和 pBIND-PPAR γ -LBD 两种质粒由中国医学科学院医药生物技术研究所以构建得到; 荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司; 脂质体 2000 转染试剂购自 Promega 公司; 逆转录酶 qPCR RT 试剂盒购自日本 Toyobo 公司; 荧光定量 qPCR 试剂盒购自美国 BIO-RAD 公司; PTP1B 检测试剂盒购自 ENZO 公司。

1.3 仪器

NU-4750 型 CO₂ 恒温培养箱 (美国 Nuair 公司); BR4i 低温高速离心机 (美国 Thermo 公司);

ELX800 多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); NANODROP2000RNA 浓度测试仪 (美国 Thermo 公司); CFD-3120 荧光实时定量 PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

3T3-L1 前脂肪细胞培养于含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养液中, HepG2 细胞培养于含 10%胎牛血清的 MEM 培养液中, 均置于 37 °C、湿度 95%、5% CO₂ 的细胞培养箱内培养。当细胞贴壁长满后, 用胰酶消化, 按 1:4 的比例传代, 取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 MTT 法测定 3T3-L1 前脂肪细胞增殖

将 3T3-L1 前脂肪细胞转入 96 孔板中, 调整细胞密度为 3×10^3 个/孔。设置空白对照组、溶媒对照组 (0.1% DMSO)、3'-羟基葛根素 (0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$) 组、罗格列酮 (10.0 $\mu\text{mol/L}$) 组和正钒酸钠 (10.0 $\mu\text{mol/L}$) 组。3T3-L1 细胞按照不同处理方法作用 48 h 后, 每孔加入 MTT 20 μL , 孵育 4 h 后, 吸出旧培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 混匀后置酶标仪主波长为 570 nm, 副波长为 630 nm 处测量吸光度 (A) 值, 计算增殖促进率。

$$\text{增殖促进率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白对照}}) / A_{\text{空白对照}}$$

2.3 油红 O 染色鉴定 3T3-L1 前脂肪细胞分化

3T3-L1 前脂肪细胞生长至接触抑制, 加入含有 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松和 10 mg/L 胰岛素的高糖 DMEM 培养基诱导 48 h 后, 换为含 10 mg/L 胰岛素的高糖 DMEM 培养基再培养 48 h, 随后换用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基继续培养, 每隔 2 d 换液, 诱导分化 8~12 d 后, 90%以上呈脂肪细胞表型可用于实验。在诱导分化第 6 天加入不同浓度的药物干预, 药物分组同“2.2”项, 作用 48 h 后弃去培养液, PBS 洗 3 次, 10%多聚甲醛固定 30 min, 用灭菌水洗 3 次, 加入油红 O 溶液染色 30 min, 灭菌水洗 3 次, 显微镜下观察, 异丙醇充分溶解染色脂肪细胞内的油红 O, 选择 520 nm 波长在酶标仪上测定 A 值, 计算分化促进率。

$$\text{分化促进率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白对照}}) / A_{\text{空白对照}}$$

2.4 胰岛素抵抗脂肪细胞葡萄糖消耗量和 FFA 定量测定

取诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞, 将其分为对照组和模型组, 对照组给予普通高糖 DMEM

培养基, 模型组给予含有 1 μmol/L 地塞米松的培养基, 孵育 96 h 后取细胞上清液, 用葡萄糖氧化酶 (GOD-POD) 法测定细胞上清液中葡萄糖的量以反映胰岛素抵抗的程度。确定造模成功后, 再分为空白对照组、溶媒对照组、模型组、3'-羟基葛根素组、罗格列酮组和正钒酸钠组, 其中模型组给予正常 DMEM 培养基培养, 其余组的处理方式同“2.2”项。另外, 上述各组再分别按照不加胰岛素处理和加 1 nmol/L 胰岛素处理。根据不同处理方法作用 48 h 后, 取细胞上清液, 分别采用 GOD-POD 法和比色法检测细胞上清液中葡萄糖和 FFA 的量, 按公式分别计算葡萄糖消耗率和 FFA 抑制率。

$$\text{葡萄糖消耗率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白对照}}) / A_{\text{空白对照}}$$

$$\text{FFA 抑制率} = (A_{\text{空白对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{空白对照}}$$

2.5 实时荧光定量 PCR 法测定 PPAR γ 和 PTP1B mRNA 的表达

取诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞, 按“2.4”项方法制备胰岛素抵抗模型, 确定造模成功后, 加入不同药物干预, 设置 6 个不同处理组: 空白对照组、模型组、溶媒对照组、3'-羟基葛根素 (0.1、1.0、10.0 μmol/L) 处理组、罗格列酮组和正钒酸钠组, 根据不同处理方法作用 48 h, 收集药物处理后的细胞, 用 Trizol 法提取细胞的总 RNA 溶于无 RNase 水中, 紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 值 (1.8~2.0)。RT-PCR 仪进行逆转录构建 cDNA 模板, 逆转录反应条件参照试剂盒说明。PPAR γ 上游引物 5'-AGGCCGAGAAGGAGAAGCTGTTG-3', 下游引物 5'-TGGCCACCTCTTTGCTCTGCTC-3', PCR 产物为 276 bp; PTP1B 上游引物 5'-AGTACGACAGTTGGAGTTGG-3', 下游引物 5'-TCGGGTGGAAGGTCTAGATC-3', PCR 产物为 450 bp; β -actin 上游引物 5'-CCACTGCCGCATCCTCTTCCTC-3', 下游引物 5'-TCCTGCTTGCTGATCCACATCT-3', PCR 产物为 400 bp。实时荧光定量 PCR 仪扩增条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 61.3 °C (PPAR γ) 或 57 °C (PTP1B) 退火 5 s, 45 个循环。以 β -actin 为管家基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达的相对变化, 其中, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{未知样品}} - Ct_{\text{未知样品内参}}) - (Ct_{\text{基准样品}} - Ct_{\text{基准样品内参}})$ 。

2.6 PTP1B 酶活性测定

体外酶活性测定, 采用 PTP1B 检测试剂盒方法检测 3'-羟基葛根素 (0.1、1.0、10.0 μmol/L) 对 PTP1B 酶活性的影响, 根据试剂盒指示进行操作, 其中 IR5

作为 PTP1B 的底物, PTP1B 抑制剂舒拉明 (Suramin) 作为阳性对照物。同时观察正钒酸钠在此酶体系的抑制效果。

2.7 嵌合蛋白基因实验

人肝癌细胞株 HepG2 细胞用 MEM 培养基 (加入 10% FBS) 培养, 消化计数后以 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h 后, 用脂多糖 2000 试剂将重组质粒 pGL3-promotor-GAL4 和 pBIND-PPAR γ -LBD 共转染入细胞中, 转染 6 h 后加药, 药物分组为溶媒对照组 (含 0.1% DMSO)、3'-羟基葛根素 (0.1、1.0、10.0 μmol/L) 处理组、罗格列酮 (1.5 μmol/L) 组。24 h 后用荧光素酶检测试剂盒检测细胞中荧光酶的活性。计算待测样品对荧光素酶活性的改变率 (改变率 = 给药组荧光素酶活性/对照组荧光素酶活性)。

2.8 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 多组比较采用方差分析 (One-Way ANOVA), 两组比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖和分化的影响

与溶媒对照组比较, 3'-羟基葛根素在浓度为 1.0~10.0 μmol/L 时显著促进 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖和分化 ($P < 0.05$ 、0.01), 且具有浓度依赖性。阳性药罗格列酮能显著促进 3T3-L1 前脂肪细胞增殖和分化 ($P < 0.01$), 而正钒酸钠则能明显促进 3T3-L1 前脂肪细胞增殖, 但抑制其分化。结果见表 1。

表 1 3'-羟基葛根素对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖和分化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of 3'-hydroxy puerarin on proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	增殖促进率 / %	分化促进率 / %
溶媒对照	—	0.45 ± 0.14	1.34 ± 0.22
3'-羟基葛根素	0.1	3.23 ± 0.50	7.13 ± 0.52
	0.3	8.56 ± 0.82	9.15 ± 0.92
	1.0	11.22 ± 0.66*	12.26 ± 1.01*
	3.0	14.32 ± 0.71*	16.91 ± 0.68*
	10.0	24.28 ± 0.94**	21.39 ± 0.92**
罗格列酮	10.0	34.21 ± 0.72**	31.46 ± 0.93**
正钒酸钠	10.0	23.22 ± 0.46**	-12.14 ± 0.69*

与溶媒对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs solvent control group, same as below

3.2 对胰岛素抵抗脂肪细胞葡萄糖消耗量的影响

与溶媒对照组比较,无论在基础状态还是胰岛素刺激状态,胰岛素抵抗脂肪细胞的葡萄糖消耗量均显著降低 ($P < 0.01$),证明成功建立胰岛素抵抗模型。与模型组比较,3'-羟基葛根素在 1.0~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时能显著增加胰岛素抵抗脂肪细胞的葡萄糖消耗量 ($P < 0.05$ 、0.01);罗格列酮和正钒酸钠均能显著促进胰岛素抵抗脂肪细胞的葡萄糖消耗量 ($P < 0.01$),结果见表 2。

3.3 对胰岛素抵抗脂肪细胞 FFA 产生的影响

与模型组比较,3'-羟基葛根素在 1.0~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时能显著减少胰岛素抵抗脂肪细胞 FFA 的

产生 ($P < 0.05$ 、0.01);罗格列酮和正钒酸钠均显著抑制胰岛素抵抗脂肪细胞 FFA 产生 ($P < 0.01$),结果见表 2。

3.4 对胰岛素抵抗脂肪细胞 PPAR γ 和 PTP1B mRNA 表达的影响

由表 3 可知,与模型组比较,3'-羟基葛根素在 0.1~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时能显著上调 PPAR γ 的 mRNA 表达 ($P < 0.01$),但对 PTP1B 基因的表达则无明显影响 ($P > 0.05$);罗格列酮的结果与 3'-羟基葛根素一致。正钒酸钠结果则与 3'-羟基葛根素相反,其显著下调 PTP1B 基因表达 ($P < 0.01$),但对 PPAR γ 基因表达无明显影响 ($P > 0.05$)。

表 2 3'-羟基葛根素对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量和 FFA 生成量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of 3'-hydroxy puerarin on glucose consumption and FFA production in insulin resistant 3T3-L1 adipocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	葡萄糖消耗率 / %		FFA 抑制率 / %
		不含胰岛素	含胰岛素	
溶媒对照	—	40.64 \pm 0.62	44.65 \pm 1.07	54.80 \pm 2.01
模型	—	1.32 \pm 0.12**	2.31 \pm 0.14**	3.24 \pm 0.81**
3'-羟基葛根素	0.1	7.81 \pm 0.38	10.35 \pm 0.63	5.44 \pm 0.38
	0.3	10.48 \pm 0.62	16.36 \pm 0.43 [▲]	10.56 \pm 0.34
	1.0	16.10 \pm 0.74 [▲]	20.17 \pm 1.15 ^{▲▲}	13.97 \pm 1.23 [▲]
	3.0	18.35 \pm 0.59 ^{▲▲}	24.29 \pm 0.97 ^{▲▲}	15.64 \pm 1.02 [▲]
	10.0	23.02 \pm 1.11 ^{▲▲}	26.31 \pm 1.30 ^{▲▲}	20.17 \pm 1.35 ^{▲▲}
罗格列酮	10.0	36.50 \pm 1.05 ^{▲▲}	42.13 \pm 0.84 ^{▲▲}	42.81 \pm 1.23 ^{▲▲}
正钒酸钠	10.0	26.13 \pm 0.67 ^{▲▲}	31.25 \pm 0.89 ^{▲▲}	39.65 \pm 1.34 ^{▲▲}

与模型组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$, 下同

[▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs model group, same as below

表 3 3'-羟基葛根素对胰岛素抵抗脂肪细胞 PPAR γ 和 PTP1B mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of 3'-hydroxy puerarin on relative mRNA expression of PPAR γ and PTP1B of insulin resistant adipocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	PPAR γ	PTP1B
溶媒对照	—	2.61 \pm 0.10 ^{▲▲}	0.40 \pm 0.01 ^{▲▲}
模型	—	1.00 \pm 0.05	1.00 \pm 0.04
3'-羟基葛根素	0.1	1.84 \pm 0.16 ^{▲▲}	1.17 \pm 0.10
	1.0	2.36 \pm 0.11 ^{▲▲}	0.92 \pm 0.07
	10.0	3.83 \pm 0.13 ^{▲▲}	1.03 \pm 0.18
罗格列酮	10.0	3.93 \pm 0.19 ^{▲▲}	0.92 \pm 0.12
正钒酸钠	10.0	0.83 \pm 0.07	0.21 \pm 0.06 ^{▲▲}

3.5 对 PTP1B 活性的影响

从表 4 可知,与溶媒对照组比较,舒拉明在 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时能显著抑制 PTP1B 活性,抑制率达 64.63%,提示本实验酶反应体系建立成功。正钒酸钠是公认的 PTP1B 抑制剂,本实验发现其 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时对 PTP1B 的抑制率为 15.33%。3'-羟基葛根素却明显激活 PTP1B 活性 ($P < 0.01$),即对 PTP1B 没有抑制作用。

3.6 对 PPAR γ 激活的影响

从表 5 可知,与溶媒对照组比较,罗格列酮能明显激活 PPAR γ ($P < 0.01$),其荧光强度增加了 3.75 倍。3'-羟基葛根素在 0.1~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 内对 PPAR γ 具有显著的激动作用 ($P < 0.05$ 、0.01),尤其是在 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时荧光强度增加了 1.49 倍。

表 4 3'-羟基葛根素对 PTP1B 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)Table 4 Effects of 3'-hydroxy puerarin on PTP1B enzymatic activity ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	C / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	PTP1B 抑制率 / %
溶媒对照	—	1.52 ± 0.32
3'-羟基葛根素	0.1	-18.96 ± 0.03**
	1.0	-18.48 ± 0.05**
	10.0	-15.07 ± 0.01**
正钒酸钠	10.0	15.33 ± 0.64**
舒拉明	10.0	64.63 ± 0.17**

表 5 3'-羟基葛根素对细胞 PPAR γ 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)Table 5 Effects of 3'-hydroxy puerarin on PPAR γ activity ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	C / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	上调倍数 / %
溶媒对照	—	1.00 ± 0.00
3'-羟基葛根素	0.1	1.26 ± 0.03*
	1.0	1.16 ± 0.02*
	10.0	1.49 ± 0.04**
罗格列酮	1.5	3.75 ± 0.08**

4 讨论

脂肪组织作为人体最大的能量储备系统,是胰岛素作用的重要靶点和糖脂代谢的主要场所^[3]。一旦脂肪细胞出现胰岛素抵抗,就会严重影响周围组织的糖脂代谢,使葡萄糖摄取减少,FFA 产生增多。脂肪组织过度分泌的 FFA 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、瘦素 (leptin)、抵抗素 (resistin) 等脂肪因子,可以进一步影响其他组织的胰岛素敏感性,也对胰岛 β 细胞产生毒性,影响其胰岛素的合成和分泌,加重糖脂代谢的紊乱^[4]。本实验选用地塞米松诱导 3T3-L1 脂肪细胞建立胰岛素抵抗模型,发现 3'-羟基葛根素能显著增加胰岛素抵抗脂肪细胞葡萄糖消耗量和减少 FFA 的产生,提示 3'-羟基葛根素对胰岛素抵抗具有明显的改善作用。

PPAR γ 是一种配体激活的转录因子^[5]。当被配体激活后,它可与维甲酸类受体 (RXR) 形成异源二聚体,再与反应元件 (PPRE) 结合,调控下游靶基因的转录活化,从而改善胰岛素敏感性^[6]。噻唑烷二酮类 (TZD) 药物如罗格列酮和吡格列酮等是目前以 PPAR γ 为靶点的治疗 2 型糖尿病的代表药物。但是这些药物在临床应用上通常会带来体质量增加、浮肿、增加充血性心力衰竭的发生率等不良反应^[7-8]。因此,近年来治疗 2 型糖尿病的药物研究

集中在寻求具有与 TZD 类药物有相似疗效但毒副作用更小的 PPAR γ 配体上。本实验通过在 HepG2 细胞中转染质粒重组质粒 pGL3-promotor-GAL4 和 pBIND-PPAR γ -LBD 观察 3'-羟基葛根素对 PPAR γ 活性的影响,结果发现罗格列酮能明显激活 PPAR γ ,而 3'-羟基葛根素对 PPAR γ 也有明显的激活效应,揭示其可能是潜在的 PPAR γ 配体化合物。

脂肪细胞分化是由分化转录因子调控的复杂过程。PPAR γ 作为脂肪分化过程中重要的调节因子,其激活能促进脂肪细胞分化^[9-10],但这也正是 TZD 类药物在临床应用中使患者体质量增加的主要原因。在 3T3-L1 前脂肪细胞分化的过程中分别加入不同浓度的 3'-羟基葛根素,结果显示了 3'-羟基葛根素能促进脂肪细胞分化,且作用效果呈量效关系。但是,也发现 3'-羟基葛根素促进脂肪细胞分化的能力明显弱于相同浓度的罗格列酮,提示其较 TZD 类药物可能会降低体质量增加的风险。

PTP1B 一直被认为是胰岛素受体后信号转导的主要负性调控因子,近年来更是成为治疗肥胖、2 型糖尿病等胰岛素抵抗相关疾病的新靶点^[11]。正钒酸钠是公认的 PTP1B 抑制剂,故本实验选择其作为阳性对照药之一,结果发现 3'-羟基葛根素与正钒酸钠作用相反,对 PTP1B 活性以及基因表达无明显影响,但与罗格列酮相似,均能显著上调 PPAR γ 基因表达,尤其是在浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时提高的程度接近同浓度处理的罗格列酮,提示 3'-羟基葛根素可能具有胰岛素增敏作用,且其增敏作用可能与 PPAR γ 激活途径有关。

参考文献

- [1] 郑皓,王晓静.葛根的药理作用研究概况[J].光明中医,2006,21(3):49-51.
- [2] 程斯倩,陈雪,于馨洋,等.葛根异黄酮药理作用的研究进展[J].吉林医药学院学报,2013,34:46-49.
- [3] Lefterova M I, Lazar M A. New developments in adipogenesis [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, 20(3): 107-114.
- [4] Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K. Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance [J]. *Nutrients*, 2013, 5(9): 3757-3778.
- [5] Vidović D, Busby S A, Griffin P R, et al. A combined ligand-and structure-based virtual screening protocol identifies submicromolar PPAR γ partial agonists [J].

- Chem Med Chem*, 2011, 6(1): 94-103.
- [6] Sohn Y S, Park C, Lee Y, *et al.* Multi-conformation dynamic pharmacophore modeling of the peroxisome proliferator-activated receptor γ for the discovery of novel agonists [J]. *J Mol Graph Model*, 2013, 46C: 1-9.
- [7] Dunn F L, Higgins L S, Fredrickson J, *et al.* Selective modulation of PPAR γ activity can lower plasma glucose without typical thiazolidinedione side-effects in patients with Type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Complications*, 2011, 25(3): 151-158.
- [8] Lu C J, Sun Y, Muo C H, *et al.* Risk of stroke with thiazolidinediones: a ten-year nationwide population-based cohort study [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2013, 36(2): 145-151.
- [9] 张迅轶, 刘厚奇. 脂肪细胞分化相关转录因子的结构和功能 [J]. *生物科学*, 2007, 19(2): 194-197.
- [10] Ali A T, Hochfeld W E, Myburgh R, *et al.* Adipocyte and adipogenesis [J]. *Eur J Cell Biol*, 2013, 92(6/7): 229-236.
- [11] Cho H. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and obesity [J]. *Vitam Horm*, 2013, 91: 405-424.