

·药效与毒理学研究·

梓醇对3T3-L1脂肪细胞糖脂代谢的影响及其机制研究

陈立¹, 程瑾¹, 杨明炜², 库宝庆¹ (1. 襄阳市中心医院, 湖北 襄阳 441021; 2. 华中科技大学同济医院中西医结合研究所, 湖北 武汉 430061)

摘要: **目的** 观察梓醇对3T3-L1脂肪细胞糖脂代谢及过氧化物酶体增长因子活化受体(PPAR- γ)蛋白表达的影响。**方法** 采用3T3-L1前脂肪细胞诱导分化为成熟脂肪细胞, 以葡萄糖氧化酶法检测细胞的葡萄糖消耗, 以油红O染色法检测梓醇、罗格列酮对前脂肪细胞分化的影响, 以Western Blot法检测各组PPAR- γ 蛋白的表达。**结果** 与空白对照组比较, 梓醇组、罗格列酮组3T3-L1脂肪细胞的葡萄糖消耗量均明显增高($P < 0.01$), 梓醇组与罗格列酮组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 罗格列酮组OD值及PPAR- γ 蛋白的表达较空白对照组明显升高($P < 0.05$); 梓醇组OD值及PPAR- γ 蛋白的表达较空白对照组明显降低($P < 0.05$)。**结论** 梓醇在抑制PPAR- γ 蛋白表达的同时能够促进葡萄糖的消耗, 初步表明其具有体外调节脂肪细胞糖脂代谢的作用。

关键词: 梓醇; 生地黄; 3T3-L1脂肪细胞; 糖脂代谢

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)02-0111-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.001

Effect of Catalpol on Glucose and Lipid Metabolism in 3T3-L1 Adipocytes and Its Possible Mechanism

CHEN Li¹, CHENG Jin¹, YANG Mingwei², KU Baoqing¹ (1. Xiangyang Central Hospital, Xiangyang 441021 Hubei, China; 2. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430061 Hubei, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of catalpol on the glucose and lipid metabolism and the protein expression of peroxisome-activated receptor (PPAR- γ) in 3T3-L1 adipocytes. **Methods** 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate into mature adipocytes. The effects of catalpol and rosiglitazone on preadipocytes differentiation were evaluated through the examination of glucose consumption by glucose oxidase method, observation of cell differentiation by oil red O staining, and detection of PPAR- γ protein expression by Western Blot analysis. **Results** Comparing with the blank control group, the glucose consumption in 3T3-L1 adipocytes of catalpol group and rosiglitazone group both significantly increased ($P < 0.01$), but the differences between the observation groups were insignificant ($P > 0.05$). Rosiglitazone group had higher OD value and PPAR- γ protein expression than the blank control group ($P < 0.05$). On the contrary, OD value and PPAR- γ protein expression of group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Catalpol has inhibitive effect on the protein expression of PPAR- γ and can also promote the glucose consumption of adipocytes, which preliminarily indicates that catalpol would regulate glucose and lipid metabolism in adipocytes cells in vitro.

Keywords: Catalpol; Rhizoma Rehmanniae; 3T3-L1 adipocytes; Glucose and lipid metabolism

生地黄为玄参多年生草本植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libibosch. 的根, 始载于《神农本草经》, 具有

凉血、生血、补肾水真阴作用, 长期以来, 取其滋阴清热之效用于糖尿病的治疗。梓醇为生地黄的

收稿日期: 2012-04-25

作者简介: 陈立, 男, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 中西医结合内分泌专业。Email: chenlimail@163.com。

基金项目: 湖北省卫生厅中医药中西医结合课题 (2006AA301B16)。

要成分,《中国药典》规定梓醇为生地黄的定性指标^[1]。国内已有多项研究^[2]表明,梓醇具有改善糖尿病动物模型的糖脂代谢作用。脂肪组织是机体能量调节器官,近年来发现它也是重要的内分泌器官,是主要的胰岛素敏感组织之一,其糖脂代谢异常在2型糖尿病的发生发展中起重要作用。本研究以罗格列酮为对照,观察生地黄的主要药理活性物质梓醇对3T3-L1脂肪细胞糖脂代谢及过氧化物酶体增长因子活化受体(PPAR- γ)蛋白表达的影响,初步探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂 梓醇,中国药品生物制品检定所,纯度99.9%,以无菌三蒸水溶解后制成母液,4℃冰箱保存;罗格列酮盐酸盐,北京高盟化工有限公司;3T3-L1前脂肪细胞株,中国协和医科大学细胞库;3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、地塞米松、胰岛素、油红“O”染剂,美国Sigma公司;葡萄糖检测试剂盒,北京北化康泰临床试剂有限公司;高糖DMEM培养基,Gibco公司;胎牛血清(FBS),杭州四季清公司;牛血清白蛋白(BSA),Roche公司;多克隆PPAR- γ 抗体及 β -actin抗体,美国Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠IgG,武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 前脂肪细胞培养及诱导分化 参照文献方法^[3],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℃、5%CO₂饱和湿度下培养。细胞状态良好时接种于培养板,待细胞融合2 d后,加含0.5 mmol·L⁻¹ 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、0.25 μ mol·L⁻¹地塞米松、1 mg·L⁻¹胰岛素,10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养48 h,换以含1 mg·L⁻¹胰岛素的培养基再培养48 h,随后以10%胎牛血清的DMEM高糖培养基继续培养,2 d换培养液1次,诱导分化8~12 d的3T3-L1细胞90%以上呈脂肪细胞表型,可用于试验。

1.3 分组及给药 空白对照组加入等量无菌生理盐水;罗格列酮组加入终浓度为5 μ mol·L⁻¹的罗格列酮;梓醇组加入终浓度为5 μ mol·L⁻¹的梓醇。

1.4 葡萄糖消耗试验 将96孔板中诱导分化成熟的3T3-L1脂肪细胞以含0.5% BSA的培养液孵育12 h后,换以含10%胎牛血清及相应药物浓度的培养液孵育24 h,以葡萄糖氧化酶法检测每孔培养液中葡萄糖的含量,与未接种细胞的空白孔的糖含量均值相减,计算各组葡萄糖的消耗量^[4]。

1.5 油红O染色鉴定脂肪细胞 96孔板中孵育的3T3-L1脂肪细胞在诱导分化的第1天即加入含相应浓

度药物的培养基,待诱导分化结束后,先用PBS洗3次以去除培养基;将培养物用体积分数为10%甲醛固定1 h后,用蒸馏水洗涤,然后每孔加入油红O工作液3 mL并密封,2 h后倒掉油红O工作液,用蒸馏水洗涤数次,直到完全洗涤干净;将染色后的培养板置于32℃培养箱内,蒸发水分后每孔立即加入60%异丙醇1 mL进行萃取;萃取后的染液用吸管吸出,用蒸馏水冲洗,稍干后用分光光度计在510 nm波长下测定其吸光度(OD值),以吸光度的大小反映其脂肪含量。

1.6 Western blot法检测PPAR- γ 蛋白的表达

1.6.1 总蛋白提取 同1.4项下操作,将细胞接种于24孔板,待干预结束后,去除培养液,用PBS将细胞洗3遍,每孔加入100 μ L裂解液,用枪吹打数下,使裂解液和细胞充分接触。置冰上1 h,期间每隔10 min用振荡仪振荡1次。充分裂解后,12000 r·min⁻¹离心10 min,取上清即为细胞总蛋白。用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。

1.6.2 PPAR- γ 蛋白表达检测 依据蛋白浓度取各组样品(含蛋白质50 μ g),以12%的SDS-PAGE胶分离蛋白,然后用湿转法(200 mA,3 h)将蛋白质转移至PVDF膜上,再用含5%脱脂奶粉的TBST(含0.1% Tween 20)室温下封闭2 h后加入抗PPAR- γ 抗体(1:1000)及抗 β -actin抗体,4℃过夜,洗膜后加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温轻摇2 h;TBST漂洗,充分洗涤后用ECL显影曝光,洗片后用激光扫描仪测定各条带光密度。蛋白相对含量以目的蛋白吸光度 $\times$ 面积与 β -actin条带的比值表示。

1.7 统计学方法 采用SPSS13.0统计分析软件,所有数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对3T3-L1脂肪细胞葡萄糖消耗量的影响 与空白对照组比较,梓醇组和罗格列酮组3T3-L1脂肪细胞葡萄糖消耗量均明显增高($P<0.05$);梓醇组和罗格列酮组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

表1 葡萄糖消耗试验($\bar{x}\pm s$, $n=24$)

Table 1 Glucose consumption of 3T3-L1 adipocytes in each groups

组别	剂量/ μ mol·L ⁻¹	葡萄糖消耗量/mmol·L ⁻¹
空白对照组	—	5.63 $\pm$ 0.47
罗格列酮组	5	10.81 $\pm$ 0.62*
梓醇组	5	11.45 $\pm$ 0.73*

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 对3T3-L1前脂肪细胞分化的影响 诱导分化第8天,在倒置相差显微镜下,空白对照组绝大部分细胞中含有单个大脂滴,或多个小脂滴排列在细胞核周围,形成“戒环结构”;罗格列酮组细胞脂质堆积明显增加;梓醇组的胞浆脂滴数低于空白对照组及罗格列酮组,仅少量细胞出现明显脂滴。异丙醇处理后,分光光度计的OD值与镜下观察结果一致,见表2。

表2 对3T3-L1前脂肪细胞分化的比较($\bar{x}\pm s$, $n=24$)
Table 2 Comparison of the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	OD值
空白对照组	-	0.471 ± 0.015
罗格列酮组	5	$0.687\pm 0.011^*$
梓醇组	5	$0.311\pm 0.009^*$

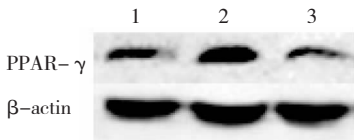
注:与空白对照组比较, $^*P<0.05$ 。

2.3 对3T3-L1脂肪细胞PPAR- γ 蛋白表达的影响 与空白对照组比较,梓醇组PPAR- γ 蛋白的表达明显降低($P<0.05$),罗格列酮组PPAR- γ 蛋白的表达明显增高($P<0.05$),见表3、图1。

表3 对3T3-L1脂肪细胞PPAR- γ 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=24$)
Table 3 PPAR- γ protein expression of 3T3-L1 adipocytes in each group

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	PPAR- γ / β -actin
空白对照组	-	0.193 ± 0.027
罗格列酮组	5	$0.314\pm 0.031^*$
梓醇组	5	$0.101\pm 0.019^*$

注:与空白对照组比较, $^*P<0.05$ 。



注:1. 空白对照组; 2. 罗格列酮组; 3. 梓醇组

图1 对3T3-L1脂肪细胞PPAR- γ 蛋白表达的影响

Figure 1 PPAR- γ protein expression of 3T3-L1 adipocytes in each group

3 讨论

生地黄具清热凉血、养阴生津功效,为治疗糖尿病的四大“圣药”之一,在“消渴”治疗方面具有悠久的历史。有统计表明,在治疗糖尿病的中药复方中,生地黄使用率居前三位^[5],而且在治疗糖尿病中成药中也大多数含有生地黄。国内外学者对生地黄的降糖作用进行了大量研究,发现无论生地黄单药、含生地复方,还是生地的活性成分均有良好的降糖作用^[6],其活性成分包括梓醇、地黄低聚糖^[7]、

地黄寡糖^[8]、地黄苷D^[9]等。梓醇是生地黄的指标成分之一,也是环烯醚萜苷类的主要组成部分。近年研究^[2]发现,梓醇能明显降低四氧嘧啶致糖尿病小鼠的血糖水平、改善糖耐量、提高血清HDL-C含量、降低血清TC和TG水平,提示梓醇能全面调节糖尿病小鼠的糖脂代谢,对糖尿病及其并发症具有一定的治疗和预防作用。因此,梓醇可能是一种新的降血糖天然成分。本课题组前期体外细胞试验也证实了梓醇能改善胰岛素抵抗3T3-L1脂肪细胞的糖代谢,其机制可能与梓醇增加了3T3-L1脂肪细胞的Glut 4表达有关^[10]。本次研究旨在进一步研究梓醇对3T3-L1脂肪细胞的糖脂代谢影响,并初步分析其可能机制。

噻唑烷二酮类药物(Thiazolidinedione, TZDs)是一类新型的胰岛素增敏剂,作为体内过氧化物酶体增长因子活化受体(PPAR- γ)激动剂,能够改善胰岛素抵抗,减轻胰岛 β 细胞受损,从而达到降糖与降低血管并发症危险的治疗目的,具有很好应用前景。但TZDs激活PPAR- γ 会导致脂肪分解减少,脂肪合成增加,促进皮下脂肪细胞分化和脂肪生成,从而加重肥胖。动物实验和人体研究还证实TZDs降低瘦素水平导致体重增加。肥胖为2型糖尿病的危险因素之一,故从此角度看, TZDs的长期疗效尚待进一步观察。另外TZDs还具有程度不等的心脏毒性、肝脏毒性、水肿及低血糖等不良反应,从而限制了其临床运用。

本次实验以TZDs代表药物罗格列酮为对照,观察生地黄主要活性物质梓醇对3T3-L1脂肪细胞糖脂代谢的影响。实验结果表明,梓醇及罗格列酮均能显著增加3T3-L1脂肪细胞的葡萄糖消耗,组间比较差异无显著性意义。梓醇能显著抑制3T3-L1前脂肪细胞向脂肪细胞分化,而罗格列酮明显促进了此分化。我们进一步检测了各组细胞PPAR- γ 蛋白,发现罗格列酮组PPAR- γ 蛋白表达与空白对照组比较明显升高,而梓醇组PPAR- γ 蛋白表达明显降低。由此我们认为,梓醇在3T3-L1脂肪细胞中的降糖机制与罗格列酮不同。结合我们前期实验结果,梓醇能上调Glut 4的表达,但对C-Cbl相关蛋白无明显影响,故推测梓醇增加3T3-L1脂肪细胞葡萄糖消耗可能与上调胰岛素信号转导途径PI-3K/Akt通路有关^[10]。梓醇能通过下调PPAR- γ 的表达,从而抑制3T3-L1前脂肪细胞向脂肪细胞的分化,说明梓醇具有一定程度的改善血脂的作用。可见,梓醇在抑制PPAR- γ 蛋白表达的同时,依然能够促进葡萄糖的消耗,初步表

明其具有体外调节脂肪细胞糖脂代谢的作用, 具有进一步研究并运用于临床的前景。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[J]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 213-214.
- [2] 赵素容, 卢宏伟, 陈金龙, 等. 地黄梓醇降糖作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20 (1): 171-172.
- [3] Tamori Y, Masugi J, Nishino N. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes[J]. Diabetes, 2002, 51(7): 2045-2055.
- [4] 杨桂枝, 高小平, 宴菊芳. GOD-POD法微量测定方法建立及其在3T3-L1脂肪细胞和HepG2细胞糖摄取检测应用[J]. 四川解剖学杂志, 2003, 11(1): 12-14.
- [5] 李晋宏. 52首治疗糖尿病的中药复方用药规律研究[J]. 长春中医药大学学报, 2008, 24(2): 176-177.
- [6] 李莉. 生地黄治疗糖尿病的药理研究[J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27(4): 670-672.
- [7] 张汝学, 顾国明, 张永祥, 等. 地黄低聚糖对实验性糖尿病与高血糖大鼠糖代谢的调节作用[J]. 中药药理与临床, 1996, 12(1): 14-17.
- [8] 曾艳, 贾正平, 张汝学, 等. 地黄寡糖在2型糖尿病大鼠模型上的降血糖作用及机制[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(4): 411-415.
- [9] 于震, 王军, 李更生, 等. 地黄苷D滋阴补血和降血糖作用的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2001, 28(4): 240-242.
- [10] 陈立, 杨明伟. 小檗碱与梓醇及其配伍对胰岛素抵抗3T3-L1脂肪细胞葡萄糖转运子4蛋白及C-Cb1相关蛋白表达的影响[J]. 中草药, 2008, 39(10): 1510-1514.

(编辑: 梁进权)

库拉索芦荟中7种单体化合物对蘑菇酪氨酸酶活力的影响

钟佳胜, 刘 丹, 吴小芳, 丁雯静, 万金志(中山大学药学院药物分析实验室, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 研究库拉索芦荟中7种单体化合物对蘑菇酪氨酸酶催化氧化左旋多巴的活力的影响, 并确定活性成分的抑制类型。方法 以左旋多巴为底物, 37℃条件下, 以酶标仪记录反应体系在475 nm下光密度随时间的变化, 通过相对酶活力比较加药后酶活力的变化, 并通过Lineweaver-Burk曲线判定抑制类型, 通过Dixon曲线求抑制常数。结果 库拉索芦荟中的芦荟苦素具有很强的蘑菇酪氨酸酶抑制作用, 且强于 β -熊果苷, 其50%抑制浓度(IC_{50})为 $108.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 抑制类型为非竞争性抑制, 抑制常数 $K_i=130.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而其余6种化合物的抑制作用较弱或没有抑制作用。结论 芦荟苦素是库拉索芦荟中主要的蘑菇酪氨酸酶抑制成分。

关键词: 库拉索芦荟; 蘑菇酪氨酸酶; 芦荟苦素; 抑制作用; 抑制类型

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)02-0114-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.002

Effects of Seven Compounds from *Aloe barbadensis* Mill on Activities of Mushroom Tyrosinase

ZHONG Jiasheng, LIU Dan, WU Xiaofang, DING Wenjing, WAN Jinzhi (Laboratory for Pharmaceutical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of seven compounds from *Aloe barbadensis* Mill on the activity of mushroom tyrosinase in the catalysis of levodopa, and to determine the inhibition type of active components. **Methods** Tyrosinase activity was measured by the absorbance variations accompanying with the oxidation of the substrate levodopa which were recorded with a microplate reader at 475 nm under a constant temperature of 37℃. Inhibition type was determined by Lineweaver-Burk plot, and inhibition constant(K_i) was calculated by Dixon graphs. **Results** Aloesin was a strong noncompetitive inhibitor of mushroom tyrosinase and was more potent than arbutin, with an IC_{50} value of $108.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and a K_i value of $130.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The other compounds had weak activities or even had no activities. **Conclusion** Aloesin is the main mushroom tyrosinase inhibitor in *Aloe barbadensis* Mill.

Keywords: *Aloe barbadensis* Mill; Mushroom tyrosinase; Aloesin; Inhibition; Inhibition type

收稿日期: 2012-10-16

作者简介: 钟佳胜, 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物活性成分的研究。Email: zjs12309@21cn.com。通讯作者: 万金志, 副教授, 研究方向: 天然药物及中药的研究开发与质量评价, 芦荟作用物质基础与组效关系研究。Email: jinzhiwan2004@yahoo.com.cn。

基金项目: 2012年度“十二五”农村领域国家科技计划课题“区域特产资源生态高附加值加工质量安全控制关键技术研究”(2012BAD36B02)。