

滇结香花提取物组分 1(Fr.1)对 C2C12 肌细胞胰岛素抵抗的改善作用

孟照敏¹, 耿燕^{*1}, 李恒¹, 许泓瑜¹, 许正宏^{1,2}, 赵辉³, 刘敏³, 史劲松¹

(1. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122; 3. 青藏高原微生物国家地方联合工程研究中心 西藏 拉萨 850000)

摘要: 探讨滇结香花正己烷提取物组分 1(Fr.1)改善棕榈酸(Palmitic acid, PA)诱导 C2C12 肌细胞产生胰岛素抵抗(Insulin Resistance, IR)的效果及其作用机制。方法:本文采用 PA 诱导 C2C12 肌细胞建立稳定的胰岛素抵抗细胞模型,通过检测 Fr.1 对胰岛素抵抗细胞(C2C12/IR)葡萄糖消耗量、葡萄糖摄取量的变化,研究其对 PA 介导的 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)、胞内磷脂酰肌醇激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(PI3K/AKT)信号通路中相关基因及蛋白表达的影响。结果:0.75 mmol/L PA 作用 C2C12 肌细胞 16 h 作为最佳建模条件;Fr.1 在无细胞毒性范围内 (12.5~100 μg/mL)可显著增加 C2C12/IR 对葡萄糖的消耗量及摄取量;Fr.1 可明显上调胰岛素受体(Insulin receptors, IRs)、胰岛素受体底物 (Insulin receptor substrate-1, IRS-1)、葡萄糖转运蛋白 4 (Glut4)、PI3K、AMPKα 基因的表达水平,并上调 p-IRs、p-IRS-1、Glut4、p-AMPKα、磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶(p-ACC)、p-AKT 蛋白质的表达水平,表明滇结香花提取物 Fr.1 可通过调控多个信号通路改善 IR。

关键词: 胰岛素抵抗; C2C12 成肌细胞; 滇结香花; 棕榈酸; 信号通路

中图分类号: R 285 文章编号: 1673-1689(2019)11-0055-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.11.008

Ameliorative Effects of Fraction 1 from the Flower of *Edgeworthia gardneri* (Wall.) Meisn on Insulin Resistance of C2C12 Cells

MENG Zhaomin¹, GENG Yan^{*1}, LI Heng¹, XU Hongyu¹,
XU Zhenghong^{1,2}, ZHAO Hui³, LIU Min³, SHI Jinsong¹

(1. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China 3. National United Engineering Research Center for Tibetan Plateau Microbiology, Lhasa 850000, China)

Abstract: To investigate the ameliorative effects of n-Hexane extract Fraction 1 (Fr.1) from the flower of *Edgeworthia gardneri* (Wall.) Meisn on insulin resistance (IR), we established IR cell

收稿日期: 2017-01-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401931)。

* 通信作者: 耿燕(1984—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事天然药物筛选及分子机制方面的研究。

E-mail: gengyanjnu@163.com

引用本文: 孟照敏,耿燕,李恒,等. 滇结香花提取物组分 1(Fr.1)对 C2C12 肌细胞胰岛素抵抗的改善作用[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(11): 55-62.

model of C2C12 by using palmitic acid (PA). Glucose consumption, glucose uptake, relative mRNA and protein expression were detected by the glucose oxidase method, 2-NBDG uptake, qRT-PCR and western blot analyses. 0.75 mmol/L PA and 16 hours were the optimal concentration and time to induce IR in C2C12 cells. In the range of non-cytotoxic concentration (12.5~100 $\mu\text{g/mL}$), Fr.1 promoted glucose consumption and uptake in C2C12/IR. Fr.1 also significantly upregulated *Insulin receptors (IRs)*, *Insulin receptor substrate-1 (IRS-1)*, *Glut4*, *PI3K* and *AMPK α* mRNA expression and increased p-IRs, p-IRS, Glut4, p-AMPK α , p-ACC and p-AKT protein expression. Fr.1 from the flower of *E. gardneri* ameliorated IR through modulating IRs/IRS-1/PI3K/Akt/Glut4 and AMPK/ACC signaling pathways in C2C12 cells.

Keywords: insulin resistance, C2C12 cells, *Edgeworthia gardneri* (Wall.) Meisn, palmitic acid, signaling pathways

胰岛素抵抗 (Insulin Resistance, IR) 是 II 型糖尿病发生和发展的关键驱动性因素,也是引起一系列代谢疾病如冠心病、高脂血症、高血压等共同的病理生理基础^[1]。其主要表现为靶细胞对胰岛素的敏感性和 (或) 反应性降低,即正常剂量的胰岛素 (Insulin, Ins) 产生低于正常生物学效应的一种状态,主要发生在肝脏、骨骼肌和脂肪组织,在肝脏中通过抑制糖原分解和糖异生来降低肝脏葡萄糖输出的能力,在脂肪、骨骼肌组织中表现为摄取葡萄糖并将其利用或存储的能力下降^[2-3]。其中人体 80%~90% 的葡萄糖消耗和摄取是通过骨骼肌,是葡萄糖代谢过程中最为重要的组织,目前认为游离脂肪酸 (Free fatty acid, FFA) 的蓄积是引起骨骼肌 IR 的重要原因^[4],因此选用棕榈酸 (Palmitic acid, PA) 诱导 C2C12 肌细胞建立胰岛素抵抗细胞模型作为体外评价手段。

滇结香花 (*Edgeworthia gardneri* (Wall.) Meisn) 属于瑞香科、结香属植物,俗称绿萝花,多分布在西藏、云南等地区,是西藏地区的民族特色习用药材,泡水饮用可治疗糖尿病、冠心病、高血压、高血脂等疾病^[5]。据国内外文献报道,从滇结香花中分离出的化合物主要有香豆素类、黄酮类、挥发油类、有机酸类及甾类等,具有抗菌、消炎、镇痛、降血糖及降血脂等功效^[6-7]。目前有研究表明,滇结香花水提物、有机溶剂提取物在体内、外均具有较好的降血糖活性,因此,利用滇结香花治疗糖尿病具有良好的研究价值及应用前景。

作者所在课题组前期发现滇结香花正己烷提取物在体内、外均能有效改善 IR,随后对其正己烷

提取物经硅胶柱层析分离得到 Fr.1。以 Fr.1 为研究对象,通过 PA 诱导 C2C12 肌细胞建立胰岛素抵抗细胞模型评价其体外降血糖活性,检测 IR 相关信号通路中基因、蛋白质的表达水平,探究其作用机制,为滇结香花改善 IR 从而治疗 II 型糖尿病的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料 滇结香花 (*Edgeworthia gardneri* (Wall.) Meisn) 由西藏月王生物科技有限公司提供,经鉴定为瑞香科、结香属植物,标本保藏于中国科学院昆明植物研究所^[8];C2C12 成肌细胞由江南大学金坚教授实验室馈赠。

1.1.2 试剂 高糖 DMEM 培养基、无酚红高糖 DMEM 培养基、胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)、马血清 (Horse serum, HS): 购自美国 Gibco 公司;胰酶-EDTA 消化液、青霉素-链霉素 (100 \times)、10% SDS、1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)、1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8): 购自碧云天公司;牛胰岛素: 购自阿拉丁;牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA)、棕榈酸 (PA)、噻唑蓝 (MTT): 购自美国 Sigma 公司;2-(N-7-硝基-2,1,3-苯并恶二唑-4-氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖 (2-NBDG): 购自美国 Invitrogen 公司;葡萄糖氧化酶法测定试剂盒: 购自北京普利莱技术有限公司;Trizol、FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)、细胞裂解液: 购自美国 Roche 公司;AMPK α 、p-AMPK α 、ACC、p-ACC、AKT、p-AKT 抗体: 购自 Cell Signaling Technology 公司;p-IRs、IRs

(Insulin receptors)、p-IRS、IRS-1 (Insulin receptor substrate-1)、Glut4、 β -actin 抗体:均购自英国 Abcam 公司;其余试剂为分析纯,购自国药集团化学有限公司。

1.1.3 仪器 旋转蒸发器:德国 Heidolph 公司;Reveleris iES 中低压柱层析:美国 Grace 公司;Multiskan MK3 型荧光酶标仪:德国 Eppendorf 公司;CO₂ 细胞培养箱:美国 Thermo 公司;倒置显微镜:日本 Nikon 公司;RT-PCR 仪、化学发光成像仪:美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Fr.1 的制备 干燥滇结香花(500 g)粉碎后,按质量体积比为 1:10 以正己烷提取,于 60 °C 浸提 6 h 后过滤得澄清滤液,滤渣再重复浸提两次,合并滤液,采用旋转蒸发去除正己烷后得到滇结香花正己烷提取物 15.15 g。利用中低压柱层析仪分离上述提取物,填料为硅胶,采用正己烷、乙酸乙酯为流动相进行梯度洗脱,流速 30 mL/min,检测波长为 254 nm 和 320 nm,在乙酸乙酯洗脱比例为 14% 时收集洗脱峰,经旋转蒸发得到 Fr.1 5.99 g。

1.2.2 C2C12 细胞培养、传代与分化 生长培养基:高糖 DMEM 培养基+含 10% 胎牛血清 (FBS)+1% 抗生素(100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素)。

分化培养基:高糖 DMEM 培养基+含 2% 马血清 (HS)+1% 抗生素 (100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素)。

培养条件:置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

细胞传代:细胞贴壁生长,至 80%~90% 时进行胰酶消化,终止消化后加生长培养基悬浮细胞,接种传代。

细胞分化:细胞贴壁生长,至 80% 左右,换为分化培养基继续培养 5~7 d,隔天换液,C2C12 成肌细胞 90% 分化为肌细胞即多核肌管后进行后续实验^[8]。

1.2.3 MTT 法检测 PA 作用 C2C12 肌细胞后对细胞活力的影响 将对数生长期的 C2C12 细胞以 5 \times 10⁴ 个/孔的密度铺于 96 孔板,细胞长至 80% 后换为分化培养基培养 5~7 d,隔天换液,待细胞分化为肌细胞后,换含 2% BSA 的无酚红高糖 DMEM 培养基培养 12 h,换以含不同浓度 PA (0.25、0.5、0.75、1 mmol/L) 及含 1 nmol/L Ins 的 2% BSA 无酚红高糖 DMEM 培养基培养 16 h,每组 6 个平行,弃去培养液,每孔加入含 0.5 mg/mL MTT 的培养基 100 μ L

孵育 4 h,吸去培养基,加入 150 μ L 二甲基亚砜 (DMSO),振荡使紫色结晶溶解,在 570 nm 处测 OD 值^[10],按照公式(1)进行计算。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{样品管值}} - \text{OD}_{\text{空白管值}}}{\text{OD}_{\text{对照管值}} - \text{OD}_{\text{空白管值}}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 葡萄糖氧化酶法检测 PA 诱导 C2C12 肌细胞产生 IR 对葡萄糖消耗量的影响 将对数生长期的 C2C12 细胞以 5 \times 10⁴ 个/孔的密度铺于 96 孔板,细胞长至 80% 后换为分化培养基培养 5~7 d,隔天换液,待细胞分化为肌细胞后,换含 2% BSA 的无酚红高糖 DMEM 培养基培养 12 h,换以含不同浓度 PA (0.25、0.5、0.75、1 mmol/L) 及含 1 nmol/L Ins 的 2% BSA 无酚红高糖 DMEM 培养基培养 16 h^[11],每组 6 个平行,取上清培养液按照葡萄糖氧化酶法测定试剂盒检测葡萄糖含量,分为空白管、标准管、样品管,分别对应加入 5 μ L 蒸馏水、5 μ L 标准品(10 mmol/L)、5 μ L 培养基上清液,与 195 μ L 混合试剂(将 R1 和 R2 按照体积比 4:1 混合)于 37 °C 反应 20 min,在 570 nm 处测 OD 值,计算各组葡萄糖消耗量^[12],确定最佳造模浓度。选用最佳造模浓度分别作用细胞 8、16、24、32 h,每组 6 个平行,取上清培养液检测不同作用时间各组葡萄糖消耗量,与阳性对照组比较,确定最佳作用时间,按照公式(2)进行计算。

葡萄糖浓度(mmol/L)=

$$\frac{\text{标准品浓度}(\text{mmol/L}) \times (\text{OD}_{\text{样品管值}} - \text{OD}_{\text{空白管值}})}{\text{OD}_{\text{标准管值}} - \text{OD}_{\text{空白管值}}} \quad (2)$$

1.2.5 2-NBDG 法检测 PA 诱导 C2C12 肌细胞产生 IR 对葡萄糖摄取量的影响 将对数生长期的 C2C12 细胞以 5 \times 10⁴ 个/孔的密度铺于 96 孔黑色荧光板,细胞长至 80% 后换为分化培养基培养 5~7 d,隔天换液,待细胞分化为肌细胞后,换含 2% BSA 的无酚红高糖 DMEM 培养基培养 12 h,换含有不同浓度 PA (0.25、0.5、0.75、1 mmol/L) 的 2% BSA 的无酚红高糖 DMEM 培养基培养 16 h,每组 6 个平行,100 nmol/L Ins 作用 30 min 后,每孔加入终浓度为 50 μ mol/L 的 2-NBDG 孵育 1 h,DPBS 漂洗细胞三遍后,换 2% BSA 的无酚红高糖 DMEM 培养基于激发波长 485 nm、发射波长 530 nm 处测定荧光值^[11],与阳性对照组比较,确定最佳作用浓度。选用最佳造模浓度作用细胞 8、16、24、32 h,每组 6 个平行,测定不同时间的葡萄糖摄取量,确定最佳作用时间,按照公式(3)进行计算。

$$\text{葡萄糖摄取率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{样品管值}} - \text{OD}_{\text{空白管值}}}{\text{OD}_{\text{对照管值}} - \text{OD}_{\text{空白管值}}} \times 100\% \quad (3)$$

1.2.6 MTT 法检测 Fr.1 作用 C2C12 肌细胞后对细胞活力的影响 将对数生长期的 C2C12 细胞以 5×10^4 个/孔的密度铺于 96 孔板, 细胞长至 80% 后换为分化培养基培养 5~7 d, 隔天换液, 待细胞分化为肌细胞后, 换含 2% BSA 的无酚红高糖 DMEM 培养基培养 12 h, 换以含不同质量浓度 Fr.1 (12.5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及含 1 nmol/L Ins、0.75 mmol/L PA 的 2% BSA 无酚红高糖 DMEM 培养基培养 16 h, 每组 6 个平行, 检测方法同 1.2.3。

1.2.7 葡萄糖氧化酶法检测 Fr.1 改善 C2C12/IR 对葡萄糖消耗的影响 培养方法同 1.2.6, 检测方法同 1.2.4。

1.2.8 2-NBDG 法检测 Fr.1 改善 C2C12/IR 对葡萄糖摄取的影响 将对数生长期的细胞以 5×10^4 个/孔的密度铺于 96 孔黑色荧光板, 细胞长至 80% 后换为分化培养基培养 5~7 d, 隔天换液, 待细胞分化为肌细胞后, 换含 2% BSA 的无酚红高糖 DMEM 培养基培养 12 h, 换以含不同质量浓度 Fr.1 (12.5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及含 0.75 mmol/L PA 的 2% BSA 无酚红高糖 DMEM 培养基培养 16 h, 每组 6 个平行, 100 nmol/L Ins 作用 30 min 后, 检测方法同 1.2.5。

1.2.9 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测 IR 相关基因的表达 采用苯酚抽提法提取细胞总 RNA, 逆转录得到 cDNA, 采用荧光染料 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 进行荧光定量 PCR 反应, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[12]对 IRs、IRS-1、Glut4、PI3K、AMPK α mRNA 的表达水平进行相对定量, 采用的引物见表 1。

1.2.10 蛋白质免疫印迹法 (Western Blot) 检测 IR 相关蛋白质的表达 细胞加药作用后, 预冷的 DPBS 漂洗细胞, 每皿加入 100 μL 蛋白质裂解液 (含蛋白酶及磷酸酶抑制剂), 在冰上裂解 30 min, 将细胞刮下收集于 1.5 mL 离心管中, 12 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取蛋白质上清液, BCA 试剂盒测样品的蛋白质浓度。经 10% 的 SDS-PAGE 电泳湿法转膜至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育一抗, 常温孵育二抗 1 h, 显色拍照, 通过 Image J 软件分析蛋白质条带, 定量检测 p-IRs、p-IRS-1^[10]、Glut4^[13]以及 AKT^[14]、AMPK^[13]信号通路蛋白质的表达。

表 1 IR 相关基因序列

Table 1 Sequences of IR primers

基因名称	引物序列 (5'-3')
IRs-F	TGACAATGAGGAATGTGGGGAC
IRs-R	GGGCAAACCTTCTGACAATGACTG
IRS-1-F	CTCCTGCTAACATCCACCTTGV
IRS-1-R	AGCTCGCTAACTGAGATAGTCAT
Glut4-F	GTGACTGGAACACTGGTCCTA
Glut4-R	CCAGCCACGTTGCATTGTAG
PI3K-F	CCCCTACTGTAGCCAACAAC
PI3K-R	CGTACCAAAAAGTCCCATCA
AMPK α -F	GTCAAAGCCGACCCAATGATA
AMPK α -R	CGTACACGCAAATAATAGGGGTT
β -action-F	GGCTGTATCCCCTCCATCG
β -action-R	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

1.2.11 数据统计 实验结果通过 One-Way ANOVA 进行统计学分析, 数据用平均值 \pm 标准偏差表示, $p < 0.05$, 与阳性对照组相比, 极显著水平表示为 $^{***}p < 0.001$, 与模型组相比, 极显著水平表示为 $^{###}p < 0.001$ ^[11]。

2 结果与分析

2.1 棕榈酸 (PA) 诱导 C2C12 肌细胞建立胰岛素抵抗细胞模型

组织或细胞产生 IR 会降低其对胰岛素的敏感性, 造成血糖代谢紊乱, 所以作者采用检测葡萄糖消耗量和摄取量来反应 IR 的程度。2-NBDG 是 2-脱氧葡萄糖的荧光类似物, 通过识别细胞膜上的葡萄糖转运体进入细胞中, 因其无放射性危害, 易于检测且分辨率高, 已广泛用于糖摄取及糖代谢的研究^[11]。

如图 1(a) 所示, 在无细胞毒性 (0.25~1 mmol/L) 的 PA 作用浓度范围内, 通过检测细胞葡萄糖消耗量、葡萄糖摄取量两个指标选择建立胰岛素抵抗细胞模型的最佳作用剂量及作用时间。如图 1 (B) 所示, 与阳性对照组相比, 不同浓度 PA (0.25、0.5、0.75、1 mmol/L) 作用于 C2C12 肌细胞后, 0.75 mmol/L PA 组葡萄糖消耗量有极显著的下调 ($^{***}p < 0.001$); 采用 2-NBDG 法检测不同浓度作用下各组葡萄糖摄取量, 如图 1(d) 所示, 0.75 mmol/L PA 诱导肌细胞后葡萄糖摄取量有显著的降低 ($^{***}p < 0.001$)。如图 1(c、e) 所示, 选择最佳作用浓度 0.75 mmol/L PA

与C2C12肌细胞共同孵育8、16、24、32 h,与阳性对照组相比,0.75 mmol/L PA作用细胞16 h后,其葡萄糖消耗能力及摄取能力大大减弱 (** $p < 0.001$);因此,选择0.75 mmol/L PA作用C2C12肌细胞16 h

作为最佳建模条件。

2.2 Fr.1 体外降糖活性评价

2.2.1 Fr.1 对C2C12肌细胞活力的影响

将不同质量浓度的Fr.1(12.5、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)与C2C12

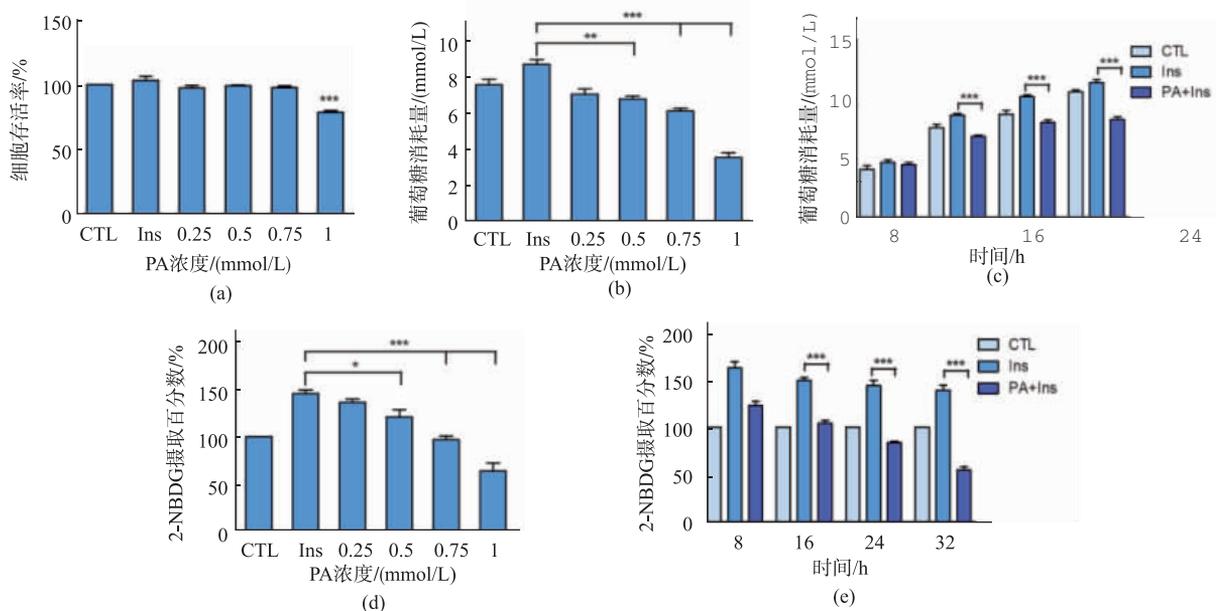


图1 C2C12胰岛素抵抗细胞模型的构建

Fig. 1 Establishment of insulin resistance cell model in C2C12 cells

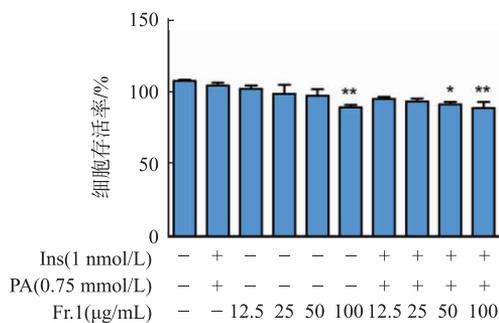
肌细胞共孵育16 h,利用MTT法检测细胞存活率。如图2所示,Fr.1在低于100 $\mu\text{g/mL}$ 作用质量浓度时对C2C12肌细胞无明显毒性,细胞存活率均在90%以上。Fr.1与Ins(1 nmol/L)、PA(0.75 mmol/L)共同作用细胞16 h后,在100 $\mu\text{g/mL}$ 的Fr.1作用下,Fr.1对C2C12肌细胞的生长有12%的抑制率。因此,选择Fr.1作用质量浓度在12.5~100 $\mu\text{g/mL}$ 时与C2C12肌细胞共孵育16 h进行后续研究。

2.2.2 Fr.1对C2C12/IR葡萄糖消耗量及摄取量的影响

通过检测细胞对葡萄糖的消耗量及摄取量,考察Fr.1(12.5、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)的降糖活性。如图3(a)和3(b)所示,与阳性对照组相比,0.75 mmol/L PA诱导后,细胞对葡萄糖的消耗量及摄取量显著降低 (** $p < 0.001$),而在Fr.1作用C2C12/IR后显著提高 (** $p < 0.001$),且具有明显的剂量依赖关系,100 $\mu\text{g/mL}$ Fr.1与模型组相比,葡萄糖消耗量提高64.9%,葡萄糖摄取量提高60.4%。

图2 不同质量浓度的Fr.1对C2C12肌细胞存活率的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of Fr.1 on cell viability in C2C12 cells



2.3 Fr.1改善C2C12肌细胞IR作用机制初步探讨

骨骼肌是利用葡萄糖的主要外周组织,葡萄糖进入骨骼肌细胞需要细胞膜上的Glut4直接参与,促进Glut4转运从而提高细胞对葡萄糖的摄取主要是通过PI3K/AKT和蛋白激酶AMPK两条信号转导途径来实现。PI3K/AKT信号传导通路的阻滞是外

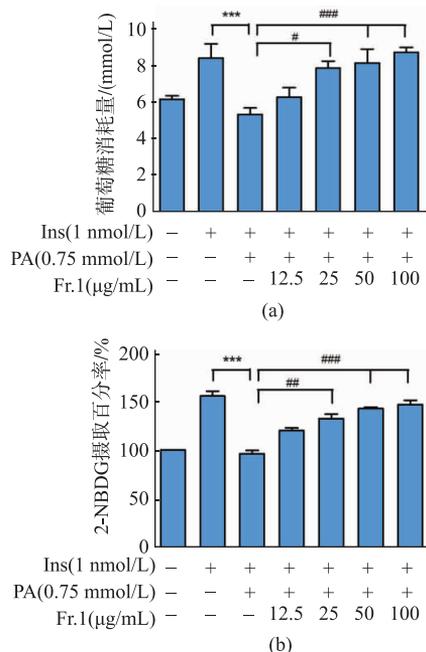


图3 Fr.1对C2C12/IR葡萄糖消耗及摄取的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of Fr.1 on consumption and uptake of glucose in C2C12/IR

周组织 IR 发生最基本的机制之一。胰岛素在 IRs 的介导下,使 IRS-1 的酪氨酸磷酸化,通过酪氨酸位点与 PI3K 结合使其下游 Akt 磷酸化蛋白增加,促进 Glut4 转运增加其葡萄糖摄取率^[15]。AMPK 信号通路在增加骨骼肌对葡萄糖的摄取、增强胰岛素敏感性、增加脂肪酸氧化等方面发挥重要作用。激活 AMPK 是通过非胰岛素途径促进 Glut4 的表达和转位,从而提高骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取,进一步改善 IR^[17]。乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)被认为是 AMPK 活化的标志,AMPK 可以直接磷酸化 ACC 的 Ser79 位点,从而激活 AMPK 信号通路^[16]。作者通过对 IR 相关基因及蛋白质水平的检测,初步探讨 Fr.1 改善 C2C12 肌细胞 IR 的作用机制。

2.3.1 Fr.1 对 C2C12 肌细胞 IR 相关基因表达的影响 采用 qRT-PCR 技术进一步检测 Fr.1 对 PA 诱导 C2C12 肌细胞产生 IR 相关基因表达水平的影响,结果见图 4。0.75 mmol/L PA 诱导 C2C12 肌细胞产生 IR 后, *IRs*、*IRS-1*、*Glut4*、*PI3K*、*AMPKα* 转录水平显著降低 (** $p < 0.001$)。Fr.1 (12.5、25、50、100 µg/mL) 作用 C2C12/IR 后显著上调基因的表达 (** $p < 0.001$),且具有剂量相关性。

2.3.2 Fr.1 对 C2C12 肌细胞 IR 相关蛋白质表达的影响 通过 Western blot 法检测在 0.75 mmol/L PA

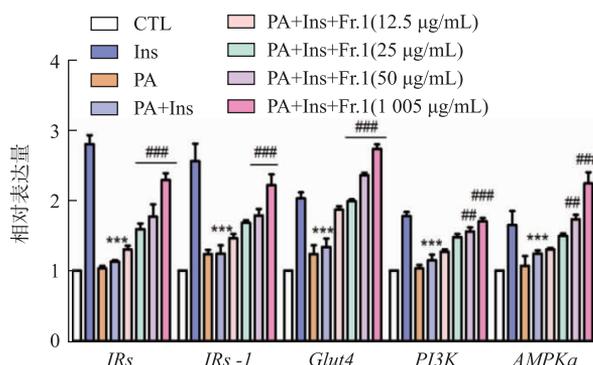


图4 Fr.1组分对 *IRs*、*IRS-1*、*Glut4*、*PI3K*、*AMPKα* 基因相对表达量的影响

Fig. 4 Effect of Fr.1 on the expression of *IRs*、*IRS-1*、*Glut4*、*PI3K* and *AMPKα* mRNA induced by PA

的诱导下,不同质量浓度 Fr.1 作用于 C2C12/IR 后细胞中 p-IRs、p-IRS-1、Glut4 及 p-AMPKα、p-ACC、p-AKT 的表达。如图 5 (a) 所示,PA 作用于 C2C12 肌细胞后相对于阳性对照组可显著降低 p-IRs、p-IRS-1 蛋白质的表达 (** $p < 0.001$),而 50、100 µg/mL 的 Fr.1 作用于细胞后,IRs、IRS 磷酸化蛋白质的表达显著升高 (** $p < 0.001$); Glut4 是骨骼肌细胞协助葡萄糖转运的主要蛋白质,如图 5(b) 所示,C2C12/IR 细胞 Glut4 的表达显著下降 (** $p < 0.001$),与阳性对照组相比下调了 49.5%,50 µg/mL Fr.1 作用后使 Glut4 的表达上调 54.4%,从而达到改善 IR 的效果。

PA 可以通过抑制 AMPK、AKT 的信号通路从而产生 IR 导致糖尿病。如图 5(c) 所示,产生 IR 后 AMPKα 磷酸化水平明显下降 (** $p < 0.001$),50、100 µg/mL 的 Fr.1 作用于细胞后,AMPKα、ACC 磷酸化蛋白质的表达水平升高 (** $p < 0.001$),表明 Fr.1 可以激活 AMPK 信号通路。如图 5(d) 所示,模型组 AKT(Ser473)磷酸化水平下降,给予 Fr.1 处理后,明显提高了 AKT (Ser473) 磷酸化蛋白质的表达水平 (** $p < 0.001$),说明 Fr.1 组分可以激活 PI3K/AKT 胰岛素信号通路。综上所述,Fr.1 通过调控多个 PA 诱导的信号通路中的蛋白质表达水平改善 IR。

3 结语

张琨^[18]、张晓英^[19]等发现滇结香花石油醚、乙酸乙酯提取物具有良好的治疗糖尿病肾病的疗效。钟国跃^[20]、Die Gao 等^[21]人发现滇结香花有机溶剂提取物通过激活 PPAR 靶点作为治疗糖尿病的受体激动

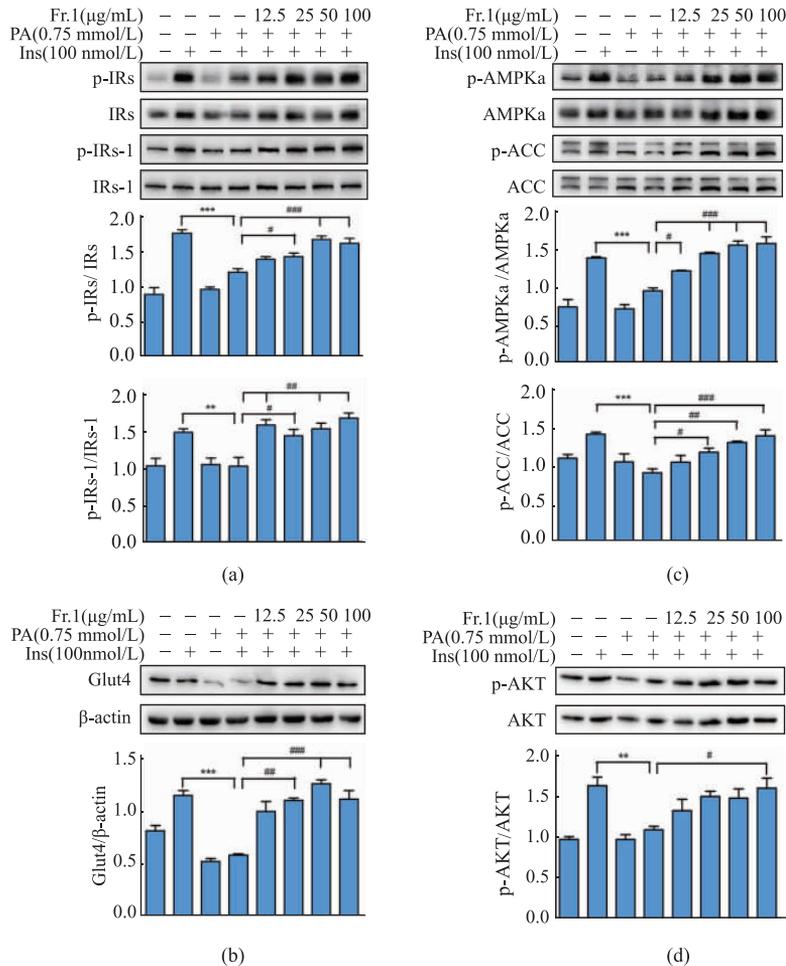


图 5 Fr.1 对 C2C12/IR 细胞 p-IRs、p-IRS-1、Glut4、p-AMPKα、p-ACC、p-AKT 蛋白质表达的影响
 Fig. 5 Effect of Fr.1 on expression of p-IRs、p-IRS-1、Glut4、p-AMPKα、p-ACC、p-AKT in C2C12/IR

剂。耿燕^[22]等研究表明,滇结香花提取物对酵母和大鼠来源的α-葡萄糖苷酶均具有较好的体外抑制活性。Gao 等^[23]发现滇结香花乙酸乙酯提取物通过调节AMPK 信号通路抑制脂肪细胞的分化,从而调节脂质代谢。王赛^[24]等通过建立高脂、高糖大鼠动物模型证明滇结香花具有降血糖、降血脂的功效。综合以上研究发现,滇结香花有机溶剂提取物具有良好的降血糖活性,并且这一发现多数是利用体外抑制活性筛选模型,目前对滇结香花利用细胞模型评价药效及机制来改善 IR 的研究甚少,因此对滇结香花通过改善 IR 达到治疗 II 型糖尿病的研究是非常必要的。

作者通过 PA 诱导 C2C12 肌细胞建立胰岛素抵抗细胞模型,运用此模型研究了滇结香花正己烷

提取物 Fr.1 的体外降糖活性。结果表明,Fr.1 可促进 C2C12/IR 对葡萄糖的消耗和提高对葡萄糖的摄取。通过对 IR 相关基因及蛋白质表达的检测,发现 Fr.1 可显著增加胰岛素与 IRs 结合来磷酸化 IRS-1 的酪氨酸位点,从而激活 PI3K,PI3K 又激活蛋白激酶 AKT,最终激活葡萄糖转运体 Glut4。Fr.1 亦可上调 p-AMPKα 及 p-ACC 蛋白质的表达,从而促进 Glut4 的转位。Fr.1 通过激活 PI3K/AKT 和 AMPK 两条信号通路增强了细胞周围的葡萄糖转运水平,起到改善 IR 的效果。

后期需要对滇结香花提取物 Fr.1 进一步分离纯化,分析鉴定 Fr.1 中主要活性物质,同时结合体内、体外模型,进一步研究其治疗 II 型糖尿病的作用机制,为民族特色习用药材治疗糖尿病提供理论依据。

参考文献:

- [1] KAHN S E, HULL R L, UTZSCHNEIDER K M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2006, 444: 840-846.
- [2] PERRY R J, SAMUEL V T, PETERSEN K F, et al. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2014, 510: 84-91.
- [3] SAMUEL V T, LIU Z X, WANG A, et al. Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117: 739-745.
- [4] ZHAI Wenjuan, LI Zhiyong. Research progress of free fatty acid and insulin resistance in skeletal muscle[J]. *China Modern Medicine*, 2014, 21(13): 186-188. (in Chinese)
- [5] XU PAN, XIA ZHINING, LIN YEXIN. Chemical constituents from *Edgeworthia gardneri* (*Thymelaeaceae*) [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012, 45: 148-150.
- [6] 徐玲. 结香花化学成分及提取工艺研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2012.
- [7] MA Y Y, ZHAO D G, ZHOU, et al. α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of phenolics from the flowers of *Edgeworthia gardneri*[J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 8162-8169.
- [8] WANG Qiuyu, XU Hongyu, XU Zhenghong, et al. Hypoglycemic effect of water extracts from *Edgeworthia gardneri* (Wall.) Meisn on Type 2 diabetic mice[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2014, 26: 1385-1388. (in Chinese)
- [9] TETSUAKI MIYAKE, JOHN C. MCDERMOTT, ANTHONY O. GRAMOLINI. A method for the direct identification of differentiating muscle cells by a fluorescent mitochondrial dye[J]. *Plos One*, 2011, 12(6): e28628.
- [10] WANG Jing, GENG Yan, SUN Qing, et al. Inhibitory effects of extract fraction 2 from *Antrodia cinnamomea* on the activation of CFSC-8B cells induced by PDGF-BB[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(9): 917-923. (in Chinese)
- [11] DENG YEA-TZY, CHANG TSAI-WEN, LEE MING-SHYUE. Suppression of free fatty acid-induced insulin resistance by phytopolyphenols in C2C12 mouse skeletal muscle cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60: 1059-1066.
- [12] ZHAO Dandan, MU Qianqian, FANG Xin, et al. Effects of Jiangtang Xiaoke Granule containing serum on insulin resistance C2C12 IR cells[J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2014, 29(5): 1577-1579.
- [13] MAZIBUKO Y S E, MULLER C J F, JOUBERT E, et al. Amelioration of palmitate-induced insulin resistance in C2C12 muscle cells by rooibos (*Aspalathus linearis*) [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20: 813-819.
- [14] LI H B, YANG Y R Y, Z J, et al. Silibinin improves palmitate-induced insulin resistance in C2C12 myotubes by attenuating IRS-1/PI3K/Akt pathway inhibition[J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2015, 48(5): 440-446.
- [15] NAGENDRA YALURI, SHALEM MODI, TARJA KOKKOLA. Simvastatin induces insulin resistance in L6 skeletal muscle myotubes by suppressing insulin signaling, GLUT4 expression and GSK-3 β phosphorylation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 480(2): 194-200.
- [16] LIU J, ZHANG JF, LU JZ, et al. Astragalus polysaccharide stimulates glucose uptake in L6 myotubes through AMPK activation and AS160/TBC1D4 phosphorylation[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2013, 34: 137-145.
- [17] YE J M, DZANIKO N, HOY A J, et al. Rosiglitazone treatment enhances acute AMP-activated protein kinase-mediated muscle and adipose tissue glucose uptake in high-fat-fed rats[J]. *Diabetes*, 2006, 55(10): 2797-2804.
- [18] 张琨, 徐学涛, 杜志云, 等. 西藏绿萝花及其提取物在制备糖尿病药物中的应用[P]. 中国专利: 101181446, 2008-05-21.
- [19] SHAO P L, KUI J Z, JI N Z, et al. A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury[J]. *Life Sciences*, 2003, 73: 2503-2513.
- [20] 钟国跃, 徐盼, 梁旭明, 等. 用于治疗糖尿病肾病的绿萝花提取物、制备方法及应用[P]. 中国专利: 102204997, 2011-05-18.
- [21] GAO DIE, ZHANG YONG-LAN, XU PAN, et al. In vitro evaluation of dual agonists for PPAR γ / β from the flower of *Edgeworthia gardneri* (wall.) Meisn[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 162: 14-19.
- [22] GENG Yan, YANG Hongmei, XU Hongyu, et al. α -glucosidase inhibitor activity of the alabastrum of *Edgeworthia gardneri* (wall.) Meisn[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(9): 967-971. (in Chinese)
- [23] GAO DIE, ZHANG YONG-LAN, YANG FENG-QING, et al. The flower of *Edgeworthia gardneri* (wall.) Meisn. suppresses adipogenesis through modulation of the AMPK pathway in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 191: 379-386.
- [24] WANG Sai, LIU Qun, HAN Jintan, et al. Therapeutic test of hyperglycemia in mouse model with *Scindapsus aureus* [J]. *Progress In Veterinary Medicine*, 2015, 36(4): 67-72. (in Chinese)