

颗粒细胞 AdipoR2、p38MAPK 表达增高,则提示补肾化痰复方能活化 APN 介导的 p38MAPK 信号通路。因此,补肾化痰方改善肥胖型 PCOS 糖脂代谢紊乱的机制可能是通过激活 APN/p38MAPK 信号通路而实现的。

#### 参考文献:

- [1] Diamanti - Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications[J]. *Endocr Rev.* 2012; 33(6): 981.
- [2] 丁 娇. 多囊卵巢综合征患者胰岛素抵抗与肥胖的研究和分析[J]. *中国医药指南* 2014, 12(25): 221.
- [3] 黎红芳. 多囊卵巢综合征脂代谢情况的研究[D]. 广西医科大学硕士学位论文, 2009.
- [4] 孙 忻, 丁彩飞, 卜亚利. 从“肾虚肝郁”理论浅谈非肥胖型多囊卵巢综合征[J]. *浙江中西医结合杂志* 2014, 24(9): 841.
- [5] 潘爱珍, 陈克芳, 侯祥平, 等. 苍附导痰汤对肥胖型多囊卵巢综合征大鼠的瘦素、脂联素水平及胰岛素敏感指数的影响[J]. *中医临床研究* 2015, 7(1): 4.
- [6] Ji W, Sun L, Lian K, et al. Rosiglitazone for obese patients fat cells in the influence of adiponectin expression[J]. *Chinese Heart J* 2011, 23(5): 570.
- [7] Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(6): 2563.
- [8] Putz DM, Goldner WS, Bar RS, et al. Adiponectin and C - reactive protein in obesity, type 2 diabetes, and monodrug therapy [J]. *Metabolism* 2004, 53(11): 1454.
- [9] Chabrolle C, Tosca L, Rame C et al. Adiponectin increases insulin - like growth factor I - induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells [J]. *Fertil Steril* 2009, 92(6): 1988.
- [10] 余 凡, 胡毅娜, 靳 镭. 多囊卵巢综合征患者脂联素及脂联素受体表达的对照研究[J]. *中国妇幼保健* 2010, 25(2): 245.
- [11] 张 宁. 多囊卵巢综合征痰湿证与脂联素与脂联素受体蛋白表达的相关研究[J]. *中华中医药学刊* 2015, 33(1): 21.
- [12] 胡卫红, 乔 杰, 王黎娜, 等. 多囊卵巢综合征患者代谢综合征的发生及临床特征的相关性[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2010, 42(2): 159.
- [13] Chen X, Luo Y, Wang R, et al. Effects of fatty acid transport protein 1 on proliferation and differentiation of porcine intramuscular preadipocytes [J]. *Anim Sci J*, 2017, 88(5): 731.

## 太子参环肽类化合物 Pseudostellarin E 对 3T3 - L1 前脂肪细胞分化和葡萄糖吸收的作用

张伟云<sup>1</sup>, 姚芳华<sup>1</sup>, 王 青<sup>1</sup>, 温忠秀<sup>1</sup>, 陈全成<sup>2\*</sup>

- (1. 厦门医学院中心实验室、厦门市中药生物工程重点实验室、福建省中药精加工与健康产品开发重点研究室、福建省地道药材生物工程重点实验室, 厦门医学院 药学系 福建 厦门 361023;
2. 厦门大学 药学院 福建 厦门 361102)

**摘要:** 目的 探讨太子参环肽类化合物 Pseudostellarin E 是否具有治疗 2 型糖尿病的潜力。方法 在 3T3 - L1 前脂肪细胞中应用了葡萄糖吸收试验和分化模型。结果 Pseudostellarin E 不仅加速 3T3 - L1 前脂肪细胞分化进程, 而且在高浓度(30 mM) 葡萄糖条件下增加了分化的脂肪细胞对胰岛素刺激的葡萄糖的吸收。结论 上述结果表明, Pseudostellarin E 可能具有治疗糖尿病的潜能。

**关键词:** Pseudostellarin E; 3T3 - L1 前脂肪细胞; 分化; 葡萄糖吸收

DOI 标识: doi: 10. 3969/j. issn. 1008-0805. 2018. 05. 002

中图分类号: R285. 5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2018)05-4028-03

### Effect of Pseudostellarin E from *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax et Hoffm. on differentiation in 3T3 - L1 pre - adipocytes and glucose uptake

ZHANG Wei-yun<sup>1</sup>, YAO Fang-hua<sup>1</sup>, WANG Qing<sup>1</sup>, WEN Zhong-xiu<sup>1</sup>, CHEN Quan-cheng<sup>2\*</sup>

- (1. Central Laboratory of Xiamen Medical College, Xiamen Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Finish Processing and Health Product Development of Fujian Province, Fujian Provincial Key Laboratory of Genuine Regional Drug Bio - engineering, Department of Pharmacy, Xiamen Medical College, Xiamen, 361023, China;
2. School of Pharmaceutical Sciences,

收稿日期: 2017-09-21; 修订日期: 2018-03-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81773601); 福建省教育厅 2015 年第二批高等学校优秀学科(专业)带头人赴海外访学研修资助项目(闽教人[2015]103 号); 福建省自然科学基金计划资助项目(2015J01065); 福建省卫生系统中青年骨干人才培养项目 2015 年资助计划基础项目(2015 - ZQN - JC - 45); 福建省厦门市科技局科技计划高校创新项目(3502Z20143026); 厦门医学院科研项目(Z2013 - 12, Z2013 - 25)

作者简介: 张伟云(1980-), 女(汉族), 山东日照人, 厦门医学院副教授, 博士学位, 主要从事中药活性成分及其药理活性的研究工作。

\* 通讯作者简介: 陈全成(1977 -), 男(汉族), 福建漳浦人, 厦门大学药学院副教授, 博士学位, 主要从事天然产物活性成分分离纯化、鉴定、结构修饰、药理功能等研究工作。

Xiamen University, Xiamen, 361102, China)

**Abstract: Objective** In the present study, it was designed to explore whether Pseudostellarin E has therapeutic potential for treatment of type 2 diabetes. **Methods** Glucose uptake assay and differentiation model were applied in 3T3-L1 pre-adipocytes. **Results** It exhibited that Pseudostellarin E not only accelerate differentiation process, but also increased insulin-stimulated glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes under high-glucose conditions (30 mM). **Conclusion** These results implied that Pseudostellarin E may possess anti-diabetic properties.

**Key words:** Pseudostellarin E; 3T3-L1 pre-adipocytes; Differentiation; Glucose uptake

2 型糖尿病的特点是胰岛素分泌受损、胰岛素抵抗增加、高血糖以及对胰岛细胞损伤增加<sup>[1]</sup>。一般来说,高血糖是导致并发症的主要原因,因此糖尿病治疗的重点是降低血糖水平<sup>[1,2]</sup>。在脂肪组织中高度表达的过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 是噻唑烷二酮类药物的靶标,它被临床用于增加 2 型糖尿病患者胰岛素敏感性<sup>[3-5]</sup>。噻唑烷二酮类药物和过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  激动剂能够增加骨骼肌和脂肪组织胰岛素敏感性<sup>[6-8]</sup>。噻唑烷二酮类代表性药物罗格列酮单一疗法,能有效地改善 2 型糖尿病患者血糖水平<sup>[9-11]</sup>。

在 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中,前脂肪细胞被诱导分化为成熟脂肪细胞,成熟的脂肪细胞在外部环境中消耗葡萄糖。胰岛素或胰岛素类似物与细胞中不同的酶和受体相互作用,激活了细胞和细胞核中的许多信号通路,进一步促进了成熟脂肪细胞周围葡萄糖的吸收、运输、消耗。所以,3T3-L1 前脂肪细胞系被广泛用于降血糖药物的筛选<sup>[12-14]</sup>。

太子参是石竹科植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax et Hoffm. 的干燥块根,含有环肽、三萜皂苷、多糖等化学成分。太子参提取物促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化<sup>[15]</sup>,但具体活性成分并不明确。此试验以罗格列酮作为阳性对照药,探讨了从太子参环肽类化合物 Pseudostellarin E 在 3T3-L1 前脂肪细胞中对分化的影响和对葡萄糖吸收的作用。

## 1 材料与仪器

**1.1 仪器与试剂** 试验过程中主要使用的仪器包括全波长酶标仪(美国赛默飞世尔科技有限公司, Multiskan Go), CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(新加坡 ESCO, IFS-110-8)等。Pseudostellarin E 购自成都瑞芬思生物科技有限公司。罗格列酮(批号为#074M4704V)、油红 O(批号为#SLBM4444V)、苏木素伊红溶液(批号为SLBK4345V)、胰岛素(批号为 I0305000)均购自美国 Sigma 公司;葡萄糖荧光示踪剂 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) 2-NBDG 购自 Molecular Probes;胎牛血清、胰酶、DMEM 低糖培养基等购自美国 Hyclone 公司,其余试剂为分析纯。

**1.2 细胞** 小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC),用 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基即 DMEM 添加 10% 热灭活胎牛血清在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

## 2 方法

**2.1 MTT 试验** 为评估 Pseudostellarin E 对 3T3-L1 前脂肪细胞活力是否有影响,应用 MTT 法,使用全波长酶标仪在 490 nm 波长处测定了分别用 0.5  $\mu$ M 和 1  $\mu$ M Pseudostellarin E 处理 48 h 后的细胞吸光度值,对照组细胞吸光度设定为 100%。

**2.2 前脂肪细胞分化、油红 O 染色试验** 根据文献所述方法<sup>[16-19]</sup>,使用油红 O 染色方法,评价 Pseudostellarin E 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响。先将 3T3-L1 前脂肪细胞以每孔  $4 \times 10^3$  个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板培养 24 h,各组再分

别用药物处理 3 天,阳性对照组用 1  $\mu$ M 的胰岛素和 0.5  $\mu$ M 或 1  $\mu$ M 的罗格列酮处理,测试组分别用 1  $\mu$ M 的胰岛素和 0.5  $\mu$ M 或 1  $\mu$ M 的 Pseudostellarin E 处理,对照组仅用 1  $\mu$ M 胰岛素处理。最后对细胞进行油红 O/苏木素伊红染色,首先用 10% 福尔马林室温条件下固定 1 h,接着用油红 O 溶液室温染色 2 h,再用苏木素伊红溶液室温染色 15 min,最后用 60% 异丙醇清洗 3 次,用以除去未结合的染料,最终在显微镜下(400 $\times$ )观察并拍摄染色图像。

**2.3 流式细胞仪测定细胞吸收葡萄糖** 按照文献方法操作<sup>[16-19]</sup>,通过流式细胞仪检测 Pseudostellarin E 对葡萄糖荧光示踪剂 2-NBDG 吸收的影响。以  $1 \times 10^4$  个细胞/孔的密度,将分化的 3T3-L1 脂肪细胞种于 96 孔细胞培养板,使用含 1  $\mu$ M 胰岛素的无血清高浓度葡萄糖(30 mM)的 DMEM 培养 24 h,接着分别用 0.5  $\mu$ M 和 1  $\mu$ M 的 Pseudostellarin E 及罗格列酮和 10  $\mu$ M 2-NBDG 处理 1 h,对照组则用无血清 DMEM 处理 1 h。将收集的各组细胞悬浮于预冷的 500  $\mu$ l 无血清高浓度葡萄糖的 DMEM 中。采用 FACSCalibur 流式细胞分析仪 FL1 通道,记录各组细胞吸收 2-NBDG 的荧光强度,每组均收集 1000 个单细胞数据。用 Pseudostellarin E 或罗格列酮处理但未加 2-NBDG 进行处理的细胞组的荧光强度分别作为其测量背景值,用于排除假阳性。

**2.4 统计分析** 所有数据用三个独立实验的平均值  $\pm$  标准平均误差表示。使用 SPSS 13.0 软件进行分析。\* $P < 0.01$  被认为是具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 Pseudostellarin E 对 3T3-L1 前脂肪细胞活力的影响** 在 490 nm 波长下测定 Pseudostellarin E 对 3T3-L1 前脂肪细胞活力的影响,对照组细胞的吸光度被设定为 100%。在 0.5  $\mu$ M 或 1  $\mu$ M 的浓度下, Pseudostellarin E 均没有显著影响细胞活力(图 1)。

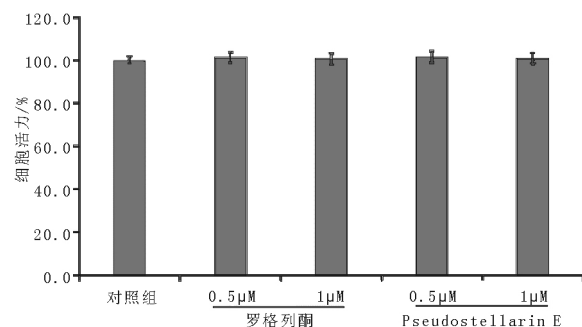
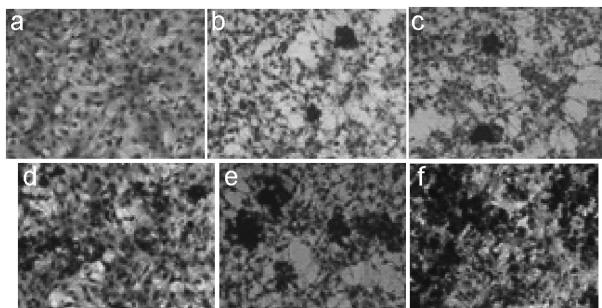


图 1 Pseudostellarin E 对 3T3-L1 前脂肪细胞活力的影响 ( $n = 6$ )

**3.2 Pseudostellarin E 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的作用** 如图 2 所示,罗格列酮促进了 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞。在 0.5  $\mu$ M 或 1  $\mu$ M 的浓度下, Pseudostellarin E 显著地加快了分化过程,并且显示出比阳性对照药罗格列酮更强的活性。

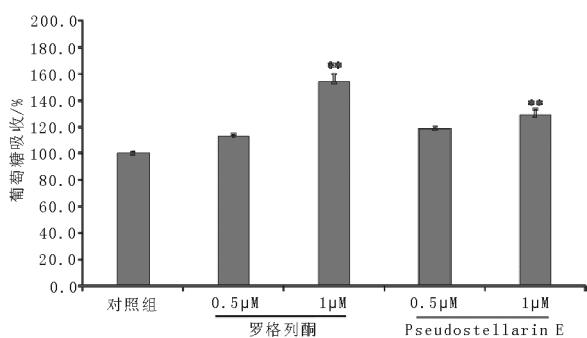


(a) 前脂肪细胞组, (b) 对照组, (c) 0.5 μM 罗格列酮组, (d) 1 μM 罗格列酮组, (e) 0.5 μM Pseudostellarin E 组, (f) 1 μM Pseudostellarin E 组

图2 Pseudostellarin E 对 3T3-L1 pre-adipocytes 分化的作用 (油红 O 染色图像)

3.3 Pseudostellarin E 对分化的 3T3-L1 脂肪细胞吸收葡萄糖的作用 为了评价在高浓度葡萄糖 (30 mM) 条件下 Pseudostellarin E 对分化的脂肪细胞对葡萄糖吸收的作用, 在分化的 3T3-L1 脂肪细胞中进行了葡萄糖示踪剂 2-NBDG 吸收试验。

分化的 3T3-L1 脂肪细胞在 30 mM 浓度的葡萄糖环境中, 用 1 μM 胰岛素或 1 μM 胰岛素与测试药物处理 1 h 后, 流式细胞仪测定和分析结果显示 0.5 μM 和 1 μM 罗格列酮处理组明显增加了胰岛素刺激的葡萄糖吸收, Pseudostellarin E 也显示出与罗格列酮类似的作用, 在分化的 3T3-L1 脂肪细胞中促进了胰岛素刺激的葡萄糖吸收 (图 3)。



与对照组比较, \*\* P < 0.01

图3 Pseudostellarin E 在脂肪细胞中对胰岛素刺激的葡萄糖吸收的作用 (n = 3)

#### 4 讨论

Pseudostellarin E 明显促进了 3T3-L1 前脂肪细胞的分化过程, 这可能会增加成熟脂肪细胞的胰岛素敏感性, 从而提高脂肪细胞对葡萄糖的吸收。Pseudostellarin E 显著地增加了分化的 3T3-L1 脂肪细胞对胰岛素刺激的葡萄糖吸收, 这提示 Pseudostellarin E 可能具有降血糖的潜能, 提示 Pseudostellarin E 可能是治疗 2 型糖尿病的候选化合物。但需深入研究并进一步探讨其作用机理。

#### 参考文献:

[1] Seltzer HS. Drug-induced hypoglycemia. A review of 1418 cases [J]. Endocrinol. Metab Clin North Am, 1989, 18(1):163.

[2] Warren RE. The stepwise approach to the management of type 2 diabetes [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2004, 65(Suppl 1): S3.

[3] Forman BM, Tontonoz P, Chen J, et al. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma [J]. Cell, 1995, 83(5): 803.

[4] Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, et al. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) [J]. J Biol Chem, 1995, 270(22): 12953.

[5] Braissant O, Fufelle F, Scotto C, et al. Differential expression of peroxisome proliferator activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR alpha, -beta, and -gamma in the adult rat [J]. Endocrinology, 1996, 137(1): 354.

[6] Saltiel AR, Olefsky JM. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes [J]. Diabetes, 1996, 45(12): 1661.

[7] Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, et al. Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in Type II diabetic patients [J]. Diabetologia, 2001, 44(12): 2210.

[8] Carey DG, Cowin GJ, Galloway GJ, et al. Effect of rosiglitazone on insulin sensitivity and body composition in type 2 diabetic patients [J]. Obes Res, 2002, 10(10): 1008.

[9] Raskin P, Rappaport EB, Cole ST, et al. Rosiglitazone short-term monotherapy lowers fasting and post-prandial glucose in patients with type II diabetes [J]. Diabetologia, 2000, 43(3): 278.

[10] Lebovitz HE, Dole JF, Patwardhan R, et al. Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes [J]. J Clin Endocrinol. Metab, 2001, 86(1): 280.

[11] Phillips LS, Grunberger G, Miller E, et al. Once- and twice-daily dosing with rosiglitazone improves glycemic control in patients with type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2001, 24(2): 308.

[12] Kamei R, Kadokura M, Kitagawa Y, et al. 2'-benzyloxychalcone derivatives stimulate glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes [J]. Life Sci, 2003, 73(16): 2091.

[13] Moini H, Tirosh O, Park YC, et al. R-alpha-lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes [J]. Arch of Biochem Biophys, 2002, 397(2): 384.

[14] Kamon J, Naitoh T, Kitahara M, et al. Prostaglandin F(2) alpha enhances glucose consumption through neither adipocyte differentiation nor GLUT1 expression in 3T3-L1 cells [J]. Cell Signal, 2001, 13(2): 105.

[15] 张伟云, 温忠秀, 王晓禹, 等. 太子参提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响 [J]. 海峡药学, 2016, 28(12): 8.

[16] Zhang WY, Lee JJ, Kim IS, et al. 7-O-methylaromadendrin stimulates glucose uptake and improves insulin resistance in vitro [J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(9): 1494.

[17] Zhang WY, Lee JJ, Kim Y, et al. Amelioration of insulin resistance by scopoletin in high-glucose induced, insulin-resistant HepG2 cells [J]. Horm Metab Res, 2010, 42(13): 930.

[18] Zhang WY, Lee JJ, Kim IS, et al. Stimulation of glucose uptake and improvement of insulin resistance by aromadendrin [J]. Pharmacology, 2011, 88(5-6): 266.

[19] Zhang WY, Lee JJ, Kim YH, et al. Effect of Eriodictyol on Glucose Uptake and Insulin Resistance in Vitro [J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(31): 7652.