

# 没食子儿茶素没食子酸酯对脂肪 细胞吸收葡萄糖的影响

张伟云<sup>1</sup>, 张 勇<sup>2</sup>, 徐晶晶<sup>1</sup>, 向云亚<sup>1</sup>, 陈全成<sup>3\*</sup>

(1. 厦门医学院 药学系, 福建 厦门 361023; 2. 厦门医学院 机能与临床转化福建省  
高等学校重点实验室, 福建 厦门 361023; 3. 厦门大学 药学院, 福建 厦门 361102)

**摘要:**目的: 探讨没食子儿茶素没食子酸酯是否存在促进 3T3-L1 脂肪细胞吸收葡萄糖的潜力。方法: 为测定没食子儿茶素没食子酸酯对脂肪细胞吸收葡萄糖的作用和对前脂肪细胞分化的影响, 分别采用了葡萄糖荧光示踪剂检测法和 3T3-L1 前脂肪细胞分化模型。结果: 没食子儿茶素没食子酸酯可提高脂肪细胞在高浓度葡萄糖(30 mM)条件下由胰岛素刺激的葡萄糖吸收, 促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化为脂肪细胞。结论: 没食子儿茶素没食子酸酯可促进脂肪细胞吸收葡萄糖和前脂肪细胞分化, 提示没食子儿茶素没食子酸酯可能对降低血糖和改善胰岛素抵抗有一定作用。

**关键词:** 没食子儿茶素没食子酸酯; 葡萄糖吸收; 脂肪细胞; 3T3-L1 前脂肪细胞; 脂肪分化

**中图分类号:** R285.5      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1673-2197(2019)08-0053-03

**DOI:** 10.11954/ytctyy.201908015

## Influence of Gallic acid-3-Gallate on Glucose Uptake in Adipocytes

Zhang Weiyun<sup>1</sup>, Zhang Yong<sup>2</sup>, Xu Jingjing<sup>1</sup>, Xiang Yunya<sup>1</sup>, Chen Quancheng<sup>3\*</sup>

(Department of Pharmacy, Xiamen Medical College, Xiamen, 361023, China; 2. Functional and Clinical Transformation Key Laboratory of Fujian Province University, Xiamen Medical College, Xiamen, 361023, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361102, China)

**Abstract:** Ethanol extract of *Camellia Oleifera* Abel. decreased blood glucose in type 2 diabetic mice to a certain extent. Therefore, this study explored whether Gallic acid-3-gallate which isolated from ethanol extract of *Camellia Oleifera* Abel. possessed therapeutic potential for enhancing glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. After 3T3-L1 pre-adipocytes were induced to differentiate into mature adipocytes, mature adipocytes consumed glucose in the external environment. The effects of insulin or insulin analogues on different enzymes and receptors in cells can activate signaling pathways in many cells and nuclei to further promote the absorption, transportation and consumption of glucose around mature adipocytes, and ultimately lead to the decrease of glucose concentration in cell culture media. Therefore, 3T3-L1 pre-adipocyte line has been widely used in screening hypoglycemic drugs. In addition, it is very important to select a direct, objective and rigorous method to evaluate the hypoglycemic potential of components. To determine effect of Gallic acid-3-gallate on glucose uptake and differentiation, the fluorescent tracer of glucose 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) uptake assay and 3T3-L1 pre-adipocytes differentiation model were adopted. Gallic acid-3-gallate accelerated insulin-stimulated glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes under high-glucose conditions (30 mM) and enhanced 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. Gallic acid-3-gallate increased glucose uptake in adipocytes and improve 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation, therefore, it might contribute to glycemic control and insulin resistance amelioration.

**Keywords:** Gallic acid-3-Gallate; Glucose Uptake; Adipocytes; 3T3-L1 Pre-adipocytes; Differentiation

降血糖作用是衡量某活性物质是否具有防治 2 型糖尿病能力的重要标准之一, 选择快速、直接、客观、严谨的细胞葡萄糖吸收检测方法用以评估待测化学成分的降血糖活性

具有十分重大的意义。葡萄糖荧光示踪剂 2-[N-(7-硝基苯-2-氧代-1,3-重氮基-4-基)氨基]-2-脱氧-D-葡萄糖(2-NBDG)在 467 nm 波长被激发时, 于 542 nm 波长处产生强烈的荧

收稿日期: 2019-01-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81773601); 福建省教育厅中青年教师教育科研项目(JT180664); 福建省卫生系统中青年骨干人才培养项目(2015-ZQN-JC-45)

作者简介: 张伟云(1980-), 女, 博士, 厦门医学院副教授, 研究方向为中药活性成分及其机理。E-mail: zhangwy@xmu.edu.cn

通讯作者: 陈全成(1977-), 男, 博士, 厦门大学副教授, 研究方向为活性物质筛选与作用机制。E-mail: chenqc@xmu.edu.cn

光,采用 2-NBDG 作为葡萄糖示踪剂,利用流式细胞仪直接检测单细胞吸收葡萄糖的方法<sup>[1]</sup>,不但克服了放射性示踪剂无法测定单细胞吸收葡萄糖的缺点,同时也避免了放射性废物处理的问题<sup>[2]</sup>,并且能够客观、快速、高效地获取试验数据。

3T3-L1 前脂肪细胞被诱导分化为成熟的脂肪细胞后能促进外部环境中的葡萄糖消耗。胰岛素、胰岛素类似物与不同酶和受体相互作用,通过激活细胞和细胞核中的多个信号通路,进而加速成熟脂肪细胞对周围葡萄糖的吸收、运输、消耗,最终使细胞培养基中葡萄糖浓度降低。因而,3T3-L1 前脂肪细胞系已被广泛应用于降糖药物筛选模型<sup>[3-5]</sup>。

研究表明,油茶醇提取物可在一定程度上降低 2 型糖尿病小鼠的血糖浓度<sup>[6]</sup>,前期研究提示油茶醇提取物中的没食子儿茶素没食子酸酯很可能在一定程度上加快细胞吸收葡萄糖。因此,本研究以罗格列酮为对照药,对没食子儿茶素没食子酸酯在 3T3 脂肪细胞中对葡萄糖吸收的影响及其对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的作用进行了考察。

## 1 材料与仪器

### 1.1 药品

葡萄糖、胰岛素、罗格列酮均购买于 Sigma-Aldrich; 没食子儿茶素没食子酸酯(纯度>98%)购买于成都瑞芬思生物科技有限公司。

### 1.2 试剂

油红 O、苏木精-伊红溶液均购自 Sigma-Aldrich; 葡萄糖荧光示踪剂 2-NBDG 购自 Molecular Probes。其他化学试剂均为分析纯。

### 1.3 仪器

试验中使用的主要仪器包括全波长酶标仪(Multiskan Go,美国赛默飞世尔科技有限公司); 流式细胞仪(FACS Calibur flowcytometer,美国 Becton Dickinson 公司); CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(IFS-110-8,新加坡 Esco Micro Pte 有限公司)。

### 1.4 细胞

小鼠源 3T3-L1 前脂肪细胞购自美国菌种保藏中心(ATCC),用 10% 胎牛血清 DMEM 在 5% CO<sub>2</sub> 加湿空气的细胞培养箱中于 37℃ 进行培养,第 5~9 代细胞用于实验。

## 2 方法

### 2.1 细胞活力测定

使用 MTT 法检测,采用含有 0.5 μM 和 1 μM 没食子儿茶素没食子酸酯或罗格列酮的无血清 DMEM 处理 48 h 后,观察 3T3-L1 前脂肪细胞的生长及增殖的情况,于酶标仪 490 nm 波长下测定各组光密度值,设置空白对照组细胞对应的光密度值为 100%。

### 2.2 没食子儿茶素没食子酸酯对脂肪细胞吸收葡萄糖的影响

参照文献方法操作<sup>[7-15]</sup>,通过流式细胞仪测定没食子儿茶素没食子酸酯对葡萄糖荧光示踪剂 2-NBDG 吸收的影响。以 1×10<sup>4</sup> 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,于含 1 μM 胰岛素的无血清高浓度葡萄糖(30 mM)的 DMEM 中培养 24 h,再分别用 0.5 μM 和 1 μM 的没食子儿茶素没食子酸酯及罗格列酮和 10 μM 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 μL 无血清但含高浓度葡萄糖(30 mM)的 DMEM 中,保持在 4℃,用流式细胞仪分析细胞吸收葡萄糖的情况,记录各组细胞吸收 2-NBDG 的荧光强度值。用没食子儿茶素没食子酸酯或罗格列酮处理但未加 2-NBDG 进行处理的对照组的细胞荧光强度分别作为其测量背景值,以排除假阳性。统计药物处理组的荧光强度值与背景值之差,以作后续数据分析。

### 2.3 油红 O 染色和脂积累量测定

参照文献<sup>[7-15]</sup>诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化。按照 4×

10<sup>3</sup> 细胞/孔的密度,将 3T3-L1 前脂肪细胞种于 96 孔细胞培养板,培养 24 h 后,再用含 1 μM 胰岛素和 0.5 μM 及 1 μM 的没食子儿茶素没食子酸酯或罗格列酮的培养基继续培养 3 d,对照组细胞则用含 1 μM 胰岛素的培养基培养 3 d,12 天后,进行油红 O 染色和脂含量测定。用 10% 福尔马林溶液固定各组细胞 1 h 后,在室温下用油红 O 溶液染色 2 h,接着用苏木精-伊红染色 15 min。为了去除游离染料,用 60% 异丙醇溶液轻柔清洗各组细胞 3 次。应用全波长酶标仪在 510 nm 波长下测定各组细胞的脂积累量。在光学显微镜下拍摄(400×)各组细胞油红 O 的染色情况,用以对比和评估没食子儿茶素没食子酸酯对 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程的影响。

### 2.4 统计学方法

所有数据采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 没食子儿茶素没食子酸酯对 3T3-L1 前脂肪细胞活力的影响

以空白对照组细胞光密度值为 100%,与空白对照组相比,没食子儿茶素没食子酸酯和罗格列酮在 0.5 μM 和 1 μM 浓度下均对 3T3-L1 前脂肪细胞的生长和增殖没有显著影响,提示没食子儿茶素没食子酸酯和罗格列酮对 3T3-L1 前脂肪细胞无细胞毒性,不破坏细胞的生长和增殖。如图 1 所示。

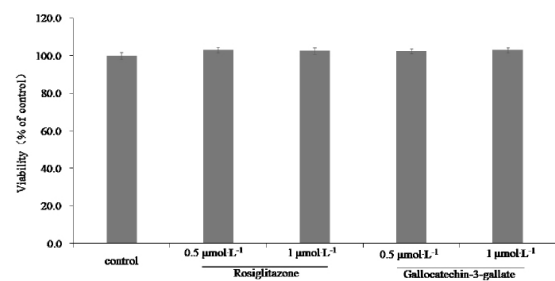
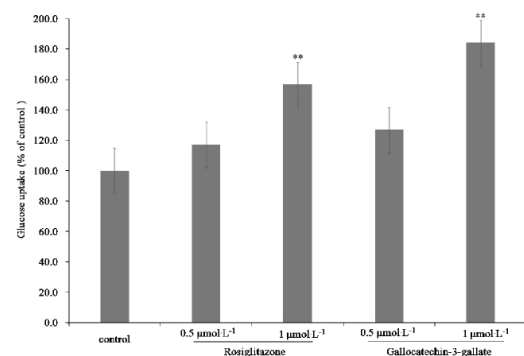


图 1 没食子儿茶素没食子酸酯对 3T3-L1 前脂肪细胞活力的影响(n=6)

### 3.2 没食子儿茶素没食子酸酯对葡萄糖吸收的影响

采用 3T3-L1 前脂肪细胞分化模型,测定没食子儿茶素没食子酸酯在 3T3-L1 脂肪细胞中对胰岛素刺激的葡萄糖荧光示踪剂 2-NBDG 吸收的作用。与对照组相比,0.5 μM 和 1 μM 罗格列酮可显著促进在高浓度葡萄糖(30 mM)条件下 3T3-L1 脂肪细胞中胰岛素刺激的葡萄糖吸收(图 2)。没食子儿茶素没食子酸酯在 1 μM 的浓度下也可显著增加 3T3-L1 脂肪细胞对胰岛素调节的 2-NBDG 吸收,并且比 1 μM 罗格列酮体现出更强的趋势。



注:n=6,与对照组比较,\*\* $P < 0.01$ 。

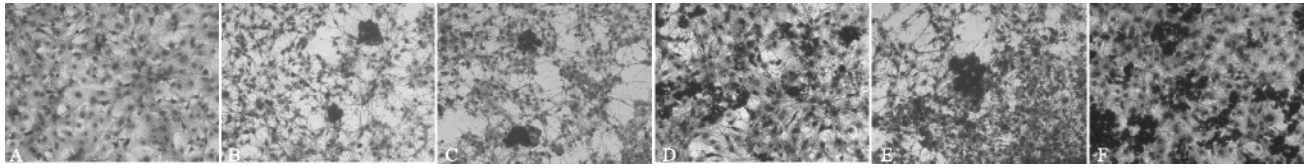
图 2 没食子儿茶素没食子酸酯对胰岛素刺激的脂肪

细胞吸收葡萄糖的影响

3.3 没食子儿茶素没食子酸酯对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响

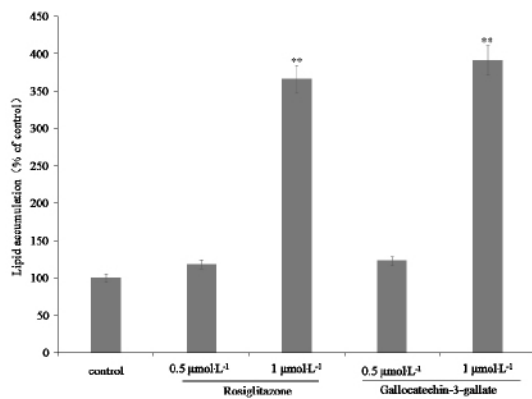
相对于空白对照组 3T3-L1 前脂肪细胞(图 3A),对照组细胞(图 3B)受到胰岛素的影响出现了少量成熟的脂肪细胞,新生成的成熟脂肪细胞被油红 O 染成红色。与对照

组细胞(图 3B)相比,1 μM 罗格列酮可明显加速脂肪分化,出现了较多成熟的脂肪细胞(图 3D),还可促进脂积累(图 4)。在 1 μM 的浓度下,没食子儿茶素没食子酸酯也体现出与罗格列酮相似的活性,可明显促进脂肪分化(图 3F),显著增加脂含量(图 4)。



注:(A)空白组;(B)胰岛素处理组;(C)0.5 μM 罗格列酮处理组;(D)1 μM 罗格列酮处理组;(E)0.5 μM 没食子儿茶素没食子酸酯处理组;(F)1 μM 没食子儿茶素没食子酸酯处理组。

图 3 没食子儿茶素没食子酸酯对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响



注:n=6,设定对照组中脂的含量为 100%;与对照组比较,\*\* P < 0.01。

图 4 没食子儿茶素没食子酸酯对 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中脂含量的影响

4 讨论

没食子儿茶素没食子酸酯可显著提高分化的 3T3-L1 脂肪细胞在高浓度葡萄糖条件下对胰岛素刺激条件下的葡萄糖吸收,这表明没食子儿茶素没食子酸酯可能具有降低血糖的潜能,但需要深入研究其作用机制。

上调过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARγ)表达能显著提高胰岛素敏感性<sup>[16-18]</sup>。PPARγ2 选择性表达于脂肪细胞中,其表达离不开脂肪细胞分化过程<sup>[19]</sup>。因此,能够促进脂肪细胞分化的化合物很可能具有改善胰岛素敏感性和提高胰岛素刺激的葡萄糖吸收的潜力<sup>[7-15]</sup>。试验结果提示没食子儿茶素没食子酸酯促进了 3T3-L1 前脂肪细胞的分化过程,这可能是没食子儿茶素没食子酸酯加快脂肪细胞中胰岛素刺激的葡萄糖吸收的一个原因,但这仍需进一步研究。

5 结语

综上所述,没食子儿茶素没食子酸酯不仅促进了分化的 3T3-L1 脂肪细胞对胰岛素刺激的葡萄糖吸收,而且加速了 3T3-L1 前脂肪细胞的分化过程。因此,没食子儿茶素没食子酸酯可能具有降低血糖和改善胰岛素抵抗的潜能,这对于预防或辅助治疗 2 型糖尿病具有重要意义。

参考文献:

[1] ZOU CH, WANG YJ, SHEN ZF. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement[J]. J Biochem Biophys Methods, 2005, 64(3): 207-215.

[2] YAMADA K, NAKATA M, HORIMOTO N, et al. Measurement of glucose uptake and intracellular calcium concentration in single, living pancreatic beta-cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(29): 22278-22283.

[3] KAMEI R, KADOKURA M, KITAGAWA Y, et al. 2'-benzylloxylchalcone derivatives stimulate glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes[J]. Life Sciences, 2003, 73(16): 2091-2099.

[4] 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]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002, 397(2): 384-391.

[5] 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): 105-109.

[6] 张伟云,洪珠凤,陈全成,等. 油茶醇提取物对 2 型糖尿病小鼠血糖的作用[J]. 海峡药学,2017, 29(1):21-24.

[6] ZHANG WY, HONG ZF, CHEN QC, et al. Effect of Ethanol Extract from *Camellia Oleifera* Abel. on Blood Glucose in Type 2 Diabetic Mice[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2017, 29(1):21-24.

[7] ZHANG WY, LEE JJ, KIM IS, et al. 7-O-methylaromadendrin stimulates glucose uptake and improves insulin resistance in vitro[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2010, 33(9): 1494-1499.

[8] ZHANG WY, LEE JJ, KIM Y, et al. Amelioration of insulin resistance by scopoletin in high-glucose induced, insulin-resistant HepG2 cells[J]. Hormone and Metabolic Research, 2010, 42(13): 930-935.

[9] 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): 266-274.

[10] ZHANG WY, LEE JJ, KIM YH, et al. Effect of Eriodictyol on Glucose Uptake and Insulin Resistance in Vitro[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(31):

7652-7658.

## 参麦注射液及其中间体相对分子质量研究

王雪莲<sup>1</sup>,李响明<sup>1\*</sup>,王文鹏<sup>1</sup>,周永妍<sup>1</sup>,孙胜斌<sup>2</sup>

(1. 神威药业集团有限公司,河北 石家庄 051430;2. 中药注射剂新药技术开发  
国家地方联合工程实验室,河北 石家庄 051430)

**摘要:**目的:研究参麦注射液及其中间体中大分子物质的测定。方法:采用高效凝胶渗透色谱法,选用 TSK-Gel GPWXL4000,7.8 mm×300 mm 凝胶柱,以 10 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵溶液为流动相,柱温 40℃,流速为 0.6 mL·min<sup>-1</sup>,蒸发光散射检测器(干燥气体流速 3.0 L·min<sup>-1</sup>;漂移管温度 115℃)。结果:参麦注射液中物质的分子量小于 8 000,绝大多数物质的分子量不到 400。结论:该方法可用于参麦注射液及其中间体中大分子物质相对分子质量及分布的测定,测定结果可作为提高参麦注射液质量标准的依据。

**关键词:**参麦注射液;高效凝胶渗透色谱;大分子物质;相对分子质量

**中图分类号:**R284.2

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-2197(2019)08-0056-04

**DOI:**10.11954/ytctyy.201908016

参麦注射液为红参和麦冬提取有效成分制成的纯中药注射液制剂,主要以人参皂苷类和糖类为主要有效成分<sup>[1]</sup>。参麦注射液具有益气固脱、养阴生津、生脉的作用,临床用

于冠心病、休克、病毒性心肌炎等多种疾病的治疗,为临床常用中药注射液品种之一<sup>[2-3]</sup>。大分子物质被广泛认为是引起中药注射液中不良反应的源头<sup>[4]</sup>,受生产工艺及存放

- [11] 张伟云,陈全成,王丽荣,等. 泽泻降低 2 型糖尿病小鼠血糖的有效部位筛选[J]. 上海中医药杂志,2016, 50(10):81-85.
- [11] ZHANG WY, CHEN QC, WANG LR, et al. Screening research on effective parts of *Alisma orientalis* (Samuel.) Juzep associated with blood glucose decrease in type 2 diabetic mice[J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 50(10): 81-85.
- [12] 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):8-11.
- [12] ZHANG WY, WEN ZX, WANG XY, et al. Effects of *Pseudostellaria Heterophylla* (Miq.) Pax et Hoffm. Extract on 3T3-L1 Pre-adipocytes Differentiation [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2016, 28(12):8-11.
- [13] 张伟云,姚芳华,王青,等. 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[J]. 时珍国医国药,2018, 29(5):1028-1030.
- [13] ZHANG WY, YAO FH, WANG Q, et al. Effect of Pseudostellarin E from *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax et Hoffm. on differentiation in 3T3-L1 pre-adipocytes and glucose uptake [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2018, 29(5):1028-1030.
- [14] 张伟云,王丽荣,许长江,等. 槐花提取物降血糖活性研究[J]. 上海中医药杂志,2017,51(5):93-97.
- [14] ZHANG WY, WANG LR, XU CJ, et al. Research on hypoglycemic activity of *Sophora japonica* L extract[J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 51(5): 93-97.
- [15] 张伟云,王青,向云亚,等. 芦丁对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的作用[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(1): 90-94.
- [15] NAOWABOOT J, CHUNG C H, CHOI R. Effects of rutin on differentiation of 3T3-L1 preadipocytes [J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 52(1): 90-94.
- [16] SALTIEL AR, OLEFSKY JM. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes[J]. Diabetes 1996, 45(12): 1661-1669.
- [17] OLEFSKY JM, SALTIEL AR. PPAR  $\gamma$  and the treatment of insulin resistance[J]. Trends Endocrinol Metab, 2000, 11(9): 362-368.
- [18] PICARD F, AUWERX J. PPAR( $\gamma$ ) and glucose homeostasis [J]. Annu Rev Nutr, 2002, 22(1): 167-197.
- [19] REN D, COLLINGWOOD TN, REBAR EJ, et al. PPAR $\gamma$  knockdown by engineered transcription factors; exogenous PPAR $\gamma$ 2 but not PPAR $\gamma$ 1 reactivates adipogenesis [J]. Genes Dev, 2002, 16(1): 27-32.

(编辑:陈湧涛)

收稿日期:2019-02-24

基金项目:国家中医药管理局中药标准化建设项目(ZYBZH-C-HEB-11)

作者简介:王雪莲(1989—),女,神威药业集团有限公司助理工程师,研究方向为中成药质量与工艺。

通讯作者:李响明(1986—),女,神威药业集团有限公司助理工程师,研究方向为中成药质量与工艺。E-mail:342399087@qq.com