

黄芪多糖和小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞糖代谢及细胞分化的影响

王树海 王文健 汪雪峰 陈伟华

摘要 目的 比较黄芪多糖和小檗碱对脂肪细胞糖代谢和细胞分化的影响,并分析其改善糖代谢的可能机制。**方法** 检测黄芪多糖和小檗碱干预的脂肪细胞对³H-葡萄糖的摄取,对黄芪多糖和小檗碱干预分化的细胞进行油红 O 染色并通过比色定量分析脂肪细胞分化程度。逆转录多聚酶联反应(RT-PCR)检测脂肪细胞分化相关基因过氧化物体增殖刺激受体 γ (PPAR γ)、CAAT/增强子结合蛋白 α (C/EBP α)mRNA 的表达。**结果** 黄芪多糖和小檗碱组葡萄糖摄取率分别为正常组的 109.3% 和 182.7%;黄芪多糖明显促进分化及其 PPAR γ mRNA 表达,与对照组比较,差异有显著性($P < 0.01$);小檗碱则明显抑制细胞分化及 PPAR γ 、C/EBP α mRNA 表达,与对照组比较,差异有显著性($P < 0.01$)。**结论** 黄芪多糖促进脂肪细胞葡萄糖摄取及细胞分化和 PPAR γ mRNA 表达,而小檗碱促进葡萄糖摄取但抑制脂肪细胞分化和 PPAR γ 及 C/EBP α mRNA 的表达。

关键词 脂肪细胞;黄芪多糖;小檗碱;糖代谢;分化

Effect of Astragalus Polysaccharides and Berberine on Carbohydrate Metabolism and Cell Differentiation in 3T3-L1 Adipocytes WANG Shu-hai, WANG Wen-jian, WANG Xue-feng, et al *Institute of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine, Institute of Endocrinology and Diabetology, Fudan University, Shanghai (200040)*

Objective To compare the effects of Astragalus polysaccharides (AP) and berberine (BB) on the adipocyte's carbohydrate metabolism and cell differentiation, for assessing the possible mechanism of them in improving carbohydrate metabolism. **Methods** Adipocytes were treated with AP or BB, the ³H-glucose up-take rate in them was investigated, those of differentiation phase were stained by oil red O to analyze the degree of cell differentiation by spectrophotography quantitatively. The adipocyte differentiation related expression of PPAR γ mRNA and C/EBP α mRNA were determined by RT-PCR. **Results** The ³H-glucose up-take rate in the AP group and BB group were 109.3% and 182.7% of that in the blank control group respectively. AP obviously promoted the cell differentiation and up-regulated expression of PPAR γ mRNA, while BB suppressed the differentiation and expression of PPAR γ and C/EBP α mRNA distinctly, all showing significant difference as compared with that in the blank control ($P < 0.01$). **Conclusion** AP could promote glucose up-take, cell differentiation and PPAR γ mRNA expression, BB also promote glucose up-take, but suppress the cell differentiation, and inhibit expressions of PPAR γ and C/EBP α mRNA in 3T3-L1 adipocytes.

Key words adipocyte; Astragalus polysaccharides; berberine; carbohydrate metabolism; cell differentiation

脂肪细胞分化失常可导致脂肪组织的过多堆积,造成肥胖。大量证据表明肥胖与胰岛素抵抗有高度相关性^[1],是引发 2 型糖尿病、糖耐量异常、高血压、高脂血症及动脉粥样硬化等代谢性疾病的重要因素。脂肪

细胞分化将直接影响糖脂代谢,进而影响代谢性疾病的发生发展。黄芪和黄连是临床常用的治疗糖尿病和改善胰岛素抵抗的中药,我们采用其主要有效成分黄芪多糖和小檗碱,观察比较它们对 3T3-L1 脂肪细胞糖代谢及前脂肪细胞分化的影响,现报告如下。

材料与方法

1 材料 3T3-L1 细胞株购自 ATCC(American

基金项目:教育部 985 工程资助项目(No. 2001-13)

作者单位:复旦大学中西医结合研究所 复旦大学内分泌糖尿病研究所(上海 200040)

通讯作者:王文健, Tel: 021-62489999 转 6518, E-mail: wj6518@163.com

Type Culture Collection)公司;黄芪多糖由本研究所提供;小檗碱(化学对照品)购于中国药品生物制品检定所;DMEM、Trizol 购自 Gibco 公司;油红 O、细胞松弛素 B 购自 Sigma 公司;³H-葡萄糖购自北京原子高科核技术应用股份有限公司;牛血清白蛋白(BSA)为 Sino-American Biotech 公司产品;AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒为 Bio-Basic 公司产品,PCR 扩增试剂盒购上海生工公司。

2 黄芪多糖和小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖摄取的影响 3T3-L1 前脂肪细胞培养与诱导分化方法同文献^[2]。将 24 孔培养板中分化成熟的脂肪细胞以含 0.2% BSA 的 DMEM 培养基培养 12h 后,分为对照组(不加药)、黄芪多糖组、小檗碱组和罗格列酮组,药物干预培养 24h。³H-葡萄糖摄取检测按文献方法^[2]。

3 3T3-L1 前脂肪细胞的分化检测 采用油红 O 染色法,设置对照组(不加药)、黄芪多糖组、小檗碱组和罗格列酮组,在加分化液同时加药,药物与培养液同步更换。分化第 8 天进行油红 O 染色,异丙醇处理染色的细胞,570nm 波长检测吸光度值(OD 值)。

4 过氧化物体增殖剂活化受体 γ (PPAR γ)与 CAAT/增强子结合蛋白 α (C/EBP α)mRNA 表达 采用逆转录多聚酶联反应(RT-PCR)法检测。药物处理同上,分化第 8 天抽提细胞总 RNA,以 AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒逆转录为 cDNA。设计上下游引物,由上海捷倍思基因公司合成。PPAR γ 上游引物:5' GACCACTCGCATTCCTTT3',下游引物:5' CCACAGACTCGGCACTCA3'; C/EBP α 上游引物:5' GAGGAGGACGAGGCGAAGCA3',下游引物:5' TCCAGCGACCCGAAACCA3'; β -actin 上游引物:5' GTCTTTACGGATGTCAACG3',下游引物:5' CCCTGTATGCTCTGGTC3'。PCR 扩增后以 2% 的琼脂糖凝胶电泳, Syngene 图像分析系统拍照, GeneTool 软件进行定量分析。

5 统计学方法 采用 SPSS For Windows 11.0 统计软件对实验结果进行统计分析,组间比较采用 One-Way ANOVA, Student-Newman-Keuls 分析。

结 果

1 黄芪多糖和小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖摄取的影响 见表 1。以对照组葡萄糖摄取量作为对照基值(100%),各组分别与之相比作为各自葡萄糖摄取率。结果显示黄芪多糖组和小檗碱组葡萄糖摄取率分别为正常对照的 109.3% 和 182.7%。提示黄芪

多糖和小檗碱均可增加细胞葡萄糖摄取。

2 黄芪多糖和小檗碱对细胞分化的影响 见表 1。对脂肪细胞油红 O 染色后进行 OD 值测定,可以定量检测细胞内脂肪的含量,判断细胞的分化程度。结果发现黄芪多糖组 OD 值明显高于小檗碱组和对照组(均 $P<0.01$),低于罗格列酮组($P<0.05$);小檗碱组 OD 值显著低于对照组和罗格列酮组(均 $P<0.01$)。提示黄芪多糖能促进细胞内脂质的积聚,促进细胞分化,而小檗碱则抑制细胞内脂质的积聚,抑制分化。

表 1 黄芪多糖和小檗碱对脂肪细胞³H-葡萄糖摄取及细胞分化的影响 ($\bar{x} \pm s$)

药物及浓度	n	³ H-葡萄糖摄取率 (%)	n	细胞分化 (OD 值)
黄芪多糖(0.1μg/μl)	7	109.3±3.5* ^{△△}	12	0.602±0.048** ^{△△}
小檗碱(5μmol/L)	7	182.7±18.5**	12	0.315±0.057** ^{△△}
罗格列酮(5μmol/L)	7	190.4±9.2**	12	0.700±0.033**
对照(不加药)	7	100.0±3.3	12	0.538±0.053

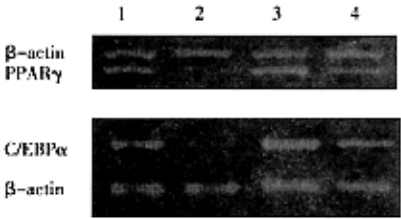
注:与对照组比较, $P<0.05$, $P<0.01$;与罗格列酮比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与小檗碱组比较, $\blacktriangle P<0.01$

3 黄芪多糖和小檗碱对脂肪细胞的 PPAR γ 和 C/EBP α mRNA 表达的影响 黄芪多糖组 PPAR γ mRNA 表达量明显高于对照组($P<0.01$),低于 PPAR γ 激动剂罗格列酮($P<0.05$),而对 C/EBP α mRNA 表达的影响与对照组比较无明显差异($P>0.05$);小檗碱 PPAR γ 和 C/EBP α mRNA 表达量均显著低于其他 3 组(均 $P<0.01$)。见表 2,图 1。

表 2 黄芪多糖和小檗碱对脂肪细胞的 PPAR γ 和 C/EBP α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

药物及浓度	n	PPAR γ	C/EBP α
黄芪多糖(0.1μg/μl)	6	0.95±0.12* ^{△△}	0.67±0.09 ^{△△} [△]
小檗碱(5μmol/L)	6	0.23±0.06* ^{△△}	0.22±0.08 ^{△△}
罗格列酮(5μmol/L)	6	1.06±0.15* [△]	1.07±0.24 [△]
对照(不加药)	6	0.67±0.08 [△]	0.60±0.06 [△]

注:与对照组比较,* $P<0.01$;与罗格列酮比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与小檗碱组比较, $\blacktriangle P<0.01$



注:1.黄芪多糖组;2.小檗碱组;3.罗格列酮组;4.对照组

图 1 黄芪多糖和小檗碱对脂肪细胞的 PPAR γ 和 C/EBP α mRNA 表达的影响

讨 论

脂肪组织是体内巨大的能量贮备系统,它对于维持机体的能量代谢平衡发挥着重要作用;另一方面,脂肪细胞分化失常可引起脂肪的过多堆积,继而导致肥胖和胰岛素抵抗的发生。因此,近年来脂肪细胞分化的调控及其与肥胖、胰岛素抵抗发病机制的关系一直是国内外的研究热点。研究药物对脂肪细胞的分化的影响,对于防治与肥胖和胰岛素抵抗密切相关的 2 型糖尿病、高血压、血脂紊乱、动脉粥样硬化等代谢性疾病的发病及减轻其危害具有重要意义。

脂肪细胞分化是由分化转录因子调控的复杂过程。过氧化物体增殖剂活化受体家族(PPARs)、CAAT/增强子结合蛋白家族(C/EBPs)是调控脂肪细胞分化的主要转录因子^[3]。这些转录因子的表达与肥胖、高脂血症、2 型糖尿病等疾病的形成和发展密切相关。PPAR 属激素核受体超家族成员,由不同基因编码的 3 个亚型组成:PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ 。其中 PPAR γ 最具脂肪组织特异性,对脂肪细胞的分化起着重要作用。噻唑烷二酮(TZD)和 15-脱氧前列腺素 J2(15-dPJ2)分别是 PPAR γ 的合成和天然的配体,与之结合可以促进脂肪生成。PPAR γ 对脂肪细胞分化进行调控是通过与配体结合被激活后再与受体结合形成 PPAR-RXR 异二聚体,进一步同反应元件结合激活靶基因最终导致脂肪细胞分化成熟^[3]。C/EBPs 家族有 C/EBP α 、 β 、 γ 等成员,其中 C/EBP α 在脂肪细胞分化中起着关键性作用,促进 PPAR γ 的高表达,保持分化细胞的表型^[4]。

TZD 类药物罗格列酮是目前治疗胰岛素抵抗的代表药物,它促进 PPAR γ 表达增加和脂肪细胞的分化,促进葡萄糖转运,增加脂肪组织胰岛素敏感性。但罗格列酮最终使脂肪积聚增多,引起体重增加,而肥胖与胰岛素抵抗具有高度相关性,造成了治疗上的矛盾^[5]。因此,寻求既能改善胰岛素抵抗又可 not 增加体脂和体重的药物对于代谢性病的防治极具意义。

黄芪味甘性微温,是补气升阳的常用中药,多用于治疗各种气虚证;黄连味苦性寒,功能清热燥湿泻火,多用于治疗湿热实证。近年多有报道它们及其有效成分黄芪多糖和小檗碱具有改善胰岛素抵抗及糖脂代谢的作用^[6-8],我们的实验结果亦表明二者均可增加脂肪细胞葡萄糖摄取和利用,说明它们都能在一定程度上改善胰岛素抵抗,这是其共同点;但在对脂肪细胞分化的影响方面有所不同,黄芪多糖促进脂肪细胞的分化,并促进 PPAR γ mRNA 的表达,其效应与 PPAR γ 激动剂罗

格列酮相似;而小檗碱则抑制前脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化,抑制分化相关基因 PPAR γ 和 C/EBP α mRNA 的表达,其效应完全不同于黄芪多糖和 PPAR γ 激动剂罗格列酮。提示小檗碱在增加细胞葡萄糖摄取的同时不会引起体脂的聚积而造成体重增加,可能适合于治疗肥胖和胰岛素抵抗相关的代谢性疾病,这将为胰岛素抵抗的防治提供新的思路,但其确切机制及能量的去处尚有待于深入研究。同时这种性味的不同体现在治疗机制上的相反作用对于我们理解中药性味的本质以及治疗药物的筛选具有一定的启示作用。

参 考 文 献

- 1 Bloomgarden ZT. Obesity, hypertension, and insulin resistance. *Diabetes Care* 2002;25(11):2088—2097.
- 2 Atsuko Takano, Tetsuro Haruta, Minoru Iwata, et al. Growth hormone induces cellular insulin resistance by uncoupling phosphatidylinositol 3-kinase and its downstream signals in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 2001;50:1981—1990.
- 3 Rosen ED, Hus CH, Wang X, et al. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev* 2002;16:22—26.
- 4 Ram ji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 2002;365:561—575.
- 5 王树海,王文健.胰岛素抵抗的发病机制及中西医结合防治策略. *中西医结合学报* 2004;2(1):14—16.
Wang SH, Wang WJ. Pathogenesis of insulin resistance and prevention and cure strategy in integrated of traditional Chinese medicine and western medicine. *J Chin Integr Med* 2004;2(1):14—16.
- 6 鲁 瑾,邹大进,张家庆.黄芪预防肿瘤坏死因子- α 所致胰岛素抵抗. *中国中西医结合杂志* 1999;19(7):420—422.
Lu J, Zou DJ, Zhang JQ. Preventive effect of radix astragali on insulin resistance caused by tumor necrosis factor α . *Chin J Integr Tradit West Med* 1999;19(7):420—422.
- 7 叶红英,俞茂华,游 利,等.黄芪多糖对 STZ 糖尿病大鼠物质代谢和心功能的影响. *上海医科大学学报* 2000;27(5):357—358.
Ye HY, Yu MH, You L, et al. Effect of Astragalus polysaccharides on metabolism and heart function in STZ diabetes rats. *J Shanghai Med Univ* 2000;27(5):357—358.
- 8 陆 灏,叶伟成,丁学屏.黄连素对实验大鼠胰岛素抵抗的影响. *辽宁中医学院学报* 2002;4(4):259—260.
Lu H, Ye WC, Ding XP. Effect of Berberine on insulin resistance in experiment rats. *J Liaoning Coll TCM* 2002;4(4):259—260.

(收稿:2004-03-31 修回:2004-07-02)