

· 博士之窗 ·

西洋参茎叶总皂苷对脂肪细胞糖脂代谢及胰岛素抵抗信号转导的影响

张颖¹ 陈可冀¹ 杨领海² 白桂荣² 殷惠军¹

摘要 目的 观察西洋参茎叶总皂苷 (panax quinquefolius saponin, PQS) 对脂肪细胞糖脂代谢及胰岛素抵抗信号转导的影响。**方法** 将 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化为成熟脂肪细胞, 用游离脂肪酸 (FFA) 制备脂肪细胞胰岛素抵抗 (IR) 模型, 再加入相应药物作用, 最后用葡萄糖氧化酶法检测药物作用后脂肪细胞培养液中葡萄糖消耗量, 用比色法检测药物对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的脂解作用的影响, 用 Western-blot 法检测胰岛素刺激后信号蛋白磷酸化水平。**结果** 模型组葡萄糖消耗量 (mmol/L) 为 5.250 ± 2.671 , 显著低于对照组 14.133 ± 1.305 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 二甲双胍组 (1 mmol/L 及 PQS 大、中、小剂量组 (0.08、0.04、0.02 mg/mL) 葡萄糖消耗量均显著增加 ($P < 0.01$), 分别为 11.807 ± 1.358 、 10.784 ± 2.373 、 10.217 ± 1.237 、 9.984 ± 2.006 , 且随着 PQS 用药剂量的增加, 葡萄糖消耗量也逐渐增加。TNF- α 组培养液中 FFA 浓度 (nmol/ μ g) (2.479 ± 0.597) 显著高于对照组 (1.320 ± 0.538) ($P < 0.01$); 与 TNF- α 组相比, 二甲双胍及 PQS 大、中、小剂量组培养液中 FFA 浓度均显著降低 ($P < 0.01$), 分别为 1.210 ± 0.566 、 1.105 ± 0.631 、 1.108 ± 0.260 、 1.201 ± 0.593 , 且随着 PQS 用药剂量的加大, 其抗脂解作用逐渐增强。模型组胰岛素受体 β 亚单位、IRS-1 酪氨酸磷酸化水平及 PKB 的 Ser473 磷酸化水平均较对照组减低; 与模型组比较, PQS 小剂量组信号蛋白磷酸化水平无明显变化, 但 PQS 中、大剂量和二甲双胍组信号蛋白磷酸化水平均有不同程度增高的趋势。**结论** PQS 能够促进脂肪细胞利用葡萄糖、抑制 TNF- α 的促脂解作用, 从而调节糖脂代谢。PQS 调节糖脂代谢的作用可能与其促进脂肪细胞胰岛素信号转导、改善胰岛素抵抗有关。

关键词 西洋参茎叶总皂苷; 3T3-L1 脂肪细胞; 胰岛素信号转导; 糖脂代谢

Effects of Panax Quinquefolius Saponin of Stem and Leaf on Glucose-Lipid Metabolism and Insulin Signal Transduction in Insulin Resistant Model Adipocytes ZHANG Ying, CHEN Ke-ji, YANG Ling-hai, et al *Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091)*

ABSTRACT Objective To observe the effects of panax quinquefolius saponin (PQS) of stem and leaf on glucose-lipid metabolism and insulin signal transduction in the insulin resistant model of adipocytes. **Methods** The insulin resistant model of differentiated 3T3-L1 adipocytes was established *in vitro* with free fatty acid. After induction of insulin resistance, cells were treated with metformin or PQS for 2 days. The glucose consumption in culture fluid was detected by glucose oxidase method; the effects of PQS on the lipolysis induced by tumor necrosis factor (TNF- α) was observed using colorimetry; and the phospholation of signal proteins was detected by Western-blot. **Results** The amount of glucose consumption (mmol/L) in the model group (5.250 ± 2.671) was significantly lower than that in the normal control group (14.133 ± 1.305 , $P < 0.01$), it increased in the meformin treated group (11.807 ± 1.358), and the groups treated with high-, middle- and low-dose PQS dose-dependently (10.784 ± 2.373 , 10.217 ± 1.237 and 9.984 ± 2.006 , respectively), significantly higher than that in the model group ($P < 0.01$). Upon TNF- α treatment, the concentration of free fatty acid (FFA) (nmol/ μ g) in culture medium was 2.479 ± 0.597 , predominantly higher than that in the control group (1.320 ± 0.538 , $P < 0.01$), while it was 1.210 ± 0.566 in the metformin group, 1.105 ± 0.631 in high-dose PQS group, 1.108 ± 0.260 in the middle-dose PQS group, 1.201 ± 0.593 in the low-dose PQS group, all were lower than that in the

基金项目:北京市自然科学基金资助项目 (No. 7063090)

作者单位: 1. 中国中医科学院西苑医院心血管病研究室 (北京 100091); 2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所

通讯作者: 殷惠军, Tel: 010-62875599 转 6408, E-mail: huijunyin@yahoo.com.cn

TNF- α group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and a dose-dependent tendency of PQS's action was seen. The tyrosine phosphorylation of insulin receptor and IRS-1 as well as Ser473 phosphorylation of PKB were lower in the model group than in the control group; they were insignificantly changed in the low-dose PQS group, but did show significant difference in comparing with those in the high-and middle-dose PQS groups or metformin group. **Conclusion** PQS can accelerate the glucose utilization and depress the lipolysis in adipocytes induced by TNF- α , which may be correlated with its promoting insulin signal transduction and improving insulin resistance in adipocytes.

KEYWORDS panax quinquefoliums saponin of stem and leaf; 3T3-L1 adipocytes; insulin signal transduction; glucose-lipid metabolism

胰岛素抵抗 (IR) 是指胰岛素分泌量在正常水平时刺激靶细胞 (肝细胞、骨骼肌细胞、脂肪细胞等) 摄取和利用葡萄糖的生理效应显著减弱, 或者是靶细胞维持摄取、利用葡萄糖的正常生理效应需要超常量的胰岛素。IR 是联系多种代谢相关疾病 (如冠心病、糖尿病、高血压、血脂异常、肥胖等) 的共同病理生理基础。其生理效应的发挥是通过与靶细胞膜表面的胰岛素受体结合, 启动受体后信号转导, 调节代谢及基因表达而实现的。胰岛素信号转导异常是导致机体 IR 和糖脂代谢异常的重要环节之一。

西洋参茎叶总皂苷 (Panax quinquefolius saponin, PQS) 是从国产西洋参茎叶中提取的活性成分。研究表明 PQS 确实同时具有调整脂质代谢、降低血糖和改善心肌缺血的作用。那么, 该药调脂降糖机制是什么? 是否是通过改善胰岛素抵抗而实现的? 其改善 IR 的机制又是什么? 本研究以 3T3-L1 脂肪细胞 IR 为对象, 观察药物 PQS 对脂肪细胞糖脂代谢及胰岛素抵抗信号转导的影响。

材料与方 法

1 细胞系 小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞株来源于 American Type Culture Collection (ATCC), 由中国医学科学院协和医科大学细胞中心购得。细胞用含 10% 优级胎牛血清及青链霉素的高糖 (25 mmol/L glucose) IMDM 培养液 (GIBCO 公司) 传代培养, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂。

2 药物 PQS 由我院制剂室外购干燥的西洋参茎叶, 水煎、醇提、回收乙醇, 每克生药可提取 40 mg 皂苷, 用蒸馏水配液, 过滤灭菌后用于细胞培养, 实验时终浓度分别为 0.02、0.04、0.08 mg/mL。二甲双胍的实验时终浓度为 1 mmol/L。

3 试剂与仪器 磷酸化的胰岛素受体抗体 (Lot No. 4, CELL SIGNALING)、磷酸化的蛋白激酶 B 抗体 (Lot No. 27730, UPSTATE)、山羊抗兔 IgG 抗体 (Lot No. 23795A, UPSTATE)、山羊抗鼠 IgG 抗体 (Lot No.

23796A, UPSTATE)、兔抗绵羊 IgG 抗体 (Lot No. 23650A, UPSTATE)、抗胰岛素受体 β 亚单位抗体 (Lot No. C2905, SANTA CRUZ)、磷酸化的胰岛素受体底物 1 抗体 (Lot No. D0104, SANTA CRUZ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α , Sigma 公司 Lot No. 302CY25)、蛋白浓度测定试剂盒 (CALBIOCHEM 公司)、游离脂肪酸测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)、电泳仪 (BIO-RAD 公司, 型号 DYY-III 12 型)、转印仪 (美国伯乐公司, 型号 TRANS-BIOT)、酶标仪 (TECAN 公司, 型号 SUNRISE A-5082)。

4 实验方法

4.1 分组 参考 Ross SA^[1] 等的方法将 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化为成熟脂肪细胞后, 传于 6 孔板, 分为 6 组: 空白对照组 (对照组)、模型组、二甲双胍组、PQS 大、中、小剂量组。

4.2 造模方法^[2] 模型组与各药物治疗组细胞均先用含 0.65 mmol/L 棕榈酸、1% BSA、10 nmol/L 葡萄糖的 KRP 缓冲液 (131.2 mmol/L NaCl, 4.71 mmol/L KCl, 2.48 mmol/L Na₃PO₄ · 12H₂O, 1.24 mmol/L MgSO₄, 2.47 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L HEPES, pH 值 7.2 ~ 7.4) 孵育 12 h, 每 2 h 换液 1 次。对照组用不含棕榈酸的上液做同样处理。12 h 后, 均用含 1 mmol/L 丙酮酸钠、1% BSA 的 KRP 缓冲液孵育 1 h。再用含 1% BSA 的 KRP 缓冲液孵育 1 h。然后全部换用全 IMDM 孵育。至此, 模型成功, 可用于实验。

4.3 观察项目及方法

4.3.1 PQS 对葡萄糖消耗作用研究 诱导分化成熟的脂肪细胞造模成功后予相应药物 [二甲双胍 1 mmol/L、PQS 大 (0.08 mg/mL)、PQS 中 (0.04 mg/mL)、PQS 小 (0.02 mg/mL)] 剂量培养 24 h。取培养液, 用葡萄糖氧化酶法测培养液中葡萄糖残存量, 以未接种细胞空白复孔的糖含量均值为基础值, 计算出各孔细胞葡萄糖消耗量。

4.3.2 脂肪分解的检测 诱导分化成熟的细胞, 于 6 孔培养板中生长融合, 分别设对照组、TNF- α 组及

各药物治疗组。除对照组外,均用 TNF- α 诱导脂解,培养液中终浓度为 1.5 nmol/L。各药物治疗组在培养液中,除加 TNF- α 外,还分别加入相应药物培养 48 h。48 h 后,吸取培养液,用试剂盒检测培养液中游离脂肪酸(FFA)的浓度。以 0.1 mol/L NaOH 液裂解细胞,用 MERCK 蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度,以校正 FFA 浓度。

4. 3.3 PQS 对胰岛素抵抗状态下信号蛋白磷酸化水平的影响 诱导分化成熟的脂肪细胞传于 100 mm 的培养皿,分 6 组,每组 6 孔,造模成功后予相应药物培养 48 h。48 h 后,制备细胞蛋白样品,步骤如下:(1)用 Human insulin 150 nmol/L 刺激细胞;(2)30 min 后用冰冷的 PBS 洗细胞 1 次;(3)消化:加胰酶消化液,收集细胞悬液,离心;(4)洗涤:用冰冷 PBS 吹洗 2 次,离心;(5)裂解:加 50 μ L modified RIPA buffer/支(modified RIPA .buffer 成分:Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7.4; NP40 2%; TritonX-100 1%; sodium deoxycholate 0.5%; NaCl 150 mmol/L; EDTA 1mmol/L; PMSF 1mmol/L; Na₃VO₄ 1 mmol/L; NaF 1mmol/L);(6)分装入 2 个 0.5 mL EP 管,1 支用于测定蛋白浓度(Bradford Coomassie dye-binding assay),另 1 支用于 Western-blot, -80 $^{\circ}$ C 保存。用 Western-blot 法检测磷酸化蛋白水平,步骤如下:(1)将蛋白样品用上样缓冲液稀释,95 ~ 100 $^{\circ}$ C 煮 5 min;(2)SDS-PAGE 蛋白电泳,3%的浓缩胶,10%的分离胶,上样量 20 μ L/孔;(3)转膜:硝酸纤维素膜用含 20% 甲醇的转膜液浸泡 5 min,半干法转膜,恒定电流 0.8 mA/cm²,时间 1 h;(4)封闭及抗体孵育:封闭液:TBS/T + 5% (w/v) 脱脂奶粉。室温,摇动 1 h,用 TBS/T 洗膜,杂交袋中与一抗(以封闭液 1:100 稀释)孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜,TBS/T 洗膜;杂交袋中与二抗(以封闭液 1:1 000 稀释)孵育,室温 1.5 h;TBS/T 洗膜;(5)显色:化学增强发光法(ECL),曝光时间为 2 min。

5 统计学方法 所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学处理,对各组数据进行正态性检验和方差齐性检验,Levene 方差齐性检验示方差齐,计量资料组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

结 果

1 PQS 对葡萄糖消耗量的影响(表 1) 模型组葡萄糖消耗量低于对照组($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组葡萄糖消耗量显著增加($P < 0.01$),且随着 PQS 用药剂量的增加,葡萄糖消耗量也有逐渐增加

的趋势。

表 1 各组葡萄糖消耗量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	葡萄糖消耗量 (mmol/L)
对照	6	14.133 \pm 1.305
模型	6	5.250 \pm 2.671*
二甲双胍	6	11.807 \pm 1.358 Δ
PQS 大剂量	6	10.784 \pm 2.373 Δ
PQS 中剂量	6	10.217 \pm 1.237 Δ
PQS 小剂量	6	9.984 \pm 2.006 Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

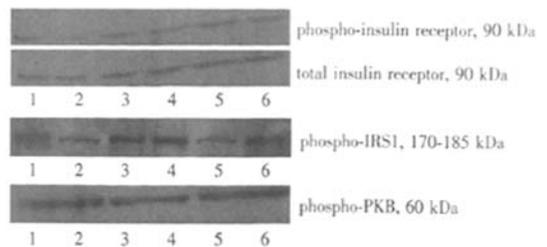
2 PQS 对脂肪分解的影响(表 2) TNF- α 组培养液中 FFA 浓度显著高于对照组($P < 0.01$)。各用药组培养液中 FFA 浓度均显著低于 TNF- α 组($P < 0.01$),且随着 PQS 用药剂量的加大,培养液中 FFA 浓度有逐渐减少的趋势。

表 2 各组 TNF- α 的脂解作用比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FFA 浓度 (nmol/ μ g)
对照	6	1.320 \pm 0.538
TNF- α	6	2.479 \pm 0.597*
二甲双胍	6	1.210 \pm 0.566 Δ
PQS 大剂量	6	1.105 \pm 0.631 Δ
PQS 中剂量	6	1.108 \pm 0.260 Δ
PQS 小剂量	6	1.201 \pm 0.593 Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与 TNF- α 组比较, $\Delta P < 0.01$

3 PQS 对胰岛素抵抗时胰岛素信号转导途径中信号蛋白磷酸化的影响(图 1) Western blot 结果发现,胰岛素刺激 30 min 后,胰岛素抵抗模型组胰岛素受体 β 亚单位酪氨酸磷酸化水平(phospho-insulin receptor)、IRS-1 酪氨酸磷酸化水平(phospho-IRS1)、PKB 的 Ser473 磷酸化水平(phospho-PKB)均较对照组减低;与模型组比较,PQS 中、大剂量和二甲双胍组信号蛋白磷酸化水平均有不同程度增高的趋势。



注:1 为对照组;2 为模型组;3 为 PQS 小剂量组;4 为 PQS 中剂量组;5 为 PQS 大剂量组;6 为二甲双胍组

图 1 各组信号蛋白磷酸化水平

讨 论

胰岛素生理效应的发挥是通过与靶细胞膜表面的胰岛素受体 α 亚基结合,解除其对 β 亚基的抑制,受体酪氨酸蛋白激酶活化,酪氨酸发生自身磷酸化引起

构象改变,从而能与三磷酸腺苷(ATP)及胰岛素受体底物接触,将受体底物蛋白的酪氨酸残基磷酸化。胰岛素受体底物(insulin receptor substrates, IRSs)包括 IRS-1、IRS-2、IRS-3、IRS-4、SHC、CBL、APS、SH2B、GAB-1、GAB-2、DOCK-1、DOCK-2,转基因小鼠的研究提示,胰岛素的效应大部分由 IRS-1 和 IRS-2 介导。IRS-1 主要调控外周胰岛素效应(脂肪、骨骼肌)和身体生长,其酪氨酸磷酸化后,可与效应蛋白(如 PI3-K; 酪氨酸磷酸酶 SHP2; 酪氨酸激酶 fyn)和接头蛋白结合,使胰岛素信号向下传递。活化的胰岛素受体可经以下途径进行信号转导:(1) 磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3-K)信号转导途径:活化的 IRSs 与 PI3-K 调节亚基 p85 结合,使催化亚基 p110 活化。PI3-K 活化后,催化细胞浆膜侧的 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇 PI(4,5)P₂ 转变成三磷酸磷脂酰肌醇(PIP₃)。PIP₃ 可将 PKB、PIP₃ 依赖的蛋白激酶-1(PDK-1)和非典型蛋白激酶 C(aPKC)募集至细胞浆膜侧附近,在那里 PDK-1 使 PKB 的 Ser473 磷酸化,进而产生多种生物学效应(如促进葡萄糖转运,抗脂肪分解,促进糖原、蛋白及脂肪合成,抑制细胞凋亡,促进内皮细胞产生一氧化氮,促进特定基因表达^[3-5])。(2) 活化的胰岛素受体可通过 CAP/Cb1 途径,与 PI3-K 途径协同,促进 GLUT4 转位和葡萄糖转运。(3) Ras 信号转导途径^[6]:IRSs 与生长因子受体结合蛋白 2(Grb-2)结合,后者与鸟苷酸交换因子(SOS)结合进而激活 Ras,通过 MAP 激酶级联系统调节基因表达。胰岛素信号转导异常是导致机体 IR 和糖脂代谢异常的重要环节之一,促进胰岛素信号转导是改善胰岛素抵抗的有效途径之一。

本研究表明:模型组葡萄糖糖消耗量显著低于对照组($P < 0.01$),提示 FFA 可以减少脂肪细胞对葡萄糖的消耗,诱导 IR 的发生,而二甲双胍和 PQS 3 个剂量组葡萄糖糖消耗量均较模型组显著增加($P < 0.01$),且随着 PQS 用药剂量的增加,葡萄糖消耗量也逐渐增加。同时,TNF- α 还可诱导脂肪分解,使细胞培养液中 FFA 浓度显著升高($P < 0.01$),而二甲双胍和 PQS 3 个剂量组培养液中 FFA 浓度均较 TNF- α 组显著下降($P < 0.01$),且随着 PQS 用药剂量的加大,其抗脂解作用有逐渐增强的趋势。以上结果提示:PQS 能够促进脂肪细胞利用葡萄糖,并抑制 TNF- α 的促脂解作用,从而调节糖脂代谢。

其次,胰岛素信号转导的研究结果显示:FFA 诱导脂肪细胞发生胰岛素抵抗时,胰岛素刺激下的胰岛素受体 β 亚单位和 IRS-1 的酪氨酸磷酸化水平降低,PKB 的 Ser473 磷酸化水平下降、活性下降,胰岛素信号转导

通路受阻,终至葡萄糖转运障碍,脂肪细胞摄取利用葡萄糖下降,葡萄糖消耗量减少。而 PQS 同二甲双胍均有不同程度促进胰岛素受体 β 亚单位、IRS-1 酪氨酸磷酸化及 PKB 第 473 位丝氨酸磷酸化的趋势,从而促进脂肪细胞摄取利用葡萄糖,改善胰岛素抵抗。

结合本研究室其他研究结果:PQS 可促进胰岛素刺激下的 GLUT-4 转位、葡萄糖转运、CAP 基因转录^[7]。我们可以得出如下结论:PQS 可调节脂肪细胞糖脂代谢,这可能与其促进胰岛素信号转导、改善机体胰岛素抵抗状态有关。但 FFA 可诱导脂肪细胞发生胰岛素抵抗,FFA 和葡萄糖二者之间供能的竞争可能是 FFA 引发血糖升高及 IR 的重要原因,故 PQS 所致胰岛素受体后信号转导的改善是药物的直接效应还是通过“影响脂肪细胞脂肪代谢使脂肪分解减少、FFA 释放减少”而发挥的间接效应尚待进一步的研究来证实。

参 考 文 献

- [1] Ross SA, Chen XL, Hope H, et al. Development and comparison of two 3T3-L1 adipocyte models of insulin resistance: increased glucose flux vs glucosamine treatment [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273(3): 1033-1041.
- [2] Van Epps-Fung M, Williford J, Wells A, et al. Fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes [J]. *Endocrinology*, 1997, 138(10):4338-4345.
- [3] Nesto RW. The relation of insulin resistance syndromes to risk of cardiovascular disease [J]. *Rev Cardiovas Med*, 2003, 4(Suppl 6):S11-S18.
- [4] Woodgett JR. Recent advances in the protein kinase B signaling pathway [J]. *Cell Biol*, 2005, 17(2):150-157.
- [5] Feuvray D, Darmellah A. Diabetes-related metabolic perturbations in cardiac myocyte [J]. *Diabetes Metab* 2008, 34: S3-S9.
- [6] Halevy O, Cantley LC. Differential regulation of the phosphoinositide 3-kinase and MAP kinase pathways by hepatocyte growth factor vs. insulin-like growth factor-I in myogenic cells [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 297(1):224-234.
- [7] 殷惠军,张颖,杨领海,等. 西洋参茎叶总皂苷对胰岛素抵抗脂肪细胞葡萄糖转运、GLUT-4 转位和 CAP 基因表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(10):421-426.

Yin HJ, Zhang Y, Yang LH, et al. The effects of PQS on glucose transport, GLUT4 translocation and CAP mRNA expression of adipocytes [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2007, 23(10):421-426.

(收稿:2009-12-23 修回:2010-03-28)