

· 经典名方 ·

代综方对不同方式诱导3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗的改善作用

徐婧^{1,2}, 刘喜明², 朱晓云^{2*}, 马文欣^{1,2}, 付守强^{1,2}, 张莉唯^{1,2}

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的:探讨中药代综方(DZF)对不同方式诱导的脂肪细胞胰岛素抵抗(IR)的改善作用。方法:鸡尾酒式联合诱导3T3-L1前脂肪细胞分化成熟,分别采用棕榈酸(PA),高浓度葡萄糖(HG),地塞米松(DEX)诱导建立IR模型。不同质量浓度DZF提取物(含生药质量浓度2.0,0.5,0.1 g·L⁻¹)干预24 h,另设模型组,罗格列酮(RSG)组,空白组。采用葡萄糖氧化酶法(GOD-POD)法检测培养上清中的葡萄糖浓度,计算葡萄糖基础消耗量(G_{Basic})和胰岛素刺激下葡萄糖消耗量(G_{Ins}),评价胰岛素敏感性指数(ISI)。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测葡萄糖转运蛋白4(GLUT4) mRNA表达。结果:与模型组比较,3种模型中,DZF高浓度组 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI均明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);另外,PA诱导的IR模型中,DZF中浓度组 G_{Basic} , G_{Ins} 显著增加($P<0.01$),RSG组的 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);HG诱导的IR模型中,DZF中浓度组的 G_{Ins} ,ISI显著增加($P<0.05$),RSG组 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI显著增加($P<0.01$);DEX诱导的IR模型中,RSG组 G_{Ins} ,ISI显著增加($P<0.01$);3种模型中,不同质量浓度组间存在差异,DZF高浓度组 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI较DZF中、低浓度组有不同程度的增加($P<0.05$)。3种模型中,DZF高浓度组,RSG组均提高了GLUT4 mRNA表达($P<0.05$)。结论:代综方能够减轻HG,DEX,PA诱导的脂肪细胞IR,存在一定的量效关系,同时具有非胰岛素依赖的增加葡萄糖摄取作用;其机制可能与提高GLUT4表达有关。

[关键词] 代综方; 3T3-L1脂肪细胞; 胰岛素抵抗; 模型

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)17-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211602

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210629.0920.001.html>

[网络出版日期] 2021-06-29 11:41

Effect of Daizongfang on Insulin Resistance of 3T3-L1 Adipocytes Induced by Different Methods

XU Jing^{1,2}, LIU Xi-ming², ZHU Xiao-yun^{2*}, MA Wen-xin^{1,2}, FU Shou-qiang^{1,2}, ZHANG Li-wei^{1,2}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Daizongfang (DZF) on insulin resistance (IR) of adipocytes induced by different methods. **Method:** The cocktail induction method was adopted to induce the differentiation and maturity of 3T3-L1 preadipocytes. An IR model in mature adipocytes was established by the induction of palmitic acid (PA), high-concentration glucose (HG), and dexamethasone (DEX). DZF extracts at different concentrations (2.0, 0.5, 0.1 g·L⁻¹) intervened for 24 hours. A model group, a rosiglitazone (RSG) group, and a blank control group were set up at the same time. The glucose concentration in the culture supernatant was measured by the glucose oxidase-peroxidase (GOD-POD) method. Glucose consumptions under

[收稿日期] 20210415(001)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81804085);国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09102-011-08);北京市自然科学基金项目(7082082)

[第一作者] 徐婧,在读博士,从事中医药防治内分泌代谢性疾病研究,E-mail:619617607@qq.com

[通信作者] *朱晓云,助理研究员,从事中医药防治内分泌代谢性疾病研究,Tel:010-88001383,E-mail:qiebenben@163.com

basic conditions (G_{Basic}) and insulin stimulation (G_{Ins}) were calculated to evaluate the insulin sensitivity index (ISI). The mRNA expression of glucose transporter 4 (GLUT4) was detected by the real-time polymerase chain reaction (PCR). **Result:** Compared with the model group, the DZF ($2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) showed increased G_{Basic} , G_{Ins} , and ISI in three IR models ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In addition, for the PA-induced IR model, G_{Basic} and G_{Ins} in the DZF ($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) group were elevated ($P < 0.01$), and G_{Basic} , G_{Ins} , and ISI in the RSG group increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). For the HG-induced IR model, G_{Ins} and ISI increased in the DZF ($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) group ($P < 0.05$), and G_{Basic} , G_{Ins} , and ISI were elevated in the RSG group ($P < 0.01$). For the DEX-induced IR model, G_{Ins} and ISI increased in the RSG group ($P < 0.01$). In the three models, there were differences among groups with different doses. G_{Basic} , G_{Ins} , and ISI in the high-dose DZF group increased in varying degrees compared with those in the medium- and low-dose DZF groups ($P < 0.05$). In the three models, the DZF ($2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) group and the RSG group both increased GLUT4 mRNA expression ($P < 0.05$). **Conclusion:** DZF can reduce IR of adipocytes induced by HG, DEX, or PA in a dose-dependent manner and increase glucose uptake in an insulin-independent manner, which may be related to the increase in GLUT4 expression.

[**Keywords**] Daizongfang; 3T3-L1 adipocytes; insulin resistance; model

慢性代谢性疾病如肥胖,2型糖尿病,代谢综合征是致使人类死亡的元凶之一,正在全球范围内流行,患病率显著上升。据报道,2015年全球肥胖总体患病率为12.0%,2025年预计达到18.0%^[1-2]。2019年成人糖尿病患病率达9.3%,2045年预计增至10.9%^[3]。代谢综合征患者估计已超过10亿人^[4],在中国城市人口的患病率可达到36.4%^[5]。胰岛素抵抗(IR)是此类代谢性疾病的共同病理特征,表现为机体靶组织对胰岛素的反应下降,体内葡萄糖的摄取和利用降低。脂肪组织是胰岛素作用的关键靶组织之一,在维持全身糖脂代谢稳态中发挥着重要作用,通常是IR发生的初始部位。胰岛素对脂肪组织最关键的生理作用是抑制脂肪分解,增加脂肪生成,促进葡萄糖运输,刺激葡萄糖摄取^[6]。研究表明,脂肪IR发生时,胰岛素对脂解抑制减弱,血浆中游离脂肪酸(FFAs)水平升高,胰岛素传导信号受损,阻止葡萄糖转运蛋白4(GLUT4)受体向骨骼肌细胞膜表面转移,促进肝糖异生和异位脂肪沉积,诱导肝脏和骨骼肌发生IR,最终可发展为全身IR^[7]。因此,从脂肪IR入手研究IR的治疗有重要意义。以3T3-L1脂肪细胞建立IR模型被广泛应用于研究脂肪IR机制和抗IR药物的体外筛选。建立此模型存在不同方式,诱导的药物有高浓度葡萄糖(HG),棕榈酸(PA),地塞米松(DEX),胰岛素等,体现了糖毒性、脂毒性等引发脂肪IR的多种因素。目前,西医主要从调控饮食、运动,使用胰岛素增敏剂等治疗IR,药物功效相对单一。中药复方在改善IR作用上具有多途径、多靶点的优势,有更为广阔的应用前景。

代综方(DZF)由《伤寒论》的经典名方小陷胸汤化裁而来,具有清热化痰,行气散满功效。本方已在肥胖、代谢综合征及2型糖尿病临床相关治疗中应用多年,取得了良好的疗效。课题组前期的体内实验表明DZF可以减轻代谢综合征患者体质量,降低血糖、血脂水平^[8],减轻db/db糖尿病小鼠的IR,减少肝脏的脂质沉积^[9]。体外实验证实DZF能够调节C2C12骨骼肌细胞,肝癌HepG2细胞,3T3-L1脂肪细胞糖脂代谢,抑制脂肪细胞分化^[10-13],但DZF对脂肪IR的作用尚未明确。本研究分别采用HG, PA, DEX 3种药物诱导建立3T3-L1脂肪细胞IR模型,以罗格列酮(RSG)为阳性药,全面评价DZF改善不同因素引起的脂肪IR的作用效果及对GLUT4的影响,在细胞研究层面上与中医“异病同治”理念相契合,为后续机制挖掘奠定基础,为DZF的临床应用提供更多实验证据。

1 材料

1.1 细胞株 3T3-L1细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

1.2 药物与试剂 DZF由黄连、半夏、瓜蒌、枳实、肉桂、红曲6味药物组成。DZF提取物(冻干粉)由浙江九旭药业有限公司生产和提供,批号20141201。经高效液相色谱法(HPLC)鉴定其有效化学成分及含量为小檗碱 $28.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 巴马汀 $5.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 药根碱 $3.93 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 柚皮苷 $73.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 橙皮苷 $8.61 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 新橙皮苷 $87.09 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 质量稳定^[9]。称取DZF粉末溶解于超纯水,超声使粉末充分溶解、混悬,经 $0.22 \mu\text{m}$ 无菌滤膜过滤,配成 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DZF母液,于 -20°C 冻存,使

用时用完全培养基稀释到所需的药物质量浓度。新生牛血清、优级胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号分别为20151113,20150827);马来酸罗格列酮片(葛兰素史克天津有限公司,批号H20020475);DEX,胰岛素,3-异丁基-1-甲基黄嘌呤,PA(美国Sigma公司,批号分别为D4902,I5500,I7018,P5585-10G);DMEM低糖培养基,高糖培养基(美国Gibco公司,批号分别为627479,1290007);葡萄糖临床检测试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司,批号361500);TRIzol,反转录试剂盒(美国Invitrogen公司,批号分别为15596026,4374966);SYBR Green Master Mix(美国ABI公司,批号4367659)。

1.3 仪器 Heracell150 I型二氧化碳培养箱(美国Thermo公司);7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司);SynergyHT型酶标仪(美国BioTek公司)。

2 方法

2.1 3T3-L1前脂肪细胞的培养和诱导分化 使用含10%新生牛血清的高糖DMEM培养3T3-L1细胞株,在37℃,饱和湿度,5%CO₂的条件下培养。至细胞完全融合后,接触抑制2 d,在10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中添加0.5 mmol·L⁻¹ 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤,1.0 μmol·L⁻¹ DEX,1 mg·L⁻¹胰岛素培养72 h,更换为含1 mg·L⁻¹胰岛素的培养基再培养48 h,随后以10%胎牛血清的DMEM高糖培养基继续培养,2 d换液1次。诱导分化10~14 d,90%以上3T3-L1细胞呈脂肪细胞表型,用于后续实验。

2.2 3T3-L1脂肪细胞IR模型的建立与分组

2.2.1 PA诱导 成熟脂肪细胞,给予含10%胎牛血清,5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖,0.5 mmol·L⁻¹ PA的DMEM培养基诱导IR,另设空白组给予5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖,10%胎牛血清的DMEM培养。PA诱导72 h后分组,PA模型组,代综方高、中、低质量浓度组(5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖,0.5 mmol·L⁻¹ PA,含DZF生药量2.0,0.5,0.1 g·L⁻¹),RSG组(5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖,0.5 mmol·L⁻¹ PA,10.0 μmol·L⁻¹ RSG);各组复孔3个,给予相同体积培养基,干预24 h。

2.2.2 HG诱导 成熟脂肪细胞,给予含10%胎牛血清25 mmol·L⁻¹葡萄糖的DMEM培养基诱导IR,另设空白组给予5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖,10%胎牛血清的DMEM培养;HG诱导48 h后分组,HG模型组,DZF高、中、低浓度组(25 mmol·L⁻¹葡萄糖,含DZF生药量2.0,0.5,0.1 g·L⁻¹),RSG组(25 mmol·L⁻¹

葡萄糖,10.0 μmol·L⁻¹ RSG);各组3个复孔,给予相同体积培养基,干预24 h。

2.2.3 DEX诱导 成熟脂肪细胞,给予含10%胎牛血清,5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖,1.0 μmol·L⁻¹ DEX的DMEM培养基诱导IR,另设空白组给予5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖,10%胎牛血清的DMEM培养;DEX诱导72 h后分组:DEX模型组,DZF高、中、低质量浓度组(5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖,1.0 μmol·L⁻¹ DEX,含DZF生药量2.0,0.5,0.1 g·L⁻¹);RSG组(5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖,1.0 μmol·L⁻¹ DEX,10.0 μmol·L⁻¹ RSG);各组3个复孔,给予相同体积培养基,干预24 h。

2.3 葡萄糖消耗检测 根据文献[14],12孔板各组吸弃培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次,加入无血清含或不含500 μg·L⁻¹胰岛素的低糖DMEM溶液300 μL,37℃培养3 h。应用葡萄糖氧化酶法(GOD-POD)测定培养上清中葡萄糖浓度,以培养前葡萄糖浓度(C₀)减去反应后糖浓度(C_{3h})乘以反应体积(V),计算脂肪细胞葡萄糖消耗量(G)。同时,收集细胞,以37℃培养箱和液氮反复冻融3次裂解细胞,采用二辛可宁酸(BCA)法测定细胞裂解液蛋白浓度,以每毫克蛋白(pro)校正各组细胞数量引起的误差,G(μmol·mg⁻¹·pro⁻¹)=(C₀-C_{3h})×V/pro,V=0.3 mL。

2.4 胰岛素敏感性评价 以胰岛素敏感性指数(ISI)评价脂肪细胞IR程度。ISI=[(G_{Ins}-G_{Basic})/X]/[(G_{Ins}-G_{Basic})/Con]×100。G_{Ins}为胰岛素刺激后葡萄糖消耗量,G_{Basic}为基础状态的葡萄糖消耗量,X为实验组,Con为空白组。

2.5 Real-time PCR检测 GLUT-4 mRNA表达水平 使用TRIzol提取细胞总RNA并测定浓度。取总RNA 3 μg以Oligo(dT)18为引物,逆转录反应总体积20 μL,其中2 μL cDNA样本进行PCR扩增。PCR扩增条件为95℃预变性10 min,95℃变性25 s,55℃退火25 s,72℃延伸50 s,共40个循环,72℃后延伸5 min。使用7500软件计算C_t值,为防止出现假阳性信号,通过溶解曲线来检查非特异性产物的构成。以β-肌动蛋白(β-actin)基因为内标参照,使用比较2^{-ΔΔC_t}法来计算基因的相对定量。引物由北京赛百盛生物技术公司合成,引物序列见表1。

2.6 统计学处理 采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,模型组与空白组间比较采用独立样本t检验;多个实验组与模型组间比较采用

表1 PCR引物序列

Table 1 Prime sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GLUT-4	上游 GATGCCGTCGGGTTTCCAGCA	233
	下游 TGAGGGTGCCTTGTGGGATGG	
β -actin	上游 GAGACCTTCAACACCCAGCC	264
	下游 AATGTCACGCACGATTCC	

单因素方差分析,根据方差是否齐,组间比较分别采用最小显著性差异法(LSD)或Dunnett-*t*检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对PA诱导的3T3-L1脂肪细胞IR葡萄糖消耗及ISI的影响 与空白组比较,PA处理后,模型组 G_{Basic} 无明显变化, G_{Ins} ,ISI分别降低20.36% ($P<$

0.01),50.57% ($P<0.01$),说明造模成功。与PA模型组比较,不同质量浓度DZF或RSG干预后脂肪细胞葡萄糖消耗及胰岛素敏感性均不同程度增加,DZF高浓度组 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI分别增加54.84% ($P<0.01$),64.46% ($P<0.01$),89.32% ($P<0.01$);DZF中浓度组的 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI分别增加44.53% ($P<0.01$),40.90% ($P<0.01$),31.52%;RSG组的 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI分别增加35.59% ($P<0.05$),78.98% ($P<0.01$),19.15% ($P<0.01$);DZF低浓度组的 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI分别增加14.86%,11.61%,3.23%。不同质量浓度DZF组之间比较,DZF高浓度组较DZF中浓度组 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI不同程度增加,其中 G_{Ins} 增加差异有统计学意义 ($P<0.05$);DZF高浓度组较DZF低浓度组 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI均明显增加 ($P<0.05$, $P<0.01$);DZF中浓度组较DZF低浓度组 G_{Ins} 显著增加 ($P<0.01$)。见表2。

表2 DZF对PA诱导的3T3-L1细胞IR葡萄糖消耗及ISI的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of DZF on glucose consumption and ISI in 3T3-L1 cells IR induced by PA ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/ $g\cdot L^{-1}$	$G/\mu mol\cdot mg^{-1}\cdot pro^{-1}$		ISI/%
		Basic	Ins	
空白		0.71 $\pm$ 0.02	1.29 $\pm$ 0.06	100.07 $\pm$ 14.28
模型		0.74 $\pm$ 0.11	1.03 $\pm$ 0.06 ²⁾	49.47 $\pm$ 10.74 ²⁾
DZF	2.0	1.15 $\pm$ 0.06 ^{4,7)}	1.69 $\pm$ 0.11 ^{4,5,8)}	93.65 $\pm$ 8.93 ^{4,7)}
	0.5	1.07 $\pm$ 0.03 ⁴⁾	1.44 $\pm$ 0.06 ^{4,8)}	65.06 $\pm$ 11.36
	0.1	0.85 $\pm$ 0.08	1.14 $\pm$ 0.06 ⁶⁾	61.06 $\pm$ 17.65
RSG	10.0 ⁹⁾	1.00 $\pm$ 0.12 ³⁾	1.84 $\pm$ 0.07 ⁴⁾	144.02 $\pm$ 10.16 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与DZF中浓度组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$;与DZF低浓度组比较⁷⁾ $P<0.05$,⁸⁾ $P<0.01$;⁹⁾表示浓度单位为 $\mu mol\cdot L^{-1}$ (表3~5同)。

3.2 对HG诱导的3T3-L1脂肪细胞葡萄糖消耗及ISI的影响 与空白组比较,HG处理后,模型组 G_{Basic} 和 G_{Ins} 有降低趋势,差异无统计学意义,ISI明显降低43.47% ($P<0.05$),说明造模成功。与HG模型组比较,不同质量浓度DZF组和RSG组均不同程度增加脂肪细胞葡萄糖消耗,DZF高浓度组 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI分别显著增加60.05%,100.21%,189.79%,差异有明显统计学意义 ($P<0.01$);DZF中浓度组 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI分别明显增加17.85%,38.56%,差异有明显统计学意义 ($P<0.05$),84.76% ($P<0.05$);DZF低浓度组 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI分别增加6.97%,18.29%,43.54%;RSG组 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI分别显著增加55.67%,82.18%,141.29%,差异有明显统计学意义 ($P<0.01$)。不同质量浓度DZF组之间比较,DZF高浓度组较DZF中、低浓度组的 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI明显增加 ($P<0.05$, $P<0.01$),DZF中、低浓度组间比较 G_{Ins} 显著增加,差异有明显统计学意义 ($P<0.01$)。见表3。

3.3 对DEX诱导的3T3-L1脂肪细胞葡萄糖消耗及ISI的影响 与空白组比较,DEX处理后,模型组 G_{Basic} 有降低趋势,但差异无统计学意义, G_{Ins} ,ISI分别显著降低20.68% ($P<0.05$),36.53% ($P<0.01$),说明造模成功。与DEX模型组比较,各给药组 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI均有不同程度增加,其中DZF高浓度组 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI分别增加33.22%,差异有明显统计学意义 ($P<0.05$),61.33% ($P<0.01$),111.32% ($P<0.01$);RSG组 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI分别显著增加23.06%,55.42%,差异有显著统计学意义 ($P<0.01$),112.98% ($P<0.01$)。DZF中、低浓度组 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI有增加趋势,但差异均无统计学意义。不同质量浓度DZF组之间比较,DZF高浓度组较DZF低浓度组的 G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI均明显增加,差异有明显统计学意义 ($P<0.05$);DZF高、中浓度组间比较及DZF中、低浓度组间比较, G_{Basic} , G_{Ins} ,ISI有增加趋势,但差异均无统计学意义。见表4。

表 3 DZF 对 HG 诱导的 3T3-L1 细胞 IR 葡萄糖消耗及 ISI 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of DZF on glucose consumption and ISI in 3T3-L1 cells IR induced by HG ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	G/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{pro}^{-1}$		ISI/%
		Basic	Ins	
空白		0.66±0.07	1.16±0.16	100.00±19.85
模型		0.63±0.05	0.91±0.11	56.53±10.56 ¹⁾
DZF	2.0	1.00±0.04 ^{4,5,7)}	1.82±0.04 ^{4,6,8)}	163.81±17.18 ^{4,5,7)}
	0.5	0.74±0.10	1.26±0.19 ^{3,8)}	104.44±21.59 ³⁾
	0.1	0.67±0.14	1.07±0.05 ⁶⁾	81.14±23.33
RSG	10.0 ⁹⁾	0.98±0.09 ⁴⁾	1.65±0.13 ⁴⁾	136.40±21.04 ⁴⁾

表 4 DZF 对 DEX 诱导的 3T3-L1 细胞 IR 葡萄糖消耗及 ISI 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of DZF on glucose consumption and ISI in 3T3-L1 cells IR induced by DEX ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	G/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{pro}^{-1}$		ISI/%
		Basic	Ins	
空白		0.70±0.03	1.28±0.09	100.03±10.67
模型		0.65±0.06	1.01±0.06 ¹⁾	63.50±3.98 ²⁾
DZF	2.0	0.86±0.05 ^{3,5,7)}	1.63±0.21 ^{4,7)}	134.18±28.04 ^{4,7)}
	0.5	0.70±0.12	1.27±0.21	97.70±17.16
	0.1	0.65±0.07	1.12±0.12	80.55±9.82
RSG	10.0 ⁹⁾	0.80±0.05	1.57±0.11 ⁴⁾	135.23±18.48 ⁴⁾

3.4 对 3 种 3T3-L1 脂肪细胞 IR 模型 GLUT4 mRNA 表达的影响 与空白组比较,3 种方法诱导后的模型组的 GLUT4 mRNA 表达均显著降低($P<0.01$)。3 种脂肪细胞 IR 模型中,与模型组比较,DZF 高浓度组和 RSG 组 GLUT4 mRNA 表达均明显提高($P<0.05, P<0.01$)。见表 5。

表 5 DZF 对 GLUT4 mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of DZF on relative expression of GLUT4 mRNA ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	PA 诱导	HG 诱导	DEX 诱导
空白		1.01±0.08	1.04±0.12	1.01±0.05
模型		0.49±0.03 ²⁾	0.35±0.02 ²⁾	0.45±0.06 ²⁾
DZF	2.0	0.68±0.08 ³⁾	0.69±0.06 ⁴⁾	0.79±0.03 ⁴⁾
RSG	10.0 ⁹⁾	1.11±0.07 ⁴⁾	0.57±0.10	0.81±0.03 ⁴⁾

4 讨论

随着人们生活方式和膳食结构的改变,慢性代谢性疾病如肥胖、代谢综合征及 2 型糖尿病发病率不断增高,给全球居民生活质量和生命健康带来了重大危害,造成了公共卫生体系的巨大负担。IR 普遍存在于此类慢性代谢性疾病中,是重要的发病机制之一,表现为组织细胞的胰岛素效应低于正常的病理状态。抗 IR 的治疗研究已经成为世界性的难题。

IR 影响因素复杂,除了遗传因素外,饮食方式和生活习惯也是公认的重要因素。中医学认为 IR 的病因包括饮食不节、久坐少动、情志失调等方面,病位在脾胃,基本病机为中满内热。饮食不节,过食肥甘,损伤脾气;久坐少动,情志不畅,阻碍脾气运行。脾失运化,水谷精微布散失常,聚生痰湿,郁而化热。痰热中阻,脏腑失于濡养,久之则机体组织功能失调进而对胰岛素敏感性下降,出现 IR。课题组前期通过对 3 398 例代谢综合征患者中医证候学调查发现,“痰热互结”证最为多见^[15],佐证了 IR 的病机特点。DZF 是在仲景名方“小陷胸汤”基础上加减而来的临床经验方,以清热化痰,行气散满为治疗法则。方中主要药物黄连苦寒,能清中焦湿热;半夏辛温,可化痰而除痞;瓜蒌甘寒滑润,能清热而导痰下行;枳实苦辛微寒,可行气而消痰散满。近期研究表明本方的主要成分小檗碱能降低 2 型糖尿病、代谢综合征患者血糖、血脂^[16],对脂肪细胞有明显的抗 IR 活性^[17],可通过增加 3T3-L1 脂肪细胞中的循环支链氨基酸分解代谢,减轻 IR^[18]。

胰岛素的关键靶器官主要为脂肪组织、骨骼肌、肝脏。前期研究已经表明 DZF 能够减轻肝脏 IR 和骨骼肌 IR,机制可能与调节磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 通路,激活 AMP 依赖的蛋白激酶信号通

路,促进 GLUT4 表达及膜转位等有关^[9-10],但对脂肪 IR 的作用和机制研究尚欠缺。脂肪组织是全身代谢调节的重要环节,主要分为白色脂肪组织(WAT),棕色脂肪组织和米色脂肪组织。WAT 以甘油三酯(TG)的形式储存能量,通过脂肪分解释放 FFAs,维持代谢稳态。棕色脂肪和米色脂肪主要作用是利用线粒体非耦联呼吸产热,将多余的脂质氧化分解。虽然三者都对胰岛素敏感,但 WAT 与 IR 发生关联更为密切^[19]。3T3-L1 细胞是通过克隆分离得到的 Swiss 小鼠胚胎成纤维细胞系的亚群。经过特定诱导液的孵育,可逐步分化为成熟的脂肪细胞。成熟的 3T3-L1 脂肪细胞在结构和功能方面与人体白色脂肪细胞具有极高的相似性,是研究脂肪 IR 的基本工具。不仅具有转化率高、稳定性强的优点,还避免了原代脂肪细胞提取复杂、纯度不一、存活率低等问题。因此,本研究选择分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞为研究对象,模拟人体白色脂肪细胞。

目前,使用 PA, HG, DEX 诱导建立脂肪细胞 IR 模型操作简便,成模速度快,被广泛应用。不同的诱导方式在 IR 发生发展机制上侧重不同,具有不同的研究意义。本研究进行了 3 种方法的建模,全面观察了 DZF 对不同因素引起的脂肪细胞 IR 的影响。实验以 GOD-POD 法分别检测脂肪细胞基础的葡萄糖消耗量和胰岛素刺激后的葡萄糖消耗量,进而确定胰岛素敏感性,能够准确快捷地评估脂肪细胞 IR 的程度。结果显示给予 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA, $25.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HG 或 $1.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEX 可导致脂肪细胞对葡萄糖的摄取利用出现不同程度的下降,胰岛素敏感性显著降低,表明 3 种方法造模均成功。其中使用 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA 处理 72 h 的方法与 $25.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HG 处理 48 h 和 $1.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEX 处理 72 h 的方法相比,ISI 降低的趋势程度更大,表现出更强的脂肪细胞 IR 抗性。

PA 又称软脂酸,是 FFAs 的主要成分之一。FFAs 是引发脂肪 IR 的关键因素,肥胖人群血浆中的 FFAs 水平常显著升高,采用 PA 诱导侧重于模拟与肥胖相关疾病患者体内的高 FFA 环境。HG 是引起脂肪 IR 的另一重要因素,而血糖升高也是糖尿病患者最主要的病理表现。采用 HG 诱导侧重于模拟糖尿病前期持续高血糖的内环境。DEX 是糖皮质激素的一种,而糖皮质激素是 IR 的有效激活剂和胰岛素分泌的抑制剂。人类和啮齿动物长期接触糖皮质激素会导致脂肪组织 IR^[20]。DEX 诱导的 3T3-L1 脂肪细胞 IR 使用较早,是经典的模型。本研究

结果显示,在胰岛素刺激下,不同质量浓度的 DZF 能促进 3 种 IR 模型脂肪细胞的葡萄糖摄取和利用,提高胰岛素敏感性,说明 DZF 能够改善糖脂代谢紊乱等多种因素引起的 IR;不同质量浓度组间存在差异,以高质量浓度组 DZF 作用最显著,说明 DZF 改善 IR 作用有一定的量效关系。本研究发现在缺乏胰岛素刺激的基础状态下,DZF 同样能够增强 IR 脂肪细胞的葡萄糖消耗,说明 DZF 还具有独立于胰岛素作用之外的降糖作用,对于 2 型糖尿病晚期胰岛素分泌不足患者可能有一定的治疗效果。

葡萄糖转运减少是 IR 的关键环节。脂肪细胞的 IR 对葡萄糖代谢的影响具有高度的特异性,使胰岛素刺激下的葡萄糖转运功能比抑制脂肪分解作用受损更重^[21-22]。GLUT4 是脂肪细胞中最丰富的葡萄糖转运蛋白,在全身性葡萄糖稳态和器官串扰中起重要作用^[23-24]。而且无论 PA 或 HG 或 DEX 诱导的脂肪 IR 发生,都与 GLUT4 存在密切联系。研究表明高游离脂肪酸可能通过激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)减少 GLUT4 蛋白表达,扰乱脂肪细胞的糖代谢^[25],或通过激活细胞内炎症信号和应激活化蛋白激酶 1/2 干扰胰岛素信号转导,减少葡萄糖转运^[26]。长期暴露在高浓度的葡萄糖会引起脂肪细胞胰岛素受体底物表达和酪氨酸磷酸化降低,损害 GLUT4 的“内在活性”或膜转位^[27],上调细胞因子自家趋化素^[28],增强脂肪细胞氧化应激反应和活性氧,导致 IR^[29]。DEX 引起脂肪 IR 的机制涉及通过增加某些脂肪酶的表达促进脂解,下调转运体 GLUT4 减少葡萄糖摄取,降低胰岛素受体底物-1 的磷酸化和表达,损伤细胞线粒体功能等^[20,29]。因此, GLUT4 对 DZF 作用机制的研究有重要意义。本研究结果显示 DZF 能下调 3 种 IR 模型的脂肪细胞 GLUT4 mRNA 的表达,说明 GLUT4 可能是 DZF 改善脂肪 IR 的作用靶点。

本研究的阳性对照药 RSG 是噻唑烷二酮类代表药,属于胰岛素增敏剂。该药通过激活脂肪组织中的过氧化酶体增殖物激活受体- γ 受体,促进脂肪细胞的脂肪生成,抑制脂解,减少 FFAs 释放,增加肌肉等外周组织葡萄糖利用,抑制肝糖异生,起到减轻 IR 作用^[31]。然而 RSG 存在诸多不良反应,长期使用会引起体质量增加,还提高了心衰、体液潴留、骨折等病的发生风险^[32]。本研究中 DZF 改善 IR 的效果与 RSG 接近,且前期研究已经表明 DZF 在增加脂肪细胞葡萄糖消耗的同时能减少胞内 TG 的积累^[12],减轻代谢综合征患者体质量^[8],弥补了 RSG

的部分缺点。因此,中药 DZF 在 IR 的治疗中较 RSG 具有更多优势,值得推广应用。

综上所述,DZF 能改善由糖代谢紊乱或脂代谢紊乱等多种因素引起的脂肪 IR,作用机制可能与 GLUT4 有关。IR 是肥胖症,2 型糖尿病,代谢综合征等慢性代谢性疾病共同的病理特征。异病同治是中医治疗的独特优势,着眼于不同疾病在发生发展过程中是否出现相同的病机。因此,本研究从细胞层面证明了 DZF 对肥胖症,2 型糖尿病,代谢综合征的治疗作用,一定程度上反映了中医“异病同治”的治疗理念。但对机制的研究较浅,后续需要根据每个模型的特点对 DZF 的治疗脂肪 IR 作用机制开展更加深入的研究。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] GBD 2015 Obesity Collaborators. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(1): 13-27.
- [2] DAMSGAARD C T, MICHAELSEN K F, MOLBO D, et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants [J]. *Lancet*, 2016, 387 (10026): 1377-1396.
- [3] SAEEDI P, PETERSOHN I, SALPEA P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the international diabetes federation diabetes atlas, 9th edition [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 157: 107843.
- [4] SAKLAYEN M G. The global epidemic of the metabolic syndrome [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2018, 20(2): 12.
- [5] CHEN J, KONG X, JIA X, et al. Association between metabolic syndrome and chronic kidney disease in a Chinese urban population [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 470: 103-108.
- [6] PETERSEN M C, SHULMAN G I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(4): 2133-2223.
- [7] DA SILVA ROSA S C, NAYAK N, CAYMO A M, et al. Mechanisms of muscle insulin resistance and the cross-talk with liver and adipose tissue [J]. *Physiol Rep*, 2020, 8(19): e14607.
- [8] 朱晓云,王春霞,赵玉雪,等. 代综方改善 38 例代谢综合征糖脂代谢异常的临床研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(9): 1881-1885.

- [9] ZHU L L, ZHU X Y Z, SUN G B, et al. A traditional Chinese herbal formula, ameliorates insulin resistance in db/db mice [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 224-237.
- [10] 赵玉雪,朱晓云,袁泉,等. 代综方对 C2C12 骨骼肌细胞葡萄糖摄取及 GLUT4 蛋白表达的影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2017, 42(11): 1494-1497.
- [11] 董菲菲,朱晓云,张俊龙,等. 代综方对油酸诱导的 HepG2 细胞内脂质堆积的影响 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2015, 10(3): 330-334.
- [12] 朱晓云,王朋倩,刘喜明. 代综方对 3T3-L1 脂肪细胞糖脂代谢的作用研究 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2015, 10(2): 175-179.
- [13] 朱晓云,楚小燕,王兆礼,等. 代综方对 3T3-L1 脂肪细胞分化及相关基因表达的影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2015, 40(7): 1016-1020.
- [14] 朱晓云,王朋倩,韩曼,等. GOD-POD 法在 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗评价中的应用 [J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35(11): 1684-1687.
- [15] 赵玉雪,朱晓云,曹松华,等. 3398 例代谢综合征患者证候学分析 [J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(1): 5-7.
- [16] CAO C F, SU M Q. Effects of berberine on glucose-lipid metabolism, inflammatory factors and insulin resistance in patients with metabolic syndrome [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(4): 3009-3014.
- [17] 张敬升,王晓婉,张广霞,等. 小檗碱对 3T3-L1 前脂肪细胞及其胰岛素抵抗模型的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(22): 145-149.
- [18] YUE S J, LIU J, WANG A T. Berberine alleviates insulin resistance by reducing peripheral branched-chain amino acids [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2019, 316(1): E73-E85.
- [19] CZECH M P. Mechanisms of insulin resistance related to white, beige, and brown adipocytes [J]. *Mol Metab*, 2020, 34: 27-42.
- [20] BEAUPERE C, LIBOZ A, FÈVE B, et al. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 623.
- [21] TAN S X, FISHER-WELLMAN K H, FAZAKERLEY D J, et al. Selective insulin resistance in adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(18): 11337-11348.
- [22] FAZAKERLEY D J, KRYCER J R, KEARNEY A L, et al. Muscle and adipose tissue insulin resistance: malady without mechanism? [J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(10): 1720-1732.
- [23] KAHN B B. Adipose tissue, inter-organ communication, and the path to type 2 diabetes: the 2016 banting medal for scientific achievement lecture

- [J]. Diabetes, 2019, 68(1):3-14.
- [24] CHADT A, AL-HASANI H. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease[J]. Pflugers Arch, 2020, 472(9):1273-1298.
- [25] 陆环,张君,徐文静,等. 游离脂肪酸对3T3-L1脂肪细胞糖代谢的影响[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(2):212-215.
- [26] STAFEEV I S, MICHURINA S S, PODKUVCHENKO N V, et al. Chemical inducers of obesity-associated metabolic stress activate inflammation and reduce insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes[J]. Biochemistry (Mosc), 2019, 84(5):553-561.
- [27] NELSON B A, K A ROBINSON K A, BUSE M G. High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes[J]. Diabetes, 2000, 49(6):981-991.
- [28] D'SOUZA K, KANE D A, TOUAIBIA M, et al. Autotaxin is regulated by glucose and insulin in adipocytes[J]. Endocrinology, 2017, 158(4):791-803.
- [29] EBRAHIMI S M, BATHAIE S Z, FARIDI N, et al. L-lysine protects C2C12 myotubes and 3T3-L1 adipocytes against high glucose damages and stresses[J]. PLoS One, 2019, 14(12):e0225912.
- [30] LUAN G X, LI G, MA X, et al. Dexamethasone-induced mitochondrial dysfunction and insulin resistance-study in 3T3-L1 adipocytes and mitochondria isolated from mouse liver[J]. Molecules, 2019, 24(10):1982.
- [31] GONG L L, JIN H, LI Y H, et al. Rosiglitazone ameliorates skeletal muscle insulin resistance by decreasing free fatty acids release from adipocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 533(4):1122-1128.
- [32] LEOVITZ H E. Thiazolidinediones: the forgotten diabetes medications[J]. Curr Diab Rep, 2019, 19(12):151.

[责任编辑 周冰冰]