

文章编号 1006-8147(2020)04-0317-07

论 著

## 衍生物 Fla-CN 的抗糖尿病作用及其作用机制研究

寇川, 梁艳, 张畅, 秦楠, 段宏泉, 陈莹

(天津医科大学药学院天然药物化学系, 天津 300070)

**摘要** 目的: 体内外研究黄酮衍生物 Fla-CN 的抗糖尿病作用及其机制。方法: 体外实验以人肝 HepG2 细胞为研究对象, 不同浓度 Fla-CN 孵育后, 利用荧光标记 2-脱氧葡萄糖(2-NBDG), 通过检测 HepG2 细胞内 2-NBDG 的荧光强度, 观察 Fla-CN 对肝细胞葡萄糖摄取的影响; 采用硫酸-蒽酮比色法检测 HepG2 细胞内糖原含量; 通过检测一定时间内葡萄糖生成量, 观察 Fla-CN 对肝细胞糖异生过程的影响。体内实验采用 2 型糖尿病模型 db/db 小鼠为研究对象, 给予 Fla-CN 和二甲双胍干预 4 周后, 测定 db/db 小鼠空腹血糖、糖耐量以及胰岛素耐量, 计算糖耐量、胰岛素耐量实验血糖-曲线下面积(AUC)。通过 Western 印迹法检测化合物干预后小鼠肝组织中磷酸化 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)、糖异生关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)、葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)及转录调控因子过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  协同刺激因子 1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ ) 的表达。进一步通过 Western 印迹检测 AMPK 抑制剂 Compound C 或 AMPK 激动剂 AICAR 与 Fla-CN 联用后, HepG2 细胞内 PEPCK、G6Pase、PGC-1 $\alpha$  的蛋白表达。**结果:** Fla-CN 能够促进 HepG2 细胞对葡萄糖的摄取( $F=33.50, P<0.01$ )和糖原合成( $F=93.63, P<0.01$ ), 抑制糖异生( $F=44.19, P<0.01$ )。同时, Fla-CN 显著降低 2 型糖尿病 db/db 小鼠空腹血糖以及时间-血糖曲线下面积( $F=98.40, P<0.05$ )。Western 印迹显示 Fla-CN 能够激活 db/db 小鼠肝组织中 AMPK, 抑制 PEPCK、G6Pase 以及 PGC-1 $\alpha$  的表达, 并呈现一定剂量依赖性。Compound C 能在一定程度上阻断 Fla-CN 对 AMPK 的激活和对 PEPCK、G6Pase 以及 PGC-1 $\alpha$  的抑制作用。**结论:** 黄酮衍生物 Fla-CN 通过激活 AMPK, 有效调节肝 HepG2 细胞糖代谢, 抑制肝糖异生, 降低 2 型糖尿病 db/db 小鼠空腹血糖, 改善其受损的糖耐量, 提高胰岛素敏感性。

**关键词** Fla-CN; 糖尿病; 糖摄取; 糖异生; AMPK 通路

中图分类号 R589

文献标志码 A

### Study on the anti-diabetic effect and mechanism of the derivative Fla-CN

KOU Chuan, LIANG Yan, ZHANG Chang, QIN Nan, DUAN Hong-quan, CHEN Ying

(Department of Nature Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** **Objective:** To study the anti-diabetic effect and mechanism of the flavonoid derivative Fla-CN *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** *In vitro* experiment, HepG2 cells were incubated with different concentrations of Fla-CN, and the fluorescence intensity of 2-NBDG in HepG2 cells was detected to observe the effect of Fla-CN on glucose uptake in hepatocytes. The glycogen content in HepG2 cells was measured by sulfuric acid anthrone colorimetry. The glucose production was measured to investigate the effect of Fla-CN on gluconeogenesis of hepatocytes. *In vivo* experiments, db/db mice model of type 2 diabetes were used as the subjects of study. After intervention with Fla-CN and metformin for 4 weeks, fasting blood glucose, glucose tolerance and insulin tolerance of db/db mice were investigated, and AUC of glucose tolerance and insulin tolerance were calculated. Western blotting was used to detect the expression of AMP dependent protein kinase (AMPK) phosphorylation, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), glucose-6-phosphatase (G6Pase) and peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) in the liver tissue of mice. The protein expression of PEPCK, G6Pase and PGC-1 $\alpha$  in HepG2 cells was further detected by Western blotting after an incubation of AMPK inhibitor Compound C or AMPK agonist AICAR combined with Fla-CN. **Results:** Fla-CN could promote glucose uptake ( $F=33.50, P<0.01$ ), glycogen synthesis ( $F=93.63, P<0.01$ ) and inhibit gluconeogenesis ( $F=44.19, P<0.01$ ) in HepG2 cells. Meanwhile, Fla-CN significantly reduced fasting blood glucose and its AUC in db/db mice ( $F=98.40, P<0.05$ ). Western blotting showed that Fla-CN could activate AMPK, inhibit the expression of PEPCK, G6Pase and PGC-1 $\alpha$  in the liver of db/db mice in a dose-dependent manner. Compound C could impair the activation of AMPK and the inhibition of PEPCK, G6Pase and PGC-1 $\alpha$  by Fla-CN. **Conclusion:** Fla-CN could effectively regulate the glucose metabolism of HepG2 cells, reduce the fasting blood glucose of db/db mice, and improve the impaired glucose tolerance and insulin sensitivity. Further studies have shown that Fla-CN promotes glucose uptake and inhibits gluconeogenesis by activating AMPK in liver.

**Key words** Fla-CN; diabetes mellitus; glucose uptake; gluconeogenesis; AMPK signal pathway

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81373297)

作者简介 寇川(1993-), 男, 硕士在读, 研究方向: 中药和天然药物活性物质的现代研究; 通信作者: 陈莹, E-mail: chenyingweixiao37@163.com。

糖尿病的发病原因错综复杂,但是临床上都具有一个共同特征:血糖的病理性升高。慢性高血糖症导致易感组织的病理损伤,并可能最终导致继发性并发症,如视网膜病变、肾病和神经病变、心血管疾病和卒中<sup>[1-3]</sup>。通常,胰岛素的释放减少和作用受到抑制会导致糖异生作用增加,糖摄取降低,从而导致血糖水平升高。肝脏在维持2型糖尿病的葡萄糖稳态中起重要作用。当血糖升高时,肝脏会增强肝脏对葡萄糖的吸收,吸收糖原存储,合成脂肪酸并改善胰岛素敏感性。因此,改善肝葡萄糖代谢稳态可能是治疗2型糖尿病的潜在策略。

3-O-[(E)-4-(4-cyanophenyl)-2-oxobut-3-en-1-yl] kaempferol (Fla-CN) 是委陵菜黄酮 Tiliroside 的衍生物,通过激活 AMP 活化蛋白激酶 (AMPK), 增强 HepG2 细胞的葡萄糖消耗<sup>[4]</sup>。本课题组以高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型为研究对象,发现 Fla-CN 不仅具有抗肥胖作用,而且可提高肥胖小鼠的胰岛素敏感性<sup>[5]</sup>。糖尿病 C57BL/KsJ-db/db 小鼠是瘦素受体基因突变导致的,是目前广泛应用于研究人类2型糖尿病的动物模型之一<sup>[5-6]</sup>。本研究旨在以2型糖尿病模型 db/db 小鼠为研究对象,评价 Fla-CN 对糖代谢的调节作用及其机制。

## 1 材料和方法

**1.1 黄酮衍生物 Fla-CN** 化合物 Fla-CN 的结构 (图1) 通过 <sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C NMR 和 2D NMR 波谱数据分析确定,包括 COSY、HSQC、HMBC 和 ROESY 光谱。通过 HPLC 分析 Fla-CN 的纯度 ≥95%。

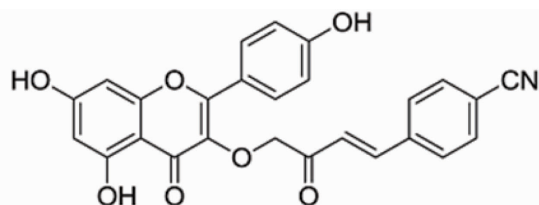


图1 Fla-CN 的化学结构

Fig 1 The chemical structure of Fla-CN

**1.2 细胞培养** 人肝癌细胞株 HepG2 细胞购自美国模式培养物集存库 (ATCC)。细胞培养于 10% 胎牛血清 100 IU/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素的 α-MEM 培养基中,置 CO<sub>2</sub> 培养箱中,于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。在显微镜下观察、计数,根据实验需要,调整细胞密度,接种于培养瓶或培养板中,同样条件下继续培养,待细胞融合形成连续单层后即可用于实验。

**1.3 葡萄糖生成测定** 取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板,细胞密度为 2×10<sup>5</sup> 个细胞/孔,培

养 24 h 后,弃去原培养基,PBS 洗 2 次,更换为无血清培养基,加入 Fla-CN (1、2、5 和 10 μmol/L) 及二甲双胍 (1 mmol/L),同时设立空白对照组,孵育 24 h。用 PBS 洗涤两次以除去葡萄糖,然后更换葡萄糖生成测定培养基 (含有 1 mmol/L 丙酮酸钠,20 mmol/L 乳酸钠和 15 mmol/L HEPES 的无葡萄糖和酚红的 DMEM),温育 4 h<sup>[7-8]</sup>。使用 Amplex Red Glucose / 葡萄糖氧化酶测定试剂盒 (Sigma, St. Louis, USA),取上清液用于测量葡萄糖浓度。通过 Thermo Scientific BCA 蛋白测定试剂盒测定细胞蛋白浓度。

**1.4 葡萄糖摄取测定** 取对数生长期 HepG2 细胞以 3×10<sup>5</sup> 个细胞/孔的密度接种到 6 孔板中,待 12 h 贴壁后,加入不同浓度 Fla-CN,预留空白对照组、阳性对照组 (Ins 组)。24 h 后,PBS 洗 3 遍,更换为无糖无血清的 DMEM 培养基饥饿 3 h, PBS 洗 2 遍,每孔加入 300 μL 的无糖无血清 DMEM 培养基,同时加入 1.5 μL 浓度为 20 mmol/L 的 2-NBDG,阳性对照组加入 100 nmol/L 短效人胰岛素,作用 30 min。实验结束,消化细胞,收集细胞至 Ep 管中,5 000 r/min (离心半径 6.2 cm) 4℃ 离心 5 min,小心吸弃上清液,同时加入 200 μL PBS 重悬细胞沉淀,于荧光酶标仪激发波/发射波为 488/520 nm 的条件下读取数值。

**1.5 糖原含量测定** 将对数生长期 HepG2 细胞接种到 6 孔板中,待 12 h 贴壁后,吸弃旧培养基,PBS 洗 2 遍,每孔分别加入无血清高糖 DMEM 培养基以及 Fla-CN (1、2、5 和 10 μmol/L) 及胰岛素 (100 nmol/L),24 h 后吸弃上清液,消化细胞,收集细胞,在 30% KOH 中匀浆。将样品煮沸 20 min,加入 1.5 mL 乙醇,然后以 12 000 r/min (离心半径 6.2 cm) 离心 15 min。将沉淀物溶于 0.5 mL 蒸馏水中,并加入 0.2% 的蒽酮 (用 98% 的硫酸稀释) 稀释后煮沸 20 min。在 620 nm 处检测并记录 OD 值,通过 Thermo Scientific BCA 蛋白测定试剂盒测定细胞蛋白浓度。

**1.6 动物与干预** C57BL/KsJ-db/db 和 C57BL/KsJ-db/m 雄性小鼠 42 只,SPF 级,6~8 周龄,由南京大学模型动物研究中心提供 [批号:SCXK (苏) 2018-0008]。小鼠饲养于天津市南开医院动物实验中心 [饲养许可证号:SYXK (津) 2015-0007],按照 SPF 饲养标准适应性喂养 1 周,期间自由进食、进水。1 周后称重并按照随机数字表法随机分组。以 C57BL/KsJ-db/m 小鼠为对照组,灌胃给予生理盐水 (db/m)。C57BL/KsJ-db/db 小鼠根据体重和血糖水平按照随机数字表法随机分为不同的治疗组。为期 4 周的研究分组如下:db/db (生理盐水溶液)、Fla-

CN 高剂量组(Fla-CNH)、中剂量组(Fla-CNM)及低剂量组(Fla-CNL),给药剂量分别为 15 mg/kg、8 mg/kg、2.3 mg/kg,阳性对照组给予盐酸二甲双胍 150 mg/kg。灌胃,每天 1 次。在研究结束时,所有小鼠禁食 12 h。在处死之前收集空腹血液以测量空腹血糖。将组织和血清保持在 $-80^{\circ}\text{C}$ 直至进一步分析。

1.7 口服葡萄糖耐量试验(OGTT)和腹腔内胰岛素耐量试验(IPITT) 禁食过夜的动物在第 12 周末通过口服 2 g/kg 葡萄糖进行 OGTT,固定小鼠,75%医用酒精对尾部消毒后,剪尾 0.5 mm 让血液自然滴于血糖试纸上,测量空腹血糖水平,记为 OGTT 试验 0 min 血糖水平。给予 20%葡萄糖灌胃后,记录小鼠在 30、60、90 和 120 min 血糖水平,绘制血糖曲线,计算血糖-时间曲线下面积。

IPITT 在间隔 3 d 后进行。小鼠禁食 2 h,鼠尾取血记录血糖水平,记为 0 min 血糖水平,腹腔注射 0.75 IU/kg 人短效胰岛素。胰岛素注射后记录 30、60、90 和 120 min 血糖浓度。绘制血糖曲线,计算血糖-时间曲线下面积。

1.8 免疫印迹 细胞达到汇合后,将培养基替换为补充有 0.2%BSA 的 DMEM。12 h 后,除去培养基,并加入含有不同浓度的 Fla-CN 和 (或)20  $\mu\text{mol/L}$  AICAR 和 (或)20  $\mu\text{mol/L}$  compound C 的培养基。孵育 24 h 后,使用蛋白质提取试剂盒提取总蛋白质和核蛋白。将肝组织在含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的冰冷 RIPA 缓冲液中匀浆。将组织匀浆离心 [13 000 r/min(离心半径 6.2 cm),20 min, $4^{\circ}\text{C}$ ],并将上清液用于蛋白质印迹分析。通过 Thermo Scientific BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。通过 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质样品(60  $\mu\text{g}$ /泳道),并转移至 PVDF 膜(Millipore, Bedford, MA)。将膜用含 10%脱脂奶粉的

TTBS 封闭 1 h,并在  $4^{\circ}\text{C}$ 下与磷酸化 AMPK、磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶(p-ACC)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)、葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  协同刺激因子 1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ )、AMPK 和  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)孵育过夜。TTBS 洗 3 次,每次 10 min。之后,辣根过氧化物酶耦联的二抗孵育 1 h。通过使用增强的化学发光 Western 印迹检测系统(GE Healthcare Life Sciences,英国)对条带进行可视化。应用 NIH Image J 软件分析,进行定量分析。所有抗体均购自 Cell Signaling Technology。

1.9 统计学处理 所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,数据由 Graph Pad Prism 6 软件统计分析,3 组或多组实验数据均采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

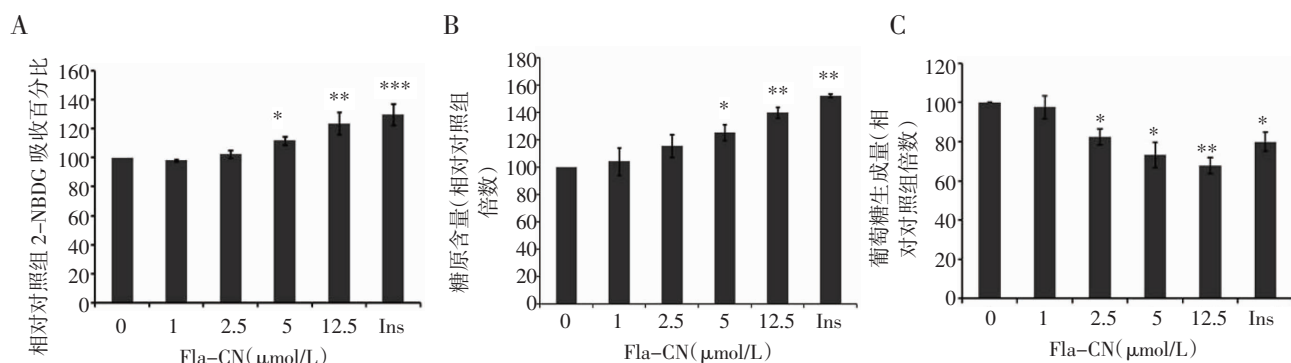
## 2 结果

2.1 Fla-CN 对肝 HepG2 细胞糖代谢的影响 如图 2A 所示,研究首先观察了 Fla-CN 对 HepG2 细胞中葡萄糖摄取的影响。HepG2 细胞分别与 Fla-CN(1、2.5、5、12.5  $\mu\text{mol/L}$ )以及胰岛素(100 nmol/L)孵育后,与对照组相比,5、12.5  $\mu\text{mol/L}$  的 Fla-CN 以及胰岛素均显著增加了肝细胞对 2-NBDG 的摄取( $F=33.50, P < 0.01$ )。

研究通过蒽酮法测定 HepG2 细胞内糖原含量,结果如图 2B 所示,与对照相比,胰岛素刺激后 HepG2 细胞内的糖原含量显著增加。不同浓度的 Fla-CN 孵育的 HepG2 细胞内糖原含量呈剂量依赖性增加,其中浓度分别为 5、12.5  $\mu\text{mol/L}$ ( $F=93.63, P < 0.01$ )的 Fla-CN 明显提高细胞内的糖原含量。

Fla-CN 呈剂量依赖性的抑制肝葡萄糖产生( $F=44.19, P < 0.01$ , 图 2C)。同时 Fla-CN 对 HepG2 细胞内乳酸含量无显著影响(数据未显示)。

2.2 Fla-CN 对 2 型糖尿病 db/db 小鼠空腹血糖、口服



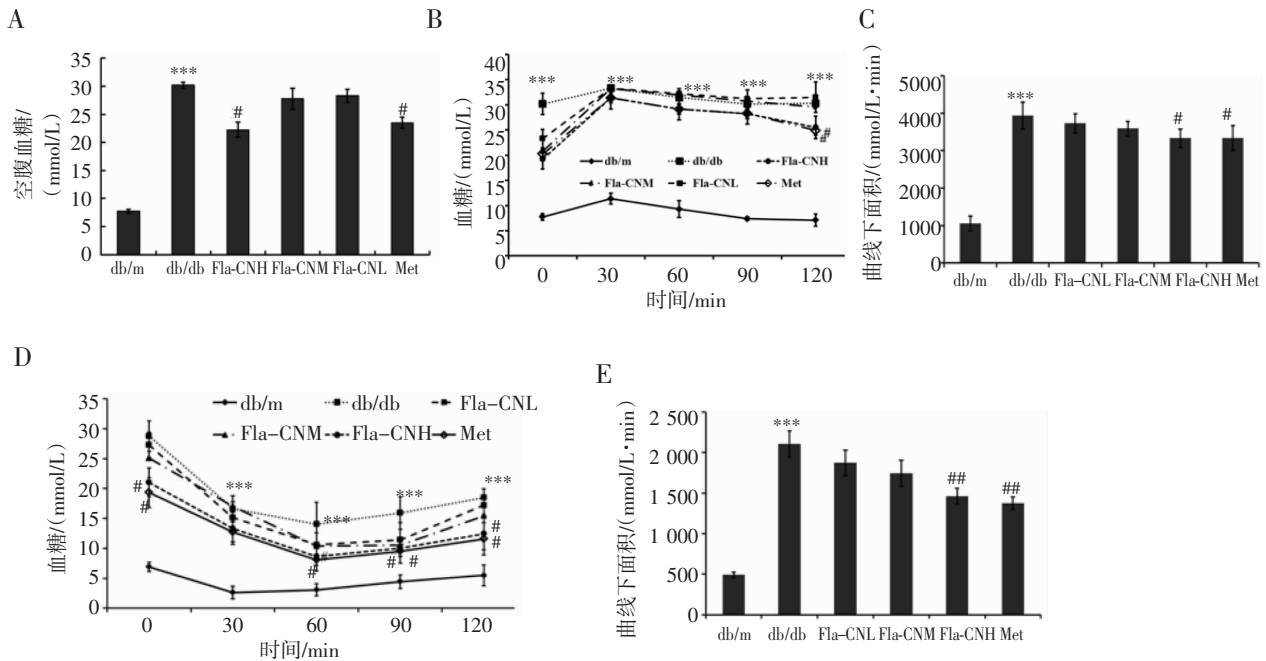
注:与空白组、对照组相比,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;A:Fla-CN 对肝细胞 HepG2 细胞 2-NBDG 的摄取影响;B:Fla-CN 对肝细胞 HepG2 细胞内糖原含量的影响;C:Fla-CN 对肝细胞 HepG2 细胞内葡萄糖生成的影响

图 2 Fla-CN 对肝细胞 HepG2 细胞内糖摄取、糖原合成以及糖异生过程的影响

Fig 2 Effect of Fla-CN on hepatic glucose uptake, glycogen synthesis and gluconeogenesis in HepG2 cells

糖耐量和胰岛素耐量的影响 如图3A所示,在实验结束时,模型组 db/db 小鼠的空腹血糖明显高于对照组 db/m 小鼠。与模型组相比,Fla-CN 组空腹血糖水平显著降低( $t=3.853, P<0.05$ )。在 OGTT(图3B)和 IPITT(图3D)中,Fla-CN 干预组各个时间点

血糖浓度均低于该时间点模型组的血糖浓度。在 OGTT 中,与 db/m 相比,模型组 db/db 的曲线下面积显著增加( $t=104.6, P<0.001$ );而与 db/db 组相比,Fla-CN 组二甲双胍组( $F=98.40, P<0.05$ )曲线下面积则明显降低(图3C、E)。

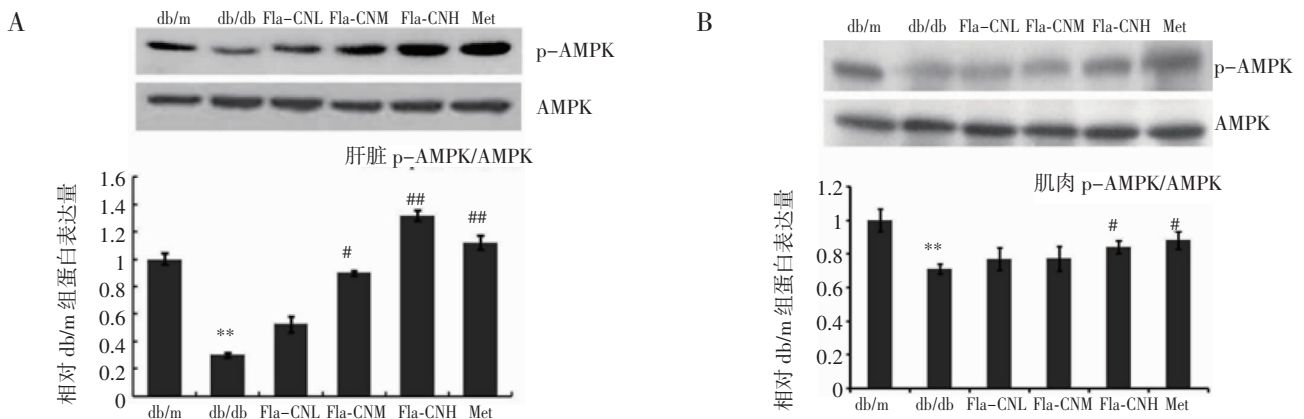


注:与 db/m 组相比, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ;与 db/db 组相比, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ ; A:Fla-CN 对 2 型糖尿病 db/db 小鼠空腹血糖的影响;B:Fla-CN 对 2 型糖尿病 db/db 小鼠口服糖耐量的影响;C:Fla-CN 对 2 型糖尿病 db/db 小鼠糖耐量时间-血糖曲线下面积的影响;D:Fla-CN 对 2 型糖尿病 db/db 小鼠胰岛素耐量的影响;E:Fla-CN 对 2 型糖尿病 db/db 小鼠胰岛素耐量时间-血糖曲线下面积的影响

图3 Fla-CN 对 2 型糖尿病 db/db 小鼠空腹血糖、口服葡萄糖耐量实验及其时间-血糖曲线下面积、胰岛素耐量实验及其时间-血糖曲线下面积的影响  
Fig 3 Effects of Fla-CN on fasting blood glucose, oral glucose tolerance and its AUC, insulin tolerance and its AUC in mice

2.3 Fla-CN 对 2 型糖尿病 db/db 小鼠肝脏和肌肉组织 AMPK 磷酸化的影响 如图4所示,与 db/db 组相比,不同剂量 Fla-CN 均上调 db/db 小鼠肝脏组织和肌肉组织中磷酸化 AMPK 蛋白表达,并呈现浓度依赖性。同时,各给药组小鼠肝组织和肌肉组织中AMPK

的总水平没有显著变化。故与 2 型糖尿病模型 db/db 组相比,肝脏组织 Fla-CN 与二甲双胍治疗组的磷酸化 AMPK/AMPK 比例明显提高( $F=134.7, P<0.01$ ),在肌肉组织中也观察到 Fla-CN 与二甲双胍治疗组磷酸化AMPK/AMPK 比例显著提高( $F=40.47, P<0.05$ )。

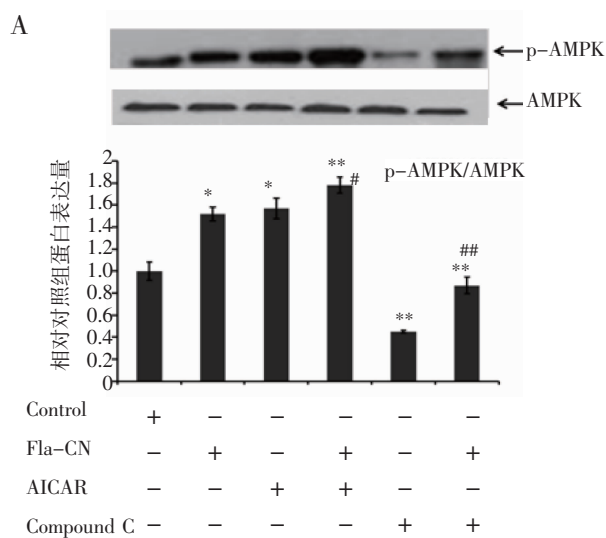


注:与 db/m 组相比, \*\* $P<0.01$ ;与 db/db 组相比, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ ; A:肝脏组织中 AMPK 和 AMPK 磷酸化蛋白表达;B:肌肉组织中 AMPK 和 AMPK 磷酸化蛋白表达;AMPK:AMP 活化蛋白激酶

图4 Fla-CN 对 2 型糖尿病 db/db 小鼠肝脏和肌肉组织中 AMPK 磷酸化的影响  
Fig4 Effect of Fla-CN on AMPK phosphorylation in liver and muscle of db/db mice

**2.4 Fla-CN 对 2 型糖尿病 db/db 小鼠肝组织糖异生的影响** Western 印迹(图 5)结果显示,db/db 组中 PEPCK( $t=51.53, P<0.001$ )、G6Pase( $t=19.47, P<0.001$ )的蛋白表达显著增加,PGC-1 $\alpha$  的蛋白表达也明显升高( $t=36.95, P<0.001$ )。而 Fla-CN 则明显抑制 PEPCK( $F=54.20, P<0.001$ )、G6Pase( $F=36.79, P<0.001$ )和 PGC-1 $\alpha$ ( $F=44.78, P<0.05$ )的蛋白表达。

**2.5 Fla-CN 通过 AMPK 激活抑制糖异生** 为了确认衍生物 Fla-CN 是否通过激活 AMPK 调节糖异生过程,实验采用 Fla-CN(12.5  $\mu\text{mol/L}$ )结合 AMPK 抑制剂 Compound C(4  $\mu\text{mol/L}$ )和激活剂 AICAR(0.1 mmol/L)处理 HepG2 细胞。如图 6A 所示,Fla-CN 显著增加了 AMPK 的磷酸化,这种作用被 Compound C 阻断。Fla-CN 和 AICAR 都显著下调了 HepG2 细胞中 PEPCK、G6Pase 和 PGC-1 $\alpha$  的蛋白表达。此外,与 Fla-CN 组相比,Fla-CN 和 Compound C 共同孵育对 PEPCK( $t=24.82, P<0.01$ )、G6Pase( $t=4.673, P<0.05$ )和 PGC-1 $\alpha$ ( $t=10.58, P<0.01$ )的抑制作用减弱。



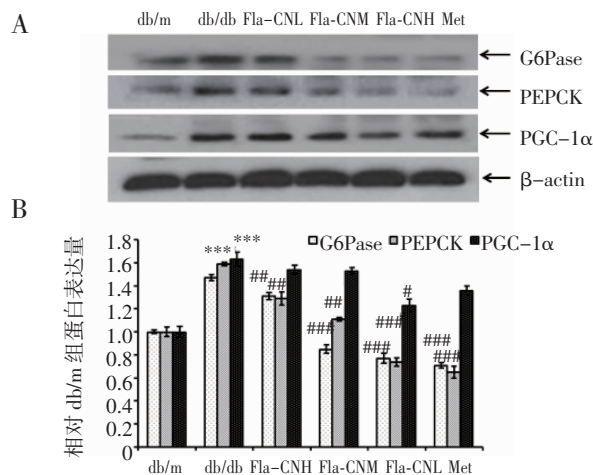
注:与 Control 组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与 Fla-CN 组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;A:化合物 C(10  $\mu\text{mol/L}$ )与 HepG2 肝细胞预孵 30 min 后,Fla-CN 或 AICAR(0.1 mmol/L)对细胞内 p-AMPK/AMPK 比值的影响;B:化合物 C(10  $\mu\text{mol/L}$ )与 HepG2 肝细胞预孵 30 min 后,Fla-CN 或 AICAR(0.1 mmol/L)对细胞内 G6Pase、PEPCK 和 PGC-1 $\alpha$  水平的影响;G6Pase:葡萄糖-6-磷酸酶;PEPCK:磷酸烯醇式丙酮羧酸激酶;PGC-1 $\alpha$ :过氧化物酶体增殖物活化受体  $\gamma$  协同刺激因子-1 $\alpha$ ;AMPK:AMP 活化蛋白激酶

图 6 Fla-CN 通过 AMPK 信号通路对肝糖异生的抑制作用

Fig 6 Fla-CN exerts an inhibitory effect on hepatic gluconeogenesis via the AMPK signaling pathway

### 3 讨论

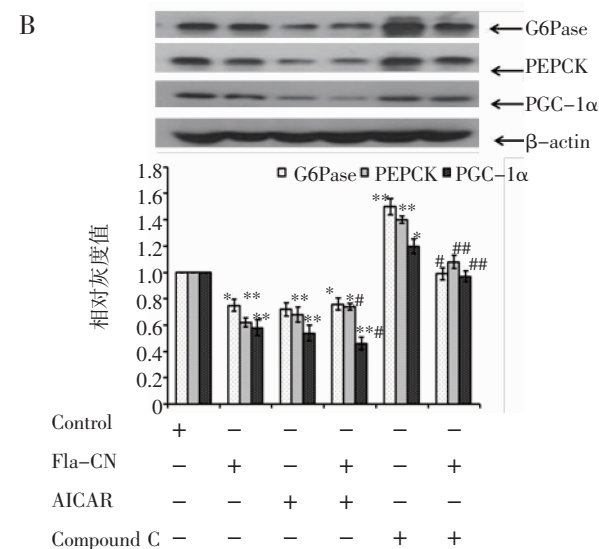
血糖稳态是机体通过调节内源性葡萄糖的产生以及对胰岛素敏感的外周组织的葡萄糖摄取来实现的。正常机体摄食后,胰岛素抑制肝脏中糖异生和糖原分解,并增强周围组织对血液中葡萄糖的利用,如糖原合成、糖酵解等。然而,在 2 型糖尿病



注:与 db/m 组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.001$ ;与 db/db 组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ;A:肝组织中 G6Pase、PEPCK 和 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达;B:Image J 分析 G6Pase、PEPCK 和 PGC-1 $\alpha$  蛋白相对表达量;G6Pase:葡萄糖-6-磷酸酶;PEPCK:磷酸烯醇式丙酮羧酸激酶;PGC-1 $\alpha$ :过氧化物酶体增殖物活化受体  $\gamma$  协同刺激因子-1 $\alpha$ ;AMPK:AMP 活化蛋白激酶

图 5 Fla-CN 对 2 型糖尿病 db/db 小鼠肝组织糖异生过程中 G6Pase、PEPCK 和 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of Fla-CN on the protein expression of G6Pase, PEPCK and PGC-1 $\alpha$  in the liver of db/db mice



患者体内,肝脏的糖异生明显增加、糖原合成降低;血液中葡萄糖的摄取作为骨骼肌、肝脏等组织对葡萄糖利用的起始,在机体胰岛素抵抗情况下受到抑制<sup>[10]</sup>。这些变化导致葡萄糖的生成率超过血液循环中葡萄糖的清除率,引起血液循环中血糖升高<sup>[11]</sup>。近年来,在对 2 型糖尿病的药物研发中,寻找能够调

节葡萄糖代谢、恢复血糖稳态的活性天然产物已经成为治疗 2 型糖尿病药物研发的热点。据报道,小檗碱<sup>[12]</sup>、山奈酚<sup>[13]</sup>、人参皂甙<sup>[7,14]</sup>等能够抑制肝葡萄糖生成,促进葡萄糖摄取而表现出降血糖的作用。本研究发现,黄酮衍生物 Fla-CN 在一定浓度范围内能够显著增加肝 HepG2 细胞对葡萄糖的摄取,抑制糖异生,促进糖原合成,提示 Fla-CN 在调节糖代谢中具有重要作用。体内实验进一步显示,Fla-CN 能够明显降低 2 型糖尿病 db/db 小鼠空腹血糖,改善 db/db 小鼠受损的糖耐量和胰岛素耐量,这些结果证明 Fla-CN 具有显著调节葡萄糖稳态,有效提高胰岛素敏感性,改善胰岛素抵抗的作用。

AMPK 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是由  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  亚基组成的异源三聚体,能够维持细胞能量平衡。外周组织如骨骼肌、肝脏和脂肪组织中 AMPK 的激活能够加快新陈代谢,改善胰岛素敏感性,有利于 2 型糖尿病的预防和治疗。AMPK 复合物不仅可以感知细胞中 AMP 和 ATP 的比例,而且细胞内糖原含量的改变可影响 AMPK 的活性,所以 AMPK 被认为是细胞能量代谢状态和能量储备状态的感受器<sup>[15]</sup>。骨骼肌是机体餐后摄取葡萄糖的主要器官,能够摄取 80% 餐后升高的血糖,对维持血糖稳态发挥重要作用。研究表明,葡萄糖的摄取必须借助跨膜蛋白葡萄糖转运蛋白(GLUT)的转位来完成。目前已经发现的 GLUT 有 14 种,分别是 GLUT 1~14,这些 GLUTs 分布在机体不同组织。其中由 SLC2A4 基因编码的 GLUT4 是细胞葡萄糖摄取率的决定因素,它与 2 型糖尿病的代谢异常密切相关。激活的 AMPK 可以导致其底物 AS160 磷酸化,降低 AS160 的 Rab-GTP 酶活性,刺激 GLUT4 由细胞内转位至细胞膜,促进葡萄糖的摄取<sup>[16-17]</sup>。降糖药物二甲双胍作为临床一线药物,通过促进外周组织对葡萄糖的摄取和利用,维持血糖稳定。研究发现,二甲双胍是一种 AMPK 激动剂,主要通过激活 AMPK 发挥其降糖作用<sup>[18-19]</sup>。本研究结果显示,Fla-CN 处理后显著增加了糖尿病 db/db 小鼠肝脏和肌肉组织中 AMPK 的磷酸化,表明 Fla-CN 可能通过激活 AMPK 促进葡萄糖摄取。

另一方面,肝脏中 AMPK 的激活可有效抑制糖异生关键酶 PEPCK 和 G6Pase 的表达,进而抑制肝脏糖异生,降低葡萄糖生成<sup>[20]</sup>。而肝 AMPK 特异性敲除小鼠后显示糖耐量受损以及空腹高血糖,这可能是由于 PEPCK 和 G6Pase 活性增加,从而肝脏糖异生增加<sup>[21]</sup>。PGC-1 $\alpha$  是一种转录共激活因子,参与调节细胞能量代谢的多个方面,在 1 型和 2 型糖尿

病中,PGC-1 $\alpha$  的基因表达水平均显著升高。由腺病毒介导在大鼠肝脏过表达 PGC-1 $\alpha$ ,其原代肝细胞和禁食动物肝脏中观察到激活的 PGC-1 $\alpha$  参与糖异生的整个过程。重要的是,在原代肝细胞中观察到葡萄糖分泌增加,而大鼠禁食后体内葡萄糖水平升高<sup>[22]</sup>。因此,肝脏中 PGC-1 $\alpha$  活性升高很可能导致糖尿病的高血糖症。最近的研究表明,PGC-1 $\alpha$  也是肝细胞核受体 4 $\alpha$ (HNF4 $\alpha$ )和叉头框蛋白 O1(FOX-O1)的辅激活因子,调控糖异生关键酶 PEPCK 和 G6Pase 的活性<sup>[23-25]</sup>。有研究报道,AMPK 可能导致共激活因子 PGC-1 $\alpha$  的表达下调,进而抑制 PEPCK 和 G6Pase 的表达<sup>[9]</sup>。在本研究中,2 型糖尿病小鼠的肝组织和 HepG2 肝细胞中,Fla-CN 显著激活 AMPK,同时抑制 PEPCK、G6Pase 和 PGC-1 $\alpha$  的表达,这可能是 Fla-CN 降低 db/db 小鼠空腹血糖,抑制肝细胞糖异生的作用机制。为了进一步证实 AMPK 在 Fla-CN 调节糖异生过程的作用,研究采用 AMPK 抑制剂(Compound C)来阻断 Fla-CN 诱导的 AMPK 活化作用。笔者发现 Compound C 可以阻止 AMPK 的活化,并且削减了 Fla-CN 对 PEPCK、G6Pase 和 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达的抑制作用,表明 AMPK 在 Fla-CN 的调控糖异生过程机制中起关键作用。

本研究表明,黄酮衍生物 Fla-CN 具有调节肝 HepG2 细胞糖代谢的作用,并且能够显著降低 2 型糖尿病 db/db 小鼠空腹血糖,改善其受损的糖耐量,提高胰岛素敏感度。进一步研究显示,Fla-CN 可以通过激活 AMPK 调节糖摄取和肝糖异生,从而发挥抗糖尿病作用。

#### 参考文献:

- [1] Deshpande A D, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications [J]. *Phys Ther*, 2008, 88(11):1254
- [2] Srikanth S, Deedwania P. Primary and secondary prevention strategy for cardiovascular disease in diabetes mellitus[J]. *Cardiol Clin*, 2011, 29(1):47
- [3] Lam D W, Le Roith D. The worldwide diabetes epidemic[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2012, 19(2):93
- [4] Qin N, Li C B, Jin M N, et al. Synthesis and biological activity of novel tilirosidederivants[J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46(10):5189
- [5] Hummel K P, Dickie M M, Coleman D L. Diabetes, a new mutaftonin the mouse[J]. *Science*, 1966, 153(3740):1127
- [6] Zhang F, Sun C, Wu J, et al. Combretastatin A-4 activates AMP-activated protein kinase and improves glucose metabolism in db/db-mice[J]. *Pharmacol Res*, 2008, 57(4):318
- [7] Kim S J, Yuan H D, Chung S H. Ginsenoside Rg1 suppresses hepatic glucose production via AMP-activated protein kinase in HepG2 cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(2):325
- [8] Waltner-Law M E, Wang X L, Law B K, et al. Epigallocatechingal-

- late, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(38):34933
- [9] Aatsinki S M, Buler M, Salomäki H, et al. Metformin induces PGC - 1 $\alpha$  expression and selectively affects hepatic PGC - 1 $\alpha$  functions[J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(9):2351
- [10] Stanford K I, Goodyear L J. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle [J]. *Adv Physiol Edu*, 2014, 38(4):308
- [11] Rizza R A. Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy [J]. *Diabetes*, 2010, 59(11):2697
- [12] Zhang M, Lv X, Li J, et al. Sodium caprate augments the hypoglycemic effect of berberine via AMPK in inhibiting hepatic gluconeogenesis[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 363(1/2):122
- [13] Zanatta L, Rosso A, Folador P, et al. Insulinomimetic effect of kaempferol 3-neohesperidoside on the rat soleus muscle[J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(4):532
- [14] Quan H Y, Yuan H D, Jung M S, et al. Ginsenoside lowers blood glucose and lipid levels via activation of AMP-activated protein kinase in HepG2 cells and high-fat diet fed mice[J]. *Int J Mol Med*, 2011, 29(1):73
- [15] Long Y C, Zierath J R. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(7):1776
- [16] Wang Z, Cao Y, Yin Q, et al. Activation of AMPK alleviates cardiopulmonary bypass induced cardiac injury via ameliorating acute cardiac glucose metabolic disorder[J]. *Cardiovasc Ther*, 2018, 36(6): e12482
- [17] You H N, Park M H, Hwang S Y, et al. Nardostachys jatamansi DC extract alleviates insulin resistance and regulates glucose metabolism in C57BL/KsJ- db/db mice through the AMP-activated protein kinase signaling pathway[J]. *J Med Food*, 2018, 21(4):324
- [18] Deshpande A D, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications[J]. *Phys Ther*, 2008, 88(11):1254
- [19] Wang F, Yang X, Lu Y, et al. The natural product antroalbol H promotes phosphorylation of liver kinase B1 (LKB1) at threonine 189 and thereby enhances cellular glucose uptake[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(27): 10415.
- [20] Lochhead P A, Salt I P, Walker K S, et al. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase[J]. *Diabetes*, 2000, 49(6):896
- [21] Fabrizio A, Marc F, Claude K, et al. Liver adenosine monophosphate-activated kinase- $\alpha$ 2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(5):2432
- [22] Shaw R J, Lamia K A, Vasquez D, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin[J]. *Science*, 2005, 310(5754):1642
- [23] Rodgers J T, Lerin C, Haas W, et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 and SIRT1[J]. *Nature*, 2005, 434(7029):113
- [24] Rhee J, Inoue Y, Yoon J C, et al. Regulation of hepatic fasting response by PPAR coactivator-1 (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4 in gluconeogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100(7):4012
- [25] Yoon J C, Pulgarserver P, Chen G, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1 [J]. *Nature*, 2001, 413(6852):131
- (2019-11-12 收稿)

+++++

(上接第 316 页)

- [9] Lee K L, Kuo Y C, Ho Y S, et al. Triple-negative breast cancer: current understanding and future therapeutic breakthrough targeting cancer stemness[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(9):1334
- [10] Dong X, Wang J, Tang B, et al. The role and gene expression profile of SOCS3 in colorectal carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(22):15984
- [11] Lin X M, Chen H, Zhan X L. MiR-203 regulates JAK-STAT pathway in affecting pancreatic cancer cells proliferation and apoptosis by targeting SOCS3[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(16):6906
- [12] Li H, Zhang B, Ding M, et al. C1QTNF1-AS1 regulates the occurrence and development of hepatocellular carcinoma by regulating miR-221-3p/SOCS3[J]. *Hepatol Int*, 2019, 13(3):277
- [13] Jin W. Role of JAK/STAT3 signaling in the regulation of metastasis, the transition of cancer stem cells, and chemoresistance of cancer by epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cells*, 2020, 9(1):217
- [14] Li G, Martinez-Bonet M, Wu D, et al. High-throughput identification of noncoding functional SNPs via type IIS enzyme restriction[J]. *Nat Genet*, 2018, 50(8):1180
- [15] Richards D M, Seftin J P, Gieffers C, et al. Concepts for agonistic targeting of CD40 in immuno-oncology[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2020, 16(2):377
- [16] Pang X, Zhang L, Wu J, et al. Expression of CD40/CD40L in colon cancer, and its effect on proliferation and apoptosis of SW48 colon cancer cells[J]. *J BUON*, 2017, 22(4):894
- [17] Georganaki M, Ramachandran M, Tuit S, et al. Tumor endothelial cell up-regulation of IDO1 is an immunosuppressive feed-back mechanism that reduces the response to CD40-stimulating immunotherapy[J]. *Oncoimmunology*, 2020, 9(1):1730538
- [18] Carrigan P E, Bingham J L, Srinivasan S, et al. Characterization of alternative spliceforms and the RNA splicing machinery in pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2011, 40(2):281
- [19] Liu T, Sun H, Zhu D, et al. TRA2A promoted paclitaxel resistance and tumor progression in triple-negative breast cancers via regulating alternative splicing[J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(7):1377
- [20] Yu J, Zayas J, Qin B, et al. Targeting DNA methylation for treating triple-negative breast cancer[J]. *Pharmacogenomics*, 2019, 20(16):1151
- [21] Hernandez-Vargas H, Ouzounova M, Le Calvez-Kelm F, et al. Methylome analysis reveals JAK-STAT pathway deregulation in putative breast cancer stem cells[J]. *Epigenetics*, 2011, 6(4):428
- (2020-02-15 收稿)