

· 论 著 ·

牛蒡子苷对 L6 骨骼肌细胞中腺苷酸活化蛋白激酶信号通路的影响

相 芳¹, 魏 玮¹, 相 红², 王玉兰³, 季 蔚¹, 许 诺¹, 万小梅¹

[摘要] 目的 探讨牛蒡子苷在 L6 骨骼肌细胞中对葡萄糖消耗和腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路的调节作用。方法 用含 2% 胎牛血清的 1640 培养基诱导 L6 骨骼肌细胞分化,直至细胞生长出肌管,分化完成后的 L6 骨骼肌细胞用含有不同浓度牛蒡子苷的培养基培养 24 h 后,采用葡萄糖氧化酶法检测细胞葡萄糖消耗,western blot 法检测 AMPK 的亚单位 AMPK α 和磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMP-activated protein kinase, p-AMPK α)的蛋白表达水平;以 real-time PCR 法检测过氧化物酶体增生生物激活受体 γ 共激活因子 1 α (peroxisome-proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) mRNA 表达水平。结果 牛蒡子苷浓度为 1000 g/L 时,可增加 L6 骨骼肌细胞的葡萄糖消耗,差异显著($P < 0.01$);与对照组相比,牛蒡子苷呈浓度依赖性的增强 L6 骨骼肌细胞中 p-AMPK α 蛋白表达水平;并以相同的趋势增强 PGC-1 α mRNA 表达水平。结论 牛蒡子苷增加 L6 骨骼肌细胞的葡萄糖消耗,并激活 AMPK/PGC-1 α 信号通路,具有潜在的改善胰岛素抵抗的作用。

[关键词] 牛蒡子苷;胰岛素抵抗;腺苷酸活化蛋白激酶;L6 骨骼肌细胞

[中图分类号] R966 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2016.02.015

Effect of arctiin on AMPK signal pathway in L6 myotubes

XIANG Fang¹, WEI Wei¹, XIANG Hong², WANG Yu-lan³, JI Wei¹, XU Nuo¹, WAN Xiao-mei¹. 1. Department of Pharmacy, 81 Hospital of PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 2. The First Sanatorium for Retired Cadres, Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210000, China; 3. The Second Sanatorium for Retired Cadres, Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210005, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of arctiin on glucose consumption and AMPK pathway in L6 myotubes. **Methods** L6 myoblasts were differentiated to myotubes and treated with or without arctiin. After 24 h, glucose oxidase method was performed at the end of treatment and the AMPK α and p-AMPK α levels were detected by western blot (mammalian AMPK is a trimer structure that composed of alpha, beta, gamma of three subunits, and the content detection of total AMPK and activated AMPK proteins usually refers to the alpha subunit.); The PGC-1 α mRNA level were measured with real-time PCR. **Results** The result of glucose oxidase assay suggested that arctiin increase. Compared with control group, arctiin enhanced the activity of p-AMPK α with a concentration-dependent manner, and arctiin promoted the transcription of PGC-1 α with a concentration-dependent manner, too. **Conclusion** Arctiin increases glucose consumption and activates AMPK/PGC-1 α signal pathway in L6 myotubes, which suggests that arctiin could potentially improve insulin resistance.

[Key words] arctiin; insulin resistance; AMPK; L6 myotubes

据世界卫生组织统计,全球有 3.47 亿人患有糖尿病,预计至 2030 年糖尿病将成为全球第七大死亡原因,糖尿病患者中约 90% 为 2 型糖尿病(T2DM)^[1]。2 型糖尿病是以胰岛素分泌相对不足和胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)为特征的代谢

综合征,改善胰岛素抵抗是降低血糖和防治糖尿病并发症的重要干预措施^[2]。肌肉组织是维持葡萄糖内稳态的主要组织,研究表明骨骼肌中葡萄糖转运减少可以导致机体葡萄糖摄取能力受损,进而导致胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的发生^[3]。因此,促进骨骼肌细胞的葡萄糖转运是改善胰岛素抵抗的重要治疗措施。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)作为细胞的“能量感受器”在葡萄糖转运中发挥着重要作用。研究表明,激活 AMPK 可促进骨骼肌中不依赖胰岛素的葡萄糖转运,增加胰岛素敏感性,因此,AMPK 途径是改善

作者单位: 1. 210002 江苏南京,解放军 81 医院药剂科;
2. 210000 江苏南京,南京军区第一干休所;
3. 210005 江苏南京,南京军区第二干休所

通讯作者: 魏 玮, E-mail: gynkey@sina.com

引用格式: 相 芳, 魏 玮, 相 红, 等. 牛蒡子苷对 L6 骨骼肌细胞中腺苷酸活化蛋白激酶信号通路的影响[J]. 东南国防医药, 2016, 18(2): 157-159, 187.

胰岛素抵抗及治疗 2 型糖尿病的重要靶点^[4]。

牛蒡子苷 (Arctiin, ARC) 是从菊科两年生草本植物牛蒡属牛蒡 (*Arctium lappa* L.) 的干燥成熟果实牛蒡子中提取分离的木脂素类化合物^[5], 其结构见图 1。大量研究表明牛蒡子苷及其苷元对改善炎症、抗肿瘤和改善肾病等具有显著疗效^[6-8]。本研究通过观察牛蒡提取物牛蒡子苷对 L6 骨骼肌细胞中 AMPK 信号通路的调节作用, 进而研究牛蒡子苷对胰岛素抵抗的改善作用。由于哺乳动物的 AMPK 是一个三聚体结构, 由 α 、 β 、 γ 三个亚单位组成, 通常研究中所检测的总 AMPK 及活性 AMPK 蛋白是指其 α 亚单位。本研究即检测 AMPK 的亚单位 AMPK α 和磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 (p-AMP-activated protein kinase, p-AMPK α) 的蛋白表达水平, 并检测过氧化物酶体增生物激活受体 γ 共激活因子 1 α (peroxisome-proliferator-activated receptor γ co-activator-1 α , PGC-1 α) mRNA 的表达。以探讨牛蒡子苷在 L6 骨骼肌细胞中对葡萄糖消耗和 AMPK 信号通路的调节作用。

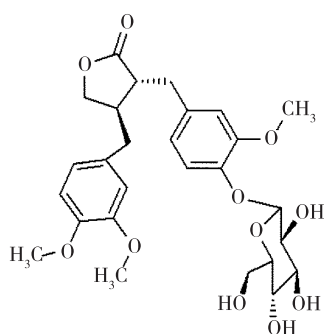


图 1 牛蒡子苷的化学结构

1 材料与方法

1.1 主要试剂 牛蒡子苷为四川省维克奇生物科技有限公司产品 (批号: 150821, 纯度: >98%)。1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清和青霉素链霉素混合液购自美国 Hyclone 公司; 葡萄糖检测试剂盒购自普利莱基因技术有限公司; Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; Takara 逆转录试剂盒和 PCR 引物购自宝生物工程 (大连) 有限公司; SYBR Supermix 试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司; 荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; AMPK 和 p-AMPK 蛋白含量检测相关试剂: AMPK α 亚型、p-AMPK α 亚型 (苏氨酸 172 位点) 和 β -actin 抗体购自美国 CST 公司; 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 小鼠 L6 细胞 小鼠 L6 骨骼肌细胞购自美国

模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC)。

1.3 L6 细胞培养及诱导分化 L6 骨骼肌细胞用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养, 培养基中添加青霉素 100 U/mL 及链霉素 100 U/mL。待细胞生长至 70%~80% 融合时, 换为含 2% 胎牛血清的 1640 培养基进行诱导分化, 每隔 2 d 换液, 直至细胞生长出肌管, 培养 6 d。分化完成后的 L6 骨骼肌细胞在含有不同浓度牛蒡子苷的无血清 1640 培养基中培养 24 h, 然后进行葡萄糖消耗检测及蛋白和 RNA 提取。

1.4 葡萄糖消耗分析 将 96 孔板中分化完成的 L6 骨骼肌细胞分别用浓度为 1000、100、10、及 0 g/L (对照组) 的牛蒡子苷溶液适量处理 24 h 后, 采用葡萄糖氧化酶法检测各孔培养基中葡萄糖量, 用不含细胞的孔内培养基中葡萄糖量均值减去各组培养孔的培养基中剩余葡萄糖量, 即为每孔细胞葡萄糖消耗量。

1.5 Western Blot 法检测细胞蛋白表达水平 收集加药处理 24 h 后的细胞, 按照说明书操作, 提取细胞总蛋白, 采用 BCA 法检测蛋白浓度。取 30 μg 细胞蛋白提取液, 用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳后, 转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用含 0.1% 吐温 20 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲盐溶液 (TBST) 洗膜 3 \times 5 min。再加 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, Tris-HCl 缓冲溶液洗涤后按照说明书操作显色。以 β -actin 作为内参, 采用 Quantity One 软件对 Western Blot 条带进行分析。

1.6 实时荧光 PCR 检测 PGC-1 α mRNA 表达水平 按照 Trizol 试剂盒说明书进行提取细胞总 RNA, 每个样品取 1 g RNA 按照 Takara 逆转录试剂盒说明书逆转录为 cDNA。使用 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪检测各目的基因 mRNA 表达水平。GAPDH 上游引物 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTG-3', 下游引物 5'-GGCCATCCACAGTCTTCTGG-3'; PGC-1 α 上游引物 5'-GCCCCGTACAGTGAGTGTTTC-3', 下游引物 5'-CTGGGCCGTTTAGTCTTCCT-3' [由宝生物工程 (大连) 有限公司提供]; 扩增条件为: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s; 65~95 $^{\circ}\text{C}$, 每升高 0.5 摄氏度保持 10 s; 共 40 个循环。反应完毕后, 根据循环数 (Ct 值) 对所有基因的表达进行数据分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,

组间比较采用单因素方差分析,其中两两比较采用 LSD-法,方差不齐采用 Kruskal-Wallis 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牛蒡子苷增加 L6 骨骼肌细胞中葡萄糖消耗
葡萄糖消耗是检测细胞葡萄糖摄取能力的常用指标。如图 2 所示,牛蒡子苷可以促进 L6 骨骼肌细胞的葡萄糖消耗,当牛蒡子苷浓度为 1000 g/L 时,葡萄糖消耗量为对照组的 1.8 倍。

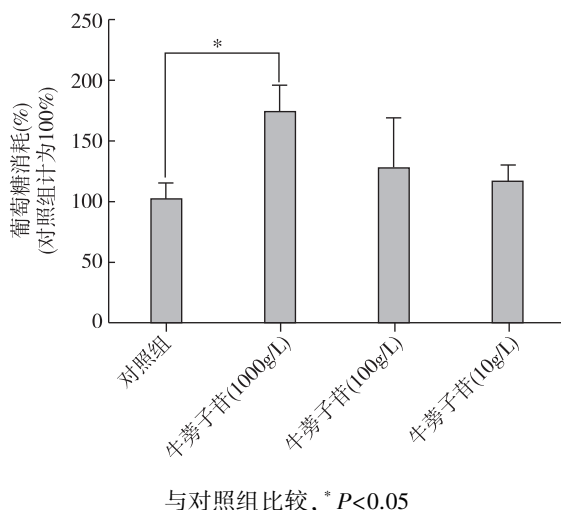


图 2 牛蒡子苷对 L6 骨骼肌细胞葡萄糖消耗的影响

2.2 牛蒡子苷增强 L6 骨骼肌细胞 AMPK 蛋白磷酸化水平 如图 3 所示,牛蒡子苷对 AMPK α 蛋白表达没有明显影响,但牛蒡子苷呈浓度依赖型增强 p-AMPK α 蛋白表达。

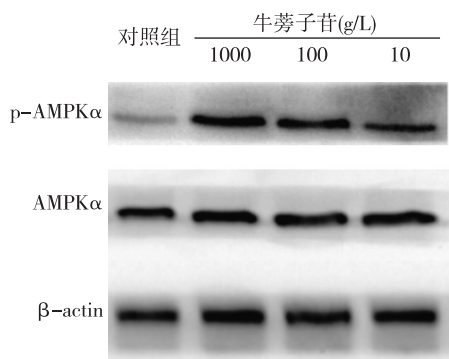


图 3 牛蒡子苷对 AMPK α 和 p-AMPK α 蛋白表达的影响

2.3 牛蒡子苷增强 L6 骨骼肌细胞 PGC-1 α mRNA 表达水平 PGC-1 α 是 AMPK 的下游效应分子,参与调控线粒体功能和生物发生,并影响胰岛素抵抗^[9]。如图 4 所示,分别用不同浓度的牛蒡子苷处理分化完成的 L6 细胞 24 h 后,与对照组相比,牛蒡

子苷各处理组的 PGC-1 α mRNA 表达水平显著升高,并且这种作用随着牛蒡子苷给药浓度增加而增强。

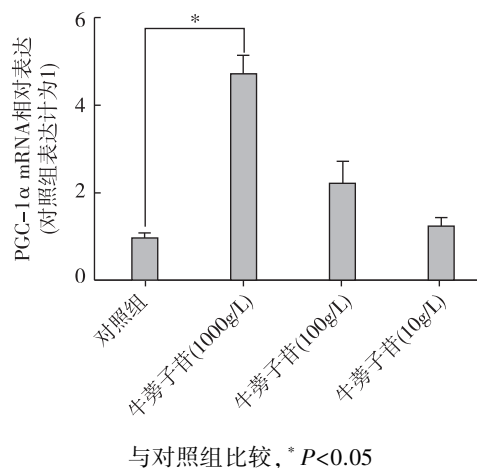


图 4 牛蒡子苷对 PGC-1 α mRNA 表达的影响

3 讨论

AMPK 在维持内环境能量稳态方面发挥重要的调节作用,被称为“细胞能量调节器”。在探求新型作用分子来治愈 2 型糖尿病的过程中,AMPK 作为一个创新性的药理靶点,已得到广泛关注。2 型糖尿病是一种较多发生的代谢性疾病,胰岛素抵抗是其主要病理特征之一^[10]。产生胰岛素抵抗时,组织对胰岛素刺激的葡萄糖摄取和利用效率降低^[11]。骨骼肌的葡萄糖转运是机体摄取葡萄糖的主要方式,对于维持机体葡萄糖内稳态具有重要作用^[12]。葡萄糖转运主要有两条途径:一条是胰岛素依赖途径,另一条是非胰岛素依赖的信号途径,即 AMPK 途径。对于 2 型糖尿病患者,骨骼肌中胰岛素介导的葡萄糖转运已经受损,因此,改善 AMPK 途径的葡萄糖转运成为 2 型糖尿病更有效、更具前景的治疗靶点^[13]。AMPK 激活可以刺激骨骼肌中葡萄糖摄取和脂肪酸氧化,增强能量代谢,且这种作用不依赖于胰岛素^[14]。在发生胰岛素抵抗的 2 型糖尿病动物模型中,其肝脏、肌肉和脂肪组织中 AMPK 的活性比正常组明显降低,而 AMPK 激动剂可以有效降低血糖及改善胰岛素抵抗^[15]。本研究表明,用牛蒡子苷处理 L6 骨骼肌细胞可以显著增加细胞的葡萄糖消耗,升高 AMPK 蛋白的磷酸化水平,增强 AMPK 活性,表明牛蒡子苷可以促进骨骼肌细胞的葡萄糖摄取,对胰岛素抵抗具有潜在改善作用。

(下转第 187 页)

- (6): 1354-1356.
- [2] Moon HS, Koo JS, Park SH, et al. Parasitic leiomyoma in the abdominal wall after laparoscopic myomectomy [J]. Fertil Steril, 2008, 90(4): 1201-1202.
- [3] Kho KA, Nezhat C. Parasitic myomas [J]. Obstet Gynecol, 2009, 114(3): 611-615.
- [4] 梁海燕, 李华军, 卞美璐. 寄生性子宫肌瘤临床分析[J]. 中日友好医院学报, 2009, 23(3): 143-145.
- [5] 罗玉君, 徐艳燕, 刘 强. 6 例子宫阔韧带肌瘤的超声误诊分析[J]. 东南国防医药, 2013, 15(6): 628-629.
- [6] Osman T, Hakan E, Bulent A, et al. A case of parasitic myoma 4 years after laparoscopic myomectomy [J]. J Minim Access Surg, 2014, 10(4): 202-203.
- [7] 吴超英, 李 咏, 赵丹梅, 等. 开腹与腹腔镜多发性子宫肌瘤剔除术临床疗效分析[J]. 东南国防医药, 2014, 16(3): 278-280.
- [8] 高月清, 赵 栋. 医源性寄生性肌瘤 2 例报道并文献复习[J]. 现代妇产科进展, 2012, 21(8): 629-631.
- (收稿日期: 2015-10-25; 修回日期: 2015-11-18)
- (本文编辑: 黄攸生)

(上接第 159 页)

PGC-1 α 是一种核转录共激活因子, 在调节能量平衡中起着重要作用, AMPK 激活可以增加 PGC-1 α 的表达水平^[16]。近年来, PGC-1 α 在线粒体功能和胰岛素抵抗中的作用成为研究热点^[17]。有研究表明增强 PGC-1 α 活性可以改善线粒体代谢及促进线粒体发生^[18]。另有研究表明 PGC-1 α 可以增强葡萄糖转运体 4 (glucose transporter type 4, GLUT4)mRNA 表达水平, 提高肌细胞的葡萄糖转运能力及对胰岛素的敏感性, 进而降低血糖^[19]。本研究亦显示, 牛蒡子苷可以浓度依赖性地增强 L6 骨骼肌细胞中 PGC-1 α 的基因表达水平, 证实牛蒡子苷具有潜在的增强胰岛素敏感性的作用。

综上所述, AMPK 信号通路可以调节葡萄糖摄取且不依赖于胰岛素, 是改善胰岛素抵抗的有效途径; 牛蒡子苷可以增加 L6 骨骼肌细胞的葡萄糖消耗, 增强 AMPK 活性, 并促进 PGC-1 α 转录, 表明牛蒡子苷具有潜在地增强胰岛素敏感性和改善 2 型糖尿病临床症状的作用。

【参考文献】

- [1] Association AD. 14. Diabetes advocacy [J]. Diabetes Care, 2015, 38(Supplement 1): S86-S87.
- [2] Szendroedi J, Phielix E, Roden M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus [J]. Nature Reviews Endocrinology, 2012, 8(2): 92-103.
- [3] Hansell CAH, Chris S, Ross K, et al. Universal expression and dual function of the atypical chemokine receptor D6 on innate-like B cells in mice [J]. Blood, 2011, 117(20): 5413-5424.
- [4] Koistinen HA, Galuska D, Chibalin AV, et al. 5-amino-imidazole carboxamide riboside increases glucose transport and cell-surface GLUT4 content in skeletal muscle from subjects with type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2003, 52(5): 1066-1072.
- [5] 王 璐, 赵 烽, 刘 珂. 牛蒡子苷及牛蒡子苷元的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 467-470.
- [6] 刘冬恋, 莫正纪, 马松涛, 等. 牛蒡子苷对糖尿病肾病大鼠肾小球滤过屏障损伤的保护作用 [J]. 华西药学杂志, 2011, 26(6): 536-539.
- [7] 张淑雅, 王小萍, 陈 昕, 等. 牛蒡苷抗炎和解热作用研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(6): 422-425.
- [8] Su S, Cheng X, Wink M. Natural lignans from *Arctium lappa* modulate P-glycoprotein efflux function in multidrug resistant cancer cells [J]. Phytomedicine, 2015, 22(2): 301-307.
- [9] Lira VA, Benton CR, Yan Z, et al. PGC-1 α regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity [J]. Am J Physiol-Endocr Metab, 2010, 299(2): E145-E161.
- [10] 周 江, 文 萍, 肖秋金. 老年 2 型糖尿病患者心脏功能改变与胰岛素抵抗的关系 [J]. 东南国防医药, 2014, 16(3): 308-309.
- [11] 黄 艳, 赵亚萍, 王加林. 肥胖相关胰岛素抵抗分子机制的研究进展 [J]. 东南国防医药, 2010, 12(6): 526-529.
- [12] Flannery C, Dufour S, Rabol R, et al. Skeletal muscle insulin resistance promotes increased hepatic de novo lipogenesis, hyperlipidemia, and hepatic steatosis in the elderly [J]. Diabetes, 2012, 61(11): 2711-2717.
- [13] Huang SL, Yu RT, Gong J, et al. Arctigenin, a natural compound, activates AMP-activated protein kinase via inhibition of mitochondria complex I and ameliorates metabolic disorders in ob/ob mice [J]. Diabetologia, 2012, 55(5): 1469-1481.
- [14] Ruderman NB, Carling D, Prentki M, et al. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome [J]. J Clin Invest, 2013, 123(7): 2764.
- [15] Hardie DG. AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer [J]. Diabetes, 2013, 62(7): 2164-2172.
- [16] Buler M, Aatsinki S-M, Izzi V, et al. SIRT5 is under the control of PGC-1 α and AMPK and is involved in regulation of mitochondrial energy metabolism [J]. FASEB J, 2014, 28(7): 3225-3237.
- [17] Ruas JL, White JP, Rao RR, et al. A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy [J]. Cell, 2012, 151(6): 1319-1331.
- [18] Kristensen JM, Skov V, Petersson SJ, et al. A PGC-1 α -and muscle fibre type-related decrease in markers of mitochondrial oxidative metabolism in skeletal muscle of humans with inherited insulin resistance [J]. Diabetologia, 2014, 57(5): 1006-1015.
- [19] Eckardt K, Taube A, Eckel J. Obesity-associated insulin resistance in skeletal muscle: role of lipid accumulation and physical inactivity [J]. Rev Endocr Metab Dis, 2011, 12(3): 163-172.
- (收稿日期: 2015-12-08; 修回日期: 2016-01-25)
- (本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)