

人参皂甙 Rb₁ 促进 3T3-L1 脂肪细胞分化并抑制脂解

尚文斌 杨颖 姜博仁 周丽斌 唐金凤 李凤英 金华 刘尚全 陈名道

【摘要】 目的 观察人参皂甙 Rb₁ (Rb₁) 对 3T3-L1 脂肪细胞分化和脂肪分解的作用,并探讨人参抗糖尿病的作用机制。**方法** 在 3T3-L1 脂肪细胞诱导分化过程中,分别加入不同浓度的 Rb₁ 作用 6 d,各组脂肪细胞分别进行油红 O 染色,甘油三酯(TG)含量、³H-葡萄糖转运率检测,并用实时定量 PCR 和免疫印迹对脂肪细胞 PPAR γ 2、CCAAT 增强子结合蛋白(C/EBP α)、脂肪酸结合蛋白(ap2)和葡萄糖转运体(Glut)1、Glut4 的 mRNA 和蛋白水平进行测定;运用表面等离子体共振技术(SPR)测定 Rb₁ 与 PPAR γ 结合亲和力;在分化成熟的脂肪细胞加入 Rb₁ 孵育后,测定释放到上清液的甘油含量。**结果** Rb₁ 能促进 3T3-L1 脂肪细胞的分化程度,并呈剂量依赖关系,10 μ mol/L 浓度使细胞内 TG 含量增加约 56%,同时 PPAR γ 2 和 C/EBP α 的 mRNA 和蛋白水平均显著升高,其下游基因 ap2 的 mRNA 水平也明显增加。分化过程中加入 Rb₁ 的脂肪细胞基础和胰岛素诱导的葡萄糖转运率增加。Glut4 的 mRNA 和蛋白水平均上升,而 Glut1 则未见显著变化;SPR 检测结果显示 Rb₁ 具有 PPAR γ 结合活性,提示 Rb₁ 是 PPAR γ 的配体;在诱导分化成熟的脂肪细胞中,Rb₁ 抑制基础脂肪分解,10 μ mol/L 浓度使上清甘油含量下降约 50%,但对异丙肾上腺素诱导的脂解没有影响。**结论** Rb₁ 作为 PPAR γ 的配体,通过上调 PPAR γ 2、C/EBP α 的表达促进脂肪细胞的脂肪形成;增加基础和胰岛素刺激的葡萄糖利用;同时抑制基础脂解。以上结果表明人参和人参皂甙抗糖尿病的作用可能与促进脂肪细胞分化,增加胰岛素敏感性和抑制基础脂解有关。

【关键词】 人参皂甙; 脂肪细胞; 分化; PPAR γ ; CCAAT 增强子结合蛋白; 脂解作用

Ginsenoside Rb₁ facilitates adipocyte differentiation and inhibits lipolysis in 3T3-L1 adipocytes SHANG Wen-bin, YANG Ying, JIANG Bo-ren, ZHOU Li-bin, TANG Jin-feng, LI Feng-ying, JIN Hua, LIU Shang-quan, CHEN Ming-dao. Shanghai Institute of Endocrine and Metabolic Diseases, Department of Endocrine and Metabolic Diseases, Shanghai Clinical Center of Endocrine and Metabolic Diseases, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China
Corresponding author: CHEN Ming-dao, Email: mingdaochensh@yahoo.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of ginsenoside Rb₁, the most abundant ginsenoside in ginseng root, on differentiation and lipolysis of 3T3-L1 cells and to explore its anti-diabetic mechanism. **Methods** 3T3-L1 preadipocytes were induced under standard differentiation process in the presence of 0.1, 1, 10, 100 μ mol/L ginsenoside Rb₁ for 6 days. Oil red O staining, measurement of triglyceride contents and glucose uptake assay were performed. The expressions of mRNA and protein of PPAR γ 2, C/EBP α , ap2, glucose transporter (Glut)1, and Glut4 were analysed with quantitative real time-PCR and Western blot. The binding affinity of Rb₁ to PPAR γ -LBD was evaluated by Surface Plasmon Resonance (SPR). Lipolysis of adipocytes was examined by the measurement of glycerol released from adipocytes treated with Rb₁ for 1 h. **Results** Ginsenoside Rb₁ facilitated differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in a dose-dependent manner. 10 μ mol/L ginsenoside Rb₁ increased lipid accumulation by about 56%. Treatment of differentiating adipocytes with 10 μ mol/L ginsenoside Rb₁ increased the expressions of PPAR γ 2 and C/EBP α mRNA and protein, as well as mRNA expression of ap2, one of their target genes. After treatment of differentiating adipocytes with Rb₁, basal and insulin-mediated glucose transport augmented significantly accompanied by up-regulations of mRNA and protein level of Glut4, but not of Glut1. SPR showed Rb₁ could bind to PPAR γ which suggested Rb₁ was a ligand of PPAR γ . Ginsenoside Rb₁ inhibited basal lipolysis in adipocytes in a dose-dependent manner. However, it did not affect isoproterenol-stimulated lipolysis. **Conclusion** As a PPAR γ ligand, ginsenoside Rb₁ promotes adipogenesis, inhibits basal lipolysis and increases basal and insulin-mediated glucose transport in cultured adipocytes. Therefore, anti-diabetic and insulin-sensitizing activity of

基金项目:上海市优秀青年医学人才培养基金(2004),上海市教委科研基金(05BZ28);上海联合利华研究发展基金(2004)

作者单位:200025 上海内分泌代谢病研究所,上海交通大学医学院附属瑞金医院内分泌代谢病科,上海市内分泌代谢病临床医学中心;第一作者现在南京中医药大学第一临床医学院

通讯作者:陈名道,Email:mingdaochensh@yahoo.com

ginsenosides is, at least in part, involved in the enhancing effect on PPAR γ 2 and C/EBP α expressions, hence promoting adipogenesis and glucose uptake, and inhibiting lipolysis in adipocytes.

【Key words】 Ginsenoside; Adipocytes; Differentiation; PPAR γ ; CCAAT-enhancer-binding proteins; Lipolysis

(Chin J Endocrinol Metab, 2007, 23:258-263)

脂肪组织作为内分泌器官对机体的能量代谢发挥调节作用,正成为治疗肥胖、2 型糖尿病和心血管疾病的潜在药物靶点^[1]。肥胖和脂肪形成不良均与胰岛素抵抗和糖尿病相关,而成熟脂肪的生成主要受两类关键的转录因子家族调控,即 CCAAT 增强子结合蛋白(C/EBP)和 PPAR γ ^[2]。噻唑烷二酮类药物(TZD)作为 PPAR γ 的配体,能够通过激活 PPAR γ 促进脂肪细胞的分化和增强胰岛素敏感性,起降血糖作用^[3]。

近年来,一些临床研究和动物实验表明人参和西洋参及其主要活性成分人参皂甙具有降低血糖,增加胰岛素敏感性,减轻体重,调节糖脂代谢的作用^[4-8],但其作用机制并不十分清楚。有研究发现人参提取物能促进糖尿病小鼠脂肪组织 PPAR γ 的 mRNA 和蛋白水平^[9,10]。这些研究提示人参皂甙可能直接对脂肪细胞的发生和功能产生作用。本研究观察人参及西洋参中含量最丰富的人参皂甙 Rb₁ 对 3T3-L1 脂肪细胞的分化和糖脂代谢的影响以及对 PPAR γ 和 C/EBP α 的调控作用,其结果将有助于了解人参抗糖尿病和胰岛素增敏作用的机制。

材料和方法

一、主要试剂

人参皂甙 Rb₁ (Rb₁)、地塞米松(DEX)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、异丙肾上腺素、甘油和甘油三酯(TG)测定试剂购自美国 Sigma 公司;曲格列酮(Tro)购自美国 Calbiochem 公司;DMEM 购自美国 GIBCO 公司;胎牛血清(FCS)购自奥地利 PAA 公司;重组人胰岛素(常规优泌林)购自美国礼来公司;SuperScript II 逆转录酶和 Oligo(dT)引物购自美国 Invitrogen 公司;实时定量 PCR 测定试剂盒(Absolute QPCR Mixes)购自英国 Abgene;PPAR γ 2 (G18)抗体、actin 抗体和羊二抗购自美国 Santa Cruz 公司;C/EBP α (P42)抗体、兔二抗和小鼠二抗来自美国 Cell Signaling Technology;葡萄糖转运体(Glut)1 抗体来自美国 Chemicon;Glut4 抗体来自美国 R&D 公司;2-脱氧-D-[1-³H] 葡萄糖(2-DOG)购自英国 Amersham;BCA 蛋白测定试剂盒和 West Pico Chemiluminescent 发光底物来自美国 PIERCE。

二、方法

1. 细胞培养:小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞购自美国

ATCC (American Type Culture Collection)。细胞培养于 10% FCS 高糖(25 mmol/L 葡萄糖)DMEM,置于 37℃,7% CO₂ 孵育箱。接种于培养板,汇合后 2 d,加入诱导液 A(10% FCS 高糖 DMEM 含 0.5 mmol/L IBMx, 1 μ mol/L DEX, 0.17 μ mol/L 胰岛素)开始诱导。48 h 后,换成诱导液 B(10% FCS 高糖 DMEM 含 0.17 μ mol/L 胰岛素)。48 h 后重新换成 10% FCS 高糖 DMEM,隔天换液一次。用于脂解实验的细胞在诱导过程中胰岛素浓度为 1.7 μ mol/L。诱导分化实验中,从开始诱导分别加入相应不同浓度的药物 6 d。Rb₁ 和曲格列酮按应用液的 1 000 倍溶于二甲基亚砜(DMSO),等量 DMSO 加入对照组。

2. 油红 O 染色:诱导后 8 d 的脂肪细胞以 PBS 洗两遍,4% 多聚甲醛(溶于 PBS)固定 1 h,然后用 0.6% 油红 O 室温染色 1 h,用 60% 异丙醇洗 3 次去除多余油红 O,拍照摄片。24 孔板用 100 μ l 洗脱液(4% NP-40,用异丙醇配制,v/v)洗脱,洗脱液在 490 nm 下测定吸光度值(A₄₉₀)。

3. TG 测定:诱导后 8 d 的细胞用 PBS 洗两遍,用 200 μ l TG 抽提液(2 mol/L 氯化钠,2 mmol/L EDTA, 50 mmol/L 磷酸钠,pH 7.4)刮落细胞,超声裂解,测定 TG 含量。剩余裂解液离心后,测定蛋白含量用于校正 TG 值。

4. 葡萄糖转运测定:诱导后 8 d 的细胞经含 0.2% 牛血清白蛋白(BSA)的 DMEM 孵育 24 h 后,PBS 洗 3 遍,加入含或不含 100 nmol/L 胰岛素的 Krebs-Ringer 磷酸缓冲液(KRP,1.32 mmol/L 氯化钠,4.71 mmol/L 氯化钾,47 mmol/L 氯化钙,1.24 mmol/L 硫酸镁,2.48 mmol/L 磷酸钠,10 mmol/L HEPES,pH 7.4),孵育 30 min 后加入终浓度为 0.5 μ Ci/ml 的 2-DOG,孵育 10 min,吸出上清,用含有 10 mmol/L 葡萄糖的冰冷 KRP 洗 3 遍。细胞用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液裂解,用液闪计数仪(美国 Beckman Instruments)测定 dpm 值,并用裂解液的蛋白含量校正 dpm 值。

5. 表面等离子体共振技术(Surface Plasmon Resonance,SPR)测定 PPAR γ 结合亲和力:运用表面等离子体共振仪(Biacore 3000)来测定 Rb₁ 与 PPAR γ 结合亲和力。首先将 PPAR γ -LBD(PPAR γ 配体结合结构域)蛋白固定于感应芯片上,用连续流动的上样缓冲液[含 10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 3

mmol/L EDTA, 0.005% (v/v) 表面活性剂 P20] 平衡 1 h, 将用上样缓冲液系列稀释的 Rb_1 以 30 ml/min 流速注入通道, 然后再用上样缓冲液冲洗, 同时采集信号, 完成检测。用 BIA evaluation 软件计算平衡解离常数(KD)。

6. 总 RNA 抽提和实时定量 PCR: $10 \mu\text{mol/L}$ Rb_1 作用下诱导 6 d 后, 用 TRIZOL 试剂提取脂肪细胞总 RNA。定量后, 用 SuperScript II 逆转录酶和 Oligo(dT) 引物将 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA 逆转录成 cDNA。参照 Absolute QPCR Mixes 试剂说明书, 在 ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) 上进行定量 PCR 扩增和检测, 设置参数为 95°C 15 min; 95°C 15 s 和 60°C 1 min, 共 40 循环。用 β -actin 作为内参校正, 样本来自 3 次独立的重复实验。每个样本均设置复孔, 同时用系列稀释的 β -actin 制作标准曲线计算相对表达量。每个基因引物如下: PPAR γ 2 上游引物为 5'-gatgcactgcctatgagcaatt-3', 下游引物为 5'-agaggtccacagagctgattcc-3'; C/EBP α 上游引物为 5'-ggaacagctgagc-cgtgaac-3', 下游引物为 5'-gcaacccgaaaccatcct-3'; 脂肪酸结合蛋白 (ap2) 上游引物为 5'-caccgcagacgacaggaag-3', 下游引物为 5'-gcacctgcaccagggc-3'; Glut1 上游引物为 5'-catccttattgccaggtgttt-3', 下游引物为 5'-gaagacgacactgagcagcaga-3'; Glut4 上游引物为 5'-cttctttgagattggc-cctgg, 下游引物为 5'-aggtgaagatgaagaagccaagc-3'; β -actin 上游引物为 5'-ctgggacgatatggagaaga-3', 下游引物为 5'-agaggcatcacagggacaaca-3'。

7. 蛋白免疫印迹分析: $10 \mu\text{mol/L}$ Rb_1 作用下诱导分化 8 d 后的细胞用冰冷的 PBS 洗两遍, 再用裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mmol/L PMSF, $5 \mu\text{g/ml}$ Aprotinin, $5 \mu\text{g/ml}$ Leupeptin, pH 7.4) 裂解细胞, 超声后 $13\ 000 \text{ r/min}$ 离心 20 min, 吸取上清进行蛋白定量。加入上样缓冲液, 95°C 变性 5 min, 用 8% SDS-PAGE 分离蛋白, 转膜后室温 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗 4°C 杂交过夜, 二抗室温杂交 2 h, 洗膜后, 压片显影检测蛋白。

8. 脂肪分解测定: 诱导 8 d 后的脂肪细胞, 以含 0.2% BSA 的 DMEM 孵育过夜, PBS 洗两遍, 加入含有不同浓度 Rb_1 或 $10 \mu\text{mol/L}$ 异丙肾上腺素的 2% BSA 的 PBS, 37°C 孵育 1 h 后, 吸取上清液; 或先加入 Rb_1 30 min, 再加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 异丙肾上腺素, 37°C 孵育 1 h 后, 吸取上清液, 测定甘油含量。

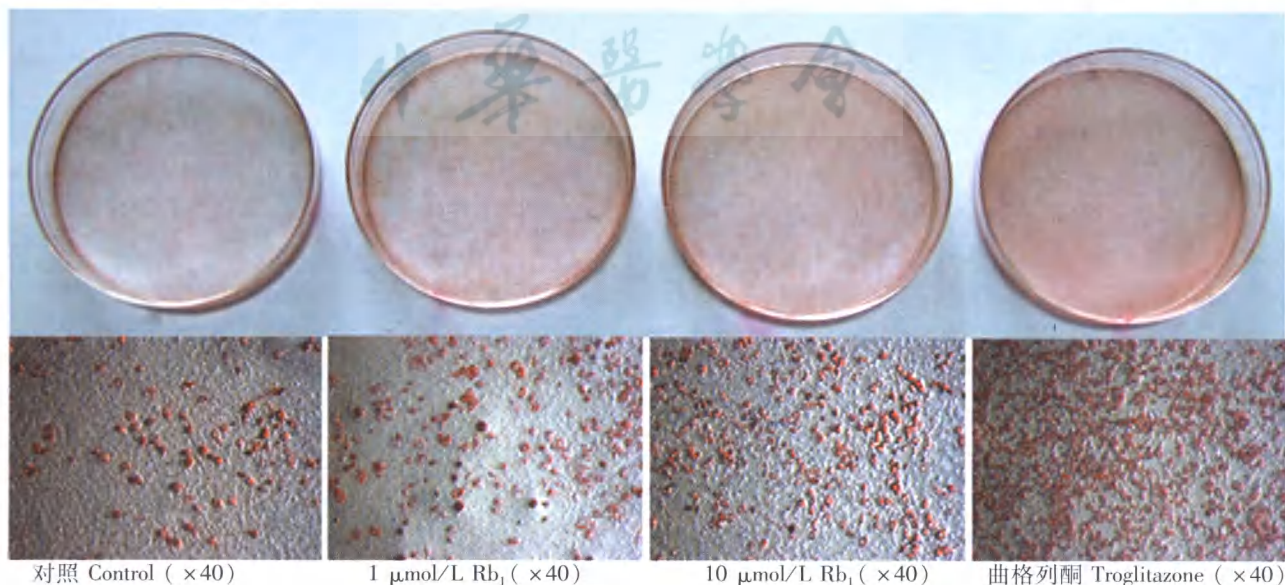
三、统计学处理

所有数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 12.0 软件进行 t 检验。

结 果

一、 Rb_1 促进 3T3-L1 脂肪细胞的分化

在 3T3-L1 脂肪细胞诱导成脂肪细胞的过程中, 加入 Rb_1 作用 6 d, 能够促进脂肪细胞分化, 并呈剂量依赖关系 (图 1)。从表 1 和表 2 可以看出 $10 \mu\text{mol/L}$ Rb_1 使诱导后脂肪细胞的油红 O 染色和 TG 含量分别



注: Rb_1 : 人参皂甙 Rb_1 Ginsenoside Rb_1 ; 曲格列酮浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ Troglitazone concentration was $10 \mu\text{mol/L}$

图 1 Rb_1 处理后各组细胞油红 O 染色图片

Fig 1 Photographs of Rb_1 -treated differentiated adipocytes stained by oil red O

表 1 Rb₁ 处理后各组油红 O 抽提液吸光度值的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 A₄₉₀ value of oil red O elution from Rb₁-treated differentiated adipocytes ($\bar{x} \pm s$)

Rb ₁ ($\mu\text{mol/L}$)	样本数 <i>n</i>	A ₄₉₀
0	6	0.50 ± 0.06
0.1	6	0.65 ± 0.11
1	6	0.67 ± 0.11
10	6	0.72 ± 0.05 *

注:略语同图 1 The abbreviations is the same as Fig 1; 与空白组比较 vs control group, * $P < 0.05$

表 2 Rb₁ 处理后各组细胞 TG 含量($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 TG content of Rb₁-treated differentiated adipocytes ($\bar{x} \pm s$)

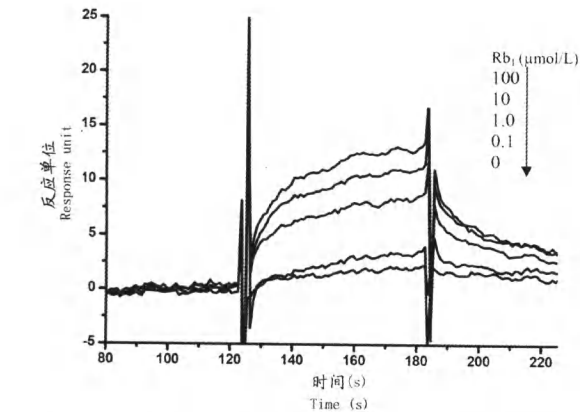
组别 Group	样本数 <i>n</i>	TG 含量 TG content (mg/mg protein)
对照 Control	8	0.15 ± 0.01
0.1 $\mu\text{mol/L}$ Rb ₁	8	0.17 ± 0.02
1 $\mu\text{mol/L}$ Rb ₁	8	0.19 ± 0.03 *
10 $\mu\text{mol/L}$ Rb ₁	8	0.24 ± 0.02 *
10 $\mu\text{mol/L}$ Troglitazone	8	0.29 ± 0.05 *

注: TG: 甘油三酯 Triglyceride; Control: 空白对照; Troglitazone: 曲格列酮; 其他略语同图 1 The other abbreviation is the same as Fig 1; 与空白对照组比较 vs control group, * $P < 0.05$

增加了 45% 和 56% ($P < 0.05$), 同时曲格列酮作为阳性对照也明显促进脂肪细胞的分化 ($P < 0.05$), 与以前文献报道一致。

二、Rb₁ 具有 PPAR γ 结合活性, 并且增加 3T3-L1 脂肪细胞 PPAR γ 2 和 C/EBP α 的 mRNA 和蛋白水平

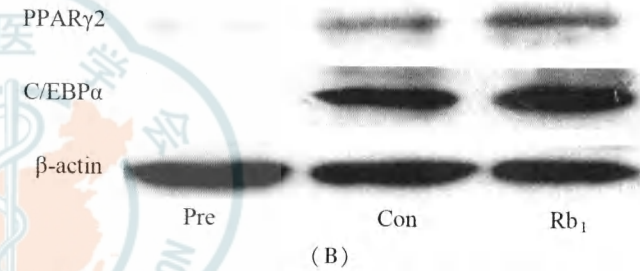
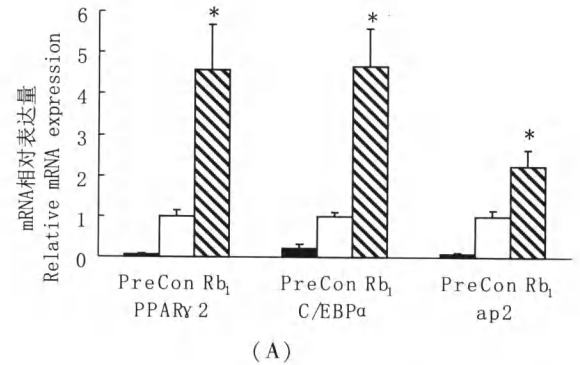
SPR 检测结果显示 Rb₁ 具有 PPAR γ 结合活性, 其 KD 值为 3.07 $\mu\text{mol/L}$, 提示 Rb₁ 为 PPAR γ 的配体 (图 2)。同时 10 $\mu\text{mol/L}$ Rb₁ 能够使诱导分化 6 d 的脂肪



注: SPR: 表面等离子体共振 Surface plasmon resonance; 其他略语同图 1 The other abbreviation is the same as Fig 1

图 2 SPR 技术测定 Rb₁ 与 PPAR γ -LBD 结合亲和力
Fig 2 The binding affinity of Rb₁ to PPAR γ -LBD evaluated by SPR

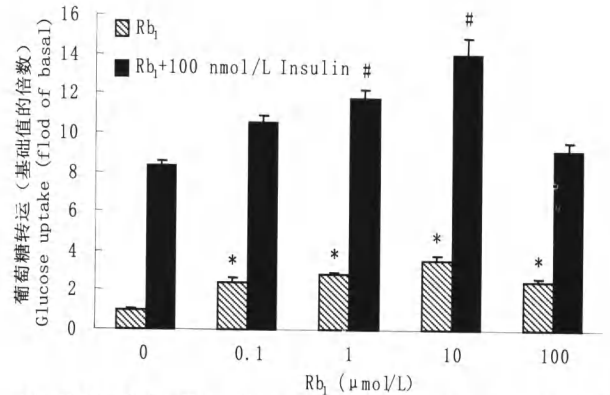
细胞 PPAR γ 2 和 C/EBP α 的 mRNA 水平分别上调约 4.5 和 4.7 倍 ($P < 0.05$), 两者的蛋白水平也明显增加。ap2 作为 PPAR γ 调控的下游基因, 其 mRNA 水平也上调约 2.2 倍 ($P < 0.05$, 图 3)。



注: A: 实时定量 PCR 结果 Real-time quantitative PCR results; B: 蛋白免疫印迹结果 Western blot results; C/EBP α : CCAAT 增强子结合蛋白 CCAAT/enhancer binding protein; ap2: 脂肪酸结合蛋白 Fatty acid-binding protein; Pre: 前脂肪细胞 Preadipocytes; Con: 对照组 Control; 其他略语同图 1 The other abbreviation is the same as Fig 1; Rb₁: 10 $\mu\text{mol/L}$ Rb₁ 组 10 $\mu\text{mol/L}$ Rb₁ group; 与对照组比较 vs control group, * $P < 0.05$

图 3 Rb₁ 对脂肪细胞 PPAR γ 2 和 C/EBP α mRNA 和蛋白表达的影响

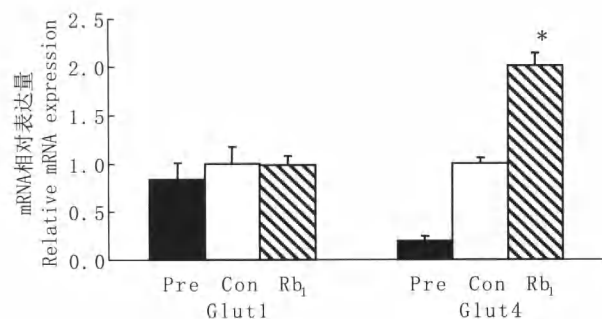
Fig 3 The effects of Rb₁ on mRNA and protein expressions of PPAR γ 2 and C/EBP α in adipocytes



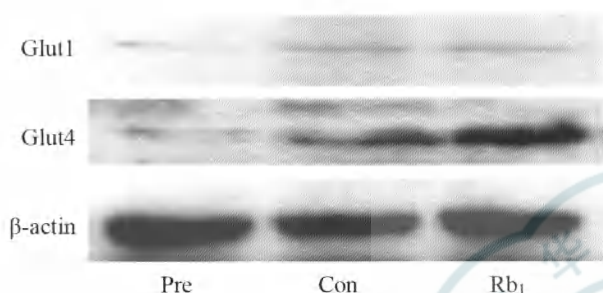
注:略语同图 1 The abbreviation is the same as Fig 1; 与基础值比较 vs basal, * $P < 0.05$; 与单独胰岛素比较 vs insulin alone, # $P < 0.05$

图 4 Rb₁ 处理后脂肪细胞的基础和胰岛素介导的葡萄糖转运的变化

Fig 4 The changes of the basal and insulin-mediated glucose uptake in Rb₁-treated adipocytes



(A)



(B)

注: A: 实时定量 PCR 结果 Real-time quantitative PCR results; B: 蛋白免疫印迹结果 Western blot results; Glut: 葡萄糖转运体 Glucose transporter; 其他略语同图 1 和图 3 The other abbreviations are the same as Fig 1 and Fig 3; 与对照组比较 *vs* control group, * $P < 0.05$

图 5 Rb_1 处理后脂肪细胞的变化 Glut1 和 Glut4 mRNA 和蛋白表达水平的变化

Fig 5 The changes of the mRNA and protein expressions of Glut1 and Glut 4 in Rb_1 -treated adipocytes

三、 Rb_1 促进 3T3-L1 脂肪细胞的基础和胰岛素刺激的葡萄糖转运及 Glut4 表达

Rb_1 作用下, 诱导分化的脂肪细胞基础和胰岛素刺激的葡萄糖转运明显增加, 并呈剂量依赖性, $10 \mu\text{mol/L}$ Rb_1 使基础糖转运增加约 3.5 倍 ($P < 0.05$), 使胰岛素刺激的葡萄糖转运增加约 67% ($P < 0.05$, 图 4)。 $10 \mu\text{mol/L}$ Rb_1 作用后, Glut4 的 mRNA 上调约 2 倍 (图 5, $P < 0.05$), 蛋白水平也增加 (图 5); 而 Glut1

表 3 Rb_1 对脂肪细胞基础状态下脂解的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The effect of Rb_1 on basal lipolysis in adipocytes ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	样本数 <i>n</i>	甘油含量 Glycerol content (mg/ml)
对照 Control	8	0.123 ± 0.012
$0.1 \mu\text{mol/L}$ Rb_1	8	$0.093 \pm 0.020^*$
$1 \mu\text{mol/L}$ Rb_1	8	$0.070 \pm 0.031^*$
$10 \mu\text{mol/L}$ Rb_1	8	$0.065 \pm 0.024^{**}$
$10 \mu\text{mol/L}$ Isoproterenol	8	$0.244 \pm 0.047^{**}$

注: Isoproterenol: 异丙肾上腺素; 其他略语同图 1 The abbreviations are the same as Fig 1; 与空白对照组比较 *vs* control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 4 Rb_1 对脂肪细胞异丙肾上腺刺激的脂解的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 The effect of Rb_1 on isoproterenol-stimulated lipolysis in adipocytes ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	样本数 <i>n</i>	甘油含量 Glycerol content (mg/ml)
对照 Control	4	0.097 ± 0.016
$10 \mu\text{mol/L}$ Rb_1	4	$0.051 \pm 0.008^*$
$10 \mu\text{mol/L}$ Isoproterenol	4	$0.167 \pm 0.011^*$
Isoproterenol + Rb_1	4	$0.181 \pm 0.014^{**}$

注: Isoproterenol: 异丙肾上腺素; 其他略语同图 1 The abbreviations are the same as Fig 1; 与空白对照组比较 *vs* control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

的 mRNA 和蛋白水平未见明显改变。

四、 Rb_1 抑制 3T3-L1 脂肪细胞基础状态下的脂肪分解

Rb_1 作用 1 h 能使脂肪细胞基础状态下的甘油释放显著降低 (表 3), 呈剂量依赖性。 $10 \mu\text{mol/L}$ Rb_1 能使脂肪分解下降约 50% ($P < 0.05$)。 异丙肾上腺素明显增加脂解 ($P < 0.05$), 而 Rb_1 不能抑制异丙肾上腺素刺激的脂解 (表 4)。

讨 论

脂肪细胞的生成和分化受到 PPAR γ 和 C/EBP α 两类转录因子的调控, 激活和过表达 PPAR γ 和 C/EBP α 均能促进脂肪细胞的分化, 而两者又共同调节其下游与维持成熟脂肪细胞表型的有关基因的表达, 并且参与脂肪细胞的糖脂代谢^[2]。在脂肪细胞分化过程中, 两者的表达量明显增加, 其中 PPAR γ_2 选择性地表达于脂肪细胞^[12]。在本实验中, Rb_1 能够促进 3T3-L1 脂肪细胞分化, 增加 TG 含量。在分子水平, Rb_1 通过增加 PPAR γ_2 和 C/EBP α 的表达来促进脂肪细胞的分化。同时 PPAR γ 直接调控的下游基因 ap2 的表达量也随之上升, 表明 PPAR γ 的调节活性增加。而在 SPR 测定中, Rb_1 能直接结合于 PPAR γ -LBD, 提示 Rb_1 可能与 TZD 类似, 作为 PPAR γ 的配体, 激活 PPAR γ 的活性来影响脂肪细胞的分化。

Glut1 在组织中广泛表达, 而 Glut4 在脂肪和骨骼肌等胰岛素敏感的细胞中特异表达。一般认为基础葡萄糖转运与 Glut1 有关, 而 Glut4 对胰岛素敏感, 负责胰岛素介导的葡萄糖转运^[13]。所以胰岛素介导的葡萄糖转运可以间接反映脂肪细胞的分化程度^[14]。在本研究中, Rb_1 作用下诱导的脂肪细胞基础和胰岛素介导的葡萄糖转运均显著增加, Glut4 表达水平上升, 而 Glut1 没有显著变化。增加胰岛素介导的葡萄糖转运是由增加的 Glut4 水平所致, 而基础葡萄糖转运也

可能是 Glut4 升高所致,有证据表明 Glut4 也参与葡萄糖转运的调节^[15,16]。由于 Glut4 的表达受 PPAR γ 调控^[17],可以认为 Rb₁ 增加胰岛素敏感性与激活和增强 PPAR γ 2 和 C/EBP α 表达,促进脂肪细胞分化和 Glut4 表达有关。

Rb₁ 能够明显抑制脂肪细胞基础脂解水平,其作用机制并不清楚。而异丙肾上腺素通过结合脂肪细胞肾上腺素 β 受体,进一步激活腺苷酸环化酶,增加 cAMP 水平,导致激素敏感脂酶 (HSL) 被激活,促进 TG 水解^[18]。Rb₁ 对异丙肾上腺素刺激的脂肪分解没有影响,有研究表明磷酸二酯酶 (phosphodiesterase 4, PDE4) 抑制剂能对抗西洋参总提取物的脂解作用^[19],提示 Rb₁ 可能通过胰岛素抑制脂解的信号通路起作用。

脂肪组织储存 TG 的能力下降可以导致脂肪异位沉积于肌肉和肝脏,引起胰岛素抵抗、糖耐量异常和糖尿病^[20];脂解增加是肥胖和 2 型糖尿病患者体内游离脂肪酸 (FFA) 升高的重要因素,而持续升高的 FFA 不仅降低肌肉、脂肪和肝脏对胰岛素的敏感性,而且影响胰岛 β 细胞胰岛素的分泌功能,即所谓的脂毒性^[21]。而 TZD 正是通过激活 PPAR γ ,促进脂肪细胞分化,增加小脂肪细胞的数量,减少脂肪的异位沉积和 FFA 对胰岛素敏感组织的毒性作用^[20]。本实验结果提示人参皂甙的抗糖尿病和胰岛素增敏作用机制与 TZD 的作用方式类似,但仍然需要体内研究进一步证实。

综上所述,本研究结果表明人参皂甙 Rb₁ 作为 PPAR γ 的配体,能够激活 PPAR γ 及增加 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达量而促进脂肪细胞的分化,同时抑制基础脂解,这可能是人参和人参皂甙的抗糖尿病和胰岛素增敏作用机制之一。

志谢 感谢中国科学院上海药物研究所沈旭教授协助 SPR 检测

(本文部分内容已发表于 Life Science, 2007, 80:618-625)

参 考 文 献

- Nawrocki AR, Scherer PE. Keynote review: the adipocyte as a drug discovery target. *Drug Discov Today*, 2005, 10:1219-1230.
- Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16:145-171.
- Yki-arvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*, 2004, 351:1106-1118.
- Sotaniemi EA, Haapakoski E, Rautio A. Ginseng therapy in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care*, 1995, 18:1373-375.
- Yun SN, Moon SJ, Ko SK, et al. Wild ginseng prevents the onset of high-fat diet induced hyperglycemia and obesity in ICR mice. *Arch Pharm Res*, 2004, 27:790-796.
- Vuksan V, Sievenpiper JL, Wong J, et al. American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) attenuates postprandial glycemia in a time-dependent but not dose-dependent manner in healthy individuals. *Am J Clin Nutr*, 2001, 73:753-758.
- Attele AS, Zhou YP, Xie JT, et al. Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes*, 2002, 51:1851-1858.
- Xie JT, Mehendale SR, Li X, et al. Anti-diabetic effect of ginsenoside Re in ob/ob mice. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1740:319-325.
- Chung SH, Choi CG, Park SH. Comparisons between white ginseng radix and rootlet for antidiabetic activity and mechanism in KKAY mice. *Arch Pharm Res*, 2001, 24:214-218.
- Park MY, Lee KS, Sung MK. Effects of dietary mulberry, Korean red ginseng, and banaba on glucose homeostasis in relation to PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LPL mRNA expressions. *Life Sci*, 2005, 77:3344-3354.
- Tafari SR. Troglitazone enhances differentiation, basal glucose uptake, and Glut1 protein levels in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*, 1996, 137:4706-4712.
- Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, et al. PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev*, 2002, 16:27-32.
- Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*, 2003, 89:3-9.
- Liu X, Kim JK, Li Y, et al. Tannic acid stimulates glucose transport and inhibits adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *J Nutr*, 2005, 135:165-171.
- Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, et al. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem*, 1993, 268:22243-22246.
- Zisman A, Peroni OD, Abel ED, et al. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med*, 2000, 6:924-928.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*, 1998, 78:783-809.
- Arner P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2005, 19:471-482.
- Wang H, Reaves LA, Edens NK. Ginseng extract inhibits lipolysis in rat adipocytes in vitro by activating phosphodiesterase 4. *J Nutr*, 2006, 136:337-342.
- Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89:463-478.
- Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab*, 2000, 11:351-356.

(收稿日期:2006-09-25)

(本文编辑:周丽斌)