

人参皂苷 F2 通过 PI3K/Akt 途径改善 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗

韩胜强^{1,2}, 谢元^{1,2}, 李甫³, 胡烨烨², 周静^{1,2}, 胡卫成^{1,2}, 张迹^{1,2*}

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830052) (2. 淮阴师范学院江苏省高校区域现代农业与环境保护协同创新中心, 江苏淮安 223300) (3. 中国科学院成都生物研究所, 四川成都 610041)

摘要: 该研究探讨了人参皂苷 F2 对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的影响及其机制。将 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化成熟后, 用 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松处理 48 h, 建立胰岛素抵抗模型。用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的罗格列酮 (阳性对照) 和 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 F2 处理胰岛素抵抗细胞 12 h, 检测细胞对 2-NBDG 的摄取。实验结束后用 RT-qPCR 检测各组细胞中葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT-4) 和胰岛素底物受体 1 (IRS-1) mRNA 相对表达量, 并利用 Western blot 检测 PI3K/Akt 信号通路中蛋白表达及其磷酸化水平。结果表明: 与模型组相比, 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 F2 均能促进胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞对 2-NBDG 的摄取, 分别增加了 12.58%、29.07% 和 34.62% ($p<0.05$); 人参皂苷 F2 作用 12 h 后, GLUT-4 和 IRS-1 mRNA 相对表达量以及 PI3K、Akt 的磷酸化水平显著提高 ($p<0.01$)。该研究表明人参皂苷 F2 可通过促进胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞中 GLUT-4 和 IRS-1 mRNA 相对表达, 增加 PI3K 和 Akt 蛋白磷酸化, 从而激活 PI3K/Akt 信号通路, 改善其糖代谢和胰岛素抵抗。

关键词: 人参皂苷 F2; 3T3-L1 脂肪细胞; PI3K/Akt 信号通路; 胰岛素抵抗

文章篇号: 1673-9078(2022)05-8-15

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.5.0789

Ginsenoside F2 Improves Insulin Resistant in 3T3-L1 Adipocytes via the PI3K/Akt Signaling Pathway

HAN Shengqiang^{1,2}, XIE Yuan^{1,2}, LI Fu³, HU Yeye², ZHOU Jing^{1,2}, HU Weicheng^{1,2}, ZHANG Ji^{1,2*}

(1. College of Food Science and Pharmacology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

(2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Regional Modern Agriculture & Environmental Protection, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, China)

(3. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: In this study, the effect of ginsenoside F2 (GF2) on insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and the underlying mechanisms were investigated. After 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate and mature, they were treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ dexamethasone for 48 h to establish an insulin resistance model. The insulin-resistant cells were treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ rosiglitazone (positive control) and 25, 50 or 100 $\mu\text{mol/L}$ GF2 for 12 h, and the uptake of 2-NBDG by the cells was determined. After the experiments, real-time quantitative PCR was used to evaluate the relative mRNA expression levels of glucose transporter 4 (GLUT-4) and insulin receptor substrate 1 (IRS-1) in each group of cells. The protein expression and phosphorylation level of the PI3K/Akt signaling pathway were also evaluated by western blot. The results showed that compared with the model group, 25, 50, and 100 $\mu\text{mol/L}$ GF2 promoted the uptake of 2-NBDG in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes in a dose-dependent manner (increased by 12.58%, 29.07% and 34.62% respectively; $p<0.05$). After the 12 h treatment with ginsenoside F2, the

引文格式:

韩胜强, 谢元, 李甫, 等. 人参皂苷 F2 通过 PI3K/Akt 途径改善 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗[J]. 现代食品科技, 2022, 38(5): 8-15

HAN Shengqiang, XIE Yuan, LI Fu, et al. Ginsenoside F2 improves insulin resistant in 3T3-L1 adipocytes via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 8-15

收稿日期: 2021-07-24

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20201480)

作者简介: 韩胜强 (1995-), 男, 硕士, 研究方向: 食品营养与功能性, E-mail: 276120635@qq.com

通讯作者: 张迹 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养学, E-mail: zhangjihnu@163.com

relative mRNA expression levels of GLUT-4 and IRS-1 as well as the phosphorylation levels of PI3K and Akt increased remarkably ($p<0.01$). This research shows that GF2 could activate the PI3K/Akt pathway, and improve glucose metabolism and insulin resistance, through promoting the relative mRNA expressions of GLUT-4 and IRS-1 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes, and increasing the phosphorylation levels of PI3K and Akt proteins.

Key words: ginsenoside F2; 3T3-L1 adipocytes; PI3K/Akt pathway; insulin resistance

II型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是世界上最常见的慢性疾病之一，主要表现为外周组织的高血糖和胰岛素抵抗 (Insulin resistance, IR)，在世界范围内引起很高的患病率和死亡率^[1,2]。当胰岛素敏感性组织（例如肝脏、脂肪和骨骼肌）由于胰岛素信号传导途径受损而对胰岛素的敏感性降低时，就会发生 IR。最终会导致 β 细胞的损伤和凋亡，血糖水平持续升高^[3,4]。肥胖是与胰岛素抵抗相关的糖尿病的触发因素，通过刺激 IR 加剧 T2DM 的发展^[5]。肥胖是脂肪组织中脂肪细胞分化积聚大量脂肪的状态^[6]，会加速脂肪组织的老化，而脂肪细胞在维持全身葡萄糖稳态中占据重要地位，同时在 IR 和 T2DM 中也起重要作用^[7,8]。葡萄糖转运蛋白将血液中葡萄糖转运到脂肪细胞中，促进脂肪的合成，同时抑制脂肪分解，使游离脂肪酸进入血液，通过血液循环供其他器官直接利用。当脂肪组织发生 IR 时，游离脂肪酸被大量释放到血液中，引起血脂异常，加剧 IR 和 T2DM。其中，胰岛素信号通路受损是脂肪细胞产生 IR 的主要原因之一^[9,10]。因此，建立体外胰岛素抵抗模型有助于筛选改善胰岛素抵抗的药物或天然产物。

人参 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 是一种多年生的草本植物，具有抗疲劳、延缓衰老以及保护心血管等功效^[11]。在现代临床试验中证实了人参及提取物能够降低糖尿病患者的血糖，并改善葡萄糖耐受量^[12]。人参的主要活性成分为人参皂苷，研究表明原人参二醇类的 Rb1、Rg3、Rc、Rb2 和原人参三醇类的 Re、Rg1 具有增加胰岛素敏感性和降糖作用^[13]，而且 Rb1、Rg3、Rh1 对脂肪细胞的影响均有相关研究^[14,15]。

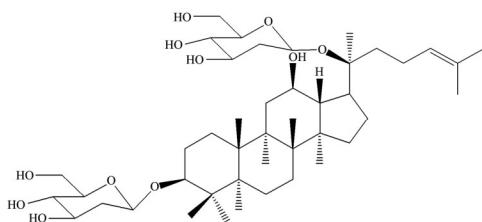


图1 人参皂苷 F2 结构图

Fig.1 Structure diagram of ginsenoside F2

人参皂苷 F2 (Ginsenoside F2, GF2) 在人参中含量较少，主要是通过 Rb1、Rg3、Rc、Rb2 等原人参二醇类皂苷经过生物转化^[16]后得到的产物^[17]，被证明

具有抗氧化^[18]、抗炎^[19]、抗癌^[20]、降脂^[21]等生物活性，但其对脂肪细胞葡萄糖摄取和降血糖的作用机制尚不明确。本研究通过 3T3-L1 脂肪细胞建立胰岛素抵抗模型，研究了 GF2 对糖吸收的影响，并进一步探讨 GF2 通过 PI3K/Akt 通路改善胰岛素抵抗的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞，武汉大学中国典型培养物保藏中心；GF2 (纯度>98%)，四川成都至纯本草生物科技有限公司。

磷酸盐缓冲液片剂 (PBS, pH=7.4)，美国 Amersco 公司；DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、青-链霉素双抗混合液，加拿大 Gibco 公司；罗格列酮 (RGZ)、二甲亚砜 (DMSO)、Trizol Reagent，美国 Sigma-Aldrich 公司；3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基-2-四氮唑溴盐 (MTT)，德国 Biofroxx 公司；BCA 蛋白定量试剂盒，中国上海爱必信生物科技有限公司；2-(N-(7-硝基苯-2-氧-1,3-二唑-4-基)氨基)-2-脱氧葡萄糖(2-NBDG)、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；Phospho-Akt 抗体 (#4060S)、Akt 抗体 (#9272S)、Phospho-PI3K 抗体 (#4228S)，美国 Cell Signaling Technology 公司；anti-rabbit IgG 抗体 (#ab6721)、anti-mouse IgG 抗体 (#ab6789)，美国 abcam 公司。

1.1.2 主要仪器设备

5414R 低温高速离心机，德国 Eppendorf 公司；HERACELL 150i CO₂ 培养箱，美国 Thermo Fisher 公司；IX71 倒置显微镜，日本 Olympus 公司；DM6B 荧光显微镜，瑞士 Leica 公司；HH-8 数显恒温水浴锅，江苏金坛市亿通电子有限公司；Infinite M200 Pro 酶标仪，瑞士 Tecan 公司；T100 Thermal Cycle PCR 仪，美国 Bio-Rad 公司；CPX connect 实时荧光定量 PCR 仪，美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分化

3T3-L1 前脂肪细胞在 37 °C、5% CO₂ 条件下用 DMEM 培养基(含有 10% FBS 和 1% 青-链霉素)培养, 细胞融合 90% 后, 用含 0.5 μmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、1 μmol/L 地塞米松 (DEX) 和 10 μg/mL 胰岛素的 DMEM 培养基诱导分化。2 d 后, 将分化培养基更换为含有 10 μg/mL 胰岛素的 DMEM 培养基继续维持培养, 每 2 d 更换一次培养基, 持续 4~6 d。

1.2.2 油红 O 染色

3T3-L1 前脂肪细胞以 2×10^4 cells/mL 的密度接种于 24 孔板 (500 μL/孔), 按照 1.2.1 方法诱导分化后, 3T3-L1 细胞用 PBS 洗涤, 并用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min。去除固定液后, 加入油红 O 染液, 置于 60 °C 烘箱避光染色 15 min, 最后水洗 2 次晾干, 于 IX71 倒置显微镜下观察拍照。

1.2.3 细胞活力的测定

3T3-L1 前脂肪细胞以 1×10^4 cells/mL 的密度接种在 96 孔板中, 过夜培养后吸弃培养基。以添加 12.5、25、50、100 μmol/L GF2 的 DMEM 培养基处理细胞, 同时设不含 GF2 为正常组; 在 37 °C, 5% CO₂ 条件下处理 24 h, 弃去上清液, 每孔加入 100 μL 用无血清 DMEM 配制的 0.5 mg/mL MTT 溶液, 孵育 4 h 后, 结束后每孔加入 100 μL MTT 终止液, 继续培养 16~20 h, 酶标仪在 550 nm 处测定各孔的吸光值。

1.2.4 胰岛素抵抗模型的建立

参照 Meng^[22] 和 PARK 等^[23] 的方法, 略有改进: 将分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞以 1×10^4 cells/mL 的密度接种于 96 孔透明底黑板中 (100 μL/孔), 在 37 °C, 5% CO₂ 条件下孵育, 待细胞融合 80% 左右, 将细胞分为对照组和模型组, 对照组用 DMEM 处理, 模型组用含有 1 μmol/L DEX 的 DMEM 处理, 48 h 后然后将培养基换成含有 100 μmol/L 2-(N-(7-硝基苯-2-氧-1,3-二唑-4-基)氨基)-2-脱氧葡萄糖 (2-NBDG) 的 PBS 在 37 °C 下处理 30 min, 结束后弃上清液, 用预冷的 PBS 漂洗 2 次, 酶标仪在 485/535 nm 下测定各组细胞的荧光强度。

1.2.5 胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞的糖摄取

按照 1.2.4 方法处建立胰岛素抵抗模型后, 实验分组及给药: 正常组和模型组: DMEM 培养基; 阳性药物组: 含 10 μmol/L 罗格列酮 (RGZ) 的 DMEM 培养

基; 药物组: 含 25 μmol/L GF2 的 DMEM 培养基、含 50 μmol/L GF2 的 DMEM 培养基、含 100 μmol/L GF2 的 DMEM 培养基; 置于 37 °C 细胞培养箱共同孵育 12 h 后, 弃掉培养基, 加入含有 100 μmol/L 2-NBDG 的 PBS 在 37 °C 下处理 30 min, 结束后弃上清液, 用预冷的 PBS 漂洗 2 次, 用酶标仪在 485/535 nm 下测定各组细胞的荧光强度。

1.2.6 RT-qPCR 检测 IRS-1 和 GLUT-4 mRNA 相对表达量

3T3-L1 脂肪细胞以 5×10^4 cells/mL 的密度接种于 6 孔板中, 按照 1.2.5 方法分组处理后, 去除培养液, 用预冷的 PBS 轻轻漂洗一遍后, 每孔加入 1 mL Trizol 裂解液吹打细胞至溶液清亮, 收集于 1.5 mL 离心管中。利用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 然后反转录合成 cDNA。根据 NCBI 数据库上的基因序列设计 IRS-1 和 GLUT-4 基因上下游引物序列, GAPDH 作为内参, 引物序列见表 1。按照 FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 试剂盒说明进行 RT-qPCR, 每组实验重复 3 次, 最后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

1.2.7 Western blot 检测 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白

在不同组的脂肪细胞中加入含磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 之后将样品离心 (4 °C, 12000 r/min, 15 min) 并收集上清液。用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。取 30 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转移到 PVDF 膜上后用 5% BSA 或 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 然后与各种一抗在 4 °C 孵育过夜。TTBS 洗涤 3 次后加入二抗, 室温摇床 2 h 后, 加入 eECL 发光液反应, 曝光后拍照分析。

1.3 统计分析

各组数据以平均值±标准差表示, 用 SPSS 23.0 统计软件进行分析, 采用单因素方差分析比较组间差异, 以 $p < 0.05$ 以为差异具有统计学意义。使用 Sigma Plot 10.0 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 细胞分化和油红 O 染色

表 1 RT-qPCR 所用引物序列

Table 1 Primers used in RT-qPCR

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
IRS-1	TTAACCCCATCAGACGCCAC	AGAGACGAAGATGCTGGTGC
GLUT-4	GTCGCTGACGCACTAGCTGA	CTGCCACAATGAACCAGGGA
GAPDH	CCATCTTCCAGGAGCGAGAC	GGTCATGAGCCCTTCCACAA

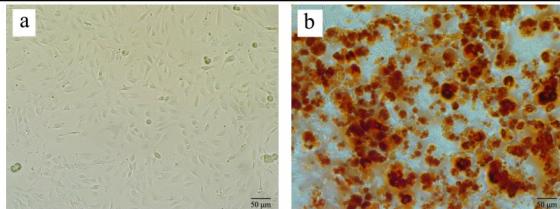


图 2 3T3-L1 脂肪细胞油红 O 染色 (200×)

Fig.2 Oil red O staining on 3T3-L1 cells (200×)

注: a: 3T3-L1 前脂肪细胞; b: 油红 O 染色成熟脂肪细胞。

脂肪细胞在 T2DM 中起着重要作用, 它既是脂肪组织的主要成分, 也是胰岛素抵抗的主要部位。前脂肪细胞具有增殖和分化能力, 建立的体外胰岛素抵抗模型常用于筛选胰岛素增敏剂药物作用的评价和研究以及相应的糖脂代谢作用^[24]。3T3-L1 前脂肪细胞在形态上呈典型的纺锤体型, 体积小, 细胞质中没有脂肪滴 (图 2a)。在分化的第 10 d, 细胞变大变圆, 而且细胞内出现大量脂肪滴, 分化成为成熟的脂肪细胞; 细胞用油红 O 染色, 脂滴被染为红色, 形成环状 (图 2b)。

2.2 GF2 对 3T3-L1 前脂肪细胞活力的影响

采用 MTT 法检测了 GF2 对 3T3-L1 前脂肪细胞活力的影响。由图 3 可知, GF2 浓度从 12.5 到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 3T3-L1 前脂肪细胞的活力无影响。结果表明在此浓度范围内 GF2 对 3T3-L1 脂肪细胞无显著毒性。

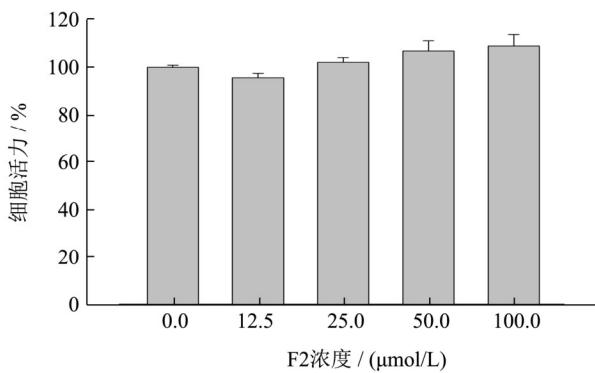


图 3 GF2 对 3T3-L1 前脂肪细胞活力的影响

Fig.3 Effect of GF2 on viability of 3T3-L1 preadipocytes

2.3 胰岛素抵抗模型的建立

胰岛素抵抗是 T2DM 的主要因素, 其主要特征是对胰岛素信号的响应减弱, 使目标组织中葡萄糖的摄取或利用降低^[25]。多项研究表明, DEX 是一种糖皮质激素类似物^[26], 能抑制 IRS-1 和 GLUT-4 的表达^[27], 从而抑制脂肪组织、肌肉组织和肝组织对葡萄糖的摄取, 进一步导致糖尿病症状加重。用 DEX 诱导 48 h 建立胰岛素抵抗模型, 并利用 2-NBDG 荧光探针检测

细胞的糖摄取, 平均荧光强度反映了细胞对葡萄糖的摄取量。由图 4 可知, 1 $\mu\text{mol/L}$ DEX 处理 48 h 后, DEX 诱导的模型组 2-NBDG 平均荧光强度显著低于正常组 ($p<0.05$), 降低了 34.17%, 表明细胞对葡萄糖的摄取能力受到抑制, 胰岛素抵抗模型建立成功。谢洁等^[28]的研究发现, 1 $\mu\text{mol/L}$ DEX 作用 24 h 和 48 h 均能诱导 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗, 同时指出该模型在 48 h 内稳定。王丽静等^[29]的研究表明, 100 nmol/L 和 1 $\mu\text{mol/L}$ DEX 诱导 48 h 后不但降低了 3T3-L1 脂肪细胞基础状态下的糖吸收, 还抑制了胰岛素刺激下葡萄糖的吸收, 产生胰岛素抵抗症状。

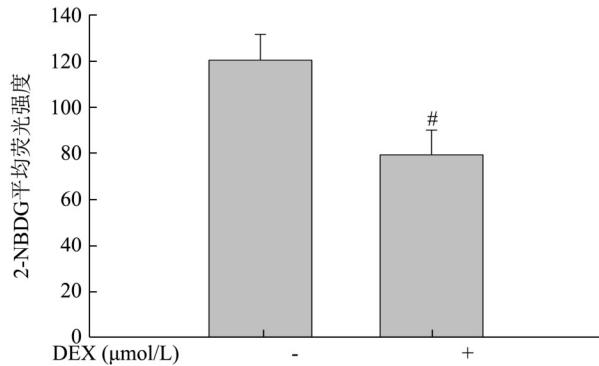


图 4 胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞模型的建立

Fig.4 The establishment of the insulin resistance model of 3T3-L1 adipocytes

注: +: 添加; -: 无添加。与正常组比较, $\#p<0.05$ 。

2.4 GF2 对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞糖摄取的影响

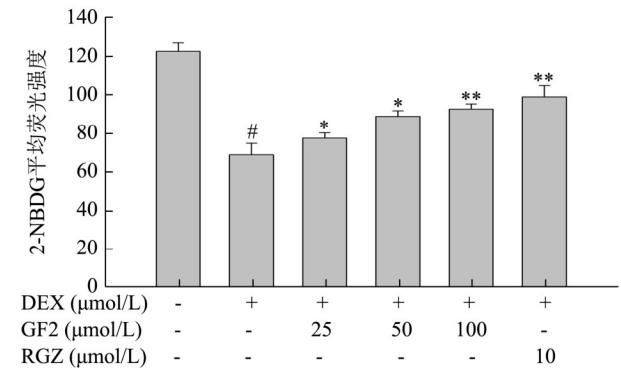


图 5 GF2 对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞 2-NBDG 摄取的影响

Fig.5 Effect of GF2 on 2-NBDG uptake in 3T3-L1 adipocytes with insulin resistance

注: +: 添加; -: 无添加。与正常组比较: $\#p<0.05$, $##p<0.01$; 与模型组比: * $p<0.05$, ** $p<0.01$; 下同。

不同浓度 GF2 (25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞糖摄取的影响如图 5 所示, GF2 和罗格列酮 (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理 12 h 后, 均显著增加细

胞对 2-NBDG 摄取 ($p<0.05$)；与模型组相比，阳性对照组的平均荧光强度增加了 43.82% ($p<0.01$)；25、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ GF2 荧光强度分别增加了 12.58%、29.07% 和 34.62% ($p<0.05$)，且 GF2 浓度越高，2-NBDG 荧光强度越强，GF2 呈现出剂量依赖性促进细胞对 2-NBDG 的摄取。

2.5 GF2 对葡萄糖转运蛋白表达的影响

不同组织细胞对葡萄糖的吸收主要依赖于 GLUTs。在脂肪细胞中，葡萄糖摄取可以由 GLUT-4 介导^[30]。由图 6 可知，模型组中 GLUT-4 mRNA 相对表达量极显著降低 ($p<0.01$)；50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ GF2 可显著增加 GLUT-4 mRNA 相对表达 ($p<0.01$)，分别高于模型组 1.58 倍和 2.94 倍；而 25 $\mu\text{mol/L}$ GF2 处理 12 h 对 GLUT-4 mRNA 表达无显著差异。Meng 等^[22]从体内和体外说明了来自桑叶中的黄酮类化合物可以显著增加 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型中的 GLUT-4 表达，并降低游离脂肪酸的表达，从而改善胰岛素抵抗模型中的代谢异常。Dwiyati 等^[31]研究发现姜黄通过增加 GLUT-4 表达和下调 PPAR- γ 表达改善 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖摄取，从而表现出降糖活性。

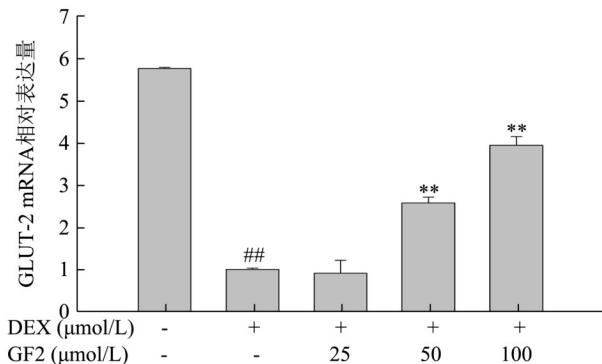


图 6 GF2 对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞 GLUT-4 基因表达的影响

Fig.6 Effect of GF2 on GLUT-4 mRNA in 3T3-L1 adipocytes with insulin resistance

2.6 GF2 对 IRS-1/PI3K/Akt 信号通路的影响

GF2 促进了 GLUT-4 mRNA 相对表达量，增加了胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞对葡萄糖的吸收。GLUT-4 对葡萄糖的摄取可以通过 PI3K 和 AMPK 两种途径激活^[32,33]，同时两种途径也可以激活 PI3K/Akt 信号通路和非典型蛋白激酶途径。这两种途径均可促进细胞对葡萄糖吸收^[34]。研究表明人参皂苷 Rg1 可激活 AMPK 和 PI3K/Akt 途径，并诱导 Akt 在丝氨酸 473 位点磷酸化，促进 GLUT-4 表达，增加 3T3-L1 脂肪细胞对葡萄糖的摄取^[35]；Rb1 激活胰岛素信号通路中的

Akt 蛋白，上调脂肪组织中 GLUT-1 和 GLUT-4 促进葡萄糖的摄取和消耗，改善 IR 和糖代谢异常^[13]；Rg3 和 Re 通过 IRS-1/PI3K 途径上调脂肪细胞中 GLUT-4 促进细胞对葡萄糖的摄取^[14]。Rg1、Rb1、Rg3、Re 等作为 GF2 的前体皂苷^[16]，通过不同的作用机制促进脂肪细胞对葡萄糖的摄取，从而改善 IR，因此我们推测 GF2 也具有降糖作用。另外有报道称在糖尿病患者中 IRS-1 表达降低^[36]，因此，为了进一步研究 GF2 对葡萄糖摄取的作用机制，检测了 PI3K/Akt 信号通路的激活。

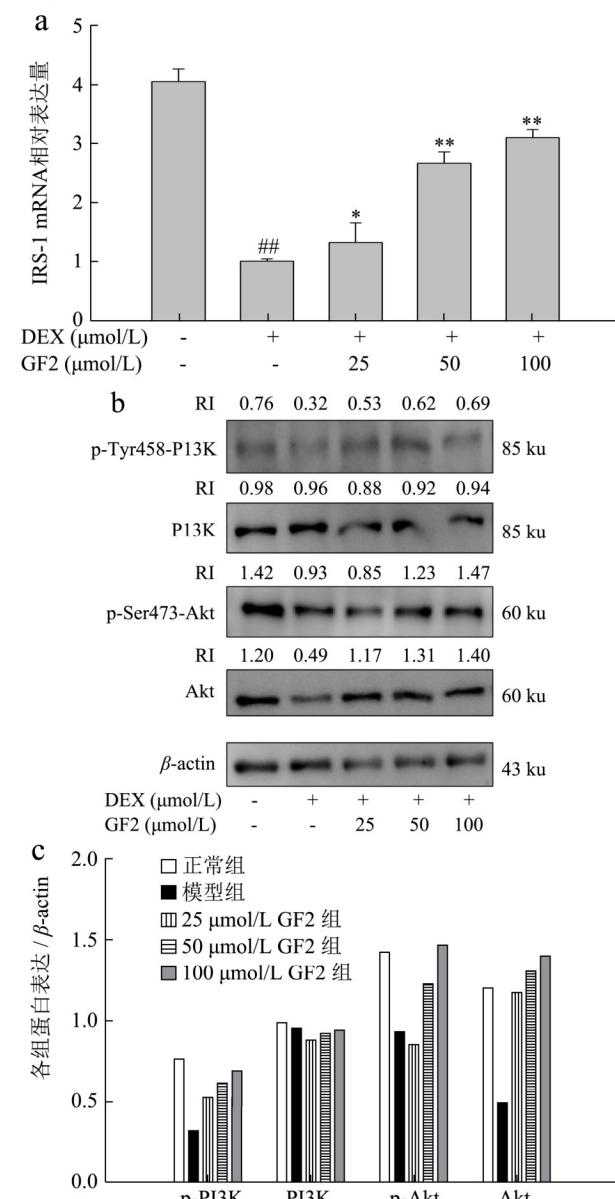


图 7 GF2 对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1/PI3K/Akt 信号通路的影响

Fig.7 Effect of GF2 on IRS-1/PI3K/Akt signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes with insulin resistance

注：a: IRS-1 mRNA 相对表达量；b: PI3K/Akt 信号通路蛋白表达水平，其中 RI 表示各组蛋白灰度与 β -actin 的比值。

图 7a 显示的是 GF2 对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1 表达的影响。经 DEX 诱导后, 模型组中 IRS-1 基因表达水平极显著低于正常组 ($p<0.01$), GF2 处理 12 h 后, 增加了 IRS-1 基因的表达 ($p<0.05$), 随着 GF2 剂量的增加, IRS-1 基因表达分别高于模型 0.33 倍、1.66 倍和 2.10 倍。IRS-1 包含酪氨酸磷酸化位点和丝氨酸/苏氨酸磷酸化位点, 在未被激活的情况下, IRS-1 上的丝氨酸处于磷酸化状态, 而在被胰岛素激活后, 酪氨酸磷酸化增强^[37]。当 IRS-1 酪氨酸磷酸化后, PI3K 和 Akt 被活化, 胰岛素信号通路被激活, 活化的 Akt 可促进葡萄糖转运蛋白向膜易位, 从而增加对葡萄糖代谢^[38]。

图 7b 为各组 p-PI3K、PI3K、p-Akt 和 Akt 蛋白表达水平, 其中 RI 为各组蛋白灰度与对应 β -actin 的比值。模型组中, DEX 抑制了 p-PI3K、p-Akt 和 Akt 的表达 ($p<0.05$); GF2 处理 12 h 后, 增加了胰岛素抵抗细胞中 PI3K 和 Akt 的磷酸化, 同时也促进了 Akt 的表达 ($p<0.05$)。Akt 磷酸化后可进一步诱导 GLUT-4 易位至质膜并促进葡萄糖吸收进入细胞^[39], 从而降低高血糖^[40]。结果表明, GF2 可增加胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞中的 IRS-1mRNA 的表达以及增强 PI3K/Akt 磷酸化, 激活 PI3K/Akt 信号通路。Jang 等^[41]研究表明东莨菪碱通过激活 PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路增加胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖摄取。

3 结论

人参皂苷 F2 通过增加胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞 GLUT-4 mRNA 的表达水平, 促进细胞对葡萄糖的摄取; 同时提高 IRS-1 mRNA 和 Akt 的表达水平, 并增加 PI3K 和 Akt 的磷酸化, 激活 PI3K/Akt 信号通路, 改善胰岛素抵抗。本研究结果初步表明人参皂苷 F2 具有调节糖脂代谢作用, 为开发预防糖尿病相关保健产品提供理论支撑。

参考文献

- [1] Lin Y, Sun Z J. Current views on type 2 diabetes [J]. Journal of Endocrinology, 2010, 204(1): 1-11
- [2] Virally M, Bickle J F, Girard J, et al. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives [J]. Diabetes and Metabolism, 2007, 33(4): 231-244
- [3] Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity [J]. Frontiers of Medicine, 2013, 7(1): 1-11
- [4] Keane K N, Cruzat V F, Carlessi R, et al. Molecular events linking oxidative stress and inflammation to insulin resistance and β -cell dysfunction [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015: 181643
- [5] Tsegyie Y. Obesity, Insulin resistance, and type 2 diabetes: associations and therapeutic implications [J]. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, 2020, 13: 3611-3616
- [6] Jou P C, Ho B Y, Hsu Y W, et al. The effect of monascus secondary polyketide metabolites, monascin and ankaflavin, on adipogenesis and lipolysis activity in 3T3-L1 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(24): 12703-12709
- [7] Guilherme A, Virbasius J V, Puri V, et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9(5): 367-77
- [8] Soares A F, Guichardant M, Cozzone D, et al. Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2005, 38(7): 882-889
- [9] Xia J Y, Morley T S, Scherer P E. The adipokine/ceramide axis: key aspects of insulin sensitization [J]. Biochimie, 2014, 96: 130-139
- [10] 伍明江, 张德芹, 李盼, 等. 桤柳黄素对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的影响及 AMPK 信号通路的作用机制[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(6): 953-960
WU Mingjiang, ZHANG Deqin, LI Pan, et al. Effect of tamarixetin on insulin resistance of 3T3-L1 fat cells and the mechanism of AMPK signaling pathway [J]. Natural Product Research and Development, 2020, 32(6): 953-960
- [11] 孙立伟, 李香艳, 赵大庆. 人参“大补元气”中医及生物学内涵研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(11): 1969-1974
SUN Liwei, LI Xiangyan, ZHAO Daqing. A research on the effects of reinforcing vital energy of *Panax Ginseng* based on traditional and modern studies [J]. World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine, 2016, 18(11): 1969-1974
- [12] Bang H, Kwak J H, Ahn H Y, et al. Korean red ginseng improves glucose control in subjects with impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, or newly diagnosed type 2 diabetes mellitus [J]. Journal of Medicinal Food, 2014, 17(1): 128-134
- [13] 尚文斌, 郭超, 赵娟, 等. 人参皂苷 Rb1 通过上调脂肪组织葡萄糖转运体促进葡萄糖消耗[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4448-4452

- SHANG Wenbin, GUO Chao, ZHAO Juan, et al. Ginsenoside Rb1 upregulates expressions of GLUTs to promote glucose consumption in adipocytes [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(22): 4448-4452
- [14] Lee O H, Lee H H, KIm J H, et al. Effect of ginsenosides Rg3 and Re on glucose transport in mature 3T3-L1 adipocytes [J]. *Phytotherapy Research*, 2011, 25(5): 768-773
- [15] Gu W, Kim K A, Kim D H. Ginsenoside Rh1 ameliorates high fat diet-induced obesity in mice by inhibiting adipocyte differentiation [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2013, 36(1): 102
- [16] 彭婕, 刘春莹, 陈双, 等. 原人参二醇类皂苷(PPD)在酶反应中转化动态及其产物稀有皂苷的制备[J]. 中草药, 2017, 1: 93-102
- PENG Jie, LIU Chunying, CHEN Shuang, et al. Protopanaxadiol ginsenosides dynamics in enzymatic reaction and preparation of rare ginsenosides [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2017, 1: 93-102
- [17] Zheng M M, Xu F X, Li Y J, et al. Study on transformation of ginsenosides in different methods [J]. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 1-10
- [18] Mao Q, Zhang P H, Wang Q, et al. Ginsenoside F2 induces apoptosis in humor gastric carcinoma cells through reactive oxygen species-mitochondria pathway and modulation of ASK-1/JNK signaling cascade *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2014, 21(4): 515-522
- [19] Siraj F M, Sathishkumar N, Kim Y J, et al. Ginsenoside F2 possesses anti-obesity activity via binding with PPAR γ and inhibiting adipocyte differentiation in the 3T3-L1 cell line [J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2015, 30(1): 9
- [20] Park S, Seo W, Eun H S, et al. Protective effects of ginsenoside F2 on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation in mice [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 478(4): 1713-1719
- [21] Kim D E, Chang B Y, Jeon B M, et al. SGL 121 attenuates nonalcoholic fatty liver disease through adjusting lipid metabolism through AMPK signaling pathway [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(12): 4534
- [22] Meng Q, Qi X, Chao Y, et al. IRS1/PI3K/AKT pathway signal involved in the regulation of glycolipid metabolic abnormalities by mulberry (*Morus alba* L.) leaf extracts in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Chinese Medicine*, 2020, 15(12): 426-430
- [23] Park J E, Park J Y, Seo Y, et al. A new chromanone isolated from *Portulaca oleracea* L. increases glucose uptake by stimulating GLUT4 translocation to the plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 123: 26-34
- [24] 聂绪强, 杨建文, 史海霞, 等. IR-3T3-L1 脂肪胰岛素抵抗细胞的建立[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(1): 103-108
- NIE Xuqiang, YANG Jianwe, SHI Haixia, et al. Establishment of a cell model of insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2015, 35(1): 103-108
- [25] Saad M F, Rewers M, Selby J, et al. Insulin resistance and hypertension: the insulin resistance atherosclerosis study [J]. *Hypertension: Journal of the American Heart Association*, 2004, 43(6): 1324-1331
- [26] Sangeetha K N, Shilpa K, Kumari P J, et al. Reversal of dexamethasone induced insulin resistance in 3T3L1 adipocytes by 3 β -taraxerol of *Mangifera indica* [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(3-4): 213-220
- [27] Haber R S, Weinstein S P. Role of glucose transporters in glucocorticoid-induced insulin resistance. GLUT4 isoform in rat skeletal muscle is not decreased by dexamethasone [J]. *Diabetes*, 1992, 41(6): 728-735
- [28] 谢洁, 杨瑞仪. 地塞米松体外诱导胰岛素抵抗细胞模型的建立[J]. 科技通报, 2015, 31(10): 31-33
- XIE Jie, YANG Ruiyi. Insulin resistance model induced dexamethasone *in vitro* cell [J]. *Bulletin of Science and Technology*, 2015, 31(10): 31-33
- [29] 王丽静, 张尉, 刘小莺, 等. 地塞米松诱导 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型的建立[J]. 福建医科大学学报, 2007, 3: 282-284
- WANG Lijing, ZHANG Wei, LIU Xiaoying, et al. The development of dexamethasone induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocyte [J]. *Journal of Fujian Medical University*, 2007, 3: 282-284
- [30] Bryant N J, Govers R, James D E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4 [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3(4): 267-277
- [31] Pujimulyani D, Yulianto W A, Setyowati A, et al. Hypoglycemic activity of *Curcuma mangga* Val. extract via modulation of GLUT4 and PPAR- γ mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Journal of Experimental Pharmacology*, 2020, 12: 363-369

- [32] Holmes B F, Kurth-kraczek E J, Winder W W. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle [J]. *Journal of Applied Physiology*, 1999, 87(5): 1990-1995
- [33] Chibalin A V, Yu M, Ryder J W, et al. Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(1): 38-43
- [34] Martin S S, Haruta T, Morris A J, et al. Activated phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to mediate actin rearrangement and GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(30): 17605-17608
- [35] Lee H M, Lee O H, Kim K J, et al. Ginsenoside Rg1 promotes glucose uptake through activated AMPK pathway in insulin-resistant muscle cells [J]. *Phytotherapy Research*, 2012, 26(7): 1017-1022
- [36] Min K, Ahn B Y, Ji S L, et al. The ginsenoside Rg3 has a stimulatory effect on insulin signaling in L6 myotubes [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2009, 389(1): 70-73
- [37] Weng L P, Smith W M, Brown J L, et al. PTEN inhibits insulin-stimulated MEK/MAPK activation and cell growth by blocking IRS-1 phosphorylation and IRS-1/Grb-2/Sos complex formation in a breast cancer model [J]. *Human Molecular Genetics*, 2001, 10(6): 605-616
- [38] Costa G, Francisco V, Lopes M C, et al. Intracellular signaling pathways modulated by phenolic compounds: application for new anti-inflammatory drugs discovery [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2012, 19(18): 25
- [39] Kanzaki M, Pessin J E. Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(45): 42436
- [40] Oku A, Nawano M, Ueta K, et al. Inhibitory effect of hyperglycemia on insulin-induced Akt/protein kinase B activation in skeletal muscle [J]. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 2001, 280(5): E816-824
- [41] Jang J H, Park J E, Han J S. Scopoletin increases glucose uptake through activation of PI3K and AMPK signaling pathway and improves insulin sensitivity in 3T3-L1 cells [J]. *Nutrition Research*, 2019, 74: 52-61

(上接第 117 页)

- [23] 刘影,李晓宇,杜小龙,等.不同涂膜处理对水蜜桃常温贮藏品质的影响[J].食品研究与开发,2019,40(12):1-5
LIU Ying, LI Xiaoyu, DU Xiaolong, et al. Effect of different coating treatments on quality of peach stored at room temperature [J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(12): 1-5
- [24] Petriccione M, De Sanctis F, Pasquariello M S, et al. The effect of chitosan coating on the quality and nutraceutical traits of sweet cherry during postharvest life [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2015, 8(2): 394-408
- [25] 李逸,王子鑫,韩延超,等.可降解包装膜的制备及在水蜜桃保鲜中的应用[J].包装工程,2019,40(23):23-31,10
LI Yi, WANG Zixin, HAN Yanchao, et al. Preparation and application of degradable film in peach preservation [J]. *Packaging Engineering*, 2019, 40(23): 23-31, 10
- [26] 马之胜,王越辉,贾云云,等.桃果实果胶、可溶性糖、可滴定酸含量和果实大小与果实硬度关系的研究[J].江西农业学报,2008,10:45-46
MA Shengzhi, WANG Yuehui, JIA Yunyun, et al. Study on the relationship between pectin, soluble sugar, titratable acid content, fruit size and fruit firmness in peach fruit [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2008, 10: 45-46
- [27] Miller W B, Langhans R W. Low temperature alters carbohydrate metabolism in easter lily bulbs [J]. *Hortscience*, 1990, 25 (4): 463-465
- [28] 周洲.柑桔成熟果实脱落期间生长素、乙烯和 IDA 肽的关系[J].中国果业信息,2021,38(2):60-61
ZHOU Zhou. Relationship between auxin ethylene and IDA peptide during abscission of citrus ripe fruit [J]. *China Fruit Industry Information*, 2021, 38(2): 60-61
- [29] 李金丽,黄少云,田学军,等.保鲜纸箱对油桃常温贮藏品质的影响[J].保鲜与加工,2018,18(1):21-25
LI Jinli, HUANG Shaoyun, TIAN Xuejun, et al. Effect of preservation carton on postharvest quality of nectarines at room temperature [J]. *Storage and Process*, 2018, 18(1): 21-25