

白藜芦醇对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞 葡萄糖代谢的影响

陈思凡¹, 柯梁汝², 郑琳¹, 单智铭², 周妮曼², 冯翔^{1,*}

(1. 中山大学公共卫生学院, 广东省营养膳食与健康重点实验室, 广东 广州 510089;

2. 中山大学中山医学院, 广东 广州 510089)

摘要: 目的: 研究白藜芦醇(resveratrol, Res)对胰岛素抵抗状态下 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖代谢的影响, 并探讨其分子机制。方法: 用地塞米松诱导 3T3-L1 细胞建立胰岛素抵抗模型, 用不同剂量 Res 进行干预, 添加或不添加胰岛素刺激, 测定各组细胞的葡萄糖消耗量, 实时荧光定量 PCR 检测各组细胞的脂联素(adiponectin)、瘦素(leptin)和抵抗素(resistin)mRNA 表达, Western blotting 检测腺苷酸激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)的蛋白质表达及磷酸化水平。结果: 各组细胞经胰岛素刺激, 0.01、0.1、1 μmol/L 的 Res 组的葡萄糖消耗量分别是对照组的 1.3、1.5、1.4 倍($P < 0.05$), 添加 Res 可促进脂联素、瘦素 mRNA 的表达, 降低抵抗素 mRNA 表达, 增加 AMPK α 的磷酸化水平。结论: Res 可以明显改善胰岛素抵抗状态下 3T3-L1 细胞葡萄糖代谢。其机制可能是通过增加脂联素、瘦素表达, 降低抵抗素表达从而介导 AMPK α 磷酸化实现的。

关键词: 白藜芦醇; 胰岛素抵抗; 脂联素; 瘦素; 抵抗素; 脂肪细胞; 糖代谢

Effect of Resveratrol on Glucose Metabolism in Insulin-resistant 3T3-L1 Adipocytes

CHEN Si-fan¹, KE Liang-ru², ZHENG Lin¹, SHAN Zhi-ming², ZHOU Ni-man², FENG Xiang^{1,*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Food, Nutrition and Health, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China; 2. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: Objective: To explore the effect and mechanism of resveratrol on glucose metabolism in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. Methods: Insulin-resistant model was established by the induction of dexamethasone in 3T3-L1 adipocytes. The glucose consumption of insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes with and without resveratrol stimulation was determined. The mRNA expression of leptin, adiponectin and resistin was determined by real time PCR, and the expression and phosphorylation of AMPK α were determined by Western blotting. Results: After insulin stimulation with the concentration of 0.01, 0.1 μmol/L and 1 μmol/L, resveratrol could increase the glucose consumption by 1.3, 1.5 folds and 1.4 folds compared with the control ($P < 0.05$). Meanwhile, resveratrol could increase mRNA expression of adiponectin and leptin and decrease mRNA expression of resistin. Moreover, resveratrol increased the phosphorylation of AMPK α . Conclusion: Resveratrol can improve glucose metabolism in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. The molecular mechanism may be the phosphorylation of AMPK α by increasing the expression of adiponectin and leptin and inhibiting the expression of resistin.

Key words: resveratrol; insulin resistance; adiponectin; leptin; resistin; fat cells; AMPK

中图分类号: Q946.8

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0285-04

白藜芦醇(resveratrol, Res)是一种多酚类化合物, 具有抗癌、抗氧化、抗菌、抗炎等作用, 可广泛地应用于医药、保健品、食品和化妆品等领域。研究表明, Res 对于组织和细胞能量代谢有广泛的影响, 可通

过增加葡萄糖转运子(glucose transporter, Glut)的表达来增加骨骼肌细胞的葡萄糖摄取^[1], 还可以减少脂肪细胞的脂质形成, 抑制前脂肪细胞向脂肪细胞分化^[2]。然而, 有关 Res 对于胰岛素抵抗状态下脂肪细胞的葡萄糖

收稿日期: 2010-03-22

基金项目: 广东省医学科研基金资助项目(A2010143)

作者简介: 陈思凡(1984—), 男, 硕士, 研究方向为营养与健康。E-mail: dishi1984@126.com

* 通信作者: 冯翔(1969—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为营养与健康。E-mail: fengx@mail.sysu.edu.cn

代谢的作用及机制研究相对较少。本实验选取 3T3-L1 脂肪细胞作为研究对象,旨在探讨 Res 对胰岛素抵抗状态下 3T3-L1 细胞葡萄糖代谢的作用及其机制。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

3T3-L1 细胞株,购自中国科学院上海细胞库。

白藜芦醇、1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤(IBMx)、地塞米松、合成人胰岛素 美国 Sigma 公司;高糖 DMEM 培养基、新生牛血清 美国 Gibco 公司;葡萄糖诊断试剂盒 瑞士 Roche 公司;Trizol 美国 Invitrogen 公司;Real time PCR 试剂盒 日本 TaKaRa 公司;兔抗 AMPK α 、AMPK α Thr172 单克隆抗体 美国 CST 公司;兔抗 GAPDH 单克隆抗体 Boster 公司;BCA 试剂盒、HRP 标记的抗兔二抗 Beyotime 公司。

1.2 方 法

1.2.1 3T3-L1 脂肪细胞的诱导分化

3T3-L1 前脂肪细胞接种于 6 孔培养板,待细胞汇合后接触抑制 48h,换用含 0.5mmol/L IBMx、1 μ mol/L 地塞米松、10mg/L 胰岛素的培养基培养 48h,然后换用含 10mg/L 胰岛素的培养基培养 48h,随后再换用 DMEM 培养基继续培养,每 2d 换液 1 次,培养 4d,90% 以上细胞分化为成熟脂肪细胞。

1.2.2 胰岛素抵抗模型的建立

对 3T3-L1 脂肪细胞进行分组,添加 1 μ mol/L 的地塞米松作为胰岛素抵抗模型组,培养 24h 后给予 100nmol/L 的胰岛素,刺激 15min 后取培养基,计算培养基中葡萄糖消耗量,与非胰岛素抵抗组(100nmol/L 胰岛素刺激 15min)对比,评价胰岛素抵抗的程度。

1.2.3 葡萄糖消耗量的测定

建立胰岛素抵抗模型后,分别添加 0、0.01、0.1、1 μ mol/L 的 Res,作用 24h,每个剂量组平行分为两组,给予或不给予 100nmol/L 的胰岛素刺激 15min,收集各组的培养基,按照葡萄糖诊断试剂盒说明书,在全自动生化分析仪上测定各实验组和原 DMEM 培养基的葡萄糖含量,葡萄糖消耗量为 DMEM 培养基葡萄糖量与实验组培养基葡萄糖量之差。以不加任何药物的组别为对照组,此组的葡萄糖消耗量设为 100,其他组与之相比。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测脂联素、瘦素和抵抗素 mRNA 表达

细胞经实验干预后用 Trizol 抽提细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA。RT 步骤:取 1g/L 的 RNA 1 μ L,分别加入 4 μ L 的 5 \times PrimeScriptTM Buffer、1 μ L 的 RT Enzyme Mix I、1 μ L 的 Oligo dT Primer、1 μ L 的 Random 6 mers,补充 13 μ L 的 DEPC 水,RT 反应液总体

积为 20 μ L,37 $^{\circ}$ C RT 15min,85 $^{\circ}$ C 5s 灭活反转录酶。RT 后以 cDNA 为模板进行扩增。PCR 步骤:取 2 μ L 的 cDNA 溶液,分别加入 10 μ L 的 2 \times SYBR Premix Ex TaqTM、0.4 μ L 的 Forward Primer、0.4 μ L 的 Reverse Primer、0.4 μ L 的 50 \times ROX Reference Dye II,补充 6.8 μ L 的 dH₂O,PCR 反应液总体积为 20 μ L。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30s,95 $^{\circ}$ C 5s 变性、55 $^{\circ}$ C 30s 退火、72 $^{\circ}$ C 30s 延伸,扩增 40 个循环。引物为:脂联素正义链 5'-GTC AGT GGA TCT GAC GAC ACC AA-3'、反义链 5'-ATG CCT GCC ATC CAA CCT G-3',PCR 产物 171bp;瘦素正义链 5'-CCA GGA TCA ATG ACA TTT CAC ACA C-3'、反义链 5'-AGG TCA TTG GCT ATC TGC AGC AC-3',PCR 产物 184bp;抵抗素正义链 5'-TTG GCT TAA ATT GCT GGA CAG TCT C-3'、反义链 5'-GGA AGC GAC CTG CAG CTT ACA-3',PCR 产物 191bp; β -actin 正义链 5'-CAT CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C-3'、反义链 5'-ATG GAG CCA CCG ATC CAC A-3',PCR 产物 171bp。Real time PCR 反应引物由 TaKaRa 公司设计并合成。用 Sequence Detection System 软件分析各组的循环阈值(Ct),通过计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 得出各组基因的相对表达水平。

1.2.5 Western blotting 检测 AMPK α 蛋白表达及磷酸化水平

用 NP-40 裂解细胞,提取细胞总蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量。灌制 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,恒压 120V、80mA 预电泳 10min,上样,进行 SDS-PAGE 电泳,半干式转移,5% 脱脂奶粉室温封闭 1h,一抗按照 1:1000 的稀释度于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗(1:5000)室温孵育 1h,暗房中滴加发光底物混合物 2mL 于膜上,用 X 光片曝光、显影、定影。

1.3 统计学处理

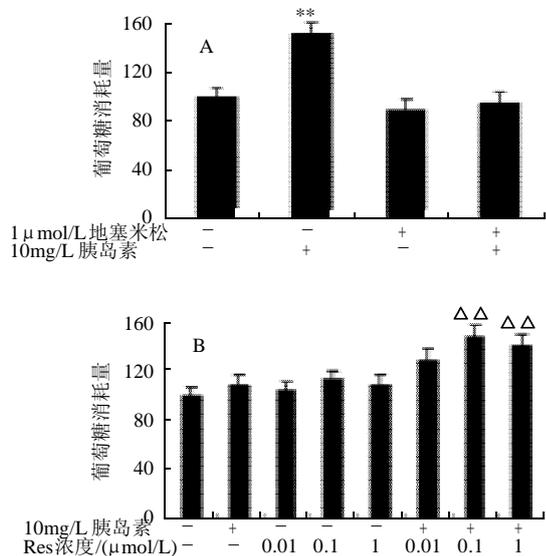
采用 SPSS 11.0 统计软件,各组比较采用单因素方差分析,组间比较用 Bonferroni 法,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 Res 对胰岛素抵抗状态下脂肪细胞葡萄糖消耗量的影响

正常状态下 3T3-L1 脂肪细胞经胰岛素刺激后,葡萄糖的消耗量极显著增加($P < 0.01$)。添加地塞米松后,加胰岛素刺激,与对照组相比,葡萄糖消耗量无明显变化,说明细胞出现胰岛素抵抗(图 1A)。用 0、0.01、0.1、1 μ mol/L 的 Res 处理胰岛素抵抗状态下的细胞,经胰岛素刺激后,各处理组与对照组比较,葡萄糖消耗量均显著增加($P < 0.05$),而未经胰岛素刺激,与对照

组比较, 0.1 μmol/L 处理组葡萄糖消耗量增加($P < 0.05$, 图 1B)。



- 无添加; + 添加。* 与对照组相比, 差异显著($P < 0.05$); ** 与对照组相比, 差异极显著($P < 0.01$)。Δ 与胰岛素添加组相比, 差异显著($P < 0.05$); ΔΔ 与胰岛素添加组相比, 差异极显著($P < 0.01$)。下同。

图 1 Res 对胰岛素抵抗状态下 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量的影响
Fig.1 Effect of resveratrol on glucose consumption of insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes

2.2 Res 对胰岛素抵抗状态下脂肪细胞脂联素、瘦素和抵抗素 mRNA 表达的影响

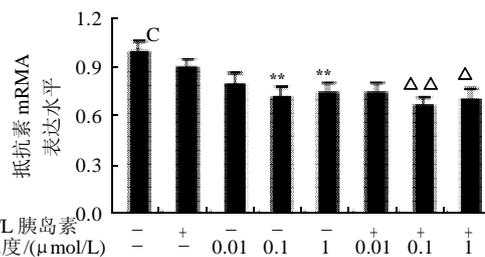
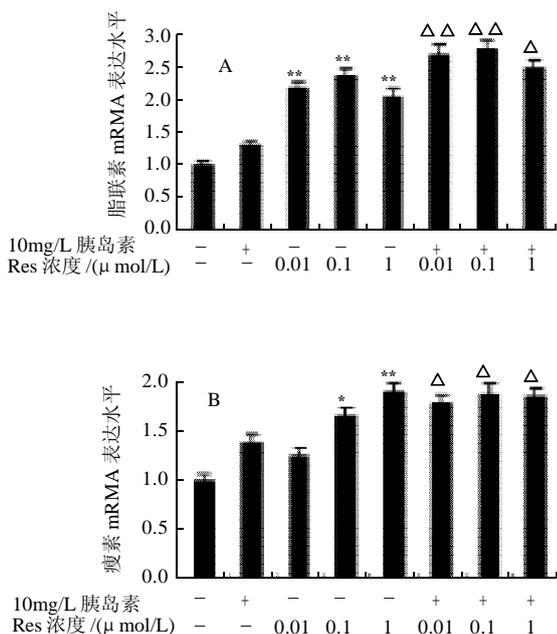


图 2 Res 对胰岛素抵抗状态下 3T3-L1 脂肪细胞脂联素、瘦素和抵抗素 mRNA 表达的影响

Fig.2 Effect of resveratrol on mRNA expression of adiponectin, leptin and resistin of insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes

由图 2 可知, 给予或不给予胰岛素刺激, 与相应的对照组比较, Res 组脂联素的 mRNA 表达均显著增加($P < 0.05$, 图 2A); 不给予胰岛素刺激, 与对照组比较, 0.1、1 μmol/L 的 Res 组瘦素的 mRNA 表达显著增加($P < 0.05$), 而给予胰岛素刺激, 3 个剂量组瘦素的 mRNA 表达均显著增加($P < 0.05$); 给予或不给予胰岛素刺激, 与对照组比较, 0.1、1 μmol/L 的 Res 组抵抗素的 mRNA 表达显著下降($P < 0.05$, 图 2C)。

2.3 Res 对胰岛素抵抗状态下脂肪细胞 AMPKα 蛋白表达及磷酸化水平的影响

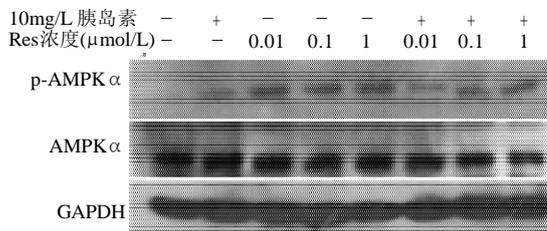


图 3 Res 对胰岛素抵抗状态下脂肪细胞 AMPKα 的蛋白表达及磷酸化水平的影响

Fig.3 Effect of resveratrol on the phosphorylation of AMPK α in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes

由图 3 可知, 给予或不给予胰岛素刺激, 与相应的对照组比较, Res 组的 p-AMPKα 表达升高, 即 AMPKα Thr172 的磷酸化水平增加, 而 AMPKα 的总蛋白表达无明显变化。

3 讨论

胰岛素与细胞膜上的胰岛素受体结合后, 激活受体的内源性酪氨酸激酶活性, 导致自身磷酸化和胰岛素受体底物(IRS)的酪氨酸磷酸化。活化的 IRS 可磷酸化下游的 PI3K 和 akt, 从而促进 Glut4 迁移到胞膜上介导组织细胞利用葡萄糖^[3]。体内和体外研究证明, Res 可以增

加依赖或非依赖胰岛素的葡萄糖转运^[4]，其机制尚不完全清楚。本实验结果显示，无论胰岛素存在与否，Res 均能增加胰岛素抵抗状态下 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖的摄取，但在有胰岛素刺激时，3 种浓度的 Res 组均正向促进葡萄糖转运，而在缺乏胰岛素刺激的条件下，只有 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 Res 组增加胰岛素抵抗状态下细胞葡萄糖的摄取，提示 Res 改善胰岛素抵抗状态下细胞的葡萄糖代谢可能通过 IRS-PI3K-akt- Glut4 通路，而且可能还存在其他不依赖胰岛素的通路，有待进一步的探讨。

脂联素、瘦素和抵抗素都是脂肪细胞分泌的因子。研究显示，脂联素可增加胰岛素的敏感性和脂肪组织的氧化，最终减少循环中脂肪酸水平和减少肝脏和脂肪细胞的 TG 水平^[5]，从而改善胰岛素抵抗。有研究证明，恒河猴自发展为 2 型糖尿病的过程中，脂联素含量下降，高胰岛素钳夹实验显示，随着胰岛素抵抗的加重，血中脂联素水平逐渐降低^[6]。本实验结果显示，无论胰岛素存在与否，Res 都可使胰岛素抵抗状态下的 3T3-L1 脂肪细胞脂联素的 mRNA 表达增加，提示 Res 可能通过增加脂联素的表达水平来改善胰岛素抵抗。

瘦素主要是由白色脂肪组织分泌的，且只有在成熟的脂肪细胞中才表达^[7]。瘦素通过中枢神经递质抑制食欲，促进糖脂代谢，参与多种内分泌激素的相互协调，以控制肥胖的发生发展^[8]。在对 3T3-L1 细胞的研究中发现，瘦素不能直接诱导脂肪细胞凋亡，但能直接抑制前脂肪细胞的成熟分化，减少细胞中的脂质堆积^[9]。本实验结果显示，Res 组瘦素 mRNA 表达增加，提示 Res 改善胰岛素抵抗可能与增加瘦素的表达有关。

抵抗素是由脂肪细胞分泌的多肽类激素。研究表明，在胰岛素抵抗的动物体内抵抗素水平明显高于正常个体，降低血清抵抗素水平能减少脂肪沉积，提高胰岛素的敏感性^[10]。抵抗素通过降低胰岛素刺激的葡萄糖摄取来降低脂肪细胞、骨骼肌细胞和肝细胞以及胰腺 β 细胞的胰岛素敏感性，诱导产生胰岛素抵抗。本实验结果显示，经过或不经胰岛素刺激，0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 的 Res 组抵抗素的 mRNA 表达都下降，因此推测 Res 改善胰岛素抵抗可能与下调抵抗素的表达有关。

AMPK 广泛存在于真核细胞中，属于丝/苏氨酸蛋白激酶家族成员，是一个异源三聚体，由具有催化作用的 α 亚基和具有调节作用的 β 和 γ 亚基构成， α 亚基对整个激酶的活性是必需的。当代谢性应激引起细胞内 AMP/ATP 比值升高时，AMPK 发生磷酸化并激活其下游靶分子，减少 ATP 的消耗和增加 ATP 的生成，即促进分解代谢；当 AMP/ATP 比值降低时，AMPK 则促进合成代谢。对 2 型糖尿病患者和正常对照组进行的体外实验显示，5-氨基-4-咪唑甲酰胺核苷酸(AICAR, AMPK 的激活剂)通过增加细胞表面 Glut4 含量，增加葡萄糖转运，这一过程依赖 AMPK 途径^[11]。在大鼠原代脂肪细胞中，脂联素可通过磷酸化 AMPK 和 ACC，促

进细胞摄取葡萄糖^[12]。在骨骼肌细胞中，瘦素可激活 AMPK $\alpha 2$ 亚单位的活性，加速脂肪酸氧化作用^[13]。抵抗素可通过抑制 AMPK 活性而作用于脂肪、肝脏及骨骼肌等胰岛素靶器官，促进肝糖输出，导致产生胰岛素抵抗^[14-15]。本实验结果显示，无论胰岛素存在与否，Res 都增加胰岛素抵抗状态下 3T3-L1 脂肪细胞 AMPK α 的磷酸化水平。提示 Res 可能通过增加细胞脂联素与瘦素的表达，减少抵抗素的表达，从而增加 AMPK α 磷酸化，活化 AMPK α 经或不经胰岛素信号转导通路(IRS-PI3K-akt)，促进 Glut4 的转位，增加葡萄糖转运，改善胰岛素抵抗。

综上所述，Res 增加胰岛素抵抗状态下 3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖代谢，改善其胰岛素抵抗。Res 可能通过增加脂联素和瘦素的表达并下调抵抗素的表达，进而增加 AMPK 的磷酸化水平，经过或不经胰岛素信号转导通路，增加葡萄糖摄取。本研究结果可为 Res 防治 2 型糖尿病及其他代谢综合征提供理论依据。

参考文献：

- [1] CUCCIOLLA V, BORRIELLO A, OLIVA A, et al. Resveratrol: from basic science to the clinic[J]. Cell Cycle, 2007, 6(20): 2495-2510.
- [2] PANG Weijun, SUN Shiduo, BAI Liang, et al. Effects of resveratrol on pig primary preadipocytes proliferation, differentiation and transcription expression of *Sirt1* gene[J]. Chin J Biotechnol, 2006, 22(5): 850-855.
- [3] PENDE M, KOZMA S C, JAQUET M, et al. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice[J]. Nature, 2000, 408(6815): 994-997.
- [4] DENG Jenying, HSIEH P S, HUANG Jiungpang, et al. Activation of estrogen receptor is crucial for resveratrol stimulating muscular glucose uptake via both insulin-dependent and independent pathways[J]. Diabetes, 2008, 57(7): 1814-1823.
- [5] BERG A H, COMBS T S, SCHERER P E. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism[J]. Trends Endocrinol Metab, 2002, 13(2): 84-89.
- [6] HOTTA K, FUNAHASHI T, BODKIN N L, et al. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesusmon-keys[J]. Diabetes, 2001, 50(5): 1126-1133.
- [7] 段刚, 许慕强, 张福平, 等. 糖尿病及肥胖患者血浆瘦素水平的检测[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(6): 831-855.
- [8] 宁鸿珍, 李清钊, 刘英莉, 等. 茶多酚对肥胖大鼠体重的影响及其与瘦素、血脂水平的关系[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 358-360.
- [9] AMBATI S, KIM H K, YANG J Y, et al. Effects of leptin on apoptosis and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes[J]. Biochem Pharmacol, 2007, 73(3): 378-384.
- [10] STEPPAN C M, BAILEY S T, BHAT S T, et al. The hormones resistin links obesity to diabetes[J]. Nature, 2001, 409(3): 307-312.
- [11] KOISTINEN H A, GALUSKA D, CHIBALIN A V, et al. 5-aminoimidazole 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.
- [12] WU Xiangdong, MOTOSHIMA H, MAHADEV K, et al. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes[J]. Diabetes, 2003, 52(6): 1355-1363.
- [13] MINOKOSHI Y, ALQUIER T, FURUKAWA N, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus[J]. Nature, 2004, 428(6982): 569-574.
- [14] PALANIVEL R, SWEENEY G. Regulation of fatty acid uptake and metabolism in L6 skeletal muscle cells by resistin[J]. FEBS Lett, 2005, 579(22): 5049-5054.
- [15] FILKOVA M, HALUZIK M, GAY S, et al. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies[J]. Clin Immunol, 2009, 133(2): 157-170.