

女贞苷通过激活 AMPK 促进脂联素的组装

郭文文¹, 张志杰², 李珍^{1*}

(1. 清华大学生命科学学院, 北京 100084; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**检测女贞苷对 AMPK[一磷酸腺苷激活的蛋白激酶, adenosine 5'-monophosphate(AMP)-activated protein kinase]的激活作用,探究其激活机制以及对脂联素高聚体组装的影响。**方法:**用一定浓度的女贞苷处理人胚肾细胞衍生株 293T 细胞,通过蛋白质印迹法检测 AMPK 磷酸化水平,通过 HPLC 检测细胞中 AMP 和 ATP(三磷酸腺苷, Adenosine 5'-triphosphate)的含量。用女贞苷处理 3T3-L1 脂肪细胞,检测其对脂联素组装的影响。**结果:**女贞苷能够使 293T 细胞中 AMPK 磷酸化水平升高。经过女贞苷处理后,细胞中 AMP 与 ATP 浓度的比值(AMP/ATP 比值)升高。当 AMPK 表达被沉默后,女贞苷对脂联素高聚体组装的促进作用被解除。**结论:**女贞苷能够通过提高细胞中 AMP/ATP 比值来激活 AMPK,进而促进脂联素高聚体的组装。

[关键词] 女贞苷; AMPK; 脂联素; AMP/ATP; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6;R942 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0018-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010018

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151118.1147.006.html>

[网络出版时间] 2015-11-18 11:47

Assembly of Adiponectin with Ligustroflavone by Activating AMPK

GUO Wen-wen¹, ZHANG Zhi-jie², LI Zhen^{1*}

(1. School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate activation mechanism of AMPK [adenosine 5'-monophosphate (AMP) -activated protein kinase] by ligustroflavone, and explore effect of ligustroflavone on assembly of adiponectin. **Method:** 293T cells were treated with ligustroflavone. AMPK phosphorylation and level of cellular AMP and ATP were examined by western blotting and high performance liquid chromatography (HPLC), respectively. 3T3-L1 adipocyte was treated by ligustroflavone and its effect on assembly of adiponectin was detected. **Result:** Ligustroflavone can activate AMPK and increase ratio of AMP/ATP in 293T cells. Ligustroflavone also can promote assembly of adiponectin multimers. **Conclusion:** Ligustroflavone activates AMPK by increasing ratio of AMP/ATP and promotes adiponectin multimerization by activating AMPK.

[Key words] ligustroflavone; AMPK; adiponectin; AMP/ATP; HPLC

AMPK[一磷酸腺苷激活的蛋白激酶, adenosine 5'-monophosphate(AMP)-activated protein kinase]广泛存在于真核细胞中,维持三磷酸腺苷(ATP)生成

和消耗的重要激酶^[1]。AMPK由 α, β, γ 异源三聚体组成,结构保守, α 亚基N端有一段保守的丝氨酸/苏氨酸激酶结构域。其中 α 亚基上的Thr172

[收稿日期] 20150520(001)

[基金项目] 国家基础科学人才培养基金项目(J1310020)

[第一作者] 郭文文,硕士,在读硕士,从事脂联素组装调控方面的研究, Tel:15652918827, E-mail: gwwuniversity@163.com

[通讯作者] *李珍,博士,副教授,从事脂联素多聚体的调控机制研究, Tel:010-62796919, E-mail: lizhen@mail.tsinghua.edu.cn

(172 号位的苏氨酸)为磷酸化位点,该位点被上游激酶磷酸化后,AMPK 被激活^[2]。

目前发现的 AMPK 激活剂根据作用方式不同,可大体分为 2 类:①直接激活剂,如 Abbott 实验室发现的 A-769662,通过与 AMPK 上不同于 AMP 结合位点的区域结合来激活 AMPK^[3];②间接激活剂,如盐酸小檗碱二甲双胍,通过抑制线粒体呼吸链上的复合体 I 降低 ATP 的浓度,提高细胞内 AMP/ATP 比值来间接激活 AMPK^[4-5]。

脂联素是由脂肪细胞合成与分泌的脂肪因子,在血浆中,脂联素主要以低聚体、中聚体和高聚体的形式存在^[6]。脂联素高聚体是发挥胰岛素敏感性功能的主要形式,其高聚化水平和糖尿病等代谢疾病相关,高聚体水平上升有助于提高葡萄糖耐受性和胰岛素敏感性^[7-9]。具有胰岛素增敏作用的药物能够增加血清中脂联素高聚体所占比例,临床上用于糖尿病的治疗^[10]。前期研究发现盐酸小檗碱能够通过激活 AMPK 来促进脂联素高聚体的组装,提升高聚体占脂联素总量的比例^[11]。因此,寻找 AMPK 的有效激活剂对于研发糖尿病药物具有重要意义。现代临床上,女贞子用于高血脂症、冠心病、高血压等疾病的治疗^[12-13]。本实验拟研究女贞苷激活 AMPK 的机制及其对脂联素高聚体组装的影响,为女贞苷作为潜在的治疗 II 型糖尿病的药物提供参考。

1 材料

1260 infinity 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),Scientz-II D 型超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物公司),DYCZ-24DN 型电泳仪(北京六一仪器厂),ELITE II 型二氧化碳恒温培养箱(Revco 公司)。女贞苷,盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111918-201102,037K1090,纯度依次为 88.6%,98.0%),人肾上皮细胞系 HEK293T(清华大学医学院常智杰教授实验室),3T3-L1 小鼠前体脂肪细胞(美国 ATCC 细胞中心),抗 AMPK 磷酸化和抗 AMPK 总量抗体(美国 Cell Signalling 公司),小干扰 RNA(siRNA,上海吉玛制药技术有限公司);抗 β -actin 的抗体,5'-ATP 二钠盐和 5'-AMP 二钠盐(批号分别为 SLBH6428V,BCBL4139V)均购自美国 Sigma 公司。

2 方法与结果

2.1 人肾上皮细胞系 HEK293T 细胞的培养和药物处理

普通培养基[DMEM(杜尔伯科改良伊格尔培养基)+10%胎牛血清+1%双抗]在 CO₂ 细胞培养

箱(5% CO₂,37 °C)培养 293T 细胞,24 h 更换培养基,待细胞密度达 90% 左右即可药物处理。处理细胞时,将女贞苷或盐酸小檗碱加入无血清的普通培养基[DMEM+0.5%不含脂肪酸牛血清白蛋白(BSA)+1%双抗]中培养 1 h 后收细胞。女贞苷、小檗碱的储备液浓度均为 50 mmol·L⁻¹。

2.2 3T3-L1 前体细胞的培养和分化

用普通培养基培养 3T3-L1 前体脂肪细胞,每 2 d 更换培养基,细胞长至 70% 左右即可传代。诱导 3T3-L1 前体细胞分化,用普通培养基培养其至汇合,接触抑制 48 h。换诱导分化培养基[普通培养基+0.5 mmol·L⁻¹1-甲基-3-异丁基黄嘌呤(IBMx)+1 μ mol·L⁻¹地塞米松(DEX)+5 mg·L⁻¹胰岛素]诱导分化 4 d(每 2 d 换液 1 次),换成维持液(普通培养基+5 mg·L⁻¹胰岛素)至其分化为成熟的脂肪细胞。

2.3 3T3-L1 成熟细胞的药物处理

3T3-L1 成熟细胞进行药物处理前,用无血清的普通培养基培养 24 h,加女贞苷处理 48 h 后收细胞。

2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹检测

293T 和 3T3-L1 细胞均用细胞裂解液[25 mmol·L⁻¹4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES),100 mmol·L⁻¹氯化钠,1%曲拉通 X-100(triton X-100),5 mmol·L⁻¹乙二胺四乙酸(EDTA),5 mmol·L⁻¹乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA),10%甘油,蛋白酶抑制剂,pH 7.5]裂解后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹法检测。对于 AMPK 磷酸化,AMPK 总量,肌动蛋白和脂联素总量的检测,均用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,样品用 β -巯基乙醇还原 30 min 并煮沸 5 min 变性处理。用 2%~15%梯度的非变性非还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测样品中脂联素各聚体(低聚体、中聚体和高聚体)。

2.5 HPLC 检测细胞中 ATP 和 AMP 的水平

将 5'-ATP 二钠盐和 5'-AMP 二钠盐对照品用水分别配成 1 g·L⁻¹的储备液,分别取 50 μ L 加至 900 μ L 水中制成混合对照品溶液,溶液中 2 种钠盐的质量浓度均为 50 mg·L⁻¹。色谱条件为 Phenomenex Synergi Hydro-RP 色谱柱(2.0 mm×150 mm,4 μ m),流动相 50 mmol·L⁻¹ K₂HPO₄/KH₂PO₄(pH 6.5),流速 0.5 mL·min⁻¹,进样量 10 μ L。

向收集的 293T 细胞样品中加入含有 1 mmol·L⁻¹ Na-EDTA 的 0.3 mol·L⁻¹高氯酸 500 μ L,充分混匀后在冰上超声裂解 4 min。离心(4 °C,12 000 ×g,5 min,下同),将上清液转移到新的离心管中,用 2 mol·L⁻¹氢氧化钾溶液 80 μ L 中和(pH 6~7),混

匀后在冰上放置 5 min,离心取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存^[12],得样品。

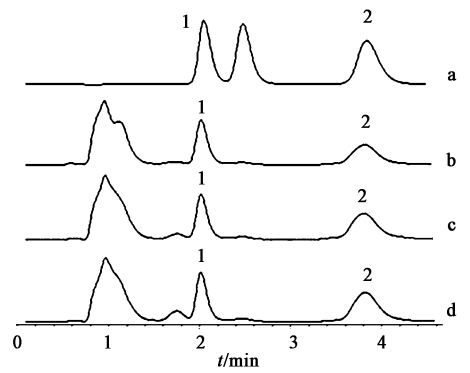
2.6 RNA 干扰(RNAi) 设计好的 siRNA 送公司合成,siRNA 转染参照 Lipofectamine 2000 脂质体转染说明书。诱导成熟的 3T3-L1 转染前 24 h 换无抗生素培养基培养细胞。分别用 Opti-MEM 减血清培养基稀释 siRNA 和转染试剂,各自轻混,室温放置 5 min。将稀释后的 siRNA 和转染试剂轻混,室温放置 20 min。将混合体系加入培养基中,4~6 h 换液,转染 48~72 h 收细胞。转染时需做阴性对照,AMPK 的 siRNA 序列为 5'-ACAUAUGCUGCAGGUGGA-3'。

2.7 数据处理及统计学分析 蛋白质印迹法条带分析采用 NIH Image J 图像分析软件。实验均至少重复 3 次。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间均数的比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析(两两比较采用 LSD 方法), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.7.1 女贞苷在 HEK293T 细胞中激活 AMPK 用 0,10,20,40,80,160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 女贞苷处理 293T 细胞 1 h,收取细胞裂解后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹,用 AMPK 磷酸化抗体检测细胞内 AMPK 磷酸化(pAMPK)水平,用 AMPK 抗体检测 AMPK 总量作为参照。使用 NIH Image J 软件对蛋白质印迹法得到的蛋白条带进行定量测定。将对照组 pAMPK/AMPK 的比值设定为 100%,以此为参照,计算试验组 pAMPK 的相对值分别为 100%,217%,256%,250%,178%,189%。结果显示随着女贞苷浓度的升高,293T 细胞内 AMPK 磷酸化水平逐渐升高。当女贞苷浓度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,AMPK 磷酸化水平达最高,约为对照组的 2.5 倍。

2.7.2 女贞苷提高 293T 细胞中 AMP/ATP 比值 研究表明盐酸小檗碱能通过抑制线粒体的功能,提高细胞 AMP/ATP 比值来激活 AMPK^[4]。采用盐酸小檗碱作阳性对照,研究女贞苷激活 AMPK 的机制。用 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 女贞苷处理 293T 细胞 1 h,超声裂解细胞。利用 HPLC 检测细胞内 ATP 和 AMP 含量,检测波长 254 nm,见图 1。与 AMPK 间接激活剂盐酸小檗碱类似,女贞苷处理 1 h 后的 293T 细胞 AMP 含量上升,ATP 含量下降。计算 AMP/ATP 比值,将对照组的比值设置为 1,以此为参照,计算试验组的相对值。女贞苷处理的细胞 AMP/ATP 比值上升,达 1.5,表明女贞苷是通过提高细胞中 AMP/ATP 比值激活 AMPK。

2.7.3 女贞苷促进 3T3-L1 细胞中脂联素高聚体的



a. 对照组;b. 空白样品;c. 女贞苷处理的样品;d. 盐酸小檗碱处理的样品;1. ATP;2. AMP

图 1 细胞中 ATP 和 AMP 的 HPLC

Fig.1 HPLC of ATP and AMP in cells

组装 研究发现盐酸小檗碱通过激活 AMPK 能促进 3T3-L1 细胞中脂联素高聚体的组装^[11]。检测女贞苷在 3T3-L1 脂肪细胞中对 AMPK 的激活情况,方法同 2.7.1 项。结果显示女贞苷对 AMPK 的激活效果明显。利用 0,2,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 女贞苷处理 3T3-L1 成熟脂肪细胞 48 h,裂解细胞进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹,通过抗脂联素 C 端球形结构域抗体检测脂联素各聚体,抗 N 端胶原蛋白样结构域抗体检测脂联素总量。脂联素高聚体/总量比值被普遍用于定量衡量脂联素的高聚化程度。对蛋白质印迹法得到的蛋白条带进行定量测定,计算各点高聚体/总量比值,将对照组比值设定为 1,以此为参照,计算试验组的相对值分别为 1,2,5。肌动蛋白为细胞管家基因表达,可做内参。结果发现随着女贞苷浓度的增加,脂联素高聚体的水平逐渐增加,而脂联素低聚体水平逐渐降低,总量也逐渐降低。脂联素高聚体/总量比值随着女贞苷的浓度增大而升高。说明与盐酸小檗碱类似,女贞苷能够促进 3T3-L1 细胞中脂联素高聚体的组装。

2.7.4 女贞苷通过激活 AMPK 促进脂联素的组装 为了证明女贞苷通过激活 AMPK 促进脂联素高聚体的组装,用特异性 AMPK α 1 siRNA 转染 3T3-L1 细胞 48 h,降低 3T3-L1 成熟脂肪细胞中 AMPK α 1 的表达,以非特异性 siRNA 作为对照。用 0,2,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 女贞苷处理 3T3-L1 成熟脂肪细胞 48 h。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹法检测脂联素及相关蛋白的表达。结果显示 AMPK α 1 的表达量比对照组明显减少。随着女贞苷浓度的增大,脂联素高聚体/总量比值分别为 1.0,1.2,1.1,不随女贞苷浓度的增加而发生显著变化。因此,抑制 AMPK α 1 的表达解除了女贞苷对脂联素组装的

促进作用。证明女贞苷可通过激活 AMPK 通路促进脂联素的组装。

3 讨论

本课题发现了一种新的 AMPK 激活剂。女贞苷作为女贞子的专属活性成分,对 AMPK 具有良好的激活效果,而且其促进脂联素组装的药物作用浓度较低,如果后续动物实验效果良好,有望进行临床药物的开发。另外,从传统药物筛选有用的单体活性成分,可为中药材开发和标准化研究提供重要经验。

激活 AMPK 促进脂联素高聚体的组装,脂联素的高聚化对于提高葡萄糖耐受性和胰岛素敏感性具有重要意义。因此,脂联素的组装调控一直是研究的热点和难点,临床上一直致力于寻找有效的 AMPK 激活剂,用于治疗糖尿病等相关代谢疾病。目前市场上某些治疗 II 型糖尿病的药物均为 AMPK 激活剂,如二甲双胍和罗格列酮^[3],但这些药物一般具有副作用,二甲双胍会引起维生素缺乏、肠胃问题、乳酸中毒等副作用,罗格列酮可能会致使患者心力衰竭^[14-15]。因此,寻找新的能降低胰岛素抵抗且副作用很小的 AMPK 激活剂具有重要意义。通过研究 AMPK 的激活机制,能够为发现或设计新的副作用更小的 AMPK 激活剂。

AMPK 是机体的能量平衡器。当身体能量缺乏(ATP 被大量分解产生 AMP 或 ADP)时,细胞中浓度升高的 AMP 会激活 AMPK,启动分解代谢反应重新合成 ATP。细胞就是通过感应 AMP 与 ATP 的相对变化来调节 AMPK 的活性。因此实际研究中通常把 AMP/ATP 比值的变化作为 AMPK 活性调控的参考指标。盐酸小檗碱是本实验室已经发现的 AMPK 激活剂,激活效果显著,且也是来自传统中药的活性成分。在药物用量、处理方法和处理时间上,盐酸小檗碱和女贞苷的差别不大,非常适合作为阳性对照。

[参考文献]

[1] Yeh L A, Lee K H, Kim K H. Regulation of rat liver acetyl-CoA carboxylase. Regulation of phosphorylation and inactivation of acetyl-CoA carboxylase by the adenylate energy charge [J]. J Biol Chem, 1980, 255 (6): 2308-2314.

[2] Winder W W, Hardie D G. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch; Possible roles in Type 2 diabetes [J]. Am J Physiol-Endoc M, 1999, 277 (1): 1-10.

[3] Cool B, Zinker B, Chiou W, et al. Identification and

characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome [J]. Cell Metab, 2006, 3 (6): 403-416.

[4] Turner N, Li J Y, Gosby A, et al. Berberine and its more biologically available derivative dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I; a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action [J]. Diabetes, 2008, 57 (5): 1414-1418.

[5] Owen M R, Doran E, Halestrap A P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain [J]. Biochem J, 2000, 348 (3): 607-614.

[6] Waki H, Yamauchi T, Kamon J, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (41): 40352-40363.

[7] Liu M, Liu F. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin [J]. Biochem J, 2010, 425 (1): 41-52.

[8] Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome [J]. J Clin Invest, 2006, 116 (7): 1784-1792.

[9] Scherer P E. Adipose tissue: From lipid storage compartment to endocrine organ [J]. Diabetes, 2006, 55 (6): 1537-1545.

[10] Pajvani U B, Hawkins M, Combs T P, et al. Complex Distribution, Not Absolute Amount of Adiponectin, Correlates with Thiazolidinedione-mediated Improvement in Insulin Sensitivity [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (13): 12152-12162.

[11] Li Y, Wang P, Zhuang Y, et al. Activation of AMPK by berberine promotes adiponectin multimerization in 3T3-L1 adipocytes [J]. FEBS Lett, 2011, 585 (12): 1735-1740.

[12] 黄雯, 苏子仁, 毕文川, 等. HPLC 法测定女贞子药材中女贞苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29 (5): 824-826.

[13] 封丽彬. HPLC 测定生新发胶囊中特女贞苷的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20 (12): 54-55.

[14] Bennett W L, Maruthur N M, Singh S, et al. Comparative effectiveness and safety of medications for type 2 diabetes: An update including new drugs and 2-drug combinations [J]. Ann Intern Med, 2011, 154 (9): 602-676.

[15] Anne C T, Emmanuelle R S, Knoppers B M. Trends in ethical and legal frameworks for the use of human biobanks [J]. Eur Respir J, 2007, 30 (2): 373-382.

[责任编辑 刘德文]