

基于网络药理学和体外实验验证探讨 吲哚-3-甲醇治疗肥胖的作用机制

古丽若依·帕尔哈提¹, 毛旭文², 程路峰^{1*}

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011;

2. 新疆医科大学新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的:根据分子对接技术与网络药理学初步预测出吲哚-3-甲醇作用的靶点和相关信号通路,再通过体外实验来验证网络药理学与分子对接技术得出的结果。方法:利用SwissTargetPrediction成分靶点预测数据库及查阅文献获得吲哚-3-甲醇的药理作用相关的靶点;利用在线人类孟德尔遗传病数据库(OMIM)、基因数据库(GeneCards)、毒性与基因比较数据库(CTD)取得与肥胖相关的靶点;在通过STRING数据库得到吲哚-3-甲醇-肥胖靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图;通过Cytoscape 3.8.2软件进行筛选和分析;利用DAVID 6.8数据库对药物-疾病交集靶点进行基因本体(GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。通过AutoDock vina 1.1.2软件对吲哚-3-甲醇和疾病靶点进行分子对接;最后通过体外实验验证了药物抗肥胖的作用。结果:预测结果得出吲哚-3-甲醇与肥胖共同靶点有80个,包括基质金属蛋白酶(MMP)-9、Janus激酶(JAK)2等;KEGG富集分析结果显示吲哚-3-甲醇治疗肥胖主要作用于肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路、酪氨酸激酶受体2(ErbB2)、VEGF等信号通路;分子对接显示吲哚-3-甲醇与肥胖相关蛋白(FTO)受体表现出良好的对接活性;体外蛋白免疫印迹、噻唑蓝(MTT)和油红O染色结果表明,不同剂量的吲哚-3-甲醇能有效抑制3T3-L1细胞内FTO蛋白的表达($P<0.05$)。结论:吲哚-3-甲醇治疗肥胖的作用机制可能与抑制FTO蛋白表达有关,进而与抑制脂肪细胞增殖能力有关。该研究为吲哚-3-甲醇抗肥胖提供了基本实验依据。

[关键词] 吲哚-3-甲醇; 肥胖; 网络药理学; 分子对接; 体外验证

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)07-0126-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221217 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220719.1043.003.html>

[网络出版日期] 2022-07-20 09:27:11

Mechanism of Indole-3-Methanol in Treatment of Obesity Based on Network Pharmacology and *in Vitro* Experiment

Guliruoyi·Paerhati¹, MAO Xuwen², CHENG Lufeng^{1*}

(1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Xinjiang Key Laboratory of Natural Drug Active Components and Drug Release Technology, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To preliminarily predict the targets and signaling pathways of indole-3-methanol in the treatment of obesity based on molecular docking technology and network pharmacology, and then verify the prediction results by the experiment *in vitro*. **Method:** The pharmacological targets of indole-3-methanol were obtained from SwissTargetPrediction and literature review. Obesity-related targets were obtained from Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), GeneCards, and Comparative Toxicogenomics Database (CTD). The protein-protein interaction network of the targets of indole-3-methanol and obesity was built by

[收稿日期] 2021-12-14

[基金项目] 新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室项目(XJDX1713)

[第一作者] 古丽若依·帕尔哈提,在读硕士,从事心血管药理研究工作,E-mail:1276086782@qq.com

[通信作者] *程路峰,博士,教授,博士生导师,从事心血管药理研发工作,E-mail:lewis_clf@163.com

STRING. Cytoscape 3.8.2 was used for target screening. Gene ontology (GO) functional annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment were performed for the common targets shared by obesity and indole-3-methanol in DAVID 6.8. AutoDock Vina 1.1.2 was employed to perform the molecular docking between indole-3-methanol and disease targets. Finally, the *in vitro* experiment was carried out to verify the anti-obesity effect of indole-3-methanol. **Result:** Indole-3-methanol and obesity shared 80 common targets, which included matrix metalloproteinase (MMP)-9, Janus kinase (JAK) 2, etc. KEGG enrichment predicted that indole-3-methanol mainly acted on tumor necrosis factor (TNF), vascular endothelial growth factor (VEGF), tyrosine kinase receptor 2 (ErbB2), and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways in the treatment of obesity. Molecular docking showed that indole-3-methanol had good binding activity with fat mass and obesity-associated protein (FTO). The results of Western blot, MTT assay, and oil-red O staining showed that indole-3-methanol down-regulated the expression of FTO in 3T3-L1 cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** Indole-3-methanol may treat obesity by down-regulating the expression of FTO protein and further inhibiting adipocyte proliferation. This study provides an experimental basis for deciphering the anti-obesity mechanism of indole-3-methanol.

[Keywords] indole-3-methanol; obesity; network pharmacology; molecular docking; *in vitro* validation

近年来世界卫生组织所公布的统计资料表明, 现世界上大约有 19 亿成年人属超重群体, 其中 6.5 亿人归于肥胖群体, 占总世界人口的 13%^[1]。西医一般认为肥胖是导致许多代谢性病症的主要原因之一, 如高血糖、动脉粥样硬化、高血压、脂类代谢障碍等^[2]。有报道认为肥胖是由于遗传因素及环境因素共同作用下导致机体能量代谢失衡。中医学上认定为肥胖症是以气虚痰湿偏盛为主要发生原因, 由此导致人体脂肪积聚过多, 体质量异常增加, 同时伴随头昏疲乏、神疲懒语、少动持续时间减少等表现的一种疾病^[3]。中医认为肥胖症的病机实为肾虚标实, 本为气虚, 标为湿、痰、脂, 临床上当据证而辨, 辨证论治^[4]。

吴学敏等^[5]在小陷胸汤里加决明子、车前子、葶苈子、莱菔子、芫蔚子组成 1 个新的加味小陷胸汤方剂从而达到糖脂肥其平衡治疗效果。科学研究已证实, 决明子有降血糖、降血脂、降高压、通便及护肝等功效^[6]。车前子中的主要有效成分是由种皮中的黏液物质和多糖类化合物所构成的, 其有防传染、降血糖、降血脂和调节免疫力等功能药理作用^[7]。研究表明, 葶苈子中的葶苈子醇萃取产物、卞基芥子油和南葶苈子油, 共同有抗肿瘤、强心、降脂等作用^[8]。科学研究已经证实, 芫蔚子的主要提取物有紧缩子宫、降血压、调血脂和抗氧化的功能, 所以在临床上也可用来防治心血管疾病、妇科疾病、脑动脉硬化等^[9]。莱菔子在药用中多用来消食除胀、降气化痰, 因为其有抗氧化、降压、降脂、抗癌、抑菌、改善胃肠道动力等多种药理作用^[10]。

研究表明, 莱菔子主要是由生物碱、硫代葡萄糖苷、异硫氰酸盐类、黄酮提取物及挥发油类等化学物质组成^[10]。文献中报道, 吡咯-3-甲醇(I3C)为吡咯族硫苷中的 3-吡咯甲基硫苷的降解物质^[11]。莱菔子中富含 I3C, 具有很强的抗癌功能, 如结肠癌、乳腺癌等。研究发现食用富含 I3C 饮食可以使肠道干细胞增殖正常化, 促进其进一步分化出肠上皮细胞和杯状细胞, 增加紧密连接蛋白表达, 促进肠屏障完整性, 预防结肠癌的发生发展。结肠炎模型小鼠通过食用富含 I3C 的西蓝花调节肠道菌群显著改善结肠炎症状^[12]。由于肥胖患者机体长期摄入营养物质不均衡造成肠道微生态环境失调, 宿主肠屏障功能减弱, 肠内巨噬细胞对菌群刺激过度应答, 引发肠道炎症^[13-14]。因此推测 I3C 可能通过改善肠道炎症、增强肠屏障来发挥抗肥胖的作用, 故通过网络药理学预测 I3C 治疗肥胖的作用及其作用靶点。课题组前期初步研究发现 I3C 可以抑制脂肪细胞 3T3-L1 细胞增殖, 但对 I3C 治疗肥胖作用机制靶点有待深入研究。

肥胖相关蛋白(FTO)是调节质量与脂肪摄入量的重要因素之一, 其参与了肥胖的发生与发展^[15]。位于人类染色体 16q12.2 上的 FTO 蛋白, 长度约为 430 kbp, 共含有 9 个外显子, A 等位基因位于基因 rs9939609 位点上能使人体质量指数(BMI)水平提高, 从而增高患 2 型糖尿病的风险。FTO 主要通过调节脂肪形成过程中调节脂肪形成而参与脂肪积累^[16], 抑制 FTO 或 FTO 突变可导致体质量和脂肪堆积减少^[17-18]。相反, 过表达 FTO 会导致体质量和脂

放量增加。本研究通过网络药理学和分子对接技术预测出I3C治疗肥胖的可能作用机制,通过体外实验验证了I3C对FTO蛋白表达的影响,探讨其在预防或治疗肥胖的作用靶点,可为I3C的开发利用提供理论依据。

1 方法

1.1 I3C靶点预测 通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库, SwissTargetPrediction (<http://www.SwissTargetPrediction.ch/>) 平台,预测出与I3C所对应的作用靶位。把药效靶位图导入到 Cytoscape 3.8.2 程序,可以建立“药品-作用靶点”的网络图。

1.2 肥胖疾病靶点的预测 通过 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、在线的人体孟德尔遗传病资料库 (OMIM, <http://omim.org/>) 和 CTD (<http://ctdbase.org/>) 资料库等,以“Fat”为基础搜索词条,对肥胖靶位进行收集和收集,以发现疾病的新靶位。在利过 Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 等在线工具可以绘出韦恩图,从而获得 I3C 和肥胖的交集靶点。

1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络建立与核心靶点检测 使用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 分析一点二项中所得到的交集治疗靶位点数据,将结果存储为 *tsv 格式文档,并输入 Cytoscape 3.8.2 应用软件中,并使用“Network Analyzer”的功能对 PPI 结果加以解析,从而建立了 PPI 网络系统,并使用 Cytoscape 3.8.2 应用软件中检测出了核心靶位点。

1.4 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)生物富集分析 鉴于 DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库,过滤要求为 $P < 0.05$,对交集靶点提供了 GO 功能注释和 KEGG 通路富集解析。在中国通过微生信的在线平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 将 KEGG 通路富集结果绘成气泡图像。

1.5 药物-核心靶点的分子对接验证 I3C 的 2D 结构从有机小分子生物活性数据库 (PubChem) 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载后所存储的“SDF”格式,利用 Open Babel 软件将其“SDF”格式转换为“MOL2”格式。FTO 靶点的 3D 结构可以从 RCSB PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 中存储的“PDB”格式,可以直接利用 PyMOL 软件对蛋白质实现了预处理;利用 AutoDock vina 1.1.2 软件系统,检验目标物质和靶蛋白间的相互亲和力和融

合模式,并选择结合能小的对接模型(结合能等于零,可视为配体与受体蛋白能自发的融合,通常以结合能 $\leq -5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($1 \text{ cal} \approx 4.186 \text{ J}$) 当作评价准则,检测功能靶点蛋白)。

2 I3C抗肥胖的体外验证

2.1 试药 I3C (纯度 97%,沸点 267.28 °C,熔点 96~99 °C,储存条件 2~8 °C,上海源叶生物,批号 S49927);胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号分别为 10270106、25200056);高糖 DMEM (美国 Hyclon 公司,批号 SH30243.01);噻唑蓝 (MTT,质量浓度 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、FTO 抗体、油红 O 染色试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、4×蛋白质上样缓冲液、脱脂奶粉、ECL 化学发光试剂(索莱宝科技有限公司,批号分别为 M1025-1ml、BS-7056R、G1262、P1200、P1016、D8340、SW2020),Marker (兰杰柯科技有限公司,批号 BL750B),奥利司他胶囊(舒尔佳,山东新时代药业有限公司,批号 H20143118);二甲基亚砜 (DMSO,美国 Sigma 公司,批号 D8371)。3T3-L1 前脂肪细胞(武汉普诺赛细胞资源库,批号 CL-0006)。

2.2 仪器 Galaxy 170R 型细胞培养箱、Multiskan 型全自动酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司); Nanodrop 2000/2000C 型分光光度计(美国 Thermo Fisher 科技公司);Br4i 型离心机(美国 Jouan 公司);AE31 型荧光倒置显微镜(中国麦克迪奥公司);SK-O180E 型摇床(美国 Scilogex 公司);GL-88B 型涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);PowerPac 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);FluorChem E Alpha 化学发光凝胶成像系统(美国 ProteinSimple 公司)。

2.3 细胞培养 3T3-L1 前脂肪细胞,使用含有 10% 胎牛血清高糖 DMEM 于 37 °C、5% CO_2 恒温箱中培养。

2.4 细胞增殖检测 将 3T3-L1 前脂肪细胞复苏后,培养条件为 DMEM 高糖培养基加 10% 胎牛血清在 37 °C、5% CO_2 恒温箱中培养,于隔日用胰酶消化传代,取对数生长期细胞做实验。3T3-L1 前脂肪细胞随机分为空白组和不同浓度 I3C 组 (10、25、50、100、200、300、400、500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及阳性药奥利司他组 (150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 干预 48 h。48 h 后换完全培养液 180 μL ,加入 MTT 后反应 4 h,弃去各孔中的液体再加入 DMSO 150 μL 摇床室温震荡 10 min。酶标仪 450 nm 下检测。

2.5 I3C 对 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化的影响 含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液培养 2 d,

细胞贴壁达到100%后。加入含10 mg·L⁻¹胰岛素、0.5 mmol·L⁻¹ IBMX、1 μmol·L⁻¹ DEX的完全培养液(即细胞初级诱导液),同时加入68.18 μmol·L⁻¹ I3C溶液与150 μmol·L⁻¹ 奥利司他溶液,同时设置空白组。培养2 d后,换只含10 mg·L⁻¹胰岛素的完全培养液,培养2~4 d。换用完全培养液培养4 d,直到分化结束,80%左右细胞已经分化为成熟的脂肪细胞。每孔加入磷酸盐缓冲液(PBS)1 mL洗去残余培养基。弃去PBS,每孔加入固定液1 mL,静置45 min后弃去固定液后用PBS清洗细胞2次,放置30 min,每孔加入油红O染料500 μL,静置60 min后,在弃去油红O溶液,用60%异丙醇洗涤细胞2次,再用双蒸水清洗3~4次后,置于显微镜下观察并拍照。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot) 将细胞裂解液和蛋白酶抑制剂加入各个培养皿中充分裂解细胞在冰上静置30 min。用细胞刮刀将细胞从培养皿底部刮下并收集至EP管中。4℃离心12 000 r·min⁻¹ 20 min得到细胞裂解蛋白上清液,并检测蛋白浓度。每个样本取蛋白样品50 μg,加入5×上样缓冲液,金属浴锅95℃加热变性10 min后常温12 000 r·min⁻¹ 高速离心1 min后取上清液上样。

将SDS-PAGE胶垂直固定于电泳槽内,灌注足量Running buffer,总蛋白20 μg样本体积上样,连接电泳仪,以80 V稳压进行上层浓缩胶电泳。根据预染Marker判断目的蛋白大小位置的蛋白电泳至PAGE胶中部时可以终止电泳、转膜、将转膜后的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜取出,脱色、摇床上用5%脱脂牛奶内封闭1 h,根据待检测的目标蛋白大小,参照预染Marker将PVDF膜裁剪分开。用FTO抗体配制一抗稀释液(1:5 000)加入PVDF膜孵育盒中,在4℃摇摆摇床孵育过夜。回收一抗后,再在摇摆摇床上用PBST洗涤5 min 3次。用二抗包被PVDF膜,室温摇床孵育1 h, PBST洗涤5 min 3次。将PVDF膜放入化学发光凝胶成像分析仪,拍照、分析蛋白条带图像。

2.7 统计学处理 采用GraphPad软件解析,所有数据都以 $\bar{x}\pm s$ 显示,各组之间的对比使用单因素方差分析,而二组之间对比使用*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 I3C潜在作用靶点预测结果 通过PubChem数据库和SwissTargetPrediction平台,共获取I3C潜在作用靶点100个。

3.2 药物-疾病交集靶点获取结果 通过GeneCards, OMIM和CTD疾病数据库中获取疾病相关靶点13 337个。通过Venny 2.1.0在线工具绘制韦恩图,取其交集后获得疾病-药物共同靶点79个,见增强出版附加材料。

3.3 PPI网络分析及关键靶点获取结果 交集靶点可以通过STRING数据库实现PPI解析,见增强出版附加材料。获取共包括了79个节点和202条边。使用Cytoscape 3.8.2软件和Network Analyzer工具解析了网络中节点之间的度值,从而建立了PPI蛋白互作系络图。其中前10位分别为EGFR、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、PTGS2、基质金属蛋白酶(MMP)-9、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)14、雌激素受体1(ESR1)、MMP-2、雄激素受体(AR)、酪氨酸激酶受体2(ErbB2)、儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT)是I3C治疗肥胖的核心靶点。见表1。

表1 I3C治疗肥胖核心靶点互作的拓扑学参数

Table 1 Topological parameters of core protein interactions in treatment of obesity with indole-3-methanol

| 序号 | 英文名称 | 中文名称 | BC | CC | TC |
|----|-----------|-------------|-------|-------|-------|
| 1 | EGFR | 表皮生长因子受体 | 0.182 | 0.603 | 0.190 |
| 2 | Caspase-3 | 胱天蛋白酶-3 | 0.105 | 0.590 | 0.211 |
| 3 | PTGS2 | 前列腺素G/H合酶2 | 0.173 | 0.580 | 0.213 |
| 4 | MMP-9 | 基质金属蛋白酶-9 | 0.024 | 0.506 | 0.288 |
| 5 | MAPK14 | 丝裂原活化蛋白激酶14 | 0.027 | 0.516 | 0.272 |
| 6 | ESR1 | 雌激素受体1 | 0.047 | 0.545 | 0.258 |
| 7 | MMP-2 | 基质金属蛋白酶-2 | 0.015 | 0.491 | 0.317 |
| 8 | AR | 雄激素受体 | 0.036 | 0.513 | 0.276 |
| 9 | ERBB2 | 酪氨酸激酶受体2 | 0.008 | 0.473 | 0.332 |
| 10 | COMT | 儿茶酚-氧-甲基转移酶 | 0.096 | 0.490 | 0.186 |

注:BC.介数中间性;CC.接近中心性;TC.拓扑系数

3.4 GO及KEGG通路富集分析 79个共同靶点通过DAVID 6.8进行分析,获取GO功能富集条目155条。根据GO富集结果,对*P*排名生物过程、分子功能、细胞过程功能分别GO富集分析出的前5条条目信息,见表2。根据DAVID数据库得到KEGG通路20条,KEGG气泡图,见增强出版附加材料。其中*Y*轴代表通路名称,*X*轴代表基因所占百分比,气泡面积代表通路富集基因数,气泡面积越大信号通路的显著性就越高,气泡颜色代表*P*的大小。通过通路-靶点-药物网络图得知20个信号通路、79个核心靶点和药物间关系密切,见图4。得到了I3C治疗肥胖的作用主要分布在癌症通路,肿瘤坏死因子

(TNF)信号通路, VEGF信号通路, 以及EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药性等信号通路。

表2 I3C治疗肥胖的潜在靶点GO富集分析结果(各前5条)

Table 2 GO enrichment analysis of potential targets of I3C in treatment of obesity (top 5)

| GO-ID | 基因功能名称 | 类别 | P | 基因比例 | 靶点 |
|------------|---------------|------|-------|-------|-----------------------|
| GO:0071407 | 细胞对有机环状化合物的反应 | 生物过程 | 0.000 | 0.036 | MMP-7/JAK2/EGFR |
| GO:0003013 | 循环系统过程 | 生物过程 | 0.000 | 0.033 | JAK2/CASR/EGFR |
| GO:0120254 | 烯烃化合物代谢过程 | 生物过程 | 0.000 | 0.101 | FAAH/JAK2/EGFR |
| GO:0050727 | 炎症反应的调节 | 生物过程 | 0.000 | 0.041 | Caspase-1/JAK2/PSMB8 |
| GO:0030574 | 胶原分解代谢过程 | 生物过程 | 0.000 | 0.170 | MMP-2/MMP-7/CDK1 |
| GO:0004672 | 蛋白激酶活性 | 分子功能 | 0.000 | 0.031 | CDK1/JAK2/CSNK1E |
| GO:0020037 | 血红素结合 | 分子功能 | 0.000 | 0.071 | MAOA/JAK2/EGFR |
| GO:0004713 | 蛋白酪氨酸激酶活性 | 分子功能 | 0.000 | 0.065 | JAK2/EGFR/ERBB2 |
| GO:0004222 | 金属内肽酶活性 | 分子功能 | 0.000 | 0.075 | Caspase-1/MMP-2/MMP-7 |
| GO:0004879 | 核受体活性 | 分子功能 | 0.000 | 0.115 | EGFR/PGR/FABP4 |
| GO:0045121 | 膜筏 | 细胞过程 | 0.000 | 0.028 | CHRM1/JAK2/EGFR |
| GO:0048471 | 细胞质核周区 | 细胞过程 | 0.000 | 0.015 | EGFR/ERBB2/PTGES |
| GO:0005925 | 黏着斑 | 细胞过程 | 0.000 | 0.019 | OPRM1/MMP-14/JAK1 |
| GO:0031012 | 细胞外基质 | 细胞过程 | 0.000 | 0.016 | MMP-2/MMP-7/MMP13 |
| GO:0031968 | 细胞器外膜 | 细胞过程 | 0.000 | 0.027 | MAOA/CYP11B1/EGFR |

3.5 分子对接验证 从分子对接结果得到, I3C与FTO靶点蛋白的结合分值为 $-6.7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 与其他结果结合来看具有更明显的结合功能, 结果见表3; I3C与FTO靶点蛋白可自发结合并通过氢键形成比较固定的结构, 分子对接可视化结果见增强出版附加材料。

表3 I3C抗肥胖靶点结合能预测

Table 3 Prediction of binding energy of indole-3-methanol anti-obesity target

| 靶点名称 | PDB ID | I3C结合能 | Orlistat结合能 |
|-----------|--------|--------|-------------|
| FTO | 4IE7 | -6.7 | -6.8 |
| EGFR | 5Y9T | -5.9 | -5.3 |
| Caspase-3 | 2CNO | -5.5 | -5.2 |
| PTGS2 | 5F19 | -6.6 | -7.9 |
| MAPK14 | 7BE5 | -5.9 | -6.5 |

3.6 I3C对3T3-L1前脂肪细胞增殖的影响 I3C显著抑制3T3-L1前脂肪细胞增殖($P < 0.05$ 为差异有统计学意义), 在10、25、50、100、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈剂量依赖性, 其半效抑制浓度为 $68.18 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 见表4。

3.7 油红O染色检测 I3C对3T3-L1前脂肪细胞分化的影响 空白组细胞在加入诱导剂分化后开始出现脂肪细胞表型, 左右的前脂肪细胞分化成为成

表4 MTT法检测I3C对3T3-L1前脂肪细胞增殖抑制作用

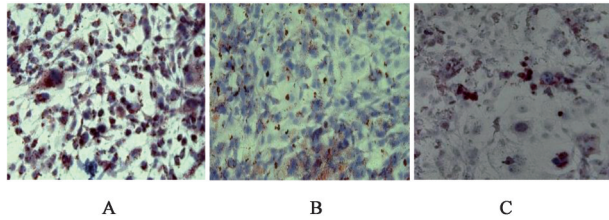
Table 4 MTT assay showed inhibitory effect on 3T3-L1 preadipocytes

| I3C药物浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 细胞存活率/% |
|--|---------|
| 0 | 100 |
| 10 | 97 |
| 25 | 75 |
| 50 | 58 |
| 75 | 11 |
| 100 | 9 |
| 200 | 9 |

熟的脂肪细胞。细胞内包浆丰富, 有大量脂滴分布于细胞核周围, 呈戒环状。在加入 $68.18 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ I3C和 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥利司他孵育48 h后, 可以不同程度的抑制前脂肪细胞的分化, 可以使脂肪积累逐渐减少, 脂肪滴变小, 油红O染色较空白组色淡。由此可以看出明I3C减少前脂肪细胞的分化程度。见图1。

3.8 I3C对3T3-L1细胞FTO蛋白表达水平的影响

与空白组比较, 经过 $68.18 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ I3C处理的3T3-L1细胞中FTO蛋白的表达水平显著降低($P < 0.01$), 见图2、表5。



注:A.空白组;B.68.18 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 吡啶-3-甲醇;C.150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 奥利司他胶囊(图2同)

图1 I3C和奥利司他对3T3-L1细胞分化后脂肪沉积的影响(油红O染色, $\times 20$)

Fig. 1 Effect of I3C and orlistat on fat deposition after 3T3-L1 cell differentiation (oil red O staining, $\times 20$)

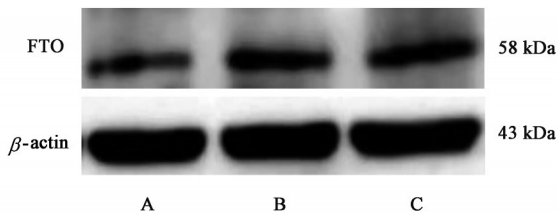


图2 3T3-L1前脂肪细胞中FTO蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoretic diagram of FTO protein expression in 3T3-L1 preadipocytes

表5 I3C对3T3-L1脂肪细胞FTO蛋白表达影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of I3C on FTO protein expression relative optical density of 3T3-L1 adipocytes ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 48 h |
|-------|---------------------------------------|-------------------------------|
| 空白组 | | 1.77 \pm 0.02 |
| I3C组 | 68.18 | 0.76 \pm 0.01 ¹⁾ |
| 奥利司他组 | 150 | 1.25 \pm 0.02 ¹⁾ |

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$

4 讨论

4.1 通过网络药理学对I3C作用靶点与肥胖的关系 根据PPI网络分析,与I3C治疗肥胖有关的前10位靶点分别是FTO、EGFR、Caspase-3、MMP-9、MAPK14等。FTO基因的主要功能,是调控机体的新陈代谢速度、能量平衡、体质量和体脂肪比例聚集^[19]。高表达的FTO蛋白能引起肥胖症,儿童生长发育迟缓和早期的高死亡率都和FTO基因缺失或功能位点的不足有关密切相关^[20]。由于EGFR的酪氨酸激酶功能,又可与细胞表皮生成因素(EGF)结合以启动细胞核中的相关基因,可使脂肪细胞增殖而导致肥胖^[21]。Caspase-3参与细胞凋亡、发育、坏死、炎症等许多重要的生理过程,可以减少肥胖患者体内炎症反应且可抑制细胞异常增殖。是降解并重塑细胞外基质的动态平衡,调控其他蛋白酶和细胞激素的活力,并维持中性粒细胞弹性蛋白酶活力,降解 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶或是细胞MMP-9的主要功

能。肥胖患者身体处于轻度炎症状态与此靶点结合可减轻炎症病态^[22]。

4.2 重要通路和肥胖的关系 本研究对I3C治疗肥胖所富集到的80个靶点进行GO功能分析和KEGG信号通路解析,涉及到炎症反应的调节、蛋白酶活性等538个GO条目。

KEGG富集分析得到了与I3C治疗肥胖相关的信号通路总共有20条,其中涉及有TNF信号通路、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路等。肿瘤坏死因子(TNF)通过与细胞膜上的特殊的接受器结合实现了各种生物效果,如能促使细胞的生长、分解、凋亡和引起炎症等。抑制TNF信号通路可以减轻肥胖患者体内的炎症病理状态,且可促进脂肪细胞的凋亡减少脂肪细胞的过度增殖。VEGF信号通路中的血管内皮生长因子B(VEGF-B)与脂代谢密切联系,在调节组织器官对于脂肪酸摄取、参与能量代谢中VEGF-B是关键因子。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/雷帕霉素靶体蛋白(mTOR)信号通路,PI3K与生长因子受体(如EGFR)结合后,会使Akt的蛋白结构改变,并会以磷酸化作用激活或抑制下游一系列底物如凋亡相关蛋白Bad、Caspase-9活性,从而调节细胞的增殖、分化、凋亡及迁移等表型。它既可以从细胞凋亡角度影响肥胖又可从减轻炎症的角度参与肥胖治疗。

4.3 分子对接验证 I3C与FTO靶点蛋白的结合分值为 $-6.7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,与EGFR靶点蛋白的结合分值为 $-5.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,与EGFR靶点蛋白的结合分值为 $-5.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,与Caspase-3靶点蛋白的结合分值为 $-5.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,与PTGS2靶点蛋白的结合分值为 $-6.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,与MAPK14靶点蛋白的结合分值为 $-5.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,这些靶点中I3C与FTO表现出较强的结合活性。

5 结论

I3C显著抑制3T3-L1前脂肪细胞增殖,在10、25、50、100、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈剂量依赖性,其半效抑制浓度为68.18 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。低浓度的I3C也能够减弱3T3-L1前脂肪细胞分化程度,并且抑制FTO蛋白表达,发挥抗肥胖的作用。本实验将进一步通过动物实验验证I3C治疗肥胖的药理作用及作用机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] NEELAND I J, POIRIER P, DESPRES J P. Cardiovascular and metabolic heterogeneity of obesity:

- Clinical challenge and implications for management [J]. *Circulation*, 2018, 137(13):1391-1406.
- [2] MOZAFFARIAN D. Dietary and policy priorities for cardiovascular disease, diabetes, and obesity: A comprehensive review [J]. *Circulation*, 2016, 133(2): 187-225.
- [3] 刘志诚. 肥胖病的针灸治疗 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008:12-15.
- [4] 祝然然, 邹彪, 陈秋. 陈秋教授自拟代综方联合穴位埋线治疗脾虚湿阻型肥胖症的临床疗效研究 [J]. *中国全科医学*, 2017, 20(13):1635-1641.
- [5] 吴学敏, 王涵, 罗金丽, 等. 态靶辨证在痰湿郁热型肥胖症中的运用——小陷胸汤加决明子、车前子、葶苈子、莱菔子、茺蔚子 [J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(12):4-6.
- [6] 刘自平, 李瑾, 孟晓雅, 等. 决明子多糖对胰脂肪酶的抑制作用研究 [J]. *黄河科技学院学报*, 2021, 23(11):78-81.
- [7] 彭东辉, 匡海学, 王秋红. 车前子多糖的研究进展 [J]. *广东药科大学学报*, 2019, 35(5):702-706.
- [8] 林雪竹, 李蔚群, 关永霞, 等. 葶苈子化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2022, 24(3): 550-558.
- [9] 舒朋华, 罗跃辉, 刘婉蓉, 等. 茺蔚子化学成分与药理作用的研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(7): 39-43.
- [10] 赵振华, 李媛, 季冬青, 等. 莱菔子化学成分与药理作用研究进展 [J]. *食品与药品*, 2017, 19(2):147-151.
- [11] LAI P Y, TSAI C B, TSENG M J. Active form Notch4 promotes the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(3):1132-1139.
- [12] 赵娜. 吡啶-3-甲醇对免疫应激肉兔肌肉品质、血清生化、行为及盲肠菌群的影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2021.
- [13] NUGON-BAUDET L, RABOT S, WAL J M, et al. Actions of the intestinal microflora with glucosinolates in rapeseed meal toxicity: First evidence of an intestinal lactobacillus possessing a myrosinase like activity *in vivo* [J]. *J Sci Food Agric*, 1990, 52: 547-559.
- [14] RINNINELLA E, CINTONI M, RAOUL P, et al. Food components and dietary habits: Keys for a healthy gut microbiota composition [J]. *Nutrients*, 2019, 11:2393.
- [15] FAUST I M, JOHNSON P R, STERN J S, et al. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: A new model of obesity [J]. *Am J Physiol*, 1978, 235(3): E279-286.
- [16] BRAVARD A, LEFAI E, MEUGNIER E, et al. FTO is increased in muscle during type 2 diabetes, and its overexpression in myotubes alters insulin signaling, enhances lipogenesis and ROS production, and induces mitochondrial dysfunction [J]. *Diabetes*, 2011, 60(1):258-268.
- [17] LOOS R J, BOUCHARD C. FTO: The first gene contributing to common forms of human obesity [J]. *Obes Rev*, 2008, 9(3):246-250.
- [18] RIVERA M, COHEN-WOODS S, KAPUR K, et al. Depressive disorder moderates the effect of the FTO gene on body mass index [J]. *Mol Psychiatry*, 2012, 17(6):604-611.
- [19] GULATI P, CHEUNG M K, ANTROBUS R, et al. Role for the obesity-related FTO gene in the cellular sensing of amino acids [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(7):2557-2562.
- [20] HO A J, STEIN J L, HUA X, et al. A commonly carried allele of the obesity-related FTO gene is associated with reduced brain volume in the healthy elderly [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(18): 8404-8409.
- [21] CHENG B, FU X, SUN T, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and related phosphorylation proteins in hypertrophic scars and normal skin [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2002, 115(10): 1525-1528.
- [22] 陈益民, 李玲, 曾艳萍, 等. 妊娠期高血压疾病中晚期糖基化终末产物及其受体、基质金属蛋白酶-9表达关系的研究 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2019, 11(1):90-93.

[责任编辑 顾雪竹]