

中药研究

人参皂苷 Rb1 对 C2C12 骨骼肌细胞葡萄糖利用及 AMPK 信号通路相关基因表达的影响

赵丹丹¹ 吴 瑞² 白 颖¹ 莫芳芳¹ 马如风¹ 柳辰玥¹朱如愿¹ 左加成¹ 姜广建¹ 张东伟¹ 高思华¹

(1 北京中医药大学中医学院, 北京, 100029; 2 中国中医科学院广安门医院南区内分泌科, 北京, 1026183)

摘要 目的: 观察人参皂苷 Rb1 对胰岛素抵抗(IR)的 C2C12 骨骼肌细胞葡萄糖利用的影响, 并基于 AMPK 信号通路探讨其可能的作用机制。方法: 将 C2C12 细胞分为正常组、模型组、人参皂苷 Rb1 组, 模型组以 0.25 mmol/L 棕榈酸, 1% 小牛血清白蛋白培养 16 h 诱导 IR, 人参皂苷 Rb1 组在模型组的基础上以 1、3、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的人参皂苷 Rb1 分别干预 24 h 和 48 h, 通过检测培养液中的葡萄糖含量反映葡萄糖消耗量, 并应用 CCK8 试剂盒及光镜观察不同浓度人参皂苷 Rb1 对 C2C12 细胞活性及形态的影响, 实时荧光定量 PCR 扩增分析人参皂苷 Rb1 对 C2C12 细胞 AMPK α 、SIRT-1、PGC-1 α 基因表达的影响。并应用 shRNA 沉默 AMPK α 的表达, 构建 AMPK α 低表达的骨骼肌细胞模型, 以 1、3、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的人参皂苷 Rb1 分别干预 24 h 和 48 h, 与不含人参皂苷 Rb1 的培养液比较, 再次验证人参皂苷 Rb1 对 C2C12 细胞葡萄糖利用的影响及其与 AMPK 信号通路的关系。结果: 1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rb1 对 C2C12 细胞形态及活性无显著影响, 而 100 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rb1 造成 C2C12 细胞活性降低及部分细胞死亡。10、30 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rb1 能够促进 IR 的 C2C12 骨骼肌细胞葡萄糖消耗量, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且人参皂苷 Rb1 能够上调 C2C12 细胞 AMPK α 、SIRT-1、PGC-1 α 的基因表达 ($P < 0.05$)。10、30 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rb1 亦能增加 AMPK α 低表达的骨骼肌细胞的葡萄糖消耗量 ($P < 0.05$), 而该作用程度低于其对棕榈酸诱导的 C2C12 细胞 IR 的影响, 且 RT-PCR 结果显示人参皂苷 Rb1 能上调 AMPK α 低表达的 C2C12 细胞 SIRT-1、PGC-1 α 的基因表达。结论: 人参皂苷 Rb1 能够有效促进 IR 的 C2C12 骨骼肌细胞葡萄糖消耗, 该作用与调节 AMPK 信号通路有关, 但除 AMPK 信号通路亦有其他作用途径。

关键词 人参皂苷 Rb1; C2C12 骨骼肌细胞; 胰岛素抵抗; 基因沉默; 葡萄糖消耗; AMPK 信号通路

Effects of Ginsenoside Rb1 on Glucose Utilization and Gene Expression Related to AMPK Signaling Pathway in C2C12 Skeletal Muscle Cells

Zhao Dandan¹, Wu Rui², Bai Ying¹, Mo Fangfang¹, Ma Rufeng¹, Liu Chenyue¹, Zhu Ruyuan¹,
Zuo Jiacheng¹, Jiang Guangjian¹, Zhang Dongwei¹, Gao Sihua¹

(1 School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2 Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 102618, China)

Abstract Objective: To observe the effects of ginsenoside Rb1 on glucose utilization in C2C12 cells with insulin resistance (IR) and to explore its possible mechanism based on AMPK signaling pathway. **Methods:** C2C12 cells were divided into normal group, model group and ginsenoside Rb1 group. C2C12 cells in model group were incubated in 0.25 mmol/L palmitic acid and 1% bovine serum albumin for 16 hours to induce IR. On the basis of the model group, different concentrations of ginsenoside Rb1 of 1 $\mu\text{mol/L}$, 3 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 30 $\mu\text{mol/L}$, and 100 $\mu\text{mol/L}$ were added in ginsenoside Rb1 groups for 24 hours and 48 hours respectively. Glucose consumption of the cells in different groups was measured by measuring the glucose content in the nutrient fluid. CCK8 kit and light microscope were used to observe the effect of ginsenoside Rb1 on the vitality and morphology of C2C12 cells with IR. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to analyze the effect of ginsenoside Rb1 on the gene expressions of AMPK α , SIRT-1 and PGC-1 α . In addition, another IR cell model was established by knocking down expression of AMPK- α through shRNA. Ginsenoside Rb1 at concentrations of 1 $\mu\text{mol/L}$, 3 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 30 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$ were used to this IR cell model for 24 h and 48 h respectively. Glucose utilization and gene expression were again determined to verify

基金项目: 国家自然科学基金项目 (NSFC81503540, NSFC81274041); 朝阳区科委协同创新项目 (CYXC1513), 重大新药创制子课题 (2012ZX09103201-005), 北京市共建项目 (0101216-14&0101216-2013)

作者简介: 赵丹丹 (1985.07—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中医药防治糖尿病的基础与临床研究, E-mail: bucmzhaoDandan@163.com

通信作者: 高思华 (1957.07—), 男, 博士, 二级教授, 博士研究生导师, 研究方向: 脏腑相关理论与中医药防治糖尿病的基础与临床研究, Tel: (010)64286929, E-mail: gaosihua1216@163.com

the effects of ginsenoside Rb1 on C2C12 cells and its relationship with AMPK signaling pathway. **Results:** Ginsenoside Rb1 with concentrations of 1 $\mu\text{mol/L}$, 3 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 30 $\mu\text{mol/L}$ did not influence the morphology and vitality of C2C12 cells significantly. However, high concentrations of ginsenoside Rb1 (100 $\mu\text{mol/L}$) decreased the vitality of C2C12 cells significantly and caused cell death. Compared with model group, 10 $\mu\text{mol/L}$ and 30 $\mu\text{mol/L}$ ginsenoside Rb1 could promote the glucose consumption of C2C12 cells with IR obviously, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Ginsenoside Rb1 could up-regulate the gene expressions of AMPK α , SIRT-1 and PGC-1 α in C2C12 cells ($P < 0.05$). In addition, 10 $\mu\text{mol/L}$ and 30 $\mu\text{mol/L}$ ginsenoside Rb1 could also enhance the glucose utilization of C2C12 cells with AMPK α knocked down ($P < 0.05$). However, this function was not as effective as that in the former IR C2C12 cells induced by palmitic acid. RT-PCR results showed that ginsenoside Rb1 could increase the gene expression of SIRT-1 and PGC-1 α in C2C12 cells with low expression of AMPK α . **Conclusion:** Ginsenoside Rb1 can effectively promote glucose utilization in C2C12 skeletal muscle cells with insulin resistance, which is related but not limited to the regulation of AMPK signaling pathway.

Key Words Ginsenoside Rb1; C2C12 cells; Insulin resistance; Gene knocking-down; Glucose consumption; AMPK signaling pathway

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.01.011

胰岛素抵抗 (Insulin Resistance, IR) 造成的葡萄糖摄取及利用障碍, 是 2 型糖尿病等多种代谢相关疾病的中心环节^[1]。骨骼肌细胞是参与机体葡萄糖等能量物质代谢的重要外周组织, 在维持体内葡萄糖动态平衡及外周组织的胰岛素敏感性中发挥着关键作用^[2]。降糖消渴颗粒乃肝脾肾三脏同调的组方, 临床用于治疗糖尿病疗效确切, 且离体研究亦证实降糖消渴颗粒含药血清具有促进 C2C12 细胞葡萄糖摄取及利用的作用^[3]。文献报道显示, 该方的主要健脾益气组分人参皂苷 Rb1 能够改善糖尿病大鼠骨骼肌组织的胰岛素敏感性^[4], 亦能促进脂肪细胞能量代谢^[5], 其作用途径可能与调节瘦素受体、脂联素受体, 葡萄糖转运蛋白等有关^[6-8]。单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMPK) 是机体细胞能量代谢的重要激酶, 能够调节线粒体能量物质的代谢, 应用 shRNA 沉默 AMPK 基因构建稳定的 AMPK 低表达的细胞株^[9], 可以造成细胞对葡萄糖摄取及利用障碍^[10], 用于胰岛素抵抗的相关研究。本研究将通过棕榈酸诱导的和 AMPK α 低表达的 2 种 IR 细胞模型, 进一步观察降糖消渴颗粒中主要健脾益气组分人参皂苷 Rb1 对 C2C12 骨骼肌细胞葡萄糖利用及 AMPK α 等基因表达的影响, 从分子水平探析其对骨骼肌葡萄糖利用的情况及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 C2C12 骨骼肌细胞株, 购自中国医学科学院基础医学研究所北京协和医学院细胞资源中心。

1.1.2 药物 人参皂苷 Rb1 (曼思特, 纯度 $\geq 98\%$) 购自北京百诺威生物科技有限公司。

1.1.3 试剂与仪器 DMEM 培养基, 胰蛋白酶, 均

购自 GIBCO 公司; 胎牛血清 (杭州四季青)、青/链霉素, 购自百诺威生物科技有限公司; 棕榈酸、小牛血清白蛋白, 购自 Sigma 公司; 葡萄糖氧化酶法测定试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所; CCK-8 试剂盒, 购自于碧云天生物技术有限公司; Trizol 试剂购自于美国 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒购自于美国 Thermo 公司, Power SYBR Green PCR Master Mix 购自于美国 ABI 公司。BMG 全波长酶标仪 (德国 BMG LABTECH 公司), 逆转录 PCR 仪 (美国 Thermo 公司), 实时荧光定量 PCR 仪器 7500 型 (美国 ABI 公司)。PCR 扩增引物: AMPK α , 沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (SIRT-1), 过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 辅激活子-1 α (PGC-1 α) 由上海生工公司合成。引物序列如下: AMPK α 上游引物 AAACCCACA-GAAATCCAAACAC, 下游引物 CCTTCCATTTCAT-AGTCCAACTG; SIRT-1 上游引物 GCAACAGCATCT-TGCCTGAT, 下游引物 GTGCTACTGGTCTACAAG; PGC-1 α 上游引物 CCCTGCCATTGTGAAGACC, 下游引物 TGCTGCTGTTCTGCTCTCT。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与传代 C2C12 骨骼肌细胞以含 10% 胎牛血清 (FBS), 100 IU/mL 青霉素, 100 IU/mL 链霉素的 DMEM 基础培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下无菌培养。当细胞融合至 80% 左右时用 0.25% 胰酶进行消化并传代, 每 2~3 d 传代 1 次。

1.2.2 胰岛素抵抗细胞模型的建立及鉴定 方法同前期实验, 具体如下: C2C12 细胞以 104/mL 接种于 96 孔板, 每 6 孔 1 组, 分别加入正常培养液及含 0.25 mmol/L 棕榈酸, 1% 小牛血清白蛋白的 DMEM 培养基, 培养 16 h 后观察, 若其葡萄糖消耗量明显下降, 则表明 IR 模型建立成功^[3]。

1.2.3 AMPK α 低表达的骨骼肌细胞模型的建立

首先应用绿色荧光蛋白质粒电转 C2C12 细胞,摸索最佳的电转条件,并确定嘌呤霉素的药杀浓度。根据 AMPK α 基因信息(GeneID:105758),构建 shRNA 沉默点,设计并合成 AMPK α 基因 shRNA 靶位点,将 AMPK α 基因 shRNA 克隆至定点整合表达载体上,转入大肠杆菌后抽提质粒测序,使质粒达到电转级别;电转 C2C12 细胞,根据沉默效果筛选阳性克隆及摸索好的电转条件,将靶向性 oligo 和 shRNA 定点整合载体同时电转 C2C12 细胞。经药杀后,real-time PCR 验证确定阳性克隆数量及过表达倍数;完成 AMPK α 低表达 C2C12 细胞株建立,用于后续人参皂苷 Rb1 的干预研究。

1.2.4 干预方法 将 20 mg 人参皂苷 Rb1,溶解于适量 DMSO 中,0.22 μ m 滤膜过滤后作为贮存液。使用时用完全培养基进行稀释,分为 5 个剂量组,将终浓度分别为 1、3、10、30、100 μ mol/L 的人参皂苷 Rb1 分别干预 IR 的 C2C12 细胞和 AMPK α 低表达的 C2C12 细胞,空白组给予含有等体积 DMSO 正常培养基进行均一化对照,每组设 5 个复孔,药物干预 24 h、48 h。

1.2.5 葡萄糖消耗量、细胞增殖检测及细胞形态的观察 分别在给药干预 24 h、48 h 时取培养基上清 20 μ L/孔,按 GOD-POD 法,依照葡萄糖氧化酶法测定试剂盒中的步骤进行检测。绘制标准曲线并根据公式及稀释倍数计算葡萄糖的浓度(mmol/L),通过比较培养液中葡萄糖的浓度,即可得知各组中细胞葡萄糖消耗量。按照 CCK-8 试剂盒说明,分别将不同药物浓度干预 24 h、48 h 后,每孔加入 10 L CCK-8 溶液,将培养板在培养箱中孵育 1 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光毒,记录 OD 值,观察不同浓度药物对细胞增殖的影响,并用于校正葡萄糖消耗量

检测时的细胞数。并用光学显微镜进行拍照,观察不同浓度药物对细胞形态的影响。

1.2.6 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 将 C2C12 细胞及 AMPK α 低表达的 C2C12 细胞中,分别加入中浓度人参皂苷 Rb1 (1、3、10、30、100 μ mol/L)干预 24 h 后,分别设置空白对照组,每组 4 个样本复孔,使用 Trizol 试剂抽提总 RNA 并定量,取总 RNA 1 μ g 使用 Oligo (dT) 引物逆转录成第一链 cDNA。进一步以 SYBR MIX (10 μ L) + cDNA 模板 (2 μ L) + 上/下游引物(各 1 μ L) + 无核酸酶超纯水 (6 μ L) 的反应体系,上荧光定量 PCR 仪进行扩增反应,95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,继以 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,如此反复 40 个循环后,结束后 4 $^{\circ}$ C 保存。每个样品设立 2 个复孔重复。以 GAPDH 为内参进行标准化,结果以相对 mRNA 水平表示($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法),

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,计量数据均使用 (Mean $\pm$ SEM) 形式表示,多组数据比较采用方差分析(ANOVA),两两比较采用 Dunnett 法或独立样本 t 检验进行,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 GraphPadPrism6 软件进行数据管理并制图。

2 结果

2.1 对 IR 的 C2C12 细胞形态及活力的影响 如图 1 所示,应用前法构建 IR 模型,并加入不同浓度的人参皂苷 Rb1 干预 48 h,光镜下观察低浓度(1、3、10、30 μ mol/L)人参皂苷 Rb1 对 C2C12 骨骼肌细胞形态无显著影响,100 μ mol/L 的人参皂苷 Rb1 组细胞生长略缓慢,细胞数有所减少,培养基中出现部分死亡的细胞。CCK-8 检测亦显示,人参皂苷 Rb1 干预 48 h 后,除 100 μ mol/L 以外,其他低浓度人参皂苷 Rb1 对骨骼肌活力影响差异无统计学意义($P > 0.05$)。

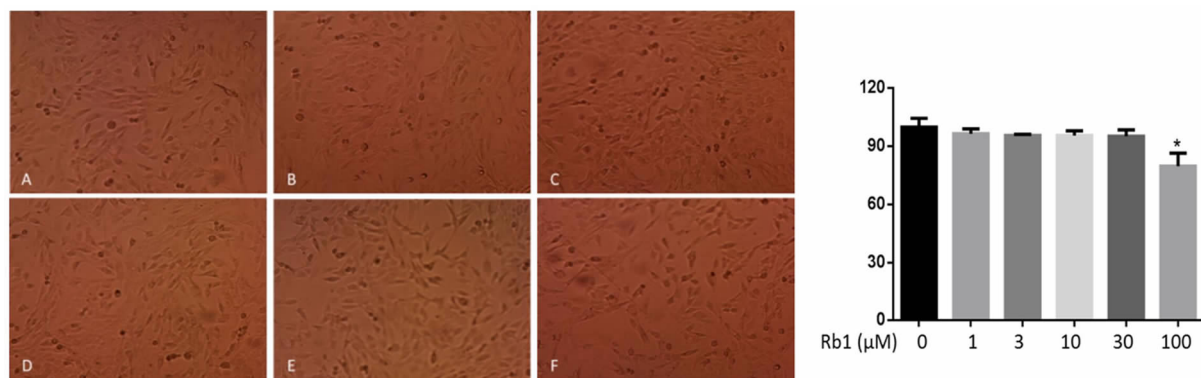


图1 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 C2C12 细胞形态及活力的影响

注:A-F:人参皂苷 Rb1 浓度分别为 0、1、3、10、30、100 μ mol/L(×200),与不含 Rb1 的对照组比较,* $P < 0.05$

2.2 对 IR 的 C2C12 细胞模型葡萄糖消耗的影响

由图 2 可见,与正常 C2C12 细胞比较,加入棕榈酸的 C2C12 细胞的培养液中剩余葡萄糖浓度明显升高,葡萄糖消耗量均明显降低($P < 0.05$),提示 IR 细胞模型构建成功。与无药物干预的 IR 细胞比较,除 100 $\mu\text{mol/L}$ 外,不同浓度的人参皂苷 Rb1 (1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$) 干预 24 h、48 h,葡萄糖消耗量均有一定程度的增加,且呈现了一定的剂量依赖性,其中干预 24 h 时,10 $\mu\text{mol/L}$ 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 组干预细胞的葡萄糖消耗量分别增加了 82.23% 和 83.13%,干预 48 h 时 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 组干预细胞的葡萄糖消耗量分别增加了 87.50% 和 100.50%,与不加入人参皂苷 Rb1 的对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

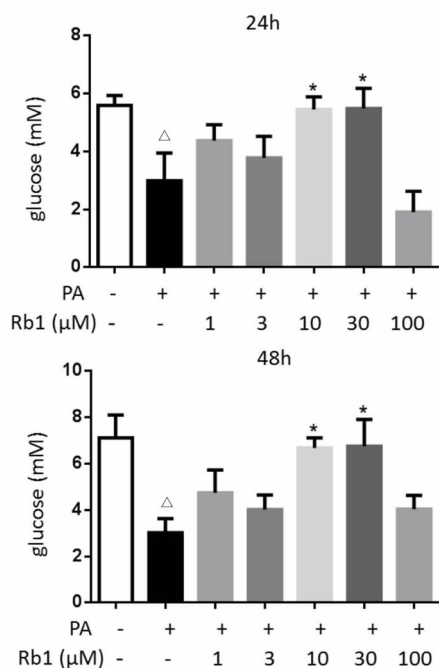


图2 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 IR 的 C2C12 细胞葡萄糖消耗量的比较

注:与加入 PA,不加 Rb1 组比较, * $P < 0.05$;与不加 PA 和 Rb1 组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 对 IR 的 C2C12 细胞 AMPK α 、SIRT-1、PGC-1 α 基因的影响

与对照组 IR 的 C2C12 细胞比较,10 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rb1 能够显著上调细胞 AMPK α 、SIRT-1、PGC-1 α 的基因表达($P < 0.05$)。说明人参皂苷 Rb1 促进葡萄糖消耗的作用可能与调节上述基因有关。见图 3。

2.4 对 AMPK α 低表达的 C2C12 细胞模型葡萄糖消耗的影响

如图 4 所示,与不经药物干预的 AMPK α 低表达的 C2C12 细胞比较,除 100 $\mu\text{mol/L}$

外,不同浓度的人参皂苷 Rb1 (1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$) 干预 24 h、48 h,葡萄糖消耗量均有显著的增加($P < 0.05$)。其中干预 24 h 时,10 $\mu\text{mol/L}$ 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 组干预细胞的葡萄糖消耗量分别增加了 61.14% 和 76.29%,干预 48 h 时,10 $\mu\text{mol/L}$ 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 组干预细胞的葡萄糖消耗量分别增加了 58.86% 和 65.54%,与不加入人参皂苷 Rb1 的对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。人参皂苷 Rb1 对 AMPK α 低表达的 IR 细胞的葡萄糖消耗量的影响程度低于对棕榈酸诱导的 IR 细胞的影响,该结果进一步说明人参皂苷 Rb1 促进 C2C12 细胞葡萄糖消耗的作用与调节 AMPK α 有关。

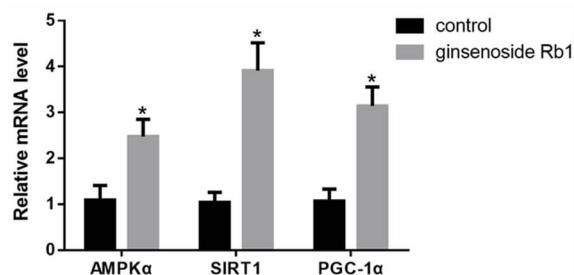


图3 人参皂苷 Rb1 对 IR 的 C2C12 细胞 AMPK α 、SIRT-1、PGC-1 α 基因的影响

注:与不含 Rb1 的对照组比较, * $P < 0.05$

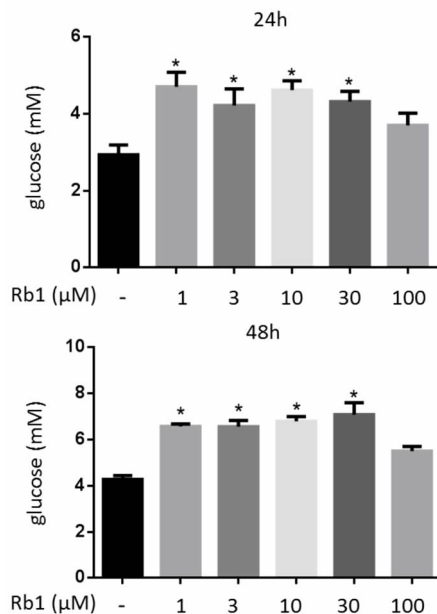


图4 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 AMPK α 低表达的 C2C12 细胞葡萄糖消耗量的比较

注:与不含 Rb1 的对照组比较, * $P < 0.05$

2.5 对 AMPK α 低表达的 C2C12 细胞 AMPK α 、SIRT-1、PGC-1 α 基因的影响

与对照组 IR 的 C2C12 细胞比较,10 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rb1 能够显著上调 AMPK α 低表达的 C2C12 细胞 SIRT-1、PGC-

1 α 的基因表达 ($P < 0.05$), 对 AMPK α 的低表达细胞株的 AMPK α 基因表达有一定的上调作用, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。可见 AMPK α 基因沉默影响了人参皂苷 Rb1 对 AMPK α 的影响, 但对 SIRT-1、PGC-1 α 基因的影响仍存在, 说明人参皂苷 Rb1 促进 AMPK α 低表达的 C2C12 细胞葡萄糖消耗的作用可能不仅仅通过调节 AMPK α 基因来完成。

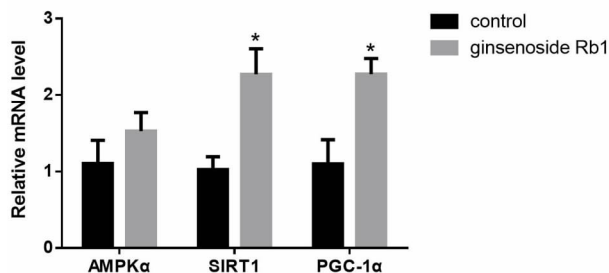


图5 人参皂苷 Rb1 对 AMPK α 低表达的 C2C12 细胞 AMPK α 、SIRT-1、PGC-1 α 基因的影响

注:与不含 Rb1 的对照组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

人参用于治疗糖尿病历史悠久, 早在《本草纲目》中就有过记载。现代研究证明, 人参中抗糖尿病作用的有效成分主要有 人参皂苷, 人参多肽, 人参多糖等, 其中人参皂苷是人参药理活性最重要的成分^[11-12]。其抗糖尿病的作用机制包括抑制食欲, 降低肠道葡萄糖与脂肪的吸收; 调节糖脂代谢通路, 增加能量消耗; 调节过氧化物酶体增殖剂活化受体 γ 活性和表达, 改善 IR; 促进胰岛素分泌和抗胰岛 β 细胞凋亡; 抗氧化应激和抗炎作用等^[13-14]。

人参皂苷 Rb1 是二醇组皂苷的主要成分之一, 我们前期研究发现人参皂苷 Rb1 能够改善肥胖小鼠的胰岛素敏感性, 该作用可能与促进白色脂肪组织棕色化有关^[15]。也有文献报道其具有促进脂肪细胞、骨骼肌细胞等胰岛素敏感细胞葡萄糖摄取的作用^[8,16], 该作用与调节葡萄糖转运子 4 (GLUT4) 的表达有关^[8], 然其上游是否与调节 AMPK α 等因子相关却尚待深入研究。

在本研究中, 我们观察到一定浓度的人参皂苷 Rb1 (10、30 $\mu\text{mol/L}$) 能够促进高糖高脂诱导的 IR 的 C2C12 骨骼肌细胞的葡萄糖消耗, 但过高剂量 100 $\mu\text{mol/L}$ 因影响细胞活性而降低了葡萄糖的利用, 且人参皂苷 Rb1 能够上调 IR 的 C2C12 骨骼肌细胞 AMPK α 、SIRT-1、PGC-1 α 的基因表达。PGC-1 α 参与骨骼肌葡萄糖摄取及胰岛素敏感性的调节^[17], 可以通过激活下游靶基因 NRF-1、NRF-2 等增强线粒体的生物合成, 提高细胞线粒体数量和氧

化呼吸功能^[18], 与机体葡萄糖的消耗密切相关。而 AMPK 和 SIRT-1 是 PGC-1 α 的重要上游调节因子, AMPK 一方面可以直接磷酸化 PGC-1 α 相关位点增强 PGC-1 α 的转录活性, 另一方面 AMPK 亦能通过提升胞内 NAD⁺ 水平增强 SIRT-1 的活性, 从而以去乙酰化的方式调节 SIRT-1 下游靶蛋白 PGC-1 α 的活性^[19]。我们的研究结果表明人参皂苷 Rb1 调节骨骼肌细胞葡萄糖利用与 AMPK 信号通路有关, 该发现与既往研究结果一致^[4]。

此外, 我们进一步通过构建 AMPK α 基因沉默的细胞株, 进一步验证人参皂苷 Rb1 促进骨骼肌细胞葡萄糖利用与 AMPK 信号通路的关系。结果显示人参皂苷 Rb1 (10、30 $\mu\text{mol/L}$) 亦能促进 AMPK α 低表达细胞株的葡萄糖消耗情况, 但其促进作用较在棕榈酸诱导的 IR 的细胞中发挥的作用弱, 且在 AMPK α 低表达细胞株中, 较低浓度 (1、3 $\mu\text{mol/L}$) 人参皂苷 Rb1 也显示了一定的促进葡萄糖消耗的作用。此外, PCR 结果提示人参皂苷 Rb1 对 AMPK α 基因沉默的细胞株 SIRT-1、PGC-1 α 基因亦有上调作用。总之, 本研究结果证实了参皂苷 Rb1 促进骨骼肌细胞葡萄糖利用与 AMPK 信号通路的有关, 但不是单纯通过 AMPK 信号通路发挥作用, 亦有其他信号通路发挥着调节作用。

综上所述, 靶组织中葡萄糖摄取是维持的机体血糖水平关键步骤, AMPK 信号通路是葡萄糖等能量物质代谢的重要调节机制^[20-21]。本研究结果揭示了人参皂苷 Rb1 对骨骼肌细胞的葡萄糖消耗利用的促进作用, 这种作用可能与 AMPK α 、SIRT-1、PGC-1 α 多个因子的调节密切相关。然而有鉴于经由 AMPK 信号通路调节的葡萄糖利用多是通过线粒体呼吸链有氧呼吸完成的, 人参皂苷 Rb1 促进葡萄糖消耗及对 AMPK 信号通路的调节是否与影响骨骼肌线粒体呼吸功能有关, 尚待进一步研究明确。

参考文献

- [1] 王娟, 李彩萍. 胰岛素抵抗与 2 型糖尿病[J]. 医学综述, 2005, 11 (6): 511-513.
- [2] Dimopoulos N, Watson M, Sakamoto K, et al. Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells[J]. Biochem J, 2006, 399 (3): 473-481.
- [3] 赵丹丹, 穆倩倩, 方心, 等. 降糖消渴颗粒含药血清对 C2C12 细胞胰岛素抵抗的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29 (5): 1577-1579.
- [4] Shen L, Haas M, Wang DQ, et al. Ginsenoside Rb1 increases insulin sensitivity by activating AMP-activated protein kinase in male rats [J]. Physiol Rep, 2015, 3 (9): e12543.

(下接第 63 页)

- 方剂学杂志,2013,19(8):367-370.
- [5]李雯,尹华.白术化学成分的药理作用研究进展[J].海峡药学,2012,24(3):9-11.
- [6]施文荣,刘艳,陈玲,等.白术燥湿利水作用的研究[J].福建中医学院学报,2007,17(3):29-31.
- [7]董海燕,董亚琳,贺浪冲,等.白术抗炎活性成分的研究[J].中国药理学杂志,2007,42(14):1055-1059.
- [8]岳美颖,潘媛,敖慧.白术化学、药理与临床研究进展[J].亚太传统医药,2016,12(5):66-68.
- [9]杨斌,钟艳梅,冯毅凡.白术化学成分和药理作用的研究进展[J].广东药学院学报,2012,28(2):218-221.
- [10]Gao H, Huang YN, Gao B, et al. Inhibitory effect on α -glucosidase by *Adhatoda vasica* Nees [J]. Food Chem, 2008, 108(3):965-972.
- [11]张连群,周小琴.白术内酯类成分与药理作用的研究进展[J].按摩与康复医学,2017,8(21):1-2.
- [12]李伟,文红梅,崔小兵,等.白术健脾有效成分研究[J].南京中医药大学学报:自然科学版,2006,22(6):366-367.
- [13]Yoon M, Kim MY. The anti-angiogenic herbal composition Ob-X from *Morus alba*, *Melissa officinalis*, and *Artemisia capillaris* regulates obesity in genetically obese ob/ob mice [J]. Pham Biol, 2011, 49(6):614-619.
- [14]林霄.茵陈蒿的药理作用研究[J].长春中医药大学学报,2008,24(6):663.
- [15]李铁英,关晓海,邢朝斌,等.青蒿琥酯对糖尿病大鼠视网膜细胞凋亡的作用[J].中国医药,2016,11(4):536-539.
- [16]曹锦花.茵陈的化学成分和药理作用研究进展[J].沈阳药科大学学报,2013,30(6):489-494.
- [17]王茜.茵陈的药理作用及其主要化学成分药物代谢动力学研究进展[J].安徽中医学院学报,2012,31(4):87-90.
- [18]艾力,张奕,吴小海,等.茵陈对神经细胞保护机制的研究现状和进展[J].交通医学,2017,31(2):136-138.
- [19]魏建华,刘学敏.茵陈的现代药理研究[J].基层医学论坛,2009,13(22):743-744.
- [20]王喜军,李廷利,孙晖.茵陈蒿汤及其血中移行成分 6,7-二甲氧基香豆素的肝保护作用[J].中国药理学通报,2004,20(2):239-240.
- [21]闫晗,孙媛媛,于治国,等.HPLC 法同时测定白术药材中白术内酯 I 等 4 种有效成分的含量[J].沈阳药科大学学报,2015,32(9):699-702,708.
- [22]李虹,何丹,杨常成.高效液相色谱法测定白术中白术内酯 I、II 和 III 的含量[J].中南药学,2014,12(1):70-73.
- [23]尹华,王知青,王玲,等.HPLC-DAD 波长切换法同时测定白术中白术内酯 I、II、III 和苍术酮的含量[J].中华中医药杂志,2013,28(1):233-236.
- [24]王韵,赵亮,柴逸峰,等.RP-HPLC 法同时测定茵陈蒿汤中 14 个成分[J].药物分析杂志,2017,37(3):393-401.

(2018-06-06 收稿 责任编辑:杨觉雄)

(上接第 58 页)

- [5]Mu Q, Fang X, Li X, et al. Ginsenoside Rb1 promotes browning through regulation of PPAR γ in 3T3-L1 adipocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 466(3):530-535.
- [6]Tabandeh MR, Hosseini SA, Hosseini M. Ginsenoside Rb1 exerts antidiabetic action on C2C12 muscle cells by leptin receptor signaling pathway [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2017, 37(4):370-378.
- [7]Tabandeh MR, Jafari H, Hosseini SA, et al. Ginsenoside Rb1 stimulates adiponectin signaling in C2C12 muscle cells through up-regulation of AdipoR1 and AdipoR2 proteins [J]. Pharm Biol, 2015, 53(1):125-132.
- [8]Hosseini S A, Tabandeh M R, Mesbah Namin S A. Promoting Effect of Ginsenoside Rb1 for GLUT-4 Gene Expression and Cellular Synthesis in C2C12 Muscle Cells [J]. International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences, 2016, 5(2):151-158.
- [9]Tangeman L, Wyatt CN, Brown TL. Knockdown of AMP-activated protein kinase alpha 1 and alpha 2 catalytic subunits [J]. J RNAi Gene Silencing, 2012, 8:470-478.
- [10]Lam CK, Chari M, Rutter GA, et al. Hypothalamic nutrient sensing activates a forebrain-hindbrain neuronal circuit to regulate glucose production in vivo [J]. Diabetes, 2011, 60(1):107-113.
- [11]Kim S, Shin BC, Lee MS, et al. Red ginseng for type 2 diabetes mellitus: a systematic review of randomized controlled trials [J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(12):937-944.
- [12]盖鑫,弓晓杰,鲁明明,等.人参治疗糖尿病有效成分研究[J].长春中医药大学学报,2013,29(3):539-540.
- [13]Xie J T, Mchendale S, Yuan C S. Ginseng and diabetes [J]. Am J Chin Med, 2005, 33(3):397-404.
- [14]Yuan H D, Kim J T, Kim S H, et al. Ginseng and Diabetes [J]. Journal of Ginseng Research, 2012, 36(3):27-39.
- [15]左加成.降糖消渴颗粒及益气温阳组对肥胖小鼠 C57BL/6J 白色脂肪棕色化的影响研究 [D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [16]Shang W, Yang Y, Jiang B, et al. Ginsenoside Rb1 promotes adipogenesis in 3T3-L1 cells by enhancing PPAR γ 2 and C/EBP α gene expression [J]. Life Sci, 2007, 80(7):618-625.
- [17]赵文惠,杨文英. PGC-1 α 与脂质代谢 [J]. 国外医学:内分泌学分册, 2005, 25(5):355-357.
- [18]Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 [J]. Cell, 1999, 98(1):115-124.
- [19]Cantó C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure [J]. Current Opinion in Lipidology, 2009, 20(2):98-105.
- [20]Ke R, Xu Q, Li C, et al. Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism [J]. Cell Biol Int, 2018, 42(4):384-392.
- [21]Kukidome D, Nishikawa T, Sonoda K, et al. Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells [J]. Diabetes, 2006, 55(1):120-127.

(2018-10-12 收稿 责任编辑:王明)