

黄酮衍生物 C45 对高脂诱导肥胖小鼠的糖脂代谢改善作用及机制探讨

张畅¹ 陈莹² 袁恒杰¹

¹天津医科大学总医院药剂科 300052; ²天津医科大学药学院 300070

通信作者:袁恒杰, Email: hengjieyuan@163.com

【摘要】 **目的** 探讨黄酮衍生物 C45 对高脂诱导肥胖小鼠的糖脂代谢改善作用及机制。**方法** 高脂饮食喂养建立胰岛素抵抗的肥胖小鼠模型,缺氧条件下共培养的脂肪细胞和巨噬细胞的条件培养基(HF/M)诱导 AML12 肝细胞胰岛素抵抗。给予肥胖小鼠和胰岛素抵抗的肝细胞黄酮衍生物 C45 处理,小鼠血清糖脂代谢和氧化应激指标分别用相应的试剂盒检测,流式细胞术检测小鼠外周血炎症细胞比例,天狼星红染色检测小鼠肝组织纤维化,免疫印迹法检测糖脂代谢和炎症相关分子的蛋白和磷酸化水平,荧光定量聚合酶链反应检测肝细胞脂代谢相关分子的 mRNA 水平。**结果** 黄酮衍生物 C45 显著降低肥胖小鼠血清空腹血糖、空腹胰岛素、甘油三酯、总胆固醇、游离脂肪酸和丙二醛的水平,升高肥胖小鼠高密度脂蛋白-胆固醇/低密度脂蛋白-胆固醇比值和超氧化物歧化酶水平,降低外周血炎症中性粒细胞比例、肝组织胶原纤维数量和体积。黄酮衍生物 C45 逆转 HF/M 降低 AML12 细胞蛋白激酶 B 胰岛素敏感性的作用、降低过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 和固醇调节元件结合蛋白 1c 的 mRNA 水平以及核因子- κ B 的磷酸化水平。**结论** 黄酮衍生物 C45 调节糖脂代谢、氧化应激和炎症,改善胰岛素抵抗,具有抗糖尿病作用。

【关键词】 黄酮衍生物 C45;胰岛素抵抗;糖尿病;代谢;氧化应激;炎症

基金项目:国家自然科学基金青年基金(82003825)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121383-20220722-07043

Effect and mechanism of flavonoid derivative C45 on the metabolism of glucose and lipid in high fat diet-induced obese mice Zhang Chang¹, Chen Ying², Yuan Hengjie¹. ¹Department of Pharmacy, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; ²School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Corresponding author: Yuan Hengjie, Email: hengjieyuan@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore the effect and mechanism of flavonoid derivative C45 (C45) on the metabolism of glucose and lipid in high fat diet-induced obese mice. **Methods** Insulin resistant obese mice model was induced by high fat diet (HFD) feeding. The condition medium from co-cultured adipocytes and macrophages under hypoxic condition was used to induce AML12 hepatocytes insulin resistance. Obese mice and insulin resistant hepatocytes were treated with C45. Glucose and lipid metabolism and oxidative stress related markers in mice serum were detected by commercial kits, respectively. The proportion of mice peripheral inflammatory cells was detected by flow cytometry. Mice liver fibrosis was detected by sirius red stain. The protein and phosphorylation levels of hepatic glucose metabolism- and inflammation- related molecules were detected by Western blot. The mRNA expressions related to lipid metabolism were measured by fluorescence quantitative PCR. **Results** C45 significantly decreased the serum levels of fasting glucose, insulin, TC, TG, NEFA and MDA, whereas increased levels of HDL/LDL and SOD of obese mice. C45 decreased the proportion of peripheral inflammatory neutrophils, the number and volume of collagen fibers in liver. C45 reversed HF/M-reduced insulin phosphorylated Akt level and increased the mRNA expressions of PPAR γ and SREBP1c in AML12 cells, as well as NF- κ B phosphorylation. **Conclusion** Tiliroside derivative C45 regulates glucose and lipid metabolism, oxidative stress, inflammation and insulin resistance, which may prevent diabetes.

【Keywords】 Tiliroside derivative C45; Insulin resistance; Diabetes; Metabolism; Oxidative stress;

Inflammation

Fund program: National Science Foundation for Young Scientist (82003825)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121383-20220722-07043

肥胖个体常有胰岛素抵抗并伴低水平系统性炎症。肥胖的脂肪组织缺氧,伴有巨噬细胞浸润,脂肪组织分泌的因子诱发周身胰岛素抵抗及氧化应激,引起糖脂代谢紊乱,诱发 2 型糖尿病等代谢性疾病^[1]。

中药委陵菜有效成分委陵菜黄酮有抗糖尿病作用,本课题组对委陵菜黄酮进行衍生合成和体外筛选,首次优选出具有药理活性的新结构类型黄酮衍生物 C45 单体^[2],本研究探讨 C45 对高脂诱导的肥胖小鼠糖脂代谢的改善作用及机制。

1 对象和方法

1.1 实验动物、细胞系及主要试剂 SPF 级 4 周龄 C57BL/6 雄性小鼠购自中国人民解放军军事医学科学院。3T3-L1 小鼠成纤维细胞、RAW264.7 小鼠巨噬细胞、AML12 小鼠肝细胞均购自美国模式培养物集存库。

小鼠饲料购自常州鼠一鼠二生物科技有限公司,高脂饲料和对照饲料购自常州鼠一鼠二生物科技有限公司,高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、牛血清蛋白、磷酸盐缓冲液、胰蛋白酶购自以色列 Biological Industries 公司。胎牛血清购自美国 GIBCO 公司。甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)/低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)比值和超氧化物歧化酶(SOD)水平、游离脂肪酸(NEFA)、胰岛素、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性检测试剂盒购自北京普利莱生物技术有限公司。天狼星红染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。流式染色缓冲液购自美国 BD Biosciences 公司。小鼠 Ly6G、Ly6C、CD11b 抗体购自美国 eBioscience 公司。蛋白激酶 B(Akt) pS473(批号 25)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK) pT183/Y185(批号 17)、磷酸化核因子(NF)-κB p65 抗体(批号 26)、抗兔和抗小鼠 IgG HRP 偶联抗体(批号 34、28)购自美国 Cell Signaling Technology 公司。血糖试纸购自上海罗氏制药有限公司。

1.2 高脂饮食诱导肥胖(DIO)小鼠模型的建立和给药 本研究经天津医科大学动物保护与利用委员

会批准。小鼠随机分为对照低脂饲料组(LFD, $n=5$)和高脂饲料组,喂养 12 周后将高脂饲料组小鼠随机分为高脂组(HFD)、C45 低剂量组(2 mg/kg 小鼠体重, HFD+C45L)、C45 中剂量组(20 mg/kg 小鼠体重, HFD+C45M)、C45 高剂量组(200 mg/kg 小鼠体重, HFD+C45H)、二甲双胍阳性对照组(150 mg/kg 小鼠体重, HFD+Met),每组 5 只。将 C45 粉末和二甲双胍分别溶于 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液,制备给药液,小鼠每天给药或给 CMC-Na 溶液 1 次,共给药 4 周,期间自由饮水,自由饮食,饲料不变,取血检测前小鼠禁食 8 h。动物饲料成分和饲养环境参照笔者发表的论文^[3]。

1.3 细胞培养和给药 细胞培养:用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基将 3T3-L1 细胞接种于 transwell 6 孔板下层,在 37 °C, 5% CO₂ 孵箱中培养,细胞生长至融合时加入三联诱导分化液(IBMx, 1:1 000;地塞米松, 1:1 000;胰岛素, 1:1 000), 2 d 后加入胰岛素,隔天换回普通培养基,1 周后使用。RAW 264.7 细胞用同上培养基接种于下层接种有分化好的脂肪细胞的 transwell 6 孔板上层。在含 1% O₂ 的培养箱中缺氧非接触共培养 16 h,提取细胞上清液至无菌的 Eppendorf 管中,即为缺氧共培养的脂肪细胞和巨噬细胞条件培养基(HF/M)。4 °C 离心 10 min,收集上清液,直接孵育肝细胞或分装后保存于-80 °C 冰箱。

给药:将 C45 溶于 DMSO,用 10 μM C45 孵育 AML12 细胞 24 h,最后 10 min 加入 100 nM 胰岛素。

1.4 血液指标检测 禁食过夜后的小鼠,眼内眦取血,分离血清,酶法测定 TG、TC 和 NEFA,直接测定法测定 HDL 和 LDL,羟胺法测定 SOD,硫代巴比妥酸法测定 MDA,速率法测定 ALT 和 AST。

1.5 流式细胞术检测 小鼠眼内眦取血 100 μl,加入预冷的含 1%胎牛血清的磷酸盐缓冲液(PBS⁺)和 ACK 裂红液裂解红细胞后洗涤,离心弃上清液,加入 PBS⁺重悬细胞。小鼠 Ly6G、Ly6C、CD11b 抗体原液 1:1:1 混合后加到管中冰上避光孵育后清洗,离心弃上清液,用 PBS⁺重悬细胞,流式细胞仪检测。

1.6 肝脏纤维化检测 肝组织包埋切片及脱蜡,天

狼星红染液泡染 1 h, 分别用 0.5% 乙酸 I 和 0.5% 乙酸 II 洗、自来水冲洗、封片。

1.7 蛋白质印迹法 (Western-blot) 检测 提取肝细胞和肝组织蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。10% 聚丙烯酰胺凝胶, 每孔加入 50 μg 蛋白样品。一抗 (1 : 1 000 稀释) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, HRP 标记的二抗 (1 : 5 000 稀释) 室温孵育 1 h, 加入化学发光试剂 ECL, 曝光机曝光, NIH Image J 软件分析。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测 提取 RNA, Nano-Drop 2000 检测 RNA 浓度。取 2 000 ng 总 RNA 配制 20 μl 体系, 逆转录。取 cDNA 配制 20 μl 反应体系。94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 s; 50~60 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 s, 35 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 最后降温至 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.9 统计学处理 数据由 GraphPad Prism 9 统计软件统计分析。3 组或多组实验数据用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行统计, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄酮衍生物 C45 对 DIO 小鼠血清糖脂代谢指标的影响 结果如表 1, C45 剂量依赖性改善 DIO 小鼠空腹血糖、空腹胰岛素、体重和肝功能。相比于 LFD 组, HFD 组脂代谢紊乱, TG、TC 和 NEFA 均显著升高, HDL-C/LDL-C 比值显著降低 (表 2), C45

剂量依赖性改善 DIO 小鼠脂代谢。

2.2 黄酮衍生物 C45 对 DIO 小鼠血清氧化应激指标的影响 MDA 反映氧化应激, SOD 反映抗氧化能力。研究发现 HFD 组小鼠血清 MDA 水平是 LFD 组的 (1.66 \pm 0.35) 倍 ($P < 0.001$)。药物干预 4 周后, HFD+C45L 组、HFD+C45M 组、HFD+C45H 组和 HFD+Met 组的 MDA 分别是 HFD 组的 (0.81 \pm 0.17) 倍、(0.78 \pm 0.17) 倍 ($P < 0.05$)、(0.74 \pm 0.14) 倍 ($P < 0.05$) 和 (0.75 \pm 0.10) 倍 ($P < 0.05$)。C45 剂量依赖性降低 MDA 水平, 高剂量 C45 的作用与二甲双胍相当 (图 1A)。

另一方面, HFD 组小鼠 SOD 活力是 LFD 组的 (0.78 \pm 0.07) 倍 ($P < 0.001$)。药物干预 4 周后, HFD+C45L 组、HFD+C45M 组、HFD+C45H 组和 HFD+Met 组的 SOD 活力分别是 HFD 组的 (1.07 \pm 0.09) 倍、(1.20 \pm 0.11) 倍 ($P < 0.01$)、(1.25 \pm 0.06) 倍 ($P < 0.01$) 和 (1.19 \pm 0.16) 倍 ($P < 0.05$)。C45 剂量依赖性增强 SOD 活力, 中、高剂量 C45 的作用与二甲双胍相当 (图 1B)。

2.3 黄酮衍生物 C45 对 DIO 小鼠外周血炎症免疫细胞的影响 检测外周血中炎症单核细胞指标 CD11b⁺/Ly6C⁺ 和激活型中性粒细胞指标 CD11b⁺/Ly6G⁺ 发现, 与 LFD 组相比, HFD 组小鼠外周血中炎

表 1 小鼠体重和肝功能指标 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

实验分组	LFD	HFD	HFD+Met	HFD+C45H	HFD+C45M	HFD+C45L
体重(g) 0周	32.01 \pm 0.30	46.16 \pm 2.52 ^a	44.72 \pm 2.13	44.64 \pm 1.99	44.46 \pm 2.88	44.78 \pm 2.37
体重(g) 4周	34.22 \pm 0.56	55.26 \pm 0.99 ^a	47.44 \pm 0.90 ^c	44.32 \pm 3.14 ^c	50.32 \pm 3.37 ^b	48.92 \pm 3.77 ^c
AST 活性 (U/g 蛋白)	71.20 \pm 5.86	133.48 \pm 13.02 ^a	54.07 \pm 5.07 ^c	54.2 \pm 7.91 ^c	66.53 \pm 7.08 ^c	78.68 \pm 9.31 ^c
ALT 活性 (U/g 蛋白)	30.59 \pm 4.65	48.99 \pm 7.31 ^a	25.82 \pm 2.31 ^c	27.19 \pm 2.83 ^c	30.70 \pm 2.35 ^c	36.12 \pm 5.20 ^b

注: LFD: 低脂组; HFD: 高脂组; HFD+C45L: 高脂+C45 低剂量组; HFD+C45M: 高脂+C45 中剂量组; HFD+C45H: 高脂+C45 高剂量组; HFD+Met: 高脂+二甲双胍组; ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶; 与低脂组比, ^a $P < 0.0001$; 与高脂组比, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.0001$

表 2 小鼠血清糖脂代谢指标 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

实验分组	LFD	HFD	HFD+Met	HFD+C45H	HFD+C45M	HFD+C45L
血糖 (mmol/L)	6.44 \pm 0.67	10.98 \pm 0.74 ^b	7.58 \pm 0.59 ^f	7.94 \pm 0.62 ^f	9.40 \pm 0.46 ^d	9.82 \pm 0.20 ^c
胰岛素 (pg/ml)	1.74 \pm 0.16	10.11 \pm 0.35 ^b	3.59 \pm 0.23 ^f	2.88 \pm 0.23 ^f	3.39 \pm 0.39 ^f	3.58 \pm 0.53 ^f
HOMA-IR	0.49 \pm 0.05	5.05 \pm 0.33 ^b	1.24 \pm 0.16 ^f	0.99 \pm 0.01 ^f	1.39 \pm 0.20 ^f	1.56 \pm 0.26 ^f
总甘油三酯 (mmol/L)	0.46 \pm 0.12	2.18 \pm 0.26 ^b	0.36 \pm 0.11 ^f	0.44 \pm 0.09 ^f	0.97 \pm 0.20 ^f	1.35 \pm 0.35 ^e
总胆固醇 (mmol/L)	2.69 \pm 0.43	8.04 \pm 1.08 ^b	5.03 \pm 0.49 ^f	4.25 \pm 0.36 ^f	4.66 \pm 0.34 ^f	6.27 \pm 0.56 ^d
HDL-C/LDL-C	1.47 \pm 0.05	0.94 \pm 0.13 ^a	1.10 \pm 0.09	1.37 \pm 0.19 ^d	1.47 \pm 0.08 ^e	0.93 \pm 0.12
游离脂肪酸 ($\mu\text{mol/L}$)	55.48 \pm 5.26	409.46 \pm 46.59 ^b	81.17 \pm 13.76 ^f	33.32 \pm 9.06 ^f	105.37 \pm 13.93 ^f	331.51 \pm 35.46 ^d

注: LFD: 低脂组; HFD: 高脂组; HFD+C45L: 高脂+C45 低剂量组; HFD+C45M: 高脂+C45 中剂量组; HFD+C45H: 高脂+C45 高剂量组; HFD+Met: 高脂+二甲双胍组; HOMA-IR: 稳态模型评估-胰岛素抵抗指数; HDL-C/LDL-C: 高密度脂蛋白-胆固醇/低密度脂蛋白-胆固醇, 与低脂组比, ^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.0001$; 与高脂组比, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, ^e $P < 0.001$, ^f $P < 0.0001$

性中性粒细胞比例显著增加($P<0.001$)。C45 干预 4 周后,中、高剂量 C45 显著降低该比例。此外, HFD 组外周血炎症单核细胞比例也显著增加($P<0.05$),但 C45 对其无显著影响(图 2)。

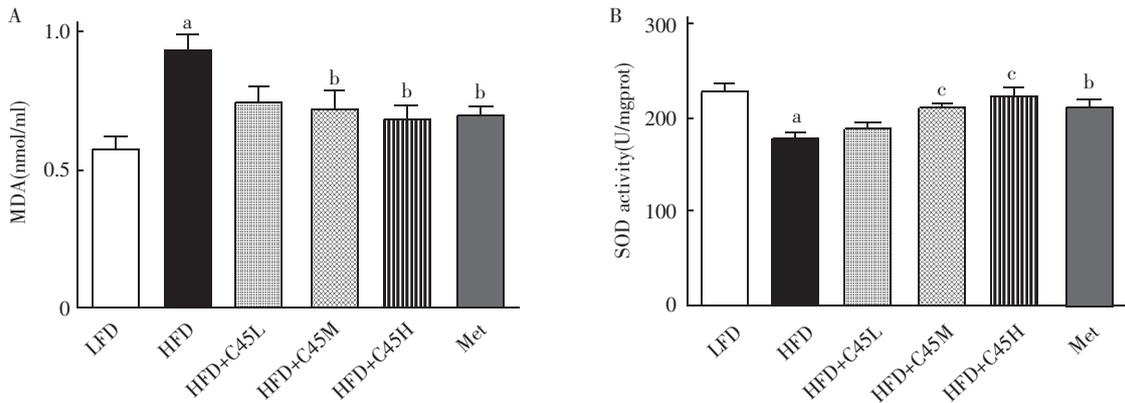
2.4 黄酮衍生物 C45 对 DIO 小鼠肝组织纤维化的影响 如图 3 所示,与 LFD 组相比, HFD 组小鼠肝脏胶原纤维数量增多,纤维体积增粗, C45 改善此现象,提示 C45 对 DIO 小鼠的肝纤维化有保护作用。

2.5 黄酮衍生物 C45 对 HF/M 孵育的肝细胞糖脂代谢的影响及机制 肥胖的脂肪组织缺氧,缺氧的脂肪组织中的脂肪细胞和巨噬细胞分泌的因子影响肝脏糖代谢,笔者应用缺氧共培养这两种细胞的条件培养基模拟肥胖的脂肪组织分泌的因子,发现 HF/M 降低胰岛素磷酸化 Akt 的作用,表明 HF/M

诱发肝细胞胰岛素抵抗。C45 部分逆转 HF/M 的作用, Akt 磷酸化水平是 HF/M 组的(1.81 ± 0.51)倍($P<0.001$,图 4A),表明 C45 可改善糖代谢的胰岛素抵抗。

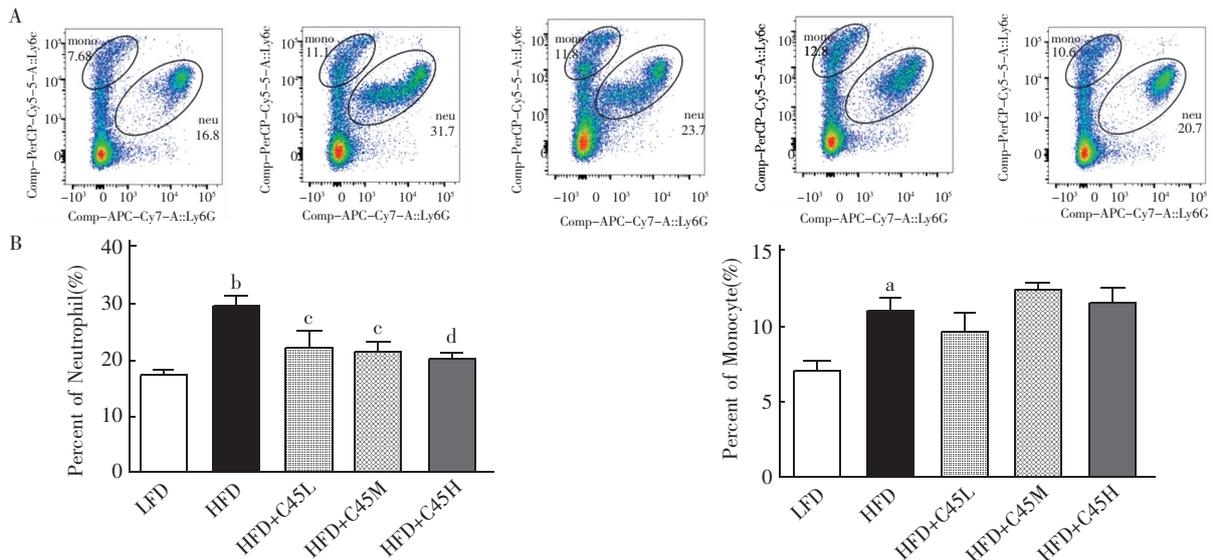
进一步分析 C45 改善胰岛素抵抗的机制,发现 C45 显著抑制炎症相关分子 JNK 和 NF- κ B 的磷酸化, C45 组 JNK 和 NF- κ B 的磷酸化分别为 HF/M 组的(0.82 ± 0.01)倍($P<0.05$)和(0.65 ± 0.16)倍($P<0.05$,图 4B,4C),提示 C45 可能通过抑制 JNK 和 NF- κ B 改善肝细胞胰岛素抵抗。

检测 C45 对 HF/M 诱发的肝细胞脂代谢紊乱的影响,结果显示 HF/M+C45 显著抑制 HF/M 升高过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)和固醇调节元件结合蛋白 1c(SREBP1c)的 mRNA 表达作用,



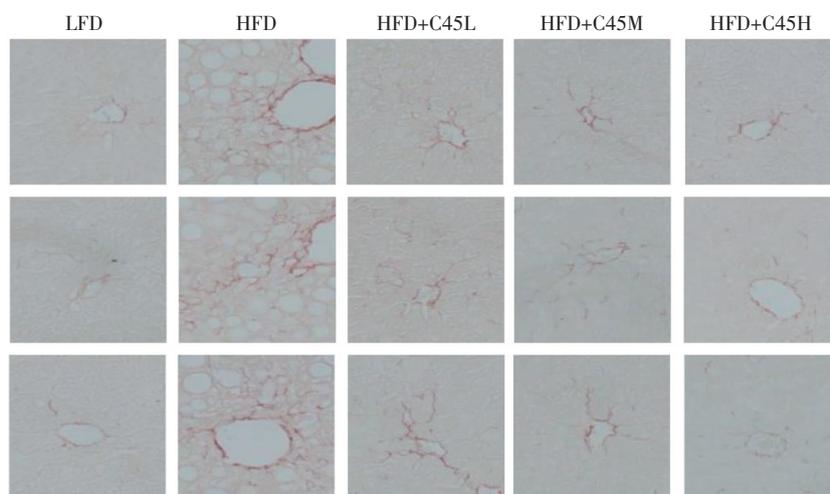
注:MDA(A)和 SOD(B);MDA:丙二醛;SOD:超氧化物歧化酶;LFD:低脂组;HFD:高脂组;HFD+C45L:高脂+C45 低剂量组;HFD+C45M:高脂+C45 中剂量组;HFD+C45H:高脂+C45 高剂量组;HFD+Met:高脂+二甲双胍组;与 LFD 相比, $^aP<0.001$;与 HFD 相比, $^bP<0.05$, $^cP<0.01$;结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,每组小鼠 $n=5$

图 1 ELISA 检测小鼠血清 MDA 和 SOD



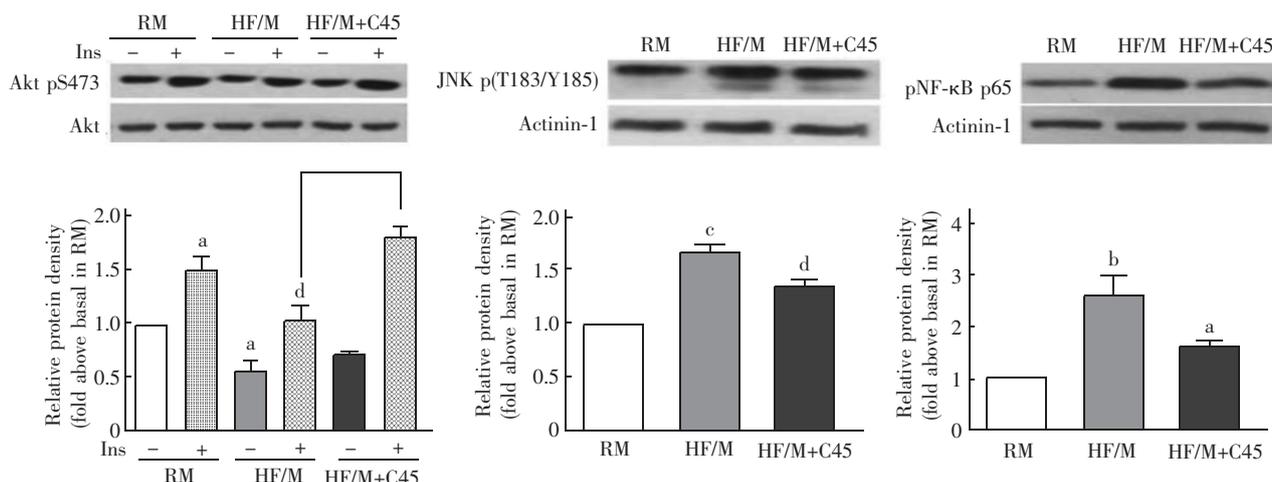
注:A:流式细胞检测图;B:统计图;LFD:低脂组;HFD:高脂组;HFD+C45L:高脂+C45 低剂量组;HFD+C45M:高脂+C45 中剂量组;HFD+C45H:高脂+C45 高剂量组;与 LFD 相比, $^aP<0.05$, $^bP<0.001$;与 HFD 相比, $^cP<0.05$, $^dP<0.01$;结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,每组小鼠 $n=5$

图 2 流式细胞术检测小鼠外周血炎症单核细胞和中性粒细胞



注:LFD:低脂组;HFD:高脂组;HFD+C45L:高脂+C45 低剂量组;HFD+C45M:高脂+C45 中剂量组;HFD+C45H:高脂+C45 高剂量组;结果在 100 倍镜下观察并拍照;每组小鼠 $n=5$

图 3 天狼星红染色检测小鼠肝纤维化



注:RM:普通培养基处理组;HF/M:缺氧共培养的脂肪细胞和巨噬细胞条件培养基处理组;HF/M+C45:HF/M 基础上添加 C45 处理组;Akt:蛋白激酶 B;JNK:c-Jun 氨基末端激酶;NF-κB:核因子-κB;如图所示分组处理 AML12 肝细胞,100 nM 胰岛素作用 10 min,Western blot 检测 Akt(A)、JNK(B)和 NF-κB(C)的磷酸化;细胞研究重复 3 次,与对照 RM 组基础状态相比,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$,^c $P<0.001$;与胰岛素刺激的 RM 组相比,^d $P<0.05$,^e $P<0.01$,^f $P<0.001$

图 4 免疫印迹检测 AML12 肝细胞 Akt、JNK 和 NF-κB 的磷酸化

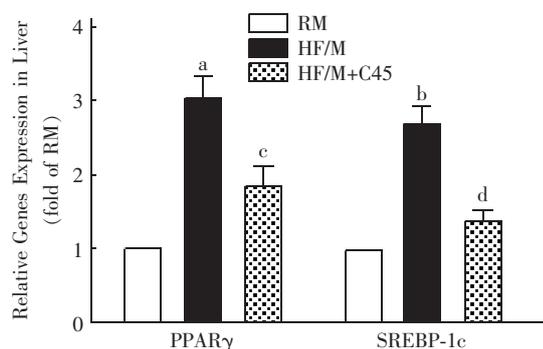
分别是 HF/M 组的 (0.60 ± 0.06) 倍 ($P<0.05$) 和 (0.51 ± 0.14) 倍 ($P<0.01$, 图 5), 提示 C45 有改善脂代谢的药效。

3 讨论

民间应用草本植物委陵菜治疗糖尿病疗效显著,委陵菜黄酮是其有效成分。研究表明黄酮类化合物可以改善血脂异常和胰岛素抵抗^[4]。本课题组合成了黄酮衍生物 C45,研究 C45 对用高脂饮食诱导的肥胖小鼠糖脂代谢的调节作用和机制,发现 C45 以剂量依赖的趋势降低肥胖小鼠空腹血糖和空腹胰岛素以及 TG、TC 和 NEFA 水平,并升高 HDL-C/LDL-C 比值。高剂量 C45 的作用与二甲双胍效果接近,提示 C45 具有改善肥胖小鼠糖脂代谢的作用。

组织器官氧化应激增加与胰岛素抵抗有关^[5],MDA 水平降低、SOD 活力增加可改善糖尿病的氧化应激。有报道黄酮类天然产物有抑制氧化应激的作用,与之一致,本研究发现中、高剂量的 C45 降低血清 MDA 含量并升高 SOD 活力,且高剂量 C45 的效力与二甲双胍相当,表明 C45 改善氧化应激,此作用可能是其改善糖脂代谢的机制之一。天然黄酮芹菜素抑制活性氧的产生,降低炎性因子的表达,抑制内皮细胞氧化应激和炎症反应,胞外信号调节激酶 (ERK)/NF-κB 通路参与此机制^[6]。研究发现 C45 体外抑制 NF-κB 活性,NF-κB 是否参与 C45 调节氧化应激有待进一步研究。

肥胖的脂肪组织浸润的巨噬细胞和脂肪细胞分泌炎性因子,连同脂肪细胞分泌的脂质,诱发系统性



注:RM:普通培养基处理组;HF/M:缺氧共培养的脂肪细胞和巨噬细胞条件培养基处理组;HM/F+C45:HF/M基础上添加C45处理组;PPAR γ :过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ;SREBP1c:固醇调节元件结合蛋白1c;如图处理AML12肝细胞,检测PPAR γ 和SREBP-1c的mRNA水平;实验重复3次,与对照RM组相比,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.001$ 与HF/M组相比,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

图5 实时定量PCR检测AML12肝细胞PPAR γ 和SREBP-1c的基因表达

胰岛素抵抗和炎症^[7]。肝脏的脂质积累促进M1巨噬细胞的活化,加剧胰岛素抵抗以及非酒精性脂肪肝病甚至肝纤维化的发生。许多来源于天然产物的黄酮类化合物或其衍生物如5-羟基黄酮、木犀草素、茺花苷等具有抑制炎症的作用,其机制包括抑制炎症因子的表达以及活性氧的产生等^[8],涉及NF- κ B。本研究发现C45降低肥胖小鼠外周血中中性粒细胞比例,抑制肥胖小鼠肝纤维化,表明C45有改善炎症的作用,与文献报道的黄酮类化合物或其衍生物有相似的作用,但C45对炎症单核细胞比例无显著影响还有待进一步探讨。

肝脏在糖脂代谢中发挥重要作用,胰岛素激活其关键信号分子Akt磷酸化下游分子GSK-3 β ,促进肝糖原合成。此外,肝脏通过糖异生将血中的脂肪酸、氨基酸转化为葡萄糖。活化的Akt磷酸化其下游分子FOXO1,抑制糖异生。因此,根据Akt对胰岛素的应答可评估胰岛素敏感性。笔者前期报道HF/M诱发骨骼肌细胞胰岛素抵抗^[9],本研究发现HF/M诱发肝细胞Akt胰岛素抵抗,而C45逆转HF/M的作用。进一步探讨相关机制,已知炎症相关分子NF- κ B和JNK是胰岛素信号通路的负调节分子,研究发现HF/M激活NF- κ B和JNK,C45显著抑制HF/M的作用,提示C45可能通过抑制NF- κ B和JNK改善肝细胞胰岛素抵抗。随着胰岛素抵抗的改善,C45降低肥胖小鼠血清AST和ALT活性,高剂量C45的作用效果与二甲双胍相当,提示C45在改善肝功能方面具有显著效果。

糖脂代谢密切相关,FOXO1水平与肝脂沉积和脂质分泌正相关^[10]。PPAR γ 调节脂质摄取,

SREBP参与脂质合成,两者的过度活化可造成脂质在肝脏积聚。肥胖时脂质摄取和合成增多,而脂质氧化和输出减少,导致肝脂沉积。本研究发现,HF/M上调PPAR γ 和SREBP-1c的基因表达,C45逆转此现象,提示C45可改善肝细胞脂代谢。

综上,黄酮衍生物C45可改善糖脂代谢紊乱、氧化应激和炎症,改善胰岛素抵抗,有望为预防2型糖尿病的发生发展提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders [J]. Nature, 2006, 444(7121): 860-867. DOI: 10.1038/nature05485.
- [2] Nie JP, Qu ZN, Chen Y, et al. Discovery and anti-diabetic effects of novel isoxazole based flavonoid derivatives [J]. Fitoterapia, 2020, 142: 104499. DOI: 10.1016/j.fitote.2020.104499.
- [3] Qin N, Chen Y, Jin MN, et al. Anti-obesity and anti-diabetic effects of flavonoid derivative (Fla-CN) via microRNA in high fat diet induced obesity mice [J]. Eur J Pharm Sci, 2016, 82: 52-63. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.11.013.
- [4] Vijayaraghavan K, Iyyam Pillai S, Subramanian SP. Design, synthesis and characterization of zinc-3 hydroxy flavone, a novel zinc metallo complex for the treatment of experimental diabetes in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 680(1-3): 122-129. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.01.022.
- [5] Ren BC, Zhang W, Zhang W, et al. Melatonin attenuates aortic oxidative stress injury and apoptosis in STZ-diabetes rats by Notch1/Hes1 pathway [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2021, 212: 105948. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2021.105948.
- [6] Zhang X, Wang G, Gurley EC, et al. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107072. DOI: 10.1371/journal.pone.0107072.
- [7] Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance [J]. Cell Metab, 2008, 7(6): 496-507. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.04.003.
- [8] Aziz N, Kim MY, Cho JY. Anti-inflammatory effects of luteolin: a review of in vitro, in vivo, and in silico studies [J]. J Ethnopharmacology, 2018, 225: 342-358. DOI: 10.1016/j.jep.2018.05.019.
- [9] Zhang C, Luo X, Zhang D, et al. Hypoxic adipocytes induce macrophages to release inflammatory cytokines that render skeletal muscle cells insulin resistant [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 521(3): 625-631. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.10.162.
- [10] Cheng Q, Li YW, Yang CF, et al. Methyl ferulic acid attenuates ethanol-induced hepatic steatosis by regulating AMPK and FoxO1 pathways in rats and L-02 cells [J]. Chem Biol Interact, 2018, 291: 180-189. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.06.028.

(收稿日期: 2022-07-22)