

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.09.001

· 基础研究 ·

木犀草素是具有 PPAR γ 激动剂活性的新型 AMPK 激活剂 *张雨点^{1#} 谢锦艳^{2#} 李小川¹ 张志杰^{2Δ} 李 珍^{1Δ}

(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:木犀草素是一种天然黄酮类化合物,早期报导其能激活 PPAR γ ,本实验室发现其也能激活 AMPK。因此本研究验证木犀草素在脂肪细胞中能否激活 PPAR γ 和 AMPK,并探究这两种活性对脂肪前体细胞分化及脂联素高聚化的影响。**方法:**使用 Lanthascreen TR-FRET PPAR γ 竞争性结合检测试剂盒检测木犀草素与 PPAR γ 的结合能力,并用 PPRE 转录激活报告基因体系验证木犀草素是否激活 PPAR γ 转录活性,利用油红 O 染色法检测木犀草素对 3T3-L1 脂肪前体细胞分化的影响,采用 RNA 干扰沉默成熟脂肪细胞中 AMPK α 1,用 Western Blot 检测相关蛋白水平。**结果:**木犀草素能直接结合 PPAR γ ,其 IC₅₀ 为 1880 nmol·L⁻¹,并显示剂量依赖的 PPAR γ 转录激活活性,抑制 PPAR γ Ser-273 位点磷酸化。木犀草素能升高 pAMPK(Thr-172)水平,抑制脂肪前体细胞分化,升高脂联素高聚化水平。**结论:**木犀草素通过激活 AMPK 和 PPAR γ 调控脂肪前体细胞分化和脂联素高聚化,是一种具有 PPAR γ 激动剂活性的新 AMPK 激活剂,有望成为治疗 II 型糖尿病和肥胖等代谢紊乱疾病的潜在药物。

关键词:木犀草素;PPAR γ ;AMPK;脂联素;胰岛素敏感性

中图分类号:R-33;Q5-33;R281;R915 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)09-1601-07

Luteolin is a Novel AMPK Activator with Partial PPAR γ Agonist Activity*ZHANG Yu-dian^{1#}, XIE Jin-yan^{2#}, LI Xiao-chuan¹, ZHANG Zhi-jie^{2Δ}, LI Zhen^{1Δ}

(1 MOE Key Laboratory of Bioinformatics, 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: In this study, we reported that luteolin, a natural flavonoid with partial PPAR γ -agonist activity, also activates AMPK, and investigated the effects of luteolin on preadipocytes differentiation and adiponectin multimerization in adipocytes. **Methods:** In vitro binding of luteolin to PPAR γ was analyzed by a Lanthascreen time-resolved fluorescent energy transfer (TR-FRET) PPAR γ competitive binding assay; the effect of luteolin on the transcriptional activity of PPAR γ was examined by luciferase reporter assays; the effect of luteolin on preadipocytes differentiation was examined by Oil Red O staining; mature 3T3-L1 adipocytes transfected with mouse AMPK α 1 siRNA were treated with luteolin to detect the levels of total adiponectin and adiponectin oligomers. **Results:** The competitive binding assay confirmed direct binding of luteolin to the LBD of PPAR γ with IC₅₀ being 1880 nmol·L⁻¹. Luteolin dose-dependently increased the transcriptional activity of PPAR γ and inhibited the phosphorylation of PPAR γ at Ser-273. Luteolin increased the level of pAMPK(Thr-172), inhibited preadipocytes differentiation, and increased the level of high molecular weight adiponectin (HMW). **Conclusions:** Luteolin is a novel AMPK activator with partial PPAR γ agonist activity. Luteolin inhibits preadipocytes differentiation and promotes multimerization of adiponectin by activating both AMPK and PPAR γ . The dual-activity makes luteolin a potential insulin sensitizer for the treatment of type II diabetes.

Key words: Luteolin; PPAR γ ; AMPK; Adiponectin; Insulin Sensitivity

Chinese Library Classification(CKC): R-33; Q5-33; R281; R915 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)09-1601-07

前言

单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate

(AMP)-activated protein kinase, AMPK) 是一种丝氨酸 / 苏氨酸激酶, 由具有催化功能的 α 亚基和具有调节功能的 β 和 γ 亚基组成的异源三聚体, 是参与调控糖脂代谢以及细胞生长和调

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31570760)

共同第一作者

作者简介: 张雨点, 硕士研究生, 主要研究方向: 生物学, E-mail: yudian_zhang@163.com;

谢锦艳, 硕士研究生, 主要研究方向: 中药学, E-mail: lotusxie33@163.com

Δ 通讯作者: 张志杰(1966-), 医学博士, 研究员, 主要研究方向: 中药质量控制与新药发现, E-mail: zzjtc@126.com;

李珍(1966-), 教授, 主要研究方向: 2 型糖尿病新型药物靶点的筛选与鉴定, E-mail: lizhen@tsinghua.edu.cn, 电话: 010-62770581

(收稿日期: 2018-07-28 接受日期: 2018-08-23)

亡等过程的重要激酶^[1-3]。当细胞内 AMP 或钙离子浓度升高时, AMPK 上游激酶 (例如 LKB1 和 CaMKK β) 可在 α 亚基 Thr-172 位上磷酸化 AMPK, 从而激活 AMPK^[3], 增强其作为激酶的活性。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR γ) 是一种在脂肪组织中高表达的转录因子, 参与调控脂肪细胞中多种特异性基因的表达及脂肪前体细胞分化过程^[4]。AMPK 及 PPAR γ 是治疗糖尿病的两个重要药物靶点。研究发现, 临床上用于治疗 II 型糖尿病的主要药物二甲双胍 (Metformin) 和噻唑烷二酮类 (Thiazolidinediones, TZDs) 分别是 AMPK 激活剂和 PPAR γ 激动剂^[5,6]。但是二甲双胍通过抑制呼吸链来间接激活 AMPK, 抑制线粒体的功能, 引起乳酸中毒等副作用^[7]。TZDs 也会引起肥胖、膀胱癌等副作用^[5,8]。因此, 随着糖尿病成为全球性健康问题, 迫切需要发现新的副作用小的 AMPK 激活剂及 PPAR γ 激动剂, 以期开发出更有效的糖尿病治疗药物。

木犀草素 (Luteolin) 是一种具有抗炎症、抗肿瘤等多种药理活性的天然黄酮类化合物, 早期有报导称木犀草素能激活 PPAR γ 转录活性, 是 PPAR γ 激动剂^[9-11]。本研究发现木犀草素在脂肪细胞中不仅能激活 PPAR γ , 还能激活 AMPK, 是具有 PPAR γ 激动剂活性的 AMPK 激活剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 木犀草素、盐酸小檗碱、5'-ATP 二钠盐和 5'-AMP 二钠盐 (美国 Sigma 公司, 纯度均为 98 %), DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶 (trypsin)、青霉素-链霉素双抗溶液 (美国 Hyclone 公司), 南美胎牛血清 (FBS) (美国 Gibco 公司), Western Blot 发光底物 (美国 Pierce 公司), 羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗 (美国 Santa Cruz 公司), PVDF 膜 (美国 Millipore 公司), Lanthascreen TR-FRET PPAR γ 竞争性结合检测试剂盒 (美国 Life Technologies 公司, PV4894), 抗 PPAR γ 、pAMPK、AMPK 抗体 (美国 Cell Signaling 公司), 抗 pPPAR γ 抗体 (北京 Bioss 公司), 抗脂联素、脂联素多聚体抗体为实验室自制, 其它试剂均为分析纯 (北京化工厂)。

1.1.2 细胞 3T3-L1 脂肪前体细胞、293T 细胞购于美国 ATCC, 用含 10 % FBS 和 1 % 双抗的 DMEM 高糖培养基, 置于 CO₂ 细胞培养箱 (5 % CO₂, 37 °C) 中培养。

1.1.3 仪器 细胞培养箱 (美国 Revco 公司), 液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 多功能荧光发光分析仪 (德国 BMG LABTECH 公司)。

1.2 方法

1.2.1 PPAR γ 配体亲和力检测 根据 Lanthascreen TR-FRET PPAR γ 竞争性结合检测试剂盒说明进行实验。不同浓度的木犀草素与 5 nmol·L⁻¹ Fluormone Pan-PPAR Green、5 nmol·L⁻¹ GST-PPAR γ -LBD、5 nmol·L⁻¹ 鼠-GST 抗体在 384 孔盘中室温孵育 2 h, 以 DMSO 为无配体对照, 在多功能荧光发光分析仪上检测 TR-FRET 信号, 获得 340 nm 激发波长下 520 nm 发射波长和 490 nm 波长荧光强度, 计算 520 nm/490 nm 比值表示荧光强度。若木犀草素为 PPAR γ 配体, 则会与 Fluormone Pan-PPAR Green 竞争结合到 PPAR γ LBD 上, 荧光强度降低。

将无配体组比值设为 1, 通过计算可得不同浓度木犀草素的相对荧光强度 (relative 520 nm/490 nm)。

1.2.2 荧光素酶检测 PPAR γ 转录活性 将 293T 细胞均匀铺在六孔盘中, 待细胞密度达到 70 %-80 %, 将 PPRE-Luc、PPAR γ 、RXR α 三种质粒共转入细胞中, 构建出 PPRE 介导的转录激活的报告基因检测体系, 培养 6 h 后, 再加入木犀草素, 并培养 18 h, 收集细胞进行荧光素酶检测。

1.2.3 RNA 干扰 设计并合成 si-AMPK α 1, 利用 Lipofectamine 2000 脂质体在成熟 3T3-L1 细胞中转染 si-RNA, 24 h 后更换无抗有血清 DMEM 培养基, 用药物处理细胞 48 h 后收集并裂解细胞, 通过 Western Blot 检测裂解液中相关蛋白的变化情况。

1.2.4 SDS-PAGE 和蛋白免疫印迹 (Western Blot) 给药处理后的细胞用含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液于冰上裂解细胞 2 h, 离心后取上清液, 并加入 β 巯基乙醇还原 30 min 煮沸 5 min 进行变性还原处理, 用 10 % SDS-PAGE 胶分离。对于脂联素多聚体, 则用 2 %-15 % 梯度胶进行分离, 样品无需加热和还原。将蛋白电转到 PVDF 膜上, 用 5 % 脱脂奶粉封闭 1 h, 用相应抗体于 4 °C 孵育过夜, 充分洗膜后, 用二抗室温孵育 1 h, 再次充分洗膜后, 加上发光底物, 在暗室曝光感光胶片, 拍照并处理图像数据。

1.2.5 油红染色检测脂肪前体细胞分化 将 3T3-L1 脂肪前体细胞均匀铺在六孔盘中, 待细胞长满并接触抑制, 使用含木犀草素的诱导液对脂肪前体细胞进行诱导并维持 8 天后, 固定细胞并油红-O 工作液室温下染色 1 h。加入含 4 % NP40 的异丙醇使油红完全溶解于异丙醇, 取 100 μ L 放入 96 孔板, 用酶标仪于 490 nm 波长下检测样品的 OD 值。

1.3 统计学分析

Western Blot 结果用 NIH 的 Image J 软件进行定量分析, 使用 GraphPad Prism 6.0 进行统计分析。本论文中需进行统计学分析的实验都至少进行了 3 次独立的实验且得到了相似的结果, 并展示具有代表性的结果。统计结果用表示, 两组样品间均数的比较采用 t-test, 多组间均数比较采用单因素方差分析 (两两比较采用 LSD 法), $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义, * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 木犀草素通过结合 PPAR γ 激活其转录活性

为验证木犀草素能否作为 PPAR γ 配体激活其转录活性, 我们通过基于时间分辨率-荧光共振能量转移 (time resolved-fluorescence resonance energy transfer, TR-FRET) 的 PPAR γ 配体竞争性结合检测试剂盒检测木犀草素直接结合 PPAR γ 的能力。该实验中, 阳性参照罗格列酮 (Rosiglitazone, Rosi) 表现竞争性结合, 其 IC₅₀ 为 39 nmol·L⁻¹, 木犀草素显示浓度依赖的竞争性结合能力, 其 IC₅₀ 为 1880 nmol·L⁻¹ (图 1A), 说明木犀草素能直接结合 PPAR γ 。

为验证其激活活性, 在 293T 细胞中构建 PPRE 转录激活报告基因体系并检测木犀草素对 PPAR γ 的转录激活活性的影响, 我们发现木犀草素能够剂量依赖性地提高 PPAR γ 转录活性。而加入 PPAR γ 抑制剂 GW9662 后, 木犀草素激活 PPAR γ

转录活性的能力被抑制(图 1B)。说明木犀草素能在 293T 细胞中能激活 PPAR γ 转录活性。因此木犀草素通过直接结合 PPAR γ 激活其转录活性,是 PPAR γ 激动剂。但 10 μ M 木犀草

素对 PPAR γ 转录活性的激活作用仍弱于 0.5 μ M 罗格列酮的效果,证明木犀草素是一个弱 PPAR γ 激动剂。

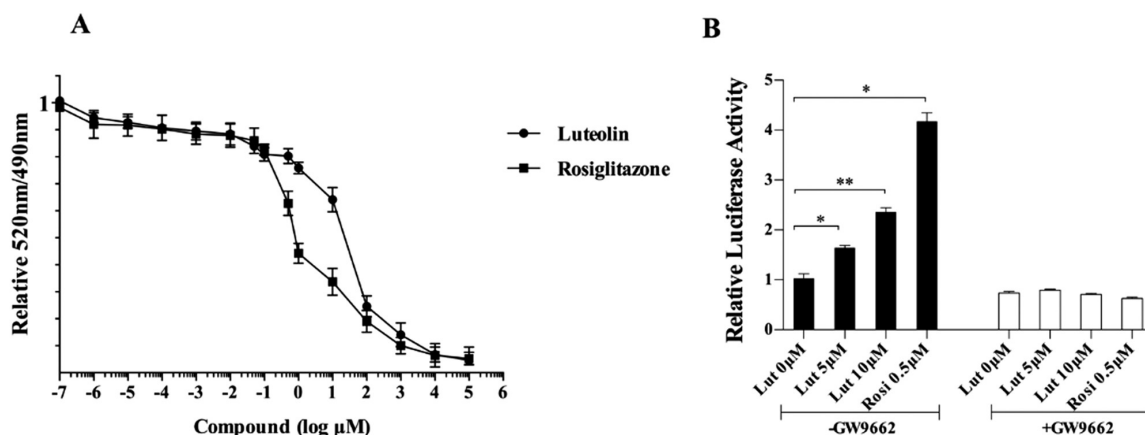


图 1 木犀草素是弱 PPAR γ 激动剂

Fig.1 Luteolin is a weak PPAR γ agonist

A. Lanthascreen TR-FRET PPAR competitive binding assay of luteolin (Lut) and rosiglitazone (Rosi). The reaction mixture containing Fluormone Pan-PPAR Green, GST-PPAR γ -LBD, Terbium-tagged anti-GST antibody, and varying concentration of luteolin and rosiglitazone was incubated in the dark for 2 hours and TR-FRET signals were measured. B. 293T cells were transfected with PPRE-Luciferase reporter along with PPAR γ and RXR α expression vectors. Six hours after transfection, the cells were treated with luteolin or rosiglitazone in the presence or absence of GW9662 (GW) for 18 hours. The cell extracts were subjected to luciferase assay. The results (expressed as the mean $\pm$ SD, n=3) were presented relative to the control (0 μ M luteolin). *, P<0.05; **, P<0.01.

2.2 木犀草素在 3T3-L1 成熟脂肪细胞中抑制 PPAR γ Ser-273 位点磷酸化

TNF- α 会引起炎症反应, 激活 Cdk5 激酶, 从而磷酸化 PPAR γ Ser-273 位点, 导致胰岛素抵抗^[12]。研究发现 TZD 类药物能抑制 PPAR γ Ser-273 磷酸化, 为了检测木犀草素是否有此作用, 用不同浓度的木犀草素处理成熟 3T3-L1 脂肪细胞 1 h,

再用 TNF- α 处理 1 h, 用 Western Blot 检测脂肪细胞中 pPPAR γ 水平。发现木犀草素能剂量依赖地降低 pPPAR γ (图 2), 在木犀草素浓度 20 μ M 时, pPPAR γ 水平被抑制超过 50%(图 2B), 说明木犀草素和 TZD 类药物相似, 能抑制 PPAR γ Ser-273 位点磷酸化。

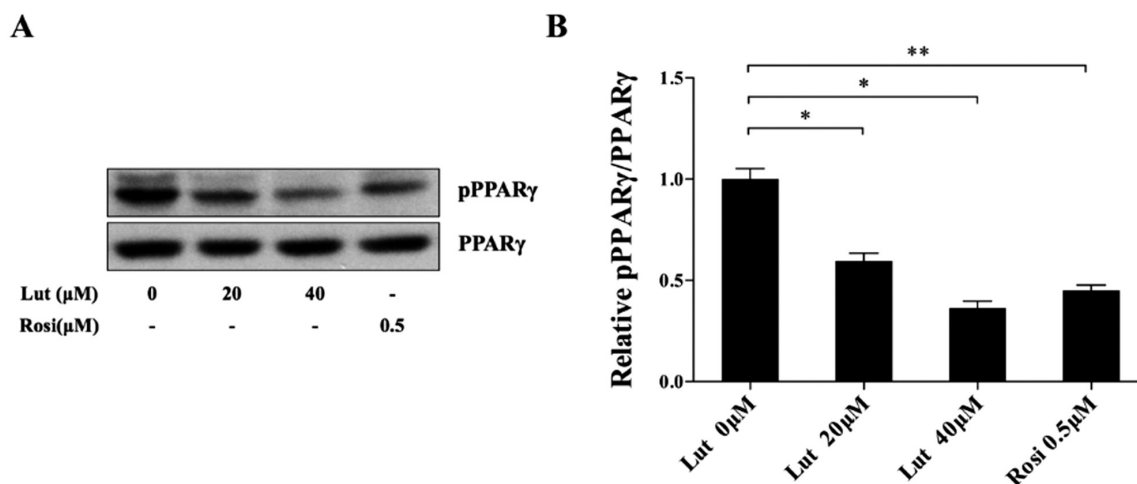


图 2 木犀草素在成熟 3T3-L1 脂肪细胞中抑制 PPAR γ Ser-273 磷酸化

Fig.2 Luteolin inhibits PPAR γ Ser-273 phosphorylation in 3T3-L1 adipocytes

A. 3T3-L1 adipocytes were treated with luteolin or rosiglitazone (Rosi) for 1 hour, followed by treatment with TNF- α for another 1 hour. Phosphorylated PPAR γ at Ser-273 (pPPAR γ) and total PPAR γ were detected using anti-pPPAR γ antibody or anti-PPAR γ antibody, respectively. B. The amounts of pPPAR γ and total PPAR γ were quantified and the pPPAR γ /PPAR γ ratio was calculated and presented relative to the control (0 μ M luteolin).

2.3 木犀草素在 3T3-L1 成熟脂肪细胞中激活 AMPK

通过磷酸化 Thr-172 激活 AMPK, AMPK 激酶活性可显著

提高^[13]。为了探究木犀草素能否激活 AMPK, 我们用不同浓度木犀草素处理成熟 3T3-L1 脂肪细胞 1 h, 用 Western Blot 检测

脂肪细胞中 pAMPK(Thr-172)及 AMPK 水平。经木犀草素处理后,细胞中 pAMPK 水平剂量依赖性地升高(图 3),在木犀草

素浓度为 20 μM 时升高约 1.5 倍。所以木犀草素在成熟 3T3-L1 脂肪细胞中激活 AMPK,是一种新 AMPK 激活剂。

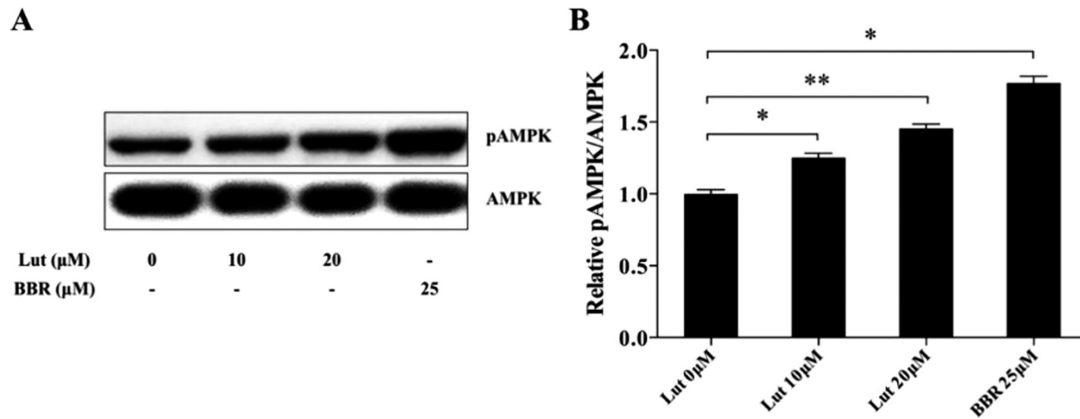


图 3 木犀草素在成熟 3T3-L1 脂肪细胞中激活 AMPK

Fig.3 Luteolin activates AMPK in 3T3-L1 adipocytes

A. 3T3-L1 adipocytes were treated with luteolin for 1 hour. pAMPK and total AMPK were detected using anti-pAMPK antibody or anti-AMPK antibody, respectively. B. The amount of pAMPK and AMPK was quantified and presented relatively to the control (0 μM luteolin).

2.4 木犀草素通过激活 AMPK 和 PPAR γ 抑制 3T3-L1 脂肪前体细胞分化

AMPK 激活剂能抑制脂肪前体细胞分化^[14],而 PPAR γ 是脂肪前体细胞分化的主要调控因子,PPAR γ 激动剂能促进脂肪前体细胞分化。木犀草素能够与 PPAR γ 结合,并激活 PPAR γ 转录活性(图 1)。但与 TZDs 不同的是,木犀草素并不促进脂肪前体细胞分化,反而像 AMPK 激活剂小檗碱(Berberine)一样抑制分化过程;当 AMPK 活性被 Compound C 抑制时,木犀草素 10 μM 可促进分化 2 倍以上(图 4)。说明木犀草素通过激活 AMPK 和 PPAR γ 调控脂肪前体细胞分化,其中木犀草素 AMPK 激活活性起主导作用。该实验验证了木犀草素是具有 PPAR γ 激动剂活性的 AMPK 激活剂的结论。

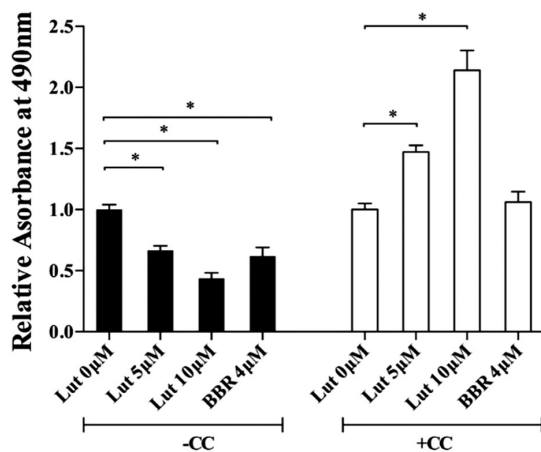


图 4 木犀草素通过激活 AMPK 和 PPAR γ 抑制 3T3-L1 脂肪前体细胞分化

Fig.4 Luteolin inhibits preadipocytes differentiation by activating both AMPK and PPAR γ

3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate in the presence of luteolin or berberine (BBR) with or without Compound C (CC) for 8 days. The cells were stained with Oil Red O. Quantification of the staining results was presented relatively to the control (0 μM luteolin).

2.5 木犀草素通过激活 AMPK 和 PPAR γ 促进脂联素高聚化

脂联素(Adiponectin, Ad)是一种由脂肪组织特异性分泌的脂肪因子^[15],在机体内,Ad 以三种多聚体的形式发挥生理作用:低聚体(low molecular weight, LMW)、中聚体(medium molecular weight, MMW)以及高聚体(high molecular weight, HMW),其中高聚体是调控机体糖脂代谢的主要形式。而脂联素高聚体与脂联素总量的比值(HMW/Total Ad)与胰岛素敏感性呈高度正相关^[16]。II 型糖尿病患者血浆中脂联素高聚体水平显著低于健康人群^[17]。本实验室早期研究表明 AMPK 激活剂(如大黄素、吴茱萸碱、WSF-P-1 等)能够提高 HMW/Total Ad 比值,促进脂联素高聚化^[16,18-20],从而增强胰岛素敏感性。而 PPAR γ 激动剂,如 TZD 类药物,能够激活 PPAR γ 转录活性,使得其下游脂联素基因的表达显著提高,从而提升细胞中 Ad 总量及各多聚体的水平^[21]。

为了探究木犀草素对成熟脂肪细胞脂联素高聚化的影响,我们用不同浓度木犀草素处理成熟 3T3-L1 脂肪细胞 48 h,用 Western Blot 检测脂联素单体总量及多聚体的水平,发现细胞中 HMW 水平升高,LMW 水平降低(图 5A),HMW/Total Ad 比值呈剂量依赖性升高(图 5B)。所以木犀草素能在 3T3-L1 成熟脂肪细胞中促进脂联素高聚化。为了验证这一效果是由 AMPK 介导的,我们使用 siRNA 特异性沉默成熟脂肪细胞 AMPK α 1,然后用木犀草素处理并检测 Ad 多聚体水平,发现 Ad 单体及各个聚体水平均显著升高(图 5A),HMW/Total Ad 比值并不随木犀草素浓度升高而升高(图 5B)。所以,抑制 AMPK α 1 表达后,木犀草素对成熟脂肪细胞脂联素高聚化的调控作用受到抑制,说明木犀草素通过激活 AMPK 促进脂联素高聚体的组装。

沉默 AMPK α 1 后,脂肪细胞中脂联素总量随木犀草素浓度升高而升高(图 5A),说明在成熟脂肪细胞中木犀草素的 PPAR γ 激动剂活性同样调控脂联素的表达。为证实这一点,我们用木犀草素和 GW9662 同时处理成熟脂肪细胞,检测细胞中脂联素及其多聚体水平。我们发现与无 GW9662 参与组相比,同时加入 GW9662 的细胞中脂联素总量下降更加显著(图

5C),说明木犀草素在成熟脂肪细胞中通过激活 PPAR γ 上调脂联素表达,但其作用效果低于其 AMPK 活性作用。当细胞中 PPAR γ 活性被 GW9662 抑制,木犀草素的 AMPK 激活活性变得更显著;在同时加入 GW9662 和 10 μ M 木犀草素的细胞中, HMW/Total Ad 比值是只加入 10 μ M 木犀草素组的 2 倍(图 5D)。

这些结果说明在成熟脂肪细胞中,木犀草素 PPAR γ 激动剂活性和 AMPK 激活剂活性两种活性并存,但 AMPK 激活活性起主导作用,其对脂联素的表达和高聚化的影响是 PPAR γ 激活活性和 AMPK 激活活性共同作用的结果。

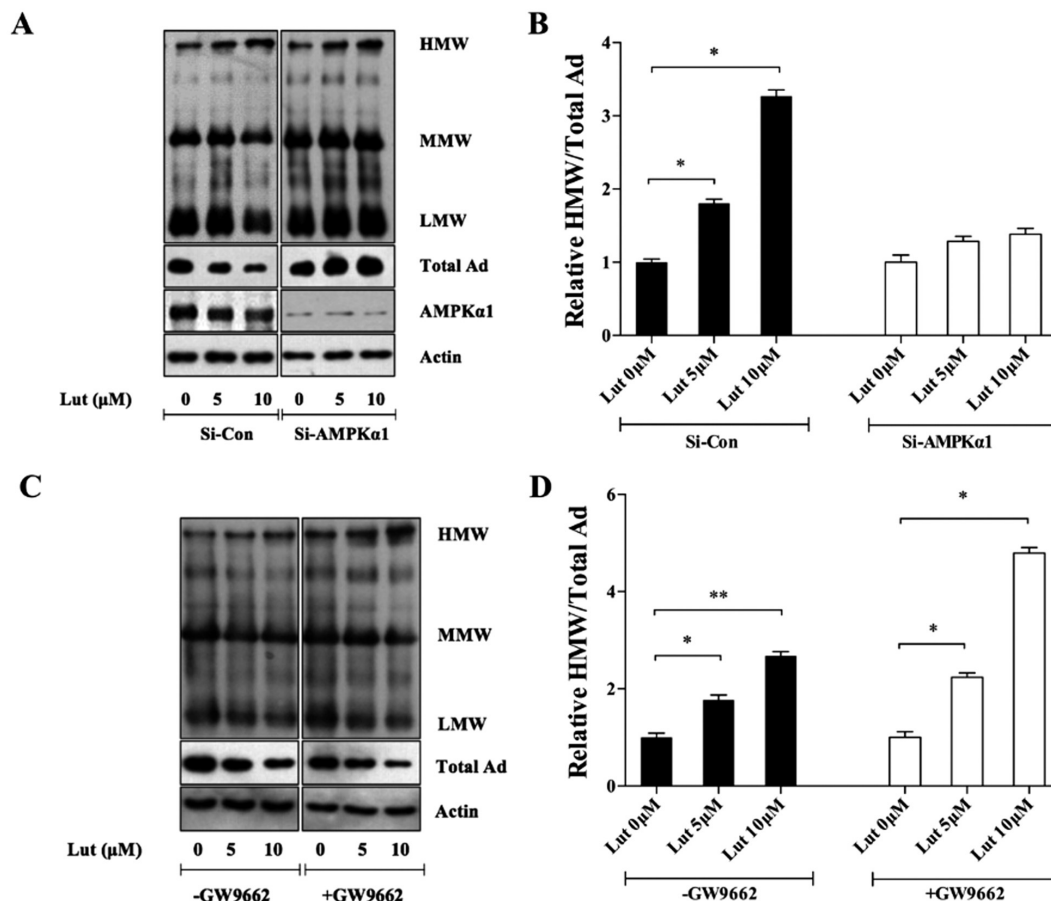


图 5 木犀草素在成熟 3T3-L1 脂肪细胞中通过激活 AMPK 和 PPAR γ 促进脂联素高聚体化

Fig.5 Luteolin promotes adiponectin multimerization by activating both AMPK and PPAR γ in 3T3-L1 adipocytes

A. 3T3-L1 adipocytes transfected with AMPK α 1 siRNA or control siRNA for 48 hours were treated with luteolin for another 48 hours. The cell lysates were subjected to 2%-15% gradient gel electrophoresis under non-reducing and non-heat-denaturing conditions to detect the three oligomeric forms of adiponectin (LMW, MMW and HMW). The amount of total adiponectin (Total Ad), actin, or AMPK α 1 was detected with antibodies against the N-terminal peptide of adiponectin, -actin, or AMPK α 1, respectively. B. The amounts of each oligomer and total adiponectin were quantified and the HMW/total ratio of adiponectin was calculated. The results are presented as the ratio of HMW/total relatively to the control (0 μ M luteolin). C. 3T3-L1 adipocytes were treated with luteolin, or luteolin and GW9662 for 48 hours. The oligomeric forms of adiponectin and the amount of total adiponectin were detected. D. The HMW/total ratio of adiponectin of Figure 5C was calculated and presented.

3 讨论

本研究发现木犀草素能在成熟 3T3-L1 脂肪细胞中升高 pAMPK(Thr-172)水平,激活 AMPK(图 3),是一种新的 AMPK 激活剂。我们的工作进一步证明木犀草素是能够直接与 PPAR γ 结合的 PPAR γ 配体(图 1A),并和 TZD 类药物相似,可以抑制 PPAR γ Ser-273 位点磷酸化(图 2)。同时,木犀草素激活 PPAR γ 转录的活性弱于罗格列酮(图 1B),说明木犀草素是一种弱 PPAR γ 激动剂。我们证明木犀草素是具有弱 PPAR γ 激动剂活性的新 AMPK 激活剂。

AMPK 激活剂能抑制脂肪前体细胞分化,促进脂联素高聚化,升高 HMW/Total Ad 比值,从而增强胰岛素敏感性^[9]。而

PPAR γ 激动剂能激活 PPAR γ 转录活性,升高下游基因表达,提高脂联素及其各聚体水平^[21],却不能升高 HMW/Total Ad 比值。我们发现木犀草素能抑制脂肪前体细胞分化(图 4),促进脂联素高聚化,升高 HMW/Total Ad 比值(图 5B),验证了木犀草素是一种新 AMPK 激活剂。而加入 AMPK 抑制剂 Compound C 后,木犀草素却促进脂肪前体细胞分化(图 4);在成熟脂肪细胞中加入 PPAR γ 抑制剂 GW9662 后,木犀草素能更加显著地升高 HMW/Total Ad 比值(图 5D),验证了木犀草素同样具有 PPAR γ 活性。我们的研究表明,木犀草素在脂肪前体细胞和成熟脂肪细胞中能同时发挥 PPAR γ 激动剂活性和 AMPK 激活剂活性,其中 AMPK 活性占主导地位,表现为抑制脂肪前体细胞分化和促进脂联素高聚体的组装,提高 HMW/Total Ad 比

值(图4、图5),为木犀草素能够增强胰岛素敏感性提供新的依据。

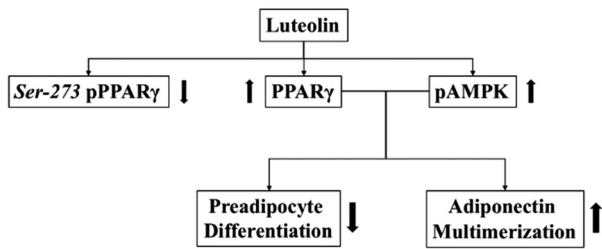


图6 木犀草素在 3T3-L1 脂肪细胞中的作用

Fig.6 The effects of luteolin in 3T3-L1 adipocytes

本课题利用 LanthaScreen TR-FRET PPAR γ 竞争性结合检测试剂盒进行体外 PPAR γ 配体亲和力检测,直观地反映了木犀草素与 PPAR γ 的直接结合作用,显示木犀草素与 PPAR γ 的亲和力水平,与早期木犀草素是 PPAR γ 激动剂的报导相互验证和补充^[9,10]。同时,本研究用不同浓度的木犀草素处理成熟 3T3-L1 脂肪细胞,通过 Western Blot 检测细胞内 AMPK 磷酸化水平,可以直接有效地检测出木犀草素是否能够激活 AMPK。这两种检测方法能快速有效地筛选 PPAR γ 配体和 AMPK 激活剂,可作为实验室高通量筛选药物的有效手段。

本实验室早期研究发现 AMPK 通路在脂联素生物合成过程中有两个重要作用^[19]。一方面,AMPK 被激活后通过抑制 PPAR γ 转录活性抑制 Ad 表达,导致 Ad 的低水平表达。另一方面,AMPK 被激活后促进 LMW 组装成 HMW,导致与胰岛素敏感性有密切关联的 HMW/Total Ad 比值的升高。然而,我们无法预测 HMW 水平的升高能否抵消 Ad 低水平表达带来的生理学影响,因此我们希望能在 Ad 表达水平和 HMW 水平升高两方面找到一个平衡点。与此前我们报导的 AMPK 激活剂(如吴茱萸碱、WSF-P-1 等)不同,木犀草素同时存在 AMPK 和 PPAR γ 两种活性,在升高 HMW/Total Ad 比值的同时仅有限地抑制了 Ad 的表达,AMPK 活性导致的 Ad 低水平表达被 PPAR γ 活性部分抵消。而用罗格列酮等 PPAR γ 激动剂处理细胞,会导致 Ad 及其各聚体水平均显著升高^[2],因此 HMW/Total 比值不会升高。所以,作为具有弱 PPAR γ 活性的 AMPK 激活剂,木犀草素在调控脂联素高聚化方面比其他 AMPK 激活剂和 PPAR γ 激动剂更有优势。

木犀草素早期被报导能作为 PPAR γ 激动剂增强 PPAR γ 转录活性,促进脂肪前体细胞分化^[9,10],但同时也有报导称木犀草素能作为 PPAR γ 拮抗剂抑制脂肪前体细胞分化和 PPAR γ 转录活性^[23]。我们发现,木犀草素是同时具有 PPAR γ 激活活性的 AMPK 激活剂。如果 AMPK 激活活性占主导地位,木犀草素就会像 PPAR γ 拮抗剂一样抑制脂肪前体细胞分化(图4);而在某些环境下,木犀草素的 PPAR γ 活性可能更突出,则表现为 PPAR γ 激动剂。我们的研究为这两种完全相反的前期报导提供了合理解释。

炎症反应与肥胖症、胰岛素抵抗、II 型糖尿病密切相关^[24,25]。越来越多的证据表明,激活 AMPK 能抑制炎症反应^[26]。在下调 AMPK 表达的巨噬细胞中的研究表明,激活 AMPK 能显著降低炎症相关细胞因子的表达^[27]。阿司匹林是常用退热、镇痛、消炎药物,它在体内的主要代谢产物水杨酸被报导能直接激活 AMPK^[28],这就能解释为什么阿司匹林具有抗炎作用。AMPK

同时还是一个肿瘤抑制因子,其激活剂二甲双胍、苯乙双胍和 A-769662 均能在小鼠中抑制肿瘤生长^[29]。在淋巴 B 细胞过表达 Myc 原癌基因产物的转基因小鼠中,敲除 AMPK α 1 会加速淋巴瘤的生长,并伴随着有氧糖酵解的升高^[30]。而激活 AMPK 会促进更加高能效的氧化代谢反应,抑制多种肿瘤细胞中常见的有氧糖酵解反应,从而起到抑制肿瘤生长的作用^[30]。木犀草素具有抗炎、抗肥胖、抗肿瘤等多种药理活性的功能^[31,32],存在于多种可食用植物中,如菠菜、胡萝卜、胡椒等。本研究发现木犀草素能激活 AMPK,为木犀草素的有抗炎和抗肿瘤作用提供新的实验依据。

AMPK 是细胞中保守的腺苷酸感受器,其在糖脂代谢过程中的重要作用使 AMPK 成为治疗 II 型糖尿病的重要靶点^[33,34]。目前所发现的 AMPK 激活剂可以直接或间接激活 AMPK。A-769662 是有效的 AMPK 直接激活剂,通过在不同 AMP 的结合位点上与 AMPK 直接结合来激活 AMPK^[35]。间接激活主要有两种方式:一是升高细胞内 AMP/ATP 的比值,如盐酸小檗碱和二甲双胍通过抑制呼吸链从而增加 AMP/ATP 的比值来间接激活 AMPK^[5,36];二是升高细胞内钙离子浓度,如吴茱萸碱通过 Ca²⁺-PI3K/Akt/CaMKII 信号通路间接激活 AMPK^[34,37]。本实验室将进一步研究木犀草素激活 AMPK 的分子机制,探究木犀草素是否通过升高细胞内 AMP/ATP 的比值或钙离子浓度来间接激活 AMPK,或通过其他直接激活方式来激活 AMPK。若木犀草素能够直接激活 AMPK,则可能避免 AMPK 间接激活剂造成的乳酸中毒等副作用,这一猜想有待进一步研究。

低剂量地饮食补充木犀草素能有效改善小鼠食源性肥胖和胰岛素抵抗^[38]。本研究中,我们为木犀草素通过激活 AMPK 和 PPAR γ 增强胰岛素敏感性提供了更多实验依据;和罗格列酮相似,木犀草素能抑制 PPAR γ 在 Ser-273 位点的磷酸化(图2);与此同时,木犀草素通过激活 AMPK 和 PPAR γ 抑制脂肪前体细胞分化和促进脂联素高聚体组装(图6)。综上所述,木犀草素作为具有弱 PPAR γ 激动剂活性的 AMPK 激活剂,有望成为治疗 II 型糖尿病或其他肥胖相关代谢疾病的新药物。在今后的研究中,本实验室将进一步展开生理学实验,如通过动物实验研究木犀草素对胰岛素抵抗的影响,为木犀草素治疗 II 型糖尿病的临床实验奠定理论基础。

参考文献(References)

- [1] Towler M C, Hardie D G. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling [J]. *Circulation Research*, 2007, 100(3): 328-341
- [2] Hardie D G, Schaffer B E, Brunet A. AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs [J]. *Trends in Cell Biology*, 2016, 26(3): 190-201
- [3] Carling D, Sanders M J, Woods A. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases[J]. *International Journal of Obesity (Lond)*, 2008, 32(Suppl 4): S55-S59
- [4] Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell B B, et al. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(11): 2553-2561
- [5] Brunmair B, Staniek K, Gras F, et al. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? [J]. *Diabetes*, 2004, 53 (4): 1052-1059

- [6] Xu C, Zhao J, Zhou X, et al. Thiazolidinediones versus metformin on improving abnormal liver enzymes in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(15): 12389-12399
- [7] Ota S, Horigome K, Ishii T, et al. Metformin suppresses glucose-6-phosphatase expression by a complex I inhibition and AMPK activation-independent mechanism [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 388(2): 311-316
- [8] Bennett W L, Singh S, Segal J B. An Update on the Comparative Effectiveness and Safety of Medications for Type 2 Diabetes RESPONSE[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2011, 155(8): 563-563
- [9] Ding L, Jin D, Chen X. Luteolin enhances insulin sensitivity via activation of PPARgamma transcriptional activity in adipocytes[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2010, 21(10): 941-947
- [10] Puhl A C, Bernardes A, Silveira R L, et al. Mode of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation by luteolin [J]. *Molecular Pharmacology*, 2012, 81(6): 788-799
- [11] Hong J L, Fristiohady A, Nguyen C H, et al. Apigenin and Luteolin Attenuate the Breaching of MDA-MB231 Breast Cancer Spheroids Through the Lymph Endothelial Barrier in Vitro[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9(220): 1-10
- [12] Choi J H, Banks A S, Estall J L, et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5 [J]. *Nature*, 2010, 466(7305): 451-456
- [13] Suter M, Riek U, Tuerk R, et al. Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(43): 32207-32216
- [14] Lee H, Kang R, Bae S, et al. AICAR, an activator of AMPK, inhibits adipogenesis via the WNT/beta-catenin pathway in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28(1): 65-71
- [15] Hara K, Yamauchi T, and Kadowaki T Adiponectin: an adipokine linking adipocytes and type 2 diabetes in humans[J]. *Current Diabetes Reports*, 2005, 5(2): 136-140
- [16] 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]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(41): 40352-40363
- [17] Turer A T, Scherer P E. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(9): 2319-2326
- [18] Chen Z, Zhang L, Yi J, et al. Promotion of adiponectin multimerization by emodin: a novel AMPK activator with PPARgamma-agonist activity [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2012, 113 (11): 3547-3558
- [19] Li Y, Wang P, Zhuang Y, et al. Activation of AMPK by berberine promotes adiponectin multimerization in 3T3-L1 adipocytes[J]. *FEBS Letters*, 2011, 585(12): 1735-1740
- [20] Wang Y, Zhang Y, Peng H, et al. WSF-P-1, a novel AMPK activator, promotes adiponectin multimerization in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry*, 2017, 81(8): 1529-1535
- [21] Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein[J]. *Diabetes*, 2001, 50(9): 2094-2099
- [22] Wu G, Yi J, Liu L, et al. Pseudoginsenoside F11, a novel partial PPAR gamma agonist, promotes adiponectin oligomerization and secretion in 3T3-L1 adipocytes[J]. *PPAR Research*, 2013, 2013(2013): 1-8
- [23] Park H S, Kim S H, Kim Y S, et al. Luteolin inhibits adipogenic differentiation by regulating PPARgamma activation [J]. *Biofactors*, 2009, 35(4): 373-379
- [24] Donath M Y, and Shoelson S E Type 2 diabetes as an inflammatory disease[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2011, 11(2): 98-107
- [25] Stenkula K G, and Erlanson-Albertsson C Adipose cell size: Importance in health and disease [J]. *American Journal of Physiology-regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2018
- [26] Steinberg G R, Dandapani M, and Hardie D G AMPK: mediating the metabolic effects of salicylate-based drugs?[J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2013, 24(10): 481-487
- [27] Sag D, Carling D, Stout R D, et al. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype[J]. *Journal of Immunology*, 2008, 181(12): 8633-8641
- [28] Hawley S A, Fullerton M D, Ross F A, et al. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase[J]. *Science*, 2012, 336(6083): 918-922
- [29] Huang X, Wullschlegel S, Shpiro N, et al. Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice[J]. *Biochemical Journal*, 2008, 412(2): 211-221
- [30] Faubert B, Boily G, Izreig S, et al. AMPK Is a Negative Regulator of the Warburg Effect and Suppresses Tumor Growth In Vivo [J]. *Cell Metabolism*, 2013, 17(1): 113-124
- [31] Kwon E Y, Jung U J, Park T, et al. Luteolin attenuates hepatic steatosis and insulin resistance through the interplay between the liver and adipose tissue in mice with diet-induced obesity [J]. *Diabetes*, 2015, 64(5): 1658-1669
- [32] Seelinger G, Merfort I, Schempp C M. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin[J]. *Planta Medica*, 2008, 74 (14): 1667-1677
- [33] Lee Y S, Kim W S, Kim K H, et al. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states [J]. *Diabetes*, 2006, 55(8): 2256-2264
- [34] Foretz M, Hebrard S, Leclerc J, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010, 120(7): 2355-2369
- [35] Sanders M J, Ali Z S, Hegarty B D, et al. Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(45): 32539-32548
- [36] 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
- [37] Liu L H, Xie J Y, Guo W W, et al. Evodiamine activates AMPK and promotes adiponectin multimerization in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2014, 16(11): 1074-1083
- [38] Xu N, Zhang L, Dong J, et al. Low-dose diet supplement of a natural flavonoid, luteolin, ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance in mice [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, 58(6): 1258-1268