

7-二氟甲氧基-5,4'-二甲氧基金雀异黄素上调 miR-26b 对妊娠期糖尿病脂肪细胞葡萄糖摄取的影响

孟娅妮¹, 于海伦^{1,2} (1.杭州市妇产科医院妇产科, 杭州 310008; 2.山东省淄博市临淄区人民医院产科, 山东 淄博 255400)

摘要: 目的 探究 7-二氟甲氧基-5,4'-二甲氧基金雀异黄素(7-difluoromethoxy-5,4'-dimethoxygenistein, DFMG)对妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)肠系膜脂肪细胞摄取葡萄糖的影响。方法 提取 GDM 孕妇肠系膜脂肪细胞, MTT 检测不同浓度 DFMG 对脂肪细胞的毒性; 液体闪烁仪检测脂肪细胞对 [³H]-2-脱氧-D-葡萄糖的摄取率; RT-PCR 检测孕妇肠系膜脂肪细胞 miR-26b 及其下游靶基因 PTEN mRNA 表达变化; Western blotting 检测 IRS-PI3K/AKT- mGLUT4 信号通路相关蛋白的表达。结果 DFMG 对体外培养 GDM 孕妇肠系膜脂肪细胞无毒副作用, 与 GDM 组相比, 液体闪烁仪提示 DFMG 可显著促进 GDM 肠系膜脂肪细胞对 [³H]-2-脱氧-D-葡萄糖的摄取率($P<0.05$)。RT-PCR 提示 DFMG 可以显著上调 GDM 脂肪细胞 miR-26b 表达($P<0.05$), 下调 PTEN mRNA 表达($P<0.05$)。Western blotting 提示 DFMG 可以下调 PTEN 蛋白表达($P<0.05$), 上调 p-PI3K、p-AKT 和 mGLUT4 蛋白表达($P<0.05$)。结论 DFMG 可能通过上调 miR-26b 表达, 调节 IRS-PI3K/AKT-GLUT4 信号通路, 调节 GDM 肠系膜脂肪细胞对葡萄糖的摄取率。

关键词: 7-二氟甲氧基-5,4'-二甲氧基金雀异黄素; miR-26b; 妊娠期糖尿病

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)08-1104-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.08.007

引用本文: 孟娅妮, 于海伦. 7-二氟甲氧基-5,4'-二甲氧基金雀异黄素上调 miR-26b 对妊娠期糖尿病脂肪细胞葡萄糖摄取的影响[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(8): 1104-1108.

Effects of 7-Difluoromethoxy-5,4'-dimethoxygenistein on Adipocyte Cells of Gestational Diabetes Mellitus In-taking Glucose via Up-regulation miR-26b

MENG Yani¹, YU Hailun^{1,2} (1.Department of Obstetrics and Gynecology, Hangzhou Obstetrics and Gynecology Hospital, Hangzhou 310008, China; 2.Department of Obstetrics, Zibo Linzi Distict People's Hospital, Zibo 255400, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of 7-difluoromethoxy-5,4'-dimethoxygenistein(DFMG) on adipocyte cells of gestational diabetes mellitus(GDM) in-taking glucose. **METHODS** Adipocyte cells were extracted from mesenteric adipose tissue of GDM patients. The toxicity of different concentrations of DFMG for adipocyte cells were determined by MTT assay. The rate of adipocyte cells in-taking [³H]-2-decoxy-glucose was evaluated by liquid scintillation detector. The expression of miR-26b and its downstream target gene PTEN mRNA were examined by RT-PCR assay. The proteins expression related to IRS-PI3K/AKT-mGLUT4 signaling pathways were assessed using Western blotting method. **RESULTS** There was no toxide side effect of DFMG on adipocyte cells of GDM *in vitro*. Liquid scintillation detector showed DFMG could prompt the rate of adipocyte cells in-taking [³H]-2-decoxy-glucose compared with GDM group($P<0.05$). RT-PCR method indicated DFMG could up-regulate the expression of miR-26b and down-regulate its target gene PTEN mRNA compared with GDM group($P<0.05$). Western blotting assay showed DFMG could reduce the expression of PTEN protein compared with GDM group($P<0.05$), enhance the expressions of p-PI3K, p-AKT and mGLUT4 proteins($P<0.05$). **CONCLUSION** DFMG can promote the rate of adipocyte cells in-taking [³H]-2-decoxy-glucose via up-regulating miR-26b expression, adjusting the IRS-PI3K/AKT-GLUT4 signaling pathways.

KEY WORDS: 7-difluoromethoxy-5,4'- dimethoxygenistein; miR-26b; gestational diabetes mellitus

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是指妊娠期间发生的糖代谢异常, 并发症较多, 已成为围产期主要的健康问题, 当前常采用胰岛素治疗 GDM, 但由于妊娠过程的复杂性及个别患者对胰岛素过敏或不能耐受等原因, 限制了胰岛素的临床使用, 开发新型类胰岛素药物为临床工作者的热点之一^[1]。7-二氟甲氧基-5,4'-二甲氧基金雀

异黄素(7-difluoromethoxy-5,4'-dimethoxygenistein, DFMG)是一种从豆类植物提取的异黄酮化合物衍生物, 具有促进细胞增殖、诱导细胞分化、类雌激素等作用^[2], 但是对人脂肪细胞的作用及其机制尚无报道。本研究提取 GDM 患者脂肪细胞, 体外观察 DFMG 对 GDM 葡萄糖摄取的作用及其可能的分子生物学机制展开研究, 为 GDM 治疗提供理

作者简介: 孟娅妮, 女, 主治医师 Tel: 13968121867 E-mail: hzsymyn2015@126.com

论支持和实验数据。

1 材料

1.1 肠系膜脂肪细胞来源及体外培养

脂肪细胞来源于2015年12月—2016年12月杭州市妇产科医院正常足月妊娠、GDM孕妇肠系膜脂肪细胞未接受/接受DFMG作用各20例,3组孕妇年龄、孕期体质量增加、身高、营养状况、文化程度、病程、并发症差异均无统计学意义,组间具有可比性;所有孕妇均采用剖宫产终止妊娠,手术时取少许肠系膜脂肪组织作研究使用,取材后立即以含青霉素 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和链霉素 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的无菌生理盐水洗净,制成单细胞悬液,用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养^[1]。实验设计通过杭州市妇产科医院伦理委员会审核批准,所有标本取样均得到患者本人同意并签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂

DFMG由湖南师范大学曹建国教授从大豆中提取金雀异黄酮(genistein, GEN),然后在第7位碳原子引入了烷基得到(分子量为544,黄色粉末,纯度为98%)。脂肪细胞用含20%胎牛血清的DMEM在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 含5% CO_2 的空气中培养(青霉素和链霉素,批号分别为140611和140324,山东齐鲁制药)。DMEM、胎牛血清购自杭州四季青公司;人脂肪细胞饥饿培养基(上海妙通公司); ^3H -2-脱氧-D-葡萄糖、D-葡萄糖购于北京原子能研究所;DMSO、MTT购自美国Sigma;一抗PI3K(批号:A02638)、p-PI3K(批号:BA1353-1)、AKT(批号:B00024)、p-AKT(批号:P00024)、GLUT4(批号:BM2162)和mGLUT4(批号:PB0143)均购于Boster公司;一抗IRS(批号:AI618)、p-IRS(批号:AI612)、PTEN(批号:AP686)、二抗(批号:AG019),PVDF膜(批号:FFP26)、TBST封闭液(批号:P0231)、ECL发光试剂盒(批号:P0018)均购于Beyotime公司;脂质体LipofectamineTM2000转染试剂盒(批号:15338-100,美国Invitrogen公司);OneStep RT-PCR试剂盒(批号:STR50)、核酸内切酶BamH I(批号:1010S)、Hind III(批号:1615)和 T_4 DNA连接酶(批号:3332)均购于大连TaKaRa公司。

BPN-240CRH CO_2 细胞培养箱(美国SHEL-LAB公司);BX-51倒置光学显微镜(日本Olympus公司);YH01A液体闪烁计数仪(上海迈迈医疗器械公司);PCR仪(北京博辉生物公司);

165-3301垂直电泳仪、电泳槽和转膜系统均购于美国BIO-RAD公司;LRH-250A生化培养箱(广东医疗器械厂);Perkin elmer lambda bio 2.2紫外分光光度计(美国PE公司);EIX-800酶联免疫检测仪(美国Bio-Tek公司);PIPS-2020凝胶图像分析系统(重庆天海医疗设备公司)。

2 方法

2.1 MTT检测DFMG对脂肪细胞的毒副作用

采用含生理盐水和不同浓度DFMG(0.005, 0.05, 0.5, 5, 50, 500, $5\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的20%胎牛血清的DMEM培养基在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 含5% CO_2 的饱和湿度的培养箱中培养脂肪细胞3, 7, 14 d后,移除培养液,添加 $5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT继续培养4 h,移除MTT混悬液,添加 $100\ \mu\text{L}$ DMSO, $570\ \text{nm}$ 检测光密度(OD)。观察DFMG在体外对脂肪细胞的细胞毒性,细胞增殖率=实验组平均OD值/对照组平均OD值 $\times 100\%$ ^[3]。

2.2 液体闪烁仪检测葡萄糖摄取实验

采用人脂肪细胞饥饿培养基培养脂肪细胞12 h后用PBS冲洗2次,然后用KRP缓冲液和HEPES缓冲液(含或不含 $100\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的胰岛素)继续孵育30 min,再加入 $2\ \mu\text{L}$ ^3H -2-脱氧-D-葡萄糖,孵育10 min后,计算细胞对 ^3H -2-脱氧-D-葡萄糖的摄取。用含有 $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-葡萄糖预冷PBS快速冲洗2次,终止上述反应。向各孔中各加入 $1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH $200\ \mu\text{L}$ 溶解细胞后加入闪烁液,通过液体闪烁计数仪检测各组细胞的葡萄糖摄取率^[4]。

2.3 RT-PCR检测脂肪细胞miR-26b及其下游基因PTEN mRNA表达

采用Trizol法提取RNA, Romega逆转录试剂盒获得cDNA产物(按Romega公司反转录试剂盒说明书进行), SYBR Green I实时定量PCR反应在Light Cycle荧光PCR仪上测定。引物分别是目标基因miR-26b: 5'-CAAAGGTCCATAGCAAGG GT-3', 5'-GCGACCTTGTCATGGTTTATAG-3'; 内参基因U6: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACAA-3', 反义链5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; 目标基因PTEN: 5'-TCAGGCGAGGGAGATGAGA-3', 5'-GACGAA GAGGAGGCGAGAAA-3'; 内参基因GAPDH: 5'-ACGTCTGCTGGAAGGTGGAC-3', 反义链5'-GGTACC ACCATGTACCCAGG-3'。采用 C_t 值($2^{-\Delta\Delta C_t}$)法表示相对表达量^[5]。

2.4 Western blotting 检测脂肪细胞 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达

采用 PMSF 细胞裂解液提取蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 取 50 μg 样品用 SDS-PAGE 分离, 然后将蛋白转移至 PVDF 上, 再用 5% 脱脂牛奶-TBST 室温摇床封闭 2 h, 一抗于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3 h, 二抗于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, ECL 发光剂激发荧光, 压片显影定影。结果用灰度扫描仪处理分析^[6]。

2.5 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 组间均数比较用 One-way ANOVA 分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 DFMG 对脂肪细胞的毒副作用

采用含生理盐水和不同浓度 DFMG(0.005, 0.05, 0.5, 5, 50, 500, 5 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基作用于 GDM 脂肪细胞 3, 7, 14 d 后, 各时间段细胞增殖率比较, 组间比较差异无统计学意义, 提示 DFMG 对体外培养人妊娠脂肪细胞增殖无毒副作用。结果见图 1。

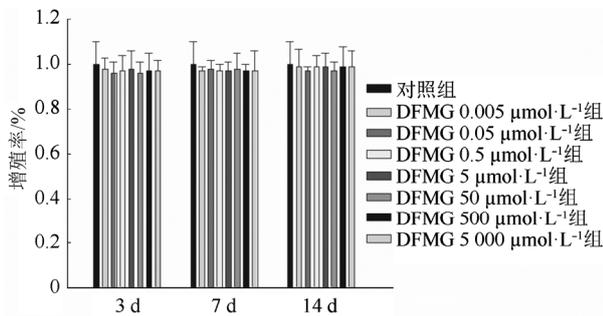


图 1 DFMG 对人 GDM 脂肪细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of DFMG on the proliferative rate of GDM adipocyte cells

3.2 液体闪烁仪检测脂肪细胞对葡萄糖的摄取量

液体闪烁仪检测提示脂肪细胞对 $[^3\text{H}]-2\text{-D}$ -脱氧-D-葡萄糖的摄取率, 与对照组比较, GDM 组细胞对 $[^3\text{H}]-2\text{-D}$ -脱氧-D-葡萄糖的摄取率显著降低, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而经 DFMG 治疗后, 脂肪细胞对 $[^3\text{H}]-2\text{-D}$ -脱氧-D-葡萄糖的摄取率明显提高, 与 GDM 组比较, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); DFMG 治疗 14 d 后, 与对照组比较 $[^3\text{H}]-2\text{-D}$ -脱氧-D-葡萄糖摄取率略低, 但 2 组间比较差异无统计学意义。结果见图 2。

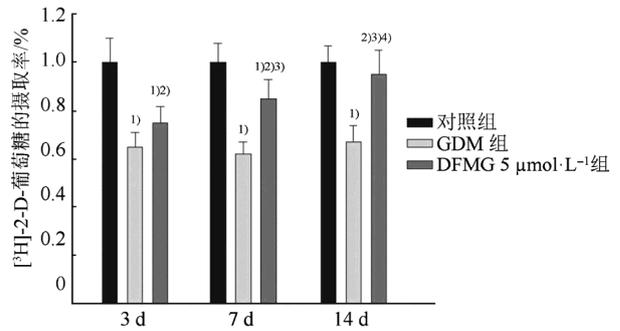


图 2 DFMG 对脂肪细胞对 $[^3\text{H}]-2\text{-D}$ -葡萄糖的摄取量的影响与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 GDM 组比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与作用 3 d 比较, ³⁾ $P < 0.05$; 与作用 7 d 比较, ⁴⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 2 Effects of DFMG on the intaking amount of $[^3\text{H}]-2\text{-deoxy-glucose}$ of adipocyte cells

Compared with normal control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with GDM group, ²⁾ $P < 0.05$; compared with administrated for 3 d, ³⁾ $P < 0.05$; compared with administrated for 7 d, ⁴⁾ $P < 0.05$.

3.3 RT-PCR 检测 miR-26b 在脂肪细胞中的表达

miR-26b 在对照组、GDM 组和 DFMG 组脂肪细胞中均有表达; GDM 组中 miR-26b 的表达显著低于对照组和 DFMG 组, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 对照组中 miR-26b 的表达高于 DFMG 组, 但 2 组之间差异不具有统计学意义。结果见图 3。

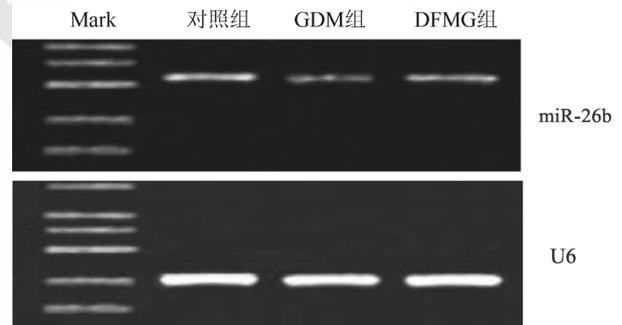


图 3 DFMG 对 miR-26b 在脂肪细胞中的表达的影响

Fig. 3 Effects of DFMG on the expression of miR-26b in adipocyte cells

3.4 RT-PCR 检测 PTEN mRNA 在脂肪细胞中的表达

PTEN mRNA 在对照组、GDM 组和 DFMG 组脂肪细胞中均有表达; GDM 组中 PTEN mRNA 的表达显著高于对照组和 DFMG 组, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 对照组中 PTEN mRNA 的表达低于 DFMG 组, 但 2 组之间差异不具有统计学意义。结果见图 4。

3.5 Western blotting 检测 PI3K/AKT 信号通路蛋白在脂肪细胞中的表达

在对照组、GDM 组和 DFMG 组中, 脂肪细胞

IRS、p-IRS、PI3K、AKT 和 GLUT4 蛋白表达，组间差异无统计学差异。与对照组比较，GDM 组脂肪细胞 PTEN 蛋白表达上调，组间差异有统计学意义($P<0.05$)；而经 DFMG 作用后的 GDM 脂肪细胞，PTEN 蛋白表达下调，与 GDM 组比较，组间差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较，GDM 组脂肪细胞 p-PI3K，mGLUT4 和 p-AKT 蛋白表达下调，组间差异有统计学意义($P<0.05$)；而经 DFMG 作用后的 GDM 组脂肪细胞 p-PI3K，mGLUT4 和 p-AKT 蛋白表达上调，与 GDM 组比较，组间差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 5。

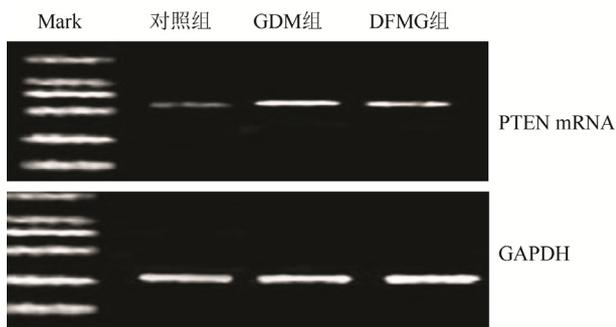


图 4 PTEN mRNA 在脂肪细胞中的表达
Fig. 4 Effects of DFMG on the expression of PTEN mRNA in adipocyte cells

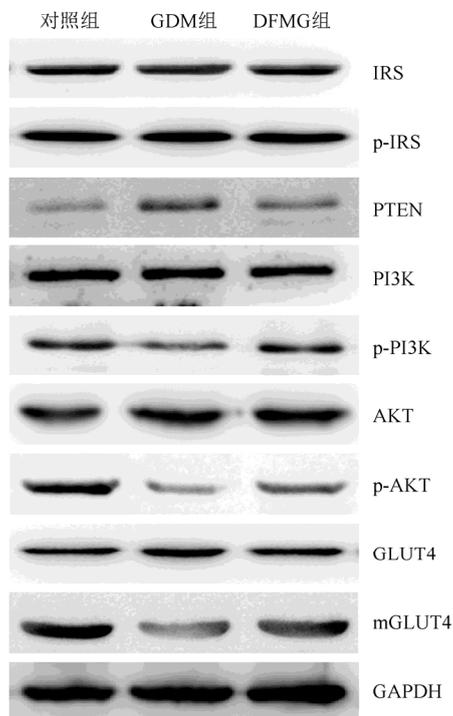


图 5 DFMG 对 PI3K/AKT 信号通路蛋白在脂肪细胞中表达的影响
Fig. 5 Effects of DFMG on the related proteins of PI3K/AKT signal pathway in adipocyte cells

3 讨论

GEN 是一种从植物中提取的类黄酮药物，它药理作用广泛，具有抗肿瘤、抗氧化、促进增殖以及促代谢等作用，但 GEN 溶解性差、肠道吸收少、血药浓度较低、体内活性低下，限制了它的临床应用^[2]，DFMG 是在 GEN 母核第 7 位碳原子引入了烷基而合成的 GEN 衍生物，不仅其溶解性和肠道吸收均显著提高，生物活性也显著改善。研究表明 DFMG 有抗肿瘤、抗氧化作用^[2]，但是对 GDM 患者脂肪细胞的调节作用尚未报道，为此本研究拟检测 DFMG 对肠系膜脂肪细胞的代谢作用是否有调节作用。本研究提取 GDM 患者肠系膜脂肪细胞，检测其对脂肪细胞代谢的影响及其可能的分子生物学机制，为临床治疗 GDM 提供理论支持和实验数据。

微小 RNA(miRNA)是机体内源性表达的非编码小分子单链 RNA，长约 21~23 个核苷酸，没有开放阅读框，无法编码任何蛋白质，通过转录后机制调控基因的表达，参与生命活动和疾病的发生发展，并具有高度保守性、组织特异性及时序性^[3]。目前已鉴定出 8 000 余种家族成员、能对真菌、病毒等生物体的发育过程起抑制或促进作用^[4]。研究表明，miRNA 参与调控脂肪细胞的分化、胰岛素的产生和分泌、糖脂代谢的调节等生物学过程，近来的研究发现 miRNA 可能参与胰岛素抵抗的发生^[5]。本研究 DFMG 对体外培养的 GDM 患者的肠系膜脂肪细胞无毒副作用，但可以促进肠系膜脂肪细胞对葡萄糖的摄取率，伴随着 miR-26b 表达均显著上调($P<0.05$)，PTEN mRNA 显著下调($P<0.05$)，提示 miR-26b 参与了 GDM 的发生发展，而 DFMG 可以通过对 miR-26b 调节，发挥对 GDM 肠系膜脂肪细胞葡萄糖的摄取调控作用，这与张乃键的研究结果相似^[6]。

机体在正常情况下，胰岛素作用靶器官或组织细胞，主要通过 IRS-PI3K/AKT-GLUT4 途径发挥胰岛素刺激下的葡萄糖摄取吸收^[1,7]。本研究发现 DFMG 处理后的 GDM 孕妇肠系膜脂肪细胞 IRS 和 p-IRS 蛋白表达差异无统计学意义，提示 DFMG 调节 GDM 患者肠系膜脂肪细胞对葡萄糖的摄取作用与胰岛素受体、胰岛素受体底物及其磷酸化无关联。PTEN 基因对 PI3K/AKT 具有负性调控作用，有研究表明，PTEN 基因参与糖尿病和肥胖患者的代谢机制^[8-9]。本研究发现 DFMG 处理后的

GDM 患者肠系膜脂肪细胞对葡萄糖的摄取量提高, 伴随着 PTEN 蛋白表达降低, 其下游基因 p-PI3K、p-AKT 和 mGLUT4 蛋白表达增高, 而 GLUT4 蛋白总体表达不变, 这提示 PTEN 基因可能通过调控 PI3/AKT-mGLUT4 信号通路参与 GDM 的发生发展; 而 DFMG 可能通过调节 GDM 患者肠系膜脂肪细胞 miR-26b 及其下游靶基因 PTENmRNA 的表达, 进一步调节 PI3K/AKT-mGLUT4 信号通路, 发挥其对脂肪细胞葡萄糖摄取的调控作用, 这与 Aziz 等^[10]研究的 DFMG 的前体物质调节 3T3-L1 脂肪细胞代谢的效果相一致, 提示 DFMG 与其前体物质一样, 具有调节肠系膜脂肪细胞代谢的功能。

综上所述, DFMG 在体外对人 GDM 患者肠系膜脂肪细胞无毒副作用, DFMG 可通过调节 GDM 患者肠系膜脂肪细胞 miR-26b 及其下游靶基因 PTENmRNA 的表达, 进而调节 PI3K/AKT-mGLUT4 信号通路, 发挥其对 GDM 患者肠系膜脂肪细胞的葡萄糖的调控作用, DFMG 有望成为一种治疗 GDM 新型药物, 但目前研究仅仅局限于体外实验, 相关机制和体内实验还需进一步研究。

REFERENCES

[1] WANG H R, JIANG M, XU Z X, et al. miR-146b-5p promotes VSMC proliferation and migration [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 12901-12907.

- [2] ZHANG Y, LI L, YOU J, et al. Effect of 7-difluoromethyl-5, 4'-dimethoxygenistein on aorta atherosclerosis in hyperlipidemia ApoE(-/-) mice induced by a cholesterol-rich diet [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2013(7): 233-242.
- [3] MEI Z R, TAN X P, HUANG H H, et al. Puerarin against Alzheimer's disease by inhibition β -amyloid protein [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2015, 32(1): 5-9.
- [4] SHI Y X, YU L, ZHAI M F, et al. Effect of nano Chinese yam polysaccharide on 4 kinds of tumor cells [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2016, 33(8): 968-971.
- [5] HA B G, NAGAOKA M, YONEZAWA T, et al. Regulatory mechanism for the stimulatory action of genistein on glucose uptake *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(5): 501-509.
- [6] ZHANG N J. The molecular mechanisms underlying miR-26b affecting insulin sensitivity in adipocytes [D]. Bengbu: Bengbu Medical College, 2015.
- [7] LIU F, CAO J G, LI C, et al. Protective effects of 7-difluoromethyl-5,4'-dimethoxygenistein against human aorta endothelial injury caused by lysophosphatidyl choline [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 363(1/2): 147-155.
- [8] HE A, ZHU L, GUPTAL N, et al. Over-expression of miR-29, highly upregulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(11): 2785-2794.
- [9] LI J, YING H, CAI G, et al. Pre-eclampsia-associated reduction in placental growth factor impaired beta cell proliferation through PI3k Signalling [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(1): 34-43.
- [10] AZIZ S A, WAKELING L A, MIWA S, et al. Metabolic programming of a beige adipocyte phenotype by genistein [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61(2): 1600574. doi: 10.1002/mnfr.201600574.

收稿日期: 2017-01-10
(本文责编: 蔡珊珊)

撤稿声明

本刊于 2013 年第 30 卷第 7 期 718~722 页发表的《新型低氧还原剂 Q39 通过阻断 HIF-1 α 转运引起肝癌 Bel-7402 细胞凋亡》论文, 因作者原因, 现予以撤稿, 特此声明。