

· 论 著 ·

灰兜巴中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 活性部位的筛选^{*}

张圣英, 黄子婷, 刘喜纲, 杨坤宝[△]

(承德医学院中药研究所, 河北 承德 067000)

[摘要] **目的** 通过构建过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 激动剂的细胞筛选模型, 检测灰兜巴的不同极性提取物对 PPAR γ 的激活效率。为开发新型、高效、安全的天然 PPAR γ 激动剂提供可靠的实验依据。**方法** 采用 Lipofectamine3000 转染试剂将重组质粒 pBIND-PPAR γ -LBD 与报告质粒 pGL4.35 共同转入 293T 细胞中, 同时在 293T 细胞中只转染 pGL4.35 报告质粒作为阴性对照, 以 PPAR γ 激动剂人工合成配体吡格列酮作为阳性对照药, 通过检测荧光素酶活性来计算灰兜巴的不同极性提取物对 PPAR γ 的激活作用。所有结果均使用 Origin2021 软件分析计算, 样品间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结果** 阳性对照组加入 0.75 $\mu\text{mol/L}$ 的吡格列酮后荧光强度较空白对照组荧光强度增加 1.27 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 阴性对照组加入吡格列酮后未见荧光素酶被激活; 共转染细胞组加入不同浓度 (400、200 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$) 灰兜巴的不同极性提取物后, 荧光素酶激活程度各不相同, 其中 400 $\mu\text{g/mL}$ 的正己烷、正丁醇、水提醇沉上清、水提醇沉部分的激活能力相当于空白对照组的 145%、128%、147%、157%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 将 PPAR γ 重组质粒和报告质粒 pGL4.35 共转染入 293T 细胞中可作为 PPAR γ 激活能力的细胞筛选模型, 灰兜巴正己烷、正丁醇、水提醇沉上清、水提醇沉提取物可作为 PPAR γ 的天然激动剂。

[关键词] 灰兜巴; 糖尿病; PPAR γ ; PPAR γ 激动剂; 肾脏纤维化

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.11.002

中图法分类号: R966

文章编号: 1009-5519(2023)11-1809-05

文献标识码: A

Screening of active site of peroxisome proliferator-activated receptor γ in Huidouba^{*}

ZHANG Shengying, HUANG Ziting, LIU Xigang, YANG Kunbao[△]

(Institute of Traditional Chinese Medicine Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a cell screening model of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) agonist, in order to detect the activation efficiency of different polar extracts of Huidouba on PPAR γ . And to provide a reliable experimental basis for the development of new, efficient and safe natural PPAR γ agonists. **Methods** The recombinant plasmid bind-PPAR γ -LBD and the reporter plasmid pGL4.35 were co-transfected into 293T cells with Lipofectamine3000 transfection reagent. Meanwhile, the reporter plasmid pGL4.35 transfected in 293T cells only was used as a negative control. The PPAR γ agonist synthetic ligand pioglitazone was used as the positive control drug. The activation effect by different polar extracts in Huidouba on PPAR γ was calculated by detecting luciferase activity. All results were calculated using Origin 2021 analysis with statistically significant differences between samples ($P < 0.05$). **Results** After adding 0.75 $\mu\text{mol/L}$ of pioglitazone in the positive control group, the fluorescence intensity was 1.27 times higher than that of the blank control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). No luciferase was activated after adding pioglitazone to the negative control group. After different concentrations (400 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$) of different polar extracts were added to the co-transfected cell group, the activation degree of firefly luciferase was different. The activation capacity of 400 $\mu\text{g/mL}$ n-hexane, n-butanol, water-extracted alcohol precipitation supernatant and water-extracted alcohol precipitation extract was equivalent to 145%, 128%, 147% and 157% of the blank control group ($P < 0.01$). **Conclusion** PPAR γ recombinant plasmid and reporter plasmid pGL4.35 are co-transfected into 293T cells, which can be used as the cell screen-

^{*} 基金项目: 承德医学院重点课题项目 (201810)。

作者简介: 张圣英 (1996—), 在读硕士研究生, 主要从事民族药治疗糖尿病及并发症作用机制研究工作。 [△] 通信作者, E-mail: ykb2002-0216@163.com。

ing model of PPAR γ activation. n-hexane, n-butanol, water-extracted alcohol precipitation supernatant and water-extracted alcohol precipitation extract can be used as the natural agonist of PPAR γ .

[Key words] Huidouba; Diabetes; Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist; Renal fibrosis

过氧化物酶体增植物激活受体 γ (PPAR γ)是配体激活的转录因子,是调节细胞分化和机体代谢过程中的重要因子,尤其在脂肪和葡萄糖的动态调节方面发挥重要作用^[1]。其主要作用机制是 PPAR 转录因子与相应的受体形成异源二聚体,随后与其靶基因上的序列特异性结合,激活配体,形成 PPAR 的活化复合物,从而导致糖脂代谢相关基因过度表达^[2],造成糖脂代谢失衡。噻唑烷二酮(TZD)是核受体 PPAR γ 特异性高且极具亲和力的外源性配体。然而,TZD 具有严重的不良反应,包括心血管并发症、液体潴留和骨流失等,给机体带来巨大伤害,因此限制了其在临床上的广泛应用^[3]。因此,以 PPAR γ 作为靶点,从天然药物中筛选出安全有效的活性物质的研究工作变得极其重要。基于这一基础,作者找到了一味降糖效果显著的民间中药灰兜巴。灰兜巴(又名闭口袋),其性味平、淡,具有缓解糖尿病症状,改善胰岛 β 细胞,调节体内血糖的自然平衡功能^[4]。本文将构建 PPAR γ 激动剂筛选细胞模型,检测灰兜巴的不同极性提取物对 PPAR γ 的激活效率,为开发新型、高效、安全的激动 PPAR 的活性部分提供了可靠的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

1.1.1 材料 实验菌株:大肠埃希杆菌 DH5 α 菌株(天根生物公司)、质粒: pGL4. 35 (luc2p/ 9XGAL4UAS/Hygro,美国 Promega 公司)、实验室自组合质粒, pBIND-PPAR γ -LBD、细胞: HEK-293T 细胞(中国科学院上海细胞库,由承德医学院基础医学研究所保存)。中药材:灰兜巴,购于四川省峨眉山市双福镇,6 月中下旬采摘,晒制,专家鉴定为正品。

1.1.2 试剂 无内毒素质粒大提试剂盒(天根生物公司)、Bright-GloTM 荧光底物(美国 Promega 公司), UltraFection 3.0 高效转染试剂(美国 Invitrogen 公司),胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司),DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司),双抗(PS)青链霉素混合液(索莱宝公司),胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),PBS 缓冲液(美国 Gibco 公司),吡格列酮(MCE 公司),二甲基亚砷(DMSO,索莱宝公司),CCK-8 分析试剂盒(索莱宝公司),正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、无水乙醇(美国迈瑞达公司)。

1.1.3 仪器 AG-245 电子分析天平(瑞士 MET-

TLER),DRC-1000REEC 冻干机(日本 Rikakkikai 公司),IKA RV8V 型旋转蒸发器(德国艾卡仪器有限公司),MS-H280-Pro 型加热磁力搅拌器(北京大龙兴创实验仪器有限公司),Elx808 型酶标仪(美国 Bio Tek 公司),超纯水系统(美国 Millipore 公司),微孔板(96 孔)和细胞培养板(6 孔),(美国 Corning Costar 公司),CO₂ 细胞培养孵箱(德国 Heraeus 公司),超净工作台(上海跃进医疗器械厂),倒置荧光相差显微镜(日本 Nikon 公司),SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(LI-CHEN 力辰科技有限责任公司),UV-1700 紫外分光光度计(日本岛津公司),SPX-250-Z 恒温培养摇床(上海跃进医疗器械有限公司),低温超速离心机(德国 Heraeus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 pBIND-PPAR γ -LBD 质粒的构建 pBIND-PPAR γ -LBD 的合成:此次实验选择使用 pBIND 质粒作为载体,结构见图 1,利用 Premier 软件设计 PPAR γ 的 PCR 引物,见表 1,通过 RT-PCR 从 HuH7 细胞 RNA 克隆 PPAR γ -LBD cDNA 序列,将所得的 PCR 反应产物在 1%琼脂糖凝胶上跑电泳,回收跑完后的目的条带,将载体 pBIND 质粒和目的基因 PPAR γ -LBD 的 PCR 产物进行酶切,然后回收、纯化酶切后产物,再将纯化的 PPAR γ -LBD 连接至酶切后的 pBIND 上形成新的重组质粒 pBIND-PPAR γ -LBD,并通过 DH5 α 感受态大肠埃希杆菌转化,接着挑取单克隆菌落进行 PCR 验证,然后用 LB 液体培养基在摇床上扩大培养含有目的质粒的菌落,严格按照所购买的质粒提取试剂盒操作步骤提取重组质粒,参考 PPAR γ -LBD 和 pBIND 的序列,采用 KpnI 和 Sall 对构建的表达质粒进行双酶切鉴定, pBIND-PPAR γ -LBD 鉴定结果见图 2,重组质粒经过电泳验证后,送碧云天生物技术有限公司进行测序鉴定,测序结果通过 NCBI Blast 比对,询问序列和目标序列完全匹配,同源性 100%,表明表达质粒构建成功,可用于下一步的转染实验。此过程由北京恩威天诚科技有限公司协助完成。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列 5'-3'
PPAR γ -F	ACGCGTCGACTCTCATAATGCCATCAG
PPAR γ -R	GGGGTACCTTCCGTGACAATCTGTCTGA

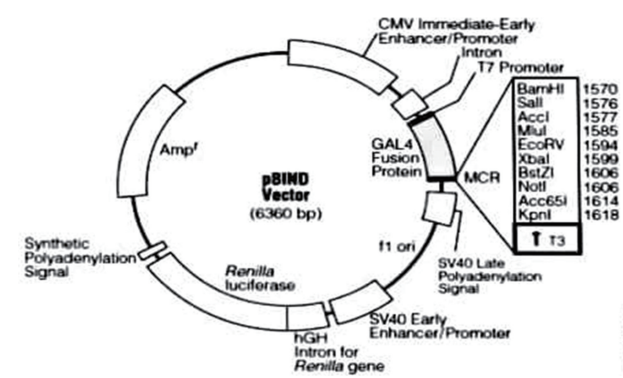


图 1 pBIND 质粒结构图

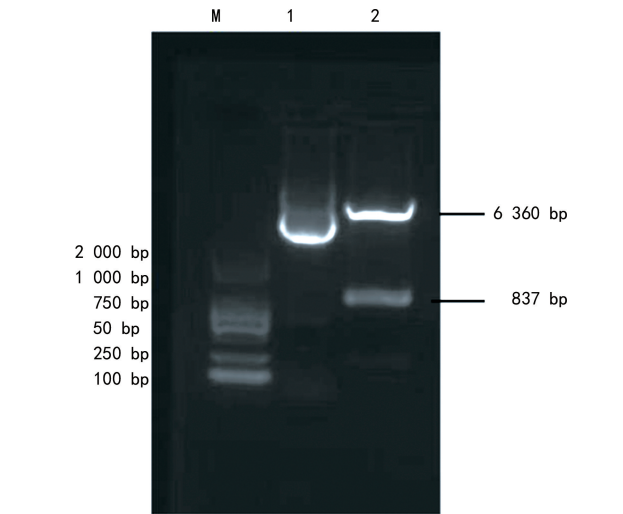


图 2 pBIND-PPAR γ -LBD 双酶切电泳分析

1.2.2 pGL4.35 报告质粒 pGL4.35 质粒购买自美国 Promega 公司,结构见图 3。

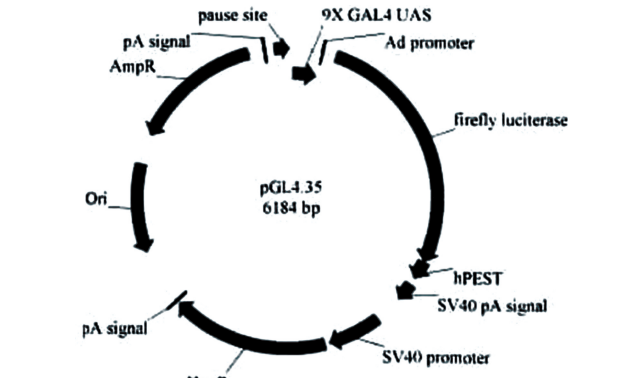


图 3 pGL4.35 质粒结构图

1.2.3 PPAR γ 细胞筛选模型的构建 细胞培养: 293T 细胞在 37℃、5%CO₂、全湿度的细胞培养箱中培养,所用培养基为含有 10% 的胎牛血清、1% 双抗的 DMEM,3 d 左右用胰蛋白酶进行消化传代。

细胞筛选模型构建:接种细胞,转染前 6 h 将 293T 细胞以每孔细胞密度 2×10^4 mL⁻¹ 接种到 6 孔板中,每孔 2 mL 完全培养基,培养至细胞融合率达 90% 左右取出。在 6 孔板中,用转染试剂将重组质粒 pBIND-PPAR γ -LBD 和报告质粒 pGL4.35 以瞬时转

染的方式转入 293T 细胞中,每孔转入的量为 2.5 μ g,即 1 μ g pBIND-PPAR γ -LBD 质粒和 1.5 μ g 的 pGL4.35 质粒,之后置于培养箱中培养 24 h,取出,将 6 孔板中的细胞消化,转入 96 孔板中,每孔细胞数为 2×10^4 mL⁻¹,培养 24 h;待细胞生长状态良好时,取出板,加入配置好的吡格列酮阳性对照药与灰兜巴不同极性提取物的待测样品(每个样品在同一浓度下都设置 6 个复孔),培养 24 h 后加入荧光酶试剂;避光等待 10 min 后,用 Veritas™ 微孔板发光检测 96 孔板中各孔的荧光酶活性。

1.2.4 灰兜巴的处理和不同极性组分的制备 灰兜巴用剪刀剪碎后,每种药材称取 50.0 g,密封,置于冰箱-20℃备用。经上述处理的灰兜巴依次用 85%乙醇和水,以料液比为 1:10 的比例进行回流提取,接着用乙酸乙酯、正丁醇、正己烷以 1:1:1 的比例,对已挥发掉乙醇的醇提物进行液液萃取 3 次;灰兜巴的水提物则经浓缩后,加入 95%乙醇至醇浓度为 80%,沉淀,冰箱静置 12 h,离心用热水复溶沉淀物质后,用冷冻干燥机冻干样品。最后,获得 5 种不同的极性组分(正己烷部分、乙酸乙酯部分、正丁醇部分、水提物上清液部分和水提醇沉部分),这些提取物中的溶剂均被移除并干燥后,保存于干燥器中,备用。

1.2.5 待测样品的配制 灰兜巴不同溶剂提取物及阳性药物吡格列酮,均用二甲基亚砜(DMSO)溶解配制成一定的母液,置于-20℃冰箱中保存,由于灰兜巴不同极性提取物在 DMSO 中的溶解度不同,所以母液浓度范围也不同;在测定 PPAR γ 激活效率时,需要用含有 FBS 的细胞培养基 DMEM 对样品母液进行稀释,再加入对应的 96 孔板中,必须保证每孔中 DMSO 的含量<0.1%。每种提取物至少配制 100、200、400 μ g/mL 3 个不同浓度的样品,进行 PPAR γ 活性实验检测,实验独立重复 3 次,确保每次结果相近。

1.2.6 CCK-8 法评价给药浓度安全性 以每孔细胞密度为 5×10^3 mL⁻¹ 接种 293T 细胞到 96 孔板中,待细胞融合率达 80%~90% 时,分别加入用培养基配制的不同浓度(10、50、100、200、300、400 μ g/mL)灰兜巴不同极性的提取物及吡格列酮(0.75 μ g/mL),干预 24 h(加入的药物时使得每孔 DMSO 的含量<0.1%),每个样品在同一浓度下都设置 3 个复孔,向板的每个对应的孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液,将培养板在培养箱中孵育 2 h,低速振荡混匀,在酶标仪 450 nm 波长处测定其吸光度,计算细胞存活率,结果表明受试药物在实验相应浓度下对细胞增殖影响较少。

1.3 统计学处理 所有结果均使用 Origin2021 软件分析计算样品间的显著性差异,显著水平 $P < 0.05$,极显著水平 $P < 0.01$ 。

2 结 果

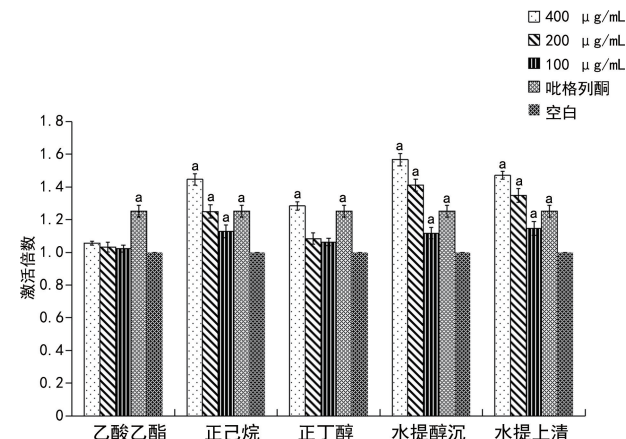
2.1 灰兜巴不同极性部分的提取率 灰兜巴依照 1.2.4 项的流程进行提取后,获得 5 种不同的提取物共提取率见表 2。

2.2 PPAR γ 表达质粒和报告质粒共转染细胞组有效性检验 共转染细胞组加入吡格列酮 0.75 $\mu\text{mol/L}$ 后荧光强度明显增强,且阳性对照组较空白组荧光强度增加 1.27 倍。而单独转染报告质粒细胞组即阴性对照组在加入相同浓度的吡格列酮后未见荧光增强。提示吡格列酮导致荧光增强与激活 PPAR γ 有关。上述实验结果提示,PPAR γ 表达质粒和报告质粒共转染的 293T 细胞可作为 PPAR γ 激动剂的筛选模型。

2.3 灰兜巴提取物对 PPAR γ 的激活作用 在共转染细胞组加入不同浓度的不同极性提取物(400、200、100 $\mu\text{g/mL}$)后,荧光强度均较对照组有不同程度的增加,并且随着不同极性提取物浓度的降低,荧光强度也逐渐减弱,实验结果表明:正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、水提醇沉上清、水提醇沉 5 种灰兜巴的不同提取部分较对照组荧光增加的倍数各不相同。其中 400 $\mu\text{g/mL}$ 灰兜巴的正己烷、正丁醇、水提醇沉上清、水提醇沉部分的激活能力较空白对照组均有显著性差异($P<0.01$),激活倍数为 145%、128%、147%、157%。其余的灰兜巴提取物激活能力不及阳性对照药的激活能力。见图 4、5,最终确定为灰兜巴的水提醇沉部分对 PPAR γ 的激活作用最强。

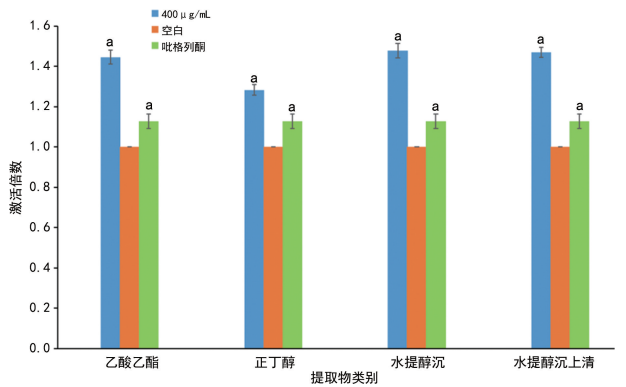
表 2 灰兜巴不同极性部分的提取率 g/100 g
($\bar{x}\pm s$, %, $n=7$)

编号	灰兜巴不同极性部分	提取率
1	正己烷部分	0.080 $\pm$ 0.004
2	乙酸乙酯部分	0.180 $\pm$ 0.010
3	正丁醇部分	0.060 $\pm$ 0.003
4	水提醇沉上清部分	0.150 $\pm$ 0.004
5	水提醇沉部分	0.090 $\pm$ 0.003



注: $^aP<0.0$ 。

图 4 灰兜巴不同提取物分别对 PPAR γ 的激活作用



注: $^aP<0.0$ 。

图 5 部分灰兜巴提取物的激活能力与空白对照组和阳性对照组激活能力的比较

3 讨 论

3.1 筛选模型的有效性分析 本实验表明在 293T 细胞中共同转染 PPAR γ 表达质粒和 pGL4.35 报告质粒后,用 PPAR γ 激动剂吡格列酮检测可见报告质粒荧光效应,而只转染 pGL4.35 报告质粒后给予吡格列酮则未见有荧光效应。上述结果表明,吡格列酮是通过激活 PPAR γ 而使得报告质粒产生荧光效应的。因此,实验结果提示 PPAR γ 表达质粒和 pGL4.35 报告质粒共转染的 293T 细胞可作为 PPAR γ 激动剂的细胞筛选模型。本实验未能进一步确立细胞个数、质粒转染比例等因素对荧光素酶激活效率的影响,需建立更完善的、高通量的细胞筛选模型。

3.2 灰兜巴不同极性提取物对 PPAR γ 的激动效率分析 灰兜巴不同极性提取物作用于构建好的 PPAR γ 激动剂的细胞筛选模型后可导致报告质粒产生不同的荧光效应,根据实验结果得出,每一种灰兜巴的提取物对 PPAR γ 的激活效率都随着给药浓度的升高而升高,在 400 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下,灰兜巴的正己烷、正丁醇、水提醇沉上清、水提醇沉部分的激活能力分别是空白对照组的 145%、128%、147%、157%;在 200 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下,正己烷水提醇沉,水提醇沉上清部分的激活能力是空白对照组的 125%、141%、134%。其他部分及其他浓度的激活能力均较低,与空白组比较无显著性差异。综上所述,灰兜巴水提醇沉部分在 400 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下 PPAR γ 激活能力是最强的,是空白对照组的 157%,水提醇沉上清激活能力也是较强的,仅次于水提醇沉部分,是空白对照组的 147%,因此可选择灰兜巴水提物作为 PPAR γ 的天然激动剂,为糖尿病的防治提供了新型安全有效的药物。通过实验可推测出,灰兜巴水煎剂发挥降糖作用可能是通过激活 PPAR γ 、改善体内糖脂代谢平衡来实现的。本研究存在较多的局限性,确定好水提醇沉的部分激活能力最强后,应细化水提醇沉部分的浓度,进一步验证水提醇沉部分对灰兜巴的激活能力是

否随药物浓度的升高而升高, $>400 \mu\text{g/mL}$ 的浓度对 PPAR γ 激活能力如何, 仍需进一步研究。且灰兜巴的提取物激活 PPAR γ 后, 在体内通过什么机制达到防治糖尿病的效果, 也需要进一步的探讨。

3.3 灰兜巴在糖尿病治疗中的应用前景分析 研究表明, PPAR γ 主要分布在机体的脂肪组织中, 与糖脂代谢的动态平衡密切相关^[6]。PPAR γ 被激活后主要参与脂肪组织中脂质摄取及形成等过程^[7], 在脂肪代谢、氧化应激、抗炎、胰岛素增敏等方面也发挥着重要作用^[8]。研究表明, 机体中脂肪酸水平的升高可导致胰岛素敏感性下降, 机体中葡萄糖的含量增加^[9]。而 PPAR γ 的激活会降低机体中脂肪酸的合成^[10], 从而起到降糖作用。综上所述, PPAR γ 在糖代谢中起重要作用^[11], 主要是通过改善体内胰岛素抵抗状态、增加组织外周的胰岛素敏感性、促进机体对葡萄糖的摄取、抑制肝糖原的输出, 最终降低机体血糖浓度^[12]。本研究证实了灰兜巴中含有激活 PPAR γ 的部分, 为灰兜巴部分提取物可通过激活 PPAR γ 发挥降糖作用提供了可靠的实验依据。

综上所述, PPAR γ 表达质粒和报告质粒 pGL4.35 共转染的 293T 细胞可作为 PPAR γ 激动剂的细胞筛选模型, 灰兜巴的部分提取物可能通过激活 PPAR γ 在糖尿病的防治中发挥作用, 上述结果可为灰兜巴的临床应用提供实验依据, 推进了灰兜巴的临床应用, 促进了我国民族医药资源的开发, 且为灰兜巴治疗糖尿病作用机制的研究提供了新思路。

参考文献

- [1] JANANI C, RANJITHA KUMARI B D. PPAR gamma gene—a review[J]. Diabetes Metab Syndr, 2015, 9(1): 46-50.
- [2] GRYGIEL-GÓRNIK B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications areview[J]. Nutr J, 2014, 13: 17.
- [3] KUMARI G K, KIRAN A V, KRISHNAMU RTHY P T. Preliminary evaluation on the beneficial effects of pioglitazone in the treatment of endometrial cancer[J]. Med Oncol, 2021, 5(6): 71.
- [4] 杨坤宝, 庞宗然. 藏药灰兜巴治疗糖尿病的研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(8): 1682-1686.
- [5] 林叶新, 夏之宁. 抗糖尿病天然药物的 PPAR γ 活性部位筛选[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 2(4): 505-513.
- [6] ABAJ F, SOTOUDEH G, KARIMI E, et al. Interaction between the dietary indices and PPAR- γ Pro12Ala gene variants on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Int J Clin Pract, 2021, 8(8): 14307.
- [7] SHI Y, ZOU Y, SHEN Z, et al. Trace elements, PPARs, and metabolic syndrome[J]. Int J Mol Sci, 2020, 4(7): 2612.
- [8] LEFERE S, PUENGEL T, HUNDERTMARK J, et al. Differential effects of selective and pan-PPAR agonists on experimental steatohepatitis and hepatic macrophages[J]. J Hepatol, 2020, 10, 73(4): 757-770.
- [9] GASTALDELLI A, SABATINI S, CARLI F, et al. PPAR- γ -induced changes in visceral fat and adiponectin levels are associated with improvement of steatohepatitis in patients with NASH[J]. Liver Int, 2021, 41(11): 2659-2670.
- [10] D'ONOFRIO N, PIERETTI G, CICCARELLI F, et al. Abdominal fat SIRT6 expression and its relationship with inflammatory and metabolic pathways in pre-diabetic overweight patients[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(5): 1153.
- [11] YUAN Y, PENG W, LIU Y, et al. Circulating miR-130 and its target PPAR- γ may be potential biomarkers in patients of coronary artery disease with type 2 diabetes mellitus[J]. Mol Genet Genomic Med, 2019, 7(9): 909.
- [12] OSTADHADI S, NIKOUI V, HAJ-MIRZAIAN A, et al. The role of PPAR- γ receptor in pruritus[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 9(5): 322-325.

(收稿日期: 2022-09-28 修回日期: 2023-01-10)