

辣木异硫氰酸酯改善 C2C12 肌管细胞胰岛素抵抗

毛家英^{1,2}, 白玉英^{1,2}, 彭麟杰^{1,2}, 解静^{1*}, 田洋^{2,3*}

¹ 云南农业大学食品科学技术学院 昆明 650201

² 云南省生物大数据重点实验室 昆明 650201

³ 食药同源资源开发与利用教育部工程中心 昆明 650201)

摘要 目的: 建立 C2C12 肌管细胞胰岛素抵抗(C2C12-IR)模型,探讨辣木异硫氰酸酯(MIC-1)对 C2C12 肌管细胞胰岛素抵抗的影响。方法:利用棕榈酸(PA)诱导 C2C12 肌管细胞,建立稳定的 C2C12-IR 模型,并用不同浓度 MIC-1(0,2,4,8,16 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞 16 h。采用 MTT 法检测 C2C12-IR 细胞存活率,并观察 MIC-1 对 C2C12-IR 细胞葡萄糖代谢的影响;检测细胞氧化损伤情况,包括一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH);采用 Western blot 检测磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)信号通路中相关蛋白表达变化情况。结果:确定了 C2C12-IR 模型最佳建模条件,即用 0.5 mmol/L PA 处理 C2C12 肌管细胞 16 h;与 C2C12-IR 组相比,MIC-1 呈剂量依赖性方式,显著增加了 C2C12-IR 细胞葡萄糖消耗量和糖原含量;MIC-1 显著降低了 C2C12-IR 细胞中 MDA 和 NO 水平,显著增加了 GSH 水平;此外,MIC-1 显著增加了丙酮酸脱氢酶激酶同工酶 1(PDK1)、磷酸化 AKT 和葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)的表达水平。结论:MIC-1 通过抑制氧化应激改善胰岛素抵抗。

关键词 辣木异硫氰酸酯; C2C12 细胞; 胰岛素抵抗; 氧化应激; 胰岛素信号通路

文章编号 1009-7848(2023)01-0032-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.01.004

2 型糖尿病(Type 2 diabetes,T2DM)是一种严重威胁人类健康的非传染性慢性疾病,是临床上最为常见的糖尿病类型, 占所有糖尿病患者的 90%~95%。T2DM 的主要特征为持续高血糖,可造成肾、足、眼和神经等多组织脏器损害,并引发多种并发症^[1]。世界卫生组织最新公布的权威数据显示,全球糖尿病患者的人数预计到 2025 年将达到 3.7 亿,并且有夸大化和年轻化的趋势。糖尿病已成为影响人体健康的关键因素, 如何医治糖尿病是人类共同面临的问题与挑战^[2]。

胰岛素抵抗(Insulin resistance,IR)是 T2DM 的主要发病原因之一,它是胰岛素靶器官或组织对正常水平的胰岛素敏感性和反应性不足的一种病理状态,主要表现为外周组织,如脂肪、骨骼肌、

肝脏组织等对葡萄糖的摄取和利用效率降低^[3]。研究表明,胰岛素抵抗贯穿于糖尿病发生、发展过程,是造成各种慢性并发症的重要病理基础。如何对其进行有效调节是治疗糖尿病的重要靶点之一。此外,大量研究发现,氧化应激是导致 IR 的关键因素,已知在发生 IR 的大鼠中,肝脏超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和总谷胱甘肽(Glutathione peroxidase,GSH)均显著降低,而代谢产物丙二醛(Malondialdehyde,MDA)蓄积^[4]。

辣木(*Moringa oleifera* Lam.)为辣木科辣木属多年生热带落叶乔木,在我国的热带和亚热带地区,如云南、福建、广东等地被广泛种植^[5]。辣木营养价值丰富,且具有较高的药用价值,其各部位如叶、根、种子、树皮、果实、鲜花和未成熟的豆荚等都能入药,具有降血脂、降血压、降血糖、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、保肝护肾、抗菌和抗病毒等功能^[6]。

异硫氰酸酯是一类含有 R-N=C=S 结构的化合物,具有杀菌^[7]、抗氧化^[8]、抗癌^[9]及降血糖和降血脂^[10]等生物活性。最新研究表明,辣木叶和辣木籽中富含异硫氰酸酯^[11],具有与其它十字花科蔬菜中的异硫氰酸酯化合物相同的药效团(R-N=C=S),然而,由于辣木异硫氰酸酯存在芳香环和鼠李

收稿日期: 2022-01-24

基金项目: 云南省科技厅重大科技专项计划项目(202002 AA100005,202102AE090027-2); 云南绿色食品国际合作研究中心项目(2019ZG009); 云南省万人计划产业领军人才项目(YNWR-CYJS-2020-010)

第一作者: 毛家英,女,硕士生

通信作者: 解静 E-mail: jingxie0624@163.com

田洋 E-mail: tianyang1208@163.com

糖部分,其在化学结构上与其它异硫氰酸酯化合物有一定区别^[12]。辣木异硫氰酸酯(MIC-1)是辣木中含量最高的一种异硫氰酸酯,已有研究证明其具有体外抗炎和抗氧化活性^[13]。此外,大量证据显示 MIC-1 可能是辣木调控糖脂代谢的主要活性物质^[14-15]。本研究以 MIC-1 为试验材料,研究其对棕榈酸(Palmitic acid,PA)诱导的 C2C12 肌管细胞胰岛素抵抗的改善作用,明确 MIC-1 调控糖代谢的生物活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

C2C12 成肌细胞从中国科学院昆明动物研究所获得。辣木籽,云南天佑科技开发有限公司。DMEM 培养基、无酚红 DMEM 培养基,Hyclone 公司;胎牛血清(Fetal bovine serum,FBS)、马血清(Horse serum,HS),BI 公司;青霉素-链霉素、10% SDS、1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)、1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)、BCA 蛋白测定试剂盒,碧云天公司;牛胰岛素(Insulin,INS),江苏万邦生物医药股份有限公司;胰酶-EDTA 消化液、细胞裂解液、牛血清白蛋白(Bovine serum albumin,BSA)、棕榈酸(PA)、噻唑蓝(MTT)、一氧化氮(Nitric oxide,NO)、微量丙二醛(MDA),solarbio 公司;葡萄糖氧化酶法测定试剂盒、糖原测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;丙酮酸脱氢酶激酶同工酶 1(Phosphoinositide-dependent protein kinase-1,PDK1)、蛋白激酶 B (Protein kinase B,AKT)、磷酸化 AKT (p-AKT)(Ser407) 和葡萄糖转运蛋白 4(Glucose transporter 4, GLUT4)、 β -Tubulin 抗体,万类生物科技有限公司;二抗 HRp Rabbit Anti-Goat IgG、HRp Mouse Anti-Goat IgG,ABclonal 公司。

1.2 仪器与设备

多功能酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司;二氧化碳培养箱,苏州贝茵医疗器械有限公司;细胞计数仪,Invitrogen 有限公司;倒置荧光显微镜,蔡康光学有限公司;恒温金属浴,上海一恒科技有限公司;电子分析天平 FA2004,沈阳龙腾电子有限公司;紫外分光光度计,日本 Shimodzu 公司;4 °C 冰箱、-80 °C 冰箱,海尔公司;Z36HK 型

高速台式冷冻离心机,德国 Hermle Labortechnik GmbH 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 MIC-1 的制备 辣木籽粉碎后用石油醚去油,以料液比(g/mL)1:60,温度 30 °C,pH 5,时间 9 h 的提取条件获得酶解提取液,采用萃取、减压浓缩及重结晶获取纯净晶体,备用,纯度达 98%^[16]。

1.3.2 C2C12 细胞培养、传代与分化生长 细胞传代:C2C12 成肌细胞置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养,细胞贴壁生长,至 80%~90%时进行胰酶消化,终止消化后加生长培养基悬浮细胞,接种传代。

细胞分化:细胞贴壁生长至 80%左右,换为 2%HS DMEM 分化培养基继续培养 5~7 d,隔天换液,C2C12 成肌细胞 90%分化为肌管细胞后进行后续试验^[17]。

1.3.3 C2C12-IR 模型建立 将对数生长期的 C2C12 成肌细胞以 1×10^4 个细胞/孔的密度置于 96 孔板中。待细胞分化为肌管细胞后,立即加入 2%FBS 无酚红 DMEM 培养基,置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 12 h,每组 8 个平行。然后用含不同浓度 PA(0.25,0.5,0.75 mmol/L)及含 100 nmol/L INS 的 2%FBS 无酚红 DMEM 培养基培养 16 h^[18],取上清培养液,采用葡萄糖氧化酶法测定试剂盒检测葡萄糖含量,以空白孔葡萄糖含量减去样品孔葡萄糖含量,计算出各孔葡萄糖消耗量,确定最佳造模浓度。

1.3.4 C2C12-IR 细胞存活率检测 将对数生长期的 C2C12 成肌细胞以 1×10^4 个/孔的密度接板 96 孔板,待细胞分化为肌管细胞后,换含 2%FBS 的无酚红 DMEM 培养基培养 12 h。然后用含不同浓度 MIC-1 (0,0.5,1,2,4,8,16 μ mol/L),100 nmol/L INS 和 0.5 mmol/L PA 的 2%FBS 无酚红 DMEM 培养基培养细胞 16 h。弃上清,每孔加入 100 μ L 的 0.5 mg/mL MTT 的培养基 4 h,弃去培养基,每孔加入 100 μ L DMSO,在 492 nm 波长处测定吸光值,计算细胞存活率。

1.3.5 C2C12-IR 细胞葡萄糖消耗量检测 将对数生长期的 C2C12 成肌细胞以 1×10^4 个/孔的密度接板 96 孔板,待细胞分化为肌管细胞后,换含

2%FBS的无酚红DMEM培养基培养12 h,按上述方法给药处理细胞16 h,取上清,采用葡萄糖氧化酶法测定试剂盒,检测细胞上清葡萄糖含量,并计算得到葡萄糖消耗量。

1.3.6 C2C12-IR 细胞糖原含量检测 将对数生长期的C2C12成肌细胞以 5×10^5 个/皿的密度接种于5 mm培养皿,待细胞分化为肌管细胞后,换含2%FBS的无酚红DMEM培养基培养12 h,然后用含不同浓度MIC-1(0,2,4,8 $\mu\text{mol/L}$)、100 nmol/L INS和0.5 mmol/L PA的2%FBS无酚红DMEM培养基培养细胞16 h。每组设3个重复,重复3次。给药16 h后,收集各组细胞,用磷酸盐缓冲液洗涤2次,细胞匀浆后按BCA法测定蛋白含量,并用硫酸蒽酮法测定各组细胞内糖原含量,按照公式(1)计算肌糖原含量:

肌糖原含量(mg/mg pro)=(样品OD值/校准OD值) $\times 0.01 \times 10 \div 1.1$ (1)

1.3.7 C2C12-IR 细胞MDA、NO含量及GSH活力检测 将对数生长期的C2C12成肌细胞以 5×10^5 个/皿的密度接种于5 mm培养皿中,待细胞分化为肌管细胞后,换含2%FBS的无酚红DMEM培养基培养12 h,按1.3.6节的给药方式处理细胞,每组设3个重复,重复3次。给药16 h后,收集各组细胞,用磷酸盐缓冲液洗涤2次,细胞匀浆后按BCA法测定蛋白含量,MDA、NO含量及GSH活力的测定按照试剂盒说明书操作。

1.3.8 C2C12-IR 细胞PI3K/AKT通路相关蛋白表达检测 将对数生长期的C2C12成肌细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于5 mm培养皿中,待细胞分化为肌管细胞后,换含2%FBS的无酚红DMEM培养基培养12 h,按1.3.6节的给药方式处理细胞,每组设3个重复,重复3次。给药16 h后,用预冷的PBS漂洗细胞,每皿加入100 μL 蛋白质裂解液,在冰上裂解30 min,将细胞刮下收集于1.5 mL离心管中,12 000 $\times g$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min,取蛋白质上清液,BCA试剂盒测样品的蛋白质浓度。经电泳、转膜、封闭后,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育一抗,常温孵育二抗1 h,显色拍照,通过Image J软件分析蛋白质条带,定量检测蛋白质表达水平。

1.4 数据统计

试验数据使用Graphpad prism、ImageJ等软

件进行分析统计,各项指标均以“平均数 \pm 标准差”表示,组间比较采用单因素方差分析,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 C2C12-IR 细胞模型的建立

为了明确C2C12-IR模型的建立方法,用不同浓度的PA(0.25,0.5,0.75 mmol/L和100 nmol/L INS共同处理C2C12肌管细胞16 h,并以葡萄糖消耗量为检测指标。结果如图1所示,与对照组相比,INS组葡萄糖消耗量显著增加($P < 0.01$);与INS组相比,不同剂量PA组葡萄糖消耗量均显著降低($P < 0.001$),且葡萄糖消耗量从INS组的8.07 mmol/L分别降低到4.75 mmol/L($P < 0.001$),2.87 mmol/L($P < 0.001$),3.82 mmol/L($P < 0.001$)。结果表明,0.5 mmol/L的PA诱导的C2C12细胞胰岛素抵抗程度最强,因此选择0.5 mmol/L的PA作用C2C12肌管细胞16 h作为最佳建模条件。

2.2 MIC-1对C2C12-IR细胞存活率的影响

为研究MIC-1对C2C12-IR细胞存活率的影响,用不同浓度的MIC-1(0,0.5,1,2,4,8,16 $\mu\text{mol/L}$)处理C2C12-IR细胞16 h,然后采用MTT法检测细胞存活率。结果如图2所示,与对照组相比,INS增加了细胞的存活率;与INS组相比,PA显著降低了细胞的存活率,然而与C2C12-IR组相比,MIC-1对C2C12-IR细胞的存活率没有影响,结果表明,MIC-1对C2C12-IR细胞没有毒性。

2.3 MIC-1对C2C12-IR细胞葡萄糖消耗量的影响

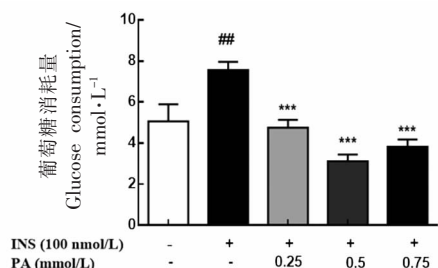
为了明确MIC-1是否具有改善胰岛素抵抗的作用,用不同浓度的MIC-1(0,0.5,1,2,4,8,16 mol/L)处理C2C12-IR细胞16 h,采用葡萄糖氧化酶法检测葡萄糖消耗量。结果如图3所示,与对照组相比,INS显著增加肌管细胞葡萄糖消耗量($P < 0.001$);与INS组相比,C2C12-IR组葡萄糖消耗量显著降低($P < 0.001$);然而与C2C12-IR组相比,MIC-1呈剂量依赖的方式显著增加C2C12-IR细胞葡萄糖消耗量,且葡萄糖消耗量从C2C12-IR组的4.48 mmol/L分别增加到6.33 mmol/L($P < 0.001$),6.47 mmol/L($P < 0.001$),7.05 mmol/L

($P<0.001$), 9.43 mmol/L($P<0.001$)。以上结果表明 MIC-1 具有改善 IR 的作用。

2.4 MIC-1 对 C2C12-IR 细胞肝糖原含量的影响

为了明确 MIC-1 是否能促进 C2C12-IR 细胞对糖的储存能力, 通过对 C2C12-IR 细胞糖原含量的测定来确定糖原的合成情况。如图 4 所示, 与对照组相比, INS 显著增加了肌管细胞糖原含量 ($P<0.001$); 与 INS 组相比, C2C12-IR 组肝糖原含

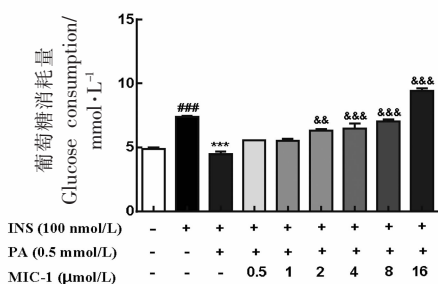
量显著降低 ($P<0.01$); 然而, 用不同浓度的 MIC-1 (2, 4, 8 $\mu\text{mol/L}$) 处理 C2C12-IR 细胞 16 h 后, C2C12-IR 细胞糖原含量显著增加, 且具有明显的剂量依赖性, 糖原含量从 C2C12-IR 组的 0.089 mg/mg pro 分别增加到 0.094 mg/mg pro ($P<0.05$), 0.109 mg/mg pro ($P<0.001$), 0.14 mg/mg pro ($P<0.001$)。结果表明, MIC-1 可通过促进糖原合成提高 C2C12-IR 细胞对葡萄糖的摄取利用。



注: 与对照组比, ###. $P<0.001$; 与 INS 组比, ***. $P<0.001$ 。

图 1 不同浓度 PA 对 C2C12 肌管细胞葡萄糖消耗量的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of PA on glucose consumption of C2C12 myotube cells

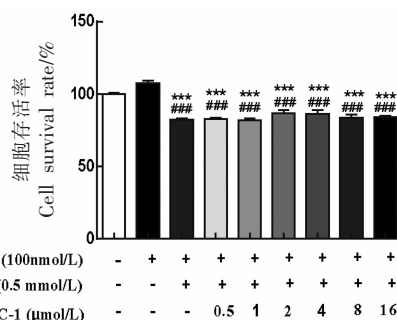


注: 与对照组比, ###. $P<0.001$; 与 INS 组比, ***. $P<0.001$; 与 C2C12-IR 组比, && $P<0.01$, &&& $P<0.001$ 。

图 3 MIC-1 对 C2C12-IR 细胞葡萄糖消耗量的影响
Fig.3 Effect of MIC-1 on glucose consumption in C2C12-IR cells

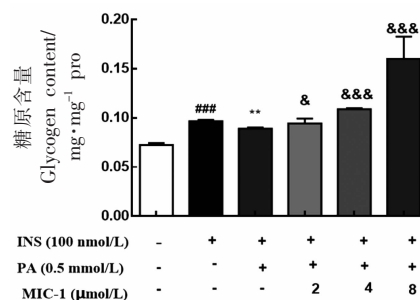
2.5 MIC-1 对 C2C12-IR 细胞氧化应激的影响

如图 5 所示, 与对照组相比, INS 对 C2C12 肌管细胞 MDA 水平、NO 水平和 GSH 活力没有影响。与 INS 组相比, C2C12-IR 组 MDA 水平 ($P<0.01$) 和 NO 水平 ($P<0.05$) 显著升高, GSH 活力 ($P<0.05$) 显著下降, 表明 C2C12-IR 细胞氧化应激增强。然而与 C2C12-IR 组相比, MIC-1 以浓度依赖



注: 与对照组比, ###. $P<0.001$; 与 INS 组比, ***. $P<0.001$ 。

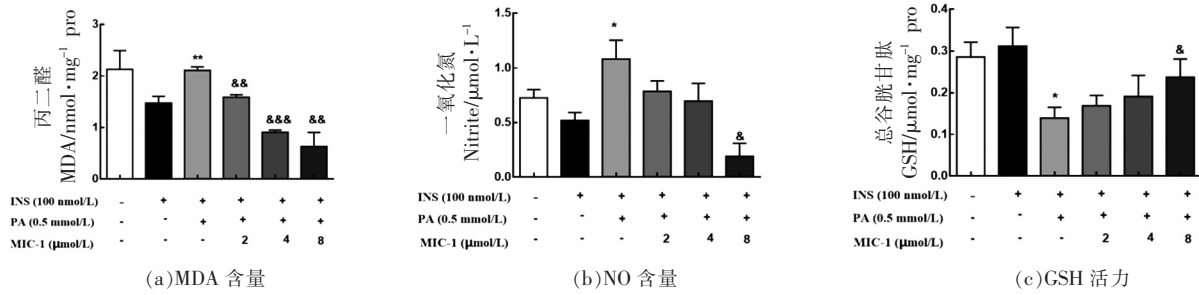
图 2 不同浓度的 MIC-1 对 C2C12-IR 细胞存活率的影响
Fig.2 Effects of different concentrations of MIC-1 on the survival rate of C2C12-IR cells



注: 与对照组比, ###. $P<0.001$; 与 INS 组比, ** $P<0.01$; 与 C2C12-IR 组比, & $P<0.05$, &&& $P<0.001$ 。

图 4 MIC-1 对 C2C12-IR 细胞糖原含量的影响
Fig.4 Effect of MIC-1 on C2C12-IR cells glycogen content

的方式显著降低了细胞 MDA 和 NO 水平, 且当 MIC-1 剂量为 8 $\mu\text{mol/L}$ 时, C2C12-IR 细胞的 MDA 水平从 2.13 nmol/mg pro 降低到 0.63 nmol/mg pro ($P<0.01$), NO 水平从 1.08 $\mu\text{mol/L}$ 降低到 0.19 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.05$), GSH 活力从 0.14 $\mu\text{mol/mg pro}$ 增加到 0.24 $\mu\text{mol/mg pro}$ ($P<0.05$)。结果表明 MIC-1 能改善 IR 的氧化损伤。



注:与INS组比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与C2C12-IR组比,& $P < 0.05$,&& $P < 0.01$,&&& $P < 0.001$ 。

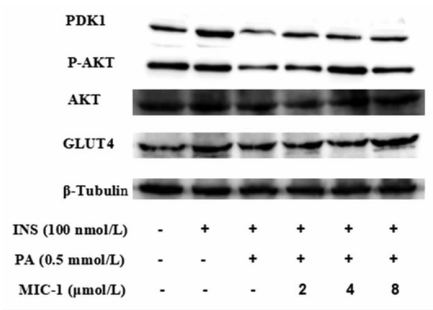
图5 MIC-1对C2C12-IR细胞氧化应激的影响

Fig.5 Effect of MIC-1 on oxidative stress of C2C12-IR cells

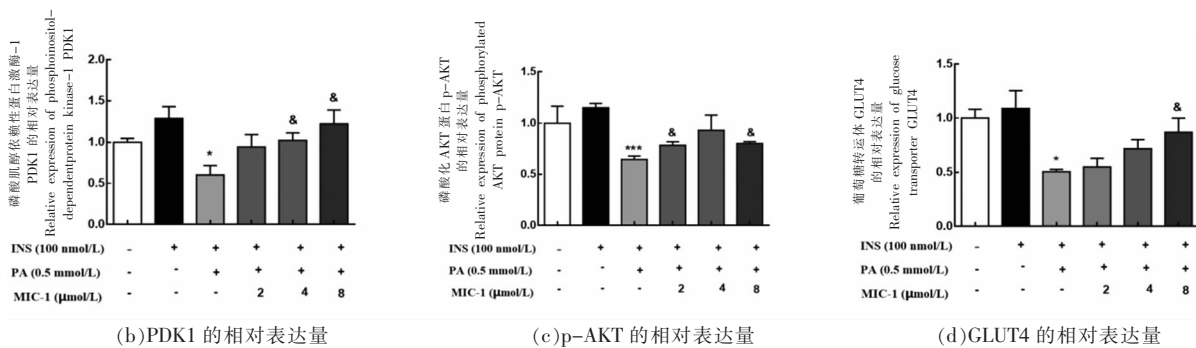
2.6 MIC-1对C2C12-IR细胞PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达水平的影响

如图6所示,与INS组相比,C2C12-IR组PDK1($P < 0.05$)、p-AKT($P < 0.001$)和GLUT4($P < 0.05$)蛋白表达水平显著降低;然而与C2C12-IR组相比,MIC-1剂量为8 μmol/L时,显著增加了

PDK1($P < 0.05$)、p-AKT($P < 0.05$)和GLUT4($P < 0.05$)的蛋白表达水平,结果表明MIC-1对IR的改善可能与细胞中AKT蛋白的磷酸化调节有关,并且MIC-1通过促进GLUT4的表达提高细胞对葡萄糖的利用,从而降低血糖。



(a)PDK1、p-AKT、GLUT4的电泳图



注:与INS组比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;与C2C12-IR组比,& $P < 0.05$ 。

图6 MIC-1对C2C12-IR细胞PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达水平的影响

Fig.6 Effects of MIC-1 on the expression of PI3K/AKT signaling pathway related proteins in C2C12-IR cells

3 讨论

研究发现辣木各部位的提取物显示出不同的降血糖作用。汪芳等^[9]发现辣木叶多糖具有降血

糖活性,能显著增加HepG2细胞葡萄糖的消耗量。吉莉莉^[20]发现辣木叶总黄酮中的异槲皮苷具有降低糖尿病大鼠血糖,抑制胰岛素抵抗,改善胰

岛功能的作用。Ndong 等^[21]的研究发现糖尿病大鼠食用辣木叶粉末后,血糖明显降低,表明辣木叶可以改善葡萄糖耐量。同时研究证明,辣木籽粉及其提取物有一定的降血糖功效,在糖尿病的预防和治疗方面具有巨大研究潜力^[22-23]。然而大量的辣木降糖研究均以粗提物为原材料,辣木降血糖的活性成分仍不清楚。

研究发现富含异硫氰酸酯的辣木籽提取物通过调节机体 *iNOS* 和 *NQO1* 等基因表达,从而发挥减轻体重,减少肥胖,改善葡萄糖耐量,减少炎症基因表达和增加抗氧化基因表达的作用^[24]。从新鲜辣木叶制得的富含异硫氰酸盐的辣木浓缩物(含 1%~3%异硫氰酸酯)可显著降低肝脂肪、糖异生、胰岛素、胆固醇和炎症标志物的水平^[25]。因此,本研究对于辣木异硫氰酸酯是否有降糖作用提出了设想。以实验室提取的高纯度 MIC-1 为试验材料,通过建立 C2C12-IR 细胞模型,明确 MIC-1 抑制氧化应激改善胰岛素抵抗的作用,并且其作用机制可能与 PI3K/AKT 信号通路有关。

T2DM 是一种与高血糖相关的复杂的代谢紊乱相关性疾病,高血糖会导致线粒体产生大量活性氧、活性氮,在氧化系统中,主要包括超氧阴离子(O_2^-)、羟自由基(OH^-)、过氧化氢(H_2O_2)、一氧化氮(NO^-)、过氧化亚硝酸盐($ONOO^-$)等,进而不同程度对线粒体功能造成损伤,引起氧化应激反应^[26]。氧化应激状态的显著性特征为氧自由基(Reactive oxygen species,ROS)水平的升高,ROS 化学性质活泼,不易被检测,MDA 是 ROS 发生过氧化反应生成的脂质过氧化产物,其水平的高低可以直接反映机体受 ROS 攻击的程度强弱以及氧化水平的高低^[27]。在众多的氧化应激指标中,MDA 含量可以直接反映机体脂质过氧化速率和强度,GSH 与 SOD 可以显示机体的抗氧化强度,均是反映体内氧化应激水平的经典指标,因此常用于评价机体的氧化应激状态^[28]。在本研究中,MIC-1 能降低氧化物 MDA、NO 的含量,同时提高 GSH 的活力,结果表明 MIC-1 能改善 IR 的氧化损伤。

IR 是 2 型糖尿病的主要特征,大多数 IR 发生在肝脏、骨骼肌和脂肪组织中^[29],骨骼肌是负责葡萄糖代谢的主要外周组织。因此,促进肌细胞葡

萄糖消耗成为研究降糖的重要指标。肌糖原是机体中糖原的一种储存形式,一定程度反映了机体内血糖的平衡情况。本研究以 C2C12 肌管细胞构建胰岛素抵抗模型探究 MIC-1 改善胰岛素抵抗的作用,从而探究 MIC-1 的降糖作用。研究发现 MIC-1 以剂量依赖性方式增加 C2C12-IR 细胞的葡萄糖消耗量。并且 MIC-1 处理 C2C12-IR 细胞后发现细胞糖原含量增加,反映了 MIC-1 促进 C2C12-IR 细胞糖的储存能力。综上可知,MIC-1 能通过促进 C2C12-IR 细胞葡萄糖消耗量以及糖原的合成,发挥降血糖作用,并降低氧化应激,改善胰岛素抵抗。

在 IR 状态下,骨骼肌对葡萄糖的摄取和利用存在障碍,其分子机制主要是 PI3K 信号通路活性的下降,表现为 PI3K 活性及 AKT 磷酸化水平明显下降。PDK1 和 AKT 是 PI3K 下游的信号分子^[30]。PDK1 被激活后可进一步使 AKT 被激活,磷酸化的 AKT 将 GLUT4 转运到细胞质膜上,从而促进葡萄糖吸收^[31]。在本研究中 MIC-1 显著升高了 PDK1、p-AKT 和 GLUT4 的蛋白表达,刺激 PI3K/AKT 通路的信号转导,增强了细胞周围的葡萄糖转运水平。

综上所述,PA 诱导的 IR 中,MIC-1 会缓解氧化应激造成的细胞损伤,通过激活 PI3K/AKT 信号通路,增加 GLUT4 的表达,进而促进细胞对葡萄糖的摄取,从而改善 IR。研究结果可为 MIC-1 调控糖代谢作用的深入研究提供基础数据,也为辣木资源的深加工奠定科学依据。

参 考 文 献

- [1] 吴欣平,张格第,胡齐鸣.现代医家对脾与 2 型糖尿病的认识综述[J].饮食保健,2017,4(26):378. WU X P, ZHANG G D, HU Q M. A review of modern medical understanding of the spleen and type 2 diabetes mellitus[J]. Diet and Health, 2017, 4(26): 378.
- [2] 赛米·赛麦提,买买提·伊斯热依力,艾克拜尔·艾力.肥胖与 2 型糖尿病关系的研究进展[J].中华肥胖与代谢病电子杂志,2020,6(2):130-134. SAIMAITI SAIMI, YISIREYILI MAIMAITI, ALI AIKEBAIER. Research progress of relationship be-

- tween obesity and type 2 diabetes relations[J]. Chinese Electronic Journal of Obesity and Metabolic Diseases, 2020, 6(2): 130-134.
- [3] 白颖, 暴雪丽, 赵丹丹, 等. 中医药干预胰岛素抵抗机制研究进展[J]. 世界中医药, 2021, 16(7): 1156-1160.
- BAI Y, BAO X L, ZHAO D D, et al. Research progress on mechanism of traditional Chinese medicine intervention in insulin resistance[J]. World Chinese Medicine, 2021, 16(7): 1156-1160.
- [4] PETERSEN K F, DUFOUR S, SAVAGE D B, et al. The role of skeletal muscle insulin resistance in the atherogenesis of the metabolic syndrome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(31): 12587-12594.
- [5] ZFMAB C, JA D, HZ E, et al. Evaluation of phytochemical and medicinal properties of *Moringa oleifera* as a potential functional food[J]. South African Journal of Botany, 2020, 129(1): 40-46.
- [6] 许敏, 赵三军, 宋晖, 等. 辣木的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(23): 299-309.
- XU M, ZHAO S J, SONG H, et al. Research progress of *Moringa oleifera*[J]. Food Science, 2016, 37(23): 299-309.
- [7] FAHEY J W, ZALCMANN A T, TALALAY P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants[J]. Phytochemistry, 2001, 56(1): 5-51.
- [8] YE L, ZHANG Y. Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of phase 2 detoxification enzymes[J]. Carcinogenesis, 2001, 22(12): 1987-1992.
- [9] SHIN I S, MASUDA H, NAOHIDE K. Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94(3): 255-261.
- [10] 董笑克, 胡玉立, 洪明昭, 等. 辣木叶的降糖作用及其机制研究进展[J]. 环球中医药, 2019, 12(2): 161-166.
- DONG X K, HU Y L, HONG M Z, et al. Research progress of hypoglycemic effect and mechanism of *Moringa oleifera* leave [J]. Global Chinese Medicine, 2019, 12(2): 161-166.
- [11] DHAKAD A K, IKRAM M, SHARMA S, et al. Biological, nutritional, and therapeutic significance of *Moringa oleifera* Lam [J]. Phytotherapy Research, 2019, 33(4): 2870-2903.
- [12] 郭妍. 辣木叶植物化学物质分析及体外生物活性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2018.
- GUO Y. Analysis and *in vitro* bioactivity of phytochemicals from *Moringa oleifera* leaves[D]. Kunming: Kunming University of Technology, 2018.
- [13] JAJA-CHIMEDZA A, GRAF B L, SIMMLER C, et al. Biochemical characterization and anti-inflammatory properties of an isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract[J]. PloS one, 2017, 12(8): e0182658.
- [14] ASHA J C, LI Z, KHEA W, et al. A dietary isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract improves glucose tolerance in a high-fat-diet mouse model and modulates the gut microbiome[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 47(5): 376-385.
- [15] WATERMAN C, ROJAS-SILVA P, TUMER T B, et al. Isothiocyanate-rich *Moringa oleifera* extract reduces weight gain, insulin resistance, and hepatic gluconeogenesis in mice [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2015, 59(6): 1013-1024.
- [16] 杨扬, 贺水莲, 唐明霆, 等. 从辣木籽中制备4- α -L-鼠李糖基-异硫氰酸苄酯的工艺优化研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2019, 34(2): 127-132.
- YANG Y, HE S L, TANG M T, et al. Process optimization study on the preparation of benzyl 4- α -L-rhamnosyl-isothiocyanate from *Moringa* seeds [J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Sciences), 2019, 34(2): 127-132.
- [17] 王秋玉, 许泓瑜, 许正宏, 等. 滇结香水花水提物对2型糖尿病小鼠降血糖作用的初步研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(9): 1385-388.
- WANG Q Y, XU H Y, XU Z H, et al. Hypoglycemic effect of water extracts from *Edgeworthia gardneri* (Wall.) Meissn on Type 2 diabetic mice [J]. Nat Prod Res Dev, 2014, 26(9): 1385-1388.
- [18] DENG Y T, CHANG T W, LEE M S. Suppression of free fatty acid-induced insulin resistance by polyphenols in C2C12 mouse skeletal muscle cells [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(4): 1059-1066.
- [19] 汪芳, 包伊凡, 张羽, 等. 辣木叶多糖的分离纯化及其体外降糖活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(7): 1592-1598.

- WANG F, BAO Y F, ZHANG Y, et al. Isolation and purification of polysaccharides from *Moringa oleifera* leaves and their *in vitro* hypoglycemic activity[J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2018, 9(7): 1592-1598.
- [20] 吉莉莉. 辣木叶黄酮提取分离纯化及其主要成分异槲皮苷降血糖活性与机理研究[D]. 四川: 四川农业大学, 2015.
- JI L L. Study on the hypoglycemic activity and mechanism of isoquercitrin, a major component of *Moringa oleifera* leaf flavonoids, extracted and purified[D]. Sichuan: Sichuan Agricultural University, 2015.
- [21] NDONG M, UEHARA M, KATSUMATA S, et al. Effects of oral administration of *Moringa oleifera* Lam on glucose tolerance in Goto-Kakizaki and Wistar rats[J]. Journal of Clinical Biochemistry and nutrition, 2007, 40(3): 229.
- [22] AL-MALKI A L, EL R. The antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015(8): 381040.
- [23] BUSARI M B, MUHAMMAD H L, OGBADOYI E O, et al. Hypoglycaemic properties of *Moringa oleifera* Lam seed oil in normoglycaemic rats[J]. Iosr Journal of Pharmacy & Biological Sciences, 2014, 9(6): 23-27.
- [24] ASHA J C, LI Z, KHEA W, et al. A dietary isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract improves glucose tolerance in a high-fat-diet mouse model and modulates the gut microbiome[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 47(5): 376-385.
- [25] WATERMAN C, ROJAS-SILVA P, TUMER T B, et al. Isothiocyanate-rich *Moringa oleifera* extract reduces weight gain, insulin resistance, and hepatic gluconeogenesis in mice[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2015, 59(6): 1013-1024.
- [26] 王艳秋. 血清脂联素与丙二醛及超氧化物歧化酶在糖尿病周围神经病变患者的相关性研究[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(2): 21-22.
- WANG Y Q. Correlation of serum lipocalin with malondialdehyde and superoxide dismutase in patients with diabetic peripheral neuropathy[J]. China Modern Drug Application, 2016, 10(2): 21-22.
- [27] GHAZIZADEH Z, KHALOO P, ALEMI H, et al. Definition of an oxidative stress status by combined assessment of malondialdehyde and oxidized-LDL: A study in patients with type2 diabetes and control[J]. Meta Gene, 2019, 19(1): 91-97.
- [28] 张剑, 齐艳秀, 姜伟, 等. 白藜芦醇对糖尿病性白内障大鼠 MDA, SOD 和 GSH-px 的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2016, 50(6): 497-500.
- ZHANG J, QI Y X, JIANG W, et al. Effects of resveratrol on MDA, SOD and GSH-px in diabetic cataract rats[J]. Journal of Harbin Medical University, 2016, 50(6): 497-500.
- [29] GUERRA C, NAVARRO P, VALVERDE A M, et al. Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows a diabetic phenotype without insulin resistance[J]. Journal of Clinical Investigation, 2001, 108(8): 1205-1213.
- [30] LI X Q, LI X X, WANG G B, et al. Xiao Ke Qing improves glycometabolism and ameliorates insulin resistance by regulating the PI3K/Akt pathway in KKAY mice[J]. Frontiers of Medicine, 2018, 12(6): 688-696.
- [31] BAYASCAS J R, WULLSCHLEGER S, SAKAMOTO K, et al. Mutation of the PDK1 pH domain inhibits protein kinase B/AKT, leading to small size and insulin resistance[J]. Molecular & Cellular Biology, 2008, 28(10): 3258-3272.

Isothiocyanate Extracted from *Moringa oleifera* Improves Insulin Resistance of C2C12 Myotube Cells

Mao Jiaying^{1,2}, Bai Yuying^{1,2}, Peng Linjie^{1,2}, Xie Jing¹, Tian Yang^{2,3}

(¹College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201

²Yunnan Key Laboratory of Biological Big Data, Kunming 650201

³Development and Utilization of Food and Drug Homology Resources Engineering Center, Ministry of Education, Kunming 650201)

Abstract Objective: A C2C12 myotube cell insulin resistance (C2C12-IR) model was established to explore the effect of isothiocyanate extracted from *Moringa oleifera* (MIC-1) on C2C12 myotube cell insulin resistance. Methods: Palmitic acid (PA) was used to induce C2C12 myotube cells to establish a stable C2C12-IR model, and the cells were treated with different concentrations of MIC-1 (0, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{mol/L}$) for 16 h. The cell viability of C2C12-IR cells was detected by MTT assay, and the effect of MIC-1 on glucose metabolism of C2C12-IR cells was observed. Cellular oxidative damage [nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH)] were tested. The expression levels of related proteins in the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway were detected by using Western blot assay. Results: The optimal modeling conditions for the C2C12-IR model were determined, that is, C2C12 myotube cells were treated with 0.5 mmol/L PA for 16 h. Compared with the C2C12-IR group, MIC-1 significantly increased the glucose consumption and glycogen content of C2C12-IR cells in a dose-dependent manner. MIC-1 significantly decreased the level of MDA and NO, and significantly increased the level of GSH in C2C12-IR cells. In addition, MIC-1 significantly increased the expression levels of phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1), p-AKT, and glucose transporter 4 (GLUT4). Conclusion: MIC-1 improves insulin resistance by inhibiting oxidative stress.

Keywords *Moringa oleifera* isothiocyanate; C2C12 cells; insulin resistance; oxidative stress; insulin signaling pathway