



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20200173

一种四环吡啶衍生物降血糖和降血脂活性评价与作用机制

张梦迪, 彭小林, 吴岩, 韩开林, 刘振, 孙华
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 四环吡啶衍生物 7i 是前期研究发现的高活性 α -葡萄糖苷酶抑制剂,但其作用机制以及体内降血糖和降血脂活性尚不明确。本研究通过体外酶水平的透析实验和荧光探针分析等手段揭示了化合物 7i 以不可逆的方式与 α -葡萄糖苷酶结合并抑制其活性。通过 3T3-L1 和 HepG2 细胞模型分析发现,化合物 7i 显著提高磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMPK) 和乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 蛋白磷酸化水平,降低脂质积累。另外,利用糖尿病小鼠模型研究发现,化合物 7i 能够有效抑制糖尿病小鼠的餐后血糖水平,改善葡萄糖耐量,降低血清中甘油三酯和胆固醇的含量,并且能够改善糖尿病小鼠肝脏的水肿和脂肪变性。因此,化合物 7i 通过抑制 α -葡萄糖苷酶和调节 AMPK/ACC 磷酸化水平的双重作用机制起到降低血糖和血脂的作用,为其开发成为新型抗糖尿病药物奠定了基础。

关键词: 四环吡啶; α -葡萄糖苷酶; AMPK; 糖尿病

中图分类号: R914.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2021)02-0008-07

Anti-hyperglycemic and Anti-hyperlipemic Activity Evaluation and Mechanism of Action of a Tetracyclic Oxindole Derivative

ZHANG Mengdi, PENG Xiaolin, WU Yan, HAN Kailin, LIU Zhen, SUN Hua
(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Our previous research revealed that tetracyclic oxindole 7i was a potent α -glucosidase inhibitor. However, the mechanism of a tetracyclic oxindole 7i on hyperglycemia and hyperlipidemia *in vivo* and *in vitro* were unclear. In this study, the kinetic, intrinsic fluorescence and hydrophobic analyses of α -glucosidase on 7i showed that 7i, as an α -glucosidase inhibitor, directly bound to α -glucosidase and inhibited enzyme in an irreversible manner. Moreover, the effect on lipid accumulation and Western blot in HepG2 and 3T3-L1 cells was analyzed. The results exhibited that 7i apparently reduced blood lipid content and increased the phosphorylation level of AMPK and ACC. In addition, the type 2 diabetic mice were treated with compound 7i. The results demonstrated that increase levels of postprandial blood glucose and total cholesterol and triglycerides of diabetic mice were significantly suppressed in the 7i-administered group *in vivo*. The histological observations showed that 7i improved hydropic degeneration and steatosis of diabetic mouse liver. These results provide new insights into the molecular mechanisms of 7i alleviated hyperglycemia and hyperlipemia by inhibiting α -glucosidase and regulating the AMPK/ACC pathway, and indicate that 7i may be a promising therapeutic agent for the treatment of diabetes.

Key words: tetracyclic oxindole; α -glucosidase; AMPK; diabetes

糖尿病是人类生活中最常见的代谢性疾病之一,以高血糖和高脂血症为主要特征,并伴随多种并发症,包括神经病变、肾病、心脏病、中风和血管疾病^[1]。2 型糖尿病约占糖尿病患者人数的 90% 以上,其病因

是胰岛素分泌不足或胰岛素抵抗引起的血糖升高^[2]。目前治疗 2 型糖尿病的口服药物有 α -葡萄糖苷酶抑制剂、磺脲类、噻唑烷二酮类、二甲双胍和中成药等。 α -葡萄糖苷酶通过水解低聚糖的 1,4- α -糖苷键

收稿日期: 2020-10-24; 修回日期: 2020-12-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21502138); 天津市自然科学基金资助项目(18JCYBJC94800)

作者简介: 张梦迪(1994—),女,天津人,硕士研究生; 通信作者: 孙华,教授, sunhua@tust.edu.cn

释放葡萄糖,是消化碳水化合物过程的最后一步。 α -葡萄糖苷酶抑制剂通过抑制小肠黏膜刷状缘的 α -葡萄糖苷酶活性,减缓低聚糖和二糖中葡萄糖的释放,从而降低餐后血糖水平,延缓葡萄糖吸收^[3-4]。磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)抑制合成代谢过程,刺激产生能量的分解代谢过程,降低血糖水平^[5]。AMPK活化也会抑制乙酰辅酶A羧化酶(ACC)活性和丙二酰辅酶A的产生,从而抑制脂肪合成和刺激脂肪酸氧化。

四环吡啶衍生物是一类代表性的生物碱,广泛存在于植物和微生物代谢产物中,具有多种生物活性^[6-7]。本课题组曾经报道了一系列新型四环吡啶衍生物的合成以及抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究^[8-9]。其中,四环吡啶衍生物化合物7i具有较强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,但其作用机制以及体内是否具有降血糖和降血脂活性尚不清楚。因此,本研究旨在探讨化合物7i能否改善糖尿病小鼠的高血糖和高血脂等症状,并进一步研究该化合物的抑制 α -葡萄糖苷酶作用机制以及其他可能的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

化合物7i(图1)由天津科技大学药物设计与合成研究室合成(纯度>95%)^[10]。

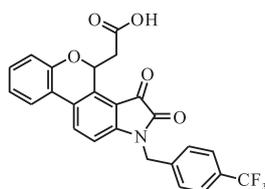


图1 化合物7i的结构

Fig. 1 Structure of compound 7i

来源于酵母的 α -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20)、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNGP)、4,4'-二苯胺-1,1'-联萘-5,5'-二磺酸二钾盐(Bis-ANS)、油红O溶液、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、地塞米松、油酸、棕榈酸、亚油酸、花生四烯酸、阿卡波糖, Sigma-Aldrich公司;透析袋(MD 34-3.5-5)、DAPI染料,北京索莱宝生物科技有限公司;人肝癌细胞HepG2、前脂肪细胞3T3-L1,中国科学院上海生物科学研究所;胰岛素,诺和诺德(中国)制药有限公司;洛伐他汀(10 μ mol/L),南京草本源生物科技有限公司; anti-p-AMPK α (Thr172)、AMPK α 、p-ACC

(Ser79)、ACC和 β -actin的抗体, Cell Signaling Technology公司;5-氨基-1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-二羟基-5-(羟甲基)恶唑-2-基]咪唑-4-甲酰胺(AICAR),安诺伦生物科技有限公司;甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)测试试剂盒,北京普利莱基因技术有限公司;链脲霉素(STZ),北京博爱港商贸有限公司。

1.2 体内活性评价

1.2.1 动物与饮食

体质量18~22g的雄性昆明小鼠购自中国农业科学院实验动物科学研究所(许可证号为SCXK(Jun)2012-0004)。该动物实验严格按照国家和当地的伦理准则执行。小鼠每笼5只,在实验室条件下(18~23℃,湿度55%~60%,光/暗周期为12h/12h)进行饲养。所有小鼠均以普通颗粒饲料喂养1周后随机分组,正常组(10只)的小鼠继续用普通饲料喂养,其余小鼠用高糖高脂饲料喂养(模型组和给药组)。所有的小鼠均自由饮食。

1.2.2 2型糖尿病小鼠的诱导及治疗

STZ溶于0.05 mol/L枸橼酸盐缓冲液中(pH 4.5),小鼠单次腹腔注射上述STZ溶液诱导2型糖尿病,并连续高糖高脂饲料辅助喂养2周,小鼠的尾静脉空腹血糖高于11.0 mmol/L,即2型糖尿病小鼠造模成功。将造模成功的2型糖尿病小鼠分为4组,每组10只。第1组灌胃生理盐水10 mL/kg(模型组);第2组灌胃阿卡波糖(溶解于生理盐水)55 mg/kg;第3和第4组分别灌胃给药7i(悬浮于生理盐水中)55 mg/kg和100 mg/kg^[11]。

1.2.3 血糖水平的测定

各组小鼠灌胃给药或生理盐水14d后,隔夜禁食,口服葡萄糖(2 g/kg),于0、30、60和120 min从尾静脉采集血样,血糖仪(三诺生物传感股份有限公司)测量血糖^[11]。

1.2.4 血脂水平的测定

在实验期结束时,眼内眦取血,1000 r/min离心获得血清,-20℃储存。血清总胆固醇和甘油三酯使用试剂盒进行分析。

1.2.5 肝脏组织学评价

小鼠麻醉处死,获取胸腺、脾、胰、肝,组织用冷生理盐水冲洗,称量。肝脏用4%多聚甲醛溶液室温下过夜固定,用石蜡包埋,42℃干燥48h,二甲苯脱石蜡,梯度乙醇复水,蒸馏水清洗后,用苏木精复染切片。随后用自来水、醋酸和双蒸水冲洗切片,在乙醇和甲苯中脱水并用中性胶密封。

1.3 体外活性评价

1.3.1 酶动力学

在磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 6.8)中加入 α -葡萄糖苷酶(400 μ L, 0.01 U/mL, 2 组), 其中一组用 7i(20 μ mol/L) 处理的 α -葡萄糖苷酶(400 μ L, 0.01 U/mL)在 4 $^{\circ}$ C下透析 24 h, 测定透析袋中残余酶活性, 另一组 α -葡萄糖苷酶经 7i 处理 30 min 后直接测定酶的活性^[10].

1.3.2 酶内源荧光影响

α -葡萄糖苷酶(1 U)经一定浓度的 7i(0 ~ 500 μ mol/L)在 37 $^{\circ}$ C预处理 30 min, 用 M200PRO 型荧光分光光度计(Tecan 公司)在 295 nm 激发波长下测定 320 ~ 400 nm 范围内的内源荧光光谱^[12].

1.3.3 酶结合区域分析

α -葡萄糖苷酶(1 U)与一定浓度的 7i(0 ~ 50 μ mol/L)在 37 $^{\circ}$ C温孵 30 min, 添加荧光探针(Bis-ANS, 30 μ L, 100 μ mol/L)后, 在 37 $^{\circ}$ C下再孵育 15 min, 使用 Synergy H1 型微板分光光度计(美国 BioTek 公司)测量 430 ~ 630 nm 范围内的荧光光谱($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$)^[12].

1.3.4 人肝癌细胞 HepG2 培养及诱导

HepG2 细胞在含有 10% 胎牛血清(FBS)、10 U/mL 青霉素和 10 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱培养. 将 HepG2 细胞接种于 6 孔板上培养 24 h, 正常组不加诱导剂, 模型组和给药组分别加入 0.75 mmol/L 的诱导剂(油酸、棕榈酸、亚油酸和花生四烯酸的体积比为 29 : 47 : 18 : 6)处理, 且给药组加入不同浓度的化合物 7i^[13].

1.3.5 前脂肪细胞 3T3-L1 培养与分化

前脂肪细胞 3T3-L1 在添加 10% 新生小牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱培养. 为了进行脂肪细胞分化, 将前脂肪细胞 3T3-L1 培养 2 d 后, 模型组和给药组加入分化培养基(含 10% 胎牛血清、0.5 mm IBMX、1 μ mol/L 地塞米松和 10 μ g/mL 胰岛素), 2 d 后更换含有 10% 胎牛血清和 10 μ g/mL 胰岛素的 DMEM 分化培养基, 继续孵育 2 d 后给药^[14-15].

1.3.6 油红 O 染色法测定脂含量

将给药处理后的人肝癌细胞 HepG2 和前脂肪细胞 3T3-L1 用油红 O 染色, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 1 \times PBS 冲洗 3 次. 用异丙醇提取细胞内结合的油红 O, 并在 492 nm 处测量吸光度, 计算细胞内脂含量^[14].

1.3.7 尼罗红染色法分析脂含量

将尼罗红溶解在 1 mg/mL 丙酮中. HepG2 细胞接种在 6 孔板上, 给药处理 24 h 后, 分别加入到终质量浓度 10 μ g/mL 的尼罗红和 1 μ g/mL DAPI 染料, 室温黑暗条件下孵育 15 min, 使用倒置荧光显微镜进行拍照^[14].

1.3.8 细胞内甘油三酯和总胆固醇的测定

将 HepG2 和 3T3-L1 细胞接种在 6 孔板上, 诱导分化后给药处理 24 h, 用 1 \times PBS 洗 3 次, 离心收集细胞, 用 TG 和 TC 试剂盒中裂解液裂解细胞, 室温保存 10 min, 对细胞内蛋白质进行定量分析, 在 70 $^{\circ}$ C加热细胞 10 min 后, 2 000 r/min 离心 5 min, 使用试剂盒分析 TG 和 TC 含量^[13].

1.3.9 免疫印迹分析

HepG2 和 3T3-L1 细胞在 60 mm 培养皿中以每孔 1×10^5 个细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱培养 24 h, 正常组不加诱导剂处理, 模型组和给药组加入诱导剂(油酸、棕榈酸、亚油酸和花生四烯酸的体积比为 29 : 47 : 18 : 6)处理. 给药组加 7i 处理 24 h 加入胰蛋白酶消化收集细胞, 细胞用 1 \times PBS 洗涤 3 次, 2 500 r/min 离心 5 min, 加入蛋白裂解液, 在冰上裂解 60 min, 4 $^{\circ}$ C、13 500 r/min 离心 20 min. 用 BCA 蛋白质分析试剂盒测定蛋白质含量, 使用等量的蛋白质溶液在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行电泳, 电泳完成后转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上. PVDF 膜在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 用不同的一抗 p-AMPK、AMPK、p-ACC、ACC 和 β -actin 与 PVDF 膜 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PVDF 膜用 1 \times PBS 清洗 3 次, 与鼠抗或兔抗(1 : 5 000 稀释度)在室温下孵育 2 h 后, ECL-Western-Blotting 底物(Thermo-Scientific 公司)检测条带^[14].

1.4 统计分析

所有数据以“均值 \pm 标准差”表示, 结果采用单因素方差(ANOVA)或双向检测(two tailed independent Student's t-tests)进行分析, 显著性差异用 SPSS 21.0 软件进行方差齐性检验和最小显著性差异(LSD)多重比较确定.

2 结果与讨论

2.1 化合物 7i 对体质量的影响

化合物 7i 对小鼠体质量的影响如图 2 所示. 经过 1 周正常喂养, 各组小鼠的初始体质量无显著性差异. 高糖高脂饲料喂养 3 周后, 模型组的体质量显著

增加. 模型组单次腹腔注射 STZ 后, 继续喂养高糖高脂饲料喂养 2 周, 模型组体质量有所减轻, 出现糖尿病小鼠的症状. 2 型糖尿病组口服灌胃化合物 7i 和阿卡波糖. 给药 2 周后, 与 2 型糖尿病模型组相比, 7i 给药组体质量没有明显变化. 结果表明: 7i 对糖尿病小鼠体质量无明显影响, 与阿卡波糖作用效果相似.

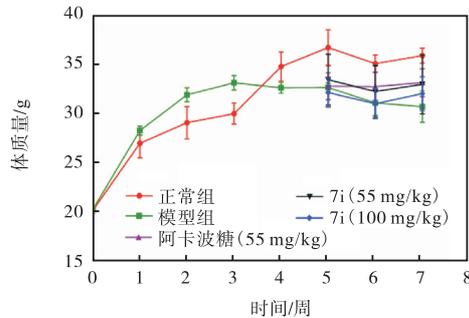
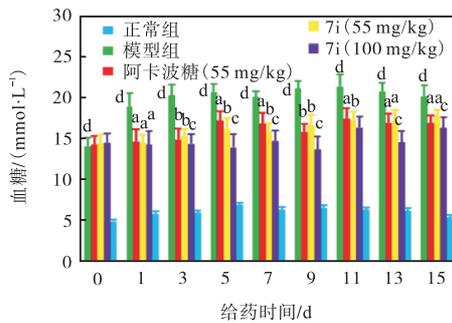


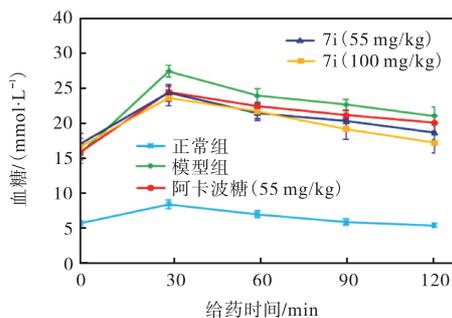
图 2 化合物 7i 对体质量的影响
Fig. 2 Effect of 7i on body weight

2.2 化合物 7i 对血糖和口服葡萄糖耐量的影响

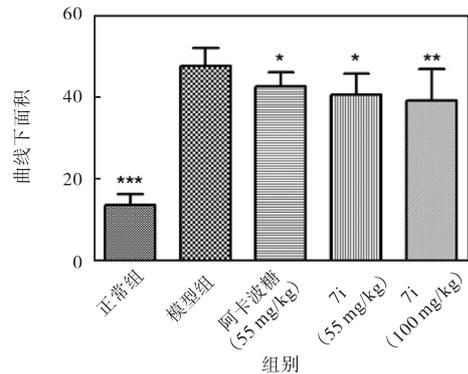
化合物 7i 对血糖和口服葡萄糖耐量的影响如图 3 所示. 以 55 和 100 mg/kg 剂量的 7i 给药后, 糖尿病小鼠的空腹血糖水平显著降低 (^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ 表示与模型组比较, ^d $P < 0.001$ 与正常对照组比较). 为了评价化合物 7i 对糖尿病小鼠的葡萄糖稳态和胰岛素敏感性的影响, 进一步进行了葡萄糖耐量的测试.



(a) 餐后血糖



(b) 口服葡萄糖耐量



(c) 口服葡萄糖耐量的曲线下面积

图 3 化合物 7i 对血糖和口服葡萄糖耐量的影响

Fig. 3 Effect of 7i on blood glucose and on oral glucose tolerance in diabetic mice

与模型组相比, 口服葡萄糖后, 7i 的 55 mg/kg 剂量组在 30、60、90 和 120 min 的血糖浓度分别降低 11.06%、10.27%、10.37% 和 11.08%. 从曲线下面积图可以看出, 与模型组相比, 阿卡波糖组和化合物 7i 均能显著改善葡萄糖耐量 (^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$).

2.3 化合物 7i 对糖尿病小鼠器官的影响

分别对各组的胸腺、脾、胰、肝脏脏器指数进行分析, 结果发现只有肝脏脏器指数发生显著变化. 口服 7i 可显著改善肝脏脏器指数的增加. 进一步对肝脏进行组织学染色分析, 结果如图 4 所示.

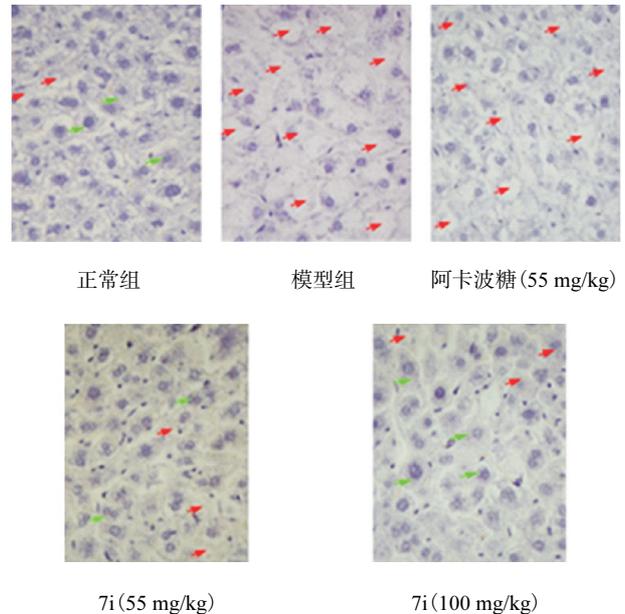


图 4 不同组小鼠肝脏苏木精染色
Fig. 4 Haematoxylin staining of different groups of mice liver

经苏木精染色后, 发现正常组肝细胞形态正常,

肝细胞索排列整齐. 模型组肝细胞出现严重的病理改变, 具有肝索紊乱、水肿变性和脂肪变性的特征. 阿卡波糖给药组肝细胞恢复效果较差, 而 7i 给药组的肝细胞出现良好的恢复现象, 尤其是给药 100 mg/kg 剂量组, 肝细胞结构与正常肝细胞结构相似, 水样变性和脂肪变性得到显著恢复. 因此, 对于改善糖尿病小鼠的肝脏病变, 相同剂量下, 化合物 7i 治疗效果优于阿卡波糖.

2.4 化合物 7i 对血脂的影响

化合物 7i 对血脂的影响见表 1. STZ 诱导后糖尿病小鼠组血清 TC 和 TG 较正常组显著升高, 而 7i 治疗的糖尿病小鼠, TC 和 TG 水平显著下降. 因此, 化合物 7i 可以显著改善糖尿病小鼠的高血脂症状.

表 1 甘油三酯和总胆固醇含量 (n = 10)

Tab. 1 Levels of TC and TG in each group of mice (n = 10)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
正常组	0	2.64 ± 0.48***	1.21 ± 0.36**
模型组	0	5.52 ± 1.89	1.86 ± 0.67
7i	55	3.39 ± 0.60***	1.29 ± 0.53**
7i	100	3.32 ± 0.76***	1.26 ± 0.21**
阿卡波糖	55	4.81 ± 1.36	1.61 ± 0.69

注: 与模型组相比, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

2.5 α-葡萄糖苷酶的动力学性质分析

利用透析方法, 对化合物 7i 抑制 α-葡萄糖苷酶的动力学性质进行了分析, 结果如图 5 所示 (与酶透析组相比, **P < 0.01). 经化合物 7i 处理的 α-葡萄糖苷酶, 透析后活性不能恢复, 与未经透析的 7i 处理的 α-葡萄糖苷酶活性相似, 这表明 7i 对 α-葡萄糖苷酶的抑制方式是不可逆的.

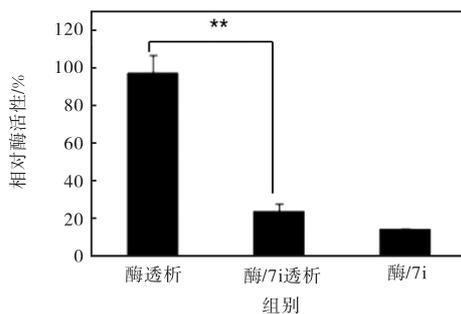


图 5 化合物 7i 处理下透析或非透析后 α-葡萄糖苷酶活性
Fig. 5 α-Glucosidase activity after dialysis or non-dialysis in presence of DMSO or 7i

2.6 化合物 7i 猝灭 α-葡萄糖苷酶的内源荧光

使用荧光猝灭实验研究了化合物 7i 与 α-葡萄糖苷酶的相互作用, 结果如图 6 所示. α-葡萄糖苷酶在 295 nm 激发波长下, 在 336 nm 处出现内源荧光吸收峰. 经不同浓度 7i 处理后, α-葡萄糖苷酶的内源荧

光强度随着化合物 7i 浓度的增加而逐渐减弱, 该结果为化合物 7i 直接与 α-葡萄糖苷酶结合提供了证据. 这种结合可能导致 α-葡萄糖苷酶中色氨酸残基的构象变化, 进而影响酶活性中心与底物的结合.

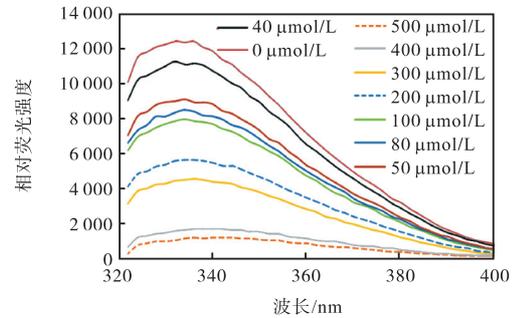


图 6 不同浓度 7i 对 α-葡萄糖苷酶内源荧光强度的影响
Fig. 6 Variation of the intrinsic fluorescence intensity of α-glucosidase in the absence and presence of different concentrations of 7i

2.7 化合物 7i 与 α-葡萄糖苷酶疏水区域的结合

利用外源荧光疏水探针 bis-ANS 进一步研究化合物 7i 与 α-葡萄糖苷酶表面疏水性区域的结合情况. 该荧光探针与 α-葡萄糖苷酶共孵育时, 在 430 ~ 630 nm 范围内可以观察到强烈的荧光信号 (图 7). 经不同浓度的 7i 处理后, 酶与荧光探针的复合物的荧光强度呈浓度依赖性明显降低. 该结果说明化合物 7i 可能与酶的疏水区域结合, 并竞争性抑制了 α-葡萄糖苷酶的表面疏水性 with 荧光探针的结合.

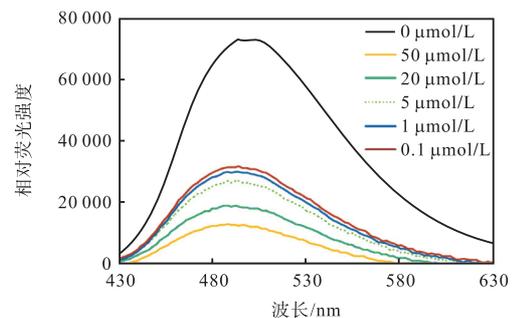


图 7 不同浓度 7i 对 α-葡萄糖苷酶与荧光探针复合物的荧光光谱的影响
Fig. 7 Fluorescence spectra of α-glucosidase-bis-ANS complex in the absence and presence of different concentrations of 7i

2.8 化合物 7i 抑制 HepG2 和 3T3-L1 细胞中 TG 和 TC 的积累

以 HepG2 和 3T3-L1 细胞为模型, 进一步研究化合物 7i 对脂质代谢的影响, 结果如图 8 所示 (与模型组相比, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

诱导剂处理 24 h 后细胞内 TG 和 TC 含量显著

增加, 加入不同浓度的 7i 和阳性对照洛伐他汀 10 $\mu\text{mol/L}$ 后, HepG2 和 3T3-L1 细胞中的 TG 和 TC 水平呈剂量依赖性降低。此外, 利用倒置荧光显微

镜, 用尼罗红和 DAPI 染色也能直观地观察到 HepG2 的脂质含量随着 7i 剂量依赖性的降低 (图 9)。

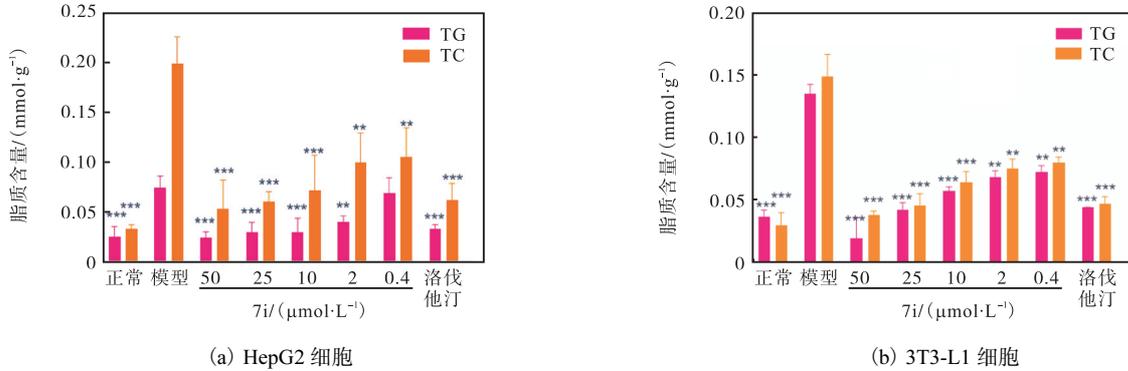


图 8 化合物 7i 对 HepG2 和 3T3-L1 细胞的脂质代谢的影响
Fig. 8 Compound 7i reduced lipid accumulation in HepG2 and 3T3-L1 cells

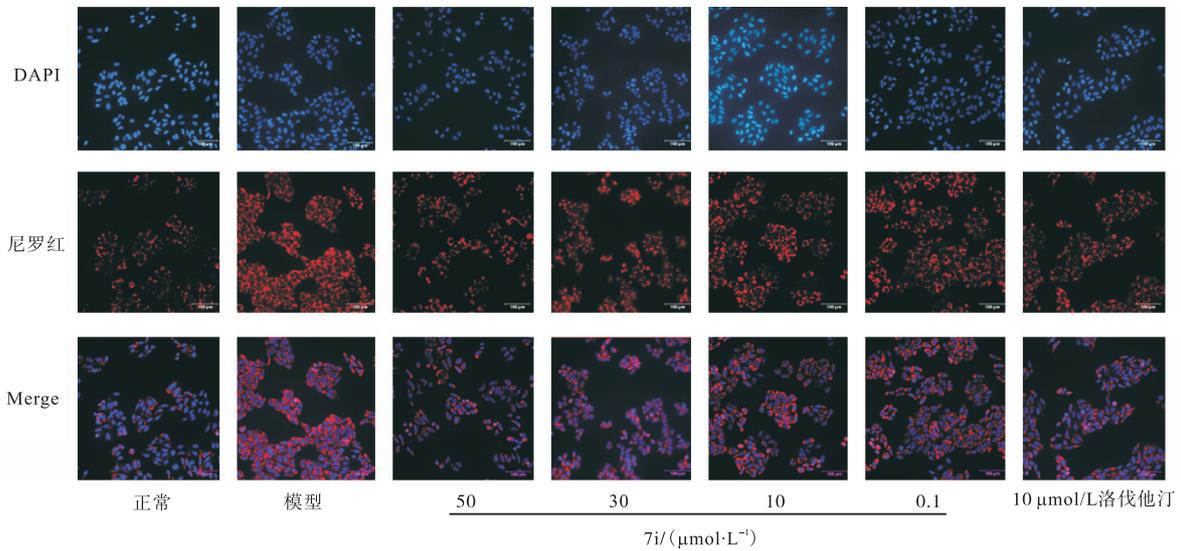
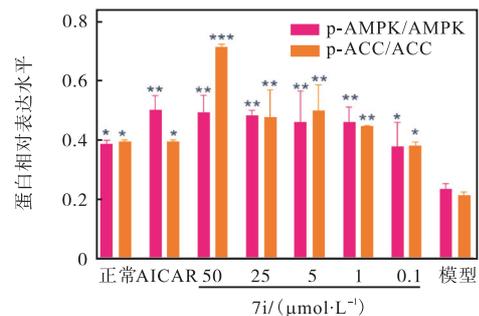
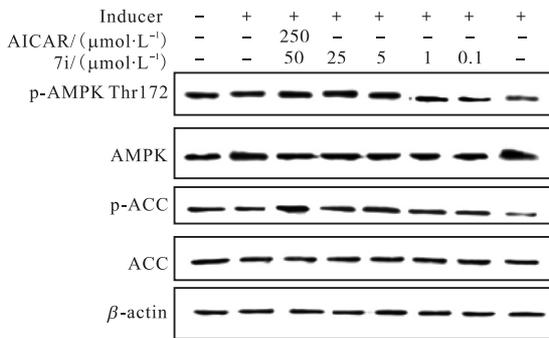


图 9 对 HepG2 细胞的尼罗红和 DAPI 染色
Fig. 9 Nile red and DAPI staining of HepG2 cells

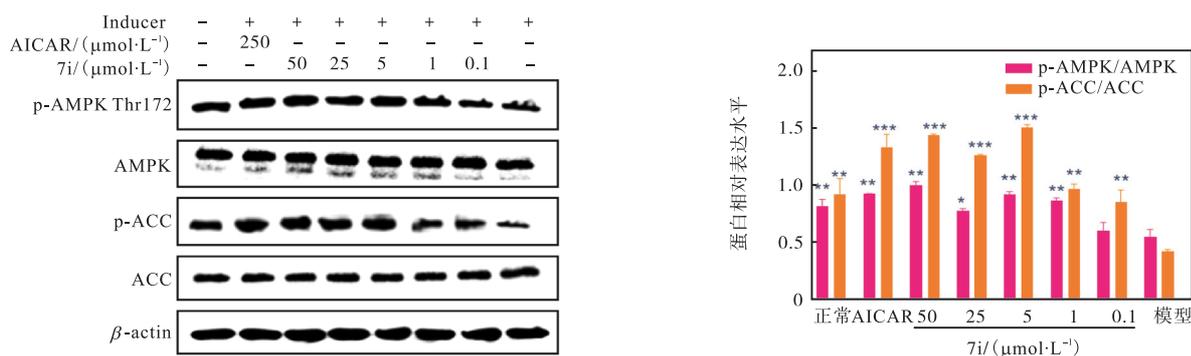
2.9 化合物 7i 对 AMPK 通路相关蛋白的影响

由于 AMPK 通路在脂质代谢过程中起着关键性作用, 因此进一步测定了 7i 对 AMPK 通路相关蛋白表达量的影响, 结果如图 10 所示 (与模型组相比,

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 以 AICAR (250 $\mu\text{mol/L}$) 为阳性对照, 实验结果表明, 化合物 7i 能够显著上调 AMPK (Thr172) 和 ACC (Ser79) 蛋白的磷酸化水平, 与 AMPK 激活剂 AICAR 作用效果相似。



(a) 对 HepG2 的免疫印迹分析



(b) 对 3T3-L1 的免疫印迹分析

图 10 化合物 7i 通过 AMPK-ACC 级联减少 HepG2 和 3T3-L1 细胞中的脂质积累

Fig. 10 Compound 7i reduces the lipid accumulation via AMPK-ACC cascade in HepG2 and 3T3-L1 cells

该结果表明, 化合物 7i 可能通过上调 AMPK 通路中 AMPK 和 ACC 磷酸化而起到降脂的作用。

3 结论

本研究评价了化合物 7i 对糖尿病小鼠的体内降血糖和降血脂作用, 以及体外抑制 α -葡萄糖苷酶机制, 细胞水平降脂活性和初步针对 AMPK 通路的调节活性和机制. 在糖尿病小鼠中, 55 和 100 mg/kg 剂量的化合物 7i 显著降低餐后血糖水平, 并明显改善葡萄糖耐量. 化合物 7i 还能明显抑制血清 TC 和 TG 水平的升高, 并改善肝脏脏器指数, 使肝细胞恢复正常. 化合物 7i 可能与 α -葡萄糖苷酶输水区域直接结合, 不可逆抑制酶的活性而达到降血糖的作用. 此外, 7i 能够降低 HepG2 和 3T3-L1 细胞中 TG 和 TC 的积累, 其机制可能是通过上调 AMPK 和 ACC 的磷酸化水平而达到降低血脂和血糖的作用. 因此, 化合物 7i 作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂和 AMPK/ACC 信号调节剂双重调节糖脂代谢紊乱, 为其发展成为新型抗糖尿病药物提供基础支持.

参考文献:

- [1] Ghani U. Re-exploring promising α -glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: Finding needle in the haystack[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015, 103: 133-162.
- [2] Eichler H G, Korn A, Gasic S, et al. The effect of a new specific alpha-amylase inhibitor on post-prandial glucose and insulin excursions in normal subjects and Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients[J]. Diabetologia, 1984, 26(4): 278-281.
- [3] McCulloch D K, Kurtz A B, Tattersall R B. A new ap-

proach to the treatment of nocturnal hypoglycemia using alpha-glucosidase inhibition[J]. Diabetes Care, 1983, 6(5): 483-487.

- [4] Kayukova L A, Uzakova A B, Baitursynova G P, et al. Inhibition of α -amylase and α -glucosidase by new β -aminopropionamidoxime derivatives[J]. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2019, 53(2): 129-133.
- [5] Schultze S M, Hemmings B A, Niessen M, et al. PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: Protein kinases in glucose homeostasis[J]. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2012, 14: e1.
- [6] Kang T H, Murakami Y, Takayama H, et al. Protective effect of rhynchophylline and isorhynchophylline on in vitro ischemia-induced neuronal damage in the hippocampus: Putative neurotransmitter receptors involved in their action[J]. Life Sciences, 2004, 76(3): 331-343.
- [7] Winkler C, Wirleitner B, Schroecksnadel K, et al. In vitro effects of two extracts and two pure alkaloid preparations of *Uncaria tomentosa* on peripheral blood mononuclear cells[J]. Planta Medica, 2004, 70(3): 205-210.
- [8] Han K, Li Y, Zhang Y, et al. Design, synthesis and docking study of novel tetracyclic oxindole derivatives as alpha-glucosidase inhibitors[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2015, 25(7): 1471-1475.
- [9] Sun H, Zhang Y, Ding W, et al. Inhibitory activity evaluation and mechanistic studies of tetracyclic oxindole derivatives as α -glucosidase inhibitors[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2016, 123: 365-378.
- [10] Lin C L, Huang H C, Lin J K. Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells[J]. Journal of Lipid Research, 2007, 48(11): 2334-2343.

(下转第 67 页)

推理,用于解决具有不确定性的知识表示与推理。

(4)将不确定推理算法应用到燃气轮机故障诊断推理系统中,得出该算法可以并行、有效地执行推理过程,得到所求命题的真值,并且有效地弥补了使用模糊Petri网解决此类问题中出现的不足。

参考文献:

- [1] 袁崇义. Petri网原理与应用[M]. 北京:电子工业出版社,2005.
- [2] Looney C G. Fuzzy Petri nets for rule-based decision-making[J]. IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, 1988, 18(1): 178-183.
- [3] Chen S M, Ke J S, Chang J F. Knowledge representation using fuzzy Petri nets[J]. IEEE Transactions on Knowledge & Data Engineering, 1990, 2(3): 311-319.
- [4] Yeung D S, Ysang E C C. A multilevel weighted fuzzy reasoning algorithm for expert systems[J]. IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, 1998, 28(2): 149-158.
- [5] Chen S M. Fuzzy backward reasoning using fuzzy Petri nets[J]. IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, 2000, 30(6): 846-856.
- [6] Gao M, Zhou M, Huang X, et al. Fuzzy reasoning Petri nets[J]. IEEE Transactions on System, Man, and Cybernetics, 2003, 33(3): 314-324.
- [7] 汪洋,林闯,曲扬,等. 含有否定命题逻辑推理的一致性模糊Petri网模型[J]. 电子学报, 2006, 34(11): 1955-1960.
- [8] 苏开远,徐志刚,朱建峰,等. 基于Petri网的废旧产品拆卸设备设计[J]. 浙江大学学报:工学版, 2020, 54(9): 1795-1804.
- [9] 程学珍,王常安,李继明,等. 基于自适应神经模糊Petri网的电机故障诊断[J]. 山东科技大学学报:自然科学版, 2020, 39(3): 109-117.
- [10] Liu B. Uncertainty Theory[M]. Berlin: Springer-Verlag, 2007.
- [11] Chen X W, Ralescu D A. A note on truth value in uncertain logic[J]. Expert, Systems with Applications, 2011, 38(12): 15582-15586.
- [12] Liu B. Uncertain entailment and modus ponens in the framework of uncertain logic[J]. Journal of Uncertain Systems, 2009, 3(4): 243-251.
- [13] 马宪民. 人工智能的原理与方法[M]. 西安:西北工业大学出版社,2002.
- [14] Looney C G, Alfize A R. Logical controls via Boolean rule matrix transformations[J]. IEEE Transactions on System, Man, and Cybernetics, 1987, 17(6): 1077-1082.
- [15] 高梅梅,吴智铭. 模糊推理Petri网及其在故障诊断中的应用[J]. 自动化学报, 2000, 26(5): 677-680.

责任编辑:郎婧

(上接第14页)

- [11] Lee S H, Park M H, Heo S J, et al. Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits alpha-glucosidase and alpha-amylase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(10): 2633-2637.
- [12] Liu M, Yin H, Liu G, et al. Xanthohumol, a prenylated chalcone from beer hops, acts as an alpha-glucosidase inhibitor in vitro[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62(24): 5548-5554.
- [13] Liu H, Wang J, Liu M, et al. Antiobesity effects of ginsenoside Rg1 on 3T3-L1 preadipocytes and high fat diet-induced obese mice mediated by AMPK[J]. Nutrients, 2018, 10(7): 830.
- [14] Li J, Liu M, Yu H, et al. Mangiferin improves hepatic lipid metabolism mainly through its metabolite-norathyriol by modulating SIRT-1/AMPK/SREBP-1c signaling[J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9: 201.
- [15] Wan L S, Chen C P, Xiao Z Q, et al. In vitro and in vivo anti-diabetic activity of *Swertia kouitchensis* extract[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 147(3): 622-630.

责任编辑:郎婧