

泽泻醇B上调cAMP/PKA信号轴促进脂肪细胞产热

陈坤铃^{1,2,3} 陈林^{1,2,3} 邱剑楠^{1,2,3} 窦晓兵^{1,2,3} 陈思亦^{1,2,3} 卢德赵^{1,2,3} 周丽萍^{1,2,3*}

(¹浙江中医药大学生命科学院, 杭州 310053; ²浙江-香港中医药肝脾同治联合实验室, 杭州 310053;

³浙江中医药大学脂代谢研究所, 杭州 310053)

摘要 该文探究泽泻醇B促进脂肪细胞产热的作用及潜在机制。采用棕色鸡尾酒法诱导3T3-L1 MBX前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞, 利用CCK-8法检测不同浓度泽泻醇B对3T3-L1 MBX存活率的影响; 油红O染色、拉曼光谱技术观察脂肪细胞内脂滴形成情况; 定量逆转录聚合酶链反应检测脂肪生成相关基因、脂肪分解相关基因、关键产热基因、cAMP/蛋白激酶A(PKA)信号轴相关基因的表达情况; 酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞内环磷酸腺苷(cAMP)水平; 蛋白免疫印迹法检测关键产热基因、cAMP/PKA信号轴相关基因的蛋白表达情况; 采用PKA抑制剂H-89验证cAMP/PKA信号轴在泽泻醇B促进脂肪细胞产热中的作用。结果表明, 泽泻醇B浓度在0~10 $\mu\text{mol/L}$ 时对3T3-L1 MBX无细胞毒性; 泽泻醇B处理可显著减少脂肪细胞中的脂质积累, 降低脂肪合成相关基因(*srebp1c*、*fas*、*acc*)表达水平, 增加脂肪分解相关基因(*hsl*、*atgl*、*cpt1*)、关键产热基因(*ucp1*、*prdm16*、*pgc-1 α*)及其蛋白表达水平, 且呈剂量依赖性; 泽泻醇B处理可上调cAMP/PKA信号轴, 采用H-89抑制剂可逆转泽泻醇B对前脂肪细胞产热的促进作用。这些结果表明, 泽泻醇B通过上调cAMP/PKA信号轴促进前脂肪细胞产热, 抑制脂肪合成, 促进脂质分解。

关键词 泽泻醇B; 脂肪细胞; 产热; 脂代谢; cAMP/PKA信号轴

Alisol B Upregulates the cAMP/PKA Signaling Axis to Promote Thermogenesis in Adipocytes

CHEN Kunling^{1,2,3}, CHEN Lin^{1,2,3}, QIU Jiannan^{1,2,3}, DOU Xiaobing^{1,2,3}, CHEN Siyi^{1,2,3}, LU Dezhaohao^{1,2,3}, ZHOU Liping^{1,2,3*}

(¹School of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; ²Zhejiang-Hong Kong Joint Laboratory for Integrated Traditional Chinese Medicine Treatment of the Liver and Spleen, Hangzhou 310053, China; ³Institute of Lipid Metabolism, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract This study investigates the role of Alisol B in promoting thermogenesis in adipocytes and its potential mechanisms. 3T3-L1 MBX preadipocytes were differentiated into mature adipocytes using the Brown's cocktail method. The CCK-8 assay was used to assess the effects of different concentrations of Alisol B on the survival rate of 3T3-L1 MBX cells. Oil red O staining and Raman spectroscopy were used to visualize lipid droplets in cells and observe their formation within adipocytes. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction was used to detect the expression of genes associated with lipogenesis, lipolysis, key thermogenic

收稿日期: 2026-06-18

接受日期: 2026-09-08

国家自然科学基金(批准号: 82505465、82374102)、浙江省“尖兵领雁+X”科技计划项目(批准号: 2025C02174)、浙江省自然科学基金(批准号: LQN26H280004、LJHSD26H290001、MS25H270057)、中国博士后科学基金(批准号: 2025M783900)、浙江省博士后科研项目(批准号: ZJ2024067)和浙江中医药大学科研项目(批准号: 2025JKZKTS30)资助的课题

*通信作者。Tel: 0571-86603203, E-mail: lipingzhou@zcmu.edu.cn

Received: June 18, 2026

Accepted: September 8, 2026

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82505465, 82374102), the Zhejiang Province “Vanguard and Leading Goose+X” Science and Technology Program (Grant No.2025C02174), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LQN26H280004, LJHSD26H290001, MS25H270057), the China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2025M783900), the Zhejiang Province Postdoctoral Research Project (Grant No.ZJ2024067) and the Zhejiang Chinese Medical University Research Project (Grant No.2025JKZKTS30)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86603203, E-mail: lipingzhou@zcmu.edu.cn

genes, and the cAMP/PKA (protein kinase A) signaling axis. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) was used to measure intracellular cAMP (cyclic adenosine monophosphate) levels. Western blot analysis was performed to detect the protein expression of key thermogenic genes and genes associated with the cAMP/PKA signaling axis. The role of the cAMP/PKA signaling axis in the thermogenic effects of Alisol B on adipocytes was validated using the PKA inhibitor H-89. The results demonstrated that Alisol B exhibited no evidence of toxicity towards 3T3-L1 MBX cells at concentrations ranging from 0 to 10 $\mu\text{mol/L}$. Treatment with Alisol B significantly reduced lipid accumulation in adipocytes, decreased the expression of genes associated with lipogenesis (*srebp1c*, *fas*, *acc*), increased the expression of genes associated with lipolysis (*hsl*, *atgl*, *cpt1*), the expression of key thermogenic genes (*ucp1*, *prdm16*, *pgc-1 α*) and their corresponding proteins, with these effects being dose-dependent. The Alisol B treatment resulted in an upregulation of the cAMP/PKA signalling axis, the use of the H-89 inhibitor reversed the thermogenic-promoting effect of Alisol B on preadipocytes. The results of this study suggest that Alisol B promotes thermogenesis in preadipocytes, inhibits lipogenesis, and enhances lipolysis by upregulating the cAMP/PKA signalling axis.

Keywords Alisol B; adipocytes; thermogenesis; lipid metabolism; cAMP/PKA signaling axis

肥胖的患病率持续攀升已使其成为全球范围内公共卫生领域的重大挑战,其本质是能量摄入与消耗的长期失衡所致的脂肪异常蓄积^[1]。作为多种代谢性疾病的核心驱动因素,肥胖显著加剧了2型糖尿病、心血管病变及恶性肿瘤患者的疾病负担,严重威胁人类健康^[2]。脂肪组织主要由负责储能的白色脂肪组织与介导产热的棕色脂肪组织构成。解偶联蛋白1(uncoupling protein 1, UCP1)介导的解偶联呼吸能增加机体基础能耗,激活脂肪组织适应性产热,是拮抗肥胖及其并发症、克服传统干预复胖率的新策略^[3]。研究表明,产热程序的启动与放大严格受控于cAMP/蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)信号轴^[4]。 β_3 肾上腺素能受体/鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 刺激亚基(guanine nucleotide binding protein, α stimulating, GNAS)/腺苷酸环化酶4(adenylate cyclase 4, ADCY4)信号轴被激活,诱导胞内cAMP生成及PKA活化;活化的PKA通过磷酸化转录因子环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB),驱动*ucp1*与*pgc-1 α* 等关键产热基因的转录重编程,激活脂肪产热^[5]。

中医临床常用泽泻治疗痰湿内阻所致之肥胖及高脂血症等代谢性病证。泽泻醇B(Alisol B)作为泽泻中含量较高的原萜三醇类成分,已被证实可抑制前脂肪细胞分化以减轻高脂饮食诱导的小鼠肥胖^[6]。另有研究表明,其能上调脂肪细胞中*ucp1*等产热基因的转录水平,并增加UCP1等产热蛋白的表达量^[7]。然而,泽泻醇B是否通过调节前脂肪细胞

内cAMP/PKA信号轴来实现促产热效应尚待研究。3T3-L1 MBX细胞系因其接近100%的脂肪分化效率,是解析产热调控机制的优选模型^[8]。本研究以此探讨泽泻醇B对前脂肪细胞产热的激活效应,并阐明其通过cAMP/PKA信号轴调控产热基因转录的机制,为泽泻醇B作为靶向产热激活分子提供依据,支撑其向代谢性疾病干预转化的潜力。

1 材料与方法

1.1 细胞、仪器及试剂

泽泻醇B(货号:18649-93-9)购自上海融禾医药科技发展有限公司;地塞米松(货号:50-02-2)、IBMX(货号:STBF6061V)、罗格列酮(货号:122320-73-4)、T3(货号:WXBF0211V)购自美国Sigma-Aldrich公司;重组人胰岛素(货号:11061-68-0)、DMSO(货号:67-68-5)购自北京索莱宝科技有限公司;H-89(货号:127243-85-0)购自美国MedChem-Express公司;DMEM培养基(货号:30-2002)、3T3-L1 MBX细胞(货号:CRL-3242)购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC);胎牛血清(货号:SA301.01.V)购自北京赛澳美细胞技术有限公司;青霉素/链霉素原液(货号:15140-122)购自天津灏洋生物科技有限公司;RNAiso Plus试剂(货号:108-95-2)购自日本TaKaRa公司;Mon-Script RTIII All-in-One Mix With dsDNase(货号:MR05101M)、SYBR Green qPCR Master Mix(Non Rox)(货号:130733)购自莫纳(苏州)生物科技有限公

司;改良油红O染色试剂盒(货号:C0158M)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0012)购自上海碧云天生物技术有限公司;cAMP ELISA检测试剂盒(货号:RF8358)购自上海瑞番生物科技有限公司;基因引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司;一抗UCP1(货号:23673-1-AP)、PGC-1 α (货号:66369-1-Ig)购自美国Proteintech Group公司;PRDM16(货号:ab303534)购自美国Abcam公司;CREB(货号:9197T)、p-CREB(货号:9198T)、PKA(货号:4782S)购自美国Cell Signaling Technology公司;p-PKA(货号:sc-377575)购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;GAPDH(货号:A00227)及二抗山羊抗鼠IgG(货号:BA1050)、山羊抗兔IgG(货号:BA1054)购自武汉博士德生物技术有限公司。倒置荧光显微镜购自日本Nikon公司;拉曼光谱仪(WITec alpha 300 Ri)购自德国Uhlmann公司;SpectraMax Plus384酶标仪购自美国MD公司;高速冷冻离心机、二氧化碳培养箱购自美国ThermoFisher Scientific公司;超净工作台购自苏州净化设备有限公司;Tpersongal PCR仪、qTOWER3G Real-time PCR热循环仪购自德国Analytik Jena公司;化学发光成像仪购自上海勤翔科学仪器有限公司。

1.2 细胞培养及处理

3T3-L1 MBX细胞接种于完全培养基(含10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素的DMEM培养基)中,于培养箱37℃、5%二氧化碳的恒定条件下进行常规传代培养,倒置荧光显微镜下观察,待细胞汇合度达70%~80%时接种于培养板中。

采用棕色鸡尾酒法诱导3T3-L1 MBX细胞分化为成熟脂肪细胞,具体培养步骤参考前期研究^[9]。

1.3 CCK-8法测定细胞活性

将3T3-L1 MBX细胞以 5×10^3 /孔的密度接种于96孔板,待细胞贴壁后,分别给予含系列梯度浓度(0、0.1、1、5、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$)泽泻醇B的培养基干预24 h。随后向每孔加入10 μL CCK-8试剂,继续37℃孵育1 h,使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔吸光度(D)值,确定合适的实验浓度。

1.4 油红O染色及拉曼成像观察细胞脂滴形态

依照试剂盒说明书,将诱导分化的成熟脂肪细胞用不同浓度泽泻醇B干预48 h后收集进行油红O染色。简要流程如下:弃去培养上清,PBS润洗后使用4%多聚甲醛室温固定10 min;加入过滤后的改良油

红O染色液室温孵育30 min;弃去染液,PBS充分洗涤背景,倒置显微镜下采集图像,观察脂滴形态及分布变化。

采用共聚焦显微拉曼光谱技术对单细胞进行无标记成像。选取代表性细胞区域,使用配备785 nm激光器的拉曼系统进行检测。设置激光功率20 mW,积分时间10 s,步长0.5 μm ,采集波数范围500~3 200 cm^{-1} 。

1.5 qRT-PCR检测基因表达水平

采用RNAiso Plus裂解液提取各组细胞总RNA。遵照MonScript RTIII All-in-One Mix With dsDNase试剂说明书进行cDNA合成,以18S rRNA为内参基因,使用SYBR Green qPCR Master Mix在实时荧光定量PCR系统上进行扩增。反应条件及引物序列均经过特异性验证。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量,实验独立重复3次。引物序列见表1。

1.6 酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞内cAMP水平

诱导分化后的脂肪细胞用不同浓度泽泻醇B以及加/不加H-89处理,弃去培养基后用PBS洗涤,加入预冷的细胞裂解液于冰上裂解15 min。收集裂解上清,参照cAMP ELISA检测试剂盒说明书进行操作:将标准品与样品加入包被有抗cAMP抗体的酶标板中,依次加入酶标二抗与显色底物,于450 nm波长处测定吸光度(D)值。基于标准曲线计算各孔cAMP浓度。

1.7 蛋白质印迹法检测相关蛋白表达情况

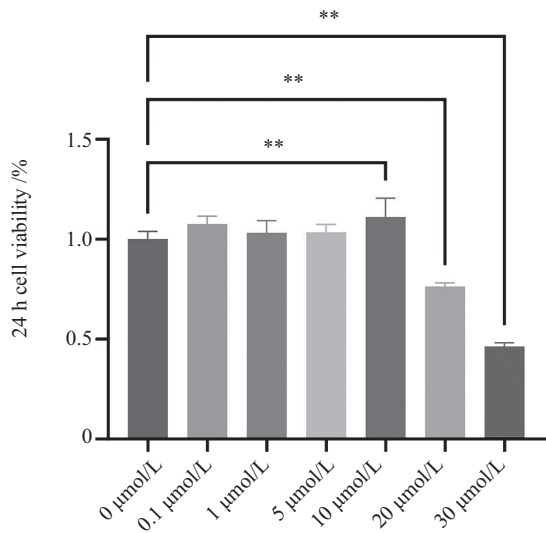
收集经不同浓度泽泻醇B以及加/不加H-89处理的分化后脂肪细胞,弃去培养基,预冷PBS洗涤后加入RIPA蛋白裂解液于冰上裂解30 min。收集裂解物于4℃、10 000 $\times g$ 离心15 min,取上清采用BCA法测定总蛋白浓度。每组取等量蛋白(30 μg)经10% SDS-PAGE分离后,湿转至PVDF膜。5%脱脂牛奶室温封闭1 h,加入一抗(稀释比例1:1 000)4℃摇床孵育过夜。加入相应二抗(稀释比例1:10 000)室温孵育1 h。曝光显影后通过ImageJ软件对特异性条带进行灰度值分析,以内参蛋白GAPDH为基准计算目的蛋白的相对表达水平。

1.8 统计学方法

采用GraphPad Prism 10.0软件进行数据整理与统计学分析。所有实验数据均独立重复至少3次,计量资料经正态性检验后,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 Sequences of primers for qRT-PCR

基因 Gene	上游序列(5'→3') Upstream sequence (5'→3')	下游序列(5'→3') Downstream sequence (5'→3')
18S rRNA	AGG TCT GTG ATG CCC TTA GA	GAA TGG GGT TCA ACG GGT TA
<i>pgc-1α</i>	GAT CCT GGT GTC TGT ATG CTG TCC	ATG ATG CTT CCG TGC CTA CTG TC
<i>prdm16</i>	AAT CTT CCC ACC ACC CTC CAA AC	CCG CCT TCT GCC TGT TCC TG
<i>ucp1</i>	GTC CGC CTT CAG GTA GAG TTA GTG	ATA GCA CCC ATT CCC AAG ACA GAG
<i>adcy4</i>	AAG GGA CAG AGC AAG TGA CAA ACC	CCG AGC CAG GAC CAG GAG TG
<i>gnas</i>	TCC TGC TTG TTC CTC CTC TAC CTC	GCC TCT GCG GTG ATC TGG TTA TG
<i>acc</i>	GAT GAA CCA TCT CCG TTG GC	GAC CCA ATT ATG AAT CGG GAG TG
<i>hsl</i>	TCC CTC AGT ATC TAG GCC AGA	GGC TCA TTT GGG AGA CTT TGT TT
<i>srebp1c</i>	CTT TGG CCT CGC TTT TCG G	TGG GTC CAA TTA GAG CCA TCT C
<i>fas</i>	TAT GAC AAC CCA GCA GGA GGA AAG	AGA CAG AGG AAG CAA GCA CAG AG
<i>atgl</i>	CAA CGC CAC TCA CAT CTA CGG	GGA CAC CTC AAT AAT GTT GGC AC
<i>cpt1</i>	CTA TGC GCT ACT CGC TGA AGG	GGC TTT CGA CCC GAG AAG A



CCK-8法检测24 h后细胞存活率, ***P*<0.01。
Cell viability was measured by the CCK-8 assay after 24 h, ***P*<0.01.

图1 不同浓度泽泻醇B处理24 h后3T3-L1 MBX细胞存活率
Fig.1 Survival rate of 3T3-L1 MBX cells after 24 h of treatment with different concentrations of Alisol B

ANOVA), 并进一步通过 Tukey’s honest significant difference检验进行两两比较。 *P*<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 泽泻醇B干预对前脂肪细胞存活率的影响

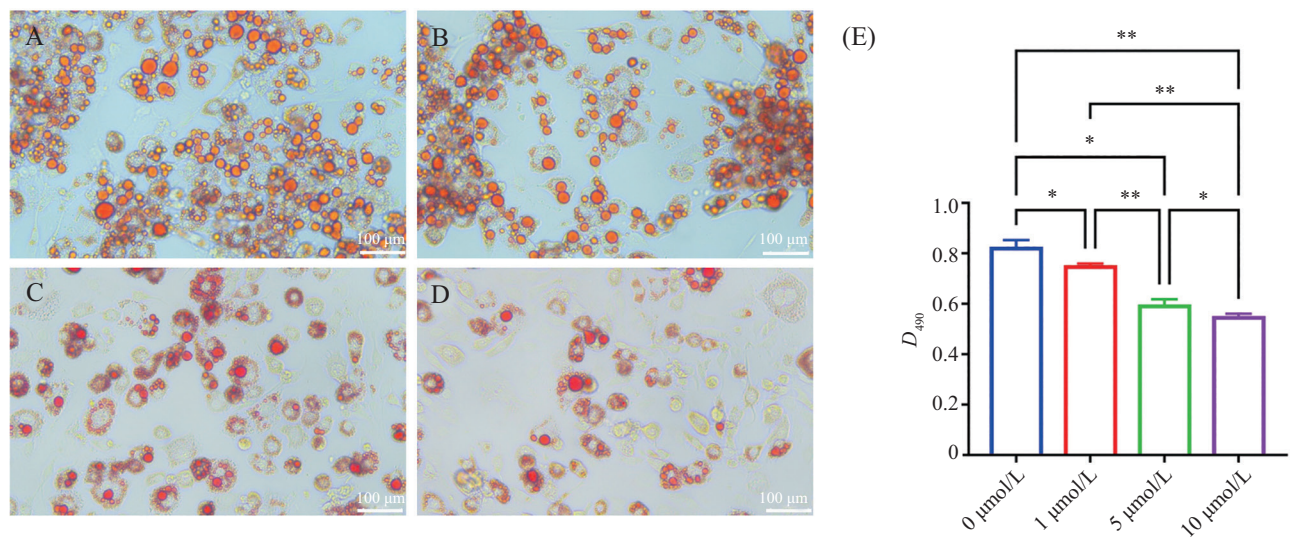
如图1所示, 用不同浓度的泽泻醇B(0、0.1、1、5、10、20、30 μmol/L)分别处理3T3-L1 MBX细胞24 h后, 20 μmol/L处理组细胞存活率均低于80%, 30 μmol/L处理组细胞存活率均低于50%, 后续实验分别选用0、1、5、10 μmol/L泽泻醇B处理, 并将细胞进行分组。

2.2 泽泻醇B抑制脂肪细胞中脂滴形成

油红 O染色结果及拉曼光谱成像结果如图2和图3所示, 1、5、10 μmol/L浓度的泽泻醇B干预3T3-L1 MBX前脂肪细胞成脂分化后, 细胞内脂滴仍呈环状分布, 但体积缩小, 数量减少, 表明其可显著抑制脂质蓄积, 且脂滴丰度随给药浓度升高而递减。

2.3 泽泻醇B促进脂肪细胞产热

如图4和图5所示, 与0 μmol/L泽泻醇B处理组比较, 泽泻醇B处理显著增加脂肪细胞关键产热基因 *ucp1*、*prdm16*、*pgc-1α*的 mRNA表达水平及UCP1、PRDM16的蛋白表达水平(均 *P*<0.05)。与0 μmol/L

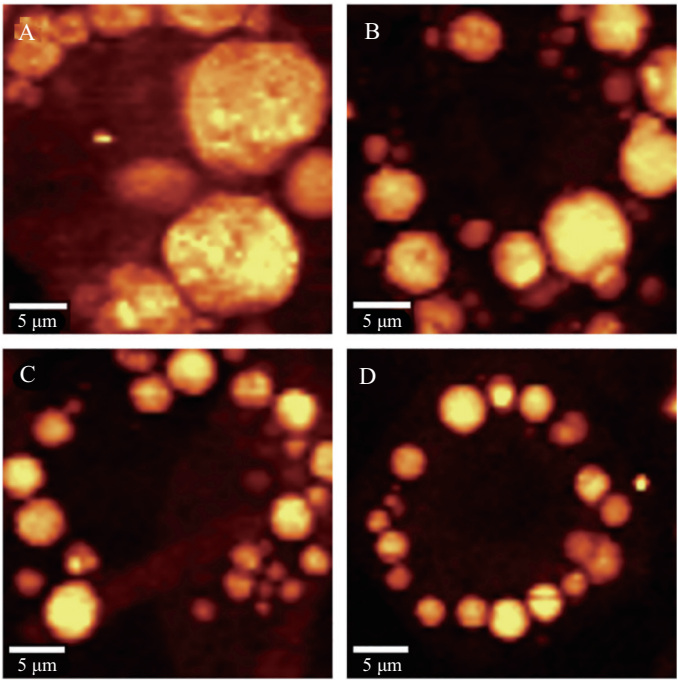


A: 0 μmol/L泽泻醇B组细胞内脂滴分布情况; B: 1 μmol/L泽泻醇B组; C: 5 μmol/L泽泻醇B组; D: 10 μmol/L泽泻醇B组; E: 油红O定量柱状图。
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: distribution of lipid droplets in cells treated with 0 μmol/L Alisol B group; B: 1 μmol/L Alisol B group; C: 5 μmol/L Alisol B group; D: 10 μmol/L Alisol B group; E: bar chart showing the quantitative analysis of oil red O. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图2 不同浓度泽泻醇B处理后脂滴形成情况(油红O染色)

Fig.2 Lipid droplet formation after treatment with different concentrations of Alisol B (oil red O staining)



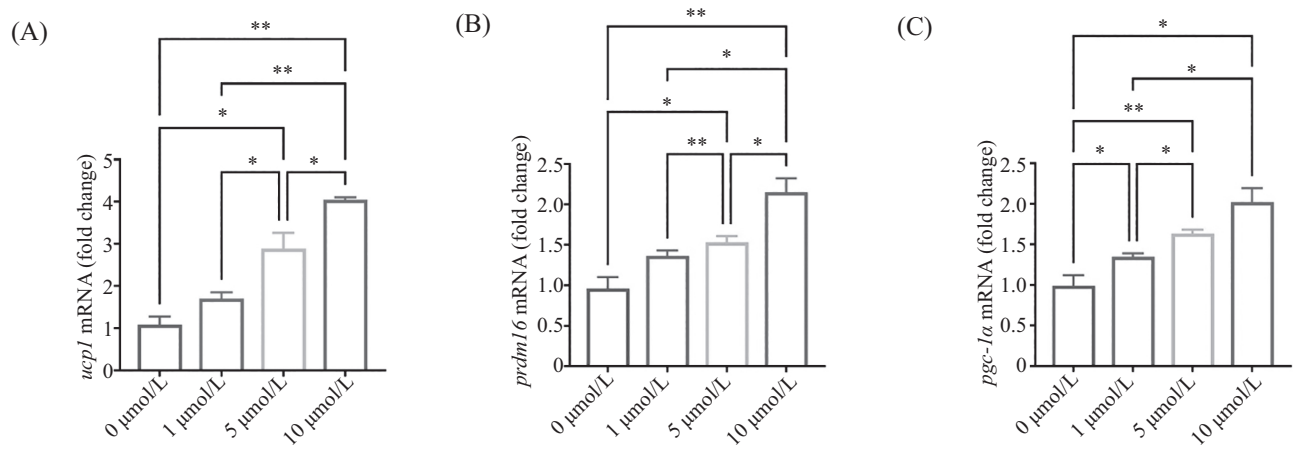
A: 0 μmol/L泽泻醇B组3T3-L1 MBX细胞内脂滴情况; B: 1 μmol/L泽泻醇B组; C: 5 μmol/L泽泻醇B组; D: 10 μmol/L泽泻醇B组。
A: lipid droplets in 3T3-L1 MBX cells in the 0 μmol/L Alisol B group; B: 1 μmol/L Alisol B group; C: 5 μmol/L Alisol B group; D: 10 μmol/L Alisol B group.

图3 不同浓度泽泻醇B处理后脂滴形成情况(细胞脂滴拉曼成像结果)

Fig.3 Lipid droplet formation following treatment with different concentrations of Alisol B
(Raman imaging results of cellular lipid droplets)

泽泻醇B组比较, 5 μmol/L与10 μmol/L的泽泻醇B处理可显著增加PGC-1α蛋白的表达水平(均 $P<0.01$)。结果表明泽泻醇B可有效促进脂肪细胞的产热, 且

呈剂量依赖性, 10 μmol/L浓度处理效果最佳。
2.4 泽泻醇B激活脂肪细胞cAMP/PKA信号轴
如图6所示, 与0 μmol/L泽泻醇B处理组比较,

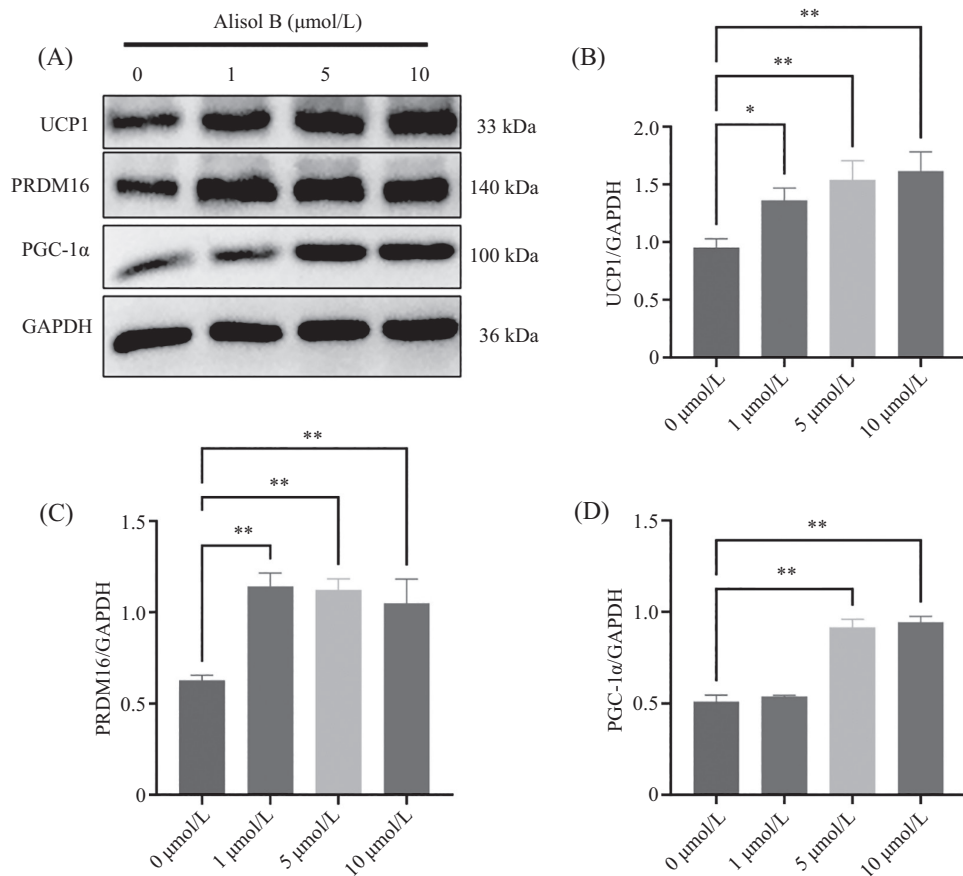


A~C: qRT-PCR检测各组产热关键基因的表达情况, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A~C: qRT-PCR analysis of the expression of key thermogenesis genes in each group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图4 不同浓度泽泻醇B处理对脂肪细胞关键产热基因表达的影响

Fig.4 The effects of different concentrations of Alisol B on the expression of key thermogenic genes in adipocytes



A~D: Western blot检测各组关键产热蛋白的表达情况, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A~D: Western blot analysis of the expression of key thermogenesis proteins in each group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图5 不同浓度泽泻醇B处理对脂肪细胞关键产热蛋白表达的影响

Fig.5 The effects of different concentrations of Alisol B on the expression of key thermogenic proteins in adipocytes

泽泻醇B处理后, 细胞内的cAMP含量显著增加(均 $P < 0.05$), 且呈剂量依赖性。与0 μmol/L泽泻醇B处理组比较, 泽泻醇B处理显著上调了*adcy4*与*gnas*的

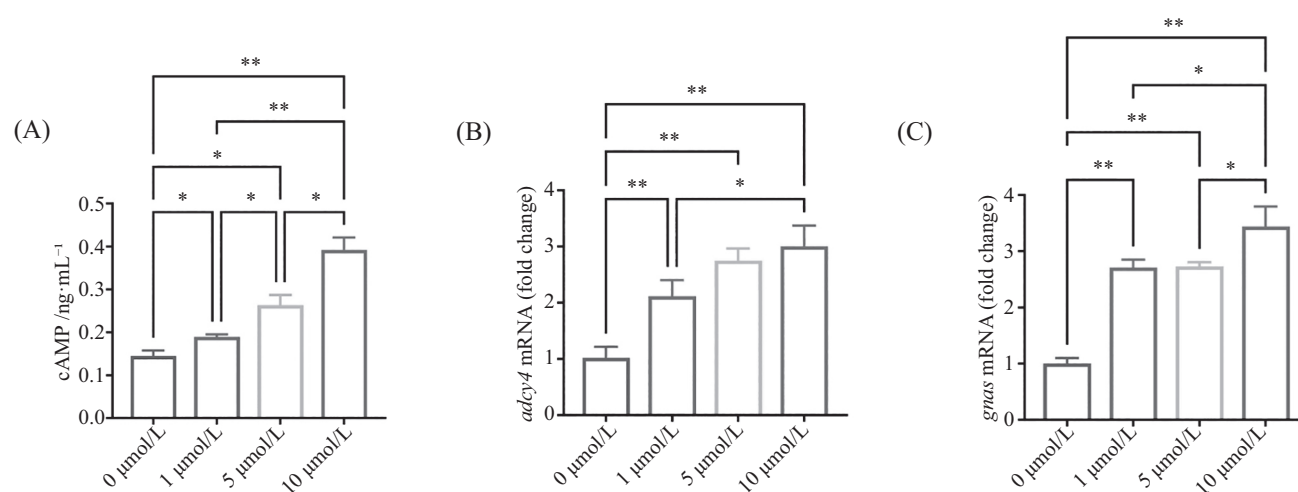
mRNA表达(均 $P < 0.01$), 其中10 μmol/L的激活效果最为显著。如图7所示随着泽泻醇B处理浓度的升高, 总PKA与总CREB蛋白表达量保持稳定, 磷酸化

PKA(p-PKA)与磷酸化CREB(p-CREB)的蛋白表达水平呈剂量依赖性显著增加(均 $P<0.01$)。结果表明泽泻醇B可通过增强腺苷酸环化酶活性来放大cAMP信号转导,驱动产热程序的启动,且呈明显的剂量依赖性。

2.5 PKA抑制剂H-89逆转泽泻醇B促进脂肪组织产热的作用

如图8和图9所示,与对照组比较,10 $\mu\text{mol/L}$ 泽泻醇B处理的泽泻醇B组显著提升了前脂肪细胞内cAMP的浓度,PKA抑制剂H-89处理的H-89组cAMP显著减少(均 $P<0.05$)。与泽泻醇B组比较,当使用

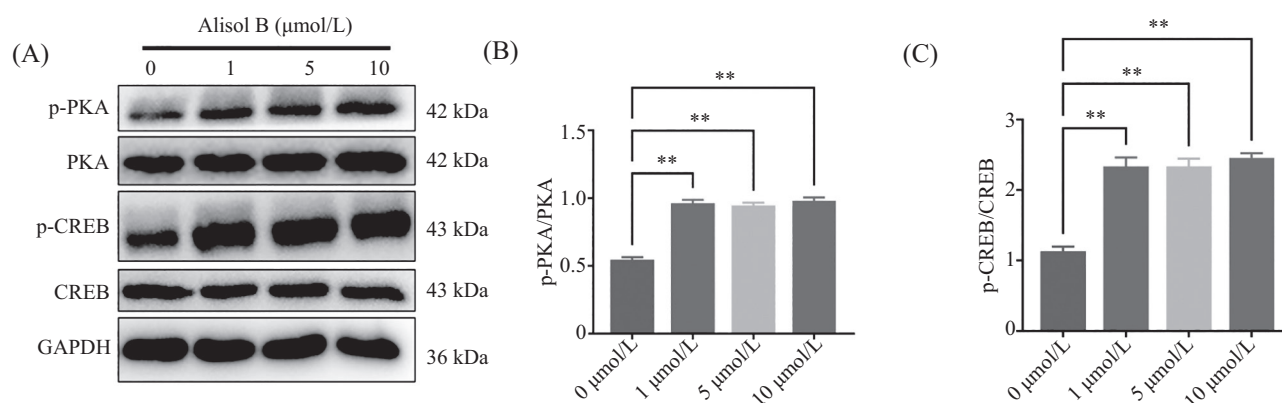
PKA抑制剂H-89处理后,泽泻醇B诱导的cAMP积累被显著削弱($P<0.01$)。与对照组比较,泽泻醇B处理可显著增加关键产热基因*ucp1*、*prdm16*及*pgc-1 α* 的mRNA和蛋白表达量(均 $P<0.05$)。与泽泻醇B组比较,H-89+泽泻醇B组关键产热基因的mRNA和蛋白表达水平均有显著降低(均 $P<0.05$),表明H-89的介入显著拮抗了泽泻醇B对上述产热标志物的诱导作用。综上所述,泽泻醇B可以提升细胞内cAMP水平进而启动PKA信号级联,驱动产热基因及蛋白的转录激活,而H-89对PKA的药理学阻断可消除这一效应,证实该促产热作用是通过上调cAMP/PKA信号



A: 不同浓度泽泻醇B处理后各组脂肪细胞cAMP含量; B、C: qRT-PCR检测各组cAMP/PKA信号轴相关基因的表达情况。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
A: cAMP levels in adipocytes from each group after treatment with different concentrations of Alisol B; B,C: qRT-PCR analysis of gene expression related to the cAMP/PKA signaling axis in each group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图6 不同浓度泽泻醇B对脂肪细胞cAMP含量及cAMP/PKA信号轴相关基因表达的影响

Fig.6 The effects of different concentrations of Alisol B on cAMP levels and gene expression related to the cAMP/PKA signaling axis in adipocytes

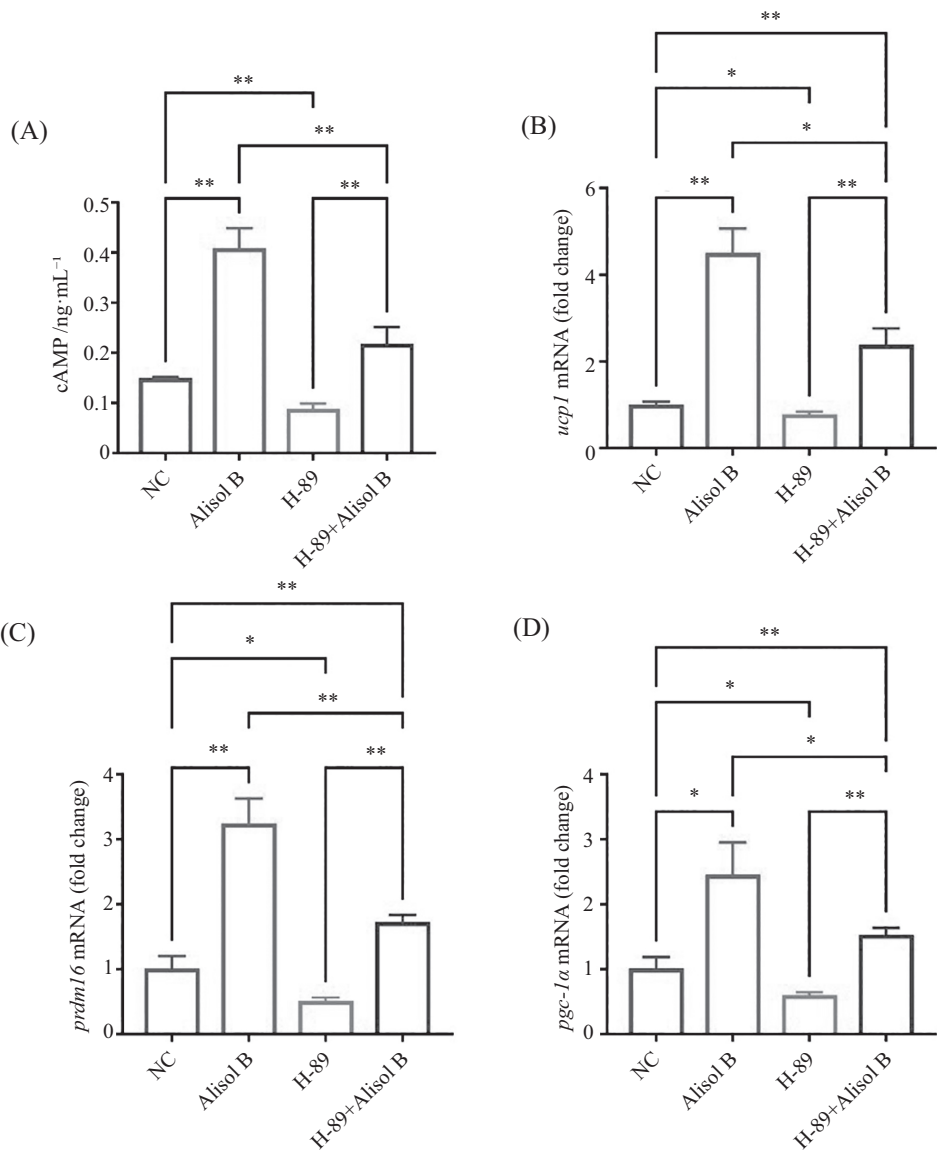


A~C: Western blot检测各组cAMP/PKA信号轴相关蛋白的表达情况, ** $P<0.01$ 。

A-C: Western blot analysis of protein expression related to the cAMP/PKA signaling axis in each group, ** $P<0.01$.

图7 不同浓度泽泻醇B处理对脂肪细胞cAMP/PKA信号轴相关蛋白表达的影响

Fig.7 The effects of different concentrations of Alisol B on the expression of proteins related to the cAMP/PKA signaling axis in adipocytes



A: 各组脂肪细胞cAMP含量; B~D: qRT-PCR检测各组关键产热基因的表达情况。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
A: cAMP levels in adipocytes from each group; B-D: qRT-PCR analysis of the expression of key thermogenic genes in each group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
图8 H-89处理对脂肪细胞cAMP含量及关键产热基因表达的影响

Fig.8 The effects of H-89 treatment on cAMP levels and the expression of key thermogenic genes in adipocytes

轴实现的。

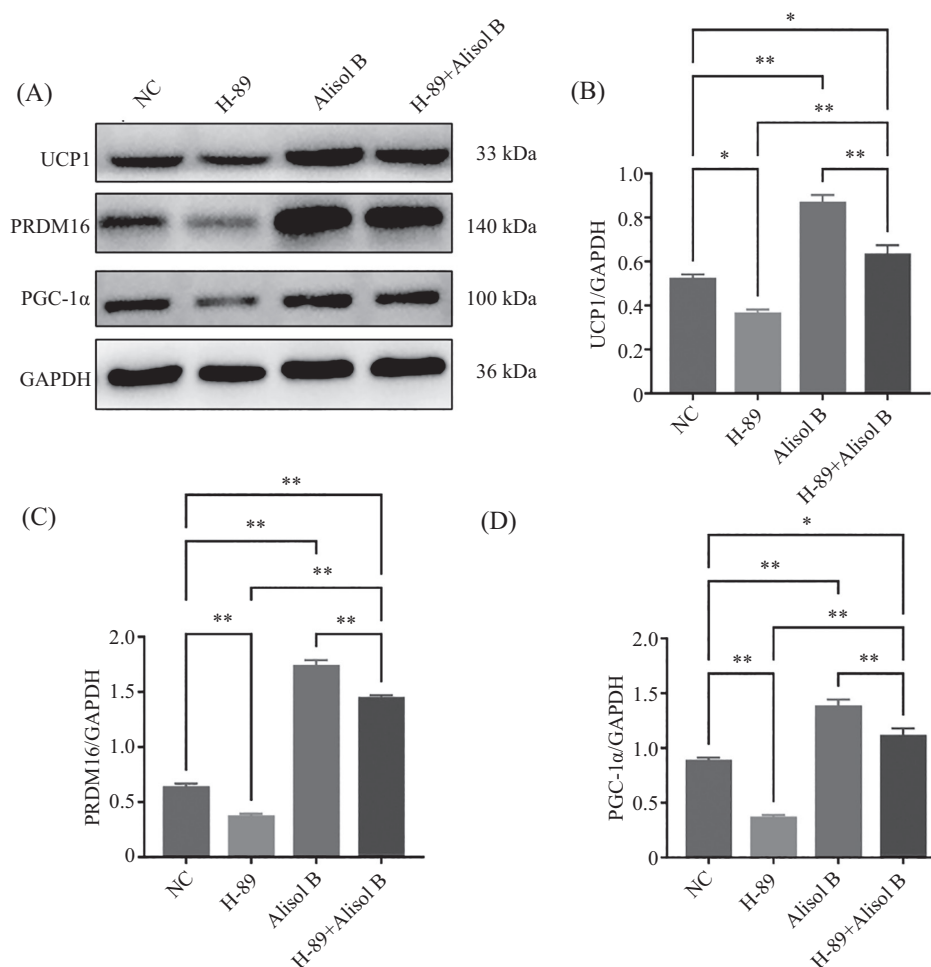
2.6 PKA抑制剂H-89逆转泽泻醇B调节脂质代谢的作用

如图 10所示, 与对照组比较, 泽泻醇B处理显著降低了脂质合成相关基因 *srebp1c*、*fas*、*acc* 的 mRNA 表达水平 (均 $P<0.01$), 同时显著增加了脂质分解相关基因 *hsl*、*atgl*、*cpt1* 的 mRNA 表达水平 (均 $P<0.05$)。与泽泻醇B处理组比较, H-89+泽泻醇B组在联合使用 PKA 抑制剂 H-89 处理后, 脂质合成相关基因的 mRNA 表达水平显著增加, 脂质分解相关基因表达量显著减少 (均 $P<0.01$)。综上所述, 泽泻醇B

处理可以抑制脂质蓄积并促进其分解氧化, 从而实现对脂质代谢稳态的调控, 而 H-89 可以逆转泽泻醇B对脂质代谢的调节作用。

3 讨论

肥胖是由能量稳态失衡诱发的慢性代谢性疾病, 其病理机制涉及脂肪功能障碍、神经内分泌紊乱、免疫代谢紊乱等多方面^[10], 尽管临床干预手段层出不穷, 但因病因复杂性及传统治疗的高复胖率, 有效治疗方案仍十分有限。白色脂肪的异常扩张与功能失调是肥胖发生的核心驱动力, 激活脂肪组织的适应性



A~D: Western blot检测各组关键产热蛋白的表达情况, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A-D: Western blot analysis of the expression of key thermogenic proteins in each group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图9 H-89处理对脂肪细胞关键产热蛋白表达的影响

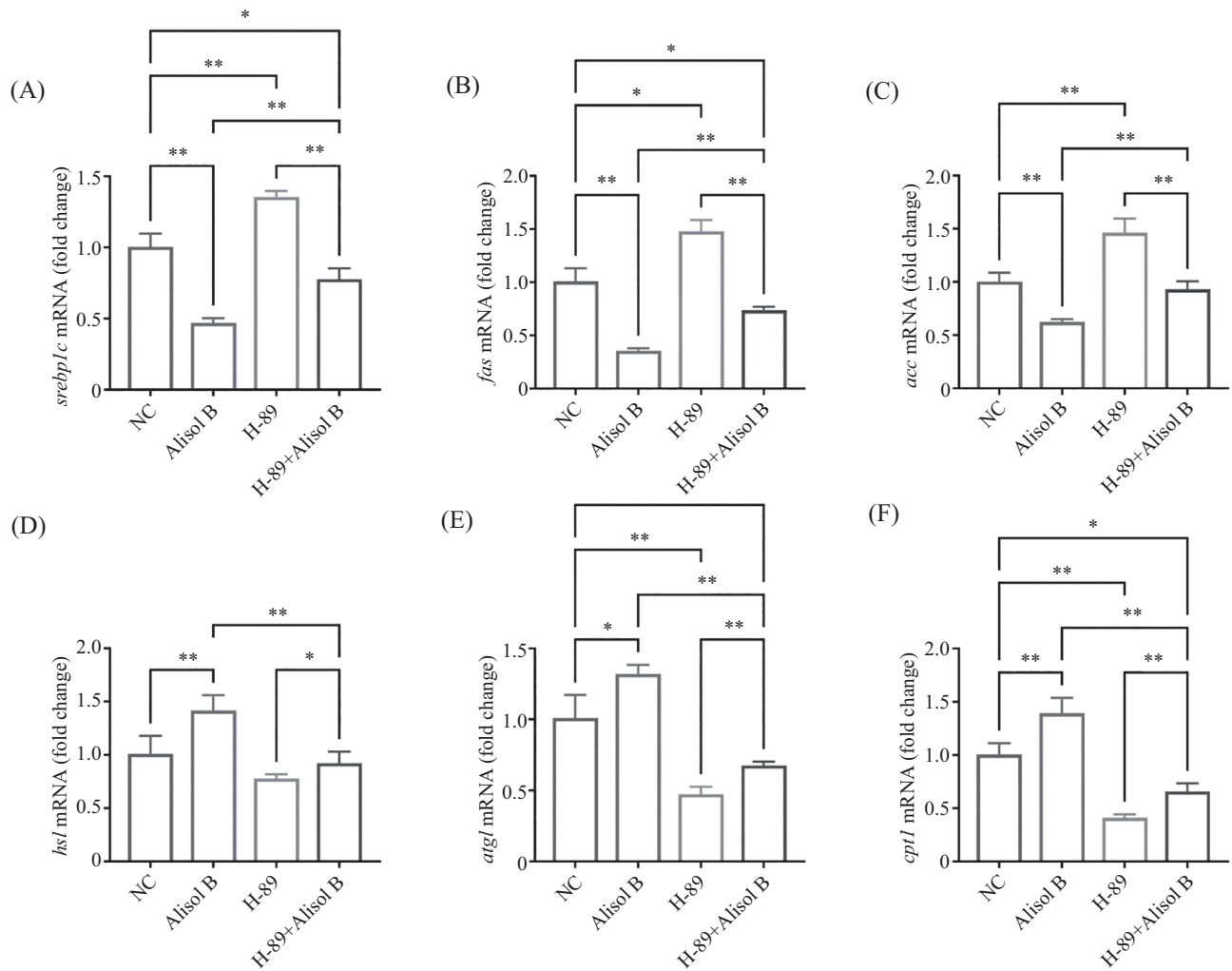
Fig.9 The effects of H-89 treatment on the expression of key proteins involved in thermogenesis in adipocytes

产热,通过UCP1介导的解偶联呼吸将化学能转化为热能消耗,是重建代谢稳态的有效途径^[11-12]。

中药防治肥胖独具优势:其一,多靶点协同,可同时干预脂肪棕色化、糖脂代谢及炎症等多条通路;其二,天然成分安全性高,不良反应少;其三,契合中医辨证论治,可实现精准干预^[13]。有研究表明,泽泻醇B作为泽泻的主要活性成分,不仅可改善胰岛素抵抗、减少肝脏脂质沉积及减轻系统性炎症^[14],还能通过调节肠道菌群增强肠黏膜屏障功能,实现多器官代谢协同^[15]。

cAMP/PKA信号通路作为调节机体生命活动的经典通路,通过精确介导蛋白质磷酸化修饰,广泛参与生命活动的精细调控,特别是在代谢稳态领域。该通路可以调节线粒体产热、脂质的分解代谢、脂肪组织棕色化、干细胞成骨分化等重要生理过程^[16-18]。

此前有研究表明,泽泻醇B能通过此通路改善认知障碍疾病^[19],但其是否能够通过此通路促进脂肪产热尚未有研究证实。本研究在前期研究的基础上,使用棕色鸡尾酒法对3T3-L1 MBX前脂肪细胞进行诱导分化^[9],所有药物干预均在分化完成后(即成熟脂肪细胞阶段)进行,旨在明确泽泻醇B对成熟脂肪细胞的直接作用,避免分化抑制效应的混淆。本研究旨在阐明泽泻醇B通过激活cAMP/PKA信号轴促进前脂肪细胞产热的具体机制,为研发通过激活脂肪产热通路治疗肥胖的潜在药物提供理论支撑。未来将进一步探讨泽泻醇B作用的时间依赖性特征。值得注意的是,以往研究发现泽泻醇B可以通过LKB1-AMPK、mTOR-SREBP1通路影响脂肪组织。而本研究揭示了泽泻醇B通过cAMP/PKA信号通路促进产热,这两条通路并非孤立存在,而是存在



A~C: qRT-PCR检测各组脂质合成相关基因的表达情况; D~F: qRT-PCR检测各组脂质分解相关基因的表达情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A~C: qRT-PCR analysis of the expression of genes related to lipid synthesis in each group; D~F: qRT-PCR analysis of the expression of genes related to lipid catabolism in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图10 H-89与泽泻醇B处理对脂肪细胞脂质代谢相关基因表达的影响

Fig.10 The effects of H-89 and Alisol B treatment on the expression of genes related to lipid metabolism in adipocytes

潜在的交互对话,例如,cAMP/PKA信号通路可影响AMPK活性,AMPK也能反馈调节cAMP的产生;同时,本研究发现泽泻醇B显著抑制*srebp1c*及其下游脂质合成基因的表达,提示泽泻醇B可能通过多通路协同抑制脂质合成。本研究聚焦于cAMP/PKA通路在泽泻醇B促产热中的核心地位,未来将进一步探讨其与已知信号通路的协同或互补关系,从而更全面地揭示泽泻醇B抗肥胖的多靶点机制。

脂肪产热的核心通路为激活 $\beta 3$ 肾上腺素能受体,引发cAMP/PKA信号级联,进而驱动下游转录重编程^[20]。在该过程中,*prdm16*作为关键的转录共调节因子^[21],通过与*pgc-1 α* 协同作用,不仅促进线粒体生物合成,更直接结合于*ucpl*等产热基因启动子区

域,诱导产热表型的建立^[22]。*pgc-1 α* 作为线粒体功能的全局调控因子,其表达水平决定了脂肪细胞的产热潜能^[23];而UCP1作为定位于线粒体内膜的解偶联蛋白可以直接将化学能转化为热能,介导非颤抖性产热^[24]。H-89是一种经典且高效的PKA特异性抑制剂,通过竞争性结合PKA催化亚基的ATP位点阻断其磷酸化活性,既往研究已证实其可有效阻断cAMP/PKA信号通路的下游效应^[25]。为验证cAMP/PKA信号轴在泽泻醇B促进前脂肪细胞产热作用中的必要性,本研究采用特异性PKA抑制剂H-89进行药理学阻断。本研究证实,泽泻醇B通过激活cAMP/PKA信号轴,显著上调了产热核心调控网络的转录与蛋白表达,且H-89预处理显著削弱了泽泻醇B对产热基因的诱

导效应,从而明确了泽泻醇B靶向cAMP/PKA驱动脂肪细胞产热的机制。此外,本研究观察到H-89可部分逆转泽泻醇B诱导的cAMP升高。尽管PKA是cAMP的下游效应分子,经典理论认为抑制PKA不应直接影响cAMP含量,但细胞内cAMP水平受到腺苷酸环化酶合成与磷酸二酯酶降解的动态平衡调控,且存在PKA介导的反馈调节环路。H-89可能通过解除PKA对磷酸二酯酶的抑制(或阻断对腺苷酸环化酶的激活),引起基础cAMP水平下降,这提示泽泻醇B可能通过激活cAMP/PKA轴触发了PKA依赖的反馈调节,以维持信号稳态。此外,H-89作为PKA特异性抑制剂,也存在潜在的脱靶效应。尽管本研究结合上游cAMP升高和PKA磷酸化激活的直接证据,有充分理由认为泽泻醇B是通过上调cAMP/PKA信号轴促进产热的,但未来仍需采用腺苷酸环化酶抑制剂(如SQ22536)等其他特异性抑制剂进行交叉验证,以进一步排除H-89脱靶干扰,使结论更加严谨。

机体脂质稳态的维系依赖于合成代谢与分解代谢之间的平衡。*srebp1c*作为脂质生成的核心转录因子,通过上调*fas*和*acc*的表达,驱动脂肪酸的从头合成;ATGL和HSL催化甘油三酯水解,释放的游离脂肪酸则进入线粒体,由CPT1转运并完成 β -氧化过程^[26-28]。本研究表明,泽泻醇B处理后,一方面,*srebp1c*及其下游*fas*、*acc*的转录被抑制;另一方面,*hsl*、*atgl*及*cpt1*的转录被激活,有效抑制了脂质合成同时促进了脂质分解,这不仅缓解了脂质代谢紊乱引起的过度堆积,还可以通过底物供给正向激活UCP1介导的产热过程。PKA信号通路可通过磷酸化修饰(如HSL)直接调控脂解过程。在本研究中,脂质分解主要被视为产热激活的伴随代谢表型,脂解产生的游离脂肪酸可为UCP1介导的解偶联产热提供必需底物。本研究的qRT-PCR结果显示,泽泻醇B显著上调*hsl*等脂解基因的mRNA表达,且该效应可被PKA抑制剂H-89逆转,表明泽泻醇B对脂解相关基因的转录调控具有严格的PKA依赖性。结合本研究已证实的泽泻醇B诱导cAMP/PKA轴激活的证据,上述结果提示泽泻醇B可通过cAMP/PKA信号轴促进脂质分解。然而,本研究未直接检测p-HSL蛋白水平以证实PKA介导的翻译后修饰调控,未来研究将聚焦p-HSL等蛋白水平的检测,以进一步探究泽泻醇B调控脂质分解的分子机制。

综上所述,泽泻醇B可通过激活cAMP/PKA信

号轴促进3T3-L1 MBX前脂肪细胞的产热并调节脂代谢,在抑制脂质合成的同时有效促进脂质分解。这为泽泻醇B在治疗肥胖中的具体作用机制提供了实验支撑,展现了其作为新的治疗肥胖手段及进一步的药物研发的临床应用前景。然而,本研究仍存在一定局限性。首先,本研究仅在细胞水平探究了泽泻醇B对脂肪细胞产热基因表达的调控,未检测细胞的耗氧率(oxygen consumption rate, OCR),未来需要进一步结合Seahorse XF等技术直接检测OCR,全面深入评估泽泻醇B的产热效应。其次,关于泽泻醇B是否能直接激活*adcy4*,抑或是通过激活 $\beta 3$ 肾上腺素能受体等进而引发cAMP升高的直接分子靶点及具体机制,目前尚未明确,未来需结合表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)、分子对接、受体敲除或过表达等进一步研究,系统筛选泽泻醇B的直接作用蛋白,以深入揭示其分子机制。

参考文献 (References)

- [1] Levin B E, Geary N, Lutz T A. The (dys)regulation of energy storage in obesity [J]. *Physiological Reviews*, 2025, 105(3): 803-895.
- [2] Piché M E, Tchernof A, Després J P. Obesity phenotypes, diabetes, and cardiovascular diseases [J]. *Circulation Research*, 2020, 126(11): 1477-1500.
- [3] Marcelin G, Silveira A L M, Martins L B, et al. Deciphering the cellular interplays underlying obesity-induced adipose tissue fibrosis [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2019, 129(10): 4032-4040.
- [4] Long F, Challa T D, Ding L G, et al. Glucagon controls obesity-specific energy expenditure via persistent cAMP/PKA signaling [J]. *Journal of Hepatology*, 2025, 83(6): 1379-1391.
- [5] London E, Stratakis C A. The regulation of PKA signaling in obesity and in the maintenance of metabolic health [J]. *Pharmacology and Therapeutics*, 2022, 237: 108113.
- [6] Gao T, Yan R, Fang N, et al. Alisol C 23-acetate might be a lead compound of potential lipase inhibitor from *Alismatis Rhizoma*: screening, identification and molecular dynamics simulation [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 278(Pt 2): 134878.
- [7] Wu Y Q, Wang X J, Yang L, et al. Therapeutic effects of *Alisma orientale* and its active constituents on cardiovascular disease and obesity [J]. *American Journal of Chinese Medicine*, 2023, 51(3): 623-650.
- [8] Berger E, Gélœn A. FABP4 controls fat mass expandability (adipocyte size and number) through inhibition of CD36/SR-B2 signalling [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(2): 1032.
- [9] 陈坤铃, 窦晓兵, 林益游等. 茯苓酸可促进前脂肪细胞棕色化及脂代谢[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2025, 54(3): 333-341.
Chen K L, Dou X B, Lin Y Y, et al. Pachymic acid promotes brown/beige adipocyte differentiation and lipid metabolism in

- preadipocytes [J]. *Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)*, 2025, 54(3): 333-341.
- [10] Stefan N, Häring H U, Hu F B, et al. Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications [J]. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2013, 1(2): 152-162.
- [11] Ukropec J, Ukropcova B, Kurdiova T, et al. Adipose tissue and skeletal muscle plasticity modulates metabolic health [J]. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2008, 114(5): 357-368.
- [12] Betz M J, Enerbäck S. Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2018, 14(2): 77-87.
- [13] Chen Y K, Liu T T, Teia F K F, et al. Exploring the underlying mechanisms of obesity and diabetes and the potential of traditional Chinese medicine: an overview of the literature [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, 14: 1218880.
- [14] Gao G, Zhao J, Ding J, et al. Alisol B regulates AMPK/mTOR/SREBPs via directly targeting VDAC1 to alleviate hyperlipidemia [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155313.
- [15] Lin Y Y, Zhang C C, Ren G L, et al. Alisol B ameliorated metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease via regulating purine metabolism and restoring the gut microbiota disorders [J]. *Phytomedicine*, 2025, 145: 156992.
- [16] Zhang H Y, Kong Q B, Wang J, et al. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer [J]. *Experimental Hematology & Oncology*, 2020, 9(1): 32.
- [17] Ahammed M S, Wang X J. Promoting proteostasis by cAMP/PKA and cGMP/PKG [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2025, 31(3): 224-239.
- [18] Fang X L, Zhang Q, Xue W W, et al. Suppression of cAMP/PKA/CREB signaling ameliorates retinal injury in diabetic retinopathy [J]. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 2023, 39(9): 916-926.
- [19] OuYang Y, Chen B W, Yi J, et al. Study on the molecular mechanisms of Liuwei Dihuang decoction against aging-related cognitive impairment based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Heliyon*, 2024, 10(11): e32526.
- [20] Chen C X, Gao H, Tian Q, et al. cAMP-PKA/EPAC signaling pathways: crucial regulators of lipid homeostasis [J]. *Adipocyte*, 2026, 15(1): 2603605.
- [21] Shen H M, He T, Wang S, et al. SOX4 promotes beige adipocyte-mediated adaptive thermogenesis by facilitating PRDM16-PPAR γ complex [J]. *Theranostics*, 2022, 12(18): 7699-7716.
- [22] Rahbani J F, Bunk J, Lagarde D, et al. Parallel control of cold-triggered adipocyte thermogenesis by UCP1 and CKB [J]. *Cell Metabolism*, 2024, 36(3): 526-540.e7.
- [23] Tabuchi C, Sul H S. Signaling pathways regulating thermogenesis [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2021, 12: 595020.
- [24] Ikeda K, Yamada T. UCP1 dependent and independent thermogenesis in brown and beige adipocytes [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11: 498.
- [25] Fusi F, Trezza A, Spiga O, et al. Cav1.2 channel current block by the PKA inhibitor H-89 in rat tail artery myocytes via a PKA-independent mechanism: electrophysiological, functional, and molecular docking studies [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2017, 140: 53-63.
- [26] Silva J, Yu X, Moradian R, et al. Dihydromyricetin protects the liver via changes in lipid metabolism and enhanced ethanol metabolism [J]. *Alcoholism Clinical & Experimental Research*, 2020, 44(5): 1046-1060.
- [27] Heeren J, Scheja L. Brown adipose tissue and lipid metabolism [J]. *Current Opinion in Lipidology*, 2018, 29(3): 180-185.
- [28] Kang J H, Kim H S, Park S H, et al. WKYMVm ameliorates obesity by improving lipid metabolism and leptin signalling [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2023, 27(18): 2782-2791.