

刘昕玥,王凤忠,郑涵文,等. 山药多糖对地塞米松诱导 IR-3T3-L1 脂肪细胞的降血糖作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(4): 73-83.

Liu XY, Wang FZ, Zheng HW, et al. Hypoglycemic effect of Chinese yam polysaccharide on DEX-induced IR-3T3-L1 adipocytes [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(4): 73-83.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.04.009

山药多糖对地塞米松诱导 IR-3T3-L1 脂肪细胞的降血糖作用及机制研究

刘昕玥¹, 王凤忠¹, 郑涵文^{1,2}, Alberto Carlos Pires Dias³, 范蓓^{1*}, 王琼^{1,2*}

(1.中国农业科学院农产品加工研究所/农业农村部农产品加工质量安全风险评估实验室/农业农村部农产品质量安全收贮运管控重点实验室,北京 100193;2.西南医科大学附属医院中医中药国际合作中心,四川 泸州 646000;3.葡萄牙米尼奥大学生物系中葡药食植物资源研究中心,葡萄牙 布拉加 4710-057)

【摘要】 目的 探究山药多糖 (Chinese yam polysaccharide, CYPS) 在地塞米松 (dexamethasone, DEX) 诱导的 3T3-L1 胰岛素抵抗 (IR-3T3-L1) 细胞模型中的降血糖作用。**方法** 将 IR-3T3-L1 脂肪细胞随机分为对照组 (Con)、DEX 组 (DEX)、Met 组 (Met, 阳性药组)、CYPS 组 (0.05、0.15、0.45 mg/mL), 通过 DEX (1 μ mol/L) 诱导建立 IR-3T3-L1 细胞模型, 进行给药后细胞对葡萄糖的消耗量和细胞中血脂 (总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)) 与丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、己糖激酶 (hexokinase, HK)、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 含量的检测, 并采用 qRT-PCR 对 AMPK-PI3K/Akt 信号通路中相关基因表达进行检测。**结果** DEX 组与 Con 组相比, 1 μ mol/L DEX 处理 48 h 显著降低了 IR-3T3-L1 细胞的葡萄糖消耗量 ($P < 0.01$), 且在 60 h 内维持稳定。0.05、0.15、0.45 mg/mL CYPS 处理 IR-3T3-L1 细胞显著增加了细胞中葡萄糖的消耗 ($P < 0.01$)、HK、PK、GSH-Px 酶活性 ($P < 0.01$)、HDL-C 含量 ($P < 0.01$); 降低了 MDA 酶活性 ($P < 0.01$)、T-CHO、TG、LDL-C 含量 ($P < 0.01$)。同时, CYPS 可以显著回调 PI3K、Akt、GLUT-4、AMPK、IRS-2、PPAR α 、Adiponectin 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$), 降低 IRS-1、GSK-3 β 、ACC、FAS 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$)。**结论** CYPS 能够改善 DEX 诱导的 IR-3T3-L1 细胞对葡萄糖的消耗, 调节脂代谢紊乱, 缓解氧化应激, 其作用机制可能通过调控 IR-3T3-L1 脂肪细胞的 AMPK-PI3K/Akt 信号通路来实现糖脂代谢紊乱和胰岛素抵抗调节来实现。

【关键词】 山药多糖; 胰岛素抵抗; 地塞米松; 3T3-L1 细胞; 二甲双胍; AMPK-PI3K/Akt 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 04-0073-11

Hypoglycemic effect of Chinese yam polysaccharide on DEX-induced IR-3T3-L1 adipocytes

LIU Xinyue¹, WANG Fengzhong¹, ZHENG Hanwen^{1,2}, ALBERTO Carlos Pires Dias³, FAN Bei^{1*}, WANG Qiong^{1,2*}

【基金项目】 国家重点研发计划 (2021YFD1600100); 高端外国专家引进计划 (G2022051012L)。

【作者简介】 刘昕玥 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药神经药理与航天医学。E-mail: LXIY_9948@163.com

【通信作者】 王琼 (1975—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药神经药理与航天医学。Email: luyiwangqiong@163.com

范蓓 (1981—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 功能因子挖掘与利用。E-mail: fanbei517@163.com

* 共同通信作者

(1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Risk Assessment Laboratory of Agricultural Products Processing Quality and Safety, Key Laboratory of Agricultural Products Quality and Safety Collection, Storage and Transportation Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100193, China. 2. Sino-Portugal TCM International Cooperation Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000. 3. Sino-PT Research Center for Medicinal and Food Plant Resources, Department of Biology, University of Minho, Braga 4710-057, Portugal)

【Abstract】 Objective To examine the hypoglycemic effect of Chinese yam polysaccharide on the 3T3-L1 insulin resistance cell model. **Methods** IR-3T3-L1 adipocytes were randomly divided into control group (Con), model group (DEX), metformin group (Met, positive drug group) and CYPS group (0.05, 0.15, 0.45 mg/mL). After the creation of the IR-3T3-L1 cell model by dexamethasone (DEX) (1 μmol/L) stimulation, Chinese yam polysaccharide treatment was applied. Glucose intake and the levels of TC, TG, LDL-C, HDL-C, GSH-Px, MDA, HK, and PK were then measured. AMPK-PI3K/Akt signaling pathway-associated gene expression was identified using qRT-PCR. **Results** The glucose consumption of IR-3T3-L1 cells was considerably decreased after 48 hours of treatment with 1 μmol/L DEX compared to that of the Con group ($P<0.01$), and the reduction persisted for 60 hours. 0.05, 0.15, 0.45 mg/mL CYPS treatment significantly increased glucose consumption ($P<0.01$), HK, PK, GSH-Px enzyme activities ($P<0.01$), HDL-C content ($P<0.01$), and decreased MDA enzyme activity ($P<0.01$), T-CHO, TG, LDL-C content ($P<0.01$) in IR-3T3-L1 cells. 01). Additionally, CYPS administration dramatically decreased PI3K, Akt, GLUT-4, AMPK, IRS-2, PPARα, and adiponectin mRNA expression levels ($P<0.05$) and reduced IRS-1, GSK-3β, ACC, and FAS mRNA expression levels ($P<0.01$). **Conclusions** In IR-3T3-L1 cells, CYPS can reduce oxidative stress, control lipid metabolism disorders, and enhance DEX-induced glucose intake. AMPK-PI3K/Akt signaling pathway-associated genes may be connected to the process.

【Keywords】 Chinese yam polysaccharide; insulin resistance; dexamethasone; 3T3-L1 cells; metformin; AMPK-PI3K/Akt signaling pathway

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

糖尿病(diabetes mellitus,DM)是一种常见的慢性代谢性疾病,其发生与多种病因相互作用密切相关。而2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)的患病人数占据了全部DM患病人数的90%^[1],其主要特征为外周组织、细胞中出现高血糖和胰岛素抵抗(insulin resistance,IR)现象^[2-3]。IR特征是胰岛素作用受损,其中靶组织,特别是肝、肌肉和脂肪组织在正常胰岛素浓度下表现出异常的生物反应^[4]。触发与IR相关的DM的关键因素之一是肥胖,其可以通过刺激IR加剧T2DM^[5]。在正常生理条件下,胰岛素可以加速脂肪细胞的葡萄糖摄取和脂肪生成,并阻断脂肪分解和刺激新生脂肪酸的合成^[6]。当IR发生时,胰岛素不能完全阻止人体脂肪细胞的脂肪分解,从而导致人体血浆中游离脂肪酸(free fat acid,FFA)水平快速升高,同时FFA异位聚积于其他组织,外周组织及全身开始出现IR现象,最终会演变成T2DM^[7]。临床上,T2DM主要以药物治疗为主,主要包括二甲双胍、阿卡波糖、格列本脲等双胍类、格列奈类及磺酰脲类^[8]。这类药物虽然具有较好的降糖活性,但长期服用会导致多种

有害副作用,例如肝肾损伤、乳酸中毒等^[9]。在治疗T2DM方面,传统中医药有着悠久的历史,同时因其整体观念和多靶点调节而具有独特优势^[10],可以为研发安全、有效、副作用小的糖尿病药物提供新的思路。

山药(*Dioscorea opposita* Thunb.)主要以新鲜或干燥茎入药,是我国药食同源的大宗药材。现代药理研究发现,山药中的主要活性成分多糖类化合物具有多种功能活性,包括降低血糖和胆固醇水平,防止氧化损伤,保护肝和脾^[11]。陈晶等^[12]通过网络药理分析途径,筛选出黄芪-山药药对26个功能活性成分,223个作用靶点,从系统层面揭示了黄芪-山药药对治疗T2DM的作用机制。此外,山药多糖可以降低T2DM小鼠的胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR),改善小鼠胰岛素抵抗和糖脂代谢紊乱^[13]。因此,山药多糖在治疗T2DM疾病中具有很大的潜力。

在本研究中,我们采用地塞米松(dexamethasone,DEX)诱导的经典IR-3T3-L1细胞

模型,二甲双胍(metformin, Met)作为阳性对照,探究山药多糖的降血糖作用及其机制,为山药多糖资源的开发利用提供实验证据。

1 材料和方法

1.1 细胞株

小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞(普诺赛生命科技有限公司,中国武汉,批号 CL-0006)。

1.2 主要试剂与仪器

CYPS(纯度 $\geq 90\%$)(维克奇生物科技有限公司,中国四川,批号 WKQ-0008257);甲醇中地塞米松(规格:每支 1.2 mL)(源叶生物科技有限公司,中国上海,批号 BW10326);盐酸二甲双胍(规格:5 g)、CCK-8 细胞活性、BCA 蛋白浓度、HK、PK 检测试剂盒(索莱宝科技有限公司,中国北京,批号 D9351、CA1210、PC0020、BC0745、BC0545);3T3-L1 完全培养基、0.25%胰蛋白酶(普诺赛生命科技有限公司,中国武汉,批号 CM-0006、PB180228);3T3-L1 Differentiation Kit (Abcam, 中国上海,批号 ab287843);油红 O(规格:5 g)(酷来搏科技有限公司,中国北京,批号 CO7961);葡萄糖、MDA、GSH-Px、TC、TG、HDL-C、LDL-C 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,中国南京,批号 A154-1-1、A003-1-1、A005-1-1、A111-1-1、A110-1-1、A112-1-1、A113-1-1);Novo Start SYBR qPCR SuperMix Plus (Annoron, 中国北京,批号 E096-01A);EASYspin Plus 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒(Aidlab, 中国北京,批号 RN2802)。GoScript Reverse Transcription System (Promega, 美国,批号 A5000);生物安全柜(苏州净化);超纯水机(美国 Millipore 公司);Herocell 180 细胞培养箱(润度生物科技有限公司);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI Q7 Flex);反转录仪(Applied biosystems);spectra MAX190 酶标仪(Molecular devices);低温冷冻离心机(德国 sigma 公司);IX71 显微镜(Olympus)。

1.3 实验方法

1.3.1 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化

取生长状态良好的细胞正常培养直到细胞汇合度达到 100%且出现接触抑制现象,更换新的完全培养液,继续培养 2 d。吸弃旧培养液,缓慢加入 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的分化诱导剂,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养 3 d。弃分化诱导剂,缓慢加入 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的维持培养液(含胰岛素),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 水平

维持在 5%的细胞培养箱中培养,直至 80%以上的细胞分化成熟。

1.3.2 油红 O 染色

从培养皿中获取需要进行实验的细胞样本,使用 1~2 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)对细胞进行润洗,将 4%多聚甲醛添加到细胞样本中,进行 30 min 的固定。使用 PBS 缓冲液再次对细胞进行洗涤,以去除多余的多聚甲醛。将 2 mL 油红 O 工作液添加到细胞中,避光培养 30~60 min。使用 60%异丙醇进行两次洗涤。最后,使用显微镜观察染色后的细胞,并进行拍照以记录实验结果。

1.3.3 CCK-8 法检测诱导后的 3T3-L1 细胞活性

在 96 孔板上以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种脂肪细胞。吸弃培养液,根据不同研究目的设置不同分组,每组设置 5 个复孔,向培养板中加入 100 μL 不同浓度的待测物质,在培养箱孵育 24 h。(1)地塞米松(DEX)对诱导后的 3T3-L1 细胞活力的影响。设置对照组(Con,加入 DMEM 完全培养基)、DEX 组(1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、1.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、3 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、4 $\mu\text{mol}/\text{L}$)以及空白组,每孔加入 100 μL ,在培养箱孵育 24 h。(2)二甲双胍(Met)对诱导后的 3T3-L1 细胞活力的影响。设置对照组(Con,加入 DMEM 完全培养基)、Met 组(0.1 mg/mL)以及空白组,每孔加入 100 μL ,在培养箱孵育 24 h。(3)山药多糖(CYPS)对诱导后的 3T3-L1 细胞活力的影响。设置对照组(Con,加入 DMEM 完全培养基)、CYPS 组(0.01 mg/mL 、0.05 mg/mL 、0.1 mg/mL 、0.5 mg/mL 、1 mg/mL 、2 mg/mL)以及空白组,每孔加入 100 μL ,在培养箱孵育 24 h。然后,向每孔加入 10%的 CCK-8 溶液,孵育 30 min,检测 OD_{450} 的吸光度。

1.3.4 IR-3T3-L1 模型建立及稳定性检测

在 96 孔板上以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种脂肪细胞。吸弃旧培养液,分别加入含 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 3 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DEX 的 DMEM 完全培养基。吸取 24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 的细胞上清培养液,1000 r/min,离心 10 min,取上清于 505 nm 处检测吸光度。从而,确定胰岛素抵抗的 DEX 的最佳造模剂量和造模时间。确定 IR-3T3-L1 后,在完全培养基中继续孵育 48 h。吸取 24 h、36 h、48 h、60 h 的细胞上清培养液,根据葡萄糖含量测定试剂盒检测葡萄糖消耗量,从而确定胰岛素抵抗模型的维持情况。

1.3.5 二甲双胍、山药多糖处理 IR-3T3-L1 模型

在 6 孔板上以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种脂肪细

胞,在培养箱中培养 24 h 后吸弃旧培养液,加入含 1 $\mu\text{mol/L}$ DEX 的完全培养基,培养 48 h,接下来,按下面分组分别加入含不同药物的完全培养液:(1) 对照组(Con):加入 DMEM 完全培养基,处理 24 h。(2)DEX 组(DEX):加入 DMEM 完全培养基,处理 24 h。(3)Met 组(Met):加入含 0.1 mg/mL Met 的完全培养基,处理 24 h。(4)CYPS 组(CYPS 0.05 mg/mL、CYPS 0.15 mg/mL、CYPS 0.45 mg/mL):加入含 0.05 mg/mL、0.15 mg/mL、0.45 mg/mL CYPS 的完全培养基,处理 24 h。

将 24 h 后各组细胞的上清液吸弃,PBS 缓冲液润洗 1~2 次,加入裂解液裂解 30~40 min,于 505 nm 处检测吸光度,从而确定二甲双胍和山药多糖对胰岛素抵抗模型的影响。

1.3.6 检测 IR-3T3-L1 细胞的 HK 和 PK 活性

在 6 孔板上以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种脂肪细胞,在培养箱中培养 24 h 后吸弃旧培养液。设置对照组(加入 DMEM 完全培养基)、DEX 组(1 $\mu\text{mol/L}$)、Met 组(Met 0.1 mg/mL)、CYPS 组(CYPS 0.05 mg/mL、0.15 mg/mL、0.45 mg/mL),含 1 $\mu\text{mol/L}$ DEX 的完全培养基预处理 48 h 后,加入 CYPS 处理 24 h。离心后向沉淀中加入提取液并超声破碎;4 $^{\circ}\text{C}$,离心(8000 r/min) 10 min。取上清,在 OD₃₄₀ 处检测吸光度。

1.3.7 检测 IR-3T3-L1 细胞的 TC、TG、LDL-C、HDL-C 含量

按照 1.3.6 进行预处理,然后根据 TC、TG、LDL-C、HDL-C 试剂盒说明书进行检测。

1.3.8 检测 IR-3T3-L1 细胞的 MDA 含量和 GSH-Px 活性

按照 1.3.6 进行预处理,然后按照 MDA 和

GSH-Px 操作按试剂盒说明书进行。

1.3.9 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测

取诱导分化成熟的脂肪细胞,按照 1.3.6 设置的分组进行实验,在完全培养基(含 1 $\mu\text{mol/L}$ DEX)预处理 48 h 后,加入 CYPS 处理 24 h。使用 EASYspin Plus 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒对各组细胞进行总 RNA 提取,并测定总 RNA 浓度和 OD_{260/280} 值。按照 GoScript Reverse Transcription System 试剂盒说明,配置反转录溶液体系,并合成 cDNA。设计并合成上下游引物序列,参考 NCBI 基因序列数据库(表 1)。以 GAPDH 作为内参,按照 Novo Start SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒说明配置 qRT-PCR 反应体系,并进行检测。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算各基因相对表达量。

1.4 统计学方法

结果以平均数 $\pm$ 标准误差($\bar{x}\pm s\bar{x}$)表示,所有实验均进行了至少 3 次的重复。数据采用最小显著差数法(LDS)、*t* 检验(Student's *t*-test)和单因素方差分析(one-way ANOVA)进行分析,所有数据分析和绘图使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行。差异的显著性在 $P<0.05$ 时被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3T3-L1 细胞诱导分化及油红 O 染色结果

如图 1A~1C 所示,使用放大倍数为 10x 的倒置显微镜观察未诱导分化的 3T3-L1 前脂肪细胞,其形态呈现纤维状以及不规则的梭形结构。随着诱导分化时间的增加,在第 7~10 天时,细胞逐渐变为椭圆形,且脂滴被油红 O 染色为红色,这说明 3T3-L1 前脂肪细胞成功地经历了诱导分化,转变为脂肪细

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Primers of qRT-PCR

名称 Name	前向引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
PI3K	CATAACCTGCAAACACTGCCC	ATCCTGCAAGGACATATTGTTGT
Akt	ATGAACGACGTAGCCATTGTG	TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT
GSK-3 β	TCGTCCATCGATGTGTGGTC	TTGTCCAGGGGTGAGCTTTG
AMPK	AAGCCGACCCAATGACATCA	CTTCCTTCGTACACGCAAAT
ACC	GAAGTCAGAGCCACGGCACA	GGCAATCTCAGTTCAAGCCACTC
FAS	ACAAACTGCACCCGTGACCCAGA	TGCTGGTTGCTGTGCATGGCT
Adiponectin	GGTCTGCCTGTCCCCATGAGTACC	CATCTTCGGCATGACTGGGCA
GLUT4	CGAGCTGGACGACGGACACTC	AGACATAGCTCATGGCTGGAACCCG
IRS-1	GCTCACGAAGAGCTGCTGCACT	GAGGCCATCATGGAACACGG
IRS-2	GCTCCCTGTTCTCTGACCGG	CAAAGGTGCCAGCCCCTGGG
PKB	ATCGTCGCCAAGGATGAGGT	TCTCGTGTCTGCTGTTGTAG
PPAR α	CGATACTGTCTCTTGATGA	CGCGTGTGATAAAGCCATTG
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	GGATGCAGGGATGATGTTCT

胞,并且可以用于胰岛素抵抗模型的建立和下一步试验。

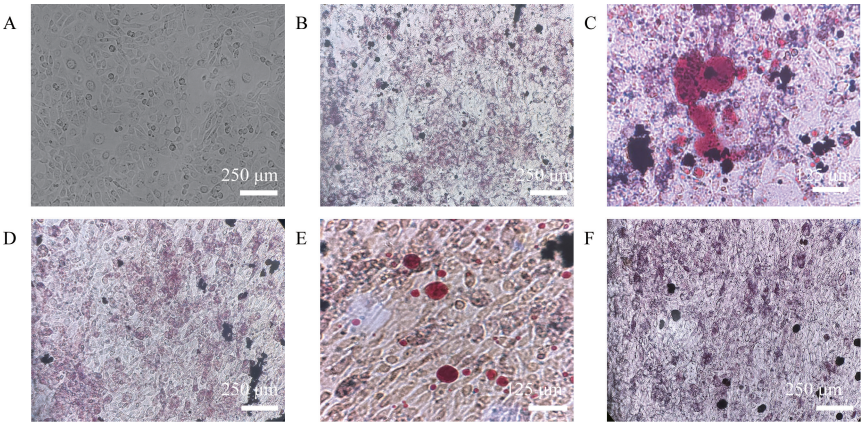
其次,如图 1D~1F,与诱导后的脂肪细胞相比,DEX 组的脂肪细胞有仍有大量小脂滴出现;山药多糖组的脂肪细胞分布比较均匀,形态较完整,无明显脂滴。

2.2 DEX、Met、CYPS 对诱导后脂肪细胞活力的影响

由图 2A 可知,结果发现 4 μmol/L DEX 对诱导后的脂肪细胞活力有抑制,且脂肪细胞活性在 70% 以下,对脂肪细胞影响较大,因此建模时可选择对

脂肪细胞活性影响较小的 1 μmol/L 和 3 μmol/L 的地塞米松药物浓度进行后续试验。

由图 2B 可知,与 Con 组相比,2 mg/mL、1 mg/mL 山药多糖对脂肪细胞活性的影响较大(分别为 $P<0.001$, $P<0.01$),0.01 mg/mL 山药多糖则对脂肪细胞出现了显著的促增殖的现象($P<0.01$),而 0.1 mg/mL 二甲双胍和 0.5 mg/mL、0.1 mg/mL、0.05 mg/mL 山药多糖不会对脂肪细胞的存活率产生负面影响($P>0.05$),对诱导后的 3T3-L1 脂肪细胞没有毒性,因此可以选择 0.5~0.01 mg/mL 范围内的山药多糖和 0.1 mg/mL 的二甲双胍进行后续试验。

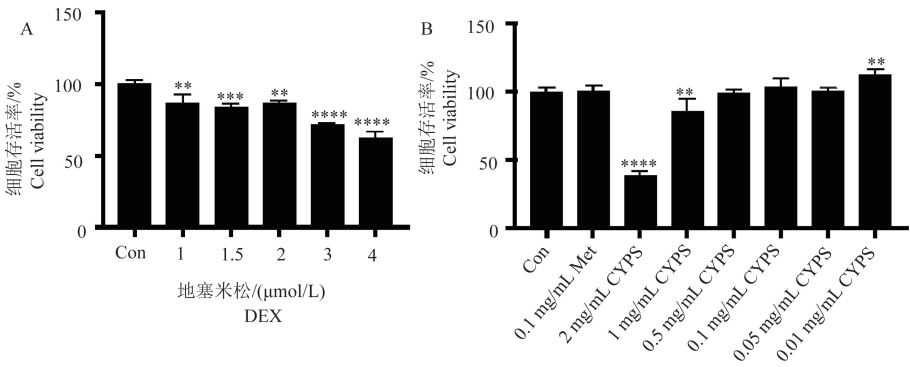


注:A:未诱导分化的前脂肪细胞(40x);B、C:分化成熟、油红 O 染色的脂肪细胞(40x、80x);D、E:地塞米松作用后的分化成熟、油红 O 染色的脂肪细胞(40x、80x);F:山药多糖作用后的分化成熟、油红 O 染色的脂肪细胞(40x)。

图 1 油红染色检测山药多糖对 3T3-L1 细胞脂质的影响

Note. A, Undifferentiation preadipocytes (40x). B/C, Differentiation matured, oil-red O stained adipocytes (40x, 80x). D/E, Oil-red O-stained mature adipocytes treated with Dex (40x, 80x). F, Oil-red O-stained mature adipocytes treated with CYPS(40x).

Figure 1 Oil red staining was used to detect the effect of CYPS on lipids in 3T3-L1 cells



注:A:地塞米松对诱导后的脂肪细胞活力的影响;B:二甲双胍、山药多糖对诱导后的脂肪细胞活力的影响。与 Con 组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图 2 地塞米松、二甲双胍和山药多糖对脂肪细胞活力的影响

Note. A, Effect of DEX on the viability of adipocytes. B, Effects of Met and CYPS on the viability of adipocytes. Compared with the Con group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

Figure 2 Effects of DEX, Met and CYPS on the viability of adipocytes

2.3 3T3-L1 细胞胰岛素抵抗模型建立

如图 3 所示,在 36 h 后加入 1 μmol/L 和 3 μmol/L DEX 的细胞中的葡萄糖含量与 Con 组相比,均出现了较为明显的变化,且在 48 h 时 1 μmol/L 的 DEX 胰岛素抵抗效果与 3 μmol/L 的 DEX 抵抗效果相差不大。但通过对比 1 μmol/L 和 3 μmol/L 的 DEX 对诱导后的脂肪细胞活性的影响,发现 3 μmol/L 的 DEX 对细胞的毒性较 1 μmol/L 的 DEX 对细胞的伤害更厉害,故选用了 1 μmol/L DEX 刺激 3T3-L1 脂肪细胞 48 h 建立 IR 模型。

2.4 IR-3T3-L1 脂肪细胞模型稳定性

如图 4 所示,待胰岛素抵抗模型有效建立后,利用完全培养液继续孵育 24 h、36 h、48 h、60 h。在 60 h 内,与 Con 组相比,DEX 组得葡萄糖含量显著升高,表明模型在此期间保持稳定。

2.5 CYPS 对 IR-3T3-L1 细胞葡萄糖消耗量的影响

采用葡萄糖氧化酶法可以检测胰岛素抵抗和促进细胞转运葡萄糖的多糖组分,对山药多糖的降糖组分测试中设置了 0.05 mg/mL、0.15 mg/mL 和 0.45 mg/mL 三个浓度。如图 5 所示,与 Con 组相比,DEX 组葡萄糖消耗量显著下降 ($P<0.0001$);与 DEX 组相比,浓度为 0.05 mg/mL、0.15 mg/mL 和 0.45 mg/mL 的 CYPS 和 Met 均促进 IR-3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖消耗(均为 $P<0.0001$)。

2.6 CYPS 对 IR-3T3-L1 细胞 HK 和 PK 活性的影响

如图 6 所示,与 Con 组相比,DEX 组 HK、PK 的酶活性均呈现显著下降(分别为 $P<0.001$, $P<0.0001$)。与 DEX 组相比,CYPS 组(0.05、0.15、0.45 mg/mL)HK、PK 的酶活性显著升高(均为 $P<0.0001$),且存在剂量依赖性。而 Met 组 PK 的酶活性出现显著升高趋势($P<0.001$)。从整体来看,CYPS 均可显著升高糖尿病人 HK、PK 的酶活性,加速葡萄糖的利用,从而达到降低血糖的目的。

2.7 CYPS 对 IR-3T3-L1 细胞脂代谢的影响

由图 7A~7C 可知,与 Con 组相比,DEX 组 T-CHO、TG、LDL-C 均出现升高,且具有显著性(均为 $P<0.0001$)。与 DEX 组相比,Met 组和 CYPS 组(0.05、0.15、0.45 mg/mL)的 T-CHO、TG、LDL-C 均出现显著下降趋势(均为 $P<0.0001$),并且 CYPS 组呈现剂量依赖性。此外由图 7D 可知,与 Con 组相比,DEX 组 HDL-C 呈现显著下降趋势($P<0.0001$)。

与 DEX 组相比,Met 组和 CYPS 组(0.05、0.15、0.45 mg/mL)的 HDL-C 均呈现显著升高趋势(分别为 $P<0.0001$, $P<0.01$, $P<0.0001$, $P<0.0001$),并且 CYPS 组呈现剂量依赖性。

2.8 CYPS 对 IR-3T3-L1 细胞氧化应激的影响

如图 8 所示,DEX 组相较于 Con 组,GSH-Px 活性降低($P<0.0001$),MDA 水平升高($P<0.0001$);

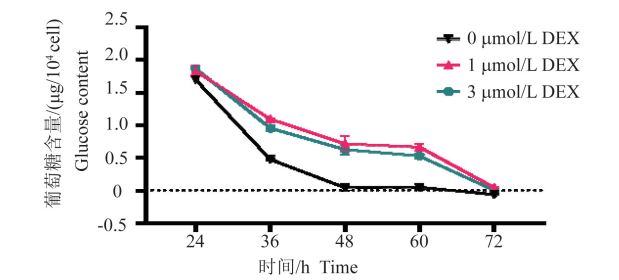


图 3 胰岛素抵抗模型

Figure 3 Insulin resistance model

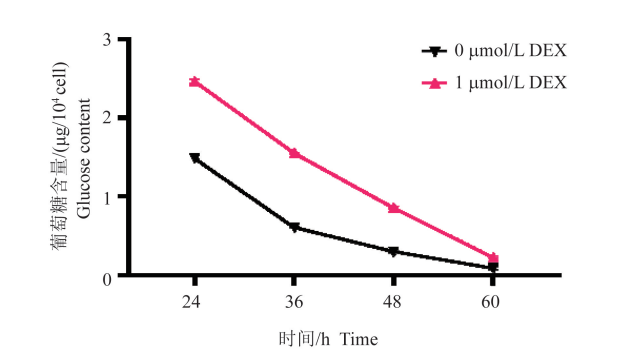
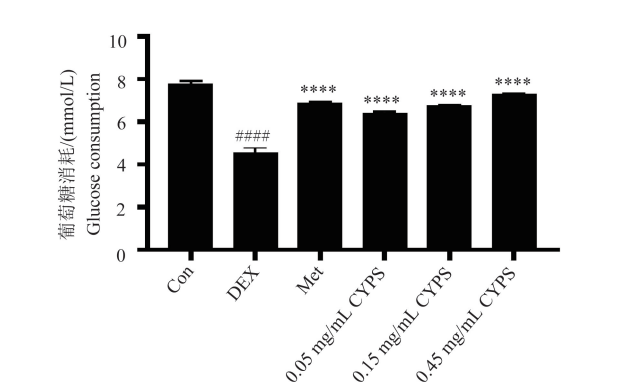


图 4 胰岛素抵抗模型维持情况

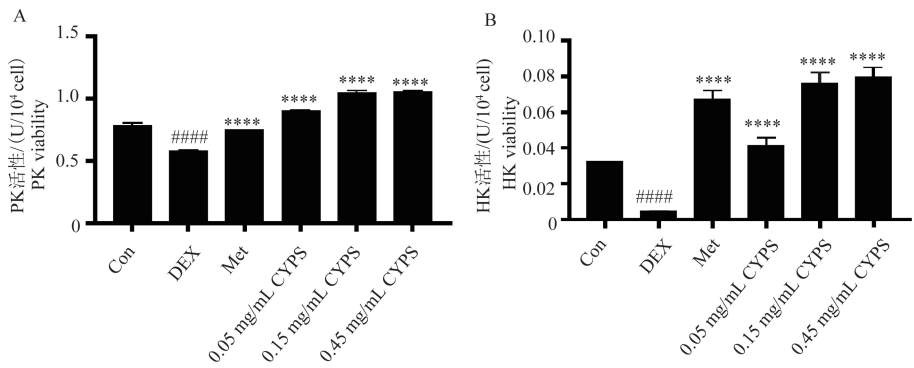
Figure 4 Maintenance of the insulin resistance model



注:与 Con 组相比,#### $P<0.0001$;与 DEX 组相比,**** $P<0.0001$ 。

图 5 CYPS 对 IR-3T3-L1 细胞葡萄糖消耗量的影响
Note. Compared with the Con group, #### $P<0.0001$. Compared with the DEX group, **** $P<0.0001$.

Figure 5 Effect of CYPS on glucose consumption in IR-3T3-L1 cells

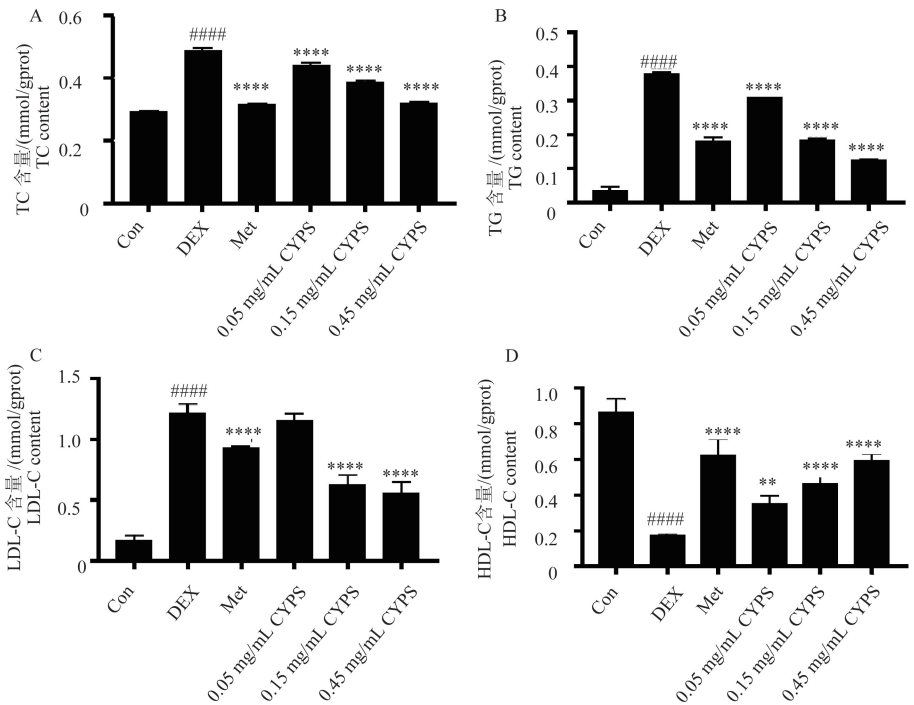


注:与 Con 组相比,#### $P<0.0001$;与 DEX 组相比,**** $P<0.0001$ 。

图 6 CYPS 对 IR-3T3-L1 脂肪细胞内 PK 和 HK 活性的影响

Note. Compared with the Con group, #### $P<0.0001$. Compared with the DEX group, **** $P<0.0001$.

Figure 6 Effect of CYPS on intracellular PK and HK activity in IR-3T3-L1 cells



注:与 Con 组相比,#### $P<0.0001$;与 DEX 组相比,** $P<0.01$,**** $P<0.0001$ 。

图 7 CYPS 对 IR-3T3-L1 脂肪细胞 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 含量的影响

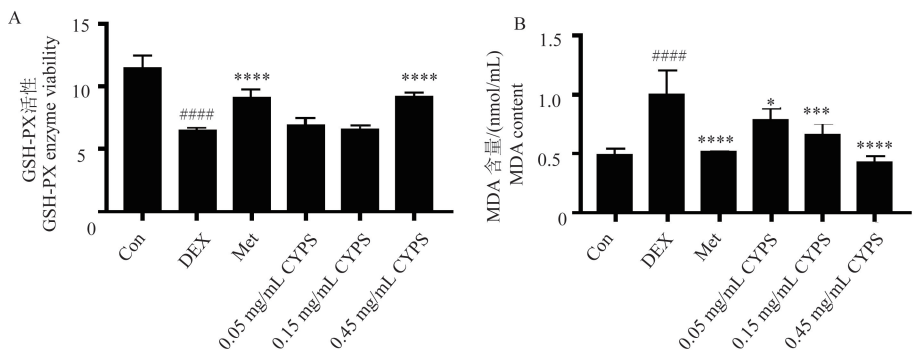
Note. Compared with the Con group, #### $P<0.0001$. Compared with the DEX group, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

Figure 7 CYPS's effects on TC, TG, LDL-C, and HDL-C in IR-3T3-L1 cells

与相比, Met 组和 CYPS 高剂量组相较于 DEX 组,其 GSH-Px 活性升高(均为 $P<0.0001$);另外, Met 组和 CYPS 组(0.05、0.15、0.45 mg /mL)的 MDA 水平显著降低(分别为 $P<0.0001$, $P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.0001$),且呈现剂量依赖性。其中,相比于 Met 组,0.45 mg/mL 的 CYPS 比 0.1 mg/mL 的 Met 对 IR-3T3-L1 细胞的抗氧化效果更好,但不具有统计学意义。

2.9 CYPS 对 IR-3T3-L1 细胞 PI3K/Akt 信号通路 mRNA 表达水平的影响

如图 9 所示, DEX 组与 Con 组相比, PI3K、Akt、GLUT-4 的 mRNA 表达水平显著降低($P<0.0001$, $P<0.0001$, $P<0.05$), IRS-1 的 mRNA 表达水平显著升高($P<0.0001$), GSK-3 β 的 mRNA 水平呈现升高趋势,但未呈现显著性,表明 DEX 抑制胰岛素抵抗脂肪细胞 PI3K/Akt 信号通路。与 DEX 组相比, Met

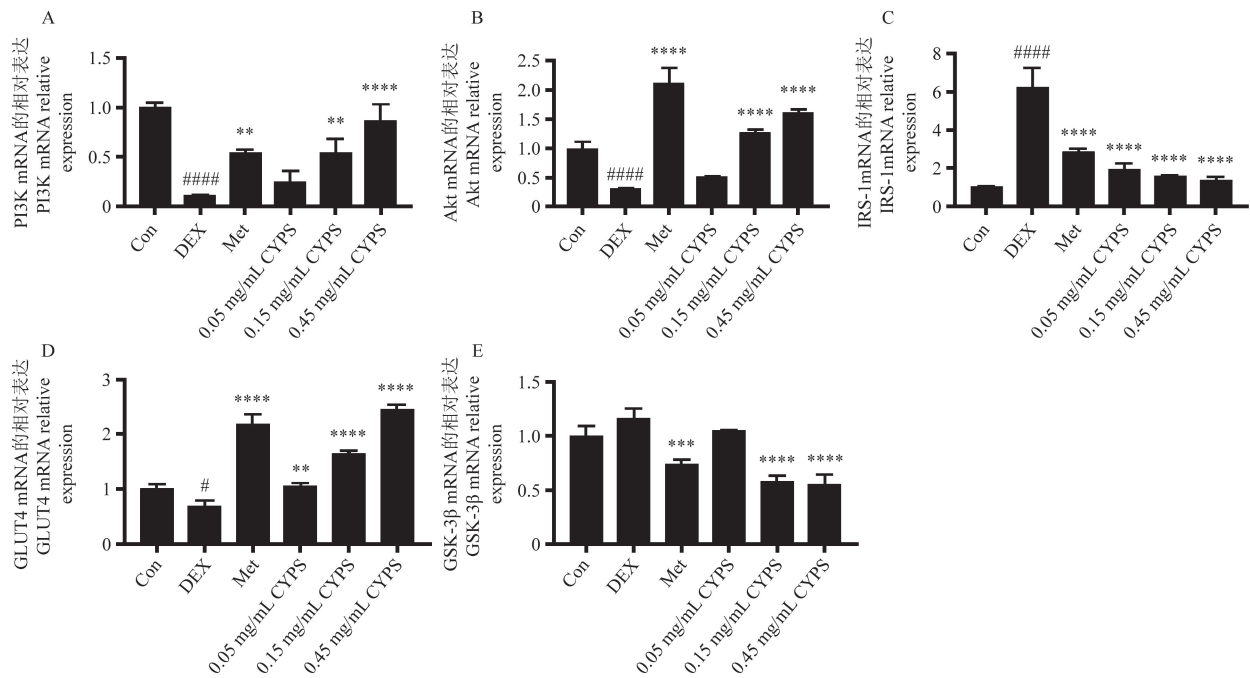


注:与 Con 组相比,#### $P<0.0001$;与 DEX 组相比,* $P<0.05$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$ 。

图 8 CYPS 对 IR-3T3-L1 脂肪细胞 GSH-Px 和 MDA 的影响

Note. Compared with the Con group,#### $P<0.0001$. Compared with the DEX group,* $P<0.05$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$.

Figure 8 Effect of CYPS on GSH-Px and MDA in IR-3T3-L1 cells



注:与 Con 组相比,# $P<0.05$,#### $P<0.0001$;与 DEX 组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$ 。

图 9 山药多糖对 IR-3T3-L1 脂肪细胞 PI3K mRNA、Akt mRNA、IRS-1 mRNA、GLUT-4 mRNA 和 GSK-3β mRNA 表达的影响

Note. Compared with the Con group,# $P<0.05$,#### $P<0.0001$. Compared with the DEX group,** $P<0.05$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$.

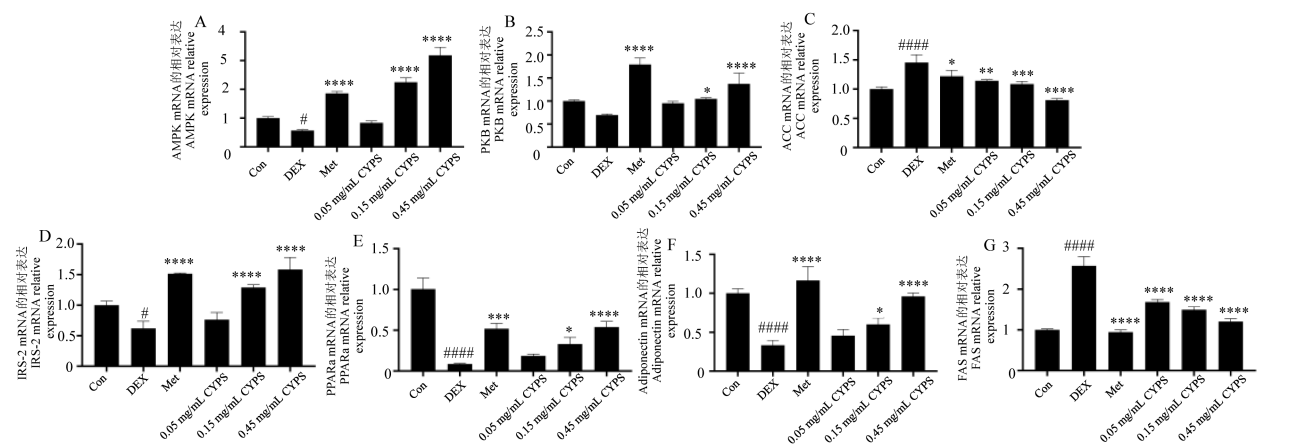
Figure 9 Effect of CYPS on the expression of PI3K mRNA, Akt mRNA, IRS-1 mRNA, GLUT-4 mRNA, and GSK-3β mRNA in IR-3T3-L1 cells

组和 CYPS 组 (0.05、0.15、0.45 mg/mL) 可以显著回调 PI3K、Akt、GLUT-4 的 mRNA 水平 ($P<0.01$, $P<0.0001$, $P<0.0001$), 降低 IRS-1、GSK-3β 的 mRNA 表达水平 ($P<0.001$, $P<0.0001$), 说明 CYPS 能够激活胰岛素抵抗脂肪细胞 PI3K/Akt 信号通路发挥降低血糖的作用。

2.10 CYPS 对 IR-3T3-L1 细胞 AMPK 信号通路 mRNA 表达水平的影响

如图 10 所示,与 Con 组相比,DEX 组 AMPK、

IRS-2、PPARα、Adiponectin 的 mRNA 水平显著降低 ($P<0.05$, $P<0.0001$), ACC、FAS 的 mRNA 水平显著升高 ($P<0.0001$), PKB 的 mRNA 水平呈现下降趋势,但未呈现显著性,表明 DEX 抑制胰岛素抵抗脂肪细胞 AMPK 信号通路。与 DEX 组相比, Met 组和 CYPS 组 (0.05、0.15、0.45 mg/mL) 可以显著回调 AMPK、IRS-2、PPARα、Adiponectin 的 mRNA 水平 ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.0001$), 降低 ACC、FAS 的 mRNA 表达水平 ($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$), 说



注:与 Con 组相比, #*P*<0.05, ####*P*<0.0001;与 DEX 组相比, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001。

图 10 山药多糖对 IR-3T3-L1 脂肪细胞 AMPK mRNA、PKB mRNA、ACC mRNA、IRS-2 mRNA、PPARα mRNA、Adiponectin mRNA、FAS mRNA 表达的影响

Note. Compared with the Con group, #*P*<0.05, ####*P*<0.0001. Compared with the DEX group, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001.

Figure 10 Effect of CYPS on the expression of AMPK mRNA, PKB mRNA, ACC mRNA, IRS-2 mRNA, PPARα mRNA, Adiponectin mRNA, and FAS mRNA in IR-3T3-L1 cells

明 CYPS 能够激活胰岛素抵抗脂肪细胞 AMPK 信号通路发挥降低血糖的作用。

3 讨论

糖尿病与心血管疾病、癌症、慢性呼吸系统疾病是目前世界范围内的四大主要非传染性慢性疾病^[14],伴随着多种并发症,而胰岛素抵抗则是 T2DM 的发病机制之一^[15]。动物模型作为降糖药物筛选及药物降糖作用机制探究中的主要模型,存在实验周期长、费用高、实验繁琐等问题^[16]。因此,体外糖尿病细胞模型逐步发展起来,相比于前者,细胞模型可以排除一定的自然差异性,更加简单、快捷和客观地观察实验结果^[17]。其中,DEX 诱导的 IR-3T3-L1 细胞模型是目前最常用的体外糖尿病模型之一,具有较长的研究历史^[18]。因此,本研究采用给药 1 μmol/L DEX 连续 48 h 诱导 3T3-L1 脂肪细胞建立胰岛素抵抗模型来评价 CYPS 的药效。油红 O 染色诱导后的 3T3-L1 脂肪细胞出现明显的红色脂滴;利用 DEX 诱导的 IR-3T3-L1 细胞对葡萄糖的消耗量显著减少,与参考文献^[19]结果一致,证明 IR-3T3-L1 细胞模型建立成功。

现代药理学表明,山药可以通过增强 GLUT1 葡萄糖转运蛋白的 mRNA 表达,调节相关的胰岛素敏感性,从而达到降低血糖的目的^[20]。而山药多糖作为山药的主要功能性成分,具有显著的降血糖活

性,例如,Li 等^[21]发现山药多糖可以通过免疫调节作用和修复能力降低 β 胰岛素细胞的血糖水平,从而降低糖尿病小鼠空腹血糖和葡萄糖耐量。此外,山药多糖可以控制糖尿病小鼠 PI3K/Akt 信号通路中关键相关蛋白的表达,促进糖原合成,减少糖异生,并改善胰岛素抵抗,从而具有调节血糖水平的作用^[22]。结合各项研究,我们认为山药多糖在治疗胰岛素抵抗导致的糖尿病的药物研发方面具有较大的潜力,因此选择山药多糖作为干预药物,探究其降血糖作用机制。

本研究发现当 CYPS 给予剂量增大到 1 mg/mL 时,细胞存活率下降。基于药效学研究表明 CYPS (0.05 mg/mL、0.15 mg/mL 和 0.45 mg/mL) 作用 24 h 后,细胞对葡萄糖的消耗量显著增加,细胞内参与酵解葡萄糖的关键酶(PK、HK)的活性显著升高;氧化应激相关因子的 GSH-Px 的酶活性水平升高,而 MDA 的含量降低;此外,细胞内 T-CHO、TG、LDL-C 含量均出现显著下降趋势,HDL-C 呈显著升高趋势。这与阳性对照药二甲双胍的实验结果一致。另外,相比于阳性对照药二甲双胍,0.45 mg/mL 的 CYPS 对于 IR-3T3-L1 细胞中 PK 和 HK 的活性、TG、LDL-C 含量的效果更为显著。说明 CYPS 可以缓解 DEX 导致的胰岛素抵抗状态,并具有一定的抗氧化^[23]、降低血糖^[21]、调节脂代谢紊乱^[24]的作用。

糖脂代谢紊乱和其他相关代谢疾病研究的一

个关键组成部分是 AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK),它是一种众所周知的细胞能量水平传感器,控制代谢以恢复能量稳态^[25]。PI3K/Akt 信号通路是控制人体细胞生长、死亡、分裂等多个过程的最重要途径之一^[26],也能促进胰岛素刺激的葡萄糖摄取与储存^[27]。在进行 CYPs 对 IR-3T3-L1 脂肪细胞作用机制的探究中,选择 AMPK-PI3K/Akt 信号通路中主要相关基因 mRNA 表达进行研究。本次实验结果显示,1 μmol/L DEX 连续 48 h 诱导 3T3-L1 脂肪细胞后 PI3K、Akt、GLUT-4、AMPK、IRS-2、PPARα、Adiponectin 的 mRNA 水平显著降低,而 PKB 的 mRNA 水平呈现下降趋势,但未呈现显著性;IRS-1、ACC、FAS 的 mRNA 水平显著升高,而 GSK-3β 的 mRNA 水平呈现升高趋势,但未呈现显著性。这一现象与 Zhang 等^[28]和 Alaaeldin 等^[29]的结果一致,DEX 可以抑制胰岛素抵抗脂肪细胞 AMPK-PI3K/Akt 信号通路。通过使用 CYPs 和二甲双胍作为治疗药物分别对 12 个基因进行 qPCR 的研究,发现 CYPs 可以显著回调 PI3K、Akt、GLUT-4、AMPK、IRS-2、PPARα、Adiponectin 的 mRNA 水平,降低 ACC、FAS、IRS-1、GSK-3β 的 mRNA 表达水平,且其作用效果与阳性对照药二甲双胍相同。此外 0.45 mg/mL 的 CYPs 对于 PI3K、GLUT-4、AMPK、ACC 和 IRS-1 mRNA 表达水平的调节效果与阳性对照药二甲双胍相比更加显著,此结果说明高浓度 CYPs 可以影响 AMPK-PI3K/Akt 信号通路,从而调节血糖浓度和脂代谢紊乱。

上述结果表明,CYPs 对 DEX 诱导的 IR-3T3-L1 脂肪细胞模型具有一定的调节血糖浓度和脂代谢紊乱(T-CHO、TG、LDL-C、HDL-C),能改善氧化应激(GSH-Px、MDA)和胰岛素抵抗,其作用机制可能与缓解氧化应激,从而减少胰岛 β 细胞的损伤有关。另外,其作用机制也可能通过调控 IR-3T3-L1 脂肪细胞的 AMPK-PI3K/Akt 信号通路来实现糖脂代谢紊乱和胰岛素抵抗调节来实现。

参考文献:

[1] 陈小娟,何福根,周迪夷. 杜仲多糖对自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠糖脂代谢的影响 [J]. 中国药学杂志, 2020, 55 (17): 1433-1438.
CHEN X J, HE F G, ZHOU D Y. Effect of *Eucommia ulmoides* polysaccharide on db/db diabetic mice's glycolipid metabolism [J]. Chin Pharm J, 2020, 55(17): 1433-1438.
[2] 解现星,张涛,赵爽,等. 苏子油对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌胰岛素敏感性相关基因表达的影响 [J]. 中国比较医学杂

志, 2015, 25(12): 1-5.
XIE X X, ZHANG T, ZHAO S, et al. Effects of *Perilla oil* on the insulin sensitivity-related gene expression in skeletal muscle in insulin resistant rats [J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(12): 1-5.
[3] AHMED A, ZENG G, JIANG D, et al. Time-dependent impairments in learning and memory in Streptozotocin-induced hyperglycemic rats [J]. Metab Brain Dis, 2019, 34(5): 1431-1446.
[4] 谭孟芳,康信聪,周佳丽,等. 灵芝醇提物对改善 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的作用 [J]. 食品研究与开发, 2022, 43 (12): 22-29.
TAN M F, KANG X C, ZHOU J L, et al. Effect of ethanol extract of *Ganoderma lucidum* on insulin resistance improvement of 3T3-L1 adipocytes [J]. Food Res Dev, 2022, 43(12): 22-29.
[5] WONDMKUN Y T. Obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes: associations and therapeutic implications [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13: 3611-3616.
[6] DOS SANTOS R M, MIYAMOTO J É, SIQUEIRA B P, et al. Interesterified palm oil promotes insulin resistance and altered insulin secretion and signaling in Swiss mice [J]. Food Res Int, 2024, 177: 113850.
[7] SANCAR G, LIU S, GASSER E, et al. FGF1 and insulin control lipolysis by convergent pathways [J]. Cell Metab, 2022, 34(1): 171-183.
[8] 刘紫欣,王宁,杨帆,等. 香椿叶提取物对 II 型糖尿病 db/db 小鼠的降血糖作用研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(23): 274-281.
LIU Z X, WANG N, YANG F, et al. Study on the hypoglycemic effect of *Toona sinensis* Roem leaf extract on type II diabetes mellitus db/db mice [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(23): 274-281.
[9] 冯学轩,严家荣,黄远英,等. 2 款保健食品配方辅助降血糖试验研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(10): 3176-3181.
FENG X X, YAN J R, HUANG Y Y, et al. Study on the assistant hypoglycemic effect of 2 kinds of health food formulas on diabetic rats [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(10): 3176-3181.
[10] AHMED A, ZENG G, AZHAR M, et al. Combination of Shengmai San and Radix puerariae ameliorates depression-like symptoms in diabetic rats at the nexus of PI3K/BDNF/SYN protein expression [J]. Animal Model Exp Med, 2023, 6(3): 211-220.
[11] 潘景芝,孟庆龙,崔文玉,等. 山药功能性成分及药理作用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(1): 420-428.
PAN J Z, MENG Q L, CUI W Y, et al. Advances in studies on functional components and pharmacological effects of *Dioscoreaopposita*Thunb [J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44 (1): 420-428.
[12] 陈晶,邵先明,侯志涛. 基于网络药理学的黄芪-山药药对

- 治疗 2 型糖尿病作用机制研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(6): 89-95.
- CHEN J, SHAO X M, HOU Z T. Study on mechanism of astragali *Radix-dioscoreae* rhizoma in treatment of type 2 diabetes mellitus based on network pharmacology [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2020, 27(6): 89-95.
- [13] 管琦, 易恒炜, 吕碧君, 等. 山药多糖对 2 型糖尿病小鼠胰岛胰岛素抵抗的影响及作用机制 [J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(3): 64-71.
- GUAN Q, YI H W, LÜ B J, et al. Mechanism and effect of yam polysaccharides on insulin resistance in type 2 diabetes mice [J]. J Food Sci Technol, 2023, 41(3): 64-71.
- [14] AHMED A, ZENG G, AZHAR M, et al. Jiawei Shengmai San herbal formula ameliorates diabetic associate cognitive decline by modulating AKT and CREB in rats [J]. Phytother Res, 2020, 34(12): 3249-3261.
- [15] 唐艺丹, 王鲜忠, 张姣姣. II 型糖尿病动物模型构建的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 870-876.
- TANG Y D, WANG X Z, ZHANG J J. Research progress in the construction of type II diabetes animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 870-876.
- [16] AYAZ A, LI Y J, LI S S, et al. Cognitive impairment by type 2 diabetes and therapy opportunities with natural medicines [J]. Prog Biochem Biophys, 2020, 47(8): 743-761.
- [17] 陈晶, 李璟. 糖尿病细胞模型及研究进展 [J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(4): 507-514.
- CHEN J, LI J. Advances in establishment of cell culture models of diabetes mellitus [J]. J Clin Pathol Res, 2016, 36(4): 507-514.
- [18] TENG H, ZHANG C, AI C, et al. Guidelines for the antidiabetic assay for bioactive substances in cell model [J]. eFood, 2022, 3(6): e38.
- [19] NICASTRO H, ZANCHI N E, DA LUZ C R, et al. Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats [J]. Nutrition, 2012, 28(4): 465-471.
- [20] GAO X, LI B, JIANG H, et al. *Dioscorea opposita* reverses dexamethasone induced insulin resistance [J]. Fitoterapia, 2007, 78(1): 12-15.
- [21] LI Q, LI W, GAO Q, et al. Hypoglycemic effect of Chinese yam (*Dioscorea opposita* rhizoma) polysaccharide in different structure and molecular weight [J]. J Food Sci, 2017, 82(10): 2487-2494.
- [22] FENG X, ZHANG Q, LI J, et al. The impact of a novel *Chinese yam*-derived polysaccharide on blood glucose control in HFD and STZ-induced diabetic C57BL/6 mice [J]. Food Funct, 2022, 13(5): 2681-2692.
- [23] LI Z, XIAO W, XIE J, et al. Isolation, characterization and antioxidant activity of yam polysaccharides [J]. Foods, 2022, 11(6): 800.
- [24] 李晓冰, 裴兰英, 陈玉龙, 等. 山药多糖对链脲菌素糖尿病大鼠糖脂代谢及氧化应激的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(2): 420-422.
- LI X B, PEI L Y, CHEN Y L, et al. The influence of *Dioscorea Batatas* polysaccharide on the glycolipid metabolism and oxidative stress of diabetic rats induced by STZ [J]. Chin J Gerontol, 2014, 34(2): 420-422.
- [25] STEINBERG G R, HARDIE D G. New insights into activation and function of the AMPK [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(4): 255-272.
- [26] FENG M, LIU F, XING J, et al. *Anemarrhena* saponins attenuate insulin resistance in rats with high-fat diet-induced obesity via the IRS-1/PI3K/AKT pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 277: 114251.
- [27] JAFARI M, GHADAMI E, DADKHAH T, et al. PI₃k/AKT signaling pathway: Erythropoiesis and beyond [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2373-2385.
- [28] ZHANG L, ZHOU X, CHEN H, et al. Mulberry extract ameliorates T2DM-related symptoms via AMPK pathway in STZ-HFD-induced C57BL/6J mice [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 313: 116475.
- [29] ALAAELDIN R, ABDEL-RAHMAN I A M, HASSAN H A, et al. Carpachromene ameliorates insulin resistance in HepG2 cells via modulating IR/IRS1/PI₃k/akt/GSK3/FoxO1 pathway [J]. Molecules, 2021, 26(24): 7629.

[收稿日期]2024-01-11