doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.13.001

·基础研究·

噻唑衍生物 WSF-SN-10 激活 AMPK 的机制研究 *

杨 洋[1] 王芸芸[2] 李小川[1] 孙 楠[2] 张志杰[3] 王石发[2△] 李 珍[1△]

（1 清华大学生命科学学院 北京 100084；
2 南京林业大学化学工程学院 江苏 南京 210037；3 中国中医科学院中药研究所 北京 100700）

摘要 目的：在噻唑衍生物中筛选新型 AMPK 激活剂并探究其激活 AMPK 的分子机制，以期找到副作用少的 II 型糖尿病治疗药物。**方法：**用 14 种噻唑衍生物处理 293T 细胞，用 Western Blot 筛选能显著提高 AMPK 磷酸化水平的化合物；用 HPLC 和 FACS 分别检测该化合物对细胞内 AMP/ATP 比值和 Ca^{2+} 浓度的影响，探究其激活 AMPK 的分子机制。**结果：**WSF-SN-10（2-(2-(6,6- 二甲基双环[3,1,1]庚 -2- 亚基)肼基)-4-(4- 氯基苯基)噻唑）为 14 种噻唑衍生物中活性最强的 AMPK 激活剂；20 μM 下 WSF-SN-10 激活 AMPK 的活性最强；用 20 μM WSF-SN-10 处理 293T 细胞后，细胞内的 AMP/ATP 比值和 LKB1 的磷酸化水平分别上升至空白对照的 1.94 和 3.04 倍，同时 Ca^{2+} 浓度无明显变化，说明 WSF-SN-10 通过增加细胞内的 AMP/ATP 比值来激活 AMPK。**结论：**噻唑衍生物 WSF-SN-10 能抑制细胞内的 ATP 合成来间接激活 AMPK，是治疗 II 型糖尿病和肥胖症的潜在药物。

关键词：噻唑衍生物；WSF-SN-10；AMPK；AMP/ATP；Ca^{2+}

中图分类号：R-33; R587.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2019）13-2401-06

The Mechanism of AMPK Activation by WSF-SN-10, a Thiazole Derivative*

YANG Yang[1], WANG Yun-yun[2], LI Xiao-chuan[1], SUN Nan[2], ZHANG Zhi-jie[3], WANG Shi-fa[2△], LI Zhen[1△]

(1 MOE Key Laboratory of Bioinformatics, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China;
2 College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu, 210037, China;
3 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700, China)

ABSTRACT Objective: AMP-activated protein kinase (AMPK) is a prime therapeutic candidate for obesity-related metabolic disorders. It is activated (phosphorylated at Thr172) mainly by increasing the ratio of AMP/ATP and increasing intracellular Ca^{2+} concentration. Biguanides and Thiazolidinediones are both AMPK activators used in the treatment of type II diabetes. However, they are associated with various undesirable side effects. In this study, we search among thiazole derivatives for the strongest AMPK activator and investigate its molecular mechanism of AMPK activation, to identify potent antidiabetic drugs with few side effects. **Methods:** 293T cells were treated with 14 thiazole derivatives and Western Blot was used to find out the strongest AMPK activator. HPLC and FACS were used respectively to measure intracellular ratio of AMP/ATP and intracellular Ca^{2+} concentration, to investigate its molecular mechanism of AMPK activation. **Results:** WSF-SN-10 was the strongest AMPK activator among the 14 thiazole derivatives; WSF-SN-10 increased the ratio of AMP/ATP and the level of LKB1 phosphorylation, but did not increase Ca^{2+} concentration in 293T cells. Therefore, WSF-SN-10 activates AMPK by increasing intracellular ratio of AMP/ATP. **Conclusions:** WSF-SN-10 is a novel AMPK activator which activates AMPK by inhibiting intracellular ATP synthesis, making it a potential drug candidate for the treatment of Type II diabetes and obesity.

Key words: Thiazole derivatives; WSF-SN-10; AMPK; AMP/ATP; Ca^{2+}

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R587.1 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2019)13-2401-06

前言

糖尿病是由胰岛素分泌不足（I 型糖尿病）或胰岛素抵抗（II 型糖尿病）引发的终身性代谢疾病，II 型糖尿病占糖尿病患者的 90%以上，是人口过早死亡的主要原因之一[1]。研究表明，目前糖尿病治疗的一线药物双胍类和噻唑烷二酮类（Thiazolidinediones，TZDs）均能激活 AMP 活化蛋白激酶（AMP-activated protein kinase，AMPK）来增强机体的胰岛素敏感度、促进葡萄糖摄取[2,3]，因此 AMPK 是治疗 II 型糖尿病的关键药物靶点。

* 基金项目：国家自然科学基金项目（31570760、31470592）

作者简介：杨洋（1994-），硕士研究生，主要研究方向：生物学，E-mail: yyang16@mails.tsinghua.edu.cn

△ 通讯作者：王石发（1965-），博士，教授，主要研究方向：手性合成化学，E-mail: wangshifa65@126.com，电话：025-85428369；
李珍（1966-），博士，教授，主要研究方向：生物学，E-mail: lizhen@mail.tsinghua.edu.cn，电话：010-62770581

（收稿日期：2019-03-01 接受日期：2019-03-29）

AMPK 是调节细胞能量平衡的重要激酶，是由 α、β 和 γ 亚基组成的异源三聚体。α 亚基的 Thr172 位点为磷酸化或激活 AMPK 的主要靶点 [4]。AMPK 主要有两种激活方式：升高 AMP/ATP 比值或升高细胞内的 Ca^{2+} 浓度[5]。AMP/ATP 比值升高时，AMP 能结合 AMPK 的 γ 亚基并改变其构象，促进 AMPK 的磷酸化并抑制其去磷酸化，使 AMPK 长期处于激活状态[6]。LKB1 能依赖 AMP 激活 AMPK，是 AMPK 最主要的上游激酶[7]。细胞内的 Ca^{2+} 浓度升高能激活 CaMKII 或 CaMKKβ 来激活 AMPK[8]。

某些药物和外来分子能影响细胞内的 AMP/ATP 比值或 Ca^{2+} 浓度来间接激活 AMPK。双胍类物质（如二甲双胍）和小檗碱能抑制线粒体有氧呼吸链的复合体 I，阻断 ATP 的合成，升高 AMP/ATP 比值来间接激活 AMPK [2,9,10]。吴茱萸碱和 WSF-P-1 能升高细胞内的 Ca^{2+} 浓度，分别通过 Ca^{2+}-PI3K/Akt-CaMKII 和 Ca^{2+}-CaMKKβ 通路激活 AMPK[8,11]。脂联素也能激活 AMPK，但激活机制并不明确[12]。TZDs 能促进脂联素的表达和组装来间接激活 AMPK[13]。

糖尿病治疗的一线药物二甲双胍和 TZDs 均为 AMPK 激活剂，但均存在一定的副作用[3]。因此，本研究在 14 种噻唑衍生物（WSF-SN-1 至 WSF-SN-14）中筛选出了活性最强的 AMPK 激活剂 WSF-SN-10，并进一步探究其激活 AMPK 的分子机制，以期找到副作用少的 II 型糖尿病治疗药物。WSF-SN-10 的化学名称为 2-(2-(6,6- 二甲基双环[3,1,1]庚 -2- 亚基)肼基)-4-(4- 氰基苯基)噻唑，分子结构如图 1。

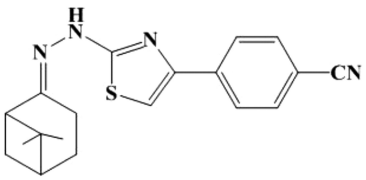

图 1 WSF-SN-10 的分子结构

Fig.1 The molecular structure of WSF-SN-10

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品和试剂 β- 蒎烯（江西省吉水县宏达天然香料有限公司），氨基硫脲、α- 卤代酮（安耐吉化学试剂有限公司），二甲基亚砜（DMSO）、5'-AMP 二钠盐、5'-ATP 二钠盐（美国 Sigma 公司，批号分别为 L9283，BCBL4139V 和 SLBH6428V），吴茱萸碱、盐酸小檗碱（中国食品药品检定研究院，批号分别为 110802-200908 和 110713-200911，纯度为 98%），胰蛋白酶、青霉素 - 链霉素双抗溶液、DMEM 高糖培养基（美国 Hyclone 公司），南美胎牛血清（FBS）（美国 Gibco 公司），Western Blot 发光底物（美国 Pierce 公司），羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗（美国 Santa Cruz 公司），PVDF 膜（美国 Millipore 公司），抗 pAMPK、AMPK、pLKB1、LKB1 抗体（美国 Cell Signaling 公司），其它试剂均为市售分析纯（北京化工厂）。

1.1.2 细胞 3T3-L1 前体脂肪细胞、293T 细胞购于美国 ATCC 公司，培养基为含 1%青霉素 - 链霉素双抗和 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基，培养条件为 5% CO_2，37 ℃。

1.1.3 仪器 CO_2 恒温培养箱（美国 Revco 公司），冷冻离心机（美国 Eppendorf 公司），BD FACSCalibur 流式细胞分析仪（美国 BD 公司），液相色谱仪（美国 Agilent 公司），梯度混合仪、恒流泵、蛋白电泳槽、蛋白转膜装置（北京六一仪器厂）。

1.2 方法

1.2.1 WSF-SN-10 的化学合成 在 50 mL 三口烧瓶中加入 0.42 g（1 mM）化合物 II-2 和 0.44 g（2 mM）α- 溴代 4- 氰基苯乙酮，0.16 g（1 mM）无水乙酸钠。常温下反应 2 h，反应结束后，用砂芯漏斗抽滤，乙醇洗涤固体。得到的噻唑固体以溴化盐的形式存在，再用二氯甲烷溶解固体，饱和碳酸氢钠溶液洗去溴化氢，氯化钠水溶液洗至中性。旋蒸除去二氯甲烷，甲醇重结晶，得到白色粉末 0.54 g[14]。

1.2.2 Western Blot 裂解细胞：用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的细胞裂解液于 4 ℃裂解细胞 2 h，4 ℃，10000 rpm 离心 10 min，取上清。Western Blot：用 β- 巯基乙醇处理样品 30 min，再煮沸 5 min 变性蛋白，用浓度为 10%的 SDS-PAGE 胶分离蛋白，以湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上，用含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 2 h，用一抗（抗 AMPK，pAMPK，LKB1，pLKB1 抗体）室温孵育 2 h，洗膜后用相应二抗室温孵育 1 h，洗膜后加显影液，用 X 光片曝光，标记目标条带并分析结果。

1.2.3 高效液相色谱（HPLC）检测细胞内的 AMP、ADP 和 ATP 浓度 收集细胞：取 3T3-L1 前体脂肪细胞，给药处理 1 h。用 1 mL PBS 收集细胞于 1.5 mL 离心管中，室温，3500 rpm 离心 10 min，吸弃上清。裂解细胞：加入 490 μL 高氯酸溶液涡旋混匀，低温超声裂解 5 min，4 ℃，12000 rpm 离心 5 min，转移上清至新的离心管，用 80 μL KOH 溶液中和。上机检测：使用仪器 Shimadzu LC-20A HPLC，色谱柱为 CAPCELL PAK MG II-S5 C18，流动相 A 为乙腈，流动相 B 为硫酸盐缓冲液，进样量为 10 μL，流速为 1.0 mL/min，检测样品吸收峰，计算样品中的 AMP、ADP 和 ATP 浓度。

1.2.4 流式细胞分析仪（FACS）检测细胞内的 Ca^{2+} 浓度 收集细胞：取 293T 细胞，给药处理 1 h，用 1mL PBS 收集细胞于 1.5 mL 离心管中，室温，3500 rpm 离心 5 min。染色：吸弃上清，用 500 μL PBS 重悬细胞，再加入 10 μL Fluo 3 储液，静置 45 min。检测荧光：室温，3500 rpm 离心 5 min，用 500 μL PBS 重悬细胞，用流式细胞分析仪（FACS）检测细胞内的荧光强度，计算一万个细胞荧光强度的平均值。

1.3 统计学分析

用 NIH ImageJ 软件定量分析免疫印迹蛋白条带的灰度。条带灰度及其他数据均使用 GraphPad Prism 7.0 分析作图。各数据均通过至少三次独立实验获得，统计结果表示为均值± 标准偏差的形式。用 t-test 比较两组数据的均数，用单因素方差分析（one-way ANOVA）比较多组数据的均数，$P<0.05$ 说明差异有统计学意义，* 代表 $P<0.05$，** 代表 $P<0.01$。

2 结果

2.1 WSF-SN-10 是 14 种噻唑衍生物中活性最强的 AMPK 激活剂

本研究首先在已有的 14 种噻唑衍生物（WSF-SN-1 至 WSF-SN-14）中筛选活性最强的 AMPK 激活剂。用 20 μM 药物

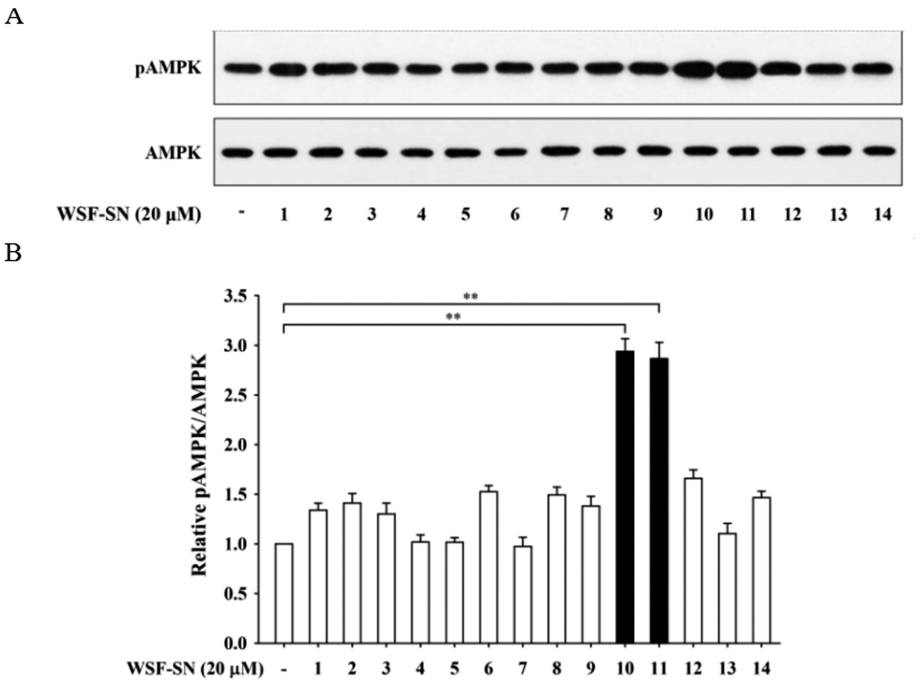

图 2 WSF-SN-10 为 14 种噻唑衍生物中活性最强的 AMPK 激活剂

Fig.2 WSF-SN-10 is the strongest AMPK activator in the 14 thiazole derivatives

A. 293T cells were treated with DMSO and 20 μM thiazole derivatives (WSF-SN-1 to WSF-SN-14) for one hour. Phosphorylated AMPK at Thr172 (pAMPK) and total AMPK were detected using anti-pAMPK antibody and anti-AMPK antibody, respectively. B. The amount of pAMPK and AMPK was quantified using the NIH ImageJ software. The pAMPK/AMPK ratio (expressed as mean ± SD, n = 3) was calculated and presented relative to the control (0 μM thiazole derivatives). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

处理 293T 细胞 1 h，用 Western Blot 检测细胞裂解液中的 pAMPK 和 AMPK 蛋白水平。如图 2A，WSF-SN-10 和 WSF-SN-11 增强 AMPK 磷酸化水平（即激活 AMPK）的效果最为明显。

为定量研究 14 种噻唑衍生物激活 AMPK 的效果，我们用 NIH ImageJ 软件统计图 2A 中各条带的灰度，用 pAMPK/AMPK 比值表示 AMPK 的磷酸化水平。设空白对照的 AMPK 磷酸化水平为 1，其余样品与之相比得到统计图。如图 2B，20 μM 的 WSF-SN-10 和 WSF-SN-11 处理后，AMPK 的磷酸化水平提升至空白对照的 2.93 倍和 2.86 倍，远远大于其余衍生物的处理效果。因此 WSF-SN-10 与 WSF-SN-11 均能激活 AMPK，而 WSF-SN-10 为 14 种衍生物中活性最强的 AMPK 激活剂。

为选择合适的浓度来检测 WSF-SN-10 激活 AMPK 的分子机制，我们用 0、2.5、5、10、20 和 40 μM 的 WSF-SN-10 处理 293T 细胞 1 h，收集并裂解细胞，用 Western Blot 检测样品中的 pAMPK 和 AMPK 蛋白水平。结果如图 3，随着 WSF-SN-10 处理浓度的升高，AMPK 的磷酸化水平先升高后下降，在浓度为 20 μM 时，AMPK 的磷酸化水平达到最大，为空白对照组磷酸化水平的 3.52 倍。由于 WSF-SN-10 在 10 μM、20 μM 时激活 AMPK 的活性最强，之后将取 10 μM、20 μM 为 WSF-SN-10 的工作浓度。

2.2 WSF-SN-10 抑制细胞内的 ATP 合成来激活 AMPK

AMPK 主要有两种激活方式：升高细胞内的 AMP/ATP 比值和升高细胞内的钙离子浓度 [5]。为探究 WSF-SN-10 激活

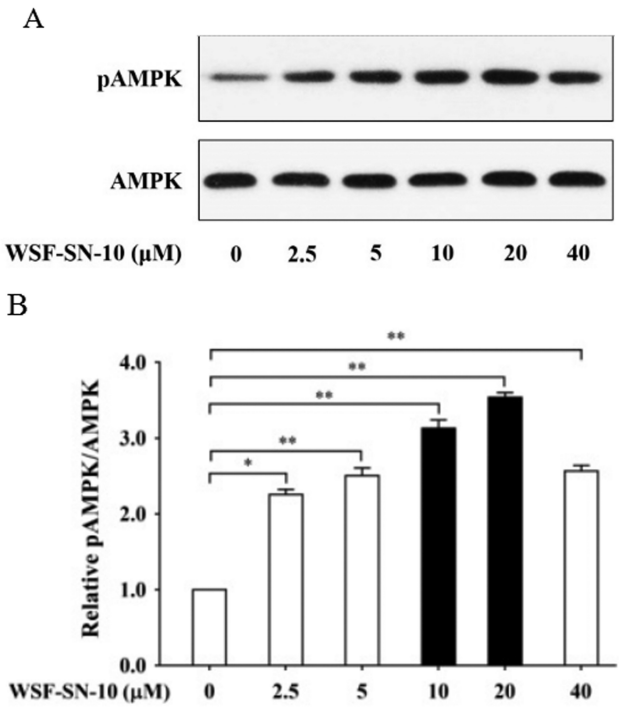

图 3 WSF-SN-10 在 20 μM 下激活 AMPK 的活性最强

Fig.3 WSF-SN-10 activates AMPK with the highest level seen at 20 μM

A. 293T cells were treated with 0, 2.5, 5, 10, 20 and 40 μM WSF-SN-10 for one hour. Phosphorylated AMPK and total AMPK were detected using anti-pAMPK antibody and anti-AMPK antibody, respectively. B. The amount of pAMPK and AMPK was quantified and the pAMPK/AMPK ratio was presented relatively to the control (0 μM WSF-SN-10).

AMPK 的分子机制，我们首先检测药物处理对 293T 细胞中 AMP、ADP 与 ATP 浓度的影响。用 0、10、20 μM 的 WSF-SN-10 和 10 μM 的小檗碱（BBR）处理 293T 细胞 1 h，用 HPLC 检测细胞内的 AMP、ADP 和 ATP 浓度，计算 AMP/ATP 比值。结果如图 4A，药物处理后细胞中的 AMP 浓度均无明显变化。

小檗碱作为阳性对照，能减少细胞内的 ADP 和 ATP 含量，显著提高 AMP/ATP 比值（图 4B），使细胞处于低能量状态，从而激活能量感受器 AMPK。WSF-SN-10 处理后细胞内的 ADP 和 ATP 含量也显著降低，10、20 μM 的 WSF-SN-10 使细胞内的 ATP 水平下降至空白对照的 0.66 和 0.46 倍，从而使 AMP/ATP 比值上升至空白对照的 1.52 倍和 1.94 倍。综上所述，WSF-SN-10 与小檗碱相同，能抑制细胞内的 ATP 合成来激活 AMPK。

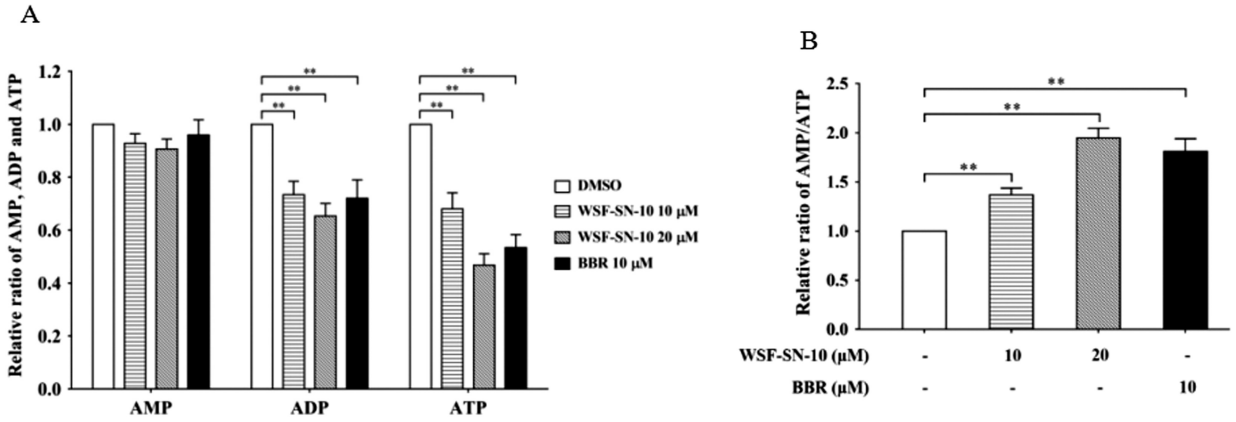

图 4 WSF-SN-10 抑制细胞内的 ATP 合成来激活 AMPK

Fig.4 WSF-SN-10 activates AMPK by inhibiting intracellular ATP synthesis

A. 293T cells were treated with WSF-SN-10 or berberine (BBR) for 1 hour. AMP, ADP and ATP in cell extracts were separated and quantified by HPLC. The concentration of AMP, ADP and ATP was calculated and presented relative to the control (0 μM WSF-SN-10). B. The AMP/ATP ratio was calculated and presented relative to the control (0 μM WSF-SN-10).

细胞内的 AMP/ATP 比值上升能激活 LKB1，LKB1 是 AMPK 最主要的上游激酶 [15]。为探究 WSF-SN-10 和 WSF-SN-11 能否激活 LKB1，用 0、10、20 μM 的 WSF-SN-10 和 10 μM 的小檗碱（BBR）处理 293T 细胞 1 h，收集并裂解细胞，检测细胞裂解液中的 pLKB1 和 LKB1 蛋白水平，用 pLKB1/LKB1 表示 LKB1 的磷酸化水平。

如图 5，10 μM 的小檗碱使细胞内的 pLKB1/LKB1 比值上升至空白对照的 2.56 倍。以小檗碱为阳性对照，10、20 μM 的 WSF-SN-10 也使细胞内 LKB1 的磷酸化水平上升至空白对照的 2.19 和 3.04 倍。因此，WSF-SN-10 确实能增加细胞内的 AMP/ATP 比值，提升 LKB1 的磷酸化水平来激活 AMPK。

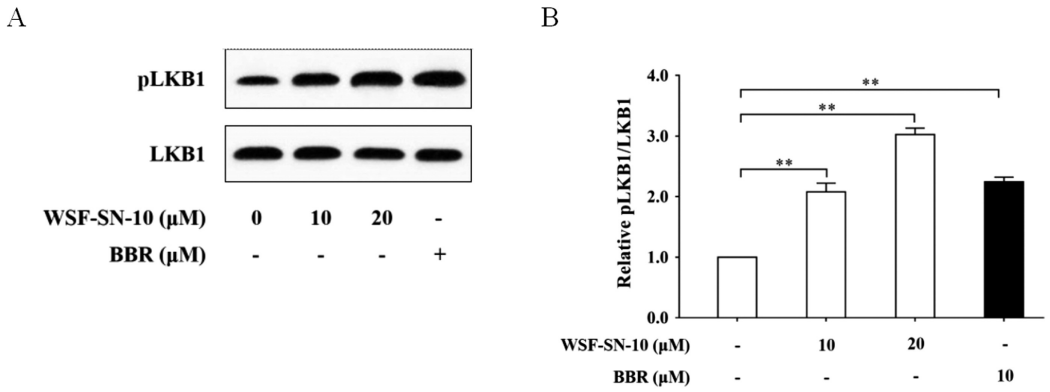

图 5 WSF-SN-10 能在 293T 细胞中激活 LKB1

Fig.5 WSF-SN-10 can activate LKB1 in 293T cells

A. 293T cells were treated with WSF-SN-10 or berberine (BBR) for one hour. Phosphorylated LKB1 at Thr-336 (pLKB1) and total LKB1 were detected using anti-pLKB1 antibody and anti-LKB1 antibody, respectively. B. The amount of pLKB1 and LKB1 was quantified and the pLKB1/LKB1 ratio was presented relatively to the control (0 μM WSF-SN-10).

2.3 WSF-SN-10 不能升高细胞内的钙离子浓度

提高细胞内的 Ca^{2+} 浓度也能间接激活 AMPK，研究表明，吴茱萸碱和 WSF-P-1 能升高细胞内的 Ca^{2+} 浓度，分别通过 Ca^{2+}-PI3K/Akt-CaMKII 和 Ca^{2+}-CaMKKβ 信号通路间接激活

AMPK[8,11]。为探究 WSF-SN-10 对细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响，用 0、10、20 μM 的 WSF-SN-10 和 20 μM 的吴茱萸碱（Evo）处理 293T 细胞 1 h，用 FACS 检测细胞内的 Ca^{2+} 浓度。如图 6，20 μM 吴茱萸碱使细胞内的 Ca^{2+} 浓度上升至空白对照的 1.95 倍。以吴茱萸碱为阳性对照，WSF-SN-10 不能显著增加细胞内的 Ca^{2+} 浓度。说明 WSF-SN-10 不通过升高细胞内的 Ca^{2+} 浓度来激活 AMPK。

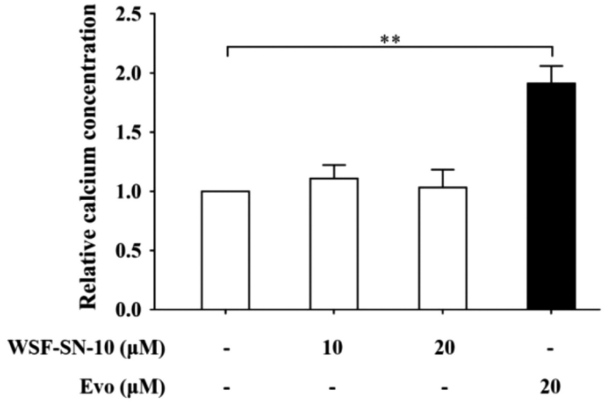

图 6 WSF-SN-10 不能升高细胞内的 Ca^{2+} 浓度

Fig.6 WSF-SN-10 did not increase intracellular calcium concentration

293T cells were treated with WSF-SN-10 or evodiamine (Evo) for 1 hour. After incubation with Fluo-3, the cells were analyzed on a flow cytometer using FL-1 as a detector. Intracellular calcium concentration was calculated from the mean value of FL-1 peak and presented relative to the control (0 μM WSF-SN-10).

3 讨论

3.1 研究意义及总结

糖尿病患者众多、死亡人数多且快速增长[1]，AMPK 作为能量调节器，是治疗 II 型糖尿病等代谢疾病的重要靶标。二甲双胍能提高细胞内的 AMP/ATP 比值来间接激活 AMPK，但其作用部位主要为肝脏和小肠，长期服用会产生腹痛腹泻、乳酸中毒、维生素 B12 不足等副作用[3]。唯一发现的 AMPK 直接激活剂 A-769662 临床效果并不理想[16]。噻唑衍生物有应用于糖尿病治疗的先例，如罗格列酮和吡格列酮，但长期服用这两种药物会产生膀胱癌、肥胖、贫血等副作用[17]。因此，本研究在 14 种噻唑衍生物（WSF-SN-1 至 WSF-SN-14）中筛选 AMPK 激活剂，并进一步探究其激活 AMPK 的分子机制，以期找到副作用少的 II 型糖尿病治疗药物。

本研究发现，WSF-SN-10，即 2-(2-(6,6- 二甲基双环[3,1,1]庚 -2- 亚基)肼基)-4-(4- 氰基苯基)噻唑，为 14 种噻唑衍生物中活性最强的 AMPK 激活剂（图 2）。以一系列浓度梯度处理 293T 细胞，发现 WSF-SN-10 在 20 μM 下激活 AMPK 的活性最强（图 3），因此以 10 μM、20 μM 为 WSF-SN-10 的工作浓度。为探究 WSF-SN-10 激活 AMPK 的分子机制，我们以小檗碱为阳性对照，用 HPLC 检测 WSF-SN-10 处理后细胞内的 AMP、ADP 和 ATP 浓度，分析药物处理是否升高细胞内的 AMP/ATP 比值来激活 AMPK。另一方面，以吴茱萸碱为阳性对照，用 FACS 检测 WSF-SN-10 处理后细胞内的 Ca^{2+} 浓度，分析药物处理是否升高细胞内的 Ca^{2+} 浓度来激活 AMPK。结果表明，用 20 μM WSF-SN-10 处理 293T 细胞后，细胞内的 AMP/ATP 比值和 LKB1 的磷酸化水平分别上升至空白对照的 1.94 和 3.04 倍（图 4 和图 5），同时 Ca^{2+} 浓度无明显变化（图 6），说明 WSF-SN-10 抑制细胞内的 ATP 合成并磷酸化 LKB1，而不能升高细胞内的 Ca^{2+} 浓度来激活 AMPK。

AMPK 是能量调节器，当细胞内的 AMP/ATP 比值上升，即细胞处于低能量状态时，被激活的 AMPK 能磷酸化下游的调节蛋白，开启分解代谢通路（如脂肪酸氧化和糖酵解），关闭合成代谢通路（如葡萄糖的合成代谢），储存 ATP 来应对细胞及整个机体的内外压力[5,18,19]，其调节糖脂与生长代谢过程中的重要作用，使其成为了代谢疾病治疗的重要靶标。本研究用相同浓度的噻唑衍生物处理 293T 细胞，检测细胞内 AMPK 的磷酸化水平，在 14 种噻唑衍生物中快速找到了 AMPK 激活剂 WSF-SN-10 和 WSF-SN-11（图 2），为今后的潜在药物筛选提供了一个快捷有效的方法。

3.2 研究讨论

14 种噻唑衍生物均在南京林业大学化学工程系王石发老师的实验室合成，均以含氮的五元杂环噻唑为基本碳骨架。但除 WSF-SN-10 和 WSF-SN-11 外，其余衍生物均无法激活 AMPK（图 2）。WSF-SN-10 和 WSF-SN-11 的分子结构极其类似，不同之处仅在于苯环 4 位的取代基（WSF-SN-10 为氰基而 WSF-SN-11 为羟基），但二者激活 AMPK 的最佳浓度和激活机制均不相同。WSF-SN-10 与 WSF-SN-11 分别在 20 μM 和 40 μM 下激活 AMPK 的活性最强，WSF-SN-10 抑制 ATP 的合成，而 WSF-SN-11 激活 TRPV1 及 Ca^{2+}-CaMKKβ 信号通路来激活 AMPK（data not shown）。

相似结构的化合物生理活性完全不同，这在医药史中并不鲜见。最有名的就是发生于 1950s 的沙利度胺“反应停”事件，作为一个手性化合物，沙利度胺的 R- 构型能镇痛催眠、抑制妊娠反应，但 S- 构型有致畸性[20]。1950s 沙利度胺在拉丁美洲、大洋洲、非洲等地上市后，由于右旋分子能在血清中消旋形成左旋沙利度胺，全世界 46 个国家超过一万名新生儿出现畸形，为无数家庭带来毁灭性的灾难。

碳骨架相同的分子激活 AMPK 的能力、最佳浓度和激活机制不同，这本身也是个值得思考和研究的问题。也许这恰恰说明，激活 AMPK 的关键结构不是碳骨架，而是与碳骨架相连、结构有所不同的官能团。我们需设计实验，将相同的官能团放到其他的碳骨架上，用相同的分子生物学实验检测其激活 AMPK 的能力和机制，来论证这一说法。如果确实如此，建立数据库，对特定 AMPK 激活机制所对应化合物的官能团和碳骨架予以归纳总结，将对未来的信号通路研究、药物开发和化合物改造大有裨益。

3.3 研究展望

脂联素是白色脂肪组织分泌的、血清中含量最高的脂肪因子。在其组装形成的三种多聚体中，高聚体是调节糖脂代谢的最主要的活性成分，与机体的胰岛素敏感度紧密相关[21,22]。研究表明，小檗碱、吴茱萸碱和 WSF-P-1 等 AMPK 激活剂能抑制 3T3-L1 前体脂肪细胞的分化，在 3T3-L1 成熟脂肪细胞中抑制

脂联素的表达，促进脂联素的高聚化（增加高聚体脂联素占脂联素总量的比例），来增加细胞的胰岛素敏感度和葡萄糖摄取，是治疗糖尿病和肥胖症等代谢紊乱疾病的潜在药物[8,10,11]。

我们已发现，在 293T 细胞中，WSF-SN-10 为活性较强的 AMPK 激活剂，能抑制 ATP 的合成，升高细胞内的 AMP/ATP 比值并磷酸化 LKB1 来激活 AMPK，接下来，我们将用 WSF-SN-10 处理 3T3-L1 前体脂肪细胞和 3T3-L1 成熟脂肪细胞，探究 WSF-SN-10 对脂肪细胞分化、对脂联素的表达和组装，对细胞的胰岛素敏感度和葡萄糖摄取能力的影响，为 WSF-SN-10 的进一步开发应用提供理论基础。

二甲双胍抑制了线粒体的功能，可能导致乳酸堆积，使机体乳酸中毒[3]。WSF-SN-10 处理也能显著降低细胞内的 ADP 和 ATP 浓度（图 4A），使细胞处于低能量状态来激活 AMPK，由于 WSF-SN-10 的激活机制与二甲双胍类似，所以在使用过程中可能产生同样的副作用。在今后的研究中，我们将用动物实验检测 WSF-SN-10 是否具有降血糖、缓解糖尿病的生理功能，同时密切关注药物处理对机体乳酸积累的影响，为 WSF-SN-10 成为糖尿病或肥胖症的潜在治疗药物提供更多的理论支持和实践依据。

参 考 文 献（References）

[1] Cuschieri S. Type 2 diabetes - An unresolved disease across centuries contributing to a public health emergency [J]. Diabetes Metab Syndr, 2019, 13(1): 450-453

[2] Ota S, Horigome K, Ishii T, et al. Metformin suppresses glucose-6-phosphatase expression by a complex I inhibition and AMPK activation-independent mechanism [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 388(2): 311-316

[3] Bennett WL, Maruthur NM, Singh S, et al. Comparative effectiveness and safety of medications for type 2 diabetes: an update including new drugs and 2-drug combinations [J]. Ann Intern Med, 2011, 154 (9): 602-613

[4] Spasic MR, Callaerts P, Norga KK. AMP-activated protein kinase (AMPK) molecular crossroad for metabolic control and survival of neurons[J]. Neuroscientist, 2009, 15(4): 309-316

[5] Hardie DG, Schaffer BE, Brunet A. AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs[J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(3): 190-201

[6] Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP [J]. Nature, 2011, 472 (7342): 230-233

[7] Lizcano JM, Goransson O, Toth R, et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1[J]. EMBO J, 2004, 23(4): 833-843

[8] Wang Y, Zhang Y, Wang Y, et al. WSF-P-1, a novel AMPK activator, promotes adiponectin multimerization in 3T3-L1 adipocytes [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2017, 81(8): 1529-1535

[9] Turner N, Li JY, Gosby A, et al. Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action[J]. Diabetes, 2008, 57(5): 1414-1418

[10] Li Y, Wang P, Zhuang Y, et al. Activation of AMPK by berberine promotes adiponectin multimerization in 3T3-L1 adipocytes[J]. FEBS Lett, 2011, 585(12): 1735-1740

[11] Liu LH, Xie JY, Guo WW, et al. Evodiamine activates AMPK and promotes adiponectin multimerization in 3T3-L1 adipocytes [J]. J Asian Nat Prod Res, 2014, 16(11): 1074-1083

[12] Huypens P, Moens K, Heimberg H, et al. Adiponectin-mediated stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in pancreatic beta cells[J]. Life Sci, 2005, 77(11): 1273-1282

[13] Ialenti A, Grassia G, Di Meglio P, et al. Mechanism of the anti-inflammatory effect of thiazolidinediones: relationship with the glucocorticoid pathway[J]. Mol Pharmacol, 2005, 67(5): 1620-1628

[14] Sun Nan, Wang Xing, Ding Zhi-bing, et al. Synthesis and Biological Activity of Novel Pinanyl Thiazole Derivatives[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2016, 36(10): 2489-2495

[15] Lizcano JM, Göransson O, Toth R, et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1[J]. The EMBO Journal, 2004, 23(4): 833-843

[16] Guigas B, Sakamoto K, Taleux N, et al. Beyond AICA riboside: in search of new specific AMP-activated protein kinase activators [J]. IUBMB Life, 2009, 61(1): 18-26

[17] Goldstein MR, Mascitelli L. An update on the comparative effectiveness and safety of medications for type 2 diabetes [J]. Ann Intern Med, 2011, 155(8): 562-563

[18] Hardie DG. Hot stuff: thyroid hormones and AMPK [J]. Cell Res, 2010, 20(12): 1282-1284

[19] Ross FA, Jensen TE, Hardie DG. Differential regulation by AMP and ADP of AMPK complexes containing different gamma subunit isoforms[J]. Biochem J, 2016, 473(2): 189-199

[20] Kumar P, Kumar HA, Sundaresan L, et al. Thalidomide remodels developing heart in chick embryo: discovery of a thalidomide mediated hematoma in heart muscle[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2018, 391(10): 1093-1105

[21] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes [J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(45): 26746-26749

[22] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors[J]. Endocrine Reviews, 2005, 26(3): 439-451