

油酸诱导胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型优化及小檗碱、黄芩苷、葛根素和甘草苷的体外降糖作用研究

朱水兰¹, 黎宇^{1,3}, 严奉东², 涂珺^{1*}

1. 江西中医药大学 中医基础理论分化发展研究中心&江西省病因生物学重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西中医药大学 药学院, 江西 南昌 330004

3. 江西省萍乡市妇幼保健院 药剂科, 江西 萍乡 337000

摘要: 目的 以油酸诱导脂代谢紊乱建立肝胰岛素抵抗 (IR) 细胞模型, 研究中药单体成分小檗碱、黄芩苷、葛根素和甘草苷的体外降糖作用, 为中药降糖组方或成分配伍优化提供研究基础。方法 采用油酸不同浓度 (0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L) 及不同作用时间点 (24、36、48 h) 诱导 HepG2 细胞, 建立 IR-HepG2 细胞模型, 葡萄糖氧化酶法测定细胞葡萄糖消耗量, CCK-8 法检测细胞活力, 确立模型的油酸最佳诱导浓度及最佳作用时间; 蒽酮法和三酰甘油氧化酶法检测 IR 模型细胞内肝糖原和三酰甘油水平; 油红 O 染色检测细胞形态的变化; 观察葡萄糖消耗量检测 IR 模型的稳定性。采用油酸最佳诱导浓度及最佳作用时间建立 IR-HepG2 细胞模型, 研究不同剂量小檗碱、葛根素、黄芩苷和甘草苷对细胞葡萄糖消耗量、糖原含量、三酰甘油及细胞活力的影响。结果 油酸诱导 IR-HepG2 细胞模型最佳浓度 1 mmol/L, 最佳作用时间 24 h, 此时与对照组比较, HepG2 细胞肝糖原含量明显下降 ($P < 0.001$), 三酰甘油显著上升 ($P < 0.01$), 模型建立后可至少持续稳定 36 h 以上。与 IR 模型组比较, 给药干预 24 h 后, 不同浓度小檗碱 (5、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$)、黄芩苷 (1、5、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$)、葛根素 (20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 甘草苷显著增加葡萄糖消耗量 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。与 IR 组比较, 不同浓度小檗碱 (10、20、50 $\mu\text{mol/L}$)、黄芩苷 (20、50 $\mu\text{mol/L}$)、葛根素 (10、20、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 显著提高肝糖原含量 ($P < 0.001$); 甘草苷升高糖原含量但是差异不显著。与对照组比较, 除 160 $\mu\text{mol/L}$ 葛根素和 1 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷显著抑制细胞活力 ($P < 0.05$) 外, 其他组对细胞活力的影响均不显著。结论 1 mmol/L 油酸诱导 24 h 后能够建立稳定 IR-HepG2 细胞模型, 适合作为高脂饮食诱导 2 型糖尿病的体外肝 IR 细胞模型。小檗碱、黄芩苷和葛根素显著增加油酸诱导的 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量和糖原合成, 进而改善脂代谢诱发的肝 IR。

关键词: 胰岛素抵抗; HepG2 细胞; 小檗碱; 黄芩苷; 葛根素; 甘草苷; 油酸

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2017)10-1402-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.10.007

Optimization of oleic acid - induced insulin resistance HepG2 cell model and anti-hyperglycemic effect of berberine, baicalin, puerarin and liquiritin

ZHU Shui-lan¹, LI Yu^{1,3}, YAN Feng-dong², TU Jun¹

1. Jiangxi Province Key Laboratory of TCM Etiopathogenesis, Research Center for Differentiation and Development of TCM Basic Theory, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. Pharmacy Department, Pingxiang Maternal and Child Health-Care Hospital, Pingxiang 337000, China

Abstract: Objective To investigate the anti-hyperglycemic effect of the Chinese medicine ingredients such as berberine, baicalin, puerarin and liquiritin on the optimal insulin resistance (IR)-HepG2 cell model by oleic acid. It would provide the theoretical basis for the optimization of Chinese medicine prescription or anti-hyperglycemic components combination. **Methods** Different concentrations (0.1, 0.2, 0.5, and 1.0 mmol/L) of oleic acid were used to induce HepG2 cells for different time (24, 36 and 48 h), the glucose consumption was measured by glucose oxidase assay, and cell viability was detected by CCK-8 assay to define the optimal

收稿日期: 2017-06-05

基金项目: 国家自然科学基金 (81460621); 江西省自然科学基金重点项目 (20143ACB20010)

作者简介: 朱水兰, 硕士在读, 研究方向为中西医结合基础。E-mail: 604985245@qq.com

*通信作者 涂珺, 博士, 教授。E-mail: jtu2012@163.com

inducing concentration and time for IR-HepG2 cell model. Then the cell morphological changes were detected by oil red O staining. Finally, the stability of IR-HepG2 cell model was tested. After the IR-HepG2 model was optimally established, the glucose consumption, glycogen content and cell viability were detected after 24 h administration with different concentrations of berberine, baicalin, puerarin and liquiritin by anthrone method, glycerol phosphate oxidase assay and CCK-8 assay respectively. **Results** The optimal oleic acid-induced concentration was 1 mmol/L and the optimal induced time was 24 h for the IR-HepG2 cell model that could keep stable more than 36 h. Comparing with IR model group, berberine, puerarin and baicalin significantly increased the glucose consumption, whereas liquiritin did not show significant change in the glucose consumption except for 1 μ mol/L. Only 160 μ mol/L puerarin and 1 μ mol/L baicalin significantly inhibited IR-HepG2 cell viability. Moreover, berberine, puerarin, and baicalin significantly elevated the glycogen content; Liquiritin did not change glycogen content significantly. **Conclusion** The IR-HepG2 cell model could be stably established with 24 h treatment of 1 mmol/L oleic acid. Berberine, puerarin, and baicalin significantly increased the glucose consumption and glycogen content in the IR-HepG2 cells. The results suggest that berberine, baicalin and puerarin maybe perform different pathways of anti-hyperglycemic effects due to different incentives of IR.

Keywords: insulin resistance-HepG2 cell model; berberine; baicalin; puerarin; liquiritin; oleic acid

糖尿病是继肿瘤、心血管病变后全球第三大严重威胁人类健康的慢性疾病群^[1-3]。胰岛素抵抗 (Insulin resistance, IR) 是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的主要病理特征, 是贯穿多种代谢性疾病的主线。IR 是指胰岛素靶组织对胰岛素的敏感性和反应性降低^[4], 具体发病机制尚不明确。肝脏作为能量代谢的主要场所, 又是胰岛素的主要效应器官, 对血糖稳态至关重要。肝 IR 时, 肝糖原合成减少而分解加强, 肝糖输出增多, 促使空腹和餐后血糖升高。长期肝 IR 可诱发全身系统性 IR 进而形成 T2DM, 因而研究药物干预肝 IR 的降糖作用及相关机制为 T2DM 新药研发提供理论指导和用药依据。

近年来葛根芩连汤经方新用于 T2DM 临床疗效确切, 葛根为君药, 黄连、黄芩为臣药, 炙甘草为佐使^[5]。研究发现, 葛根芩连汤及方中多种药效成分如小檗碱、黄芩苷、葛根素和甘草苷等均具有降糖降脂、改善 IR 的药理作用^[6-7]。为了深入研究这些重要中药降糖成分改善肝 IR 的作用机制, 需要在体外建立稳定可靠的细胞模型, HepG2 细胞是体外研究肝 IR 机制的理想细胞^[8], 多采用胰岛素和/或地塞米松诱导糖代谢紊乱建立 IR-HepG2 细胞模型, 但这种模型不能模拟高脂食物诱发糖尿病的人体发病状况, 即体内脂代谢紊乱诱发糖代谢紊乱, 难以真实全面反映体内多重诱因的病理情况。本研究通过优化建立稳定可靠的油酸诱导 IR 细胞模型, 研究小檗碱、黄芩苷、葛根素和甘草苷对 IR-HepG2 细胞模型糖消耗量的改善作用, 并与已有胰岛素加地塞米松诱导模型降糖结果进行比较研究, 进一步理清及整合完善体外药效细节, 为深入理解这些中

药降糖成分的体内药效及作用机制提供参考。

1 材料

1.1 细胞

人肝癌细胞系 HepG2 细胞, 购于北京鼎国生物科技有限公司 (源于协和细胞库)。

1.2 药物及主要试剂

油酸 (批号 20131101, 质量分数 $\geq 99.9\%$, 天津市大茂化学试剂厂); 葛根素 (批号 150328, 质量分数 $\geq 98\%$)、黄芩苷 (批号 140302, 质量分数 $\geq 98\%$)、小檗碱 (批号 140502, 质量分数 $\geq 98\%$) 和甘草苷 (批号 140401, 质量分数 $\geq 98\%$), 均购自四川魏克奇生物科技有限公司; 葡萄糖测定试剂盒 (GOD-POD 法, 批号 361500, 上海荣盛生物药业有限公司); DMEM 高糖培养基 (批号 NAE1396, Hyclone 公司); 胰岛素 (Sigma 分装); 地塞米松 (批号 BCBC92609V, Sigma 公司); 细胞裂解液 (Thermo 公司, 批号 QL226664); 苯甲基磺酰氟 (PMSF, Solarbio 公司, 批号 20111018); Cell Counting Kit-8 (批号 JH620, 同仁化学研究所); 三酰甘油测定试剂盒 (批号 20160531)、糖原测定试剂盒 (批号 20141016), 均购于南京建成生物有限公司。

1.3 主要仪器

CKX41 倒置显微镜, OLYMPLUS Japan; SpectraMax Plus384 全波长酶标仪, Molecular Devices, USA。

2 方法

2.1 HepG2 细胞的培养

将冻存的 HepG2 细胞复苏后用含 15%FBS 的 DMEM 培养基转至细胞培养瓶中, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞接触性抑制后, 每 3 天用含

10%FBS 的 DMEM 培养基按 1:3 比例传代 1 次,待细胞复苏适应 2 周后,在对数生长期用于实验。

2.2 IR-HepG2 细胞模型的建立

在参考文献方法^[9-10]的基础上加以改进,将处于对数生长期的细胞消化后,用含 2% FBS 的 DMEM 培养基调整细胞浓度 $2 \times 10^5/L$,接种在 96 孔板上,待细胞单层贴壁后,对 HepG2 细胞分组,分为对照组和油酸 0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L 组。加入油酸 24 h 后,弃去培养液,先用 PBS 洗涤 2 次,再用含 2%胎牛血清的 DMEM 培养基 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 20 min;重复上述过程 1 次,最后用 PBS 洗涤 2 次,最后换上无血清的培养液孵育 24 h。葡萄糖测定试剂盒检测各组细胞培养上清液中葡萄糖含量,计算葡萄糖消耗量。

葡萄糖消耗量=DMEM 培养基葡萄糖含量-给药组葡萄糖含量

复制上述分组给药方案,换上无血清的 DMEM 培养基孵育 24 h 后,每孔加 10 μL CCK-8 测定液,孵育 1 h 后,酶标仪检测 450 nm 吸光度 (A_{450}) 值。

选择葡萄糖消耗量最小且不影响细胞活力的油酸作用浓度为最佳作用浓度。确定油酸最佳浓度后,再取油酸作用 24、36、48 h 时间点,检测葡萄糖消耗量及细胞活力,选择葡萄糖消耗量最小且不影响细胞活力的油酸作用时间为最佳作用时间。

2.3 细胞形态学观察

参照文献^[9]并加以改进,按照“2.2”项中培养方法,将单层贴壁后的细胞分为对照组和油酸组,采用“2.2”项中最佳给药浓度和诱导时间建立 IR 模型组,诱导成功后,弃培养液,用 PBS 清洗 2 次后对细胞进行油红 O 染色,倒置显微镜拍照观察细胞形态及染色情况。

2.4 细胞糖原及三酰甘油含量的测定

在参考文献^[11]方法的基础上加以改进,将处于对数生长期的细胞消化后,用含 2% FBS 的 DMEM 培养基调整细胞浓度 $2 \times 10^5/L$,接种在 24 孔板上,待细胞单层贴壁后,按照“2.3”项中分组及建模方法建立 IR 模型。用蒽酮法和三酰甘油氧化酶法检测细胞内糖原及三酰甘油含量,检测及计算方法按照说明书进行。

2.5 IR-HepG2 细胞模型稳定性研究

采用“2.2”项中最佳造模方法造模成功后,将对照组和 IR 模型组同时置于不含油酸的正常培养基中继续培养,每 12 h 用葡萄糖试剂盒检测上清液

葡萄糖含量,计算消耗量差值,直至两组葡萄糖消耗量无统计学差异,得出该模型稳定维持时间。

2.6 中药单体成分对 IR-HepG2 细胞模型影响

复制“2.2”项的 IR 模型,小檗碱、黄芩苷、葛根素和甘草苷(1、5、10、20、50 μmol/L)给药干预 IR-HepG2 细胞 24 h,2 mmol/L 二甲双胍作为阳性药,按说明书方法测定葡萄糖消耗量、糖原含量、细胞活力。

2.7 统计方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较用单因素方差分析(One-way ANOVA)及 Dunnett 多重比较 t 检验分析,由 Graphpad prism 6.0 统计软件完成并做图。

3 结果

3.1 不同浓度油酸作用 HepG2 细胞 24 h 后对葡萄糖消耗量及细胞活力的影响

结果显示,不同浓度的油酸对细胞葡萄糖消耗量都有所减弱,其中 0.5 和 1.0 mmol/L 浓度组葡萄糖消耗量显著下降($P < 0.05$ 、 0.001),而相应浓度的油酸对细胞活力没有明显的影响。因而选择葡萄糖消耗量最小且对细胞活力没有影响的 1 mmol/L 油酸浓度作为建模的最佳浓度。结果见表 1。

表 1 不同浓度油酸诱导 24 h 对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量和细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Glucose consumption and cell viability were detected respectively in HepG2 cells with 24 h treatment of different concentrations of oleic acid ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度/ (mmol·L ⁻¹)	葡萄糖消耗量/ (mmol·L ⁻¹)	A_{450}
对照	—	16.32±0.22	0.70±0.02
油酸	0.1	15.23±0.12	0.82±0.03
	0.2	15.22±0.42	0.78±0.04
	0.5	15.79±0.11*	0.78±0.01
	1.0	14.67±0.27***	0.62±0.04

与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group

3.2 1 mmol/L 油酸诱导 IR-HepG2 细胞建模的最佳作用时间

1 mmol/L 油酸分别诱导 24、36、48 h, HepG2 细胞葡萄糖消耗量均显著减少($P < 0.001$),但 36、48 h 细胞活力显著降低($P < 0.05$ 、 0.001),细胞死亡增多,只有 24 h 对细胞活力无明显影响,故选定 24 h 为油酸诱导 IR-HepG2 细胞的最佳建模时间。结果见表 2。

表2 不同时间油酸诱导后 HepG2 细胞消耗葡萄糖量和细胞活力测定 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Glucose consumption and cell viability detected respectively in HepG2 cells with treatment of 1 mmol/L oleic acid at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	24 h		36 h		48 h	
	葡萄糖消耗量/(mmol·L ⁻¹)	A ₄₅₀	葡萄糖消耗量/(mmol·L ⁻¹)	A ₄₅₀	葡萄糖消耗量/(mmol·L ⁻¹)	A ₄₅₀
对照	11.10±0.47	1.06±0.04	11.84±0.64	1.00±0.08	13.50±0.43	1.04±0.06
油酸	7.82±0.55***	1.02±0.06	9.62±0.21***	0.91±0.06*	9.52±0.47***	0.80±0.09***

与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group

3.3 IR-HepG2 细胞模型建立前后细胞形态学变化

如图1所示, 1 mmol/L 油酸诱导 HepG2 细胞 24 h 后, 油红染色发现, 模型组细胞内有明显红色, 说明 IR 细胞脂滴增多。

3.4 IR-HepG2 细胞模型糖原和三酰甘油的变化

1 mmol/L 油酸诱导 24 h HepG2 细胞后, 与对照组比较, IR-HepG2 细胞中糖原含量显著降低 ($P < 0.001$), 而三酰甘油含量显著增加 ($P < 0.01$)。结果见表3。

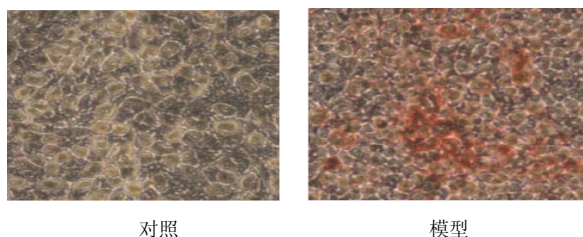


图1 IR-HepG2 细胞模型建立前后细胞形态学变化

Fig. 1 Cell morphology changes before and after establishment of IR-HepG2 cell model

3.5 1 mmol/L 油酸诱导 HepG2 细胞建模的稳定性研究

1 mmol/L 油酸诱导 24 h 后, HepG2 细胞葡萄糖消耗量与对照组比较明显减少, 提示建模成功。将对照组与 IR 模型组同时置于不含油酸的正常培养基中继续培养, 48 h 后两组差异消失, 结果表明 IR-HepG2 细胞模型至少能维持 36 h。结果见表4。

表3 1 mmol/L 油酸诱导 24 h 后 HepG2 细胞肝糖原及三酰甘油含量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Content of hepatic glycogen and triglyceride in HepG2 cells after 1 mmol/L oleic acid induced 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	糖原/(mg·g ⁻¹)	三酰甘油/(mmol·L ⁻¹)
对照	11.03±0.24	0.37±0.09
油酸	7.87±0.12***	0.69±0.07**

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

表4 1 mmol/L 油酸诱导 24 h 后 IR-HepG2 细胞模型稳定性 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Stability of IR-HepG2 cell model after 24 h treatment of 1 mmol/L oleic acid ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	葡萄糖消耗量/(mmol·L ⁻¹)				
	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
对照	9.39±0.18	11.16±0.41	13.04±0.47	14.20±0.37	15.67±0.35
油酸	4.64±0.32***	6.72±0.39***	9.29±0.27***	12.69±0.57**	15.14±0.70

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group

以上结果表明, 1 mmol/L 油酸诱导 24 h 能稳定建立脂糖代谢紊乱的 IR-HepG2 细胞模型, 模型稳定 36 h 以上, 用于后续中药成分的降糖作用研究。

3.6 中药单体成分对油酸诱导的 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量和细胞活力影响

在药物作用 24 h 后, 多个浓度小檗碱、黄芩苷和葛根素均能上调 IR-HepG2 细胞的葡萄糖消

耗量。与 IR 模型组比较, 5、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱显著增强细胞葡萄糖消耗量 ($P < 0.001$), 呈一定的剂量相关性; 1、5、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷均显著增加葡萄糖消耗量 ($P < 0.001$), 但无明显剂量相关性; 20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 葛根素显著增加葡萄糖消耗量 ($P < 0.05$), 但无明显剂量相关性。除 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度外, 甘草苷不能

改善 IR 模型的葡萄糖消耗量。与对照组比较,除 160 $\mu\text{mol/L}$ 葛根素和 1 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷明显抑制细胞活力 ($P < 0.05$) 外,其他组对细胞活力的影响均不显著,见表 5。

3.7 中药单体成分对 IR-HepG2 细胞糖原含量的影响

与 IR 模型组比较,5、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱,20、50 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷及 10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 葛根素能显著增加糖原合成量 ($P < 0.01$ 、 0.001),从另一个角度说明小檗碱、黄芩苷和葛根素具有改善糖代谢的作用;甘草苷一定程度增加糖原的合成,但效果不显著。结果见表 6。

4 讨论

T2DM 由多基因与环境相互作用诱发,其复杂发病机制已经成为医药领域的研究热点。研究费用高、长周期性及操作困难等原因制约了人体和动物体内机制研究及药物筛选实验的大量开展,因而建立 IR 细胞模型成为研究 T2DM 药物干预机制及体外筛选的快速有效方法。

HepG2 细胞株是从人肝胚胎瘤细胞分离出来的细胞株,有类似于正常肝细胞的代谢功能,其细胞膜表面表达高亲和力的胰岛素受体,被广泛作为研究 IR 机制的体外细胞模型。在已有 IR-HepG2 模型研究中,主要由糖代谢紊乱、脂代谢紊乱、炎症因子及衣霉素等诱导 IR 细胞模型,以胰岛素和地塞米松诱导 IR-HepG2 模型较为成熟常见^[12],但其无法完整模拟人体长期高脂食物诱发肥胖型糖尿病的发病状况。肥胖型糖尿病首先是脂代谢紊乱引发脂肪长期堆积,最终造成糖代谢紊乱,经典的胰岛素

表 5 不同浓度小檗碱、黄芩苷、葛根素和甘草苷对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量和细胞活力影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Glucose consumption and cell viability were detected respectively in IR-HepG2 cells with treatment of berberine, baicalin, puerarin and liquiritin at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	葡萄糖消耗量/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A_{450}
对照	—	11.03±0.24	0.81±0.03
模型	—	7.87±0.12 ^{###}	0.73±0.01
二甲双胍	2 000	9.73±0.40 ^{***}	0.79±0.02
小檗碱	1	7.58±0.01	0.82±0.09
	5	10.23±0.27 ^{***}	0.76±0.07
	10	11.29±0.25 ^{***}	0.75±0.09
	20	12.52±0.39 ^{***}	0.75±0.04
	50	13.10±0.16 ^{***}	0.78±0.04
葛根素	10	7.99±0.30	0.78±0.07
	20	8.38±0.12 [*]	0.78±0.08
	40	8.30±0.15 [*]	0.79±0.07
	80	8.11±0.64 [*]	0.71±0.06
	160	8.59±0.12 [*]	0.68±0.05 [#]
黄芩苷	1	9.14±0.93 ^{***}	0.69±0.02 [#]
	5	9.15±0.16 ^{***}	0.77±0.06
	10	9.46±0.28 ^{***}	0.81±0.07
	20	9.51±0.31 ^{***}	0.82±0.04
	50	9.70±0.12 ^{***}	0.79±0.03
甘草苷	1	8.29±0.17 [*]	0.79±0.07
	5	7.37±0.19	0.75±0.05
	10	7.18±0.12	0.83±0.07
	20	7.39±0.06	0.82±0.05
	50	7.49±0.14	0.77±0.09

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

^{***} $P < 0.001$

[#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

表 6 小檗碱、黄芩苷、葛根素、甘草苷对 IR-HepG2 细胞糖原合成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Glycogen was detected in IR-HepG2 cells with 24h treatment of berberine, baicalin, puerarin and liquiritin ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	小檗碱		黄芩苷		葛根素		甘草苷	
	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	糖原/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	糖原/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	糖原/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	糖原/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
对照	—	1.63±0.1 ^{***}	—	1.63±0.1 ^{***}	—	1.63±0.1 ^{***}	—	1.63±0.1 ^{***}
模型	—	0.99±0.01	—	0.99±0.01	—	0.99±0.01	—	0.99±0.01
二甲双胍	2 000	1.62±0.13 ^{***}	2 000	1.62±0.13 ^{***}	2 000	1.62±0.13 ^{***}	2 000	1.62±0.13 ^{***}
给药	1	1.11±0.05	1	0.83±0.07	10	1.32±0.06 ^{***}	1	1.09±0.12
	5	1.19±0.06 ^{**}	5	0.83±0.06	20	1.27±0.05 ^{***}	5	1.00±0.05
	10	1.41±0.05 ^{***}	10	1.00±0.05	40	1.22±0.03 ^{**}	10	0.97±0.11
	20	1.27±0.08 ^{***}	20	1.39±0.15 ^{***}	80	1.35±0.06 ^{***}	20	1.02±0.03
	50	1.33±0.06 ^{***}	50	1.31±0.13 ^{***}	160	1.29±0.11 ^{***}	50	1.15±0.03

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs control group

和/或地塞米松模型对其发病机制研究存在诸多局限。本课题组曾尝试了棕榈酸、软脂酸和油酸等多种脂类物质诱导脂代谢紊乱引发 IR-HepG2 细胞模型,油酸模型相对更为稳定且易操作。本实验经过测试发现,1 mmol/L 油酸诱导 24 h 可建立较为稳定 IR-HepG2 细胞模型,并可维持 IR 状态至少 36 h 以上。油酸诱导 IR-HepG2 细胞出现明显脂糖代谢紊乱,如葡萄糖消耗减少、肝糖原含量减少、三酰甘油明显增多,比胰岛素和/或地塞米松诱导的糖代谢紊乱更有效表征大部分糖尿病患者的体内情况,为药物降糖作用及 IR 机制研究提供了有效的体外肝 IR 细胞模型。

在此基础上,对油酸诱导建立的 IR-HepG2 细胞进行给药干预,发现不同浓度的小檗碱、黄芩苷和葛根素均增加 IR-HepG2 细胞摄糖量,并对细胞活力影响不大,这与以往小檗碱、黄芩苷和葛根素降糖作用的文献结果类似^[13-15],也与本课题组采用小檗碱与黄芩苷干预胰岛素加地塞米松诱导 IR-HepG2 细胞的量效结果基本一致;葛根素仍显著上调摄糖量;而除 1 μ mol/L 浓度外,甘草苷对 IR-HepG2 细胞摄糖量轻微升高但效果不显著;葛根素和甘草苷增加油酸诱导 IR-HepG2 细胞摄糖量明显不如胰岛素加地塞米松模型。在肝糖原检测中发现小檗碱、黄芩苷和葛根素均显著升高肝糖原含量,而甘草苷并不影响 IR-HepG2 细胞糖原含量。葛根素增加油酸诱导 IR-HepG2 细胞糖原合成优于胰岛素加地塞米松模型糖原合成,推测葛根素增强三酰甘油向糖原转化,结果提示葛根素在不同 IR-HepG2 细胞模型上可能采用了差异化的降糖机制达到类似降糖效应,表明中药成分葛根素降糖降脂药效的作用机制复杂性和脂代谢联动变化。

通过优化建立不同诱因的体外 IR 细胞模型,有助于厘清体内 IR 机制具体环节及中药成分协同干预 IR 机制,能够更针对性地指导中药复方及成分配伍研发及临床合理用药。

参考文献

- [1] Shen X, Vaidya A, Wu S, et al. The diabetes epidemic in china: an integrated review of national surveys [J]. *Endocr Pract*, 2016, 22(9): 1119-1129.
- [2] Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. *JAMA*, 2013, 310(9): 9948-9958.
- [3] 王小彦,王玉丽,徐为人. 近几年治疗糖尿病热点靶点的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2012, 35(1): 42-45.
- [4] 孙青,梁晓春. 中药改善 IR 的研究进展 [J]. *中国临床医生*, 2012, 40(10): 37-39.
- [5] Xu J, Lian F, Zhao L, et al. Structural modulation of gut microbiota during alleviation of type 2 diabetes with a Chinese herbal formula [J]. *ISME*, 2015, 9(3): 552-562.
- [6] 陈丽红,唐于平,王强. 葛根芩连汤的现代研究进展 [J]. *中草药*, 2010, 41(4): 676-680.
- [7] 章常华,马广强,邓永兵,等. 葛根芩连汤对 KK-Ay 糖尿病小鼠血浆中 LPS、TNF- α 、IL-6 及肠道菌群的影响 [J]. *中草药*, 2017, 48(8): 1611-1616.
- [8] 方飞,吴新荣,罗明俐,等. HepG2 细胞 IR 模型的建立及在筛选桑叶有效部位中的应用 [J]. *医药导报*, 2012, 31(6): 691-694.
- [9] 章斌,刘艳,张春风,等. 漏芦对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪累积的干预作用 [J]. *亚太传统医药*, 2013, 9(5): 10-12.
- [10] 龚受基,刘仲华,黄建华,等. 软脂酸诱导的 HepG2 细胞糖脂代谢紊乱及机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(10): 1383-1391.
- [11] 任新风,陆雪芬. 科罗索酸对 HepG2 细胞糖消耗以及细胞内糖原的影响 [J]. *药学进展*, 2011, 35(3): 129-132.
- [12] 张泽生,李雨蒙,张梦娜,等. 胰岛素抵抗细胞模型建立及药物评价的研究进展 [J]. *中国食品添加剂*, 2016, 10: 198-203.
- [13] 龚茜,李芬,邹欣,等. HepG2 细胞胰岛素抵抗模型建立及盐酸小檗碱改善胰岛素抵抗的实验研究 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(12): 1750-1754.
- [14] 刘志霞,韩淑英,李继安. 人肝癌细胞胰岛素抵抗模型建立及有效中药成分的筛选 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(28): 5241-5244.
- [15] 沈红燕,吴晓冬. 黄芩苷对大鼠脂肪细胞胰岛素抵抗的改善作用 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2011, 16(3): 263-269.