

β -肾上腺素能受体,激活腺苷酸环化酶,引起交感神经亢进,从而使心率加快,心肌负荷增加,诱发心室重构。过量的甲状腺素能激活肾素-血管紧张素系统(remin-angiotensin system, RAS)^[8],并提高儿茶酚胺的敏感性。

本实验结果揭示这两种模型动物出现全心和左心指数显著增加,心肌组织局部或循环 Ang I、ALD 浓度提高,说明造模成功。cAMP 是第二信使物质,主要参与心脏兴奋、肾脏保水等,它的浓度上升与交感兴奋有关。葶苈子水提物降低了小鼠血浆 cAMP 浓度,提示其可能具有抑制交感神经兴奋性作用。L-Thy 致心室重构大鼠模型中,葶苈子水提物降低了心肌组织 Ang I、血浆 ALD 和心肌 Hyp 的量,说明葶苈子水提物具有抑制 RAAS 神经内分泌因子和心肌纤维化作用,这可能是葶苈子水提物保护心肌,抑制心肌肥大、心室重构的作用机制之一。本实验结果提示,葶苈子有望成为一种有效的抑制心肌肥大、心室重构,进而防治慢性心衰发生与发展的药物。

References:

- [1] Wu X L, Huang D L. The effect of the aqueous extract of Tinglizi on the left ventricular function of dog [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 1998, 21(5): 243-245.
- [2] Zhao H, Zhao M, Rong Z, et al. The effect of Tinglizi prescription injection on pneumocardial disease and pulmonary hypertension during the acute stage of onset [J]. *J Emerg Syndromes Tradit Chin Med* (中国中医急症), 2002, 11(5): 330-331.
- [3] Shen J P, Li R F. The responsiveness of the fibroblasts from the myocardium-infarcted rats to angiotensin I [J]. *Chin J Arterioscler* (中国动脉硬化杂志), 2002, 10(2): 115-117.
- [4] Neumann S, Huse K, Semrau R, et al. Aldosterone and D-glucose stimulate the proliferation of human cardiac myofibroblasts *in vitro*. [J]. *Hypertension*, 2002, 39(3): 756-760.
- [5] Barr C S, Lang C C, Hanson J, et al. Effect of adding spironolactone to Angiotensin converting enzyme inhibitor in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease [J]. *Am J Cardiol*, 1995, 76(17): 1259-1265.
- [6] Lijin P, Petrov V. Induction of cardiac fibrosis by aldosterone [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32(3): 865-879.
- [7] Chen C X, Fang W X. Advance in research of animal models of cardiac hypertrophy and the effects of Chinese traditional herbs on cardiac hypertrophy [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(4): 299-302.
- [8] Ocaranza M P, Diaz-Araya G, Chiong M, et al. Isoproterenol and angiotensin I-converting enzyme in lung, left ventricle, and plasma during myocardial hypertrophy and fibrosis [J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 40(2): 246-254.

梓醇与小檗碱及其配伍对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞的影响

刘芳芳,杨明伟*,王晓强,王开富,陆付耳

(华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所,湖北 武汉 430030)

摘要:目的 观察梓醇与小檗碱及其配伍对地塞米松诱导的胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗、转运及这一过程中过氧化物增殖物激活受体(PPAR- γ) mRNA 表达的影响。方法 采用地塞米松诱导胰岛素抵抗细胞模型,分别给予罗格列酮、小檗碱、梓醇、梓醇+小檗碱进行干预,以葡萄糖氧化酶法检测培养液中葡萄糖消耗量,以 2-脱氧-[³H]-D-葡萄糖摄入法观察葡萄糖的转运率,以 RT-PCR 检测 PPAR- γ mRNA 的表达。结果 含或不含 10 nmol/L 胰岛素的条件下,梓醇、小檗碱及其配伍组胰岛素抵抗脂肪细胞的葡萄糖消耗量和转运率较模型组明显改善($P < 0.05, 0.01$),配伍组效应优于梓醇、小檗碱单药组($P < 0.05, 0.01$);且小檗碱组及配伍组 PPAR- γ mRNA 的表达降低($P < 0.05, 0.01$)。结论 梓醇、小檗碱均能增加葡萄糖消耗和转运,改善胰岛素抵抗,其作用不依赖胰岛素的存在,且小檗碱及两药配伍还能下调脂肪细胞 PPAR- γ mRNA 的表达水平,提示梓醇、小檗碱改善胰岛素抵抗的作用机制可能与罗格列酮不同。

关键词:梓醇;小檗碱;3T3-L1;葡萄糖消耗;葡萄糖转运;过氧化物增殖物激活受体(PPAR- γ) mRNA

中图分类号:R286.72

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)10-1523-04

Effect of catalpol, berberine, and their combination on insulin resistant 3T3-L1 adipocytes

LIU Fang-fang, YANG Ming-wei, WANG Xiao-qiang, WANG Kai-fu, LU Fu-er

(Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Affiliated Tongji Hospital,

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To study the effect of catalpol, berberine, and their combination on glucose

收稿日期:2007-01-04

基金项目:湖北省卫生厅中医药中西医结合课题

作者简介:刘芳芳(1981—),女,湖南衡阳人,在读研究生,研究方向为中西医结合内分泌专业。

Tel: (027) 83563304 Fax: (027) 83552220 E-mail: endocrinology027@yahoo.com.cn

* 通讯作者 杨明伟 Fax: (027) 83662148 E-mail: mwyang@tjh.tjmu.edu.cn

consumption and transportation of insulin resistant 3T3-L1 adipocytes induced by Dexamethasone, and expression of cell peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) mRNA. **Methods** Adipocyte insulin resistance (IR) model was induced with Dexamethasone and under the intervention of rosiglitazone, berberine, catalpol, and combination of catalpol and berberine. Glucose consumption of cells incubated with corresponding medicine was assayed with glucose oxidase method, glucose transporting rate was detected with measuring the uptake of [^3H] 2-DG, and PPAR- γ mRNA expression was tested with RT-PCR. **Results** With or without 10 nmol/L insulin, glucose consumption and transportation in catalpol, berberine, and the combination groups were significantly improved in comparison with the model ($P < 0.05$ and 0.01), the effect of the combination group was better than that of the single drug groups ($P < 0.05$ and 0.01). Adipocyte PPAR- γ mRNA expression was down-regulated in berberine and the combination groups ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** Both catalpol and berberine can increase the glucose consumption and transportation and improve IR. The actions are independent of insulin. Berberine can also down-regulate the expression of PPAR- γ mRNA, which indicates the mechanism of their improving IR may differ from that of rosiglitazone.

Key words: catalpol; berberine; 3T3-L1; glucose consumption; glucose transportation; peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) mRNA

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是糖尿病、肥胖、高血压病、高血脂症、冠心病等多种疾病的共同病理生理学基础。中医古代文献虽无 IR 的记载,但对于 IR 相关疾病的防治积累了丰富经验,尤其是对糖尿病的治疗,历代医家总结出了大量验方,其中,《千金要方》黄连丸(黄连,生地)备受关注。临床实践表明以黄连丸为基本方法治疗 2 型糖尿病具有良好疗效^[1],初步实验研究显示该方具有明显的降血糖作用^[2]。本研究通过建立胰岛素抵抗脂肪细胞模型,进一步观察黄连活性成分小檗碱,生地活性成分梓醇及两者配伍对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的影响,同时与过氧化物体增殖物激活受体 (PPAR- γ) 激动剂罗格列酮进行对照。

1 材料

3T3-L1 脂肪细胞株,购自武汉大学中国典型培养物保藏中心;盐酸小檗碱、梓醇为中国药品生物制品检定所产品;马来酸罗格列酮片,葛兰素史克天津有限公司产品;异丁基-甲基-黄嘌呤 (IBMX), Sigma 公司产品;地塞米松、胰岛素,Fluka 公司产品;高糖 DMEM 培养基, Gibco 公司产品;胎牛血清 (FBS), 杭州四季青公司产品;葡萄糖检测试剂盒,北京北化康泰临床试剂有限公司;牛血清白蛋白 (BSA), Roche 公司产品;2-脱氧- ^3H -D-葡萄糖,北京原子高科有限公司产品。

2 方法

2.1 受试药品的配制:梓醇,质量分数 99.9%,三蒸水溶解后制成母液,4℃ 冰箱保存,培养液中终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$;小檗碱,质量分数 99.9%,少量 DMSO (完全溶解所需最小剂量) 助溶后加三蒸水

制成母液,室温保存,培养液中终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 前脂肪细胞的培养和诱导分化:按文献所述方法^[3],将 3T3-L1 前脂肪细胞接种于 24 孔培养板,用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基在 37℃、5% CO_2 条件下培养,每 2 天换液。待细胞完全融合后继续接触抑制 2 d,换以含 0.5 mmol/L IBMX, 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松,1 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素的 10% FBS 高糖 DMEM 培养基培养 48 h,换以含 1 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素的培养基再培养 48 h,随后以 10% FBS 高糖 DMEM 培养基继续培养,分化 8~10 d 的细胞表现为成熟脂肪细胞表型,可用于实验。

2.3 葡萄糖消耗实验:将 24 孔板中诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞换入含 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松的完全培养基培养 20 h,另设空白对照组。给药组换以含 0.5% BSA 的无血清 DMEM 培养液孵育 12 h,随后换以含 0.5% BSA 及相应浓度药物的培养液培养 24 h,取每孔培养液,用葡萄糖氧化酶法检测其中的葡萄糖的量。以未接种细胞的空白复孔平均葡萄糖的量为基础值,该值减去每孔所测读数视为每孔葡萄糖消耗量。

2.4 葡萄糖转运实验:上述药物干预后的细胞移去培养液,以含 0.5% BSA 的 KRP 缓冲液 37℃ 条件下孵育 15 min,换以含或不含 10 nmol/L 胰岛素的 KRP 缓冲液继续孵育 20 min,加入 2-脱氧- ^3H -D-葡萄糖,终浓度为含 18.5 kBq/mL,37℃ 孵育 10 min,吸去液体,以预冷的 PBS 快速洗 3 次中止反应,加 0.1 mol/L NaOH 1 mL 作用 2 h,取细胞裂解液,加入闪烁液,液闪仪上测定读数。另设

一组加 10 $\mu\text{mol/L}$ 细胞松弛素 B, 检测 2-脱氧-[^3H]-D-葡萄糖的非特异性摄取量, 所有数据减去此值, 作为各孔细胞的葡萄糖摄取量^[4]。以不含胰岛素条件下空白对照组葡萄糖摄取量为基础值, 所有数据与该值的比为各孔葡萄糖转运率。

2.5 PPAR- γ mRNA 的检测: 采用 RT-PCR 法。3T3-L1 前脂肪细胞按上述方法分化并加药干预, 以 Trizol 抽提各组细胞的总 RNA。PPAR- γ 引物自行设计, 北京奥科生物技术公司合成。S: 5'-GACCACTCGCATTCCTTT-3'; A: 5'-CCACAG-ACTCGGCACTCA-3', 扩增片断长 266 bp; 内参照 β -肌动蛋白 (β -actin) 引物自行设计: S: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; A: 3'-TCC-ACCACCCTGTTGCTGTA-5', 扩增片断长 452 bp。PCR 条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 共 30 个循环, 然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 延伸。以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物。

2.6 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异显著性用多因素方差分析, 数据统计用 SPSS 13.0 软件。

3 结果

表 1 各组 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量和转运率 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Glucose consumption and transportation rate of 3T3-L1 lipocytes in each groups ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	C/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	葡萄糖消耗量/($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		葡萄糖转运率/%	
		不含胰岛素	含胰岛素	不含胰岛素	含胰岛素
空白对照	—	3.91 $\pm$ 0.11 Δ	6.28 $\pm$ 0.13 Δ	100 Δ	237.63 $\pm$ 26.48 Δ
模型	1	0.43 $\pm$ 0.04 Δ	1.56 $\pm$ 0.04 Δ	12.00 $\pm$ 3.12 Δ	44.25 $\pm$ 4.06 Δ
罗格列酮	5	0.50 $\pm$ 0.05 Δ	3.36 $\pm$ 0.15 Δ	16.50 $\pm$ 4.69 Δ	77.63 $\pm$ 14.40 Δ
小檗碱	5	2.01 $\pm$ 0.09 Δ	2.67 $\pm$ 0.07 Δ	49.50 $\pm$ 6.50 Δ	56.25 $\pm$ 6.65 Δ
梓醇	5	1.89 $\pm$ 0.07 Δ	2.46 $\pm$ 0.12 Δ	41.00 $\pm$ 5.61 Δ	51.50 $\pm$ 1.90 Δ
梓醇+小檗碱	5+5	2.41 $\pm$ 0.20 Δ	3.07 $\pm$ 0.18 Δ	59.38 $\pm$ 7.09 Δ	70.00 $\pm$ 6.05 Δ

与空白对照组比较: $\Delta P < 0.001$; 与梓醇+小檗碱组比较: $\Delta P < 0.001$

$\Delta P < 0.001$ vs blank control group; $\Delta P < 0.001$ vs berberine+catalpol group

等重复试验方差分析, 不同处理之间、胰岛素存在与否以及不同处理和胰岛素的交互作用对脂肪细胞葡萄糖转运率的作用差异均具有极显著意义 ($F_{\text{不同处理}} = 398.186$, $P < 0.01$; $F_{\text{胰岛素}} = 431.166$, $P < 0.01$; $F_{\text{交互作用}} = 98.783$, $P < 0.01$)。不同处理之间经多重比较, 空白对照组与其余各组差异均具有显著性意义 ($P < 0.001$); 小檗碱单药组和梓醇单药组差异无统计学意义, 梓醇+小檗碱组与梓醇单药组差异具有显著性意义 ($P < 0.001$) 而与小檗碱单药组差异无显著性意义, 同样, 将单用小檗碱和梓醇以及合用和模型组的数据提取出来, 进行了两种中药作用的方差分析, 分析结果显示: 葡萄糖转运在无胰岛素存在下, 两中药均存在交互作用 ($P < 0.01$), 两药合用时的转运率的均值最大, 效果最好, 说明这两种中药在

3.1 药物对脂肪细胞葡萄糖消耗的影响: 经双因素等重复试验方差分析, 不同处理之间、胰岛素存在与否以及不同处理和胰岛素的交互作用对脂肪细胞葡萄糖消耗的作用差异均具有极显著意义 ($F_{\text{不同处理}} = 2251.519$, $P < 0.01$; $F_{\text{胰岛素}} = 3354.657$, $P < 0.01$; $F_{\text{交互作用}} = 288.681$, $P < 0.01$)。不同处理之间经多重比较, 空白对照组与其余各组差异均具有显著性意义 ($P < 0.001$); 小檗碱单药组和梓醇单药组差异无统计学意义, 梓醇+小檗碱组与梓醇单药组差异具有显著性意义 ($P < 0.001$) 而与小檗碱单药组差异无显著性意义, 考虑是因为双因素分析中胰岛素与小檗碱的交互作用较明显, 从而掩盖了梓醇与小檗碱合用与小檗碱单用的差异, 因此进一步将单用小檗碱和梓醇以及合用和模型组的数据提取出来, 进行了两种中药作用的方差分析。分析结果显示: 葡萄糖消耗在无胰岛素存在下, 两中药均存在交互作用 ($P < 0.01$), 两药合用时的消耗的均值最大, 效果最好, 说明这两种中药在脂肪细胞葡萄糖消耗作用中存在协同作用。见表 1。

3.2 药物对脂肪细胞葡萄糖转运的影响: 经双因素

脂肪细胞葡萄糖转运作用中存在协同作用。见表 1。

3.3 药物对脂肪细胞 PPAR- γ mRNA 表达的影响: 3T3-L1 脂肪细胞总 RNA 经 RT-PCR 后的产物进行电泳, 与 Marker 比较, PCR 产物片断与预期结果 (266 bp) 一致。经灰度值扫描后得出: 与空白对照组相比, 罗格列酮组脂肪细胞 PPAR- γ mRNA 表达增多 ($P < 0.01$), 小檗碱组及梓醇+小檗碱组 PPAR- γ mRNA 表达减少 ($P < 0.05, 0.01$), 梓醇组与空白对照组无差异, 见图 1 和表 2。

4 讨论

脂肪组织是机体的主要胰岛素敏感组织之一, IR 时机体脂肪组织对葡萄糖吸收明显降低。目前关于 IR 细胞模型的建立大多采用 3T3-L1 脂肪细胞分别与不同的诱导因子共同培养诱导, 这些诱导因



1-空白对照组 2-模型组 3-罗格列酮组 4-小檗碱组
5-梓醇组 6-梓醇+小檗碱组
1-blank control group 2-model group 3-rosiglitazone group
4-berberine group 5-catalpol group
6-berberine+catalpol group

图1 各组 3T3-L1 脂肪细胞 PPAR- γ mRNA 的表达
Fig. 1 PPAR- γ mRNA expression of 3T3-L1 adipocytes in each group

表2 各组凝胶电泳产物灰度值 ($n=3$)
Table 1 Grayness value of gel electrophoresis in each groups ($n=3$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	灰度值
空白对照	—	0.101 $\pm$ 0.002
模型	1	0.198 $\pm$ 0.007**
罗格列酮	5	0.438 $\pm$ 0.032**
小檗碱	5	0.043 $\pm$ 0.003**
梓醇	5	0.108 $\pm$ 0.008
梓醇+小檗碱	5+5	0.079 $\pm$ 0.005*

与空白对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs blank control group

子主要包括:高胰岛素、高葡萄糖、游离脂肪酸、TNF- α 、IL-6、地塞米松、雌激素、葡糖胺等。本实验参照有关文献方法^[5],在正常培养 3T3-L1 脂肪细胞的基础上,采用地塞米松诱导建立 IR 脂肪细胞模型。实验结果显示:模型组葡萄糖消耗和转运较空白对照组明显降低,表明 IR 脂肪细胞模型建立成功,而罗格列酮、梓醇、小檗碱、梓醇+小檗碱组干预后,细胞 IR 均有不同程度的改善。值得注意的是:在有无胰岛素存在的条件下,梓醇、小檗碱及其配伍均能显著增加细胞对葡萄糖的消耗与转运,在本实验中,罗格列酮在不含胰岛素条件下虽略能显著增加葡萄糖消耗和转运,但在加入 10 nmol/L 胰岛素条件下其效应显著加强,上述现象提示罗格列酮增加葡萄糖消耗与转运的效应主要依赖于胰岛素的存在。而中药组的效应则不依赖胰岛素的存在,为此,推测其作用机制可能与胰岛素增敏剂罗格列酮有所不同,中药可能作用于胰岛素受体以外的其他受体或下游因子,最终影响葡萄糖转运子 4 (GLUT4) 的表达和转位,抑或两药通过胰岛素信号转导途径外的其他途径达到降血糖目的。梓醇、小檗碱配伍组效应优于单药组,提示两药合用有一定协同作用,为古方黄连丸以生地配伍黄连提供了科学依据。柯雅芳等^[6]报道,梓醇能与肾上腺素能受体 α_1 (adrenoreceptor α_1) 结合,而小檗碱目前被认为与

细胞的“小檗碱受体”结合,两药是否竞争细胞膜的同位点需要进一步的研究。

PPAR- γ 是一类由配体调节的核激素受体,其超生理活化与活性的中度缺失均与 IR 或 U 型曲线关系^[7]。在未注意到适当抑制 PPAR- γ 同样能改善 IR 这一现象之前,噻唑烷二酮类药物 TZD 被广泛运用于 2 型糖尿病的治疗中,其机制为 TZD 与 PPAR- γ 结合,激活 PPAR- γ 并进一步促进导致胰岛素敏感性提高的下游基因的转录,同时抑制 TNF- α 和 FFA 等导致 IR 的物质基因转录,从而达到改善机体 IR 的目的。但是同时,PPAR- γ 也刺激前脂肪细胞分化成为成熟脂肪细胞,导致肥胖的发生^[8]。长期使用 TZD 类药物,患者体重易增加,进而加重代谢紊乱,造成了治疗上的矛盾,尤其不利于预防 IR。因此,寻求既能改善 IR 又不增加体重的药物对于代谢性疾病的防治具有重要意义。

本实验检测了药物对 3T3-L1 脂肪细胞 PPAR- γ mRNA 的表达,结果表明,小檗碱及其与梓醇配伍均能下调 PPAR- γ mRNA 的表达,由此可见,与罗格列酮相比,中药组具有改善 IR 同时不易导致肥胖的优势,具有良好的应用前景。

References:

- [1] Wang Z L. Research of treating type I diabetes with *Radix Rehmanniae* and *Radix Coptis* Decoction [J]. *Acta Shandong Univ Tradit Chin Med* (山东中医药大学学报), 1995, 19 (3), 185-189.
- [2] Li Z, Ma G F. Experimental study on decoction of *Radix Rehmanniae* and *Radix Coptis* affecting fasting blood-glucose, serum insulin in mice with alloxan diabetes [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med* (辽宁中医杂志), 2000, 27 (12), 573.
- [3] Tamori Y, Masugi J, Nishino N. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes [J]. *Diabetes*, 2002, 51(7): 2045-2055.
- [4] Romero R, Casanova B, Pulido N. Stimulation of glucose transport by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes: increased abundance of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter proteins [J]. *Endocrinology*, 2000, 164: 187-195.
- [5] Anli K L, Marita A R. Troglitazone prevents and reverses dexamethasone induced insulin resistance on glycogen synthesis in 3T3 adipocyte [J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 130: 351-358.
- [6] Ke Y F, Zheng R T. Antihyperglycemic action of catalpol [A]. *Dissertation of Master Degree of Chenggong University* (成功大学硕士论文) [D]. Taiwan: Chenggong University, 2003.
- [7] Akiyama T E, Nicol C J, Gonzalez F J. On par with PPARs [J]. *Trends Genet*, 2001, 17: 310-312.
- [8] Kahrr B B, Flier J S. Obesity and insulin resistance [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106: 473-480.