

头花蓼体外降糖作用及机制研究

童南森, 吴梅佳, 王娟, 陈平, 黄绳武*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 311400

摘要:目的 研究头花蓼的降糖作用靶点。方法 采用人源肝癌 HepG2 细胞, 检测细胞经头花蓼提取物 (PCB) 作用后培养液上清中葡萄糖的量。采用 qRT-PCR 检测 PCB 对 HepG2 细胞过氧化物酶体增殖物激活受体- α (PPAR- α)、葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 基因表达的影响。采用与胰岛 β 细胞功能相似的大鼠胰岛细胞瘤 INS-1 细胞, 分为药物保护组和修复组, 检测 PCB 对链脲佐菌素 (STZ) 损伤的 INS-1 细胞的保护和修复作用。MTT 法检测 INS-1 细胞的增殖活力、生化法检测细胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 水平, Western blotting 法检测 INS-1 细胞 Cyt C、Caspase-3 蛋白表达水平。采用麦芽糖为底物的 α -葡萄糖苷酶抑制模型, 测定 PCB 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率。结果 PCB 显著促进 HepG2 细胞对上清中葡萄糖的吸收, 且显著上调 PPAR- α 、GLUT4 基因表达 ($P < 0.001$)。对 STZ 损伤的 INS-1 细胞的保护和修复实验中, 相比于模型组, PCB 组细胞活力显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001), 升高 SOD 水平, 降低 MDA 水平 ($P < 0.05$), 同时显著降低 Cyt C、Caspase-3 蛋白表达水平 ($P < 0.001$)。PCB 对 α -葡萄糖苷酶有抑制活性, IC_{50} 为 11.53 mg/mL。结论 PCB 可通过上调 PPAR- α 、GLUT4 基因表达促进 HepG2 细胞对上清中葡萄糖的吸收; 通过阻碍 Cyt C-Caspase-3 通路减少 STZ 损伤的 INS-1 细胞凋亡; 通过升高 SOD、降低 MDA 改善 INS-1 细胞氧化应激; 对 α -葡萄糖苷酶有抑制活性。

关键词: 糖尿病; 头花蓼; 过氧化物酶体增殖物激活受体- α ; 葡萄糖转运蛋白 4; α -葡萄糖苷酶; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)16-3401-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.16.024

Study on *in vitro* hypoglycemic effect and mechanism of *Polygonum capitatum*

TONG Nan-sen, WU Mei-jia, WANG Juan, CHEN Ping, HUANG Sheng-wu

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311400, China

Abstract: Objective To investigate the hypoglycemic targets of *Polygonum capitatum*. **Methods** Human liver cancer HepG2 cells were adopted to detect the supernatant culture medium glucose content, and the effect on PPAR- α and GLUT4 gene expression was investigated by qRT-PCR after treatment of *P. capitatum* extracts (PCB). INS-1 cells similar to islet β cells, divided into drug protection group and repair group, were adopted to determine the cell proliferation activity by MTT; The intracellular SOD and MDA levels were measured by biochemical method; The Cyt C and Caspase-3 protein expression levels were detected by Western blotting. Adopting maltose as substrate of α -glycosidase enzyme inhibition model, the inhibitory efficiency of PCB on glycosidic enzyme was determined. **Results** PCB group significantly promoted the absorption of HepG2 cells to supernatant glucose and increased the expression of PPAR- α and GLUT4 genes significantly. Aim at protection and repair of INS-1 cells, PCB group significantly increased cell vitality and SOD level, reduced MDA level compared with model group, and at the same time significantly reduced Cyt C and Caspase-3 protein expression levels. PCB had inhibitory activity to α -glycosidase enzymes, with IC_{50} of 11.53 mg/mL. **Conclusion** PCB could significantly increase the PPAR- α and GLUT4 genes expression to promote the absorption of HepG2 cells to supernatant glucose by blocking the Cyt C-Caspase-3 pathways to reduce apoptosis of islet cells which were damaged by STZ and by raising SOD and declining MDA to improve INS-1 cell oxidative stress; What's more it has inhibitory activity to α -glycosidase enzymes.

Key words: diabetes; *Polygonum Capitatum* Buch. -Ham. ex D. Don; PPAR- α ; GLUT4; α -glycosidase enzymes; apoptosis

糖尿病是一种慢性终生性疾病, 易伴随心、脑、管疾病之后, 威胁人类健康的第 3 大杀手。国际糖尿病联盟 (IDF) 最新数据显示, 2015 年全世界有

收稿日期: 2017-07-21

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LY16H280010)

作者简介: 童南森, 男, 硕士研究生, 主要从事药物新剂型与新技术研究。Tel: 15990043016 E-mail: 15990043016@163.com

*通信作者 黄绳武, 男, 硕士生导师, 教授, 研究方向为药物新剂型与新技术研究。Tel: (0571)86613524 E-mail: hsw55@163.com

4.15 亿糖尿病患者。其中在高收入国家, 2 型糖尿病占 85%~95%, 在低收入和中等收入国家, 糖尿病引起的直接死亡率超过 80%, 目前中国成人糖尿病患病率为 11.6%。随着糖尿病死亡人数和医疗费用支出日益增加, 预计到 2040 年, 全世界糖尿病患者人数将增长 55%, 达到 6.42 亿^[1-5]。

糖尿病发生发展的机制复杂, 目前还没有根治的特效药物。药物治疗主要是使用降糖药物使患者的血糖降低到合理的范围, 从而达到治疗糖尿病的目的。促进组织对葡萄糖的吸收、保护修复胰岛细胞、延缓胃肠道对葡萄糖的吸收是现今降糖药物研究的主要机制方向^[6]。目前, 上述 3 种作用机制的药物主要以化学药为主, 药物的不良反应较多^[7]。与之相比, 中药注重整体调节、标本兼治, 不良反应较少, 具有多成分多靶点的特性。

苗药头花蓼为蓼科植物头花蓼 *Polygonum capitatum* Buch. -Ham. ex D. Don 的干燥全草或地上部分, 具有清热利湿、解毒止痛、活血散瘀、利尿通淋的功效, 收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》2003 年版。已有研究表明头花蓼的化学成分主要为没食子酸、黄酮类、木脂素类化合物, 并含有挥发油等^[8-9]。现代药理研究表明其具有抗菌、抗氧化^[10]、镇痛、抗炎^[11]、利尿等多种药理活性, 以头花蓼作为主要原料的多种药物制剂已被国家标准收载并有多个发明专利, 如单方制剂热淋清颗粒收载于《中国药典》2015 年版^[12-13]。经前期实验证明头花蓼提取物 (PCB) 能显著降低四氧嘧啶损伤小鼠的血糖^[14], 为深入了解其降血糖机制, 本实验以 HepG2 细胞、INS-1 细胞、 α -葡萄糖苷酶^[15]为研究对象, 分别观察 PCB 作用后葡萄糖消耗及相关因子变化、氧化应激指标及相关凋亡蛋白表达变化, 以及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。

1 材料

1.1 实验细胞

HepG2 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院; INS-1 细胞购自上海博谷科技有限公司。

1.2 试剂

头花蓼药材 (批号 20130828, 浙江百草中药饮片公司) 经浙江中医药大学中药资源与鉴定教研室陈孔荣副教授鉴定为蓼科植物头花蓼 *Polygonum capitatum* Buch. -Ham. ex D. Don 的干燥全草或地上部分; PCB 为实验室自制; DMEM 培养液 (Gibco 公司); RPMI-1640 培养液 (Gibco 公司); 新生牛

血清 (FBS, 杭州四季青生物工程材料有限公司); MTT 试剂盒 (Amresco 公司); 胰蛋白酶 (Northend 公司); PBS (杭州吉诺生物医药技术有限公司); DMSO (Sigma 公司); 罗格列酮 (RGZ, 批号 12100034, 太极集团有限公司); 葡萄糖酶法测定试剂盒 (上海荣盛生物药业有限公司); 2XUltra SYBR Mixture、逆转录试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司); 小鼠单克隆 Cyt C 抗体、Caspase-3 抗体 (上海碧云天生物技术有限公司); TR 标记荧光二抗 (兔抗)、FITC 标记鼠抗 (Santa Cruz 公司); 过硫酸铵 (APS, Sigma 公司); Tris-base、甘氨酸 (Gly) 购自 Amresco 公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS, 西陇化工股份有限公司); NaCl、KCl (国药集团化学试剂有限公司); 脱脂奶粉 (Sigma 公司); 聚山梨酯-20 (成都西亚试剂有限公司); 凋亡试剂盒 (BD 公司); 超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); Trizol (Invitrogen 公司); 凯基全蛋白提取试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司); BCA 蛋白测定试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司); α -葡萄糖苷酶 (瑞阳生物科技有限公司); 链脲佐菌素 (STZ, Sigma 公司); 麦芽糖 (上海源叶生物科技有限公司); 蛋白 Marker (Thermo Scientific 公司); D101 树脂、AB-8 树脂 (上海开平树脂有限公司); 纯化水 (自制)。

1.3 仪器与耗材

CKX31 荧光倒置显微镜 (Olympus 公司); 311 恒温 CO₂ 培养箱 (Thermo 公司); 1658001 电泳槽、Odyssey CLx 红外激光双色成像系统 (Bio Rad 公司); SW-CJ-1FD 超净工作台 (AirtechI 公司); Multiskan MK3 酶标仪 (Thermo Fisher 公司); 低速离心机 (Eppendorf 公司); TGL-16M 高速冷冻离心机 (Beckman Coulter 公司); IMS-25 全自动制冰机 (Xueke 公司); TS-1 水平脱色摇床 (Kylin-bell 公司); GD603 电子天平 (Sartorius 公司); MLS-3750 蒸汽灭菌锅 (Sanyo 公司); ND-2000 超微量分光光度计 (Thermo 公司); Mastercycler nexus 普通 PCR 仪 (Eppendorf 公司); 7500 荧光定量 PCR 仪 (Life technologies 公司); 八连管 (Axygen 公司); PVDF 膜 (Millipore 公司)。

2 方法

2.1 PCB 制备

取头花蓼药材粗段以料液比 1 : 24, 用 80%乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h, 首次提取前浸泡药材

0.5 h, 合并浓缩滤液, 回收乙醇。醇提后药渣加 15 倍水回流提取 2 次, 首次补加 4 倍水, 提取 1.5 h, 第 2 次提取 1 h, 合并浓缩水提液。醇提液以总黄酮/药材为 4.890 mg/g 上样于 D101 树脂纯化; 水提液以生药量 0.5 g/mL 上样, AB-8 树脂纯化后, 混合醇提纯化液, 干燥得到浸膏。浸膏中总黄酮量为 11.25%, 总多糖量为 41.08%。

2.2 PCB 促进 HepG2 细胞葡萄糖吸收机制研究

2.2.1 细胞培养 取 HepG2 细胞复苏后用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液转入培养瓶, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 根据细胞生长情况, 1~2 d 换液 1 次, 待细胞 70%~80% 融合时倾去培养基, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 按 1:2~1:3 传代, 取对数生长期的细胞用于实验。

2.2.2 葡萄糖消耗实验 HepG2 细胞长至对数生长期时将其消化转至 6 孔培养板中继续培养, 贴壁 24 h 后加入含中等有效质量浓度的 PCB (经前期 MTT 实验筛选为 100 mg/L) 的培养液及阳性药 RGZ (10 mg/L), 作用 24 h 后检测上清中葡萄糖的量。

2.2.3 HepG2 细胞总 RNA 提取 待“2.2.2”项下细胞上清葡萄糖量测定完后倒出培养液, 用 PBS 清洗 1 次。转入 1.5 mL EP 管中, 离心后加入 1.0 mL Trizol, 用移液枪反复吹打直至细胞裂解液中无明显沉淀, 室温静置 5 min。然后加入 0.2 mL 氯仿, 盖紧离心管盖, 用力震荡 30 s。待充分乳化溶液呈乳白状后, 在室温静置 10 min, 12 000 r/min、4 °C 离心 20 min, 从离心机中小心取出离心管, 吸出上清液转入新的离心管 (RNA free) 中, 向上清中加入等体积的异丙醇, 上下颠倒离心管充分混匀, 在 -20 °C 静置 30 min。12 000 r/min、4 °C 离心 15 min。小心弃去上清, 缓慢地沿离心管壁加入 75% 乙醇 1 mL, 轻轻上下颠倒洗涤离心管壁, 12 000 r/min、4 °C 离心 5 min 后小心弃去乙醇。室温干燥沉淀, 加入 40 μL DEPC 水溶解沉淀, 超微量分光光度计测定 RNA 量后用于后续实验。

2.2.4 qRT-PCR 检测 HepG2 细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体-α (PPAR-α)、葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 基因表达量 根据 Genbank 公布的人类 PPAR-α、GLUT4 和肌动蛋白 (β-actin) mRNA 序列, 使用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计引物, 上海生工生物工程技术有限公司合成。β-actin: 上游 5'-GAGCGGGAAATCGTGCGTGAC-3', 下游 5'-GCCTAGAAGCATTTGCGGTGGAC-3', 扩增产

物 518 bp; PPAR-α: 上游 5'-TGTGGCTGCTATCA-TTGCTGTGG-3', 下游 5'-CTCCCCCGTCTCCTT-TGTAGTGC-3', 扩增产物 344 bp; GLUT4: 上游 5'-TCTCCAACCTGGACGAGCAAC-3', 下游 5'-CAG-CAGGAGGACCGCAAATA-3', 扩增产物 101 bp。

取总 RNA 各 1 μg, 按试剂说明书组成 20 μL 逆转录反应体系, 合成 cDNA 第 1 链。PCR 20 μL 反应体系: 2×Ultra SYBR Mixture 10 mL, 上游引物 10 μmol/L、下游引物 10 μmol/L 各 0.5 μL, cDNA 1 μL, 加 DEPC 水至 20 μL。qRT-PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环后, 72 °C 最后延伸 7 min。

2.3 PCB 对 STZ 损伤的 INS-1 细胞的保护和修复作用

2.3.1 细胞培养 待 INS-1 细胞复苏后用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液转入培养瓶, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 根据细胞生长情况, 1~2 d 换液 1 次, 待细胞 70%~80% 融合时倾去培养基, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 按 1:2~1:3 传代, 取对数生长期的细胞用于实验。

2.3.2 MTT 法检测 INS-1 细胞增殖 INS-1 细胞长至对数生长期时消化并移至 96 孔板, 贴壁 24 h 后, 对照组加 RPMI-1640 培养液; 修复组先加入 3 mmol/L 的 STZ 作用 12 h, 再弃去上清液加入含不同质量浓度 PCB (50、100、200 mg/L) 或 RGZ (10 mg/L) 的 RPMI-1640 培养液继续孵育 12 h; 保护组加入不同质量浓度 PCB (50、100、200 mg/L) 或 RGZ (10 mg/L) 混合 3 mmol/L STZ 作用 12 h; 模型组加入 3 mmol/L STZ 作用 12 h。待药物作用结束, 每孔加入 20 μL、5 mg/mL MTT 溶液作用 4 h, 小心吸弃上清液, 加入 150 μL DMSO 溶解结晶, 于 492 nm 下测定吸光度 (A) 值。

2.3.3 WST-8、TBA 法检测 INS-1 细胞内 SOD 及 MDA 的量 INS-1 细胞长至对数生长期时消化移至 6 孔板中。对照组加 RPMI-1640 培养液; 修复组先加入 3 mmol/L STZ 作用 12 h, 再弃去上清液加入含 PCB (100 mg/L) 或 RGZ (10 mg/L) 的 RPMI-1640 培养液继续孵育 12 h; 保护组加入 PCB (100 mg/L) 或 RGZ (10 mg/L) 混合 3 mmol/L STZ 作用 12 h; 模型组加入 3 mmol/L STZ 作用 12 h。收集细胞, 经 RIPA 裂解液裂解后, 采用 WST-8 法检测胞内 SOD 的量及 TBA 法检测胞内 MDA 的量。

2.3.4 流式细胞仪检测 INS-1 细胞凋亡 实验分组

同“2.3.3”项下,将细胞收集后,PBS清洗3次,分别加入5 μL 的PI和FITC-Annexin V,室温避光反应15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡。

2.3.5 Western blotting 法检测 INS-1 细胞中 Cyt C、Caspase-3 蛋白表达水平 实验分组同“2.3.3”项下,在6孔板中培养细胞,待药物孵育后将细胞消化至1.5 mL离心管中,PBS清洗3次,加入500 μL RIPA细胞快速裂解液,冰上剧烈摇晃至完全裂解,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心15 min,取上清,用BCA法检测蛋白量。取30 μg 样品上样,12% SDS-PAGE电泳,切胶,湿法转膜仪80 V冰上转膜2 h至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,TBST清洗3遍,分别加入兔抗人 β -actin(1:10 000稀释)、Caspase-3(1:200稀释)、鼠抗人Cyt C(1:200稀释)一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,回收一抗,TBST清洗3次,每次5 min,随后分别加入荧光二抗扫膜,计算灰度值,目的条带与内参条带灰度比值为各目的蛋白相对表达量。

2.4 PCB对 α -葡萄糖苷酶抑制作用

以麦芽糖为底物,在离心管中加入10 g/L α -葡萄糖苷酶40 μL 和含不同质量浓度的PCB(2、5、11、22、44、88、176 mg/mL)及阳性药阿卡波糖(0.062 5、0.125、0.25、0.5、1 mg/mL)各40 μL ,对照组加入40 μL α -葡萄糖苷酶溶液和40 μL 水,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应5 min,再加入120 μL 28 mmol/L麦芽糖溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应30 min,加入50 μL 0.2 mmol/L Na_2CO_3 溶液终止反应,混匀后,取上清依据葡萄糖试剂盒说明测定葡萄糖量(Glu),计算抑制率及半数抑制浓度(IC_{50})值。

$$\text{抑制率} = (\text{Glu}_{\text{对照}} - \text{Glu}_{\text{药物}}) / \text{Glu}_{\text{对照}}$$

2.5 数据处理

采用SPSS 17.0软件进行统计学处理,组间显著性差异采用单因素方差分析法,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用GraphPad Primer 5软件进行图像绘制。

3 结果

3.1 PCB促进HepG2细胞葡萄糖吸收机制研究

3.1.1 PCB对HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响 由图1可知,与对照组相比,PCB组细胞上清液中葡萄糖的量显著降低,说明PCB可显著促进细胞对上清液中葡萄糖的摄取。

3.1.2 PCB对HepG2细胞中PPAR- α 、GLUT4基因表达量的影响 由图2可知,与对照组比较,阳性药PGZ组细胞中葡萄糖消耗相关基因PPAR- α 、

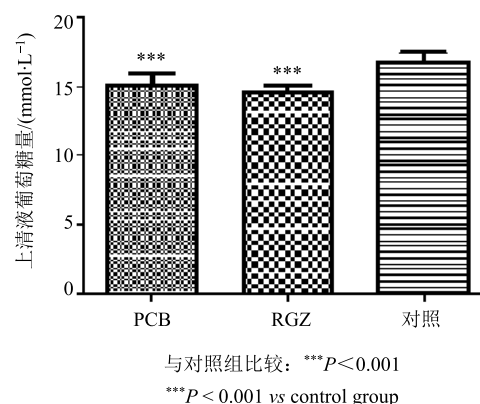


图1 PCB对HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Effects of PCB on Glu consumption of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

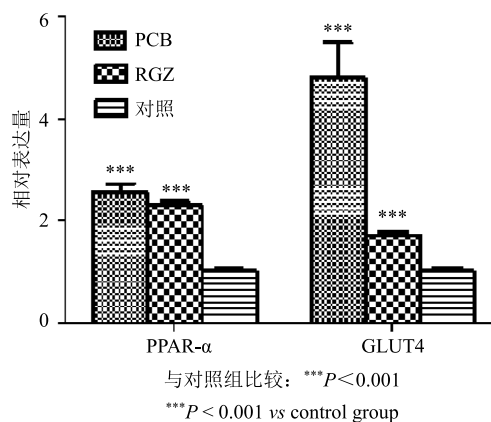


图2 PCB对HepG2细胞PPAR- α 、GLUT4基因表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effects of PCB on PPAR- α and GLUT4 genes expression of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

GLUT4表达均显著上调($P<0.001$),而PCB 100 mg/L可极显著地上调PPAR- α 、GLUT4的表达($P<0.001$)。

3.2 PCB对STZ损伤的INS-1细胞的保护和修复作用

3.2.1 PCB对STZ损伤的INS-1细胞增殖的影响 结果如表1所示,与模型组比较,含PCB的各实验组均可显著增加INS-1细胞增殖活力,且PCB 200 mg/L+STZ组与对照组相比无差异,可见PCB在此质量浓度下可有效地防止STZ对INS-1细胞的损伤。

3.2.2 PCB对STZ损伤的INS-1细胞内SOD及MDA量的影响 如表2所示,模型组中SOD的量显著降低,MDA的量显著升高,表明细胞经STZ氧化损伤后胞内出现氧化应激反应。PCB+STZ组与模型组相比可显著增加SOD的量,降低MDA的

表 1 PCB 对 STZ 损伤的 INS-1 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effects of PCB on proliferation of STZ damaged INS-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	A 值
对照	1.81±0.16
模型	1.27±0.16***
STZ+PCB 200 mg·L ⁻¹	1.61±0.14####
STZ+PCB 100 mg·L ⁻¹	1.52±0.24####
STZ+PCB 50 mg·L ⁻¹	1.36±0.28**
STZ+RGZ	1.77±0.14###
PCB 200 mg·L ⁻¹ +STZ	1.73±0.21###
PCB 100 mg·L ⁻¹ +STZ	1.54±0.14####
PCB 50 mg·L ⁻¹ +STZ	1.52±0.16####
RGZ+STZ	1.86±0.33###

与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与模型组比较: #### $P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; #### $P<0.001$ vs model group

表 2 PCB 对 STZ 损伤的 INS-1 细胞内 SOD、MDA 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of PCB on SOD and MDA in STZ damaged INS-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
对照	59.80±2.64	4.19±0.21
模型	48.70±3.01*	7.68±0.06*
STZ+PCB 100 mg·L ⁻¹	68.70±2.63	3.86±0.63 [#]
STZ+RGZ	82.20±3.12 [#]	2.42±0.10 ^{##}
PCB 100 mg·L ⁻¹ +STZ	77.30±0.86 [#]	3.78±0.61 [#]
RGZ+STZ	78.80±1.43 [#]	3.14±0.44 ^{##}

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

量,有效地防止细胞内氧化应激反应;STZ+PCB 组与模型组相比,MDA 量显著降低,SOD 量无明显增加。

3.2.3 PCB 对 INS-1 细胞凋亡率的影响 结果如表 3 所示,模型组凋亡率显著增加,表明 STZ 氧化损伤可导致 INS-1 细胞凋亡。与模型组比较,PCB、RGZ 保护组及修复组可有效抑制由 STZ 损伤引起的凋亡。

3.2.4 PCB 对 INS-1 细胞中 Cyt C、Caspase-3 蛋白表达水平的影响 结果如图 3 所示,与对照组相比,模型组中的 Cyt C、Caspase-3 蛋白表达均显著增加,表明 STZ 损伤的 INS-1 细胞的凋亡通路中 Cyt C-Caspase-3 激活,可导致细胞凋亡增加。与模型组

表 3 PCB 对 INS-1 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of PCB on apoptosis rate of INS-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	凋亡率/%
对照	2.60±0.49
模型	9.50±0.98*
STZ+RGZ	3.30±1.12###
STZ+PCB 100 mg·L ⁻¹	4.80±2.21 [#]
PCB 100 mg·L ⁻¹ +STZ	3.30±2.11 [#]
RGZ+STZ	3.00±2.00 [#]

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

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

相比,给予 RGZ 或 PCB 后,在损伤前(保护)及损伤后(修复)均有效抑制 2 种蛋白的表达,即抑制 Cyt C-Caspase-3 通路,抑制由 STZ 氧化损伤引起的凋亡。

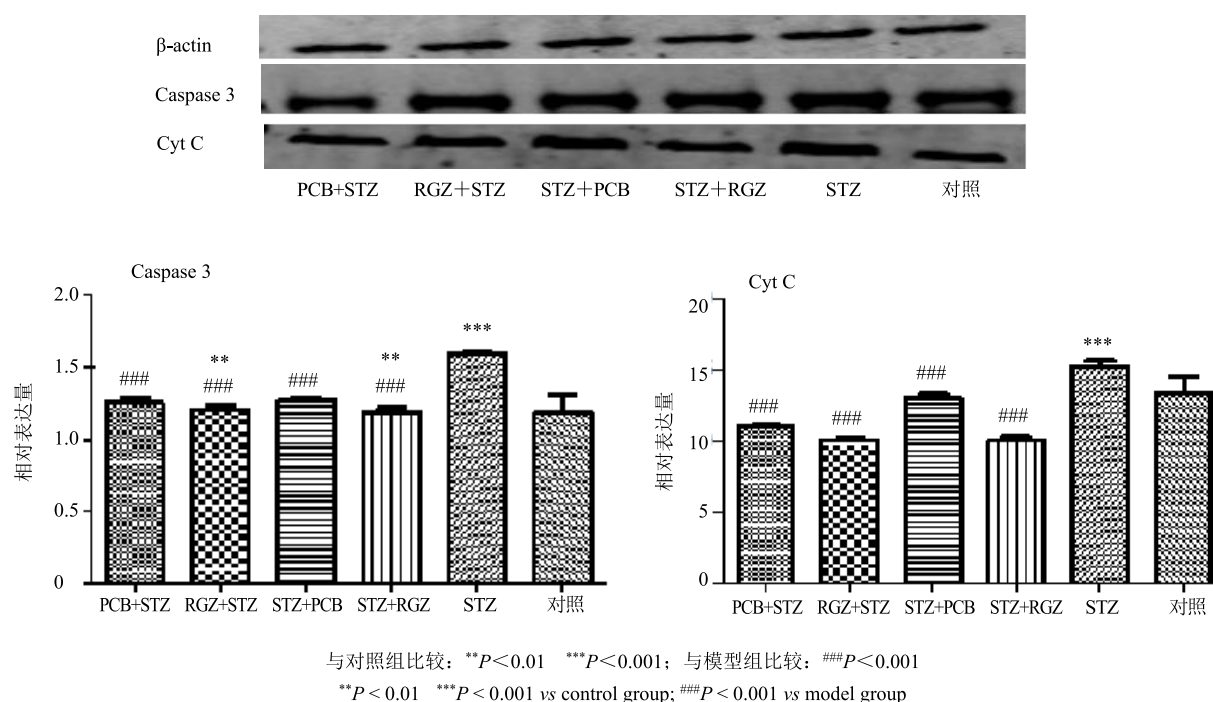
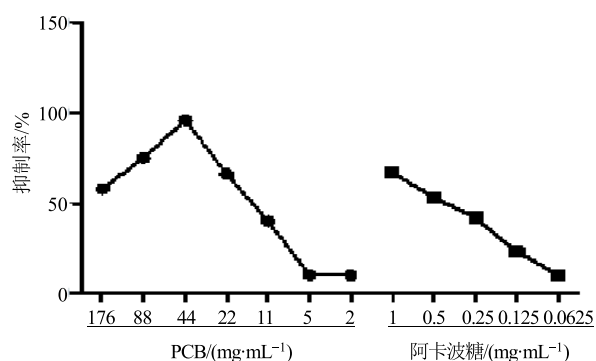
3.3 PCB 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

结果如图 4 所示,随着 PCB 质量浓度的提高,对 α -糖苷酶活性的抑制率随之提高,当质量浓度达到 44 mg/mL 时抑制率达到 96%,之后抑制率不再上升,说明 PCB 对酶的抑制活性在一定质量浓度范围内呈现明显的剂量效应关系,经 Grapad prism 5 计算 PCB 对 α -葡萄糖苷酶的 IC₅₀ 为 11.53 mg/mL,阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的 IC₅₀ 为 173.3 μ g/mL。

4 分析与讨论

4.1 PCB 促进 HepG2 细胞吸收上清葡萄糖

HepG2 细胞是人肝癌细胞株,来源于肝脏又保留了正常肝细胞的基本生物特性,其表面表达高亲和力的胰岛素受体,满足典型胰岛素受体所要求的标准^[16],包括葡萄糖摄取、糖原合成酶的活性、脂类生成及 RNA 合成。将其置于高浓度胰岛素中可产生胰岛素抵抗,与正常细胞相比,抵抗细胞的胰岛素受体减少了 56%^[17]。RGZ 是治疗糖尿病的一种常规药物,对 PPAR 具有高选择性、强效激动性,提高靶组织对胰岛素的敏感性而有效地降糖^[18]。经前期实验结果可知,PCB 不仅可以增加胰岛素抵抗状态的 HepG2 细胞对葡萄糖的摄取,还可增加非胰岛素抵抗的 HepG2 细胞对葡萄糖的摄取,为了更加清楚地阐明 PCB 的药理作用,采用未造成胰岛素抵抗的 HepG2 细胞进行相关基因表达影响实验。PPAR- α 活化后,促进三酰甘油分解为脂肪酸,促进肝脏摄取脂肪酸,进而促进脂肪酸的氧化,改善

图 3 PCB 对 INS-1 细胞中 Cyt C、Caspase-3 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 Effects of PCB on expression levels of Cyt C/ β -actin and Caspase-3/ β -actin in INS-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)图 4 PCB 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率Fig. 4 Inhibition rate of PCB to α -glucosidases

机体的胰岛素抵抗^[19]; 葡萄糖的跨膜转运是机体糖代谢的限速步骤, GLUT4 在细胞经胰岛素刺激后由细胞内的囊泡中转移至细胞膜上, 且活性增加, 加强对葡萄糖的转运速度。PCB 通过上调 PPAR- α 、GLUT4 基因可促进 HepG2 细胞对葡萄糖的吸收^[20], 作为中药混合物, 其中某些成分起到和 RGZ 相同的降糖作用, 其有效成分有待进一步确定。

4.2 PCB 对 STZ 氧化损伤的 INS-1 细胞的保护和修复作用

氧化应激是指机体内活性氧 (ROS) 产生过多和清除减少, 引起多种分子、细胞和组织的损伤。

在一些病理状态下, 当体内 ROS 产生增多时会损伤蛋白质、脂质、核酸等大分子物质, 引起很多有害的改变。越来越多的研究表明氧化应激反应增强存在于糖尿病的发生、发展中。MDA 是脂质过氧化产物, 反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度, SOD 活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力^[21]。Caspase 家族作为细胞凋亡必须经过的要塞, 其主要途径是线粒体途径。线粒体是进行能量代谢的场所, 在胰岛素合成与分泌中起到重要作用, 线粒体产生的 ATP 是细胞代谢的能量来源。多种因素引起的凋亡因子作用于线粒体, 引起线粒体膜的通透性增加并开放转运通道, 线粒体融合和分裂的动态平衡被打破, 细胞液进入线粒体基质中, 引发肿胀促使线粒体外膜破裂, 释放出凋亡因子 Cyt C, 激活 Caspases 家族的级联反应, 从而诱导细胞凋亡^[22-23]。

实验表明, STZ 损伤后的 INS-1 细胞中 MDA 显著增加, SOD 显著降低, 且 Cyt C、Caspase-3 蛋白表达增高, 提示 STZ 可能通过胰岛细胞脂质过氧化损伤、抑制胰岛细胞抗氧化能力, 导致自由基清除障碍, 同时激活 Cyt C-Caspase-3 细胞凋亡信号, 从而导致细胞活力下降, 凋亡率升高。在 PCB 保护组中预先加入 PCB, MDA 水平显著降低, SOD 水

平显著升高,提示PCB能有效保护STZ引起的胰岛细胞损伤,并使胰岛细胞活力有所恢复。Cyt C、Caspase-3蛋白表达量较模型组显著降低,提示细胞凋亡率的下降可能是通过抑制Cyt C-Caspase-3通路实现。在PCB修复组中,在STZ损伤胰岛细胞后再加入PCB,STZ所致的细胞活力降低、MDA表达量增高、Cyt C、Caspase-3蛋白表达量增高均较模型组有显著改善,提示PCB对STZ所致的细胞损伤有一定程度的修复作用。但是SOD水平无明显增高,表明PCB不能提高已损伤的胰岛细胞的抗氧化能力,且各指标数值显示PCB保护组较修复组效果更明显,提示PCB对胰岛细胞的作用更偏向于保护。

阳性药RGZ在保护修复胰岛细胞中也有显著效果,可显著提高SOD、降低MDA水平,在损伤前(保护)及损伤后(修复)均有效抑制Cyt C、Caspase-3蛋白的表达量,进一步证明RGZ不仅为PPAR- α 激动剂,也可通过抑制Cyt C-Caspase-3通路对胰岛细胞进行保护和修复,对胰岛细胞的保护修复作用显著。

4.3 体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性

PCB对 α -葡萄糖苷酶的IC₅₀为11.53 mg/mL,相比于RGZ的抑制效果并不理想,需提高给药剂量,推测在高剂量下PCB与 α -葡萄糖苷酶形成竞争抑制效应可能是其发挥降血糖的途径之一。

参考文献

- [1] IDF Diabetes Atlas Group. IDF diabetes atlas-7th edition [EB/OL]. (2015-12-01) [2016-02-08]. <http://www.Diabetesatlas.org/>.
- [2] 张伟华,冯兴中.糖尿病合并抑郁症的中医药治疗概况[J].中华中医药杂志,2016,31(4):1374-1376.
- [3] Ruddock J S, Poindexter M, Gary-Webb T L, et al. Innovative strategies to improve diabetes outcomes in disadvantaged populations [J]. *Diabet Med*, 2016, 33(6): 723-733.
- [4] 王月,王涛,吴建霞,等.金芪降糖片组分体外抗糖尿病的作用及机制[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(16):105-109.
- [5] 吴萍,刘乃丰.2型糖尿病患者降糖药物用药依从性和糖化血红蛋白水平的相关性研究[J].中国药理学杂志,2017,52(3):240-243.
- [6] 王靖茹.番石榴叶三萜化合物对INS-1胰岛细胞增殖、胰岛素分泌和氧化损伤的影响及其作用机制[D].广州:暨南大学,2013.
- [7] Ruiz E, Redondo S, Gordillo-MoscOSO A, et al. Pioglitazone induces apoptosis in human vascular smooth muscle cells from diabetic patients involving the transforming growth factor-beta/activin receptor-like kinase-4/5/7/Smad2 signaling pathway [J]. *J Pharm Exp Ther*, 2007, 321(2): 431-438.
- [8] 王洪平,曹芳,杨秀伟.头花蓼地上部分的化学成分研究[J].中草药,2013,44(1):24-30.
- [9] 赵焕新,白虹,李巍,等.头花蓼木脂素类化学成分研究[J].中药材,2010,33(9):1409-1411.
- [10] 刘志军,戚进,朱丹妮,等.头花蓼化学成分及抗氧化活性研究[J].中药材,2008,31(7):995-998.
- [11] 李勇军,骆宏丰,王永林,等.头花蓼黄酮类化学成分的研究[J].中国药理学杂志,2007,31(4):370-371.
- [12] 徐英春,张小江,谢秀丽,等.热淋清颗粒对淋病奈瑟球菌体外抑菌活性的研究[J].临床泌尿外科杂志,2001,16(6):287.
- [13] 孙佳,梅朝叶,向文英,等.头花蓼有效组分在大鼠粪便和胆汁中的代谢研究[J].中草药,2016,47(18):3248-3264.
- [14] 谢红梅.PCB降糖片的药学研究[D].杭州:浙江中医药大学,2015.
- [15] 陈百泉,李昌勤,常星,等.头花蓼对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(8):151-153.
- [16] Knowles B B, Howe C C, Aden D P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen [J]. *Science*, 1980, 209(4455): 497-499.
- [17] 陈秋,夏永鹏,邱宗荫.胰岛素耐受的HepG2细胞模型的建立[J].细胞生物学杂志,2005,27(3):334-338.
- [18] 宓伟,练武,尹淑英,等.山楂原花青素及维生素C对胰岛素抵抗大鼠肝脏氧化应激的影响[J].中草药,2016,47(4):625-629.
- [19] Everitt L, Galli A, Crabb D. The role of hepatic peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) in health and disease [J]. *Liver*, 2000, 20(20): 191-199.
- [20] 刘洪丰,任岩海,韩智学,等.黄芪多糖对2型糖尿病大鼠GLUT4 mRNA表达的影响[J].中国老年学杂志,2011,10(31):3988-3989.
- [21] 任文辉,张保丽,李中平,等.芍药苷对STZ损伤的INS-1细胞的保护和修复作用[J].中国老年学杂志,2011,31(1):230-232.
- [22] 谢红,姚丽,陈立军,等.青蒿素对人白血病细胞Caspase-3及细胞色素C表达的影响[J].中华中医药学刊,2008,26(12):2648-2650.
- [23] 顾丽萍,吴艺捷.Caspase与胰岛 β 细胞凋亡的关系[J].国外医学:内分泌学分册,2005,25(6):414-417.