

大黄素、小檗碱对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的预防作用研究

□王琦* 尹春梅 王慧莲

(山西医科大学附属第二临床医学院消化内科 太原 030001)

摘要:目的:研究大黄素、小檗碱对 HepG2 细胞产生胰岛素抵抗的预防作用及机制。方法:首先用 MTT 法筛选大黄素、小檗碱作用于 HepG2 细胞的实验浓度,然后用软脂酸诱导 HepG2 细胞,同时分别加入大黄素、小檗碱干预,并设正常组、对照组进行比较,通过葡萄糖氧化酶法、蒽酮法、RT-PCR 法,观察大黄素、小檗碱对 HepG2 细胞上糖代谢及瘦素长型受体、短型受体 mRNA 表达水平的影响。结果:对照组成为具有胰岛素抵抗的 HepG2 细胞,且细胞上瘦素长型及短型受体 mRNA 的表达水平较正常组显著下降($P < 0.01$);而大黄素、小檗碱组培养液中葡萄糖含量、细胞内糖原含量以及细胞上瘦素长型及短型受体 mRNA 的表达水平较正常组无明显改变($P > 0.05$)。结论:大黄素、小檗碱均能预防 HepG2 细胞产生胰岛素抵抗,这一作用与它们影响 HepG2 细胞上糖代谢及瘦素受体 mRNA 表达水平有关。

关键词:大黄素 小檗碱 软脂肪酸 胰岛素抵抗 瘦素受体

肝细胞大泡性脂肪变性的形成是由于甘油三酯(triglyceride, TG)的蓄积、产生和转运之间不平衡造成的,当 TG 的形成超过其输出能力时,蓄积在肝内,使体内和肝脏中游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)显著增多,脂肪酸代谢产物也大量增多,进而阻断了胰岛素信号的传导^[1],产生胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)。IR 是非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)发病的重要基础,贯穿其发生、发展的整个过程,几乎所有的 NAFLD 患者均有 IR 现象^[2]。通过大量动物实验研究,发现小檗碱及大黄素具有减肥降糖,降低血胰岛素水平,改善脂代谢紊

乱及 IR 等作用^[3-5],但其作用机制尚不明确。

本实验采用高浓度软脂酸作用于 HepG2 细胞(HepG2 细胞是一种表型与肝细胞极为相似的肝胚胎瘤细胞,保留了肝细胞的许多生物学活性),同时分别加入大黄素、小檗碱进行干预,通过观察它们对 HepG2 细胞中糖代谢及细胞上瘦素受体 mRNA 表达水平的影响,研究其对 IR 的预防作用及机制,为临床上预防 NAFLD 提供理论依据。

一、材料和方法

1. 材料

RPMI-1640 培养基购于美国 Gibco BRL 公司;软脂酸、小檗碱、大黄素购于 Sigma 公司;葡萄糖浓度

收稿日期:2009-03-09

修回日期:2009-07-21

* 联系人:王琦,教授,硕士研究生导师,主要研究方向:脂肪肝的防治,E-mail:wangqiqi72000@yahoo.com.cn。

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 555

测定试剂盒和蛋白质定量试剂盒及葱酮试剂购于南京建成公司;MTT 购于北京夏斯生物技术有限公司;RNA 提取试剂盒购于美国 Genra 公司;PCR 反应试剂盒购于美国 Promega 公司。

2. 方法

(1) HepG2 细胞的培养。

在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中培养 HepG2 细胞,将增殖状态良好的细胞用胰酶消化,对其进行传代并置于 37℃,5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中。

(2) 药物作用浓度的筛选。

取大黄素和小檗碱浓度为 0.1μmol·L⁻¹、5μmol·L⁻¹、10μmol·L⁻¹、15μmol·L⁻¹、20μmol·L⁻¹、25μmol·L⁻¹、30μmol·L⁻¹ 作用于 HepG2 细胞,用 MTT 法分别于酶标仪上检测 570nm、490nm 吸光度 A 值,计算细胞存活率(细胞存活率=实验组 A 值/对照组 A 值×100%),取细胞存活率约为 90%时的浓度为实验浓度。

(3) 实验分组。

实验分为四组:取 HepG2 细胞作为正常组;单层贴壁 HepG2 细胞用 0.40mmol·L⁻¹ 软脂酸培养 24h,此为对照组;在单层贴壁 HepG2 细胞同时加软脂酸及大黄素培养 24h,为大黄素组;在单层贴壁 HepG2 细胞同时加软脂酸及小檗碱培养 24h,为小檗碱组。

(4) 培养液中葡萄糖含量和细胞内糖原含量的测定。

葡萄糖含量的测定:取培养液用葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖含量(mg/mg·pro),裂解细胞后用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。培养液中葡萄糖含量=样品光密度值/标准光密度值×标准品浓度(mg·mL⁻¹)×1mL/蛋白含量(mg)。

细胞内糖原含量的测定:用葱酮法测定细胞内糖原含量(mg×10⁻²/mg pro)。糖原含量=样品光密度值/标准光密度值×标准品糖原含量(mg×10⁻²)/蛋白含量(mg)。

(5) 瘦素受体 OB-Ra mRNA、OB-Rb mRNA 表达的确定及检测。

细胞总 RNA 的提取 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA,操作按说明书进行,紫外分光光度仪测定 RNA 的 A260/A280 值。

cDNA 第一链的合成逆转录反应体系为 20μL,其中 5×逆转录缓冲液 4μL,核糖核酸酶抑制剂

0.4μL,10mmol·L⁻¹ dNTP 2μL,寡聚 T 引物 0.4μL,细胞总 RNA 5μg,M-MLV (逆转录酶)1μL (200U),用 DEPC-双蒸水补充至 20μL。反应条件为 42℃水浴 1h,然后 70℃水浴 10min 以灭活逆转录酶。

RT-PCR OB-Ra、OB-Rb 的引物设计是根据 GenBank 库中 OB-Ra、OB-Rb 的 cDNA 序列进行,OB-Ra 的上游引物:5'-ATGTTCCGAACCCCAA-GAAT-3',下游引物:5'-CAATAGTGGAGGGAGGGT-CA-3',扩增片断 221bp。OB-Rb 的上游引物:

5'-CAGAAGCCAGAAACG TTTGAG -3',下游引物 5'-AGCCCTTGTTCTTACCAGT-3',扩增片段 344 bp;内参照为 GAPDH,其上游引物:5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3',下游引物:5'-TC-CACCACCCTGTTGCTGTA-3',扩增片断 307 bp。反应体系 25μL,其中 buffer 20.5μL,cDNA 1μL,Taq DNA 聚合酶 1.5μL (5U),0.2μmol·L⁻¹ 上游引物及下游引物各 1μL。扩增条件:首次 95℃预变性 2min,然后 95℃变性 30s,60℃退火 30s,72℃延伸 45s,循环 35 次,最后 72℃延伸 10min。取扩增产物 5μL,用 2%的琼脂糖凝胶(EB 浓度为 0.5μg·mL⁻¹)电泳,以 100bp 为分子量标准,在 300nm 紫外光下摄影,通过图像分析软件进行分析。内参照也采用上述同样的实验方法进行分析。瘦素受体的表达水平用瘦素受体的平均灰度值与内参的平均灰度值的比值表示。

(6) 统计方法。

全部数据使用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理;每组数据以均数±标准差表示,进行单因素方差分析,组间两两比较用 SNK 检验,取 α=0.05 为显著性检验水准,P<0.05 有统计学意义。

二、结果

1. 大黄素、小檗碱实验浓度的确定

MTT 实验测得大黄素、小檗碱可抑制 HepG2 细胞的生长,这一作用呈剂量依赖性。大黄素浓度为 10μmol·L⁻¹ 时,HepG2 存活率为 90.8%,小檗碱浓度为 10μmol·L⁻¹ 时,HepG2 存活率为 91.3%,故本实验大黄素、小檗碱均采用 10μmol·L⁻¹ 作为实验浓度。

2. 培养液中葡萄糖含量和细胞内糖原含量的测定

HepG2 细胞中加入 0.40mmol·L⁻¹ 软脂酸培养 24h 后(对照组),培养液中葡萄糖含量较正常组显著增高,细胞内糖原量显著减少(P<0.01);大黄素、小

槲碱干预组培养液中葡萄糖含量较对照组显著下降,细胞内糖原量较对照组显著增加($P < 0.01$),与正常组相比无明显差别($P > 0.05$)(见表2)。

3. 瘦素受体 mRNA 的表达

对照组中 HepG2 细胞上 OB-Ra mRNA、OB-Rb mRNA 的表达的较正常组显著下降($P < 0.01$),大黄素、小檗碱组 OB-Ra mRNA、OB-Rb mRNA 的表达较对照组显著增高($P < 0.01$),与正常组相比无明显差别($P > 0.05$)(见图1)。

三、讨论

NAFLD 常伴有 IR 和高胰岛素血症,这一现象与机体对瘦素的敏感性降低有关。IR 是 NAFLD 的独立危险因素,IR 可以通过促进脂肪细胞降解和高胰岛素血症引起肝细胞内脂质沉积,以及改变肝内细胞因子的表达,在肝炎、肝硬化等发生发展中起重要作用。瘦素与胰岛素之间有双向调节作用^[6],研究表明,在小鼠及人类的胰岛 β 细胞上,存在有 OB-Ra、OB-Rb 两种受体,瘦素通过作用于 β 细胞上的特异性受体,可通过外周和中枢两种途径抑制胰岛素的分泌^[7-9]。因此,预防 IR 的发生为临床上 NAFLD 的预防提供了一种新的方法。

在本实验中我们观察到 HepG2 细胞上存在有 OB-Ra、OB-Rb 两种受体,且对照组培养液中葡萄糖含量较正常组显著升高,细胞内糖原含量明显降低,细胞上瘦素短型受体 OB-Ra mRNA 及长型受体 OB-Rb mRNA 的表达水平明显下调($P < 0.01$);而大黄素、小檗碱组培养液中葡萄糖含量较对照组明显降低,细胞内糖原含量明显增高,细胞上瘦素受体 mRNA 的表达水平明显上调($P < 0.01$),与正常组相比无明显差别($P > 0.05$),说明大黄素、小檗碱可以调节培养液中葡萄糖含量、细胞内糖原含量及细胞上瘦素受体 mRNA 的表达水平。

有人提出脂肪-胰岛素轴反馈假说,正常情况下,脂肪堆积引起瘦素分泌增加,抑制胰岛素分泌,从而减少脂肪的合成与储存。病理情况下,某种原因使瘦素受体敏感性下降,而瘦素是与其受体结合后

才能发挥其生理作用,故此时对胰岛素的分泌抑制作用减弱,正常的脂肪-胰岛素轴反馈机制被破坏,高胰岛素血症、IR 随之出现。在本实验我们发现 FFA 可以通过增加培养液中葡萄糖含量、降低细胞内糖原含量、抑制细胞上瘦素受体 mRNA 的表达水平使 HepG2 细胞产生 IR,而大黄素、小檗碱可通过调节糖代谢及上调 HepG2 细胞瘦素受体的表达水平,来增强瘦素对胰岛素的分泌抑制作用,抑制脂肪细胞的合成代谢,促进其分解代谢,改善脂肪-胰

表1 不同浓度大黄素、小檗碱对 HepG2 存活率的影响($\bar{x} \pm s$)

分组(浓度)	细胞存活率	
	大黄素	小檗碱
0.1	1.116±0.053	1.032±0.050
5	0.986±0.031	0.972±0.028
10	0.908±0.035	0.913±0.024
15	0.882±0.024	0.887±0.033
20	0.806±0.048	0.811±0.055
25	0.670±0.032	0.671±0.030
30	0.491±0.021	0.512±0.047

浓度单位($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),细胞存活率(%)

表2 培养液中葡萄糖含量及细胞内糖原含量的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	葡萄糖含量 (mg/mg·pro)	糖原含量 (mg×10 ⁻² /mg·pro)
正常组	13.276±0.291*	12.428±0.254*
对照组	15.593±0.247 ⁺	7.798±0.250 ⁺
大黄素组	12.997±0.252*	12.751±0.289*
小檗碱组	12.786±0.229*	13.011±0.265*

与正常组比较 * $P < 0.01$ 与对照组比较 * $P < 0.01$

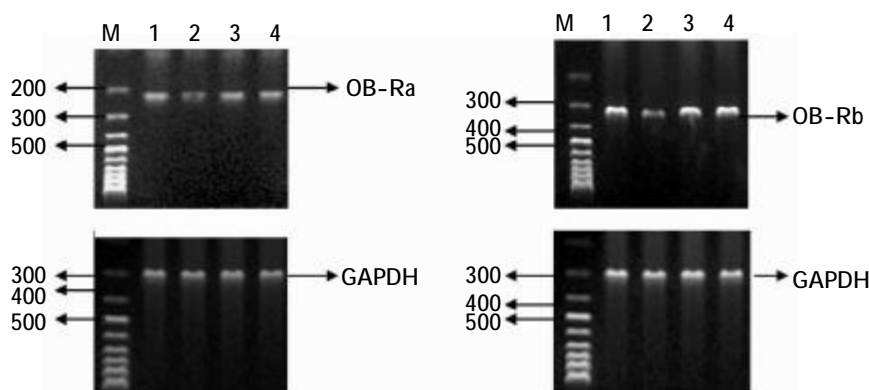


图1 HepG2 细胞中 OB-Ra mRNA 及 OB-Rb mRNA 的表达

(1 正常组,2 对照组,3 大黄素组,4 小檗碱组)

HepG2 细胞上 OB-Ra mRNA 的表达及其对应的内参照 GAPDH

HepG2 细胞上 OB-Rb mRNA 的表达及其对应的内参照 GAPDH

胰岛素轴的反馈机制,进而缓解高胰岛素血症,从而改善 IR。

本实验通过研究发现,中药单体成分大黄素、小檗碱可以通过增加培养液中葡萄糖的消耗、增加细胞内糖原含量以及上调 HepG2 细胞上瘦素受体 mRNA 的表达水平来预防 IR 的发生,从而为临床上预防 NAFLD 提供理论依据。

参考文献

- 1 Raszeja-Wyszomirska J, Lawniczak M, Marlicz W, et al. Non-alcoholic fatty liver disease-new view. *Pol Merkur Lekarski*,2008,24:568-571.
- 2 Enjoji M, Kotoh K, Kato M, et al. Therapeutic effect of ARBs on insulin resistance and liver injury in patients with NAFLD and chronic hepatitis C: a pilot study. *International journal of molecular medicine*, 2008,22:521-527.
- 3 Ko BS, Choi SB, Park SK, et al. Insulin sensitizing and insulinotropic

- action of berberine from *Cortidis rhizome*. *Biol Pharm Bull*,2005,28:1431-1437.
- 4 刘锋,冷三华,陆付耳,等.小檗碱对 HepG2 细胞核因子基因表达的影响. *中国中西医结合消化杂志*,2007,15:141-144.
 - 5 杨永青,杨公社.大黄素对大鼠前体脂肪细胞增殖和分化的影响. *中国中药杂志*,2007,3:424-427.
 - 6 Kamal R, Donald M, Gina M, et al. Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes*, 2005, 54:2012-2018.
 - 7 Yildiz BO, Haznedaroglu IC. Rethinking leptin and insulin action:Therapeutic opportunities for diabetes. *Int J Biochem Cell Biol*,2006, 38:820-830.
 - 8 Zhao YF, Feng DD,Chen C.Contribution of adipocyte-derived factors to beta-cell dysfunction in diabetes. *Int J Biochem Cell Biol*,2006, 38:804-819.
 - 9 LAUBNER K, KIEFFER TJ,LAM NT, et al. Inhibition of preproinsulin gene expression by leptin induction of suppressor of cytokine signaling 3 in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 2005, 54:3410-3417.

Prevention effect of emodin and berberine on insulin resistance in HepG2 cells

Wang Qi, Yin Chunmei, Wang Huilian

(Department of Internal Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: This work aimed to study the prevention effect of emodin and berberine on insulin resistance in HepG2 cells as well as its mechanism. The experimental concentrations of emodin and berberine for HepG2 cells were screened by the MTT assay. The HepG2 cells were induced by free fatty acid, meanwhile emodin and berberine were separately added for intervention. A normal group and a control group were established for comparison. The glucose oxidase method, the anthrone method, the RT-PCR method were adopted to observe the effect of emodin and berberine on the medium glucose, cell glycogen level, and mRNA expression of long and short leptin receptors in HepG2 cells. For the control group, HepG2 cells became insulin-resistant, and the mRNA expressions of long and short leptin receptors were significantly decreased ($P > 0.05$). While for the experimental group, the medium glucose, cell glycogen level and the mRNA expressions of long and short leptin receptors showed no significant change compared with the normal group ($P > 0.05$). The results show that both emodin and berberine may prevent FFA in HepG2 cells from inducing insulin resistance, which is probably associated with the effect of emodin and berberine on the medium glucose, cell glycogen level and mRNA expressions of long and short leptin receptors in HepG2 cells.

Keywords: emodin; berberine; free fatty acids (FFA); insulin resistance (IR); Leptin receptor

(责任编辑:王 瑀,责任译审:张立崑)