

# 黄芪散有效部位群对胰岛素抵抗 HepG2 细胞 SREBP-1c 及其靶基因表达的影响

王春怡, 唐嘉玲, 许沛鑫, 李卫民\*  
(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

**[摘要]** 目的:观察黄芪散有效部位群(HQS)对胰岛素抵抗 HepG2 细胞固醇调控元件结合蛋白-1c(SREBP-1c)及其靶基因表达的影响,并探讨其可能的作用机制。方法:噻唑蓝(MTT)比色法检测 HQS 对细胞活性的影响,采用高糖高胰岛素诱导 HepG2 细胞建立胰岛素抵抗模型,造模同时予以不同浓度 HQS 进行干预,并以二甲双胍(MET)作为阳性药,另设空白组。采用荧光 D-葡萄糖同系物 2-脱氧-D-葡萄糖(2-NBDG)检测细胞糖摄入量,测定细胞内甘油三酯(TG),游离脂肪酸(FFA)含量,油红 O 染色法观察细胞脂质沉积情况,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测细胞内 SREBP-1c,乙酰辅酶 A 羧化酶 1(ACC1),脂肪酸合成酶(FAS),硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(SCD1)基因的表达。结果:依据 MTT 实验结果,选择 25,50,100 mg·L<sup>-1</sup> 分别作为 HQS 低、中、高质量浓度值(HQS-L,HQS-M,HQS-H),处理时间为 24 h。与空白组比较,模型组细胞糖摄取显著减少( $P < 0.01$ ),细胞内 TG,FFA 含量显著升高( $P < 0.01$ ),胞浆内可见大量红色的小泡性脂滴,SREBP-1c,ACC1,FAS,SCD1 mRNA 的表达显著上调( $P < 0.01$ )。与模型组比较,不同质量浓度 HQS 均可显著升高细胞糖摄入量( $P < 0.05, P < 0.01$ ),HQS-H,HQS-M 可显著降低细胞中 TG,FFA 含量( $P < 0.01$ ),减少细胞内脂滴数量,HQS-L 亦可降低 FFA 含量( $P < 0.05$ ),此外,HQS-H 可显著下调 SREBP-1c,ACC1,FAS,SCD1 mRNA 的表达( $P < 0.05, P < 0.01$ ),HQS-M 亦可下调 SREBP-1c,FAS,SCD1 mRNA 的表达( $P < 0.05$ ),对 ACC1 mRNA 表达具有一定程度的抑制。结论:HQS 可能通过抑制 SREBP-1c 的表达,减少脂质合成,改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗。

**[关键词]** 黄芪散有效部位群; 脂毒性; 胰岛素抵抗; HepG2 细胞; 固醇调控元件结合蛋白-1c

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)16-0096-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181621

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180523.1126.002.html>

**[网络出版时间]** 2018-05-24 13:24

## Effect of Effective Fractions of Huangqisan on mRNA Expression of SREBP-1c and Its Target Genes in Insulin-resistant HepG2 Cells

WANG Chun-yi, TANG Jia-ling, XU Pei-xin, LI Wei-min\*

(School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of effective fractions of Huangqisan (HQS) on mRNA expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) and its target genes in insulin-resistant HepG2 cells. **Method:** The effect of HQS on the activity of HepG2 cells was detected by methye thiazolye telrazlium (MTT) method. The model of insulin-resistant HepG2 cells was induced and established by high glucose and high insulin. While inducing the model, HepG2 cells were treated with different concentrations of

**[收稿日期]** 20180302(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81503375);广东省自然科学基金项目(2015A030313350);广州中医药大学青年英才培养工程项目(QNYC20170107)

**[第一作者]** 王春怡,博士,副教授,从事中药药效物质基础及作用机制研究,Tel:020-39358044,E-mail:wangchunyi@gzucm.edu.cn

**[通信作者]** \*李卫民,博士,教授,从事新药研究与开发,Tel:020-39358290,E-mail:liweimin@gzucm.edu.cn

HQS, and metformin (MET) was used for positive control. The glucose uptake of cells was detected by fluorescent *D*-glucose homologue (2-NBDG), and the contents of total triglyceride (TG) and free fatty acids (FFA) in cells were also detected by assay kits. Meanwhile, intracellular lipid droplets were observed by oil red O staining. Besides, Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) method was used to detect mRNA expressions of SREBP-1c, acetyl CoA carboxylase 1 (ACC1), fatty acid synthase (FAS) and stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1). **Result:** According to the findings of MTT experiment, three different concentrations 25 mg·L<sup>-1</sup> (HQS-L), 50 mg·L<sup>-1</sup> (HQS-M) and 100 mg·L<sup>-1</sup> (HQS-H) of HQS were selected for treating cells, and the treating time was 24 h. Compared with control group, the glucose uptake of cells significantly decreased in model group ( $P < 0.01$ ), and the contents of TG and FFA markedly increased ( $P < 0.01$ ). Besides, a large number of red vesicular lipid droplets were also observed in cytoplasm, and the mRNA expressions of SREBP-1c, ACC1, FAS and SCD1 all apparently up-regulated ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, different concentrations of HQS all significantly increased the glucose uptake ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). HQS-H and HQS-M reduced the contents of TG and FFA in cells ( $P < 0.01$ ) and the number of intracellular lipid droplets. Meanwhile, HQS-L decreased FFA content ( $P < 0.05$ ). Besides, HQS-H apparently down-regulated the mRNA expressions of SREBP-1c, ACC1, FAS and SCD1 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and HQS-M also down-regulated the mRNA expressions of SREBP-1c, FAS and SCD1 ( $P < 0.05$ ). Although HQS-M could also inhibit ACC1 mRNA expression, there was no statistically significant difference. **Conclusion:** HQS may alleviate insulin resistance in HepG2 cells by inhibiting SREBP-1c mRNA expression and reducing lipid synthesis.

**[Key words]** effective fractions of Huanqisan; lipotoxicity; insulin resistance; HepG2 cells; sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)

脂毒性导致的脂质异位沉积是胰岛素抵抗发生、发展的重要原因。研究表明,肝脏脂质沉积可以直接导致肝脏胰岛素抵抗<sup>[1]</sup>,肝脏脂肪含量的增加是启动糖代谢异常的使动因素<sup>[2]</sup>,非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)与2型糖尿病(T2DM)互为共患性疾病,均具有胰岛素抵抗的病理生理基础,并形成恶性循环<sup>[3-4]</sup>。因此,在T2DM治疗策略中,应重视肝脏脂质沉积所带来的严重后果。固醇调控元件结合蛋白(SREBPs)是调控肝脏脂肪酸(FFA),甘油三酯(TG)和胆固醇(TC)代谢基因表达的主要转录因子,其中SREBP-1c又称脂肪细胞定向和分化因子-1(ADD-1),主要表达于肝脏、骨骼肌和脂肪组织<sup>[5]</sup>,调控与FFA,TG合成相关的靶基因,激活脂质合成过程<sup>[6]</sup>。

古方黄芪散源自北宋《圣济总录》,由葛根、黄芪、桑白皮3味中药按质量比2:1:1组成,主治“三消渴疾”,具有益气健脾、生津止渴、三消共治的功效。黄芪散有效部位群(HQS)是在前期制备工艺基础上结合药效配伍研究结果对黄芪散提取物进一步精制所获得的符合有效部位质量要求的提取物<sup>[7]</sup>。前期研究结果表明,HQS能显著改善多个糖尿病动物模型的胰岛素敏感性,降糖同时伴随显著的降脂、减肥现象<sup>[7-8]</sup>,同时,促进肝糖原合成,抑制

糖异生酶的表达<sup>[9]</sup>。此外,HQS还可通过调控内质网应激改善高脂饲料诱导的大鼠肥胖和脂肪肝,其作用机制与下调SREBP-1c蛋白及基因的表达有关<sup>[10]</sup>。综合前期药效来看,HQS对脂质代谢的调节作用明显优于糖代谢,提示HQS降糖作用也可能是其改善脂质代谢,增强胰岛素敏感性的继发性结果。

目前,关于HQS的体外实验研究仍未见有报道,为进一步阐明HQS通过调控脂毒性改善肝脏胰岛素抵抗的作用机制以及对上述体内药效机制的验证,本实验采用高糖高胰岛素诱导HepG2细胞建立胰岛素抵抗细胞模型,观察HQS不同浓度对胰岛素抵抗HepG2细胞糖脂代谢、脂质沉积以及SREBP-1c及其靶基因表达的影响,从而为全面阐述HQS的作用机制提供依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人肝细胞系HepG2细胞株来源于ATCC细胞库。

**1.2 药物及HQS制备** 黄芪、葛根、桑白皮药材均购自广州中医药大学大药房有限公司,经广州中医药大学新药中心高英教授鉴定,黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根;葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* 的干燥根;桑白皮为桑科植物桑 *Morus salba* 除去栓皮的

干燥根皮。HQS 制备方法参考文献[7];二甲双胍[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号C310BA0011]。

**1.3 试剂** 胰岛素,葡萄糖(Macklin公司,货号分别为I828365,D823520);荧光D-葡萄糖同系物2-(N-7-硝基-2,1,3-苯并恶二唑-4-氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖(2-NBDG)(美国Invitrogen公司,批号1788307);TG,FFA试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20160425,20160420);胰蛋白酶(美国Genview公司,货号9002-07-7);磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液(美国HyClone公司,批号ABA212280);油红O(美国Sigma公司,批号00625)。总RNA trizol提取试剂盒(美国Life Technologies公司,批号15596-018);逆转录试剂盒、扩增试剂盒(日本TaKaRa公司,批号分别为RR047A,RR091A);SREBP-1c,乙酰辅酶A羧化酶1(ACC1),脂肪酸合成酶(FAS),硬脂酰辅酶A去饱和酶(SCD1),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)各基因引物自行设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

**1.4 仪器** SW-CJ-1FD型超净生物工作台(苏州净化设备有限公司);CX31型生物显微镜(日本Olympus公司);FACSCanto II型流式细胞仪(美国BD公司);RT-2100C型自动酶标仪(美国Thermo Fisher公司);细胞培养板、培养瓶(美国Corning公司);CFX96TM型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪,核酸蛋白测定仪(美国Bio-Rad公司);BCD-569WPXC型-80℃医用低温冰箱(中科美菱低温科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 药物及试剂的配制** DMEM完全培养基配制(全培):取DMEM 200 mL加入10%胎牛血清和1%双抗(100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素,100 U·mL<sup>-1</sup>链霉素),4℃放置,37℃水浴温浴后使用。HQS溶液配制:黄芪散提取物2 mg(冷冻干燥所得)溶于10 μL DMSO中,加完全培养基10 mL,终质量浓度为200 mg·L<sup>-1</sup>,用0.22 μm滤膜过滤除菌,临用前以全培将该母液稀释至实验用浓度。二甲双胍溶液配制:二甲双胍溶解于全培中,使终质量浓度为335 mg·L<sup>-1</sup>(2 mmol·L<sup>-1</sup>)。MTT溶液配制:称取MTT 0.5 g,溶于PBS 100 mL中,质量浓度为5 g·L<sup>-1</sup>,用0.22 μm滤膜滤过,4℃避光保存即可。

**2.2 细胞培养** HepG2细胞用全培于37℃5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养,直至细胞生长融合至80%~90%

时传代,PBS液洗2遍,再加0.25%胰蛋白酶1 mL消化1 min,显微镜下观察,待细胞变圆,并从瓶壁上脱落,立即加入完全培养基终止消化,调节细胞密度至1×10<sup>5</sup>个/mL,接种于培养瓶中传代培养。

**2.3 MTT法检测HQS对HepG2细胞活性的影响** 将处于对数生长期的细胞按1×10<sup>4</sup>个/孔接种于96孔培养板中,待细胞完全贴壁后,吸弃培养基,加入HQS药液,使其终质量浓度为25,50,100,150,200 mg·L<sup>-1</sup>,每个浓度设5个平行孔,另设培养基空白组和不加药物组。分别在加药培养后的24,48,72 h时,向每孔中加入MTT溶液20 μL,混匀,37℃培养4 h,弃上清,每孔加入DMSO 150 μL,避光混匀后立即在酶联免疫检测仪上测定吸光度A,测定波长为490 nm。按公式计算细胞存活率。

$$\text{存活率} = (A_{\text{药物组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{不加药物组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

**2.4 胰岛素抵抗细胞模型建立** 取对数生长期HepG2细胞,接种于6孔板,待细胞贴壁后,换液,加入无血清培养基12 h,使细胞同步化,吸弃培养基,PBS缓冲液清洗2遍,更换为含高糖(30 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖)和高胰岛素(100 nmol·L<sup>-1</sup>的胰岛素)培养基,培养24 h<sup>[11]</sup>。

**2.5 细胞分组及给药** 依据MTT实验结果,实验分为6组,分别为空白组,模型组,二甲双胍组(335 mg·L<sup>-1</sup>),高质量浓度HQS组(100 mg·L<sup>-1</sup>,HQS-H),中质量浓度HQS组(50 mg·L<sup>-1</sup>,HQS-M),低质量浓度HQS组(25 mg·L<sup>-1</sup>,HQS-L)。细胞接种及无血清培养基培养后,除空白组,其余各组培养基更换为含有高糖高胰岛素或及含有二甲双胍或HQS各浓度的培养基,空白组加入全培,每组设3个复孔,培养24 h。

## 2.6 指标检测

**2.6.1 2-NBDG检测HepG2细胞葡萄糖摄取能力**<sup>[12-13]</sup> 细胞采用6孔板接种,分组和给药24 h后,用KRB缓冲液清洗3遍,各组加入2-NBDG(100 μmol·L<sup>-1</sup>)500 μL,37℃孵育30 min后用KRB缓冲液清洗3遍,加入0.25%胰蛋白酶消化细胞,再加入1 mL全培终止消化,在低温离心机中1500 r·min<sup>-1</sup>离心3 min,弃掉上清,用KRB缓冲液1 mL轻轻吹打成悬液加入流式管中,在激发波长488 nm,发射波长520 nm下用流式细胞仪检测细胞内平均荧光强度。

**2.6.2 TG和FFA含量测定** 吸弃培养基,加入预冷PBS缓冲液2 mL洗涤2次,用0.25%胰酶消化后,加入裂解液进行裂解。3500 r·min<sup>-1</sup>离心

10 min 后,取部分上层清液用试剂盒检测 TG 和 FFA 含量,剩余上清液用 BCA 法蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,以每 1 mg 蛋白浓度校正 TG 和 FFA 含量。

**2.6.3 油红 O 染观察细胞内脂滴情况** 细胞弃去培养基,用 PBS 清洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 15 min 以上。吸去固定液,用 PBS 洗涤 2 次。加入油红 O 染液,37 °C 避光染色 10 min,60% 异丙醇漂洗,PBS 洗涤 1 次,显微镜下观察。

**2.6.4 Real-time PCR 检测肝组织中 SREBP-1c 及靶基因的表达** 取适量细胞,加入 trizol 1 mL,震荡混匀室温放置 5 min。加入三氯甲烷 0.2 mL,剧烈震荡 15 s,4 °C 静置 3 min。4 °C,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离

心 10 min,分离上层水相,加入等体积异丙醇,混匀,静置 20 min。4 °C,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,去上清。用 75% DEPC 乙醇 1 mL 洗涤沉淀。4 °C,8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,弃去液体。室温晾干后,加入 DEPC 处理过的 ddH<sub>2</sub>O 水 30 μL,溶解 RNA,按照反转录试剂盒,逆转录成 cDNA。以 GAPDH 为内参,PCR 反应体系为 cDNA 1 μL,上下游引物 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 各 0.5 μL, master mix 10.0 μL, dH<sub>2</sub>O 8 μL,总体积 20 μL;反应步骤条件为 94 °C 预变性 5 s;94 °C 变性 20 s, 58 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,40 次循环;熔解曲线分析为 62 ~ 95 °C 15 s。结果用 C<sub>t</sub> 值表示,采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法进行相对定量分析。引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence for Real-time PCR

引物名称	引物序列(5'-3')		片段长度 /bp
	上游	下游	
SREBP-1c	CGGAACCATCTTGCAACAGT	CGCTTCTCAATGGCGTTGT	141
ACCI	TCACACCTGAAGACCTTAAAGCC	AGCCCACACTGCTTGTACTG	152
FAS	TCTGGTTCTTACGTCTGTTGC	CTGTGCAGTCCCTAGCTTTCC	197
SCD1	TTCCTACCTGCAAGTTCTACACC	CGGAGCTTTGTAAGAGCGGT	116
GAPDH	TGTTCTGTCATGGGTGTGAAC	ATGGCATGGACTGTGTCAT	154

**2.7 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 统计软件,计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示;多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 HepG2 细胞活性的影响** 随着 HQS 浓度和培养时间的增加,细胞活性也随之下降。不同浓度 HQS 处理 HepG2 细胞 24 h 后,仅 200 mg·L<sup>-1</sup> HQS 对细胞存活率有明显影响 ( $P < 0.05$ )。当处理 48 h 时,低质量浓度 (25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup>) 的 HQS 对细胞存活率没有显著影响,而高质量浓度 (150, 200 mg·L<sup>-1</sup>) HQS 呈浓度依赖性的抑制 HepG2 细胞活性 ( $P < 0.01$ )。当处理时间延长至 72 h 时,各浓度 HQS 对 HepG2 细胞活性的抑制作用均显著增强,且呈浓度依赖性 ( $P < 0.01$ )。因此,为排除 HQS 对细胞活性的影响,本实验选择 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> 分别作为 HQS-L, HQS-M, HQS-H 的浓度值, HQS 处理细胞时间为 24 h。见表 2。

**3.2 对胰岛素抵抗 HepG2 细胞 2-NBDG 糖摄取的影响** 二甲双胍以及 HQS 各浓度干预 24 h 后,细

表 2 HQS 对 HepG2 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of HQS on activity of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	细胞存活率/%		
		24 h	48 h	72 h
空白	-	100.00 ± 5.84	100.00 ± 4.90	100.00 ± 5.83
HQS	25	102.00 ± 5.58	92.34 ± 9.01	69.92 ± 9.63 <sup>2)</sup>
	50	101.71 ± 6.80	94.50 ± 7.52	74.87 ± 9.42 <sup>2)</sup>
	100	96.23 ± 6.14	87.89 ± 10.71	64.89 ± 10.51 <sup>2)</sup>
	150	94.10 ± 9.21	76.85 ± 8.98 <sup>2)</sup>	60.23 ± 9.13 <sup>2)</sup>
	200	88.19 ± 6.28 <sup>1)</sup>	61.33 ± 9.23 <sup>2)</sup>	44.65 ± 7.67 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$

胞内平均荧光强度与空白组比较显著降低 ( $P < 0.01$ ),提示该模型细胞葡萄糖摄取显著减少。与模型组比较,二甲双胍和 HQS 各浓度均可明显升高平均荧光强度 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),提示两种药物均可促进细胞对葡萄糖的摄取,且 HQS 的作用呈现浓度依赖性。见表 3。

**3.3 对胰岛素抵抗 HepG2 细胞 TG, FFA 含量的影响** 与空白组比较,采用高糖高胰岛素干预的 HepG2 细胞其 TG, FFA 含量显著升高 ( $P < 0.01$ )。

表 3 HQS 对胰岛素抵抗 HepG2 细胞荧光葡萄糖摄取的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of HQS on 2-NBDG uptake in insulin-resistant HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	平均荧光强度
空白	-	60.25 ± 5.09
模型	-	20.54 ± 5.13 <sup>2)</sup>
二甲双胍	335	59.48 ± 0.92 <sup>4)</sup>
HQS	100	44.75 ± 3.60 <sup>4)</sup>
	50	39.23 ± 1.33 <sup>4)</sup>
	25	32.21 ± 1.11 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 4,5 同)。

与模型组比较,二甲双胍以及 HQS-H, HQS-M 均可显著降低胰岛素抵抗 HepG2 细胞中 TG, FFA 含量 ( $P < 0.01$ ), HQS-L 亦可降低 FFA 含量 ( $P < 0.05$ ), 但对 TG 含量没有显著影响。见表 4。

表 4 HQS 对胰岛素抵抗 HepG2 细胞 TG, FFA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of HQS on TG and FFA concentration in insulin-resistant HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	TG	FFA
空白	-	8.53 ± 0.90	13.69 ± 1.49
模型	-	27.29 ± 0.52 <sup>2)</sup>	34.41 ± 0.28 <sup>2)</sup>
二甲双胍	335	13.39 ± 0.99 <sup>4)</sup>	17.15 ± 3.26 <sup>4)</sup>
HQS	100	15.93 ± 1.20 <sup>4)</sup>	25.38 ± 0.81 <sup>4)</sup>
	50	22.08 ± 1.40 <sup>4)</sup>	29.43 ± 1.19 <sup>4)</sup>
	25	26.03 ± 1.06	32.68 ± 0.46 <sup>3)</sup>

**3.4 对胰岛素抵抗 HepG2 细胞形态及脂质沉积的影响** 油红 O 染色结果显示,空白组 HepG2 细胞胞膜界限清楚,细胞浆丰富,胞浆内可见少量红色圆形脂滴。采用高糖高胰岛素孵育 24 h 后,胞浆内可见大量红色的小泡性脂滴,分布在靠近细胞膜的区域,细胞膜界限模糊,符合小泡性脂肪变性特征。与模型组比较,二甲双胍以及 HQS-H, HQS-M 浓度组 HepG2 细胞内脂滴数量明显减少, HQS-L 浓度组脂滴数量未见显著变化。提示 HQS 可显著改善胰岛素抵抗 HepG2 脂质沉积现象。见图 1。

**3.5 对胰岛素抵抗 HepG2 细胞 SREBP-1c, ACC1, FAS, SCD1 mRNA 表达的影响** 与空白组比较,模型组 HepG2 细胞内 SREBP-1c, ACC1, FAS, SCD1 mRNA 的表达显著上调 ( $P < 0.01$ )。与模型组比

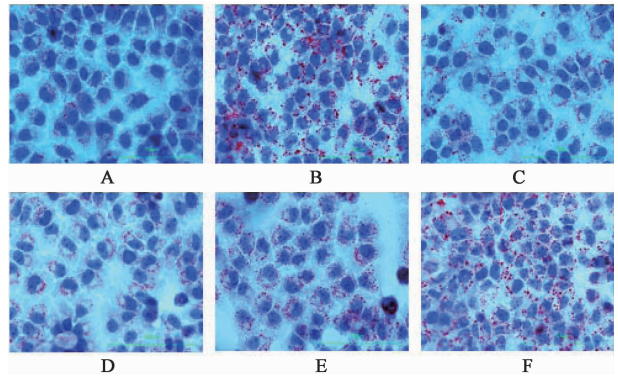


图 1 HQS 对胰岛素抵抗 HepG2 细胞内脂质沉积的影响 (油红 O,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of HQS on lipid accumulation in insulin resistant HepG2 cells (Oil red O,  $\times 200$ )

较,二甲双胍和 HQS-H 均可显著下调胰岛素抵抗 HepG2 细胞内 SREBP-1c, ACC1, FAS, SCD1 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), HQS-M 亦可抑制 SREBP-1c, FAS, SCD1 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ), 对 ACC1 mRNA 表达具有一定的下调作用,但无统计学意义, HQS 作用呈现一定的浓度依赖性。见表 5。

表 5 HQS 对胰岛素抵抗 HepG2 细胞 SREBP-1c, ACC1, FAS, SCD1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of HQS on mRNA expression of SREBP-1c, ACC1, FAS, SCD1 mRNA in insulin-resistant HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	SREBP-1c	ACC1	FAS	SCD1
空白	-	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.11	1.01 ± 0.14
模型	-	2.60 ± 0.22 <sup>2)</sup>	1.85 ± 0.21 <sup>2)</sup>	2.67 ± 0.30 <sup>2)</sup>	1.89 ± 0.14 <sup>2)</sup>
二甲双胍	335	1.38 ± 0.13 <sup>4)</sup>	1.33 ± 0.15 <sup>3)</sup>	1.67 ± 0.10 <sup>4)</sup>	1.27 ± 0.15 <sup>4)</sup>
HQS	100	1.75 ± 0.09 <sup>4)</sup>	1.39 ± 0.16 <sup>3)</sup>	1.88 ± 0.18 <sup>3)</sup>	1.54 ± 0.14 <sup>3)</sup>
	50	2.14 ± 0.11 <sup>3)</sup>	1.50 ± 0.06	1.92 ± 0.27 <sup>3)</sup>	1.60 ± 0.09 <sup>3)</sup>
	25	2.49 ± 0.16	1.88 ± 0.16	2.46 ± 0.12	1.80 ± 0.14

#### 4 讨论

肝脏是葡萄糖合成和代谢的中心场所<sup>[14]</sup>,也是发生胰岛素抵抗的主要靶器官。因此,建立稳定、可靠的胰岛素抵抗肝细胞模型对体外研究胰岛素抵抗的分子机制和筛选防治胰岛素抵抗的药物至关重要。HepG2 细胞源于人的肝胚瘤细胞,具有与正常人肝细胞相似的形态和生物学功能,因此是目前国内外用于研究肝脏胰岛素抵抗最为广泛的细胞模型<sup>[15]</sup>。胰岛素作为建立胰岛素抵抗细胞模型的诱导剂已得到广泛认可<sup>[16-17]</sup>。在高浓度的胰岛素条



- homeostasis [J]. Trends Endocrinol Metab, 2008, 19 (2):65-73.
- [6] Jump B D, Botolin D, WANG Y, et al. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription [J]. J Nutr, 2005, 135(11):2503-2506.
- [7] 张娟. 不同配比黄芪散提取物的含测、药效学及量效关系研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [8] 徐思源. 黄芪散调节“瘦素—胰岛素”平衡改善 ob/ob 小鼠的胰岛素敏感性[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [9] 王春怡, 高颖, 李艳, 等. 黄芪散有效部位群对 2 型糖尿病大鼠肝脏糖原含量及糖异生酶的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(1):1-7.
- [10] 李艳. 黄芪散调控 FABP4 表达改善肥胖和非酒精性脂肪肝的机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [11] YU L, XU S, Maria M M, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice [J]. Cell Metab, 2011, 13(4):376-388.
- [12] 龚茵, 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.
- [13] 叶林, 陆凯, 张冬颖, 等. 2-NBDG 检测 H9c2 心肌细胞葡萄糖摄取能力的研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(15):1533-1537.
- [14] Reinke H, Asher G. Circadian clock control of liver metabolic functions [J]. Gastroenterology, 2016, 150(3):574-580.
- [15] Lorenzo C, Hanley A J, Wagenknecht L E, et al. Relationship of insulin sensitivity, insulin secretion, and adiposity with insulin clearance in a multiethnic population the insulin resistance atherosclerosis study [J]. Diabetes Care, 2013, 36(1):101-103.
- [16] 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.
- [17] 李秀丽, 贺嵩敏, 朱莹, 等. HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的建立与鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5):203-207.
- [18] Levy J R, Belsky M. Down-regulated insulin receptors in HepG2 cells have an altered intracellular itinerary [J]. Am J Med Sci, 1990, 299(5):302-308.
- [19] Nakajima K, Yamauchi K, Shigematsu S, et al. Selective attenuation of metabolic branch of insulin receptor down-signaling by high glucose in a hepatoma cell line, HepG2 cells [J]. J Biol Chem, 2000, 275(27):20880-20886.
- [20] 薛建军, 范强, 杨丽霞, 等. 糖尿病心肌病发病机制治疗概述[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22):211-217.
- [21] Turkheimer F, Moresco R M, Lucignani G, et al. The use of spectral analysis to determine regional cerebral glucose utilization with positron emission tomography and [18F] fluorodeoxyglucose: theory, implementation, and optimization procedures [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1994, 14(3):406-422.
- [22] Millon S R, Ostrander J H, Brown J Q, et al. Uptake of 2-NBDG as a method to monitor therapy response in breast cancer cell lines [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 126(1):55-62.
- [23] Ahmed M H, Byrne C D. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. Drug Discov Today, 2007, 12(17/18):740-747.
- [24] Raghov R, Yellaturu C, DENG X, et al. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis [J]. Trends Endocrinol Metab, 2008, 19(2):65-73.
- [25] McPherson R, Gauthier A. Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis [J]. Biochem Cell Biol, 2004, 82(1):201-211.
- [26] Nakayama H, Otabe S, Ueno T, et al. Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis [J]. Metabolism, 2007, 56(4):470-475.
- [27] 李凤霞, 李金磊, 荣向路, 等. 脂肪分化障碍引起的胰岛素抵抗、脂肪肝及高胆固醇血症小鼠模型[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(1):100-105.
- [28] 周和超, 黄贵心. 脂毒性与胰岛素抵抗的相关研究进展[J]. 国外医学: 老年医学分册, 2007, 28(1):28-31.
- [29] Bays H, Mandarino L, DeFronzo R A. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(2):463-478.
- [30] Cline G W, Johnson K, Reigttnig W, et al. Effects of anovel glycogen Synthase kinase-3 inhibitor on insulin-stimulated glucose metabolism in Zucker diabetic fatty (fa/fa/) rats [J]. Diabetes, 2002, 51(10):1903-2910.
- [31] 高颖, 秦阳, 王春怡, 等, 李卫民. 黄芪散对 2 型糖尿病大鼠心肌 MG53/PPAR- $\alpha$  通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(9):123-127.

[责任编辑 周冰冰]