

橄榄苦苷对胰岛素抵抗 HepG2 肝细胞胰岛素信号传导的影响

杨双, 徐继璞*

(遂宁市中心医院, 四川 遂宁 629000)

[摘要] **目的:**观察橄榄苦苷(oleuropein, OL)对胰岛素抵抗 HepG2 肝细胞的胰岛素信号传导的影响。**方法:**常规复苏细胞,于10% FBS + 1% 青-链霉素的 DMEM($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖)培养基中,37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中培养,常规细胞培养传至第3代待用;利用 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素溶液刺激 HepG2 肝细胞 36 h 后建立肝细胞胰岛素抵抗模型,分为模型组,OL组($50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),另设正常 HepG2 肝细胞为正常组,每组设6个复孔;对数生长期细胞,饥饿培养24 h后,诱导建立胰岛素抵抗模型,进行药物干预36 h后,以细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测 OL 对细胞活性的影响;OL 对胰岛素抵抗 HepG2 肝细胞干预后,实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测肝细胞胰岛素受体(InsR),胰岛素受体底物-1(IRS-1),葡萄糖转运蛋白-2(GLUT-2)mRNA 和蛋白表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组胰岛素抵抗的 HepG2 肝细胞活性明显降低($P < 0.05$),胰岛素信号分子 InsR,IRS-1, GLUT-2 mRNA 和蛋白表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,OL 干预后胰岛素抵抗的 HepG2 肝细胞活性显著升高($P < 0.01$);胰岛素信号分子 InsR,IRS-1, GLUT-2 mRNA 和蛋白表达明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**OL 能够增加胰岛素抵抗肝细胞活性,上调肝细胞胰岛素信号通路中 InsR,IRS-1, GLUT-2 mRNA 和蛋白的表达,这可能是其改善胰岛素抵抗的机制之一。

[关键词] 橄榄苦苷; 2型糖尿病; 胰岛素抵抗; HepG2 肝细胞; 胰岛素受体; 胰岛素受体底物-1; 葡萄糖转运蛋白-2

[中图分类号] R22;R242;R285.5;R2-031;R279 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)20-0164-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181817

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180629.1107.012.html>

[网络出版时间] 2018-06-29 19:12

Effect of Oleuropein on Insulin Signal Transduction in Insulin Resistant HepG2 Hepatocytes

YANG Shuang, XU Ji-pu*

(Suining Central Hospital, Suining 629000, China)

[Abstract] **Objective:** This study aimed to explore the effect of oleuropein (OL) on insulin signal transduction in insulin resistant HepG2 hepatocytes. **Method:** Routine resuscitation HepG2 cells were cultured in DMEM medium (10% FBS + 1% streptomycin), incubated in 5% CO₂ cell incubator at 37 °C, and the routine cell culture was spread to third generation for stand-by. The insulin resistant hepatocyte model was established by stimulating HepG2 hepatocytes for 36 h with $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ insulin solution. Then the cells were divided into model group, OL group ($50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and normal HepG2 hepatocytes were also used as a normal group. Each group had 6 duplicate holes and three times repeated. After 24 h of starvation culture, the logarithmic growth phase cells were induced to establish insulin resistance model. After drug intervention for 36 h, the effect of OL on cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8). After intervention by OL, Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to respectively detect mRNA and protein expression levels of insulin receptor (InsR), insulin receptor substrate-1 (IRS-1), and glucose transporter-2 (GLUT-2) in liver cells.

[收稿日期] 20171210(012)

[基金项目] 遂宁市科学技术局科研项目(14)

[第一作者] 杨双, 硕士, 主治医师, 从事糖尿病中医临床研究, Tel:0825-2292335, E-mail:727813574@qq.com

[通信作者] * 徐继璞, 副主任医师, 从事糖尿病中医临床研究, Tel:0825-2292335, E-mail: 420354704@qq.com

Result: As compared with normal group, cell viability was reduced significantly in model group ($P < 0.05$), and the mRNA and protein expressions of InsR, IRS-1, GLUT-2 were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with model group, the cell viability of HepG2 cells was significantly increased after OL intervention ($P < 0.01$); the mRNA and protein expressions of InsR, IRS-1, and GLUT-2 were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** OL can reduce the blood glucose and improve the insulin resistance, and the mechanism may be related to up-regulating the mRNA and protein expressions of InsR, IRS-1, and GLUT-2 in HepG2 cells.

[**Key words**] oleuropein; type 2 diabetes; insulin resistance; HepG2 cells; insulin receptor (InsR); insulin receptor substrate-1 (IRS-1); glucose transporter-2 (GLUT-2)

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的主要发病机制之一,指胰岛素发挥生理效应的靶器官,如肝脏、骨骼肌、脂肪等,对胰岛素的敏感性降低,导致细胞内外胰岛素信号传导障碍,细胞摄取、利用葡萄糖不足,血糖水平持续升高^[1]。IR 贯穿于糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 的发生、发展的全过程,同时不仅与 T2DM 多种并发症的发生密切相关,还与多种疾病的发生关系密切,如心脑血管疾病,高脂血症^[2],多囊卵巢综合征^[3],乳腺癌^[4],阿尔茨海默病等^[5]。因此,IR 防治在 T2DM 治疗中意义重大。

油橄榄是系木犀科植物,叶和果实,营养丰富、抗氧化性较强,用途广泛^[6]。橄榄苦苷 (oleuropein, OL) 主要存在于橄榄叶中,其化学结构明确 (图 1),报道显示在降低血糖^[7-8],降脂^[9],抗炎抗氧化^[10],以及抑制癌细胞活性^[11-12]等方面具有药物活性。前期实验发现,OL 可以增加链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的 DM 大鼠胰岛素敏感性,有良好的降糖效果^[7-8],但对降血糖、改善 IR 的作用机制未做详细报道。本研究以胰岛素诱导建立 HepG2 肝细胞胰岛素抵抗模型,通过体外实验研究 OL 水溶液改善 HepG2 细胞 IR 作用及其对胰岛素信号传导通路调节机制。

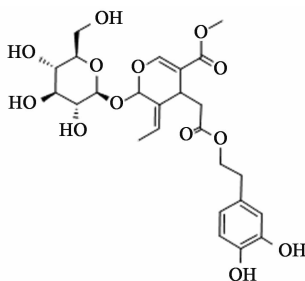


图 1 橄榄苦苷化学结构式
Fig. 1 Chemical structural formula of oleuropein

1 材料

1.1 细胞 HepG2 人肝癌细胞,由北京中医药大学罗广斌教授实验室赠予。常规复苏细胞,养于含 10% FBS,1% 青-链霉素的 DMEM ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose) 培养基,放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养传至第 3 代冻存待用。

1.2 药物与试剂 OL (成都普瑞法科技开发有限公司,批号 32619-42-4,纯度为 99%);胰酶,DMEM 培养基,胎牛血清 (FBS) (美国 Gibco 公司,批号分别为 1744349, L4R25522, 1744349);胰岛素 (丹麦诺和诺德公司,批号国药准字 J20100117);细胞计数试剂盒-8 (CCK-8, 同仁化工有限公司,批号 KH862);RIPA 裂解缓冲液 (北京普利莱基因技术有限公司,批号 C1053);trizol 试剂 (美国 Life Technologies 公司,批号 98903);GoTaq[®] qPCR Master Mix, GoScript[™] Reverse Transcription System (美国 Promega 公司,批号均为 0000076581);I 抗 InsR Rabbit mAb, IRS-1 Rabbit mAb, II 抗 Anti-rabbit 免疫球蛋白 (Ig) G, β -肌动蛋白 (β -actin) rabbit mAb (美国 CST 公司,批号分别为 0011, 0003, 0026, 4970);GLUT-2 rabbit mAb (英国 Abcam 公司,批号 ab54460);ECL 发光液 (美国 Bio-Rad 公司,批号 170-5060)。

1.3 仪器 BX53 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司);3K15 型离心机 (美国 Sigma 公司);E9032 型酶标仪 (美国 Promega 公司);Mini-PROTEAN Tera System 型垂直电泳仪及转移槽, ChemiDoc[™] XRS 型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司);HERA CELL 150i CO_2 incubator 型细胞培养箱 (美国 Thermo 公司);UV1800 型 SMA 超微紫外分光光度计 (日本岛津公司);Prism 7500 型 PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 液氮中迅速取出细胞, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴

锅中不断摇动冻存管加速融化, 无菌条件下, 将融化的细胞悬液吸入到含有培养基 5 mL 的离心管中, 2 000 × g 离心 5 min, 弃上清, 加入新的培养基 2 mL, 混匀, 将细胞悬液转移到细胞培养皿中, 补加培养基 4 mL; 将细胞培养皿放入 37 °C 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 过夜、更换新的培养基。

2.2 HepG2 肝细胞胰岛素抵抗模型的建立 取对数生长期 HepG2 细胞, 胰酶消化, DMEM 稀释为 5 × 10⁴ 个/mL 的细胞悬液, 种植到 12 孔板, 1 mL/孔, 饥饿培养 12 h; 弃 DMEM, 加入诱导培养基 DMEM + 10% FBS + 1% 青-链霉素 + 1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 胰岛素, 37 °C 5% CO₂ 培养箱中诱导培养 36 h, 即为 HepG2 肝细胞 IR 模型。

2.3 CCK-8 法检测 IR HepG2 细胞活性 培养皿取出生长对数期 HepG2 细胞, 以 5 × 10⁴ 个/mL 接种于 6 孔板中, 每孔加培养液 2 mL, 培养 24 h, 弃上清, 加无血清 DMEM 培养基培养 24 h, 弃上清, 然后分组加药, 正常组: 10% FBS + DMEM 培养基; 模型组: 1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 胰岛素溶液 + 10% FBS + DMEM 培养基; OL 组: 1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 胰岛素溶液 + 10% FBS + DMEM 培养基 + 50 μmol·L⁻¹ OL^[13-15]; 以上 3 组, 每组设 6 个复孔, 培养 36 h, 每孔抽取培养基 100 μL 另置于 96 孔板, 加入 CCK-8 溶液 10 μL/孔, 37 °C 温箱 1 h, 酶标仪测定波长 450 nm 吸光度 A, 记录数值并分析。

2.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 mRNA 表达 细胞分组及给药同 2.3 项, 干预细胞 36 h 后, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 次, 每个孔中加入遇冷的 trizol 300 μL, 冰上放置 15 min, 刮取细胞、移至离心管中待用。根据试剂盒指示提取细胞总 RNA; GoScript™ Reverse Transcription System 试剂盒步骤进行反转录, 得到 cDNA; 配置 20 μL 反应体系, GoTaq 反应液 10 μL + cDNA 稀释液 2 μL 加入 + Nuclease-Free Water 7.2 μL + 引物混合物 0.8 μL, 置于 PCR 扩增仪扩增, 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 1 min (共 40 次循环); 95 °C 15 s, 60 °C 15 s 溶解。运用 2^{-ΔΔC_t} 相对定量法比较各组目标 mRNA 表达差异。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 见表 1。

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达 细胞分组及给药同 2.3 项, 干预细胞 36 h 后, PBS 洗 2 次, 加入 RIPA 裂解液 100 μL/孔, 置于冰上 15 min 充分裂解, 细胞刷刮取各孔细胞, 4 °C, 12 000 × g 离心 15 min, 抽取上清液置于新离心管

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
InsR	上游 5'-CCATCGACTACATCCGCTTCTT-3'	22
	下游 5'-ACTTCGCAGGGTCAGGTTCTC-3'	21
IRS1	上游 5'-CCTGCTTCTGCCACTTG-3'	18
	下游 5'-GTTCACCCCTGATTCTGTATGTC-3'	23
GLUT2	上游 5'-AGGACCCTGAGGCATCTATT-3'	24
	下游 5'-ATGACCTCTGCCATCTCC-3'	21
GAPDH	上游 5'-TGAAGCAGGCATCTGAGGG-3'	19
	下游 5'-CGAAGGTGAAGAGTGGGAG-3'	20

中, 得到组织总蛋白。加预冷的上样缓冲液, 沸水中 5 min 蛋白变性, 上样, 100V 电泳 2 h, 100 A 半干法蛋白转移 1 h, TBS 溶液洗膜; 脱脂奶粉封闭 25 min, 一抗 (1:1 000) 4 °C 过夜孵育, TBS 溶液洗膜, 二抗 (1:10 000) 室温孵育 1 h。ECL 发光液 1 min, 曝光成像, Image J 7.0 图像分析蛋白条带, 以目的蛋白与内参蛋白灰度比值来表示蛋白表达水平。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件处理数据, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 两组间比较, 满足方差齐性时用 LSD 检验, 不满足方差齐性时用非参数检验; $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

3 结果

3.1 OL 对 IR HepG2 肝细胞存活率的影响 与正常组比较, 模型组肝细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$); OL 干预后, OL 组肝细胞存活率较模型组显著升高 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 OL 对 IR HepG2 肝细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of OL on activity of insulin resistant HepG2 hepatocyte ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	胰岛素浓度 /mol·L ⁻¹	药物浓度 /μmol·L ⁻¹	存活率 /%
正常	-	-	100.43 ± 8.72
模型	1 × 10 ⁻⁶	-	98.84 ± 8.63 ¹⁾
OL	1 × 10 ⁻⁶	50	143.75 ± 10.56 ⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

3.2 OL 对 IR HepG2 肝细胞 InsR, IRS-1, GLUT-2 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组 HepG2 细胞 InsR, IRS-1, GLUT-2 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, OL 能够显著上调

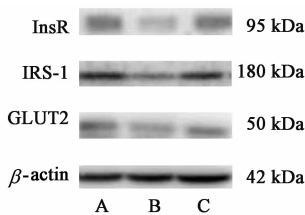
HepG2 细胞 InsR, IRS-1, GLUT-2 mRNA 表达 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 OL 对 IR HepG2 细胞 InsR, IRS-1, GLUT-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of OL on mRNA expression of InsR, IRS-1 and GLUT-2 in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	胰岛素 /mol·L ⁻¹	药物 /μmol·L ⁻¹	InsR	IRS-1	GLUT-2
正常	-	-	1.22 ± 0.11	2.15 ± 0.13	1.78 ± 0.15
模型	1 × 10 ⁻⁶	-	0.54 ± 0.05 ²⁾	1.08 ± 0.15 ²⁾	0.82 ± 0.08 ²⁾
OL	1 × 10 ⁻⁶	50	1.04 ± 0.07 ⁴⁾	2.06 ± 0.28 ⁴⁾	1.59 ± 0.11 ⁴⁾

3.3 OL 对 IR HepG2 肝细胞 InsR, IRS-1, GLUT-2 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 HepG2 细胞经胰岛素诱导后 InsR, IRS-1, GLUT-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较,OL 则能够明显增加胰岛素诱导后的 HepG2 细胞 InsR, IRS-1, GLUT-2 蛋白表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2, 表 4。



A. 正常组; B. 模型组; C. OL 组

图 2 OL 作用 IR HepG2 细胞后相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of capsaicin on protein expressions of HepG2 cells

表 4 OL 对 IR HepG2 细胞 InsR, IRS-1, GLUT-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of OL on protein expression of InsR, IRS-1 and GLUT-2 in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	胰岛素 /mol·L ⁻¹	药物 /μmol·L ⁻¹	InsR /β-actin	IRS-1 /β-actin	GLUT-2 /β-actin
正常	-	-	2.18 ± 0.07	1.68 ± 0.01	1.63 ± 0.02
模型	1 × 10 ⁻⁶	-	1.81 ± 0.05 ¹⁾	1.28 ± 0.13 ²⁾	1.19 ± 0.05 ²⁾
OL	1 × 10 ⁻⁶	50	2.09 ± 0.08 ³⁾	1.59 ± 0.03 ³⁾	1.52 ± 0.07 ⁴⁾

4 讨论

油橄榄主要分布在欧洲地中海沿岸等国家,叶有降糖作用,大量研究表明,橄榄叶中含有降糖成分,能够改善 DM 大鼠血糖水平,促进胰岛细胞释放胰岛素^[16-17]。现代药理学研究发现,油橄榄叶中的抗氧化活性物质含量高于油橄榄果和茎,主要的

活性物质包括 OL, 橄榄多酚, 黄酮类, 裂环烯醚萜类等^[18]。OL 是橄榄叶中主要的活性提取成分之一, 实验研究表明, OL 能够显著降低血糖。Gonzalez 等^[19]使用 STZ 诱发的糖尿病动物模型首次提出橄榄叶提取物 OL 具有降血糖作用, 并发现 OL 的降血糖作用与其抗氧化作用有关。另有研究发现 OL 能够显著降低 STZ 诱导的 DM 大鼠血糖, 同时大鼠总胆固醇也明显下降, 表明 OL 具有降血糖、降血脂作用; 还能改善肝脏氧化应激, 这可能是其降糖机制之一^[20]。因此, OL 降糖效果明确, 但机制不清。

IR 是 T2DM 的主要发病机制之一, 改善 IR, 提高胰岛素敏感性是治疗 2 型糖尿病的一个重要途径^[21]。肝脏是调节机体糖脂代谢的主要器官, 通过调节糖原合成和糖异生维持血糖稳态, 在糖尿病发病中起着重要作用^[22]。InsR 是胰岛素信号传导的起始因子, 与胰岛素结合后磷酸化, 促使 IRS 酪氨酸磷酸化, 启动胞内的信号传导, 导致细胞内传导分子与酶发生级联反应, 将信号传递到效应靶点, 增加细胞对葡萄糖摄取以及细胞内糖原合成, 从而降低血糖^[23]。IRS-1 是 InsR 的下游分组, 受体 InsR 磷酸化激活, IRS-1 酪氨酸位点发生磷酸化, 继而激活磷脂酰肌醇 3 激酶途径, 调节细胞对葡萄糖的摄取、利用^[24]。实验研究发现, 小鼠敲除 IRS-1 后血糖水平明显升高^[25]。GLUT-2 是肝细胞将细胞外的葡萄糖转运到细胞内储存的载体蛋白^[26], 大量研究表明, 胰岛素可以增强 GLUT-2 在肝细胞膜上的表达, 从而加强肝脏对葡萄糖的摄取和利用^[27]。这些胰岛素信号传导过程中的靶点分子任一出现障碍均会导致 IR 发生。本实验发现, 在 OL 干预胰岛素抵抗 HepG2 肝细胞 36h 后, Western blot 和 PCR 检测显示, InsR, IRS-1, GLUT-2 mRNA 和蛋白的表达较高糖组显著升高, 提示 OL 对胰岛素信号转导通路具体调控作用, 这可能是它改善 IR 的机制。

综上所述, 橄榄叶具有降糖活性成分, OL 是其重要成分之一, 实验研究发现其具有改善糖尿病小鼠 IR, 调节糖脂代谢的作用, 本实验发现 OL 能够上调 HepG2 肝细胞胰岛素信号传导通路 InsR, IRS-1, GLUT-2 mRNA 和蛋白表达水平, 可能是 OL 的降糖作用机制, 为进一步动物实验提供依据。

[参考文献]

[1] 李斌, 范源, 李鑫. 基于 PI3K/Akt 信号通路的中药治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗研究进展 [J]. 中成药, 2017, 39(1): 151-154.

- [2] ZHENG Z G, ZHOU Y P, ZHANG X, et al. Anhydrocaritin improves diet-induced obesity and hyperlipidemia and alleviates insulin resistance by suppressing SREBPs activation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 15(6) : 42-61.
- [3] Jeanes Y M, Reeves S. Metabolic consequences of obesity and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: diagnostic and methodological challenges [J]. *Nutr Res Rev*, 2017, 30(1) : 97-105.
- [4] Ferroni P, Roselli M, Riondino S, et al. Insulin resistance as a predictor of venous thromboembolism in breast cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2016, 23(6) : L25-28.
- [5] Monte S M. Insulin resistance and neurodegeneration: progress towards the development of new therapeutics for Alzheimer's disease [J]. *Drugs*, 2017, 77(1) : 47-65.
- [6] Visioli F, Poli A, Gall C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil [J]. *Med Res Rev*, 2001, 22(1) : 65-75.
- [7] 刘天亮,王玲洁,宋宗辉,等. 橄榄苦苷的药理作用及其研究进展 [J]. *西南国防医药*, 2016, 26(6) : 685-687.
- [8] Badawi S A. Effect of ethanol olive leaf and its callus ethanol extracts in alloxan-induced diabetic mice (blood glucose and lipid profiles) [J]. *J Bio Technol*, 2013, 2(7) : 62-66.
- [9] Oi-Kano Y, Iwasaki Y, Nakamura T, et al. Oleuropein aglycone enhances UCP1 expression in brown adipose tissue in high-fat-diet-induced obese rats by activating β -adrenergic signaling [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, 40(3) : 209-218.
- [10] SHI J, WU G F, ZOU X H, et al. Oleuropein protects intracerebral hemorrhage-induced disruption of blood-brain barrier through alleviation of oxidative stress [J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(6) : 1206-1212.
- [11] 郑洁,魏鉴腾,刘建飞,等. 油橄榄叶提取物生物活性研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(4) : 613-618.
- [12] 高彩霞,王成章,陈文英,等. 油橄榄叶中多酚和黄酮的含量分析 [J]. *生物质化学工程*, 2006, 40(4) : 4-6.
- [13] 徐朝琪,许玉宇,姜盼,等. 橄榄苦苷抑制丙烯醛诱导的HBE细胞内质网应激的机制研究 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2017, 37(9) : 1124-1130.
- [14] 陈侯馨,汪洋,刘扬,等. 橄榄苦苷对破骨细胞的分化以及骨吸收功能的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(14) : 1435-1439.
- [15] 胡光强,袁园,杜曦,等. 橄榄苦苷对脂多糖诱导的小鼠急性肝损伤的保护效应 [J]. *重庆医学*, 2017, 46(3) : 312-314.
- [16] Eidi A, Eidi M, Darzi R. Antidiabetic effect of *Olea europaea* L. in normal and diabetic rats [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(3) : 347-350.
- [17] 吉腾飞,冯孝章. 木犀榄属植物化学成分和药理活性研究概况 [J]. *天然产物研究与开发*, 2004, 16(4) : 345-352.
- [18] Jemai H, El F A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(19) : 8798-8804.
- [19] Gonzalez M, Zarzuelo A, Gamez M J, et al. Hypoglycemic activity of olive leaf [J]. *Planta Med*, 1992, 58(6) : 513-515.
- [20] Poudyal H, Campbell F, Brown L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats [J]. *J Nutr*, 2010, 140(5) : 946-953.
- [21] GUO S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms [J]. *J Endocrinol*, 2014, 220(2) : T1-T23.
- [22] 刘舟,李月碧,张卫华,等. 黄连温胆汤对糖尿病大鼠海马胰岛素抵抗和神经发生受损的改善作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(18) : 115-119.
- [23] CHEN B Q, ZHOU Y F. Advances on relationship between insulin receptor substrate-1 and insulin resistance in liver cirrhosis [J]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao; Yi Xue Ban*, 2012, 41(3) : 339-344.
- [24] Aoki K, Tajima K, Taguri M, et al. Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on Akt and protein kinase C zeta (PKCzeta) phosphorylation in different tissues of C57BL6, insulin receptor substrate (IRS) 1 (-/-), and IRS2 (-/-) male mice fed a high-fat diet [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016, 159(7) : 110-120.
- [25] 郭胜男,刘洪斌,李东华,等. 番石榴叶总黄酮对糖尿病小鼠肝脏葡萄糖代谢及胰岛素信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(4) : 166-170.
- [26] 李俊燕,王静懿,徐杰,等. 清化颗粒对糖尿病小鼠葡萄糖转运因子的影响 [J]. *中医杂志*, 2017, 58(1) : 50-53.
- [27] 王卫娜. 葡萄籽原花青素对糖尿病大鼠肾脏 GLUT2 及肾功能的影响 [J]. *中医临床研究*, 2016, 8(11) : 10-12.

[责任编辑 张丰丰]