

桑叶生物碱、黄酮及多糖 对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的改善作用

何美霞^{1,2}, 常化静¹, 海洋¹, 吴新荣^{1*}

(1. 广州军区广州总医院 药学部, 广州 510010; 2. 广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] 目的:探讨桑叶生物碱、黄酮及多糖对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的改善及其作用机制。方法:采用高糖高胰岛素培养基诱导 HepG2 细胞形成红外 (IR) 模型,葡萄糖氧化酶法检测正常组、模型组、罗格列酮组、生物碱组、黄酮组及多糖组的细胞葡萄糖消耗情况,并用 RT-qPCR 法检测 C-Jun 氨基端激酶 (JNK) 通路相关基因的表达,观察桑叶生物碱、黄酮及多糖改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗及其作用机制。结果:高糖及高胰岛素培养基培养 HepG2 细胞,使细胞葡萄糖消耗率明显下降,造成胰岛素抵抗的细胞模型,给予桑叶生物碱、黄酮及多糖干预之后,细胞葡萄糖消耗率明显上升,同时下调 JNK 和上调 IRS-1, AKT mRNA 的表达。结论:桑叶生物碱、黄酮及多糖均可增加 HepG2 细胞的葡萄糖消耗量,其改善胰岛素抵抗作用可能与调节 JNK 信号通路有关。

[关键词] 桑叶有效部位; IR-HepG2 细胞; C-Jun 氨基端激酶通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0192-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020192

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141204.0942.002.html>

[网络出版时间] 2014124 9:42

Influence of Different Effective Extracts of Mori Folium on HepG2 Cells HE Xian-xia^{1,2},
CHANG Hua-jing¹, HAI Yang¹, WU Xin-rong^{1*} (1. General Hospital of Guangzhou Military Command of
PLA, Guangzhou 510010, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect and its mechanism of different effective extracts of Mori Folium on the infrared (IR) model of HepG2 cells. **Method:** High glucose and insulin in HepG2 cells to form a cell model of insulin resistance, glucose oxidase detect the expression of glucose consumption, and using the real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) technique to observe the expression level of C-Jun amino terminal kinase (JNK) pathway related genes in different effective extracts of Mori Folium on the IR model of HepG2 cells. **Result:** High sugar and high insulin culture environment capable of inducing cells to produce insulin resistance. All of the groups can increase the glucose consumption ($P < 0.01$) and has the influence on the expression of JNK related genes. **Conclusion:** The alkaloids, flavonoids and polysaccharides of mulberry leaves can increase the glucose consumption on the HepG2 cells, which may be related to regulating JNK signaling pathways.

[Key words] Mori Folium effective extracts; IR-HepG2 cells; JNK pathway

HepG2 细胞是一种表型与肝细胞相似的人肝肿瘤细胞株^[1],亦是体外研究降糖药物改善胰岛素抵抗机制的理想模型^[2]。现代研究证实桑叶具有明显的降血糖作用^[3-5],其有效成分主要是黄酮、多

糖、生物碱。近来发现,当机体处于 2 型糖尿病状态下,往往伴有炎症因子、急性期反应物及其他应激分子水平升高,从而激活相应的应激信号通路,其中就包含了 c-Jun 氨基端激酶 (JNK)^[6]。JNK 信号通路

[收稿日期] 20140504(024)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2011A080300004)

[第一作者] 何美霞,在读硕士,从事天然药物有效部位开发研究, Tel:15017556894, E-mail:xianxiah@sina.cn

[通讯作者] * 吴新荣,主任药师,博士生导师,硕士,从事中药筛选及药理研究, Tel:020-36653476, E-mail:gzwxrong@yahoo.com

是近年来糖尿病发病机制研究的热点,其在肝脏中广泛表达,通过胰岛素信号传递中关键分子的磷酸化改变,在改善胰岛素抵抗中起到关键作用^[7]。鉴于此,本实验以胰岛素抵抗 HepG2 细胞为模型,探讨桑叶生物碱、黄酮及多糖改善胰岛素抵抗状态的作用机制,为进一步开发桑叶为有效的降糖中药提供理论依据。

1 材料

桑叶生物碱(1.2 mg·g⁻¹),桑叶黄酮(22.7 mg·g⁻¹),桑叶多糖(75.26 mg·g⁻¹),马来酸罗格列酮片[葛兰素史克(天津)有限公司,批号 H20031082],均由广州军区广州总医院药剂科提供;结晶牛胰岛素(美国 Sigma),高糖 DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Hyclone),胰蛋白酶(美国 Gibco),葡萄糖测定试剂盒(上海科欣生物技术研究),Total RNA 提取试剂(TriPure,聚研生物科技有限公司),Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche),FastStart Universal SYBR Green Master (Roche),焦碳酸二乙酯 DEPC(Ameresco),PCR 引物(上海英淮捷基贸易有限公司合成),三氯甲烷、异丙醇等其余试剂为国产分析纯。

HT2 型酶标仪(Biocell),Torma 系列 CO₂ 培养箱(Thermo),AIR TECH 型超净工作台(北京格瑞恩科技发展有限公司),KUBOTA 5220 离心机(北京东迅天地医疗仪器有限公司),CK40 型倒置显微镜(日本奥林巴斯),PTC-1148 MJ Mini PCR 仪(Bio-Rad),RG 6000 型实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司),Nano drop2000 微量紫外分光光度计(Thermo),Allegra 64R 型高速低温冷冻离心机(Beckman),超纯水机(Apuapro)。

2 方法

2.1 分组及给药 经预实验,实验分为正常组,模

型组^[8](用含 10 mg·L⁻¹的胰岛素培养液作用细胞 48 h),罗格列酮组,桑叶生物碱组、黄酮组和多糖组,每个分组均给药干预 24 h。

2.2 葡萄糖消耗实验 取对数生长期的 HepG2 细胞,以 5 000 个/孔接种于 96 孔板。每组设 6 个复孔,加药 24 h 后以葡萄糖氧化酶法检测培养液上清液中的葡萄糖含量。以未接种细胞的空白组的葡萄糖含量均值减去各组测得的培养液中葡萄糖含量均值即得各组细胞的葡萄糖消耗量。

2.3 RT-qPCR 引物设计 在 Ensembl genome browser 75 查到目的基因和内参基因的编码序列,使用软件 Oligo 6.0 对所需引物进行设计。JNK 上游引物:5'-GTGGGTTAGGAAATCTGA-3';下游引物:3'-TAATGTATGGGAAGCGTA-5';扩增片段为 190 bp。IRS-1 上游引物:5'-GCCGTGAGGAG-GAGCTAAGC-3';下游引物:3'-GCCACTGAGGACT-GGGACGG-5';扩增片段为 235 bp。AKT 上游引物:5'-AGCACT AAGGCCGTGTC-3';下游引物:3'-CCGTGGAGAGA TCATCTG-5';扩增片段为 185 bp。 β -actin 上游引物:5'-AGCACTAAGGCCGTGTC-3'; β -actin:3'-CCGTGGAGAGATCATCTG-5';扩增片段为 235 bp。

2.4 提取总 RNA 按照 TriPure 试剂盒操作说明提取贴壁细胞总 RNA,经 Nano drop2000 测定其 RNA 浓度后,再取 1 μ g 总 RNA 按照 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书合成 cDNA,所得 cDNA 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.5 RT-qPCR 反应 参照 FastStart Universal SYBR Green Master 试剂盒说明,建立 PCR 反应体系。每个反应做 3 管,放入实时荧光定量 PCR 仪,设置反应程序,见表 1。所得结果用 RG 6000 软件分析,最后运用 Comparative Delta-delta C_t 法对数据进行分析。

表 1 各基因实时荧光定量 PCR 反应程序

Table 1 Real-time quantitative PRC reaction procedure of each gene

基因	RT-qPCR 反应程序
JNK	Hold 95 $^{\circ}$ C, 10 min; Step1 95 $^{\circ}$ C, 15 s; Step2 50 $^{\circ}$ C, 30 s; Step3 72 $^{\circ}$ C, 30 s; Melt 72 ~ 95 $^{\circ}$ C
IRS-1	Hold 95 $^{\circ}$ C, 10 min; Step1 95 $^{\circ}$ C, 15 s; Step2 58 $^{\circ}$ C, 15 s; Step3 72 $^{\circ}$ C, 30 s; Melt 72 ~ 95 $^{\circ}$ C
AKT	Hold 95 $^{\circ}$ C, 10 min; Step1 95 $^{\circ}$ C, 10 s; Step2 54 $^{\circ}$ C, 30 s; Step3 72 $^{\circ}$ C, 30 s; Melt 72 ~ 95 $^{\circ}$ C

注:循环数均为 50 cycles。

2.6 统计学方法 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理使用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素的方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

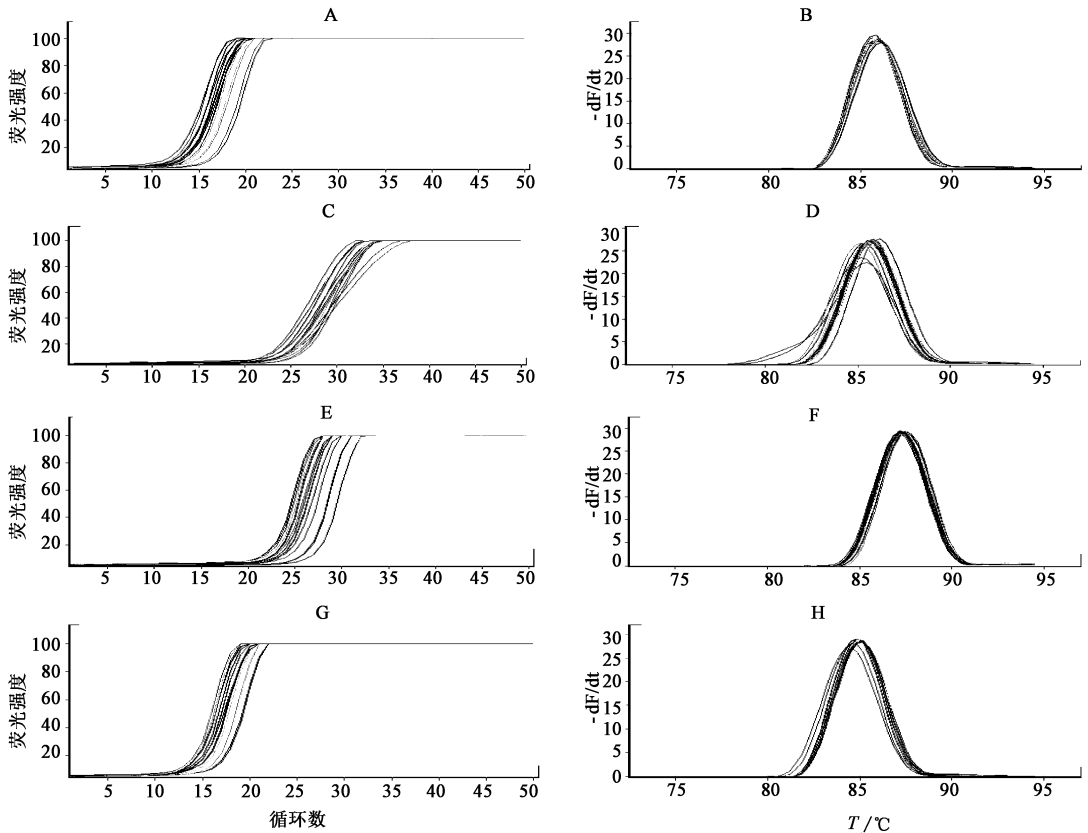
3 结果

3.1 不同组细胞葡萄糖消耗量情况 与正常组比较,经过高浓度胰岛素作用后,模型组对胰岛素的敏

感性降低,细胞葡萄糖消耗量明显减少($P < 0.01$),表明该模型组细胞对胰岛素产生抵抗;与模型组及阳性药罗格列酮比较,高、中、低剂量的生物碱和高剂量的黄酮、多糖组均能增加模型组细胞的葡萄糖消耗量,说明药物干预有可能改善了细胞的胰岛素抵抗状态,对模型组细胞的胰岛素抵抗状态起到了

修复作用,其差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

3.2 各基因的扩增曲线和溶解曲线 经 RG 6000 软件分析,每组 3 个复孔的扩增曲线拟合良好,溶解曲线无拖尾或杂峰,说明实验 PCR 反应体系稳定,引物特异性较好,结果可靠。见图 1。



A. β -actin 的扩增曲线; B. β -actin 的溶解曲线; C. JNK 的扩增曲线; D. JNK 的溶解曲线; E. IRS-1 的扩增曲线; F. IRS-1 的溶解曲线; G. AKT 的扩增曲线; H. AKT 的溶解曲线

图 1 不同基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线、溶解曲线

Fig. 1 Real-time quantitative PCR amplification curves & melting curves for each gene

表 2 桑叶各降糖有效部位对 HepG2 及 IR HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of mulberry leaves extracts on glucose consumption in insulin resistance of HepG2 and IR HepG2 cell ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	葡萄糖消耗量/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	8.305 ± 0.014
模型	-	$4.940 \pm 0.016^{(1)}$
罗格列酮	0.01	$9.487 \pm 0.003^{(1,2)}$
桑叶生物碱	2	$7.464 \pm 0.029^{(2)}$
	5	$8.822 \pm 0.031^{(2)}$
	10	$9.634 \pm 0.041^{(1,2)}$
桑叶黄酮	5	$0.845 \pm 0.032^{(1,2)}$
	100	$3.461 \pm 0.020^{(1,2)}$
	200	$6.269 \pm 0.019^{(1,2)}$
桑叶多糖	5	$1.543 \pm 0.028^{(1,2)}$
	100	$3.440 \pm 0.024^{(1,2)}$
	200	$6.254 \pm 0.013^{(1,2)}$

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

3.3 桑叶生物碱、黄酮及多糖对 JNK 信号通路相关基因表达的影响 通过 QPCR 技术检测 JNK 通路各基因在 IR HepG2 细胞中的表达差异,结果显示:①与正常组比较,模型组中 JNK mRNA 的相对表达量显著增加($P < 0.01$);与模型组相比较,各个药物干预组的 JNK mRNA 的相对表达量都降低了,其中桑叶生物碱组降低最显著。②与正常组比较,模型组中 IRS-1 mRNA 的相对表达量显著降低($P < 0.01$);与模型组相比较,各个药物干预组的 IRS-1 mRNA 的相对表达量都增加了,其中桑叶生物碱组增加最显著。③与正常组比较,模型组中 AKT mRNA 的相对表达量显著降低($P < 0.01$);与模型组相比较,各个药物干预组的 AKT mRNA 的相对表

达量都增加了,其中桑叶生物碱组增加最显著。见表3。

表3 桑叶各降糖有效部位干预对 IR HepG2 细胞 JNK, IRS-1, AKT mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effects of each group of drugs on JNK, IRS-1, AKT mRNA in IR-HepG2 cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	JNK	IRS-1	AKT
正常	0.72 ± 0.12	1.78 ± 0.14	2.03 ± 0.08
模型	1.01 ± 0.05 ¹⁾	1.03 ± 0.07 ¹⁾	1.04 ± 0.01 ¹⁾
罗格列酮	0.82 ± 0.07 ^{1,2)}	2.77 ± 0.11 ^{1,2)}	2.37 ± 0.13 ^{1,2)}
桑叶生物碱	0.74 ± 0.09 ²⁾	4.39 ± 0.08 ^{1,2)}	5.30 ± 0.06 ^{1,2)}
桑叶黄酮	0.83 ± 0.11 ^{1,2)}	3.02 ± 0.09 ^{1,2)}	3.17 ± 0.12 ^{1,2)}
桑叶多糖	0.81 ± 0.07 ^{1,2)}	3.00 ± 0.13 ^{1,2)}	2.29 ± 0.07 ^{1,2)}

4 讨论

2型糖尿病主要是由胰岛β细胞功能障碍和外周组织的胰岛素抵抗导致的,改善胰岛素抵抗状态是治疗2型糖尿病的主要药效机制之一^[9]。众多研究表明^[6,10-11],在2型糖尿病患者及糖尿病动物模型中,其许多组织的JNK活性均升高,而通过特异性敲除JNK1基因或者通过降糖药物^[7,12]来抑制体内JNK,ph-JNK的表达可改善2型糖尿病的胰岛素抵抗状态。本实验通过测定桑叶生物碱、黄酮和多糖干预IR HepG2细胞后的葡萄糖消耗量,同时应用RT-qPCR技术对JNK,IRS-1,AKT mRNA在IR HepG2细胞中的表达差异进行了定量检测,从体外层面初步探讨了桑叶生物碱、黄酮及多糖改善HepG2细胞胰岛素抵抗的作用机制。从实验结果来看,桑叶生物碱、黄酮及多糖增加胰岛素抵抗HepG2细胞的葡萄糖消耗量的同时,其均可抑制JNK mRNA,增强IRS-1 mRNA,AKT mRNA的表达,由此推断,通过调节JNK信号通路相关基因的表达,可能是改善胰岛素抵抗状态下葡萄糖摄取的重要机制之一。

[参考文献]

[1] 苗宇船,李明磊,刘杨,等. 脂多糖对 HepG2 细胞胰岛

素抵抗的影响[J]. 北京中医药大学学报,2012,35(4):261-264.

[2] Gupta D, Varma S, Khandelwal R L. Long-term effects of tumor necrosis factor-alpha treatment on insulin signaling pathway in HepG2 cells and HepG2 cells overexpressing constitutively active Akt/PKB[J]. J Cell Biochem, 2007, 100(3):593-607.

[3] Andallu B, Suryakantham V, Lakshmi S B, et al. Effect of mulberry (*Morus indica* L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes[J]. Clin Chim Acta, 2001, 314(1/2):47-53.

[4] Andallu B, Varadacharyulu N C. Antioxidant role of mulberry (*Morus indica* L. cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats[J]. Clin Chim Acta, 2003, 338(1/2):3-10.

[5] Miyahara C, Miyazawa M, Satoh S, et al. Inhibitory effects of mulberry leaf extract on postprandial hyperglycemia in normal rats[J]. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2004, 50(3):161-164.

[6] 王慧敏,都健. JNK 信号转导通路与2型糖尿病[J]. 国际内科学杂志,2009,36(3):128-131.

[7] 丁俊,章秋,李芳,等. 二甲双胍对2型糖尿病大鼠肝脏JNK表达的影响[J]. 安徽医科大学学报,2010,45(3):334-337.

[8] 方飞,吴新荣,罗明俐,等. 桑叶有效部位对胰岛素抵抗 HepG2 细胞体外糖代谢的影响[J]. 广东药学院学报,2011,27(6):637-640.

[9] 刘志霞,韩淑英,李继安. 人肝癌细胞胰岛素抵抗模型建立及有效中药成分的筛选[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(28):5241-5243.

[10] 李芳. 胰岛素增敏剂对糖尿病大鼠肝脏及 JNK 表达的影响[D]. 合肥:安徽医科大学,2009.

[11] 吴元洁,方朝晖,郑书国,等. 丹蛭降糖胶囊联合运动对糖尿病大鼠胰腺 JNK 信号通路的影响[J]. 中西医结合学报,2012,10(11):1279-1285.

[12] 刘光宇,安振梅. 罗格列酮钠保护 STZ 糖尿病大鼠胰岛β-细胞及对 JNK 信号通路的影响研究[J]. 四川大学学报医学版,2009,40(3):430-434.

[责任编辑 邹晓翠]