

# 苦荞麦总黄酮对软脂酸诱导 EA. hy926 细胞 PI3K 合成的影响

赵丹玉<sup>1</sup>, 李刚<sup>2</sup>, 王艳杰<sup>1</sup>, 冯晓帆<sup>1</sup>, 杨雪峰<sup>1</sup>, 柳春<sup>1\*</sup>

(1. 辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847; 2. 日本三益制药株式会社, 东京)

**[摘要]** 目的:研究苦荞麦总黄酮对于软脂酸诱导 EA. hy926 细胞 PI3K 合成的影响。方法:将体外培养的 EA. hy926 细胞分为正常组、模型组、苦荞麦总黄酮组及二甲双胍组。采用 RT-PCR 以及免疫细胞化学法分别测定各组细胞 PI3K mRNA 和蛋白的表达。结果:模型组细胞 PI3K mRNA 和蛋白表达与正常组相比明显下降( $P < 0.01$ )。苦荞麦总黄酮组与二甲双胍组细胞 PI3K mRNA 和蛋白表达与模型组相比明显增加( $P < 0.01$ )。治疗组间无明显差异。结论:苦荞麦总黄酮对于软脂酸诱导下 EA. hy926 细胞 PI3K 合成具有明显促进作用。

**[关键词]** 苦荞麦总黄酮; PI3K; 胰岛素抵抗

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0169-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030169

## Effect of Total Flavonoids of Tartary Buckwheat on Palmitic Acid-induced PI3K Synthesis in EA. hy926

Cells ZHAO Dan-yu<sup>1</sup>, LI Gang<sup>2</sup>, WANG Yan-jie<sup>1</sup>, FENG Xiao-fan<sup>1</sup>, YANG Xue-feng<sup>1</sup>, LIU Chun<sup>1\*</sup>

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 2. Japan Samick Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of total flavonoids of tartary buckwheat on palmitic acid-induced PI3K in EA. hy926 cells. **Method:** EA. hy 926 cells were cultured *in vitro* and divided into the control group, the model group, the total flavonoids of tartary buckwheat group and the metformin group. The PI3K mRNA and protein expression levels were determined by RT-PCR and immunocytochemistry, respectively. **Result:** Compared with the control group, the expression levels of PI3K mRNA and protein were significantly lower in the control group ( $P < 0.01$ ). Compared with the control group, the PI3K mRNA and protein expression increased markedly in both total flavonoids of tartary buckwheat group and metformin group ( $P < 0.01$ ), and there is no significant difference between two groups. **Conclusion:** Total flavonoids of tartary buckwheat could effectively promote the expression of PI3K mRNA and protein in endothelial cells under palmitic acid stimulation.

**[Key words]** total flavonoids of tartary buckwheat; PI3K; insulin resistance

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是指胰岛素作用的靶器官对胰岛素作用的敏感性下降,即正常剂量的胰岛素不能产生正常生物学效应的一种状态<sup>[1]</sup>。胰岛素抵抗是代谢综合征的主要发病机制之一,是促使糖尿病、高血压、高血脂等疾病发生发展的最重要和最根本的原因,故此胰岛素抵抗问题一直是世界医学研究的热点。最近研究表明,IR 的发生与胰岛素不能顺利穿过毛细血管到达靶细胞密

切相关,因此血管内皮细胞的功能异常在 IR 的发病机制中占有重要地位<sup>[2]</sup>。本实验体外培养的人脐静脉内皮细胞株 EA. hy926 细胞,通过高浓度软脂酸诱导,建立胰岛素抵抗状态细胞模型,研究苦荞麦总黄酮对于胰岛素抵抗状态下的 EA. hy926 细胞中 PI3K mRNA 和蛋白表达的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人脐静脉血管内皮细胞株 EA. hy926

**[收稿日期]** 20140506(004)

**[基金项目]** 辽宁省杰出青年学者成长计划项目(LJQ2013102);辽宁省博士科研启动基金项目(20121100);辽宁省社发攻关及成果转化项目(2013020195-202)

**[第一作者]** 赵丹玉,博士,副教授,从事中药及其提取物对受体及受体后信号转导途径的研究, Tel: 13889113591, E-mail: danyu1978@163.com

**[通讯作者]** \*柳春,博士,教授,从事中药及其提取物对受体及受体后信号转导途径的研究, Tel: 024-31207093, E-mail: liuchun5@aliyun.com

(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心), DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶、双抗(美国 HyClone 公司), RT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司), 二甲双胍(上海生工生物工程有限公司), 苦荞麦总黄酮(日本三益制药株式会社提供, 经显色分光光度法测定黄酮样品中总黄酮含量为 99.16%, 即黄酮样品中总黄酮质量分数为 991.645 mg·g<sup>-1</sup>), 一抗兔抗人 PI3K 抗体、二抗 HRP 标记山羊抗兔 IgG(均为美国 Cell Singling 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 试剂配制** 软脂酸的配制: 称取 0.04 g NaOH 加去离子水 10 mL, 配制成 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液。取 0.025 6 g 软脂酸加入到上述 1 mL NaOH 溶液中, 70 °C 充分溶解, 即成 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 软脂酸钠溶液。称 0.5 g 不含脂肪酸的牛血清白蛋白(BSA), 加去离子水至 10 mL, 配制成 5% BSA 溶液。吸取 1 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 软脂酸钠溶液加入到 9 mL BSA 溶液中(1:9 混合), 混匀, 37 °C 反应 1 h, 过滤, 4 °C 保存备用。

苦荞麦总黄酮: 用二甲基亚砷配制成质量浓度为 25 g·L<sup>-1</sup> 的母液, 过滤, 室温保存。

**1.2.2 EA.hy926 细胞的培养** 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基常规培养 EA.hy926 细胞。取生长状态良好处于对数生长期的细胞传代, 接种于培养瓶或 24 孔培养板中待用。

**1.2.3 实验分组** 实验分为正常组、模型组、苦荞麦总黄酮组、二甲双胍组。各组细胞均加入含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基和终浓度为 50 nmol·L<sup>-1</sup> 的胰岛素, 除正常组外, 其他各组加入终浓度为 600 μmol·L<sup>-1</sup> 的软脂酸建立胰岛素抵抗血管内皮细胞模型<sup>[3]</sup>; 根据本实验前期研究结果, 苦荞麦总黄酮组加入终质量浓度为 125 mg·L<sup>-1</sup> 的苦荞麦总黄酮<sup>[4]</sup>; 二甲双胍组加入终浓度为 2 mmol·L<sup>-1</sup> 的二甲双胍。

**1.2.4 RT-PCR 测定细胞 PI3K mRNA 表达** 将细胞按 5 × 10<sup>5</sup>/mL 的密度接种于培养瓶里, 各组细胞加入处理因素 24 h 后, 提取细胞总 RNA, 并测定浓度及纯度。按 RT-PCR 试剂盒说明进行操作。PI3K 上游引物序列为: 5'-ATGGGGATGATTTACGGC-3', 下游引物序列为: 5'-CTCCTTTGTTCTTGTCTTTGA-3', 扩增片段大小 256 bp, 退火温度为 65 °C。β-actin 上游引物序列: 5'-ACACGAAAGCAA TGCTATCACCTC-3', 下游引物序列: 5'-TGACAGC AGTCCGTTGGAGCGA-3' 扩增片段长度 153 bp, 退火温度为 65 °C。PCR 扩增结束后, 将其产物进行琼

脂糖凝胶电泳, 并采用凝胶成像分析系统对其结果进行分析。以各组 PI3K 条带吸光度与相应内参条带吸光度的比值, 来表示 PI3K mRNA 表达的强弱。

**1.2.5 免疫细胞化学法测定细胞 PI3K 蛋白表达** 细胞接种于 24 孔板, 按上述分组加药处理结束后, 各组细胞处理后用多聚甲醛固定, PBS 冲洗 3 遍, 加 0.5% 的 Triton × 100 20 min, 再次用 PBS 冲洗 3 遍, 加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 min。5% BSA 封闭 20 min, 加入兔抗人 PI3K 抗体(1:1 000 稀释), 37 °C 处理 2 h 后, 4 °C 过夜。用 HARP 标记的羊抗兔 IgG, 37 °C 20 min。PBS 冲洗 3 遍, DAB 法显色。阴性对照: 一抗用 PBS 代替, 其余条件相同。二抗采用 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:1 000 稀释), 常温 2 h, DAB 染色。扫描条带测定积分吸光度(IA)。

**1.2.6 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件, 各组数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 进行单因素方差分析, 两两比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组细胞 EA.hy926 PI3K mRNA 的表达** RT-PCR 结果表明与正常组相比, 模型组细胞 PI3K mRNA 表达明显减少( $P < 0.01$ ); 苦荞麦总黄酮组与二甲双胍组与模型组相比 PI3K mRNA 表达显著增加( $P < 0.01$ ), 苦荞麦总黄酮组与二甲双胍组间无显著差异, 见表 1。

表 1 各组 EA.hy926 细胞 PI3K mRNA 及蛋白表达结果( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Expression levels of PI3K mRNA and protein in each group( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量	PI3K mRNA /β-actin mRNA	PI3K 蛋白表达 /IA
正常	-	0.987 ± 0.011	0.556 ± 0.010
模型	-	0.467 ± 0.018 <sup>1)</sup>	0.348 ± 0.099 <sup>1)</sup>
苦荞麦总黄酮	125 mg·L <sup>-1</sup>	0.724 ± 0.024 <sup>2)</sup>	0.478 ± 0.007 <sup>2,3)</sup>
二甲双胍	2 mmol·L <sup>-1</sup>	0.694 ± 0.842 <sup>2)</sup>	0.505 ± 0.007 <sup>2)</sup>

注: 与正常组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与二甲双胍组相比<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

**2.2 各组细胞 EA.hy926 PI3K 蛋白的表达** 对照组可见大量 PI3K 阳性表达细胞, 且呈强阳性表达; 模型组 PI3K 阳性表达细胞数量显著减少, 阳性程度较弱; 苦荞麦总黄酮组和二甲双胍组可见大量 PI3K 阳性表达细胞, 阳性程度与模型组相比显著增加, 见表 1。

## 3 讨论

胰岛素抵抗的发病机制尚未完全清楚, 目前认为从分子水平上包括受体前、受体和受体后 3 个环节<sup>[5]</sup>。胰岛素由胰岛的 β 细胞分泌后, 经血液循环

至毛细血管,穿过血管内皮屏障后同靶细胞表面的胰岛素受体结合,从而激活靶细胞内的相关信号途径,产生生物学效应。其中任何环节出现问题都会导致胰岛素抵抗。血液中的胰岛素首先同血管内皮细胞表面的胰岛素受体(IR)结合,激活细胞内的胰岛素受体底物-2(IRS-2),使其磷酸化,进一步激活磷脂酰肌醇3激酶(PI3K),蛋白激酶B(AKT)等,内皮型一氧化氮合酶(eNOS)被磷酸化激活,NO合成增加,毛细血管舒张,通透性增强。此即为胰岛素依赖的血管内皮细胞IRS-2/eNOS信号途径。最近研究表明<sup>[2]</sup>,该途径是胰岛素穿过内皮屏障作用于靶组织的枢纽,而2型糖尿病患者血管内皮细胞NO合成下降,该途径出现明显障碍。因此提高该信号途径,增加NO的释放,促进胰岛素越过内皮屏障可以作为改善IR的治疗策略。

目前,2型糖尿病胰岛素抵抗的治疗药物主要有双胍类药物、血管紧张素转换酶抑制剂以及胰岛素增敏剂等<sup>[6]</sup>。这些西药治疗虽然起效快,降糖效果较好,但是副作用较大,对某些并发症改善不明显,不适合长期用药。苦荞麦作为一种蓼科药食兼用的植物资源,其医疗保健作用在中国历代医书中多有阐述,现代医学研究也证明苦荞麦具有多种生理功能<sup>[7]</sup>,如降血糖、降血脂、类雌激素作用<sup>[8]</sup>、调节血压以及扩张血管<sup>[9]</sup>等。本研究前期工作<sup>[3]</sup>已提取出苦荞麦的有效成分总黄酮,并发现其可以有效增加血管内皮细胞NO的合成,从而使毛细血管扩张,通透性增加。NO的合成与IRS-2/eNOS信号途径密切相关,是该途径的效应分子,因此本课题提出假说:苦荞麦总黄酮可以通过提高血管内皮细胞内胰岛素依赖的IRS-2/eNOS信号途径,增加NO的释放,提高血管通透性,达到缓解胰岛素抵抗的目的。本实验研究了IRS-2/eNOS信号途径中关键分子PI3K的表达,为解释苦荞麦总黄酮治疗胰岛素抵抗提供实验依据。

本实验用高浓度的脂肪酸建立了胰岛素抵抗细胞模型,这是目前比较公认的较为成熟的模型建立方法<sup>[2]</sup>。实验结果表明,与正常对照组相比,模型组细胞PI3K的mRNA与蛋白表达均明显下降,结合前期实验及文献<sup>[10-11]</sup>,说明本实验的造模是成功的,同时也说明胰岛素抵抗状态下血管内皮细胞内PI3K的表达受到了抑制,可推测IRS-2/eNOS信号途径在高浓度脂肪酸的作用下被有效抑制。苦荞麦总黄酮组与二甲双胍组细胞PI3K mRNA与蛋白表达较模型组明显提高,说明苦荞麦总黄酮与二甲双胍能增强胰岛素抵抗状态下血管内皮细胞PI3K

mRNA以及蛋白的表达,进而有可能提高血管内皮细胞内的IRS-2/eNOS信号途径,从而增加血管舒张因子NO的合成,起到扩张血管,增加血管通透性的作用,利于胰岛素通过血管屏障转运至靶组织发挥其生物学活性。这可能是苦荞麦治疗胰岛素抵抗的机制之一。2型糖尿病是一种进展性疾病,病程长,甚至是终身性的,所以药物的安全性问题备受关注。本实验表明,苦荞麦总黄酮提高血管内皮细胞内的IRS-2/eNOS信号途径的作用与二甲双胍相当,但是由于中药本身具有多靶点,多途径的特点,加上苦荞麦本身是药食同源的经济作物,种植广泛,副作用小、价格低廉的优势,具有广阔的开发前景。

#### [参考文献]

- [1] 王剑侠,郑涛,舒广文,等. 榭藤子总皂苷改善胰岛素抵抗机制的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(20):157-161.
- [2] Kubota T, Kubota N, Kumagai H, et al. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle [J]. Cell Metabolism, 2011, 13(3):294-307.
- [3] 潘丽丽. 游离脂肪酸对人脐静脉内皮细胞eNOSmRNA及ET-1mRNA表达水平的影响[D]. 石家庄:河北医科大学,2004.
- [4] 杨雪峰,张瑞鹏,李刚,等. 苦荞麦总黄酮对软脂酸诱导EA.hy926细胞NO合成的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012,28(10):1055-1057.
- [5] 王家琳,陶存武,冀舒文,等. 2型糖尿病胰岛素抵抗的中医药治疗与研究[J]. 安徽中医药临床杂志, 2010,22(1):28-31.
- [6] 明志红,肖伟,黄雁玲. 二甲双胍联合用药治疗2型糖尿病的疗效观察[J]. 当代医学,2010,16(9):51.
- [7] 谭玉荣,陶兵兵,关郁芳,等. 苦荞类黄酮的研究现状及展望[J]. 食品工业科技,2012,33(18):377-381.
- [8] Wang Anming, Zhang Fangkai, Huang Lifeng, et al. New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids [J]. J Med Pla Res, 2010,4(10):847-856.
- [9] Schini-Kerth V B, Etienne-Selloum N, Chataigneau T, et al. Vascular protection by natural product-derived polyphenols: *in vitro* and *in vivo* evidence [J]. Planta Medica, 2011,77(11):1161-1167.
- [10] Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells [J]. Diabetes, 2000,49(11):1939-1945.
- [11] Whiteside C I. Cellular mechanisms and treatment of diabetes vascular complications converge on reactive oxygen species [J]. Cur Hypert Rep, 2005, 7(2): 148-154.

[责任编辑 邹晓翠]