

# 桑叶有效部位对高胰岛素诱导人肝癌 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响

常化静<sup>1,2</sup>, 何美霞<sup>1</sup>, 贺胜<sup>1</sup>, 周杏子<sup>1</sup>, 吴新荣<sup>1\*</sup>

(1. 广州军区广州总医院, 广州 510010; 2. 南方医科大学, 广州 510515)

**[摘要]** 目的:观察桑叶有效部位(总多糖、总黄酮、总生物碱)影响核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路对高胰岛素诱导人肝癌 HepG2 细胞胰岛素抵抗的改善作用。方法:以人肝癌 HepG2 细胞为研究对象,在含  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  胰岛素的培养基中培养 48 h,建立 IR-HepG2 模型;采用桑叶有效部位观察对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响,从而确定最佳给药浓度。实验分为空白组,  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  胰岛素处理组(模型组),总多糖组,总黄酮组,总生物碱组,小白菊内酯组。采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法(GOD-POD)法检测培养液中残存葡萄糖含量,RT-qPCR 法检测 NF- $\kappa$ B, I- $\kappa$ B 激酶- $\beta$ (I $\kappa$ K $\beta$ )及核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ ) mRNA 的表达,Western blot 检测蛋白 NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ K $\beta$  及 I $\kappa$ B $\alpha$  的相对表达量。结果:经桑叶有效部位改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的筛选得出各给药组最佳给药剂量分别为总多糖组、总黄酮组、总生物碱组、小白菊内酯组最佳给药质量浓度分别为  $200, 100, 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}, 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与空白组比较,高胰岛素刺激后,NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ K $\beta$  含量明显升高( $P < 0.01$ ),NF- $\kappa$ B 结合蛋白 I $\kappa$ B $\alpha$  明显降低( $P < 0.01$ ),表明高胰岛素刺激后 NF- $\kappa$ B 通路已被部分激活;而桑叶有效部位干预后,与模型组相比,只有黄酮组 NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ K $\beta$  的含量明显降低( $P < 0.05$ ),抑制 I $\kappa$ B $\alpha$  的降解( $P < 0.05$ );多糖组和生物碱组影响作用不明显。结论:高胰岛素诱导人肝癌 HepG2 细胞发生胰岛素抵抗后,NF- $\kappa$ B 通路在一定程度上被激活,推测胰岛素抵抗与 NF- $\kappa$ B 炎症通路间存在一定的关系;而桑叶黄酮可影响 NF- $\kappa$ B 通路从而改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗状态。

**[关键词]** HepG2 细胞; 胰岛素抵抗; 桑叶总多糖; 桑叶总黄酮; 桑叶总生物碱; 核因子- $\kappa$ B; 核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$ ; I- $\kappa$ B 激酶- $\beta$

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)05-0163-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050163

**Effective Ingredients from Mori Folium on Improving High Insulin-induced Insulin Resistance in Human HepG2 Cells** CHANG Hua-jing<sup>1,2</sup>, HE Xian-xia<sup>1</sup>, HE Sheng<sup>1</sup>, ZHOU Xing-zi<sup>1</sup>, WU Xin-rong<sup>1\*</sup> (1. General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou 510010, China; 2. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Mori Folium effective parts (total polysaccharides, flavonoids and total alkaloids) on high insulin-induced insulin resistance of human hepG2 cells by nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway. **Method:** The insulin resistance cell model was induced by insulin stimulated human HepG2 cells for 48 h. The experimental groups were the control group, the model group ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  insulin), total polysaccharide (MFP) group, total flavonoid (MFF) group, the total alkaloid group (MFA), parthenolide (PTL) group. Residual glucose content of liquid culture was detected using glucose oxidase-peroxidase method (GOD-POD). Expressions of NF- $\kappa$ B, I- $\kappa$ B kinase  $\beta$  (I $\kappa$ K $\beta$ ) and inhibitor  $\kappa$ B protein  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ) mRNA were detected using RT-qPCR. The relative expressions of protein NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ K $\beta$  and I $\kappa$ B $\alpha$  were detected using Western blot. **Result:** The optimal doses against insulin resistance for MFP, MFF, MFA and PTL were  $200, 100, 10, 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. After insulin stimulation, NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ K $\beta$  activity were enhanced significantly ( $P < 0.01$ ), NF- $\kappa$ B binding protein I $\kappa$ B $\alpha$  decreased significantly ( $P < 0.01$ ), which indicated that NF- $\kappa$ B pathway had been

**[收稿日期]** 20140621(006)

**[基金项目]** 广东省重大科技专项(2011A080300004)

**[第一作者]** 常化静,在读硕士,从事中药制剂开发研究,Tel:15625065030,E-mail:843118534@qq.com

**[通讯作者]** \*吴新荣,硕士,主任药师,从事中药筛选及药理研究,Tel:020-88653476,E-mail:gzwrxrong@yahoo.com

activated. After intervention of the mulberry effective parts, only flavonoids could lower NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ K $\beta$  activity significantly ( $P < 0.05$ ), inhibit the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  ( $P < 0.05$ ). The results was not significant in polysaccharide group and alkaloid group. **Conclusion:** After high insulin-induced insulin resistance in HepG2 cells, NF- $\kappa$ B pathway was activated to some extent, suggesting that there is a certain relationship between insulin resistance and NF- $\kappa$ B inflammatory pathways. Meanwhile, mulberry flavonoids could improve the insulin resistance by NF- $\kappa$ B pathway.

[**Key words**] HepG2 cells; insulin resistance; polysaccharide from Mori Folium; flavonoid from Mori Folium; alkaloid from Mori Folium; nuclear factor- $\kappa$ B; inhibitor  $\kappa$ B protein  $\alpha$ ; I $\kappa$ B kinase  $\beta$

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是指胰岛素敏感组织如肝、骨骼肌、脂肪等组织受胰岛素介导的葡萄糖摄取和利用效能减低的一种病理生理状态。胰岛素抵抗是肥胖、2 型糖尿病、血脂障碍的共同病理生理改变<sup>[1]</sup>。胰岛素抵抗的发生机制已成为当今的研究热点之一。目前大量研究<sup>[2]</sup>认为,核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的激活与胰岛素抵抗的发生发展密切相关。

Pomy Barma 等<sup>[3]</sup>已发现脂多糖诱导 NF- $\kappa$ B 过表达导致骨骼肌细胞发生胰岛素抵抗。Padilha 等<sup>[4]</sup>也发现桑叶可以抑制炎症因子的产生,发挥一定的抗炎活性。前期的研究结果<sup>[5]</sup>也发现桑叶可有效改善胰岛素抵抗状态降低血糖,其作用机制可能与调节炎症因子的产生、抑制炎症反应有关。然而胰岛素抵抗状态下炎症机制研究相对较少。本实验选取 HepG2 作为研究对象,观察研究桑叶有效部位——桑叶多糖、桑叶黄酮、桑叶生物碱对胰岛素抵抗状态下对 NF- $\kappa$ B 通路相关基因蛋白表达的影响。

## 1 材料

**1.1 细胞** 人肝癌 HepG2 细胞株,由广州军区广州总医院医学实验科提供。

**1.2 药物及试剂** 小白菊内酯 (parthenolide, PTL, 成都瑞芬生物科技,批号 X-028130403) 以 DMSO 溶液配成 100 mmol·L<sup>-1</sup> 并保存于 4 ℃; 桑叶多糖 (Mori Folium polysaccharides, MFP)、桑叶黄酮 (Mori Folium flavonoids, MFF)、桑叶生物碱 (Mori Folium alkaloids, MFA) 浸膏 (广州军区广州总医院药剂科提供)。胎牛血清 (美国 Hyclone 公司,批号 96118006-2), DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基 (美国 Hyclone 公司,批号 NXD0620), CCK-8 试剂盒 (碧云天生物技术研究,批号 20130735), 葡萄糖测定试剂盒 (碧云天生物技术研究,批号 20130830), TriPure 试剂盒 (瑞士 ROX 公司,批号 B5702-1), 逆转录试剂盒 (瑞士 ROX 公司,批号 BK1301), 荧光定量 PCR 反应试剂盒 (瑞士 ROX 公司,批号

BK1303), BCA 法蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术研究), 兔抗 NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ), I $\kappa$ B 激酶  $\beta$  (I $\kappa$ K $\beta$ ) 单克隆抗体,  $\beta$ -actin (美国 CST 公司,批号分别为 D14E12, 44D4, 2C8, 122625), HRP 标记的羊抗兔二抗 (聚研生物科技有限公司,批号 BA1054)。

**1.3 仪器** YSK-370 型酶标仪 (瑞士 Biocell 公司), 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司), 超净工作台 (日本 Air Tech 公司), Kubota 5220 型离心机 (日本久保田公司), CK40 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), ABI Prism 7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Science 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 人肝癌 HepG2 细胞常规培养于含 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中,在 37 ℃, 体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中进行培养。细胞为贴壁生长, 0.25% 的胰蛋白酶消化传代, 每隔 2 d 换液。取对数生长期细胞进行实验。

**2.2 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的建立** 在参考文献的基础上<sup>[6]</sup>加以改进, 将细胞以 4 500 个/孔接种于 96 孔培养板中。分为空白组和模型组。待细胞贴壁长至 80% 后, PBS 洗 2 次, 加入新配置的含有 10 mg·L<sup>-1</sup> 胰岛素的培养液, 于 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 48 h, 用葡萄糖氧化酶法分别测定各组的细胞上清葡萄糖水平, 同期在显微镜下观察细胞的形态学变化, 最后计算各胰岛素组与空白组的差值。通过葡萄糖消耗差值计算及细胞形态观察确定 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型。

**2.3 HepG2 的胰岛素抵抗模型** 在桑叶提取物药物浓度筛选中的应用及 CCK8 法测定细胞活性 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型成功建立后, 将模型细胞分为 MFP, MFF, MFA, PTL 组和胰岛素抵抗细胞模型组, 同时设正常细胞培养的细胞做对照。除空白组和胰岛素抵抗细胞模型组以外, 其他 4 组分别加入相应的药物 (MFP 质量浓度为 50, 100, 200 mg·L<sup>-1</sup>;

MFF 质量浓度为 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup>; MFA 质量浓度为 5, 10, 20 mg·L<sup>-1</sup>; PTL 浓度为 10, 15, 20 μmol·L<sup>-1</sup>) 完全培养基, 空白组和胰岛素抵抗细胞模型组不加药物用完全培养基继续培养。各组设 3 各复孔。药物干预到 24 h 后葡萄糖氧化酶法测定各组细胞上清葡萄糖含量, 以未接种细胞的空白组的葡萄糖含量均值减去测得的培养液中葡萄糖含量即得各孔细胞的葡萄糖消耗量; 然后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 轻轻震荡混匀, 继续孵育 2 h, 酶标仪波长 450 nm 处检测吸光度(A), 判断细胞活性。

**2.4 RT-qPCR 法检测 NF-κB 信号通路相关基因 mRNA 的表达** 建立 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型, 给予桑叶有效提取物及 PTL 药物干预, 收集各实验组细胞, 用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA, 鉴定 RNA 完整性及纯度, 各组按照 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche 公司) 合成第一链 cDNA, cDNA 产物于 -20 ℃ 保存。Ensembl genome 查找 NF-κB 信号通路相关基因 NF-κB, IκBα, IκKβ 的序列, Blast 比对, 确定最终编码序列; primer 5 软件设计基因上下游引物序列。在 Rotor-Gene Q Series Software 1.7 进行实时定量 PCR 扩增及荧光检测, PCR 反应条件为 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 15 s, 56 ℃ 15 s, 72 ℃ 30 s (NF-κB, 40 循环), 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 15 s, 57 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s (IκKβ, 40 循环), 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 15 s, 59 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s (IκBα, 40 循环)。扩增目的基因, 扩增结束后, 根据 2<sup>-Δct</sup> 来计算各基因的相对表达量。根据以 β-actin 作为内参引物序列, 上游: 5'-TGACGTGGAC ATCCGCAAAG-3', 下游: 5'-CTGGAAGGTGGAC AGCGAGG-3'; NF-κB, 上游: 5'-GGACCAGCAAA GGTATTGTTC-3', 下游: 5'-TTATACACGCCTCTG TCATTCC-3'; IκKβ, 上游: 5'-GTTTGAGA ACTGCTG TGGTCTG-3', 下游: 5'-AACTTCACCGTTCCATTC AAGT-3'; IκBα, 上游: 5'-ATGAATGGTCCGACAGCG-3', 下游: 5'-CGTAGCCGAAGACGAGGG-3'。

**2.5 Western blot 法检测 NF-κB 信号通路相关蛋白的相对表达量** PBS 洗涤各实验组细胞 2 次, 收集各实验组细胞, 加入新鲜配置的 RIPA 细胞裂解液并置于冰上裂解 30 min, 于 4 ℃, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min, 收集上清液, BCA Protein Assay 测定上清蛋白水平, 定量后将蛋白浓度调整为一致<sup>[7]</sup>, 加等量的 3 × 十二烷基硫酸钠 (SDS) 上样缓冲液, 100 ℃ 煮沸变性 10 min, 等量蛋白 (60 μg) 上样, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDA-PAGE) 电泳后, 转

膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后, 加入相应的一抗 4 ℃ 孵育过夜, 以 β-actin 作内参照。TBST 洗膜 3 次, 加入 HRP 标记的二抗, 37 ℃ 孵育 1 h, 洗膜 3 次, ECL 化学发光法曝光显影、定影。Quantity One 软件进行分析。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析, RT-qPCR 结果采用 Rotor-Gene Q Series Software 1.7 软件进行分析, Western blotting 结果采用 Quantity One 灰度值分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的建立** 通过 HepG2 细胞对葡萄糖消耗量减低来判断胰岛素抵抗的情况, 与空白组比较, 经过高浓度胰岛素作用后, 模型组对胰岛素的敏感性降低, 细胞的葡萄糖消耗明显降低 (P < 0.01), 说明该模型组细胞对胰岛素可能会产生抵抗, 可认为 HepG2 细胞在 10 mg·L<sup>-1</sup> 胰岛素培养基中孵育 48 h 产生胰岛素抵抗, 造模成功。见表 1。

表 1 胰岛素干预后 HepG2 及 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Comparison of glucose consumption in HepG2 and IR-HepG2 cells after insulin intervention ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	胰岛素 /mg·L <sup>-1</sup>	上清液的葡萄糖含量 /mmol·L <sup>-1</sup>	葡萄糖消耗量 /mmol·L <sup>-1</sup>
空白	-	15.096 ± 0.231	5.686 ± 0.052
模型	10	18.189 ± 0.168 <sup>1)</sup>	2.593 ± 0.036 <sup>1)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup> P < 0.05。

**3.2 对 IR-HepG2 细胞活性及上清液葡萄糖含量的影响** 与模型组比较, 随着 4 组药物浓度的增加, 葡萄糖消耗量也明显增加, 推测 4 组药物有一定的量效关系。MFP, MFF, PTL 药物组间无显著性差异, 说明细胞的活性无明显变化; 但 MFA 药物的质量浓度为 20 mg·L<sup>-1</sup> 时, A 与空白组间有差异性, 说明 20 mg·L<sup>-1</sup> 的 MFA 对 HepG2 及 IR-HepG2 细胞活性有影响, 因此最终确定 MFP 药物的质量浓度为 200 mg·L<sup>-1</sup>, MFF 药物的质量浓度为 100 mg·L<sup>-1</sup>, MFA 药物的质量浓度为 10 mg·L<sup>-1</sup>, PTL 药物的浓度为 20 μmol·L<sup>-1</sup>, 对改善胰岛素抵抗效果较好, 作为后续实验的药物干预浓度。见表 2。

**3.3 对 IR-HepG2 细胞 IκKβ, NF-κB 及 IκBα mRNA 相对表达的影响** 当桑叶提取物干预后, 与模型组比较, 桑叶提取物中只有桑黄酮对 IκKβ, NF-κB mRNA 相对表达量有明显的抑制作用 (P <

表 2 桑叶有效部位对胰岛素抵抗的 HepG2 细胞活性及上清液葡萄糖含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effects of glucose content of cellular supernatants and cell survival rate of the medicines in different concentrations of Mori Folium extracts ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	葡萄糖/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	1.02 ± 0.13	12.59 ± 0.23
模型	-	1.14 ± 0.04	15.16 ± 0.17 <sup>1)</sup>
MFP	50	1.01 ± 0.05	14.30 ± 0.35 <sup>2)</sup>
	100	1.00 ± 0.03	13.40 ± 0.15 <sup>2)</sup>
	200	1.02 ± 0.05	12.99 ± 0.33 <sup>2)</sup>
MFF	25	1.16 ± 0.02	14.09 ± 0.13 <sup>2)</sup>
	50	1.11 ± 0.06	13.75 ± 0.43 <sup>2)</sup>
	100	1.13 ± 0.04	13.26 ± 0.52 <sup>2)</sup>
MFA	5	1.16 ± 0.12	14.78 ± 0.28
	10	1.00 ± 0.10	14.00 ± 0.40 <sup>2)</sup>
	20	0.80 ± 0.03 <sup>1)</sup>	13.64 ± 0.59 <sup>2)</sup>
PTL <sup>3)</sup>	10	0.98 ± 0.15	14.45 ± 0.42 <sup>2)</sup>
	15	1.02 ± 0.12	14.13 ± 0.20 <sup>2)</sup>
	20	1.02 ± 0.08	13.92 ± 0.16 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;<sup>3)</sup> PTL 的浓度单位为“ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ”(表 3, 图 1~3 同)。

0.05), 而  $I\kappa B\alpha$  mRNA 表达抑制解除, 使  $I\kappa B\alpha$  mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.05$ ), 桑叶多糖组、桑叶生物碱组对相关基因影响不明显。

表 3 桑叶有效部位对 IR-HepG2 细胞  $I\kappa B\beta$ , NF- $\kappa B$  及  $I\kappa B\alpha$  mRNA 相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

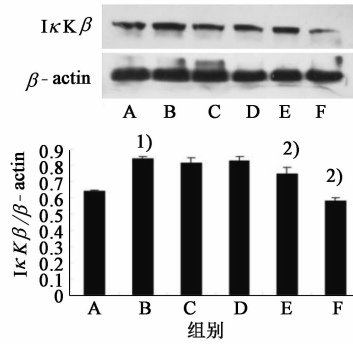
Table 3 Effect of  $I\kappa B\beta$ , NF- $\kappa B$  and  $I\kappa B\alpha$  mRNA relative expression of insulin resistance HepG2 cells after Mori Folium extracts ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$I\kappa B\beta$ / $\beta$ -actin	NF- $\kappa B$ / $\beta$ -actin	$I\kappa B\alpha$ / $\beta$ -actin
空白	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	-	3.65 ± 0.223 <sup>1)</sup>	3.51 ± 0.03 <sup>1)</sup>	0.35 ± 0.223 <sup>1)</sup>
MFP	200	3.59 ± 0.021	3.44 ± 0.032	0.37 ± 0.021
MFF	100	2.96 ± 0.024 <sup>2)</sup>	2.98 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.56 ± 0.024 <sup>2)</sup>
MFA	10	3.56 ± 0.056	3.45 ± 0.06	0.34 ± 0.056
PTL <sup>3)</sup>	20	2.32 ± 0.042 <sup>2)</sup>	2.05 ± 0.094 <sup>2)</sup>	0.78 ± 0.042 <sup>2)</sup>

### 3.4 对 IR-HepG2 细胞 $I\kappa B\beta$ , NF- $\kappa B$ 及 $I\kappa B\alpha$ 蛋白表达的影响

**3.4.1 对 IR-HepG2 细胞  $I\kappa B\beta$  蛋白表达的影响** 与空白组比较, 模型组  $I\kappa B\beta$  蛋白表达明显增加 ( $P < 0.05$ ), 给药处理后, 与模型组比较, 桑黄酮和小白菊内酯可以显著降低  $I\kappa B\beta$  蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ ), 桑多糖和桑生物碱对 IR-HepG2 细胞  $I\kappa B\beta$  蛋白表达水平无影响。见图 1。

**3.4.2 对 IR-HepG2 细胞  $I\kappa B\alpha$  蛋白表达的影响** 与空白组比较, 模型组  $I\kappa B\alpha$  蛋白表达水平明显下降 ( $P < 0.05$ ); 给药处理后, 与模型组比较, 桑叶黄



A. 空白组; B. 模型组; C. MFP 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; D. MFF 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; E. MFA 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; F. PTL 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组(图 2~3 同)

图 1 桑叶有效部位对 IR-HepG2 细胞  $I\kappa B\beta$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 1 Effects of  $I\kappa B\beta$  protein relative expression of insulin resistance HepG2 cells after Mori Folium extracts ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

酮和小白菊内酯可明显提高  $I\kappa B\alpha$  蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ ), 桑叶多糖和桑叶生物碱对 IR-HepG2 细胞  $I\kappa B\alpha$  蛋白表达水平无影响。见图 2。

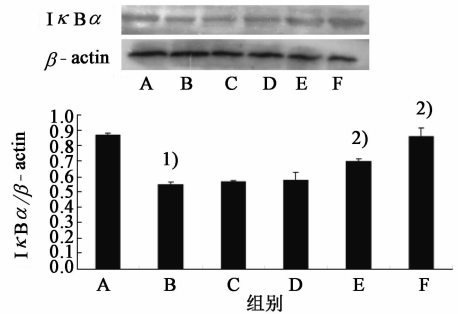


图 2 桑叶有效部位对 IR-HepG2 细胞  $I\kappa B\alpha$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 3 Effects of  $I\kappa B\alpha$  protein relative expression of insulin resistance HepG2 cells after Mori Folium extracts ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

**3.4.3 对 IR-HepG2 细胞 NF- $\kappa B$  蛋白表达水平的影响** 与空白组比较, 模型组 NF- $\kappa B$  蛋白表达明显增加 ( $P < 0.05$ ); 给药处理后, 与模型组比较, 桑黄酮和小白菊内酯可以显著降低  $I\kappa B\beta$  蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ ), 桑多糖和桑生物碱对 IR-HepG2 细胞 NF- $\kappa B$  蛋白表达水平无影响。见图 3。

## 4 讨论

本研究应用高浓度胰岛素诱导的 HepG2 细胞的胰岛素抵抗模型, 模拟了体内胰岛素抵抗发生的过程。在胰岛素抵抗细胞建立过程中, 笔者以模型细胞的葡萄糖消耗量来判断模型成功标准, 最终确定以  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的胰岛素干预 HepG2 细胞 48 h, 成功建立了胰岛素抵抗模型, 从而为治疗 2 型糖尿病中药筛选奠定了基础。

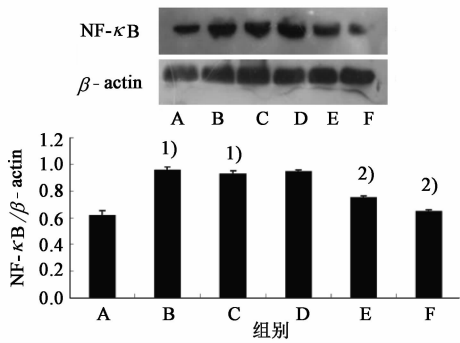


图 3 桑叶有效部位对 IR-HepG2 细胞 NF-κB 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Fig. 3 Effects of NF-κB protein relative expression of insulin resistance HepG2 cells after Mori Folium extracts ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

炎症学说<sup>[8]</sup>在胰岛素抵抗和糖尿病发病机制中的作用备受关注,目前认为 IR 是一个慢性亚临床炎症过程<sup>[9]</sup>,与氧化应激、免疫系统相互作用,引起胰岛素抵抗从而导致糖尿病的发生。NF-κB 信号转导通路主要包括 NF-κB, NF-κB 抑制蛋白 (inhibitory nuclear factor kappa B, IκB) 和 IκB 激酶 (IκB kinase, IκK)。当细胞在静息状态下, NF-κB 与 IκBα 以二聚体结合成三聚体复合物,以无活性的形式存在于胞质中<sup>[10]</sup>。氧化应激、前炎症细胞因子、内毒素等外界刺激使 IκKβ 激活,增加 IR (胰岛素受体) 及 IRS (胰岛素受体底物) 的丝氨酸磷酸化,影响 PI3K 和 GLUT4 等关键蛋白的转位和抑制 PI3K 的表达,使 IκB 发生构象改变,从而干扰胰岛素信号的转导,进而导致胰岛素抵抗的发生<sup>[7]</sup>。

Boden 等<sup>[11]</sup>研究发现,与正常小鼠相比,游离脂肪酸导致的胰岛素抵抗小鼠肝组织中 IκKβ 的活性上升了 6.4 倍,同时伴随 IκBα 含量下降 50% 和 NF-κB 活性明显上升。本实验结果发现 HepG2 细胞受到高胰岛素刺激产生胰岛素抵抗后, IκKβ 和 NF-κB 的活性增加, IκBα 含量也具有一定程度的下降,表明 IκKβ/NF-κB 信号通路在一定程度上被激活。本实验探讨了桑叶有效部位对 IκKβ, NF-κB, IκBα 蛋白表达水平的影响。结果发现 MFA, MFP 对 IκKβ, NF-κB, IκBα 蛋白表达都没有影响,而 MFF 可以显著改变 NF-κB 信号通路相关蛋白的表达,此结果与 Sugimoto 等<sup>[12]</sup>在 db/db 小鼠实验中得出的结论一致。因此通过调节 NF-κB 信号通路相关蛋白的表达水平是 MFF 改善胰岛素抵抗状态的重要机制之一。而 MFF 是通过怎样的途径激活 NF-κB, 又如何调节肝细胞对葡萄糖的吸收以及 MFP, MFA 降糖的作用机制将有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Li G Q, Kam A, Wong K H, et al. Herbal medicines for the management of diabetes [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 771:396-413.

[2] Li J, Tang Y, Cai D. IκKβ/NF-kappaB disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes [J]. Nat Cell Biol, 2012, 14(10):999-1012.

[3] Barma P, Bhattacharya S, Bhattacharya A, et al. Lipid induced overexpression of NF-kappaB in skeletal muscle cells is linked to insulin resistance [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1792(3):190-200.

[4] Padilha M M, Vilela F C, Rocha C Q, et al. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves [J]. Phytother Res, 2010, 24(10):1496-1500.

[5] 罗明琍, 吴薇, 刘伟, 等. 桑叶不同有效部位对 2 型糖尿病大鼠的降糖作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(15):1221-1226.

[6] 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.

[7] Quan J, Liu J, Gao X, et al. Palmitate induces interleukin-8 expression in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll like receptor 4/NF-kappaB pathway [J]. J Diabetes, 2014, 6(1):33-41.

[8] Tornatore L, Thotakura A K, Bennett J, et al. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation [J]. Trends Cell Biol, 2012, 22(11):557-566.

[9] Hirabara S M, Gorjao R, Vinolo M A, et al. Molecular targets related to inflammation and insulin resistance and potential interventions [J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012:379024.

[10] Al-Malki A L, Sayed A A, El R H. Proanthocyanidin attenuation of oxidative stress and NF-kappa B protects apolipoprotein E-deficient mice against diabetic nephropathy [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013:769409.

[11] Alarcon-Aguilar F J, Fortis-Barrera A, Angeles-Mejia S, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of a hypoglycemic fructan fraction from *Psacalium peltatum* (H. B. K.) Cass. in streptozotocin-induced diabetes mice [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132(2):400-407.

[12] Sugimoto M, Arai H, Tamura Y, et al. morus alba ameliorates the expression profile of adipocytokines by inhibiting oxidative stress in white adipose tissue in db/db mice [J]. Atherosclerosis, 2009, 204(2):388-394.

[责任编辑 周冰冰]