

葛根芩连汤含药血清对 HepG2 肝细胞胰岛素抵抗模型糖代谢的调节作用

章常华¹, 邓可众¹, 于梅¹, 魏学鑫¹, 屈飞¹, 徐国良², 盛军庆^{3*}

(1. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004; 3. 南昌大学生命科学学院, 南昌 330031)

[摘要] **目的:**探讨葛根芩连汤含药血清对 HepG2 肝细胞胰岛素抵抗模型糖代谢的调节作用。**方法:**大鼠分别按含生药 6 g·kg⁻¹剂量 ig 葛根芩连汤, 空白组 ig 给予等量蒸馏水, 按 3 mg·kg⁻¹剂量 ig 吡格列酮, 2 次/d, 连续 7 d, 末次给药 1 h 后, 心脏穿刺取血制备葛根芩连汤、空白和吡格列酮含药血清。采用 MTT 法检测葛根芩连汤含药血清对细胞增殖的影响; HepG2 细胞以含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基传代培养, 将处对数生长期细胞消化后, 用含 2% FBS DMEM 培养基调整细胞密度为 10⁶ 个/mL, 以 10 mg·L⁻¹ 胰岛素处理 24 h, 复制 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型, 葡萄糖氧化酶法检测葛根芩连汤含药血清对 HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响; 蒽酮法检测细胞内糖原含量; 乳酸脱氢酶偶联比色法测定肝细胞磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 的活性。**结果:**与正常组比较, 模型组葡萄糖消耗量明显下降 ($P < 0.01$), 糖原含量显著降低 ($P < 0.05$), 而 PEPCK 活性升高 ($P < 0.05$); 8% 葛根芩连汤含药血清作用 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型 24 h 能显著增加葡萄糖消耗量 ($P < 0.05$), 且葛根芩连汤含药血清 (8%, 16%) 能够增加糖原含量, 葛根芩连汤含药血清 (4%, 8%, 16%) 能够降低 PEPCK 活性 ($P < 0.05$)。**结论:**葛根芩连汤含药血清可调节肝糖代谢, 进而可改善肝细胞胰岛素抵抗。

[关键词] 葛根芩连汤; 含药血清; 糖代谢; 调节作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)05-0120-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015050120

Effects of Gegen Qinlian Tang-containing Serum on Glycometabolism in Insulin-resistance HepG2 Cell Line

ZHANG Chang-hua¹, DENG Ke-zhong¹, YU Mei¹, WEI Xue-xin¹, QU Fei¹, XU Guo-liang², SHENG Jun-qing^{3*}
(1. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China; 2. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 3. College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Gegen Qinlian Tang-containing serum (GGQLT-CS) on glycometabolism in insulin-resistance HepG2 cell line. **Method:** GGQLT-CS was prepared. MTT was used to detect the effects of GGQLT-CS on cell proliferation; the model of insulin resistance was established, the effect of GGQLT-CS on the glucose consumption of HepG2 cells was observed in insulin resistance through the method of glucose oxidase, detecting phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity was detected with the method of the lactate dehydrogenase coupled assay, and the anthrone method was used to detect intracellular glycogen content. **Result:** GGQLT-CS could promote glucose consumption of HepG2 cell in insulin resistance, reduce PEPCK activity, and increase hepatic glycogen content. **Conclusion:** GGQLT-CS can regulate glucose metabolism of HepG2 cells, and improve hepatic insulin resistance.

[Key words] Gegen Qinlian Tang; containing drug serum; glycometabolism; regulating action

[收稿日期] 20140718(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260660, 81460622); 江西省卫生厅中医药科研计划项目(2013A057); 国家科技部 973 计划项目(2010CB530603); 江西中医药大学重点学科青年教师培养项目(2013jzdxk040)

[第一作者] 章常华, 博士, 副教授, 主要从事药理学教学科研工作, Tel: 0791-87118919, E-mail: shengjunqin@163.com

[通讯作者] * 盛军庆, 博士, 副教授, 从事生物学教学科研工作, Tel: 0791-83969530, E-mail: shengqingjun@163.com

糖尿病属于中医学“消渴病”范畴,2型糖尿病胰岛素抵抗是一种复杂的代谢性疾病,其发病率也呈逐年升高趋势。肝脏是利用和产生葡萄糖的主要器官,它是胰岛素作用的靶器官之一。胰岛素抵抗时肝脏对葡萄糖摄取利用减少,同时,肝脏糖的产生及输出增加^[1]。而HepG2肝细胞是体外研究胰岛素抵抗发病机制和糖代谢作用机制的理想细胞模型^[2]。

葛根芩连汤(Gegen Qinlian Tang, GGQLT)出自张仲景所著《伤寒论》,由葛根、黄芩、黄连、炙甘草4味中药组成。作为经方,将其应用于2型糖尿病胰岛素抵抗的治疗,取得良好效果^[3]。且在前期动物实验等研究中,笔者发现葛根芩连汤对糖脂代谢有一定的改善作用,对2型糖尿病胰岛素抵抗有一定防治作用^[4]。然而,迄今尚未见葛根芩连汤对HepG2细胞糖代谢影响的相关报道,在本研究中,笔者采用HepG2肝细胞胰岛素抵抗模型,探讨葛根芩连汤对糖代谢的调节作用。

1 材料

1.1 细胞 HepG2细胞来自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)。

1.2 动物 健康SD大鼠80只,SPF级,雄性,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(湘)2011-0003。

1.3 药物和试剂 葛根芩连汤(葛根8g,黄芩3g,黄连3g,炙甘草2g)为本实验室自制:取葛根芩连汤各味药加水8倍药重,浸泡30~60min,以泡透为准,时间不低于30min;武火煮沸后,计时40min,提取2次,导出药液,3000 r·min⁻¹,离心25min或设定温度80℃,减压浓缩至含生药量1g·mL⁻¹的水提物。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD, N8110, Solarbio),三羟甲基氨基甲烷盐酸(Tris·HCl, 批号120410772),草酰乙酸(批号YK0803B2012J),变旋酶(批号34005101),丙酮酸激酶(批号CK0928B3011J),腺嘌呤核苷三磷酸(ATP, 批号

00099555, Fermentas),蔗糖(批号RS0717S5012J),均为生工生物工程(上海)有限公司;胎牛血清(批号NVW0344),DMEM/高糖(批号NXE0636),均为Hyclone公司;咪唑(批号1122A032),MTT(噻唑蓝,批号MW41403),均为Solarbio公司产品;葡萄糖试剂测定盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号112711);肝糖原试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20120720),盐酸吡格列酮片(江苏德源药业有限公司,批号10030951)。

1.4 仪器 MCO-20AIC型CO₂培养箱(日本Sanyo公司),GFM-600型倒置显微镜(德国莱卡公司),SW-CJ-2FD型超净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),EXx808iu型酶标仪(基因有限公司)。

2 方法

2.1 葛根芩连汤含药血清制备 实验方法参照文献[5-6]的基础上加以改进制备含药血清:SD 80只大鼠随机分成3组,每鼠每天给药2次,连续ig 7次后,于最后1次给药后1h,心脏穿刺取血。血样常温放置4h后,在4℃下,离心3000×g,15min。第1组:大鼠20只,每只鼠按含生药6g·kg⁻¹剂量ig葛根芩连汤,此血清即为葛根芩连汤含药血清(Gegen Qinlian Tang-containing serum, GGQLT-CS);第2组:大鼠50只,每只鼠按同等条件ig等体积的生理盐水,此血清即为空白对照血清;第3组:大鼠10只,按3mg·kg⁻¹剂量ig吡格列酮,此血清即为吡格列酮阳性对照血清。血清0.22μm滤膜过滤分装,-20℃保存,用之前56℃灭活30min。各组血清临用前以无血清DMEM培养基配成实验用相应体积分数,见表1。

2.2 对HepG2细胞增殖的影响 实验方法参照文献[7-8]的基础上加以改进,HepG2细胞以1.0×10⁵/孔接种于96孔板中,24h后,加入制备好的葛根芩连汤含药血清,调节为4%,8%,16%,另设空白组(不加任何血清),每组各6个复孔,并设空白孔调

表1 实验分组

Table 1 Experimental grouping method

组别	剂量/g·kg ⁻¹	不同体积分数含药血清的制备
空白	-	22%空白血清
模型	-	10 mg·L ⁻¹ 胰岛素+22%空白血清
8%吡格列酮含药血清	3×10 ⁻³	10 mg·L ⁻¹ 胰岛素+8%吡格列酮含药血清+14%空白血清
4%GGQLT-CS	6	10 mg·L ⁻¹ 胰岛素+4%葛根芩连汤含药血清+18%空白血清
8%GGQLT-CS	6	10 mg·L ⁻¹ 胰岛素+8%葛根芩连汤含药血清+14%空白血清
16%GGQLT-CS	6	10 mg·L ⁻¹ 胰岛素+16%葛根芩连汤含药血清+6%空白血清

零。培养 24 h 后,每孔加 20 μL 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MTT 液,培养箱中继续孵育 4 h,弃上清,各孔加入 200 μL DMSO,震荡 10 min,使结晶物充分溶解,用酶标仪在 490 nm 处测各孔吸光度(A)。

细胞存活率 = 实验组 A / 对照组 A \times 100%

2.3 对 HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响 实验方法参照文献[2, 9-11]的基础上加以改进,HepG2 细胞以含 10% FBS 的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下无菌培养,将处对数生长期细胞消化后,用含 2% FBS DMEM 培养基调整细胞密度为 10^6 个/mL,加新配制的含 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰岛素的培养液。分组如表 1,分别设:①空白组:未造模的细胞,加入含 22% 空白血清的培养液培养;②模型组:造模后,加入含 22% 空白血清的培养液;③给药组不同浓度组别:分别含 4% ,8% ,16% 葛根芩连汤含药血清的培养液,不足的血清以空白血清补足④吡格列酮阳性对照组:含 8% 吡格列酮含药血清的培养液,不足的血清以空白血清补足。上述各组在胰岛素(10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)刺激及药物处理 24 h 后,检测葡萄糖含量,以无细胞的空白孔为空白对照,计算各组细胞葡萄糖消耗量,每组 6 孔,实验重复 3 次,每孔数值取平均值。

2.4 对 HepG2 细胞 PEPCK 活性的影响 实验方法参照文献[1, 5, 12]的基础上加以改进,实验分组给药方案及造模方法同 2.3。酶活性测定:采用乳酸脱氢酶偶联比色法,测定肝细胞 PEPCK 的活性。酶活性的公式计算:吸光度变化/min \times 1/6. 22 (NADPH 吸光系数) $\times V_{\text{总}}/V_{\text{样}} \times 1\ 000$ 。

$V_{\text{总}}$ 表示反应体积, $V_{\text{样}}$ 为样品体积。

2.5 对 HepG2 细胞糖原含量的影响 实验方法参照文献[12-14]的基础上加以改进,实验分组方案及造模方法同 2.3。蒽酮法检测细胞内糖原含量,糖原检测及计算方法按照说明书进行。

2.6 统计学检验 所有实验结果均采用 SPSS 11.5 软件进行分析。两组之间计量资料比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义,所有统计图表均用 Sigma Plot 10.0 软件绘制。

3 结果

3.1 对 HepG2 细胞增殖的影响 4% ,8% ,16% 葛根芩连汤含药血清作用于 HepG2 细胞 24 h 后,其 A 与空白组相比差异无统计学意义,表明 4% ,8% ,16% 葛根芩连汤含药血清对细胞增殖没有明显影响。

3.2 对 HepG2 细胞模型葡萄糖消耗、糖原含量和 PEPCK 活性的影响 模型组 HepG2 细胞用高浓度胰岛素培养 24 h 后,其培养液中葡萄糖含量较正常组显著升高,葡萄糖消耗量明显下降($P < 0.05$),而 8% 葛根芩连汤含药血清和吡格列酮(8% 含药血清)能显著增加葡萄糖消耗量($P < 0.05$),培养液中葡萄糖含量明显下降。见表 2。

与空白组相比,模型组细胞的糖原含量显著降低($P < 0.05$),而 PEPCK 活性升高($P < 0.05$)。在药物作用 24 h 后,与模型组相比,葛根芩连汤含药血清(8% ,16%)和吡格列酮(8% 含药血清)能够使胰岛素抵抗 HepG2 细胞的糖原含量增加,同时,葛根芩连汤含药血清(4% ,8% ,16%)能够使胰岛素抵抗 HepG2 细胞的 PEPCK 活性下降。见表 2。

表 2 葛根芩连汤含药血清对 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型细胞中葡萄糖消耗、糖原含量和 PEPCK 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of Gegen Qinlian Tang-containing serum on consumption of glucose, glycogen content and PEPCK activity in insulin-resistance HepG2 cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	葡萄糖消耗量 / $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	糖原含量 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	PEPCK / $\text{mU}\cdot\text{min}^{-1}$
正常	-	2.21 \pm 0.12	5.77 \pm 0.62	1.06 \pm 0.01
模型	-	1.65 \pm 0.13 ¹⁾	3.44 \pm 0.48 ¹⁾	1.64 \pm 0.18 ¹⁾
8% 吡格列酮含药血清	3 \times 10 ⁻³	2.07 \pm 0.44 ²⁾	11.07 \pm 0.04 ²⁾	-
4% GGQLT-CS	6	1.76 \pm 0.27	4.01 \pm 0.17 ²⁾	1.06 \pm 0.01 ²⁾
8% GGQLT-CS	6	2.10 \pm 0.22 ²⁾	12.58 \pm 0.46 ²⁾	1.22 \pm 0.02 ²⁾
16% GGQLT-CS	6	1.94 \pm 0.32	4.71 \pm 0.25 ²⁾	1.21 \pm 0.07 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

糖尿病和肝胰岛素抵抗的一个重要特征是肝糖生成增加,胰岛素对肝糖代谢调节失常^[15]。本实验

结果显示葛根芩连汤含药血清对 HepG2 细胞增殖没有显著影响,不会影响细胞有效性。本研究采用含 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰岛素培养液作用 24 h,成功建立了

HepG2 细胞胰岛素抵抗模型,与文献[8,11]报道的基本一致;结果表明,葛根芩连汤明显增加了 HepG2 肝细胞的葡萄糖消耗量,增加 HepG2 细胞对葡萄糖的摄取利用。本实验选用盐酸吡格列酮作为阳性对照药物,吡格列酮是噻唑烷二酮类抗糖尿病药物,作用机制与胰岛素的存在有关,属胰岛素增敏剂,可减少肝脏的胰岛素抵抗,减少肝糖的输出^[16]。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCK)是肝糖异生限速酶^[17],在糖异生调节中具有重要的意义,本研究结果表明,葛根芩连汤含药血清可降低 HepG2 细胞的 PEPCK 活性。同时,本研究结果也显示,葛根芩连汤还可增加 HepG2 细胞的糖原含量,降低血糖。这些研究结果与相关临床观察发现葛根芩连汤可治疗糖尿病^[3,18];以及与一些动物实验也证明葛根芩连汤具有一定的降糖作用相关文献^[19-20]报道一致。

因此,葛根芩连汤对肝糖代谢有一定的调节作用,其具体作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 郭丽民. 地黄寡糖对 HepG2 细胞(人肝癌细胞株)胰岛素抵抗的改善作用及机制研究[D]. 兰州:兰州大学, 2007.

[2] 方飞, 吴新荣, 罗明俐, 等. HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的建立及在筛选桑叶有效部位中的应用[J]. 医药导报, 2012, 31(6):691-694.

[3] Tong X L, Zhao L H, Lian F M, et al. Clinical observations on the dose-effect relationship of gegen qinlian decoction on 54 out-patients with type 2 diabetes [J]. J Tradit Chin Med, 2011, 31(1):56-59.

[4] Zhang C H, Xu G L, Liu Y H, et al. Anti-diabetic activities of Gegen Qinlian Decoction in high-fat diet combined with streptozotocin-induced diabetic rats and in 3T3-L1 adipocytes[J]. Phytomedicine, 2013, 20(3/4):221-229.

[5] 李超林, 赵璐杰, 肖谦. 抵抗素对大鼠肝细胞磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性及 mRNA 表达的影响[J]. 临床医学, 2012, 32(9):103-105.

[6] 李然, 刘立萍, 马骥, 等. 小柴胡汤含药血清对肝癌 HepG-2 细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5):217-220.

[7] 王慧莲. 大黄素和小檗碱对胰岛素抵抗 HepG2 细胞的实验研究[D]. 太原:山西医科大学, 2009.

[8] 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):5241-5244.

[9] Zhang H J, Ji B P, Chen G, et al. A combination of grape seed-derived procyanidins and gypenosides alleviates insulin resistance in mice and HepG2 cells [J]. J Food Sci, 2009, 74(1):H1-H7.

[10] 苗宇船, 李明磊, 刘杨, 等. 降脂平肝汤含药血清对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5):207-210.

[11] 马河, 刘园华, 张金杰. 知母水溶性小分子提取物对胰岛素抵抗 HepG2 细胞体外糖代谢的影响[J]. 食品与药品, 2013, 15(1):26-28.

[12] Kang Y J, Jung U J, Lee M K, et al. Eupatilin, isolated from *Artemisia princeps* Pampanini, enhances hepatic glucose metabolism and pancreatic β -cell function in type 2 diabetic mice [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008, 82(1):25-32.

[13] 杨红霞, 巫冠中. 新型磺酰脲类化合物 G004 对胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型糖代谢的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(6):820-826.

[14] Fritsche L, Hoene M, Lehmann R, et al. IL-6 deficiency in mice neither impairs induction of metabolic genes in the liver nor affects blood glucose levels during fasting and moderately intense exercise [J]. Diabetologia, 2010, 53(8):1732-1742.

[15] 万学东, 王西明, 夏炎枝, 等. 软脂酸诱导 HepG2 细胞胰岛素抵抗及其机理[J]. 江苏医药, 2006, 32(1):4-6.

[16] 李延兵, 廖志红, 黄知敏, 等. 吡格列酮和二甲双胍对 2 型糖尿病胰岛素抵抗的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2004, 20(1):30-32.

[17] Franckhauser S, Muñoz S, Elias I, et al. Adipose overexpression of phosphoenolpyruvate carboxykinase leads to high susceptibility to diet-induced insulin resistance and obesity [J]. Diabetes, 2006, 55(2):273-280.

[18] 金莉, 安文灿, 安文铎. 葛根芩连汤治疗糖尿病 120 例[J]. 长春中医药大学学报, 2012, 28(2):315.

[19] 陈瑞平. 葛根芩连汤对实验性糖尿病动物模型降血糖机制的初步研究[D]. 长春:长春师范学院, 2011.

[20] 潘竞锵, 韩超, 刘惠钝, 等. 葛根芩连汤降血糖作用的实验研究[J]. 中国新药杂志, 2000, 9(3):167-170.

[责任编辑 聂淑琴]