

## 双益方、组方中药及有效成分对骨骼肌及 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响

田春雨\*, 薄海美, 喇孝瑾, 朱亮, 贾永森, 曹慧娟, 李继安, 张碧激, 徐雪梅, 李孟佳  
(华北理工大学, 河北 唐山 063210)

**[摘要]** **目的:**研究双益方、组方中药及有效成分对骨骼肌细胞胰岛素抵抗模型葡萄糖消耗量及人肝癌 HepG2 细胞糖原合成、己糖激酶(hexokinase, HK), 丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)活性的影响, 初步探讨其作用机制, 为其临床应用奠定基础。**方法:**采用高胰岛素方法建立骨骼肌细胞的胰岛素抵抗(IR)模型, 观察双益方低、中、高剂量组、组方中药(黄芪、山茱萸、黄连、桑白皮、葛根、佩兰), 有效成分(黄芪甲苷, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷, 熊果酸, 马钱苷, 小檗碱, 1-脱氧野尻霉素, 葛根素)组(30, 120, 480  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )对骨骼肌细胞胰岛素抵抗模型的葡萄糖消耗量的影响, 蛋白质免疫印迹法(Western blot)测定骨骼肌细胞蛋白酪氨酸磷酸酶-1B(protein tyrosine phosphatase-1B, PTP-1B), 葡萄糖转运蛋白 4(glucosetransporters 4, GLUT4)表达; 建立 HepG2 细胞的胰岛素抵抗模型, 研究双益方、组方中药及其有效成分对 HepG2 细胞糖原合成及己糖激酶、丙酮酸激酶活性的影响。**结果:**双益方, 黄芪, 山茱萸, 黄芪甲苷, 1-脱氧野尻霉素, 葛根素可降低骨骼肌细胞细胞上清液葡萄糖浓度( $P < 0.05$ ), 以 480  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  双益方, 黄芪甲苷组及葛根素组效果较好; 与模型组比较, 双益方、黄芪及有效成分组方可降低 PTP-1B, 提高 GLUT-4 的表达( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与正常组比较, 模型组糖原合成量及 HK, PK 活性显著降低( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各浓度组单味中药及有效成分均能一定程度的增加糖原合成量及 HK, PK 活性( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 其中黄芪甲苷、黄芪提取液增加糖原合成及提高 HK 活性作用较好; 双益方提取液及葛根素增加 PK 活性作用较好。**结论:**双益方、组方中药及有效成分对骨骼肌, HepG2 细胞胰岛素抵抗具有一定缓解作用, 降低 PTP-1B 表达、提高 GLUT4 表达、增加糖原合成、提高 HK, PK 活性可能是其作用机制。

**[关键词]** 双益方; 骨骼肌细胞; HepG2 细胞; 胰岛素抵抗

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)18-0118-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180118

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170629.0944.030.html>

**[网络出版时间]** 2017-06-29 9:44

## Effect of Shuangyi Prescription, Component Herbs and Different Active Ingredients on Insulin Resistance in Skeletal Muscle and HepG2 Cells

TIAN Chun-yu\*, BO Hai-mei, LA Xiao-jin, ZHU Liang, JIA Yong-sen, CAO Hui-juan, LI Ji-an,  
ZHANG Bi-wei, XU Xue-mei, LI Meng-jia  
(North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Shuangyi prescription (SYP), component herbs and active ingredients on insulin resistance model of skeletal muscle cells, and glycogen synthesis, hexokinase (HK) and pyruvate kinase (PK) activity of IR-HepG2 cells, in order to analyze the mechanism, and lay a foundation for its clinical application. **Method:** The insulin resistance model of skeletal muscle cells was established by high concentration of insulin, in order to observe the effect of low, medium and high-dose (30, 120, 480  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) SYP, component herbs (Astragali Radix, Corni Fructus, Coptidis Rhizome, Mori Cortex, Puerariae Lobatae Radix, Eupatorii Herba), and different active ingredients (astragaloside, calycosin-7-glucoside, ursolic acid,

**[收稿日期]** 20170405(008)

**[基金项目]** 河北省自然科学基金项目(H2015209025);河北省高等学校科学技术研究项目(QN2015119)

**[通讯作者]** \*田春雨, 博士, 副教授, 从事中药防治糖尿病研究, Tel:13722533361, E-mail:tcy4479@sina.com

loganan, berberine, puerarin, 1-deoxynojirimycin) on insulin resistance model of skeletal muscle cells. The IR-HepG2 cells model of high concentration of insulin was established *in vitro*, so as to study the effects of glycogen synthesis, HK and PK activities of IR-HepG2 cells of SYP, component herbs and active ingredients. Western blot was performed to detect protein expressions of tyrosine 4 phosphatase-1B (PTP-1B) and glucose transporters 4 (GLUT4). **Result:** SYP, Astragali Radix, Corni Fructus, astragaloside, 1-deoxynojirimycin, and puerarin could reduce glucose concentration in skeletal muscle cell supernatant ( $P < 0.05$ ), with a better effect in SYP, Astragali Radix and puerarin groups with the dose of  $480 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Compared with the model group, SYP, Astragali Radix and active ingredients could decrease the expression of PTP-1B, and increase the expression of GLUT-4. Compared with the model group, different concentrations of active ingredients and component herbs could increase glycogen synthesis and HK, PK activities of HepG2 cells ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); Astragaloside and Astragali Radix extracts had a better effect in increasing glycogen synthesis and HK activity, and SYP and puerarin had a better effect in increasing PK activity. **Conclusion:** SYP, component herbs and active ingredients could relieve the insulin resistance of skeletal muscle and HepG2 cells, and its action mechanism may be decrease in the expression of PTP-1B, and increase in the expression of GLUT4, glycogen synthesis and HK, PK activities.

[**Key words**] Shuangyi prescription (SYP); skeletal muscle cell; HepG2 cells; insulin resistance

近些年来糖尿病的发病率越来越高,预计到2040年全球将有6.4亿人患上糖尿病,在糖尿病患者中2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)占其总数的90%~95%,已严重危害中国及世界人民的健康,研制对2型糖尿病安全、有效的药物及治疗方法已经成为目前全球医药研究的重点和热点问题。近些年来中医药防治2型糖尿病取得了显著的疗效,笔者参考了李东垣《脾胃论》治疗消渴的“升阳降火汤”组方原则及《医学衷中参西录》滋脾饮的药物配伍,自拟双益方组成为黄芪、山茱萸、黄连、桑白皮、葛根、佩兰,方中黄芪益气健脾、山茱萸益肾涩精为君药,以固其本;黄连清泄胃火、燥湿解毒,桑白皮清泻肺火、利水消肿,二药清泻肺、胃之热为臣药,以治其标;葛根升发脾胃之阳气、生津止渴为佐药;佩兰芳香醒脾,化湿浊,去陈腐,促进脾胃运化,为使药,前期实验研究表明双益方具有一定程度的改善胰岛素抵抗的作用,黄芪甲苷,毛蕊异黄酮葡萄糖苷,熊果酸,马钱苷,小檗碱,1-脱氧野尻霉素组,葛根素可能为其主要的有效成分<sup>[14]</sup>。本实验拟在前期研究的基础上,建立骨骼肌细胞及HepG2细胞的胰岛素抵抗模型,研究双益方、组方中药及其有效成分对骨骼肌细胞, HepG2细胞胰岛素抵抗模型葡萄糖消耗量的影响,分析其可能的作用机制,为双益方的开发利用及临床推广奠定基础。

## 1 材料

**1.1 试剂** 盐酸吡格列酮(北京太洋药业,批号140202);DMEM高糖培养液、无酚红DMEM高糖培养液(Gibco中国公司,批号分别为8115031,

1042204);胎牛血清(Gemini中国公司,批号A97D00E);青/链霉素(HyClone中国公司,批号J130054);噻唑蓝(MTT)试剂盒(碧云天生物技术研究,批号C0009);cose试剂盒(中生北控科技公司,批号143331);胰岛素注射液(江苏万邦医药,批号1403203);酪氨酸磷酸酶-1B(PTP-1B)一抗, GLUT4 GAPDH Antibody(Bioworld Technology中国公司,批号分别为11334-1-AP, AA56134, AA56133);HRP山羊抗兔二抗抗体(碧云天生物技术研究,批号A028);己糖激酶试剂盒、肝糖元试剂盒、丙酮酸激酶试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20150604,20150602,20150604)。

**1.2 药物** 双益方由黄芪15g,山茱萸15g,黄连12g,桑白皮12g,葛根9g,佩兰6g组成,饮片购于唐山同仁堂药店,由华北理工大学田春雨副教授鉴定均为正品,符合2015年版《中国药典》一部相关要求。

**1.3 动物** SPF雄性Wistar大鼠,体重( $290 \pm 10$ )g,购自军事医学科学院动物实验中心,合格证号SCXK(军)2014-0001。动物实验的开展获得华北理工大学实验动物伦理委员会批准(编号201521)。

**1.4 仪器** BS224S型1/1万精密电子天平(德国Sartorius公司);M200PRO型酶标仪(瑞士Tecan公司);A2型生物安全柜,311型CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo Scientific公司);Mini-PROTEAN Tetra System小型垂直电泳槽(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 药物提取** 双益方按组方中药比例(黄芪-山茱萸-黄连-桑白皮-葛根-佩兰5:5:4:4:3:2)混合,

粉碎,加10倍量水,60℃水浴8h,然后静置12h,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,取上清液,用诱导成模的培养液稀释至所需浓度,得双益方低、中、高剂量(30,120,480 mg·L<sup>-1</sup>)。黄芪、山茱萸、黄连、桑白皮、葛根、佩兰同样方法制成30,120,480 μg·L<sup>-1</sup>溶液;将黄芪甲苷,毛蕊异黄酮葡萄糖苷,熊果酸,马钱苷,小檗碱,葛根素,1-脱氧野尻霉素制成30,120,480 μg·L<sup>-1</sup>溶液;吡格列酮溶于DMSO(0.4 mL)+不含酚红的DMEM(9.6 mL)中,过滤,稀释至所需质量浓度25,100,400 μg·L<sup>-1</sup>溶液。

**2.2 骨骼肌细胞培养(酶消化法)** 取3~5 d Wistar 乳鼠骨骼肌于培养皿中,剪取肌肉约0.10 cm<sup>3</sup>,然后用PBS清洗,剔除脂肪、结缔组织、骨骼,撕碎肌肉。将剪碎的肌肉放入培养皿,采用PBS进行清洗3次,弃去上层液,向上述培养皿中+0.25%胰酶1 mL+0.1%胶原酶-4 1 mL,将肌肉组织进行撕碎,然后置显微镜下观察,观察到肌肉细胞脱离组织后,加入培养液,终止消化。200目过筛,800 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,弃上清液,加入含10% FBS,1%青/链霉素的DMEM培养液6~8 mL,移入培养瓶,在细胞培养箱中培养,24 h后换液培养。

**2.3 细胞诱导分化及其鉴定** 待培养的细胞长至70%~80%时,改用诱导液(DMEM+2% FBS+1%青/链霉素)进行诱导分化,诱导5~7 d,PBS清洗3次,用2.5%戊二醛固定30 min,PBS清洗3次,加入1% TritonX-100 干预10 min,蒸馏水洗3次,再加入0.2%考马斯亮兰(R-250)溶液,染色30 min。

**2.4 骨骼肌细胞胰岛素抵抗(IR)模型造模<sup>[5]</sup>** 对细胞进行纯化,将培养的第2代骨骼肌细胞按照2×10<sup>4</sup>个/mL接种到96孔板中,进行培养,待细胞长至70%~80%时改用诱导液(DMEM+2% FBS+1%青/链霉素)诱导分化,观察到长出肌管后,倒掉96孔板中的培养液,用PBS进行清洗3次,每孔加入(无酚红DMEM+2% FBS+1%青/链霉素)的无酚红诱导液180 μL,加入胰岛素20 μL,设不同胰岛素浓度(5×10<sup>-5</sup>,5×10<sup>-6</sup>,5×10<sup>-7</sup>,5×10<sup>-8</sup>,5×10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup>),并设正常组(不加胰岛素),在干预12,24,36 h后测定细胞上清液的葡萄糖(glucose)含量,用MTT比色法检测其细胞活力。

**2.5 骨骼肌细胞上清液 glucose 含量测定** 当培养的骨骼肌细胞 IR 造模成功后,用PBS进行清洗3次,加入无酚红诱导液180 μL,双益方、单味中药及其有效成分(30,120,480 μg·L<sup>-1</sup>)各加20 μL,作用24 h后,测定各组细胞上清液 glucose 含量<sup>[5-8]</sup>。

**2.6 蛋白质免疫印迹法(Western blot)测定骨骼肌细胞蛋白酪氨酸磷酸酶-1B(PTP-1B),葡萄糖转运蛋白4(GLUT4)的表达** 将生长至80%汇聚度的骨骼肌细胞用胰酶消化液消化,轻轻吹打成均匀的单细胞悬液后以1.2×10<sup>6</sup>个/孔细胞密度在6孔板中接种,每孔加入培养液2.5 mL培养24 h。造模成功后分别给予二甲双胍、双益方、黄芪及其有效成分组方(黄芪甲苷+毛蕊异黄酮葡萄糖苷+1-脱氧野尻霉素+熊果酸+马钱苷+小檗碱+葛根素)(480 μg·L<sup>-1</sup>)干预24 h,并设立正常组和模型组。PBS冲洗细胞3次,冲洗后用滤纸将残留PBS吸干,将IP细胞裂解液和PMSF以99:1配制细胞裂解液,在6孔板中,加入细胞裂解液进行裂解,并将6孔板置于摇床上震荡约5 min,使试剂和细胞能够充分接触,然后将细胞刮下,将得到的样品用超声细胞破碎仪200 W超声5 s,然后25 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min取上清液备用。采用BCA法测定组织蛋白浓度,取蛋白50 μg,混合蛋白上样缓冲液,100℃金属浴热浴5 min。10%聚丙烯酰胺凝胶电泳100 V,300 mA湿转0.5 h,PMSF膜用封闭液封闭2 h,Western blot 洗涤液清洗,然后将PMSF膜置于PTP-1B及GLUT4一抗中(抗体工作浓度均为1:1 000),放入4℃冰箱中,进行孵育12 h,用Western blot 洗涤液清洗,加入辣根过氧化物酶标记的二抗稀释液孵育1 h,Western blot 洗涤液清洗,ECL化学发光试剂盒显色,Bio-Rad Image Lab 软件分析。

**2.7 双益方、组方中药及其有效成分对 HepG2-IR 细胞模型的干预作用** 将 HepG2 细胞以3 000个/孔接种于96孔培养板中,分为空白组、模型组、双益方组和吡格列酮组,待细胞贴壁生长至80%后,空白组加入正常培养液100 μL(胎牛血清质量浓度为5%),模型组、双益方组和吡格列酮组加入新配置的含有胰岛素浓度为1×10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup>的培养液100 μL(胎牛血清质量浓度为5%)。37℃5%CO<sub>2</sub>培养箱内孵育36 h,建立胰岛素抵抗模型。吸取培养液,用PBS洗涤3次,空白组和模型组分别加入培养液100 μL(含5% FBS无酚红DMEM),双益方组分别加入不同质量浓度的双益方溶液(含5% FBS无酚红DMEM)。37℃5%CO<sub>2</sub>培养箱内孵育24 h。在前期实验基础上将160 μg·L<sup>-1</sup>双益方组,160 μg·L<sup>-1</sup>黄芪组,160 μg·L<sup>-1</sup>山茱萸组,160 μg·L<sup>-1</sup>黄连组,80 μg·L<sup>-1</sup>葛根组,160 μg·L<sup>-1</sup>桑白皮组,40 μg·L<sup>-1</sup>佩兰组,9.0 μg·L<sup>-1</sup>黄芪甲苷,18 μg·L<sup>-1</sup>毛蕊异黄酮葡萄糖苷,18 μg·L<sup>-1</sup>熊果酸,

18  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  马钱苷, 9.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  小檗碱, 18  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  葛根素, 18  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  1-脱氧野尻霉素进行其对 HepG2-IR 细胞模型己糖激酶(HK), 糖原合成, 丙酮酸激酶(PK)影响的实验<sup>[9]</sup>。

**2.8 数据分析** 采用 SPSS 21.0 分析软件分析数据, 数据测定结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组组间比较采用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 骨骼肌细胞 IR 模型造模 不同浓度胰岛素

表 1 不同时间、不同胰岛素浓度 ( $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-9} \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 干预下细胞上清液 glucose 浓度、细胞活力测定 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Cell supernatant glucose and activity assay concentration ( $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-9} \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of different times and different insulin concentrations intervention ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	glucose/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$			A		
		12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h
正常	-	16.29 $\pm$ 0.65	16.62 $\pm$ 0.52	17.45 $\pm$ 0.71	0.35 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.01
胰岛素	$5 \times 10^{-9}$	16.65 $\pm$ 0.74	17.55 $\pm$ 0.75	17.55 $\pm$ 0.62	0.35 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.01
	$5 \times 10^{-8}$	17.14 $\pm$ 0.52	17.68 $\pm$ 0.55	17.22 $\pm$ 0.68	0.35 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.01
	$5 \times 10^{-7}$	18.86 $\pm$ 0.58 <sup>1)</sup>	18.93 $\pm$ 0.96 <sup>1)</sup>	18.52 $\pm$ 0.42 <sup>1)</sup>	0.36 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.01
	$5 \times 10^{-6}$	17.14 $\pm$ 0.54	17.75 $\pm$ 0.65	16.74 $\pm$ 0.87	0.34 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01
	$5 \times 10^{-5}$	17.12 $\pm$ 0.68	17.85 $\pm$ 0.71	16.87 $\pm$ 0.76	0.27 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.01

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.2 双益方、组方中药及其有效成分对骨骼肌 IR 细胞上清液 glucose 浓度的影响** 骨骼肌细胞 IR 造模成功后, 采用 PBS 液清洗 3 次, 加入无酚红的诱导液 180  $\mu\text{L}$ , 双益方、组方单味中药、其有效成分 (30, 120, 480  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各加 20  $\mu\text{L}$ , 作用 24 h 后, 测

( $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-9} \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作用于骨骼肌细胞 12, 24, 36 h 后测定细胞上清液中 glucose 的含量, 与正常组比较,  $5 \times 10^{-7} \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度胰岛素组 glucose 含量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 其他组与正常组比较没有差异。不同浓度胰岛素 ( $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-9} \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作用于骨骼肌细胞 12, 24, 36 h 后, 进行细胞活性检测,  $5 \times 10^{-7} \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度的胰岛素组与正常组比较, 未见差异, 对细胞活性未见明显的影响, IR 模型造模浓度定为  $5 \times 10^{-7} \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见表 1。

定各组细胞上清液 glucose 含量。与正常组比较, 骨骼肌细胞的 IR 模型组细胞上清液的 glucose 浓度明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 双益方组、黄芪甲苷组、葛根素组细胞上清液的 glucose 浓度明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

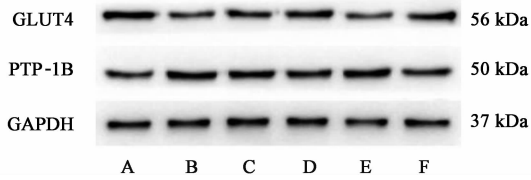
表 2 不同质量分数双益方、组方中药及其有效成分对骨骼肌 IR 细胞上清液 glucose 浓度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of SYP, component herbs and ingredients on cell supernatants glucose concentration of skeletal muscle ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	120 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	480 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
正常	17.55 $\pm$ 0.62	17.55 $\pm$ 0.62	17.55 $\pm$ 0.62
模型	30.63 $\pm$ 1.75 <sup>2)</sup>	30.63 $\pm$ 1.75 <sup>2)</sup>	30.63 $\pm$ 1.75 <sup>2)</sup>
双益方	24.56 $\pm$ 0.98 <sup>1)</sup>	23.45 $\pm$ 1.01 <sup>1,3)</sup>	20.99 $\pm$ 1.05 <sup>1,3)</sup>
盐酸吡格列酮	21.52 $\pm$ 0.82 <sup>1,3)</sup>	20.82 $\pm$ 0.81 <sup>1,3)</sup>	19.52 $\pm$ 0.92 <sup>1,3)</sup>
黄芪	24.68 $\pm$ 1.01 <sup>2)</sup>	23.58 $\pm$ 1.11 <sup>1)</sup>	22.14 $\pm$ 1.12 <sup>1,3)</sup>
山茱萸	24.89 $\pm$ 1.18 <sup>2)</sup>	24.15 $\pm$ 1.21 <sup>2)</sup>	22.56 $\pm$ 0.99 <sup>1,3)</sup>
黄连	25.85 $\pm$ 1.12 <sup>2)</sup>	24.86 $\pm$ 1.02 <sup>2)</sup>	23.22 $\pm$ 1.23 <sup>2)</sup>
桑白皮	25.98 $\pm$ 1.08 <sup>2)</sup>	25.63 $\pm$ 1.16 <sup>2)</sup>	24.56 $\pm$ 1.15 <sup>2)</sup>
葛根	26.78 $\pm$ 1.22 <sup>2)</sup>	24.45 $\pm$ 1.18 <sup>2)</sup>	24.28 $\pm$ 1.13 <sup>2)</sup>
佩兰	26.45 $\pm$ 1.04 <sup>2)</sup>	25.58 $\pm$ 1.22 <sup>2)</sup>	25.15 $\pm$ 1.20 <sup>2)</sup>
黄芪甲苷	23.22 $\pm$ 0.96 <sup>1)</sup>	22.68 $\pm$ 1.15 <sup>2)</sup>	22.01 $\pm$ 1.01 <sup>1,3)</sup>
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	24.58 $\pm$ 1.45 <sup>2)</sup>	22.87 $\pm$ 1.12 <sup>1,3)</sup>	22.58 $\pm$ 0.88 <sup>1,3)</sup>
1-脱氧野尻霉素	23.45 $\pm$ 0.82 <sup>1)</sup>	22.74 $\pm$ 1.02 <sup>1,3)</sup>	21.21 $\pm$ 1.05 <sup>1,3)</sup>
熊果酸	26.45 $\pm$ 1.41 <sup>2)</sup>	25.56 $\pm$ 1.51 <sup>2)</sup>	23.52 $\pm$ 1.12 <sup>2)</sup>
马钱苷	25.58 $\pm$ 1.32 <sup>2)</sup>	24.25 $\pm$ 1.12 <sup>2)</sup>	23.22 $\pm$ 1.52 <sup>1)</sup>
小檗碱	27.85 $\pm$ 1.12 <sup>2)</sup>	26.25 $\pm$ 1.25 <sup>2)</sup>	24.58 $\pm$ 1.55 <sup>2)</sup>
葛根素	25.56 $\pm$ 1.18 <sup>2)</sup>	23.45 $\pm$ 1.56 <sup>2)</sup>	22.02 $\pm$ 1.42 <sup>1)</sup>

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

**3.3 双益方、黄芪及其有效成分组方对 PTP-1B 表达的影响** 与正常组比较,模型组 PTP-1B 的表达显著增加, GLUT4 表达显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 双益方、黄芪、有效成分组方可不同程度降低 PTP-1B 的表达, 提高 GLUT4 表达 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 1, 表 3。



A. 正常组; B. 模型组; C. 二甲双胍组; D. 双益方组; E. 黄芪组; F. 有效成分组

**图 1 双益方、黄芪、有效成分组方对 PTP-1B、GLUT4 表达的影响**  
**Fig. 1 PTP-1B, GLUT4 expression of in liver of T2DM rats in each group**

**表 3 双益方、黄芪、有效成分组方对 PTP-1B、GLUT4 蛋白相对表达量的影响** ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

**Table 3 Comparisons of PTP-1B and GLUT4 protein content in each group** ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	PTP-1B/GAPDH	GLUT4/GAPDH
正常	-	1.54 ± 0.06 <sup>3)</sup>	2.24 ± 0.09 <sup>4)</sup>
模型	-	2.12 ± 0.10 <sup>1)</sup>	1.11 ± 0.05
二甲双胍	480	1.81 ± 0.07	1.25 ± 0.06
双益方	480	1.70 ± 0.06 <sup>3)</sup>	1.51 ± 0.07 <sup>3)</sup>
黄芪	480	2.35 ± 0.10	1.12 ± 0.05
有效成分组方	480	1.74 ± 0.07 <sup>3)</sup>	1.80 ± 0.06 <sup>4)</sup>

**表 4 双益方、组方中药及有效成分对 HepG2-IR 细胞模型 HK, 糖原合成, PK 的影响** ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

**Table 4 Effect of SYP, component herbs and different active in gredientson glycogen synthesis, HK and PK activity of HepG2-IR cells** ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	糖原/ $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	HK/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	PK/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$
正常	-	0.81 ± 0.04 <sup>4)</sup>	8.87 ± 0.38 <sup>4)</sup>	52.96 ± 2.11 <sup>4)</sup>
模型	-	0.33 ± 0.02 <sup>2)</sup>	4.29 ± 0.21 <sup>2)</sup>	28.36 ± 1.36 <sup>2)</sup>
吡格列酮	9	0.62 ± 0.04 <sup>3)</sup>	6.59 ± 0.26 <sup>3)</sup>	45.43 ± 2.06 <sup>4)</sup>
双益方	160	0.53 ± 0.03 <sup>3)</sup>	6.42 ± 0.21 <sup>3)</sup>	48.63 ± 2.69 <sup>3)</sup>
山茱萸	160	0.55 ± 0.02 <sup>3)</sup>	6.13 ± 0.22 <sup>3)</sup>	34.96 ± 2.96
黄芪	160	0.66 ± 0.04 <sup>4)</sup>	7.96 ± 0.29 <sup>4)</sup>	45.38 ± 2.89 <sup>4)</sup>
桑白皮	160	0.59 ± 0.03 <sup>3)</sup>	5.05 ± 0.21	46.55 ± 2.86 <sup>4)</sup>
黄连	160	0.56 ± 0.03 <sup>3)</sup>	4.53 ± 0.19	38.38 ± 2.57
葛根	80	0.52 ± 0.04 <sup>3)</sup>	4.32 ± 0.14	46.53 ± 3.02 <sup>4)</sup>
佩兰	40	0.40 ± 0.03	5.63 ± 0.22 <sup>3)</sup>	42.51 ± 2.23 <sup>4)</sup>
马钱苷	18	0.62 ± 0.03 <sup>4)</sup>	5.85 ± 0.25 <sup>3)</sup>	47.53 ± 3.28 <sup>4)</sup>
黄芪甲苷	9	0.73 ± 0.04 <sup>4)</sup>	6.76 ± 0.32 <sup>3)</sup>	46.18 ± 2.11 <sup>4)</sup>
1-脱氧野尻霉素	18	0.60 ± 0.04 <sup>4)</sup>	6.44 ± 0.21 <sup>3)</sup>	47.49 ± 2.23 <sup>4)</sup>
熊果酸	18	0.65 ± 0.03 <sup>4)</sup>	5.28 ± 0.23	39.68 ± 3.10
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	18	0.42 ± 0.03	4.69 ± 0.24	34.98 ± 2.85
葛根素	18	0.59 ± 0.04 <sup>3)</sup>	4.49 ± 0.22	48.13 ± 3.10 <sup>4)</sup>
小檗碱	9	0.53 ± 0.05 <sup>3)</sup>	5.89 ± 0.19 <sup>3)</sup>	42.24 ± 1.88 <sup>4)</sup>

**3.4 双益方、组方中药及有效成分对 HepG2-IR 细胞 HK, 糖原合成, PK 的影响** 与正常组比较, IR 模型组 HK 活性、糖原合成量及 PK 活性显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各浓度组单味中药及有效成分均能一定程度的增加糖原合成量及 HK, PK 活性 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 其中桑叶提取液、白藜芦醇及 1-脱氧野尻霉素增加糖原合成及提高 HK 活性作用较好; 制首乌提取液、二苯乙烯苷及白藜芦醇增加 PK 活性作用较好。见表 4。

#### 4 讨论

骨骼肌及肝脏是糖代谢的重要场所, 本研究取大鼠的新生乳鼠骨骼肌细胞, 进行原代细胞培养,  $5 \times 10^{-7} \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  胰岛素干预 12 h 的方法建立骨骼肌 IR 细胞模型; 以  $1 \times 10^{-7} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  胰岛素、造模时间为 36 h 建立 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型。观察双益方、组方中药、其有效成分对这 2 个模型 glucose 代谢的影响。

PTP-1B 是蛋白酪氨酸磷酸酶家族中的主要成员, PTP-1B 可以使胰岛素受体底物 (IRS) 等许多信号分子的酪氨酸去磷酸化而失活, 从而减弱、阻止胰岛素信号传导反应, 引起机体糖代谢异常, 从而导致 2 型糖尿病 (T2DM) 胰岛素抵抗 (IR); GLUT4 为位于细胞膜上的葡萄糖载体, 具有增加细胞摄取葡萄糖、促进葡萄糖利用的作用。实验结果表明, 与正常组比较, 模型组 PTP-1B 的表达显著增加, GLUT4 的表达降低; 与模型组比较, 双益方、黄芪、有效成分

组方可不同程度的降低 PTP-1B 的表达、提高 GLUT4 的表达,改善骨骼肌细胞胰岛素信号传导通路,可能是其改善胰岛素抵抗、调节葡萄糖代谢的作用机制。

己糖激酶(HK)是糖代谢途径中的一个关键限速酶,激活 HK 可以增加胰岛素释放和肝脏对葡萄糖的利用,而丙酮酸激酶(PK)可把磷酸烯醇式丙酮酸和 ADP 变为 ATP 和丙酮酸,为加速肝细胞摄取葡萄糖,降低血糖浓度起到了重要作用。实验结果显示,与正常组比较,模型组糖原合成量及 HK,PK 活性显著降低;与模型组比较,各浓度组单味中药及有效成分均能一定程度的增加糖原合成量及 HK,PK 活性,其中黄芪甲苷、黄芪提取液增加糖原合成及提高 HK 活性作用较好;双益方提取液及葛根素增加 PK 活性作用较好。

本实验进行了双益方、组方中药、其有效成分对骨骼肌及 HepG2 细胞胰岛素抵抗细胞模型葡萄糖消耗量的影响,实验结果表明双益方、组方中药、其有效成分对骨骼肌细胞胰岛素抵抗模型葡萄糖消耗量具有不同的作用,以双益方  $480 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时其葡萄糖消耗量最高,进一步实验表明双益方、组方中药及其有效成分组方对 PTP-1B 的表达具有不同的抑制作用;双益方及其有效成分可增加 HepG2 细胞糖原合成、提高 HK,PK 活性,通过该实验表明双益方调节葡萄糖代谢可能是其组方中药及有效成分共同发挥作用的结果,为双益方有效成分、作用机制及临床应用奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] 崔鹏,田春雨,张艳萍,等. 双益方对 2 型糖尿病大鼠 SOD、MDA、FFA 影响的实验研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(8):1840-1842.
- [2] 田春雨,刘志霞,王亚,等. 双益降糖方对 2 型糖尿病大鼠糖、脂代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(9):177-180.
- [3] 田春雨,薄海美,喇孝瑾,等. 正交设计法优选双益降糖方中小檗碱的提取工艺[J]. 河北联合大学学报:医学版,2013,15(1):51-52.
- [4] 田春雨,薄海美,喇孝瑾,等. 正交设计法优选双益降糖方中葛根素的提取工艺[J]. 河北联合大学学报:医学版,2013,15(2):158-159.
- [5] 周雪梅,田春雨,喇孝瑾,等. 十子代平方水煎液对原代骨骼肌细胞胰岛素抵抗模型的影响[J]. 天然产物研究与开发,2016,28(7):1139-1143.
- [6] 周雪梅,石丽莉,李钰慧,等. 五子降糖方对原代骨骼肌细胞胰岛素抵抗模型的影响[J]. 华北理工大学学报:医学版,2016,18(5):389-392.
- [7] 朱海燕,高泓,郭保根,等. 参芪复方对 2 型糖尿病大血管病变小鼠糖脂代谢及骨骼肌病变的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(4):124-128.
- [8] 张捷平,秦崇涛,余文珍,等. 金匱肾气丸对糖尿病大鼠骨骼肌胰岛素受体表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(22):165-168.
- [9] 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.

[责任编辑 邹晓翠]