

# 白子菜对 HepG2 细胞胰岛素抵抗作用的分子机制

韦乃球<sup>1,2</sup>, 郝二伟<sup>1,2</sup>, 冼寒梅<sup>1</sup>, 覃文慧<sup>1</sup>, 覃骊兰<sup>1</sup>, 李琦<sup>1</sup>, 柳俊辉<sup>1\*</sup>

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 广西中药药效研究重点实验室, 南宁 530200)

**[摘要]** 目的:观察白子菜对胰岛素抵抗人肝癌 HepG2 细胞的胰岛素受体 (insulin receptor, InsR), 葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter4, GLUT4) mRNA 表达和蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 糖原合成激酶-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) 蛋白表达的影响, 探讨其干预胰岛素抵抗的分子机制。方法:用胰岛素诱导 HepG2 细胞使其产生胰岛素抵抗, 实验分为空白组, 模型组, 白子菜水提物 (*Gynura divaricata* hot water extracts, GDE) 高、低质量浓度 (1.0, 0.5 g·L<sup>-1</sup>) 组, 白子菜总黄酮 (*G. divaricata* flavonoids, GDF) 高、低质量浓度 (0.2, 0.1 g·L<sup>-1</sup>) 组, 白子菜总生物碱 (*G. divaricata* alkaloid, GDA) 高、低质量浓度 (0.1, 0.05 g·L<sup>-1</sup>) 组, 二甲双胍 (1×10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup>) 组, 葡萄糖氧化酶法检测 HepG2 细胞培养液上清液中葡萄糖的含量, 实时荧光定量聚合酶反应 (Real-time PCR) 检测 HepG2 细胞 InsR, GLUT4 mRNA 表达, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 HepG2 细胞 PKB, GSK-3 $\beta$  的蛋白表达。结果:与模型组比较, 1.0, 0.5 g·L<sup>-1</sup> GDE 组上清液葡萄糖含量极显著降低 ( $P < 0.01$ ), 0.2 g·L<sup>-1</sup> GDF 组上清液葡萄糖含量显著降低 ( $P < 0.05$ ); GDE, GDF 组 InsR, GLUT4 的 mRNA 表达显著增加 ( $P < 0.05$ ); GDE 组 PKB 的蛋白表达显著增加 ( $P < 0.05$ ), GSK-3 $\beta$  的蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), GDF 组 PKB 的蛋白表达极显著增加 ( $P < 0.01$ ), GSK-3 $\beta$  的蛋白表达极显著降低 ( $P < 0.01$ )。结论:白子菜可改善胰岛素抵抗 HepG2 细胞对葡萄糖的摄取, 其机制可能与上调胰岛素抵抗 HepG2 细胞 InsR, GLUT4 mRNA 表达和 PKB 的蛋白表达及降低 GSK-3 $\beta$  的蛋白表达相关。

**[关键词]** 糖尿病; 白子菜; HepG2 细胞; 胰岛素; 分子机制

**[中图分类号]** R285.5; R259; R242; R277.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0110-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2018020110

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171102.1856.048.html>

**[网络出版时间]** 2017-11-02 18:56

## Molecular Mechanism of *Gynura divaricata* on Insulin Resistance in HepG2 Cells

WEI Nai-qiu<sup>1,2</sup>, HAO Er-wei<sup>1,2</sup>, XIAN Han-mei<sup>1</sup>, QIN Wen-hui<sup>1</sup>, QIN Li-lan<sup>1</sup>, LI Qi<sup>1</sup>, LIU Jun-hui<sup>1\*</sup>

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Nanning 530200, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of *Gynura divaricata* on mRNA expressions of insulin receptor (InsR) and glucose transporter 4 (GLUT4), and protein expressions of protein kinase B (PKB) and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) on insulin resistance in HepG2 cells, in order to discuss the molecular mechanism of insulin resistance after intervention. **Method:** Insulin-induced HepG2 cells were used to produce insulin resistance. The experiment included blank control group, model group, high-dose and low-dose *G. divaricata* hot water extracts (GDE, 1.0, 0.5 g·L<sup>-1</sup>) groups, high-dose and low-dose *G. divaricata* flavonoids (GDF, 0.2, 0.1 g·L<sup>-1</sup>) groups, high-dose and low-dose *G. divaricata* alkaloid (GDA, 0.1, 0.05 g·L<sup>-1</sup>) groups. Glucose oxidase method was used to detect the content of glucose in supernatant of HepG2 cell culture medium; mRNA expressions of insulin receptor (InsR) and glucose transporter 4 (GLUT4) in HepG2 cells were detected by Real-time PCR; and Western blot was used to detect protein expressions of kinase B (PKB) and GSK-

**[收稿日期]** 20170701(003)

**[基金项目]** 广西自然科学基金青年基金项目(2014GXNSFBA118159);广西中药药效研究重点实验室系统性研究课题项目(14-B-03)

**[第一作者]** 韦乃球, 硕士, 副教授, 从事中药基础理论及药效学研究工作, Tel: 13977163405, E-mail: 593164965@qq.com

**[通信作者]** \* 柳俊辉, 博士, 副教授, 从事中药理论与中药药效学研究工作, Tel: 0771-4953127, E-mail: 451947085@qq.com

$3\beta$  in HepG2 cells. **Result:** Compared with model control group, the glucose content of supernatant was significantly decreased in 1.0, 0.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  GDE groups ( $P < 0.01$ ), and the glucose content was significantly decreased in supernatant of 0.2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  GDF group ( $P < 0.05$ ); the mRNA expressions of INSR and GLUT4 in GDE and GDF groups increased significantly ( $P < 0.05$ ); the protein expression of PKB was significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the protein expression of GSK-3 $\beta$  was significantly reduced in GDE group ( $P < 0.05$ ), the protein expression of PKB was significantly increased ( $P < 0.01$ ) and the protein expression of GSK-3 $\beta$  decreased significantly in GDF group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** *Gynura divaricata* may improve insulin resistance HepG2 cells' uptake of glucose. Its mechanism may be related to the up-regulation of InsR, GLUT4 mRNA expression and PKB protein expression, and the reduction of GSK-3 $\beta$  protein expression in insulin resistant HepG2 cells.

[**Key words**] diabetes mellitus (DM); *Gynura divaricata*; HepG2 cell; insulin; molecular mechanism

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种以胰岛素分泌受损和胰岛素敏感的靶组织对其反应性下降的一类慢性代谢性疾病, 据其发病机制分为 1 型 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 和 2 型 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 两大类, 其中 T2DM 占有糖尿病的 90% 左右<sup>[1]</sup>。胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是指胰岛素作用的靶组织对内源性或外源性胰岛素的敏感性或反应性降低, 机体对正常量的胰岛素产生的生理效应低于正常水平<sup>[2]</sup>。74% 的 T2DM 患者存在 IR<sup>[3]</sup>。因此, 改善 IR 是治疗 T2DM 和相关并发症的有效干预措施<sup>[4]</sup>。

正常情况下, 胰岛素与其靶细胞膜表面的受体结合, 启动受体后信号转导, 调节代谢和基因表达而实现生理效应, 任何环节异常均可引起胰岛素抵抗。其中, 胰岛素受体 (insulin receptor, InsR) 参与胰岛素信号的转导, 其数量、结构及分布异常, 将导致胰岛素信号转导障碍, 诱发胰岛素抵抗<sup>[5]</sup>; 葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 主要分布于细胞内, 其表达或活性下降会导致葡萄糖的摄取减少<sup>[6-7]</sup>; 蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt) 是磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidyl inositol 3-kinase, PI3K) 信号通路下游的重要靶蛋白, 该信号通路也与 IR 的关系密切<sup>[8-9]</sup>; 糖原合成激酶-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其活性增强可导致 IR<sup>[10-11]</sup>。中医药在改善 2 型糖尿病 IR 方面具有一定的优势, 已成为近年来的研究热点<sup>[12]</sup>。

白子菜, 又名白背三七, 为菊科多年生草本植物的全株, 其味甘、性寒, 具有清热解毒、清肺祛痰、散瘀消肿、止血之功效, 主要用于肺病、肺热咳嗽、跌打损伤、外伤出血等<sup>[13-14]</sup>。已有文献报道白子菜具有改善大鼠 IR, 降低糖尿病小鼠血糖、升高糖尿病大鼠血清超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase,

SOD) 含量等作用<sup>[15-20]</sup>。本课题组前期研究也证实, 白子菜可改善 IR 和调节 IR 关键酶活性等作用<sup>[21-22]</sup>。但是, 白子菜改善 IR 的体外分子机制至今未见相关研究报道。该实验拟模仿机体 IR 的发病机制诱导 IR 的人肝癌细胞株 (HepG2) 细胞模型, 并给予白子菜水提物 (*Gynura divaricata* hot water extracts, GDE), 白子菜总黄酮 (*G. divaricata* flavonoids, GDF), 白子菜总生物碱 (*G. divaricata* alkaloid, GDA) 干预, 采用实时荧光定量聚合酶反应 (Real-time PCR) 技术和蛋白免疫印迹法 (Western blot) 分别检测 IR 的 HepG2 细胞中 InsR, GLUT4 mRNA 表达和 PKB, GSK-3 $\beta$  蛋白表达, 揭示白子菜体外改善 IR 的分子机制, 为白子菜治疗糖尿病和开发广西特色壮药提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 药物** 白子菜采于广西隆安县, 经广西中医药大学药用植物教研室郭敏副教授鉴定, 为菊科多年生草本植物白子菜 *Gynura divaricata* 的全株。盐酸二甲双胍片 (北京京丰制药有限公司, 批号 20150811)。

**1.2 细胞** HepG2 细胞由中国医学科学院基础医学研究所提供。

**1.3 试剂** 结晶牛胰岛素 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 510D027); 噻唑蓝 (MTT, 美国 Sigma 公司, 批号 298-93-1); DMEM (江苏凯基生物技术股份有限公司, 批号 161101); 胎牛血清 (美国 Corning 公司, 批号 35076111); 胰蛋白酶 (杭州吉诺生物医药技术有限公司, 批号 20161227); 葡萄糖测定 (葡萄糖氧化酶法) 试剂盒 (浙江东瓯生物公司, 批号 A031); trizol (Ambion 公司, 批号 15596026); RIPA (强) 组织细胞快速裂解液, BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) 和 Goat Anti-Rabbit 免疫球蛋白 (IgG) (Bioswamp 公司, 批号分别为 PAB180006,

PAB180007, PAB160011); RT 逆转录试剂盒(日本 Takara 公司, 批号 639505); SYBR Green PCR 试剂盒(KAPABiosystems 公司, 批号 KM4101);  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin, 北京中杉金桥生物公司, 批号 161208); Akt(PKB) 和 GSK3 beta 抗体(Abcam 公司, 批号分别为 ab179463, ab32391)。

**1.4 仪器** UV-1800 型紫外-可见分光光度仪(日本岛津公司); MDF-U7386S 型超低温保存箱(日本 Sanyo 公司); BSA124S 型电子天平(德国 Sartorius 公司); BX51T-PHD-J11 型显微镜(日本奥林巴斯公司); RM2015 型切片机(德国莱卡公司); Image-Pro Plus 型多功能真彩色细胞图象分析管理系统(美国 Media Cybernetics 公司); ABI7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司); ELX800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); DYY-7C 型电泳仪, DYCZ-40D 型转膜仪(北京六一仪器厂); ST16R 型台式高速冷冻离心机和 Universal Hood II 型凝胶成像系统(德国 ThermoFisher 公司); Tanon-5200 全自动化学发光分析仪(上海天能公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备与处理** GDE 制备, 取白子菜干粉, 加 12 倍量水浸泡 1 h 后回流提取 1.5 h, 趁热过滤, 药渣加 10 倍量水回流提取 1.0 h, 趁热过滤, 混合 2 次滤液浓缩制成浸膏。GDF 制备, 取白子菜干粉, 95% 乙醇反复提取 3 次, 提取液浓缩后的浸膏混悬于水中, 经石油醚萃取后, 水相再经正丁醇萃取, 正丁醇萃取物上聚酰胺柱, 乙醇梯度洗脱后得总黄酮。GDA 制备, 取白子菜干粉, 95% 乙醇反复提取 3 次, 提取液浓缩后得浸膏, 浸膏混悬于水中后酸碱处理, 以三氯甲烷( $\text{CHCl}_3$ ) 萃取,  $\text{CHCl}_3$  部位回收溶剂得总生物碱。药物处理, GDE, GDF, GDA 均需溶于二甲基亚砜(DMSO) 中过夜, 分别用 0.44, 0.22  $\mu\text{m}$  的滤器过滤, 使用时根据实验需要加入无血清 DMEM 培养基稀释至相应浓度。

**2.2 细胞培养** 用含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 的高糖 DMEM 完全培养基, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养 HepG2 细胞, 待细胞长满培养瓶瓶底后, 用 PBS 液洗 1 次, 再加 0.05% 胰酶和体积分数 0.2% EDTA 的消化液消化, 用含 10% FBS 的高糖 DMEM 完全培养基终止反应。细胞悬液倒入离心管中, 1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃上清, 加完全培养基, 将细胞吹打成细胞悬液, 按 1:3 传代, 实验均取对数生长期的细胞。

**2.3 MTT 比色法确定细胞给药安全范围** 将处于

对数生长期的细胞按  $1 \times 10^4$  个/mL 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 待细胞贴壁后, 加入一定浓度梯度的白子菜进行干预。设空白组和不同浓度药物组, 空白组加正常培养液 100  $\mu\text{L}$ , 不同浓度药物组分别加入正常培养液 90  $\mu\text{L}$  和含药工作液 10  $\mu\text{L}$ , 将培养板置于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养 24 h 后, 每孔加入 MTT 20  $\mu\text{L}$ , 其中培养液-MTT(5:1), 全程关闭超净台光, 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ , 50  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡 10 min, 用酶标仪检测波长为 490 nm 时的吸光度 A。

**2.4 IR HepG2 细胞模型的诱导**<sup>[21]</sup> 取对数生长期的细胞按  $4 \times 10^4$  个/mL 接种于 24 孔培养板中, 继续置于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养, 24 h 后形成单层贴壁细胞, 再用无 FBS 的 DMEM 洗涤 1 次, 加入  $1 \times 10^{-7}$   $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的胰岛素进行干预, 空白组不加胰岛素诱导, 将培养板置于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 36 h。

**2.5 白子菜对 IR HepG2 细胞模型的干预** 将 HepG2 细胞弃去培养液, 用 PBS 洗涤 2 次, 然后分别设空白组, 模型组, GDE 高、低剂量组, GDF 高、低剂量组, GDA 高、低剂量组和二甲双胍组, 每组 6 个复孔。药物处理 24 h 后停止药物作用, 继续以下实验。

**2.6 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 HepG2 细胞 InsR, GLUT4 mRNA** 收集各组细胞(收集促进葡萄糖摄取效果更佳的药物剂量组细胞进行检测, 下同), 采用 trizol 提取总 RNA, 按逆转录试剂盒操作步骤进行 RT 反应, 所得 cDNA 在 PCR 仪上进行扩增, 以 cDNA 1  $\mu\text{L}$  为模板,  $\beta$ -actin 为内参, 基因引物系列为 InsR: 上游 5'-AACCCACCTATTCTACG-3', 下游 5'-CTTCCAATCACAACTAGT-3', 扩增片段为 109 bp; GLUT4: 上游 5'-CCCGCTACCTCTACATC-3', 下游 5'-GCACTCCAGAAACATCG-3', 扩增片段为 90 bp;  $\beta$ -actin: 上游 5'-ACACTGTGCCCATCTACG-3', 下游 5'-TGTCAGCACGATTTCC-3', 扩增片段为 153 bp。其扩增反应程序为 95  $^{\circ}\text{C}$ , 3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ , 5 s; 56  $^{\circ}\text{C}$ , 10 s; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 25 s; 39 个循环; 65  $^{\circ}\text{C}$ , 5 s; 95  $^{\circ}\text{C}$ , 50 s。用 Universal Hood II-凝胶成像分析系统进行分析, 以待测样品/内参做半定量分析。

**2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 HepG2 细胞 PKB, GSK-3 $\beta$  的蛋白表达** 收集各组细胞, 细胞裂解液提取细胞总蛋白, 用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度。制备 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离

胶,每孔加蛋白样品 10 μg,经电泳后通过半干式电转仪将分离的蛋白转到硝酸纤维素滤膜上。将膜用 5% 脱脂牛奶含有 0.1% 聚山梨酯 20 的 (TBST) 在摇床上封闭 2 h,加入一抗 (PKB 和 GSK-3β 抗体稀释比例分别为 1:10 000,1:5 000) 后 4 ℃ 下孵育过夜,用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;加入二抗 (1:10 000),摇床孵育 2 h,用 TBST 洗 3 次,每次 5 min,将膜放置在暗室中,加入发光显色剂 ECL 显色,然后将膜置于全自动化学发光分析仪中检测。

**2.8 统计学分析** 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间采用单因素方差分析,两两组间比较采用 LSD 法,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 药物对细胞存活率的影响** 与空白组比较, GDE, GDF, GDA 质量浓度分别在 0.062 5 ~ 1.0, 0.012 5 ~ 0.2, 0.006 25 ~ 0.1 g·L<sup>-1</sup> 时,对细胞生长无明显抑制作用。见表 1。

表 1 白子菜对 HepG2 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of *Gynura divaricata* on survival rate of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	A <sub>490 nm</sub>
空白	-	0.58 ± 0.03
GDE	1.0	0.57 ± 0.04
	0.5	0.56 ± 0.02
	0.25	0.54 ± 0.03
	0.125	0.55 ± 0.03
	0.062 5	0.56 ± 0.03
	GDF	0.2
0.1		0.55 ± 0.05
0.05		0.55 ± 0.06
0.025		0.55 ± 0.04
0.012 5		0.54 ± 0.07
GDA		0.1
	0.05	0.55 ± 0.03
	0.025	0.54 ± 0.02
	0.012 5	0.55 ± 0.01
	0.006 25	0.57 ± 0.05

**3.2 白子菜对 IR HepG2 细胞模型的影响** 与空白组比较,模型组上清液葡萄糖含量显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较,1.0, 0.5 g·L<sup>-1</sup> GDE 和二甲双胍组上清液葡萄糖含量极显著降低 ( $P < 0.01$ ), 0.2 g·L<sup>-1</sup> GDF 组上清液葡萄糖含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 白子菜对 IR HepG2 细胞葡萄糖含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of *Gynura divaricata* on content glucose in insulin resistance HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	葡萄糖/mmol·L <sup>-1</sup>
空白	-	13.45 ± 0.39
模型	-	15.00 ± 1.08 <sup>1)</sup>
GDE	1.0	13.21 ± 0.75 <sup>4)</sup>
	0.5	13.82 ± 0.72 <sup>4)</sup>
GDF	0.2	13.35 ± 0.19 <sup>3)</sup>
	0.1	13.87 ± 0.12 <sup>1)</sup>
GDA	0.1	13.93 ± 0.24 <sup>1)</sup>
	0.05	14.86 ± 0.39
二甲双胍	1 × 10 <sup>-3</sup> 5)	13.04 ± 0.53 <sup>4)</sup>

注:与空白组比较<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>  $P < 0.01$ ; <sup>5)</sup> 浓度单位为 mol·L<sup>-1</sup> (表 3, 4 同)。

**3.3 白子菜对 IR HepG2 细胞 InsR, GLUT4 mRNA 表达的影响** 与空白组比较,模型组 InsR 和 GLUT4 的 mRNA 显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, GDE, GDF 组 InsR 和 GLUT4 的 mRNA 显著增加 ( $P < 0.05$ ), 二甲双胍组 InsR 的 mRNA 极显著增加 ( $P < 0.01$ ), GLUT4 的 mRNA 显著增加 ( $P < 0.05$ )。见图 1, 表 3。

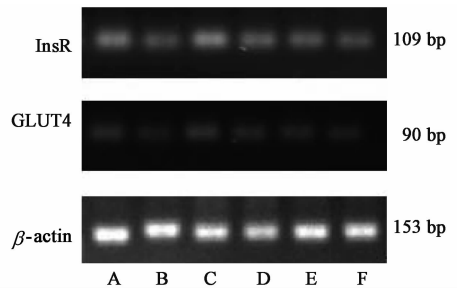


图 1 白子菜对 IR HepG2 细胞 InsR, GLUT4 mRNA 表达电泳 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Effect of *Gynura divaricata* on mRNA expression of InsR, GLUT4 in insulin resistance HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

表 3 白子菜对 IR HepG2 细胞 InsR, GLUT4 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of *Gynura divaricata* on mRNA expression of InsR, GLUT4 in insulin resistance HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量分数/g·L <sup>-1</sup>	InsR	GLUT4
空白	-	1.46 ± 0.05	1.60 ± 0.07
模型	-	1.38 ± 0.04 <sup>1)</sup>	1.52 ± 0.01 <sup>1)</sup>
GDE	1.0	1.44 ± 0.01 <sup>3)</sup>	1.58 ± 0.05 <sup>3)</sup>
GDF	0.2	1.43 ± 0.02 <sup>3)</sup>	1.54 ± 0.01 <sup>3)</sup>
GDA	0.1	1.41 ± 0.01	1.52 ± 0.02
二甲双胍	1 × 10 <sup>-3</sup>	1.45 ± 0.04 <sup>3)</sup>	1.55 ± 0.03 <sup>3)</sup>

**3.4 白子菜对 IR HepG2 细胞 PKB, GSK-3 $\beta$  蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型组 PKB 蛋白表达极显著降低( $P < 0.01$ ),GSK-3 $\beta$  蛋白表达极显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,GDE 组 PKB 蛋白表达显著增加( $P < 0.05$ ),GSK-3 $\beta$  蛋白表达显著降低( $P < 0.05$ ),GDF 和二甲双胍组 PKB 蛋白表达极显著增加( $P < 0.01$ ),GSK-3 $\beta$  蛋白表达极显著降低( $P < 0.01$ )。见图 2,表 4。

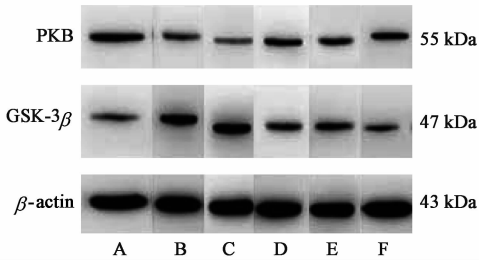


图 2 白子菜对 IR HepG2 细胞 PKB, GSK-3 $\beta$  蛋白表达电泳 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of *Gynura divaricata* on protein expression of PKB, GSK-3 $\beta$  in insulin resistance HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

表 4 白子菜对 IR HepG2 细胞 PKB, GSK-3 $\beta$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of *Gynura divaricata* on protein expression of PKB, GSK-3 $\beta$  in insulin resistance HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量分数/g·L <sup>-1</sup>	PKB/ $\beta$ -actin	GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -actin
空白	-	0.70 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.02
模型	-	0.33 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	0.74 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>
GDE	1.0	0.38 $\pm$ 0.03 <sup>2,3)</sup>	0.63 $\pm$ 0.08 <sup>2,3)</sup>
GDF	0.2	0.44 $\pm$ 0.02 <sup>2,4)</sup>	0.47 $\pm$ 0.02 <sup>2,4)</sup>
GDA	0.1	0.38 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	0.64 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>
二甲双胍	1 $\times$ 10 <sup>-3</sup>	0.63 $\pm$ 0.03 <sup>2,4)</sup>	0.42 $\pm$ 0.03 <sup>2,4)</sup>

#### 4 讨论

IR 在细胞水平的定义是由于胰岛素受体或受体后缺陷,一定浓度的胰岛素不能使细胞达到其相应代谢水平<sup>[23]</sup>。由于人体试验的局限性,往往不便于对 IR 的发生机制进行深入研究。因此,建立 IR 的细胞模型,不仅可以在细胞水平探讨 IR 形成的机制和葡萄糖代谢障碍的病理生理,而且便于筛选改善 IR 的药物。肝脏及其外周组织是胰岛素作用的靶组织,是 IR 产生的主要部位。HepG2 细胞是一种表型与肝细胞极为相似的肝胚胎瘤细胞株,保留了肝细胞的许多生物学特性<sup>[24]</sup>。故该实验将 HepG2 细胞置于 1  $\times$  10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup> 的胰岛素中 36 h 建立 IR 模型并予以 GDE, GDF, GDA 干预,采用 Real-time PCR 技术和 Western blot 法分别检测 IR HepG2 细

胞中 InsR, GLUT4 mRNA 和 PKB, GSK-3 $\beta$  蛋白表达。本实验结果显示,模型组上清液葡萄糖含量显著高于空白组上清液葡萄糖含量, GDE, GDF, 二甲双胍组上清液葡萄糖含量均显著低于模型组上清液中葡萄糖含量。

胰岛素通过与细胞表面的 InsR 结合,达到激活蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinase, PTK) 的作用,激活后的 PTK 与胰岛素结合发生自动磷酸化,磷酸化后的 InsR 通过激发细胞内胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS) 发生磷酸化,磷酸化后的 IRS 和 PI3K 的 p85 调节亚基结合并将信号传递给 Akt<sup>[25-27]</sup>。此外,在胰岛素和 PTK 的作用下,使磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 肌醇环上的 D-3 位点磷酸化,使 Akt 转移到细胞膜上,从而活化 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 (phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1)。PDK1 催化 Akt 活性区 Thr308 位点发生磷酸化,使生物信号得以传递其下游的 GLUT4, GSK 等多种底物受体,引起 GLUT-4 易位至细胞膜,介导葡萄糖转运入细胞;抑制 GSK 的活性,减少肝糖原的合成<sup>[28-30]</sup>。反之,胰岛素受体后 PI3K/Akt 信号通路障碍及下游靶蛋白功能异常均可引发糖脂代谢障碍,继而导致 IR 的发生<sup>[31-34]</sup>。本实验结果显示,与模型组比较,GDE, GDF 组 InsR, GLUT4 mRNA 表达显著增加,GDE 组 PKB 的蛋白表达显著增加,GSK-3 $\beta$  的蛋白表达显著降低,GDF 组 PKB 的蛋白表达极显著增加,GSK-3 $\beta$  的蛋白表达极显著降低。

综上所述,可推断 GDE, GDF 具有改善细胞 IR 的作用,其作用机制可能是通过募集 PKB/Akt 到其上游的 InsR,并结合形成信号转导复合物,从而调节下游的 GSK-3 和 GLUT4,促进葡萄糖摄取、糖原合成及抑制糖异生,提高机体对胰岛素的敏感性。但对于白子菜可能存在的其他改善 IR 的机制及其有效单体成分尚未完全明确,今后将针对白子菜分离出的有效单体及其改善 IR 的作用机制进行进一步的深入探讨。

#### [参考文献]

- [1] Guariguata L, Whiting D R, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 103(2): 137-149.
- [2] Reaven G M. Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease [J]. *Med Clin N Am*, 2011, 95(5): 875-892.

- [ 3 ] Cook J R, Langlet F, Kido Y, et al. Pathogenesis of selective insulin resistance in isolated hepatocytes [ J ]. *J Biol Chem*, 2015, 290(22) : 13972-13980.
- [ 4 ] HAN J H, Kim I S, Jung S H, et al. The effects of propionate and valerate on insulin responsiveness for glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes and C<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> myotubes *via* G protein-coupled receptor 41 [ J ]. *PLoS One*, 2014, 9(4) : e95268.
- [ 5 ] Bence K K. Hepatic PTP1B deficiency: the promise of a treatment for metabolic syndrome [ J ]. *Am J Med*, 1998, 105:331-345.
- [ 6 ] Albury-Warren T M, Pandey V, Spinel L P, et al. Prediabetes linked to excess glucagon in transgenic mice with pancreatic active AKT1 [ J ]. *J Endocrinol*, 2016, 228(1) : 49-59.
- [ 7 ] 唐海双, 王清松, 焦炳华, 等. GLUT4 在胰岛素调控葡萄糖转运中的作用 [ J ]. *生命的化学*, 2014, 34(2) : 285-290.
- [ 8 ] XIAO X, HE Y, LI C, et al. Nicastrin mutations in familial acne inversa impact keratinocyte proliferation and differentiation through the Notch and PI3K/Akt signaling pathways [ J ]. *Br J Dermatol*, 2016, 174(3) : 522-532.
- [ 9 ] CHI M, YE Y, ZHANG X D, et al. Insulin induces drug resistance in melanoma through activation of the PI3K/Akt pathway [ J ]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8( default) : 255-262.
- [ 10 ] Eldar-Finkelman H, Schreyer S A, Shinohara M M, et al. Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes and obesity-prone C57BL/6J mice [ J ]. *Diabetes*, 1999, 48(3) : 1662-1666.
- [ 11 ] Nikoulina S E, Ciaraldi T P, Mudaliar S, et al. Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes [ J ]. *Diabetes*, 2000, 49(1) : 263-271.
- [ 12 ] 陈忠云, 杨叔禹. 中医药改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗的病理生理学机制研究进展 [ J ]. *福建医药杂志*, 2017, 39(3) : 140-142.
- [ 13 ] 广西壮族自治区革委会卫生局. 广西本草选编 [ M ]. 南宁: 广西人民出版社, 1974: 1826.
- [ 14 ] 江苏新医学院. 中药大词典 [ M ]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 749.
- [ 15 ] 韩海峰, 张雪英, 申红立, 等. 白背三七对胰岛素抵抗大鼠肝脏胰岛素受体表达的影响 [ J ]. *中药药理与临床*, 2014, 30(5) : 102-105.
- [ 16 ] 马正东, 陈磊, 宋洪涛, 等. 白背三七水提取物对 2 型糖尿病大鼠的降血糖作用及其机制 [ J ]. *中草药*, 2010, 41(4) : 623-626.
- [ 17 ] 贺克, 刘姣, 刘丽华, 等. 白背三七总黄酮对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响 [ J ]. *中成药*, 2014, 37(11) : 2501-2504.
- [ 18 ] 袁六六, 杨娟, 张国彬, 等. 白子菜提取物对糖尿病小鼠血脂代谢和肝脏保护作用 [ J ]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34(18) : 1572-1576.
- [ 19 ] 吴霞, 张钱钱, 王忠震, 等. 白子菜叶片中酸性多糖的降血糖作用及其对相关指标的影响 [ J ]. *植物资源与环境学报*, 2015, 24(2) : 115-117.
- [ 20 ] 俞浩, 毛斌斌, 周国梁, 等. 白背三七总黄酮对糖尿病大鼠的降血糖作用 [ J ]. *食品科学*, 2013, 34(15) : 295-298.
- [ 21 ] 韦乃球, 洗寒梅, 杨柯, 等. 白背三七对 HepG2 细胞胰岛素抵抗改善作用的实验研究 [ J ]. *时珍国医国药*, 2011, 22(6) : 1395-1396.
- [ 22 ] 韦乃球, 杨柯, 洗寒梅, 等. 白子菜水提液对胰岛素抵抗 HepG2 细胞关键酶活性的影响 [ J ]. *医药导报*, 2013, 32(3) : 281-284.
- [ 23 ] 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.
- [ 24 ] Knowles B B, Howe C C, Aden D P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma protein and hepatitis B surface antigen [ J ]. *Science*, 1980, 209(4455) : 497-499.
- [ 25 ] Czauderna F, Fechtner M, Aygun H, et al. Functional studies of the PI(3)-kinase signalling pathway employing synthetic and expressed siRNA [ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(2) : 670-682.
- [ 26 ] Hers I, Vincent E E, Tavares J M. Akt signalling in health and disease [ J ]. *Cell Signal*, 2011, 23(10) : 1515-1527.
- [ 27 ] WANG H, ZHANG Q, WEN Q, et al. Proline-rich Akt substrate of 40kDa (PRAS40): a novel downstream target of PI3k/Akt signaling pathway [ J ]. *Cell Signal*, 2012, 24(1) : 17-24.
- [ 28 ] Brozinick J T, Roberts B R, Dohm G L. Defective signaling through Akt-2 and-3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: potential role in insulin resistance [ J ]. *Diabetes*, 2003, 52(4) : 935-941.
- [ 29 ] HU X, WANG S, XU J, et al. Triterpenoid saponins from *Stauntonia chinensis* ameliorate insulin resistance *via* the AMP-activated protein kinase and IR/IRS-1/PI3K/Akt pathways in insulin-resistant HepG2 cells [ J ]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6) : 10446-10458.
- [ 30 ] 吕娟, 陈莉娜, 马欣. PI3K/Akt 信号通路与胰岛素抵抗相关疾病的关系 [ J ]. *国外医学: 医学地理分册*, 2012, 33(2) : 127-131.
- [ 31 ] 韩海峰, 张雪英, 申红立, 等. 白背三七对胰岛素抵抗大鼠肝脏胰岛素受体表达的影响 [ J ]. *中药药理与临床*, 2014, 30(5) : 102-105.
- [ 32 ] 黄桂红, 刘天旭, 朱钊铭, 等. 鬼针草黄酮对 HepG2 胰岛素抵抗细胞 PI3K/AKT1/GLUT4 信号通路的调控作用 [ J ]. *实用医学杂志*, 2016, 32(24) : 3994-3998.
- [ 33 ] 刘颐轩, 臧莎莎, 宋光耀, 等. 津力达对胰岛素抵抗大鼠肝脏 PI3K/AKT 信号通路的影响 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(12) : 72-76.
- [ 34 ] 金鑫, 赵海燕, 马永平. 甘草黄酮对 2 型糖尿病大鼠肝脏中 GSK-3 $\beta$  蛋白表达的影响 [ J ]. *天然产物研究与开发*, 2014, 26(3) : 419-422.

[责任编辑 邹晓翠]