

# 肉桂多酚改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的分子机制

卢兆莲<sup>1</sup>, 黄才国<sup>2\*</sup>

(1. 济南军区总医院 实验诊断科, 济南 250031;  
2. 第二军医大学 生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 目的:研究肉桂多酚改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的分子机制。方法:以 HepG2 细胞为模型,设立对照组和肉桂多酚实验组,肉桂多酚组设 5,10,15 mg·L<sup>-1</sup> 3 种不同质量浓度组。肉桂多酚作用细胞 24 h 后,运用实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)技术,检测肉桂多酚对胰岛素抵抗 HepG2 细胞内葡萄糖转运蛋白 2(GLUT2)、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)和葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)基因表达的影响。结果:与对照组比较,肉桂多酚作用细胞 24 h 后,降低了 GLUT2 mRNA 的表达( $P < 0.05$ );肉桂多酚能够明显降低 PEPCK, G-6-Pase mRNA 的表达( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且随着浓度的升高,肉桂多酚对 PEPCK 和 G-6-Pase mRNA 表达的抑制作用越明显。结论:肉桂多酚对 HepG2 胰岛素抵抗具有明显的改善作用,其机制可能与降低细胞内 GLUT2, PEPCK 和 G-6-Pase mRNA 的表达有关。

**[关键词]** 肉桂多酚; HepG2; 胰岛素抵抗; 葡萄糖转运蛋白 2、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)24-0276-04

## Molecular Mechanism of Cinnamon Polyphenols on Improvement of Insulin Resistance in HepG2 Cells *in vitro*

LU Zhao-lian<sup>1</sup>, HUANG Cai-guo<sup>2\*</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, General Hospital of Ji'nan Military Area, Ji'nan 250031, China;  
2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the molecular mechanism of cinnamon polyphenols on improvement of insulin resistance in HepG2 cells *in vitro*. **Method:** The HepG2 cells were used as cell model. Cells were

**[收稿日期]** 20120528(007)

**[通讯作者]** \* 黄才国,教授,从事药理学研究, Tel:021-81870970, E-mail: huangcaigu@ hotmail

血管痉挛及血管内凝血,导致脑梗死范围扩大而加重脑组织损伤范围。自由基及脂质过氧化物的增多,远远超过脑组织的清除能力,机体自身抗氧化酶大量消耗,导致 SOD 等抗氧化酶活性降低<sup>[6]</sup>。本试验通过对小叶锦鸡儿总黄酮的研究发现,CMF 各剂量组较模型组均可明显提高模型大鼠脑组织 SOD 活性,降低 MDA 含量;明显抑制血液黏度升高,降低血小板聚集性,改善红细胞变形能力。因此,其防治脑缺血再灌注损伤的机制可能与其抗氧化应激及降低血黏度作用有关。

### [参考文献]

[1] 牛西午. 柠条研究论文集[C]. 太原:山西科学技术出版社,2003:163.

- [2] 杜学武,郭晓玲,郭春林,等. 锦鸡儿治疗风湿性关节炎临床研究[J]. 中国医药杂志,1995,4(3):11.
- [3] 孙国栋,岳永花,李先荣,等. 芪蛭通络胶囊辅助阿司匹林对脑缺血再灌注损伤大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):202.
- [4] 陈奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:35.
- [5] Zea Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J] Stroke, 1989, 20(1):84.
- [6] Cuzzocrea S, Riley D P, Caputi A P, et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/ reperfusion injury [J]. Pharmacol Rev, 2001;53(1): 135.

[责任编辑 聂淑琴]

incubated with cinnamon polyphenols of three different concentrations (5, 10, 15 mg·L<sup>-1</sup>). Control cells were incubated without cinnamon polyphenols. After 24 h, the mRNA expression of porcine glucose transporter 2 (GLUT2) phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) related to insulin resistance was detected by Real-time PCR (RT-PCR). **Result:** Compared with the control group, the RT-PCR showed the mRNA expression of GLUT2 decreased after being treated with the cinnamon polyphenols ( $P < 0.05$ ); the cinnamon polyphenols significantly decreased the expression of PEPCK and G-6-Pase mRNA ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), moreover, the cinnamon polyphenols inhibited the expression of PEPCK and G-6-Pase mRNA in a dose-dependent manner. **Conclusion:** Cinnamon polyphenols can significantly improve insulin-resistance of HepG2 cells and its mechanism is related to the inhibition of GLUT2, PEPCK, G-6-Pase gene expression.

[ **Key words** ] Cinnamon polyphenols; HepG2 cells; insulin resistance; glucose transporter2; phosphoenolpyruvate carboxykinase

2 型糖尿病是一个以高血糖和引起眼睛、肾脏、神经和血管长期的并发症为特征的慢性代谢紊乱症<sup>[1-2]</sup>,而胰岛素抵抗是 2 型糖尿病发病的独立危险因素,普遍存在于 2 型糖尿病中,几乎占 95% 以上,肝脏是 2 型糖尿病胰岛素抵抗的关键器官。肝脏胰岛素敏感性降低导致肝脏葡萄糖异生和葡萄糖输出增加与餐后高胰岛素血症。肝脏糖代谢受复杂的新陈代谢信号网络的影响,所以在胰岛素信号转导的诸多环节中任何部分异常都有可能参与胰岛素抵抗的发生。肉桂多酚具有改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的作用,其机制可能是通过特定的信号转导影响了细胞内一些与糖脂代谢相关的基因的表达。本实验通过采用不同浓度的肉桂多酚处理 HepG2 细胞,观察处理前后细胞葡萄糖转运蛋白 2、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 和葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-Pase) 基因表达变化,旨在从分子水平探讨肉桂多酚改善胰岛素抵抗的可能机制。

## 1 材料

**1.1 药物** 肉桂多酚是从肉桂中提取分离出来的多酚类物质。肉桂标本采于我国上海,由复旦大学顾关云教授鉴定为肉桂树 (*Cinnamomum cassia* Presl. Tree), 2 kg 肉桂经分离纯化后,产生 113.6 g 肉桂多酚的提取物。这些凭证标本 (RG003-RG005) 存放于中国上海中医药大学药学院中药化学植物标本室。药物用 PBS 溶解。

**1.2 试剂** DMEM 培养基,青霉素(100 U·mL<sup>-1</sup>)/链霉素(100 mg·L<sup>-1</sup>)购自 Gibco 公司;6 孔板购自 Costar 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司;异丙醇,氯仿,乙醇购自国药集团;环磷酸腺苷((cAMP)、地塞米松、乳酸钠和丙酮酸钠(Sigma 公司), TRIzol RNA 抽提试剂(Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(MBI Fermentas 公司);实时定量 PCR

试剂盒(ABI 公司);引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;其余试剂均为分析纯。

**1.3 仪器** 核酸定量检测仪(Eppendorf 公司), PCR 仪(Stratagene 公司), 7300 Real-time PCR 仪(ABI 公司), Sorvall 高速低温离心机(Thermo Fish 公司), Model 100A 电子天平(Denver Instrument company), -80 °C 低温冰箱(Heraeus 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 人肿瘤细胞株 HepG2 细胞培养于 DMEM 培养基(含 10% 灭活的胎牛血清、100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素和 100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素)中。细胞置于 37 °C 5% 的 CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。

### 2.2 检测胰岛素抵抗相关基因的表达

**2.2.1 细胞处理** 取对数生长期细胞以  $1 \times 10^6$  的密度接种于 6 孔培养板中,细胞贴壁后,换液,加入含  $5 \times 10^{-7}$  mol·L<sup>-1</sup> 的胰岛素和 1% 胎牛血清的培养基,24 h 后,弃上清,用 PBS 洗细胞 3 次,再加入新鲜培养基孵育 20 min,再用 PBS 洗。再加入肉桂多酚,使药物终质量浓度分别为 5, 10, 15 mg·L<sup>-1</sup> 并设不加药对照组,作用 24 h 后,抽提细胞总 RNA,以检测 GLUT2。

取对数生长期细胞以  $1 \times 10^6$  的密度接种于 6 孔培养板中,细胞贴壁后,换液,分别加入终浓度为 100 μmol·L<sup>-1</sup>, 500 nmol·L<sup>-1</sup>, 20, 2 mmol·L<sup>-1</sup> 的环磷酸腺苷(cAMP)、地塞米松、乳酸钠和丙酮酸钠的含 1% 胎牛血清的无糖 DMEM 培养基及终质量浓度为 5, 10, 15 mg·L<sup>-1</sup> 肉桂多酚,并设阴性(不加药)和阳性胰岛素 10 nmol·L<sup>-1</sup> 对照组。作用 24 h 后,抽提细胞总 RNA,以检测 PEPCK 和 G-6-Pase。

**2.2.2 细胞总 RNA 抽提** 肉桂多酚处理组和对照组分别加入 1 mL Trizol,用吸管吹吸细胞多次直至细

胞裂解,转移至 1.5 mL 无酶 EP 管中;加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振摇 30 s,呈乳白状,室温静置 2 ~ 3 min;4℃ 12 000 × *g* 离心 15 min,吸取上层水相于另一 EP 管,加等体积异丙醇,混匀,静置 10 min,4℃ 12 000 × *g* 离心 10 min;弃上清,加冰预冷的 75% 乙醇 1 mL 进行洗涤,4℃ 7 500 × *g* 离心 5 min,溶于适量 DEPC 水中,-80℃ 保存备用。

**2.2.3 RNA 的定量与鉴定** 取上述 RNA 溶液 2 μL 溶于 198 μL DEPC 水中,用紫外分光光度法测定 RNA 样品在波长 260 nm 和 280 nm 处的紫外吸收(*A*)。根据 1 *A*<sub>260</sub> 相当于 40 mg·L<sup>-1</sup> RNA 的量,根据 *A*<sub>260</sub>/*A*<sub>280</sub> 判断 RNA 样品的纯度,选择 *A*<sub>260</sub>/*A*<sub>280</sub> 为 1.7 ~ 2.0 的 RNA 样品。本实验室用核酸/蛋白定量仪来检测,直接读出 RNA 的浓度和 *A*<sub>260</sub>/*A*<sub>280</sub>。

**2.2.4 RNA 的反转录** 用 MBI 的逆转录试剂盒以 20 μL 的反应体系在冰上进行。取 4.5 μg 模板 RNA,11.0 μL 随机引物,用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 12 μL,混匀,70℃ 水浴 5 min 后,再加入 4 μL 的 5 × buffer,1 μL Rnasin(RNA 抑制剂),2 μL dNTP,混合均匀,37℃ 水浴 5 min,再加入 1 μL M-MuLV RTase(逆转录酶),使总体积达到 20 μL,42℃ 60 min,70℃,10 min 冰上冷却。置冰浴上进行后续实验或 -20℃ 冷冻保存。

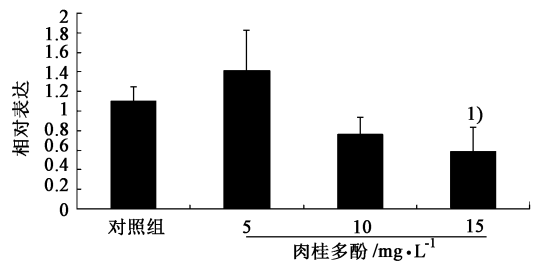
**2.2.5 Real-Time PCR 扩增** 用 Toyobo SYBR Green Real-Time PCR Master Mix 试剂盒进行, GLUT2, PEPCK, G-6-Pase 的 Real-Time PCR 扩增,以 β-actin 为内参。用 Primer Express 软件设计引物序列, GLUT2-F: 5'-AATTGCTCCAACCGCTCTCA-3', GLUT2-R: 5'-CTAATAAGAATGCCCGTGACGAT-3'; PEPCK-F: 5'-TGTCGCTCCTGGGACTTCA-3', PEPCK-R: 5'-CTCGGCCACATTGCTAAAGATT-3', G-6-P-F: 5'-CAT-TGACACCACACCCTTTC-3', G-6-P-R: 5'-CCCTGTA-CATGCTGGAGTTGAG-3' β-actin-F: 5'-CTGGAACGGT-GAAGGTGACA-3', β-actin-R: 5'-AAGGGACTTCCTG-TAACAATGCA-3'。反应体系 20 μL,包括 1 μL DNA 模板,10 μL SYBR Green PCR Master Mix,各 0.4 μL 10 μmol·L<sup>-1</sup> 的上下游引物,8.2 μL ddH<sub>2</sub>O。采用 ABI7300,按照机器说明书进行 95℃ 60 s 预变性,45 个循环(95℃ 10 s,60℃ 31 s)。数据采用仪器自带软件(ABI Prism 7300 SDS Software)分析。

**2.2.6 数据分析** 以 β-actin 为内参,采用相对定量的方法,得到 *Ct* 值(达到阈值的循环数)为原始数据,计算 *Ct* 值均值,应用相对定量法(ΔΔ*Ct*) 进行分析,按照 2<sup>-ΔΔ*Ct*</sup> 法进行数据处理和作图。

**2.3 统计学处理** 采用 SPSS 10.0 统计软件,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

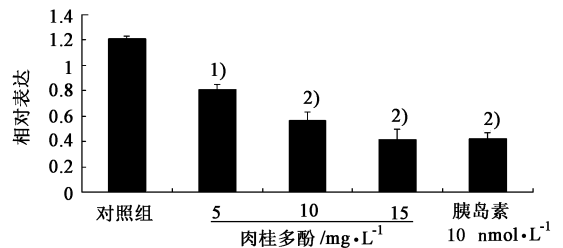
**3.1 对 HepG2 细胞内 GLUT2 表达的影响** 通过 Real-time PCR 技术对 GLUT2 基因的 mRNA 进行检测。如图 1 所示,以 β-actin 为内参,采用 2<sup>-ΔΔ*Ct*</sup> 法进行数据处理,与对照组相比,肉桂多酚作用 24 h 后,对 GLUT2 mRNA 随着药物浓度的升高,其表达明显下调(*P* < 0.05)。



与对照组比<sup>1)</sup> *P* < 0.05

图 1 肉桂多酚作用于 HepG2 细胞 24 h 后, GLUT2 基因 mRNA 表达变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**3.2 对 HepG2 细胞 PEPCK 基因和 G-6-Pase 基因 mRNA 表达的影响** 以 β-actin 为内参,采用 2<sup>-ΔΔ*Ct*</sup> 法进行数据处理,与对照组相比,药物作用 24 h 后, PEPCK 和 G-6-Pase 基因 mRNA 随着药物浓度的升高,表达逐渐下调,表现出明显的抑制作用,且随着浓度的增加,表现出更加明显的抑制作用(*P* < 0.05, *P* < 0.01),阳性对照组也明显的抑制了基因的表达(*P* < 0.01)。见图 2 ~ 3。



与对照组比<sup>1)</sup> *P* < 0.05, <sup>2)</sup> *P* < 0.01 (图 3 同)

图 2 肉桂多酚作用于 HepG2 细胞 24 h 后, PEPCK 基因 mRNA 表达变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 4 讨论

GLUT2 是一种主要分布于肝细胞、胰腺 β 细胞、小肠黏膜和肾小管上皮细胞的膜蛋白。在肝脏, GLUT2 主要表达于窦状隙膜,它占肝细胞已发现的葡萄糖转运蛋白 97% 以上。已有研究证实糖尿病动物肝 GLUT2 比正常动物表达增加<sup>[3]</sup>。在动物实

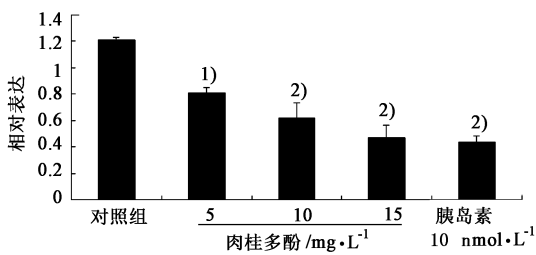


图3 肉桂多酚作用于 HepG2 细胞 24 h 后, G-6-Pase 基因 mRNA 表达变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

验中也发现,甲状腺激素能够提高肝脏 GLUT2mRNA 和其蛋白的表达,上调的 GLUT2 能够促进肝糖的输出<sup>[4]</sup>,升高的血糖导致胰岛素抵抗<sup>[5]</sup>。在胰岛素抵抗时,在 HepG2 细胞中, GLUT2 基因表达水平升高<sup>[6]</sup>,因此, GLUT2 表达上调是肝胰岛素抵抗的必然结果,也是肝胰岛素抵抗的一个标志<sup>[7]</sup>。前面的实验结果表明,胰岛素抵抗的 HepG2 细胞中 GLUT2mRNA 表达水平升高,而在肉桂多酚处理后 HepG2 细胞 GLUT2mRNA 表达降低,且随着肉桂多酚浓度的逐渐升高, HepG2 细胞 GLUT2mRNA 表达逐渐降低。由此可见,肉桂多酚能够抑制肝细胞内糖的输出,降低体内血糖的水平,改善细胞的胰岛素抵抗的状态。

肝细胞中的 PEPCK, G-6-Pase 是糖异生途径的关键限速酶,其转录的多少,决定着糖异生的速度<sup>[8]</sup>。PEPCK 催化草酰乙酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸,是糖异生作用中的第一个关键酶;G-6-Pase 是糖异生过程中的最后一步,催化葡萄糖-6-磷酸转化为葡萄糖,所以,PEPCK 和 G-6-Pase 在肝脏的糖异生过程中起着关键的作用。肝脏 PEPCK 和 G-6-Pase 的过表达可扰乱整个糖脂稳态,诱导葡萄糖失耐受、空腹高血糖和外周胰岛素抵抗<sup>[9-10]</sup>,这些说明 PEPCK 和 G-6-Pase 在维持正常血糖水平与胰岛素抵抗发生中具有重要的意义。实验结果表明,肉桂多酚抑制 PEPCK 和 G-6-Pase 基因的表达,在基因转录水平降低 PEPCK 和 G-6-Pase 酶的活性,这表明肉桂多酚可通过降低 PEPCK 和 G-6-Pase 基因的表达,调整糖异生的过程,减少肝内葡萄糖的产生。肝脏胰岛素抵抗主要表现为肝葡萄糖输出增加,肝葡萄糖输出来源于糖异生和糖原分解两部分。肉桂多酚能够减少肝葡萄糖的产生,从而改善胰岛素抵抗。

综上所述,肉桂多酚能够显著改善 HepG2 细胞的胰岛素抵抗状态,其机制可能与抑制 GLUT2、PEPCK 和 G-6-Pase mRNA 的表达抑制肝的糖异生作用,降低细胞内源性葡萄糖产生,减少肝糖的输出

有关。而肉桂多酚通过何种具体途径改善胰岛素抵抗,还有待进一步研究。

[参考文献]

[ 1 ] Kim Y M, Namkoong S, Yun Y G, et al. Water extract of Korean red ginseng stimulates angiogenesis by activating the PI3K/Akt-dependent ERK1/2 and Enos pathways in human umbilical vein endothelial cells [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(7):1674.

[ 2 ] Tuttle K R, McGill J B, Haney D J, et al. Kidney outcomes in long-term studies of ruboxistaurin for diabetic eye disease [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2007, 2: 631.

[ 3 ] Taizo Yamamoto, Hirofumi Fukumoto, Gyohan Koh, et al. Liver and muscle-fat type glucose transporter gene expression in obese and diabetic rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 175(3):995.

[ 4 ] Weinstein S P, O'Boyle E, Fisher M, et al. Regulation of GLUT2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system [J]. Endocrinology, 1994, 135(2):649.

[ 5 ] Asano T, Katagiri H, Tsukuda K, et al. Upregulation of GLUT2 mRNA by glucose, mannose, and fructose in isolated rat hepatocytes [J]. Diabetes, 1992, 41(1):22.

[ 6 ] Luoz, Zhang Y, Li F, et al. Resistin induces insulin resistance by both AMPK-dependent and AMPK-independent mechanisms in HepG2 cells [J]. Endocrine, 2009; 36(1):60.

[ 7 ] 张汝学,贾正平,李茂星,等.地黄寡糖改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的分子机制研究 [J]. 中草药, 2008, 39(8):1184.

[ 8 ] Goto M, Yoshioka T, Battelino T, et al. TNFalpha decreases gluconeogenesis in hepatocytes isolated from 10-day-old rats [J]. Pediatr Res, 2001, 49: 552.

[ 9 ] Trinh K Y, O' Doherty R M, Anderson P, et al. Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats [J]. J Biol Chem, 1998, 273:31615.

[10] Valera A, Pujol A, Pelegrin M, et al. Transgenic mice overexpressing Phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 9151.

[责任编辑 聂淑琴]