

小檗碱对白介素-6 诱导胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达的影响

章常华^{1,3}, 李冰涛², 屈飞¹, 魏学鑫¹, 余日跃¹, 徐国良^{2*}

(1. 江西中医学院药学院, 南昌 330004;

2. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

3. 中山大学中山医学院药理学教研室, 广州 510080)

[摘要] 目的: 观察小檗碱对白介素-6(IL-6)诱导胰岛素抵抗的3T3-L1脂肪细胞脂联素表达的影响。方法: 选用IL-6诱导3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗(IR)模型。以 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IL-6培养48 h, 将3T3-L1脂肪细胞随机分为正常对照组、模型组、吡格列酮组($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和小檗碱高、中、低剂量组($10, 20, 50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 以葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖消耗量, 观察小檗碱对脂肪细胞葡萄糖摄取的影响, 鉴定IR模型; 采用实时荧光定量PCR技术测定脂肪细胞脂联素基因mRNA水平。结果: 模型组葡萄糖消耗量及脂联素基因表达水平与正常对照组比较, 均显著降低($P < 0.05$); 小檗碱高、中、低剂量组及吡格列酮组均能显著增加葡萄糖消耗量及脂联素基因表达水平($P < 0.05$)。结论: 小檗碱可增加白介素-6诱导胰岛素抵抗的3T3-L1脂肪细胞脂联素基因mRNA的表达, 改善胰岛素抵抗状态。

[关键词] 小檗碱; 胰岛素抵抗; 白介素-6; 脂联素; 3T3-L1细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0164-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.1006.030.html>

[网络出版时间] 2012-10-12 10:06

Effect of Berberine on Gene Expression of Adiponectin by IL-6 Induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocyte

ZHANG Chang-hua^{1,3}, LI Bing-tao², QU Fei¹, WEI Xue-xin¹, YU Ri-yue¹, XU Guo-liang^{2*}

(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. Department of Pharmacology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of berberine on adiponectin gene mRNA expression in 3T3-L1 adipocyte of insulin resistant induced by interleukin-6 (IL-6). **Method:** To build 3T3-L1 adipocyte model of insulin resistant induced by interleukin-6. 3T3-L1 adipocytes were exposed to $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IL-6 for 48 h, the 3T3-L1 adipocytes with insulin resistant were divided into six groups randomly: normal control groups, model groups, pioglitazone ($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and low, middle, high doses of berberine groups ($10, 20, 50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), the amount of glucose consumption was measured by detecting the glucose content in cell culture supernatants with glucose oxidase assay, the effect of berberine on glucose uptake of 3T3-L1 adipocytes was observed, and cell model of insulin resistant was identified. mRNA expression of adiponection gene was determined by real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction. **Result:** There was statistical difference between model group and

[收稿日期] 20120527(006)

[基金项目] 国家科技部973计划项目(2010CB530603); 国家自然科学基金项目(81260660)

[第一作者] 章常华, 在读博士, 讲师, 主要从事药理学教学科研工作, E-mail: shengjunqin@163.com

[通讯作者] * 徐国良, 博士, 教授, 从事中药药理学研究, E-mail: xuguoiliang6606@126.com

normal control group in their amount of glucose consumption and gene expression of adiponectin, which was decreased markedly in model group ($P < 0.05$). Pioglitazone ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and low, middle, high doses of berberine groups ($10, 20, 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) markedly increased both amount of glucose consumption and gene expression of adiponectin. **Conclusion:** Berberine can increase mRNA expression of adiponectin gene and improve insulin resistant in 3T3-L1 adipocytes.

[**Key words**] berberine; insulin resistance; interleukin-6; adiponectin; 3T3-L1 cells

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是指胰岛素作用靶器官对胰岛素作用的敏感性下降,即正常剂量的胰岛素产生低于正常生物学效应的一种状态^[1]。小檗碱(berberine, BBR)是黄连的主要成分,中药黄连性苦味寒,具有清热燥湿之功,是中医治疗消渴病的常用药。在临床工作中发现 BBR 具有降血糖、纠正脂质代谢紊乱、降低体重、改善胰岛素抵抗等功能^[2-3]。

白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)的表达水平在胰岛素抵抗时明显升高,参与胰岛素抵抗的发生和促进其进展^[4-5]。

脂联素(adiponectin)是由脂肪细胞分泌的细胞因子,它能明显提高肝脏、肌肉对胰岛素的敏感性,促进糖和脂肪的代谢。目前认为,脂联素可作为一种新型的治疗胰岛素抵抗及 2 型糖尿病靶标^[6]。本实验观察小檗碱对白介素-6 诱导胰岛素抵抗的 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达的影响,以探讨小檗碱降血糖,改善胰岛素抵抗的作用。

1 材料

1.1 细胞 3T3-L1 前脂肪细胞株由中科院昆明动物所细胞库(昆明细胞库编号 KCB92010YJ)提供。

1.2 试剂 胎牛血清(Hyclone,批号 NWG0445);高糖/低糖 DMEM(Hyclone 公司,批号 NWJ0473);青链霉素混合液(Solarbio 公司,批号 20110818);0.25%胰蛋白酶消化液(Gibco 公司,批号 951538);3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(批号 1416650V),胰岛素(批号 I5500),地塞米松(D1756),油红 O 染料(O0625),均为 Sigma 公司产品;白细胞介素 6(peprotech 公司,批号 110650);GOD-PAP 法血糖测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号 1110131);Trizol 总 RNA 提取液(美国 Invitrogen 公司,批号 28207);SYBR premix EX Taq™(Takara, DRR420A lot BK706);盐酸吡格列酮片(江苏德源药业有限公司,批号 10030951);盐酸小檗碱(中国药品生物制品检定所,批号 110713-200911)。

1.3 仪器 倒置显微镜(德国 Leica 公司),全自动酶标检测仪(北京中诺远东科技有限公司),

VICTOR3Multilable Plate Counter(Perkin Elmer), MCO-175 型二氧化碳培养箱(日本 Sanyo 公司),荧光定量 PCR 仪(Eppendorf, Germany);Eppendorf Mastercycler ep realplex 仪器工作站,Heal Force 台式高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 3T3-L1 前脂肪细胞的培养、诱导分化及鉴定^[7-8] 在 37°C 5% CO_2 的条件下,用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养 3T3-L1 前脂肪细胞,以 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素、 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松的高糖 DMEM 刺激,2 d 后撤去 IBMx 和地塞米松等诱导剂,换用只含 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素及 10% 胎牛血清的高糖 DMEM,诱导分化 3T3-L1 细胞,脂肪细胞内可见明显脂滴。以油红 O 染色法鉴定脂肪细胞。用 10% 甲醛室温下固定细胞 30 min,弃去固定液,PBS 洗 3 次,然后将细胞晾干 20 min;加入油红 O 溶液,室温下染色 2 h,用蒸馏水洗去未着色的染料,倒置显微镜下观察、照相。

2.2 分组及胰岛素抵抗模型的建立 选用 IL-6 诱导 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型^[4-5],将 3T3-L1 脂肪细胞随机分为正常对照组、模型组、吡格列酮组($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和小檗碱高、中、低剂量组(10, 20, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。换上含 0.2% 胎牛血清的 DMEM 无血清培养液培养 12 h,使细胞同步化,每孔加入 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ IL-6,正常对照组加入等体积培养液;阳性组加入 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 吡格列酮组,给药组分别加入 10, 20, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 小檗碱,正常对照组及模型组加入等体积培养液,温育 48 h 后,以葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖消耗量,观察小檗碱对脂肪细胞葡萄糖摄取的影响,鉴定 IR 模型;采用实时荧光定量 PCR 技术测定脂肪细胞脂联素基因 mRNA 水平。

2.3 各组 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量测定^[9] 取细胞上清液,以葡萄糖氧化酶法检测每孔培养液中葡萄糖的含量,与未接种细胞的空白孔的糖含量均值相减,计算及比较各组葡萄糖的消耗量。酶标仪

测吸光度(A),葡萄糖消耗量($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)= $((\text{未接种细胞孔待测液 } A - \text{接种细胞孔待测液 } A)/\text{标准液 } A) \times 5.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

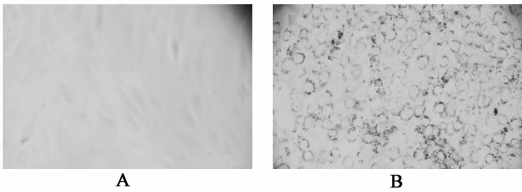
2.4 实时荧光定量 PCR 技术测定脂肪细胞脂联素基因 mRNA 水平^[10] 每 10 cm^2 生长的培养细胞中加入 1 mL Trizol 试剂,按说明书提取总 RNA。取 DNA 酶 $1 \mu\text{L}$,RNA 酶抑制剂 $1 \mu\text{L}$,RNA $8 \mu\text{L}$,上述体系 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 h 消化后加 $1 \mu\text{L}$ DNA 酶终止剂后,于 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ PCR 10 min ,之后开始反转;脂联素上游引物的序列:5'-GTTGCAAGCTCTCCTGTTCC-3',下游引物的序列:5'-TCTCCAGGAGTGCCATCTCT-3', β -actin 上游引物序列:5'-CAAAAGCCACCCCCACTCCTAAGA-3',下游引物序列:5'-GCCCTGGCTGCCTCAACACCTC-3';以上引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

取上面消化后全部序列(含 RNA $8 \mu\text{L}$),用 M-MLV (Promega 公司)进行反转录,然后,取 TaqSYBR $10 \mu\text{L}$, ddH_2O $8.4 \mu\text{L}$,上游引物 $0.4 \mu\text{L}$,下游引物 $0.4 \mu\text{L}$,模板 $0.8 \mu\text{L}$ 按下列条件扩增: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s , $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min ,35 个循环,循环后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min 。以融解曲线决定扩增的特异性,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因的相对倍数变化,以 β -actin 为内参,脂联素 mRNA 表达水平以相对倍数变化来表示^[11]。

2.5 统计学方法 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用 SPSS 11.5 软件,组间数据的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 3T3-L1 前脂肪细胞的诱导分化及鉴定 诱导分化前的 3T3-L1 脂肪细胞呈典型的梭形,形态与成纤维细胞相似,胞浆中无脂滴。3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟的脂肪细胞,表现为细胞浆丰富,含有大量的脂滴,脂滴分布于核周围,形成“戒环样”结构,为典型的成熟脂肪细胞形态,油红染色后脂滴着红色(图 1)。



A. 3T3-L1 前脂肪细胞; B. 鉴定 3T3-L1 脂肪细胞(油红 O 染色)

图 1 3T3-L1 前脂肪细胞的诱导分化及鉴定($\times 100$)

3.2 小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量的影响 $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IL-6 处理 48 h 后,模型组葡萄糖消

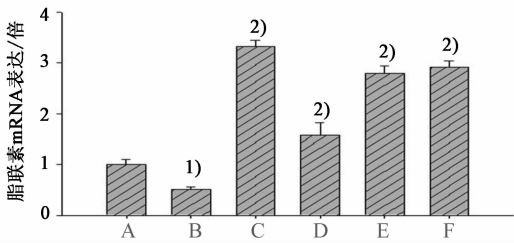
耗量较之正常对照组有明显下降($P < 0.05$),提示 IL-6 抑制 3T3-L1 脂肪细胞的基础状态葡萄糖消耗量(表 1),成功建立了模型;小檗碱高、中、低剂量组($10, 20, 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)及吡格列酮组($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)均能显著增加葡萄糖消耗量($P < 0.05$),呈剂量依赖性。

表 1 IL-6 对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	葡萄糖消耗量/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
正常对照	—	2.07 ± 0.27
模型	—	$1.42 \pm 0.24^{1)}$
吡格列酮	50	$4.63 \pm 0.41^{2)}$
小檗碱	10	$2.96 \pm 0.33^{2)}$
	20	$3.82 \pm 0.41^{2)}$
	50	$4.17 \pm 0.38^{2)}$

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

3.3 小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞脂联素 mRNA 基因表达的影响 结果显示,模型组脂联素基因表达水平显著下降($P < 0.05$),小檗碱高、中、低剂量组及吡格列酮组均能显著上调脂联素 mRNA 基因表达($P < 0.05$),呈剂量依赖性。见图 2。



A. 正常对照组; B. 模型组; C. 吡咯列酮组 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D. 小檗碱组 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; E. 小檗碱组 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; F. 小檗碱组 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$

图 2 各组脂肪细胞脂联素 mRNA 基因表达水平

4 讨论

小檗碱(berberine, BBR)是中药黄连的主要有效成分之一^[12]。早在魏晋时期,《名医别录》就有“黄连止消渴”的记载;在治疗消渴的方剂配伍中,不少含有黄连^[13]。胰岛素抵抗(IR)是 2 型糖尿病发生和进展的驱动因素,研究发现 74% 的 T2DM 患者存在 IR,因此,IR 已成为糖尿病研究领域的热点^[14]。3T3-L1 脂肪细胞是源于 American type culture collection(美国 ATCC)细胞库,此细胞株生存能力强、细胞纯度高,已广泛应用于体外 IR 模型及脂肪细胞分泌功能的研究。笔者以 3T3-L1 脂肪细胞为研究对象,将 IL-6 与 3T3-L1 脂肪细胞共孵育诱导 IR。利用葡萄糖氧化酶法比较葡萄糖消耗量的变化,鉴定模型。在本研究中,结果显示,模型组葡萄糖消耗量较之正常对照组有明显下降($P <$

0.05),模型成功建立。

脂联素是一种新近发现的由脂肪组织分泌、具有胰岛素增敏效应的激素。脂联素的含量与糖尿病的发生、发展及防治密切相关,脂联素显示了一定的抗糖尿病作用^[15]。在本实验中,我们应用荧光定量PCR技术观测到模型组脂联素基因 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$),小檗碱高、中、低剂量组 (10,20,50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能显著上调脂联素 mRNA 基因表达 ($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。本实验结果提示小檗碱可减轻胰岛素抵抗,其具体分子机制需进一步研究。

[参考文献]

[1] Groop L C. Insulin resistance: the fundamental trigger of type 2 diabetes [J]. Diabetes Obes Metab, 1999, Suppl 1:S1.

[2] 任毅,杨静. 小檗碱治疗 2 型糖尿病作用机制的进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2008,6(2):208.

[3] 王琦,李志峰,陈刚,等. 黄连的化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):74.

[4] Lagathu C, Bastard J P, Auclair M, et al. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 311(2):372.

[5] 曾天舒,潘世秀,陈璐璐. 白细胞介素 6 导致脂肪细胞胰岛素抵抗机制的初步探讨 [J]. 中国病理生理杂志,2007,23(7):1331.

[6] Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, et al. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes [J]. Biochem Biophys Res

Commun, 2003, 301(4):1045.

[7] Engelman J A, Lisanti M P, Scherer P E. Specific inhibitors of p38 MAP kinase block 3T3-L1 Adipogenesis [J]. J Biol Chem, 1998, 273:32111.

[8] Kasturi R, Joshi V C. Hormonal regulation of stearoyl coenzyme A desaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells [J]. J Biol Chem, 1982, 257:12224.

[9] Zhou L, Yang Y, Wang X, et al. Berberine stimulates glucose transport through a mechanism distinct from insulin [J]. Metabolism, 2007, 56(3):405.

[10] Fasshauer M, Klein J, Neumann S, et al. Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes [J]. FEBS Lett, 2001, 507(2):142.

[11] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method [J]. Nat Protoc, 2008, 3(6):1101.

[12] 唐丽琴,吕飞,刘圣,等. 小檗碱对糖尿病肾病大鼠肾小球系膜细胞 TGF- β_1 与 IV 型胶原蛋白表达的影响 [J]. 中国中药杂志,2011,36(24):3494.

[13] 赵炎,陆付耳. 小檗碱治疗糖尿病的研究进展 [J]. 中西医结合研究,2010,2(6):307.

[14] 郑华,戈延茹. 改善胰岛素抵抗的中药活性成分及其作用机制研究进展 [J]. 中国中药杂志,2010,35(4):531.

[15] Oster R T, Tishinsky J M, Yuan Z, et al. Docosahexaenoic acid increases cellular adiponectin mRNA and secreted adiponectin protein, as well as PPAR γ mRNA, in 3T3-L1 adipocytes [J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2010, 35(6):783.

[责任编辑 聂淑琴]