

降脂平肝汤含药血清对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响

苗宇船^{1*}, 李明磊¹, 刘杨¹, 郭继龙¹, 曾群¹, 韩德五², 赵元昌²

(1. 山西中医学院, 太原 030024; 2. 山西医科大学肝病研究所, 太原 030001)

[摘要] 目的: 探讨降脂平肝汤含药血清对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响。方法: 以浓度分别为 5×10^{-5} , 5×10^{-6} , 5×10^{-7} , 5×10^{-8} , $5 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胰岛素孵育 HepG2 细胞 24 h, 建立并筛选最佳 HepG2 胰岛素抵抗模型, 分别以 20% 大鼠空白血清及 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 罗格列酮为对照, 采用细胞培养、糖原染色、葡萄糖摄取分析等方法检测 20% 降脂平肝汤含药血清对 HepG2 细胞胰岛素抵抗相应指标的变化。结果: 以 $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胰岛素成功建立 HepG2 胰岛素抵抗模型。与胰岛素抵抗模型组相比, 降脂平肝汤含药血清组及罗格列酮组在基础状态下和胰岛素刺激状态下细胞的葡萄糖摄取以及糖原含量均明显增加, 细胞糖原颗粒显著增多, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 降脂平肝汤含药血清能减轻 HepG2 细胞的胰岛素抵抗。

[关键词] 降脂平肝汤; HepG2 细胞; 胰岛素抵抗; 血清药理学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0207-04

Effects of Serum Containing Jiangzhi Pinggan Decoction on Insulin Resistance in HepG2 Cell Line

MIAO Yu-chuan^{1*}, LI Ming-lei¹, LIU Yang¹, GUO Ji-long¹, ZENG Qun¹, HAN De-wu², ZHAO Yuan-chang²

(1. Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China;

2. The Institute of Hepatology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of serum containing Jiangzhi Pinggan decoction on insulin resistance (IR) in HepG2 cell line. **Method:** The model of IR in HepG2 cell line was established, and the serum of normal rats and rosiglitazone was collected as the control, then the changes of IR related indexes in HepG2 cell line induced by Jiangzhi Pinggan decoction containing serum were detected with method of cell culture, PAS and glucose uptake analysis. **Result:** The model of IR in HepG2 cell line was established successfully, and compared with the model of IR, in Jiangzhi Pinggan decoction containing serum group and rosiglitazone group, the glucose uptake, glycogen content and glycogen granules in cells were elevated significantly both in the basic state and in insulin stimulate state, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** IR in HepG2 cell line could be alleviated with Jiangzhi Pinggan decoction containing serum.

[Key words] Jiangzhi Pinggan decoction; HepG2 cell line; insulin resistance; plasma pharmacology

有调查发现, 大约 98% 的非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 患者存在胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)^[1-3], IR 不仅与 NAFLD 的发生、发展密切相关^[4], 而且是其发病机制的重要标志^[5]。前期的动物研究结果证明, 复方

降脂平肝汤可以通过减轻 IR、调节脂质代谢起到防治 NAFLD 的作用^[6]。本实验通过体外培养 HepG2 细胞制备胰岛素抵抗模型, 并以复方中药降脂平肝汤的大鼠含药血清干预, 探讨其对肝细胞胰岛素敏感性的影响。

1 材料

1.1 动物及细胞 SPF 雄性 Wistar 大鼠 20 只, 体重 (350 ± 20) g, 由山西医科大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(晋)2009-0001。HepG2 细胞株购自中国科学院上海细胞所, 本实验室自行保存传

[收稿日期] 20110731(010)

[第一作者] 苗宇船, 博士, 副教授, 从事肝脏病的病理生理及其中医药防治研究, Tel: 0351-2272365, 13546389605, E-mail: mych65@163.com

代备用。

1.2 试剂 DMEM 培养基(GIBCO 公司),胎牛血清(FBS)(杭州四季青生物工程材料有限公司),胰蛋白酶、胰岛素、二甲基亚砜(DMSO),细胞松弛素 B(cytochalasin B)(Sigma 公司),甘氨酸、牛血清白蛋白(BSA)均购自 Amresco 公司,³H-2 脱氧葡萄糖(北京原子高科核技术股份有限公司),闪烁纯(POPOP)、闪烁体(PPO)(上海试剂一厂),考马斯亮蓝 G-250 为进口分装,糖原试剂盒(南京建成生物工程研究所第一分所),罗格列酮钠(太极集团重庆涪陵制药厂有限公司,4 mg/片,批号 08021256)。

1.3 仪器 超净工作台,CO₂ 培养箱,Forma Scientific 3100;超低温冰箱(Forma Scientific),BH-2 倒置显微镜照相系统(日本 Olympus),MSR-2000 台式冷冻离心机(日本三洋),微量加样器(德国吉尔森公司),Tri-Carb3170TR/SL 液闪谱仪(美国 PACK 公司),PTC-100 PCR 仪(MJ Research Inc USA),PS3000-231V 电泳仪(Hoefer Scientific Instruments USA),GDS7500 紫外凝胶图像分析系统(UVP 德国);MSE 低温高速离心机(SANYO Japan),酶标仪(宝特公司)。

2 方法

2.1 建立 HepG2 胰岛素抵抗模型 HepG2 细胞以基础培养液(含 10% FBS 的 DMEM 培养液)于 37 ℃,5% CO₂ 条件下无菌培养,取对数生长期细胞移至 96 孔板中,待细胞长至 80%~90% 融合后用于实验。不铺细胞的空白孔加入无血清的 DMEM 培养液;其余各孔则加入无血清的含胰岛素培养液及终浓度分别为 5×10^{-5} , 5×10^{-6} , 5×10^{-7} , 5×10^{-8} , 5×10^{-9} mol·L⁻¹ 的胰岛素。孵育 24 h 后,用葡萄糖氧化酶法检测培养液上清的葡萄糖含量。以空白孔为对照,计算 24 h 葡萄糖消耗量。每组 9 孔。实验重复 3 次。根据所得结果,选取形成胰岛素抵抗的最佳胰岛素浓度,并观察胰岛素不同的作用时间对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响。

2.2 含药血清对胰岛素抵抗细胞的影响

2.2.1 大鼠血清的制备 将降脂平肝汤药物制成水煎剂并浓缩至每毫升含 3 g 生药。Wistar 大鼠 20 只随机分为空白血清组(15 只)和含药血清组(5 只)。依据文献[7],每 12 h ig 1 次,连续 ig 3 d,计 6 次。根据中药血清药理学原理,参考文献[7]及预试验结果,计算出各组每次 ig 量如下:空白血清组 10 mL·kg⁻¹ 饮用水;含药血清组 ig 30 g·kg⁻¹ 降脂平肝汤水煎剂。最后 1 次 ig 后 1 h,麻醉,腹主动脉取

血,常规分离血清,56 ℃ 水浴灭活 30 min, -20 ℃ 分装冻存备用。处死前 12 h 禁食。

2.2.2 细胞分组与处理 将细胞换上含 0.5% BSA 的低糖 DMEM 培养液中培养 12 h 后,细胞分为对照组(Control 组,基础培养液内加入 20% 大鼠空白血清)、胰岛素抵抗模型组(INS 组,基础培养液内加入 20% 大鼠空白血清和终浓度为 5×10^{-7} mol·L⁻¹ 胰岛素的培养液)、罗格列酮加胰岛素组(ROS + INS 组,基础培养液内加入 20% 大鼠空白血清和终浓度为 5×10^{-7} mol·L⁻¹ 胰岛素、5 μmol·L⁻¹ 罗格列酮的培养液)、含药血清组(PGT + INS 组,基础培养液内加入 20% 大鼠含药血清和终浓度为 5×10^{-7} mol·L⁻¹ 的胰岛素)培养 24 h。每组 9 孔。实验重复 3 次,每孔数值取平均值。

2.2.3 糖原含量测定 细胞每组设平行孔 9 个,于 96 孔板培养 24 h 后 Bradford 微量法检测各组细胞总蛋白的含量。吸取培养 24 h 后的各组细胞培养液,蒽酮法于 620 nm 检测吸光度(A)并计算细胞内糖原含量。实验重复 3 次,每孔数值取平均值。

糖原含量 = [样品 A / 标准 A × 标准品糖原含量 (mg × 10⁻²)] / 蛋白含量 (mg)。

2.2.4 糖原染色 制备细胞爬片,采用 PAS 染色法进行糖原染色。

2.2.5 葡萄糖摄取分析 参照文献[8],测定基础状态(无胰岛素刺激,加/不加细胞松弛素 B)和胰岛素刺激下(加/不加细胞松弛素 B)的细胞对葡萄糖的摄取。实验重复 3 次,每孔数值取平均值。按如下公式计算得到基础特异性转运或胰岛素刺激的特异性转运的放射活性^[9],再用与对照组的比来表示其相对值。

特异性转运 (cpm) = 总放射性 (不加细胞松弛素 B) - 非特异性放射性 (加细胞松弛素 B)

2.3 统计分析 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 SPSS 13.0 统计学软件进行 t 检验或单因素方差分析, P < 0.05 具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度胰岛素对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响 与 Control 组比较,INS 组的胰岛素浓度由 5×10^{-9} mol·L⁻¹ 增加到 5×10^{-5} mol·L⁻¹ 时,胰岛素组对葡萄糖的摄取逐渐减少,使培养液中的葡萄糖消耗量逐渐降低, 5×10^{-7} mol·L⁻¹ 时达到最小 (P < 0.01),见表 1。

3.2 胰岛素不同作用时间对 HepG2 细胞胰岛素抵

表 1 不同浓度胰岛素对 HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	胰岛素浓度/mol·L ⁻¹	葡萄糖消耗/mmol·L ⁻¹
正常对照	0	3.46 ± 0.07
胰岛素	5 × 10 ⁻⁵	3.08 ± 0.10 ¹⁾
	5 × 10 ⁻⁶	2.87 ± 0.11 ²⁾
	5 × 10 ⁻⁷	2.72 ± 0.08 ²⁾
	5 × 10 ⁻⁸	2.91 ± 0.13 ¹⁾
	5 × 10 ⁻⁹	3.22 ± 0.14

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

抗的影响 如表 2 所示,在 $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胰岛素作用不同时间内,随着胰岛素作用时间的延长,胰岛素组对葡萄糖的摄取均比空白对照组低,胰岛素抵抗状态从 24 h 开始持续到 48 h,统计学处理差异均具有显著性 ($P < 0.01$)。

表 2 胰岛素 $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同作用时间对 HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	葡萄糖消耗/mmol·L ⁻¹			
	12 h	24 h	36 h	48 h
正常对照	3.77 ± 0.08	3.86 ± 0.14	3.89 ± 0.10	3.81 ± 0.11
胰岛素	3.28 ± 0.06	2.80 ± 0.09 ²⁾	2.77 ± 0.15 ²⁾	2.71 ± 0.17 ²⁾

3.3 HepG2 细胞糖原含量的变化及葡萄糖摄取分析 $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胰岛素诱导的 HepG2 细胞 INS 组糖原含量比 Control 组明显降低,具有统计学差异 ($P < 0.01$); 与 INS 组相比,ROS + INS 组与 PGT + INS 组的糖原含量明显增高,具有统计学差异 ($P < 0.01$),见表 3。Control 组细胞在没有胰岛素作用的基础状态下对葡萄糖有低水平摄取,胰岛素刺激可以使细胞葡萄糖摄取明显增加 ($P < 0.01$); 与 INS 组相比,ROS + INS 组和 PGT + INS 组基础状态下和胰岛素刺激状态下细胞的葡萄糖摄取均明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$),见表 3。

表 3 降脂平肝汤含药血清对胰岛素诱导的 HepG₂ 细胞葡萄糖摄取相对值的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	相对基础	相对胰岛素刺激	糖原含量 /mg·g ⁻¹
	特异性转运	的特异性转运	
正常对照	1	1	2.136 ± 0.174
胰岛素	0.69 ± 0.07 ¹⁾	0.47 ± 0.11 ¹⁾	1.770 ± 0.287 ¹⁾
ROS + INS ⁴⁾	0.83 ± 0.09 ³⁾	0.80 ± 0.12 ³⁾	2.044 ± 0.247 ²⁾
PGT + INS ⁵⁾	0.81 ± 0.12 ²⁾	0.61 ± 0.11 ²⁾	2.113 ± 0.245 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与胰岛素 (INS $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; ⁴⁾ ROS 浓度 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ⁵⁾ PGT 含药血清浓度为 20%。

3.4 PAS 染色 PAS 染色观察见图 1,对照组的细胞浆内充满了红色的糖原颗粒,而高胰岛素诱导的 HepG2 细胞糖原颗粒少见,ROS + INS 组和 PGT + INS 组与 INS 组相比则明显增多。

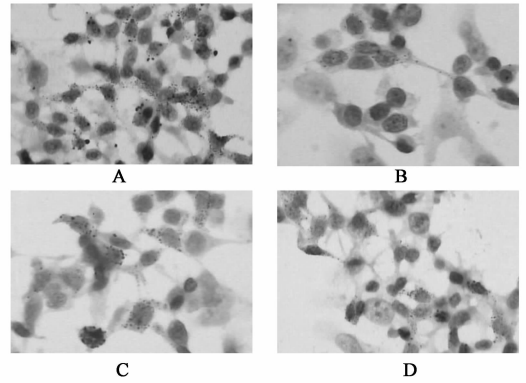


图 1 不同浓度胰岛素作用 HepG2 细胞显微照片 (PAS, ×200)
A. 对照组 (20% 大鼠空白血清); B 胰岛素抵抗模型组 ($5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素); C. 罗格列酮加胰岛素组 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 罗格列酮 + $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素); D. 降脂平肝汤含药血清组 (20% 大鼠含药血清 + $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素)

应用图像分析 Image-Pro Plus 5.0 测量各组 PAS 的 IA 结果统计分析,与形态学观察和含量测定结果一致。

4 讨论

1988 年,Reaven^[10] 提出的 IR 的经典定义为胰岛素敏感细胞对胰岛素介导的葡萄糖摄取及利用的抵抗,它反映的是胰岛素的糖代谢效应。胰岛素刺激的葡萄糖的摄取障碍是 IR 的主要特征,利用细胞对同位素标记的葡萄糖摄取实验,可以准确的评价细胞对胰岛素刺激的葡萄糖摄取和利用能力,即胰岛素的敏感性,从而判断是否存在 IR。

本实验采用³H-DG 转运的测定方法,通过加入细胞松弛素 B 作为对照,去除了葡萄糖非特异转运的因素,所得结果为葡萄糖经胰岛素信号传递级联、以促进扩散方式(葡萄糖转运子)通过细胞膜的特异性转运,是公认的鉴定细胞水平 IR 的特异性方法^[11]。

HepG2 细胞系一种表型与肝细胞极为相似的人肝胚胎瘤细胞株,保留了肝细胞的许多生物学特性,其表面表达高亲和力的胰岛素受体,当胰岛素受体数目下调至一定的程度时,则该细胞对胰岛素的作用产生抵抗,其程度与胰岛素水平及刺激持续的时间呈正相关。以高浓度 ($5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的胰岛素作用于 HepG2 细胞 24 h 后影响了细胞的糖代谢平衡,明显抑制其葡萄糖的摄取,降低了糖原含

量,使细胞产生 IR,模型复制成功,适用于胰岛素相关机制的研究。

本实验以复方中药降脂平肝汤的大鼠含药血清干预前述 IR 模型细胞,并以公认的具有减轻 IR 的胰岛素增敏剂罗格列酮作为阳性对照,结果发现 HepG2 细胞的 IR 得到了一定的控制,提示降脂平肝汤可减轻肝细胞的 IR。

[参考文献]

[1] Bajaj S, Nigam P, Luthra A, et al. A case-control study on insulin, metabolic co-variables & prediction score in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Indian J Med Res, 2009, 129(3):285.

[2] 翁小刚,朱晓新,杨庆,等. 非酒精性脂肪肝的实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11):104.

[3] 姜楠,石岩,蒲纪,等. 糖代谢异常的代谢综合征大鼠模型的建立及评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):141.

[4] 苗宇船,韩德五,郭建红,等. 甘氨酸对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(11):2260.

[5] Lirussi F, Vitturi N, Azzalini L, et al. Perihepatic

adipose tissue thickness: a new non-invasive marker of NAFLD [J]. J Gastrointestin Liver Dis, 2009, 18(1):61.

[6] 苗宇船,张志岗,柴宝,等. 降脂平肝汤对脂肪肝大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 山西中医, 2008, 24(3):45.

[7] 李赛美,王志高,凌家杰,等. 加味桃核承气汤含药血清对胰岛素诱导兔血管平滑细胞增殖的抑制作用[J]. 四川中医, 2007, 5(6):9.

[8] 张静,王秋月,姜雅秋,等. 游离脂肪酸诱导 3T3-L1 细胞胰岛素抵抗模型的建立[J]. 解剖科学进展, 2008, 14(2):126.

[9] Kalyankar Mahadev, Hiroyuki Motoshima. The NAD(P)H Oxidase Homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(5):1844.

[10] Reaven G M. Banting lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease [J]. Diabetes, 1988, 37(12):1595.

[11] Song M J, Kim K H, Yoon J M, et al. Activation of toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes [J]. BBRC, 2006, 346(3):739.

[责任编辑 聂淑琴]

欢迎订阅 2012 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、信息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究成果与最新进展。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊为半月刊,16 开本,288 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。2012 年每期定价 25 元,全年 24 期定价为 600 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:BM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购,地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:czd@vip.sina.com,网址:www.syfjxz.com。