

# 甘草主要成分改善 L6 大鼠成肌细胞胰岛素抵抗的机制

程丽娜<sup>1</sup>, 曹世杰<sup>2</sup>, 曲明<sup>1,3</sup>, 邱峰<sup>3</sup>, 康宁<sup>1\*</sup>

(1. 天津中医药大学 中西医结合学院, 天津 300193;

2. 天津市现代中药重点实验室, 天津 300193; 3. 天津中医药大学 中药学院, 天津 300193)

**[摘要]** **目的:** 确定甘草主要化学成分是否通过调节 L6 大鼠成肌细胞内糖原合成、糖酵解途径和脂肪酸合成改善胰岛素抵抗。**方法:** 利用  $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  棕榈酸(PA)孵育 9 h 诱导 L6 大鼠成肌细胞建立胰岛素抵抗(IR)细胞模型; 实验设正常组, 模型组, 甘草酸(GA,  $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组,  $18\beta$ -甘草次酸( $18\beta$ -GA,  $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组, 异甘草素(ILG,  $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组和异甘草苷(ILQ,  $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组; 葡萄糖试剂盒检测细胞培养液上清葡萄糖含量; 糖原检测试剂盒测定肌糖原含量; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测固醇调节元件结合蛋白-1c(SREBP-1c), 脂肪酸合成酶(FAS)和糖原合成酶激酶  $3\beta$ (GSK3 $\beta$ )的蛋白表达水平; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测糖酵解关键酶的 mRNA 水平。**结果:** 与正常组比较, 模型组 IR-L6 大鼠成肌细胞中葡萄糖消耗率显著下调( $P < 0.01$ ), 细胞中的糖原含量减少( $P < 0.05$ ), SREBP-1c 和 FAS 蛋白表达减少( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 磷酸果糖激酶 1(PFK1), 丙酮酸激酶(PK)和己糖激酶(HK) mRNA 水平下调( $P < 0.05$ ), GSK3 $\beta$  蛋白表达增加( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 各给药组 GA,  $18\beta$ -GA 和 ILG 可以明显增加 IR-L6 大鼠成肌细胞中糖原含量( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), GA,  $18\beta$ -GA 和 ILQ 则明显增加 SREBP-1c 蛋白表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而 GA,  $18\beta$ -GA, ILG 和 ILQ 可明显增加 FAS 的蛋白表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )以及 PFK1, PK 和 HK mRNA 表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 但下调 GSK3 $\beta$  蛋白表达( $P < 0.05$ )。**结论:** 甘草主要成分通过促进糖酵解和糖原合成发挥降糖作用, 并且可通过调节脂肪酸合成改善胰岛素抵抗。

**[关键词]** 甘草主要成分; L6 大鼠成肌细胞; 胰岛素抵抗; 糖原; 糖酵解; 脂肪酸合成

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)04-0088-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200102

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190911.1032.001.html>

**[网络出版时间]** 2019-09-11 14:32

## Action Mechanism of Main Components from Glycyrrhizae Radix et Rhizoma in Improving Insulin Resistance in L6 Rat Myoblasts

CHENG Li-na<sup>1</sup>, CAO Shi-jie<sup>2</sup>, QU Ming<sup>1,3</sup>, QIU Feng<sup>3</sup>, KANG Ning<sup>1\*</sup>

(1. School of Integrative Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300193, China;

2. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine TCM, Tianjin 300193, China;

3. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine whether the main components of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma can improve insulin resistance by regulating glycogen synthesis, glycolysis pathway and fatty acid synthesis in myoblasts of L6 rat myoblasts. **Method:** Insulin resistance (IR) model of L6 rat myoblasts was established through incubation with  $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  palmitic acid (PA) for 9 hours. Normal group, model group, glycyrrhizic acid (GA,  $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) group,  $18\beta$ -glycyrrhetic acid ( $18\beta$ -GA,  $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) group, isoliquiritigenin (ILG,  $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) group and isoliquiritin (ILQ,  $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) group were set up, glucose content in supernatant of cell culture medium was detected by glucose kit, myoblasts glycogen content was determined by glycogen detection

**[收稿日期]** 20190610(014)

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(81430095)

**[第一作者]** 程丽娜, 在读硕士, 从事糖脂代谢研究, E-mail: chenglina1993@163.com

**[通信作者]** \* 康宁, 博士, 教授, 从事糖脂代谢研究, E-mail: kangnidd@163.com

kit, protein expression levels of Sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), fatty acid synthetase (FAS) and glycogen synthase kinase $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ) were detected by Western blot, and the mRNA expressions of key enzymes in glycolysis were detected by quantitative real-time fluorescence polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with those in the normal group, the glucose consumption rate was significantly down-regulated in model group ( $P < 0.01$ ), the glycogen content was decreased ( $P < 0.05$ ), the protein expressions of Sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) and fatty acid synthase (FAS) were decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the mRNA expressions of fructose phosphate kinase 1 (PFK1), pyruvate kinase (PK) and hexokinase (HK) were down-regulated ( $P < 0.05$ ), and the protein expression of glycogen synthase kinase 3 (GSK3 $\beta$ ) protein was increased ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, GA, 18 $\beta$ -GA and ILG could significantly increase glycogen content in myoblasts of IR-L6 rats ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). GA, 18 $\beta$ -GA and ILQ could significantly increase the expression of SREBP-1c ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and GA, 18 $\beta$ -GA, ILG and ILQ could significantly increase the expression of FAS ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the mRNA expressions of PFK1, PK and HK ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and down-regulate the protein expression of GSK3 $\beta$  ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The main components of licorice improve the insulin resistance by promoting glycolysis and glycogen synthesis and regulating fatty acid synthesis.

[**Key words**] main components of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; L6 rat myoblast; insulin resistance; glycogen; glycolysis; fatty acid synthesis

糖尿病是一种由胰岛素分泌缺陷及(或)胰岛素作用障碍引起的以血糖水平增高为主要特征的代谢疾病,随着生活水平的提高,糖尿病的发病率逐年增加<sup>[1-2]</sup>。截至 2017 年,我国大约有 425 万糖尿病病例,其中 II 型糖尿病(T2DM)在患者中所占比例最高,达 90% 以上<sup>[3-4]</sup>,已成为威胁人类健康的重要危险信号之一<sup>[5]</sup>。胰岛素抵抗(IR)是 II 型糖尿病最主要的发病机制<sup>[6-8]</sup>,研究表明,游离脂肪酸(FFA)浓度增高是引起胰岛素抵抗主要原因之一<sup>[9-10]</sup>。骨骼肌是胰岛素刺激葡萄糖摄取最重要的外周组织,是胰岛素作用的主要靶组织<sup>[11]</sup>。骨骼肌内 FFA 异常增多,导致肌细胞利用葡萄糖能力下降,摄取葡萄糖减少,影响骨骼肌胰岛素信号的传递,引起胰岛素抵抗<sup>[12]</sup>。以游离脂肪酸棕榈酸(PA)刺激 L6 大鼠成肌细胞建立胰岛素抵抗模型已经应用于多种降糖潜在药物的评价工作中<sup>[13-16]</sup>。

甘草为豆科植物甘草、胀果甘草或光果甘草的干燥根和根茎,其主要化学成分有三萜类化合物和黄酮类化合物。王波等<sup>[17]</sup>通过收集、整理并挖掘《中医方剂大辞典》中 341 首消渴病方剂,进行药物频次统计发现甘草最常用,为核心中药。目前大量研究发现,甘草能明显降低 II 型糖尿病大鼠高血糖、高血脂的水平及缓解胰岛素抵抗<sup>[18-19]</sup>。然而甘草中发挥降糖作用的化学成分迄今尚不明确,且作用机制研究甚少。本研究采用 PA 体外诱导法建立 L6 大鼠成肌细胞胰岛素抵抗模型,首次从糖原合成、糖

酵解以及脂肪酸合成等角度探讨中药甘草主要化学成分改善胰岛素抵抗的作用及相关机制,以期更加明确甘草降糖、改善 IR 的作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞** L6 大鼠成肌细胞购于中科院上海细胞库。

**1.2 药物** 甘草酸(GA,批号 1320417),18 $\beta$ -甘草次酸(18 $\beta$ -GA,批号 1320412),异甘草素(ILG,批号 1321525)和异甘草苷(ILQ,批号 1321524)购于上海源叶有限公司,HPLC 的纯度 >98%。

**1.3 试剂** DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号 1996842);胰蛋白酶(美国 Biosharp 公司,批号 428A047);胎牛血清(BI 公司,批号 1705124);胰岛素(丹麦诺和诺德公司,批号 55105);棕榈酸,trizol,考马斯亮蓝染色试剂(美国 Sigma 公司,批号分别为 258725, T9424, 246875);葡萄糖检测试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号 E1010);BSA 试剂盒,糖原含量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 PC0020, BC0345);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒,逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 639505, AK6101);糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )抗体(美国 Cell Signal Technology 公司,批号 D5C52);固醇调节元件结合蛋白-1c(SREBP-1c)抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 SC366);脂肪酸合成酶(FAS)抗体(美国 Proteintech 公司,批号 10624-2-AP); $\beta$ -肌动蛋白

( $\beta$ -actin) 抗体, 辣根过氧化物酶标记的二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为 ZB-2301, ZB-2305)。

**1.4 仪器** HF240 型二氧化碳培养箱(上海力申有限公司); Ts2R 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司); ELX800 型酶标仪(美国 Bio Tek 公司); LightCycler480 型 PCR 仪(瑞士罗氏公司); Mini-PROTEAN Tetra cell 系统蛋白电泳仪, Mini-PROTEAN Tetra cell 系统转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); Tanon-5200 型化学发光成像系统(上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 L6 大鼠成肌细胞的培养和诱导分化** 当 L6 大鼠成肌细胞在 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基生长至 70% ~ 80% 时, 换为含 2% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基进行诱导分化。诱导分化培养 5 ~ 7 d, 每隔 2 d 换液, 直至 80% 的细胞生长出肌管, 即得到分化成熟的骨骼肌细胞。

**2.2 考马斯亮蓝染色法鉴定 L6 大鼠成肌细胞** 将诱导分化成熟的细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗 3 次; 然后加入 1% Triton X-100 浸泡 10 min, 蒸馏水漂洗 3 次; 再加入 0.2% 考马斯亮蓝溶液染色 30 min 后蒸馏水漂洗; 倒置显微镜下观察并拍照。

**2.3 葡萄糖氧化酶法试剂盒检测上清液中葡萄糖含量** 采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法(SOD-POD 法)测定细胞培养上清液的剩余葡萄糖浓度。将葡萄糖检测试剂盒中试剂混合配制成浓度比为 4:1 的工作液, 在培养板中取 5  $\mu$ L 的上清液与 195  $\mu$ L 的工作液混合, 同时设立标准管, 37  $^{\circ}$ C 孵育 20 ~ 30 min, 在 550 nm 处测定各孔的吸光度 A。具体操作详见葡萄糖检测试剂盒说明书。

**2.4 PA 诱导建立 L6 大鼠成肌细胞胰岛素抵抗模型** 待 L6 大鼠成肌细胞诱导分化成熟后, 将空白组的培养液换为含有 0.5% BSA 的无血清 DMEM 高糖培养基, 模型组换为加入 0.05 mmol $\cdot$ L $^{-1}$  PA 并含有 0.5% BSA 的无血清 DMEM 高糖培养基, 于 5% CO $_2$  培养箱 37  $^{\circ}$ C 孵育 9 h。最后, 弃去原有培养基, 用 PBS 清洗 1 次, 将空白组和模型组换为无血清低糖 DMEM 培养基, 空白加胰岛素组和模型加胰岛素组换为加入含有 100 nmol $\cdot$ L $^{-1}$  胰岛素的无血清低糖 DMEM 培养基, 15 min 后吸取上清液, 葡萄糖氧化酶法试剂盒检测上清液中葡萄糖含量<sup>[13-16]</sup>。

**2.5 糖原含量测定** 细胞分化完全后将空白组的

培养液换为含有 0.5% BSA 的无血清 DMEM 高糖培养基, 模型组和模型加药组换为含有 0.5% BSA 的无血清 DMEM 高糖培养基, 并含有 0.05 mmol $\cdot$ L $^{-1}$  PA 或者含有 0.05 mmol $\cdot$ L $^{-1}$  PA 的 GA, 18 $\beta$ -GA, ILG 和 ILQ 作用 9 h, 吸去上清液, 用 PBS 洗 1 次, 并加 100 nmol $\cdot$ L $^{-1}$  的胰岛素刺激 15 min 后, 收集细胞。加入 0.3 mL 提取液超声破碎细胞(功率 20%, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次); 转移至离心管中, 置于 95  $^{\circ}$ C 水浴 20 min, 隔 5 min 振摇离心管 1 次, 使充分混匀; 取出离心管冷却后, 25  $^{\circ}$ C 8 000  $\times$  g 离心 10 min, 取上清待测。具体操作详见糖原检测试剂盒说明书。

**2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 GSK3 $\beta$ , SREBP-1c 和 FAS 的蛋白表达** 细胞造模结束后, 空白、模型组和加药组分别加 100 nmol $\cdot$ L $^{-1}$  的胰岛素刺激 15 min 后, 去除培养液, 收细胞于 1.5 mL 的离心管中, 提取总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。根据蛋白浓度, 取蛋白 20  $\mu$ g 上样, 以 8% 的 SDS-PAGE 分离蛋白, 然后用湿转法(50 V, 3 h)将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 再用含 5% 脱脂奶粉的 TBST(含 0.1% Tween-20)室温封闭 30 min 后加入 GSK3 $\beta$ , SREBP-1c 和 FAS 一抗(1:1 000), 4  $^{\circ}$ C 过夜, 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3 000), 室温 1 h, 充分洗涤后, 用 Imager 进行拍照, 最后用 Image J 软件进行灰度分析, 目的蛋白的相对含量为样品组灰度/正常组灰度的值。

**2.7 Real-time PCR 检测磷酸果糖激酶 1(PFK1), 丙酮酸激酶(PK)和己糖激酶(HK) mRNA 表达** 收集细胞, 按试剂盒说明书提取总 RNA, 用核酸蛋白分析仪计算所提 RNA 含量和纯度。10  $\mu$ L 反应体系, 置 PCR 仪中 37  $^{\circ}$ C 反应 15 min, 85  $^{\circ}$ C 变性 5 s。建立 10  $\mu$ L 反应体系, 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 s, 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60  $^{\circ}$ C 退火/延伸 31 s, 扩增 40 个循环。在 Real-time PCR 仪上检测各样本 mRNA 表达, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参照, 进行定量分析。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以空白作为标准, 根据 C $_t$  值<sup>[20]</sup>, 计算各组基因表达为空白的倍数, 以此倍数作统计。引物序列及扩增片段长度见表 1。

**2.8 统计学分析** 采用 SPSS 18.0 统计软件, 统计学资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 实验结果采用 SPSS 统计学软件进行单因素方差分析(ANOVA),  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

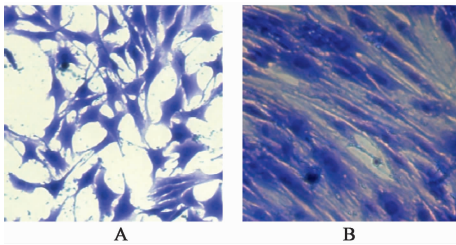
表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
HK	上游 CTGTTTCTGGAAACGCGAGG	178
	下游 GAGTCGGGGTCGAGTAGAGA	
PFK1	上游 TTGAGCACCGAATCCCCAAA	168
	下游 CCCCTCACTCCAAAGTGTC	
PK	上游 CAGGATCTGAAGTACGCCCG	264
	下游 AGAAATTCAGCCGAGCCACA	

### 3 结果

**3.1 L6 大鼠成肌细胞形态学变化** 考马斯亮蓝染色结果显示 80% 以上的细胞出现肌纤维, 呈现长梭形, 提示本研究采用的诱导分化方法切实可行。见图 1。



A. 诱导分化前; B. 诱导分化后

图 1 L6 大鼠成肌细胞诱导前后细胞形态变化(考马斯亮蓝,  $\times 200$ )

Fig. 1 Morphological changes of myoblasts of L6 rats before and after induction (CBB,  $\times 200$ )

**3.2 PA 对 L6 大鼠成肌细胞存活率和葡萄糖消耗的影响** 与未加胰岛素的空白组比较, 胰岛素刺激能够显著增加 L6 大鼠成肌细胞对葡萄糖的消耗 ( $P < 0.01$ )。然而与加胰岛素空白组比较, 胰岛素刺激并不能促进 PA 组细胞葡萄糖摄取。提示胰岛素刺激下的 PA 作用的 L6 大鼠成肌细胞葡萄糖代谢能力的降低, 即 L6 细胞胰岛素的敏感性的降低, 由此可以认为本研究建立起 PA 诱导的 L6 大鼠成肌细胞胰岛素抵抗模型 (IR-L6)。见表 2。

**3.3 甘草主要成分对 IR-L6 大鼠成肌细胞糖原含量的影响** 与正常组比较, 模型组的 IR-L6 细胞内糖原的含量明显下降 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, GA,  $18\beta$ -GA 和 ILG 组可以明显逆转 IR-L6 大鼠骨骼肌细胞内糖原含量 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而 ILQ 组也可以一定程度增加细胞内糖原含量, 但是与模型组比较, 差异无显著性。见表 3。

**3.4 甘草主要成分对 IR-L6 大鼠成肌细胞 GSK3 $\beta$  表达的影响** 与空白组比较, 模型组细胞 GSK3 $\beta$  表

表 2 PA 对 L6 大鼠成肌细胞存活率和葡萄糖消耗的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 2 Effect of PA on survival rate and glucose consumption in L6 rats myoblast ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	存活率/%	葡萄糖消耗/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	100.00	1.00
空白 + 胰岛素	$1 \times 10^{-4}$	$103.92 \pm 6.76$	$1.57 \pm 0.23^{1)}$
PA	0.05	$90.39 \pm 2.33$	$1.46 \pm 0.55$
PA + 胰岛素	$0.05 + 1 \times 10^{-4}$	$97.42 \pm 4.18$	$1.01 \pm 0.09^{2)}$

注: 与空白不加胰岛素比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与空白加胰岛素比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

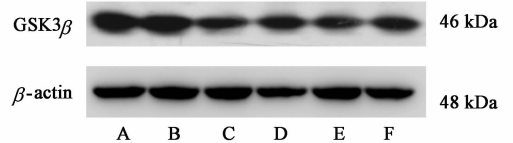
表 3 甘草主要成分对 IR-L6 大鼠成肌细胞内糖原含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

Table 3 Effect of main components of licorice on glycogen content in myoblasts of IR-L6 rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	糖原含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
正常	-	1.00
模型	-	$0.71 \pm 0.09^{1)}$
GA	25	$0.91 \pm 0.22^{2)}$
$18\beta$ -GA	25	$0.99 \pm 0.26^{2)}$
ILG	25	$1.08 \pm 0.27^{3)}$
ILQ	25	$0.80 \pm 0.15$

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$  (表 5 同)。

达明显增加 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, GA,  $18\beta$ -GA, ILG 和 ILQ 组可以明显降低 IR-L6 大鼠骨骼肌细胞内 GSK3 $\beta$  的表达 ( $P < 0.05$ )。见图 2, 表 4。



A. 正常组; B. 模型组; C. GA 组; D.  $18\beta$ -GA 组; E. ILG 组; F. ILQ 组 (图 3 同)

图 2 L6 大鼠成肌细胞 GSK3 $\beta$  蛋白表达

Fig. 2 Electrophoresis of GSK3 $\beta$  protein expression in L6 rat myoblasts

**3.5 甘草主要成分对 IR-L6 大鼠成肌细胞 PFK1, PK 和 HK mRNA 表达的影响** 与空白组比较, 模型组 PFK1, PK 和 HK mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, GA,  $18\beta$ -GA, ILG 和 ILQ 组均能明显上调 PFK1, PK 和 HK mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 5。

表 4 甘草主要成分对 IR-L6 大鼠成肌细胞中 GSK3 $\beta$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Table 4 Effect of main components of licorice on protein expression of GSK3 $\beta$  in myoblasts of IR-L6 rats ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	GSK3 $\beta$ / $\beta$ -actin
空白	-	0.69 $\pm$ 0.22
模型	-	1.00 <sup>1)</sup>
GA	25	0.66 $\pm$ 0.31 <sup>2)</sup>
18 $\beta$ -GA	25	0.83 $\pm$ 0.19 <sup>2)</sup>
ILG	25	0.74 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>
ILQ	25	0.63 $\pm$ 0.29 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

表 5 甘草主要成分对 IR-L6 大鼠成肌细胞 PFK1, PK 和 HK mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of main components of licorice on expression of PFK-1, PK and HK mRNA in myoblasts of IR-L6 rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PKF1	PK	HK
模型	-	0.75 $\pm$ 0.11 <sup>1)</sup>	0.67 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>	0.67 $\pm$ 0.29 <sup>1)</sup>
GA	25	1.55 $\pm$ 0.61 <sup>3)</sup>	1.21 $\pm$ 0.45 <sup>3)</sup>	1.14 $\pm$ 0.15 <sup>2)</sup>
18 $\beta$ -GA	25	1.94 $\pm$ 0.39 <sup>3)</sup>	1.10 $\pm$ 0.54 <sup>3)</sup>	1.08 $\pm$ 0.21 <sup>3)</sup>
ILG	25	1.24 $\pm$ 0.92 <sup>2)</sup>	1.22 $\pm$ 0.24 <sup>3)</sup>	1.22 $\pm$ 0.23 <sup>3)</sup>
ILQ	25	1.09 $\pm$ 0.41 <sup>2)</sup>	1.51 $\pm$ 0.58 <sup>3)</sup>	1.30 $\pm$ 0.47 <sup>3)</sup>

注:设空白组各 mRNA 含量均为 1。

3.6 甘草主要成分对 IR-L6 大鼠成肌细胞 SREBP-1c 和 FAS 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组的 SREBP-1c 和 FAS 蛋白表达显著下调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与模型组比较,GA,18 $\beta$ -GA 和 ILQ 可以明显抑制 SREBP-1c 和 FAS 的蛋白表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),而 ILG 可以减少 FAS 的蛋白表达,但不影响 SREBP-1c 的表达。见图 3,表 6。

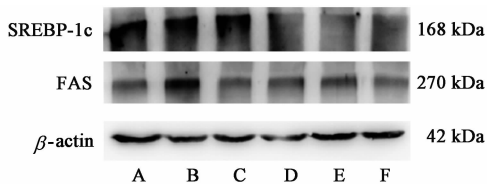


图 3 L6 大鼠成肌细胞 SREBP-1c 和 FAS 蛋白表达电泳  
Fig.3 Electrophoresis of SREBP-1c protein expression and FAS in L6 rat myoblasts

#### 4 讨论

葡萄糖是人体内糖类运输形式,而糖原是糖类的储存形式<sup>[21]</sup>。在人体中 80% 的糖原储存在骨骼肌中<sup>[22]</sup>。T2DM 患者胰岛素降糖能力下降,出现这种缺陷的原因可能是葡萄糖转化成肌糖原减少和糖

表 6 甘草主要成分对 IR-L6 大鼠成肌细胞中 SREBP-1c 和 FAS 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of main components of licorice on protein expression of SREBP-1c and FAS in myoblasts of IR-L6 rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	SREBP-1c/ $\beta$ -actin	FAS/ $\beta$ -actin
空白	-	0.57 $\pm$ 0.32	0.65 $\pm$ 0.09
GA	25	0.33 $\pm$ 0.25 <sup>4)</sup>	0.57 $\pm$ 0.21 <sup>5)</sup>
18 $\beta$ -GA	25	0.60 $\pm$ 0.22 <sup>3)</sup>	0.69 $\pm$ 0.22 <sup>4)</sup>
ILG	25	0.64 $\pm$ 0.09	0.58 $\pm$ 0.21 <sup>5)</sup>
ILQ	25	0.37 $\pm$ 0.38 <sup>4)</sup>	0.55 $\pm$ 0.22 <sup>5)</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>  $P < 0.01$ ;设模型组各蛋白含量均为 1。

原合酶去磷酸化受损<sup>[23]</sup>。徐晓艺等<sup>[24]</sup>研究发现,高脂喂养诱导的 IR 小鼠骨骼肌中肌糖原的含量较正常对照组明显降低。笔者的研究发现,PA 诱导的 IR-L6 模型中糖原含量显著下降,而甘草中主要成分 GA,18 $\beta$ -GA 和 ILG 可以显著逆转 IR-L6 细胞中糖原含量下降。糖原合成在骨骼肌中受胰岛素敏感性的调节并受限速酶糖原合成酶(GS)影响<sup>[25]</sup>。GSK-3 $\beta$  通常被认为在糖原合成的调控中起着重要的作用,GSK-3 $\beta$  可使 GS 磷酸化失活,从而使糖原合成减少<sup>[26]</sup>。谭婕等<sup>[27]</sup>通过对 30 例 T2DM 患者和 30 例健康者的对比研究指出 T2DM 患者与健康对照组比较 GSK-3 $\beta$  蛋白水平显著升高。陈丹等研究也发现,高脂饲料喂养诱导的 IR 大鼠骨骼肌中 GSK3 表达明显高于正常组,给予葛根素后,大鼠骨骼肌 GSK3 表达较模型组明显下降<sup>[28]</sup>。可见,动物实验及人体指标监测均提示 GSK-3 $\beta$  在机体中的异常表达与高血糖密切相关。实验结果发现,在 IR-L6 大鼠骨骼肌细胞中 GSK3 $\beta$  表达明显增加,加入 GA,18 $\beta$ -GA,ILG 和 ILQ 后,与模型组比较,GSK3 $\beta$  的蛋白表达明显下降。以上结果提示 GA,18 $\beta$ -GA 和 ILG 可能是通过抑制 GSK3 $\beta$  表达,恢复糖原合成酶活性从而增加细胞内糖原的合成,达到降糖的目的。然而,本研究中 ILQ 虽显著抑制 GSK3 $\beta$  蛋白表达,但并没有逆转 IR-L6 糖原含量下降,提示可能存在 GSK3 $\beta$  以外的其他因素影响糖原的合成,具体机制有待进一步研究。

糖分解代谢是生物体获取能量的主要方式。生物体中糖的氧化分解主要有 3 条途径:糖的无氧氧化、糖的有氧氧化和磷酸戊糖途径。其中,糖的无氧氧化又称糖酵解(Glycolysis)<sup>[29-30]</sup>。糖酵解在骨骼肌糖代谢中具有重要作用,PFK1,PK 和 HK 均为糖

酵解途径关键酶<sup>[31-32]</sup>。温俊平<sup>[33]</sup>发现 II 型糖尿病大鼠骨骼肌组织中糖酵解的关键酶的基因表达明显被抑制。与其研究报道类似,在本研究中,PA 诱导的胰岛素抵抗模型中 PFK1,PK 和 HK 的表达均显著下降,而 GA,18β-GA,ILG 和 ILQ 均可以显著增加 IR-L6 大鼠骨骼肌细胞中 PFK1,PK 和 HK mRNA 表达,提示 GA,18β-GA,ILG 和 ILQ 对 PA 诱导的 L6 大鼠成肌细胞中糖酵解中关键酶具有明显的上调作用,有助于改善胰岛素抵抗。

大量证据表明,FFAs 升高与胰岛素抵抗有关<sup>[34-35]</sup>。FAS 是 FFAs 合成过程中一个关键酶,其异常表达与肥胖、胰岛素抵抗的发生、发展密切相关<sup>[36]</sup>。SREBP-1c 是调控脂肪合成相关酶蛋白表达的关键转录因子,其可通过影响 FAS 表达进而调控脂肪酸合成过程<sup>[37]</sup>。Ito 等<sup>[37]</sup>研究表明 SREBP-1c 的失调与肥胖,胰岛素抵抗和血脂异常的发病机制有关。结果发现,在 PA 诱导的 IR-L6 大鼠成肌细胞中 SREBP-1c 和 FAS 蛋白表达明显升高,GA,18β-GA 和 ILQ 可以显著降低 SREBP-1c 和 FAS 的蛋白表达,提示 GA,18β-GA 和 ILQ 通过降低 SREBP-1c 和 FAS 的蛋白表达,进而减少脂肪酸的合成来改善胰岛素抵抗。然而 ILG 可以显著降低 FAS 表达,但不能显著降低 SREBP-1c,表明 ILG 可能通过其他转录因子调节 FAS 的表达进而发挥改善胰岛素抵抗的作用。

综上所述,甘草主要成分 GA,18β-GA,ILG 和 ILQ 通过促进糖酵解和糖原合成发挥降糖作用;GA,18β-GA,ILG 和 ILQ 通过调节脂肪酸合成改善胰岛素抵抗,见图 4。本研究初步阐明中药甘草主要化学成分改善胰岛素抵抗作用机制,为其降血糖的临床应用奠定了坚实的理论基础。

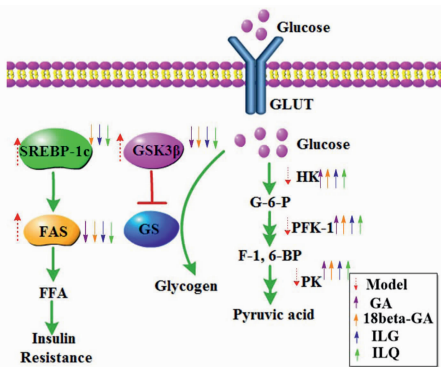


图 4 GA,18β-GA,ILG 和 ILQ 改善 IR-L6 大鼠成肌细胞胰岛素抵抗的机制

Fig. 4 Mechanism of GA, 18β-GA, ILG and ILQ improving insulin resistance in myoblasts of IR-L6 rats

[参考文献]

[ 1 ] WANG J H, Kim B S, HAN K, et al. Ephedra-treated donor-derived gut microbiota transplantation ameliorates high fat diet-induced obesity in rats [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14(6): E555.

[ 2 ] WU W, QIU J, WANG A, et al. Impact of whole cereals and processing on type 2 diabetes mellitus: a review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019(1): 1.

[ 3 ] YANG T C, CHAO H F, SHI L S, et al. Alkaloids from *Coptis chinensis* root promote glucose uptake in C2C12 myotubes [J]. *Fitoterapia*, 2014, 93 ( Complete ): 239-244.

[ 4 ] WANG H J, Chiang B H. Anti-diabetic effect of a traditional Chinese medicine formula [J]. *Food Funct*, 2012, 3(11): 1161-1169.

[ 5 ] International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 8th edn Brussels: IDF [EB/OL]. 2017. <http://www.diabetesatlas.org>.

[ 6 ] Kraegen E W, Cooney G J. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2008, 19(3): 235-241.

[ 7 ] Jayanthi G, Roshana Devi V, Ilango K, et al. Rosmarinic acid mediates mitochondrial biogenesis in insulin resistant skeletal muscle through activation of AMPK [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(7): 1839-1848.

[ 8 ] 高春林, 赵亚萍, 陈小慧, 等. 不同浓度葡萄糖和游离脂肪酸对大鼠骨骼肌细胞株 L6 细胞胰岛素敏感性和细胞内活性氧的影响 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2011, 19(3): 221-224.

[ 9 ] YE J P. Role of Insulin in the pathogenesis of free fatty acid-induced insulin resistance in skeletal muscle [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2007, 7(1): 65-74.

[ 10 ] 赵海燕, 王勇, 马永平, 等. 胰岛素信号转导障碍与胰岛素抵抗 [J]. *新医学*, 2010, 41(4): 267.

[ 11 ] Ragadeepthi T, Thurmond D C. Promoting glucose transporter-4 vesicle trafficking along cytoskeletal tracks: PAK-Ing them out [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017, 8: 329.

[ 12 ] 林媛媛, 蒙碧辉. 游离脂肪酸异常蓄积与骨骼肌胰岛素抵抗 [J]. *广西医科大学学报*, 2006, 23(4): 683-685.

[ 13 ] 沈歆, 胡梓朔, 王力彬, 等. 棕榈酸通过抑制 IRS-1 表达诱导大鼠骨骼肌细胞胰岛素抵抗 [J]. *中国药师*, 2016, 12: 2201-2205.

[ 14 ] Sinha S, Perdomo G, Brown N F. Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of

- nuclear factor kappa B [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (40):41294-41301.
- [15] TANG S, WU W, TANG W, et al. Suppression of Rho-kinase 1 is responsible for insulin regulation of the AMPK/SREBP-1c pathway in skeletal muscle cells exposed to palmitate [J]. *Acta Diabetol*, 2017, 54 (7): 635-644.
- [16] Chriett S, Zerzaihi O, Vidal H, et al. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate improves insulin signalling in palmitate-induced insulin resistance in L6 rat muscle cells through epigenetically-mediated up-regulation of Irs1 [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 439: 224-232.
- [17] 王波, 周荣荣, 唐仕欢. 《中医方剂大辞典》中消渴病方剂“核心药物-作用靶点”关联性挖掘研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43 (19): 3919-3926.
- [18] Dastagir G, Rizvi M A. Review-*Glycyrrhiza glabra* L. (Liquorice) [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2016, 29 (5): 1727-1733.
- [19] YANG R, WANG L Q, YUAN B C, et al. The pharmacological activities of licorice [J]. *Planta Med*, 2015, 81 (18): 1654-1659.
- [20] 高艳, 崔广智, 李慧颖, 等. 姜黄素、小檗碱及其配伍对 db/db 小鼠糖脂代谢相关基因 mRNA 表达的影响 [J]. *天津中医药大学学报*, 2011, 30 (1): 33-36.
- [21] 庞广昌, 陈庆森, 胡志和, 等. 过度营养与人体代谢和疾病关系的研究进展 [J]. *食品科学*, 2013, 34 (15): 373-396.
- [22] Jensen J, Inge R P, Jensen K A, et al. The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise [J]. *Front Physiol*, 2011, doi:10.3389/fphys.2011.00112.
- [23] Jensen J, LAI Y C. Regulation of muscle glycogen synthase phosphorylation and kinetic properties by insulin, exercise, adrenaline and role in insulin resistance [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2009, 115 (1): 13-21.
- [24] 徐晓艺, 李竞, 高凌, 等. 胰岛素抵抗小鼠骨骼肌中磷脂酰肌醇 3 激酶表达及肌糖原含量的改变 [J]. *临床内科杂志*, 2015, 32 (4): 274-276.
- [25] Solini A, Di Virgilio F, Chiozzi P, et al. A defect in glycogen synthesis characterizes insulin resistance in hypertensive patients with type 2 diabetes [J]. *Hypertension*, 2001, 37 (6): 1492-1496.
- [26] Frizzo M E. Putative role of glycogen as a peripheral biomarker of GSK3 $\beta$  activity [J]. *Med Hypotheses*, 2013, 81 (3): 376-378.
- [27] 谭婕, 吴建华, 王江平, 等. 2 型糖尿病患者糖原合成酶激酶 3 $\beta$  的表达及活性 [J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37 (20): 2831-2834.
- [28] 陈丹, 毕会民, 苏杭. 葛根素对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌中 GSK-3 表达的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2005, 16 (4): 233-237.
- [29] 张星华, 杜小正, 王金海, 等. 糖酵解途径与类风湿关节炎发病的关系 [J]. *广东医学*, 2015, 36 (15): 2430-2433.
- [30] 廖阳, 闫荣玲, 李常健, 等. 《生物化学》重要章节——《糖酵解》课堂教学体会与思考 [J]. *生物学杂志*, 2014, 6: 110-114.
- [31] Pinheiro C H, Silveira L R, Nachbar R T, et al. Regulation of glycolysis and expression of glucose metabolism-related genes by reactive oxygen species in contracting skeletal muscle cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48 (7): 953-960.
- [32] Kim J K, Wi J K, Youn J H. Plasma free fatty acids decrease insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake by suppressing glycolysis in conscious rats [J]. *Diabetes*, 1996, 45 (4): 446-453.
- [33] 温俊平. 2 型糖尿病大鼠骨骼肌基因表达谱 [D]. 福州: 福建医科大学, 2004.
- [34] HAN P, ZHANG Y Y, LU Y, et al. Effects of different free fatty acids on insulin resistance in rats [J]. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int*, 2008, 7 (1): 91-96.
- [35] 金鑫, 张会欣, 张彦芬, 等. 津力达对高脂诱导的胰岛素抵抗 ApoE $^{-/-}$ 小鼠骨骼肌脂质转运酶类的表达变化 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40 (6): 1156-1160.
- [36] Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2011, 18 (2): 139-143.
- [37] Ito M, Nagasawa M, Omae N, et al. A novel JNK2/SREBP-1c pathway involved in insulin-induced fatty acid synthesis in human adipocytes [J]. *J Lipid Res*, 2013, 54 (6): 1531-1540.

[责任编辑 周冰冰]