

桑叶改善 3T3-L1 细胞胰岛素抵抗的作用及其机制分析

王敏, 李亚琪, 马全涛, 柳辰玥, 张驰, 邱敏懿, 张彩娟, 王婷, 赵保胜*

(北京中医药大学 中药学院, 北京中医药研究院, 北京 100029)

[摘要] **目的:**观察桑叶含药血清对脂肪细胞株 3T3-L1 胰岛素抵抗 (IR) 模型葡萄糖消耗量及细胞活力的影响, 筛选出桑叶含药血清的最佳浓度, 并检测其对炎症因子含量的影响, 探讨可能的作用机制。**方法:**取对数生长期 3T3-L1 前脂肪细胞, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素 (Ins), $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松 (DEX), $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) 诱导 48 h 后, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Ins 再次诱导 48 h, 待其分化为成熟脂肪细胞后, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX 诱导 96 h 以建立 IR 细胞模型。桑叶水提物含药血清培养 12, 24, 36, 72 h 后, 采用葡萄糖氧化酶法检测桑叶含药血清培养后细胞葡萄糖的消耗量, 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测桑叶含药血清培养后 IR 模型的细胞活力, 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测桑叶含药血清对细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量的影响, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 测定桑叶含药血清对胰岛素信号通路胰岛素受体 (InsR), 胰岛素受体底物 (IRS), 磷酸化 IRS1 (p-IRS1), 葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 蛋白表达的影响。**结果:**桑叶含药血清可显著提高 IR 细胞葡萄糖消耗量 ($P < 0.01$), 增强细胞活力 ($P < 0.01$), 降低炎症因子 TNF- α 的含量 ($P < 0.01$), 调节胰岛素信号通路下游蛋白的表达量 ($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**桑叶可明显改善 3T3-L1 细胞 IR 状态, 其作用机制可能与抑制 TNF- α 表达、促进胰岛素信号通路蛋白的表达有关。

[关键词] 桑叶; 含药血清; 2 型糖尿病; TNF- α ; 胰岛素信号通路

[中图分类号] R22; R24; R285; R285.5; TQ467.32 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)01-0135-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190128

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181019.1052.004.html>

[网络出版时间] 2018-10-22 9:42

Effect and Mechanism of Mori Folium on Insulin Resistance in 3T3-L1 Cells

WANG Min, LI Ya-qi, MA Quan-tao, LIU Chen-yue, ZHANG Chi, QIU Min-yi,

ZHANG Cai-juan, WANG Ting, ZHAO Bao-sheng*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing Research Institute of Chinese Medicine,
Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effect of Mori Folium-containing serum on glucose consumption and cell activity of fat cell line 3T3-L1 insulin resistance (IR) model, in order to screen out the optimal concentration of drug-containing serum, detect effect of Mori Folium on the content of inflammatory factors, and explore the possible mechanism. **Method:** 3T3-L1 preadipocytes in logarithmic growth phase were selected, and induced with $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ insulin (Ins), $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dexamethasone (DEX) and $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-isobutyl-methylxanthine (IBMX) for 48 h and then with $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Ins for 48 h. After the cells were differentiated into mature adipocytes, they were induced with $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX for 96 h to establish IR model. Glucose content in the supernatant of cells was detected by glucose oxidase after serum containing Mori Folium cultured for 12, 24, 36, 72 h. Methylthiazdyl-tetrazolium (MTT) was used to detect the effect of serum containing Mori Folium on IR cells activity. The content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

[收稿日期] 20180807(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773960)

[第一作者] 王敏, 在读硕士, 从事中医药防治糖尿病研究, E-mail: weme9916@163.com

[通信作者] * 赵保胜, 博士, 研究员, 从事中药防治糖尿病及新药研发研究, E-mail: zhaobs1973@163.com

Meanwhile, the effects of inflammatory factors on the expressions of insulin signaling pathway proteins insulin receptor (InsR), insulin receptor substrate (IRS), p-IRS1 and glucose transporter 4 (GLUT4) were determined by Western blot. **Result:** Serum containing Mori Folium could significantly increase the glucose consumption rate and cell activity of IR cells ($P < 0.01$), reduce the content of TNF- α ($P < 0.01$), and regulate the expression of insulin signaling pathway proteins ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Mori Folium can significantly improve IR status of 3T3-L1 cells, and its mechanism may be related to inhibiting TNF- α and promoting the expressions of insulin signaling pathway proteins.

[**Key words**] Mori Folium; serum containing drug; type 2 diabetes mellitus (T2DM); tumor necrosis factor- α (TNF- α); insulin signaling pathway

随着生活节奏的加快以及高热高糖饮食的摄入,我国成年人糖尿病发病率逐年上升。最新研究表明,中国 18 岁以上人群中约有 1.14 亿人患有 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM)^[1]。T2DM 的病理机制尚未有定论,但是胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 在 T2DM 的发病过程中扮演重要角色。IR 是指肝脏、肌肉、脂肪等组织对胰岛素的敏感性下降,胰岛素 (Ins) 对葡萄糖代谢的生物学效应降低,是引发肥胖、糖尿病及高血压等慢性疾病的共同病理特征。IR 的形成与遗传和环境两方面因素有关,前者主要是基因突变引起的胰岛素,Ins 受体或其底物异常导致的 IR; 后者主要是由于不良的生活习惯引起的肥胖所致。1990 年代有研究认为 IR 是机体低度的慢性炎症反应过程,患者体内虽然没有明显的炎症症状,但是肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等炎症因子高水平表达,说明机体处于炎症状态。炎症因子的持续表达可以抑制机体 Ins 信号通路的传导,产生或加剧 IR^[2]。

桑叶是桑科植物桑 *Morus alba* 的叶,可行疏风散热、清肺润燥、清肝明目之功效,为常用中药之一^[3]。桑叶用于治疗 T2DM 最早记载于《本草纲目》,临床研究证明桑叶及其配方均可有效治疗 T2DM^[4-5],对其并发症也有一定的防治作用^[6]。当前桑叶降血糖的研究以动物实验为主,桑叶对细胞的作用鲜有报道。

3T3-L1 前脂肪细胞是源于 Swiss 小鼠胚胎的脂肪纤维细胞,具有高 Ins 敏感性且稳定性较好的特点,在 Ins 或地塞米松 (DEX) 的刺激下,可以破坏 3T3-L1 细胞的葡萄糖转运系统,降低其对葡萄糖的利用率^[7],广泛被应用于研究脂肪 IR 机制及抗 IR 药物体外筛选^[8]。因此本实验拟在课题组前期研究基础上,通过 3T3-L1 前脂肪细胞增殖分化,制备 IR 细胞模型,观察桑叶含药血清对 3T3-L1 前脂肪

细胞 IR 模型葡萄糖的消耗量、炎症因子含量的影响,并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,雄性,SPF 级,5~6 周龄,体质量 180~200 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2016-0002,饲养于北京中医药大学屏障环境动物房,实验动物使用许可证号 SYXK(京)2016-0038。本研究获得北京中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号 BUCM-4-20017101908-4008)。

1.2 材料和试剂 3T3-L1 小鼠前脂肪细胞购于国家实验细胞资源共享平台;桑叶经北京中医药大学中药学院中药鉴定系刘春生教授鉴定为桑科植物桑 *M. alba* 的干燥叶,由北京仟草中药饮片有限公司提供;DMEM 高糖培养液(美国 Gibco 公司,批号 1744353);Ins(中国诺和诺德制药有限公司,批号 EVG4950);胎牛血清[依科赛生物科技(太仓)有限公司,批号 11F364];DEX,3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)(美国 Sigma 公司,批号分别为 01705675, 822A0520);小鼠 TNF- α 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司,批号 1790473A);噻唑蓝 (MTT),BCA 蛋白定量测定试剂盒,RIPA 裂解液(北京鼎国昌盛生物技术有限公司,批号分别为 68M10350,75900145,64L001100);四甲基乙二胺 (TMEMD,美国 Genbio 公司,批号 bw-t 0023-5);三羟甲基氨基甲烷 (Tris,美国 Genview 公司,批号 611040106400);饱和油红 O 染液,聚丙烯酰胺电泳缓冲液 (SDS-PAGE)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 20170113,20160309); β -肌动蛋白 (β -actin),胰岛素受体 (InsR),胰岛素受体底物 1 (IRS1),磷酸化 IRS1 (p-IRS1),葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4)(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab8226, ab13128, ab52167, ab46800, ab654);HRP-羊抗鼠免疫球蛋白 (Ig)G 酶标二抗,HRP-羊抗兔 IgG 酶标二

抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 ZB2305,ZB2301)。

1.3 仪器 FLUOstar Omega 型全自动多功能酶标仪(德国 Bmg Labtech 公司);IX71 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);DYCZ40 型转印电泳仪, DYCZ25D 型垂直电转仪(北京六一生物科技有限公司);C600 型多功能分子成像系统(美国 Azure Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 桑叶含药血清的制备

2.1.1 制备桑叶水提物 称取桑叶 175 g,加 10 倍量的去离子水,加热回流提取 10 h,多层纱布过滤,弃去滤渣,取上清液,旋转蒸发浓缩,250 mL 容量瓶定容,使桑叶水提物含生药为 0.7 g·mL⁻¹。

2.1.2 大鼠含药血清的制备 大鼠适应性饲养一周后,按体质量随机分为桑叶组 30 只,正常组 20 只。桑叶组灌胃桑叶水提物,10 mL·kg⁻¹,每天上、下午各灌胃 1 次,连续 5 d,正常组灌胃等量的蒸馏水。末次给药 1 h 后,乙醚麻醉,腹主动脉取血,4 ℃ 静置 1 h,3 000 r·min⁻¹离心 15 min,分离含药血清,微孔滤膜过滤后,-80 ℃ 保存备用。

2.2 桑叶含药血清对 3T3-L1 细胞 IR 的影响

2.2.1 IR 细胞模型的制备 参考文献制备 IR 细胞模型^[9],将冻存细胞 37 ℃ 水浴锅内解冻 1 min,用移液器将其全部移至 10 mL 离心管中,加入血清培养基,1 000 r·min⁻¹离心 3 min,弃上清,加入含 DMEM 血清培养基,置于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱培养 24 h。细胞密度为 80% 时弃去原培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次后,加入胰蛋白酶 1.5 mL,充分振荡,细胞层脱落并浮起时,加入 DMEM 培养基 2 mL 终止消化。脱落的细胞吸入离心管中,离心 3 min (1 000 r·min⁻¹),弃上清液,1:2 传代。取对数生长期细胞,传代 3 次以上,进行细胞计数后,培养于 96 孔板中,48 h 后弃去培养基,加入 10 mg·L⁻¹ Ins, 0.25 mmol·L⁻¹ 地塞米松(DEX),0.5 mmol·L⁻¹ IBMX,诱导分化 48 h 后,再次加入 10 mg·L⁻¹ Ins, 培养 48 h,更换为 DMEM 培养基,观察 8~12 d 后,完成分化。将分化细胞弃去培养基,PBS 洗 1 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,每孔加入油红 O 工作液 200 μL 染色 1 h 后,60% 异丙醇洗 1 次,PBS 洗 2 次,细胞内有明显的脂滴聚集,形成“戒环状”即表示细胞分化成熟。将成熟 3T3-L1 脂肪细胞分为正常组和模型组,正常组给予 DMEM 培养基,模型组给予含有 1 μmol·L⁻¹ DEX 的培养基,每孔 200 μL,

设 4 个复孔,重复 5 次,分别诱导 12,24,36,72 h 后用葡萄糖氧化酶试剂盒测定培养基中的葡萄糖含量,并计算葡萄糖消耗量。

$$\text{葡萄糖的消耗量} = \text{空白组葡萄糖含量} - \text{各给药组葡萄糖含量}^{[10]}$$

2.2.2 分组及给药 确定最佳造模时间后,按照上述方法,复制 3T3-L1 细胞 IR 模型,将细胞分为模型组和桑叶组,每组加入 DMEM 培养基 180 μL 和大鼠血清 20 μL,其中模型组细胞加入大鼠空白血清 20 μL,桑叶组按照表 1 比例加入桑叶含药血清和大鼠空白血清共 20 μL,设置 6 个浓度梯度,使得桑叶含药血清在培养基中的比例分别为 10%,7%,4.9%,3.43%,2.4%,1.7%,另设成熟 3T3-L1 脂肪细胞为正常组,加入 DMEM 培养基 180 μL 和大鼠空白血清 20 μL 培养。

表 1 细胞分组及给药浓度梯度

Table 1 Cell grouping and concentration gradient of cell-drug delivery

组别	空白血清 /μL	含药血清 /μL	血清含药量 /g·kg ⁻¹ ·U ⁻¹	血清含药体积分数/%
正常	20	0	-	-
模型	20	0	-	-
桑叶	0	20	0.49	10
	6	14	0.34	7
	10.2	9.8	0.24	4.9
	13.32	6.86	0.17	3.43
	15.2	4.8	0.12	2.4
	16.6	3.4	0.08	1.7

注:血清含药量 = 动物每日公斤体质量给药剂量/含药血清体外系统稀释倍数^[11]。含药血清以生药量计算。

2.2.3 桑叶对 IR 细胞模型活力的影响 IR 细胞按 1 × 10⁵ 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,按表 1 加入桑叶含药血清,培养 12,24,36,72 h 后,弃去培养液,PBS 洗 1 次后,加入 1 g·L⁻¹ MTT 溶液,100 μL/孔,37 ℃ 培养箱孵育 4 h 后,每孔加入 DMSO 150 μL,轻微震荡 10 min,用酶标仪 490 nm 波长处测定吸光度 A,观察桑叶对 IR 细胞活力的影响。

$$\text{细胞相对活力} = \text{实验组 } A / \text{正常组 } A \times 100\%$$

2.2.4 桑叶对 IR 细胞模型葡萄糖消耗量及 TNF-α 的影响 IR 细胞加入桑叶含药血清 24 h 后取细胞上清液,在各孔中加入对照品或样品各 100 μL,其他步骤严格按照试剂盒说明书要求进行操作,在 450 nm 处测定 A,检测葡萄糖消耗量及 TNF-α 的含

量,筛选桑叶含药血清作用的合适浓度进行后续实验。

2.2.5 桑叶对 IR 细胞模型胰岛素信号蛋白的影响

细胞培养及药物处理同 2.2.2 和 2.2.3,弃去培养基,PBS 冲洗 3 次后加入 RIPA 裂解液,吹打数次,使细胞与裂解液充分接触,置冰上,每 10 min 震荡 1 次,30 min 后,12 000 r·min⁻¹离心 20 min,取上清液备用。BCA 试剂盒测定蛋白浓度后,取等量蛋白样品 50 μg 用样品缓冲液处理,蛋白变性后,SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白,电转移法使蛋白转移至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温下封闭 2 h,封膜后分别加入 β-actin, InsR, IRS1, p-IRS1, GLUT4 抗体(1:2 000,1:100,1:500,1:2 000,1:2 000),4 ℃ 过夜,TBST 洗膜后以 HRP 标记的二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次后,显影,曝光,Image J 软件进行灰度值分析。

2.3 统计学分析 数据采用 SAS 9.2 统计软件分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若符合正态,均数比较采用 One-way ANOVA 进行分析;根据方差是否齐,组间比较分别采用 LSD 或者 DUNETT's T3。数据若不符合正态,均数及组间比较采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 3T3-L1 脂肪细胞 IR 模型的建立

3.1.1 油红 O 染色 3T3-L1 细胞诱导分化及鉴定 200 倍镜下可以明显观察到,细胞内的脂滴被油红 O 特异性的染成红色;400 倍镜下观察到明显的“戒环状”脂滴。对细胞进行随机计数,脂肪细胞占总细胞数的 95% 以上,表明 3T3-L1 细胞已诱导分化为脂肪细胞。见图 1。

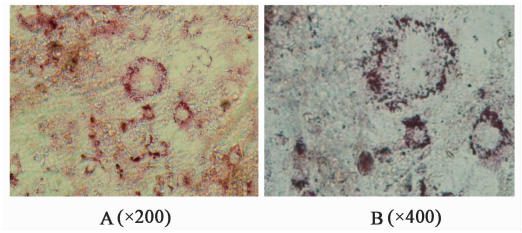


图 1 3T3-L1 前脂肪细胞鉴定(油红 O)

Fig. 1 Identification of 3T3-L1 adipocytes (oil red staining)

3.1.2 对 3T3-L1 细胞 IR 模型葡萄糖消耗量的影响 与正常组比较,模型组细胞培养 24 h 和 72 h,培养基内葡萄糖浓度明显升高,说明模型组细胞葡萄糖消耗量明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 3T3-L1 细胞 IR 模型培养不同时间后对葡萄糖浓度的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of IR model of 3T3-L1 cells on glucose content after different time of culture($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	12 h	24 h	36 h	72 h
正常	16.42 ± 3.46	12.64 ± 1.93	8.47 ± 1.53	4.92 ± 1.60
模型	18.90 ± 3.93 ¹⁾	14.68 ± 1.97 ²⁾	9.72 ± 2.04	7.12 ± 1.71 ²⁾

注:与正常组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 桑叶对 IR 细胞模型的影响

3.2.1 桑叶对 IR 细胞活力的影响 与正常组比较,模型组细胞 24,36 h 活力明显下降($P < 0.01$);与模型组比较,桑叶 10%,7%,4.9% 含药血清组 24,36 h 细胞活力显著升高($P < 0.01$)。其中含药血清体积分数 10% 培养 24 h 后细胞活力最好。见表 3。

表 3 桑叶对 IR 模型细胞相对活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Mori Folium on activity of IR model cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体积分数/%	12 h	24 h	36 h	72 h
正常	-	100	100	100	100
模型	-	69.01 ± 12.24	80.36 ± 10.21 ¹⁾	77.28 ± 13.16 ¹⁾	97.12 ± 19.78
桑叶含药血清	10	116.32 ± 16.18	133.96 ± 19.21 ²⁾	117.52 ± 11.38 ²⁾	115.35 ± 16.28
	7	113.02 ± 15.31	120.65 ± 12.11 ²⁾	103.27 ± 8.06 ²⁾	101.16 ± 14.52
	4.9	97.32 ± 8.12	111.34 ± 12.76 ²⁾	93.81 ± 10.23 ²⁾	105.05 ± 9.37
	3.43	104.01 ± 7.28	107.41 ± 15.24 ⁴⁾	94.76 ± 12.21	110.31 ± 10.79
	2.4	102.10 ± 19.05	89.71 ± 11.98	94.76 ± 15.21	104.21 ± 11.50
	1.7	107.18 ± 13.08	89.46 ± 12.13	94.78 ± 15.56	106.72 ± 14.95

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 桑叶对 IR 细胞葡萄糖的消耗量及 TNF- α 的影响 与正常组比较,模型组葡萄糖消耗量显著降低 ($P < 0.01$),TNF- α 含量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,桑叶体积分数为 10%、7%、4.9%、3.43% 的含药血清,可明显增加细胞葡萄糖消耗 ($P < 0.01$);体积分数为 10%、7% 的桑叶含药血清培养后,细胞中 TNF- α 含量明显下降 ($P < 0.01$),其余各组有一定抑制其表达的趋势,但没有显著性差异,因此选择体积分数为 10%、7% 的桑叶含药血清培养细胞,探讨桑叶对 IR 细胞胰岛素下游信号通路的影响。见表 4。

3.4 桑叶对 IR 细胞胰岛素信号通路相关蛋白的影响 桑叶可明显增加 IR 细胞 InsR、IRS1 和 GLUT4 蛋白的表达,抑制 IRS1 蛋白丝氨酸磷酸化 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5,图 2。

表 5 桑叶对 IR 细胞蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of Mori Folium on the relative expression of insulin signaling pathway protein in IR model cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

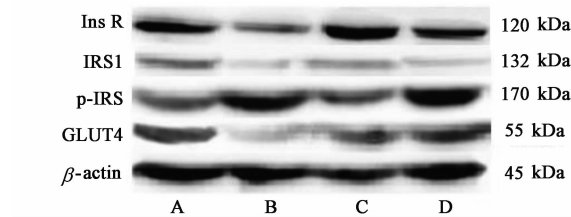
组别	体积分数/%	InsR/ β -actin	IRS1/ β -actin	p-IRS1/ β -actin	GLUT4/ β -actin
正常	-	0.94 \pm 0.19	0.44 \pm 0.07	0.55 \pm 0.11	0.83 \pm 0.09
模型	-	0.48 \pm 0.08 ¹⁾	0.11 \pm 0.03 ¹⁾	0.90 \pm 0.20 ¹⁾	0.39 \pm 0.15 ¹⁾
桑叶含药血清	10	0.84 \pm 0.13 ³⁾	0.25 \pm 0.07 ³⁾	0.57 \pm 0.10 ³⁾	0.57 \pm 0.15 ²⁾
	7	0.89 \pm 0.28 ³⁾	0.18 \pm 0.09	0.82 \pm 0.10	0.58 \pm 0.16 ²⁾

表 4 桑叶对 IR 细胞葡萄糖消耗及 TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Mori Folium on glucose consumption and TNF- α of IR model cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体积分数/%	葡萄糖消耗量/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	0.88 \pm 0.34	55.65 \pm 30.91
模型	-	0.36 \pm 0.20 ¹⁾	177.70 \pm 68.75 ¹⁾
桑叶含药血清	10	0.84 \pm 0.14 ³⁾	71.57 \pm 29.72 ³⁾
	7	0.73 \pm 0.11 ³⁾	91.55 \pm 44.83 ³⁾
	4.9	0.69 \pm 0.06 ³⁾	108.06 \pm 48.63
	3.43	0.63 \pm 0.17 ²⁾	119.98 \pm 48.52
	2.4	0.57 \pm 0.10	132.83 \pm 47.82
	1.7	0.56 \pm 0.12	142.89 \pm 50.24

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 5 同)。



A. 正常组;B. 模型组;C. 桑叶含药血清体积分数 10%;D. 桑叶含药血清体积分数 7%

图 2 IR 细胞中 InsR、IRS1、p-IRS1、GLUT4 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of InsR, IRS1, p-IRS1, GLUT4 protein in IR model cells

4 讨论

T2DM 是由于胰岛素生物效应降低而产生的机体糖类、脂类及蛋白质类物质代谢紊乱的慢性代谢性疾病。随着病情的发展,可以出现高血压、视网膜病变、神经病变及下肢血管病变等多种并发症,给患者及其家属带来沉重的经济负担和生活压力。据世界糖尿病联盟(IDF)调查显示,目前世界约有 4.25 亿糖尿病患者,其中超过 80% 的患者为 T2DM,并且此占比还在持续增加。T2DM 主要病理特征为 IR,IR 发生在 Ins 调节葡萄糖代谢吸收的任何过程,但是患者大多为受体后水平的 IR,即 Ins 受体后信号传导受到抑制^[12]。除了基因缺陷引起的 IR,饮食

不节,过食肥腻,好逸恶劳、劳欲过度等不良的生活习惯,也是引起 IR 的重要因素。中医认为上述恶习易导致身体阴虚燥热或痰湿血瘀,而产生“消渴”。由于病因病机的不同,中药治疗 T2DM 的用药也有诸多分类,清热药是中药治疗糖尿病的常用药物,桑叶即为其中之一^[13,14]。

IR 主要受累组织为肝脏、肌肉、脂肪,但是研究表明 IR 过程中脂肪组织的炎症反应更为明显^[15],脂肪组织不仅是机体的储能器官,同时也是重要的内分泌器官,多种炎症因子在 IR 的炎症过程中发挥作用。一方面是脂肪细胞刺激免疫细胞分泌 TNF- α 、IL-6 等炎症因子^[16],另一方面,其自身也可以分泌 TNF- α 、IL-6,促进炎症反应的发生。脂肪细胞是 TNF- α 主要来源之一,有报道指出 T2DM 患者体内 TNF- α 水平明显高于非糖尿病人群^[17],实验研究发现模型大鼠脂肪组织中 TNF- α 含量上升^[18]。脂肪细胞中的 TNF- α 与其受体结合后可以下调 InsR 和 IRS1 的表达^[19];可以诱导 IRS1 丝氨酸磷酸化,抑制其酪氨酸磷酸化,减少 IRS1 表达或抑制其活性,TNF- α 还可以抑制 GLUT4 的表达,抑制 Ins 信号通路的传导,造成或加重 IR。降低 TNF- α 的表达可以有效提高细胞 Ins 敏感性,改善 IR^[20]。

桑叶治疗 T2DM 的作用显著,但是其物质基础复杂,直接用于细胞实验,可能对实验结果产生影响。研究报道表明,中药发挥药效作用的主要成分为其入血代谢产物^[21],因此采用桑叶含药血清进行细胞实验,为避免血清中的成分对细胞的干扰,同时设置空白血清组作为对照。本课题组前期通过高分辨质谱对桑叶水提物及桑叶含药血清成分分别进行了鉴定,发现桑叶水提物中主要为黄酮类化合物,桑叶含药血清中主要为黄酮类代谢产物^[22],与文献中报道桑叶降血糖重要成分为黄酮类相符^[23]。本实验通过诱导 3T3-L1 前脂肪细胞增殖分化,制备 IR 细胞模型,其葡萄糖消耗量明显降低。给予桑叶含药血清进行培养后,可以明显提高 IR 模型细胞对葡萄糖的摄取,表明桑叶含药血清对模型细胞 IR 糖代谢具有改善作用。桑叶可以降低 3T3-L1 脂肪细胞 IR 模型 TNF- α 表达水平,桑叶含药血清培养后,细胞 InsR, IRS1, GLUT4 蛋白的表达上调, p-IRS1 表达下调,表明桑叶可以抑制脂肪细胞分泌 TNF- α 表达的同时,可以上调 InsR 的表达,促进 IRS1 蛋白表达,并抑制其丝氨酸磷酸化,促进 GLUT4 蛋白的活化,从而起到改善细胞 IR 的作用。

[参考文献]

[1] 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4): 292-344.

[2] 年雪,王小丽,于东升,等. 小檗碱通过抑制 Traf2-MEKK1-MEK-ERK 通路改善 TNF- α 诱导的胰岛素抵抗[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(36): 7001-7007.

[3] 季涛,宿树兰,郭盛,等. 基于 α -葡萄糖苷酶抑制活性评价桑叶多组分药效相互作用研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(11): 1999-2006.

[4] 陈群,苏傲蕾,黄正团. 糖脉康颗粒对 2 型糖尿病气阴两虚夹瘀证大鼠 CRP 及脏器指数的影响[J]. 光明中医, 2017, 32(23): 3393-3396.

[5] 朱群. 降糖饮治疗 2 型糖尿病 60 例[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(14): 36-37.

[6] 刘洪凤,韩智学,聂影,等. 桑叶多糖对糖尿病肾病大鼠肾脏纤维化的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(14): 3959-3960.

[7] 杨桂枝,高小平,晏菊芳,等. 地塞米松和胰岛素诱导 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的分子机理[J]. 西南师范大学学报:自然科学版, 2003(3): 460-464.

[8] 张敬升,王晓婉,张广霞,等. 小檗碱对 3T3-L1 前脂肪细胞及其胰岛素抵抗模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(22): 145-149.

[9] 王丽静,张尉,刘小莺,等. 地塞米松诱导 3T3-L1 脂肪

细胞胰岛素抵抗模型的建立[J]. 福建医科大学学报, 2007(3): 282-284.

[10] 刘晓华,江湖,李海星,等. 胰岛素诱导 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型的建立[J]. 食品科学, 2012, 33(19): 249-253.

[11] 姜廷良,霍海如,李兰芳,等. 15 种中西药物含药血清对大鼠成骨细胞增殖成熟的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2002(4): 65-68.

[12] 陆菊明. 胰岛素抵抗与 2 型糖尿病的发生发展[J]. 药品评价, 2014, 11(23): 12-15, 40.

[13] 袁群,俞璐,邵致格,等. 糖脉康颗粒对 2 型糖尿病患者胰岛素敏感性的临床疗效观察[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(12): 1099-1102.

[14] 陆施婷,陈清光,徐佩英,等. 基于中医传承辅助平台探讨丁学屏诊治糖尿病的临床证经验及用药规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 198-205.

[15] Oh D Y, Morinaga H, Talukdar S, et al. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice [J]. Diabetes, 2012, 61(2): 346-354.

[16] Olefsky J M, Glass C K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance [J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72(72): 219-246.

[17] 王风华. 2 型糖尿病患者 ANGPTL3、TNF- α 、FFA 水平变化及其与胰岛素抵抗相关性研究[D]. 济南: 山东大学, 2008.

[18] 郭锡熔,陈荣华,费莉,等. 神经肽 YY5 受体反义寡核苷酸对肥胖大鼠血清胰岛素与 C 肽水平及脂肪组织 TNF- α 基因 mRNA 表达的影响[J]. 中华儿科杂志, 2002(11): 30-34.

[19] Fujishiro M, Gotoh Y, Katagiri H, et al. Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes [J]. Mol Endocrinol, 2003, 17(3): 487-497.

[20] Uysal K T, Wiesbrock S M, Marino M W, et al. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function [J]. Nature, 1997, 389(6651): 610-614.

[21] 唐锋,梁少瑜,陈飞龙,等. 血清药物化学和血清药理学相结合的方法探讨麻黄附子细辛汤抗炎和免疫抑制的物质基础[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(10): 1971-1976.

[22] 唐明敏,田恒康,杨文宁,等. 桑叶水提物及其含药血清化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(9): 25-29.

[23] 江正菊,宁林玲,胡霞敏,等. 桑叶总黄酮对高脂诱导大鼠高血脂及高血糖的影响[J]. 中药材, 2011, 34(1): 108-111.

[责任编辑 孙丛丛]