

[文章编号] 1000-4718(2009)10-2044-04

· 短篇论著 ·

# 大黄素和小檗碱改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的机制研究

王慧莲, 王琦<sup>△</sup>, 尹春梅

(山西医科大学第二临床医学院消化内科, 山西 太原 030001)

**[摘要]** 目的: 探讨大黄素和小檗碱对高浓度游离脂肪酸(FFA)诱导 HepG2 细胞的胰岛素抵抗(IR)的影响及机制。方法: 用高浓度的 FFA 培养 HepG2 细胞, 诱导为 IR 的细胞模型, 测定培养液中葡萄糖浓度及细胞内糖原含量作为模型鉴定指标; MTT 法分别检测大黄素和小檗碱的最适药物浓度; RT-PCR 方法检测细胞中脂联素受体 2(AdipoR2)、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)的 mRNA 表达。结果: (1) IR 的模型组培养液中葡萄糖含量明显高于正常对照组, 细胞内糖原含量显著减少, AdipoR2 和 PPAR $\gamma$  mRNA 表达下降, PEPCK mRNA 表达升高( $P < 0.01$ )。 (2) 培养液中分别加入大黄素、小檗碱和吡格列酮可明显改善 IR。结论: 高浓度的 FFA 培养 HepG2 细胞, 能够诱导 IR, 大黄素、小檗碱能显著改善 FFA 引起的 IR, 并且可能通过 AdipoR2、PPAR $\gamma$ 、PEPCK 而起作用。

**[关键词]** 胰岛素抵抗; 大黄素; 小檗碱; 受体, 脂联素

**[KEY WORDS]** Insulin resistance; Emodin; Berberine; Receptors, adiponectin

**[中图分类号]** R575.5 **[文献标识码]** A

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的病理生理基础, 改善 IR 对治疗 NAFLD 有着至关重要的作用。脂联素受体 2 (adiponectin receptor, AdipoR2)、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferative activated receptor, gamma, PPAR $\gamma$ ) 和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) 是肝脏 IR 形成的重要因素。大黄素、小檗碱作为中药大黄和黄连的主要有效成分具有明显减轻 IR 大鼠肝细胞的脂肪变性<sup>[1,2]</sup>。然而, 在细胞水平研究大黄素、小檗碱通过上述 3 个指标改善 IR 的作用, 国内外未见报道。基于以上研究, 我们应用高浓度的游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 诱导培养 HepG2 细胞, 建立 IR 的细胞模型, 并进一步观察大黄素和小檗碱对该细胞模型 IR 的影响, 同时测定上述 3 个指标的变化, 以阐明该影响发生的机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

HepG2 细胞购自中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物研究所; 软脂酸、小檗碱、大黄素购于 Sigma; RNA 提取试剂盒购于 Gentra; PCR 反应试剂盒购于 Promega。

### 2 HepG2 细胞的培养

在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中培养 HepG2 细胞, 将增殖状态良好的细胞用胰酶消化, 对其进行

传代并置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中。

### 3 IR - HepG2 细胞模型的建立与分组

IR 细胞模型建立参照文献<sup>[3,4]</sup>。单层贴壁 HepG2 细胞用 FFA (0.40 mmol/L) 培养 24 h 后, 于 4 °C 条件下用预冷 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞 3 次, 即成为具有 IR 的细胞模型。鉴定模型成功后, 分别加入大黄素、小檗碱、吡格列酮为大黄素组、小檗碱组、吡格列酮组。实验分组 (5 组): 正常组、模型组、大黄素组、小檗碱组和吡格列酮组。

### 4 模型鉴定

取培养液采用葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖含量 (g/g protein)。裂解细胞提取蛋白质, 用 Bradford 微量法测定蛋白浓度。培养液中葡萄糖含量 = 样品吸光度值/标准管吸光度值  $\times$  标准品浓度 (g/L)  $\times$  1 L/g protein。细胞内糖原含量测定: 蒽酮法测定细胞内糖原含量 [ $10^{-2} \times \text{g}/(\text{g protein})$ ], 糖原含量 = 样品吸光度值/标准吸光度值  $\times$  标准品糖原含量 ( $10^{-2} \times \text{g})/\text{g protein}$ 。

### 5 MTT 法筛选大黄素和小檗碱的工作浓度

调节大黄素和小檗碱浓度分别为 0.1、5、10、15、20、25、30  $\mu\text{mol/L}$ , 用 MTT 法选择细胞活力在 90% 以上的浓度为工作浓度, 分别在酶标仪 570 nm、490 nm 处测各孔吸光度 (A) 值。细胞存活率 (%) = 实验组 A 值/对照组 A 值  $\times$  100%。

### 6 RT-PCR 检测各组细胞中 AdipoR2、PPAR $\gamma$ 、PEPCKmRNA 的表达

**6.1 细胞总 RNA 的提取** Trizol 一步法提取细胞总 RNA。操

[收稿日期] 2008-11-25

[修回日期] 2009-04-17

△通讯作者 E-mail: wangqiqi72000@yahoo.com.cn

作按说明书进行。紫外分光光度仪测定 RNA 的  $A_{260}/A_{280}$  值。

**6.2 cDNA 第 1 链的合成** 逆转录反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 其中  $5 \times$  逆转录缓冲液 4  $\mu\text{L}$ , 核糖核酸酶抑制剂 0.4  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTP 2  $\mu\text{L}$ , 寡聚 T 引物 0.4  $\mu\text{L}$ , 细胞总 RNA 5  $\mu\text{g}$ , M-MLV (逆转录酶) 1  $\mu\text{L}$  (200 U), 用 DEPC-双蒸水补充至 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件为 42  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h, 然后 70  $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min 以灭活逆转录酶。

**6.3 RT-PCR** 各个引物设计是根据 GenBank 库中的 cDNA 序列进行: AdipoR2 上游引物 5' - TCCAGCAAAAGGTGGGATCT - 3', 下游引物 5' - GGCTTCTGTCCAAATGGCCA - 3', 扩增片段 219 bp。PPAR $\gamma$  上游引物 5' - AAAGAAGC-CAACTAAACC - 3', 下游引物 5' - CTTCCATTACG-GAGAGATCC - 3', 扩增片段 150 bp。PEPCK 上游引物 5' - GCTCTGAGGAGGAGAATGC - 3', 下游引物 5' - TGCTCTT-GGGTGACGATAAC - 3', 扩增片段 154 bp。内参照为 GAPDH, 其上游引物 5' - TGAACGGGAAGCTCACTGG - 3', 下游引物 5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTA - 3', 扩增片段 307 bp。反应体系 25  $\mu\text{L}$ , 其中 buffer 20.5  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶 1.5  $\mu\text{L}$  (5U), 0.2  $\mu\text{mol/L}$  上游引物及下游引物各 1  $\mu\text{L}$ 。扩增条件: 首次 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 然后 94  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s (PPAR $\gamma$  退火温度为 52  $^{\circ}\text{C}$ ), 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 循环 35 次, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。取扩增产物 5  $\mu\text{L}$ , 用 2% 的琼脂糖凝胶 (EB 浓度为 0.5 mg/L) 电泳, 以 100 bp 为分子量标准, 在 300 nm 紫外光下摄影, 通过图像分析软件进行分析。内参照也采用上述同样的实验方法进行分析。表达水平用平均灰度值与内参的比值表示。

**7 统计学处理**

使用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理; 每组数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 进行单因素方差分析, 组间两两比较用 SNK 检验。

**结 果**

**1 MTT 实验筛选大黄素和小檗碱的工作浓度**

HepG2 细胞存活率随着大黄素、小檗碱浓度的增高而降低, 当大黄素、小檗碱浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  时细胞存活率分别为 (92.52  $\pm$  4.05)%、(92.79  $\pm$  3.86)%, 选择细胞存活率大于 90% 以上的浓度为工作浓度, 故选择 10  $\mu\text{mol/L}$  为大黄素和小檗碱的工作浓度, 见图 1、2。

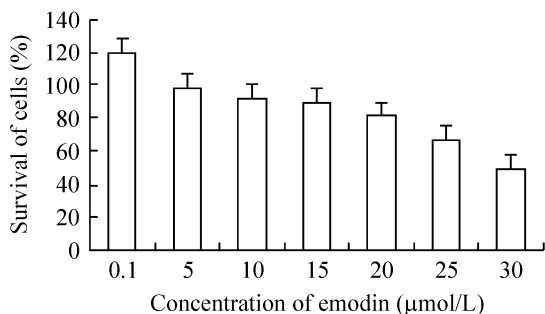


Fig 1 Effect of different concentrations of emodin on the survival rate of HepG2 cells.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ .

图 1 不同浓度大黄素对 HepG2 细胞存活率的影响

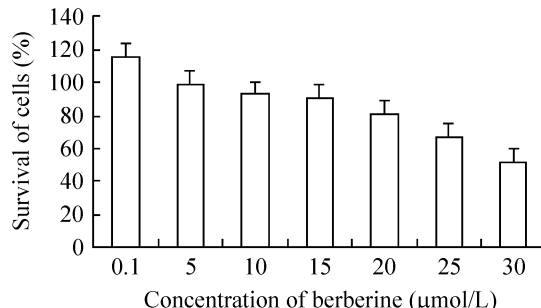


Fig 2 Impact of berberine at different concentrations on the survival rate of HepG2 cells.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ .

图 2 不同浓度小檗碱对 HepG2 细胞存活率的影响

**2 培养液中葡萄糖含量及细胞内糖原含量变化**

IR 组培养液中葡萄糖含量较正常对照组明显升高, 细胞内糖原含量降低; 分别加入大黄素 (10  $\mu\text{mol/L}$ )、小檗碱 (10  $\mu\text{mol/L}$ )、吡格列酮 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 后, 培养液中葡萄糖含量较 IR 模型组显著降低, 细胞内糖原含量升高 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。

表 1 各组培养液中葡萄糖含量及细胞内糖原含量

Tab 1 Contents of glucose in culture medium and HepG2 intracellular glycogen in different groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Group	Contents of glucose in culture medium (g/g protein)	Contents of HepG2 intracellular glycogen ( $10^{-2} \times \text{g/g protein}$ )
Normal	8.87 $\pm$ 0.28 **	13.00 $\pm$ 0.21 **
IR	12.07 $\pm$ 0.23	8.89 $\pm$ 0.22
Emodin treatment	8.80 $\pm$ 0.17 **	12.86 $\pm$ 0.41 **
Berberine treatment	8.82 $\pm$ 0.19 **	12.88 $\pm$ 0.41 **
Pioglitazone treatment	8.87 $\pm$ 0.15 **	12.91 $\pm$ 0.30 **

\*\*  $P < 0.01$  vs IR group.

**3 细胞中 AdipoR2、PPAR $\gamma$ 、PEPCK mRNA 表达水平比较**

正常 HepG2 细胞可表达 AdipoR2、PPAR $\gamma$ 、PEPCK, IR 组 AdipoR2、PPAR $\gamma$  mRNA 表达减少, PEPCK mRNA 表达增高。分别加入大黄素 (10  $\mu\text{mol/L}$ )、小檗碱 (10  $\mu\text{mol/L}$ )、吡格列酮 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 后, AdipoR2、PPAR $\gamma$  mRNA 表达增高, PEPCK mRNA 表达减少 ( $P < 0.01$ ), 见表 2 及图 3-5。

表 2 各组细胞中 AdipoR2、PPAR $\gamma$ 、PEPCK 的 mRNA 表达

Tab 2 Expression of AdipoR2, PPAR $\gamma$ , PEPCK mRNA in different groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Group	Expression of AdipoR2 mRNA	Expression of PPAR $\gamma$ mRNA	Expression of PEPCK mRNA
Normal	1.596 $\pm$ 0.063 **	1.256 $\pm$ 0.032 **	0.976 $\pm$ 0.029 **
IR	0.808 $\pm$ 0.047	0.648 $\pm$ 0.024	1.618 $\pm$ 0.064
Emodin treatment	1.550 $\pm$ 0.058 **	1.222 $\pm$ 0.040 **	0.931 $\pm$ 0.038 **
Berberine treatment	1.571 $\pm$ 0.081 **	1.256 $\pm$ 0.036 **	0.950 $\pm$ 0.045 **
Pioglitazone treatment	1.585 $\pm$ 0.042 **	1.259 $\pm$ 0.040 **	0.976 $\pm$ 0.030 **

\*\*  $P < 0.01$  vs IR group.

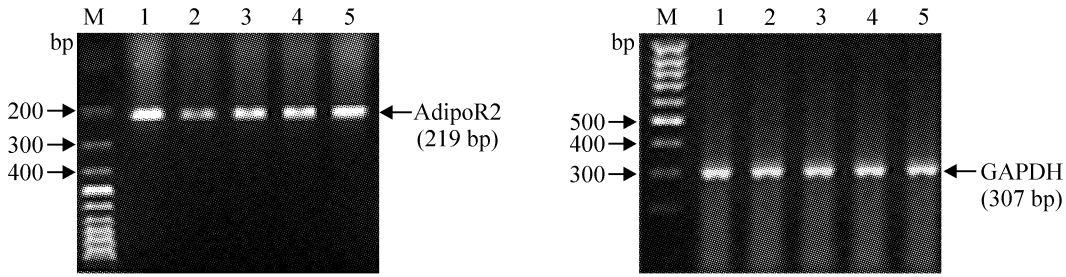


Fig 3 Expression of AdipoR2 and GAPDH mRNA in different groups. M:marker; Lane 1: normol; Lane 2: IR; Lane 3: emodin treatment; Lane 4: berberine treatment; Lane 5: pioglitazone treatment.

图3 各组中 AdipoR2 及 GAPDHmRNA 的表达

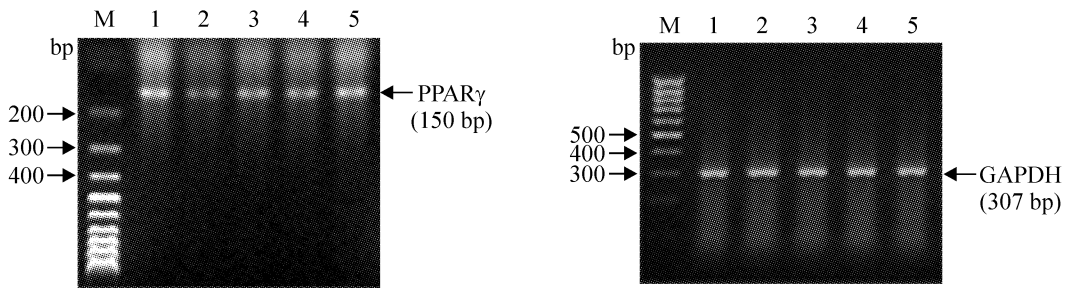


Fig 4 Expression of PPAR $\gamma$  and GAPDH mRNA in different groups. M:marker; Lane 1: normol; Lane 2: IR; Lane 3: emodin treatment; Lane 4: berberine treatment; Lane 5: pioglitazone treatment.

图4 各组中 PPAR $\gamma$  及 GAPDHmRNA 的表达

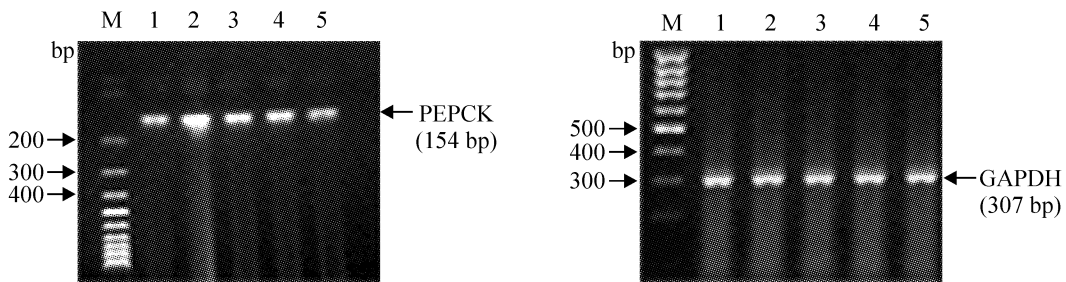


Fig 5 Expression of PEPCK and GAPDH mRNA in different groups. M:marker; Lane 1: normol; Lane 2: IR; Lane 3: emodin treatment; Lane 4: berberine treatment; Lane 5: pioglitazone treatment.

图5 各组中 PEPCK 及 GAPDHmRNA 的表达

### 讨 论

NAFLD 是一种无过量饮酒史,以肝细胞脂肪变性和脂质贮积为特征的临床病理综合征,目前学术界普遍认为 IR 是肝脏脂质贮积的首要原因,因此改善肝脏 IR 对防治 NAFLD 起着关键的作用。而中医药以其疗效稳定持久、价格便宜、不良反应小等优势,在治疗 IR 方面取得一定进展,但查阅文献大黄素和小檗碱改善肝脏 IR 的分子生物学机制未见报道,加之 AdipoR2、PPAR $\gamma$ 、PEPCK 是 IR 重要的致病因素<sup>[5,6]</sup>。故我们以 AdipoR2、PPAR $\gamma$ 、PEPCK 为切入点研究中药改善肝脏 IR 的分子生物学机制。

我们的研究发现:高浓度的 FFA 可诱导为 IR - HepG2 细胞模型,模型组培养液中葡萄糖含量明显高于正常组,而细胞内糖原含量显著降低,而加入大黄素和小檗碱后能明显降低培养液中葡萄糖含量,升高细胞内糖原含量,由此可见二者可显著改善 FFA 诱导的 IR - HepG2 细胞模型。另外,模型组中 AdipoR2、PPAR $\gamma$ mRNA 表达减少,PEPCKmRNA 表达增

高,提示 AdipoR2、PPAR $\gamma$ 、PEPCK 参与肝脏 IR 的形成。大黄素组、小檗碱组和吡格列酮组 AdipoR2 和 PPAR $\gamma$ mRNA 的表达增加,PEPCKmRNA 表达减少。推测大黄素、小檗碱有类似西药吡格列酮的作用,二者可能为 AdipoR2 和 PPAR $\gamma$  的激动剂,并且可能通过 AdipoR2、PPAR $\gamma$  和 PEPCK 改善 IR。此外也进一步提示 AdipoR2 很可能是 PPAR $\gamma$  作用的新靶点。结合我们前期的实验结果,大黄素和小檗碱可明显阻断肝脏 IR 的形成,我们可以得出如下结论:单味中药有效成分大黄素和小檗碱可通过 AdipoR2、PPAR $\gamma$  和 PEPCK 在一定程度上治疗肝脏 IR。

### [参 考 文 献]

[1] Dang SS, Zhang X, Jia XL, et al. Protective effects of emodin and astragalus polysaccharides on chronic hepatic injury in rats [J]. Chin Med, 2008, 121 (11): 1010 - 1014.