

滇越金线兰中 2 个丁酸衍生物对 HepG2 细胞胰岛素抵抗改善作用的实验研究

赵 林¹, 朱 恩², 蔡金艳²(1. 广东药学院生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006; 2. 广东药学院药科学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 建立 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型, 并用于评价滇越金线兰中 2 个丁酸衍生物对胰岛素敏感性的改善作用。 **方法** 采用高糖高浓度胰岛素诱导 HepG2 细胞建立肝细胞胰岛素抵抗模型, 研究滇越金线兰 2 个丁酸衍生物对胰岛素抵抗模型细胞葡萄糖摄取和细胞活力的影响。 **结果** 胰岛素浓度为 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞的葡萄糖摄取量最小, 为合适的模型复制浓度。与模型组比较, 2 个丁酸衍生物都能显著增加胰岛素抵抗的 HepG2 细胞对葡萄糖的吸收, 葡萄糖摄取量分别增加了 76.7 % 和 77.8 %, 半数有效浓度(EC_{50})分别为 9.372 和 10.854 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对胰岛素抵抗的 HepG2 细胞的葡萄糖摄取呈现较好的促进作用。 **结论** 2 个丁酸衍生物对胰岛素具有增敏活性, 能有效促进胰岛素抵抗细胞对葡萄糖的摄取和利用。

关键词: 滇越金线兰; 丁酸衍生物; HepG2 细胞; 胰岛素抵抗; 葡萄糖摄取

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)04-0393-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.002

Effect of Two Butanoic Acid Derivatives from *Anoectochilus chapaensis* on Ameliorating Insulin Resistance in HepG2 Cells

ZHAO Lin¹, ZHU En², CAI Jinyan²(1. School of Life Science and Bio-pharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish an insulin-resistance model of HepG2 cells and to investigate the effect of two natural butanoic acid derivatives from *Anoectochilus chapaensis* on insulin resistance. **Methods** HepG2 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with high glucose and high-concentration insulin to optimize the conditions for the establishment of insulin-resistance cell model. Glucose consumption in the cells was determined by glucose oxidase method. The effects of the tested samples at different concentrations on the vitality of the insulin resistant cells were evaluated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) staining. **Results** Insulin resistance cell model was induced successfully when the insulin concentration was at $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Compared with the model group, the glucose uptake was significantly increased by 76.7 % and 77.8 %, and the EC_{50} was 9.372 and 10.854 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in groups treated with metformin and the butanoic acid derivatives ($P < 0.01$), respectively. **Conclusion** The two natural butanoic acid derivatives from *Anoectochilus chapaensis* may be good potential candidates focusing on improving the state of insulin resistance, and promoting the intake and utilization of glucose by the insulin-resistance HepG2 cells.

Keywords: *Anoectochilus chapaensis*; Butanoic acid derivatives; HepG2 cells; Insulin resistance; Glucose uptake

收稿日期: 2013-12-05

作者简介: 赵林, 男, 博士, 研究方向: 中药免疫药理。Email: biozhl@126.com。通讯作者: 蔡金艳, 副教授, 研究方向: 从事天然药物活性成分和创新药物研究。Email: caijy928@163.com。

基金项目: 广东省医学科研基金项目 (B2011150); 国家自然科学基金项目 (81001628); 广东省自然科学基金项目 (S2013010014771)。

糖尿病是由于胰岛素在体内的绝对或相对不足而引起糖、脂肪及蛋白质代谢紊乱的疾病,主要分为胰岛素依赖型糖尿病(T1DM)和非胰岛素依赖型糖尿病(T2DM),其中T2DM约占90%以上^[1],以胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)为主要特征。因此,提高胰岛素敏感性、减轻胰岛素抵抗是治疗和预防T2DM和延缓糖尿病发展的关键。建立胰岛素抵抗细胞模型可以在细胞及分子水平深入分析其发生机制,体外筛选防治胰岛素抵抗药物。本研究采用的HepG2细胞源于人的肝胚胎瘤细胞,是一种表型与肝细胞极为相似的肝胚胎瘤细胞株,在高水平胰岛素条件下,细胞表面胰岛素受体的数目下降,下降程度与胰岛素水平及刺激持续的时间呈现正相关^[2]。因此,HepG2细胞可作为胰岛素抵抗的理想细胞模型,已被广泛用在细胞水平筛选改善胰岛素敏感性的活性化合物。

滇越金线兰为兰科开唇兰属植物(*Anoectochilus Chapeansis* Gagnep)的干燥全草,有清凉解毒、滋阴降火、消炎止痛之功效^[3]。本课题组通过对野生滇越金线兰的化学成分研究^[4],鉴定了两个糖苷化的丁酸衍生物,分别为kinsenoside, 3(R)-O- β -D-吡喃葡萄糖基-丁酸(γ)内酯(I)和4-O- β -D-吡喃葡萄糖基-丁酸甲酯(II)。前期曾对胰岛素抵抗的关键酶蛋白酪氨酸磷酸酶1B(PTP1B)体外抑制活性筛选^[5],结果显示两化合物对PTP1B有不同程度的抑制作用,尤其kinsenoside对PTP1B有非常显著的抑制作用,活性强于阳性对照药。而PTP1B已公认为是治疗2型糖尿病胰岛素抵抗一个重要的潜在靶点^[6],通过抑制PTP1B可增加胰岛素和瘦蛋白的活性。本研究建立HepG2细胞胰岛素抵抗模型,进一步探讨滇越金线兰中2个丁酸衍生物是否能改善细胞对胰岛素的敏感性,促进细胞对葡萄糖的摄取。

1 材料与方法

1.1 受试样品 丁酸衍生物I(kinsenoside, 3(R)-O- β -D-吡喃葡萄糖基-丁酸(γ)内酯)和丁酸衍生物II(4-O- β -D-吡喃葡萄糖基-丁酸甲酯),以滇越金线兰药材分离纯化制得,纯度在98%以上。

1.2 细胞及试剂 HepG2细胞由中山大学法学院研究所提供;结晶牛胰岛素(批号:1-5500),噻唑蓝

(MTT,批号:M2128),美国Sigma公司;含酚红高糖培养基(DMEM,葡萄糖含量为25 mmol·L⁻¹),美国Hyclone公司,批号:NYB0805;0.25%胰蛋白酶,美国Gibco公司,批号:1255886;葡萄糖测定试剂盒,中深百控生物科技有限公司,批号:201307133101;二甲双胍(metformin),北京双鹤药业。

1.3 仪器 MK3型全自动酶标仪,芬兰雷勃公司;CO₂培养箱(Thermo model3111)、离心机(Thermo CR3i),美国Thermo公司;倒置显微镜(Leica DFC420),德国Leica公司。

1.4 HepG2细胞胰岛素抵抗模型的建立

1.4.1 HepG2细胞培养 HepG2细胞复苏后用含10%灭活FBS的DMEM培养液转入25 mL培养瓶中,在5%CO₂、37℃条件下培养。待细胞长满后,倾去培养基,用0.25%胰蛋白酶消化,每3天按1:3比例传代1次,待细胞从复苏适应2周后,在对数生长期用于试验。

1.4.2 胰岛素溶液的配制 精密称取胰岛素适量,溶解于羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES)缓冲溶液(136 mmol·L⁻¹氯化钠,4.7 mmol·L⁻¹氯化钾,1.25 mmol·L⁻¹硫酸镁,1.2 mmol·L⁻¹氯化钙,0.2%牛血清蛋白,20 mmol·L⁻¹HEPES, pH 5.4),超声、涡旋使其溶解,定容。用时稀释成所需的浓度。

1.4.3 HepG2细胞胰岛素抵抗模型的建立 参考文献^[8-11]方法并加以改进。将处于对数生长期的细胞消化后,以每孔3000个细胞接种于96孔培养板中,继续培养。待细胞贴壁长至80%后,分为空白对照组和不同浓度的胰岛素处理组,每组设6个复孔;各组加入含1%FBS饥饿12 h,使细胞同步化;空白对照组加入不含胰岛素的培养液(含1%FBS),模型组加入新配制的胰岛素浓度分别为10⁻⁵, 5×10⁻⁶, 10⁻⁶, 5×10⁻⁷, 10⁻⁷, 5×10⁻⁸, 10⁻⁸, 5×10⁻⁹, 10⁻⁹, 5×10⁻¹⁰, 10⁻¹⁰, 5×10⁻¹¹ mol·L⁻¹的培养液(含1%FBS),37℃、5%CO₂培养箱中孵育24 h,用葡萄糖测定试剂盒^[12]检测培养液上清中的葡萄糖含量,通过数据曲线分析确定细胞生长的最佳复制模型浓度和最佳生长浓度。

1.4.4 12 h模型稳定性考察 按照1.4.3项下建立模型,24 h后弃去上清液,空白对照组和模型组都加入含最佳生长胰岛素浓度的培养基(含1%FBS)孵育12 h,葡

萄糖测定试剂盒检测培养液上清液中的葡萄糖含量，观察在 12 h 内模型是否稳定维持胰岛素抵抗特性。

1.5 样品对胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖摄取和细胞活力的影响 将处于对数生长期的细胞消化后，以每孔 3000 个细胞接种于 96 孔培养板中，继续培养。待细胞贴壁长至 80 % 后，用含 1 % FBS 的 DMEM 高糖培养基饥饿细胞 12 h 后，分为空白对照组，模型组，不同浓度的丁酸衍生物组(每组设 4 个复孔)和二甲双胍阳性对照组。空白对照组加入含胰岛素浓度 $10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基(含 1 % FBS)，模型组和丁酸衍生物组加入含胰岛素浓度为 $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基(含 1 % FBS)孵育 24 h 后，吸取培养液。丁酸衍生物组及二甲双胍阳性对照组分别加入 100, 70, 50, 30, 20, 10 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的丁酸衍生物和二甲双胍，胰岛素浓度为 $10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基(含 1 % FBS)。培养 12 h 后检测培养液中的葡萄糖含量和细胞活力。

1.6 统计学处理方法 采用 SPSS17.0 统计软件，计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的胰岛素对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响 与空白对照组比较，胰岛素处理浓度在 $0\sim 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围，葡萄糖的摄取量逐渐增加，到浓度为 $10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时葡萄糖的摄取量较空白对照组增加了 49.5 %；但是随着胰岛素浓度的继续增加，细胞对葡萄糖的摄取逐渐减少。胰岛素浓度 $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基中葡萄糖摄取量较 $10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时减少 23.8%，差异有统计学意义($P = 0.002$)。提示细胞生长的最佳胰岛素浓度为 $10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，而诱发 HepG2 细胞产生胰岛素抵抗模型的胰岛素最佳浓度为 $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，见表 1。

2.2 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型 12 h 内的稳定性研究 见表 1。在胰岛素浓度较低时，细胞对葡萄糖的摄取量随着胰岛素浓度的增加而增加；但到一定浓度 ($5 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 时，细胞对葡萄糖的摄取随着胰岛素浓度的增加而开始减少；当达到最佳建模浓度 ($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 时，葡萄糖的摄取量接近最低值，说明随着胰岛素浓度继续增加，细胞对胰岛素的敏

表 1 不同浓度胰岛素处理组细胞的葡萄糖摄取量($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of different concentrations of insulin on glucose uptake of HepG2 cells

胰岛素浓度 / $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	葡萄糖摄取量/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	
	造模后	稳定性考察 12 h 后
10^{-5}	$4.136 \pm 0.481^{**}$	$3.029 \pm 0.574^{*}$
5×10^{-6}	$3.815 \pm 0.334^{**}$	$2.827 \pm 0.187^{*}$
10^{-6}	$3.817 \pm 0.356^{**}$	$2.835 \pm 0.321^{*}$
5×10^{-7}	$3.666 \pm 0.374^{**}$	$2.865 \pm 0.659^{*}$
10^{-7}	$3.244 \pm 0.381^{**}$	$3.286 \pm 0.178^{*}$
5×10^{-8}	$3.912 \pm 0.337^{**}$	3.851 ± 0.474
10^{-8}	$3.921 \pm 0.585^{**}$	4.389 ± 0.517
5×10^{-9}	$3.935 \pm 0.264^{**}$	4.359 ± 0.325
10^{-9}	$4.260 \pm 0.177^{**}$	$5.254 \pm 0.211^{**}$
5×10^{-10}	$4.046 \pm 0.165^{**}$	$4.942 \pm 0.748^{**}$
10^{-10}	$3.968 \pm 0.374^{**}$	$4.808 \pm 0.215^{**}$
5×10^{-11}	$3.645 \pm 0.361^{**}$	4.192 ± 0.191
0	2.848 ± 0.360	3.723 ± 0.399

注：与空白对照组比较， $^{*}P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$ 。

感性反而降低。该结果与 2.1 项下的变化规律基本一致，说明 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型复制成功，并且在 12 h 的实验期间能稳定维持胰岛素抵抗特性。

2.3 样品对 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型葡萄糖摄取和细胞活力的影响 见表 2。模型组对葡萄糖的摄取量较空白对照组明显减少。丁酸衍生物样品和阳性药处理组都能增加葡萄糖的摄取量，与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。样品 I 的浓度达到 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时细胞对葡萄糖的摄取比模型组增加了 76.7 %，在一定的浓度范围内呈现良好的剂量依赖性。计算得样品 I 对葡萄糖摄取的半数有效浓度(EC_{50})为 $9.372 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。样品 II 浓度小于 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，葡萄糖的摄取量逐渐增加，最高时葡萄糖摄取量较模型组增加了 77.8 %。但当样品浓度进一步增加时，葡萄糖的摄取量反而降低。样品 II 的 EC_{50} 为 $10.854 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

与模型组比较，样品 I 和 II 分别在浓度小于 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，细胞 A_{490} 变化较小，不影响细胞的生长；但是当样品浓度较高时，细胞生长受到显著影响，细胞的数量急剧减少，从而导致葡萄糖摄取量的减少。

3 讨论

HepG2 细胞株是国内外应用较广泛的研究胰岛素抵抗机制的细胞模型^[12-14]。本试验结果表明，用胰岛

表 2 样品对 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型葡萄糖摄取和细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)
Table 2 Comparison of glucose uptake and vitality of the insulin resistant HepG2 cells in different groups

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	葡萄糖摄取量 / $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$			MTT 结果(A_{490})		
		I	II	二甲双胍	I	II	二甲双胍
空白对照组		2.774 $\pm$ 0.370	2.774 $\pm$ 0.370	4.395 $\pm$ 0.288	0.803 $\pm$ 0.064	0.803 $\pm$ 0.064	1.222 $\pm$ 0.376
模型组		2.356 $\pm$ 0.414	2.356 $\pm$ 0.414	3.686 $\pm$ 0.225	1.242 $\pm$ 0.058	1.232 $\pm$ 0.058	2.185 $\pm$ 0.376
给药组	100	3.579 $\pm$ 0.358**	3.227 $\pm$ 0.431**	4.500 $\pm$ 0.290**	0.976 $\pm$ 0.074	1.013 $\pm$ 0.056	1.812 $\pm$ 0.499
	70	3.372 $\pm$ 0.191**	3.201 $\pm$ 0.686**	4.816 $\pm$ 0.545**	0.953 $\pm$ 0.057	1.056 $\pm$ 0.075	1.672 $\pm$ 0.539
	50	3.986 $\pm$ 0.145**	4.188 $\pm$ 0.455**	4.217 $\pm$ 0.270**	1.265 $\pm$ 0.013	1.059 $\pm$ 0.091	1.750 $\pm$ 0.487
	30	4.160 $\pm$ 0.618**	4.022 $\pm$ 0.568**	4.550 $\pm$ 0.511**	1.191 $\pm$ 0.061	1.167 $\pm$ 0.090	1.972 $\pm$ 0.394
	20	4.031 $\pm$ 0.319**	4.030 $\pm$ 0.267**	3.991 $\pm$ 0.560**	1.242 $\pm$ 0.064	1.170 $\pm$ 0.081	1.909 $\pm$ 0.686
	10	3.525 $\pm$ 0.543**	3.518 $\pm$ 0.297**	4.193 $\pm$ 0.167**	1.260 $\pm$ 0.059	1.220 $\pm$ 0.066	1.737 $\pm$ 0.215

注：与模型组比较，** $P < 0.01$ 。

素处理 HepG2 细胞，在浓度为 $10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时葡萄糖的摄取最大，在 $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时葡萄糖的摄取最少，表明 HepG2 细胞产生胰岛素抵抗的最佳胰岛素浓度为 $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，细胞最适生长胰岛素浓度为 $10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过 12 h 稳定性试验考察，验证了该模型在 12 h 内能维持对胰岛素抵抗的特性，表明胰岛素抵抗细胞模型复制成功。

滇越金线兰中 2 个丁酸衍生物对细胞的实验结果表明，样品 I 和 II 都能显著增加胰岛素抵抗的 HepG2 细胞对葡萄糖的吸收，葡萄糖摄取量分别增加了 76.7 %和 77.8 %， EC_{50} 分别为 9.372 和 10.854 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。但是在较高浓度时，2 样品均对处于胰岛素抵抗状态的细胞活力有一定的影响。本研究在前期体外 PTP1B 活性抑制试验筛选的基础上^[9]，采用胰岛素抵抗细胞模型进一步证实了滇越金线兰 2 个丁酸糖苷化的活性化合物对胰岛素有良好的增敏作用，促进葡萄糖的吸收，有望作为潜在的治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗的候选化合物加以研究与开发。

参考文献：

[1] Willians JF, Olefsky JM. Defecetive insulin receptor function in down-regulated HepG2 cell[J]. Endocrinology, 1990, 127(4): 1706-1717.
[2] Luo Z, Zhang Y, Li F, et al. Resistin induces insulin resistance by both AMPK-dependent and AMPK-independent mechanisms in HepG2 cells[J]. Endocrine, 2009, 36(1):60-69.
[3] 谢宗万. 全国中草药汇编(下册)[M]. 北京：人民卫生出版社，1992：392-393.

[4] 蔡金艳，宫立孟，张勇慧，等. 金线莲化学成分的研究[J]. 中药材，2008，31(3)：370-372.
[5] 蔡金艳，张锦文，唐菲，等. 野生金线莲中两个丁酸苷类化合物的 PTP1B 抑制活性[J]. 中药药理与临床，2010，26(4)：16-18.
[6] 倪晓东，张惠斌，周金培. 蛋白质酪氨酸磷酸酯酶 1B(PTP1B) 抑制剂研究进展[J]. 药学与临床研究，2007，15(4)：259-263.
[7] 陈秋，朱玉霞，苏言辉，等. 吡格列酮对胰岛素抵抗 HepG2 细胞胰岛素受体底物表达的影响[J]. 山东医药，2009，49(17)：971-976.
[8] Chen Q, Xia YP, Qiu ZY. Establishment of insulin resistant HepG2 cell model and pharmacological evaluation of pioglitazone [J]. Chin Pharmacol Bull, 2006, 22(2): 248-251.
[9] Hwang JT, Park IJ, Lee SK, et al. Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activate protein kinase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338(2)：694-699.
[10] Ma YM, Tao RY, Liu Q, et al. PTP1B inhibitor improves both insulin resistance and lipid abnormalities in vivo and in vitro[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 357: 65-72.
[11] 杨桂枝，高小平，晏菊芳，等. GOD-POD 法微量测定方法的建立及其在 3T3L-1 脂肪细胞和 HepG2 细胞糖摄取中的应用[J]. 四川解剖学杂志，2003，11(1)：12-15.
[12] 李秀丽，贺嵩敏，朱莹，等. HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的建立及鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志，2012，31(6)：691-694.
[13] 方飞，吴新荣，罗明俐，等. HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的建立及在筛选桑叶有效部位中的应用[J]. 医药导报，2013，19(5)：203-207.
[14] 张汝学，贾正平，李茂星，等. 体外胰岛素抵抗细胞模型的建立及在药物筛选中的应用[J]. 中国药理学通报，2004，24(7)：971-976.

(编辑：梁进权)