

·药效与毒理学研究·

黄连素对 IEC-6 细胞株增殖与凋亡的影响

刘文科, 仝小林, 冯春鹏, 邓 岚, 李 敏(中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

摘要: **目的** 观察黄连素对 IEC-6 细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 采用水溶性四氮唑-1(WST-1)法观察黄连素对 IEC-6 细胞增殖的影响; 采用 Annexin V-FITC 和 PI 双标流式术检测黄连素对 IEC-6 细胞凋亡的影响。**结果** 与正常胎牛血清培养比较, 黄连素低浓度组细胞存活率显著增加, 其中 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄连素组促增殖作用最显著, 细胞存活率为 220.17%, 故选用 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄连素浓度作为工作浓度。流式细胞术检测结果显示, 黄连素干预 24 h 后, 不同葡萄糖状态下细胞的凋亡率均明显下降。与高糖组比较, 高糖加黄连素组细胞凋亡率下降了 6.23%; 与低糖组比较, 低糖加黄连素组细胞凋亡率下降了 8.51%; 与超高糖组比较, 超高糖加黄连素组细胞凋亡率下降了 9.3%。**结论** 黄连素能够促进肠道 L 细胞系 IEC-6 细胞株增殖, 并减少其凋亡。

关键词: 黄连素; IEC-6 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R **文献标志码:** **文章编号:** 1003-9783(2016)03-0000-0

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2016.03.0

The effect of berberine on proliferation and apoptosis of IEC-6 cells

Liu Wenke, Tong Xiaolin, Feng Chunpeng, Deng Lan, Li Min Δ (Guang'anmen Hospital of CACMS, Beijing, 100053)

Abstract: **Objective** To observe the proliferation and apoptosis effects of berberine on IEC-6 cells. **Methods:** The proliferation of IEC-6 cells was observed by WST-1 assay. The apoptosis of IEC-6 cells was observed by flow cytometry. **Results** The viability of IEC-6 cells was significantly increased after intervention with berberine, comparing with normal culture group. $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ berberine has the most significant proliferation promoting effect on IEC-6 cells, with a survival rate of 220.17%. $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ berberine solution was chosen as the working concentration. The apoptosis rate of IEC-6 cells decreased significantly after berberine intervention at different concentrations of glucose. Compared with the normal culture group, the apoptosis rate of berberine group decreased by 6.23%. Compared with the low glucose DMEM medium group, the apoptosis rate of berberine group decreased by 8.51%. Compared with the higher glucose DMEM medium group, the apoptosis rate of berberine group decreased by 9.3%. **Conclusion:** Berberine could promote the proliferation of IEC-6 cells, and reduce the apoptosis of IEC-6 cells.

Keywords: Berberine; IEC-6 cells; Proliferation; Apoptosis

肠促胰岛素(GLP-1)是一种由远端回肠、直肠和结肠的 L 细胞分泌的肠肽激素, 具有葡萄糖依赖性促胰岛素分泌、促胰岛细胞增殖、抑制食欲、减轻体重

等作用, 因而近年来成为糖尿病研究的重点^[1-3]。有学者基于胃肠手术能够治愈 2 型糖尿病, 且胃肠手术后, 患者的 GLP-1 分泌水平大大增加, 并能长期维

收稿日期: 2015-10-04

作者简介: 刘文科, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 内分泌代谢疾病的中医药治疗。Email: liuwenke_2006@126.com。通信作者: 李敏, 研究员, 中国中医科学院广安门医院分子生物实验室主任, 研究方向: 内分泌代谢疾病的中医药治疗。Email: limin-72114@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81102717)。

持体重的现实,提出了糖尿病很可能是一种小肠疾病的假说^[4]。IEC-6 细胞株属肠上皮来源的 L 细胞系,研究证实,IEC-6 细胞不仅能够表达 GLP-1 基因,而且在胰十二指肠同源异形盒(PDX-1)或联合胰岛因子-1(Isl-1)诱导下,IEC-6 细胞也能够表达胰岛素基因,以 L 细胞系为代表的肠道内分泌细胞可能成为糖尿病细胞或基因治疗的有效途径^[5-7]。近年来,虽有研究表明,一些中药复方或单体具有促进 GLP-1 分泌作用,但对肠道内分泌 L 细胞是否具有直接作用尚不清楚。本研究选用 IEC-6 细胞株,观察黄连素单体对体外培养的 IEC-6 细胞增殖的影响,并应用流式细胞术观察黄连素单体对细胞凋亡的影响,以观察黄连素对 IEC-6 细胞自然生长状态的影响,为黄连素降糖作用的靶点提供进一步研究启示。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂 DMEM 培养基(含 L-谷氨酰胺 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,不含丙酮酸,其中高糖含、含葡萄糖 $4500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,低糖含葡萄糖 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,美国 ATCC 公司);牛胰岛素(Insulin,美国 Sigma 公司);酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);流式细胞仪(Beeton Dickinson 公司);WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号分别为:KGA316, KGA107)。

1.2 细胞培养液配制 DMEM 高糖培养基配制:每 500 mL 高糖培养基加入 Insulin 50 U。最终按照 9:1 比例,向培养基中加入胎牛血清(FBS), 4°C 冰箱保存。DMEM 超高糖培养基配制:称取葡萄糖 2.25g,用 DMEM 50 mL 高糖培养基溶解。然后过滤至 450 mL 培养基中。余同 DMEM 高糖培养基的配制方法。DMEM 低糖培养基配制方法同 DMEM 高糖培养基。

1.3 黄连素标准品溶液的配制 称取 15 mg 黄连素标准品,溶于 10 mL 甲醇溶液中,配制成 $1.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的黄连素标准品甲醇溶液。通过移液器分别取 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 μL 标准品溶液,再向各离心管中均加入 15 mL 不含 FBS 的 DMEM 高糖培养基,分别配制成 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄连素标准品溶液,并保证有机溶剂在标准品溶液中的浓度不超过 5%。DMEM 低糖、高糖培养基黄连素标准品溶液配制方法与黄连素标准品溶液相同。

1.4 IEC-6 细胞的培养

1.4.1 IEC-6 细胞复苏与传代 按照 ATCC 提供的 IEC-6 细胞株培养说明,在 DMEM 高糖培养基(含 10%胎牛血清)条件下进行细胞复苏与传代,详细操

作见参考文献^[8]。

1.5 MTT 法检测细胞生长周期 将细胞接种后置于 37°C 含 5% CO_2 细胞培养箱中分别培养 12, 24, 36, 48, 72h。在酶标仪上选择 490 nm 波长每孔的光密度。每个 96 孔板设 24 个复孔。结果显示 12~48 h 为细胞生长的对数生长期。

1.6 水溶性四氮唑-WST-1 法检测细胞存活率 细胞接种培育 24 h 后,向每孔中加不同浓度的黄连素标准品溶液(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),每种浓度设 6 个复孔,并设胎牛血清及空白培养基(无血清)作为对照。继续于培养箱中再孵育 24 h。不同时间点重复测定 3 次,结果取平均值。计算细胞存活率:将各测试孔的 OD 值减去本底 OD 值(完全培养基加 WST-1,无细胞)或空白药物孔 OD(完全培养基加受试药物加 WST-1,无细胞),各重复孔的 OD 值取均数 $\pm$ SD。细胞存活率 = (药物细胞 OD 值 / 对照细胞 OD 值) $\times$ 100 %。

1.7 实验分组 实验设置 6 个不同干预组:低糖组、高糖组、超高糖组、低糖加黄连素组、高糖加黄连素组、超高糖加黄连素组,见表 1。并根据 WST-1 检测细胞对药物敏感性结果,确定正式实验中黄连素标准品溶液浓度。

表 1 实验分组及药物干预

Table 1 Groups and administration

分组	培养情况
低糖组	DMEM 低糖培养基(含 $5.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖),含 10%胎牛血清
高糖组	DMEM 高糖培养基(含 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖),含 10%胎牛血清
超高糖组	DMEM 高糖培养基(含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖),10%含胎牛血清
黄连素低糖组	DMEM 低糖培养基(含 $5.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖),含 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄连素,不含胎牛血清
黄连素高糖组	DMEM 高糖培养基(含 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖),含 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄连素,不含胎牛血清
黄连素超高糖组	DMEM 超高糖培养基(含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖),含 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄连素,不含胎牛血清

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡 选取处于生长对数期生长良好的细胞以 1×10^5 密度接种于 6 孔板,以上 6 个试验组每组分别设 6 个复孔,每两个复孔收集为 1 个待测样品,每组均收集 3 个样品。另单独接种一 6 孔板正常培养细胞作为正常对照组,以待进行 Annexin-V/碘化丙啶(PI)染色时作为校正所用,每 2 个复孔收集为一个样品,共 3 个样品,其中 1 个样品单染 ANNEXIN-V,一个样品单染 PI,一个样品不染色。干预 24 h 后,加 0.25%胰蛋白酶(不含 EDTA)进行消化、离心。避光条件下每管样品中分别加入

ANNEXIN-V 5μL 和 PI 5μL, 充分反应 10 min 后, 立即于流式细胞仪上进行流式分析检测细胞凋亡率。

1.9 统计学处理方法 所有数据均至少重复 3 遍, 使用 SPSS17.1 统计软件处理数据, 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。根据数据资料的特征采用相应的统计方法: (1)多样本均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA 检验), 方差齐时采用 SNK-q 检验(Student-Newman-Keuls method)进行两两间显著性检验, 方差不齐时先变量转换, 如仍不齐则用秩和检验中的 H 检验法(Kruskal-Wallis); (2)两样本均数比较采用两独立样本的 *t* 检验, 方差不齐时先变量转换, 如仍不齐则用 Man-Whitney U 检验。

2 结果

2.1 WST-1 法检测黄连素对细胞活性的影响 见表 2。不同浓度黄连素溶液及含胎牛血清培养液干预后, 各组间细胞吸光度(OD)值比较, 差异均有统计学意义($F=28.224, P=0.000$)。1 μg·mL⁻¹ 黄连素组 OD 值与 4, 5, 6, 7, 8 μg·mL⁻¹ 黄连素组及 10 %胎牛血清组 OD 值比较, 差异均有统计学意义($P=0.004, P=0.001, P=0.008, P=0.000, P=0.000$)。以正常培养条件下含 10 %胎牛血清的 DMEM 高糖培养基组作为对照细胞组, 计算 1 μg·mL⁻¹ 连素干预后的细胞存活率为 220.17 %。因此, 选择 1 μg·mL⁻¹ 浓度黄连素溶液进行后续实验研究。

表 2 不同浓度黄连素溶液对细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 The viability of IEC-6 cells under different concentrations of beberin

组别	黄连素对细胞的影响		F	P
	OD 值	细胞存活率 /%		
1 μg·mL ⁻¹ 黄连素组	1.28650 ± 0.172374	220.17	28.224	0.000
2 μg·mL ⁻¹ 黄连素组	1.15250 ± 0.086715	197.23		
3 μg·mL ⁻¹ 黄连素组	1.12967 ± 0.121758	193.32		
4 μg·mL ⁻¹ 黄连素组	1.08100 ± 0.134012 ^{△△}	184.99		
5 μg·mL ⁻¹ 黄连素组	1.03817 ± 0.119822 ^{△△}	177.67		
6 μg·mL ⁻¹ 黄连素组	0.85617 ± 0.142020 ^{△△}	146.52		
7 μg·mL ⁻¹ 黄连素组	0.82250 ± 0.152330 ^{△△}	140.76		
8 μg·mL ⁻¹ 黄连素组	0.71667 ± 0.095910 ^{△△}	122.65		
10 %胎牛血清组	0.58433 ± 0.077019 ^{△△}	—		

注: 与 1 μg·mL⁻¹ 黄连素组比较, ^{△△} $P < 0.01$ 。

2.2 不同糖浓度培养下黄连素对细胞凋亡的影响 本研究通过采用 Annexin V-FITC 和 PI 双标流式术检测了黄连素对 IEC-6 细胞凋亡的影响。用 Annexin V-FITC 和 PI 制作的参数散点图中, 左上象限为细胞碎片裂解, 左下象限为活细胞, 右上象限为晚期凋亡 + 坏死细胞, 右下象限为早期凋亡细胞。当黄连素干预 24 h 后, 不同葡萄糖状态下细胞的凋亡率均明显下降, 从散点图上表现为右上象限和(或)右下象限散点明显减少。

在不同糖浓度状态下, 与高糖组比较, 高糖加黄连素组细胞凋亡率下降了 6.23 %; 与低糖组比较,

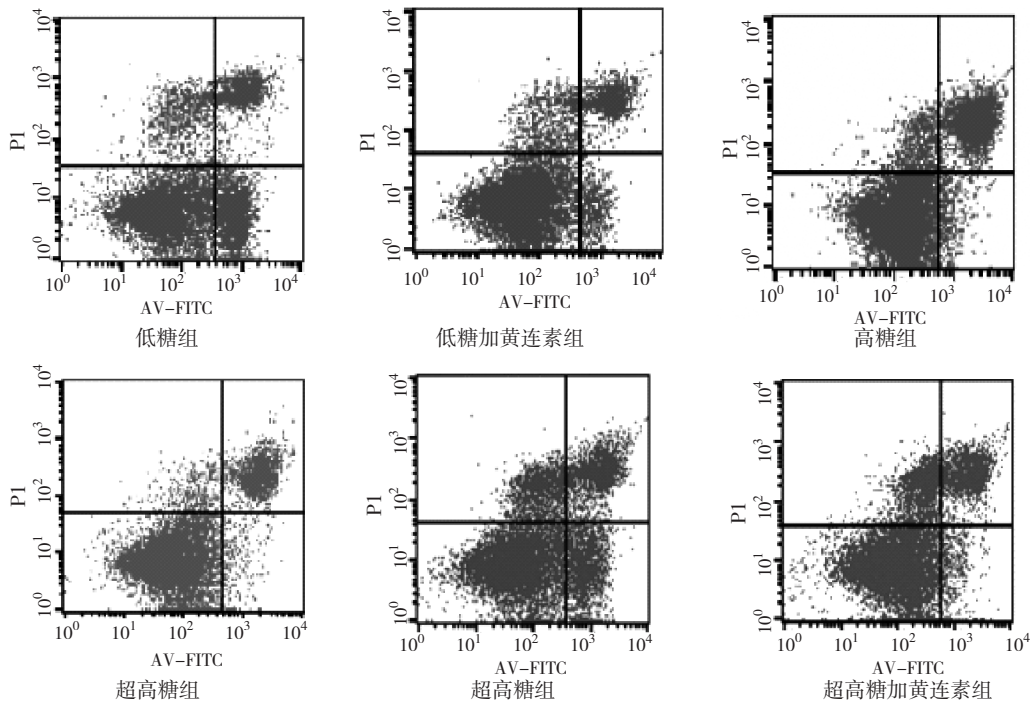


图 1 黄连素对 IEC-6 细胞凋亡的影响
Figure 1 The apoptosis effeciton of beberin on IEC-6 cells

低糖加黄连素组细胞凋亡率下降了 8.51 %; 与超高糖组比较, 超高糖加黄连素组细胞凋亡率下降了 9.3 %。黄连素组细胞凋亡率与相应的高糖、低糖、超高糖组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表 3 黄连素对 IEC-6 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 The apoptosis effecton of beberin on IEC-6 cells

组别	凋亡率 /%	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
高糖加黄连素组	13.95 ± 0.79	5.280	0.002
高糖组	20.18 ± 2.78		
低糖加黄连素组	13.17 ± 1.15	8.378	0.000
低糖组	21.68 ± 2.21		
超高糖加黄连素组	14.07 ± 1.04	8.538	0.000
超高糖组	23.37 ± 2.45		

3 讨论

黄连素(别名小檗碱)是中药黄连的主要成分,也是黄连发挥降血糖作用的主要成分。既往研究^[9-14]证实,黄连素可通过提高肝脏 HNF-4 α mRNA 及蛋白表达改善胰岛素抵抗,通过激活腺苷酸环化酶,刺激糖酵解而增强葡萄糖代谢,通过促进前脂肪细胞增殖、抑制脂肪细胞分化而影响脂肪代谢,通过影响内质网应激通路中关键分子 GPR78 及 ORP150 表达而改善内质网应激,同时可直接刺激胰腺 β 细胞分泌胰岛素,调节 β 细胞功能。而有最新研究发现^[14]黄连素可促进大鼠 GLP-1 分泌,提高血清中胰岛素水平,并能够增加胰岛 β 细胞数量。黄连素改善胰岛素抵抗、增强糖代谢等的相关研究较多,但关于其促进 GLP-1 分泌的研究较少,而关于黄连素对肠道 L 细胞系的作用影响的相关研究目前未见报道。本研究以肠道上皮 L 细胞系 IEC-6 细胞株为模型,观察了黄连素对不同葡萄糖状态下肠道上皮细胞的增殖和凋亡影响。

3.1 黄连素对 IEC-6 细胞有促增殖作用 本研究通过 WST-1 比色法检测了黄连素对 IEC-6 细胞增殖的影响。结果显示,各浓度黄连素干预后细胞的存活率较胎牛血清培养组的细胞存活率明显增加,提示黄连素对 IEC-6 细胞有促进增殖作用,其中 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄连素干预后,细胞存活率为 220.17 %,细胞存活率显著高于 $4 \sim 8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度组,由此确定浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄连素溶液作为工作浓度。

3.2 黄连素对 IEC-6 凋亡有抑制作用 本研究采用 Annexin V-FITC 和 PI 双标流式术检测了黄连素对 IEC-6 细胞凋亡的影响。与相应的高糖、低糖、超高

糖组比较,黄连素组细胞凋亡率均下降。提示黄连素对细胞的自然凋亡有抑制作用。

综上所述,黄连素能够促进 IEC-6 细胞增殖、抑制 IEC-6 细胞凋亡,为黄连素降糖的作用靶点及机制提供了一种新的研究思路和方向。

参考文献:

- [1] Vilsboll T, Zdravkovic M, Le-Thi T, et al. Liraglutide, a long-acting human GLP-1 analog, given as mono therapy significantly improves glycemic control and lowers body weight without risk of hypoglycemia in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 2007, 30(6): 1608-1610.
- [2] Arulmozhi DK, Portha B. GLP-1 based therapy for type 2 diabetes[J]. Eur J Pharm Sci, 2006, 28(1/2): 96-108.
- [3] Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide-1[J]. Physiol Rev, 2007, 87(4): 1409-1439.
- [4] Francesco R. Is type 2 diabetes an operable intestinal Disease? [J]. Diabetes Care, 2008, 31(S2): S290-S296.
- [5] Yoshida S, Kajimoto Y, Yasuda T, et al. PDX-1 induces differentiation of intestinal epithelioid iec-6 into insulin-producing cells[J]. Diabetes, 2002, 51: 2505-2513.
- [6] Kojima H, Nakamura T, Fujita Y, et al. Combined expression of pancreatic duodenalhomeobox 1 and islet factor 1 induces immature enterocytes to produce insulin[J]. Diabetes, 2002, 51: 1398-1408.
- [7] Wu XK, Ma CF, Han L, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type ii diabetes[J]. Curr Microbiol, 2010, 61: 69-78.
- [8] 谷鸿喜, 张凤民, 凌虹. 细胞培养技术[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2012. 55-101
- [9] Gao ZQ, Leng SH, Lu F, et al. Effect of berberine on expression of hepatocyte nuclear factor-4alpha in rats with fructose-induced insulin resistance[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(3): 261-265.
- [10] Yin J, Gao JG, Liu D, et al. Berberine improves glucose metabolism through inducti-on of glycolysis[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 294(1): E148-E156.
- [11] Choi SB, Ko BS, Park SK, et al. Insulin sensitizing and insulinotropic action of berberine from Cortidis rhizome[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(8): 1431-1437.
- [12] Lu SS, Yu YL, Zhu HJ, et al. Berberine promotes glucagon-like peptide-1(7-36)amide secretion in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. J Endocrinol, 2009, 200(2): 159-165.
- [13] Huang C, Zhang Y, Gong Z, et al. Berberine inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPAR-gamma pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 348(2): 571-578.
- [14] Ko WH, Yao XQ, Lau CW, et al. Vasorelaxant and antiproliferative effects of berberine[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 399(2-3): 187-196.

(编辑: 梁进权)