

海普诺改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗作用研究

金水华^{1,2}, 吴 宁², 刘少芳², 江 波², 梁 惠¹, 史大永²

(1. 青岛大学公共卫生学院, 山东 青岛 266021; 2. 中国科学院 海洋研究所 海洋生物技术工程研究发展中心, 山东 青岛 266071)

摘要: 通过细胞形态观察和 CCK-8 法研究 HPN 对 HepG2 细胞活力的影响。采用高糖高浓度胰岛素持续作用诱导 HepG2 细胞建立胰岛素抵抗细胞模型, 用多功能自动生化仪葡萄糖-己糖激酶法检测海普诺(HPN)对正常 HepG2 细胞及胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响。实验结果显示, 低浓度的 HPN 对 HepG2 细胞增殖没有影响。HPN 与胰岛素协同作用 HepG2 细胞, 低浓度胰岛素对葡萄糖利用有一定的促进作用; 当胰岛素浓度为 1×10^{-6} mol/L 时, HPN 可明显促进 HepG2 细胞葡萄糖消耗。进一步研究表明, HPN 在 $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-7}$ mol/L 浓度范围内可明显促进胰岛素抵抗 HepG2 细胞的葡萄糖的消耗。HPN 可明显改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗。

关键词: 海普诺; 胰岛素抵抗; HepG2 细胞

中图分类号: R965, R963 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)03-0026-07

doi: 10.11759/hykyx20140830001

胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)是机体靶组织对胰岛素的反应性低于正常水平的一种病理状态, 表现为胰岛素促进外周组织(包括肌肉和脂肪组织)摄取和利用葡萄糖以及抑制肝糖输出的效应减弱; 它是多种疾病的始发因素, 易导致动脉硬化、肾病、心脏病变、脑血管病变等合并症, 尤其是在 2 型糖尿病(T2DM)重要发病机制之一, 贯穿 T2DM 发生、发展的全过程^[1-2]。世界卫生组织评估 2012 年全球有超过 3.46 亿人患有糖尿病, 其中在中国有将近 9200 万糖尿病患者^[3], 若不采取任何措施, 预计到 2030 年患糖尿病人数将翻一番。IR 综合征发病率高, 危害性大。因此, 寻找一种新型高效的治疗 IR 的药物一直是研究人员的研究热点。

海普诺(HPN)是以海洋松节藻提取物 BPN 为先导物, 进行结构修饰得到的衍生物, 其分子式为 $C_{17}H_{17}Br_3O_5$, 结构式见图 1。前期体外酶实验证实 HPN 对蛋白酪氨酸磷酸酶 1B(PTP1B)有较高的抑制活性, 其 IC_{50} 达到 $0.63 \mu\text{mol/L}$; 体内药效试验证实 HPN 可明显降低 db/db 小鼠血糖和血脂水平, 对糖尿病模型动物升高的糖化血红蛋白水平, 糖化血清蛋白水平有明显的改善作用; 其作用机制可能与抑制 PTP1B 活性进而促使胰岛素增敏作用相关^[4]。另外, 该化合物口服相对安全, 最大耐受量为动物实验有效剂量的 160 倍。因此, HPN 起效剂量低, 毒副作用小, 具有良好的开发应用前景。目前尚未对 HPN

其活性进行细胞水平研究。本研究探讨了 HPN 对正常 HepG2 细胞及胰岛素抵抗 HepG2(IR-HepG2)细胞的葡萄糖代谢的影响, 期望为 HPN 抗糖尿病作用机理提供实验依据。

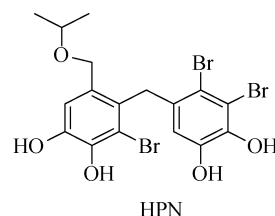


图 1 HPN 的结构

Fig. 1 Structure of HPN

1 材料

1.1 仪器

超净工作台(苏州净化设备有限公司); CO_2 恒温培养箱(德国 Hears); 8022 型离心机(上海医疗器械);

收稿日期: 2014-08-30; 修回日期: 2014-11-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(NO.41276167, NO.41206066); 青岛市市南区科技发展资金项目(NO.2012-5-007-SW)

作者简介: 金水华(1987-), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 研究方向: 营养与食品卫生学, 电话: 0532-82898741, Email: shisheng14226@126.com; 梁惠, 通信作者, 教授, 博士生导师, 研究方向: 医学营养学, E-mail: qdlianghui@126.com; 史大永, 通信作者, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 海洋天然产物, 电话: 0532-82898719, E-mail: shidayong@qdio.ac.cn

IX80 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司产品)
EX1808 酶标仪(美国 BioTek 公司)。

1.2 试剂

DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶和青、链霉素(美国 Hyclone 公司); 胎牛血清(美国 Gibco 公司); CCK-8 试剂盒(BestBio 公司); 二甲双胍、罗格列酮(美国 sigma 公司); 牛血清蛋白、牛胰岛素(Solarbio 公司); 葡萄糖测定试剂盒-己糖激酶法(北京利德曼生化股份有限公司)。

1.3 细胞株

HepG2 人体肝癌细胞株购自青岛大学医学院。接种于含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 高糖培养基(补充青霉素、链霉素各 1%), 置于 37℃ 含有 5%CO₂ 的细胞培养箱。当细胞贴壁长满后, 倾去培养基, 用 0.25%胰蛋白酶消化, 每 3 d 按 1:3 比例传代 1 次, 取对数生长期的细胞用于实验。

2 方法

2.1 CCK-8 法测定 HPN 对细胞增殖的影响和倒置相差显微镜下观察细胞形态的变化

取对数生长期的 HepG2 细胞, 按每孔 5×10^3 个密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 每组 6 个复孔。待细胞贴壁以后, 用不同浓度的 HPN 溶于培养基中, 再每孔补充 100 μ L 含药物的培养基, 分别作用 24, 36 和 48 h。HPN 的药物浓度为($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L), 以只加 DMSO 的为正常对照组。作用后弃培养基, 加入 100 μ L 的不含血清的培养基, 再每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂, 在细胞培养箱中孵育 2 h, 置酶标仪 450 nm 波长处测 OD 值。测试孔的 OD 值=药物处理组 D₄₅₀-调零组 D₄₅₀。

此外, 把经 HPN 作用 48 h 后的 96 孔板, 置于倒置相差显微镜下观察细胞形态的变化后, 再加 CCK-8 试剂进行后续实验。

2.2 HPN 在低浓度胰岛素介导下对正常 HepG2 葡萄糖消耗量的影响^[5-6]

把 HepG2 单细胞悬液, 按每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 每组 6 个重复孔。待细胞贴壁以后, 弃去培养基, 用 PBS 冲洗一遍, 加入新配置的含有胰岛素(0, 1×10^{-9} 和 1×10^{-7} mol/L)和 0.2% BSA, 不含血清的 DMEM 高糖培养基。实验设

置正常对照组, 胰岛素处理组, 药物处理组; 药物处理组分别加入二甲双胍(1×10^{-3} mol/L), 罗格列酮(1×10^{-6} mol/L)及各个浓度的 HPN, 以上每孔 200 μ L。以二甲双胍组和罗格列酮组为阳性对照组。作用 48 h 后, 取上清液离心后混匀, 用多功能自动生化仪采用葡萄糖-己糖激酶法测定细胞上清液中的葡萄糖含量, 细胞所消耗的葡萄糖含量=培养基的葡萄糖含量-细胞上清液的葡萄糖含量。

2.3 HPN 在高浓度胰岛素介导下对正常 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

参考 2.2 的做法, 用含有胰岛素浓度为 1×10^{-6} mol/L 和 0.2% BSA, 不含血清的 DMEM 高糖培养基作用 HepG2 细胞 48 h, 检测 HPN 和胰岛素协同作用下对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响。

2.4 高糖高胰岛素诱导 IR-HepG2 细胞模型的建立^[7-8]

把 HepG2 单细胞悬液, 按每孔 3×10^4 个接种于 48 孔板, 每孔 300 μ L, 每组 6 个重复孔。待细胞贴壁以后, 弃去培养基, 用 PBS 冲洗一把遍, 每孔加入 600 μ L 新配置的含有不同浓度的胰岛素($1 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-6}$ mol/L)和 1% FBS 的高糖培养基(30 mmol/L), 置于细胞培养箱中培养 72 h。实验分为对照组和模型组, 将在含有胰岛素培养液中培养的 HepG2 细胞作为模型组, 不含胰岛素的培养液中培养的 HepG2 细胞为正常对照组。待作用 72 h 后弃去培养基, PBS 冲洗一遍, 无血清的 DMEM 高糖培养基冲洗一遍后, 模型组和对照组都换上含 0.2%BSA, 含有 1×10^{-9} mol/L 浓度的胰岛素、无血清无酚红的正常高糖培养基(25mmol/L), 作用 6 h 后, 取上清液, 离心, 用葡萄糖-己糖激酶法测定细胞上清液中的葡萄糖含量。

2.5 HPN 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

参考以上模型建立的方法, 按照文献稍作改进^[9, 10], 在 HepG2 细胞中加入新配置含有 1% FBS, 胰岛素浓度为 1×10^{-6} mol/L 的高糖培养基(30 mmol/L), 培养 72 h 后, 弃去原培养液, PBS 冲洗一遍, 再用无血清的 DMEM 冲洗一遍后, 细胞用于后续的实验。将细胞分为模型组, 罗格列酮阳性对照组, 和 HPN 各个剂量处理组($1 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-7}$ mol/L), 同时设正常对照组。各组同时加入 1×10^{-9} mol/L 的胰岛素、0.2%BSA 不含血清和酚红的培养液, 分别作用 6 h, 取上清液,

离心后用葡萄糖-己糖激酶法测定细胞上清液中的葡萄糖含量。

2.6 统计学处理

所有数据用统计软件 SPSS 16.0 统计软件处理, 实验数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组数据采用单因素方差分析, LSD 法检验后多重比较组间差异; 若方差不齐, 采用非参统计检验, 以 $P < 0.05$ 具有统计学意义, $P < 0.01$ 视为统计学差异非常显著。

3 结果

3.1 HPN 对 HepG2 细胞增殖的影响

如表 1 所示, HPN 浓度范围在 $10^{-7} \sim 5 \times 10^{-6}$ mol/L 时无细胞毒性, 细胞增殖不受影响。但是, 随着 HPN 浓度的增加细胞增殖受到影响。当 HPN 作用细胞超

过 36 h, HPN 浓度在 1×10^{-5} mol/L 时与细胞增殖受到影响($P < 0.05$)。当 HPN 浓度增至 $5 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L 时细胞增殖受到显著抑制($P < 0.01$)。

如图 2 所示, 各个剂量的 HPN 作用 HepG2 细胞 48 h 后, 在倒置相差显微镜(40X)下观察细胞形态, 对照组和 HPN 低剂量组 HepG2 细胞生长良好, 细胞为多边形或梭形, 以贴壁方式生长, 部分呈复层性生长, 细胞形态饱满, 透光性好。经不同浓度的 HPN 干预后, 尤其在 5×10^{-6} mol/L 时以后存活细胞数目减少, 细胞形态逐渐由多边形转变为圆形, 细胞体内颗粒感增强, 透光性差, 细胞间界限模糊。在 5×10^{-5} mol/L 时细胞变成了不规则长梭形或圆形; 在 1×10^{-4} mol/L 时细胞几乎全部死亡。实验结果说明, 低浓度 HPN 对 HepG2 细胞增殖无影响, 而高浓度 HPN 则会抑制细胞增殖。因此, 采用低于 5×10^{-6} mol/L 浓度的 HPN 进行下面的实验。

表 1 不同浓度的 HPN 在不同作用时间下对 HepG2 细胞增殖的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effect of different concentrations of HPN on the proliferation of HepG2 cells at different time points($n=6$, mean $\pm$ SD)

组分	浓度(mol/L)	OD 值		
		24 h	36 h	48 h
正常对照组	0	0.58±0.03	0.62±0.03	0.67±0.03
HPN 处理组	1×10^{-7}	0.63±0.03	0.63±0.03	0.69±0.03
	5×10^{-7}	0.61±0.05	0.63±0.02	0.69±0.13
	1×10^{-6}	0.60±0.07	0.65±0.05	0.70±0.08
	5×10^{-6}	0.54±0.09	0.52±0.07	0.59±0.04
	1×10^{-5}	0.57±0.02	0.51±0.05*	0.55±0.07*
	5×10^{-5}	0.42±0.04**	0.42±0.04**	0.45±0.06**
	1×10^{-4}	0.27±0.04**	0.27±0.04**	0.29±0.05**

注: 与正常对照组相比 “*” 表示 $P < 0.05$; “**” 表示 $P < 0.01$

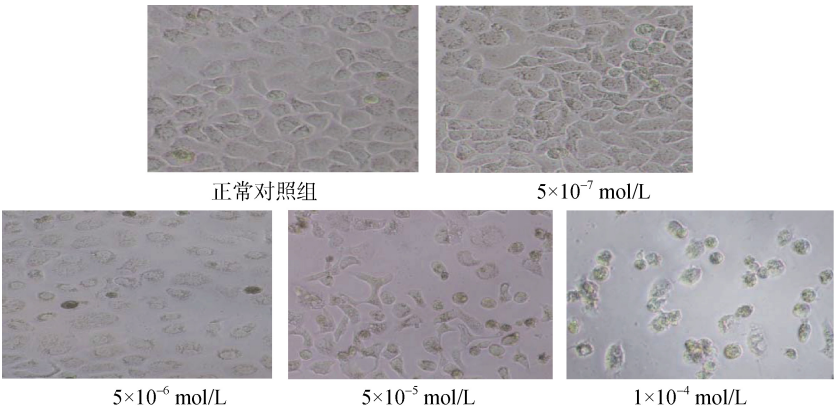


图 2 不同浓度的 HPN 对 HepG2 细胞形态的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of HPN on HepG2 cell morphology

3.2 HPN 在低浓度胰岛素介导下对正常 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

HPN 对正常 HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响见表 2。结果显示, 当不添加胰岛素时, 各个剂量的 HPN 均对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量无显著影响。而 HPN 和胰岛素协同作用时, 能显著促进 HepG2 细胞

葡萄糖消耗量; 尤其当胰岛素的浓度为 1×10^{-7} mol/L, HPN 在浓度为 $5 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-7}$ mol/L 时, 能够显著促进 HepG2 细胞的葡萄糖摄取量($P < 0.01$)。在有效作用剂量范围内, HPN 与二甲双胍相比降糖效果不如二甲双胍显著; 与罗格列酮相比, HPN 降糖效果与之相当, 但用药效剂量比罗格列酮小。

表 2 HPN 在胰岛素介导下对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Effect of HPN on glucose consumption of HepG2 cells pretreated with insulin($n=6$, mean $\pm$ SD)

组分	加药剂量(mol/L)	葡萄糖消耗量(mmol/L)		
		胰岛素(0)	胰岛素(1×10^{-9} mol/L)	胰岛素(1×10^{-7} mol/L)
正常对照组	—	4.29 $\pm$ 0.12	4.31 $\pm$ 0.34	4.37 $\pm$ 0.19
胰岛素组	—	—	4.56 $\pm$ 0.29	4.56 $\pm$ 0.17
二甲双胍组	1×10^{-3}	6.58 $\pm$ 0.12 ^{▲▲}	5.88 $\pm$ 0.38**	6.17 $\pm$ 0.40**
罗格列酮组	1×10^{-6}	4.84 $\pm$ 0.30 ^{▲▲}	4.95 $\pm$ 0.28*	4.96 $\pm$ 0.20**
HPN 组	1×10^{-8}	4.45 $\pm$ 0.18	4.95 $\pm$ 0.28*	4.94 $\pm$ 0.23*
	5×10^{-8}	4.23 $\pm$ 0.19	4.93 $\pm$ 0.40	4.90 $\pm$ 0.18**
	1×10^{-7}	4.38 $\pm$ 0.25	4.67 $\pm$ 0.26	4.88 $\pm$ 0.11**
	5×10^{-7}	4.50 $\pm$ 0.24	4.62 $\pm$ 0.09	4.70 $\pm$ 0.16
	1×10^{-6}	4.32 $\pm$ 0.20	4.49 $\pm$ 0.23	4.62 $\pm$ 0.27

注: 与正常对照组相比“▲▲”表示 $P < 0.01$; 与胰岛素组相比“*”表示 $P < 0.05$, “**”表示 $P < 0.01$

3.3 HPN 在高浓度胰岛素介导下对正常 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

由表 3 可知, 胰岛素(1×10^{-6} mol/L)作用 HepG2 细胞 48 h 后, 细胞的葡萄糖消耗量明显低于正常对照组($P < 0.05$), 说明胰岛素组的 HepG2 细胞产生了

IR 作用。当 HPN(1×10^{-7} mol/L)与胰岛素(1×10^{-6} mol/L)协同作用 HepG2 细胞 48 h 后, HepG2 不产生胰岛素抵抗效应, 与胰岛素组相比细胞葡萄糖消耗量增加了 35%, 与阳性对照罗格列酮组相当(36%)。说明 HPN 具有改善 HepG2 细胞 IR 的作用。

表 3 HPN 在 1×10^{-6} mol/L 胰岛素介导下对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Effect of HPN on glucose consumption of HepG2 cells pretreated with 1×10^{-6} mol/L insulin($n=6$, mean $\pm$ SD)

组分	加药剂量(mol/L)	葡萄糖消耗量(mmol/L)	葡萄糖消耗量比值
正常对照组	—	5.16 $\pm$ 0.35	1.26
胰岛素组	—	4.08 $\pm$ 0.23 [▲]	1
二甲双胍组	1×10^{-3}	6.97 $\pm$ 0.40**	1.71
罗格列酮组	1×10^{-6}	5.55 $\pm$ 0.31*	1.36
HPN 组	1×10^{-8}	3.87 $\pm$ 0.60	0.95
	5×10^{-8}	3.96 $\pm$ 0.18	0.97
	1×10^{-7}	5.49 $\pm$ 0.02*	1.35
	5×10^{-7}	3.93 $\pm$ 0.67	0.96
	1×10^{-6}	3.95 $\pm$ 0.68	0.97

注: 葡萄糖消耗量比值=各处理组葡萄糖消耗量/胰岛素组葡萄糖消耗量; 与正常对照组相比“▲”表示 $P < 0.05$; 与胰岛素相比“*”表示 $P < 0.05$, “**”表示 $P < 0.01$

3.4 IR-HepG2 细胞模型的建立

由表 4 可知, 用 30 mmol/LD-葡萄糖刺激 72 h, 更换常规培养基, 6 h 后检测细胞葡萄糖摄入量, 发现细

胞的糖摄入量显著降低, 表明单纯给与高糖刺激, 细胞也能形成 IR 模型。当同时用含有高浓度胰岛素和高糖的培养基作用 HepG2 细胞 72 h, 更换常规培

培养基, 继续培养 6 h 后检测细胞葡萄糖摄入量, 发现当胰岛素为 1×10^{-6} mol/L、D-葡萄糖浓度为 30 mmol/L 时, 细胞所消耗的葡萄糖含量最少, 与正常对照组

的葡萄糖消耗量减少了 45%, 达到最大 IR 状态。由此表明, 高糖高胰岛素诱发的细胞 IR 造模最佳胰岛素浓度为 1×10^{-6} mol/L, D-葡萄糖浓度为 30 mmol/L。

表 4 高糖高胰岛素诱导 IR 模型($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Insulin resistance cell model induced by high glucose and high insulin($n=6$, mean $\pm$ SD)

组分	胰岛素浓度(mol/L)	D-葡萄糖含量(mmol/L)	葡萄糖消耗量(mmol/L)	葡萄糖消耗量比值
正常对照组	0	25	3.27 $\pm$ 0.13	1.00
模型组	0	30	1.93 $\pm$ 0.20**	0.59
	1×10^{-7}	30	2.20 $\pm$ 0.55**	0.63
	5×10^{-7}	30	2.16 $\pm$ 0.46**	0.66
	1×10^{-6}	30	1.79 $\pm$ 0.45**	0.55
	5×10^{-6}	30	1.83 $\pm$ 0.33**	0.56

注: 葡萄糖消耗量比值=模型组葡萄糖消耗量/正常对照组葡萄糖消耗量; 与正常对照组相比“**”表示 $P<0.01$

3.5 HPN 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

由表 5 可知, 与模型组相比, 当 HPN 在 $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-7}$ mol/L 的浓度范围内能显著增加 HepG2 细胞葡

萄糖消耗量并明显改善细胞的 IR 效应($P<0.05$)。尤其当 HPN 的浓度为 1×10^{-7} mol/L 时, 葡萄糖消耗量增加了 59%。但当 HPN 的浓度增加 5×10^{-7} mol/L 时葡萄糖消耗量明显减弱。

表 5 HPN 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Tab.5 Effect of HPN on glucose consumption of IR- HepG2 cells($n=6$, mean $\pm$ SD)

组分	加药剂量(mol/L)	葡萄糖消耗量(mmol/L)	葡萄糖消耗量比值
正常对照组	—	3.11 $\pm$ 0.22	1.62
模型组	—	1.86 $\pm$ 0.20 ^{▲▲}	1
罗格列酮组	1×10^{-6}	2.47 $\pm$ 0.20*	1.33
HPN 组	1×10^{-8}	2.37 $\pm$ 0.45	1.27
	5×10^{-8}	2.80 $\pm$ 0.67*	1.51
	1×10^{-7}	2.95 $\pm$ 0.25**	1.59
	5×10^{-7}	1.90 $\pm$ 0.20	1.02

注: 葡萄糖消耗量比值=各处理组葡萄糖消耗量/模型组葡萄糖消耗量; 与正常对照组相比“▲▲”表示 $P<0.01$; 与模型组相比“*”表示 $P<0.05$, “**”表示 $P<0.01$

4 讨论

在细胞水平 IR 的定义为由于胰岛素受体数目减少和(或)受体后缺陷, 一定的胰岛素不能使细胞达到预期的代谢水平, 只有相应提高胰岛素浓度才能达到相应的代谢水平。胰岛素最主要的生物学效应是促进机体组织细胞葡萄糖代谢, 故通常所言 IR 即是指机体对胰岛素促进葡萄糖摄取利用的效应产生了抵抗。故本文主要在细胞葡萄糖代谢方面初步阐述了 HPN 改善 IR 的作用。

建立稳定、有效的 IR 细胞模型, 不仅可以广泛研究细胞水平 IR 的发病机制和作用机理, 而且便于

观察干预因素对 IR 的直接影响, 特别是更方便于筛选改善胰岛素抵抗的药物。目前国内外已经成功建立了多种的细胞模型, 主要归类为高胰岛素诱导型, 高糖诱导型, 激素诱导型^[11], 肿瘤坏死因子诱导型^[12], 游离脂肪酸诱导型^[13], 地塞米松诱导型^[14]等, 其中利用高胰岛素和高糖诱导的较为常见。建立 IR 细胞模型所采用的细胞主要有脂肪细胞、肝细胞、骨骼肌细胞、干细胞等。由于肝脏是摄取、储存、合成葡萄糖和代谢的主要场所, 故本实验选择来源于肝脏, 表型与肝细胞极为相似的 HepG2 细胞, 其既保留了正常肝细胞的基本生物特性, 又排除了正常肝细胞表现的细胞衰亡的现象^[15, 16]; 本研究采用高糖

高胰岛素诱导 HepG2 细胞成功建立 IR 模型, 在一定程度上模拟了 IR 的自然发病过程。本实验结果显示模型组与正常对照组相比差异性显著($P < 0.01$), 说明该方法成功建立了 IR 模型。

由以上实验结果表明, 与 IR 模型组相比, HPN 浓度为 1×10^{-7} mol/L 时无细胞毒性, 对细胞增殖没有影响, 然而却能明显促进 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗, 表明 HPN 起效剂量低, 毒副作用小, 具有良好的治疗 IR 的优势。HPN 与高浓度胰岛素协同作用, 同样可明显提高 HepG2 细胞的葡萄糖消耗量。然而, 在无胰岛素的作用下, HPN 不能促进正常 HepG2 细胞的葡萄糖的消耗; 在胰岛素浓度为 1×10^{-7} mol/L 时, 对正常 HepG2 细胞的葡萄糖消耗量影响较大, 表明 HPN 在促进葡萄糖代谢时对一定浓度的胰岛素有依赖性。由于 HPN 对 IR-HepG2 细胞比对正常 HepG2 细胞的葡萄糖消耗量增加量较大, 说明 HPN 对葡萄糖代谢的影响主要表现在 IR 细胞, 而对正常 HepG2 细胞葡萄糖代谢影响较小。故 HPN 能在细胞水平改善 IR。

目前开发以 PTP1B 为作用靶点的抗 T2DM 新药是抗糖尿病药物研究的热点^[17-18]。研究表明^[19-20], PTP1B 是胰岛素受体的负调控因子和治疗糖尿病等相关的代谢综合征的一个潜在的药物靶点, PTP1B 过度表达会降低由胰岛素刺激而引起的细胞表面 IR 或胰岛素受体底物去磷酸化水平, 进而抑制了胰岛素信号的下传, 机体表现为 IR。降低 PTP1B 的表达水平, 如通过反义寡核苷酸或中和抗体, 可以增强胰岛素启动信号^[21-22]。前期体外酶实验已证实 HPN 对 PTP1B 有较高的抑制活性, 其 IC_{50} 达到 $0.63 \mu\text{mol/L}$ 。本研究中 HPN 能改善 IR 作用, 增加胰岛素刺激下的葡萄糖消耗量, 可能与抑制 PTP1B 的活性增加了胰岛素传导信号相关。本实验从细胞水平初步探讨了 HPN 对 IR 的改善作用, 从分子水平上阐明 HPN 对 IR 细胞葡萄糖代谢作用机制、探讨 HPN 对 IR 细胞胰岛素信号通路的影响的研究正在进行中。

参考文献:

[1] Cordain L, Eades M R, Eades M D. Hyperinsulinemic diseases of civilization: more than just Syndrome X[J]. *Comp BiochemPhysiol A MolIntegrPhysiol*, 2003, 136(1): 95-112.

[2] Kopelman P. The metabolic syndrome as a clinical problem[J]. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform*,

2004, 9: 77-88 .

[3] Yang W Y, Lu J M, Weng J P, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. *New England Journal of Medicine*, 2010, 362: 1090-1101.

[4] Shi D Y, Guo S J, Jiang B, et al. HPN, a Synthetic Analogue of Bromophenol from Red Alga *Rhodomela confervoides*: Synthesis and Anti-Diabetic Effects in C57BL/KsJ-db/db Mice[J]. *Mar Drugs*, 2013, 11: 350-362.

[5] Yin J, Hu R, Chen M, et al. Effects of Berberine on Glucose Metabolism In Vitro[J]. *Metabolism*, 2002, 15: 1439-1443.

[6] Lovatil M R, Manzoni C, Castiglioni S, et al. Lupin seed γ -conglutin lowers blood glucose in hyperglycaemic rats and increases glucose consumption of HepG2 cells [J]. *British Journal of Nutrition*, 2011, 107: 67-73.

[7] 陈秋, 夏永鹏, 邱宗荫. 吡格列酮对胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型的药理学评价[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(2): 248-251.

[8] 刘晓海, 董志, 傅洁民, 等. 倍他福林对胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型的作用及其初步机制[J]. *中国新药杂志*, 2008, 17(12): 1026-1029.

[9] Xie W D, Wang W, Su H, et al. Effect of ethanolic extracts of *Ananas comosus* L. leaves on insulin sensitivity in rats and HepG2[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2006, 143: 429-435.

[10] 郭丽民. 地黄寡糖对 HepG2 细胞(人肝癌细胞株)胰岛素抵抗的改善作用及机制研究[D]. 兰州大学, 2007.

[11] Collison M, Campbell I W, Salt I P, et al. Sex hormones induce insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes by reducing cellular content of IRS proteins[J]. *Diabetologia*, 2000, 43 (11): 1374-1380.

[12] Ruan H, Hachohen N, Golub T R, et al. Tumor necrosis Factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes nuclear Factor- κ B activation by TNF- α is obligatory[J]. *Diabetes*, 2002, 51(5): 1319-1336.

[13] Griffin M E, Marcucci M J, Cline G W, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade[J]. *Diabetes*, 1999, 48: 1270-1274.

- [14] Sakoda H, Ogihara T, Anai M, et al. Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than Insulin Signal Transduction[J]. Diabetes, 2000, 49(10): 1700-1708.
- [15] Ciaraldi T P, Goldberg M, Odom R, et al. In vitro effects of amylin on carbohydrate metabolism in liver cells [J]. Diabetes, 1992, 41(8): 975-981.
- [16] Han J, Jo L, Chakarabarti R, et al. Demonstration of insulin-insensitive storage Pool of glucose transporters in rat hepatocytes and HepG2 cells[J]. J cell Physiol, 1992, 152(1): 56-63.
- [17] Xie L P, Zhang Z Y, Andersen J N, et al. Cellular effects of small molecule PTP1B inhibitors on insulin signaling[J]. Biochemistry, 2003, 42(44): 12792-12804.
- [18] Liu G. Technology evaluation: ISIS-113715, Isis[J]. Curr Opin Mol Ther, 2004, 6: 331-336.
- [19] Xie L, Lee S Y, Andersen J N, et al. Cellular effects of small molecule PTP1B inhibitors on insulin signaling [J]. Biochemistry, 2003, 42: 12792-12804.
- [20] Dadke S, Kusari J, Chernoff J. Down-regulation of insulin signalling by protein-tyrosine phosphatase 1B is mediated by an N-terminal binding region[J]. J Biol Chem, 2000, 275(3): 23642-23647.
- [21] Kenner K A, Anyanwu E, Olefsky J M, et al. Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin-and insulin-like growth factor-I-stimulated signaling [J]. J Biol Chem, 1996, 271: 19810-19816.
- [22] Zinker B A, Rondinone C M, Trevillyan J M, et al. PTP 1B antisense oligonucleotide lowers PTP 1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice[J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99: 11357-11362.

HPN improves insulin resistance of HepG2 cells

JIN Shui-hua^{1, 2}, WU Ning², LIU Shao-fang², JIANG Bo², LIANG Hui¹, SHI Da-yong²

(1. Institute of Human Nutrition, College of Public Health, Qingdao University, Qingdao 266021, China; 2. Research and Development Center of Marine Biotechnology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Aug., 30, 2014

Key words: HPN; insulin resistance; HepG2 cell

Abstract: The effect of HPN on viability of HepG2 cells was determined by cell morphology and CCK8 assay. Insulin resistant HepG2 cell model was established by continuously treating cells with high concentrations of glucose and insulin. The glucose consumption was determined by multi-functional automatic glucose-hexokinase method. The results showed that HPN had no effect on proliferation of HepG2 cells at low concentrations., The glucose consumption of HepG2 cells was improved by HPN when collaborating with a low concentration of insulin. When the insulin concentration increased to 1×10^{-6} mol/L, the HPN can markedly increase the glucose consumption of HepG2 cells. HPN can greatly enhance the glucose consumption in the insulin resistant cells with a concentration range of 5×10^{-8} mol/L to 1×10^{-7} mol/L. Therefore, HPN can significantly improve insulin resistance.

(本文编辑: 康亦兼)