

苦荞麦总黄酮对软脂酸诱导 EA. hy926 细胞 IRS-2 合成的影响

刘恋¹, 李刚², 柳春¹, 赵丹玉¹, 任艳玲^{1*}

(1. 辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847; 2. 日本三益制药株式会社, 福岡)

[摘要] 目的:研究苦荞麦总黄酮对于软脂酸诱导 EA. hy926 细胞胰岛素受体底物 2(IRS-2)合成的影响。方法:将体外培养的 EA. hy926 细胞分为正常对照组、模型组、苦荞麦总黄酮组、二甲双胍组,各组均加入 10% FBS 的 DMEM 完全培养基和终浓度为 50 nmol·L⁻¹的胰岛素,除正常对照组其余各组加入终质量浓度为 600 μmol·L⁻¹的软脂酸建立胰岛素抵抗细胞模型;苦荞麦总黄酮组加入终浓度为 125 mg·L⁻¹的苦荞麦总黄酮;二甲双胍组加入终浓度为 2 mmol·L⁻¹的二甲双胍。采用 RT-PCR 以及 western blot 法分别测定各组细胞 IRS-2 mRNA 和蛋白的表达。结果:模型组细胞 IRS-2 mRNA 和蛋白表达与正常组相比明显下降($P < 0.05$),正常对照组 IRS-2 mRNA 的相对表达量为(1.203 ± 0.040),蛋白相对表达量为(1.164 ± 0.034),模型组为(0.611 ± 0.022)和(0.580 ± 0.006),苦荞麦总黄酮组与二甲双胍组细胞 IRS-2 mRNA 和蛋白表达与模型组相比明显增加($P < 0.05$),治疗组间无明显差异($P > 0.05$)。苦荞麦总黄酮组 IRS-2 mRNA 的相对表达量为(0.904 ± 0.157),蛋白相对表达量为(0.845 ± 0.029),二甲双胍组为(0.890 ± 0.054)和(0.841 ± 0.006)。结论:苦荞麦总黄酮对于软脂酸诱导下 EA. hy926 细胞 IRS-2 合成具有明显促进作用。

[关键词] 苦荞麦总黄酮;胰岛素受体底物 2;胰岛素抵抗

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)08-0182-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014080182

Effect of Total Flavonoids of *Tartary buckwheat* on Palmitic Acid Induced IRS-2 Synthesis in EA. hy926 Cells

LIU Lian¹, LI Gang², LIU Chun¹, ZHAO Dan-yu¹, REN Yan-ling^{1*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine School of Basic Medical Sciences, Shenyang 110847, China; 2. Japan Samick Pharmaceutical Co. Ltd, Fukuoka, Japan)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of total flavonoids of tartary buckwheat on IRS-2 in EA. hy926 cells in the presence of palmitic acid. **Method:** EA. hy 926 cells were cultured *in vitro* and divided into control group, insulin resistance induced by palmitic acid group, total flavonoids of tartary buckwheat group and metformin group randomly. Each group combined 10% FBS ADMA complete medium and insulin (50 nmol · L⁻¹), compared with control group, other groups contain palmitic acid (600 μmol · L⁻¹), and total flavonoids of tartary buckwheat group contain total flavonoids of tartary buckwheat flavonoids (125 mg · L⁻¹), metformin group contain metformin (2 mmol · L⁻¹). The IRS-2 mRNA and protein expression levels were determined by RT-PCR and Western blot respectively. **Result:** Compared with control groups, the expression levels of IRS-2 mRNA and protein were significantly lower in insulin resistance group ($P < 0.05$). the expresssion levels of IRS-2 mRNA and protein of control group were (1.203 ± 0.040) and (1.164 ± 0.034), and insulin resistance induced by palmitic acid group were (0.611 ± 0.022) and (0.580 ± 0.006), Compared with insulin resistance group, the IRS-2 mRNA and protein expression were markedly increased in both total flavonoids of tartary buckwheat group and metformin group ($P < 0.05$), and there is no significant difference between two groups. the expression levels

[收稿日期] 20130514(016)
[基金项目] 辽宁省科学技术计划项目(2008226021);2012 年度辽宁省博士科研启动基金项目(20121100)
[第一作者] 刘恋,硕士,从事中药及其提取物对受体及受体后信号转导途径的研究,Tel:18604065073,E-mail:ll2lxy@163.com
[通讯作者] *任艳玲,博士,教授,从事方药配伍规律及作用机制研究,Tel:024-31207267,E-mail:yanlingren@tom.com

of IRS-2 mRNA and protein of total flavonoids of tartary buckwheat group were (0.904 ± 0.157) and (0.845 ± 0.029), and metformin group randomly were (0.890 ± 0.054) and (0.841 ± 0.006). **Conclusion:** Total flavonoids of tartary buckwheat effectively promotes the expression of IRS-2 mRNA and protein in endothelial cells under palmitic acid stimulation.

[**Key words**] total flavonoids of tartary buckwheat; insulin receptorsubstrate-2; insulin resistance

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是2型糖尿病重要的发病机制之一,贯穿于糖尿病的发生、发展全过程,同时也是导致糖尿病并发症的“动力”根源^[1]。IR指的是正常剂量的胰岛素无法产生其应有的生物学效应的一种状态^[2]。最新研究表明,血管内皮细胞胰岛素信号通路的障碍是胰岛素抵抗发生发展的重要原因^[3],血管内皮细胞内的胰岛素受体底物2(insulin receptorsubstrate-2, IRS-2)是该信号通路中重要分子。本实验体外培养的人脐静脉内皮细胞株 EA.hy926 细胞,通过高浓度软脂酸诱导,建立胰岛素抵抗状态细胞模型,研究苦荞麦总黄酮对于胰岛素抵抗状态下的 EA.hy926 细胞中 IRS-2 mRNA 和蛋白表达的影响。

1 材料

1.1 药物 苦荞麦总黄酮(日本三益制药株式会社提供),经显色分光光度法测定黄酮样品中总黄酮含量为 99.16%,即黄酮样品中总黄酮浓度为 $991.645 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;一抗兔抗人 IRS-2 抗体,二抗 HRP 标记山羊抗兔 IgG(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 试剂 DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶、双抗(美国 HyClone 公司);RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司);二甲双胍(上海生工生物工程有限公司)。

1.3 动物与细胞株 人脐静脉血管内皮细胞株 EA.hy926 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2 方法

2.1 EA.hy926 细胞的培养 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基常规培养 EA.hy926 细胞。定期冻存细胞,每 2 d 换液 1 次,3 d 传代 1 次。取生长状态良好处于对数期的细胞,胰酶消化后,接种于 96 孔板或者培养瓶内待用。

2.2 分组 分为正常组、模型组、苦荞麦总黄酮组、二甲双胍组。各组细胞均加入含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基和终浓度为 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胰岛素,除正常对照组外,其他各组加入终浓度为 $600 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的软脂酸建立胰岛素抵抗血管内皮细胞模型^[4];根据本实验前期研究结果,苦荞麦总黄酮

组加入终浓度为 $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苦荞麦总黄酮^[5];二甲双胍组加入终浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的二甲双胍。

2.3 RT-PCR 测定细胞 IRS-2 mRNA 表达 将细胞按 5×10^5 个/mL 的密度接种于培养瓶里,各组细胞加入处理因素 24 h 后,提取细胞总 RNA 并测定浓度及纯度,按 RT-PCR 试剂盒说明进行操作。IRS-2 上游引物序列为:5'-GGCTTCCAGAATGCTCTCAA-3',下游引物序列为:5'-AAGTCAATGCTGGCGTAG-GT-3',扩增片段大小 239 bp,退火温度为 65°C 。 β -actin 上游引物序列:5'-ACACGAAAGCAATGCTAT-CACCTC-3',下游引物序列:5'-TGACAGCAGTCGGT-TGGAGCGA-3'扩增片段长度 153 bp,退火温度为 65°C 。PCR 扩增结束后,将其产物进行琼脂糖凝胶电泳,并采用凝胶成像分析系统对其结果进行分析。以各组 IRS-2 条带吸光度与相应内参条带吸水度的比值来表示 IRS-2 mRNA 表达的强弱。

2.4 Western bolt 测定细胞 IRS-2 蛋白表达 细胞按上述分组加药处理结束后,提取各组细胞总蛋白,并测定浓度。将各组蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,之后转印 1.5 h,封闭液 37°C 封闭 2 h,加入兔抗人 IRS-2 抗体(1:100 稀释), 37°C 处理 2 h 后, 4°C 过夜。二抗采用 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:1 000 稀释),常温 2 h, DAB 染色。扫描条带测定积分吸光度值(A),内参采用 GAPDH。结果以各组 IRS-2 IA 与 GAPDH IA 的比值表示。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件,各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析,两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 EA.hy926 IRS-2 mRNA 的表达 RT-PCR 结果表明与正常对照组相比,模型组细胞 IRS-2 mRNA 表达明显减少($P < 0.05$);苦荞麦总黄酮组与二甲双胍组与模型组相比 IRS-2 mRNA 表达显著增加($P < 0.05$),苦荞麦总黄酮组与二甲双胍组间无显著差异(图 1,表 1)。

3.2 EA.hy926 IRS-2 蛋白的表达 Western blot 结果表明,与正常对照组相比,模型组细胞 IRS-2 蛋白表达明显减少($P < 0.05$);苦荞麦总黄酮组与二甲

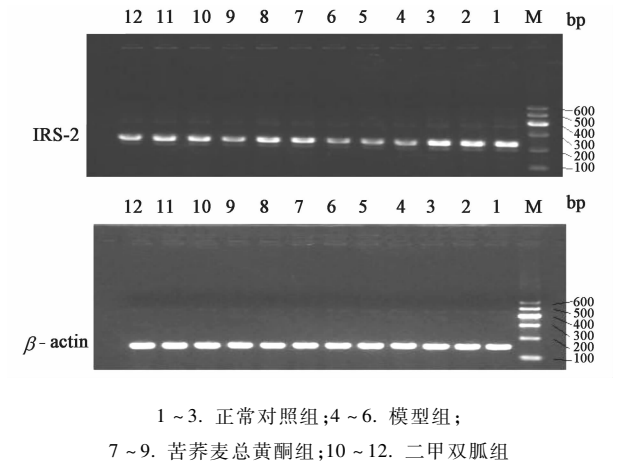


图 1 各组细胞 IRS-2 mRNA 和 β -actin mRNA 的表达

双胍组细胞 IRS-2 蛋白与模型组相比表达显著增加 ($P < 0.05$),苦荞麦总黄酮组与二甲双胍组间无显著差异 (图 2,表 1)。

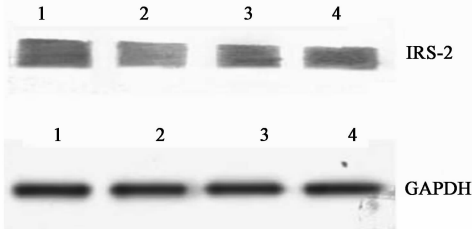


图 2 各组细胞 IRS-2 蛋白和 GAPDH 蛋白的表达

组别	IRS-2 mRNA	IRS-2 IA
	/ β -actin mRNA	/ GAPDH IA
正常对照	1.203 $\pm$ 0.040	1.164 $\pm$ 0.034
模型	0.611 $\pm$ 0.022 ¹⁾	0.580 $\pm$ 0.006 ¹⁾
苦荞麦总黄酮	0.904 $\pm$ 0.157 ²⁾	0.845 $\pm$ 0.029 ²⁾
二甲双胍	0.890 $\pm$ 0.054 ²⁾	0.841 $\pm$ 0.006 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

IR 是 2 型糖尿病的重要发病基础,改善 IR 是治疗 2 型糖尿病的关键^[6]。NO 是重要的血管舒张因子,血管内皮细胞是合成 NO 的主要来源^[7]。血管内皮细胞内的 IRS-2/eNOS 信号途径是合成 NO,使胰岛素穿过内皮屏障作用于靶组织的枢纽,而 2 型糖尿病患者血管内皮细胞 NO 合成下降,该途径出现明显障碍^[3]。因此提高该信号途径、增加 NO 的释放、促进胰岛素越过内皮屏障可以作为改善 IR 的治疗策略。IRS-2 是血管内皮细胞内的 IRS-2/

eNOS 信号途径的关键分子,介导胰岛素在细胞内发挥生物学作用,促进 NO 的释放。随着基因敲除技术的发展,发现敲除 IRS-2 基因的纯合子动物具有 2 型糖尿病的全部特征,因此,IRS-2 的作用及表达变化近年来引起了学术界的广泛关注^[8]。

目前,胰岛素抵抗治疗药物主要有双胍类药物、血管紧张素转换酶抑制剂以及胰岛素增敏剂等^[9]。采用这些西药治疗虽然降糖效果较好,起效快,但是副作用较大,对某些并发症改善不明显。并且 2 型糖尿病是一种进展性疾病,病程长,甚至是终身性的,因此开发安全性较高的有效治疗药物势在必行。中药治疗具有多靶点,副作用小等特点越来越受到人们的关注^[10-11]。苦荞麦其花、叶、茎、籽粒中均富含多种黄酮类化合物。这些黄酮类化合物具有降血糖、血脂、抗氧化和改善微循环等多种生理活性^[12]。本研究前期工作已提取出苦荞麦的有效成分总黄酮,并发现其具有明显增加血管内皮细胞内 eNOS 的表达,增加 NO 的合成的作用^[5]。本实验进一步探讨苦荞麦总黄酮对于血管内皮细胞内的 IRS-2/eNOS 信号途径中关键分子 IRS-2 的表达的影响,研究其改善胰岛素抵抗的可能机制。

本研究结果表明,与正常对照组相比,模型组细胞 IRS-2 mRNA 与蛋白表达均明显下降,结合本课题组前期的研究结果^[5]及以往文献^[13-14],说明本实验的 IR 细胞模型造模是成功的。苦荞麦总黄酮组与二甲双胍组细胞 IRS-2 mRNA 与蛋白表达较模型组明显提高,说明苦荞麦总黄酮与二甲双胍能增强胰岛素抵抗状态下血管内皮细胞 IRS-2 mRNA 以及蛋白的表达,进而提高血管内皮细胞内的 IRS-2/eNOS 信号途径,进而提高了 IRS-2 的下游分子 eNOS 的表达,增加了 NO 的合成,利于血管舒张,从而促进胰岛素通过血管屏障转运至靶组织,发挥其生物学效应。这可能是苦荞麦总黄酮作用的可能机制。苦荞麦总黄酮与二甲双胍的作用无显著差异,但苦荞麦本身是药食同源的经济作物,广泛种植,具有副作用小、对并发症的改善效果好、患者的经济负担轻等优势,因此具有非常广阔的开发价值。

[参考文献]

[1] 王春怡,陈艳芬,李卫民,等. 黄芪葛根汤对实验性糖尿病及胰岛素抵抗的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):144.

[2] 罗静思,夏宁. 罗格列酮与胰岛素信号传递中的 IRS-2、FOXO1 及胰岛素抵抗关系的研究进展[J]. 广西医学,2010,32(5):592.

灵巴菌质油对 A549 细胞成瘤能力及伪足形成的影响

燕珂, 杨光明, 孙钰, 潘扬*
(南京中医药大学药学院, 南京 210023)

〔摘要〕 目的:探讨灵巴菌质油对人肺癌细胞 A549 成瘤能力及伪足形成的效应。**方法:**灵巴菌质油 25,50,100 mg·L⁻¹ 分别作用 A549 细胞 20 d 和 24 h,通过软琼脂克隆形成法和 PI 单染法观察灵巴菌质油对 A549 细胞的成瘤能力和生长周期的影响;灵巴菌质油 100 mg·L⁻¹ 作用 A549 细胞 24 h,通过免疫荧光染色法观察细胞骨架的影响。**结果:**灵巴菌质油能够抑制细胞克隆的形成,低、中、高剂量组作用 A549 细胞 20 d 后的平均细胞克隆形成数与空白对照组比较均有极显著差异 ($P < 0.01$),抑制率与药物浓度呈正相关,并将细胞的生长阻滞在 G₂ 期,中、高剂量组 G₂ 期细胞比例分别为 21.92% 和 29.94%,与空白对照组 12.44% 相比均有显著性差异 ($P < 0.05$);但灵巴菌质油能改变 A549 细胞中微丝结构的分布,使其产生伪足。**结论:**灵巴菌质油具有降低 A549 细胞克隆形成能力及损伤其细胞骨架的作用,但它亦可能导致瘤细胞的迁移。

〔关键词〕 灵巴菌质油; A549 细胞; 成瘤能力; 伪足形成
〔中图分类号〕 R285.5 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1005-9903(2014)08-0185-05
〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfix.2014080185

〔收稿日期〕 20131008 (008)
〔基金项目〕 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (ysxk-2010);国家药典委员会资助项目 (2013)
〔第一作者〕 燕珂,硕士,助理研究员,从事中药及质量标准研究,Tel: 025-85811958,E-mail: flyingke01@163.com
〔通讯作者〕 * 潘扬,博士,教授,从事中药化学与生物技术研究,Tel: 025-86798185,E-mail: y.pan2006@163.com

[3] Kubota T, Kubota N, Kumagai H, et al. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle [J]. Cell Metabolism, 2011, 13(3):294.

[4] 潘丽丽. 游离脂肪酸对人脐静脉内皮细胞 eNOSmRNA 及 ET-1mRNA 表达水平的影响 [D]. 石家庄:河北医科大学,2004.

[5] 杨雪峰,张瑞鹏,李刚,等. 苦荞麦总黄酮对软脂酸诱导 EA.hy926 细胞 NO 合成的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012,28(10):1055.

[6] 蒲翔,冯泳,王明强,等. 理气活血法对 2 型糖尿病模型大鼠胰岛素抵抗的影响 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1):126.

[7] 蔡鹰,魏群利,陆晓和. 回心草对脐静脉内皮细胞的保护作用及对分泌一氧化氮和一氧化氮合酶的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(7):79.

[8] 付颖,王耀光,李永春,等. II 型糖尿病大鼠运动后骨骼肌 IRS-2、GLUT4 含量及 IRS-2 磷酸化变化的时间特征 [J]. 首都体育学院学报,2011,23(4):372.

[9] 明志红,肖伟,黄雁玲. 二甲双胍联合用药治疗 2 型

糖尿病的疗效观察 [J]. 当代医学,2010,16(9):51.

[10] 田秀红,刘鑫峰,闫峰,等. 苦荞麦的药理作用与食疗 [J]. 农产品加工学刊,2008,14(8):31.

[11] 郑华,戈延茹. 改善胰岛素抵抗的中药活性成分及其作用机制研究进展 [J]. 中国中药杂志,2010,35(4):531.

[12] 崔鹏,李继安. 中药有效成分改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗的研究进展 [J]. 中国煤炭工业医学杂志,2012,15(5):736.

[13] Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells [J]. Diabetes,2000,49(11):1939.

[14] Whiteside C I. Cellular mechanisms and treatment of diabetes vascular complications converge on reactive oxygen species [J]. Current Hypertension Reports,2005,7(2):148.