

山药多糖对人肝癌 HepG2 细胞葡萄糖消耗能力及胰岛素抵抗的影响^Δ

苏瑾*, 焦钧, 于莲#, 孙维彤, 胡艳秋, 郭宇(佳木斯大学药学院省高校生物药制剂重点实验室, 黑龙江佳木斯 154007)

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)04-0458-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.04.09

摘要 目的:研究山药多糖对人肝癌 HepG2 细胞葡萄糖消耗能力和胰岛素抵抗的影响。方法:采用胰岛素(1×10^{-7} mol/L)持续作用于 HepG2 细胞 24 h 以复制细胞胰岛素抵抗模型。将正常 HepG2 细胞分为正常对照(常规培养液)组、二甲双胍(0.01 mg/ml)组与山药多糖高、中、低浓度(质量浓度分别为 1.00、0.10、0.01 mg/ml)组;将胰岛素抵抗 HepG2 细胞分为模型(常规培养液)组、二甲双胍(0.01 mg/ml)组与山药多糖高、中、低浓度(质量浓度分别为 1.00、0.10、0.01 mg/ml)组,另设正常对照(正常细胞,常规培养液)组。加入相应药物后作用 24 h,倒置显微镜下观察正常细胞与模型细胞的形态;测定细胞葡萄糖消耗量(Δ GC),MTT 法测定单位细胞 Δ GC(Δ GC/OD)。结果:与正常对照组比较,山药多糖高、中、低浓度组正常细胞 Δ GC 增加, Δ GC/OD 升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);模型组细胞 Δ GC 减少, Δ GC/OD 降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,山药多糖高、中、低浓度组细胞 Δ GC 增加, Δ GC/OD 升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。正常 HepG2 细胞与胰岛素抵抗 HepG2 细胞的形态未见明显差异。结论:山药多糖能改善 HepG2 细胞的葡萄糖消耗能力,并且可以增强细胞对胰岛素的敏感性,具有体外降糖作用。

关键词 糖尿病;山药多糖;HepG2 细胞;胰岛素抵抗;降糖活性

Effects of *Dioscorea japonica* Polysaccharide on Glucose Consumption Capacity and Insulin Resistance of Human Lung Cancer HepG2 Cells

SU Jin, JIAO Jun, YU Lian, SUN Wei-tong, HU Yan-qiu, GUO Yu (Provincial Key Lab of Biological Medicine Preparation, College of Pharmacy, Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154007, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of *Dioscorea japonica* polysaccharide on glucose consumption capacity and insulin resistance of human lung cancer HepG2 cells. METHODS: HepG2 cells were treated with insulin (1×10^{-7} mol/L) continuously to induce insulin resistance model cells. Normal HepG2 cells were divided into normal control group (routine culture), metformin group (0.01 mg/ml) and *D. japonica* polysaccharide high-dose, medium-dose and low-dose groups (1.00, 0.10, 0.01 mg/ml); model HepG2 cells were divided into model group (routine culture), metformin group (0.01 mg/ml) and *D. japonica* polysaccharide high-dose, medium-dose and low-dose groups (1.00, 0.10, 0.01 mg/ml), setting normal control group (normal cells, routine culture). They were treated with relevant medicine for 24 h, cytomorphology photos were observed by microscope; glucose consumption of cells (Δ GC) was determined, and glucose consumption of cells of unit cell (Δ GC/OD) by MTT assay. Morphology of normal cells and model cells were observed. RESULTS: Compared with normal control group, Δ GC and Δ GC/OD of normal cells were increased in *D. japonica* polysaccharide high-dose, medium-dose and low-dose groups; there was statistical significance ($P < 0.01$). Compared with normal control group, Δ GC and Δ GC/OD were decreased in model group; there was statistical significance ($P < 0.01$). Compared with model group, those of *D. japonica* polysaccharide high-dose, medium-dose and low-dose groups were increased; there was statistical significance ($P < 0.01$). No obvious change of cytomorphology in normal HepG2 cells and insulin-resistant HepG2 cells was found. CONCLUSIONS: *D. japonica* polysaccharide can improve the ability of HepG2 cells to consume glucose, and can enhance the sensitivity of cells to insulin. *D. japonica* polysaccharide has a hypoglycemic effect *in vitro*.

KEYWORDS Diabetes; *Dioscorea japonica* polysaccharide; HepG2 cells; Insulin resistance; Hypoglycemic activity

山药(*Dioscoreaceae japonica*)为薯蓣科植物薯蓣的干燥根茎,性平、味甘,有健脾除湿、补气益肾等功效^[1-2]。自古以来山药就是药食同源的保健食品之一,现代研究发现山药主要含有丰富的淀粉、蛋白质、多糖、脂肪酸、游离氨基酸等营养成分,

具有降血糖、降血脂、抗肿瘤、抗氧化、增强免疫功能等药理作用,其中多糖为山药的主要活性成分之一^[3-5]。近年来多糖作为降糖活性物质的研究受到了人们的青睐,其对糖尿病及其并发症的预防和治疗具有药性平和、不良反应小等特点。文献显示目前降糖药物作用机制多以建立胰岛素抵抗的细胞或动物模型进行研究^[6-12]。为此,笔者研究山药多糖对正常 HepG2 细胞及胰岛素抵抗模型 HepG2 细胞体外降糖作用的影响,为下一步山药多糖体内降糖活性研究提供依据。

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81274101)

* 副教授。研究方向:靶向制剂及靶向系统。E-mail: sj0129@163.com

通信作者:教授。研究方向:靶向制剂及中药微生态制剂。E-mail: jdyulian@163.com

1 材料

1.1 仪器

3100型CO₂恒温培养箱(美国Thermo公司);酶标仪(美国Tecan公司);A1130232型倒置显微镜(日本Olympus公司);DW-HL388型超低温冷冻储存箱(中科美菱低温有限责任公司);LS-C50L型高压蒸汽灭菌锅(江阴滨江医疗设备有限公司);TDZ4-WS台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 药品与试剂

山药多糖(陕西慈缘生物技术有限公司,批号:201101207,纯度:95%);胰岛素(美国Sigma公司);盐酸二甲双胍片(河南兴源制药有限公司,批号:1305200,规格:0.25g/片);RPMI1640培养液(美国Hyclone公司);葡萄糖试剂盒、胎牛血清(FBS)(杭州四季青生物工程材料有限公司);0.25%胰蛋白酶(美国Gibco公司);青霉素原液(中国医学科学院生物医学工程研究所);磷酸盐缓冲液(PBS,武汉博士德生物有限公司,pH 7.2~7.6);MTT、二甲基亚砜(DMSO)均购自美国Amresco公司。

1.3 细胞

HepG2细胞(中国科学院细胞生物学研究所)。

2 方法

2.1 山药多糖对正常细胞的葡萄糖消耗试验

取对数生长期的正常HepG2细胞,用0.25%胰蛋白酶溶液消化细胞,用10%FBS培养液吹打均匀,在倒置显微镜下调整细胞密度至 $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$,每孔200 μl ,接种于96孔培养板中,置于培养箱中培养24 h。待细胞贴壁后,倾去培养液,更换无血清培养液培养12 h,待细胞适应无血清环境后再将培养液倾出,更换无血清含药培养基。将正常HepG2细胞分为正常对照(常规培养液)组、二甲双胍(0.01 mg/ml)组与山药多糖高、中、低浓度(质量浓度分别为1.00、0.10、0.01 mg/ml)组,每孔100 μl ,每组设3复孔。培养24 h后,取40 μl 培养液用葡萄糖试剂盒检测葡萄糖剩余含量,并计算葡萄糖消耗量(ΔGC),考察山药多糖对正常HepG2细胞 ΔGC 影响;弃去培养液,加上无血清培养液,培养24 h后,以不铺细胞的培养液为空白组。用葡萄糖试剂盒检测培养液中葡萄糖剩余含量, ΔGC =空白组细胞葡萄糖含量-用药物组细胞葡萄糖含量。

2.2 山药多糖对胰岛素抵抗细胞的葡萄糖消耗试验

将处于对数生长期的正常HepG2细胞以 $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 的密度接种于96孔板,每孔板200 μl ,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂饱和湿度培养箱内培养24 h。加入含有胰岛素的培养液,使胰岛素的终浓度为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ^[13]以复制胰岛素抵抗模型。将胰岛素抵抗细胞用0.25%胰蛋白酶溶液消化细胞,用10%FBS培养液吹打均匀,在倒置显微镜下调整为细胞密度 $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 的单细胞悬液,每孔200 μl ,接种于96孔培养板中,置于培养箱中培养24 h。待细胞贴壁后,倾去培养液,更换无血清培养液培养12 h,待细胞适应无血清环境后再将培养液倾出,更换无血清含药培养基。将胰岛素抵抗细胞分为模型(常规培养液)组、二甲双胍(0.01 mg/ml)组与山药多糖高、中、低浓度(质量浓度分别为1.00、0.10、0.01 mg/ml)组,每孔100 μl ,每组设3复孔;另设正常对照(常规培养液)组。培养24 h后,取40 μl 培养液用葡萄糖试剂盒检测葡萄糖剩余含量,按“2.1”项下方法计算 ΔGC ,考察山药多糖对模型细胞 ΔGC 的影响。

2.3 细胞形态学观察

将“2.2”项下各组细胞,置倒显微镜下观察细胞的形态,并拍照记录。

2.4 MTT 试验

取“2.1”和“2.2”项下各组细胞培养液,分别加入20 μl MTT溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养4 h后,倾去上清液,加入200 μl DMSO,振荡10 min至紫色结晶溶解,用酶标仪于490 nm波长下检测各孔的光密度(OD)。OD水平代表细胞存活水平,以 $\Delta\text{GC}/\text{OD}$ 表示单位细胞 ΔGC 。

2.5 统计学方法

采用SPSS 17.0软件处理数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 正常HepG2细胞的 ΔGC 检测结果

与正常对照组比较,二甲双胍组与山药多糖高、中、低浓度组正常细胞 ΔGC 增加, $\Delta\text{GC}/\text{OD}$ 增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);山药多糖高、中浓度组正常细胞OD减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明,山药多糖可使单位细胞的 ΔGC 增加。各组正常HepG2细胞 ΔGC 的检测结果见表1。

表1 各组正常HepG2细胞的 ΔGC 检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Glucose consumption of normal HepG2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度,mg/ml	$\Delta\text{GC},\text{mmol/L}$	OD	$\Delta\text{GC}/\text{OD}$
正常对照组	0	3.996 ± 0.023	0.687 ± 0.004	5.817 ± 0.037
山药多糖低浓度组	0.01	$4.288 \pm 0.052^*$	0.671 ± 0.005	$6.390 \pm 0.028^*$
山药多糖中浓度组	0.10	$4.440 \pm 0.046^*$	$0.635 \pm 0.004^*$	$6.992 \pm 0.043^*$
山药多糖高浓度组	1.00	$4.849 \pm 0.058^*$	$0.628 \pm 0.008^*$	$7.717 \pm 0.055^*$
二甲双胍组	0.01	$4.585 \pm 0.033^*$	0.683 ± 0.006	$6.714 \pm 0.027^*$

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$

3.2 胰岛素抵抗HepG2细胞的 ΔGC 检测结果

与正常对照组比较,模型组细胞 ΔGC 减少, $\Delta\text{GC}/\text{OD}$ 降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,二甲双胍组与山药多糖高、中、低浓度组细胞 ΔGC 增加, $\Delta\text{GC}/\text{OD}$ 升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);山药多糖高、中浓度组细胞OD减少,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果表明,山药多糖可使单位胰岛素抵抗HepG2细胞 ΔGC 增加。各组胰岛素抵抗HepG2细胞的 ΔGC 检测结果见表2。

表2 各组胰岛素抵抗HepG2细胞的 ΔGC 检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Glucose consumption of insulin-resistant HepG2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度,mg/ml	$\Delta\text{GC},\text{mmol/L}$	OD	$\Delta\text{GC}/\text{OD}$
正常对照组	0	3.996 ± 0.023	0.687 ± 0.004	5.817 ± 0.037
模型组	0	$2.589 \pm 0.041^*$	0.677 ± 0.007	$3.824 \pm 0.043^*$
山药多糖低浓度组	0.01	$3.359 \pm 0.024^{**}$	0.664 ± 0.007	$5.056 \pm 0.016^{**}$
山药多糖中浓度组	0.10	$3.561 \pm 0.053^{**}$	$0.656 \pm 0.006^{\#}$	$5.429 \pm 0.025^{**}$
山药多糖高浓度组	1.00	$3.946 \pm 0.044^{**}$	$0.641 \pm 0.005^{\#}$	$6.198 \pm 0.085^{**}$
二甲双胍组	0.01	$3.722 \pm 0.053^{**}$	0.680 ± 0.008	$5.473 \pm 0.067^{**}$

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, $^{\#}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

3.3 正常 HepG2 细胞与胰岛素抵抗 HepG2 细胞的形态

倒置显微镜下观察,正常 HepG2 和胰岛素抵抗 HepG2 细胞均贴壁生长,细胞呈梭形、菱形、不规则形;两组细胞生长状态均未见明显差别。正常 HepG2 细胞与胰岛素抵抗 HepG2 细胞的形态见图 1。

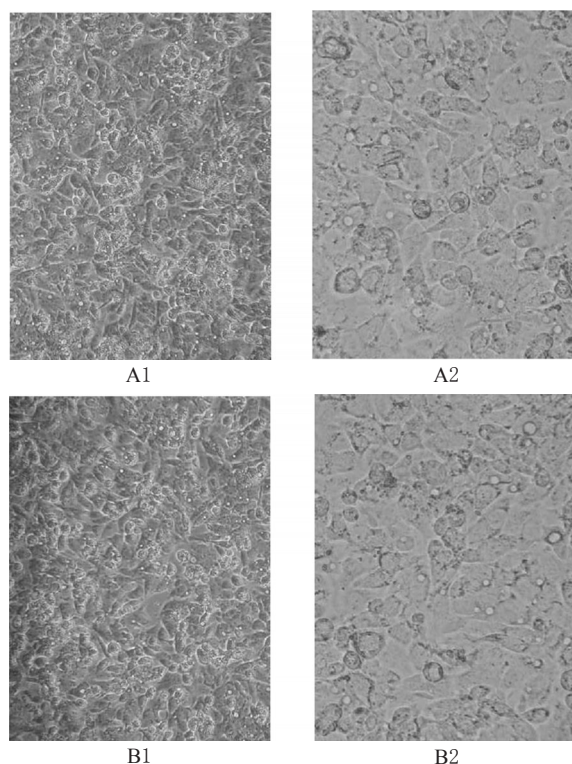


图 1 正常 HepG2 细胞与胰岛素抵抗 HepG2 细胞的形态
A1.正常 HepG2 细胞($\times 200$);A2.正常 HepG2 细胞($\times 400$);B1.胰岛素抵抗 HepG2 细胞($\times 200$);B2.胰岛素抵抗 HepG2 细胞($\times 400$)

Fig 1 Cytomorphology photos of normal HepG2 cells and Insulin-resistant HepG2 cells

A1.normal HepG2 cells($\times 200$);A2. normal HepG2 cells ($\times 400$); B1. Insulin-resistant HepG2 cells ($\times 200$); B2. Insulin-resistant HepG2 cells ($\times 400$)

4 讨论

HepG2 细胞来源于人肝胚胎瘤细胞株,其是一种表型与正常肝细胞极为相似的肝癌细胞,并且保留了正常肝细胞的特征和功能。2 型糖尿病主要是外周组织对胰岛素不够敏感(胰岛素抵抗)造成血液中葡萄糖升高,因此采用 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型来研究 2 型糖尿病是合适的。

研究结果证实山药多糖不仅可以增加正常 HepG2 细胞 ΔGC ,也能很好地增加胰岛素抵抗 HepG2 细胞 ΔGC ,且呈剂量依赖性。MTT 法是一种检测细胞存活和生长的方法,MTT 数值高低代表细胞数的多寡^[14-15]。MTT 试验中,0.10、1.00 mg/ml 质量浓度下,山药多糖对 HepG2 细胞增殖有明显抑制作用,说明用正常 HepG2 及胰岛素抵抗 HepG2 单位细胞 ΔGC (即 $\Delta GC/OD$)可以扣除细胞增殖的影响。本研究提示增强 HepG2 细胞

对胰岛素的敏感性可能是山药多糖防治 2 型糖尿病的作用机制之一,但山药多糖降糖作用机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:16.
- [2] 何海玲,单承莺,张卫明,等.山药研究进展[J].中国野生植物资源,2006,25(6):1.
- [3] 李敏.山药活性成分提取技术及药理功能的研究进展[J].南方农业学报,2013,44(7):1 184.
- [4] 杨宏莉,张宏馨,李兰会,等.山药多糖对 2 型糖尿病大鼠降糖机理的研究[J].河北农业大学学报,2010,33(3):100.
- [5] 杨宏莉,李少春,张伟伟,等.山药多糖的药理作用[J].医学研究与教育,2010,27(3):80.
- [6] 邹玲莉,韩国柱,肇小茗,等.茶多酚对胰岛素抵抗及非胰岛素抵抗 HepG2 细胞体外糖脂代谢的影响[J].中成药,2010,32(8):1 411.
- [7] 李长贵,宁光,陈家伦.胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型的建立及鉴定[J].中国糖尿病杂志,1999,7(4):198.
- [8] Park SY, Lee S, Park KS, *et al.* Proteomic analysis of cellular change involved in mitochondria-to-nucleus communication in L6 GLUT4myc myocytes[J]. *Proteomics*, 2006,6(4):1 210.
- [9] 何云.山药多糖降血糖作用的实验研究[J].华北煤炭医学院学报,2008,10(4):448.
- [10] 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,2008,24(7):971.
- [11] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, *et al.* Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening [J]. *Pharmacol Res*, 2005,52(4):313.
- [12] 段亚平,王聚乐,普珍,等.藏药花锚降血糖和降血脂作用研究[J].中国药房,2011,22(43):4 044.
- [13] 郭丽民,张汝学,贾正平,等.地黄寡糖对 HepG2 胞增殖及胰岛素抵抗的作用[J].中国中药杂志,2007,32(13):1 328.
- [14] 汪宁,朱荃,周义维,等.桑寄生对培养的人 HepG2 细胞葡萄糖消耗作用的影响[J].中医药学刊,2006,15(3):442.
- [15] 陈红英,李学刚,叶小利,等.黄连中胆碱的分离及其对小檗碱在 HepG2 细胞中糖代谢作用的影响[J].中国中药杂志,2012,37(12):1 771.

(收稿日期:2014-03-05 修回日期:2014-06-12)

(编辑:张 静)