

· 基础研究 ·

大黄蒽醌类化合物对 HepG2 细胞内胰岛素信号通路的激活及其机制

刘璞¹, 尹佳萌^{1,2}, 张鑫¹, 郭君¹, 魏洁¹, 林雅军^{1*}

(¹ 北京医院国家老年医学中心, 国家卫生健康委北京老年医学研究所, 国家卫生健康委老年医学重点实验室, 中国医学科学院老年医学研究院, 北京 100730; ² 华北理工大学基础医学院, 河北省慢性疾病基础医学重点实验室, 河北 唐山 063210)

【摘要】目的 探讨大黄蒽醌类化合物在有或无胰岛素抵抗的情况下是否能激活人肝癌细胞 (HepG2) 胰岛素信号通路。**方法** 通过噻唑蓝比色法 (MTT 法) 测定细胞活性, 利用醛固酮 (ALD) 构建 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型, 考察 2.5~20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的大黄蒽醌类化合物 (大黄酸、大黄酚、大黄素、芦荟大黄素) 能否激活 HepG2 细胞胰岛素信号通路。利用葡萄糖含量检测试剂盒检测细胞葡萄糖, 利用糖原含量检测试剂盒检测细胞糖原, 通过 Western blot 检测细胞中磷酸化蛋白激酶 B/蛋白激酶 B (p-Akt/Akt)、磷酸化糖原合成酶激酶-3 β /糖原合成酶激酶-3 β (p-GSK-3 β /GSK-3 β) 蛋白表达。采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。根据数据类型, 分别采用 *t* 检验或方差分析进行组间比较。**结果** 2.5~20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的大黄蒽醌类化合物 (大黄酸、大黄酚、大黄素、芦荟大黄素) 对 HepG2 细胞的存活率无显著影响 ($P>0.05$)。然而, 有或无胰岛素抵抗的情况下均能增加 p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 比值 ($P<0.05$)。进一步研究还发现大黄酸、大黄酚、大黄素处理组的葡萄糖相对含量均降低 ($P<0.05$), 芦荟大黄素葡萄糖相对含量变化不明显 ($P>0.05$)。大黄酸、大黄酚、大黄素及芦荟大黄素处理组的糖原相对含量均降低 ($P<0.05$)。大黄酸和大黄素均能够逆转醛固酮诱导的 HepG2 细胞糖原颗粒减少。**结论** 大黄蒽醌类化合物 (大黄酸、大黄酚、大黄素、芦荟大黄素) 在有或无胰岛素抵抗的情况下均能激活 HepG2 细胞糖原合成通路。

【关键词】 胰岛素抵抗; 大黄蒽醌类化合物; HepG2 细胞; 抗蛋白激酶 B; 糖原合成酶激酶-3 β

【中图分类号】 R587.1

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2022.10.166

Activation of rhubarb anthraquinones on insulin signaling pathway in HepG2 cells and its mechanism

LIU Pu¹, YIN Jia-Meng^{1,2}, ZHANG Xin¹, GUO Jun¹, WEI Jie¹, LIN Ya-Jun^{1*}

(¹ National Center of Gerontology of Beijing Hospital, Beijing Institute of Geriatrics of National Health Commission, Key Laboratory of Geriatrics of National Health Commission, Institute of Geriatrics of Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China;

² School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, Tangshan 063210, China)

【Abstract】Objective To investigate whether rhubarb anthraquinones can activate the insulin signaling pathway in HepG2 cells in the presence and absence of insulin resistance. **Methods** After an insulin resistance model of HepG2 cells was constructed using aldosterone (ALD), whether rhubarb anthraquinones (including rhein, chrysophanol, emodin and aloe-emodin) at concentrations of 2.5–20 $\mu\text{mol/L}$ could activate the insulin signaling pathway in HepG2 cells was investigated by detecting cellular activity with Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. Contents of cellular glucose and glycogen levels were measured with glucose and glycogen content assay kit, respectively, and protein expression levels of phosphorylated protein kinase B/protein kinase B (p-Akt/Akt) and phosphoglycogen synthase kinase3 β /glycogen synthase kinase-3 β (p-GSK-3 β /GSK-3 β) were determined with Western blotting. SPSS statistics 20.0 was used for data analysis. Student's *t* test or ANOVA was employed for intergroup comparison. **Results** Rhein, chrysophanol, emodin and aloe-emodin of 2.5–20 $\mu\text{mol/L}$ had no significant effect on the survival of HepG2 cells ($P>0.05$). However, they increased the ratios of p-Akt/Akt and p-GSK-3 β /GSK-3 β in the presence and absence of insulin resistance ($P<0.05$). Further studies also found that the relative glucose content was reduced in the rhein, chrysophanol and emodin treatment groups ($P<0.05$), but no such change was seen in the aloe-emodin treatment group ($P>0.05$). The relative glycogen content was decreased in all the rhein, chrysophanol, emodin and aloe-emodin treatment groups ($P<0.05$). Both rhein and emodin were able to reverse the ALD-induced reduction of glycogen granules in HepG2 cells. **Conclusion** Rhubarb anthraquinones (rhein, chrysophanol, emodin and aloe-emodin) activate the glycogen synthesis pathway in HepG2 cells in the presence and absence of insulin resistance.

【Key words】 insulin resistance; rhubarb anthraquinones; HepG2 cells; Akt; GSK-3 β

收稿日期: 2022-06-16; 接受日期: 2022-08-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81671391)

通信作者: 林雅军, E-mail: linyajun2000@126.com

This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81671391).

Corresponding author: LIN Ya-Jun, E-mail: linyajun2000@126.com

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是指胰岛素作用的靶器官、靶组织对胰岛素的反应性降低或丧失而产生的一系列病理生理改变,即葡萄糖摄取减少、糖原合成与储存减少,继而导致胰岛素代偿性分泌增多^[1]。目前认为 IR 是 2 型糖尿病 (diabetes mellitus type 2, T2DM) 及多种代谢相关疾病的发病基础,是心血管疾病、高脂血症、高尿酸血症及代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 等疾病的共同病理基础,已经成为当前医学科研的热点问题^[2]。醛固酮 (aldosterone, ALD) 不仅调节肾脏水钠平衡,而且在 IR 中起重要作用^[3]。在 ALD 水平较高的 MS 患者中也常见 ALD 水平与高胰岛素血症及 IR 显著正相关,并在高血压和心血管并发症的发生中起到一定作用^[4]。ALD 是活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生的有效刺激物,其诱导 ROS 的生成不仅导致氧化应激,还损害胰岛素信号传导和胰岛素诱导的血管松弛^[5]。ALD 也导致蛋白酶体的胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substrate-1, IRS-1) 的降解,增加胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factors-1, IGF-1) 的信号,削弱胰岛素诱导的抗蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 磷酸化和一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 活化,并降低血管平滑肌细胞对葡萄糖的摄取。ALD 还能激活包括丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK), 如细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2), p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38) 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)^[6-8]。

大黄,味苦寒,具有保肝、利尿、抗肿瘤、泻下、消除氧自由基、抗炎及抑菌的作用,其主要成分包括蒽醌、蒽酮、芪等 7 大类^[9,10]。其中,大黄蒽醌类化合物包括大黄酸 (rhein, RHE)、大黄酚 (chrysophanol, CHR)、大黄素 (emodin, EMO)、芦荟大黄素 (aloe-emodin, ALO) 等。目前许多研究表明大黄多种有效成分在调节糖脂代谢、改善 IR 及治疗糖尿病中有显著作用^[11]。如大黄酸可有效治疗糖尿病肾病,同时有显著的降糖效果^[12];大黄素被证实对 IR 有显著的治疗效果^[13];此外,大黄及其有效成分也可能通过其他途径改善 IR 来治疗糖尿病^[14]。虽然许多报道均提示大黄蒽醌类化合物能够改善 IR,但大黄酸、大黄

酚、大黄素、芦荟大黄素在改善 IR 时的起效时间及作用强弱尚不明确,为此本研究在有或无 IR 的情况下研究大黄蒽醌类化合物能否激活 HepG2 细胞胰岛素信号通路。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

大黄酸、大黄酚、大黄素、芦荟大黄素、赖氨酸 (纯度 98%, 南京卡塞斯医药科技有限公司); ALD (上海源叶生物科技有限公司); 胰岛素 (江苏万邦生化医药公司); 胎牛血清、杜尔伯科改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、聚氨基丙烯酸正丁酯蛋白测定试剂盒 (bicinchoninic acid, BCA)、胰蛋白酶 (赛默飞世尔科技, 美国); 蛋白提取试剂盒 (radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA)、蛋白磷酸酶抑制剂、噻唑蓝 (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)、二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、葡萄糖含量检测试剂盒、糖原含量检测试剂盒、过碘酸-雪夫 (periodic acid-schiff staining, PAS) 染色 (索莱宝, 北京); 葡萄糖测试盒 (南京建成生物工程研究所); Akt、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β)、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-Akt)、磷酸化糖原合成酶激酶-3 β (phospho-glycogen synthase kinase 3 β , p-GSK-3 β)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (赛信通生物试剂有限公司, 上海); 山羊抗兔的二抗 (北京中杉金桥生物有限公司)。

1.2 细胞培养与传代

HepG2 细胞购于美国 ScienCell 公司。HepG2 细胞用 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素) 于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 每 2 天传代 1 次, 0.25% 胰蛋白酶进行消化、传代, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 药物的配制

将大黄酚、大黄素、芦荟大黄素加入到 DMSO 中, 制备需要的浓度。将大黄酸加入到赖氨酸水溶液 (摩尔比为 1:2), 制备需要的浓度。胰岛素加入到蒸馏水中, 制备需要的浓度。将醛固酮加入到 DMSO 中, 制备需要的浓度。

1.4 IR 模型建立

参照文献[15] IR 模型建立条件,并在其基础上加以完善。取对数生长期的 HepG2 细胞,分为对照组、ALD 组与不同浓度药物处理组。醛固酮(100 nmol/L)刺激血清饥饿的 HepG2 处理 18 h,然后将细胞在 DMEM(含 10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素)培养基中培养,药物处理组于药物处理 6 h 后,加入 17 nmol/L 胰岛素处理 5 min。在建立模型后,采用葡萄糖氧化酶法测定空白组(不含细胞只含培养基)、对照组与 ALD 组细胞培养上清中的葡萄糖消耗量。葡萄糖浓度(mmol/L)=标准品浓度×(样品管吸光度/标准管吸光度)。葡萄糖消耗量(mmol/L)=葡萄糖浓度_{空白组}-葡萄糖浓度_{处理组}。葡萄糖相对消耗量=葡萄糖消耗量_{处理组}/葡萄糖消耗量_{对照组}。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.5 细胞活力检测

以 2×10^3 /孔的接种密度将 HepG2 细胞接种于 96 孔板中,于 5%CO₂ 细胞培养箱中 37℃ 培养。细胞贴壁后,处理组加入终浓度为 2.5,5,10,20 μmol/L 大黄酸、大黄酚、大黄素、芦荟大黄素。处理 12 h 后加入 20 μl 5 g/L 的 MTT 溶液,继续培养 4 h。培养结束后,弃去培养基并加入 150 μl DMSO 避光震荡 10 min,快速在酶标仪下测定 490 nm 处的光密度值。细胞活性 = 处理组 A_{490nm} /对照组 $A_{490nm} \times 100\%$ 。每组设 6 个复孔,实验重复 3 次。

1.6 葡萄糖含量检测

根据试剂盒说明书进行了一系列实验。以 800×10^4 /孔的接种密度将 HepG2 细胞接种于 10 mm 培养皿中,10 μmol/L 大黄酸、大黄酚、大黄素、芦荟大黄素处理 12、24 h 后,蒸馏水收集各组细胞,将细胞悬液超声、煮沸、8 000 g 离心 10 min 后,收集上清液用于后续测定。在酶标仪下测定 505 nm 处的光密度值。葡萄糖含量 = $(A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}})/(A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div \text{蛋白浓度}$ 。葡萄糖相对含量 = 葡萄糖含量_{处理组}/葡萄糖含量_{对照组}。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.7 糖原含量检测

根据试剂盒说明书进行了一系列实验。以 800×10^4 /孔的接种密度将 HepG2 细胞接种于 10 mm 培养皿中,10 μmol/L 大黄酸、大黄酚、大黄素、芦荟大黄素处理 12、24 h 后,收集各组细胞,将细胞悬液超声、煮沸、8 000 g 离心 10 min 后,收集上清液用于后续测定。在酶标仪下测定 620 nm 处的光密度值。糖原含量 = $0.09 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}})/(A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div \text{蛋白浓度}$ 。糖原相对含量 = 糖原含量_{处理组}/糖原含量_{对照组}。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.8 Western blot 检测细胞内 Akt、GSK-3β、p-Akt、p-GSK-3β 蛋白的表达

以 60×10^4 /孔的接种密度将 HepG2 细胞接种于 60 mm 培养皿中,处理相应时间。提取的各组细胞蛋白采用蛋白提取试剂盒(radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA)在冰上裂解 30 min。BCA 蛋白浓度测定试剂盒法定量并配平各组蛋白后煮沸变性。然后通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白并转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上。在室温条件下,用含 8%脱脂牛奶的吐温-三羟甲基氨基甲烷缓冲生理盐水(tris buffered saline with tween, TBST)封闭 2 h,加入相应的一抗(1:1 000 稀释)4℃ 震荡过夜。随后 TBST 洗涤条带 4 次,每次 10 min。洗涤好的条带加入到稀释好的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔二抗(1:5 000 稀释)中,室温孵育 2 h。用增强型化学发光试剂(enhanced chemiluminescence, ECL)反应,采用 Image J 软件分析条带灰度值,计算目标蛋白表达量。实验重复 3 次。

1.9 糖原染色

制备细胞爬片,按照试剂说明书,采用过碘酸-雪夫(periodic acid-schiff staining, PAS)染色法进行糖原染色。具体步骤为:以 20×10^4 /孔的接种密度将 HepG2 细胞接种于 6 孔培养板中,处理相应时间后,取各组细胞爬片,95%乙醇固定 10 min,蒸馏水洗 3 次;聚乙二醇辛基苯基醚(triton-X-100)作用 15 min,蒸馏水洗 3 次;1%高碘酸溶液浸染 15 min,蒸馏水洗 3 次;席夫氏试剂(Schiff)染液浸染 30 min,亚硫酸钠溶液洗 3 次,每次 2 min,流水冲洗 5 min;苏木素染液(Hematoxylin)复染 1 min,蒸馏水洗 3 次;树胶封固于载玻片上。显微镜下观察,拍摄照片。实验重复 3 次。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,2 组间比较使用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大黄蒽醌类化合物的有效成分

我国大黄产量较高,而从大黄属植物中分离鉴定的主要成分包括蒽醌、蒽酮、芪等 7 大类。本研究采用的大黄蒽醌类化合物,即大黄酸、大黄酚、大黄素、芦荟大黄素,其结构详见图 1。

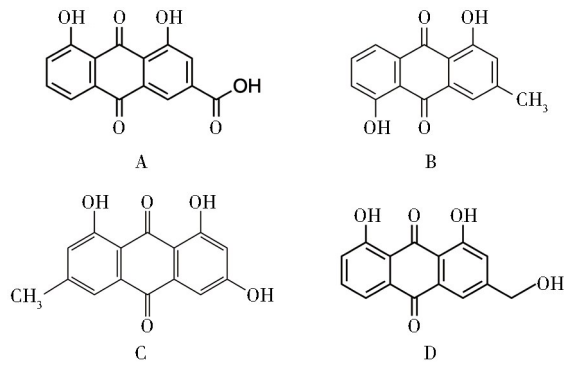


图 1 大黄蒽醌化合物的结构式

Figure 1 Structural formula of rhubarbanthraquinone compounds
A: rhein; B: chrysophanol; C: emodin; D: aloe-emodin.

2.2 大黄蒽醌类化合物对 HepG2 细胞增殖的影响

与对照组比较,2.5,5,10,20 μmol/L 大黄酸、大黄酚、大黄素、芦荟大黄素作用 12 h 后,细胞的存活率均无明显变化($P>0.05$;图 2)。大黄蒽醌类化合物对 HepG2 细胞的存活率无显著影响。

2.3 大黄蒽醌类化合物对 HepG2 细胞内 Akt、GSK-3β、p-Akt、p-GSK-3β 蛋白表达水平的影响

与对照组相比,大黄酸药物处理 3、6 h 时, p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β 比值显著增加($P<0.05$)。大黄酚药物处理组中, p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β 比值在药物处理 1.5 h 时显著增加($P<0.05$)。而大黄

素处理组中, p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β 比值在 12 h 内均有所增加,其中 p-Akt/Akt 的比值在 12 h 显著增加, p-GSK-3β/GSK-3β 比值在 1.5、3 h 增加较为明显($P<0.05$)。芦荟大黄素处理组中, p-GSK-3β/GSK-3β 比值在 1.5、6、12 h 增加, p-GSK-3β/GSK-3β、p-Akt/Akt 比值于 1.5 h 增加最为明显($P<0.05$;图 3,图 4)。

2.4 大黄蒽醌类化合物对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

与对照组比较,大黄酸、大黄酚、大黄素处理组的葡萄糖相对含量均降低,芦荟大黄素葡萄糖相对含量变化不明显。其中,大黄酸、大黄素在药物处理 12、24 h 后,葡萄糖相对含量显著降低($P<0.05$;图 5)。

2.5 大黄蒽醌类化合物对 HepG2 细胞糖原消耗量的影响

与对照组比较,大黄酸、大黄酚、大黄素及芦荟大黄素处理组的糖原相对含量均降低。其中,大黄酸、大黄素在药物处理 12、24 h 后,糖原相对含量显著降低($P<0.05$;图 6)。

2.6 ALD 对 HepG2 细胞 IR 模型葡萄糖消耗量的影响

与对照组比较,经 100 nmol/L 的 ALD 作用 18 h 后,细胞的葡萄糖消耗量均显著降低($P<0.05$),结合以上结果,以 100 nmol/L 的 ALD 作用 18 h 诱导 HepG2 细胞建立 IR 模型(图 7)。

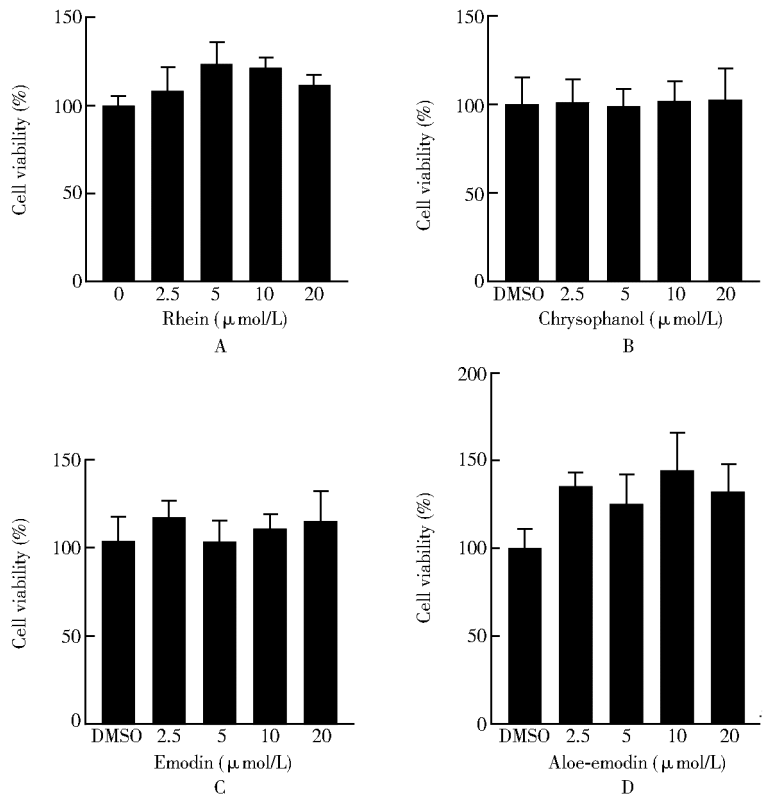


图 2 不同浓度大黄蒽醌对 HepG2 细胞存活率的影响

Figure 2 Effects of different concentrations of rhubarb anthraquinones on survival rate of HepG2 cells ($n=6$)
DMSO: dimethyl sulfoxide.

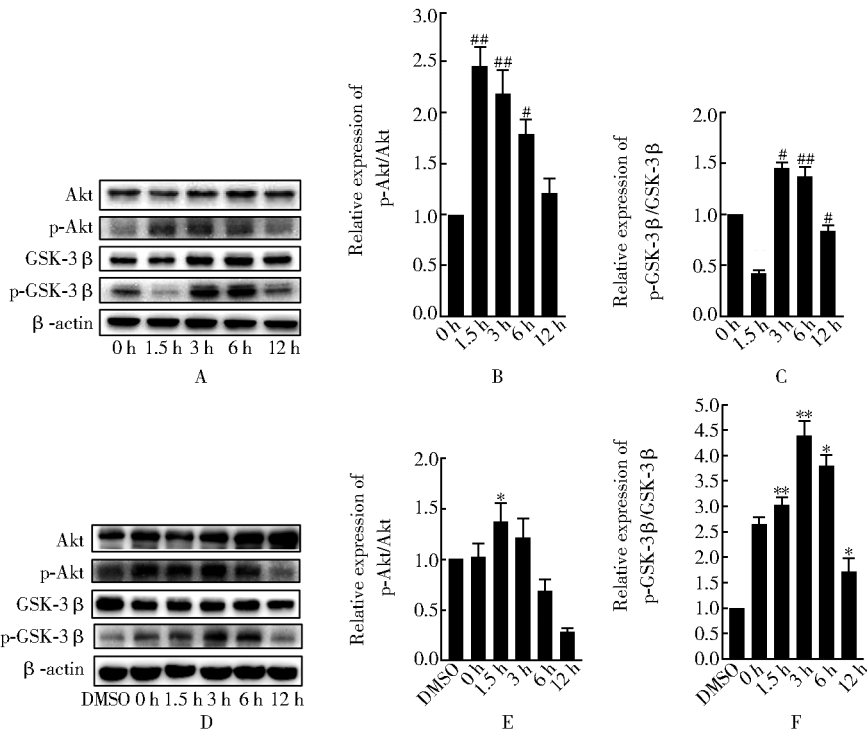


图 3 大黄酸、大黄酚 p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β 蛋白表达

Figure 3 Expression of p-Akt/Akt, p-GSK-3β/GSK-3β protein in rhein and chrysophanol (n=3)

A: Western blot, 10 μmol/L concentration of rhein; B: quantitative analysis results of p-Akt/Akt of rhein; C: quantitative analysis results of p-GSK-3β/GSK-3β of rhein; D: Western blot, 10 μmol/L concentration of chrysophanol; E: quantitative analysis results of p-Akt/Akt of chrysophanol; F: quantitative analysis results of p-GSK-3β/GSK-3β of chrysophanol. Akt: protein kinase B; p-Akt: phosphorylated protein kinase B; GSK-3β: glycogen synthase kinase-3β; p-GSK-3β: phospho-glycogen synthase kinase3β; DMSO: dimethyl sulfoxide. Compared with DMSO group, * P<0.05, ** P<0.01; compared with 0 h group, # P<0.05, ##P<0.01.

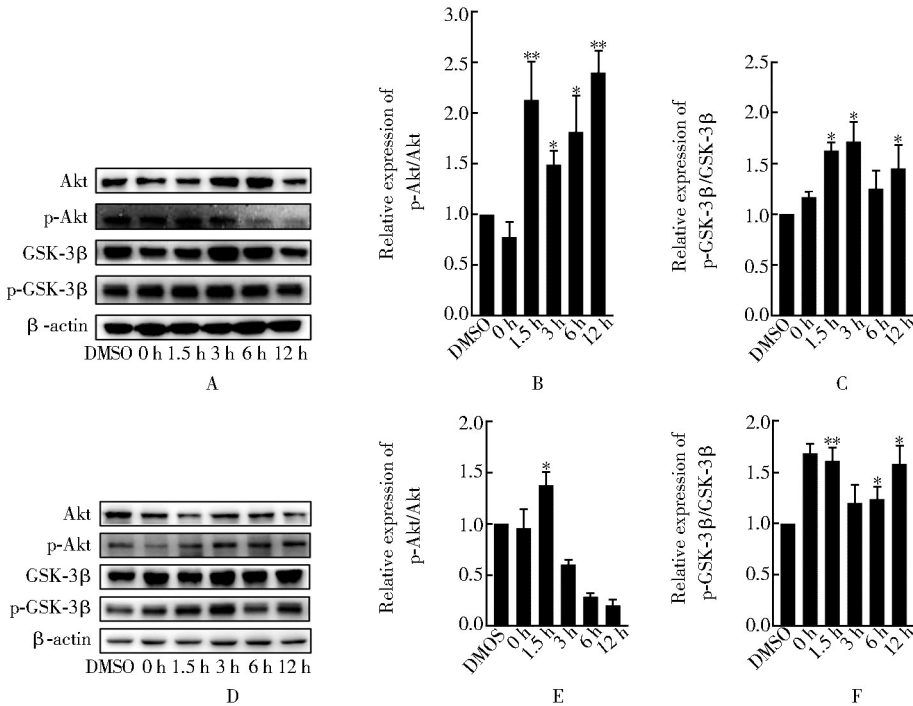


图 4 大黄素、芦荟大黄素 p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β 蛋白表达

Figure 4 Expression of p-Akt/Akt, p-GSK-3β/GSK-3β protein in emodin and aloe-emodin (n=3)

A: Western blot, 10 μmol/L concentration of emodin; B: quantitative analysis results of p-Akt/Akt of emodin; C: quantitative analysis results of p-GSK-3β/GSK-3β of emodin; D: Western blot, 10 μmol/L concentration of aloe-emodin; E: quantitative analysis results of p-Akt/Akt of aloe-emodin; F: quantitative analysis results of p-GSK-3β/GSK-3β of aloe-emodin. Akt: protein kinase B; p-Akt: phosphorylated protein kinase B; GSK-3β: glycogen synthase kinase-3β; p-GSK-3β: phospho-glycogen synthase kinase3β; DMSO: dimethyl sulfoxide. Compared with DMSO group, * P<0.05, ** P<0.01.

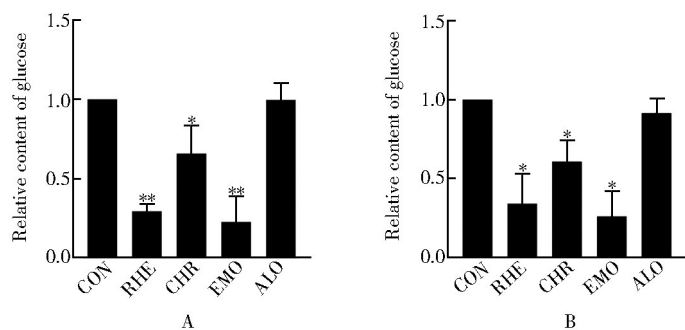


图 5 大黄蒽醌中葡萄糖相对含量比较

Figure 5 Comparison of relative content of glucose in rhubarb anthraquinones (n=3)

A: relative content of glucose in rhubarb anthraquinones at 12 h; B: relative content of glucose in rhubarb anthraquinones at 24 h. CON: control; RHE: rhein; CHR: chrysophanol; EMO: emodin; ALO: aloe-emodin. Compared with control group, *P<0.05, **P<0.01.

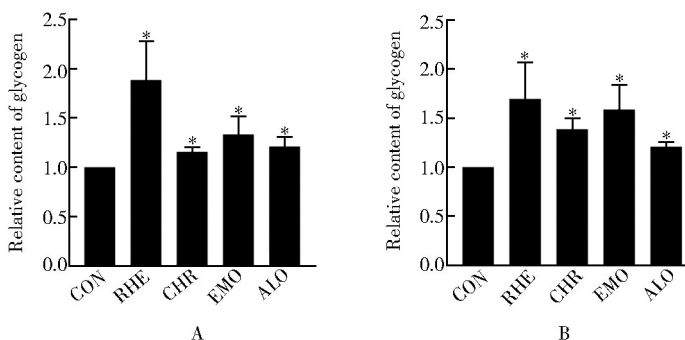


图 6 大黄蒽醌中糖原相对含量比较

Figure 6 Comparison of relative content of glycogen in rhubarb anthraquinones (n=3)

A: relative content of glycogen in rhubarb anthraquinones at 12 h; B: relative content of glycogen in rhubarb anthraquinones at 24 h. CON: control; RHE: rhein; CHR: chrysophanol; EMO: emodin; ALO: aloe-emodin. Compared with control group, *P<0.05, **P<0.01.

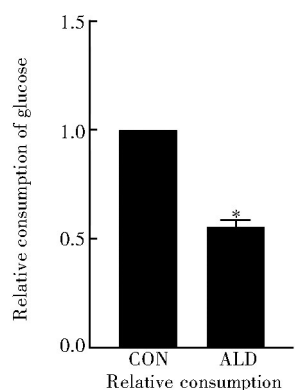


图 7 ALD 对 HepG2 细胞 IR 模型葡萄糖相对消耗量的影响

Figure 7 Effect of ALD on relative consumption of glucose in IR model of HepG2 cells

ALD: aldosterone; IR: insulin resistance; CON: control. Compared with control group, *P<0.05.

2.7 大黄蒽醌类化合物对 HepG2 细胞 IR 模型中 Akt、GSK-3β、p-Akt、p-GSK-3β 蛋白表达水平的影响

与 ALD 组比较,大黄酸、大黄酚、大黄素、芦荟大黄素处理组, p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β 比值均增加 P<0.05。其中,用 2.5、5、10 μmol/L 浓度大黄酸处理后, p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β 比值均升高,

在 5 μmol/L 大黄酸浓度处理组中, p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β 比值升高最为明显。在 2.5、10 μmol/L 芦荟大黄素处理组中, p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β 比值均升高, 2.5、10 μmol/L 浓度的芦荟大黄素处理后, p-GSK-3β/GSK-3β 比值升高较显著 (P<0.05)。在 2.5、10 μmol/L 大黄酚处理组中, p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β 比值均升高, 10 μmol/L 浓度的大黄酚处理后, p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β 比值升高最为明显 (P<0.05)。在 10 μmol/L 大黄素处理组中, p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β 比值均升高 (P<0.05; 图 8, 图 9)。

2.8 大黄酸、大黄素增加 HepG2 细胞 IR 模型中的糖原含量

对照组的细胞浆内充满了红色的糖原颗粒, 而 ALD 诱导后的 HepG2 细胞糖原颗粒减少 (P<0.05)。ALD+大黄酸组、ALD+大黄酸+胰岛素组、ALD+大黄素组、ALD+大黄素+胰岛素组与 ALD 组相比明显增多 (P<0.05)。其中, ALD+大黄酸+胰岛素组、ALD+大黄素+胰岛素组与 ALD+胰岛素组相近 (图 10)。

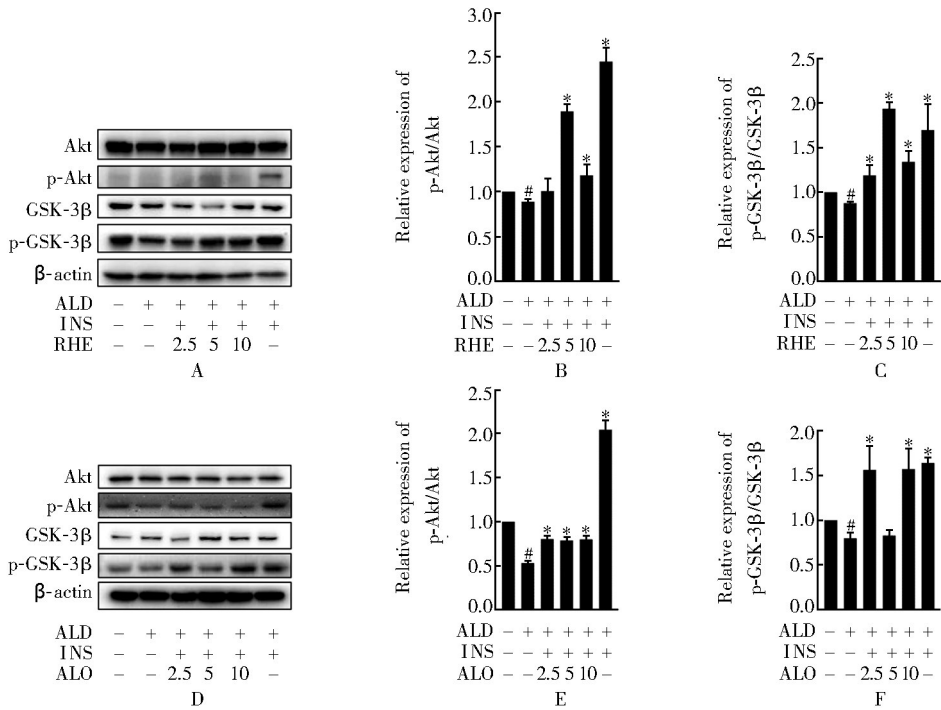


图 8 大黄酸、芦荟大黄素对 HepG2 细胞 IR 模型中 Akt、GSK-3β、p-Akt、p-GSK-3β 蛋白表达的影响

Figure 8 Effects of rhein and aloe-emodin on protein expression of Akt, GSK-3β, p-Akt and p-GSK-3β in HepG2 cell IR model (n=3) A: Western blot of rhein; B: quantitative analysis results of p-Akt/Akt of rhein; C: quantitative analysis results of p-GSK-3β/GSK-3β of rhein; D: Western blot of aloe-emodin; E: quantitative analysis results of p-Akt/Akt of aloe-emodin; F: quantitative analysis results of p-GSK-3β/GSK-3β of aloe-emodin. RHE: rhein; ALO: aloe-emodin; INS: insulin; ALD: aldosterone; p-Akt: phosphorylated protein kinase B; Akt: protein kinase B; p-GSK-3β: phospho-glycogen synthase kinase3β; GSK-3β: glycogen synthase kinase-3β. The concentration of aldosterone is 100 nmol/L and the concentration of insulin is 17nmol/L. Compared with ALD group, *P<0.05; compared with ALD(-), INS(-) and RHE/ALO(-) group, #P<0.05.

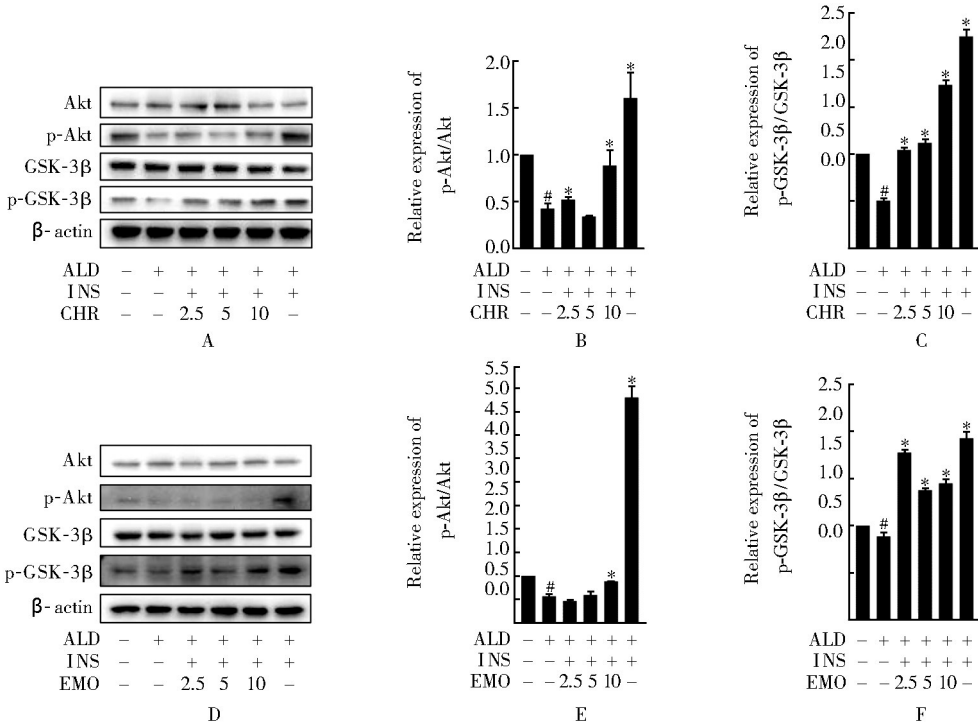


图 9 大黄酚、大黄素对 HepG2 细胞 IR 模型中 Akt、GSK-3β、p-Akt、p-GSK-3β 蛋白表达的影响

Figure 9 Effects of chrysophanol and emodin on protein expression of Akt, GSK-3β, p-Akt and p-GSK-3β in HepG2 cell IR model (n=3) A: Western blot of chrysophanol; B: quantitative analysis results of p-Akt/Akt of chrysophanol; C: quantitative analysis results of p-GSK-3β/GSK-3β of chrysophanol; D: Western blot of emodin; E: quantitative analysis results of p-Akt/Akt of emodin; F: quantitative analysis results of p-GSK-3β/GSK-3β of emodin. Akt: protein kinase B; p-Akt: phosphorylated protein kinase B; GSK-3β: glycogen synthase kinase-3β; p-GSK-3β: phospho-glycogen synthase kinase3β; ALD: aldosterone; INS: insulin; CHR: chrysophanol; EMO: emodin. The concentration of aldosterone is 100 nmol/L and the concentration of insulin is 17nmol/L. Compared with ALD group, *P<0.05; compared with ALD(-), INS(-) and CHR/EMO(-) group, #P<0.05.

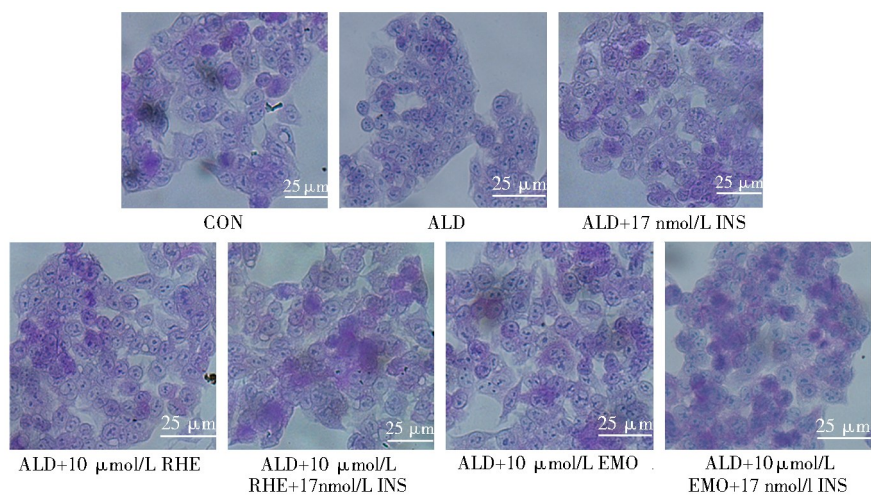


图 10 大黄酸、大黄素增加 HepG2 细胞 IR 模型中的糖原含量

Figure 10 Rhein and emodin increase glycogen content in IR model of HepG2 cells (PAS× 200)

IR: insulin resistance; PAS: periodic acid-Schiff staining; CON: control; ALD: aldosterone; INS: insulin; RHE: rhein; EMO: emodin.

3 讨论

糖尿病是一种受遗传因素、生活方式、社会因素及环境因素影响的多因素疾病,已成为影响人类健康的主要慢性非传染性疾病之一。既往研究表明 IR 是糖尿病发生发展的关键因素^[16,17]。本研究从药食同源的传统中草药中选取了大黄为研究对象,探讨了其蒽醌类化合物在有或无 IR 的情况下,能否激活 HepG2 细胞胰岛素信号通路。研究表明在无 IR 的情况下,大黄中主要蒽醌类化合物(大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素)能够通过激活 p-Akt 和 p-GSK-3β 逆转 IR,起效时间略有不同。大黄酚、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素分别在给药后 1.5、3、12 h 引起 Akt 磷酸化水平增加。大黄酚、芦荟大黄素、大黄素、大黄酸分别在给药后 1.5、1.5、1.5 和 3 h 引起 GSK-3β 磷酸化水平增加。表明大黄酚、芦荟大黄素、大黄素、大黄酸能够在 24 h 内不同时间点发挥逆转 IR 活性,最早出现在给药后 1.5 h,最迟出现在给药后 12 h,这对降低患者餐后血糖,维持机体全天血糖稳态非常重要。接下来本研究观察了大黄中主要蒽醌类化合物(大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素)对葡萄糖水平的影响。结果显示:在葡萄糖水平变化情况方面,大黄酸>大黄素>大黄酚,而芦荟大黄素没有显示出降低血糖活性。详细机制尚需进一步研究。同时本研究观察了大黄蒽醌类化合物(大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素)对糖原水平的影响,结果显示,在糖原水平变化情况方面,大黄酸>大黄素>大黄酚>芦荟大黄素,详细机制尚需进一步研究。

前面我们探讨了非 IR 情况下,大黄蒽醌类化合物对胰岛素信号通路的激活作用。为了模仿体内

IR 的情况,本研究应用了醛固酮诱导 IR 模型^[18],结果发现醛固酮能够降低 Akt 和 GSK-3β 磷酸化水平,而应用大黄酚、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素处理后能够逆转醛固酮诱导的 Akt 和 GSK-3β 磷酸化水平降低,表明大黄蒽醌化合物也能够缓解病理状况下的 IR。

有研究表明 IR 可导致糖原合成减少^[19,20]。因此本研究还观察了糖原合成情况,结果显示大黄酸和大黄素均能逆转 ALD 处理后的糖原合成减少,进一步证实了大黄酸和大黄素改善 IR 的功效。与单用胰岛素相比,大黄酸+胰岛素及大黄素+胰岛素组的糖原合成水平没有进一步增加,暗示当胰岛素足够时,大黄酸和大黄素不会再增加胰岛素的作用,能够保证用药的安全性。

总之,大黄中主要蒽醌类化合物(大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素)能够在 IR 和不抵抗情况下激活糖原合成通路。从而降低培养基中葡萄糖水平,增加糖原合成,实现降低血糖的目的。这表明食物中的有效成分对糖尿病等慢性病的治疗发挥着重要作用,与药物相比,食物更安全,更适合慢性病的长期辅助治疗。

【参考文献】

[1] Mastrototaro L, Roden M. Insulin resistance and insulin sensitizing agents[J]. Metabolism, 2021, 125: 154892. DOI: 10.1016/j.metabol.2021.154892.
[2] Pearson ER. Type 2 diabetes: a multifaceted disease[J]. Diabetologia, 2019, 62(7): 1107-1112. DOI: 10.1007/s00125-019-4909-y.
[3] Underwood PC, Adler GK. The renin angiotensin aldosterone system and insulin resistance in humans[J]. Curr Hypertens Rep, 2013, 15(1): 59-70. DOI: 10.1007/s11906-012-0323-2.

- [4] Park S. Emerging role of aldosterone in mediating the vicious cycle of obesity, insulin resistance and metabolic syndrome[J]. Korean Circ J, 2018, 48(3): 227–229. DOI: 10.4070/kcj.2018.0003.
- [5] Bender SB, McGraw AP, Jaffe IZ, *et al.* Mineralocorticoid receptor-mediated vascular insulin resistance: an early contributor to diabetes-related vascular disease? [J]. Diabetes, 2013, 62(2): 313–319. DOI: 10.2337/db12-0905.
- [6] Jia G, Whaley-Connell A, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease[J]. Diabetologia, 2018, 61(1): 21–28. DOI: 10.1007/s00125-017-4390-4.
- [7] Skøtt O, Uhrenholt TR, Schjerning J, *et al.* Rapid actions of aldosterone in vascular health and disease-friend or foe? [J]. Pharmacol Ther, 2006, 111(2): 495–507. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2005.10.010.
- [8] Kiyomoto H, Rafiq K, Mostofa M, *et al.* Possible underlying mechanisms responsible for aldosterone and mineralocorticoid receptor-dependent renal injury[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 108(4): 399–405. DOI: 10.1254/jphs.08r02cr.
- [9] 金丽霞, 金丽军, 栾仲秋, 等. 大黄的化学成分和药理研究进展[J]. 中医药信息, 2020, 37(1): 121–126. DOI: 10.19656/j.cnki.1002-2406.200027.
Jin LX, Jin LJ, Luan ZQ, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacology of rhubarb [J]. Inf Tradit Chin Med, 2020, 37(1): 121–126. DOI: 10.19656/j.cnki.1002-2406.200027.
- [10] 赵天池. 大黄药效成分及其药理活性研究进展[J]. 中国民康医学, 2021, 33(11): 104–105, 107. DOI: 10.3969/j.issn.1672-0369.2021.11.042.
Zhao TC. Research progress of active ingredients and pharmacological activities of rhubarb[J]. Med J Chin People's Health, 2021, 33(11): 104–105, 107. DOI: 10.3969/j.issn.1672-0369.2021.11.042.
- [11] 刘扬扬, 熊壮. 大黄用于治疗糖尿病胰岛素抵抗综述[J]. 河南中医, 2017, 37(12): 2222–2224. DOI: 10.16367/j.issn.1003-5028.2017.12.0762.
Liu YY, Xiong Z. Review of Dahuang (radix et rhizoma rhei) for the treatment of diabetic insulin resistance[J]. Henan Tradit Chin Med, 2017, 37(12): 2222–2224. DOI: 10.16367/j.issn.1003-5028.2017.12.0762.
- [12] 郭青玉, 邵加庆. 大黄酸改善糖脂代谢的相关机制[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2019, 39(3): 207–211. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2019.03.015.
- [13] 寇小妮, 解新科, 郝明霞, 等. 大黄素介导 IRS-2/PI3 K/Akt 通路干预大鼠非酒精性脂肪性肝炎的实验研究[J]. 疑难病杂志, 2020, 19(1): 80–84. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.01.019.
Kou XN, Xie XK, Hao MX, *et al.* The experimental study of emodin mediated IRS-2/PI3K/Akt pathway on nonalcoholic steatohepatitis in rats[J]. Chin J Difficult Complicated Cases, 2020, 19(1): 80–84. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.01.019.
- [14] 赵娟, 尚文斌, 于希忠. 大黄及其有效成分抗糖尿病作用机制的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1704–1706. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2014.07.074.
Zhao J, Shang WB, Yu XZ. Research progress on anti-diabetic effect of rheum palmatum and its ingredients[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2014, 25(7): 1704–1706. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2014.07.074.
- [15] Hitomi H, Kiyomoto H, Nishiyama A, *et al.* Aldosterone suppresses insulin signaling *via* the downregulation of insulin receptor substrate-1 in vascular smooth muscle cells[J]. Hypertension, 2007, 50(4): 750–755. DOI: 10.1161/hypertensionaha.107.093955.
- [16] Sacerdote A, Dave P, Lokshin V, *et al.* Type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, and vitamin D[J]. Curr Diab Rep, 2019, 19(10): 101. DOI: 10.1007/s11892-019-1201-y.
- [17] Taylor R. Type 2 diabetes: etiology and reversibility[J]. Diabetes Care, 2013, 36(4): 1047–1055. DOI: 10.2337/dc12-1805.
- [18] Sherajee SJ, Fujita Y, Rafiq K, *et al.* Aldosterone induces vascular insulin resistance by increasing insulin-like growth factor-1 receptor and hybrid receptor[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(2): 257–263. DOI: 10.1161/atvbaha.111.240697.
- [19] Rasool S, Geetha T, Broderick TL, *et al.* High fat with high sucrose diet leads to obesity and induces myodegeneration[J]. Front Physiol, 2018, 9: 1054. DOI: 10.3389/fphys.2018.01054.
- [20] Zhang H, Huang Y, Chen S, *et al.* Hydrogen sulfide regulates insulin secretion and insulin resistance in diabetes mellitus, a new promising target for diabetes mellitus treatment? A review[J]. J Adv Res, 2021, 27: 19–30. DOI: 10.1016/j.jare.2020.02.013.

(编辑: 郑真真)