

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2015.11.016

实验研究

糖耐康对胰岛素抵抗 3T3-L₁ 脂肪细胞 肿瘤坏死因子- α 表达的影响

赵天宇^{1,2}, 贾淑明^{*}, 刘铜华²

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京市西城区北线阁街 5 号, 100053; 2. 北京中医药大学)

摘要 目的 探讨中药糖耐康治疗 2 型糖尿病的作用机制。方法 44 只 Wistar 大鼠随机分为中药组 ($n = 18$), 空白组 ($n = 20$), 西药组 ($n = 6$)。中药组给予糖耐康灌胃, 制备中药血清; 西药组给予吡格列酮灌胃制备西药血清; 空白组给予蒸馏水灌胃制备空白血清。用 3T3-L₁ 脂肪细胞制备胰岛素抵抗模型, 分为模型组、吡格列酮组及糖耐康高、中、低剂量组, 并以正常脂肪细胞作为空白组。糖耐康高剂量组予含中药血清的培养液, 糖耐康中剂量组予含 1 份空白血清及 2 份中药血清配置的培养液, 糖耐康低剂量组予含 2 份空白血清及 1 份中药血清的培养液, 吡格列酮组予含西药血清的培养液, 空白组和模型组给予基础培养液。各组均培养 72h 后采用 ELISA 法测各组细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量, 免疫荧光法观察各组细胞内 TNF- α 蛋白表达, RT-PCR 法测定细胞内 TNF- α mRNA 水平。结果 模型组脂肪细胞 TNF- α 蛋白水平较正常组显著升高 ($P < 0.01$); 各给药组 TNF- α 蛋白水平均显著低于模型组 ($P < 0.01$), 且糖耐康高、中剂量组显著低于吡格列酮组 ($P < 0.01$)。模型组细胞内有大量 TNF- α 阳性反应颗粒, 糖耐康中剂量组和高剂量组及吡格列酮组 TNF- α 阳性反应颗粒较模型组明显减少。与模型组比较, 糖耐康高剂量组、中剂量组及吡格列酮组 TNF- α mRNA 表达明显减少, 且以糖耐康中剂量组最少。结论 糖耐康能够有效改善成熟的 3T3-L₁ 脂肪细胞胰岛素抵抗, 明显降低胰岛素抵抗 3T3-L₁ 脂肪细胞中 TNF- α 的蛋白及其 mRNA 表达水平, 这可能是其治疗 2 型糖尿病的作用机制之一。

关键词 糖耐康; 胰岛素抵抗; 肿瘤坏死因子; 2 型糖尿病; 脂肪细胞

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是指机体的胰岛素靶组织 (肝脏、骨骼肌以及脂肪组织) 对胰岛素的敏感性下降, 导致胰岛素介导的葡萄糖利用减少, 为 2 型糖尿病的主要发病机制^[1]。糖耐康为课题组多年临床经验总结, 具有清热养阴、益气调肝之功, 降糖效果确切^[2]。我们通过不同浓度糖耐康对胰岛素抵抗 3T3-L₁ 脂肪细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达调节的研究, 探索该药治疗 2 型糖尿病的具体机制。

1 材料与方法

1.1 细胞和动物

3T3-L₁ 前脂肪细胞株购自美国生物资源中心 (编号: CL-173)。Wistar 大鼠 44 只, 清洁级,

体重 (200 ± 20) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2003-0007。

1.2 主要试剂和仪器

糖耐康组成: 夏枯草 30 g, 番石榴叶 30 g, 人参 10 g, 女贞子 20 g, 三白草 30 g, 其干浸膏粉由四川美大康佳乐药业有限公司加工制备, 每克干粉含 4.5 g 生药; 盐酸吡格列酮片由江苏恒瑞医药股份有限公司生产, 15 mg/片, 批号: 060608510453。新生牛血清 (NCS, Gibco 公司, 批号: 623311), DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司, 批号: 938924), 3-甲基-1-异丁基-黄嘌呤 (IBMX, Sigma 公司, 批号: 057k1551), 地塞米松 (Dex, Sigma 公司, 批号: D1756), 葡萄糖检测试剂盒 (北京北化生物试剂公司, 批号: 20071030), TNF- α 抗体试剂盒 (Abcam 公司, 批号: ab34674;

基金项目: 国家自然科学基金 (81302962)

* 通讯作者: jsm860@163.com

RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司, 批号: DP419)。

普通显微镜 (50I, 日本 Nikon 公司), 荧光显微镜 (IX81, Olympus 公司), 高功率数控超声波清洗器 (KQ-1000KDE, 昆山市超声仪器有限公司), 立式自动电热压力蒸汽灭菌器 (LDZX-40SBI, 北京申安医疗器械厂), 低温水平离心机 (5810R, 德国 Eppendorf 公司), 电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-9245A, 上海一恒科技有限公司), 电泳仪 (J-max, 大连竞迈生物科技有限公司)。

1.3 3T3-L₁ 前脂肪细胞培养和诱导分化

采用完全培养液 (DMEM + 10% NCS + 100 U/L 青霉素) 在 37℃ 孵箱 (5% CO₂ + 95% 空气) 中培养, 每 2 ~ 3 天换液 1 次。细胞完全融合后 2 天 (第 0 天) 开始诱导分化: 将培养液换成分化液 1 (含 0.5 mmol/L IBMX、1 mmol/L Dex 及 5 mg/L 胰岛素的完全培养液); 48 h 后换分化液 2 (为含 5 mg/L 胰岛素的完全培养液); 72 h 后换成不含任何诱导剂的完全培养液^[9]。每 2 天换液 1 次。至第 8 ~ 12 天 90% 以上细胞分化为成熟的脂肪细胞 (经油红 “O” 染色鉴定), 即用于实验。

1.4 3T3-L₁ 脂肪细胞胰岛素抵抗模型制备

造模方法参考文献 [4], 成熟的脂肪细胞分别换用造模液 1 (含 1 μmol/L Dex 的完全培养液) 和 2 (含 1 μmol/L Dex、5 mg/L 胰岛素的完全培养液) 培养, 2 天换液 1 次, 96 h 后采用葡萄糖氧化酶法检测培养液上清中葡萄糖含量, 以鉴定胰岛素抵抗情况。造模后模型组细胞上清葡萄糖含量显著高于 (9.962 ± 0.481) mg/ml, 正常组的 (8.015 ± 0.823) mg/ml ($P < 0.01$), 提示细胞胰岛素抵抗模型造模成功。

1.5 制备含药血清

糖耐康药液由糖耐康干浸膏粉用蒸馏水配制成 0.32 g/ml 浓度溶液, 吡格列酮片研成细粉后用蒸馏水配制成浓度为 0.10 mg/ml 的溶液, 均 4℃ 保存。灌胃前取出, 升至常温后使用。

44 只大鼠采用随机数字表法分为中药组 18 只、空白组 20 只、西药组 6 只。中药组大鼠给予 2 ml 糖耐康药液灌胃, 每日上午 8 点和下午 4 点各 1 次, 西药组给予 2 ml 吡格列酮药液灌胃, 仅每日下午 4 点灌胃 1 次, 空白组给予 2 ml 蒸馏水灌胃, 时间同中药组。7 天后, 予 10% 水合氯醛 0.4 ml/100 g 腹腔注射麻醉, 各组大鼠腹主动脉取血处死。收集血液并分离血清, 56℃ 30 min 灭活后,

0.22 μm 滤器过滤除菌、分装, -20℃ 保存备用, 为糖耐康高剂量组含药血清。糖耐康中、低剂量组所用血清用空白组血清和中药高剂量组含药血清混合配制, 糖耐康中剂量组所用血清为 1 份空白组血清配 2 份中药组含药血清, 糖耐康低剂量组所用血清为 2 份空白组血清配 1 份中药组血清。

1.6 细胞分组及培养

造模成功的脂肪细胞移至 12 孔培养板中, 分为空白组 (正常脂肪细胞)、模型组 (胰岛素抵抗细胞模型)、吡格列酮组及糖耐康高、中、低剂量组, 共 6 组。每孔加入 1.0×10^5 个细胞, 空白组和模型组加入完全培养液 1 ml, 吡格列酮组及糖耐康高、中、低剂量组均加入含有 20% 相应含药血清的完全培养液 1 ml, 培养于 37℃、5% CO₂、湿度 90% ~ 95% 的培养箱。各组均培养 72 h, 每 48 h 换液 1 次。

1.7 检测指标及方法

ELISA 法测培养基 TNF-α 蛋白水平, 免疫荧光法显示细胞内 TNF-α 蛋白表达。操作均严格按照试剂盒说明书步骤测定。

RT-PCR 法测定细胞内 TNF-α mRNA 水平: 提取 RNA 样品完整逆转录为 cDNA, PCR 扩增以此为模板进行, RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA。TNF-α 的上游引物为 5'-TCTCATTCCTGCTTGTGGC-3', 下游引物为 5'-ACTTGGTGGTTTGCTACG-3', 产物长度为 197 bp; β-actin 的上游引物: 5'-TCAGTCCACCCAGAAGAC-3', 下游引物为 5'-GAAGTCGCAGGAGACAACC-3', 产物长度为 317 bp (引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成)。具体操作严格按照试剂盒说明书。经 1% 琼脂糖胶电泳后, PCR 产物以 β-actin 作内参, 计算 TNF-α mRNA 的相对含量, 以 TNF-α 条带占 β-actin 条带密度比值作为 TNF-α mRNA 水平的定量指标。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 10.0 软件处理数据。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组脂肪细胞上清中 TNF-α 蛋白水平比较

表 1 示, 模型组脂肪细胞上清中 TNF-α 蛋白水平较空白组显著升高 ($P < 0.01$); 吡格列酮组和糖耐康高、中、低剂量组 TNF-α 蛋白水平均显著低于模型组 ($P < 0.01$); 糖耐康高、中剂量组

TNF- α 蛋白水平均显著低于吡格列酮组 ($P < 0.01$); 糖耐康高剂量组 TNF- α 蛋白水平显著低于低剂量组 ($P < 0.01$)。

表 1 各组脂肪细胞上清中 TNF- α 蛋白水平比较 (pg/ml)

组别	孔数	TNF- α
空白组	5	7.10 $\pm$ 1.43*
模型组	5	15.21 $\pm$ 1.39
吡格列酮组	5	11.10 $\pm$ 1.45*
糖耐康高剂量组	5	5.71 $\pm$ 2.03* Δ
糖耐康中剂量组	5	6.51 $\pm$ 1.31* Δ
糖耐康低剂量组	5	9.16 $\pm$ 1.87* $\blacktriangle$

注: 与模型组比较, * $P < 0.01$; 与吡格列酮组比较, $\Delta P < 0.01$; 与糖耐康高剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

2.2 各组细胞内 TNF- α 蛋白表达

ELISA 法检测结果显示, 模型组细胞内有大量 TNF- α 阳性反应颗粒; 糖耐康中剂量组和高剂量组及吡格列酮组 TNF- α 阳性反应颗粒较模型组明显减少, 与正常组浓度接近。

2.3 各组细胞 TNF- α mRNA 表达比较

RT-PCR 法检测结果显示, 模型组细胞内 TNF- α mRNA 表达水平很高; 与模型组相比, 糖耐康高、中剂量组及吡格列酮组 TNF- α mRNA 表达量明显降低, 提示模型组脂肪细胞 TNF- α 基因表达显著增加, 吡格列酮和糖耐康都能显著降低脂肪细胞 TNF- α 基因表达量。

3 讨论

糖尿病属于中医学“脾瘅”“消瘅”“消渴”等范畴, 其中约 95% 为 2 型糖尿病^[1]。2 型糖尿病患者早期病情较轻, 多无明显症状, 属于“脾瘅”范畴, 多由多食肥甘所致; 体型偏瘦患者多由于禀赋薄弱, 脏气郁久化火伤阴而发病, 当属“消瘅”; 发展至中晚期, 出现“三多一少”, 多气阴两虚, 归属“消渴”^[2]。临床上, 阴虚热盛、气阴两虚均为 2 型糖尿病常见证型。糖耐康由夏枯草、番石榴叶、人参、女贞子及三白草组成。其中夏枯草舒肝清肝, 番石榴叶和三白草清热解暑养阴, 人参大补元气, 女贞子补肝肾阴, 全方共奏清热调肝、益气养阴之功。

胰岛素抵抗贯穿于 2 型糖尿病发病的全过程, 其中, 脂肪组织对胰岛素敏感性下降为其主要方面。近些年学术界均已认识到脂肪是内分泌器官^[3]。脂肪细胞分泌过量的 TNF- α 、游离脂肪酸 (FFA)、白细胞介素 6 (IL-6)、瘦素及抵抗素,

以及脂联素的过低表达, 可引起肌细胞、肝细胞及自身等胰岛素作用的靶组织细胞的 IR^[4-10]。Colwell MD^[11] 研究发现, 胰岛素抵抗中 TNF- α 呈高表达, 且血清循环中浓度增高, 并通过抑制胰岛素受体酪氨酸激酶活性而加重胰岛素抵抗。

TNF- α 主要来源于激活的巨噬细胞, 是重要的炎症因子。近年, 在脂肪组织中亦发现有 TNF- α mRNA 表达^[12], 且在肥胖导致的胰岛素抵抗的脂肪细胞中过度表达^[13]。本研究结果显示, 经地塞米松和胰岛素共同诱导的 3T3-L₁ 脂肪细胞胰岛素抵抗模型确实能够引起其细胞 TNF- α 高表达, 表明脂肪细胞是分泌 TNF- α 的重要场所, 在胰岛素抵抗和高血糖状态下, 其表达量明显上调, 说明其与胰岛素抵抗的发生有密切联系, TNF- α 确实参与了胰岛素抵抗的形成。

2 型糖尿病是累及全身多器官组织的慢性代谢性疾病, 中药复方可以多靶点多角度地调节 2 型糖尿病和胰岛素抵抗中脂源性蛋白表达, 具有西药无法比拟的优势。本研究结果显示, 糖耐康能够有效改善成熟的 3T3-L₁ 脂肪细胞胰岛素抵抗情况, 明显降低胰岛素抵抗 3T3-L₁ 脂肪细胞中 TNF- α 的蛋白和基因表达水平。但 TNF- α 参与 IR 形成的途径错综复杂, 高血糖的发生更是复杂, 因此糖耐康降血糖的作用及机制有待更多角度进行研究。

参考文献

- [1] 陈灏珠, 林果为, 王吉耀. 实用内科学 [M]. 14 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 1023.
- [2] Guo XY, Duan Y, Li JE, et al. Antidiabetic effects of Tangnaikang on obese Zucker rats and the mechanism [J]. J Integr Med, 2010, 8 (6): 535-540.
- [3] Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression [J]. J Nutr, 2000, 130 (12): 3122-3126.
- [4] 杨桂枝, 高小平, 晏菊芳, 等. 地塞米松和胰岛素诱导 3T3-L₁ 脂肪细胞增殖及胰岛素抵抗的分子机理 [J]. 西南师范大学学报 (自然科学版), 2003, 28 (3): 460-464.
- [5] 刘桂芳, 刘文科, 姬航宇, 等. 2 型糖尿病中医诊疗思路 [J]. 中医杂志, 2011, 52 (14): 1243-1245.
- [6] Hotamisligil GS. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte [J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000, 24 (Suppl 4): S23-S27.
- [7] 徐炯, 李晓惠, 顾继安. 肿瘤坏死因子 α 与 2 型糖尿病关系的探讨 [J]. 上海医学, 2001, 24 (4): 227-229.
- [8] Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Olszanecka-Glinianowicz M, et al. Serum concentrations of TNF-alpha and soluble TNF-alpha receptors in obesity [J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000, 24 (11): 1392-1395.

- [[1]] Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(5): 447-455.
- [[10]] Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 induces insulin resistance in 3T3-L₁ adipocytes and is like IL-8 and TNF- α over-expressed in human fat cells from insulin-resistant subjects [[1]]. *J Biol Chem*, 2003, 278(46): 45777-45784.
- [[11]] Colwell MD. Inflammation and diabetic vascular complication [[2]]. *Diabetes care*, 1999, 22(12): 147-148.
- [[2]] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance [[3]]. *Science*, 1993, 259(5091): 87-91.
- [[3]] Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance [[4]]. *J Clin Invest*, 1995, 95(5): 2409-2415.

Effects of *Tangnaikang* (糖耐康) on Expression of TNF- α in Insulin Resistance 3T3-L1 Adipocyte

ZHAO Tianyu^{1,2}, JIA Shuming¹, LIU Tonghua²

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100053; 2. Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To study the effect and mechanism of Chinese medicine *Tangnaikang* on type 2 diabetes mellitus. **Methods** Totally 44 wistar rats were randomly divided into Chinese medicine group ($n = 18$), blank group ($n = 20$), and western medicine group ($n = 6$). Perfused Chinese medicine group with *Tangnaikang* to prepare Chinese medicine serum; Perfused western medicine group with Pioglitazone to prepare western medicine serum; Perfused blank group with distilled water to prepare blank serum. Insulin resistance model was made with 3T3-L1 adipocyte, then were divided into model group, Pioglitazone group, *Tangnaikang* group of high, middle and low dosages group, and normal adipocyte was taken as blank group. *Tangnaikang* high dosage group was given nutrient solution containing Chinese medicine serum. *Tangnaikang* middle dosage group was given confected nutrient solution containing one part blank serum and two parts Chinese medicine serum. Low dosage group was given nutrient solution containing two parts blank serum and one part Chinese medicine serum. Pioglitazone group was given nutrient solution containing western medicine serum. Blank and model group were given basic nutrient solution. After cultivating for 72 h, determined content of TNF- α with ELISA, observed the expression of TNF- α protein using the immunofluorescence method, and determined the level of TNF- α mRNA using RT-PCR method. **Results** TNF- α protein level of adipocyte in model group increased remarkably compared with normal group ($P < 0.01$); TNF- α protein level of all medication groups was lower than that of the model group remarkably ($P < 0.01$), and that of *Tangnaikang* high and middle dosage group was lower than that of Pioglitazone group remarkably ($P < 0.01$). There were abundant TNF- α positive reaction particle in cells of model group. TNF- α positive reaction particles of *Tangnaikang* middle and high dosage group and Pioglitazone group decreased remarkably compared with model group. Compared with the model group, expression of TNF- α mRNA of *Tangnaikang* high and middle dosage group and Pioglitazone group decreased remarkably, and that of *Tangnaikang* middle dosage group was the least. **Conclusion** *Tangnaikang* can effectively improve insulin resistance of mature 3T3-L1 adipocyte, remarkably decrease expression level of TNF- α protein and mRNA in insulin resistance 3T3-L1 adipocyte. This might be one of the mechanism of *Tangnaikang* in treatment of type 2 diabetes mellitus.

Keywords *Tangnaikang*; insulin resistance; tumor necrosis factor; type 2 diabetes mellitus; adipocyte

(收稿日期: 2014-08-25; 修回日期: 2014-10-20)

编辑: 王利芬