

降脂平肝汤含药血清对大鼠 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的影响

苗宇船^{1,2*} 刘 杨¹ 郭建红² 韩德五² 赵嘉慧² 赵元昌²

(1. 山西中医学院基础医学院, 山西省太原市晋祠路一段 89 号, 030024; 2. 山西医科大学)

基金项目: 山西省科技厅科技攻关计划项目(2007031089-1)

* 通讯作者: mych65@163.com, 13546389605

[摘要] 目的 观察降脂平肝汤含药血清对大鼠 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素受体底物 1(IRS-1) mRNA 和过氧化物酶增殖体激活受体(PPAR)- γ mRNA 表达的影响, 探讨其对脂肪细胞胰岛素抵抗影响的可能机制。方法 选择 Wistar 大鼠 16 只, 诱导分化 3T3-L1 脂肪前体细胞为成熟的脂肪细胞并以肿瘤坏死因子 α (TNF α) 诱导建立脂肪细胞的胰岛素抵抗模型, 取诱导成功的胰岛素抵抗模型细胞分为对照组(基础培养液加入 20% 大鼠空白血清)、模型组(基础培养液加入 20% 大鼠空白血清和 20 ng/ml TNF- α)、罗格列酮组(基础培养液加入 20% 大鼠含药血清和 20 ng/ml TNF- α)、降脂平肝汤组(基础培养液加入 20% 大鼠含药血清和 20 ng/ml TNF- α) 每组 4 只, 培养 48 h, 观察细胞 IRS-1 mRNA 和 PPAR- γ mRNA 表达水平的变化。结果 模型组 IRS-1 mRNA 和 PPAR- γ mRNA 表达明显降低, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 罗格列酮组与降脂平肝汤组 IRS-1 mRNA 和 PPAR- γ mRNA 表达均明显增高, 与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 降脂平肝汤可能通过增强大鼠 IRS-1、PPAR- γ 基因的表达起到抑制脂肪细胞胰岛素抵抗的作用。

[关键词] 降脂平肝汤; 脂肪细胞; 胰岛素抵抗; 胰岛素受体底物 1; 过氧化物酶增殖体激活受体- γ

Influence of Serum Containing Jiangzhi Pinggan Decoction on the Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes

MIAO Yuchuan^{1,2}, LIU Yang¹, GUO Jianhong², HAN Dewu², ZHAO Jiahui², ZHAO Yuanchang²

(1. Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Shanxi Province 030024; 2. Shanxi Medical University)

ABSTRACT **Objective** To observe the influence of serum containing Jiangzhi Pinggan Decoction (Decoction for lowering lipid and calming the liver) on the expression of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) mRNA and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) mRNA in 3T3-L1 adipocytes in rats and discuss its mechanism. **Methods** Sixteen Wistar rat were selected. The 3T3-L1 preadipocytes were cultured in vitro and differentiated to adipocytes. The cell model of insulin resistance (IR) was induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α). The control group was established by adding 20% of blank serum to the culture medium. The model group was established by adding 20 ng/ml of TNF- α on the basis of the control group. The rosiglitazone group and Jiangzhi Pinggan group was added the corresponding bbc-containing serum respectively besides the culture medium and 20 ng/ml of TNF- α . The expression of IRS-1 mRNA and PPAR- γ mRNA was observed after culturing for 48 hours. **Results** Comparing with the control group, the expression of IRS-1 mRNA and PPAR- γ mRNA was significantly decreased in the model group ($P < 0.05$). The expression of IRS-1 mRNA and PPAR- γ mRNA in the rosiglitazone group was similar to that in the Jiangzhi Pinggan Decoction group, but the differences were statistically significant between the model group and both medication groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Jiangzhi Pinggan Decoction could inhibit the IR of 3T3-L1 adipocytes, which may be relevant to enhancing the expression of IRS-1 mRNA and PPAR- γ mRNA.

Keywords Jiangzhi Pinggan Decoction (Decoction for lowering lipid and calming the liver); adipocytes; insulin resistance; insulin receptor substrate-1; peroxisome proliferator-activated receptor γ

目前, 非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 被认为是以胰岛素抵抗(insulin resistance, IR) 为中心机制的代谢综合征的重要组成部分^[1]。大约 98% 的 NAFLD 患者存在 IR^[2]。临床实践证实, 复方降脂平肝汤具有调肝脾、化痰湿、祛瘀血、消积滞的功效, 以降脂平肝汤为主方, 临证辨证加减可以降脂、降酶, 对非酒精性脂

肪肝有良好疗效^[3]。进一步的实验结果证明, 复方降脂平肝汤可以通过减轻 IR、调节脂质代谢起到防治 NAFLD 的作用^[4-5]。本研究旨在探讨降脂平肝汤对脂肪细胞 IR 的影响及可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及细胞株

Wistar 大鼠 16 只, 清洁级, 雌雄各半, 体重

(200±20)g,由山西医科大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(晋)2009-0001。小鼠 3T3-L1 脂肪前体细胞株,购自中国科学院上海细胞研究所。

1.2 药品及试剂

罗格列酮钠片(商品名:太罗,太极集团重庆涪陵制药有限公司,4mg/片,批号 08021256),DMEM 培养基(GIBCO 公司),胎牛血清(FBS,杭州四季青生物工程材料有限公司),胰蛋白酶(Sigma 公司),地塞米松(Sigma 公司),3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(isobutylmethylxanthine, IBMX, Sigma 公司),胰岛素(Sigma 公司),肿瘤坏死因子(TNF α , Pepro Tech 公司),反转录试剂盒(晶美生物公司),Tag 酶(上海生工生物技术有限公司),Marker(宝生物工程(大连)有限公司),Trizol 试剂(Invitrogen Life Technologies 公司)。

1.3 主要仪器

二氧化碳培养箱(美国 Forma Scientific 公司)、PTC-100 型 PCR 仪(美国 MJ Research 公司)、PS3000-231V 电泳仪(美国 Hoefer Scientific Instruments 公司)、GDS7500 型紫外凝胶图像分析系统(德国);BH-2 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)等。

1.4 药物制备方法

中药均购自北京同仁堂山西连锁药店,经专业药师进行饮片的鉴定及制剂。将降脂平肝汤^[3](丹参 3:泽泻 3:山楂 3:大黄 1)组药材用相当于药材量 5 倍的蒸馏水浸泡 2h,武火煮沸后文火保持微沸煎煮 30min,过滤取煎液。原渣再加水 3 倍,煎煮 20min,过滤取煎液。合并两次煎液,于水浴恒温器上浓缩至浓度为每毫升药液含生药 3g,最后得到灌胃液,4℃ 保存。罗格列酮组直接将罗格列酮计算用量后溶于生理盐水制成灌胃液。

1.5 大鼠含药血清的制备

按随机区组法将大鼠分为对照组、模型组、罗格列酮组、降脂平肝汤组,每组 4 只。连续灌胃 3 天,除罗格列酮组每 24h 灌胃 1 次外,各组均每 12h 灌胃 1 次。

根据中药血清药理学原理,参考文献^[6]方法及预试验结果,计算出各组每次灌胃量如下:对照组及模型组 2ml 饮用水;罗格列酮组每次 0.256mg/100g,降脂平肝汤组每次 3g/100g。

1.6 含药血清提取与分离

最后 1 次灌胃后 1h,1% 戊巴比妥钠 0.3ml/100g 腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,常规分离血清,0.2 μ m 滤器过滤后 56℃ 水浴灭活 30min,分装冻存于-20℃ 备用。

1.7 3T3-L1 脂肪前体细胞的诱导分化

在 37℃,5% CO₂ 的条件下,3T3-L1 脂肪前体细胞在基础培养液(含 25mmol/L 葡萄糖、10% FBS 的 DMEM 培养基)中生长至融合,融合 48 h 后,换诱导分化培养液 A(含 10% FBS、0.5 mmol/L IBMX、10mg/L 胰岛素、1 μ mol/L 地塞米松的高糖 DMEM)培养 48 h,然后换诱导分化培养液 B(含 10% FBS、10mg/L 胰岛素的高糖 DMEM)培养 48 h,随后换基础培养液继续培养约 8~12 天,每 2 天换 1 次培养液,90%~95% 的细胞分化为脂肪细胞的表型,可以用于实验^[7]。

1.8 脂肪细胞的分组处理

将诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞换上含 0.5% BSA 的低糖 DMEM 培养液中培养 12h 后,分为对照组(基础培养液加入 20% 大鼠空白血清)、模型组(基础培养液加入 20% 大鼠空白血清和 20 ng/ml TNF α)、罗格列酮组(基础培养液加入 20% 大鼠含药血清和 20 ng/ml TNF α)、降脂平肝汤组(基础培养液加入 20% 大鼠含药血清和 20 ng/ml TNF α),每组 9 孔。培养 48h 后收样。

1.9 RT-PCR 法检测胰岛素受体底物 1(IRS-1) mRNA、过氧化物酶增殖体激活受体- γ (PPAR γ) 的表达

所有 PCR 引物均由上海生工生物技术有限公司合成(见表 1)。

表 1 RT-PCR 引物序列

转录物	正向引物	反向引物	引物长度
β -actin	TGGAATCCTGTG-GCATCCATGAAAC	TAAAACGCAGCT-CAGTAACAGTCCG	349bp
IRS-1	CCCACAGCAGAT-CATTAACC	AGAGACGAAGAT-GCTGGTGC	165bp
PPAR γ	TTGAGCCCAAGT-TCGAGTTTGCTG	ATTCTAGAGCCCG-CAGAATGGTGT	436bp

冰浴中构建 PCR 扩增反应体系,反应总体积为 50 μ l。扩增条件 β -actin 为:94℃ 20s,58℃ 30s,72℃ 40s,共 36 个循环。IRS-1 为:94℃ 30s,57℃ 30s,72℃ 1 min,共 36 个循环。PPAR γ 为:94℃ 20s,58℃ 30s,72℃ 30s,共 36 个循环。1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电压 130 V。紫外凝胶成像系统观察电泳结

果,Photoshop 分析软件分析目的片段扩增带和 β -actin 扩增带,以二者灰度值的比表示扩增产物的相对含量。

1.10 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 3T3-L1 脂肪细胞分化结果

图 1 示,诱导分化前,3T3-L1 脂肪前体细胞呈梭形与成纤维细胞形态相似,胞质内未见亮红色脂滴,细胞突触伸展于细胞间隙形成网状;细胞生长至完全融合后 2 天(第 0 天)开始诱导分化,至分化第 8 天,细胞增大呈圆形或椭圆形,胞浆丰富,含有大量的脂滴密集于核周,被油红染成了亮红色,形成“指环样”结构,呈典型的成熟脂肪细胞形态,85%以上的脂肪细胞均已分化成熟为脂肪细胞的表型。

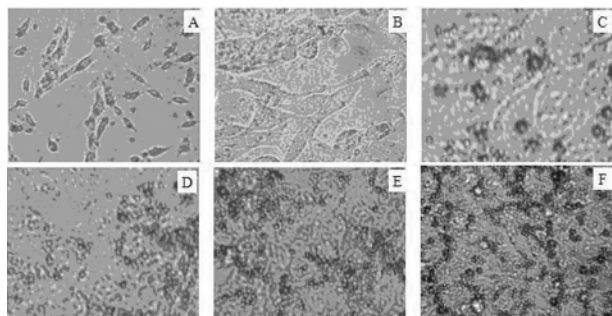


图 1 3T3-L1 脂肪细胞的分化结果(油红染色)

A:诱导第 0 天(15 $\times$ 10 倍);B:诱导第 0 天(15 $\times$ 40 倍);C:诱导第 2 天(15 $\times$ 40 倍);D:诱导第 4 天(15 $\times$ 40 倍);E:诱导第 6 天(15 $\times$ 40 倍);F:诱导第 8 天(15 $\times$ 40 倍)

2.2 各组脂肪细胞 IRS-1 mRNA 与 PPAR- γ mRNA 表达比较

表 2 示,各组脂肪细胞 IRS-1 mRNA 和 PPAR- γ mRNA 的表达相对值中模型组表达最弱,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);降脂平肝汤组与罗格列酮组相似,表达较强,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 各组脂肪细胞 IRS-1 mRNA 和 PPAR- γ mRNA 表达的相对值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	IRS-1 mRNA	PPAR- γ mRNA
对照组	9	2.03 $\pm$ 0.32	2.32 $\pm$ 0.26
模型组	9	0.51 $\pm$ 0.10*	1.69 $\pm$ 0.34*
罗格列酮组	9	1.78 $\pm$ 0.28 Δ	2.17 $\pm$ 0.31 Δ
降脂平肝汤组	9	1.69 $\pm$ 0.09 Δ	2.26 $\pm$ 0.35 Δ

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, Δ $P<0.05$

3 讨论

本实验诱导分化 3T3-L1 脂肪前体细胞为成熟的脂肪细胞,以 $\text{TNF}\alpha$ 诱导脂肪细胞的 IR 模型,模型组脂肪细胞 IRS-1 mRNA 的表达最弱,显著低于正常对照组,表明 IR 模型复制成功。

IR 包括胰岛素受体前、受体、受体后三个水平,胰岛素信号转导通路中胰岛素受体后缺陷在 IR 的发生发展过程中发挥着关键作用。而 IRS-1 作为胰岛素信号通路中重要的受体后信号传导分子,在 IR 的环节中具有重要的意义。PPAR 是一种激素激活核受体和转录因子,细胞核内 PPAR- γ 存在于胰岛素敏感组织如肝脏、脂肪和骨骼肌中,是 IR 的靶点。因此,我们选择 IRS-1 mRNA 和 PPAR- γ mRNA 作为衡量 IR 的发生与否及其程度的指标。

罗格列酮是目前应用较广泛的 PPAR- γ 的配体噻唑烷二酮类药物之一,它的胰岛素增敏作用是通过与 PPAR- γ 高亲和力的结合使之活化,从而使许多代谢调节因子的基因转录,增加多种蛋白质的合成,这些蛋白质在细胞对胰岛素产生生物反应时,参与葡萄糖转运和利用以及脂代谢过程。近年来的研究发现^[8],改善 IR 的药物罗格列酮可以治疗大鼠 NAFLD。目前已经发现了许多中药可以通过不同的途径增加胰岛素的敏感性,改善 IR^[9-10]。本实验以罗格列酮作为阳性对照,结果表明,降脂平肝汤含药血清与罗格列酮均上调了 $\text{TNF}\alpha$ 诱导的脂肪细胞 IR 模型中 IRS-1 mRNA 和 PPAR- γ mRNA 的表达,复方中药降脂平肝汤起到了类似罗格列酮的作用。

降脂平肝汤主要由丹参、泽泻、山楂、大黄组成。其中大黄味苦性寒,归脾、胃、大肠、肝、心包经,具有泻热通肠、凉血解毒、逐瘀通经的功效。大黄含大黄酸、大黄素等,可通过降低胰岛素水平、增加胰岛素受体数目及胰岛素与受体的结合力来提高胰岛素的敏感性,并可下调抵抗素(resistin)及瘦素的表达,降低 $\text{TNF}\alpha$ 水平达到改善 IR 的作用。丹参味苦微寒,归心、肝经,具有活血调经、祛瘀止痛等功效。现代药理学研究发现,丹参对细胞水平的 IR 病理状态的进展有一定的阻止作用。丹参与罗格列酮联合用药可降低血糖、甘油三酯,改善肝功能和 IR,显著修复糖尿病肝脂肪变性^[11]。山楂味甘、酸,性微温,归脾、胃、肝经,具有消食化积、活血化瘀的功效。现代医学研究发现^[12],山楂具有降低血压、保护心血管、调节糖脂代谢、抗氧化、抗血栓、增强免疫等作

用,其提取物总黄酮组分可明显降低血糖水平并增强胰岛素敏感性,调节胆固醇的合成,提高血浆中高密度脂蛋白的含量,促进内源性甘油三酯的排出,防止脂肪肝的形成,并进一步起到防治 IR 的功效。

本实验研究结果提示,复方降脂平肝汤对 NAFLD 的作用,除了拮抗内毒素,降低肠源性内毒素入血之外^[5],可能还通过增强 IRS-1、PPAR- γ 基因的表达式减轻了 IR,其作用机制尚有待于进一步研究。

参考文献

- [1]Lirussi F,Vitturi N,Azzalini L,et al. Perihepatic adipose tissue thickness: a new non-invasive marker of NAFLD [J]. J Gastrointest Liver Dis,2009,18(1):61-66.
- [2]Bajaj S,Nigam P,Luthra A,et al. A case-control study on insulin,metabolic co-variables & prediction score in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Indian J Med Res,2009,129(3):285-292.
- [3]苗宇船,李美蕊. 降脂平肝汤治疗肥胖性脂肪肝 39 例临床观察[J]. 山西中医,2003,19(2):14-15.
- [4]苗宇船,李瑞华. 复方中药防治大鼠脂肪肝的实验研究[J]. 山西中医学院学报,2003,4(2):15-17.
- [5]苗宇船,张志岗,柴宝,等. 降脂平肝汤对脂肪肝大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 山西中医,2008,24(3):45-47.
- [6]陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006:29-30.
- [7]苗宇船,韩德五,郭建红,等. 甘氨酸对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的影响[J]. 中国病理生理杂志,2008,24(11):2260-2262.
- [8]Omer Z,Cetinkalp S,Akyildiz M,et al. Efficacy of insulin-sensitizing agents in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol,2010,22(1):18-23.
- [9]张荻,王旭. 治疗糖尿病的中药主要成分及作用机制研究概述[J]. 中医杂志,2011,52(11):976-979.
- [10]柯斌,秦鉴. 中医对 2 型糖尿病胰岛素抵抗的认识及治疗进展[J]. 中医杂志,2010,51(S2):257-259.
- [11]杜玉茗,黄海燕,刘利则,等. 罗格列酮联合丹参对 2 型糖尿病 db/db 小鼠糖脂代谢及转氨酶的影响[J]. 中国老年学杂志,2011,31(19):3762-3763.
- [12]彭丹洋,王琳,朱德增,等. 中药山楂防治代谢综合征的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2011,20(29):3760-3762.

(收稿日期:2011-02-11;修回日期:2012-01-10)

[编辑:行 之]



**多快好省
煎好药**



十功能自动煎药机



自动两煎煎药机



均分包装机



常压1+1煎药包装一体机



常压循环1+1一体机



双循环1+1煎药包装一体机

专业品牌
煎药包装设备行业领军品牌,拥有
多项国家专利(ZL02 2 53232.3 ZL 03 2 66107.X等)
6000多家医院、40000多家终端客户共
同见证。

专业资质
9大系列、30多个型号产品,覆盖了
中药煎药包装行业全部领域,充分满
足医院、药店、诊所等不同机构的不
同需求。

专业品质
通过ISO9001、ISO13485质量管理体系
认证,德国CE安全认证,产品质量、
服务及安全均已达到欧盟标准。

专业服务
全国30多家分公司和办事处,100多位
维修工程师,450多位服务人员,为贵
提供及时周到的“一站式”服务。

北京东华原医疗设备有限责任公司

传 真: 010-89718021
网 址: www.donghuagroup.com
地 址: 北京市中关村科技园区昌平园振超路1号

**400-888-0258
800-810-0359**