

虫草头孢提取物 Fr.8 组分对 HepG-2 胰岛素抵抗的改善作用

韩一凤¹, 耿燕^{*1}, 孟照敏¹, 杜妍¹, 许泓瑜¹, 史劲松¹, 许正宏^{1,2}

(1. 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为探讨虫草头孢正己烷分离组分 Fr.8 对高胰岛素诱导的 HepG-2 细胞胰岛素抵抗的改善作用, 作者建立了稳定的胰岛素抵抗细胞模型, 并检测了 Fr.8 组分对胰岛素抵抗细胞 (HepG-2/IR) 的葡萄糖消耗、葡萄糖摄取及相关基因转录和蛋白质表达的影响。结果显示, 5 $\mu\text{mol/L}$ 胰岛素是诱导细胞成为 HepG-2/IR 的最佳作用浓度; Fr.8 组分在无细胞毒性范围内可显著增加 HepG-2/IR 对葡萄糖的消耗及摄取; Fr.8 (>25 $\mu\text{g/mL}$) 可明显上调 *IR*、*IRS1*、*IRS2*、*Glut2*、*AMPK α* mRNA 的表达水平, 并上调 *IR*、*IRS*、*Glut2*、p-*AMPK α* 、p-*AKT* 蛋白质的表达。研究表明, 虫草头孢 Fr.8 可改善 HepG-2 胰岛素抵抗, 其机制可能与胰岛素受体及底物、葡萄糖转运蛋白 2、p-*AMPK α* 和 p-*AKT* 蛋白的激活有关。

关键词: 胰岛素抵抗; HepG-2 细胞; 虫草头孢; mRNA 表达; 蛋白质表达

中图分类号: R 285 文章编号: 1673-1689(2019)03-0111-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.03.016

Ameliorative Effects of Extract Fraction 8 from *Cephalosporium sinensis* on Insulin Resistance of HepG-2 Cells

HAN Yifeng¹, GENG Yan^{*1}, MENG Zhaomin¹, DU Yan¹,
XU Hongyu¹, SHI Jinsong¹, XU Zhenghong^{1,2}

(1. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To investigate the ameliorative effects of extract fraction 8 (Fr.8) from *Cephalosporium sinensis* on insulin resistance of HepG-2 cells, in this study, a stable insulin resistance cell model in vitro was established to detect the glucose consumption, glucose uptake, relative mRNA expression and protein expression of Fr.8 on HepG-2/IR cells. The results showed that 5 $\mu\text{mol/L}$ insulin was the optimal concentration to induce HepG-2 cells become HepG-2/IR cells. In the range of non-cytotoxic, Fr.8 could distinctly promote glucose consumption and uptake in HepG-2 / IR cells. Fr.8 (>25 $\mu\text{g/mL}$) significantly upregulated *IR*, *IRS1*, *IRS2*, *Glut2*, *AMPK α* mRNA expression and obviously increased *IR*, *IRS*, *Glut2*, p-*AMPK α* and p-*AKT* protein expression. Therefore, we provide

收稿日期: 2016-02-07

基金项目: 江苏省科技成果转化专项资金项目 (BA2015006); 江苏高校品牌专业建设工程资助项目。

* 通信作者: 耿燕 (1984—), 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事天然药物筛选及分子机制研究。E-mail: gengyanjnu@163.com

引用本文: 韩一凤, 耿燕, 孟照敏, 等. 虫草头孢提取物 Fr.8 组分对 HepG-2 胰岛素抵抗的改善作用[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38 (03): 111-117.

theoretical basis to demonstrate Fr.8 from *C. sinensis* ameliorated insulin resistance of HepG-2 cells, which in part, the mechanism may be associated with insulin receptor and substrate, glucose transporter protein 2, the activated protein of p-AMPK α and p-AKT.

Keywords: insulin resistance, HepG-2 cell, *Cephalosporium sinensis*, mRNA expression, protein expression

胰岛素抵抗 (Insulin Resistance, IR) 是 2 型糖尿病的重要发病机制之一^[1-3], 且伴随疾病产生发展的整个过程, 亦常出现于肥胖、高血压、高血脂等代谢疾病中^[2-3]。通常表现为胰岛素敏感性下降且胰岛素介导的葡萄糖利用率减弱。IR 的发生部位主要有外周组织和肝脏, 于外周组织中表现为: 在脂肪组织和骨骼肌中, 胰岛素促进其摄取、利用及储存葡萄糖的能力减弱; 于肝脏中则表现为: 胰岛素抑制肝糖输出的能力降低^[4], 而肝脏在机体的糖、脂代谢调节中起重要作用。肝脏胰岛素抵抗亦是 2 型糖尿病治疗的重要靶点, 因此本实验主要针对肝细胞的胰岛素抵抗进行研究。

据国内外文献报道, 虫草头孢 (*Cephalosporium sinensis*) 及其菌粉中含有氨基酸 (Amino acid)、腺苷 (Adenosine)、甘露醇 (Mannitol)、虫草多糖 (Polysaccharide)、虫草酸 (Cordyceps acid) 及虫草素 (Cordycepin)^[5-6]。现代药理及毒理实验已证明, 虫草菌粉提取物在抗菌、抗癌、抗炎、抗肿瘤、降血脂等方面具有独特功效^[7], 但对于其在改善胰岛素抵抗即减缓 2 型糖尿病方面的研究甚少^[5,7]。

实验前期已从虫草头孢正己烷提取物中经硅胶柱层析分离得到 Fraction 8 (Fr.8) 组分, 体外实验初步评价其具有降糖活性。因此, 作者以 Fr.8 组分为研究对象, 采用稳定的体外高胰岛素诱导的 HepG-2 胰岛素抵抗模型评价其降糖活性, 检测其作用于此细胞模型后相关基因转录水平及蛋白质表达水平的变化, 探讨 Fr.8 组分具有降糖活性的作用机制, 为虫草头孢减缓 2 型糖尿病的研究提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料 虫草头孢菌粉: 江苏神华药业有限公司提供; HepG-2 细胞: 江南大学金坚教授实验室馈赠。

1.1.2 试剂 胰岛素: 购自阿拉丁; RPMI-1640 细胞培养基、胎牛血清 (FBS): 购自美国 Gibco 公司; 胰酶消化液、双抗 (青霉素-链霉素 100 $\times$)、10% SDS、1 mol/L Tris-HCl, pH 6.8、1.5 mol/L Tris-HCl, pH 8.8: 购自碧云天公司; MTT、葡萄糖检测试剂盒、2-NBDG: 购自美国 Sigma 公司; 细胞己糖激酶检测试剂盒、细胞丙酮酸激酶检测试剂盒: 购自上海杰美基因科技有限公司; Trizol 试剂、SYBR Green Master、蛋白裂解液: 购自美国 Roche 公司; P-AMPK α 、P-AKT 抗体: 购自 Cell Signaling Technology 公司; IR、IRS、Glut2 抗体: 购自 Abcam 公司。

1.1.3 仪器 中低压柱层析: Grace 公司; Multiskan MK3 型酶标仪: 德国 Eppendorf 公司; CO₂ 细胞培养箱: Thermo 公司; 倒置显微镜: Nikon 公司; RT-PCR 仪、化学发光成像仪: Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Fr.8 组分的制备 虫草头孢菌粉 (2 kg) 与正己烷质量体积比为 1:10 浸提 12 h 后过滤得到澄清的滤液, 重复浸提 3 次收集滤液, 将滤液旋转蒸发去除正己烷后得到虫草头孢正己烷提取物 103.4 g。通过薄层层析法确定提取虫草头孢正己烷的流动相为正己烷、乙酸乙酯。用 40 g 硅胶柱, 流速 20 mL/min, 流动相正己烷和乙酸乙酯梯度洗脱, 在乙酸乙酯洗脱比例为 82% 时收集馏分得到 Fr.8 组分 1.29 g。

1.2.2 HepG-2 细胞培养 根据 HepG-2 细胞的生长状态, 选择含有 10% 胎牛血清 (FBS) 及 1% 抗生素 (100 U/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素) 的 RPMI-1640 细胞培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 湿润环境的培养箱中培养细胞, 待细胞融合至 80%~90% 时传代铺板, 并选择处于对数生长期的细胞进行相关实验。

1.2.3 高胰岛素诱导的 HepG-2 胰岛素抵抗细胞模型的建立 选择处于对数生长期的细胞, 分别以 2 $\times$ 10⁴ 个/孔和 5 $\times$ 10⁵ 个/孔的密度铺于 96 孔板和 6 孔板中, 24 h 后换无 FBS 培养基饥饿细胞 24 h, 每孔

加含 0、0.01、0.1、1、5、10、50 $\mu\text{mol/L}$ 胰岛素(设有空白细胞对照)的培养基作用于细胞 36 h 后,换无 FBS 培养基孵育细胞 12 h,96 孔板取上清培养液用葡萄糖检测试剂盒测每孔葡萄糖含量,与空白细胞组比较,计算各组的葡萄糖消耗量^[8-9];6 孔板中的细胞加裂解液后于冰上裂解 30 min,用细胞刮将细胞刮下,参照试剂盒说明,根据酶偶联反应比色法定量检测细胞己糖激酶和丙酮酸激酶的活性。

1.2.4 MTT 法检测细胞活力 选择处于对数生长期的细胞,以 2×10^4 个/孔的密度铺于 96 孔板,培养 24 h 后换含有不同质量浓度 Fr.8 组分(0、12、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)的培养基孵育细胞 24 h(每组 6 个复孔),弃去培养液,每孔加入含 0.5 mg/mL MTT 的培养基 100 μL 孵育 4 h 后,弃去废液,每孔加 150 μL DMSO,用酶标仪在 570 nm 处测 OD 值^[10]。细胞存活率的计算公式为:

$$A = ((B - C) / (D - C)) \times 100\%$$

式中: A 为细胞存活率, B 为药物组 OD 值, C 为空白组 OD 值, D 为对照组 OD 值。

1.2.5 2-NBDG 法测细胞葡萄糖摄取 将处于对数生长期的细胞,以 2×10^4 个/孔的密度铺于 96 孔黑色荧光板,24 h 后用 DPBS 漂洗细胞三遍,换无血清的培养基饥饿细胞 24 h,加不同浓度的胰岛素(0、0.01、0.1、1、5、10、50 $\mu\text{mol/L}$)作用细胞 36 h,每孔加入含终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 2-NBDG(荧光标记的葡萄糖类似物)^[11-12] 孵育 1 h,DPBS 漂洗细胞三遍后,换无血清的培养基于激发波长 485 nm,发射波长 530 nm 处测荧光值^[11,13]。

1.2.6 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 法检测相关基因的表达 采用 Trizol 试剂抽提细胞总 RNA,将 RNA 反转录为 cDNA,用 SYBRGreen 进行荧光定量 PCR 反应,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[10] 对 *IR*、*IRS1*、*IRS2*、*Glut2*、*AMPK α* mRNA 的转录水平进行相对定量,采用的引物见表 1。

1.2.7 蛋白免疫印迹 (Western Blotting) 法检测相关蛋白质的表达 用预冷的 DPBS 漂洗细胞后,每皿加入 100 μL 蛋白质裂解液(含蛋白酶及磷酸酶抑制剂),于冰上裂解 30~40 min 后,用细胞刮将细胞刮下,吹打均匀后收集于 1.5 mL 离心管中,12 000 g 低温离心 10 min,将蛋白质上清液移至新的 1.5 mL EP 管中,用 BCA 试剂盒测定不同样品的蛋白质质量浓度。经 SDS-PAGE 电泳后将分布于蛋白

胶上的蛋白质湿法转膜至 PVDF 膜上,封闭后,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗过夜,TBST 洗膜 3 次后,室温孵育二抗 1 h,ECL 化学发光底物显色后拍照,用 Image J 软件分析蛋白质条带的灰度值,定量监测胰岛素抵抗相关蛋白 *IR*、*IRS*、*Glut2* 及相关信号通路蛋白 *p-AMPK α* ^[14-15]、*p-AKT*^[9,16] 的表达。

表 1 胰岛素抵抗相关基因序列

Table 1 Sequences of insulin resistance primers

引物名称	引物序列 (5'-3')
IR-F	CATCCGGGGATCACGACTG
IR-R	ATCAGGTTGTAGAGCCGAGT
IRS1-F	CCCAGGACCCGCATTCAAA
IRS1-R	GGCGGTAGATACCAATCAGGT
IRS2-F	CACCTCCCCACGACAGTTG
IRS2-R	TCGATGGCGATGTAGTTGAGA
Glut2-F	GGGCAATTATGATCTGTGGCA
Glut2-R	TTCTGCTCACTCGATGCTTCT
AMPK α -F	TTTGGGTGTACGAAGGAAGAAT
AMPK α -R	CTCTGTGGAGTAGCAGTCCCT
β -action-F	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCTG
β -action-R	CAGCACTGTGTGTGGCTACAG

1.2.8 数据统计 用 One-Way ANOVA 统计学分析实验结果,每组数据以平均值 $\pm$ 标准偏差表示, $p < 0.05$,与对照组相比,极显著水平表示为 $***p < 0.01$,与模型组相比,极显著水平表示为 $###p < 0.01$ ^[10]。

2 结果与分析

2.1 高胰岛素诱导的 HepG-2 胰岛素抵抗细胞模型的建立

在无细胞毒性($< 5 \mu\text{mol/L}$)的胰岛素作用范围见图 1(a)。通过检测细胞的葡萄糖消耗量、葡萄糖摄取量两个指标选择建立胰岛素抵抗细胞模型的胰岛素最佳作用剂量,通过检测胞内己糖激酶活性和丙酮酸激酶活性,验证此模型的可靠性。如图 1(b)所示,不同浓度胰岛素(0、0.01、0.1、1、5 $\mu\text{mol/L}$)作用于 HepG-2 细胞后检测各组细胞的葡萄糖消耗量,5 $\mu\text{mol/L}$ 胰岛素诱导的胰岛素抵抗细胞(HepG-2/IR)与对照组细胞相比,葡萄糖消耗量有极显著的降低($***p < 0.001$);采用 2-NBDG 法检测各组细胞的葡萄糖摄取量,见图 1(c)。5 $\mu\text{mol/L}$ 胰岛素诱导的胰岛素抵抗细胞(HepG-2/IR)与对照组细胞相比,葡萄糖摄取量有极显著的减少($***p <$

0.001); 用酶偶联反应比色法试剂盒定量检测胰岛素诱导后的胰岛素抵抗细胞 (HepG-2/IR) 的胞内己糖激酶活性和丙酮酸激酶活性见图 1(d)-(e)。5 $\mu\text{mol/L}$ 胰岛素诱导的胰岛素抵抗细胞 (HepG-2/IR) 与对照组细胞相比, 己糖激酶和丙酮酸激酶的活性均显著降低 (** $p < 0.01$); 因此, 选择 5 $\mu\text{mol/L}$ 胰岛素为 HepG-2 胰岛素抵抗细胞模型的最佳诱导浓度。

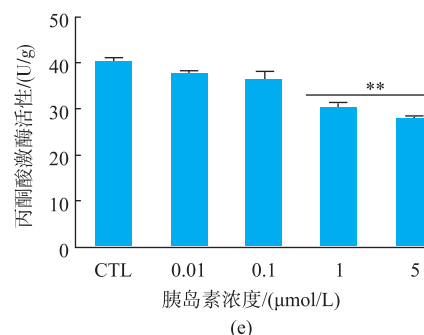
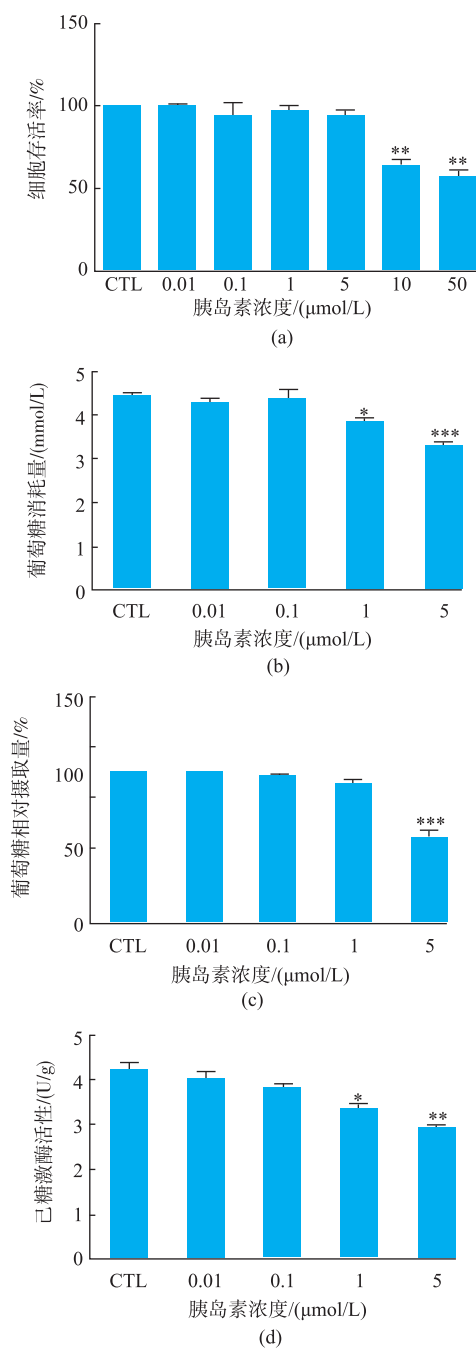


图 1 HepG-2 胰岛素抵抗细胞模型的建立

Fig. 1 Establishment of insulin resistance cell model in HepG-2

2.2 Fr.8 组分的体外降糖活性评价

2.2.1 Fr.8 组分对 HepG-2 细胞活力的影响 不同质量浓度 (0、12、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 的 Fr.8 组分作用于 HepG-2 细胞 24 h 后, MTT 法测各组细胞活力, 见图 2。不同剂量的 Fr.8 组分对 HepG-2 细胞均无毒副作用, Fr.8 组分与胰岛素共同作用于细胞后, 仅 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 Fr.8 组分对 HepG-2 细胞的生长有 19% 的抑制, 可进行后续实验。

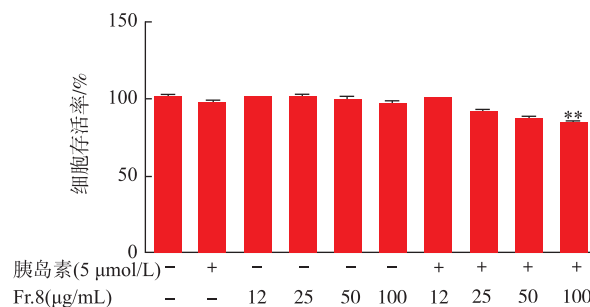


图 2 不同质量浓度的 Fr.8 对 HepG-2 细胞存活率的作用

Fig. 2 Effects of different concentrations of Fr.8 on cell viability in HepG-2

2.2.2 Fr.8 组分对 HepG-2/IR 细胞葡萄糖消耗及摄取的影响 不同质量浓度 (0、12、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 的 Fr.8 组分作用于胰岛素抵抗细胞 (HepG-2/IR) 后, 通过检测细胞对葡萄糖的消耗量及摄取量变化, 评价 Fr.8 组分于体外细胞具有显著的降糖活性。如图 3(a)-(b) 所示, Fr.8 组分作用于 HepG-2/IR 细胞后, 细胞对葡萄糖的消耗量及摄取量相比于模型组均显著提高 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), 且具有明显的剂量依赖关系。

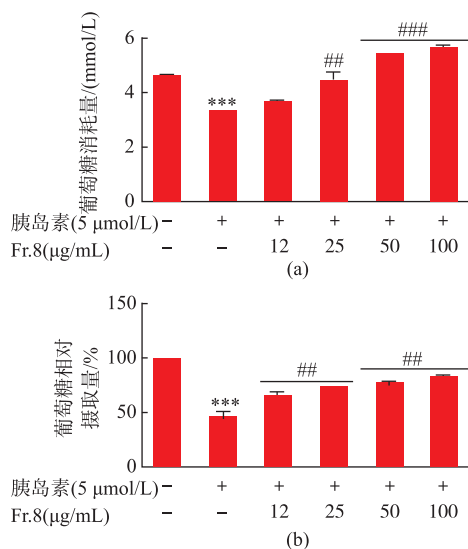


图3 Fr.8 组分对 HepG-2/IR 细胞葡萄糖消耗量及摄取量的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of Fr.8 on consumption and uptake of glucose in HepG-2/IR cells

2.3 Fr.8 组分改善 HepG-2 胰岛素抵抗作用机制初步探讨

胰岛素在细胞水平上是通过与靶细胞膜上的特异受体结合而启动的,这一特异受体即胰岛素受体(IR);胰岛素受体底物(IRS)是细胞内胰岛素反应的重要配体,IR 可与 IRS 键合,激活相应的酶体,影响糖脂代谢;葡萄糖转运蛋白 2(Glut2)是一种跨膜转运蛋白,主要存在于肝脏和胰腺 β 细胞膜上,是葡萄糖转运的理想载体;AMPK 即 AMP 依赖的蛋白激酶,是糖脂代谢调节的关键蛋白质,目前也是糖尿病及其他代谢相关疾病的研究核心,其激活能改善由 2 型糖尿病引起的代谢失衡;AKT 激酶是 PI3K 下游最重要的信号转导蛋白质,分布在肝脏 AKT 的作用主要是促进糖原合成、抑制糖异生、促进 Glut2 转位到细胞膜上,调节糖代谢。作者通过检测胰岛素抵抗相关基因转录及蛋白质表达水平的变化,初步探讨 Fr.8 组分改善 HepG-2 胰岛素抵抗的作用机理。

2.3.1 Fr.8 组分对 HepG-2 胰岛素抵抗相关基因转录的影响 在基因水平上,采用 qRT-PCR 技术进一步检测 Fr.8 组分对于 HepG-2 胰岛素抵抗相关基因 (*IR*、*IRS1*、*IRS2*、*Glut2*、*AMPK α*) 转录的影响,结果见图 4。5 μ mol/L 胰岛素作用于 HepG-2 细胞

后可显著下调 *IR*、*IRS1*、*IRS2*、*Glut2*、*AMPK α* 基因的表达 (** $p < 0.001$)。Fr.8 组分 (12、25、50、100 μ g/mL) 显著上调 *Glut2*、*AMPK α* 基因的表达 (### $p < 0.001$),且具有剂量相关性。50、100 μ g/mL 的 Fr.8 组分亦可显著上调 *IR*、*IRS1* 及 *IRS2* 的表达 (### $p < 0.001$),且具有剂量依赖性。

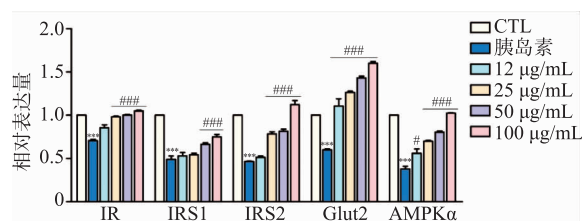


图4 Fr.8 组分对 *IR*、*IRS1*、*IRS2*、*Glut2* 及 *AMPK α* 基因相对表达量的影响

Fig. 4 Effect of Fr.8 on the relative expression of *IR*、*IRS1*、*IRS2*、*Glut2* and *AMPK α* mRNA

2.3.2 Fr.8 组分对 HepG-2 胰岛素抵抗相关蛋白质表达的影响 在 HepG-2/IR 细胞中分别加入质量浓度为 12、25、50、100 μ g/mL 的 Fr.8 组分,检测 IR、IRS、Glut2 及 p-AMPK α 、p-AKT 的表达情况,结果见图 5(a)。50 μ g/mL 的 Fr.8 组分可使 IR 蛋白质表达上调,与对照组相比提高了 66.6%;同样,Fr.8 组分有上调 IRS 表达的作用,且具有良好的剂量依赖关系,见图 5(b)。随着 Fr.8 组分浓度提高,IRS 蛋白表达量逐步增加,当 Fr.8 组分作用质量浓度达到 100 μ g/mL 时,IRS 蛋白质表达量提高到最大,与对照组相比提高了 60.6%;Glut2 占肝细胞葡萄糖载体蛋白的 97%以上,Glut2 在负责葡萄糖的转运的过程中起到非常重要的作用。如图 5(c)所示, HepG-2/IR 细胞 Glut2 的表达量显著下降 (** $p < 0.01$),与对照组相比,下调了 20.3%,而经 Fr.8 组分作用后, Glut2 的表达则上调 8%~37.7%,从而达到改善胰岛素抵抗的效果。如图 5(d)-(e)所示,模型组磷酸化蛋白 p-AMPK α 和 p-AKT (Ser473) 的表达与对照组相比显著降低 (** $p < 0.001$),这说明细胞产生胰岛素抵抗后,AMPK α 和 AKT 蛋白质的磷酸化水平下降,而 Fr.8 组分作用于细胞后,明显提高了 AMPK α 和 AKT(Ser473) 磷酸化蛋白质的表达水平 (### $p < 0.001$)。

已有文献报道,虫草头孢及其发酵产物可以改善化学诱导型大鼠糖尿病模型^[7],且虫草多糖对于糖尿病的体外及体内治疗已经具有成熟的研究^[18-20];

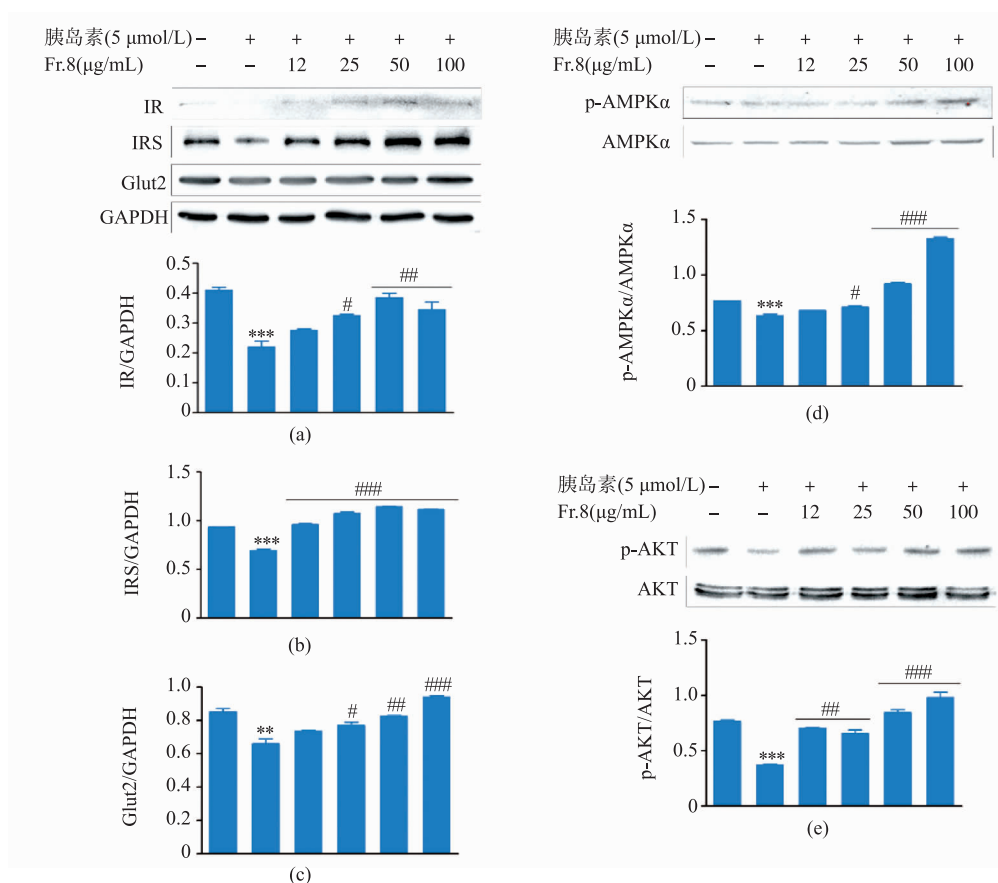


图 5 Fr.8 对 HepG-2/IR 细胞 IR、IRS、Glut2、p- AMPKα 及 p-AKT 蛋白质表达的影响

Fig. 5 Effect of Fr.8 on protein expression of IR、IRS、Glut2、p- AMPKα and p-AKT in HepG-2/IR cells

而对虫草头孢中小分子化合物治疗糖尿病的研究并不多见,本研究为虫草头孢中小分子化合物治疗糖尿病提供了一定实验依据。研究结果显示,虫草头孢正己烷分离组分 Fr.8 可通过调节多个相关蛋白质的表达改善 HepG-2 胰岛素抵抗,这也表明虫草头孢正己烷分离组分 Fr.8 可能成为治疗糖尿病的潜力药物。

3 结 语

2 型糖尿病(T2DM)主要表现为胰岛素抵抗或胰岛素分泌不足,而胰岛素必须与受体结合并固定在细胞膜上,才有可能将细胞周围的葡萄糖运送到细胞中,葡萄糖一旦进入细胞,即被细胞所利用。因此,在同等血浆胰岛素水平时,胰岛素受体越多,胰岛素作用能力越强,组织细胞对胰岛素越敏感;反之,当胰岛素受体减少,胰岛素的作用能力会相应减弱,进而组织细胞会对胰岛素产生抵抗作用。

肝脏是糖脂代谢的主要场所,对于维持血糖稳

定是必不可少的。因此,肝细胞的糖代谢紊乱对胰岛素抵抗的发生具有十分重要的意义,着重于肝脏胰岛素抵抗的研究具有一定的药理价值。作者采用的 HepG-2 细胞虽来源于肝癌细胞,但很大程度上保留了肝细胞的许多特性,其表面亦存在胰岛素受体,且受体数目与胰岛素的调节水平息息相关,当胰岛素受体数目减少到一定水平后,细胞就会对胰岛素产生抵抗作用。

作者构建了高胰岛素诱导的 HepG-2/IR 细胞模型,并运用此模型研究了虫草头孢正己烷提取物 Fr.8 组分的体外降糖活性。实验证明,Fr.8 组分不但可促进 HepG-2/IR 细胞对葡萄糖的消耗,还可以提高 HepG-2/IR 细胞对葡萄糖的摄取,从而在一定程度上改善肝脏胰岛素抵抗。研究结果表明,Fr.8 组分可使 HepG-2/IR 细胞对葡萄糖的消耗量和摄取量分别增加 70.39%和 83.70%。

通过对胰岛素抵抗相关基因转录及蛋白质表达的检测、分析,推测 Fr.8 组分的降糖活性与上调

IR、IRS、Glut2、p-AMPK α 及 p-AKT 的表达有关。研究表明,Fr.8 组分可显著增加 IR 及 IRS 的表达量,两者键合后再与胰岛素结合并固定在细胞膜上,既直接增强了胰岛素的作用能力,提高了胰岛素的敏感性,又间接维持了细胞周围的葡萄糖稳态。另外,Fr.8 组分亦可上调 p-AMPK α 及 p-AKT 蛋白质的

表达,从而促进 Glut2 的转位,起到改善 2 型糖尿病引起的代谢失衡作用。

因此,对虫草头孢提取物 Fr.8 组分进行体内降糖活性研究及进一步分离纯化,对 2 型糖尿病治疗药物的筛选意义重大。

参考文献:

- [1] TOLMAN K G, FONSECA V, DALPIAZ A, et al. Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease[J]. **Diabetes Care**, 2007, 30(3): 734-743.
- [2] PERRY R J, SAMUEL V T, PETERSEN K F, et al. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes[J]. **Nature**, 2014, 510(7503): 84-91.
- [3] SAMUEL V T, LIU Z X, WANG A, et al. Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease[J]. **Journal of Clinical Investigation**, 2007, 117(3): 739-745.
- [4] SILVIO E, INZUCCHI M D. Oral Antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes[J]. **Jama—Journal of The American Medical Association**, 2002, 287(3): 360-372.
- [5] SILVA D R, SYLVIE H, KEVIN D, et al. Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus[J]. **Fungal Diversity**, 2012, 56(1): 1-29.
- [6] LEE E J, JANG K H, IM S Y, et al. Physico-chemical properties and cytotoxic potential of *Cordyceps sinensis* metabolites[J]. **Natural Product Research**, 2015, 29(5): 455-459.
- [7] YANG L M, PING K C, et al. Anti-inflammatory principles from *Cordyceps sinensis*[J]. **Journal of Natural Products**, 2011, 74(9): 1996-2000.
- [8] LI Changhui, NING Guang, et al. Establishing and identifying insulin -resistant HepG-2 cell line[J]. **Chinese Journal of Diabetes**, 1999, 7(4): 198-200. (in Chinese)
- [9] FANG Fei, LUO Mingli, et al. Effect of mulberry leaves extracts on glucose uptake of insulin-resistant HepG2 cells and the mechanism[J]. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 2012, 47(11): 1452-1456. (in Chinese)
- [10] WANG Jing, GENG Yan, SUN Qing, et al. Inhibitory effects of extract fraction 2 from *Antrodia cinnamomea* on the activation of CFSC-8B cells induced by PDGF-BB[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(9): 917-923. (in Chinese)
- [11] ZOU H C, JIE Y W, et al. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement [J]. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 2005, 64(3): 207-215.
- [12] YAN C, JIAN Y Z, YANG X Z. 2-NBDG as a marker for detecting glucose uptake in reactive astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation in vitro[J]. **Journal of Molecular Neuroscience**, 2015, 55(1): 126-130.
- [13] MANAHARAN T, MING H C, et al. Syzygiumaqueum leaf extract and its bioactive compounds enhances pre-adipocyte differentiation and 2-NBDG uptake in 3T3-L1 cells[J]. **Food Chemistry**, 2013, 136(2): 354-363.
- [14] ZANG W M, ZUCCOLLO A, et al. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004, 279(46): 47898-47905.
- [15] JIN N M, SHI R G, et al. Flavonoids from tetrastigma obtectum enhancing glucose consumption in insulin-resistance HepG2 cells via activating AMPK[J]. **Fitoterapia**, 2013, 90: 240-246.
- [16] HERRERA I C, MARTIN M A, et al. Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2014, 64(2): 10-19.
- [17] HUI C L, TAI H H, et al. Anti-hyperglycemic activity of natural and fermented *Cordyceps sinensis* in rats with diabetes induced by nicotinamide and streptozotocin[J]. **The American Journal of Chinese Medicine**, 2006, 34(5): 819-832.
- [18] SHAO P L, KUI J Z, JI N Z, et al. A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury[J]. **Life Sciences**, 2003, 73(19): 2503-2513.
- [19] LI S P, ZENG Q, et al. Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps mycelia*[J]. **Phytomedicine**, 2006, 13(6): 428-433.
- [20] QING G Z, YUE D H, YONG B, et al. Hypoglycemic activity of the fungi *Cordyceps militaris*, *Cordyceps sinensis*, *Tricholoma mongolicum*, and *Omphalia lapidescens* in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2006, 72(6): 1152-1156.