

食用菌提取物对胰岛素抵抗细胞体外糖代谢的影响

张超^{1,2}, 汪雯翰¹, 杨焱^{*1}, 颜梦秋¹, 冯娜¹, 张劲松¹

(1. 农业部南方食用菌资源利用重点实验室/国家食用菌工程技术研究中心/上海市农业科学院 食用菌研究所, 上海 201403; 2. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 以高胰岛素诱导的 HepG2 细胞和地塞米松诱导的 3T3-L1 脂肪细胞两种胰岛素抵抗细胞模型, 分别对 9 种食用菌(桑黄、灵芝、香菇、杏鲍菇、鸡腿菇、灰树花、猴头、姬松茸和蛹虫草)醇提取物、桑黄和灵芝的 4 种有机溶剂(正丁醇、乙酸乙酯、氯仿和石油醚)萃取物的体外降糖活性进行了研究。HepG2 模型研究结果表明, 9 种食用菌醇提取物中灵芝和桑黄醇提取物促进细胞葡萄糖消耗效果最好, 并且两者高浓度组的葡萄糖消耗量均好于阳性对照组; 桑黄 3 种有机溶剂萃取相(正丁醇相、乙酸乙酯相和石油醚相)和灵芝 4 种有机溶剂萃取相促进细胞葡萄糖消耗效果较好, 均好于阳性对照组。3T3-L1 细胞模型结果表明, 9 种食用菌醇提取物中灵芝和桑黄醇提取物的促进葡萄糖消耗效果最好, 均好于阳性对照组; 灵芝及桑黄 4 种有机溶剂萃取相中, 乙酸乙酯萃取相的葡萄糖消耗效果较好。

关键词: 桑黄; 灵芝; HepG2 细胞; 3T3-L1 脂肪细胞; 胰岛素抵抗

中图分类号: Q 53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)01-0022-05

Effect of Different Edible Fungi on the Bioactivity of Anti-Insulin Resistance in Insulin Resistant Cells

ZHANG Chao^{1,2}, WANG Wenhan¹, YANG Yan^{*1}, YAN Mengqiu¹, FEN Na¹, ZHANG Jingsong¹

(1. Key Laborator of Edible Fungi Resources and Utilization / National Engineering Research Center of Edible Fungi / Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The effect of nine different edible fungi ethanolic extracts (*Phellinus baumii*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps militaris*, *Agaricus blazei*, *Coprinus comatus*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus* and *Pleurotus eryngii*) on glucose consumption was investigated in two models of insulin-resistant cells (high concentration insulin-induced HepG2 and dexamethasone-induced 3T3-L1). The glucose consumption of alcoholic extracts from the edible mushroom using four different organic solution (petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and n-butanol phase) from *G. Lucidum* or *P. Baumii* was detected in the two cell models. The cell glucose consumption was

收稿日期: 2015-03-14

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD36B05)。

* 通信作者: 杨焱(1970—), 女, 贵州石阡人, 工学博士, 研究员, 主要从事药用真菌研究。E-mail: yangyan@saas.sh.cn

引用本文: 张超, 汪雯翰, 杨焱, 等. 食用菌提取物对胰岛素抵抗细胞体外糖代谢的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(01): 22-26.

greatly enhanced by the ethanolic extracts from *G. Lucidum* or *P. baumii* in HepG2 model. A better result of glucose consumption was achieved for the two groups with high-concentration compared with the positive control. The cell glucose consumption was also effectively promoted by *P. baumii* extracted by petroleum ether, ethyl acetate or n-butanol, and similar improvement was observed in *G. Lucidum* extracted with four types of organic solvents. The glucose consumption increased by ethanolic extracts from *G. Lucidum* and *P. baumii* in the study of 3T3-L1 adipocyte cell model. The extracts from *P. baumii* and *G. Lucidum* by ethyl acetate facilitated the glucose consumption.

Keywords: *Ganoderma Lucidum*, *Phellinus Baumii*, HepG2 cell, 3T3-L1 adipocyte cells, insulin-resistant

II 型糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病,胰岛素抵抗是其特征病症之一。胰岛素抵抗是指各种原因使胰岛素促进葡萄糖摄取和利用率下降,机体代偿性的分泌过多胰岛素产生高胰岛素血症。II 型糖尿病发病率在所有糖尿病患者中接近 90%。据世界卫生组织估计,2025 年全球糖尿病患者将达到 3 亿,其中 1.2 亿患者在中国、印度和日本等亚洲国家。糖尿病给患者自身、家庭和国家造成沉重的负担,据统计,我国每年治疗 2 型糖尿病及其并发症的医疗总成本为 20 860 亿元, 占中国医疗卫生总费用的 43.8%^[1]。

HepG2 细胞为人的肝胚胎瘤细胞,表型与肝细胞极其相似,高浓度的胰岛素可导致细胞表面的胰岛素受体数目呈下降趋势,与体内胰岛素水平及刺激持续时间呈正相关^[2],因而通过高胰岛素诱导 HepG2 细胞可建立胰岛素抵抗模型。脂肪细胞的增殖与分化亦是导致人类肥胖、心血管疾病和 II 型糖尿病等发生的主要原因,通过地塞米松诱导 3T3-L1 前脂肪细胞可建立另一种胰岛素抵抗模型。以上两种胰岛素抵抗模型现已被广泛应用于糖和脂肪代谢相关的实验研究^[3]。

当前临床应用的 II 型糖尿病药物主要有胰岛素、胰岛素类似物、磺酰脲类、双肌类、和噻唑烷二酮(TDZ)类等,其中胰岛素类药物往往使病人产生依赖或拮抗,而其他药物则具有作用慢、活性低等缺点,并常常会导致糖尿病患者出现低血糖、贫血、肥胖和耐药性等副作用,然而天然降血糖产物能够有效避免以上不良反应。

大量研究表明多种食用菌如灵芝、桑黄、北虫草和香菇等降血糖效果明显^[4],作用温和,能够预防和治疗糖尿病,是无明显毒副作用的优良天然降糖

资源,但在相关的国内外研究中对食用菌醇提物及其天然产物单体化合物的降糖作用的报道并不多见,尚未明确其降血糖作用的主要有效成分及其降糖机理。因此,作者通过 HepG2 和 3T3-L1 两种胰岛素抵抗细胞模型追踪桑黄、灵芝和猴头等 9 种食用菌提取物,及桑黄和灵芝有机溶剂萃取相对胰岛素抵抗模型葡萄糖消耗量的影响,筛选具有降糖活性的食用菌源性的有效部位和成分,为探讨食用菌降血糖机理和相关功能食品的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

3T3-L1 小鼠前脂肪细胞和 HepG2 细胞(人类肝癌细胞株):购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx):美国 Sigma 公司产品;葡萄糖临床检测试剂盒:南京建成生物工程研究所产品;精蛋白生物合成人胰岛素注射液:诺和诺德医用注射产品。胰蛋白酶、含酚红和无酚红的 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)高糖培养基、含酚红和无酚红 RPMI1640 培养基、胎牛血清(FBS)和胰酶:GIBCO 公司产品。

桑黄(*Phellinus baumii*)和灵芝(*Ganoderma lucidum*)子实体由上海市农业科学院食用菌研究所栽培获得,菌种保存于中国微生物菌种保藏中心上海食用菌分中心,标本存放于上海市农业科学院食用菌研究所加工技术与发酵工程研究室;香菇(*Lentinula edodes*);刺芹侧耳(*Pleurotus eryngii*);柱状田头菇(*Coprinus comatus*)、灰树花(*Grifola frondosa*)、猴头菌(*Hericium erinaceus*)、姬松茸(*Agaricus blazei Murrill*)和蛹虫草(*Cordyceps*

militaris)子实体:上海百信生物科技有限公司提供。

DJ-10A 中药粉碎机:上海隆拓仪器设备有限公司产品;BC-R2001 型旋转蒸发仪:上海贝凯生物化工设备有限公司产品;Heto PL-3000 冷冻干燥机:赛默飞世尔科技(中国)产品;Synergy HT 多功能酶标仪:美国 BIO2TEK 公司产品;Delta series 生物安全柜:美国 LABCONCO 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 活性样品制备 桑黄、灵芝、香菇、杏鲍菇、鸡腿菇、灰树花、猴头、姬松茸和蛹虫草等 9 种食用菌子实体醇提物:参照文献[5]制备获得;桑黄及灵芝子实体 4 种有机溶剂萃取相的制备:将桑黄和灵芝醇提物分别旋蒸干后溶于体积分数 20%乙醇溶液,再将悬浊液依次用等体积的石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取 24 h。每种有机溶剂萃取 2 次。各萃取液分别合并之后超低温浓缩至干燥。

1.2.2 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的建立方法 HepG2 细胞复苏后用含 10%灭活 FBS 的 RPMI 1640 培养液转入 25 mL 培养瓶中,在 37 ℃,体积分数 5% CO₂ 条件下培养。当细胞贴壁长满后,倾去培养基,用质量分数 0.25%胰蛋白酶消化,每 3 天按 1:3 比例传代 1 次,取对数生长期的细胞用于实验。将处于对数生长期的细胞消化后,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度为 2×10^4 个/mL,在 96 孔细胞培养板中每孔加入 200 μ L 细胞悬液继续培养。待细胞单层贴壁后,加入含有胰岛素浓度为 1 500 IU/L 的培养基,于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中孵育 36 h 后,弃去培养基,用 0.01 mol/L PBS 洗涤 1 次,再加入 RPMI 1640 培养基 37 ℃孵育 20 min。重复上述过程 1 次,最后用 0.01 mol/L PBS 洗涤后,换上无血清无酚红的 RPMI 1640 培养基。

按照下列体系加样后孵育 24 h:

阴性对照组:0.01 μ L 葡萄糖标准液/孔;样品组:0.01 μ L 葡萄糖标准液/孔+1 μ L 样品/孔;阳性对照组:0.01 μ L 葡萄糖标准液/孔+1 μ L 300 mmol/L 二甲双胍/孔;孵育结束后,利用葡萄糖试剂盒进行葡萄糖消耗量的测定:取 50 μ L R1、50 μ L R2、10 μ L 样品于酶标板,37 ℃孵育 20 min,在波长 505 nm 条件下测定吸光值。

1.2.3 3T3-L1 胰岛素抵抗细胞模型的建立方法 将 3T3-L1 前脂肪细胞置于含质量分数 10% FBS

的 DMEM 高糖培养基中,其培养方法与 1.2.1 中一致。将处于对数生长期的细胞消化后,用含质量分数 10% FBS 的 DMEM 培养基调整细胞浓度为 2×10^4 个/mL,在 96 孔细胞培养板中每孔加入 200 μ L 细胞悬液继续培养;待细胞融合 2 d 后,加含 0.5 mmol/L IBMX、0.25 μ mol/L 地塞米松、286 IU/L 的胰岛素液,10% FBS 的 DMEM 高糖培养基培养 48 h;吸去培养基,再加入含 286 IU/L 胰岛素的培养基再培养 48 h;随后以 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基继续培养,2 d 换培养液 1 次,诱导分化 6~10 d。90%以上 3T3-L1 细胞呈脂肪细胞表型,即出现脂滴可用于试验^[6]。加入含终浓度为 1 μ mol/L 地塞米松的培养基,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 48 h。弃去培养基,用 0.01 mol/L PBS 洗涤 1 次,再用无酚红 DMEM 培养基 37 ℃孵育 20 min。重复上述过程 1 次,最后用 0.01 mol/L PBS 洗涤后,换上无血清无酚红 DMEM 培养基。

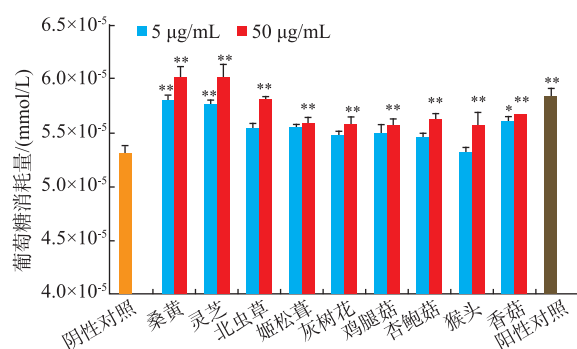
按照下列体系加样后孵育 24 h: 阴性对照组:0.01 μ L 葡萄糖标准液/孔;样品组:0.01 μ L 葡萄糖标准液/孔+1 μ L 样品/孔;阳性对照组:0.01 μ L 葡萄糖标准液/孔+1 μ L 300 mmol/L 二甲双胍/孔;孵育结束后,参照 1.2.1 方法进行葡萄糖消耗量的计算。

2 结果与讨论

2.1 HepG2 胰岛素抵抗模型

2.1.1 9 种食用菌提取物对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 9 种食用菌提取物对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的研究结果如图 1 所示,桑黄和灵芝醇提物高浓度组促进葡萄糖消耗效果好于阳性对照组;其他 7 种食用菌(香菇、杏鲍菇、鸡腿菇、灰树花、猴头、姬松茸和蛹虫草)的醇提物高浓度组也呈现一定的促进葡萄糖消耗作用,与阴性对照相比有显著性差异;北虫草醇提物高浓度组葡萄糖消耗量与阳性对照组接近。

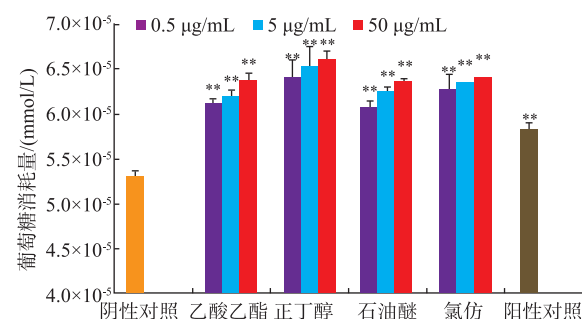
2.1.2 灵芝及桑黄 4 种有机萃取相对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 基于 2.1.1 的实验结果,进一步跟踪桑黄和灵芝的 4 种有机溶剂萃取相促葡萄糖消耗作用,研究结果如图 2 和图 3 所示。灵芝 4 种萃取相组葡萄糖消耗量显著高于阳性对照。桑黄石油醚萃取相、乙酸乙酯萃取相和正丁醇萃取相各浓度组葡萄糖消耗效果均高于阳性对照,并呈浓度梯度依赖性,氯仿萃取相效果较弱。



与阴性对照组比较, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

图1 9种食用菌提取物对胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

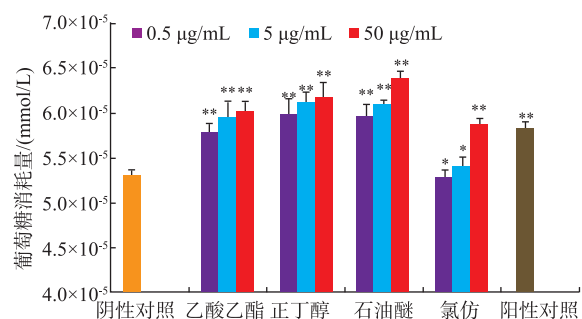
Fig. 1 Effect of nine species edible fungi on glucose consumption in insulin-resistant HepG2 cells



与阴性对照组比较, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

图2 4种灵芝萃取相对胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

Fig. 2 Effect of four phase *G. Lucidum* extractson glucose consumption in insulin-resistant HepG2 cells



与阴性对照组比较, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

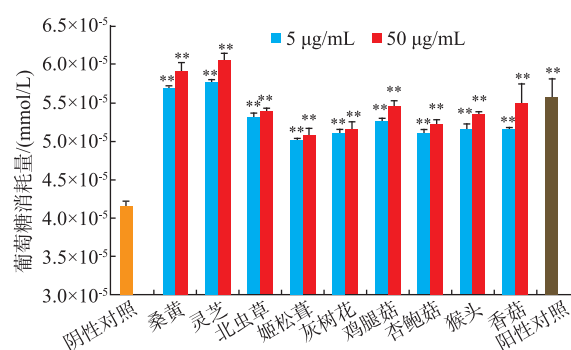
图3 4种桑黄萃取相对胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

Fig. 3 Effect of four phase *P.baumii* extracts on glucose consumption in insulin-resistant HepG2 cells

2.2 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型

2.2.1 9种食用菌醇提取物对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂

肪细胞葡萄糖消耗量的影响 9种食用菌醇提取物对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗的实验结果如图4所示,在9种食用菌醇提取物中,灵芝和桑黄醇提取物促 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖的消耗效果最好,高浓度灵芝醇提取物和桑黄醇提取物的葡萄糖消耗量均好于阳性对照组。



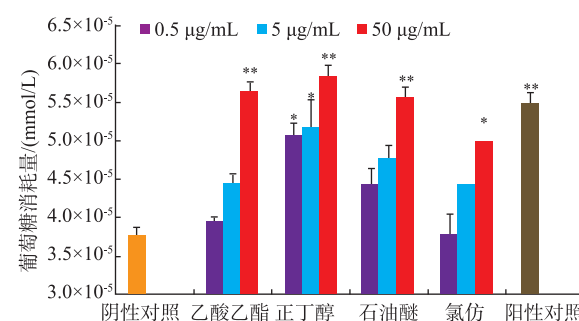
与阴性对照组比较, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

图4 9种食用菌提取物对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量的影响

Fig. 4 Effect of nine species edible fungi on glucose consumption in insulin -resistant 3T3 -L1 adipocyte cells

2.2.2 灵芝和桑黄4种有机萃取相对胰岛素抵抗

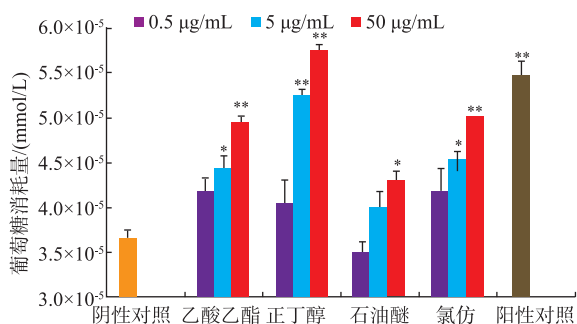
3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量的影响 2.2.1 的实验结果表明灵芝和桑黄在九种食用菌醇提取物中促葡萄糖消耗效果是最佳的,因此进一步利用此模型跟踪桑黄和灵芝的石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇4种萃取相的促 3T3-L1 葡萄糖消耗作用。实验结果如图5和图6所示,灵芝和桑黄的乙酸乙酯萃



与阴性对照组比较, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

图5 4种灵芝萃取相对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量的影响

Fig. 5 Effect of four phase *P.baumii* extracts on glucose consumption in insulin-resistant 3T3-L1 adipocyte cells



与阴性对照组比较, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

图 6 4 种桑黄萃取相对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量的影响

Fig. 6 Effect of four *G. Lucidum* extracts on glucose consumption in insulin-resistant 3T3-L1 adipocyte cells

取相效果均好于其他有机溶剂萃取相,高浓度乙酸乙酯萃取相的葡萄糖消耗量显著高于阳性对照组,并呈现浓度梯度依赖性。

3 结 语

脂肪、肝脏和肌肉是胰岛素抵抗的主要靶器官,因而肝细胞、脂肪细胞和骨骼肌源性的细胞株常被用来建立胰岛素抵抗模型⁷。肝脏是人体的物质代谢中心,并且相比其他内脏器官其胰岛素受体

分布十分密集,因而是影响胰岛素促进葡萄糖摄取的主要靶器官;HepG2 细胞株是一种人分化肝胚细胞瘤细胞株,其生化特性及生物合成能力与人正常肝细胞极为相似,因此 HepG2 胰岛素抵抗模型能够较为准确模拟体内胰岛素抵抗的发生过程,是一种可靠的胰岛素抵抗模型。脂肪组织是人体重要的能量储存器和内分泌器官,但脂肪组织过多积累会导致大量脂肪酸溢出,并异位沉积,从而引发脂质代谢紊乱和胰岛素抵抗;有研究表明,脂肪组织是胰岛素抵抗的始发部位,脂肪细胞合成和分泌瘦素、抵抗素、肿瘤坏死因子、白介素、促分裂原活化蛋白激酶等多种活性物质,这些因子在胰岛素抵抗发生过程中具有重要作用。3T3-L1 前脂肪细胞是从 17-19 天龄小鼠胚胎 Swiss 3T3 细胞中分离获得的前体细胞,具有单一分化潜能,适当条件下可诱导分化为脂肪细胞。

灵芝和桑黄是民间较为常见的两种药用真菌,具有增强免疫力、抗癌和抗氧化等药效学活性。作者前期动物实验结果发现桑黄乙酸乙酯萃取相具有良好的降糖活性,而进一步提示灵芝和桑黄有机溶剂萃取相能明显促进 HepG2 和 3T3-L1 细胞葡萄糖消耗量上升,但具体为哪一种或几种有效物质还有待后续深入研究。

参考文献:

- [1] FAN Yinglan, DU Jialin, LI Xianhua, et al. Detriment and protection of diabetes mellitus [J]. *J PRA TRAD CHIN INTER MED*, 2012, 26(6): 56-58. (in Chinese)
- [2] WILLIAMS J F, OLEFSKY J M. Defective insulin receptor function in down-regulated HepG2 cell [J]. *Endocrino*, 1990, 127(4): 1706-1717.
- [3] SOARES F, GUICHARDANT M, COZZONE D, et al. Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38(7): 882-889.
- [4] LU Fei, LI Bo, SUO Xiaomin, et al. Research advances in hypoglycemic activity of edible fungi [J]. *Food Res Dev*, 2010, 31(2): 189-193. (in Chinese)
- [5] WANG Wenhan, ZHANG Jingsong, YANG Yan, et al. A comparative study on antioxidant and anti-aging activities of ten edible / medicinal fungi [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2013, 25(8): 1027-1032. (in Chinese)
- [6] ANIL K L, MARITA A R. Troglitazone prevents and reverses dexamethasone induced insulin resistance on glycogen synthesis in 3T3 adipocyte [J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 130: 351-358.
- [7] CAO Li, MAO Caiping, GU Zhenlun. The influence of puerarin on glucose consumption of high insulin rats hepatic cells [J]. *Chin J Hemorrh*, 2007, 17(2): 215-216, 232. (in Chinese)