

委陵菜提取物对 L6 肌细胞糖代谢影响的研究

李 瑾¹, 何计国¹, 陆 璐¹, 刘宗林², 韩兴谦¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083 2. 北京市食品研究所, 北京 100076)

摘 要: 研究了委陵菜中醇提物和氯仿碱性提物组分对 L6 肌肉细胞糖代谢的影响。结果表明: 委陵菜的醇提物和氯仿碱性粗提物均有促进 L6 肌肉细胞糖代谢的作用, 其中的氯仿碱性粗提物作用更为明显, 随着浓度的增加作用效果增强。氯仿碱性提取物的体外代谢液对 L6 肌肉细胞的糖代谢有明显的促进作用, 但作用效果与该提取物本身无显著差异。

关键词: 委陵菜; L6 肌细胞; 糖代谢

Study on Effects of Extracts of Potentilla on Glucose Metabolism of L6 Muscle Cells

LI Jin¹, HE Ji-guo¹, LU Lu¹, LIU Zong-lin², HAN Xing-qian¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Beijing Food Research Institute, Beijing 100076, China)

Abstract: Studied the efficacy of ethanol extracts and alkalescent chloroform extracts of potentilla on glucose metabolism of L6 skeletal muscle cells. The results showed that both ethanol extracts and alkalescent chloroform extracts of potentilla have the ability to enhance the glucose metabolism of L6 skeletal muscle cells. Besides, the alkalescent chloroform extracts indicated a better efficacy, moreover, this efficacy and the concentration have a positive relativity. In addition, the product of metabolism of the alkalescent chloroform extracts *in vitro* also indicated a telling efficacy that enhance the glucose metabolism of L6 skeletal muscle cells and this efficacy has few discrepancy with the one of extracts itself.

Key words potentilla; L6 skeletal muscle cells; metabolism of glucose

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)01-0299-04

血糖控制可以延缓糖尿病并发症的发生, 缓解糖尿病症状, 改善患者生活质量^[1-2]。目前以化学合成药物降血糖效果最好, 但其毒副作用也较大, 常见的有肝、肾损伤, 昏迷、腹泻、低血糖、乳酸中毒等副作用^[3]。因此从天然产物中寻找降糖成分一直是近年来国内外研究的热点^[4]。天然成分具有整体调节碳水化合物、蛋白质、脂肪代谢紊乱的作用, 虽然降糖作用的强度和起效时间不及西药, 但天然产物通过多种有效成分对人体多靶点的整合调节作用。委陵菜作为降血糖药物使用始于最近几年, 对其研究尚显不足, 因此对委陵菜进行降糖研究有利于委陵菜的开发与利用。委陵菜为蔷薇科植物委陵菜的干燥全草味苦、性寒。有清热解毒、凉血止血的功能^[5-6]。

目前有一些文献报道表明委陵菜水提液有降血糖改善血脂紊乱的功效^[7-12], 也有报道对其水提液的降糖机理作了一定的研究^[13-16]。但对其作用成分的研究尚不多见, 张红芝分离出部分黄酮粗提物、生物碱粗提物和

熊果酸粗提物并研究了其对肝细胞糖代谢的影响, 在此基础上, 进一步研究各种成分对动物体内糖代谢最广泛的组织肌肉的影响。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

细胞株: L6 大鼠成肌细胞株 协和医科大学细胞中心; 委陵菜干燥全草 北京市同仁堂总店。

葡萄糖氧化酶测定试剂盒 北京北化康泰临床试剂有限公司; DMEM 高糖培养基 GBECO 公司; DMEM 高糖无酚红液体培养基 协和医科大学细胞中心; 胎牛血清 四季青公司。

二氧化碳培养箱 美国 Thermo 公司; SZ-97 自动三重纯水蒸馏器、旋蒸仪 上海亚荣生化仪器; 倒置显微镜; 全自动生化仪 美国 Thermo 公司; 超声波振荡仪 济宁金百特电子有限责任公司; 超净工作台 北京市百剑空气净化设备厂; TGL-20M 高速台式冷冻离心

收稿日期: 2007-10-30

作者简介: 李瑾(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养与食品安全。E-mail: lijn19820913@126.com

机 湘仪离心机厂; DY89-II型电动玻璃匀浆机 宁波新之生物科技有限公司; 低速离心机 上海安亭科学仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 组分粗提物的制备

委陵菜醇提取物(粗黄酮)的制备^[17]: 委陵菜干燥全草, 打碎, 60% 乙醇超声提取两次(30min, 60℃), 石油醚脱脂, 下层加乙酸乙酯萃取, 旋干, PBS 溶解, 0.2 μm 滤膜过滤, 4℃ 冷藏备用。

委陵菜碱性氯仿提取物(粗生物碱)的制备^[17]: 委陵菜干燥全草, 打碎, 10% Na₂CO₃ 渗漉过夜, 氯仿超声提取两次(30min, 60℃), 旋干, PBS 溶解, 0.2 μm 滤膜过滤, 4℃ 冷藏备用。

委陵菜碱性氯仿提取物(粗生物碱)体外代谢液的制备^[18]: 肝微粒体混合功能氧化酶 S₉ 10ml 与 5mg/ml 提取物 1.5ml, 37℃ 混合作用 30min, 75℃ 下作用 30min 使酶钝化, 所得液体为模拟体内代谢制备的体外代谢液。

1.2.2 细胞培养

L6 细胞的增殖培养^[19-21]: L6 细胞株, 5% CO₂ 37℃, DMEM 高糖培养基, 接种于 25 cm² 培养瓶中。

L6 细胞的分化培养^[21-23]: 细胞长满 60% 时, 按 10⁴~10⁵ 个/ml, 将细胞接种至 24 孔板中, 当细胞长满板壁, 更换培养基, 改用含 FBS 2% 的分化培养基, 约 48h 后, 梭型成肌细胞间打通, 形成纤维状的肌肉细胞。

委陵菜中的各粗提物对 L6 肌细胞糖代谢的影响: 将细胞分为两组(醇提取物组和碱性氯仿提取物组), 接种 24 孔板, 当成肌细胞 80% 分化成肌肉细胞时, 更换新的分生培养基, 每孔加入分生培养基 0.5ml, 再分为 6 组, 每组加入不同浓度的粗提物 0.5 μl, 浓度分别为 0.3、0.6、0.9、1.2、1.5mg/ml 空白组加入 0.5 μl 的 PBS 缓冲液, 每组设 6 个平行, 分别在 0、3、6、9、12h 时对培养基中的葡萄糖浓度进行检测。

委陵菜中碱性氯仿提取物及其代谢产物对 L6 肌细胞糖代谢的影响: 以 10⁴~10⁵ 个/ml 个细胞密度接种 24 孔板, 当成肌细胞 80% 分化成肌肉细胞时, 更换新的分生培养基, 每孔加入分生培养基 0.5ml, 再分为 3 组, 空白组(加入 0.5 μl PBS), 碱性氯仿提取物组(加入 0.5 μl 浓度为 1.5mg/ml 的碱性氯仿提取物), 代谢液组(加入 0.5 μl 浓度为 1.5mg/ml 的碱性氯仿提取物体外代谢液), 每组设 6 个平行, 12h 后测定培养基中葡萄糖浓度。

1.2.3 葡萄糖浓度的测定

应用全自动生化仪参照葡萄糖氧化酶试剂盒说明书步骤测定。

1.3 数据处理

结果均以均数±标准差表示, 多组间比较用方差分析, 两组间比较用 t 检验。

2 结果与分析

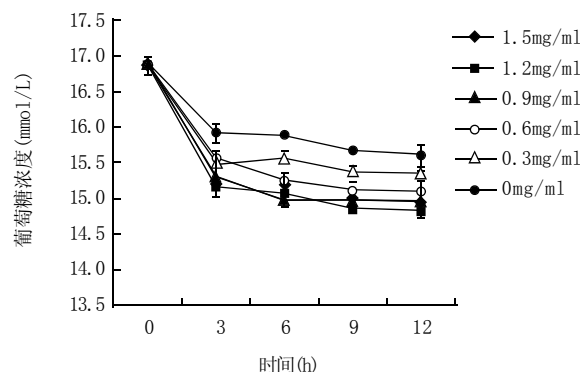


图1 不同时间、不同浓度委陵菜醇提取物对 L6 糖代谢的影响

Fig.1 Effects of potentilla flavonoids on L6 metabolism of glucose in different time and different concentrations

图1表明, 在0~12h之间, 随着作用时间的延长, 各组的培养基葡萄糖浓度持续下降, 在0~3h之间下降迅速, 作用9h后不再有显著变化。各剂量组的葡萄糖浓度下降速度大于空白对照组, 且剂量组中各点与对应的同一时刻空白对照点有显著性差异($p < 0.05$), 表明醇提取物各剂量组均有一定的降糖功效; 作用9h后, 0.9~1.5mg/ml 作用效果相似, 与低剂量两组差异显著($p < 0.05$)。

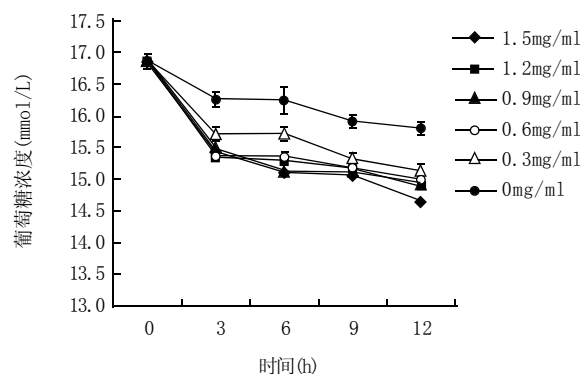


图2 不同浓度委陵菜碱性氯仿提取物对 L6 糖代谢的影响

Fig.2 Effects of potentilla alkaloid on L6 metabolism of glucose in different time and different concentrations

图2表明, 在0~12h之间, 随着作用时间的延长, 各组的培养基葡萄糖浓度持续下降, 在0~3h之间下降迅速, 9h后对照组趋于平稳, 剂量组仍有明显的下降趋势; 各剂量组的葡萄糖浓度下降速度大于空白对照组, 且剂量组中各点与对应的同一时刻空白对照点有显著性差异($p < 0.05$), 表明氯仿碱性提取物有一定降糖功效; 作用12h后, 在0.3~1.5mg/ml 的实验范围内, 随浓度增加作用效果增强。

图3选取以上两组中最高剂量组进行对比, 在6h以

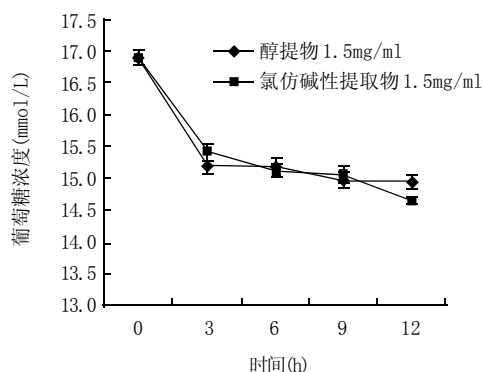


图3 1.5mg/ml时两种粗提物作用的对比

Fig.3 Contrast of two crude extract in concentration of 1.5 mg/ml

前, 醇提物组葡萄糖代谢速度大于碱性氯仿提取物组, 在6~9h, 二者的作用速率相近, 9h以后氯仿组的代谢速度明显的高于醇提物组, 在12h时, 氯仿组的葡萄糖浓度明显的低于醇提物组, 由此可见碱性氯仿提取物的降糖效果要优于醇提物, 以后的实验选择在作用12h测定。

表1 碱性氯仿提取物体外代谢液对L6细胞糖代谢的影响
Table 1 Effects of alkaloids products *in vitro* on L6 glucose metabolism of glucose

组别	剂量(mg/ml)	n	葡萄糖含量(mmol/L)
空白	0	6	28.820±0.964
碱性氯仿提取物组	1.5	6	27.005±1.128 ^a
体外代谢液组	1.5	6	26.905±1.13 ^{ab}

注: a 与空白对照组相比 $p < 0.05$; b 与提取物组相比 $p > 0.05$ 。

表1表明, 1.5mg/ml的氯仿碱性提取物体外代谢液作用于L6细胞12h后, 培养基中的葡萄糖浓度与空白对照组有显著性差异($p < 0.05$), 明显的促进了L6糖代谢作用; 1.5mg/ml的氯仿碱性提取物作用于L6细胞12h后, 培养基中的葡萄糖浓度与空白对照组也有显著性差异, 促进了L6的糖代谢作用; 但是氯仿碱性提取物组与其体外代谢液组之间没有显著性差异, 表明二者在促进L6细胞糖代谢的作用上没有显著差异。

3 讨论

血糖控制是控制II型糖尿病的关键。从研究糖代谢入手是研究治疗II型糖尿病的药物的一条有效途径。由胰岛素控制的糖代谢, 通过PI3K、AKt等多种酶调控的一系列磷酸化作用从而控制血液中的葡萄糖转运入细胞内合成糖原等活动。我们研究药物对糖代谢的影响选择由效果到机理的研究。

肌肉和肝脏是动物体内糖代谢的最主要的器官和组织, 其中肌肉的分布遍及全身, 分布最为广泛。研究药物对糖代谢的影响, 以达到控制血糖减缓糖尿病的作用, 肌肉是重要的研究对象。已有研究表明, 委陵菜

的水提液及某些组分能够提高肝细胞的糖代谢, 本研究则继续研究了委陵菜中的醇提物和碱性氯仿提取物组分对L6肌肉细胞糖代谢的影响。

3.1 培养时间和剂量的初步探索及两种粗提物作用的比较

图1和2表明, 委陵菜的醇提物和碱性氯仿提取物对L6肌肉细胞的糖代谢均有一定的促进作用, 通过图3的比较表明碱性氯仿提取物的作用效果较为温和, 降糖较缓, 更符合对新型降糖药物的要求; 3h以前各组糖代谢速度均较大, 9h以后碱性氯仿提取物的降糖效果明显优于醇提物, 具有良好的降糖特性, 有待于进一步从此代谢过程和组成角度研究其作用机制。

以上实验所使用的药物剂量为0.3~1.5g/ml, 在此剂量范围内, 碱性氯仿提取物的实验效果均随作用剂量的增加而增强, 由此可以推测继续增大作用剂量可能有助于增强作用效果, 可以继续研究。而作用时间的转折点是9h, 醇提物在作用9h后效果趋于平缓, 而氯仿碱性提取物的作用增强, 所以后续试验可以选择在12h进行测定。

3.2 生物碱体外代谢液作用12h对L6肌细胞糖代谢的影响

氯仿碱性提取物和其体外代谢液都有显著提高L6肌肉细胞糖代谢的作用, 可以继续对该提取物进行研究, 研究其对糖代谢过程中的各个胰岛素受体和转运蛋白的作用, 开发降糖药物; 但是二者的作用效果却没有显著性差异, 即氯仿碱性提取物经过模拟体内代谢过程处理后形成的体外代谢液对L6肌肉细胞的糖代谢作用没有明显的改变, 可见体内的代谢机制没有对该粗提物本身的活性有所改变, 碱性氯仿提取物可能以原型发挥作用, 可以进一步将该粗提物分离提纯, 研究其降糖特性。

4 结论

委陵菜的醇提物和氯仿碱性粗提物均有促进L6肌肉细胞糖代谢的作用, 其中的氯仿碱性粗提物作用更为明显, 随着浓度的增加作用效果增强。氯仿碱性提取物的体外代谢液对L6肌肉细胞的糖代谢有明显的促进作用, 但作用效果与该提取物本身无显著差异。

可见委陵菜的氯仿碱性提取物显示出了较好的促进肌肉细胞糖代谢的功效, 具有开发成为降糖药物的良好潜质, 可对其机制继续进行研究。

参考文献:

- [1] 姚姣娟, 马惠风. 城市社区居民糖尿病流行病学调查[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(6): 982-984.
- [2] 章庆红. 我国各地糖尿病发病趋势[J]. 河北医药, 2005, 27(8): 624-625.
- [3] 陈端生. 糖尿病防治的中医药干预[J]. 海峡预防医学杂志, 2006, 12

- (1):76.
- [4] 刘丽平, 黄键, 陈必链. 天然产物降血糖成分的研究进展[J]. 海峡药学, 2004, 16(5): 4-7.
- [5] 沈阳, 王庆贺, 林厚文. 委陵菜化学成分的研究中药材[J]. 2006, 29(3): 237-239.
- [6] 刘普, 段宏泉, 潘勤. 委陵菜三萜成分研究[J]. 中国医药杂志, 2006, 31(22): 1875-1880.
- [7] 崔荣军, 李怀慧, 郭新民. 翻白草对II型糖尿病大鼠血糖的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(11): 84-85.
- [8] 孟令云, 朱黎霞, 郑海洪, 等. 翻白草对高血糖动物模型的作用研究[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(5): 588-590.
- [9] 王晓敏, 王建红, 徐冬平, 等. 翻白草水提液对糖尿病小鼠降血糖作用[J]. 江西中医院学报, 2005, 17(2): 53-54.
- [10] 孟令云, 朱黎霞, 杜慧. 翻白草对家兔血糖影响的研究[J]. 中医药学报, 2001, 29(4): 35-36.
- [11] 郭新民, 崔荣军, 申梅淑. 翻白草对II型糖尿病大鼠血脂代谢紊乱的影响[J]. 牡丹江医学院学报, 2005, 26(2): 4-7.
- [12] 姜长玲, 胡晓晨, 赵晓刚. 翻白草对II型糖尿病脂代谢和血液流变学的影响[J]. 中国中医药信息志, 2002, 9(8): 41-43.
- [13] 郭新民, 崔荣军. 翻白草对II型糖尿病大鼠血清胰岛素和胸腺指数的影响[J]. 牡丹江医学院学报, 2004, 25(4): 1-3.
- [14] 郭新民, 崔荣军, 董琦. 翻白草对II型糖尿病大鼠胰岛素降解酶基因表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(2): 40-42.
- [15] 郭新民, 于松涛. 翻白草合剂对II型糖尿病大鼠海马神经生长因子及神经纤维蛋白含量的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(11): 82-83.
- [16] 韩永明, 袁芳, 段妍君, 等. 翻白草对糖尿病大鼠血管内皮细胞形态结构的影响[J]. 中国药理学, 2005, 23(9): 614-616.
- [17] 徐任生, 陈仲良. 中草药有效成分提取与分离[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 1989.
- [18] 张桥. 卫生毒理学基础[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [19] PALANIVEL P, SWEENEY G. Regulation of fatty acid uptake and metabolism in L6 skeletal muscle cells by resistin[J]. FEBS Letters, 2005, 579: 5049-5054.
- [20] SLEEMAN M W, ZHOU H, ROGER S. Retinocic acid stimulates glucose transporter expression in L6 muscle cells[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1995, 108: 161-167.
- [21] SHILLABEER G, CHAMOUN C, HATCH G, et al. Exogenous triacylglycerol inhibits insulin-stimulated glucose transport in L6 muscle cells *in vitro*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 1995: 768-774.
- [22] YAMAMOTO N, SATO T, TAWASAKI K, et al. A nonradioisotope, enzymatic assay for 2-deoxyglucose uptake in L6 skeletal muscle cells cultured in a 96-well microplate[J]. Analytical Biochemistry, 2006, 351: 139-145.
- [23] NAKAGAWA H, MUTOH T, KUMANO T, et al. HMG-CoA reductase inhibitor-induced L6 myoblast cell death: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway[J]. FEBS Letters, 1998, 438: 289-292.
- [24] 陈卫辉, 钱化, 王慧中. 麦冬多糖对正常和实验性糖尿病小鼠血糖的影响[J]. 中国现代应用学, 2002, 12(2): 81-82.