

两种滇西北黄芪属植物醇提物改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的作用研究

刘汉福¹, 胡晶², 谢琴琴², 姜北¹, 肖朝江¹, 王金达², 沈磊^{1,2*}

[1. 云南省滇西抗病原植物资源筛选研究重点实验室(培育), 云南大理 671000; 2. 大理大学药学院, 云南大理 671000]

摘要: 目的 研究两种滇西北黄芪属植物(梭果黄芪和云南黄芪)醇提物对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响。方法 制备高糖高胰岛素诱导 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型, 评价正品黄芪、梭果黄芪和云南黄芪醇提物对胰岛素抵抗的作用。HPLC 分析 3 种黄芪醇提物的成分差异。**结果** 正品黄芪、梭果黄芪和云南黄芪均能增加胰岛素抵抗细胞的葡萄糖消耗量, 均有一定的促进细胞中葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1) 和葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) mRNA 表达的作用; 正品黄芪和梭果黄芪还能升高细胞中己糖激酶活性。3 种黄芪含有的化学成分存在一定差异。**结论** 3 种黄芪均能改善胰岛素抵抗, 比较云南黄芪, 正品黄芪和梭果黄芪增加己糖激酶活性和改善葡萄糖转运的能力更强。

关键词: 黄芪属植物; 云南黄芪; 正品黄芪; 梭果黄芪; 滇西北; 胰岛素抵抗; HepG2 细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)02-0587-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.02.044

近年来, 黄芪已被证明具有一定治疗糖尿病的作用, 如黄芪降糖颗粒能降低 2 型糖尿病小鼠的空腹血糖^[1]; 黄芪消渴方联合胰岛素治疗气阴两虚型 2 型糖尿病时, 疗效和安全性均优于单用胰岛素^[2]; 黄芪桂枝五物汤能改善气虚血瘀型糖尿病患者的周围神经病变^[3]; 黄芪乌梅配方可降低自发性糖尿病大鼠的血糖和游离脂肪酸^[4]。除此之外, 黄芪多糖、黄芪甲苷和黄芪黄酮也有控制血糖和治疗糖尿病并发症的疗效^[5-7]。

药用正品黄芪为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongolicus* 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* 的根, 生长于高纬度地区。云南没有正品黄芪分布, 却是黄芪属植物在我国的分布中心之一, 且绝大部分生长于滇西北的高海拔地区, 其独特的药用价值亟待开发。本课题组前期对不同种黄芪属植物的化学成分进行了研究^[8-10], 发现同为黄芪亚属, 梭果黄芪 *Astragalus ernstii* Comber 主要成分与正品黄芪类似, 多为环阿屯烷型三萜皂苷类和黄酮苷类化合物, 而云南黄芪 *Astragalus yunnanensis* Franch 中大多数为甾体类成分。因此, 本研究聚焦胰岛素抵抗这一 2 型糖尿病的关键特征来探讨梭果黄芪和云南黄芪是否具有与正品黄芪类似的治疗糖尿病的潜力, 为了解滇西北黄芪属植物的药用价值提供依据。

1 材料

1.1 细胞 人肝癌 HepG2 细胞来源于 ATCC 细胞库, 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 于常规高糖 DMEM 培养基中培养、传代, 取第 3~10 代细胞用于实验。

1.2 试剂与药物 正品黄芪的原产地为甘肃, 购自云南省

大理市下关万花路健之佳药店, 批号 20180102; 梭果黄芪和云南黄芪全株采于云南省香格里拉, 经大理大学张德全教授鉴定为梭果黄芪 *Astragalus ernstii* Comber 和云南黄芪 *Astragalus yunnanensis* Franch。乙腈(批号 211921)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 纯净水(批号 20211103)购自杭州娃哈哈集团有限公司; 盐酸吡格列酮(批号 P7701)、牛血清白蛋白(BSA, 批号 1016J051)、牛胰岛素(批号 121R021)、胰蛋白酶(批号 20190819)、己糖激酶测定试剂盒(批号 20201211)、蛋白浓度测定试剂盒(BCA 法, 批号 20210513), CCK-8 试剂盒(批号 508E013)均购自北京索莱宝科技有限公司; DMEM 高糖培养基(批号 2072064)、胎牛血清(批号 2168090RP)均购自美国 Gibco 公司; DMEM 无糖无酚红培养基(批号 PM150278)购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 葡萄糖(批号 SLBZ6903)购自美国 Sigma 公司; 葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 法, 批号 0713A19)购自北京雷根生物技术有限公司; RNA 提取试剂盒(批号 7E413L0)、反转录试剂盒(批号 7E591D1)、Real-time PCR 试剂盒(批号 7E561F1)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1)、葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4)、 β -肌动蛋白(β -actin)引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成。

1.3 仪器 生物安全柜(BSC-1000 II A2 型), 苏州安泰空气技术有限公司; CO₂ 培养箱(NU-5510/E 型), 美国 Nuair 公司; 高速冷冻离心机(HC-3018R 型), 安徽中科中佳科学仪器有限公司; 相差显微镜(CKX41 型), 日本

收稿日期: 2022-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170313); 大理大学滇西特色药用植物与白族药开发利用创新团队项目(ZKLX2019106)

作者简介: 刘汉福(1997—), 女, 硕士生, 研究方向为药理学。Tel: (0872) 2257412, E-mail: 1119836438@qq.com

* 通信作者: 沈磊(1981—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药药理学。Tel: (0872) 2257412, E-mail: scort20009@163.com

Olympus 公司；多功能酶标仪 (Varisokan LUX 型), 美国 Thermo 公司；PCR 仪 (785BR15145 型), 美国 Bio-Rad 公司；核酸蛋白测定仪 (N60 型), 德国 Implen 公司；高效液相色谱仪 (1260 型), 美国安捷伦公司；电子天平 (EL204 型), 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司。

2 方法

2.1 黄芪提取物制备 将3种黄芪的干燥根(正品黄芩 37.7 g、梭果黄芩 16.2 g、云南黄芩 16.6 g)分别粉碎成粗粉,经乙醇热回流提取3次(75%乙醇 1 h、95%乙醇 2 h、95%乙醇 2 h),减压浓缩后得浸膏,再经冷冻干燥后制成冻干粉,得率分别为正品黄芪 41.5%、梭果黄芪 13.2%、云南黄芪 13.9%。细胞实验时,用 DMSO 将提取物配制成生药量 200 mg/mL 的母液,涡旋混匀,超声溶解,0.22 μm 微孔滤膜过滤后备用,再用培养基稀释母液至相应质量浓度用于实验。

2.2 黄芪提取物对 HepG2 细胞相对活力和葡萄糖消耗量的影响 取对数生长期的 HepG2 细胞,以 1×10^5 /mL 的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,待细胞贴壁长至融合度 80% 后,弃培养基, PBS 洗 1 次,加入含生药 10、1、0.1、0.01、0.001 g/L 的 3 种黄芪的无酚红高糖 DMEM 培养基(含 10% FBS, 25 mmol/L 葡萄糖)处理细胞 24 h,另设不加药物的正常组(高糖 DMEM 孵育细胞)和空白组(仅有培养基,无细胞)。取 3 μL 上清液用葡萄糖氧化酶法(GOD-POD 法)检测葡萄糖含量,再将培养基换为含 CCK-8 试剂的培养基于 37 °C 孵育 1 h 后测定 450 nm 波长处的吸光度(A)值。细胞相对活力 = $A_{\text{给药孔}} / A_{\text{正常对照孔}} \times 100\%$; 葡萄糖消耗量 = 空白对照孔葡萄糖含量 - 测试孔葡萄糖含量; 标准化葡萄糖消耗量 = 葡萄糖消耗量 / 细胞相对活力。

2.3 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的建立 按“2.2”项下方法将细胞接种于 96 孔板,贴壁培养至融合度 80% 后,吸弃培养基, PBS 洗 1 次,加入含 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-8}$ mol/L 胰岛素的无酚红高糖 DMEM,另设正常组(加入不含胰岛素的无酚红高糖 DMEM)和空白组(仅有培养基,无细胞),培养 24、36、48 h 后,按“2.2”项下方法检测细胞相对活力和标准化葡萄糖消耗量。

2.4 黄芪提取物对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响

2.4.1 细胞相对活力和标准化葡萄糖含量测定 经胰岛素抵抗模型条件的摸索,确定采用含 1×10^{-6} mol/L 胰岛素的高糖 DMEM 孵育细胞 36 h 建立胰岛素抵抗细胞模型。细胞接种于 96 孔板并生长至对数生长期后,分成 12 组,分别为正常组、模型组、阳性药吡格列酮组及正品黄芪、梭果黄芪、云南黄芪各 3 个剂量组(1、0.1、0.01 g/L),除正常组(加入不含胰岛素的高糖 DMEM)外,各组均加入含 1×10^{-6} mol/L 胰岛素的无酚红高糖 DMEM 孵育 36 h,弃培养基后 PBS 洗 1 次,加入含不同剂量黄芪的无血清无酚红高糖 DMEM(含 0.2% BSA),正常组和模型组加入不含药的培养基,吡格列酮组加入含 0.003 92 g/L (1×10^{-6} mol/L)吡格列酮的培养基,作用 24 h 后测定细胞相对活力和标准

化葡萄糖消耗量。

2.4.2 己糖激酶活性检测 将细胞以 5×10^5 /mL 的密度接种于 12 孔板中,每孔 2 mL,按“2.4.1”项下方法分组(其中 3 种黄芪仅设 1、0.1 g/L 2 个剂量)、造模和药物处理,24 h 后每孔收集 5×10^5 个细胞,加入提取液裂解细胞,4 °C、8 000×g 离心 10 min,取 30 μL 上清液与己糖激酶试剂盒中的反应试剂进行反应,于 20、320 s 时检测 340 nm 波长处的 A 值,计算己糖激酶活性,同时采用 BCA 法测定蛋白浓度。

2.4.3 GLUT1、GLUT4 mRNA 表达检测 按“2.4.2”项下方法接种细胞、分组、造模和药物处理,提取各孔细胞的总 RNA,并测定 RNA 浓度,按照试剂盒说明书方法将 RNA 逆转录为 cDNA。加入特异性引物后用实时荧光定量 PCR 法扩增目的片段并检测基因表达,每孔重复 3 次,计算平均值作为每个样品的 C_T 值,每组设 3 个复孔。以 β -actin 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析 GLUT1、GLUT4 mRNA 相对表达。GLUT1 正向序列 CTGTCGTGTCGCTGTTTGTG,反向序列 GGCCACAAAGCCAAAGATGG; GLUT4 正向序列 CTTCTTTGAGATTGGCCCTGG,反向序列 AGGTGAAGATGAAG AAGCCAAGC; β -actin 正向序列 GAGACCTTCAACACCCC AGCC,反向序列 AATGTACGCACGATTTCCC。

2.5 HPLC 分析 取 3 种黄芪的冻干粉,加色谱纯甲醇溶解至 13.3 mg/mL,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后备用。色谱条件为 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~5 min, 5%~10% A; 5~20 min, 10%~30% A; 20~30 min, 30%~40% A; 30~43 min, 40% A; 43~60 min, 40%~100% A; 60~65 min, 100% A); 体积流量 1 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 210 nm; 进样量 30 μL。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均值比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同黄芪属植物醇提取物对 HepG2 细胞相对活力和葡萄糖消耗量的影响 与正常组比较,10 g/L 正品黄芪、梭果黄芪均能抑制细胞生长($P < 0.05$, $P < 0.01$),10 g/L 云南黄芪也能抑制细胞生长,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与正常组比较,10 g/L 正品黄芪、梭果黄芪能降低标准化葡萄糖消耗量($P < 0.05$),这可能是由于抑制了细胞生长所致,其余剂量黄芪醇提取物对细胞的葡萄糖消耗均无明显作用($P > 0.05$),见表 1。因此,采用 1、0.1、0.01 g/L 的剂量进行后续实验。

3.2 胰岛素抵抗模型的建立 与对照组(0 mol/L)比较,随着胰岛素孵育时间增加,较低浓度的胰岛素能促进细胞增殖,其中 1×10^{-8} mol/L 胰岛素孵育 36 h 或 48 h, 1×10^{-6} mol/L 胰岛素孵育 48 h 均能增加细胞相对活力($P < 0.01$)。4 个浓度胰岛素孵育不同时间均能一定程度地减少标准化葡萄糖消耗量($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中以 1×10^{-6} mol/L

表 1 不同黄芪属植物醇提取物对 HepG2 细胞相对活力和葡萄糖消耗量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·L ⁻¹)	细胞相对活力/%	葡萄糖消耗量/(mmol·L ⁻¹)	标准化葡萄糖消耗量/(mmol·L ⁻¹)
正常组	-	100.00±7.01	2.83±0.35	2.83±0.31
正品黄芪组	10	86.33±6.19*	1.81±0.32**	2.10±0.31*
	1	108.14±6.74	3.33±0.71	3.11±0.81
	0.1	93.54±9.41	3.01±0.36	3.22±0.32
	0.01	105.77±8.89	3.01±0.65	2.88±0.76
	0.001	106.14±6.71	3.11±0.34	2.93±0.31
梭果黄芪组	10	35.06±4.34**	0.38±0.37**	1.01±0.90*
	1	111.02±5.78	3.66±0.93	3.33±0.99
	0.1	102.26±15.46	3.37±0.79	3.28±0.47
	0.01	102.17±11.96	2.87±0.31	2.85±0.54
	0.001	100.39±12.75	3.13±0.81	3.10±0.53
云南黄芪组	10	87.70±10.54	2.06±0.57	2.33±0.47
	1	101.94±8.17	3.63±0.71	3.60±0.86
	0.1	94.00±8.74	3.09±0.43	3.28±0.28
	0.01	105.29±18.26	3.33±0.44	3.27±0.84
	0.001	105.93±10.38	3.35±0.82	3.14±0.60

注：与正常组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

胰岛素建立的胰岛素抵抗模型最稳定，且孵育 36 h 后与对照组比较，葡萄糖消耗量差值最大 ($P<0.01$)，见表 2。因

此，选择 1×10^{-6} mol/L 胰岛素孵育 36 h 来诱导 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型。

表 2 不同浓度胰岛素作用不同时间对 HepG2 细胞相对活力和葡萄糖消耗量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

胰岛素浓度/ (mol·L ⁻¹)	24 h		36 h		48 h	
	细胞相对活力/%	标准化葡萄糖消耗量/(mmol·L ⁻¹)	细胞相对活力/%	标准化葡萄糖消耗量/(mmol·L ⁻¹)	细胞相对活力/%	标准化葡萄糖消耗量/(mmol·L ⁻¹)
0	100.00±8.60	2.32±0.53	100.00±11.54	4.23±1.09	100.00±15.58	6.05±1.29
1×10^{-5}	111.98±12.25	1.81±0.63	107.98±14.85	2.68±0.72**	101.93±11.38	6.83±0.64
1×10^{-6}	108.26±18.65	1.45±0.43*	110.76±7.39	2.61±0.72**	139.58±10.67**	4.81±0.51*
1×10^{-7}	102.54±7.01	1.72±0.67	100.04±8.46	2.77±0.52**	112.58±6.66	5.21±1.03
1×10^{-8}	98.18±10.90	2.29±1.11	112.78±9.06*	3.61±0.77	132.83±18.07*	4.07±0.70**

注：与同时时间点对照组 (0 mol/L) 比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

3.3 不同黄芪属植物醇提取物对胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 如表 3 所示，与正常组比较，模型组细胞相对活力升高 ($P<0.01$)，而标准化葡萄糖消耗量降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，阳性药吡格列酮组及 1、0.1 g/L 正品黄芪组、1 g/L 梭果黄芪组、0.1 g/L 云南黄芪组均能增加标准化葡萄糖

消耗量 ($P<0.05, P<0.01$)，说明以上药物可以改善 HepG2 细胞的胰岛素抵抗。当剂量为 1 g/L 时，增加标准化葡萄糖消耗量的能力为正品黄芪>梭果黄芪>云南黄芪；而当剂量为 0.1 g/L 时，云南黄芪>正品黄芪>梭果黄芪。此外，梭果黄芪能在模型的基础上进一步促进细胞增殖。

表 3 不同黄芪属植物醇提取物对胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·L ⁻¹)	细胞相对活力/%	葡萄糖消耗量/(mmol·L ⁻¹)	标准化葡萄糖消耗量/(mmol·L ⁻¹)
正常组	-	100.00±8.75	3.09±0.65	3.10±0.68
模型组	-	120.67±8.77##	1.15±0.66##	0.98±0.58##
吡格列酮组	0.003 92	125.08±11.57	2.27±0.84**	1.85±0.83**
正品黄芪组	1	107.43±11.88	2.24±0.77**	2.06±0.54**
	0.1	128.21±21.02	1.97±0.72*	1.62±0.74*
	0.01	114.52±26.97	0.94±0.78	0.79±0.55
梭果黄芪组	1	129.42±21.67	2.30±0.60**	1.80±0.49**
	0.1	150.21±24.44	1.98±1.12*	1.41±0.94
	0.01	159.01±20.66*	2.16±0.80**	1.42±0.70
云南黄芪组	1	129.52±11.63	1.39±0.80	1.08±0.61
	0.1	130.15±13.89	2.41±0.88**	1.85±0.72**
	0.01	115.91±8.72	0.97±0.59	0.83±0.53

注：与正常组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

3.4 不同黄芪属植物醇提取物对胰岛素抵抗 HepG2 细胞内己糖激酶活性的影响 与正常组比较，胰岛素抵抗模型组细

胞内己糖激酶活性下降 ($P<0.05$)；与模型组比较，吡格列酮组、1 g/L 正品黄芪组和 1 g/L 梭果黄芪组均能增加己

糖激酶活性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其他剂量的3种黄芪也有升高己糖激酶活性的作用, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。当剂量为1 g/L时, 增加己糖激酶活性的能力为正品黄芪>梭果黄芪>云南黄芪, 见表4。

表4 不同黄芪属植物醇提物对胰岛素抵抗 HepG2 细胞内己糖激酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(g·L ⁻¹)	己糖激酶活性/(U·mg prot ⁻¹)
正常组	-	13.51±5.10
模型组	-	5.04±2.44 [#]
吡格列酮组	0.003 92	11.40±3.57 [*]
正品黄芪组	1	11.44±2.81 ^{**}
	0.1	6.96±1.17
梭果黄芪组	1	9.77±1.78 [*]
	0.1	8.31±4.10
云南黄芪组	1	9.60±2.57
	0.1	8.41±1.83

注: 与正常组比较,[#] $P < 0.05$; 与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

表5 不同黄芪属植物醇提物对胰岛素抵抗 HepG2 细胞 GLUT1、GLUT4 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(g·L ⁻¹)	GLUT1	GLUT4
正常组	-	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	-	0.18±0.12 ^{##}	0.02±0.01 ^{##}
吡格列酮组	0.003 92	0.85±0.37 ^{**}	0.22±0.11 ^{**}
正品黄芪组	1	1.05±0.39 ^{**}	0.23±0.12 ^{**}
	0.1	0.73±0.43 [*]	0.18±0.08 ^{**}
梭果黄芪组	1	1.52±0.70 ^{**}	0.29±0.14 ^{**}
	0.1	0.99±0.48 ^{**}	0.24±0.12 ^{**}
云南黄芪组	1	1.04±0.46 ^{**}	0.23±0.07 ^{**}
	0.1	0.50±0.14	0.21±0.08 ^{**}

注: 与正常组比较,^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

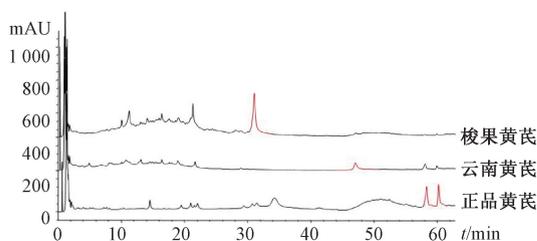


图1 不同黄芪属植物醇提物 HPLC 色谱图

糖的消耗量降低, 是2型糖尿病的特征。过量胰岛素诱导糖原合成的能力下降是导致胰岛素抵抗的重要原因。葡萄糖转运体、激酶磷酸化和糖原的储存是调节胰岛素介导糖原合成代谢的3个主要控速步骤, 可作为调控胰岛素抵抗的主要靶标^[12]。本研究表明, 实验所用剂量范围内的3种黄芪不影响正常的葡萄糖消耗量, 却能增加高糖高胰岛素诱导的葡萄糖消耗量, 说明这些黄芪对胰岛素抵抗均有一定的改善作用。同时, 正品黄芪和梭果黄芪恢复己糖激酶活性和改善葡萄糖转运体活性的能力较云南黄芪强。

在胰岛素抵抗中, 胰岛素促进糖原合成和葡萄糖转运的能力均下降。葡萄糖转运蛋白 (GLUT) 介导了葡萄糖的跨膜转运^[13], GLUT1 负责基础条件下大部分组织中的葡萄

3.5 不同黄芪属植物醇提物对胰岛素抵抗 HepG2 细胞 GLUT1、GLUT4 mRNA 表达的影响 如表5所示, 胰岛素抵抗后, 模型组 GLUT1、GLUT4 mRNA 表达均较正常组下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 吡格列酮组、正品黄芪组、梭果黄芪组和云南黄芪组均可增加 GLUT1、GLUT4 mRNA 表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。其中, 梭果黄芪的作用最强; 正品黄芪对 GLUT1 mRNA 表达的作用稍强于云南黄芪, 而对 GLUT4 mRNA 表达的作用与云南黄芪相当。

3.6 HPLC 化学成分分析 如图1所示, 3种黄芪的出峰情况有异同。在10~24 min的大极性区间, 3种黄芪呈现的色谱峰类似而峰高(含量)有差异; 在30~50 min区间, 3种黄芪样品的色谱峰有差异性, 表现为正品黄芪和梭果黄芪在30~35 min有吸收峰, 而云南黄芪在47 min有吸收峰; 当保留时间为58、60 min时, 3种黄芪均有吸收峰, 但是含量不同。

4 讨论

胰岛素抵抗是指外周组织对胰岛素利用不足^[11], 对血

糖摄取^[14]; GLUT4在胰岛素敏感组织中高表达^[15], 胰岛素刺激后, GLUT4转运葡萄糖的活性增强^[16]。本研究发现, 胰岛素抵抗发生后, 2种GLUT的活性均下降; 正品黄芪和梭果黄芪均能提高2种GLUT的活性, 而云南黄芪主要增加GLUT4的活性, 说明正品黄芪和梭果黄芪能明显改善胰岛素抵抗发生后大部分组织的基础血糖转运和胰岛素敏感组织的血糖吸收, 而云南黄芪主要针对胰岛素敏感组织的葡萄糖转运。葡萄糖转运入细胞后在己糖激酶的作用下生成6-磷酸-葡萄糖(G6P), 促进细胞内糖原合成或葡萄糖分解, 而胰岛素通过增强己糖激酶活性来降低血糖^[17]。本研究发现, 产生胰岛素抵抗的HepG2细胞内己糖激酶活性降低, 使得胰岛素作用减弱; 正品黄芪和梭果黄芪能提高己糖激酶活性来改善胰岛素抵抗, 但云南黄芪无此作用。

3种黄芪对胰岛素抵抗作用靶点的区别可能与其所含化学成分种类和含量的差别有关。根据报道可知, 正品黄芪中主要含有环阿屯烷型三萜皂苷类成分(如黄芪皂苷I、II、III)、黄酮苷类成分(如黄酮、异黄酮)等^[18-20]。课题组前期研究表明, 梭果黄芪含有与正品黄芪类似的黄酮苷类成分(如毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷)和环阿屯烷型三萜皂苷类成分(如梭果黄芪苷A、B、C)等^[8,10,21],

而云南黄芪中的成分大多为甾体类(如蒲公英甾醇、 β -谷甾醇等甾体等)^[9]。本研究通过 HPLC 分析发现, 3 种黄芪的化学成分既有类似也有区别, 尤其是在保留时间 30~50 min 区间, 正品黄芪和梭果黄芪出峰多, 而云南黄芪出峰少。由于黄酮类成分含吸收强的共轭键, 云南黄芪含的黄酮类成分可能少于另外 2 种黄芪。

综上所述, 云南黄芪改善胰岛素抵抗的作用要弱于正品黄芪和梭果黄芪, 其中梭果黄芪表现出更好的治疗糖尿病潜力。

参考文献:

[1] 马燕, 张晶, 王亚, 等. 黄芪降糖颗粒降糖作用实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 157-160.

[2] 冯国华. 黄芪消渴方治疗 2 型糖尿病(气阴两虚) 30 例[J]. 光明中医, 2020, 35(12): 1841-1843.

[3] 杨会蓉, 黄泽晖, 王文春. 黄芪桂枝五物汤加味治疗气虚血瘀型糖尿病周围神经病变的临床效果[J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(2): 14-17.

[4] 刘凯, 李淑玲, 李应东. 黄芪乌梅配方颗粒对 GK 大鼠血糖及胰岛素敏感性的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(1): 5-10.

[5] 朱世杰, 陈瑞, 梁建东, 等. 黄芪多糖的实验研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2018, 40(4): 63-66.

[6] 李杨, 王凡, 贾宁. 黄芪甲苷治疗糖尿病及其并发症药理作用研究[J]. 黑龙江医学, 2019, 43(1): 96-97.

[7] 夏恒. 黄芪生脉散降糖提取物及其组方配伍研究[D]. 广州: 广东药学院, 2014.

[8] Xiao C J, Zhang Y, Qiu L, et al. A new schistosomicidal and antioxidative phenylpropanoid from *Astragalus englerianus* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, 17(7): 772-777.

[9] Zhao M Z, Shen Y, Xu W, et al. A new lignan glycoside from *Astragalus yunnanensis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2020, 22(6): 594-600.

[10] Li J Q, Xiao C J, Li Y M, et al. Astremestin, a novel aurone-

phenylpropanoid adduct from the roots of *Astragalus ernestii* [J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(20): 2894-2899.

[11] Kahn S E, Cooper M E, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future [J]. *Lancet*, 2014, 383(9922): 1068-1083.

[12] Yaribeygi H, Farrokhi F R, Butler A E, et al. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8152-8161.

[13] Wasik A A, Lehtonen S. Glucose transporters in diabetic kidney disease-friends or foes? [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 155.

[14] Coward R J, Welsh G I, Yang J, et al. The human glomerular podocyte is a novel target for insulin action [J]. *Diabetes*, 2005, 54(11): 3095-3102.

[15] Mattei L, Francisqueti-Ferron F V, Garcia J L, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of gamma-oryzanol attenuates insulin resistance by increasing GLUT-4 expression in skeletal muscle of obese animals [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 537: 111423.

[16] Jaldin-Fincati J R, Pavarotti M, Frendo-Cumbo S, et al. Update on GLUT4 vesicle traffic: A cornerstone of insulin action [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(8): 597-611.

[17] 田春雨, 薄海美, 喇孝瑾, 等. 双益方、组方中药及有效成分对骨骼肌及 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 118-123.

[18] 周家林, 慕泽涇, 钟国跃, 等. 黄芪属植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 中成药, 2021, 43(7): 1845-1851.

[19] 马艳春, 胡建辉, 吴文轩, 等. 黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2022, 50(4): 92-95.

[20] Su H F, Shaker S, Kuang Y, et al. Phytochemistry and cardiovascular protective effects of Huang-Qi (*Astragali Radix*) [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(4): 1999-2038.

[21] 田新雁, 韩冰洋, 肖朝江, 等. 梭果黄芪的化学成分和生物活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(2): 188-192; 259.