

蓝莓花色苷提取物干预人肝癌细胞对葡萄糖消耗的作用研究

张森¹, 吴莹², 张久亮¹

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070) (2. 湖北中医药大学药学院, 湖北武汉 430065)

摘要: 探究蓝莓花色苷提取物对胰岛素抵抗的人肝癌细胞 HepG2 细胞对葡萄糖消耗的干预作用。利用 MTT 实验筛选得到 3 个品种蓝莓花色苷提取物的最适作用浓度; 筛选胰岛素和葡萄糖诱导 HepG2 细胞产生胰岛素抵抗的最佳浓度; 以 MTT 矫正细胞数量, 用葡萄糖氧化酶法检测细胞培养基中葡萄糖的变化来研究蓝莓花色苷提取物的对细胞胰岛素抵抗的干预作用。北陆花色苷提取物在低于 200 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度时, 灿烂和园蓝花色苷提取物在低于 100 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度时, 对 HepG2 细胞活力无明显影响; 以诱导剂胰岛素的浓度为 1×10^{-8} mol/L, 孵育 24 h 作为诱导条件, 其模型效果更佳、对细胞活力改变小且稳定性好; 3 个品种的蓝莓花色苷提取物在 7.8125~31.25 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时, 可不同程度促进正常 HepG2 细胞和胰岛素抵抗的 HepG2 细胞对葡萄糖的消耗量, 且与剂量成正比关系, 在 31.25 $\mu\text{g/mL}$ 达到促进最大值, 与模型组比较均有极显著差异, 糖消耗量分别增加了 60%、65% 和 88%。三个品种的蓝莓花色苷提取物均能较好的预防和改善胰岛素抵抗 HepG2 细胞对葡萄糖的利用。

关键词: 蓝莓; 花色苷; 肝细胞; 糖消耗; 胰岛素抵抗

文章编号: 1673-9078(2019)04-36-43

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.4.006

Blueberry Anthocyanin Extracts Regulate Glucose Consumption in HepG2 Cells

ZHANG Sen¹, WU Ying², ZHANG Jiu-liang¹

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Hubei Wuhan 430070, China)

(2. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

Abstract: The regulation of glucose consumption in insulin-resistant hepatoma cell line HepG2 with blueberry anthocyanin extracts was investigated. The optimum concentration of blueberry anthocyanin extracts was screened by MTT assay. Different concentrations of insulin and glucose were performed to induce insulin resistance in HepG2 cells. The number of cells was corrected by MTT, and contents of glucose in medium were detected by glucose oxidase method. Changes in glucose in the medium reflected the intervention of the blueberry anthocyanin extract on cellular insulin resistance. MTT results showed that and there was no significant effect on the activity of HepG2 cells at concentrations below 200 $\mu\text{g/mL}$ of the extracts of NL BAEs and that below 100 $\mu\text{g/mL}$ of the extracts of BW BAEs and GB BAEs. With the inducing agent insulin concentration of 1×10^{-8} mol/L and incubation for 24 h as the induction condition, the model was effective, while the cell viability had no significant change and the stability was good. It could promote glucose consumption in normal HepG2 cells and insulin-resistant HepG2 cells at the concentration of 7.8125~31.25 $\mu\text{g/mL}$ of three varieties of blueberry anthocyanin extracts and showed a dose-effect relationship. It had a maximum at 31.25 $\mu\text{g/mL}$. Compared to the model group, sugar consumptions of extracts of NL BAEs, BW BAEs and GB BAEs had increased by 60%, 65% and 88%, respectively. Three varieties of blueberry anthocyanin extract could prevent and improve the utilization of glucose by insulin-resistant HepG2 cells.

Key words: blueberry; anthocyanin; hepatocytes; glucose consumption; insulin resistance

蓝莓 (Blueberry) 为被子植物门 (Angiospermae)

收稿日期: 2018-12-14

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (2662018PY022)

作者简介: 张森 (1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物化学

通讯作者: 张久亮 (1982-), 男, 医学博士, 副教授, 研究方向: 膳食营养与健康

杜鹃花科 (*Ericaceae*) 越橘属 (*Vaccinium* spp.) 类植物的果实, 蓝莓果扁球形状、粒小色深, 果肉细腻多汁。根据其培育品种常将蓝莓分为高丛蓝莓 (*V. corymbosum*)、矮丛蓝莓 (*V. chamaebuxus*) 和兔眼蓝莓 (*V. ashei* Reade)^[1]。本实验选用 3 种代表性品种: 北陆 (Northland, NL) 属于半高丛蓝莓 (*V. corymbosum*)

L.*×V. angustifolium* Aiton.); 灿烂 (Britewell, BW) 和园蓝 (Gardenblue, GB) 属于兔眼蓝莓 (*V. ashei* Reade)。蓝莓含有丰富的黄酮、纤维素、维生素和矿物质^[2], 其中花色苷和酚酸等活性化合物在蓝莓提取物中也不断被发现^[3-5]。

高血糖是机体发生胰岛素抵抗 (Insulin resistance, IR) 时最显著的特征^[6], 胰岛素抵抗常由于长期高浓度的血糖导致胰岛 β 细胞分泌过多的胰岛素来促进细胞摄取血浆中的葡萄糖, 从而降低血糖浓度, 长此以往, 致使胰岛素依赖的胰岛 β 细胞对其敏感性降低, 因此造成机体的胰岛素抵抗^[7]。当机体发生胰岛素抵抗后, 血糖浓度无法控制在正常的范围内, 导致糖尿病及糖尿病综合症。

胰岛素抵抗主要发生组织在肌肉、脂肪和肝脏, 当肝脏组织发生胰岛素抵抗时, 其对葡萄糖的利用降低, 增加肝糖原的糖异生途径, 从而血糖升高^[8]。HepG2 细胞是一种与人的肝细胞表型极为相似的肝胚胎瘤细胞株, 广泛用于体外糖脂代谢研究, 其对葡萄糖消耗模型常用于基于表型的降糖药物筛选, HepG2 细胞在一定时间内对培养基中葡萄糖的消耗量增加或减少即可直观的检测并初步鉴定胰岛素抵抗是否存在, 其实验结果筛选得到的化合物在进一步糖尿病小鼠模型中通常能够得到验证^[9]。本研究从蓝莓花色苷提取物对正常 HepG2 细胞和产生胰岛素抵抗的 HepG2 细胞的糖消耗角度, 研究其对肝脏的胰岛素抵抗的预防和缓解作用, 以期为进一步开发和合理利用蓝莓资源提供有益的信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

蓝莓鲜果, 由湖北牧童蓝莓科技有限公司, 同期采收于湖北恩施种植基地的半高丛 (*V. corymbosum* L.*×V. angustifolium* Aiton.) 灿烂以及湖北木兰种植基地的兔眼蓝莓 (*V. ashei* Reade) 北陆和园蓝, 共 3 个品种。人肝癌细胞株 HepG2 细胞由华中农业大学食品科学与技术学院张久亮实验室提供。胰岛素购自华中农业大学医院, 药品名称为精蛋白生物合成人胰岛素注射液 (预混 50R)。二甲双胍 (Metformin)、二甲基亚砷 (DMSO)、牛血清白蛋白 (BSA) 购自美国 sigma 公司; DMEM 低糖培养基和 RPMI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司; 无酚红 RPMI 1640 培养基和 DMEM 低糖培养基购自吉诺生物有限公司; 胰蛋白酶购自美国 Genivew 公司; 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购自 Biosharp 公司; 葡萄糖测定试剂盒 (氧化酶法)

购自南京建成生物工程研究所; 细胞培养瓶、培养板各种规格均购自美国 Fisher 公司。

1.2 主要实验仪器

Infinite 200pro 多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; 低温离心机, Thermo Forma 公司; 液氮罐, Thermo Forma 公司; 电热恒温水浴箱, 上海精宏实验设备有限公司; 高压灭菌锅, 上海东亚压力容器制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 蓝莓花色苷的提取与纯化

蓝莓花色苷的提取工艺如下: 称取在 -80 °C 保存的新鲜蓝莓鲜果 10 g, 研磨研碎后, 用 150 mL 的 60% 乙醇 (0.1 M HCl 溶液酸化) 混合至 pH 3.0, 45 °C 水浴中提取 2 h, 抽滤去除杂质, 提取过程重复 2 次, 合并提取液, 40 °C 下真空旋蒸浓缩后, 正己烷溶剂脱脂, 重复萃取三次后合并所得提取物, 浓缩后冻干。

蓝莓花色苷的纯化工艺如下: 称取溶剂提取物的冻干粉 100 mg 溶于含有柠檬酸和磷酸氢二钠的 pH 3.0 缓冲液中, 装载到 AB-8 树脂柱 (25 mm $\times$ 100 mm) 中, 柱用 0.1% HCl 酸化的蒸馏水洗涤, 酚类化合物用 60% 乙醇水溶液解吸, 收集洗脱液至无色为止, 将洗脱液经过减压浓缩, 冷冻干燥即得到蓝莓花色苷提取物 (Blueberry Anthocyanin Extracts, BAEs), 三个蓝莓品种花色苷提取物北陆 (Northland)、园蓝 (Gardenblue) 和灿烂 (Britewell) 分别简称为 NL BAEs、GB BAEs 和 BW BAEs。储存在 -20 °C 待用。

1.3.2 细胞培养条件

含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 低糖培养基 (即完全培养基), 放置于 5% CO₂ 培养箱中, 37 °C 恒温培养箱内培养细胞, 隔天更换新鲜培养基, 细胞融合达 80%~90% 时用胰酶消化传代。

1.3.3 MTT 法检测样品对细胞增殖活力的影响

取对数生长期 HepG2 细胞进行实验, 当细胞生长融合达 80% 以上时, 用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化, 以完全培养基反复吹打, 直至吹散成单细胞悬液, 计数, 以 1.6×10^5 cells/mL 接种于 96 孔板中, 留一列空白对照孔, 每孔 100 μ L, 放置 5% CO₂ 培养箱, 37 °C 恒温培养 24 h。

用含不同浓度胰岛素或样品的基础培养基处理 24 h 后, 吸除培养基, 每孔加入含 0.5 mg/mL MTT 的 DMEM 基础培养基, 每孔 200 μ L, 于 5% CO₂、37 °C 恒温培养 4 h。弃去上清后每孔加入 150 μ L 的 DMSO (分析纯, 国药试剂), 置酶标仪中 37 °C 震荡 10 min

后在 490 nm 处测其吸光值。按以下公式计算细胞活力。

$$cell\ viability(\%) = \frac{(A_{test} - A_{blank})}{(A_{control} - A_{blank})} \times 100$$

式中: A_{blank} 为无细胞的背景对照组; $A_{control}$ 为不加样品的实验对照组; A_{test} 为加胰岛素或样品的实验组。

1.3.4 HepG2 细胞葡萄糖消耗的测定

葡萄糖消耗实验参照^[10]等方法。将处于对数生长期的 HepG2 细胞消化离心后,用完全培养基调整细胞浓度后接种于 96 孔板中,24 h 后更换培养基为含 0.2% BSA 的无血清无酚红 DMEM 培养液,分组加药。设空白组、对照组、二甲双胍阳性组和实验组,二甲双胍终浓度为 1 mmol/L,每组设 6 个复孔,重复 3 次。作用 24 h 后,取培养基上清液用葡萄糖试剂盒—氧化酶法测定相应培养基中的葡萄糖含量。同时,细胞以 MTT 法矫正细胞数量:每孔加入 200 μ L 含 0.5 mg/mL MTT 的 DMEM 基础培养基,在 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 4 h。弃去上清后每孔加入 150 μ L 的 DMSO (分析纯,国药试剂),置酶标仪中 37 $^{\circ}$ C 震荡 10 min 后在 490 nm 处测其吸光值,MTT 值以空白组为背景,对照组为 100% 计算。葡萄糖消耗量 (Glucose consumption) 按以下公式计算:

$$Glucose\ consumption(mmol/L) = C_{blank} - \frac{C_{test}}{cell\ viability(\%)}$$

式中: C_{blank} 为无细胞组的培养基葡萄糖浓度; C_{test} 为实验组的培养基葡萄糖浓度。

1.3.5 HepG2 胰岛素抵抗模型的建立

根据前期文献参考^[11],选取胰岛素和高糖进行胰岛素抵抗模型摸索。将处于对数生长期的 HepG2 细胞消化离心,以完全培养基调整细胞浓度至 1.5×10^5 cells/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,培养 24 h。

将细胞随机分为空白组、对照组、不同浓度的胰岛素组和不同浓度的高糖组,弃去培养基,将空白组和对照组的培养基换为含 2% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基,胰岛素组加入不同浓度梯度的胰岛素: 5×10^{-10} 、 1×10^{-10} 、 5×10^{-9} 、 1×10^{-9} 、 5×10^{-8} 、 1×10^{-8} 、 5×10^{-7} 、 1×10^{-7} mol/L,高糖加入不同浓度梯度葡萄糖溶液: 22、33、44、55、66、77、88、99 mmol/L。培养 24 h 后,弃去培养基,用 100 μ L PBS 轻柔洗一次,每孔换液为含 1×10^{-7} mol/L 的无血清无酚红 DMEM 培养基 4 h 后,用葡萄糖试剂盒—氧化酶法测定相应培养基中的葡萄糖含量。同时,细胞以 MTT 法矫正细胞数量。

1.3.6 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型的糖消耗测定

根据上述胰岛素抵抗模型筛选最佳诱导条件,选取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 96 孔板,实验分为空白组、对照组、胰岛素模型组、二甲双胍阳性组和花色苷样品组。培养 24 h 后,更换为含 2% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基,花色苷样品组加药、二甲双胍终浓度为 1 mmol/L。于培养箱中孵育 24 h。除空白组和对照组,其余各组按 HepG2 胰岛素抵抗模型筛选的最优条件建立胰岛素抵抗模型,每组设 6 个复孔,重复 3 次试验。24 h 后同上述方法测培养基中葡萄糖浓度和各孔细胞 MTT 值。

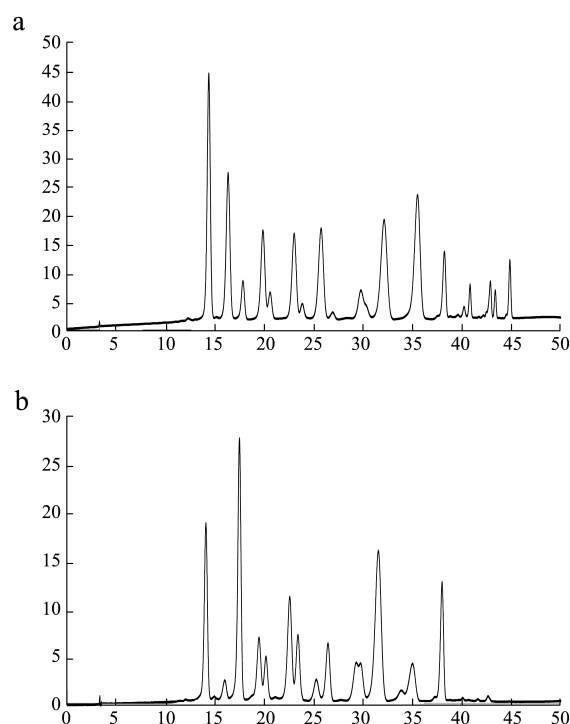
1.3.7 统计分析

实验数据以平均值 $\pm$ 标准差表示,使用 GraphPad Prism 6.0 中的 one-way ANOVA 进行数据分析,在方差齐性检验后采用 Dunnett's 多重检验分析各组间差异, $p < 0.05$ 时认为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 蓝莓花色苷提取物的成分分析

利用高效液相 HPLC 结合实验室成熟花色苷液相条件^[3]对 3 个品种的蓝莓花色苷提取物进行初步成分分析,520 nm 为花色苷特殊最大吸收波长。如图 1 可见,3 个蓝莓花色苷提取物的花色苷种类丰富,各花色苷含量差异较大,其中北陆品种的蓝莓花色苷种类最多,灿烂花色苷提取物在 40 min 之后几乎再无明显峰,为后期活实验奠定化学基础。



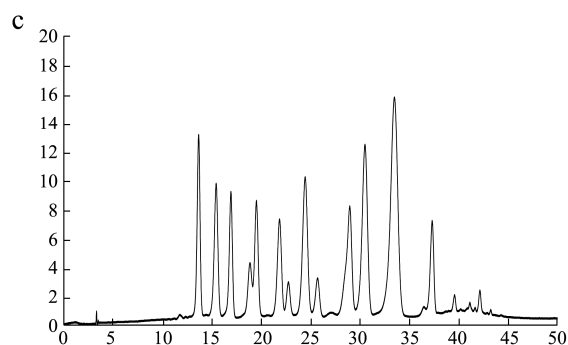


图1 蓝莓花色苷提取物 520 nm 液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of blueberry anthocyanin extracts monitored at 520 nm

注: a: Northland; b: Britewell; c: Gardenblue.

表1 蓝莓花色苷提取物的总花色苷含量分析

Table 1 Contents of total anthocyanin in blueberry anthocyanin extracts by HPLC

Spices	Total anthocyanin content/(mg/g)
Northland	328.93 ± 2.47
Britewell	308.88 ± 2.20
Gardenblue	234.61 ± 0.96

以矢车菊素葡萄糖苷为标准品绘制标准曲线, 计算3个品种的蓝莓花色苷提取物在520 nm时花色苷含量。结果如表1所示, 北陆提取物的花色苷含量最高, 为328.93±2.47 mg/g, 结合图1, 北陆花色苷种类在三者中较多; 园蓝提取物的花色苷含量相对含量不如北陆和灿烂花色苷提取物, 为234.61±0.96 mg/g。此外, 三个品种的提取物其花色苷单体组成较为相似, 北陆品种除了含有其它两个品种的花色苷单体, 还拥有3种酰基化花色苷; 虽然三个品种的提取物其花色苷组成类似, 但是单体花色苷含量有较大的差异; 北陆、园蓝和灿烂提取物的花色苷含量比例最高的物质分别为飞燕草素-3-O-半乳糖苷、锦葵色素-3-O-半乳糖苷和锦葵色素-3-O-葡萄糖苷。

2.2 蓝莓花色苷样品对 HepG2 细胞活力的影响

蓝莓花色苷样品蓝莓花色苷提取物对 HepG2 细胞的细胞活力如图2所示, 北陆花色苷提取物(NL BAEs)在0.1~200 μg/mL时对细胞活力无明显影响, 随着北陆花色苷提取物浓度的升高(400~1000 μg/mL), 其抑制细胞生长能力增强, 量效关系明显, 细胞存活率从85%降至50%左右; 灿烂花色苷提取物

(BW BAEs)达到200 μg/mL时对 HepG2 细胞生长开始有明显影响, 到800 μg/mL时细胞存活率已低于30%, 提示该样品在进行后续实验浓度不宜超过400 μg/mL; 园蓝花色苷提取物(GB BAEs)在0.1~10 μg/mL时对细胞活力没有改变, 在100 μg/mL显示该样品能显著促进细胞增殖, 但在200 μg/mL和400 μg/mL时, 抑制细胞增殖, 到800 μg/mL的样品浓度时, 细胞存活率低于30%。

结果表明, 3个品种蓝莓花色苷提取物样品在高浓度时对细胞有一定的损伤作用, 在后续试验中应排除细胞数量和状态对实验结果的干扰。

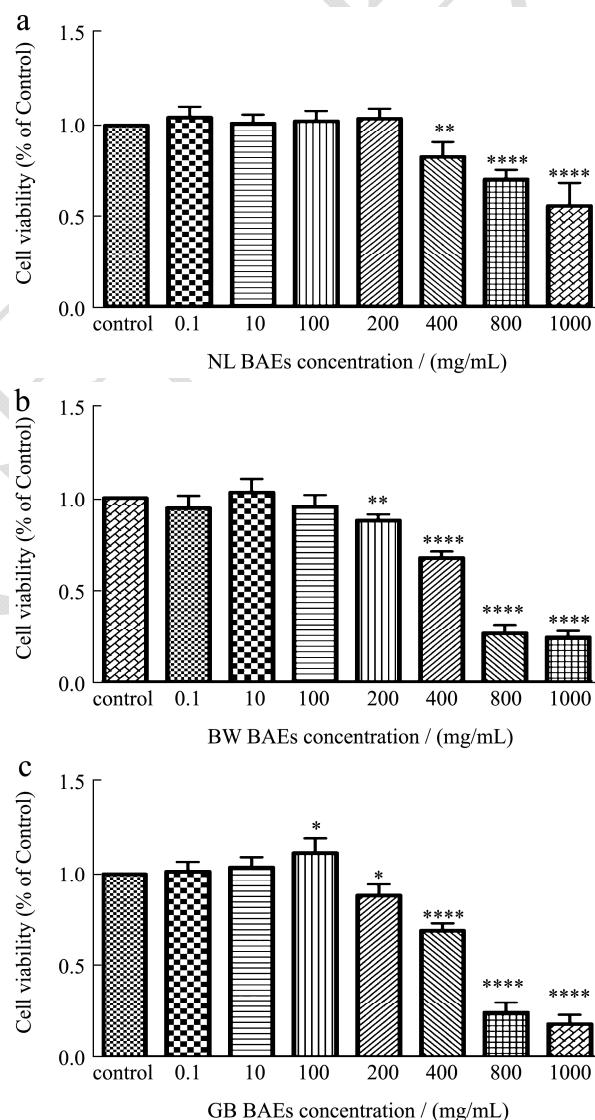


图2 三个品种蓝莓花色苷样品对细胞增殖活力影响

Fig.2 Effects of blueberry anthocyanin extracts on cell viability on HepG2 cells

注: *表示与对照组相比有显著性差异($p < 0.05$), **表示($p < 0.01$), ****表示($p < 0.0001$)。下图3、4、6同。

2.3 胰岛素和葡萄糖对 HepG2 细胞增殖的影响

不同浓度胰岛素和葡萄糖对细胞增殖活力的影响如图3所示,胰岛素在 1×10^{-9} mol/L开始对细胞增殖有明显促进作用,但浓度达到 5×10^{-7} mol/L时,该促进作用未表现出显著性差异。葡萄糖在22~99 mmol/L时对HepG2细胞增殖均无显著性影响。

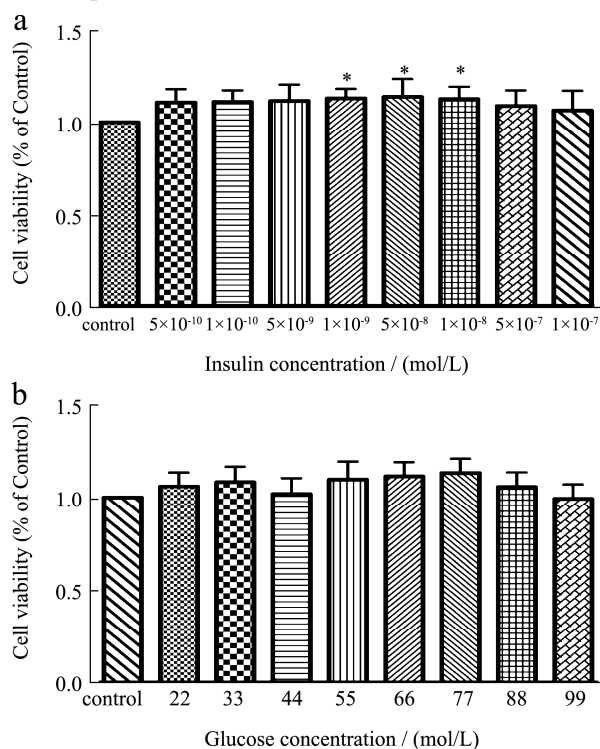


图3 胰岛素和葡萄糖对细胞增殖活力影响

Fig.3 Effects of Insulin and glucose on cell viability on HepG2 cells

2.4 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的建立

根据胰岛素和葡萄糖对细胞活力的影响,选取合适范围进行摸索最佳造模条件,如图4所示,胰岛素对HepG2细胞的糖消耗影响较大,在一定范围内随着胰岛素浓度增高,糖消耗量逐渐减少,在胰岛素浓度为 1×10^{-9} mol/L时,糖消耗量减少表现出显著性差异($p < 0.05$),在 1×10^{-7} mol/L时,HepG2细胞的糖消耗量极显著降低($p < 0.0001$),与对照组相比糖消耗减少了70%,说明细胞已发生胰岛素抵抗;葡萄糖对HepG2细胞糖消耗影响相对胰岛素较小,在葡萄糖达到55 mmol/L和88 mmol/L,HepG2细胞糖消耗量显著降低,与对照组相比糖消耗分别减少了40%、35%,但未呈现剂量关系。综合以上实验结果,HepG2胰岛素抵抗模型选胰岛素 1×10^{-8} mol/L造模24 h为模型方法。

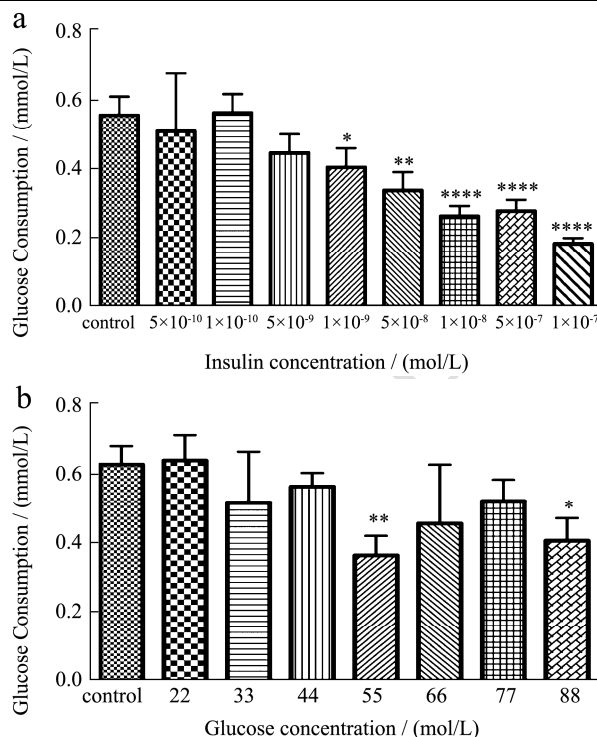


图4 不同浓度胰岛素和葡萄糖对HepG2细胞葡萄糖消耗的影响

Fig.4 Effect of insulin and glucose on glucose consumption in HepG2 cells

2.5 HepG2/IR 细胞的形态学变化

倒置显微镜下观察,HepG2细胞为菱形或不规则成团的贴壁细胞,呈典型的肿瘤细胞形态学特征,HepG2/IR模型细胞与对照细胞对比,形态学特征未见明显改变。

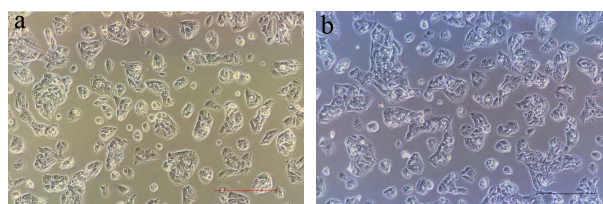


图5 HepG2 细胞形态学观察

Fig.5 Morphological observation of HepG2 cells

注: a: HepG2 细胞; b: HepG2/IR 模型细胞。

2.6 蓝莓花色苷样品对正常 HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响

以3个品种的蓝莓花色苷提取物为实验材料,进行其对正常HepG2细胞的糖消耗影响实验,结果见图6。阳性对照二甲双胍在1 mmol/L时均显示与对照组有显著差异,证明阳性药品二甲双胍能促进HepG2细胞对葡萄糖的消耗,3个品种的蓝莓花色苷提取物样品在7.8125~31.25 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度时,均不同程度促

进了 HepG2 细胞糖消耗量,其中北陆花色苷提取物样品在 15.625 $\mu\text{g/mL}$ 、灿烂和园蓝品种样品在 31.25 $\mu\text{g/mL}$ 表现出与对照组有显著差异,表明 3 个品种的蓝莓花色苷提取物样品在一定浓度时能促进正常 HepG2 细胞的糖消耗量。

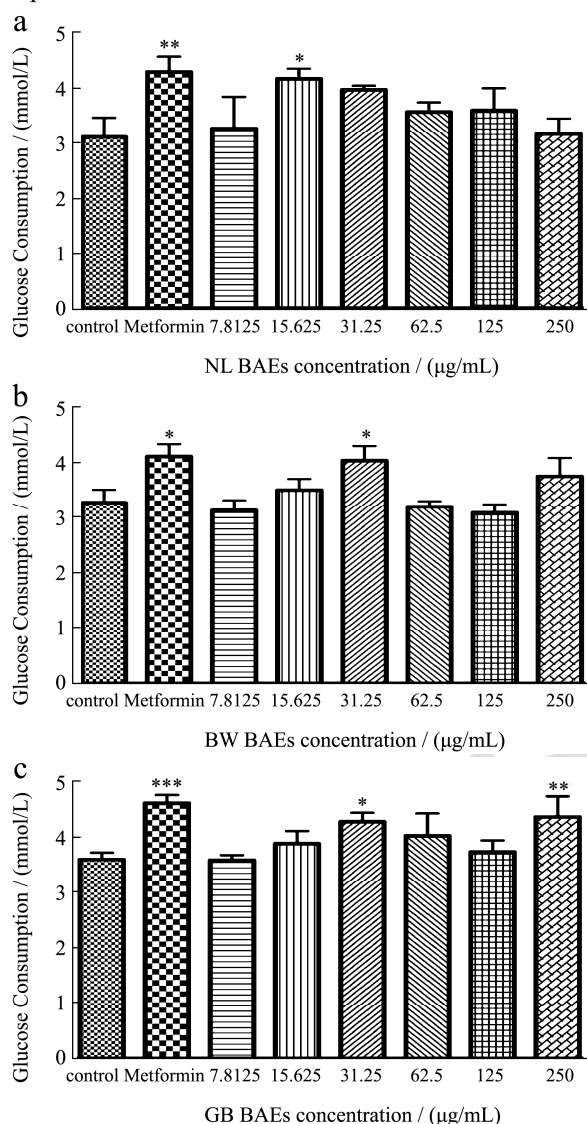


图 6 花色苷提取物对 HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响

Fig.6 Effects of Blueberry anthocyanin extracts (BAEs) on glucose consumption in HepG2 cells

2.7 蓝莓花色苷样品对胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响

基于胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型筛选,以 1×10^8 mol/L 胰岛素造模 24 h 为造模条件,以 1 mmol/L 二甲双胍为阳性对照,进行 3 个品种蓝莓花色苷提取物样品对胰岛素抵抗 HepG2 细胞糖消耗的影响实验,结果如图 7 所示。模型组与对照组存在极显著差异,证明造模成功;阳性组与模型组的糖消耗量显示有极显著

差异,即阳性对照选择无误;3 个品种的蓝莓花色苷提取物样品在 7.8125~31.25 $\mu\text{g/mL}$ 范围内不同程度促进了细胞糖消耗量,且与剂量成正比关系,在 31.25 $\mu\text{g/mL}$ 达到促进最大值,与模型组比较均有极显著差异,糖消耗分别增加了 60%、65%、88%,说明 3 个蓝莓品种的花色苷提取物能较好的改善胰岛素抵抗 HepG2 细胞的糖消耗量。

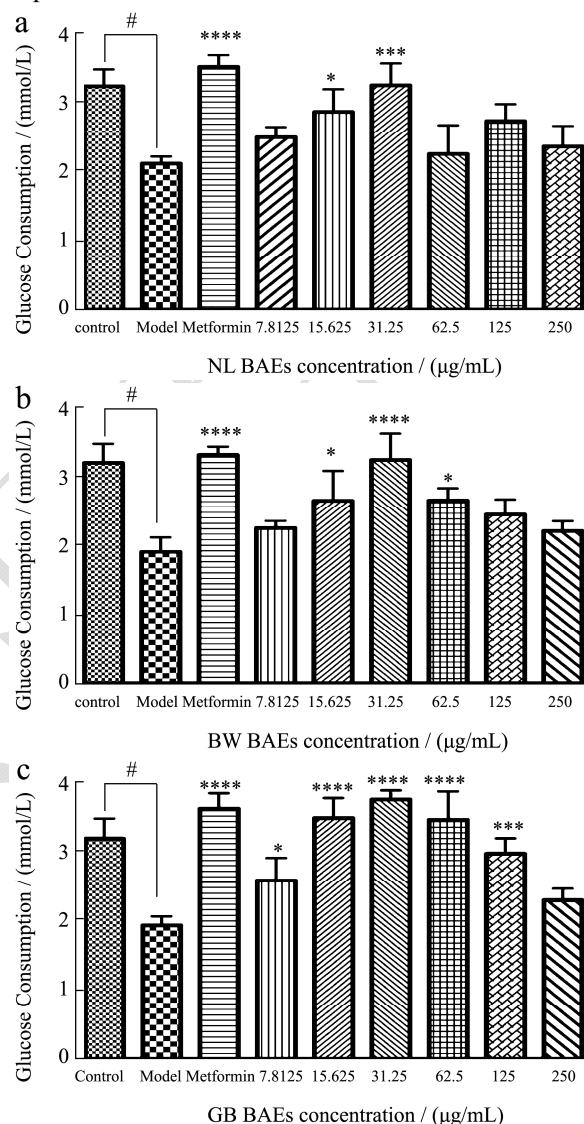


图 7 花色苷提取物对胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖消耗的效应

Fig.7 Effect of Blueberry anthocyanin extracts (BAEs) on glucose consumption in insulin resistant HepG2 cells

注: #表示与对照组相比有显著性差异 ($p < 0.0001$), *表示与模型相比有显著性差异 ($p < 0.05$), **表示 ($p < 0.01$), ***表示 ($p < 0.001$), ****表示 ($p < 0.0001$)。

3 结论

3.1 近年来,随着科学技术的发展,古人以黑为补、尤其偏爱深色果蔬的观念在科学领域得到进一步的认证,有颜色特征的花色苷广受研究者喜爱^[12]。黑米、

桑葚、蓝莓以及其他深色的果蔬中均还有丰富的花色苷^[13-15], 花色苷具有类黄酮的 C6-C3-C6 的特殊结构, 又具有多酚类化合物多羟基特点, 其最重要的特征为抗氧化作用较强^[16]; 其对炎症因子也有较好的抑制表达作用^[17,18]。郭红辉等发现黑米花色苷提取物能够增加胰岛素刺激后胰岛素受体底物-1(IRS-1)的酪氨酸磷酸化和葡萄糖转运体-4(GLUT4)的易位^[19]。浙江大学阎芙洁发现, 桑葚花色苷可以恢复被高糖和棕榈酸刺激形成的胰岛素抵抗 HepG2 细胞的葡萄糖消耗, 并降低糖异生相关酶活性^[20]。胡昕倩等发现花色苷可恢复高胰岛素对 Müller 细胞活性的改变^[21]。本文选择 3 个品种的蓝莓, 利用实验室成熟的方法制得蓝莓花色苷^[3], 比较 3 个品种蓝莓花色苷提取物对 HepG2 细胞的糖消耗量的影响, 旨在从正常细胞和胰岛素抵抗的细胞模型研究花色苷提取物对糖的利用和代谢的干预作用。

3.2 本文比较了不同浓度的胰岛素诱导和不同浓度的葡萄糖诱导 HepG2 细胞转变为胰岛素抵抗的 HepG2 细胞, MTT 结果显示胰岛素在 1×10^{-9} mol/L 开始对细胞增殖有明显促进, 葡萄糖在 22~99 mmol/L 时对 HepG2 细胞增殖均无显著性影响; 最终选择胰岛素浓度 1×10^{-8} mol/L, 孵育 24 h 作为诱导条件, 其模型效果较佳、对细胞活力改变小且稳定性好。而高浓度的葡萄糖诱导在 55 mmol/L 时效果最佳, 但可能由于 HepG2 贴壁不牢固, 不能多次清洗, 培养基中高浓度的葡萄糖对后续结果测定影响较大。此模型建立与姜保平关于比较葡萄糖和胰岛素作为胰岛素抵抗的诱导剂结果相似, 姜^[11]得到 HepG2 细胞在 10^{-7} mol/L 浓度的胰岛素作用 24 h 和 55 mmol/L 的葡萄糖刺激 24 h, 细胞葡萄糖消耗量明显减少, 稳定性良好且细胞存活率无明显影响。本文用高浓度胰岛素 (1×10^{-8} mol/L) 刺激 HepG2 细胞 24 h 后, 细胞的葡萄糖消耗量显著减少, 说明胰岛素受体的功能发生缺陷, 受体自身磷酸化功能和胰岛素刺激的糖、脂、蛋白质代谢降低^[22], 因而证明 HepG2 细胞的胰岛素抵抗模型建立成功。因此, 综合以上情况, 确定胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型的最佳方案为: 1×10^{-8} mol/L 胰岛素, 孵育 24 h。

3.3 利用正常 HepG2 细胞葡萄糖消耗模型和胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖消耗模型, 对不同品种蓝莓花色苷提取物进行干预试验。根据前期细胞增殖实验, 三个品种的蓝莓花色苷提取物在 200 $\mu\text{g/mL}$ 时开始对细胞增殖有一定影响, 在 800 $\mu\text{g/mL}$ 的样品浓度时, 细胞存活率低于 30%, 因此选择三个品种浓度在 0~250 $\mu\text{g/mL}$ 范围内进行干预试验。在正常 HepG2 细胞葡萄糖消耗模型中, 3 个品种的蓝莓花色苷提取物

在 7.8125~31.25 $\mu\text{g/mL}$ 时均不同程度促进了细胞糖消耗量; 在胰岛素抵抗的 HepG2 细胞葡萄糖消耗模型中, 三个品种蓝莓花色苷提取物在 7.8125~31.25 $\mu\text{g/mL}$ 范围内不同程度促进了细胞葡萄糖消耗量, 且与剂量成正比关系, 在 31.25 $\mu\text{g/mL}$ 达到促进最大值, 与模型组比较均有极显著差异, 说明蓝莓花色苷提取物均能较好地改善胰岛素抵抗的 HepG2 细胞对葡萄糖的消耗量。结合前期研究结果, 蓝莓花色苷提取物能明显增加肝脏组织的抗氧化因子^[23]、下调炎症因子的表达^[24], 动物实验也证明给予蓝莓花青素能增加小鼠肝糖原^[25], 初步 12 周的医学营养试验也表明蓝莓能改善整体胰岛素水平^[26], 本文结果提示蓝莓花色苷对胰岛素抵抗^[27]或降糖作用^[28], 一部分来源于其在肝脏对细胞的葡萄糖利用的明显改善。

参考文献

- [1] Michalska A, Lysiak G. Bioactive compounds of blueberries: post-harvest factors influencing the nutritional value of products [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(8): 18642-18663
- [2] Liu S X, Yang H Y, Li S Y, et al. Polyphenolic compositions and chromatic characteristics of bog bilberry syrup wines [J]. *Molecules*, 2015, 20(11): 19865-19877
- [3] Wu Y, Zhou Q, Chen X Y, et al. Comparison and screening of bioactive phenolic compounds in different blueberry cultivars: Evaluation of anti-oxidation and α -glucosidase inhibition effect [J]. *Food Research International*, 2017, 100 (Part 1): 312-324
- [4] 徐玉涛, 李珂珂, 王贺新, 等. 高效液相色谱法对蓝莓果实中 8 个有机酸含量的测定[J]. *食品科学*, 2015, 36(18): 127-131
XU Yu-tao, LI Ke-ke, WANG He-xin, et al. Determination of 8 organic acids in blueberry fruit by high performance liquid chromatography [J]. *Food Science*, 2015, 36(18): 127-131
- [5] Tian Y, Liimatainen J, Alanne A L, et al. Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants [J]. *Food Chemistry*, 2017, 220(4): 266-281
- [6] Musso G, Gambino R, Cassader M. Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update [J]. *Obesity Reviews*, 2009, 11: 430-445
- [7] Hajiaghaalipour F, Khalilpourfarshbafi M, Arya A. Modulation of glucose transporter protein by dietary flavonoids in type 2 diabetes mellitus [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2018, 11(5): 508-524
- [8] Stull A. Blueberries' impact on insulin resistance and glucose

- intolerance [J]. Antioxidants, 2016, 5(4): 44-11
- [9] Yan F, Dai G, Zheng X. Mulberry anthocyanin extract ameliorates insulin resistance by regulating PI3K/AKT pathway in HepG2 cells and db/db mice [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2016, 36(10): 68-80
- [10] Yan F, Zhang J, Zhang L, et al. Mulberry anthocyanin extract regulates glucose metabolism by promotion of glycogen synthesis and reduction of gluconeogenesis in human HepG2 cells [J]. Food & Function, 2016, 7(1): 425-433
- [11] 黄明辉,葛长杰,于淑娟.山茱萸中马钱苷和莫诺苷对 HepG2 细胞及其胰岛素抵抗模型的影响研究[J].现代食品科技,2017,33(4):13-18
HUANG Ming-hui, GE Chang-jie, YU Shu-juan. Effects of loganin and morroniside extracted from cornus officinalis on HepG2 cells and their insulin resistance model [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(4): 13-18
- [12] Nile S H, Park S W. Edible berries: bioactive components and their effect on human health [J]. Nutrition, 2014, 30(2): 134-144
- [13] Huang H P, Chang Y C, Wu C H, et al. Anthocyanin-rich Mulberry extract inhibit the gastric cancer cell growth in vitro and xenograft mice by inducing signals of p38/p53 and c-jun [J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1703-1709
- [14] Wang H, Guo X, Hu X, et al. Comparison of phytochemical profiles, antioxidant and cellular antioxidant activities of different varieties of blueberry (*Vaccinium* spp.) [J]. Food Chemistry, 2017, 217(C): 773-781
- [15] Pedro A C, Granato D, Rosso N D. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability [J]. Food Chemistry, 2016, 191: 12
- [16] Sun L Q, Ding X P, Qi J, et al. Antioxidant anthocyanins screening through spectrum effect relationships and DPPH-HPLC-DAD analysis on nine cultivars of introduced rabbiteye blueberry in China [J]. Food Chemistry, 2012, 132(2): 759-765
- [17] Vendrame S, Daugherty A, Kristo AS, et al. Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption improves inflammatory status in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2013, 24(8): 1508-1512
- [18] 韩彩静,程安玮,陈相艳,等.蓝莓多酚对巨噬细胞中 iNOS、COX-2 基因表达的影响[J].食品科学,2014,35(19):144-148
HAN Cai-jing, CHENG An-wei, CHEN Xiang-yan, et al. Effects of blueberry polyphenols on the expression of iNOS and COX-2 in macrophages [J]. Food Science, 2014, 35(19): 144-148
- [19] 郭红辉,胡艳,刘驰,等.黑米花色苷对果糖喂养大鼠胰岛素敏感性影响[J].中国公共卫生,2008,24(10):1200-1202
GUO Hong-hui, HU Yan, LIU Chi, et al. Effect of anthocyanin extracted from black rice on insulin sensitivity in fructose-fed rats [J]. Chin J Public Health, 2008, 24(10): 1200-1202
- [20] 阎芙洁.桑葚花色苷对糖代谢的调控作用及其机制研究[D].杭州:浙江大学,2018
YAN Fu-jie. Study on the beneficial effect and mechanism of mulberry anthocyanins on glucose metabolism regulation [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018
- [21] 胡昕倩,柯敏.花色苷对高糖高胰岛素培养下 Müller 细胞的保护[J].武汉大学学报(医学版),2011,32(5):623-626
HU Xin-qian, KE Min. Effect of cyanin in protecting cultured müller cells under high glucose and high insulin condition [J]. Medical Journal of Wuhan University, 2011, 32(5): 623-626
- [22] Mokashi P, Khanna A, Pandita N. Flavonoids from *Enicostema littorale blume* enhances glucose uptake of cells in insulin resistant human liver cancer (HepG2) cell line via IRS-1/PI3K/Akt pathway [J]. Biomedicine et Pharmacotherapy, 2017, 90: 268-277
- [23] 武雪玲,李筱筱,贾世亮,等.黑果枸杞花青素对 A β_{42} 致痴呆模型大鼠记忆力及抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2017, 33(3):29-34
WU Xue-ling, LI Xiao-xiao, JIA Shi-liang, et al. Memory enhancing and antioxidant activities of lycium ruthenicum murray anthocyanin extracts in an A β_{42} -induced rat model of dementia [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(3): 29-34
- [24] Vendrame S, Daugherty A, Kristo AS, et al. Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption improves inflammatory status in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2013, 24(8): 1508-1512
- [25] 张卓睿,毛迪锐,高晗,等.蓝莓花青素对小鼠抗疲劳及体内抗氧化作用[J].食品科学,2017,38(21):207-211
ZHANG Zhuo-rui, MAO Di-rui, GAO Han, et al. Anti-fatigue and antioxidation of blueberry anthocyanins in mice [J]. Food Science, 2017, 38(21): 207-211
- [26] Nilgun I, Ozan G. Investigation of the impact of blueberries on metabolic factors influencing health [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 38(Part A): 298-307

现代食品科技