

# 苦瓜水提物和醇提物对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的调节作用

祝莹, 罗远平, 白娟, 张易, 肖香, 董英

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

**摘要:** 为研究苦瓜水提物 (BMWE) 和醇提物 (BMEE) 调节胰岛素抵抗的异同点, 本文采用棕榈酸诱导 HepG2 细胞建立胰岛素抵抗 (IR) 细胞模型, 测定了 BMWE 和 BMEE 对 HepG2-IR 细胞葡萄糖消耗量、糖原、甘油三酯 (TG)、ATP 及胰岛素抵抗信号通路相关基因 mRNA 表达水平的影响。结果表明, BMWE 和 BMEE 均可显著增加 IR 细胞的葡萄糖消耗量和胞内糖原含量; BMEE 还能显著降低细胞中 TG 含量 (112.08% vs. 132.97%)、增加细胞中 ATP 含量 (80.62% vs. 48.44%); 同时 BMWE 和 BMEE 均能显著提高 IR 细胞中 IRS1 (胰岛素受体 1)、PI3K (磷脂酰肌醇-3-激酶)、AMPK (腺苷酸活化蛋白激酶) 和 CPT1 (肉毒碱棕榈酰转移酶 1) mRNA 的表达水平, 降低 ACC2 (乙酰辅酶 A 羧化酶 2) mRNA 的表达水平; BMWE 还可增加细胞中 AKT (蛋白激酶 B) mRNA 的表达水平。在 mRNA 水平, BMWE 通过激活 IR 细胞的 IRS1-PI3K-AKT 信号通路改善胰岛素抵抗; 而 BMEE 则通过调节 AMPK-ACC2-CPT1 信号通路改善 IR 细胞的糖脂代谢, 二者的作用途径有所不同。

**关键词:** 苦瓜水提物; 苦瓜醇提物; HepG2 细胞; 胰岛素抵抗

文章编号: 1673-9078(2018)05-1-7

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.05.001

## Modulation of Insulin Resistant in HepG2 Cells by Water Extracts and Ethanol Extracts from Bitter Melon

ZHU Ying, LUO Yuan-ping, BAI Juan, ZHANG Yi, XIAO Xiang, DONG Ying

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract:** In order to investigate the similarities and differences in the regulation of insulin resistance between water extracts (BMWE) and ethanol extracts (BMEE) from bitter melon on insulin resistant, the insulin resistance (IR) cell model was established in HepG2 cells induced by palmitic acid. Glucose consumption, glycogen, triglyceride (TG), ATP content and the mRNA expression levels of relative gene were determined. The results showed that BMWE and BMEE could significantly increase the glucose consumption and intracellular glycogen content of IR cells, and BMEE could significantly decrease TG content in cells (112.08% vs. 132.97%) and increase ATP content in cells (80.62% vs. 48.44%); BMWE and BMEE could increase insulin receptor substrate 1 (IRS1), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) mRNA expression, and could decrease acetyl-CoA carboxylase 2 (ACC2) mRNA expression; BMWE could also increase protein kinase B (AKT) mRNA expression. BMWE might improve insulin resistance by activating IRS1-PI3K-AKT signaling pathway in IR cells; However, BMEE could regulate glucose and lipid metabolism of IR cells through AMPK-ACC2-CPT1 signaling pathway, and their action pathways were different.

**Key words:** water extracts of bitter melon; ethanol extracts of bitter melon; HepG2 cell; insulin resistance

随着人类生活方式的改变, 以肥胖为核心的代谢综合征已成为影响人类健康最主要的非传染性慢性疾病

收稿日期: 2017-12-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31371760); 江苏高校优势学科建设工程项目; 江苏大学高级人才科研启动基金项目 (15JDG065); 镇江市重点研发项目 (现代农业) (NY2017009)

作者简介: 祝莹 (1987-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品营养

通讯作者: 董英 (1954-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品营养与安全

病之一。而肥胖可诱导机体胰岛素抵抗 (Insulin resistance, IR) 的发生, 继而产生葡萄糖耐受不良、血脂紊乱等症状<sup>[1]</sup>。胰岛素抵抗是指组织 (肝脏、骨骼肌和脂肪等) 对胰岛素敏感性下降, 机体代偿性的分泌过多胰岛素产生高胰岛素血症, 以维持血糖的稳定。因此, 长期胰岛素抵抗引起的糖脂代谢紊乱最终会导致 2 型糖尿病、非酒精性脂肪肝等疾病的发生<sup>[2]</sup>。

肝脏是胰岛素作用的靶组织, 是胰岛素抵抗产生的主要部位。HepG2 细胞是一种表型与肝细胞极为相

似的肝胚胎瘤细胞株,经诱导剂的刺激可使表面胰岛素受体数目下降,从而使细胞呈现胰岛素抵抗状态<sup>[3]</sup>。已有研究表明胰岛素抵抗与过量摄入高脂饮食密切相关。血液中过量的游离脂肪酸会对肝脏产生脂毒性,削弱胰岛素受体的信号转导,从而降低胰岛素敏感性<sup>[4]</sup>。棕榈酸是饮食和血清中最常见的饱和脂肪酸,因此,通过棕榈酸诱导建立HepG2 胰岛素抵抗细胞模型,是体外研究功能活性成分改善胰岛素抵抗作用途径的良好试验模型<sup>[5]</sup>。

苦瓜(*Momordica charantia* L.)富含多糖、皂苷、多酚和多肽等多种活性成分,长期以来被用于预防和改善肥胖、糖尿病,本课题组前期通过动物试验证实苦瓜具有改善胰岛素抵抗、调节糖脂代谢的作用<sup>[6,7]</sup>。目前研究发现苦瓜中活性成分调脂降糖途径主要有通过修复胰岛 $\beta$ 细胞来调节胰岛素释放;或是通过改善葡萄糖代谢促进葡萄糖转化,刺激糖原的贮存;或是发挥胰岛素类似物的作用,促进外周组织的葡萄糖摄取<sup>[8]</sup>,但仍存争议。苦瓜作为天然食品,其复杂的成分必然导致其作用的多样性,对于其不同组分对胰岛素抵抗作用的异同点还有待进一步研究。

本文通过棕榈酸诱导建立了 HepG2 胰岛素抵抗(HepG2-IR)细胞模型,从糖脂代谢途径研究苦瓜水提物和醇提物对胰岛素抵抗调节作用的异同点,为揭示苦瓜改善胰岛素抵抗的机制提供试验依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料与仪器设备

#### 1.1.1 试验材料与试剂

HepG2 细胞购自中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物研究所;苦瓜购自扬州中绿健苦瓜种植基地。

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 高糖培养液、胎牛血清,美国 Gibco 公司;葡萄糖测定试剂盒、糖原测定试剂盒、甘油三酯(TG)测定试剂盒、BCA (Bicinchoninic Acid) 法蛋白浓度测定试剂盒、ATP 测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;四甲基偶氮唑盐(MTT)、棕榈酸、牛血清白蛋白、二甲双胍,美国 Sigma 公司;荧光定量 PCR 引物,上海生工生物工程技术有限公司;荧光定量 PCR 相关试剂, Takara 公司;其他生化试剂均为分析纯,购自国药集团上海化学试剂有限公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

UV-9600 紫外可见分光光度计,北京瑞丽分析仪器有限公司;CO<sub>2</sub> 恒温培养箱,芬兰 Thermo 公司;Leica

DM2500 倒置荧光显微镜,德国莱卡有限公司;荧光定量 PCR,美国 Bio-Rad 公司;B040234 全自动酶标仪,美国 Thermo 公司;96 孔板、25 cm<sup>2</sup> 培养瓶,美国 Corning 公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 苦瓜水提物和醇提物的制备

鲜苦瓜去籽切片冻干后,在江苏大学食品与生物工程学院中心实验室制备苦瓜粉。称取 100 g 苦瓜粉,加入 1000 mL 水室温浸提 12 h,过滤后上清液冻干即为苦瓜水提物(BMWE)。称取 100 g 苦瓜粉,加入 500 mL 石油醚回流脱脂,过滤后将残渣 40 °C 烘干,加入 1000 mL 的乙醇,室温搅拌 12 h 后离心,上清液旋蒸挥掉乙醇后冻干得到苦瓜醇提物(BMEE)。

#### 1.2.2 苦瓜水提物和醇提物的成分测定

苦瓜提取物中多糖含量的测定采用苯酚-硫酸法;苦瓜提取物中皂苷含量的测定采用徐斌等<sup>[9]</sup>采用的方法;苦瓜提取物中多酚含量的测定采用 Folin-Ciocalteu 法;苦瓜提取物中蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法。

#### 1.2.3 细胞培养

HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

#### 1.2.4 胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型的建立

将 HepG2 细胞接种于 96 板中,37 °C 培养 24 h 后,弃去上清液,换成不含血清的 DMEM 高糖培养液饥饿 12 h,弃去上清液,用 PBS 洗 2 次,再加入含有棕榈酸的无血清培养液(棕榈酸终浓度为 0.25 mM)<sup>[10]</sup>诱导 12 h 后,即为 HepG2-IR 细胞模型。

#### 1.2.5 细胞存活率的测定

以 2×10<sup>4</sup> 个/mL 的接种密度将 HepG2 细胞接种于 96 孔板,分为正常组、阴性组和苦瓜提取物组,每组 6 个平行。细胞饥饿 12 h 后,正常组加入无血清 DMEM 培养液,阴性组和苦瓜提取物组采用 1.2.4 的方法建立胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型,其中苦瓜提取物组的棕榈酸诱导液同时分别加入 50、100、250、500、750、1000、2000 μg/mL 的 BMWE 和 BMEE (浓度为培养液中的终浓度),12 h 后,弃去上清,用 PBS 洗 2 次,加入无酚红培养液继续培养 12 h。最后每孔加入 20 μL MTT (终浓度为 0.5 mg/mL) 培养 4 h,弃去上清液,每孔加 200 μL DMSO 溶解结晶颗粒(另设 6 个空白孔),于 570 nm 波长处测定 OD 值。细胞存活率(%)=(试验组 OD 值-空白 OD 值)/(正常组 OD 值-空白 OD 值)×100%。

### 1.2.6 葡萄糖消耗量的测定

HepG2 细胞接种于 96 孔板, 试验分为空白组(不含细胞)、正常组、阴性组、苦瓜提取物组和二甲双胍组(Met), 除空白组、正常组外, 其他各组按照 1.2.4 的方法建立 HepG2-IR 细胞模型。二甲双胍组和苦瓜提取物组在模型建立期间分别加入含有 2 mM 二甲双胍(前期试验已经证明其对细胞存活率无影响)和不同浓度的苦瓜提取物(选取 1.2.5 试验筛选出的浓度)的培养液, 作用 12 h 后继续采用无酚红培养液培养 12 h。采用葡萄糖测定试剂盒检测培养液中的葡萄糖含量, 同时采用 MTT 法测定细胞存活率, 葡萄糖消耗量相对含量(%)=[(空白组葡萄糖含量-试验组葡萄糖含量)/试验组 MTT 值]/[(空白组葡萄糖含量-正常组葡萄糖含量)/正常组 MTT 值]×100%。

### 1.2.7 胞内糖原、甘油三酯及 ATP 含量的测定

取 HepG2 细胞以  $2.5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板, 试验分为正常组、阴性组和苦瓜提取物组(选取 1.2.6 试验筛选出的浓度), 在模型建立过程中加药物培养 12 h。

糖原和蛋白含量采用试剂盒测定。糖原相对含量(%)=(试验组糖原含量/试验组蛋白浓度)/(正常组糖原含量/正常组蛋白浓度)×100%。

甘油三酯(TG)和蛋白浓度采用试剂盒测定。TG

相对含量(%)=(试验组 TG 含量/试验组蛋白浓度)/(正常组 TG 含量/正常组蛋白浓度)×100%。

ATP 和蛋白含量采用试剂盒测定。ATP 相对含量(%)=(试验组 ATP 含量/试验组蛋白浓度)/(正常组 ATP 含量/正常组蛋白浓度)×100%。

### 1.2.8 胰岛素抵抗信号通路相关基因转录水平的测定

HepG2 细胞接种于 6 孔板, 试验分为正常组、阴性组、BMWE500 组(选取上述试验筛选出的最佳浓度 500 μg/mL)和 BMEE250 组(选取上述试验筛选出的最佳浓度 250 μg/mL)。

采用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 反转录试剂盒制备 cDNA, 用 Real-time PCR 法检测 IRS1(胰岛素受体 1)、PI3K(磷脂酰肌醇-3-激酶)、AKT(蛋白激酶 B)、AMPK(腺苷酸活化蛋白激酶)、ACC2(乙酰辅酶 A 羧化酶 2)、CPT1(肉毒碱棕榈酰转移酶 1)的基因表达水平, 并选取 GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)为内参基因, 采用 Primer Express 3.0 软件设计引物, 并由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列如表 1 所示。扩增条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共进行 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。扩增反应完成后测定吸光值, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算 mRNA 相对表达量。

表 1 引物列表

Table 1 Primer sequence

基因	引物序列	
	上游	下游
IRS1	GGAGTACATGAAGATGGACCTGG	CTGTTC GCATGT CAGCAT AGC
PI3K	AGCACCGACTTCAAGACTACG	GGATGCCAATGAGATTGTCC
AKT	ACTTCTCCGTAGCAGAATGCC	AGCCACACTTGTAGTCCATGG
AMPK	ACAGGCATATGGTGGTCCATAGAGA	TTGGGTGAGCCACAACCTTGTTTC
ACC2	GCAAGAACGTGTGGGGTTACT	TCGTAGTGGGCTTGCTGAAAA
CPT1	GGTGAACAGCAACTATTATGTC	ATCCTCTGGAAGTGCATC
GAPDH	GGGGCTCTCCAGAACATCAT	TCAAGGGGTCTACATGGCAA

### 1.2.9 统计处理

各组数据以  $\bar{x} \pm SD$  表示, 采用 SPSS 18.0 中 ANOVA 模块对试验数据进行方差分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 BMEE 和 BMWE 中成分分析

由表 2 可以看出, BMEE 和 BMWE 中主要活性成分多糖和皂苷的含量具有较大差异。BMWE 中多糖含量显著高于 BMEE ( $p < 0.05$ ), 说明苦瓜中多糖主要为水溶性; 而 BMEE 中皂苷的含量显著高于 BMWE

(19.24% vs. 4.84%), 这是由于皂苷属于醇溶性物质, 因此 BMEE 中皂苷显著高于 BMWE。

表 2 BMWE 和 BMEE 中多糖、皂苷、多酚和蛋白质含量

Table 2 The content of polysaccharide, saponins, phenolics and protein in BMWE and BMEE

组别	含量/%			
	多糖	皂苷	多酚	蛋白质
BMWE	31.30±2.10 <sup>a</sup>	4.84±0.18 <sup>b</sup>	2.56±0.14 <sup>a</sup>	1.77±0.06 <sup>a</sup>
BMEE	0.52±0.03 <sup>b</sup>	19.24±1.10 <sup>a</sup>	3.34±0.16 <sup>a</sup>	0.85±0.03 <sup>b</sup>

注: 同一列中不同字母之间存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

此外, BMEE 和 BMWE 的多酚含量分别为 3.34%

和 2.56%，无显著差异；蛋白含量分别为 0.85%和 1.77%，具有显著差异，说明蛋白水溶性比醇溶性多。

### 2.2 BMWE 和 BMEE 对 HepG2-IR 细胞活性的影响

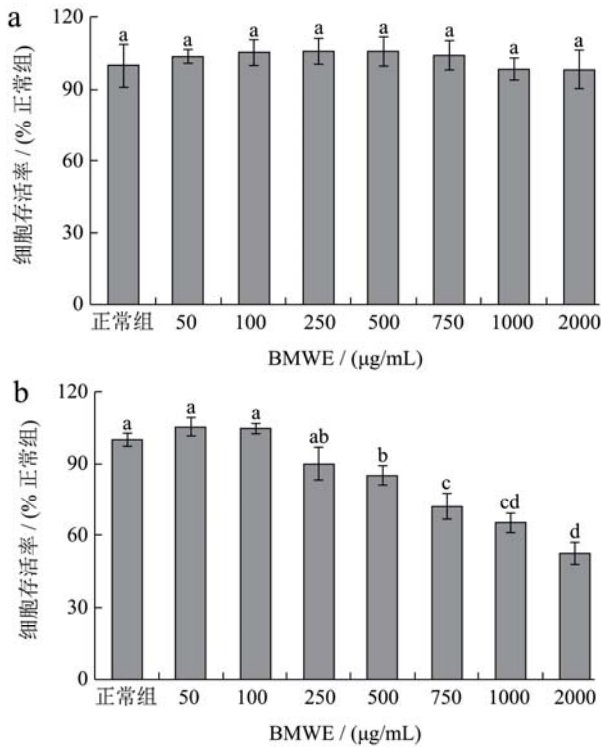


图 1 不同浓度 BMWE 和 BMEE 对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of BMWE and BMEE on the survival rate of HepG2 cells

注：同一图表中不同字母的组之间存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )。图 a 表示 BMWE，图 b 表示 BMEE。

图 1 显示了不同浓度 BMWE 和 BMEE 作用 12 h 对 HepG2 细胞存活率的影响。

从图 1a 可以看出，采用 BMWE 作用 HepG2 细胞 12 h，50~2000 µg/mL BMWE 对细胞活力皆无显著影响，试验组细胞与正常组细胞存活率相当 ( $p > 0.05$ )。因此，确定 50~2000 µg/mL 为试验中 BMWE 浓度。从图 1b 可以看出，当 BMEE 的浓度由 50 增加至 250 µg/mL 时，对细胞活力无显著影响 ( $p > 0.05$ )，而当作用浓度为 500、750、1000、2000 µg/mL 时，细胞存活率随着浓度的增加显著减小，分别为 84.67%、71.69%、65.12%和 55.00%，与正常组 (100%) 具有显著差异 ( $p < 0.05$ )，表明 BMEE 浓度大于 500 µg/mL 时会对细胞生长产生明显的抑制作用。因此，BMEE 的浓度范围确定为 50~250 µg/mL。

### 2.3 BMWE 和 BMEE 对 HepG2-IR 细胞葡萄糖

### 糖消耗量的影响

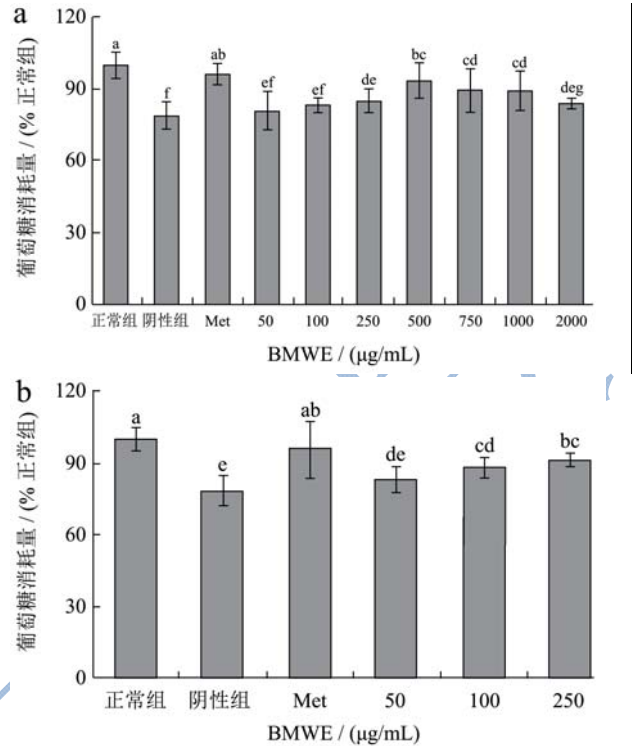


图 2 不同浓度 BMWE 和 BMEE 对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of BMWE and BMEE on the glucose consumption of HepG2 cells

注：同一图表中不同字母的组之间存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )。图 a 表示 BMWE，图 b 表示 BMEE。

不同浓度 BMWE 和 BMEE 对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响如图 2 所示。从图 2a 和图 2b 中均可以看出，经棕榈酸诱导后，阴性组细胞葡萄糖消耗量显著低于正常组 (78.58%、78.51% vs. 100.00%) ( $p < 0.05$ )，说明 HepG2-IR 细胞模型建模成功。从图 2a 还可发现，50、100、2000 µg/mL BMWE 组细胞的葡萄糖消耗量与阴性组无显著性差异 ( $p > 0.05$ )，而 250、500、750、1000 µg/mL BMWE 能显著增加 HepG2 胰岛素抵抗细胞的葡萄糖消耗量 (分别为 84.65%、94.90%、89.59%和 90.01%) ( $p < 0.05$ )，其中 500 µg/mL BMWE 效果最优。如图 2b 所示，BMEE 作用浓度为 100 和 250 µg/mL 时均能显著增加 HepG2 胰岛素抵抗细胞葡萄糖消耗量 (分别为 86.99%和 91.38%) ( $p < 0.05$ )，且 BMEE 浓度越高其细胞的葡萄糖消耗量越高，呈现一定的量效关系。二甲双胍也可增加 IR 细胞的葡萄糖消耗量 (分别为 96.03%和 96.13%)，主要是由于二甲双胍可促进细胞的葡萄糖转运。

BMWE 和 BMEE 均对 IR 细胞葡萄糖消耗量有一定的作用效果，但作用浓度有一定的差异，这可能是

由于BMWE和BMEE中含有的活性成分的种类与数量均不同导致的。Roffey等<sup>[11]</sup>发现苦瓜水提物能增加3T3-L1脂肪细胞的葡萄糖消耗量,这可能与细胞中脂联素的分泌量增加有关。BMEE中皂苷含量较高,而前人的研究表明<sup>[12]</sup>苦瓜皂苷能刺激GLUT4(葡萄糖转运蛋白4)转移到细胞膜上,从而促进葡萄糖进入细胞。因此BMWE和BMEE均能有效改善HepG2模型细胞的胰岛素抵抗,增加葡萄糖消耗量。

#### 2.4 BMWE 和 BMEE 对 HepG2-IR 细胞糖原含量的影响

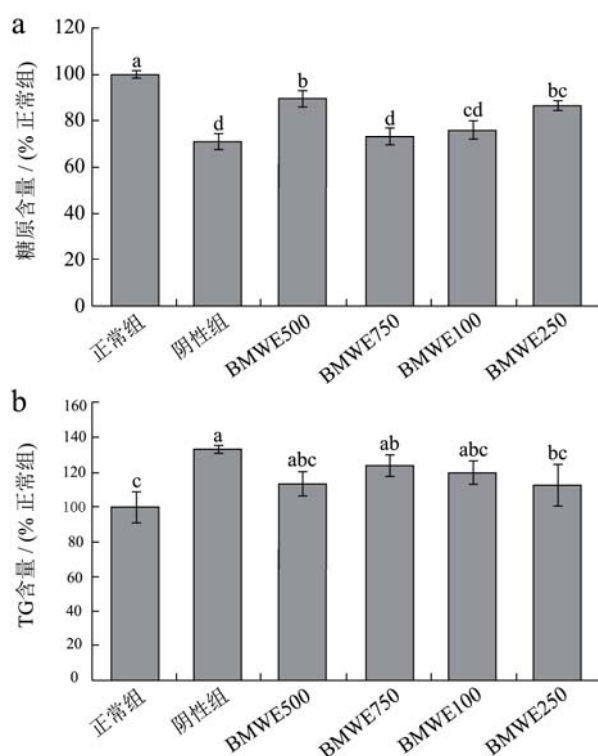


图3 BMWE 和 BMEE 对胰岛素抵抗 HepG2 细胞糖原和 TG 含量的影响

Fig.3 Effects of BMWE and BMEE on the glycogen and TG content of HepG2-IR cells

注:不同字母表示差异显著( $p < 0.05$ )。图a表示糖原含量,图b表示TG含量。

肝脏是机体调节血糖的主要部位,肝脏可通过糖异生和肝糖原的合成与分解来调节血糖浓度。如图3a所示,经棕榈酸诱导12h后,与正常组相比,HepG2-IR细胞中糖原的含量显著降低(70.47% vs. 100.00%) ( $p < 0.05$ ),说明肝细胞的糖代谢发生紊乱;而500  $\mu\text{g/mL}$ 的BMWE和250  $\mu\text{g/mL}$ 的BMEE可显著增加IR细胞的糖原含量(88.15%、86.09%),与阴性组具有显著差异( $p < 0.05$ )。说明BMWE和BMEE均可以通过抑制糖异生、促进肝糖原的合成来调节HepG2-IR

细胞的糖代谢。

#### 2.5 BMWE 和 BMEE 对 HepG2-IR 细胞甘油三酯含量的影响

糖脂代谢紊乱会导致输送至肝细胞的游离脂肪酸量增加,并在胞内积累生成甘油三酯,使肝细胞出现小泡性脂变,进一步降低肝细胞对胰岛素的敏感性。由图3b数据可知,经棕榈酸诱导后,肝细胞内TG过度积累,与正常组相比,HepG2-IR细胞中TG含量可达132.97%;而BMWE和BMEE均能降低HepG2-IR细胞中TG含量,但仅BMEE250组与阴性组具有显著差异(112.08% vs. 132.97%) ( $p < 0.05$ ),说明BMEE对IR细胞TG含量的影响优于BMWE。苦瓜醇提取物中主要含有的活性成分有三萜皂苷类,Popovich等研究发现苦瓜三萜皂苷可显著减少前脂肪细胞分化为脂肪细胞过程中的脂质积累,同时降低胞内甘油三酯含量,因此BMEE能显著降低HepG2-IR细胞的TG含量<sup>[13]</sup>。

#### 2.6 BMWE 和 BMEE 对 HepG2-IR 细胞 ATP 含量的影响

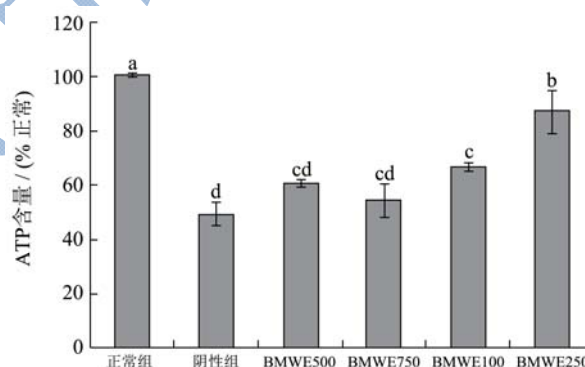


图4 BMWE 和 BMEE 对胰岛素抵抗 HepG2 细胞 ATP 含量的影响

Fig.4 Effects of BMWE and BMEE on the ATP content of HepG2-IR cells

注:不同字母表示差异显著( $p < 0.05$ )。

ATP是一种高能磷酸化合物,在细胞中,它与ADP的相互转化实现贮能和放能,从而保证细胞各项生命活动的能量供应。ATP含量反映了细胞能量代谢水平,棕榈酸会导致细胞线粒体呼吸链的解偶联,降低细胞内ATP含量,使氧化磷酸化进入空转状态,造成肝细胞能量代谢紊乱<sup>[14]</sup>。图4显示的是BMWE和BMEE对胰岛素抵抗HepG2细胞ATP含量的影响。经棕榈酸诱导后,与正常组相比,阴性组细胞中ATP含量显著降低(48.44% vs. 100.00%) ( $p < 0.05$ );100和250  $\mu\text{g/mL}$ 的BMEE可显著增加细胞中ATP含量(分别为66.46%

和 80.62%)，与阴性组具有显著差异 ( $p < 0.05$ )，而 BMWE500 和 BMWE750 未能显著增加 IR 细胞内 ATP 含量 ( $p > 0.05$ )。BMEE 能提高 IR-HepG2 细胞中 ATP 水平可能是由于 BMEE 能抑制线粒体呼吸链的解偶联，从而促进 ATP 的正常产生，具体机制还需进一步研究。而 BMWE 对 HepG2-IR 细胞中 ATP 水平无显著作用，说明 BMEE 和 BMWE 对 IR 细胞 ATP 含量的作用具有显著差异。

## 2.7 BMWE 和 BMEE 对 HepG2-IR 细胞 IRS1、PI3K、AKT、AMPK、ACC2 和 CPT1 mRNA 表达水平的影响

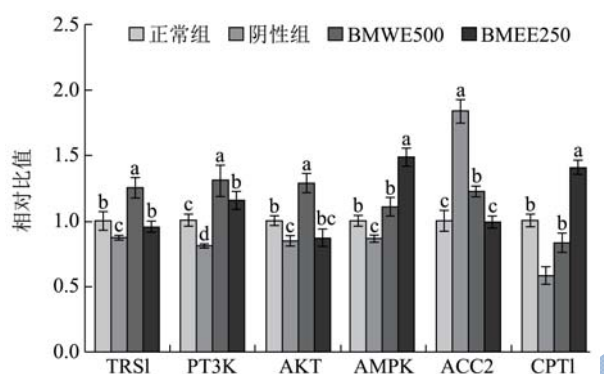


图 5 BMEE 对胰岛素抵抗 HepG2 细胞 IRS1、PI3K、AKT、AMPK、ACC2、CPT1 mRNA 表达水平的影响

Fig.5 Effects of BMEE on the IRS1, PI3K, AKT, AMPK, ACC2 and CPT1 mRNA levels of HepG2-IR cells

注：不同字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

IRS1-PI3K-AKT 信号通路的阻断是胰岛素抵抗的重要特征<sup>[15]</sup>。胰岛素经  $\beta$  细胞分泌后作用于细胞表面的胰岛素受体，胰岛素受体激活后磷酸化 IRS1，进而激活 PI3K，PI3K 可活化 AKT，活化的 AKT 可通过促进葡萄糖的代谢。由图 5 数据可知，与正常组相比，阴性组细胞中 IRS1 mRNA 表达水平显著降低 (0.87 vs. 1.0) ( $p < 0.05$ )，而经 BMWE 和 BMEE 作用模型细胞 12 h 后，BMEE 可将 HepG2-IR 细胞的 IRS1 mRNA 表达水平上调到与正常组无显著性差异 ( $p > 0.05$ )，而 BMWE 则更能显著提高 IRS1 mRNA 表达水平 (1.25 vs. 0.87)。阴性组细胞中 PI3K mRNA 表达水平显著低于正常组 (0.81 vs. 1.0) ( $p < 0.05$ )，而 BMWE500、BMEE250 组细胞中 PI3K mRNA 表达水平均显著增加 (分别为 1.31 和 1.15)，且 BMWE500 组的效果更优。阴性组细胞的 AKT mRNA 表达水平显著低于正常组 (0.83 vs. 1.0)，BMWE 能显著增加细胞中 AKT mRNA 表达水平 (1.27 vs. 0.83)

( $p < 0.05$ )，而 BMEE 虽也能增加 AKT mRNA 的表达水平 (0.87)，但与阴性组无显著差异 ( $p > 0.05$ )。因此，BMWE 可通过调节 IRS1-PI3K-AKT 通路增加葡萄糖消耗量和糖原含量，抑制糖异生；BMEE 也能部分调节 IRS1-PI3K-AKT 通路的表达水平，但其效果弱于 BMWE。

AMPK-ACC2-CPT1 通路是葡萄糖摄取和脂肪酸氧化的关键途径。AMPK 是影响脂肪酸代谢平衡的重要靶点，可减少糖异生、促进葡萄糖转运及脂肪酸脂解和氧化；ACC2 是丙二酰辅酶 A 合成的限速酶，而丙二酰辅酶 A 可促进脂肪酸合成<sup>[16]</sup>；CPT1 为线粒体脂肪酸  $\beta$  氧化的主要酶，ACC2 能抑制 CPT1 的表达。AMPK 能够磷酸化 ACC2 使其失活，进而促进了 CPT1 调节的脂肪酸  $\beta$  氧化，并减少脂质在外周组织的沉积<sup>[17]</sup>。BMWE 和 BMEE 对 HepG2-IR 细胞 AMPK、ACC2、CPT1 mRNA 表达水平的影响如图 5 所示。阴性组细胞的 AMPK mRNA 表达水平显著低于正常组 (0.87 vs. 1.0) ( $p < 0.05$ )，BMWE 和 BMEE 均能显著增加 AMPK mRNA 表达量 (分别为 1.10 和 1.48)，且 BMEE 效果更好。与正常组相比，阴性组 ACC2 mRNA 表达水平显著增加 (1.86 vs. 1.0) ( $p < 0.05$ )，BMWE 和 BMEE 能显著降低 ACC2 mRNA 表达水平 (分别为 1.20 和 0.99)。阴性组细胞 CPT1 mRNA 表达水平显著低于正常组 (0.68 vs. 1.0) ( $p < 0.05$ )，BMWE500 和 BMEE250 均能显著增加 CPT1 mRNA 表达水平 (分别为 0.82 和 1.40)。结果表明，BMWE 和 BMEE 均能调节 AMPK-ACC2-CPT1 通路，从而增加线粒体中脂肪酸氧化，减少脂质积累，改善 IR 细胞的糖脂代谢，且 BMEE 的效果更优。

## 3 结论

苦瓜水提物和醇提物均能显著增加 HepG2-IR 细胞的葡萄糖消耗量及糖原含量，并提高 IRS1、PI3K、AMPK 和 CPT1 mRNA 的表达水平，降低 ACC2 mRNA 的表达水平；同时苦瓜水提物可增加胞内 AKT mRNA 的表达水平，苦瓜醇提物能降低 HepG2-IR 细胞 TG 含量，增加 ATP 水平。因此 BMWE 主要通过激活胰岛素抵抗细胞的 IRS1-PI3K-AKT 信号通路促进细胞摄取葡萄糖及抑制糖异生，从而改善细胞胰岛素抵抗状态；而 BMEE 则主要通过调节 AMPK-ACC2-CPT1 信号通路促进线粒体的脂肪酸氧化、减少 TG 积累，改善胰岛素抵抗细胞的糖脂代谢，二者的作用途径有所不同。

## 参考文献

- [1] Eckel R H, Grundy S M, Zimmet P Z. The metabolic syndrome [J]. *The Lancet*, 2005, 365(9468): 1415-1428
- [2] Perry R J, Camporez J-P G, Kursawe R, et al. Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Cell*, 2015, 160(4): 745-758
- [3] Zang M, Zuccollo A, Hou X, et al. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(46): 47898-47905
- [4] Kovacs P, Stumvoll M. Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver [J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005, 19(4): 625-635
- [5] Jung T W, Lee K T, Lee M W, et al. SIRT1 attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in HepG2 cells via induction of oxygen-regulated protein 150 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 422(2): 229-232
- [6] 祝莹,董英,钱希文,等. 苦瓜冻干超微粉调节肥胖大鼠胰岛素抵抗及其作用机制研究[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(7): 5-13  
ZHU Ying, DONG Ying, QIAN Xi-wen, et al. Mechanism research of bitter melon lyophilized superfine grinding powder on insulin resistance in nutritional obese rats [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(7): 5-13
- [7] Bai J, Zhu Y, Dong Y. Response of gut microbiota and inflammatory status to bitter melon (*Momordica charantia* L.) in high fat diet induced obese rats [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 194: 717-726
- [8] Grover J, Yadav S. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: A review [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 93(1): 123-132
- [9] 徐斌,董英. 分光光度法测定苦瓜总皂甙含量[J]. *食品科学*, 2006,26(10):165-169  
XU Bin, DONG Ying. Determination on total saponins of *Momordica Charantia* L. by spectrophotometry [J]. *Food Science*, 2006, 26(10): 165-169
- [10] 张易,董英,祝莹,等. 苦瓜碱提多糖调节 HepG2 细胞胰岛素抵抗的途径[J]. *中国食品学报*, 2016,16(12):10-16  
ZHANG Yi, DONG Ying, ZHU Ying, et al. Regulation pathway of polysaccharides from *Momordica Charantia* L. to the insulin resistant of HepG2 Cell [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(12): 10-16
- [11] Roffey B W, Atwal A S, Johns T, et al. Water extracts from *Momordica charantia* increase glucose uptake and adiponectin secretion in 3T3-L1 adipose cells [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 112(1): 77-84
- [12] Tan M J, Ye J M, Turner N, et al. Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway [J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(3): 263-273
- [13] Popovich D G, Li L, Zhang W. Bitter melon (*Momordica charantia*) triterpenoid extract reduces preadipocyte viability, lipid accumulation and adiponectin expression in 3T3-L1 cells [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(6): 1619-1626
- [14] Cho J, Zhang Y, Park S Y, et al. Mitochondrial ATP transporter depletion protects mice against liver steatosis and insulin resistance [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14477
- [15] Wu W, Gan W, Tong M, et al. Over-expression of NYGGF4 (PID1) inhibits glucose transport in skeletal myotubes by blocking the IRS1/PI3K/AKT insulin pathway [J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2011, 102(3): 374-377
- [16] O'Neill H M, Lally J S, Galic S, et al. AMPK phosphorylation of ACC2 is required for skeletal muscle fatty acid oxidation and insulin sensitivity in mice [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(8): 1693-1702
- [17] Schreurs M, Kuipers F, Van Der Leij F. Regulatory enzymes of mitochondrial  $\beta$ -oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome [J]. *Obesity Reviews*, 2010, 11(5): 380-388