己糖激酶介导小豆蔻明改善血管平滑肌细胞糖代谢的作用 *

牛培广 [1] 张钰璇 [2] 史道华 [2△]

(1 福建医科大学福总临床医学院药学科 福建 福州 350108;2 南京军区福州总医院药学科 福建 福州 350025)

摘要 **目的:**探讨小豆蔻明对胰岛素抵抗状态(IR)血管平滑肌细胞(VSMCs)糖代谢的影响及其作用机制。**方法:**采用高糖(2.5×10^{-2} mol·L^{-1})高胰岛素(100 U·L^{-1})培养 VSMCs,72 h 后加入小豆蔻明培养 48 h,观察培养液中葡萄糖消耗量、细胞内己糖激酶活性以及细胞增殖。**结果:**高糖高胰岛素培养 72 h 后,血管平滑肌细胞糖消耗量降低(P<0.01);小豆蔻明能显著性增加 IR 细胞的平均糖消耗量(P<0.01),增强己糖激酶活性(P<0.01);同时明显抑制高糖高胰岛素引起的 VSMCs 增殖(P<0.01)。**结论:**小豆蔻明能增强己糖激酶活性,改善 IR 状态下细胞糖代谢;同时抑制高糖高胰岛素刺激引起的 VSMCs 异常增殖。

关键词:小豆蔻明;胰岛素抵抗;糖消耗;己糖激酶

中图分类号:R965,R977.15 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-653-04

Improvement Effects of Cardamonin on Glucose Metabolism of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Hexokinase*

NIU Pei-guang[1], ZHANG Yu-xuan[2], SHI Dao-hua[2△]

(1 Department of Pharmacy, Fuzhou Medical school of Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China;

2 Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of cardamonin on regulation of glucose metabolism on the vascular smooth muscle cells (VSMCs) and its possible mechanism in the insulin-resistant condition. Methods: VSMCs were cultured in high glucose (2.5×10^{-2} mol·L^{-1}) and high insulin (100 U·L^{-1}) medium for 72 hours, then cardamonin was added to incubate for 48 hours. Glucose consumption, hexokinase activity and proliferation of VSMCs were measured in the experiment. Results: Cultured with high glucose and high insulin for 72 hours, glucose consumption of VSMCs was significantly decreased (P<0.01). Cardamonin significantly increased the glucose consumption and hexokinase activity of VSMCs in IR statue (P<0.01) and inhibited the proliferation induced by high glucose and high insulin (P<0.01). Conclusion: The results suggested that cardamonin could improve the glucose metabolism and inhibit the proliferation of VSMCs in the IR condition, which might be related to enhancement of hexokinase activity.

Key words: Cardamonin; Insulin Resistance; Glucose Consumption; Hexokinase

Chinese Library Classification: R965, R977.15 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2011)04-653-04

前言

胰岛素抵抗 (Insulin Resistance,IR) 状态下机体组织、器官对胰岛素的敏感性降低,体内糖代谢紊乱,胰岛素和血糖水平相对升高。高糖可激活多种生长因子,引起血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)过度增生[1],而 VSMCs 异常增殖是动脉粥样硬化、高血压和血管再狭窄等多种血管疾病的共同的病理基础。因此,改善 IR,增加机体糖代谢可成为防治血管增殖性疾病的重要措施。

小豆蔻明(Cardamonin,CAR)为姜科山姜属植物草豆蔻种子中的主要黄酮类单体,在体内主要通过肝微粒体中 P450 同功酶 CYP1A2 和 CYP2E1 代谢[2]。研究显示,CAR 具有舒张血管的作用,其机制与增加一氧化氮(NO)生成、阻滞蛋白激酶 C(PKC)诱导的血管收缩有关[3];同时,CAR 还可通过阻断 Ca^{2+} 离子通道,激活 K+ 离子通道引起血管舒张[4]。郑炜[5]等证实 CAR 能抑制高糖高胰岛素引起的 VSMC 异常增殖,其作用机制与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路密切相关;另有研究表明 CAR 能通过抑制 mTOR 活性逆转高果糖诱导的 IR 大鼠血管增生性病变,同时改善整体动物 IR 状态,降低空腹血清胰岛素含量和胰岛素抵抗指数,增强胰岛素敏感指数[6]。CAR 是否通过改善 IR 状态时糖代谢,进而逆转其诱导的血管增殖性病变少见报道。本文主要考察 CAR 对 IR 状态下 VSMCs 增殖、糖消耗及己糖激酶活性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

RPMI-1640 干粉培养基,Gibco 公司;小牛血清,杭州江滨生物技术公司;胰岛素注射液,江苏万邦生化医药股份有限公

* 基金项目:福建省自然科学基金项目(2008J0103)

作者简介:牛培广(1983-),男,硕士研究生 研究方向:心血管药理学。电话:13645089298, E-mail:npg4031@163.com

△通讯作者:史道华,男,教授 研究方向:心血管药理学与临床药学, Tel:0591-22859416,

Fax:0591-83739964,E-mail:shidh@yeah.net

(收稿日期:2010-11-05 接受日期:2010-11-30)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

司(400 U:10 mL);葡萄糖,天津市科密欧化学试剂开发中心;盐酸吡格列酮(PIO),原料药,杭州中美华东制药有限公司(批号 030101);小豆蔻明(CAR),中国药品生物制品检定所(批号:110763-200302);四甲基偶氮唑盐,Sigma 公司;葡萄糖检测试剂盒,宁波美康生物科技有限公司;己糖激酶测试盒,南京建成生物工程研究所;其他常规试剂均为国产分析纯

1.2 主要仪器

MCO-20AIC 型二氧化碳培养箱,日本三洋公司;YJ-1450B 型医用净化工作台,苏州中亚净化设备有限公司;AFX-DX 型倒置显微镜,日本 Nikon 公司;酶联免疫检测仪(Moder 680):BIO-RAD 公司;TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司

1.3 血管平滑肌细胞的培养

采用组织贴块法培养人脐动脉 VSMCs。分离人脐动脉,用 D-Hank's 液清洗干净,剥除脐动脉外膜,纵向剪开血管,刮除血管内膜。将动脉中膜切成 1-2 mm^2 的小块,均匀贴于 25 cm^2 的培养瓶内,用含 20 %胎牛血清的 1640 培养基,37 ℃、5 % CO_2 的培养箱中培养。待细胞长满瓶底后,用含 10 %小牛血清 RPMI-1640 培养基按 1:3 传代培养,每 3 d 换液一次。每 7 d 传代一次。4-10 代细胞用于实验。

1.4 胰岛素抵抗模型的建立

采用高糖高胰岛素培养基(在正常培养基中分别葡萄糖和胰岛素至终浓度为 2.5×10^{-2} mol·L^{-1} 和 100 U·L^{-1} Ins)诱导培养法复制胰岛素抵抗模型。VSMCs 以 1×10^{4}/ 孔密度接种于 96 孔板中,每孔 200 μ L。细胞贴壁后同步化培养过夜,用不含小牛血清的 1640 培养液洗涤两次。加入高糖高胰岛素的培养液于 37 ℃、5 % CO_2,培养箱中培养 72 h。分别于 24、48、72、96 h 测定培养基中葡萄糖的消耗量。

1.5 实验分组

普通培养基培养和 IR 培养细胞分别设立细胞对照组、溶剂对照组(0.1 % DMSO),阳性对照吡咯列酮组(10^{-5} mol·L^{-1})及试药 CAR 组(10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol·L^{-1})。

1.6 四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定细胞增殖

弃 96 孔板中培养基,每孔加入 MTT 混合溶液(MTT 浓度为 5 g·L^{-1},与培养基 1:9 混合) 200 μ L,37 ℃继续培养 4 h;弃去孔内上清液,每孔加入 150 μ L DMSO 震荡 15 min;以不含细胞的培养基空白孔调零,490 nm 波长,酶联免疫检测仪测定各孔吸光度。

1.7 葡萄糖消耗测定

取对数生长期细胞接种于 96 孔板中,按上述方法复制 IR 模型。更换新的高糖高胰岛素培养基并分别加入吡格列酮、小豆蔻明,设立正常对照组。孵育 48 h 后吸出培养液,用己糖激酶法检测培养液中的葡萄糖含量。以未接种细胞的空白复孔葡萄糖含量均值为基础值,计算各孔细胞葡萄糖消耗量。采用培养基中糖消耗量(glucose consumption,GC)与 MTT 的比值(GC/MTT)表示细胞的平均糖消耗水平,排除细胞数目的影响。

1.8 己糖激酶活性测定

采用葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶偶联比色法。取对数生长期 VSMCs 接种于 6 孔板中,细胞密度为 2×10^{5} 个 / 孔,按上述方法复制 IR 模型。更换新的高糖高胰岛素培养基并分别加入吡格列酮、小豆蔻明,设立正常对照组。培养 48 h 后,弃上清,预冷的 PBS 洗涤细胞,加入 250 μ L 匀浆缓冲液,用细胞刮将细胞刮下,吹打细胞使其完全分散,将缓冲液转移至微量离心管中,在冰上匀浆破碎,12000 rpm,4 ℃离心 15 min,取上清液按试剂盒说明书检测己糖激酶活性。考马斯亮兰法测定蛋白含量。

1.9 统计分析

成组数据用均数 ± 标准差($\bar{X}\pm$ S)表示,统计学软件使用 SPSS16.0,多组间比较采用单因素方差分析,两样本均数比较采用 Student's t 检验,界定 P<0.05 为差异有统计学意义。

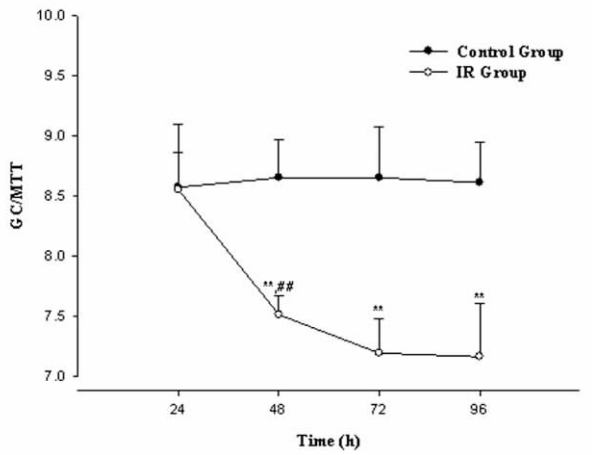
2 结果

2.1 IR 血管平滑肌细胞糖消耗变化

普通培养基培养 VSMCs 过程中正常对照组细胞每日葡萄糖平均消耗量无显著性改变;与正常组相比,48 h 后高糖高胰岛素培养的 VSMCs 葡萄糖平均消耗量明显降低(P<0.01);培养 72 h 后,糖消耗量降低最明显,96 h 葡萄糖平均消耗量降低与 72 h 时无显著差异(图 1)。

图 1 高糖高胰岛素培养对 VSMCs 糖消耗量 /MTT(GC/MTT)的影响

Fig 1 Effect of high glucose and high insulin medium on glucose consumption/MTT(GC/MTT) of VSMCs



Note: IR stands for insulin resistance; **P<0.01 Compared with Control Group; ##P<0.01 Compared with 24h cultured with high glucose and high insulin of IR Group.

2.2 小豆蔻明对 IR 血管平滑肌细胞糖消耗影响

DMSO 溶剂对正常和 IR 培养的 VSMCs 糖消耗及增殖均无明显影响。CAR 明显抑制胰岛素抵抗状态下 VSMCs 增殖,其中高剂量组(10^{-5} mol·L^{-1})作用最明显(P<0.01);同时 CAR 能明显增加 IR 细胞的葡萄糖均消耗量(P<0.01),但各剂量组间无显著性差异,均比吡格列酮(10^{-5} mol.L^{-1})作用弱(表 1)。

2.3 小豆蔻明对 IR 血管平滑肌细胞己糖激酶活性影响

IR 培养状态下,VSMCs 己糖激酶活性显著性降低(P<0.01);DMSO 溶剂对正常培养和 IR 培养细胞己糖激酶活性无影响。CAR 能增强 IR 细胞己糖激酶活性(P<0.01),其中高剂量作用更加明显,且强于吡格列酮(10^{-5} mol.L^{-1})(表 2)。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 小豆蔻明对 IR 血管平滑肌细胞糖消耗的影响 ($\bar{X}\pm$ S, n=6)

Tab 1 Effect of cardamonin on glucose consumption of insulin-resistant VSMCs

Groups	Glucose	Consumption GC(mmol·L^{-1})	MTT GC/MTT
Control Group	4.61± 0.34	0.533± 0.033	8.61± 0.31
Solvent Group	4.63± 0.32	0.570± 0.034	8.37± 0.23
IR Group	4.68± 0.29	0.654± 0.015**	7.07± 0.14**
IR Solvent Group	4.70± 0.17	0.662± 0.028**	7.13± 0.17**
IR+PIO (10^{-5} mol.L^{-1})	5.19± 0.24	0.549± 0.031##	9.41± 0.56##
IR+CAR(10^{-7} mol.L^{-1})	4.97± 0.12	0.588± 0.021#	8.46± 0.31##
IR+CAR(10^{-6} mol.L^{-1})	4.96± 0.46	0.569± 0.013##	8.72± 0.47##
IR+CAR(10^{-5} mol.L^{-1})	4.01± 0.29	0.443± 0.027##	8.90± 0.71##

Note: **P<0.01 Compared with Control Group; #P<0.05, ##P<0.01 Compared with IR Group.

表 2 小豆蔻明对 IR 血管平滑肌细胞己糖激酶活性的影响 ($\bar{X}\pm$ S, n=6)

Tab 2 Effect of cardamonin on hexokinase activity of insulin-resistant VSMCs

Groups	Hexokinase Activity(U/g pro)
Control Group	7.42± 0.26
Solvent Group	7.33± 0.29
IR Group	5.67± 0.15**
IR Solvent Group	5.46± 0.22**
IR+PIO (10^{-5} mol.L^{-1})	7.34± 0.35##
IR+CAR(10^{-7} mol.L^{-1})	7.00± 0.24##
IR+CAR(10^{-6} mol.L^{-1})	7.66± 0.31##
IR+CAR(10^{-5} mol.L^{-1})	8.63± 0.19##

Note: **P<0.01 Compared with Control Group; ##P<0.01 Compared with IR Group.

3 讨论

在细胞水平上对 IR 的研究中常需要使用 IR 细胞模型[7]。肝脏细胞和平滑肌细胞内可进行多种与糖代谢有关的生化反应,包括葡萄糖摄取、葡萄糖有氧氧化及糖原合成等;同时肌肉和肝脏是机体产生 IR 的主要部位[8]。因此,平滑肌和肝脏细胞是研究 IR 的理想细胞。目前,已建立的 IR 细胞模型包括 3T3-L1 脂肪细胞[9]、HepG2 肝癌细胞[7]以及 L6 成肌细胞[10],这些细胞模型多采用高胰岛素诱导培养、高葡萄糖培养、游离脂肪酸诱导以及肿瘤坏死因子(TNF-α)刺激等方法。Begum[11]等采用高糖高胰岛素培养的方法建立了血管平滑肌细胞的 IR 模型。IR 状态下,组织细胞对生理浓度的胰岛素的反应性不敏感,胰岛素信号通路受阻,胰岛素不能发挥正常的生理作用,最终导致糖代谢平衡受损,引起糖吸收、糖酵解、糖原合成降低。本研究采用高糖高胰岛素培养的方法诱导建立 VSMCs 胰岛素抵抗模型,并检测葡萄糖的消耗量。结果证实高糖高胰岛素培养 48 h 后,VSMCs 糖消耗量显著性降低,糖代谢受到抑制;培养 72 h 后糖消耗量降低最明显。由于糖尿病发病时伴有多种心血管疾病,而血管平滑肌细胞的病变在这些疾病的发生发展中起重要作用,因此 VSMCs 胰岛素抵抗模型对糖尿病引发的血管病变的研究具有重要价值。

血糖升高是引起各种糖尿病血管并发症的主要原因。高糖刺激 VSMCs 由收缩型向合成型转变,有丝分裂增强,血管基质增加,VSMCs 过度增殖和迁移[12];机体内多种蛋白质在高血糖状态下非酶氧化生成糖基化终末产物(AGEs)可损害血管平滑肌细胞外基质和细胞功能[13],最终导致血管病变。高糖高胰岛素培养可引起 VSMCs 异常增殖[14]。另有研究证实,PPAR-γ 激动剂吡格列酮能抑制高糖高胰岛素刺激引起的 VSMCs 过度增殖,其作用机制与增强一氧化氮合酶活性有关[15]。本实验的结果表明,高糖高胰岛素模拟胰岛素抵抗的机体内环境可引起 VSMCs 异常增殖,同时糖消耗量明显降低。吡格列酮和 CAR 均能显著性抑制 VSMCs 增殖,增加细胞的糖消耗量。因此,推测 CAR 能改善胰岛素抵抗 VSMCs 糖代谢,降低糖含量,进而逆转高糖诱导的血管异常增殖。

糖酵解是糖代谢的核心途径,此过程需要多种代谢酶的参与,其中存在三个关键的限速酶:己糖激酶、6- 磷酸果糖激酶 -1 和丙酮酸激酶。己糖激酶为第一个限速酶,在糖酵解的起始过程中极为重要。研究表明,在 IR 状态下,胰岛素受体底物 -1

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

（IRS-1）酪氨酸磷酸化降低可引起己糖激酶 mRNA 表达和活性降低[16]。本实验结果显示，CAR 剂量依赖性增强己糖激酶活性，并且高剂量组（10^{-5} mol.L^{-1}）作用强于吡格列酮。mTOR 是胰岛素信号通路中的重要分子，研究表明其高度活化是 IR 产生的重要原因[17]，靶向抑制 mTOR 可增强 IRS-1 酪氨酸磷酸化，改善糖代谢酶活性[18]。郑炜[5]、Liao[6]等的研究表明 CAR 的作用机制可能与抑制 mTOR 密切相关，进一步证实 CAR 可调节糖代谢酶的活性。而吡格列酮主要通过激活 PPAR-γ 增强机体对胰岛素的敏感性，对代谢酶的作用较弱。

本研究证实 CAR 能增强己糖激酶活性，改善胰岛素抵抗状态 VSMCs 糖代谢；同时抑制高糖高胰岛素刺激引起的 VSMCs 异常增殖。因此，CAR 在治疗糖尿病及其血管并发症方面具有广阔的应用前景，可望成为新型药物研究的方向，进一步探讨其作用机制具有重要意义。

参 考 文 献（References）

[1] Schulman IH, Zhou MS. Vascular insulin resistance: a potential link between cardiovascular and metabolic diseases [J]. Curr Hypertens Rep, 2009,11(1):48-55

[2] He YQ, Yang L, Liu Y, et al. Characterization of cardamonin metabolism by P450 in different species via HPLC-ESI-ion trap and UPLC-ESI-quadrupole mass spectrometry [J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30 (10):1462-1470

[3] Wang ZT, Lau CW, Chan FL, et al. Vasorelaxant effects of cardamonin and alpinetin from Alpinia henryi K. Schum [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2001,37(5):596-606

[4] Fusi F, Cavalli M, Mulholland D, et al. Cardamonin is a bifunctional vasodilator that inhibits Ca (v)1.2 current and stimulates K(Ca)1.1 current in rat tail artery myocytes [J]. J Pharmacol Exp Ther,2010, 332(2):531-540

[5] 郑炜, 史道华, 纪相福, et al. 小豆蔻明对人脐动脉平滑肌细胞增殖的影响及机制研究 [J]. 中国中药杂志,2010,35(17):2318-2323
Zheng Wei, Shi Dao-hua, Ji Xiang-fu, et al. Antiproliferation of cardamonin associated with mRNA expression of mTOR, Raptor and Rictor [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2010, 35(17): 2318-2323

[6] Liao Q, Shi DH, Zheng W, et al. Antiproliferation of cardamonin is involved in mTOR on aortic smooth muscle cells in high fructose-induced insulin resistance rats [J]. Eur J Pharmacol, 2010,641(2-3): 179-186

[7] Lee JY, Cho HK, Kwon YH. Palmitate induces insulin resistance without significant intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells [J]. Metabolism, 2010,59(7):927-934

[8] Bastard JP, Faraj M, Karelis AD, et al. Muscle and liver insulin resistance indexes derived from the oral glucose tolerance test: response to Abdul-Ghani [J]. Diabetes Care, 2007, 30(7):e83

[9] Adochio R, Leitner JW, Hedlund R, et al. Rescuing 3T3-L1 adipocytes from insulin resistance induced by stimulation of Akt-mammalian target of rapamycin/p70 S6 kinase (S6K1) pathway and serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: effect of reduced expression of p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and S6K1 kinase [J]. Endocrinology, 2009, 150(3):1165-1173

[10] Chen Y, Li Y, Wang Y, et al. Berberine improves free-fatty-acid-induced insulin resistance in L6 myotubes through inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma and fatty acid transferase expressions [J]. Metabolism, 2009,58(12):1694-1702

[11] Begum N, Ragolia L. High glucose and insulin inhibit VSMC MKP-1 expression by blocking iNOS via p38 MAPK activation [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000,278(1):C81-91

[12] Huang CN, Chan KC, Lin WT, et al. Hibiscus sabdariffa inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration induced by high glucose--a mechanism involves connective tissue growth factor signals [J]. J Agric Food Chem, 2009,57(8):3073-3079

[13] Orasanu G, Plutzky J. The pathologic continuum of diabetic vascular disease [J]. J Am Coll Cardiol, 2009,53(5 Suppl):S35-42

[14] Cifarelli V, Luppi P, Tse HM, et al. Human proinsulin C-peptide reduces high glucose-induced proliferation and NF-kappaB activation in vascular smooth muscle cells [J]. Atherosclerosis, 2008, 201(2): 248-257

[15] 陈鹭颖, 徐江平, 庞建新, et al. 一氧化氮部分介导吡格列酮抑制培养兔胸主动脉平滑肌细胞增殖 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005,10(6):642-645
Chen Lu-ying, Xu Jiang-ping, Pang Jian-xin, et al. Antiproliferative effects of pioglitazone involved of nitric oxide on cultured rabbit aortic smooth muscle cells [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2005,10(6):642-645

[16] Maiztegui B, Borelli MI, Raschia MA, et al. Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: beta-cell mass, glucokinase, glucose metabolism, and insulin secretion [J]. J Endocrinol, 2009, 200 (2):139-149

[17] Wang X, Yu W, Nawaz A, et al. Palmitate Induced Insulin Resistance by PKCtheta-Dependent Activation of mTOR/S6K Pathway in C2C12 Myotubes [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2010,118(9):657-661

[18] O'Reilly KE, Rojo F, She QB, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt [J]. Cancer Res, 2006,66(3):1500-1508

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net