

小檗碱对肝细胞核因子6 mRNA表达及葡萄糖激酶活性的影响

闫忠卿, 冷三华, 陆付耳, 陆小红, 董慧, 高志强

背景资料
肝细胞核因子家族成员变异在糖代谢中的重要调节作用及其变异参与糖尿病发病过程的重要性引起了高度关注。

闫忠卿, 冷三华, 陆付耳, 董慧, 高志强, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所 湖北省武汉市430030
陆小红, 湖北天茂集团制剂厂 湖北省荆门市 448000
国家自然科学基金资助项目, No. 30500685
通讯作者: 陆付耳, 430030, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所. felu@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83663237 传真: 027-83663237
收稿日期: 2007-08-31 修回日期: 2007-12-13

Effects of berberine on expression of hepatocyte nuclear factor 6 and glucokinase activity in mouse primary hepatocytes

Zhong-Qing Yan, San-Hua Leng, Fu-Er Lu, Xiao-Hong Lu, Hui Dong, Zhi-Qiang Gao

Zhong-Qing Yan, San-Hua Leng, Fu-Er Lu, Hui Dong, Zhi-Qiang Gao, Institute of Integrative Traditional and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Xiao-Hong Lu, Hubei Biocause Pharmaceutical Co., Ltd, Jingmen 448000, Hubei Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500685

Correspondence to: Fu-Er Lu, Institute of Integrative Traditional and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. felu@tjh.tjmu.edu.cn
Received: 2007-08-31 Revised: 2007-12-13

Abstract

AIM: To observe the expression of hepatocyte nuclear factor 6 (HNF6) and the activity of glucokinase (GK), the key enzyme in glucose metabolism, and to investigate the possible mechanism of berberine in treating type II diabetes.

METHODS: Mouse primary hepatocytes were isolated by an improved single two-step perfusion method. The murine hepatocytes were incubated with berberine (0, 1, 3, 10, 30 and 100 $\mu\text{mol/L}$) and 1 mmol/L metformin for 24 hours. mRNA expression for HNF6 was determined by

RT-PCR and analyzed by consequent quantification, and the activity of GK was detected by an enzyme kinetics method.

RESULTS: Compared with the negative control group, 1, 3, 10 or 30 $\mu\text{mol/L}$ berberine promoted the expression of HNF6 mRNA (1.00 ± 0.21 , 1.11 ± 0.06 , 1.37 ± 0.10 or 1.40 ± 0.09 vs 0.68 ± 0.02 ; $P < 0.01$). At 10 or 30 $\mu\text{mol/L}$, berberine up-regulated GK activity (0.069 ± 0.082 , 0.080 ± 0.073 vs 0.009 ± 0.007 ; $P < 0.05$). Both of these reached a maximum at a concentration of 30 $\mu\text{mol/L}$. At 100 $\mu\text{mol/L}$ berberine, expression of HNF6 mRNA and activity of GK decreased, probably because high-concentration berberine inhibited the growth of primary hepatocytes.

CONCLUSION: It is suggested the effects of berberine in improving glucose metabolism may be associated with its up-regulation of HNF6 mRNA expression and induction of hepatic GK activity.

Key Words: Berberine; Hepatocyte Nuclear Factors; Primary Hepatocytes; Glucokinase; Reverse transcription polymerase chain reaction

Yan ZQ, Leng SH, Lu FE, Lu XH, Dong H, Gao ZQ. Effects of berberine on expression of hepatocyte nuclear factor 6 and glucokinase activity in mouse primary hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3842-3846

摘要

目的: 观察小檗碱对小鼠原代肝细胞核因子6(HNF6) mRNA表达及葡萄糖代谢关键酶葡萄糖激酶(GK)活性的影响, 探讨小檗碱治疗2型糖尿病的分子机制。

方法: 采用改良两步灌流法培养原代肝细胞, 用不同浓度的小檗碱(0, 1, 3, 10, 30, 100 $\mu\text{mol/L}$)和1 mmol/L二甲双胍干预24 h后, 采用MTT比色法观察小檗碱对原代肝细胞增殖的影响; 采用RT-PCR方法检测HNF6 mRNA表达, 同时检测GK的活性。

结果: 与阴性对照组相比, 1, 3, 10, 30 $\mu\text{mol/L}$

的小檗碱均能促进HNF6 mRNA的表达(1.00 ± 0.21 , 1.11 ± 0.06 , 1.37 ± 0.10 , 1.40 ± 0.09 vs 0.68 ± 0.02 ; $P < 0.01$); 当小檗碱为10, 30 $\mu\text{mol/L}$ 时, 均可上调GK的活性(0.069 ± 0.082 , 0.080 ± 0.073 vs 0.009 ± 0.007 ; $P < 0.05$); 二者均在30 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大值. 小檗碱为100 $\mu\text{mol/L}$ 时HNF6 mRNA的表达、GK的活性与阴性对照组无差异, 可能与其抑制肝细胞生长有关.

结论: 小檗碱改善糖代谢的作用可能与其调节HNF6的表达进而调节GK活性有关.

关键词: 小檗碱; 肝细胞核因子; 原代肝细胞; 葡萄糖激酶; 逆转录聚合酶链反应

闫忠卿, 冷三华, 陆付耳, 陆小红, 董慧, 高志强. 小檗碱对肝细胞核因子6 mRNA表达及葡萄糖激酶活性的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3842-3846
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3842.asp

0 引言

人们在研究鉴定调节肝脏基因表达的时候发现了肝细胞核因子家族成员(hepatocyte nuclear factors, HNFs), 进而发现HNFs变异可引起三种年轻的成人发病型糖尿病(MODY1、MODY3和MODY5)^[1]; 因而HNFs在糖代谢中的重要调节作用及其变异参与糖尿病发病过程的重要性引起了高度关注. HNFs作为调控糖和脂肪多层代谢过程的上游信号分子族, 可引起机体糖和脂质代谢紊乱, 导致II型糖尿病^[2-4], HNF6就是其中之一. 小檗碱是中药黄连的主要成分, 具有广泛的生物化学和药理学作用. 近年来有多项研究表明小檗碱能够促进肝细胞摄取葡萄糖和调节脂质代谢^[5-6]. 本实验从小檗碱与HNF6及GK的关系方面了解其内在联系, 探讨其治疗糖尿病的机制.

1 材料和方法

1.1材料 实验动物: 6-8 wk SPF级昆明种小鼠购自华中科技大学同济医学院实验动物学部. 小檗碱、IV型胶原酶、胰岛素、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G-6-PDH)均购自Sigma公司; 二甲双胍由武汉合中化工制造厂馈赠; 地塞米松购自武汉滨湖双鹤药业; 促肝细胞生长因子购自吉林省辉南辉发制药公司; RPMI 1640培养基、胎牛血清购自Gibco公司、二甲基亚砷(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、5'-三磷酸腺苷二钠(ATPNa₂)均购自Amresco公司; RT-PCR试剂均为TOYOBO公司产品. ELX800全自动酶标测试仪, OLYMPUS倒置

显微镜, 高精密度电子分析天平, Sigma低温高速离心机, 美国进口水套式CO₂培养箱, Eppendorf梯度PCR仪, 山东高密彩虹分析仪器有限公司半自动生化分析仪.

1.2 方法

1.2.1 原代肝细胞分离和培养: 按照Seglen法^[7]并略加调整. 昆明小鼠腹腔麻醉, 酒精消毒体表, 断头放血后打开腹腔, 使其充分暴露肝脏, 剥离下腔静脉、门静脉, 从下腔静脉匀速灌流预温至37℃的无钙灌流液(NaCl 8.3 g/L, KCl 0.5 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 0.2513 g/L, EDTA 0.186 g/L, HEPES 2.4 g/L, pH7.4)30 mL; 待其流出液体澄清后, 用止血钳结扎门静脉改作灌流预温至37℃的0.5 g/L IV型胶原酶灌流液(IV型胶原酶0.5 g/L, NaCl 3.9 g/L, KCl 0.5 g/L, CaCl₂ 0.7 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 0.2513 g/L, HEPES 2.4 g/L, pH7.5)20 mL, 待肝脏表面出现龟背裂纹后停止灌流; 取下肝脏用RPMI 1640(不含血清)培养基终止消化, 用镊子钝性分离肝细胞, 得到的肝细胞混悬液用200目尼龙网滤去不能消化的肝包膜和纤维组织, 500 r/min离心3次, 得到纯度大于90%、活力大于90%的肝细胞. 肝细胞培养液(RPMI 1640培养基, 胎牛血清100 mL/L, 促肝细胞生长因子0.02 g/L, 地塞米松0.005 g/L, 胰岛素0.005 g/L, pH7.4)培养3 d后用于实验.

1.2.2 MTT实验: 将原代肝细胞接种在96孔板中, 加入不同浓度的小檗碱(0, 1, 3, 10, 30, 100 $\mu\text{mol/L}$), 1 mmol/L二甲双胍干预, 各组DMSO含量均为0.2%, 且均是无血清培养, 每组各5个复孔. 培养24 h后, 加入0.5%的MTT溶液10 μL . 继续培养4 h, 弃去培养液, 加入100 μL 的DMSO, 充分振荡混匀后, 置于酶标仪上检测490 nm吸光度值.

1.2.3 RT-PCR检测小鼠原代肝细胞、HNF6 mRNA表达: 药物干预细胞24 h后提取RNA, 提取按照说明书操作, 用核酸分析仪检测RNA的浓度和纯度, 取 A_{260}/A_{280} 比值在1.8-2.0的RNA进行实验. 引物自行设计并由上海生工生物工程公司合成, 引物设计见表1. 取2 μg 的RNA逆转录合成cDNA单链进行PCR扩增, 扩增条件为: 94℃预变性5 min; HNF6: 94℃变性1 min, 退火58℃ 1 min, 72℃延伸1 min; β -actin: 94℃变性50 s, 退火54℃ 50 s, 72℃延伸50 s; 扩增的循环数分别为29、34个循环; 最后72℃ 10 min. 扩增产物经16 g/L琼脂糖凝胶电泳, 于凝胶成像分析仪上进行光密度扫描. 进行电泳条带分析. 以目的条

研发前沿
HNFs作为调控糖和脂肪多层代谢过程的上游信号分子族, 可引起机体糖和脂质代谢紊乱, 导致2型糖尿病, HNF6就是其中之一, 本实验从小檗碱与HNF6及GK的关系方面了解其内在联系, 探讨其治疗糖尿病的机制.

相关报道
近年在权威期刊《Science》发表的关于肝细胞核因子家族异常表达和2型糖尿病发生密切相关的论文,揭示HNFs作为调控糖和脂肪多层代谢过程的上游信号分子族,可引起机体糖和脂质代谢紊乱,导致2型糖尿病。

表 1 PCR引物序列和产物长度

引物名称	引物序列	产物长度(bp)
HNF6	上游 5'CAAATGGCAGGACGAGG3'	434
	下游 5'GTGGTGAACAGATAAGAACG3'	
β-actin	上游 5'TGCCCATCTATGAGGGTTAC3'	579
	下游 5'GGAAGGTGGACAGTGAGGC3'	

带比β-actin的相对积分吸光度值表示结果。

1.2.4 酶活性测定: GK活性用酶法分析的方法检测^[8], 主要步骤如下, 原代肝细胞接种在6孔板中, 待加入不同浓度的药物培养24 h后, 弃去培养液, D-Hanks漂洗3遍后, 用PBS清洗细胞单层3次, 用含K₂HPO₄(20 mmol/L)、EDTA(1 mmol/L)、MgCl₂(110 mmol/L)以及DTT(5 mmol/L)的预冷缓冲液收集细胞并超声破碎处理, 将处理后液体在4℃以12 000 *g*离心15 min, 收集上清。酶活性检测反应液包括高糖(100 mmol/L)和低糖(0.5 mmol/L)两组, 其组成为: HEPES(50 mmol/L, pH7.4), KCl(100 mmol/L), MgCl₂(7.4 mmol/L), NAD(0.5 mmol/L), 0.05% BSA, G6PDH(3 mg/L), ATP(5 mmol/L), β-mercatoethanol(15 mmol/L)及上述不同浓度葡萄糖。将含GK的上清10 μL加到200 μL反应液中, 并于30℃温育1 h, 加入2 mL NaHCO₃(500 mmol/L, pH9.4)来终止反应。在347 nm发射光、448 nm激发光下测定吸光度 A 。每个测量中, 以无ATP的0.5和100 mmol/L葡萄糖时的值作为空白管。GK活性用100 mmol/L葡萄糖浓度时的活性减去0.5 mmol/L葡萄糖浓度时的活性。蛋白浓度用考马斯亮蓝试剂盒测定。用以下公式计算GK的活性: (高糖 A -低糖 A)/(蛋白质量×时间)。

统计学处理 所有数据均采用SPSS13.0软件mean±SD进行分析, 用单因素方差分析进行统计。

2 结果

2.1 分离得到的肝细胞 从小鼠得到的原代肝细胞大多为圆形或类圆形, 少数为不规则形状, 胞质丰富, 其中可见大量颗粒状内容物(图1A)。HE染色可见较多单核、双核细胞及少数三核细胞(图1B)。

2.2 小檗碱对原代肝细胞活力的影响 MTT结果显示随着小檗碱浓度的增加, 存活率逐渐有所下降, 表明其对原代肝细胞的抑制作用增强(表2)。

2.3 小檗碱对原代肝细胞HNF6 mRNA表达的影响 1, 3, 10, 30, 100分别表示小檗碱浓度为1, 3,

表 2 不同浓度小檗碱干预原代肝细胞24 h后存活率比较($n=6$)

小檗碱(mol/L)	A_{490}	存活率(%)
0	1.984 ± 0.114	100.00
1	2.023 ± 0.150	102.02
3	1.671 ± 0.334 ^a	84.39
10	1.628 ± 0.270 ^a	82.24
30	1.530 ± 0.248 ^b	77.37
100	1.505 ± 0.115 ^b	76.01

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 阴性组(0 mol/L)。

10, 30, 100 mol/L; 二甲表示二甲双胍的浓度为1 mmol/L, 与阴性对照组(0 μmol/L)相比, 小檗碱在1, 3, 10, 30 μmol/L时和二甲双胍均能促进HNF6 mRNA的表达($P<0.01$), 以30 μmol/L时表达最多(图2)。

2.4 小檗碱对GK活性的影响 0, 1, 3, 10, 30, 100分别表示小檗碱浓度为0, 1, 3, 10, 30, 100 μmol/L, 二甲表示二甲双胍的浓度为1 mmol/L, 由图3可知, 与阴性组(0 μmol/L)比较, 小檗碱能够上调GK活性的表达, 但只有当其浓度为10 μmol/L, 30 μmol/L时其活性才明显增强($P<0.05$, 图3), 以30 μmol/L时最高。

3 讨论

小檗碱又名黄连素, 是中药黄连的主要成分, 长期以来在临床中广泛用于治疗消化性溃疡及腹泻^[9-11], 本实验室前期研究发现小檗碱能够促进胰岛β-细胞分泌胰岛素^[12], 并证实小檗碱有降糖和调脂的作用, 其他同行也证实小檗碱可以促进肝细胞摄取葡萄糖和调节脂质代谢^[5-6]。小檗碱用于糖尿病的治疗越来越受到重视。

HNF6在肝脏、胰腺、大脑、脾脏及肠道中均有表达, 他与肝脏内至少227个基因结合, 并可参与肝脏葡萄糖代谢中多种酶的调节。GK是一种已糖激酶, 是葡萄糖代谢的关键酶之一, 其特异性存在于成熟肝细胞和胰岛细胞中。GK活性增强, 促进肝脏葡萄糖磷酸化, 使肝糖原合成能力增加, 抑制肝糖原异生, 从而维持血糖稳定。GK是HNF6下游直接或间接效应因子, 还有人认为HNF6可控制GK基因的表达^[13]。

本实验中观察到, 不同浓度的小檗碱作用于原代肝细胞, 引起HNF6 mRNA及GK活性发生不同的变化, 但总体趋势一致, 即在一定浓度范围内随着小檗碱浓度的增大, HNF6 mRNA的表达增加, GK活性增强, 当小檗碱浓度较高

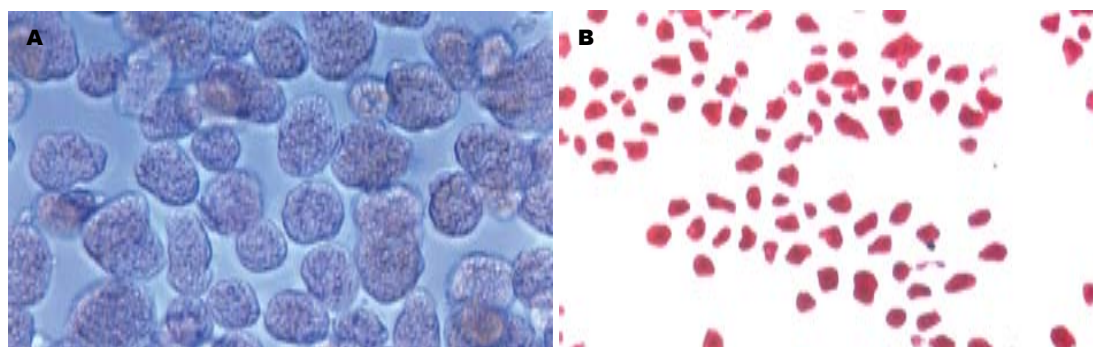


图 1 原代肝细胞. A: 分离纯化的原代肝细胞($\times 400$); B: 原代肝细胞HE染色($\times 100$).

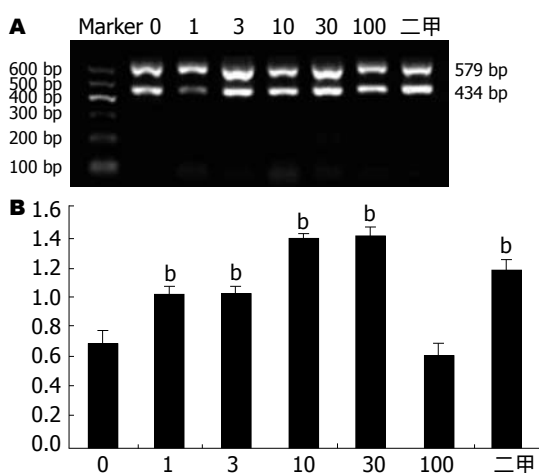


图 2 不同浓度小檗碱HNF6 mRNA表达. A: 各组HNF6 mRNA RT-PCR电泳图; B: 各组对HNF6 mRNA表达的影响($n=6$, ^b $P<0.01$).

(100 $\mu\text{mol/L}$)时, HNF6 mRNA的表达与GK的活性反而下降, 这可以提示我们肝细胞核因子的表达、GK的活性与小檗碱呈一定的剂量依赖关系, 即在较低浓度范围内随着小檗碱浓度的增大肝细胞核因子的表达、GK的活性呈上升趋势, 当小檗碱浓度继续增大到某一水平肝细胞核因子的表达、GK的活性反而下降, 这可能与其高浓度抑制原代肝细胞的生长有关. 我们还发现, 与阴性对照组相比, HNF6 mRNA的表达在小檗碱浓度为1, 3, 10, 30 $\mu\text{mol/L}$ 时均显著增加($P<0.01$), GK的活性在小檗碱浓度为10, 30 $\mu\text{mol/L}$ 时才显著增加($P<0.05$), 二者均在30 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大值, 也就是说只有当小檗碱浓度达到一定程度时才使HNF6 mRNA表达、GK的活性均明显增加. 小檗碱浓度发生变化引起HNF6 mRNA表达、GK的活性发生变化; 而GK又是HNF6的直接或间接效应因子, 从实验中也发现GK的活性与HNF6 mRNA表达变化趋势基本一致; 两者合二为一小檗碱可能先作用于HNF6, 通过HNF6的变化来调节其下游的肝细

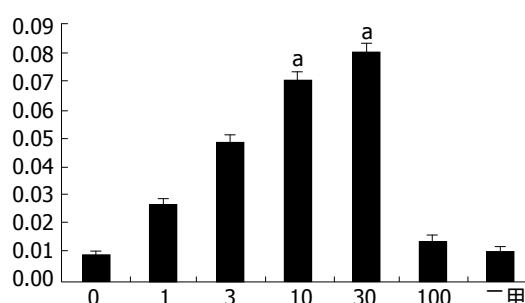


图 3 不同浓度小檗碱对GK活性的影响. ^a $P<0.05$

胞代谢关键酶GK的活性, 从而达到调节糖代谢的作用. 但是由于他们之间相互作用, 机制十分复杂, 我们还不能确定他们之间是否存在直接因果关系, 其机制有待进一步研究. 另外本实验也观察到二甲双胍虽然也使HNF6 mRNA有一定程度增加, 但并未引起GK活性的增强, 这可能与使其HNF6 mRNA表达量未达到一定程度有关.

总之, 小檗碱能够调节HNF6的表达, 进而调节肝脏葡萄糖激酶的活性, 从而发挥其治疗糖尿病的作用, 因此HNF6可能是小檗碱治疗糖尿病的关键靶点之一. 但是小檗碱如何调控HNF6和糖脂代谢相关激酶的表达以及这些他们之间的相互作用关系有待进一步探讨.

4 参考文献

- 1 Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* 2001; 345: 971-980
- 2 Kulkarni RN, Kahn CR. Molecular biology. HNFs-linking the liver and pancreatic islets in diabetes. *Science* 2004; 303: 1311-1312
- 3 Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI, Young RA. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 2004; 303: 1378-1381
- 4 Duncan SA, Navas MA, Dufort D, Rossant J, Stoffel M. Regulation of a transcription factor network

应用要点
小檗碱分子机制的研究有助于提高其临床应用的合理性, 为进一步筛选和研发具有降糖调脂作用且具我国特色的小檗碱类衍生物提供依据.

同行评价
本文选题新颖, 设计合理, 层次清楚, 有较好的参考价值.

- required for differentiation and metabolism. *Science* 1998; 281: 692-695
- 5 Yin J, Hu R, Chen M, Tang J, Li F, Yang Y, Chen J. Effects of berberine on glucose metabolism in vitro. *Metabolism* 2002; 51: 1439-1443
- 6 Kong W, Wei J, Abidi P, Lin M, Inaba S, Li C, Wang Y, Wang Z, Si S, Pan H, Wang S, Wu J, Wang Y, Li Z, Liu J, Jiang JD. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat Med* 2004; 10: 1344-1351
- 7 Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976; 13: 29-83
- 8 Aalinkeel R, Srinivasan M, Kalhan SC, Laychock SG, Patel MS. A dietary intervention (high carbohydrate) during the neonatal period causes islet dysfunction in rats. *Am J Physiol* 1999; 277: E1061-E1069
- 9 刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正. 中西医结合治疗溃疡性结肠炎. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2806-2808
- 10 杨禄红, 陆付耳, 董慧, 徐丽君, 王开富. 大黄素和黄连素对2型糖尿病大鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 608-611
- 11 Pan LR, Tang Q, Fu Q, Hu BR, Xiang JZ, Qian JQ. Roles of nitric oxide in protective effect of berberine in ethanol-induced gastric ulcer mice. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 1334-1338
- 12 Leng SH, Lu FE, Xu LJ. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 496-502
- 13 Lannoy VJ, Decaux JF, Pierreux CE, Lemaigre FP, Rousseau GG. Liver glucokinase gene expression is controlled by the onecut transcription factor hepatocyte nuclear factor-6. *Diabetologia* 2002; 45: 1136-1141

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 2007 年 1 - 11 月份收稿及发稿数字统计结果

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology (WJG)* 2007年1-48期共发表文章1120篇, 其中国际文章791篇, 占71%; 国内文章329篇, 占29%. 社论63篇, 综述30篇, 专题亮点139篇, 文章663篇(基础研究和临床研究), 病例报告193篇, 读者来信等32篇, 评论性文章占发文总量的21%. 2007年1-11月份共收稿2432篇, 其中国内稿件912篇, 占38%; 国外稿件1520篇, 占62%; 退稿1000篇, 退稿率为41%. (常务副主任: 刘晔 2007-11-15)