

四味姜黄汤超分子的分选表征及其改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗作用研究

黄雪梅¹, 罗玉婷¹, 宗毅¹, 彭家艳¹, 米玛², 次旦南卓^{2*}, 范刚^{3*}

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 西藏藏医药大学, 西藏 拉萨 850000;
3. 成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611137)

[摘要] 对四味姜黄汤中超分子物质进行分离和表征,并探究其对 HepG2 细胞胰岛素抵抗(IR)的改善作用和机制。采用离心透析法制备分离四味姜黄汤的超分子物质,运用扫描电镜(SEM)和激光粒度仪进行形态学表征,采用超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)技术进行化学成分分析。以葡萄糖胺诱导 HepG2 细胞建立 IR 模型。以细胞葡萄糖消耗量为评价指标,研究四味姜黄汤不同部位的药效差异。采用蛋白质印迹法测定磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路相关蛋白的表达。结果显示,四味姜黄汤中存在大小均一、呈球形的超分子纳米颗粒,平均粒径为(436.18±7.68)nm。超分子主要由小檗皮中的生物碱类,姜黄、余甘子中的多酚类,以及蒺藜中的黄酮类成分组成。与模型组相比,四味姜黄汤超分子物质能显著提高 HepG2 细胞的葡萄糖消耗量,可上调磷酸化 PI3K(p-PI3K)/PI3K 和磷酸化 Akt(p-Akt)/Akt 的表达,并具有和原汤液相当的药效活性。这些结果表明,超分子是四味姜黄汤改善 IR 的关键药效物质,其作用机制与激活 PI3K/Akt 通路有关。

[关键词] 四味姜黄汤; 超分子; 理化表征; 胰岛素抵抗; PI3K/Akt 通路

Isolation and characterization of supramolecules of Siwei Jianghuang Decoction and its effect on improving insulin resistance in HepG2 cells

HUANG Xue-mei¹, LUO Yu-ting¹, ZONG Yi¹, PENG Jia-yan¹, MI Ma², CIDAN Nan-zhuo^{2*}, FAN Gang^{3*}

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
2. University of Tibetan Medicine, Lhasa 850000, China; 3. School of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] The supramolecular substances in Siwei Jianghuang Decoction were isolated and characterized, and their effects and mechanisms in improving insulin resistance (IR) in HepG2 cells were investigated. The supramolecular substances were prepared using centrifugal dialysis, and their morphology was characterized by scanning electron microscopy (SEM) and laser particle size analysis. The chemical composition of supramolecular substances was analyzed using ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole exactive Orbitrap mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS). An IR model was established in HepG2 cells by induction with glucosamine. Using glucose consumption as the evaluation index, the pharmacodynamic differences among different components of Siwei Jianghuang Decoction were assessed. The expression of proteins related to the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway was determined by Western blot. The results showed that uniformly sized, spherical supramolecular nanoparticles were present in Siwei Jianghuang Decoction, with an average particle size of (436.18 ± 7.68)

[收稿日期] 2025-02-27

[基金项目] 四川省重点研发项目(2022YFS0434);2023年中医学(藏医)博士点建设及中药学(藏药)博士点培育科研资助计划项目(BSDJS-23-01);西藏藏医药大学重点学科建设项目(BSDJS-XKJS-24-01)

[通信作者] * 范刚,教授,主要从事民族药的药效物质基础及作用机制研究,E-mail:fangang1111@163.com;* 次旦南卓,副教授,主要从事藏族医药研究与药物开发,E-mail:536913114@qq.com

[作者简介] 黄雪梅,硕士研究生,E-mail:huangxueimei5678@163.com

nm. These supramolecular structures were mainly composed of alkaloids from *Berberidis Cortex*, polyphenols from *Curcumae Longae Rhizoma* and *Phyllanthi Fructus*, and flavonoids from *Tribuli Fructus*. Compared with the model group, the supramolecular substances significantly increased glucose consumption in HepG2 cells and upregulated the expression of phosphorylated PI3K (p-PI3K)/PI3K and phosphorylated Akt (p-Akt)/Akt. Moreover, they exhibited pharmacological activity equivalent to that of the original decoction. These findings suggest that the supramolecular substances are the key pharmacodynamic components of Siwei Jianghuang Decoction in improving IR, and their mechanism of action is associated with activation of the PI3K/Akt signaling pathway.

[Key words] Siwei Jianghuang Decoction; supermolecule; physicochemical characterization; insulin resistance; PI3K/Akt pathway

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20250410.302

汤剂是藏族医(以下简称“藏医”)临床用药的传统剂型之一,与其他剂型相比,汤剂具有吸收快、作用强等特点。现代研究表明,汤剂是真溶液、胶体、混悬液和乳浊液的混合物^[1-2]。近年来,有研究表明汤剂起效不仅与其含有的化学成分有关,还与成分的存在形式或物相状态有关^[2-3]。如麻杏石甘汤的抗菌活性被证明与多种成分互作形成的物理相态有关,使用化学干扰剂破坏相态导致抗菌活性的显著降低^[3]。在汤剂煎煮过程中,不同药材的化学成分之间可通过各种非共价键作用而自组装形成超分子聚集体,从而引起相态的变化^[4]。目前,在麻杏石甘汤、芍药甘草汤、葛根芩连汤、黄连解毒汤、白虎汤中已发现不同化学成分自组装形成的超分子物质^[5-6]。重要的是,这些自组装形成的超分子被证明具有明显的生物活性,如从芍药甘草汤中分离出的超分子可有效改善小鼠的银屑病,并且与全汤的药效基本相同^[7]。此外,葛根芩连汤中的聚集物颗粒被发现具有和全汤相当的抗糖尿病活性^[8]。由此可见,汤剂中自组装形成的超分子是其重要的药效物质。

糖尿病是一种以高血糖为特征的慢性代谢性疾病。近年来,糖尿病的患病人数逐渐增多,其中超过90%患者为2型糖尿病(T2DM)^[9]。胰岛素抵抗(IR)是T2DM的主要发病机制之一^[10]。四味姜黄汤又名“勇哇西汤”,始载于藏医经典著作《四部医典》,由姜黄、小檗皮、余甘子、蒺藜4味药组成。四味姜黄汤是藏医治疗“京尼萨库”病(糖尿病)的常用方剂,疗效确切,安全性好^[11]。课题组前期研究发现,四味姜黄汤煎煮后的水煎液呈浑浊状态,并存在明显的丁达尔效应,初步推断4味药材在煎煮过程中不同化学成分发生相互作用形成超分子物质。故本文以四味姜黄汤为研究对象,对其超分子部位进行分离和形态表征,并结合超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)分析技术和HepG2细胞实验,从超分子新视角

探究四味姜黄汤改善IR的药效物质及作用机制。

1 材料

1.1 仪器

MSSS型磁力搅拌器[群安科学仪器(浙江)有限公司];JSM-IT700HR型扫描电子显微镜(日本电子株式会社);Litesizer 500型激光粒度仪[安东帕(上海)商贸有限公司];Sartorius BSA124S型电子天平(德国Sartorius公司);TGL-16M型高速冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司);Vanquish™超高效液相色谱仪(美国ThermoFisher Scientific公司);Q-Exactive™Orbitrap高分辨质谱仪(美国ThermoFisher Scientific公司);ReadMax 1500型光吸收全波长酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司);UVP ChemStudio智能成像系统(德国Analytikjena公司);CO₂细胞培养箱、超净工作台(青岛海尔生物科技有限公司)。

1.2 试剂

甲酸、甲醇为色谱纯(美国ThermoFisher Scientific公司)。HepG2细胞专用培养基(货号CM-0103,武汉普诺赛生命科技有限公司);胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)(货号PYG0067、PYG0021,武汉博士德生物工程有限公司);盐酸二甲双胍(货号B25331,上海源叶生物科技有限公司);葡萄糖胺(GlcN)(货号S1635,上海碧云天生物技术有限公司);葡萄糖测试盒(货号A154-1-1,南京建成生物工程研究所);细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂盒(货号BG0025,重庆葆光生物技术有限公司);磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抗体(货号A4992,武汉爱博泰克生物科技有限公司);磷酸化PI3K(p-PI3K)抗体(货号bs-3332R,北京博奥森生物科技有限公司);蛋白激酶B(Akt)抗体、磷酸化Akt(p-Akt)抗体(货号H651500026、H651506050,杭州华安生物技术有限公司); β -actin抗体(货号AC240505001,武汉赛维尔生物科技有限公司)。咖啡酸、槲皮素

(批号 100081-200406、100081-200406, 中国食品药品检定研究院); 柚皮素(批号 MUST-16032406, 成都曼斯特生物科技有限公司); 木兰花碱、去甲氧基姜黄素、小檗碱、小檗红碱(批号 RFS-M02602011005、RFS-Q03511807019、Y-035-150818、X-061-181129, 成都瑞芬思生物科技有限公司); 药根碱、巴马汀、没食子酸、柯里拉京、阿魏酸、芦丁、姜黄素、双去甲氧基姜黄素(批号 DST220209-287、DST221210-287、DSTDM000802、DST210311-012、DSTDF008102、DSTDL001702、DSTDJ001401、DSTDS002101, 成都乐美天医药科技有限公司); 以上对照品纯度均 $\geq 98\%$ 。姜黄、小檗皮、余甘子、蒺藜药材由四川省德格县藏医院提供, 由成都中医药大学范刚教授鉴定为姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的干燥根茎, 小檗科植物甘肃小檗 *Berberis kansuensis* Schneid. 的干燥茎皮或根皮, 大戟科植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的干燥成熟果实, 蒺藜科植物蒺藜 *Tribulus terrestris* L. 的干燥成熟果实。

2 方法

2.1 四味姜黄汤超分子部位的制备分离

2.1.1 四味姜黄汤溶液制备 称取姜黄 15 g、小檗皮 12.5 g、余甘子和蒺藜各 25 g, 制成粗粉(过 3 号筛)。加水煎煮 2 次, 每次 1 h, 合并煎液, 滤过, 取上清液, 即得。

2.1.2 离心转速考察 将得到的四味姜黄汤溶液分别在 3 500、5 000、7 000 $r \cdot \min^{-1}$ 的条件下离心 15 min, 上清液装入 500 Da 透析袋, 在室温 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 下透析。每 2 h 换一次液体, 透析 6 h 后得到四味姜黄汤溶液中的超分子部位, 并将其冷冻干燥, 扫描电镜(SEM) 观察形态和粒径大小, 选择最佳离心转速。

2.1.3 透析袋规格考察 按 2.1.2 项方法, 在最佳离心转速下, 将离心后的上清液分别加入规格为 500、3 500、7 000 Da 的透析袋中进行透析, 透析总时间均为 6 h, 通过 SEM 观察, 选择最佳透析袋。

2.1.4 透析时间考察 按 2.1.2 项方法, 在最佳离心转速、透析袋规格条件下, 分别透析 3、6、9 h, 通过 SEM 观察, 选择最佳透析时间。

2.2 四味姜黄汤超分子部位的形态表征

将超分子部位冷冻干燥, 用超纯水稀释, 超纯水为对照, 使用红外激光笔对溶液进行照射, 观察溶液中是否出现一条清晰光亮的通路, 拍照记录。将超

分子部位冻干粉用超纯水稀释, 使用 SEM 对样品进行图像采集, 观察形态。

2.3 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术的四味姜黄汤超分子部位的化学成分分析

2.3.1 供试品溶液的制备 取四味姜黄汤超分子冻干粉约 0.1 g, 精密称定, 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加入纯甲醇 20 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.3.2 混合对照品的制备 取适量木兰花碱、药根碱、小檗碱、阿魏酸、巴马汀、姜黄素、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素等对照品溶液, 配制各对照品溶液质量浓度为 0.5~0.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 备用。

2.3.3 色谱条件 色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈ (2.1 mm \times 150 mm, 1.8 μm); 流动相 0.1% 甲酸水(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~10 min, 10%~20% B; 10~25 min, 20%~60% B; 25~40 min, 60%~90% B; 40~50 min, 90%~10% B); 流速 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 2 μL 。

2.3.4 质谱条件 采用加热电喷雾离子源(ESI), 正、负离子模式检测, 正离子检测模式喷雾电压为 +3 500 V; 负离子检测模式喷雾电压为 -3 000 V; 鞘气流速 40.0 arb; 辅助气流速 15.0 arb, 毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 采用一级质谱全扫描结合自动触发二级质谱扫描模式(Full MS/dd-HRMS²) 扫描模式, Full MS 分辨率 70 000, dd-HRMS² 分辨率 17 500, 扫描范围 m/z 100~1 500。

2.3.5 数据处理 将原始数据导入 Compound Discoverer 3.0 软件, 创建并启动分析工作流程, 构建检索数据库。通过 Xcalibur 2.0 软件确定分子的精确质量(误差范围 $\pm 5.0 \times 10^{-6}$)。此外, 结合对照品比对, 确认未知化合物的分子式和结构, 确定质谱裂解路径, 对分析的成分进行归属。

2.4 四味姜黄汤超分子部位改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的药效研究

2.4.1 溶液的制备 按处方药量称取 4 味药材, 加水煎煮 2 次, 每次 1 h, 合并煎液, 滤除药渣, 得到四味姜黄汤原汤液样品。将原汤液样品经 5 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 15 min, 分离出沉淀, 得到四味姜黄汤沉淀样品。取离心后的上清液装入 3 500 Da 透析袋

中,再置于装有 1 000 mL 超纯水的烧杯中透析 6 h,透析过程中用磁力搅拌器不断搅拌,每隔 2 h 更换一次超纯水,分别收集透析袋中的液体及透析袋外的液体,冷冻干燥,即得四味姜黄汤超分子部位样品及真溶液样品。

称取 450 mg 葡萄糖,充分溶于 100 mL 专用培养基中,制成葡萄糖浓度为 $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的高糖培养基, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,备用。

称取 GlcN 粉末 0.215 g,充分溶于 1 mL PBS 中,用高糖培养基配制成 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GlcN 母液,用 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤除菌,备用。

称取 0.063 g 盐酸二甲双胍粉末,充分溶解于 10 mL PBS 中,振荡混匀,制成 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的盐酸二甲双胍母液, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,分装后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,临用时用培养基将浓度稀释为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4.2 细胞培养 HepG2 细胞在专用培养基中于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。每 2 d 更换该培养基,细胞达到 80%~90%后,用 PBS 缓冲液清理,胰蛋白酶消化进行传代培养,传代 2~3 次后的细胞用于后续实验。

2.4.3 CCK-8 法检测四味姜黄汤不同部位对细胞活性的影响 将 HepG2 细胞(每孔 2×10^5 个, $100 \mu\text{L}$)接种于 96 孔板中,在细胞培养箱中孵育 24 h。设置对照组和四味姜黄汤原汤液、超分子部位、真溶液及沉淀的不同质量浓度组(1 600、800、400、200、100、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。孵育 24 h,每组 6 个复孔,重复 3 次。再去取出弃掉培养液,PBS 清洗 2 次,每孔加入含 10% CCK-8 的专用培养基溶液 $100 \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 1 h 后,取出 96 孔板,用酶标仪测定各孔在波长 450 nm 处的吸光度。

2.4.4 建立 IR-HepG2 细胞模型 将 HepG2 细胞,放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后,弃去培养基,加入 $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GlcN 溶液造模,放于细胞培养箱孵育 24 h,加入高糖培养基继续培养 24 h。

2.4.5 四味姜黄汤不同部位对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 正常对照组加入专用培养基;模型组加入 $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GlcN 溶液;阳性组加入 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸二甲双胍;给药组为原汤液组、超分子部位组、真溶液组、沉淀组,给药组的高、中、低剂量按 2.4.3 项筛选确定;每组设置 3 个复孔。药

物处理 24 h 后,计算各组葡萄糖的消耗量。

2.4.6 蛋白质印迹法(Western blot)分析相关蛋白表达 将 HepG2 细胞每孔以 6×10^5 个细胞接种在 6 孔板中,培养 24 h 后,正常组加入高糖培养基,模型组、阳性组和给药组按 2.4.4 项建立 IR-HepG2 模型。培养 24 h 后,弃去培养基,正常组和模型组加入高糖培养基,阳性组加入 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸二甲双胍溶液,给药组加入的四味姜黄汤超分子部位溶液($0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),培养 24 h 后收集细胞。使用 RIPA 细胞裂解液与蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂提取组织中的总蛋白,BCA 蛋白质试剂盒测定蛋白浓度。取蛋白样品 30 μg ,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,然后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。使用含 5%牛血清白蛋白(BSA)的含聚山梨酯 20 的 Tris-盐酸缓冲液(TBST)封闭 2 h,加入一抗 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。次日用 TBST 洗涤 5 次,每次 5 min,加入二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗膜 5 次,每次 5 min。最后采用增强型化学发光剂(ECL)显色,以 β -actin 为内参,计算 Akt、p-Akt、PI3K、p-PI3K 蛋白的表达量。灰度值结果采用 ImageJ 软件进行分析。

2.5 数据分析

采用 GraphPad Prism 10.1.2 进行统计分析,组间比较选用单因素方差分析(One-way ANOVA),结果以平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)的形式呈现,以 $P<0.05$ 作为显著性差异的标准。

3 结果

3.1 四味姜黄汤超分子部位的制备分离

3.1.1 离心速度考察 SEM 图显示, $3\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 时,超分子的粒径差别较大; $7\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 时,超分子部位存在的纳米粒子较少,且存在大量破碎颗粒; $5\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 时,超分子部位粒径较为均一,且分布更加密集。故选择 $5\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心转速制备四味姜黄汤超分子部位,见图 1。

3.1.2 透析袋规格考察 SEM 图显示,经 500 Da 透析的超分子颗粒边缘模糊, $7\ 000 \text{ Da}$ 透析的超分子粒径大小差异较大、存在大量不规则碎片, $3\ 500 \text{ Da}$ 透析的超分子粒径较为均一、边缘清晰。故选择 $3\ 500 \text{ Da}$ 的透析袋对四味姜黄汤超分子部位进行制备分离,见图 1。

3.1.3 透析时间考察 SEM 图显示,透析 3 h 得到

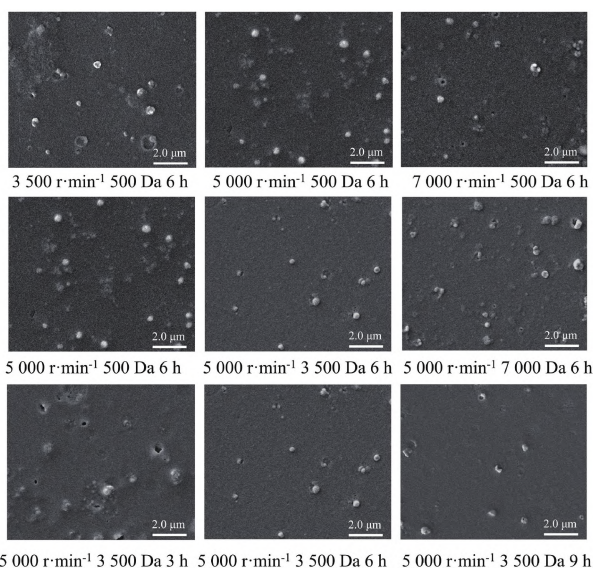


图1 四味姜黄汤超分子部位制备的条件考察

Fig. 1 Preparation conditions of supramolecular parts of Siwei Jianghuang Decoction

的超分子纳米粒呈现大量团聚状态,粒子间的间隙模糊,难以辨别;透析6、9 h后超分子边缘清晰,但透析9 h后部分超分子纳米粒呈现破碎状态。故选择透析6 h作为最佳透析时间,见图1。

通过单因素考察,对四味姜黄汤超分子部位分离方法进行优化,最终得到最佳条件:按处方药量称取4味药材,加水煎煮2次,每次1 h,合并煎液,滤过,滤液经 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上清液装入3 500 Da透析袋中,再置于装有1 000 mL超纯水的烧杯中透析6 h,透析过程中用磁力搅拌器不断搅拌,每隔2 h更换一次超纯水,收集透析袋中的液体,冷冻干燥,即得。

3.2 四味姜黄汤中超分子部位的形态表征

丁达尔效应可用于表征超分子^[12]。在暗室环境下,四味姜黄汤水煎液经激光笔垂直照射后能观察到明显的丁达尔现象(见本文增强出版附加材料),表明可能存在超分子物质。为了更直观地观察形态结构,将超分子部位置于SEM下观察形态,结果显示存在球形的超分子颗粒,见图2。此外,激光粒度仪测得四味姜黄汤超分子的平均粒径为 $(436.18\pm 7.68)\text{ nm}$ 。

3.3 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS技术的四味姜黄汤超分子部位的化学表征

根据2.3项测定方法对四味姜黄汤超分子部

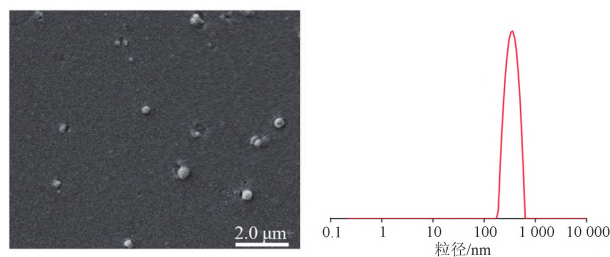


图2 超分子部位的形态学表征

Fig. 2 Morphological characterization of supramolecular parts

位进行化学成分分析,UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS正负总离子流图见图3。本研究共鉴定出18个化学成分,见表1,其中生物碱类成分6个,酚类成分6个,黄酮类成分4个,有机酸类成分2个,其中15个化学成分由对照品比对鉴定。生物碱类成分主要来源于小檗皮,酚类成分主要来源于余甘子和姜黄。

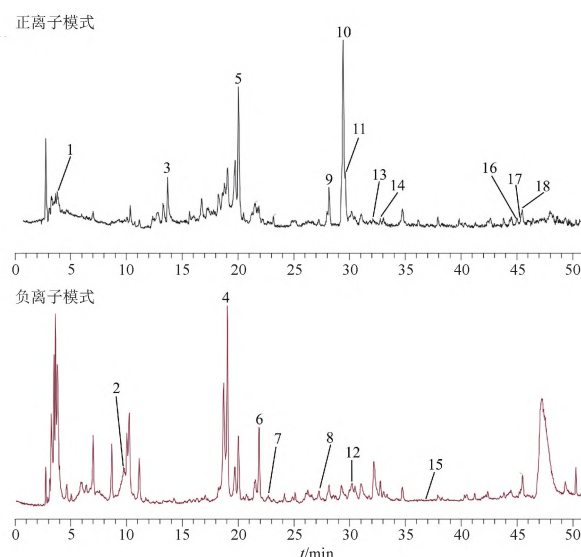


图3 四味姜黄汤超分子部位的UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS正负总离子流图

Fig. 3 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS positive and negative total ion chromatograms of supramolecular fraction of Siwei Jianghuang Decoction

3.4 四味姜黄汤超分子部位改善HepG2细胞胰岛素抵抗的药效评价及作用机制研究

3.4.1 CCK-8法检测不同部位药物对HepG2细胞活性的影响 为筛选出四味姜黄汤的安全浓度范围,运用CCK-8法对HepG2细胞活力进行测定,以

表 1 四味姜黄汤超分子部位的化学成分分析

Table 1 Chemical composition analysis of supramolecular parts of Siwei Jianghuang Decoction

No.	t_R /min	分子式	离子模式	一级质谱	碎片离子	化合物	来源	类别
1	3.39	$C_5H_{11}NO_2$	$[M+H]^+$	118.086 3	118.086 3, 59.073 6, 58.065 8	甜菜碱	小檗皮	生物碱类
2	9.78	$C_7H_6O_5$	$[M-H]^-$	169.013 7	169.013 7, 125.023 6, 107.012 9, 97.028 6, 81.033 6	没食子酸 ¹⁾	余甘子	酚类
3	10.33	$C_{13}H_{18}N_2O$	$[M+H]^+$	219.149 0	219.149 0, 160.075 5, 132.080 7	蟾蜍特尼定	小檗皮	生物碱类
4	19.01	$C_{16}H_{20}O_9$	$[M-H]^-$	355.104 3	355.104 3, 193.050 2, 149.060 1	阿魏酸-4-O- β -D-吡喃葡萄糖苷	小檗皮	黄酮类
5	19.98	$C_{20}H_{23}NO_4$	$[M]^+$	342.169 6	342.169 6, 297.111 8, 282.088 1, 265.085 5, 237.090 7, 219.080 2, 191.085 3	木兰花碱 ¹⁾	小檗皮	生物碱类
6	22.08	$C_{27}H_{22}O_{18}$	$[M-H]^-$	633.073 5	633.073 5, 463.052 1, 300.999 1, 169.013 8	柯里拉京 ¹⁾	余甘子	酚类
7	22.13	$C_9H_8O_4$	$[M-H]^-$	179.034 6	179.034 6, 135.044 4, 116.968 6, 107.049 2, 89.023 4	咖啡酸 ¹⁾	余甘子	有机酸类
8	27.11	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	193.050 4	193.050 4, 178.026 6, 149.060 2, 134.036 4	阿魏酸 ¹⁾	小檗皮、	有机酸类
9	28.00	$C_{20}H_{20}NO_4$	$[M]^+$	338.138 0	338.138 0, 307.083 6, 279.088 4	药根碱 ¹⁾	小檗皮	生物碱类
10	29.27	$C_{20}H_{17}NO_4$	$[M]^+$	336.122 6	336.122 6, 320.091 3, 292.096 5, 278.081 0	小檗碱 ¹⁾	小檗皮	生物碱类
11	29.59	$C_{21}H_{22}NO_4$	$[M]^+$	352.153 8	352.153 8, 337.130 5, 336.122 6, 308.127 7, 292.096 5	巴马汀 ¹⁾	小檗皮	生物碱类
12	30.45	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M-H]^-$	609.146 9	609.1469, 301.0353, 300.0275, 271.0254, 255.0305, 227.0359	芦丁 ¹⁾	余甘子、	黄酮类
13	32.22	$C_{14}H_6O_8$	$[M+H]^+$	303.013 2	303.013 2, 285.002 6, 275.018 4, 257.007 8, 247.023 5, 229.013 2, 201.018 2	鞣花酸 ¹⁾	余甘子	酚类
14	32.72	$C_{15}H_{10}O_7$	$[M+H]^+$	303.049 4	303.049 4, 257.007 7, 229.049 3, 153.018 1	槲皮素 ¹⁾	小檗皮、	黄酮类
15	36.57	$C_{15}H_{12}O_5$	$[M-H]^-$	271.061 5	271.061 5, 177.018 9, 151.003 1, 107.013 0	柚皮素 ¹⁾	余甘子	黄酮类
16	45.22	$C_{19}H_{16}O_4$	$[M+H]^+$	309.111 5	309.111 5, 225.090 1	双去甲氧基姜黄 ¹⁾	姜黄	酚类
17	45.26	$C_{20}H_{18}O_5$	$[M+H]^+$	339.122 2	339.122 2, 255.101 1, 177.054 4	去甲氧基姜黄 ¹⁾	姜黄	酚类
18	45.54	$C_{21}H_{20}O_6$	$[M+H]^+$	369.132 9	369.132 9, 285.111 8, 177.054 5	姜黄素 ¹⁾	姜黄	酚类

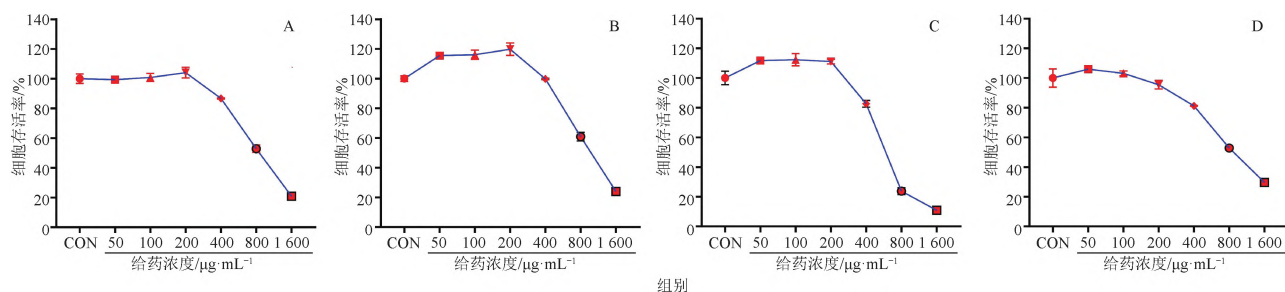
注:¹⁾与对照品比对。

细胞存活率 80%以上作为无毒剂量^[13]。CCK-8 实验结果见图 4,低浓度的四味姜黄汤原汤液、超分子部位、真溶液及沉淀部分对 HepG2 细胞无毒。当给药浓度为 800、1 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,HepG2 细胞的存活率均低于 80%。因此选择 100、200、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度进行后续实验。

3.4.2 四味姜黄汤不同部位对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量影响 为评价四味姜黄汤不同部位对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响,选取 CCK-8 法确定的安全剂量(400、200、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)作为评价 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的给药浓度。结果见表 2,模型组的葡萄糖消耗相比于对照组显著降低,说明 IR-HepG2 模型建立成功。与模型组相比,

阳性组,原汤溶液组和超分子部位组的高、中、低剂量组均可显著提高 IR-HepG2 细胞的葡萄糖消耗量 ($P<0.05$),有改善 IR 的作用;而原汤液去除超分子后的剩余部分(真溶液组、沉淀部位组)对葡萄糖消耗量无显著影响,没有改善 IR 的作用。这些结果表明,四味姜黄汤中的超分子部位与原汤液改善 IR 的作用相当。且当超分子部位被移除后,改善 IR 的作用消失,说明超分子是四味姜黄汤改善 IR 的关键药效物质。

3.4.3 四味姜黄汤超分子对 IR-HepG2 细胞 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响 研究表明,PI3K/Akt 信号通路是胰岛素通路的核心环节^[14]。为进一步探究四味姜黄汤超分子对 IR-HepG2 细胞



A. 原汤液组; B. 超分子部位组; C. 真溶液组; D. 沉淀部位组。CON. 对照组。

图4 四味姜黄汤不同部位对 HepG2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Effects of different parts of Siwei Jianghuang Decoction on HepG2 cell viability ($\bar{x} \pm s, n=3$)表2 四味姜黄汤不同部位对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 2 Effects of different parts of Siwei Jianghuang Decoction on glucose consumption of IR-HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	葡萄糖消耗量/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	$10.04 \pm 0.08^{3)}$
模型	-	3.89 ± 0.35
阳性	-	$9.04 \pm 0.21^{3)}$
原汤液	400	$6.78 \pm 0.06^{3)}$
	200	$5.97 \pm 0.02^{3)}$
	100	$4.76 \pm 0.16^{3)}$
超分子部位	400	$6.81 \pm 0.76^{3)}$
	200	$5.51 \pm 0.09^{3)}$
	100	$4.98 \pm 0.05^{1)}$
真溶液	400	4.56 ± 0.23
	200	3.69 ± 0.23
	100	3.51 ± 0.21
沉淀部位	400	4.15 ± 0.07
	200	2.68 ± 0.19
	100	2.17 ± 0.02

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$ (表3同)。

糖代谢的影响机制,本研究采用 Western blot 法检测 IR-HepG2 细胞中 p-PI3K、PI3K、p-Akt 及 Akt 蛋白的表达,结果见图 5、表 3。与正常组相比,模型组的 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值的蛋白表达显著降低,说明在 IR 状态下,PI3K/Akt 通路被抑制。但四味姜黄汤超分子处理后 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值显著升高,表明 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达量增加,说明四味姜黄汤的超分子物质可激活 PI3K/Akt 通路,改善 IR。

5174

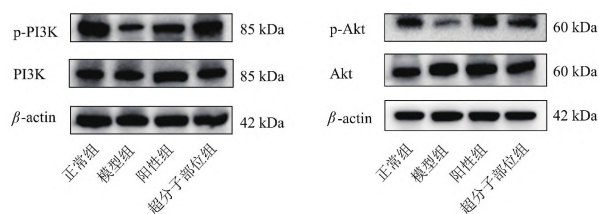


图5 超分子对 IR-HepG2 细胞 PI3K/Akt 通路相关蛋白影响的电泳图

Fig. 5 Electrophoretic image of the effect of supramolecules on PI3K/Akt pathway-related proteins in IR-HepG2 cells

表3 超分子对 IR-HepG2 细胞 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Effects of supramolecules on PI3K/Akt pathway-related protein expression in IR-HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
正常	$1.22 \pm 0.11^{2)}$	$0.85 \pm 0.14^{1)}$
模型	0.67 ± 0.10	0.52 ± 0.08
阳性	0.93 ± 0.11	$0.89 \pm 0.11^{1)}$
超分子部位	$1.13 \pm 0.12^{2)}$	$0.93 \pm 0.09^{2)}$

4 讨论

汤剂是藏医临床常用的剂型。现代研究表明,汤剂在煎煮过程中不同药材含有的各类化学成分可通过氢键、静电引力、疏水作用、 π - π 堆积等非共价键作用而自组装形成各种超分子聚集体^[15-17]。近年来,自组装形成的超分子物质被发现具有促吸收、缓释等独特的功能,并展现出明显的生物活性^[18-19],这为揭示中药的药效物质基础、配伍机制等提供了新的研究思路。四味姜黄汤是藏医治疗糖尿病的代表性方剂,有研究发现四味姜黄汤改善糖尿病肾病的作用可能与其调节 PI3K/Akt 等通路有

关^[20]。本研究对四味姜黄汤的超分子部位进行分离和表征,并探究其改善 IR 的药理活性及作用机制。

本研究对四味姜黄汤中超分子物质的分离条件进行了优化,发现超分子的粒径约为 436 nm。通过 SEM 观察到超分子的大小均一、呈球形。随后,采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术发现超分子主要由小檗皮中的生物碱类(小檗碱、药根碱等),姜黄和余甘子中的酚类(姜黄素、鞣花酸等),以及蒺藜中的黄酮类(芦丁、槲皮素等)成分组成。有研究报道,生物碱类易与酸性或黄酮类成分发生分子自组装形成超分子聚集体,如小檗碱与大黄酸^[21]、小檗碱与马兜铃酸^[22]、小檗碱与黄芩苷^[23]。本研究结果证明,小檗皮药材中的生物碱类成分可与姜黄、余甘子中的多酚类成分,以及蒺藜中的黄酮类成分在煎煮过程中发生相互作用形成超分子纳米颗粒。

近年来,我国糖尿病患者人数逐年增加,其中 T2DM 占糖尿病患者总人数的 90%~95%^[24]。肝脏是胰岛素作用的重要器官,其能量代谢失衡会导致胰岛素抵抗,诱发 T2DM^[25]。HepG2 细胞是来源于人肝癌组织的肝胚胎肿瘤细胞系,与正常肝细胞具有相同的脂质和葡萄糖代谢生理功能,被广泛用于药物治疗糖尿病机制研究^[26-27]。因此,本研究采用 HepG2 细胞探究超分子的药效作用及机制。结果显示,超分子部位可显著提高 HepG2 细胞的葡萄糖消耗量,有改善 IR 的作用。PI3K/Akt 通路与糖脂代谢和胰岛素抵抗密切相关,对于调节葡萄糖稳态至关重要^[28-29]。PI3K 是一种细胞内信号转导酶;Akt 是 PI3K 的下游靶标,是胰岛素信号转导代谢效应的重要介质,可促进肝脏中葡萄糖的摄取和糖原的合成^[30]。因此,通过调节 PI3K/Akt 通路改善 IR 是治疗 T2DM 的有效策略。p-PI3K 和 p-Akt 是 PI3K 和 Akt 的激活状态。有研究发现,PI3K 和 Akt 的磷酸化蛋白在 IR 情况下表达量显著降低^[31]。本研究结果表明,IR-HepG2 细胞中 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白的表达显著降低,而四味姜黄汤的超分子部位可以显著上调其表达,表明其改善 IR 作用可能与激活 PI3K/Akt 通路有关。

综上,本研究优化了四味姜黄汤中超分子物质的提取分离条件,发现存在大小均一、呈球形的超分子纳米颗粒。超分子可明显改善 IR,其作用机制与激活 PI3K/Akt 通路有关。此外,本研究发现超分子

的药效与四味姜黄汤原汤溶液相当,而除去超分子后无改善 IR 作用,表明超分子可能是四味姜黄汤改善 T2DM 的关键药效物质。然而,超分子具体的形成机制尚不清楚,后续还需要进一步研究。此外,本研究仅从体外细胞实验探讨了超分子改善 IR 的作用及机制,后续还需进行动物实验验证。

[参考文献]

- [1] 陈瑞,陈志鹏. 利用超分子组装理论探讨麻杏石甘汤抗病毒机制研究的新策略[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(1): 136.
- [2] 乔宏志,狄留庆,平其能,等. 结构中药学:中药药效物质基础研究的新领域[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(10): 2443.
- [3] 朱耀萱,陈伟,王振中,等. 麻杏石甘汤抗菌活性的空间异质性及其物理结构基础[J]. 药学学报, 2021, 56(8): 2112.
- [4] 惠璇,张竞研,康安,等. 中药物质基础新形式及其药动/药效研究[J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(10): 1013.
- [5] GAO Y, DONG Y Y, GUO Q, et al. Study on supramolecules in traditional Chinese medicine decoction[J]. Molecules, 2022, 27(10): 3268.
- [6] 沈成英,胡菲,朱君君,等. 中药自组装纳米粒的形成及应用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(19): 4875.
- [7] 秦祉剑,闫巧,杭凌宇,等. 芍药甘草汤自组装纳米粒的分离、表征及抗小鼠银屑病的研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(8): 2116.
- [8] 吴殿芳,柯李晶,刘宏波,等. 葛根芩连汤及其聚集物颗粒对 STZ 诱导 2 型糖尿病大鼠的降糖作用研究[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2014, 42(6): 957.
- [9] CHAN J C N, ZHANG Y, NING G. Diabetes in China: a societal solution for a personal challenge[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2014, 2(12): 969.
- [10] BIAN G, YANG J B, ELANGO J, et al. Natural triterpenoids isolated from *Akebia trifoliata* stem explants exert a hypoglycemic effect via α -glucosidase inhibition and glucose uptake stimulation in insulin-resistant HepG2 cells[J]. Chem Biodivers, 2021, 18(5): e2001030.
- [11] 王小艳,向宇楠,高洁,等. 藏药四味姜黄汤中 10 种有效成分含量测定及其煎煮工艺优化[J]. 中国药房, 2020, 31(8): 913.
- [12] ZHANG Y L, WANG Y L, YAN K, et al. Traditional Chinese medicine formulae QY305 reducing cutaneous adverse reaction and diarrhea by its nanostructure[J]. Adv Sci, 2024, 11(5): 2306140.
- [13] 张聪. 鞣花酸改善小鼠肝脏脂肪变性的作用机制及尿石素 A 脂质体制备研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2020.
- [14] ZHAO H, ZHAI B W, ZHANG M Y, et al. Phlorizin from *Lithocarpus litseifolius* [Hance] Chun ameliorates FFA-induced insulin resistance by regulating AMPK/PI3K/AKT signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2024, 130: 155743.

- [15] 胡静雯, 贾国香, 董亚倩, 等. 从中药全过程视角探析纳米颗粒自组装行为及应用[J]. 中草药, 2022, 53(22): 7307.
- [16] 王蕾, 曹雪晓, 栗焕焕, 等. 中药化学成分的分子识别与自组装在中药研究中的应用[J]. 中草药, 2020, 51(2): 516.
- [17] 王凤霞, 陈芳雯, 沈成英, 等. 中药汤剂煎法的科学内涵研究进展[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(4): 994.
- [18] 高杉, 高丰, 孔靖玮, 等. 基于弱键诱导的超分子体系探究熊去氧胆酸-小檗碱超分子对溃疡性结肠炎的治疗作用[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(10): 2739.
- [19] 林晓钰, 魏吉昌, 赵一航, 等. 基于中药超分子化学探究大黄-黄连配伍不同煎煮方式的物质基础差异[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(18): 4948.
- [20] 仁增加, 李啟恩, 切羊让忠, 等. 基于“味性化味-网络药理-分子对接”的藏药四味姜黄汤防治糖尿病肾病的作用机制预测[J]. 中成药, 2022, 44(2): 640.
- [21] 林晓钰, 田学浩, 黄雪梅, 等. 基于中药超分子化学探究大黄-黄连配伍平和“苦-寒”之性物质基础[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 6066.
- [22] WANG P, GUO W, HUANG G, et al. Berberine-based heterogeneous linear supramolecules neutralized the acute nephrotoxicity of aristolochic acid by the self-assembly strategy [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13(28): 32729.
- [23] LI T, WANG P, GUO W B, et al. Natural berberine-based Chinese herb medicine assembled nanostructures with modified antibacterial application[J]. Acs Nano, 2019, 13(6): 6770.
- [24] 姜慰, 史茜, 刘晓颖, 等. HepG2 细胞胰岛素抵抗模型建立及在筛选天然有效多糖中的应用[J]. 新疆大学学报(自然科学版)(中英文), 2023, 40(4): 461.
- [25] 杨旭, 岳仁宋, 王琦越. 基于 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号途径探讨半夏泻心汤改善 T2DM 模型大鼠胰岛素抵抗的机制研究[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(7): 1560.
- [26] YANG Z, HUANG W, ZHANG J, et al. Baicalein improves glucose metabolism in insulin resistant HepG2 cells [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 854: 187.
- [27] CHEN L, LIN X, TENG H. Emulsions loaded with dihydromyricetin enhance its transport through Caco-2 monolayer and improve anti-diabetic effect in insulin resistant HepG2 cell [J]. J Funct Foods, 2020, 64: 103672.
- [28] 李德锋, 樊金玲, 杜琳, 等. 光甘草定通过调节 ERK/IRS-1 和 PI3K/Akt 信号通路改善 HepG2 细胞的胰岛素抵抗 [J]. 中草药, 2022, 53(24): 7751.
- [29] MALIK S A, ACHARYA J D, MEHENDALE N K, et al. Pterostilbene reverses palmitic acid mediated insulin resistance in HepG2 cells by reducing oxidative stress and triglyceride accumulation [J]. Free Radic Res, 2019, 53(7): 815.
- [30] FENG Y, REN Y, ZHANG X, et al. Metabolites of traditional Chinese medicine targeting PI3K/AKT signaling pathway for hypoglycemic effect in type 2 diabetes [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1373711.
- [31] FAN X, JIAO G, PANG T, et al. Ameliorative effects of mangiferin derivative TPX on insulin resistance via PI3K/AKT and AMPK signaling pathways in human HepG2 and HL-7702 hepatocytes [J]. Phytomedicine, 2023, 114: 154740.

[责任编辑 孔晶晶]