

羧糖脂对 HepG2 胰岛素抵抗细胞葡萄糖代谢及相关蛋白表达的影响

尹恣强, 刘 溪, 吴婷婷, 张胜来, 丁玉勇

江苏食品药品职业技术学院, 江苏 淮安 223002

摘要: 目的 通过体外实验探讨羧糖脂改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗 (IR) 的作用, 并初步探明其作用机制。方法 采用 1×10^{-7} mol/L 胰岛素诱导 HepG2 细胞, 建立 IR 细胞模型; MTT 法检测羧糖脂对 HepG2 细胞的增殖抑制率; 葡萄糖氧化酶-过氧化物酶 (GOD-POD) 法检测羧糖脂对 HepG2 IR 细胞葡萄糖吸收的影响; Western blotting 法检测胰岛素受体底物 1 磷酸化丝氨酸 p-IRS-1 (Ser307)、磷酸酰肌醇-3-激酶 (PI3K)、葡萄糖转运体-4 (GLUT-4) 的表达。结果 HepG2 细胞置于含 10^{-7} 胰岛素培养液孵育 24 h, 与对照组比较, 葡萄糖吸收水平下降, 表明建模成功; 30~120 μ g/mL 羧糖脂均能显著增加 IR 细胞葡萄糖吸收率, 显著上调 GLUT-4、PI3K 蛋白表达水平, 显著下调 IRS-1 Ser307 磷酸化水平。结论 羧糖脂能有效增强 HepG2 IR 细胞对葡萄糖的消耗能力, 推测与上调 GLUT-4、PI3K 蛋白表达, 抑制 IRS-1 丝氨酸磷酸化相关。

关键词: 羧糖脂; 胰岛素抵抗; HepG2 细胞; 胰岛素受体底物 1 磷酸化丝氨酸 p-IRS-1 (Ser307); 磷酸酰肌醇-3-激酶 (PI3K); 葡萄糖转运体-4 (GLUT-4)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)06-0783-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.06.010

Effects of Ji Tang Zhi on glucose metabolism and related protein expression in insulin resistance HepG 2 cell line

YIN Min-qiang, LIU Xi, WU Ting-ting, ZHANG Sheng-lai, DING Yu-yong

Jiangsu food and pharmaceutical college, Huaian 223002, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of Ji Tang Zhi on glucose metabolism in insulin resistance (IR) HepG 2 cell line, and to explore the related mechanism. **Methods** The HepG2 cells were incubated in culture medium addition of 10^{-7} mol/L insulin for 24 h to establish the IR cell model. Effect of Ji Tang Zhi on rate of glucose absorption in HepG2 cell was detected by the method of glucose oxidase - peroxidase (GOD - POD). We performed an MTT assay to determine cytotoxicity effects of Ji Tang Zhi on HepG2 cell line. The expression of p-IRS-1 Ser307, PI3K and GLUT-4 were detected by Western blotting. **Results** Incubated with 10^{-7} mol/L insulin for 24 h, the insulin resistance cell model had been built. Compared with model group, the rate of glucose absorption of cell treated with JTZ (30 ~ 120 μ g/mL) was significantly improved. According to model cells, the expression of GLUT-4 and PI3K decreased significantly compared to control cells. While the expression of p-IRS-1 Ser 307 was inhibited and GLUT-4 and PI3K expression were increased in IR cells after treated with JTZ (30 ~ 120 μ g/mL). **Conclusion** JTZ exert beneficial effects on hyperglycemia in IR cell line possibly through regulating the levels of GLUT-4, p-IRS-1 Ser307 and PI3K in HepG2 cell.

Key words: Ji Tang Zhi; Insulin resistance; HepG2 cell line; phosphorylation-Insulin Receptor Substrate 1 Serine 307, p-IRS-1 Ser307; Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K); Glucose Transporter 4 (GLUT-4)

羧糖脂为苏州太仓民间验方, 在防治糖尿病、高血压等疾病方面具有良好的作用, 其组成药材包括苦瓜、枸杞、南瓜花、金银花等。文献报道, 苦瓜皂苷^[1]、枸杞多糖^[2]、南瓜提取物^[3]、金银花^[4]对 2 型糖尿病模型动物发挥降糖作用, 目前对该验方

降糖作用机制的研究文献极少。

糖尿病是由于胰岛素分泌相对不足或胰岛素作用障碍所致的以血糖升高为主要特征的一种代谢性疾病, 其中胰岛素抵抗 (Insulin resistance, IR) 是 2 型糖尿病 (Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM) 的

收稿日期: 2017-02-07

基金项目: 淮安市科技局基金资助项目 (HAN2015025)

作者简介: 尹恣强, 助理研究员, 研究方向药理学。Tel: (022)84845240 E-mail: haoch@tjipr.com ymq_19891116@126.com

典型特征,也是 T2DM 的发病基础。目前用于 IR 模型建立的细胞主要包括脂肪细胞^[5]、肌细胞^[6]、人源肝癌细胞^[7]等。人源肝癌细胞保留了正常肝细胞的基本特性,便于体外培养,排除了正常肝细胞衰老现象,具有胰岛素受体和受体后功能缺陷,是 IR 的理想细胞模型。本实验体外建立 HepG2 细胞 IR 模型,评价该方对 IR 的改善作用,并通过 PI3K/Akt 信号通路探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 细胞

HepG2 细胞株,购自中国科学院上海细胞所,本实验室自行保存传代备用。

1.2 药物及主要试剂

羧糖脂由苏州神良生物科技有限公司制备,批号 20140327。实验用苦瓜、枸杞、金银花中药饮片,均购自国大药房,南瓜花购自太仓市神英中草药专业合作社,经江苏省植物研究所王年鹤研究员鉴定,分别为苦瓜 *Momordica charantia* L.、枸杞 *Lycium chinense* Mill.、金银花 *Lonicera japonica* Thunb.以及南瓜 *Cucurbita moschata* (Duch. ex Lam.) Duch. ex Poiret.的花。将各单味饮片剪碎,加入蒸馏水,NaHCO₃沸水提取 1.5 h,不停搅拌,纱布过滤,得提取液;加入 1/4 体积氯仿,得最上层清液,加入 3 倍体积 95%乙醇,搅拌,得沉淀物;使用丙酮、乙醇分别洗涤,干燥,得枸杞多糖、苦瓜皂苷、南瓜多糖、金银花提取物,质量分数分别为 79.7%、65.2%、80.6%、1.5%,根据羧糖脂配方配比混合,临用前双蒸水溶解,紫外照射 12 h。

DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS),购自 Hyclone 公司;胰蛋白酶消化液、青霉素/链霉素(100 U/mL 和 100 μg/mL)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒,均购自上海碧云天生物技术有限公司;MTT、DMSO,均购自 Sigma 公司;无水乙醇、氯化钠、十二水合磷酸二氢钾、磷酸氢二钠,均购自中国国药集团上海化学试剂公司;胰岛素注射液,购自江苏万邦生化医药股份有限公司,批号 21508212;葡萄糖测定试剂盒,购自南京建成生物工程研究所,批号 20150402147;胰岛素受体底物 1 磷酸化丝氨酸(Phosphorylation-Insulin Receptor Substrate 1 Serine 307, p-IRS-1 Ser307)、磷酸酰肌醇-3-激酶(Phosphatidylinositol-3-Kinase, PI3K)、葡萄糖转运体-4(Glucose Transporter 4, GLUT-4)、GAPDH 兔

多克隆抗体,购自江苏凯基生物技术股份有限公司,批号分别为 20151104、20151109、20151120;超敏 ECL 化学发光试剂盒,购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司;预染蛋白质 Marker,美国 Thermo Scientific,批号 00295962;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

BS124S 电子天平,北京赛多利斯系统有限公司;ELX-800VV 酶标仪、Synergy2 酶联免疫检测仪,美国 Bio-TEK 公司;TDL-3 低速离心机、微量加样器,美国 EPPENDORF 公司;脱色摇床,海门其林贝尔仪器制造有限公司;PROTEAN 电泳槽、Trans-Blot 电转移槽,美国 Bio-Rad 公司;制冰机,日本 SANYO 公司;HH-420s 数显恒温水箱,金坛市大地自动化仪器厂。

2 方法

2.1 对 HepG2 细胞增殖的影响

将冻存的 HepG2 细胞放入 37 °C 水浴中融化复苏,离心后弃上清液,加入含 10%FBS 的 DMEM 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 条件下传代培养。取处于对数生长期的 HepG2 细胞加胰酶消化、均匀接种于 96 孔板内(1×10⁴/孔),待细胞贴壁后,弃去培养基,羧糖脂组加入含药培养基,浓度分别为 62.5、125、250、500、1 000 μg/mL,对照组加入等体积的双蒸水,分别孵育 24、48 h,加入 MTT(5 mg/mL) 10 μL 孵育。4 h 后弃上清,加入 100 μL DMSO 溶解蓝紫色结晶甲瓚,在酶联免疫检测仪 490 nm 处测定各孔吸光度(A)值,计算细胞活力。

细胞活力=羧糖脂组 A 值/对照组 A 值

2.2 HepG2 细胞 IR 模型的建立及鉴定

将 HepG2 细胞加入含 10%FBS 的 DMEM 培养基中,37 °C、5% CO₂ 条件下传代培养。将对数生长期的细胞消化后,用含 10%FBS 的 DMEM 培养基稀释成 1×10⁵/mL 细胞密度,接种于 96 孔板上,每孔加 200 μL,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。弃去培养基,对照组加入含 10%FBS 的 DMEM 培养基;模型组加含 10 μg/mL 胰岛素的 DMEM 培养基(不加 FBS);另设空白孔,加入培养基,不接种细胞;37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。

采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶(GOD-POD)法^[8]测定培养液中的葡萄糖浓度,计算各孔的葡萄糖吸收率:

葡萄糖吸收率=(空白孔葡萄糖浓度-各孔葡萄糖浓度)/空白孔葡萄糖浓度

2.3 对 HepG2 IR 模型细胞葡萄糖消耗的影响

将成模细胞分为模型组及羧糖脂组, 对照组及模型组加入不含羧糖脂的培养基, 羧糖脂组分别加入 120、60、30 $\mu\text{g/mL}$ 的羧糖脂。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h。GOD-POD 法测定培养液中的葡萄糖浓度, 计算各孔细胞的葡萄糖吸收率。

2.4 对 HepG2 IR 细胞 GLUT-4、p-IRS-1 Ser307 及 PI3K 蛋白表达的影响

将 HepG2 细胞接种到 96 孔板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下进行培养, 每 24~48 h 传代一次, 控制细胞密度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$, 加含药培养液(浓度分别为 120、60、30 $\mu\text{g/mL}$), 5% CO_2 条件下共孵育 48 h。将细胞移至 1.5 mL 离心管内, 加入细胞裂解液, 提取细胞总蛋白, BCA 法测定所得各组蛋白浓度。蛋白质经 10% SDS-PAGE 电泳分离后转至硝酸纤维素膜, 置于摇床上, 加入 3% BSA 封闭液, 室温孵育 1 h。弃去封闭液, 分别加入 p-IRS-1 Ser307、PI3K、GLUT-4、GAPDH 一抗(1:200), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。取出硝酸纤维素膜, 置于 TBST 溶液中, 漂洗 5 次, 每次 10 min。将膜置于 3% BSA 中稀释, 培养皿内加入二抗稀释液(1:1 000), 放摇床上, 室温孵育 2 h。取出硝酸纤维素膜, 置于 TBST 溶液中, 漂洗 3 次, 每次 10 min。洗膜后, ECL 化学发光法检测条带。使用 Gel-Pro 图像处理软件进行半定量分析。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件, 组间比较分析采用单因素方差分析, 两组间样本均数比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 对 HepG2 细胞增殖的影响

用 MTT 法检测羧糖脂对 HepG2 细胞的细胞毒作用, 如图 1 所示, 62.5、125.0、250.0 $\mu\text{g/mL}$ 羧糖脂干预 24 h 对 HepG2 细胞增殖无显著影响, 500、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的羧糖脂对 HepG2 细胞的促增殖作用显著 ($P < 0.01$)。羧糖脂 62.5、125.0、250.0 $\mu\text{g/mL}$ 处理 48 h, 对 HepG2 细胞增殖亦无显著影响, 500、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的羧糖脂对 HepG2 细胞有显著的促增殖作用 ($P < 0.01$)。结果提示, 羧糖脂 62.5、125.0、250.0 $\mu\text{g/mL}$ 对 HepG2 细胞增殖无显著影响, 为安全剂量范围。

3.2 胰岛素诱导 HepG2 IR 细胞模型

HepG2 细胞给予 10 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素干预, 细胞对葡萄糖的吸收率低于对照组细胞, 差异具有显著性: $(42.21 \pm 1.94) \% \text{ vs } (35.26 \pm 2.18) \% (P < 0.05)$,

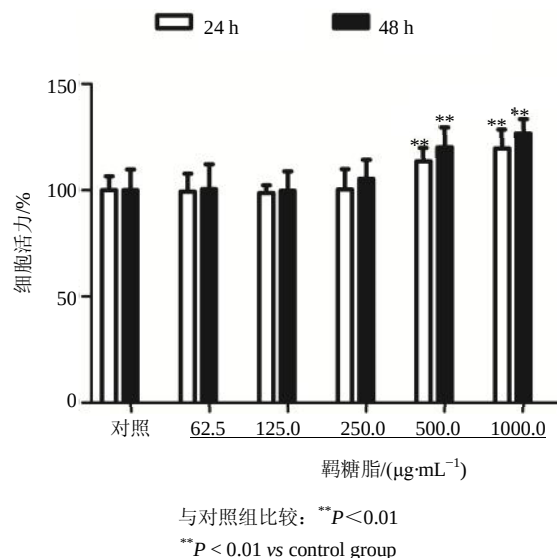


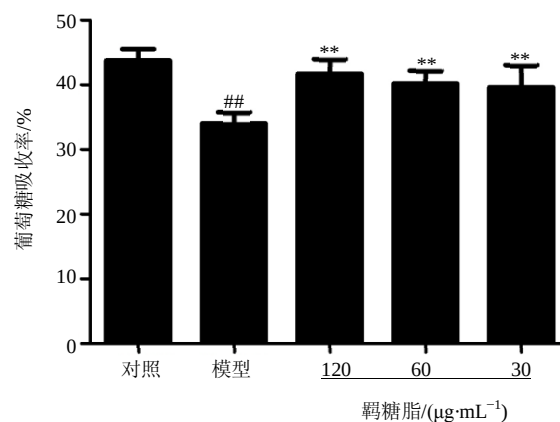
图 1 羧糖脂对 HepG2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 1 Effects of Ji Tang Zhi on proliferation of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

$n = 4$)。结果提示, HepG2 细胞经高浓度胰岛素作用后, 对胰岛素的敏感性下降, IR 细胞模型建立成功。

3.3 改善 HepG2 IR 细胞对葡萄糖的吸收

与模型组比较, 羧糖脂处理后, 细胞对葡萄糖的吸收显著增加, 差异显著 ($P < 0.01$), 如图 2 所示, 羧糖脂对模型细胞葡萄糖吸收能力的影响呈剂量相关性。



与对照组比较: ## $P < 0.01$ 与模型组比较: ** $P < 0.01$

$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

图 2 羧糖脂改善 HepG2 IR 细胞的葡萄糖吸收率 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Improvement of Ji Tang Zhi on rate of absorption glucose in HepG2 cell ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.4 对胰岛素抵抗细胞 IRS-1 Ser307 磷酸化、PI3K、GLUT-4 水平的影响

IRS-1 是一种亲水性蛋白质,不同部位的 IRS-1 磷酸化,可激活不同信号传导通路。酪氨酸磷酸化是 IRS-1 正向信号传导的第一步,丝氨酸磷酸化可发生抑制胰岛素信号传导的调节。在胰岛素抵抗或糖尿病患者体内,丝氨酸磷酸化的发生亦可引发信号传导系统之间信号串扰,以及骨骼肌、肝脏组织发生胰岛素抵抗。因此本课题组研究羧糖脂对胰岛素抵抗 HepG2 细胞中丝氨酸磷酸化水平的影响。与对照组比较,模型组胰岛素抵抗细胞 p-IRS1-ser307 相对表达量显著增加 ($P < 0.01$),增加 373.72%。

与模型组比较,羧糖脂可下调胰岛素抵抗细胞的 IRS1 Ser307 磷酸化水平 ($P < 0.05$ 、 0.01),以羧糖脂 120 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组作用最强。

与对照组比较,模型组 PI3K 蛋白表达水平受明显抑制 ($P < 0.01$),PI3K 表达量下降 82.64%。与模型组比较,羧糖脂可以剂量依赖关系上调胰岛素抵抗细胞 PI3K 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

与对照组比较,模型组细胞 GLUT-4 表达水平受到明显抑制 ($P < 0.01$),抑制率达到 89.82%。与模型组比较,羧糖脂可显著上调 GLUT-4 水平 ($P < 0.01$),其中 120 $\mu\text{g/mL}$ 作用效果最显著,上调 634.02%。结果见图 3。

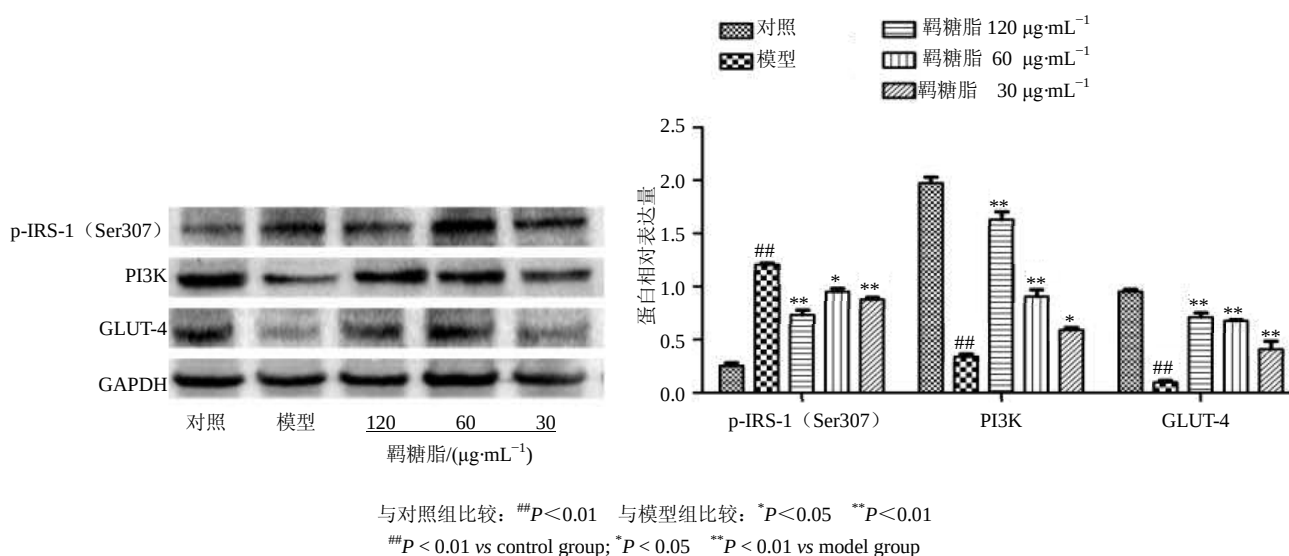


图3 羧糖脂对 HepG2 IR 细胞 p-IRS1、Ser307、PI3K 以及 Glut-4 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Effects of Ji Tang Zhi on expression of p-IRS1 Ser307, PI3K and Glut-4 in HepG2 IR cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

4 讨论

胰岛素抵抗存在组织器官特异性,不同组织胰岛素抵抗的程度存在差异^[9]。肝脏在糖代谢中发挥重要作用,本实验使用高浓度胰岛素诱导人源肝癌 HepG2 细胞,构建胰岛素抵抗细胞模型,进而模拟肝脏胰岛素抵抗的发生。

胰岛素信号传导有酪氨酸磷酸化信号分子调控,如胰岛素受体以及 IRS。磷酸化的胰岛素受体底物可向下传递胰岛素信号,激活 PI3K 通路。胰岛素受体底物丝氨酸磷酸化水平,可影响胰岛素的信号传导,抑制机体对葡萄糖利用从而产生 IR^[10]。提高胰岛素受体底物丝氨酸残基磷酸化水平,可使酪氨酸残基磷酸化及酪氨酸激酶活性降低,胰岛素信号传导受抑制。结果显示,高浓度胰岛素诱导的

HepG2 胰岛素抵抗细胞模型 IRS-1 Ser307 磷酸化水平升高,从而降低细胞代谢葡萄糖的能力。研究结果提示,IRS-1 可能是羧糖脂发挥改善 IR 作用的关键信号分子之一。

葡萄糖转运家族有多种亚型,其中最为常见的是 GLUT-4,它参与机体及细胞的葡萄糖稳态平衡的调节^[11]。GLUT-4 是由胰岛素调控的一种蛋白,胰岛素增强肝脏细胞、骨骼肌中葡萄糖转运是通过 GLUT-4 转位实现的^[12]。因此,本研究通过 Western blotting 方法对 HepG2 细胞进行半定量分析,结果显示,羧糖脂显著上调细胞 GLUT-4 表达,增强细胞对葡萄糖摄取能力,从而降低机体血糖水平。

葡萄糖与脂肪的能量代谢主要靠胰岛素进行调控,而胰岛素主要通过 PI3K/PKB 途径介导其代谢

调节作用^[13]。研究发现,在2型糖尿病患者以及肥胖-非糖尿病患者体内,PI3K通路发生严重的IR,而MAPK介导的信号传导则正常^[14]。研究发现,PI3K通路下游信号分子PKB基因敲除小鼠的肝脏以及脂肪等器官组织对胰岛素的敏感性显著低于正常小鼠,其中肝糖原合成能力以及脂肪组织对葡萄糖吸收能力减弱,表明PKB是糖代谢必需的基因,通过靶基因剔除小鼠PI3K基因后,受试小鼠出现不同程度的IR以及高血糖症^[15]。本研究通过Western blotting测定HepG2细胞PI3K蛋白表达水平,结果发现羧糖脂有效上调PI3K表达,从而增强下游PDK信号分子对胰岛素信号的传导,减少糖异生、促进机体对葡萄糖利用。以上结果提示,羧糖脂改善细胞及机体IR的可能机制是上调PI3K表达。

综上,羧糖脂可有效抑制IRS-1丝氨酸磷酸化水平,增强GLUT-4转位进而活化PI3K,上调葡萄糖消耗水平、促进细胞对葡萄糖的吸收,改善胰岛素抵抗。

参考文献

- [1] 柴瑞华,肖春莹,关健,等. 苦瓜总皂苷降血糖作用的研究[J]. 中草药, 2007, 39(2):746-747.
- [2] 王康君,庞晓斌. 复方枸杞胶囊对2型糖尿病大鼠血糖及血脂的影响[J]. 中医研究, 2009, 22(8): 11-13.
- [3] 李全宏,田泽,蔡同一. 南瓜提取物对糖尿病大鼠降糖效果研究[J]. 营养学报, 2003, 25(1): 34-36.
- [4] 林宏. 金银花药理研究进展[J]. 江西中医药大学学报, 2009, 21(6): 82-84.
- [5] 刘晓华,江湖,李海星,等. 胰岛素诱导3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗模型的建立[J]. 食品科学, 2012, 33(19): 249-253.
- [6] 龚连生,李媛媛,邹从贤. 不同中药提取物对胰岛素抵抗L6肌细胞葡萄糖摄取率的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(21): 5-10.
- [7] 李秀丽,贺嵩敏,朱莹,等. HepG2细胞胰岛素抵抗模型的建立与鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 203-207.
- [8] 朱晓云,王朋倩,韩曼,等. GOD-POD法在3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗评价中的应用[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(11): 1684-1687.
- [9] Li H, Li H, Bao Y, et al. Free fatty acids induce endothelial dysfunction and activate protein kinase C and nuclear factor- κ B pathway in rat aorta[J]. Int J Cardiol, 2011, 152(2): 218-24.
- [10] 冯晓桃,刘毅,王文健. β -arrestins在胰岛素/胰岛素样生长因子-1信号转导中的作用[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2010, 30(2):106-109.
- [11] Cai S, Sun W, Fan Y, et al. Effect of mulberry leaf (Folium Mori) on insulin resistance via IRS-1/PI3K/Glut-4 signalling pathway in type 2 diabetes mellitus rats[J]. Pharm Biol, 2016, 54(11): 2685-2691.
- [12] 潘佳秋,郭晓闻,张超,等. 新诊断2型糖尿病患者血清 β 抑制蛋白2与游离脂肪酸水平变化及其与胰岛素抵抗的关系研究[J]. 中国全科医学, 2014, 17(23): 2700-2703.
- [13] Xiao K, Mcclatchy D B, Shukla A K, et al. Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(29): 12011-12016.
- [14] 马建,姚秀明,赵娜,等. 祛胰抵方对2型糖尿病胰岛素抵抗大鼠PI-3K的影响[J]. 中医药学报, 2013, 41(5): 50-53.
- [15] Shehata M F. Role of the IRS-1 and/or -2 in the pathogenesis of insulin resistance in Dahl salt-sensitive (S) rats[J]. Heart Int, 2009, 4(1): e6.