

小檗碱抑制 IKK β Ser 181 磷酸化改善高糖诱导的 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的分子机制

易 屏¹, 陆付耳^{2*}, 陈 广², 徐丽君², 王开富²

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 中医科, 湖北 武汉 430030; 2. 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 武汉 430030)

摘要:目的 研究小檗碱对高糖诱导的 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的作用, 探讨小檗碱改善胰岛素抵抗的分子机制。方法 以 25 mmol/L 葡萄糖加 0.6 nmol/L 胰岛素诱导 3T3-L1 脂肪细胞产生胰岛素抵抗, 予以小檗碱进行干预, 同时以阿司匹林作为阳性对照, 以 2-脱氧-[³H]-D-葡萄糖摄取法观察葡萄糖的转运率, 用 Western blotting 检测 IKK β 蛋白, IKK β Ser 181 磷酸化, IRS-1 蛋白, IRS-1 Ser 307 磷酸化, PI-3K p85 蛋白, GLUT4 蛋白的表达。结果 25 mmol/L 葡萄糖加 0.6 nmol/L 胰岛素作用 18 h 使 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖转运抑制 60%, IKK β Ser 181 磷酸化, IRS-1 Ser 307 磷酸化的表达增加, IRS-1 和 PI-3K p85 蛋白的表达减少; 同时加入小檗碱或阿司匹林则可逆转上述效应。但高糖、小檗碱、阿司匹林对 3T3-L1 脂肪细胞 IKK β 蛋白、GLUT4 蛋白的表达无明显影响。结论 小檗碱可以明显改善高糖诱导的胰岛素抵抗, 其分子机制可能是小檗碱通过抑制 IKK β Ser 181 磷酸化, 使 IRS-1 丝氨酸残基磷酸化减少而酪氨酸残基磷酸化增加, 调节胰岛素信号蛋白的表达来实现的。

关键词:小檗碱; 胰岛素抵抗; IKK β ; 高糖

中图分类号: R286.72

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)05-0724-06

Molecular mechanism of berberine on improving insulin resistance of 3T3-L1 adipocytes induced by high glucose through IKK β Ser 181 phosphorylation

YI Ping¹, LU Fu-er², CHEN Guang², XU Li-jun², WANG Kai-fu²

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of berberine on insulin resistance of 3T3-L1 adipocytes induced by high glucose and to investigate its possible molecular mechanism. **Methods** 3T3-L1 Adipocytes were treated with 25 mmol/L glucose with 0.6 nmol/L insulin to induce insulin resistance. Berberine was used for the treatment and Aspirin was used for the positive control. 2-Deoxy-[³H]-D-glucose uptaking method was used to observe the transporting rate. Western blotting was used for the determination of IKK β Ser 181 phosphorylation, IRS-1 Ser 307 phosphorylation, and the protein expression of IKK β , IRS-1, PI-3K p85, and GLUT4. **Results** After the treatment with 25 mmol/L glucose with 0.6 nmol/L insulin for 18 h, the insulin-stimulated glucose transportation in 3T3-L1 adipocyte was inhibited by 60%, the protein expression of IRS-1 and PI-3K p85 were reduced; phosphorylation of IKK β Ser 181 and IRS-1 Ser 307 were induced. Meanwhile, these were reversed by prior treatment of the cells with berberine or Aspirin. But the protein expression of GLUT4 and IKK β in 3T3-L1 adipocyte was no change during this study. **Conclusion** The results show that berberine could significantly improve the insulin resistance of 3T3-L1 adipocytes induced by high glucose and its molecular mechanism might be that berberine could decrease the phosphorylation of serine residue of IRS-1 and increase the phosphorylation of tyrosine residue by inhibiting the phosphorylation of IKK β Ser 181, thereby regulating the protein expression of the signal of insulin to improve the insulin-resistance.

Key words: berberine; insulin resistance; IKK β ; high glucose

收稿日期: 2007-08-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371816)

作者简介: 易 屏 (1971—), 女, 湖北武汉人, 医学博士, 主治医师, 主要从事中西医结合内分泌研究。

Tel: (027) 62605927 E-mail: fpp2004@yahoo.com.cn

* 通讯作者 陆付耳 Tel/Fax: (027) 83663237 E-mail: felu@tjh.tjmu.edu.cn

现代药理学研究表明,小檗碱不仅具有清热解毒和抗炎的作用,还具有改善胰岛素抵抗,降低血糖,纠正脂质紊乱的作用^[1~4]。小檗碱同时具有抗炎和抗糖尿病的双重作用正好与 2 型糖尿病在病理本质上是一种慢性炎症性疾病的最新研究观点^[5,6]不谋而合,小檗碱同时具有抗炎作用与改善胰岛素抵抗作用的分子机制尚不清楚。本研究以高糖诱导的胰岛素抵抗细胞为模型^[7],观察小檗碱对炎症分子靶点 IKK β 及胰岛素信号转导相关分子的影响,试图阐明小檗碱同时具有抗炎作用与改善胰岛素抵抗作用的分子机制。

1 材料

盐酸小檗碱、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、地塞米松、胰岛素、阿司匹林、DMSO、细胞松弛素 B (均购自 Sigma 公司);BSA、DMEM、胎牛血清 (FBS) (Gibco BRL 公司);2-脱氧-[³H]-D-葡萄糖 (北京原子高科股份有限公司);3T3-L1 前脂肪细胞 (中国医学科学院基础医学研究所细胞中心);兔 IKK β 抗体、兔磷酸化 IKK β Ser 181 抗体、兔磷酸化 IRS-1 Ser 307 抗体 (Cell Signaling 公司);兔 IRS-1 抗体、兔 PI-3K p85 抗体 (Santacruz 公司);小鼠 GLUT4 抗体 (R&D SYSTEMS 公司);兔 β -actin 抗体 (LAB VISION 公司);辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (Pierce 公司);蛋白 Marker (Fermentas 公司);BCA 蛋白检测试剂盒、增强化学发光法 (ECL) 试剂盒 (Pierce 公司);其他化学试剂均为分析纯。SH87261616 型 CO₂ 培养箱 (美国 Sheldon 公司);倒置相差显微镜 (日本 Olympus CHK 公司);YJ-1450 型医用净化工作台 (苏州净化设备公司);Micro Beta 1540 型液闪仪 (美国 PE 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及诱导分化:在 37 °C、5% CO₂ 条件下,3T3-L1 前脂肪细胞在含 10% FBS 的高糖 DMEM 中培养,待细胞融合 2 d 后,加入含 0.5 mmol/L IBMX、1 μ mol/L 地塞米松、10 mg/L 胰岛素和 10% FBS 的高糖 DMEM 培养 48 h,然后换上含 10 mg/L 胰岛素和 10% FBS 的高糖 DMEM 再培养 48 h,随后以 10% FBS 的高糖 DMEM 继续培养,2 d 换培养液 1 次,诱导分化 8-12 d 的 3T3-L1 细胞 90%~95% 呈脂肪细胞表型,可用于实验^[7]。

2.2 3T3-L1 细胞胰岛素抵抗模型的建立与分组处理:将诱导分化成熟的 3T3-L 脂肪细胞换上含 0.2% BSA 的 DMEM 无血清培养液培养 12 h 后,

分别换上含 25 mmol/L 葡萄糖、0.6 nmol/L 胰岛素、1% BSA 的 DMEM 培养液培养 18 h (模型组, M);含 25 mmol/L 葡萄糖、0.6 nmol/L 胰岛素、10 μ mol/L 小檗碱、1% BSA 的 DMEM 培养液培养 24、48 h (小檗碱高剂量组, BH24, BH48);含 25 mmol/L 葡萄糖、0.6 nmol/L 胰岛素、1 μ mol/L 小檗碱、1% BSA 的 DMEM 培养液培养 24、48 h (小檗碱低剂量组, BL24, BL48);含 25 mmol/L 葡萄糖、0.6 nmol/L 胰岛素 5 mmol/L 阿司匹林、1% BSA 的 DMEM 培养液培养 24、48 h (阿司匹林组, As24, As48);含 1% BSA 的 DMEM 培养液培养 24 h (正常组, N)。

2.3 葡萄糖转运试验:将 24 孔板中诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞以含 0.2% BSA 的 DMEM 培养液培养 12 h,换以含 0.2% BSA 的含药培养液孵育一定时间后,移去培养液,以 KRP 缓冲液 (131.2 mmol/L NaCl、4.71 mmol/L KCl、2.47 mmol/L CaCl₂、1.24 mmol/L MgSO₄、2.48 mmol/L Na₃PO₄、10 mmol/L HEPES, pH 7.4) 洗 3 次,再以含或不含 100 nmol/L 胰岛素的 KRP 缓冲液 37 °C 孵育 30 min,加入 1 mL 含 1.75 $\times$ 10⁴ Bq/mL 2-脱氧-[³H]-D-葡萄糖的 KRP 缓冲液 37 °C 孵育 10 min,以预冷含 10 mmol/L 葡萄糖的 PBS 快速洗 3 次中止反应,加 1 mL 0.1 mol/L NaOH 作用 2 h,取细胞裂解液,用液闪仪计数其每分钟衰变数 (cpm)。另设一组加 10 μ mol/L 细胞松弛素 B 作为 2-脱氧-[³H]-D-葡萄糖的非特异摄取率,所有数据减去此值,作为各组细胞的葡萄糖摄取率^[8]。每次实验设 3 个复孔,共重复 3 次实验。另用 CCK-8 法监测细胞的数目和活力^[9]。

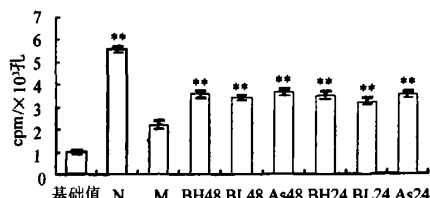
2.4 Western blotting 试验:分化成熟、高糖 (25 mmol/L) 加胰岛素 (0.6 nmol/L)、小檗碱 (10、1 μ mol/L)、阿司匹林 (5 mmol/L) 分别处理 24、48 h 的 3T3-L1 脂肪细胞用细胞裂解液裂解后提取总蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取等量的蛋白样品 50 μ g,用样品缓冲液处理,蛋白变性、SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白、电转移法使蛋白转移至 PDVF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST (Tris-HCl 50 mmol/L、NaCl 150 mmol/L, pH 7.4, 0.1% 聚山梨酯) 室温下封闭 2 h 以减少非特异性结合,封膜后加入抗相应蛋白的抗体为特异性第一抗体,4 °C 过夜, TBST 洗膜后以辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (1:3 000) 孵育,室温下轻摇 2 h, TBST 洗膜后用 ECL 化学发光法曝光显影,洗片

后用 Bio-Rad 图像分析系统对目的条带进行扫描, 然后用 Quantity One 软件进行分析。

2.5 统计学处理: 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 t 检验, 所有数据应用 SPSS 软件进行统计学分析。

3 结果

3.1 小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖转运的影响: 葡萄糖转运实验发现, 诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞, 胰岛素刺激的葡萄糖转运较基础状态下明显增加, 是基础状态下的 5.6 倍, 这表明诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞对胰岛素极其敏感, 是研究胰岛素增敏剂的理想细胞模型, 胰岛素刺激的葡萄糖转运值可以反映胰岛素敏感性。实验结果显示: 25 mmol/L 葡萄糖加 0.6 nmol/L 胰岛素作用 18 h 使 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖转运抑制 60%; 加入 1、10 μ mol/L 小檗碱作用 24 h 后 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖转运分别增加 46%、56%, 作用 48 h 后分别增加 52%、61%, 呈时间剂量依赖效应, 加入 5 mmol/L 阿司匹林作用 24 h 后 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖转运增加 58%, 作用 48 h 后增加 65%, 见图 1。



与模型组 (M) 比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model (M) group

图 1 各组 3T3-L1 脂肪细胞对 2-脱氧- $[^3\text{H}]$ -D-葡萄糖的摄取 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig. 1 Insulin-induced 2-deoxy- $[^3\text{H}]$ -D-glucose uptaking in 3T3-L1 adipocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

CCK-8 结果显示: 25 mmol/L 葡萄糖加 0.6 nmol/L 胰岛素存在时, 3T3-L1 脂肪细胞的 CCK-8 值无影响; 加入 1、10 μ mol/L 小檗碱作用 24、48 h 对 3T3-L1 脂肪细胞的 CCK-8 值均无影响, 加入 5 mmol/L 阿司匹林作用 24、48 h 对 3T3-L1 脂肪细胞的 CCK-8 值亦无影响, 与正常组比较差异不显著 ($P > 0.05$), 见表 1。

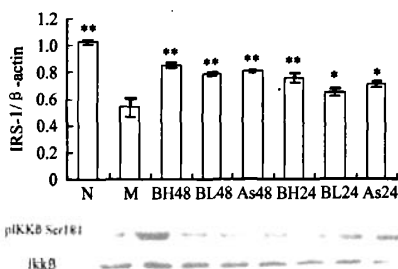
3.2 小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1、PI-3K p85 和 GLUT4 蛋白表达的影响: 采用 Western blotting 检测 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1、PI-3K p85 和 GLUT4 蛋白的表达, 结果显示: 25 mmol/L 葡

表 1 小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞 CCK-8 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 1 Effect of berberine on CCK-8 in 3T3-L1 adipocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	CCK-8 值	组别	CCK-8 值
N	1.869 $\pm$ 0.050	As48	1.837 $\pm$ 0.023
M	1.855 $\pm$ 0.019	BH24	1.856 $\pm$ 0.025
BH48	1.849 $\pm$ 0.020	BL24	1.854 $\pm$ 0.021
BL48	1.854 $\pm$ 0.019	As24	1.845 $\pm$ 0.030

萄糖加 0.6 nmol/L 胰岛素作用 18 h 可以明显抑制 IRS-1 和 PI-3K p85 蛋白的表达, 与正常对照组比较差异非常显著 ($P < 0.01$); 同时加入小檗碱或 IKK β 抑制剂阿司匹林则可以逆转其作用, 使 IRS-1 和 PI-3K p85 蛋白的表达增加, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$); 且其表达与小檗碱的作用和剂量呈依赖关系 (图 2、3)。但是无论加入高糖还是同时加入小檗碱或阿司匹林对 3T3-L1 脂肪细胞 GLUT4 蛋白的表达无明显影响 ($P > 0.05$), 见图 4。

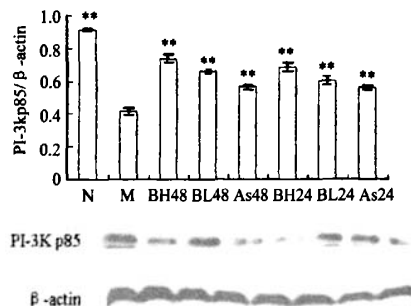


与模型组 (M) 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model (M) group

图 2 各组 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig. 2 Protein expression of IRS-1 in 3T3-L1 adipocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)



与模型组 (M) 比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model (M) group

图 3 各组 3T3-L1 脂肪细胞 PI-3K p85 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig. 3 Protein expression of PI-3K p85 in 3T3-L1 adipocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

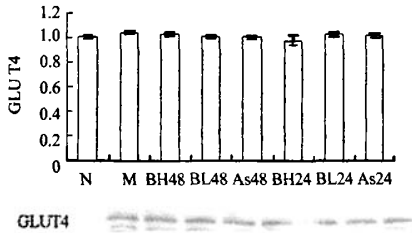
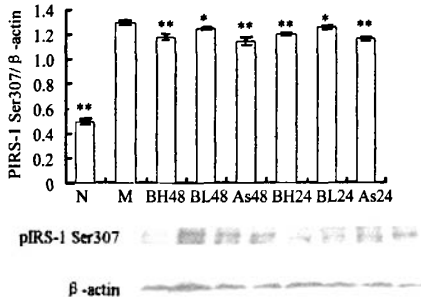


图 4 各组 3T3-L1 脂肪细胞 GLUT4 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig. 4 Protein expression of GLUT4 in 3T3-L1

adipocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

3.3 小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1 Ser 307 磷酸化的影响: 采用 Western blotting 检测 3T3-L1 脂肪细胞磷酸化 IRS-1 蛋白的表达, 结果显示: 25 mmol/L 葡萄糖加 0.6 nmol/L 胰岛素作用 18 h 可以刺激 IRS-1 Ser 307 磷酸化, 与正常对照组比较差异非常显著 ($P < 0.01$); 同时加入小檗碱或 IKK β 抑制剂阿司匹林则可以逆转 PA 的作用, 使 IRS-1 Ser 307 磷酸化明显减少, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$), 并且 IRS-1 Ser 307 磷酸化程度与小檗碱的剂量和作用时间呈依赖关系, 见图 5。



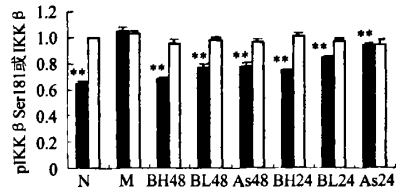
与模型组 (M) 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model (M) group

图 5 各组 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1 Ser 307 磷酸化的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig. 5 Expression of IRS-1 Ser 307 phosphorylation in 3T3-L1 adipocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

3.4 小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞 IKK β Ser 181 磷酸化和 IKK β 蛋白表达的影响: 采用 Western blotting 同时检测 3T3-L1 脂肪细胞磷酸化与非磷酸化 IKK β 蛋白的表达, 结果显示: 25 mmol/L 葡萄糖加 0.6 nmol/L 胰岛素作用 18 h 可以显著刺激 IKK β Ser 181 磷酸化, 与正常对照组比较, 差异非常显著 ($P < 0.01$); 同时加入小檗碱或 IKK β 抑制剂阿司匹林则可以逆转 PA 的作用, 使 IKK β Ser 181 磷酸化明显减少, 与模型组比较, 差异非常显著

($P < 0.01$), 并且 IKK β Ser 181 磷酸化与小檗碱的剂量和作用时间呈依赖关系。但是, 高糖、小檗碱、阿司匹林对 3T3-L1 脂肪细胞非磷酸化 IKK β 蛋白的表达并无影响 ($P > 0.05$), 见图 6。



与模型组 (M) 比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model (M) group

图 6 各组 3T3-L1 脂肪细胞 IKK β Ser 181 磷酸化及 IKK β 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig. 6 Phosphorylation of IKK β Ser 181 and protein expression of IKK β in 3T3-L1 adipocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

4 讨论

小檗碱是从黄连等植物中提取的一种异喹啉类生物碱, 最初作为清热解毒药和抗炎药应用于临床。最近研究表明小檗碱通过激活 AMPK 途径而增加胰岛素敏感性, 表明小檗碱具有改善胰岛素抵抗, 降低血糖, 纠正脂质紊乱的作用^[1~4]。相关文献报道传统的解热镇痛抗炎药水杨酸制剂通过抑制 IKK β 而逆转肥胖和饮食诱导的胰岛素抵抗^[10,11], IKK 激酶复合物属丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白激酶超家族成员, 其主要功能是调节核因子 (NF- κ B) 的转位活化, 其激活 NF- κ B 的功能主要由 IKK β 介导^[12]。近年来的研究显示, 胰岛素信号转导过程中的多种信号蛋白除受到酪氨酸磷酸化调节外, 还受到 Ser/Thr 磷酸化的调节, Ser/Thr 蛋白激酶 IKK β 的活化与胰岛素抵抗的发生密切相关, 是治疗胰岛素抵抗的重要分子靶点^[10]。本研究探讨了小檗碱的抗炎作用与改善胰岛素抵抗作用共同的分子靶点是否为 IKK β 。

本实验室前期采用小剂量链脲佐菌素 iv 加高脂高糖饮料喂养方法建立 Wistar 大鼠胰岛素抵抗模型, 予以小檗碱干预治疗 10 周后, 动物的空腹血糖和胰岛素水平明显降低, 葡萄糖耐量明显改善, 血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、急性反应蛋白 (CRP)、黏附分子 (ICAM-1、VCAM-1) 明显降低, 同时脂肪、肌肉组织的 InsR β 亚基酪氨酸磷酸化蛋白、IRS-1 酪氨酸磷酸化蛋白、IRS-1 蛋白、GLUT4

蛋白表达及转位、PI-3K 蛋白的表达均明显增高,证明小檗碱同时具有抗炎、降低血糖、改善胰岛素抵抗的作用^[13~15]。本实验以 25 mmol/L 葡萄糖加 0.6 nmol/L 胰岛素诱导 3T3-L1 脂肪细胞产生胰岛素抵抗,予以小檗碱进行干预,同时以 IKK β 抑制剂阿司匹林作为阳性对照,检测 IKK β 及胰岛素信号转导相关蛋白的表达。

本实验发现:25 mmol/L 葡萄糖加 0.6 nmol/L 胰岛素作用 18 h 后使 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖转运抑制 60%,若预先加入小檗碱或 IKK β 抑制剂阿司匹林则可以逆转其作用,使葡萄糖转运增加 46%~65%。胰岛素刺激的葡萄糖转运是衡量胰岛素敏感性、判断胰岛素抵抗的重要指标,这说明 25 mmol/L 葡萄糖加 0.6 nmol/L 胰岛素作用 18 h 后 3T3-L1 脂肪细胞产生胰岛素抵抗,而小檗碱具有改善胰岛素抵抗的作用。

为了研究小檗碱改善高糖诱导的胰岛素抵抗的作用机制,应用 Western blotting 检测胰岛素信号转导蛋白 IRS-1、PI-3K p85 和 GLUT4 的表达,结果发现:25 mmol/L 葡萄糖加 0.6 nmol/L 胰岛素作用 18 h 可以明显抑制 IRS-1 和 PI-3K p85 蛋白的表达,同时加入小檗碱或 IKK β 抑制剂阿司匹林则可以逆转其作用,使 IRS-1 和 PI-3K p85 蛋白的表达增加,但是无论加入高糖还是同时加入小檗碱或阿司匹林对 GLUT4 蛋白的表达无明显影响。这说明高糖诱导的胰岛素刺激的葡萄糖转运抑制是 IRS-1 和 PI-3K p85 蛋白表达减少的结果,而与 GLUT4 蛋白的表达无关,小檗碱通过提高 IRS-1 和 PI-3K p85 蛋白的表达改善胰岛素抵抗。

已有研究证实 IRS-1 Ser 307 磷酸化可导致 IRS-1 蛋白表达减少,且 IRS-1 Ser 307 磷酸化发生于 IRS-1 蛋白减少之前^[16],是胰岛素抵抗的重要分子标志^[17,18]。于是进一步检测了小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1 Ser 307 磷酸化的影响,结果发现:25 mmol/L 葡萄糖加 0.6 nmol/L 胰岛素作用 18 h 可以刺激 IRS-1 Ser 307 磷酸化,同时加入小檗碱或 IKK β 抑制剂阿司匹林则可以逆转其作用,使 IRS-1 Ser 307 磷酸化明显减少,这说明小檗碱通过抑制高糖诱导的 IRS-1 Ser 307 磷酸化改善胰岛素抵抗。

据报道,IRS-1 Ser 307 能被 Ser/Thr 蛋白激酶 IKK 或 JNK 磷酸化^[19],在哺乳动物细胞中,IKK β Ser 181 磷酸化是 IKK β 活化的关键^[20]。本实验还检测了小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞 IKK β Ser 181 磷

酸化的影响,结果发现:25 mmol/L 葡萄糖加 0.6 nmol/L 胰岛素作用 18 h 可以刺激 IKK β Ser 181 磷酸化,同时加入小檗碱或 IKK β 抑制剂阿司匹林则可以逆转其作用,使 IKK β Ser 181 磷酸化明显减少,这说明小檗碱通过抑制高糖诱导的 IKK β Ser 181 磷酸化,使 IRS-1 丝氨酸残基磷酸化减少而酪氨酸残基磷酸化增加,调节胰岛素信号蛋白的表达,改善胰岛素抵抗。

本研究结果提示,胰岛素抵抗与慢性炎症有关,IKK β 是治疗胰岛素抵抗的重要靶点,小檗碱可能通过 IKK β 途径实现其抗炎和改善胰岛素抵抗的双重功效。如果小檗碱作为一种 IKK β 的抑制剂应用于临床,将为以胰岛素抵抗和慢性炎症为基本病理生理学基础的非感染性慢性退行性疾病的治疗提供崭新的思路。

参考文献:

- [1] Lee Y S, Kim W S, Kim K H, *et al.* Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states [J]. *Diabetes*, 2006, 55: 2256-2264.
- [2] Yin J, Hu R, Chen M, *et al.* Effects of berberine on glucose metabolism *in vitro*. [J]. *Metabolism*, 2002, 51: 1439-1443.
- [3] Leng S H, Lu F E, Xu L J, *et al.* Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25: 496-502.
- [4] Ko B S, Choi S B, Park S K, *et al.* Insulin sensitizing and insulinotropic action of berberine from *Cordis rhizoma*. [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28: 1431-1437.
- [5] Lazar M A. How obesity causes diabetes: not a tall tale [J]. *Science*, 2005, 307: 373-375.
- [6] Syed M A, Barinas-Mitchell E, Pietropaolo S L, *et al.* Is type 2 diabetes a chronic inflammatory/autoimmune disease? [J]. *Diabetes Nutr Metab*, 2002, 15: 68-83.
- [7] Nelson B A, Robinson K A, Buse M G. High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Diabetes*, 2000, 49: 981-991.
- [8] Romero R, Casanova B, Pulido N, *et al.* Stimulation of glucose transport by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes; increased abundance of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter proteins [J]. *Endocrinology*, 2000, 164: 187-195.
- [9] Takeuchi A, Mishina Y, Miyaishi O, *et al.* Heterozygosity with respect to Zip148 causes complete loss of fetal germ cells during mouse embryogenesis [J]. *Nat Genet*, 2003, 33: 172-176.
- [10] Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, *et al.* Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKK β [J]. *Science*, 2001, 293(5535): 1673-1677.
- [11] Kim J K, Kim Y J, Fillmore J J, *et al.* Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate [J]. *Clin Invest*, 2001, 108(3): 437-446.
- [12] Li Z W, Chu W M, Hu Y L, *et al.* The IKK β subunit of I κ B kinase (IKK) is essential for nuclear factor κ B activation and prevention of apoptosis [J]. *Exp Med*, 1999, 189: 1893-

- 1845.
- [13] 肖雁凌, 陆付耳, 徐丽君, 等. 黄连解毒汤对2型糖尿病大鼠血管内皮功能的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(22): 1767-1770.
- [14] 叶爱丽, 陆付耳, 徐丽君, 等. 黄连解毒汤对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 IRS-1 表达及酪氨酸磷酸化水平的影响[J]. 中医杂志, 2005, 46(9): 695-697.
- [15] 谭 焱, 陆付耳, 徐丽君, 等. 黄连解毒汤对2型糖尿病大鼠血清炎症介质和标志物水平的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(12): 1113-1115.
- [16] Zhande R, Mitchell J J, Wu J, *et al.* Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 1016-1026.
- [17] Lee Y H, Giraud J, Davis R J, *et al.* C-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade [J]. *Biol Chem*, 2003, 278: 2896-2902.
- [18] Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance [J]. *Nature*, 2002, 420: 333-336.
- [19] Gao Z, Zuberi A, Quon M, *et al.* Aspirin inhibits TNF-induced serine phosphorylation of IRS-1 through targeting multiple serine kinases [J]. *Biol Chem*, 2003, 278: 24944-24950.
- [20] Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, *et al.* Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation [J]. *Science*, 1999, 284: 309-313.

芦荟大黄素抑制胃癌细胞生长与细胞周期阻滞的关系

肖丙秀¹, 郭俊明^{1*}, 刘东海^{1,2}, 张 顺^{1,2}, 刘 琼¹

(1. 宁波大学医学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学医学院附属医院宁波市第二医院, 浙江 宁波 315210)

摘要:目的 探讨芦荟大黄素抑制胃癌细胞生长与细胞周期阻滞的关系。方法 人胃癌 SGC-7901 细胞用 2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 芦荟大黄素处理 1~5 d。分别用 MTT 方法和流式细胞术检测细胞增殖情况和细胞周期的变化, 然后用 Western blotting 方法检测细胞周期相关调控蛋白周期蛋白 (cyclin) 和周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 的变化。结果 芦荟大黄素以剂量依赖方法抑制胃癌细胞的生长; 芦荟大黄素引起细胞阻滞在 G₂/M 期; 其分子机制为引起 cyclin A 和 CDK2 的表达水平下降, cyclin B1 和 CDK1 的表达水平上升。结论 芦荟大黄素抑制胃癌细胞生长的机制之一是阻滞细胞周期, 说明芦荟大黄素在胃癌治疗方面有潜在的临床价值。

关键词: 芦荟大黄素; 胃癌细胞 SGC-7901; 细胞周期

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)05-0729-04

Relationship between antiproliferation effects of aloe-emodin on growth of gastric cancer cells and cell cycle arrest

XIAO Bing-xiu¹, GUO Jun-ming¹, LIU Dong-hai^{1,2}, ZHANG Shun^{1,2}, LIU Qiong¹

(1. School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Ningbo No. 2 Hospital, Affiliated Hospital, School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315210, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the antiproliferation effects of aloe-emodin on growth of gastric cancer cells and cell cycle arrest. **Methods** Human gastric cancer SGC-7901 cells were treated with 2.5, 5, 10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$ aloe-emodin for 1—5 d. The cell growth was determined by MTT assay. Cell proliferation and cycle distributions were analyzed by flow cytometry. Western blotting assay was used to detect the changes of cell cycle regulators, cyclins, and cyclin-dependent kinases (CDK). **Results** Aloe-emodin inhibited the growth of gastric cancer cells in a dose-dependent manner. Treatment of aloe-emodin resulted in cell cycle arresting at G₂/M phase. Its molecular mechanisms involved the decrease of the expression of cyclin A and CDK2, the increase of the expression of cyclin B1 and CDK1. **Conclusion** One of the antitumor mechanism of aloe-emodin on the growth of gastric cancer SGC-7901 cells is to arrest the cell cycle, which indicates that aloe-emodin has a potential value for the treatment of gastric cancer in clinic.

Key words: aloe-emodin; gastric cancer SGC-7901 cell; cell cycle

收稿日期: 2007-09-12

基金项目: 宁波市自然科学基金资助项目 (2006A610047); 浙江省“151 人才”工程培养项目 (2003236); 宁波市高校名师培养项目 (2004771)

作者简介: 肖丙秀 (1965—), 女, 江西兴国人, 高级实验师, 学士, 主要从事肿瘤分子生物学研究。

Tel: (0574) 87600759 E-mail: xiaobingxiu@nbu.edu.cn

* 通讯作者 郭俊明

小檗碱抑制IKK β Ser 181磷酸化改善高糖诱导的3T3-L1脂肪

细胞胰岛素抵抗的分子机制

作者：[易屏](#)，[陆付耳](#)，[陈广](#)，[徐丽君](#)，[王开富](#)，[YI Ping](#)，[LU Fu-er](#)，[CHEN Guang](#)，[XU Li-jun](#)，[WANG Kai-fu](#)

作者单位：[易屏, YI Ping\(华中科技大学同济医学院附属同济医院中医科, 湖北, 武汉430030\)](#)，[陆付耳, 陈广, 徐丽君, 王开富, LU Fu-er, CHEN Guang, XU Li-jun, WANG Kai-fu\(华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所, 湖北, 武汉430030\)](#)

刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**

英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)

年，卷(期)：2008, 39(5)

被引用次数：2次

参考文献(20条)

1. [Lee Y S;Kim W S;Kim K H](#) Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states[外文期刊] 2006(8)
2. [Yin J;Hu R;Chen M](#) Effects of berberine on glucose metabolism in vitro[外文期刊] 2002(11)
3. [Leng S H;Lu F E;Xu L J](#) Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion[期刊论文]-[Acta Pharmacologica Sinica](#) 2004
4. [Ko B S;Choi S B;Park S K](#) Insulin sensitizing and insulinotropic action of berberine from *Coptidis rhizoma*[外文期刊] 2005(8)
5. [Lazar M A](#) How obesity causes diabetes: not a tall tale[外文期刊] 2005(5708)
6. [Syed M A;Barinas-Mitchell E;Pietropaolo S L](#) Is type 2 diabetes a chronic inflammatory/autoimmune disease? 2002
7. [Nelson B A;Robinson K A;Buse M G](#) High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes[外文期刊] 2000(6)
8. [Romero R;Casanova B;Pulido N](#) Stimulation of glucose transport by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes: increased abundance of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter proteins[外文期刊] 2000(2)
9. [Takeuchi A;Mishina Y;Miyaishi O](#) Heterozygosity with respect to Zfp148 causes complete loss of fetal germ cells during mouse embryogenesis[外文期刊] 2003(2)
10. [Yuan M;Konstantopoulos N;Lee J](#) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKKβ[外文期刊] 2001(5535)
11. [Kim J K;Kim Y J;Fillmore J J](#) Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate 2001(03)
12. [Li Z W;Chu W M;Hu Y L](#) The IKKβ subunit of IκB kinase (IKK) is essential for nuclear factor κB activation and prevention of apoptosis 1999
13. [肖雁凌;陆付耳;徐丽君](#) 黄连解毒汤对2型糖尿病大鼠血管内皮功能的影响[期刊论文]-[中国中药杂志](#) 2005(22)
14. [叶爱丽;陆付耳;徐丽君](#) 黄连解毒汤对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌IRS-1表达及酪氨酸磷酸化水平的影响[期刊论文]-[中医杂志](#) 2005(09)
15. [谭焱;陆付耳;徐丽君](#) 黄连解毒汤对2型糖尿病大鼠血清炎症性介质和标志物水平的影响[期刊论文]-[中国医院药学杂志](#) 2005(12)
16. [Zhander R;Mitchell J J;Wu J](#) Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1 2002

17. [Lee Y H;Giraud J;Davis R J C-Jun N-terminal kinase\(JNK\)mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade](#) 2003
18. [Hirosumi J;Tuncman G;Chang L A central role for JNK in obesity and insulin resistance](#)[外文期刊] 2002(6913)
19. [Gao Z;Zuberi A;Quon M Aspirin inhibits TNF-induced serine phosphorylation of IRS-1 through targeting multiple serine kinases](#)[外文期刊] 2003
20. [Delhase M;Hayakawa M;Chen Y Positive and negative regulation of I \$\kappa\$ B kinase activity through IKK \$\beta\$ subunit phosphorylation](#)[外文期刊] 1999(5412)

本文读者也读过(6条)

1. [易屏, 陆付耳, 陈广, 徐丽君, 王开富, YI Ping, LU Fu-er, CHEN Guang, XU Li-jun, WANG Kai-fu 小檗碱改善3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗的分子机制](#)[期刊论文]-[中华内分泌代谢杂志](#)2007, 23(4)
2. [易屏, 陆付耳, 陈广, 徐丽君, 董慧, 王开富, Ping Yi, Fu-Er Lu, Guang Chen, Li-Jun Xu, Hui Dong, Kai-Fu Wang 小檗碱对3T3-L1胰岛素抵抗细胞模型PI-3K p85蛋白表达的影响](#)[期刊论文]-[世界华人消化杂志](#)2008, 16(19)
3. [易屏, 陆付耳, 陈广, 徐丽君, 王开富, YI Ping, LU Fu-er, CHEN Guang, XU Li-jun, WANG Kai-fu 小檗碱抑制核因子NF- \$\kappa\$ B p65的核转位改善高糖诱导的3T3-L1细胞胰岛素抵抗的分子机制](#)[期刊论文]-[中国医院药学杂志](#)2008, 28(12)
4. [易屏, 陆付耳, 陈广, 徐丽君, 董慧, 王开富, YI Ping, LU Fu-Er, CHEN Guang, XU Li-Jun, DONG Hui, WANG Kai-Fu 高糖磷酸化IKK \$\beta\$ Ser181诱导3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗的分子机制](#)[期刊论文]-[中国免疫学杂志](#)2009, 25(2)
5. [张艳萍, 李继安, ZHANG Yanping, LI Ji'an 中药治疗2型糖尿病胰岛素抵抗的分子机制研究进展](#)[期刊论文]-[华北煤炭医学院学报](#)2011, 13(4)
6. [包·照日格图, 却翎, 万春平, 宋娜丽, 唐志国, 李翀 五味清浊散对3T3-L1细胞TNF- \$\alpha\$ 浓度和基因表达的影响](#)[期刊论文]-[中国民族医药杂志](#)2008, 14(9)

引证文献(2条)

1. [罗映, 金磊, 何琦, 周岐新, 杨俊霞 小檗碱对兔血脂代谢及维生素D受体和胰岛素诱导基因2基因表达的影响](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2011(8)
2. [李井彬, 陆付耳 中医药改善胰岛素抵抗及其分子机制的研究进展](#)[期刊论文]-[中西医结合研究](#) 2011(1)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200805030.aspx