

◆方药研究◆

## 小檗碱对 HepG2 胰岛素抵抗细胞 PI3K/ AKT1/GLUT1 信号通路的调控作用

龚又明<sup>1</sup>, 郑显辉<sup>1</sup>, 谢鸣坤<sup>1</sup>, 陈艳红<sup>1</sup>, 邓广海<sup>1</sup>, 王芳<sup>2</sup>

1. 广东省中医院药学部, 广东 广州 510120; 2. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

[摘要] 目的: 探讨小檗碱对 HepG2 胰岛素抵抗细胞 PI3K/AKT1/GLUT1 信号通路的调控作用。方法: MTT 法检测小檗碱不同浓度对细胞生长的抑制率; 建立胰岛素抵抗细胞模型, 实验分为 5 组, 分别为空白组、模型组、二甲双胍组、小檗碱高剂量组、小檗碱低剂量组, 给予相应的药物后, Western Blot 检测葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1)、磷脂酰肌醇激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B1 (AKT1) 的表达。结果: 与空白组比较, 模型组细胞培养基中的葡萄糖含量显著升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 说明胰岛素抵抗细胞模型建立成功。与空白组比较, 模型组 PI3K 蛋白、GLUT1 蛋白表达显著降低, AKT1 蛋白表达显著升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 二甲双胍组、小檗碱高剂量组、小檗碱低剂量组 PI3K 蛋白、GLUT1 蛋白表达显著升高, AKT1 蛋白表达显著降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 小檗碱具有改善细胞胰岛素抵抗的作用, 其分子机制可能通过调控 PI3K/AKT1/GLUT1 信号通路中转录因子蛋白的表达, 从而改善细胞胰岛素抵抗状态。

[关键词] 胰岛素抵抗; HepG2 细胞; 小檗碱; 信号通路; 葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1); 磷脂酰肌醇激酶 (PI3K); 蛋白激酶 B1 (AKT1); 细胞实验

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 08-0001-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.08.001

### Berberine Can Regulate PI3K, AKT1 and GLUT1 Signal Pathway in HepG2 Insulin Resistant Cells

GONG Youming, ZHENG Xianhui, XIE Mingkun, CHEN Yanhong, DENG Guanghai, WANG Fang

Abstract: Objective: To discuss the regulation effect of berberine on PI3K, AKT1 and GLUT1 signal pathway in HepG2 insulin resistant cells. Methods: Detected inhibition rate of different concentrations of berberine, and established insulin resistance cell model. Divided study object into five groups, including blank group, model group, metformin group, high dose of berberine group, low dose of berberine group which were given corresponding medicine. Detected expression of glucose transporter 1 (GLUT1), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Protein kinase B1 (AKT1) with Western Blot. Results: Compared with the blank group, the glucose content in the cell culture medium of the model group was significantly increased ( $P < 0.05$ ), indicating that the insulin resistance cell model was established successfully. Compared with the blank group, the expression of PI3K protein and GLUT1 protein in the model group was significantly lower, the expression of AKT1 protein was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the expression of PI3K protein and GLUT1 protein in metformin group, high dose of berberine group and low dose of berberine group was significantly increased, the expression of AKT1 protein was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Conclusion: Berberine has the effect of improving insulin resistance of cells, and its molecular mechanism may be improving insulin resistance condition by regulating the expression of transcription factor protein in PI3K, AKT1 and GLUT1 signal pathway.

Keywords: Insulinresistance; HepG2 cells; Berberine; Signalpathway; Glucosetransporter-1(GLUT1); Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K); Protein kinase B1(AKT1); Cell experiment

[收稿日期] 2017-03-12

[作者简介] 龚又明 (1981-), 男, 主管中药师, 主要从事中药学相关工作。

[通讯作者] 王芳, E-mail: fangzisunny@126.com。

胰岛素抵抗是指各种原因使胰岛素促进葡萄糖摄取和效率下降,机体代偿性的分泌过多胰岛素产生高胰岛素血症,以维持血糖的稳定<sup>[1]</sup>。胰岛素抵抗易导致如糖尿病、动脉粥样硬化、高血脂、中心性肥胖、高血压、高血糖、脂肪肝、冠心病、高胰岛素血症、高尿酸血症、血液高凝状态和微量白蛋白尿等<sup>[2]</sup>。胰岛素抵抗的患病率呈逐年上升趋势,有关胰岛素抵抗的研究也受到各国学者的重视。黄连是一味抗菌药,临床上长期以来用于解热镇痛、抗肠道细菌感染,近年来发现其主要成分小檗碱还有抗心律失常、降血脂<sup>[3-5]</sup>、降血糖<sup>[6]</sup>、抗血小板聚集等药理作用。本实验拟从分子生物学上探讨小檗碱调控胰岛素 PI3K/AKT1/GLUT1 信号通路中的转录因子,改善胰岛素抵抗作用的分子机制,为小檗碱治疗胰岛素抵抗的靶向研究提供新的理论依据。

## 1 材料与与方法

1.1 仪器及试剂 DMEM 培养基购于 Gibco 公司, Lot: 8114351; 血清购于 ExCellBio 公司, Lot No: 11E074; BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝生物有限公司); 盐酸二甲双胍(北京太洋药业有限公司); 葡萄糖测定试剂盒(南京建成公司); 胰岛素(Sigma 公司); 蛋白磷酸酶抑制剂混合物(北京普利莱基因技术有限公司);  $\beta$ -actin 购于 ZSGB-BIO, 批号: ZB2305; AKT1 和 GLUT1 抗体购于 abcam, Lot 分别为: ab81283, ab115730。黄连饮片购于康美药业股份有限公司, 批号 161021231。

1.2 药物提取 称 2 g 磨细的中药黄连, 放入 25 mL 圆底烧瓶中, 加入 10 mL 乙醇, 装上回流冷凝管, 在热水浴中加热回流 0.5 h, 冷却并静置浸泡 0.5 h, 抽滤, 滤渣重复上述操作处理 1 次, 合并 2 次所得滤液。在水泵减压下蒸出乙醇, 再加入 1% 醋酸溶液(6~8 mL), 加热溶解, 趁热抽滤以除去不溶物, 然后在滤液中滴加浓盐酸至溶液混浊为止(约需 2 mL), 放置冷却即有黄色针状晶体析出。抽滤结晶, 并用冰水洗涤 2 次, 再用丙酮洗涤 1 次, 烘干后称重约 0.2 g。

1.3 细胞培养 HepG2 细胞来源于武汉博士德生物工程有限公司, 用含有 10% FBS 和青链霉素混合液(青霉素浓度为 100 U/mL, 链霉素浓度为 100  $\mu$ g/mL)的 DMEM 培养基培养, 用 0.25% 胰酶消化传代, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 和 90% 湿度的孵箱培养。

1.4 胰岛素抵抗细胞模型建立 HepG2 细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 的浓度接种于 96 孔板中, 每孔 200  $\mu$ L, 放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 和 90% 湿度的孵箱。细胞贴壁后, 分为 2 组, 分别为空白组和模型组, 每组设 6 个复孔, 空白组给予不含药溶剂, DMSO 浓度  $\leq 0.1\%$ , 模型组给予胰岛素的浓度为  $1 \times 10^{-6}$  mol/L。24 h 后, 换无酚红培养基培养 12 h, 收集培养基, 用葡萄糖测定试剂盒检测上清液中葡萄糖的含量, 计算葡萄糖消耗量, 具体按照试剂盒说明书步骤进行操作。

1.5 MTT 法检测小檗碱对 HepG2 细胞存活率的影响 HepG2

细胞以  $1 \times 10^4$  个/mL 接种于 2 块 96 孔板中, 每孔 200  $\mu$ L, 培养 24 h 后, 分别加入各浓度的小檗碱(120、100、80、60、40、20、0  $\mu$ mol/L)。每组设 6 个复孔, 培养 24 h 后加入 MTT 液(5 mg/mL)10  $\mu$ L/孔, 4 h 后去培养基, 加入 150  $\mu$ L DMSO, 摇床振荡 10 min 后, 酶标仪 490 nm 测吸光度值。细胞存活率=(实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.6 Western Blot 法检测小檗碱对 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型中 PI3K、AKT1 和 GLUT1 蛋白表达的影响 HepG2 细胞以  $2 \times 10^5$  个/mL 接种在 6 孔板上, 每孔加入 2 000  $\mu$ L 细胞悬液, 将 6 孔板置于 5% CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C 条件下培养, 12 h 后给药。细胞贴壁后, 分为 5 组, 分别为空白组(完全培养基)、模型组(胰岛素:  $1 \times 10^{-6}$  mol/L)、二甲双胍组(二甲双胍:  $1 \times 10^{-3}$  mol/L+胰岛素:  $1 \times 10^{-6}$  mol/L)、小檗碱高剂量组(小檗碱: 60  $\mu$ mol/L+胰岛素:  $1 \times 10^{-6}$  mol/L)、小檗碱低剂量组(小檗碱: 40  $\mu$ mol/L+胰岛素:  $1 \times 10^{-6}$  mol/L)。给药 12 h 后提取蛋白, 各组细胞用 RIPA 裂解液裂解, 提取细胞总蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白含量, 蛋白加入 5 $\times$  loading buffer 煮沸 10 min, 然后按照蛋白定量计算的上样量为 10  $\mu$ L 上样, 用 SDS-PAGE 电泳方法, 配 10% 分离胶和浓缩胶跑胶, 1.5 h 后转到 pvdf 膜上, 将膜置于浓度为 5% 的脱脂奶粉中, 室温轻摇封闭 1 h, 用特殊抗体(Anti-AKT1 抗体、Anti-GLUT1 抗体)一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 一抗比例 PI3K(1:2 000), AKT1(1:5 000), GLUT1(1:2 000),  $\beta$ -actin(1:1 000), 再用二抗(辣根酶标记山羊抗兔 IgG)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 二抗比例 1:10 000, 洗膜后用显影液, 经化学发光仪显影。

1.7 统计学方法 采用 SPSS18.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较用  $F$  检验, 两两比较用  $q$  检验。

## 2 结果

2.1 各组细胞培养基中葡萄糖含量比较 见表 1。与空白组比较, 模型组细胞培养基中的葡萄糖含量显著升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 说明胰岛素抵抗细胞模型建立成功。

表 1 各组细胞培养基中葡萄糖含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	葡萄糖含量(mmol/L)
空白组	6	14.76 $\pm$ 0.47
模型组	6	20.08 $\pm$ 1.27

与空白组比较, ① $P < 0.05$

2.2 各浓度组细胞存活率结果比较 见表 2。与空白对照组比较, 不同浓度的小檗碱对细胞存活率影响不同, 细胞存活率在 80% 以上即可选择药物浓度, 基于药物浓度的有效性以及考虑到药物配制过程中的误差, 选择浓度为 60  $\mu$ mol/L 和 40  $\mu$ mol/L 的小檗碱进行下一步的实验。

2.3 各组细胞 PI3K、AKT1、GLUT1 蛋白表达结果比较 见表 3。与空白组比较, 模型组 PI3K 蛋白表达、GLUT1 蛋白表

达显著降低, AKT1 蛋白表达显著升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 二甲双胍组、小檗碱高剂量组、小檗碱低剂量组 PI3K 蛋白表达、GLUT1 蛋白表达显著升高, AKT1 蛋白表达显著降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 2 各浓度组细胞存活率结果比较 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	浓度	细胞存活率(%)
小檗碱组	120 $\mu\text{mol/L}$	64.95 $\pm$ 1.88
	100 $\mu\text{mol/L}$	73.44 $\pm$ 8.59
	80 $\mu\text{mol/L}$	83.42 $\pm$ 6.14
	60 $\mu\text{mol/L}$	85.48 $\pm$ 5.11
	40 $\mu\text{mol/L}$	89.25 $\pm$ 8.99
	20 $\mu\text{mol/L}$	91.80 $\pm$ 6.77
空白组	0 $\mu\text{mol/L}$	100 $\pm$ 0

表 3 各组细胞 PI3K、AKT1、GLUT1 蛋白表达结果比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	PI3K 蛋白灰度值	AKT1 蛋白灰度值	GLUT1 蛋白灰度值
空白组	1.00 $\pm$ 0	1.00 $\pm$ 0	1.00 $\pm$ 0
模型组	0.55 $\pm$ 0.05	1.51 $\pm$ 0.051	0.55 $\pm$ 0.05
二甲双胍组	1.11 $\pm$ 0.10	1.25 $\pm$ 0.056	1.11 $\pm$ 0.10
小檗碱高剂量组	1.23 $\pm$ 0.05	1.04 $\pm$ 0.062	1.02 $\pm$ 0.10
小檗碱低剂量组	1.20 $\pm$ 0.36	1.17 $\pm$ 0.059	0.90 $\pm$ 0.06

与空白组比较, ①  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, ②  $P < 0.05$

### 3 讨论

胰岛素是机体分泌的唯一一种具有降血糖作用的物质, 其作用的靶器官(组织)主要是肝脏、肌肉和脂肪组织。大量研究表明, 胰岛素受体底物(IRS)- 磷脂酰肌醇-3- 激酶(PI3K)- AKT 途径是介导胰岛素刺激细胞摄取利用葡萄糖的主要途径, 而通过 PI3Kp85 信号通路的调节是胰岛素新陈代谢的主要媒介<sup>[7-9]</sup>。AKT 是 PI3Kp85 下游的主要靶点之一, 当 AKT 分子被激活以后, 通过激活或抑制作用, 对其下游的靶蛋白产生重要的影响, 调节胰岛素的一些生物功能<sup>[10-12]</sup>, 如糖摄取、脂质代谢等, AKT1 的过表达会导致机体空腹或非空腹血糖的升高并诱导胰岛素抵抗的产生。

GLUT1 的主要作用是参与分布组织基础或组成性的葡萄糖转运, 优先保证仅以葡萄糖为能量来源的组织器官正常功能活动。有研究表明, GLUT1 其功能是将血液循环中的葡萄糖转运进入组织, 增加葡萄糖的摄取<sup>[13]</sup>。GLUT1 是表达最广泛的葡萄糖转运蛋白, 对一些化学和激素的刺激产生应答, 参与细胞内平衡的维护。因此, 调控的表达可以为细胞适应环境变化的分子机制研究提供重要的参考。研究表明, 胰岛素刺激能够增加 GLUT1 mRNA 和蛋白的表达, 此外, 失活时, 胰岛素诱导 GLUT1 的表达明显受到抑制<sup>[14]</sup>。

本实验利用胰岛素联合诱导 HepG2 细胞胰岛素抵抗模

型, 并在小檗碱干预下, 通过 Western Blot 实验, 证明小檗碱对胰岛素抵抗细胞 PI3K/AKT1/GLUT1 信号通路的调控作用。结果显示: 与胰岛素抵抗模型组比较, 小檗碱组高低剂量组(60、40  $\mu\text{mol/L}$ )能够增加细胞中 PI3Kp85、GLUT1 蛋白表达及降低 AKT1 蛋白表达, 差异均有统计学意义。因此, 可推断小檗碱具有改善细胞胰岛素抵抗的作用, 其作用分子机制可能是通过激活胰岛素信号传导中的 PI3K/AKT 信号通路, 增加 PI3Kp85、GLUT1 蛋白表达, 减少 AKT1 对胰岛素信号传导的负反馈调节, 从而提高细胞的葡萄糖转运能力, 增加葡萄糖的利用率, 改善胰岛素抵抗。对于小檗碱可能存在的其他改善胰岛素抵抗的机制及其有效单体成分尚未完全明确, 还需要进行进一步的深入探讨。

### [参考文献]

- [1] Bruce KD, Hanson MA. The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome [J]. J Nutr, 2010, 140(3): 648- 652.
- [2] Sah SP, Singh B, Choudhary S, et al. Animal models of insulin resistance: A review [J]. Pharmacol Rep, 2016, 68(6): 1165- 1177.
- [3] 任妍林, 王定坤, 董慧, 等. 小檗碱治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(3): 438- 442.
- [4] 汪群红, 何贤君, 胡敏, 等. 小檗碱对 2 型糖尿病大鼠降血糖作用的药效学研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(10): 2531- 2533.
- [5] 刘晓燕, 刘剑, 高宇. 小檗碱调节糖脂代谢机制研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(16): 4117- 4119.
- [6] 任毅, 王彦, 杨静, 等. 小檗碱对初诊 2 型糖尿病糖脂代谢和脂联素的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(16): 1921- 1922.
- [7] Li Y, Wang J, Gu T, et al. Oleanolic acid supplement attenuates liquid fructose- induced adipose tissue insulin resistance through the insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3- kinase/Akt signaling pathway in rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2014, 277 (2): 155- 163.
- [8] Li M, Han Z, Bei W, et al. Oleanolic Acid Attenuates Insulin Resistance via NF-  $\kappa$ B to Regulate the IRS1- GLUT4 Pathway in HepG2 Cells [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 643102, PMID: 26843885.
- [9] 蔡双朋, 李俊, 黄成, 等. 丹参酮对 HepG2 细胞胰岛素抵抗作用及机制的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(7): 974- 977.
- [10] Matsuda S, Nakanishi A, Wada Y, et al. Roles of

- PI3K/AKT/PTEN Pathway as a Target for Pharmaceutical Therapy[J]. Open Med Chem J, 2013, 7: 23- 29.
- [11] 石明隽, 肖瑛, 桂华珍, 等. 糖尿病大鼠肾组织中 AKT 的表达及意义[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(22): 4375- 4378.
- [12] Albury- Warren TM, Pandey V, Spinel LP, et al. Prediabetes linked to excess glucagon in transgenic mice with pancreatic active AKT1 [J]. J Endocrinol, 2016, 228(1): 49- 59.
- [13] 俞晓燕, 孙子林. GLUT1 的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(30): 3411- 3414.
- [14] 叶林, 陆凯, 张冬颖, 等. 胰岛素激活 PI3K- AKT 通路而促进 H9c2 心肌细胞葡萄糖摄取[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(6): 538- 542.
- (责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

## 活体成像动态观察黄芪多糖对裸鼠卵巢癌细胞休眠的维持作用

胡向丹<sup>1</sup>, 王爱爱<sup>1</sup>, 翟秋丽<sup>2</sup>, 肖静<sup>1</sup>

1. 广东省中医院大学城医院妇科, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006

[摘要] 目的: 利用活体成像技术观察黄芪多糖对裸鼠卵巢癌细胞休眠的维持作用。方法: 选取建立成功的卵巢癌细胞休眠裸鼠模型 30 只随机分成 3 组: 即对照组、黄芪多糖组、顺铂组, 每组 10 只, 连续给药 14 天; 利用活体成像系统分别在给药前 1 天、给药后第 7 天、第 14 天监测各组裸鼠卵巢癌细胞休眠情况。结果: 与对照组比较, 黄芪多糖组给药后第 7 天、第 14 天, 裸鼠体质量无明显变化; 而顺铂组在给药后第 7 天、第 14 天, 体质量明显降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。对照组裸鼠卵巢癌细胞光子量随着时间而升高。与对照组比较, 黄芪多糖组和顺铂组在给药第 7 天、第 14 天时, 裸鼠肿瘤休眠细胞光子量明显降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论: 黄芪多糖具有较好的维持裸鼠卵巢癌细胞休眠的作用, 活体成像技术可动态地观察肿瘤细胞休眠的情况, 为黄芪多糖应用于临床提供理论依据。

[关键词] 黄芪多糖; 卵巢癌; 人卵巢癌 SKOV3 细胞; 休眠; 活体成像; 维持作用; 动物实验; 裸鼠

[中图分类号] R737.31; R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 08-0004-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.08.002

## Astragalus Polysaccharide Has Good Effect on Maintaining Dormancy of Ovarian Cancer Cells in Nude Mice by Living Imaging System

HU Xiangdan, WANG Ai'ai, ZHAI Qiuli, XIAO Jing

Abstract: Objective: To observe the maintenance effect of Astragalus polysaccharide on the dormancy of ovarian cancer cells in nude mice by living imaging system. Methods: Thirty dormant nude model mice which was successfully established were randomly divided into three groups: the control group, astragalus polysaccharide group, cisplatin group, 10 cases in each. Continuous administration lasted for 14 days; detected dormancy of ovarian cancer cells in nude mice of each group by living imaging system in one day before medication, seven days and fourteen days after medication. Results: Compared with the control group, there was no significant change in the body weight of Astragalus polysaccharide group seven days and fourteenth days after medication, while body weight of Cisplatin group was decreased obviously ( $P < 0.01$ ). Photon amount in the dormant ovarian cancer cells in nude mice of the control group was increased over time. Compared with the control group, photon amount in the dormant ovarian cancer cells in nude mice of astragalus polysaccharide group and cisplatin group was decreased significantly seven days and fourteenth days after medication ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Conclusion: Astragalus polysaccharide has a good effect on maintaining the dormancy of ovarian cancer cells in nude mice. Living imaging technology can be used to observe the dormancy of tumor cells dynamically, so as to provide a theoretical basis for clinical application of Astragalus

[收稿日期] 2017-04-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81403422)

[作者简介] 胡向丹 (1977-), 女, 医学博士, 副主任医师, 主要从事中医药防治妇科恶性肿瘤的研究。

[通讯作者] 肖静, E-mail: xiaojingson\_2004@126.com。