

丹参酮 I 对 HepG2 细胞胰岛素抵抗作用及机制的研究

蔡双朋 李俊 黄成 孟晓明 陈培杰

摘要 目的 探讨丹参酮 I 对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的作用及分子机制。方法 高浓度胰岛素诱导建立胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型; MTT 法确定丹参酮 I 的给药浓度; 葡萄糖氧化酶法检测丹参酮 I 对胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响; Western blot 法测定蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B)、磷酸化的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B (P-AKT)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B (AKT) 蛋白表达情况。结果 以 10^{-7} mol/L 胰岛素诱导 24 h 成功建立了胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型; MTT 筛选出了 78、156、312 ng/ml 丹参酮 I 给药浓度; 丹参酮 I 呈浓度依赖地增加胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖消耗量; Western blot 法结果显示, 与正常组比较, 模型组 PTP1B 表达升高、P-AKT 表达降低。与模型组比较, 丹参酮 I 给药组 PTP1B 的表达浓度依赖性地降低、P-AKT 的表达浓度依赖性地升高。结论 丹参酮 I 能改善胰岛素抵抗 HepG2 细胞, 其机制可能是通过抑制 PTP1B 的表达, 进而促进了 P-AKT/AKT 信号通路的活化。

关键词 2 型糖尿病; 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B; 丹参酮 I; 胰岛素抵抗; HepG2

中图分类号 R 965; R 966

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-0974-04

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一种代谢性疾病, 占糖尿病总数的 90% 以上, 是严重威胁人类健康的重要疾病之一, 而且其发病率呈逐年上升趋势^[1]。胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是 T2DM 发病的重要因素和显著特征, 主要表现为外周靶器官或组织 (主要是肝脏、肌肉和脂肪^[2]) 对胰岛素的敏感性和反应性降低, 从而导致胰岛素难以产生正常的生理效应^[3]。肝脏是维持血糖稳态的主要器官, 当餐后血糖浓度升高时, 肝脏

会在胰岛素的作用下通过合成糖原来降低血糖。相反, 当血糖浓度降低时, 肝糖原及糖异生作用加强, 生成葡萄糖送入血中, 维持血糖的稳定。当肝脏发生 IR, 会导致肝脏的血糖调节功能紊乱, 最终导致血糖升高^[4]。蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B) 是一种定位于内质网细胞质面的酪氨酸磷酸酶, 可以使磷酸化的酪氨酸残基去磷酸化, 在肥胖以及 IR 等疾病中发挥着重要的调节作用。在肝脏发生 IR 时, PTP1B 的表达升高, 使得磷酸化的胰岛素受体和胰岛素受体底物-1 去磷酸化, 阻碍胰岛素信号的向下传导, 降低细胞对葡萄糖的吸收利用^[5]。丹参酮 I 是从传统中药丹参其同属植物中分离到的一种脂溶性单体化合物, 在中医中被广泛用于治疗心血管疾病^[6]。研究^[7]显示丹参酮单体 (如丹参酮 II A、隐丹参酮) 能够有效地增加 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量, 改善 IR, 但是丹参酮 I 改善 HepG2 细胞 IR 的作用和分子机制并不清楚。该实验探究丹参酮 I 改善 HepG2 细胞 IR 的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料与试剂 人肝癌细胞 (HepG2) 株 (中国科学院上海细胞库); 丹参酮 I (南京春秋生物工程有限公司); DMEM 培养液 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (杭州四季青公司); 胰酶 (上海碧云天生物技术有限公司); 青-链霉素溶液、MTT、DM-SO (美国 Sigma 公司); 葡萄糖测定试剂盒 (长春汇力生物技术有限公司); 兔抗 PTP1B (北京博奥森公司); 兔抗 β -actin (美国 Abcam 公司); 兔抗丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) (美国 CST 公司); 兔抗磷酸化的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, P-AKT) (美国 CST 公司); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (武汉博士德生物); 化学发光 (ECL) 试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.1.2 仪器 MK3 型酶标仪 (荷兰雷勃公司);

2016-03-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81273526、81473268); 安徽省重点科技攻关项目 (编号: 1301042212); 安徽省自然科学基金 (编号: 1308085MH145)

作者单位: 安徽医科大学药学院、安徽医科大学肝病研究所、安徽省创新药物产业共性研究院, 合肥 230032

作者简介: 蔡双朋, 男, 硕士研究生;

李俊, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: li-jun@ahmu.edu.cn11

NAPCO-6100 型细胞培养箱(美国 SHELLAB 公司); SW-CJ-4F 型超净工作台(江苏苏净集团苏州安泰空气技术有限公司); Sigam3-46K 高速离心机(美国 Sigma 公司); 冷冻离心机 TGL-48R(珠海黑马医学仪器有限公司); Western blot 设备(美国 Biorad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HepG2 细胞培养和传代 HepG2 细胞使用含有 10% 胎牛血清及 100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素的高糖培养基,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。当细胞生长融合达到约 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代或按所需浓度接种培养瓶、培养板。

1.2.2 胰岛素抵抗模型的建立 取对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h 使细胞贴壁,然后添加终浓度为 10⁻⁷ mol/L 的胰岛素,于培养箱中继续培养 24 h 建立 IR 模型。

1.2.3 葡萄糖消耗量的检测 取对数生长期的 HepG2 细胞,以 20 000 个/孔接种于 24 孔板。实验分为空白组、正常组、模型组、丹参酮 I 给药组(78、156、312 ng/ml),每组设 4 个复孔。空白组和正常组加入不含胰岛素的培养基,模型组和丹参酮 I 给药组加入含 10⁻⁷ mol/L 的胰岛素的培养基。24 h 后吸去培养基并用 PBS 清洗 2 遍,空白组、正常组和模型组加入无酚红无血清的培养基,丹参酮 I 给药组分别加入含质量浓度为 78、156、312 ng/ml 丹参酮 I 的无酚红无血清的培养基。24 h 后以葡萄糖氧化酶检测试剂盒检测各培养孔中培养液上清的葡萄糖浓度,并以空白组的葡萄糖含量均值减去测得的培养液中葡萄糖含量计算得到各孔细胞的葡萄糖消耗量。

1.2.4 Western blot 检测蛋白水平 收集处理后的细胞,经 PBS 清洗,加入含 1% PMSF 的 RIPA 蛋白裂解液,冰上裂解 30 min 后转移至 1.5 ml 的 EP 管中。4℃、12 000 r/min 离心 30 min,取上清液进行蛋白定量后加入蛋白上样缓冲液;100℃ 加热 10 min 使蛋白变性。蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,按蛋白分子量大小切胶转膜,以 5% 的脱脂奶粉室温封闭 3 h,Tris-HCl-Tween(TBST)洗膜后在一抗中孵育 4℃ 过夜,一抗稀释液的浓度为: PTP1B(1:300)、P-AKT(1:500)、AKT(1:500)、

β-actin(1:3 000)。孵育后的膜用 TBST 清洗后,用与一抗属相匹配的的二抗室温孵育 1 h,ECL 发光试剂盒显影,以 β-actin 为内参,Image J 软件扫描并分析蛋白质表达相对含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;One-Way ANOVA 检验各组间差异的显著性。

2 结果

2.1 丹参酮 I 对 HepG2 细胞活力的影响 以不同浓度的丹参酮处理 HepG2 细胞 24 h,MTT 结果显示,当丹参酮 I 的浓度低于 625 ng/ml 时,HepG2 的细胞活力与正常组相比差异无统计学意义($F = 2.333, P > 0.05$),而当浓度为 625 ng/ml 时丹参酮 I 则会抑制正常细胞的生长($t = 5.666, P < 0.05$),当浓度高于 625 ng/ml 时(1 250、2 500、5 000 ng/ml)丹参酮 I 则会明显抑制正常细胞的生长($F = 385.5, P < 0.01$),因此本实验选定 78、156、312 ng/ml 作为丹参酮 I 后续实验的给药浓度。见图 1。

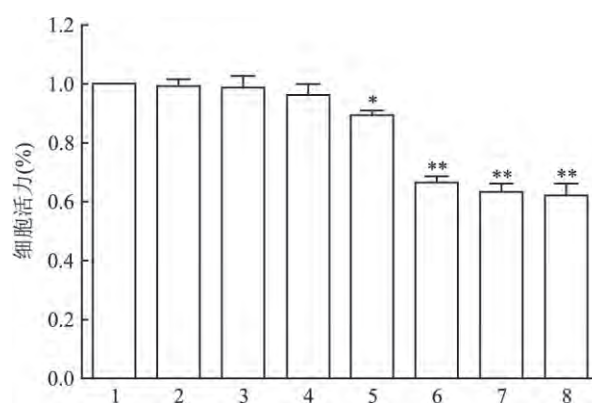


图 1 不同浓度的丹参酮 I 对 HepG2 细胞增殖的影响

1: 正常组; 2: 78 ng/ml 丹参酮 I 组; 3: 156 ng/ml 丹参酮 I 组; 4: 312 ng/ml 丹参酮 I 组; 5: 625 ng/ml 丹参酮 I 组; 6: 1 250 ng/ml 丹参酮 I 组; 7: 2 500 ng/ml 丹参酮 I 组; 8: 5 000 ng/ml 丹参酮 I 组; 与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 丹参酮 I 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 与正常组比较,经过高浓度胰岛素作用后,模型组细胞的葡萄糖消耗明显降低,说明该模型组细胞产生了 IR($t = 29.81, P < 0.01$);与模型组比较,丹参酮 I (78、156、312 ng/ml) 处理组可以剂量依赖地增加细胞的葡萄糖消耗($F = 201.1, P < 0.01$),改善了细胞的 IR 状态。见图 2。

2.3 丹参酮 I 对 IR-HepG2 细胞中 PTP1B 表达的

影响 与正常组比较 经过高浓度胰岛素作用后 模型组细胞中的 PTP1B 表达明显升高 ($t = 10.21$, $P < 0.01$); 而经不同浓度丹参酮 I (78、156、312 ng/ml) 处理 24 h 后, PTP1B 蛋白表达在明显降低 ($F = 150.2$, $P < 0.01$), 且随着给药浓度的增加蛋白表达水平逐渐降低。见图 3。

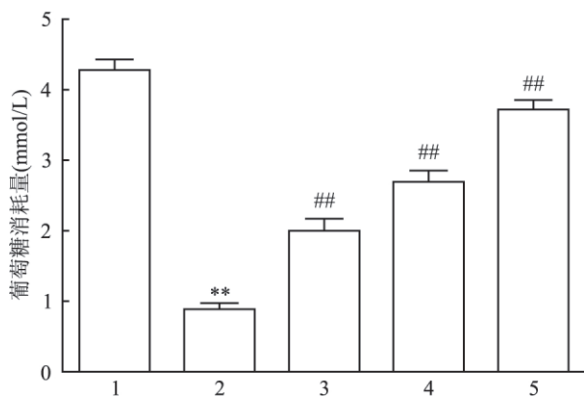


图2 不同浓度丹参酮 I 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

1: 正常组; 2: 模型组; 3: 模型 + 78 ng/ml 丹参酮 I 组; 4: 模型 + 156 ng/ml 丹参酮 I 组; 5: 模型 + 312 ng/ml 丹参酮 I 组; 与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

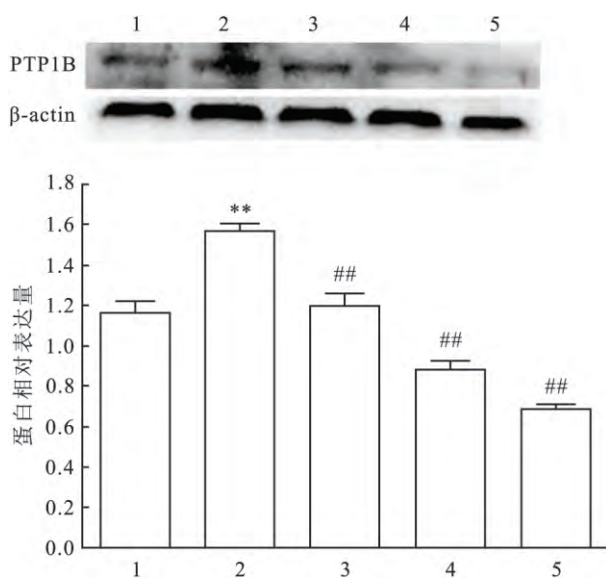


图3 不同浓度丹参酮 I 处理对 HepG2 细胞中 PTP1B 表达的影响

1: 正常组; 2: 模型组; 3: 模型 + 78 ng/ml 丹参酮 I 组; 4: 模型 + 156 ng/ml 丹参酮 I 组; 5: 模型 + 312 ng/ml 丹参酮 I 组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

2.4 丹参酮 I 对 IR-HepG2 细胞中 AKT 通路的影响 与正常组比较 经过高浓度胰岛素作用后 模型组细胞中的 P-AKT 蛋白表达明显降低 ($t = 6.153$, $P < 0.05$); 而经不同浓度丹参酮 I (78、156、312 ng/ml)

处理 24 h 后 P-AKT 蛋白的表达在 HepG2 细胞中明显升高 ($F = 32.65$, $P < 0.01$), 且随着给药浓度的增加蛋白表达水平逐渐升高。见图 4。

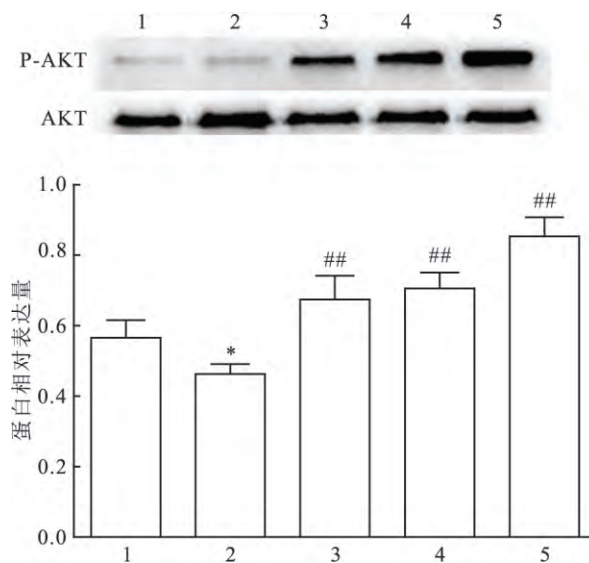


图4 不同浓度丹参酮 I 处理对 HepG2 细胞中 P-AKT 表达的影响

1: 正常组; 2: 模型组; 3: 模型 + 78 ng/ml 丹参酮 I 组; 4: 模型 + 156 ng/ml 丹参酮 I 组; 5: 模型 + 312 ng/ml 丹参酮 I 组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

IR 是 T2DM 发生和发展的中心环节,也是多种代谢相关疾病的共同病理生理基础。因此针对 IR 的治疗是寻找优良抗糖新药的关键。近年来 PTP1B 在 T2DM 中的治疗价值日益受到重视。发生 IR 时, PTP1B 可以通过增加表达或提高活性使胰岛素受体及受体底物去磷酸化,而对胰岛素信号转导起负性调节作用,最终导致 IR^[8]。因此,以 PTP1B 为抗糖药物的作用靶点为临床治疗糖尿病提供新的方向。

本研究首先通过 MTT 确定了丹参酮 I 的给药浓度并成功建立了 HepG2 细胞的 IR 模型。随后给予不同浓度的丹参酮 I 治疗 24 h,显示其各个浓度均能有效地增加 IR-HepG2 的葡萄糖消耗量,而且随着给药剂量的增加,葡萄糖消耗量逐渐增加。在确定丹参酮 I 改善 HepG2 细胞 IR 的药效后,课题组进一步检测 PTP1B 蛋白水平的表达,结果显示高浓度的胰岛素诱导 HepG2 细胞发生 IR 后,PTP1B 较正常组明显升高,在给予不同浓度的丹参酮 I 治疗 24 h 后,其各个浓度均能有效地降低 IR-HepG2 细胞的 PTP1B 蛋白表达,这说明丹参酮 I 可能通过

降低 PTP1B 的表达来改善 HepG2 细胞的 IR。为进一步明确其在改善 HepG2 细胞 IR 中的分子机制,课题组进一步检测 PTP1B 下游所调节的 P-AKT 的表达,观察丹参酮 I 对 IR-HepG2 细胞 AKT 磷酸化水平的影响,Western blot 结果显示丹参酮 I 能够有效增加 IR-HepG2 细胞 AKT 磷酸化水平。综上所述,丹参酮 I 可以增加 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量,有效改善 HepG2 细胞的 IR,并且推测其可能是通过降低 PTP1B 的表达,进而抑制 AKT 的磷酸化而发挥作用,但具体作用机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Rathmann W, Giani G. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030 [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(10): 2568–9.
- [2] 陈莉, 陈冠军, 陈兵等. 白藜芦醇改善高脂血症小鼠脂肪组织胰岛素抵抗的机制探讨 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(8): 1104–9.
- [3] Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms [J]. *J Endocrinol*, 2014, 220(2): T1–T23.
- [4] Tang Z, Zhang W, Wan C, et al. TRAM1 protect HepG2 cells from palmitate induced insulin resistance through ER stress-JNK pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 457(4): 578–84.
- [5] Bakke J, Haj F G. Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 37: 58–65.
- [6] Jang S I, Jeong S I, Kim K J, et al. Tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* inhibits inducible nitric oxide synthase expression and production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in activated RAW 264.7 cells [J]. *Planta Med*, 2003, 69(11): 1057–9.
- [7] Hwang S L, Yang J H, Jeong Y T, et al. Tanshinone IIA improves endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance through AMP-activated protein kinase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(4): 1246–52.
- [8] Zabolotny J M, Haj F G, Kim Y B, et al. Transgenic overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle causes insulin resistance, but overexpression with leukocyte antigen-related phosphatase dose not additively impair insulin action [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(23): 24844–51.

Effect and mechanism of tanshinone I in insulin resistance-HepG2 cells

Cai Shuangpeng, Li Jun, Huang Cheng, et al

(School of Pharmacy, Anhui Medical University; Institute for Liver Diseases of Anhui Medical University; Anhui Institute of Innovative Drugs, Hefei 230032)

Abstract **Objective** To explore effect and molecular mechanism of improved insulin resistance (IR) in HepG2 cells by tanshinone I. **Methods** IR-HepG2 was induced by high concentrations of insulin. The appropriate concentrations of tanshinone I were determined by MTT assay. The glucose consumption was detected by glucose assay kit. The expressions of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), P-AKT, AKT were determined by Western blot. **Results** The IR-HepG2 cells were established successfully by incubating with 10^{-7} mol/L insulin for 24 hours. The ultimate concentrations of tanshinone I were determined as 78, 156, 312 ng/ml and tanshinone I concentration-dependently increased glucose consumption of IR-HepG2 cells. Western blot showed increased expression of PTP1B and decreased expression of P-AKT in model group compared with the normal group. Moreover, tanshinone I concentration-dependently decreased expression of PTP1B and increased expression of P-AKT compared with the model group. **Conclusion** Tanshinone I improved IR in HepG2 cells. The putative mechanism is that tanshinone I decrease expression of PTP1B and promotes activation of P-AKT/AKT signaling pathway.

Key words type 2 diabetes mellitus; protein tyrosine phosphatase 1B; tanshinone I; insulin resistance; HepG2