

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2015.07.05

小檗碱对 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型中 LKB1-AMPK-TORC2 信号网络的影响

匡霞^{1,2}, 陆付耳¹, 易屏³

(¹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, 武汉 430030;

²天津武警后勤学院附属医院 内分泌科, 天津 300162;

³华中科技大学同济医学院附属同济医院 中西医结合科, 武汉 430030)

摘要:[目的]观察小檗碱对游离脂肪酸诱导的 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型 AMPK 信号通路蛋白及其下游糖脂代谢关键蛋白表达的影响,探讨小檗碱改善胰岛素抵抗的分子机制。[方法]软脂酸诱导 HepG2 细胞建立胰岛素抵抗模型,予以不同浓度的小檗碱进行干预,同时以 AICAR 作为阳性对照,Compound C 作为阴性对照,用葡萄糖氧化酶法检测葡萄糖消耗量,甘油三酯试剂盒检测细胞内的甘油三酯含量,Western blot 检测 LKB1、AMPK、TORC2、PEPCK、G-6-P、P-ACC、ACC、FAS 蛋白表达。[结果]软脂酸作用 24 h 使 HepG2 细胞葡萄糖消耗量显著下降,TG 含量显著增加,LKB1、AMPK 及 P-ACC 蛋白表达明显减少,TORC2、PEPCK、G-6-P、ACC、FAS 蛋白表达明显增加;而小檗碱或 AICAR 则可逆转上述效应。[结论]小檗碱可以有效改善软脂酸诱导的胰岛素抵抗,其分子机制可能与小檗碱调控 AMPK 信号通路相关蛋白的表达有关。

关键词:小檗碱;AICAR;Compound C;HepG2 细胞;胰岛素抵抗

中图分类号:R977.1

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2015)07-0467-05

Effects of berberine on the signal Pathway of LKB1/ AMPK/TORC2 in insulin-resistant cell model in HepG2 cells

KUANG Xia^{1,2}, LU Fuer¹, YI Ping³

(¹Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; ²Department of Endocrinology, The Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China; ³Department of TCM, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Corresponding author: YI Ping, E-mail: pyi219@163.com

Abstract:[Objective] To reveal the molecular mechanism of berberine on improving insulin resistance by observing the effects of berberine on the expression of AMPK signaling pathway and downstream glucolipid metabolism related key proteins in insulin-resistant HepG2 cells induced by free fatty acid. [Methods] HepG2 cells were treated with palmitic acid to induce insulin resistance and intervened with different concentrations of berberine, meanwhile, AICAR was used for positive control as well as Compound C used for negative control. Glucose consumption was assayed through glucose oxidase method and the amount of triglycerides was measured by Triglyceride Assay kit. The expression of LKB1, AMPK, TORC2, PEPCK, G-6-P, P-ACC, ACC, FAS protein was detected by Western blot. [Results] Treatment with palmitic acid for 24 hours made glucose consumption of HepG2 cells substantially reduced and triglyceride content markedly increased. Besides, the expression of LKB1, AMPK and their primary downstream targeting enzyme P-ACC reduced obviously, while the expression of TORC2, ACC, FAS and gluconeogenic limiting enzymes PEPCK and G-6-P increased apparently. However, the aforementioned indices were reversed by

收稿日期:2015-02-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:30973836)

通讯作者:易屏, E-mail: pyi219@163.com

treatment with berberine or AICAR. [Conclusion] Berberine can effectively improve the insulin resistance induced by palmitic acid in HepG2 cells. Its molecular mechanism may be associated with regulating AMPK related signal pathway proteins expression.

Key words: berberine; AICAR; Compound C; HepG2 cell; insulin resistance

糖尿病属于祖国医学“消渴”的范畴,自《黄帝内经》就有记载。而关于消渴的治疗,传统中药有着得天独厚的优势,这其中之一的黄连作为抗糖尿病药物已有 1500 年历史。小檗碱(berberine, BBR),又名黄连素,是黄连的主要活性成份,传统用药主要讲黄连和小檗碱应用于治疗肠道感染性疾病,如腹泻,细菌性痢疾等。自陈其明等^[1]首先报道 BBR 具有磺脲和双胍类化合物的药理作用以来,已有大量的研究报道肯定了 BBR 对糖尿病的治疗作用。本课题在发现并证实小檗碱具有促进胰岛素分泌,改善胰岛素抵抗,促进肝细胞葡萄糖代谢,调节脂质代谢等多重抗糖尿病功效的基础上,结合《Science》发表的关于 LKB1-AMPK-TORC2 信号网络调控异常与 T2 DM 的发病密切相关的文章^[2-3],试图验证小檗碱可能具有调控 LKB1-AMPK-TORC2 信号网络而改善胰岛素抵抗的功效与分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

小檗碱(纯度>98%),由四川蕪州市市郊植物提制;软脂酸(PA)、胰岛素、牛血清白蛋白(BSA)、Compound C、DMSO(Sigma 公司);AICAR、BCA 蛋白测定试剂盒(上海碧云天公司);HepG2 细胞株(华中科技大学同济医学院肝病研究所馈赠);高糖 DMEM(Hyclone,美国);胎牛血清(FBS,杭州四季青公司);葡萄糖氧化酶法检测试剂盒、甘油三酯检测试剂盒(长春汇力生物技术有限公司);LKB1、AMPK、TORC2、PEPCK、G-6-P、P-ACC、ACC、FAS、 β -actin 抗体(Abcam 公司);荧光二抗(KPL 公司);其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及胰岛素抵抗模型的建立及分组

HepG2 细胞株用含 10%FBS、1%青/链霉素的高糖 DMEM 于 37℃、5%CO₂、相对湿度为 95%的培养箱中培养,取对数生长期的细胞用于实验,分为正常组(Nor),模型组(Mod),小檗碱组(BBR),AICAR 组,Compound C 组,用含 0.2% BSA 的高糖 DMEM 培养 12 h 后,Nor 组换上含 1 nmol/L Insulin,0.2% BSA 的高糖 DMEM,Mod 组换上含 0.25 mmol/L PA 及 1 nmol/L Insulin,0.2% BSA 的高糖 DMEM,药物干预组在 Mod 组培养基基础上分别加入 5、10 μ mol/L BBR,0.5 mmol/L AICAR,

10 μ mol/L Compound C 干预 24 h。

1.2.2 葡萄糖消耗实验 将 HepG2 细胞株接种至 96 孔培养板继续培养,培养方式及实验分组同上并设置空白对照孔。孵育 24 h 后,用葡萄糖氧化酶法检测培养液中的葡萄糖含量。葡萄糖消耗量=空白孔中葡萄糖含量-测定孔中葡萄糖含量。考虑细胞增殖可能对葡萄糖消耗造成影响,葡萄糖消耗检测完成之后,再利用 MTT 法测定细胞存活率,具体方法参考文献^[4]。

1.2.3 细胞内甘油三酯(TG)含量测定 将 HepG2 细胞株接种至 6 孔培养板继续培养,培养方式及实验分组同上并设置空白对照孔。孵育 24 h 后,弃各孔培养液,萃取细胞内的 TG,方法参考文献^[5]。收集的细胞裂解液上清利用甘油三酯检测试剂盒测定细胞内的 TG 含量。

1.2.4 Western blot 药物干预 24 h 后的 HepG2 细胞用细胞裂解液裂解后提取总蛋白,用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。取等量蛋白样品 50 μ g,经缓冲液处理、蛋白变性、SDS-PAGE 胶电泳分离后,采用湿转法将蛋白转移至 NC 膜上,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 2 h,封膜后加入抗相应蛋白的抗体,4℃过夜,TBST 洗膜 3 次后加入近红外荧光标记的二抗,室温避光孵育 1 h。再次 TBST 洗膜 3 次后用 Odyssey 双色红外荧光成像系统对目的条带进行扫描,然后用 Image J 软件进行分析。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用 ANOVA 方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小檗碱对软脂酸诱导的 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型葡萄糖消耗量的影响

与 Nor 组比较,Mod 组葡萄糖消耗量显著下降($P < 0.01$);与 Mod 组相比,BBR 组、AICAR 组葡萄糖消耗量明显增加($P < 0.01$),而 Compound C 组无显著变化(表 1)。

2.2 小檗碱对软脂酸诱导的 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型 TG 含量的影响

与 Nor 组比较,Mod 组 TG 含量明显增多($P < 0.01$);与 Mod 组相比,5 BBR、Compound C 组 TG 含量无显著变化;10 BBR 组和 AICAR 组 TG 含量均明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)(表 2)。

表 1 HepG2 细胞各组的葡萄糖消耗量

$\bar{x} \pm s, n=6$

组别	葡萄糖消耗 (mmol · L ⁻¹)	吸光度/A	存活率/%
Nor 组	3.11 ± 0.28	0.67 ± 0.03	100.00 ± 0.00
Mod 组	1.32 ± 0.25 ¹⁾	0.62 ± 0.03	93.32 ± 0.18
5 BBR 组	2.25 ± 0.48 ²⁾	0.62 ± 0.02	92.85 ± 1.23
10 BBR 组	2.54 ± 0.38 ²⁾	0.60 ± 0.02	90.53 ± 1.07
AICAR 组	2.70 ± 0.28 ²⁾	0.62 ± 0.02	92.38 ± 0.86
Compound C 组	1.40 ± 0.27	0.61 ± 0.02	90.67 ± 0.42

与 Nor 组比较,¹⁾ $P<0.01$;与 Mod 组比较,²⁾ $P<0.01$ 。

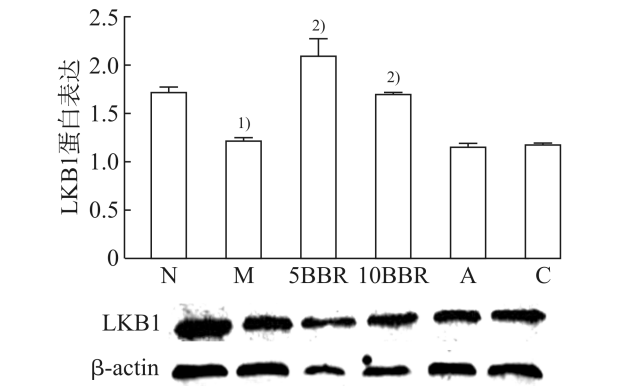
表 2 HepG2 细胞各组的 TG 含量 $\bar{x} \pm s, n=6$

组别	细胞内 TG 含量/(mmol · L ⁻¹)
Nor 组	0.10 ± 0.01
Mod 组	0.21 ± 0.00 ¹⁾
5 BBR 组	0.19 ± 0.01
10 BBR 组	0.18 ± 0.02 ²⁾
AICAR 组	0.16 ± 0.02 ³⁾
Compound C 组	0.20 ± 0.01

与 Nor 组比较,¹⁾ $P<0.01$;与 Mod 组比较,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

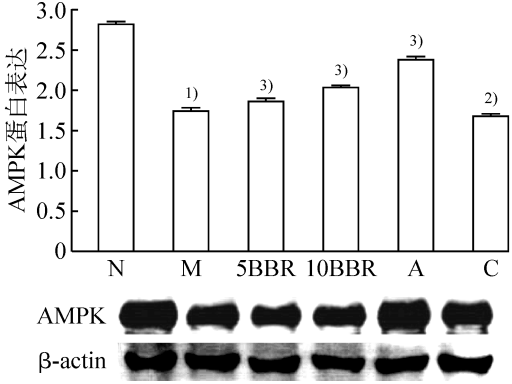
2.3 小檗碱对软脂酸诱导的 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型 LKB1、AMPK 蛋白表达的影响

与 Nor 组相比,Mod 组 LKB1、AMPK 蛋白表达减少($P<0.01$);与 Mod 组相比,BBR 组 LKB1、AMPK 表达增加($P<0.01$),AICAR 组 LKB1 表达无显著变化,AMPK 表达增加($P<0.01$),Compound C 组 LKB1 表达无显著变化,AMPK 表达减少($P<0.05$)(图 1、图 2)。



与 Nor 组比较,¹⁾ $P<0.01$;与 Mod 组比较,²⁾ $P<0.01$ 。

图 1 各组 HepG2 细胞 LKB1 蛋白的表达

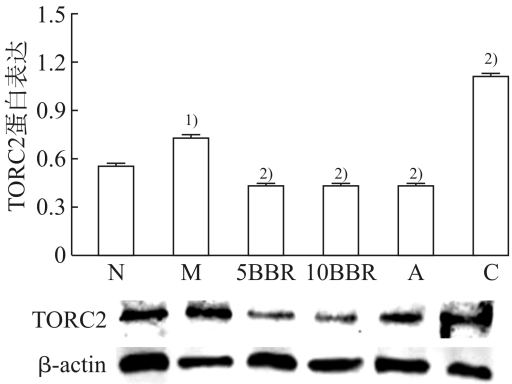


与 Nor 组比较,¹⁾ $P<0.01$;与 Mod 组比较,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

图 2 各组 HepG2 细胞 AMPK 蛋白的表达

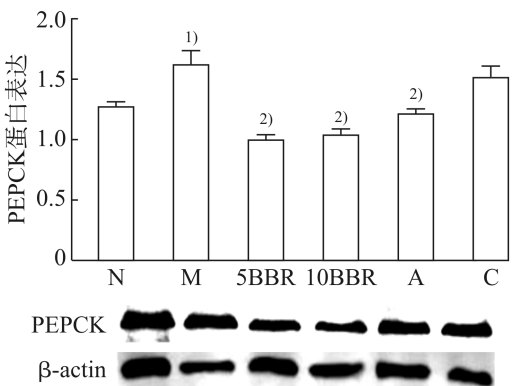
2.4 小檗碱对软脂酸诱导的 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型 TORC2、PEPCK、G-6-P 蛋白表达的影响

与 Nor 组相比,Mod 组 TORC2、PEPCK、G-6-P 蛋白表达增加($P<0.01$ 或 $P<0.05$),与 Mod 组相比,BBR 和 AICAR 组 TORC2、PEPCK、G-6-P 蛋白表达减少($P<0.01$),Compound C 组 TORC2 蛋白增加($P<0.01$),PEPCK、G-6-P 蛋白表达无显著变化(图 3、图 4、图 5)。



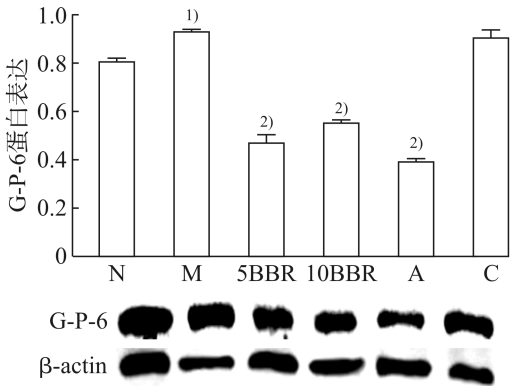
与 Nor 组比较,¹⁾ $P<0.01$;与 Mod 组比较,²⁾ $P<0.01$ 。

图 3 各组 HepG2 细胞 TORC2 蛋白的表达



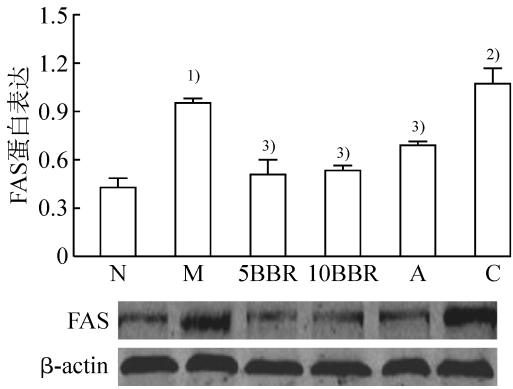
与 Nor 组比较,¹⁾ $P<0.01$;与 Mod 组比较,²⁾ $P<0.01$ 。

图 4 各组 HepG2 细胞 PEPCK 蛋白的表达



与 Nor 组比较,¹⁾ $P<0.05$;与 Mod 组比较,²⁾ $P<0.01$ 。

图 5 各组 HepG2 细胞 G-6-P 蛋白的表达

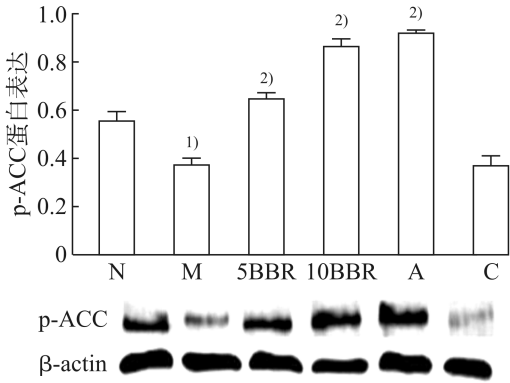


与 Nor 组比较,¹⁾ $P<0.01$;与 Mod 组比较,²⁾ $P<0.05$,
³⁾ $P<0.01$ 。

图 8 各组 HepG2 细胞 FAS 蛋白的表达

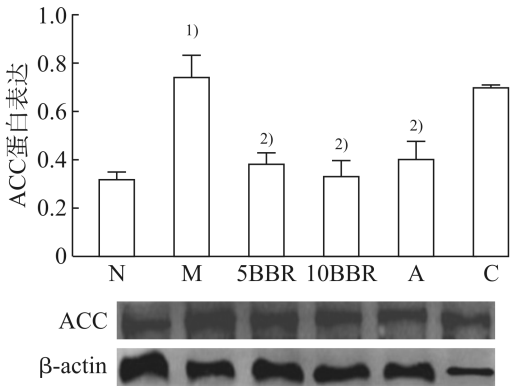
2.5 小檗碱对软脂酸诱导的 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型 P-ACC、ACC、FAS 蛋白表达的影响

与 Nor 组比较,Mod 组 P-ACC 蛋白表达减少($P<0.01$),ACC、FAS 蛋白表达增加($P<0.01$),与 Mod 组比较,BBR 和 AICAR 组 P-ACC 增加($P<0.01$),ACC、FAS 蛋白表达减少($P<0.01$),Compound C 组 P-ACC、ACC 蛋白表达无显著变化,FAS 蛋白表达增加($P<0.05$)(图 6-8)。



与 Nor 组比较,¹⁾ $P<0.01$;与 Mod 组比较,²⁾ $P<0.01$ 。

图 6 各组 HepG2 细胞 P-ACC 蛋白的表达



与 Nor 组比较,¹⁾ $P<0.01$;与 Mod 组比较,²⁾ $P<0.01$ 。

图 7 各组 HepG2 细胞 ACC 蛋白的表达

3 讨论

本实验选择 LKB1、AMPK、TORC2 蛋白均表达的 HepG2 细胞,确保了我们的拟研究的信号通路的完整性,主要从蛋白表达的角度探索了 BBR 如何从 AMPK 信号通路途径发挥降糖、降脂的作用。以 0.25 mmol/L 软脂酸体外培养诱导建立肝脏 IR 细胞模型,同时予 AMPK 的激动剂 AICAR 及抑制剂 Compound C 作为对照,结果显示,细胞对葡萄糖的消耗能力下降,胞内 TG 含量升高,符合肝脏细胞 IR 的代谢特点,提示造模成功;予以 BBR 干预后,葡萄糖的消耗显著增加,同时,调控糖异生的关键蛋白 TORC2 及糖异生关键酶 PEPCK 和 G-6-P 表达均减少;胞内 TG 含量下降伴脂肪合成相关蛋白 FAS、ACC 表达减少。

AMPK 是一种异源三聚体蛋白,参与调控多种代谢过程,被称为“细胞的能量感受器”^[6],而胞内 ACC 磷酸化水平上调则被作为 AMPK 活化的标志^[7]。因此,本实验虽未直接检测 AMPK 的磷酸化水平,但从 BBR 上调 ACC 磷酸化水平可以推断,BBR 可以激活 AMPK,与已有文献报道^[8]一致。

LKB1 是人体的一个抑癌基因,编码的蛋白由 433 个氨基酸组成,以 LKB1/STRAD α /MO25 α 三聚体共存,其亚细胞定位是 LKB1 发挥激酶活性的关键^[9]。在 LKB1^{-/-} 的 HeLa 细胞中,AMPK 不能被激活,而转染 LKB1 后,AMPK 才可被激活^[10];另外,在 LKB1^{-/-} 的成年小鼠肝脏中亦发现 AMPK 活性几乎完全丧失^[2],由此可见,LKB1 是 AMPK 的重要上游激酶。本实验结果显示,BBR 显著增加 LKB1 蛋白的表达,提示 BBR 上调 LKB1 蛋白的表达可能促进 AMPK 的活化。

TORC2 是环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (CREB) 的辅激活物,其去磷酸化入核是 CREB 发挥活性的基础^[11]。TORC2 在肝脏中高表达,同时

受多种信号通路调控,胰高血糖素、胰岛素水平以及细胞内的能量变化均会使 TORC2 做出相应的应答反应^[12],并且,胰岛素促进 TORC2 磷酸化,胰高血糖素促进 TORC2 去磷酸化,从而奠定了 TORC2 调控糖异生的关键“分子开关”作用^[13]。另外,肝脏 TORC2 过量表达可促使小鼠出现高血糖症,而利用 RNAi 技术致使肝脏 TORC2 基因沉默,小鼠的高血糖症状及胰岛素敏感性均明显改善^[14],表明 TORC2 的表达量亦能影响肝糖异生。结合本实验的结果,模型组 TORC2 表达显著增加,而 BBR 干预组 TORC2 表达显著下降,同时,肝脏糖异生的两个关键限速酶 PEPCK 和 G-6-P 表达亦受到抑制,提示 BBR 可能通过抑制 TORC2 及下游 PEPCK 和 G-6-P 表达而减少肝脏糖异生。目前研究发现,TORC2 可以被活化的 AMPK 磷酸化而固定于细胞质中,已被认为是 AMPK 信号通路的下游分子之一^[15],而本实验未检测 TORC2 的活性,因此,BBR 对 TORC2 的作用是否与 AMPK 有直接的关联还不得而知。

另外,IR 状态的 HepG2 细胞 TG 含量增多,可能与细胞对外环境中游离脂肪酸的摄取增多有关,也可能是脂肪酸的重新合成增多,和/或细胞内脂质的划分调节异常^[16]。ACC 是脂肪酸合成的限速酶,活化的 AMPK 促进 ACC 磷酸化而发挥作用,最终导致脂肪酸及 TG 合成减少^[17],由此可见,BBR 抑制 HepG2 细胞内 TG 含量与 BBR 激活 AMPK,上调 ACC 的磷酸化水平,抑制 ACC 和 FAS 蛋白的表达有关。

综上所述,BBR 改善 HepG2 细胞的胰岛素抵抗状态,无论是糖代谢还是脂代谢,其调控的关键分子靶点均为 LKB1-AMPK-TORC2 信号网络。由此可见 LKB1-AMPK-TORC2 信号网络调控异常与 T2 DM 的发病密切相关,而小檗碱可能通过调控 LKB1-AMPK-TORC2 信号通路相关蛋白有效改善软脂酸诱导的胰岛素抵抗。

参考文献

- [1] 陈其明,谢明志.黄连及小檗碱降血糖作用的研究[J].四川中医,1999,17(11):17-19.
- [2] SHAW R J, LAMIA K A, VASQUEZ D, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin[J]. Science, 2005, 310:1642-1646.
- [3] KESHAVERZ P, INOUE H, NAKAMURA N, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes encoding LKB1(STK11), TORC2(CRTC2)and AMPK alpha2-subunit(PRKAA2)and risk of type 2 diabetes[J]. Mol Genet Metab, 2008, 93:200-209.
- [4] ZHENG X K, ZHANG L, WANG W W, et al. Anti-

- diabetic activity and potential mechanism of total flavonoids of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring in rats induced by high fat diet and low dose STZ[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137:662-668.
- [5] ZANG M, ZUCCOLLO A, HOU X, et al. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279:47898-47905.
- [6] HARDIE D G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8:774-785.
- [7] HARDIE D G, CARLING D. The AMP-activated protein kinase-fuel gauge of the mammalian cell[J]? Eur J Biochem, 1997, 246:259-273.
- [8] 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.
- [9] ALESSI D R, SAKAMOTO K, BAYASCAS J R. LKB1-dependent signaling pathways[J]. Annu Rev Biochem, 2006, 75:137-163.
- [10] DOLINSKY V W, CHAN A Y, ROBILLARD FRAYNE I, et al. Resveratrol prevents the prohypertrophic effects of oxidative stress on LKB1[J]. Circulation, 2009, 119, 1643-1652.
- [11] KATOH Y, TAKEMORI H, LIN X Z, et al. Silencing the constitutive active transcription factor CREB by the LKB1-SIK signaling cascade[J]. FEBS J, 2006, 273:2730-2748.
- [12] SCREATON R A, CONKRIGHT M D, KATOH Y, et al. The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium-and cAMP sensitive coincidence detector[J]. Cell, 2004, 119:61-74.
- [13] KOO S H, FLECHNER L, QI L, et al. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism[J]. Nature, 2005, 437:1109-1111.
- [14] SABERI M, BJELICA D, SCHENK S, et al. Novel liver-specific TORC2 siRNA corrects hyperglycemia in rodent models of type 2 diabetes[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009, 297:E1137-46.
- [15] YANG M, ZHANG Z, WANG C, et al. Nesfatin-1 action in the brain increases insulin sensitivity through Akt/AMPK/TORC2 pathway in diet-induced insulin resistance[J]. Diabetes, 2012, 61:1959-1968.
- [16] RUDERMAN N, PRENTKI M. AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome[J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3:340-351.
- [17] HARDIE D G, ROSS F A, HAWLEY S A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13:251-262.