

实验研究

降糖消渴颗粒含药血清对 INS-1 细胞
FoxO1 表达的影响莫芳芳¹ 刘海霞¹ 华 静² 赵丹丹¹ 田 甜¹ 高思华¹

(1 北京中医药大学, 北京, 100029; 2 北京中医药大学第三附属医院, 北京, 100029)

摘要 目的:通过研究降糖消渴颗粒含药血清对 INS-1 细胞 FoxO1 因子表达的影响,探讨降糖消渴颗粒含药血清保护胰岛 β 细胞的分子机制。方法:通过慢病毒转染的方法制备 FoxO1 高表达 INS-1 稳定细胞株,以 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 四环素干预 12 h 诱导 FoxO1 高表达以成模。以 10% 的降糖消渴颗粒含药血清干预细胞模型 24 h,正常鼠血清作对照。高倍镜下观察细胞形态,MTT 法计算细胞存活率,全自动生化仪检测细胞培养液中葡萄糖含量以计算葡萄糖消耗量,Elisa 法检测细胞胰岛素分泌量,Western blot 检测细胞中 FoxO1 总蛋白表达水平及其磷酸化水平,以 qRT-PCR 检测 FoxO1mRNA 表达情况。结果:高倍镜下观察细胞形态、细胞存活率均无统计学意义。降糖消渴颗粒含药血清组葡萄糖消耗量与细胞胰岛素分泌量均显著升高($P < 0.01$)。Western-blot 结果显示 FoxO1 总蛋白表达无统计学意义($P > 0.05$),而 p-FoxO1 蛋白表达增加($P < 0.05$)。qRT-PCR 结果显示 FoxO1mRNA 表达量稍有降低,但差异没有统计学意义($P > 0.05$)。结论:降糖消渴颗粒含药血清不能降低 INS-1 细胞 FoxO1 蛋白表达水平,但能促进 FoxO1 磷酸化,进而达到改善胰岛 β 细胞功能的作用。

关键词 降糖消渴颗粒;FoxO1;INS-1 细胞;2 型糖尿病

Effects of Jiangtang Xiaoke Granule Contained Serum on FoxO1 Expression in INS-1 Cell

Mo Fangfang¹, Liu Haixia¹, Hua Jing², Zhao Dandan¹, Tian Tian¹, Gao Sihua¹

(1 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To study the molecular mechanism of Jiangtang Xiaoke Granule contained serum in protecting β -cells through studying the effects of Jiangtang Xiaoke Granule (JTXK) contained serum on FoxO1 expression in INS-1 cell. **Methods:** Lentivirus transfection was used to prepare FoxO1-overexpressing INS-1 stable cell line, and the overexpression was induced by 2.5 $\mu\text{g/mL}$ doxycycline for 12 hours. The cells were treated with 10% JTXK granule containing serum for 24 h. And normal rat serum was used as control. The morphological changes of cells were observed under high power microscope. MTT analysis was used to calculate cell viability. The glucose concentration in cell culture was detected by automatic biochemical analyzer. And the glucose consumption was calculated. ELISA analysis was used to examine insulin secretion. The expression levels of FoxO1 and P-FoxO1 were evaluated by western blot. And the expression levels of FoxO1mRNA were evaluated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **Results:** The cells did not have significant differences in size and shape. And there was no difference in cell viability among three groups. The glucose consumption and insulin secretion were increased in JTXK group ($P < 0.01$). At the same time, the results of western-blot and qRT-PCR showed that the expression of FoxO1 and FoxO1mRNA had no difference ($P > 0.05$). However, the expression of P-FoxO1 was increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** JTXK granule cannot decrease the expression of FoxO1 of INS-1 cell, but can promote phosphorylation of FoxO1, so as to improve β -cell function.

Key Words Jiangtang Xiaoke (JTXK) granule, FoxO1, INS-1 cell, Type 2 diabetes mellitus (T2DM)

中图分类号:R285.6 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.12.047

Forkhead (Fox) 因子是一类蛋白质家族,其在生物体内起着重要作用,已经成为生命科学研究的热

点之一^[1]。目前发现 Fox 有 17 个亚族,FoxO 是其中之一。FoxO 主要通过转录调控和信号传导途径

基金项目:北京中医药大学青年教师自主选题项目(2015-JYB-JSMS015)

作者简介:莫芳芳(1982.03—),女,博士,助理研究员,研究方向:脏腑相关理论与中医药防治糖尿病研究,E-mail: xiaofang. tcm@163.com

通信作者:高思华(1957.07—),男,博士,教授,研究方向:运气学说、脏腑相关理论与中医药防治糖尿病研究,Tel: (010) 64286915, E-mail: sihuagaopaper@ sina.com

来调节动物的生长发育、细胞分化、代谢、凋亡、炎症反应和免疫等^[2]。FoxO1 是 FoxO 家族中发现最早的成员,它能促进脂肪细胞的分化^[3-4]、负调控骨骼肌的生成和 I 型肌纤维基因的表达^[5],且对肝细胞、胰岛 β 细胞及脂肪细胞中胰岛素作用的发挥起重要作用^[6]。《CELL》发表的研究结果表明 FoxO1 与胰岛 β 细胞去分化相关,是维持 β 细胞身份的最主要作用因子^[7]。

2 型糖尿病 (Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM) 是一种复杂的遗传因素和环境因素共同作用所致的内分泌代谢性疾病。胰岛 β 细胞数目减少及功能受损是 T2DM 发生发展的最重要病理生理基础之一。降糖消渴颗粒是在导师肝脾肾同调辨治糖尿病大法指导下所组方剂,其临床疗效确切^[8]。实验研究也已经证实降糖消渴颗粒含药血清可抑制大鼠胰岛 β 细胞瘤株 INS-1 凋亡^[9]。为进一步研究降糖消渴颗粒治疗 T2DM 的作用机制,本研究拟从 FoxO1 切入,通过体外培养 INS-1 细胞,慢病毒转染制备 FoxO1 高表达模型,再以降糖消渴颗粒含药血清干预,探讨其对 β 细胞 FoxO1 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 8 周龄 SD 大鼠 30 只,体重 (300 ± 20) g,购自北京维通利华实验动物中心 (合格证号:SCXK(京)2012-0001)。INS-1 细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所北京协和医学院细胞资源中心。

1.1.2 药物 降糖消渴颗粒的成药颗粒剂型由北京中医药大学中药学院中药科技发展部生产及提供,已经过质量鉴定,每克颗粒含 5.01 g 生药,药物样品均保存于北京中医药大学糖尿病研究中心实验室内 (4°C 保存),以备未来参考。临用时用蒸馏水配成相应浓度的混悬液^[10]。

1.1.3 试剂与仪器 RPMI-1640 培养基,购自 INVITROGEN 公司;胰蛋白酶,购自 SOLAR BIO 公司;胎牛血清,购自杭州四季青生物工程材料有限公司;青/链霉素,购自 HYCLONE 公司;RIPA 裂解缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒,购自北京普利莱基因技术有限公司;MTT 购自 Sigma 公司;大鼠胰岛素 (INS) ELISA kit,购自武汉华美生物工程有限公司;FoxO1 (C29H4) Rabbit mAb 购自 CST 公司;Anti-FOXO1A (phospho S256) antibody 购自 ABCAM 公司;RNeasy Mini Kit,购自 QIAGEN 公司;RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit,购自 FERMENTAS

公司;FG, POWER SYBR GREEN PCR, 购自 INVITROGEN 公司;PCR 引物购自上海生工生物工程有限公司。CO₂ 培养箱、荧光定量 PCR 仪:美国 Thermo 公司;超净台工作:香港 Heal Force 公司;酶标仪:瑞士 Tecan 全波长多功能酶标仪;显微镜、AU400 全自动生化分析仪:日本 OLYMPUS 公司;电泳和转膜装置、XRS 凝胶成像仪:美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 含药血清的制备方法 雄性 8 周龄 SD 大鼠 30 只,体重 (300 ± 20) g,按体质量随机分组如下:空白对照组 10 只,降糖消渴颗粒组 20 只,给药剂量为 52.8 g 生药/(kg 体重 $\cdot$ d) (相当于临床人公斤体质量用量的 60 倍) 进行灌胃,每天上、下午各灌胃 1 次,共 5 次。空白对照组只灌胃等量的蒸馏水。末次灌胃后 1 h,乙醚麻醉大鼠,无菌条件下经腹主动脉取血, 4°C 静置 1 h, 3 000 r/min 离心 20 min,分离含药血清。合并同组大鼠含药血清, 56°C 水浴 30 min 灭活,微孔滤膜过滤除菌,冻存管分装, -80°C 保存备用^[11]。

1.2.2 INS-1 细胞培养 INS-1 细胞以含 10% 胎牛血清 (FBS), 100 IU/mL 青霉素, 100 IU/mL 链霉素, 50 $\mu\text{mol/L}$ β -巯基乙醇的 RPMI-1640 完全培养基置于 37°C , 5% CO₂ 条件下无菌培养 24 h 更换培养基一次,待细胞密度达到 70% ~ 80% 后进行细胞传代。

1.2.3 INS-1 细胞 FoxO1 高表达模型的建立及鉴定 构建含有 FoxO1 基因片段的质粒载体,应用慢病毒转染的方法将其转入 INS-1 细胞,经 puromycin 筛选获得稳定表达 FoxO1 细胞株 (OE) 和阴性对照细胞株 (NC), 2.5 $\mu\text{g/mL}$ Doxycycline 干预 12 h 诱导 FoxO1 表达。用 qRT-PCR 检测 NC、OE 2 种细胞株 FoxO1 基因的表达情况,以对模型进行鉴定。

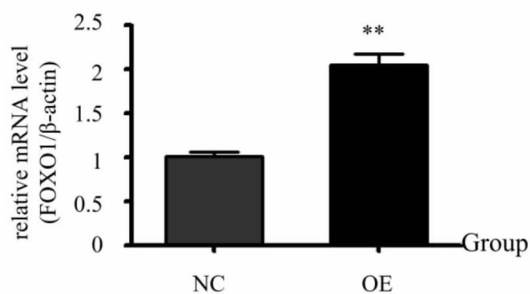


图 1 FoxO1 相对基因的表达

注:与 NC 组比较, ** $P < 0.01$

OE 组 FoxO1 基因的表达丰度是 NC 组的 2.05 倍, NC 组相对 RNA 水平是 (1.003 ± 0.089), OE 是

(2.050 ± 0.213), 有明显的统计学意义, 说明 FoxO1 基因转染成功, 模型建立成功。

1.2.4 药物干预及指标检测 以 10% 的降糖消渴颗粒含药血清^[9] 干预细胞模型 24 h, 正常鼠血清作对照。分别检测正常组、模型组、药物组细胞培养液中的葡萄糖含量, 计算葡萄糖消耗量, MTT 法检测吸光度, 计算细胞存活率, Elisa 法检测细胞胰岛素分泌量, Western blot 检测细胞中 FoxO1 总蛋白表达水平及其磷酸化水平, 以 qRT-PCR 检测 FoxO1 mRNA 表达情况。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行数据处理分析, 每组实验重复 3 次, 数据均以 Mean $\pm$ SE 表示, 2 组比较采用 *t* 检验, 多组组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态观察 在高倍镜下观察, 正常组、模型组和降糖消渴颗粒组的细胞呈梭形或多边形, 细胞核明显, 细胞形态基本相似(如图 2)。结果显示, 慢病毒转染造模和 10% 降糖消渴颗粒含药血清干预细胞均不会造成细胞形态的变化。

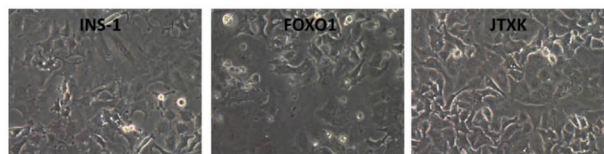


图2 细胞形态(200 ×)

2.2 降糖消渴颗粒含药血清对 INS-1 细胞葡萄糖消耗量及细胞存活率的影响 检测细胞培养液中葡萄糖含量, 与未接种细胞的空白复孔的葡萄糖浓度相减, 算出各孔的葡萄糖消耗量。结果如图 3 所示, 与正常对照组比较, 模型组的细胞葡萄糖消耗量明显减少($*P < 0.01$), 差异有统计学意义。与模型对照组比较, 10% 降糖消渴颗粒含药血清能够增加 FoxO1 高表达 INS-1 细胞模型的葡萄糖消耗量($**P < 0.01$)。

MTT 法测定波长在 570 nm 各孔的吸光度, 计算细胞存活率。如图 3 所示, 各组之间细胞存活率无显著性差异($#P > 0.05$, $##P > 0.05$), 说明慢病毒转染制备 FoxO1 高表达模型与 10% 降糖消渴颗粒含药血清干预细胞均未见明显细胞毒性。

2.3 降糖消渴颗粒含药血清对 INS-1 细胞胰岛素分泌功能的影响 如图 4 所示, 与正常组比较, INS-1 细胞 FoxO1 高表达模型组的细胞胰岛素分泌量减少, 差异有统计学意义($*P < 0.01$), 提示 FoxO1 高表达 INS-1 细胞胰岛素分泌功能受损。与模型组比

较, 10% 降糖消渴颗粒含药血清能够明显增加细胞胰岛素分泌量($**P < 0.01$)。

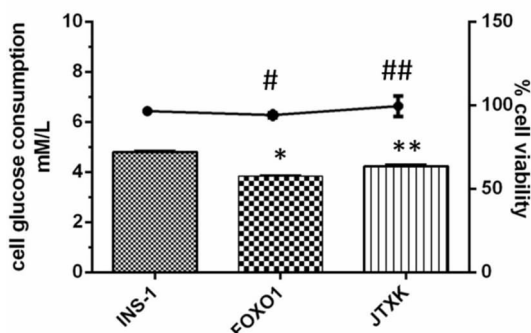


图3 降糖消渴颗粒含药血清对 INS-1 细胞葡萄糖消耗量及细胞存活率的影响

注: 与正常组比较, $*P < 0.01$, $#P > 0.05$, 与模型组比较, $**P < 0.01$, $##P > 0.05$

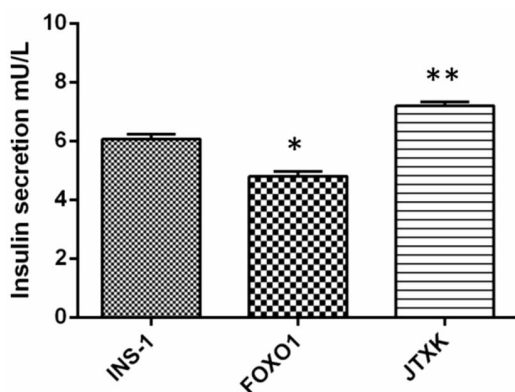


图4 降糖消渴颗粒含药血清对 INS-1 细胞胰岛素分泌功能的影响

注: 与正常组比较, $*P < 0.01$, 与模型组比较, $**P < 0.01$

2.4 降糖消渴颗粒含药血清对 INS-1 细胞 FoxO1 蛋白表达及其磷酸化水平的影响 如图 5 所示, Western-blot 结果显示, 与正常 INS-1 细胞比较, FoxO1 高表达细胞模型组 FoxO1 总蛋白表达增加($*P < 0.01$), p-FoxO1 蛋白表达无统计学意义($*P > 0.05$), 提示模型稳定。应用 10% 降糖消渴颗粒含药血清干预 24 h 后, 与模型对照组比较, FoxO1 总蛋白表达无统计学意义($##P > 0.05$), 而 p-FoxO1 蛋白表达增加($**P < 0.05$)。

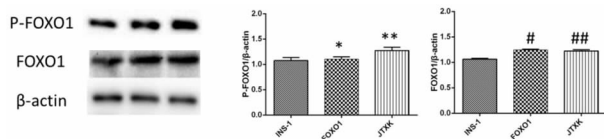


图5 降糖消渴颗粒含药血清对 INS-1 细胞 FoxO1、P-FoxO1 蛋白表达的影响

注: 与正常组比较, $*P > 0.05$, $#P < 0.01$, 与模型组比较, $**P < 0.05$, $##P > 0.05$

2.5 降糖消渴颗粒含药血清对 INS-1 细胞 FoxO1 mRNA 表达的影响 如图 6 所示,qRT-PCR 结果显示,与正常组比较,模型对照组 FoxO1 mRNA 表达量明显升高(* $P < 0.01$),提示细胞模型稳定。以 10% 降糖消渴颗粒含药血清干预 FoxO1 高表达 INS-1 细胞模型 24 h,与模型对照组比较,FoxO1 基因表达量稍有降低,但差异没有统计学意义(** $P > 0.05$)。

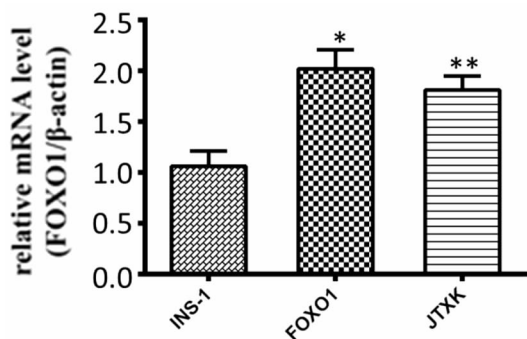


图 6 降糖消渴颗粒含药血清对 INS-1 细胞 FoxO1 mRNA 表达的影响

注:与正常组比较,* $P < 0.01$,与模型组比较,** $P > 0.05$

3 讨论

胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞受损是 T2DM 发病的重要病理机制,尤其 β 细胞数量减少和功能受损在 T2DM 发生和发展中发挥了重要作用。大量研究资料表明,FoxO1 在胰岛 β 细胞中表达丰富,FoxO1 作用于协调 β 细胞的更新和功能之间的关系,是胰岛 β 细胞应激、增殖、凋亡调控网络的关键点^[12-17]。

FoxO1 的活性受胰岛素的负性调节。FoxO1 作为胰岛素/胰岛素样生长因子 1 (INS/IGF-1) 信号通路中的关键因子,其上游受磷酸肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/PKB) 磷酸化级联通路的调节。FoxO1 分子中有三个保守的 AKT/PKB 蛋白激酶的磷酸化位点,PI3K/AKT 途径被激活后,使细胞核中的 FoxO1 磷酸化而发生核输出,由核内转至胞质中,失去转录活性,从而抑制细胞的凋亡。当胰岛素信号减弱时,通过 PI3K/AKT 通路,AKT/PKB 蛋白激酶活性降低,使 FoxO1 磷酸化水平降低而滞留在细胞核内,失去活性,进而通过诱导靶基因表达而导致细胞功能的改变^[18]。

在我们的研究中发现 FoxO1 高表达的 INS-1 细胞的葡萄糖消耗量和胰岛素分泌量均有所降低,提示 FoxO1 高表达导致了 INS-1 细胞分泌胰岛素的功能受损。降糖消渴颗粒含药血清能够增加胰岛 β 细胞的葡萄糖消耗量和胰岛素分泌量,从而改善了细胞功能。进一步研究分子机制,FoxO1 高表达 INS-1

细胞中总的 FoxO1 蛋白水平和 mRNA 均显著增加,说明慢病毒转染的细胞模型稳定。经降糖消渴颗粒含药血清干预,细胞中总的 FoxO1 蛋白水平和 mRNA 含量均无显著性变化,而 P-FoxO1 蛋白水平增加,说明降糖消渴颗粒含药血清促进了 β 细胞中 FoxO1 磷酸化出核,可能激活 PI3K/AKT 途径,从而改善细胞胰岛素分泌功能。这可能是降糖消渴颗粒含药血清保护胰岛 β 细胞、改善细胞功能的作用机制之一。

综上所述,FoxO1 因子在 β 细胞中发挥着重要作用,本研究表明了降糖消渴颗粒不能降低 FoxO1 蛋白水平,但能促进 FoxO1 磷酸化,进而改善 β 细胞的胰岛素分泌功能,然而降糖消渴颗粒是否通过激活 PI3K/AKT 通路而发挥作用,还需进一步实验证实。

参考文献

- [1] Michael PC. Insulin's expanding control of forkheads[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 11198-11200.
- [2] Potente M, Urbich C, Sasaki K, et al. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization[J]. J Clin Invest, 2005, 115(9): 2382-2392.
- [3] Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, et al. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation[J]. Dev Cell, 2003, 4(1): 119-129.
- [4] Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase[J]. Science, 2004, 303(5666): 2011-2015.
- [5] Kamei Y, Miura S, Suzuki M, et al. Skeletal muscle FOXO1 (FKHR)-transgenic mice have less skeletal muscle mass, down 2 regulated type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control[J]. J Biol Chem, 2004, 279(39): 41114-41123.
- [6] Farmer SR. The forkhead transcription factor FoxO1: a possible link between obesity and insulin resistance[J]. Mol Cell, 2003, 11(1): 6-8.
- [7] Talchai C, Xuan S, Lin H, et al. Pancreatic b Cell Dedifferentiation as a Mechanism of Diabetic b Cell Failure[J]. Cell, 2012, 150(6): 1223-1234.
- [8] 高思华, 龚燕冰, 倪青, 等. 肝脾肾同治法辨证治疗 2 型糖尿病的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(8): 1007-1010.
- [9] 徐倩, 杨颖, 柳洋, 等. 不同种类降糖药物对 2 型糖尿病患者血清胰岛素样生长因子 1 及胰岛素样生长因子结合蛋白 3 水平的影响[J]. 中国医药, 2016, 11(7): 1015-1019.
- [10] 赵丹丹, 穆倩倩, 方心, 等. 降糖消渴颗粒含药血清对 C2C12 细胞胰岛素抵抗的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(5): 1577-1579.
- [11] Cao B, Zhang Z, Zhang Y, et al. Effect of Smilax china L-containing serum on the expression of POLD1 mRNA in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells[J]. Exp Ther Med, 2013, 6(4): 1070-1076.

(下接第 3054 页)

- [11]周彦明,杨甲梅,殷正丰,等. 内质网应激诱导的细胞凋亡与小鼠肝脏缺血再灌注损伤的关系[J]. 中国普通外科杂志,2009,18(8):870-872.
- [12]陈鹏,杨成明,曾春雨,等. 心肌梗死后心力衰竭小鼠心肌组织内质网应激相关凋亡途径的研究[J]. 中国病理生理杂志,2010,26(6):1069-1074.
- [13]Lakshmanan AP, Harima M, Suzuki K, et al. The hyperglycemia stimulated myocardial endoplasmic reticulum(ER) stress contributes to diabetic cardiomyopathy in the transgenic non-obese type 2 diabetic rats;a differential role of unfolded protein response(UPR) signaling proteins[J]. Int J Biochem Cell Biol,2013,45(2):438-447.
- [14]Argemí J, Kress TR, Chang HC, et al. X-box Binding Protein 1 Regulates Unfolded Protein, Acute-phase, and DNA Damage Responses During Regeneration of Mouse Liver[J]. Gastroenterology,2017,152(5):1203-1216.
- [15]Liu L, Qi X, Chen Z, et al. Targeting the IRE1 α /XBP1 and ATF6

arms of the unfolded protein response enhances VEGF blockade to prevent retinal and choroidal neovascularization[J]. Am J Pathol, 2013,182(4):1412-1424.

- [16]Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, et al. XBP1 downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation[J]. Immunity,2004,21(1):81-93.
- [17]Sriburi R, Bommasamy H, Buldak GL, et al. Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1(S)-induced endoplasmic reticulum biogenesis[J]. J Bio Chem,2007,282(10):7024-7034.
- [18]Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, et al. XBP1 controls diverse cell type and condition-specific transcriptional regulatory networks[J]. Molecular Cell,2007,27(1):53-66.

(2017-08-31 收稿 责任编辑:徐颖)

(上接第3049页)

- [12]Martinez SC, Cras-Mneur C, Bernal-Mizrachi E, et al. Glucose regulates FOXO1 through insulin receptor signaling in the pancreatic islet β -cell[J]. Diabetes,2006,55(6):1581-1591.
- [13]Accili D. Lilly lecture 2003 the struggle for mastery in insulin action;from triumvirate to republic[J]. Diabetes,2004,53(7):1633-1642.
- [14]Zhang W, Feng D, Li Y, et al. PERK EIF2AK3 control of pancreatic β cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis[J]. Cell Metab,2006,4(6):491-497.
- [15]Liu P, Kao TP, Huang H. CDK1 promotes cell proliferation and sur-

vival via phosphorylation and inhibition of FOXO1 transcription factor[J]. Oncogene,2008,27(34):4733-4744.

- [16]Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2005,54(3):727-735.
- [17]Talchai S C, Accili D. Legacy effect of Foxo1 In pancreatic endocrine progenitors on adult β -cell mass and function[J]. Diabetes, 2015,64(8):2868-2879.
- [18]黄荷,夏宁. FoxO1 对糖尿病胰腺 β 细胞的作用[J]. 内科, 2009,4(3):404-407.

(2017-07-21 收稿 责任编辑:徐颖)