

菩人丹对高糖诱导的 INS-1 细胞凋亡、 BAD 和 FOXO1 蛋白表达的影响

杜子亮,鲁碧楠,陈书,白永飞,德力格玛,庞宗然*

(中国少数民族传统医学国家民委-教育部重点实验室,北京 100081)

[摘要] 目的:观察菩人丹(Puren Dan, PRD)对高糖诱导的 INS-1 细胞凋亡、Bal-xl/Bcl-2 相关死亡促进因子(BAD)和叉头框转录因子 O 亚族 1(FOXO1)蛋白表达的影响,探讨 PRD 恢复 INS-1 细胞分泌功能的相关分子机制。**方法:**采用血清药理学方法制备菩人丹含药血清,建立高浓度葡萄糖(33.3 mmol·L⁻¹)诱导 INS-1 细胞损伤模型,以菩人丹药物血清干预 24 h;实验分为 5 组,即正常对照组(control 组)、高糖模型组(HG 组)、菩人丹药物血清高剂量组(H-PRD 组)、菩人丹药物血清低剂量组(L-PRD 组)和二甲双胍药物血清对照组(MF 组);采用 CCK8 试剂盒检测细胞活力,流式 Annexin V-FITC/PI 双染法考察细胞凋亡水平,Western blotting assay 检测 BAD 和 FOXO1 蛋白表达水平及其磷酸化水平。**结果:**与正常组比较高糖能够显著降低 INS-1 细胞活力、诱导细胞凋亡、降低 INS-1 细胞 BAD、FOXO1 丝氨酸磷酸化水平;与模型组比较菩人丹含药血清(终体积分数 10%)则能抑制 INS-1 细胞凋亡,增加细胞活力,下调 FOXO1 表达,促进 BAD 和 FOXO1 丝氨酸磷酸化。**结论:**菩人丹药物血清能够减少高糖诱导的 INS-1 细胞凋亡,这种作用与上调 BAD 和 FOXO1 蛋白丝氨酸磷酸化水平直接相关。

[关键词] 菩人丹;高糖;大鼠胰岛素瘤细胞系细胞;凋亡;Bal-xl/Bcl-2 相关死亡促进因子;叉头框转录因子 O 亚族 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0173-05

[doi] 10.11653/syjf2013220173

[收稿日期] 20130625(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072963)

[第一作者] 杜子亮,医学学士,在读硕士研究生,从事 2 型糖尿病病理机制与中医药干预研究,Tel:010-68933254, E-mail: katinaka@163.com

[通讯作者] *庞宗然,医学博士,研究员,博士生导师,从事糖尿病及其并发症发病机制与传统医药干预研究,Tel:010-68939090, E-mail: zrpang@163.com

上说明了鳖甲功效的物质基础在于活性肽类;而且鳖甲七肽对 MAO 抑制效果较好,提示鳖甲七肽在抗肝纤维化方面有较大应用前景,具有开发价值。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:361.
[2] 杨清,王星云,关向荣,等. 病毒性肝纤维化酶谱变化的相关性研究[J]. 中国实验诊断学,2006,10(10):1146.
[3] Batalle R, Brenner D A. Liver fibrosis [J]. J Clin Invest,2005,115(2):209.
[4] 杨青,张国成,关向荣. 清肝饮对大鼠肝纤维化单胺氧化酶活性的影响[J]. 长春中医药大学学报,2006,22(4):13.

[5] 王豪,郭本恒,吴正钧,等. 一株具有抑制单胺氧化酶作用的干酪乳杆菌筛选[J]. 微生物学报,2010,50(2):197.
[6] 雷海民. 抗乙肝病毒肽类及其衍生物,申请号:201010187949.9,实质审查的生效.
[7] 王豪,周凌华,徐致远,等. 单胺氧化酶的制备及活性测定[J]. 江苏农业科学,2011,19(3):372.
[8] 江绍基. 临床肝胆系病学[M]. 上海. 上海科学技术出版社,1992:106.
[9] 宋金香,杨文东,安振国. 肝硬化患者血清单胺氧化酶和透明质酸与 Child-Pugh 分级的关系[J]. 江西医学检验,2004,22(2):142.
[10] 李洪. 肝硬化患者血清前白蛋白、胆碱酯酶、单胺氧化酶的变化[J]. 内蒙古中医药,2011,30(3):23.

[责任编辑 聂淑琴]

Effect of Puren Dan Recipe Containing Drug-serum on the Apoptosis of INS-1 Cell and Expressions of BAD and FOXO1 in High Glucose Condition

DU Zi-liang, LU Bi-nan, CHEN Shu, BAI Yong-fei, Deligema, PANG Zong-ran*

(Key Laboratory for Chinese Minority Traditional Medicine of Ministry of Education, Beijing 100081, China)

[Abstract] Objective: To observe the effect of Puren Dan (PRD) recipe on the apoptosis of INS-1 cell and expression of Bal-xl/Bcl-2 associated death promoter (BAD) and forkhead box O1 (FOXO1) in high glucose condition, and explore the molecular mechanism of PRD on restoring secretion function of INS-1 cell. **Method:** Experimental injured INS-1 cell model was induced by high glucose (containing $33.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), and intervened by PRD drug-serum. INS-1 cells were divided into 5 groups: the control group, high glucose group, high PRD drug-serum group, low PRD drug-serum group and metformin drug-serum group. Cell viability, INS-1 cell apoptosis and expression level of related proteins and its phosphorylation were detected by CCK-8 assay, flow cytometry and AnnexinV-FITC/PI staining and Western blotting assay, respectively. **Result:** High glucose could decrease cell viability and induce INS-1 cell apoptosis, and it also downregulated phosphorylation level of BAD and FOXO1. PRD can increase cell viability, reduce apoptosis of INS-1 cell downregulated expression of FOXO1 and improved phosphorylation level of BAD and FOXO1. **Conclusion:** PRD drug-serum shows a protective effect on apoptosis INS-1 cell which induced by high glucose, and the mechanism may be associated with increase of the phosphorylation levels of BAD and FOXO1.

[Key words] Puren Dan; high glucose; INS-1 cell; apoptosis; BAD; FOXO1

高血糖是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 病程中最基本的病理特征之一, 不仅与 T2DM 各种急慢性并发症的发生发展密切相关, 而且参与了胰岛 β 细胞的凋亡。研究显示^[1], 分离的胰岛 β 细胞在超生理浓度 3 倍的葡萄糖刺激中培养较生理浓度葡萄糖液中培养的细胞凋亡显著升高。Bal-xl/Bcl-2 相关死亡促进因子 (BAD) 和叉头框转录因子 O 亚族 1 (FOXO1) 是大量表达于胰岛 β 细胞内的蛋白分子, 二者蛋白质表达或者磷酸化异常均可影响胰岛 β 细胞的存活^[2], 与胰岛 β 细胞凋亡密切相关。因此, 本实验以 BAD 和 FOXO1 蛋白为研究靶点, 对高浓度葡萄糖处理后的 INS-1 细胞给予善人丹含药血清进行干预, 观察 INS-1 细胞的活力、凋亡变化、BAD 和 FOXO1 蛋白的表达水平及其磷酸化水平, 旨在阐明善人丹对高糖诱导的大鼠胰岛素瘤细胞素 (INS-1) 细胞凋亡的改善作用及其潜在的分子机制。

1 材料

1.1 药品与试剂 善人丹药物组成: 苦瓜 (君)、人参 (臣)、丹参 (臣)、制水蛭 (佐)、制何首乌 (佐) 及葛根 (使)。苦瓜冻干粉购自诺金科生物技术有限公司 (批号 20110712); 人参 (批号 110704) 与制何

首乌 (批号 110801) 购自亚威中药饮片有限公司; 丹参 (批号 111201)、葛根 (批号 120201) 及制水蛭 (批号 110801) 购自金香中药饮片有限公司; 盐酸二甲双胍片购自北京双鹤药业 (批号 110444); Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 购于 DOJINDO 同仁化学研究所 (批号 CY632); 细胞凋亡与坏死检测试剂盒购于碧云天生物技术研究 (批号 11G0127)。

1.2 细胞株与动物 大鼠胰岛素瘤细胞系 INS-1 细胞株, 协和医科大学细胞中心; SPF 级雄性 Wistar 大鼠 90 只, 体重 (300 ± 10) g, 军事医学科学院实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (军) 2007-004。

1.3 仪器 流式细胞仪 (美国 BD 公司), 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 有限公司), Bio-Rad 电泳仪 (美国伯乐仪器有限公司), 湿转电泳槽 (北京凯元信瑞仪器有限公司)。

2 方法

2.1 INS-1 细胞的培养 INS-1 细胞在常规 RPMI1640 培养液中, 于 5% CO_2 37 °C 恒温湿化培养箱中培养, 待细胞长至 70% ~ 80% 融合后予以传代。

2.2 含药血清的制备 将大鼠按随机数字表法分组, 30 只为善人丹组, 30 只为二甲双胍阳性对照组,

30 只为空白对照组,各组均饲以普通维持饲料。菩人丹组给予正常剂量 ($1.77 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 10 倍的菩人丹^[3],二甲双胍阳性对照组以 $0.07 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的二甲双胍 0.5% CMC-Na 乳浊液灌胃,空白对照组以 0.5% CMC-Na 溶液灌胃。每日给药 2 次(间隔 12 h),连续给药 5 d,于第 5 日首次给药(即第 9 次给药)后 1 h,10% 水合氯醛 ($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip) 麻醉大鼠,腹主动脉取血,室温静置 3 h 后 $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,分离血清,分别将各组大鼠血清混合,56 °C 水浴灭活 30 min,一次性无菌微孔滤膜 ($0.22 \mu\text{m}$) 过滤灭菌,分装后 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.3 高糖诱导 INS-1 细胞损伤模型的复制及分组 取同代 INS-1 细胞置于高糖 RPMI1640 培养液内培养 3 d 进行模型复制。根据实验设计分组如下:正常对照组 (Control 组,常规 RPMI1640 中培养)、高糖模型组 (HG 组,含葡萄糖 $33.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RPMI1640 培养液培养 3 d)、菩人丹药物血清高剂量组 (H-PRD 组, HG 组细胞中加入终浓度为 10% 的菩人丹含药血清培养液干预 24 h)、菩人丹药物血清低剂量组 (L-PRD 组, HG 组细胞中加入终浓度为 5% 的菩人丹含药血清培养液干预 24 h) 和二甲双胍药物血清对照组 (MF 组, HG 组细胞中加入终浓度为 10% 的二甲双胍含药血清培养液干预 24 h)。

2.4 CCK8 试剂盒检测细胞活力 收集对数生长期的 INS-1 细胞,接种于 96 孔板中,各组细胞干预结束后按照 CCK-8 试剂盒说明书进行操作,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A),以正常组 A 为对照,按照干预组 A /正常组 $A \times 100\%$ 计算细胞活力。

2.5 流式 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡 收集对数生长期的 INS-1 细胞,各组细胞干预结束后按照试剂盒说明书检测细胞凋亡率。

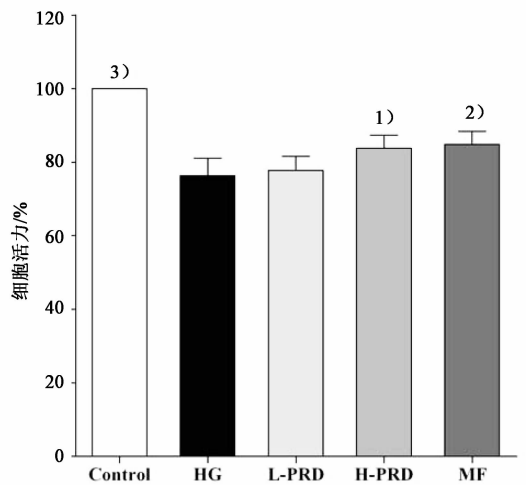
2.6 Western blot 检测 FOXO1 和 BAD 蛋白表达水平及其磷酸化水平 收集各组细胞,按 RIPA 蛋白抽提试剂盒说明提取各组细胞总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。制备蛋白样品,转膜,封闭,一抗 (BAD 1:2 000;p-BAD 1:5 000;FOXO1 1:2 000;p-FOXO1 1:1 000) 4 °C 过夜。次日置于二抗 (1:20 000) 中,室温孵育 40 min,ECL 发光显色^[4]。Bio-Rad 图像分析系统对 Western 印迹目的条带进行扫描,然后用 Quantity One 软件分析目的条带吸光度与内参条带吸光度的比值来评估结果。

2.7 统计学处理 实验数据使用 SPSS 18.0 软件进行分析。正态分布计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组

间比较采用两样本均数的 t 检验,多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。

3 结果

3.1 细胞活力检测 如图 1 所示,以 Control 组细胞活力 100% 为对照,各组细胞活力显著降低,HG 组细胞活力下降幅度最大(细胞活力 $76.4\% \pm 4.77\%$, $P < 0.001$),L-PRD 组细胞活力与 HG 组相比无明显差异(细胞活力 $77.80\% \pm 3.83\%$),但 H-PRD 组细胞活力较 HG 组明显升高(细胞活力 $83.8\% \pm 3.49\%$, $P < 0.01$),并且与 MF 组效果相当(细胞活力 $84.8\% \pm 3.56\%$)。



Control. 正常对照组;HG. 高糖模型组;L-PRD. HG + 5% PRD 血清; H-PRD. HG + 10% PRD 血清;MF. HG + 10% 二甲双胍含药血清与 HG 组比较¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$ ³⁾ $P < 0.001$ (图 2 ~ 4 同)

图 1 菩人丹对高糖损伤 INS-1 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.2 各组细胞凋亡水平 如图 2 所示,HG 组细胞凋亡率较 Control 组显著升高 ($P < 0.001$);与 HG 组相比,L-PRD 组 ($P = 0.003$) 和 H-PRD 组 ($P < 0.001$) 细胞凋亡率明显下降;但 L-PRD 组细胞凋亡率明显高于 MF 组 ($P < 0.001$),而 H-PRD 组细胞凋亡率下降,与 MF 组细胞凋亡率无显著性差异。

3.3 BAD 及其丝氨酸磷酸化水平 如图 3 所示,与 control 组相比,HG BAD (ser136) 磷酸化水平下降 74% ($P < 0.001$),菩人丹干预后 HG 组 BAD (ser136) 磷酸化水平升高 2.65 倍 ($P < 0.001$),并且与阳性对照药 MF 作用趋势一致。

3.4 FOXO1 及其丝氨酸磷酸化水平 如图 4 所示,HG 组 FOXO1 蛋白质表达水平较 control 组升高 1.43 倍 ($P < 0.001$),菩人丹作用后 HG 组损伤细胞的 FOXO1 蛋白质表达水平下降 1.61 倍



图 2 菩人丹抑制高糖诱导 INS-1

细胞凋亡(流式 Annexin V-FITC/PI 双染法, $n = 3$)

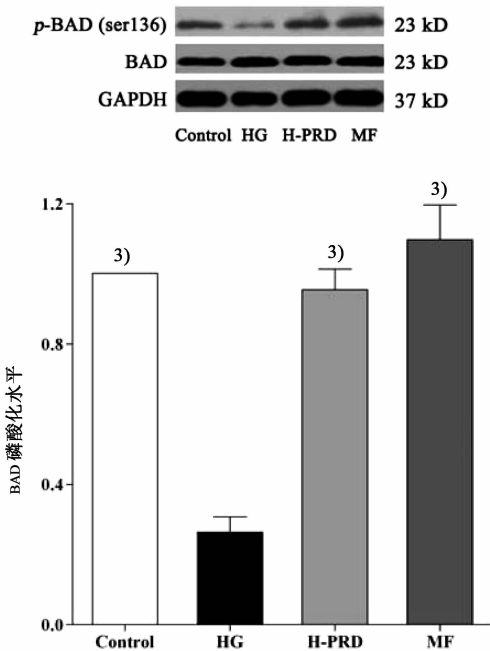


图 3 菩人丹对高糖损伤 INS-1 细胞 BAD (ser136) 磷酸化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

($P < 0.001$), 其作用效果甚至强于阳性对照药 MF 组; FOXO1 (ser256) 磷酸化水平在高糖作用下显著降低, 与 control 组相比, HG 组 FOXO1 (ser256) 磷酸化水平下降 86% ($P < 0.001$), 菩人丹干预后 HG 损伤细胞 FOXO1 (ser256) 磷酸化水平上调了 5.34 倍 ($P < 0.001$), 其作用效果明显超过阳性对照药 MF 组。

4 讨论

胰岛 β 细胞功能减退直至衰竭是目前公认的 T2DM 发病机制之一, β 细胞凋亡和数量的进行性减少是导致其自身功能由代偿期向衰竭期转变的关键因素。葡萄糖毒性是导致 β 细胞凋亡的主要原因之一, 临床研究^[5]显示: T2DM 患者的胰岛细胞新生过程正常, 但凋亡细胞数比正常人增加了 3 ~ 10 倍,

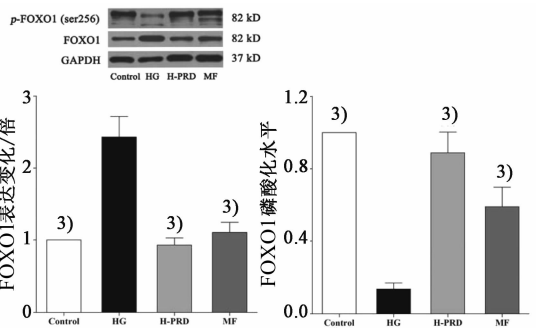


图 4 菩人丹对高糖损伤 INS-1 细胞 FOXO1 蛋白质相对表达量及 ser256 位点磷酸化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

这可能是 T2DM 患者胰岛 β 细胞数量随时间推移而不断减少的原因。实验研究^[6]也表明在高糖环境下 β 细胞增殖受到抑制、凋亡增加。本实验中 CCK8 细胞活力检测结果显示持续高糖 (72 h) 对 INS-1 细胞增殖有明显的抑制作用, 表明高糖具有细胞毒性作用; 进一步采取流式 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡, 结果显示高糖环境下 INS-1 细胞凋亡显著增加, 而 PRD 能显著提升高糖环境下 INS-1 细胞活力, 减少其凋亡率。

B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell leukemia-2, Bcl-2) 家族蛋白在细胞凋亡调控中发挥着重要的作用, BAD 为 Bcl-2 家族中的促凋亡成员之一。BAD 蛋白促凋亡活性受到磷酸化/去磷酸化修饰的调控, 在没有凋亡信号刺激的生理状态下, BAD 以磷酸化形式存在于细胞质中, 与 14-3-3 蛋白结合成稳定的复合物, 不干扰 Bcl-xL 和 Bcl-2 的抑制细胞凋亡的活性, 从而发挥其抗凋亡作用, 当有凋亡刺激信号产生时, 如 β 细胞内葡萄糖和脂质的增多, 使 BAD 发生去磷酸化反应, 游离的 BAD 构型发生改变, 易位至细胞线粒体外膜, 并通过拮抗 Bcl-xL 和 Bcl-2 的抑凋亡功能, 发挥 BAD 的促凋亡活性^[7-8]。本实验发现, 高糖诱导的 INS-1 细胞 BAD 蛋白 ser136 位点的丝氨酸磷酸化水平降低, 其机制可能是由于高糖环境下 Akt 活性受到抑制, 使 BAD 蛋白中可被 PI3K 依赖性 Akt 诱导磷酸化的 Ser136 位点磷酸化水平降低^[9], 结果导致去磷酸化形式存在的 BAD 增多, 从而拮抗 Bcl-2 的作用进而促进 INS-1 细胞的凋亡。菩人丹可能通过促进 BAD 蛋白 ser136 位点的磷酸化, 阻止 BAD 线粒体易位, 恢复 Bcl-2 和 Bcl-xL 的抑凋亡活性, 进而抑制了高糖诱导的细胞凋亡。

转录因子 FOXO1 是 Forkhead 家族成员之一, 在胰岛 β 细胞中大量表达, 并作为 β 细胞胰岛素信号传递蛋白 Akt 下游的效应分子介导了胰岛素信号转导, 发挥了调控 β 细胞增殖、分化、凋亡等作

用^[10]。磷酸化、乙酰化和泛素化是 FOXO1 蛋白主要的修饰方式,胰岛 β 细胞的胰岛素信号转导系统中 Akt 的激活可以介导 FOXO1 蛋白的磷酸化^[11]。FOXO1 磷酸化位点有 Thr24, Ser256 和 Ser319, 三者均可被活化的 Akt 磷酸化。当 FOXO1 蛋白被磷酸化后,磷酸化的 FOXO1 与伴侣蛋白 14-3-3 蛋白结合,阻止 FOXO1 核内转运,促进 FOXO1 核外转运,使其滞留在细胞质中,无法发挥其转录活性^[12]。在高糖毒性作用下, β 细胞 Akt 活性被抑制,FOXO1 磷酸化减少,不能与 14-3-3 蛋白结合,因而留在细胞核内,行使其转录活性。非磷酸化的 FOXO1 可在细胞核内,与细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白(CDKI),如 INK4b 和 INK4d 上的启动子结合,上调二者的蛋白质表达,使其与细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK4)结合,引起 CDK 失活,最终导致细胞周期停滞,使 β 细胞增殖抑制,凋亡增加^[13]。本实验中也发现,高糖损伤细胞 FOXO1 的 ser256 位点磷酸化均下降,而菩人丹干预组 FOXO1 磷酸化程度显著增加,提示菩人丹可能通过活化胰岛 β 细胞内的 Akt 使 FOXO1 磷酸化,进而抑制了 FOXO1 的核内转位而使其失活,从而保护了高糖毒性下的胰岛 β 细胞。

总之,胰岛 β 细胞的数量取决于增殖、新生与凋亡细胞的比例,高糖毒性可导致胰岛 β 细胞凋亡,打破这一比例的动态平衡,使 β 细胞数量异常减少,引起胰岛 β 细胞功能减退直至衰竭而引发 T2DM。因此,如何维持正常的 β 细胞数量,促进其增殖、分化,减少凋亡是有效防治 T2DM 的一个重要方面。BAD 和 FOXO1 不仅与胰岛 β 细胞增殖凋亡密切相关,还部分介导了胰岛素信号的转导,调控 BAD 和 FOXO1 蛋白表达及其磷酸化水平有利于 β 细胞数量的维持和功能的改善,本实验结果显示菩人丹能够增加 FOXO1 蛋白表达水平,促进 BAD 和 FOXO1 的丝氨酸磷酸化,这可能是菩人丹药物血清能够减少高糖诱导的 INS-1 细胞凋亡的潜在机制。

[参考文献]

[1] Eun-Mi Lee, Young-Eun Lee, Esder Lee, et al. Protective effect of heme oxygenase-1 on high glucose-induced pancreatic β -cell injury[J]. *Diabetes Metab J*,

2011, 35(5):469.

- [2] Wang W, Liu Y, Chen Y, et al. Inhibition of Foxo1 mediates protective effects of ghrelin against lipotoxicity in MIN6 pancreatic beta-cells[J]. *Peptides*, 2010, 31(2):307.
- [3] 庞宗然,刘祖涵,苏晓慧,等. 菩人丹超微粉对肥胖型 T2DM 大血管损伤大鼠 ET-1、NO、FFAs 含量的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(10):1779.
- [4] Ryu G R, Yoo J M, Lee E, et al. Decreased expression and induced nucleocytoplasmic translocation of pancreatic and duodenal homeobox 1 in INS-1 cells exposed to high glucose and palmitate [J]. *Diabetes Metab J*, 2011, 35(1):65.
- [5] 杨健,陈高红,王汉斌. 糖尿病治疗中改善胰岛 β 细胞功能的探索[J]. *中华现代临床医学杂志*, 2009, 7(12):1903.
- [6] 刘好,曹仁贤,文格波,等. 高糖诱导胰岛细胞凋亡机制的研究[J]. *医学研究生学报*, 2005, 18(10):882.
- [7] 李捷萌,陈彦青,刘荣国,等. 线粒体凋亡途径与 Bcl-2 家族蛋白研究进展[J]. *医学综述*, 2008, 14(4):489.
- [8] 柳向军,张令强,刘小林,等. 细胞凋亡中的 Bcl-2 家族蛋白及其 BH3 结构域的功能研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(3):221.
- [9] 林益川,王林曦,王燕萍,等. 地塞米松对小鼠 MIN6 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *福建医科大学学报*, 2008, 42(6):500.
- [10] 孙情,乔伟,冯乐平,等. 叉头转录因子 FoxO1 对 β 细胞生物学作用的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(18):2417.
- [11] 郑舒静,陈诺琦. 胰岛 β 细胞转录因子 FoxO1 的研究进展[J]. *医学综述*, 2011, 17(1):47.
- [12] 钟茜,邓宇斌. FoxO1 转录因子及其翻译后修饰的生物学意义[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26(03):203.
- [13] Kaiser G, Gerst F, Michael D, et al. Regulation of forkhead box O1 (FOXO1) by protein kinase B and glucocorticoids; different mechanisms of induction of beta cell death *in vitro* [J]. *Diabetologia*, 2013, 56(7):1587.

[责任编辑 聂淑琴]