

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00561

• 短篇论著 •

褪黑素受体激动剂 Neu-P11 对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1 和 GLUT-4 表达的影响

李秀平¹, 尹卫东^{2*}, 胡晓波², 余美华², 王平平², 张素君², 黄 靓²

1. 怀化医学高等专科学校检验系, 怀化 418000

2. 南华大学医学院心血管疾病研究所, 衡阳 412000

[摘要] **目的** 探讨褪黑素受体激动剂 Neu-P11 对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1 和 GLUT-4 表达的影响。**方法** 用高糖高胰岛素作用 3T3-L1 脂肪细胞 24 h, 建立胰岛素抵抗细胞模型。分别采用褪黑素、Neu-P11、褪黑素+luzindole(褪黑素受体拮抗剂)和 Neu-P11+luzindole 处理细胞, 并以未加药细胞作为对照。用葡萄糖氧化酶法检测培养液中的糖含量并计算糖消耗量, 用蛋白质印迹分析检测细胞内 IRS-1、GLUT-4 蛋白表达变化。**结果** 胰岛素抵抗细胞用褪黑素和 Neu-P11 处理后, 糖消耗量较未加药对照组升高($P<0.05$), GLUT-4、IRS-1 的蛋白表达也增高($P<0.05$); 褪黑素和 Neu-P11 分别与 luzindole 联合作用于细胞后, 细胞的上述蛋白表达较单用褪黑素组和单用 Neu-P11 组降低($P<0.05$), 而与未加药对照组相比差异无统计学意义。**结论** 褪黑素受体激动剂 Neu-P11 可提高胰岛素抵抗脂肪细胞的胰岛素敏感性, 增加糖消耗量, 这种作用可能与上调 IRS-1、GLUT-4 蛋白的表达有关。

[关键词] Neu-P11; 褪黑素; 脂细胞; 胰岛素抵抗

[中图分类号] R 587.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)05-561-04

Effect of melatonin receptor agonist Neu-P11 on expression of IRS-1 and GLUT-4 in insulin-resistant adipocytes

LI Xiu-ping¹, YIN Wei-dong^{2*}, HU Xiao-bo², SHE Mei-hua², WANG Ping-ping², ZHANG Su-jun², HUANG Liang²

1. Department of Laboratory Medicine, Huaihua Medical College, Huaihua 418000, Hunan, China

2. Institute of Cardiovascular Disease, School of Medicine, University of South China, Hengyang 412000, Hunan, China

[Abstract] **Objective** To explore the influence of melatonin receptor agonist Neu-P11 on the expression of IRS-1 and GLUT-4 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. **Methods** Insulin resistant 3T3-L1 adipocytes were induced with high glucose/high insulin for 24 hours, and then they were divided into 4 treatment groups: melatonin, Neu-P11, melatonin+luzindole and Neu-P11+luzindole. And non-treated insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes were taken as control. Glucose consumption was detected by enzymatic method. IRS-1 and GLUT-4 protein expressions were detected by Western blotting analysis. **Results** After the insulin-resistant adipocytes were treated with melatonin and Neu-P11, the glucose consumption and the expressions of IRS-1, GLUT-4 proteins were significantly increased compared with the non-treated control group ($P<0.05$). The expressions of IRS-1, GLUT-4 proteins in melatonin+luzindole(melatonin receptor antagonist) and Neu-P11+luzindole groups were significantly decreased compared with melatonin alone or Neu-P11 alone groups ($P<0.05$), and were similar to those in the non-treated control group. **Conclusion** Melatonin receptor agonist Neu-P11 can increase glucose consumption, insulin sensitivity in insulin resistant-adipocytes, which might be associated with the up-regulation of IRS-1 and GLUT-4 protein expression.

[Key words] Neu-P11; melatonin; high glucose/high insulin; adipocytes; insulin resistance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(5):561-564]

[收稿日期] 2012-11-18

[接受日期] 2013-02-04

[基金项目] 湖南省教育厅科学研究项目(12C1196), 怀化医学高等专科学校科学研究项目(2011K03). Supported by Program of Education Department of Hunan Province (12C1196) and Research Program of Huaihua Medical College(2011K03).

[作者简介] 李秀平, 硕士, 讲师. E-mail: lixiuping0801@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0734-8283939, E-mail: wdy20042004@126.com

褪黑素(melatonin, Mel)是主要由松果体释放的一种循环激素,可能通过调节胰岛素分泌影响糖尿病及有关的代谢紊乱^[1]。但褪黑素半衰期短,进入人体后代谢很快,加上提取与合成褪黑素都相对较难,限制了其临床应用。Neu-P11是一种新式褪黑素非选择性受体激动剂,体外合成比较容易,作用时间持久,不良反应小,可与褪黑素受体作用而发挥广泛的生物学作用。我们前期研究发现,对高糖高脂饲料喂养的大鼠给予 Neu-P11,能够抑制大鼠的体质量增长,并改善其胰岛素敏感性^[2],但其机制尚不清楚。

葡萄糖运载体4(Glucose transporter-4, GLUT-4)是胰岛素作用下的脂肪细胞等摄取葡萄糖的重要载体,对维持机体的糖稳态具有重要作用^[3]。已有研究确切表明:GLUT-4的表达与转位的下调,能减少骨骼肌、脂肪组织对葡萄糖的摄取与利用,最后致使其发生胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)与糖尿病^[4]。胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate 1, IRS-1)是胰岛素信号转导通路中受体后水平的重要信号蛋白,其表达不足或者异常磷酸化可以导致胰岛素抵抗^[5-6]。本研究观察了 Neu-P11对细胞的胰岛素抵抗及 IRS-1、GLUT-4蛋白表达的影响,以探讨 Neu-P11改善胰岛素抵抗的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 3T3-L1小鼠成纤维细胞株来源于中国医学科学院基础医学研究所;DMEM低糖/高糖培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶购自Gibco公司;地塞米松(DEX)、IBMX、牛胰岛素、褪黑素受体拮抗剂 luzindole 购自Sigma公司;IRS-1、GLUT-4一抗购自Cell Signaling Technology公司;褪黑素、Neu-P11为Neurim Pharma-ceuticals Ltd公司提供。

1.2 3T3-L1细胞的培养和分化 将3T3-L1细胞放在37℃、5% CO₂条件的培养箱中用含10% FBS的DMEM低糖培养液进行培养,当细胞长至培养瓶的80%~90%时传代,每48 h换液1次,等细胞长满2 d后用含1 μmol/L DEX、10% FBS、0.5 mmol/L IBMX和5 mg/L胰岛素的DMEM低糖培养液(经典的“鸡尾酒”法)进行诱导分化,48 h后,再用含10% FBS、5 mg/L胰岛素的DMEM低糖培养液继续作用4 d,中间换液1次,其后继续用含10% FBS的DMEM低糖培养液培养,隔天换液1次,诱导分化10~12 d,90%以上的细胞呈脂肪细胞表型。

将在6孔培养板内诱导分化成熟的脂肪细胞先用PBS清洗2次,用3.7%~4.0%甲醛溶液固定15 min后,加PBS洗3次,用油红O染液染色30 min(密封),倒掉染液再用PBS洗,直到背景透明。用图像分析系统采集图像,在显微镜下拍照,记录细胞分化情况。

1.3 IR细胞模型的建立 在DMEM低糖培养液中加入1% FBS、1%牛血清白蛋白(BSA),然后作用于已经诱导分化的脂肪细胞24 h,即为胰岛素敏感(IS)细胞;在DMEM高糖培养液中加入1% FBS、1% BSA、1 μmol/L胰岛素作用于脂肪细胞24 h,建立IR细胞模型。分别用50、100、200 nmol/L的胰岛素作用于细胞,6 h后收集培养液上清,以葡萄糖氧化酶法测定培养液中的葡萄糖浓度,计算糖消耗量,根据细胞糖消耗量的变化来鉴定建模是否成功。实验重复3次,每次3个复孔。

1.4 Neu-P11对IR细胞糖消耗量及IRS-1、GLUT-4蛋白表达的影响 将IR细胞分为5组:(1)未加药组;(2)褪黑素组(10 nmol/L的褪黑素处理细胞6 h);(3)Neu-P11组(10 nmol/L的Neu-P11处理细胞6 h);(4)褪黑素+luzindole组(10 nmol/L褪黑素+100 nmol/L luzindole联合处理细胞6 h);(5)Neu-P11+luzindole组(10 nmol/L Neu-P11+100 nmol/L luzindole联合处理细胞6 h)。分别用50、100、200 nmol/L胰岛素作用于5组细胞,6 h后收集培养液上清,以葡萄糖氧化酶法测定培养液中的葡萄糖浓度,计算糖消耗量,观察药物对脂肪细胞糖消耗量的影响。收集各组细胞,用蛋白质印迹检测IRS-1、GLUT-4蛋白表达,观察药物对脂肪细胞这两种蛋白表达的影响。实验重复3次,每次3个复孔。

1.5 统计学处理 采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析与独立样本 t 检验进行数据分析。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 3T3-L1细胞分化后的形态学变化 小鼠3T3-L1前脂肪细胞培养8~10 d时,大部分细胞分化为成熟的脂肪细胞(图1A),占细胞总数的90%以上。用油红O染液对分化成熟的脂肪细胞进行染色,在显微镜下观察,可见其胞质内有大量的红色脂滴(图1B),进一步确定此为脂肪细胞。

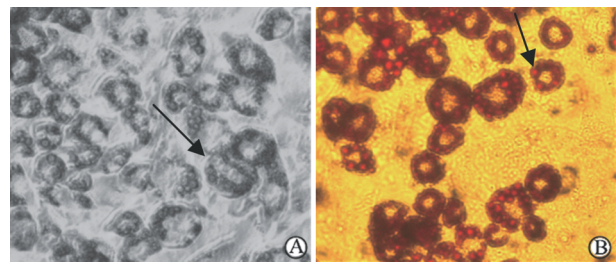


图 1 3T3-L1 细胞分化为脂肪细胞
A: 分化成熟的脂肪细胞(箭头); B: 油红 O 染色示红色脂滴(箭头). Original magnification: ×20

2.2 IR 细胞模型的鉴定 用 50、100、200 nmol/L 的胰岛素作用于经高糖高胰岛素培养的脂肪细胞, 糖消耗降低($P<0.05$), 如图 2 所示, 证明细胞模型建立成功。

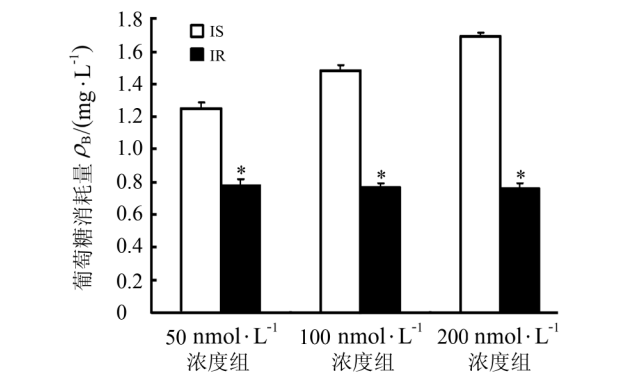


图 2 胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞的糖消耗量变化
IS: 胰岛素敏感细胞; IR: 胰岛素抵抗细胞. * $P<0.05$ 与 IS 细胞比较. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

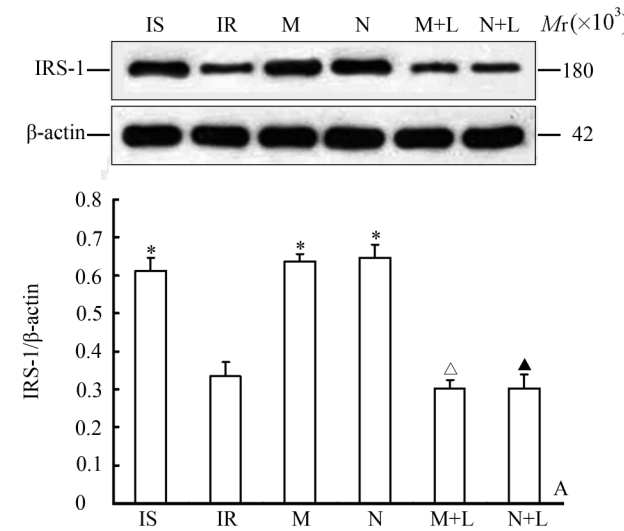


图 4 不同药物对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1(A)和 GLUT-4(B)表达的影响
IRS-1: 胰岛素受体底物 1; GLUT-4: 葡萄糖载体 4. IS 为胰岛素敏感细胞, 其他均为胰岛素抵抗细胞. IR: 未加药组; M: 褪黑素处理组; N: Neu-P11 处理组; M+L: 褪黑素+luzindole 处理组; N+L: Neu-P11+luzindole 处理组. * $P<0.05$ 与 IR 组比较; $\triangle P<0.05$ 与 M 组比较; $\blacktriangle P<0.05$ 与 N 组比较. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.3 Neu-P11 对 IR 细胞糖消耗的影响 由图 3 可见, 褪黑素和 Neu-P11 均能够提高 IR 细胞的葡萄糖消耗能力($P<0.05$), 褪黑素受体拮抗剂 luzindole 能够逆转这种作用($P<0.05$)。

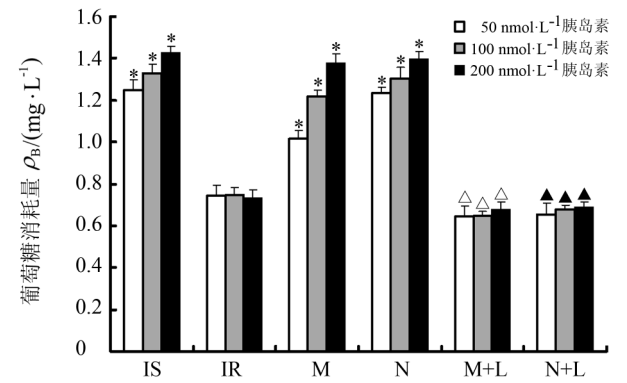


图 3 不同药物对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞糖消耗的影响
IS 为胰岛素敏感细胞, 其他均为胰岛素抵抗细胞. IR: 未加药组; M: 褪黑素处理组; N: Neu-P11 处理组; M+L: 褪黑素+luzindole 处理组; N+L: Neu-P11+luzindole 处理组. * $P<0.05$ 与经同浓度胰岛素作用的 IR 组比较; $\triangle P<0.05$ 与经同浓度胰岛素作用的 M 组比较; $\blacktriangle P<0.05$ 与经同浓度胰岛素作用的 N 组比较. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.4 Neu-P11 对 IR 细胞 IRS-1、GLUT-4 表达的影响 由图 4 可见, 褪黑素和 Neu-P11 均能够使 IR 细胞 IRS-1、GLUT-4 的蛋白表达上调($P<0.05$), 而褪黑素受体拮抗剂 luzindole 能够逆转这种作用($P<0.05$)。

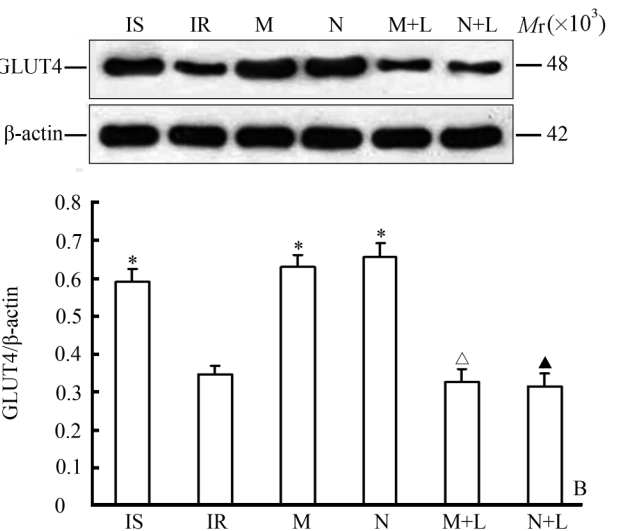


图 4 不同药物对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1(A)和 GLUT-4(B)表达的影响
IRS-1: 胰岛素受体底物 1; GLUT-4: 葡萄糖载体 4. IS 为胰岛素敏感细胞, 其他均为胰岛素抵抗细胞. IR: 未加药组; M: 褪黑素处理组; N: Neu-P11 处理组; M+L: 褪黑素+luzindole 处理组; N+L: Neu-P11+luzindole 处理组. * $P<0.05$ 与 IR 组比较; $\triangle P<0.05$ 与 M 组比较; $\blacktriangle P<0.05$ 与 N 组比较. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

褪黑素刺激骨骼肌细胞葡萄糖转运主要是通过 IRS-1/磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3-K) 途径增加 PI3-K 的活性。有实验表明,松果体切除后会导致褪黑素枯竭,降低胰岛素的敏感性,同时 GLUT-4 基因表达下调^[8]。GLUT-4 是胰岛素依赖型蛋白,主要存在于脂肪细胞、组织肌肉、肾脏和大脑等组织中,是胰岛素作用下的脂肪细胞等摄取葡萄糖的重要载体,对维持机体的糖稳态具有重要作用^[3]。当 GLUT-4 出现异常表达、活性下调、移位发生阻碍时,可降低细胞摄取、利用葡萄糖的效率。IRS 是胰岛素信号转导通路中受体后水平的重要信号蛋白,被激活后将信号传递至下游的 PI3-K,在此信号转导通路中 IRS-1 发挥主要作用。研究显示,IRS-1 表达不足或异常磷酸化可以导致 IR^[5, 11]。本研究也发现 IR 脂肪细胞中的 GLUT-4、IRS-1 蛋白表达较 IS 组降低($P < 0.05$),说明这两种蛋白的表达水平和 IR 密切相关。将 IR 脂肪细胞用药物褪黑素、Neu-P11 处理后,脂肪细胞的糖消耗量增加,同时 GLUT-4、IRS-1 的蛋白表达增高,与 IR 组细胞比较差异有统计学意义($P < 0.05$),这说明褪黑素、Neu-P11 能够提高这两种蛋白的表达,具有改善 IR、提高胰岛素敏感性的作用;但这两种药物与褪黑素受体拮抗剂 luzindole 联合作用于细胞后,细胞的糖消耗量及 GLUT-4、IRS-1 蛋白表达与未加阻断剂组相比均降低,这说明褪黑素、Neu-P11 主要通过与褪黑素受体结合而发挥相应的生物学效应。因此,从本实验中我们初步判断:Neu-P11 能够提高 IR 脂肪细胞 GLUT-4、IRS-1 的蛋白表达,具有改善 IR、提高胰岛素敏感性的作用。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Espino J, Pariente J A, Rodríguez A B. Role of melatonin on diabetes-related metabolic disorders[J]. World J Diabetes, 2011, 2: 82-91.

- [2] She M, Deng X, Guo Z, Laudon M, Hu Z, Liao D, et al. NEU-P11, a novel melatonin agonist, inhibits weight gain and improves insulin sensitivity in high-fat/high-sucrose-fed rats[J]. Pharmacol Res, 2009, 59: 248-253.
- [3] Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, Litvak L, Dralle H, Mühlbauer E. Melatonin and type 2 diabetes-a possible link? [J]. J Pineal Res, 2007, 42: 350-358.
- [4] 何明. 胰岛素受体后信号通路与妊娠期糖尿病发病机制的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2009.
- [5] Danielsson A, Ost A, Lystedt E, Kjolhede P, Gustavsson J, Nystrom F H, et al. Insulin resistance in human adipocytes occurs downstream of IRS1 after surgical cell isolation but at the level of phosphorylation of IRS1 in type 2 diabetes[J]. FEBS J, 2005, 272: 141-151.
- [6] Hribal M L, Federici M, Porzio O, Lauro D, Borboni P, Accili D, et al. The Gly→Arg972 amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85: 2004-2013.
- [7] Ha E, Yim S V, Chung J H, Yoon K S, Kang I, Cho Y H, et al. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells[J]. J Pineal Res, 2006, 41: 67-72.
- [8] Zanutta M M, Seraphim P M, Sumida D H, Cipolletto J, Machado U F. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane[J]. J Pineal Res, 2003, 35: 141-148.
- [9] Tsai Y L, Hou C W, Liao Y H, Chen C Y, Lin F C, Lee W C, et al. Exercise training exacerbates tourniquet ischemia-induced decreases in GLUT4 expression and muscle atrophy in rats[J]. Life Sci, 2006, 78: 2953-2959.
- [10] James D E. MUNC-ing around with insulin action[J]. J Clin Invest, 2005, 115: 219-221.
- [11] Morino K, Petersen K F, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents[J]. J Clin Invest, 2005, 115: 3587-3593.

[本文编辑] 孙岩