

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.09.1184

## Neu-P11 在胰岛素抵抗脂肪细胞模型中对胰岛素受体后信号通路的影响

李秀平<sup>1</sup>, 蔡世昌<sup>2\*</sup>, 尹卫东<sup>3</sup>, 张素君<sup>4</sup>, 卢琼<sup>2</sup>, 李兴<sup>2</sup>, Moshe Laudon<sup>5</sup>

1. 湖南医药学院检验医学院, 怀化 418000
2. 湖南医药学院基础医学院, 怀化 418000
3. 南华大学医学院心血管疾病研究所, 衡阳 412000
4. 南华大学实验动物学部, 衡阳 412000
5. Neurim Pharmaceuticals Ltd., Tel-Aviv 69710, Israel

[关键词] Neu-P11; 褪黑素; 胰岛素抵抗; p-IRS-1; PI3K; p-GSK3 $\beta$ ; luzindole

[中图分类号] R 587 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2016)09-1184-03

### Effect of Neu-P11 on insulin signaling pathway in insulin-resistant adipocyte model

LI Xiu-ping<sup>1</sup>, CAI Shi-chang<sup>2\*</sup>, YIN Wei-dong<sup>3</sup>, ZHANG Su-jun<sup>4</sup>, LU Qiong<sup>2</sup>, LI Xing<sup>2</sup>, Moshe Laudon<sup>5</sup>

1. College of Laboratory Medicine, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, Hunan, China
2. Division of Basic Medical Sciences, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, Hunan, China
3. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China Medical College, Hengyang 412000, Hunan, China
4. Department of Experimental Animal, University of South China, Hengyang 412000, Hunan, China
5. Neurim Pharmaceuticals Ltd., Tel-Aviv 69710, Israel

[Key words] Neu-P11; melatonin; insulin resistance; p-IRS-1; PI3K; p-GSK3 $\beta$ ; luzindole

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(9): 1184-1186]

2型糖尿病为影响人类生存质量的主要病因之一,在过去十年里,2型糖尿病在全球范围的发病率显著增加<sup>[1]</sup>。其主要特征是胰岛素相对不足和存在胰岛素抵抗。2型糖尿病的胰岛素抵抗作用和人体肝脏、骨骼肌及脂肪组织中的胰岛素信号转导通路紊乱关系密切<sup>[2]</sup>。经典的胰岛素信号转导有胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate 1, IRS-1)/磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)和丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)两条途径,但主要是通过胰岛素受体后 IRS-1/PI3K 途径来调节其代谢。研究表明,胰岛素抵抗产生的最主要原因是由于胰岛素受体后蛋白信号转导通路的改变,导致胰岛素刺激的信号不能向下游按程序传递<sup>[3]</sup>。

已有研究表明,褪黑素(melatonin, Mel)可以通过调节胰岛素分泌进而纠正糖尿病引发的代谢紊乱<sup>[4]</sup>。但 Mel 被人体吸收后在体内迅速代谢,其半衰期通常为 20~30 min,若直接药用则效果甚微,而剂量过高又会产生不良反应;此外,提取与合成 Mel 也相对较难,

因此亟需开发具有持续作用的长半衰期 Mel 替代品。Neu-P11 是由以色列 Neurim 制药公司开发合成的一种新式 Mel 非选择性受体激动剂,其具有体外合成易、作用时间持久、不良反应小的特点,并且还能代替 Mel 与其受体作用,从而发挥一系列的生物学作用<sup>[5]</sup>。本课题组前期研究表明,Neu-P11 可以和 Mel 受体结合起来发挥生物学效应,降低细胞,最终提高胰岛素抵抗脂肪细胞胰岛素受体后信号转导的重要通道蛋白 IRS-1、葡萄糖转运体 4(glucose transporter 4, GLUT4)、蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB)的蛋白表达<sup>[6-7]</sup>。为了更深入研究 Neu-P11 在胰岛素抵抗模型中对胰岛素受体后系列信号通路的影响,本研究对脂肪细胞胰岛素受体后信号通路的其他重要信号转导通路蛋白 p-IRS-1、PI3K、磷酸化糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (phosphorylated glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , p-GSK3 $\beta$ )也进行了分析,以深入探讨 Neu-P11 与胰岛素受体后信号转导通道蛋白之间的关系,为开发 Neu-p11 作为新的治疗糖尿病的药物提供理论基础。

[收稿日期] 2015-09-04 [接受日期] 2016-04-14

[基金项目] 湖南省教育厅科学研究项目(14C0909),湖南医药学院科学研究项目(2014KY02)。Supported by Program of Education Department of Hunan Province (14C0909) and Research Program of Hunan University of Medicine (2014KY02)。

[作者简介] 李秀平,硕士生,讲师、主管技师。E-mail: lixiuping0801@126.com

\*通信作者 (Corresponding author). Tel: 0745-2382481, E-mail: caishichang2008@163.com

## 1 材料和方法

1.1 实验材料与试剂 Mel、Neu-P11 由以色列 Neurim 制药公司提供。3T3-L1 小鼠成纤维细胞株由中国医学科学院基础医学研究所提供；p-IRS-1、p-GSK3 $\beta$  一抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司；PI3K 一抗购自 Santa Cruz 公司；胎牛血清、DMEM 低糖/高糖培养基、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司；3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、地塞米松 (DEX)、牛胰岛素、luzindole 购自 Sigma 公司。

1.2 3T3-L1 细胞的培养与分化 将 3T3-L1 小鼠成纤维细胞置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中,用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基培养,至细胞生长占培养瓶的 80%~90% 时进行传代,每隔 2 d 换液一次,等细胞长满培养瓶 2 d 后进行诱导分化。“鸡尾酒法”(含 10% 胎牛血清、1  $\mu$ mol/L DEX、0.5 mmol/L IBMX、5 mg/L 牛胰岛素的低糖 DMEM 培养基)诱导细胞 48 h 后,换含 10% 胎牛血清和 5 mg/L 牛胰岛素的低糖 DMEM 培养基培养 4 d,中间换液一次;再用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基继续培养,隔天换液一次,诱导分化 10~12 d;至显微镜下观察到 90% 以上的细胞呈现出脂肪细胞表型时,即可用于下一步研究。

1.3 油红 O 染色<sup>[6]</sup> 诱导成功后,取部分细胞用 PBS 洗 2 次,甲醛(浓度 3.7%~4.0%)固定 15 min;后加 PBS 洗 3 次,油红 O 染液密封染色 30 min;倒掉染液,PBS 洗至透明,显微镜下观察并记录细胞分化情况,图像分析系统采集并分析图像。

1.4 胰岛素抵抗模型的建立与鉴定 诱导成功后,取部分细胞接种于 6 孔培养板并分为两组:用含 1% BSA 和 1% FBS 的低糖 DMEM 培养基作用脂肪细胞 24 h,即为胰岛素敏感组 (IS 组);用含 1% BSA、1  $\mu$ mol/L 胰岛素和 1% FBS 的高糖 DMEM 培养基作用脂肪细胞 24 h,即为胰岛素抵抗组。胰岛素抵抗模型的鉴定:用 50、100、200 nmol/L 的胰岛素分别作用于各组脂肪细胞,6 h 后收集细胞培养液,葡萄糖氧化酶法测定其葡萄糖浓度,计算糖消耗量,根据脂肪细胞糖消耗量的变化来判定模

型是否建立成功。当两组细胞糖消耗量差异具有统计学意义时表明建模成功<sup>[6]</sup>,将建模成功的脂肪细胞用于后续药物分析。

1.5 实验分组与处理 将建模成功的胰岛素抵抗组脂肪细胞分为未加药对照组 (IR 组)、Neu-P11 组 (10 nmol/L Neu-P11)、Mel 组 (10 nmol/L Mel)、Mel+luzindole 组 (10 nmol/L Mel+100 nmol/L luzindole)、Neu-P11+luzindole 组 (10 nmol/L Mel+100 nmol/L luzindole) 5 组,培养 6 h 后,再分别用 50、100、200 nmol/L 的胰岛素作用各组脂肪细胞 6 h,收集各组培养液,葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖浓度。

1.6 各组细胞 p-IRS-1、PI3K、p-GSK3 $\beta$  蛋白的表达 收集各组脂肪细胞,制备蛋白质样品,用蛋白质印迹法检测信号转导通路 p-IRS-1、PI3K、p-GSK3 $\beta$  蛋白的表达水平<sup>[8]</sup>,实验重复 3 次。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理。数据以  $\bar{x}\pm s$  表示。各独立样本比较采用 *t* 检验,各组蛋白表达差异比较采用单因素方差分析。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 3T3-L1 细胞诱导分化情况 油红 O 染色结果可见,诱导分化 8~10 d 后细胞胞质内有大量的红色脂滴,表明大部分 3T3-L1 细胞被诱导分化为成熟的脂肪细胞。

2.2 胰岛素抵抗模型建立情况 采用葡萄糖氧化酶法测定两组细胞的糖消耗量,结果发现胰岛素敏感组与胰岛素抵抗组细胞的糖消耗量差异具有统计学意义,表明胰岛素抵抗细胞模型建立成功,可用于后续药物分析。

2.3 各组脂肪细胞 p-IRS-1、PI3K、p-GSK3 $\beta$  蛋白的表达水平 结果(图 1)表明,Mel 组和 Neu-P11 组脂肪细胞 p-IRS-1、PI3K、p-GSK3 $\beta$  蛋白表达高于 IR 组 ( $P < 0.05$ );而 Mel+luzindole 组、Neu-P11+luzindole 组 p-IRS-1、PI3K、p-GSK3 $\beta$  蛋白表达均分别低于 Mel 组和 Neu-P11 组 ( $P < 0.05$ ),与 IR 组相比则差异无统计学意义。上述结果说明加入 luzindole 后,Mel、Neu-P11 上调 p-IRS-1、PI3K、p-GSK3 $\beta$  蛋白表达的作用受到抑制。

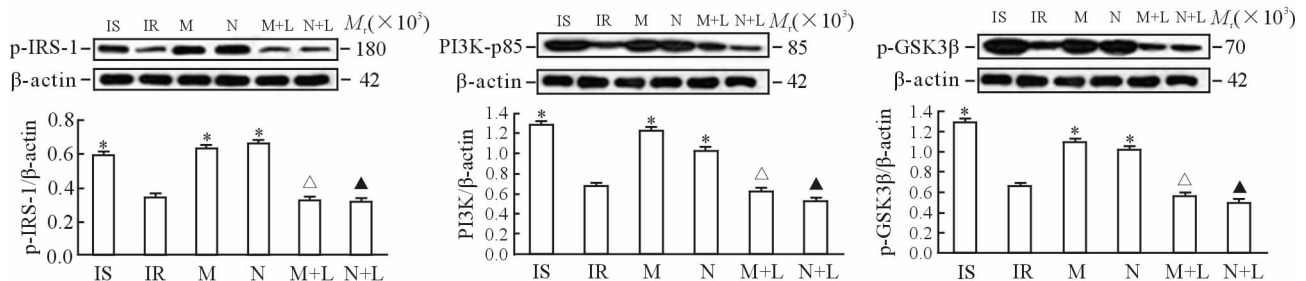


图1 各组 3T3-L1 脂肪细胞 p-IRS-1、PI3K、p-GSK3 $\beta$  蛋白的表达

IS: 胰岛素敏感组; IR: 未加药对照组; M: 10 nmol/L Mel 组; N: 10 nmol/L Neu-P11 组; M+L: 10 nmol/L Mel+100 nmol/L luzindole 组; N+L: 10 nmol/L Neu-P11+100 nmol/L luzindole 组。p-IRS-1: 磷酸化胰岛素受体底物 1; PI3K: 磷脂酰肌醇 3-激酶; p-GSK3 $\beta$ : 磷酸化糖原合成酶激酶 3 $\beta$ ; Mel: 褪黑素。\*  $P < 0.05$  与 IR 组比较;  $\Delta P < 0.05$  与 M 组比较;  $\blacktriangle P < 0.05$  与 N 组比较。n=3,  $\bar{x}\pm s$

### 3 讨论

Mel 主要是通过 IRS-1/PI3K 途径刺激骨骼肌细胞的葡萄糖转运,其机制与增强 PI3K 的活性有关<sup>[9]</sup>。有研究显示,Mel 减少或完全消失可导致胰岛素的敏感性降低并使 GLUT-4 基因表达下调<sup>[10]</sup>。在胰岛素刺激下细胞膜上的胰岛素底物与胰岛素迅速结合,底物中酪氨酸(主要是 IRS-1 和 IRS-2)迅速磷酸化,信号下传并通过 PI3K 刺激下游的蛋白激酶 C (protein kinase C,PKC)、PKB 活化,从而使 GLUT-4 转位,导致葡萄糖摄取完成。当 GLUT-4 出现表达异常致使活性下调、移位发生阻碍时,骨骼肌细胞葡萄糖跨膜转运可能出现障碍,导致细胞摄取、利用葡萄糖的效率降低<sup>[11-12]</sup>。胰岛素刺激 PKB 磷酸化,从而使 GSK3 $\beta$  上 9/21 丝氨酸位点磷酸化和失活,阻止 GSK3 对糖原合成酶活性的抑制,引起糖原合成酶去磷酸化等一系列胞内级联磷酸化反应<sup>[11]</sup>,促进糖原和蛋白合成。

本课题组前期实验研究发现,胰岛素抵抗脂肪细胞 GLUT-4、IRS-1、PKB 蛋白的表达水平和胰岛素抵抗密切相关,而 Mel、Neu-P11 能够上调 GLUT-4、IRS-1、PKB 的蛋白表达,改善胰岛素抵抗<sup>[6-7]</sup>。本研究进一步分析发现,Mel 组和 Neu-P11 组脂肪细胞 p-IRS-1、PI3K、p-GSK3 $\beta$  的蛋白表达高于 IR 组 ( $P < 0.05$ ),表明 Mel、Neu-P11 能上调 p-IRS-1、PI3K、p-GSK3 $\beta$  蛋白的表达。而加入 Mel 受体拮抗剂 luzindole 后,p-IRS-1、PI3K、p-GSK3 $\beta$  的蛋白表达水平下降,说明 Mel、Neu-P11 上调 p-IRS-1、PI3K、p-GSK3 $\beta$  蛋白表达的作用也主要是通过 Mel 受体 2 结合实现的。

综上所述,Mel、Neu-P11 能够提高胰岛素抵抗脂肪细胞重要信号转导蛋白 p-IRS-1、PI3K 和 p-GSK3 $\beta$  的表达,且其表达都能被 Mel 受体拮抗剂 luzindole 阻断,表明 Mel、Neu-P11 能够提高胰岛素抵抗脂肪细胞中胰岛素受体后信号重要通路蛋白的表达,改善因信号通路蛋白异常所致的胰岛素抵抗,提高胰岛素的敏感性。Mel、Neu-P11 可能是通过与 Mel 受体 2 结合来上调胰岛素受体后信号重要通路蛋白的表达。本研究结果将为开发 Neu-P11 作为新的治疗糖尿病的药物进一步提供理论和实验基础,也为将来开发新的改善胰岛素抵抗的药物提供价值较高的参数。

### 【参考文献】

[1] CHAKRABORTY C, DOSS C G, BANDYOPADHYAY S, AGORAMOORTHY G. Influence of miRNA in insulin signaling pathway and insulin resistance; micro-molecules with a major role in type-2 diabetes[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2014, 5: 697-712.

[2] TAYLOR R, HOLMAN R R. Normal weight individuals who develop type 2 diabetes: the personal

fat threshold [J]. Clin Sci (Lond), 2015, 128: 405-410.

- [3] 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.
- [4] ESPINO J, PARIENTE J A, RODRIGUEZ A B. Role of melatonin on diabetes-related metabolic disorders [J]. World J Diabetes, 2011, 2: 82-91.
- [5] 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.
- [6] 李秀平, 尹卫东, 胡晓波, 余美华, 王平平, 张素君, 等. 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[J]. 第二军医大学学报, 2013, 34: 561-564.
- LI X P, YIN W D, HU X B, SHE M H, WANG P P, ZHANG S J, et al. Effect of melatonin receptor agonist Neu-P11 on expression of IRS-1 and GLUT-4 in insulin-resistant adipocytes [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34: 561-564.
- [7] 李秀平, 蔡世昌, 尹卫东, 张素军, 胡蓉, 李兴, 等. 褪黑素受体激动剂 Neu-P11 对 3T3-L1 小鼠脂肪细胞蛋白激酶 B 及其磷酸化的影响[J]. 第二军医大学学报, 2015, 36: 802-804.
- LI X P, CAI S C, YIN W D, ZHANG S J, HU R, LI X, et al. Effect of melatonin receptor agonist Neu-P11 on phosphorylation of protein kinase B in mouse 3T3-L1 adipocytes [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36: 802-804.
- [8] 李秀平, 蔡世昌, 尹卫东, 胡晓波, Moshe Laudon. Neu-P11/luzindole 在胰岛素抵抗脂肪细胞模型中对脂联素/内脏脂肪素的影响[J]. 生物物理学报, 2013, 29: 422-432.
- [9] 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.
- [10] ZANQUETTA M M, SERAPHIM P M, SUMIDA D H, CIPOLLA-NETO 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.
- [11] 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.
- [12] JAMES D E. MUNC-ing around with insulin action [J]. J Clin Invest, 2005, 115: 219-221.