

褪黑素通过抑制 ROS 改善胰岛素抵抗 HepG2 细胞糖代谢

余美华,蒋文艳,张 瑶,杨 娟,尹卫东

(南华大学药学与生物科学学院生物技术系,湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 探讨褪黑素(MLT)对胰岛素抵抗(IR)HepG2 细胞葡萄糖代谢的影响及机制。 **方法** 培养 HepG2 细胞,高糖高胰岛素(25 mmol/L 葡萄糖、1 μ mol/L 胰岛素)诱导 24h,建立 IR 细胞模型并给予 MLT (1 nmol/L,10 nmol/L)处理。葡萄糖氧化酶法、蒽酮法和荧光探针法检测 HepG2 细胞的糖摄取、糖原含量及活性氧(ROS)产率。 **结果** HGI 孵育 HepG2 细胞 24 h 后,细胞的葡萄糖摄取及糖原含量明显减少($P < 0.01$),ROS 产率显著增加($P < 0.01$);而 MLT 处理增加了 IR 细胞葡萄糖的摄取($P < 0.01$)和糖原合成($P < 0.05$),降低 ROS 的水平($P < 0.01$)。 **结论** MLT 可能通过抑制 ROS 的生成而改善氧化应激,从而促进胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖的摄取和利用、增强其胰岛素敏感性。

关键词: 褪黑素; 胰岛素抵抗; 葡萄糖摄取; 糖原; ROS

中图分类号:R587

文献标识码:A

Melatonin Ameliorates Glucose Metabolism via Inhibiting ROS Generation in Insulin Resistant HepG2 Cells Induced by High Glucose and Insulin

SHE Meihua,JIANG Wenyan,ZHANG Yao,et al

(*Department of Biochemistry and Molecular Biology,School of Pharmaceutical and Biological Science, University of South China,Hengyang,Hunan 421001,China*)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of melatonin on glucose metabolism in high glucose and insulin-induced insulin resistant HepG2 cells. **Methods** Insulin resistant HepG2 cells were induced by high glucose and insulin (HGI,25 mmol/L and 1 μ mol/L respectively) coculture for 24 h,and then melatonin was added. The uptake of glucose was measured by glucose oxidase method,anthrone method was used to detect the Glycogen synthesis and fluorescence probe was used to detect ROS production. **Results** HGI incubating led to significant decreases in insulin-stimulated glucose uptake and glycogen synthesis in HepG2 cells ($P < 0.01$),but ROS production increased ($P < 0.01$). However,MLT treatment reversed the above state by increasing glucose uptake ($P < 0.01$) and glycogen synthesis ($P < 0.05$),inhibiting the generation of ROS($P < 0.01$). **Conclusions** MLT could improve oxidative stress by inhibiting the production of ROS,and thereby increase glucose utilization and improve insulin sensitivity of insulin resistance HepG2 cells.

Key words: MLT; insulin resistance; glucose uptake; glycogen; ROS

褪黑素(melatonin,MLT)是大脑松果体腺合成和分泌的一种吲哚类神经内分泌激素,具有调节昼夜节律的作用。近年来研究表明褪黑素参与维持机

体葡萄糖稳态和改善胰岛素敏感性^[1]。如实施松果体切除术后的大鼠葡萄糖耐受不良、胰岛素敏感性下降,而外源性补充 MLT 则能逆转这一状态^[2]。Agil 等^[3]发现 MLT 能降低 T2DM 模型大鼠的高胰岛素血症和 HOMA-IR。由于胰岛素抵抗(IR)的发生与氧化应激密切相关,氧化应激状态下 ROS 生成过多或清除不足,诱发细胞膜脂质过氧化,并且它还能通过多条应激敏感性信号通路影响基因表达和损伤细胞^[4],最终影响细胞的正常代谢。基于 MLT、

收稿日期:2014-03-06

基金项目:国家自然科学基金(81200590);高等学校博士学科点专项科研基金(20124324120005)。

作者简介:余美华,博士,副教授,研究方向:糖尿病的分子机制研究,E-mail:shemhbb@163.com,通信作者尹卫东,教授,博士生导师,研究方向:糖尿病的分子机制研究,E-mail:wdy20042004@126.com。

氧化应激以及胰岛素抵抗之间的联系,本实验将探讨 MLT 是否通过改善氧化应激来改善胰岛素抵抗。

1 材料与方法

1.1 材料来源

HepG2 细胞购于北京协和细胞资源中心;MLT 由以色列 Neurim Pharmaceuticals 公司提供,DMSO 溶解后用 DMEM 稀释至工作浓度(DMSO 终浓度低于 0.01%);胰岛素(INS)、胎牛血清(FBS)均购于 Sigma 公司。

1.2 细胞培养与分组处理

HepG2 细胞于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下,10% FBS 的 L-DMEM 中培养,观察细胞生长情况,细胞融合后进行传代,转入 6 孔板,待贴壁生长后,分正常对照组,其余为胰岛素抵抗模型组。正常对照组(IS 组)以含 5.5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养液培养;模型组则以含高糖高胰岛素(25 mmol/L 葡萄糖和 1 μmol/L 胰岛素)的 DMEM 培养液培养 24 h,再用含或不含 MLT(1 nmol/L、10 nmol/L)的 DMEM 培养液继续培养 6 h。

1.3 葡萄糖消耗实验

按照 GOD-POD 试剂盒(上海荣盛生物药业有限公司),将上述各组细胞分别给予有无 100 nmol/L 胰岛素刺激 6 h 后,用葡萄糖氧化酶法检测培养液中的葡萄糖含量,以未接种细胞空白复孔的糖含量均值相减,算出各孔细胞的葡萄糖摄入量。

1.4 细胞内糖原含量检测

按照糖原含量检测试剂盒(南京建成),采用蒽酮法检测上述细胞中的糖原含量。按说明将细胞消化下来,离心沉淀并加入 300 μL 碱液,双蒸水定容至 500 μL,加显色液,沸水浴 5 min,冷却后在 620 nm 波长下比色测定。

1.5 细胞内 ROS 含量检测

按照活性氧检测试剂盒(碧云天生物技术研究),采用 DCFH-DA 荧光探针法检测各组细胞内 ROS 的含量。先去除培养液,无血清 DMEM 洗涤,加入 DCFH-DA 工作液并孵育 20 min;去除工作液,用预热 PBS 洗 3 次;常规消化收集细胞,PBS 洗涤 3 次,反复吹打成单细胞悬液,用荧光分光光度计(488 nm 激发波长,525 nm 发射波长)检测荧光强度。

1.6 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,由 SPSS 统计软件对组内比较,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结 果

2.1 MLT 改善高糖高胰岛素诱导 HepG2 细胞胰岛素抵抗

基础状态下,各组细胞的葡萄糖摄入无明显差异。在胰岛素存在条件下,IS 组细胞对葡萄糖摄入量明显增加,为基础状态下的 1.78 倍($P < 0.01$);高糖高胰岛素处理后 HepG2 细胞(单纯 IR 细胞组),其胰岛素介导的葡萄糖摄入量显著低于 IS 组,下降 29%($P < 0.01$),说明高糖高胰岛素诱导发生胰岛素抵抗;而对胰岛素抵抗细胞进行 MLT 处理后,其胰岛素介导的葡萄糖摄入明显增加($P < 0.01$)。

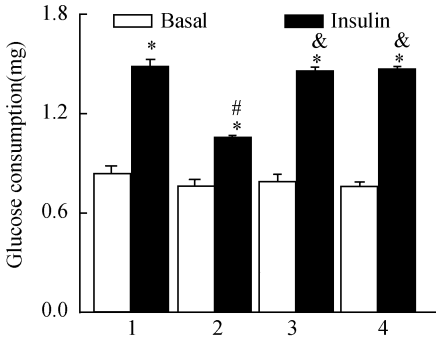


图 1 MLT 对 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型糖消耗的影响 1:IS;2:IR;3:1 nmol/L MLT;4:10 nmol/L MLT。与基础状态葡萄糖摄入量相比,*: $P < 0.01$;胰岛素介导的葡萄糖摄入,与 IS 组相比,#: $P < 0.01$;与 IR 组相比,&: $P < 0.01$, $n = 3$

2.2 MLT 对 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型糖原含量的影响

与正常对照 HepG2 细胞相比,高糖高胰岛素诱导 IR 组细胞糖原含量减少约 85%($P < 0.01$);而对该 IR 模型细胞进行 MLT 处理,其糖原含量增加 3 倍以上($P < 0.05$)(图 2),提示 MLT 促进了高糖高胰岛素诱导细胞的糖原的合成。

2.3 MLT 对胰岛素抵抗 HepG2 细胞 ROS 含量的干预作用

与正常对照 HepG2 细胞相比,高糖高胰岛素诱

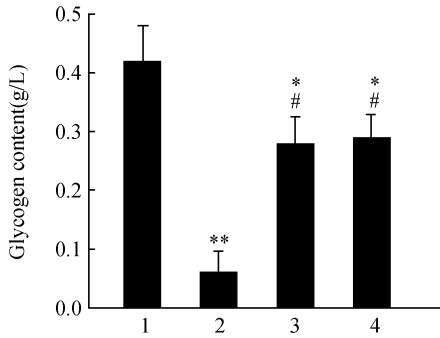


图 2 MLT 对 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型糖原的影响 1: IS;2:IR;3:1 nmol/L MLT;4:10 nmol/L MLT 与 IS 组相比, ** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$; 与 IR 组相比, #: $P < 0.05$, $n = 3$

导的 IR 组细胞 ROS 增加明显,增加 0.42 倍 ($P < 0.01$),MLT (1 nmol/L, 10 nmol/L) 处理后的 IR 模型细胞 ROS 无显著性差异。与 IR 组比较,低高浓度 MLT 处理组细胞 ROS 则显著减少,分别减少约 27% 和 31% ($P < 0.01$)。低高浓度 MLT 处理组相比,无显著性差异 (图 3)。

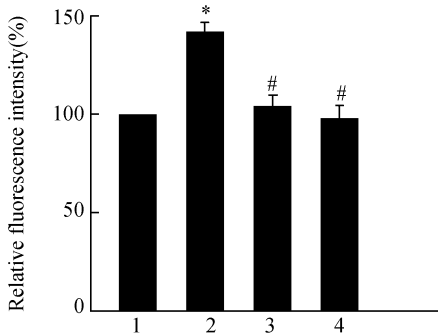


图 3 MLT 对 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型 ROS 的影响 1: IS;2:IR;3:1 nmol/L MLT;4:10 nmol/L MLT 与 IS 组相比, * : $P < 0.01$; 与 IR 组相比, #: $P < 0.01$, $n = 3$

3 讨 论

肝脏是胰岛素发挥作用的主要靶器官之一,肝细胞糖代谢的紊乱对胰岛素抵抗的发生具有十分重要意义。胰岛素抵抗时,糖代谢紊乱,糖摄取能力减弱和肝糖原合成减少,导致血糖升高。本研究通过高糖高胰岛素成功诱导 HepG2 细胞发生 IR,表现为对葡萄糖摄取减少,同时细胞内糖原合成降低,提示高糖高胰岛素抑制了细胞对葡萄糖的利用能力。

最近研究表明,反应活性氧与胰岛素抵抗的发生发展密切相关^[5-7]。ROS 是一类具有强氧化性的

含氧物质的总称,主要包括超氧阴离子 ($O_2^{\cdot -}$)、羟自由基 ($OH \cdot$)、过氧化氢 (H_2O_2) 和脂质过氧基 ($ROO \cdot$) 等,它不仅可以直接氧化体内生物活性大分子如蛋白质、脂质及核酸等而使细胞受损,而且能够行使第二信使信号分子功能激活各种应激激酶,活化多条氧化应激敏感性信号通路,干扰细胞胰岛素信号转导,导致胰岛素抵抗。在活性氧介导的氧化应激状态下,3T3-L1 脂肪细胞胰岛素受体底物 (IRS-1) 和 (IRS-2) 丝氨酸残基磷酸化,进而下调 IRS-1 的表达,导致胰岛素抵抗^[6]。Evans 等^[7]发现高糖所致的 ROS 是通过激活 AGES、NF- κ B 及 PKC 等途径导致胰岛素抵抗的。Houstis 等^[8]用地塞米松和 TNF- α 处理细胞,发现细胞内 ROS 产生增加,而应用抗氧化药物降低 ROS 水平后 IR 得到改善。可见清除活性氧的含量,有助于改善胰岛素抵抗。本研究发现高糖高胰岛素培养显著增加了 HepG2 细胞 ROS 含量,推测 ROS 是高糖高胰岛素诱导发生胰岛素抵抗的重要因素。

褪黑素是大脑松果体腺分泌的一种吲哚类神经内分泌激素,除具有改善睡眠,改善免疫功能以外,还具有强效的抗氧化性,它可以直接清除自由基、减少自由基的生成,提高抗氧化酶的活性等。

本研究发现褪黑素显著增加了其胰岛素刺激的葡萄糖摄入和糖原的合成,同时 ROS 减少了含量。提示 MLT 通过降低 ROS 水平改善氧化应激状态,从而促进了高糖高胰岛素培育 HepG2 细胞对葡萄糖的利用率,改善胰岛素抵抗。

参考文献:

- [1] Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions [J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 351 (2): 152-166.
- [2] She M, Deng X, Guo Z, 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 (4): 248-253.
- [3] Agil A, Rosado I, Ruiz R, et al. Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats [J]. Pineal Res, 2012, 52 (2): 203-210.
- [4] Bolisetty S, Jaimes EA. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14 (3): 6306-6344.

(上接第 474 页)

- [3] 周静,唐仲进,刘垣升,等.大鼠中枢 5-HT_{1A} 受体的结合容量与高血压[J].第二军医大学学报,2002,23(5):523-525.
- [4] 李晓英,贾晓清,赵黎明,等.老年人血脂、血糖水平与高血压患病率的关系[J].中华保健医学杂志,2011,13(4):321-322.
- [5] 罗斌,黄育玲,于李,等.老年原发性高血压中医证型

与血脂及生存质量研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2013,11(7):774-775.

- [6] 刘莉,叶鹏.肾小管中血管紧张素受体相关蛋白增加可抑制血管紧张素依赖性高血压[J].中华高血压杂志,2013,21(7):625.
- [7] 董武松 李馨欣 杨俊.内皮素-1 在心血管系统中的作用国际心血管病杂志[J].2012,39(3):153-156.

(此文编辑:朱雯霞)