

海洋溴酚化合物 BDDPM 促进肝糖原合成及缓解胰岛素抵抗的作用研究

罗 娇^{1,2}, 徐 琦^{1,2}, 王立军¹, 江 波¹, 史大永¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: BDDPM 是一种从海洋松节藻中分离出来的全新结构的溴酚类化合物, 前期研究表明 BDDPM 具有良好的 PTP1B 蛋白酶活抑制能力。在本文中利用 HepG2 细胞和 C2C12 细胞, 研究 BDDPM 对肝细胞糖原合成能力的影响及对胰岛素抵抗的作用。结果表明, 1 $\mu\text{mol/L}$ BDDPM 可以在细胞水平显著激活胰岛素信号通路, 提高肝糖原的合成, 缓解棕榈酸诱导的胰岛素抵抗, 初步具有开发成为新型抗糖尿病海洋药物的潜力。

关键词: 松节藻; BDDPM; T2DM; 糖原合成; 胰岛素抵抗

中图分类号: R915 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2016)11-0108-05

doi: 10.11759/hyxx20160413001

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种复杂的代谢综合症, 其特征是高血糖, 结果导致外周组织的胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞胰岛素分泌的减少^[1]。胰岛素信号通路相关的一些靶点蛋白是治疗 T2DM 新的有效靶标^[2]。蛋白质酪氨酸磷酸酶 1B(protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B)位于内质网的胞质面, 在胰岛素靶向组织中广泛表达。PTP1B 可以催化胰岛素受体(insulin receptor, IR) β 亚基和胰岛素受体底物(insulin receptor substrate 1/2, IRS1/2)的酪氨酸脱磷酸化, 从而削弱了胰岛素信号的转导^[3]。PTP1B 过表达会抑制 IR 和 IRS1/2 的酪氨酸磷酸化, 从而导致胰岛素抵抗。小鼠体内试验表明, 组织特异性(肝组织、肌肉组织及脂肪组织)的 PTP1B 蛋白敲除可以显著提高胰岛素的敏感性^[4-6]。另外, Elchebly 等^[5]通过对全身 PTP1B 敲除(KO)小鼠研究还发现, PTP1B 敲除小鼠表现出全身性的胰岛素敏感度的增加和葡萄糖耐受性的增强。当喂食高脂肪的饮食时, PTP1B KO 小鼠能够有效抑制体重的增加及降低外周组织胰岛素抵抗的发生。因此, PTP1B 是胰岛素信号转导系统的负调节蛋白。目前, 已经被公认为是一种全新的用于治疗 2 型糖尿病和肥胖的药物靶标^[7]。许多制药公司, 包括雅培, 诺和诺德, 阿斯利康, 礼来, 默克, 诺华, Incyte, 惠氏和 ISIS 公司, 都对 PTP1B 抑制剂表现出浓厚的兴趣^[7-8]。

海洋作为全球至为重要的资源库, 为人们提供

了丰富的生物资源。海洋红藻中含有许多结构新颖、活性独特的溴酚类化合物。作者从红藻门的松节藻(*Rhodomela confervoides*)中分离出一种全新结构的溴酚化合物: 双-(2, 3-二溴-4, 5-二羟基苯基)-甲烷(BDDPM)(图 1), 在体外具有良好的 PTP1B 酶抑制活性, IC_{50} 值为 2.42 $\mu\text{mol/L}$ ^[9]。本文通过研究 PTP1B 抑制剂 BDDPM 在细胞水平上对糖原合成和胰岛素抵抗的影响, 期待为 BDDPM 作为 T2DM 候选药物的开发提供一定的理论支持。

1 材料

1.1 试剂

化合物 BDDPM 由本实验室全合成, 溶于 DMSO, 配置成 10 mol/L 的储液, 存于 -20°C 冰箱。

其他试剂有: MTT(索莱宝), 高糖 DMEM 培养基(Hyclone), 胎牛血清(Gibco), 胰蛋白酶(Hyclone),

收稿日期: 2016-04-13; 修回日期: 2016-05-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(41276167); 山东省重点研发计划(2015GGF01039); 青岛市基础研究计划项目(No.14-2-4-35-jch); 国家高层次人才特支计划“万人计划”; 国家海洋实验室“鳌山人才计划”

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 41276167; Key Research Program of Shandong Province, No. 2015GGF01039; Fundamental Research Program of Qingdao, No. 14-2-4-35-jch; Ten Thousand Talents Program; Aoshan Talents Program]

作者简介: 罗娇(1990-), 女, 安徽宿州人, 博士研究生, 研究方向为海洋药物, E-mail: luojiao2012@163.com; 史大永, 通信作者, 电话: 0532-82898719, E-mail: shidayong@qdio.ac.cn

胰岛素(Sigma), 棕榈酸(Vetec), 马血清(Hyclone), RIPA 细胞裂解液(碧云天), BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Thermo), ECL 发光液(Millipore)。

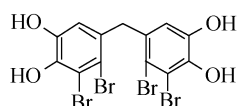


图1 BDDPM 分子结构式
Fig. 1 Structure of BDDPM

一抗: anti-phospho-IR β (Tyr1146) rabbit IgG, phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP Rabbit mAb, Phospho-Glycogen Synthase(Ser641) Antibody, 和 Phospho-GSK-3 β (Ser9) (D85E12)XP $\text{\textcircled{R}}$ Rabbit mAb 购自 Cell Signaling Technology 公司; p-IRS-1/2 Antibody (Tyr 612)-R 购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; anti- β -actin mouse monoclonal IgG 购自 Proteintech Group 公司。

二抗: 山羊抗小鼠-HRP 和山羊抗兔-HRP, 均购自 Proteintech Group 公司。

1.2 仪器

CO $_2$ 细胞培养箱(Thermo), 生物安全柜(Thermo), 微孔酶标仪(BioTek), 恒温离心机(Eppendorf), 4 $^{\circ}$ C 层析柜(青岛海尔)。

1.3 细胞

HepG2 购自青岛大学医学院, 用含有 10%FBS 的高糖 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}$ C CO $_2$ 细胞培养箱中培养。待细胞涨至 90%密度时按 1:4 的比例传代。

C2C12 购自美国 ATCC 公司, 用含有 10%FBS 的高糖 DMEM 培养基培养, 待细胞涨至 80%~90%密度时按 1:3 的比例传代。

2 方法

2.1 BDDPM 对细胞活力的影响

为测定 BDDPM 的细胞毒性, 取对数生长期的 HepG2 细胞铺至 96 孔板, 每孔 5×10^3 个细胞, 于细胞培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。在细胞密度达到 80%时加入相应浓度的 BDDPM 溶液, 浓度分别为: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} mol/L。24 h 以后用 MTT 法检测 HepG2 的细胞活力。具体方法如下: 每孔加入 10 μ L MTT(5 g/L, 溶于 PBS)后于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育 4 h。4 h 后, 小心倒掉上清液, 并加入 150 μ L DMSO。将 96 孔板置于水平摇床上, 室温孵育 10 min 后, 用酶标仪读取 490 nm 处的吸光值。

2.2 BDDPM 对胰岛信号通路及糖原合成的影响

将对数生长期的 HepG2 细胞铺至 6 孔板, 每孔 5×10^5 个细胞, 于细胞培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。第二天在细胞密度达到 70%左右时, 把培养基换成不含血清的高糖 DMEM, 将细胞饥饿培养过夜。24 h 后, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 BDDPM 溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 12 h。实验以 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 的胰岛素(INS, 终浓度 100 nmol/L)处理组为阳性对照实验组。

2.3 BDDPM 对棕榈酸引起的胰岛素抵抗的影响

将对数生长期的 C2C12 细胞铺至 6 孔板, 每孔 5×10^5 个细胞。当细胞密度达到 90%时将培养基换成 C2C12 分化培养基, 即 2%马血清的高糖 DMEM。每天换液, 共分化 7 d。在第 7 天加入终浓度分别为 10, 1, 0.1 mmol/L 的 BDDPM, 预孵育 1 h。1 h 以后加入终浓度为 0.75 mmol/L 的棕榈酸, 37 $^{\circ}$ C 孵育 16 h。

2.4 Western Blot

实验组细胞经胰酶消化、PBS 清洗后, 用冰预冷的 RIPA 裂解液(含新加入的 PMSF 和磷酸酶抑制剂)裂解细胞。用 4 $^{\circ}$ C 恒温离心机 12 000 r/min 离心 20 min 后取上清液。用 BCA 法测定蛋白浓度后, 取 50 μ g 样品上样。经电泳及转膜后, 用 5%的脱脂牛奶室温封闭 1 h。通过相应的一抗检测目的蛋白。一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后用 TBST 洗膜, 每次 5 min, 洗 3 次。随后用 HRP 偶联的二抗于室温孵育 1 h。经 TBST 洗膜后用化学发光法检测目的蛋白信号。最后用 ImageJ 软件进行蛋白条带的灰度分析。

2.5 统计学分析

使用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差的形式表示。多组间差异通过单因素方差分析进行, 以 $P < 0.05$ 具有显著的统计学意义。

3 结果

3.1 BDDPM 对细胞活力的影响

如图 2 所示, 用含有不同浓度 BDDPM 的培养基培养 HepG2 细胞 24 h 以后, 与 DMSO 处理组相比, BDDPM 在 10^{-5} ~ 10^{-10} mol/L 的浓度范围内 HepG2 的细胞活力比分别为 0.87, 1.03, 0.99, 1.03, 0.96, 0.94。这个结果表明 BDDPM 在 10^{-5} ~ 10^{-10} mol/L 的浓度范围内没有细胞毒性($P > 0.05$), 不会影响细胞的活力。

但是在超过 10^{-5} mol/L 时, BDDPM 具有极显著的细胞毒性($P<0.001$)。以上实验结果表明 BDDPM 在低浓度时没有细胞毒性, 不会影响细胞增殖, 但高浓度的 BDDPM 具有极强的细胞毒性。在以下各实验中均采用 10^{-6} mol/L, 即 1 μ mol/L 的 BDDPM 处理细胞。

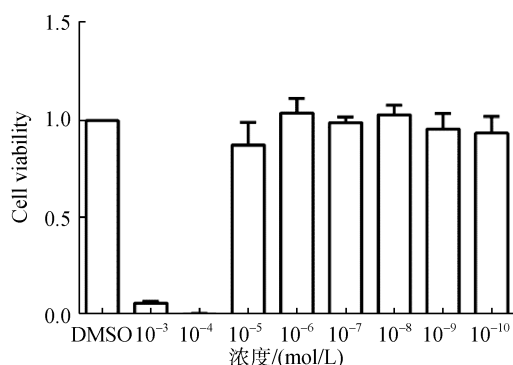


图2 BDDPM 对细胞活力的影响
Fig. 2 Effect of BDDPM on cell viability

3.2 BDDPM 对胰岛素信号通路的影响

将终浓度为 1 μ mol/L 的 BDDPM 作用 HepG2 细胞 12 h, 收集细胞后使用免疫印记的方法检测 BDDPM 对胰岛素信号通路蛋白的作用。如图 3 所示, BDDPM 能显著提高胰岛素受体(IR) β 亚基 1146 位酪氨酸的磷酸化水平以及胰岛素受体底物(IRS1/2)612 位酪氨酸的磷酸化水平($P<0.001$)。其中, pIR β / β -Actin 的比率与阳性对照 INS 处理组相当。另外, BDDPM 也能显著提高 Akt 蛋白 473 位丝氨酸的磷酸化($P<0.05$)。以上结果表明 BDDPM 能显著激活胰岛素信号通路的转导。

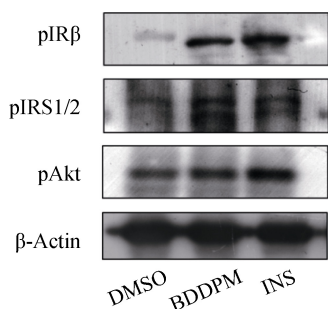


图3 BDDPM 对胰岛素信号通路的激活作用
Fig. 3 Insulin signaling activation of BDDPM

3.3 BDDPM 对肝糖原合成的影响

本实验检测了 BDDPM 对肝细胞糖原合成的影响。如图 4 所示, 1 μ mol/L 的 BDDPM 作用 HepG2 细胞 12 h 可以显著提高糖原合成酶 3(GSK3) β 亚

基 9 位丝氨酸的磷酸化水平($P<0.001$), 同时显著降低了糖原合成酶(GS)641 位丝氨酸的磷酸化水平($P<0.01$), 这表明 BDDPM 能够显著增强肝细胞的糖原合成能力。

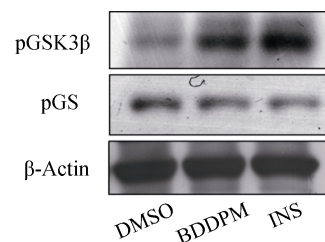


图4 BDDPM 对肝糖原合成的促进作用
Fig. 4 Hepatic glycogen synthesis enhancement effect of BDDPM

3.4 BDDPM 对棕榈酸诱导的胰岛素抵抗的影响

大量研究表明棕榈酸(palmitic acid, PA)在体外水平和体内水平上均能够引起胰岛素靶向组织的胰岛素抵抗^[10-13]。如图 5 所示, 用 0.75 mmol/L 的棕榈酸处理 C2C12 肌管细胞 16 h 可以显著降低 IR β 、IRS1/2 和 Akt 的磷酸化水平, 引起胰岛素抵抗。用 1 μ mol/L 和 0.1 μ mol/L BDDPM 处理细胞后可以恢复 IR β 、IRS1/2 和 Akt 的磷酸化水平, 这表明 BDDPM 可以缓解由棕榈酸引起的胰岛素抵抗状态。

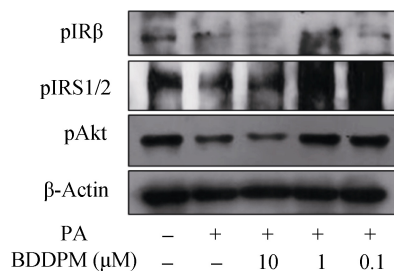


图5 BDDPM 对胰岛素抵抗的改善作用
Fig. 5 The improvement of insulin resistance by BDDPM

4 讨论

PTP1B 是胰岛素信号通路的负调节因子, PTP1B 蛋白的活性状态与 T2DM 的发生密切相关。PTP1B 作为酪氨酸磷酸酶家族的一员, 可以将 IR 和 IRS1 磷酸化的酪氨酸脱磷酸化, 从而导致胰岛素信号转导的削弱及胰岛素抵抗的发生^[3, 14]。我们实验室之前的研究表明, 海洋天然溴酚类化合物 BDDPM 是一种良好的 PTP1B 抑制剂, 在本文中作者通过 HepG2 细胞和 C2C12 细胞研究 BDDPM 在细胞水平上对糖

原合成和胰岛素抵抗的改善作用。实验结果表明 BDDPM 可以激活 PTP1B 蛋白下游的胰岛素信号通路, 提高 IR β 、IRS1/2 的酪氨酸磷酸化水平以及 Akt 的丝氨酸磷酸化水平(图 3)。

T2DM 的特征是高血糖, 因此血糖的调控是治疗 T2DM 的关键所在, 主要表现在细胞葡萄糖吸收量的增加以及存储能力的增强。在人体内, 葡萄糖以糖原的形式存储, 其中以肝糖原为主。GSK3 和 GS 是调控糖原合成的关键蛋白^[15], 如图4所示, BDDPM 可以提高 GSK3 β (Ser9)的磷酸化状态, 同时降低了 GS(Ser641)的磷酸化水平。这意味着 BDDPM 对 IR/IRS-1/Akt 的线性激活可以使其下游的 GSK3 蛋白失活, 这进一步导致了糖原合成酶的脱磷酸化, 从而增加肝糖原的合成能力。

胰岛素抵抗是胰岛素靶向组织对胰岛素响应不敏感的一种状态, 是促进 T2DM 发生发展的重要因素^[16]。研究表明, T2DM 病人的血浆游离脂肪酸水平比正常人显著升高^[17]。而且这些游离脂肪酸在胰岛素抵抗的发生过程中起重要作用。在本文中作者使用棕榈酸诱导 C2C12 肌管细胞 16h 来研究 BDDPM 对胰岛素抵抗的改善作用。结果显示 BDDPM 可以恢复 IR β 、IRS1/2 的酪氨酸磷酸化水平, 重新激活 Akt 丝氨酸的磷酸化(图 5)。这表明 BDDPM 可以缓解棕榈酸诱导的胰岛素抵抗。

目前, PTP1B 抑制剂的开发是一种治疗 T2DM 的热门策略^[7, 18-20]。鉴于 BDDPM 具有对肝糖原合成的促进作用以及对棕榈酸诱导的胰岛素抵抗状态的缓解作用, 这意味着 BDDPM 已经初步具有开发成为治疗 T2DM 候选药物的潜力。

参考文献:

- [1] Liao E P. Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment[J]. American Journal of Medicine, 2012, 125(10): 2-3.
- [2] Moller D E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome[J]. Nature, 2001, 414(6865): 821-827.
- [3] Byon J C, Kusari A B, Kusari J. Protein-tyrosine phosphatase-1B acts as a negative regulator of insulin signal transduction[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 1998, 182(1-2): 101-108.
- [4] Zabolotny J M, Ha F G J, Kim Y B, et al. Transgenic overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle causes insulin resistance, but overexpression with leukocyte antigen-related phosphatase does not additively impair insulin action[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(23): 24844-24851.
- [5] Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene[J]. Science, 1999, 283(5407): 1544-1548.
- [6] Klamann L D, Boss O, Peroni O D, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice[J]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20(15): 5479-5489.
- [7] Zhang S, Zhang Z Y. PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery[J]. Drug Discovery Today, 2007, 12(9-10): 373-381.
- [8] Combs A P. Recent advances in the discovery of competitive protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for the treatment of diabetes, obesity, and cancer[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 53(6): 2333-2344.
- [9] Dayong Shi Jing Li, Bo Jiang, et al. Bromophenols as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B with antidiabetic properties[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, 22(8): 2827-2832.
- [10] Seiji Nakamura, Toshinari Takamura, Naoto Matsuzawa-Nagata, et al. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria[J]. Journal Of Biological Chemistry, 2009, 284(22): 14809-14818.
- [11] Margaret E. Griffin, Melissa J. Marcucci, Gary W. Cline, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade[J]. Diabetes, 1999, 48(6): 1270-1274.
- [12] Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM[J]. Diabetes, 1997, 46(1): 3-10.
- [13] Chavez J A, Summers S A. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes[J]. Archives of Biochemistry And Biophysics, 2003, 419(2): 101-109.
- [14] Bakke J, Haj F G. Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation[J]. Seminars In Cell & Developmental Biology, 2015, 27: 58-65.
- [15] Lee J, Kim M S. The role of GSK3 in glucose homeostasis and the development of insulin resistance[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007, 77: 49-57.
- [16] Zimmet P, Alberti K G M M, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic[J]. Nature, 2001, 414(6865): 782-787.
- [17] Reaven G M, Hollenbeck C, Jeng C Y, et al. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM[J]. Diabetes,

- 1988, 37(8): 1020-1024.
- [18] Tonks N K. PTP1B: from the sidelines to the front lines![J]. FEBS Lett, 2003, 546(1): 140-148.
- [19] Thareja S, Aggarwal S, Bhardwaj T R, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: a molecular level legitimate approach for the management of diabetes mellitus[J]. Medicinal Research Reviews, 2012, 32(3): 459-517.
- [20] Koren S, Fantus I G. Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2007, 21(4): 621-640.

A study on hepatic glycogen synthesis and insulin resistance of marine derived bromophenol BDDPM

LUO Jiao^{1, 2}, XU Qi^{1, 2}, WANG Li-jun¹, JIANG Bo¹, SHI Da-yong¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Apr. 13, 2016

Key words: *Rhodomela confervoides*; BDDPM; T2DM; glycogen synthesis; insulin resistance

Abstract: Bis (2, 3-dibromo-4, 5-dihydroxy-phenyl)-methane (BDDPM) is a bromophenol compound with a new structure extracted from the marine red algae *Rhodomela confervoides*. A previous study showed that BDDPM could significantly inhibit PTP1B activity *in vitro*. In this research, we studied the effect of BDDPM on hepatic glycogen synthesis ability and insulin resistance in HepG2 and C2C12 cells. The results reveal that 1- μ M BDDPM can significantly activate insulin signaling, enhance hepatic glycogen synthesis, and alleviate PA-induced insulin resistance. As such, BDDPM has the potential to be developed as an anti-diabetic agent.

(本文编辑: 康亦兼)