

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.05.003

## PTEN 参与小檗碱保护脂毒性损伤的胰岛 $\beta$ TC3 细胞 \*

张娟<sup>1,2</sup> 赵原<sup>3</sup> 赵晓宏<sup>2</sup> 周庆元<sup>2</sup> 李晓苗<sup>1Δ</sup>

(1 第四军医大学西京医院内分泌代谢科 陕西 西安 710032; 2 三二〇一医院内分泌科 陕西 汉中 723000;

3 第四军医大学药剂学教研室 陕西 西安 710032)

**摘要 目的:**探讨小檗碱保护棕榈酸诱导的胰岛  $\beta$ TC3 细胞的可能机制,观察 PTEN 是否参与该过程,以及小檗碱对胰岛素分泌的影响。**方法:**用 1.0 mmol/L 棕榈酸制作胰岛  $\beta$ TC3 细胞脂毒性损伤模型,给予小檗碱干预;放射免疫法检测胰岛素分泌,Western blot 法进行 PTEN、p-AKT、AKT、Bcl-2、Bax、活性 Caspase3 蛋白的检测。实验分 3 大组(对照组、棕榈酸组、棕榈酸 + 小檗碱治疗组),棕榈酸分别作用 3 个时间段(24、48、72 h)。**结果:**①放射免疫法胰岛素分泌测定结果显示: $\beta$  细胞暴露于棕榈酸 24 h 后,5.6、16.7 mmol/L 葡萄糖刺激的胰岛素分泌均较正常对照组显著减少( $P < 0.01$ );添加小檗碱干预后胰岛素分泌较棕榈酸组回升,但较对照组减少( $P$  均  $< 0.01$ )。②在棕榈酸处理的 3 个时间段内,与对照组相比,棕榈酸组的 PTEN、Bax、Active-Caspase3 蛋白表达水平显著升高,p-AKT、Bcl-2 蛋白水平下降;小檗碱干预后 PTEN、Bax 蛋白表达水平下降,p-AKT、Bcl-2 蛋白水平提高( $P$  均  $< 0.01$ )。**结论:**小檗碱可改善棕榈酸引起的胰岛素分泌减少,抑制脂毒性诱导的 PTEN 表达增加,减少促凋亡基因 Bax、Active-Caspase3 表达,并增加抑凋亡基因 Bcl-2 基因表达及 AKT 的活化,从而拮抗棕榈酸诱导的  $\beta$  细胞凋亡,保护  $\beta$  细胞功能。

**关键词:**小檗碱;棕榈酸;胰岛  $\beta$ TC3 细胞;胰岛素分泌;PTEN

**中图分类号:**R-33;R285.5;R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)05-810-05

## PTEN Gene Participated in Protective Effects of Berberine on Lipoapoptosis in Pancreatic $\beta$ TC3 Cells\*

ZHANG Juan<sup>1,2</sup>, ZHAO Yuan<sup>3</sup>, ZHAO Xiao-hong<sup>2</sup>, ZHOU Qing-yuan<sup>2</sup>, LI Xiao-miao<sup>1Δ</sup>

(1 Department of Endocrinology and Metabolism, Xijing hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Endocrinology, 3201 hospital, Hanzhong, Shaanxi, 723000, China; 3 Department of Pharmaceutics, Fourth Military

Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

**ABSTRACT Objective:** To evaluate the protective effect of berberine on pancreatic  $\beta$ TC3 cells lipoapoptosis induced by free fatty acids, investigated the role of PTEN/AKT signaling in berberine involved beta cell protection. To explore the anti-diabetic effects of berberine and its influence on insulin secretion. **Methods:** The basal and glucose stimulated insulin secretion capability of  $\beta$ TC3 cells were evaluated when exposed to FFAs with or without berberine by Radioimmunoassay. The expression of PTEN, AKT, p-AKT and apoptosis related proteins Bax, Bcl-2 and Active-Caspase3 were detected by western blotting in  $\beta$ TC3 cells when exposed to FFAs with or without berberine. **Results:** Berberine substantially facilitated the basal and glucose stimulated insulin secretion of beta cells in high FFAs condition. Western blot revealed that the phosphorylation of AKT and Bcl-2 was markedly decreased under lipid stress but was elevated when treated with berberine. Moreover, FFAs could up-regulate the expression levels of PTEN, Bax, and Active-Caspase3, but down-regulate the expression levels of p-AKT and Bcl-2 in beta cells, which were canceled by the addition of berberine. **Conclusions:** Berberine observably inhibited the apoptosis, elevated proliferation and the basal and glucose stimulated insulin secretion of beta cells in high FFAs condition. Furthermore, the protective action of berberine was probability mediated by activation of PTEN/AKT, which was accompanied by the down-regulation of Bax, Active-Caspase3 and up-regulation of p-AKT and Bcl-2 expressions.

**Key words:** Berberine; Palmitic acid; Pancreatic  $\beta$ TC3 cells; Insulin secretion; PTEN

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R285.5; R587.1 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2017)05-810-05

### 前言

高 FFAs 水平被认为是 T2DM 的一个重要发病机制,FFAs

介导的  $\beta$  细胞功能障碍以葡萄糖刺激的胰岛素分泌受损及细胞凋亡为特征<sup>[1]</sup>。细胞凋亡是  $\beta$  细胞进行性缺失的主要形式,氧化应激是  $\beta$  细胞诱导凋亡的重要机制之一,而游离脂肪酸

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81573746);陕西省卫计委 2014 课题(2014D67)

作者简介:张娟(1985-),硕士研究生,主治医师,主要研究方向:肥胖及糖尿病的研究,电话:17791079691, E-mail: zhangjiao@163.com

Δ 通讯作者:李晓苗,硕士,副主任医师、副教授,硕士,主要研究方向:内分泌及代谢性疾病的临床及基础研究,

E-mail: xiaomiao@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2016-03-31 接受日期:2016-04-14)

(FFAs)被认为是氧化应激的重要诱因。FFAs 不仅是体内重要的营养物质,还在胰岛素分泌调节中发挥关键作用。因此,拮抗 FFAs 诱导的胰岛  $\beta$  细胞损伤将从机制上保护  $\beta$  细胞功能,治疗糖尿病。传统中药小檗碱具有广泛的药理作用,如止泻、抗炎、抗肿瘤等,既往被用于感染和炎症性疾病的治疗<sup>[1]</sup>,近年来被证明有益于糖脂代谢紊乱的调节<sup>[2]</sup>。

第十号染色体同源丢失性磷酸酶-张力蛋白基因(Phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10, PTEN)是最早发现的具有脂质和蛋白质双特异性磷酸酶活性的肿瘤抑制基因,在多种肿瘤的发生发展中发挥关键作用。近年来研究发现 PTEN 不但参与细胞凋亡、增殖、迁徙过程,还负性调节 PI3K-AKT 信号通路。PTEN 表达或激活改变在胰岛素抵抗、代谢紊乱中扮演至关重要的角色,被认为是 T2DM 与肥胖治疗的一个新靶点。在 T2DM 鼠模型中发现,PTEN 在肝脏、肌肉、脂肪组织中的表达较正常组显著升高,PTEN 可能通过抑制 PI3K 的激活,导致 T2DM 中胰岛素抵抗的发生<sup>[4,5]</sup>。还有研究<sup>[6]</sup>显示棕榈酸促进 PTEN 转录,抑制 AKT 激活,从而促进  $\beta$  细胞凋亡,提示 PTEN 增加会抑制 AKT 信号通路激活,参与 FFAs 造成的胰岛  $\beta$  细胞损伤;而阻断 PTEN 表达可改善 FFAs 引起的  $\beta$  细胞损害。本研究前期结果<sup>[7]</sup>表明小檗碱可减轻 FFAs 诱导的胰岛  $\beta$ TC3 细胞凋亡,保护  $\beta$  细胞功能,但其具体机制尚未阐述清楚;本实验根据前期实验结果选取 1.0 mmol/L 棕榈酸制作胰岛  $\beta$ TC3 细胞脂毒性凋亡模型,观察 0.1  $\mu$ mol/L 小檗碱拮抗脂毒性损伤胰岛  $\beta$  细胞的可能分子机制,以及其对脂毒性介导的  $\beta$  细胞胰岛素分泌受损的影响,并观察 PTEN 在此过程的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

胰岛  $\beta$ TC3 细胞由第四军医大学药剂学教研室冻存收藏。盐酸小檗碱,分子量:371.82, HPLC  $\geq$  98%,天津西玛科技有限公司产品。RPMI-1640 培养液、胎牛血清为 Hyclone 公司产品。胰蛋白酶消化液、青链霉素混合液、RIPA 裂解液、上样缓冲液、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购自科昊生物技术有限公司。牛血清白蛋白、棕榈酸、APS、TEMED 为 sigma 公司产品。碘(125I)胰岛素放射免疫分析药盒购自北京北方生物技术研究所有限公司。AKT、phospho-AKT (Ser473)、Bcl-2、Bax、PTEN、Active-Caspase3 抗体购自 Cell Signaling Technology。抗体  $\beta$ -actin 购自美国 bioworld 公司。辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。甘氨酸、Tris、SDS、丙烯酰胺购自美国 Amresco 公司。化学发光液、PVDF 膜购自 Millipore。冷冻离心机购自 Eppendorf 公司。恒温水浴箱:Pharmacia (LKB)公司。光学显微镜、全自动酶标仪(BIO-RAD550)、水平、垂直电泳系统(PAC300)购自美国 bio-rad 公司。四探头放射免疫计数仪(XH-6020)购自国营二六二厂 J2-MC 超速低温离心机购自美国 Beckman 公司。发光仪购自上海勤翔科学仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 配制棕榈酸溶液(5 mmol/L 棕榈酸) 取 0.013 g 棕榈酸加入 250  $\mu$ L 无水乙醇中置于 70 $^{\circ}$ C 水浴箱中待其完全溶解,加入配好的 10%BSA 定容至 10 mL,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中加热至

溶液透明。0.22  $\mu$ m 滤器过滤后分装,-20 $^{\circ}$ C 保存,使用前解冻稀释。

1.2.2 配制小檗碱原液 取 18.591 mg 盐酸小檗碱加入 5 mL DMSO,得浓度为 3.7182 mg/mL(10 mol/L)的母液,稀释 1000 倍得到 10 mmol/L 的原液,过滤、分装后 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 细胞培养 用 RPMI1640 培养基(含 9%胎牛血清+1%青链霉素混合液)在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养  $\beta$ TC3 细胞,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.4 KRHB 缓冲液配制 NaCl 695.4 mg, KCl 34.3 mg, CaCl<sub>2</sub> 27.7 mg, MgSO<sub>4</sub> 14.4 mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 16.3 mg, NaHCO<sub>3</sub> 21 mg, 4-HEPES 238.3 mg, BSA 0.1 g, 加压灭菌蒸馏水定容至 100 mL, 0.22  $\mu$ m 滤器过滤, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 胰岛素分泌测定 将  $\beta$ TC3 细胞以 1.0 $\times$ 10<sup>6</sup>/孔接种于 6 孔板, 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 后, 吸弃各孔上清培养液, 细胞分 3 组培养 24 h: 对照组(加培养液 2 mL); 棕榈酸组(加 1.0 mmol/L 棕榈酸 2 mL); 小檗碱治疗组(加 1.0 mmol/L 棕榈酸 2 mL); 各组补齐 BSA 和无水乙醇。后吸弃各孔上清液, 对照组与棕榈酸组加入培养液, 小檗碱治疗组加入 0.1  $\mu$ mol/L 小檗碱, 继续培养 24 h。待各组细胞处理结束后, 吸弃培养液, 进行如下操作: 1) 用 PBS 轻轻冲洗 3 遍, 加入不含葡萄糖的 KRHB 缓冲液 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 使细胞对葡萄糖敏感。2) 弃上清, 加入含 5.6 mmol/L 葡萄糖的 KRHB 缓冲液, 每孔 800  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 收集上清 -20 $^{\circ}$ C 保存。3) PBS 冲洗, 加入含 16.7 mmol/L 葡萄糖的 KRHB 缓冲液, 每孔 800  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 收集上清, -20 $^{\circ}$ C 保存。4) 加入胰酶消化, 细胞悬液以 1000 r/min, 离心 5 min, 取细胞进行蛋白定量, 用于均衡各组胰岛素分泌量。5) 125I 胰岛素放射免疫分析试剂盒进行胰岛素含量测定, 结果以  $\mu$ IU/mL 表示。

1.2.6 Western blot 蛋白检测 将细胞分为 3 大组, 脂毒性凋亡模型分 3 个作用时段, 共 9 小组。分别为 control 组; PA1.0 mmol/L(PA 组), PA1.0 mmol/L+BBR 0.1  $\mu$ mol/L(PA+BBR)。PA 分别处理 24、48、72 h, 加入 BBR 继续培养 24 h。提取蛋白后用考马斯亮蓝进行蛋白定量, 制胶加样后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 待溴酚兰跑出分离胶后进行电转膜至 PVDF 膜, 取出转印好的膜, 丽春红 S 复染, PBST 洗涤脱色, 标记, 剪裁; 将膜放入 5%脱脂奶粉的 PBST 缓冲液中室温封闭 1 h, 后用 PBST 洗 3 遍将膜放入稀释好的抗 PTEN、p-AKT (Ser473)、AKT 等抗体中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBST 洗涤三次, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗室温孵育 1 h; 洗膜三次, 进行化学发光, 后用 Clixn Image Analysis 进行灰度检测。

1.2.7 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件, one way ANOVA 及 LSD 方法进行统计学分析, P<0.05 为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小檗碱对脂毒性损伤 $\beta$ TC3 细胞胰岛素分泌的影响

各组细胞处理结束后分别用低糖及高糖刺激胰岛素分泌, 使用放射免疫法测定各组胰岛素含量, 结果见表 1。由表 1 可以看出, 对照组细胞在基础葡萄糖刺激后胰岛素分泌值为 64.52 $\pm$ 1.09  $\mu$ IU/mL, 高糖刺激后胰岛素分泌值进一步升高, 达到 113.43 $\pm$ 3.57  $\mu$ IU/mL; 而细胞暴露于棕榈酸 24 h 后无论是

基础葡萄糖还是高糖刺激的胰岛素分泌均被抑制,以高糖刺激的胰岛素分泌降低最为明显;在给予小檗碱干预后基础及高糖刺激的胰岛素分泌值较棕榈酸组增加。在基础与高糖刺激条件下,3个组之间的胰岛素分泌值均有统计学差异( $P < 0.01$ )。

表 1 低浓度与高浓度葡萄糖刺激后各组细胞胰岛素分泌的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of the basal insulin secretion and stimulated insulin secretion in different groups

Groups	n	Insulin secretion( $\mu$ IU/mL)	
		5.6 mmol/L glucose	16.7 mmol/L glucose
Control	6	64.52 $\pm$ 1.09	113.43 $\pm$ 3.57
PA	6	42.42 $\pm$ 0.34**	29.53 $\pm$ 1.26**
PA+BBR	6	50.75 $\pm$ 0.86***	61.62 $\pm$ 1.35***

Note: \*\*  $P < 0.01$ , compared with control group; ##  $P < 0.01$ , compared with PA group.

### 2.2 小檗碱对脂毒性损伤 $\beta$ TC3 细胞氧化应激相关蛋白 PTEN、AKT、p-AKT 表达的影响

$\beta$ TC3 细胞分别经 1.0 mmol/L 棕榈酸孵育 24、48、72 h 后,加入 0.1  $\mu$ mol/L 小檗碱继续培养 24 h,Western blot 测 PTEN、Akt、p-Akt 蛋白水平。如图 1 所示,在各处理时间段内,与对照组相比,PA 组的 PTEN 表达水平明显升高,p-Akt 表达下降;与 PA 组相比,BBR 治疗组的 PTEN 水平下降,p-Akt 水平明显升高。灰度扫描结果分析显示,PTEN、p-AKT 蛋白表达水平在模

型组与对照组、模型组与小檗碱治疗组、对照组与小檗碱组均有差异( $P$  均  $< 0.01$ )。并且随着时间的增加,棕榈酸抑制 AKT 磷酸化的作用增大,促进 PTEN 转录作用增加,而小檗碱可拮抗棕榈酸引起的改变,但 BBR 治疗组与对照组有差距。说明小檗碱可抑制棕榈酸诱导的 PTEN 表达增加,增加 AKT 的激活,且 PTEN-AKT 信号通路参与了该过程,但也可能存在其他通路参与该保护过程。

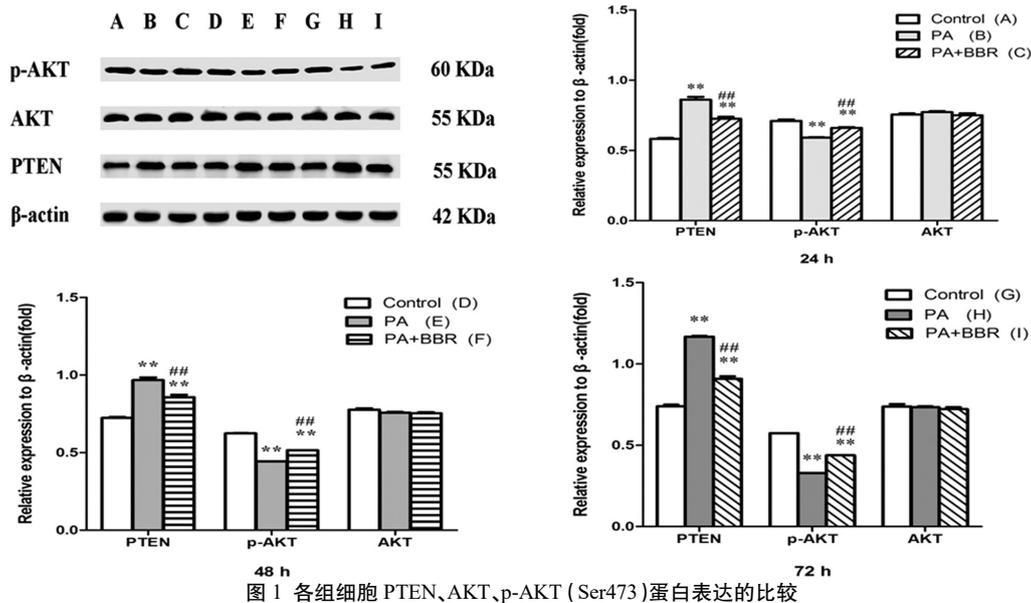


图 1 各组细胞 PTEN、AKT、p-AKT (Ser473) 蛋白表达的比较

Fig.1 Comparison of the protein expression of PTEN, AKT, p-AKT among different groups

Note: A: control group of exposing to PA for 24 h; B: model group of exposing to PA for 24 h; C: Berberine treatment group of exposing to PA for 24 h;

D: control group of exposing to PA for 48 h; E: model group of exposing to PA for 48 h; F: Berberine treatment group of exposing to PA for 48 h;

G: control group of exposing to PA for 72 h; H: model group of exposing to PA for 72 h; I: Berberine treatment group of exposing to PA for 72 h;

\*\* $P < 0.01$ , compared with control group, ##  $P < 0.01$ , compared with model group.

### 2.3 小檗碱对脂毒性损伤 $\beta$ TC3 细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Active-Caspase3 水平的影响

Western blot 及灰度扫描结果见图 2,如图 2 所示,与对照组比较,棕榈酸组的 Bax、Active-Caspase3 表达水平明显升高,Bcl-2 表达下降;与棕榈酸组相比,小檗碱治疗组的 Bax、Active-Caspase3 水平下降,Bcl-2 的表达水平升高。小檗碱可降低棕榈酸引起 Caspase3 活性增加,下调促凋亡基因且上调抑凋亡基因的表达。在各个处理时间段中,灰度分析结果显示 PA

组与对照组及 BBR 治疗组均有统计学差异( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

糖尿病是以  $\beta$  细胞功能障碍为核心的慢性代谢性疾病;血脂异常与高 FFAs 在糖尿病发生发展中作用重大。研究表明高浓度游离脂肪酸在影响胰岛素分泌、合成功能的同时,还会激活多种凋亡信号通路来导致  $\beta$  细胞功能障碍<sup>[8]</sup>。而  $\beta$  细胞抗氧化酶表达少,抗氧化能力弱,应该是最容易受到氧化损伤且极

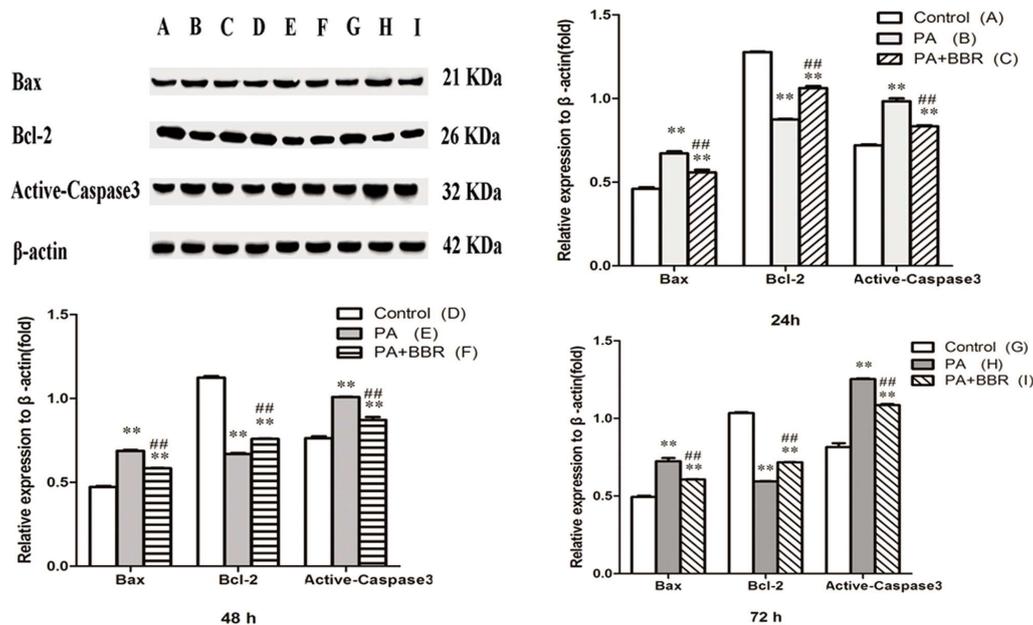


图2 各组细胞 Bax、Bcl-2、Active-Caspase3 蛋白水平的比较

Fig.2 Comparison of the protein expression of Bax, Bcl-2, Active-Caspase3 among different groups

Note: A: control group of exposing to PA for 24 h; B: model group of exposing to PA for 24 h; C: Berberine treatment group of exposing to PA for 24 h;

D: control group of exposing to PA for 48 h; E: model group of exposing to PA for 48 h; F: Berberine treatment group of exposing to PA for 48 h;

G: control group of exposing to PA for 72 h; H: model group of exposing to PA for 72 h; I: Berberine treatment group of exposing to PA for 72 h;

\*\* P<0.01, compared with control group, ##P<0.01, compared with model group.

易凋亡的细胞。因此,如何拮抗氧化应激损伤、保护胰岛β细胞功能成为防治糖尿病的关键。中药黄连在中国医疗史上被用来治疗糖尿病已有1400多年的历史,从基础到临床均有研究表明小檗碱具有抗炎、抗细菌及病毒感染、调脂降糖、减少β细胞凋亡、促进胰岛素分泌等作用。但目前在糖尿病的临床治疗中应用价值欠佳,究其原因,一方面是小檗碱的肠道吸收和生物利用度有限,更重要的是其核心的调节糖脂代谢机制尚未研究清楚,这一点大大阻碍了新型药物靶点的开发。如果小檗碱降糖调脂,保护胰岛β细胞功能等机制明确,其在糖尿病及脂代谢紊乱的治疗中将占据不可替代的重要地位,尤其是在伴有肝肾及血管并发症的患者中应用价值巨大。

小檗碱(BBR)是T2DM治疗中使用最多的中药成分,其降糖作用机制被广泛关注,比如增加胰岛素敏感性,促进胰岛素分泌;抗炎与抗氧化应激<sup>[9]</sup>;通过调节PPARs蛋白表达控制肝脏血糖及血脂代谢;降低肠道葡萄糖的吸收。研究表明小檗碱可以抑制STZ诱导的胰岛细胞凋亡,调节胰岛素抵抗大鼠体内肠道菌群结构(改进有益微生物群,抑制有害微生物群)<sup>[10]</sup>,还能改善大鼠的肥胖和胰岛素抵抗状况。前期实验表明小檗碱可以抑制棕榈酸诱导的胰岛β细胞凋亡,本实验通过放射免疫法测定了β细胞暴露于不饱和FFAs棕榈酸,以及给予小檗碱干预后的胰岛素分泌情况,结果发现高浓度FFAs使基础及高糖刺激的胰岛素分泌均减少,与对照组有差异(P<0.01);这与王玉梅等<sup>[11]</sup>结果一致。糖脂毒性在β细胞功能凋亡与胰岛素分泌缺陷中扮演至关重要的角色<sup>[12]</sup>;FFAs导致的β细胞障碍,既包括了胰岛素分泌障碍又包括了氧化应激等引起的细胞凋亡。沈宁与申竹芳<sup>[13]</sup>等研究表明小檗碱(50 mg/kg/d)显著改善饮食诱导的存在高胰岛素血症肥胖老鼠的葡萄糖耐量和胰岛

素抵抗,降低高脂饮食诱导的FFAs水平升高。Liu<sup>[14]</sup>等研究表明小檗碱在高糖处理的INS-1E细胞和糖尿病小鼠中通过激活AMPK和增加UCP2表达抑制氧化应激,恢复胰岛素分泌。本实验提示小檗碱可以减轻FFAs造成的β细胞损伤,表现为抑制FFAs介导的胰岛β细胞凋亡和增加被FFAs抑制的胰岛素分泌。

PTEN在小檗碱保护作用中的角色近年开始被关注,体外研究证明小檗碱可以通过抑制血管内皮细胞PTEN表达,激活AKT途径;有研究发现BBR对四氧嘧啶诱导的大鼠胰岛β细胞株INS-1损伤的保护作用可能与PTEN/PI3K/Akt信号通路有关<sup>[5]</sup>。还有研究表明在神经胶质瘤细胞中转染PTEN可以诱导细胞凋亡,并观察到Bcl-2蛋白表达减少,提示PTEN诱导的肿瘤细胞凋亡可能与Bcl-2有关<sup>[6]</sup>。Chueh等研究表明小檗碱主要通过下调Bax/Bcl-2的表达比例来拮抗β细胞凋亡<sup>[7]</sup>。本实验观察到胰岛βTC3细胞PTEN、促凋亡基因Bax、激活型Caspase3蛋白表达水平在棕榈酸刺激后上调,而小檗碱对这种上调有一定的抑制作用;同时,在β细胞暴露于棕榈酸后,AKT磷酸化被抑制,抑凋亡基因Bcl-2蛋白水平下降,小檗碱可拮抗此作用;但随着暴露于棕榈酸的时间延长,胰岛β细胞的损伤作用增加,小檗碱对棕榈酸引起的蛋白表达改变的拮抗作用减弱,这与前期细胞增殖、凋亡的结果一致,说明小檗碱的保护作用具有一定的局限性。

目前PTEN参与β细胞凋亡及胰岛素分泌的机制主要集中在两方面:一方面,PTEN被认为是胰岛素/PI3K/AKT信号通路的负性调节因子,其水平增加会引起胰岛素抵抗,其下调可提高胰岛素敏感性,减少胰岛素抵抗,进而改善β细胞功能。动物实验结果表明肝脏、脂肪、肌肉组织特异性敲减PTEN基

因可提高胰岛素敏感性,增加脂肪酸合成,促进葡萄糖利用,避免高脂饮食诱导胰岛素抵抗及糖尿病<sup>[18]</sup>。另一方面,PTEN 在氧化应激中扮演重要角色,可能是 Nrf2-ARE 内源性抗氧化反应信号通路上游的负性调控因子。如有研究发现在视网膜光氧化损伤中存在保护性的内源性抗氧化反应,其中 Nrf2 和 PI3K/Akt 的 "cross-talk" 具有重要作用,而这一过程是受 PTEN 负性调控的<sup>[19]</sup>;还有研究表明 PTEN 可以抑制 Nrf2 所介导的抗氧化酶 HO-1 的表达<sup>[20]</sup>。

本实验表明 PTEN-AKT 信号及 Bcl-2/Bax、Caspase3 参与了小檗碱保护脂毒性损伤的  $\beta$  细胞过程。但由于未加入 PTEN 拮抗剂,也未进行 PTEN 基因敲除后再进行细胞增殖、凋亡、胰岛素分泌及蛋白等检测,还不能说明小檗碱是通过下调 PTEN 发挥抑制 FFAs 诱导的  $\beta$  细胞凋亡,只能说明 PTEN 参与了该过程,小檗碱抗  $\beta$  细胞凋亡过程与 PTEN-AKT 通路相关。而且,本实验只是在细胞水平上表明小檗碱可以拮抗棕榈酸引起的 PTEN 上调,要证明小檗碱是通过 PTEN 信号通路抑制  $\beta$  细胞凋亡及抗糖尿病的氧化应激作用还需进行动物实验,利用 PTEN 基因敲除糖尿病动物模型来观察 PTEN 在小檗碱保护胰岛  $\beta$  细胞过程中的具体机制。

#### 参考文献(References)

- [1] Barlow J, Affourtit C. Novel insights into pancreatic beta-cell glucolipotoxicity from real-time functional analysis of mitochondrial energy metabolism in INS-1E insulinoma cells [J]. *Biochem J*, 2013, 456(3): 417-426
- [2] Singh I P, Mahajan S. Berberine and its derivatives: a patent review (2009-2012)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2013, 23(2): 215-231
- [3] Lan J, Zhao Y, Dong F, et al. Meta-analysis of the effect and safety of berberine in the treatment of type 2 diabetes mellitus, hyperlipemia and hypertension[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 161: 69-81
- [4] Zeng J B, Zhang Y, Sun Q, et al. Phosphatase and tension homolog overexpression in insulin resistant diabetic adipose tissue [J]. *Chin Med Sci J*, 2014, 29(3): 167-173
- [5] Su D, Zhang C L, Gao Y C, et al. Gene Expression and Correlation of Pten and Fabp4 in Liver, Muscle, and Adipose Tissues of Type 2 Diabetes Rats[J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 3616-3621
- [6] Hou R, Zhang J, Yin T, et al. Upregulation of PTEN by peroxynitrite contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta-cells[J]. *Apoptosis*, 2010, 15(8): 877-886
- [7] 张娟, 刘文妹, 李晓苗. 小檗碱对游离脂肪酸损伤的胰岛  $\beta$ TC3 细胞的保护作用[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(13): 2442-2447  
Zhang Juan, Liu Wen-shu, Li-Xiao-miao, et al. Protective effect of berberine on lipapoptosis in pancreatic  $\beta$ TC3 cells induced by free fatty acid [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16 (13): 2442-2447
- [8] Joffe D. Liraglutide: a once-daily human glucagon-like peptide-1 analogue for type 2 diabetes mellitus [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2010, 67(16): 1326-1336
- [9] Li Z, Geng Y N, Jiang J D, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of berberine in the treatment of diabetes mellitus [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 289264
- [10] Zhang X, Zhao Y, Zhang M, et al. Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42529
- [11] 文玉梅, 李励, 蔡劲薇, 等. 游离脂肪酸对大鼠胰岛分泌功能和胰岛细胞凋亡的影响研究 [J]. *广西医科大学学报*, 2013, 30(05): 657-660  
Wen Yu-mei, Li Li, Cai Jin-wei, et al. Effect of free fatty acid on isolated islet cells function and apoptosis [J]. *Journal of Guanxi Medical University*, 2013, 30(05): 657-660
- [12] Somesh B P, Verma M K, Sadasivuni M K, et al. Chronic glucolipotoxic conditions in pancreatic islets impair insulin secretion due to dysregulated calcium dynamics, glucose responsiveness and mitochondrial activity[J]. *BMC Cell Biol*, 2013, 14: 31
- [13] Shen N, Huan Y, Shen Z F. Berberine inhibits mouse insulin gene promoter through activation of AMP activated protein kinase and may exert beneficial effect on pancreatic beta-cell [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 694(1-3): 120-126
- [14] Liu L, Liu J, Gao Y, et al. Uncoupling protein-2 mediates the protective action of berberine against oxidative stress in rat insulinoma INS-1E cells and in diabetic mouse islets [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(13): 3246-3254
- [15] 吴惠玲. 小檗碱对胰岛  $\beta$  细胞的保护作用及其机制研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(12): 2213-2218  
Wu Hui-ling. Protective effects of berberine in pancreatic islet beta cells[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2014, 30 (12): 2213-2218
- [16] 李侠, 章翔, 顾建文, 等. PTEN 基因诱导人脑胶质瘤 SHG-44 细胞凋亡及 bcl-2 蛋白表达下调[J]. *肿瘤*, 2002, 22(01): 29-31  
Li Xia, Zhang Xiang, Gu Jian-wen, et al. PTEN gene induces apoptosis and Down-regulation of bcl-2 protein in human brain glioma SHG-44 cells [J]. *Tumor Jan*, 2002, 22(01): 29-31
- [17] Chueh W H, Lin J Y. Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits streptozotocin-induced apoptosis in mouse pancreatic islets through down-regulating Bax/Bcl-2 gene expression ratio [J]. *Food Chem*, 2012, 132(1): 252-260
- [18] Wijesekara N, Konrad D, Eweida M, et al. Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(3): 1135-1145
- [19] Pitha-Rowe I, Liby K, Royce D, et al. Synthetic triterpenoids attenuate cytotoxic retinal injury: cross-talk between Nrf2 and PI3K/AKT signaling through inhibition of the lipid phosphatase PTEN[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(11): 5339-5347
- [20] Almazari I, Park J M, Park S A, et al. Guggulsterone induces heme oxygenase-1 expression through activation of Nrf2 in human mammary epithelial cells: PTEN as a putative target [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(2): 368-376