

小檗碱对高糖诱导心肌细胞 AMPK-AS160-GLUT4 通路的调节及保护作用

王瑞瑶¹, 霍梦露¹, 李超¹, 关锡梅¹, 倪伟建², 唐丽琴²

[1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230031; 2. 中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)药剂科]

[摘要] **目的** 探讨小檗碱对高糖诱导心肌细胞 AMPK-AS160-GLUT4 通路调节及保护作用。**方法** 体外培养大鼠 H9c2 心肌细胞系, 设置组别为健康对照组、高糖模型组、不同浓度小檗碱组(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)并分别处理。CCK-8 法检测细胞增殖与毒性; Annexin V-FITC/PI 双染实验观察小檗碱对高糖诱导心肌细胞凋亡的影响; 鬼笔环肽染色观察心肌细胞骨架; Western blot 法检测小檗碱对高糖诱导心肌细胞腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、磷酸化糖代谢调节蛋白(P-AS160)、葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)、丙酮酸脱氢酶(PDH)蛋白表达的影响。**结果** CCK-8 检测结果可见高糖诱导心肌细胞的细胞活力 100 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱组显著高于模型组($P < 0.05$); Annexin V-FITC/PI 双染实验结果显示心肌细胞凋亡率 100 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱组显著低于模型组($P < 0.01$); 心肌细胞骨架观察结果显示, 小檗碱可改善心肌细胞肥大情况。Western blot 结果显示 AMPK 与 AS160 的磷酸化程度小檗碱组明显高于模型组($P < 0.01$), 丙酮酸脱氢酶(PDH)含量 100 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱组明显高于模型组($P < 0.01$), 心肌细胞膜上 GLUT4 含量 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱组明显高于模型组($P < 0.01$)。**结论** 小檗碱可改善高糖诱导心肌细胞损伤, 提高心肌细胞葡萄糖代谢效率, 其作用机制可能与调控 AMPK-AS160-GLUT4 信号通路有关。

[关键词] 糖尿病心肌病; 肌细胞, 心脏; 蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶; 小檗碱; 细胞保护; 细胞凋亡

DOI: 10.3969/J.issn.1672-6790.2020.02.026

Regulation and protective effect of berberine on hyperglycemic-induced AMPK-AS160-GLUT4 pathway in cardiomyocytes Wang Ruiyao*, Huo Menglu, Li Chao, Guan Ximei, Ni Weijian, Tang Liqin(* School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

Corresponding author: Tang Liqin, Email: tangliqin@ustc.edu.cn

[Abstract] **Objective** To explore the regulation and protective effect of berberine on hyperglycemic-induced AMPK-AS160-GLUT4 pathway in cardiomyocytes. **Methods** Rat H9c2 cardiomyocyte cell line was cultured in vitro, and were divided as normal control group, high glucose model group and different concentrations of berberine group (25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) and treated separately. Cell proliferation and toxicity were detected by cck-8 assay; Annexin V-FITC/PI double staining was used to observe the effect of berberine on apoptosis of high glucose-induced cardiomyocytes; observation of myocardial cytoskeleton by ghost pen ring peptide staining. The effects of berberine on the expression of hyperglycemia-induced cardiomyocyte adenylate activated protein kinase (AMPK), phosphorylated glucose metabolism regulatory protein (p-as160), glucose transporters 4 (GLUT4) and pyruvate dehydrogenase (PDH) were determined by Western blot. **Results** CCK-8 test results showed that the cell viability of cardiomyocytes induced by high glucose in the 100 $\mu\text{mol/L}$ berberine group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.05$). Annexin V-FITC/PI double staining results showed that the apoptosis rate of cardiomyocytes in the 100 $\mu\text{mol/L}$ berberine group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.01$). Myocardial cytoskeleton observations show that berberine can improve myocardial cell hypertrophy. Western blot results showed that the phosphorylation degree of AMPK and AS160 in the berberine group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.01$). The content of pyruvate dehydrogenase (PDH) in the 100 $\mu\text{mol/L}$ berberine group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.01$). The

基金项目: 国家自然科学基金项目(81773955); 安徽省中医药科研项目(2016zy08)

作者简介: 王瑞瑶, 硕士研究生, Email: masterchief00@163.com

通信作者: 唐丽琴, 教授, 博士研究生导师, Email: tangliqin@ustc.edu.cn

GLUT4 content in the myocardial cell membrane in the 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ berberine group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Berberine can alleviate myocardial cell injury induced by high glucose and improve the glucose metabolism efficiency of myocardial cells, and its mechanism may be related to the regulation of AMPK-AS160-glut4 signaling pathway.

[**Keywords**] Diabetic cardiomyopathies; Myocytes, cardiac; Protein-serine-threonine kinases; Berberine; Cytoprotection; Apoptosis

糖尿病是一类以胰岛素分泌的绝对或相对不足而引起的持续性高糖为特征,并伴有脂肪、蛋白质代谢紊乱的内分泌性疾病^[1]。糖尿病心肌病(DCM)是由糖尿病引起的、与血管疾病同时伴行或单独发生的特殊性心肌病,是糖尿病最为严重的并发症之一^[2]。糖尿病心肌病状态下由于心脏代谢紊乱,微血管病变引发心脏广泛灶性坏死,出现亚临床心功能异常,最终发展为心律失常、心力衰竭以及心源性休克^[3]。目前糖尿病心肌病发病原因尚不清楚,研究显示,慢性高血糖会通过电子链使活性氧(ROS)大量生成,进而诱发心肌细胞凋亡。2型糖尿病患者通常伴随高胰岛素血症,在高胰岛素和胰岛素抵抗情况下心脏对于葡萄糖利用明显减弱,从而使心脏更多依赖于脂肪酸氧化进行能量代谢,相应的葡萄糖转运蛋白 GLUT1 及 GLUT4 表达减少,导致心脏能量代谢效率大幅降低^[4],其中 GLUT4 主要在胰岛素敏感的骨骼肌、心肌和脂肪细胞中表达,因此刺激 GLUT4 质膜转运将会是改善心脏葡萄糖代谢障碍重要的一环^[5-8]。小檗碱(BBR)是黄连根茎中的主要成分,有降血糖、降血脂之功效,为黄连治疗消渴的物质基础。有研究报道,小檗碱可通过激活 AMPK 抑制脂肪合成,改善胰岛素抵抗^[9]。AMPK 为生物能量代谢关键分子,其所调控的 AS160 蛋白即为 GLUT4 关键激动蛋白。因此本实验将通过高糖诱导心肌细胞模拟糖尿病机体心脏高血糖环境,探讨 BBR 对高糖诱导心肌细胞糖代谢功能以及心肌细胞损伤是否有改善作用,为 BBR 治疗 DCM 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及培养 H9c2(2-1)大鼠心肌细胞购自中国科学院上海细胞库,使用 Low Glucose DMEM 培养基 + 10% 胎牛血清 + 1% 双抗培养,培养环境温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 浓度。

1.2 药品与试剂 小檗碱由中国科学技术大学附属第一医院药剂科提取纯化(小檗碱纯度 98%);兔抗腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)单克隆抗体,兔抗磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(P-AMPK)单克隆抗

体,兔抗丙酮酸脱氢酶(PDH)单克隆抗体,兔抗磷酸化糖代谢调节蛋白(P-AS160),兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体均自 CST 公司;兔抗葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4),兔抗糖代谢调节蛋白(AS160),均自 Abcam 公司;辣根酶标记的山羊抗兔 IgG 均自 CST。Immobilon Western ECL 化学发光试剂盒, PVDF 膜均自 Millipore;磷酸酶抑制剂,蛋白酶抑制剂均自 Med Chem Express;Quickblock 一抗稀释液, Quickblock 二抗稀释液, SDS-PAGE 凝胶快速配置试剂盒, PMSF, RIPA 裂解液(强), BCA 蛋白定量试剂盒, SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液($5\times$), 曲拉通 X-100, DAPI 染色液, 青霉素-链霉素双抗, 胰酶细胞消化液均自碧云天;甘氨酸, Tris 均自北京索莱宝;H9c2(2-1)大鼠心肌细胞购自中国科学院上海细胞库;DMEM 低糖培养基均自 Hyclone;胎牛血清均自 Gibco;CCK-8 试剂盒, 膜蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒均自上海贝博;Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒均自南京维诺赞公司;鬼笔环肽均自 Sigma;4% 多聚甲醛均自 Biosharp。

1.3 主要仪器 超净工作台, 苏州净化技术有限公司;细胞培养箱, 上海力申科学仪器有限公司;压力蒸汽灭菌器, 上海申安仪器厂;金属浴, 杭州博日有限公司;超声波清洗器, 宁波新芝生物科技股份有限公司;电子分析天平, Mettler Toledo 公司;纯水机, 力康仪器有限公司;超低温冰箱, 中科美菱有限公司;高速冷冻离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司;酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司;摇床, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;电泳装置及转膜装置, 上海天能科技有限公司;制冷剂, 常熟市雪科电器有限公司;化学发光成像仪, 上海培清科技有限公司。流式细胞仪, 美国 Beckman Coulter 公司。荧光显微镜, 德国 Leica 公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞计数 台盼蓝染色液经 0.22 μm 滤膜过滤备用。将细胞消化, 细胞悬液转移至 EP 管中吹打混匀, 取 10 μL 细胞悬液与台盼蓝染液等体积

混匀,吸取 10 μL 至细胞计数板。将计数板插入细胞自动计数仪,于显示屏上可见活细胞呈中间通透圆点状,死细胞为实心深色圆点状,待机器自动计算板中活细胞及死细胞数量,记录数据。

1.4.2 细胞活力检测 根据细胞计数结果,将细胞加入培养基稀释密度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 。横向加入 96 孔板各孔 100 μL 细胞悬液,边缘 36 孔加入 PBS。待细胞长至 70% ~ 80%,弃去原培养基,分别加入高糖(葡萄糖浓度 50 mmol/L)及 BBR(浓度分别为 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)组,模型组(葡萄糖浓度 50 mmol/L)和健康对照组干预 24 h。各孔加入培养基体积十分之一体积即 10 μL CCK-8 试剂。4 h 内任意时间点读板,选取吸光度(OD)值在 1.0 附近时分析。

1.4.3 细胞凋亡检测 使用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测心肌细胞凋亡,分组为健康对照组,高糖诱导模型组及高糖条件下 BBR(浓度分别为 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)加药组,心肌细胞培养 24 h 后收集各实验组细胞,控制 1×10^6 个细胞与 500 μL 工作液中,加入 10 μL FITC 染液,混匀避光室温孵育 10 min,再在每组加入 5 μL PI 染液同样混匀避光室温孵育 10 min,上流式细胞仪检测细胞凋亡百分率。

1.4.4 心肌细胞骨架观察 将心肌细胞接种在 24 孔板中,分组同 1.4.3 分别加入高糖及小檗碱刺激 24 h,弃去培养基,用 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热的 PBS 洗 2 次,向各孔中加入 150 μL 4% 多聚甲醛固定细胞,室温孵育 10 min。吸出多聚甲醛,用 PBS 冲洗 2 次,加入 200 μL 0.1% 曲拉通,室温孵育 5 min 后用 PBS 冲洗 2 次。向每孔中刚加入 100 μL 现配 0.1% 鬼笔环肽,室温避光孵育 30 min,于摇床上使用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,再加入 100 μL DAPI 染液,室温避光孵育 10 min,用 PBS 清洗 2 次,每孔加入 200 μL PBS 于荧光显微镜下观察。

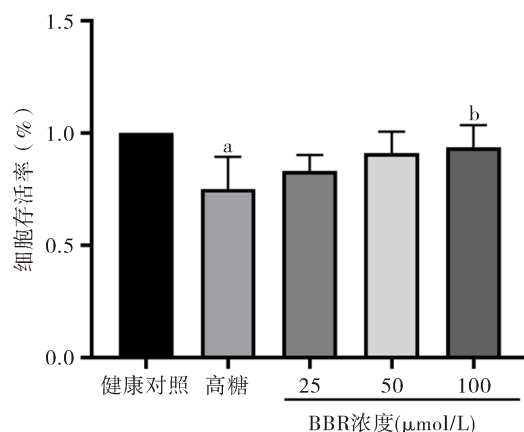
1.4.5 Western blot 检测相关蛋白表达 取处于对数生长期细胞,分组为高糖条件下 BBR(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)浓度组,模型组,对照组,以 1×10^8 个/孔接种六孔板,加药处理 24 h 后使用细胞刮收集细胞,加入 RIPA 裂解液及膜蛋白或胞浆蛋白提取试剂盒分别提取细胞总蛋白或膜蛋白,BCA 定量测定蛋白浓度。总蛋白与膜蛋白分别加入 1/4 体积的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液($5 \times$),总蛋白放入沸水煮沸 5 min 后备用,膜蛋白 - 80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。待 SDS-PAGE 凝胶电泳结束,切胶转 PVDF 膜,放入 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,TPBS 洗涤 3 次,置于配

置好的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h,ECL 显色,利用 Image J 软件分析灰度值,以 GAPDH 为内参考各蛋白变化。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 23.0 对数据进行分析。实验所得计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 描述,多组间比较使用单因素方差分析,事后两两比较使用 Dunnett 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBR 对高糖诱导心肌细胞存活率影响 图 1 的 CCK-8 结果显示,高糖刺激 24 h 后,与健康对照组相比,高糖组细胞存活率明显下降;BBR(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)与高糖组相比可以逐步提高心肌细胞存活率,且呈浓度相关性。



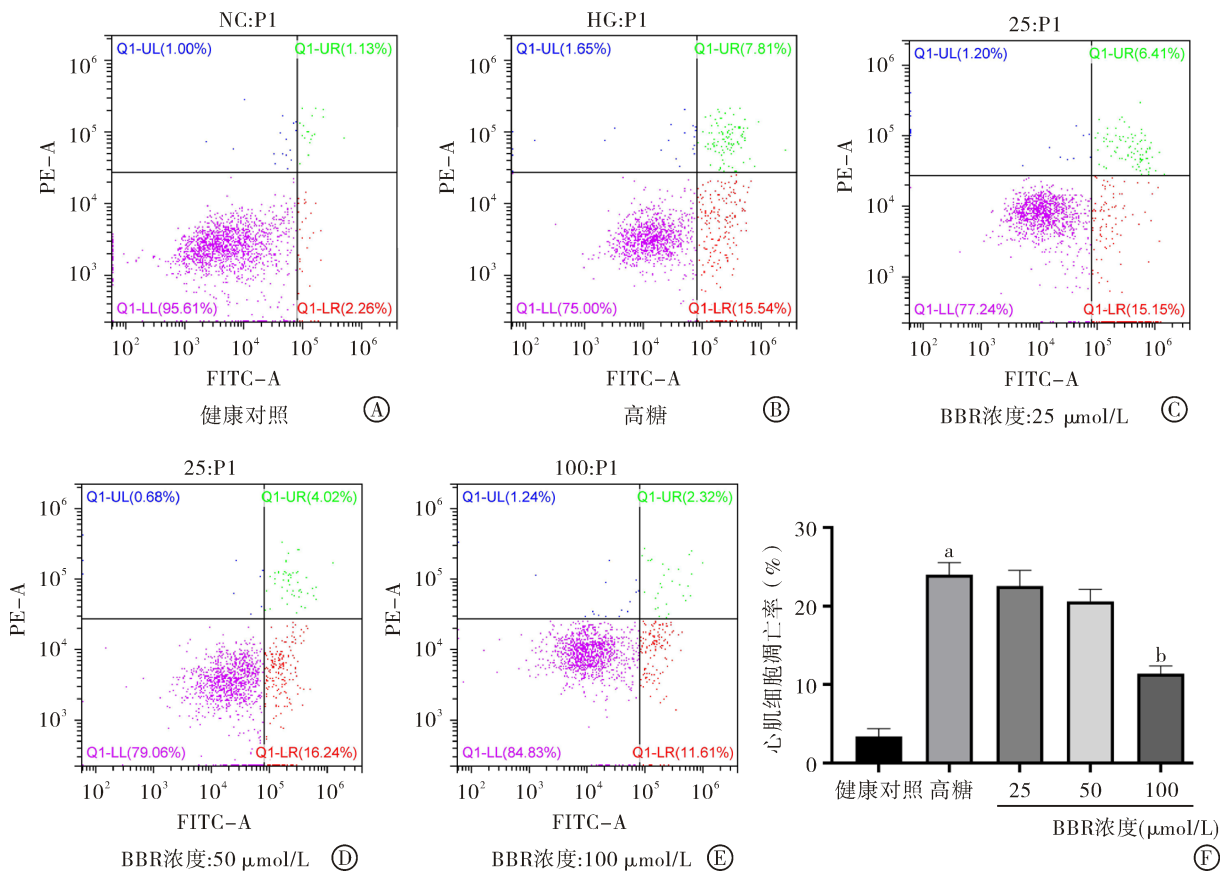
注:与健康对照组比较,^a $P < 0.01$;与高糖组比较,^b $P < 0.05$

图 1 BBR 对高糖诱导心肌细胞存活率的影响($n = 3$)

2.2 BBR 对高糖诱导心肌细胞凋亡的影响 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测心肌细胞凋亡率。图 2 流式细胞仪检测结果显示,模型组与对照组相比,高糖能明显诱导心肌细胞凋亡;高糖条件下 BBR(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)加药组与模型组比较,加药组可以明显降低心肌细胞凋亡率,对心肌细胞起到一定的保护作用。

2.3 BBR 对高糖诱导心肌细胞形态影响 鬼笔环肽染色结果显示,高糖诱导心肌细胞与正常组细胞相比,细胞呈肥大表现,BBR 干预组(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)则可不同程度上改善心肌细胞肥大,使细胞形态趋于正常。见图 3。

2.4 BBR 对高糖诱导心肌细胞 AMPK、P-AMPK、AS160、P-AS160、PDH、GLUT4 蛋白表达影响 AMPK 蛋白是生物能量代谢关键分子,其调控 AS160 从而激活 GLUT4 向膜外转运,维持细胞正常葡萄糖摄取



注:与健康对照组比较,^a $P < 0.01$;与高糖组比较,^b $P < 0.05$

图2 BBR对高糖诱导心肌细胞凋亡的影响($n = 3$): A-E:Annexin V-FITC/PI 双重染色法检测 BBR对心肌细胞凋亡的影响;F:不同组大鼠心肌细胞凋亡率比例的定量分析

功能。PDH 为丙戊酸脱氢酶,是催化丙酮酸不可逆的氧化脱羧为乙酰辅酶 A 的限速酶。

Western blot 结果显示,与正常组比较,高糖组 P-AMPK、P-AS160、PDH、胞膜 GLUT4 含量明显降低;与高糖组相比,BBR(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)可以不同程度提高心肌细胞内 P-AMPK、P-AS160、PDH、胞膜 GLUT4 的表达水平。见图 4。

3 讨论

DCM 作为糖尿病最为严重并发症之一,病理特征表现为心肌细胞肥大、间质纤维化和 PAS 阳性的物质浸润,冠状小动脉基底膜增厚,心肌内可见微血管病变^[10]。糖尿病心血管病变中,DCM 发病率最高,目前已成为老年糖尿病患者死亡的主要原因。由于发病机制尚不清楚,目前 DCM 的治疗主要是通过控制血糖及血压实现的,并没有较为理想的药物。因此进一步探索 DCM 发病机制,以便制定更加有效合理的治疗方案显得尤为重要。

有研究显示,慢性高血糖可引起心肌细胞损伤,

高脂血症会使脂肪酸大量进入心肌细胞,进而致使细胞脂肪酸氧化过载产生脂毒性^[11]。因此心肌细胞的能量代谢障碍或许是 DCM 发病的重要原因。正常心肌细胞中,脂肪酸氧化与葡萄糖、乳酸代谢共同供能于心脏,保证其正常收缩功能^[12-13]。而在高血糖环境中,葡萄糖转运蛋白活性下降,影响细胞对葡萄糖跨膜运输速率,导致葡萄糖代谢提供 ATP 不足,进而导致心脏供能不足。本实验则从改善心肌细胞葡萄糖代谢入手,观察小檗碱是否可以通过 AMPK-AS160 通路刺激 GLUT4 的向膜转运,从而逆转糖尿病状态下的心脏糖代谢障碍。

本实验中,通过考察心肌细胞活力值,凋亡率,细胞形态观察以及相关通路蛋白的表达分析小檗碱对 HG 诱导心肌细胞的保护作用。从实验结果可得知小檗碱可一定程度提高 HG 条件下心肌细胞活力值,降低心肌细胞凋亡率,改善心肌细胞肥大^[14]。通路蛋白中,小檗碱激活 AMPK 的磷酸化,从而刺激下游通路 AS160,促进 GLUT4 的质膜转运过程。

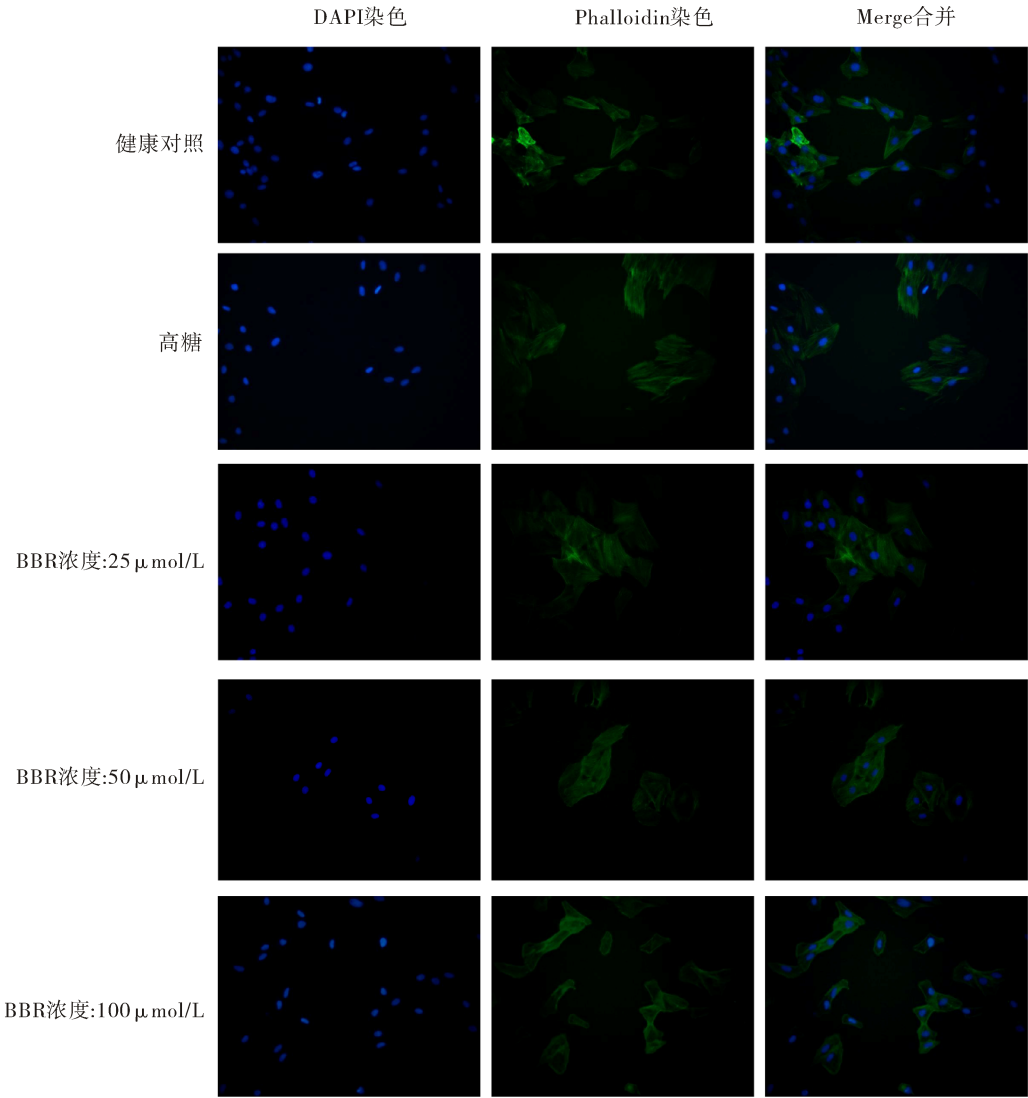
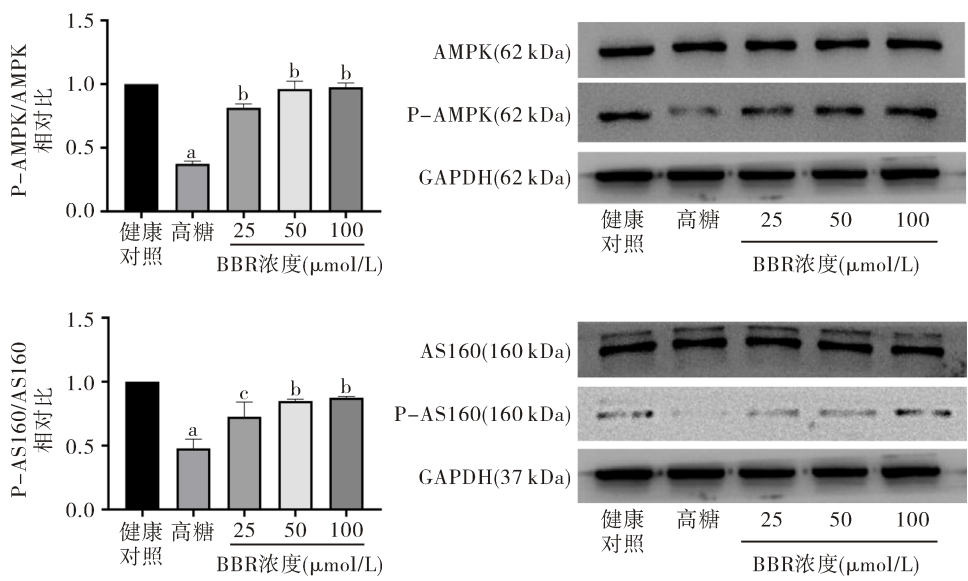
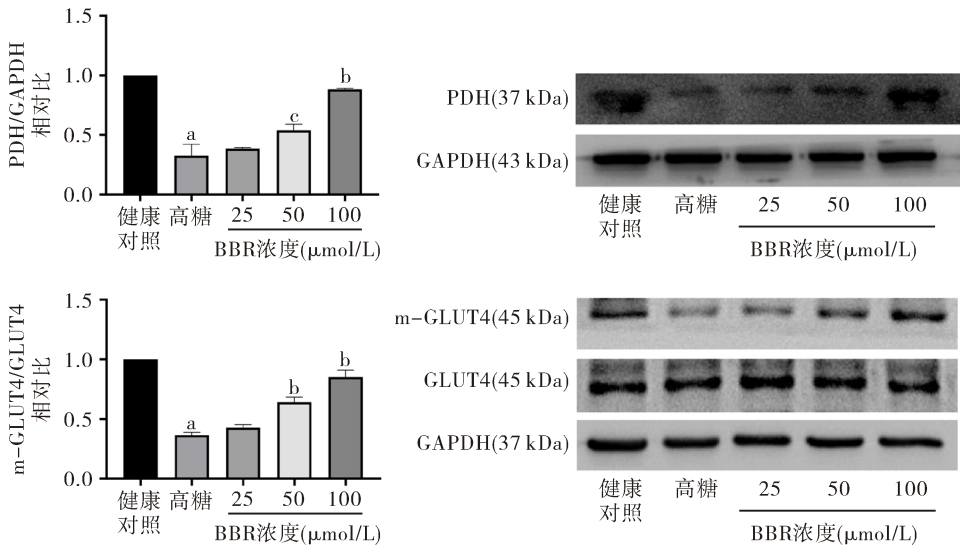


图3 BBR对高糖诱导H9c2(2-1)大鼠心肌细胞形态影响($\times 200$)





注:与健康对照组比较,^a $P < 0.01$;与高糖组比较,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.05$

图 4 BBR 对 AMPK、AS160、PDH 和 GLUT4 蛋白表达的影响($n = 3$)

这提示到小檗碱可通过激活 AMPK 通路改善 HG 诱导心肌细胞葡萄糖代谢障碍情况。但其通过何种方式进入细胞影响 AMPK 还有待进一步考证。

综上所述,本实验阐明了小檗碱可保护心肌细胞,降低 HG 诱导下细胞凋亡率,并激活 AMPK 磷酸化,促进 GLUT4 质膜转运,从而起到治疗 DCM 状态下心肌细胞能量代谢障碍的作用,为治疗 DCM 提供新思路。

参考文献

[1] 王雪萍,李医明,王钊,等. 原花青素类成分在防治 2 型糖尿病作用机制方面的研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(20):28-34.

[2] SHAVER A, NICHOLS A, THOMPSON E, et al. Role of serum biomarkers in early detection of diabetic cardiomyopathy in the west virginian population[J]. Int J Med Sci, 2016,13(3):161-168.

[3] JIA G, HILL M A, SOWERS J R. Diabetic cardiomyopathy: an update of mechanisms contributing to this clinical entity[J]. Circ Res, 2018,122(4):624-638.

[4] 和彩玲,金智生,张花治,等. 红芪多糖对糖尿病心肌病 db/db 小鼠心肌损伤的改善作用[J]. 中国临床药理学杂志,2017,33(5):418-422.

[5] 田静,吕嵘,郭炜. 线粒体障碍在糖尿病性心脏病中的作用及中医药研究进展[J]. 中国中药杂志,2018(1):8-14.

[6] 涂琨,朱水兰,周小妹. 黄芩苷、小檗碱和葛根素体外

胰岛素抵抗细胞差异化降糖作用研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(20):4097-4103.

[7] 唐铭翔,郭莹,周于禄,等. 雷公藤多苷对实验性糖尿病心脏病大鼠的影响[J]. 中国中药杂志,2009,34(6):740-743.

[8] 张羽飞,孟娜娜,李厚忠,等. 柚皮苷对糖尿病大鼠心肌氧化应激及内质网应激的影响[J]. 中国中药杂志,2018,43(3):596-602.

[9] BRUSQ J M. Inhibition of lipid synthesis through activation of AMP kinase: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine[J]. J Lipid Res, 2006,47(6):1281-1288.

[10] RITTERHOFF J. Metabolism in cardiomyopathy: every substrate matters[J]. Circ Res, 2017,113(4):411-421.

[11] 冯新星,陈燕燕. 糖尿病心肌病的研究进展[J]. 中国循环杂志,2015,30(1):87-89.

[12] 李骋,何金枝,周学东,等. 黄连素调控胰岛素抵抗相关 2 型糖尿病的研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(12):2254-2260.

[13] ISFORT M, STEVENS S C W, SCHAFFER S, et al. Metabolic dysfunction in diabetic cardiomyopathy[J]. Heart Fail Rev, 2014,19(1):35-48.

[14] 魏潇,雷建明,郭静文,等. 白藜芦醇抑制高糖诱导的 H9C2 心肌细胞系肥大[J]. 基础医学与临床,2017,37(3):36-40.

(收稿日期:2019-10-17)