

小檗碱对 NIT-1 细胞胰岛素分泌和葡萄糖激酶活性的影响

王增四, 陆付耳*, 陈广, 徐丽君, 王开富, 邹欣

(华中科技大学 同济医学院 附属同济医院 中西医结合研究所, 湖北 武汉 430030)

摘要: 本文探讨小檗碱对 NIT-1 细胞胰岛素分泌的影响及其分子机制。采用不同浓度小檗碱干预 NIT-1 细胞后, 以放射免疫法、液体闪烁计数法、酶法分析及 Western blotting 分别检测其胰岛素水平、葡萄糖利用、葡萄糖激酶 (GK) 活性、GK 和葡萄糖激酶调节蛋白 (GKRP) 的表达。结果表明, 在高浓度葡萄糖刺激下, 与空白对照组相比, 小檗碱组的 NIT-1 细胞胰岛素分泌增加、葡萄糖利用活跃, 且 GK 酶活性增强、GK 表达增加, 而 GKRP 表达降低 ($P < 0.05$)。结果表明, 小檗碱促进 NIT-1 细胞高浓度葡萄糖诱导的胰岛素分泌, 可能与其作为 GK 激活剂, 使 NIT-1 细胞葡萄糖利用增加、GK 酶活性及表达增强有关。

关键词: 小檗碱; 胰岛素; 葡萄糖激酶

中图分类号: R282.71; R963 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)10 - 1045 - 05

Effect of berberine on insulin secretion and glucokinase activity of NIT-1 cells

WANG Zeng-si, LU Fu-er*, CHEN Guang, XU Li-jun, WANG Kai-fu, ZOU Xin

(Institute of Integrative Traditional and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: To investigate the effect of berberine on insulin secretion of NIT-1 cells stimulated by glucose and the possible molecular mechanism, we used radioimmunoassay, scintillation counting technique, enzymatic method and Western blotting to measure the effects of berberine on insulin secretion, glucose utilization, the activity of glucokinase (GK) and protein level of GK and GK regulation protein (GKRP). Compared with untreated group, insulin secretion level, glucose utilization, the activity and protein level of GK in NIT-1 cells stimulated by high concentration of glucose were increased significantly in berberine group ($P < 0.05$), while the protein level of GKRP in berberine group decreased markedly. In conclusion, berberine can promote insulin secretion of NIT-1 cells induced by high concentration of glucose. The possible molecular mechanism may be associated with berberine acting as a GK activator, improving glucose utilization, enhancing the activity and protein expression level of GK, as well as decreased the protein level of GKRP.

Key words: berberine; insulin; glucokinase

葡萄糖激酶 (glucokinase, GK) 发生失功能突变在 2 型糖尿病的发病中越来越受到关注^[1,2], 一系列具有使 GK 发生变构激活活性的化合物也逐渐被发现。研究表明这些 GK 激活剂 (GK activator, GKA) 能使 GK 对葡萄糖的亲合力和最大反应速度

增加, 动物试验也表明 GKA 具有降低血糖、改善糖尿病症状的作用^[1]。从陈其明等^[3]发现黄连的有效成分小檗碱具有降糖作用后, 国内外对其研究日益深入, 大量研究进一步证实了小檗碱不仅具有降糖作用, 还具有促进胰岛素分泌、调脂和改善胰岛素抵抗等功能^[4-6], 但对其作用机制还没有完全阐明。本研究旨在探讨小檗碱 (berberine, Ber) 是否作为一种 GKA 参与 GK 途径而发挥促胰岛素分泌、降糖等作用, 从而为小檗碱治疗糖尿病的临床应用进一

收稿日期: 2007-03-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472254).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 27 - 83663237,

E-mail: felu@tjh.tjmu.edu.cn

步提供实验依据。

材料与方 法

药物与试剂 盐酸小檗碱 ($C_{20}H_{18}ClNO_4 \cdot 2H_2O$)的相对分子质量为 407.85,纯度为 97.4%,四川彭州市西郊植物提取厂产品(批号:060208)。DMEM(美国 Gibco BRL公司);胎牛血清(FBS,澳大利亚 HyClone公司);胰酶(1:250,美国 Amresco公司);生物素(昆明杰辉生物公司); ^{125}I 胰岛素放射免疫分析药盒(北京原子能生物研究所)、氚标葡萄糖(中国原子能科学研究院);GK、GGRP-1抗(美国 Santa Cruz公司); β -actin抗体(美国 Lab Vision公司);考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成公司);增强化学发光法(ECL)试剂盒(美国 Pierce公司);其余试剂均为分析纯。

主要仪器 半自动生化分析仪(山东高密彩虹分析仪器有限公司),电泳仪(北京市六一仪器厂),液体闪烁计数仪(美国 Beckman公司)。

细胞培养 NIT-1细胞购于华中科技大学同济医学院免疫学教研室,用含 10%热灭活的 FBS、L-谷氨酰胺($2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、青霉素($1 \times 10^5\text{ u} \cdot \text{L}^{-1}$)和链霉素($100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的 DMEM低糖培养基于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养,当细胞长至 70%~80%融合后予以传代。

胰岛素分泌实验^[7] 将 NIT-1细胞以细胞数 1×10^5 接种到 24孔培养板中,待细胞生长至 60%~70%融合后予以干预。具体方法如下:弃去板中的培养基,用无葡萄糖的 KRB($\text{NaCl } 118.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2H_2O\ 2.54\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4\ 1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{KCl } 4.74\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{NaHCO}_3\ 25\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\ 1.19\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, HEPES $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.1% BSA, pH 7.4)预孵育 30 min以使细胞对葡萄糖致敏,弃去 KRB,进行如下实验:①加入含葡萄糖浓度为 $5.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 并含不同浓度小檗碱的 KRB。②加入含葡萄糖浓度为 $16.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 并含不同浓度小檗碱的 KRB。③加入含 α 酮异己酸(α -ketoisocaproate, KIC)浓度为 $10.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 并含不同浓度小檗碱的 KRB。④加入含 KIC浓度为 $20.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 并含不同浓度小檗碱的 KRB。以上各组孵育 1 h,收集上清液保存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$,待测。用放射免疫法测定胰岛素含量。

葡萄糖利用测定^[8] 将培养板中 长至 60%~70%融合的 NIT-1细胞用含 1% BSA及 $2.8\text{ mmol} \cdot$

L^{-1} 葡萄糖的 KRB在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下预培养 90 min,以使细胞达到基础代谢状态。将含不同浓度葡萄糖、小檗碱或生物素(biotin, Bio)的 KRB($100\ \mu\text{L}$)加入各孔,每孔中含 2脱氢-[$5\text{-}^3\text{H}$]葡萄糖 $74\ \mu\text{GBq}$,并继续在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养 90 min,加入 5%三氯乙酸 $50\ \mu\text{L}$ 以终止反应,收集上清液于内管,并将其置于含蒸馏水 $500\ \mu\text{L}$ 的体积为 20 mL 的液闪瓶中后将液闪瓶密封,将其在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 中孵育约 12 h以使内管反应液中的 [^3H] H_2O 与液闪瓶中的蒸馏水充分达到平衡,收集液闪瓶中的蒸馏水,加入闪烁液,用液体闪烁计数器计数各管的放射性活度。无细胞的空白管的放射性回收率小于 0.01%。每管中 [^3H] H_2O 回收率通过在 KRB中加入已知浓度 [^3H] H_2O ,并与液闪瓶中 H_2O 平衡得到平衡系数(EQC,约在 60%~80%),裂解细胞,其蛋白浓度采用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒检测,葡萄糖利用($\text{pmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)以下公式计算: $(A_{\text{测量管}} - A_{\text{空白管}}) \cdot (C \cdot \text{EQC} \cdot t \cdot m)^{-1}$,其中 A 为放射性活度, C 为比放射性活度, t 为作用时间, m 为蛋白总量。

GK活性检测^[9] 采用含不同浓度小檗碱、生物素或葡萄糖的 DMEM培养基培养 24 h后,弃培养基, PBS清洗 NIT-1细胞单层 3次,用含 K_2HPO_4 ($20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、EDTA($1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 MgCl_2 ($110\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)以及 DTT($5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的预冷缓冲液收集细胞并超声破碎处理,将处理后的液体在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 以 $12\ 000 \times g$ 离心 5 min,收集上清液。酶活性检测反应液分为高糖($100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和低糖($0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)两组,其组成为: HEPES($50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4), KCl($100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), MgCl_2 ($7.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), DTT($2.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), NAD($0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), BSA($10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), G6PD($2\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), ATP($5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)及不同浓度葡萄糖(16.5 和 $5.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。将含 GK的上清液 $10\ \mu\text{L}$ 加到反应液 $200\ \mu\text{L}$ 中,并于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 温育 1 h,加入 NaHCO_3 ($500\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 9.4) 2 mL 终止反应。在 347 nm 发射光、 448 nm 激发光条件下测定吸光度值。每次测量中,以不含 ATP的 0.5 或 $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖作为空白管。GK活性用 $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖的活性减去 $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖的活性表示。蛋白浓度采用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒检测。用公式计算 GK的活性($\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$): $(A_{\text{高糖}} - A_{\text{低糖}}) \cdot (m \cdot t)^{-1}$,其中 A 为吸光度, m 为蛋白总量, t 为反应时间。

GK及GKRP蛋白表达检测 将 NIT-1 细胞用含葡萄糖、小檗碱或生物素的培养液干预 24 h 后,用三去污细胞裂解液 (Tris·HCl 50 mmol·L⁻¹, NaCl 150 mmol·L⁻¹, 0.02% 叠氮钠, SDS 1 mg·mL⁻¹, PMSF 100 μg·mL⁻¹, 抑蛋白酶肽 1 μg·mL⁻¹, 1% NP-40, 去氧胆酸钠 5 mg·mL⁻¹) 提取蛋白,以考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒检测蛋白浓度。取 40 μg 总蛋白,经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,冰浴下电转移 (200 mA, 4 h) 至硝酸纤维素膜上。用含 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 TBST 溶液 (Tris-HCl 50 mmol·L⁻¹, NaCl 100 mmol·L⁻¹, 0.1% Tween-20, pH 7.4) 室温封闭 2 h。分别加入兔抗鼠 GK 或羊抗鼠 GKRP 抗体 (1:2 000 稀释), 4 ℃ 过夜,洗膜后分别加入 HRP 标记的羊抗兔或兔抗羊 IgG 二抗 (1:6 000 稀释),室温下孵育 2 h。洗膜后加入 ECL 试剂盒, X 射线胶片曝光,随后显影、定影,用激光光密度扫描仪测定蛋白条带的光密度,进行定量分析。

统计学分析 采用 SPSS 12.0 软件,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过单因素方差分析进行组间差异比较,两两比较采用 LSD 检验。

结果

1 小檗碱对 NIT-1 细胞胰岛素分泌的影响

当葡萄糖的浓度为 5.5 mmol·L⁻¹ 时,与空白对照组 (葡萄糖 5.5 mmol·L⁻¹) 比较,小檗碱对 NIT-1 细胞的胰岛素分泌没有显著作用;而当葡萄糖的浓度为 16.5 mmol·L⁻¹ 时,1.0 μmol·L⁻¹ 小檗碱组的胰岛素水平达到 5.721 μU·L⁻¹,与空白对照组 (葡萄糖 16.5 mmol·L⁻¹) 相比差异显著 ($P < 0.05$),见表 1。同样,在 KIC 的浓度为 10 mmol·L⁻¹ 时,小檗碱对 NIT-1 细胞的胰岛素分泌没有显著作用;而当 KIC 的浓度为 20 mmol·L⁻¹ 时,1.0 μmol·L⁻¹ 小檗碱组的胰岛素水平达到 8.912 μU·L⁻¹,与空白对照组 (KIC 20 mmol·L⁻¹) 相比差异显著 ($P < 0.05$),见表 2。

2 小檗碱对 NIT-1 细胞葡萄糖利用的促进作用

当葡萄糖的浓度为 5.5 mmol·L⁻¹ 时,小檗碱各组的葡萄糖利用与空白对照组 (葡萄糖 5.5 mmol·L⁻¹) 相比无显著差异;而当葡萄糖的浓度达到 16.5 mmol·L⁻¹ 时,与空白对照组 (葡萄糖 16.5 mmol·L⁻¹) 相比,小檗碱各组的葡萄糖利用均显著升高 ($P < 0.01$),且与 Bio 组相比无显著性差异,见表 3。

Table 1 Effect of berberine (Ber) on insulin secretion of NIT-1 cells stimulated by glucose

Group	Insulin/μU·L ⁻¹
Glucose (5.5 mmol·L ⁻¹)	4.358 ± 0.608
Glucose (16.5 mmol·L ⁻¹)	4.585 ± 0.567
Glucose (5.5 mmol·L ⁻¹) + Ber (0.5 μmol·L ⁻¹)	5.145 ± 0.962
Glucose (5.5 mmol·L ⁻¹) + Ber (1.0 μmol·L ⁻¹)	5.203 ± 0.973
Glucose (16.5 mmol·L ⁻¹) + Ber (0.5 μmol·L ⁻¹)	5.600 ± 0.586*
Glucose (16.5 mmol·L ⁻¹) + Ber (1.0 μmol·L ⁻¹)	5.721 ± 1.172*

NIT-1 cells were preincubated in KRB for 30 min, then incubated in KRB containing glucose (5.5 or 16.5 mmol·L⁻¹) in the presence or absence of Ber (0.5 or 1.0 μmol·L⁻¹) for 1 h. The concentration of insulin was measured by radioimmunoassay. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs glucose (16.5 mmol·L⁻¹) group

Table 2 Effect of berberine (Ber) on insulin secretion of NIT-1 cells stimulated by KIC

Group	Insulin/μU·L ⁻¹
KIC (10 mmol·L ⁻¹)	5.263 ± 0.427
KIC (20 mmol·L ⁻¹)	6.951 ± 0.202
KIC (10 mmol·L ⁻¹) + Ber (0.5 μmol·L ⁻¹)	5.701 ± 0.369
KIC (10 mmol·L ⁻¹) + Ber (1.0 μmol·L ⁻¹)	5.755 ± 0.495
KIC (20 mmol·L ⁻¹) + Ber (0.5 μmol·L ⁻¹)	8.012 ± 0.275*
KIC (20 mmol·L ⁻¹) + Ber (1.0 μmol·L ⁻¹)	8.912 ± 0.209*

NIT-1 cells were preincubated in KRB for 30 min, then incubated in KRB containing KIC (10 or 20 mmol·L⁻¹) in the presence or absence of Ber (0.5 or 1.0 μmol·L⁻¹) for 1 h. The concentration of insulin was measured by radioimmunoassay. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs KIC (20 mmol·L⁻¹) group

Table 3 Effect of berberine (Ber) on glucose utilization of NIT-1 cells

Group	Glucose utilization / pmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹
Glucose (5.5 mmol·L ⁻¹)	5.690 ± 0.322
Glucose (16.5 mmol·L ⁻¹)	12.218 ± 0.801
Glucose (5.5 mmol·L ⁻¹) + Ber (0.5 μmol·L ⁻¹)	5.986 ± 0.446
Glucose (5.5 mmol·L ⁻¹) + Ber (1.0 μmol·L ⁻¹)	6.509 ± 0.246
Glucose (5.5 mmol·L ⁻¹) + Ber (5.0 μmol·L ⁻¹)	6.948 ± 0.362
Glucose (16.5 mmol·L ⁻¹) + Ber (0.5 μmol·L ⁻¹)	17.045 ± 0.425**
Glucose (16.5 mmol·L ⁻¹) + Ber (1.0 μmol·L ⁻¹)	17.956 ± 0.675**
Glucose (16.5 mmol·L ⁻¹) + Ber (5.0 μmol·L ⁻¹)	19.630 ± 2.026**
Glucose (5.5 mmol·L ⁻¹) + Bio (1.0 μmol·L ⁻¹)	6.652 ± 0.789
Glucose (16.5 mmol·L ⁻¹) + Bio (1.0 μmol·L ⁻¹)	18.547 ± 1.163**

NIT-1 cells were preincubated in KRB containing 2.8 mmol·L⁻¹ glucose for 90 min, then incubated in KRB containing glucose (5.5 or 16.5 mmol·L⁻¹) plus 74 μGBq of 2-dehydro-[5-³H] glucose in the presence or absence of Ber (0.5, 1.0 or 5.0 μmol·L⁻¹) or Bio (1.0 μmol·L⁻¹) at 37 ℃ for 90 min. Glucose utilization was measured by the formation of [³H] H₂O. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs glucose (16.5 mmol·L⁻¹) group

3 小檗碱对 NIT-1细胞 GK活性的影响

当葡萄糖的浓度为 $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,小檗碱各组对 GK活性与空白对照组(葡萄糖 $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)相比无显著影响;而当葡萄糖的浓度达到 $16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,小檗碱各组的 GK活性较空白对照组(葡萄糖 $16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)明显升高 ($P < 0.05$),且与 Bio组相比无显著性差异 ($P > 0.05$),其中小檗碱的浓度为 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 GK活性最高,为 $6.827 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$,见表 4。

Table 4 Effect of berberine (Ber) on GK activity of NIT-1 cells stimulated by glucose

Group	GK activity/ $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
Glucose ($5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.917 ± 0.238
Glucose ($16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.198 ± 0.081
Glucose ($5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Ber ($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.826 ± 0.584
Glucose ($5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Ber ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.977 ± 0.412
Glucose ($5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Ber ($5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	4.074 ± 0.21
Glucose ($16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Ber ($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$5.931 \pm 0.673^*$
Glucose ($16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Ber ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$6.827 \pm 0.844^{**}$
Glucose ($16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Ber ($5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$6.648 \pm 0.375^*$
Glucose ($5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Bio ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.391 ± 0.986
Glucose ($16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Bio ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$6.539 \pm 1.046^*$

NIT-1 cells were stimulated by glucose with different concentration in the absence or presence of Ber ($0.5, 1.0$ or $5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) or Bio ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). $n = 4, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs glucose ($16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) group

4 小檗碱对 NIT-1细胞 GK和 GKR P蛋白表达的影响

当葡萄糖的浓度为 $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,小檗碱各组对 GK和 GKR P的表达与空白对照组(葡萄糖 $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)相比无显著影响;而当葡萄糖的浓度达到 $16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,小檗碱各组对 GK的表达较空白对照组(葡萄糖 $16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)明显升高 ($P < 0.05$),并与 Bio组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。但是,小檗碱各组对 GKR P的表达较空白对照组(葡萄糖 $16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)明显减少 ($P < 0.01$),并与 Bio组相比无显著差异 ($P > 0.05$),见图 1。

讨论

机体内血糖稳定受多种机制的调节,是机体多种组织对空腹或和餐后血糖水平感受后相互调节和共同作用的结果。由于 GK在控制葡萄糖刺激的胰岛素释放和肝脏糖原合成中具有关键作用,以此

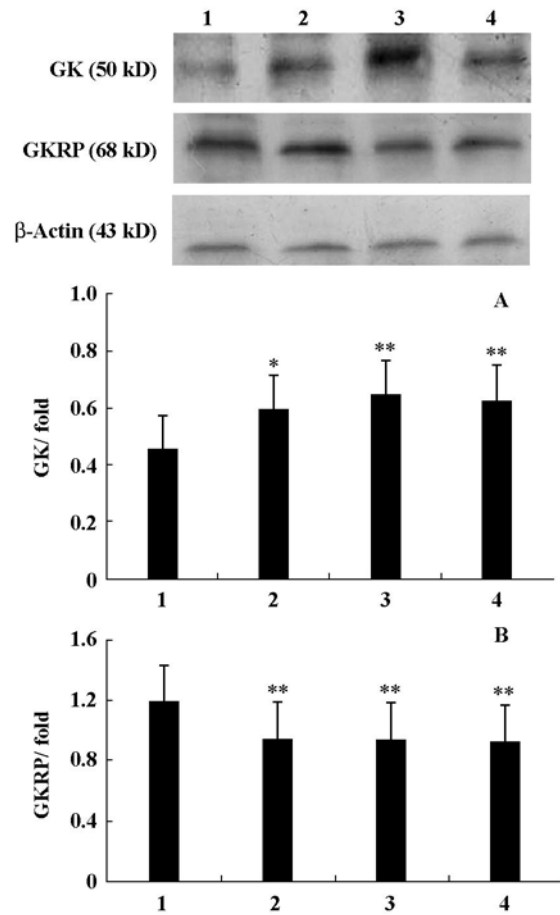


Figure 1 Effect of berberine (Ber) on protein level of GK (A) and GKR P (B) in NIT-1 cells stimulated by glucose. 1: Glucose ($16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 2: Glucose ($16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Ber ($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 3: Glucose ($16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Ber ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 4: Glucose ($16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Bio ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). NIT-1 cells were stimulated by glucose ($16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 24 h in the absence or presence of Ber (0.5 or $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) or Bio ($1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Protein level of GK and GKR P was determined by Western blotting. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs glucose ($16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) group (1)

为治疗靶点,通过提高其活性而显著改善高血糖水平的策略逐渐受到关注^[1]。近年来,已有一系列的 GK变构激活剂被发现,GK变构激活剂通过结合 GK变构位点,使 GK活性增强,GK对其底物葡萄糖的亲合力升高,糖酵解过程中酶促反应的最大反应速率增加,最终促进胰岛素分泌^[1,2,10]。在正常和糖尿病动物模型中也均发现,GKA能通过刺激胰岛细胞释放胰岛素,促进肝脏糖代谢降低血糖。

生物素是一种能促进胰岛细胞内 GK 表达并增强其活性的物质^[11]。为了探讨小檗碱对 NIT-1 细胞胰岛素分泌的影响是否与其作为 GK 激活剂有关,本实验选择生物素作为阳性对照药。本研究结果表明,在高葡萄糖浓度下,小檗碱能明显促进 NIT-1 细胞胰岛素分泌,而在低葡萄糖浓度下则无明显影响,这可能是因为当葡萄糖浓度在 $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时未能达到 GK 对葡萄糖的半数起效浓度 ($S_{0.5} = 8.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[12];而当葡萄糖浓度为 $16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,则超过其 $S_{0.5}$,因而小檗碱能发挥其促胰岛素分泌的功能。另外,本实验还检测了小檗碱对非葡萄糖刺激 (KIC) 的胰岛素分泌的影响。KIC 在胰岛细胞中可以作为磺酰脲类的类似物或谷氨酸或谷胺酰胺氨基转移的底物而起作用,抑制 K_{ATP} 通道开放,促进胰岛素分泌^[13]。实验结果显示,小檗碱能使高浓度 KIC 刺激的胰岛素分泌增强,作者猜测这可能与其抑制 K_{ATP} 通道开放有关。为了进一步探讨小檗碱在高糖浓度下促进胰岛素分泌是否与其对 GK 活性和表达的影响有关,本实验检测了小檗碱对不同浓度葡萄糖时 GK 活性的影响,结果表明,高浓度葡萄糖时经小檗碱干预后 GK 活性增强,与空白对照组相比较有显著性差异 ($P < 0.01$),而与具有促进胰岛细胞 GK 活性的生物素相比无显著性差异;在低浓度葡萄糖时,小檗碱和生物素都对 NIT-1 细胞 GK 活性无明显影响。可见,小檗碱与生物素一样具有增强 GK 活性的作用。在胰岛细胞内, GK 的表达主要受到高浓度葡萄糖的调控,因为高浓度葡萄糖能使 GK 发生翻译后修饰,导致 GK 表达增强^[12]。本实验检测结果显示,与空白对照组相比在高浓度葡萄糖时小檗碱能使胰岛细胞内 GK 表达增加, GKR P 表达减少,这种差异与生物素组相比无显著差异,而在低浓度葡萄糖时小檗碱的这些作用与空白对照组比较均无显著差异,这与以上胰岛素分泌、糖利用等结果一致。

综上所述,作者认为小檗碱促进胰岛细胞胰岛素分泌、降低血糖可能通过以下机制发挥作用:在高糖浓度下,小檗碱使细胞内 GK 表达增加, GKR P 表达减少,导致细胞核内 GK、GKR P 解离, GK 从细胞核向细胞浆转移,使其从无催化活性状态转变为具有催化活性的“开放状态”^[2],最终导致胰岛细胞内葡萄糖利用增加,胰岛素分泌增加,血糖降低。本实验已研究了小檗碱作为 GK 激活剂的作用机制,但其对 NIT-1 细胞是否具有 GK 变构激活的功能,还

有待于进一步研究。

References

- [1] Grimsby J, Sarabu R, Corbett WL, et al. Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy [J]. *Science*, 2003, 301: 370 - 373.
- [2] Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, et al. Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase [J]. *Structure*, 2004, 12: 429 - 438.
- [3] Chen QM, Xie MZ. Studies on the hypoglycemic effect of *Coptis chinensis* and berberine [J]. *Acta Pharm Sin (药理学报)*, 1986, 21: 401 - 406.
- [4] Leng SH, Lu FE, Xu LJ. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25: 496 - 502.
- [5] Lee YS, Kim WS, Kim KH, et al. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states [J]. *Diabetes*, 2006, 55: 2256 - 2264.
- [6] Kong W, Wei J, Abidi P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins [J]. *Nat Med*, 2004, 10: 1344 - 1351.
- [7] Yang J, Wong RK, Wang X, et al. Leucine culture reveals that ATP synthase functions as a fuel sensor in pancreatic β -cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 53915 - 53923.
- [8] García-Ocaña A, Vasavada RC, Cebrian A, et al. Transgenic overexpression of hepatocyte growth factor in the β -cell markedly improves islet function and islet transplant outcomes in mice [J]. *Diabetes*, 2001, 50: 2752 - 2762.
- [9] Aalink R, Srinivasan M, Kalhan SC. A dietary intervention (high carbohydrate) during the neonatal period causes islet dysfunction in rats [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1999, 277: 1061 - 1069.
- [10] Efanov AM, Barnett DG, Brenner MB, et al. A novel glucokinase activator modulates pancreatic islet and hepatocyte function [J]. *Endocrinology*, 2005, 146: 3696 - 3701.
- [11] Navarro GR, Valladares GC, Geman MS, et al. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats [J]. *Endocrinology*, 1999, 140: 4595 - 4600.
- [12] Matschinsky FM. Regulation of pancreatic β -cell glucokinase from basics to therapeutics [J]. *Diabetes*, 2002, 51: S394 - S404.
- [13] Heissig H, Urban KA, Hastedt K, et al. Mechanism of the insulin-releasing action of α -ketoisocaproate and related α -keto acid anions [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68: 1097 - 1105.