基础医学

丝胶通过PI3K/Akt信号通路对受损INS-1细胞糖酵解的调控作用

李雨欣，韩思雨，易梦雅，李警耀，陈志宏*
（承德医学院基础医学院，河北承德 067000）

摘要： **目的** 观察丝胶对链脲佐菌素（STZ）致损伤大鼠胰岛素瘤细胞（INS-1细胞）PI3K/Akt信号通路和糖酵解的调控作用。**方法** 实验以体外培养的INS-1细胞为研究对象随机分为五组，正常对照组、模型组、丝胶组、Akt1抑制剂组、Akt1激动剂组。运用蛋白印迹和实时荧光定量PCR法检测各分组细胞的磷脂酰肌醇-3-激酶（PI3K），蛋白激酶B（Akt），磷酸果糖激酶-1（PFK1），6-磷酸果糖-2,6-二磷酸酶（PFKFB2）的蛋白及mRNA的表达情况。**结果** 与正常对照组相比，模型组PI3K，p-Akt，PFK1，PFKFB2的蛋白表达显著下降（$P<0.05$）；丝胶组与模型组相比PI3K，p-Akt，PFK1，PFKFB2的蛋白表达显著增高（$P<0.05$）；Akt1抑制剂组与丝胶组相比，p-Akt，PFK1，PFKFB2的蛋白表达显著降低（$P<0.05$）；Akt1激动剂组与丝胶组相比，p-Akt，PFK1，PFKFB2的蛋白呈现上升的趋势。各组INS-1细胞中PI3K，Akt，PFK1，PFKFB2 mRNA的变化趋势与蛋白一致。**结论** 丝胶对STZ致损伤INS-1细胞发挥保护作用的机制可能是，靶向Akt1影响PI3K/Akt信号通路增强糖酵解。

关键词： 丝胶；糖尿病；INS-1细胞；PI3K/Akt信号通路；糖酵解
中图分类号： R587.1　　**文献标志码：** A　　**文章编号：** 1004-6879(2024)03-0181-04

Regulatory Effects of Sericin on Glycolysis of Damaged INS-1 Cells through PI3K/Akt Signal Pathway

LI Yu-xin, HAN Si-yu, YI Meng-ya, LI Jing-yao, CHEN Zhi-hong*
(School of Basic Medicine, Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China)

Abstract: **Objective** To observe the regulatory effects of sericin on PI3K/Akt signal pathway and glycolysis of INS-1 cells injured by streptozotocin (STZ). **Methods** INS-1 cells cultured in vitro were randomly divided into five groups. Normal control group, model group, sericin group, Akt1 inhibitor group and Akt1 agonist group. Western blotting and real-time fluorescence quantitative PCR were used to detect the expression of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), phosphofructosekinase-1 (PFK1), 6-phosphofructose-2,6-diphosphatase (PFKFB2) protein and mRNA. **Results** Compared with the normal control group, the protein expression of PI3K, p-Akt, PFK1, PFKFB2 of INS-1 cells in the model group decreased significantly ($P<0.05$). The protein expression of PI3K, p-Akt, PFK1, PFKFB2 of INS-1 cells in the sericin group were significantly higher than that in the model group ($P<0.05$). The protein expression of p-Akt, PFK1, PFKFB2 of INS-1 cells in the Akt1 inhibitor group were significantly lower than that in the sericin group ($P<0.05$). Compared with sericin group, the protein expression of p-Akt, PFK1 and PFKFB2 showed an upward trend in the Akt1 agonist group. The change trend of PI3K, Akt, PFK1, PFKFB2 mRNA expression in INS-1 cells of each group were consistent with that of protein. **Conclusion** The protective mechanism of sericin on STZ-induced injury of INS-1 cells may be that targeted Akt1 affects PI3K/Akt signal pathway and enhances glycolysis.

Key words: sericin; diabetes; INS-1 cells; PI3K/Akt signaling pathway; glycolysis

资助项目：河北省“三三三人才工程”资助项目（A2016005063）；承德医学院优势学科B资助
*通讯作者

糖尿病是一种全球流行病，预计到2030年全球糖尿病患病人数将达到6.43亿。糖尿病时机体糖代谢发生异常，在糖代谢的多种途径中糖酵解占有一定的比例[2]。研究发现[4]，磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase，PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B，Akt)信号通路参与许多生物学过程，包括葡萄糖代谢[3]。糖尿病时，PI3K/Akt信号通路被抑制；导致其下游的糖酵解关键酶磷酸果糖激酶(phosphofructokinase-1，PFK1)表达下调，糖酵解过程受损[5]。因此考虑，是否可以通过调控糖酵解改善糖代谢、降低血糖，从而治疗糖尿病。本课题组前期实验发现[4]，丝胶具有明显降低血糖的作用，但丝胶降血糖的机制尚不明确。本研究以PI3K/Akt信号通路调控糖酵解为切入点，探讨丝胶对受损INS-1细胞发挥保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大鼠胰岛素瘤细胞、特级胎牛血清(武汉普诺赛)；STZ、丝胶蛋白(美国Sigma公司)；RPMI Medium 1640 basic (1×，美国Gibco公司)；β-巯基乙醇(北京索莱宝)；β-actin兔抗单克隆抗体(美国Abclonal公司)；PI3K兔抗多克隆抗体(美国Abcam公司)；p-Akt兔抗多克隆抗体(美国CST公司)；PFK1兔抗多克隆抗体(武汉三鹰)；6-磷酸果糖-2,6-二磷酸酶(6-phosphofructose-2,6-diphosphatase，PFKFB2)兔抗多克隆抗体(美国Abclonal公司)；辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG(美国KPL公司)；PCR引物(上海生工工程有限公司)。

1.2 细胞培养与实验分组

INS-1细胞培养在RPMI-1640培养基(含10%胎牛血清和50 μmol/L的β-巯基乙醇)、37℃、5% CO_2培养箱培养，取对数生长期细胞进行实验。

INS-1细胞随机分为5组，正常对照组(不予任何药物处理)、模型组(10 mmol/L STZ处理细胞24 h)、丝胶组(10 mmol/L的STZ、600 μg/mL的丝胶共同处理细胞24 h)、Akt1抑制剂组(10 mmol/L的STZ、600 μg/mL的丝胶、0.3 μmol/L A-674563共同处理细胞24 h)Akt1激动剂组(10 mmol/L的STZ、600 μg/mL的丝胶、0.8 μmol/L SC79共同处理细胞24 h)。

1.3 蛋白印迹技术检测INS-1细胞PI3K，p-Akt，PFK1，PFKFB2蛋白的表达

药物作用24 h后向INS-1细胞中加入RIPA裂解液(含1%的PMSF)，于-80℃冰箱过夜。提取各组INS-1细胞的总蛋白，并根据BCA蛋白定量试剂盒说明书操作，测定蛋白浓度。每孔上样量为30 μg，进行SDS-PAGE凝胶电泳(分离胶浓度12%，浓缩胶浓度5%)，恒压120 V电泳50 min，150 mA恒流转膜1.5 h，然后将蛋白转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上，用含5%脱脂奶粉的TBST封闭2 h。加入TBST稀释的抗体反应液，分别为PI3K(1∶1000)，p-Akt(1∶1000)，PFK1(1∶1000)，PFKFB2(1∶1000)，β-actin(1∶10000)，室温孵育2 h，TBST清洗后加入TBST稀释的二抗(1∶10000)，室温孵育1 h。TBST清洗后，Super ECL Plus超敏发光液显影后扫描条带，测定指标蛋白条带与相应β-actin条带的灰度值，使用Image J软件分析二者的比值，作为各指标蛋白的相对表达水平。

1.4 实时荧光定量PCR法检测INS-1细胞PI3K，Akt，PFK1，PFKFB2 mRNA的表达

药物作用24 h后，将INS-1细胞用PBS清洗一遍，然后在各组细胞中加入Trizol溶液，离心后取上层水相，通过异丙醇沉淀提取总RNA，测定各组RNA浓度并逆转录为cDNA。配置扩增反应体系混合液共20 μL，根据设定程序进行扩增。各检测指标的引物序列(引物购于上海生工工程有限公司)见表1。以各组样品指标拷贝数与相应GAPDH拷贝数的比值作为各目的基因mRNA的相对表达水平。采用公式$2^{-\triangle\triangle Ct}$法代入各组CT值进行定量数据分析。

表1 各检测指标的引物序列

检测指标	引物序列(5'-3')
PI3K	F：GATAGACCACCGCTTCCTCCTC R：TGCCCTGTTCCTCTGCCTTC
Akt	F：ATCGTGTGGCAAGATGTGTATGAG R：AGGCGGCGTGATGGTGATC
PFK1	F：CCATCGCCGTGTTGAC R：CCGTGAAGATGCCAACTCGTACC
PFKFB2	F：GGTCAACAGAGTTCAGGACTACATC R：ACAGATAGATGGTGCGAGGATGG
GAPDH	F：GACATGCCGCCTGGAGAAAC R：AGCCCAGGATGCCCTTTAGT

1.5 统计学处理

应用SPSS 25.0统计学软件处理数据，正态齐性检验$P>0.05$时，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采

用LSD-*t*检验，以$P<0.05$为差异具有统计学意义。实验数据均以($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

2.1 各实验组INS-1细胞中PI3K，p-Akt，PFK1，PFKFB2蛋白的表达

与正常对照组相比，模型组INS-1细胞PI3K，p-Akt，PFK1，PFKFB2的蛋白表达显著下降($P<0.05$)。与模型组相比，丝胶组INS-1细胞PI3K，p-Akt，PFK1，PFKFB2的蛋白表达显著增高($P<0.05$)。与丝胶组相比，Akt1抑制剂组INS-1细胞PI3K的蛋白表达无明显差异；p-Akt，PFK1，PFKFB2的蛋白表达明显降低($P<0.05$)。与丝胶组相比，Akt1激动剂组INS-1细胞PI3K的蛋白表达无明显差异；p-Akt，PFK1，PFKFB2蛋白表达有上升趋势。见图1。

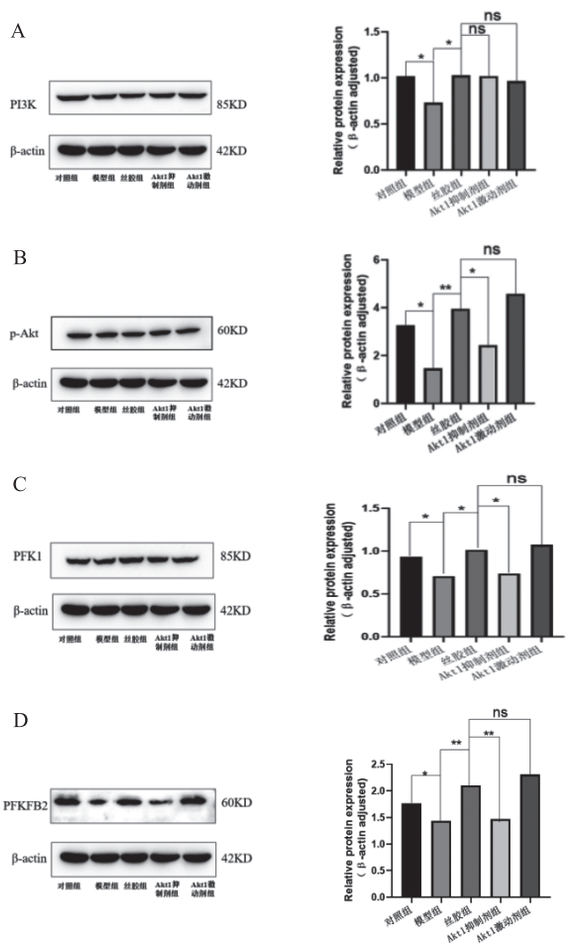


图1 各实验组INS-1细胞PI3K，p-Akt，PFK1，PFKFB2的蛋白表达

A. PI3K；B. p-Akt；C. PFK1；D. PFKFB2；$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

2.2 各实验组INS-1细胞中PI3K，Akt，PFK1，PFKFB2 mRNA的表达

与正常对照组相比，模型组INS-1细胞PI3K，Akt，PFK1，PFKFB2的mRNA表达显著下降($P<0.05$)。与模型组相比，丝胶组INS-1细胞PI3K，Akt，PFK1，PFKFB2的mRNA表达显著增高($P<0.05$)。与丝胶组相比，Akt1抑制剂组INS-1细胞PI3K的mRNA表达无明显差异；Akt，PFK1，PFKFB2的mRNA表达明显降低($P<0.05$)。与丝胶组相比，Akt1激动剂组INS-1细胞PI3K的mRNA表达无明显差异；Akt，PFK1，PFKFB2的mRNA表达有上升趋势。见表2。

表2 各实验组INS-1细胞中PI3K，Akt，PFK1，PFKFB2 mRNA的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	PI3K mRNA	Akt mRNA	PFK1 mRNA	PFKFB2 mRNA
对照组	1.0000±0.0000	1.0000±0.0000	1.0000±0.0000	1.0000±0.0000
模型组	0.4590±0.0273*	0.7132±0.0506*	0.6749±0.0502*	0.5486±0.1121*
丝胶组	0.7026±0.0598$^{\#}$	0.9781±0.2036$^{\#}$	0.9127±0.1217$^{\#}$	0.8346±0.1122$^{\#}$
Akt1抑制剂组	0.5528±0.1653	0.6621±0.8914$^{\$}$	0.5424±0.0495$^{\#}$	0.5739±0.1448$^{\#}$
Akt1激动剂组	0.8793±0.0675	1.2527±0.1260$^{\$}$	1.6734±0.2441$^{\$}$	0.8451±0.2060

$^{*}P<0.05$ *vs.*对照组；$^{\#}P<0.05$ *vs.* STZ组；$^{\$}P<0.05$ *vs.* 丝胶组

3 讨论

糖尿病作为一种慢性消耗性疾病，也称为“消渴病”，是一种以血糖升高为主的多系统损伤疾病，典型的临床症状为“三多一少”，即多饮、多食、多尿、体重减轻[6]。目前，糖尿病在世界的发病率逐年上升，虽然临床药物控制血糖的疗效显著，但这些药物有一定的副作用，对患者的远期预后造成影响。因此，寻求疗效佳，毒副作用少的天然物质变得刻不容缓。丝胶源于蚕茧，具有抗氧化、抗菌、抗细胞凋亡和抗凝的性能[7]。并且，民间已有温水煮蚕茧辅助降血糖的方法。本课题组前期实验表明[4]，丝胶具有明显的降低血糖作用，但丝胶发挥保护作用的具体机制还不清楚。

胰岛B细胞的作用是根据血糖水平的变化分泌胰岛素，将血糖水平维持在一定的范围内。胰岛B细胞功能缺陷是糖尿病的一大特征。胰岛B细胞的葡萄糖反应随着糖尿病的进展而下降，这与B细胞功能减退的进程是一致的[8,9]。葡萄糖诱导胰岛素分泌受两条信号通路调控，即触发通路和放大通路，这两者都需要B细胞的葡萄糖代谢[10]。放大通路被触发的特征是细胞内ATP水平的增加，使得对ATP敏感的K^{+}(KATP)通道被抑制，导致膜去极化并且使电压依赖的Ca^{2+}通道打开，细胞内Ca^{2+}内流增

加，刺激了胰岛素颗粒胞外分泌，使胰岛素分泌增加[11]。因此，B细胞葡萄糖代谢是胰岛素分泌调节的中心。糖酵解在葡萄糖代谢中占有一定的比例，B细胞糖酵解的改变是一个关键的代谢特征，也是2型糖尿病的潜在治疗靶点[8]。

糖酵解是氧化磷酸化和三羧酸循环共同开始的步骤，参与这个过程的限速酶之一是PFK1。PFK1将6-磷酸果糖转化为果糖-1,6-二磷酸（fructose-1,6-diphosphate，F-1,6-BP），F-1,6-BP是确定糖酵解通量的主要限速步骤，在糖代谢中发挥着重要作用[1]。B细胞上亦存在胰岛素PI3K/Akt信号通路，主要作用是维持B细胞的生长和增殖以及调控胰岛素分泌等[4]。另外，PI3K/Akt信号通路与多种酶促生物学效应和葡萄糖代谢密切相关[3]。PI3K活化后促进Akt磷酸化，磷酸化的Akt可导致PFKFB2磷酸化，PFKFB2磷酸化后可使2, 6-磷酸果糖产生增多，进而促进PFK1活化，而PFK1是糖酵解的关键限速酶，从而导致糖酵解增加[12,13]。

本研究发现，STZ致损伤INS-1细胞PI3K，p-Akt的表达量显著降低，同时糖酵解相关PFKFB2，PFK1的表达也显著降低，说明胰岛B细胞损伤后胰岛素PI3K/Akt信号通路转导异常，通路活性下降，使INS-1细胞糖酵解障碍。给予丝胶处理STZ致损伤INS-1细胞，PI3K、p-Akt、PFKFB2、PFK1的表达量均显著升高，说明丝胶可通过激活胰岛素PI3K/Akt信号通路，促进INS-1细胞糖酵解，这可能是丝胶发挥保护作用的机制之一。本课题组前期采用Label-free定量蛋白质组学结合生物信息学技术，对丝胶干预下STZ致损伤INS-1细胞的差异蛋白进行鉴定和分析，预测丝胶发挥干预作用的关键节点分子之一可能为Akt1。为此，本研究在丝胶干预的STZ致损伤INS-1细胞中分别加入Akt1抑制剂和激动剂，分析丝胶发挥作用的靶点。结果显示，与丝胶干预组相比，加入Akt1抑制剂后p-Akt、PFKFB2、PFK1的表达下降，差异具有统计学意义；加入Akt1激动剂后，与丝胶干预组比较p-Akt、PFKFB2、PFK1表达有升高趋势。进一步说明，丝胶发挥保护作用是通过靶向Akt1影响PI3K/Akt信号通路增强糖酵解实现。

综上所述，丝胶可通过激活PI3K/Akt信号通路，增强糖酵解，改善胰岛B细胞代谢，从而对STZ致损伤INS-1细胞发挥保护作用，且其发挥作用的靶点为Akt1，考虑这是丝胶发挥抗糖尿病作用的机制之一。

参考文献

[1] Song C, Wang S, Fu Z, et al. IGFBP5 promotes diabetic kidney disease progression by enhancing PFKFB3-mediated endothelial glycolysis[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(4): 340.

[2] 陈宇婷. 增强的角膜糖酵解通过Keap1/Nrf2通路上调MMP-9表达参与糖尿病相关干眼发病[D]. 广州：南方医科大学，2023.

[3] Xie Y, Shi X, Sheng K, et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review)[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(2): 783-791.

[4] 刘美晓，孙一婵，侯丽娜，等. 丝胶对2型糖尿病大鼠胰腺胰岛素PI3K-Akt信号通路的调节作用[J]. 解剖学报，2016，47(6)：807-811.

[5] 余虹霓，孙梦捷，王凤丽，等. 地黄饮子调节PI3K/Akt信号通路保护AD小鼠脑组织星形胶质细胞损伤及糖酵解的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29(8)：10-18.

[6] Nair ATN, Wesolowska-Andersen A, Brorsson C, et al. Heterogeneity in phenotype, disease progression and drug response in type 2diabetes[J]. Nat Med, 2022, 28(5): 982-988.

[7] El-Samad LM, Hassan MA, Basha AA, et al. Carboxymethyl cellulose/sericin-based hydrogels with intrinsic antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory properties promote re-epithelization of diabetic wounds in rats[J]. Int J Pharm, 2022, 629: 122328.

[8] Murao N, Yokoi N, Takahashi H, et al. Increased glycolysis affects β-cell function and identity in aging and diabetes[J]. Mol Metab, 2022, 55: 101414.

[9] Swisa A, Glaser B, Dor Y. Metabolic Stress and Compromised Identity of Pancreatic Beta Cells[J]. Front Genet, 2017, 8: 21.

[10] Henquin JC. Regulation of insulin secretion, a matter of phase control and amplitude modulation[J]. Diabetologia, 2009, 52(5): 739-751.

[11] Prentki M, Matschinsky FM, Madiraju SR. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion[J]. Cell Metab, 2013, 18(2): 162-185.

[12] Pilkis S, Claus T, KurlandI, et al. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, a metabolic signaling enzyme[J]. Annu Rev Biochem, 1995, 64: 799-835.

[13] Lee JH, Liu R, Li J, et al. EGFR-Phosphorylated Platelet Isoform of Phosphofructokinase 1 Promotes PI3K Activation[J]. Mol Cell, 2018, 70(2): 197-210.

（收稿日期：2023-11-07）