丝胶靶向Akt1调控PI3K/Akt信号通路促进STZ致损伤INS-1细胞增殖

韩思雨，李雨欣，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 探讨丝胶是否通过靶向Akt1调控磷酸肌醇-3-激酶（PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）信号通路促进链脲佐菌素（STZ）致损伤大鼠胰岛素瘤细胞（INS-1细胞）增殖。**方法** INS-1细胞随机分为4组：对照组（不予任何处理）、模型组（给予10 mmol/L STZ处理细胞）、丝胶组（给予10 mmol/L STZ+600 μg/mL丝胶处理细胞）、抑制剂组（给予10 mmol/L STZ+600 μg/mL丝胶+0.3 mmol/L的Akt1抑制剂A-674563处理细胞）。药物作用时间均为24 h。CCK-8法检测各组INS-1细胞存活率。免疫蛋白印迹法（western blot）检测PI3K/Akt信号通路相关蛋白PI3K、p-Akt和增殖相关蛋白增殖细胞核抗原（PCNA）、细胞核增殖相关抗原Ki67（Ki67）的表达情况。**结果** 与对照组相比，模型组INS-1细胞存活率下降（$P<0.05$），PI3K、p-Akt1、PCNA和Ki67的蛋白表达显著下降（$P<0.05$）；与模型组相比，丝胶组INS-1细胞存活率上升（$P<0.05$），PI3K、p-Akt1、PCNA和Ki67的蛋白表达显著增多（$P<0.05$）；与丝胶组相比，抑制剂组INS-1细胞存活率下降（$P<0.05$），p-Akt1、PCNA和Ki67的蛋白表达显著下降（$P<0.05$）。**结论** 丝胶具有促进STZ致损伤INS-1细胞增殖的作用，其作用机制与丝胶通过靶向Akt1调控PI3K/Akt信号通路有关。

关键词： 丝胶；2型糖尿病；INS-1细胞；增殖
中图分类号： R587.1　　**文献标志码：** A　　**文章编号：** 1004-6879(2024)02-0096-05

Sericin Targeting Akt1 Regulates PI3K/Akt Signaling Pathway to Promote Proliferation of INS-1 Cells Damaged by STZ

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

Abstract: **Objective** To investigate whether sericin promotes proliferation of streptozotocin (STZ) damaged insulinoma cells (INS-1 cells) through targeting Akt1 regulates PI3K/Akt signaling pathway. **Methods** INS-1 cells were randomly divided into four groups. In control group, INS-1 cells were cultured under conventional conditions without other treatments. In model group, INS-1 cells were cultured with 10 mmol/L STZ. In sericin group, INS-1 cells were cultured with 10 mmol/L STZ and 600 μg/mL sericin. In inhibitor group, INS-1 cells were cultured with 10 mmol/L STZ, 600 μg/mL sericin and 0.3 mmol/L Akt1 inhibitor A-674563. The cells in four groups were cultured with corresponding drugs respectively for 24h. The survival rate of INS-1 cells in each group was detected by CCK-8 method. Western blot was used to detect the expression of PI3K/Akt signaling pathway related proteins PI3K and p-Akt, and proliferation related proteins PCNA and Ki67. **Results** The survival rate, and the protein expressions of PI3K, p-Akt1, PCNA, and Ki67 of INS-1 cells in model group significantly decreased compared with control group ($P<0.05$). The survival rate, and the protein expressions of PI3K, p-Akt1, PCNA, and Ki67 of INS-1 cells in sericin group significantly increased compared with model group ($P<0.05$). The survival rate, and the protein expressions of PI3K, p-Akt1, PCNA, and Ki67 of INS-1 cells in inhibitor group significantly decreased compared with sericin group ($P<0.05$). **Conclusion** Sericin can protect proliferation of INS-1 cells damaged by STZ, and the protective mechanisms may related to target Akt1 regulates PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: sericin; type 2 diabetes mellitus; INS-1 cells; proliferation

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(diabetes mellitus,DM)是一种慢性代谢性疾病,其特征在于胰岛素分泌缺陷、胰岛素生物作用受损或两者兼有引起的高血糖[1]。其中,90%以上的糖尿病病例为2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)[2]。T2DM的发病机制复杂,是环境因素和遗传因素共同作用的结果。目前,尚未发现有效的方法根治T2DM。

本课题组前期研究发现,丝胶有良好的抗糖尿病功效[3-5]。前期应用非标记定量(Label-free)蛋白质组学和生物信息学方法时发现,Akt1可能为丝胶蛋白抗糖尿病的关键节点。磷酸肌醇-3-激酶(phosphate inositol-3-kinase,PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B,Akt)信号通路是胰岛素下游重要的信号转导途径,能够调控细胞生长、自噬、增殖等多种生物学行为[6]。PI3K/Akt信号通路受到抑制会导致T2DM的发生和发展[7]。为探讨丝胶抗糖尿病作用的可能机制及靶点,本研究观察了丝胶干预后链脲佐菌素(streptozocin,STZ)致损伤INS-1细胞PI3K/Akt信号通路相关蛋白、增殖相关蛋白的表达及INS-1细胞存活率,并观察了使用Akt1特异性抑制后上述指标的变化,以期为深入探讨丝胶抗糖尿病的机制及糖尿病的临床治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 大鼠胰岛素瘤细胞(武汉普诺赛生物技术有限公司)。

1.1.2 主要试剂 丝胶(日本和光株式会社)、STZ(美国Sigma-Aldrich公司)、特级胎牛血清(武汉普诺赛生物技术有限公司)、RPMI-1640基础培养基(美国赛默飞世尔科技公司)、β-巯基乙醇(北京索莱宝科技有限公司)、PI3K抗体(英国Abcam公司)、p-Akt1抗体(美国Cell Signaling Technology公司)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)抗体和Ki67抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司)、β-actin抗体(美国ABclonal公司)。

1.2 细胞培养及分组处置

1.2.1 INS-1细胞培养 完全培养基=85% RPMI-1640基础培养基+10% FBS+5%双抗+50 μmol/L β-巯基乙醇。培养条件:37 ℃,5% CO_2培养箱。

1.2.2 INS-1细胞分组及处置 将对数生长期的INS-1细胞随机分为4组:对照组、模型组、丝胶组和抑制剂组。对照组,将INS-1细胞按上述条件培养;模型组,即STZ致损伤组,向INS-1细胞完全培养基中加入浓度为10 mmol/L的STZ;丝胶组,向INS-1细胞完全培养基中加入浓度为10 mmol/L的STZ和浓度为600 μg/mL丝胶;抑制剂组为Akt1抑制剂组,向INS-1细胞完全培养基中加入浓度为10 mmol/L的STZ、浓度为600 μg/mL丝胶和浓度为0.3 mmol/L的Akt1抑制剂A-674563[8]。各组细胞药物作用时间均为24 h。

1.3 CCK-8法检测INS-1细胞的存活率

加入完全培养基将对数生长期INS-1细胞配置成细胞悬液,在96孔板中每孔接种100 μL细胞悬液(约为1×10^4个细胞/孔)。设置空白调零孔(含有完全培养基,不含细胞)。将96孔板在培养箱中培养24h。

取出96孔板,吸弃培养基,向96孔板中按照上述分组加入药物。将96孔板在培养箱中培养24 h。

取出96孔板,吸弃含药物培养基,每孔加入100 μL的完全培养基和10 μL的CCK-8溶液,37 ℃培养箱孵育2 h。从培养箱中取出96孔板,使用酶标仪测量450 nm处的吸光度,计算细胞存活率。

细胞存活率(%)=[(As-Ab)/(Ac-Ab)]×100。

As=实验孔吸光度(即模型组、丝胶组和抑制剂组的孔的吸光度)。

Ab=空白孔吸光度(即空白调零孔的吸光度)。

Ac=对照孔吸光度(即对照组的孔的吸光度)。

1.4 蛋白印记技术检测INS-1细胞PI3K、p-Akt1、PCNA和Ki67蛋白的表达

各组细胞药物处理24 h后向INS-1细胞中加入含1% PMSF的蛋白裂解液,置于-80 ℃冰箱过夜。提取各组INS-1细胞的总蛋白。收集完各组样品后,使用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,并确定30 μg的蛋白上样量。

SDS-PAGE凝胶电泳后转膜(稳流150 mA,转膜时间为0.5~4 h),5%脱脂奶粉封闭2 h,一抗(稀释比例为1∶500~1∶1000)室温孵育0.5 h后置于4 ℃冰箱过夜孵育,洗膜3次(时间分别为15 min、10 min、10 min),二抗(稀释比例为1∶10000)室温孵育1 h,洗膜3次(5 min/次),Super ECL Plus超敏发光液显影,分别测定目的蛋白条带与相应β-actin条带的灰度值,使用Image J软件分析两者的比值,作为各指标蛋白的相对表达水平。

1.5 统计学分析

应用SPSS 26.0统计学软件处理数据,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,检验

结果以$P<0.05$为差异具有统计学意义。实验所得数据均以($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

2.1 各实验组INS-1细胞的存活率

与对照组相比，模型组INS-1细胞存活率显著降低($P<0.05$)；与模型组相比，丝胶组INS-1细胞存活率显著升高($P<0.05$)；与丝胶组相比，抑制剂组存活率显著降低($P<0.05$)。各实验组INS-1细胞的存活率结果见图1。

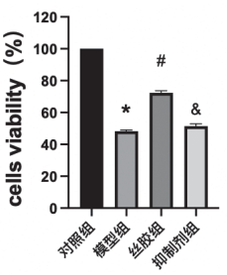


图1 各实验组INS-1细胞的存活率

*$P<0.05$ vs 对照组；#$P<0.05$ vs 模型组；&$P<0.05$ vs 丝胶组

2.2 各实验组INS-1细胞PI3K/Akt信号通路相关蛋白PI3K、p-Akt1的表达

与对照组相比，模型组PI3K/Akt信号通路相关蛋白PI3K和p-Akt1的表达显著降低($P<0.05$)；与模型组相比，丝胶组PI3K/Akt信号通路相关蛋白PI3K和p-Akt1的表达显著升高($P<0.05$)；抑制剂组PI3K/Akt信号通路相关蛋白PI3K的表达与丝胶组比较无明显差异($P>0.05$)，抑制剂组PI3K/Akt信号通路相关蛋白p-Akt1的表达与丝胶组相比显著降低($P<0.05$)。各实验组INS-1细胞PI3K/Akt信号通路相关蛋白PI3K、p-Akt1的表达见图2和图3。

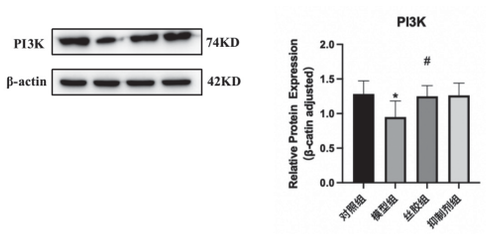


图2 各实验组INS-1细胞中PI3K蛋白的表达

*$P<0.05$ vs 对照组；#$P<0.05$ vs 模型组

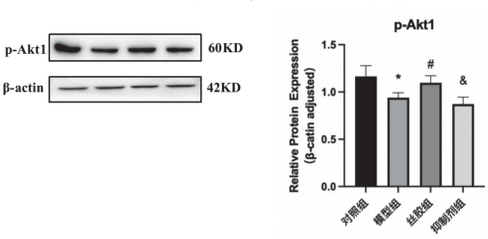


图3 各实验组INS-1细胞中p-Akt1蛋白的表达

*$P<0.05$ vs 对照组；#$P<0.05$ vs 模型组；&$P<0.05$ vs 丝胶组

2.3 各实验组INS-1细胞增殖相关蛋白PCNA、Ki67的表达

与对照组相比，模型组增殖相关蛋白PCNA和Ki67的表达显著降低($P<0.05$)；与模型组相比，丝胶组增殖相关蛋白PCNA和Ki67的表达显著升高($P<0.05$)；与丝胶组相比，抑制剂组增殖相关蛋白PCNA和Ki67的表达显著降低($P<0.05$)。各实验组INS-1细胞增殖相关蛋白PCNA、Ki67的表达结果见图4和图5。

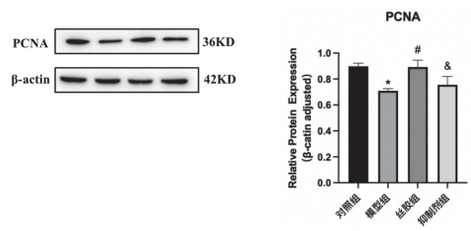


图4 各实验组INS-1细胞中PCNA蛋白的表达

*$P<0.05$ vs 对照组；#$P<0.05$ vs 模型组；&$P<0.05$ vs 丝胶组

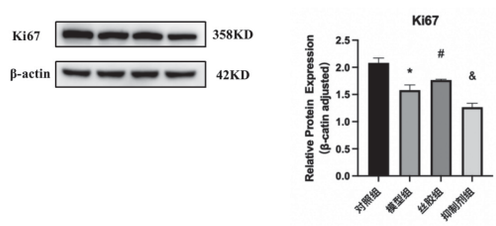


图5 各实验组INS-1细胞中Ki67的蛋白表达

*$P<0.05$ vs 对照组；#$P<0.05$ vs 模型组；&$P<0.05$ vs 丝胶组

3 讨论

我国自古就对蚕茧的应用进行了探索，针对丝胶蛋白(也称丝胶)进行了较多研究。丝胶是一种包裹在蚕丝表面的天然蛋白质，主要由甘氨酸、丝氨酸、天冬氨酸和丝氨酸等氨基酸构成[9]。近年来，人们发现丝胶有利于细胞增殖和皮肤组织的损伤恢复，因此丝胶经常被用作生物材料[10]。丝胶的抗糖尿病作用早在明朝时就被李时珍记载在《本草纲目》中："煮汤治消渴，古方甚称之。"本课题组前期通过动物实验和细胞实验，发现丝胶具有较好的抗糖尿病作用[3,4]。结合近年来研究发现的丝胶的生物学作用，本课题组进一步探究了丝胶抗糖尿病的作用机制，以期为临床上糖尿病治疗提供新思路。

根据国际糖尿病联合会在2021年的最新数据显示，全球20～79岁人群的糖尿病患病率约为10.5%(约5.37亿人)，预计2045年将增加到12.2%(7.832亿人)[11]。当今，糖尿病的致病原因尚未完全研究清楚，其致病原因复杂多样，与饮食、精神因素、遗传等多个因素有关。目前，越来

越多的研究显示，胰岛细胞的异常可能是T2DM发生发展的中心环节[12]。

胰岛中主要包含α细胞和β细胞两类细胞，其中胰岛β细胞的主要功能是根据血糖浓度合成与分泌胰岛素。胰岛β细胞数量的减少会导致胰岛素分泌量异常，最终导致糖代谢异常[13]，因此胰岛β细胞在维持葡萄糖稳态方面至关重要[14]。正常情况下，机体可以通过PI3K/Akt信号通路调节β细胞功能和胰岛素分泌[15]。在T2DM中，PI3K/Akt通路受到抑制，胰岛β细胞数量减少，胰岛β细胞分泌胰岛素的功能也受到抑制[14]。

本研究以INS-1细胞为研究对象，用STZ模拟糖尿病时的胰岛β细胞损伤。结果显示，模型组INS-1细胞与正常对照组INS-1细胞相比，PI3K/Akt信号通路相关蛋白PI3K、p-Akt的表达降低，增殖相关蛋白PCNA、Ki67的表达降低，细胞存活率降低。证实了INS-1细胞受损后，由于PI3K/Akt信号通路受到抑制，影响了增殖相关因子的表达，导致INS-1细胞存活率下降。

为探讨丝胶抗糖尿病的作用机制，本研究给予丝胶干预STZ致损伤INS-1细胞，发现与模型组INS-1细胞相比，丝胶组INS-1细胞PI3K/Akt信号通路相关蛋白PI3K、p-Akt的表达升高，增殖相关蛋白PCNA、Ki67的表达升高，细胞存活率升高。提示丝胶可以通过调控INS-1细胞的PI3K/Akt信号通路，影响增殖相关因子的表达，最终使INS-1细胞的存活率增加。

本课题组前期应用Label-free蛋白质组学和生物信息学方法，发现Akt1蛋白可能为丝胶蛋白抗糖尿病的关键节点。根据丝氨酸/苏氨酸残基的差异Akt包含三种异构体：Akt1、Akt2和Akt3，其中Akt1在机体多数组织中广泛表达。为证实Akt1的靶点作用，本研究应用Akt1特异性抑制剂A-674563抑制Akt1的表达，观察STZ致损伤INS-1细胞增殖相关指标的变化。与丝胶组相比，抑制剂组的p-Akt1的表达明显降低，说明加入抑制剂后Akt1的表达受到了抑制；同时发现，抑制剂组INS-1细胞增殖相关蛋白PCNA、Ki67表达下降，细胞存活率降低。以上结果说明Akt1受到特异性抑制后，丝胶无法发挥对STZ致损伤INS-1细胞的促增殖作用，因此说明丝胶通过调控PI3K/Akt信号通路促进STZ致损伤INS-1细胞的增殖过程中，Akt1是关键位点。

综上所述，丝胶对STZ致损伤的INS-1细胞具有保护作用，其作用机制可能与丝胶通过靶向Akt1调控PI3K/Akt信号通路从而促进STZ致损伤INS-1细胞的增殖有关。丝胶的抗糖尿病作用除了通过PI3K/Akt信号通路调控外，还能否通过其他信号通路进行调控从而发挥更好的效果，本课题组在今后的实验中将会对此做进一步的研究。

参考文献

[1] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition[J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2019, 157: 107843.

[2] Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2006, 116(7): 1802-1812.

[3] 李金尧，韩思雨，李雨欣，等. 丝胶对STZ致损伤的INS-1细胞的保护作用[J]. 承德医学院学报，2023，40(2)：91-95.

[4] 刘东慧，付文亮，付秀美，等. 丝胶对2型糖尿病大鼠肝脏胰岛素PI3K/Akt信号通路的调节作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版)，2020，46(2)：228-232.

[5] 付秀美，马宝君，赵立军，等. 丝胶对2型糖尿病大鼠血糖的影响[J]. 承德医学院学报，2008，(4)：351-353.

[6] Gao Y, Zhang MW, Zhang RF, et al. Whole grain brown rice extrudate ameliorates the symptoms of diabetes by activating the IRS1/PI3K/Akt Insulin Pathway in db/db Mice[J]. Journal of agricultural and food Chemistry, 2019, 67(42): 11657-11664.

[7] Abeyrathna P, Su Y. The critical role of Akt in cardiovascular function[J]. Vascular pharmacology, 2015, 74(11): 38-48.

[8] 胡万祥. 丝胶蛋白靶向Akt1调控PI3K/Akt/NF-κB信号通路保护STZ致损伤INS-1细胞的机制研究[D]. 承德：承德医学院，2022.

[9] Saad M, El-Samad LM, Gomaa RA, et al. A comprehensive review of recent advances in silk sericin: Extraction approaches, structure, biochemical characterization, and biomedical applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 250(7): 126067.

[10] Kumari N, Pullaguri N, Sahu V, et al. Research and therapeutic applications of silk proteins in cancer[J]. Journal of Biomater Applications, 2023, 38(1): 39-50.

[11] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. Diabetes research and clinical practice, 2022, 183(1): 109119.

[12] Gerasi E. 胰岛素生成，胰岛素分泌及2型糖尿病：问题的核

心在于β细胞[J]. 中华内分泌代谢杂志,2005,21(3):194-198.
[13] Lingohr MK, Buettner R, Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes[J]. Trends in molecular medicine, 2002, 8(8): 375-384.
[14] Zhang J, Liu F. Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging[J]. IUBMB Life, 2014, 66(7): 485-495.
[15] Georgia S, Bhushan A. β cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal β cell mass[J]. Journal of Clinical Investigation, 2004, 114(7): 963-968.

(收稿日期:2023-10-06)

IFITM1和Wnt/β-catenin信号通路在结肠癌发生发展中的作用

付溶川[1],周 涛[1],赵学荣[1],王建平[1],郑 帅[2],赵恩宏[2],肖丽君[1*]
(1.承德医学院基础医学院,河北承德 067000;2.承德医学院附属医院)

摘要: **目的** 探究干扰素诱导跨膜蛋白1(IFITM1)在结肠癌中的表达以及其在结肠癌中发挥的作用。**方法** 应用生物信息学分析IFITM1在结肠癌中的表达情况和预后情况,并分析IFITM1与β-连环蛋白的相关性。免疫组化观察IFITM1和β-catenin在结肠癌及癌旁组织中的表达情况。构建IFITM1过表达细胞模型,CCK-8实验检测细胞增殖能力的变化,双荧光素酶报告基因检测TCF/LEF转录因子的激活情况,Western blot检测Wnt/β-catenin信号通路上关键蛋白β-catenin、C-myc、CyclinD1的表达情况。**结果** 在线数据库分析结果显示,IFITM1在结肠癌中高表达($P<0.05$),且与患者的预后不良显著相关;IFITM1与β-catenin之间存在正相关关系。免疫组化染色结果显示,IFITM1和β-catenin在结肠癌组织中的表达显著高于癌旁组织,IFITM1的表达同肿瘤直径大小及组织浸润程度有关($P<0.05$),与其他因素无关($P>0.05$);β-catenin的表达与仅与肿瘤直径大小有关($P<0.05$),与其余因素无关($P>0.05$),且二者之间存在正向相关性。在结肠癌细胞HCT-15中过表达IFITM1后,OE-IFITM1组细胞的增殖能力显著高于OE-NC组($P<0.05$),OE-NC组和MOCK组之间无差异($P>0.05$)。双荧光素酶报告基因结果显示,OE-IFITM1组的启动子活性高于OE-NC组($P<0.05$),OE-NC组与MOCK组之间无差异($P>0.05$)。Western blot结果显示,OE-IFITM1组的β-catenin,CyclinD1,C-myc的表达量高于OE-NC组($P<0.05$),OE-NC组和MOCK组之间蛋白表达无差异($P>0.05$)。**结论** IFITM1在结肠癌组织中的表达显著高于癌旁组织,并可能通过Wnt/β-catenin信号通路促进细胞增殖。

关键词: IFITM1;结肠癌;β-catenin;TCF/LEF转录因子
中图分类号: R735.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-6879(2024)02-0100-06

Role of IFITM1 and Wnt/β-catenin Signaling Pathways in the Development and Progression of Colon Cancer

FU Rong-chuan[1], ZHOU Tao[1], ZHAO Xue-rong[1], WANG Jian-ping[1], ZHENG Shuai[2], ZHAO En-hong[2], XIAO Li-jun[1*]
(1. Basic Medical Institute of Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China; 2. Affiliated Hospital of Chengde Medical University)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of IFITM1 in colon cancer and the mechanism of its promotion of colon cancer cell proliferation. **Methods** The expression and prognosis of IFITM1 in colorectal cancer were analyzed by bioinformatics, and the correlation between IFITM1 and β-catenin was researched. Immunohistochemical SP staining was examined to observe the expression of IFITM1 and β-catenin in colon cancer tissues. The overexpressed cell model

资助项目:河北省高等学校科学技术研究项目(QN2020208)
*通讯作者