

·基础研究·

免疫抑制剂姜黄素逆转胰岛素抵抗的研究

郭颖, 高毅, 刘永光

(南方医科大学珠江医院器官移植科, 广东 广州 510282)

摘要: 【目的】为探讨姜黄素(curcumin)对胰岛素抵抗的治疗作用及其机制。【方法】利用胰岛素抵抗的小鼠模型, 观察姜黄素对小鼠胰岛素抵抗的水平、转录因子 I- κ B α 、循环细胞因子的变化。【结果】姜黄素能抑制 TNF α 刺激 Fao 细胞 NF- κ B 激活; 姜黄素治疗后小鼠的空腹血糖水平没有明显下降, 但空腹胰岛素的水平下降约 30%, 葡萄糖耐量曲线的水平也明显下降; 循环中 TNF α [(34.5 \pm 3.4) pg/mL vs (31.3 \pm 1.1) pg/mL] 水平没有明显改变, 而 IL-1 β [(33.9 \pm 3.2) pg/mL vs (15.6 \pm 1.1) pg/mL] 和 IL-6 [(72.1 \pm 9.8) pg/mL vs (47.2 \pm 5.3) pg/mL] 水平明显被抑制; 胰岛素刺激的 IRS-1 酪氨酸的磷酸化水平明显升高, 而胰岛素受体的磷酸化水平没有明显改变。与 IRS-1 酪氨酸的磷酸化水平平行, P85 的磷酸化水平也明显升高, AKT 的磷酸化的水平也明显升高。【结论】姜黄素能提高小鼠胰岛素敏感性, 有治疗改善肥胖诱导的胰岛素抵抗的作用。

关键词: 姜黄素; NF- κ B; 胰岛素; 抵抗

中图分类号: R302.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)05-0481-04

Immune Inhibitor Curcumin Reverses Insulin Resistance

GUO Ying, GAO Yi, LIU Yong-guang

(Department of Organs Transplantation, Zhujiang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510282, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate inhibitory effect of curcumin and its mechanism on insulin resistance. 【Methods】 Curcumin co-operated high fat diets were tested for the effect of curcumin on obesity induced insulin resistance in rodent model. Transcription factor I and circulating cytokines were also detected after curcumin treatment. 【Results】 (1) Curcumin inhibited TNF α -stimulated NF- κ B activation in Fao cells. (2) The fasting plasma glucose level was not obviously decreased after the treatment of curcumin, but the level of fasting insulin decreased by about 30%. Furthermore, the level of glucose tolerance curve dropped significantly. (3) The level of TNF α [(34.5 \pm 3.4) pg/mL vs (31.3 \pm 1.1) pg/mL] in circulation was not obviously changed, but the level of IL-1 β [(33.9 \pm 3.2) pg/mL vs (15.6 \pm 1.1) pg/mL] and IL-6 [(72.1 \pm 9.8) pg/mL vs (47.2 \pm 5.3) pg/mL] was suppressed dramatically. (4) IRS-1 tyrosine phosphorylation levels stimulated by insulin obviously increased, but the phosphorylation level of insulin receptor did not change. Being parallel with tyrosine phosphorylation levels of IRS-1, the phosphorylation levels of P85 and AKT increased accordingly. Significantly improved insulin sensitivity was observed in groups with curcumin. 【Conclusion】 Curcumin inhibits NF- κ B dependent inflammatory pathway and reverses obesity-induced insulin resistance.

Key words: curcumin, NF- κ B, insulin, resistance

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):481-484]

姜黄 (*Curcuma longa* L.) 是常用中药, 临床上用于活血、行气、通经、止痛。姜黄素 (curcumin) 是一种黄色色素, 从姜黄中提取到的主要有效成分。近年来, 大量研究发现它具有免疫调节、抗氧化、抗炎及抗肿瘤、抗动脉粥样硬化等生理和药理作用^[1-4]。

在实验室资料中姜黄素是良好的免疫调节剂, 并有结果提示姜黄素可以抑制宿主抗移植反应, 而且提高受体动物的存活率^[5,6]。在实验研究中, 炎症又与胰岛素抵抗密切相关^[7,8]。炎症被证实是代谢综合征的共同土壤, 联想到许多抗炎药物如阿司匹林

收稿日期: 2007-03-18

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (973 项目, 2006CB9503900)

作者简介: 郭颖 (1963-), 女, 安徽宿州市人, 副教授, 副主任医师, 主要从事免疫抑制剂与胰岛素抵抗的临床和实验研究, E-mail: guohanjing001@163.com.

可以逆转胰岛素抵抗,本文尝试利用姜黄素治疗肥胖合并极度胰岛素抵抗的炎症模型,并对姜黄素逆转胰岛素抵抗的机制作初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 姜黄素 购于印度亚洲公司(纯度 99%)。

1.1.2 动物 Obob 雄性小鼠 16 只,8 周龄、空腹体质量(33~38 g),购自南京国家模式动物中心,用含脂肪 6.4%的标准饲料饲养,实验前 1 周纪录小鼠的饲料摄取、空腹血糖、空腹胰岛素水平及体量等。

1.1.3 FAO 细胞 购自 The American Type Culture Collection(ATCC)。

1.1.4 试剂 IR、IRS-1、AKT、P85 多克隆抗体由 Steven Shoelson 实验室(Joslin Diabetes Center, Harvard)提供。FBS TNF α 、胰岛素购自 Sigma, St. Louis USA, I- κ B α 抗体,IKK γ 抗体,购于 Santa Cruz, CA, GST-I- κ B(1-54)底物由 Boston Biologicals, Wellesley, MA 合成。

1.2 方法

1.2.1 体外细胞实验 FAO 细胞使用培养液 DMEM(购自 Gibco 公司),细胞置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO $_2$ 的培养箱中培养。在 10 cm 培养皿用 10 mL DMEM+10%FBS 含有高浓度葡萄糖(25 mmol/L)的培养液中培养至 80%重叠率,经 5 mL 0.1%BSA 孵育 16 h 后接受不同浓度(0~40 μ mol/L)的姜黄素预处理,然后接受鼠 TNF α 10 nmol/L 刺激处理,于 20 min 后用预冷的 PBS 终止,并收集细胞,用于制作蛋白匀浆,备用, I- κ B α 的水平用免疫印迹的灰度表示。NF- κ B 的活性用 20 min 内试验细胞和对照细胞 I- κ B α 灰度差值表示。

1.2.2 动物实验 利用食物参入法制成含 2%姜黄素的颗粒饲料(Lab Diets, 5008),低温保存。动物饲养环境为中央通气,层流环境,恒温(23 $^{\circ}$ C)、恒湿,12 h 明暗光照循环,24 h 随意饮食环境。动物购入后第 5 天开始接受口服葡萄糖耐量试验,并留取空腹血浆作血浆胰岛素水平,和其它循环因子的检查。在验证空腹血糖和胰岛素水平后动物被随机分成两组,并接受姜黄素治疗,对照组用颗粒饲料 5008 作为对照。每天记录动物的摄食量,每 3 周测量空腹血糖并留取空腹血浆 1 次,第 6 周空腹状态下进行第 2 次口服葡萄糖耐量试验,并留取空腹血浆。试验后继续接受姜黄素治疗,第 7 周于空腹状态下接

受 5 U/kg 胰岛素富强注射,注射后 5 min 整,用断颈法迅速处死动物,留取肝脏经液氮过渡后在-80 $^{\circ}$ C 低温冰箱保存,作胰岛素信号分析之用。血浆多种循环炎症细胞因子的检查用 Linco Research 的 Luminex 试剂盒并采用 Luminex 200 监测结果。

1.2.3 免疫印迹 细胞或组织裂解液(30 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, pH 7.4。蛋白酶抑制剂由 1 mmol/L PMSF, 3 μ mol/L aprotinin, 5 μ mol/L pepstatin, 10 μ mol/L leupeptin, 25 mmol/L Benzamidin, 2 mmol/L Na-vanadate, 5 mmol/L β -glycerolphosphate, 10 mmol/L NaF, 1 mmol/L Ammonium Molybdate, 30 mmol/L tetrasodium pyrophosphate, 5 mmol/L EGTA)裂解细胞, SDS-聚丙烯酰胺凝胶(6%),蛋白加热变性后每孔加 30 μ g,电转移仪将蛋白转到 PVDF 膜。5%脱脂奶粉 TBS-T 缓冲液洗膜,加一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBS-T 缓冲液洗膜,加过氧化物酶标记的 IgG 抗体(购自 Amersham USA),室温 1 h, TBS-T 缓冲液洗膜,加 ECL 1 min,暗室显影 2~3 min 后冲洗胶片。凝胶成像分析系统摄像。

1.2.4 统计学分析 采用 t 检验。

2 结果

2.1 姜黄素抑制 NF- κ B 的量效和时效关系

Fao 细胞在 10 cm 2 培养皿用 10 mL 在 10% FBS+DMEM 含有高浓度葡萄糖的培养液中培养至 80%重叠,经 5 mL 0.1% BSA 孵育 16 h 后接受姜黄素预处理:剂量关系用梯度浓度如图 1 所示,时效曲线用 30 μ mol/L。预处理后接受鼠 TNF 10 nmol/L 刺激处理,于 20 min 后用预冷的 FBS 终止,并收集细胞,用于制作蛋白匀浆。用免疫印迹检测匀浆内 I- κ B α 的水平。如图 1A 所示:20 μ mol/L 姜黄素 20 min 预处理能够抑制 TNF 刺激的 I κ B α 的降解。从姜黄素的时效关系图 1B 可见,姜黄素有效剂量 30 μ mol/L 对 NF- κ B 的抑制作用在 30~60 min 时最强。

2.2 姜黄素以逆转肥胖小鼠的胰岛素抵抗

经过 6 周姜黄素的治疗,小鼠的空腹血糖水平没有明显下降,但空腹胰岛素的水平下降约 30%(图 2),口服葡萄糖耐量曲线的水平也明显下降(图 2A),曲线下面积的比较有明显差异($P < 0.01$)。由空腹血糖和胰岛素水平计算的 HOMA 指数[用 FBS(mmol/L) \times 胰岛素(mmol/L)/22.5 计算]也呈明显降低($P < 0.05$,图 2C),提示小鼠对胰岛素抵抗的水平得到明显改善。

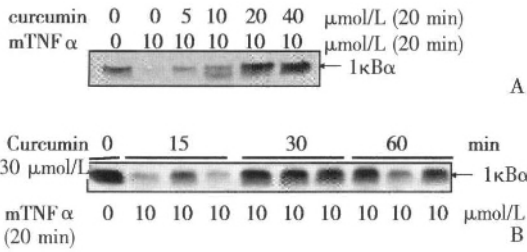


图 1 姜黄素作用的量效关系与时效关系

Fig.1 Dose and time responsive effects on NF- κ B inhibition from curcumin

2.3 姜黄素对循环细胞因子的影响

Obob 小鼠治疗 6 周后的空腹血浆用 Linco Research Luminex 试剂盒同时检测细胞因子 IL-1 β , IL-6 和 TNF α 的水平。如图 3 所示: 尽管循环胰岛素的水平明显下降, 但 TNF α [(34.5 \pm 3.4) pg/mL vs (31.3 \pm 1.1) pg/mL] 水平没有明显改变, 与之对应, 循环中 IL-1 β [(33.9 \pm 3.2) pg/mL vs (15.6 \pm 1.1) pg/mL] 和 IL-6 [(72.1 \pm 9.8) pg/mL vs (47.2 \pm 5.3) pg/mL] 水平明显被抑制 ($P < 0.05$)。

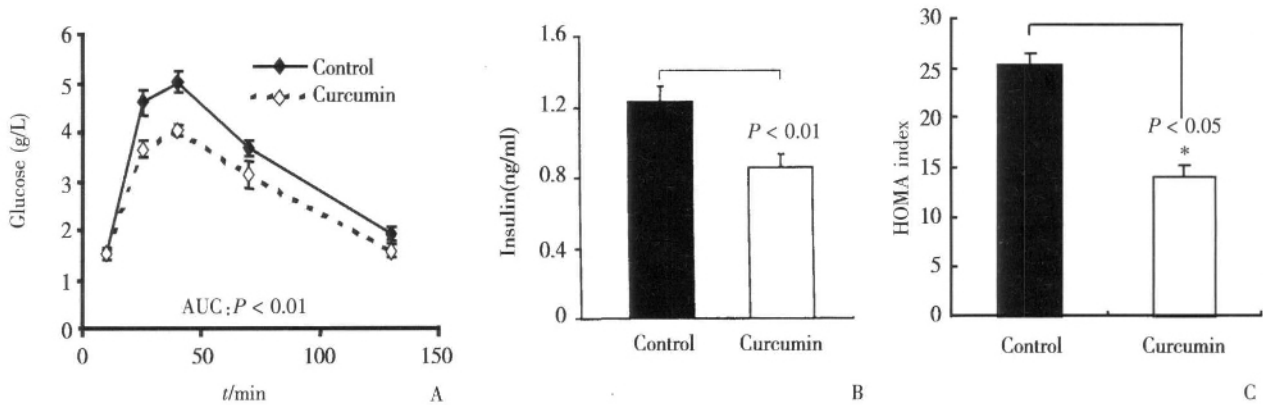


图 2 姜黄素逆转小鼠胰岛素抵抗

Fig.2 Curcumin reversed insulin resistance in obob mice

A: Glucose levels during GTT; B: Fasting insulin levels after treatment; C: Homa index

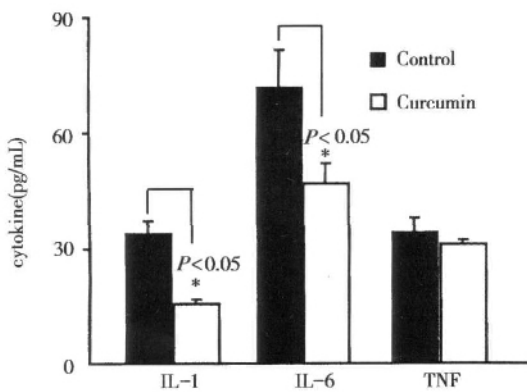


图 3 姜黄素对循环细胞因子的影响

Fig.3 Curcumin inhibited cytokines circulation levels

2.4 姜黄素为胰岛素信号的增效剂

经胰岛素刺激的肝脏组织在液氮下作粉碎并以 1% Triton X100 RAPA (含有全部蛋白酶抑制剂, 和蛋白磷酸酶抑制剂) 缓冲液在冰点匀浆。经全速 4 离心 30 min 取上清液 (1 mg 蛋白质) 作 IRS-1 和 IR 联合免疫沉淀。经上样缓冲液释放的沉淀目标蛋白

质经 6% 的 SDS-PAGE 分离, 转移到 PVDF 膜上。用 4G10、P85、AKT 抗体作免疫印迹。如图 4 所示: 胰岛素刺激的 IRS-1 酪氨酸的磷酸化水平明显升高, 而胰岛素受体的磷酸化水平没有明显改变。与 IRS-1 酪氨酸的磷酸化水平平行, P85 的磷酸化水平也明显升高, AKT 的磷酸化的水平也明显升高。

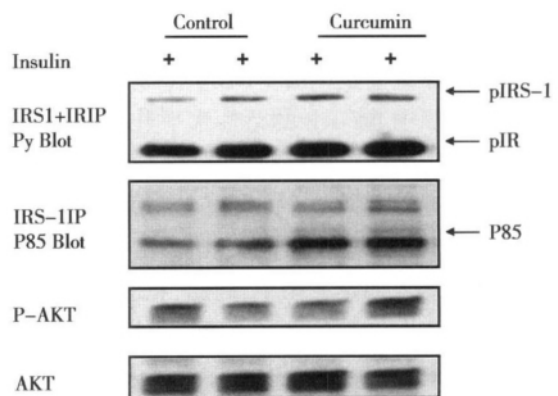


图 4 姜黄素对 obob 小鼠胰岛素信号的作用

Fig.4 Curcumin improved insulin signaling

3 讨 论

胰岛素抵抗(IR)及胰岛 β 细胞功能减退是2型糖尿病发病机理的重要环节^[9],目前被认为是一个慢性非特异性炎症过程,胰岛素对胰岛素敏感组织作用的缺陷(肝脏、脂肪组织、骨骼肌)会导致慢性、低水平炎症状态的恶化,任何与慢性炎症有关的过程都会削弱胰岛素的作用,作为恶性循环,胰岛素抵抗又会使炎症恶化^[10]。在抗炎药物对胰岛素抵抗有逆转作用的报道之后,我们探索新的抗炎药物对胰岛素抵抗的治疗作用,姜黄素是继阿司匹林后又一个具有类似协同作用的活性成分^[11]。在姜黄素治疗6周后,尽管治疗组和对照组的体重没有明显改善,但小鼠空腹血糖的水平明显下降,而且胰岛素的水平也明显降低,提示胰岛素的敏感性明显升高,葡萄糖耐量曲线在治疗后也明显改善,说明小鼠整体对葡萄糖的处理能力明显升高,即obob小鼠的胰岛素抵抗的水平得到明显改善。这些都进一步说明姜黄素治疗改善肥胖诱导的胰岛素抵抗。

研究证实NF- κ B是启动和控制炎症的主要核转录因子,在非激活条件下,NF- κ B和胞浆内一种被称为NF- κ B的抑制物(I- κ B)的蛋白质结合处于无功能状态。我们利用胰岛素敏感组织来源的细胞系FAO,验证了姜黄素能够抑制TNF α 刺激的I κ B α 的降解,继而抑制NF- κ B的活性,我们推测在高度肥胖NF- κ B高度激活的肥胖小鼠obob体内,姜黄素可能具有更加明显的改善代谢的作用。

在NF- κ B激活的模型上我们证实炎症激发的高水平循环细胞因子是系统性胰岛素抵抗的原因。采用细胞因子的中和抗体可以逆转胰岛素抵抗,在NF- κ B抑制型模型,胰岛素敏感性升高,而且循环中细胞因子的水平较低。在肥胖发生过程中,NF- κ B活性与动物的体重呈正相关。Obob小鼠的肝脏,脂肪以及淋巴组织中NF- κ B的活性水平升高,循环细胞因子的水平增高,这些都说明炎症介质与胰岛素抵抗的关系。经姜黄素治疗的肥胖动物循环中细胞因子IL-1,IL-6水平均明显下降,由于IL-1和IL-6是NF- κ B活性调控的重要因子,因此,我们认为姜黄素在胞浆内有多个作用靶点,通过对上述细胞因子的抑制作用,影响NF- κ B的活性,继而达到逆转胰岛素抵抗和改善胰岛素敏感性的作用。在肝脏组织的胰岛素信号检测中,胰岛素刺激的IRS-1酪氨酸磷酸化的水平明显升高,AKT的活性也明显增强。这些

结果都进一步说明肥胖小鼠胰岛素的敏感性在治疗后得到了改善,姜黄素能提高obob小鼠胰岛素的敏感性,姜黄素作为一个免疫调节剂用于抑制免疫排斥的同时,对系统性炎症也有抑制作用,可能是通过抑制NF- κ B来改善胰岛素敏感性的。

参考文献:

- [1] HUANG H C, JAN T R, YEH S F. Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Eur J Pharmacol*, 1992, 221(3):381-384.
- [2] CHEN H W, HUANG H C. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells [J]. *Br J Pharmacol*, 1998, 124(7):1029-1040.
- [3] SIDHU G S, MANI H, GADDIPATI J P, et al. Curcumin enhances wound healing in streptozotocin induced diabetic rats and genetically diabetic mice [J]. *Wound Repair Regen*, 1999, 7(7):362-374.
- [4] NAITO M, WU X, NOMURA H, et al. The protective effects of tetrahydrocurcumin on oxidative stress in cholesterol-fed rabbits [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2002, 11(9):243-250.
- [5] SHARMA S, CHOPRA K, KULKARNI S K, et al. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway [J]. *Clin Exp Immunol*, 2007, 147(7):155-163.
- [6] JAGETIA G C, AGGARWAL B B. 'Spicing Up' of the Immune System by Curcumin [J]. *J Clin Immunol*, 2007, 27(7):19-35.
- [7] YUAN M, KONSTANTOPOULOS N, LEE J, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta [J]. *Science*, 2001, 293(5535):1673-1677.
- [8] CAI D, YUAN M, FRANTZ D F, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB [J]. *Nat Med*, 2005, 11(7):183-190.
- [9] 程桦, 严励, 傅祖植. 糖尿病综合研究10年(1992-2001年) [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2003, 24(1):1-6.
- [10] FERN CNDEZ- REAL J M, RICART W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome [J]. *Endocrine Reviews*, 2003, 24(4):278-301.
- [11] OSAWA T, KATO Y. Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1043(6):440-451.

(编辑 徐杰)