

丝胶通过 Akt1 调控 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路对链脲佐菌素引起 INS-1 细胞损伤的保护作用及其机制

陈程¹, 李警耀², 胡万祥³, 刘东慧², 陈志宏²

(1. 承德医学院基础医学院生理学教研室, 河北承德 067000; 2. 承德医学院基础医学院人体解剖学教研室, 河北承德 067000; 3. 军科正源(天津)生物医药科技有限公司, 天津 301700)

[摘要] **目的:** 探讨丝胶对链脲佐菌素 (STZ) 致损伤 INS-1 细胞磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) / 蛋白激酶 B (Akt) / 核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路和细胞凋亡的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 采用含 0、0.1、0.3、1.0、3.0 和 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Akt1 抑制剂 A-674563 及 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ 及 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶的完全培养基培养 INS-1 细胞, 分为 0、0.1、0.3、1.0、3.0 和 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563 组, 另设置对照组 (不含药物的完全培养基), 采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法检测 INS-1 细胞存活率, 并计算半数抑制浓度 (IC_{50}) 值, 筛选 A-674563 最佳抑制浓度, 并采用 Western blotting 法验证。将 INS-1 细胞分为正常对照组 (完全培养基)、模型组 (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+完全培养基)、低、中和高剂量丝胶组 (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶+完全培养基、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶+完全培养基和 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶+完全培养基), 采用 CCK-8 法检测各组 INS-1 细胞存活率, 筛选丝胶最佳作用浓度。另将 INS-1 细胞分为正常对照组 (完全培养基)、模型组 (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+完全培养基)、丝胶组 (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶+完全培养基) 和 A-674563 组 (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶+0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563+完全培养基), 采用流式细胞术检测各组 INS-1 细胞凋亡率, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组 INS-1 细胞中 Akt1、NF- κ B、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 6 (IL-6) mRNA 表达水平, Western blotting 法检测各组 INS-1 细胞磷酸化 Akt1 (p-Akt1) 和 NF- κ B 蛋白表达水平, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组 INS-1 细胞中 TNF- α 和 IL-6 水平。**结果:** 对照组 INS-1 细胞存活率为 100.00% \pm 0.00%, 0、0.1、0.3、1.0、3.0 和 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563+10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶+完全培养基共同作用后 INS-1 细胞存活率分别为 82.50% \pm 2.28%、69.47% \pm 1.94%、51.51% \pm 1.74%、38.94% \pm 1.57%、24.79% \pm 1.14% 和 19.85% \pm 1.03%。A-674563 对 INS-1 细胞的 IC_{50} 值为 0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 选择 0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563 作用 INS-1 细胞。与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563 比较, 0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563+10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶+完全培养基共同作用下, INS-1 细胞中 p-Akt1 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$)。CCK-8 法检测, 与正常对照组比较, 模型组 INS-1 细胞存活率明显降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 低、中和高剂量丝胶组 INS-1 细胞存活率均明显升高 ($P<0.05$); 与低和中剂量丝胶组比较, 高剂量丝胶组 INS-1 细胞存活率明显升高 ($P<0.05$), 因此选择 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶作用细胞。与正常对照组比较, 模型组 INS-1 细胞存活率明显降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 丝胶组

[收稿日期] 2024-08-31 [录用日期] 2024-10-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81441133); 河北省卫健委医学科学研究项目 (20210468); 承德医学院国家自然科学基金项目培育基金项目 (201912)

[作者简介] 陈程 (1990—), 女, 河北省承德市人, 讲师, 医学硕士, 主要从事糖尿病及其并发症中西药预防方面的研究。

[通信作者] 陈志宏, 教授, 硕士研究生导师 (E-mail: czh1971@126.com);
刘东慧, 副教授 (E-mail: 313804850@qq.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

INS-1 细胞存活率明显升高 ($P < 0.05$); 与丝胶组比较, A-674563 组 INS-1 细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$)。流式细胞术检测, 与正常对照组比较, 模型组 INS-1 细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 丝胶组 INS-1 细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$); 与丝胶组比较, A-674563 组 INS-1 细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$)。RT-qPCR 法检测, 与正常对照组比较, 模型组 INS-1 细胞中 Akt1 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 低、中和高剂量丝胶组 INS-1 细胞中 Akt1 mRNA 表达水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与低和中剂量丝胶组比较, 高剂量丝胶组 INS-1 细胞中 Akt1 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。与正常对照组比较, 模型组 INS-1 细胞中 NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 丝胶组 INS-1 细胞中 NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.05$); 与丝胶组比较, A-674563 组 INS-1 细胞中 NF- κ B mRNA 表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)。Western blotting 法检测, 与正常对照组比较, 模型组 INS-1 细胞中 p-Akt1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 低、中和高剂量丝胶组 INS-1 细胞中 p-Akt1 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与低和中剂量丝胶组比较, 高剂量丝胶组 INS-1 细胞中 p-Akt1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。与正常对照组比较, 模型组 INS-1 细胞中 NF- κ B 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 丝胶组 INS-1 细胞中 NF- κ B 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与丝胶组比较, A-674563 组 INS-1 细胞中 NF- κ B 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。ELISA 法检测, 与正常对照组比较, 模型组 INS-1 细胞中 TNF- α 和 IL-6 水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 丝胶组 INS-1 细胞中 TNF- α 和 IL-6 水平均明显降低 ($P < 0.05$); 与丝胶组比较, A-674563 组 INS-1 细胞中 TNF- α 和 IL-6 水平均明显升高 ($P < 0.05$)。**结论:** 丝胶通过靶向 Akt1 减轻 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路介导的炎症反应和细胞凋亡, 对 STZ 引起的 INS-1 细胞损伤具有保护作用。

[关键词] 丝胶; INS-1 细胞; 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/核因子 κ B 信号通路; 炎症反应; 细胞凋亡

[中图分类号] R587.1 **[文献标志码]** A

Protective effect of sericin on streptozotocin-induced INS-1 cell damage by regulating PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway through Akt1 and its mechanism

CHEN Cheng¹, LI Jingyao², HU Wanxiang³, LIU Donghui², CHEN Zhihong²

(1. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2. Department of Human Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 3. Junkezhengyuan(Tianjin) Biopharmaceutical Technology Co., Ltd, Tianjin 301700, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of sericin on the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway and apoptosis in the streptozotocin (STZ)-damaged INS-1 cells, and to clarify its mechanism. **Methods:** The INS-1 cells were cultured with complete medium containing 0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, and 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Akt1 inhibitor A-674563, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ, and 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sericin, and divided into 0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, and 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563 groups, and the control group (complete medium without drugs) was set up. Cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the survival rates of the INS-1 cells, and the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value was calculated to determine the optimal inhibitory concentration of A-674563, which was further verified by Western blotting method. The INS-1 cells were divided into normal control group (complete medium), model group (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+complete medium), and low, medium, and high doses of sericin groups (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sericin+complete medium,

10 mmol·L⁻¹ STZ+300 mg·L⁻¹ sericin+complete medium, and 10 mmol·L⁻¹ STZ+600 mg·L⁻¹ sericin+complete medium). CCK-8 method was used to detect the survival rates of the INS-1 cells in various groups to determine the optimal concentration of sericin. Additionally, the INS-1 cells were divided into normal control group (complete medium), model group (10 mmol·L⁻¹ STZ+complete medium), sericin group (10 mmol·L⁻¹ STZ+600 mg·L⁻¹ sericin + complete medium), and A-674563 group (10 mmol·L⁻¹ STZ+600 mg·L⁻¹ sericin+0.3 μmol·L⁻¹ A-674563+complete medium). Flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the INS-1 cells in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of Akt1, NF-κB, tumor necrosis factor-α (TNF-α), and interleukin-6 (IL-6) mRNA in the INS-1 cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of phosphorylated Akt1 (p-Akt1) and NF-κB proteins in the INS-1 cells in various groups; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the levels of TNF-α and IL-6 in the INS-1 cells in various groups. **Results:** The survival rates of the INS-1 cells in control group was 100.00%±0.00%; in 0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, and 10.0 μmol·L⁻¹ A-674563+10 mmol·L⁻¹ STZ+600 mg·L⁻¹ sericin+complete medium groups, which were 82.50%±2.28%, 69.47%±1.94%, 51.51%±1.74%, 38.94%±1.57%, 24.79%±1.14%, and 19.85%±1.03%, respectively. The IC₅₀ value of A-674563 for INS-1 cells was 0.3 μmol·L⁻¹, and 0.3 μmol·L⁻¹ A-674563 was selected for subsequent experiments. Compared with 0 μmol·L⁻¹ A-674563, the expression level of p-Akt1 protein in the INS-1 cells after treated with 0.3 μmol·L⁻¹ A-674563+10 mmol·L⁻¹ STZ + 600 mg·L⁻¹ sericin+complete medium was significantly decreased ($P<0.05$). The CCK-8 results showed that compared with normal control group, the survival rate of the INS-1 cells in model group was significantly decreased ($P<0.05$); compared with model group, the survival rates of the INS-1 cells in low, medium, and high doses of sericin groups were significantly increased ($P<0.05$); compared with low and medium doses of sericin groups, the survival rate of the INS-1 cells in high dose of sericin group was significantly increased ($P<0.05$). Thus, 600 mg·L⁻¹ sericin was selected for subsequent experiments. The CCK-8 results showed that compared with normal control group, the survival rate of the INS-1 cells in model group was significantly decreased ($P<0.05$); compared with model group, the survival rate of the INS-1 cells in sericin group was significantly increased ($P<0.05$); compared with sericin group, the survival rate of the INS-1 cells in A-674563 group was significantly decreased ($P<0.05$). The flow cytometry results showed that compared with normal control group, the apoptotic rate of the INS-1 cells in model group was significantly increased ($P<0.05$); compared with model group, the apoptotic rate of the INS-1 cells in sericin group was significantly decreased ($P<0.05$); compared with sericin group, the apoptotic rate of the INS-1 cells in A-674563 group was significantly increased ($P<0.05$). The RT-qPCR results showed that compared with normal control group, the expression level of Akt1 mRNA in the INS-1 cells in model group was significantly decreased ($P<0.05$); compared with model group, the expression levels of Akt1 mRNA in the INS-1 cells in low, medium, and high doses of sericin groups were significantly increased ($P<0.05$); compared with low and medium doses of sericin groups, the expression level of Akt1 mRNA in the INS-1 cells in high dose of sericin group was significantly increased ($P<0.05$). Compared with normal control group, the expression levels of NF-κB, TNF-α, and IL-6 mRNA in the INS-1 cells in model group were significantly increased ($P<0.05$); compared with model group, the expression levels of NF-κB, TNF-α, and IL-6 mRNA in the INS-1 cells in sericin group were significantly decreased ($P<0.05$); compared with sericin group, the expression level of NF-κB mRNA in the INS-1 cells in A-674563 group was significantly increased ($P<0.05$). The Western blotting results showed that compared with normal control group, the expression level of p-Akt1 protein in the INS-1 cells in model group was significantly decreased ($P<0.05$); compared with model group, the expression levels of p-Akt1 protein in the INS-1 cells in low, medium, and high doses of sericin

groups were significantly increased ($P < 0.05$); compared with low and medium doses of sericin groups, the expression level of p-Akt1 protein in the INS-1 cells in high dose of sericin group was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with normal control group, the expression level of NF- κ B protein in the INS-1 cells in model group was significantly increased ($P < 0.05$); compared with model group, the expression level of NF- κ B protein in the INS-1 cells in sericin group was significantly decreased ($P < 0.05$); compared with sericin group, the expression level of NF- κ B protein in the INS-1 cells in A-674563 group was significantly increased ($P < 0.05$). The ELISA results showed that compared with normal control group, the levels of TNF- α and IL-6 in the INS-1 cells in model group were significantly increased ($P < 0.05$); compared with model group, the levels of TNF- α and IL-6 in the INS-1 cells in sericin group were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with sericin group, the levels of TNF- α and IL-6 in the INS-1 cells in A-674563 group were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sericin alleviates the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway-mediated inflammatory response and apoptosis by targeting Akt1, exerting a protective effect against STZ-induced damage in INS-1 cells.

KEYWORDS Sericin; INS-1 cells; Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/nuclear factor- κ B signaling pathway; Inflammatory response; Apoptosis

近年来,糖尿病在全球范围内呈现出较高的发病率,已严重威胁人们的生活质量和生命健康,国际糖尿病联合会预测至2045年,全世界糖尿病患者人数可达7.83亿,其中90%~95%为2型糖尿病患者^[1-2]。2型糖尿病病因及发病机制较为复杂,有研究^[3-4]报道炎症与2型糖尿病的发生发展密切相关。磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)/核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)信号通路是机体炎症反应的关键调控途径之一,对其深入研究有助于进一步探寻2型糖尿病的发病机制并发掘潜在的治疗靶点^[5-7]。目前,临床上糖尿病治疗药物的不良反应日益增多,寻找安全有效的天然药物已成为抗糖尿病药物研发的新方向。丝胶是存在于蚕茧中的一种天然水溶性蛋白,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤和促细胞增殖等作用,近年来因其低免疫原性和可生物降解等特点而引起关注^[8-9]。前期研究^[10]显示:丝胶可通过调节胰岛素 PI3K/Akt 信号转导通路对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)所导致的 INS-1 细胞损伤发挥保护作用,但其与调控炎症反应的关系尚未完全阐明。本研究通过观察丝胶干预下 STZ 致 INS-1 细胞损伤中炎症相关因子的表达及细胞存活情况,探讨丝胶抗糖尿病的作用机制及可能的作用靶点,以期临床开发糖尿病治疗药物提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 大鼠胰岛素瘤细胞

(INS-1 细胞)购于武汉普诺赛生命科技有限公司。RPMI 1640 培养基、100 U·mL⁻¹青霉素、100 mg·L⁻¹链霉素和 50 μ mol·L⁻¹ β -ME 购于美国 Gibco 公司,10%胎牛血清购于武汉普诺赛生命科技有限公司,STZ 购于美国 Sigma 公司,丝胶购于日本和光纯药公司,Akt1 抑制剂 A-674563 购于美国 Selleck 生物科技有限公司,细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒购于美国 APEXbio 公司,细胞凋亡试剂盒购于江苏凯基生物技术股份有限公司,PCR 引物购于宝生物工程(大连)有限公司,细胞总 RNA 提取试剂盒和 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒购于日本 TaKaRa 公司,大鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购于杭州联科生物技术股份有限公司,RIPA (组织/细胞)裂解液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司,兔抗大鼠 β -actin 单克隆抗体购于美国 ABclonal 公司,兔抗大鼠磷酸化 Akt1 (phosphorylated- Akt1, p-Akt1) 和 NF- κ B 单克隆抗体购于美国 CST 公司。DYY-6B 型稳压稳流转移电泳仪购于北京市六一仪器厂, Mx3000P 型实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪购于上海吉泰生物科技有限公司,流式细胞仪购于美国 BD FACSCalibur 公司。

1.2 细胞培养 INS-1 细胞于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下,采用 RPMI-1640 培养基(含 100 U·mL⁻¹青霉

素、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素、 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -ME和10%胎牛血清)培养48~72 h后传代、冻存。

1.3 Akt1抑制剂A-674563作用浓度筛选 取对数生长期INS-1细胞,分为0、0.1、0.3、1.0、3.0和 $10.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563组,分别于含0、0.1、0.3、1.0、3.0和 $10.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563及 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ以及 $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶的完全培养基中培养24 h,另设置对照组,对照组INS-1细胞采用不含药物的完全培养基培养。采用CCK-8法检测INS-1细胞存活率,并计算半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC_{50})值,筛选A-674563最佳抑制浓度,并采用Western blotting法验证。

1.4 细胞分组和处理 取对数生长期INS-1细胞,随机分为正常对照组,模型组,低、中和高剂量丝胶组,分别在完全培养基, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+完全培养基, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+ $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶+完全培养基、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+ $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶+完全培养基和 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+ $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶+完全培养基中培养24 h。

1.5 CCK-8法检测各组INS-1细胞存活率 各组INS-1细胞经相应药物处理结束后弃原培养基,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)清洗后每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 10% CCK-8溶液,充分混匀,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下继续培养2 h,随后置于酶标仪上,于波长 450 nm 处检测各组细胞吸光度(A)值,计算各组INS-1细胞存活率,根据细胞存活率筛选丝胶最适作用浓度。细胞存活率=(药物组孔A值-空白孔A值)/(正常对照组孔A值-空白孔A值) $\times 100\%$ 。

另取对数生长期的INS-1细胞,随机分为正常对照组、模型组、丝胶组和A-674563组,分别在完全培养基、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+完全培养基、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+ $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶+完全培养基和 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ STZ+ $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶+ $0.3\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563+完全培养基中培养24 h。

1.6 流式细胞术检测各组INS-1细胞凋亡率 各组INS-1细胞经相应药物处理结束后弃原培养基,先后通过预冷的PBS缓冲液清洗和不含EDTA的胰酶消化,吹打均匀,过筛计数,将细胞放入流式管内 $1\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、室温离心2次,每次5 min,再加入预先稀释好的 $1\times$ Binding Buffer、FITC和PI染色液,轻轻混匀,于室温避光孵育5~15 min,

随后上机检测,计算各组INS-1细胞凋亡率。细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.7 RT-qPCR法检测各组INS-1细胞中Akt1、NF- κ B、TNF- α 和IL-6 mRNA表达水平 各组INS-1细胞经相应药物处理结束,经预冷的PBS缓冲液清洗后提取总RNA并反转录为cDNA,以 β -actin为内参扩增Akt1基因片段。引物序列: Akt1上游引物5'-ATGGACTTCCGGTCAGGTTCA-3', Akt1下游引物5'-GCCCTTGCCAGTAGCTTCA-3'; NF- κ B上游引物5'-ATCCCTGCTTCCCCTT-TCTC-3', NF- κ B下游引物5'-CTGTCTTATGG-CTGAGGTCTGGT-3'; TNF- α 上游引物5'-CTG-TGCCTCAGCCTCTTCTCATTC-3', TNF- α 下游引物5'-TTGGGAACCTTCTCCTCCTTGTTGG-3'; IL-6上游引物5'-ACAAGTCGGAGGCTTA-ATTACACAT-3', IL-6下游引物5'-AATCAGA-ATTGCCATTGCACAA-3'; β -actin上游引物5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3', β -actin下游引物5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTG-CTG-3'。扩增条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,共40次循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因表达水平。

1.8 Western blotting法检测各组INS-1细胞中p-Akt1和NF- κ B蛋白表达水平 各组INS-1细胞经相应药物处理结束后弃原培养基,用预冷的PBS缓冲液清洗后,添加蛋白裂解液,提取总蛋白。利用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量后,取 $30\text{ }\mu\text{g}$ 总蛋白上样,10%凝胶、电泳、转膜、封闭过夜,一抗p-Akt1(1:1 000)、NF- κ B(1:1 000)、 β -actin(1:5 000)室温孵育2 h,二抗(1:10 000)室温孵育1 h、洗膜、显影。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/ β -actin蛋白条带灰度值。

1.9 ELISA法检测各组INS-1细胞中TNF- α 和IL-6水平 各组INS-1细胞经相应药物作用结束后取细胞培养上清液, $1\text{ }500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min后参照ELISA试剂盒使用说明书操作,检测各组INS-1细胞中TNF- α 和IL-6水平。

1.10 统计学分析 采用SPSS 26.0和GraphPad prism 8.4.2统计软件进行统计学分析。各组INS-1细胞存活率和细胞凋亡率,细胞中Akt1、NF- κ B、TNF- α 和IL-6 mRNA及p-Akt1和NF- κ B蛋白表达水平,细胞中TNF- α 和IL-6水平均符合

正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验均重复3次。

2 结果

2.1 A-674563作用浓度筛选 对照组及0、0.1、0.3、1.0、3.0和10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563组INS-1细胞存活率分别为100.00% \pm 0.00%、82.50% \pm 2.28%、69.47% \pm 1.94%、51.51% \pm 1.74%、38.94% \pm 1.57%、24.79% \pm 1.14%和19.85% \pm 1.03%。A-674563对INS-1细胞的 IC_{50} 值为0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,因此后续实验中选择0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563作用INS-1细胞。见图1。

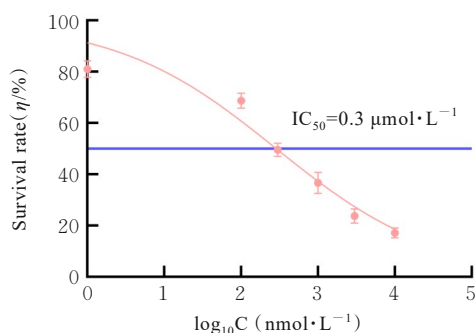
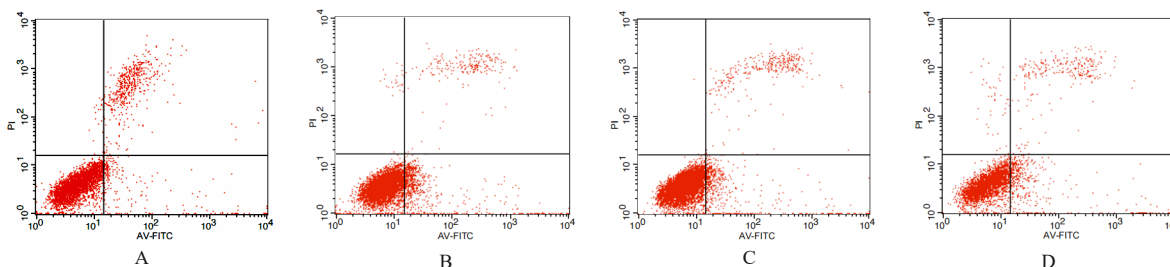


图1 不同浓度A-674563作用下各组INS-1细胞存活率

Fig. 1 Survival rates of INS-1 cells in various groups after treated with of different concentrations of A-674563

Western blotting法检测结果显示:与0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563组比较,0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563组INS-1细胞中p-Akt1蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。见图2。

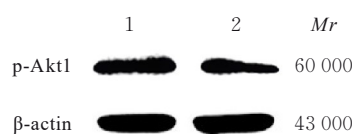
2.2 各组INS-1细胞存活率 与正常对照组



A: Normal control group; B: Model group; C: Sericin group; D: Akt1 inhibitor group.

图3 各组INS-1细胞凋亡率

Fig. 3 Apoptotic rates of INS-1 cells in various groups



Lane 1: 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563 group; Lane 2: 0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563 group.

图2 0和0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563组INS-1细胞中p-Akt1蛋白表达电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of expression of p-Akt1 protein in INS-1 cells in 0 and 0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-674563 groups

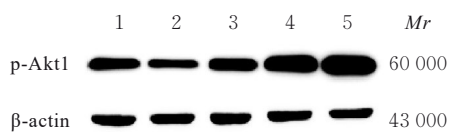
(100.00% \pm 0.00%)比较,模型组INS-1细胞存活率(50.51% \pm 1.01%)明显降低($P<0.05$)。与模型组比较,低、中和高剂量丝胶组INS-1细胞存活率(57.30% \pm 1.15%、63.33% \pm 1.64%和80.79% \pm 2.56%)均明显升高($P<0.05$)。与低和中剂量丝胶组比较,高剂量丝胶组INS-1细胞存活率明显升高($P<0.05$)。因此,后续实验中选择600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝胶作用细胞。

与正常对照组(100.00% \pm 0.00%)比较,模型组INS-1细胞存活率(50.85% \pm 0.68%)明显降低($P<0.05$);与模型组比较,丝胶组INS-1细胞存活率(71.89% \pm 0.83%)明显升高($P<0.05$);与丝胶组比较,A-674563组INS-1细胞存活率(51.91% \pm 0.75%)明显降低($P<0.05$)。

2.3 各组INS-1细胞凋亡率 与正常对照组(4.66% \pm 0.26%)比较,模型组INS-1细胞凋亡率(11.06% \pm 0.66%)明显升高($P<0.05$);与模型组比较,丝胶组INS-1细胞凋亡率(7.21% \pm 0.53%)明显降低($P<0.05$);与丝胶组比较,A-674563组INS-1细胞凋亡率(10.51% \pm 0.59%)明显升高($P<0.05$)。见图3。

2.4 各组INS-1细胞中Akt、NF- κ B、TNF- α 和IL-6 mRNA表达水平 与正常对照组 (1.00 ± 0.00) 比较, 模型组INS-1细胞中Akt1 mRNA表达水平 (0.51 ± 0.02) 明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 低、中和高剂量丝胶组INS-1细胞中Akt1 mRNA表达水平 (0.73 ± 0.04 、 0.96 ± 0.05 和 1.32 ± 0.07) 均明显升高 ($P < 0.05$); 与低和中剂量丝胶组比较, 高剂量丝胶组INS-1细胞中Akt1 mRNA表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。与正常对照组 (1.00 ± 0.00 、 1.00 ± 0.00 和 1.00 ± 0.00) 比较, 模型组INS-1细胞中NF- κ B、TNF- α 和IL-6 mRNA表达水平 (1.29 ± 0.10 、 2.84 ± 0.27 和 4.58 ± 0.61) 均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 丝胶组INS-1细胞中NF- κ B、TNF- α 和IL-6 mRNA表达水平 (1.05 ± 0.07 、 1.02 ± 0.09 和 2.19 ± 0.46) 均明显降低 ($P < 0.05$); 与丝胶组比较, A-674563组INS-1细胞中NF- κ B、TNF- α 和IL-6 mRNA表达水平 (1.25 ± 0.08 、 2.38 ± 0.24 和 3.75 ± 0.56) 均明显升高 ($P < 0.05$)。

2.5 各组INS-1细胞中p-Akt1和NF- κ B蛋白表达水平 与正常对照组 (1.07 ± 0.05) 比较, 模型组INS-1细胞中p-Akt1蛋白表达水平 (0.85 ± 0.04) 明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 低、中和高剂量丝胶组INS-1细胞中p-Akt1蛋白表达水平 (1.16 ± 0.05 、 1.59 ± 0.09 和 1.94 ± 0.11) 均明显升高 ($P < 0.05$); 与低和中剂量丝胶组比较, 高剂量丝胶组INS-1细胞中p-Akt1蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见图4。



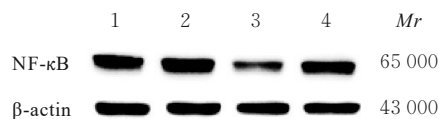
Lane 1: Normal control group; Lane 2: Model group; Lane 3: Low dose of sericin group; Lane 4: Medium dose of sericin group; Lane 5: High dose of sericin group.

图4 各组INS-1细胞中p-Akt1蛋白表达电泳图

Fig. 4 Electrophoregram of expression of p-Akt1 protein in INS-1 cells in various groups

与正常对照组 (1.18 ± 0.03) 比较, 模型组INS-1细胞中NF- κ B蛋白表达水平 (1.33 ± 0.04) 明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 丝胶组INS-1细胞中NF- κ B蛋白表达水平 (0.94 ± 0.02) 明显降低 ($P < 0.05$); 与丝胶组比较, A-674563组

INS-1细胞中NF- κ B蛋白表达水平 (1.31 ± 0.03) 明显升高 ($P < 0.05$)。见图5。



Lane 1: Normal control group; Lane 2: Model group; Lane 3: Sericin group; Lane 4: Akt1 inhibitor group.

图5 各组INS-1细胞中NF- κ B蛋白表达电泳图

Fig. 5 Electrophoregram of expression of NF- κ B in INS-1 cells in various groups

2.6 各组INS-1细胞中TNF- α 和IL-6水平 与正常对照组 [(9.71 ± 0.32) ng·L⁻¹ 和 (9.14 ± 0.18) ng·L⁻¹] 比较, 模型组TNF- α 和IL-6水平 [(16.84 ± 1.21) ng·L⁻¹ 和 (13.99 ± 0.32) ng·L⁻¹] 均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 丝胶组TNF- α 和IL-6水平 [(11.43 ± 0.99) ng·L⁻¹ 和 (10.74 ± 0.26) ng·L⁻¹] 均明显降低 ($P < 0.05$); 与丝胶组比较, Akt1抑制剂组TNF- α 和IL-6水平 [(16.13 ± 1.19) ng·L⁻¹] 和 (12.54 ± 0.31) ng·L⁻¹] 均明显升高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

2型糖尿病是一种由胰岛素抵抗和(或)胰岛素分泌相对不足所导致的全身慢性代谢性疾病^[11-12]。炎症反应是触发胰岛素抵抗及诱导细胞凋亡的重要因素之一^[13-16]。PI3K/Akt/NF- κ B信号通路作为机体内经典的炎症调控通路, 可调节多种炎性细胞因子的转录表达。当细胞外的细胞因子、生长因子或激素等物质与细胞膜上的受体结合后会激活PI3K, 活化后的PI3K可将细胞膜上的磷脂酰肌醇4, 5二磷酸(phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate, PIP2)转化为磷脂酰肌醇-3, 4, 5-三磷酸(phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate, PIP3), PIP3作为第二信使可招募并激活含有PH-结构域的Akt蛋白至细胞膜, 并在一系列激酶的作用下发生磷酸化而被激活^[17]。Akt1是Akt家族重要亚型之一, 在机体多种组织中广泛表达, 是PI3K/Akt/NF- κ B信号通路的核心因子, 可参与细胞增殖、凋亡和炎症反应等过程^[18-19]。本课题组前期应用非标记定量蛋白质组学和生物信息学方法分析发现: Akt1蛋白可能是丝胶抗糖尿病的关键节点。因此, 本研究选择Akt1作为验证丝胶抗糖尿

病作用的观察指标之一。本研究以具有与正常胰岛 β 细胞关键特征及功能相似的 INS-1 细胞作为研究对象,建立 STZ 致 INS-1 细胞损伤模型,以细胞存活率降低作为成模标准^[20],结果显示:模型组 INS-1 细胞存活率较正常对照组明显降低,表明 STZ 致 INS-1 细胞损伤模型建立成功。在给予 STZ 致损伤的 INS-1 细胞不同浓度丝胶进行干预后,与模型组比较,不同剂量丝胶组 INS-1 细胞存活率和 Akt1 表达均明显升高,且高剂量丝胶组 INS-1 细胞存活率和 Akt1 蛋白表达水平最高,因此确定后续实验使用的丝胶浓度为 $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

NF- κ B 是一种广泛存在于细胞内调控 B 淋巴细胞中免疫球蛋白轻链表达的转录因子,作为 PI3K/Akt 通路下游的信号分子能够调控众多与炎症相关基因的表达,被认为是炎症反应的“中心”,激活的 PI3K/Akt 通路会显著降低 NF- κ B 的表达水平,进而抑制基因转录过程,减少 TNF- α 和 IL-6 等炎症因子的释放^[21-23]。TNF- α 和 IL-6 均为典型的炎症标志物,二者可通过阻碍胰岛素受体底物磷酸化干扰胰岛素信号通路的转导,进而引发胰岛素抵抗,还可诱导胰岛 β 细胞凋亡,导致胰岛素合成及分泌障碍^[24-26]。IL-6 水平升高可促进 TNF- α 的持续释放和活化,进而通过瀑布样连锁反应形成体内炎症的恶性循环,进一步加重胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞凋亡,导致 2 型糖尿病的发生发展^[27]。本研究结果显示:模型组 INS-1 细胞中 NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 水平及细胞凋亡率均较正常对照组明显升高,细胞存活率明显降低,提示模型组 INS-1 细胞出现了炎症反应及细胞凋亡;在给予丝胶干预后,INS-1 细胞炎症指标和细胞凋亡率明显降低且细胞存活率明显升高,提示丝胶可改善 STZ 致损伤 INS-1 细胞的炎症反应和细胞凋亡。为进一步验证丝胶的保护作用是否与 Akt1 靶点有关,在确定 Akt1 抑制剂 A-674563 的作用浓度后,将 A-674563 与丝胶和 STZ 共同作用于 INS-1 细胞,结果显示:A-674563 可逆转丝胶对 STZ 所导致损伤的 INS-1 细胞存活率升高以及炎症相关因子 NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 水平及细胞凋亡率降低,提示丝胶可能通过增加 Akt1 磷酸化激活 PI3K/Akt 信号通路,进而提升对 NF- κ B 的抑制作用,导致基因转录过程受阻,炎症因子 TNF- α 和 IL-6 释放减少,介导的炎症水平降低,INS-1 细胞凋亡率降低,这可能是丝胶抗糖尿病的作用机制之一。

综上所述,丝胶通过靶向 Akt1 减轻 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路介导的炎症反应及细胞凋亡,对 STZ 引起的 INS-1 细胞损伤具有保护作用。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

陈程参与研究设计、实验操作和论文撰写,李警耀参与实验操作,胡万祥参与实验操作,刘东慧参与研究设计、数据收集、整理和分析及论文校对,陈志宏参与论文审校。

[参考文献]

- [1] TEO Z L, THAM Y C, YU M, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: systematic review and meta-analysis [J]. *Ophthalmology*, 2021, 128(11): 1580-1591.
- [2] CHO N H, SHAW J E, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138: 271-281.
- [3] ZOU X Z, ZHANG Y W, PAN Z F, et al. Gentiopicroside alleviates cardiac inflammation and fibrosis in T2DM rats through targeting Smad3 phosphorylation [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154389.
- [4] ABDULWAHAB D A, EL-MISSIRY M A, SHABANA S, et al. Melatonin protects the heart and pancreas by improving glucose homeostasis, oxidative stress, inflammation and apoptosis in T2DM-induced rats [J]. *Heliyon*, 2021, 7(3): e06474.
- [5] 王尹,余辉,徐利娟,等. 糖肾灌肠方通过 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路调节糖尿病肾病炎症反应的机制研究 [J]. *中药药理与临床*, 2024, 40(3): 8-16.
- [6] PENG W J, SONG Y S, ZHU G P, et al. FGF10 attenuates allergic airway inflammation in asthma by inhibiting PI3K/AKT/NF- κ B pathway [J]. *Cell Signal*, 2024, 113: 110964.
- [7] LI J H, DONG S Z, QUAN S L, et al. Nuciferine reduces inflammation induced by cerebral ischemia-reperfusion injury through the PI3K/Akt/NF- κ B pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 125: 155312.
- [8] 李温柔. 蚕丝提取物在护肤品中的活性成分分析与开发 [J]. *化纤与纺织技术*, 2023, 52(11): 21-23.
- [9] HU D D, LI T D, LIANG W A, et al. Silk sericin as building blocks of bioactive materials for advanced therapeutics [J]. *J Control Release*, 2023, 353: 303-316.
- [10] 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.
- [11] 蔡柳, 唐墨为. 利拉鲁肽联合短期胰岛素泵强化治疗初诊肥胖2型糖尿病的疗效[J]. 临床合理用药, 2024, 17(24): 83-85.
- [12] 赖长盛, 刘雁明, 曾辉. 生脉散合增液汤加味联合西药治疗气阴两虚型2型糖尿病的临床效果[J]. 临床合理用药, 2024, 17(24): 79-82.
- [13] HALIM M, HALIM A. The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes) [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13(2): 1165-1172.
- [14] DARYABOR G, ATASHZAR M R, KABELITZ D, et al. The effects of type 2 diabetes mellitus on organ metabolism and the immune system [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1582.
- [15] ZHANG X, ZHANG L, TAN Y M, et al. Hecpudin gene silencing ameliorated inflammation and insulin resistance in adipose tissue of db/db mice *via* inhibiting METs formation [J]. *Mol Immunol*, 2021, 133: 110-121.
- [16] SUREN GARG S, KUSHWAHA K, DUBEY R, et al. Association between obesity, inflammation and insulin resistance: Insights into signaling pathways and therapeutic interventions [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2023, 200: 110691.
- [17] HU L N, ZHANG X Y, ZANG S B. Mutations in Ras homolog family member A in patients with peripheral T-cell lymphoma and implications for personalized medicine [J]. *Cancer Biol Med*, 2024, 21(9): 754-768.
- [18] NIE Y J, WANG Z X, CHAI G S, et al. Dehydrocostus lactone suppresses LPS-induced acute lung injury and macrophage activation through NF- κ B signaling pathway mediated by p38 MAPK and Akt [J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1510.
- [19] 杨永芳, 彭善鑫, 王恺悦, 等. 脉络舒通丸治疗缺血性卒中的网络药理学分析和实验验证 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(23): 6466-6475.
- [20] 周柯江. 磷脂酶C ϵ 1在链脲佐菌素诱导INS-1细胞损伤中的作用机制 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2023.
- [21] 刘玉斌, 王晓蕴, 马凌云. 利拉鲁肽、双歧杆菌三联活菌胶囊用于胰岛素+口服药疗效不佳的肥胖2型糖尿病患者的疗效观察 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2024, 24(7): 818-822.
- [22] ZHANG J W, JIANG H, WU F, et al. Neuroprotective effects of hesperetin in regulating microglia polarization after ischemic stroke by inhibiting TLR4/NF- κ B pathway [J]. *J Healthc Eng*, 2021, 2021: 9938874.
- [23] ZAPPAVIGNA S, COSSU A M, GRIMALDI A, et al. Anti-inflammatory drugs as anticancer agents [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2605.
- [24] 吕宝伟, 冯春青, 杨昊, 等. 补肾降浊饮及其拆方改善非酒精性脂肪肝大鼠胰岛素抵抗的机制研究 [J]. *中医临床研究*, 2023, 15(4): 70-75.
- [25] 杨洪艳, 冯正平. 维生素D与糖尿病发生及发展的相关性研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2020, 36(13): 2028-2031.
- [26] UMAR M, SASTRY K S, CHOUCANE A I. Role of vitamin D beyond the skeletal function: a review of the molecular and clinical studies [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1618.
- [27] 岳屹立, 张力, 王亚周, 等. 程序性细胞坏死及其炎症反应在脑缺血损伤中的研究进展 [J]. *神经解剖学杂志*, 2019, 35(1): 75-78.