

网络出版时间: 2024-07-18 09:58:56 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20240717.1523.012>

# 柚皮素通过调控 *miR-29b* 的高表达对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的改善作用

王元<sup>1,2</sup>, 曾凯宏<sup>2,3</sup>, 余雪梅<sup>1</sup>, 邓波<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨柚皮素(Nar)调控微小RNA-29b(*miR-29b*)的高表达对人肝癌细胞HepG2细胞胰岛素抵抗(IR)的作用,为研究Nar对糖尿病的防治作用机制做铺垫。方法 用100 nmol/L胰岛素刺激HepG2细胞建立HepG2细胞IR模型(IR-HepG2),分别用不同浓度(0、25、50、100  $\mu\text{g/ml}$ )的Nar干预IR-HepG2细胞;用葡萄糖试剂盒测定Nar对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗的影响;对50  $\mu\text{g/ml}$  Nar干预组IR-HepG2细胞转染*miR-29b mimic*和*miR-29b inhibitor*,分别用实时定量反转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)和蛋白质印迹法检测胰岛素信号传导通路中胰岛素受体底物-1(IRS-1)、蛋白激酶B/磷酸化蛋白激酶B(Akt/p-Akt)、葡萄糖转运子4(GLUT4)基因和蛋白的表达。结果 与IR-HepG2模型组比较,不同浓度Nar干预组细胞的葡萄糖消耗量升高( $P < 0.01$ ),其中50  $\mu\text{g/ml}$  Nar干预IR组最明显( $P < 0.001$ ),不同浓度Nar干预组IRS-1、Akt的mRNA表达增加( $P < 0.05$ ),其中50  $\mu\text{g/ml}$  Nar干预组IRS-1、Akt的mRNA表达增加最明显( $P < 0.001$ ),且50  $\mu\text{g/ml}$  Nar干预组GLUT4的mRNA表达增加( $P < 0.05$ ),同时,不同浓度Nar干预组IRS-1、p-Akt的蛋白表达增加( $P < 0.001$ )。与IR-HepG2模型组相比,*miR-29b mimic*转染组细胞中IRS-1、Akt、GLUT4的mRNA表达和IRS-1、p-Akt蛋白表达降低( $P < 0.001$ ),*miR-29b inhibitor*转染组中IRS-1、Akt、GLUT4的mRNA表达量和IRS-1、p-Akt蛋白表达无差异,Nar干预模型组和Nar干预转染*miR-29b mimic*组IRS-1、Akt、GLUT4的mRNA表达增加( $P < 0.001$ ),IRS-1、p-Akt的蛋白表达增加( $P < 0.05$ )。与Nar干预模型组比较,Nar干预转染*miR-29b mimic*组IRS-1、Akt、GLUT4的mRNA表达无变化,IRS-1、p-Akt蛋白表达增加( $P < 0.05$ ),Nar干预转染*miR-29b inhibitor*组IRS-1、Akt、GLUT4的

mRNA表达和IRS-1、p-Akt的蛋白表达下降( $P < 0.001$ )。结论 Nar干预可增加IR-HepG2细胞葡萄糖的消耗,提高胰岛素抵抗HepG2细胞中IRS-1、Akt、GLUT4基因的表达量,增加IRS-1、p-Akt蛋白的表达量,Nar通过抑制*miR-29b*高表达增加IR-HepG2细胞IRS-1、p-Akt蛋白的表达,改善HepG2细胞IR,Nar有望作为糖尿病有效防治前景的植物化合物。

关键词 柚皮素;胰岛素抵抗;微小RNA-29b

中图分类号 R 151.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)08-1423-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.020

糖尿病是一种全身糖代谢紊乱性疾病,其中90%以上为2型糖尿病(diabetes mellitus type 2, T2DM),其发病率逐年增加,随着病程发展,由T2DM诱发的心血管病变、糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变等疾病也严重影响患者生活质量<sup>[1-2]</sup>。二氢黄酮类化合物柚皮素(naringenin, Nar)在化橘红、枳实等中药含量较高,并广泛存在于芸香科柑橘属植物葡萄柚、酸橙、甜橙等的果皮和果肉中。研究<sup>[3]</sup>表明Nar具有降血糖、降血脂、保护肝脏等作用,显示出丰富的资源优势 and 巨大的潜在利用价值,但Nar对糖尿病的分子作用机制及靶点,目前尚存在很大争议。近年来,微小RNA对糖尿病的发生和胰岛素抵抗(胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)的作用成为热点,临床研究<sup>[4]</sup>表明T2DM患者血清中微小RNA-29b(*mircoRNA-29b*, *miR-29b*)上升,动物实验研究<sup>[5]</sup>表明T2DM大鼠肝、骨骼肌中*miR-29b*均被上调,这些研究证明*miR-29b*的高表达与T2DM的发生发展相关。因此,该实验选用人肝癌细胞HepG2细胞,构建肝脏HepG2细胞IR模型(insulin resistant HepG2 cell, IR-HepG2),用以评价Nar对肝脏IR的作用,并进一步探讨*miR-29b*过表达与Nar对IR的关系,以期解释Nar缓解T2DM的IR提供理论依据和新的治疗策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验细胞和药品 人肝癌细胞(HepG2)购

2024-05-22 接收

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(编号:150216);四川省中医药管理局中医药科研专项(编号:2021MS470);四川省人民医院科研基金(编号:2023QN06)

作者单位:<sup>1</sup>四川省医学科学院·四川省人民医院临床营养科,成都610072;<sup>2</sup>电子科技大学医学院,成都610054<sup>3</sup>四川省医学科学院·四川省人民医院健康管理研究所,成都610072

作者简介:王元,女,技师;

曾凯宏,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: zengkaihong@med.uestc.edu.cn

自美国菌种保藏中心(ATCC); Nar 购自上海 BBI Life Science 公司。

**1.1.2 主要试剂与仪器** DMEM 培养基、胎牛血清(FBS) 购自美国 Gibco 公司; 胰岛素购自美国 Sigma 公司; 磷酸盐缓冲液(PBS) 购自美国 Hyclone 公司; 胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS) -1、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt) /磷酸化 Akt(phosphorylated Akt, p-Akt)、葡萄糖转运体-4(glucose transporter-4, GLUT-4) 购自英国 Abcam 公司; miR-29b mimics、miR-29b inhibitor 购自上海 Genepharma 公司; IgG 兔抗鼠购自美国 CST 公司; 蛋白 RIPA 裂解液、TBST 购自北京 Solarbio 公司; 去 gDNA 反转录试剂盒、iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix 购自美国 Bio-Rad 公司; 脂质体 Lipofectamine™2000 购自美国 Invitrogen 公司; 蛋白预染 marker 购自瑞典 Merckodia 公司; qPCR 扩增仪(型号: ABI 7500 型) 购自美国 Applied Biosystems 公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 HepG2 细胞 IR 模型的建立及实验分组** 将 HepG2 细胞接种于含 10% FBS 的 DMEM 中, 放于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、相对湿度 95% 培养箱中培养。待传代 HepG2 细胞生长稳定后, 更换 1% FBS、5 mmol/L 的 DMEM 培养液继续培养 12 h, 更换 100 nmol/L 胰岛素、10% FBS、5 mmol/L 的 DMEM 培养基培养 24 h, 建立 IR-HepG2 细胞模型<sup>[6]</sup>。

分别用不同浓度(0、25、50、100 μg/ml) 的 Nar 干预 24 h, 建立如下分组: NC 组(正常培养基培养的细胞, 未干预)、模型组(IR 组, IR 模型细胞 + 无干预)、溶剂模型组(IR-V 组, IR 模型细胞 + 4 μl/ml DMSO)、IR-L-Nar 组(IR 模型细胞 + 25 μg/ml Nar)、IR-M-Nar 组(IR 模型细胞 + 50 μg/ml Nar)、IR-H-Nar 组(IR 模型细胞 + 100 μg/ml Nar)。

### 1.2.2 Nar 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的测定

IR-HepG2 细胞按分组要求培养稳定后, 更换培养基 10% FBS DMEM 培养基继续培养 2 h, 按照葡萄糖氧化酶试剂盒使用说明进行操作, 测定各孔内剩余葡萄糖含量, 使用酶标仪测量吸光度值(使用波长 570 nm), 根据标准浓度测出的标准曲线计算各孔中葡萄糖含量, 葡萄糖消耗量 = 葡萄糖含量(空白对照组) - 葡萄糖含量(待测各组)。

**1.2.3 细胞转染及转染后分组** 根据不同浓度 Nar 干预对 IR-HepG2 模型细胞糖代谢、基因及蛋白的结果, 选用效果最佳 50 μg/ml Nar 干预进行进一步实验。将其中 miRNA-29b mimic(40 nmol/L) 和

miRNA-29b inhibitor(200 nmol/L) 在 50 μg/ml Nar 干预前加入前 1 h 通过 Lipofectamine™2000 转染入 HepG2 细胞内。按照如下分组进行继续实验。

转染效率实验分组为以下 5 组: IR 组(IR-HepG2 细胞 + 空白溶剂)、IR-miR-29b-mimic 组(IR-HepG2 细胞 + miR-29b mimic 转染)、IR-mimic-NC 组(IR-HepG2 细胞 + mimic 转染)、IR-miR-29b-inhibitor 组(IR-HepG2 细胞 + miR-29b inhibitor 转染)、IR-inhibitor-NC 组(IR-HepG2 细胞 + inhibitor 转染)。

转染后 Nar 干预实验分组: NC 组(HepG2 细胞 + 普通培养液)、IR 组(IR-HepG2 细胞)、IR-miR-29b 组(IR-HepG2 细胞 + miR-29b mimics 转染)、IR-anti-miR-29b 组(IR-HepG2 细胞 + miR-29b inhibitor)、IR-Nar 组(IR-HepG2 细胞 + 50 μg/ml Nar)、IR-miR-29b-Nar 组(IR-HepG2 细胞 + miR-29b mimics + 50 μg/ml Nar)、IR-anti-miR-29b-Nar 组(IR-HepG2 细胞 + miR-29b inhibitor + 50 μg/ml Nar)。

**1.2.4 实时荧光定量反转录聚合酶链反应(Real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR) 实验测定 miRNA-29b 和胰岛素信号通路基因的表达** 分别收集各试验组中细胞, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 测定 GLUT4、IRS1、Akt 用 TaKaRa 反转录试剂盒进行逆转录, 采用 SYBR Green PCR 试剂盒进行 Real-time PCR, 测定 miR-29b 按照 TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit 和 TaqMan MicroRNA Assays 试剂盒说明书进行 RT-qPCR, 以 U6 为内参, 根据 RT-qPCR 反应曲线得到各组样品目的基因和内参基因的 C<sub>T</sub> 值。首先计算  $\Delta\Delta C_T$  值 = (实验组目的基因的 C<sub>T</sub> 平均值 - 实验组内参基因的 C<sub>T</sub> 平均值) - (对照组目的基因的 C<sub>T</sub> 平均值 - 对照组目的内参基因的 C<sub>T</sub> 平均值), 则基因相对表达量为  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 。引物序列见表 1。

### 1.2.5 Western blot 检测胰岛素信号通路蛋白表达

收集各组细胞, 用 1% PMSF 的 RIPA 细胞裂解液在冰上进行裂解, 离心取上清液, BCA 法测定总蛋白质浓度, 使用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 转印到 PVDF 上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入一抗后在 4 °C 温度下孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入相应二抗室温孵育 1 h, ECL 法凝胶成像系统处理, 对各组条带进行计值及统计分析。

**1.3 统计学处理** 使用 SPSS 20.0 统计软件分析处理, 定量数据采用平均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组

间比较采用单因素方差分析(ANOVA)进行评估,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表1 引物序列的核苷酸序列

名称	引物序列(5'-3')
GLUT4	F: TCATTCTGGACGGTTCCTC
	R: GCCAGTTGGTTGAGTGTCC
IRS1	F: CTATGCTGACATGCGGACAG
	R: GGTGGCTCCTTGAGGTGTAA
Akt	F: GGACCACAGTCATCGAGAG
	R: CTGTAAATCCATGGCGTCTC
GAPDH	F: TGCCACTCAGAAGACTGTGG
	R: TTCAGCTCTGGGATGACCTT
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA
	R: AACGCTTACGAATTTGCGT
miR-29b mimics	F: UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
	R: ACGCGAGCCGAACGAACAAAUU
mimics NC	F: UUCUCCGAACGUGUCAGGUTT
	R: ACGUGACACGUUCGGAGAATT
miR-29b inhibitor	F: UCACGCGAGCCGAACGAACAAA
	R: AGUGCGCUCGGCUUGCTTGUUU
Inhibitor NC	F: CAGUACUUUGUGUAGUACAA
	R: GTCAUGAAAACACAUCATGUU
miR-29b	F: ACGUGACACGUUCGGAGAATT
	R: CTTACTATCCGTTTGTTCGTTCG

## 2 结果

**2.1 Nar 干预对 IR-HepG2 模型细胞糖代谢的影响** 与 NC 葡萄糖消耗量(  $4.75 \pm 0.24$  ) mmol/L 比较, IR-HepG2 模型组细胞的葡萄糖消耗量(  $2.06 \pm 0.32$  ) mmol/L 降低(  $P < 0.001$  ), 说明细胞出现 IR; 与 IR-HepG2 模型组比较, 溶剂干预模型组细胞的葡萄糖消耗量(  $2.14 \pm 0.18$  ) mmol/L 差异无统计学意义, 25  $\mu\text{g/ml}$ 、50  $\mu\text{g/ml}$ 、75  $\mu\text{g/ml}$  Nar 干预组细胞的葡萄糖消耗量分别为(  $3.08 \pm 0.34$  )、(  $3.98 \pm 0.26$  )、(  $3.25 \pm 0.37$  ) mmol/L 均升高(  $F = 38.55$ ,  $P < 0.01$  ), 其中 50  $\mu\text{g/ml}$  Nar 干预 IR 组最明显(  $P < 0.001$  )。

**2.2 Nar 对 IR-HepG2 模型细胞 IRS-1、Akt、GLUT4 基因表达的影响** 与 NC 组 HepG2 细胞比较, 模型组 IRS-1、Akt、GLUT4 的 mRNA 表达均明显下降, 其差异有统计学意义(  $P < 0.001$  )。与模型组比较, 溶剂模型组基因的表达与模型组一致, 说明 Nar 对 IR 模型细胞基因的表达不受溶剂的影响。与模型组比较, 不同浓度 Nar 干预组 IRS-1、Akt 的 mRNA 表达均增加(  $P < 0.05$  ), 其中 IR-M-Nar 干预组增加最明显(  $P < 0.001$  ), 且 IR-M-Nar 组 GLUT4 的

mRNA 表达增加(  $P < 0.05$  )。见图 1。

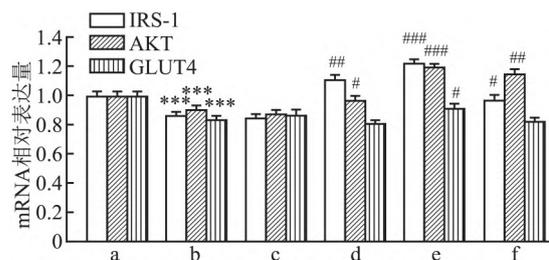


图1 Nar 干预对 IR-HepG2 模型细胞基因表达的影响

a: NC 组; b: IR 组; c: IR-V 组; d: IR-L-Nar 组; e: IR-M-Nar 组; f: IR-H-Nar 组; 与 NC 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 IR 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$

**2.3 Nar 对 IR-HepG2 模型细胞 IRS-1、p-Akt 蛋白表达的影响** 与正常培养 HepG2 细胞相比, IR-HepG2 未干预模型组细胞 IRS-1、p-Akt 的蛋白表达均下降(  $F = 307$ ,  $P < 0.001$ ;  $F = 1157$ ,  $P < 0.001$  ); 与 IR-HepG2 未干预模型组相比, 溶剂干预组蛋白的表达与模型组一致, 说明 Nar 对 HepG2 细胞模型细胞蛋白的表达作用不受溶剂的影响。与 IR-HepG2 未干预模型组相比, 不同浓度 Nar 干预组 IRS-1、p-Akt 的蛋白表达均增加。见图 2。

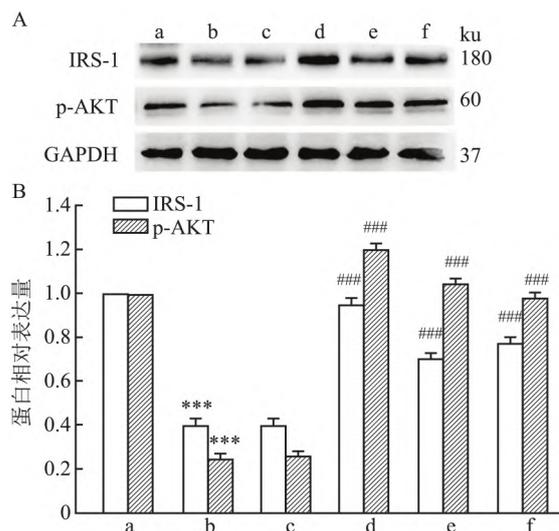


图2 Nar 干预各组 HepG2 细胞蛋白表达量和相对表达量

A: 蛋白表达电泳图; B: 定量分析蛋白相对表达量; a: NC 组; b: IR 组; c: IR-V 组; d: IR-L-Nar 组; e: IR-M-Nar 组; f: IR-H-Nar 组; 与 NC 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 IR 组比较: ###  $P < 0.001$

**2.4 对 IR-HepG2 细胞转染 miR-29b 的鉴定** 与 IR-HepG2 细胞未转染组相比, IR-HepG2 细胞被转染后, IR-miR-29b mimic 组细胞的 miR-29b 表达上升(  $P < 0.001$  ), IR-miR-29b-inhibitor 组 miR-29b 的

表达水平降低 ( $P < 0.001$ ) ,mimic-NC 和 inhibitor-NC 与 IR-HepG2 细胞未转染组 *miR-29b* 表达一致。此结果表明 *miR-375-mimic* 和 *miR-375-inhibitor* 均被成功转染进入 IR-HepG2 细胞。见图 3。

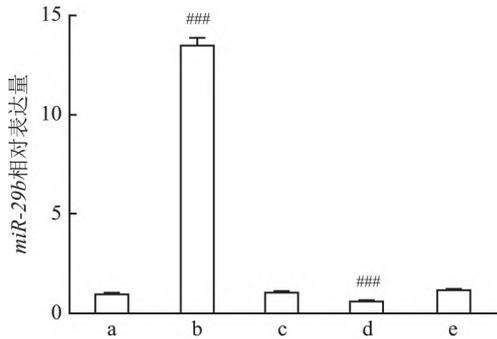


图3 IR-HepG2 细胞转染结果

a: IR 组; b: IR-miR-29b-mimic 组; c: IR-mimic-NC 组; d: IR-miR-29b-inhibitor 组; e: IR-inhibitor-NC 组; 与 IR 组比较: ###  $P < 0.001$

**2.5 Nar 对 IR-HepG2 细胞 *miR-29b* 上调/下调后 *IRS-1*、*Akt*、*GLUT4* 基因表达的影响** 与正常对照组相比 ,IR-HepG2 模型细胞中 *IRS-1*、*Akt*、*GLUT4* 的 mRNA 表达均下降 ( $P < 0.001$ ) ; 与 IR-HepG2 模型组相比 ,*miR-29b* mimic 模型组 HepG2 细胞中 *IRS-1*、*Akt*、*GLUT4* 的 mRNA 表达降低 ( $P < 0.001$ ) ,*miR-29b* inhibitor 模型组中 *IRS-1*、*Akt*、*GLUT4* 的 mRNA 表达量差异无统计学意义 ,而 Nar 干预模型组 *IRS-1*、*Akt*、*GLUT4* 的 mRNA 表达增加 ( $P < 0.001$ ) ,Nar 干预 *miR-29b* mimic 模型组 *IRS-1*、*Akt*、*GLUT4* 的 mRNA 表达上升 ( $P < 0.001$ ) ,Nar 干预 *miR-29b* inhibitor 模型组中 *IRS-1*、*Akt*、*GLUT4* 的 mRNA 表达量差异无统计学意义; 与 Nar 干预模型组比较 ,Nar 干预转染 *miR-29b* mimic 的细胞组 *IRS-1*、*Akt*、*GLUT4* 的 mRNA 表达量差异无统计学意义 ,Nar 干预转染 *miR-29b* inhibitor 的细胞组 *IRS-1*、*Akt*、*GLUT4* 的 mRNA 表达量降低 ( $P < 0.001$ ) 。见图 4。

**2.6 Nar 对 IR-HepG2 细胞 *miR-29b* 上调/下调后 *IRS-1*、*p-Akt* 蛋白表达的影响** 如图 5 所示 ,与正常对照组相比 ,模型组 HepG2 细胞中 *IRS-1*、*p-Akt* 的蛋白表达均下降 ( $P < 0.001$ ) ; 与模型组相比 ,*miR-29b* mimic 干预模型组中 *IRS-1*、*p-Akt* 的蛋白表达均降低 ,*miR-29b* inhibitor 模型组细胞中 *IRS-1*、*p-Akt* 的蛋白表达均差异无统计学意义 ,Nar 干预模型组 *IRS-1*、*p-Akt* 的蛋白表达均增加 ,Nar 干预 *miR-29b* mimic 模型组 *IRS-1*、*p-Akt* 的蛋白增加更明显; 与 Nar 干预模型组相比 ,Nar 干预 *miR-29b* mimic 模

型组 *IRS-1*、*p-Akt* 的蛋白均增加 ( $P < 0.05$ ) ,Nar 干预 *miR-29b* inhibitor 模型组 *IRS-1*、*p-Akt* 的蛋白表达下降 ( $P < 0.001$ ) 。

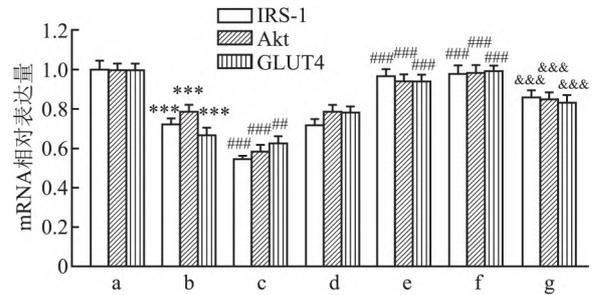


图4 Nar 干预对 IR-HepG2 细胞转染 *miR-29b* mimic/inhibitor 后基因表达的影响

a: NC 组; b: IR 组; c: IR-miR-29b 组; d: IR-anti-miR-29b 组; e: IR-Nar 组; f: IR-miR-29b-Nar 组; g: IR-anti-miR-29b-Nar 组; 与 NC 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 IR 组比较: #  $P < 0.01$  , ##  $P < 0.001$ ; 与 IR-Nar 组比较: &&&  $P < 0.001$

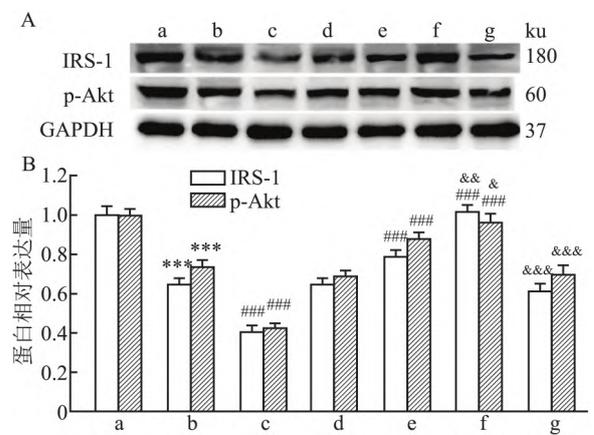


图5 转染 *miR-29b* mimic/inhibitor

IR-HepG2 细胞 Nar 干预后 *IRS-1*、*p-Akt* 的蛋白表达量

A: 蛋白表达电泳图; B: 定量分析蛋白相对表达量; a: NC 组; b: IR 组; c: IR-miR-29b 组; d: IR-anti-miR-29b 组; e: IR-Nar 组; f: IR-miR-29b-Nar 组; g: IR-anti-miR-29b-Nar 组; 与 NC 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 IR 组比较: ###  $P < 0.001$ ; 与 IR-Nar 组比较: &  $P < 0.05$  , &&  $P < 0.01$  , &&&  $P < 0.001$

### 3 讨论

糖尿病是一种以高血糖为特征的慢性代谢性疾病 ,已是当今全球多个国家的常见疾病 ,严重威胁着人类健康 ,其病死率排至第三 ,仅次于肿瘤和心血管疾病<sup>[1]</sup>。食用植物性食品对促进健康非常重要 ,特别是对慢性疾病的预防和管理。Nar 是柑橘类水果中的主要黄酮类生物活性物质之一 ,同时在化橘红、枳实等中药含量较高 ,具有多种有益作用 ,尤其是抗糖尿病作用。研究表明膳食补充 Nar 可以显著降低

链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病小鼠的空腹血糖和血浆的糖化血红蛋白值,明显升高糖尿病小鼠血浆中胰岛素浓度<sup>[7]</sup>,可以改善链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠的炎症反应<sup>[8]</sup>,但Nar影响糖尿病的具体分子机制尚不清楚。

IR是2型糖尿病主要的发病机制之一。肝脏是机体重要的糖代谢器官,肝脏细胞发生IR时,细胞内胰岛素信号传递受到抑制,即胰岛素信号传导通过胰岛素受体促进胰岛素与IRS-1、IRS-2的结合,然后将信号发出,激活胰岛素下游信号传导通路的蛋白激酶位点,如Akt被激活<sup>[9-10]</sup>,进而触发下游GLUT-4向膜转运,降低靶细胞对葡萄糖的摄取能力,引起IR的发生<sup>[11]</sup>,由此,肝脏细胞对胰岛素敏感性下降,导致糖代谢调控能力减弱,葡萄糖的摄取能力下降,进一步糖原合成受阻、糖脂代谢紊乱<sup>[12]</sup>。课题组前期研究发现Nar干预可以提高IR HepG2细胞模型葡萄糖的摄取和胰岛素敏感性<sup>[13]</sup>。本实验表明Nar干预增加IR-HepG2细胞IRS-1、Akt、GLUT4基因的表达,同时Nar干预增加了IR-HepG2细胞IRS-1、p-Akt的蛋白表达。

近年来,miRNA在糖尿病机制中的调节作用机制备受关注,其结构含约22个核苷酸的非编码单链RNA分子,作用主要通过促进目标靶基因降解或抑制其翻译,从而减弱目标靶基因的功能<sup>[14]</sup>。大量实验研究发现,miRNA-29在糖尿病的发生发展中的改变,Alfaifi et al<sup>[4]</sup>发现在200例临床确诊新诊断T2DM患者和200例健康受试者中,T2DM患者血清中miRNA-29b明显升高,且miRNA-29b的升高与T2DM患者的严重程度相关;通过深度测序和实时定量PCR证实,Kurtz et al<sup>[15]</sup>在饮食诱导的IR小鼠模型中,肝脏Foxa2和miR-29的mRNA水平升高;Yang et al<sup>[16]</sup>在饮食诱导肥胖小鼠的骨骼肌和肝脏中miR-29a显著上调,且miR-29a的高表达导致IRS-1蛋白表达显著降低,导致肌细胞胰岛素信号和葡萄糖摄取受损,证明miR-29a与IR的发展有因果关系。Nar对IR的影响是否也与高表达的miR-29b相关,目前鲜少报道。

该研究进一步探索了Nar对IR的影响与高表达的miR-29b的关系,结果显示,miR-29b过表达后IR-HepG2细胞的IRS-1、Akt、GLUT4的mRNA表达下降,IRS-1、p-Akt的蛋白表达受到抑制,Nar干预能逆转IR-HepG2细胞中IRS-1、Akt、GLUT4的mRNA表达下降,并且通过抑制miR-29b高表达增加IR-HepG2细胞的IRS-1、p-Akt的蛋白的表达。该研

究提示Nar可能通过抑制miR-29b的高表达介导IR-HepG2细胞IRS-1/Akt信号通路中蛋白的表达,最终改变IR对HepG2的影响,增强IR-HepG2细胞对胰岛素的敏感性,促进葡萄糖吸收的作用。柑橘类黄酮Nar是很有前途的抗糖尿病候选药物,为糖尿病的防治提供很好的思路,但该实验仅通过细胞实验予以阐明,缺少动物实验,仍需进一步补充以趋完善。

## 参考文献

- [1] Ahmad E, Lim S, Lamptey R, et al. Type 2 diabetes [J]. Lancet, 2022, 400(10365): 1803-20.
- [2] 邵青, 索南巴吉, 张滨婧, 等. 2021年糖尿病相关重要临床进展回顾[J]. 中国实用内科杂志, 2022, 42(5): 391-3.
- [3] Raja Kumar S, Mohd Ramli E S, Abdul Nasir N A, et al. Preventive effect of naringin on metabolic syndrome and its mechanism of action: a systematic review [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 9752826.
- [4] Alfaifi M, Verma A K, Alshahrani M Y, et al. Assessment of cell-free long non-coding RNA-H19 and miRNA-29a, miRNA-29b expression and severity of diabetes [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13: 3727-37.
- [5] Massart J, Sjögren R J O, Lundell L S, et al. Altered miR-29 expression in type 2 diabetes influences glucose and lipid metabolism in skeletal muscle [J]. Diabetes, 2017, 66(7): 1807-18.
- [6] Gao F, Jian L, Zafar M I, et al. 4-Hydroxyisoleucine improves insulin resistance in HepG2 cells by decreasing TNF- $\alpha$  and regulating the expression of insulin signal transduction proteins [J]. Mol Med Rep. 2015; 12(5): 6555-60.
- [7] Zygmunt K, Faubert B, MacNeil J, et al. Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398(2): 178-83.
- [8] Molotski N, Soen Y. Differential association of microRNAs with polysomes reflects distinct strengths of interactions with their mRNA targets [J]. RNA, 2012, 18(9): 1612-23.
- [9] Zygmunt K, Faubert B, MacNeil J, et al. Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398(2): 178-83.
- [10] Molotski N, Soen Y. Differential association of microRNAs with polysomes reflects distinct strengths of interactions with their mRNA targets [J]. RNA, 2012, 18(9): 1612-23.
- [11] Harmon A W, Patel Y M. Naringenin inhibits phosphoinositide 3-kinase activity and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305(2): 229-34.
- [12] Watt M J, Miotto P M, De Nardo W, et al. The liver as an endocrine organ-linking NAFLD and insulin resistance [J]. Endocr Rev, 2019, 40(5): 1367-93.
- [13] 王元, 曾凯宏, 邓波, 等. 柚皮素对3T3-L1和HepG2细胞胰岛素抵抗模型葡萄糖摄取能力和胰岛素敏感性的影响 [J]. 成都医学院学报, 2017, 12(6): 651-65.
- [14] Miao C, Zhang G, Xie Z, et al. MicroRNAs in the pathogenesis of type 2 diabetes: new research progress and future direction [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2018, 96(2): 103-12.

[15] Kurtz C L , Peck B C , Fannin E E , et al. MicroRNA-29 fine-tunes the expression of key FOXA2-activated lipid metabolism genes and is dysregulated in animal models of insulin resistance and diabetes[J]. *Diabetes* ,2014 ,63( 9) : 3141 –8.

[16] Yang W M , Jeong H J , Park S Y , et al. Induction of miR-29a by saturated fatty acids impairs insulin signaling and glucose uptake through translational repression of IRS-1 in myocytes [J]. *FEBS Lett* ,2014 ,588( 13) : 2170 –6.

## Naringenin ameliorates insulin resistance in HepG2 cells by regulating high *miR-29b* expression

Wang Yuan<sup>1 2</sup> , Zeng Kaihong<sup>2 3</sup> , Yu Xuemei<sup>1</sup> , Deng Bo<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Clinical Nutrition , Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital , Chengdu 610072; <sup>2</sup>School of Medicine , University of Electronic Science and Technology of China , Chengdu 610054; <sup>3</sup>Dept of Health Management Center & Institute of Health Management , Sichuan Provincial People's Hospital , University of Electronic Science and Technology of China , Chengdu 610072)

**Abstract Objective** To investigate the impact of naringenin( Nar) on insulin resistance( IR) in HepG2 cells and evaluate the role of *mircoRNA-29b* (*miR-29b*) expression in mediating this effect , thereby providing a foundation for further exploration into the mechanisms underlying naringenin's potential as a preventative and therapeutic agent for diabetes. **Methods** Insulin resistant HepG2 ( IR-HepG2) was established by stimulating HepG2 cells with 100 nmol/L insulin. Nar was treated with different concentrations ( 0 , 25 , 50 , 100  $\mu\text{g/ml}$ ) in IR-HepG2 cells. The effect of Nar on glucose consumption in IR-HepG2 cells was determined with glucose kit. *miR-29b mimic* and inhibitor were transfected into IR-HepG2 cells of the 50  $\mu\text{g/ml}$  Nar intervention group , and the expressions of insulin receptor substrate-1 ( IRS-1) , protein kinase B ( Akt) /phosphorylated Akt ( p-Akt) , glucose transporter-4 ( *GLUT4*) genes and proteins in the insulin signaling pathway were detected by Real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction ( RT-qPCR) and Western blot , respectively. **Results** Compared with IR-HepG2 model group , glucose consumption was increased in Nar intervention group with different concentrations (  $P < 0.01$ ) , among which 50  $\mu\text{g/ml}$  Nar intervention group was the most significant (  $P < 0.001$ ) , and mRNA expressions of *IRS-1* and *Akt* were increased in Nar intervention group with different concentrations (  $P < 0.05$ ) , the mRNA expression of *IRS-1* and *Akt* in 50  $\mu\text{g/ml}$  Nar intervention group was the most significantly increased (  $P < 0.001$ ) , and *GLUT4* mRNA expression in 50  $\mu\text{g/ml}$  Nar intervention group was increased (  $P < 0.05$ ) . The protein expressions of *IRS-1* and *p-Akt* were increased in different Nar concentration groups (  $P < 0.001$ ) . Compared with IR-HepG2 model group , mRNA expression of *IRS-1* , *Akt* and *GLUT4* and protein expression of *IRS-1* and *p-Akt* were decreased in *miR-29b mimic* transfected cells (  $P < 0.001$ ) , mRNA expression of *IRS-1* , *Akt* and *GLUT4* and protein expression of *IRS-1* and *p-Akt* were not different in *miR-29b inhibitor* transfection group , Nar intervention model group and Nar intervention transfected *miR-29b mimic* group increased the mRNA expression of *IRS-1* , *Akt* and *GLUT4* (  $P < 0.001$ ) , and the protein expression of *IRS-1* and *p-Akt* increased (  $P < 0.05$ ) . Compared with Nar intervention model group , Nar transfected *miR-29b mimic* with Nar intervention did not change the mRNA expressions of *IRS-1* , *Akt* and *GLUT4* , while the protein expressions of *IRS-1* and *p-Akt* were increased (  $P < 0.05$ ) , Nar interfered with mRNA expression of *IRS-1* , *Akt* and *GLUT4* and protein expression of *IRS-1* and *p-Akt* in *miR-29b inhibitor* group (  $P < 0.001$ ) . **Conclusion** Nar can increase glucose consumption in IR-HepG2 cells , increase the expression of *IRS-1* , *Akt* and *GLUT4* genes , and increase the expression of *IRS-1* and *p-Akt* proteins in IR-HepG2 cells. Nar increases the expression of *IRS-1* and *p-Akt* in IR-HepG2 cells by inhibiting the overexpression of *miR-29b* , and improves insulin resistance in HepG2 cells. Nar , as a plant compound , is expected to be a potential drug for the prevention and treatment of diabetes.

**Key words** naringenin; insulin resistance; microRNA-29b