La berberina reduce la resistencia a la insulina a través de la proteína quinasa C dependiente regulación positiva de la expresión del receptor de insulina.

Resumen:

Se ha informado que el producto natural berberina (BBR) tiene actividades hipoglucemiantes y sensibilizadoras a la insulina; Sin embargo, su mecanismo sigue sin estar claro. Este estudio fue diseñado para investigar el mecanismo molecular de BBR contra la resistencia a la insulina. Aquí, identificamos el receptor de insulina (InsR) como un objetivo de BBR para aumentar la sensibilidad a la insulina. En células hepáticas humanas cultivadas, BBR aumentó el ARN mensajero InsR (ARNm) y la expresión de proteínas de una manera dependiente de la dosis y el tiempo. La berberina también aumentó la expresión de InsR en las células del músculo esquelético de rata L6. La expresión de InsR mejorada con berberina mejoró el consumo de glucosa celular solo en presencia de insulina. El silenciamiento del gen InsR con un pequeño ARN interferente o el bloqueo de la fosfoinositol-3-quinasa disminuyó este efecto. La berberina indujo la expresión del gen InsR a través de una activación dependiente de la proteína quinasa C (PKC) de su promotor. La inhibición de PKC abolió la activación del promotor InsR causada por BBR y la transcripción de ARNm de InsR. En modelos animales, el tratamiento de ratas con diabetes mellitus tipo 2 con BBR disminuyó la glucosa en sangre en ayunas y la insulina sérica en ayunas, aumentó la sensibilidad a la insulina y aumentó la actividad de ARNm de InsR y PKC en el hígado. Además, BBR redujo la glucosa en sangre en KK-Ay tipo 2 pero no en ratones con diabetes mellitus tipo 1 NOD / LtJ que eran deficientes en insulina. Nuestros resultados sugieren que BBR es una medicina natural única contra la resistencia a la insulina en la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico.
© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introducción

El receptor de insulina (InsR) es una glucoproteína integral de la membrana celular y es esencial para la unión de la insulina a las células objetivo. La unión de la insulina con InsR en la superficie celular desencadena una vía de insulina intracelular que incluye la activación de InsR, la fosforilación de los sustratos del receptor de insulina, así como eventos seriales posteriores que incluyen fosfoinositol-3-quinasa (PI3K), quinasa dependiente de fosfoinositida, proteína quinasa B y mitógeno -proteína quinasas activadas [1]. La interacción entre InsR e insulina causa una amplia gama de respuestas fisiológicas para mantener la homeostasis de la glucosa, especialmente la glucosa en sangre en ayunas. La anormalidad en InsR es de gran importancia para el desarrollo de resistencia a la insulina, que es la causa subyacente y el componente esencial para la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico [2,3]. Las personas con resistencia a la insulina tienen ausencia o reducción de la expresión de InsR en los tejidos periféricos, particularmente el hígado, los músculos y los adipocitos [4].

Las tiazolidinedionas como la rosiglitazona y la zona pioglita reducen efectivamente la resistencia a la insulina al dirigirse a un receptor nuclear, receptor activado por proliferador de peroxisoma γ (PPAR-γ); pero el mecanismo sigue sin estar claro [5,6]. Aunque los medicamentos que se dirigen a PPAR-γ muestran un efecto hipoglucémico significativo en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 [7,8], se producen efectos adversos, que incluyen aumento de peso y retención de líquidos [9]. El fluido corporal expandido por tiazolidinedionas está asociado con la estimulación PPAR-γ de la absorción de sal renal mediada por el canal epitelial de Na (+) [10]. La búsqueda de objetivos y / o medicamentos nuevos y seguros contra la resistencia a la insulina sigue siendo el foco principal en el descubrimiento de fármacos.

La berberina (BBR; peso molecular, 371.8) es un compuesto de bencil tetra hidroxiquinolina extraído de Coptis chinensis [11]. Hemos identificado previamente BBR como un nuevo fármaco para la hiperlipidemia, que causa la reducción de colesterol y triglicéridos en pacientes [12]. Aumenta la expresión del receptor de lipoproteínas

de baja densidad (LDLR) a través de un mecanismo postranscripcional dependiente de la quinasa regulada por señal extracelular (ERK) [12-14]. Además, también se ha demostrado que BBR tiene actividad hipoglucémica y sensibilizante a la insulina tanto en el modelo animal como en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 [15,16]. Sin embargo, su mecanismo molecular aún no está claro. En el presente estudio, identificamos InsR como otro objetivo primario de BBR, que antagoniza la resistencia a la insulina in vitro e in vivo. Estos dos hallazgos juntos hacen que la BBR sea un compuesto importante de múltiples objetivos biológicos para las enfermedades metabólicas relacionadas con el azúcar y los lípidos. Debido a que hemos descrito su mecanismo en LDLR, esta presentación informará su modo de acción en InsR.

2- Materiales y métodos

2.1. Cultivo de células

Las líneas celulares de hepatoma humano HepG2 y Bel-7402 se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibióticos apropiados en una atmósfera de CO2 al 5% a 37 ° C. Las células L6 se cultivaron y mantuvieron en medio esencial mínimo α que contenía suero bovino fetal al 2% y antibióticos.

2.2. *Aislamiento de ARN, transferencia de ranura y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real.*

Los ARN celulares o tisulares totales se aislaron usando la solución de lisis de ARN Ultraspec (Laboratorio Biotecxs, Hous-ton, TX) siguiendo las instrucciones del vendedor. Para la transferencia de ranura, se transfirieron 10 µg de cada muestra de ARN a la membrana de nitrocelulosa a través de un aparato de transferencia de ranura (Schleicher y Schuell, Keene, NH). Las manchas se fijaron horneando a 80 ° C durante 2 horas, seguido de hibridación con una sonda de ADN complementario de InsR humano (cDNA) marcado con 32P de 0,89 kilobases (kb). Las mismas membranas fueron luego despojadas y rehibridadas a una sonda de β-actina humana (Actb) como control interno.

Los ARN celulares o tisulares totales se transcribieron inversamente en ADNc utilizando el Sistema de transcripción inversa (Promega, Madison, WI). La reacción en cadena cuantitativa en tiempo real de polímero-ase (PCR) se realizó con estos ADNc como se describió anteriormente [12]. Se usó β-actina como control interno; Los niveles de expresión normalizados de ARN mensajero InsR o LDLR (ARNm) se representaron como pliegues del control no tratado.

2.3. Citometría de flujo y análisis de tinción doblemente inmune.

Se usó un anticuerpo monoclonal contra InsR (Labvision / NeoMarkers, Fremont, CA) en el análisis de citometría de flujo de los niveles de expresión de la proteína InsR en las superficies celulares HepG2 o Bel-7402. Para la doble tinción, las células se incubaron simultáneamente con anticuerpo monoclonal InsR y un anticuerpo policlonal de conejo contra LDLR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). La inmunoglobulina G de ratón normal (IgG) y la IgG de conejo se usaron como controles. Después del lavado, las células se tiñeron con una IgG anti-ratón de cabra conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Santa Cruz Biotechnology), así como con una IgG anti-conejo de cabra conjugada con tetrametil-rodamina isotiocianato (Santa Cruz Biotechnology). Se analizaron las intensidades de fluorescencia del isotiocianato de fluoresceína / isotiocianato de tetrametil rodamina en la superficie celular.

2.4. Transfección de ARN interferente pequeña y ensayo de consumo de glucosa.

En un pequeño experimento de transfección de ARN interferente (ARNip), las células HepG2 se sembraron en placas de 6 pocillos con 2 x 105 células por pocillo. Para 1 pocillo de una placa de 6 pocillos, se diluyeron 6 µL de dúplex de siRNA InsR humano (Santa Cruz Biotechnology) o siRNA de control y 6 µL de reactivo de transfección de siRNA (Santa Cruz Biotechnology) y se mezclaron bien con 1 ml de medio de transfección de

siRNA (Santa Cruz Biotecnología). Las mezclas se cargaron en células HepG2 durante 6 horas. Después de la transfección, se usaron 7,5 µg / ml de BBR y / o 1 nmol / L de insulina para tratar las células. Después de la incubación durante 12 horas, se analizaron los niveles de glucosa en los medios de muestra. El consumo de glucosa se calculó de la siguiente manera: nivel de glucosa del RPMI-1640 fresco menos nivel de glucosa del RPMI-1640 usado. El derribo de la expresión de ARNm de InsR por InsR siRNA se confirmó mediante transcriptasa inversa (RT) en tiempo real -PCR.

2.5. Bloqueo

Las células HepG2 se pretrataron o no se trataron con inhibidor de PI3K wortmannina durante 1 hora; Luego se añadieron 1 nmol / L de insulina y 7,5 µg / ml de BBR al medio de cultivo. Después de la incubación durante 12 horas, se determinaron los niveles de glucosa en el medio de muestra; y se calcularon los consumos de glucosa.

En otro conjunto de experimentos, el inhibidor de la quinasa p38 SB203580, el inhibidor de MEK1 U0126, la curcumina del inhibidor de cinasa N-terminal c-Jun, el inhibidor de PI3K wortmannin y el inhibidor de la proteína quinasa C (PKC) calfostina C se agregaron al medio de cultivo 1 hora antes de la tratamiento con BBR. Las células se cosecharon después del tratamiento con BBR durante 8 horas. Se analizaron los niveles de ARNm de InsR y LDLR y las actividades del promotor de InsR.

2.6. Estudio de semivida del ARNm de InsR

Las células HepG2 se trataron o no se trataron con 7,5 µg / ml de BBR durante 8 horas. Posteriormente, se añadieron 5 µg / ml de actinomicina D para bloquear la transcripción. Los ARN celulares totales se recolectaron en diferentes puntos de tiempo después del tratamiento con actinomicina D y se transfirieron a las membranas de nitrocelulosa. Las membranas se hibridaron, respectivamente, con sondas específicas de InsR y Actb como se describió anteriormente; y las bandas se cuantificaron mediante densitometría. Los niveles de ARNm de InsR se normalizaron a Actb, y sus porcentajes restantes se representaron en función del tiempo; Se calcula la tasa de descomposición o la vida media del ARNm de InsR.

2.7. Plásmido, transfección transitoria y ensayo de luciferasa.

El Dr. Araki E. proporcionó amablemente el plásmido de fusión del gen de luciferasa del promotor InsR (pGL3-1.5kIRP). En esta construcción de fusión, se insertó un fragmento de 1,5 kb del promotor del gen InsR humano en el sitio HindIII del vector pGL3-basic, formando El plásmido de fusión pGL3-1.5kIRP [17]. Las células HepG2 (2 × 105 por pocillo de una placa de 6 pocillos) se transfectaron con 1 µg del pGL3-1.5kIRP utilizando el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche Applied Science, Indianápolis, IN). Después de la transfección durante la noche, se eliminaron los medios de cultivo; y las células transfectadas se trataron con BBR durante 8 horas a diferentes concentraciones como se indica. Se prepararon lisados celulares y se midieron las actividades de luciferasa usando el sistema de ensayo de luciferasa (Promega).

2.8. Ensayo de actividad de PKC

Las actividades de PKC celular y tisular se analizaron usando el kit de ensayo de PKC no radiactivo PepTag (Promega) según el protocolo. Brevemente, después de la homogeneización y la purificación parcial, se mezclaron 10 µL de proteína de muestra con 5 µL de péptido PepTag C1 (sustrato específico de PKC), 5 µL de tampón de reacción y 5 µL de solución activadora de PKC en un sistema de reacción de 25 µL. Las reacciones se realizaron a 30 ° C durante 30 minutos. Las muestras se cargaron luego en un gel de agarosa al 0,8%. Después de la electroforesis, los péptidos PepTag C1 fosforilados y no fosforilados se separaron, con los fosforilados cargados negativamente y migraron hacia el ánodo. Los geles fueron fotografiados bajo una luz UV. Las bandas que contienen los sustratos fosforilados se escindieron y se fundieron. Se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se cuantificaron utilizando una densitometría de acuerdo con el protocolo del proveedor.

La actividad catalítica del PKC total de una muestra específica se expresó como picomoles por minuto por miligramo, lo que representa el número de picomoles de fosfato transferidos al sustrato por minuto por miligramo de proteína de la muestra.

2.9. Experimentos con animales

2.9.1 Modelo de rata

Las ratas Wistar (macho, 250 ± 10 g) se obtuvieron del Instituto de Ciencias de Animales de Laboratorio (Academia China de Ciencias Médicas, Beijing, China). La diabetes mellitus tipo 2 fue inducida por la alimentación con grasa y el tratamiento con estreptozotocina como se describe [18]. Las ratas diabéticas fueron tratadas con BBR por vía oral dos veces al día, con una dosis total de BBR a 75 o 150 mg / (kg d), respectivamente. Se tomaron muestras de sangre por corte de cola después de un ayuno de 6 horas en los días indicados de tratamiento, y se midieron los niveles de glucosa en sangre. El último día del experimento, todas las ratas fueron sacrificadas después del ayuno nocturno. Los hígados y los tejidos musculares de los bíceps femorales de las ratas se diseccionaron y almacenaron en nitrógeno líquido para extracción de ARN, ensayo de RT-PCR en tiempo real y ensayo de actividad PKC. También se recogieron muestras de sangre total para analizar los niveles de insulina en suero en ayunas. Los niveles de insulina se analizaron mediante radioinmunoensayo (Linco Research, St Charles, MO). Los índices de sensibilidad a la insulina (ISI) se calcularon de acuerdo con la fórmula 104 / (insulina sérica en ayunas × glucosa en sangre en ayunas) [19]. El nivel de insulina y el ISI de las ratas normales se determinaron para comparación.

2.9.2 Diabetes mellitus tipo 1 NOD / LtJ y diabetes mellitus tipo 2 KK-Ay ratones.

Se obtuvieron ratones hembra NOD / LtJ de 8 a 10 semanas de edad del Centro de Animales de Laboratorio de Shanghai (Academia China de Ciencias, Shanghai, China). El desarrollo de diabetes (diabetes mellitus tipo 1) en ratones NOD / LtJ se determinó controlando la glucosa en sangre. A las 15 ± 1 semanas de edad, aproximadamente el 75% de los ratones NOD / LtJ desarrollaron diabetes espontáneamente, de acuerdo con informes anteriores [20]. La diabetes mellitus tipo 2 hembra KK-Ay y los ratones C57BL / 6J de tipo salvaje se obtuvieron del Instituto de Ciencias de Animales de Laboratorio. Todos los animales fueron alimentados con comida para roedores regular. Los ratones diabéticos NOD / LtJ y KK-Ay se dejaron sin tratar o se trataron oralmente con BBR a 100 o 200 mg / (kg d), respectivamente. Antes y después de 3 semanas de período de tratamiento, se tomaron muestras de sangre mediante un corte de cola después de un ayuno de 6 horas; y se midieron los niveles de glucosa en sangre. El último día del experimento, todos los ratones fueron sacrificados; y se tomaron muestras de sangre para analizar los niveles de insulina en suero en ayunas. Sus hígados fueron disecados para el análisis de la expresión de InsR. El nivel de insulina en ayunas de ratones C57BL / 6J se determinó como control de tipo salvaje.

Todos los experimentos con animales siguieron las instrucciones del Estatuto de Manejo de Animales de Laboratorio de Beijing Municipality. Los animales fueron atendidos de acuerdo con las pautas institucionales de la Academia China de Ciencias Médicas.

2.10. análisis estadístico

Después de la validación de la prueba de homogeneidad de la varianza, se examinaron las diferencias de los resultados medios entre los grupos de estudio mediante análisis de varianza de 1 o 2 vías seguido de comparaciones múltiples.

3. RESULTADOS

3.1. BBR regula la expresión de InsR y aumenta el consumo de glucosa en las células hepáticas humanas.

Las células de hepatoma humano HepG2 se trataron con BBR y mostraron un aumento dependiente de la dosis en la expresión de ARNm de InsR (Fig. 1A). La RT-PCR cuantitativa en tiempo real mostró un aumento del 40% del ARNm de InsR en las células tratadas con 2.5 µg / ml de BBR durante 8 horas, y se observó un aumento máximo de 3.2 veces el control con una concentración de 15 µg / ml; Una transferencia de ranura confirmó una magnitud similar de aumento en el nivel de ARNm de InsR (Fig. 1A). El efecto de BBR también dependía del tiempo. El nivel de ARNm de InsR aumentó 4 horas después de la exposición de las células a BBR (7,5 µg / ml) y alcanzó el nivel máximo de 2,5 veces el control a las 8 horas; la expresión de InsR mRNA permaneció alta durante al menos 24 horas (Fig. 1B). En consecuencia, la abundancia de proteína InsR en la superficie celular HepG2 se incrementó mediante BBR (Fig. 1C). El efecto de BBR sobre InsR se confirmó aún más en otra línea celular de hepatoma, Bel-7402 de origen chino (datos no mostrados). Para ver el aumento simultáneo de InsR y LDLR por BBR, se realizó una tinción doblemente inmune y se demostró una notable regulación positiva de LDLR e InsR en una magnitud similar en la superficie de los hepatocitos humanos tratados con BBR (Fig. 1D), lo que sugiere La bioactividad de doble objetivo de BBR.

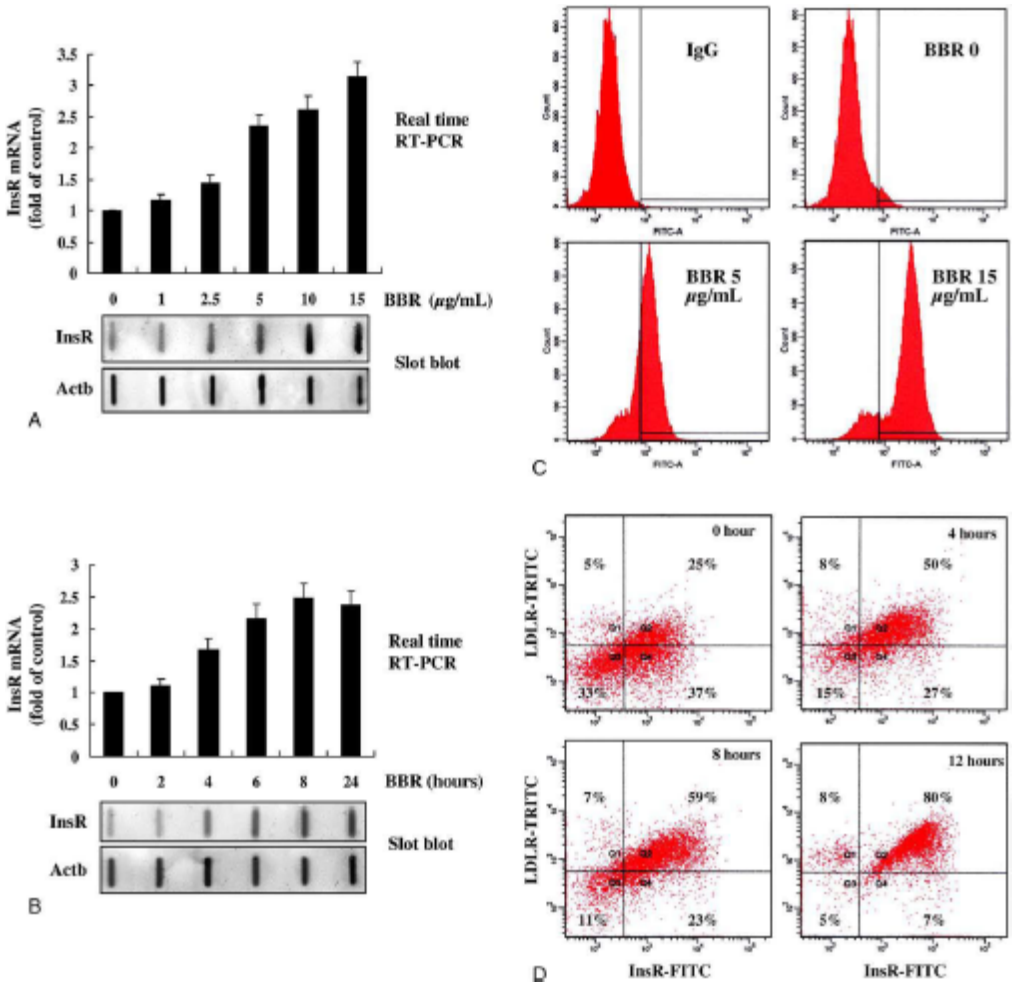

Fig. 1. Regulación al alza de la expresión de InsR por BBR en células HepG2. A, inducción dependiente de la dosis de expresión de ARNm de InsR por BBR. Las células HepG2 se incubaron con BBR a diferentes concentraciones durante 8 horas. Los niveles de ARNm del receptor de insulina se analizaron por RT-PCR en tiempo real (panel superior) y transferencia de ranura (panel inferior), respectivamente, con Actb como control interno. Los resultados son la media ± DE de al menos 3 experimentos repetidos. B, Inducción dependiente del tiempo de expresión de ARNm de InsR por BBR. Las células HepG2 se trataron con BBR (7,5 µg / ml) durante los tiempos indicados. Se aislaron los ARN totales para el análisis de la expresión de ARNm de InsR por RT-PCR en tiempo real (panel superior) y transferencia de ranura (panel inferior). Los resultados son la media ± DE de

al menos 3 experimentos repetidos. C, Berberina aumentó la expresión de InsR en la superficie celular. Las células HepG2 se trataron con diferentes concentraciones de BBR durante 8 horas; La expresión de InsR de la superficie celular se analizó mediante citometría de flujo usando un anticuerpo monoclonal anti-InsR. Se incluyó IgG de ratón normal en el ensayo como control para la unión no específica. D, Regulación al alza de InsR y LDLR. La berberina (7,5 µg / ml) aumentó la expresión de InsR y LDLR en la superficie de las células HepG2, y la regulación por incremento aumentó con el tiempo para ambos receptores.

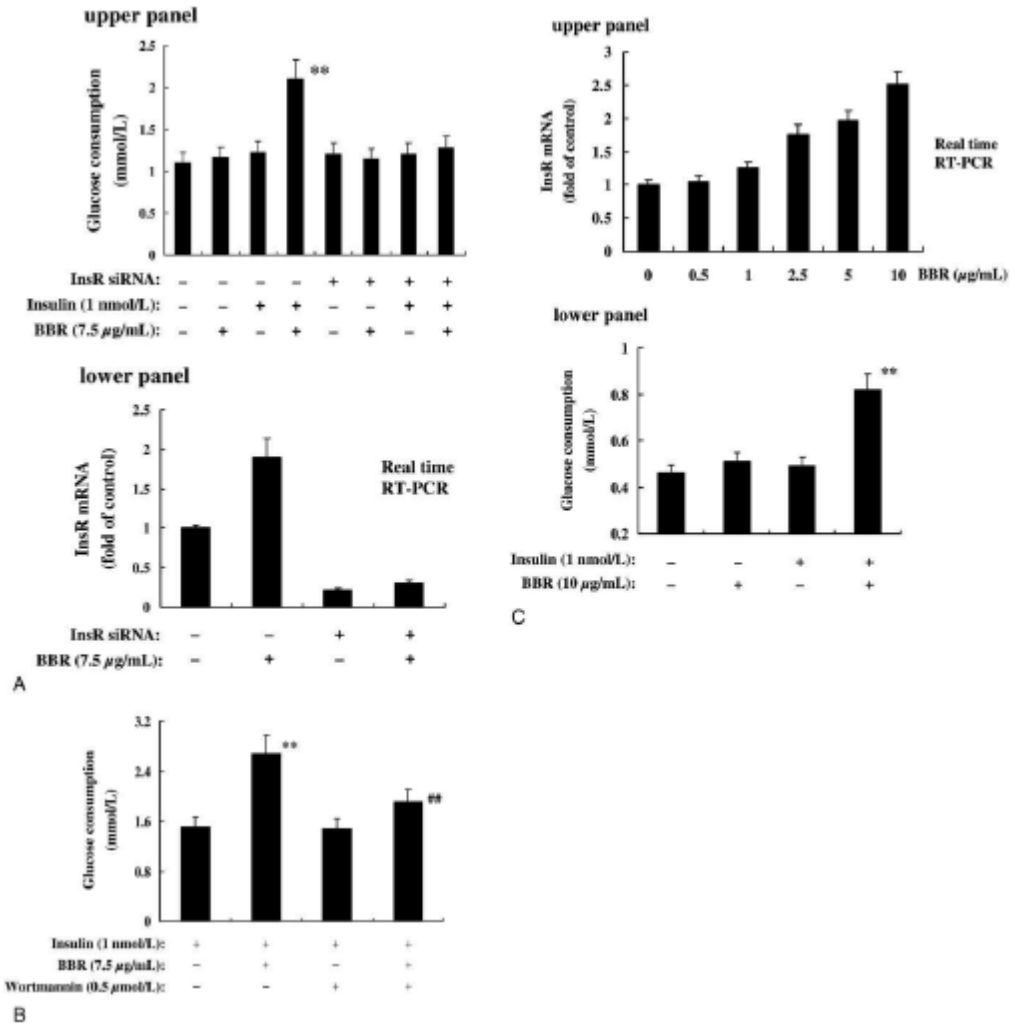

Fig. 2. La berberina mejora el consumo de glucosa en células cultivadas. A, la berberina aumentó el consumo de glucosa en presencia de expresión de InsR e insulina en las células HepG2 (panel superior). El silenciamiento de InsR con siRNA inhibió la expresión de InsR mRNA (panel inferior) y, por lo tanto, abolió el efecto de aumento de consumo de glucosa de BBR (panel superior). Los valores son la media ± DE de al menos 3 experimentos separados. ∗∗P b .01 frente a la del control no tratado. B, el bloqueo de PI3K abolió el efecto de BBR en el consumo de glucosa. Las células HepG2 se pretrataron o no se trataron con 0,5 µmol / L de wortmannina; 1 hora despues; Se agregaron insulina y BBR a los medios de cultivo. Después de 12 horas de incubación, se determinaron los niveles de glucosa en los medios de muestra; y se calcularon los consumos de glucosa. Los valores son la media ± DE de al menos 3 experimentos separados. ∗∗P b .01 frente a insulina sola, ## P b .01 frente a insulina más BBR. C, el efecto de la berberina en las células musculares esqueléticas de rata L6. Regulación al alza de la expresión de ARNm de InsR en células musculares L6 por BBR después de un tratamiento de 24 horas (panel superior). La berberina aumentó el consumo de glucosa en las células musculares L6 después del tratamiento de 24 horas en presencia de insulina (panel inferior). Los valores son la media ± DE de al menos 3 experimentos separados. ∗∗P b .01 frente a la del control no tratado.

El aumento de la expresión de InsR se tradujo directamente en una mayor sensibilidad a la insulina en las células diana. El consumo de glucosa de las células hepáticas humanas tratadas con insulina aumentó significativamente por BBR (P b .01; Fig. 2A, panel superior). Para conocer el papel de InsR en este efecto, se usó siRNA para derribar el gen InsR. Aunque el control siRNA no tuvo ningún efecto sobre la expresión de InsR mRNA (datos no mostrados), el InsR siRNA específico inhibió fuertemente la expresión de InsR mRNA (Fig. 2A, panel inferior) y abolió totalmente el efecto de BBR sobre el consumo de glucosa relacionada con la insulina en las células hepáticas (Fig. 2A, panel superior). Estos resultados indican que la presencia de InsR en la superficie celular y la insulina en las circunstancias son esenciales para que BBR aumente el consumo celular de glucosa. El efecto de la berberina también dependía de la vía de señalización de la insulina. Como se muestra en la Fig. 2B, el bloqueo de PI3K con wortmannina abolió el efecto de BBR sobre el consumo de glucosa. Además de los hepatocitos, BBR también aumentó la expresión de InsR en las células musculares (Fig. 2C, panel superior) y, posteriormente, el consumo de glucosa en presencia de insulina (Fig. 2C, panel inferior), lo que indica la efectividad de BBR en InsR en otros órganos relacionados con el metabolismo del azúcar.

3.2. BBR aumenta la expresión del gen InsR a través de la activación dependiente de PKC de su promotor.

Como se muestra en la figura 3A, el tratamiento con BBR no prolongó la tasa de renovación del transcrito de InsR con respecto a las células no tratadas (4,7 frente a 4,4 horas), lo que sugiere que la expresión mejorada del gen InsR por BBR se produjo en la etapa transcripcional en lugar de la postranscripcional. Por lo tanto, dirigimos nuestra atención al promotor del gen InsR [21,22]. El plásmido de fusión (pGL3-1.5kIRP) que contenía pGL3 y un segmento de 1,5 kb del promotor InsR se usó para examinar la actividad de BBR. Las células en placas de cultivo se transfectaron transitoriamente con el plásmido de fusión. Después de la incubación durante la noche, las células se trataron con BBR durante 8 horas. Como se muestra en la Fig. 3B, BBR aumentó el nivel de luciferasa en las células transfectadas con pGL3-1.5kIRP de una manera dependiente de la dosis; y a una concentración de 10 µg / ml, BBR elevó el nivel de luciferasa en las células en 2,5 veces. Este resultado demuestra el efecto estimulante de BBR en el promotor del gen InsR.

Para explorar la vía responsable de la transcripción del gen InsR inducida por BBR, se utilizaron diferentes inhibidores de quinasas. Descubrimos que la actividad de BBR en la transcripción del gen InsR era más sensible al inhibidor de PKC calphostin C. La calphostin C a 0.2 µmol / L disminuyó completamente la actividad de BBR en la transcripción del gen InsR, pero no cambió el nivel de mRNA de LDLR (Fig. . 4A). Por el contrario, la inhibición de la ruta ERK por U0126 no tuvo efecto sobre la actividad de BBR en la transcripción de InsR, pero abolió por completo el aumento del ARNm de LDLR (Fig. 4B). Estos resultados indican que la vía BBR en la expresión del gen InsR está totalmente separada de su efecto en LDLR. Para determinar si BBR activa directamente PKC, las células se trataron con BBR; y se evaluó la actividad de PKC total. La actividad de PKC aumentó en las células hepáticas tratadas con BBR de forma dependiente del tiempo; La elevación de la actividad de PKC se observó por primera vez a las 0,5 horas después del tratamiento con BBR y aumentó con el tiempo (Fig. 4C). La cinética de la activación de PKC precedió a la regulación positiva de la expresión de InsR por BBR. El pretratamiento de las células con calphostin C disminuyó completamente la actividad de BBR en el promotor del gen InsR (Fig. 4D). Un conocido activador PKC, el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), se utilizó como referencia en los experimentos y exhibió los mismos resultados, lo que indica que PKC es parte del mecanismo para la activación del promotor del gen InsR. El resultado está de acuerdo con el de la Fig. 4A e indica que la activación de la vía PKC es esencial para la regulación positiva mediada por BBR de la expresión de InsR.

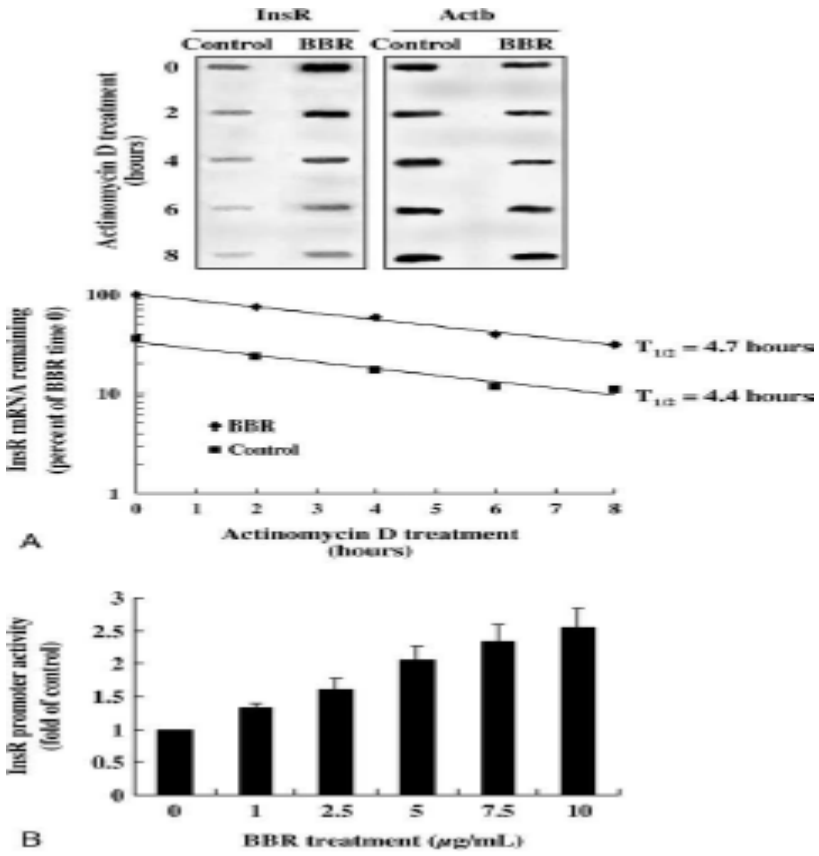

Fig. 3. La berberina aumenta la expresión del gen InsR a nivel transcripcional. A, la berberina no tuvo efecto sobre la descomposición del ARNm de InsR. Las células HepG2 no fueron tratadas o tratadas con BBR durante 8 horas. Posteriormente, se añadió actinomicina D a las células durante diferentes intervalos. Los niveles de ARNm de InsR se analizaron por transferencia de ranura. Los niveles de ARNm InsR normalizados se representaron como el porcentaje del resto. Las curvas de descomposición se trazaron frente al tiempo. T1 / 2 indica vida media. B, Activación del promotor del gen InsR. Las células HepG2 se transfectaron con el plásmido de fusión pGL3-1.5kIRP. Las actividades de luciferasa se midieron después del tratamiento con BBR y se representaron como pliegue de control. Los datos representan actividades promotoras de InsR normalizadas de al menos 3 experimentos separados (media ± DE).

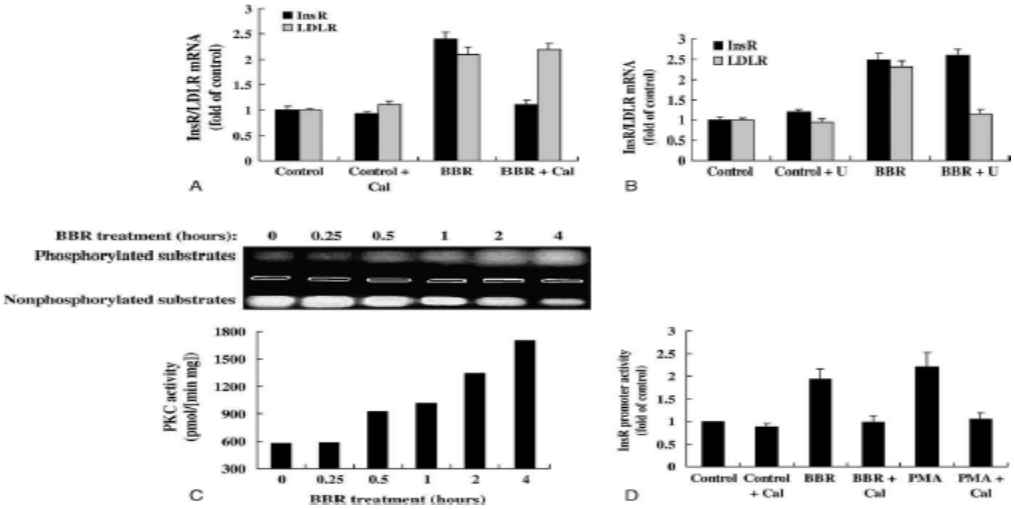

Fig. 4. La berberina estimula el promotor del gen InsR a través de la activación de PKC. A, el efecto dependiente de PKC de BBR en la expresión de InsR. Las células HepG2 sin o con el pretratamiento de 0,2 µmol / L de

calfostina C (un inhibidor de PKC) se trataron con 7,5 µg / ml de BBR durante 8 horas. Se aisló el ARN total y se midió la cantidad relativa de ARNm de InsR y LDLR por RT-PCR en tiempo real. Los resultados son la media ± DE de al menos 3 experimentos repetidos. Cal indica calphostin C. B, el efecto de Berberine en InsR es independiente de la actividad ERK. Las células HepG2 sin o con el pretratamiento de 1 µmol / L U0126 (un inhibidor de ERK) se trataron con 7,5 µg / ml de BBR durante 8 horas. La cantidad relativa de ARNm InsR y LDLR se midió por RT-PCR en tiempo real. Los resultados son la media ± DE de al menos 3 experimentos repetidos. U indica U0126. C, aumento de la actividad PKC por BBR. Las células HepG2 se trataron con BBR (5 µg / ml) durante los tiempos indicados. Los lisados celulares totales se usaron para detectar los sustratos fosforilados y no fosforilados que se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa. La actividad PKC se cuantificó usando densitometría y se expresó como el número de picomoles de fosfato transferidos al sustrato por minuto por miligramo de proteína de muestra. Presentado fue representativo de al menos 3 experimentos separados. D, la activación dependiente de PKC del promotor del gen InsR. Las células HepG2 transfectadas con pGL3-1.5kIRP con o sin pretratamiento de 0.2 µmol / L de calphostin C fueron expuestas a 5 µg / mL de BBR o 0.5 µmol / L de PMA durante 8 horas, seguido de lisis celular. Se midieron las actividades de luciferasa. Los resultados representan la actividad normalizada del promotor InsR (media ± DE).

3.3. BBR reduce la glucosa en sangre en el modelo 2, pero no en el modelo 1 de diabetes mellitus en roedores.

Para examinar el mecanismo y la actividad in vivo, los experimentos con animales se realizaron primero en ratas, en las que los efectos de la grasa de la dieta añadida sobre la resistencia a la insulina han sido bien documentados [18,23]. Antes del tratamiento con BBR, los animales fueron alimentados con una dieta alta en grasas durante 4 semanas y tratados con estreptozotocina. Redujeron significativamente la sensibilidad a la insulina (P b .001, Fig. 5E) y elevaron la glucosa en sangre en ayunas de 7 a 12.8 mmol / L (P b .001), semejando la característica de resistencia a la insulina en la diabetes mellitus tipo 2. El tratamiento de estas ratas mediante la administración oral de BBR durante 15 días resultó en una disminución de la glucosa en sangre en ayunas dependientes de la dosis (Fig. 5A). Después de 15 días de terapia, BBR a una dosis de 75 mg / (kg d) redujo la glucosa en un 22% (P b .01); y a la dosis de 150 mg / (kg d), redujo la glucosa en un 33% (P b .001) en comparación con las ratas no tratadas en la misma dieta alta en grasas. El efecto de BBR también dependía del tiempo (Fig. 5A).

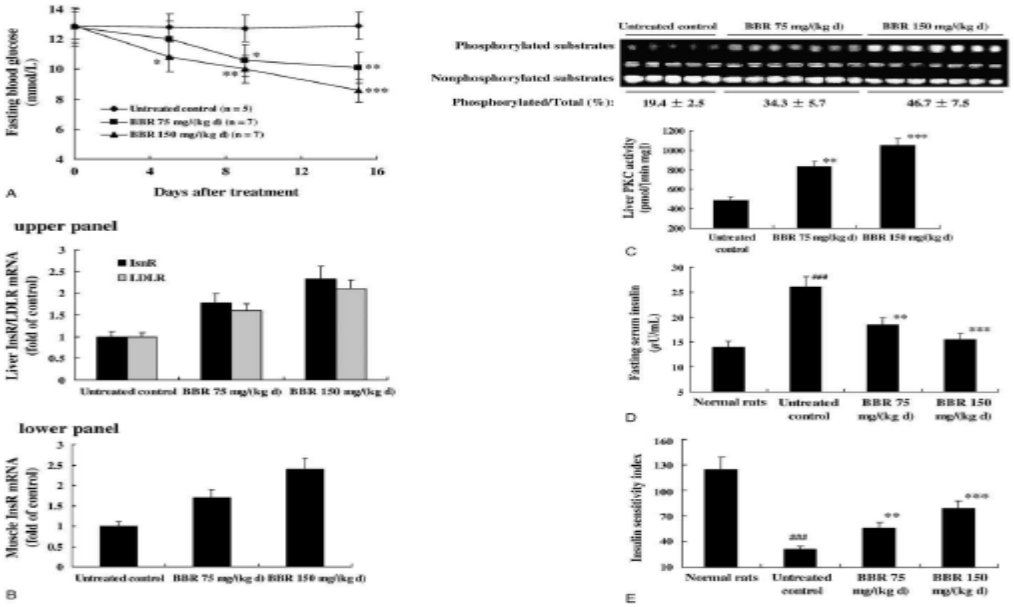

Fig. 5. La berberina reduce la glucosa en sangre en ratas hiperglucémicas alimentadas con una dieta alta en grasas. La diabetes mellitus tipo 2 fue inducida por la alimentación con grasa y el tratamiento con estreptozotocina en ratas Wistar machos. Las ratas diabéticas se dividieron en 3 grupos con 5 a 7 animales en

cada grupo. Se dejaron sin tratamiento o tratados con BBR por vía oral dos veces al día, con una dosis total de 75 o 150 mg / (kg d), respectivamente. Los animales fueron tratados durante 15 días. A, reducción dependiente del tiempo y la dosis de la glucosa en sangre en ayunas por BBR. B, Regulación al alza de InsR en ratas tratadas con BBR. Los extractos de ARNm de hígado (panel superior) y músculo (panel inferior) de las ratas se usaron para el ensayo de RT-PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de InsR / LDLR. C, aumento de la actividad de PKC en el hígado. Las muestras de hígado de las ratas se analizaron para determinar la actividad de PKC como se describe en "Materiales y métodos". Se determinaron los porcentajes medios de sustratos fosforilados entre el total. D, reducción de la insulina en sangre. E, sensibilidad a la insulina mejorada por BBR. Los resultados representan la media ± DE de 5 a 7 animales en cada grupo. ### P b .001 versus el de las ratas normales; ∗P b .05, ∗∗P b .01 y ∗∗∗P b .001 frente al control hiperglucémico no tratado.

Se observaron disminuciones en la glucosa en sangre en el día 5 y se volvieron estadísticamente significativas para el día 9 en ambas dosis (P b .05, b .01). Al final del tratamiento, se examinaron los niveles de ARNm de InsR en el hígado y los músculos en las ratas. El ARNm de InsR hepático se elevó en todas las ratas tratadas con BBR de forma dependiente de la dosis; Se detectaron aumentos de 1,8 y 2,25 veces del ARNm de InsR en hígados de ratas tratados con BBR a 75 o 150 mg / (kg d), respectivamente (Fig. 5B, panel superior). El aumento del ARNm de InsR en los músculos de las ratas fue similar al de los hepatocitos (Fig. 5B, panel inferior). La expresión elevada de ARNm de InsR fue concurrente con la actividad incrementada de PKC en el hígado de ratas tratadas con BBR (Fig. 5C). Estos resultados proporcionan un enlace directo para el efecto reductor de glucosa de BBR con su actividad en la expresión de InsR y confirman el importante papel de PKC in vivo.

También se midió la insulina sérica en ayunas en los animales. Como se muestra en las figuras 5D y E, las ratas no tratadas alimentadas con una dieta alta en grasas durante 4 semanas demostraron un aumento significativo de la insulina sérica en ayunas y una disminución de ISI en comparación con los controles normales, lo que indica un estado de resistencia a la insulina en los animales. El tratamiento de los animales con BBR redujo significativamente el nivel de insulina en suero elevado por la alimentación con alto contenido de grasa (Fig. 5D). Al mismo tiempo, BBI mejoró en gran medida el ISI (Fig. 5E), lo que sugiere una restauración de la sensibilidad a la insulina alterada y una reducción de la resistencia a la insulina.

Luego intentamos seleccionar un modelo animal adecuado para saber si InsR es la molécula esencial in vivo para el efecto hipoglucémico de BBR. Una de las opciones es el ratón homocigótico InsR gen knockout (InsR - / -); sin embargo, las crías murieron dentro de las 2 semanas posteriores al nacimiento, semejando el fenotipo del leprechaunismo en humanos [24]. Del mismo modo, los ratones con mosaicismo celular para alelos InsR nulos (ablación en 80% -98%) sobrevivieron durante solo 3 semanas [25]. Otro posible modelo es el ratón knockout InsR específico para hígado (LIRKO) [26]. El modelo LIRKO no se consideró adecuado para este estudio debido a 2 razones. Primero, los ratones LIRKO tenían glucosa en sangre normal; segundo y más importante, BBR aumentó la expresión de InsR no solo en el hígado sino también en otros tejidos como los músculos (Figs. 2C y 5B). Alternativamente, se usaron los ratones NOD / LtJ que no tienen insulina en sangre. El ratón con diabetes mellitus tipo 1 NOD / LtJ se considera un espejo genético del ratón InsR - / -. La hipótesis es que, si BBR reduce la glucosa en sangre a través de la expresión de InsR solamente, no debería tener ese efecto en animales que carecen de insulina. Los resultados se muestran en la Fig. 6.

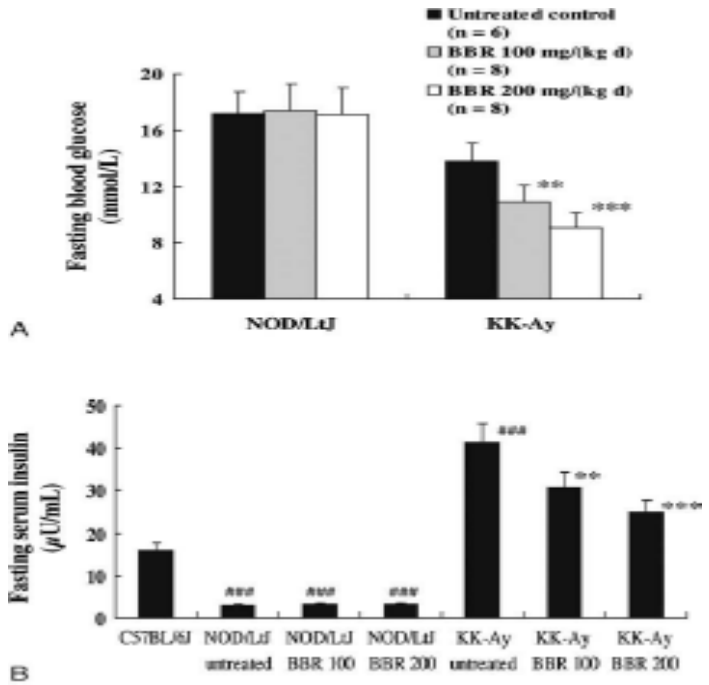

Fig. 6. Efectos de BBR en modelos de ratones con diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2. A, Efecto de BBR en la glucosa en sangre en ayunas. Los ratones NOD / LtJ (diabetes mellitus tipo 1) o KK-Ay (diabetes mellitus tipo 2) no se trataron o se trataron oralmente con BBR a 100 o 200 mg / (kg d), respectivamente. Los animales fueron tratados durante 3 semanas; Se determinaron los niveles finales de glucosa en sangre en ayunas. B, Efecto de BBR sobre la insulina sérica en ayunas. Los valores son la media ± DE de 6 a 8 animales en cada grupo. ### P b.001 frente al de C57BL / 6J; ∗∗P b .01, ∗∗∗P b .001 frente a la del grupo sin tratamiento KK-Ay.

La berberina no redujo el nivel de glucosa en sangre en ratones NOD / LtJ (Fig. 6A) debido a la falta de insulina en su circulación (Fig. 6B). En contraste, BBR redujo significativamente la glucosa en sangre en otro modelo de roedor de diabetes mellitus tipo 2: ratones KK-Ay (Fig. 6A). A diferencia de los ratones NOD / LtJ, los ratones KK-Ay tenían un alto nivel de insulina en sangre que disminuyó después del tratamiento con BBR (Fig. 6B). Debe mencionarse aquí que los niveles de expresión de InsR en el hígado fueron elevados por BBR en ambos modelos de 2 ratones (datos no mostrados). Estos resultados indican claramente que InsR y su interacción con la insulina son absolutamente esenciales para que BBR reduzca la glucosa en sangre.

4. **Discusión**

El gen de InsR se encuentra en el brazo corto del cromosoma 19 [27]. Aunque la región codificadora y promotora del gen InsR humano ha sido identificada y caracterizada [22,27], los mecanismos reguladores y las vías que controlan la expresión del gen InsR aún no se han dilucidado, lo que subraya la dificultad en el diseño racional de los fármacos sensibilizadores a la insulina. Aquí, mostramos que BBR es un compuesto que regula de manera efectiva InsR.

Nuestro trabajo anterior identificó a BBR como un novedoso regulador de LDLR [12]. A diferencia de su acción sobre LDLR, BBR no estabiliza el ARNm de InsR. La regulación transcripcional es el mecanismo principal que subyace al efecto de este medicamento en la expresión de InsR hepático. El inhibidor de PKC calphostin C abolió totalmente el efecto estimulante de BBR sobre el promotor del gen InsR y luego la transcripción de mRNA. BBR aumenta la expresión de InsR a través de un mecanismo dependiente de PKC y se separa de su acción sobre LDLR porque (1) la inhibición de PKC por calfostina C abolió la actividad de BBR en la transcripción del gen InsR, pero no cambió su actividad en la expresión de LDLR ; (2) la inhibición de la ruta ERK abolió el efecto de regulación positiva de BBR sobre el gen LDLR, pero no inhibió la expresión de ARNm de InsR causada

por BBR; y (3) BBR regula positivamente la expresión de InsR a través del promotor del gen InsR (un mecanismo transcripcional), pero la expresión de LDLR al estabilizar su ARNm (uno postranscripcional). Curiosamente, BBR también activa la proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) en los adipocitos, que se ha demostrado que juega un papel en la reducción de la resistencia a la insulina en informes recientes [28]. Debido a que los inhibidores de PKC anulan la activación de AMPK [29], indica el papel aguas arriba de PKC en la vía de AMPK. La relación entre PKC y AMPK está bajo investigación en nuestro laboratorio.

Este estudio muestra que PKC es un componente esencial requerido para la actividad de BBR en la transcripción del gen InsR. Nuestros experimentos también demuestran que PKC juega un papel en la activación del promotor del gen InsR. Se podría deducir que, si eso fuera cierto, otros activadores de PKC también podrían estimular el promotor del gen InsR; de hecho, el tratamiento de las células hepáticas con un activador de PKC conocido, PMA, resultó en la activación del promotor del gen InsR similar al observado con BBR. Estos resultados confirman la función reguladora de PKC en la transcripción del gen InsR, que es consistente con informes anteriores [30]. El mecanismo detallado de PKC en la transcripción del gen InsR y los posibles factores de transcripción responsables de la acción de BBR están ahora bajo investigación en nuestro laboratorio. Estudios previos sobre la regulación de InsR han demostrado que la proteína del grupo de alta movilidad I-Y juega un papel importante en la actividad transcripcional en el gen InsR [31, 32]. De hecho, la proteína nuclear de la proteína I-Y del grupo de alta movilidad es un sustrato de PKC-α, β, γ y δ [33].

Aunque InsR en el músculo también estaba regulado por BBR, la mayoría de los experimentos en este estudio utilizaron células y tejidos hepáticos porque la resistencia a la insulina hepática es una fuerza impulsora importante de la hiperglucemia de la diabetes mellitus tipo 2 [34]. De acuerdo con estudios in vitro, BBR aumenta la expresión de InsR y la actividad de PKC in vivo. El efecto de BBR sobre InsR se observó en el hígado y los tejidos musculares de los roedores diabéticos y se correlacionó con la reducción de la glucosa en sangre. La ausencia de InsR en células cultivadas o su interacción con la insulina en el modelo animal disminuyó el efecto de aumento de consumo de glucosa o de disminución de glucosa en sangre de BBR, lo que indica el papel esencial de InsR en el mecanismo de BBR. Parece que BBR ejecuta su actividad relacionada con el azúcar a través de la siguiente cascada: PKC → promotor InsR → expresión de InsR en la superficie celular → vía PI3K → consumo de glucosa.

La homeostasis del azúcar y el metabolismo de los lípidos se encuentran en una red dinámica, en la que la insulina regula el catabolismo de los triglicéridos y las anomalías de los lípidos también influyen en el metabolismo de la glucosa [35]. Un exceso de ácidos grasos circulantes que se deriva principalmente de las reservas de triglicéridos corporales también contribuye a la resistencia a la insulina [36-38]. Los experimentos con animales mostraron que incluso la infusión a corto plazo de emulsiones lipídicas podría provocar resistencia a la insulina [39]. El efecto antagonista de BBR sobre la resistencia a la insulina representa un efecto sinérgico de este compuesto tanto en InsR como en LDLR.

El "síndrome metabólico" representa un grupo de factores de riesgo metabólico que consisten en resistencia a la insulina, dislipidemia, obesidad, presión arterial elevada, et al. Actualmente, no hay medicamentos aprobados que traten eficazmente el síndrome metabólico [40]. El principio de la terapia farmacológica actual para los factores de riesgo metabólico es la combinación de fármacos hipolipemiantes y fármacos antihipertensivos que reducen los lípidos [40]. Sin embargo, estos regímenes terapéuticos complicados causan problemas de polifarmacia de efectos adversos, interacción fármaco-fármaco, falla de adherencia, errores de medicación, etc. [41]. Los estudios sobre BBR arrojan nuevas luces sobre el tratamiento de esta enfermedad.

En resumen, nuestro estudio demuestra que BBR aumenta la expresión de InsR y LDLR y produce una respuesta celular completa contra la resistencia a la insulina. Sugerimos que BBR sea un compuesto del mecanismo de fármaco-múltiples objetivos para tratar la diabetes mellitus tipo 2 y otras anomalías metabólicas caracterizadas por la resistencia a la insulina.