

菊苣酸在 HepG2 细胞中对 SOCS3 表达的调节作用*

潘志生^{1,2}, 许志臻¹, 陈苓曦¹, 黄刚¹, 何凤田¹, 陈斌², 曾益军¹

(1. 第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400038; 2. 重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所
重庆高校生物活性物质工程研究中心 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要 探讨菊苣酸(Chicoric acid, CRA)在人肝细胞系 HepG2 细胞中对细胞因子信号转导抑制分子 3(Suppressor of cytokine signaling 3, SOCS3)表达的影响,用剂量为 0、5 和 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CRA 分别处理 HepG2 细胞 24 h 后经 RT-PCR、Real-time PCR 检测 SOCS3 基因的 mRNA 表达情况,再以上述不同剂量 CRA 分别处理细胞 24 h 以及 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CRA 分别处理 HepG2 细胞 0、6、12、18 和 24 h 后用 Western blot 法检测 SOCS3 基因的表达情况。研究结果显示 CRA 作用于 HepG2 细胞后,SOCS3 基因的 mRNA 和蛋白表达水平随着 CRA 剂量增加而显著下降($p < 0.01$),且呈现一定的剂量依赖性,随着处理时间的增加,SOCS3 蛋白表达水平下降更加明显,说明在翻译水平 CRA 不仅呈剂量依赖性,还呈时间依赖性下调 SOCS3 蛋白的表达。这些结果提示 CRA 可抑制 SOCS3 蛋白在 HepG2 细胞中的表达。

关键词 菊苣酸 细胞因子信号转导抑制分子 3(SOCS3) HepG2 细胞 胰岛素抵抗

中图分类号: Q7; RA587; R589

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2012)06-0075-05

细胞因子信号转导抑制分子(Suppressor of cytokine signaling, SOCS)家族可在多种细胞内表达或诱导表达。目前发现该家族有 SOCS1~7 和 CIS 共 8 个成员分子,主要通过它们的 SH2 结构与其他细胞因子受体结合,抑制细胞信号转导^[1-3]。抑制信号转导主要有两种方式:一是与目标底物结合,促进底物降解,而抑制信号转导^[4];二是作为类似底物,竞争结合靶分子的催化位点,而抑制信号转导^[5]。细胞因子信号转导抑制分子 3(SOCS3)作为 SOCS 家族的重要一员,它可被多种细胞因子和激素如 LPS、IL-6、IFN- γ 、胰岛素、瘦素等诱导表达^[4-9]。在胰岛素抵抗疾病中伴有 SOCS3 的过表达的发生,如胰岛素可诱导 SOCS3 蛋白的过表达的发生,而过表达的 SOCS3 蛋白又通过与胰岛素受体底物(IRS)竞争结合并促进 IRS 泛素化降解,阻碍信号转导,降低胰岛素敏感性,加重病情的发展^[7]。由于 SOCS3 蛋白的表达水平与胰岛素抵抗等疾病密切相关,因此抑制 SOCS3 蛋白的过表达对于治疗胰岛素抵抗等代谢疾病有着重要的作用。

菊苣酸(Chicoric acid, CRA)是一种多酚,是咖啡酸和酒石酸的衍生物,最早是从菊苣类中分离发现的一种有效活性物质。已有研究发现 CRA 可以

提高免疫细胞的吞噬作用和促进干扰素、免疫球蛋白等相关免疫分子的表达。据新近研究报道, CRA 还具有增强胰岛素分泌和胰岛素敏感性的作用^[10],但能否影响 SOCS3 基因的表达尚未报道。本研究就 CRA 在人肝细胞系 HepG2 中对 SOCS3 基因 mRNA 和蛋白水平的影响进行了探讨,为相关研究提供基础资料,也为胰岛素抵抗、肥胖等代谢疾病的防治提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

研究所用主要材料和试剂为:人肝细胞系 HepG2;DMEM 细胞培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司出品);CRA(天津马克公司出品);DMSO(美国 Sigma 公司出品);动物 RNA-out(北京天净沙公司出品);M-MLV 逆转录酶和琼脂糖(美国 Invitrogen 公司出品);随机引物 Oligo d(T)₁₈、r-TaqDNA 聚合物、SYBR[®] Green I 试剂(宝生物工程(大连)公司出品);RNAaseI 抑制剂和 dNTPs(美国 Promega 公司出品);蛋白酶抑制剂(瑞士 Roche 公司出品);细胞裂

* 收稿日期 2012-03-23 修回日期 2012-05-13 网络出版时间 2012-11-12 16:42:01

资助项目 国家自然科学基金(No. 81001302; No. 31071968)

作者简介 潘志生,男,硕士,研究方向为蛋白质与核酸的功能及其调节机制 通讯作者 陈斌, E-mail: c_bin@hotmail.com

网络出版地址 http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20121112.1642.201206.75_017.html

解液和 BCA 蛋白浓度测得试剂盒(上海碧云天公司出品);化学发光底物检测试剂盒(美国 Thermo 公司出品);封闭蛋白干粉(武汉博士德公司出品);兔抗人 SOCS3 抗体(英国 Abcam 公司出品);兔抗人 β -actin 抗体(北京博奥森公司出品);羊抗兔二抗(广州中杉公司出品)。引物使用 Primer Premier 3.0 软件设计,经上海 Invitrogen 公司合成;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

采用含 10% 胎牛血清、高糖型 DMEM(含 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素, $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素)培养基,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱内培养,并通过常规换液和传代,使细胞保持在对数生长期。CRA 以 DMSO 作为溶剂溶解(DMSO 终浓度为 1%),给药的剂量梯度为 0、0.1、1、5、20 和 $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,其中 $0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CRA 的 DMSO 溶液为对照。给药时间梯度为 0、6、12、18 和 24 h,药物处理时采用含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基。

1.3 细胞总 RNA 的提取和 PCR 反应

以每毫升 5.0×10^5 个细胞的密度将 HepG2 细胞接种于细胞培养板中,稳定培养 16 h 左右后加入溶解好的 CRA,以溶剂 DMSO 为对照进行处理。药物处理时间为 24 h。按动物 RNA-out 试剂操作说明提取细胞总 RNA,并利用紫外分光光度仪测定波长 260、280 nm 的光密度值,确定 RNA 质量以及浓度。

使用逆转录试剂盒进行 cDNA 的合成,逆转录体系、反应条件参考试剂盒的操作说明,体系及反应条件如下:总 RNA $2 \sim 2.5 \text{ } \mu\text{g}$,随机引物 Oligo $(\text{T})_{18}$ $50 \text{ pmol} \cdot \text{ } \mu\text{L}^{-1}$ (DEPC 水溶解) $1 \text{ } \mu\text{L}$, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs $1 \text{ } \mu\text{L}$,补充 1% DEPC 水到 $13 \text{ } \mu\text{L}$, $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 5 min,然后迅速置于冰上处理 2 min;接着加入 $5 \times$ first buffer $4 \text{ } \mu\text{L}$, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT $2 \text{ } \mu\text{L}$,M-MLV 逆转录酶 $0.3 \text{ } \mu\text{L}$,RNAaseI 抑制剂 $0.7 \text{ } \mu\text{L}$,总反应体系 $20 \text{ } \mu\text{L}$,混匀后 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 逆转录 52 min, $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 酶灭活 15 min;所得 cDNA 于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。

1.3.1 逆转录 PCR 反应 逆转录 PCR 反应体系及条件参考 r-Taq 酶的操作说明进行实验。单管反应体系为 cDNA $1 \text{ } \mu\text{L}$, $20 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物(用 ddH_2O 配制,具体见表 1)各 $0.5 \text{ } \mu\text{L}$, $10 \times$ buffer (Mg²⁺ free) $2.5 \text{ } \mu\text{L}$, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs $2 \text{ } \mu\text{L}$, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg²⁺ $2 \text{ } \mu\text{L}$, r-Taq DNA 聚合酶 $0.15 \text{ } \mu\text{L}$,补水至 $25 \text{ } \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为:1) β -actin $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min,然后 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 45 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 45 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 45 s,扩增 25 个循环。2) SOCS3: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min,然后 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 45 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 45 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 45 s,扩增 30 个循环。反应完成后,取 PCR 产物 $5 \text{ } \mu\text{L}$ 加 $6 \times$ DNA 上样缓冲液 $1 \text{ } \mu\text{L}$ 混匀,以 1% 琼脂糖凝胶, $0.5 \times$ TAE 缓冲液进行电泳,后于凝胶成像仪上观察结果。

表 1 PCR 引物序列

基因名称	正反链	引物序列	产物大小/bp	TM 值/ $^\circ\text{C}$
RT- β -actin	正义链	5'-CCA TGT ACG TTG CTA TCC AGG-3'	252	60
	反义链	5'-TCT CCT TAA TGT CAC GCA CGA-3'		
RT-SOCS3	正义链	5'-AGG CTC CTT TGT GGA CTT CA-3'	320	60
	反义链	5'-AGC TGG TAC TCG CTC TTG GA-3'		
Real-time- β -actin	正义链	5'-GTG AAG GTG ACA GCA GTC GGT T-3'	157	60
	反义链	5'-GAA GTG GGG TGG CTT TTA GGA-3'		
Real-time-SOCS3	正义链	5'-ATC CTG GTG ACA TGC TCC TC-3'	136	60
	反义链	5'-GGC ACC AGG TAG ACT TTG GA-3'		

1.3.2 实时荧光定量 PCR 反应 采用 SYBR[®] Green I 嵌合荧光法进行 Real-time PCR,反应体系及条件参考 SYBR[®] Premix Ex Taq[™](Perfect Real-time)试剂的操作说明进行实验。单管反应体系为 cDNA $1 \text{ } \mu\text{L}$, $20 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物(ddH_2O 配制)各 $0.5 \text{ } \mu\text{L}$, SYBR[®] 混合物 $10 \text{ } \mu\text{L}$,补水至 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 。Real-time PCR 反应条件为:1) β -actin $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s,然后 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 10 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 15 s,扩增 40 个循环。2)

SOCS3 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s,然后 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 10 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s,扩增 40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 法分析相对表达量^[11]。

1.4 蛋白提取与免疫印迹

细胞培养于 6 孔板中,实验组和对照组处理条件按照本文 1.3 部分进行浓度处理和时间依赖处理。细胞处理好后,弃去培养上清,用 PBS 洗两次,吸尽液体,参考细胞裂解液操作说明,加入一定的细

胞裂解混合液(已加蛋白酶抑制剂),冰浴 30 min,刮下细胞,接着以 4 °C、12 000 g 条件离心 5 min,取上清于另一新的预冷 EP 管中,用 BCA 法测量蛋白浓度。

取 40 μg 总蛋白加入适量 5 × SDS 上样缓冲液中,沸水浴中变性 5 min, -80 °C 保存。用 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离后,采用湿转方法进行蛋白转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜置于含 5% 封闭蛋白干粉的封闭液中封闭,37 °C 孵育 90 min。然后用一抗稀释液以 1: 2 000 稀释兔抗人 SOCS3 抗体 4 °C 孵育 16 ~ 18 h,接着用 PBST 洗 3 次,每次 10 min。洗后将 PVDF 膜用封闭液以 1: 20 000 稀释羊抗兔二抗,于 37 °C 孵育 90 min, PBST 洗 3 次,每次 10 min。最后在暗室中,用化学发光底物检测试剂将 PVDF 膜上蛋白进行化学发光,并对 X 光胶片曝光。用 Bio-Rad 图像分析系统对 Western blot 的条带进行灰度值扫描和半定量分析。

1.5 统计分析

上述实验均进行 3 次以上重复,实验数据分析用“平均数 ± 标准差”表示,组间差异用 Microsoft Excel 2000 软件进行单因素方差分析,显著性检验水平设为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

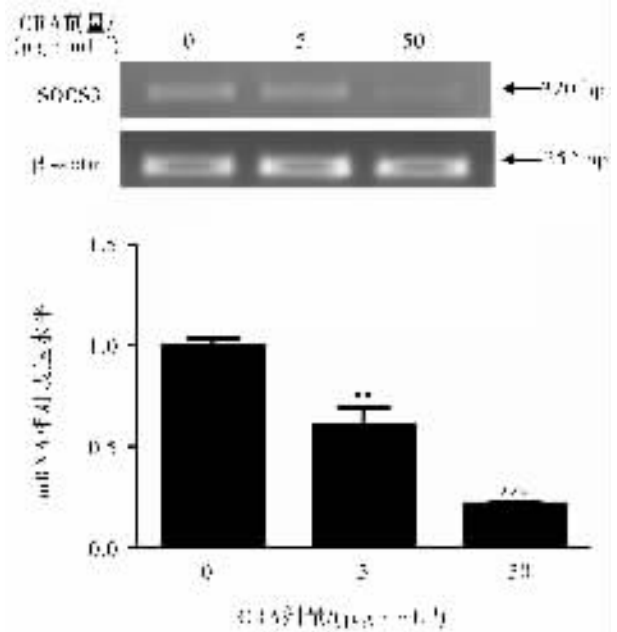
2.1 对 SOCS3 基因转录水平的影响

以 0、5 和 50 μg · mL⁻¹ CRA 处理 HepG2 细胞后,经 RT-PCR 和 Real-time PCR 检测的结果显示,在使用 5 和 50 μg · mL⁻¹ CRA 处理后,SOCS3 基因的 mRNA 表达水平被显著抑制($p < 0.01$),分别为对照组水平即 0 μg · mL⁻¹ CRA 处理的(60.91 ± 0.12)%、(21.71 ± 0.02)% (图 1)。这说明在 HepG2 细胞中 CRA 可剂量依赖性地抑制 SOCS3 基因 mRNA 的表达。

2.2 对 SOCS3 蛋白水平的剂量效应

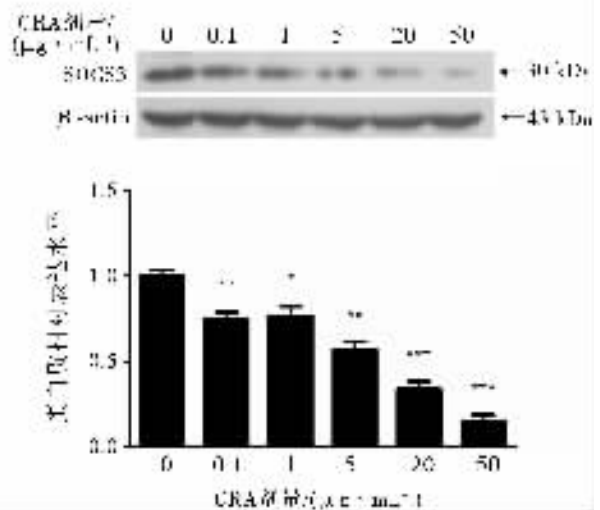
以不同剂量 CRA 处理 HepG2 细胞 24 h 后,经 Western blot 技术检测 SOCS3 蛋白的表达的结果显示,与 0 μg · mL⁻¹ CRA 处理的对照组相比,以 0.1、1、5、20 和 50 μg · mL⁻¹ CRA 处理 24 h 后,随着 CRA 剂量的增加 SOCS3 蛋白表达水平被显著抑制($p < 0.05$),蛋白表达水平分别为对照组表达水平的(75.30 ± 0.05)%、(76.84 ± 0.07)%、(56.84 ± 0.06)%、(34.00 ± 0.06)% 和(15.22 ± 0.05)% (图 2)。该结果说明在 HepG2 细胞中 CRA 可剂量依赖

性地抑制 SOCS3 蛋白的表达。



注:上图为不同剂量 CRA 处理 HepG2 细胞 24 h 后,通过半定量 RT-PCR 检测 SOCS3 基因 mRNA 的表达水平;下图为用实时荧光定量 RT-PCR 分析 CRA 处理 24 h 后 HepG2 细胞中的 SOCS3 基因 mRNA 的表达水平 (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)。

图 1 CRA 在 HepG2 细胞中抑制 SOCS3 mRNA 的表达



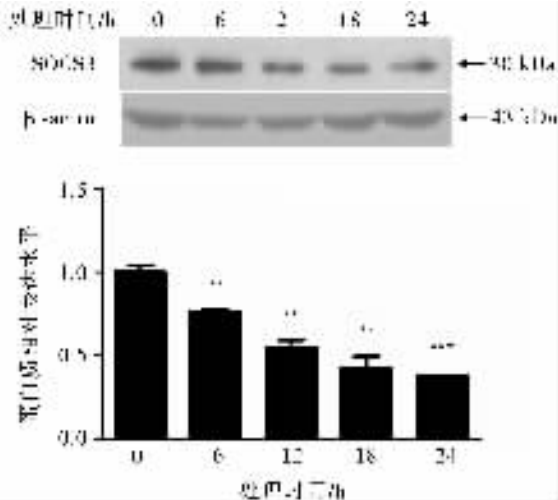
注:上图为不同剂量 CRA 处理 HepG2 细胞 24 h 后,经 Western blot 技术检测 SOCS3 蛋白的表达结果。下图为半定量分析 SOCS3 蛋白的表达水平 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)。

图 2 CRA 在 HepG2 细胞中对 SOCS3 蛋白水平的剂量效应

2.3 对 SOCS3 蛋白水平的时效效应

以 50 μg · mL⁻¹ CRA 处理细胞 0、6、12、18 和 24 h 后,经 Western blot 技术检测 SOCS3 蛋白表达的结果显示,与对照组即处理 0 h 相比,随着处理时间的增加,SOCS3 蛋白水平被显著抑制($p < 0.05$),蛋白

表达水平分别为对照组表达水平的(76.56 ± 0.01)%、(55.01 ± 0.06)%、(43.14 ± 0.08)%和(37.77 ± 0.01)% (图 3)。上述结果说明在 HepG2 细胞中 CRA 可时间依赖性地抑制 SOCS3 蛋白的表达。



注: 上图为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CRA 处理 HepG2 细胞 0、6、12、18、24 h 后经 Western blot 技术检测 SOCS3 蛋白的表达结果。下图为半定量分析 SOCS3 蛋白的表达水平 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)。

图 3 CRA 在 HepG2 细胞中对 SOCS3 蛋白水平的时效性

3 讨论

目前有关 SOCS3 蛋白在胰岛素抵抗方面的研究结果显示,核受体 PPAR γ 、LXR 等可通过下调 SOCS3 蛋白的表达从而增强胰岛素敏感性,并且利用转基因技术也可对 SOCS3 蛋白进行敲出;然而 SOCS3 蛋白敲出后不仅不能改善胰岛素抵抗症状,反而会通过模拟慢性炎症加重病情的发展^[2,12-13]。而有关传统中药所含活性物质对 SOCS3 蛋白影响的研究更加少见。CRA 作为从紫锥菊提取出的活性物质,具有广泛的生理活性。它可以提高机体免疫,具有降低胆固醇、阻止氧化应激反应、促进创伤愈合等多种功能^[14-17]。据报道 CRA 可以增加胰肌细胞葡萄糖的摄取和增加胰岛细胞分泌胰岛素以及提高胰岛素敏感性^[11],但具体机制尚不明了,特别是 CRA 缓解胰岛素抵抗的作用是否与调节 SOCS3 表达有关在本研究前一直未见报道。本研究则发现,CRA 在肝细胞 HepG2 中可明显抑制 SOCS3 蛋白的表达,体现在基因的转录和翻译水平上,并具有剂量依赖性和时间依赖性。因此,本研究结果为深入研究 CRA 调节 SOCS3 蛋白表达的机制奠定了基

础,同时也为探讨 CRA 在防治胰岛素抵抗等代谢疾病中的作用机制提供了一定科学依据。

参考文献:

- [1] Croker B A, Kiu H, Nicholson S E. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19(4): 414-422.
- [2] Serrano-Marco L, Rodriguez-Calvo R, El Kochairl, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR- β/δ) ameliorates insulin signaling and reduces SOCS3 levels by inhibiting STAT3 in interleukin-6-stimulated adiposities [J]. *Diabetes* 2011, 60(7): 1990-1999.
- [3] Panveloski-Costa A C, Pinto Júnior D A, Brandão B B, et al. Resistive training reduces inflammation in skeletal muscle and improves the peripheral insulin sensitivity in obese rats induced by hyperlipidic diet [J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2011, 55(2): 155-163.
- [4] Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, et al. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling [J]. *J Biol Chem* 2000, 275(21): 15985-15991.
- [5] Lubis A R, Widia F, Soegondo S, et al. The role of SOCS-3 protein in leptin resistance and obesity [J]. *Acta Med Indones* 2008, 40(2): 89-95.
- [6] Yang S J, Xu C Q, Wu J W, et al. SOCS3 inhibits insulin signaling in porcine primary adipocytes [J]. *Mol Cell Biochem* 2010, 345(1/2): 45-52.
- [7] Rui L, Yuan M, Frantz D, et al. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(44): 42394-42398.
- [8] Story D J, Stephens J M. Modulation and lack of cross-talk between signal transducer and activator of transcription 5 and suppressor of cytokine signaling-3 in insulin and growth hormone signaling in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Obesity (Silver Spring)* 2006, 14(8): 1303-1311.
- [9] McGillicuddy F C, Chiquoine E H, Hinkle C C, et al. Interferon gamma attenuates insulin signaling, lipid storage, and differentiation in human adipocytes via activation of the JAK/STAT pathway [J]. *Biol Chem*, 2009, 284(46): 31936-31944.
- [10] Tusch D, Lajoix A D, Hossy E, et al. Chicoric acid, a new compound able to enhance insulin release and glucose uptake [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 377(1): 131-135.
- [11] Bustin S A, Benes V, Garson J A, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. *Clin Chem* 2009, 55(4): 611-622.

- [12] Collino M ,Aragno M ,Castiglia S ,et al. Pioglitazone improves lipid and insulin levels in overweight rats on a high cholesterol and fructose diet by decreasing hepatic inflammation [J]. *Br J Pharmacol* 2010 ,160(8) :1892-1902.
- [13] Sachithanandan N ,Fam B C ,Finch S ,et al. Liver-specific suppressor of cytokine signaling-3 deletion in mice enhances hepatic insulin sensitivity and lipogenesis resulting in fatty liver and obesity [J]. *Hepatology* 2010 ,52(5) : 1632-1642.
- [14] Crosby D C ,Lei X ,Gibbs C G ,et al. Design ,synthesis ,and biological evaluation of novel hybrid dicaffeoyltartaric/diketo acid and tetrazole-substituted L-chicoric acid analogues inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase [J]. *J Med Chem* 2010 ,53(22) :8161-8175.
- [15] Salzameda N T ,Eubanks L M ,Zakhari J S ,et al. A cross-over inhibitor of the botulinum neurotoxin light chain b 'a natural product implicating an exosite mechanism of action [J]. *Chem Commun (Camb)* 2011 ,47(6) :1713-5171.
- [16] Kour K ,Bani S. Chicoric acid regulates behavioral and biochemical alterations induced by chronic stress in experimental swiss albino mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav* , 2011 ,99(3) :342-348.
- [17] Park C M ,Jin K S ,Lee Y W ,et al. Luteolin and chicoric acid synergistically inhibited inflammatory responses via inactivation of PI3K-Akt pathway and impairment of NF- κ B translocation in LPS stimulated RAW 264. 7 cells [J]. *Eur J Pharmacol* 2011 ,660(2/3) :454-459.

The Regulation of SOCS3 by Chicoric Acid in HepG2 Cells

PAN Zhi-sheng^{1,2} , XU Zhi-zhen¹ , CHEN Ling-xi¹ , HUANG Gang¹ , HE Feng-tian¹ ,
CHEN Bin¹ , ZENG Yi-jun¹

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology , College of Basic Medical Sciences ,
Third Military Medical University , Chongqing 400038 ;

2. Institute of Entomology and Molecular Biology , Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substances ,
Chongqing Key Laboratory of Animal Biology , Chongqing Normal University , Chongqing 401331 , China)

Abstract : To understand the effect of chicoric acid on the expression of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line HepG2 , the present study investigated the relationship among the mRNA level , protein expression of SOCS3 and chicoric acid concentration. Firstly , HepG2 was treated with a series of concentration of chicoric acid. Secondly , the SOCS3 mRNA was assayed by semi-quantitative RT-PCR and Real-time RT-PCR 24h later , and the expression of SOCS3 protein was assayed using Western Blot technique. And then , total protein expression of SOCS3 in HepG2 treated with different time (0、6、12、18、24 h) of chicoric acid was analyzed using Western Blot. The results showed that , compared with control group , both of mRNA and protein expression of SOCS3 in HepG2 cells decreased significantly with the increasing concentration of chicoric acid in a dose-dependent manner ($p < 0.01$). Moreover , with the increase of manipulation time , the protein expression of SOCS3 in HepG2 cells was found to be down regulated significantly by chicoric acid in a dose- and time-dependent way. Therefore , this study shows that the chicoric acid can down regulate the expression of SOCS3 in HepG2 cells.

Key words : chicoric acid ; suppressor of cytokine signaling (SOCS3) ; HepG2 cells ; insulin resistance

(责任编辑 方 兴)