

滇结香花改善糖尿病胰岛损伤及机制研究

王亚欣¹, 张志文¹, 任怡琳^{2,3}, 刘敏⁴, 史劲松¹, 许正宏^{2,3}, 许泓瑜^{2,3*}

¹江南大学药学院; ²江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室; ³江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 无锡 214122; ⁴青藏高原微生物国家地方联合工程研究中心, 拉萨 850000

摘要: 本文旨在评价滇结香花正己烷提取物(EGH)降糖及保护胰岛作用, 并通过胰岛损伤细胞模型探究其作用机制。采用链脲佐菌素(STZ)联合高脂饲料诱导小鼠 2 型糖尿病模型, 通过检测小鼠空腹血糖、糖化血红蛋白和胰岛素分泌, 评价 EGH 的降糖和保护胰岛作用。并采用棕榈酸联合葡萄糖诱导胰岛 RIN-m5F 细胞损伤模型, 对 ROS 生成量、caspase-3 基因水平、AKT、FOXO1 和 JNK 蛋白水平进行检测, 探究 EGH 改善糖尿病胰岛损伤作用机制。结果表明 EGH 可以减少 ROS 生成量、降低 caspase-3 基因转录水平、激活 AKT 抑制 FOXO1, 同时抑制 JNK 的激活, 从而改善 β 细胞的损伤。

关键词: 糖尿病; 胰岛损伤; 滇结香花; 降糖; 信号通路

中图分类号: R285; Q946

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)3-0506-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.3.022

The improvement and the mechanism of impaired islets in diabetes mellitus of *Edgeworthia gardneri*(Wall.) Meissn

WANG Ya-xin¹, ZHANG Zhi-wen¹, REN Yi-lin^{2,3}, LIU Min⁴, SHI Jin-song¹, XU Zheng-hong^{2,3}, XU Hong-yu^{2,3*}

¹School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University; ²Bioengineering Institute, Key Laboratory of Industrial Microbiology of Ministry of Education, Jiangnan University; ³National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; ⁴National United Engineering Research Center for Tibetan Plateau Microbiology, Lasa 850000, China

Abstract: The purpose of this study was to evaluate the hypoglycemic effect and protective effect of hexane extract (EGH) of *Edgeworthia gardneri* (Wall.) Meissn and to explore its mechanism through islet cell damage model. The model of type 2 diabetic mice induced by streptozotocin (STZ) combined with high fat diet was used to evaluate the effect of EGH on reducing the glucose and protecting the islet, by testing the fasting blood glucose, oral glucose tolerance, HbA1c and insulin secretion. On the model of RIN-m5F cell injury induced by palmitic acid combined with glucose, the level of ROS, caspase-3 gene, AKT, FOXO1 and JNK protein were detected to explore the mechanism of EGH to improve islet injury. The results showed that EGH could reduce the amount of ROS generation, reduce the transcription level of caspase-3 gene, activate AKT, inhibit FOXO1 and inhibit the activation of JNK, thus improving the damage of β -cell.

Key words: diabetes; impaired islets; *Edgeworthia gardneri* (Wall.) Meissn; hypoglycemic effect; signaling pathway

2 型糖尿病 (T2DM) 的发病率日渐增加, 胰岛 β 细胞功能受损和胰岛素抵抗是其两大发病机制^[1]。过去认为胰岛素抵抗在 T2DM 病理生理机制中占主要位置, 现在越来越多地认识到胰岛 β 细胞功能障碍在 T2DM 发生发展中起重要作用。胰岛 β 细胞功能障碍是 T2DM 发生的必要条件, 胰岛 β 细胞凋亡是造成胰岛素分泌能力绝对下降的重要因素^[2]。

滇结香 *Edgeworthia gardneri* (Wall.) Meissn, *E. gardneri* 属于瑞香科、结香属植物, 主要分布在我国西藏及云南地区。滇结香是我国特有的珍贵药材, 据《藏医养身图说》书中记载, 滇结香花具有清肝明目等作用, 民间泡水饮用对糖尿病、高血压、高血脂等慢性疾病均具有预防和治疗效果^[3], 其主要成分包括双香豆素类、黄酮类、多酚类等^[4]。随着人们对滇结香研究的不断深入, 发现其具有抗菌^[5]、抗氧化^[6]、降血糖^[7]、降血脂^[8]等多种作用。

本实验室前期在 2 型糖尿病动物模型上评价滇结香提取物,发现滇结香花水提取物具有良好的降糖活性,能增加胰岛素分泌量,并对损伤胰岛组织有一定的修复作用^[9]。因此利用胰岛损伤模型对滇结香花提取物中保护胰岛的物质进行筛选并探究其降糖作用机制是非常必要的。本实验从滇结香花中提取分离制备组分,通过胰岛细胞损伤模型及化学诱导型 T2DM 小鼠模型对其体外、体内降糖活性和作用机制进行研究,为滇结香花保护胰岛细胞治疗 T2DM 提供依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

5 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 16 ~ 20 g,30 只。购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2012-0002。

1.2 细胞株

大鼠胰岛 β 细胞 RIN-m5F,购自国家实验细胞资源共享服务平台。

1.3 药物与试剂

滇结香花由西藏月王公司提供,与保藏在中国科学院昆明植物研究所的滇结香标本一致,并经分子鉴定确认;RPMI-1640 培养基和无糖 RPMI-1640 培养基胎牛血清(GIBCO 公司,美国);噻唑蓝(MTT)、胰酶(碧云天公司);AKT、FOXO1、JNK 抗体(CST 公司,美国);棕榈酸(PA)、葡萄糖、DCFH-DA(Sigma 公司,美国);链脲佐菌素(STZ)(麦克林公司);艾塞那肽注射液(Baxter Pharmaceutical Solutions LLC 公司,美国);其他试剂,均为国产分析纯试剂。

1.4 主要仪器

Multiskan MK3 型酶标仪(Thermo-Labsystems 公司,美国);CO₂ 培养箱(Thermo Forma 公司,美国);倒置显微镜(Nikon 公司,日本);蛋白电泳仪、电转仪(Bio-Rad 公司,美国);冷冻离心机(Eppendorf 公司,德国);PCR 扩增仪、荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国)。

2 方法

2.1 滇结香花提取物的制备

取干燥滇结香花(500 g)粉碎后,按质量体积比 1:10 正己烷提取,于 60 °C 浸提 6 h,过程中不断搅拌。过滤得澄清滤液,滤渣再重复浸提两次,合并滤液,旋转蒸发去除正己烷后得到滇结香花正己烷提取物(EGH)。

2.2 剂量与分组

将 3 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠分为空白对照组(NC)与造模组,NC 组喂养普通饲料,造模组喂养 60% 高脂饲料 4 周后,连续腹腔注射链脲佐菌素(STZ)(50 mg/kg/day)5 天,注射结束后监测 FBG 2 周,待血糖稳定升高且 FBG \geq 11.1 mmol/L 时造模成功,然后随机分成模型组、阳性对照组以及低中高 EGH 干预组。空白对照组(NC):灌胃 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液;模型组(DM):灌胃 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液;阳性对照组(EX):腹腔注射艾塞那肽 4 μ g/kg/day;EGH 低剂量组(L-40 mg/kg/day);EGH 中剂量组(M-80 mg/kg/day);EGH 高剂量组(H-160 mg/kg/day)。

2.3 空腹血糖(FBG)

每周定时检测小鼠 FBG。小鼠测量 FBG 前一晚 8 点开始禁食 12 h,自由饮水,第二天早 8 点剪尾采血测量 FBG。

2.4 全血中糖化血红蛋白(HbA_{1c})的检测

采用南京建成全血中糖化血红蛋白测定试剂盒检测 HbA_{1c},遵照试剂盒说明书方法测定。

2.5 空腹血清胰岛素

采用赛默飞小鼠胰岛素酶联免疫(ELISA)检测试剂盒检测胰岛素水平。遵照试剂盒说明书方法进行实验,并用酶标仪测量结果,计算胰岛素浓度。

2.6 细胞培养及胰岛损伤细胞模型建立

在 37 °C,5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中,采用含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 1640 培养基(含有 10 mmol/L 葡萄糖,不含胰岛素)培养 RIN-m5F 细胞,待细胞汇合度达到 70% ~ 80% 时采用胰酶消化,按 1:3 比例传代,每 2 ~ 3 天传代一次。

取对数生长期的 RIN-m5F 细胞,以 2×10^4 个细胞/孔的密度接种在 96 孔板中。根据安丽萍等^[10]和蔺亿^[11]等方法加以改良,采用 0.25 mmol/L 棕榈酸联合 30 mmol/L 葡萄糖培养基刺激 RIN-m5F 细胞 6 h 作为诱导胰岛 β 细胞损伤的条件。

2.7 MTT 法测定细胞存活率

将 RIN-m5F 细胞以 2×10^4 个细胞/孔的密度接种在 96 孔板中,加入刺激药物孵育,一定时间后进行 MTT 测定。孵育结束后,弃去培养基,PBS 清洗细胞后,将细胞与 MTT(0.5 mg/mL)一起孵育 4 h,弃去培养基并加入 DMSO(150 μ L),避光震荡 10 min,于 570 nm 波长处测定吸光度(OD,重复 3 次)。

2.8 DCFH-DA 荧光探针法检测细胞内活性氧 (ROS) 水平

将 RIN-m5F 细胞以 2×10^4 个细胞/孔的密度接种在 96 孔黑色荧光板中, 实验分为 6 组: 正常组 (CTL): 含 1640 完全培养基; 模型组 (DM): 0.25 mmol/L 棕榈酸联合 30 mmol/L 葡萄糖培养基; 阳性对照组 (EX): 0.25 mmol/L 棕榈酸联合 30 mmol/L 葡萄糖培养基加入 10 nM 艾塞那肽; 实验组: 0.25 mmol/L 棕榈酸联合 30 mmol/L 葡萄糖培养基加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (L)、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (M)、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (H) 滇结香花正己烷提取物。作用细胞时间为 6 h。孵育结束后, 弃去培养基, 用 $10 \mu\text{M}$ DCFH-DA 探针于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育细胞 30 min。使用激发/发射波长为 488/525 nm 的酶标仪分析其荧光强度。以空白组的荧光强度 (0 mmol/L 棕榈酸联合 10 mmol/L 葡萄糖) 为 100%, 对实验组进行相对定量。

2.9 荧光定量 PCR 法检测细胞凋亡基因的表达

采用苯酚抽提法提取细胞总 RNA, 按照条件 (25 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 48 $^{\circ}\text{C}$, 40 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存) 反转录为 cDNA。然后按照条件 (50 $^{\circ}\text{C}$, 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, 一个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 40 个循环扩增) 进行 qRT-PCR。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法对 caspase-3 基因的表达进行相对定量, 计

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of target genes for qRT-PCR

目标基因 Target genes	引物序列 Nucleotide sequences (5'-3')
GAPDH-F	AGCCCCAACACTGAGCAT
GAPDH-R	TGCAGCGAACTTTATTGATGCT
Caspase-3 -F	TTCTCCCTGGACGCCACTT
Caspase-3 -R	CCTACCCCACTCCAGTCATT

表 2 EGH 对 C57BL/6J T2DM 小鼠模型 FBG 的影响 ($n=5$)

Table 2 Effect of EGH on FBG during the treatment in C57BL/6J mice ($n=5$)

组别 Group	0 周 0 Week (mmol/L)	1 周 1 Week (mmol/L)	2 周 2 Weeks (mmol/L)	3 周 3 Weeks (mmol/L)	4 周 4 Weeks (mmol/L)
CTL	6.34 \pm 1.87	7.12 \pm 1.02	8.32 \pm 0.62	7.38 \pm 0.69	7.82 \pm 0.08
DM	23.14 \pm 2.52 ^{***}	23.98 \pm 3.11 ^{***}	25.16 \pm 0.68 ^{***}	25.14 \pm 0.65 ^{***}	25.92 \pm 0.62 ^{***}
EX	23.92 \pm 2.58	21.24 \pm 2.99 ^{##}	18.54 \pm 0.52 ^{###}	15.10 \pm 0.82 ^{###}	11.14 \pm 0.51 ^{###}
L	24.28 \pm 1.45	24.00 \pm 2.54	23.22 \pm 2.08 ^{##}	20.50 \pm 2.45 ^{###}	19.98 \pm 1.10 ^{###}
M	23.46 \pm 1.95	23.18 \pm 2.39	21.62 \pm 2.03 ^{##}	18.28 \pm 0.94 ^{###}	17.58 \pm 1.73 ^{###}
H	23.24 \pm 1.83	22.12 \pm 2.30	19.88 \pm 2.30 ^{##}	17.66 \pm 1.43 ^{###}	15.54 \pm 1.72 ^{###}

注: 与正常组相比, ^{***} $P < 0.001$; 与模型组相比, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control group, ^{***} $P < 0.001$; compared with model group, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$.

算其表达倍数, 所需引物序列如下:

2.10 蛋白免疫印迹

将 RIN-m5F 细胞接种到 6 孔板 (1.5×10^6 个细胞/孔) 上。处理后, 用冰的裂解缓冲液裂解 RIN-m5F 细胞。根据蛋白质含量试剂盒说明测量蛋白质浓度。在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上分离等量蛋白质的样品, 然后转移到聚偏二氟乙烯膜上, 分别用针对 AKT, FOXO1, JNK 的选择性抗磷酸化或非磷酸化抗体进行检测。

2.11 统计学分析

实验结果通过 One-Way ANOVA 进行统计学分析, 数据结果用于平均值 \pm 标准差表示。显著性差异表示为: 与对照组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$; 与模型组相比, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ 。实验中所有数据均在 Graph-Pad Prism 5 中进行数据分析。

3 结果

3.1 EGH 对胰岛损伤模型小鼠空腹血糖 (FBG) 的影响

空腹血糖作为糖尿病的常用检测指标, 其变化可初步反映药物的降糖活性。如表 1, STZ 诱导 C57BL/6J 糖尿病模型小鼠的 FBG 与正常组相比, 具有显著性升高的差异, 且四周后并无恢复; 阳性药物 EX 和 EGH 低、中、高三个剂量治疗一周后 FBG 开始降低, 持续治疗四周后, EX 降低 FBG 57.02%, 低、中、高三个剂量分别降低 FBG 22.91%、32.18%、40.04%, 结果显示 EGH 可有效降低胰岛损伤糖尿病模型小鼠的 FBG。

3.2 EGH 对胰岛损伤模型小鼠糖化血红蛋白 (HbA1c) 的影响

HbA1c 主要表示过去 4 ~ 8 周内平均血糖控制水平,如图 1 所示,C57 小鼠 HbA1c 含量 DM 组显著高于 NC 组 (** $P < 0.01$);治疗 4 周后 EX 组 HbA1c 含量显著降低(## $P < 0.01$),且接近于 NC 组;EGH 治疗可明显减少 C57BL/T2DM 模型小鼠 HbA1c 含量,并呈剂量依赖性,其中高剂量组效果与阳性药物艾塞那肽相近。

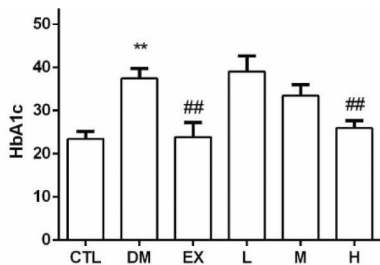


图 1 EGH 对 C57BL/6J 小鼠 HbA1c 的影响

Fig. 1 Effect of EGH on HbA1c of T2DM model C57BL/6J mice

注:与对照组相比, ** $P < 0.01$;与模型组相比,## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$; compared with model group, ## $P < 0.01$.

3.3 EGH 对胰岛损伤模型小鼠胰岛素分泌的影响

胰岛素是机体内唯一的降血糖激素,也是唯一能同时促进糖原、脂肪、蛋白质合成的激素,血清胰岛素的测定是糖尿病诊断的必要参考指标^[12]。结束治疗后,收集小鼠空腹时的血清,采用 ELISA 检测小鼠的血清胰岛素水平,如图 2,糖尿病模型小鼠的血清胰岛素水平明显低于正常小鼠 (** $P < 0.001$);治疗四周后,治疗组较模型组小鼠的血清胰岛素水平显著上升(## $P < 0.05$,### $P < 0.01$);中、高剂量的 EGH 可明显提高糖尿病小鼠的血清胰岛素水平。

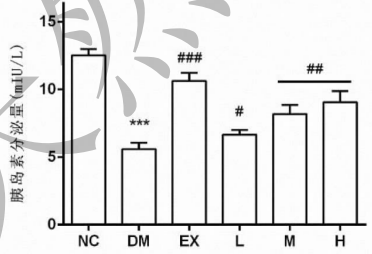


图 2 EGH 对 T2DM 模型小鼠胰岛素分泌的影响

Fig. 2 Effect of EGH on insulin secretion of T2DM model mice

注:与空白对照组相比,*** $P < 0.001$;与模型组相比,## $P < 0.05$,### $P < 0.01$,#### $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control group, *** $P < 0.001$; compared with model group, ## $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$.

3.4 MTT 法检测滇结香花提取物对 RIN-m5F 损伤细胞存活率的影响

如图 3 结果显示,采用 0.25 mmol/L 棕榈酸联合 30 mmol/L 葡萄糖的模型组显著降低细胞存活率 (** $P < 0.01$)。经过 100 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EGH 处理后,与模型组相比细胞存活率明显上升 (# $P < 0.05$)。

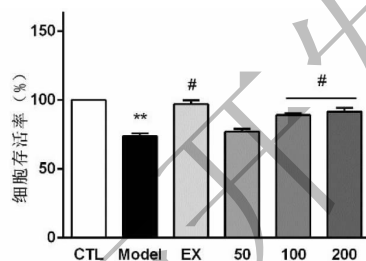


图 3 EGH 对 RIN-m5F 损伤细胞存活率的影响

Fig. 3 Effect of EGH on cell viability in RIN-m5F cells

注:与空白对照组相比, ** $P < 0.01$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$; compared with model group, # $P < 0.05$.

3.5 DCFH-DA 荧光探针法检测滇结香花提取物对 RIN-m5F 细胞内 ROS 水平的影响

采用本实验室建立的胰岛损伤细胞模型以活性氧生成量为检测指标评价不同浓度滇结香花正己烷提取物对胰岛细胞的保护作用。如图 4,与空白对照组相比,模型组 ROS 生成量显著增加 (** $P < 0.001$);与模型组相比,EGH 作用 RIN-m5F 细胞后 ROS 生成量显著降低且呈剂量依赖性。

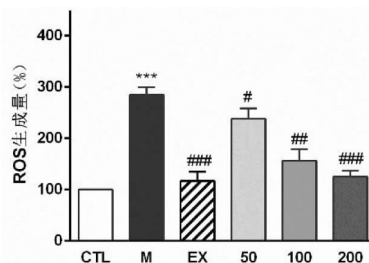


图 4 滇结香花提取物对 RIN-m5F 损伤细胞 ROS 的影响

Fig. 4 Effect of extractions of *E. gardneri* on ROS in RIN-m5F injury cells

注:与空白对照组相比,*** $P < 0.001$;与模型组相比,# $P < 0.05$,### $P < 0.01$,#### $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control group, *** $P < 0.001$; compared with model group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$.

3.6 qRT-PCR 法检测 caspase-3 基因的转录

β 细胞损伤时,可能触发了凋亡途径导致细胞

存活率降低。如图 5 所示,当 0.25 mmol/L 棕榈酸联合 30mmol/L 葡萄糖作用后,与空白对照组相比,模型组 caspase-3 基因表达水平增加;与模型组相比,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EGH 能明显降低 caspase-3 基因表达水平($^{##}P < 0.01$)。

3.7 Western blot 法检测胰岛损伤和凋亡信号通路蛋白的表达

PI3K/AKT 信号通路是与胰岛素信号相关的一条信号通路,它参与细胞增殖、分化、凋亡等多种活动^[13]。如图 6 所示,与空白对照组相比,模型组 p-AKT、p-FOXO1 蛋白水平明显下调,p-JNK 蛋白水平明显上调($^{***}P < 0.001$)。在浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

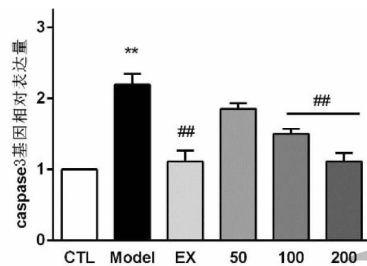


图 5 EGH 对 RIN-m5F 细胞 caspase-3 基因转录的影响
Fig. 5 Effect of EGH on transcription level of caspase-3 gene in RIN-m5F cells

注:与空白对照组相比, $^{**}P < 0.01$; 与模型组相比, $^{##}P < 0.01$ 。
Note: Compared with control group, $^{***}P < 0.001$; compared with model group, $^{##}P < 0.01$.

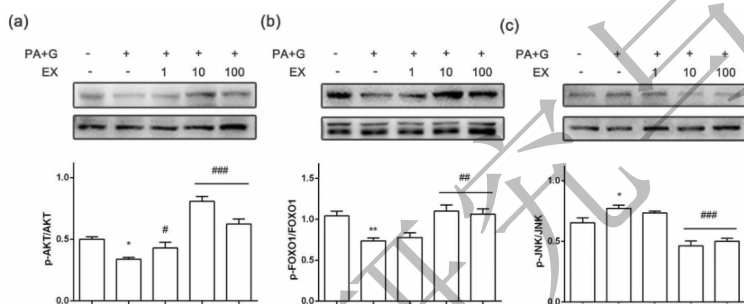


图 6 滇结香花提取物对 RIN-m5F 损伤细胞相关蛋白的影响。(a) AKT;(b) FOXO1;(c) JNK

Fig. 6 Effect of extractions of *E. gardneri*. on relevant protein in RIN-m5F injury cells. (a) AKT;(b) FOXO1;(c) JNK

注:与空白对照组相比, $^{***}P < 0.001$; 与模型组相比, $^{##}P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, $^{***}P < 0.001$; Compared with model group, $^{##}P < 0.01$.

的 EGH 作用 RIN-m5F 细胞后, AKT、FOXO1 蛋白磷酸化水平升高, JNK 蛋白磷酸化水平降低($^{##}P < 0.01$), 证明 EGH 可以激活 AKT 抑制 FOXO1, 导致 FOXO1 从细胞核移位到细胞质, 从而使 FOXO1 失活^[14]。同时抑制 JNK 的激活, 保护 β 细胞免受氧化应激影响。

4 讨论

糖尿病胰岛 β 细胞的功能障碍及数量减少是 2 型糖尿病(T2DM)的主要发病原因。伴随着营养过剩以及肥胖的发生, 人体血浆中葡萄糖和游离脂肪酸的水平明显增加。糖毒性和脂毒性是导致胰岛 β 细胞衰竭的重要病理因素, 但其损伤机制至今尚未完全阐明。本实验室前期研究报道滇结香花提取物通过抑制 α -葡萄糖苷酶活性等方面治疗 T2DM^[7]。滇结香花水提取物展现出良好的降糖活性。实验同时还发现对损伤胰岛组织也有一定的修复作用, 提示利用胰岛损伤的体内和体外模型对滇结香花中保护胰岛的物质进行筛选并探究其机制是非常必要

的。本实验通过检测空腹血糖、糖化血红蛋白和胰岛素分泌等指标证实滇结香花正己烷提取物能明显降低糖尿病小鼠的空腹血糖、糖化血红蛋白和口服糖耐量, 并提高胰岛素水平。

本试验结果提示滇结香花正己烷提取物可以改善损伤的 RIN-m5F 细胞存活率, 降低活性氧(ROS)生成量。而氧化应激被认为是糖尿病发生和发展过程中的重要风险因素。长期高血糖和高游离脂肪酸引起氧化应激和的 ROS 加速产生, 导致胰岛细胞损伤和凋亡, 降低胰岛素基因的表达, 减少胰岛素分泌^[15]。

Caspase-3 是细胞凋亡途径中 caspase 依赖性途径中的关键效应分子, 其活化和含量的提高意味着凋亡的加强。实验中我们证实了 EGH 与模型组相比能够减少 caspase-3 基因的转录水平, 提示 EGH 对损伤的 RIN-m5F 细胞具有抗凋亡的作用。

氧化应激的发生通常包含了多条信号通路, 如 PI3K/AKT 途径。PI3K/AKT 通过下游多种途径对靶蛋白进行磷酸化而发挥抗凋亡作用, 例如胰岛 β

细胞中特异性过表达 AKT 可导致 β 细胞数目和大小的显著增加^[16]。AKT 还是参与内质网线粒体连接水平调节的关键激酶,通过调控 IP3R1 磷酸化水平,进而影响内质网内钙离子的释放。而钙离子在葡萄糖促进胰岛素释放中起着关键的调节作用^[17]。FOXO1 转录因子是控制细胞周期的重要分子,其核内定位导致细胞凋亡^[18]。这些均证明 AKT/FOXO1 信号通路在 PA 诱导的细胞凋亡起着重要的调节作用。C-Jun N-末端激酶(JNK)在各种细胞类型(包括胰腺 β 细胞)中被氧化应激激活。现有证据表明内质网应激与氧化应激通过激活 JNK,从而抑制胰岛素生物合成和干扰胰岛素作用通路^[19]。因此 JNK 在胰岛 β 细胞功能障碍和凋亡以及胰岛素抵抗中起着关键作用。实验中我们发现浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 EGH 处理后,细胞内 AKT、FOXO1 蛋白磷酸化水平升高,JNK 蛋白磷酸化水平降低,证明 EGH 可以激活 AKT 抑制 FOXO1,导致 FOXO1 从细胞核移位到细胞质,从而使 FOXO1 失活。同时抑制 JNK 的激活,减少氧化应激对 β 细胞的影响,抑制凋亡。

参考文献

- 1 Kudva YC, Butler PC. Insulin secretion in type II diabetes mellitus [M]. New Jersey: Humana Press, 1997: 119-136.
- 2 Alejandro EU, Gregg B, Blandino-Rosano M, et al. Natural history of β -cell adaptation and failure in type 2 diabetes [J]. Mol Aspects Med, 2015, 42: 19-41.
- 3 Huang FK. Illustrated macrobotics of Tibetan medicine (藏医养生图说) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 169-171.
- 4 Zhou AY. Chemical constituents and hypoglycemic activity of flower from *Edgeworthia gardneri* [D]. Guangzhou: Guangdong Technology University (广东工业大学), 2016.
- 5 Li XL, Sun GJ. *Buddleja of ficinalis* Maxim/*Edgeworthia chrysantha* Lindl. effect of active ingredients [J]. J Northwest Pharm (西北药学杂志), 1996, 11: 165-166.
- 6 Han J. Chemical constituents analysis and studies on antibacterial and anti-oxidative effects of *Flos Edgeworthiae* [D]. Chendu: Southwest Jiaotong University (西南交通大学), 2012.
- 7 Geng Y, Yang HM, Xu HY, et al. α -Glucosidase inhibitory activity of the alabastrum of *Edgeworthia gardneri* (wall.) meissn [J]. J Food Sci Biotechnol (食品与生物技术学报), 2013, 32: 967-971.
- 8 Lin YX, Xia ZN, Yang FQ, et al. Research progress in the natural agonists for PPA receptors [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24: 998-1005.
- 9 Wang QY, Xu HY, Xu ZH, et al. Hypoglycemic effect of water extracts from *Edgeworthia gardneri* (wall.) meissn on type 2 diabetic mice [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1385-1388.
- 10 An LP, Liu XM, Wang CM, et al. The protective effect of exenatide on palmitic acid-induced RINm5F apoptosis [J]. Chin J Gerontol (中国老年学杂志), 2011, 31: 3562-3563.
- 11 Lin Y, Gao CC, Chen LL, et al. Effect of GABA on RIN-m5f cells in high glucose-induced oxidative injury model [J]. J Food Sci Biotechnol (食品与生物技术学报), 2015, 2: 1673-1689.
- 12 Cerf ME. Beta cell dynamics: beta cell replenishment, beta cell compensation and diabetes [J]. Endocrine, 2013, 44: 303-311.
- 13 Liu YH, Yang L. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Morus nigra* leaves on type 2-diabetic mice [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2015, 27: 1411-1415.
- 14 Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Acts [J]. Gene Dev, 1999, 13: 2905-2927.
- 15 Joseph JW, Koshkin V, Saleh MC, et al. Free fatty acid-induced β -cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 51049-51056.
- 16 Tuttle RL, Gill NS, Pugh W, et al. Regulation of pancreatic β -cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKB α [J]. Nat Med, 2001, 7: 1133.
- 17 Zhang X, Tang N, Hadden TJ, et al. Akt, FoxO and regulation of apoptosis [J]. BBA-Mol Cell Res, 2011, 1813: 1978-1986.
- 18 Kitamura T. The role of FOXO1 in β -cell failure and type 2 diabetes mellitus [J]. Nat Rev Endocrinol, 2013, 9: 615.
- 19 Kim JY, Lim DM, Moon CI, et al. Exendin-4 protects oxidative stress-induced β -cell apoptosis through reduced JNK and GSK3 β activity [J]. J Korean Med Sci, 2010, 25: 1626-1632.