

红景天苷对胰岛 β 细胞保护作用研究及机制探讨

鞠霖杰^{1,2}, 温小花², 舒鸾^{2*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230031; 2. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028)

摘要: **目的** 考察红景天苷的降糖功效及其对胰岛 β 细胞的保护作用。 **方法** 采用 C57BL/6 小鼠一次性注射链脲佐菌素 (STZ) 150 mg/kg 建立小鼠糖尿病模型, 红景天苷剂量为 100 mg/kg, 每日 1 次灌胃给药, 每 5 日检测小鼠空腹血糖, 30 d 后检测小鼠胰岛素水平并进行口服糖耐量实验 (OGTT)。同时分离正常小鼠胰岛培养 3 d 后, 通过 Ki67 免疫荧光染色及 TUNEL 染色方法考察红景天苷 (50 μ mol/L) 对胰岛 β 细胞增殖与凋亡的作用。通过 RT-PCR 方法检测 β 细胞增殖相关基因 insulin、Pdx-1、GLP-1R、IL-1 β 转录水平变化。 **结果** 与 STZ 组相比较, 红景天苷组 (STZ/Sal) 能够有效降低小鼠空腹血糖, 并表现出胰岛素水平增加的趋势, 其 OGTT 实验也得到显著改善。而小鼠胰岛染色实验表明, 红景天苷可以明显促进 β 细胞增殖, 减少高糖诱导的 β 细胞凋亡。并且红景天苷促进 insulin、Pdx-1、GLP-1R 等基因的 mRNA 水平升高, 降低炎症因子 IL-1 β 的 mRNA 水平。 **结论** 本研究证实红景天苷有效保护胰岛 β 细胞, 促进 β 细胞增殖并抑制其凋亡, 从而实现降低血糖的作用。

关键词: 红景天苷; 糖尿病; 胰岛 β 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-0482(2016)05-0456-05

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2016.0456

Study on Protective Effects of Salidroside on Pancreatic β -Cell Survival

JU Lin-jie^{1,2}, WEN Xiao-hua², SHU Luan^{2*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, 230031, China; 2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210028, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the hypoglycemic action and β -cell protective effect of salidroside in streptozotocin (STZ) induced diabetic mice and cultured mouse islets. **METHODS** C57BL/6J mice were injected with a single dose of 150 mg/kg freshly prepared STZ with citrate buffer as control. The salidroside intervention with a dosage of 100 mg/kg/d was initiated on the 8th day after STZ injection and conducted for 30 d. Fasting blood glucose levels were measured every five days. After 30 d treatment, the oral glucose tolerance test (OGTT) was performed, and blood samples were collected to detect plasma insulin concentrations. The isolated mouse islets were cultured with salidroside (50 μ mol/L) or DMSO for 3 d. Ki67 staining and TUNEL assay were performed to investigate the effects of salidroside on β -cell proliferation and apoptosis. Meanwhile, the mRNA levels of insulin, Pdx-1, GLP-1R and IL-1 β in islets were detected by RT-PCR. **RESULTS** Compared with the STZ group, salidroside displayed significantly hypoglycemic effects, together with increased plasma insulin contents as well as improved OGTT. The Ki67 staining in cultured islets showed the proliferation of β -cell was remarkably increased by salidroside, while the β -cell apoptosis induced by high glucose was strongly inhibited by salidroside. Moreover, the mRNA levels of insulin, Pdx-1 and GLP-1R were up-regulated by salidroside significantly. However, the mRNA level of IL-1 β which is a cytokine involved in β -cell apoptosis was down-regulated by salidroside. **CONCLUSION** The present study demonstrates that salidroside can ameliorate the hyperglycemia in STZ diabetic mice by protecting β -cell survival with increased β -cell proliferation and decreased β -cell apoptosis.

KEY WORDS: salidroside; diabetes; pancreatic β -cell; proliferation; apoptosis

收稿日期: 2016-05-01; 修稿日期: 2016-06-29

基金项目: 国家自然科学基金 (81102488, 81370924); 江苏省自然科学基金 (BK2011865); 江苏省六大人才高峰项目 (2015-YY010)

作者简介: 鞠霖杰 (1990—), 男, 江苏泰兴人, 安徽中医药大学 2014 级硕士研究生。* 通信作者: shuluan2006@hotmail.com

β 细胞衰竭是糖尿病致病机制的核心环节,是糖尿病发生、发展的病理生理基础这一理念目前已被人们普遍接受。基于 β 细胞衰竭是引起糖尿病的重要病因,促进糖尿病状态下 β 细胞生存及再生已成为新的治疗策略之一,为糖尿病治疗带来了新的思路 and 希望^[1]。

近年来,研究发现降糖中药在改善胰岛 β 细胞功能,维持胰岛 β 细胞数量方面具有一定的功效。例如,苦瓜伤流汁可以明显增加链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病小鼠胰岛 β 细胞的数量,表明苦瓜治疗糖尿病的机制与促进胰岛 β 细胞增生或修复受损的 β 细胞相关^[2]。

中药红景天的应用历史悠久,药理作用广泛。红景天对四氧嘧啶、肾上腺素和葡萄糖引起的小鼠高血糖均有抑制作用^[3],然而其是否能够对 β 细胞产生直接的作用尚不明确。本实验以分离培养的小鼠胰岛为研究对象,考察了红景天苷对高糖环境下胰岛 β 细胞的保护作用,初步阐明其降糖作用可能的新机制。

1 材料

1.1 实验动物

C57BL/6小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,由江苏省中医药研究院实验动物中心饲养。

1.2 主要仪器

生物安全柜(Labconco Purifier Class II Biosafety Cabinet);CO₂培养箱(Thermo Electrom公司);XDS-1B倒置显微镜(重庆光电仪器总公司);微量移液器(Eppendorf,德国),Anke TDL-40B型低容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂);高速冷冻离心机(Beckman,美国);荧光定量PCR循环仪(ABI,美国);IX51型荧光倒置显微镜(Olympus,日本);Nanodrop1000微量紫外分光光度计(瑞士METTLER TOLEDO公司);微血糖测量仪及试纸(德国罗氏诊断有限公司)。

1.3 药品和试剂

红景天苷(南京泽朗医药科技有限公司,纯度98%);葡萄糖、链脲佐菌素(STZ)(美国Sigma公司);胰岛素放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究);Trizol与逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);CYBR Green PCR Master Mix荧光定量PCR试剂盒(美国ABI公司);Insulin与Ki67一抗,及荧光二抗购自Abcam公司;TUNEL染色

检测试剂盒(In Situ Cell Death Detection Kit,罗氏公司);DAPI甘油封闭液(Vector Labs)。

2 方法

2.1 动物模型的建立

对C57BL/6J小鼠进行一次性注射链脲佐菌素(STZ)150 mg/kg^[4]构建小鼠糖尿病模型。

2.2 实验分组与处理

建模1周后,以空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L作为模型成功。将动物分为正常对照组(con),模型组(STZ)、红景天苷治疗组(Sal),每组10只。红景天苷剂量为100 mg/kg^[5],每日1次灌胃给药,每5日检测小鼠空腹血糖,30 d后进行口服糖耐量实验(OGTT)并分离小鼠血浆检测胰岛素水平。

2.3 小鼠口服糖耐量(OGTT)的测定

在末次给药后,禁食12 h,各组小鼠口服给予25%葡萄糖(2 g/kg)溶液,于口服前及口服后30、60、90、120 min尾静脉取血测定血糖。

2.4 小鼠胰岛分离培养

对小鼠行腹腔注射戊巴比妥钠进行麻醉(60 mg/kg)。75%乙醇消毒皮肤,无菌剖腹,暴露胰腺及胆总管。从胆总管进针,逆行缓慢注入4℃预冷的胶原酶P(0.8 g/L),2 mL,使胰腺充分膨胀。剪心放血处死小鼠,剪除胃与横结肠之间的大网膜及脾脏,沿十二指肠边缘自十二指肠向小肠方向剥离胰腺组织。剩余部分沿胰腺边缘完整取出,完整胰腺入含有3 mL 4℃预冷胶原酶P的50 mL离心试管中。37℃水浴消化13~17 min,振荡使其呈细砂状,加入4℃含10%新生牛血清(NBS)的Hanks液10 mL,终止消化,孔径600 μ m不锈钢滤网筛过滤,1 500 r/min离心2 min,弃去上清,4℃含10%NBS的Hanks液重新清洗离心1遍,收集沉淀。胰岛采用6孔板培养,每孔放置25~30个胰岛。加入33.3 mmol/L葡萄糖模拟高糖环境,红景天苷剂量为50 μ mol/L^[5]。培养3 d后进行染色处理或提取RNA。RNA提取与逆转录实验参照诺唯赞公司试剂盒说明书进行。

2.5 小鼠胰岛Ki67染色

经4%中性甲醛固定的胰腺组织常规脱水、透明、包埋、制成厚4 μ m切片。取切片脱蜡,梯度乙醇水化,PBS洗涤后,滴加封闭血清在湿盒中室温封闭30 min。加适宜浓度的一抗置湿盒中4℃孵育过夜,PBS洗涤后加入不同荧光二抗,置湿盒中室温避光孵育1 h。最后用含蓝色荧光核染料(DAPI)

的甘油封片。保存切片于暗盒中,800 倍荧光显微镜下观察。

2.6 小鼠胰岛 TUNEL 染色

胰腺切片脱蜡,梯度乙醇脱水,PBS 洗涤,3% 乙酸 37 ℃ 处理,Proteinase 消化,TBS 洗涤,标本加标记液 37 ℃,标记 2 h,生物素化抗地高辛抗体孵育,37 ℃ 反应 60 min,TBS 洗涤,SABC-AP 抗体孵育,37 ℃ 反应 60 min,TBS 洗涤,滴加显色液显色 37 ℃,30 min 后充分水洗,0.1% 核固红复染 0.5~1 min,洗净,封裱剂封片,光镜下观察组织病理变化并拍照。

2.7 RT-PCR

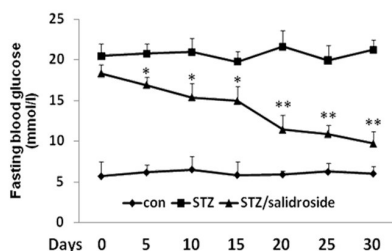
引物序列如下:insulin:5'-TTCTTCTACACACCA-3'(Forward),5'-CTAGTTGCAGTAGT-TCT-3'(Reward);IL-1 β :5'-GACCTTCCAGGAT-GAGACA-3'(Forward),5'-AGCTCATATGGGTCCGACAG-3'(Reward);PDX-1:5'-GAG-GACCCGTACTGCCTACA-3'(Forward),5'-CGGGGTCCCGCTACTACGTT-3'(Reward);TCF7L2:5'-CAGGGAAGAACAGGCAAAAT-3'(Forward),5'-GGGGGAGGCGAGTCTAGTAA-3'(Reward);GLP-1R:5'-CCTGAGGAACAGCTC-CTGTC-3'(Forward),5'-GGATGCAAACAGGT-TCAGGT-3'(Reward);tubulin:5'-GTTGGCCAG-GCTGGTGTCCAG-3'(Forward),5'-CTGTGAT-GAGCTGCTCAGGGTGG-3'(Reward)。

2.8 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS16.0 统计软件进行方差分析,组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 红景天苷对 STZ 糖尿病小鼠的空腹血糖水平、口服糖耐量实验(OGTT)及胰岛素水平的调节结果见图 1。



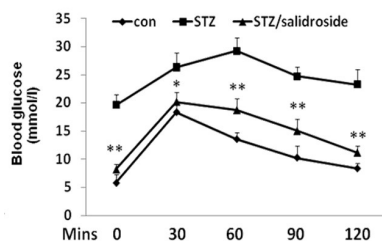
注:与 STZ 比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 1 红景天苷对 STZ 小鼠空腹血糖的调控作用

如图 1 所示,与正常对照组(con)比较,STZ 造模成功后小鼠 FBG 有显著的升高($P < 0.01$)。而

红景天苷组给药 5 d 后,与 STZ 模型组相比,红景天苷(Sal)治疗组小鼠血糖水平明显开始呈现降低趋势($P < 0.05$),并且在整个 30 d 的给药疗程中,降糖作用一直持续。

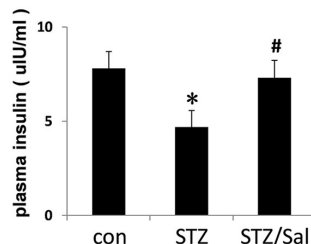
在 30 d 治疗结束时作者进行了小鼠口服糖耐量实验(OGTT)。模型组小鼠的 OGTT 中各时间点的血糖值均显著高于正常组,表明小鼠糖耐量异常。而红景天苷组小鼠各时间点的血糖值明显均低于模型组($P < 0.05$),提示红景天苷能够有效改善糖尿病小鼠的糖耐量(图 2)。



注:与 STZ 比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 2 红景天苷对 STZ 小鼠 OGTT 实验的影响

而血浆胰岛素检测结果显示(图 3),与对照组比较,由于 STZ 对胰岛 β 细胞特异性细胞毒作用, β 细胞死亡数量显著减少,造成 STZ 组小鼠的胰岛素水平明显降低($P < 0.05$)。而红景天苷治疗组的胰岛素水平表现出有效的升高($P < 0.05$),提示红景天苷可能具有保护胰岛 β 细胞的作用。



注:与 con 比较,* $P < 0.05$;与 STZ 比较,# $P < 0.05$ 。

图 3 红景天苷对 STZ 小鼠血浆胰岛素水平的作用

3.2 高糖环境下红景天苷对 β 细胞的保护作用

为进一步考察证实红景天苷对 β 细胞是否具有保护作用,我们通过分离培养的小鼠胰岛进行 β 细胞增殖与凋亡检测。

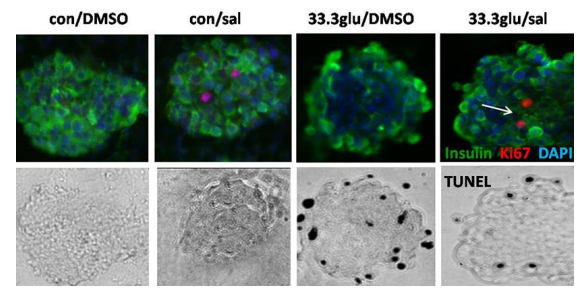
如图 4 所示,Ki67 是细胞分裂增殖的核蛋白标志物(红色),高糖对照组(左列 33.3 glu)中 β 细胞增殖受到抑制,未观察到 Ki67 表达阳性 β 细胞。而右列红景天苷组(33.3 glu/salidroside)能够观察到明显的 Ki67 表达阳性 β 细胞。Ki67 阳性 β 细胞计数结果表明,高糖显著抑制 β 细胞增殖,而红景天苷能够有效增加 β 细胞的增殖比例(图 5)。而图 4 中所

示 TUNEL 染色结果(细胞凋亡检测方法,图 4 中黑点),可见高糖对照组细胞 TUNEL 染色阳性细胞显著增加,表明高糖对 β 细胞的损害作用,而红景天苷能显著降低 β 细胞的凋亡比率,提示其对胰岛细胞生存的保护作用,计数结果如图 5。

3.3 红景天苷调控 β 细胞生存相关基因 insulin、Pdx-1、TCF7L2、GLP-1R、IL-1β 表达变化

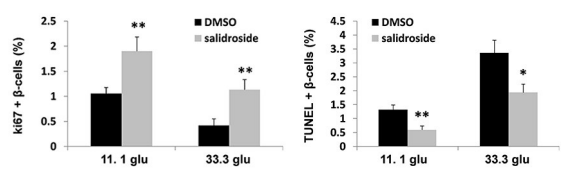
RT-PCR 实验结果显示(图 6),红景天苷可以显著降低小鼠 β 细胞中的白介素-1β(IL-1β)mRNA 水平。IL-1β 是 T2DM 中诱导 β 细胞凋亡的主要炎症因子,有观点认为糖尿病从根本上说也属于一种慢性炎症性疾病^[6]。这一发现提示红景天苷抑制 β 细胞凋亡的作用可能与其抗炎作用相关。

与对照组相比,红景天苷显著上调 β 细胞 insulin、Pdx-1、TCF7L2 及 GLP-1R 基因 mRNA 水平,提示红景天苷可能通过激活 Wnt 通路与 GLP-1R 通路,从而实现促进 β 细胞增殖的作用。



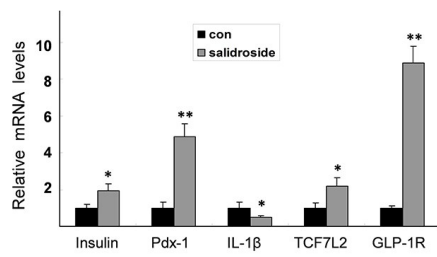
注:insulin,绿色;Ki67,红色;TUNEL,黑色。

图 4 染色实验显示红景天苷对 β 细胞的保护作用



注:与 DMSO 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 5 红景天苷对高糖诱导的 β 细胞凋亡和增殖作用



注:与 con 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 6 红景天苷对胰岛 β 细胞生存相关基因的表达调控

4 讨论

中医药治疗糖尿病历史悠久,传统中医文献中记载能治疗消渴,即为中医理论的糖尿病的中药为

数众多。而近年来,具有降糖功效的植物来源天然化合物的研究也受到人们越来越多的重视^[7]。

红景天有效成分红景天苷(Salidroside)在改善胰岛素抵抗方面的作用机制已有报道。例如最新发表在 British J. Pharmacology 杂志的研究表明,红景天苷能够通过激活线粒体相关的 AMPK/PI3K/Akt/GSK3β 通路改善胰岛素抵抗^[5]。另有研究表明,红景天提取物能够通过激活 AMPK 信号通路抑制肝糖异生作用,从而实现降糖功效^[8]。然而红景天苷对 β 细胞是否具有直接作用尚不明确。

在本研究中,我们通过分离培养的小鼠胰岛增殖与凋亡检测方法,考察了红景天苷对 β 细胞的直接保护作用,发现红景天苷可以有效促进 β 细胞的增殖,同时抑制由高糖诱导的 β 细胞凋亡,显示出保护胰岛 β 细胞的作用。

进一步,我们检测了红景天苷对 β 细胞生存密切相关的基因表达的调控作用。RT-PCR 实验表明,具有促进 β 细胞增殖与胰岛素合成的基因如 insulin、Pdx-1 在红景天苷组都得到显著升高。并且我们观察到红景天苷上调 GLP-1R 和 TCF7L2 的作用。

GLP-1R 是重要的肠促胰岛素:胰高血糖素样肽 1 (GLP-1)的受体,诸多研究证实 GLP-1-R 信号通路激活能够增强胰岛素的分泌,并且具有促进 β 细胞增殖保护 β 细胞生存的作用^[9]。基于 GLP-1 开发的新型降糖药物,例如二肽基肽酶 4 (DPP-4) 抑制剂、GLP-1 类似物、GLP-1 受体激动剂等已经在国内外得到广泛应用。红景天苷能够显著上调 GLP-1R 的 mRNA 水平,提示其对 GLP-1R 通路的潜在作用,值得我们今后进一步的深入探讨。

转录因子 TCF7L2 在 β 细胞生存中的重要作用也在我们之前的研究中得到证实^[10]。TCF7L2 为经典 Wnt 信号通路中的重要转录因子,与 β-catenin 形成转录复合物起始下游基因的转录,共同调控细胞分化再生过程。Wnt 通路在降糖中药作用机制中的研究正被人们所重视^[11]。

已有研究表明 T2DM 体内存在由高糖高脂所诱导的一种炎症环境^[12],炎症细胞因子表达水平的增加对胰岛 β 细胞产生多种不利影响,而白介素-1β (IL-1β)是其中诱导 β 细胞凋亡的主要炎症因子。阻断 IL-1β 通路、抗炎药物是近年来 2 型糖尿病治疗领域的新策略。IL-1β 抗体成为目前 2 型糖尿病治疗药物研发的一个颇具前景方向^[13]。我们的研

究显示,红景天苷可以显著降低由高糖诱导的小鼠胰岛中 IL-1 β mRNA 的升高,提示红景天苷能够通过降低 IL-1 β 水平从而抑制 β 细胞的凋亡。

综上所述,本研究考察了红景天苷对 β 细胞生存的直接影响,证实其能够促进 β 细胞增殖并抑制 β 细胞凋亡,从而保护 β 细胞生存,进而实现改善机体糖尿病状态。同时我们初步探讨了其作用可能与激活经典 Wnt 通路以及 GLP-1R 通路,抑制 IL-1 β 表达相关,其分子作用机制有待我们进一步的研究。

参考文献:

- [1] DESGRAZ R, BONAL C, HERRERA PL. β -cell regeneration: the pancreatic intrinsic faculty[J]. Trends Endocrinol Metab, 2011, 22(1):34-43.
- [2] 董英,朱晶英,陈钧.苦瓜伤流液对链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠的降糖功能研究[J].食品科学, 2010, 31(21):349-352.
DONG Y, ZHU JY, CHEN J. Antihyperglycemic function of *Momordica charantia* L. bleeding sap in STZ-induced diabetic mice[J]. Food Sci, 2010, 31(21):349-352.
- [3] 程秀娟,邸琳,吴岩,等.高山红景天多糖降血糖作用[J].中国中药杂志, 1993, 18(9):557-559, 575.
CHENG XJ, DI L, WU Y, et al. Studies on the hypoglycemic effect of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Polysaccharides[J]. China J Chin Mater Med, 1993, 18(9):557-559, 575.
- [4] 王聪,刘玉强,才谦.齿叶白鹃梅叶对小鼠糖耐量的影响及降糖作用研究[J].中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2):203-205.
WANG C, LIU YQ, CAI Q. Effects of leaves of *Exochorda serratifolia* on glucose tolerance in mice and hypoglycemic effect on STZ induced diabetic mice[J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2011, 17(2):203-205.
- [5] ZHENG T, YANG X, WU D, et al. Salidroside ameliorates in-

sulin resistance through activation of a mitochondria-associated AMPK/PI3K/Akt/GSK3 β pathway[J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(13):3284-3301.

- [6] DONATH MY. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(6):465-476.
- [7] NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years[J]. J Nat Prod, 2007, 70(3):461-477.
- [8] LEE SY, LAI FY, SHI LS, et al. *Rhodiola crenulata* extract suppresses hepatic gluconeogenesis via activation of the AMPK pathway[J]. Phytomedicine, 2015, 22(4):477-486.
- [9] BUTEAU J. GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival[J]. Diabetes Metab, 2008, Suppl 2:S73-S77.
- [10] SHU L, SAUTER NS, SCHULTHESS FT, et al. Transcription factor 7-like 2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets[J]. Diabetes, 2008, 57:645-653.
- [11] 常保超,陈卫东,张燕,等.白芍总苷对 2 型糖尿病大鼠肾组织 Wnt/ β -catenin 信号通路表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19):3829-3835.
CHANG BC, CHEN WD, ZHANG Y, et al. Effect of total glucosides of paeony on Wnt/ β -catenin signal transduction pathway expression in kidney of diabetic rats[J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(19):3829-3835.
- [12] XIE W, DU L. Diabetes is an inflammatory disease: evidence from traditional Chinese medicines[J]. Diabetes Obes Metab, 2011, 13(4):289-301.
- [13] CAVELTI-WEDER C, TIMPER K, SEELIQ E, et al. Development of an interleukin-1 β vaccine in patients with type 2 diabetes[J]. Mol Ther, 2016, 24(5):1003-1012.

(编辑:杨巍敏)

• 投稿须知 •

统计学 统计学方法部分,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计分析方法。统计结果应提供所用统计分析方法的具体名称(如成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析等)和统计量的具体值和 P 值(如 $t=3.45, P<0.05$);涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果同时,还应给出 95% 置信区间。统计学符号按中华人民共和国国家标准 GB3358-1982《统计学名词及符号》的有关规定书写,一律用斜体。

摘要、关键词 论文应附摘要(200~500 字)、关键词(3~8 个)。实验性文章摘要为四要素式摘要,即分为目的、方法、结果、结论 4 个部分,结果部分要详细,需将具体实验结果(P 值等)说明。中医理论学术探讨、专论、综述为叙述形式的指示性摘要,可不使用四要素式摘要。多个关键词之间应用分号分隔。英文摘要内容及字数要多于中文摘要,不必直译,也可不使用四要素(OBJECTIVE, METHODS, RESULTS, CONCLUSION)形式,以利于国际交流。