· 基础医学论著/研究 ·

黄芩素对糖尿病大鼠胰岛功能的影响及其机制探讨

魏雪芳,林绍彬,熊红萍,杨 煜,周 强,徐 静

摘要:目的 观察黄芩素对糖尿病大鼠血糖及胰岛细胞功能的影响,并初步探讨其可能的机制。**方法** 制备 2 型糖尿病大鼠模型。Wistar 大鼠按随机数字表法随机分为正常对照组(NC 组)、模型组(DM 组)和黄芩素组(BAI 组)。DM 组及 BAI 组注射链脲佐菌素(STZ,25 mg/kg)2 次,间隔 1 周进行造模;NC 组注射相应剂量柠檬酸盐缓冲液。造模成功后 BAI 组给予黄芩素 250 mg/kg 灌胃;NC 组及 DM 组用相同容量的生理盐水灌胃。每日灌胃 1 次,连续灌胃 8 周。检测各组大鼠的空腹血糖(FBG)及空腹血清胰岛素水平(FINS)水平。制备胰腺组织匀浆,测定胰腺组织中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性,同时以 Western Blot 法测定各组 cleaved Caspase-3 的表达情况。**结果** 与 NC 组比较,DM 组大鼠 FBG 水平、MDA 含量及 cleaved Caspase-3 表达升高,FINS 水平、SOD 活性降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 DM 组比较,BAI 组 FBG 水平、MDA 含量及 cleaved Caspase-3 表达降低,FINS 水平、SOD 活性升高($P<0.05$)。**结论** 黄芩素治疗能使糖尿病大鼠的血糖降低,并增加其胰岛细胞分泌胰岛素,其机制可能与黄芩素可降低胰腺氧化应激水平,抑制胰岛细胞凋亡有关。

关键词:2 型糖尿病;黄芩素;氧化应激;凋亡

中图分类号:R587.1 R285.5 **文献标识码:**A **doi:**10.12102/j.issn.1672-1349.2019.19.012

The Influence of Baicalein on Islet Function in Diabetic Rats

WEI Xuefang,LIN Shaobin,XIONG Hongping,YANG Yu,ZHOU Qiang,XU Jing
Fuzhou Second Hospital Affiliated to Xiamen University,Fuzhou 350007,Fujian,China
Corresponding Author:LIN Shaobin

Abstract:Objective To observe the influence of Baicalein on blood glucose and the function of islet cells in diabetic rats and explore its possible mechanism.**Methods** The model of type 2 diabetic rats was established.The Wistar rats were randomly divided into control group (NC),diabetic model group (DM),and baicalein treatment group(BAI).The rats in DM group and BAI group were injected with Streptozotocin (STZ,25 mg/kg) twice at interval of one week,while,NC group were injected with corresponding amount of citrate buffer. Then BAI group was gavaged with 250 mg/kg of Baicalein,while NC group and DM group were gavaged with the same quantity of normal saline,once per day for 8 weeks.The fasting blood glucose (FBG) and fasting serum insulin (FINS) were measured in each group. Pancreatic tissue homogenate was prepared and malondialdehyde (MDA) content and activity of superoxide dismutase (SOD) in pancreatic tissues were determined.The expression of cleaved Caspase-3 in each group was determined by western bloting.**Results** Compared with NC group,the expression of FBG、MDA and the protein of cleaved Caspase-3 of DM group were higher than those in the control group ($P<0.05$),while FINS and SOD activity decreased ($P<0.05$).After treatment with Baicalein,compared with DM group,the FBG,MDA content,and the protein expressions of cleaved Caspase-3 decreased,and the FINS and SOD activity in the BAI group were increased ($P<0.05$).**Conclusion** Baicalein could decrease the blood glucose and increase the insulin secretion of diabetic rats.The mechanism might be related to Baicalein could reduce the oxidative stress of pancreas and inhibit the apoptosis of islet cells.

Keywords:type 2 diabetes mellitus;baicalein;oxidative stress;apoptosis

近年来,中国的糖尿病患病率不断攀升,截至 2013 年,中国成年人糖尿病患病率已达 10.4%[1],即我国有 1.4 亿糖尿病病人,位居全球第一,且仍有 63% 的糖尿病病人未得到诊断,严重危害人类健康。糖尿病不断进展的重要原因是胰岛 β 细胞功能进行性减退,而 β 细胞凋亡是导致 2 型糖尿病 β 细胞功能减退的重要原因[2],因此抑制β细胞过度凋亡,成为治疗糖尿病的关键要素。黄芩素是黄芩中含量最高的黄酮类化合物之一,其具备很强的抗氧化作用[3]。而胰岛 β 细胞容易受到氧化应激攻击而发生凋亡,目前有关黄芩素的降糖、改善胰岛功能的作用鲜有报道。本研究通过制备 2 型糖尿病大鼠模型,采用黄芩素干预治疗,通过检测大鼠外周血血糖、胰岛素、胰腺组织膜脂过氧化产物丙二醛(malondialdehyde,MDA)及抗氧化物超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、凋亡蛋白的表达变化,观察黄芩素对 2 型糖尿病大鼠的治疗效果,并初步探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 30 只,体质量 180~250 g,购至上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号码 SCXK(沪)2012-0002]。通过厦

基金项目 福建省自然科学基金项目(No.2017J01335);福州市科技计划项目(No.2016-S-123-2)

作者单位 厦门大学附属福州第二医院(福州 350007)

通讯作者 林绍彬,E-mail:sblin1964@163.com

引用信息 魏雪芳,林绍彬,熊红萍,等.黄芩素对糖尿病大鼠胰岛功能的影响及其机制探讨[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(19):2933-2935.

门大学附属福州第二医院动物伦理委员会审核(审批号 2016-021)。

1.2 试剂及仪器 黄芩素(上海图赫实业有限公司);链脲佐菌素(streptozotocin,STZ,美国 Sigma 公司);MDA 检测试剂盒(山西澳瑞鑫生物科技有限公司);胰岛素检测试剂盒和 SOD 检测试剂盒(天津易捷康科技发展有限公司);血糖仪及试纸(美国雅培公司,FreeStyle Optium Neo H);相关抗体 cleaved Caspase-3、β-actin(美国 CST 公司)。仪器:TGL-16M 低温高速离心机(常州金坛良友仪器有限公司),科华酶标仪 ST-360(济南来宝医疗器械有限公司),DYY-6C 型电泳仪(南京普阳科学仪器研究所)。

1.3 模型制备及分组 6 周龄雄性 Wistar 大鼠 30 只,适应性喂养 1 周后,采用随机数字表法随机抽出 10 只作为正常对照组(NC 组),余下 20 只为造模组。NC 组普通饲料喂养,与造模组同步腹腔注射相应剂量的 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液。

造模组高脂饲料喂养 4 周后,腹腔注射 STZ(25 mg/kg)2 次,间隔 1 周;1 周后检测空腹血糖(fasting blood glucose,FBG),当 FBG≥7.8 mmol/L 时,模型构建成功,最终成模率为 100%[4]。将已造模成功的 20 只大鼠再按随机数字表法随机分为两组,糖尿病模型组(DM 组)和黄芩素组(BAI 组),每组 10 只。开始给药,每日 09:00~10:00 灌胃给药 1 次,灌胃期间每 4 周断尾测定血糖 1 次,连续灌胃 8 周。BAI 组给予黄芩素 250 mg/kg 灌胃;NC 组及 DM 组用相同容量的生理盐水灌胃。

1.4 样品收集 末次给药后,麻醉大鼠,腹主动脉采血 10 mL,采用注射麻醉法处死大鼠。留取全血,离心 15 min 后分离血清备用。分离胰腺,液氮速冻,而后转至−80 ℃冰箱冻存。

1.5 FBG 及空腹胰岛素(FINS)检测 FBG 浓度采用血糖仪测定;采用 ELISA 法测定血清 FINS。

1.6 胰腺组织中 MDA 及 SOD 检测 取胰腺组织(1 g 左右)剪碎,研磨制成 10% 胰腺组织匀浆,离心,取上清液冷冻保存。分别按试剂盒说明书测定 MDA 和 SOD 含量。

1.7 Western 印迹法检测 cleaved Caspase-3 的表达 取大鼠胰腺组织蛋白 1 g 左右,加入 RIPA 裂解液,分离胰腺组织蛋白,二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度,取等量蛋白电泳,同时 PVDF 膜印迹,室温下封闭后,加入 cleaved Caspase-3 一抗溶液,及标准内参 β-actin,4 ℃孵育过夜,而后再加入 HRP-山羊抗兔 IgG 二抗溶液,室温孵育 1 h,电化学发光显色,Bio-Rad 凝胶成像系统成像,Quantity-One 测灰度值并分析。实验重复 4 次,取平均值。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 16.0 进行分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),非正态分布资料采用对数转换为正态分布,并采用最小显著差法(LSD)进行两两比较。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠 FBG、FINS 水平比较(见表 1) 与 NC 组比较,DM 组 FBG 水平升高($P<0.05$),而 FINS 水平降低($P<0.05$);与 DM 组比较,BAI 组的 FBG 水平降低($P<0.05$),而 FINS 水平升高($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠 FBG、FINS 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	FBG(mmol/L)	FINS(pg/mL)
NC 组	10	6.13±0.62	6 735.45±102.12
DM 组	10	15.11±2.06[1)]	3 405.57±214.35[1)]
BAI 组	10	12.61±2.11[1)2)]	4 126.89±243.67[1)2)]

与 NC 组比较,1) $P<0.05$;与 DM 组比较,2) $P<0.05$

2.2 各组大鼠胰腺 SOD 活性和 MDA 含量比较(见表 2) 与 NC 组比较,DM 组 SOD 活性明显下降($P<0.05$),MDA 含量明显升高($P<0.05$);与 DM 组比较,BAI 组 SOD 活性明显升高($P<0.05$),MDA 含量明显降低($P<0.05$)。

表 2 各组大鼠胰腺 SOD 活性和 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	SOD(NU/mL)	MDA(mmol/L)
NC 组	10	50.31±1.30	0.470±0.049
DM 组	10	23.49±0.92[1)]	1.060±0.031[1)]
BAI 组	10	44.65±0.63[1)2)]	0.590±0.071[2)]

与 NC 组比较,1) $P<0.05$;与 DM 组比较,2) $P<0.05$

2.3 各组大鼠胰腺组织凋亡蛋白 cleaved Caspase-3 蛋白表达比较(见图 1、表 3) 与 NC 组比较,DM 组 cleaved Caspase-3 表达升高($P<0.05$),而 BAI 组给予黄芩素治疗 8 周后,cleaved Caspase-3 表达显著下降($P<0.05$)。

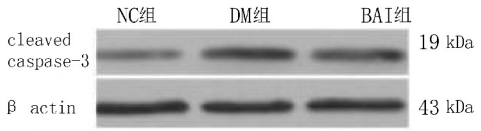

图 1 各组大鼠 cleaved Caspase-3 蛋白电泳图

表 3 各组大鼠胰腺组织 cleaved Caspase-3 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	cleaved Caspase-3
NC 组	10	0.96±0.15
DM 组	10	2.14±0.23[1)]
BAI 组	10	1.15±0.17[2)]

与 NC 组比较，1) $P<0.05$；与 DM 组比较，2) $P<0.05$

3 讨 论

黄芩是著名的传统中药，黄芩素是黄芩中含量最高的黄酮类化合物之一，其具备抗炎、抗氧化、清除氧自由基及抗肿瘤等作用[5]，其中以抗氧化作用尤为突出。黄芩素分子结构内含有 3 个羟基，因而它们具有一定的自由基清除活性。研究发现黄芩素对羟自由基、超氧阴离子（O^{2-}）及烷过氧自由基有较强的清除作用[4]。

有研究表明，糖尿病的发生发展与氧化应激有密切的关系[6]。胰岛 β 细胞对活性氧自由基（reactive oxygen species，ROS）的变化非常敏感，而胰腺抗氧化物水平比较低（包括过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶），因此，胰岛 β 细胞容易受到氧化应激攻击而出现损伤[7]。糖尿病持续的高血糖可致使胰腺组织产生大量 ROS，而其抗氧化酶活性下降，胰腺组织氧化应激增强。MDA 是膜脂过氧化重要的产物之一，膜脂过氧化的程度可通过 MDA 了解[8]。本研究中，DM 组大鼠胰腺 MDA 显著高于 NC 组大鼠，而 SOD 活性显著下降，说明糖尿病大鼠胰腺组织中 ROS 生成增多，而抗氧化防御系统能力降低，胰腺组织受到氧化应激攻击而损伤，从而影响胰岛分泌功能。给予糖尿病大鼠黄芩素治疗后，糖尿病大鼠血糖显著下降，胰岛素分泌增加，同时胰腺组织中 MDA 减少，SOD 活性增加，说明黄芩素可抑制糖尿病大鼠胰腺组织中氧化应激，改善胰岛 β 细胞的分泌功能，在一定程度上缓解了糖尿病大鼠的糖尿病症状。

在 2 型糖尿病高糖、高脂的状态下，大量 ROS 产生，不可避免地出现胰岛 β 细胞的凋亡，引起胰岛 β 细胞崩解。ROS 可导致胰岛 β 细胞线粒体膜的损伤，使其通透性增高，细胞色素 C 被释放到细胞质中，激发胰岛 β 细胞凋亡，从而导致靶组织损伤[9]。细胞凋亡主要有两条通路：①线粒体所介导的凋亡途径（线粒体通路），也被称为细胞凋亡的内源途径，如 Bcl-2/Bax 凋亡途径；②死亡受体通路，也被称为细胞凋亡的外在途径，主要通过细胞外信号激活细胞内的凋亡酶，包括 Fas/FasI 信号途径和 TNFR/TNF 信号途径。两条通路最终都激活 Caspase-8、Caspase-9 等凋亡启动者，从而引起 Caspase 级联反应[10-11]，进而使细胞内重要的结构蛋白和功能分子断裂，引起细胞凋亡。已有的研究表明，Caspase-3 是细胞凋亡通路中一个重要蛋白酶，同时也是凋亡发生的标志酶[11]。在细胞凋亡中，Caspase-3 是主要执行者，其活化时会被剪切生成活性片段 cleaved Caspase-3，而后发挥蛋白水解酶作用而促进细胞凋亡，因此可以通过测定 cleaved Caspase-3 大致反映细胞凋亡情况[12]。本研究中，糖尿病大鼠胰腺的 cleaved Caspase-3 蛋白表达明显增强，而在给予黄芩素处理后可显著抑制 Caspase-3 蛋白的表达，cleaved Caspase 3 蛋白表达下降，提示黄芩素有降低胰岛 β 细胞凋亡的作用。

综上所述，黄芩素能降低糖尿病大鼠的血糖，并改善胰腺 β 细胞的胰岛素分泌功能，其可能的机制是增强胰腺抗氧化的防御，减少氧化应激，最终抑制了 cleaved Caspase-3 的表达，从而使得 β 细胞凋亡减少。然而，黄芩素对胰腺 β 细胞的确切作用机制尚需进一步研究。

参考文献：

[1] WANG L M,GAO P,ZHANG M,*et al*.Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013[J].JAMA,2017,317(24):2515-2523.

[2] MAEDLER K.Beta cells in type 2 diabetes - acrucial contribution to pathogenesis[J].Diabetes Obes Metab,2008,10:408-420.

[3] 田硕,洪涛,张多,等.黄芩素的药理作用及分子机制的最新研究进展[J].黑龙江医药,2015,28(6):1196-1198.

[4] 周强,金智生,张东鹏,等.红芪多糖对高脂饲养 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠的影响[J].中医儿科杂志,2006,2(2):24.

[5] 卫昊,郭玲玲,李柳柳,等.不同海拔和光对黄芩中 7 种黄酮类有效成分含量的影响[J].中草药,2019,50(6):1472-1476.

[6] 辛文妤,宋俊科,何国荣,等.黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J].中国新药杂志,2013,22(6):647-653;659.

[7] GERBER P A,RUTTER G A.The role of oxidative stress and hypoxia in pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes mellitus[J].Antioxid Redox Signal,2017,26(10):501-518 .

[8] 李大鹏,张霞,吕春雷,等.创伤对机体脂质过氧化及抗氧化能力影响的实验研究[J].实验动物科学,2016,33(4):67-69;73.

[9] 任春久,张瑶,崔为正,等.氧化应激在 2 型糖尿病发病机制中的作用研究进展[J].生理学报,2013,65(6):664-673.

[10] SHALINI S,DORSTYN L,DAWAR S,*et al*.Old,new and emerging functions of caspases[J].Cell Death Differ,2015,22(4):526-539.

[11] WU H,CHE X,ZHENG Q,*et al*.Caspases: a molecular switch mode in the crosstalk between autophagy and apoptosis[J].Int J Biol Sci,2014,10(9):1072-1083.

[12] LIU P F,HU Y C,KANG B H,*et al*.Expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3 in tumorigenesis and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma[J].PLoS One,2017,12(7):e0180620.

（收稿日期：2019-06-14）
（本文编辑 王雅洁）