

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.06.034

白花丹参对糖尿病大鼠胰岛 B 细胞凋亡的影响

张海伶¹, 马 晓²

(1. 航空总医院急诊科, 北京 100012; 2. 航空总医院呼吸科, 北京 100012)

摘要: 白花丹参是一种珍稀的中药材, 含有多种微量元素, 具有极高的药用价值. 本文针对白花丹参进行了多项实验, 采用 MTT 法检测白花丹参浸出液对 INS-1 细胞的凋亡的抑制作用, 并且建立糖尿病大鼠模型研究白花丹参对血糖和胰岛素释放的影响, 取实验大鼠的胰岛做 HE 染色和免疫组化染色, 观察白花丹参抑制胰岛 B 细胞凋亡的效果和胰岛组织中抑制凋亡的 Bcl-2 蛋白和促进凋亡的 Bax 蛋白的分布. 实验结果证明, 白花丹参能促进 Bcl-2 蛋白的产生, 削弱 Bax 蛋白促进凋亡的能力, 抑制了胰岛 B 细胞的凋亡, 从而使胰岛素的释放增加, 最终达到控制血糖的目的.

关键词: 白花丹参; 糖尿病; 胰岛 B 细胞; 抑制凋亡

中图分类号: R587.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)06-1341-04

Inhibitory effects of *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba water extract on apoptosis of islet B cells in rats

ZHANG Hai-Ling¹, MA Xiao²

(1. Department of Emergency, General Hospital of China Aviation, Beijing 100012, China;

2. Department of Respiration, General Hospital of China Aviation, Beijing 100012, China)

Abstract: *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba is a kind of rare Chinese herbal medicine, which contains multiple kinds of trace elements and has high medicinal value. In this paper, MTT method was used to detect the inhibitory effect of *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba extract on the apoptosis of INS-1 cells, glycemic and insulin was tested, and HE staining and immunohistochemical staining was carried out. The experimental results show that *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba can promote the production of Bcl-2 proteins, weaken the ability of Bax proteins to promote apoptosis, thereby increase the release of insulin, ultimately achieve glycemic control purposes.

Keywords: *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba; Diabetes mellitus; Islet B cells; Inhibition of apoptosis

1 引言

糖尿病不仅会引起多尿、多饮、多食和消瘦, 还会引发心血管疾病、神经损伤、肾脏病变和眼底病变等并发症, 严重者还可能引起急性并发症酮症酸中毒和高渗昏迷, 最终可能致命. 近年来, 因为肥胖、高热量饮食、缺乏运动等不良的生活方式

和遗传因素引起的 2 型糖尿病的患病率不断增加^[1]. Butler 等人曾对 124 具尸体的胰腺组织进行检验, 包括 91 例肥胖者 (BMI > 27 kg/m², 其中 41 例患有 2 型糖尿病, 15 例表现空腹血糖异常, 35 例非糖尿病) 和 33 例不肥胖者 (BMI < 25 kg/m², 16 例患有 2 型糖尿病, 17 例非糖尿病), 实验证明胰岛 B 细胞凋亡增加引起 2 型糖尿病患

收稿日期: 2016-02-13

作者简介: 张海伶(1971-), 女, 副主任医师, 主要研究方向: 急症处理和糖尿病研究. E-mail: zhanghailing1971@outlook.com

者的胰岛 B 细胞减少^[2]。细胞凋亡是导致胰岛 B 细胞功能障碍的关键因素,而胰岛 B 细胞功能障碍是导致胰岛素分泌不足的主要原因^[3,4]。抑制胰岛 B 细胞的凋亡是治疗糖尿病的途径之一。

白花丹参含有丹参酮 II-A、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参新酮、柳杉酚、丹参醇、 β -谷甾醇、胡萝卜苷^[5],具有丹参的药理作用,但其有效成分是紫花丹参的 2~3 倍,更含有紫花丹参不具有的成分,有很高的药用价值。有研究证明白花丹参水提物能使血液内丙二醛(MDA)及活性氧(ROS)不同程度下降,提高血液内超氧化物歧化酶(SOD)的活性,且在一定程度上能控制糖尿病大鼠血糖^[6]。为了进一步研究白花丹参控制糖尿病大鼠血糖的作用机制,本实验在 INS-1 细胞和 Wistar/Slac 大鼠上研究白花丹参浸出液对胰岛细胞凋亡的影响,主要采用 MTT 法、血糖和胰岛素检测、HE 染色和免疫组化染色等手段,来检验白花丹参浸出液对糖尿病大鼠的治疗效果、胰岛 B 细胞凋亡的抑制效果和胰岛组织中抑制凋亡的 Bcl-2 蛋白和促进凋亡的 Bax 蛋白的分布^[7-9]。

2 材料和方法

2.1 材料

雄性 Wistar/Slac 大鼠,体重约 200 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。大鼠胰岛 B 细胞 INS-1 细胞,由上海酶联生物科技有限公司提供。

链脲佐菌素(STZ)购自上海宝曼生物科技有限公司。白花丹参购自莱芜紫光生态园有限公司。阿卡波糖购自拜耳医药保健公司。大鼠胰岛素(INS)酶联免疫检测试剂盒购自苏州艾瑞德生物科技有限公司。抗 Bcl-2 抗体(Apoptosis regulator Bcl-2)和抗 Bax 抗体(Apoptosis regulator BAX)购自武汉博士德生物工程有限公司。

罗氏血糖仪,型号 Accu-Chek[®] Softclix,德国罗氏诊断有限公司。酶标仪,型号 Multiskan MK3,美国赛默飞世尔科技公司。自动凝胶分析仪,型号 JS-380,上海培清科技有限公司。

2.2 实验方法

2.2.1 白花丹参浸出液的制备 取自然干燥的白花丹参生药 90 g,切片并加入 200 mL 水浸泡 12 h,然后加热煮沸 25 min。趁热过滤去除滤渣,将滤液蒸馏浓缩至 90 mL,得到生药浓度为 1 g/mL 的白花丹参浸出液,保存于 4 °C 备用。

2.2.2 白花丹参对 INS-1 细胞凋亡的抑制作用

INS-1 细胞用胰酶消化后以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中,在 5% CO₂、37 °C 条件下培养 12 h,部分细胞用 1 mg/mL 的 STZ 共孵育 12 h,部分细胞正常培养 12 h。将 INS-1 细胞分为 4 组:空白组、白花丹参组、STZ 组、STZ+白花丹参组。空白组,加入新鲜培养基。白花丹参组,将制备好的白花丹参浸出液用 0.22 μ m 的过滤头过滤,用培养基稀释到生药浓度为 0.5 g/mL,与细胞共孵育。STZ 组,将含有 STZ 的培养基去除,加上新鲜培养基。STZ+白花丹参组,将含有 STZ 的培养基去除,加上生药浓度为 1 mg/mL 白花丹参浸出液共孵育。4 组细胞孵育 24 h 或 48 h 后进行 MTT 检测,用酶标仪检测 OD 值。

2.2.3 建立糖尿病大鼠模型 雄性 Wistar/Slac 大鼠常规饲养 3d 后,禁食不禁水 12 h,按照 55 mg/kg STZ 的剂量对大鼠进行腹腔注射。5d 后随机 3 次取大鼠尾尖第二滴血测血糖,若测定大鼠血糖水平都大于 16.7 mmol/L,则造模成功。

2.2.4 白花丹参对糖尿病大鼠的血糖和胰岛素分泌的影响 取健康大鼠和糖尿病大鼠进行分组,共分成 4 组,每组 6 只,以阿卡波糖作为阳性对照^[10]。空白对照组:健康大鼠,用等量生理盐水灌胃。糖尿病对照组:糖尿病大鼠,用等量生理盐水灌胃。阿卡波糖组:糖尿病大鼠,用剂量为 15mg/kg 的阿卡波糖灌胃。白花丹参组:糖尿病大鼠,用剂量为 10 g/kg 的白花丹参浸出液灌胃。

将 4 组大鼠按分组进行连续灌胃给药 7d,期间观察各组的行为表现,并测体重,在最后一次灌胃后 30 min、60 min、120 min 分别进行大鼠尾尖取血,取血 0.5 mL,以 3000 r/min 离心 10min 取得血清,分别检测胰岛素和血糖值^[10-13]。

2.2.5 HE 染色 将检测血糖和胰岛素所用的大鼠麻醉,解剖后取大小约 1.0×1.0 cm² 的胰岛组织,生理盐水冲洗,用 10% 福尔马林浸泡固定 24 h,用常规方法进行石蜡包埋,然后切片进行苏木精-伊红(HE)染色。

2.2.6 免疫组化检验 取上述石蜡切片进行免疫组化染色,采用免疫组化 SP 法染色, DAB 显色,其中一抗采用 Bax 抗体或 Bcl-2 抗体(1:100 稀释),二抗采用生物素化山羊抗兔 IgG。晾干封片后用自动凝胶分析仪观察,并随机选择 5 个视野进行拍照,用平均光密度表示蛋白表达的相对含量^[14]。

2.2.7 统计学分析 所有数据均以 $\pm s$ 表示,采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 白花丹参对 INS-1 细胞凋亡的抑制作用

在孵育 24 h 时, 白花丹参组与空白组的 OD 值差别不大, STZ 组的 OD 值则明显小于空白组, STZ + 白花丹参组的 OD 值略小于空白组但明显大于 STZ 组。孵育 48 h 时同样有这样的现象。由此可知, 白花丹参浸出液对正常细胞没有明显毒副作用, 而经过 STZ 处理的 INS-1 细胞受到损伤, 细胞活力不如正常细胞。用白花丹参浸出液孵育 STZ 处理的损伤细胞能增加细胞活力, 白花丹参浸出液在具有抗 INS-1 细胞凋亡的作用(图 1)。

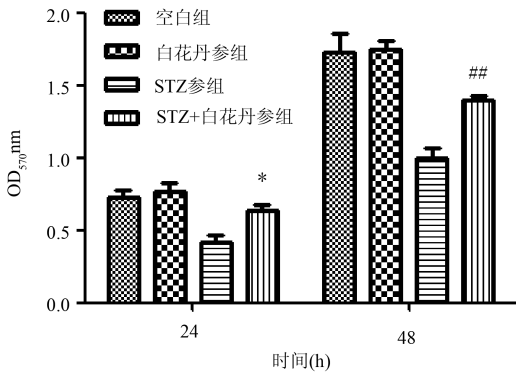


图 1 MTT 法检测白花丹参抗胰岛 B 细胞凋亡的作用与 24 h 的 STZ 组比较 * $P < 0.05$, 与 48 h 的 STZ 组比较 ** $P < 0.01$

Fig. 1 Detection of anti apoptosis effect of *Salvia miltiorrhiza* bge. f. *alba* on islet B cells by MTT * $P < 0.05$, significantly higher than that of 24 h STZ group; ** $P < 0.01$, significantly higher than that of 48 h STZ group

3.2 白花丹参对糖尿病大鼠的血糖和胰岛素分泌的影响

在实验期间, 空白对照组的饮食和行为均无

异常; 糖尿病对照组、阿卡波糖组和白花丹参组均表现出多饮、多尿、多食, 毛皮干燥, 体重降低表 1, 活动量减小; 阿卡波糖组和白花丹参组大鼠的活动量比空白对照组少, 但比糖尿病对照组多。由表 2 可见, 与糖尿病组相比, 白花丹参组大鼠的血糖都有所下降, 且与阿卡波糖组相差不大。分析胰岛素分泌的数据, 糖尿病对照组、阿卡波糖组和白花丹参组分泌的胰岛素都少于空白对照组, 而白花丹参组分泌的胰岛素量略大于阿卡波糖组。白花丹参能促进胰岛素分泌, 从而使血糖降低。

表 1 各组大鼠的体重变化 ($\pm s$, $n=6$)

Tab. 1 Body weight of 4 groups ($\pm s$, $n=6$)

分组	给药前体重(g)	用药 7d 后体重(g)
空白对照组	250 \pm 8.53	310 \pm 9.34
糖尿病对照组	246 \pm 5.85	164 \pm 6.24
阿卡波糖组	262 \pm 7.43	204 \pm 10.37
白花丹参组	258 \pm 4.25	192 \pm 8.96

3.3 HE 染色

HE 染色结果显示, 糖尿病对照组、阿卡波糖组和白花丹参组均存在不同程度的凋亡, 白花丹参组的凋亡情况较轻(图 2)。

3.4 免疫组化检验

在白花丹参组实验大鼠胰岛组织中发现 Bcl-2 蛋白比糖尿病对照组和阿卡波糖组的多, 且在其组织中发现 Bax 量较糖尿病对照组少(表 3)。由免疫组化实验证明, 白花丹参能促进 Bcl-2 蛋白的产生, Bcl-2 与 Bax 结合产生 Bcl-2-Bax 异源二聚体, 削弱了 Bax 蛋白促进凋亡的能力, 抑制了胰岛 B 细胞的凋亡, 从而起到降血糖的作用。

表 2 各组大鼠的血糖和胰岛素值 ($\pm s$, $n=6$)

Tab. 2 Blood glucose and insulin values of 4 groups ($\pm s$, $n=6$)

分组	血糖 (mmol/L)			胰岛素 (mIU/L)		
	30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
空白对照组	7.4 \pm 0.74	7.8 \pm 0.85	8.2 \pm 1.77	14.2 \pm 2.89	14.8 \pm 1.01	12.6 \pm 0.63
糖尿病对照组	17.4 \pm 1.72	18.2 \pm 0.49	16.4 \pm 3.61	7.3 \pm 1.03	7.8 \pm 0.98	7.7 \pm 0.83
阿卡波糖组	9.9 \pm 2.41	10.1 \pm 1.23	10.8 \pm 2.19	7.9 \pm 2.44	8.8 \pm 2.88	7.0 \pm 1.65
白花丹参组	11.9 \pm 1.41	11.4 \pm 1.04	10.6 \pm 1.93	9.2 \pm 0.78	10.2 \pm 0.74	9.3 \pm 1.36

4 讨论

白花丹参具有很高的药用价值, 其水溶性成分具有很强的抗脂质过氧化、自由基清除作用, 并

对血脂、血管有调节保护作用。目前百花丹参已经广泛应用于防治冠心病、脑血管及外周血管的多种病变, 但对糖尿病治疗中的作用研究尚少。

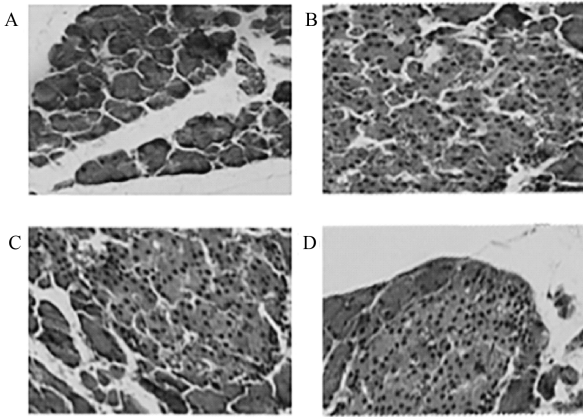


图 2 大鼠胰腺 HE 染色

A 为空白对照组, B 为糖尿病对照组, C 为阿卡波糖组, D 为白花丹参组

Fig. 2 HE stained dissected rat pancreas

A: control group. B: diabetes group. C: acarbose group. D: *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba.

表 3 白花丹参对胰岛 B 细胞的相关凋亡蛋白的影响
($\pm s, n=6$)

Tab. 3 Effects of *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba on apoptosis related proteins of islet B cell ($\pm s, n=6$)

分组	D _{Bax}	D _{Bcl-2}
空白对照组	0.86 \pm 0.04	1.39 \pm 0.03
糖尿病对照组	1.11 \pm 0.09	0.99 \pm 0.10
阿卡波糖组	1.05 \pm 0.11	1.00 \pm 0.07
白花丹参组	0.90 \pm 0.03	1.28 \pm 0.05

本文通过细胞和动物实验研究白花丹参对糖尿病大鼠胰岛 B 细胞凋亡的影响,并探究其影响机制. INS-1 细胞的 MTT 实验结果显示,白花丹参在一定程度上具有抗 INS-1 细胞凋亡的作用,并对正常细胞没有明显毒副作用.进一步建立糖尿病大鼠模型并检测大鼠服用白花丹参后的血糖和胰岛素含量,发现白花丹参具有一定的促进胰岛素分泌的作用,有利于降低血糖.对大鼠胰腺切片的免疫组化染色和 HE 染色实验更加证明了,白花丹参能提高 Bcl-2 蛋白表达量,使 Bcl-2 蛋白与 Bax 蛋白结合,从而抑制胰岛 B 细胞凋亡,促进胰岛素分泌,使血糖降低.

细胞凋亡是细胞的程序性死亡过程,实验证实白花丹参可以抑制胰岛素 B 细胞凋亡、促进胰岛素的分泌,对糖尿病具有保护作用,是治疗糖尿病的途径个之一.

参考文献:

- [1] Shaw J, Sicree R, Zimmet P. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 [J]. *Diabetes Res Clin Pr*, 2010, 87: 4.
- [2] Butler A E, Janson J, Bonner-Weir S, *et al.* β -cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes [J]. *Am Diabetes Assoc*, 2003, 52: 102.
- [3] 杨庆宇, 郜娜. 利拉鲁肽通过调节 microRNA-375 对胰岛细胞凋亡的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32: 1627.
- [4] Lorenzo C, Wagenknecht L E, D'Agostino RB Jr, *et al.* Insulin resistance, beta-cell dysfunction, and conversion to type 2 diabetes in a multiethnic population: the insulin resistance atherosclerosis study [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33: 67.
- [5] 曹春泉, 孙隆儒, 姜红祥, 等. 白花丹参的化学成分研究 [J]. *时珍国医国药*, 2009, 20: 636.
- [6] 李广红, 郭征东, 李菁, 等. 白花丹参水提物对糖尿病大鼠心肌组织氧化应激的影响 [J]. *泰山医学院学报*, 2015, 36: 848.
- [7] 魏士杰, 陈文强. 云芝多糖影响人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖和凋亡的研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53: 1162.
- [8] 吴兰, 赵梓亦, 李灵. 融合蛋白 TAT-p53-MTS 的促细胞凋亡作用 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2015, 52: 170.
- [9] 龙添珍, 黄学琴, 刘海朋, 等. XIAP 在 TRAIL 抗性细胞 HCT116 bax^{-/-}中的作用机制研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53: 1398.
- [10] Potter D, Gao F. Intersimple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*Juglans regia*) cultivars [J]. *J Am Soc Hortic Sci*, 2002, 127: 75.
- [11] 李志田, 杨保津, 马广恩. 白花丹参化学成分的研究 [J]. *药学学报*, 1991, 26: 209.
- [12] 高允生, 姜隆梅, 刘延平, 等. 白花丹参茎叶水提物对小鼠缺氧作用的研究 [J]. *中国临床康复*, 2005, 9: 115.
- [13] 王贤军, 夏青, 蔡洪信, 等. 白花丹参叶制剂对局灶性脑梗死 HSP70 及细胞凋亡的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2005, 3: 140.
- [14] 章毓晋. 图像处理和分析基础 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 103.