

药理作用,目前还不是很清楚。

由于人参皂苷 Rb1 分子结构中含有 4 个葡萄糖基团,所以我们推测 GLUT1 和 GLUT3 可能介导了 Rb1 的透血脑屏障进入脑靶组织而发挥脑保护作用。我们通过实验研究发现根皮素可显著抑制人参皂苷 Rb1 在 rBMECs 上的转运,而根皮素是葡萄糖转运体的抑制剂,所以我们认为人参皂苷 Rb1 的转运机制可能是经葡萄糖转运体介导的跨膜转运。GLUT1 和 GLUT3 均存在于 rBMECs,而 GLUT3 是否也参与了人参皂苷 Rb1 的脑转运,其在人参皂苷 Rb1 脑转运过程中发挥了什么作用还有待于进一步地探讨。通过该实验我们可以通过干预或调节葡萄糖转运体的表达,进一步帮助人参皂苷 Rb1 透血脑屏障而进入脑靶组织,发挥脑保护作用。另外有研究证明,人参皂苷 Rb1 可上调葡萄糖转运体的表达,使得人参皂苷 Rb1 可以进一步透血脑屏障进入脑靶器官,两者良性循环对 Rb1 脑保护作用的影响,是我们下一步的研究方向。

REFERENCES

[1] RADAD K, MOLDZIO R, RAUSCH W D. Ginsenosides and their CNS targets[J]. *CNS Neurosci Thera*, 2011, 17(6):761-768.

[2] YANG Q Y, LI X Y, LIU G L. Research progress in pharmacological activities of ginsenoside Rb1[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2013, 48(15):1233-1237.

[3] LI F C, TAO Z Y, LIU A M, et al. Effect of ginsenoside Rb1 on the expression of GLUT1 in penumbra area after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Chin J Exper Surg*(中国实验外科杂志), 2005, 21(9):571-573.

[4] YE X J, LI F C, CAO D X, et al. Effect of propofol pretreatment on the expression of glucose transporter-3 in rat brain cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Chin J Anesthesiol*(中华神经外科杂志), 2005, 22(2):69-70.

[5] YUAN Q L, YANG C X, XU P, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rb1 on transient cerebral ischemia in rats[J]. *Brain Res*, 2007, 1167:1-12.

[6] ZHU M X, RAN B, FENG Z Q, et al. Effects of Rb1 and Rg1 on the expression of Bcl-2, Bax in apoptosis of HK-2 cells induced by the serum of kidney ischemia/reperfusion[J]. *Chin J Appl Physiol*(中国应用生理学杂志), 2009, 25(4):496-499.

[7] JIANG Z, WANG Y, ZHANG X, et al. Preventive and therapeutic effects of ginsenoside Rb1 for neural injury during cerebral infarction in rats[J]. *Am J Chin Med*, 2013, 41(2):341-352.

[8] LIU D, ZHANG H, GU W, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rb1 on high glucose-induced neurotoxicity in primary cultured rat hippocampal neurons[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):793-799.

[9] YANG Q Y, KANG L, GU S Y, et al. Pharmacokinetic studies of ginsenoside Rb1 in rats [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2014, 49(3):221-226.

[10] CARRUTHERS A, DEZUTTER J, GANGULY A, et al. Will the original glucose transporter isoform please stand up! [J]. *Am*

J Physiol Endocrinol Metab, 2009, 297(4):836-848.

[11] IDA-YONEMOCHI H, NAKATOMI M, HARADA H, et al. Glucose uptake mediated by glucose transporter 1 is essential for early tooth morphogenesis and size determination of murine molars [J]. *Dev Biol*, 2012, 363(1):52-61.

[12] LIU Y, XUE Q, TANG Q, et al. A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells[J]. *Microvas Res*, 2013, 90:199-205.

[13] QIAN Z Y, HUANG Q, ZHOU L Y, et al. Isolation and long-term cultivation of rat brain microvascular endothelial cells[J]. *Chin J Cell Biol*(中国细胞生物学杂志), 1999, 21:42-45.

[14] USP XXII, NF XVII [S]. United States Pharmacopeial Convention, Inc, 1990:2069.

[15] SUGAWARA I, HAMADA H, TSURUO T, et al. Specialized localization of P-glycoprotein recognized by MRK16 monoclonal antibody in endothelial cells of brain and spinal cord[J]. *Cancer Res*, 1990, 51:727-730.

[16] ICHIKAWA N, NAORA K, HIRANO H, et al. Isolation and primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells for studying drug transport *in vitro*[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1996, 36(1):45-52.

[17] FRANKE H, GALLA H J, BEUCKMANN C T. An improved low-permeability *in vitro*-model of the blood-brain barrier: Transport studies on retinoids, sucrose, haloperidol, caffeine and mannitol[J]. *Brain Res*, 1999, 818(1):65-71.

[18] FRANKE H, GALLA H J, BEUCKMANN C T. Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: A valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier *in vitro* [J]. *Brain Res Protocols*, 2000, 5(3):248-256.

[19] CHEN Y, LIU L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(7):640-665.

[20] ZHANG L, HU G, ZHANG T, et al. Rat brain microvascular endothelial cells isolation and identification [J]. *Anim Husb Vet Med*(畜牧与兽医), 2008, 40(10):70-73.

[21] GYNERT M, ROPPONEN J, LAINE K, et al. Glucose promoiety enables glucose transporter mediated brain uptake of ketoprofen and indomethacin prodrugs in rats [J]. *J Med Chem*, 2009, 52(10):3348-3353.

[22] BATTAGLIA G, LA RUSSA M, BRUNO V, et al. Systemically administered D-glucoseconjugates of 7-chlorokynurenic acid are centrally available and exert anticonvulsant activity in rodents [J]. *Brain Res*, 2000, 860(12):149-156.

[23] BONINA F, PUGLIA C, RIMOLI M G, et al. Glycosyl derivatives of dopamine and L-dopa as anti-Parkinson prodrugs: Synthesis, pharmacological activity and *in vitro* stability studies [J]. *J Drug Target*, 2003, 11(1):25-36.

[24] SALIM K N, MCEWEN B S, CHAO H M. Ginsenoside Rb1 regulates ChAT, NGF and trkA mRNA expression in the rat brain [J]. *Mol Brain Res*, 1997, 47(12):177-182.

[25] CHEN Z Y, LU T T, YUE X Y, et al. Neuroprotective effect of ginsenoside Rb1 on glutamate-induced neurotoxicity: With emphasis on autophagy[J]. *Neurosci Lett*, 2010, 482(3):264-268.

[26] ZHAO Q X, YAN W H, HAN X F, et al. A β_{25-35} and ginsenoside Rb1 influence on the expression of GSK-3 β , CDK-5 and PP2A in differentiated neural stem cells of rats[J]. *Chin J Appl Physiol*(中国应用生理学杂志), 2010, 26(2):187-191.

[27] XIE X, WANG H T, LI C L, et al. Ginsenoside Rb1 protects PC12 cells against beta-amyloid-induced cell injury[J]. *Mol Med Rep*, 2010, 3(4):635-639.

(收稿日期:2014-04-27)

番石榴酸抗 H_2O_2 诱导的 INS-1 胰岛 β 细胞氧化损伤作用及其机制分析

王婧茹^{1,2}, 叶开和¹, 吕艳青¹, 魏崧丞¹, 张晓琦³, 叶文才³, 叶春玲^{1*} (1. 暨南大学药学院药理学教研室, 广州 510632; 2. 瑞典卡罗林斯卡医学院, 瑞典 斯德哥尔摩 17177; 3. 暨南大学中药与天然药物研究所, 广州 510632)

摘要:目的 考察番石榴酸(guavenoic acid, GA)对 INS-1 胰岛 β 细胞氧化损伤的作用。方法 培养 INS-1 胰岛 β 细胞, 给予番石榴酸 0.3、1、3、10、30 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并设空白对照组、溶媒对照组及阳性药组, 药物作用时间均为 48 h。650 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 干预细胞 2 h 建立氧化损伤模型, 用四甲基偶氮唑蓝法检测药物对 INS-1 β 细胞氧化损伤的保护作用, 用核染色法观察细胞核变化, 用流式细胞术检测药物对细胞活性氧生成的作用, 用双染-流式细胞术检测药物对细胞凋亡的保护作用。**结果** 与氧化损伤模型组比较, 低剂量的番石榴酸(0.3、1 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)能显著保护 INS-1 β 细胞活力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 核染色结果显示, 与氧化损伤模型组相比, 低浓度番石榴酸(0.3 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用下, 细胞荧光强度较弱。0.3、1、3 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 番石榴酸均能十分显著地降低二氯荧光黄(DCF)荧光强度($P < 0.01$), 即减少细胞内活性氧的产生。0.3 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 番石榴酸能显著抵抗细胞凋亡的发生($P < 0.05$)。**结论** 番石榴酸能对抗 INS-1 细胞氧化损伤, 可能与其抑制细胞内活性氧的产生、对抗细胞凋亡有关。

关键词: 番石榴酸; INS-1 胰岛 β 细胞; 氧化损伤

doi:10.11669/cpj.2015.03.011 **中图分类号:**R285;R363;R965.2;R979.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-2494(2015)03-0232-06

Effects of Guavenoic Acid on Protection against Oxidative Damage in INS-1 Cells and Its Mechanisms

WANG Jing-ru^{1,2}, YE Kai-he¹, LÜ Yan-qing¹, WEI Song-cheng¹, ZHANG Xiao-qi³, YE Wen-cai³, YE Chun-ling^{1*} (1. Department of Pharmacology, Pharmacy College of Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. The Karolinska Institute in Sweden, Stockholm 17177, Sweden; 3. Research Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To investigate the effects of guavenoic acid (GA) on protection against oxidative damage in INS-1 cells. **METHODS** INS-1 β cells were cultured *in vitro*. Control group, medium group, model group, drug groups and positive group were set. INS-1 cells were treated with GA in 0.3, 1, 3, 10, 30 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 48 h. Using 650 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 challenges the INS-1 cells for 2 h to establish the oxidative damage model (OD), the cell viability was tested by MTT assay, the nuclear was stained by Hoechst 33258, the ROS in OD-INS-1 was tested by ROS-kit and the apoptosis was tested via double staining-fcm. **RESULTS** Compared with model group, at low concentration GA(0.3, 1 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) could protect INS-1 cells exposed to H_2O_2 significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Nuclear staining results showed that compared with the oxidative damage model group, cells treated with 0.3 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA, and emitting weaker cell fluorescence. 0.3, 1, 3 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA could reduce the DCF fluorescence intensity very significantly ($P < 0.01$). At 0.3 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, GA can significantly resist the occurrence of apoptosis ($P < 0.05$). **CONCLUSION** GA could protect INS-1 cells from oxidative damage, maybe achieved by inhibiting intracellular ROS generation and against apoptosis.

KEY WORDS: guavenoic acid; INS-1 β cells; oxidative damage

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种慢性病, 由胰岛素绝对或相对不足引发的以慢性高血糖为主要表现的代谢综合征^[1]。葡萄糖是胰岛素分泌机制的最重要调控因子^[2]。当胰岛 β 细胞长期处于高糖状态下, 细胞线粒体会释放过量的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS), 并通过葡萄糖代谢

通路诱发氧化应激, 进而损伤胰岛 β 细胞。在此过程中, H_2O_2 是关键因子^[3]。研究表明, 胰岛 β 细胞与其他组织细胞相比, 含有的抗 H_2O_2 氧化酶水平较低, 应对自由基产生过多与清除障碍导致的细胞氧化-抗氧化系统失衡的能力较低^[4], 更易受到氧化应激损伤^[5]。因此, 保护氧化应激状态下的胰岛 β 细

基金项目: 广东省高等学校科技创新重点项目(cxzd1111)

作者简介: 王婧茹, 女, 硕士 研究方向: 内分泌药理学 * **通讯作者:** 叶春玲, 女, 教授, 硕士生导师 研究方向: 内分泌药理学

Tel: (020)85223843 E-mail: yechunling2005@163.com

胞活力及功能,减缓糖尿病及其并发症病程的研究得到了重视^[6-7]。

番石榴(*Psidium guajava*)为桃金娘科番石榴属植物。番石榴叶提取物具有抗氧化和清除自由基、降血糖和降血压等多种药理活性^[8]。本课题组首次发现番石榴叶总三萜(total triperpenoids in *Psidium guajava* leaf, TTPGL)是番石榴叶降血糖的有效组分(发明专利号:ZL201110100466.5)。已初步认为TTPGL降血糖的活性部位以乌苏烷型多羟基三萜酸为主要成分,其中乌苏酸(ursolic acid)、2 α -羟基乌苏酸(2 α -hydroxyursolic acid)、积雪草酸(asiatic acid)和番石榴酸(guavenoic acid, GA)四者的总相对含量为50%以上。为进一步研究番石榴叶总三萜的抗糖尿病作用,弄清总三萜中发挥抗糖尿病作用的活性成分及作用机制,本实验将研究GA对H₂O₂诱导的INS-1胰岛 β 细胞氧化损伤的保护作用并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 细胞

INS-1胰岛 β 细胞株(中国医学科学院北京协和细胞资源中心)。

1.2 药品及主要试剂

GA结构式见图1(暨南大学中药与天然药物化学研究所)。RPMI 1640培养液(Lot. 8112347)、0.05%胰酶-EDTA(1 \times)(Lot. 210175K)、胎牛血清(Lot. 1184652)(Gibco公司);D-(+)-葡萄糖、2 β -巯基乙醇、DMSO(Sigma公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT, Lot. M1959, MP公司);槲皮素(暨南大学中药与天然药物化学研究所);Hoechst 32258、活性氧检测试剂盒、Annexin V/PI双染试剂盒(碧云天生物技术研究所)。

1.3 主要仪器

SAFIRZ-Z Microplate Reader (TZCAN公司,

Austria); DC300 DMRA2 荧光显微镜(Leica公司, Germany); FACS AriaTM流式细胞仪(BD公司, USA)。

2 方法

2.1 INS-1胰岛细胞的培养

培养条件为含有10%胎牛血清(FBS)、5.6 mmol \cdot L⁻¹葡萄糖、100 U双抗、50 μ mol \cdot L⁻¹2 β -巯基乙醇的RPMI1640培养液;于37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂环境培养。

2.2 INS-1胰岛细胞氧化损伤模型的建立

取对数生长期的细胞,消化后计数,调整细胞至1 \times 10⁵个 \cdot mL⁻¹,接种于96孔板,每孔100 μ L, 24 h后将细胞培养液吸掉,进行干预,分不同浓度H₂O₂,干预2 h后,弃上清, PBS洗2次后加入120 μ L含MTT的基础培养液(1:5), 37 $^{\circ}$ C孵育4 h, 酶标仪570、630 nm波长下测定吸光度。应用GraphPad Prism 5.0软件计算IC₅₀,选择最优刺激条件。

2.3 氧化损伤INS-1细胞活力的测定

取对数生长期的细胞,调整细胞至1 \times 10⁵个 \cdot mL⁻¹,接种于96孔板,每孔100 μ L,培养24 h。空白对照组、溶媒对照组与氧化损伤模型组给予完全培养液,阳性对照组(100 nmol \cdot L⁻¹槲皮素)、给药组(0.3、1、3、10、30 nmol \cdot L⁻¹GA)给予相应药物作用48 h,弃上清, PBS洗2次后,模型组与给药组加入650 μ mol \cdot L⁻¹ H₂O₂。37 $^{\circ}$ C干预2 h后,弃上清。PBS洗后加入120 μ L含MTT的基础培养液(1:5), 37 $^{\circ}$ C孵育4 h,酶标于570、630 nm波长下测定吸光度。结果以抑制率表示。

2.4 INS-1细胞氧化损伤的染色观察

取对数生长期INS-1胰岛细胞,调整细胞至1 \times 10⁵个 \cdot mL⁻¹,接种于6孔板中的爬片上,每孔1 mL,补充完全培养液,培养24 h,分组与H₂O₂处理同“2.3”项下,其中GA浓度调整为0.3、1、3 nmol \cdot L⁻¹。PBS洗后加入4%多聚甲醛固定液每孔200 μ L, 37 $^{\circ}$ C固定15 min;去固定液, PBS洗2次,每次3 min;加入Hoechst 32258染液约每孔100 μ L,室温下染色5 min,避光;除去染液, PBS洗2次,每次3 min;小心夹起细胞爬片,翻转置于载玻片上,固定爬片后,于荧光显微镜下观察,激发波长352 nm,发射波长为461 nm。防止荧光淬灭,应尽快完成实验。

2.5 INS-1细胞内活性氧的检测

取对数生长期INS-1胰岛细胞,调整细胞至2 \times

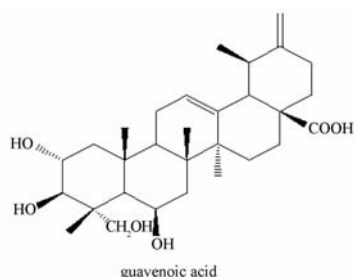


图1 番石榴酸(GA)的化学结构式

Fig. 1 Structural formula of guavenoic acid (GA)

10^5 个 \cdot mL $^{-1}$,接种于24孔板,每孔500 μ L,培养24 h,按分组给予药物,分组同“2.3”项下。作用48 h,弃上清,PBS洗2次后,加入稀释好的DCFH-DA溶液(1:1 000),每孔200 μ L,装载探针。37 $^{\circ}$ C孵育20 min,弃上清,PBS洗3次。模型组与给药组加入650 μ mol \cdot L $^{-1}$ H $_2$ O $_2$ 。37 $^{\circ}$ C干预2 h后,弃上清,PBS洗后消化细胞,细胞重悬后用PBS洗3次,上机测定荧光强度,激发波长488 nm,发射波长525 nm。另备200 μ L不装载探针的细胞。细胞内ROS结果以DCFH-DA相对荧光强度表示:实验组荧光强度/空白对照组荧光强度 \times 100%。

2.6 INS-1 细胞凋亡的检测

取对数生长期INS-1胰岛细胞,调整细胞至 2×10^5 个 \cdot mL $^{-1}$,接种于6孔板,每孔500 μ L。24 h后将培养液弃去,分组与H $_2$ O $_2$ 处理同“2.3”项下,其中GA浓度调整为0.3 nmol \cdot L $^{-1}$ 。消化细胞后,预冷PBS洗3次,依照试剂盒说明,加入含Ca $^{2+}$ 的结合缓冲液与AnnexinV-FITC荧光探针,避光孵育后,加入PI染液,4 $^{\circ}$ C避光孵育5 min;加入结合缓冲液后振荡混匀,尼龙网过滤,上机测定,激发波长488 nm,发射波长 Annexin V 525 nm,PI 630 nm。结果以凋亡百分率表示,为早期凋亡与晚期凋亡百分率之和。

2.7 统计学分析

以上实验均进行重复性实验,结果以“平均值 \pm 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示。应用SPSS17.0统计学软件对实验结果进行统计学分析,两组间比较用t-test, $P < 0.05$ 被认为有显著性差异, $P < 0.01$ 为差异非常显著;应用GraphPad Prism 5.0软件绘图。

3 结果

3.1 H $_2$ O $_2$ 诱导 INS-1 胰岛细胞氧化损伤模型的建立

实验表明,H $_2$ O $_2$ 对INS-1细胞的IC $_{50}$ 随作用时间增加而减小,在作用2 h条件下,600、900、1 000、1 500、2 000、4 800 μ mol \cdot L $^{-1}$ H $_2$ O $_2$ 可引起INS-1细胞活力呈剂量依赖性下降($P < 0.01$),对浓度取对数后绘制IC $_{50}$ 曲线,结果显示,H $_2$ O $_2$ 对INS-1 β 细胞的IC $_{50}$ 为673 μ mol \cdot L $^{-1}$,拟合度为0.98。为此,氧化损伤模型实验中选用650 μ mol \cdot L $^{-1}$ 。结果见图2。

3.2 GA 对 H $_2$ O $_2$ 氧化损伤的 INS-1 细胞活力的影响

MTT实验显示,与溶媒对照组(100 ± 0)%比较,氧化损伤模型组INS-1 β 细胞活力显著下降($P < 0.01$),降低至(53.6 ± 3.2)%。与模型组比较,在较低浓度(0.3、1 nmol \cdot L $^{-1}$)GA显著提高INS-1 β 细胞活力($P < 0.01$),至(66.1 ± 7.8)%、(65.5 ± 4.0)%;但较高浓度时作用并不显著。阳性对照药物槲皮素在100 nmol \cdot L $^{-1}$ 浓度也可提高INS-1 β 细胞活力($P < 0.05$),至(56.4 ± 2.3)%。结果见图3。

3.3 GA 对 INS-1 细胞氧化损伤的影响 (Hochest 33258 染色法)

结果显示,溶媒对照组荧光强度较弱,模型组呈现致密即斑块状浓染。与模型组相比,GA在低浓度0.3 nmol \cdot L $^{-1}$ 时正常细胞数占比较大,荧光较弱;但随药物浓度的增加,其正常细胞数比例减少,荧光强度增强。阳性对照药物槲皮素也表现为抗氧化损伤作用,其正常细胞数占比较模型组高。结果见图4。

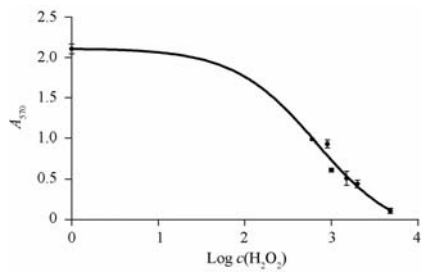


图2 过氧化氢对INS-1胰岛细胞的IC $_{50}$. $n = 6, \bar{x} \pm s$
Fig.2 IC $_{50}$ of H $_2$ O $_2$ on INS-1 cells. $n = 6, \bar{x} \pm s$

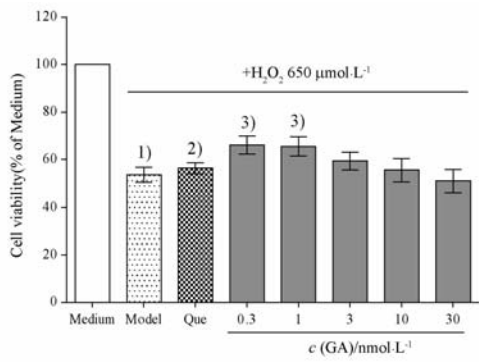


图3 GA对H $_2$ O $_2$ 氧化损伤的INS-1细胞活力的影响. $n = 6, \bar{x} \pm s$
与溶媒组比, $^1)P < 0.01$;与模型组比, $^2)P < 0.05$, $^3)P < 0.01$
Fig.3 Protection of GA on H $_2$ O $_2$ -challenged INS-1 cells. $n = 6, \bar{x} \pm s$
 $^1)P < 0.01$, compared with medium group; $^2)P < 0.05$, $^3)P < 0.01$, compared with model group

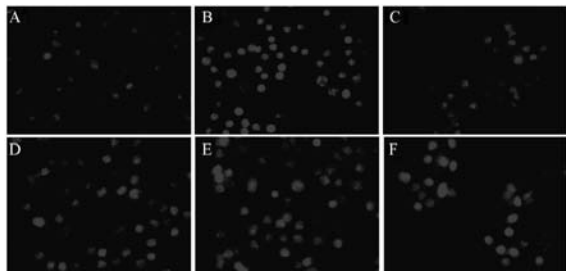


图4 GA对INS-1 H_2O_2 诱导的细胞氧化损伤的影响(Hoechst 33258染色法)($\times 630$)

A-溶媒组;B-模型组($650 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$);C-槲皮素组($650 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Que}$);D-GA低剂量组($650 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 0.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}$);E-GA中剂量组($650 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}$);F-GA高剂量组($650 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}$)

Fig. 4 Protection of GA against apoptosis induced by H_2O_2 in INS-1 cells stained with Hoechst 33258($\times 630$)

A-medium group; B-model group($650 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$); C-Que group($650 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Que}$); D-low-dose group of GA($650 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 0.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}$); E-middle dose group of GA($650 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}$); F-high-dose group of GA($650 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}$)

3.4 GA对氧化损伤INS-1细胞内产生ROS的影响

ROS测定结果显示,与溶媒对照组比较,模型组($650 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 作用2 h)DCF荧光强度极显著地增强($P < 0.01$),增至(271.1 ± 35.8)%,说明其中ROS水平显著增高。与模型组比较,在 H_2O_2 作用之前,预先给予药物作用48 h,0.3、1、3 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的GA均能极显著降低DCF荧光强度($P < 0.01$),至(156.4 ± 33.7)%、(109.5 ± 34.2)%、(116.3 ± 28.7)%;100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 槲皮素降低DCF荧光强度作用极显著($P < 0.01$),降至(125.4 ± 24.5)%。结果见图5。

3.5 GA对 H_2O_2 氧化损伤的INS-1细胞抗凋亡作用

与溶媒对照组(6.62 ± 1.54)%比较,氧化损伤模型组INS-1 β 细胞的凋亡率增加十分显著($P < 0.01$),达到(31.3 ± 6.71)%。与模型组比较,在 $650 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 作用前给予药物干预INS-1 β 细胞48 h后,细胞凋亡率显著减小,0.3 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA能显著抵抗细胞凋亡的发生($P < 0.05$),降至(21.92 ± 0.53)%;阳性对照药物槲皮素在100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 也可降低INS-1 β 细胞凋亡率至(9.64 ± 6.75)%($P < 0.05$, $P < 0.01$),结果见图6,7。

4 讨论

胰岛 β 细胞活力降低和细胞功能障碍加速糖

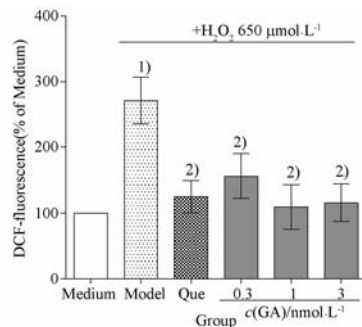


图5 GA对氧化损伤INS-1细胞内产生ROS的影响. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

与溶媒组比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比, ²⁾ $P < 0.01$

Fig. 5 Effects of GA on intracellular ROS generation of H_2O_2 -challenged INS-1 cells. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.01$, compared with medium group; ²⁾ $P < 0.01$, compared with model group

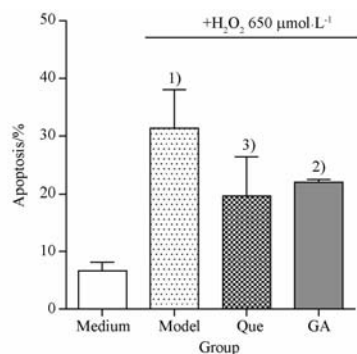


图6 GA对 H_2O_2 氧化损伤的INS-1细胞抗凋亡作用. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

与溶媒组比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$

Fig. 6 Protection of GA against apoptosis in INS-1 cells induced by H_2O_2 assessed by FCM. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.01$, compared with medium group; ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, compared with model group

尿病及其并发症的发生发展^[9]。胰岛 β 细胞内抗氧化酶,如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)等较其他组织细胞含量低^[10]。因此, β 细胞内氧化-抗氧化平衡更易受到破坏,导致 β 细胞功能受损。正常情况下, H_2O_2 能够发挥调节胰岛素分泌的作用,但在高糖环境下, H_2O_2 则通过增加细胞氧化应激导致细胞损伤,导致胰岛 β 细胞功能紊乱^[11-13]。 H_2O_2 诱导氧化应激的机制尚未明确,但研究表明, H_2O_2 能够轻易通过细胞膜,直接作用于细胞线粒体上,诱导氧化应激、细胞凋亡的速度较高糖快,因此被广泛应用于胰岛 β 细胞氧化损伤、细胞凋亡机制等的研究^[14]。

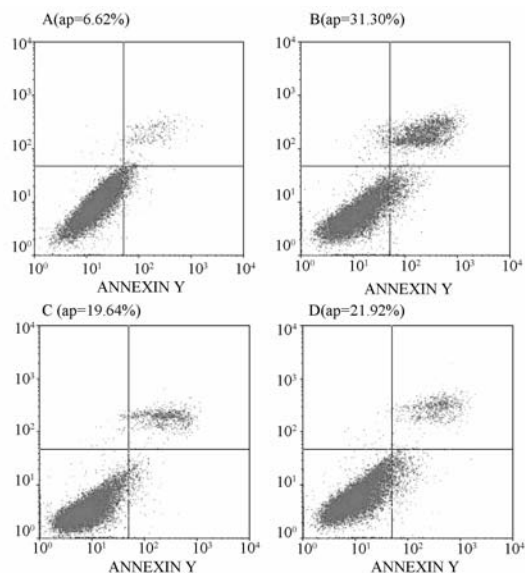


图7 GA对 H_2O_2 氧化损伤的INS-1细胞抗凋亡作用
凋亡率以“ap”表示。A-溶媒组;B-模型组;C-槲皮素阳性对照组;D- $0.3\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA组

Fig. 7 Apoptosis in GA-challenged INS-1 cells exposed to H_2O_2 assessed by FCM

Apoptotic rate(%) is designated as ‘ap’. A – medium group; B – model group; C – positive control group of Que; D – $0.3\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA group

本实验通过条件摸索,测定 H_2O_2 对INS-1胰岛 β 细胞的 IC_{50} 值,建立了INS-1胰岛 β 细胞氧化损伤模型。为进一步验证该模型是否成功,对 $650\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 作用2 h后的INS-1胰岛 β 细胞进行了以下检测:荧光显微镜下观察INS-1细胞核染色形态,探针-流式细胞术测定细胞内ROS含量。结果显示,模型组INS-1细胞核染色后出现致密荧光斑块比例较溶媒对照组大,聚光性强;细胞内ROS水平明显高于溶媒组近2倍。同时,阳性药 $100\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 槲皮素能显著改善INS-1细胞的氧化损伤程度。以上结果说明, $650\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 作用2 h成功建立了INS-1胰岛 β 细胞氧化损伤模型。

本实验通过观察INS-1细胞活力和形态,考察了GA对 H_2O_2 诱导胰岛 β 细胞氧化损伤的保护作用。MTT实验结果表明,GA在较低浓度($0.3\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)下对INS-1胰岛 β 细胞起到保护作用,但在高浓度下作用并不显著,其原因有待进一步探讨。Hoechst 33258是一种可以穿透细胞膜的核染料,对DNA具有特异性,在pH值约7.0环境下能与A-T键结合,发出蓝色荧光。该染料能立即对损伤细胞染色,对正常细胞则进行渐进性染色,在10 min内达到饱和。于荧光显微镜下,可观察到活细胞的细胞核呈

均匀稀疏的蓝色荧光,损伤细胞的细胞核则呈现致密浓染或碎块状浓染,蓝色荧光强度高于正常细胞。本实验发现,GA能够明显减少受损细胞数,其中 $0.3\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的GA作用下,蓝色荧光强度最低,提示其对INS-1细胞有明显抗氧化损伤的保护作用。

线粒体在保护自身与维持细胞内环境稳定的过程中,氧化产生ATP的同时会产生大量的活性氧,是细胞内的ROS主要来源^[15]。ROS会对葡萄糖刺激胰岛素分泌(glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)过程产生影响:①胰岛 β 细胞内葡萄糖的代谢,ROS出现短暂的升高,伴随其他葡萄糖代谢信号增强(例如:ATP/ADP),胰岛素分泌增加,以上变化可增加靶细胞的葡萄糖摄取而降低血糖水平;②氧化应激发生诱导相关酶活力上调,与小分子抗氧化物质的产生,以消除自由基;③这种抗氧化反应也能消除瞬时释放的①葡萄糖代谢过程中产生的ROS,从而削弱GSIS^[16];④当抗氧化物质无法抵抗过度、持续的氧化应激,便导致细胞的损伤与死亡;⑤对于胰岛 β 细胞则会导致其GSIS功能受损^[17]。慢性高血糖暴露,将直接增加细胞内ROS的产生,其导致的氧化应激是糖尿病患者胰岛 β 细胞功能障碍的重要诱因^[18]。研究发现,ROS作为传导信号的生化机制常与 H_2O_2 有关^[19-20],过度和(或)持续的 H_2O_2 生产可以直接或间接地干扰胰岛 β 细胞的完整性和功能^[21]。Martin等^[10]研究证明,可可类黄酮表儿茶素能有效地通过减少ROS的过度生产使细胞抗氧化防御系统、胰岛素分泌能力恢复,从而抵抗由化学诱导的氧化应激、保护胰岛素分泌INS-1E细胞的完整性和功能。

本实验应用活性氧检测试剂盒(Reactive Oxygen Species Assay Kit)检测GA对 H_2O_2 氧化损伤INS-1胰岛 β 细胞内ROS的作用。该试剂盒利用在细胞内活性氧作用下无荧光的DCFH可生成有荧光的DCF的原理,通过检验DCF荧光强度,即可反映细胞内ROS水平。结果提示能降低INS-1细胞内ROS水平。实验结果显示,GA降低DCF荧光强度。研究表明,ROS的产生对细胞早期凋亡有重要的作用^[22]。双染法测定GA对INS-1胰岛 β 细胞凋亡的作用结果显示,该三萜化合物能够减轻氧化损伤的INS-1胰岛 β 细胞的凋亡程度,具体机制有待进一步的研究。

总之,GA能显著消除INS-1细胞内ROS。结合细胞活力、核染色结果,推测其可能通过抑制细胞内ROS的生成、降低细胞凋亡,从而保护胰岛 β 细胞。

REFERENCES

- [1] GARDNER D G, SHOBACK D M. *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*[M]. 9th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2011.
- [2] GEMBAL M, GILON P, HENQUIN J C. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells[J]. *J Clin Investigat*, 1992, 89(4):1288-1295.
- [3] PI J, BAI Y, ZHANG Q, *et al*. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion[J]. *Diabetes*, 2007, 56(7):1783-1791.
- [4] SINGH U, DEVARAG S, JIALAL I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation[J]. *Annu Rev Nut*, 2005, 25:151-174.
- [5] PEREIRA E C, FERDERBAR S, BERTOLAMI M C, *et al*. Biomarkers of oxidative stress and endothelial dysfunction in glucose intolerance and diabetes mellitus[J]. *Clin Biochem*, 2008, 41(18):1454-1460.
- [6] YOKOZAWA T, KIM Y, KIM H Y, *et al*. Protective effect of persimmon peel polyphenol against high glucose-induced oxidative stress in LLC-PK(1) cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(10):1979-1987.
- [7] LEE S H, HAN J S, HEO S J, *et al*. Protective effects of dieckol isolated from *Ecklonia cava* against high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Toxicol in Vitro*, 2010, 24(2):375-381.
- [8] GUTIERREZ R M, MITCHELL S, SOLIS R V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(1):1-27.
- [9] MARTIN M A, FERNANDEZ-MILLAN E, RAMOS S, *et al*. Cocoa flavonoid epicatechin protects pancreatic beta cell viability and function against oxidative stress[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(3):447-456.
- [10] BRASNYO P, MOLNAR G A, MOHAS M, *et al*. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients[J]. *Br J Nutr*, 2011, 106(3):383-389.
- [11] ROBERTSON R P, HARMON J, TRAN P O, *et al*. Glucose toxicity in β -cells: Type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection[J]. *Diabetes*, 2003, 52(3):581-587.
- [12] ROBERTSON R P, HARMON J S. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet β cell[J]. *Free Rad Biol Med*, 2006, 41(2):177-184.
- [13] CUMAOGU A, RACKOVA L, STEFEK M, *et al*. Effects of olive leaf polyphenols against H₂O₂ toxicity in insulin secreting β -cells[J]. *Acta Biochim Pol*, 2011, 58(1):45-50.
- [14] CHENG Q, DONG W, QIAN L, *et al*. Visfatin inhibits apoptosis of pancreatic β -cell line, MIN6, via the mitogen-activated protein kinase/phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. *J Mol Endocrinol*, 2011, 47(1):13-21.
- [15] LACRAZ G, FIGEAC F, MOVASSAT J, *et al*. Diabetic GK/Par rat β -cells are spontaneously protected against H₂O₂-triggered apoptosis. A cAMP-dependent adaptive response[J]. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*, 2010, 298(1):17-27.
- [16] RAALTE D H, KWA K A A, GENUGTEN R E, *et al*. Islet-cell dysfunction induced by glucocorticoid treatment: Potential role for altered sympathovagal balance[J]. *Metabolism*, 2013, 62(4):568-577.
- [17] WANG Y, LI Y, YIN J, *et al*. Autophagy regulates inflammation following oxidative injury in diabetes[J]. *Autophagy*, 2013, 9(3):272-277.
- [18] TAKAHASHI H, TRAN P O T, LEROY E, *et al*. D-Glyceraldehyde causes production of intracellular peroxide in pancreatic islets, oxidative stress, and defective beta cell function via non-mitochondrial pathways[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(36):37316-37323.
- [19] BONEKAMP N A, VOLKL A, FAHIMI H D, *et al*. Reactive oxygen species and peroxisomes: Struggling for balance[J]. *Biofactors*, 2009, 35(4):346-355.
- [20] SCHRADER M, FAHIMI H D. Peroxisomes and oxidative stress[J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Cell Res*, 2006, 1763(12):1755-1766.
- [21] DEL GUEEEA S, LUPI R, MARSELLI L, *et al*. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2005, 54(3):727-735.
- [22] LEE S H. Bioactive compounds extracted from ecklonia cava by using enzymatic hydrolysis protects high glucose-induced damage in INS-1 pancreatic beta-cells[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 167(7):1973-1985.

(收稿日期:2014-05-06)