

# 金丝桃苷靶向途径调节胰岛 $\beta$ 细胞氧化应激 在2型糖尿病中的作用机制研究

刘亮亮<sup>1</sup>, 艾隐粹<sup>2</sup>, 刘适<sup>3</sup>, 吕莹<sup>4</sup>, 贾媛媛<sup>5</sup>, 蔺菲<sup>5\*</sup>

(1. 齐齐哈尔医学院附属第三医院药剂科, 齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔市甘南县人民医院护理部, 齐齐哈尔 162006;  
3. 齐齐哈尔医学院附属第三医院中心实验室, 齐齐哈尔 161006; 4. 齐齐哈尔医学院基础医学学科中心, 齐齐哈尔 161006;  
5. 齐齐哈尔医学院附属第三医院内分泌科, 齐齐哈尔 161006)

**摘要: 目的** 探究金丝桃苷靶向 Nrf2/HO-1 通路在2型糖尿病中调控胰岛  $\beta$  细胞功能和潜在的分子机制。**方法** 通过过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 诱导大鼠胰岛  $\beta$  细胞系 RIN-m5F 氧化损伤, 采用 0、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  金丝桃苷和 ML385 (Nrf2 抑制剂) 处理胰岛  $\beta$  细胞。分别使用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 评估 Nrf2、HO-1, 蛋白质印迹检测 cleaved-Caspase3 及 Caspase3, 使用葡萄糖刺激胰岛素分泌实验、3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑蓝, 四甲基偶氮唑盐 (MTT)、流式细胞仪、氧化应激试剂盒对大鼠胰岛  $\beta$  细胞系 RIN-m5F 进行胰岛素、细胞活力、凋亡、氧化应激检测。**结果** 一定浓度的金丝桃苷对 RIN-m5F 胰岛  $\beta$  细胞无细胞毒性作用, 增加了细胞存活率。金丝桃苷剂量依赖性地降低了细胞凋亡率、活性氧 (ROS)、丙二醛 (MDA) 水平, 增加了过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 和胰岛素水平。随着金丝桃苷剂量依赖性增加, cleaved-Caspase3 水平显著减少, cleaved-Caspase3/Caspase3 比值显著下降, Nrf2 和 HO-1 表达水平显著增加, 加入 Nrf2 抑制剂 ML385 后整体表达水平下降, 趋势与之前相同。金丝桃苷可激活抗氧化响应元件 (ARE) 及热休克蛋白 (HSP90 $\alpha$ ) 水平, 提示金丝桃苷可启动一系列抗氧化基因的转录, 调节抗氧化反应。**结论** 金丝桃苷通过激活 Nrf2/HO-1/ARE 通路在2型糖尿病胰岛  $\beta$  细胞中起到保护作用, 改善了胰岛  $\beta$  细胞功能。

**关键词:** 金丝桃苷; Nrf2/HO-1/ARE; 2型糖尿病; 胰岛  $\beta$  细胞

## The mechanism of hypericin targeting pathway regulating oxidative stress of pancreatic $\beta$ cells in Type 2 diabetes

LIU Liang-Liang<sup>1</sup>, AI Yin-Cui<sup>2</sup>, LIU Shi<sup>3</sup>, LYU Ying<sup>4</sup>, JIA Yuan-Yuan<sup>5</sup>, LIN Fei<sup>5\*</sup>

(1. Pharmacy Department of the Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China; 2. Nursing Department of Gannan County People's Hospital, Qiqihar 162006, China; 3. Central Laboratory of the Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China; 4. Qiqihar Medical College Basic Medical Research Center, Qiqihar 161006, China; 5. Endocrinology Department of the Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China)

**ABSTRACT: Objective** To explore the regulatory effect of hypericin targeting Nrf2/HO-1 pathway on pancreatic beta cell function in Type 2 diabetes and its potential molecular mechanism. **Methods** Induced oxidative damage in rat pancreatic beta cell line RIN-m5F by hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), pancreatic beta cells were treated with 0, 25, 50, and 100  $\mu\text{M}$  hyperoside and ML385 (Nrf2 inhibitor). Real time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was used to evaluate Nrf2 and HO-1, protein imprinting was used to detect cleaved-Caspase3 and Caspase3, and glucose stimulated insulin secretion assay, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazole)-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazole blue, tetrazolium tetrazolium salt (MTT), flow cytometry, and oxidative stress assay kit were used to detect insulin, cell viability, apoptosis, and oxidative stress in rat pancreatic beta cell line RIN-m5F. **Results** A certain concentration of hyperoside had no cytotoxic effect on

基金项目: 齐齐哈尔市科技局联合引导项目 (项目编号: LSF GG-2024006)

Fund: Qiqihar Science and Technology Bureau (Number: LSF GG-2024006)

\* 通信作者: 蔺菲, 硕士, 主管护师, 研究方向为糖尿病发病机制的研究及糖尿病患者的健康管理。E-mail: lf30030572@163.com

\* Corresponding author: LIN Fei, Master, Charge Nurse, Pharmacy Department of the Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China. E-mail: lf30030572@163.com

RIN-m5F pancreatic beta cells and increased cell survival rate. Hypericin dose dependently reduced apoptosis rate, reactive oxygen species (ROS), and malondialdehyde (MDA) levels, while increasing catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), and insulin levels. With the dose-dependent increase of hyperoside, the level of cleaved-Caspase3 significantly decreased, the ratio of cleaved-Caspase3/Caspase3 significantly decreased, and the expression levels of Nrf2 and HO-1 significantly increased. After the addition of Nrf2 inhibitor ML385, the overall expression level decreased, with the same trend as before. Hypericin can activate the levels of antioxidant response elements (ARE) and heat shock protein (HSP90  $\alpha$ ), indicating that it can initiate the transcription of a series of antioxidant genes and regulate antioxidant responses. **Conclusion** Hypericin plays a protective role in Type 2 diabetes islet beta cells by activating Nrf2/HO-1/ARE pathway, and improves the function of islet beta cells.

**KEY WORDS:** hypericin; Nrf2/HO-1/ARE; Type 2 diabetes; pancreatic  $\beta$  cells

## 0 引言

2型糖尿病(T2DM)是最常见的人类内分泌和代谢紊乱之一。其特征是外周胰岛素抵抗和由胰岛 $\beta$ 细胞功能障碍引起的胰岛素分泌不足<sup>[1-2]</sup>。随着人们生活方式的改变及老龄化人口的增多, T2DM已经成为一个严重的公共卫生问题。

氧化应激被认为是胰岛 $\beta$ 细胞损伤的关键机制之一, 而核因子 $\gamma$ 2 (Nrf2) 及其下游基因血红素加氧酶1 (HO-1) 在维持细胞内氧化还原平衡方面发挥着重要作用。已有研究表明, Nrf2/HO-1通路的激活可以减轻氧化应激对胰岛 $\beta$ 细胞造成的损害<sup>[3]</sup>。

天然植物化合物近年来因其潜在的治疗效果受到广泛关注<sup>[4]</sup>。金丝桃苷(Hyperoside)作为一种天然存在的黄酮类化合物, 已被证实具有多种生物活性, 包括抗炎、抗氧化等<sup>[5]</sup>。然而, 关于金丝桃苷是否能够通过靶向Nrf2/HO-1通路来保护胰岛 $\beta$ 细胞功能进而缓解T2DM的研究相对较少。

鉴于此, 本研究旨在探讨金丝桃苷对T2DM模型中胰岛 $\beta$ 细胞功能的影响及其潜在机制, 以期为开发新的治疗策略提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

大鼠胰岛 $\beta$ 细胞系RIN-m5F购自中舟新乔。细胞接种于1%青霉素/链霉素和10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中, 在37°C及5%CO<sub>2</sub>的环境下培养。当细胞达到70%的融合度时加入100  $\mu$ mol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理。部分细胞培养基中加入5  $\mu$ mol/L ML385 (Nrf2抑制剂)处理。在各培养基中分别加入0、25、50、100  $\mu$ mol/L金丝桃苷。

### 1.2 胰岛素分泌实验

RIN-m5F细胞以每孔 $2 \times 10^5$ 个细胞的密度接种在48孔板中, 并允许其过夜贴壁。用Krebs-Ringer碳酸氢盐缓冲液(KRB; 115 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 24 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 25 mmol/L HEPES, 1 g/L BSA; pH 7.4)洗涤三次, 并在37°C下预孵育1小时。接着, 细胞在含有4 mmol/L或20 mmol/L葡萄糖的1 mL KRB中孵育1小时。1小时后, 从每个孔中取出上清液并离心(2000 r/min, 4°C, 5 min)。然后使用大鼠胰岛素ELISA试剂盒(E-EL-R2466, Elabscience)测定胰岛素浓度。

### 1.3 MTT检测

细胞活力通过MTT比色法测定。细胞以 $2 \times 10^4$ 个细胞密度接种在96孔板中培养。加入100  $\mu$ L的MTT溶液(1 mg/mL), 并在37°C下孵育4小时, 使用100  $\mu$ L二甲基亚砜(DMSO)溶解存活细胞中的甲瓩晶体, 使用微板读数仪在540纳米波长下测定各孔的吸光度。

### 1.4 细胞凋亡检测

使用Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(C1062M, beyotime)

进行评估。通过离心收集细胞, 将细胞沉淀用染色缓冲液洗涤, 并重悬于结合缓冲液中。细胞在黑暗中与APC Annexin V和7-AAD孵育15分钟。洗涤样品以去除多余的染料, 并使用流式细胞仪分析以确定凋亡的百分比。

### 1.5 氧化应激检测

细胞用PBS清洗, 然后在37°C避光条件下与DCFH-DA以最终浓度10  $\mu$ M孵育30分钟。使用流式细胞仪(FACSCALLBUR, 美国BD公司)测定样品的荧光强度。

根据氧化应激测试试剂盒的说明书, 测定丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、CAT和GSH-PX活力, 以评估胰岛 $\beta$ 细胞中的氧化应激程度。

### 1.6 蛋白质印迹检测

RIPA裂解液提取的蛋白质通过10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。负载有蛋白质的聚偏二氟乙烯的膜与5%脱脂牛奶共同孵育2小时。使用相应一抗及二抗进行孵育。最后使用电化学发光检测系统进行曝光检测。

### 1.7 RT-qPCR

使用Trizol试剂提取总RNA。配制20  $\mu$ L的逆转录反应体系, 处理获得cDNA。在CFX Connect Real-Time系统(qTOWER2.2, 德国Analytik Jean公司)中进行RT-qPCR分析, 检测Nrf2和HO-1水平。目标基因相对表达采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行分析。 $\beta$ -actin作为内参基因。

$\beta$ -actin: 正向引物: 5'-AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC-3'; 反向引物: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Nrf2: 正向引物: 5'-CTCTCTGGAGACGCCATGACT-3'; 反向引物: 5'-CTGGGCTGGGACAGTGGTAGT-3'

HO-1: 正向引物: 5'-CAGGCAGAGAATGCTGAGTTC-3'; 反向引物: 5'-GATGTTGAGCAGGAACGCAGT-3'

HSP90 $\alpha$ : 正向引物: 5'-TCTGGAAGATCCCCAGACAC-3'; 反向引物: 5'-AGTCATCCCTCAGCCAGAGA-3'

ARE: 正向引物: 5'-TCTGGAAGATCCCCAGACAC-3'; 反向引物: 5'-AGTCATCCCTCAGCCAGAGA-3'

### 1.8 数据统计

结果均以平均值 $\pm$ 标准差表示。统计分析使用SPSS软件(版本29.0, SPSS, 美国)。数据通过两因素重复测量方差分析进行分析。Tukey检验用于事后分析以定位差异。不同组别的数据通过单因素方差分析进行分析,  $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义(根据Tukey检验)。

## 2 结果与分析

### 2.1 金丝桃苷对RIN-m5F无细胞毒性作用

在经过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后的大鼠RIN-m5F胰岛 $\beta$ 细胞培养基中分别添加0、25、50、100  $\mu$ mol/L金丝桃苷, 通过MTT比色法检测细胞存活率。结果显示随着金丝桃苷的剂量增加, 细胞存活率显著上升(图1)。表明一定浓度的金丝桃苷对RIN-m5F没

有细胞毒性作用, 能够增加细胞的存活率。

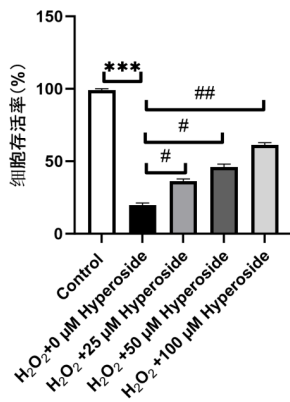


图 1 金丝桃苷对 RIN-m5F 无细胞毒性作用

Fig.1 hyperoside has no cytotoxic effect on RIN-m5F.

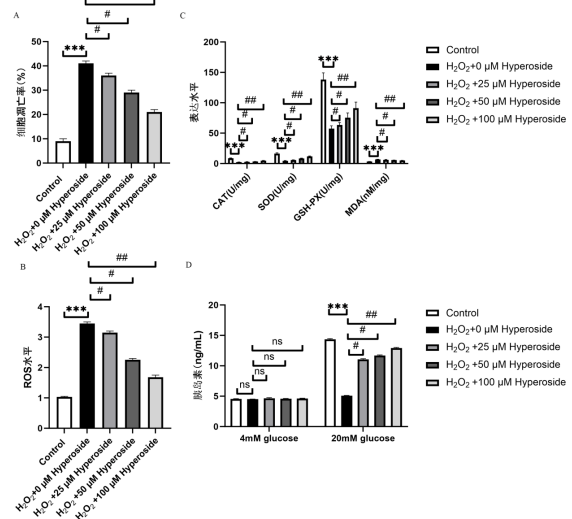
### 2.2 金丝桃苷对胰岛 $\beta$ 细胞氧化损伤和功能障碍有保护作用

鉴于金丝桃苷对 RIN-m5F 无细胞毒性作用, 实验研究了金丝桃苷对其氧化损伤和功能障碍的影响。结果显示, 金丝桃苷剂量依赖性降低了细胞凋亡率、ROS、MDA 水平 (图 2A-C), 增加了 CAT、SOD、GSH-PX 和 20 mmol/L 葡萄糖刺激下的胰岛素水平 (图 2C-D)。以上表明, 金丝桃苷能够剂量依赖性地减轻胰岛  $\beta$  细胞的氧化损伤和凋亡, 改善其分泌胰岛素的功能。

### 2.3 金丝桃苷对胰岛 $\beta$ 细胞氧化损伤保护作用的机制

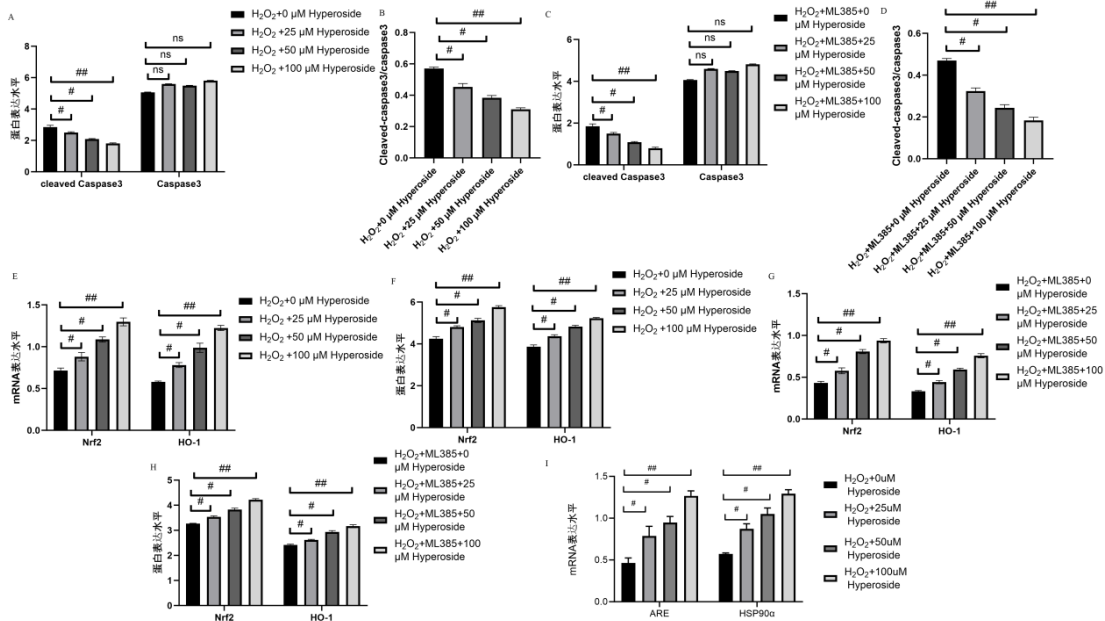
金丝桃苷对胰岛  $\beta$  细胞氧化损伤有一定的保护作用, 而 Nrf2/HO-1 信号通路是抗氧化应激的经典通路, 猜测金丝桃苷可能通过调节 Nrf2/HO-1 通路对胰岛  $\beta$  细胞氧化损伤进行调控。通过蛋白质印迹检测凋亡蛋白的表达水平, 结果显示, 随着金丝桃苷剂量依赖性增加, cleaved-Caspase3 水平显著减少, cleaved-Caspase3/Caspase3 比值显著下降 (图 3A-B), 加入 Nrf2

抑制剂 ML385 后虽然整体表达水平下降, 但趋势与之前相同 (图 3C-D)。此外, 通过 RT-qPCR 和 ELISA 检测 Nrf2 和 HO-1 表达水平, 随着金丝桃苷剂量依赖性增加, Nrf2 和 HO-1 表达水平也显著增加 (图 3E-F), 加入 ML385 后整体表达水平下降, 但趋势与之前相同 (图 3G-H)。



注: (A-B)通过流式细胞仪检测细胞凋亡率和 ROS 水平; (C)通过氧化应激试剂盒检测 CAT、SOD、GSH-PX 和 MDA 水平; (D)在 4 mmol/L 和 20 mmol/L 葡萄糖刺激下检测胰岛素水平。\*\*\*—— $P < 0.001$  vs. 对照组; #—— $P < 0.05$ ; ##—— $P < 0.01$  vs.  $H_2O_2$  组

图 2 金丝桃苷对胰岛  $\beta$  细胞氧化损伤和功能障碍有保护作用  
Fig.2 Hypericin has a protective effect on  $H_2O_2$  induced oxidative damage and functional impairment of pancreatic beta cells



注: (A)蛋白质印迹检测 cleaved-Caspase3 和 Caspase3 表达水平; (B)cleaved-Caspase3/Caspase3 比值; (C)蛋白质印迹检测加入 ML385 后裂解 Caspase3 和 Caspase3 表达水平; (D)加入 ML385 后 cleaved-Caspase3/Caspase3 比值; (E)RT-qPCR 检测 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达水平; (F)ELISA 检测 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平; (G)RT-qPCR 检测加入 ML385 后 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达水平; (H)通过 ELISA 检测加入 ML385 后 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平 (I)RT-qPCR 检测加入金丝桃苷后 ARE 和 HSP90 $\alpha$ mRNA 表达水平。ns——无显著差异; #—— $P < 0.05$ ; ##—— $P < 0.01$  vs.  $H_2O_2$  组

图 3 金丝桃苷通过 Nrf2/HO-1/ARE 通路发挥胰岛  $\beta$  细胞氧化损伤的保护作用

Fig.3 Hypericin exerts protective effects against oxidative damage in pancreatic beta cells through the Nrf2/HO-1 pathway

为进一步揭示金丝桃苷通过 Nrf2/HO-1 的细胞生物学机制,在此基础上 RT-qPCR 检测抗氧化应急元件 ARE 水平,结果如图 3I 所示,金丝桃苷的加入可激活 ARE 水平,并且热休克蛋白 HSP90 $\alpha$  水平也显著上调,提示金丝桃苷可启动一系列抗氧化基因的转录,调节抗氧化反应。这些结果表明,金丝桃苷能够通过 Nrf2/HO-1/ARE 通路发挥作用,抑制 Nrf2/HO-1/ARE 通路会对表达水平造成抑制,表明金丝桃苷直接作用于 Nrf2/HO-1/ARE 通路对胰岛  $\beta$  细胞氧化损伤起保护作用。

### 3 讨论与结论

糖尿病是一种慢性疾病,对国家的医疗保健系统构成了巨大挑战<sup>[6]</sup>。氧化应激是糖毒性和脂毒性的结果,在胰岛素抵抗和  $\beta$  细胞损伤的发展中起着重要作用<sup>[7]</sup>。金丝桃苷已被证明具有抗炎、抗氧化、调血脂等作用,广泛用于靶向肝脏及心脏等疾病的氧化应激<sup>[8]</sup>。然而,金丝桃苷对 2 型糖尿病胰岛  $\beta$  细胞功能的作用研究较少。此外,基于 Nrf2/HO-1/ARE 信号通路对氧化还原的敏感性,在维持氧化还原中具有重要作用。因此,本研究旨在探讨金丝桃苷是否通过调控 Nrf2/HO-1/ARE 通路发挥其对 2 型糖尿病胰岛  $\beta$  细胞的保护作用。

研究可知金丝桃苷在一定浓度范围内对 RIN-m5F 细胞没有明显的细胞毒性作用,并且能够提高细胞存活率。这一发现为金丝桃苷作为潜在的胰岛  $\beta$  细胞保护剂提供了初步证据。随着金丝桃苷剂量依赖性增加,细胞存活率显著上升。这表明金丝桃苷在一定浓度范围内对 RIN-m5F 细胞具有保护作用。

金丝桃苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的胰岛  $\beta$  细胞氧化损伤和功能障碍具有保护作用。金丝桃苷能够剂量依赖性地降低细胞凋亡率、ROS 水平和 MDA 含量,同时增加 CAT、SOD、GSH-PX 的活性。樊惠杰等人<sup>[9]</sup>报道了金丝桃苷在神经细胞中的保护作用,表明其在多种细胞类型中均具有抗氧化特性。本研究进一步验证了金丝桃苷在胰岛  $\beta$  细胞中的抗氧化作用,并表明其能够改善胰岛素分泌功能。金丝桃苷通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路发挥其保护作用。金丝桃苷剂量依赖性地增加了 Nrf2、HO-1 及 ARE 和 HSP90 $\alpha$  水平,提示金丝桃苷可启动一系列抗氧化基因的转录,调节抗氧化反应。金丝桃苷通过直接激活 Nrf2/HO-1 信号通路,从而减轻胰岛  $\beta$  细胞的氧化损伤和凋亡。这一发现与黄达民等人<sup>[10]</sup>的研究结果一致,他们报道了金丝桃苷通过激活 Nrf2 信号通路减轻心肌组织氧化损伤的作用。

尽管研究揭示了金丝桃苷对胰岛  $\beta$  细胞在氧化应激条件下的保护作用及其潜在机制,但也存在一些局限性。本研究仅在体外细胞模型中进行了实验,缺乏体内动物模型的验证。金丝桃苷在体内是否同样有效尚需进一步研究。其次,虽然金丝桃苷通过 Nrf2/HO-1 信号通路发挥了保护作用,但其具体的分子机制仍需更深入的研究,以明确其作用靶点和信号传导途径。

本研究中使用的细胞系 RIN-m5F 虽然广泛应用于胰岛  $\beta$  细胞研究,但仍不能完全代表体内胰岛  $\beta$  细胞的真实情况,未来的研究还需要在原代细胞或更接近生理状态的模型中进一步验证。

本研究揭示了金丝桃苷通过激活 Nrf2/HO-1/ARE 通路在 2 型糖尿病中调控胰岛  $\beta$  细胞功能的保护机制。金丝桃苷能够通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路,减轻氧化应激,提高细胞存活率,并改善胰岛素分泌功能。这些发现为进一步开发金丝桃苷作为治疗糖尿病的潜在药物提供了重要的科学依据。

### 参考文献

- [1] 陈可,张效科.中药黄连治疗 2 型糖尿病的药理机制研究进展[J/OL].辽宁中医药大学学报,1-12.[2024-08-19].<http://cnki2.699wx.cn/kcms/detail/21.1543.r.20240816.1740.040.html> [2024-12-07].
- [2] 朱珊珊,付永祥,卢昭,等.2 型糖尿病及其并发症 DNA 甲基化研究进展[J].检验医学与临床,2024,21(16):2449-2453,2458.
- [3] 朱瑾,王苑铭,安小平,等.基于 Nrf2/HO-1 信号通路研究黄连化浊胶囊对糖尿病大鼠胰岛  $\beta$  细胞及 MCP1、IRE1 $\alpha$  表达的影响[J].中药材,2023,46(05):1285-1289.
- [4] 赵继荣,杨文通,胡继宏,等.天然化合物黄酮抗炎作用信号通路机制研究进展[J].中华中医药学刊,2023,41(07):10-14.
- [5] 邱会斌,姜金利,李鹏强,等.金丝桃苷对大鼠颅脑损伤后炎症反应及血脑屏障通透性的影响[J].中国临床神经外科杂志,2024,29(01):28-34.
- [6] 罗泽鹏,沈绍晨,黄红卫.2 型糖尿病风险评估的研究进展[J].健康体检与管理,2024,5(03):244-249,291.
- [7] 谢婷婷,王丽梅,凌铭培.达格列净联合二甲双胍与甘精胰岛素对老年 2 型糖尿病患者糖脂代谢胰岛素抵抗和氧化应激的影响[J].基层医学论坛,2024,28(26):23-26,87.
- [8] 杜睿凯,朱浩.金丝桃苷调节 TLR4/Myd88/NF- $\kappa$ B 信号通路对冠心病大鼠内皮细胞焦亡的影响[J].中国老年学杂志,2024,44(15):3718-3723.
- [9] 樊惠杰,柴智,周然.金丝桃苷对神经系统保护作用的研究进展[J].中华中医药杂志,2018,33(10):4560-4562.
- [10] 黄达民,张金春,宋蕾,等.金丝桃苷对急性心肌梗死小鼠心功能及 Nrf2/HO-1 信号通路的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2023,21(05):828-831.

### 作者简介

刘亮亮,药师,研究方向为药物合理使用与评价、药学监护与用药指导。

藜菲,硕士,主管护师,研究方向为糖尿病发病机制的研究及糖尿病患者的健康管理。