

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research柚皮素对糖尿病相关肠道炎症的作用及
机制研究Research on the effects and mechanism of naringenin on diabetes – related
intestinal inflammation齐海鑫¹, 陈 植¹, 董云飞¹,
方征宇¹, 林国强¹, 周桂群²

(1. 浙江中医药大学 附属第一医院/浙江省中医院 肛肠外科, 浙江 杭州 310003; 2. 浙江中医药大学 附属第三医院 消化内科, 浙江 杭州 310005)

QI Hai – xin¹, CHEN Zhi¹,
DONG Yun – fei¹, FANG Zheng – yu¹,
LIN Guo – qiang¹, ZHOU Gui – qun²

(1. Department of Anorectal Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medicine University/Zhejiang Provincial Hospital of Chinese Medicine, Hangzhou 310003, Zhejiang Province, China; 2. Department of Gastroenterology, The Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310005, Zhejiang Province, China)

基金项目:浙江省中医药科技计划基金资助项目(202571317)

作者简介:齐海鑫(1984 –),男,主治医师,主要从事肛周及肠道炎症性疾病的诊断与治疗方面的工作和研究

通信作者:齐海鑫

MP:18858121236

E – mail:18858121236@163.com

摘要:目的 分析柚皮素改善糖尿病相关肠道炎症的潜在作用机制。方法 在细胞实验中,将 STC – 1 细胞随机分为空白组、晚期糖基化终末产物(AGEs)组、低剂量实验组(AGEs + 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的柚皮素)和高剂量实验组(AGEs + 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的柚皮素)。在动物实验中,将 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为空白对照组、模型组(构建糖尿病相关肠道损伤模型)、低剂量实验组(建模 + 25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的柚皮素)、高剂量实验组(建模 + 75 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的柚皮素)和二甲双胍组(建模 + 0.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的二甲双胍)。用 Hoechst 33342/检测碘化丙啶(PI)双染法检测 STC – 1 细胞坏死性凋亡,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测糖脂代谢指标和促炎因子水平,用蛋白质印迹法检测磷酸化混合谱系激酶结构域样(p – MLKL)蛋白和闭锁蛋白(Occludin)蛋白表达情况。**结果** 在细胞实验中,空白组、AGEs 组、低剂量实验组和高剂量实验组的 PI 阳性率分别为(4.36 $\pm$ 0.30)%、(19.37 $\pm$ 1.58)%、(15.90 $\pm$ 1.03)%和(12.85 $\pm$ 1.51)%;IL – 6 水平分别为(17.74 $\pm$ 2.23)、(71.46 $\pm$ 6.54)、(42.39 $\pm$ 5.34)和(33.63 $\pm$ 1.82) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;p – MLKL 蛋白相对表达水平分别为 0.39 $\pm$ 0.05、0.83 $\pm$ 0.10、0.74 $\pm$ 0.07 和 0.58 $\pm$ 0.04,上述指标在 AGEs 组与空白组比较,低、高剂量实验组与 AGEs 组比较,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。在动物实验中,干预后,空白对照组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组和二甲双胍组的 FBG 分别为(4.89 $\pm$ 0.54)、(26.88 $\pm$ 1.96)、(18.47 $\pm$ 1.53)、(14.96 $\pm$ 1.67)和(13.91 $\pm$ 1.16) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;TG 水平分别为(0.43 $\pm$ 0.06)、(1.70 $\pm$ 0.15)、(1.46 $\pm$ 0.14)、(1.13 $\pm$ 0.10)和(0.81 $\pm$ 0.09) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;IL – 6 水平分别为(13.59 $\pm$ 1.06)、(62.02 $\pm$ 5.92)、(50.19 $\pm$ 4.44)、(37.78 $\pm$ 3.58)和(48.91 $\pm$ 8.46) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;p – MLKL 蛋白相对表达水平分别为 0.38 $\pm$ 0.05、1.07 $\pm$ 0.13、0.79 $\pm$ 0.08、0.61 $\pm$ 0.05 和 0.80 $\pm$ 0.09;Occludin 蛋白相对表达水平分别为 0.97 $\pm$ 0.07、0.35 $\pm$ 0.04、0.61 $\pm$ 0.05、0.83 $\pm$ 0.07 和 0.43 $\pm$ 0.06,上述指标在模型组与空白对照组比较,柚皮素低、高剂量实验组及二甲双胍组与模型组比较,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 柚皮素可以改善肠内分泌细胞功能对糖尿病相关肠损伤发挥保护作用,可能与 MLKL 介导的坏死性凋亡机制有关。

关键词:柚皮素;糖尿病相关肠损伤;肠内分泌细胞;炎症反应;混合谱系激酶结构域样相关信号

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.01.015

中图分类号:R28 **文献标志码:**A

文章编号:1001-6821(2026)01-0093-07

Abstract: Objective To analyze the potential mechanism of naringenin in improving diabetes – related intestinal inflammation. **Methods** In cell experiment, STC – 1 cells were randomized into blank group, advanced glycation end products (AGEs) group, experimental – L group

(AGEs + 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ naringenin) and experimental - H group (AGEs + 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ naringenin). In animal experiment, male C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group (to construct diabetes - related intestinal injury model), experimental - L group (modeling + 25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ naringenin), experimental - H group (modeling + 75 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ naringenin) and metformin group (modeling + 0.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ metformin). STC - 1 cell necroptosis was detected using the Hoechst 33342/propidium iodide (PI) double staining method. Glycolipid metabolism indicators and pro - inflammatory factor levels were measured by enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of phosphorylated mixed lineage kinase domain - like (p - MLKL) protein and Occludin protein was assessed by Western blotting. **Results** In cell experiment, PI - positive rates of blank, AGEs, experimental - L and experimental - H groups were (4.36 $\pm$ 0.30)%, (19.37 $\pm$ 1.58)%, (15.90 $\pm$ 1.03)% and (12.85 $\pm$ 1.51), respectively; IL - 6 levels were (17.74 $\pm$ 2.23), (71.46 $\pm$ 6.54), (42.39 $\pm$ 5.34) and (33.63 $\pm$ 1.82) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; p - MLKL relative expression levels were 0.39 $\pm$ 0.05, 0.83 $\pm$ 0.10, 0.74 $\pm$ 0.07 and 0.58 $\pm$ 0.04, respectively. All indicators showed significant differences between AGEs group and blank group, experimental - L group or experimental - H group and AGEs group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In animal experiment, post - intervention FBG levels of blank control group, model group, experimental - L group, experimental - H group and metformin group were (4.89 $\pm$ 0.54), (26.88 $\pm$ 1.96), (18.47 $\pm$ 1.53), (14.96 $\pm$ 1.67) and (13.91 $\pm$ 1.16) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; TG levels were (0.43 $\pm$ 0.06), (1.70 $\pm$ 0.15), (1.46 $\pm$ 0.14), (1.13 $\pm$ 0.10) and (0.81 $\pm$ 0.09) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; IL - 6 levels were (13.59 $\pm$ 1.06), (62.02 $\pm$ 5.92), (50.19 $\pm$ 4.44), (37.78 $\pm$ 3.58) and (48.91 $\pm$ 8.46) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the relative expression levels of p - MLKL were 0.38 $\pm$ 0.05, 1.07 $\pm$ 0.13, 0.79 $\pm$ 0.08, 0.61 $\pm$ 0.05 and 0.80 $\pm$ 0.09, respectively; the relative expression levels of Occludin were 0.97 $\pm$ 0.07, 0.35 $\pm$ 0.04, 0.61 $\pm$ 0.05, 0.83 $\pm$ 0.07 and 0.43 $\pm$ 0.06, respectively. Significant differences were observed between model group and blank control group, experimental - L group or experimental - H group or metformin groups and model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Naringenin can improve the function of intestinal endocrine cells and protect against diabetes - related intestinal injury, which may be related to the mechanism of necrotic apoptosis mediated by MLKL.

Key words: naringenin; diabetes - related intestinal injury; intestinal endocrine cell; inflammatory response; mixed lineage kinase domain - like correlation signal

Ⅱ型糖尿病是由多种风险因素引起的,例如年龄、肥胖或不健康的生活方式等,高脂或高糖饮食会导致低度炎症和肠道微生物群组成改变,从而促进代谢内毒素血症和肠上皮损伤^[1]。在糖尿病患者中,肠道炎症炎性标志物的上调可以破坏肠道内环境,导致肠屏障功能障碍^[2],有动物实验证实,增强肠道屏障可以延缓小鼠糖尿病的发病^[3],表明抑制肠道炎症恢复肠黏膜屏障生物学功能可能是应对Ⅱ型糖尿病的一种创新干预策略。近年来,中医药基于炎症反应治疗糖尿病并发症中的优势已被证实^[4],柚皮素是一种具有强抗炎活性的黄酮类化合物,已证实可以调节体内多种炎症生物标志物差异表达^[5],并进一步改善糖尿病^[6],柚皮素对糖尿病相关肠道炎症的改善作用及其潜在机制尚不清晰,本文旨在通过体内外实验分析柚皮素改善糖尿病肠道损伤的潜在机制,以期寻找治疗糖尿病并发症提供思路。

材料与方法

1 材料

细胞 小肠内分泌细胞系 STC - 1,购自美国 ATCC 公司。

动物 60只6周龄的 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠,体质量为 18 ~ 22 g,购自浙江大学,动物生产许可证号为 SCXK(浙)2023 - 0005,小鼠均饲养在屏障环境动物房中,(温度为 22 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$,湿度为 50% ~ 60%,每 12 h 明暗交替),自由饮食和进水,适应性饲养 1 周后进行实验,本研究经浙江中医药大学附属第一医院(浙江省中医院)伦理委员会批准(伦理批号:20240257)。

药品与试剂 柚皮素,规格:每瓶 25 mg,纯度:99.0%,批号:20241218,四川成都普思生物科技有限公司生产;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ),规格:每

支 100 mg, 纯度: 98.5%, 批号: 241109, 上海源叶生物科技有限公司生产; 盐酸二甲双胍片, 规格: 0.25 g, 批号: 20241127, 批准文号: 国药准字 H12020587, 天津津药达仁堂集团股份有限公司新新制药厂生产; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL)-6、IL-1 β 、高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1 protein1, HMGB-1) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒, 均由上海梵楚生物科技有限公司生产; 胰高血糖素样肽 (glucagon-like peptide, GLP-1), 上海莪试生物技术有限公司生产; 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色液, 江西南昌雨露实验器材有限公司生产; BCA 蛋白定量试剂盒, 上海爱必信生物科技有限公司生产; 磷酸化-混合谱系激酶结构域样 (phosphorylation-mixed lineage kinase domain-like, p-MLKL)、MLKL、闭锁蛋白 (Occludin)、紧密连接蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1)、磷酸化-受体相互作用蛋白 3 (phosphorylation-receptor interaction protein 3, p-RIP3)、RIP3、 β -肌动蛋白 (β -actin) 一抗及二抗、糖基化终产物 (glycation end products, AGEs) 和 BSA, 均由美国 Abcam 公司生产; 杜氏改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified eagle media, DMEM) 培养基, 广东环凯微生物科技有限公司生产; Hoechst 33342/碘化丙啉 (proidium iodide, PI) 双染试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司生产。

SpectraMax i3x 酶标仪, 奥地利 Molecular Devices 公司产品; Catalyst One[®] 全自动生化分析仪, 美国 IDEXX 公司产品; DYCZ-MINI4 垂直电泳, 北京六一生物公司产品; NIB400 生物显微镜, 浙江 Nexcope 公司产品; DM2000 荧光显微镜, 德国 Leica 公司产品。

2 研究方法

2.1 细胞实验

2.1.1 STC-1 细胞培养、分组与处理方法^[7]

将 STC-1 细胞培养在 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清和 1% 双抗) 中, 并置于培养箱 (5% CO₂, 温度: 37 °C, 湿度: 75%) 中培养, 隔天更换 1 次培养液。并将 STC-1 细胞随机分为空白组、AGEs 组、低剂量实验组和高剂量实验组, 其中空白组细胞进行常规培养, AGEs 组用 200 ng · mL⁻¹ AGEs 刺激细胞 48 h, 低剂量实验组、高剂量实验组细胞分别用 25 和 50 μ g · mL⁻¹ 柚皮素与 200 ng · mL⁻¹ AGEs 共同处理细胞 48 h。

2.2.2 Hoechst 33342/PI 双染法检测 STC-1 细胞坏死性凋亡^[8]

收集处理后每组的 STC-1 细胞, 弃去原来培养

基, 用 PBS 清洗细胞后加入 Hoechst 33342 染色液, 避光孵育 10 min 后清洗, 然后加入 PI 染色液 10 min, PBS 清洗后用荧光显微镜观察并拍照记录。

2.1.3 蛋白质印记法检查 STC-1 细胞坏死情况^[8]

处理后的每组细胞, 加入 RIPA 裂解液充分裂解后离心收集上清液, 并检测蛋白总浓度, 取 25 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 转至 PVDF 膜 (室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h), 然后与 MLKL (1:1 000)、p-RIP3 (1:1 000)、RIP3 (1:2 000) 一抗孵育过夜 (4 °C), 次日清晨出去一抗清洗后与二抗 (1:5 000) 孵育 2 h (37 °C), 显色后曝光成像, 并使用 Image J 软件分析灰度值。

2.1.4 ELISA 实验法检测 STC-1 细胞炎症因子表达^[9]

收集每组细胞, 离心 (3 500 r · min⁻¹, 10 min) 收集上清, 之后按照试剂盒中的操作步骤检测结肠组织或细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、HMGB-1 和 GLP-1。

2.2 动物实验

2.2.1 动物模型制备

小鼠适应性饲养 1 周后根据参考文献^[9]给予高脂饲料 (67.5% 基础饲料、16.0% 猪油、10.0% 蔗糖、2.5% 胆固醇、1.0% 胆酸钠) 喂养, 连续喂养 8 周, 之后腹腔注射 100 mg · kg⁻¹ STZ (用柠檬酸缓冲液溶解, 稀释浓度为 10 mg · mL⁻¹), 隔 1 天注射 1 次, 共注射 3 次, 并检测小鼠空腹血糖 ≥ 16.7 mmol · L⁻¹, 即糖尿病小鼠模型建模成功。用于建模的小鼠均建模成功。

2.2.2 动物分组与处理方法

将小鼠随机分为空白对照组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组和二甲双胍组, 每组 12 只小鼠, 空白对照组小鼠腹腔注射给予 0.1 mol · L⁻¹ 柠檬酸缓冲液并给予普通饲料喂养, 余组按照“2.2.1”中方法建模, 建模后低、高剂量实验组小鼠分别每天灌胃给予 25 和 75 mg · kg⁻¹ 柚皮素 (二甲基亚砷进行溶解, 配制成 50 mg · mL⁻¹ 的储备液, 用生理盐水稀释至 2.5 和 7.5 mg · mL⁻¹), 二甲双胍组小鼠每天灌胃 0.5 g · kg⁻¹ 二甲双胍 (生理盐水溶解, 并稀释至稀释至 50 mg · mL⁻¹), 空白对照组和模型组小鼠均灌胃等量的生理盐水, 连续灌胃 8 周。8 周后禁食 12 h 后尾静脉采血检测空腹血糖 (fasting blood-glucose, FBG), 并麻醉小鼠后, 心脏采血收集血液样本, 并死后收集肠组织标本备用。

2.2.3 生化分析仪检测生化指标

小鼠干预前及干预后禁食 12 h 时, 尾静脉采血,

检测 FBG;处理结束后取每组小鼠血液样本,在 4 ℃ 下离心($3\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 10 min)收集上层血清,用生化分析仪检测血清中糖化血清蛋白(glycated serum protein,GSP)、甘油三酯(triglyceride,TG)、总胆固醇(total cholesterol,TC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterin,LDL-C)水平。

2.2.4 ELISA 实验法检测结肠组织炎症因子表达^[9]

取每组小鼠结肠组织并清洗干净,剪碎、充分研磨并超声破碎,离心($1.2\times 10^4\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 10 min)取上清,后续参考“2.1.4”中方法进行。

2.2.5 HE 染色法检测小鼠肠组织病理学改变^[9]

取肠组织放入固定液处理 24 h,之后用乙醇(不同浓度)梯度脱水和二甲苯透明,石蜡包埋后切片($4\text{ }\mu\text{m}$),将载玻片上的切片进行脱蜡水化后用苏木精染色 5 min,自来水冲洗干净,盐酸乙醇分化数秒后返蓝,伊红试剂染色 3 min,再经乙醇脱水、二甲苯透明后封片(中性树胶),并用显微镜观察。

2.2.6 蛋白质印迹法检测肠组织相关蛋白表达^[8]

参照“2.1.3”的步骤进行,Occludin(1:500)、ZO-1(1:1 000)、 β -actin(1:500)一抗孵育过夜(4 ℃),次日清晨除去一抗清洗后与二抗(1:5 000)孵育 2 h(37 ℃),显色后曝光成像,并用 Image J 软件分析灰度值。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。若计量资料同时满足正态分布(Shapiro-Wilk 检验)和方差齐性(Levene's 检验),组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-t 检验;若未同时满足上述条件,则用 Kruskal-Wallis (K-W) 检验。组内比较用配对 t 检验。

结 果

1 柚皮素减轻 AGEs 诱导的 STC-1 细胞坏死

与空白组比较,AGEs 组细胞 PI 阳性率及

p-RIP3、p-MLKL 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P<0.001$);与 AGEs 组比较,低、高剂量实验组细胞 PI 阳性率及 p-RIP3、p-MLKL 蛋白相对表达水平均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$);与低剂量实验组比较,高剂量实验组细胞 PI 阳性率及 p-RIP3、p-MLKL 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P<0.001$),见图 1 和表 1。

2 柚皮素抑制 AGEs 诱导的 STC-1 细胞促炎因子分泌

与空白组比较,AGEs 组细胞的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 HMGB-1 水平均显著升高(均 $P<0.001$),GLP-1 水平显著降低($P<0.001$);与 AGEs 组比较,低、高剂量实验组细胞的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 HMGB-1 水平均显著降低($P<0.01$, $P<0.001$),GLP-1 水平显著升高($P<0.001$);相比低剂量实验组,高剂量实验组细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 HMGB-1 水平均显著降低($P<0.01$, $P<0.001$),GLP-1 水平显著升高($P<0.01$),见表 2。

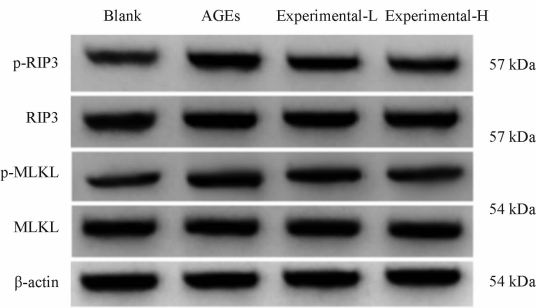


图 1 蛋白质印迹法检测每组细胞(RIP3-MLKL)信号蛋白相对表达水平

Figure 1 Relative expression levels of the (RIP3-MLKL) signaling protein in each group of cells detected by Western blot
Blank group: Routine culture; AGEs group: AGEs stimulated the cells for 48 hours; Experimental-L group: Cells were co-treated with naringenin ($25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and AGEs ($200\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); Experimental-H group: Cells were co-treated with naringenin ($50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and AGEs ($200\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); p-:Phosphorylation-.

表 1 每组细胞碘化丙啶(PI)阳性率及相关蛋白表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of the positive rate of propidium iodide (PI) and the relative expression levels of related proteins in each group of cells($\bar{x}\pm s$)

Group	n	PI positive rate(%)	p-RIP3	RIP3	p-MLKL	MLKL
Blank	10	4.36±0.30	0.37±0.04	1.06±0.12	0.39±0.05	0.87±0.08
AGEs	10	19.37±1.58***	0.74±0.051***	1.00±0.10	0.83±0.10***	0.92±0.11
Experimental-L	10	15.90±1.03###	0.63±0.08##	1.05±0.07	0.74±0.07#	0.85±0.09
Experimental-H	10	12.85±1.51###ΔΔΔ	0.50±0.04###ΔΔΔ	1.01±0.10	0.58±0.04###ΔΔΔ	0.91±0.09

Compared with the blank group,*** $P<0.001$;Compared with the AGEs group,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$;Compared with the low dose group,ΔΔΔ $P<0.001$.

3 柚皮素改善模型小鼠糖脂代谢指标

与空白对照组比较,干预前后,模型组小鼠 FBG 及血清 GSP、TG、TC 和 LDL - C 水平均显著升高(均 $P < 0.001$);与模型组比较,柚皮素低、高剂量实验组 和二甲双胍组血清 FBG、GSP、TG、TC 和 LDL - C 水平均显著降低($P < 0.01$, $P < 0.001$);与柚皮素低剂量 实验组比较,柚皮素高剂量实验组血清 FBG、GSP、 TG、TC 和 LDL - C 水平均显著降低($P < 0.01$, $P < 0.001$),见表 3。

4 柚皮素减轻模型小鼠肠组织炎症损伤

空白对照组小鼠结肠组织结构完整,细胞形 态正常,未见明显变性;模型组小鼠结肠组织黏

膜层结构受损,可见炎性细胞浸润;相比模型组, 柚皮素低、高剂量实验组及二甲双胍组结肠组织 损伤均有不同程度的改善,炎性细胞浸润明显减 少,其中柚皮素高剂量实验组改善程度最高,见 图 2。

与空白对照组比较,模型组小鼠肠组织炎性因子 (TNF - α 、IL - 1β 、IL - 6) 水平均显著升高(均 $P < 0.001$);与模型组比较,柚皮素低、高剂量实验组 和二甲双胍组肠组织炎性因子水平均显著降低(均 $P < 0.001$);与柚皮素低剂量实验组比较,柚皮素高剂 量实验组肠组织炎性因子水平均显著降低(均 $P < 0.001$),见表 4。

表 2 各组细胞促炎因子表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the expression levels of pro-inflammatory factors in each group of cells($\bar{x} \pm s$)

Group	n	TNF - α (pg $\cdot$ mL ⁻¹)	IL - 1β (pg $\cdot$ mL ⁻¹)	IL - 6 (pg $\cdot$ mL ⁻¹)	HMGB - 1 (ng $\cdot$ mL ⁻¹)	GLP - 1 (ng $\cdot$ mL ⁻¹)
Blank	10	63.52 $\pm$ 5.02	28.93 $\pm$ 4.20	17.74 $\pm$ 2.23	7.46 $\pm$ 0.72	5.31 $\pm$ 0.46
AGEs	10	188.25 $\pm$ 15.07 ***	98.11 $\pm$ 11.43 ***	71.46 $\pm$ 6.54 ***	43.89 $\pm$ 2.541 ***	3.26 $\pm$ 0.17 ***
Experimental - L	10	162.80 $\pm$ 15.59 ##	81.33 $\pm$ 8.21 ##	42.39 $\pm$ 5.34 ###	30.94 $\pm$ 4.19 ###	3.88 $\pm$ 0.32 ###
Experimental - H	10	140.94 $\pm$ 12.27 ### $\Delta\Delta$	52.94 $\pm$ 5.31 ### $\Delta\Delta\Delta$	33.63 $\pm$ 1.82 ### $\Delta\Delta\Delta$	19.21 $\pm$ 2.22 ### $\Delta\Delta\Delta$	4.45 $\pm$ 0.32 ### $\Delta\Delta\Delta$

Dose and n refer to figure 1; TNF - α : Tumor necrosis factor - α ; IL: Interleukin; HMGB - 1: High mobility group box - 1 protein1; GLP - 1: Glucagon - like peptide 1; Compared with the blank group, *** $P < 0.001$; Compared with the AGEs group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with the experimental - L group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

表 3 每组小鼠空腹血糖 (FBG) 及血清糖脂代谢指标的比较 (mmol $\cdot$ L⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of fasting blood glucose (FBG) and serum glycolipid metabolism indicators of each group of mice (mmol $\cdot$ L⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

Group	n	FBG		GSP	TG	TC	LDL - C
		Before intervention	After intervention				
Control	12	4.53 $\pm$ 0.32	4.89 $\pm$ 0.54	1.51 $\pm$ 0.15	0.43 $\pm$ 0.06	1.13 $\pm$ 0.10	0.26 $\pm$ 0.05
Model	12	17.29 $\pm$ 0.91 ***	26.88 $\pm$ 1.96 ***	2.31 $\pm$ 0.18 ***	1.70 $\pm$ 0.15 ***	2.86 $\pm$ 0.181 ***	1.06 $\pm$ 0.091 ***
Experimental - L	12	17.66 $\pm$ 0.83	18.47 $\pm$ 1.53 ###	2.06 $\pm$ 0.14 ##	1.46 $\pm$ 0.14 ##	2.56 $\pm$ 0.21 ##	0.78 $\pm$ 0.09 ###
Experimental - H	12	17.76 $\pm$ 0.70	14.96 $\pm$ 1.67 ### $\Delta\Delta\Delta$	1.85 $\pm$ 0.12 ### $\Delta\Delta$	1.13 $\pm$ 0.10 ### $\Delta\Delta\Delta$	2.13 $\pm$ 0.24 ### $\Delta\Delta\Delta$	0.50 $\pm$ 0.05 ### $\Delta\Delta\Delta$
Metformin	12	17.41 $\pm$ 0.49	13.91 $\pm$ 1.16 ###	1.65 $\pm$ 0.13 ###	0.81 $\pm$ 0.09 ###	1.53 $\pm$ 0.12 ###	0.40 $\pm$ 0.05 ###

FBG: Fasting blood glucose; GSP: Glycated serum protein; TG: Triglyceride; TC: Total cholesterol; LDL - C: Low density lipoprotein cholesterol; Control group: Conventional breeding; Model group: Establish a diabetes model; Experimental - L group: After modeling, 25 mg $\cdot$ kg⁻¹ of naringenin was administered; Experimental - H group: After modeling, 75 mg $\cdot$ kg⁻¹ of naringenin was administered; Metformin group: After modeling, 0.5 g $\cdot$ kg⁻¹ of metformin was administered; Compared with the control group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with the experimental - L group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

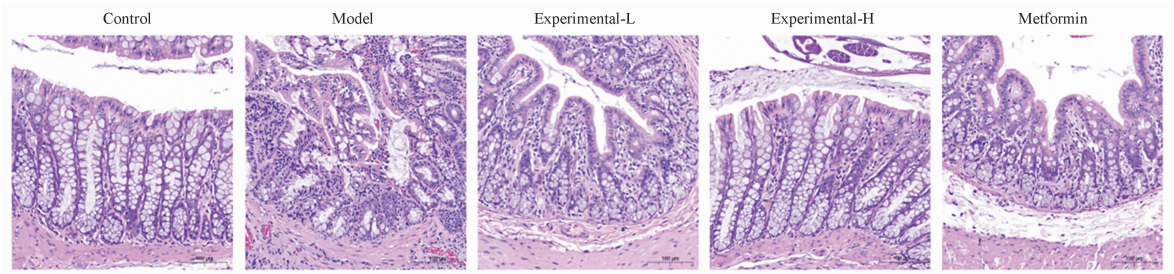


图 2 苏木精 - 伊红 (HE) 染色法观察每组小鼠肠组织病理学改变 ($\times 400$)

Figure 2 Observation of the histopathological changes of intestinal tissues in each group of mice by hematoxylin - eosin (HE) staining ($\times 400$)

5 柚皮素抑制模型小鼠肠组织 p-MLKL 蛋白表达并改善肠黏膜屏障功能

与空白对照组比较,模型组小鼠肠组织 p-MLKL 蛋白相对表达水平显著升高($P < 0.001$),Occludin 和 ZO-1 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.001$);与模型组比较,柚皮素低、高剂量实验组和二甲双胍组肠组织 p-MLKL 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.001$),Occludin 和 ZO-1 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.01$);与柚皮素低剂量实验组比较,柚皮素高剂量实验组肠组织 p-MLKL 蛋白相对表达水平显著降低($P < 0.001$),Occludin 和 ZO-1 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$),见表 5 和图 3。

表 4 各组小鼠肠组织炎症相关因子指标的比较($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}, \bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of the indicators of intestinal tissue inflammation-related factors in each group of mice($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}, \bar{x} \pm s$)

Group	TNF- α	IL-1 β	IL-6
Control	51.25 $\pm$ 5.48	26.96 $\pm$ 1.94	13.59 $\pm$ 1.06
Model	169.53 $\pm$ 21.10***	109.49 $\pm$ 9.97***	62.02 $\pm$ 5.92***
Experimental-L	135.05 $\pm$ 12.79###	81.35 $\pm$ 4.94###	50.19 $\pm$ 4.44###
Experimental-H	106.12 $\pm$ 9.23#### $\Delta\Delta$	64.34 $\pm$ 6.29#### $\Delta\Delta$	37.78 $\pm$ 3.58#### $\Delta\Delta$
Metformin	122.17 $\pm$ 10.85###	73.69 $\pm$ 6.13###	48.91 $\pm$ 8.46###

Dose and n refer to table 3; TNF- α : Tumor necrosis factor - α ; IL: Interleukin; Compared with the control group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$; Compared with the experimental-L group, $\Delta\Delta P < 0.001$.

表 5 每组小鼠肠组织屏障功能相关蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of the relative expression levels of barrier function-related proteins in intestinal tissues of each group of mice($\bar{x} \pm s$)

Group	p-MLKL	MLKL	Occludin	ZO-1
Control	0.38 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.15	0.97 $\pm$ 0.07	0.73 $\pm$ 0.09
Model	1.07 $\pm$ 0.13***	0.99 $\pm$ 0.11	0.35 $\pm$ 0.04***	0.22 $\pm$ 0.031***
Experimental-L	0.79 $\pm$ 0.08###	0.97 $\pm$ 0.15	0.61 $\pm$ 0.05###	0.34 $\pm$ 0.07###
Experimental-H	0.61 $\pm$ 0.05#### $\Delta\Delta$	0.91 $\pm$ 0.13	0.83 $\pm$ 0.07#### $\Delta\Delta$	0.55 $\pm$ 0.05#### $\Delta\Delta$
Metformin	0.80 $\pm$ 0.09###	1.01 $\pm$ 0.11	0.43 $\pm$ 0.06##	0.29 $\pm$ 0.06##

Dose and n refer to table 3; p-MLKL: Phosphorylation-mixed lineage kinase domain-like; ZO-1: Zonula occludens-1; Compared with the control group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$; Compared with the experimental-L group, $\Delta\Delta P < 0.001$.

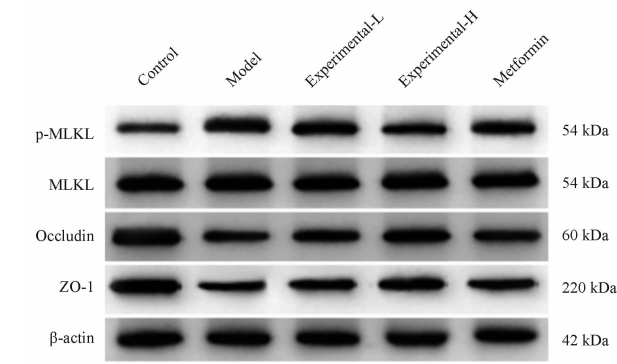


图 3 蛋白质印迹法检测肠组织屏障功能相关蛋白表达

Figure 3 Relative expression levels of barrier function-related proteins detected by Western blot experiment

讨 论

柚皮素是一种普遍存在于西红柿和柑橘类水果中的二氢黄酮类化合物,其具有广泛的生物学功能,抗氧化、抗炎、调节脂质代谢等,柚皮素具有较好的改善肠道功能障碍的作用,有研究表明,柚皮素可以通过抑制炎性小体减轻新生小鼠肠道损伤^[10]。实验证实了柚皮素在糖尿病中的降糖作用^[11],这些证据表明,柚皮素具有改善糖尿病相关肠道炎性损伤的巨大潜力,本文中采用高脂喂养合并 STZ 成功构建了糖尿病小鼠模型,并通过 HE 染色法观察到糖尿病模型小鼠肠道发生病理性损伤,表明糖尿病相关肠道损伤模

型小鼠构建成功。使用柚皮素进行干预后发现,模型小鼠 FBG 及血清糖脂代谢相关指标 GSP、TG、TC 和 LDL-C 水平均显著降低,提示柚皮素可以改善模型小鼠脂质代谢并降低血糖,与文献结果一致^[11]。在本试验中,柚皮素干预后,小鼠肠组织病理性损伤得到明显改善,ELISA 显示,模型小鼠肠组织促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 分泌被柚皮素抑制;同时柚皮素治疗后肠组织中 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达均显著上调,Occludin 和 ZO-1 是构成肠上皮细胞单层紧密连接的重要蛋白质,紧密连接的破坏是肠上皮完整性缺陷的决定性因素,与肠上皮屏障的破坏有关^[12]。本研究提示,柚皮素可以改善糖尿病诱导的肠道炎性和恢复其肠屏障功能。

长期的高血糖通过 AGEs 的积累导致全身潜在的破坏性生化和生理后果,AGEs 的积累作为糖尿病发病的重要机制,可以导致细胞功能障碍甚至死亡,最终导致糖尿病多发组织细胞损伤,当分布于肠上皮的肠内分泌细胞持续暴露于高浓度 AGEs 时,肠促胰岛素的分泌功能受损^[13-14],肠促胰岛素(如 GLP-1)可以刺激胰岛素分泌,提高胰岛素敏感性,这对维持葡萄糖稳态至关重要,GLP-1 分泌减少与糖尿病的发病机制有关^[15]。本文使用 AGEs 诱导肠内分泌细胞 STC-1 构建体外糖尿病肠损伤模型,荧光标记实验观察到,AGEs 刺激后,STC-1 细胞坏死性凋亡率显著升高,GLP-1 分泌减少,AGEs 诱导 STC-1 细胞死亡及 GLP-1 分泌减少的作用被柚皮素所逆转,提示柚皮素可以通过抑制肠内分泌细胞死亡保护糖尿病诱导的肠损伤。

受体相互作用蛋白激酶是程序性死亡通路的关键分子,在维持健康的肠屏障中起重要作用,RIP3 介导的磷酸化可以激活细胞质 MLKL,p-MLKL 作为执行因子最终诱导坏死性凋亡并通过释放细胞损伤分子模式引起多种炎症性疾病,导致继发性组织损伤^[16-17];本研究观察到,AGEs 激活 STC-1 细胞中 p-RIP3 和 p-MLKL 表达,p-MLKL 的激活伴随着促炎介质的释放及细胞损伤相关分子模式标志物 HMGB-1 表达,而柚皮素干预后,高剂量实验组 p-MLKL 水平较模型组降低约 43%,且这一抑制效应同步伴随肠屏障功能的修复与炎症因子的下调,提示柚皮素对 MLKL 通路的调控是其改善糖尿病肠道炎症的关键靶点之一。传统观点认为,MLKL 的激活仅依赖 RIP3 的磷酸化,但本研究发现,柚皮素并非直接抑制 RIP3 的表达,而是可以通过下调 MLKL 的磷酸化水平阻断其向细胞膜转位,从而抑制其介导的上皮细胞坏死性凋亡。进一步结合肠道微环境特征,这一调控还能打破菌群紊乱-AGEs 累积-MLKL 激活的正反馈:既保护肠上皮,又减少受损上皮细胞释放损伤相关分子模式释放,实现了靶向坏死性凋亡、重塑屏障微环境的双向作用,为糖尿病肠道炎症治疗提供了新策略。

本研究提示:柚皮素处理可以减轻 STC-1 细胞的坏死炎症,改善 GLP-1 分泌功能,进而维持葡萄糖稳态,在糖尿病相关肠损伤中发挥保护作用。

参考文献:

- [1] TOMASICS G, SCHANDL L, POLYAK A, et al. A diabetes mellitus-associated microbiome [Diabetes mellitus and the intestinal microbiome] [J]. *Orv Hetil*, 2023, 164 (25): 981—987.
- [2] FRUHBEEK G, GOMEZ - AMBROSI J, RAMIREZ B, et al. Decreased expression of the NLRP6 inflammasome is associated with increased intestinal permeability and inflammation in obesity with type 2 diabetes [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81 (1): 77.
- [3] SUN Y, WANG Y, LIN Z, et al. Irisin delays the onset of type 1 diabetes in NOD mice by enhancing intestinal barrier [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 265 (1): 130857.
- [4] 张璐璐, 王晓月, 徐云生. 中医药基于炎症机制治疗糖尿病肾病研究进展 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2025, 23 (4): 153—155.
- [5] LING Z, WANG Z, CHEN L, et al. Naringenin alleviates radiation - induced intestinal injury by inhibiting TRPV6 in mice [J/OL]. *Mol Nutr Food Res*, 2024, 68 (8): e2300745. 2024 - 04 - 06 [2025 - 08 - 04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38581304/>.
- [6] VALLE - VELAZQUEZ E, ZAMBRANO - VASQUEZ O R, CORTES - CAMACHO F, et al. Naringenin - a potential nephroprotective agent for diabetic kidney disease: A comprehensive review of scientific evidence [J]. *Biomol Biomed*, 2024, 24 (6): 1441—1451.
- [7] 陈方鹏. 低能量甜味剂对 STC-1 细胞甜味通路的机制研究 [D]. 江苏 扬州: 扬州大学, 2022.
- [8] 周素平, 吴智勇, 杨德忠, 等. 基于 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路探讨青蒿琥酯对高糖诱导心肌细胞坏死性凋亡的影响 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2024, 16 (12): 1491—1495.
- [9] 赵伟, 李润琪, 徐冰蕊, 等. 基于 NLRP3 炎症小体探讨降糖 3 号方缓解糖尿病小鼠炎症反应的分子机制 [J]. *北京中医药大学学报*, 2024, 47 (11): 1541—1549.
- [10] 田洪民, 王淑屏, 王鸿雁, 等. 柚皮素调控 NLRP3 炎症小体对坏死性小肠结肠炎新生小鼠肠道的保护作用研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37 (10): 1196—1200.
- [11] 李泽林. 柚皮素对 II 型糖尿病骨代谢的影响 [D]. 山西 太原: 山西医科大学, 2023.
- [12] SCHLEGEL N, BOERNER K, WASCHKE J. Targeting desmosomal adhesion and signalling for intestinal barrier stabilization in inflammatory bowel diseases - lessons from experimental models and patients [J/OL]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2021, 231 (1): e13492. 2020 - 05 - 22 [2025 - 08 - 04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32419327/>.
- [13] WU X Q, ZHANG D D, WANG Y N, et al. AGE/RAGE in diabetic kidney disease and ageing kidney [J/OL]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 171: 260—271. 2021 - 05 - 18 [2025 - 08 - 04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34019934/>.
- [14] LI L, YAO Y, CAO L, et al. RAGE - mediated intestinal pro - inflammatory responses triggered by giardia duodenalis [J/OL]. *Acta Trop*, 2025, 262: 107529. 2025 - 01 - 21 [2025 - 08 - 04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39848554/>.
- [15] DRUCKER D J. Efficacy and safety of GLP-1 medicines for type 2 diabetes and obesity [J]. *Diabetes Care*, 2024, 47 (11): 1873—1888.
- [16] HE X Y, WANG F, SUO X G, et al. Compound - 42 alleviates acute kidney injury by targeting RIPK3 - mediated necroptosis [J]. *Br J Pharmacol*, 2023, 180 (20): 2641—2660.
- [17] WU X, ZHAO X, LI F, et al. MLKL - mediated endothelial necroptosis drives vascular damage and mortality in systemic inflammatory response syndrome [J]. *Cell Mol Immunol*, 2024, 21 (11): 1309—1321.

(本文编辑: 崔兰卿 收稿日期 2025 - 09 - 22)