DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.08.024

生地黄中梓醇和地黄苷A通过激活胰岛β细胞自噬抑制凋亡发挥抗2型糖尿病作用

胡楠[1],孟祥龙[1,2,3,4],李鸿昌[2],张朔生[1,2,3,4]

[1. 山西中医药大学中药与食品工程学院,山西 晋中 030619;2. 山西中医药大学中药炮制山西省重点实验室,山西 晋中 030619;3. 山西中医药大学中药材加工炮制传承与创新重点研究室,山西 晋中 030619;4. 中药炮制技术传承基地(山西中医药大学),山西 晋中 030619]

摘要:目的 探讨中药地黄的两种环烯醚萜类成分梓醇(Catalpol)及地黄苷A(Rehmannioside A,ReA)对过氧化氢(H_2O_2)诱导胰岛β细胞损伤的保护作用,以及在治疗2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)中的分子机制。方法 通过应用H_2O_2诱导大鼠胰岛细胞瘤细胞(Rat insulinoma cells,INS-1)及小鼠胰岛β细胞(Mouse pancreatic β cells,MIN6)损伤模型,评价梓醇和地黄苷A对细胞活力及增殖的影响,并结合流式细胞术、细胞免疫荧光、蛋白免疫印迹等方法,检测细胞自噬、凋亡及相关蛋白表达。结果 梓醇和地黄苷A能够明显提升H_2O_2诱导的INS-1及MIN6细胞存活率($P<0.01$);显著提升细胞的增殖活力($P<0.01$);有效降低细胞的凋亡率($P<0.01$);细胞中微管相关蛋白轻链3(Microtubule-associated protein light chain 3,LC3)蛋白相对荧光强度显著增强($P<0.01$);上调细胞Bcl-2同源结构域蛋白1(Beclin1)、LC3BⅡ、自噬相关蛋白7(Autophagy related 7,ATG7)、自噬相关蛋白5(Autophagy related 5,ATG5)、B淋巴细胞瘤-2蛋白(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)、半胱天冬酶-9(Cysteinyl aspartate specific proteinase-9,Caspase-9)、半胱天冬酶-3(Cysteinyl aspartate specific proteinase-3,Caspase-3)、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶1(Poly ADP-ribose polymerase 1,PARP1)蛋白表达($P<0.05$,$P<0.01$);下调细胞选择性自噬接头蛋白(Sequestosome 1,P62)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein,Bax)蛋白表达($P<0.05$,$P<0.01$)。结论 梓醇和地黄苷A通过增强胰岛β细胞自噬活性,减少因氧化损伤导致的细胞凋亡,改善胰岛β细胞的活力与增殖,最终发挥抗T2DM的作用。

关键词:梓醇;地黄苷A;胰岛β细胞;细胞自噬;细胞凋亡

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2026)08-0111-10

Catalpol and Rehmannioside A from Shengdiihuang(Rehmanniae Radix) Activate Autophagy And Inhibit Apoptosis In Pancreatic β-Cells To exert anti-T2DM Effects

HU Nan[1],MENG Xianglong[1,2,3,4],LI Hongchang[2],ZHANG Shuosheng[1,2,3,4]

[1. Traditional Chinese Medicine and Food Engineering,Shanxi University of Chinese Medicine,Jinzhong 030619,Shanxi,China;
2. Shanxi Key Laboratory of Chinese Herbal Medicine Processing,Shanxi University of Chinese Medicine,Jinzhong 030619,Shanxi,China;
3. Key Research Laboratory of Processing and Innovation in Traditional Chinese Medicinal Materials,Shanxi University of Chinese Medicine,Jinzhong 030619,Shanxi,China;
4. Traditional Chinese Medicine Processing Technology Inheritance Base(Shanxi University of Chinese Medicine),Jinzhong 030619,Shanxi,China]

Abstract:*Objective* Explored the protective effects of two iridoid compounds,catalpol and rehmannioside A(ReA),from the traditional Chinese medicine Shengdiihuang(Rehmanniae Radix),against hydrogen peroxide(H_2O_2)-induced injury of pancreatic β-cells in vitro,as well as their molecular mechanisms in the treatment of type 2 diabetes mellitus(T2DM). *Methods* By utilizing an H_2O_2-induced injury model of rat insulinoma cells(INS-1) and mouse pancreatic β-cells(MIN6),the effects of catalpol and ReA on cell viability and proliferation were evaluated. Additionally,flow cytometry,cellular immunofluorescence and protein immunoblotting were employed to detect autophagy,apoptosis and the expressions of related proteins. *Results* Catalpol and

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81673601);国家中医药管理局中药炮制技术传承基地项目(2022年);山西省应用基础研究计划项目(20210302124694);山西省教育厅项目(2021L364,2023L189);山西省中医药管理局科研项目(2023ZYYA2012);山西省留学人员科技活动择优项目(重点项目)(20230034);山西省筹资金资助归国留学人员科研项目(2023-156);山西中医药大学博士科研启动基金项目(2023BK38);山西中医药大学科技创新能力培育计划(太行本草专项)项目(2022PY-TH-02);山西中医药大学基础与临床合作专项(2024PY-JL-7-02)

作者简介:胡楠(1990-),女,山西临汾人,实验师,硕士,研究方向:中药药效分子机制。

通讯作者:孟祥龙(1988-),男,黑龙江铁力人,高级实验师,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药炮制现代化。E-mail:sszywzh@126.com。

ReA can significantly increase the survival rate of H_2O_2 - induced INS - 1 and MIN6 cells($P<0.01$), markedly enhance the cell proliferation vitality($P<0.01$), effectively reduce the apoptosis rate of cells($P<0.01$), significantly increase the relative fluorescence intensity of Microtubule - associated protein light chain 3(LC3) protein in cells($P<0.01$), up - regulate the expressions of Beclin 1, LC3B Ⅱ, Autophagy related 7(ATG7), Autophagy related 5(ATG5), B - cell lymphoma - 2(Bcl - 2), Cysteinyl aspartate specific proteinase - 9(Caspase - 9), Cysteinyl aspartate specific proteinase - 3(Caspase - 3), Poly ADP - ribose polymerase 1(PARP1) proteins in cells($P<0.05$, $P<0.01$) and down - regulate the expressions of Sequestosome 1(P62) and Bcl - 2 associated X protein(Bax) proteins in cells($P<0.05$, $P<0.01$). *Conclusion* Catalpol and ReA exert their anti - T2DM effects by enhancing autophagic activity, reducing cell apoptosis caused by oxidative damage, and improving the viability and proliferation of pancreatic β - cells.

Keywords: catalpol; rehmannioside A; pancreatic β - cells; autophagy; apoptosis

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种与体内葡萄糖代谢异常相关的严重疾病[1]。国际糖尿病联盟(International diabetes federation, IDF)发布的第10版《全球糖尿病地图》报告显示,2021年全球约有5.37亿成年人患有T2DM,预计到2045年这一数字将上升至7.83亿人[2]。胰岛β细胞功能受损是T2DM发病机制的一个重要因素,这种损伤涉及β细胞数量、形态结构和功能的改变,进而影响胰岛素的分泌[3-4]。氧化、内质网及线粒体功能障碍等应激条件可能破坏β细胞的稳态,导致细胞功能障碍和凋亡[5-8]。有研究表明,自噬对维持胰岛β细胞活力和适当的胰岛素分泌方面意义重大,激活自噬能通过对抗糖脂毒性损伤、改善氧化损伤及抑制细胞凋亡等途径发挥改善T2DM症状的作用[9-10]。因此,对于能够激活胰岛β细胞自噬,抑制细胞过度凋亡药物的研究成为治疗T2DM的一种思路。

地黄为玄参科地黄属植物地黄的根,最早载于《神农本草经》,是一味用于治疗糖尿病的传统中药,具有长达千年的应用历史[11-12]。地黄根据不同的炮制方法可分为鲜地黄、生地黄和熟地黄[12]。在中医传统理论中,生地黄被赋予了清热凉血、养阴生津等功效,这使得生地黄在治疗热病口渴、内热消渴等症状方面展现出独特的效果。现代药理学研究表明,地黄在内分泌系统及葡萄糖代谢、心血管系统、中枢神经系统等多个方面展现出显著的药理作用,其应用范围还扩展至抗肿瘤、抗菌、延缓衰老等多个领域[13-15]。随着对生地黄研究的不断深入,越来越多的活性成分被发现,如环烯醚萜类、紫罗兰酮类、苯乙醇类等化合物。其中,环烯醚萜类成分是生地黄的主要活性成分[16]。课题组前期对生地黄化学成分进行剖析,并辨识了其对T2DM的入血/入胰腺药效成分。结果显示,梓醇及地黄苷A是生地黄治疗T2DM的主要药效成分[17-19]。

梓醇和地黄苷A皆属于环烯醚萜类化合物。梓醇具有多种生物活性,包括降血糖、免疫调节、抗炎、抗肿瘤和抗细胞凋亡等[20];地黄苷A结构比梓醇更稳定,其具有抗氧化、抗炎等药理作用[21]。近年来,关于梓醇治疗T2DM的研究主要集中于其对肝脏、骨骼肌胰岛素抵抗的机制上[22-23],对胰岛β细胞功能的干预研究相对较少。地黄苷A抗T2DM的研究则鲜有报道。基于此,本实验采用体外研究方法,利用胰岛细胞瘤细胞(Rat insulinoma cells, INS - 1)及胰岛β细胞(Mouse pancreatic β cells, MIN6)细胞构建氧化损伤模型,旨在探讨生地黄中的两种单体成分梓醇和地黄苷A对胰岛β细胞的保护作用及可能的分子机制,为进一步揭示生地黄药理作用及对T2DM的潜在治疗机制提供研究基础及科学依据。

1 材料

1.1 细胞 大鼠胰岛细胞瘤细胞INS - 1及小鼠胰岛β细胞株MIN6均购于海星生物科技有限公司(货号:TCR - C608;TCM - C787)。

1.2 药物与试剂 地黄苷A(纯度>98%,货号:AB3348,成都埃法生物);梓醇(纯度99.98%,货号:HY - N0820)、氯喹(Chloroquine, CQ)(纯度:99.82%,货号:HY - 17589A)、雷帕霉素(Rapamycin)(纯度:99.94%,货号:HY - 10219)(美国MCE公司);RPMI1640培养基(货号:10491)、DMEM高糖培养基(货号:D5194)(北京索莱宝科技有限公司);胎牛血清(货号:FCS500,依科赛科技有限公司);0.25%胰酶 - EDTA消化液(货号:MA0232)、青链霉素溶液(货号:MA0110)(大连美仑生物技术有限公司);CCK - 8检测试剂盒(货号:C0038)、EdU - 488细胞增殖检测试剂盒(货号:C0071S)、Annexin V - FITC细胞凋亡检测试剂盒(货号:C1062L)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0012)、超敏ECL化学发光试剂盒(货号:P0018S)、4%多聚甲醛固定液(货号:P0099)、免疫染色通透液Triton X - 100(货号:P0096)、微丝绿色荧光探针(货号:C2201S)、RIPA裂解液(货号:P0013B)、蛋白酶/磷酸酶抑制剂(货号:P1051)(上海碧云天生物技术有限公司);Bcl - 2同源结构域蛋白1(Beclin1)、自噬相关蛋白5(Autophagy related 5, ATG5)、自噬相关蛋白7(Autophagy related 7, ATG7)、LC3B、P62(Sequestosome 1, P62)、Bcl - 2相关X蛋白(Bcl - 2 associated X protein, Bax)、B淋巴细胞瘤 - 2蛋白(B - cell lymphoma - 2, Bcl - 2)、半胱天冬酶 - 3(Cysteinyl aspartate specific proteinase - 3, Caspase - 3)、半胱天冬酶 - 9(Cysteinyl aspartate specific proteinase - 9, Caspase - 9)、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶1(Poly ADP - ribose polymerase 1, PARP1)、β - actin、HRP山羊抗兔二抗、Cy3山羊抗兔二抗(货号:A21191、A19677、A19665、A21895、A19700、A19684、A18415、A25309、A18676、A19596、AC038、AS014、AS007,武汉爱博泰克生物科技有限公司)。

1.3 仪器 细胞培养箱(型号:3131 - GP)、全自动细胞计数仪(型号:Countess 3)(美国Thermo Fisher公司);荧光倒置显微镜(型号:D - 35578 Wetziar,德国Leica公司);酶标仪(型号:iMark 1681130)、电泳仪(型号:PowerPac 1645050)、凝胶成像系统(型号:ChemiDoc XRS +)(美国Bio - Rad公司);流式细胞仪(型号:NovoCyte Quanteon,美国Agilent公司)。

2 实验方法

2.1 细胞培养与氧化损伤模型的建立 INS - 1细胞使用含

10% FBS、1% 青链霉素、0.05 mmol·L^{-1} β-巯基乙醇的 RPMI1640 培养基，在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。MIN6 细胞使用含 10% FBS、1% 青链霉素、0.05 mmol·L^{-1} β-巯基乙醇的 DMEM 高糖培养基，培养方法同上所述。

将对数生长期的 INS-1、MIN6 细胞，分别以 1×10^5·mL^{-1}的密度接种于 96 孔板中培养 48 h。之后将细胞分为正常组和过氧化氢（H_2O_2）不同浓度组（10、25、50、100、200、400 μmol·L^{-1}），每组设 6 个复孔，H_2O_2 处理细胞 2 h 后，采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力，并使用显微镜观察各组细胞形态变化，由此确定氧化损伤模型的最佳诱导浓度。

2.2 细胞活力及 EdU 法细胞增殖能力检测 取对数生长期的 INS-1 与 MIN6 细胞，分别以 1×10^5·mL^{-1}密度接种于 96 孔板中培养 24 h。将细胞分为正常组和药物组（地黄苷 A 和梓醇浓度梯度：10、20、40、80、160、320、640 μmol·L^{-1}），每组 6 个复孔，药物干预 24 h 后，采用 CCK-8 法检测细胞活力，用以确定不影响正常细胞活力的药物浓度范围。同样采用上述操作，将细胞分为正常组、模型组及药物干预组。模型组为细胞培养 48 h 后，加适宜浓度 H_2O_2 处理 2 h，以模拟氧化损伤；药物组的细胞则在培养 24 h 后，分别接受不同浓度地黄苷 A 和梓醇处理 24 h，随后同样以适宜浓度 H_2O_2 处理 2 h，以评估药物对细胞氧化损伤的保护效果。通过测定各组细胞活力，最终确定地黄苷 A 和梓醇在改善细胞氧化损伤方面的有效浓度范围。

采用上述操作，将两种细胞分为正常组、模型组、药物组（低、高剂量），根据 EdU 细胞增殖检测试剂盒说明书方法，对细胞 DNA 合成期间 EdU 的掺入进行分析。用 50 μmol·L^{-1} EdU 孵育细胞 2 h 后离心收集，PBS 洗涤细胞 1 次，甲醇固定细胞 30 min。在摇床中用 0.5% Triton X-100 裂解细胞膜。将染色反应液加入细胞中并避光培养 30 min。细胞核用 Hoechst 33342 染色 5 min，后通过荧光显微镜拍照并测定掺入 EdU 的细胞比例。

2.3 细胞凋亡检测 分组及药物干预同 2.2 项，将细胞分为正常组、模型组、药物组（低、高剂量）。按照 Annexin V-FITC/PI 染色检测试剂盒说明书，用 0.25% 不含 EDTA 胰酶消化收集细胞，PBS 清洗后，加入染料及缓冲液避光孵育，混匀后上机检测细胞凋亡情况。

2.4 细胞免疫荧光分析 将细胞分为正常组、模型组及药物组（低、高剂量）。收集细胞并用 PBS 洗涤，4% 多聚甲醛固定细胞 20 min，后用 Triton X-100 通透细胞 15 min[24]。2% BSA 室温封闭 1 h 后，将细胞与一抗 LC3B（1∶200 稀释）室温孵育 2 h，然后与 Cy3 荧光二抗（1∶500 稀释）及微丝绿色荧光探针（1∶100 稀释）共同室温避光孵育 1 h。TBST 洗涤细胞后加入 DAPI 复染细胞核，用荧光显微镜拍照，Image J 软件计算相对荧光强度。

2.5 细胞自噬及凋亡相关蛋白表达的测定 检测细胞自噬相关蛋白，将细胞分为正常组、模型组以及不经 H_2O_2 处理的药物组（低、高剂量）、阳性药物对照组（Rapamycin，2 nmol·L^{-1}）。检测细胞凋亡相关蛋白，将细胞分为正常组、模型组、CQ+模型组、CQ+药物组（低、高剂量）。弃培养基并用 PBS 洗涤，加入含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液，冰上裂解细胞 30 min，12 000 r·min^{-1} 4 ℃离心 30 min 取上清则为细胞总蛋白。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明检测样品总蛋白浓度。蛋白变性后上样，经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后，250 mA，1 h 湿转至 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉封闭后，加入相应的一抗溶液（1∶1000 稀释）4 ℃过夜封闭。TBST 洗膜 3 次后加入二抗溶液（1∶3000 稀释）孵育 1 h，洗膜后加入 ECL 发光液，凝胶成像仪采集蛋白条带[25]。以 β-actin 作为内参，使用 Image J 软件分析各组 Beclin1、ATG5、ATG7、LC3B、P62、Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9、PARP1 蛋白相对表达量。

2.6 统计分析 采用 Graphpad Prism 8.0 软件对各个实验数据进行统计分析并完成作图，所有数据均以均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。组间差异比较用单因素方差分析（One-way ANOVA）和 t 检验分析。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 H_2O_2 对细胞活力的影响 为建立优化 H_2O_2 诱导细胞氧化损伤模型，并确定适宜的损伤浓度，本研究采用梯度浓度（10、25、50、100、200、400 μmol·L^{-1}）的 H_2O_2 对细胞进行 2 h 处理。结果显示，与正常组相比，随着 H_2O_2 浓度的增加，INS-1 和 MIN6 细胞的活力呈现出先上升后逐渐下降的趋势。具体表现为，INS-1 细胞在 H_2O_2 浓度为 10 μmol·L^{-1}和 25 μmol·L^{-1}时活力增强，而随着浓度的进一步增加，其活力逐渐减弱；MIN6 细胞则在 10 μmol·L^{-1}至 100 μmol·L^{-1}的浓度范围内活力上升，随后在更高浓度下呈现出活力下降的趋势。为确保细胞氧化损伤程度适中，在后续实验中，对于INS-1 细胞，本研究选择了 50 μmol·L^{-1}的 H_2O_2 浓度，而对于 MIN6 细胞，则选用了 200 μmol·L^{-1}的浓度，均干预 2 h，细胞存活率分别为 67.13% 和 54.75%。显微镜下观察细胞形态发生明显改变，细胞变圆，体积增大，细胞间隙增宽及折光率降低。

3.2 梓醇和地黄苷 A 对氧化损伤细胞活力及增殖能力的影响 本研究首先通过梯度浓度的梓醇和地黄苷 A 分别处理 INS-1、MIN6 细胞 24 h，以评估其对正常细胞活力的潜在影响。结果显示，当给药组浓度达到 640 μmol·L^{-1}时，两种细胞的活力均下降，而较低浓度（10、20、40、80、160、320 μmol·L^{-1}）对细胞活力无明显影响。因此，后续研究中梓醇和地黄苷 A 的浓度被限定在不超过 320 μmol·L^{-1}的范围内。

在成功建立稳定的 H_2O_2 损伤模型并确定安全给药剂量后，本研究进一步探究了梓醇和地黄苷 A 对细胞的保护作用。以 10、20、40、80、160、320 μmol·L^{-1}浓度的梓醇和地黄苷 A 分别干预两种细胞 24 h 后，再使用 H_2O_2 诱导细胞损伤 2 h。与模型组相比，两种细胞在不同浓度药物处理后均表现出活力上升趋势。特别是 INS-1 细胞在地黄苷 A（20、40 μmol·L^{-1}）和梓醇（40、80 μmol·L^{-1}）处理后，细胞活力显著提升，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。同样，MIN6 细胞在地黄苷 A（80 μmol·L^{-1}）及梓醇（40、80 μmol·L^{-1}）处理后，细胞活力也呈现显著提升（$P<0.01$）（见插页ⅩⅩ图 1）。该结果为后续实验选择合适的药物浓度提供了重要依据。

在细胞增殖阶段，EdU 作为一种胸腺嘧啶核苷类似物能够掺入正在复制的 DNA 分子，进而通过检测 EdU 标记的 DNA 来评估细胞的增殖状态。实验数据显示，INS-1 细胞中正常组阳性细胞占比达到 61.31%，而模型组仅占 10.19%；地黄苷 A 20、40 μmol·L^{-1}浓度组阳性细胞百分比分别为 21.46% 和

29.13%，梓醇40、80 μmol·L^{-1}浓度组的阳性细胞百分比分别为19.25%和27.04%，与模型组比较，药物组细胞增殖活力均显著提高（$P<0.01$）。MIN6细胞中，正常组阳性细胞占比为56.24%，而模型组则降低至13.26%；地黄苷A 40、80 μmol·L^{-1}浓度组阳性细胞百分比分别为17.19%和33.78%（$P<0.01$），梓醇40、80 μmol·L^{-1}浓度组的阳性细胞百分比分别为18.15%和32.02%（$P<0.01$）（见插页XXII图2）。以上数据表明，梓醇和地黄苷A均能以剂量依赖的方式有效缓解H_2O_2对细胞DNA合成的抑制作用。

3.3 梓醇和地黄苷A对H_2O_2诱导细胞凋亡的影响 本研究采用Annexin V-FITC/PI双染结合流式细胞检测技术，对梓醇和地黄苷A抑制H_2O_2诱导细胞凋亡的作用进行了定量评估。结果显示，INS-1细胞正常组凋亡率（Q2+Q3）为4.41%，H_2O_2诱导的模型组凋亡率上升至33.80%；MIN6细胞对照组凋亡率为5.71%，模型组凋亡率则高达55.47%。在两种细胞中，与模型组相比，梓醇及地黄苷A组的细胞凋亡率均表现出明显的下降趋势（$P<0.01$）（见插页XXII图3）。这提示梓醇和地黄苷A均能有效抑制H_2O_2诱导的细胞凋亡，发挥细胞保护作用。

3.4 梓醇和地黄苷A对细胞自噬的影响 为探究梓醇和地黄苷A对细胞自噬的诱导作用，本研究通过免疫荧光法检测INS-1、MIN6两种细胞中LC3B蛋白的定位及相对荧光强度。结果显示，与正常组相比，INS-1细胞经地黄苷A（20、40 μmol·L^{-1}）及梓醇（40、80 μmol·L^{-1}）处理后，细胞质中LC3B蛋白，即红色荧光亮度显著增强（$P<0.01$）。类似地，MIN6细胞经地黄苷A（40、80 μmol·L^{-1}）及梓醇（40、80 μmol·L^{-1}）处理后，LC3B蛋白相对荧光强度也呈现出显著增强的趋势（$P<0.01$），并且增强效果呈现出一定的剂量依赖性，即高剂量组的效果优于低剂量组（见插页XXIII图4）。以上结果表明梓醇和地黄苷A均能有效增强INS-1和MIN6两种细胞中LC3B蛋白的表达，并表现出一定的剂量效应关系。

3.5 梓醇和地黄苷A对细胞自噬及凋亡相关蛋白表达的影响 细胞自噬相关蛋白表达分析显示，在INS-1细胞中，与正常组相比，地黄苷A（20、40 μmol·L^{-1}）及梓醇（40、80 μmol·L^{-1}）组显著促进了Beclin1和LC3BⅡ蛋白的表达（$P<0.05$）；ATG7、ATG5蛋白在地黄苷A（40 μmol·L^{-1}）及梓醇（40、80 μmol·L^{-1}）组中表达也显著上调（$P<0.01$）；而P62蛋白则在地黄苷A（40 μmol·L^{-1}）及梓醇（80 μmol·L^{-1}）组中呈现表达下调的趋势。此外，MIN6细胞中的蛋白表达与INS-1细胞类似，也呈现出同样的趋势（见插页XXIV图5）。

细胞凋亡相关蛋白表达分析显示，在INS-1细胞中，相较于H_2O_2+CQ组，经梓醇（40、80 μmol·L^{-1}）处理的H_2O_2+CQ组显著下调了Bax蛋白的表达（$P<0.01$）；同时经药物处理的H_2O_2+CQ组中Bcl-2、Caspase-9、Caspase-3、PARP1蛋白表达均有不同程度的上调。这一趋势在MIN6细胞中亦得到了相似的体现，各蛋白表达呈现出与INS-1细胞相同的趋势（见插页XXIV图6）。

4 讨论

T2DM是一种复杂的代谢紊乱性疾病，通常伴随有胰岛素功能抵抗和胰岛β细胞分泌功能缺陷[26]。细胞自噬被认为是参与再循环变性蛋白质或功能失调细胞器的重要过程，已有研究揭示了自噬在维持胰岛β细胞的结构、功能和质量方面的重要作用。自噬缺陷的小鼠表现出高血糖、低胰岛素血症以及β细胞增殖显著减少和细胞质量下降等细胞形态学改变，这些变化均导致胰岛素分泌的显著减少[6]。具体而言，自噬能诱导胰岛β细胞代偿性增生，并通过降解再利用受损细胞器来维持其结构和功能，进而保持胰岛β细胞的稳态[27]。另有研究表明，在T2DM胰岛素分泌功能失调的发展过程中，β细胞自噬的上调可以平衡胰岛素的过量产生[7]。这也意味着，在T2DM患者胰岛素分泌受损的背景下，自噬能够作为一种代偿机制来调节胰腺激素含量。基于此，通过药物调节将细胞自噬恢复到正常水平，从而保护胰岛β细胞免于凋亡，可能成为一种预防或治疗T2DM的新思路。

生地黄性味甘、寒，清热凉血，养阴生津，是极具防治T2DM中医临床用药历史的典型药物。文献调研地黄在T2DM方剂中的出现频率得出，生地黄以其“清/凉”之效，常用于阴虚燥热和阴虚热盛型T2DM治疗方剂中；常见知柏地黄丸、玉泉丸、四物汤、增液汤、六味地黄丸、参芪地黄汤、知柏地黄汤、杞菊地黄汤和当归六黄汤等配伍生地黄的组方治疗T2DM及其并发症的研究报道[28]。然生地黄以梓醇及地黄苷A为药效物质并发挥“清/凉”之效治疗T2DM作用机制有待深入研究。现代药理研究也证实，“清/凉”之效的中药见长于调节细胞或组织炎症应激、氧化应激，以维持自噬和凋亡的平衡稳态，并确保发挥其相应生理学功能。

本研究采用H_2O_2诱导胰岛β细胞氧化损伤模型，系统性评估梓醇和地黄苷A对细胞活力、增殖能力、自噬及凋亡的影响，旨在探讨这两种化合物对胰岛β细胞的潜在保护作用。实验数据揭示，梓醇及地黄苷A均对H_2O_2诱导的胰岛β细胞氧化损伤及凋亡具有保护作用，其机制可能是通过调节自噬和凋亡相关蛋白，在增强胰岛β细胞活力与增殖的同时降低凋亡率，从而维持细胞自噬与凋亡的平衡。梓醇和地黄苷A通过上调Beclin-1蛋白的表达，从而增强细胞自噬。作为细胞自噬启动的关键调控因子之一，Beclin-1可被多种Caspase剪切，经剪切的Beclin-1丧失其原有的自噬调控功能，转而启动细胞凋亡程序[29]。同时，这两种化合物还能不同程度地降低p62的表达，而p62水平升高通常被认为是自噬活性受到抑制的标志[30]。此外，自噬形成时，LC3B Ⅰ转化为LC3B Ⅱ，并随着自噬体的增加，LC3B Ⅱ的表达量也会相应增加。在梓醇和地黄苷A处理的细胞中表现出LC3B Ⅱ表达上调的现象，这说明两种化合物能够诱导胰岛β细胞自噬体的形成。

为深入探究梓醇和地黄苷A对细胞自噬-凋亡关系的调控，本实验引入自噬抑制剂CQ联合处理。CQ通过中和溶酶体pH抑制自噬体与溶酶体融合，从而抑制自噬过程[31]。Bcl-2蛋白作为抗凋亡家族的重要成员，可以通过抑制Bax蛋白从而抑制细胞凋亡[32]。实验中观察H_2O_2+CQ组，当细胞自噬过程受到抑制时，Bcl-2表达受到抑制，而Bax表达有所上调，这提示细胞凋亡水平增加；而梓醇和地黄苷A处理组则逆转这一趋势，即Bcl-2上调/Bax下调，这表明梓醇和地黄苷A具有抑制细胞凋亡的潜力。Bax激活后可诱导Caspase级联反应，促使Caspase-9及Caspase-3活化并剪切PARP1等底物，从而推动细胞凋亡进程[33]。相较于H_2O_2+CQ组，梓醇和地黄苷A处理组中Caspase-9、Caspase-3及PARP1的表达

水平均有不同程度的升高,这进一步证实了两者的抗细胞凋亡作用。

综上,这两种单体成分,梓醇及地黄苷 A 作为生地黄发挥治疗 T2DM 的重要物质基础,可有效缓解 INS－1 和 MIN6 细胞的氧化损伤,其作用机制涉及自噬及凋亡关键蛋白的表达调控,即通过 Beclin－1/Bcl－2 通路发挥激活自噬抑制凋亡的作用,进而保护胰岛 β 细胞,实现对 T2DM 的治疗作用。

参考文献

[1] LIU L L, ZHANG J H, CHENG Y, et al. Gut microbiota: a new target for T2DM prevention and treatment[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 958218.

[2] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas[M]. 10th edn. 2021.

[3] TAMARAI K, BHATTI J S, REDDY P H. Molecular and cellular bases of diabetes: Focus on type 2 diabetes mouse model－TallyHo [J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis, 2019, 1865(9): 2276－2284.

[4] HELMAN A, AVRAHAMI D, KLOCHENDLER A, et al. Effects of ageing and senescence on pancreatic β－cell function[J]. Diabetes Obesity Metabolism, 2016, 18(S1): 58－62.

[5] DE TATA V. Age－related impairment of pancreatic beta－cell function: pathophysiological and cellular mechanisms[J]. Front Endocrinol, 2014, 5: 138.

[6] CHRISTENSEN A A, GANNON M. The beta cell in type 2 diabetes [J]. Curr Diabetes Rep, 2019, 19(9): 81.

[7] SHRESTHA N, DE FRANCO E, ARVAN P, et al. Pathological β－cell endoplasmic reticulum stress in type 2 diabetes: current evidence [J]. Front Endocrinol, 2021, 12: 650158.

[8] YAMAGATA K, TSUYAMA T, SATO Y. Roles of β－cell hypoxia in the progression of type 2 diabetes[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25 (8): 4186.

[9] ALANAZI Y A, AL－KURAISHY H M, AL－GAREEB A I, et al. Role of autophagy in type 2 diabetes mellitus: the metabolic clash [J]. J Cellular Molecular Medi, 2024, 28(23): e70240.

[10] JUNG H S, CHUNG K W, WON KIM J, et al. Loss of autophagy diminishes pancreatic β cell mass and function with resultant hyperglycemia[J]. Cell Metab, 2008, 8(4): 318－324.

[11] 冯卫生, 李孟, 郑晓珂, 等. 生地黄化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(17): 1496－1502.

[12] 陈金鹏, 张克霞, 刘毅, 等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(6): 1772－1784.

[13] ZHANG R X, LI M X, JIA Z P. Rehmannia glutinosa: Review of botany, chemistry and pharmacology[J]. J Ethnopharmacol, 2008, 117(2): 199－214.

[14] 李红伟, 孟祥乐. 地黄化学成分及其药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 218－228.

[15] LIU N, LIU J Q, LIU Y, et al. Rehmannia glutinosa polysaccharide regulates bone marrow microenvironment *via* HIF－1α/NF－κB signaling pathway in aplastic anemia mice [J]. An Acad Bras Ciênc, 2023, 95(3): e20220672.

[16] LI S Q, FAN L, XIONG D, et al. Compounds from Rehmannia glutinosa and the activity to suppress α－glucosidase[J]. Nat Prod Res, 2024, 38(12): 2060－2068.

[17] MENG X L, YAN J N, MA J N, et al. Effects of Jowiseungki－Tang on high fat diet－induced obesity in mice and functional analysis on network pharmacology and metabolomics analysis[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 283: 114700.

[18] 闫京宁, 刘晓琴, 孟祥龙, 等. 生、熟地黄对高脂饲料并链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病小鼠胰脏蛋白质组学与自噬差异性干预研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(6): 1535－1545.

[19] 孟祥龙, 刘晓琴, 宁晨旭, 等. 生、熟地黄通过 AMPK 介导NF－κB/NLRP3 信号通路改善高脂饲料并链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠的作用机制差异性研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (21): 5627－5640.

[20] 张月月, 王君明, 巫晓慧. 基于以梓醇为主要成分的地黄环烯醚萜苷生物活性研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(12): 75－77.

[21] SUN M, SHEN X M, MA Y Z. Rehmannioside A attenuates cognitive deficits in rats with vascular dementia (VD) through suppressing oxidative stress, inflammation and apoptosis[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120: 109492.

[22] YAP K H, YEE G S, CANDASAMY M, et al. Catalpol ameliorates insulin sensitivity and mitochondrial respiration in skeletal muscle of type－2 diabetic mice through insulin signaling pathway and AMPK/SIRT1/PGC－1α/PPAR－γ activation[J]. Biomolecules, 2020, 10(10): 1360.

[23] YAN J T, WANG C Y, JIN Y, et al. Catalpol ameliorates hepatic insulin resistance in type 2 diabetes through acting on AMPK/NOX4/PI3K/AKT pathway [J]. Pharmacol Res, 2018, 130: 466－480.

[24] IM K, MARENINOV S, DIAZ MFP, et al. An introduction to performing immunofluorescence staining[M]//Biobanking. New York, NY: Springer New York, 2018: 299－311.

[25] TAYLOR S C, POSCH A. The design of a quantitative western blot experiment[J]. BioMed Res Int, 2014, 2014: 361590.

[26] SAMPATH KUMAR A, MAIYA A G, SHASTRY B A, et al. Exercise and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta－analysis[J]. Ann Phys Rehabil Med, 2019, 62 (2): 98－103.

[27] ZHAO X, BIE L Y, PANG D R, et al. The role of autophagy in the treatment of type Ⅱ diabetes and its complications: a review[J]. Front Endocrinol, 2023, 14: 1228045.

[28] 王明琴, 张雪荣, 吴宿慧, 等. 地黄用于消渴病研究进展[J]. 新中医, 2021, 53(4): 19－24.

[29] 张雨晴, 张丽慧, 魏尔清, 等. Beclin1 在凋亡和自噬中的调节作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(4): 331－338.

[30] JEONG S J, ZHANG X Y, RODRIGUEZ－VELEZ A, et al. p62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases[J]. Antioxid Redox Signal, 2019, 31(6): 458－471.

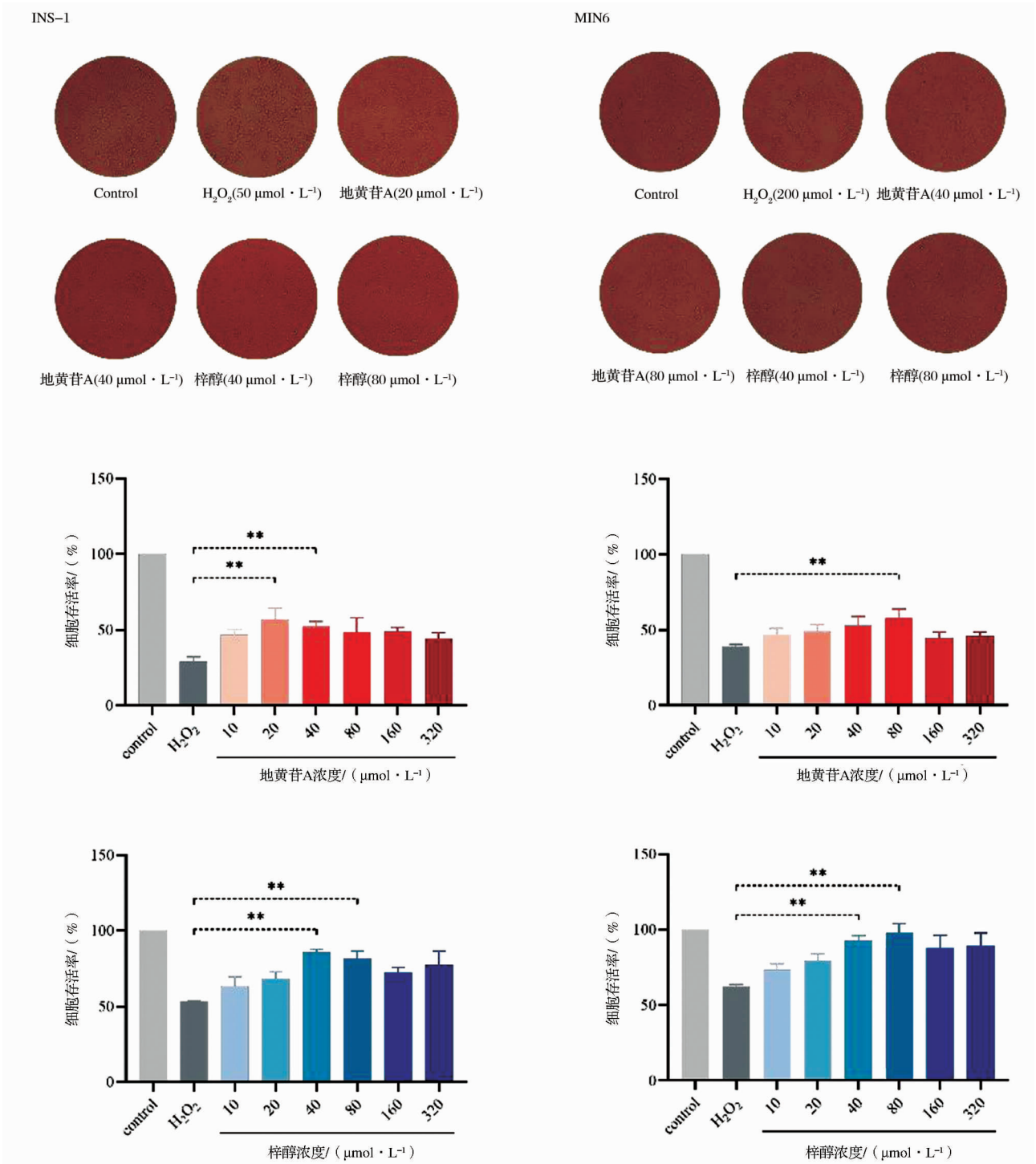
[31] FERREIRA P M P, DE SOUSA R W R, DE OLIVEIRA FERREIRA J R, et al. Chloroquine and hydroxychloroquine in antitumor therapies based on autophagy－related mechanisms[J]. Pharmacol Res, 2021, 168: 105582.

[32] GAUMER S, GUÉNAL I, BRUN S, et al. Bcl－2 and Bax mammalian regulators of apoptosis are functional in Drosophila[J]. Cell Death Differ, 2000, 7(9): 804－814.

[33] ALEMASOVA E E, LAVRIK O I. Poly(ADP－ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(8): 3811－3827.

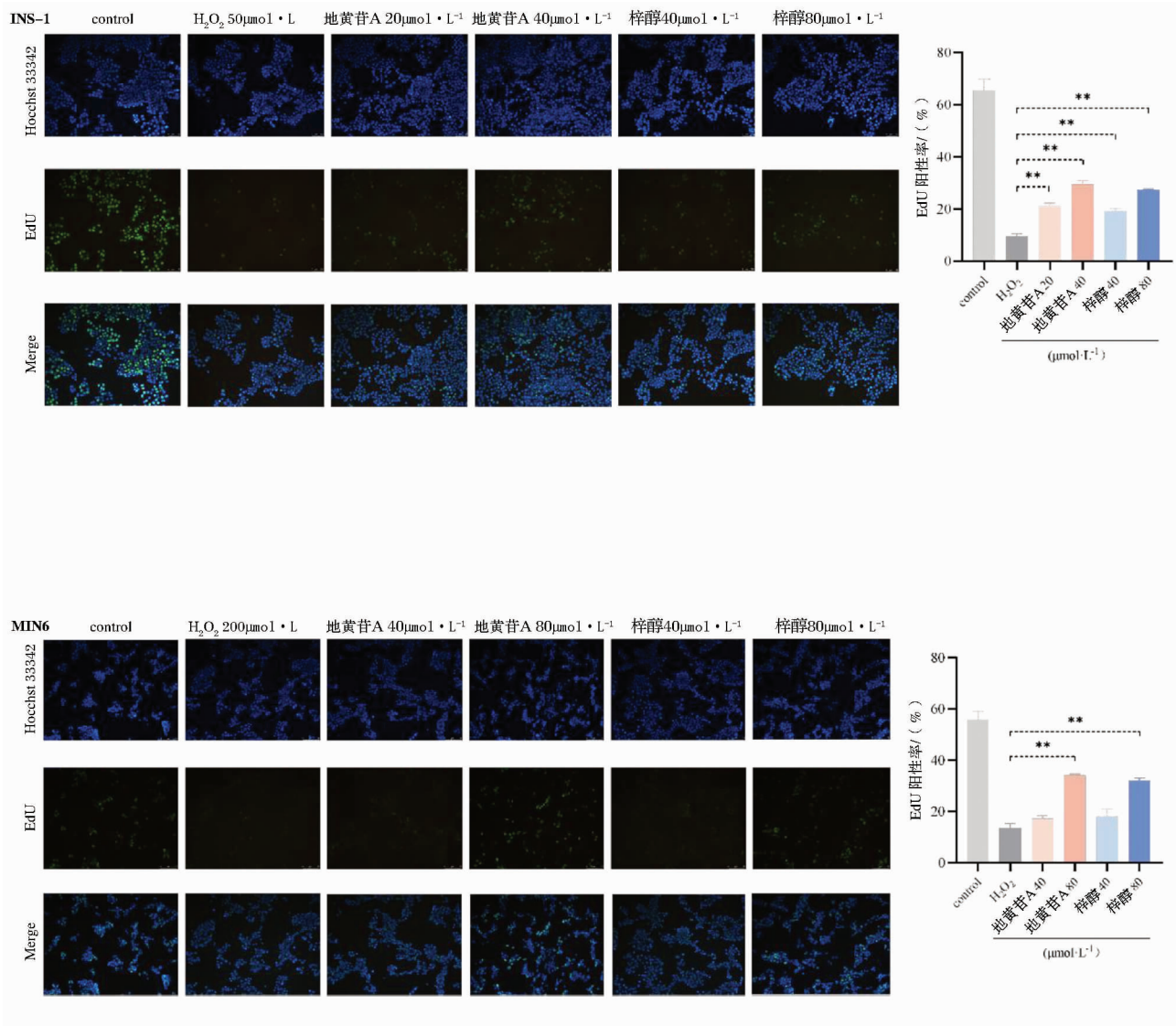
生地黄中梓醇和地黄苷 A 通过激活胰岛 β 细胞自噬抑制凋亡发挥抗 T2DM 作用

(正文见 111 – 115 页)



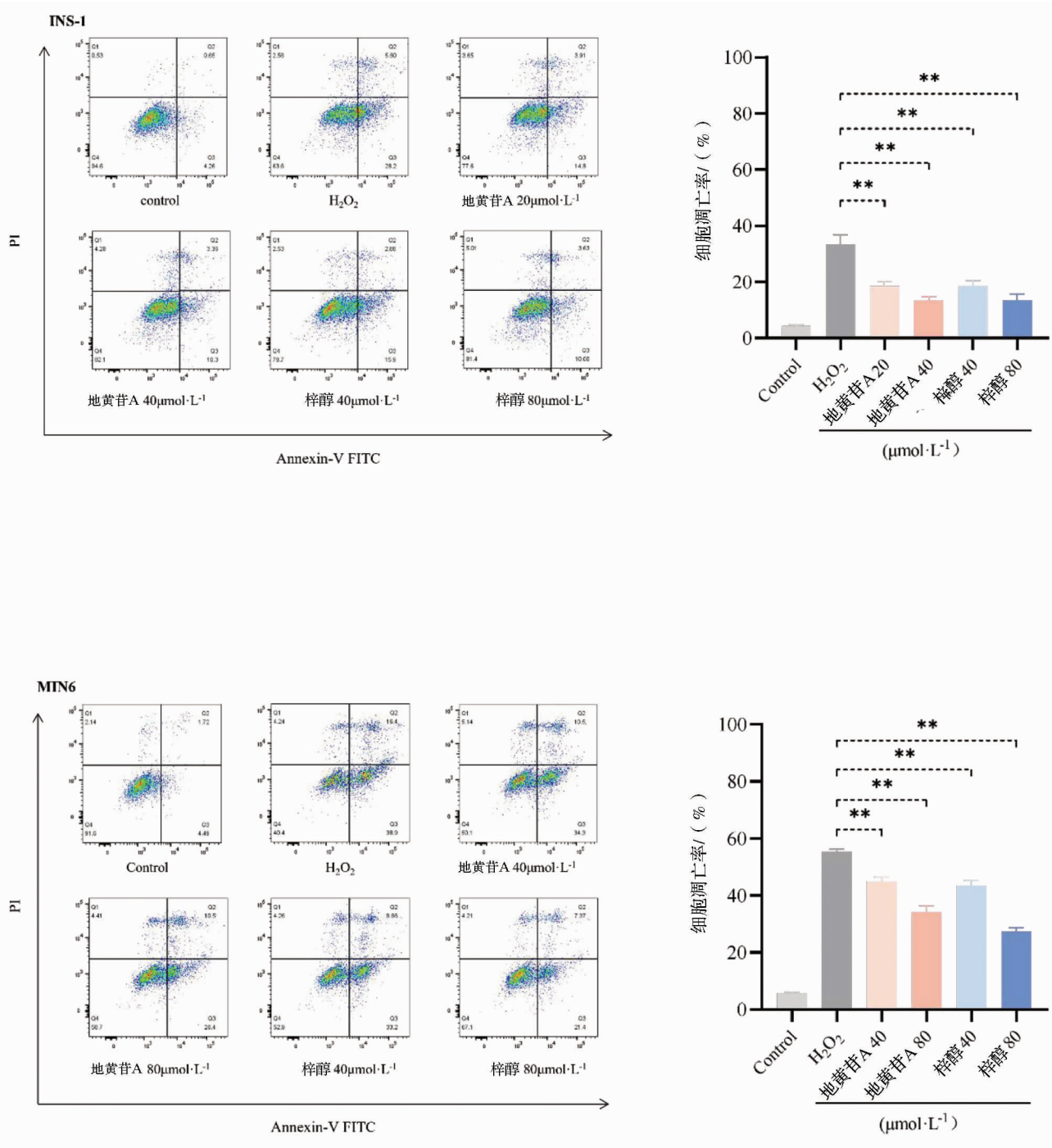
注:* * $P<0.01$。

图 1 梓醇、地黄苷 A 对 H_2O_2 诱导的 INS – 1 及 MIN6 细胞存活率的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)



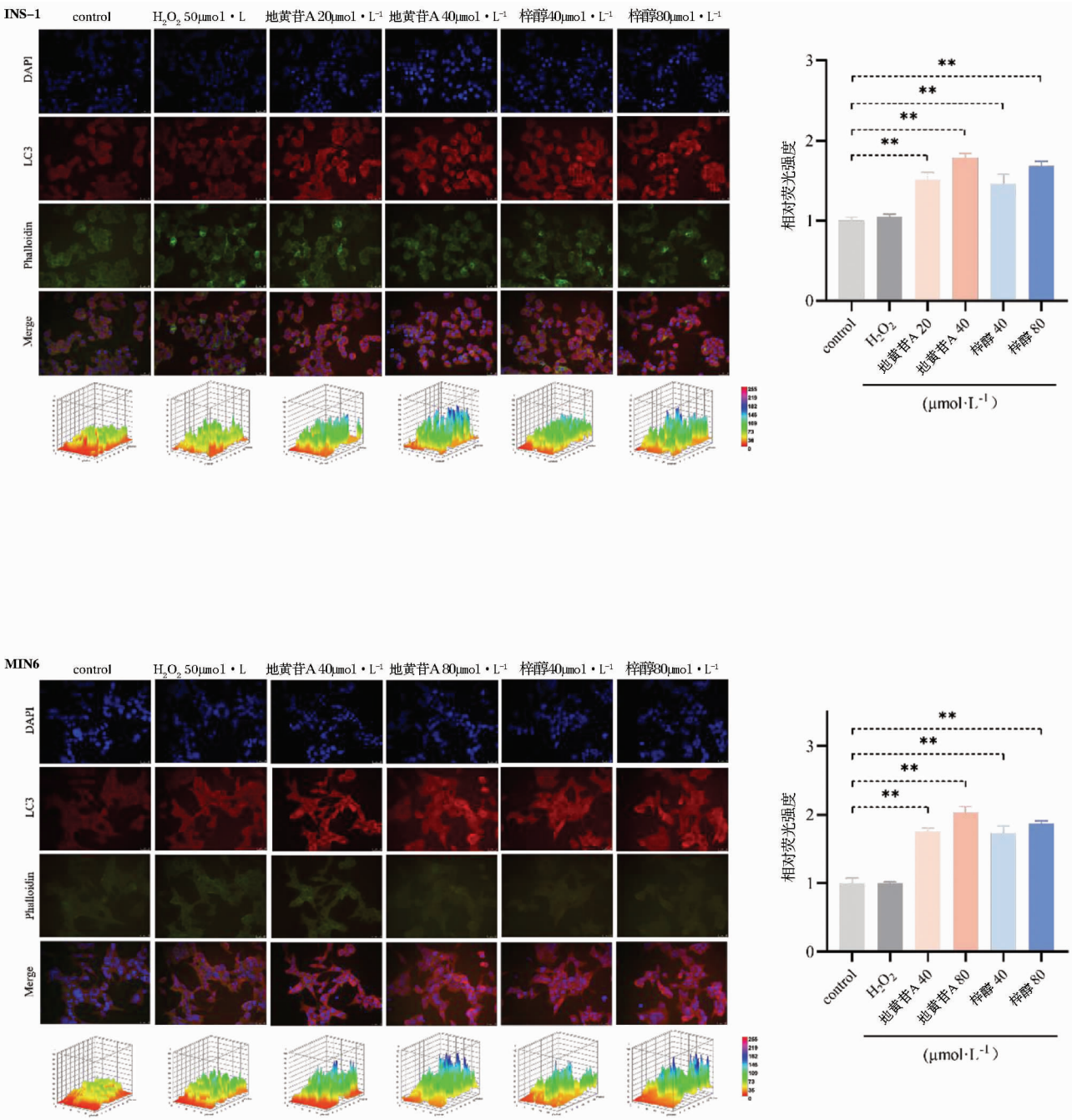
注：＊＊$P<0.01$。比例尺 = 100 μm。

图 2　梓醇、地黄苷 A 对 H_2O_2 诱导的 INS－1 及 MIN6 细胞增殖活力的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）



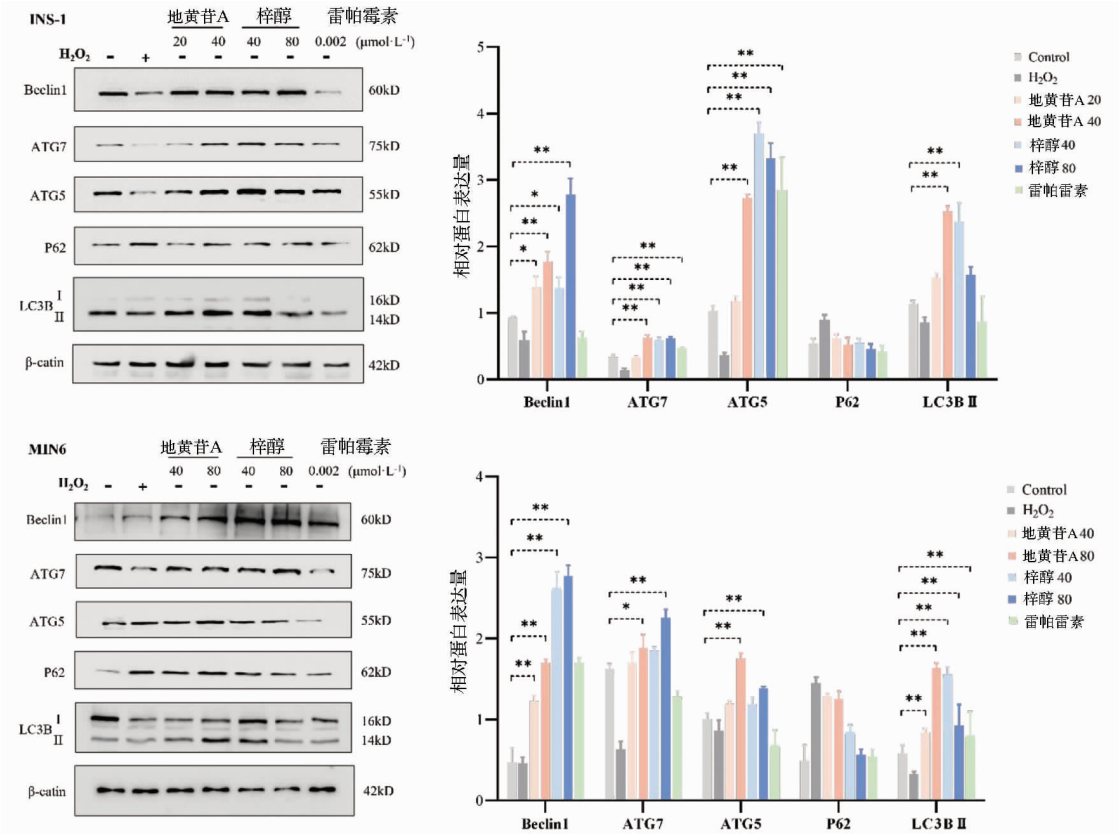
注：＊＊$P<0.01$。

图 3　梓醇、地黄苷 A 对 H_2O_2 诱导的 INS－1 及 MIN6 细胞凋亡的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）



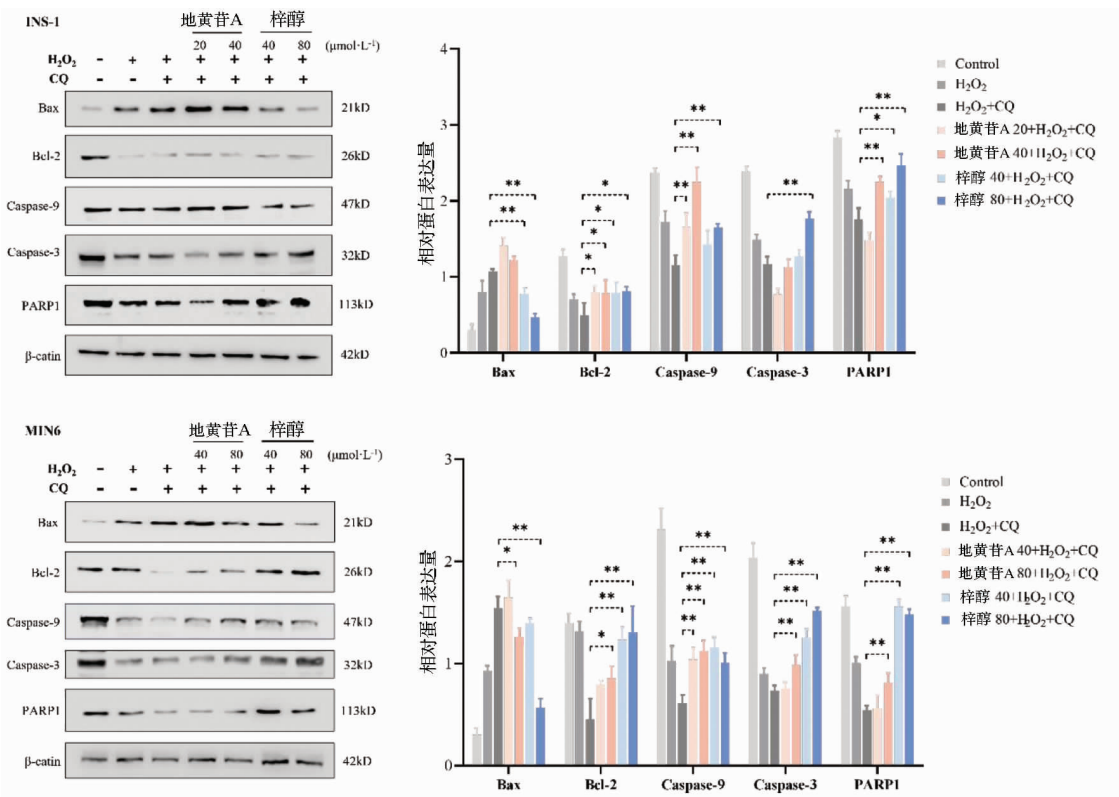
注：＊＊$P<0.01$。红色荧光表示 LC3B 在细胞质中的表达，DAPI 的蓝色荧光表示细胞核，鬼笔环肽的绿色荧光表示细胞骨架。比例尺 =25 μm。

图 4　梓醇、地黄苷 A 对 INS－1 及 MIN6 细胞自噬的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）



注：$*P<0.05$，$**P<0.01$。

图 5　梓醇、地黄苷 A 对 INS－1 及 MIN6 细胞自噬相关蛋白表达的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）



注：$*P<0.05$，$**P<0.01$。

图 6　梓醇、地黄苷 A 对 INS－1 及 MIN6 细胞凋亡相关蛋白表达的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）