

白藜芦醇通过缓解内质网应激治疗小鼠糖尿病

秦德哲 何晨 李巴仑 杨泓 何文来 孙静 张慧敏 彭莎*

(西北农林科技大学动物医学院, 咸阳 712100)

摘要 该研究利用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)建立糖尿病小鼠模型, 2周后成模, 将小鼠随机分为3组: 0 μmol 白藜芦醇组(DD)、10 μmol 白藜芦醇组(DR-10)、100 μmol 白藜芦醇组(DR-100), 白藜芦醇腹腔注射给药。制作胰腺组织切片, 之后进行HE和胰岛素免疫荧光染色, 观察胰腺胰岛的体积及形态变化; 利用血糖仪检测血糖的变化; qRT-PCR检测胰腺组织中内质网应激相关基因的变化; Western blot检测内质网应激相关蛋白的变化。结果表明, 白藜芦醇腹腔注射3周后, 模型小鼠的体质量没有发生明显的变化, 而DR-10组和DR-100组的血糖水平有所下降, 同时胰岛素的分泌量有所增加。通过分析小鼠胰腺组织的HE切片发现, DR-10和DR-100组胰岛中的细胞损伤降低。对小鼠胰腺组织切片进行免疫荧光染色发现, DR-10和DR-100组中分泌胰岛素的细胞数量明显增多。白藜芦醇促进了胰岛素、胰高血糖素、*PDX1*、*C-Myc*和*Bcl-2*基因的表达, 降低了*Grp78*、*CHOP*以及*Caspase 3*基因的表达。综上所述, 白藜芦醇通过缓解糖尿病模型小鼠胰腺的内质网应激, 进而改善糖尿病小鼠的高血糖症状。

关键词 白藜芦醇; 糖尿病; 内质网应激

Resveratrol Treats Diabetes in Mice by Relieving Endoplasmic Reticulum Stress

QIN Dezhe, HE Chen, LI Balun, YANG Hong, HE Wenlai, SUN Jing, ZHANG Huimin, PENG Sha*

(College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Xianyang 712100, China)

Abstract In this study, STZ (streptozotocin) was used to create a diabetic mouse model, which was modeled two weeks later. The mice were randomly divided into three groups, including 0 μmol resveratrol group (DD), 10 μmol resveratrol group (DR-10), and 100 μmol resveratrol group (DR-100). Resveratrol was given by intraperitoneal injection. HE and insulin immunofluorescence stainings of pancreatic tissue sections were performed to observe the changes in the volume and morphology of pancreatic islets. Using a blood glucose meter, the change of blood glucose was detected. Using qRT-PCR, the changes of endoplasmic reticulum stress-related genes in pancreatic tissues were measured. Western blot detected the changes of endoplasmic reticulum stress-related proteins. The results showed that after three weeks of intraperitoneal injection of resveratrol, the body masses of the model mice did not change significantly, the blood glucose levels of DR-10 and DR-100 groups decreased, and the amount of insulin secretion increased. Analysis of HE slices revealed that the cell damage in the pancreatic islets of DR-10 and DR-100 decreased. Immunofluorescence staining of mouse pancreas tissue sections revealed that the number

收稿日期: 2020-03-18 接受日期: 2020-06-15

陕西省重点研发计划一般项目(批准号: 2019NY-091)和陕西省科技创新团队项目(批准号: 2019TD-036)资助的课题

*通讯作者。Tel: 029-87080068, E-mail: pengshaxh@163.com

Received: March 18, 2020

Accepted: June 15, 2020

The work was supported by the General Project of the Key R & D Plan of Shaanxi Province, China (Grant No.2019NY-091) and Programme of Shaanxi Province Science and Technology Innovation Team (Grant No.2019TD-036)

*Corresponding author. Tel: +86-29-87080068, E-mail: pengshaxh@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5333>

of cells secreting insulin in DR-10 and DR-100 groups increased significantly. Resveratrol promotes the expression of *insulin*, *glucagon*, *PDX1*, *C-Myc* and *Bcl-2*, and reduces the expression of *Grp78*, *CHOP* and *Caspase 3*. In summary, resveratrol can alleviate the endoplasmic reticulum stress in the pancreas of diabetic model mice, thereby improving the symptoms of hyperglycemia in diabetic mice.

Keywords resveratrol; diabetes; endoplasmic reticulum stress

目前, 糖尿病已经严重威胁到人类健康, 成为引起人类死亡的十大疾病之一。到2015年, 全球约有4.15亿糖尿病患者, 每年约500万人死于糖尿病。预计到2046年, 糖尿病患者人数将达到6.42亿。糖尿病根据病因主要被分为1型糖尿病和2型糖尿病, 1型糖尿病主要是由于自身免疫系统对 β 细胞的攻击, 造成 β 细胞的损伤, 进而产生糖尿病; 而2型糖尿病主要是由于机体的胰岛素耐受而致使机体持续的高血糖。在糖尿病研究中, 一般选择用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)人工诱发的1型糖尿病模型小鼠作为研究对象。STZ是一种具有抗菌、抗肿瘤作用的广谱抗生素, 可以破坏胰岛的形态, 并且使 β 细胞肿胀、退变和凋亡, 进而诱发小鼠产生1型糖尿病的症状, 形成1型糖尿病模型^[1]。此外, 也有研究表明, STZ可通过引起 β 细胞的内质网应激进而造成 β 细胞的损伤^[2-3]。

白藜芦醇(resveratrol, Res; 分子量为228.24 kDa)是存在于葡萄酒、花生、虎杖等植物中的一种多酚类化合物, 具有重要的抗氧化和抗炎特性^[4]。有研究表明, 白藜芦醇可以通过减弱内质网应激而缓解由败血症引起的肾损伤, 以及由多柔比星引起的心脏中毒^[5]。另外, 白藜芦醇可通过激活沉默信息调节因子1(silent information regulator 1, Sirt1)、叉头框转录因子O亚族1(forkhead box transcription factor O1, Foxo1)信号增加患有2型糖尿病的猕猴胰腺中 β 细胞的数量, 缓解高血糖症^[6], 并且提高糖尿病大鼠移植治疗的成功率。此外, 白藜芦醇可以减少造模过程中STZ对胰岛的损伤, 减少 β 细胞的凋亡^[7-8]。而白藜芦醇发挥作用主要是缓解胰腺的氧化应激及病理性免疫反应^[9-11]。

在正常情况下, 内质网应激调控蛋白的合成、折叠和成熟。有研究表明, 内质网应激与人机体各种生理性疾病的发生相关, 如糖尿病、肥胖症、动脉硬化、癌症、神经退行性疾病以及炎症的诱发等^[12-14]。线粒体损伤、内质网应激以及 Ca^{2+} 紊乱是造成 β 细胞损伤的原因^[15]。丁酸钠通过抑制内质网应激的蛋白激酶R

样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)-C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)途径缓解糖尿病^[16]。所以内质网应激与糖尿病的发生存在着密切联系。

已有研究表明, 白藜芦醇可以缓解糖尿病的症状, 但其和内质网应激之间的关系还不是很清楚。而我们当前的研究发现, 白藜芦醇可以缓解糖尿病小鼠胰腺的内质网应激, 对损伤的胰岛具有一定的修复作用, 使小鼠体内胰岛素的分泌增加, 进而缓解糖尿病症状。总而言之, 我们的研究为将来白藜芦醇在糖尿病临床治疗中的应用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验小鼠为昆明白色小鼠品系SCXK(川)2018-026, 雄性, 10周龄, 25~30 g。实验小鼠购自第四军医大学。

1.2 试剂及仪器

STZ(Sigma-Aldrich, 0130)购自北京市博爱港科贸有限责任公司; 白藜芦醇(R5010)、Hochest33342购自Sigma公司; Trizol(9753A)购自TaKaRa公司; 反转录试剂盒(K1622)购自Thermo Scientific公司; Real Time PCR试剂盒(BSB03L1)购自Bioer公司; anti-insulin(05-1007)购自Millipore公司; RIPA裂解液(P0013B)购自上海碧云天生物技术有限公司; BCA蛋白浓度试剂盒(JC-PD002)购自西安晶彩生物科技有限公司; 二抗(anti-Rabbit)购自上海碧云天生物技术有限公司; anti-Grp78 Rabbit pAb购自沈阳万类生物科技有限公司; anti- β -actin mouse pAb购自北京博奥森生物技术有限公司; anti-Glut-2 Rabbit pAb购自沈阳万类生物科技有限公司; 二抗m488购自ZSGB-BIO公司。

1.3 STZ造模及给药方法

将STZ粉剂避光溶于pH4.2~4.5的柠檬酸钠和柠檬酸混合液中, 选择体质量为25~35 g的雄性小鼠, 购买后正常饲养2周, 以使小鼠适应新的环境, 禁食12 h

后,按照0.15 mg/g的剂量进行腹腔注射,注射30 min后喂食,连续注射2天。2周后进行血糖测试,空腹血糖>10单位视为造模成功。将造模成功的小鼠随机分为3组:0 μmol 白藜芦醇组(DD)、10 μmol 白藜芦醇组(DR-10)、100 μmol 白藜芦醇组(DR-100),用DMSO溶解白藜芦醇,每天在固定时间给药,连续给药3周。同时以正常未造模雄性小鼠作为对照组。所有动物实验方案均严格按照《实验动物的护理和使用指南》(中华人民共和国科学技术部,第2006398号政策)的道德标准执行,并已通过西北农林科技大学伦理委员会审查与批准。

1.4 血糖和胰岛素的测定

每周检测小鼠的血糖,观察小鼠血糖的变化。测定血糖之前禁食12 h,尾静脉采血,用怡成血糖仪和血糖试纸进行血糖测试。将小鼠脱颈处理后,进行心脏采血,血液于4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜,取上清,送往陕西杨凌示范区医院进行胰岛素测定。

1.5 实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

采用qRT-PCR检测相关基因的表达情况。PCR反应液体系(15 μL)如下:2 $\times$ SYBR Mix(with 4.0 mmol Mg^{2+}), 7.5 μL ; PCR forward primer (10 μmol), 0.3 μL ; PCR reverse primer (10 μmol), 0.3 μL ; Taq DNA polymerase, 0.1 μL ; ddH₂O, 5.6 μL ; cDNA 模板, 1.2 μL 。反应程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40个循环。荧光采集信号设置在72 $^{\circ}\text{C}$ 。引物序列见表1。

1.6 Western blot

将采集的小鼠胰腺在液氮中研磨,研磨后加入适

量的RIPA裂解液,加入1/5体积的5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,于100 $^{\circ}\text{C}$ 加热10 min。并利用BCA蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度。配制12%的SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis),每孔加入30 μg 蛋白,恒压(80 v) 90 min。利用湿转膜法将蛋白转到0.22 μm 的PVDF膜上,恒流(200 mA) 150 min。用8%脱脂奶粉室温封闭3 h,一抗(anti-Grp78 Rabbit pAb, 1:500; anti- β -actin mouse pAb, 1:1 000; anti-Glut-2 Rabbit pAb, 1:500)于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用TBST(Tris-buffered saline with Tween 20)洗3次,每次10 min。二抗(anti-Rabbit, 1:3 000)于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。TBST洗3次,利用Tanon-4200曝光成像。

1.7 石蜡切片的免疫荧光染色

采集小鼠胰腺末端,用4%多聚甲醛于4 $^{\circ}\text{C}$ 固定24 h,进行石蜡包埋、切片后,于60 $^{\circ}\text{C}$ 烘片5 h,用二甲苯脱蜡15 min,期间适度振荡,用二甲苯II脱蜡10 min,随后进行酒精复水,用100%的酒精处理5 min,95%的酒精处理5 min,75%的酒精处理5 min,在摇床上使用蒸馏水清洗2 min,洗2次。切片置于柠檬酸钠抗原修复液中,中火加热10 min至微沸,自然冷却30 min,用PBS(phosphate buffer saline)浸洗2 min,共浸洗2次。向切片上滴加BSA,于37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中封闭1 h。将anti-insulin按1:100稀释,滴加适量的抗体,于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用PBS浸洗3次,每次5 min。随后滴加二抗(m488, 1:500),于室温湿盒中孵育1 h。滴加Hoechst33342,于室温孵育5 min,浸洗2次,每次5 min。最后用指甲油进行封片,并在短时间内用荧光显微镜进行拍照。

1.8 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色

石蜡切片酒精复水后,用蒸馏水洗2 min, Harris

表1 qRT-PCR的引物序列
Table 1 The primer sequences used for qRT-PCR

基因 Gene	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
<i>C-Myc</i>	CCT AGT GCT GCA TGA GGA GA	TCT TCC TCA TCT TCT TGC TCT TC
<i>Caspase 3</i>	ATG GAG AAC AAC AAA ACC TCA GT	TTG CTC CCA TGT ATG GTC TTT AC
<i>PDX1</i>	GAG AGC CGT CCC TAC TAC TTC	GTT CTC TAC TGG GGG CGT TTC
<i>Bcl-2</i>	GTC GCT ACC GTC GTG ACT TC	CAG ACA TGC ACC TAC CCA GC
<i>β-actin</i>	GAT TCT GGC GAT GGT GTA ACT CA	AGA TTC CAT ACC AAT GAA AGA GGG
<i>Insulin</i>	CGA GGC TTC TTC TAC ACA CC	GAG GGA GCA GAT GCT GGT
<i>Grp78</i>	AGA AAC TCC GGC GTG AGG TAG A	TTC CTG GAC AGG CTT CAT GGT AG
<i>CHOP</i>	AGC TGG AAG CCT GGT ATG AGG A	AGC TAG GGA CGC AGG GTC AA
<i>Glucagon</i>	CCA CTC ACA GGG CAC ATT CA	GTC CCT GGT GGC AAG ATT GT

苏木素染色15 min, 蒸馏水洗2次, 每次5 min, 用1%的盐酸酒精分化30 s, 蒸馏水浸洗2次, 每次5 min, 洗涤蓝化。用1%的伊红水溶液染色10 min, 蒸馏水浸洗2次, 每次2 min。随后, 进行酒精脱水, 用75%的酒精处理1 min, 95%的酒精处理1 min, 100%的酒精处理1 min。用二甲苯I处理10 min, 二甲苯II处理10 min。最后用中性树胶进行封片。

1.9 数据统计

每次样本量 ≥ 3 , 运用GraphPad Prism 6.0进行数据分析, 数据采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。显著检验方法采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

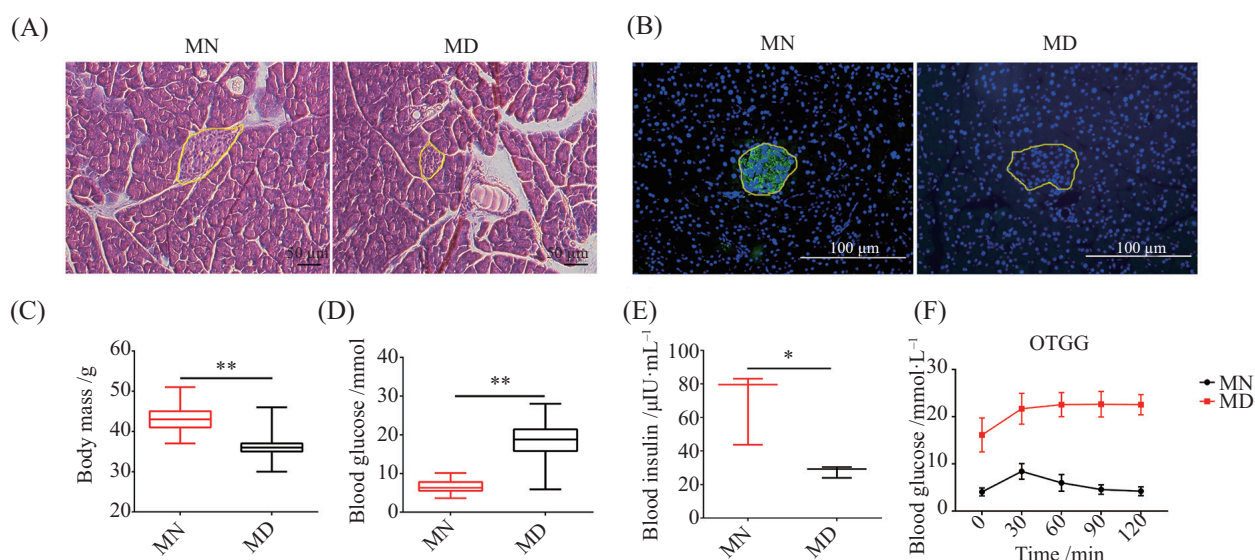
2.1 白藜芦醇对糖尿病小鼠体质量、血糖和胰岛素分泌量的影响

注射STZ 2周后, 糖尿病小鼠的血糖水平均在11 mmol以上, 高于正常血糖水平4.5~7.0 mmol, 且出现多饮、多食、多尿和体质量减少的“三多一少”症状。通过对小鼠的胰腺组织石蜡切片进行HE染色发现, 胰岛细胞出现细胞核肿大、胰岛缩小等现象(图1A)。胰岛素免疫荧光染色发现, STZ处理后, 胰

岛素阳性细胞减少, 甚至消失(图1B)。通过对小鼠血清进行胰岛素测定发现, 血清胰岛素含量以及体质量显著降低, 血糖含量显著提高(图1C~1E); 通过糖耐受实验发现, 造模组小鼠葡萄糖代谢水平出现异常(图1F)。腹腔注射白藜芦醇3周后, DR-10、DR-100 2组与DD组相比, 胰岛素分泌量明显升高, 血糖水平明显降低, 但是体质量没有显著性差异(图2A~图2C)。结果表明, 白藜芦醇增加了糖尿病小鼠胰岛素的分泌量, 改善了小鼠的“三多”症状。

2.2 白藜芦醇增加了糖尿病小鼠胰腺中 β 细胞的数量

通过以上研究发现, 白藜芦醇使小鼠血清中胰岛素的分泌量增加, 并且降低了血糖的含量。由此我们推测, 白藜芦醇可能改善了小鼠的胰腺的状况, 使胰腺中分泌胰岛素的 β 细胞的数量增加。通过HE染色发现, DR-10和DR-100 2组胰岛中细胞的肿胀现象有所缓解, 胰岛的面积增大(图2D)。随后对胰腺的胰岛素进行免疫荧光染色和统计发现, DR-10和DR-100 2组的胰岛素阳性细胞率高于DD组(图2E和图2F), 说明白藜芦醇增加了胰岛中胰岛素分泌细胞的数量, 即促进了 β 细胞的再生。

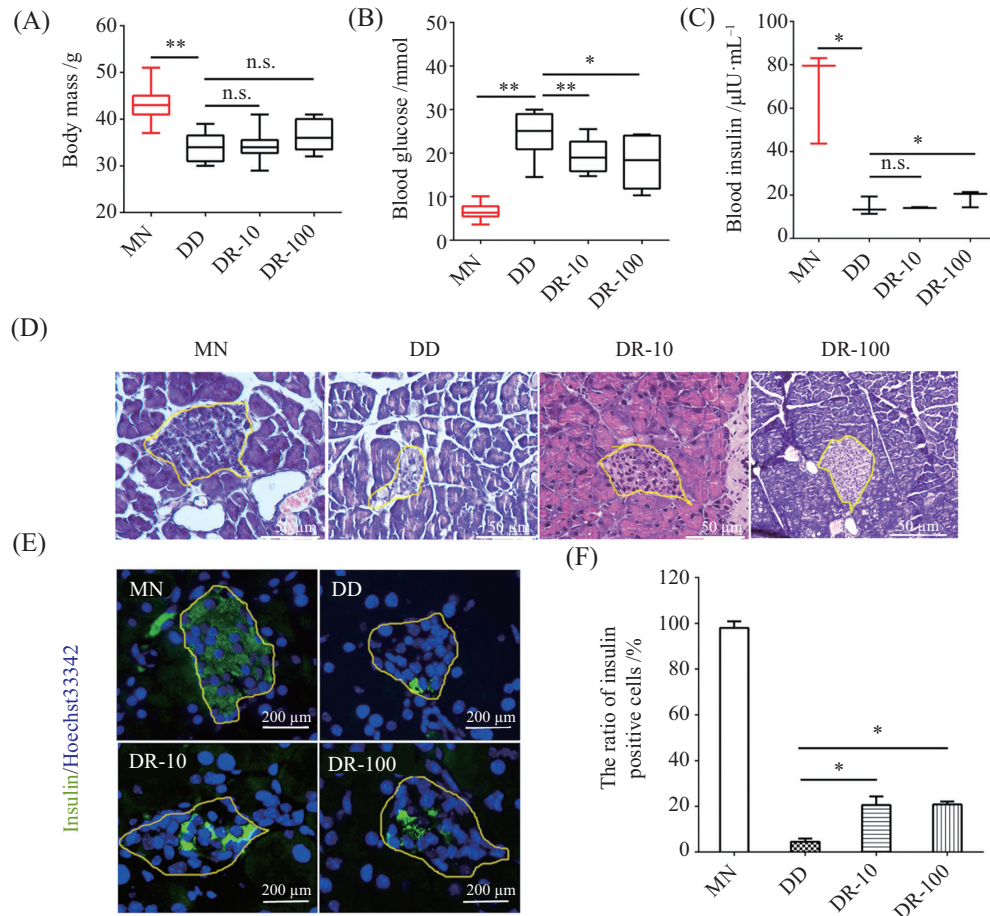


A: MN(正常小鼠)和MD(用STZ给药2周的小鼠)的胰腺组织的HE染色图像。带黄线的圆圈部分表示胰岛。B: 胰腺组织中胰岛素的免疫荧光图。带黄线的圆圈部分表示胰岛。C: MN和MD组小鼠的体质量统计, $n=30$ 。D: MN和MD组的血糖统计, $n=10$ 。E: MN和MD组的血液胰岛素统计, $n=10$ 。F: MN和MD组的葡萄糖耐量统计, $n=10$ 。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: the HE stains images of the pancreatic tissue in MN (normal mouse) and MD (mouse treated with STZ for two weeks) groups. The circled part with the yellow line indicated islets. B: the insulin immunofluorescence images of the pancreatic tissue. The circled part with the yellow line indicated islets. C: the statistics of body masses in mice of MN and MD groups, $n=30$. D: the blood glucose statistics of MN and MD groups, $n=10$. E: the blood insulin statistics of MN and MD groups, $n=10$. F: the statistics of glucose tolerance of MN and MD groups, $n=10$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图1 使用STZ诱导糖尿病小鼠模型

Fig.1 Mouse model of diabetes induced by STZ



白藜芦醇治疗3周后, MN、DD、DR-10、DR-100组的生理变化和组织学现象。A: 体质量统计, $n=10$ 。B: 血糖统计, $n=10$ 。C: 血液胰岛素统计, $n=10$ 。D: HE染色, $n=180$ 。E: 胰岛素免疫荧光染色。F: E中胰岛素阳性细胞的比例。n.s.: 无显著差异。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Physiological changes and histological phenomena in MN, DD, DR-10, DR-100 groups after three weeks of resveratrol treatment. A: the body mass statistics, $n=10$. B: the blood glucose statistics, $n=10$. C: the blood insulin statistics, $n=10$. D: HE staining, $n=180$. E: insulin immunofluorescence staining. F: the ratio of insulin-positive cells in E. n.s.: no significant difference. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图2 白藜芦醇增加了小鼠胰腺中胰岛素阳性细胞的数量

Fig.2 Resveratrol increases the number of insulin-positive cells in the mouse pancreas

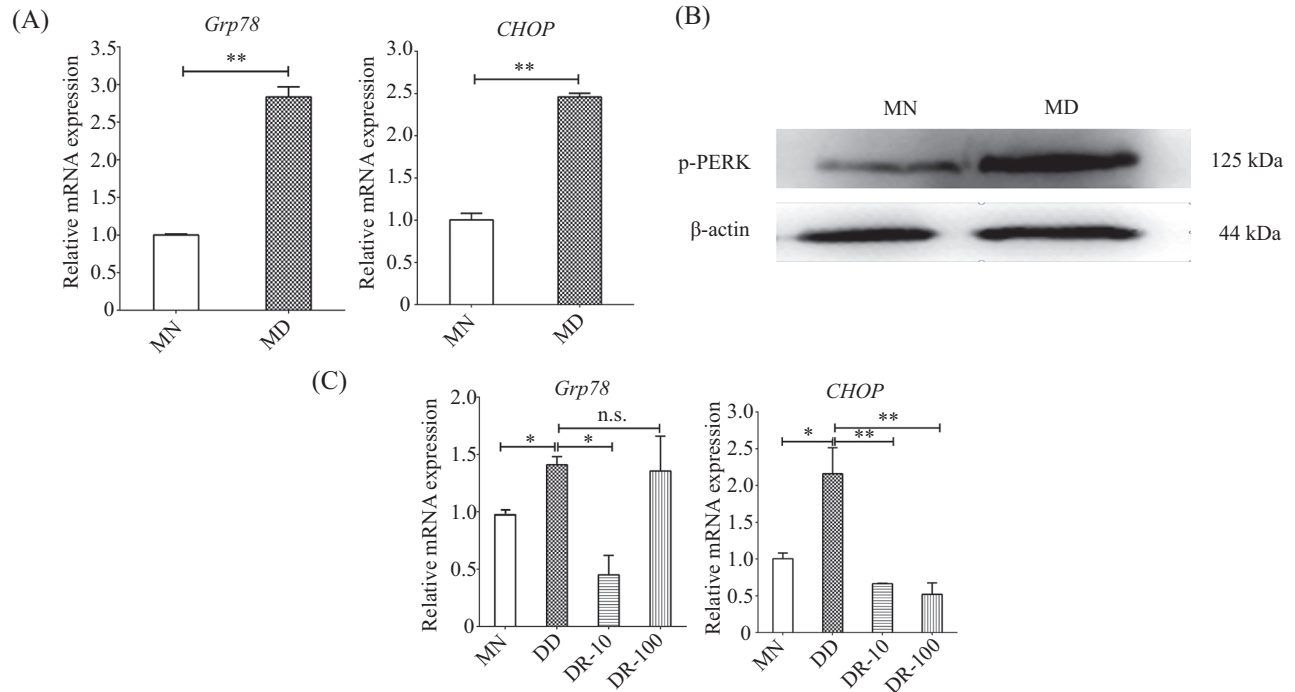
2.3 白藜芦醇通过抑制内质网应激促进β细胞的再生

通过qRT-PCR结果发现, STZ注射2周后, 小鼠胰腺中葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, Grp78)和CHOP 2个基因的表达明显升高(图3A), 说明STZ引起了小鼠胰腺的内质网应激。白藜芦醇注射3周后, Grp78、CHOP的表达显著性下调, 这表明白藜芦醇缓解了小鼠胰腺的内质网应激(图3B、图4B和图4C)。调控凋亡的基因Caspase 3的表达明显降低, 而B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)的表达明显升高; 胰-十二指肠同源框1(pancreatic and duodenal homeobox 1, PDX1)和细胞增殖相关的基因C-Myc的表达出现了明显的升高, 故白藜芦醇促进了胰腺中细胞的增殖能力; 并且, Insulin和Glu-

cagon的表达明显升高(图4A)。另外, 葡萄糖转运蛋白-2(glucose transporter-2, Glut-2)的表达也显著性的升高(图4B和图4C)。由此说明, 白藜芦醇通过缓解受损胰腺的内质网应激, 进而缓解STZ对β细胞造成的损伤, 增加了Insulin和Glucagon的表达以及对葡萄糖的转运能力。

3 讨论

糖尿病已经严重威胁到人类生命健康, 目前对糖尿病的治疗方法仅限于使用降糖药物和胰岛素注射。不断攀升的糖尿病发病率及目前使用的治疗药物的副作用使得人们寻找新型降糖药物成为必然。糖尿病患者由于胰岛素分泌不足或者胰岛素耐受而引发机体血糖代谢异常、血糖升高, 同时伴随“三多

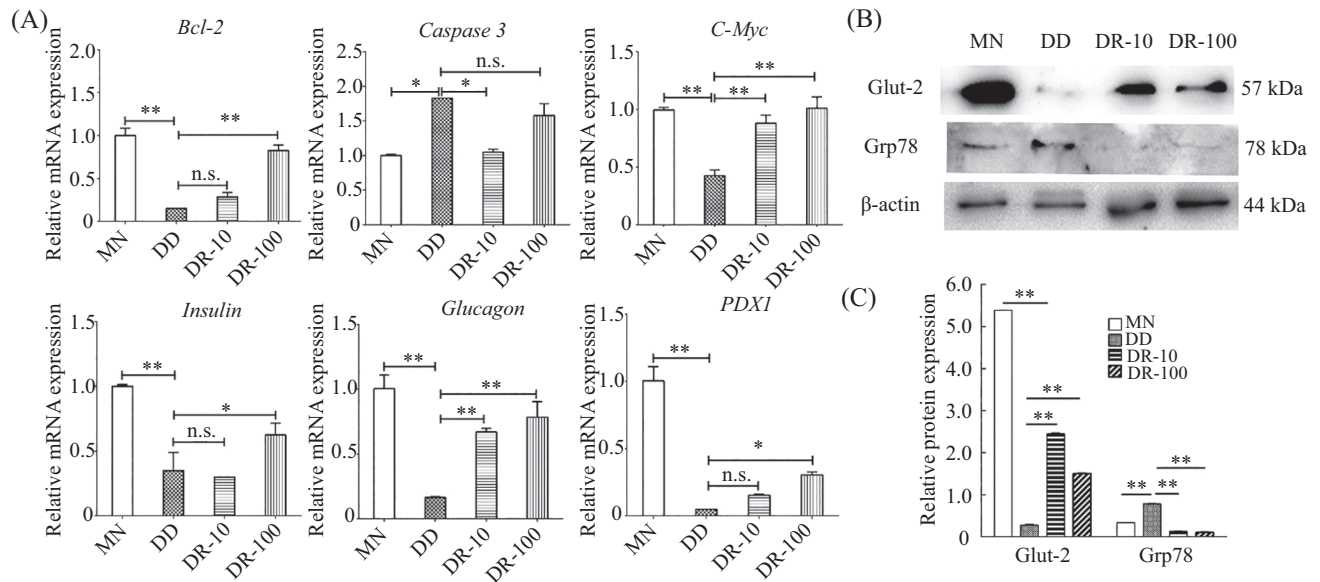


A: STZ给药2周后, qRT-PCR分析MN和MD组中*Grp78*和*CHOP*的表达。B: STZ给药2周后, Western blot分析MN和MD组中p-PERK的表达量。C: qRT-PCR分析在MN、DD、DR-10和DR-100组中*Grp78*和*CHOP*的表达。n.s.: 无显著差异。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: qRT-PCR analysis of *Grp78* and *CHOP* expression in MN and MD groups after two weeks of STZ treatment. B: Western blot analysis of p-PERK expression in MN and MD groups after two weeks of STZ treatment. C: qRT-PCR analysis of *Grp78* and *CHOP* expression of in MN, DD, DR-10 and DR-100 groups. n.s.: no significant difference. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图3 白藜芦醇降低内质网应激相关分子的表达

Fig.3 Resveratrol reduces the expression of endoplasmic reticulum stress-related molecules



A: 通过qRT-PCR检测MN、DD、DR-10、DR-100组胰腺中*Bcl-2*、*Caspase 3*、*C-Myc*、*PDX1*、胰岛素、胰高血糖素的相对mRNA水平。B: MN、DD、DR-10、DR-100组中胰腺的Grp78和Glut-2的蛋白质印迹分析。C: 图B中Grp78、Glut-2表达的相应定量结果。n.s.: 无显著差异。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: the relative mRNA levels of *Bcl-2*, *Caspase 3*, *C-Myc*, *PDX1*, *insulin*, *glucagon* were detected in pancreas of MN, DD, DR-10, DR-100 groups by qRT-PCR. B: Western blot analysis of Grp78 and Glut-2 of pancreas in MN, DD, DR-10, DR-100 groups. C: the corresponding quantification results of Grp78, Glut-2 expression in figure B. n.s.: no significant difference. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图4 白藜芦醇减轻STZ引起的小鼠胰腺内质网应激

Fig.4 Resveratrol relieved the endoplasmic reticulum stress of the mouse pancreas caused by STZ

一少”的症状,即多饮、多食、多尿和体质量减少。所以在该研究中,我们选择血糖、血清中的胰岛素和体质量作为检测指标来评价模型成功与否及白藜芦醇对糖尿病的治疗作用。

白藜芦醇是一种天然化学分子,通过缓解胰腺的氧化应激进而对糖尿病发挥一定的治疗作用。另外,白藜芦醇还通过抑制细胞的氧化应激,抑制细胞的死亡^[17]。胰岛中 β 细胞的功能损伤是糖尿病的症结所在。有研究表明,内质网应激能造成 β 细胞的凋亡,进而引发胰岛的功能损伤^[18-19]。那么,白藜芦醇在治疗糖尿病的过程中是否调控胰腺的内质网应激,这个问题目前还不清楚。Grp78被发现于20世纪80年代,作为内质网应激发生的分子伴侣,是调控内质网应激的重要蛋白^[20]。CHOP是调控内质网应激的另一种蛋白,参与调控内质网应激所诱导的细胞凋亡^[21]。我们用STZ处理小鼠,建立胰岛 β 细胞损伤模型,发现胰岛中分泌胰岛素的细胞数量减少,血清中胰岛素含量明显下降,血糖升高,小鼠体质量逐渐下降(图1)。同时发现胰腺的Grp78和CHOP的表达显著性上调(图3A),所以我们猜测,STZ引发了胰腺的内质网应激,造成胰岛内细胞发生损伤。

我们的研究表明,用白藜芦醇处理糖尿病模型小鼠后,小鼠的血糖水平有一定的下调,血清中胰岛素的含量升高(图2B和图2C)。胰岛素是由 β 细胞分泌的,所以我们推测腹腔注射白藜芦醇后,小鼠胰腺中 β 细胞的数量增加。白藜芦醇处理3周后,Grp78和CHOP的表达下调,C-Myc和Bcl-2的表达上调,Caspase 3的表达下调(图4)。其中,C-Myc是一种原癌基因,可促进细胞的增殖^[22];Bcl-2也是一种致癌基因,负调控细胞凋亡^[22];Caspase 3促进细胞的凋亡,可作为细胞凋亡的标志^[23]。以上结果说明,白藜芦醇缓解了小鼠胰腺内质网应激并抑制了胰腺内细胞的凋亡。Insulin的分泌量是评价胰腺功能的一个重要的指标,我们的研究发现,经白藜芦醇处理后,小鼠胰腺中的Insulin表达升高,并且血清中胰岛素含量升高,说明白藜芦醇增加了 β 细胞的数量。同时,通过对胰腺的免疫荧光染色发现胰岛中分泌胰岛素的细胞的阳性率升高,以此我们推测白藜芦醇增加了 β 细胞的再生能力。Glut-2是一种葡萄糖跨膜转运蛋白,位于 β 细胞的细胞膜上,感受葡萄糖的变化^[24-25]。我们发现白藜芦醇处理后,胰腺中Glut-2的表达显著升高,所以白藜芦醇增加了受损胰腺对葡萄糖的转运

能力。

综上所述,本研究通过使用不同浓度的白藜芦醇对1型糖尿病模型小鼠进行治疗,发现其可通过抑制胰腺的内质网应激促进 β 细胞的再生、抑制 β 细胞凋亡。10 μ mol和100 μ mol的处理浓度对STZ造成的胰腺损伤均具有缓解作用,但二者的效果没有明显差异,所以最优的白藜芦醇使用浓度还需要进一步探究。本研究丰富了白藜芦醇对糖尿病治疗效果及作用机制的理论依据,为临床上应用白藜芦醇治疗糖尿病奠定了理论基础。

参考文献 (References)

- [1] BONNEVIE-NIELSEN V, STEFFES M W, LERNMARK A. A major loss in islet mass and B-cell function precedes hyperglycemia in mice given multiple low doses of streptozotocin [J]. Diabetes, 1981, 30(5): 424-9.
- [2] YANG F, YU X, LI T, et al. Exogenous H₂S regulates endoplasmic reticulum-mitochondria cross-talk to inhibit apoptotic pathways in STZ-induced type I diabetes [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2017, 312(3): E190-203.
- [3] ZHANG J, WANG L, GONG D, et al. Inhibition of the SIRT1 signaling pathway exacerbates endoplasmic reticulum stress induced by renal ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic rats [J]. Mol Med Rep, 2020, 21(2): 695-704.
- [4] MALAGUARNERA M, KHAN H, CAULI O. Resveratrol in autism spectrum disorders: behavioral and molecular effects [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(3): 188.
- [5] LOU Y, WANG Z, XU Y, et al. Resveratrol prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in H9c2 cells through the inhibition of endoplasmic reticulum stress and the activation of the Sirt1 pathway [J]. Int J Mol Med, 2015, 36(3): 873-80.
- [6] FIORI J L, SHIN Y K, KIM W, et al. Resveratrol prevents β -cell dedifferentiation in nonhuman primates given a high-fat/high-sugar diet [J]. Diabetes, 2013, 62(10): 3500-13.
- [7] KU C R, LEE H J, KIM S K, et al. Resveratrol prevents streptozotocin-induced diabetes by inhibiting the apoptosis of pancreatic β -cell and the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase [J]. Endocr J, 2012, 59(2): 103-9.
- [8] CHANG C C, YANG M H, TUNG H C, et al. Resveratrol exhibits differential protective effects on fast- and slow-twitch muscles in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J Diabetes, 2014, 6(1): 60-7.
- [9] ELMARAKBY A A, SULLIVAN J C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nNephropathy [J]. Cardiovasc Ther, 2012, 30(1): 49-59.
- [10] SOUFI F G, MOHAMMAD-NEJAD D, AHMADIEH H. Resveratrol improves diabetic retinopathy possibly through oxidative stress-nuclear factor κ B-apoptosis pathway [J]. Pharmacol Rep, 2012, 64(6): 1505-14.
- [11] PALSAMY P, SUBRAMANIAN S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling [J]. Biochimica et biophysica acta, 2011, 1812(7): 719-31.

- [12] ERBAY E, BABAEV V R, MAYERS J R, et al. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis [J]. *Nat Med*, 2009, 15(12): 1383-91.
- [13] OZCAN U, CAO Q, YILMAZ E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes [J]. *Science*, 2004, 306(5695): 457-61.
- [14] AMEN O M, SARKER S D, GHILDYAL R, et al. Endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response signaling and mediates inflammation, obesity, and cardiac dysfunction: therapeutic and molecular approach [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10(1): 977.
- [15] RIEUSSET J. Mitochondria and endoplasmic reticulum: mitochondria-endoplasmic reticulum interplay in type 2 diabetes pathophysiology [J]. *Int J Biochem Cell B*, 2011, 43(9): 1257-62.
- [16] HU Y, LIU J, YUAN Y, et al. Sodium butyrate mitigates type 2 diabetes by inhibiting PERK-CHOP pathway of endoplasmic reticulum stress [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2018, 64(1): 112-21.
- [17] LI Y, CAO Z, ZHU H. Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress [J]. *Pharmacol Res*, 2006, 53(1): 6-15.
- [18] HUANG X T, LIU W, ZHOU Y, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to NMDA-induced pancreatic β -cell dysfunction in a CHOP-dependent manner [J]. *Life Sci*, 2019, 232(1): 116612.
- [19] RIAHI Y, ISRAELI T, YEROSLAVIZ R, et al. Inhibition of mTORC1 by ER stress impairs neonatal β -cell expansion and predisposes to diabetes in the mouse [J]. *Elife*, 2018, 7(1): e38472.
- [20] IBRAHIM I M, ABDELMALEK D H, ELFIKY A A. GRP78: a cell's response to stress [J]. *Life Sci*, 2019, 226(1): 156-63.
- [21] YANG Y, LIU L, NAIK I, et al. Transcription factor C/EBP homologous protein in health and diseases [J]. *Front Immunol*, 2017, 8(1): 1612.
- [22] STINE Z E, WALTON Z E, ALTMAN B J, et al. MYC, metabolism, and cancer [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(10): 1024-39.
- [23] SALVESEN G S. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows [J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9(1): 3-5.
- [24] MALAISSE W J. On the track to the beta-cell [J]. *Diabetologia*, 2001, 44(4): 393-406.
- [25] ULDRY M, IBBERSON M, HOSOKAWA M, et al. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter [J]. *Febs Letters*, 2002, 524(1/3): 199-203.