

[药 理]

翻白草水提液对大鼠胰岛细胞脂毒性损伤的保护作用

孙 洁， 马 旗， 王 璐， 胡雪剑， 杨 扬， 李 赞， 杨 燕*
(兰州大学第二医院内分泌代谢科，甘肃 兰州 730030)

摘要：目的 探讨翻白草水提液对大鼠胰岛细胞脂毒性损伤的影响。方法 棕榈酸诱导 Wistar 大鼠原代胰岛细胞凋亡模型后，FDA/PI 双染和流式法检测细胞凋亡，ELISA 法测定 GSIS 水平，qPCR 检测 *FAS*、*CPT-1* mRNA 表达，Western blot 检测 AMPK 蛋白表达，硫代巴比妥酸法测定细胞内丙二醛（MDA）活性，分光光度计法测定细胞还原型谷胱甘肽（GSH）活性。**结果** 与对照组比较，棕榈酸组 GSH 活性、*CPT-1* mRNA 表达、p-AMPK 蛋白表达显著降低，MDA 含量、*FAS* mRNA 表达显著增加（ $P<0.05$ ），而翻白草水提液+棕榈酸能明显逆转棕榈酸组上述作用。与翻白草水提液+棕榈酸组比较，BML-275（AMPK 选择性抑制剂）组 GSH 活性、*CPT-1* mRNA 表达显著降低，MDA 活性、*FAS* mRNA 表达显著增加（ $P<0.05$ ）。**结论** 翻白草水提液可能通过激活 AMPK，抑制脂肪酸合成，促进脂肪酸 β 氧化，从而抑制氧化应激所致胰岛细胞脂性凋亡，最终改善胰岛素分泌功能。

关键词：翻白草；水提液；胰岛细胞；脂性凋亡；AMPK；氧化应激

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2019)06-1242-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.06.009

Protective effects of aqueous extract of *Potentillae discoloris Herba* on lipotoxic rat islet cells

SUN Jie, MA Qi, WANG Lu, HU Xue-jian, YANG Yang, LI Yun, YANG Yan*
(Department of Endocrinology, the Second Hospital Affiliated to Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore the effects of aqueous extract of *Potentillae discoloris Herba* on lipotoxic rat islet cells. **METHODS** After palmitic acid-induced apoptosis of primary islet cells in Wistar rats, FDA/PI double staining and flow cytometry were used to detect cell apoptosis. GSIS level was determined by ELISA. *FAS* and *CPT-1* mRNA expressions were detected by qPCR. Western blot was adopted in the protein expression detection of AMPK. Intracellular malondialdehyde (MDA) activity was detected by thiobarbituric acid method, and the determination of cellular reduced glutathione (GSH) activity was performed by spectrophotometry. **RESULTS** Compared with control group, palmitic acid group demonstrated significantly decreased GSH activity, *CPT-1* mRNA expression and p-AMPK protein expression, and significantly increased MDA content and *FAS* mRNA expression ($P<0.05$), while aqueous extract of *Potentillae discoloris Herba*+palmitic acid group shared obviously reversed aforementioned indices. Compared with the aqueous extract of *Potentillae discoloris Herba*+palmitic acid group, BML-275 (AMPK selective inhibitor) group displayed significantly reduced GSH activity and *CPT-1* mRNA expression, and significantly increased MDA activity and *FAS* mRNA expression ($P<0.05$). **CONCLUSION** Aqueous extract of *Potentillae discoloris Herba* suggests its activity in inhibition of ischemic stress-induced islet cell lipid apoptosis by activating AMPK to inhibit the synthesis of fatty acids and promote the oxidation of fatty acid β , and thus achieves improvement in insulin secretion.

KEY WORDS: *Potentillae discoloris Herba*; aqueous extract; islet cells; lipid apoptosis; AMPK; oxidative stress

收稿日期：2018-08-01
基金项目：甘肃省自然科学基金（1606RJZA128）
作者简介：孙 洁（1985—），女，硕士，主治医师，从事糖尿病及其并发症研究。E-mail: seeyouin2008@163.com
* 通信作者：杨 燕（1978—），女，博士，副主任医师，从事糖尿病及并发症机制研究。E-mail: yanzi2004099@sina.com

以高血糖为标志的糖尿病是重要慢性病之一，迄今高血糖发生机制基本环节中胰岛β细胞衰竭仍是主要因素，而β细胞凋亡在其功能衰竭的发生中起着决定性作用^[1-2]。研究表明，β细胞长期暴露在高游离脂肪酸环境中可激活其线粒体氧化应激途径，诱导细胞脂性凋亡，胰岛素合成和分泌减少，从而导致β细胞功能衰退^[3-4]。

翻白草为蔷薇科委陵菜属植物翻白草 *Potentilla discolor* Bge. 的带根全草，具有降糖、降脂等多种生物活性，但其具体作用机制尚不明确，目前鲜有关注它对胰岛细胞功能的直接影响。黄酮、萜类作为翻白草的主要活性成分，具有抗氧化应激作用^[5]，由此假设翻白草可通过抗氧化作用减轻胰岛细胞脂性凋亡，从而改善胰岛素分泌功能。本实验采用体外培养的 Wistar 大鼠原代胰岛细胞，棕榈酸处理以建立脂毒性损伤细胞凋亡模型，并用翻白草水提液作为干预因素，旨在探讨该药材对胰岛细胞脂毒性损伤的影响。

1 材料

1.1 动物 2月龄健康雄性清洁级 Wistar 大鼠 30只，购自兰州大学实验动物中心，实验动物生产许可证号 SCXK（甘）2017-0003。

1.2 试剂 翻白草采于甘肃省定西市，经甘肃中医药大学药学院专家鉴定为正品。AnnexinV-FITC 试剂盒，购自南京凯基公司；胶原酶 P，购自瑞士 Roche 公司；大鼠胰岛素 ELISA 试剂盒，购自美国 R&D 公司；Ficoll 400，购自美国 Pharmacia 公司；棕榈酸、牛血清白蛋白（BSA），购自美国 Sigma 公司；BML-275（AMPK 选择性抑制剂），购自美国 Santa Cruz 公司；兔抗 AMPK（Thr-172）抗体、鼠抗胰岛素抗体，购自美国 CST 公司；qPCR 试剂盒，购自日本 TaKaRa 公司；还原型谷胱甘肽（GSH）、丙二醛（MDA）试剂盒，购自南京建成生物研究所。

1.3 仪器 FACSCalibur 流式细胞仪（美国 BD 公司）；全自动激光共聚焦显微镜（日本 Olympus 公司）；凝胶成像系统、实时定量 PCR 系统（美国 Bio-Rad 公司）。

2 方法

2.1 翻白草水提液制备^[5] 将全草烘干粉碎，加水煎煮 3 次，加水量分别为生药体积的 10、10、8 倍量，煎煮时间分别为 1.5 h、1.5 h、40 min，过滤，合并滤液，蒸发浓缩，70℃真空干燥，粉碎，过 80 目筛，1 g 提取物相当于生药 6 g。称定提取

物 62.5 mg，溶于 5 mL DMSO 中，配制成 12.5 g/L 的母液，实验时吸取 16 μL 母液加到 2 mL 培养基中，配成 10 mg/L 含药培养基。

2.2 胰岛分离和纯化 大鼠以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉，消毒后从下腹作 V 型切口，胆总管插管，破心放血后，经胆总管逆行注入胶原酶 P 溶液，摘除完整胰腺，37℃水浴消化 11 min，Hank's 液终止消化，沉淀物加 4 mL 25% Ficoll 混匀，再加入 23%、20%、11% Ficoll 液和 Hank's 液各 2 mL，1 900 r/min 离心 25 min，收集 23%→20%、20%→11% 界面上细胞层，纯化的胰岛悬液接种于 RPMI 1640 培养液，细胞铺展贴壁后进行分组培养。

2.3 胰岛染色 将胰岛制备物与双硫脲混合后孵育 10 min，倒置显微镜下计数双硫脲细胞团数（胰岛细胞为猩红色，非胰岛细胞不着色）。

2.4 分组 ①对照组，培养在 0.5% BSA 中；②棕榈酸组，剂量 0.5 mmol/L；③翻白草水提液+棕榈酸组，剂量分别为 10 mg/L、0.5 mmol/L，共同孵育；④BML-275 组，含 0.5 mmol/L 棕榈酸+10 mg/L 翻白草水提液+10 μmol/L BML-275，BML-275 预处理胰岛细胞 1 h 后再与翻白草水提液、棕榈酸共同孵育。胰岛细胞均孵育 24 h。

2.5 FDA/PI 荧光双染 双醋酸荧光素（FDA）可侵入活细胞发出绿色荧光，而活细胞对 PI 染料拒染，PI 与死亡细胞的核酸结合，发出红色荧光。吸尽 6 孔板中旧培养基，取适量 FDA/PI 荧光染液，与胰岛制备物混合 5~10 min，在共聚焦显微镜下检测。

2.6 细胞凋亡率检测 胰岛以 0.05% 胰酶-EDTA 消化分散成单细胞悬液后，接种于 6 孔板，待细胞贴壁生长稳定后按“2.4”项下不同干预措施孵育 24 h。收集细胞，多次离心、洗涤后依次加入 10 μL FITC 标记的 AnnexinV，轻轻混匀，避光 15 min 后再加入 300 μL Binding Buffer 和 5 μL 碘化丙啶（PI），避光反应 5 min 后上机检测。

2.7 胰岛素分泌功能检测 计数大鼠胰岛，换算为相当于直径 150 μm 的胰岛当量（IEQ），于 15 cm 培养皿中接种 30 IEQ/皿。干预 24 h 后，每组收集 15 个胰岛，PBS 洗涤，加入含 3.0 mmol/L 葡萄糖 KRBH 培养液缓冲 30 min 后，分别在含 3.0 mmol/L（低糖）、20 mmol/L（高糖）葡萄糖的 KRBH 培养液中培养 1 h，上清液与-20℃冰箱中保存，ELISA 检测基础胰岛素分泌（BIS）、葡

葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (GSIS), 计算刺激指数 (SI), 公式为 $SI = BIS / GSIS$ 。

2.8 免疫荧光检测 胰岛细胞接种于载玻片上, 相应干预后 4% 多聚甲醛固定, 封闭后, 兔抗 AMPK (腺苷酸激活的蛋白激酶) 抗体和鼠抗胰岛素抗体过夜孵育, DAPI 染色, 封片, 激光共聚焦下观察。

2.9 实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测 Trizol 裂解后抽提细胞总 RNA, 逆转录生成 cDNA, qPCR 检测目的基因 mRNA 表达水平, 以 β -actin 为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算其相对表达量。引物序列如表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列
FAS	正向 5'-CTAGGTTTGATGCCTCCTTCTT-3'
	反向 5'-GATGGCTTCATAGTGACTTCC-3'
CPT-1	正向 5'-TATGGTCAAGTCCTCTCAGGT-3'
	反向 5'-GAAGACGAATGGGTTTGAGTTC-3'
β -actin	正向 5'-GATCGGCGGCTCCATCCTG-3'
	反向 5'-GACTCGTCATACTCCTGCTTGC-3'

2.10 蛋白免疫印迹检测 抽提总蛋白, 测定蛋白量后常规 SDS-PAGE 电泳转膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 依次加入稀释的相应一抗、二抗反应, 并依次洗脱, ECL 显影曝光, Quantity One 软件进行图像灰度值分析, 以条带灰度值之比计算目的蛋白相对表达量。

2.11 氧化应激指标检测 收集各处理组胰岛细胞, 硫代巴比妥酸法检测丙二醛 (MDA) 活性, 分光光度计法检测还原型谷胱甘肽 (GSH) 活性, 具体操作步骤按试剂盒说明书进行。

2.12 统计分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理, 数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两样本均数比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

3 结果

3.1 胰岛分离及胰岛 β 细胞原代培养 纯化的大

鼠胰岛细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中 18~24 h, 可见贴壁生长。图 1 显示, DTZ 染色后大鼠胰岛呈现细胞团样结构, 猩红色, 圆形或椭圆形, 包膜不明显, 折光性较强, 直径 50~300 μm 不等, 而其他外分泌细胞、成纤维细胞未见红染。本实验分离大鼠胰岛细胞纯度为 $(89.23 \pm 2.9)\%$, 每只可分离 (823 ± 24) 个胰岛, 细胞存活率在 $(93.1 \pm 3.1)\%$ 以上。

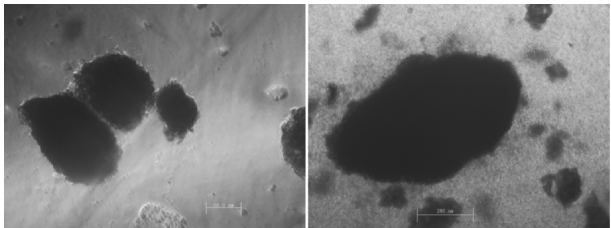
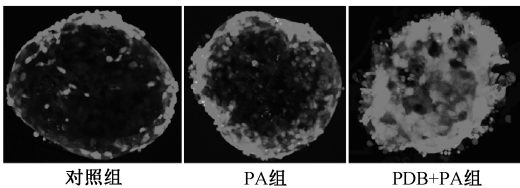


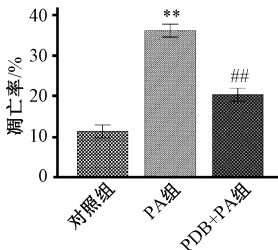
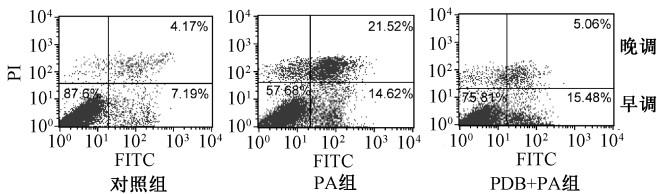
图 1 大鼠胰岛 DTZ 染色
Fig. 1 DTZ staining of rat islets

3.2 翻白草水提液对棕榈酸诱导胰岛细胞凋亡的抑制作用 FDA/PI 双染后共聚焦显微镜 (图 2) 显示, 对照组很少见到死亡细胞; 棕榈酸组红色荧光的死亡细胞, 明显多于对照组; 翻白草水提液干预后死亡细胞明显少于棕榈酸组, 细胞存活率明显更高。AnnexinV/PI 双染流式细胞术 (图 3) 显示, 对照组细胞凋亡率为 $(11.35 \pm 0.80)\%$; 棕榈酸持续作用于胰岛细胞 24 h 后, 凋亡率显著升高 $[(36.35 \pm 1.55)\%, P < 0.01]$; 翻白草水提物+棕榈酸组细胞凋亡率显著降低 $[(20.47 \pm 0.84)\%, P < 0.01]$ 。



注: PA 为棕榈酸, PDB 为翻白草水提液
图 2 大鼠胰岛细胞 FDA/PI 双染

Fig. 2 FDA/PI double staining of rat islet cells

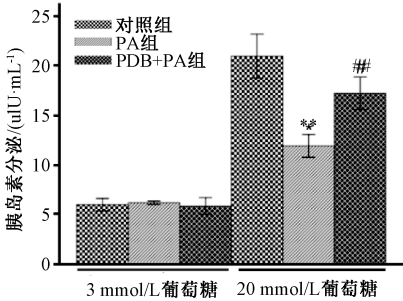


注: PA 为棕榈酸, PDB 为翻白草水提液。与对照组比较, $**P < 0.01$; 与棕榈酸组比较, $##P < 0.01$

图 3 翻白草水提液对大鼠胰岛细胞脂毒性凋亡的影响

Fig. 3 Effect of aqueous extract of *Potentillae discoloris* Herba on lipotoxicity-induced apoptosis of rat islet cells

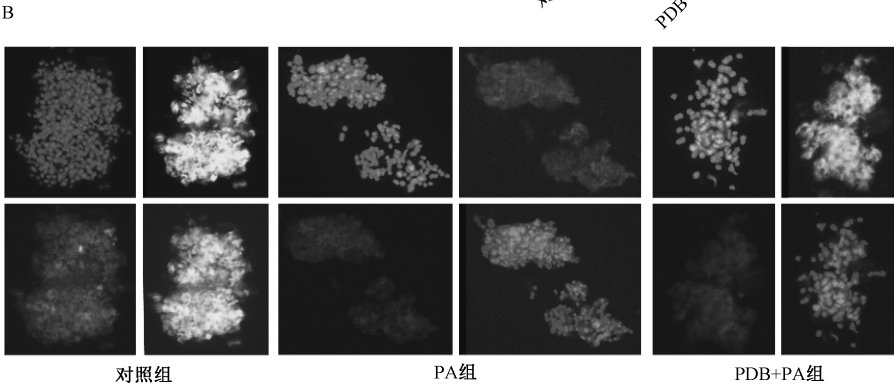
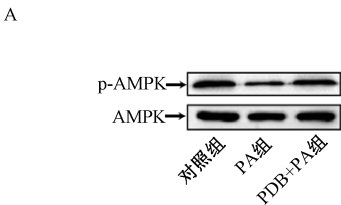
3.3 翻白草水提液对 GSIS 的影响 低糖、高糖溶液中胰岛素分泌量分别为 (5.97±0.31)、(21.03±1.11) μIU/mL, SI 为 3.52, 表明正常情况下胰岛β细胞分泌功能良好。图 4 显示, 与对照组比较, 棕榈酸组胰岛细胞 GSIS 显著减少 [棕榈酸组 (11.62±0.58) μIU/mL, 对照组 (21.03±1.11) μIU/mL, $P<0.01$]; 与棕榈酸组比较, 翻白草水提物+棕榈酸组 GSIS 显著增加 [翻白草水提物+棕榈酸组 (17.28±0.86) μIU/mL, 棕榈酸组 (11.62±0.58) μIU/mL, $P<0.01$]。



注: PA 为棕榈酸, PDB 为翻白草水提液。与对照组比较, ** $P<0.01$; 与棕榈酸组比较, ## $P<0.01$

图 4 翻白草水提液对 GSIS 的影响
Fig. 4 Effect of aqueous extract of *Potentillae discoloris* Herba on GSIS

3.4 翻白草水提液对 FAS、CPT-1、AMPK 表达的



注: 图 5A 为免疫印迹法, 图 5B 为双重免疫荧光染色。PA 为棕榈酸, PDB 为翻白草水提液。与对照组比较, * $P<0.05$; 与棕榈酸组比较, # $P<0.05$

图 5 翻白草水提液对 p-AMPK 蛋白表达的影响
Fig. 5 Effect of aqueous extract of *Potentillae discoloris* Herba on p-AMPK protein expression

影响 表 2、图 5A 显示, 与对照组比较, 棕榈酸组 FAS mRNA 表达显著升高, CPT-1 mRNA、p-AMPK 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$); 与棕榈酸组比较, 翻白草水提物+棕榈酸组中 FAS mRNA 表达显著下降, CPT-1 mRNA 表达、p-AMPK 表达显著升高 ($P<0.05$)。图 5B 显示, 棕榈酸处理后 p-AMPK 免疫荧光强度较对照组明显减弱; 与棕榈酸组比较, 翻白草水提物+棕榈酸组其荧光染色明显增强。

表 2 翻白草水提液对 FAS、CPT-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=30$)

Tab. 2 Effects of aqueous extract of *Potentillae discoloris* Herba on FAS and CPT-1 mRNA expressions ($\bar{x}\pm s$, $n=30$)

组别	FAS	CPT-1
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00
棕榈酸组	2.51±0.05 *	0.50±0.05 *
翻白草水提物+棕榈酸组	1.72±0.35 #	0.80±0.08 #

注: 与对照组比较, * $P<0.05$; 与棕榈酸组比较, # $P<0.05$

3.5 翻白草水提液对 GSH、MDA 水平的影响 表 3 显示, 与对照组比较, 棕榈酸组 GSH 水平显著降低, MDA 水平显著升高 ($P<0.05$); 与棕榈酸组比较, 翻白草水提物+棕榈酸组前者水平显著升高, 后者水平显著降低 ($P<0.05$)。

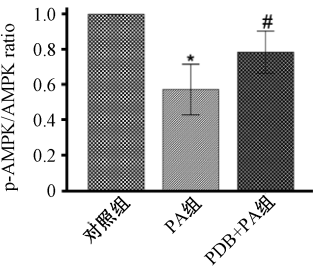


表 3 翻白草水提液对 GSH、MDA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=30$)

Tab. 3 Effects of aqueous extract of *Potentillae discoloris* Herba on GSH and MDA levels ($\bar{x}\pm s$, $n=30$)

组别	GSH/	MDA/
	($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	($\text{nmol}\cdot\text{mg prot}^{-1}$)
对照组	208.5 $\pm$ 10.63	0.75 $\pm$ 0.13
棕榈酸组	151.0 $\pm$ 10.39 [*]	2.20 $\pm$ 0.22 [*]
翻白草水提物+棕榈酸组	179.8 $\pm$ 11.03 [#]	1.37 $\pm$ 0.12 [#]

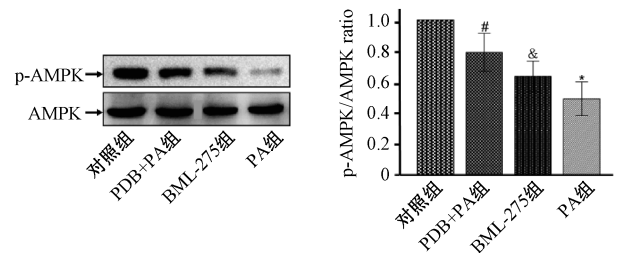
注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与棕榈酸组比较,[#] $P<0.05$

表 4 BML-275 对 FAS、CPT-1 mRNA 表达及 GSH、MDA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=30$)

Tab. 4 Effects of BML-275 on FAS, CPT-1 mRNA expressions and GSH, MDA levels ($\bar{x}\pm s$, $n=30$)

组别	FAS	CPT-1	GSH/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	MDA/($\text{nmol}\cdot\text{mg prot}^{-1}$)
对照组	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	212.5 $\pm$ 14.60	0.65 $\pm$ 0.12
棕榈酸组	2.62 $\pm$ 0.04 [*]	0.48 $\pm$ 0.07 [*]	145.5 $\pm$ 12.48 [*]	2.07 $\pm$ 0.14 [*]
翻白草水提物+棕榈酸组	1.74 $\pm$ 0.05 [#]	0.83 $\pm$ 0.03 [#]	187.3 $\pm$ 9.21 [#]	1.34 $\pm$ 0.11 [#]
BML-275 组	2.02 $\pm$ 0.10 ^{&}	0.66 $\pm$ 0.06 ^{&}	162.6 $\pm$ 5.98 ^{&}	1.70 $\pm$ 0.10 ^{&}

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与棕榈酸组比较,[#] $P<0.05$;与翻白草水提物+棕榈酸组比较,[&] $P<0.05$



注:PA 为棕榈酸,PDB 为翻白草水提液。与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与棕榈酸组比较,[#] $P<0.05$;与翻白草水提物+棕榈酸组比较,[&] $P<0.05$

图 6 BML-275 对 p-AMPK 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of BML-275 on p-AMPK protein expression

4 讨论

游离脂肪酸长期升高可使胰岛 β 细胞凋亡、数量减少、功能衰竭,称为“脂性凋亡”。本实验采用胰岛原代细胞培养、FDA/PI 双染、AnnexinV/PI 双染流式定量方法,观察棕榈酸对胰岛细胞凋亡的影响,发现该成分可诱导胰岛细胞凋亡,降低细胞存活率,然后检测大鼠胰岛细胞 BIS/GSIS 水平,发现它对胰岛细胞 BIS 水平无显著影响,但能抑制 GSIS 水平,表明它损伤了 β 细胞分泌功能。GSIS 损害是 2 型糖尿病早期特征之一,由于脂肪酸诱导 β 细胞死亡、数量减少及其导致的胰岛素分泌功能受损,至少有一部分归因于脂毒性凋亡,故推测防止 β 细胞脂性凋亡可能有益于预防或治疗 T2DM。

萜类、黄酮是翻白草主要化学成分,其中后者能有效地调节糖脂代谢^[6-9],但其具体降糖机制尚未阐明。韩永明等^[10]报道,翻白草能有效保护胰

3.6 BML-275 对 FAS、CPT-1、AMPK 表达及 GSH、MDA 水平的影响 BML-275 预处理胰岛细胞 1 h 后,再加入翻白草水提液和棕榈酸共同孵育 24 h,结果见表 4、图 6。由此可知,与翻白草水提物+棕榈酸组比较,BML-275 组 CPT-1 mRNA 表达、p-AMPK 蛋白表达、GSH 水平显著降低,FAS mRNA 表达、MDA 水平显著升高 ($P<0.05$)。

岛 β 细胞;邹志坚等^[11]通过大鼠腹腔注射四氧嘧啶建立糖尿病模型,分为高、中、低 3 个剂量组,连续给予黄酮提取物 14 d 后发现,胸腺指数、超氧化物歧化酶活性明显上升,血清丙二醛水平明显下降,表明该成分对糖尿病大鼠有治疗作用,可能是通过提高抗氧化能力和增强免疫力来实现的;本实验发现,翻白草水提液处理后胰岛细胞凋亡率较棕榈酸明显下降,而细胞存活率、GSIS 明显升高,表明它可抑制胰岛细胞脂性凋亡,改善 β 细胞已受损的分泌功能。胰岛细胞中抗氧化酶水平很低,易受氧化应激损伤,而长期暴露在高游离脂肪酸环境下可使线粒体活性氧簇生成增加,氧化应激激活,线粒体功能发生障碍,诱导细胞凋亡,从而损害 β 细胞的合成与分泌功能,故氧化应激毒性是导致胰岛细胞脂性凋亡的直接原因^[12]。本实验发现,棕榈酸处理后胰岛细胞内脂质过氧化产物 MDA 水平明显升高,非酶性抗氧化物 GSH 水平明显降低,提示游离脂肪酸的负载引起胰岛细胞氧化与抗氧化系统失衡,导致胰岛细胞氧化应激;翻白草水提液干预后可降低胰岛细胞 MDA 水平,升高 GSH 水平,表明它可缓解游离脂肪酸诱导的胰岛细胞氧化应激反应。

AMPK 是细胞内的能量和代谢感受器,由 α 、 β 、 γ 三个亚单位构成的三聚体,前者 α 亚基是 AMPK 的主要催化亚基,当其 (Thr172 位点) 磷酸化后可激活 AMPK,从而参与调节细胞内糖、脂肪酸和能量代谢^[13],而 AMPK 对脂质代谢的影响是通过抑制乙酰辅酶 A 羧化酶、FAS 等脂肪酶的

活性抑制脂肪合成,同时增加 CPT-1 活性以促进脂肪酸氧化^[14]。本实验发现,棕榈酸可明显抑制胰岛细胞中 p-AMPK 蛋白表达,增加其下游靶基因 *FAS* mRNA 表达,减少 *CPT-1* mRNA 表达,表明它能抑制 AMPK 通路激活;翻白草水提液处理后,能缓解棕榈酸对 AMPK 通路的抑制作用,上调 p-AMPK 蛋白表达及其靶基因 *CPT-1* mRNA 表达,并下调了 *FAS* mRNA 表达,但 AMPK 特异性抑制剂 BML-275 则衰减了这一作用,表明翻白草水提液减轻脂毒性的作用至少有一部分依赖于其对 AMPK 通路的调节。

研究表明,AMPK 激活后可抑制 NADPH 氧化酶的胞质内亚基 p47^{phox}、p67^{phox} 表达,从而缓解高糖诱导的血管内皮细胞的氧化应激^[15],它可通过激活核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 介导的抗氧化信号通路,上调肝细胞抗氧化酶(如超氧化物歧化酶,过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶)表达,从而减轻氧化应激反应^[16];同时还能增加 NADPH 数量,减少 NADPH 消耗,减轻成骨细胞氧化应激反应,从而调节骨代谢平衡^[17]。本实验发现,BML-275 组胰岛细胞中 MDA 水平较翻白草水提物+棕榈酸组明显升高、GSH 水平明显降低,表明 AMPK 活性的抑制减缓了翻白草水提物对棕榈酸诱导胰岛细胞氧化应激反应的缓解作用。

综上所述,在脂肪酸诱导的胰岛细胞脂性损伤模型中,翻白草水提液可能通过激活 AMPK 通路,抑制脂肪酸合成,促进脂肪酸 β 氧化,减轻脂毒性,缓解细胞氧化应激反应,从而减轻细胞脂性凋亡,最终改善胰岛细胞结构和功能的损伤,这将为该药材及其有效成分治疗 2 型糖尿病提供新的理论依据。今后,将进一步观察和探索翻白草在体内的功能和调节机制,以期更有力地证实本实验结果。

参考文献:

[1] Butler E A, Janson J, Bonner-Weir S, *et al.* β -Cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2003, 52(1): 102-110.

[2] Rhodes C J. Type 2 diabetes-a matter of β -cell life and death? [J]. *Science*, 2005, 307(5708): 380-384.

[3] Maedler K, Spinas G A, Dytar D, *et al.* Distinct effects of sat-

urated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function[J]. *Diabetes*, 2001, 50(1): 69-76.

[4] Oprescu A I, Bikopoulos G, Naassan A, *et al.* Free fatty acid-induced reduction in glucose stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress *in vitro* and *in vivo*[J]. *Diabetes*, 2007, 56(12): 2927-2937.

[5] 严哲琳,董正平,孙 文,等. 翻白草水提液对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠糖脂代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 216-219.

[6] Babu P V, Liu D, Gilbert E R. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids[J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(11): 1777-1789.

[7] Zhang L, Yang J, Chen X Q, *et al.* Antidiabetic and antioxidant effects of extracts from *Potentilla discolor* Bunge on diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132(2): 518-524.

[8] 韩永明,张业辉,熊迎春,等. 中药翻白草对糖尿病大鼠血糖的影响[J]. 湖北中医学院学报, 2002, 4(1): 3, 23-24.

[9] 郭新民,崔荣军,申梅淑,等. 翻白草对 2 型糖尿病大鼠血脂代谢紊乱的影响[J]. 牡丹江医学院学报, 2005, 26(2): 4-6.

[10] 韩永明,段妍君,袁 芳,等. 翻白草对糖尿病大鼠胰岛形态结构的影响[J]. 湖北中医学院学报, 2005, 7(3): 28-29.

[11] 邹志坚,王晓敏,冯劲松,等. 翻白草黄酮对糖尿病大鼠抗氧化的作用[J]. 江西中医学院学报, 2007, 19(3): 64-65.

[12] Fariss W M, Chan B C, Patel M, *et al.* Role of mitochondria in toxic oxidative stress[J]. *Mol Interv*, 2005, 5(2): 94-111.

[13] Hardie G D. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 33: 1-7.

[14] Lee J W, Choe S S, Jang H, *et al.* AMPK activation with glabridin ameliorates adiposity and lipid dysregulation in obesity [J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(7): 1277-1286.

[15] 梁 斌,袁 松,刘艳敏,等. 二甲双胍激活 AMPK 对高糖诱发内皮细胞氧化应激的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2015, 24(4): 302-306.

[16] Wu P, Yan Y, Ma L L, *et al.* Effects of the Nrf2 modulator salvianolic acid A alone or combined with metformin on diabetes-associated macrovascular and renal injury [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(42): 22288-22301.

[17] 李 钺,谢炜星,晋大祥,等. 激活 AMPK 保护氧化应激条件下成骨细胞的作用机制[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(3): 407-410.