

栀子苷降糖作用及相关机制研究

姚冬冬^{1,2}, 舒 雯^{2*}, 杨 蕾^{1,2}, 贾晓斌², 孙 敏^{1*}

1. 安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230039

2. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

摘要: **目的** 探讨栀子苷对糖尿病小鼠的降糖作用及机制。**方法** C57BL/6J 小鼠通过一次性注射 90 mg/kg 链脲佐菌素 (STZ) 后结合 4 周喂养高脂饲料建立糖尿病小鼠模型。实验小鼠随机分为对照组、模型组、栀子苷 (100 mg/kg) 治疗组。ig 给药, 每日 1 次, 定期检测小鼠空腹血糖及体质量。治疗 30 d 后, 检测小鼠空腹血浆胰岛素和口服糖耐量 (OGTT) 变化。采用胰岛素及 Ki67 抗体对小鼠胰腺组织切片进行免疫荧光染色, 观察胰腺组织形态学的改变, 以及胰岛 β 细胞增殖情况; Western Blotting 方法检测小鼠肝脏组织中 p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达水平。**结果** 与模型组相比, 栀子苷治疗组小鼠血糖水平降低, 体质量下降, 而血浆胰岛素水平升高, OGTT 有所改善; 胰腺组织切片免疫荧光染色结果表明, 模型组小鼠胰岛结构被破坏, 而栀子苷治疗组有明显改善, 并且观察到 Ki67 表达, 表明栀子苷能够促进胰岛 β 细胞增殖; 栀子苷治疗组小鼠肝脏中 Akt、GSK-3 β 蛋白磷酸化水平较模型组均有显著上调。**结论** 栀子苷能够有效改善糖尿病模型小鼠的高血糖症状, 并增加血浆胰岛素水平, 其作用可能与促进胰岛 β 细胞增殖, 激活胰岛素受体下游 Akt 通路有关。

关键词: 栀子苷; 糖尿病; 胰岛 β 细胞; 蛋白激酶 B; 糖原合成酶激酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)08-1121-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.08.015

Hypoglycemic effect of geniposide and its relative mechanism

YAO Dong-dong^{1,2}, SHU Luan², YANG Lei^{1,2}, JIA Xiao-bin², SUN Min¹

1. College of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China

2. China Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To investigate the hypoglycemic effect of geniposide and to explore the mechanism. **Methods** The diabetic mice were induced by a single dose of 90 mg/kg streptozotocin (STZ) injection followed by four-week high-fat diets and randomly divided into three groups: normal control (con), diabetic model (diab), and geniposide (gen, 100 mg/kg) groups. Body weight and fasting blood glucose were measured during the treatment. Thirty days later, the oral glucose tolerance test (OGTT) was performed, blood samples were collected to measure insulin concentration in plasma. The morphological changes of pancreas pathology and β -cell proliferation were examined by immuno-fluorescent staining of insulin and Ki67. The phosphorylations of AKT and GSK-3 β (p-AKT and p-GSK-3 β) in liver tissues were detected by Western blotting assay. **Results** Compared with the diab group, geniposide showed significantly hypoglycemic effect, together with lowering body weight, increasing the insulin content in plasma, and improving OGTT. The immuno-fluorescent staining showed the islets destruction caused by hyperglycemia was recovered by geniposide. The β -cell proliferation presented by Ki67 staining increased as compared with that in the diab group. Moreover, both p-Akt and p-GSK-3 β levels in the liver tissue were upregulated by geniposide remarkably. **Conclusion** The present study demonstrates that geniposide could ameliorate the hyperglycemia in diabetic mice by enhancing the pancreatic β -cell proliferation and activation of AKT signaling pathway in liver.

Key words: geniposide; diabetes; pancreatic β -cells; protein kinase B; glycogen synthase kinase

收稿日期: 2013-08-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102488); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2011865)

作者简介: 姚冬冬 (1987—), 男, 硕士, 研究方向为中药防治糖尿病作用机制。E-mail: 746012057@qq.com

*通信作者 孙 敏 E-mail: sm3216@126.com

舒 雯 E-mail: shuluan2006@hotmail.com

近年来糖尿病已成为与心血管疾病、肿瘤并列的发病率和死亡率最高的三大非传染性疾病之一，并且随着社会经济的发展和生活方式的变化，其发病率呈上升趋势。中医药治疗糖尿病历史悠久，疗效稳定，不良反应少，能有效防治并发症，且具有整体调节、多靶点作用的特点，有着西医不可替代的优势。传统降糖中药栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒的功效，《本草纲目》曾记载栀子具有解五种黄病，利五淋，通小便，解消渴，明目的功效。栀子中环烯醚萜类化合物栀子苷 (geniposide) 是其主要活性成分。Kimura 等^[1]最早报道了栀子苷具有降血糖作用。小鼠实验表明，栀子具有降低肾上腺素所致高血糖、地塞米松致胰岛素抵抗高血糖和四氧嘧啶致糖尿病高糖的作用^[2]。最新研究也报道了栀子苷能够促进 INS-1 细胞胰岛素的分泌^[3]，但目前关于栀子苷降糖作用的机制尚不明晰。本实验考察了栀子苷对糖尿病小鼠的降糖效果及胰岛 β 细胞增殖的影响，并检测了栀子苷对肝脏中蛋白激酶 B (Akt)、糖原合成酶激酶 (GSK)-3 β 蛋白磷酸化水平的作用，探讨栀子苷可能的降糖作用机制。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂

栀子苷 (质量分数 $\geq 95\%$) 购于西安开来生物工程公司 (批号 K120805)。常规食料由江苏省中医药研究院动物中心提供；高脂食料购买于上海斯莱克实验动物有限公司；链脲佐菌素 (STZ) 购自 Sigma 公司；蛋白裂解液购自碧云天生物技术研究所。所用抗体 p-Akt、p-GSK-3 β 、 β -actin 及胰岛素、Ki67、二抗均购自 Santa Cruz 公司。

1.2 仪器

电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)；ZW—A 型微量振荡器、HH—60 型数显恒温搅拌循环水浴锅 (常州国华电器有限公司)；5430R 冷冻离心机 (德国艾本德公司)；Nanodrop1000 微量紫外分光光度计、AL204 1/10 万天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)；Leica Rm2265 型超薄切片机 (德国)；微血糖测量仪及试纸 (德国罗氏诊断有限公司)；荧光显微镜 (奥林巴斯公司)。

1.3 动物模型建立

雄性 C57BL/6 小鼠购自史莱克公司，体质量 18~20 g，数量 30 只，许可证号：SCXX (沪) 2012-0002。动物进行 10 d 适应性饲养后进入实验。小鼠 ip 90 mg/kg STZ (溶于 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，

pH 4.5)，对照组注射柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。后续造模中，对照组小鼠给予正常食料喂养，STZ 小鼠均以高脂食料喂养 4 周。空腹血糖 ≥ 13 mmol/L 为糖尿病模型成功标准。将成模小鼠随机分为模型组和栀子苷 (100 mg/kg) 组^[1]，每组 10 只，ig 给药 30 d，对照组和模型组每日 ig 等剂量生理盐水。

1.4 空腹血糖和体质量测定

在注射 STZ 后每 5 天测定小鼠体质量和空腹血糖。晚上 8 点撤食，翌日上午 8 点进行小鼠体质量及血糖测定。

1.5 小鼠口服糖耐量 (OGTT) 的测定

在末次给药后，禁食 12 h，各组小鼠 ig 给予 25% 葡萄糖 (2 g/kg) 溶液，于 ig 前及 ig 后 0.5、1、1.5、2 h 尾静脉取血测定血糖。

1.6 标本采集

给药 4 周后，小鼠眼球取血置于肝素抗凝管中，取血浆，置 -20 °C 冰箱保存待测定。分离胰腺组织，用生理盐水清洗后浸泡于 4% 中性甲醛溶液中供制作切片；另取各组小鼠肝脏，-80 °C 冰箱中保存供提取蛋白样品进行 Western blotting 检测。

1.7 血浆胰岛素测定

血浆胰岛素的测定采用胰岛素放射免疫分析法，按试剂盒说明方法操作。

1.8 胰腺组织免疫荧光染色

经 4% 中性甲醛固定的胰腺组织常规脱水、透明、包埋、制成厚 4 μ m 切片。取切片脱蜡，梯度乙醇水化，PBS 洗涤后，滴加封闭血清在湿盒中室温封闭 30 min。加适宜浓度的一抗置湿盒中 4 °C 孵育过夜，PBS 洗涤后加入不同荧光二抗 (insulin 采用 FITC 绿色荧光，Ki67 采用 Cy3 红色荧光) 置湿盒中室温避光孵育 1 h。最后用含蓝色荧光核染料 (DAPI) 的甘油封片。保存切片于暗盒中，在 800 倍荧光显微镜下观察。

1.9 Western blotting 检测小鼠肝脏中 Akt、GSK-3 β 蛋白磷酸化水平

肝组织加入组织裂解液离心，取上清，煮沸变性后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，灌制 5% 浓缩胶，12% 分离胶，上样量为 20 μ g 总蛋白，恒压 80 V 电泳 20 min，而后把电压提高到 100 V，继续电泳 90 min，恒流 200 mA，120 min 湿转，将蛋白从 SDS-PAGE 凝胶转至 PVDF 膜上，脱脂牛奶封闭后加入抗体 (1:500) 4 °C 孵育过夜，最后加入二抗孵育 2 h，ECL 显色。以 β -actin 为内参。

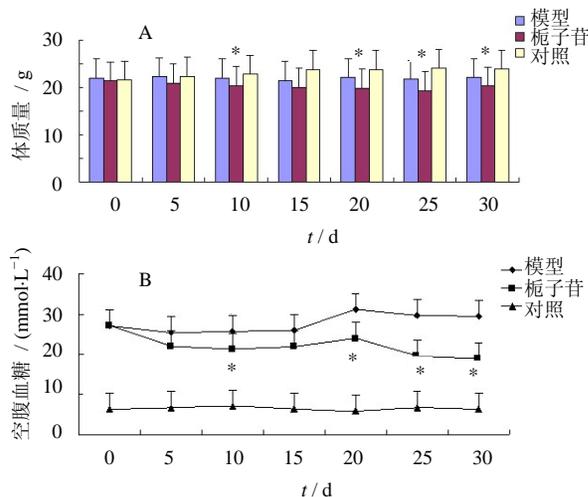
1.10 统计学处理

采用 SPSS 11.5 软件进行数据分析, 组间比较进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 栀子苷对糖尿病小鼠体质量及空腹血糖的影响

各组小鼠体质量和空腹血糖变化见图 1。与对照组比较, 模型组小鼠空腹血糖升高 3 倍, 而栀子苷治疗组给药 20 d 后空腹血糖降低, 与模型组相比具有显著差异 ($P < 0.05$), 体质量也略低于模型组 ($P < 0.05$), 表明栀子苷可以有效降低糖尿病小鼠血糖水平, 且具有一定减轻体质量的效果。



与模型组比较: * $P < 0.05$, 下图同
* $P < 0.05$ vs model group, same as below

图 1 小鼠体质量 (A) 和空腹血糖 (B) 的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 1 Body weights (A) and fasting blood glucose levels (B) of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.2 栀子苷干预后小鼠 OGTT 结果

模型组小鼠的 OGTT 中各时间点的血糖值均高于对照组, 糖耐量异常 (图 2); 栀子苷治疗后的小鼠各时间点的 OGTT 均低于模型组 ($P < 0.05$), 表明栀子苷能够改善糖尿病小鼠的糖耐量。

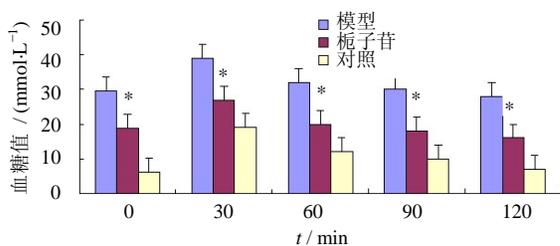


图 2 OGTT 试验血糖水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 2 Comparison on blood glucose levels in OGTT ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.3 栀子苷增加糖尿病小鼠空腹血浆胰岛素水平

模型组与对照组比较, 胰岛素分泌显著降低, 而相比模型组, 栀子苷治疗组血浆胰岛素水平明显提高 ($P < 0.05$), 提示栀子苷能够增加胰岛素的分泌, 结果见图 3。

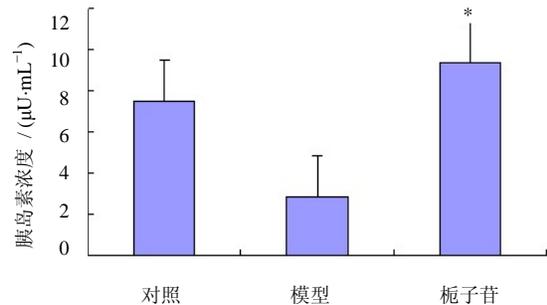


图 3 小鼠血浆胰岛素测试结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 3 Results of insulin contents in plasma of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.4 栀子苷促进胰岛 β 细胞增殖

对小鼠胰腺组织切片进行免疫荧光染色, 结果见图 4, 可以观察到对照组小鼠胰岛结构完整, 边界清晰, 胰岛素表达量高, 并且可以检测到 Ki67 阳性表达的 β 细胞。Ki67 为细胞进行有丝分裂时细胞核内特异表达的蛋白, 可作为细胞增殖的标志。模型组小鼠胰岛结构被破坏, 边界不清晰, 胰岛素表达减少, 未观察到 β 细胞增殖。而栀子苷组胰岛素表达恢复, 并检测到 Ki67 阳性 β 细胞, 提示栀子苷具有促进 β 细胞增殖的作用。

2.5 栀子苷对小鼠肝脏中 Akt 信号通路激活的作用

图 5 结果显示, 模型组小鼠肝脏中 p-Akt 和 p-GSK-3β 水平与对照组比较明显降低, 表明 Akt 通路的激活被抑制, 提示肝脏中存在胰岛素抵抗。而给予栀子苷治疗后, 显著增加了 p-Akt 和 p-GSK-3β 的水平 ($P < 0.05$)。

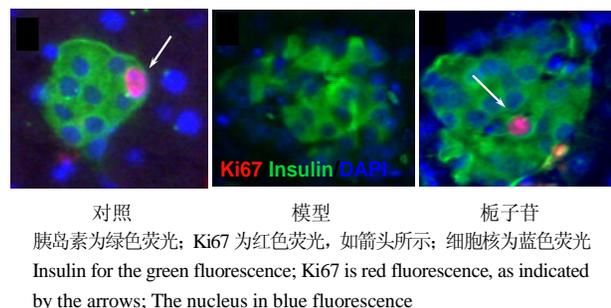


图 4 小鼠胰腺组织切片免疫荧光染色结果
Fig. 4 Immuno-fluorescent staining of pancreatic sections of mice

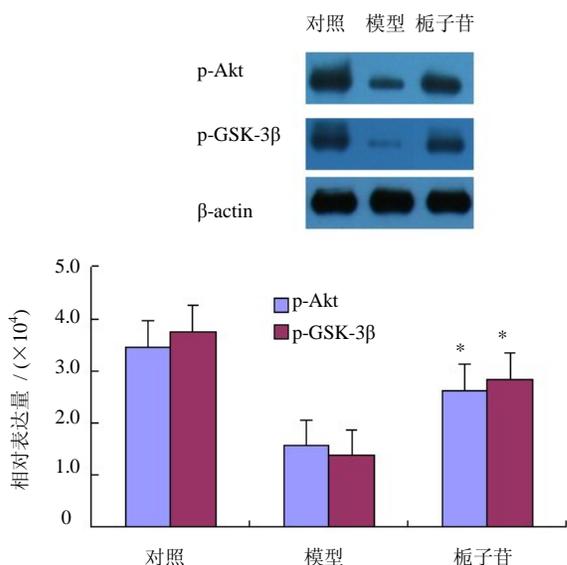


图 5 栀子苷对小鼠肝脏组织中的 Akt、GSK-3β 磷酸化水平的作用

Fig. 5 Effects of geniposide on phosphorylations of Akt and GSK-3β in liver tissues of mice

3 讨论

本研究采用一次性注射低剂量 STZ 再结合喂养高脂食料建立糖尿病动物模型的方法，动物注射 STZ 诱导胰岛局部 β 细胞凋亡，使胰岛素分泌不足，使血糖浓度快速升高^[4-5]，喂养高脂食料使小鼠持续产生胰岛素抵抗，保证糖尿病模型具有一定的稳定性^[6]。本研究发现，与模型组相比，栀子苷给药组小鼠血糖明显下降，而血浆胰岛素水平升高，口服糖耐量明显改善，表明栀子苷有较好的降血糖作用。通过小鼠胰腺组织切片免疫荧光染色，观察到模型组小鼠胰岛结构被破坏，胰岛素表达水平降低，与报道一致^[7-9]，而栀子苷有效改善胰岛的形态结构，促进 β 细胞增殖。在肝脏组织中，栀子苷能够激活 Akt 通路，p-Akt 和 p-GSK-3β 水平升高，提高了机体对胰岛素的敏感性。

大量研究表明，胰岛素敏感性降低的机制和胰岛素受体后 Akt 信号通路的改变有着密切的关系^[10-13]。胰岛素激活 Akt 通路，磷酸化下游的糖原合成酶激酶 GSK-3 并抑制其活性，阻止其对糖原合成的抑制，有利于下游糖原合成酶对葡萄糖的转化贮存，降低血液中的葡萄糖水平。病理状态下，Akt 途径发生紊乱，Akt 信号转导通路的损伤与糖尿病病变关系密切^[14]，糖尿病以及肥胖小鼠 GSK-3β 表达均

异常升高^[15]。本实验也观察到模型组小鼠肝脏组织中的 Akt 和 GSK-3β 磷酸化蛋白水平均低于对照组，而栀子苷组 p-Akt 和 p-GSK-3β 水平升高，提示栀子苷改善胰岛素抵抗，从而实现其降低血糖的作用。

而另一方面本实验首次探讨了栀子苷对糖尿病小鼠胰岛 β 细胞的保护作用，证实栀子苷能够保护胰岛结构，促进 β 细胞增殖，从而保持胰岛 β 细胞数量，增加胰岛素分泌，进而在根本上达到降低血糖的目的。认为栀子苷降糖的功效可能通过多靶点作用实现，其机制值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] Kimura Y, Okuda H, Arichi S. Effects of geniposide isolated from *Gardenia jasminoides* on metabolic alterations in high sugar diet-fed rats [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(12): 4444-4447.
- [2] 黄洪林, 杨怀瑾, 刘立超, 等. 栀子降血糖作用的实验研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2006, 17(1): 1-3.
- [3] Guo L X, Xia Z N, Gao X, et al. Glucagon-like peptide 1 receptor plays a critical role in geniposide-regulated insulin secretion in INS-1 cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(2): 237-241.
- [4] Castellano J M, Navarro V M, Fernández-Fernández R, et al. Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats [J]. *Diabetes*, 2006, 55(9): 2602-2610.
- [5] Matsuoka M, Ogata N, Minamino K, et al. Leukostasis and pigment epithelium-derived factor in rat models of diabetic retinopathy [J]. *Mol Vis*, 2007, 13: 1058-1065.
- [6] 潘长玉, 尹士男. 胰岛素抵抗-2 型糖尿病发病机制的重要因素 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2000, 16(1): 56-57.
- [7] 宋福印, 粟德林, 周景华, 等. 消渴停对糖尿病大鼠胰岛 B 细胞凋亡影响的形态学观察 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2000, 6(8): 22-24.
- [8] Donath M Y, Gross D J, Cerasi E, et al. Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes [J]. *Diabetes*, 1999, 48(4): 738-744.
- [9] 顾锦华, 黄华, 薛华, 等. 齐墩果酸对糖尿病小鼠胰岛损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2010, 41(11): 1866-1870.
- [10] Zdychová J, Komers R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications [J]. *Physiol Res*, 2005,

- 54(1): 1-16.
- [11] Carvalho E, Rondinone C, Smith U. Insulin resistance in fat cells from obese Zucker rats-evidence for an impaired activation and translocation of protein kinase B and glucose transporter 4 [J]. *Mol Cell Biochem*, 2000, 206(1/2): 7-16.
- [12] Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, *et al.* Defective insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat-fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C (zeta/lambda) activities [J]. *Diabetes*, 2001, 50(8): 1901-1910.
- [13] Manning B D, Cantley L C. AKT/PKB signaling: navigating downstream [J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1261-1274.
- [14] Krook A, Kawano Y, Song X M, *et al.* Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated Akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. *Diabetes*, 1997, 46(12): 2110-2114.
- [15] Cohen P, Goedert M. GSK-3 inhibitor: development and therapeutical potential [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3(6): 479-487.