

姜黄素调控 NF- κ B 信号通路对糖尿病模型大鼠胰岛细胞形态和功能的影响

刘虎军¹, 贾 菲¹, 贺钰梅^{2*}

1. 延安大学附属医院 药剂科, 陕西 延安 716000

2. 延安大学附属医院 全科医学科, 陕西 延安 716000

摘要: 目的 探讨姜黄素通过核因子- κ B(NF- κ B)信号通路对高糖高脂饮食诱导的糖尿病模型大鼠胰岛细胞形态和功能的影响。方法 采用高糖高脂饲料+ip 链脲佐菌素法制备糖尿病大鼠模型, 将模型成功SD大鼠随机分为5组: 模型组、二甲双胍(200 mg·kg⁻¹, 阳性药)组和姜黄素低、中、高剂量(50、150、250 mg·kg⁻¹)组, 对照组不造模。ig 给药, 每天1次, 连续6周, 对照组同时注射等量无菌磷酸盐缓冲液(PBS)。观察SD大鼠体质量变化; 血糖仪检测空腹血糖; ELISA法检测血清C肽水平; 生化分析仪检测血清中糖化血红蛋白、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBil)、肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)、尿酸(UA)水平; 取胰腺进行HE染色, 于光镜下观察胰岛形态学改变; 免疫组化染色法观察胰岛NF- κ B的阳性表达; Western blotting法检测NF- κ B信号通路相关蛋白表达; 提取胰岛细胞, 免疫荧光染色观察胰岛素分泌, 葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)实验检测胰岛素分泌量。结果 与模型组比较, 各给药组体质量在治疗第2周时开始缓慢增长, 第3、4周体质量显著升高($P < 0.05$); 血糖水平显著降低($P < 0.05$), 血清C肽水平显著升高($P < 0.05$); 糖化血红蛋白、TG、TC、LDL-C、ALT、AST、Scr、BUN、UA水平显著降低($P < 0.05$), HDL-C水平显著升高($P < 0.05$); 胰岛大小和形态逐渐恢复正常, 胰岛细胞依次变得更清晰完整, 导管系统内的囊性扩张也逐渐减少; NF- κ B阳性细胞减少; p-P65蛋白表达显著降低($P < 0.05$), p-I κ B α 蛋白表达显著升高($P < 0.05$); 胰岛原代细胞分泌胰岛素显著增加($P < 0.05$)。结论 姜黄素可以保护糖尿病大鼠胰岛细胞正常形态, 维持胰岛细胞功能, 减轻糖尿病大鼠症状, 其机制可能与调控NF- κ B信号通路有关。

关键词: 姜黄素; 核因子- κ B (NF- κ B); 糖尿病; 胰岛细胞; 胰岛素分泌

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 04-0803-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.04.014

Effects of curcumin regulating NF- κ B signal pathway on morphology and function of pancreatic islet cells in diabetes model rats

LIU Hujun¹, JIA Fei¹, HE Yumei²

1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, China

2. Department of General Medicine, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of curcumin through NF- κ B signaling pathway on the morphology and function of islet cells in diabetes mellitus rats induced by high glucose and high-fat diet. **Methods** The diabetes rat model was prepared by the method of high sugar and high fat diet + ip streptozotocin. The successfully modeled SD rats were randomly divided into five groups: the model group, metformin (200 mg·kg⁻¹, positive drug) group, and low, medium, and high dose curcumin (50, 150, 250 mg·kg⁻¹) groups. The control group was not modeled. The control group was injected with an equal amount of sterile phosphate buffer (PBS) once a day for six weeks. Observe the changes in body mass of SD rats; The fasting blood glucose was measured by a blood glucose meter. Serum C-peptide level was detected by ELISA. The serum levels of glycosylated hemoglobin, triacylglycerol (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBil), serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen

收稿日期: 2022-10-27

基金项目: 延安市科学技术局资助项目(2018CGZH-15)

第一作者: 刘虎军(1979—), 男, 陕西延安人, 汉族, 副主任药师, 本科。E-mail: lhj1979liu@163.com

*通信作者: 贺钰梅(1984—), 女, 陕西延安人, 汉族, 硕士, 副主任医师, 研究方向为内分泌代谢疾病。E-mail: heyumeih@163.com

(BUN), and uric acid (UA) were measured by a biochemical analyzer. The pancreas was taken for HE staining, and the morphological changes of the islets were observed under light microscopy. Observation of islet positive expression of NF- κ B by immunohistochemical staining. Detection of NF- κ B signal pathway related proteins expression by Western blotting. Extract islet cells, observe insulin secretion by immunofluorescence staining, and detect insulin secretion by glucose stimulated insulin secretion (GSIS) experiment. **Results** Compared with the model group, the body mass of each treatment group began to slowly increase at the second week of treatment, and significantly increased at the third and fourth weeks ($P < 0.05$). The level of blood glucose significantly decreased ($P < 0.05$), while the level of serum C-peptide significantly increased ($P < 0.05$). The levels of glycosylated hemoglobin, TG, TC, LDL-C, ALT, AST, Scr, BUN, and UA decreased significantly ($P < 0.05$), while the levels of HDL-C increased significantly ($P < 0.05$). The size and morphology of the islets gradually returned to normal, the islet cells gradually became clearer and complete, and the cystic expansion in the ductal system gradually decreased. NF- κ B positive cells decreased. The expression of p-P65 protein was significantly decreased ($P < 0.05$) and the protein expression of p-I κ B α was significantly increased ($P < 0.05$). Insulin secretion by primary islet cells was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Curcumin can protect the normal morphology of islet cells in diabetic rats, maintain the function of islet cells, and alleviate the clinical symptoms of diabetic rats. The mechanism may be related to the regulation of NF- κ B signaling pathway.

Key words: curcumin; NF- κ B; diabetes mellitus; islet cells; insulin secretion

伴随经济的快速发展,我国人民生活方式发生重大改变,糖尿病在我国的发病率逐年递增,作为一种常见的内分泌系统代谢障碍性疾病,目前已成为威胁人类健康的第3大疾病^[1-2]。姜黄素是从草本植物姜黄的根茎中提取的一种天然多酚,具有广泛的药理活性,包括抗氧化、抗肿瘤、免疫调节和抗炎等^[3-5]。已有研究发现,姜黄素不仅能够降低糖尿病大鼠的血糖血脂,改善胰岛 β 细胞损伤^[6-7],而且同吡格列酮一样对胰岛 β 细胞具有保护作用^[8];除此之外,研究还指出姜黄素具有调节多种信号途径、改善糖脂代谢、改善氧化应激、抑制炎症、降低葡萄糖生成、改善胰岛素抵抗等多方面功能,展示了其在预防和治疗糖尿病及其并发症方面的潜力^[9],但其治疗糖尿病的作用机制尚未完全阐明。

核因子- κ B(NF- κ B)是一种广泛存在于真核细胞内的多向性转录因子,参与人体多种生物学过程,可调节多种细胞因子、生化因子及酶等基因表达^[10-11]。研究发现,NF- κ B可干扰胰岛素受体的信号转导^[12];在胰岛素抵抗方面,NF- κ B活化后,可升高白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症因子的表达水平,此类炎症因子又可作用于NF- κ B信号通路,作为激活剂使NF- κ B持续活化,从而形成炎症信号的正反馈机制,加重胰岛素抵抗^[13]。研究发现,姜黄素可通过抑制NF- κ B信号通路来抑制促炎细胞因子(如IL-6和TNF- α)的分泌,进而发挥抗炎作用^[14]。本研究建立糖尿病大鼠模型,研究姜黄素是否通过NF- κ B信号通路对糖尿病大鼠胰岛细胞形态及功能发挥作用。

1 材料

1.1 实验动物

60只8周龄SPF级SD健康雄性大鼠,体重(200 $\pm$ 10)g,购自辽宁长生生物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(辽)2014-001,饲养温度21~23℃、湿度30%~40%,所有大鼠均在正常光照黑暗循环的SPF级动物房中饲养,自由摄食饮水。本研究经延安大学附属医院伦理委员会审查批准(批号YAS-20210005)。

1.2 主要试剂

姜黄素(质量分数>80%,批号458-377)购于美国Sigma公司;链脲佐菌素(STZ,批号S0130),购自Alexis公司;胰岛素放射免疫试剂盒(批号SI201201)购自北京北方生物技术研究所;兔抗磷酸化p65(p-p65)多克隆抗体(货号SAB4504488)、兔抗p-核因子 κ B抑制因子 α (I κ B α)多克隆抗体(货号I0505)、兔抗GAPDH抗体(批号GR3316865-1)购于美国Sigma公司;山羊抗兔二抗(批号BS13278)购自美国Cell Signaling Technology公司;磷酸缓冲液(PBS,批号20201228)购自于碧云天公司;PV-6001试剂盒及DAB试剂盒(批号ZLI-9032,北京中杉金桥公司);2-step plus 二步免疫组化检测试剂盒,购自北京中杉金桥生物技术有限公司;胶原酶V(批号C9263-100MG,美国Sigma公司);大鼠C肽检测试剂盒(江苏酶标生物,货号MB-2129A);高糖高脂饲料:蔗糖20%、猪油10%、胆固醇1%、胆盐0.2%、基础饲料68.8%,购于长春亿斯实验动物公司(批号040508)。

1.3 主要仪器

CX-21 光学显微镜,购自日本 Olympus 公司; ABI2720 型 RT-PCR 仪,购自美国 ABI 公司; ONE TOUCH 强生(稳豪)血糖仪和试纸,购自美国强生公司; Leica RM2335 轮转式切片机、Leica HI1220 烤片机、德国 Leica 模型 4000B 光学显微镜,购自德国 Leica 公司; HEMIX-180 型全自动生化分析仪,购自日本 Sysmex 公司。

2 方法

2.1 造模、分组及给药干预

50 只 SD 大鼠给予高糖高脂饲料喂养 4 周后,禁食不禁水 12 h,按 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 一次性 ip STZ 溶液,制备糖尿病模型。对照组普通饲料喂养 4 周后,注射相应剂量缓冲液。继续喂养 7 d 后,大鼠尾静脉取血,应用血糖仪检测血糖,血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为模型制备成功。将模型成功大鼠随机分为 5 组,每组 10 只,分别为模型组、二甲双胍($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,阳性药)组和姜黄素低、中、高剂量(50 、 150 、 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组。ig 给药,每天 1 次,连续 6 周,对照组同时注射等量无菌 PBS,观察 SD 大鼠体重变化。

2.2 空腹血糖、C 肽水平比较

姜黄素末次干预结束后,禁食禁水 12 h,颈静脉抽血,血糖仪检测血糖;以 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,分离血清,ELISA 法检测血清 C 肽水平。

2.3 生化分析仪检测血清生化

采用生化分析仪检测血清中糖化血红蛋白、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBil)、血肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)、尿酸(UA)水平。

2.4 HE 染色及免疫组化检测

断颈椎处死大鼠,立即剪开大鼠腹部,摘取胰腺组织,将胰腺组织用预冷的 PBS 溶液冲洗,后置于 10% 福尔马林溶液保存,常规石蜡包埋,切片,HE 染色,于光镜下观察胰岛形态学改变。

用免疫组化染色方法观察 NF- κ B 的表达:将预先制备的石蜡切片浸入二甲苯中,60 °C 烘箱中干燥 1 h,置于 100%、90%、80%、70% 的酒精中各 2 min 脱蜡。然后将石蜡切片在 3% 过氧化氢中孵育 15 min,并用磷酸盐聚山梨酯缓冲液(PBST)清洗 3 次(每次 15 min),石蜡切片浸入柠檬酸钠溶液中进行抗原修复(95 °C、15 min),并用 PBST 清洗 3 次(每次 5 min)。滴加 5% 牛血清白蛋白(BSA)密封剂到切片上,置

于 37 °C 孵育 30 min。然后滴加 NF- κ B p65 抗体(1:300),置于 PBS 中 4 °C 孵育 12 h。次日,将 HRP 偶联的 IgG 加入组织中,37 °C 孵育 30 min,PBST 洗涤 3 次(每次 5 min)。滴加 DAB 显色液(1:20),用中性树脂固定并载玻片覆盖,随后在显微镜上观察。

2.5 Western blotting 检测 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达

取大鼠新鲜胰腺组织,加入 RIPA 裂解液,置于冰上研碎至匀浆后,4 °C 放置 30 min, $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取一部分上清,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,另一部分上清加入上样缓冲液,煮沸变性后,加到 4% 浓缩胶浓缩,10% 分离胶分离,再经过转膜、封闭、4 °C 孵育一抗、室温孵育二抗、ECL 发光液显色、电子曝光等步骤,最后 Image J 软件进行数据分析。

2.6 胰岛细胞提取及各组胰岛细胞分泌胰岛素功能检测

2.6.1 胰岛细胞提取 脱颈椎处死小鼠,置于体视显微镜下,用胶带固定,于剑突下作横向切口,开口尽量大,暴露肝脏、胃、十二指肠和脾脏。从十二指肠肠管进针,再从肠内壁刺入十二指肠大乳头,并轻轻插入胰总管 0.8~1.0 cm,保持针头平直,扎紧胰总管的结扎线,将针头连同胰管一同扎紧,缓慢注入 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胶原酶 V 溶液 2 mL,防止倒流。此时胰腺应逐渐膨胀,胰尾开始充盈。注射完毕后,从胰尾开始轻轻分离胰腺包膜。取胰腺组织置于含胶原 P 酶的试管,然后放入 37 °C 水浴锅,每 3 分钟轻轻晃动 2 次;20 min 后将试管由水浴锅取出上下震荡,待胰腺组织均匀且呈细沙状(颗粒直径小于 1 cm^3)终止消化。通过 80 目滤网滤过组织然后将其置于台式高速低温离心机以 $1\,200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度离心 5 min,弃上清液加 H-模型 EM 培养基,然后以 $1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度离心 5 min,弃上清液后分别加入 1.1-Ficoll、1.096-Ficoll、1.066-Ficoll 密度梯度分离液,以 $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度离心 15 min,离心完成后吸取中间白色沉淀放入试管中,再次以 $1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度离心 5 min,弃上清液并转移至含 H-模型 EM 的培养皿,顺时针晃动培养皿、分离胰岛细胞,于显微镜下手检 50~300 μm 的胰岛细胞。然后将适量细胞放入有 Diphenylterazine 溶液的培养皿,并于显微镜观察活性细胞。

2.6.2 各组胰岛细胞分泌胰岛素功能检测 细胞用 PBS 洗 2 次,4% 多聚甲醛室温固定 30 min。PBS 洗 3 次。采用胰岛素放射免疫试剂盒染色,DAB 显

色。阳性颗粒呈棕黄或棕褐色,位于细胞浆。

2.7 葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)实验^[15]

将胰岛原代细胞均匀铺在12孔板中,并设置每孔中胰岛细胞的数量为30个。加入RPMI 1640完全培养基100 μL (含10%胎牛血清),置于细胞培养箱平衡12 h,用含2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖的Hank's平衡盐溶液缓冲液作为饥饿液培养6 h,之后分别用2.5、25.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖刺激2 h,刺激结束之后,收集细胞上清液,用小鼠胰岛素ELISA试剂盒检测上清液中胰岛素的含量,同时用细胞刮刀将接种的细胞完全刮下,收集细胞后用BCA试剂盒进行蛋白定量,用每孔胰岛素的含量(μIU)/每孔细胞蛋白含量(mg)作为胰岛素分泌能力的评价指标。

2.8 数据统计分析

数据采用SPSS 19.0统计软件处理分析,符合正态分布及方差齐性的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较以独立样本 t 检验。

3 结果

3.1 一般情况

姜黄素干预6周后,观察各组大鼠状态,对照组大鼠状态正常,较为活泼,毛发光亮,饮食饮水正常,体质量增长正常;模型组大鼠状态萎靡,毛发竖立无光泽,多饮、多食、多尿症状明显,反应迟钝,体质量基本无增长,甚至略有下降;姜黄素各组和二甲双胍组大鼠状态较为正常,毛发光亮,同时相较于模型组大鼠,饮食饮水较少,体质量在治疗第2周时开始缓慢增长,第3、4周体质量显著高于模型组($P<0.05$),且姜黄素高剂量组体质量增长最快,与二甲双胍组基本一致。结果见图1。

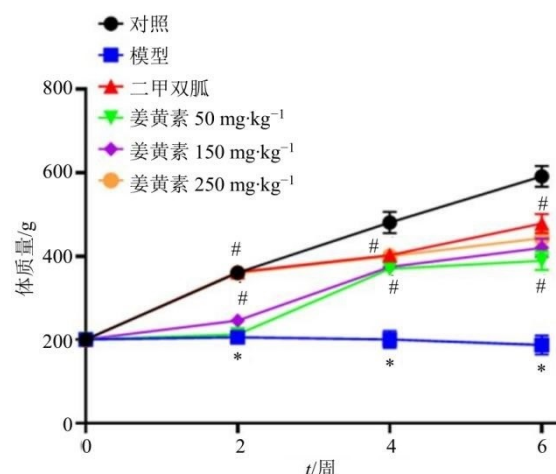
3.2 空腹血糖及C肽水平比较

姜黄素治疗干预8周后,与对照组比较,模型组大鼠空腹血糖水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,二甲双胍和姜黄素各组血糖水平显著降低($P<0.05$)。

模型组大鼠血清C肽水平显著低于对照组($P<0.05$);二甲双胍组、姜黄素各剂量组血清C肽显著高于模型组($P<0.05$)。见表1。

3.3 各组大鼠生化指标比较

与对照组比较,模型组大鼠糖化血红蛋白、TG、TC、LDL-C、ALT、AST、TBil、Scr、BUN、UA水平显著升高($P<0.05$),HDL-C水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,各给药组糖化血红蛋白、TG、TC、LDL-C、ALT、AST、Scr、BUN、UA水平显著降



与对照组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: # $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group

图1 各组大鼠体质量变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Changes in body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表1 各组大鼠空腹血糖、血清C肽比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Comparison of fasting blood glucose and serum C-peptide of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	空腹血糖/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	血清C肽/ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
对照	—	4.58±0.60	2.28±0.51
模型	—	25.55±4.25*	0.71±0.06*
二甲双胍	200	13.35±3.26#	1.75±0.38#
姜黄素	50	18.39±4.27#	1.36±0.53#
	150	15.65±3.56#	1.65±0.72#
	250	13.34±3.07#	1.79±0.43#

与对照组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: # $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group

低($P<0.05$),HDL-C水平显著升高($P<0.05$)。结果见表2~5。

3.4 胰岛细胞形态学变化

对照组胰岛呈大小不一的椭球或球形结构,不

表2 各组大鼠糖化血红蛋白比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of HBA1c levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	糖化血红蛋白/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照	—	15.45±2.51
模型	—	35.19±5.17*
二甲双胍	200	20.13±1.34#
姜黄素	50	30.15±2.64#
	150	25.34±3.15#
	250	20.09±1.57#

与对照组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: # $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group

表3 各组大鼠血脂水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 3 Comparison of serum lipid levels in rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	1.53±0.10	0.43±0.08	3.82±0.51	0.25±0.03
模型	—	3.52±0.59*	0.97±0.25*	2.31±0.23*	0.97±0.31*
二甲双胍	200	2.15±0.06 [#]	0.48±0.04 [#]	3.31±0.16 [#]	0.36±0.03 [#]
姜黄素	50	3.05±0.14 [#]	0.78±0.07 [#]	2.79±0.15 [#]	0.51±0.07 [#]
	150	2.85±0.13 [#]	0.62±0.06 [#]	2.94±0.14 [#]	0.43±0.05 [#]
	250	2.14±0.05 [#]	0.49±0.05 [#]	3.34±0.21 [#]	0.35±0.04 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group表4 各组大鼠肝功能比较($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 4 Comparison of liver function in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	TBil/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	43.25±2.48	102.36±10.48	6.25±0.54
模型	—	89.36±10.47*	235.48±15.56*	6.68±0.31*
二甲双胍	200	53.39±2.05 [#]	151.53±8.41 [#]	6.43±0.18
姜黄素	50	67.28±5.41 [#]	174.25±12.36 [#]	6.42±0.28
	150	60.57±2.19 [#]	160.23±10.29 [#]	6.47±0.24
	250	53.47±2.14 [#]	151.49±8.24 [#]	6.43±0.21

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group表5 各组大鼠肾功能比较($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 5 Comparison of renal function in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Scr/(μmol·L ⁻¹)	BUN/(μmol·L ⁻¹)	UA/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	33.51±6.48	5.28±1.25	100.39±20.17
模型	—	55.89±10.57*	15.47±2.35*	285.41±30.17*
二甲双胍	200	41.05±3.51 [#]	9.05±0.97 [#]	134.77±10.52 [#]
姜黄素	50	48.27±5.94 [#]	12.74±1.06 [#]	165.34±13.29 [#]
	150	43.06±4.29 [#]	10.19±1.36 [#]	150.34±12.19 [#]
	250	41.07±3.45 [#]	9.04±1.01 [#]	134.78±10.58 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

均匀分布于胰岛泡间。每个胰岛由上皮细胞组成, 上皮细胞形成小梁结构, 小梁结构被密集的毛细血管网隔开。上皮细胞呈圆形或卵圆形, 细胞核中央为圆形, 被完整的细胞膜包围, 充满细颗粒胞浆, 中央毛细血管周围形成管状结构; 模型组胰岛排列混乱, 并伴随坏死、萎缩, 同时胰岛细胞大小萎缩, 细胞坏死, 伴有导管系统囊性扩张; 与模型组相比, 姜黄素各组由低到高胰岛大小和形态逐渐恢复正常,

胰岛细胞依次变得更清晰完整, 导管系统内的囊性扩张也逐渐减少; 二甲双胍组胰岛大小和形状较正常, 胰岛细胞较完整, 导管系统内无导管囊性扩张, 见图2。

3.5 免疫组化检测胰岛细胞NF-κB表达变化

对照组胰岛少量细胞呈现NF-κB阳性染色, 而模型组胰岛大量细胞呈现阳性反应, 姜黄素各组和二甲基胍组NF-κB阳性细胞减少, 见图3。

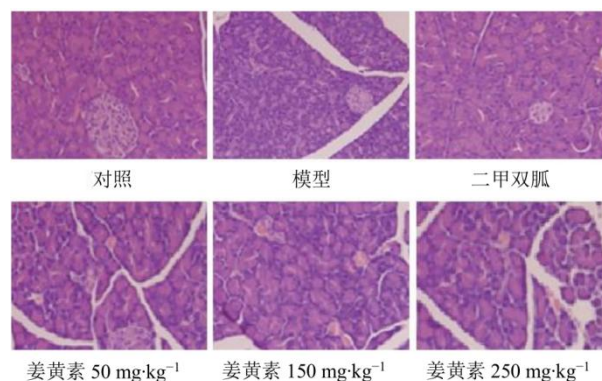


图2 各组胰岛细胞形态学变化(×400)

Fig. 2 Morphological changes of islet cells in each group (×400)

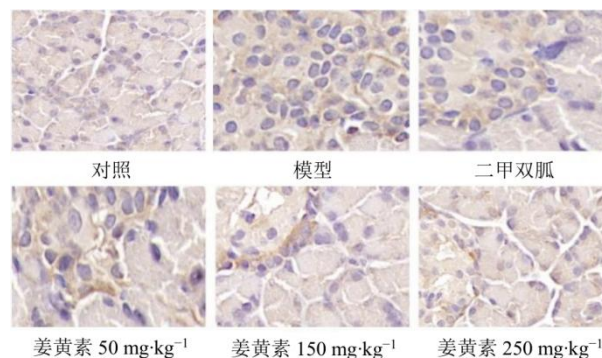


图3 各组胰岛细胞NF-κB表达变化(×400)

Fig. 3 Expression of NF-κB in islet cells of each group (×400)

3.6 胰腺组织 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达水平

与对照组比较,模型组大鼠胰腺组织中 p-P65 蛋白表达显著升高, p-I κ B α 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,姜黄素各组、二甲双胍组 p-P65 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), p-I κ B α 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$),且作用呈浓度相关性。结果见图4、5。

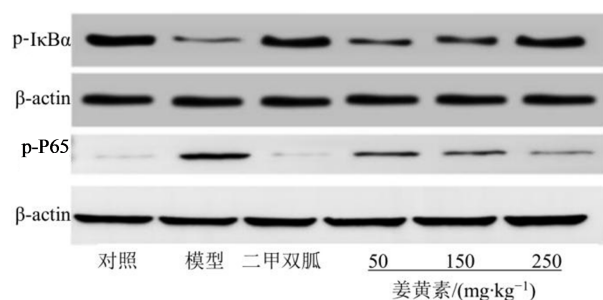


图4 胰腺组织 NF- κ B 信号通路相关蛋白的表达水平
Fig. 4 Expression level of NF- κ B signal pathway associated proteins in pancreatic tissue

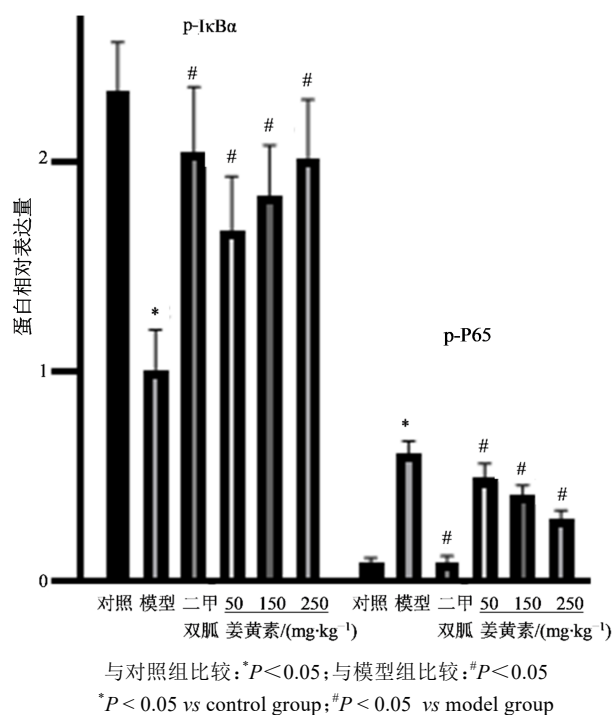


图5 胰腺组织 NF- κ B 信号通路相关蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Fig. 5 Expression level of NF- κ B signal pathway associated proteins in pancreatic tissue ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.7 胰岛细胞分泌胰岛素功能变化

对照组的胰岛几乎所有的胰岛细胞都表现出强烈的胰岛素分泌阳性反应,模型组胰岛几乎所有的胰岛细胞均无反应,二甲双胍组和姜黄素高剂量组的胰岛几乎所有的胰岛细胞都表现出强烈的阳性反应,见图6。

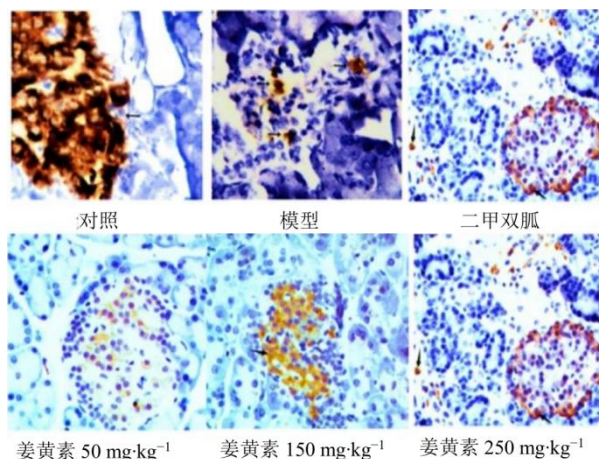


图6 各组胰岛细胞分泌胰岛素比较 ($\times 400$)

Fig. 6 Comparison of insulin secretion by islet cells in each group ($\times 400$)

3.8 GSIS刺激实验观察姜黄素对胰岛功能的影响

经葡萄糖刺激后胰岛原代细胞的胰岛素分泌结果如图7所示,用高糖或低糖刺激时,与对照组比较,模型组胰岛素分泌显著较少 ($P < 0.05$);与模型组比较,姜黄素显著增加胰岛原代细胞分泌胰岛素 ($P < 0.05$)。

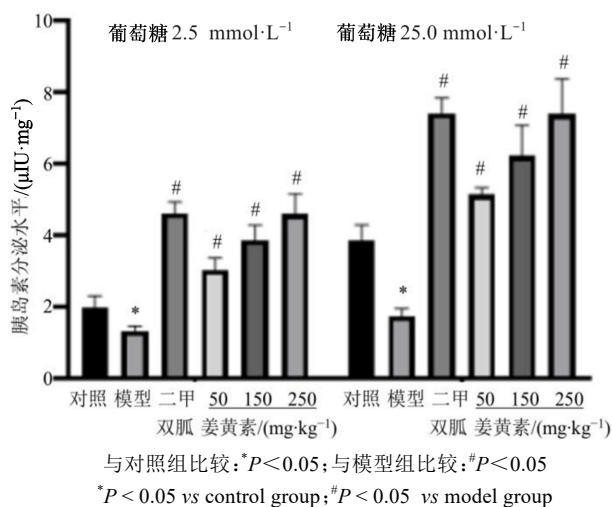


图7 各组胰岛素分泌情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Fig. 7 Insulin secretion in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

4 讨论

随着生活方式的改变,肥胖人群数量剧烈增长,糖尿病的发病率逐年提升,作为最常见的内分泌疾病,伴有各种代谢紊乱。它可导致高血糖、高血脂症、高血压、动脉粥样硬化、视网膜病变、神经病变和肾病^[15-16]。大多数糖尿病患者通过日常严格管理饮食,使用胰岛素等降糖药物^[15],控制病情。姜黄素作为一种天然植物多酚,是国内外允许使用的重要天然色素之一,应用于食品工业中。姜黄素具

有来源广、价格低、无毒性、抗炎、抗氧化及抗癌等特点,在糖尿病防治方面受到广泛关注^[18]。本研究发现,姜黄素改善糖尿病大鼠的血糖降低,降低空腹血糖、糖化血红蛋白水平,升高血清C肽水平,降低血清糖化血红蛋白、TG、TC、LDL-C、ALT、AST、Scr、BUN、UA水平,升高HDL-C水平;促使胰岛细胞结构恢复完整,萎缩坏死现象消退,胰岛细胞的完整性得到保护;促进胰岛细胞分泌胰岛素。表明姜黄素可以保护糖尿病大鼠胰岛细胞,缓解糖尿病症状。

研究表明,很多中药单体作用途径均与NF- κ B相关,如黄芪甲苷、阿魏酸及其配伍可通过调控NF- κ B通路在保护糖尿病血管内皮损害等方面发挥重要作用^[19]。另有研究表明,姜黄素可通过抑制NF- κ B信号通路减轻高糖诱导的H9C2心肌细胞损伤^[20]。NF- κ B是一类典型的蛋白质复合物,在免疫应答、应激反应、细胞凋亡等多种生理过程中起重要作用,过度激活后容易导致多种疾病^[9,19]。NF- κ B信号通路主要由NF- κ B、I κ B、I κ B激酶(I κ B kinase, IKK)3种信号分子组成,是重要的炎症信号通路^[21-23]。I κ B α 作为I κ B家族的成员之一,是NF- κ B重要的反应基因,可以负作用于NF- κ B,抑制其活动^[24-25]。P65是NF- κ B家族成员之一,其对应的核转位是NF- κ B通路被有效激活的关键标志^[26]。NF- κ B与糖尿病的病理机制有密切关系,糖尿病病理状态下,体内氧自由基产生增多、多元醇途径活性增强、糖基化终产物生成、葡萄糖自身氧化增加等导致氧化还原失衡,激活应激信号转导通路,引起细胞损伤,而NF- κ B信号通路在其中起着重要作用^[27-28]。另有研究显示NF- κ B的激活在胰岛 β 细胞丢失过程中起着关键作用,抑制NF- κ B信号通路可有效保护胰岛 β 细胞^[29]。本研究通过探讨姜黄素调节NF- κ B通路,进一步观察姜黄素治疗糖尿病的效果。本实验结果表明,与对照组相比,模型组大鼠胰腺组织中NF- κ B信号通路明显激活;与模型组相比,姜黄素各组p-P65蛋白表达水平显著降低,p-I κ B α 蛋白表达水平显著升高。证明糖尿病的发生发展中,NF- κ B信号通路与胰岛的损害密切相关;姜黄素可以抑制NF- κ B信号通路激活对糖尿病发挥治疗作用。

姜黄素可以保护糖尿病大鼠胰岛细胞正常形态,维持胰岛细胞功能,减轻糖尿病大鼠症状,其机制可能与调控NF- κ B信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李硕,倪向敏,王建. 2型糖尿病性骨质疏松症发病机制研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(11): 1661-1665.
Li S, Ni X M, Wang J. Research progress in the pathogenesis of type 2 diabetic osteoporosis [J]. Chin J Osteoporosis, 2021, 27(11): 1661-1665.
- [2] Barzilay J I, Abraham L, Heckbert S R, et al. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: The cardiovascular health study [J]. Diabetes, 2001, 50(10): 2384-2389.
- [3] Sankar P, Telang A G, Ramya K, et al. Protective action of curcumin and nano-curcumin against arsenic-induced genotoxicity in rats *in vivo* [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(11): 7413-7422.
- [4] Kunnumakkara A B, Anand P, Aggarwal B B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins [J]. Cancer Lett, 2008, 269(2): 199-225.
- [5] 狄建彬,顾振纶,赵笑东,等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(5): 854-857.
Di J B, Gu Z L, Zhao X D, et al. Advances in studies on antioxidant and anti-inflammation of curcumin [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2010, 41(5): 854-857.
- [6] 王振富,钟灵. 姜黄素对大鼠糖尿病防治作用的实验研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2014, 30(1): 68-69, 73.
Wang Z F, Zhong L. Experimental research into the preventative effect of curcumin on rat diabetes [J]. Chin J Appl Physiol, 2014, 30(1): 68-69, 73.
- [7] Song Z F, Wang H, Zhu L, et al. Curcumin improves high glucose-induced INS-1 cell insulin resistance via activation of insulin signaling [J]. Food Funct, 2015, 6(2): 461-469.
- [8] Zeender E, Maedler K, Bosco D, et al. Pioglitazone and sodium salicylate protect human beta-cells against apoptosis and impaired function induced by glucose and interleukin-1 β [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(10): 5059-5066.
- [9] 许传俊,明艳林,陈良华,等. 姜黄素在2型糖尿病及其慢性并发症中作用及机制的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(6): 30-34, 38.
Xu C J, Ming Y L, Chen L H, et al. Advances in research on effects and mechanisms of curcumin on type 2 diabetes mellitus and its chronic complications [J]. J Anhui Agric Sci, 2021, 49(6): 30-34, 38.
- [10] 张志良,王嘉睿,赵云跃,等. 人参皂苷Rb₁对糖尿病大

- 鼠心脏功能和心肌细胞凋亡的影响[J]. 热带医学杂志, 2021, 21(3): 261-265, 275, 393.
- Zhang Z L, Wang J R, Zhao Y Y, et al. The effects of ginsenoside Rb₁ on cardiac function and cardiocyte apoptosis in diabetes rats [J]. J Trop Med, 2021, 21(3): 261-265, 275, 393.
- [11] Thoma A, Lightfoot A P. NF- κ B and inflammatory cytokine signalling: Role in skeletal muscle atrophy [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1088: 267-279.
- [12] 王红磊. 成人血清免疫球蛋白浓度与2型糖尿病发病风险的前瞻性队列研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2018.
- Wang H L. Serum immunoglobulin concentrations and risk of type 2 diabetes mellitus in adults: A prospective cohort study [D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2018.
- [13] 刘施吟, 王瑞, 牟淑敏. 中医药干预NF- κ B信号通路治疗2型糖尿病的研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2016, 14(10): 143-145.
- Liu S Y, Wang R, Mou S M. Research progress of the intervention of traditional Chinese medicine on NF- κ B signaling pathway in the treatment of type II diabetes [J]. Chin Med Mod Dist Educ China, 2016, 14(10): 143-145.
- [14] 王敏, 王洪彪, 马晓蕊, 等. 姜黄素的提取、生理功能及其在肉鸡生产中的应用研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2022, 58(10): 59-64.
- [15] 王丹维, 张方方, 金亮, 等. miR-802靶向Hnf1B抑制胰岛素分泌的作用研究[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(1): 99-106.
- Wang D W, Zhang F F, Jin L, et al. Inhibition of miR-802 on insulin secretion by targeting Hnf1B [J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(1): 99-106.
- [16] 赵修振. 瑞舒伐他汀治疗老年冠状动脉粥样硬化性心脏病合并2型糖尿病的临床观察[J]. 中国临床医生杂志, 2021, 49(12): 1437-1439.
- Zhao X Z. Clinical observation of rosuvastatin in the treatment of senile coronary atherosclerotic heart disease complicated with type 2 diabetes mellitus [J]. Chin J Clin, 2021, 49(12): 1437-1439.
- [17] 阮勇, 莫伟明, 陈健, 等. 不同剂量熊果酸对糖尿病大鼠肝肾功能及血脂血糖水平的影响[J]. 中医学报, 2019, 34(5): 1007-1011.
- Ruan Y, Mo W M, Chen J, et al. Effects of different doses of ursolic acid on liver and kidney function, blood lipid and blood glucose level in diabetic rats [J]. Acta Chin Med, 2019, 34(5): 1007-1011.
- [18] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(5): 854-857.
- Di J B, Gu Z L, Zhao X D, et al. Advances in studies on antioxidant and anti-inflammation of curcumin [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2010, 41(5): 854-857.
- [19] 张具斌, 朴成玉, 刘婷婷, 等. 中药调控NF- κ B相关信号通路防治糖尿病肾病的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2022, 56(5): 98-101.
- Zhang J B, Piao C Y, Liu T T, et al. Research progress on Chinese medicine in prevention and treatment of diabetic nephropathy by interfering with NF- κ B related signaling pathways [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2022, 56(5): 98-101.
- [20] 夏娟, 张书春, 代紫阳, 等. 姜黄素通过抑制NF- κ B信号通路减轻高糖致H9C2心肌细胞损伤的实验研究[J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(6): 778-782.
- Xia J, Zhang S C, Dai Z Y, et al. Circumin attenuates high glucose-induced H9C2 cardiomyocyte injury via NF- κ B signaling pathway [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2021, 40(6): 778-782.
- [21] Su X F, Li N, Meng F L, et al. MiR-16 inhibits hepatocellular carcinoma progression by targeting FEAT through NF- κ B signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(8): 10274-10282.
- [22] Sun B Q, Sui Y D, Huang H, et al. Effect of lncRNA CRNDE on sepsis-related kidney injury through the TLR3/NF- κ B pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(23): 10489-10497.
- [23] Zhang Y M, Zhou X C, Zhang Q L, et al. Involvement of NF- κ B signaling pathway in the regulation of PRKAA1-mediated tumorigenesis in gastric cancer [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 3677-3686.
- [24] 金笑呈. 加味清肺泻肝汤通过NF- κ B信号通路对糖尿病胰岛抵抗大鼠的影响[D]. 延吉: 延边大学, 2021.
- Jin X C. The effect of modified Jiawei Qingfei Xiegan Decoction on insulin resistance diabetic rats through NF- κ B signaling pathway [D]. Yanji: Yanbian University, 2021.
- [25] Fei J, Ling Y M, Zeng M J, et al. Shixiang plaster, a traditional Chinese medicine, promotes healing in a rat model of diabetic ulcer through the receptor for advanced glycation end products (RAGE)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) and vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)/endothelial nitric oxide synthase (eNOS) signaling pathways [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 9446-9457.
- [26] Ren X F, Chen C H, Luo Y M, et al. lncRNA-PLACT1 sustains activation of NF- κ B pathway through a positive feedback loop with I κ B α /E2F1 axis in pancreatic cancer [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 35.
- [27] Duan Y, An W, Wu H M, et al. Salvianolic acid C

- attenuates LPS-induced inflammation and apoptosis in human periodontal ligament stem cells via toll-like receptors 4 (TLR4)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 9499-9508.
- [28] Oliveira I D S D S, Colares A V, Cardoso F O, et al. *Vernonia polysphaera* Baker: Anti-inflammatory activity *in vivo* and inhibitory effect in LPS-stimulated RAW 264.7 cells [J]. PLoS One, 2019, 14(12): e0225275.
- [29] 胡朝恩, 钟大鹏, 艾智华. 糖脂毒性诱导胰岛 β 细胞炎症因子过表达的研究 [J]. 检验医学与临床, 2018, 15(12): 1716-1719.
- Hu C E, Zhong D P, Ai Z H. Overexpression of inflammatory cytokines in pancreatic beta cells induced by glucolipotoxicity [J]. Lab Med Clin, 2018, 15(12): 1716-1719.
- [30] 刘璐, 曹世杰, 程丽娜, 等. 肿瘤坏死因子- α 诱导脂肪细胞胰岛素抵抗模型的建立及评价指标 [J]. 天津中医药, 2018, 35(11): 848-853.
- Liu L, Cao S J, Cheng L N, et al. Establishment and evaluation of tumor necrosis factor- α induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2018, 35(11): 848-853.

[责任编辑 兰新新]