

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.20.005

大黄素对糖尿病大鼠肠平滑肌内质网应激及调控机制的研究*

诸军¹, 马瑶¹, 陈婷¹, 陈龙霞¹, 杨倩颖¹, 赵宏贤^{2△}

(四川医科大学:1. 2010 级临床医学 2 系; 2. 组织学与胚胎学教研室, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨大黄素对糖尿病大鼠肠平滑肌细胞凋亡机制及调控机制。**方法** SD 大鼠分为对照组、糖尿病组与大黄素组, 成模 10 周时, 检测小肠推进率; TUNEL 法测肠平滑肌细胞凋亡; 免疫组织化学测细胞葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 及 Caspase-12 蛋白表达。**结果** 糖尿病组与大黄素组大鼠于成模后出现多尿、多饮、多食、体质量减轻症状; 血糖水平显著增高 ($P < 0.05$)。成模 10 周时, 与对照组比较, 糖尿病组大鼠小肠推进率显著下降 ($P < 0.05$), 肠平滑肌细胞凋亡率、GRP78、Caspase-12 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$)。与糖尿病组比较, 大黄素组小肠推进率显著增高 ($P < 0.05$), 肠平滑肌细胞凋亡率、GRP78、Caspase-12 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 内质网应激途径介导了糖尿病大鼠肠平滑肌细胞凋亡; 大黄素可能降低糖尿病大鼠肠平滑肌内质网应激介导的细胞凋亡, 从而改善肠动力。

[关键词] 大黄素; 糖尿病; 肠道; 平滑肌; 内质网应激**[中图分类号]** R587.1; R574.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)20-2750-03

Effects of emodin on endoplasmic reticulum stress of intestinal smooth muscle in diabetic rats*

Zhu Jun¹, Ma Yao¹, Chen Ting¹, Chen Longxia¹, Yang Qianying¹, Zhao Hongxian^{2△}

(1. The Second Office of 2010 Clinical Medicine Science, Sichuan Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Department of Histology and Embryology, Sichuan Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the regulation of emodin on endoplasmic reticulum stress response of intestinal smooth muscle in diabetic rats. **Methods** SD rats were divided into control group, diabetic group and emodin group randomly. 10 weeks later, the intestinal motility, apoptosis, GRP78 and Caspase-12 proteins of intestinal smooth muscle cell were detected through intestinal propulsion rate, TUNEL and immunohistochemistry respectively. **Results** The rats in diabetic group and emodin group appeared the symptoms of diabetes. 10 weeks later, compared with control group, the intestinal propulsion rate of the diabetic group decreased significantly ($P < 0.05$), cell apoptotic rate, GRP78 and Caspase-12 proteins of intestinal smooth muscle increased significantly ($P < 0.05$). Compared with diabetic group, the intestinal propulsion rate of emodin group increased significantly ($P < 0.05$), cell apoptotic rate, GRP78 and Caspase-12 proteins of intestinal smooth muscle decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** The endoplasmic reticulum stress may be involved in the cell apoptosis of intestinal smooth muscle in diabetic rats, which played a partial role in the pathogenesis of intestinal dynamic obstacles of diabetes. Emodin may reduce the apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress of the intestinal smooth muscle in diabetic rats so as to improve the intestinal motivation.

[Key words] emodin; diabetes mellitus; intestine; smooth muscle; endoplasmic reticulum stress

糖尿病是一种常见的内分泌疾病, 大量的研究证实糖尿病患者存在肠道动力下降。糖尿病引起肠道运动下降的具体机制不是很清楚, 研究发现, 糖尿病可导致肠平滑肌细胞凋亡增加。细胞凋亡有 3 条途径, 其中死亡受体与线粒体途径为经典的凋亡途径。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS) 途径是近年发现的第 3 条重要的细胞凋亡途径, 它在多种细胞凋亡中发挥重要作用, 成为当今研究热点, ERS 引起细胞凋亡又有 3 条途径: c-Jun 氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK), CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)与 Caspase-12 激活途径。其中 Caspase-12 激活是其核心途径。大黄素是中药大黄主要活性成分, 现代研究已证实大黄素能够明显调节胃肠道平滑肌运动, 其具体机制有待深入研究。本实验建立糖尿病大鼠模型, 并在观察到肠动力下降的基础上, 检测 ERS 是否参与糖尿病肠平滑肌细胞凋亡, 以及大黄素对其调控机制, 为临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 健康纯系雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量 200 g 左右(泸州医学院动物科提供, 许可证号: 川实动物管质第 17 号); 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 美国 Sigma 公司); 大黄素(上海晶纯有限公司); TUNEL 试剂盒(瑞典 Roche Diagnostics 公司); 葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、Caspase-12 多克隆抗体(美国 Bioword 公司)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病造模 SD 大鼠适应性喂养 1 周, 选择 10 只血糖正常者健康大鼠作为对照组, 其余大鼠参考 Long 等^[1] 方法制作糖尿病模型, 以血糖持续 1 周大于或等于 16.9 mmol/L 为糖尿病造模成功(成模)。成模大鼠分为糖尿病组(10 只)与大黄素组(10 只)。成模 2 周后, 对照组与糖尿病组以磷酸盐缓冲液(PBS) 5 mL/kg 灌胃, 大黄素组用 8 g/L 大黄素混悬液灌胃, 5 mL/kg 每天 1 次, 直至取材前 1 d(10 周时)。(1)一般指标: 观察进食量、饮水量、尿量等, 每周测体质量 1 次, 取材前

(10 周时)再测体质量。(2)血糖测定:造模后第 3 天及成模后 1、4 和 8 周采尾血监测空腹血糖,取材前(10 周时)再测血糖 1 次。(3)肠动力学指标:各组大鼠禁食不禁水 24 h 后,将 1 mg/mL 的亚甲蓝溶液 0.4 mL 经口灌胃,30 min 后处死大鼠,迅速游离小肠,测量小肠被美亚甲蓝染成蓝色的末端至幽门的距离(a)和小肠总长度(A)即幽门至回盲瓣的距离,计算小肠推进率= $a/A \times 100\%$ 。

1.2.2 TUNEL 法检测肠平滑肌细胞凋亡 按 TUNEL 试剂盒说明的步骤进行染色。染色样品片放入 3% H_2O_2 水溶液中,室温 10 min;PBS 洗涤样片,加 TdT 及 Biotin-dUTP 混合液至样片 20 μ L/片,37 $^{\circ}C$ 湿盒中孵育标记 60 min;以封闭液按照 1:50 配置辣根过氧化物酶(HRP)为工作液,50 μ L 加于样品片,37 $^{\circ}C$ 盒中孵育标记 60 min,二氨基联苯胺(DAB)显色液显色,苏木素染液复染细胞核。TUNEL 法阳性结果判断:细胞核棕黄(褐)色。每组取 10 个标本,每个标本 1 张切片,数码显微镜照相,Image-proplus5.0 软件计算各组细胞凋亡率。

1.2.3 免疫组织化学法检测肠平滑肌 GRP78、Caspase-12 蛋白表达 取距回盲部 10 cm 处回肠组织常规石蜡包埋,5 μ m 连续切片,二甲苯脱蜡至水,3% H_2O_2 室温孵育 10 min,蒸馏水冲洗 3 min \times 3 次,微波抗原修复 20 min,正常羊血清封闭,室温孵育 15 min,加 1:100 一抗体 4 $^{\circ}C$ 过夜,PBS 洗片 5 min \times 3 次,滴加生物素标记二抗,37 $^{\circ}C$,20 min,PBS 洗片 5 min \times 3 次,加链霉亲和素-生物素复合物(SABC)液,37 $^{\circ}C$,20 min,PBS 洗片 5 min \times 3 次,DAB 显色,自来水冲洗,脱水、透明、封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照。每组取 10 个标本,每个标本 2 张切片。GRP78、Caspase-12 阳性结果判断:细胞质着色,染成棕黄(褐)色为阳性。数码显微镜照相,Image-proplus5.0

软件分析积分光密度(OD)值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS14.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

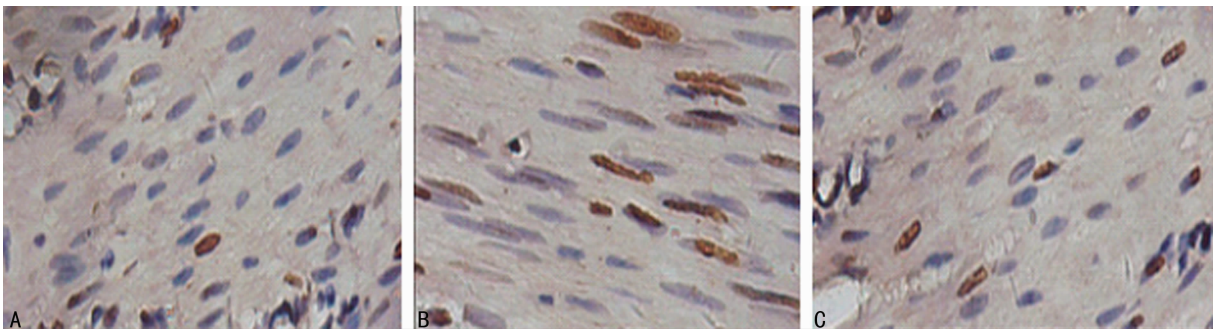
2.1 动物一般状况及血糖水平比较 对照组一般状况良好;糖尿病组与大黄素组于造模后第 3 天开始出现多饮、多食、多尿,成模 10 周时,两组大鼠精神萎靡、反应迟钝、皮毛疏松无光泽、背部的毛发部分脱落,少数极度衰竭,体质量明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。造模 3 d 后,模型组与大黄素组空腹血糖始终维持在 16.9 mmol/L 以上;成模 10 周时,与对照组比较,模型组与大黄素组大鼠血糖均显著增加($P < 0.05$),与模型组比较,大黄素组大鼠血糖显著降低($P < 0.05$),但未降至正常水平,见表 1。

表 1 大鼠体质量与血糖水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量(g)	血糖水平(mmol/L)
对照组	10	457.00 \pm 23.10	6.52 \pm 3.54
糖尿病组	10	165.54 \pm 26.48*	27.49 \pm 5.26*
大黄素组	10	175.22 \pm 15.28*	20.33 \pm 7.28*#

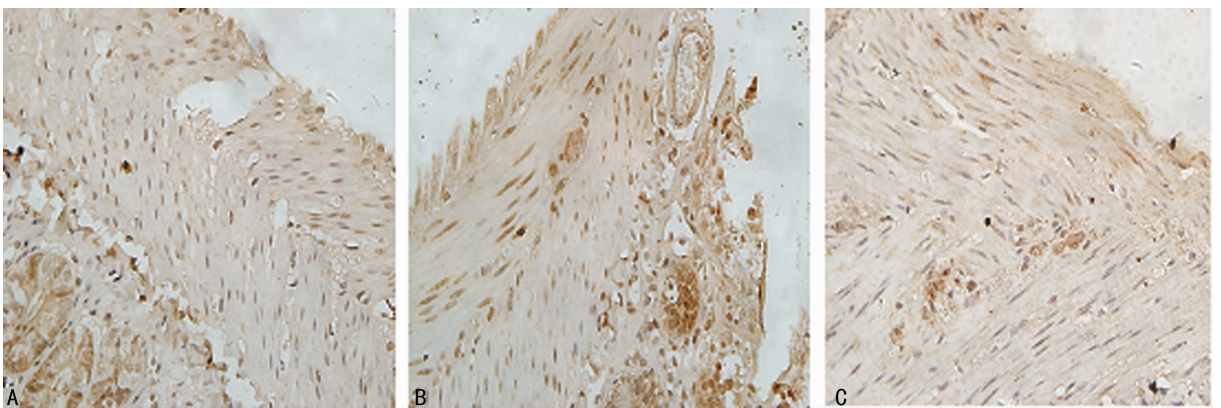
*: $P < 0.05$,与对照组比较;#: $P < 0.05$,与糖尿病组比较。

2.2 小肠推进率 糖尿病组小肠推进率明显低于对照组(31.26% \pm 8.25% vs. 50.83% \pm 7.54%),差异有统计学意义($P < 0.05$);大黄素组小肠推进率明显高于糖尿病组(40.23% \pm 6.79% vs. 31.26% \pm 8.25%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A: 对照组; B: 糖尿病组; C: 大黄素组。

图 1 肠平滑肌细胞凋亡(TUNEL, $\times 400$)

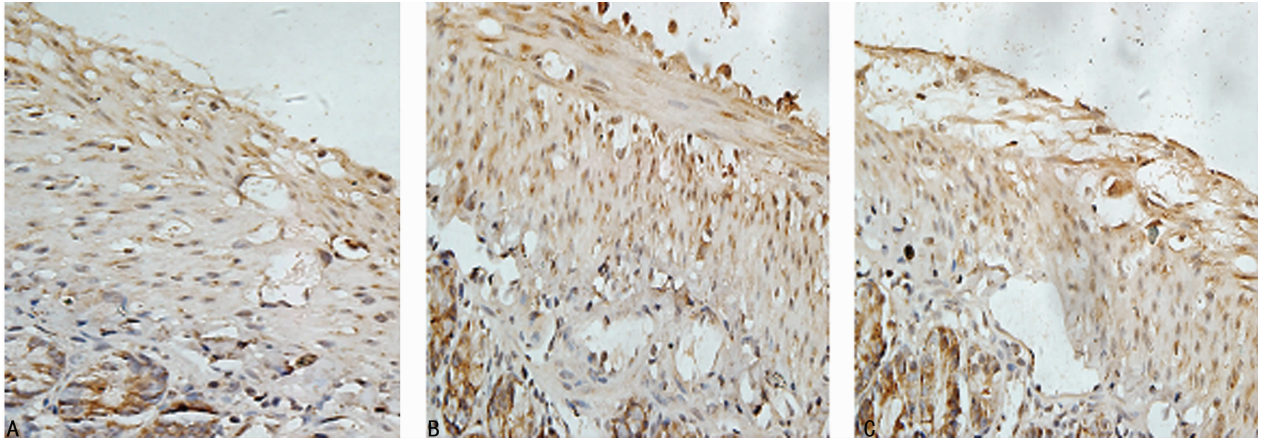


A: 对照组; B: 糖尿病组; C: 大黄素组。

图 2 肠平滑肌细胞 GRP78 蛋白阳性表达(SABC, $\times 200$)

2.3 肠平滑肌细胞凋亡率 糖尿病组肠平滑肌细胞凋亡率明显高于对照组(11.65%±3.30% vs. 2.54%±1.30%),差异有统计学意义($P<0.05$);大黄素组肠平滑肌细胞凋亡率明显

低于糖尿病组(6.50%±1.97% vs. 11.65%±3.30%),差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。



A:对照组;B:糖尿病组;C:大黄素组。

图 3 肠平滑肌细胞 Caspase-12 蛋白阳性表达(SABC,×200)

2.4 肠平滑肌细胞 GRP78 与 Caspase-12 蛋白表达情况 糖尿病组肠平滑肌细胞 GRP78 与 Caspase-12 蛋白表达明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);大黄素组肠平滑肌细胞 GRP78 与 Caspase-12 蛋白表达明显低于糖尿病组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2,图 2、3。

表 2 肠平滑肌细胞 GRP78 与 Caspase-12 蛋白 OD 值($\bar{x}\pm s$)

组别	n	GRP78	Caspase-12
对照组	10	8.87±1.781	23.68±7.24
糖尿病组	10	17.08±3.81*	51.00±8.69*
大黄素组	10	12.42±1.90*#	34.79±5.14*#

*: $P<0.05$,与对照组比较;#: $P<0.05$,与糖尿病组比较。

3 讨论

近年来大量研究证实,糖尿病患者肠道存在运动障碍,而肠道平滑肌细胞凋亡可能在上述过程中发挥重要作用。本实验显示成模 10 周时,糖尿病大鼠小肠推进率下降,表明存在肠道动力下降症状,糖尿病大鼠肠平滑肌细胞凋亡增多,与相关研究结果一致。

ERS 是指细胞受到环境毒物、缺氧、病毒、紫外线等刺激时内质网出现的腔内错误折叠,未折叠蛋白聚集以及 Ca^{2+} 平衡紊乱的状态。ERS 可促进内质网发生一系列生理变化对蓄积在内质网的错误折叠或未折叠蛋白质进行处理,从而有利于维持细胞的正常功能并使之存活,但是过度的 ERS 可引起细胞凋亡^[2]。GRP78 与热休克蛋白 70(Hsp70)家族具有高度同源性,被认为是 Hsp70 家族成员之一^[3]。GRP78 为 ERS 标志性蛋白^[4-6]。ERS 是引起糖尿病及慢性并发症发生发展的关键机制之一^[7-8]。本研究显示,糖尿病大鼠肠平滑肌细胞 GRP78 表达水平上调,表明糖尿病大鼠肠道平滑肌细胞存在 ERS 反应。ERS 介导的凋亡途径中,Caspase-12 起着至关重要的作用。Caspase-12 只在大鼠和小鼠体内被克隆。有研究认为人的 Caspase-4 与鼠 Caspase-12 为同源物,Caspase-4 在人体中发挥着鼠 Caspase-12 的作用^[9]。Caspase-12 的激活是 ERS 介导的细胞凋亡的核心途径,它可以激活 Caspase-9,后者则

激活 Caspase-3,最终引起细胞凋亡^[10]。研究表明,Caspase-12 与阿尔兹海默病、视网膜变性、呼吸系统感染疾病等多种疾病有关^[11-13]。本实验表明,糖尿病大鼠肠道平滑肌细胞 Caspase-12 蛋白表达水平上调可能引起 ERS 介导的肠平滑肌细胞凋亡,引起有功能的细胞减少,进而导致大鼠小肠动力降低。

研究表明,大黄素使便秘大鼠结肠肌间神经丛中的胆碱能神经分布趋于正常,可能是其调节结肠功能、治疗慢传输型便秘的机制之一^[14]。大黄素属蒽醌衍生物,是大黄等多种中药的有效成分。是目前临床上用于缓泻的药物如麻子仁丸、苁蓉通便口服液、大黄通便胶囊、大黄便秘散等有效成分之一^[15-16]。现代医学认为,大黄素具有诸多药理作用。大量动物实验已证实,大黄素能够明显调节胃肠道平滑肌运动。本研究表明,大黄素可提高糖尿病大鼠肠道动力,其增强肠动力的机制之一可能是通过调节 Caspase-12 蛋白表达,减轻 ERS 介导的肠平滑肌细胞凋亡。实验数据还表明大黄素并未能将糖尿病大鼠肠道动力恢复至对照组水平,提示大黄素在使用过程中应与其他药物配合治疗。

参考文献

- [1] Long QL, Fang DC, Shi HT, et al. Change of c-K it/SCF signaling system and its effect on interstitial cells in gastric antrum of diabetic rats[J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2007(2):141-143.
- [2] 姜茜, 许彩民. 内质网应激与细胞死亡[J]. 生命科学, 2009, 29(5):645-648.
- [3] Zhang J, Tang J, Cao B, et al. The natural pesticide dihydrorotnone induces human plasma cell apoptosis by triggering endoplasmic reticulum stress and activating p38 signaling pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(7):e69911.
- [4] Fireczuk M, Gabrysiak M, Barankiewicz J, et al. GRP78-targeting subtilisin cytotoxin sensitizes cancer cells to photodynamic therapy[J]. Cell Death Dis, 2013(4):e741.
- [5] Martin S, Lamb HK, Brady C, et al. Inducing apoptosis of cancer cells using small-molecule plant(下转第 2755 页)

道肿瘤细胞增殖,还可显著抑制其他系统肿瘤细胞,但具体的分子机制仍未阐明^[4-7,12-15]。

本研究通过观察细胞形态、MTT 实验发现,AMP(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作用 72 h 后,能明显抑制肾癌 786-O 细胞;AMP 浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞抑制率可达到 90% 以上,大部分细胞失去活性或死亡;表明 AMP 能显著抑制肾癌 786-O 细胞增殖。流式 Annexin V/PI 双染法是测定细胞凋亡的敏感的方法之一,通过双重荧光标记(Annexin V-FITC 和 PI)可以清楚辨别并统计出早期凋亡细胞的比例。本研究采用流式细胞学方法,探究 AMP 对体外肾癌 786-O 细胞凋亡的作用。经 AMP 处理 72 h 后,即可发现肾癌细胞的凋亡率显著上升,在一定的浓度范围内达到最大凋亡率,如 10~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,肾癌细胞凋亡率不会随着 AMP 的浓度增加而增加,而浓度为 40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 能有效促进肾癌 786-O 细胞凋亡,这可能跟 AMP 的量效浓度有关^[8-10]。

综上所述,AMP 可显著抑制肾癌细胞增殖,促进肾癌细胞凋亡,从而起到抗肿瘤的作用,为 AMP 的生物治疗作用提供一定的实验依据,为泌尿系统常见恶性肿瘤肾癌的治疗提供了新的线索。然而 AMP 作用于肾癌的具体分子机制目前仍不明确,需进一步深入研究。

参考文献

[1] 付明,黎晓英,王登守,等. 显齿蛇葡萄叶中黄酮类化合物的研究[J]. 中国药学杂志,2015,50(7):574-575.
 [2] 姚欣,周春权,林静瑜,等. 复方藤茶的药理实验[J]. 福建中医学院学报,2007,17(6):31-33.
 [3] 陈晓明,倪峰. 藤茶药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2010,22(1):16-17.
 [4] 周春权,姚欣,陈晓明,等. 藤茶提取物的抗肿瘤作用研究[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(6):640-642.

[5] 倪峰,姚欣,郭丹,等. 蛇葡萄素对人前列腺癌 PC3 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中药药理与临床,2012,28(3):39-41.
 [6] 姚欣,倪峰,郭丹,等. 蛇葡萄素对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 福建中医药大学学报,2014,24(1):22-24.
 [7] 龙云,杨泽娟,耿焱,等. 蛇葡萄素对人膀胱癌 T24 细胞株凋亡的作用研究[J]. 吉林医学,2012,33(22):4709-4711.
 [8] Guo YL,Zhou LQ. Campbell-walsh urologk[M]. 9th Ed. Beijing:Beijing Medical University Press,2009:1668.
 [9] 曹良启,王晓黎,刘德育. 黄酮类化合物诱导肿瘤细胞凋亡的研究进展[J]. 中药材,2004,27(10):785-788.
 [10] 李云霞,贺文智,索全伶,等. 黄酮类化合物活性及构效关系研究概况[J]. 内蒙古石油化工,2004,30(2):10-12.
 [11] 何桂霞,裴刚,周天达,等. 显齿蛇葡萄中总黄酮和二氢杨梅素的含量测定[J]. 中国中药杂志,2000,25(7):423-425.
 [12] 郑作文,郭成贤,唐云丽,等. 藤茶蛇葡萄素抗人胃癌细胞作用的实验研究[J]. 中国药物应用与监测,2007,4(1):29.
 [13] 刘德育,罗曼,谢冰芬,等. 蛇葡萄素的抗肿瘤作用研究[J]. 癌症,2001,20(12):1372-1375.
 [14] 张琼,刘德育. 蛇葡萄素改变 Be1-2/Bax 表达和激活 Caspase-3 诱导人肝癌细胞 Be1-7402 凋亡[J]. 中国药理学通报,2009,25(11):1502-1506.
 [15] 吕建军,任润珍,刘凯,等. 蛇葡萄素(AMP)对 SPC-A-1 细胞增殖的抑制作用[J]. 中国老年学杂志,2010,30(6):798-800.

(收稿日期:2015-01-28 修回日期:2015-03-26)

(上接第 2752 页)

compounds that bind to GRP78[J]. Br J Cancer,2013,109(2):433-443.
 [6] Takada A,Miki T,Kuno A,et al. Role of ER stress in ventricular contractile dysfunction in type 2 diabetes[J]. PLoS One,2012,7(6):e39893.
 [7] Lakshmanan AP,Harima M,Suzuki K,et al. The hyperglycemia stimulated myocardial endoplasmic reticulum, (ER) stress contribute to diabetic cardiomyopathy in the trans-genic non-obese type 2 diabetic rats;a differential role of unfolded protein response,UPR) signaling proteins[J]. Int J Biochem Cell Biol,2013,45(2):438-447.
 [8] Ortiz C,Cardemil I. Heat-shock responses in two leguminous plants;a comparative study[J]. Exp Bot,2001,52(361):1711-1719.
 [9] Koenig U,Eckhart L,Tschachle E. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene [J]. Biochem Biophys Res Commun,2001,285(5):1150-1154.
 [10] Hitomi J,Katayama T,Taniguchi M,et al. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 viacaspase-12 [J]. Neurosci Lett,2003,357(2):127-130.
 [11] Scott AM. The inflammatory caspases: guardians against

infections and sepsis[J]. Cell Death Differ,2007,14(1):23-31.
 [12] Sanges D,Comitato A,Tammaro R,et al. Apoptosis in retinal degeneration involves cross-talk between apoptosis-inducing factor(AIF) and caspase-12 and is blocked by calpain inhibitors[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(46):17366-17371.
 [13] Bitko V,Barik S. An Endoplasmic reticulum-specific stress-activated Caspase (Caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus[J]. J Cell Biochem,2001,80(3):441-454.
 [14] 汪兴伟,刘海峰,徐梅,等. 大黄对慢传输型便秘大鼠结肠肌间神经丛胆碱能神经的影响[J]. 重庆医学,2008,37(15):1685-1686.
 [15] 刘哈,高云. 大黄素药理作用的分子机制研究进展[J]. 中国药理学通报,2009,25(12):1552-1555.
 [16] Ma T,Qi QH,Xu J,et al. Signal pathways involved in emodin induced contraction of smooth muscle cells from rat colon[J]. World J Gastroenterol,2004,10(10):1476-1479.

(收稿日期:2015-01-11 修回日期:2015-03-12)