

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220623

· 论 著 ·

## 黄连化浊胶囊对分泌及 Ras 相关 GTP 酶 1A 敲除诱导的外被蛋白 II 功能障碍胰岛 $\beta$ 细胞内质网应激的干预效果

周春楠, 王苑铭\*

甘肃中医药大学附属医院内分泌科, 兰州 730200

**[摘要]** **目的** 考察黄连化浊胶囊对分泌及 Ras 相关 GTP 酶 1A (*sar-1A*) 敲除诱导的外被蛋白 II (COP-II) 功能障碍胰岛  $\beta$  细胞内质网应激的干预效果。**方法** 将小鼠胰岛  $\beta$  细胞 Min6 分为空白组 (Min6 细胞无任何干预)、阴性对照 (NC) 组 (Min6 细胞转染 *sar-1A*-NC-siRNA) 及 *sar-1A* siRNA 组 (Min6 细胞转染 *sar-1A* siRNA)。收集 *sar-1A* siRNA 转染的 Min6 细胞, 分为空白血清组 (用含 10% 大鼠空白血清的培养基培养), 5%、10%、20% 黄连化浊胶囊组 (分别用含 5%、10%、20% 黄连化浊胶囊含药血清的培养基培养), 以及罗格列酮组 (用含 10% 罗格列酮含药血清的培养基培养)。采用 qPCR 检测 Min6 细胞中 *sar-1A* miRNA 的表达、免疫荧光法检测 sec31 蛋白的表达, 蛋白质印迹法检测胰岛素原、磷酸化真核翻译起始因子 2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ )、C/EBP 同源蛋白 (CHOP)、X 盒结合蛋白 1 (XBP1)、肌醇需求酶 1 (IRE1)、X 盒 (X-box) 蛋白的表达。**结果** 空白组与 NC 组 Min6 细胞中 *sar-1A* mRNA、sec31 蛋白及胰岛素原、p-eIF2 $\alpha$ 、CHOP、XBP1、IRE1、X-box 蛋白表达差异均无统计学意义 ( $P$  均  $>0.05$ ); 与 NC 组相比, *sar-1A* siRNA 组 Min6 细胞中 *sar-1A* mRNA、sec31 蛋白及胰岛素原和 X-box 蛋白表达均降低 ( $P$  均  $<0.05$ ), p-eIF2 $\alpha$ 、CHOP、XBP1、IRE1 蛋白表达均升高 ( $P$  均  $<0.05$ )。与空白血清组相比, 5%、10%、20% 黄连化浊胶囊组及罗格列酮组 Min6 细胞中 *sar-1A* mRNA 表达均升高 ( $P$  均  $<0.05$ ), 5%、10%、20% 黄连化浊胶囊组 Min6 细胞中 *sar-1A* mRNA 表达逐渐升高, 各组间差异均有统计学意义 ( $P$  均  $<0.05$ )。空白血清组与 5% 黄连化浊胶囊组 Min6 细胞中 sec31 蛋白及胰岛素原、p-eIF2 $\alpha$ 、CHOP、XBP1、IRE1、X-box 蛋白表达差异均无统计学意义 ( $P$  均  $>0.05$ ); 与 5% 黄连化浊胶囊组相比, 10%、20% 黄连化浊胶囊组及罗格列酮组 Min6 细胞中 sec31 蛋白和胰岛素原表达均增加 ( $P$  均  $<0.05$ ), p-eIF2 $\alpha$ 、CHOP、XBP1、IRE1、X-box 蛋白表达均降低 ( $P$  均  $<0.05$ )。**结论** *sar-1A* 敲除后胰岛  $\beta$  细胞存在 COP-II 功能障碍, 黄连化浊胶囊能够降低 *sar-1A* 敲除后胰岛  $\beta$  细胞的内质网应激水平。

**[关键词]** 胰岛  $\beta$  细胞; 黄连化浊胶囊; 内质网应激; 分泌及 Ras 相关 GTP 酶 1A

**[引用本文]** 周春楠, 王苑铭. 黄连化浊胶囊对分泌及 Ras 相关 GTP 酶 1A 敲除诱导的外被蛋白 II 功能障碍胰岛  $\beta$  细胞内质网应激的干预效果 [J]. 海军军医大学学报, 2023, 44 (9): 1073-1080. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220623.

### Intervention effects of *Huanglian Huazhuo* capsule on endoplasmic reticulum stress of islet $\beta$ cells with coat protein II dysfunction induced by secretion associated Ras related GTPase 1A knockout

ZHOU Chunnan, WANG Yuanming\*

Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730200, Gansu, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the intervention effects of *Huanglian Huazhuo* capsule on endoplasmic reticulum stress (ERS) of islet  $\beta$  cells with coat protein II (COP-II) dysfunction induced by secretion associated Ras related GTPase 1A (*sar-1A*) knockout. **Methods** Mouse islet  $\beta$  cells Min6 were divided into 3 groups: blank group (Min6 cells without any intervention), negative control (NC) group (Min6 cells were transfected with *sar-1A*-NC-small interfering RNA [siRNA]), and *sar-1A* siRNA group (Min6 cells were transfected with *sar-1A* siRNA). Min6 cells transfected with *sar-1A* siRNA were collected and divided into blank serum group (cells cultured in medium with 10% blank serum), 5%, 10%, and 20% *Huanglian Huazhuo* capsule groups (cells cultured in medium with 5%, 10%, and 20% serum containing *Huanglian Huazhuo* capsule), and rosiglitazone group (cells cultured in medium with 10% serum containing rosiglitazone).

[收稿日期] 2022-07-25

[接受日期] 2022-09-02

[基金项目] 兰州市科技发展计划项目 (2022-ZD-89). Supported by Science and Technology Development Plan of Lanzhou (2022-ZD-89).

[作者简介] 周春楠, 主治医师. E-mail: 43746602@qq.com

\*通信作者 (Corresponding author). Tel: 0931-8635007, E-mail: 1935141724@qq.com

The expression of *sar-1A* mRNA in Min6 cells was detected by quantitative polymerase chain reaction, the expression of sec31 protein was detected by immunofluorescence, and the expression of proinsulin, phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ), C/EBP homologous protein (CHOP), X-box binding protein 1 (XBP1), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), and X-box proteins was detected by Western blotting. **Results** There were no significant differences in *sar-1A* mRNA, sec31, proinsulin, p-eIF2 $\alpha$ , CHOP, XBP1, IRE1, or X-box protein between the blank group and the NC group (all  $P > 0.05$ ). Compared with the NC group, the *sar-1A* siRNA group showed decreased expression of *sar-1A* mRNA, sec31 protein, proinsulin, and X-box protein (all  $P < 0.05$ ), and increased expression of p-eIF2 $\alpha$ , CHOP, XBP1, and IRE1 proteins (all  $P < 0.05$ ). Compared with the blank serum group, the *sar-1A* mRNA expression in the 5%, 10%, and 20% *Huanglian Huazhuo* capsule groups and the rosiglitazone group was significantly increased (all  $P < 0.05$ ). The expression of *sar-1A* mRNA was gradually increased in the 5%, 10%, and 20% *Huanglian Huazhuo* capsule groups (all  $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the expression of sec31, proinsulin, p-eIF2 $\alpha$ , CHOP, XBP1, IRE1, or X-box protein between the blank serum group and the 5% *Huanglian Huazhuo* capsule group (all  $P > 0.05$ ). Compared with the 5% *Huanglian Huazhuo* capsule group, sec31 protein and proinsulin in Min6 cells of 10%, 20% *Huanglian Huazhuo* capsule groups and rosiglitazone group were significantly increased (all  $P < 0.05$ ), and p-eIF2 $\alpha$ , CHOP, XBP1, IRE1, and X-box proteins were significantly decreased (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** COP- II dysfunction is found in the islet  $\beta$  cells after *sar-1A* knockdown, and *Huanglian Huazhuo* capsule can reduce ERS of islet  $\beta$  cells after *sar-1A* knockdown.

[ **Key words** ] islet  $\beta$  cell; *Huanglian Huazhuo* capsule; endoplasmic reticulum stress; secretion associated Ras related GTPase 1A

[ **Citation** ] ZHOU C, WANG Y. Intervention effects of *Huanglian Huazhuo* capsule on endoplasmic reticulum stress of islet  $\beta$  cells with coat protein II dysfunction induced by secretion associated Ras related GTPase 1A knockdown [J]. Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(9): 1073-1080. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220623.

胰岛素是机体降低血糖的重要激素, 胰腺  $\beta$  细胞在内质网中可形成前胰岛素原, 其信号肽被信号肽酶剪切形成另一个前体胰岛素原, 经过分子伴侣及相关蛋白处理后形成具有空间结构的胰岛素原, 后者被运出内质网到达高尔基体发挥作用<sup>[1-2]</sup>。当胰岛素原在内质网中发生错误折叠不能运出时, 内质网的稳态被打破, 错误折叠的蛋白质在其中积累可致内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS)。外被蛋白 II (coat protein II, COP-II) 可介导非选择性运输, 参与内质网到高尔基体的运输<sup>[3]</sup>。分泌及 Ras 相关 GTP 酶 1A (secretion associated Ras related GTPase 1A, sar-1A) 是具有召集鸟苷三磷酸酶的蛋白, 主要在细胞质中表达, 与转运蛋白 Sec23、Sec24 形成二聚体后参与 COP-II 的形成, 当 sar-1A 发生化学突变后会导致 COP-II 功能障碍<sup>[4]</sup>。有研究表明, 当 COP-II 发生功能障碍时胰岛素原从内质网输出减慢, 胰岛素原的表达减少, 可对内质网稳态产生影响<sup>[5]</sup>。

中医将糖尿病归属为消渴范畴, 认为其发病机制与饮食不节、中焦失运或先天不足、后天失养有关。黄连化浊胶囊又名黄金胶囊, 是根据浊毒理论所研制的中药复方制剂, 由温胆汤转化而来, 具

有清热解毒、运脾化浊等功效, 其可以通过降低胰岛素抵抗控制血糖<sup>[6]</sup>。本研究探讨了黄连化浊胶囊对 *sar-1A* 敲除诱导 COP-II 功能障碍胰岛  $\beta$  细胞 ERS 的干预效果, 以期为相关研究提供参考。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物及细胞 30 只 4 周龄、体重为 200~350 g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠购自济南朋悦实验动物繁育有限公司 [动物生产许可证号: SCXK (鲁) 20190003]。饲养条件: 在相对湿度为 55%、常温、模拟昼夜交替环境下, 无菌饮食 2 周。按照《实验动物管理条例》规定进行实验, 动物实验经我院伦理委员会审批, 批准号为 [2021] 动伦审字 (S742)。小鼠胰岛  $\beta$  细胞 Min6 购自通派 (上海) 生物科技有限公司。

1.2 药物、主要试剂与仪器 黄连化浊胶囊 (黄连 9 g, 鸡内金 12 g, 法半夏 9 g, 竹茹 15 g, 枳实 9 g, 陈皮 9 g, 茯苓 15 g, 炙甘草 9 g) 为甘肃中医药大学附属医院院内制剂 (批准文号: 甘药制字 Z120110), 批号 171103。马来酸罗格列酮片为葛兰素史克 (天津) 有限公司产品 (批准文号: 国药准字 H20020475)。

小鼠 *sar-1A* siRNA (货号 L-042764-00-0005, 中国 Dharmacon 公司), FBS、青-链霉素、PBS、0.25% 胰蛋白酶溶液 (货号分别为 SH30109.03、SV30010、SH30256.01、SH30042.01, 美国 HyClone 公司), 脂质体 Lipofectamine™ 2000 (货号 13778-075, 中国 ThermoFisher Scientific 公司), Opti-MEM 培养基 [货号 U21-08100F, 攸碧艾 (上海) 贸易有限公司], *sar-1A* 抗体 [货号 15350-1-AP, 安诺伦 (北京) 生物科技有限公司], C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 抗体、 $\beta$ -肌动蛋白抗体 (货号分别为 GTX112827、GTX629630, 中国 GeneTex 公司), 胰岛素原单克隆抗体 (货号 HZK-11647, 上海沪峥生物科技有限公司), 兔抗鼠真核翻译起始因子  $2\alpha$  (eukaryotic translation initiation factor  $2\alpha$ , eIF $2\alpha$ ) 单克隆抗体 (货号 XG-K1047, 上海西格生物科技有限公司), 兔抗鼠 X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP1) 单克隆抗体 (货号 YB00708, 上海钰博生物科技有限公司), 肌醇需求酶 1 (inositol-requiring enzyme 1, IRE1) 单克隆抗体 (货号 IMX-3612, 武汉艾美捷科技有限公司), 兔抗鼠 X 盒 (X-box) 蛋白单克隆抗体 (货号 9016049, 深圳子科生物科技有限公司), Prime Script<sup>RT</sup> Master Mix 试剂盒 (货号 RR036A, 日本 TaKaRa 公司), 磷酸化真核翻译起始因子  $2\alpha$  (phosphorylated eukaryotic translation initiation factor  $2\alpha$ , p-eIF $2\alpha$ ) 抗体 (货号 HK10458, 上海户实医药科技有限公司), TRIzol 提取试剂盒 (货号 YIJI10254655, 上海一基实业有限公司), PCR SYBR Preme Ex Taq II (2 $\times$ ) 试剂盒 (货号 RR820A, 武汉科昊佳生物科技有限公司), sec31 抗体 (货号 ybs-4453R, 上海研谨生物科技有限公司), 荧光淬灭封片剂 (货号 LM-1058D, 上海联迈生物工程有限公司), HRP 标记的二抗 (货号 H6161S/H6161, 苏州优逸兰迪生物科技有限公司), 0.2% Triton X-100 (货号 JK-E1694, 上海晶抗生物有限公司)。

DA7600 实时荧光定量 PCR 仪 (中山大学达安基因股份有限公司), 伯乐 ChemiDoc MP 化学发光凝胶成像系统 (中国 Bio-Rad 公司), Qilinbeier TS-1000 型摇床 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司), IX71 型倒置显微镜 (上海赖氏电子科技有限公司), TDZ4-WS 型低速离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司), 电泳仪 (北京六一仪器

厂), Smartproof 5 型激光共聚焦显微镜 (德国蔡司公司), 蔡司 Zen 4.000 软件 (中国 Carl Zeiss 显微镜有限责任公司), Image-Lab™ 图像分析系统 (哈尔滨德远科技开发有限公司)。

1.3 Min6 细胞培养及 *sar-1A* siRNA 转染 Min6 细胞用含有 10% FBS、1% 青霉素、1% 链霉素的 Opti-MEM 培养基, 于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C、饱和湿度的细胞培养箱中培养, 取对数生长期细胞进行后续实验。将 Min6 细胞分为空白组、阴性对照 (negative control, NC) 组及 *sar-1A* siRNA 组。转染方法: 将 Min6 细胞接种到 6 孔板中, 利用脂质体 Lipofectamine™ 2000 进行转染, 将 *sar-1A* siRNA、*sar-1A*-NC-siRNA 分别转染 50% 融合的 Min6 细胞, 转染 48 h 后收获细胞进行后续实验。空白组细胞不做任何干预处理。

1.4 qPCR 检测 Min6 细胞中 *sar-1A* mRNA 表达 采用 TRIzol 提取试剂盒提取细胞中总 RNA。相关基因引物均由济南海智科技发展有限公司设计并合成。参考 5 $\times$ Prime Script<sup>RT</sup> Master Mix 试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA。PCR 扩增参考 SYBR Preme Ex Taq II (2 $\times$ ) 试剂盒说明书进行。引物序列如下: *sar-1A* 正向引物为 5'-CG-CGAATTCAATGTCCTTTTCATATTTGAGTGG-3', 反向引物为 5'-GGATCCTCAGTCAATATACTGGAGAGTTAGC-3';  $\beta$ -肌动蛋白正向引物为 5'-CCGCCAGAAGATGAGTGAAAT-3', 反向引物为 5'-ACGCTTCACGAATTTGGGTHTC-3'。基因相对转录水平采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算。

1.5 大鼠含药血清的制备 30 只大鼠按照随机数字表法分为空白组、黄连化浊胶囊组及罗格列酮组, 每组 10 只。空白组不做任何干预处理。黄连化浊胶囊组灌胃 2.025 g/kg 的黄连化浊胶囊, 罗格列酮组灌胃罗格列酮 0.5 mg/kg, 每日 2 次, 连续 3 d。末次灌胃结束后, 采用 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 取大鼠腹主动脉血 2 mL, 静置 1 h, 3 000 $\times$ g 离心 10 min, 取空白血清和含药血清于一 80 °C 保存, 使用前以 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤除菌。

1.6 细胞分组及药物处理 将转染 *sar-1A* siRNA 的 Min6 细胞分为空白血清组 (用含 10% 大鼠空白血清的培养基培养)、5% 黄连化浊胶囊组 (用含 5% 黄连化浊胶囊含药血清的培养基培养)、10% 黄连化浊胶囊组 (用含 10% 黄连化浊胶囊含药血清的培养基培养)、20% 黄连化浊胶囊组 (用含 20%

黄连化浊胶囊含药血清的培养基培养)及罗格列酮组(用含10%罗格列酮含药血清的培养基培养),24 h后收集细胞进行实验。

1.7 免疫荧光法检测 *sar-1A* 敲减对 Min6 细胞 sec31 蛋白表达的影响 Min6 细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 48 h 后,弃去培养基, PBS 洗涤,用 4% 多聚甲醛溶液固定 5 min, PBS 洗涤 3 次,室温封闭 1 h。按照说明书比例加入 sec31 抗体及 0.2% Triton X-100, 室温孵育 1 h, DAPI 染核 5 min, PBS 洗涤后加入适量抗荧光淬灭封片剂,在激光共聚焦显微镜下观察拍照,并用蔡司 Zen 4.000 软件分析各组 sec31 蛋白表达的平均荧光强度。

1.8 蛋白质印迹法检测 *sar-1A* 敲减对 Min6 细胞胰岛素原、p-eIF2 $\alpha$ 、CHOP、XBP1、IRE1、X-box 蛋白表达的影响 用 PBS (pH 7.0) 清洗细胞,添加蛋白质裂解液裂解细胞 10 min,将 1.5 mL 样本收集至离心管中,14 170 $\times$ g 离心 20 min,静置 60 s 后提取上清液,每个样本取上清液 25  $\mu$ L 检测蛋白浓度。取 50  $\mu$ g 蛋白进行 SDS-PAGE。后继续转膜, PVDF 膜从转膜槽中取出,用 TBST 漂洗 5 min,加入稀释后的胰岛素原抗体(稀释比例为 1 : 150)、p-eIF2 $\alpha$  抗体(稀释比例为 1 : 250)、CHOP 抗体(稀释比例为 1 : 200)、XBP1 抗体(稀释比例为 1 : 500)、IRE1 抗体(稀释比例为 1 : 150)、X-box

抗体(稀释比例为 1 : 150)及内参 GAPDH 抗体(稀释比例为 1 : 500)孵育,加入 HRP 标记的二抗(稀释比例为 1 : 1 000)孵育。避光环境下加显影液,反应 60 s 后,用 Image-Lab 图像分析系统进行成像和分析。

1.9 统计学处理 应用 GraphPad Prism 8 软件分析,所有数据符合正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用最小显著性差异法。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 *sar-1A* siRNA 转染的 Min6 细胞中 *sar-1A* mRNA 的表达 空白组、NC 组及 *sar-1A* siRNA 组 Min6 细胞中 *sar-1A* mRNA 表达量分别为  $1.00 \pm 0.00$ 、 $0.97 \pm 0.04$ 、 $0.42 \pm 0.07$ , 3 组间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与 NC 组相比, *sar-1A* siRNA 组 Min6 细胞中 *sar-1A* mRNA 表达降低 ( $P < 0.01$ )。

2.2 *sar-1A* 敲减对 Min6 细胞 sec31 蛋白表达的影响 空白组、NC 组及 *sar-1A* siRNA 组 Min6 细胞中 sec31 蛋白的平均荧光强度分别为  $1.30 \pm 0.22$ 、 $1.27 \pm 0.26$  及  $0.79 \pm 0.16$ , 3 组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与 NC 组相比, *sar-1A* siRNA 组 Min6 细胞中 sec31 蛋白平均荧光强度降低 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

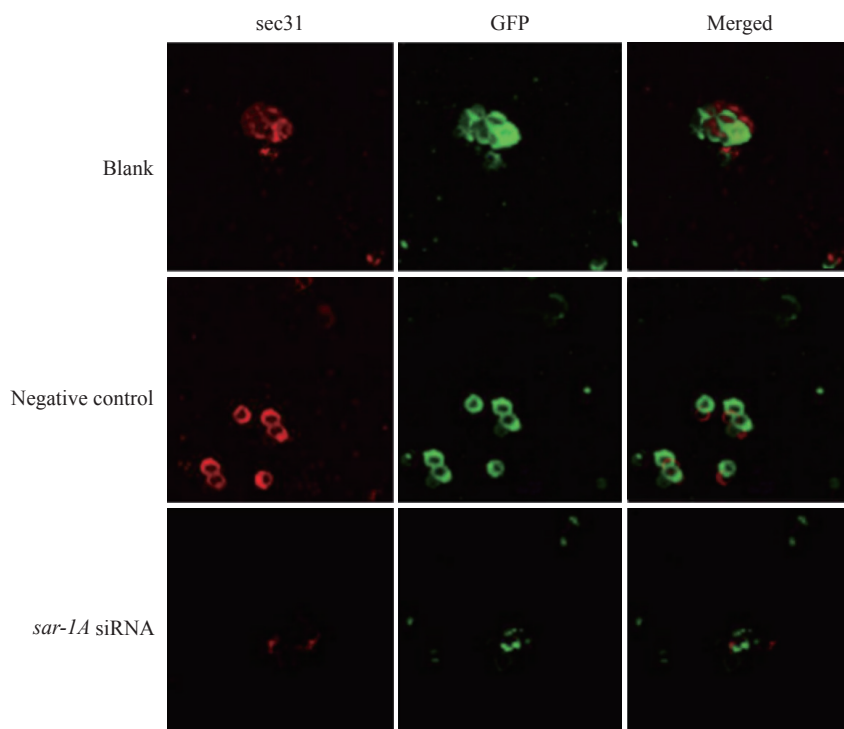


图 1 免疫荧光法检测各组 Min6 细胞中 sec31 蛋白的表达 (200 $\times$ )

Fig 1 Expression of sec31 in Min6 cells in each group detected by immunofluorescence (200 $\times$ )

GFP: Green fluorescence protein; sar-1A: Secretion associated Ras related GTPase 1A; siRNA: Small interfering RNA.

2.3 *sar-1A* 敲减对 Min6 细胞中胰岛素原、p-eIF2 $\alpha$ 、CHOP、XBP1、IRE1、X-box 蛋白表达的影响 空白组与 NC 组 Min6 细胞中胰岛素原、p-eIF2 $\alpha$ 、CHOP、XBP1、IRE1、X-box 蛋白表达的差异均无

统计学意义 ( $P$  均  $>0.05$ ) ; 与 NC 组相比, *sar-1A* siRNA 组胰岛素原和 X-box 蛋白的表达降低 ( $P$  均  $<0.05$ ) , p-eIF2 $\alpha$ 、CHOP、XBP1、IRE1 蛋白的表达升高 ( $P$  均  $<0.05$ ) 。见表 1、图 2。

表 1 3 组 Min6 细胞中胰岛素原、p-eIF2 $\alpha$ 、CHOP、XBP1、IRE1、X-box 蛋白的表达水平

Tab 1 Expression levels of proinsulin, p-eIF2 $\alpha$ , CHOP, XBP1, IRE1 and X-box in Min6 cells of 3 groups

Group	$n=6, \bar{x} \pm s$					
	Proinsulin	p-eIF2 $\alpha$	CHOP	XBP1	IRE1	X-box
Blank	1.55 $\pm$ 0.20	1.02 $\pm$ 0.17	0.84 $\pm$ 0.10	0.54 $\pm$ 0.08	0.37 $\pm$ 0.15	0.61 $\pm$ 0.10
NC	1.49 $\pm$ 0.23	0.98 $\pm$ 0.22	0.82 $\pm$ 0.09	0.51 $\pm$ 0.12	0.40 $\pm$ 0.10	0.63 $\pm$ 0.07
<i>sar-1A</i> siRNA	0.88 $\pm$ 0.17* $\Delta$	2.20 $\pm$ 0.30* $\Delta$	1.44 $\pm$ 0.27* $\Delta$	0.89 $\pm$ 0.22* $\Delta$	0.77 $\pm$ 0.16* $\Delta$	0.44 $\pm$ 0.06* $\Delta$
<i>F</i> value	20.31	51.69	24.55	11.21	15.38	10.61
<i>P</i> value	$<0.001$	$<0.001$	$<0.001$	0.001	$<0.001$	0.001

\* $P < 0.05$  vs blank group;  $\Delta P < 0.05$  vs NC group. p-eIF2 $\alpha$ : Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ ; CHOP: C/EBP homologous protein; XBP1: X-box binding protein 1; IRE1: Inositol-requiring enzyme 1; NC: Negative control; sar-1A: Secretion associated Ras related GTPase 1A; siRNA: Small interfering RNA.

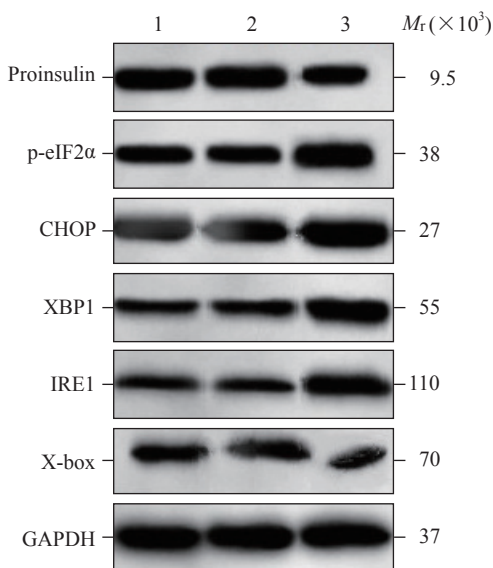


图 2 蛋白质印迹法检测 3 组 Min6 细胞中胰岛素原、p-eIF2 $\alpha$ 、CHOP、XBP1、IRE1、X-box 蛋白的表达

Fig 2 Expression of proinsulin, p-eIF2 $\alpha$ , CHOP, XBP1, IRE1 and X-box in Min6 cells of 3 groups detected by Western blotting

1: Blank group; 2: Negative control group; 3: *sar-1A* siRNA group. p-eIF2 $\alpha$ : Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ ; CHOP: C/EBP homologous protein; IRE1: Inositol-requiring enzyme 1; XBP1: X-box binding protein 1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; sar-1A: Secretion associated Ras related GTPase 1A; siRNA: Small interfering RNA.

2.4 黄连化浊胶囊对 Min6 细胞中 *sar-1A* mRNA 表达的影响 空白血清组、5% 黄连化浊胶囊组、10% 黄连化浊胶囊组、20% 黄连化浊胶囊组及罗格列酮组 Min6 细胞中 *sar-1A* mRNA 表达水平分别为 0.46 $\pm$ 0.05、0.63 $\pm$ 0.07、0.80 $\pm$ 0.10、0.96 $\pm$ 0.11、

0.82 $\pm$ 0.09, 组间差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ) 。与空白血清组相比, 其他 4 组 *sar-1A* mRNA 的表达均升高 ( $P$  均  $<0.05$ ) ; 5%、10%、20% 黄连化浊胶囊组的 *sar-1A* mRNA 表达水平随黄连化浊胶囊浓度升高而逐渐增加, 各组间差异均有统计学意义 ( $P$  均  $<0.05$ ) ; 10% 黄连化浊胶囊组与罗格列酮组的 *sar-1A* miRNA 表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) , 5%、20% 黄连化浊胶囊组与罗格列酮组的 *sar-1A* miRNA 表达水平差异均有统计学意义 ( $P$  均  $<0.05$ ) 。

2.5 黄连化浊胶囊对 Min6 细胞中 sec31 蛋白表达的影响 结果见图 3。空白血清组、5% 黄连化浊胶囊组、10% 黄连化浊胶囊组、20% 黄连化浊胶囊组及罗格列酮组 Min6 细胞中 sec31 蛋白的平均荧光强度分别为 37.48 $\pm$ 4.63、39.02 $\pm$ 5.52、56.11 $\pm$ 7.20、62.24 $\pm$ 8.11 和 61.54 $\pm$ 7.96, 组间差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ) 。空白血清组及 5% 黄连化浊胶囊组的 Min6 细胞中 sec31 蛋白表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) ; 与 5% 黄连化浊胶囊组相比, 10%、20% 黄连化浊胶囊组及罗格列酮组的 Min6 细胞中 sec31 蛋白表达均增加, 差异有统计学意义 ( $P$  均  $<0.05$ ) ; 20% 黄连化浊胶囊组与罗格列酮组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) 。

2.6 黄连化浊胶囊对 Min6 细胞中胰岛素原、p-eIF2 $\alpha$ 、CHOP、XBP1、IRE1、X-box 蛋白表达的影响 空白血清组与 5% 黄连化浊胶囊组 Min6 细胞中胰岛素原、p-eIF2 $\alpha$ 、CHOP、XBP1、IRE1、X-box 蛋白表达的差异均无统计学意义 ( $P$  均  $>0.05$ ) ; 与 5% 黄

连化浊胶囊组相比, 10%、20% 黄连化浊胶囊组及罗格列酮组的 Min6 细胞中胰岛素原的表达均增加, p-eIF2 $\alpha$ 、CHOP、XBP1、IRE1、X-box 蛋白的表

达均降低 ( $P$  均 $<0.05$ ) ; 20% 黄连化浊胶囊组与罗格列酮组上述蛋白的表达差异无统计学意义 ( $P$  均 $>0.05$ ) 。见表 2、图 4。

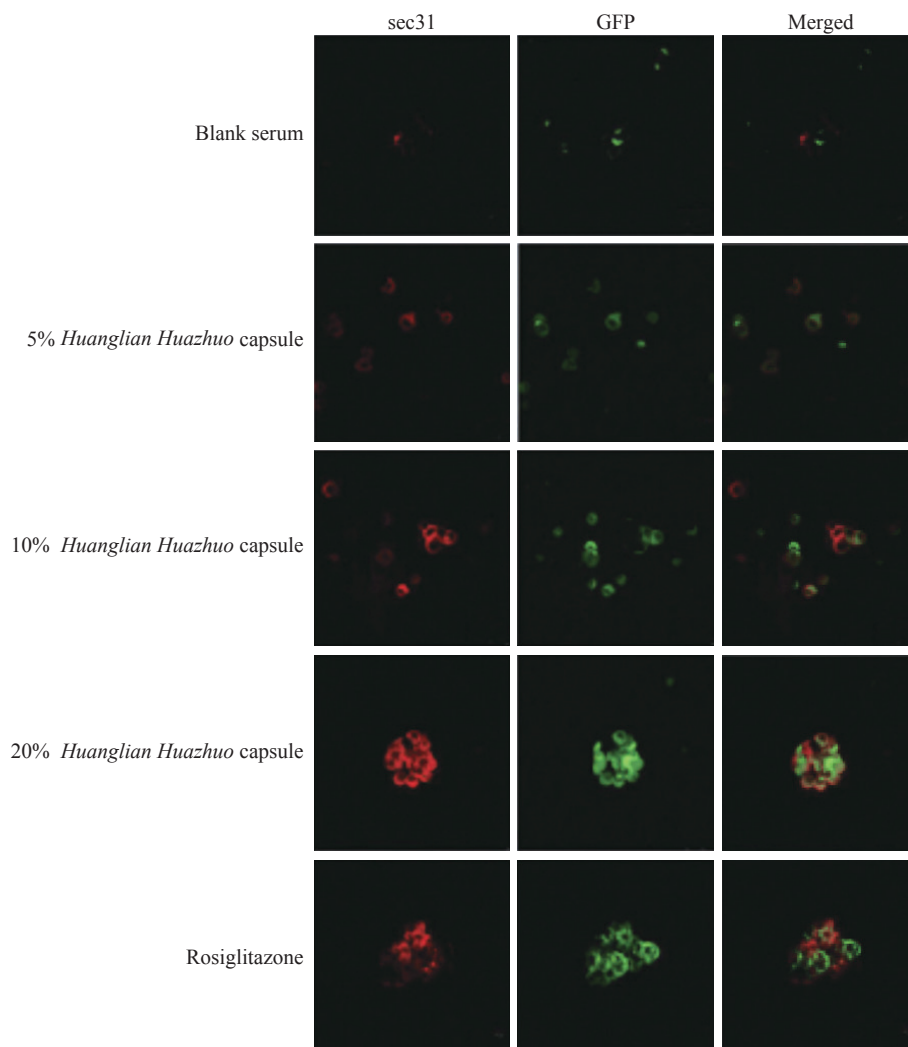


图 3 免疫荧光法检测黄连化浊胶囊对 Min6 细胞中 sec31 蛋白表达的影响 (200 $\times$ )

Fig 3 Effect of *Huanglian Huazhuo* capsule on sec31 expression in Min6 cells detected by immunofluorescence (200 $\times$ )  
GFP: Green fluorescence protein.

表 2 5 组 Min6 细胞中胰岛素原、p-eIF2 $\alpha$ 、CHOP、XBP1、IRE1、X-box 蛋白的表达水平

Tab 2 Expression levels of proinsulin, p-eIF2 $\alpha$ , CHOP, XBP1, IRE1 and X-box in Min6 cells of 5 groups

Group	$n=6, \bar{x} \pm s$					
	Proinsulin	p-eIF2 $\alpha$	CHOP	XBP1	IRE1	X-box
Blank serum	0.88 $\pm$ 0.17	2.20 $\pm$ 0.30	1.44 $\pm$ 0.27	0.89 $\pm$ 0.22	0.77 $\pm$ 0.16	0.44 $\pm$ 0.06
5% HHC	0.90 $\pm$ 0.15	2.15 $\pm$ 0.37	1.39 $\pm$ 0.30	0.87 $\pm$ 0.20	0.76 $\pm$ 0.20	0.42 $\pm$ 0.08
10% HHC	1.15 $\pm$ 0.20 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	2.02 $\pm$ 0.30 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	1.14 $\pm$ 0.19 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	0.56 $\pm$ 0.12 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	0.49 $\pm$ 0.11 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	0.37 $\pm$ 0.05 <sup>*<math>\Delta</math></sup>
20% HHC	1.36 $\pm$ 0.26 <sup>*<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup>	1.60 $\pm$ 0.28 <sup>*<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup>	0.76 $\pm$ 0.15 <sup>*<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup>	0.44 $\pm$ 0.10 <sup>*<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup>	0.30 $\pm$ 0.08 <sup>*<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup>	0.28 $\pm$ 0.07 <sup>*<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup>
Rosiglitazone	1.33 $\pm$ 0.28 <sup>*<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup>	1.64 $\pm$ 0.30 <sup>*<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup>	0.77 $\pm$ 0.13 <sup>*<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup>	0.47 $\pm$ 0.09 <sup>*<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup>	0.33 $\pm$ 0.06 <sup>*<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup>	0.30 $\pm$ 0.08 <sup>*<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup>
F value	6.588	4.978	10.12	11.82	17.98	6.328
P value	0.001	0.004	$<0.001$	0.001	$<0.001$	0.001

<sup>\*</sup> $P<0.05$  vs blank serum group;  <sup>$\Delta$</sup>  $P<0.05$  vs 5% HHC group;  <sup>$\blacktriangle$</sup>  $P<0.05$  vs 10% HHC group. p-eIF2 $\alpha$ : Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ ; CHOP: C/EBP homologous protein; XBP1: X-box binding protein 1; IRE1: Inositol-requiring enzyme 1; HHC: *Huanglian Huazhuo* capsule.

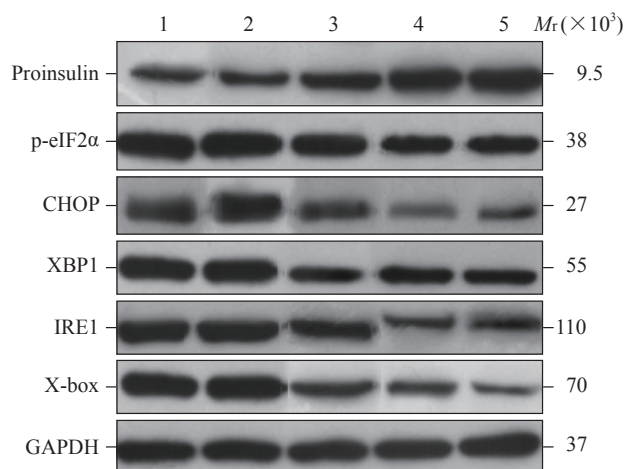


图4 蛋白质印迹法检测5组Min6细胞中胰岛素原、p-eIF2α、CHOP、XBP1、IRE1、X-box蛋白的表达  
Fig 4 Expression of proinsulin, p-eIF2α, CHOP, XBP1, IRE1 and X-box in Min6 cells of 5 groups detected by Western blotting

1: Blank serum group; 2: 5% *Huanglian Huazhuo* capsule group; 3: 10% *Huanglian Huazhuo* capsule group; 4: 20% *Huanglian Huazhuo* capsule group; 5: Rosiglitazone group. p-eIF2α: Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2α; CHOP: C/EBP homologous protein; XBP1: X-box binding protein 1; IRE1: Inositol-requiring enzyme 1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

### 3 讨论

内质网是哺乳动物最重要的细胞器,发挥着蛋白质合成、转运、折叠等作用,参与细胞质合成及钙离子的贮存。内质网具有正常的生理结构及功能,当未折叠或错误折叠的蛋白质数量增加时会破坏内质网稳态,导致氧化应激反应,称为ERS。胰岛β细胞是具有分泌胰岛素功能的细胞,正常状态下含有大量成熟的高尔基体,可经过一系列程序形成胰岛素原并发挥生理作用,但是在病理状态下胰岛素会大量进入内质网导致内质网钙耗竭,引起ERS。研究证实内质网中错误折叠的蛋白质激活在糖尿病的发生、发展中具有重要作用,认为缓解ERS对于治疗糖尿病具有重要意义<sup>[7]</sup>。

本研究结果显示,敲减*sar-1A*可增加胰岛β细胞中COP-II功能障碍,导致内质网输出损伤而降低胰岛素原表达,升高p-eIF2α、CHOP、XBP1、IRE1、X-box的表达,导致ERS的发生。胰岛素原运出内质网需要借助COP-II作为载体到达高尔基复合体而发挥作用。研究表明,在胰岛β细胞中改变*sar-1A*表达可导致胰岛素原积累在内质网,使胰

岛素合成受限,促进糖尿病的发生、发展<sup>[8]</sup>。*sar-1A*蛋白可募集家族成员形成异二聚体,是COP-II主要组成部分,*sar-1A*在COP-II可发挥促进囊泡分裂的作用,有利于胰岛素原的运输,降低胰岛素抵抗。为进一步证实COP-II介导的内质网在胰岛素折叠中的作用,研究者在胰岛β细胞中转染*sar-1A* siRNA,降低了COP-II相关蛋白sec31,增加胰岛素原错误重叠,导致内质网损伤并阻碍胰岛素原成熟<sup>[8]</sup>。ERS的发生过程主要依赖于内质网膜上的跨膜蛋白。IRE1是具有激酶活性及RNA酶活性的跨膜蛋白,在ERS发生过程中能够与Bip分离,并加快使其中的26个核苷酸从*XBP1*基因释放,最终经过转录因子到达细胞核,加快脂质代谢及炎症相关基因的表达及转录<sup>[9-10]</sup>。研究表明,当胰岛β细胞应激反应增加时可导致蛋白激酶R样内质网激酶下游因子eIF2α磷酸化,进而加快胰岛β细胞凋亡<sup>[11]</sup>。

本实验结果表明,对敲减*sar-1A*后的胰岛β细胞采用黄连化浊胶囊含药血清共培养,可改善其COP-II功能障碍,并通过降低p-eIF2α、CHOP、XBP1、IRE1、X-box表达及加快胰岛素原表达,改善胰岛素抵抗。

糖尿病的病因是外感六淫,导致五脏六腑功能失调,气血运化失常,气血停滞而脉络受阻,瘀血内生而化为血浊<sup>[12]</sup>。血浊累积于肝脏,诱导肝脏ERS发生,p-eIF2α、CHOP、XBP1、IRE1、X-box表达升高,胰岛素抵抗产生,最终导致糖尿病发生、发展。

黄连化浊胶囊具有抗糖尿病的作用,从糖尿病浊毒病理机制出发,黄连性寒、味苦,归心、脾、胃、胆及大肠经,具有泻毒、清燥、除湿及止消渴的功效<sup>[13]</sup>;鸡内金味甘、性平,归脾、小肠、胃及膀胱经,具有健脾、化滞及缩小便之功。两者均为君药,达到标本兼治及化浊、解毒的功效<sup>[14]</sup>。法半夏性温,味辛,归胃及脾脏,具有健脾除燥、温胃降逆的功效;竹茹微寒性,味甘,归胃经、胆经、脾经,具有开胃、清肺及除燥的作用;陈皮味辛,性温,归肺、脾经,以辛散之,以苦燥之,消痰导滞;枳实味苦,性寒,归胃、脾经,具有破气、化痰、消痞的作用。四者均为臣药,共奏健脾、化痰等功效<sup>[15]</sup>。茯苓味甘、淡,性平,无毒,归心、脾、肺、肾经,具有益脾除湿、安神生津的作用;

炙甘草味甘气温,调和诸药,为使药。全方共奏清热解毒、运脾化浊之效。黄连与鸡内金配伍,黄连善清中焦湿热,善治胃火炽盛,清解浊毒之邪,对于消渴病之多食易饥尤其以脾虚痰湿型消渴病尤为适用。在糖尿病大鼠中,黄连化浊胶囊可改善 ERS 紊乱,减轻肝脏损伤,这与其降低 eIF2 $\alpha$  及葡萄糖调节蛋白 78 表达相关<sup>[16]</sup>。本研究结果表明,与 5% 黄连化浊胶囊组相比,10% 黄连化浊胶囊组的抗 ERS 损伤作用显著;与 10% 黄连化浊胶囊组相比,20% 黄连化浊胶囊组改善 *sar-1A* 缺失而降低 COP- II 损伤的作用更加显著,说明随着黄连化浊胶囊药物用量的升高其抗 ERS 作用增强。

综上所述,*sar-1A* 敲减后胰岛  $\beta$  细胞存在 COP- II 功能障碍,黄连化浊胶囊可降低 *sar-1A* 敲减后胰岛  $\beta$  细胞的 ERS 水平,有望为相关疾病的治疗提供新的干预靶点。

#### [参 考 文 献]

- [1] BADMAEVA I N, ASTAFIEVA L I, KALININ P L, et al. [Central diabetes insipidus after resection of sellar-suprasellar tumors: prevalence and predictors of manifestation][J]. Zh Vopr Neurokhir Im N N Burdenko, 2021, 85(6): 111. DOI: 10.17116/neiro202185051111.
- [2] LABANDEIRA C M, FRAGA-BAU A, ARIAS RON D, et al. Diabetes, insulin and new therapeutic strategies for Parkinson's disease: focus on glucagon-like peptide-1 receptor agonists[J]. Front Neuroendocrinol, 2021, 62: 100914. DOI: 10.1016/j.yfrne.2021.100914.
- [3] LEGEAY S, FAUTRAT P, NORMAN J B, et al. Selective deficiency in endothelial PTP1B protects from diabetes and endoplasmic reticulum stress-associated endothelial dysfunction via preventing endothelial cell apoptosis[J]. Biomedecine Pharmacother, 2020, 127: 110200. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110200.
- [4] URAI Y, YAMAWAKI M, WATANABE N, et al. Pull down assay for GTP-bound form of Sar1a reveals its activation during morphological differentiation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(3): 2047-2053. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.07.157.
- [5] 克迪热亚·卡地尔,祖力皮亚·阿布拉,马红梅,等. 基于PERK-ATF4-CHOP通路探讨马利昔对高糖高脂诱导胰岛 $\beta$ 细胞损伤的影响[J]. 中中药学, 2022, 20(6): 1316-1321. DOI: 10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.016.
- [6] 张瀚文. 黄金胶囊改善糖尿病大鼠胰岛素抵抗与PI-3K、GLUT-4 蛋白表达的研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2015.
- [7] 张路煜,刘玉晖,游宇,等. 葛根对 2 型糖尿病大鼠胰腺内质网应激相关蛋白GRP78、ATF6 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(20): 82-87. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20202036.
- [8] 朱瑞敏. 内质网蛋白前向输出异常对胰岛素生物合成的影响[D]. 天津: 天津医科大学, 2019.
- [9] KOROVESIS D, RUFO N, DERUA R, et al. Kinase photoaffinity labeling reveals low selectivity profile of the IRE1 targeting imidazopyrazine-based KIRA6 inhibitor[J]. ACS Chem Biol, 2020, 15(12): 3106-3111. DOI: 10.1021/acscchembio.0c00802.
- [10] 王岩飞. 基于ERS 介导的凋亡信号通路探讨中药治疗糖尿病心肌病的机制[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [11] 赵斌. JNK 通过抑制胰岛素信号通路介导了高糖和软脂酸诱导的胰岛 $\beta$ 细胞凋亡[D]. 上海: 上海交通大学, 2008.
- [12] 康学东,张瀚文,余臣祖. 黄金胶囊对 2 型糖尿病伴胰岛素抵抗大鼠骨骼肌细胞PI-3K、GLUT4 蛋白表达的影响[J]. 新中医, 2015, 47(12): 227-229. DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.12.102.
- [13] 王苑铭,朱瑾. 基于PI3K/AKT通路研究黄金胶囊干预 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的初步机制[J]. 上海中医药杂志, 2022, 56(4): 92-96. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2022.2108033.
- [14] 余臣祖,安小平,康学东,等. 黄金胶囊对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 199-201. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2011.03.065.
- [15] 康学东,张瀚文,余臣祖. 黄金胶囊对糖尿病大鼠血糖和肝细胞PI-3K、GLUT-4 蛋白表达的影响[J]. 中医研究, 2016, 29(1): 50-54.
- [16] 余臣祖,秦双红,高攀,等. 黄金胶囊对 2 型糖尿病大鼠肝组织eIF2 $\alpha$  及GRP78 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(2): 28-32. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.201906074.

[本文编辑] 尹 茶