

石榴花水提物调节AHR/BNIP3改善糖尿病小鼠肝脏胰岛素信号

叶雨萌, 荣雨, 李包娟, 周克春, 张之

Pomegranate Flower Water Extract Modulates AHR/BNIP3 to Improve Hepatic Insulin Signaling in Diabetic Mice

YE Yumeng, RONG Yu, LI Baojuan, ZHOU Kechun, and ZHANG Yanzhi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023100075>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

石榴花浸提工艺优化及其红茶饮料的研制

Optimization of the extraction process of Pomegranate flowers and development of black tea beverage

食品工业科技. 2017(01): 230-233 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.01.036>

异鼠李素调控AKT-FOXO1通路改善胰岛素抵抗HepG2细胞糖代谢作用机制

The Mechanism of Isorhamnetin Regulating AKT-FOXO1 Pathways on Improve the Insulin Resistance Model of HepG2 Cells

食品工业科技. 2020, 41(23): 320-324 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020179>

石榴花游离型和结合型多酚提取物抗氧化活性探究

Antioxidant Activity of Free and Bound Polyphenols from Pomegranate Flowers

食品工业科技. 2021, 42(22): 290-296 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030110>

益生菌对2型糖尿病小鼠的调节作用

Administration of Probiotics on Type 2 Diabetes Mice

食品工业科技. 2020, 41(19): 339-346 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.053>

紫色马铃薯花色苷改善HepG2细胞胰岛素抵抗模型糖代谢的机制

The mechanism of purple potato anthocyanins improve the insulin resistance model of HepG2 cells^{*}

食品工业科技. 2018, 39(5): 319-324 <https://doi.org/>

乳酸菌改善糖尿病代谢作用机制研究进展

Research Progress on the Mechanism of Lactic Acid Bacteria in Improving Diabetes Metabolism

食品工业科技. 2021, 42(8): 404-409 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070270>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

叶雨萌, 荣雨, 李包娟, 等. 石榴花水提物调节 AHR/BNIP3 改善糖尿病小鼠肝脏胰岛素信号 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(7): 320–327. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100075

YE Yumeng, RONG Yu, LI Baojuan, et al. Pomegranate Flower Water Extract Modulates AHR/BNIP3 to Improve Hepatic Insulin Signaling in Diabetic Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(7): 320–327. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100075

· 营养与保健 ·

石榴花水提物调节 AHR/BNIP3 改善糖尿病小鼠肝脏胰岛素信号

叶雨萌, 荣雨, 李包娟, 周克春, 张葵之*
(新疆医科大学药学院, 新疆乌鲁木齐 830000)

摘要:目的: 探讨石榴花水提物 (pomegranate flower water extract, PFW) 对 2 型糖尿病小鼠肝脏胰岛素信号传导的影响及机制。方法: 将 C57BL/6J 随机分为正常组、模型组、二甲双胍组 (Met)、石榴花水提物低剂量组 (PFWL) 和石榴花水提物高剂量组 (PFWH)。连续给药 11 周后, 称小鼠体质量, 检测空腹血糖 (FBG)、胰岛素 (INS)、甘油三酯 (TG) 和总胆固醇 (TC) 的含量, 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR); 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝组织病理变化; Western blot 法检测肝组织中胰岛素受体底物 1 (IRS1)、p-IRS1 (Ser307)、蛋白激酶 B (AKT)、p-AKT (Ser473)、糖原合成酶激酶-3 β (Gsk3 β)、p-Gsk3 β (S9)、芳香烃受体 (AhR)、磷脂酰乙醇胺 N-甲基转移酶 (PEMT)、Bcl-2/腺病毒 E1B-19kDa 相互作用蛋白 3 (BNIP3) 蛋白表达。结果: 与模型组比较, PFWH 组 FBG、INS、HOMA-IR、TG 和 TC 含量极显著降低 ($P<0.01$); PFWH 组小鼠肝细胞内脂肪滴明显减少; PFWH 组极显著升高肝脏中 IRS1、p-AKT (Ser473)/AKT、p-Gsk3 β (S9)/Gsk3 β 、BNIP3 蛋白表达 ($P<0.01$), 极显著降低 p-IRS1 (Ser307)/IRS1、AHR、PEMT 蛋白表达 ($P<0.01$)。结论: PFW 可能通过调节 AHR/BNIP3 抑制肝脏脂质沉积, 改善 p-IRS1 (Ser307)/p-AKT (Ser473)/p-GSK3 β (S9) 胰岛素信号通路转导。

关键词:石榴花水取物, 胰岛素信号通路, 芳香烃受体, Bcl-2/腺病毒 E1B-19kDa 相互作用蛋白 3, 磷脂酰乙醇胺 N-甲基转移酶

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)07-0320-08

本文网刊:

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100075



Pomegranate Flower Water Extract Modulates AHR/BNIP3 to Improve Hepatic Insulin Signaling in Diabetic Mice

YE Yumeng, RONG Yu, LI Baojuan, ZHOU Kechun, ZHANG Yanzhi*

(School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

Abstract: Objective: To investigate the effects and mechanisms of pomegranate flower water extract on hepatic insulin signaling in type 2 diabetic mice. Methods: C57BL/6J was randomly divided into normal group, model group, metformin group (Met), pomegranate flower water extract low-dose group (PFWL) and pomegranate flower water extract high-dose group (PFWH). The drug was administered continuously for 11 weeks. Mice were tested for body mass, fasting blood glucose (FBG), insulin (INS), triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathologic changes in hepatic tissue. The expression levels of insulin receptor substrate 1 (IRS1), p-IRS1 (Ser307), protein kinase B (AKT), p-AKT (Ser473), glycogen synthase kinase-3 β (Gsk3 β), p-Gsk3 β (S9), aromatic hydrocarbon receptor (AhR), phosphatidylethanolamine N-methyltransferase

收稿日期: 2023-10-13

基金项目: 新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室 (No.XJDX1713); 国家自然科学基金项目 (No.81760767); 新疆医科大学博士启动基金 (No.2019-017)。

作者简介: 叶雨萌 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 代谢疾病研究与天然产物开发, E-mail: 1303110536@qq.com。

* 通信作者: 张葵之 (1975-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 代谢疾病研究与天然产物开发, E-mail: 1533465971@qq.com。

(PEMT), and Bcl-2/adenovirus E1B19-kDa interacting protein 3 (BNIP3) in mouse liver tissues were determined by Western blot. Results: Compared with the model group, the FBG, INS, HOMA-IR, TG and TC levels were significantly decreased in the PFWH group ($P<0.01$). Intracellular fat droplets were significantly decreased in the liver of mice in the PFWH group. Western blot results showed that compared with the model group, IRS1, p-AKT (Ser473)/AKT, p-Gsk3 β (S9)/Gsk3 β , and BNIP3 protein expression were significantly increased in the liver of the PFWH group ($P<0.01$), and p-IRS1 (Ser307)/IRS1, AHR, and PEMT protein expression were significantly decreased ($P<0.01$). Conclusion: PFW may inhibit hepatic lipid deposition by modulating AHR/BNIP3, and improve p-IRS1(Ser307)/p-AKT(Ser473)/p-GSK3 β (S9) insulin signaling pathway transduction.

Key words: pomegranate flower water extract; insulin signaling pathway; aromatic hydrocarbon receptor; Bcl-2/adenovirus E1B-19kDa interacting protein 3; phosphatidylethanolamine N-methyltransferase

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是由胰岛素分泌缺陷或胰岛素抵抗导致的,以长期高血糖为特征的代谢紊乱性疾病,主要分为 1 型糖尿病和 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM),其中 T2DM 占整个糖尿病比例的 90% 左右。T2DM 是一种以胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)为特征的非传染性疾病,目前全球患病率呈逐年上升,严重影响人们的身心健康,已成为世界性公共卫生难题^[1-2]。长期营养过剩会引起全身脂质代谢失衡,促进肝脏对脂质的摄取,肝脏脂肪积累增加可能损害胰岛素信号传导和诱导 IR^[3]。研究表明,肝脏内芳香烃受体(aromatic hydrocarbon receptor, AhR)和磷脂酰乙醇胺 N-甲基转移酶(phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, PEMT)的过表达会引起脂质沉积,进一步阻断肝脏胰岛素信号通路转导^[4-6]。Bcl-2/腺病毒 E1B-19kDa 相互作用蛋白 3(Bcl-2/adenovirus E1B19-kDa interacting protein 3, BNIP3)与慢性肝损伤和代谢紊乱密切相关,缺失 BNIP3 会加剧胰岛素抵抗及代谢综合征^[7]。已有研究发现, AhR 能够通过调节 BNIP3 减轻线粒体活性氧的产生,恢复肝脏功能性有丝分裂^[8]。本研究提出 AHR 有望通过调节 BNIP3 进而改善高脂饮食引发的胰岛素抵抗。目前糖尿病治疗药物包括双胍类、格列奈类、磺脲类等,尽管可以较好地控制血糖水平,但伴随刺激胃肠道及损害肝肾器官等副作用。传统中药在预防和改善 T2DM 方面表现出刺激性小、多靶点、多途径的优势^[9],因此,开发药食同源的天然活性物质在 T2DM 治疗上具有重要意义。

石榴是新疆特色药食两用植物,石榴花是石榴的干燥花瓣,民间常吃石榴花用于美容养颜、润肺止咳、养阴生津等^[10-11];现代研究表明石榴花具有降血糖、抗炎、保护肝脏等药理作用^[12],能治疗肺结核、中耳炎等多种疾病^[13]。李彤等^[14-15]研究发现,石榴花水提物能够改善 3T3-L1 前脂肪细胞胰岛素抵抗。但石榴花水提物改善 T2DM 小鼠肝脏胰岛素信号通路及调节肝脏脂质代谢靶点的关系尚待深入研究,本研究旨在从 AhR/BNIP3 途径调节肝脏脂质代谢探究石榴花水提物改善胰岛素信号通路的机制,以期石榴花防治糖尿病提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

50 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,体重范围(18~22)g 由新疆医科大学动物中心提供,动物许可证号 SCXK(新)2018-0003;二甲双胍片 Met 批号 170921,规格 0.25 g/片,北京京丰制药有限公司;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)纯度 $\geq 98\%$,批号 S0130,默克 Sigma 公司;高脂饲料 南通特洛菲饲料科技有限公司;石榴花水提取物(批号 QA 20210822) 西安瑞尔丽生物工程有限公司;总胆固醇试剂盒 TC Lot 20220412、甘油三酯试剂盒 TG Lot 20220412 南京建成生物工程研究所;ELISA 胰岛素试剂盒 Mouse INS ELISA KIT Lot 202207 上海 SinoBest;兔抗小鼠 PEMT(批号 5500016734)、兔抗小鼠 AhR(批号 5500016015) ABclonal 公司;PVDF 膜(批号 48659900) Roche 公司;兔抗小鼠 p-IRS1(Ser307)(批号 #35j4174) 优宁维生物公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号 15A022)、超敏 ECL 化学发光试剂盒(批号 09A062)、兔抗小鼠 AKT(批号 N12150003)、兔抗小鼠 p-AKT(Ser473)(批号 R01044074)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH(批号 N0607114)、IRS1(批号 M11303123)、兔抗小鼠 GSK3 β (批号 N12301456)、兔抗小鼠 p-GSK3 β (S9)(批号 N09213518)、兔抗小鼠 BNIP3(批号 R01161139)、HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(批号 04A032)、磷酸酶抑制剂(批号 18A112) 沈阳万类公司。

KZ-III-FP 型研磨仪 武汉赛维尔生物科技有限公司;AB106-N 型 XS205DU 分析天平 梅特勒-托利多仪器公司;Multiskan GO 1.01.12 酶标仪 赛默飞世尔上海仪器有限公司;MULTIFUGE X3R 型低温冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司;血糖仪 罗氏诊断产品有限公司;电泳仪 美国 BIORAD 公司;Eclipse Ni-U 型光学显微镜 尼康仪器有限公司;Azure 600 多功能分子成像系统 美国 Azure Biosystems 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制备及分组干预 C57BL/6J 小鼠 50 只,本实验经过新疆医科大学实验动物中心伦理委员会批准,伦理号: IACUC-20220308-14,适应性 3 d,按

体重随机分 10 只为正常组(Normal)喂普通饲料,其余给予 60% 高脂饲料喂养 6 周后,禁食不禁水 12 h 后按 85 mg/kg 剂量腹腔注射 2 次 STZ,每次间隔 3 d,正常组腹腔注射同体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。72 h 后,小鼠禁食不禁水 8 h,尾尖采血测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG),以 $FBG > 11.1$ mmol/L 为造模成功,按空腹血糖值排序,每组均匀分配每区间血糖值对应小鼠,按血糖平行可比原则进行分组,最后每组 8 只。分别为模型组(Model)、阳性对照二甲双胍组(Met)、石榴花水提物低剂量组(PFWL)和石榴花水提物高剂量组(PFWH)。正常组与模型组给予等剂量饮用水,阳性对照二甲双胍组给予剂量为 150 mg/kg 进行干预,石榴花水提物低剂量组和石榴花水提物高剂量组给予剂量分别为 200、400 mg/kg 进行干预,所有组每天上午 10:00 灌胃给药 1 次,连续干预 11 周。

1.2.2 血浆及组织样本的收集 药物干预 11 周后,小鼠禁食不禁水 8 h,称小鼠体重,测小鼠空腹血糖 FBG,腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠麻醉,眼眶取血,4 ℃、3000 r/min 离心 15 min,吸取上层血浆。颈部脱臼,摘取肝脏组织拍照并称重,一部分肝脏组织 4% 多聚甲醛固定,剩余肝脏组织于 -80 ℃ 保存。

1.2.3 肝脏指数计算 根据 1.2.2 中得到的小鼠体重及肝脏组织重量计算肝脏指数:

$$\text{肝脏指数}(\%) = \frac{\text{肝重}(\text{g})}{\text{体重}(\text{g})} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

1.2.4 血清生化指标测定 取 1.2.2 方法所得血浆,按试剂盒步骤检测 TG、TC、INS 指标,并根据说明书方法操作及计算公式测定小鼠血清中 TC、TG、INS 的含量。

$$\text{胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)} = \frac{\text{INS}(\text{mU/L}) \times \text{FBG}(\text{mmol/L})}{22.5} \quad \text{式 (2)}$$

1.2.5 苏木素-伊红(HE)染色 取 4% 多聚甲醛溶液固定的肝脏组织进行石蜡包埋,切片,按试剂盒步骤 HE 染色,在显微镜下观察并进行图像采集。

1.2.6 Western blotting 法检测 取肝脏组织,按比例加入 RIPA 蛋白裂解液并研磨,12000 r/min 离心 15 min 取上清,按 BCA 说明书法测浓度,制备 SDS-PAGE 凝胶进行电泳,结束后冰浴转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,配制磷酸化胰岛素受体底物 1(p-IRS1 Ser307)(1:2000)、胰岛素受体底物 1(IRS1)(1:500)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt Ser473)(1:1000)、蛋白激酶 B(Akt)(1:1000)、糖原合成酶激酶-3 β (Gsk3 β)(1:500)、磷酸化糖原合成酶激酶-3 β (p-Gsk3 β S9)(1:1500)、芳香烃受体(AhR)(1:1000)、Bcl-2/腺病毒 E1B-19kDa 相互作用蛋白 3(BNIP3)(1:500)、磷脂酰乙醇胺 N-甲基转移酶(PGMT)(1:3000)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(1:1000)一抗 4 ℃ 孵育过夜,0.1%TBST 洗膜,二抗 Ig G-HRP

(1:5000)室温孵育 120 min,0.1%TBST 洗膜,化学发光液显影成像。采用 Image J 分析,以 GAPDH 为内参,计算各目的蛋白相对表达量。

1.3 数据处理

所有数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。符合正态分布的方差齐性采用单因素方差分析(One way ANOVA)和方差齐性采用最小显著差数(LSD)法检测组间差异比较;不符合正态分布和方差齐性采用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。图像数据处理与分析采用 Image J 和 Prism GraphPad 8.3 软件。

2 结果与分析

2.1 PFW 对 T2DM 小鼠体重、肝重、肝脏指数的影响

如表 1 所示,与正常小鼠肝脏比较,糖尿病模型小鼠肝重、肝脏指数极显著增加($P < 0.01$);与糖尿病模型小鼠比较,石榴花水提物高剂量组肝重、肝脏指数均显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),二甲双胍组肝重、肝脏指数极显著降低($P < 0.01$);与二甲双胍组比较,石榴花水提物低剂量组和石榴花高剂量组没有统计学差异($P > 0.05$)。石榴花水提物能够减轻因高脂饮食引起的肝脏组织重量增加,且剂量相对越高,效果越好,且石榴花水提物高剂量组作用效果与二甲双胍组更相近,提示石榴花水提物高剂量改善肝脏指数具有显著效果。

表 1 PFW 对 T2DM 小鼠体重、肝重、肝脏指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of pomegranate flower water extract on body weight, liver weight and liver index of type 2 diabetes mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)	肝重(g)	肝脏指数(%)
正常组	27.66 $\pm$ 3.39	1.18 $\pm$ 0.07	4.29 $\pm$ 0.41
模型组	29.58 $\pm$ 4.10	1.59 $\pm$ 0.36**	5.33 $\pm$ 0.59**
二甲双胍组	30.63 $\pm$ 4.76	1.29 $\pm$ 0.41##	4.20 $\pm$ 0.67##
石榴花水提物低剂量组	29.15 $\pm$ 2.07	1.3 $\pm$ 0.21	4.44 $\pm$ 0.83
石榴花水提物高剂量组	29.18 $\pm$ 2.44	1.26 $\pm$ 0.17#	4.31 $\pm$ 0.52##

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;表 2 同。

2.2 PFW 对小鼠血浆生化指标的影响

各组小鼠血浆生化指标变化如表 2 所示,与正常小鼠血浆比较,糖尿病模型组小鼠血浆 FBG、INS、HOMA-IR、TG 和 TC 极显著增加($P < 0.01$);与糖尿病模型小鼠组血浆比较,石榴花水提物低剂量组 INS 和 TG 显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),石榴花水提物高剂量组 FBG、INS、HOMA-IR、TG 和 TC 均极显著降低($P < 0.01$),二甲双胍组 FBG、INS、HOMA-IR、TG 和 TC 极显著降低($P < 0.01$);与二甲双胍组比较,石榴花水提物高剂量组没有统计学差异($P > 0.05$),石榴花水提物高剂量组与二甲双胍组药效数据相接近。

表 2 PFW 对 T2DM 小鼠 FBG、INS、HOMA-IR、TG、TC 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of pomegranate flower water extract on FBG, INS, HOMA-IR, TG, TC in type 2 diabetes mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	FBG(mmol·L ⁻¹)	INS(mIU·L ⁻¹)	HOMA-IR	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)
正常组	6.4±0.77	5.22±1.02	1.50±0.45	0.65±0.033	3.79±0.32
模型组	24.67±3.68**	13.54±1.20**	14.88±2.77**	1.37±0.10**	7.74±0.64**
二甲双胍组	12.91±2.15##	7.78±1.02##	4.42±0.64##	0.84±0.093##	4.44±0.11##
石榴花水提物低剂量组	23.03±3.88	10.99±0.95##	13.11±2.23	1.14±0.11#	7.09±0.36
石榴花水提物高剂量组	16.57±3.48##	9.87±0.17##	7.27±1.48##	0.90±0.057##	5.23±0.35##

2.3 PFW 对 T2DM 小鼠肝脏外观形态与肝脏组织病理结构的影响

各组小鼠肝脏外观形态变化如图 1 所示, 与正常组小鼠肝脏比较, 高脂诱导的糖尿病模型小鼠肝脏颜色呈土黄色、体积较大、质地较软、表面油腻颗粒感较重; 与模型组小鼠肝脏比较, 二甲双胍组、石榴花水提物低剂量组和石榴花水提物高剂量组肝脏颜色较红, 边缘较锐化, 体积减小, 表面油腻感减轻, 提示石榴花水提物能够减轻 T2DM 小鼠的肝脏油腻颗粒感, 可能减少了肝脏脂质堆积。

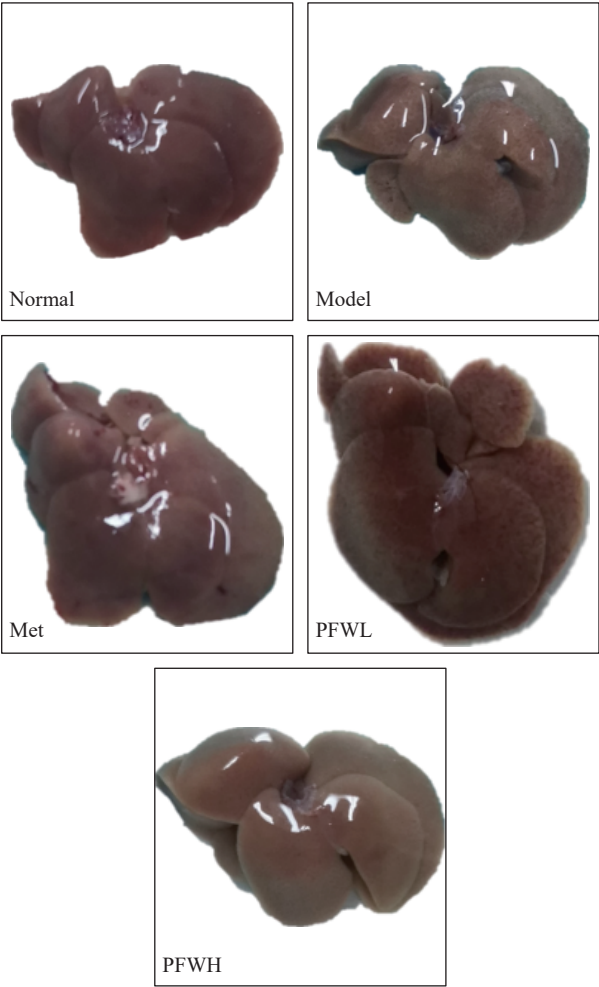


图 1 PFW 对 T2DM 小鼠肝脏外观形态的影响

Fig.1 Effect of pomegranate flower water extract on liver appearance and morphology of type 2 diabetes mice

注: 正常组: Normal; 模型组: Model; 二甲双胍组: Met; 石榴花水提物低剂量组: PFWL; 石榴花水提物高剂量组: PFWH; 图 2~图 5 同。

各组小鼠肝脏组织病理结构变化如图 2 所示, 正常小鼠肝脏组织内细胞结构正常完整, 肝小叶、肝索、肝窦整齐, 门区三管结构清晰, 未见脂滴和病变; 与正常小鼠肝脏组织比较, 糖尿病模型小鼠肝组织中观察到严重的脂肪变性, 肝细胞内含有大量的脂肪滴, 且有部分淤血这表明该模型成功建立; 与糖尿病模型小鼠肝组织比较, 二甲双胍组、石榴花水提物低剂量组和石榴花水提物高剂量组肝组织轻度脂肪变性, 脂肪滴明显数量减少且体积变小, 肝组织病理学观察结果与肝脏外观结果一致; 与二甲双胍组比较, 石榴花水提物高剂量组脂肪滴明显减少, 进一步证实了石榴花水提物有改善肝脏脂质沉积的作用。

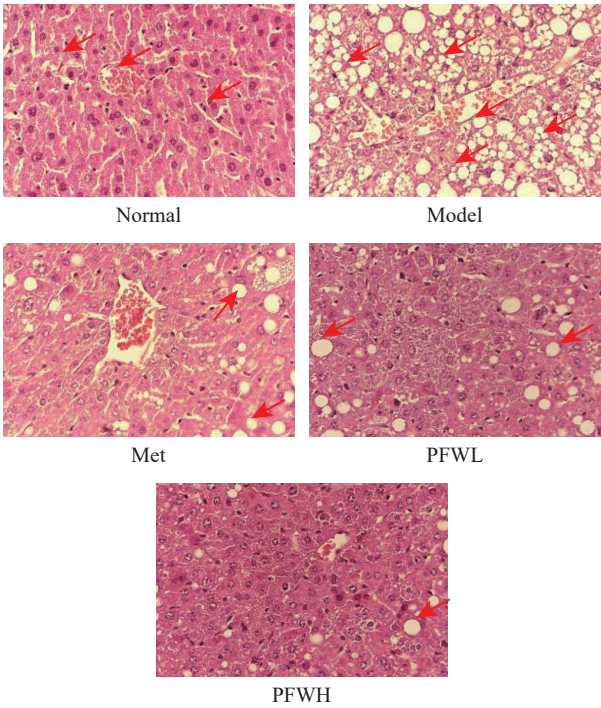


图 2 PFW 对 T2DM 小鼠肝脏组织病理结构的影响 (HE, 400×)

Fig.2 Effect of pomegranate flower water extract on liver histopathological structure in type 2 diabetes mice (HE, 400×)

2.4 PFW 对 T2DM 小鼠肝脏胰岛素信号通路蛋白的影响

与正常小鼠肝脏比较, 糖尿病模型小鼠肝脏 IRS1、p-Akt(Ser473)/Akt、p-GSK3β(S9)/GSK3β 蛋白表达量极显著降低 ($P<0.01$), p-IRS1(Ser307)/IRS1 蛋白表达量极显著升高 ($P<0.01$); 与糖尿病模

型小鼠比较,二甲双胍组、石榴花水提取物低剂量组和石榴花水提取物高剂量组 IRS1、p-Akt(Ser473)/Akt、p-GSK3 β (S9)/GSK3 β 蛋白表达量显著升高($P<0.01$, $P<0.05$),二甲双胍组、石榴花水提取物低剂量组和石榴花水提取物高剂量组 p-IRS1(Ser307)/IRS1 蛋白表达量显著降低($P<0.01$, $P<0.05$);与二甲双胍组比较,石榴花水提取物低剂量组和石榴花水提取物高剂量组未见统计学差异($P>0.05$)。结果说明石榴花水提取物可以使 p-IRS1(Ser307)/p-AKT(Ser473)/p-GSK3 β (S9) 胰岛素通路信号转导通畅(图 3~图 4)。

2.5 PFW 对 T2DM 小鼠肝脏 AhR、BNIP3、PEMT 蛋白的影响

如图 5 所示,与正常小鼠肝脏比较,糖尿病模型小鼠肝脏 AhR、PEMT 蛋白表达量极显著升高($P<$

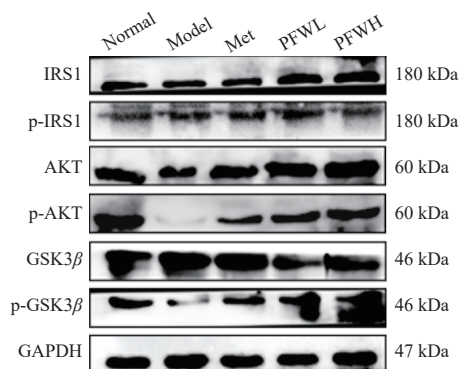


图 3 PFW 对 T2DM 小鼠肝脏胰岛素信号通路相关蛋白条带图的影响($\bar{x} \pm s$)

Fig.3 Effect of pomegranate flower water extract on protein banding of insulin signal pathway in liver of type 2 diabetes mice ($\bar{x} \pm s$)

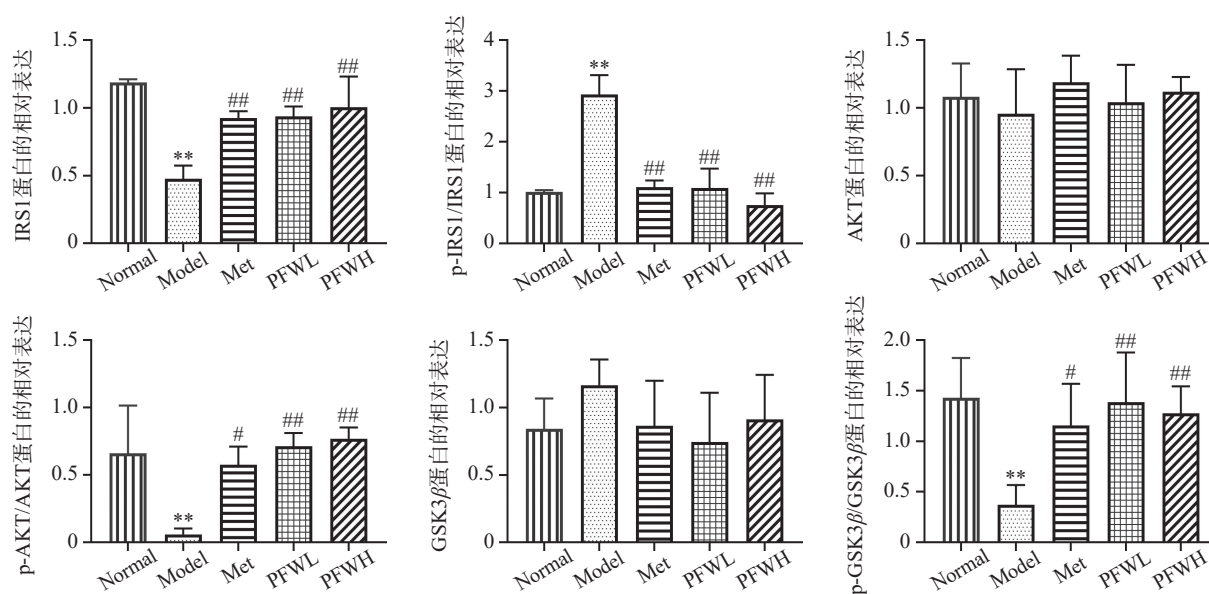


图 4 PFW 对 T2DM 小鼠肝脏胰岛素信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Fig.4 Effect of pomegranate flower water extract on the expression of insulin signal pathway related proteins in liver of type 2 diabetes mice ($\bar{x} \pm s$)

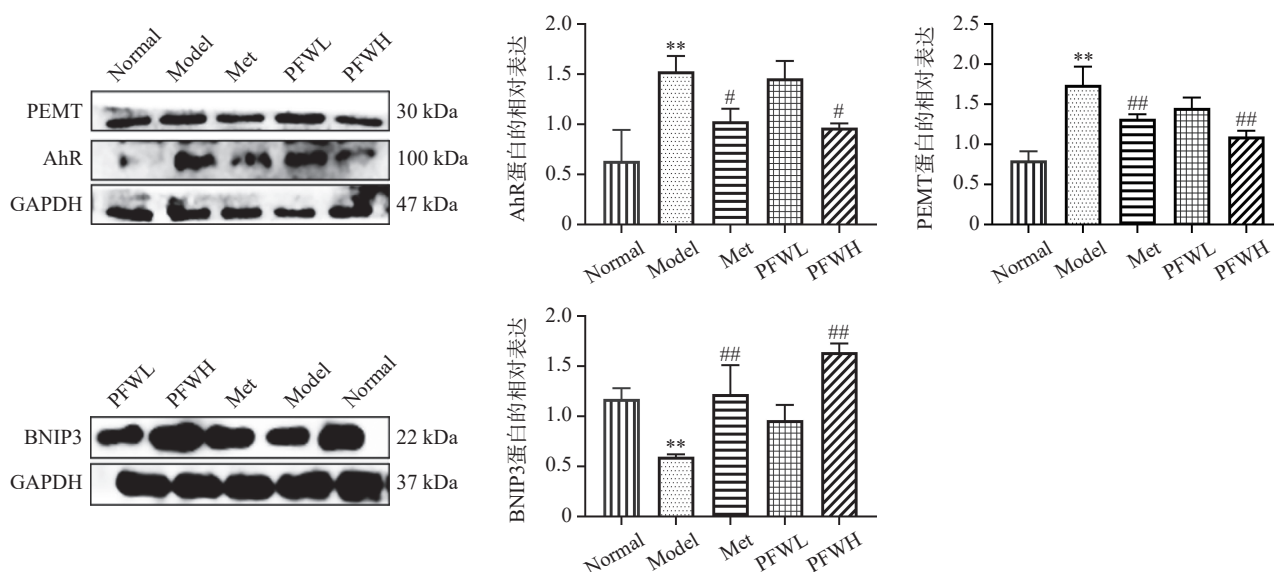


图 5 PFW 对 T2DM 小鼠肝脏 AhR、BNIP3、PEMT 蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)

Fig.5 Effects of pomegranate flower water extract on AhR, BNIP3 and PEMT protein in liver of type 2 diabetes mice ($\bar{x} \pm s$)

0.01), BNIP3 蛋白表达量极显著降低($P<0.01$); 与糖尿病模型小鼠肝脏比较, 二甲双胍组和石榴花水提物高剂量组 AhR、PEMT 蛋白表达量显著降低($P<0.01$, $P<0.05$), BNIP3 蛋白表达量极显著升高($P<0.01$); 与二甲双胍组比较, 石榴花水提物高剂量组未见统计学差异($P>0.05$)。结果表明, 石榴花水提物可以降低 AhR 和 PEMT 蛋白的表达, 升高 BNIP3 的表达, 石榴花水提物可能通过抑制 AhR 的表达, 来激活 BNIP3 的表达, 从而改善肝脏脂质。

3 讨论与结论

糖尿病作为一种普遍的慢性代谢性疾病, 其发病原因与胰岛素抵抗(IR)、肝脏脂质代谢紊乱等密切相关, 目前发病率与致死率呈逐年上升的趋势, 严重影响着人们的身体健康^[16-17]。

胰岛素信号转导受阻是导致 2 型糖尿病(T2DM)发病的重要原因之一。已有研究发现, 胰岛素能与肝脏靶细胞膜上胰岛素受体结合并启动信号传导通路, 激活胰岛素受体自身磷酸化, 导致其底物磷酸化, 进而产生生物学效应^[18-19]。IRS1 是胰岛素受体酪氨酸激酶的关键靶点, 是胰岛素信号通路连接细胞内外的信号蛋白^[20-21]。既往研究发现, IRS1 丝氨酸(Ser307)磷酸化位点会阻碍 IRS1 酪氨酸位点磷酸化, IRS1(Ser307)负反馈调节胰岛素信号转导通路^[22-23]。本研究发现, 石榴花水提物能够显著升高 IRS1 的表达并抑制 IRS1 丝氨酸 307 位点的磷酸化(IRS1 Ser307), 从而促进 IRS1 酪氨酸磷酸化, 进而促进胰岛素信号的下游传导。AKT 作为胰岛素信号传导中重要的下游分子, 通常以 p-AKT(Ser473)形式被活化, 活化的 AKT 在调节脂质代谢、提高胰岛素敏感性、降低血糖水平方面发挥重要作用^[24-25]。本研究显示石榴花水提物激活 Akt 473 丝氨酸磷酸化位点从而活化 Akt, 进而调节脂质代谢、改善肝脏胰岛素敏感性。GSK-3 β 作为 AKT 的下游信号因子^[26], 正常情况下, 活化的 AKT 会使 GSK-3 β 的 Ser9 位点磷酸化, 从而使 GSK-3 β 失活, 促进肝糖原合成, 增加葡萄糖的利用率, 从而降低血糖^[27]。GSK-3 β 过度表达或激活可导致胰岛素缺乏和 IR 的发生^[28]。本研究发现, 石榴花水提物能抑制 T2DM 小鼠肝脏 GSK3 β 表达并升高 GSK-3 β Ser9 位点的磷酸化, 提示石榴花水提物提高肝脏胰岛素敏感性与调控胰岛素信号关键靶点的磷酸化有关。

脂质代谢与胰岛素信号密切相关。已有研究表明活化的 AKT 在调节脂质代谢方面发挥重要作用^[29-30], GSK-3 β 也可调控甘油三酯、胆固醇等含量, 在调节脂质沉积中起关键作用^[31]。本研究显示石榴花水提物(400 mg/kg)降低甘油三酯、胆固醇、减少肝脏脂质沉积的作用与二甲双胍(150 mg/kg)药效相近, 提示石榴花水提物提高肝脏胰岛素敏感性、调控胰岛素信号通路与脂质代谢相关的靶点有关。本团队进一步研究了石榴花水提物对芳香烃受体

(AhR)一种介导脂质沉积和胰岛素信号传导功能障碍的关键调节蛋白的影响^[32]。已知活化的 AhR 会诱导以甘油三酯积聚为特征的自发性肝脂肪变性^[33]。另外, 肝脏中过量的胆固醇积累会进而导致 β 细胞功能障碍^[34]。以往研究发现, 小鼠肝脏缺乏 AhR 及 PEMT 能够提高胰岛素敏感性, 肝内 AhR 和 PEMT 的过表达会影响肝脏脂质代谢并导致肝脏 IR 的发生^[35-36]。此外, BNIP3 可以作为 AhR 靶基因介导禁食诱导的肝脏有丝分裂, 肝细胞内缺失 BNIP3 会导致脂肪生成增加, 在高脂肪饮食期间增加有丝分裂活性或 BNIP3 的表达对肝脏和线粒体具有保护作用^[8,37]。本研究发现石榴花水提物降低肝脏 AhR 和 PEMT 的表达, 升高肝脏中 BNIP3 表达, 因此推测石榴花水提物可能通过抑制 AhR 进而促进 BNIP3 的表达, 从而抑制肝脏脂质生成和沉积, 促进胰岛素信号通路转导通畅, 已知 BNIP3 也与自噬过程有关, 推测石榴花水提物促进 BNIP3 的表达可能也会有助于清除肝脏中受损的线粒体, 从而改善肝脏脂质代谢和胰岛素信号。另外, 本研究发现二甲双胍也降低肝脏 AhR 和 PEMT 的表达, 升高肝脏中 BNIP3 表达, 因此也推测二甲双胍可能通过抑制 AhR 进而促进 BNIP3 的表达, 从而抑制肝脏脂质生成和沉积, 促进胰岛素信号通路转导通畅。

综上所述, 本研究发现石榴花水提物能促进胰岛素信号转导通畅, 可能与其调节 AhR/BNIP3 途径改善肝内脂质合成、减少异位脂质积聚, 调控胰岛素信号关键靶点的磷酸化有关。详细机制值得进一步研究, 以期石榴花可以通过调控脂质代谢途径, 防治糖尿病等代谢紊乱疾病提供应用依据。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 张奕之, 祖丽胡马·热合曼, 董怀洋. 高糖高脂环境下尿石素 A 对 MIN6 胰岛 β 细胞形态活力影响及分子机制初探[J]. 新疆医科大学学报, 2022, 45(6): 660-665. [ZHANG Y Z, ZU L H M-R H M, DONG H Y. A preliminary study on the effect of urolithin A on the morphologic viability of MIN6 pancreatic islet β -cells and its molecular mechanism in a high glucose and high fat environment [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2022, 45(6): 660-665.]
- [2] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF diabetes atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 183: 109-119.
- [3] VANCE J E, TASSEVA G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1831(3): 543-554.
- [4] KAWANO Y, NISHIUMI S, TANAKA S, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces hepatic steatosis via the up-

- regulation of fatty acid transport[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 504(2): 221–227.
- [5] FU S, YANG L, LI P, et al. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity[J]. *Nature*, 2011, 473(7348): 528–531.
- [6] KUMAR A, SUNDARAM K, MU J, et al. High-fat diet-induced upregulation of exosomal phosphatidylcholine contributes to insulin resistance[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 213.
- [7] LI R, XIN T, LI D, et al. Therapeutic effect of Sirtuin 3 on ameliorating nonalcoholic fatty liver disease: The role of the ERK-CREB pathway and Bnip3-mediated mitophagy[J]. *Redox Biol*, 2018, 18: 229–243.
- [8] HEO M J, SUN J H, LEE S H, et al. Aryl hydrocarbon receptor maintains hepatic mitochondrial homeostasis in mice[J]. *Mol Metab*, 2023, 72: 101717.
- [9] 姜立娟, 李玉国, 崔巍, 等. PI3K/Akt 信号通路参与中药防治 2 型糖尿病胰岛素抵抗的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(9): 5405–5408. [JIANG L J, LI Y G, CUI W, et al. Research progress of PI3K/Akt signaling pathway involved in the prevention and treatment of insulin resistance in type 2 diabetes with traditional Chinese medicine[J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 36(9): 5405–5408.]
- [10] 杨思佳. 石榴的营养功效与食用方法[J]. *新农村*, 2020(8): 42. [YANG S J. The nutritional efficacy and edible methods of pomegranate[J]. *New Rural Area*, 2020(8): 42.]
- [11] 傅航, 韩磊. 石榴的营养保健功能及其食品加工技术[J]. *黑龙江科技信息*, 2017(15): 58. [FU H, HAN L. The nutritional and health functions of pomegranate and its food processing technology[J]. *Heilongjiang Science and Technology Information*, 2017(15): 58.]
- [12] 李丽蓉, 金晨, 廖辉, 等. 石榴花(古丽娜)的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(10): 209–214. [LI L R, JIN C, LIAO H, et al. Research progress on pomegranate flower (gulina)[J]. *Chinese Journal of Experimental Prescriptions*, 2016, 22(10): 209–214.]
- [13] 韦良渠. 石榴实用便方[J]. *农村百事通*, 2020(9): 55. [WEI L Q. Practical pomegranate formula[J]. *Rural Versatile*, 2020(9): 55.]
- [14] 李彤, 金晨, 熊瑶, 等. 石榴花不同萃取部位对胰岛素抵抗的影响及作用机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(5): 692–698. [LI T, JIN C, XIONG Y, et al. Study on the effect and mechanism of different extracted parts of pomegranate flower on insulin resistance[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2020, 36(5): 692–698.]
- [15] LI T, ZHANG L, JIN C, et al. Pomegranate flower extract bidirectionally regulates the proliferation, differentiation and apoptosis of 3T3-L1 cells through regulation of PPAR γ expression mediated by PI3K-AKT signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110769.
- [16] 田亚丽, 巴合提别克·托合塔尔拜克, 古丽海夏·哈勒玛合拜, 等. 鞣花酸促进自噬性清除改善 2 型糖尿病小鼠肝脏胰岛素信号通路[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(10): 2353–2356. [TIAN Y L, BA H T B K·T H T E B K, GU L H X·H L M H B, et al. Ellagic acid promotes autophagic clearance to improve hepatic insulin signaling pathway in type 2 diabetic mice[J]. *Shizhen Guojian Guojian*, 2019, 30(10): 2353–2356.]
- [17] GOMEZ Z S, MILTON L I, AGUIRRE L, et al. Effects of pterostilbene on diabetes, liver steatosis and serum lipids[J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(2): 238–252.
- [18] 张旭, 陆燕, 王琼, 等. 2 型糖尿病大鼠 STAT3 酪氨酸磷酸化与 IRS1、2 及其丝氨酸磷酸化的关系[J]. *营养学报*, 2017, 39(1): 71–75. [ZHANG X, LU Y, WANG Q, et al. The relationship between STAT3 tyrosine phosphorylation and IRS 1, 2 and serine phosphorylation in type 2 diabetes rats[J]. *Journal of Nutrition*, 2017, 39(1): 71–75.]
- [19] BATISTA T M, HAIDER N, KAHN C R, et al. Defining the underlying defect in insulin action in type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2021, 64(5): 994–1006.
- [20] COPPS KD, WHITE MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(10): 2565–2582.
- [21] LIU X, WANG K, HOU S, et al. Insulin induces insulin receptor degradation in the liver through EphB4[J]. *Nat Metab*, 2022, 4(9): 1202–1213.
- [22] CHEN G, YANG X, YANG X, et al. Jia-Wei-Jiao-Tai-Wan ameliorates type 2 diabetes by improving β cell function and reducing insulin resistance in diabetic rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 507.
- [23] LEI Z, YANG L, YANG Y, et al. Activation of Wnt/ β -catenin pathway causes insulin resistance and increases lipogenesis in HepG2 cells via regulation of endoplasmic reticulum stress[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526(3): 764–771.
- [24] HUANG X, LIU G, GUO J, et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1483–1496.
- [25] 马欢, 高楠楠, 陈俞如, 等. 糖通饮对 2 型糖尿病大鼠胰腺组织 PI3K-AKT 通路的影[J]. *贵州医科大学学报*, 2020, 45(1): 50–55. [MA H, GAO N N, CHEN Y R, et al. Effect of Tangtongyin on PI3K-AKT pathway in pancreatic tissue of type 2 diabetes rats[J]. *Journal of Guizhou Medical University*, 2020, 45(1): 50–55.]
- [26] THOTA RN, ROSATO JI, DIAS CB, et al. Dietary supplementation with curcumin reduce circulating levels of glycogen synthase kinase-3 β and islet amyloid polypeptide in adults with high risk of type 2 diabetes and alzheimer's disease[J]. *Nutrients*, 2020, 12(4): 1032.
- [27] 凌叶盛, 余舒杰, 周彬, 等. 红景天多糖对糖尿病模型小鼠肝脏信号通路 PI3K/AKT/GSK3 β 影响的实验研究[J]. *中国中医药科技*, 2018, 25(6): 812–814. [LIN Y S, YU S J, ZHOU B, et al. Effect of Rhodiola polysaccharide on PI3K/AKT/GSK3 signaling pathway in liver of diabetes model mice β experimental research on the impact[J]. *Chinese Traditional Chinese Medicine Technology*, 2018, 25(6): 812–814.]
- [28] HAO Q, ZHENG A, ZHANG H, et al. Down-regulation of betatrophin enhances insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus through activation of the GSK-3 β /PGC-1 α signaling pathway[J]. *J Endocrinol Invest*, 2021, 44(9): 1857–1868.
- [29] XIAO H, SUN X, LIN Z, et al. Gentiopicroside targets PAQR3 to activate the PI3K/AKT signaling pathway and ameliorate disordered glucose and lipid metabolism[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(6): 2887–2904.

- [30] ZHOU Y J, XU N, ZHANG X C, et al. Chrysin improves glucose and lipid metabolism disorders by regulating the AMPK/PI3K/AKT signaling pathway in insulin-resistant HepG2 cells and HFD/STZ-induced C57BL/6J mice[J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(20): 5618–5627.
- [31] LIN D, GU Y, PANG Q, et al. Vitamin C inhibits lipid deposition through GSK-3 β /mTOR signaling in the liver of zebrafish[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2020, 46(1): 383–394.
- [32] ROTHHAMMER V, QUINTANA F J. The aryl hydrocarbon receptor: An environmental sensor integrating immune responses in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(3): 184–197.
- [33] LEE J H, WADA T, FEBBROIO M, et al. A novel role for the dioxin receptor in fatty acid metabolism and hepatic steatosis[J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(2): 653–663.
- [34] YANG T, LIU Y, LI L, et al. Correlation between the triglyceride-to-high-density lipoprotein cholesterol ratio and other unconventional lipid parameters with the risk of prediabetes and type 2 diabetes in patients with coronary heart disease: A RCSCD-TCM study in China[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2022, 21(1): 93.
- [35] VANCE D E. Phospholipid methylation in mammals: From biochemistry to physiological function[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838(6): 1477–1487.
- [36] REMILLARD C R B, BUNCE N J. Linking dioxins to diabetes: Epidemiology and biologic plausibility[J]. *Environ Health Perspect*, 2002, 110(9): 853–858.
- [37] LINDEN M A, LOPEZ K T, FLETCHER J A, et al. Combining metformin therapy with caloric restriction for the management of type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease in obese rats[J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2015, 40(10): 1038–1047.