

促胰岛 β 细胞增生的黄酮类化合物的活体筛选王冲^{1,2} 林春雨^{1,2} 吴志强¹ 李明玉²

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 厦门大学药学院, 福建 厦门 361102)

摘要: 目的 利用斑马鱼为模型进行黄酮类药物筛选, 以期发现促进胰岛 β 细胞增生的药物。方法 对生长 5 d 的斑马鱼胚胎进行黄酮类药物处理, 并进行 β 细胞计数, 筛选出能够促进 β 细胞数量增加的药物, 并进一步分析其促进 β 细胞增加是源自于已有 β 细胞的复制或前体细胞的分化。结果 淫羊藿素 (Icaritin) 能够增加胰岛 β 细胞的数量, 并明显促进 β 细胞的复制。同时, 我们发现有几个黄酮类化合物具有降血糖的作用。结论 淫羊藿素能够明显促进 β 细胞的自我复制从而促进 β 细胞的增生。

关键词: 斑马鱼; 糖尿病; 药物筛选; 黄酮类药物; 胰岛 β 细胞

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 2095-5375(2019)03-0135-005

doi: 10.13506/j.cnki.jpr.2019.03.002

In vivo screening stimulators of pancreatic β -cell hyperplasia from flavonoidsWANG Chong^{1,2} LIN Chunyu^{1,2} WU Zhiqiang¹ LI Mingyu²

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: Objective To find compounds that stimulate pancreatic β -cell hyperplasia by using zebrafish model for drug screening of flavonoids. **Methods** 5 d (days post fertilization) zebrafish larvae were treated with flavonoids for 24 hours and the number of β -cell was counted to select the compounds that could increase its number. Further analysis of its promotion of β -cell growth was derived from the replication of existing β -cell or the differentiation of precursor cells. **Results** Icaritin can increase zebrafish β -cell number and the increase was contributed by β -cell self-proliferation. Moreover, we found that several flavonoids can decrease the glucose level of zebrafish larvae. **Conclusion** Icaritin can promote the β -cell hyperplasia by stimulating its proliferation.

Key words: Zebrafish; Diabetes; Drug screening; Flavonoids; Pancreatic β -cell

随着天然药物相关技术的发展, 越来越多的天然药物被人们所发现, 由此带来的对其活性进行筛选的需求也随之增加。传统意义上的药物筛选, 通常是基于分子靶点和细胞表型分析进行的药物筛选^[1]。但是这种体外筛选的方式并不能直接反应药物在体内的作用效果。近年来, 随着药物筛选的发展, 越来越多的以小型动物, 如: 秀丽线虫、果蝇、斑马鱼、非洲爪蟾为模型进行体内药物筛选的方式正快速发展^[2-3]。这种将药物直接作用于个体水平的筛选方式, 不仅能

够直接反应出药物对生物体的毒性影响, 而且能够更加全面地反应出药物对整个生物体的影响^[4-6]。由于斑马鱼具有众多适合药物筛选应用的优点, 如: 胚胎透明、便于观察; 繁殖率高、成本较低; 体型较小、便于操作等。因此, 以斑马鱼为模型进行药物筛选正得到越来越广泛的应用^[6-7]。

本文利用斑马鱼的这一特点, 以斑马鱼为模型进行黄酮类化合物的药物筛选。黄酮类化合物是以 C6-C3-C6 为基本碳架的一系列化合物, 广泛分布

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81670709); 福建省自然科学基金 (No. 2017J01145); 中央高校基本科研业务费 (No. 20720170104、20720180044)

作者简介: 王冲, 女, 研究方向: 糖尿病药物筛选, E-mail: 2810939655@qq.com

通信作者: 李明玉, 男, 副教授, 研究方向: 糖尿病疾病机理和药物开发, Tel: 18659242557, E-mail: limingyu@xmc.edu.cn

于各种植物组织中,如:荷叶、蒲公英、金银花叶、橘皮、竹叶等^[8]。在植物体内,黄酮类化合物通常与糖类结合形成苷类化合物。据报道,黄酮类具有多种医药学功能,如降压、降糖、降血脂、抗氧化等^[9-12],但具体的机理尚不清楚。

本文主要探究黄酮类药物的降糖功效与胰岛β细胞数量之间的相互关系。糖尿病以1型和2型为主,1型糖尿病是自体免疫性疾病,由自体免疫系统破坏产生胰岛素的β-细胞引起的^[13]。2型糖尿病主要由胰岛素抵抗及胰岛素相对缺乏引起的^[14]。这两种糖尿病的最终发病都会引起胰岛β-细胞数量减少或者功能损伤,从而降低胰岛素的分泌^[15]。而寻找促进胰岛β-细胞增生的药物,以期用在糖尿病治疗上一直是科学领域的研究热点^[16]。本文采用β-细胞特异性表达mCherry的转基因斑马鱼Tg(-1.2ins: H2BmCherry)为模型,进行黄酮类化合物促β-细胞增生的活性筛选。并通过指示β-细胞复制的模型Tg[ins: mAG-zGeminin(1/100)]^[17],以及指示β-细胞分化的模型TgBAC(neurod: eGFP)^[18]进行进一步分析。整个筛选操作简单,方法便捷高效,可为黄酮类药物在糖尿病领域的进一步开发提供理论基础。

1 仪器、实验试剂以及实验动物

1.1 仪器 电子天平(舜宇恒平仪器);体式荧光显微镜Leica M165FC(莱卡公司);正置荧光显微镜AXIO IMAGER AI(蔡司公司);共聚焦显微镜Zeiss LSM5(蔡司公司)。

1.2 实验试剂 二甲基亚砜(DMSO,生工,批号:D807BA001);泼尼松龙(MCE,批号:50-24-8);磷酸缓冲液(10X PBS, BBI 生命科技,批号:EB12FA0001);羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES, Thermo fisher,批号:15630080);多聚甲醛(PFA,生工,批号:D606BA0003);间氨基苯甲酸乙酯(Sigma公司,批号:MKBX0252V);黄酮类药物(成都植标化纯生物技术有限公司);Amplex Red试剂盒(In-vitrogen A12222)。

1.3 实验动物 野生型斑马鱼(AB);Tg(-1.2ins: H2BmCherry)转基因斑马鱼;TgBAC(neurod: eGFP)转基因斑马鱼;Tg[ins: mAG-zGeminin(1/100)]转基因斑马鱼。

2 实验方法

2.1 实验动物-斑马鱼的养殖以及鱼卵的收集培养

2.1.1 斑马鱼的饲养 斑马鱼的饲养是按照标准的饲养方法:每天3次投喂颗粒饲料,早晚各喂养一次

丰年虫卵,并给予适宜的光照(光照:黑暗=14:10)和温度(25℃),并利用碱泵和盐泵调节适宜的pH(pH为7左右)和电导率(电导率为500左右)进行培养。

2.2.2 鱼卵的收集及培养 在夜间避光环境下将一雌一雄的斑马鱼共同放置在同一配鱼缸里,第二天白天光照的刺激下,收集沉落在配鱼缸缸底的受精卵。将其放置在鱼卵培养箱中培养5~6d,培养箱中的温度维持在28.5℃,光照:黑暗的时间比为14:10。在培养期间,每天都应更换新鲜的斑马鱼水溶液,以维持斑马鱼生活环境的清洁。

2.2 斑马鱼的药物处理 转基因斑马鱼Tg(-1.2ins: H2BmCherry)、Tg[ins: mAG-zGeminin(1/100)]、TgBAC(neurod: eGFP)产生的胚胎发育至第5天,转移至24孔板中,将每一孔中加入2mL的斑马鱼水溶液、10条鱼和2μL的药物(终浓度为10μmol·L⁻¹),并处理24h。药物处理时,以DMSO为空白对照组,以泼尼松龙(Prednisolone,10μmol·L⁻¹)为阳性对照组。

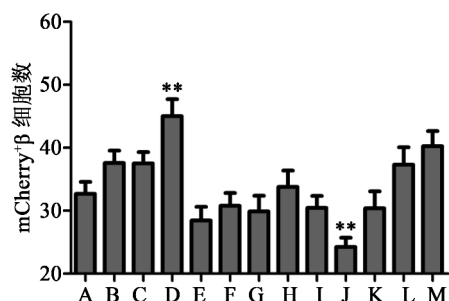
2.3 斑马鱼的固定、胰岛β细胞的成像和计数 药物处理过斑马鱼胚胎用4%PFA进行过夜固定。固定好的斑马鱼胚胎,转移至载玻片上,并使右侧朝上,在其上面滴加适量封片剂进行封片。封片完毕后,利用斑马鱼自身的胰岛β细胞所带有的荧光蛋白进行共聚焦显微成像和细胞数量统计。

2.4 斑马鱼血糖含量的测定 利用Amplex Red试剂盒测定斑马鱼幼鱼的葡萄糖含量。每10条鱼匀浆于100μL的缓冲液中,然后利用离心的方法清除匀浆。按照试剂盒的要求,每10μL的上层清液就等同于一条幼鱼,对每条鱼的血糖进行测量。室温下孵育30min。然后通过酶标仪测量其荧光值,设置的波长分别为:激发光:520nm,发射光:580~640nm。药物处理时,以DMSO为空白对照组,以罗格列酮(RGZ,10μmol·L⁻¹)为阳性对照组。每一组应做3个重复。

3 实验结果

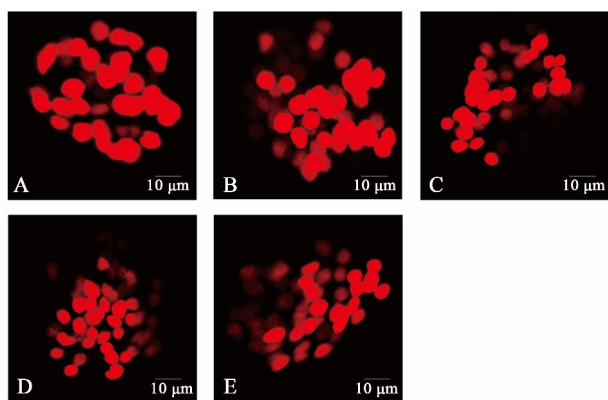
3.1 黄酮类化合物对斑马鱼胰岛β细胞的增生作用分析 我们选取了11种不同的黄酮类化合物,包括脱水淫羊藿素、淫羊藿素、香叶木素、柳穿鱼黄素、高黄芩素(野黄芩素)、甘草查尔酮C、芫花素、羟基芫花素、穗花杉双黄酮、洋艾素和银杏双黄酮。利用Tg(-1.2ins: H2BmCherry)斑马鱼胚胎,对这些化合物进行筛选。结果发现,对照组的β细胞为(32.67±1.922),泼尼松龙作为阳性药物,也能够增加β细胞的数量。而黄酮类化合物中,柳穿鱼黄素、脱水淫

羊藿素、淫羊藿素、芫花素和银杏双黄酮与空白对照 DMSO 相比,能够增加红色胰岛 β 细胞的数量,分别为(37.60 ± 1.951)、(37.53 ± 1.786)、(45.00 ± 2.714)、(33.77 ± 2.612)和(37.33 ± 2.762) (见图 1~2)。我们选取高于 DMSO 组的化合物进行下一步分析。



A. 空白对照; B. 柳穿鱼黄素; C. 脱水淫羊藿素; D. 淫羊藿素; E. 香叶木素; F. 高黄芩素(野黄芩素); G. 甘草查尔酮 C; H. 芫花素; I. 羟基芫花素; J. 穗花杉双黄酮; K. 洋艾素; L. 银杏双黄酮; M. 阳性对照; 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$

图 1 黄酮类化合物对斑马鱼胰岛 β 细胞增生作用的筛选

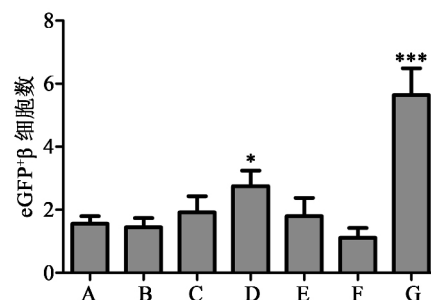


A. 空白对照; B. 柳穿鱼黄素; C. 脱水淫羊藿素; D. 淫羊藿素; E. 阳性对照

图 2 黄酮类化合物对斑马鱼胰岛 β 细胞增生作用共聚焦拍摄图

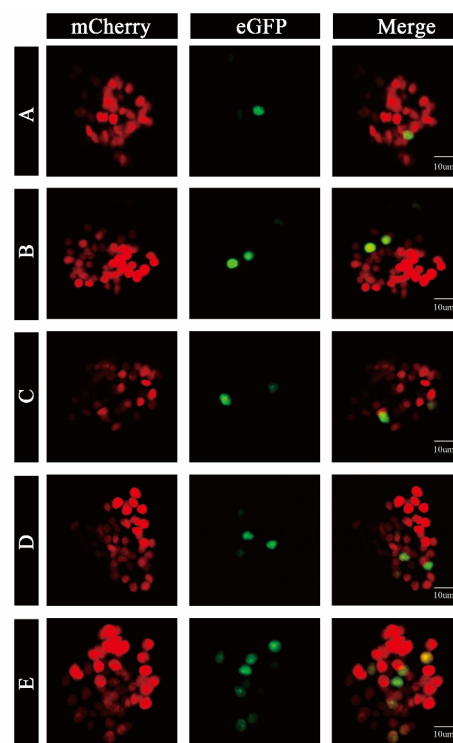
3.2 黄酮类化合物对斑马鱼胰岛 β 细胞的复制作用分析 由于胰岛 β 细胞的增生的来源之一为已有的 β 细胞的复制。我们选取了 5 个促进 β 细胞增生的黄酮类化合物,并利用指示 β -细胞复制的模型 Tg [ins: mAG-zGeminin(1/100)] 进行分析。在该模型中,胰岛 β -细胞特异性表达 S/G₂/M 期的特异性蛋白 Geminin,并以 mAG (monomeric Azami green) -Geminin 融合蛋白的形式展现,经过复制的细胞会表达绿色荧光^[16]。药物处理 24 h 后,结果发现,与空白对照组相比,淫羊藿素和阳性药泼尼松龙能够促进绿色 β 细胞的复制,数量分别为: (2.750 ± 0.491)和(5.636 ± 0.855) ,高于对照组的(1.556 ± 0.242) (见图 3~4)。

这些结果表明,在这些黄酮类药物中,柳穿鱼黄



A. 空白对照; B. 柳穿鱼黄素; C. 脱水淫羊藿素; D. 淫羊藿素; E. 香叶木素; F. 高黄芩素(野黄芩素); G. 阳性对照; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$,*** $P < 0.001$

图 3 黄酮类化合物对斑马鱼胰岛 β 细胞复制的作用分析



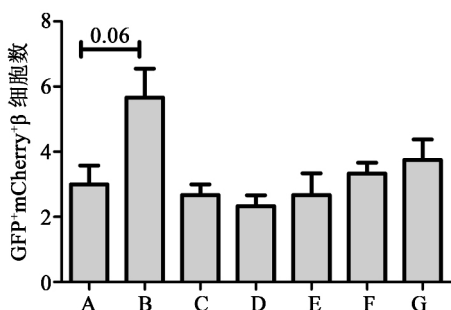
A. 空白对照; B. 柳穿鱼黄素; C. 脱水淫羊藿素; D. 淫羊藿素; E. 阳性对照

图 4 黄酮类化合物对斑马鱼胰岛 β 细胞复制的作用共聚焦拍摄图

素、脱水淫羊藿素、淫羊藿素、芫花素和银杏双黄酮能够增加 β 细胞的数量。而淫羊藿素促进 β 细胞的增加部分来源于 β 细胞自身的复制。

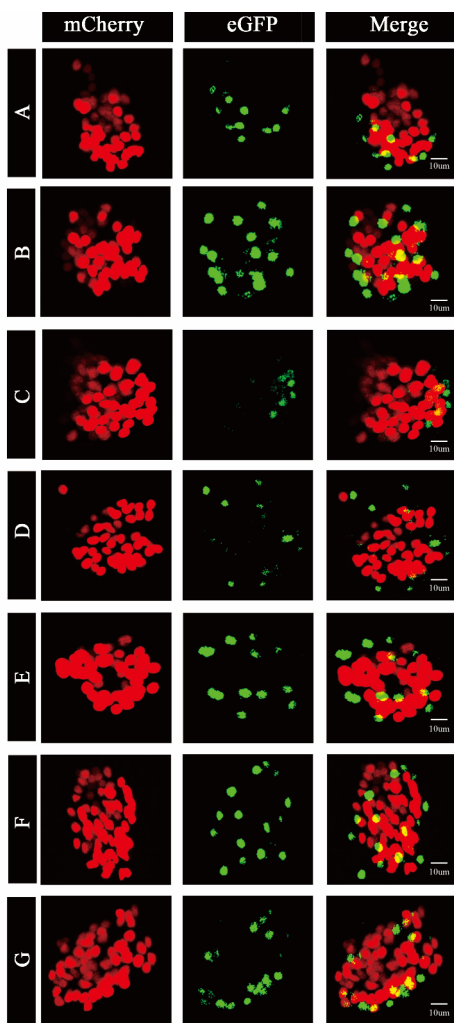
3.3 黄酮类化合物对斑马鱼胰岛 β 细胞的分化作用分析 由于胰岛 β 细胞增生的另一来源为胰岛前体细胞分化为成熟 β 细胞。我们选取了促进 5 个 β 细胞增生的黄酮类化合物,并利用指示 β -细胞分化的模型 TgBAC(neurod: eGFP) 进行分析。在该模型中,neurod 是胰岛前体细胞的标记基因之一,来源于前体细胞的新 β -细胞将表达 eGFP 绿色荧光^[18]。柳穿鱼黄素、脱水淫羊藿素、淫羊藿素、芫花素和银杏双黄酮等药物对 TgBAC(neurod: eGFP) 处

理 24 h 后 ,我们统计了诱导分化的 β 细胞的数量。结果发现 ,与空白对照组相比 柳穿鱼黄素能够促进 β 细胞的分化 ,数量分别为 (5.667 \pm 0.881 9) ,高于对照组的 (3.000 \pm 0.577 4) (图 5~6) 。



A. 空白对照; B. 柳穿鱼黄素; C. 脱水淫羊藿素; D. 淫羊藿素; E. 香叶木素; F. 高黄酮素(野黄芩素); G. 泼尼松龙

图 5 黄酮类化合物对斑马鱼 β 细胞分化作用的分析



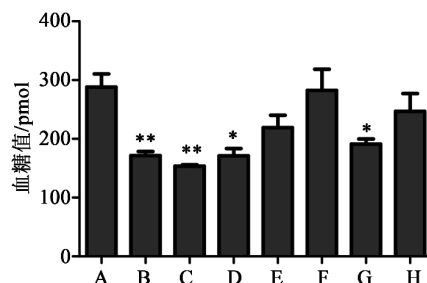
A. 空白对照; B. 柳穿鱼黄素; C. 脱水淫羊藿素; D. 淫羊藿素; E. 香叶木素; F. 高黄酮素(野黄芩素); G. 泼尼松龙

图 6 黄酮类化合物对斑马鱼 β 细胞分化作用的分析共聚焦拍摄图

3.4 黄酮类化合物对斑马鱼血糖水平的统计分析

由于脱水淫羊藿素、淫羊藿素、柳穿鱼黄素、芫花素、银

杏双黄酮、泼尼松龙能促进 β 细胞数量的增加 因此我们还进一步对药物处理的斑马鱼进行血糖水平的测量。结果发现柳穿鱼黄素、脱水淫羊藿素、淫羊藿素都能够降低斑马鱼的血糖 ,血糖值分别为: (153.5 \pm 2.202) 、(171.2 \pm 12.25) 、(171.6 \pm 6.978) pmol 明显低于空白对照组的 (288.1 \pm 22.58) pmol。这些结果说明 ,这几种黄酮类药物具有降低血糖的作用(见图 7) 。



A. 空白对照; B. 柳穿鱼黄素; C. 脱水淫羊藿素; D. 淫羊藿素; E. 香叶木素; F. 高黄酮素(野黄芩素); G. 泼尼松龙; H. 阳性对照; 与空白对照组比较 , * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 7 黄酮类化合物对斑马鱼血糖水平的影响分析

4 分析与讨论

本文以斑马鱼为模型进行黄酮类化合物的药物筛选 ,以期寻找到能够促进胰岛 β 细胞增生的药物。这些研究结果为将来开发黄酮类化合物用于糖尿病的治疗提供了参考依据。在以 β 细胞数量为指标的筛选过程中 ,我们发现柳穿鱼黄素、脱水淫羊藿素、淫羊藿素、芫花素和银杏双黄酮共 5 种黄酮类化合物能够促进胰岛 β 细胞的增生。为进一步分析这些增生的胰岛 β 细胞是通过复制还是分化而来 ,我们进行了进一步的探究。我们分别利用指示 β - 细胞复制的模型 Tg [ins: mAG - zGeminin (1/100)] 和指示 β - 细胞分化的模型 TgBAC (neurod: EGFP) ,对促进 β 细胞增生的化合物进行药物处理。结果发现 ,淫羊藿素能够诱导 β - 细胞的复制 ,但不能诱导前体细胞的分化 ,说明了淫羊藿素促进 β - 细胞的增加部分来源于自身的细胞复制。当然 ,它促进增生的 β - 细胞的数量大于复制增加的细胞数量 ,说明还有一些其他的机制参与 β - 细胞数量的增加。而柳穿鱼黄素促进通过诱导分化增加的 β - 细胞的数量与增生的数量大致相同 ,说明其促进 β - 细胞的增生主要归功于诱导前体细胞的分化。

由于胰岛 β 细胞的增加可能会引起胰岛素分泌的增加 ,从而可能起到降低血糖的作用。我们在分析化合物对血糖水平影响的分析中发现 ,这些有 3 个促进 β - 细胞增生的黄酮类化合物在不同程度上都能起到降低血糖的作用。但是由于斑马鱼血糖

水平的调节受到多种信号通路的影响,这些能够促进β细胞数量增加的药物是如何参与血糖水平的调控,还需进一步的研究。

参考文献:

[1] ZHENG W ,THORNE N ,MCKEW J C.Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery [J].Drug Discov Today 2013 ,18(21-22) : 1067-1073.
 [2] WILLIAMS C H ,HONG C C.Zebrafish small molecule screens: Taking the phenotypic plunge [J].Comput Struct Biotechnol J 2016(14) : 350-356.
 [3] GIACOMOTTO J ,SÉGALAT L.High-throughput screening and small animal models ,where are we? [J].Br J Pharmacol 2010 ,160(2) : 204-216.
 [4] MACRAE C A ,PETERSON R T.Zebrafish as tools for drug discovery [J].Nat Rev Drug Discov 2015 ,14(10) : 721-731.
 [5] STRANGE K. Drug Discovery in Fish ,Flies ,and Worms [J].ILAR J 2016 ,57(2) : 133-143.
 [6] CARRETERO M ,SOLIS G M ,PETRASCHECK M.C.ele-gans as Model for Drug Discovery [J].Curr Top Med Chem 2017 ,17(18) : 2067-2076.
 [7] MATHIAS J R ,SAXENA M T ,MUMM J S.Advances in zebrafish chemical screening technologies [J].Future Med Chem 2012 ,4(14) : 1811-1822.
 [8] 罗芝萍.黄酮类化合物的药理活性研究进展 [J].亚太传统医药 2010 ,6(4) : 126-128.

[9] 原爱红 黄哲 马骏 等.桑叶黄酮的提取及其降糖作用的研究 [J].中草药 2004 ,35(11) : 1242-1243.
 [10] 高莹 肖颖.山楂及山楂黄酮提取物调节大鼠血脂的效果研究 [J].中国食品卫生杂志 2002 ,14(3) : 14-16.
 [11] 孟宪丽 张芝 李建亚 等.淫羊藿总黄酮对老年大鼠神经内分泌免疫调节作用的研究 [J].中药药理与临床 , 1998 ,14(4) : 10-11.
 [12] 宗灿华 马山 于国萍.荷叶黄酮抗衰老作用研究 [J].中国食物与营养 2008(10) : 52-53.
 [13] KAHALY G J ,HANSEN M P.Type 1 diabetes associated autoimmunity [J].Autoimmun Rev 2016 ,15(7) : 644-648.
 [14] KAO K T ,SABIN M A.Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents [J].Aust Fam Physician 2016 , 45(6) : 401-406.
 [15] CERNEA S ,DOBREANU M.Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications [J].Biochem Med(Zagreb) 2013 ,23(3) : 266-280.
 [16] PRINCE V E ,ANDERSON R M ,DALGIN G.Zebrafish Pancreas Development and Regeneration: Fishing for Diabetes Therapies [J].Current Top Dev Biol 2017(124) : 235-276.
 [17] TSUJI N ,NINOV N ,DELAWAREY M ,et al.Whole organism high content screening identifies stimulators of pancreatic beta-cell proliferation [J].PloS One 2014 ,9(8) : e104112.
 [18] DALGIN G ,PRINCE V E.Differential levels of Neurod establish zebrafish endocrine pancreas cell fates [J].Dev Biol 2015 ,402(1) : 81-97.

(上接第 134 页)

[51] LEE J ,KIM S E ,LEE J Y ,et al.N-Alkoxysulfamide ,N-hydroxysulfamide ,and sulfamate analogues of methionyl and isoleucyl adenylates as inhibitors of methionyl-tRNA and isoleucyl-tRNA synthetases [J].Bioorg Med Chem Lett 2003 ,13(6) : 1087-1092.
 [52] LEE J ,KANG S U ,KIM S E ,et al.Vanilloid and isovanilloid analogues as inhibitors of methionyl-tRNA and isoleucyl-tRNA synthetases [J].Bioorg Med Chem Lett , 2001 ,11(8) : 965-968.
 [53] ZHANG B ,DE GRAEF S ,NAUTIYAL M ,et al.Family-wide analysis of aminoacyl-sulfamoyl-3-deazaadenosine analogues as inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetases [J].Eur J Med Chem 2018(148) : 384-396.
 [54] JARVEST R L ,BERGE J M ,BERRY V ,et al.Nanomolar inhibitors of Staphylococcus aureus methionyl tRNA synthetase with potent antibacterial activity against gram-positive pathogens [J].J Med Chem 2002 ,45(10) : 1959-1962.
 [55] BEYER D ,KROLL H P ,ENDERMANN R ,et al.New class of bacterial phenylalanyl-tRNA synthetase inhibitors with high potency and broad-spectrum activity [J].Antimicrob Agents Chemother 2004 ,48(2) : 525-532.
 [56] TENG M ,HILGERS M T ,CUNNINGHAM M L ,et al.I-

dentification of bacteria - selective threonyl - tRNA synthetase substrate inhibitors by structure-based design [J].J Med Chem 2013 ,56(4) : 1748-1760.
 [57] XIAO Z P ,HE X B ,PENG Z Y ,et al.Synthesis , structure ,molecular docking ,and structure - activity relationship analysis of enamines: 3 - aryl - 4 - alkylaminofuran-2(5H) -ones as potential antibacterials [J].Bioorg Med Chem 2011 ,19(5) : 1571-1579.
 [58] XIAO Z P ,MA T W ,LIAO M L ,et al.Tyrosyl-tRNA synthetase inhibitors as antibacterial agents: Synthesis ,molecular docking and structure-activity relationship analysis of 3-aryl-4-arylaminofuran-2(5H) -ones [J].Eur J Med Chem 2011 ,46(10) : 4904-4914.
 [59] WANG X D ,DENG R C ,DONG J J ,et al.3-Aryl-4-acyloxyethoxyfuran-2(5H) -ones as inhibitors of tyrosyl-tRNA synthetase: synthesis ,molecular docking and antibacterial evaluation [J]. Bioorg Med Chem ,2013 ,21(17) : 4914-4922.
 [60] SUN J ,LIU J J ,ZHOU W ,et al.4 - Hydroxy - 3 - (naphthalen-1-ylmethyl) thiophen-2(5H) -one as inhibitors of tyrosyl-tRNA synthase: Synthesis ,molecular docking and antibacterial evaluation [J].J Mol Struct , 2014(1056-1057) : 104-109.