龙胆苦苷调控 PI3K/Akt 信号通路改善 2 型糖尿病小鼠骨骼肌胰岛素抵抗

王　星[1]，龙冬梅[2]，李佳瑄[1]，周茂婷[1]，王　瑀[1]，胡向虹[1]，郭　楠[3*]

1. 川北医学院　药学院，四川 南充　637100
2. 南充职业技术学院　现代农业学院，四川 南充　637131
3. 复旦大学附属闵行医院　药剂科，上海　201199

摘　要：目的　研究龙胆苦苷对 2 型糖尿病（T2DM）小鼠骨骼肌胰岛素抵抗的作用并探讨其作用机制。**方法**　C57BL/6J 小鼠高脂饮食饲养 10 周后，ip 链脲佐菌素（STZ）诱导形成 T2DM 模型，将模型成功小鼠随机分为模型组和龙胆苦苷低、高剂量（25、50 mg·kg^{-1}）组，普通饲料喂养组小鼠作为对照组，ig 给药 8 周，对照组和模型组 ig 给予相应体积的 0.5%的羧甲基纤维素钠。每周测定小鼠的体质量、餐后随机血糖（PBG）和空腹血糖（FBG）；开展口服葡萄糖耐量、胰岛素耐量实验；处死小鼠前 1 周尾尖采血测定糖化血红蛋白（HbA1c）水平；处死小鼠后试剂盒法测定血清中脂质含量；病理染色观察龙胆苦苷对糖尿病小鼠骨骼肌形态的影响；试剂盒法测定血清和骨骼肌中氧化应激相关指标；免疫荧光法检测小鼠胰腺中胰岛素和胰高血糖素水平；Western blotting 法测定骨骼肌中磷酸肌醇 3-激酶（PI3K）/蛋白激酶 B（Akt）信号通路，核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）信号通路和胰岛素抵抗信号通路相关蛋白的水平。**结果**　与模型组相比，龙胆苦苷降低 T2DM 小鼠的血糖和 HbA1c 水平（P＜0.05、0.01）；明显改善 T2DM 小鼠的口服葡萄糖耐量异常（P＜0.05、0.01），提高 T2DM 小鼠对胰岛素的敏感性（P＜0.05、0.01）；显著增加 T2DM 小鼠胰腺中胰岛素含量（P＜0.05、0.01），降低胰高血糖素含量（P＜0.05、0.01），改善骨骼肌形态异常；此外，龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠血脂紊乱，增强血清和骨骼肌中抗氧化酶活性和增加抗氧化物质水平（P＜0.05、0.01），降低丙二醛（MDA）含量（P＜0.05）；蛋白检测结果表明龙胆苦苷上调骨骼肌中磷酸化蛋白 PI3K、Akt、胰岛素受体底物-1（IRS1）表达（P＜0.05、0.01），增加骨骼肌中蛋白葡萄糖转运蛋白-4（GLUT4）、Nrf2、NADPH 醌氧化还原酶-1（NQO1）、血红素加氧酶-1（HO-1）和谷氨酰半胱氨酸连接酶催化亚单位（GCLC）表达（P＜0.05、0.01），抑制骨骼肌蛋白 KELCH 样 ECH 关联蛋白 1（Keap1）表达（P＜0.05、0.01）。**结论**　龙胆苦苷可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路减轻骨骼肌氧化损伤和改善骨骼肌胰岛素抵抗，进而发挥其治疗 T2DM 作用。

关键词：龙胆苦苷；2 型糖尿病；胰岛素抵抗；氧化应激；PI3K/Akt 信号通路

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 - 6376(2025)03 - 0655 - 12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.03.012

Effect of gentiopicroside on improving insulin resistance in skeletal muscle of type 2 diabetic mice by regulating PI3K/Akt signaling pathway

WANG Xing[1], LONG Dongmei[2], LI Jiaxuan[1], ZHOU Maoting[1], WANG Yu[1], HU Xianghong[1], GUO Nan[3]

1. Department of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China
2. College of Modern Agriculture, Nanchong Vocational and Technical College, Nanchong 637131, China
3. Department of Pharmacy, Minhang Hospital, Fudan University, Shanghai 201199, China

Abstract: Objective　To study the effect of gentiopicrosid (GPS) on insulin resistance in skeletal muscle of the type 2 diabetes mellitus (T2DM) mice and explore its mechanism. **Methods**　After C57BL/6J mice were fed with high-fat diet for 10 weeks, the T2DM model was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). The successful model mice were randomly divided into model group, GPS low and high dose (25 and 50 mg·kg^{-1}) groups, and the mice in the normal diet group were administered ig for eight weeks. The

收稿日期：2024-08-03

基金项目：四川省自然科学基金青年基金项目（2023NSFSC1676）；南充市市校科技战略合作项目（22SXZRKX0012）；南充市科技计划项目（23YYJCYJ0026）；川北医学院校级杰出青年项目（CBY23-JQ03）；川北医学院附属医院科研发展计划项目（2023PTZK022）；四川省大学生创新创业项目（S202310634043, S202310634066）；上海市科委启明星（扬帆专项）项目（22YF1439800）

作者简介：王　星，博士，副教授，主要从事硒对糖尿病及其慢性并发症的调控作用。E-mail: wangxing@nsmc.edu.cn

***通信作者：**郭　楠，博士，副主任药师，主要从事抗糖尿病及糖尿病并发症药物研发和作用机制研究。E-mail: guon@fudan.edu.cn

control group and model group were ig given 0.5% sodium carboxymethyl cellulose. Body mass, postprandial random blood glucose (PBG) and fasting blood glucose (FBG) were measured weekly. Oral glucose tolerance and insulin tolerance tests were carried out. Hemoglobin a1c (HbA1c) was measured by blood sampling at tail tip 1 week before the mice were killed. The serum lipid content was determined by kit method after killing mice. The effect of GPS on skeletal muscle morphology in diabetic mice were observed by pathological staining. The oxidative stress related indexes in serum and skeletal muscle of diabetic mice were determined by biochemical method. The levels of the insulin and pancreatic hyperglycemia in pancreas of the mice were measured by immunofluorescence. The expressions of the phosphoinositide 3- kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signal pathway, nuclear factor E2 associated factor 2 (Nrf2) signal pathway and insulin resistance signal pathway in skeletal muscle were evaluated by Western blotting. **Results** Compared with the model group, GPS reduced the levels of blood glucose and glycosylated hemoglobin in T2DM mice ($P < 0.05$ and 0.01). GPS obviously attenuated the abnormal oral glucose tolerance and insulin sensitivity of the T2DM mice ($P < 0.05$ and 0.01). GPS discernibly increased the content of insulin ($P < 0.05$ and 0.01), decreased the content of glucagon in pancreas ($P < 0.05$ and 0.01), and ameliorated the morphological abnormalities of skeletal muscle in T2DM mice. Additionally, GPS alleviated the dyslipidemia, enhanced the activity of antioxidant enzymes and increased the levels of antioxidant substances ($P < 0.05$ and 0.01), and reduced the content of malondialdehyde (MDA) in serum and skeletal muscle of the T2DM mice ($P < 0.05$). The results of protein detection showed that GPS upregulated the expression of phosphorylated proteins PI3K, AKT and insulin receptor substrate-1 (IRS1) in skeletal muscle ($P < 0.05$ and 0.01). GPS increased the expression of protein glucose transporters type 4 (GLUT4), Nrf2, NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1), heme oxygenase-1 (HO-1) and glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) in skeletal muscle ($P < 0.05$ and 0.01), and inhibited the expression of protein KELCH like epichlorohydrin associated protein-1 (Keap1) ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** GPS may reduce oxidative damage and improve insulin resistance of skeletal muscle by regulating PI3K/Akt signaling pathway, and then play its anti-T2DM role.

Key words: gentiopicroside; type 2 diabetes mellitus; insulin resistance; oxidative stress; PI3K/Akt signaling pathway

糖尿病是世界范围内最常见的代谢紊乱疾病之一，全球约有 5.37 亿成年人患有糖尿病，预计到 2045 年这一数字将上升至 7 亿[1]。糖尿病是由异常的胰岛素分泌、胰岛素抵抗或这 2 种因素引起的，其特征是高血糖症，进而影响碳水化合物、脂肪和蛋白质的代谢，其中 2 型糖尿病（T2DM）约占糖尿病患者的 90%[2]。尽管目前治疗 T2DM 的药物种类很多，但是仍然存在治疗效果有限，价格昂贵和不良反应明显的局限性，因此有必要开发新的治疗药物。

骨骼肌是糖尿病患者餐后葡萄糖储存的主要储库，也是胰岛素的重要靶器官之一，对维持机体血糖平衡至关重要。骨骼肌占总体质量的 40%～50%，消耗全身 30%的能量以及吸收大约 80%的葡萄糖，是机体静息代谢率的重要决定器官。骨骼肌的基本功能是通过胰岛素信号级联增加葡萄糖转运活性[3]。正常情况下，骨骼肌通过激活胰岛素信号通路，促进葡萄糖转运蛋白工作而使肌肉细胞摄取葡萄糖进而维持血糖水平稳定[4]。氧化应激是胰岛素抵抗发生发展的关键因素，持续高血糖会使机体产生更多的活性氧（ROS）、活性氮，超过机体清除氧、氮自由基能力，而氧化剂过度的积累会引起骨骼肌细胞蛋白质氧化、脂质过氧化损伤、线粒体功能障碍和 DNA 损伤，最终会引起骨骼肌功能障碍，在糖尿病方面最明显的表现就是骨骼肌胰岛素抵抗[5-6]。而胰岛素抵抗又会减少蛋白质合成并增加蛋白质降解，导致肌肉萎缩和肌肉减少，从而加重 T2DM 的进展[7]。由此可见能改善骨骼肌胰岛素抵抗的策略或者药物可能是防治 T2DM 的有效方法。

天然产物龙胆苦苷是一种环醚萜苷类化合物，广泛存在于龙胆科植物条叶龙胆、龙胆、三花龙胆或坚龙胆中，具有抗炎镇痛、保肝利胆、抗抑郁、抗肿瘤、抗糖尿病和抗骨质疏松等诸多药理作用[8-9]。在糖尿病并发症方面，龙胆苦苷可显著改善链脲佐菌素（STZ）糖尿病大鼠的周围神经病变，其作用可能与改善神经血流量和调节血脂异常有关[10]；龙胆苦苷还可以通过抑制炎症反应和氧化应激显著改善糖尿病视网膜病变和糖尿病肾病[11-12]。在糖尿病方面，龙胆苦苷通过靶向孕激素和脂肪 Q3 受体（PAQR3）而激活磷酸肌醇 3-激酶（PI3K）/蛋白激酶 B（Akt）信号通路，从而显著改善高脂饮食（HFD）喂养联合 STZ 诱导的 T2DM 小鼠糖脂代谢障碍[13]。不仅如此，在棕榈酸诱导肝 L02 细胞形成的胰岛素抵抗细胞模型中，龙胆苦苷通过抑制糖异生来维持细胞内葡萄糖的稳态[14]。前期研究结果也表明，在高脂饮食联合 STZ 诱导形成的 T2DM 小鼠模型中，

龙胆苦苷通过抑制糖异生而改善糖尿病症状[15]，但是其改善 T2DM 作用是否与减轻骨骼肌胰岛素抵抗有关仍不清楚。因此，本研究在高脂饮食联合 STZ 诱导 C57BL/6J 小鼠形成的 T2DM 模型中，从骨骼肌胰岛素抵抗方面来探讨龙胆苦苷改善 T2DM 的作用机制，为其进一步的临床应用和产品转化提供参考，并为开发防治 T2DM 新药提供新的方向。

1　材料

1.1　实验动物

40 只 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠，体质量 20～22 g，购自北京华阜康生物科技股份有限公司，实验动物生产许可证号为 SCXK（京）2019-0008，饲养于川北医学院清洁级动物房，室温（23±2）℃，空气湿度 40%，12 h 光暗循环，小鼠自由摄食和饮水。动物实验经川北医学院实验动物伦理委员会批准，动物伦理委员会审批号为 2023011。

1.2　试剂和高脂饲料

龙胆苦苷（批号 J04HS1.84065，质量分数≥97%，上海源叶生物科技有限公司）；STZ（Sigma 公司）；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）试剂盒（北京中生北控生物科技股份有限公司）；糖化血红蛋白（HbA1c）试剂盒（北京豪迈生物工程有限公司）；还原型谷胱甘肽（GSH）、超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、丙二醛（MDA）、总抗氧化能力（T-AOC）试剂盒（南京建成生物工程研究所）；单克隆抗体核因子-E2 相关因子 2（Nrf2）、谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基（GCLC）和血红素加氧酶 1（HO-1）（英国 Abcam 公司）；单克隆抗体胞质接头蛋白（Keap1）、醌氧化还原酶 1（NQO1）、胰岛素受体底物 1（IRS1）、p-IRS1（美国 CST 公司）；单克隆抗体蛋白激酶 B（AKT）、p-AKT、磷脂酰肌醇三磷酸激酶（PI3K）、p-PI3K、葡萄糖转运蛋白 4（GLUT4）和 β-actin（武汉赛维尔生物科技有限公司）；BCA 蛋白试剂盒、RIPA 裂解缓冲液、蛋白酶和磷酸酶抑制剂、化学发光试剂、辣根过氧化物酶标记的兔二抗和鼠二抗（北京普利莱基因技术有限公司）。高脂饲料[货号 SYHF60-1，书玉生物科技（上海）有限公司]，高脂饲料组成为：40.7%普通饲料、27%猪油、8%蔗糖、10.8%全脂奶粉、13.5%酪蛋白，其中蛋白供能 20%、脂肪供能 60%、碳水供能 20%。

1.3　实验仪器

酶标仪 Infinite 200（瑞士 Tecan 公司）；HZQ-C 空气浴振荡器（哈尔滨东明医疗仪器厂）；电泳仪、垂直电泳槽及组件、转印槽及组件（北京六一生物科技有限公司）；化学发光成像系统（美国 Bio-Rad Laboratories 公司）；倒置显微镜（日本 Olympus 公司）。

2　方法

2.1　T2DM 小鼠模型制备、分组和给药

C57BL/6J 小鼠适应性喂养 1 周后，将其随机分为普通饲料喂养组和 HFD 喂养组。喂养 10 周后，HFD 小鼠连续 5 d 禁食 8 h 后 ip STZ（35 mg·kg^{-1}），而普通饲料喂养组小鼠 ip 相应体积的柠檬酸缓冲液（pH 4.4）。3 d 后禁食 6 h 尾 iv 采血，葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖（FBG），FBG≥2 000 mg·L^{-1} 视为糖尿病模型成功[16-17]。随后将模型成功小鼠随机分为模型组及龙胆苦苷低、高剂量（25、50 mg·kg^{-1}）组，普通饲料喂养组小鼠作为对照组，ig 给药 8 周，对照组和模型组 ig 给予相应体积的 0.5%的羧甲基纤维素钠（CMC-Na）。处死小鼠，留取胰腺和骨骼肌。实验期间每周测定小鼠的体质量，餐后随机血糖（PBG）和 FBG，处死小鼠前 1 周尾尖采血测定 HbA1c 水平。

2.2　小鼠口服葡萄糖耐量实验（OGTT）和胰岛素耐量实验（ITT）实验

分别在给药第 6、7 周进行 OGTT 和 ITT 实验，小鼠禁食前尾尖采血测定血糖作为 0 min 血糖。对于 OGTT 实验，小鼠禁食 10 h 后 ig 给予葡萄糖（2 g·kg^{-1}）；对于 ITT 实验，小鼠禁食 6 h 后 sc 胰岛素（0.75 U·kg^{-1}）。随后在给予葡萄糖和胰岛素后的 30、60、90、120 min 时尾尖取血，测定各个时间点的血糖。根据各个时间点血糖值绘制血糖时间曲线，计算各组血糖曲线下面积（AUC）。

2.3　小鼠血清中脂质含量和氧化应激指标测定

末次给药后，眼眶取血后处死小鼠，全血室温静置 2 h 后，20 ℃、6 000 r·min^{-1} 离心 10 min，留取上清液，随后严格按照试剂盒说明书测定血清中 TG、TC、LDL-C、HDL-C、GSH、SOD、T-AOC、CAT 和 MDA 活性或含量。

2.4　小鼠骨骼肌中氧化应激指标测定

称量 60 mg 的骨骼肌于 1.5 mL 的 EP 管中，加

入 600 μL 预冷 0.9%氯化钠溶液，手术剪剪碎后用机械匀浆器进行匀浆，冰上静置 40 min 后，4 ℃、8 000 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清液，按照试剂盒说明书测定 GSH、SOD、T-AOC 和 MDA 含量或活性，上清液稀释 10 倍后用 BCA 法测定上清液蛋白浓度，氧化应激指标最终结果用蛋白浓度进行校正。

2.5 小鼠胰腺免疫荧光分析

处死小鼠将胰腺的一部分固定于中性多聚甲醛中，24 h 后胰腺包埋在石蜡中，制备厚度为 5 μm 的切片。之后石蜡切片用二甲苯脱蜡，并通过不同浓度的乙醇再水合，然后在三乙二胺四乙酸（pH 9.0）中煮沸以进行抗原修复，随后在室温下密封 1 h，最后在 4 ℃下与兔抗胰高血糖素抗体（1∶25）和小鼠抗胰岛素抗体（1∶45）的混合物一起孵育过夜。洗涤后加入二抗 37 ℃下孵育 1 h，漂洗后滴加封片剂，然后用荧光显微镜观察并拍照。最后，使用 Image J 软件计算胰岛素和胰高血糖素的荧光强度，计算胰岛素、胰高血糖素阳性面积百分比。

胰岛素（胰高血糖素）阳性面积百分比＝胰岛素（胰高血糖素）阳性面积/胰岛面积

2.6 小鼠胰腺和骨骼肌病理染色分析

处死小鼠将胰腺和骨骼肌的一部分固定于中性多聚甲醛中，24 h 后将其包埋在石蜡中并制备成厚度为 5 μm 的切片。之后严格按照试剂盒说明书对骨骼肌和胰腺进行肝脏苏木精-伊红（HE）染色、油红染色和糖原染色（PAS）。最后，在显微镜下观察所有切片并进行拍照分析。

2.7 小鼠骨骼肌中蛋白 Western blotting 测定

每组随机选取 4 只小鼠的骨骼肌，称量 50 mg 该组织，加入 500 μL 含有蛋白酶和磷酸酶抑制的 RIPA 裂解液，手术剪剪碎后用机械匀浆器充分匀浆，冰上裂解 40 min，4 ℃、12 000 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清稀释 10 倍后用 BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白浓度调整到同一浓度后，加入 5×loading buffer 缓冲液，煮沸变性。10%聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到 PVDF 膜上，室温封闭 2 h 后在 4 ℃冰箱中过夜孵育一抗，洗膜 3 遍后室温孵育二抗 2 h，显影后使用 Image Lab 进行灰度值统计。

2.8 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，2 组间差异的显著性分析用 Excel 中的 Student's *t* test 进行，多组间的差异分析用 GraphPad Prism 6.0 软件中的单因素方差分析法进行分析，使用该软件绘制统计图。

3 结果

3.1 龙胆苦苷降低 T2DM 小鼠的血糖

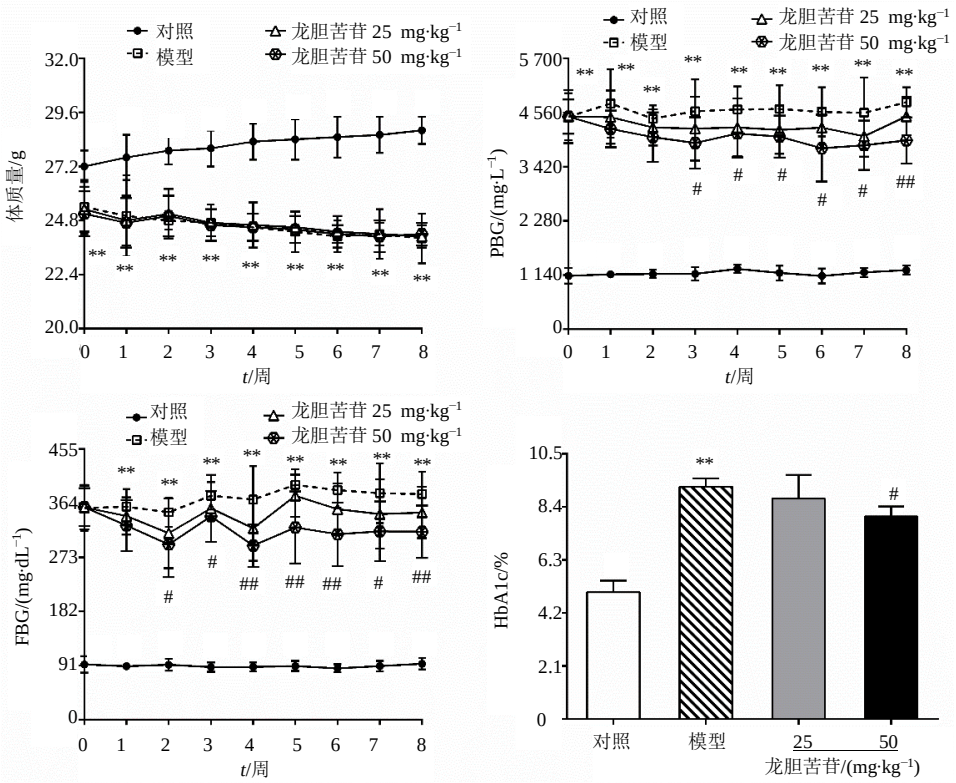
糖尿病症状相关指标测定结果如图 1 所示，实验期间对照组小鼠体质量持续稳定增加，模型组小鼠和龙胆苦苷组小鼠体质量均低于对照组（P＜0.01），且模型组小鼠和龙胆苦苷组小鼠的体质量无明显差异。与对照组比较，模型组小鼠的 PBG、FBG 和 HbA1c 均明显升高（P＜0.01），表明 T2DM 模型制备成功；与模型组比较，龙胆苦苷高剂量组小鼠的 PBG 和 FBG 分别从第 3、2 周到第 8 周均明显降低（P＜0.05、0.01），龙胆苦苷高剂量组小鼠的 HbA1c 水平也明显低于模型组（P＜0.05）；而低剂量龙胆苦苷具有降低 T2DM 小鼠 PBG、FBG 和 HbA1c 的趋势。结果表明龙胆苦苷显著改善 T2DM 小鼠的血糖紊乱。

3.2 龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠口服葡萄糖耐量异常和胰岛素抵抗

为进一步考察龙胆苦苷对 T2DM 小鼠血糖的影响，进行 OGTT 和 ITT 实验，结果如图 2 所示，糖负荷或注射胰岛素后，模型组各个时间点的血糖值和 AUC 明显高于对照组（P＜0.01），表明 T2DM 小鼠出现葡萄糖耐量异常和胰岛素抵抗。而经过龙胆苦苷治疗后，相较于模型组，糖负荷或注射胰岛素后，龙胆苦苷呈剂量相关性降低 30、60、90、120 min 的血糖值和 AUC（P＜0.05、0.01）。结果表明龙胆苦苷显著改善 T2DM 小鼠口服葡萄糖耐量异常和胰岛素抵抗。

3.3 龙胆苦苷增加 T2DM 小鼠胰腺中胰岛素含量且改善胰岛形态

处死小鼠后对胰腺进行免疫荧光和病理染色，结果如图 3 所示，相较于对照组，模型组 T2DM 小鼠胰岛中胰岛素含量显著减少，胰高血糖素含量明显增加，胰岛形态受损，α 细胞杂乱分布于整个胰岛且数目增多，β 细胞数目减少，分布区域面积变小，排列无规则。而经过 8 周的龙胆苦苷治疗后，相较于模型组，高、低剂量龙胆苦苷增加 T2DM 小鼠胰岛中胰岛素含量，降低胰高血糖素含量，逆转胰岛中 α 细胞和 β 细胞的异常分布。HE 染色结果表明模型组 T2DM 小鼠胰岛形态不规则，胰岛受损，有炎症细胞浸润，高、低剂量龙胆苦苷对这些

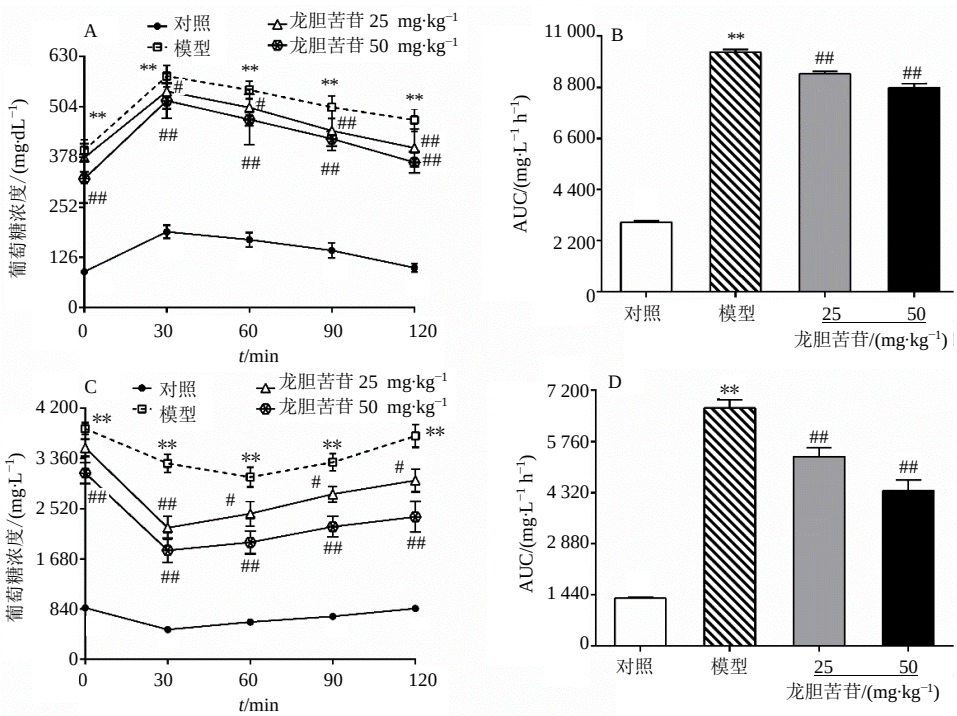


与对照组比较：$^{**}P<0.01$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$。

$^{**}P<0.01$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group.

图 1　龙胆苦苷降低 T2DM 小鼠的血糖（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Fig. 1　GPS reduced blood glucose in T2DM mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

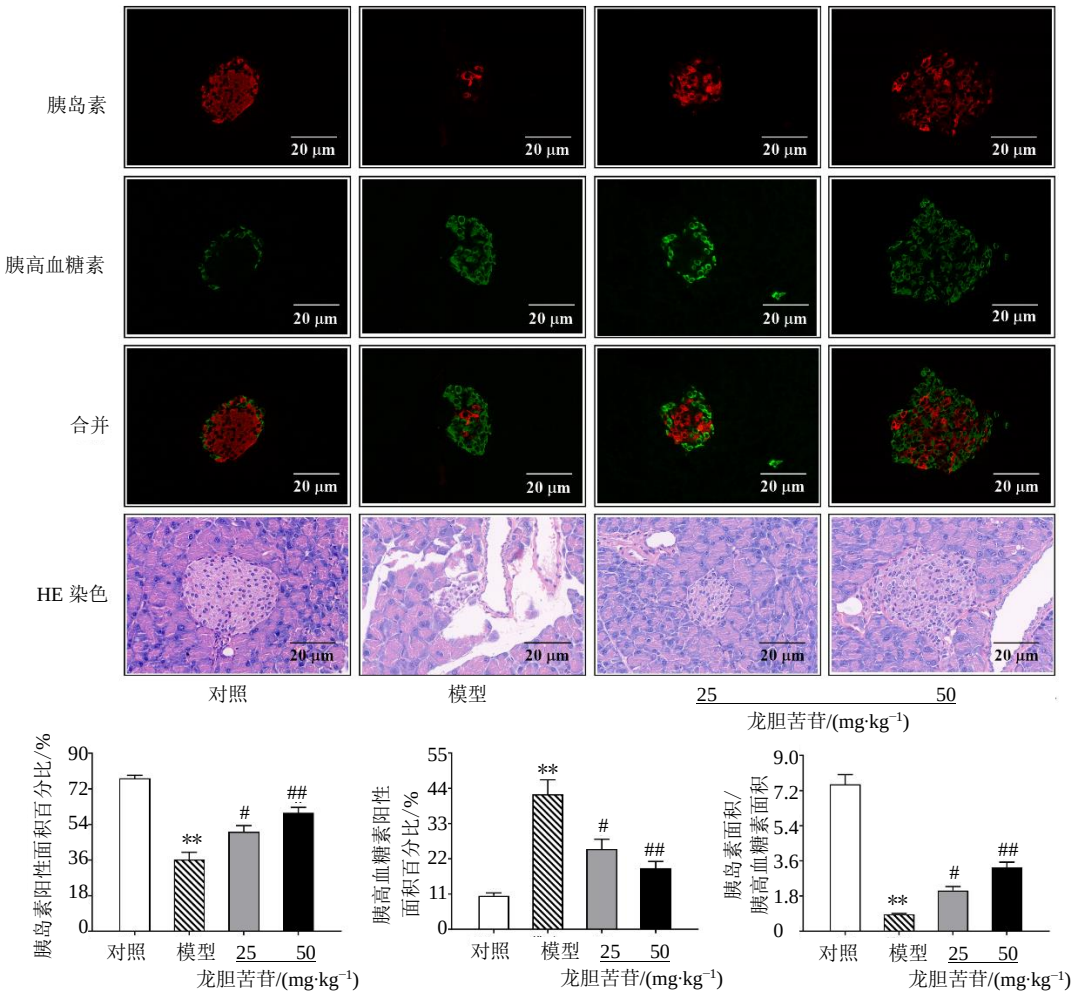


与对照组比较：$^{**}P<0.01$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$。

$^{**}P<0.01$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group.

图 2　龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠口服葡萄糖耐量异常（A、B）和胰岛素抵抗（C、D）（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Fig. 2　GPS attenuated impaired oral glucose tolerance (A and B) and insulin resistance (C and D) in T2DM mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)



与对照组比较：$^{**}P<0.01$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$。

$^{**}P<0.01$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group.

图 3　龙胆苦苷增加 T2DM 小鼠胰腺中胰岛素含量且改善胰岛形态($\bar{x}\pm s$，$n=4$)

Fig. 3　GPS increased insulin content in pancreas and improves islet morphology in T2DM mice ($\bar{x}\pm s$，$n=4$)

异常变化有一定的改善作用。免疫荧光染色强度的统计结果表明，与对照组比较，模型组 T2DM 小鼠的胰岛素阳性面积百分比显著降低（$P<0.01$），而胰高血糖素阳性面积百分比显著升高（$P<0.01$），胰岛素与胰高血糖素的荧光强度比值显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，龙胆苦苷呈剂量相关性地逆转这些异常变化（$P<0.05$、0.01）。结果表明龙胆苦苷在改善 T2DM 小鼠胰岛功能方面起着关键作用。

3.4　龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠骨骼肌病理形态异常

T2DM 小鼠骨骼肌病理染色结果如图 4 所示，HE 染色结果表明对照组小鼠骨骼肌纤维排列有序、规则且完整，尺寸大小合适；相较于对照组，模型组 T2DM 小鼠骨骼肌肌纤维尺寸显著减小，结构受损，排列松散、稀疏、无规则，而龙胆苦苷明显改善这些异常变化。PAS 染色结果表明模型组 T2DM 小鼠骨骼肌中的糖原含量明显低于对照组，而高、低剂量龙胆苦苷增加骨骼肌中糖原含量。油红染色结果表明，相较于对照组，模型组 T2DM 小鼠骨骼肌中脂质含量增加，而经过龙胆苦苷治疗后，骨骼肌中脂质含量降低。结果表明龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠骨骼肌形态异常，增加骨骼肌中糖原含量且降低脂质含量。

3.5　龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠血脂紊乱

血脂紊乱与 T2DM 的发生和发展密切相关，因此测定血清中脂质代谢相关指标，结果如图 5 所示，相较于对照组，模型组小鼠血清中 TG、TC 和 LDL-C 水平明显增加（$P<0.01$），HDL-C 水平明显降低（$P<0.01$）；经过龙胆苦苷治疗后，相较于模型组，低剂量龙胆苦苷改善这些指标的变化趋势，而高剂

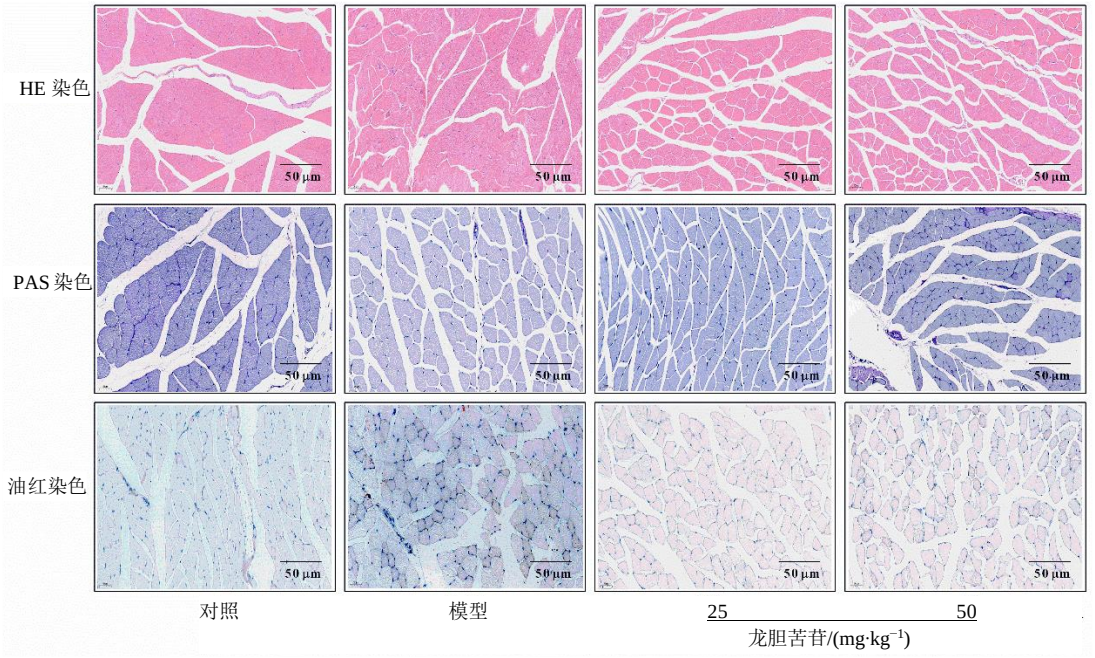
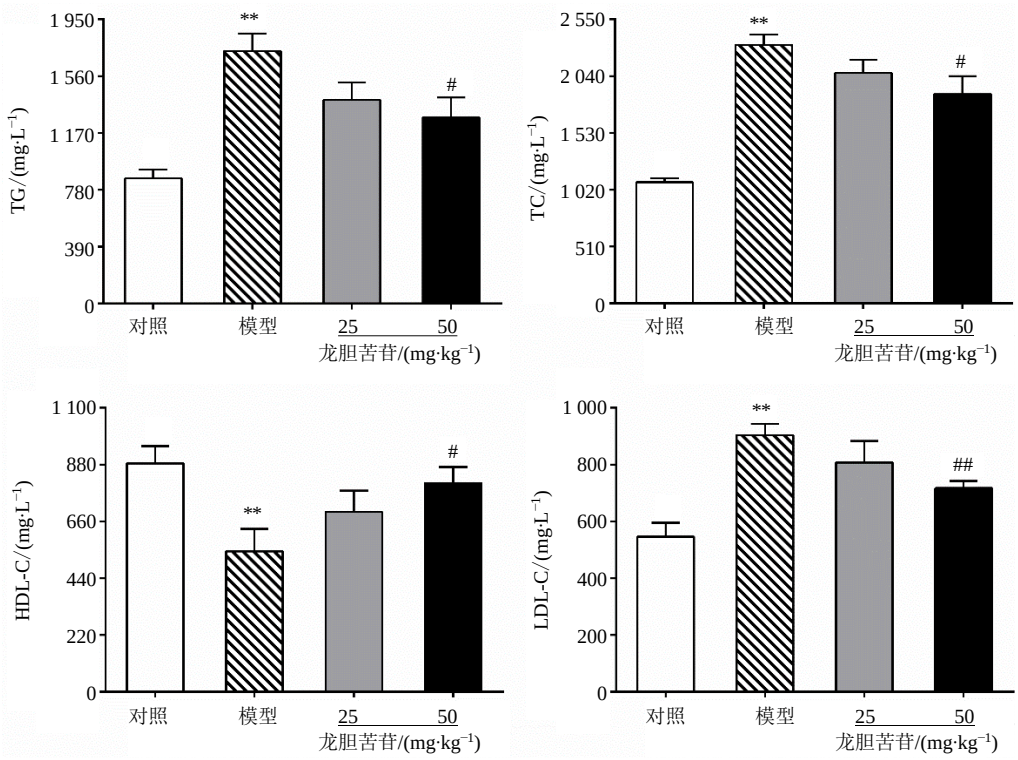


图 4　龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠骨骼肌病理形态异常(×100)

Fig. 4　GPS ameliorated pathological changes of skeletal muscle in T2DM mice (×100)



与对照组比较：$^{**}P<0.01$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$。

$^{**}P<0.01$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group.

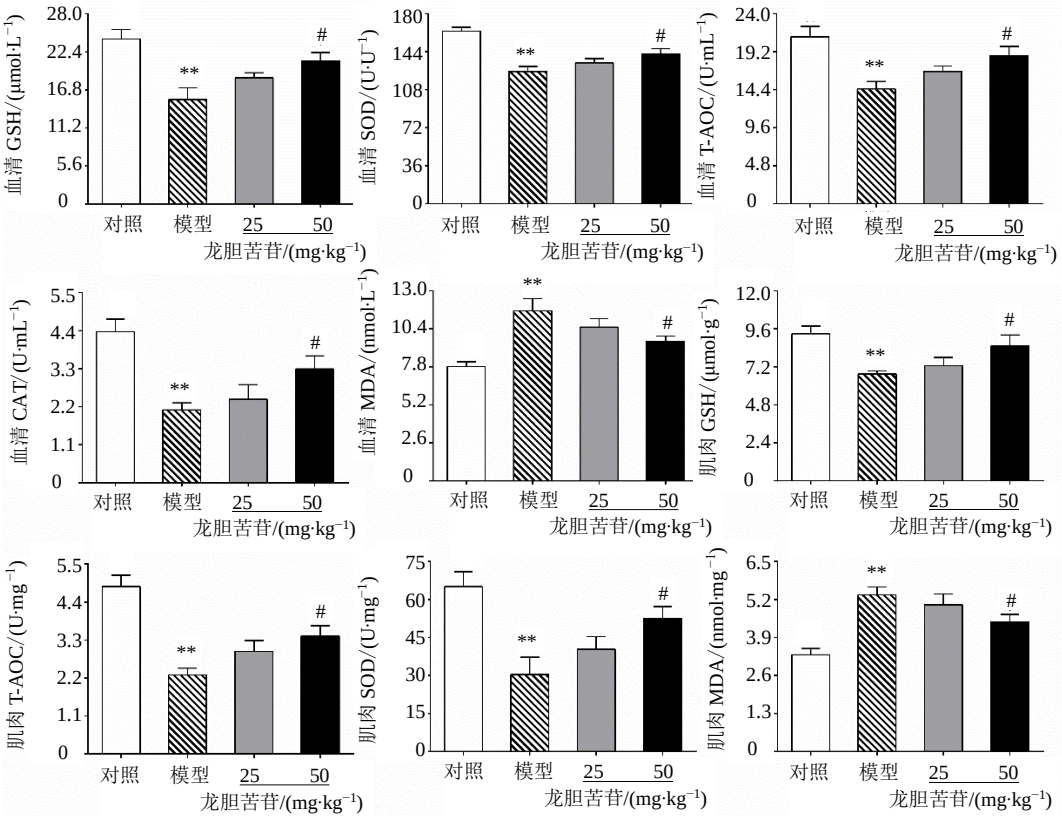
图 5　龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠血脂紊乱($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

Fig. 5　GPS alleviated dyslipidemia in T2DM mice ($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

量龙胆苦苷明显降低 T2DM 小鼠血清中 TG、TC 和 LDL-C 水平（$P<0.05$、0.01），增加 HDL-C 水平（$P<0.05$）。结果提示龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠的糖尿病症状可能与减轻血脂紊乱有关。

3.6 龙胆苦苷减轻 T2DM 小鼠骨骼肌氧化应激受损

为明确龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠骨骼肌形态异常是否与减轻氧化应激有关，测定血清和骨骼肌中氧化应激相关指标，结果如图 6 所示，相较于对照组，模型组 T2DM 小鼠血清和骨骼肌中 GSH 含量、SOD 活性、T-AOC 活性明显降低（P＜0.01），血清中 CAT 活性明显降低（P＜0.01），血清和骨骼肌中 MDA 含量明显增加（P＜0.01），表明 T2DM 小鼠发生严重氧化应激受损。与模型组比较，高剂量龙胆苦苷明显增强 T2DM 小鼠血清和骨骼肌中抗氧化酶活性（P＜0.05），提高抗氧化物质含量（P＜0.05），降低 MDA 含量（P＜0.05）；低剂量龙胆苦苷具有改善这些指标的趋势。结果表明龙胆苦苷明显减轻 T2DM 小鼠机体和骨骼肌氧化应激受损。



与对照组比较：**P＜0.01；与模型组比较：#P＜0.05。

**P < 0.01 *vs* control group; #P < 0.05 *vs* model group.

图 6 龙胆苦苷减轻 T2DM 小鼠骨骼肌氧化应激受损（$\bar{x}\pm s$，n＝10）

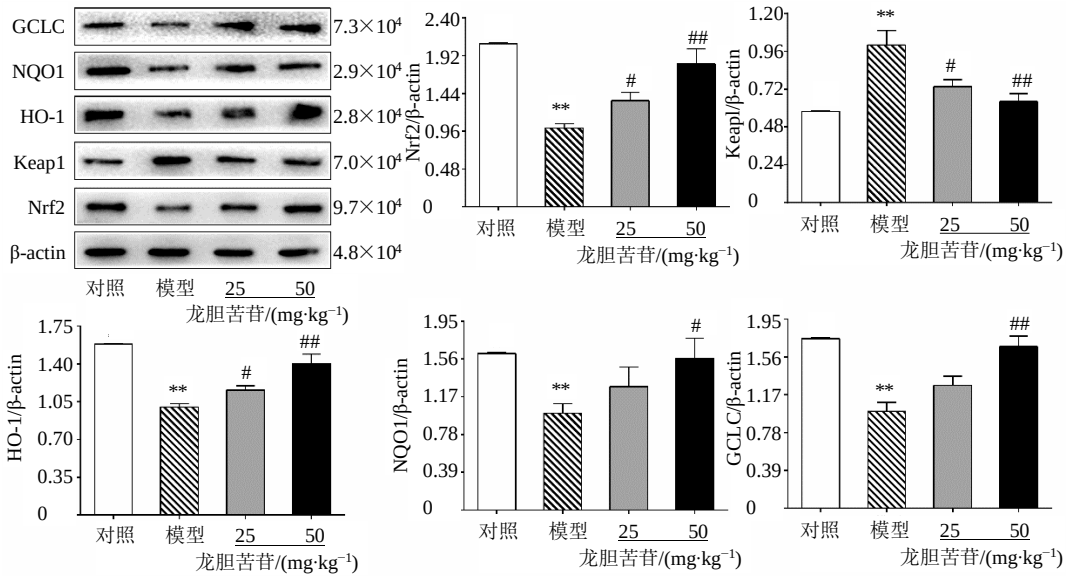
Fig. 6 GPS alleviated oxidative stress damage of skeletal muscle in T2DM mice ($\bar{x}\pm s$, n＝10)

3.7 龙胆苦苷激活 T2DM 小鼠骨骼肌中 Nrf2/Keap1 信号通路

为进一步探讨龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠骨骼肌氧化损伤可能的分子机制，用 Western blotting 检测相关蛋白表达。结果如图 7 所示，相较于对照组，模型组 T2DM 小鼠骨骼肌中蛋白 Nrf2、NQO1、HO-1 和 GCLC 表达降低（P＜0.01），蛋白 Keap1 表达明显增加（P＜0.01）；与模型组比较，高剂量龙胆苦苷明显逆转这些蛋白的异常变化（P＜0.05、0.01），低剂量龙胆苦苷明显增加 Nrf2 和 HO-1 表达（P＜0.05），显著抑制 Keap1 表达（P＜0.05），具有增加蛋白 NQO1 和 GCLC 表达的趋势。结果表明龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠骨骼肌氧化损伤可能与调节 Nrf2/Keap1 信号通路有关。

3.8 龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗

为进一步明确龙胆苦苷是否能改善 T2DM 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗，测定相关蛋白，结果见图 8。相较于对照组，模型组 T2DM 小鼠骨骼肌中蛋白 p-PI3K、p-Akt、p-IRS1 和 GLUT4 表达明显降低（P＜0.01），表明 T2DM 小鼠骨骼肌发生明显的胰岛素抵抗和葡萄糖转运异常。与模型组比较，高剂量龙胆苦苷明显增加骨骼肌中这些蛋白的表达（P＜0.05、0.01），低剂量龙胆苦苷明显增加骨骼肌中 p-PI3K、p-Akt 表达（P＜0.01），具有增加骨骼



与对照组比较：$^{**}P<0.01$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$。

$^{**}P<0.01$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group.

图 7　龙胆苦苷激活 T2DM 小鼠骨骼肌中 Nrf2/Keap1 信号通路($\bar{x}\pm s$，$n=4$)

Fig. 7　GPS activated Nrf2/Keap1 signal pathway in skeletal muscle of T2DM mice ($\bar{x}\pm s$，$n=4$)

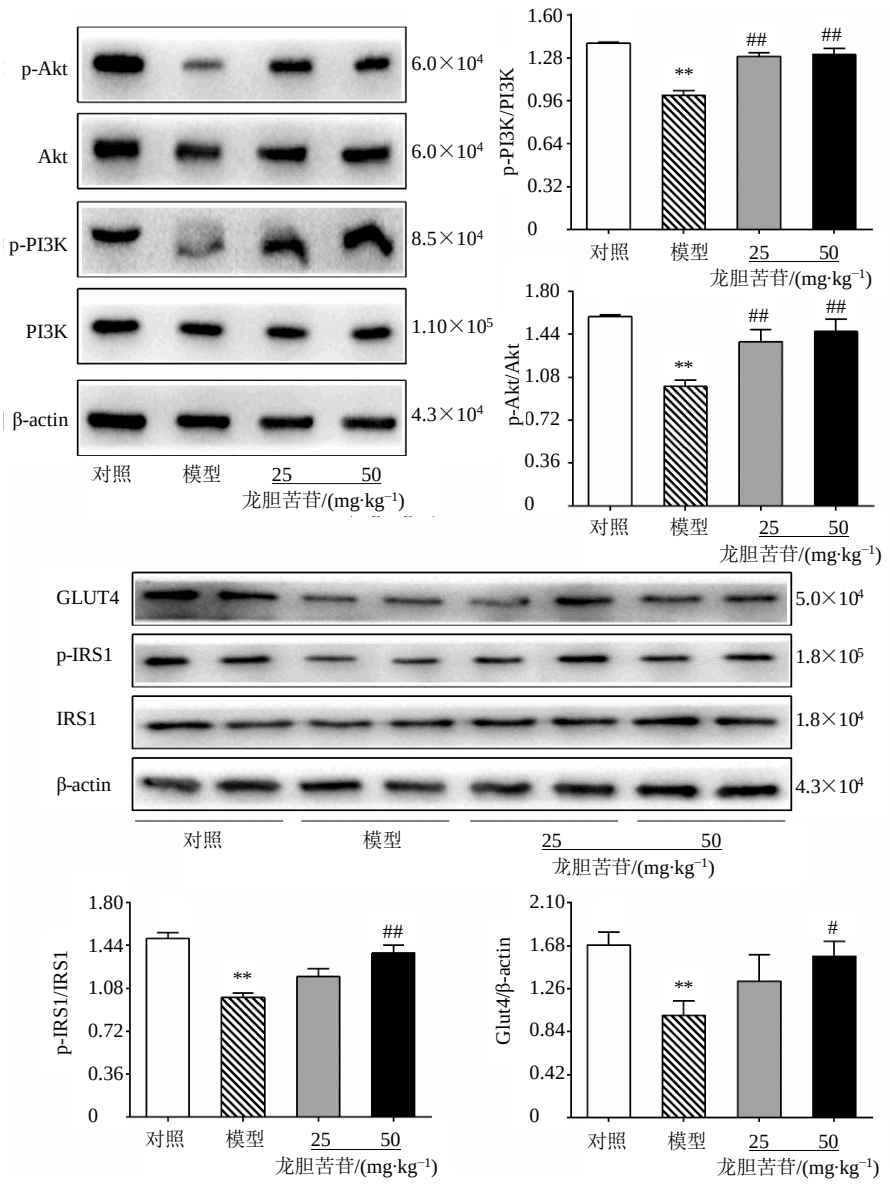
肌 p-IRS1 和 GLUT4 蛋白表达的趋势。结果表明龙胆苦苷通过调节 PI3K/Akt 信号通路而改善 T2DM 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗。

4　讨论

本研究在 HFD 喂养联合 STZ 诱导 C57BL/6J 小鼠形成的 T2DM 模型中，研究龙胆苦苷对 T2DM 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗的影响。通过开展研究主要有以下发现：（1）龙胆苦苷降低 T2DM 小鼠的 PBG 和 FBG，改善 T2DM 小鼠口服葡萄糖耐量异常，提高 T2DM 小鼠对胰岛素的敏感性；（2）龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠胰腺和骨骼肌病理形态异常，增加胰岛中胰岛素含量，降低胰岛中胰高血糖含量；（3）龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠血脂代谢紊乱和骨骼肌氧化应激受损；（4）龙胆苦苷激活 T2DM 小鼠骨骼肌 PI3K/Akt、Nrf2/Keap1 信号通路，调控骨骼肌胰岛素信号通路相关蛋白表达。综上可知，龙胆苦苷可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路改善骨骼肌氧化应激受损和胰岛素抵抗，进而发挥 T2DM 治疗作用。

T2DM 的发病机制主要体现在胰岛素分泌功能障碍和胰岛素抵抗。长期高血糖会使胰腺超负荷工作，分泌过量的胰岛素来维持血糖，从而导致胰腺功能受损和胰岛结构异常[18]；此外，持续高血糖会导致 T2DM 患者的肝脏、肌肉和脂肪对胰岛素的敏感性降低，并且身体处理葡萄糖的能力也显著降低，进而表现明显的胰岛素抵抗和葡萄糖耐量异常[19]。在 C57BL/6J 小鼠上，HFD 诱导的肥胖联合低剂量 STZ 破坏胰岛 β 细胞建立的胰岛素抵抗模型，其发病机制和特点与人类非常接近，是一种典型的用来研究 T2DM 疾病的动物模型[20]。在本研究中，与对照组相比，HFD 小鼠注射 STZ 后 PBG、FBG 和 HbA1c 明显增加，这些特征与临床糖尿病患者的特征一致，表明糖尿病模型建立成功。而龙胆苦苷治疗可以显著改善这些异常变化，与以前的研究结果一致[13, 15]。为进一步明确龙胆苦苷对糖代谢的影响，实验期间进行 OGTT 和 ITT 实验，结果表明在糖负荷或胰岛素负荷后，龙胆苦苷明显降低各个时间点血糖值和 AUC 值；骨骼肌是胰岛素三大靶器官之一，也是机体处理葡萄糖的主要器官。持续高血糖会使骨骼肌的形态结构异常，肌纤维尺寸变小，影响其对葡萄糖处理能力。在该研究中，T2DM 小鼠胰腺和骨骼肌形态结构明显受损，而龙胆苦苷减轻这些异常变化。以上结果表明龙胆苦苷对 HFD/STZ 诱发的 T2DM 具有潜在的治疗作用。

氧化应激是 T2DM 重要的发病机制之一[21]。正常范围内的 ROS 能刺激胰岛 β 细胞分泌胰岛素而调节血糖，当超过一定量后，ROS 可能改变胰岛素受体蛋白磷酸化的表达，进而影响胰岛素的分泌和外周组织对葡萄糖的吸收，从而促进 T2DM 进展[22]。另外，胰岛 β 细胞高水平的氧气消耗和较低水平的抗氧化酶特性，致使 β 细胞对 ROS 特别敏感，极易



与对照组比较：$^{**}P<0.01$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$。

$^{**}P<0.01$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group.

图 8 龙胆苦苷改善 T2DM 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

Fig. 8 GPS attenuated insulin resistance in skeletal muscle of T2DM mice ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

受到 ROS 的损害。ROS 增多可以使机体自由基增加，自由基可能会破坏 DNA 的结构，导致染色体不稳定，诱导蛋白质和脂质氧化，改变各种酶的活性，破坏蛋白结构和细胞膜功能而进一步加重损伤。此外，骨骼肌在持续的高血糖环境中，一方面抗氧化防御系统被耗竭而受损，另一方面还导致骨骼肌脂质过氧化，继而引起炎症而破坏骨骼肌[23]。在本研究中发现 T2DM 小鼠血清及骨骼肌中 MDA 产生增加，抗氧化酶和物质明显减少，而经过龙胆苦苷治疗后得到明显改善。T2DM 常常伴有血脂异常，胰岛素抵抗和胰岛素分泌不足是 T2DM 血脂异常的主要原因。发生胰岛素抵抗时，体内脂蛋白脂肪酶合成减少，进而减少 TG 的水解，导致脂质代谢紊乱[24]。不仅如此，高水平的 TG 需要更高水平的胰岛素来补偿胰岛素敏感性的下降，进一步加重胰岛素抵抗，导致恶性循环[25]。本研究发现龙胆苦苷明显降低 T2DM 小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 含量，并增加 HDL-C 含量。Nrf2/Keap1 信号通路是维持细胞氧化还原平衡最重要的信号通路之一。正常情况下，Nrf2 和它的抑制蛋白 Keap1 结合在一起

分布细胞浆中，当受到 ROS 或者自由基等外界刺激时，Keap1 结构发生变化，Nrf2 从 Keap1 上脱离下来进入细胞核中与抗氧化反应元件结合，进而促使抗氧化基因和酶（GCLC、HO-1、GCLC、NQO1）的表达来清除自由基[26]。因此，Nrf2/Keap1 通路可以快速而敏感地响应氧化应激，从而维持机体的氧化还原平衡。为进一步探讨龙胆苦苷改善氧化应激分子机制，检测骨骼肌中该信号通路相关蛋白表达，结果表明龙胆苦苷逆转 Nrf2/Keap1 信号通路相关蛋白表达。

骨骼肌是 T2DM 胰岛素抵抗形成的关键器官，胰腺分泌的胰岛素到达靶器官骨骼肌时，与胰岛素受体结合，导致葡萄糖摄取和酪氨酸激酶激活，导致 IRS 磷酸化，进而激活 PI3K/Akt 信号通路[27-28]，导致 GLUT4 转运到膜上，从而介导葡萄糖转运以保持血糖稳态[29]。研究结果表明龙胆苦苷提高 T2DM 小鼠对胰岛素的敏感性，改善骨骼肌形态异常。PI3K/Akt 信号通路不仅能通过促进糖原合成、促进葡萄糖转运和抑制糖异生来维持血糖稳态，还可调节多种生物过程，如细胞生物合成、能量代谢和分化，也是 Nrf2 的重要上游调节剂[30]。激活 PI3K/Akt 通路可以刺激 Nrf2 转移到细胞核，释放抗氧化酶，进一步降低 ROS 水平[30]。本研究发现龙胆苦苷明显增加 T2DM 小鼠骨骼肌中蛋白 p-PI3K、p-Akt、p-IRS1 和 GLUT4 表达，表明龙胆苦苷明显改善 T2DM 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗，其激活 Nrf2/Keap1 信号通路可能与调控 PI3K/Akt 信号通路有关。

龙胆苦苷明显降低 T2DM 小鼠血糖，改善口服葡萄糖耐量异常，提高其对胰岛素敏感性，改善胰腺和骨骼肌病理形态异常，其机制可能与减轻血脂异常，激活 PI3K/Akt/Nrf2/Keap1 信号通路而减轻骨骼肌氧化应激受损，调控 IRS1/PI3K/Akt/GLUT4 信号通路而改善骨骼肌胰岛素抵抗有关。该研究为龙胆苦苷进一步开发利用提供参考，也为开发 T2DM 新药提供新的思路。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 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: 109119.

[2] Crawford A L, Laiteerapong N. Type 2 diabetes [J]. Ann Intern Med, 2024, 177(6): ITC81-ITC96.

[3] Peifer-Weiß L, Al-Hasani H, Chadt A. AMPK and beyond: The signaling network controlling RabGAPs and contraction-mediated glucose uptake in skeletal muscle [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(3): 1910.

[4] Espino-Gonzalez E, Dalbram E, Mounier R, et al. Impaired skeletal muscle regeneration in diabetes: From cellular and molecular mechanisms to novel treatments [J]. Cell Metab, 2024, 36(6): 1204-1236.

[5] Zhang H, Qi G D, Wang K X, et al. Oxidative stress: Roles in skeletal muscle atrophy [J]. Biochem Pharmacol, 2023, 214: 115664.

[6] Han J Y, Park M, Lee H J. Stevia (*Stevia rebaudiana*) extract ameliorates insulin resistance by regulating mitochondrial function and oxidative stress in the skeletal muscle of db/db mice [J]. BMC Complement Med Ther, 2023, 23(1): 264.

[7] Luo W, Zhou Y, Tang Q, et al. Downhill running and caloric restriction attenuate insulin resistance associated skeletal muscle atrophy via the promotion of M2-like macrophages through TRIB3-AKT pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2024, 210: 271-285.

[8] Xing S P, Nong F F, Qin J L, et al. Gentiopicroside produces endothelium-independent vasodilation by deactivating the PI3K/Akt/rho-kinase pathway in isolated rat thoracic aorta [J]. BioMed Res Int, 2021, 2021(1): 5565748.

[9] Jin M Y, Feng H H, Wang Y, et al. Gentiopicroside ameliorates oxidative stress and lipid accumulation through nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 2940746.

[10] Lu Y, Yao J Y, Gong C L, et al. Gentiopicroside ameliorates diabetic peripheral neuropathy by modulating PPAR-Γ/AMPK/ACC signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 50(2): 585-596.

[11] Liu L H, Zuo Z F, Lu S J, et al. Naringin attenuates diabetic retinopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and NF-κB activation *in vivo* and *in vitro* [J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20(7): 813-821.

[12] Xu Z C, Zhang M, Wang Y, et al. Gentiopicroside ameliorates diabetic renal tubulointerstitial fibrosis via inhibiting the AT1R/CK2/NF-κB pathway [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 848915.

[13] Xiao H M, Sun X H, Lin Z Y, 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.

[14] Yang S Q, Chen Y D, Li H, et al. Geniposide and gentiopicroside suppress hepatic gluconeogenesis via regulation of AKT-FOXO1 pathway [J]. Arch Med Res, 2018, 49(5): 314-322.

[15] Wang X, Long D M, Hu X H, et al. Gentiopicroside modulates glucose homeostasis in high-fat-diet and streptozotocin-induced type 2 diabetic mice [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1172360.

[16] Zhang L L, Zhou X T, Chen H J, et al. Mulberry extract ameliorates T2DM-related symptoms via AMPK pathway in STZ-HFD-induced C57BL/6J mice [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 313: 116475.

[17] 李鑫, 朱明微, 李瑞楚, 等. 复方桦树茸降糖片的制备及其对 2 型糖尿病小鼠降血糖作用研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(11): 2239-2246.
Li X, Zhu M W, Li R C, et al. Preparation of Compound Inonotus obliquus Hypoglycemic Tablets and its hypoglycemic effect on type II diabetes mice [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(11): 2239-2246.

[18] Patel S, Yan Z H, Remedi M S. Intermittent fasting protects β-cell identity and function in a type-2 diabetes model [J]. Metabolism, 2024, 153: 155813.

[19] Colosimo S, Mitra S K, Chaudhury T, et al. Insulin resistance and metabolic flexibility as drivers of liver and cardiac disease in T2DM [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2023, 206: 111016.

[20] Wang C Y, Luo D H, Zheng L, et al. Anti-diabetic mechanism and potential bioactive peptides of casein hydrolysates in STZ/HFD-induced diabetic rats [J]. J Sci Food Agric, 2024, 104(5): 2947-2958.

[21] Li X, Zou J Y, Lin A P, et al. Oxidative stress, endothelial dysfunction, and N-acetylcysteine in type 2 diabetes mellitus [J]. Antioxid Redox Signal, 2024, 40(16/17/18): 968-989.

[22] Niu F L, Liu W X, Ren Y Y, et al. β-cell Neogenesis: A rising star to rescue diabetes mellitus [J]. J Adv Res, 2024, 62: 71-89.

[23] Arroyave-Ospina J C, Wu Z M, Geng Y N, et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease: Implications for prevention and therapy [J]. Antioxidants, 2021, 10(2): 174.

[24] Tan L, Liu Y B, Liu J, et al. Association between insulin resistance and uncontrolled hypertension and arterial stiffness among US adults: A population-based study [J]. Cardiovasc Diabetol, 2023, 22(1): 311.

[25] Hu Y, Zhao Y T, Zhang J, et al. The association between triglyceride glucose-body mass index and all-cause mortality in critically ill patients with atrial fibrillation: A retrospective study from MIMIC-IV database [J]. Cardiovasc Diabetol, 2024, 23(1): 64.

[26] 周俊福, 代鑫燕, 李慧, 等. 迷迭香酸活化 NRF2 负调控 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路改善急性肝损伤 [J]. 药学学报, 2024, 59(6): 1664-1673.
Zhou J F, Dai X Y, Li H, et al. Rosmarinic acid ameliorates acute liver injury by activating NRF2 and inhibiting ROS/TXNIP/NLRP3 signal pathway [J]. Acta Pharm Sin, 2024, 59(6): 1664-1673.

[27] Gumede N A, Khathi A. The role of pro-opiomelanocortin derivatives in the development of type 2 diabetes-associated myocardial infarction: Possible links with prediabetes [J]. Biomedicines, 2024, 12(2): 314.

[28] 赵丹麦, 钟睿, 王晓天, 等. 山茱萸治疗糖尿病肾病作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(3): 1078-1087.
Zhao D K, Zhong R, Wang X T, et al. Research progress on mechanism of *Corni Fructus* in treatment of diabetic nephropathy [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(3): 1078-1087.

[29] Yang Y Y, Qi J J, Jiang S Y, et al. Esculin ameliorates obesity-induced insulin resistance by improving adipose tissue remodeling and activating the IRS1/PI3K/AKT/GLUT4 pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 2): 117251.

[30] Xie X H, Wang F, Ge W X, et al. Scutellarin attenuates oxidative stress and neuroinflammation in cerebral ischemia/reperfusion injury through PI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathways [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 957: 175979.

[责任编辑 兰新新]