

小檗碱通过影响糖原结构调节肝糖代谢研究

马 林¹, 刘小翠^{1,2}, 邓 斌^{1*}

1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 药学部, 湖北 武汉 430022

2. 华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430030

摘 要: **目的** 探讨小檗碱调节糖原代谢的机制及对糖原结构的影响。**方法** 采用自发型糖尿病模型 *db/db* 小鼠作为疾病模型鼠, 考察小檗碱对 *db/db* 小鼠血糖水平的影响; 提取小鼠的肝糖原进行体积排阻色谱 (SEC) 和透射电镜 (TEM) 分析, 考察小檗碱对 *db/db* 小鼠肝糖原的结构影响, 并探讨其影响机制。**结果** 小檗碱可以显著性降低 *db/db* 小鼠的空腹血糖, 降低 *db/db* 小鼠血清胰岛素水平; 改善 *db/db* 小鼠肝糖原的结构不稳定性; 降低 *db/db* 小鼠肝组织中糖原磷酸化酶 (GP)、糖原脱分支酶 (GDBE) 和环磷酸腺苷 (cAMP) 表达水平, 降低血清胰高血糖素水平。**结论** 小檗碱可以调控 cAMP/GP 信号通路, 改善 *db/db* 小鼠的肝糖原结构, 修复受损糖原结构, 这可能是其调节肝糖代谢, 改善糖尿病症状的机制之一。

关键词: 小檗碱; 糖尿病; 糖原结构; 肝糖原; 稳定性; *db/db* 鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)16-4259-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.020

Study on mechanism of berberine on regulating glycogen metabolism by repairing glycogen structure

MA Lin¹, LIU Xiao-cui^{1,2}, DENG Bin¹

1. Department of Pharmacy, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

2. Hubei Key Laboratory of Natural Medicinal Chemistry and Resource Evaluation, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of berberine regulating glycogen metabolism and its effect on glycogen structure. **Methods** The *db/db* mice were used as diabetic mice to investigate the effect of berberine on blood glucose levels in *db/db* mice. The liver glycogen was extracted for SEC and TEM analysis to investigate the effect of berberine on liver glycogen and the mechanism of its effect. **Results** Berberine significantly decreased the fasting blood glucose level and the insulin level in serum of *db/db* mice, and berberine repaired the damaged glycogen structure. Meanwhile, berberine decreased the expression of GP, GDBE, cAMP in liver tissue and the glucagon level in serum of *db/db* mice. **Conclusion** Berberine regulated the cAMP/GP signaling pathway, improved hepatic glycogen structure in *db/db* mice, and repaired damaged glycogen structure, which may be one of the mechanisms for regulating hepatic glucose metabolism and improving symptoms of diabetes.

Key words: berberine; diabetes; glycogen structure; liver glycogen; stability; *db/db* mice

2 型糖尿病 (type 2 diabetic mellitus, T2DM) 是一种以胰岛素抵抗为特征的慢性代谢性疾病, 中医属于“消渴病”的范畴, 截止 2014 年我国已经成为世界上糖尿病患病人数最多的国家^[1], 在糖尿病患病群体中约 90% 以上患者为 2 型糖尿病^[2]。小檗碱 (berberine), 又称黄连素, 是从传统中药材黄连

Coptis chinensis Franch. 中提取的一种季铵类生物碱, 其具有广谱抗菌^[3-5]、抗炎^[6-7]、抗肿瘤^[8]、抗氧化^[9-10]、抗动脉粥样硬化^[11]等药理作用。研究表明小檗碱还具有较好的降血糖疗效^[12-13], 是公认的降糖效果确切的中药活性成分, 但因其多靶点效应的特点, 其降糖机制尚未完全明确。

收稿日期: 2019-11-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81803799); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (2017KFYXJJ252)

作者简介: 马 林, 主管药师, 主要从事医院药学研究。Tel: (027)85726192 E-mail: 1724360@qq.com

*通信作者 邓 斌, 博士, 主管药师。Tel: (027)85726192 E-mail: dengbin@hust.edu.cn

糖原磷酸化酶 (GP) 是肝脏糖原代谢过程中的关键酶, 催化糖原的磷酸解过程, 是缓解糖尿病病症的有效靶点^[14], 但是对于小檗碱是否能够作用于 GP 还未见深入研究。机体肝糖原分子结构分三级: 一级结构为葡萄糖链; 二级结构为葡萄糖链连接形成的复杂结构, 成为 β 粒子; 三级结构是 β 粒子通过 glycogenin 蛋白聚合而成的多聚体, 成为 α 粒子。肝脏中的糖原多以 α 粒子的形式储存, 在特定生理条件下, α 粒子会降解为 β 粒子, 使其与 GP 等代谢酶作用, 从而转化成能为机体提供能量的葡萄糖入血, 但在某些病理条件下, 糖原的三级结构不稳定使其降解速率异常增高, 则可能导致糖代谢紊乱等病理特征^[15-16]。因此, 通过改善糖原结构调节血糖水平也可能是缓解糖尿病病症的有效途径^[17]。本研究基于糖原磷酸化酶和肝糖原结构这两方面, 深入探讨小檗碱调节糖尿病小鼠肝糖代谢的机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 C57 雄性小鼠 (8 周龄), 购自湖北省实验动物研究中心, 许可证号: SCXK (鄂) 2015-0018, C57BL/KS-db (*db/db*) 雄性小鼠 (8 周龄) 24 只, 购自南京大学-南京生物医药研究院, 许可证号 SCXK (苏) 2015-0001。小鼠均饲养在华中科技大学同济医学院实验动物中心 SPF 级屏障系统中, 温度 (22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 (50 ± 10) %, 昼夜交替 (12 h/12 h), 自由饮食和饮水。

1.2 药品与试剂

盐酸小檗碱 (批号 B1073432, 质量分数 98%), 盐酸二甲双胍 (批号 M107827, 质量分数 97%), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris, 批号 T3253)、乙二胺四乙酸 (EDTA, 批号 03620)、蔗糖 (批号 V900116) 购自 Sigma 公司; 氯化钠 (NaCl, 批号 10019308)、氟化钠 (NaF, 批号 10019608)、十水和焦磷酸钠 ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 批号 20041418)、无水乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 批号 10009218)、硝酸钠 (NaNO_3 , 批号 10019918)、叠氮化钠 (NaN_3 , 批号 L1431402) 购自国药集团化学试剂有限公司。天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所有限公司, 胰岛素检测试剂盒、胰高血糖素检测试剂盒、糖原磷酸化酶 (GP)、糖原脱分支酶 (GDBE)、环磷酸腺苷 (cAMP) 检测试剂盒购于上海江莱科技有限公司。

1.3 仪器

XHF-D 高速分散仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Avanti J-E 高速冷冻落地离心机, 美国贝克曼库尔特有限公司; L-80xp 超高速冷冻落地离心机, 美国贝克曼库尔特有限公司; DW-HL100 超低温冰箱, 中科美菱低温科技有限公司; Mili-Q 纯水仪, 德国默克密理博; VirTis 冷冻干燥机, 美国 SP-scientific; FA1004N 分析天平, 上海精密科学仪器有限公司; Agilent 1260 infinity SEC 系统, 美国 Agilent 有限公司; Optilab T-rEX 示差检测器, 美国 Wyatt 有限公司; MALLS 十八角度激光检测器, 美国 Wyatt 有限公司; Synergy 酶标仪, 美国 BioTek 有限公司; H-7000 透射电镜, 日本日立公司。

2 方法

2.1 实验动物分组与给药

健康雄性 C57 小鼠 6 只, 作为健康对照组, C57BL/BKS 自发型糖尿病模型小鼠 (*db/db* 鼠) 18 只, 随机分为 3 组, 每组 6 只, 分别作为模型组、二甲双胍治疗组 (300 mg/kg)^[18]和小檗碱治疗组 (300 mg/kg)^[19]。采取 ig 给药法, 每日给药, 连续给药 8 周, 健康对照组和模型组 ig 相同体积的蒸馏水。每周定期监测体质量和空腹血糖。

2.2 肝糖原的提取分离纯化

配制糖原提取缓冲液 (50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaF, 5 mmol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 2 mmol/L EDTA, pH 8.0), 将 1 g 肝脏组织加入 25 mL 糖原提取缓冲液中, 于高速分散仪上匀浆 1 min, 将匀浆液于高速冷冻落地离心机 4 $^{\circ}\text{C}$, 6 000 $\times g$ 离心 10 min, 上清液于超高速冷冻落地离心机 4 $^{\circ}\text{C}$, 367 000 $\times g$ 离心 1.5 h。弃去上清液, 向沉淀中加入 5 mL 糖原提取缓冲液, 吹打使其充分溶解, 将此溶液铺于 37.5%~75%蔗糖梯度离心液上方, 并于超高速冷冻落地离心机 4 $^{\circ}\text{C}$, 367 000 $\times g$ 离心 2 h。离心得到的透明沉淀溶于 300 μL 双蒸水中, 加入 1.2 mL 无水乙醇, 充分振摇后于离心机上 4 000 $\times g$ 离心 10 min, 弃去上清, 待乙醇挥发完全后, 加入 500 μL 双蒸水使沉淀完全溶解。得到的溶液于冷冻干燥机上过夜, 得到纯化肝糖原。

2.3 采用体积排阻色谱 (SEC) 和透射电镜 (TEM) 分析肝糖原结构

配制流动相 (50 mmol/L NaNO_3 , 0.02% NaN_3), 称取 0.5 mg 纯化肝糖原溶解于适量流动相中, 配制 1 mg/mL 的糖原溶液为未被 DMSO 处理的糖原

样品。同时,称取 0.5 mg 纯化肝糖原溶解于适量 DMSO 中,于恒温振荡器上 80 ℃ 振摇 2 h,后加 4 倍体积无水乙醇沉淀糖原,待乙醇挥发完全后加 500 μL 双蒸水使沉淀完全溶解,于冷冻干燥机上过夜冻干。得到的糖原加入适量流动相,配制成 1 mg/mL 的糖原溶液为 DMSO 处理后的糖原样品。安捷伦 1260 infinity 色谱系统,色谱柱由保护柱 (Suprema, pre-column)、分析柱 Suprema 10-1000 和 Suprema10-10000 串联而成。检测器由多角度激光散射检测器和示差检测器串联。流动相为 50 mmol/L 硝酸钠和 0.02% NaN₃ 水溶液,体积流量为 3 mL/min,柱温箱为 80 ℃,进样量为 100 μL。以普鲁兰糖为标准品。称取约 1 mg 糖原溶于 Tris-HCl (50 mmol/L pH 7) 缓冲液中,使其终质量浓度为 1 mg/mL。充分溶解后,将质量浓度稀释至 0.1 mg/mL,用滴管吸取稀释后的糖原溶液,滴在 400 目的铜网上,用滤纸将铜网的溶液吸干,滴加 2-3 滴 1%醋酸铀溶液负染,之后用滤纸将铜网上的溶液吸干,样品密封保存备用。将制备好的样品置于 H-7000 型透射电镜下观察,电压 75 kV,拍摄所得照片用 AnalySiS 图片处理器处理。

2.4 指标检测

2.4.1 酶联免疫吸附法检测血清中的胰岛素和胰高血糖素水平 末次给药后,小鼠眼眶取血,室温静置 15 min,3 000×g 离心 15 min 分离血清,分装后冻存于-80 ℃冰箱,采用酶联免疫吸附法检测血清胰岛素和胰高血糖素的水平。

2.4.2 小鼠血清中 AST、ALT 水平检测 取冻存的小鼠血清,按照试剂盒说明书检测血清中 AST、ALT 水平。

2.4.3 小鼠肝脏组织 HE 染色 小鼠肝脏组织依次经 4%多聚甲醛固定、梯度浓度酒精脱水、石蜡包埋后,切片制成 4~5 μm 的切片,经 HE 染色后于显微镜下观察小鼠的肝脏组织形态。

2.4.4 酶联免疫吸附法检测肝脏组织中的 GP、GDBE、cAMP 含量 小鼠颈椎脱臼处死,解剖取出肝脏,分装后冻存于-80 ℃冰箱。将肝脏组织加入适量 PBS 制成组织匀浆,采用酶联免疫吸附法检测组织匀浆中的 GP、GDBE 和 cAMP 含量。

3 结果

3.1 小檗碱对糖尿病小鼠体质量、血糖水平和血清胰岛素水平的影响

实验结果(表 1)显示,末次给药后,糖尿病

表 1 小檗碱对糖尿病小鼠体质量、血糖和血清胰岛素水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of berberine on body weight, fasting blood glucose, and insulin level in serum of db/db mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	体质量/ g	空腹血糖/ (mmol·L ⁻¹)	胰岛素/ (mU·L ⁻¹)
健康对照	25.20±3.55	7.3±1.2	3.03±0.11
模型	40.40±9.77 ^{##}	31.4±1.5 ^{###}	3.50±0.11 ^{##}
二甲双胍	52.00±9.59	16.9±6.3 ^{***}	2.98±0.08 ^{**}
小檗碱	42.30±8.71	16.3±6.5 ^{***}	2.83±0.18 ^{**}

与健康对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较:

^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs normal control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

模型组 db/db 小鼠肝脏组织的胰岛素水平明显高于健康对照组 ($P < 0.01$),二甲双胍给药组和小檗碱给药组小鼠肝脏组织的胰岛素水平较模型组均显著降低 ($P < 0.01$),表明此糖尿病模型为胰岛素抵抗的 2 型糖尿病模型,而小檗碱与二甲双胍均可改善 db/db 小鼠的胰岛素抵抗。

同时,糖尿病模型组 db/db 小鼠的体质量明显高于健康对照组 ($P < 0.01$),空腹血糖水平也显著高于健康对照组 ($P < 0.001$);二甲双胍给药组小鼠体质量较模型组略微上升,但差异无显著性,其空腹血糖水平较模型组显著降低 ($P < 0.001$);小檗碱给药组小鼠体质量与模型组无显著性差异,空腹血糖水平较模型组显著降低 ($P < 0.001$)。表明小檗碱同二甲双胍一样可以显著降低 db/db 小鼠的空腹血糖水平,同时可能避免二甲双胍可能造成的小鼠体质量增加。

3.2 小檗碱对糖尿病小鼠肝脏功能的影响

实验结果(表 2)显示,末次给药后,糖尿病模型组 db/db 小鼠血清中 AST 和 ALT 水平均明显高于健康对照组,提示 db/db 小鼠肝脏功能受到了一定程度的损伤。二甲双胍给药组和小檗碱给药组小鼠血清中 AST 和 ALT 水平较模型组均显著降低。

同时,观察肝脏组织(图 1),可见健康对照组小鼠肝脏组织红润有光泽,表面光滑,而模型组小鼠肝脏组织泛白,表面有明显颗粒感,给予二甲双胍和小檗碱治疗 8 周后,给药组小鼠的肝脏组织都有明显的好转。此外,肝脏 HE 染色切片(图 1)显示,健康对照组小鼠肝脏细胞形态完整,结构致密,肝索清晰可见;模型组小鼠肝脏细胞损伤严重,存在明显的脂肪空洞;给药组小鼠肝脏较模型对照

表 2 小檗碱对糖尿病小鼠血清 AST、ALT 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effect of berberine on AST and ALT level in serum of *db/db* mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	AST/(mU·mg ⁻¹)	ALT/(mU·mg ⁻¹)
健康对照	98.16 ± 10.89	34.47 ± 1.13
模型	166.49 ± 23.86 [#]	85.84 ± 2.43 ^{###}
二甲双胍	89.57 ± 20.49 [*]	60.99 ± 3.33 ^{***}
小檗碱	76.12 ± 13.35 ^{**}	64.38 ± 4.42 ^{**}

与健康对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较:

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

[#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.001$ vs normal control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

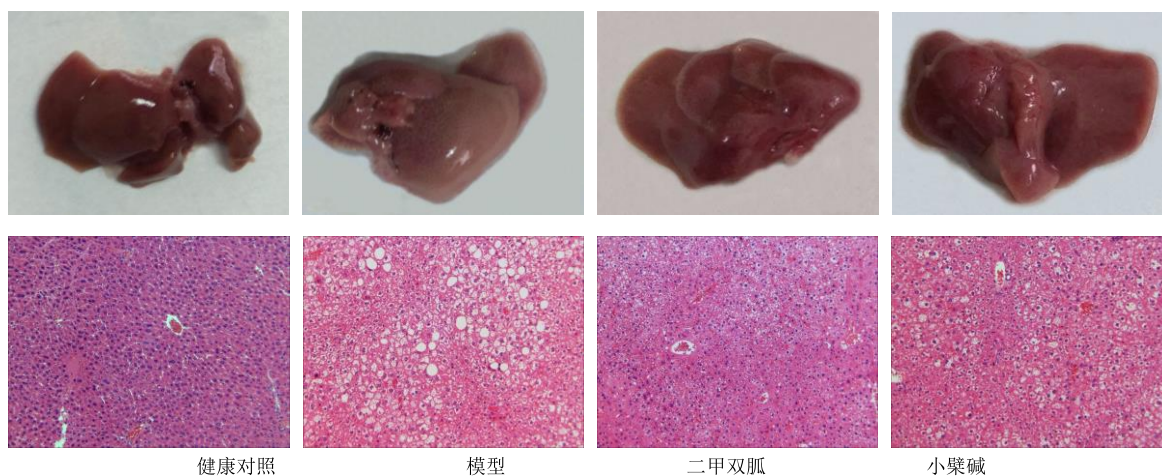


图 1 各组小鼠肝脏组织图片和 HE 染色结果 (×200)

Fig. 1 HE stain image of liver tissue of mice in each group (×200)

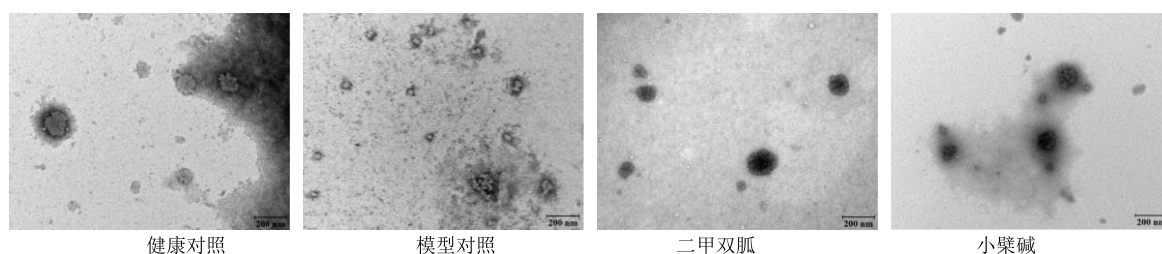


图 2 各组小鼠 DMSO 处理后的肝糖原的 TEM 表征

Fig. 2 TEM image of liver glycogen DMSO-treated mice in each group

子 ($R_h \approx 40$ nm) 形式存在。DMSO 处理之后, 健康对照组小鼠肝糖原仍以 α 粒子形式存在, 其半峰宽和峰面积较 DMSO 处理前无统计学差异, 表现为良好的 DMSO 稳定性; 模型组 *db/db* 小鼠肝糖原除 α 粒子外, 出现 β 粒子 ($R_h \approx 20$ nm), 其半峰宽和峰面积较 DMSO 处理前显著性升高 ($P < 0.001$), 表现为对 DMSO 的不稳定性; 二甲双胍和小檗碱给药组小鼠肝糖原仍以 α 粒子形式存在, 其半峰宽和峰面积较 DMSO 处理前无统计学差异, 表现为良好

组小鼠肝脏细胞形态改善明显, 脂肪空洞也显著减少。表明小檗碱与二甲双胍均可改善 *db/db* 小鼠异常的肝脏形态, 且改善肝脏功能。

3.3 小檗碱对糖尿病小鼠肝糖原结构的影响

结果 (图 2) 显示, 健康对照组小鼠肝糖原主要以粒径较大的 α 粒子形式存在, 糖尿病 *db/db* 小鼠肝糖原主要以粒径较小的 β 粒子形式存在。给予一定剂量二甲双胍和小檗碱治疗 8 周后, 二甲双胍和小檗碱治疗组小鼠肝糖原中 α 粒子较多, β 粒子较少。

体积排阻色谱 (SEC) 分析结果 (图 3 和表 3) 显示, DMSO 处理之前, 各组小鼠肝糖原均以 α 粒

的 DMSO 稳定性。表明糖尿病 *db/db* 小鼠肝糖原相较于健康对照组更脆弱, 对 DMSO 不稳定, 结果稳定性差; 而小檗碱和二甲双胍均可改善 *db/db* 小鼠肝糖原的不稳定性。

3.4 小檗碱对糖尿病小鼠肝脏组织 GP 和 GDBE 水平的影响

ELISA 法检测结果 (表 4) 显示, 糖尿病模型组小鼠肝脏组织中 GP 的含量和 GDBE 的活性较健康对照组显著性升高 ($P < 0.001$); 二甲双胍给药组

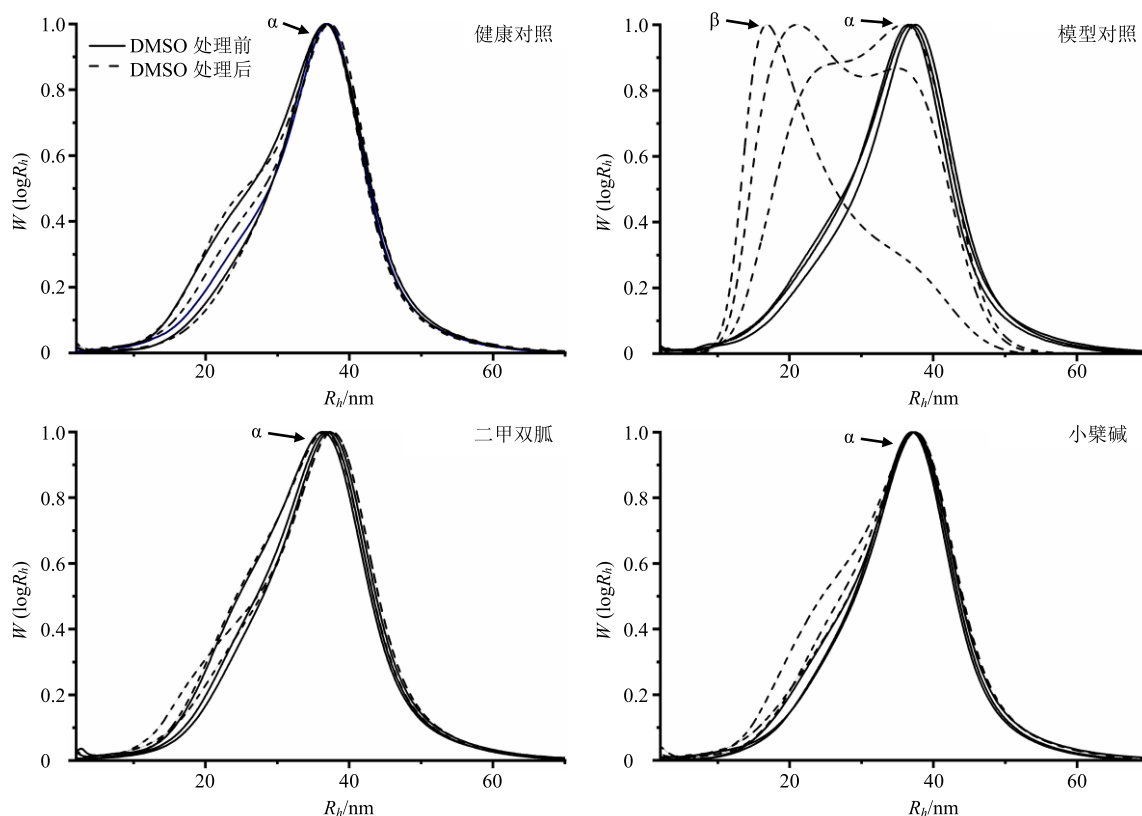


图 3 各组小鼠糖原结构的 SEC 表征 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 SEC analysis of liver glycogen of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 3 小檗碱对糖尿病小鼠肝糖原 DMSO 处理前后 SEC 半峰宽和峰面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of berberine on FWHM and peak area of SEC peak of glycogen from *db/db* mice before or after DMSO treatment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	DMSO 处理前		DMSO 处理后	
	半峰宽	峰面积	半峰宽	峰面积
健康对照	14.06 ± 0.35	17.78 ± 1.50	14.12 ± 0.42	17.71 ± 1.52
模型	14.49 ± 0.27	18.07 ± 0.80	27.94 ± 1.32***	26.73 ± 2.49***
二甲双胍	15.67 ± 0.32	18.51 ± 0.32	15.63 ± 0.37	19.22 ± 0.99
小檗碱	14.61 ± 0.48	16.87 ± 0.25	14.83 ± 0.91	18.07 ± 0.79

与 DMSO 处理之前比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs FWHM or peak area before DMSO treated

小鼠肝脏组织中 GP 的含量 ($P < 0.001$) 和 GDBE ($P < 0.01$) 的活性较模型组小鼠均显著性降低; 小檗碱给药组小鼠肝脏组织中 GP 的含量 ($P < 0.001$) 和 GDBE ($P < 0.05$) 的活性较模型组小鼠均显著性降低。表明小檗碱和二甲双胍均可降低 *db/db* 小鼠肝脏组织的 GP 含量和 GDBE 活性。

3.5 小檗碱对糖尿病小鼠血清胰高血糖素水平和肝脏组织 cAMP 水平的影响

ELISA 法检测结果 (表 5) 显示, 糖尿病模型组 *db/db* 小鼠血清胰高血糖素和肝脏组织中 cAMP 水平较健康对照组显著升高 ($P < 0.001$); 二甲双胍

给药组小鼠血清胰高血糖素和肝脏组织中 cAMP 水平较模型组小鼠均显著降低 ($P < 0.01$); 小檗碱给药组小鼠血清胰高血糖素和肝脏组织中 cAMP 水平较模型组小鼠均显著降低 ($P < 0.05$)。表明小檗碱和二甲双胍均可降低 *db/db* 小鼠血清胰高血糖素和肝脏组织的 cAMP 水平。

4 讨论

本研究选用糖尿病 *db/db* 模型鼠作为疾病模型, *db/db* 鼠是一种瘦素受体基因缺陷而导致的自发性 2 型糖尿病小鼠^[20], 表现为高血糖、胰岛素抵抗、糖代谢紊乱等特征, 其在 8 周龄开始一直维持

表 4 小檗碱对糖尿病小鼠肝脏组织 GP 和 GDBE 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of berberine on GP and GDBE in liver tissue of *db/db* mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	GP/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	GDBE/($\text{mU} \cdot \text{g}^{-1}$)
健康对照	205.76 $\pm$ 8.26	3.167 $\pm$ 0.704
模型	320.64 $\pm$ 5.53 ^{###}	6.891 $\pm$ 1.461 ^{###}
二甲双胍	264.05 $\pm$ 2.92 ^{***}	4.172 $\pm$ 0.151 ^{**}
小檗碱	286.81 $\pm$ 10.33 ^{***}	5.194 $\pm$ 0.357 [*]

与健康对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

^{###} $P < 0.001$ vs normal control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model control group

表 5 小檗碱对糖尿病小鼠血清胰高血糖素水平和肝脏组织 cAMP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of berberine on serum glucagon level and liver cAMP level of *db/db* mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	胰高血糖素/($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	cAMP/($\text{pmol} \cdot \text{g}^{-1}$)
健康对照	46.59 $\pm$ 9.16	92.45 $\pm$ 14.54
模型	75.70 $\pm$ 6.21 ^{###}	124.22 $\pm$ 14.37 ^{###}
二甲双胍	58.14 $\pm$ 7.43 ^{**}	100.55 $\pm$ 2.72 ^{**}
小檗碱	51.96 $\pm$ 21.84 [*]	106.60 $\pm$ 6.83 [*]

与健康对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较:

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs normal control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

稳定的高血糖水平, 与人类的 2 型糖尿病的临床症状非常相似, 是国际上公认可靠的 2 型糖尿病动物模型。

糖原是一种由单一葡萄糖连接而成的多糖, 因其结构与支链淀粉类似, 又被称为动物淀粉, 是机体能量的有效贮藏形式。糖代谢紊乱是 2 型糖尿病最主要的特征, 目前, 也有很多调节糖代谢的药物研究报道, 但是现有文献大多集中于药物对糖原“数量”的调控^[21], 对糖原“质量”的关注较少。研究表明糖原分子结构的改变与癫痫、拉福拉病和糖原贮积症等^[22]疾病的病理病因有着密切联系, 前期研究发现 2 型糖尿病 *db/db* 模型鼠肝糖原分子结构受损^[23], 此前研究报道小檗碱可以改善糖尿病 *db/db* 模型鼠的肝糖原受损结构^[24], 表明肝糖原的分子结构受损可能是导致糖代谢紊乱的重要原因之一。

本研究首先考察了小檗碱对糖尿病 *db/db* 小鼠肝糖原结构的影响, TEM 和 SEC 的结果均表明糖尿病 *db/db* 小鼠肝糖原的 α 粒子较健康小鼠更脆弱,

更容易降解为 β 粒子, 即在机体内也较容易降解为 β 粒子进一步更容易降解为葡萄糖入血, 可能是导致其血糖居高不下的原因之一。而给予小檗碱治疗 8 周后, *db/db* 小鼠肝糖原表现为类似健康小鼠肝糖原的稳定性, 在 DMSO 处理后仍大多以 α 粒子形式存在, 表现为较好的稳定性, 这也进一步表明了小檗碱对 *db/db* 小鼠受损肝糖原的修复作用, 使其在机体内更不易降解为 β 粒子, 从而改善机体紊乱的糖代谢, 降低其血糖水平。

同时, 糖原降解为葡萄糖的过程还需要关键酶 GP 和 GDBE 的参与, GP 可以断开糖原直链连接的 α -1,4-糖苷键, 而 GDBE 则可以断开糖原支链连接的 α -1,6-糖苷键。因此, GP 和 GDBE 在肝脏组织的表达水平或活性与糖原的酶解速率有着非常密切的联系。糖尿病 *db/db* 小鼠肝脏组织中的 GP 含量远高于健康小鼠, 这意味着 *db/db* 小鼠肝脏组织中的肝糖原更易与 GP 结合, 从而被降解为葡萄糖, 导致肝糖代谢紊乱。而小檗碱可以显著降低 ($P < 0.001$) *db/db* 小鼠肝脏组织中 GP 的含量, 同时还可以显著降低 ($P < 0.05$) 糖尿病小鼠肝脏组织中糖原脱分支酶 (GDBE) 的活性, 降低这 2 种关键酶的水平可以有效降低糖尿病小鼠肝糖原的降解速率, 改善 *db/db* 小鼠的糖代谢。

另外, 研究结果发现小檗碱可以降低 *db/db* 小鼠血清和肝脏组织中异常增高的胰高血糖素和 cAMP 水平。胰高血糖素可以作用于肝脏细胞膜表面的 G 蛋白偶联受体, 通过级联反应激活细胞内的腺苷酸环化酶 (AC), AC 则可以促进 ATP 转化为 cAMP, 形成的 cAMP 结合并激活 PKA, 继而激活磷酸化酶激酶, 促进 GP 转化为活性形式, 从而产生降解糖原的效应。胰高血糖素和 cAMP 是调节肝脏组织 GP 活性水平的关键蛋白, 过高的胰高血糖素和 cAMP 会引起 GP 的过度活化, 导致糖原的过度磷酸解。因而, 小檗碱可能是通过下调 *db/db* 小鼠肝脏中的 cAMP/GP 信号通路, 缓解其肝糖原的异常代谢的。

综上, 本研究结果表明, 小檗碱可能通过修复糖尿病受损的糖原结构, 同时通过 cAMP/GP 通路降低糖尿病小鼠肝脏组织中糖原的降解速率, 从而达到降低糖尿病小鼠血糖水平, 改善糖代谢紊乱的症状。本研究也表明糖原结构可能是糖尿病治疗过程中的潜在靶点, 为基于该靶点的药物开发提供了有效的参考依据。

参考文献

- [1] Wu Z, Jin T, Weng J. A thorough analysis of diabetes research in China from 1995 to 2015: Current scenario and future scope [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(1): 46-62.
- [2] Kerner W, Brückel J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus [J]. *Exp Clin Endocr Diab*, 2014, 122(7): 384-386.
- [3] Wu X, Li X, Dang Z, et al. Berberine demonstrates anti-inflammatory properties in helicobacter pylori-infected mice with chronic gastritis by attenuating the Th17 response triggered by the B cell-activating factor [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(7): 5373-5381.
- [4] Li L, Wang X, Sharvan R, et al. Berberine could inhibit thyroid carcinoma cells by inducing mitochondrial apoptosis, G₀/G₁ cell cycle arrest and suppressing migration via PI3K-AKT and MAPK signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 1225-1231.
- [5] 孟治平, 路曼琪, 苏文强, 等. 盐酸小檗碱粉雾剂的制备及其对金黄色葡萄球菌肺炎的作用研究 [J]. *中草药*, 2020, 50(2): 348-355.
- [6] Huang S, Qiu G, Cheng F, et al. Berberine protects secondary injury in mice with traumatic brain injury through anti-oxidative and anti-inflammatory modulation [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43: 1814-1825.
- [7] Oshima N, Shimizu T, Narukawa Y, et al. Quantitative analysis of the anti-inflammatory activity of orengedokuto II: Berberine is responsible for the inhibition of NO production [J]. *J Nat Med-Tokyo* 2018, 72: 706-714.
- [8] Wang K, Zhang C, Bao J L, et al. Synergistic chemopreventive effects of curcumin and berberine on human breast cancer cells through induction of apoptosis and autophagic cell death [J]. *Sci Rep*, 2016, <https://doi.org/10.1038/srep26064>.
- [9] Sahebkar A, Watts G F. Mode of action of berberine on lipid metabolism: A new-old phytochemical with clinical applications? [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2017, 28(3): 282.
- [10] 孙水平. 黄连素对 2 型糖尿病患者血清 IL-10、IL-6 及 CRP 水平的影响 [J]. *长春中医药大学学报*, 2017, 33(3): 431-433.
- [11] Wan Q, Liu Z, Yang Y, et al. Suppressive effects of berberine on atherosclerosis via downregulating visfatin expression and attenuating visfatin-induced endothelial dysfunction [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4): 1939-1948.
- [12] 李东伟, 邵梦寒, 葛传慧, 等. 小檗碱调节糖脂代谢及其抗糖尿病活性的研究 [J]. *生命科学*, 2019, 31(2): 201-208.
- [13] 庄微, 刘挺松, 张成成, 等. 小檗碱对波动性高糖诱导的人冠状动脉内皮细胞凋亡的影响 [J]. *中草药*, 2019, 50(6): 1365-1371.
- [14] Stravodimos G A, Chetter B A, Kyriakis E, et al. Phytogetic polyphenols as glycogen phosphorylase inhibitors: The potential of triterpenes and flavonoids for glycaemic control in type 2 diabetes [J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24(4): 384-403.
- [15] Kishnani P S, Chen Y T. Important role of abnormal glycogen structure in the development of liver cirrhosis and progression to hepatocellular carcinoma in patients with glycogen storage disease type-III [J]. *J Hepatol*, 2007, 47(2): 300-301.
- [16] Hu Z, Li E, Sullivan M A, et al. Glycogen structure in type 1 diabetic mice: Towards understanding the origin of diabetic glycogen molecular fragility [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 128: 665-672.
- [17] Deng B, Sullivan M A, Li J, et al. Molecular structure of glycogen in diabetic liver [J]. *Glycoconjugate J*, 2015, 32(3/4): 113-118.
- [18] Neschen S, Scheerer M, Seelig A, et al. Metformin supports the antidiabetic effect of a sodium glucose cotransporter 2 inhibitor by suppressing endogenous glucose production in diabetic mice [J]. *Diabetes*, 2015, 64(1): 284-290.
- [19] Xie X, Li W, Lan T, et al. Berberine ameliorates hyperglycemia in alloxan-induced diabetic C57BL/6 mice through activation of Akt signaling pathway [J]. *Endocr J*, 2011, 58(9): 761-768.
- [20] 吕晶晶, 王彩霞, 魏娜, 等. 自发性 2 型糖尿病小鼠 db/db 的生物学特性 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2013, 30(6): 455-459.
- [21] Wang K, Wang H, Liu Y, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharide attenuates type 2 diabetes mellitus via the regulation of PI3K/Akt-mediated glycogen synthesis and glucose metabolism [J]. *J Funct Foods*, 2018, 40: 261-271.
- [22] Roach P J. Glycogen phosphorylation and Lafora disease [J]. *Mol Aspects Med*, 2015, 46: 78-84.
- [23] Hu Z X, Deng B, Tan X L, et al. Diurnal changes of glycogen molecular structure in healthy and diabetic mice [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 185: 145-152.
- [24] Li C, Gan H, Tan X L, et al. Effects of active ingredients from traditional Chinese medicines on glycogen molecular structure in diabetic mice [J]. *Eur Polym J*, 2018, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.12.039.