

基于 InsR/PI3K/Akt 通路研究岩黄连总碱纠正高脂喂养小鼠糖代谢紊乱的作用机制

刘宏民, 吴洁洁, 陈欢, 韩雪婷, 邱志霞, 黄芳*

中国药科大学中药学院 中药药理与中医药学系, 江苏 南京 210009

摘要:目的 研究岩黄连 *Corydalis saxicola* 总碱对胰岛素抵抗小鼠的影响及作用机制。方法 高脂饮食喂养诱导胰岛素抵抗小鼠, 造模成功后给予岩黄连总碱 4 周, 观察岩黄连总碱对胰岛素抵抗小鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、血清胰岛素、口服糖耐量 (oral glucose tolerance test, OGTT)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triacylglycerol, TG)、糖化血清蛋白 (glycosylated serum protein, GSP)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、瘦素、脂联素 (adiponectin/ADPN, ADP/Acrp30) 及肝糖原水平的影响; 利用 Western blotting 检测肝组织中磷酸烯醇式丙酮酸激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)、叉头框蛋白 O1 (Forkhead box protein O1, FoxO1)、p-FoxO1、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、p-GSK-3 β 、胰岛素受体 (insulin receptor, InsR)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、p-Akt 蛋白表达情况。**结果** 岩黄连总碱可以显著降低胰岛素抵抗指数 ($P < 0.01$), 改善糖耐量 ($P < 0.01$), 降低血清中 TCH、TG、GSP、LDL-C、瘦素水平 ($P < 0.01$), 升高 HDL-C、ADP/Acrp30 水平 ($P < 0.05$), 促进肝糖原合成 ($P < 0.01$), 激活 InsR/PI3K/Akt 通路 ($P < 0.05$)。**结论** 岩黄连总碱可以改善高脂诱导的小鼠胰岛素抵抗, 其作用机制可能与激活 InsR/PI3K/Akt 通路有关。

关键词: 岩黄连总碱; 2型糖尿病; 胰岛素抵抗; 糖代谢; 胰岛素受体/磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)12-3687-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.12.014

Mechanism of *Corydalis saxicola* total alkaloids on correcting glucose metabolism disorder in high-fat fed mice based on InsR/PI3K/Akt signaling pathway

LIU Hong-min, WU Jie-jie, CHEN Huan, HAN Xue-ting, QIU Zhi-xia, HUANG Fang

Department of Traditional Chinese Medicine Pharmacology and Traditional Chinese Medicine, College of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of *Corydalis saxicola* total alkaloids on insulin resistance (IR) mice. **Methods** Mice were fed with high-fat diet to establish IR model. After IR model on mice was successfully established, *C. saxicola* total alkaloids was given for four weeks. Effect of *C. saxicola* total alkaloids on fasting blood glucose (FBG), blood insulin (Ins), oral glucose tolerance (OGTT), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), glycosylated serum protein (GSP), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), leptin, adiponectin (ADP/Acrp30) and liver glycogen levels were detected. Western blotting was used to detect expressions of phosphoenolpyruvate kinase (PEPCK), Forkhead box protein O1 (FoxO1), p-FoxO1, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), p-GSK-3 β , insulin receptor (InsR), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), p-PI3K, protein kinase B (Akt) and p-Akt in liver tissue. **Results** *C. saxicola* total alkaloids reduced insulin resistance index ($P < 0.01$), improved oral glucose tolerance ($P < 0.01$), decreased levels of TC, TG, GSP, LDL-C and leptin in serum ($P < 0.01$), increased HDL-C and ADP/Acrp30 levels ($P < 0.05$), promoted liver glycogen synthesis ($P < 0.01$) and activated InsR/PI3K/Akt pathway ($P < 0.05$). **Conclusion** *C. saxicola* total alkaloids can significantly improve insulin resistance induced by high fat fed in mice, and its mechanism may be related to the activation of InsR/PI3K/Akt pathway.

收稿日期: 2022-04-01

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项 (2017ZX09301026)

作者简介: 刘宏民 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: lhm_cpu@163.com

*通信作者: 黄芳 (1971—), 女, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: chengtianle007@163.com

Key words: *Corydalis saxicola* total alkaloids; type 2 diabetes mellitus; insulin resistance; glucose metabolism; InsR/PI3K/Akt signaling pathway

2型糖尿病是一种慢性代谢紊乱综合征,是全球第4大死亡病因,其特征是脂质和糖代谢的稳态失衡,从而导致胰岛素抵抗和高血糖的发生^[1]。胰岛素抵抗指肝脏、肌肉和脂肪组织等周围靶组织细胞对胰岛素的敏感性降低、胰岛素促进的葡萄糖摄取和利用效率下降,从而产生高血糖症、高胰岛素血症以及血脂紊乱等一系列临床表现^[2]。已有大量研究表明,胰岛素抵抗是2型糖尿病发病机制之一,贯穿于整个糖尿病的发生发展进程中^[3]。

岩黄连为罂粟科多年生草本植物石生黄堇 *Corydalis saxicola* Bunting 的干燥全草,主要产于广西、云南、贵州等地区,是一味珍贵的民间中药^[4]。其性凉、味苦,归胃、大肠经。《贵州民间药物》记载其有清热解毒、止痛止血的功效^[5]。岩黄连总碱是岩黄连的主要活性部位。现代研究表明岩黄连总碱具有保肝、抗癌、抗氧化、抗炎等药理作用^[6],临床上用于治疗急慢性肝炎、病毒性肝炎、肝癌、高胆红素血症等肝病^[7]。目前不断有实验证明,岩黄连总碱对脂质代谢相关脂肪性肝病具有明显的改善作用^[8],但通过调控糖代谢纠正或者逆转上述代谢性疾病发生发展进程^[9]却鲜有报道,因此本研究主要从糖代谢途径出发,以高脂饮食诱导的胰岛素抵抗小鼠为模型^[10],探究岩黄连总碱对胰岛素抵抗的改善作用及作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性C57BL/6小鼠60只,6~8周龄,体质量18~22g,购自常州卡文斯实验动物有限公司,许可证号SCXK(苏)2016-0010。动物饲养于中国药科大学药学动物实验中心,温度18~22℃,湿度55%~65%,自由活动、饮水、饮食,适应性喂养1周后,进行高脂饮食造模。所有动物实验均严格按照实验动物管理法规的规定和总则建议进行(伦理审批号2020-12-001)。

1.2 药品与试剂

岩黄连总碱(含脱氢卡维丁19.79%、盐酸巴马汀5.33%、盐酸小檗碱0.95%,批号160801),由南京中山制药有限公司提供;盐酸二甲双胍片(批号2008108)购自北京京丰制药集团有限公司;60%高脂肥胖模型饲料(批号TP23400)、低脂对照饲料(批

号TP23402)购自南通特洛菲饲料科技有限公司;总胆固醇(total cholesterol, TC)测试盒(批号F002-1-1)、三酰甘油(triglycerides, TG)测定试剂盒(批号A110-1-1)、糖化血清蛋白(glycosylated serum protein, GSP)试剂盒(批号A037-2-1)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)测定试剂盒(批号A113-1-1)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)测定试剂盒(批号A112-1-1)均购自南京建成生物科技有限公司;糖原含量检测试剂盒(批号BC0345)购自北京索莱宝科技有限公司;小鼠胰岛素酶联免疫吸附测定试剂盒(批号E-EL-M1382c)、小鼠瘦素酶联免疫吸附测定试剂盒(批号E-EL-M3008)、小鼠脂联素(adiponectin/ADPN, ADP/Acrp30)酶联免疫吸附测定试剂盒(批号E-EL-M0002c)均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;β-actin抗体(批号AF701)、磷酸烯醇式丙酮酸激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)抗体(批号DF6770)、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)抗体(批号AF6241)、p-PI3K抗体(批号AF3241)、蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)抗体(批号AF6261)、p-Akt抗体(批号AF0016)、叉头框蛋白O1(Forkhead box protein O1, FoxO1)抗体(批号AF6416)、p-FoxO1抗体(批号AF3417)、糖原合成酶激酶3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)抗体(批号AF5016)、p-GSK-3β抗体(批号AF2016)均购自Affinity公司;山羊抗兔二抗(批号ZJ2020-R)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号P0010S)均购自上海碧云天生物技术有限公司;ECL化学发光超敏显色试剂盒(批号36208ES76)购自上海翊圣生物科技有限公司。

1.3 仪器

5415R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);PB303-N型电子天平(德国Mettler Toledo公司);MULTSKAN Sky全波长酶标仪、可调式移液器(美国Thermo Fisher Scientific公司);血糖仪及血糖试纸(江苏鱼跃医疗设备有限公司);电泳仪、转膜仪(美国Bio-Rad公司);显影仪(上海天能科技有限公司);Direct-Q3实验室纯水/超纯水一体化系统(美国Millipore公司)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将 60 只 C57BL/6 小鼠, 按体质量随机分成 6 组, 每组 10 只, 依次为对照组、模型组及岩黄连总碱低、中、高剂量 (25、50、100 mg/kg) 组和盐酸二甲双胍 (200 mg/kg) 组^[11]。对照组给予低脂饲料, 其余各组给予高脂饲料, 6 周后各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg)^[12], 连续给药 4 周。

2.2 体质量的测定

给药期间每隔 1 d 测定并记录小鼠体质量。

2.3 空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 水平与口服葡萄糖耐量 (oral glucose tolerance test, OGTT) 的检测

末次给药后, 小鼠禁食 12 h, 自由饮水, 次日清晨测定 FBG; 各组小鼠 ig 葡萄糖溶液 (2 g/kg)^[13], 测定 ig 后 15、30、60、90、120 min 小鼠血糖水平, 计算曲线下面积 (area under curve, AUC)。

2.4 血清生化指标的检测

小鼠眼眶取血, 室温静置 2 h, 3000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 于 -80 °C 保存备用, 按照试剂盒说明书分别检测血清中 TC、TG、GSP、LDL-C、HDL-C、胰岛素、瘦素、ADP/Acrp30 的含量。

2.5 肝糖原含量的测定

取适量肝脏, 按照试剂盒说明书检测肝脏组织中糖原含量。

2.6 Western blotting 法测定肝脏中相关蛋白表达

称取适量肝组织, 剪碎并按照 1:10 的比例加入 RIPA 强裂解液, 裂解液中提前加入 1/100 的蛋白酶抑制剂与磷酸酶抑制剂, 电动匀浆后静置 20 min, 待充分裂解后于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。BCA 法测定蛋白浓度, 随后加入 1/4 体积的 5×loading buffer, 沸水浴 15 min 使蛋白变性, 进行 10% SDS-PAGE 垂直电泳, 转至

PVDF 膜, 加入 5% 牛血清白蛋白, 室温封闭 2 h, 分别加入一抗, 4 °C 孵育过夜; 次日 TBST 漂洗, 加入二抗孵育, ECL 显影, 采用 Image J 软件分析目的蛋白条带灰度值^[14]。

2.7 统计学处理

所有数据用 GraphPad Prism 7 和 IBM SPSS statistics 22 软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用单因素方差分析 One-way ANOVA 及 LSD-*t* 检验比较。

3 结果

3.1 岩黄连总碱对胰岛素抵抗小鼠体质量的影响

如表 1 所示, 经过 10 周的喂养, 各组小鼠体质量均有增加。与对照组相比, 模型组小鼠体质量明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 岩黄连总碱组和二甲双胍组小鼠体质量无显著变化, 表明岩黄连总碱对高脂喂养小鼠体质量没有影响, 只是改善了小鼠糖代谢紊乱。

3.2 岩黄连总碱对胰岛素抵抗小鼠 FBG、胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment, HOMA-IR) 与 OGTT 的影响

如表 2 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠 FBG、血清胰岛素水平及 HOMA-IR 明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 岩黄连总碱中、高剂量组小鼠 FBG、胰岛素水平及 HOMA-IR 均显著降低 ($P < 0.01$), 岩黄连总碱低剂量组小鼠血清胰岛素水平及 HOMA-IR 均显著降低 ($P < 0.01$)。

如表 3 所示, 各组小鼠 ig 葡萄糖 15 min 后血糖值达到峰值, 15~30 min 血糖值缓慢降低, 30~90 min 血糖值快速降低; 当 120 min 时二甲双胍给药组降到 6.4 mmol/L, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$); 岩黄连总碱高剂量组降到 7.36 mmol/L, 与模型组有极显著性差异 ($P < 0.01$); 岩黄连总碱中剂量组血糖值为 7.51 mmol/L, 与模型组比较差异显著 ($P <$

表 1 岩黄连总碱对胰岛素抵抗小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Effect of *C. saxicola* total alkaloids on body weight in insulin resistant mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g				
		给药第 0 周	给药第 1 周	给药第 2 周	给药第 3 周	给药第 4 周
对照	—	22.86 ± 0.38	23.00 ± 0.82	24.43 ± 0.79	23.43 ± 0.54	24.14 ± 0.69
模型	—	25.71 ± 1.38 ^{##}	26.43 ± 1.40 ^{##}	26.57 ± 1.27 ^{##}	27.71 ± 1.25 ^{##}	28.14 ± 1.57 ^{##}
岩黄连总碱	25	26.57 ± 1.99	26.86 ± 2.12	26.86 ± 2.34	27.29 ± 2.43	27.71 ± 2.14
	50	25.57 ± 0.98	25.86 ± 1.07	27.00 ± 1.16	27.29 ± 1.70	27.43 ± 2.15
	100	26.57 ± 0.54	27.14 ± 0.90	27.71 ± 0.95	28.43 ± 1.40	27.71 ± 1.11
二甲双胍	200	26.14 ± 0.90	26.14 ± 1.35	26.86 ± 0.69	26.71 ± 0.95	26.57 ± 1.13

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$

^{###} $P < 0.01$ vs control group

表2 岩黄连总碱对胰岛素抵抗小鼠 FBG、血清胰岛素和 HOMA-IR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effect of *C. saxicola* total alkaloids on FBG, blood insulin and HOMA-IR in insulin resistant mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	FBG/(mmol·L ⁻¹)	胰岛素/(ng·mL ⁻¹)	HOMA-IR
对照	—	4.06 ± 0.37	28.05 ± 1.77	4.99 ± 0.42
模型	—	6.94 ± 0.72 ^{##}	36.17 ± 4.14 ^{##}	10.84 ± 0.80 ^{##}
岩黄连总碱	25	6.39 ± 0.56	31.53 ± 2.83 ^{**}	8.76 ± 1.01 ^{**}
	50	5.76 ± 0.58 ^{**}	29.21 ± 2.67 ^{**}	7.38 ± 0.91 ^{**}
	100	5.14 ± 0.78 ^{**}	26.89 ± 3.21 ^{**}	6.04 ± 1.16 ^{**}
二甲双胍	200	3.59 ± 0.76 ^{**}	26.49 ± 2.09 ^{**}	3.92 ± 0.68 ^{**}

与对照组比较: [#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01, 下表同

[#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01 vs model group, same as below tables

表3 岩黄连总碱对高脂喂养小鼠 OGTT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 3 Effect of *C. saxicola* total alkaloids on OGTT in high-fat fed mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)						血糖 AUC/mm ²
		0 min	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min	
对照	—	4.06 ± 0.37	16.28 ± 1.22	12.93 ± 0.94	8.56 ± 0.98	7.06 ± 0.51	6.01 ± 0.25	49.86 ± 1.36
模型	—	6.94 ± 0.72 ^{##}	18.84 ± 1.55 ^{##}	16.05 ± 1.76 ^{##}	12.79 ± 0.80 ^{##}	9.84 ± 0.40 ^{##}	8.30 ± 0.39 [#]	65.14 ± 1.82 ^{##}
岩黄连总碱	25	6.39 ± 0.56	13.01 ± 1.48 ^{**}	12.30 ± 2.09 ^{**}	11.19 ± 1.98	9.63 ± 0.83	7.66 ± 0.66	53.15 ± 2.40 ^{**}
	50	5.76 ± 0.58 ^{**}	13.00 ± 1.13 ^{**}	11.48 ± 1.34 ^{**}	10.46 ± 1.03 ^{**}	9.07 ± 0.47	7.51 ± 0.32 [*]	50.64 ± 1.51 ^{**}
	100	5.14 ± 0.78 ^{**}	12.99 ± 1.36 ^{**}	10.66 ± 1.10 ^{**}	9.73 ± 0.41 ^{**}	8.51 ± 0.40 ^{**}	7.36 ± 0.27 ^{**}	50.69 ± 1.60 ^{**}
二甲双胍	200	3.59 ± 0.76 ^{**}	14.84 ± 0.86 ^{**}	11.36 ± 1.92 ^{**}	10.80 ± 0.80 ^{**}	7.67 ± 1.46 [*]	6.40 ± 1.28 [*]	49.66 ± 2.03 ^{**}

0.05)。与对照组相比,模型组小鼠血糖 AUC 显著升高 (*P*<0.01); 与模型组相比,各给药组小鼠血糖 AUC 的差异均具有统计学意义 (*P*<0.01)。表明岩黄连总碱可以降低血糖、血胰岛素水平,增强机体对胰岛素的敏感性,从而恢复机体对血糖的调节能力。

3.3 岩黄连总碱对胰岛素抵抗小鼠血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C、GSP、瘦素、ADP/Acrp30 水平的影响

如表 4 所示,与对照组相比,模型组小鼠 TG、TC、LDL-C、GSP、瘦素水平显著上升 (*P*<0.01),

HDL-C 水平变化不明显,仅有下降趋势,ADP/Acrp30 水平显著下降 (*P*<0.01); 与模型组相比,各给药组 TG、TC、LDL-C、GSP、瘦素水平均降低 (*P*<0.01),而且岩黄连总碱在一定程度上升高了 HDL-C 的水平 (*P*<0.05),使得 ADP/Acrp30 水平显著升高 (*P*<0.05)。表明岩黄连总碱可以通过改善脂质代谢紊乱,高剂量组从而恢复机体糖代谢稳态。

3.4 岩黄连总碱对胰岛素抵抗小鼠糖异生的影响

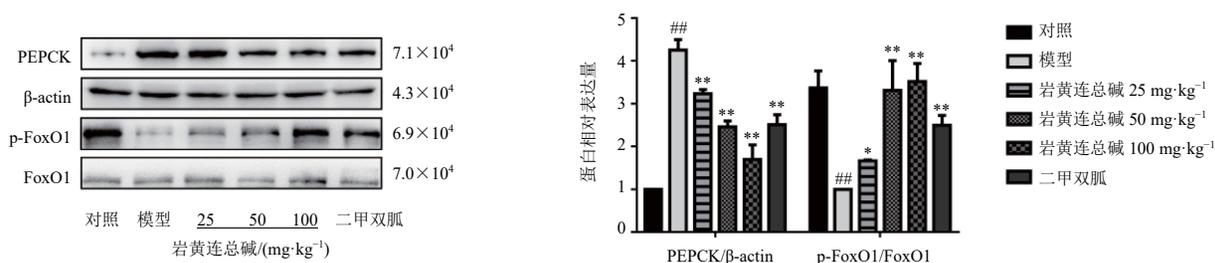
如图 1 所示,与对照组相比,模型组小鼠肝脏

表4 岩黄连总碱对胰岛素抵抗小鼠血清学指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 4 Effect of *C. saxicola* total alkaloids on serological indexes of insulin resistant mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	1.26 ± 0.13	2.70 ± 0.20	0.36 ± 0.07	9.53 ± 0.85
模型	—	2.23 ± 0.26 ^{##}	4.52 ± 0.34 ^{##}	0.91 ± 0.17 ^{##}	9.00 ± 0.27
岩黄连总碱	25	1.49 ± 0.12 ^{**}	3.78 ± 0.23 ^{**}	0.64 ± 0.17 ^{**}	9.37 ± 0.41
	50	1.48 ± 0.13 ^{**}	3.67 ± 0.18 ^{**}	0.53 ± 0.10 ^{**}	9.52 ± 0.38
	100	1.47 ± 0.17 ^{**}	3.57 ± 0.31 ^{**}	0.45 ± 0.12 ^{**}	9.67 ± 0.51 [*]
二甲双胍	200	1.45 ± 0.14 ^{**}	3.53 ± 0.62 ^{**}	0.50 ± 0.15 ^{**}	9.88 ± 0.85 ^{**}

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	GSP/(mmol·L ⁻¹)	瘦素/(ng·mL ⁻¹)	ADP/Acrp30/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	6.33 ± 0.36	1.37 ± 0.14	162.40 ± 8.52
模型	—	7.00 ± 0.37 ^{##}	7.08 ± 0.76 ^{##}	147.48 ± 5.37 ^{##}
岩黄连总碱	25	6.16 ± 0.48 ^{**}	2.43 ± 0.80 ^{**}	152.88 ± 9.93
	50	5.80 ± 0.37 ^{**}	2.39 ± 0.58 ^{**}	155.78 ± 8.51
	100	5.44 ± 0.34 ^{**}	2.35 ± 0.74 ^{**}	158.68 ± 10.64 [*]
二甲双胍	200	5.26 ± 0.32 ^{**}	1.75 ± 0.33 ^{**}	153.93 ± 10.34



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below figures

图1 岩黄连总碱对胰岛素抵抗小鼠糖异生的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of *C. saxicola* total alkaloids on gluconeogenesis in insulin resistant mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

中 PEPCK 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$) [15], p-FoxO1/FoxO1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 经给药治疗后, 岩黄连总碱组和二甲双胍组小鼠肝脏中 PEPCK 蛋白表达水平与模型组相比显著降低 ($P < 0.01$), p-FoxO1/FoxO1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。表明岩黄连总碱可以增强机体对于葡萄糖的利用率, 降低代偿性糖异生, 从而纠正糖代谢紊乱。

3.5 岩黄连总碱对胰岛素抵抗小鼠肝糖原的影响

如表 5 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肝糖原含量显著降低 ($P < 0.05$)。如图 2 所示, 模型组小鼠肝脏中 p-GSK-3 β /GSK-3 β 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 经过给药治疗后, 与模型组相比, 岩黄连总碱中、高剂量组和二甲双胍组小鼠肝糖原含量显著升高 ($P < 0.01$), 肝脏中 p-GSK-3 β /GSK-3 β 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。表明岩黄连总碱可以促进肝糖原的合成。

3.6 岩黄连总碱对 InsR/PI3K/Akt 通路的影响

如图 3 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肝脏中 InsR、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05, 0.01$); 经过给药治疗后, 与模型

表 5 岩黄连总碱对胰岛素抵抗小鼠肝糖原含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 5 Effect of *C. saxicola* total alkaloids on liver glycogen content of insulin resistant mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肝糖原/(mg·g ⁻¹)
对照	—	3.21 ± 0.91
模型	—	2.39 ± 0.49 [#]
岩黄连总碱	25	2.81 ± 0.68
	50	3.34 ± 0.35 ^{**}
	100	3.87 ± 0.63 ^{**}
二甲双胍	200	3.62 ± 0.49 ^{**}

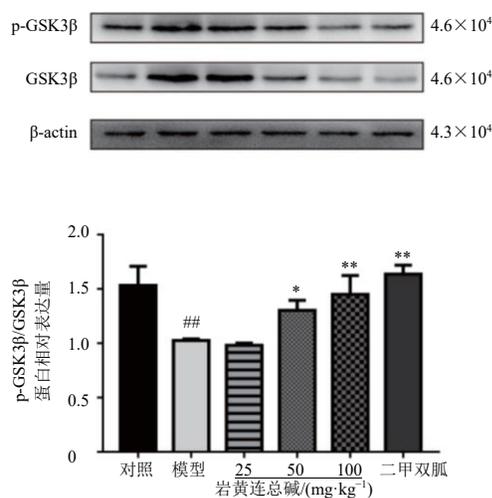


图2 岩黄连总碱对胰岛素抵抗小鼠糖原合成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of *C. saxicola* total alkaloids on glycogen synthesis in insulin resistant mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组相比, 岩黄连总碱高剂量组和二甲双胍组 InsR 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 岩黄连总碱中、高剂量组和二甲双胍组 p-PI3K/PI3K 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 岩黄连总碱高剂量组 p-Akt/Akt 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。表明岩黄连总碱可以激活 InsR/PI3K/Akt 通路, 增强胰岛素的敏感性, 从而纠正糖代谢异常。

4 讨论

本研究结果表明, 在小鼠胰岛素抵抗模型中, 小鼠表现出血糖、血清胰岛素、GSP 升高, 糖耐量异常等糖代谢紊乱相关表型 [16], 而岩黄连总碱可显著降低胰岛素小鼠 FBG、血清胰岛素和 GSP 水平, 逆转糖耐量的异常状态, 说明岩黄连总碱可以增强机体对胰岛素的敏感性, 从而恢复机体对血糖的调节能力; 小鼠血清中脂质代谢相关指标表明, 高脂

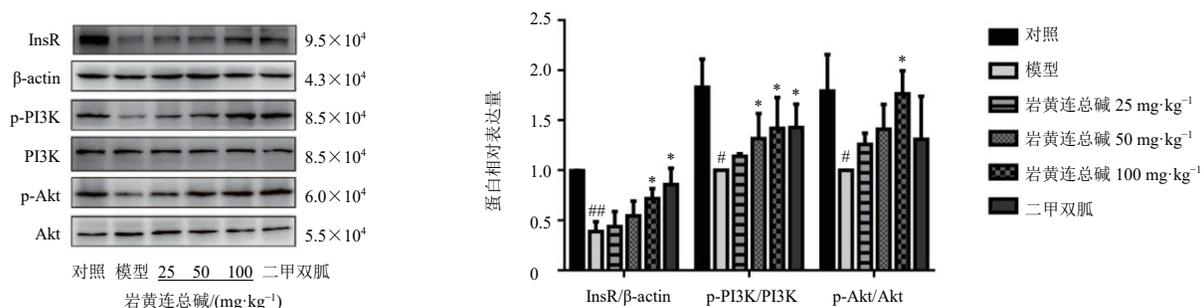


图3 岩黄连总碱对胰岛素抵抗小鼠肝脏 InsR、PI3K 和 Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of *C. saxicola* total alkaloids on protein expressions of InsR, PI3K and Akt in liver of insulin resistant mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

饮食会导致小鼠脂质代谢出现异常，且与糖脂代谢紊乱具有一定的相关性，推测岩黄连总碱可以通过纠正小鼠的脂代谢紊乱，进而恢复小鼠的糖代谢稳态。瘦素是由脂肪细胞分泌的一种激素，可以作用于下丘脑的瘦素受体，促进下丘脑分泌多种激素，从而调节机体对食物的摄取进而控制机体体质量平衡^[17]。然而数据显示岩黄连总碱连续给药后瘦素水平的改变并没有引起体质量的明显变化，可能岩黄连总碱虽然改善了脂肪组织的瘦素抵抗，使得血清瘦素水平发生变化，但并不能逆转下丘脑的瘦素受体损伤，因此摄食量没有显著减少，进而导致体质量没有显著下降。ADP/Acrp30 是另一种脂肪来源的激素，研究表明 ADP/Acrp30 可以逆转胰岛素抵抗^[18]。岩黄连总碱可以上调血清 ADP/Acrp30 水平从而改善胰岛素抵抗。有研究表明，GSK-3β 的过量表达会引起其下游底物糖原合成酶（glycogen synthase, GS）活性降低，糖原合成异常，导致胰岛素抵抗^[19]，活化的 Akt 可以促进 GSK-3β 磷酸化从而使之失活，改善糖原代谢紊乱，而岩黄连总碱可以有效促进 GSK-3β 磷酸化，增强 GS 活性，增加机体肝糖原含量，从而改善糖代谢紊乱。在糖异生方面，由于胰岛素抵抗的发生使得机体不能有效摄取与利用葡萄糖，机体便会代偿增强糖异生水平，从而为自身提供葡萄糖。FoxO1 是受胰岛素信号转导途径引起下游的信号分子 FoxO1 发生磷酸化降解，从而降低 FoxO1 的转录活性，减少糖异生关键酶（如 PEPCK）的表达，从而抑制糖异生^[20]。岩黄连总碱可以上调 p-FoxO1/FoxO1 水平，下调 PEPCK 的表达，抑制糖异生，最终改善糖代谢。

胰岛素信号转导通路中有 3 种信号通路，包括 PI3K 通路、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated

protein kinase, MAPK）通路和 C-Cbl 相关蛋白通路。其中 PI3K 信号通路是最为经典的通路^[21]。PI3K 信号通路的正常转导与糖脂代谢直接相关，任何 PI3K 信号通路转导异常都可能导致胰岛素抵抗的发生^[22]。在生理条件下，胰岛素可与其在细胞表面的受体（InsR）结合，IRS 被磷酸化，随后 PI3K 活化。活化的 PI3K 可将磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸（phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP2）催化为 PIP3，从而激活序列下游信号因子 Akt。磷酸化的 Akt 将葡萄糖转运蛋白 4（glucose transporter 4, GLUT4）转运到质膜，后者负责将葡萄糖摄取到细胞中，从而降低血浆中葡萄糖水平。因此，InsR/PI3K/Akt 信号通路在胰岛素信号转导中发挥重要的联动调节作用，该途径中的任何环节发生异常都会降低细胞对胰岛素的敏感性，导致葡萄糖摄取和利用异常，葡萄糖耐量受损，最终引起血糖水平升高^[23]。岩黄连总碱可以逆转胰岛素抵抗引起的 InsR/PI3K/Akt 信号通路下调，进而改善糖代谢过程与胰岛素抵抗（图 4）^[24]。

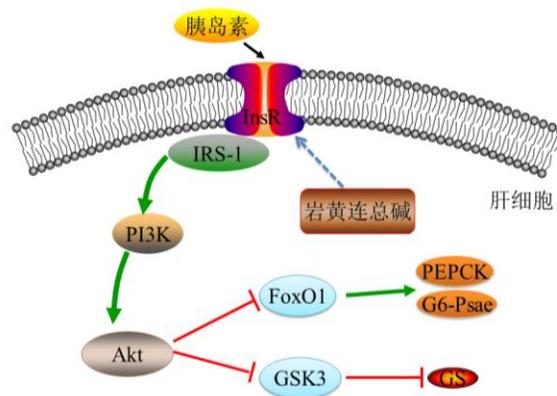


图4 岩黄连总碱改善胰岛素抵抗机制图

Fig. 4 Mechanism of *C. saxicola* total alkaloids improving insulin resistance

综上所述,岩黄连总碱能够通过激活 InsR/PI3K/Akt 介导的胰岛素信号通路,提高胰岛素信号的传导,降低血糖,减少糖异生,促进糖原合成,从而改善糖代谢。岩黄连总碱作为传统的肝病治疗药物已经得到了临床的认可,但在镇痛、抗菌、改善代谢性疾病等领域仍具有极大的潜力。本研究为岩黄连总碱在纠正糖代谢紊乱方面提供了实验方面的支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zheng T, Shu G W, Yang Z Z, *et al.* Antidiabetic effect of total saponins from *Entada phaseoloides* (L.) Merr. in type 2 diabetic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(3): 814-821.
- [2] 李骋, 何金枝, 周学东, 等. 黄连素调控胰岛素抵抗相关 2 型糖尿病的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(12): 2254-2260.
- [3] 曹莉, 顾振纶, 茅彩萍. 葛根素对糖尿病小鼠胰岛素抵抗的影响 [J]. *中草药*, 2006, 37(6): 901-904.
- [4] 张晓, 李保宏, 张永康, 等. 岩黄连的化学成分及生物活性研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(9): 2861-2871.
- [5] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准: 1990 年版 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1992: 64-65.
- [6] 张成, 姚兴东, 雷福厚. 岩黄连中生物碱的研究进展 [J]. *化工技术与开发*, 2020, 49(12): 9-13.
- [7] 余姣娇, 邱志霞, 刘秋燕, 等. 岩黄连的研究进展 [J]. *药学研究*, 2018, 37(6): 342-345.
- [8] 陈萍, 鞠霖杰, 成俊, 等. 岩黄连总碱对代谢相关脂肪性肝病小鼠的治疗作用及分子机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(3): 468-477.
- [9] 尤丽, 党娅, 杨彬彦. 蓝莓花青素对 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢的调节作用 [J]. *食品工业科技*, 2022, 43(9): 381-388.
- [10] Wang Y W, Gagnon J, Nair S, *et al.* Herring milt protein hydrolysate improves insulin resistance in high-fat-diet-induced obese male C57BL/6J mice [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(8): 456.
- [11] Song Y M, Lee Y H, Kim J W, *et al.* Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway [J]. *Autophagy*, 2015, 11(1): 46-59.
- [12] Schweiger M, Romauch M, Schreiber R, *et al.* Pharmacological inhibition of adipose triglyceride lipase corrects high-fat diet-induced insulin resistance and hepatosteatosis in mice [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14859.
- [13] 张勇, 武燕彬, 孔维佳. 天麻素在 KK-Ay 小鼠中抗糖尿病作用的实验研究 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(7): 917-924.
- [14] 聂金涛. 基于 BDNF 介导的 PI3K/AKT 信号通路补肾活血方药对血管性痴呆大鼠海马神经元保护机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
- [15] 雷静文, 宋丽华, 张晓京, 等. 白花丹素改善高脂饮食小鼠肝脏脂代谢并降低糖异生的研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(22): 2720-2726.
- [16] Tian C Y, Chang H, La X J, *et al.* Wushenziye Formula improves skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus via PTP1B-IRS1-Akt-GLUT4 signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 4393529.
- [17] Jansson J O, Palsdottir V, Hägg D A, *et al.* Body weight homeostat that regulates fat mass independently of leptin in rats and mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(2): 427-432.
- [18] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity [J]. *Nat Med*, 2001, 7(8): 941-946.
- [19] 郭明飞. 黄地安消胶囊调控 IRS-1/PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗作用及机制研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2018.
- [20] 林心君, 胡海霞, 何昱霖, 等. 石斛合剂基于 PKB/FoxO1 通路抑制糖尿病大鼠肝糖异生的机制研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(8): 1166-1171.
- [21] Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus [J]. *World J Diabetes*, 2010, 1(3): 68-75.
- [22] Abu Bakar M H, Cheng K K, Sarmidi M R, *et al.* Celastrol protects against antimycin A-induced insulin resistance in human skeletal muscle cells [J]. *Molecules*, 2015, 20(5): 8242-8269.
- [23] Liu Q P, Li X, Li C Y, *et al.* 1-Deoxyojirimycin alleviates insulin resistance via activation of insulin signaling PI3K/AKT pathway in skeletal muscle of db/db mice [J]. *Molecules*, 2015, 20(12): 21700-21714.
- [24] Feng M, Liu F, Xing J L, *et al.* *Anemarrhena* saponins attenuate insulin resistance in rats with high-fat diet-induced obesity via the IRS-1/PI3K/AKT pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 277: 114251.

[责任编辑 李亚楠]