

小檗余甘子汤中纳米超分子的分离表征及其改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗作用研究

宗毅¹, 彭家艳¹, 黄雪梅¹, 陶乙文², 苟晓玲¹, 汪丽洁², 张静^{2*}, 范刚^{2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 分离小檗余甘子汤中纳米超分子部位, 进行理化表征, 并探究其改善胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 作用及机制。方法 采用离心透析法从小檗余甘子汤煎液中分离纳米超分子部位, 以扫描电镜 (scanning electron microscope, SEM) 进行形态表征, 根据丁达尔效应评价稳定性。采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术对纳米超分子进行化学成分分析。以葡萄糖胺为诱导剂建立 HepG2 细胞 IR 模型, 通过 CCK-8 法筛选合适的给药浓度。以葡萄糖消耗量为指标评价小檗余甘子汤不同部位对 HepG2 细胞 IR 的影响。采用免疫蛋白印记法测定磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 通路相关蛋白的表达。结果 小檗余甘子汤中形成的超分子为性质稳定、均一的球形纳米颗粒, 粒径约为 514 nm, 多分散系数 (polydispersity index, PDI) 为 0.398, Zeta 电位为 -14.1 mV。纳米超分子主要以小檗碱等生物碱类和没食子酸等多酚类成分组成, 具有较好的 pH 稳定性和离子稳定性。与模型组比较, 纳米超分子部位可显著提高葡萄糖消耗量, 明显上调 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 蛋白表达, 且药效与小檗余甘子汤全汤相当。结论 小檗余甘子汤中存在形态均一、性质稳定的超分子纳米颗粒, 是改善胰岛素抵抗的关键药效物质, 其作用机制与激活 PI3K/AKT 信号通路有关。

关键词: 小檗余甘子汤; 纳米超分子; 理化表征; 胰岛素抵抗; PI3K/AKT 通路

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)14-5040-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.14.010

Isolation and characterization of nanosupramolecular from Xiaoboyuganzi Decoction and its effect on improving insulin resistance of HepG2 cells

ZONG Yi¹, PENG Jiayan¹, HUANG Xuemei¹, TAO Yiwen², GOU Xiaoling¹, WANG Lijie², ZHANG Jing², FAN Gang²

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. School of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To isolate the nanosupramolecular parts of Xiaoboyuganzi Decoction, perform physicochemical characterization, and investigate its effects and mechanisms of improving insulin resistance (IR). **Methods** Nanosupramolecular was isolated from Xiaoboyuganzi Decoction using centrifugal dialysis, morphologically characterized by scanning electron microscopy (SEM), and their stability was evaluated by the Tyndall effect. The chemical composition of the nanosupramolecular was analyzed by UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS technique. An IR model was induced in HepG2 cells with glucosamine, and cell viability was assessed by CCK-8 assay. Glucose consumption was used as an indicator to assess the effects of different components of Xiaoboyuganzi Decoction on IR in HepG2 cells. The expression levels of proteins related to the PI3K/AKT pathway were determined using western blotting. **Results** The supramolecules formed in Xiaoboyuganzi Decoction were stable and homogeneous spherical nanoparticles, with a particle size of approximately 514nm, a polydispersity index (PDI) of 0.398, and a zeta potential of -14.1 mV. The nanosupramolecular was primarily composed of berberine and other alkaloids, as well as gallic acid and other polyphenols, and

收稿日期: 2024-12-30

基金项目: 四川省自然科学基金项目 (2024NSFSC0691); 四川省重点研发项目 (2022YFS0434)

作者简介: 宗毅, 硕士研究生。E-mail: zongyi0609@163.com Tel: 13076089796

*通信作者: 范刚, 教授, 主要从事民族药的药效物质基础及作用机制研究。E-mail: fangang1111@163.com

张静, 教授, 主要从事民族药质量控制及药效物质基础研究。E-mail: zhangjingtcm@cducm.edu.cn

exhibited good pH stability and ionic stability. Compared with the model group, the nanosupramolecular significantly increased glucose consumption and upregulated the expression of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT proteins, with efficacy comparable to that of the Xiaoboyuganzi Decoction. **Conclusion** Supramolecular nanoparticles with uniform morphology and stable properties exist in Xiaoboyuganzi Decoction, which is a key pharmacodynamic substance for improving insulin resistance, and its mechanism is related to the activation of PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: Xiaoboyuganzi Decoction; nanosupramolecular; physicochemical characterization; insulin resistance; PI3K/AKT pathway

汤剂是应用最早、最广泛的一种传统剂型。中药在煎煮过程中常发生复杂的物理化学变化^[1],使得煎液形成沉淀相(粒径 $>10\ \mu\text{m}$)、混悬相(粒径 $0.1\sim 10\ \mu\text{m}$)、胶体相(粒径 $1\sim 100\ \text{nm}$)、真溶液相等多重相态^[2]。其中,胶体相及混悬相(共称为纳米相态)被发现存在较多的纳米级超分子,这些纳米物质被证明具有促吸收、缓释、靶向等独特功能,因此近年来成为研究热点^[2-5]。研究表明,汤剂中各种药材含有的不同种类化学成分之间可通过氢键、疏水作用、静电引力等非共价键作用而自组装形成纳米级超分子^[3],如生物碱与苷类、多酚类等成分能发生分子自组装形成超分子纳米颗粒^[4]。近年来,复方汤剂中存在纳米超分子现象已经得到充分证实,在黄连解毒汤、芍药甘草汤、麻杏石甘汤、白虎汤中已发现了不同成分自组装形成的超分子纳米粒^[5-6],并被发现具有明显的药效活性,是复方汤剂的重要药效物质。

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种非胰岛素依赖型的糖尿病,其以胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)为主要特征^[7]。小檗余甘子汤始载于藏医经典古籍《四部医典》,由常用藏药小檗皮和余甘子配伍而成,主要用于治疗“京尼萨库”病(糖尿病)^[8]。根据藏医“味性化味”配伍理论,小檗皮为方中君药,能清热解毒、干“黄水”,而余甘子配伍能增强其清热功效,并缓和小檗皮苦寒之性。课题组前期研究发现,小檗余甘子汤煎煮后水煎液呈明显的浑浊状态,而小檗皮和余甘子药材单独煎煮的汤液相对澄清,初步推断2味药材在合煎过程中不同化学成分可能发生相互作用形成复杂多相态。然而,小檗余甘子汤中纳米级超分子是否存在,是否具有药效活性尚不明确。故本研究对小檗余甘子汤中纳米超分子部位进行了制备分离,结合粒径分析、形态观察及化学成分分析进行理化表征,并基于HepG2细胞IR模型(IR-HepG2)探究其改善胰岛素抵抗的药效活性及作用机制,为小檗余甘子汤的药效物质基础研究与开发利用提供科

学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

MS5S 型磁力搅拌器(群安实验仪器有限公司); Mastersizer 2000 马尔文粒度仪(英国马尔文仪器有限公司); JSM-IT700HR 型扫描电镜(日本电子株式会社); FDU-2110 型冷冻干燥机(东京理化器械株式会社); D3024 型台式高速微量离心机(北京大龙兴创实验仪器股份公司)。VanquishTM 型超高效液相色谱仪(美国 Thermo-Fisher 公司); Q-ExactiveTM Orbitrap 高分辨质谱仪(美国 Thermo-Fisher 公司)。Mini-PROTEAN Tetra 电泳槽(美国 Bio-Rad 公司); UVP ChemStudio 智能成像系统(德国耶拿公司)。

1.2 药品与试剂

HepG2 细胞专用培养基(货号 CM-0103, 武汉普诺赛生命科技有限公司); 胰岛素抵抗诱导剂(货号 S1635)、总蛋白定量测定试剂盒(货号 P0010S)均购于上海碧云天生物技术股份有限公司; 0.25% 胰酶(货号 PYG0067)、无菌磷酸盐缓冲液(PBS, 货号 PYG0021)均购于武汉博士德生物工程有限公司; 葡萄糖测试盒(货号 A154-1-1, 南京建成生物工程研究所); CCK-8 试剂盒(货号 BG0025, 重庆葆光生物技术有限公司); 盐酸二甲双胍(货号 B25331, 上海源叶生物科技有限公司); 无水葡萄糖(批号 2023112901, 成都科隆化学品有限公司); 磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K, 货号 A4992)、蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT, 货号 A17909)均购于武汉爱博泰克生物科技有限公司; p-AKT 抗体(货号 H651506050)购于杭州华安生物技术有限公司; p-PI3K 抗体(货号 T40116F)购于上海艾比玛特生物医药有限公司; β -actin 抗体(货号 AC240505001)购于武汉赛维尔生物科技有限公司。

色谱级甲酸(批号 2023041701)及甲醇(批号 24072801)等分析级试剂购于成都市科隆化学品有

限公司。小檗皮和余甘子药材由四川省德格县藏医院提供,根据外观性状和 DNA 条形码方法^[9],由成都中医药大学范刚教授鉴定为小檗科植物甘肃小檗 *Berberis kansuensis* Schneid. 的干燥茎皮或根皮,以及大戟科植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的干燥成熟果实。

人肝癌细胞系 HepG2 细胞购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法

2.1 小檗余甘子汤中纳米超分子分离条件的优化

2.1.1 小檗余甘子汤制备 分别称取小檗皮、余甘子药材粉末各 5 g,混匀后,加入 10 倍量的水煎煮 2 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,即得小檗余甘子汤煎液。

2.1.2 透析袋处理 将透析袋剪至合适长度,在 2% 体积的碳酸氢钠中煮沸 10 min,放冷,将透析袋用纯水彻底漂洗,将透析袋置于 1 mmol/L 的 EDTA (pH 8) 中煮沸 10 min,放冷后,使用前纯水检查是否漏液。

2.1.3 离心转速的选择 将小檗余甘子汤煎液分别在 3 500、5 000、7 000 r/min 条件下离心 15 min,上清液装入 M_w 3 500 透析袋,进行透析,每 2 小时更换 1 次液体,透析 6 h 后得到煎液中的超分子部位,冷冻干燥后置于扫描电镜 (scanning electron microscope, SEM) 下观察形态和粒径大小,选择最佳离心转速。

2.1.4 透析袋的选择 按“2.1.3”项下同法操作,在最佳离心转速条件下,将煎液分别装入 M_w 500、3 500 和 7 000 的透析袋中透析,进行 SEM 观察,选择最佳透析袋。

2.1.5 透析时间的选择 按“2.1.3”项下同法操作,在最佳离心转速和最优透析袋条件下,将煎液分别透析 3、6、9 h,进行 SEM 观察,选择最佳透析时间。

2.2 小檗余甘子汤纳米超分子的形貌表征

使用去离子水将超分子部位冻干粉复溶至 1 mg/mL,转移至玻璃瓶中,用激光笔照射观察丁达尔现象,使用马尔文粒度仪测定粒径大小和分散性系数 (polydispersity index, PDI)。取样滴于硅片上,待水分自然挥干后喷金,置于 SEM 下观察超分子体系的微观形貌。

2.3 小檗余甘子汤纳米超分子的稳定性研究

称取超分子部位冻干粉 1 mg,分别置于 pH 值为 1、3、6、7.4、8 的缓冲溶液和 100、200、300、400 mmol/L 的氯化钠溶液中,使用红外激光笔照射

溶液,观察丁达尔效应强度变化,分析其 pH 稳定性和离子稳定性,并拍照记录。

2.4 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术的小檗余甘子汤纳米超分子化学成分分析

2.4.1 供试品溶液的制备 精密称取超分子部位冻干粉 1.0 mg,用色谱级甲醇稀释至 100 μ g/mL,超声处理 30 min,用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.4.2 色谱和质谱条件 色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈ 柱 (150 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m); 流动相为甲醇 (A) - 0.1% 甲酸溶液 (B), 梯度洗脱: 0~40 min, 2%~80% A; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 2 μ L。采用 HESI 离子源,正离子检测模式,电喷雾电压为 +3 500 V; 负离子检测模式,电喷雾电压为 -3 000 V; 鞘气体积流量为 40 arb; 辅助气体积流量为 15 arb; 毛细管温度为 350 $^{\circ}$ C; 二级质谱采用 Full MS/dd-MS² 扫描模式, Full MS 分辨率为 70 000, dd-MS² 分辨率为 17 500, 扫描范围 m/z 100~1 500。

2.4.3 数据分析 将原始数据导入 Compound Discoverer 3.0 软件中,对其进行提取、保留时间矫正等预处理。建立工作流程检索数据库,根据一级质谱提供的精确相对分子质量,采用 Xcalibur 2.0 软件拟合分子式,误差范围 $\pm 5.0 \times 10^{-6}$,并将样品质谱数据信息与数据库 ChemSpider、mzCloud 和 mzVault 中的成分数据进行匹配,通过数据库中确切的相对分子质量以及二级质谱碎片离子对成分进行初步归属和鉴定。同时,查阅 ChemSpider、Pubchem 等在线数据库以及相关文献检索成分可能的化学结构式和裂解碎片,对鉴定的成分进一步比对和检验。

2.5 小檗余甘子汤不同部位对 IR-HepG2 细胞的药效评价及作用机制研究

2.5.1 药物的制备 小檗余甘子汤不同部位的制备: 将小檗余甘子汤煎液 (CD) 经 3 500 r/min 离心透析,将透析袋中的液体进行冷冻干燥,即得小檗余甘子汤的纳米超分子部位 (SM),烧杯内的液体即为真溶液部位 (TS),离心所得沉淀物为沉淀部位 (SD)。将 CD、SM、TS 与 SD 分别溶于完全培养基中,制备成 5 000 μ g/mL 的储备溶液,充分溶解后为后续细胞实验使用。

葡萄糖胺 (GlcN) 溶液的制备: 称取 GlcN 粉末 0.215 g,溶于 1 mL PBS 中,配制成 1 mol/L 的

GlcN 溶液。

盐酸二甲双胍溶液的制备：称取盐酸二甲双胍粉末 0.063 g，充分溶解于 10 mL PBS 中，震荡混匀，制成 50 mmol/L 浓度的盐酸二甲双胍母液，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，分装后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，临用时用培养基将其浓度稀释为 6 mmol/L。

2.5.2 IR-HepG2 细胞模型的建立 HepG2 细胞复苏后，用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温培养箱，待细胞贴壁长满至 90%，用 0.25%胰酶消化传代，取对数生长期的 HepG2 细胞按 5×10^5 个/mL 密度接种于 96 孔细胞培养板，100 μL /孔，设对照组和模型组，每组 6 个复孔，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后，弃去 96 孔板中的培养基上清，向对照组中加入正常培养基，模型组加入 GlcN 浓度为 9 mmol/L 的完全培养基，培养箱孵育 24 h，加入高糖培养基继续培养 24 h，建立 IR-HepG2 细胞模型。取细胞培养基，采用葡萄糖氧化酶法检测葡萄糖含量，通过 CCK-8 法检测细胞存活率。

2.5.3 小檗余甘子汤不同部位给药浓度的筛选 细胞孵育 24 h 后，设空白组，未处理的 HepG2 细胞为对照组，质量浓度为 25、50、100、200、400、800、1 600、3 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小檗余甘子汤 CD 组、SM 组、TS 组和 SD 组，每孔各 6 个复孔。培养 24 h 后，弃去孔内培养基加入 110 μL 含 CCK-8 的完全培养基（完全培养基：CCK-8 为 10：1），置细胞培养箱中孵育 2 h 后，用酶标仪在 450 nm 波长下检测吸光度（ A ）值，计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.5.4 小檗余甘子汤不同部位对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的测定 对照组加入完全培养基，根据“2.5.3”项下筛选所得的给药浓度分别设置模型组，阳性药二甲双胍组，CD、SM、TS 以及 SD 组，给药组分别设置高、中、低剂量组，培养基均为高糖培养基。给药 24 h 后，计算各组葡萄糖的消耗量。

2.5.5 免疫蛋白印迹法（Western blotting）检测 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达 将对数生长期的 HepG2 细胞以 6×10^5 个/孔接种于 6 孔板，待细胞完全贴壁后，建立 IR-HepG2 模型，以高糖培养基设置对照组。造模 24 h 后，另分别设置模型组、阳性药二甲双胍组、纳米超分子部位高剂量组、小檗余甘子汤煎液高剂量组（相关给药剂量参考“2.5.3”项结果）和对照组，每组设置 6 个复孔，培

养 24 h 后收集细胞。加入 RIPA 裂解液提取蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入 5%BSA，室温封闭 1 h，TBST 洗膜后分别加入 PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT、 β -actin 抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜；洗膜后加入二抗，室温孵育 1 h，最后采用 ECL 发光液显影，使用 Image J 软件对条带进行灰度分析。

2.6 统计分析

采用 GraphPad Prism 10.1.2 统计软件对数据进行单因素方差分析（One-way ANOVA），实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 小檗余甘子汤中纳米超分子分离条件的确定

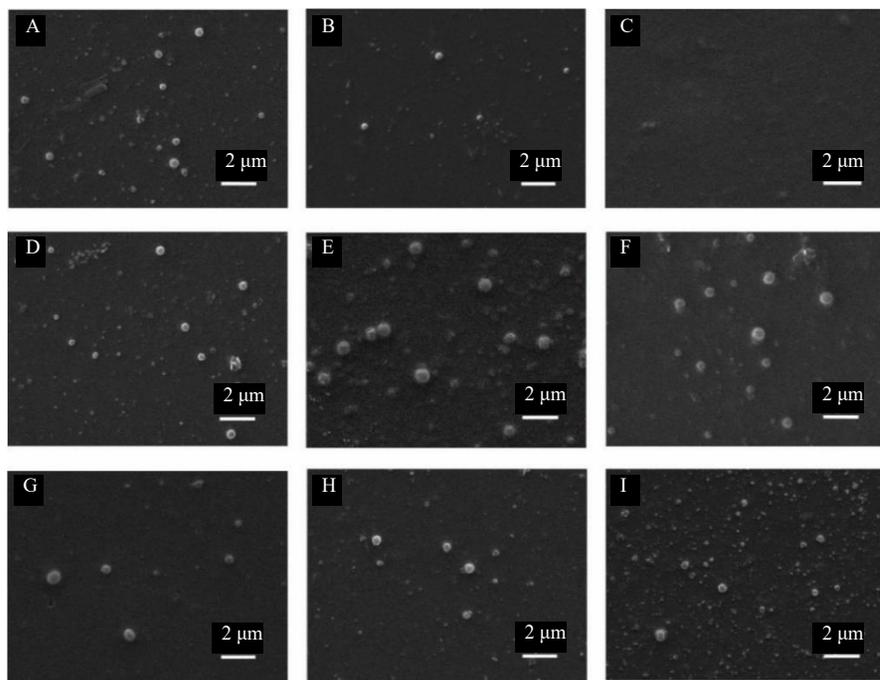
分离条件考察所得 SEM 结果见图 1。结果发现，用 7 000 r/min 离心时，由于离心转速过大的原因，未见纳米颗粒；用 5 000 r/min 离心时，粒径明显减小，粒子较为清晰完整，但纳米颗粒较少；用 3 500 r/min 离心时，测得的纳米颗粒较为完整清晰，粒径分布较为均匀，故最终选择 3 500 r/min 为最佳离心转速。透析袋 M_w 3 500 和 7 000 分离出的超分子部位粒径较大，而 M_w 500 分离出的超分子粒径较小，形状圆润，故最终选择 M_w 500 的透析袋对超分子部位进行分离。此外，透析时间越短，所得纳米粒越少，但随着透析时间的增长，纳米粒出现形状的改变，当透析时间为 6 h 时，超分子的粒径大小较为均一、形状规则，故最终选择 6 h 为最佳透析时间。

通过单因素考察，得出小檗余甘子汤中纳米超分子部位的最佳分离条件：取 2 味药材（1：1）混匀，加水煎煮 2 次，每次 1 h，滤过，合并滤液，用 3 500 r/min 离心 15 min，取上清液装入 M_w 500 透析袋中透析 6 h，用磁力搅拌器不断搅拌，多次重复操作，将最终透析袋中的液体进行冷冻干燥，即得。

3.2 小檗余甘子汤纳米超分子的形貌表征及稳定性研究

丁达尔现象表明（图 2），小檗余甘子汤呈现均一、明显的光路，初步说明汤剂中存在超分子物质。SEM 结果显示，超分子部位为球形颗粒，大小较为均一，形状圆润。利用马尔文粒径仪对超分子部位进行表征，结果显示超分子部位存在粒径约为 514 nm，PDI 为 0.398，Zeta 电位为 -14.1 mV 的纳米颗粒。

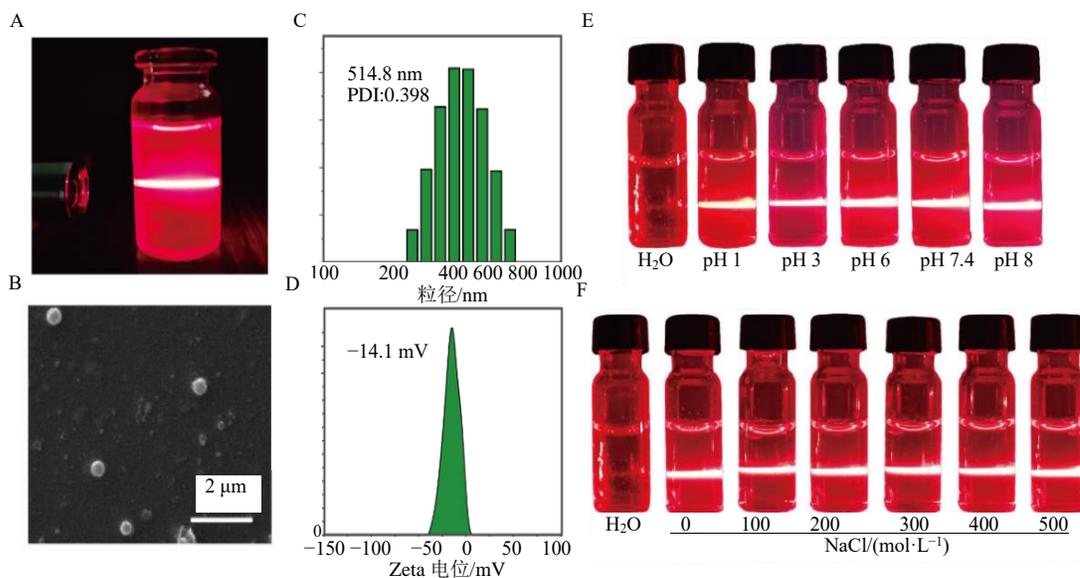
通过丁达尔效应评价纳米超分子的 pH 稳定性



A~C: 离心转数 3 500、5 000、7 000 r·min⁻¹; D~F: 透析袋 M_w 500、3 500、7 000; G~I: 透析时间 3、6、9 h。
A—C: revolutions per minute 3 500, 5 000, 7 000 r·min⁻¹; D—F: dialysis bag M_w 500, 3 500, 7 000; G—I: dialysis time 3, 6, 9 h.

图 1 不同分离条件下超分子部位的 SEM 图

Fig. 1 SEM micrographs of supramolecular parts under different separation conditions



A-丁达尔效应图; B-SEM 图; C-粒径大小; D-Zeta 电位; E-pH 稳定性考察; F-离子稳定性考察。
A-tyndall effect image; B-SEM micrograph; C-particle size; D-Zeta potential; E-pH stability; F-ionic stability.

图 2 小檗余甘子汤中纳米超分子的形貌表征及稳定性考察

Fig. 2 Morphological characterization and stability investigation of nanosupramolecular in Xiaoboyuganzi Decoction

和离子稳定性。结果如图 2 所示, 在不同 pH 缓冲液和不同浓度的 NaCl 溶液中, 小檗余甘子汤中纳米超分子部位的白色光路强度没有发生明显的变化, 表明具有较好的 pH 稳定性和离子稳定性。胃

液 pH 值一般为 1~3, 肠液 pH 值为 7~8, 而 100~200 mmol/L NaCl 为人体正常渗透压环境。这些结果表明, 小檗余甘子汤中形成的纳米超分子在人体胃肠道中可能具有好的稳定性, 为其体内发挥作用

提供了依据。

3.3 小檗余甘子汤纳米超分子部位的化学表征

采用 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术对小檗余甘子汤纳米超分子部位进行化学成分分析, 结果见图 3。通过数据库检索、对照品比对进行鉴定。结果共鉴定了 13 种化学成分 (表 1), 包括来源于小檗皮的生物碱类成分 (如小檗碱、木兰花碱、巴马汀等), 以及来源于余甘子的鞣质、酚酸等多酚类成分 (如没食子酸、鞣花酸、诃黎勒酸等)。这些结果说明, 小檗皮中生物碱类成分与余甘子中多酚类成分在共煎煮过程中发生分子相互作用形成超分子体系。

3.4 小檗余甘子汤不同部位对 IR-HepG2 细胞的药效评价及作用机制研究

3.4.1 IR-HepG2 细胞模型的鉴定 与对照组

[(4.23 ± 0.04) mmol/L]相比, 当 GlcN 浓度为 9 mmol/mL 时, 葡萄糖消耗量 [(1.80 ± 0.14) mmol/L] 显著下降 ($P < 0.001$), 且细胞存活率为 (81.85 ± 3.84) %, 大于 80%, 对细胞的杀伤力较小, 说明 IR-HepG2 模型构建成功。

3.4.2 小檗余甘子汤不同部位给药质量浓度的筛选

如图 4 所示, 在各个部位药物质量浓度为 25 ~

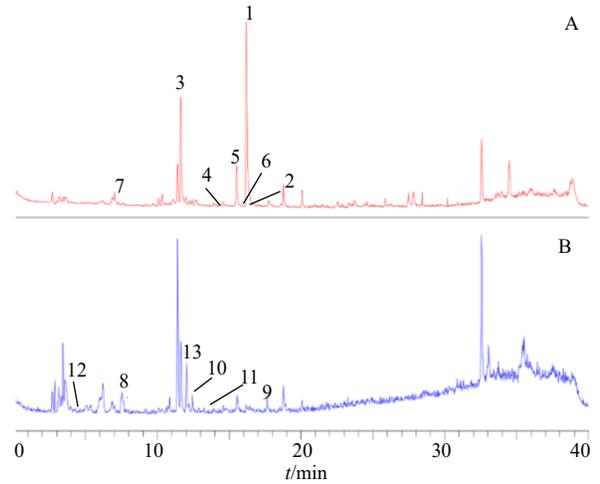


图 3 小檗余甘子汤纳米超分子部位的正离子 (A) 和负离子 (B) 模式总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatograms in positive (A) and negative (B) ionization modes of nanosupramolecular parts in Xiaoboyuganzi Decoction

表 1 小檗余甘子汤纳米超分子部位的化学成分分析结果

Table 1 Results of chemical composition analysis of nanosupramolecular parts of Xiaoboyuganzi Decoction

| 序号 | t_R /min | 分子式 | 离子模式 | 测定值 (m/z) | 主要离子碎片 | 化合物 | 来源 |
|----|------------|----------------------|-----------|---------------|--|--------------|-----|
| 1 | 16.21 | $C_{20}H_{18}NO_4^+$ | $[M]^+$ | 336.123 5 | 320.092 3, 321.099 1, 320.092 3, 304.097 4, 292.097 2, 278.081 7 | 小檗碱 | 小檗皮 |
| 2 | 16.14 | $C_{21}H_{22}NO_4$ | $[M]^+$ | 352.155 2 | 337.131 6, 336.123 7, 322.106 9, 308.128 8, 294.113 0, 292.097 5 | 巴马汀 | 小檗皮 |
| 3 | 11.63 | $C_{20}H_{24}NO_4$ | $[M]^+$ | 342.170 5 | 297.112 7, 282.089 3, 265.086 3, 237.091 3, 58.065 9 | 木兰花碱 | 小檗皮 |
| 4 | 14.58 | $C_{19}H_{18}NO_4$ | $[M]^+$ | 324.123 7 | 309.100 2, 308.092 3, 294.075 8, 280.097 3, 266.081 6 | 去亚甲基小檗碱 | 小檗皮 |
| 5 | 15.52 | $C_{20}H_{20}NO_4$ | $[M]^+$ | 338.139 4 | 323.116 1, 322.108 1, 308.092 0, 294.113 0, 280.097 7, 279.089 5 | 药根碱 | 小檗皮 |
| 6 | 15.60 | $C_{19}H_{16}NO_4$ | $[M]^+$ | 322.106 8 | 307.084 6, 279.089 4, 264.066 6, 292.063 2 | 小檗红碱 | 小檗皮 |
| 7 | 7.02 | $C_{13}H_{18}N_2O$ | $[M+H]^+$ | 219.149 7 | 160.076 0, 132.081 1, 115.054 7, 60.081 6, 117.057 7 | 蟾蜍特尼定 | 小檗皮 |
| 8 | 7.55 | $C_7H_6O_5$ | $[M-H]^-$ | 169.013 8 | 125.023 7, 107.013 1 | 没食子酸 | 余甘子 |
| 9 | 17.66 | $C_{14}H_6O_8$ | $[M-H]^-$ | 300.999 5 | 283.996 1, 257.008 7, 229.014 0, 185.024 3, 603.006 8 | 鞣花酸 | 余甘子 |
| 10 | 12.43 | $C_{27}H_{22}O_{18}$ | $[M-H]^-$ | 633.074 6 | 300.999 5, 169.013 5 | 柯里拉京 | 余甘子 |
| 11 | 13.24 | $C_{41}H_{30}O_{27}$ | $[M-H]^-$ | 953.081 2 | 633.071 7, 300.998 6, 275.019 1, 169.012 9 | 诃黎勒酸 | 余甘子 |
| 12 | 3.61 | $C_{13}H_{14}O_{12}$ | $[M-H]^-$ | 361.040 8 | 209.030 2, 191.019 5 | 粘酸-2-O-没食子酸酯 | 余甘子 |
| 13 | 12.03 | $C_8H_8O_5$ | $[M-H]^-$ | 183.029 6 | 168.006 0, 124.015 9 | 没食子酸甲酯 | 余甘子 |

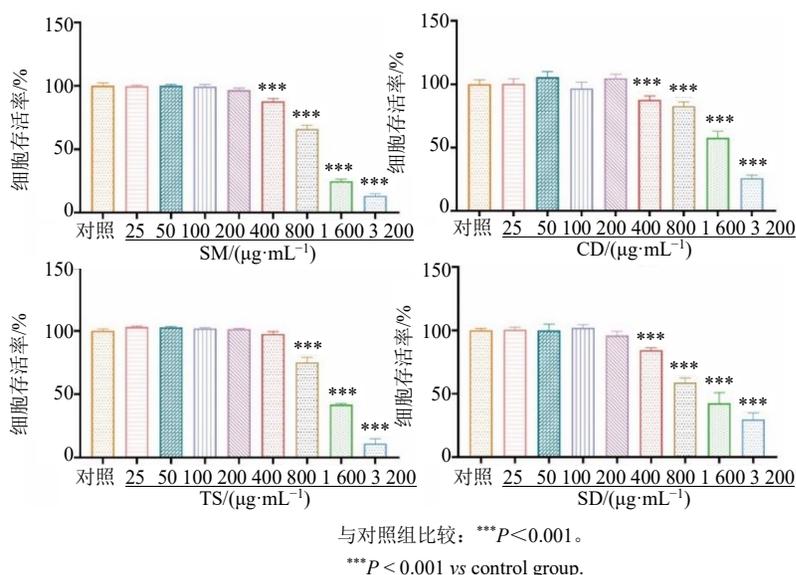


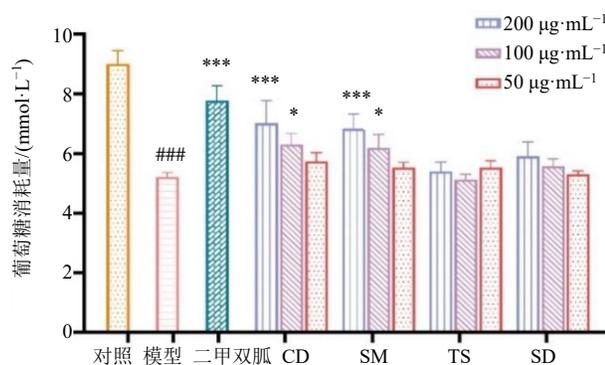
图4 小檗余甘子汤中各部位不同给药浓度对 IR-HepG2 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effects of different parts from separated fractions of Xiaoboyuganzi Decoction on IR-HepG2 cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

200 μg/mL 时, HepG2 细胞活力均与对照组无显著性差异, 当质量浓度增加到 400 μg/mL 时, HepG2 细胞活力与对照组具有显著性差异 ($P < 0.001$)。小檗余甘子汤真溶液部位的质量浓度增加到 800 μg/mL 时, 细胞活力明显下降 ($P < 0.001$)。因此, 可认为小檗余甘子汤中的 SM、CD 和 SD 部位在 200 μg/mL 下不会影响 HepG2 细胞的活性, TS 部位在 400 μg/mL 下不会影响 HepG2 细胞的活性。

3.4.3 小檗余甘子汤不同部位对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响 为了评价小檗余甘子汤不同部位对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响, 选取了各个部位对 HepG2 细胞活性均无明显影响的质量浓度 (200、100、50 μg/mL) 作为给药浓度, 结果如图 5 所示。与对照组相比, 模型组葡萄糖消耗量显著降低 ($P < 0.001$), 表明成功建立 IR-HepG2 细胞模型。与模型组比较, 给予不同剂量的小檗余甘子汤各部位后, 葡萄糖消耗量出现不同程度的增加。其中, 二甲双胍阳性药组, CD 高、中剂量组和 SM 高、中剂量组的葡萄糖消耗量显著上升 ($P < 0.05, 0.001$), 而 TS 和 SD 组没有显著性差异。这些结果表明, 小檗余甘子汤中形成的纳米超分子可显著改善 HepG2 细胞的胰岛素抵抗, 且药效与小檗余甘子汤全汤相当, 而除去纳米超分子部位后改善 IR 作用消失, 说明纳米超分子是小檗余甘子汤改善 IR 的关键药效物质。

3.4.4 小檗余甘子汤纳米超分子部位对 IR-HepG2



与对照组比较: #P < 0.05 ###P < 0.001; 与模型组比较: *P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001, 下同。
#P < 0.05 ##P < 0.01 ###P < 0.001 vs control group; *P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001 vs model group, same as below.

图5 小檗余甘子汤不同部位对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effects of separated parts from Xiaoboyuganzi Decoction on glucose consumption in IR-HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

细胞 PI3K/AKT 信号通路的影响 如图 6 所示, 与对照组相比, 模型组细胞 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 显著降低 ($P < 0.01$), 说明 PI3K/AKT 信号在 IR 过程中被抑制。与模型组相比, SM 组细胞给药后 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 显著升高 ($P < 0.05, 0.001$), 说明小檗余甘子汤中形成的纳米超分子可通过激活 PI3K/AKT 信号通路改善 IR。同时发现两组结果中, SM 组的作用与 CD 组基本相当, 这与

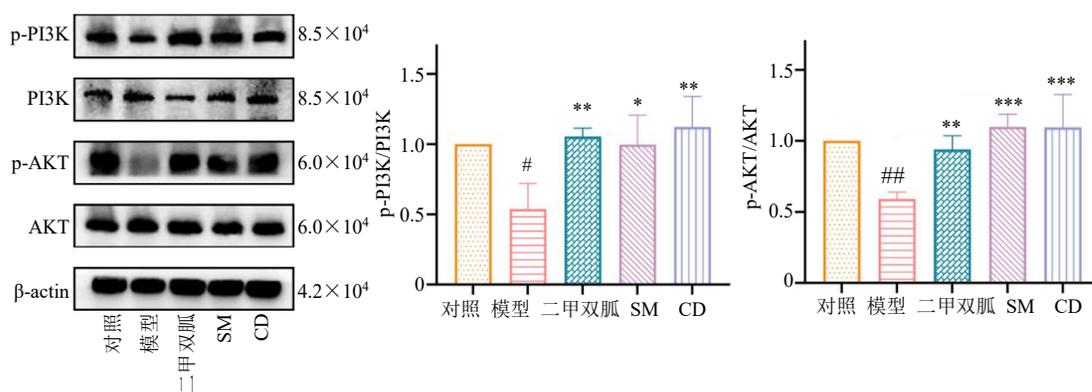


图6 药物对 IR-HepG2 细胞 PI3K、AKT 蛋白磷酸化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of drug on PI3K/AKT protein phosphorylation in IR-HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

前面药效评价结果一致，表明纳米超分子是小檗余甘子汤的关键药效物质。

4 讨论

汤剂也称为汤液，系指将饮片加水煎煮得到的液体制剂。现代研究表明，复方汤剂中存在着众多粒径在纳米尺度的超分子物质，并被证明具有独特的性质和功能^[4-5]。例如，从芍药甘草汤分离出的超分子物质可有效治疗小鼠的银屑病，呈剂量相关性，并且与芍药甘草汤的药效活性基本相同^[10]。同样，葛根芩连汤中的超分子聚集物颗粒具有和全汤相当的抗糖尿病活性，且降糖作用优于上清液^[11]。此外，从白虎汤中分离得到的纳米颗粒的解热效果甚至要优于白虎汤^[12]。由此可见，复方汤剂的疗效不仅取决于其含有的化学成分，还与其成分间相互作用形成的超分子物质有关。因此，本研究对小檗余甘子汤的纳米超分子进行分离和表征，并探究其改善胰岛素抵抗活性及作用机制。

通过对小檗余甘子汤中纳米超分子的分离及粒径测定，发现煎液中存在尺度约为 514 nm 的颗粒。通过 SEM 进一步观察其微观形态，发现煎液中聚集体为球形颗粒，大小较为均一、形状圆润，从而证明小檗余甘子汤煎液中确实存在纳米级超分子物质。基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术对纳米超分子部位进行化学表征，发现其主要成分为以小檗碱为代表的生物碱类和以没食子酸为代表的多酚类。有研究表明，生物碱类成分在煎煮过程中易与酸性成分发生分子自组装形成超分子体系，如小檗碱与大黄酸可通过 $\pi-\pi$ 相互作用自组装形成纳米颗粒^[13]；小檗碱与黄芩苷可通过静电和疏水作用形成纳米颗粒^[14]；小檗碱与肉桂酸可通过氢键和

$\pi-\pi$ 相互作用自组装形成球形纳米颗粒^[15]；熊去氧胆酸与小檗碱可通过静电和疏水作用形成类四面体型纳米颗粒^[16]。由此推断，小檗皮的生物碱类成分与余甘子的酸性成分在煎煮过程中可能通过氢键、疏水作用、静电作用、 $\pi-\pi$ 相互作用等非共价键作用而形成纳米超分子，其具体形成机制还有待进一步研究。

T2DM 为严重影响人类生活质量的十大疾病之一。胰岛素抵抗是 T2DM 的核心病理基础，肝细胞糖代谢的紊乱对胰岛素抵抗的发生具有重要的意义^[17]。HepG2 细胞是一种人源肝癌细胞系，细胞表型与正常肝细胞极为相似，且表面存在与胰岛素高亲和力结合的胰岛素受体，体外易于培养，是目前从细胞层次研究胰岛素抵抗的理想模型。故本研究建立 IR-HepG2 细胞模型评价小檗余甘子汤中纳米超分子物质的药效作用及机制。结果发现，纳米超分子部位可以促进 IR-HepG2 细胞的葡萄糖摄取，明显改善胰岛素抵抗，且药效与小檗余甘子汤全汤相当。此外，PI3K/AKT 信号通路为胰岛素调控血糖平衡的关键通路之一，是葡萄糖吸收利用、调节血糖平衡的主要转导途径^[18]。PI3K 是由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 所组成的异二聚体；AKT 又称蛋白激酶 B，是 PI3K 信号通路下游的重要靶蛋白^[19-20]。现代研究表明，胰岛素可通过胰岛素受体蛋白激活 PI3K/AKT 信号通路，增加胰岛素敏感性，激活的 AKT 影响下游蛋白的表达和膜转位，进而促进细胞摄取葡萄糖、氨基酸及脂肪酸，促进糖原蛋白质和三酰甘油的合成^[21]。在 IR 状态下，受胰岛素的刺激，PI3K/AKT 信号通路传导作用会被减弱^[18]。Western blotting 研究结果发现，小檗余甘子汤中形成的纳米超分子能显著上调 IR-HepG2 细胞 p-PI3K/

PI3K 和 p-AKT/AKT 蛋白表达,表明其改善胰岛素抵抗作用可能与激活 PI3K/AKT 信号通路有关。

综上所述,本研究通过离心透析法从小檗余甘子汤中分离得到了纳米超分子物质,并发现可明显改善胰岛素抵抗,其作用机制可能与激活 PI3K/AKT 信号通路有关。此外,我们发现纳米超分子物质的药效与小檗余甘子汤全汤相当,而除去纳米超分子后改善 IR 作用消失,表明纳米超分子可能是小檗余甘子汤治疗 T2DM 的关键药效物质。然而,本研究未对小檗余甘子汤中纳米超分子具体形成过程进行探究,其形成机制尚不明晰,且未进行体内药效学验证,今后仍需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 魏吉昌,林晓钰,张景怡,等. 基于相态变化探讨煎煮方式对黄芩-黄连超分子物质基础及配伍“和合”机制的影响 [J]. 中草药, 2024, 55(24): 8366-8378.
- [2] 肖航,黄菊,孟祥瑞,等. 中药大分子口服吸收起效:物相结构新角度及研究模式 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(2): 285-291.
- [3] Fan J M, Yu H, Lu X, *et al.* Overlooked spherical nanoparticles exist in plant extracts: From mechanism to therapeutic applications [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, doi: 10.1021/acsami.2c19065.
- [4] 胡静雯,贾国香,董亚倩,等. 从中药全过程视角探析纳米颗粒自组装行为及应用 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7307-7316.
- [5] 沈成英,胡菲,朱君君,等. 中药自组装纳米粒的形成及应用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(19): 4875-4880.
- [6] Zhuang Y, Yan J J, Zhu W, *et al.* Can the aggregation be a new approach for understanding the mechanism of traditional Chinese medicine? [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(2): 378-384.
- [7] 周曼,吴军,干定云,等. HGF 通过 p-Src 调控 MAPK/PI3K/AKT 信号通路介导 HepG2 细胞胰岛素抵抗的作用机制 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(15): 3782-3787.
- [8] 宇妥·元丹袁波著. 马世林等译. 四部医典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 66.
- [9] 李艳. 藏药小檗皮 DNA 条形码鉴定及质量控制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [10] 秦祉剑,闫巧,杭凌宇,等. 芍药甘草汤自组装纳米粒的分离、表征及抗小鼠眼屑病的研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(8): 2116-2125.
- [11] 吴殿芳,柯李晶,刘宏波,等. 葛根芩连汤及其聚集物颗粒对 STZ 诱导 2 型糖尿病大鼠的降糖作用研究 [J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2014, 42(6): 957-962.
- [12] Lü S W, Su H, Sun S, *et al.* Isolation and characterization of nanometre aggregates from a Bai-Hu-Tang decoction and their antipyretic effect [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12209.
- [13] Tian X H, Wang P L, Li T, *et al.* Self-assembled natural phytochemicals for synergistically antibacterial application from the enlightenment of traditional Chinese medicine combination [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(9): 1784-1795.
- [14] Li T, Wang P L, Guo W B, *et al.* Natural berberine-based Chinese herb medicine assembled nanostructures with modified antibacterial application [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(6): 6770-6781.
- [15] Huang X M, Wang P L, Li T, *et al.* Self-assemblies based on traditional medicine berberine and cinnamic acid for adhesion-induced inhibition multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(1): 227-237.
- [16] 高杉,高丰,孔靖玮,等. 基于弱键诱导的超分子体系探究熊去氧胆酸-小檗碱超分子对溃疡性结肠炎的治疗作用 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(10): 2739-2748.
- [17] 陈瑶,徐国良,李冰涛,等. 葛根芩连汤含药血清对 IR-HepG2 细胞糖代谢调控关系分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(10): 156-160.
- [18] 李斌,范源,李鑫. 基于 PI3K/Akt 信号通路的中药治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗研究进展 [J]. 中成药, 2017, 39(1): 151-154.
- [19] Breitbart H, Rotman T, Rubinstein S, *et al.* Role and regulation of PI3K in sperm capacitation and the acrosome reaction [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 314(2): 234-238.
- [20] Jabbour E, Ottmann O G, Deininger M, *et al.* Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematologic malignancies [J]. *Haematologica*, 2014, 99(1): 7-18.
- [21] 平菁,王玉婷,张坤宇,等. 基于 PI3K/AKT/GLUT4 通路探讨健脾养阴调脂方对糖尿病性脂肪体外模型糖脂代谢的影响 [J]. 中药材, 2024, 47(11): 2869-2875.

[责任编辑 王文倩]