

白虎加人参汤对MKR糖尿病鼠肝脏PI3K/Akt信号通路的影响

陈昱彤, 喻嵘*, 吴玉琴, 向琴, 谭艳, 周聪
(湖南中医药大学, 长沙 410208)

[摘要] 目的:探究白虎加人参汤对MKR糖尿病模型小鼠肝脏磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路相关分子的作用。方法:选取30只6周龄MKR小鼠,经高脂饲料喂养4周后予以腹腔注射链脲佐菌素(STZ)进行糖尿病造模,检测空腹血糖值 $\geq 11.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 即造模成功,造模成功后随机分成模型组、白虎加人参汤组、二甲双胍组,每组各10只,同时设10只FVB鼠为空白组,各药物干预组分别持续给药28 d,药物剂量分别为白虎加人参汤组 $12.09 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、二甲双胍组 $0.065 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。给药结束后处死小鼠检测口服葡萄糖耐量实验(OGTT)及空腹血糖(FBG),半定量酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定血清极低密度脂蛋白(VLDL)含量,血生化仪测定血脂4项;肝脏组织进行苏木素-伊红(HE)病理学检测;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠肝脏组织PI3K、Akt、磷酸化PI3K(p-PI3K)、磷酸化Akt(p-Akt)、叉头框蛋白O1(FoxO1)、胰岛素受体(InsR)、胰岛素受体底物-2(IRS-2)蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测小鼠肝脏组织PI3K、Akt、FoxO1、InsR、IRS-2 mRNA表达。结果:与空白组比较,模型组小鼠一般情况较差,糖耐量异常($P<0.05$),空腹血糖显著升高($P<0.01$),血脂代谢异常,血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、VLDL水平明显升高($P<0.05$),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平明显降低($P<0.05$),肝脏细胞脂肪样变性,发生明显病理改变,肝脏组织PI3K、Akt、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、IRS-2、InsR蛋白含量明显降低($P<0.05$);FoxO1蛋白含量明显增加($P<0.05$),肝脏组织PI3K、Akt、IRS-2、InsR mRNA表达量减少($P<0.05$),FoxO1 mRNA表达量增加($P<0.05$)。与模型组比较,白虎加人参汤组小鼠一般情况出现好转,糖脂代谢得到改善($P<0.05$),肝脏细胞病理状态好转,肝脏组织PI3K、Akt、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、IRS-2、InsR蛋白含量明显升高($P<0.05$);FoxO1蛋白含量明显降低($P<0.05$),肝脏组织PI3K、Akt、IRS-2、InsR mRNA表达量增加($P<0.05$),FoxO1 mRNA表达量减少($P<0.05$)。结论:白虎加人参汤能有效降低MKR糖尿病小鼠血糖、调节血脂代谢并改善其肝脏的病理状态,其作用机制可能是通过调控PI3K/Akt通路上信号分子的活性有关。

[关键词] 白虎加人参汤; 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路; 2型糖尿病; 糖脂代谢

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5;R587.1;R255.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)05-0114-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230594

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220816.1122.006.html>

[网络出版日期] 2022-08-16 12:01:33

Effect of Baihu Jia Ren Shen Tang on PI3K/Akt Signaling Pathway in Liver of MKR Diabetic Mice

CHEN Yutong, YU Rong*, WU Yuqin, XIANG Qin, TAN Yan, ZHOU Cong
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Baihu Jia Ren Shen Tang (BHRS) on the related molecules on the phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway in the liver of MKR diabetic model mice. **Method:** Thirty 6-week-old MKR mice were selected and fed on a high-fat diet for four weeks, followed by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) for the diabetes model establishment. The model was properly induced in the case of the fasting blood glucose (FBG) of $\geq 11.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. After modeling, the mice were randomly divided into a model group, a BHRS group ($12.09 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and a

[收稿日期] 2022-04-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82074400,82004185)

[第一作者] 陈昱彤,在读硕士,从事仲景杂病证治及经方应用基础研究,E-mail:953947215@qq.com

[通信作者] *喻嵘,博士,教授,从事仲景杂病证治及经方应用基础研究,E-mail:yuron@21.cn.com

metformin group ($0.065 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), with 10 mice in each group. Ten FVB mice were assigned to the control group. The mice in the groups with drug intervention were continuously administered correspondingly for 28 days. After administration, the mice were sacrificed, followed by the oral glucose tolerance test (OGTT) and FBG detection. Serum very low-density lipoprotein (VLDL) content was determined by semi-quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Four indexes related to blood lipid were determined by the biochemistry analyzer. Liver tissues were subjected to pathological examination by hematoxylin-eosin (HE) staining. Western blot was used to detect the protein expression of PI3K, Akt, phosphorylated(p)-PI3K, p-Akt, forkhead box protein O1 (FoxO1), insulin receptor (InsR), and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) in liver tissues of mice. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression of PI3K, Akt, FoxO1, InsR, and IRS-2 in liver tissues of mice. **Result:** Compared with the control group, the model group showed poor general conditions, abnormal glucose tolerance ($P < 0.05$), increased FBG ($P < 0.01$), abnormal blood lipid metabolism, increased serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and VLDL ($P < 0.05$), decreased level of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) ($P < 0.05$), fatty degeneration and obvious pathological changes of liver cells, reduced protein expression of PI3K, Akt, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, IRS-2, and InsR in liver tissues ($P < 0.05$), increased protein expression of FoxO1 ($P < 0.05$), decreased mRNA expression of PI3K, Akt, IRS-2, and InsR in liver tissues ($P < 0.05$), and increased FoxO1 mRNA expression ($P < 0.05$). Compared with the model group, the BHRS group showed improved general conditions and glucose and lipid metabolism ($P < 0.05$), improved pathological state of liver cells, increased protein expression of PI3K, Akt, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, IRS-2, and InsR in liver tissues ($P < 0.05$), decreased protein expression of FoxO1 ($P < 0.05$), increased mRNA expression of PI3K, Akt, IRS-2, and InsR in liver tissues ($P < 0.05$), and reduced FoxO1 mRNA expression ($P < 0.05$). **Conclusion:** BHRS can effectively reduce blood glucose, regulate blood lipid metabolism, and improve the pathological state of the liver in MKR diabetic mice, and its mechanism of action may be related to the regulation of the activity of molecules on the PI3K/Akt signaling pathway.

[Keywords] Baihu Jia Renshen Tang; phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway; type 2 diabetes; glucose and lipid metabolism

糖尿病(DM)是一种以血糖升高为主要特征的代谢性疾病^[1-2],长期慢性高血糖可造成心、脑、肾、眼、骨头等多个器官、组织的损害,诱发或提高其他病症的发病率与死亡率。有流行病学研究表明,2型糖尿病(T2DM)与癌症、肿瘤之间的相关性较1型糖尿病(T1DM)而言,更为密切^[3-4],T2DM很可能是导致癌症、肿瘤等大型疾病死亡率升高的危险因素之一,也是出现成人死亡的主要诱因之一^[5-9]。我国T2DM占比约为DM人群93.7%^[10-11]。胰岛素抵抗是T2DM发病的核心环节^[12],糖脂代谢的异常是胰岛素抵抗产生的重要因素,胰岛素抵抗又会加剧糖脂代谢紊乱^[13-14]。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路是胰岛素下游的主要分子通路,激活PI3K和Akt信号分子,抑制下游叉头框蛋白O1(FoxO1)信号分子,起到促进糖原生成、抑制糖异生作用,使人体糖脂代谢稳态达到平衡,提高胰岛素敏感,是治疗T2DM的重要途径^[15-16]。

DM隶属于中医学“消渴”范畴,张仲景所著《金匮要略·消渴小便不利淋病脉证并治》曰:“趺阳脉浮而数,浮即为气,数即消谷而大坚,气盛则溲数,溲数即坚,坚数相搏,即为消渴。”认为胃热亢盛是消渴重要发病基础,并首创具有清热益气、泻火生津功效的白虎加人参汤进行治疗。《黄帝内经》载:“肥者令人内热,甘者令人中满,故其气上溢,转为消渴。”揭示了内热是消渴的关键病机,饮食肥甘厚味导致是内热的重要因素。现代高热量、高脂、高糖饮食皆属于肥甘厚味,长期的高热量饮食,糖脂能量堆积是导致DM发生的重要原因与中医消渴的发病机制不谋而合。课题组前期研究结果发现,白虎加人参汤能下调血清中炎症因子白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平,抑制氧化应激,良好地改善MKR DM模型小鼠的炎症反应及糖脂毒性^[17-20]。本研究进一步探究白虎加人参汤对肝脏PI3K/Akt通路上

信号分子的影响,探讨白虎加人参汤治疗T2DM的作用机制。

1 材料

1.1 动物 由美国国立卫生研究院DM研究中心LeRoith D教授提供的纯合子MKR小鼠,其为骨骼肌特异性胰岛素样生长因子-1受体功能缺陷所导致的DM小鼠,本课题组按实验管理条例对MKR小鼠进行配种繁殖(伦理审批编号ZYFY20201229),饲养于湖南中医药大学SPF级实验动物中心[SYXK(湘)2013-0005],用于课题组相关实验研究,于北京斯贝福生物技术有限公司购买10只同龄FVB小鼠,许可证号SCXK(京)2019-0010,设为空白组,其为MKR小鼠同一遗传背景小鼠。所有小鼠均置于12/12 h明暗交替,温度(24±2)°C,相对湿度(50±10)%的环境中,提供相应水和食物,自主食用。

FVB鼠使用普通饲料喂养,普通饲料含碳水化合物60%、蛋白质20%、脂肪10%、其他10%(江苏省协同生物有限公司,批号SWC9101);MKR鼠造模使用高脂饲料喂养,高脂饲料含猪油15%、胆固醇1%、普通饲料84%(江苏省协同生物有限公司,批号D12492)。

1.2 药物 盐酸二甲双胍片(浙江亚太药业股份有限公司,批号H33020106,0.25 g×48片),葡萄糖溶液(湖南科伦制药有限公司,批号H20058338,规格0.5 g·mL⁻¹),白虎加人参汤相关药物组成为知母(批号202106150)、甘草(批号210502)、石膏(批号SAO247)、人参(批号210429)、粳米(联丰农贸市场),上述药物除粳米外均购于湖南中医药大学第一附属医院药房。

1.3 试剂 小鼠极低密度脂蛋白(VLDL)酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号SU-B20420),小鼠高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)ELISA检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为A112-1-1、A113-1-1、A111-2-1、A110-1-1),PI3K抗体(美国CST公司,货号4249S),Akt、磷酸化(p)-PI3K抗体(英国Abcam公司,货号分别为ab179463、ab182651),胰岛素受体(InsR)、胰岛素受体底物-2(IRS-2)、FoxO1、p-Akt、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)、HRP标记的山羊抗兔二抗(美国Proteintech公司,货号分别为20433-1-AP、20702-1-AP、18592-1-AP、66444-1-Ig、60008-1-Ig、SA00001-1、SA00001-2),苏木素染液、伊红染液(武汉谷歌

生物科技有限公司,货号分别为G1004、G1001)。

1.4 仪器 GA-3型血糖仪(三诺生物传感股份有限公司),H1650R型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),PIKOREAL96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time RCP)仪、SPL0960型荧光PCR板(美国Thermo公司),MB-530型多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司),DYY-6C型电泳仪、DYZC-40D转膜仪(中国北京六一生物科技有限公司),BA410E型三目生物显微镜(麦克奥迪实业集团中国有限公司)。

2 方法

2.1 白虎加人参汤制备 根据《方剂学》清热剂中白虎加人参汤的剂量,称取石膏50 g、知母18 g、炙甘草6 g、粳米9 g、人参10 g,于8倍的蒸馏水中浸泡30 min后,再煎煮30 min,倒出药液,再加入6倍的蒸馏水,煎煮25 min,合并2次煎煮的药液,用纱布过滤,使用旋转蒸发器将过滤后的药液浓缩至含生药量2 g·mL⁻¹,放置于4 °C冰箱备用。

2.2 DM小鼠模型的构建及分组 选取30只6周龄MKR小鼠,雌雄对半,食用高脂饲料28 d后,用浓度为0.1 mol·L⁻¹的柠檬酸缓冲液(pH 7.4)配置40 mg·kg⁻¹链脲佐菌素(STZ)溶液,连续腹腔注射5 d,建立T2DM模型。在72 h后测量空腹8 h血糖,以空腹血糖值 ≥ 11.1 mmol·L⁻¹为标准将符合条件的小鼠使用普通维持饲料喂养,将造模成功后的小鼠根据空腹血糖、性别、体质量随机分为模型组、白虎加人参汤组、二甲双胍组,每组10只。取同龄FVB鼠10只作为空白组采用普通维持饲料喂养。

2.3 给药 按人与动物体表面积等效剂量系数折算法^[21],选用70 kg成人药物用量换算,白虎加人参汤灌胃剂量白虎加人参汤组12.09 g·kg⁻¹·d⁻¹、二甲双胍组0.065 g·kg⁻¹·d⁻¹。空白组则以等体积蒸馏水灌胃,持续28 d。

2.4 样本采集 灌胃4周结束后,各组小鼠禁食不禁水过夜,在麻醉缸内铺上医用棉球,倒入乙醚,放入实验小鼠使其麻醉,待小鼠麻醉倒下后取出。采用摘眼球眼眶处取血,收集血样,静置后使用冷冻离心机3 000 r·min⁻¹,离心10 min(离心半径15 cm)得到血清。迅速打开小鼠腹腔,分离出小鼠完整肝脏,保存所需肝脏组织。

2.5 指标检测

2.5.1 一般情况观察 观察记录饮水、饮食、排尿情况;毛发、活动状态;体质量、空腹血糖情况等,测

取空腹血糖时,小鼠应提前断食不断水8 h,在其尾巴末端采血,使用血糖仪进行检测。

2.5.2 口服葡萄糖耐量试验(OGTT) 在药物治疗4周后进行糖耐量试验,断食不断水8 h,每只小鼠灌胃体积分数为20%葡萄糖,灌胃体积 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,分别用采血针于0、15、30、60、120 min从尾梢取血样,用血糖仪进行血糖测量,记录数据,并计算糖耐量曲线下沉面积(AUC)。

2.5.3 血清指标检测 血清进行了VLDL及血脂4项指标检测。参照ELISA试剂盒说明书方法进行检测,血脂4项由南京建成生物工程研究所采用全自动生化仪进行检测。

2.5.4 苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏组织病理 4%多聚甲醛固定组织24 h以上;通风橱内将组织修块,流水冲洗12 h;梯度乙醇逐步使组织脱水(体积分数由低到高),随后置于二甲苯中使其透明;融化的石蜡包埋组织;将石蜡组织切成 $4\ \mu\text{m}$ 的薄片,热水上展片,载玻片固定,烤片机烘干;二甲苯使石蜡切片脱蜡,梯度乙醇逐步使切片脱水(浓度由高到低),再以蒸馏水浸洗;苏木素染色5 min后流水冲洗,再于盐酸-乙醇中分化约1 min,再用流水冲洗,伊红染色2 min后流水冲洗;梯度乙醇逐步使组织脱水(体积分数由低到高),随后置于二甲苯中使其透明;中性树脂封片,光学显微镜下观察并拍摄照片。

2.5.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 检测肝脏组织蛋白表达取肝脏组织标本提取总蛋白,根据蛋白定量的结果,每孔上样 $10\ \mu\text{L}$,电泳结束后电转移到硝酸纤维素膜(NC膜), $4\ ^\circ\text{C}$ 封闭过夜,封闭后加入p-PI3K(1:750)、FoxO1(1:1 000)、PI3K(1:1 000)、InsR(1:1 000)、IRS-2(1:500)、Akt(1:10 000)、p-Akt(1:3 000)、 β -actin(1:5 000),室温孵育90 min。再加入HRP标记山羊抗鼠IgG(1:5 000)、山羊抗兔IgG(1:6 000),室温孵育90 min。使用ECL化学发光液与膜孵育1 min,在暗盒内与X射线胶片曝光20 min显影冲洗。以 β -actin蛋白表达量校正,用Quantity One专业灰度分析软件进行数据分析。

2.5.6 Real-time PCR检测相关mRNA表达 将肝脏组织总RNA采用TRIzol法提取。采用逆转录PCR两步法,根据逆转录试剂盒说明书逆转录RNA,得到cDNA,再以cDNA为模板进行扩增目的基因。反应体系为 $20\ \mu\text{L}$,设置反应条件为 $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性2 min, $95\ ^\circ\text{C}$ 变性15 s, $55\ ^\circ\text{C}$ 退火15 s,循环

40次。最终数据以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对定量。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
InsR	上游 TCCGCCGCTCCTATGCTCT	111
	下游 TCTGGTTGTCCAAGGCATAA	
IRS-2	上游 CCAACGGGGACTACCTCAAC	180
	下游 ACTGGTCATTGTCTCCGCTG	
FoxO1	上游 ATCTGCCATGAACCGCTTGACC	129
	下游 ACACCCATCCTACCATAGCCAT	
PI3K	上游 GTCCGTCCTGGAGAACTTGG	152
	下游 TGAGGCGTTTCTGGATTGC	
Akt2	上游 CCCTGACCAGACCTTACCC	178
	下游 GATAGCCCGCATCCACTC	
β -actin	上游 ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	223
	下游 TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	

2.6 统计学分析 使用SPSS 25.0进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组计量资料满足正态性、方差齐性采用单因素方差分析,组间采用最小显著性差异法(LSD)进行比较;若不满足方差齐性采用Dunnett-T3检验,不满足正态性时,采用秩和检验;以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠一般情况和空腹血糖的影响 空白组小鼠精神状态、毛色、进食、活动等情况较好,性情较为温和,实验期间各方面状况稳定;经高脂喂养和STZ诱导后的MKR DM模型小鼠反应稍迟钝、脾气较为暴躁,有打架斗殴现象,且伤口溃烂较难愈合,雄性小鼠更为突出,皮毛粗糙且有脱毛倾向、饮水量、食量更旺盛。在白虎加人参汤和二甲双胍干预后,药物组小鼠均可见不同程度减轻与好转。

造模前,各组小鼠空腹血糖(FBG)组间比较差异无统计学意义。造模4周后,与空白组比较,模型组与各药物组小鼠空腹血糖显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。给药28 d后,与模型组比较,各药物组小鼠FBG显著下降($P<0.01$),血糖由高到低顺序为模型组>白虎加人参汤组>二甲双胍组>空白组,药物组之间比较,二甲双胍组和白虎加人参汤组的降糖效果差异无统计学意义。见表2。

3.2 对小鼠OGTT的影响 与空白组比较,模型组小鼠AUC明显升高($P<0.05$),与模型组比较,白虎加人参汤组和二甲双胍组AUC明显降低($P<0.05$),

表2 白虎加人参汤对小鼠FBG的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	造模前	造模4周后	给药4周后
空白组		5.46±0.92	5.40±0.62	5.33±0.47
模型组		5.63±0.64	14.27±3.06 ¹⁾	16.90±5.16 ¹⁾
白虎加人参汤组	12.09	5.80±1.56	15.33±3.11 ¹⁾	8.50±0.90 ²⁾
二甲双胍组	0.065	5.53±1.18	15.97±3.67 ¹⁾	7.30±2.01 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01

各组小鼠AUC曲线结果从高至低依次为模型组、二甲双胍组、白虎加人参汤组、空白组。与空白组比较,模型组0、15、30、60、120 min血糖值明显升高

(P<0.05);与模型组比较白虎加人参汤组和二甲双胍组血糖值均明显降低(P<0.05)。白虎加人参汤组与二甲双胍组比较差异无统计学意义。见表3。

表3 白虎加人参汤对小鼠GOTT的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	OGTT/mmol·L ⁻¹					AUC
		0 min	15 min	30 min	60 min	120 min	
空白组		5.90±1.25	18.33±3.77	16.65±4.55	14.65±5.30	6.95±0.99	24.27±5.82
模型组		14.60±2.02 ¹⁾	28.00±3.64 ¹⁾	30.94±3.71 ¹⁾	22.76±6.63 ¹⁾	19.32±4.37 ¹⁾	45.85±8.13 ¹⁾
白虎加人参汤组	12.09	8.43±1.23 ²⁾	22.23±4.31 ²⁾	19.50±4.95 ²⁾	13.63±2.58 ²⁾	8.72±1.40 ²⁾	26.44±3.52 ²⁾
二甲双胍组	0.065	8.30±1.14 ²⁾	25.08±3.02 ²⁾	20.18±3.02 ²⁾	15.70±2.43 ²⁾	8.23±1.96 ²⁾	28.05±3.90 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05

3.3 对小鼠血脂代谢的影响 研究结果显示,与空白组比较,模型组血清TC、TG、LDL-C、VLDL水平显著升高(P<0.01),血清HDL-C水平显著降低(P<0.01)。与模型组比较,白虎加人参汤组和二甲双胍

组小鼠血清TC、TG、LDL-C、VLDL水平明显降低(P<0.05),血清HDL-C水平明显增高(P<0.05);白虎加人参汤组与二甲双胍组比较差异无统计学意义。见表4。

表4 白虎加人参汤对小鼠脂肪代谢的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

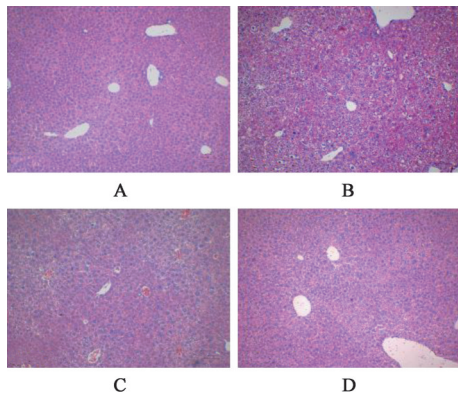
组别	剂量/g·kg ⁻¹	HDL-C	LDL-C	TG	TC	VLDL
空白组		4.06±0.47	0.52±0.25	1.35±0.08	2.30±0.85	6.31±0.28
模型组		1.53±0.70 ¹⁾	1.84±0.27 ¹⁾	3.99±0.50 ¹⁾	5.87±0.71 ¹⁾	15.38±0.38 ¹⁾
白虎加人参汤组	12.09	2.54±0.11 ²⁾	0.93±0.16 ²⁾	1.66±0.67 ²⁾	2.67±0.76 ²⁾	7.93±1.33 ²⁾
二甲双胍组	0.065	2.73±0.65 ²⁾	0.92±0.15 ²⁾	2.15±0.70 ²⁾	3.19±0.11 ²⁾	7.92±0.31 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05

3.4 对小鼠肝脏组织病理的影响 研究结果显示,空白组小鼠肝组织结构完整,呈索条状,排列规整,并呈放射状,肝细胞以双核和多核常见,形态清晰,结构清楚,胞浆均匀,无明显变性坏死,肝窦结构无异常,未见明显炎症浸润。模型组小鼠肝组织可见肝细胞索排有失规整,细胞肿胀明显,体积增大,肝细胞胞浆内存在大量大小不等的脂滴,能清楚看到多个空泡,并以弥漫性脂肪变性为主,可见少数炎症细胞浸润。白虎加人参汤组、二甲双胍组相较模型组,肝细胞索排列改善,脂肪空泡减少,胞浆较丰

富,有轻微炎症细胞浸润;药物组比较,白虎加人参汤组肝细胞肿胀略微明显,脂滴量也偏多,炎症浸润也更明显。结果表明,药物干预对MKRDM模型小鼠肝脏组织的病理变化有一定缓解,但二甲双胍对于肝脏细胞的病理改变较白虎加人参汤效果更好。见图1。

3.5 对小鼠肝脏组织IRS-2、InsR、FoxO1蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠肝脏组织IRS-2、InsR蛋白含量明显降低(P<0.05),FoxO1蛋白含量明显升高(P<0.05)。与模型组比较,白虎加



注: A. 空白组; B. 模型组; C. 白虎加人参汤组; D. 二甲双胍组 (图2和图3同)

图1 白虎加人参汤对小鼠肝脏组织病理的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effect of Baihu Jia Ren Shen Tang on histopathology of liver in mice (HE, ×100)

人参汤组和二甲双胍组 InsR、IRS-2 蛋白表达量明显上升 ($P < 0.05$), FoxO1 蛋白含量明显下降 ($P < 0.05$)。与二甲双胍组比较, 白虎加人参汤组 InsR 蛋白表达量明显降低 ($P < 0.05$), IRS-2、FoxO1 蛋白表达量差异无统计学意义。见图2、表5。

表5 白虎加人参汤对小鼠肝脏组织 InsR、IRS-2、FoxO1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effect of Baihu Jia Ren Shen Tang on InsR, IRS-2 and FoxO1 protein expressions in liver tissues of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	InsR/β-actin	IRS-2/β-actin	FoxO1/β-actin
空白组		0.61±0.03	0.57±0.11	0.40±0.02
模型组		0.24±0.02 ¹⁾	0.15±0.02 ¹⁾	0.57±0.30 ¹⁾
白虎加人参汤组	12.09	0.35±0.05 ^{2,3)}	0.30±0.03 ²⁾	0.50±0.04 ²⁾
二甲双胍组	0.065	0.50±0.06 ²⁾	0.42±0.07 ²⁾	0.46±0.02 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$; 与二甲双胍组比较³⁾ $P < 0.05$ (表6同)

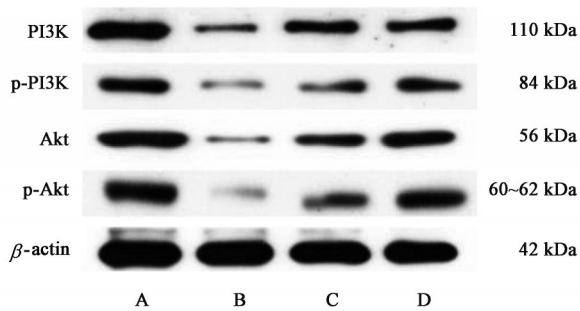


图3 各组小鼠肝脏组织 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白电泳

Fig. 3 Electrophoresis of PI3K, P-PI3K, Akt, p-Akt protein expression in liver tissue of mice in each group

3.7 对 各 组 小 鼠 肝 脏 组 织 PI3K、Akt、FoxO1、InsR、IRS-2 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 模型组肝脏组织 PI3K、Akt、InsR、IRS-2 mRNA 表达量明显减少 ($P < 0.05$), FoxO1 mRNA 表达量明显增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 白虎加人参汤组和二甲双胍组

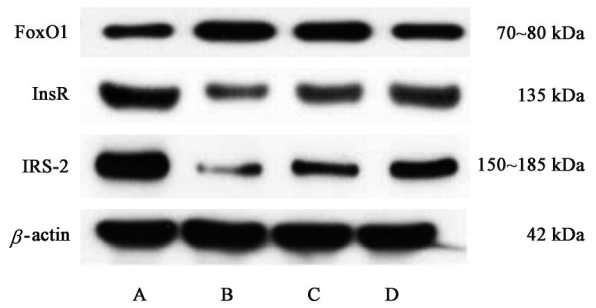


图2 各组小鼠肝脏组织 InsR、IRS-2、FoxO1 蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoresis of InsR, IRS-2 and FoxO1 protein in liver tissue of mice in each group

3.6 对小鼠肝脏组织 PI3K、Akt 蛋白表达的影响

与空白组比较, 模型组小鼠肝脏组织 PI3K、Akt、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 白虎加人参汤组和二甲双胍组 PI3K、Akt、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 明显升高 ($P < 0.05$)。与二甲双胍组比较, 白虎加人参汤组 Akt 蛋白表达量明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), PI3K、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 差异无统计学意义。见图3、表6。

肝脏组织 PI3K、Akt、InsR、IRS-2 mRNA 表达量显著增加 ($P < 0.01$), FoxO1 mRNA 表达量显著减少 ($P < 0.01$)。与二甲双胍组比较, 白虎加人参汤组 PI3K、Akt、InsR、IRS-2 mRNA 表达量明显减少 ($P < 0.05$), FoxO1 mRNA 表达量明显增加 ($P < 0.05$)。见表7。

4 讨论

PI3K/Akt 信号通路是胰岛素下游的主要分子通路, 参与调控葡萄糖和脂质代谢, 与 DM 发病机制密不可分。InsR 和 IRS 为 PI3K/Akt 信号通路上游信号分子。InsR 由 2 个位于细胞膜外层的 α 亚基、2 个位于细胞质内的 β 亚基构成^[22]。肝脏 InsR 数量降低、突变、胰岛素受体抗体的产生, 都易导致胰岛素敏感性减弱, 从而引发胰岛素抵抗的产生, 有研究表明, 被敲除胰岛素受体基因的小鼠出生后出现严重的胰岛素抵抗导致 DM^[23-24]。胰岛素与胰岛素受体结合是通路信号传导的第一步, 当胰岛素

表6 白虎加人参汤对小鼠肝脏PI3K、Akt、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effect of Baihu Jia Renshen Tang on PI3K, Akt, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt protein expression in mouse liver ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K/ β -actin	Akt/ β -actin	p-Akt/Akt	p-PI3K/PI3K
空白组		0.69±0.03	0.64±0.08	0.89±0.04	0.67±0.07
模型组		0.27±0.03 ¹⁾	0.15±0.03 ¹⁾	0.64±0.06 ¹⁾	0.38±0.11 ¹⁾
白虎加人参汤组	12.09	0.44±0.03 ²⁾	0.35±0.08 ^{2,3)}	0.78±0.08 ²⁾	0.58±0.04 ²⁾
二甲双胍组	0.065	0.51±0.08 ²⁾	0.51±0.03 ²⁾	0.87±0.01 ²⁾	0.60±0.09 ²⁾

表7 白虎加人参汤肝脏组织PI3K、Akt、FoxO1、InsR、IRS-2 mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 7 Effect of Baihu Jia Renshen Tang on mRNA expressions of PI3K, Akt, FoxO1, InsR, and IRS-2 in liver tissues ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K	Akt	InsR	IRS-2	FoxO1
空白组		0.90±0.11	0.91±0.11	1.00±0.17	1.02±0.14	0.77±0.21
模型组		0.26±0.09 ¹⁾	0.12±0.03 ¹⁾	0.28±0.09 ¹⁾	0.24±0.04 ¹⁾	3.14±0.38 ¹⁾
白虎加人参汤组	12.09	0.46±0.06 ^{2,3)}	0.31±0.08 ^{2,3)}	0.58±0.12 ^{2,3)}	0.48±0.11 ^{2,3)}	1.44±0.29 ^{2,3)}
二甲双胍组	0.065	0.73±0.09 ²⁾	0.59±0.10 ²⁾	0.82±0.17 ²⁾	0.80±0.14 ²⁾	1.04±0.22 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.01;与二甲双胍组比较³⁾P<0.05

到达靶组织细胞后先与受体外面的 α 亚基结合,然后激活里面的 β 亚基使胰岛素受体磷酸化进而激活IRS。IRS是胰岛素转导过程中的关键因子,能连接受体和多种效应分子,最终传递并放大胰岛素信号。有研究提示,上调IRS-2表达水平,能提高胰岛 β 细胞功能,具有改善T2MD的作用^[25]。IRS被磷酸化后,会进一步激活PI3K,有实验研究发现,正常人体在胰岛素的刺激下,PI3K mRNA表达量会增加,而T2DM患者的含量却无变化。PI3K是一种二聚体复合物,由调节亚基的p85和催化亚基的p110构成,是参与胰岛素PI3K/Akt信号转导的关键信号分子。被激活后的PI3K,在内膜上产生第二信使3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3)能激活其下游关键靶蛋白Akt,是葡萄糖代谢的关键酶^[26],能激活下游的信号蛋白参与人体重要的生物学过程,调控葡萄糖代谢、蛋白质合成、细胞增殖并抑制细胞凋亡的通路,对脂肪形成、胰岛素抵抗起着重要的作用^[27]。葡萄糖转运子4(GLUT4)为葡萄糖转运的主要载体,其尤为依赖于胰岛素的刺激,活化后的Akt能上调GLUT4的水平,提高胰岛素敏感组织对葡萄糖的摄取,组织内的葡萄糖激酶能将摄取的葡萄糖激化合为糖原,糖原又能进一步合成糖原合成激酶3(GSK3),GSK3又能促进糖原的合成,同时PI3K对于GLUT4至细胞表面的转运也密切相关,对于激活葡萄糖的稳态平衡至关重要。环核苷酸依赖的磷酸二酯酶3B(PDE3B)为Akt的生理底物,激活后能抑制脂肪的分解,参与调控葡萄糖转运及脂肪的代谢。FoxO1是Akt的下游分子,是胰岛素敏感基因

的负性转录调节剂,能降低胰岛素敏感性,FoxO1的活化能促进肝脏糖异生的2个关键限速酶G6Pase和PEPCK的表达,抑制血清游离脂肪酸(FFA)代谢酶的活性,导致血糖上升,脂质堆积,促进胰岛素抵抗发生。激活后的Akt能抑制FoxO1的活性,减少葡萄糖的生成。FoxO1还能与载脂蛋白C-III(ApoC-III)启动子序列相结合,促进ApoC-III的表达,从而影响肝脏VLDL生成,参与糖异生和脂质合成,直接作用的靶向调节脂质代谢和葡萄糖稳态^[28-30]。

本实验结果显示,白虎加人参汤组和二甲双胍组小鼠肝脏组织PI3K、Akt、InsR、IRS-2蛋白含量增加,PI3K、Akt磷酸化水平增加,且FoxO1蛋白含量降低;肝脏组织PI3K、Akt、InsR、IRS-2 mRNA表达量增加,FoxO1 mRNA表达量减少。实验结果与理论相吻合,故认为调控PI3K/Akt信号通路相关信号分子的活性,是白虎加人参汤改善糖脂代谢的作用机制之一。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] KAHN S E, HULL R L, UTZSCHNEUDER K M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes[J]. Nature, 2006, 444: 840-846.
- [2] STUMVOLL M, GOLDSTEIN B J, HAEFTEN T W. Type 2 diabetes: Principles of pathogenesis and therapy [J]. Lancet, 2005, 365: 1333-1346.
- [3] COUGHLIN S S, CALLE E E, TERAS L R, et al. Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a

- large cohort of US adults[J]. *Am J Epidemiol*, 2004; 159(12):1160-1167.
- [4] CALLE E E, KAAKS R. Overweight, obesity and cancer epidemiologic evidence and proposed mechanisms [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(8): 579-591.
- [5] RILICART W, FERNANDEZ-REAL J M. No decrease in free IGF-1 with increasing insulin in obesity-related insulin resistance[J]. *Obes Res*, 2001, 9(10):631-636.
- [6] CHO N H, SHAW J E, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138:271-281.
- [7] 柴桂芳, 张峻, 张同华, 等. 糖尿病促进癌症发生的流行病学和病理生理学[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(20):4597-4601.
- [8] PRADHAN R, YU O, PLATT R W, et al. Long-term patterns of cancer incidence among patients with and without type 2 diabetes in the United Kingdom [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 185:109229.
- [9] 施奕万, 王华军, 郑小飞. 2型糖尿病骨折风险及相关机制研究进展[J]. *中国骨科临床与基础研究杂志*, 2020, 12(Z1):304-311.
- [10] 刘士勇. 国内外糖尿病防控现状[J]. *中国社区医师*, 2020, 36(26):13-14.
- [11] 陈晓丽, 计仁军. 糖尿病病因与发病机理[J]. *中国现代药物应用*, 2008(24):189-190.
- [12] ATEFI M, PISHDAD G R, FAGFIH S. The effects of canola and olive oils on insulin resistance, inflammation and oxidative stress in women with type 2 diabetes: A randomized and controlled trial [J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2018, 17:85-91.
- [13] SAJI M, RINGEL M D. The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 321:20-28.
- [14] YANG J, PARK M, COOK J R, et al. Leucine regulation of glucokinase and ATP synthase sensitizes glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells [J]. *Diabetes*, 2006, 55(1):193-201.
- [15] LI Y, TENG D, SHI X, et al. Prevalence of diabetes recorded in mainland China using 2018 diagnostic criteria from the American Diabetes Association: National cross sectional study [J]. *BMJ*, 2020, 369:m997.
- [16] 王富军, 王文琦. 《中国2型糖尿病防治指南(2020年版)》解读[J]. *河北医科大学学报*, 2021, 42(12):1365-1371.
- [17] 刘旭, 钟国威, 刘天晟, 等. 白虎加人参汤对MKR转基因2型糖尿病小鼠创面感染的作用[J]. *中草药*, 2022, 53(10):3032-3043.
- [18] 向琴, 蒋宛瑾, 喻嵘, 等. 白虎加人参汤对2型糖尿病小鼠肠道UCP2、AMPK表达及GLP-1分泌的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(12):1444-1448.
- [19] 蒋宛瑾, 谢聪, 喻嵘, 等. 白虎加人参汤对转基因2型糖尿病MKR小鼠肠道TLR4/NF- κ B信号通路及肠道屏障功能的影响[J]. *中草药*, 2020, 51(11):3005-3012.
- [20] 杨金伟, 马志辉, 赵灿, 等. 白虎加人参汤含药血浆对高糖环境下SD大鼠胰岛细胞增殖、凋亡及氧化应激水平的影响[J]. *中医杂志*, 2019, 60(22):1951-1956.
- [21] 徐叔云. *临床药理学*[M]. 北京:人民卫生出版社, 1989.
- [22] 赵威, 蒙向欣, 李娟, 等. 加味芪黄饮激活InsR-IRS-1-PI3K-GLUT4信号通路延缓糖尿病肾病的研究[J]. *广东药科大学学报*, 2020, 36(3):375-380.
- [23] KIDO Y, BURKS D J, WITHERS D J, et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2 [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(2):199-205.
- [24] KADOWA K T. Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106:459-465.
- [25] 闫春雷, 黄欣, 苏乐群. PGC-1 α 的转录调节和翻译后修饰[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2015, 31(1):12-19.
- [26] CAO Y S, SUN W, XU G Y. Fuzhu jiangtang granules combined with metformin reduces insulin resistance in skeletal muscle of diabetic rats via PI3K/Akt signaling [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57:660-668.
- [27] ZHANG Z Y, LIU H D, LIU J K. Akt activation: A potential strategy to ameliorate insulin resistance [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 156:107092.
- [28] TAO R Y, WANG C X, STOHR O, et al. Inactivating hepatic follistatin alleviates hyperglycemia [J]. *Nat Med*, 2018, 24:1058-1069.
- [29] WANG T, JIANG H M, CAO S J, et al. Baic alin and its metabolites suppresses gluconeogenesis through activation of AMPK or Akt in insulin resistant HepG-2 cells [J]. *Eur J Med Chem*, 2017(141):92-100.
- [30] CHEN J Y, LU Y, TIAN M Y, et al. Molecular mechanisms of FoxO1 in adipocyte differentiation [J]. *J Mol Endocrinol*, 2019, 62:R239-R253.

[责任编辑 王鑫]