

# 左归降糖清肝方对2型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病 MKR小鼠糖脂代谢的影响

王一阳, 邹俊驹, 陆源源, 向琴\*, 喻嵘\*  
(湖南中医药大学, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的:探讨左归降糖清肝方改善2型糖尿病(T2DM)合并非酒精性脂肪性肝病骨骼肌特异性胰岛素样生长因子-1受体功能缺失(MKR)小鼠糖脂代谢的作用机制。方法:以MKR小鼠为研究对象,高脂饲料喂养8周诱导形成NAFLD,随机分为模型组、二甲双胍组(0.067 g·kg<sup>-1</sup>)、左归降糖清肝方高、低剂量组(14.8、7.4 g·kg<sup>-1</sup>),同龄FVB小鼠10只作为正常组。分别药物治疗8周后,予以糖耐量测试(OGTT),取血清检测甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC),称取小鼠肝脏湿重,取肝组织进行苏木素-伊红(HE)染色、油红O染色观察组织病理形态变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织叉头框蛋白O1(FoxO1)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)、葡萄糖6磷酸酶(G6Pase)、载脂蛋白C3(ApoC-III)的mRNA表达及其蛋白表达情况。结果:与正常组比较,模型组小鼠空腹血糖、肝脏指数、血清TG、血清TC、OGTT水平显著上升( $P<0.01$ );与模型组比较,二甲双胍组及左归降糖清肝方组小鼠空腹血糖、肝脏指数显著下降( $P<0.01$ ),左归降糖清肝方高剂量组血清的TG、TC水平均明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),二甲双胍组及左归降糖清肝方高剂量组可以降低OGTT水平( $P<0.05$ );在组织病理上,与正常组比较,模型组小鼠可见肝组织脂滴及肝细胞内空泡减少,体积变大;与模型组比较,左归降糖清肝方组和二甲基胍组可见肝组织脂滴减少,肝细胞内空泡减少,体积变小;在分子层面,与正常组比较,模型组小鼠肝组织FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III的mRNA水平显著上调( $P<0.01$ ),FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III的蛋白表达显著上调( $P<0.01$ );与模型组比较,左归降糖清肝方组FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III的mRNA水平显著下调( $P<0.01$ ),FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III的蛋白表达显著下调( $P<0.01$ )。结论:左归降糖清肝方能改善T2DM合并NAFLD糖脂代谢并能修复肝脏病理损伤,可能是通过调控肝组织FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III相关蛋白的表达,达到调脂、降糖及延缓肝脏脂肪病变的作用。

**[关键词]** 左归降糖清肝方; MKR小鼠; 2型糖尿病(T2DM); 非酒精性脂肪性肝病; 糖脂代谢

**[中图分类号]** R2-0;R22;R33;R289;R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)10-0102-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20230341

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230223.0835.001.html>

**[网络出版日期]** 2023-02-23 11:54:07

## Effect of Zuogui Jiangtang Qinggan Prescription on Glucose and Lipid Metabolism in MKR Mice with Type 2 Diabetes Mellitus and Non-alcoholic Fatty Liver Disease

WANG Yiyang, ZOU Junju, LU Yuanyuan, XIANG Qin\*, YU Rong\*  
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the mechanism of Zuogui Jiangtang Qinggan prescription (ZJQP) in improving glucose and lipid metabolism in loss of skeletal muscle-specific insulin-like growth factor-1 receptor function (MKR) mice with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

**[收稿日期]** 2022-12-30

**[基金项目]** 国家自然科学基金联合基金重点支持项目(U21A20411);国家自然科学基金项目(82074400,82004185);湖南省教育厅科技计划项目(20B450,20K094)

**[第一作者]** 王一阳,在读硕士,从事中医药防治内分泌疾病研究,E-mail:326402434@qq.com

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

\*向琴,实验师,从事代谢性疾病与肠道菌群相关性及中药防治机制研究,E-mail:003852@hnuem.edu.cn

**Method:** NAFLD was induced by high-fat diet feeding for 8 weeks in MKR mice, which were randomly divided into model group, metformin group ( $0.067 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and ZJQP high and low-dose groups ( $14.8, 7.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Ten FVB mice of the same age were used as the normal group. After 8 weeks of drug treatment, the oral glucose tolerance test (OGTT) was performed, the serum was taken to detect triacylglycerol (TG) and total cholesterol (TC), and the wet weight of the mouse liver was weighed. Haematoxylin-eosin (HE) staining and oil red O staining were performed to assess histopathology of liver. The mRNA expression and protein expression of Fork head box protein O1 (FoxO1), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), glucose-6-phosphatase (G6Pase), and apolipoprotein C3 (ApoC-III) in liver tissues were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (Real-time PCR) and Western blot, respectively. **Result:** As compared with the normal group, the levels of fasting blood glucose, liver index, serum TG, TC, and OGTT of mice in the model group increased significantly ( $P<0.01$ ). As compared with model group, the fasting blood glucose and liver index of the mice in the metformin group and the ZJQP group decreased significantly ( $P<0.01$ ), the serum levels of TG and TC in the high-dose ZJQP group decreased significantly ( $P<0.05, P<0.01$ ), and the OGTT of mice in the metformin group and the high-dose ZJQP group improved ( $P<0.05$ ). In histopathology, as compared with the normal group, mice in the model group showed decreased lipid droplets and vacuoles in hepatocytes, and their volumes became larger. Compared with the model group, the ZJQP group and metformin group showed that the lipid droplets in liver tissues were reduced, the vacuoles in liver cells were reduced, and the volume was smaller. At the molecular level, as compared with the normal group, the mRNA and protein levels of FoxO1, PEPCK, G6Pase, and ApoC-III in liver tissues of mice in the model group were significantly up-regulated ( $P<0.01$ ). As compared with the model group, the mRNA and protein levels of FoxO1, PEPCK, G6Pase, and ApoC-III in the ZJQP group was significantly decreased ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** ZJQP can improve the glucose and lipid metabolism of T2DM with NAFLD and repair the pathological damage of liver, which may be through regulating the expression of FoxO1, PEPCK, G6Pase, ApoC-III-related proteins in liver tissues to achieve the effects of regulating lipid, lowering glucose, and delaying hepatic steatosis.

**[Keywords]** Zuogui Jiangtang Qinggan prescription; MKR mice; type 2 diabetes mellitus; non-alcoholic fatty liver disease; glucose and lipid metabolism

近年来,随着经济的快速发展,生活方式的急剧变化和人口老龄化,2型糖尿病(T2DM)已经成为全球尤其是发展中国家面临的首要公共卫生问题。非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是一种较为常见的肝脏并发症,若不及时干预,可发展为脂肪性肝炎、肝纤维化等<sup>[1]</sup>。在T2DM合并NAFLD情况下,二者相互影响相互促进病程的发展,并且会增加不良临床预后风险<sup>[2]</sup>。中医药在治疗T2DM合并NAFLD方面具有独特优势,课题组前期运用左归降糖清肝方,在临床上取得了良好疗效<sup>[3]</sup>;该方化裁自朱丹溪的左归丸,以阴阳互济为指导<sup>[4]</sup>,发挥其滋阴益气活血解毒之效,并通过实验研究发现左归降糖清肝方能显著改善糖脂代谢、胰岛素抵抗和肝细胞脂肪变性<sup>[5-6]</sup>,多方面验证了该方的治疗作用<sup>[7-10]</sup>。近来有研究发现叉头框蛋白O1(FoxO1)/磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)/葡萄糖6磷酸酶(G6Pase)蛋白的表达情况可以影响血糖水平<sup>[11]</sup>,同时FoxO1又能

调控载脂蛋白C3(ApoC-III)蛋白表达影响血脂水平<sup>[12]</sup>;本次实验在前期基础研究的基础上,进一步探讨左归降糖清肝方对MKR小鼠肝组织FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III表达的影响,以分析其改善糖脂代谢的机制,进而为临床论治T2DM合并NAFLD的理论提供更全面的实验支持。

## 1 材料

**1.1 动物及动物饲料** SPF级骨骼肌特异性胰岛素样生长因子-1受体功能缺失(MKR)小鼠40只,由导师自美国国立卫生研究院糖尿病研究中心引入,在湖南中医药大学实验动物中心SPF级环境下饲养[实验单位使用许可证号SYXK(湘)2019-0009],经自然交配繁殖的子代用于实验观察。SPF级FVB小鼠10只,6周龄,购自北京华阜生物科技股份有限公司,实验动物生产合格证号SCXK(京)2019-0008。所有动物均保持在12 h/12 h明暗交替的标准情况下,在温度( $22\pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度( $50\pm$

10%)的环境中饲养。所有动物实验均根据湖南中医药大学实验动物护理和使用指南执行,经湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(批准号ZYFY20201229)。

FVB小鼠与8周龄前的MKR小鼠均予以普通饲料饲养;8周龄后的MKR小鼠后予以高脂饲料饲养。高脂饲料(普通饲料加15%猪油,1%胆固醇):江苏省协同生物有限公司,配方编码1019004。

**1.2 药物及制备** 左归降糖清肝方(熟地黄12g、黄芪18g、山药12g、山茱萸12g、黄连6g、丹参9g、茵陈15g、郁金9g、陈皮9g)于湖南中医药大学第一附属医院购入,并由湖南中医药大学药学院吴勇军副教授鉴定,符合2020年版《中华人民共和国药典》规定,由湖南中医药大学药学院煎煮浓缩至生药质量浓度 $0.75\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (低剂量组)、 $1.5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (高剂量组)。盐酸二甲双胍(中美上海施贵宝制药有限公司,批准文号20023370,规格500mg/片),葡萄糖溶液(湖南科伦制药有限公司,国药准字H20058338,规格1g/2mL),西药均购自湖南中医药大学第一附属医院门诊西药药房。

**1.3 试剂** 血糖试条(三诺生物公司,批号23929316);总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A111-1-1、A110-1-1);山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G、ApoC-III抗体、FoxO1抗体、磷酸化(p)-FoxO1抗体、PCK1抗体、G6Pase抗体、内参 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为AS014、PA5-116572、AF301660、AP0172、A2036、A21168、AC026);动物组织总RNA提取试剂盒、逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR) Easy™、实时荧光定量PCR(Real-time PCR) Easy™-SYBR Green I(成都福际生物技术有限公司,批号分别为RE 03011、RT-02021、QP 01014)。

**1.4 仪器** GA-3型血糖仪(三诺生物公司);5418R/5702R型高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);EnSpire2300型多功能酶标分析仪(新加坡PerkinElmer公司);YP1002N型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);CFX96型Real-time PCR仪(美国Bio-Rad公司);YD-315型切片机(浙江金华益迪试验器材);BA210T型显微镜(厦门Motic公司);DYY-6C型电泳仪、DYCZ-40D型转膜仪(北京六一生物科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 小鼠造模、分组及给药** 8周龄MKR小鼠

40只,高脂饲料喂养8周后随机分为以下4组,每组10只。T2DM合并NAFLD模型组(模型组)、二甲双胍组( $6.7\times 10^{-2}\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、左归降糖清肝方高、低剂量组( $14.8$ 、 $7.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。同龄FVB小鼠10只作为正常组。各组分别给予相应药物灌胃8周。正常组、T2DM合并NAFLD模型组灌服等体积蒸馏水。每周称取小鼠体质量。

**2.2 样本采集** 最后一次灌胃结束后禁食不禁水过夜,乙醚麻醉小鼠后,摘除眼球于眼眶取血, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min(离心半径6cm)获取血清。于冰上迅速开腹,取下完整肝脏组织并称重,保存所需要组织。

### 2.3 检测指标

**2.3.1 空腹血糖及糖耐量(OGTT)检测** 最后一次灌胃结束后禁食不禁水过夜(12h)剪尾采血,用快速血糖仪测得空腹血糖,随后每只小鼠灌胃20%葡萄糖 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,并分别于灌胃30、60、120min后尾部末梢取血测得血糖,绘制糖耐量曲线并计算线下面积(AUG)。

**2.3.2 生化指标** 将采集的血清进行TG、TC检查。按试剂盒说明,常规方法进行检测。

**2.3.3 肝脏组织病理观察** 苏木素-伊红(HE)染色:取各组小鼠部分肝脏组织多聚甲醛固定24h后脱水,再用石蜡包埋组织、切片,载玻片固定后脱蜡、乙醇梯度脱水、蒸馏水浸洗后进行HE染色,中性树胶封片,于光学显微镜观察。

油红O染色:取各组部分肝组织置于小冻盘,冰冻包埋切片,蒸馏水洗;油红O染液染色,70%乙醇分化;苏木素复染,蒸馏水冲洗,磷酸盐缓冲液(PBS)返蓝;缓冲甘油封片,于光学显微镜观察。

### 2.3.4 Real-time PCR检测肝脏组织mRNA水平

用总RNA提取试剂提取肝脏组织RNA,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: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性3min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性15s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火20s,循环40次。最终数据以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对定量。从NCBI网站搜索以下基因mRNA序列,运用Prime 5.0软件设计引物,具体见表1。

**2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠肝脏组织蛋白表达** 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聚偏二氟乙烯膜,封闭10min, TBST洗膜3次,加入FoxO1(1:1000)、PEPCK(1:2000)、

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
FoxO1	上游 TTTCGTCCTCGAACCAGCTC	107
	下游 TACACCAGGGAATGCACGTC	
PEPCK	上游 TGGGAAGGTCGAATGTGTGGG	203
	下游 CAGTAAACACCCCATCGCT	
G6Pase	上游 CCGGATCTACCTTGCTGCTC	105
	下游 GCATTGTAGATGCCCGGAT	
ApoC-III	上游 GTCCGATATAGCTGTGGTGGC	131
	下游 CTGGAGTTGGTTGGTCCTCA	
$\beta$ -actin	上游 GCAGATGTGGATCAGCAAGC	102
	下游 AGGGTGTAACGACGCTCAG	

G6Pase (1:2 000)、ApoC-III (1:1 000)、p-FoxO1 (1:2 500)、 $\beta$ -actin (1:5 000)一抗,4 °C孵育过夜,再次TBST洗膜3次。再加入山羊抗兔IgG (1:6 000)二抗,37 °C孵育60 min。使用ECL化学发光液与膜孵育1 min,在暗盒内与X射线胶片曝光显影冲洗。以 $\beta$ -actin、FoxO1蛋白表达量校正,用QuantityOne

专业灰度分析软件进行数据分析。

**2.4 统计学方法** 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 25.0软件进行数据处理及统计分析,多组计量资料符合正态分布、方差齐性运用单因素方差分析并进行组间比较;若不满足方差齐性则采用Dunnett T3检验; $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对小鼠空腹血糖、肝脏指数、OGTT的影响** 造模结束后,与正常组比较,模型组、二甲双胍组及左归降糖清肝方高、低剂量组空腹血糖显著增加( $P < 0.01$ ),但各组间空腹血糖差异无统计学意义。灌胃结束后,各组间体质量差异无统计学意义。与正常组比较,模型组小鼠肝指数及空腹血糖显著增加( $P < 0.01$ )。与模型组比较,二甲双胍组及左归降糖清肝方组的肝指数显著降低( $P < 0.01$ ),二甲双胍组及左归降糖清肝方高剂量组空腹血糖显著下降( $P < 0.01$ )。各组小鼠予以葡萄糖灌胃后血糖持续升高,在30 min时血糖值达到峰值。计算AUC可知,与模型组比较,二甲双胍组及左归降糖清肝方高剂量组AUC值显著降低( $P < 0.01$ )。见表2和表3。

表2 左归降糖清肝方对各组小鼠体质量、肝指数和空腹血糖的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of Zuogui Jiangtang Qinggan prescription on body weight, liver index, fasting blood glucose and AUC of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	24周体质量/g	24周肝指数/%	16周空腹血糖/mmol·L <sup>-1</sup>	24周空腹血糖/mmol·L <sup>-1</sup>
正常组		24.97±2.94	4.61±0.36	4.87±1.01	4.47±1.08
模型组		24.94±3.82	7.43±0.62 <sup>2)</sup>	16.78±3.56 <sup>2)</sup>	18.14±4.43 <sup>2)</sup>
二甲双胍组	6.7×10 <sup>-2</sup>	25.60±4.93	6.28±0.63 <sup>4)</sup>	16.27±6.06 <sup>2)</sup>	7.74±1.53 <sup>4)</sup>
左归降糖清肝方低剂量组	14.8	26.21±4.31	5.61±1.14 <sup>4)</sup>	17.93±3.74 <sup>2)</sup>	12.40±8.01
左归降糖清肝方高剂量组	7.4	25.56±4.29	4.91±1.05 <sup>4)</sup>	17.25±3.59 <sup>2)</sup>	8.05±3.95 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表3-表6同)

表3 左归降糖清肝方对各组小鼠糖耐量的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of Zuogui Jiangtang Qinggan prescription on glucose tolerance of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	0 min/mmL <sup>-1</sup>	30 min/mmL <sup>-1</sup>	60 min/mmL <sup>-1</sup>	120 min/mmL <sup>-1</sup>	AUC
正常组		4.47±1.08	11.71±3.63	7.09±2.07	4.83±1.74	14.71±3.58
模型组		18.14±4.43 <sup>2)</sup>	23.49±5.46 <sup>2)</sup>	20.97±5.39 <sup>2)</sup>	15.36±3.70 <sup>2)</sup>	39.69±6.96 <sup>2)</sup>
二甲双胍组	6.7×10 <sup>-2</sup>	7.74±1.53 <sup>4)</sup>	21.15±4.80	16.43±4.48 <sup>3)</sup>	10.69±4.29 <sup>3)</sup>	30.18±6.35 <sup>4)</sup>
左归降糖清肝方低剂量组	14.8	12.40±8.01	22.31±4.48	19.46±5.57	14.20±5.35	34.91±6.96
左归降糖清肝方高剂量组	7.4	8.05±3.95 <sup>4)</sup>	20.65±7.11	18.56±4.97	12.84±5.78	31.53±8.02 <sup>4)</sup>

**3.2 对小鼠血脂的影响** 与正常组比较,模型组小鼠TC、TG均显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,二甲双胍组及左归降糖清肝方高剂量组均可以明显降低TC含量( $P < 0.05, P < 0.01$ );与模型组比较,仅左

归降糖清肝方高剂量组可以明显降低TG含量( $P < 0.05$ )。见表4。

**3.3 对小鼠肝组织病理学变化的影响** HE染色结果显示,正常组小鼠肝脏肝小叶结构正常,无病变。

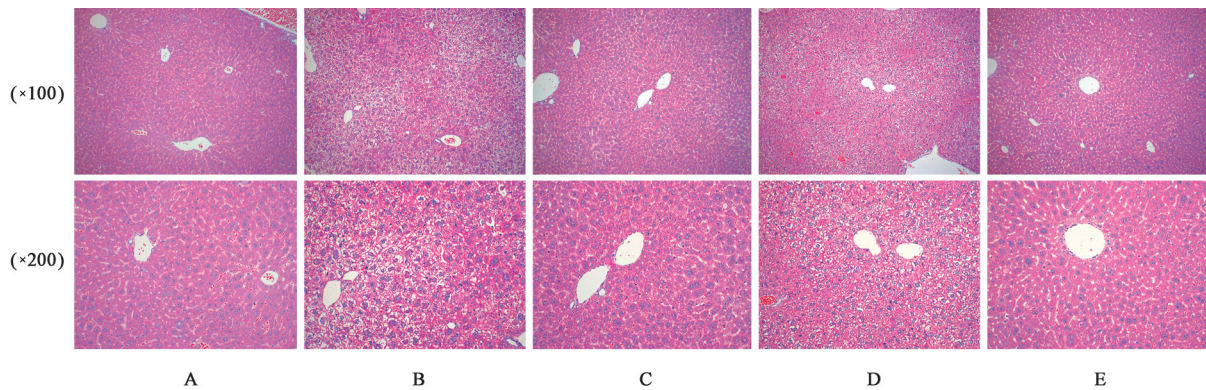
表4 左归降糖清肝方对各组小鼠TG、TC的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of Zuogui Jiangtang Qinggan prescription on TG and TC in mice of each group ( $\bar{x}\pm s, n=10$ ) mmol·L<sup>-1</sup>

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	TG	TC
正常组		1.53±0.08	3.77±0.33
模型组		1.91±0.24 <sup>2)</sup>	5.51±0.65 <sup>2)</sup>
二甲双胍组	6.7×10 <sup>-2</sup>	1.81±0.18	4.55±0.66 <sup>3)</sup>
左归降糖清肝方低剂量组	14.8	1.80±0.16	5.00±0.22
左归降糖清肝方高剂量组	7.4	1.60±0.16 <sup>3)</sup>	4.15±0.49 <sup>4)</sup>

模型组可见肝细胞体积增大,结构紊乱,胞质内多空泡,呈弥漫性脂肪变性;左归降糖清肝方组及二甲双胍组细胞肿胀程度减轻,空泡渐小。见图1。

油红O染色结果显示,正常组小鼠肝脏无明显红染脂滴,模型组可见脂滴蓄积,且分布广泛;而药物组脂滴分布及蓄积有所改善,以二甲双胍组改善最为明显,左归降糖清肝方高剂量组次之,左归降糖清肝方低剂量组也可观察到蓄积的脂滴在消散。见图2。



注:A.正常组;B.模型组;C.二甲双胍组;D.左归降糖清肝方低剂量组;E.左归降糖清肝方高剂量组(图2和图3同)

图1 左归降糖清肝方对肝组织病理形态的影响(HE)

Fig. 1 Effect of Zuogui Jiangtang Qinggan prescription on pathological morphology of liver tissue (HE)

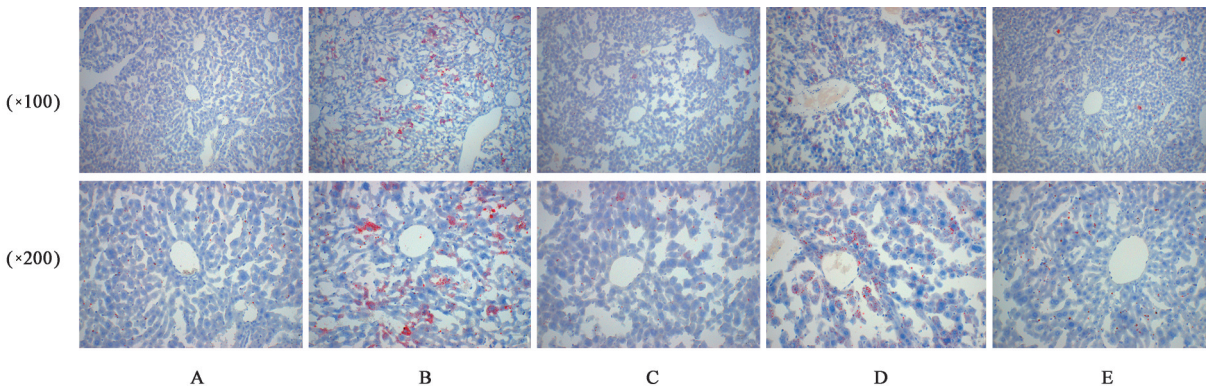


图2 左归降糖清肝方对肝组织脂肪病变的影响(油红O)

Fig. 2 Effect of Zuogui Jiangtang Qinggan prescription on fatty lesions of liver tissue (oil red O)

**3.4 对 FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III mRNA 表达水平的影响** 与空白组比较,模型组 FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III mRNA 表达水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,二甲双胍组和左归降糖清肝方高、低剂量组 FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III mRNA 表达水平显著降低,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),各给药组之间比较差异无统计学意义。见表5。

**3.5 对 p-FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III 蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型组小鼠 p-FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III 的蛋白表达水平显著升高

( $P<0.01$ );与模型组比较,二甲双胍组和左归降糖清肝方高剂量组和低剂量组 p-FoxO1、PEPCK、ApoC-III 蛋白表达明显减少( $P<0.05, P<0.01$ ),二甲双胍组和左归降糖清肝方高剂量组 G6Pase 蛋白表达明显减少( $P<0.05, P<0.01$ ),左归降糖清肝方低剂量组 G6Pase 蛋白表达与模型组比较差异无统计学意义。见表6、图3。

#### 4 讨论

随着我国经济发展,我国居民生活方式的变化,糖尿病发病率逐年增高<sup>[13-14]</sup>,而T2DM作为最主要的类型常易合并多种并发症。T2DM患者同时合

表5 左归降糖清肝方对各组小鼠FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III mRNA表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 5 Effect of Zuogui Jiangtang Qinggan prescription on FoxO1, PEPCK, G6Pase, ApoC-III mRNA expression levels in mice of each group ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	FoxO1	PEPCK	G6Pase	ApoC-III
正常组		1.01±0.11	1.05±0.24	1.02±0.12	1.10±0.21
模型组		1.45±0.08 <sup>2)</sup>	2.50±0.35 <sup>2)</sup>	1.91±0.38 <sup>2)</sup>	2.41±0.32 <sup>2)</sup>
二甲双胍组	6.7×10 <sup>-2</sup>	0.71±0.06 <sup>4)</sup>	1.46±0.15 <sup>4)</sup>	0.63±0.14 <sup>4)</sup>	1.27±0.25 <sup>4)</sup>
左归降糖清肝方低剂量组	14.8	0.64±0.12 <sup>4)</sup>	1.53±0.31 <sup>4)</sup>	1.13±0.23 <sup>4)</sup>	1.64±0.08 <sup>4)</sup>
左归降糖清肝方高剂量组	7.4	0.86±0.06 <sup>4)</sup>	1.85±0.10 <sup>4)</sup>	0.87±0.35 <sup>4)</sup>	1.05±0.39 <sup>4)</sup>

表6 左归降糖清肝方对各组小鼠p-FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 6 Effect of Zuogui Jiangtang Qinggan prescription on p-FoxO1, PEPCK, G6Pase, ApoC-III protein ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-FoxO1/FoxO1	PEPCK/ $\beta$ -actin	G6Pase/ $\beta$ -actin	ApoC-III/ $\beta$ -actin
正常组		0.57±0.12	0.84±0.05	0.42±0.02	0.64±0.07
模型组		1.43±0.12 <sup>2)</sup>	1.37±0.22 <sup>2)</sup>	1.56±0.58 <sup>2)</sup>	2.13±0.23 <sup>2)</sup>
二甲双胍组	6.7×10 <sup>-2</sup>	0.49±0.06 <sup>4)</sup>	0.66±0.07 <sup>4)</sup>	0.89±0.25 <sup>4)</sup>	0.89±0.24 <sup>4)</sup>
左归降糖清肝方低剂量组	14.8	1.16±0.25 <sup>3)</sup>	0.86±0.27 <sup>4)</sup>	1.15±0.39	0.75±0.24 <sup>4)</sup>
左归降糖清肝方高剂量组	7.4	0.79±0.04 <sup>4)</sup>	0.62±0.06 <sup>4)</sup>	0.98±0.37 <sup>3)</sup>	0.72±0.23 <sup>4)</sup>

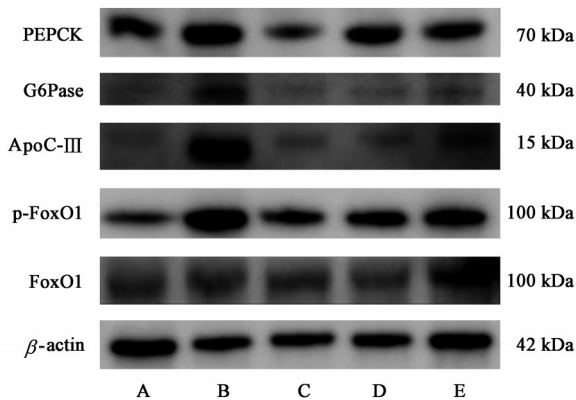


图3 各组小鼠肝脏组织FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of FoxO1, PEPCK, G6Pase and ApoC-III protein in liver tissue of mice in each group

并NAFLD的概率高达80%,而NAFLD可进一步发展为肝炎、肝纤维化甚至肝癌<sup>[15]</sup>,危害人民健康安全。之前广泛接受的NAFLD发病机制是“二次打击”学说,近年来又有学者提出“多重打击学说”<sup>[16-17]</sup>,但两种学说均将胰岛素抵抗(IR)视为肝脂肪变性的关键步骤。同时IR又是T2DM的典型病理特征,故IR作为治疗靶点一直是研究的热点<sup>[18]</sup>。

FoxO1是磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路的直接下游信号蛋白,该通路是胰岛素作用的经典途径<sup>[19]</sup>,其异常转导是导致IR发生的重要原因之一<sup>[20]</sup>。在目前的研究探索过程中,肝脏糖异生会受到FoxO1/PEPCK/G6Pase这3个因子影响,他们的编码基因表达情况在糖异生中起到

了关键的作用;既往有研究证实了胰高血糖素刺激PKA促进FoxO1磷酸化,导致FoxO1核易位,增强糖异生<sup>[21]</sup>。课题组前期通过实验已验证了左归降糖清肝方对肝组织PI3K/Akt蛋白表达的调控作用<sup>[7]</sup>。为明确其下游蛋白表达变化,本研究通过高脂饲料造模,予以左归降糖清肝方灌胃,检测肝组织FoxO1/PEPCK/G6Pase的mRNA及蛋白的表达。通过研究发现左归降糖清肝方干预后,小鼠肝脏组织中FoxO1的磷酸化水平下降,并减少了下游蛋白PEPCK及G6Pase的转录,提示左归降糖清肝方可以通过调控FoxO1的表达及磷酸化水平来影响PEPCK和G6Pase的表达,达到改善小鼠血糖水平的目的。

除此之外,实验研究发现,左归降糖清肝方干预后,肝脏组织FoxO1的磷酸化水平下降的同时,ApoC-III的mRNA和蛋白的表达水平也显著下降。但二甲双胍干预后仅降低血清的TC水平,对血清的TG水平没有明显影响,这一结果的原因可能是二甲双胍在肝组织内通过线粒体解偶联效应<sup>[22]</sup>,减少了肝组织内的脂质,造成暂时性的TG水平升高,其具体机制还需要进一步的实验来验证。众所周知,ApoC-III是载脂蛋白家族的成员之一,对脂蛋白的结构、脂质的运输及代谢均发挥重要作用<sup>[23]</sup>。不仅是调控TG水平的重要蛋白之一,也是糖尿病的强大风险标志物<sup>[24]</sup>,一项前瞻性队列研究支持将ApoC-III作为糖尿病治疗的靶点之一<sup>[25]</sup>。而FoxO1

可结合到 ApoC-III 的启动子的序列上,促进 ApoC-III 的表达;TANAKA 等<sup>[26]</sup>研究运用 FoxO1 抑制剂后,小鼠 ApoC-III 的基因表达水平被下调,其血糖血脂均得到改善。基于以上,左归降糖清肝方可能通过调控 FoxO1/ApoC-III 通路,来改善小鼠血脂水平及肝组织病理变化。

中医学并无 T2DM 合并 NAFLD 病名,但根据其临床表现可归属于“消渴”“肝癖”“胁痛”“积聚”“痞满”等范畴。基于络病理论,病机要点为“虚、毒、淤”,气阴两虚为本,痰湿浊淤内生为毒,阻于肝络,最终“因毒致损”“毒损肝络”<sup>[27]</sup>。有学者认为《素问·经脉别论》中“食气入胃,散精于肝,淫气于筋”<sup>[28]</sup>。食气入胃,浊气归心,淫精于脉……饮入于胃,游溢精气,上输于脾,脾气散精”这段内容或可作为糖脂代谢的文献记载,其精纯指糖分,在肝脾中吸收合成转化分布,其浓稠者为脂质,一部分为心所用,另一方面通过心气推动在脉络中运往全身。现代西医学中的胰岛素抵抗正是肝脾失调的表现,而血脂代谢异常,是因为脂毒化为有形之邪,或痰湿,或淤浊,阻碍气血运行。而左归降糖清肝方化裁自张景岳的左归丸,以滋阴益气为本,活血解毒为治法,方中熟地黄、山茱萸滋补肝肾之阴,山药、黄芪补脾肾之气,丹参活血化瘀,郁金、陈皮行肝脾之气,黄连、茵陈燥湿化痰,诸药合用,标本兼顾以治其病。

本次研究使用的 MKR 小鼠以及造模方法,课题组既往多次实验研究均证明其可行性<sup>[29]</sup>。本研究通过实验证明,在药效学方面,左归降糖清肝方可以降低 T2DM 合并 NAFLD 模型小鼠的空腹血糖、TG、TC 等水平,提示本方在降血糖、改善脂代谢、调治 T2DM 合并 NAFLD 确有疗效。而 HE 染色可见模型组出现细胞肿胀,细胞胞浆内出现空泡,呈现弥漫性脂肪变性;油红 O 染色可发现模型组肝组织脂滴蓄积;在药物干预后,小鼠肝脏病理学变化均得到不同程度改善,同样证实了本方的疗效。在分子水平上,可明确本方在 FoxO1/PEPCK/G6Pase/ApoC-III 通路中,调控 FoxO1、PEPCK、G6Pase、ApoC-III 蛋白的表达。

综上所述,左归降糖清肝方可以改善糖脂代谢、肝组织病理损伤,这一作用可能是通过对 FoxO1/PEPCK/G6Pase/ApoC-III 通路的调控,减少肝脏的糖异生和脂质生成异常来达成的。FoxO1 作为调控糖脂代谢的关键蛋白之一,影响其作用的上游的蛋白也较多,本实验仅针对 FoxO1 及其下游糖

脂代谢相关的部分蛋白表达进行了研究,后续还需进一步对其上游蛋白的调控机制进行完善,从而为临床及新药研究提供实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] LONARDO A, BELLENTANI S, ARGO C K, et al. Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups[J]. Dig Liver Dis, 2015, 47(12):997-1006.
- [2] TARGHER G, COREY K E, BYRNE C D, et al. The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus-mechanisms and treatments [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(9):599-612.
- [3] 程莉娟,成细华,喻嵘,等. 滋阴益气活血解毒法治疗 32 例 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝的临床观察[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(9):2807-2810.
- [4] 喻嵘,陈大舜,易法银,等. 左归降糖方治非胰岛素依赖型糖尿病临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 1999(8):13-14.
- [5] 成细华,喻嵘,胡伟,等. 左归降糖清肝方含药血清对脂肪酸孵育的 HepG2 细胞脂肪变性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(5):1307-1309.
- [6] 成细华,程莉娟,饶春梅,等. 滋阴益气活血解毒中药含药血清对脂肪变性 HepG2 细胞 SREBP-1c 和 FAS 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(12):812-815.
- [7] 陈聪,陈家旭,喻嵘,等. 左归降糖清肝方对 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病 MKR 鼠肝组织 PI3K 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(1):106-111.
- [8] 程莉娟,成细华,喻嵘,等. 左归降糖清肝方对小鼠糖尿病合并脂肪肝脂代谢相关基因 mRNA 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(17):4182-4184.
- [9] 魏冠德. 左归降糖清肝方调控 PPAR- $\alpha$ 、CYP2E1 表达改善 MKR 转基因鼠 2 型糖尿病合并脂肪肝的作用研究[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2012.
- [10] 吴勇军,成细华,喻嵘,等. 左归降糖清肝方对 2 型糖尿病转基因 MKR 鼠脂肪肝发生的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):140-143.
- [11] PEREIRA R M, DA CRUZ RODRIGUES K C, SANT'ANA M R, et al. FOXO1 is downregulated in obese mice subjected to short-term strength training [J]. J Cell Physiol, 2022, 237(11):4262-4274.
- [12] PEK S, SUM C F, YEOH L Y, et al. Association of apolipoprotein-C III (ApoC-III), endothelium-dependent vasodilation and peripheral neuropathy in a multi-ethnic population with type 2 diabetes [J].

- Metabolism, 2017, 72: 75-82.
- [13] 孙文杰, 赵能江, 李博, 等. 《中国2型糖尿病防治指南(2020年版)》推荐中成药品种述评[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(3): 1-5.
- [14] 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.
- [15] ANSTEE Q M, TARGHER G, DAY C P. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(6): 330-344.
- [16] BUZZETTI E, PINZANI M, TSOCHATZIS E A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Metabolism*, 2016, 65 (8) : 1038-1048.
- [17] FANG Y L, CHEN H, WANG C L, et al. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From "two hit theory" to "multiple hit model" [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(27): 2974-2983.
- [18] PEARSON E R. Type 2 diabetes: A multifaceted disease [J]. *Diabetologia*, 2019, 62(7): 1107-1112.
- [19] MOLINARO A, BECATTINI B, MAZZOLI A, et al. Insulin-driven PI3K-Akt signaling in the hepatocyte is mediated by redundant PI3K $\alpha$  and PI3K $\beta$  activities and is promoted by RAS [J]. *Cell Metab*, 2019, 29 (6) : 1400-1409.
- [20] 刘宏民, 吴洁洁, 陈欢, 等. 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 [J]. *中草药*, 2022, 53(12): 3687-3693.
- [21] WU Y, PAN Q, YAN H, et al. Novel mechanism of foxo1 phosphorylation in glucagon signaling in control of glucose homeostasis [J]. *Diabetes*, 2018, 67 (11) : 2167-2182.
- [22] 李颖, 曹文富, 李金蝶. 参麦兰苓汤对2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝肝脏脂肪含量及肝纤维化的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(6): 144-148.
- [23] RAMMS B, PATEL S, NORA C, et al. ApoC-III ASO promotes tissue LPL activity in the absence of ApoE-mediated TRL clearance [J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(8) : 1379-1395.
- [24] 王雅芝, 陈慧. 血清载脂蛋白CⅢ在2型糖尿病中的作用研究进展 [J]. *医学综述*, 2022, 28 (13) : 2673-2678.
- [25] YAMAMOTO R, JENSEN M K, ARONER S, et al. HDL containing apolipoprotein C-III is associated with insulin sensitivity: A multicenter cohort study [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021, 106(8) : e2928-e2940.
- [26] TANAKA H, NAGASHIMA T, SHIMAYA A, et al. Effects of the novel FoxO1 inhibitor AS1708727 on plasma glucose and triglyceride levels in diabetic db/db mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 645(1/3) : 185-191.
- [27] 于淼, 朴春丽, 南征, 等. 2型糖尿病胰岛素抵抗的肝内炎症发病机制与毒损肝络病理理论的相关性探讨 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2006, 26(11): 1032-1034.
- [28] 许凯凯, 田露. 《黄帝内经》“食气入胃”新解 [J]. *中医学报*, 2021, 36(11) : 2293-2296.
- [29] 喻嵘, 成细华, 胡伟, 等. 骨骼肌特异性胰岛素样生长因子1及胰岛素双受体功能缺失所致小鼠2型糖尿病 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2008, 16(7) : 438-440.

[责任编辑 孙丛丛]