

· 糖痹康治疗糖尿病周围神经病变作用机制研究专题 ·

[编者按] 糖尿病周围神经病变(DPN)是世界范围内最常见的神经病变原因,其患病率随着糖尿病病程的持续时间而增加,影响了约50%的糖尿病患者。DPN常导致感觉神经、运动神经损伤,出现肢体麻木、疼痛、肌肉无力及萎缩等症状。持续不断的疼痛会对患者的睡眠、情绪和功能产生负面影响,并导致生活质量低下。目前现代医学除了改善血糖控制及对症处理疼痛外,还没有针对DPN的较好方法。由于在个体化治疗、确定最佳剂量策略、初始药物治疗的选择及考虑联合治疗方面存在困难,DPN的治疗和管理仍然具有挑战性。

中医药在防治DPN方面发挥了明显优势,相当多中药具有很好减轻疼痛、缓解麻木及改善感觉异常的效果。该团队刘铜华教授师从国医大师吕仁和教授,传承吕仁和教授辨证思路,经过多年临床实践,提出“气阴不足,毒瘀神经”为DPN主要病机。“毒”包括糖毒、代谢毒、瘀毒,消渴病日久损耗气阴,气阴两虚,气血不畅,致“毒”“瘀”蕴结于神经脉络,神络失养,导致肢体远端麻木、疼痛。因此,“毒损脉络”是DPN的主要病机。DPN的治疗原则为“益气养阴、解毒化瘀通络”。刘铜华教授在多年临床诊疗基础上结合DPN的现代医学发展机制,以黄芪桂枝五物汤为基础,创制出了具有益气养阴、解毒化瘀通络的中药复方糖痹康。糖痹康组方已成功获得国家专利(国家专利号z1200810167551.1)。糖痹康源自古代经方黄芪桂枝五物汤,随着对疾病认识加深结合现代先进工艺,已经通过药品成分标记、临床初步调查。研究从药品安全性、稳定性及治疗的有效性方面得到的大量证实。经过穆晓红、秦灵灵、张宏、张岩、张露等学者大量实验研究,结合现代医学对DPN病机认识得到了多条通路和多个靶点,并证实了糖痹康多靶点治疗的特点。糖痹康治疗糖尿病周围神经病变相关课题研究自2009年始,先后获得国家科技重大新药创制专项-治疗糖尿病周围神经病变候选药物糖痹康研究(2009ZX09103-303)、国家科技重大专项-治疗糖尿病周围神经病变药物糖痹康的临床前研究(2012ZX09102201-001)、国家自然科学基金青年科学基金项目——基于氧化应激诱导细胞凋亡探讨糖痹康促糖尿病周围神经修复作用机制研究(81202970)、北京市自然科学基金项目-糖痹康调控线粒体应激PGC1 α /SirT3信号通路干预糖尿病周围神经病变机制研究(7182102)、国家自然科学基金面上项目——糖痹康调节AMPK/PGC-1 α /SirT3信号通路干预线粒体应激防治糖尿病周围神经病变的机制研究(81874467)等多项课题资助。该团队将继续深入研究,探究其重要作用机制,致力于推广中药复方糖痹康早上市、走向国门、迈向国际,使得更多的DPN患者获益。

糖痹康颗粒对2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠PI3K通路的影响

张亚奇¹, 秦灵灵^{2,3*}, 张程斐⁴, 张秋娥⁵, 白惠中¹, 刘港¹, 左心玮¹,
赵毅¹, 刘铜华^{6,7}, 穆晓红^{1*}

- (1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 北京中医药大学科技处, 北京 100029;
3. 教育部高等学校学科创新引智基地, 北京 100029;
4. 北京中医药大学生命科学学院, 北京 100029; 5. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029;
6. 北京中医药大学教育部中医养生学重点实验室, 北京 100029;
7. 科技部中医药防治糖尿病国际联合研究中心, 北京 100029)

[摘要] 目的:探讨糖痹康颗粒对2型糖尿病(T2DM)合并非酒精性脂肪肝(NAFLD)的治疗及阐明作用机制。方法:采用自发性的雄性Zucker糖尿病脂肪(ZDF)大鼠,建立T2DM合并NAFLD模型。造模成功的大鼠进行糖痹康颗粒高、中、低剂量组(2.5、1.25、0.625 g·kg⁻¹)持续灌胃治疗12周。治疗期间每4周记录空腹血糖(FBG)和体质量变化。取材前1周,检测给药治疗对大鼠进食量影响;并进行夜间禁食12 h后进行口服葡萄糖耐量实验(OGTT),曲线下面积(AUC)评价糖耐量,计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。腹主动脉取血和取肝脏,测定血糖和血脂代谢指标,包括空腹血清胰岛素(FINS)、血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及游离脂肪酸(NEFA)。对肝脏进行称

[收稿日期] 2022-09-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81874467);北京市自然科学基金项目(L192059)

[第一作者] 张亚奇,在读博士,从事糖尿病并发症基础与临床研究,E-mail: zhangyaqi689@163.com

[通信作者] * 秦灵灵,博士,助理研究员,从事糖尿病及其并发症基础和临床研究,E-mail: 700513@bucm.edu.cn;

* 穆晓红,博士,主任医师,从事糖尿病并发症基础与临床研究,E-mail: muxiaohong2006@126.com

质量计算肝脏指数,并对其进行肝脏组织形态学苏木素-伊红(HE)染色、过碘酸-Schiff(PAS)染色观察分析。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胰岛素受体底物(IRS)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)和磷酸化IRS、Akt蛋白的表达水平。所有数据采用SPSS 20.0软件进行分析。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠摄食量显著增多($P<0.01$);与模型组比较,其余各给药组糖尿病大鼠摄食量减少($P<0.05, P<0.01$)。与正常组比较,模型组大鼠8、12周体质量显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,糖痹康颗粒组在一定程度上降低FBG水平,且呈浓度依赖性。与正常组比较,模型组OGTT血糖值和AUC显著增高($P<0.01$);与模型组比较,糖痹康颗粒各组和二甲双胍组OGTT血糖值整体降低,AUC差异有统计学意义($P<0.01$)。与正常组比较,模型组大鼠血清FINS、HOMA-IR指数均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,糖痹康颗粒各组大鼠血清FINS水平、HOMA-IR指数均显著降低($P<0.01$)。与正常组比较,模型组大鼠血清TG、TC、HDL-C及NEFA水平均明显升高($P<0.05, P<0.01$),LDL-C水平呈升高趋势,但差异无统计学意义。与模型组比较,糖痹康颗粒各组大鼠血清TG、TC、LDL-C及NEFA水平降低,且糖痹康颗粒各组TG、LDL-C和NEFA水平呈浓度依赖趋势,即糖痹康颗粒高剂量组最优。与模型组比较,糖痹康颗粒高剂量组大鼠HDL-C水平明显升高($P<0.05$)。与正常组比较,模型组大鼠肝脏指数显著升高($P<0.01$);与模型组比较,给药各组大鼠肝脏指数呈降低趋势,但差异无统计学意义。肝组织形态HE染色观察,模型组大鼠肝小叶结构不清;大部分细胞肿大且大小不一,肝细胞脂肪化明显。糖痹康颗粒各组均可不同程度地减轻肝脏损伤,但以糖痹康颗粒高剂量组最为显著。肝组织形态PAS染色观察,与正常组比较,模型组肝脏细胞可见显著脂肪空泡,胞浆中紫红色糖原颗粒显著减少,颜色较浅。糖痹康颗粒高、中剂量组染色更接近正常组。Western blot检测肝组织蛋白表达,与正常组比较,模型组大鼠PI3K蛋白、p-IRS1/IRS1、p-Akt/Akt表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,糖痹康颗粒高剂量组的PI3K蛋白、p-IRS1/IRS1、p-Akt/Akt表达显著提高($P<0.01$)。**结论:**糖痹康颗粒治疗ZDF大鼠T2DM合并NAFLD,其机制可能与激活典型的PI3K信号通路相关。

[关键词] 糖痹康颗粒; 2型糖尿病; 非酒精性脂肪肝; 胰岛素受体底物-1; 磷脂酰肌醇3-激酶通路; 分子机制

[中图分类号] R2-0;R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)09-0071-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230628

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230202.1626.004.html>

[网络出版日期] 2023-02-03 09:51:56

Effect of Tangbikang Granules on PI3K Pathway in Type 2 Diabetic Mellitus Rats with Non-alcoholic Fatty Liver Disease

ZHANG Yaqi¹, QIN Lingling^{2,3*}, ZHANG Chengfei⁴, ZHANG Qiue⁵, BAI Huizhong¹,

LIU Gang¹, ZUO Xinwei¹, ZHAO Yi¹, LIU Tonghua^{6,7}, MU Xiaohong^{1*}

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. Science and Technology Office, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

3. Disciplinary Innovation Base of the Ministry of Education, Beijing 100029, China;

4. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

5. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Beijing University of Chinese Medicine, Beijing

100029, China; 6. Key Laboratory of TCM Health Sciences, Ministry of Education, Beijing University of

Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 7. International Joint Research Center for Diabetes

Prevention and Treatment with TCM, Ministry of Science and Technology, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the therapeutic effect of Tangbikang granules (TBK) on type 2 diabetes mellitus (T2DM) complicated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and to elucidate the underlying mechanism. **Method:** T2DM and NAFLD were induced in ZDF rats, which were then respectively treated (*ig*) with low-dose ($0.625 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium-dose ($1.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high-dose ($2.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) TBK for 12 weeks. Fasting blood glucose (FBG) and body mass were recorded every 4 weeks during the treatment. One week before sampling, the feed intake of rats was detected, and after 12 h night fasting, oral glucose tolerance test (OGTT) was performed. The area under the curve (AUC) was used to evaluate glucose tolerance, and the homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) was calculated. Blood in

abdominal aorta and liver were collected for determination of blood glucose and lipid metabolism indexes: Fasting serum insulin (FINS), serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and nonesterified fatty acids (NEFA). The liver was weighed to calculate the liver index, and the liver tissue morphology was observed and analyzed based on hematoxylin-eosin (HE) staining and periodic acid-Schiff (PAS) staining. The protein levels of insulin receptor substrate (IRS), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt) and phosphorylated IRS and Akt were detected by Western blotting. All data were analyzed by SPSS 20.0. **Result:** The feed intake of the model group was higher than that in the normal group ($P<0.01$), and the feed intake the administration groups was lower than that in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). At the 8th and 12th week, the body mass in the model group was lower than that in the normal group ($P<0.01$). Compared with the model group, TBK reduced FBG in a concentration-dependent manner. The blood glucose level in OGTT and AUC in the model group were higher/larger than those in the normal group ($P<0.01$). The blood glucose value in OGTT was decreased in TBK groups and the metformin group compared with that in the model group, and AUC in the administration groups was significantly different from that in the model group ($P<0.01$). The serum level of FINS and HOMA-IR in the model group were higher than those in the normal group ($P<0.01$), and they were lower in the TBK groups than in the model group ($P<0.01$). Serum levels of TG, TC, HDL-C, NEFA ($P<0.05$, $P<0.01$), and LDL-C were higher in the model group than in the normal group. Serum levels of TG, TC, LDL-C, and NEFA in the TBK groups were lower than those in the model group, and the levels of TG, LDL-C, and NEFA in TBK groups were concentration-dependent (lowest levels in high-dose TBK group). Compared with the model group, high-dose TBK significantly increased the level of HDL-C ($P<0.05$). Liver index of the model group was higher than that in the normal group ($P<0.01$). The liver index of the administration groups showed a decreasing trend with no significant difference from that in the model group. As for the HE staining result of liver, the model group had unclear structure of liver lobule, enlarged cells of different sizes, and obvious steatosis of hepatocytes. TBK of all doses alleviated liver injury, particularly the high dose. For the PAS staining, compared with the normal group, the model group demonstrated significant fat vacuoles and significant reduction in purplish red glycogen granules in the cytoplasm. The staining results of high- and medium-dose groups of TBK were more similar to the normal group. Western blot was used to detect the protein expression of liver tissue. The expression of PI3K protein, p-IRS1/IRS1, and p-Akt/Akt in the model group were lower than those in the normal group ($P<0.01$), and they were higher in the high-dose TBK group than in the model group ($P<0.01$). **Conclusion:** TBK exerts therapeutic effect on T2DM combined with NAFLD in ZDF rats by activating the typical PI3K signaling pathway.

[Keywords] Tangbikang granules; type 2 diabetes mellitus; non-alcoholic fatty liver disease; insulin receptor substrate-1; phosphatidylinositol 3-kinase pathway; molecular mechanism

2型糖尿病(T2DM)是一种以持续性血糖水平升高和胰岛素抵抗为特征的慢性代谢性疾病^[1]。在过去的50年里,随着人口老龄化不断加剧,T2DM的患病率不断上升;现在几乎50%的糖尿病患者是老年人(65岁)^[2]。非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是世界上最普遍的肝病,被诊断为T2DM的患者大多同时合并NAFLD。两者存在双向病理关系,伴有肝胰岛素抵抗的NAFLD患者通常存在与早期糖尿病相关的空腹血糖受损的高风险,而T2DM促进并加速了NAFLD的进展^[3]。二者均属于全身性复杂代谢性疾病,与胰岛素抵抗(IR)、肝脏脂肪堆积、

脂肪毒性密切相关^[4]。IR是NAFLD和T2DM两种代谢性疾病的共同特征^[5]。因此,改善IR对治疗T2DM合并NAFLD意义重大。胰岛素受体底物/磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(IRS/PI3K/Akt)信号通路在改善机体胰岛素敏感性和葡萄糖摄取过程中发挥着关键作用^[6-8]。IRS-1是胰岛素受体的下游信号因子,是葡萄糖摄取的关键激酶,也是胰岛素抵抗的靶点,能接收到信号并激活PI3K传递胰岛素信号^[9]。PI3K在细胞膜上产生信号磷脂酰肌醇,是细胞内信号和囊泡运输通路的关键^[10],可促进Akt的激活,而PI3K功能失调会导致糖脂代谢异常^[11-12]。

糖痹康颗粒在著名经典中药方剂黄芪桂枝五物汤基础上化裁而来,治疗T2DM相关周围神经病变基础研究已有十余年时间,在降糖和减轻周围神经病变方面疗效显著^[13],但其治疗T2DM合并NAFLD的分子机制尚不明确。因此,在本次研究中,本课题组试图通过建立自发性肥胖型2型糖尿病Zucker糖尿病脂肪(ZDF)大鼠模型,通过分析一般状况、血清生物学指标、肝脏组织形态学观察及相对蛋白表达量,探讨PI3K/Akt信号通路在糖痹康颗粒治疗T2DM合并NAFLD中的作用。糖痹康颗粒调节糖脂代谢的潜在机制将有助于T2DM合并NAFLD的治疗。并为其作为辅助降糖和改善NAFLD药物的开发提供客观依据。

1 材料

1.1 动物 7周龄的SPF自发性的雄性ZDF(fa/+)大鼠8只为正常组,40只ZDF(fa/fa)大鼠建立自发性肥胖型T2DM模型。体质量180~200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2021-0006。大鼠在北京中医药大学逸夫实验楼SPF级环境下饲养,标准屏障系统。动物房饲养条件为温度(22±2)℃、湿度(60±10)%,12 h/12 h光照黑暗循环,自由进食进水。该实验已经由北京中医药大学实验动物伦理审查委员会审查通过,实验过程符合动物伦理相关规定,实验动物伦理批号BUCM-4-2021031003-1096。

1.2 药物 糖痹康颗粒由北京中医药大学东直门医院中药颗粒药房提供(北京康仁堂药业有限公司,3.5 g/袋,货号120119),颗粒1 g相当于生药3.17 g,实验前用去离子水配制后超声50 min完全溶解后,4℃保存。盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,国药准字H20023370,0.5 g,20片/盒)。

1.3 试剂 戊巴比妥钠(德国默克公司,货号57330);甘油三酯(TC)、总胆固醇(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,货号分别为20210923、20210923、20210918、20210918);游离脂肪酸(NEFA)、胰岛素(Insulin)试剂盒(北京华英生物技术研究所,货号分别为20210924、20211015);苏木素-伊红(HE)、过碘酸-Schiff(PAS)染色试剂盒(武汉塞维尔生物科技有限公司,货号分别为G1003、G1008);PI3K p85抗体、Akt抗体(美国PTG公司,货号分别为60225-1-Ig、60203-2-Ig);磷酸化(p)-Akt抗体、辣根过氧化物

酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(美国CST公司,货号分别为4060s、7054、7056);IRS-1抗体、p-IRS-1抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,货号分别为ab131487、ab47764、ab8245);Blocking One/Blocking One-P(日本Nacalai Tesque公司,货号L9M0072/L8K6032)。

1.4 仪器 BS-420型全自动生化仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);DR-200BS型酶标分析仪(无锡华卫德朗仪器有限公司);BX53型光学显微镜(日本Olympus公司);GT-1941型爱科来血糖仪(爱科来日本株式会社);NanoDrop2000型超微量分光光度计(美国Thermo公司);ChemiDocTMXRS+ with Image LabTM Software型凝胶成像系统、Mini-PROTEAN Tera System型垂直电泳仪、semi-Trans-Blot SD型半干转电转印仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 造模方法 T2DM合并NAFLD模型制备^[14-15],适应性喂养1周,正常组大鼠给予常规饲料饮食,其余大鼠给予5008特殊饲料(配方为粗蛋白23.5%、粗脂肪6.5%)诱导4周。5008饲料由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,批号20210414。4周后测大鼠尾尖快速血糖,选择非同日2次随机血糖水平≥11.1 mmol·L⁻¹即成功建立模型。

2.2 分组及给药 ZDF(fa/fa)大鼠成模后根据血糖、体质量,采用随机分层抽样法,将大鼠分为5组,每组8只。分别为模型组、盐酸二甲双胍组、糖痹康颗粒高、中、低剂量组。同周龄ZDF(fa/+)大鼠8只设为正常组。盐酸二甲双胍剂量参考LI等^[16]为0.135 g·kg⁻¹·d⁻¹;糖痹康颗粒高、中、低组剂量参考张岩等^[17]前期实验,分别按2.5、1.25、0.625 g·kg⁻¹·d⁻¹给药;模型组和正常组予灌服等体积去离子水;连续12周。

2.3 标本采集与处理 第12周末次给药后,禁食不禁水12 h,戊巴比妥钠麻醉成功后腹主动脉取血,静置4 h,4℃,3 000 r·min⁻¹离心15 min,离心半径13.5 cm,吸取上清,-20℃冰箱保存,以待生化指标检测。肝脏完整取出称质量,组织部分于4%多聚甲醛固定,部分于-80℃冰箱冻存待检。

2.4 体质量、进食量及血糖监测 各组大鼠在每4周清晨相同的时间点禁食不禁水12 h,采用尾尖静脉采血方法检测其空腹血糖,然后采用电子天平称量体质量。12周取材前食物称重测24 h进食量。

2.5 口服葡萄糖耐量(OGTT)实验 OGTT实验在

ZDF大鼠给药干预第12周进行。禁食12 h,对大鼠进行空腹血糖测量,为0 min血糖,然后称质量,以 $2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量给予50%葡萄糖,分别测定给糖后30、60、120 min血糖值。用曲线下面积(AUC)评价糖耐量。以血糖(BG)计算AUC, $AUC=1/4BG_{0\text{ min}}+1/2BG_{30\text{ min}}+3/4BG_{60\text{ min}}+1/2BG_{120\text{ min}}$ 。

2.6 血清生化指标检测 采用全自动生化仪检测各组大鼠血清血脂四项、游离脂肪酸;酶免法测空腹血清胰岛素(FINS)水平;并计算胰岛素抵抗指数 $HOMA-IR=\text{空腹血糖}(\text{FBG})\times\text{FINS}\cdot 22.5^{-1}$ 。

2.7 肝脏组织形态学及肝脏指数检测 大鼠取材后,先把肝脏进行称质量,计算肝脏指数(肝脏质量/体质量);取肝脏组织部分于4%多聚甲醛中固定,取固定后的肝脏组织,分别进行梯度乙醇脱水,二甲苯浸渍、石蜡浸蜡后,进行包埋。石蜡切片(4 μm)脱蜡至水,根据试剂盒所提供步骤进行HE、PAS染色,中性树脂胶进行透明封片,光镜下观察大鼠肝脏组织形态学、糖原及胶原纤维分布。

2.8 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 肝脏组织从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出,用消毒的剪刀、镊子等将每只大鼠肝脏组织剪下黄豆粒大小,加入适量RIPA裂解液后研磨,研磨好的组织在冰上静置30 min,将离心机4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷,参数设置为4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,离心半径13.5 cm。取上清液用于蛋白定量,蛋白样品中加入蛋白上样缓冲液、裂解液,蛋白质量浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将样品密封好于沸水中煮5 min,使蛋白质完全变性。制备10% SDS-PAGE凝胶,蛋白上样、电泳后转膜至PVDF膜上。将PVDF膜置于封闭液,于摇床60 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 封闭1 h。加入一抗(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用TBST洗涤PVDF薄膜,在室温下以100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 在摇床上冲洗3次,加入二抗(1:4 000),在摇床上50 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 孵育1 h,直至抗体完全结合。完成后,再次用TBST于摇床上漂洗3次。用无尘纸巾略吸去表面的

TBST,按照1:1配制ECLA液和B液,避光与PVDF膜反应2 min,打开凝胶成像系统进行显影,使用软件Image Lab和ImageJ对条带灰度值进行分析。

2.9 统计学方法 使用SPSS 20.0软件处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组对比采用单因素方差分析,数据满足正态分布及方差齐性,用最小显著性差异法(LSD)检验;满足正态分布,不满足方差齐性,用Dunnett'*t*检验;不符合正态分布,采用多样本非参数检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对进食量的影响 与正常组比较,模型组大鼠摄食量显著增多($P<0.01$);与模型组比较,各给药组糖尿病大鼠摄食量明显减少($P<0.05, P<0.01$)。二甲双胍组和糖痹康颗粒高、中、低剂量组日摄食量同模型组比分别降低了约17.1%、12.0%、20.4%和13.1%。见表1。

表1 糖痹康颗粒对大鼠日平均进食量影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Tangbikang on average daily food intake of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 进食量/g |
|-----------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 正常组 | | 25.17 \pm 0.44 |
| 模型组 | | 55.07 \pm 0.51 ²⁾ |
| 二甲双胍组 | 0.25 | 45.60 \pm 2.41 ⁴⁾ |
| 糖痹康颗粒高剂量组 | 2.50 | 48.38 \pm 4.01 ³⁾ |
| 糖痹康颗粒中剂量组 | 1.25 | 43.83 \pm 0.86 ⁴⁾ |
| 糖痹康颗粒低剂量组 | 0.625 | 47.81 \pm 0.45 ⁴⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2-表7同)

3.2 对体质量的影响 与正常组比较,模型组大鼠药物干预第8、12周时体质量显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);其余各组糖尿病大鼠体质量与模型组比较在给药4、8、12周时差异无统计学意义。见表2。

表2 糖痹康颗粒对各组ZDF大鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Tangbikang on body weight of ZDF rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 0周 | 4周 | 8周 | 12周 |
|-----------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 正常组 | | 319.87 \pm 8.08 | 347.50 \pm 7.93 | 375.13 \pm 12.43 | 381.63 \pm 11.54 |
| 模型组 | | 346.29 \pm 7.78 ²⁾ | 343.00 \pm 9.88 | 339.43 \pm 8.30 ²⁾ | 342.43 \pm 6.90 ²⁾ |
| 二甲双胍组 | 0.25 | 352.75 \pm 5.68 | 352.63 \pm 2.92 | 344.75 \pm 8.14 | 331.13 \pm 15.26 |
| 糖痹康颗粒高剂量组 | 2.50 | 355.00 \pm 18.07 | 353.63 \pm 21.86 | 348.50 \pm 21.75 | 344.88 \pm 23.38 |
| 糖痹康颗粒中剂量组 | 1.25 | 346.38 \pm 20.58 | 345.13 \pm 22.52 | 339.75 \pm 26.85 | 340.25 \pm 28.39 |
| 糖痹康颗粒低剂量组 | 0.625 | 344.04 \pm 16.80 | 341.50 \pm 8.49 | 339.00 \pm 9.29 | 339.00 \pm 10.62 |

3.3 对空腹血糖的影响 与正常组比较,模型组大鼠FBG增高,8周达到最高点为21.57 mmol·L⁻¹,随后血糖趋于平稳高值;与模型组比较,二甲双胍组

FBG显著降低($P<0.01$),在干预12周FBG降至15.98 mmol·L⁻¹。与模型组比较,糖痹康颗粒给药可降低FBG水平,且呈浓度依赖性。见表3。

表3 糖痹康颗粒对ZDF大鼠FBG的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 0周 | 4周 | 8周 | 12周 |
|-----------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 正常组 | | 3.33±0.34 | 3.49±0.35 | 3.13±0.38 | 3.54±0.41 |
| 模型组 | | 20.51±3.12 ²⁾ | 19.73±2.33 ²⁾ | 21.57±4.12 ²⁾ | 20.30±1.70 ²⁾ |
| 二甲双胍组 | 0.25 | 19.41±4.38 | 17.11±4.25 | 15.40±2.16 | 15.98±0.75 ⁴⁾ |
| 糖痹康颗粒高剂量组 | 2.50 | 19.41±3.43 | 15.66±2.08 ³⁾ | 17.99±0.57 | 16.07±0.71 ⁴⁾ |
| 糖痹康颗粒中剂量组 | 1.25 | 19.70±3.29 | 19.26±3.14 | 18.80±1.89 | 18.84±1.75 ³⁾ |
| 糖痹康颗粒低剂量组 | 0.625 | 20.13±3.68 | 20.13±3.87 | 21.24±2.01 | 20.68±1.74 |

3.4 对糖耐量的影响 与正常组比较,模型组OGTT血糖值和AUC显著增高,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,0~60 min糖痹康颗粒各组

和二甲双胍组大鼠的OGTT BG值整体降低,AUC水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表4。

表4 糖痹康颗粒对ZDF大鼠糖耐量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 0 min/mmol·L ⁻¹ | 30 min/mmol·L ⁻¹ | 60 min/mmol·L ⁻¹ | 120 min/mmol·L ⁻¹ | AUC |
|-----------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 正常组 | | 3.54±0.41 | 5.63±0.60 | 4.59±0.95 | 3.55±0.43 | 8.86±1.34 |
| 模型组 | | 20.30±1.70 ²⁾ | 30.40±1.84 ²⁾ | 27.90±4.20 ²⁾ | 24.36±5.12 ²⁾ | 53.54±1.97 ²⁾ |
| 二甲双胍组 | 0.25 | 15.98±0.75 ⁴⁾ | 26.15±1.07 ⁴⁾ | 25.43±1.78 | 20.73±0.43 | 45.69±1.75 ⁴⁾ |
| 糖痹康颗粒高剂量组 | 2.50 | 16.07±0.71 ⁴⁾ | 26.75±2.19 ³⁾ | 25.23±1.38 | 21.13±1.00 | 45.79±2.61 ⁴⁾ |
| 糖痹康颗粒中剂量组 | 1.25 | 18.84±1.75 ⁴⁾ | 26.86±2.94 | 24.61±1.18 | 22.71±0.89 | 45.83±2.87 ⁴⁾ |
| 糖痹康颗粒低剂量组 | 0.625 | 20.68±1.74 | 29.90±1.08 | 27.74±3.68 | 25.10±4.96 | 51.32±4.85 |

3.5 对HOMA-IR、F-INS的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清FINS水平、HOMA-IR指数均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,二甲双胍组和糖痹康颗粒各组大鼠血清FINS水平、HOMA-IR指数均显著降低($P<0.01$)。见表5。

3.6 对脂代谢和肝指数影响 与正常组比较,模型组大鼠血清TG、TC、HDL-C及NEFA水平均明显升高($P<0.05, P<0.01$),模型组大鼠肝脏指数显著升高($P<0.01$);模型组大鼠LDL-C水平呈升高趋势,但差异无统计学意义。与模型组比较,二甲双胍组和糖痹康颗粒各组大鼠血清TG、TC、LDL-C及NEFA水平降低,且糖痹康颗粒各组TG、LDL-C和NEFA水平呈浓度依赖趋势,即糖痹康颗粒高剂量组最优。与模型组比较,糖痹康颗粒高剂量组大鼠HDL-C水平升高($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠肝脏指数呈降低趋势,但差异无统计学意义。见表6。

表5 糖痹康颗粒对ZDF大鼠胰岛素抵抗指数、胰岛素的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | FINS /mU·L ⁻¹ | HOMA-IR |
|-----------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| 正常组 | | 9.87±0.97 | 1.56±0.31 |
| 模型组 | | 23.62±0.48 ²⁾ | 21.34±2.23 ²⁾ |
| 二甲双胍组 | 0.25 | 12.42±0.23 ⁴⁾ | 8.82±0.54 ⁴⁾ |
| 糖痹康颗粒高剂量组 | 2.50 | 13.27±1.12 ⁴⁾ | 9.39±1.02 ⁴⁾ |
| 糖痹康颗粒中剂量组 | 1.25 | 14.55±0.70 ⁴⁾ | 12.20±1.53 ⁴⁾ |
| 糖痹康颗粒低剂量组 | 0.625 | 15.18±0.78 ⁴⁾ | 13.96±1.59 ⁴⁾ |

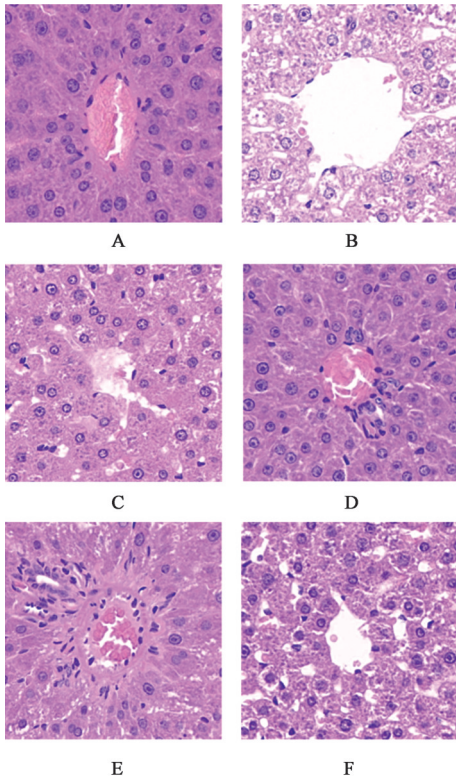
3.7 对ZDF大鼠肝组织病理形态学的影响 HE染色结果显示正常组肝小叶结构完全正常,肝小叶边缘清晰,轮廓清晰;圆形核位于细胞中心。模型组大鼠肝小叶结构不清;肝髓放射状排列不明显,大部分细胞肿大且大小不一,边缘模糊,细胞质内充

表6 糖痹康颗粒对ZDF大鼠脂代谢和肝指数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 6 Effect of Tangbikang on lipid metabolism and liver index of ZDF rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | TC/mmol·L ⁻¹ | TG/mmol·L ⁻¹ | HDL-C/mmol·L ⁻¹ | LDL-C/mmol·L ⁻¹ | NEFA/mmol·L ⁻¹ | 肝指数 |
|-----------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 正常组 | | 2.45±0.47 | 1.01±0.28 | 1.40±0.36 | 0.74±0.08 | 0.66±0.04 | 0.028±0.00 |
| 模型组 | | 5.23±0.36 ²⁾ | 5.30±0.29 ²⁾ | 2.10±0.57 ¹⁾ | 0.87±0.11 | 2.50±0.25 ²⁾ | 0.048±0.01 ²⁾ |
| 二甲双胍组 | 0.25 | 3.92±1.48 ⁴⁾ | 2.78±0.83 ⁴⁾ | 2.39±0.91 | 0.53±0.04 ⁴⁾ | 0.50±0.12 ⁴⁾ | 0.044±0.00 |
| 糖痹康颗粒高剂量组 | 2.50 | 4.34±0.53 ³⁾ | 3.36±0.98 ⁴⁾ | 2.77±0.41 ³⁾ | 0.66±0.03 ³⁾ | 0.62±0.14 ⁴⁾ | 0.041±0.00 |
| 糖痹康颗粒中剂量组 | 1.25 | 3.94±0.52 ⁴⁾ | 3.75±0.61 ⁴⁾ | 2.25±0.37 | 0.68±0.09 ³⁾ | 0.68±0.09 ⁴⁾ | 0.039±0.00 |
| 糖痹康颗粒低剂量组 | 0.625 | 4.40±0.92 | 4.33±0.28 ⁴⁾ | 2.37±0.91 | 0.71±0.14 | 0.72±0.11 ⁴⁾ | 0.039±0.00 |

满不同大小的脂肪滴,将细胞核推向外周,肝细胞脂肪化明显。二甲双胍组与正常组相似。不同剂量的糖痹康颗粒均可不同程度地减轻肝脏损伤,但以糖痹康颗粒高剂量治疗组最为显著。PAS染色结果显示正常组肝脏可见丰富紫红色糖原颗粒均匀分布于肝细胞内。与正常组比较,模型组肝脏细胞可见显著脂肪空泡,胞浆中紫红色糖原颗粒显著减少,颜色较浅;其中二甲双胍组和糖痹康颗粒高、中剂量组染色更接近正常组。见图1、图2。



注:A.正常组;B.模型组;C.二甲双胍组;D~F.糖痹康颗粒高、中、低剂量组(图2、图3同)

图1 糖痹康颗粒对大鼠肝组织形态学的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of Tangbikang on morphological observation of rat liver tissue (HE, ×400)

3.8 对ZDF大鼠肝脏PI3K、Akt、IRS1蛋白及其磷酸化水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠PI3K蛋

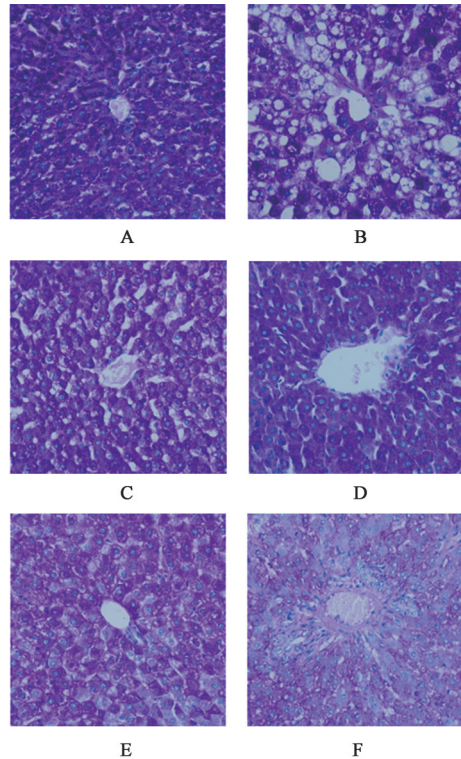


图2 糖痹康颗粒对大鼠肝组织形态学的影响(PAS,×400)

Fig. 2 Effect of Tangbikang on morphological observation of rat liver tissue (PAS, ×400)

白、p-IRS1/IRS1、p-Akt/Akt表达明显降低($P<0.01$);与模型组比较,糖痹康高剂量组的PI3K蛋白、p-IRS1/IRS1、p-Akt/Akt表达显著提高($P<0.01$);糖痹康颗粒中、低剂量组治疗后与模型组比差异无统计学意义。见图3、表7。

4 讨论

本实验所选用ZDF大鼠被广泛认为是一种成功的2型糖尿病肥胖动物模型^[18-20]。由于该模型能很好地模拟肥胖相关T2DM的发生和发展,是由高血糖的Zucker(fa/fa)大鼠近交繁殖得到的亚系,其特点是由于瘦素受体基因突变而变得摄食过多,加之Puma5008高脂饲料喂养诱导,ZDF大鼠会出现高脂血症、糖耐量受损等明显的糖脂代谢紊乱^[21-22]。

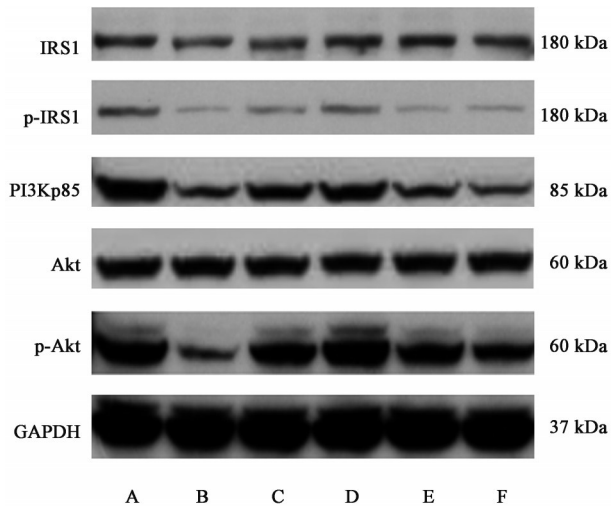


图3 各组大鼠肝脏组织PI3K、Akt、IRS1、p-IRS1、p-Akt蛋白表达
Fig. 3 Expression of PI3K, Akt, IRS1, p-IRS1, p-Akt protein in liver tissue of rats in each group

表7 糖痹康颗粒对各组ZDF大鼠肝组织相关靶蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Tangbikang on liver tissue-related target proteins of ZDF rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | p-IRS1/IRS1 | PI3K/GAPDH | p-Akt/Akt |
|-----------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 正常组 | | 2.54±0.75 | 0.75±0.05 | 0.88±0.23 |
| 模型组 | | 0.22±0.17 ²⁾ | 0.26±0.10 ²⁾ | 0.19±0.08 ²⁾ |
| 二甲双胍组 | 0.25 | 1.34±0.55 ⁴⁾ | 0.49±0.08 ³⁾ | 0.80±0.23 ⁴⁾ |
| 糖痹康颗粒高剂量组 | 2.50 | 1.39±0.39 ⁴⁾ | 0.53±0.07 ⁴⁾ | 0.88±0.31 ⁴⁾ |
| 糖痹康颗粒中剂量组 | 1.25 | 0.58±0.20 | 0.28±0.09 | 0.43±0.10 |
| 糖痹康颗粒低剂量组 | 0.625 | 0.62±0.21 | 0.23±0.15 | 0.29±0.10 |

NEFA水平明显下降, HDL-C水平升高。本研究分别通过PAS、HE染色观察肝脏组织病理发现, 经糖痹康颗粒治疗后不仅肝糖原水平升高, 而且能显著改善T2DM肝脏组织肝细胞的脂滴沉积和肝小叶的纤维化改变。肝脏组织病理学结构的改善, 推测可能是通过促进肝脏胰岛素信号通路的作用机制来改善IR。因此, 为了进一步研究糖痹康颗粒对糖尿病ZDF大鼠的降糖降脂作用机制, 本课题组对胰岛素信号通路中一些关键蛋白的表达分别进行了蛋白免疫印记技术分析。结果显示糖痹康颗粒治疗后ZDF大鼠肝脏组织p-IRS-1、PI3K、p-Akt蛋白水平表达升高, 从而对下游信号分子产生影响, 促进糖原合成及减少糖异生。该研究取得了跟以往中药单体及中药复方治疗T2DM体内实验相似的实验结果^[23-26]。

PI3K/Akt信号通路在生物生长和关键细胞过程(如葡萄糖稳态、脂质代谢、蛋白质合成和细胞增殖和存活)中通过介导生长因子信号在细胞生理学中发挥核心作用^[27]。当胰岛素与胰岛素受体结合

本研究从临床实际问题出发, 观察糖痹康颗粒对ZDF大鼠糖脂代谢的影响以及改善T2DM合并NAFLD的作用机制。在实验中首先研究了糖痹康颗粒治疗T2DM的作用。结果表明, 糖痹康颗粒不仅能降低ZDF大鼠FBG, 在干预4周时最显著, 与前期研究一致^[13]; 也可减轻体质量和减少多食的典型糖尿病症状。药物干预12周, 糖耐量实验表明糖痹康颗粒高、中剂量组可使ZDF大鼠各时间点血糖降低, 说明糖痹康颗粒可改善ZDF大鼠空腹血糖及糖耐量异常。FINS、HOMA-IR结果显示模型组较正常组显著升高, 胰岛素抵抗明显; 糖痹康颗粒各剂量组FINS及HOMA-IR较模型组显著降低, 说明糖痹康颗粒可有效改善ZDF大鼠IR。其次, 本研究糖痹康颗粒治疗对NAFLD及脂代谢的影响。结果表明, 糖痹康颗粒治疗后血清TG、TC、LDL-C及

时, 激活的胰岛素受体磷酸化后使胰岛素受体底物(IRS)-1/2酪氨酸位点激活PI3K; 活化的PI3K可以催化4, 5-2磷脂酰肌醇磷酸(PIP2), 产生PIP3, PIP3可能是激活Akt的第二信使, 活化的Akt通过调控下游分子发挥葡萄糖吸收、糖酵解、糖原合成和蛋白质合成的代谢生物学作用^[22]此外, PI3K/Akt信号通路与黄芩^[28-30]、黄连^[31]、芍药^[32]、女贞子^[33-34]、黄芪^[35]之间存在密切相关。

本研究存在一定的局限性。T2DM的综合生物学发生与肝脏、骨骼肌、脂肪组织3大代谢器官息息相关^[36]。肝脏和骨骼肌中的异位脂质积累触发通路, 损害胰岛素信号, 导致肌肉葡萄糖摄取减少和肝糖原合成减少; 随后巨噬细胞浸润到白色脂肪组织(WAT)导致脂肪分解增加, 这进一步增加了肝脏甘油三酯的合成和高脂血症。以上这些底物调控过程大多不依赖于肝脏中的胰岛素信号^[37]。因此本研究仅从肝脏的胰岛素信号角度探讨糖痹康颗粒治疗T2DM, 存在一定的局限性。

综上, 糖痹康颗粒治疗与IRS1、p-IRS-1、PI3K、

Akt及p-Akt的蛋白表达水平密切相关,提示PI3K通路在糖痹康颗粒治疗T2DM合并NAFLD分子机制中非常重要。实验结果显示,糖痹康颗粒治疗糖尿病ZDF大鼠可降低FBG、OGTT、胰岛素抵抗指数,减轻肝脏脂肪变性。糖痹康颗粒的治疗作用可能是通过激活IRS/PI3K/Akt通路来降低胰岛素受体底物。然而,本研究存在一定的局限性,糖痹康颗粒活性的详细机制有待结合肝脏、骨骼肌和白色脂肪组织进一步综合分析。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] DEMIR S, NAWROTH P P, HERZIG S, et al. Emerging targets in type 2 diabetes and diabetic complications[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(18): e2100275.

[2] BELLARY S, KYROU I, BROWN J E, et al. Type 2 diabetes mellitus in older adults: Clinical considerations and management [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17(9): 534-548.

[3] YABIKU K. Efficacy of Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in patients with concurrent type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis: A review of the evidence [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12:768850.

[4] TILG H, ADOLPH T E, DUDEK M, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: The interplay between metabolism, microbes and immunity[J]. *Nat Metab*, 2021, 3(12): 1596-1607.

[5] MU W, CHENG X F, LIU Y, et al. Potential nexus of non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: insulin resistance between hepatic and peripheral tissues [J]. *Front Pharmacol*, 2019, doi: 10.3389/fphar.2018.01566.

[6] MA Q Y, ZHAI R H, XIE X Q, et al. Hypoglycemic effects of lycium barbarum polysaccharide in type 2 diabetes mellitus mice via modulating gut microbiota [J]. *Front Nutr*, 2022, doi: 10.3389/fnut.2022.916271.

[7] CHENG C, LIU X H, HE J, et al. Apolipoprotein A4 restricts diet-induced hepatic steatosis via SREBF1-mediated lipogenesis and enhances IRS-PI3K-Akt signaling [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2022, 66(18): e2101034.

[8] YANG J Y, ZHANG T T, DONG Z, et al. Dietary supplementation with exogenous sea-cucumber-derived ceramides and glucosylceramides alleviates

insulin resistance in high-fructose-diet-fed rats by upregulating the IRS/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(32): 9178-9187.

[9] LI Z R, JIA R B, WU J, et al. Sargassum fusiforme polysaccharide partly replaces acarbose against type 2 diabetes in rats [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 170: 447-458.

[10] DI-LUOFFO M, BEN-MERIE M, LEFEBVRE P, et al. PI3K functions as a hub in mechanotransduction [J]. *Trends Biochem Sci*, 2021, 46(11): 878-888.

[11] XIAO H M, SUN X H, LIN Z Y, et al. Gentiopicroside targets PAQR3 to activate the PI3K/Akt signaling pathway and ameliorate disordered glucose and lipid metabolism [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(6): 2887-2904.

[12] HUANG Z F, WANG C E, CHEN J, et al. Ameliorating effect on glycolipid metabolism of spirulina functional formulation combination from traditional Chinese medicine [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3910116.

[13] YANG X W, LIU Q, GUO J, et al. Antioxidation and anti-inflammatory activity of Tang Bi Kang in rats with diabetic peripheral neuropathy [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, doi:10.1186/s12906-015-0600-0.

[14] KIM J Y, PARK K J, HWANG J Y, et al. Activating transcription factor 3 is a target molecule linking hepatic steatosis to impaired glucose homeostasis [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2): 349-359.

[15] ZHOU R, LIN C, CHENG Y Z, et al. Liraglutide alleviates hepatic steatosis and liver injury in T2DM rats via a GLP-1R dependent AMPK pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, doi: 10.3389/fphar.2020.600175.

[16] LI M, DING L, HU Y L, et al. Herbal formula LKLL ameliorates hyperglycaemia, modulates the gut microbiota and regulates the gut-liver axis in Zucker diabetic fatty rats [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(1): 367-382.

[17] 张岩,穆晓红,孙文,等.糖痹康对糖尿病大鼠坐骨神经Keap1/Nrf2信号的作用机制[J].*中华中医药杂志*, 2016,31(5):1822-1827.

[18] XIA C D, ZHANG X L, CAO T S, et al. Hepatic transcriptome analysis revealing the molecular pathogenesis of type 2 diabetes mellitus in Zucker diabetic fatty rats [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, doi:10.3389/fendo.2020.565858.

[19] WANG J Y, CHENG Y Z, YANG S L, et al.

- Dapagliflozin attenuates hyperglycemia related osteoporosis in ZDF rats by alleviating hypercalciuria [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, doi: 10.3389/fendo.2019.00700.
- [20] ANDREASSEN K V, LARSEN A T, SONNE N, et al. KBP-066A, a long-acting dual amylin and calcitonin receptor agonist, induces weight loss and improves glycemic control in obese and diabetic rats [J]. *Mol Metab*, 2021, doi: 10.1016/j.molmet.2021.101282.
- [21] SULTAN A, SINGH J, HOWARTH F C. Mechanisms underlying electro-mechanical dysfunction in the Zucker diabetic fatty rat heart: A model of obesity and type 2 diabetes [J]. *Heart Fail Rev*, 2020, 25 (5) : 873-886.
- [22] MAO Z J, WENG S Y, LIN M, et al. Yunpi Heluo decoction attenuates insulin resistance by regulating liver miR-29a-3p in Zucker diabetic fatty rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 243: 111966.
- [23] 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, doi: 10.1016/j.jep.2021.114251.
- [24] FAN Y B, HE Z W, WANG W, et al. Tangganjian decoction ameliorates type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver disease in rats by activating the IRS/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 733-737.
- [25] DAI B, WU Q X, ZENG C X, et al. The effect of Liuwei Dihuang decoction on PI3K/Akt signaling pathway in liver of type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats with insulin resistance [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 192: 382-389.
- [26] GONG P, XIAO X Y, WANG S, et al. Hypoglycemic effect of astragaloside IV via modulating gut microbiota and regulating AMPK/SIRT1 and PI3K/Akt pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, doi: 10.1016/j.jep.2021.114558.
- [27] HUANG X J, LIU G H, GUO J, et al. The PI3K/Akt pathway in obesity and type 2 diabetes [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1483-1496.
- [28] HOU Y Z, LIANG Z Q, QI LY, et al. Baicalin targets hsp70/90 to regulate PKR/PI3K/Akt/eNOS signaling pathways [J]. *Molecules*, 2022, 27 (4) : 1432.
- [29] FENG T, ZHOU L Y, GAI S C, et al. Acacia catechu (L. f.) willd and scutellaria baicalensis georgi extracts suppress LPS-induced pro-inflammatory responses through NF- κ B, MAPK, and PI3K-Akt signaling pathways in alveolar epithelial type II cells [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(12): 3251-3260.
- [30] HOU F, YU Z, CHENG Y, et al. Deciphering the pharmacological mechanisms of *Scutellaria baicalensis* Georgi on oral leukoplakia by combining network pharmacology, molecular docking and experimental evaluations [J]. *Phytomedicine*, 2022, 103: 154195.
- [31] CUI X, QIAN D W, JIANG S, et al. Scutellariae Radix and coptidis rhizoma improve glucose and lipid metabolism in T2DM rats via regulation of the metabolic profiling and MAPK/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3634.
- [32] ZHANG L L, WEI W. Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of paeoniflorin and total glucosides of paeony [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107452.
- [33] KONG Y, MA X, ZHANG X, et al. The potential mechanism of Fructus Ligustri Lucidi promoting osteogenetic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells based on network pharmacology, molecular docking and experimental identification [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 10640-10653.
- [34] TIAN G, CHEN J, LUO Y, et al. Ethanol extract of *Ligustrum lucidum* Ait. leaves suppressed hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 246.
- [35] YEH T S, LEI T H, LIU J F, et al. *Astragalus membranaceus* enhances myotube hypertrophy through PI3K-Mediated Akt/mTOR signaling phosphorylation [J]. *Nutrients*, 2022, 14(8): 1670.
- [36] RODEN M, SHULMAN G I. The integrative biology of type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2019, 576 (7785) : 51-60.
- [37] SAMUEL T, SHULMAN G I. The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126 (1) : 12-22.

[责任编辑 张丰丰]