

翻白草总黄酮对2型糖尿病db/db小鼠降血糖的作用机制

孔晓妮^{1,2}, 崔海燕², 周洪雷^{1*}

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355;

2. 山东中医药高等专科学校, 山东烟台 264199)

[摘要] 目的:探讨翻白草总黄酮对2型糖尿病db/db小鼠的血糖、血脂、氧化应激、组织病理及肝脏磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路的影响。方法:24只db/db小鼠随机分为模型组、盐酸二甲双胍组(0.2 g·kg⁻¹)、翻白草总黄酮低、高剂量组(0.1, 0.4 g·kg⁻¹),另取6只db/m小鼠作为正常组。药物干预4周后,检测血清中空腹血糖(FBG),糖化血清蛋白(GSP),总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),空腹血糖胰岛素(FINS),丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平,计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),检测肝糖原含量;苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏、胰腺组织病理学变化;采用蛋白免疫印迹法(Western bolt)分别检测肝脏组织中胰岛素受体β(IRβ),胰岛素受体底物-1(IRS-1),PI3K,磷酸化PI3K(p-PI3K),Akt,p-Akt,葡萄糖转运蛋白4(GLUT4)蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组肝细胞排列紊乱,胞浆内可见大量脂肪空泡、脂滴,伴有部分细胞坏死。胰腺胰岛体积减小,胰岛组织和腺泡细胞界限不明显,细胞排列紊乱,部分细胞空泡化;血清FBG,GSP,TC,TG,LDL-C,FINS,MDA水平显著升高($P<0.01$),血清HDL-C,SOD水平明显降低($P<0.05$),肝糖原含量显著降低($P<0.01$),肝脏组织IRβ,IRS-1,p-PI3K/PI3K,p-Akt/Akt和GLUT4蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,翻白草总黄酮低、高剂量组肝细胞形态结构较完整,空泡样变、水肿坏死显著减少。胰腺结构清晰,被膜结构完整,胰岛分布正常,结构完整。血清FBG,GSP,TC,TG,FINS,MDA水平明显降低($P<0.05$),血清HDL-C,SOD水平明显升高($P<0.05$),肝糖原含量显著升高($P<0.01$),肝脏组织IRS-1,p-PI3K/PI3K,p-Akt/Akt和GLUT4蛋白表达明显升高($P<0.05$)。结论:翻白草总黄酮可显著改善糖脂代谢紊乱及胰岛素抵抗,抗氧化应激,减轻肝脏、胰腺的病理损伤,提高肝脏组织PI3K/Akt信号通路中的相关蛋白表达,从而防治2型糖尿病。

[关键词] 翻白草总黄酮; db/db小鼠; 2型糖尿病; 糖脂代谢; 磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)

[中图分类号] R2-0;R289;R587.1;R977.1+5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)03-0078-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210336

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201202.1116.001.html>

[网络出版日期] 2020-12-2 13:06

Hypoglycemic Effect of Total Flavonoids from *Potentillae Discoloris* Herba in Type 2 Diabetic db/db Mice

KONG Xiao-ni^{1,2}, CUI Hai-yan², ZHOU Hong-lei^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250355, China; 2. Shandong College of TCM, Yantai 264199, China)

[Abstract] **Objective:** The hypoglycemic effects and mechanisms of total flavonoids from *Potentillae Discoloris* Herba (TFE) on insulin resistance through the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway in db/db mice were investigated. **Method:** The 24 db/db mice were randomly divided into four groups, model group, metformin group and TFE 100, 400 mg·kg⁻¹ group respectively. The 6 db/m mice as normal control group. After 4 weeks treatment, the mice were processed and the levels of fasting blood glucose

[收稿日期] 20200826(007)

[基金项目] 山东省高等学校科技计划项目(J18KA303);山东省中医药科技发展计划项目(2013-141)

[第一作者] 孔晓妮,在读博士,副教授,从事中药活性成分及质量控制研究,E-mail:kongxiaoni@163.com

[通信作者] *周洪雷,博士,教授,博士生导师,从事中药及天然药物的有效成分和质量控制研究,E-mail:zhouhongleitcm@163.com

(FBG), glycated serum protein(GSP), fasting blood insulin(FINS), triglyceride(TG), total cholesterol(TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in serum were detected. Homeostatic model assessments of insulin resistance(HOMA-IR) were quantified. Hematoxylin-eosin (HE) staining of liver and pancreatic tissues were examined. The expression of IR β , IRS-1, PI3K, phosphorylation-PI3K (p-PI3K), Akt, phosphorylation-Akt (p-Akt) and glucose transporter 4 (GLUT4) in livers were assessed by Western blot. **Result:** Compared with normal group, model group showed liver and pancreas injury. FBG, GSP, TC, TG, LDL-C, FINS and MDA levels in serum were significantly increased ($P<0.01$), HDL-C and SOD levels in serum were significantly decreased ($P<0.05$), liver glycogen content was significantly decreased ($P<0.01$), as well as expression of IR, IRS-1, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt and GLUT4 protein in liver tissues were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with model group, TFE was able to relieve liver and pancreas injury, while the levels of FBG, GSP, TC, TG, FINS and MDA in serum were significantly decreased ($P<0.05$), HDL-C and SOD levels liver were significantly increased ($P<0.05$), liver glycogen content was significantly increased ($P<0.01$), and the expressions of IRS-1, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt and GLUT4 protein in liver tissues were significantly up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion:** These findings indicate that TFE has the potential to reduce blood sugar and alleviates insulin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in the livers of db/db mice.

[Key words] total flavonoids from *Potentillae Discoloris Herba* extracts; db/db mice; type 2 diabetes mellitus; glucolipid metabolism; phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)

2型糖尿病是由于胰岛素分泌相对不足或胰岛素抵抗引起的糖脂代谢紊乱性疾病。2019年全世界成人患糖尿病人数约4.63亿,而我国占1.164亿,其中超过90%患者为2型糖尿病,糖尿病已经成为严重危害人类健康和生命的慢性非传染性疾病之一。胰岛素抵抗(IR)是2型糖尿病主要特征^[1]。胰岛素主要通过磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路进行调节^[2],PI3K/Akt信号通路是与胰岛素抵抗相关的主要信号通路之一,其参与葡萄糖转运等多种机体活动,该通路异常是糖尿病发病的重要原因^[3]。翻白草 *Potentillae Discoloris Herba* 为蔷薇科植物翻白草 *Potentilla discolor* 的干燥全草,历代本草记载其有止血止痢、清热解毒、消肿的作用^[4]。民间多将其代茶饮用来治疗2型糖尿病。现代药理研究表明,翻白草具有镇痛、抗炎、抗氧化、降血糖等作用^[5-6]。翻白草总黄酮能够纠正链脲佐菌素诱导的2型糖尿病大鼠模型糖脂代谢紊乱,减弱外周胰岛素抵抗^[7-8]。本实验在前期研究基础上,采用自发性2型糖尿病 db/db 小鼠模型,以翻白草总黄酮干预,以PI3K/Akt信号通路为切入点,探讨翻白草总黄酮抗糖尿病作用及分子机制。

1 材料

1.1 动物 7周龄 SPF 级 db/db 小鼠 24 只(雄性), db/m 小鼠 6 只(雄性),购自常州卡文斯实验动物有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(苏)2016-

0010。本实验所使用 db/db 和 db/m 小鼠及实验饲养条件均符合国家科学技术委员会制定的《实验动物管理条例》。实验方案经山东省医学科学院药物研究所动物伦理委员会批准,实验动物质量合格证号 201934249。

1.2 试剂 翻白草[北京同仁堂(亳州)饮片有限公司,批号 5010110112P],经山东中医药高等专科学校王兴顺副教授鉴定,为蔷薇科委陵菜属植物翻白草 *P. discolor* 的干燥全草。翻白草总黄酮由本课题组自制(采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠法测定总黄酮质量分数为 72.3%);盐酸二甲双胍(中美上海施贵宝制药有限公司,批号 ABG0372);小鼠胰岛素酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 20191202);肝/肌糖原测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 A043-1-1);BCA 蛋白浓度测定试剂盒,苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 PC0020, G1120);胰岛素受体 β (IR β)兔多克隆抗体,胰岛素受体底物-1(IRS-1)抗体,Akt 兔多克隆抗体,磷酸化 Akt(p-Akt)抗体,葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)抗体,PI3K 兔多克隆抗体,p-PI3K 多克隆抗体(美国 Cell Singaling Technology 公司,批号分别为 3025T, 4060T,07-1404,3407T,4257T,4228T,4691T);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),免疫球蛋白(Ig)G 二抗(上海江林生物科技有限公司,批号分别为

PAB36269, SAB43714)。

1.3 仪器 7160型全自动生化分析仪(日本日立公司); One-Touch 稳豪型血糖仪(美国强生公司); mini protean 3 cell型电泳仪(美国Bio-Rad公司); MK3型酶标仪(芬兰雷勃公司); K30型干式恒温器(杭州爽盛仪器有限公司); HM340E型石蜡切片机(德国Microm International GmbH公司); icen-24R型高速冷冻离心机(杭州奥盛仪器有限公司); Tanon-5200型全自动化学发光分析仪(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 db/db小鼠24只, 30~40 g, 按血糖值随机分为模型组、盐酸二甲双胍组, 翻白草总黄酮低、高剂量组, 每组6只; 取db/m小鼠6只设为正常组。给药剂量结合人体给药剂量按体表面积折算为小鼠剂量^[9-11], 盐酸二甲双胍组剂量为200 mg·kg⁻¹, 翻白草总黄酮低剂量为100 mg·kg⁻¹, 高剂量为400 mg·kg⁻¹。各组灌胃给药, 每日1次, 连续4周, 模型组和空白组灌胃等体积蒸馏水。

2.2 全自动生化仪检测血清中空腹血糖(FBG), 总胆固醇(TC), 甘油三酯(TG), 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、含量 各组小鼠给药4周后, 禁食过夜, 眼眶取血, 37℃放置30 min, 3 000 r·min⁻¹离心10 min, 分离血清。采用全自动生化仪检测血清中FBG, TC, TG, LDL-C, HDL-C含量。

2.3 ELISA检测血清胰岛素含量 按试剂盒说明, 采用ELISA法测定血清胰岛素水平, 计算胰岛素抵抗指数, 胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)=空腹血糖(FBG, mmol·L⁻¹)×空腹胰岛素(FINS, mIU·L⁻¹)/22.5。

2.4 糖化血清蛋白(GSP), 丙二醛(MDA), 超氧化物歧化酶(SOD)及肝糖原含量测定 严格按照试剂盒说明, 采用微板法测定血清中GSP含量, 采用羟胺法(TBA法)测定血清中MDA含量, 采用WST-1法测定血清中SOD含量, 采用硫酸蒽酮法测定肝脏组织中糖原含量。

2.5 HE染色观察肝脏、胰腺组织病理形态学改变 处死小鼠后, 取肝脏、胰腺放于4%多聚甲醛溶液中固定24 h, 脱水, 石蜡包埋, 切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 苏木素染色, 伊红染色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片, 显微镜下观察并拍摄图像。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏中IRβ, IRS-1, PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, GLUT4蛋白

表达 将冷冻的肝脏组织解冻, 取100 mg研磨, 每组3个样本, 加入适量预冷的含1%蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液裂解, BCA蛋白浓度测定试剂盒蛋白定量, SDS-PAGE电泳, 转膜、封闭、加入一抗(各指标一抗稀释比例均为1:1 000), 室温孵育1 h, 洗涤后置于1:1万稀释的二抗中, 室温孵育1 h, 充分洗涤后ECL化学发光显影, 将膜置于全自动化学发光分析仪中检测, 通过Tanon GIS软件读取相关条带灰度值。

2.7 统计学分析 采用SPSS 21.0统计软件进行统计学处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据满足正态分布采用单因素方差分析, 方差齐采用最小显著性差异法(LSD)对多样本均数进行两两比较, 方差不齐组间比较采用Tamhane's T2法; 数据不满足正态分布采用秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对db/db小鼠糖代谢的影响 与正常组比较, db/db小鼠血清中FBG水平显著较低($P < 0.01$); 与模型组比较, 翻白草总黄酮高、低剂量组均能够明显降低小鼠血清中FBG水平($P < 0.05$)。血清中GSP可反映过去1~3周内平均血糖水平。给药4周后, 测定血清中GSP含量, 与正常组比较, 模型组小鼠的GSP含量显著增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 翻白草总黄酮低、高剂量组可以明显降低GSP含量($P < 0.05, P < 0.01$)。FBG, GSP结果均表明翻白草总黄酮可以有效控制2型糖尿病db/db小鼠的血糖水平。见表1。

表1 翻白草总黄酮对血糖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of flavonoids from *Potentillae Discoloris Herba* on blood glucose ($\bar{x} \pm s, n=6$) mmol·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FBG	GSP
正常		6.01±0.67	1.76±0.21
模型		38.05±2.85 ²⁾	4.83±0.20 ²⁾
二甲双胍	0.2	31.14±2.91 ³⁾	4.74±0.20
翻白草总黄酮	0.1	31.03±2.86 ³⁾	3.54±0.37 ⁴⁾
	0.4	25.31±2.67 ³⁾	3.70±0.72 ³⁾

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2~6同)。

3.2 对db/db小鼠脂代谢的影响 与正常组比较, 模型组小鼠TC, TG, LDL-C含量均显著升高($P < 0.01$), HDL-C含量明显降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 翻白草总黄酮低、高剂量组均能够明显降低小鼠血清中TC, TG含量, 升高HDL-C含量($P < 0.05$), 同时具有降低LDL-C含量的趋势, 但差异不具有统

计学意义。说明翻白草总黄酮能够改善2型糖尿病 db/db小鼠的血脂异常。见表2。

表2 翻白草总黄酮对血脂的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常		2.89±0.19	1.29±0.16	2.63±0.10	0.32±0.02
模型		5.40±0.19 ²⁾	1.84±0.36 ²⁾	1.85±0.15 ¹⁾	0.56±0.04 ²⁾
二甲双胍	0.2	4.45±0.43 ³⁾	1.14±0.09 ⁴⁾	2.60±0.30 ³⁾	0.56±0.11
翻白草总黄酮	0.1	4.55±0.26 ³⁾	1.31±0.21 ⁴⁾	2.70±0.22 ³⁾	0.54±0.08
	0.4	4.67±0.40 ³⁾	1.48±0.09 ³⁾	3.01±0.74 ⁴⁾	0.52±0.03

3.3 对db/db小鼠FINS和HOMA-IR的影响 与正常组比较,模型组小鼠FINS,HOMA-IR均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,翻白草总黄酮低、高剂量组和二甲双胍组显著性降低db/db小鼠FINS和HOMA-IR水平($P<0.01$)。说明翻白草总黄酮具有改善胰岛素抵抗的作用。见表3。

表3 翻白草总黄酮对db/db小鼠胰岛素抵抗的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of flavonoids from *Potentillae Discoloris Herba* on insulin resistance of db/db mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FINS/mIU·L ⁻¹	HOMA-IR
正常		4.46±1.90	1.38±0.58
模型		91.02±10.48 ²⁾	155.93±16.81 ²⁾
二甲双胍	0.2	59.39±12.07 ⁴⁾	79.50±22.68 ⁴⁾
翻白草总黄酮	0.1	51.16±6.59 ⁴⁾	71.62±5.76 ⁴⁾
	0.4	45.10±9.79 ⁴⁾	39.72±9.36 ⁴⁾

3.4 对db/db小鼠血清SOD,MDA含量的影响 与正常组比较,db/db小鼠模型组血清SOD活性显著降低,血清MDA含量明显升高($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,翻白草低、高剂量组血清SOD活性显著升高,血清MDA含量明显降低($P<0.05, P<0.01$)。说明翻白草总黄酮具有一定的抗氧化应激的能力。见表4。

3.5 对db/db小鼠肝糖原含量的影响 促进肝糖原

表4 翻白草总黄酮对血清SOD活性及MDA含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of flavonoids from *Potentillae Discoloris Herba* on serum SOD activity and MDA content ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹
正常		58.00±6.01	2.80±0.84
模型		43.53±5.22 ¹⁾	7.75±0.50 ²⁾
二甲双胍	0.2	69.94±4.35 ³⁾	5.00±0.82 ³⁾
翻白草总黄酮	0.1	72.08±4.80 ³⁾	4.40±0.55 ⁴⁾
	0.4	74.84±5.07 ³⁾	5.00±0.18 ³⁾

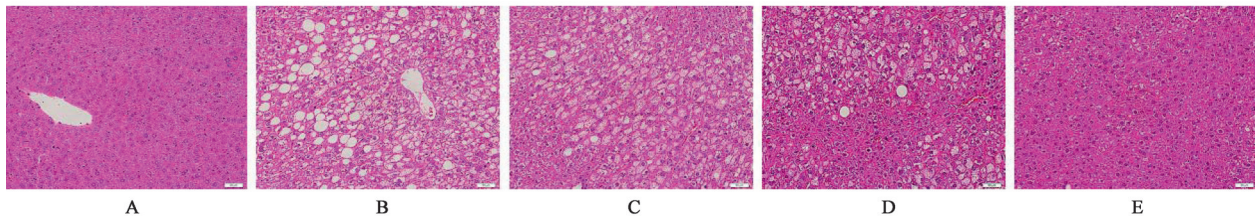
合成是机体主要降血糖途径之一,与正常组比较,模型组小鼠肝糖原含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,翻白草总黄酮低、高剂量组肝糖原含量显著增加($P<0.01$)。说明翻白草总黄酮具有促进肝糖原合成或抑制肝糖原分解的作用。见表5。

表5 翻白草总黄酮对db/db小鼠肝糖原含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of flavonoids from *Potentillae Discoloris Herba* on db/db mice liver glycogen content ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肝糖原/g·kg ⁻¹
正常		6.62±1.04
模型		4.25±0.77 ²⁾
二甲双胍	0.2	6.00±1.12 ⁴⁾
翻白草总黄酮	0.1	5.34±1.14 ⁴⁾
	0.4	5.92±0.84 ⁴⁾

3.6 对db/db小鼠肝脏、胰腺组织病理学变化的影响 由肝脏HE染色结果可知,正常组肝脏细胞大小均匀,肝小叶结构清晰,无纤维组织增生。模型组肝细胞排列紊乱,细胞轮廓不清楚,细胞胞浆内可见大量脂肪空泡、脂滴,可见严重的肝脏细胞变性改变,伴有部分细胞坏死。给予盐酸二甲双胍和翻白草总黄酮治疗4周后,肝细胞形态结构较完整,空泡样变、水肿坏死显著减少,与模型组比较,可见明显改善。表明翻白草总黄酮能够减轻糖尿病引起的肝脏损伤,见图1。由胰腺HE染色结果可知,正常组胰腺结构清晰,被膜结构完整,可见染色较浅的胰岛,胰岛分布正常,胰岛细胞排列呈团状,胰岛数量较多,未见细胞变性坏死;而模型组胰岛体积减小,发生显著萎缩,胰岛组织和腺泡细胞的界限不明显,细胞排列紊乱,胰岛数量减少,部分细胞空泡化;在给予盐酸二甲双胍和翻白草总黄酮治疗4周后,胰腺结构清晰,被膜结构完整,胰岛分布正常,结构完整。表明翻白草总黄酮能够减轻糖尿病引起的胰腺损伤。见图2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 二甲双胍组; D. 翻白草总黄酮低剂量组; E. 翻白草总黄酮高剂量组(图2, 3同)

图1 翻白草总黄酮对 db/db 小鼠肝脏组织病理学的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of flavonoids from *Potentillae Discoloris Herba* on liver histopathology of db/db mice(HE, ×200)

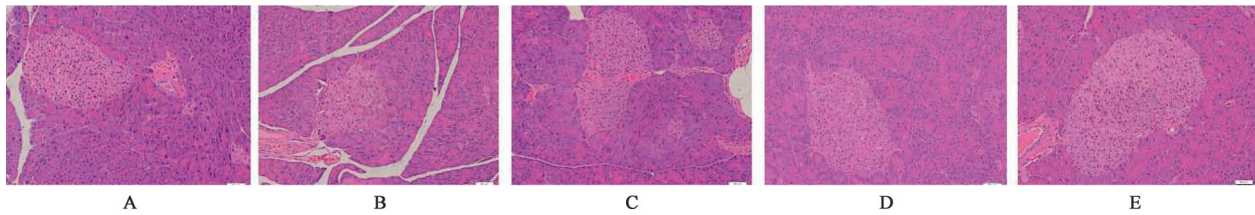


图2 翻白草总黄酮对 db/db 小鼠胰腺组织病理学的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of flavonoids from *Potentillae Discoloris Herba* on pancreatic histopathology of db/db mice(HE, ×200)

3.7 对 db/db 小鼠肝脏胰岛素信号通路相关蛋白的影响 与正常组比较, IR β , IRS-1, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt 和 GLUT4 蛋白表达显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 翻白草总黄酮各剂量给药后, 肝脏组织中 IRS-1, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt 和 GLUT4 的蛋白表达均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图3, 表6。

4 讨论

db/db 小鼠是由于4号染色体瘦素受体基因突变, 导致其进食量增加, 引起脂肪堆积从而诱发肥胖, 表现出血糖升高、尿量增多、胰岛素抵抗等2型糖尿病的症状^[12-13]。其是一种接近人类2型糖尿病发病过程的动物模型, 与人类2型糖尿病的临床表征相近, 是研究2型糖尿病最理想的动物模型之一^[14]。因此本实验选用 db/db 小鼠模型观察翻白草总黄酮抗对2型糖尿病糖脂代谢的影响^[15-16]。

2型糖尿病是指因体内胰岛素分泌相对不足所导致的慢性代谢功能紊乱疾病, 以高血糖、高血脂为主要特点。当机体持续处于高血糖、高血脂状

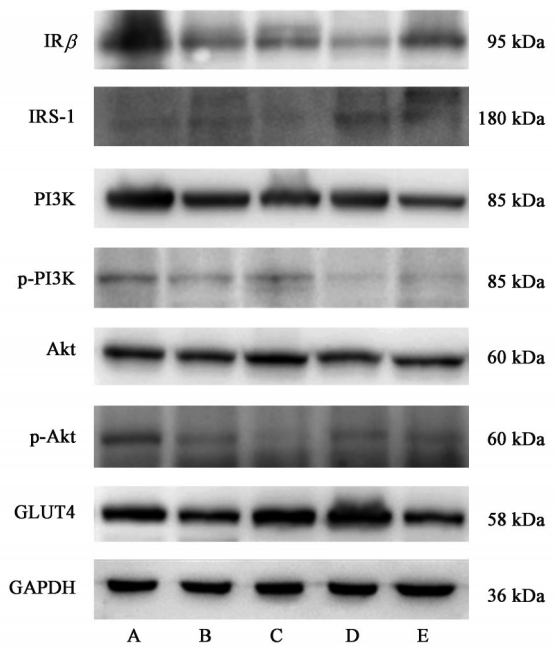


图3 小鼠肝脏组织 IR β , IRS-1, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt 和 GLUT4 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expressions of IR β , IRS-1, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt and GLUT4 of liver in mice

表6 翻白草总黄酮对 db/db 小鼠肝脏组织 IR β , IRS-1, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt 和 GLUT4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 6 Effect of flavonoids from *Potentillae Discoloris Herba* on expressions of IR β , IRS-1, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt and GLUT4 of liver in db/db mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IR β /GAPDH	IRS-1/GAPDH	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	GLUT4/GAPDH
正常		0.70±0.06	0.14±0.01	0.44±0.01	0.38±0.04	1.01±0.10
模型		0.37±0.07 ²⁾	0.08±0.01 ²⁾	0.22±0.01 ²⁾	0.26±0.02 ²⁾	0.52±0.08 ²⁾
二甲双胍	0.2	0.39±0.05	0.12±0.01 ⁴⁾	0.57±0.04 ⁴⁾	0.55±0.07 ⁴⁾	1.08±0.06 ⁴⁾
翻白草总黄酮	0.1	0.34±0.05	0.19±0.02 ⁴⁾	0.27±0.02 ³⁾	0.38±0.06 ⁴⁾	1.25±0.11 ⁴⁾
	0.4	0.33±0.04	0.20±0.01 ⁴⁾	0.43±0.03 ⁴⁾	0.41±0.04 ⁴⁾	1.07±0.09 ⁴⁾

态,直接导致胰岛 β 细胞功能受损,诱发体内胰岛素抵抗加重,糖利用及代谢能力受损,从而导致血糖进一步升高。而在高糖环境中,机体SOD,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等清除氧自由基的酶的活性降低,从而降低机体抗氧化能力,同时脂质过氧化降解产物MDA含量升高,导致大量活性氧自由基在体内聚积,导致糖尿病及其并发症^[17]。本实验发现,翻白草总黄酮给药4周后,与模型组比较,血清中FBG,GSP,TC,TG含量显著性降低,HDL-C显著升高,而血清中MDA含量明显下降,SOD含量显著升高。提示翻白草总黄酮能够显著改善db/db小鼠的糖尿病症状,调节db/db小鼠糖脂代谢紊乱,增强机体抗氧化能力,减轻氧化应激损伤。

肝脏作为胰岛素作用的主要靶器官,是机体进行糖脂代谢的重要场所。在长期高糖、高脂作用下,肝脏代谢功能出现障碍,形态结构受到一定损害^[18]。本实验结果显示,翻白草总黄酮对db/db小鼠肝脏组织具有一定的保护作用。胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能损伤是2型糖尿病发病的重要机制^[19]。空腹血清胰岛素可以表征胰腺的功能、胰岛素抵抗的状况,是糖尿病诊断的重要指标。与模型组比较,翻白草总黄酮显著降低db/db小鼠FINS和HOMA-IR水平,保护胰岛 β 细胞,抑制胰岛细胞病理损伤进程。这可能与翻白草总黄酮可以增强机体抗氧化酶活性,加速清除机体氧自由基,减少脂质过氧化副产物MDA的产生,增强抗氧化能力有关。

PI3K/Akt信号转导通路是胰岛素的主要下游分子通路^[20]。胰岛 β 细胞分泌的胰岛素入血后,作用于肝脏、骨骼肌细胞表面胰岛素受体(IR) α 亚基,胞浆内的胰岛素受体 β 亚基酪氨酸位点自磷酸化激活。激活后的胰岛素受体进一步磷酸化胰岛素受体底物(IRS)的酪氨酸位点,使IRS激活,进而激活PI3K。激活后的PI3K催化4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)生成PIP3,PIP3作为第二信使激活Akt,活化的Akt通过促进GLUT4转位,进而促进葡萄糖摄取和糖原合成,达到降低血糖作用^[21-22]。为探讨翻白草总黄酮抗糖尿病分子机制,课题组通过Western blot检测db/db小鼠肝脏PI3K/Akt信号转导通路相关蛋白表达,发现与模型组比较,翻白草总黄酮显著上调肝脏组织中IRS-1, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt和GLUT4蛋白表达水平,从而发挥改善胰岛素抵抗作用。

实验研究表明,翻白草总黄酮能够明显降低糖

尿病小鼠糖脂代谢紊乱,缓解肝脏、胰腺病理损伤改善胰岛素抵抗,能够增加肝糖原的存储,其作用机制与调节PI3K/Akt信号转导通路相关蛋白表达有关,为临床应用翻白草治疗2型糖尿病及其并发症提供可靠实验依据。

[参考文献]

- [1] MUSSELMAN D L, BETAN E, LARSEN H, et al. Relationship of depression to diabetes types 1 and 2: Epidemiology, biology, and treatment [J]. Biol Psychiat, 2003, 54(3): 317-329.
- [2] HAMEED I, MASOODI S R, MIR S A, et al. Type 2 diabetes mellitus: from a metabolic disorder to an inflammatory condition[J]. World J Diabetes, 2015, 6(4): 598-612.
- [3] 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.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国科技医药出版社, 2015: 383.
- [5] YANG J, CHEN H, ZHANG L, et al. Anti-diabetic effect of standardized extract of *Potentilla discolor* Bunge and identification of its active components[J]. Drug Develop Res, 2003, 71(2): 127-132.
- [6] SONG C W, HUANG L R, RONG L, et al. Anti-hyperglycemic effect of *Potentilla discolor* decoction on obese-diabetic (ob-db) mice and its chemical composition [J]. Fitoterapia, 2012, 83(8): 1474-1483.
- [7] 丛慧源,王颖,邓雁如. 2种近缘中药翻白草和仙鹤草的化学成分和降血糖活性比较[J]. 中草药, 2015, 46(16): 2484-2491.
- [8] 胡建新,周志愉,王晓敏,等. 翻白草总黄酮对2型糖尿病大鼠胰岛素底物-2-磷脂酰肌醇-3激酶信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(23): 146-150.
- [9] ZHANG L, YANG J, CHEN X Q, et al. Antidiabetic and antioxidant effects of extracts from *Potentilla discolor* Bunge on diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132(2): 518-24.
- [10] 王晓敏,邹志坚,陈月梅,等. 翻白草黄酮对糖尿病小鼠血清胰岛素和胰岛素抗体的作用[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 338-339.
- [11] 黄链莎,刘铜华,孙文,等. 桂皮醛对糖尿病小鼠血糖水平的影响及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(10): 95-100.
- [12] 刘芳,杨华,周文江,等. 诱发性2型糖尿病小鼠模型

- 与自发性 db/db 小鼠特性的比较[J]. 中国实验动物学报,2014,22(6):54-59.
- [13] 吕晶晶,王彩霞,魏娜,等. 自发性2型糖尿病小鼠 db/db 的生物学特性[J]. 沈阳药科大学学报,2013,30(6):455-459.
- [14] SAH S P, SINGH B, CHOUDHARY S, et al. Animal models of insulin resistance: a review[J]. Pharmacol Rep,2016,68(6):1165-1177.
- [15] 孙鑫,马志,孟庆海,等. 桑酮碱对2型糖尿病 db/db 小鼠血糖及肝脏胰岛素抵抗的影响[J]. 中成药,2017,39(5):885-890.
- [16] XU J, WANG S, FENG T, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of total saponins from *Stauntonia chinensis* in diabetic db/db mice[J]. J Cell Mol Med, 2018,22(12):6026-6038.
- [17] 孙晓泽,谭高峰,刘爱华. 消渴方加减对气阴两虚夹瘀型糖尿病肾病的内皮损伤、氧化应激及生化指标的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,29(5):43-48.
- [18] 邱艳,陈清光,李俊燕,等. 健脾清化方对2型糖尿病模型大鼠肝脏糖原合成的影响[J]. 中华中医药杂志,2019,34(2):594-597.
- [19] LU H Y, HU F, ZENG Y J, et al. Ketosis onset type 2 diabetes had better islet β -cell function and more serious insulin resistance[J]. J Diabetes Res, 2014, doi:10.1155/2014/510643.
- [20] GOODARZI M T, NAVIDI A A, REAZEI M, et al. Oxidative damage to DNA and lipids: correlation with protein glycation in patients with type 1 diabetes[J]. J Clin Lab Anal,2010,24(2):72-76.
- [21] ZHANG Z, LIU H, LIU J, et al. Akt activation: a potential strategy to ameliorate insulin resistance[J]. Diabetes Res Clin Pr,2017,30:315-317.
- [22] WANG N, LI T, HAN P. The effect of Tianmai Xiaoke Pian on insulin resistance through PI3K/Akt signal pathway [J]. J Diabetes Res, 2016, 2016: 9261259.
- [责任编辑 孙丛丛]