

# 衢枳壳提取物改善 2 型糖尿病小鼠胰岛素抵抗的作用研究

汪雯<sup>1</sup> 蓝天<sup>2</sup> 郑芳<sup>2</sup> 汪丽霞<sup>3</sup> 张峰<sup>2</sup> 王思为<sup>2</sup>

1.浙江中医药大学附属四省边际中医院 衢州市中医医院治未病中心 浙江,衢州 324000

2.温州医科大学附属衢州医院 衢州市人民医院 3.衢州市常山县农业农村局

**摘要:** [目的] 研究衢枳壳(*Quzhou Aurantii Fructus*, QAF)提取物改善 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)小鼠胰岛素抵抗的作用及其具体机制。[方法] 以 6 只雄性 db/m 小鼠为对照组(以蒸馏水灌胃),选取同性别 T2DM db/db 小鼠 24 只,随机均分至模型组(以蒸馏水灌胃)、二甲双胍组(以 200 mg·kg<sup>-1</sup> 二甲双胍灌胃)、QAF 低剂量组(以 100 mg·kg<sup>-1</sup> QAF 提取物灌胃)、QAF 高剂量组(以 300 mg·kg<sup>-1</sup> QAF 提取物灌胃)。连续灌胃 10 周,监测小鼠体质量、肝质量、附睾脂肪质量;检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、空腹血清胰岛素(fasting serum insulin, FINS)水平,以此计算胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI)、胰岛素抵抗指数(insulin resistance index, HOMA-IR);检测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、游离脂肪酸(non-esterified fatty acid, NEFA)水平;检测肝组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)活性,检测肝脏 TC、TG 表达;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察肝组织病理结构变化;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, Real-time qPCR)检测肝脏中脂肪合成基因固醇调节元件结合转录因子 1(sterol regulatory element-binding transcription factor 1, *Srebf1*)、脂肪酸合酶(fatty acid synthase, *Fasn*)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(stearyl-CoA desaturase 1, *Scd1*)、乙酰辅酶 A 羧化酶 1(acetyl-CoA carboxylase 1, *Acc1*)表达;免疫印迹法检测腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(phosphorylated adenosine monophosphate activated protein kinase, p-AMPK)、固醇调节元件结合蛋白-1(sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1)蛋白表达。[结果] 与模型组比较,不同剂量 QAF 提取物灌胃干预后,T2DM 小鼠的肝质量明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),但体质量和附睾脂肪质量变化不明显( $P>0.05$ );FBG、FINS 和 HOMA-IR 明显下降,ISI 显著升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );血清 TC、TG、NEFA 水平下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );肝脏 SOD、CAT、GSH 活性升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );肝组织脂质变性得到缓解,且 TC、TG 累积变少( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。高剂量 QAF 提取物灌胃能使肝脏脂肪合成基因表达下降,并抑制 p-AMPK 和 SREBP-1 蛋白表达( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。[结论] QAF 提取物可以缓解 T2DM 小鼠胰岛素抵抗,其机制可能与抑制肝脏脂质累积密切相关。

**关键词:** 衢枳壳; 2 型糖尿病; 胰岛素抵抗; 肝脏; 脂质合成; 血脂代谢; AMPK; SREBP-1

**中图分类号:** R331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-5509(2022)09-0936-09

**DOI:** 10.16466/j.issn1005-5509.2022.09.002

**Effect of Quzhou Aurantii Fructus Extract on Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Mice** WANG Wen<sup>1</sup>, LAN Tian<sup>2</sup>, ZHENG Fang<sup>2</sup>, et al 1. Preventive Treatment Center, Zhejiang Chinese Medical University Affiliated Four-provinces Marginal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Quzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Quzhou(324000), China; 2. The Quzhou Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Quzhou People's Hospital

**Abstract:** [Objective] To investigate the effects of Quzhou Aurantii Fructus(QAF) extract on improving insulin resistance(IR) in type 2 diabetes mellitus(T2DM) mice and its underlying mechanism. [Methods] Six male db/m mice were applied as control group (intragastric administration of distilled water), and twenty-four T2DM db/db mice of the same sex were selected. They were randomly and equally divided into model group(intragastric administration of distilled water), metformin group(intragastric administration of 200 mg·kg<sup>-1</sup> metformin), low-dose QAF group (intragastric administration of 100 mg·kg<sup>-1</sup> QAF extract) and high-dose QAF group (intragastric adminis-

基金项目:国家自然科学基金项目(81903873);衢州市科技计划竞争性分配项目(2019K34);浙江省医药卫生科技计划项目(2020PY087)

Fund projects: National Natural Science Foundation Project(81903873); Quzhou Science and Technology Competitive Allocation Project(2019K34); Medical and Health Technology Projects of Zhejiang Province (2020PY087)

通信作者:王思为, E-mail:358031289@qq.com

tration of 300 mg·kg<sup>-1</sup> QAF extract). After 10 weeks of intragastric administration, the body weight of mice and the weight of liver and epididymal fat were recorded; fasting blood glucose(FBG) and fasting serum insulin(FINS) were detected to calculate insulin sensitivity index(ISI) and insulin resistance index(HOMA-IR); the serum total cholesterol(TC), triglyceride(TG) and non-esterified fatty acid(NEFA) were detected; the activities of hepatic superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), reduced glutathione(GSH) were observed and TC, TG levels in the liver tissue were detected; hematoxylin-eosin(HE) staining was utilized to observe the hepatic histopathological changes of mice; Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(Real-time qPCR) was applied to detect the mRNA expressions of fat synthesis genes sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (*Srebf1*), fatty acid synthase(*Fasn*), stearyl-CoA desaturase 1 (*Scd1*), and acetyl-CoA carboxylase 1(*Acc1*); Western blot was used to detect the protein expressions of adenosine monophosphate activated protein kinase(AMPK), phosphorylated adenosine monophosphate activated protein kinase(p-AMPK) and sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1). [Results] Compared with model group, the liver weight of T2DM mice decreased significantly after gavage with different doses of QAF extract ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), but the body weight and epididymal fat weight showed no obvious change; the FBG, FINS and HOMA-IR were significantly declined, and ISI was obviously elevated( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); the serum levels of TC, TG, and NEFA were lowered( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); the activities of hepatic SOD, CAT, GSH were elevated( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); the hepatic lipid degeneration was alleviated, and the accumulation of hepatic TC and TG was reduced( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). High-dose QAF extract can significantly inhibit the expressions of fat synthesis genes, and down-regulate the protein expressions of p-AMPK and SREBP-1( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). [Conclusion] QAF extract can alleviate the insulin resistance of T2DM mice, which may be closely related with its inhibition on hepatic lipid accumulation.

**Key words:** Quzhou *Aurantii Fructus*; type 2 diabetes mellitus; insulin resistance; liver; lipid synthesis; blood lipid metabolism; AMPK; SREBP-1

糖尿病是由遗传、环境等因素诱发机体胰岛素分泌不足和(或)胰岛素抵抗(insulin resistance, IR),从而导致葡萄糖、脂肪、蛋白质代谢紊乱的疾病,现已成为世界性的重大公共卫生难题<sup>[1-2]</sup>。据国际糖尿病联合会最新数据报道,如今世界成人糖尿病患者已超4亿,其中2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)占90%以上<sup>[3]</sup>。T2DM发病基数庞大,而且机制复杂,牵涉到遗传和环境因素<sup>[4]</sup>。现有研究表明,T2DM发病与IR和胰岛素分泌密切相关,而前者被视为T2DM发病的最主要因素<sup>[1]</sup>。针对IR研发的胰岛素增敏剂噻唑烷二酮类或双胍类药物,可通过增加机体对胰岛素的敏感性来改善IR,但是这些药物伴随的不良反应如体质量增加、水肿、消化道不适等,严重限制了临床应用<sup>[5]</sup>。

近年来研究显示,中药可通过改善IR、保护胰岛β细胞、抑制肝脏脂质变性等途径治疗T2DM,且具有不良反应小的优势<sup>[6]</sup>。衢枳壳(Quzhou *Aurantii Fructus*, QAF)是常山胡柚(*Citrus Changshan-huyou* Y. B. Chang)的干燥未成熟果实(胡柚青果)的加工品,在2016和2018年分别被收录到《浙江省中药炮制规范(2015版)》和“新浙八味”中药材培养名单<sup>[7-8]</sup>。项目团队近年来针对QAF防治代谢性疾病展开了系统并深入的研究,已证实QAF提取物具有抑制肥胖、保护胰岛β细胞和抗肝纤维化的作用<sup>[8-10]</sup>,其主要活性成分具有抑制肝脏脂质变性和炎症反应等作用<sup>[11-14]</sup>。然而,目前

未见有关QAF提取物改善IR的研究报道。本研究拟通过自发性T2DM小鼠模型,观察QAF提取物对IR的干预作用并探讨其具体机制,为QAF提取物防治T2DM的相关药物或保健品开发提供理论依据和实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 药物与试剂

QAF中药饮片从衢州南孔中药有限公司采购(批号:2010040),并经由衢州市人民医院副主任中药师吴宏华鉴定为常山胡柚的干燥未成熟果实加工品;二甲双胍购于梯希爱(上海)化成工业发展有限公司(批号:CAS 1115-70-4);总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、游离脂肪酸(non-esterified fatty acid, NEFA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒、过氧化氢酶(catalase, CAT)检测试剂盒、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)检测试剂盒均购于南京建成生物工程研究所(批号:Lot 20190630、Lot 20200104、Lot 20200110、Lot 20190428、Lot 20200304、Lot 20190609);小鼠胰岛素酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购于江苏酶免实业有限公司(批号:MM-0579M1);Trizol试剂购于天根生化科技(北京)有限公司(批号:Lot#U8110);cDNA逆转录试剂盒购于美国Thermo Fisher公司(批号:Lot 00356918);SYBR Green试剂盒购于上海生工生物工程技术有限公司(批号:Lot G108KA4363);腺苷酸活化蛋白激酶α(adenosine

monophosphate activated protein kinase  $\alpha$ , AMPK $\alpha$ )、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 $\alpha$ (phosphorylated adenosine monophosphate activated protein kinase  $\alpha$ , p-AMPK $\alpha$ )、 $\beta$ -actin 抗体均购于美国 CST 公司(批号: #5831、#2523、#4970); 固醇调节元件结合蛋白-1 (sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1) 抗体购于美国 Abcam 公司(批号: ab28481)。

**1.2 仪器** FRESCO 17 高速冷冻离心机购于美国 Thermo Fisher 公司; LC480 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, Real-time qPCR)仪购于美国 Roche 集团; RX50 正置荧光显微镜购于宁波舜宇科技公司; 4200SF 凝胶成像仪为上海天能科技公司产品; SYNERGY H1 酶标仪购于美国 BioTek 公司。

**1.3 实验动物** 雄性 C57BLKS/J *db/m* 小鼠, 6 周龄, 体质量 18~22 g; 同遗传背景雄性并患有自发性 T2DM 的 *db/db* 小鼠(000642), 同周龄, 体质量 30~40 g, 均购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司[实验动物生产许可证号: SCXK(苏)2018-0008], 饲养于杭州鹰吻生物科技有限公司实验动物中心[实验动物使用许可证号: SYXK(浙)2020-0024], 给予自由饮水, 12 h 昼夜节律, 室温(22 $\pm$ 1)  $^{\circ}$ C。动物实验经杭州鹰吻生物科技有限公司动物福利伦理审查委员会审核批准(批准号: EYOUNG-20210514-02)。

## 1.4 方法

**1.4.1 QAF 提取物的制备** 制备方法和药物剂量计算方法参照前期研究<sup>[8-10]</sup>, 具体操作如下: 将 QAF 药材 1 kg 粉碎为粗粉, 加入 80% 乙醇 15 000 mL 浸泡 1 h 后, 运用加热回流法提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液之后冷却过滤, 回收滤液后得到 QAF 提取物。

**1.4.2 动物分组、造模及给药** 以 6 只雄性 *db/m* 小鼠为对照组, 再将 24 只雄性 T2DM 的 *db/db* 小鼠, 以随机数字表法分至模型组、二甲双胍组、QAF 低剂量组和 QAF 高剂量组, 每组 6 只。各组小鼠予不同药物灌胃干预, 连续给药 10 周。对照组、模型组采用蒸馏水灌胃; 二甲双胍组以 200 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 二甲双胍灌胃; QAF 低剂量组以 100 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> QAF 提取物灌胃; QAF 高剂量组以 300 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> QAF 提取物灌胃。每周记录各组小鼠体质量和血糖情况。末次给药 8 h 后, 各组小鼠禁食不禁水 8 h, 以 3% 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉采血, 分离血清, 分离肝脏组织和附睾脂肪并称取质量, -80  $^{\circ}$ C

储存。

**1.4.3 血清生化指标检测** 按照试剂盒操作步骤检测小鼠血清 TC、TG、NEFA 水平; 按照 ELISA 试剂盒操作步骤检测小鼠血清空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、空腹血清胰岛素(fasting serum insulin, FINS)水平, 并计算胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI)和 IR 指数(insulin resistance index, HOMA-IR)。计算公式: ISI =  $\ln[1/(FINS \times FBG)]$ 、HOMA-IR =  $(FBG \times FINS)/22.5$ 。

**1.4.4 肝组织匀浆指标检测** 将肝组织匀浆, 按试剂盒说明检测 SOD、CAT、GSH 活性以及肝脏 TC、TG 水平。

**1.4.5 肝组织病理学观察** 以 10% 甲醛溶液固定肝组织, 石蜡包埋, 切片, 苏木精-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色, 400 倍光镜下观察。

**1.4.6 Real-time PCR 检测肝脏脂肪合成基因表达** 采用 Trizol 提取小鼠肝脏 RNA, 按照试剂盒说明将 RNA 逆转录为 cDNA, 采用 SYBR Green 试剂盒进行检测, 包括固醇调节元件结合转录因子 1(sterol regulatory element-binding transcription factor 1, *Srebf1*)、脂肪酸合酶(fatty acid synthase, *Fasn*)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(stearyl-CoA desaturase 1, *Scd1*)和乙酰辅酶 A 羧化酶 1(acetyl-CoA carboxylase 1, *Acc1*)。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 30 s 预变性; 95  $^{\circ}$ C 5 s 变性, 60  $^{\circ}$ C 31 s 退火和延伸, 扩增 40 个循环, 以 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算基因相对表达量。所用引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 序列见表 1。

**1.4.7 免疫印迹法检测肝组织 AMPK $\alpha$ 、p-AMPK $\alpha$ 、SREBP-1 蛋白表达** 收集小鼠肝组织, 将放射免疫沉淀裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂配成裂解液, 小鼠肝组织加入到装有裂解液的离心管匀浆(冰上操作), 提取总蛋白并定量。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离, 转印至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜, 常温封闭后加入一抗(稀释比例: 1:1 000), 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。清洗后加入二抗(抗兔 IgG 和抗鼠 IgG, 稀释比例: 1:3 000), 常温摇床孵育 1 h, 清洗后以增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显色液显色, 凝胶成像仪拍摄条带。采用 Image J 软件进行统计分析, 目的蛋白相对表达量以目的蛋白的灰度值除以内参蛋白的灰度值计算。

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

目的基因	上游序列	下游序列
<i>Srebf1</i>	5'-CAAGGCCATCGACTACATCCG-3'	5'-CACCACTTCGGGTTTCATGC-3'
<i>Fasn</i>	5'-GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT-3'	5'-TGGGTAATCCATAGAGCCCAG-3'
<i>Scd1</i>	5'-TTCTTGGGATACACTCTGGTGC-3'	5'-CGGGATTGAATGTTCTTGTCTG-3'
<i>Acc1</i>	5'-CTCCCGATTTCATAATTGGGTCTG-3'	5'-TCGACCTTGTCTTACTAGGTGC-3'
<i>Gapdh</i>	5'-TGAGGCCGCTGCTGACTATGT-3'	5'-CAGTCTTCTGGCTGCCACTGAT-3'

**1.5 统计学分析** 应用GraphPad Prism 7.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验或方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠体质量、肝质量、附睾脂肪质量比较** 与对照组比较,模型组T2DM小鼠的体质量、肝质量、附睾脂肪质量均明显增加( $P<0.01$ )。与模型组比较,连续给药10周后,二甲双胍组小鼠体质量、肝质量和附睾脂肪质量明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。QAF低、高剂量组小鼠体质量和附睾脂肪质量无明显改变( $P>0.05$ ),但是肝质量明显降低( $P<0.01$ )。见表2。

**2.2 各组小鼠FBG比较** 与对照组比较,灌胃干预前模型组,二甲双胍组,QAF低、高剂量组T2DM小鼠的FBG显著升高( $P<0.01$ );而各组T2DM小鼠间比较,FBG差异无统计学意义( $P>0.05$ )。灌胃10周后,与模型组比较,二甲双胍组,QAF低、高剂量组小鼠FBG显著减低( $P<0.05$ )。见表3。

**2.3 各组小鼠FINS、ISI、HOMA-IR比较** 与对照组比较,模型组T2DM小鼠血清FINS、HOMA-IR升高,而ISI降低( $P<0.01$ ),提示模型组小鼠发生IR。药物干预

后,与模型组比较,二甲双胍组和QAF低、高剂量组小鼠血清FINS和HOMA-IR显著下降,ISI显著升高( $P<0.05, P<0.01$ )。见表4。

**2.4 各组小鼠血脂代谢比较** 与对照组比较,模型组T2DM小鼠血清中的TC、TG和NEFA水平明显增高( $P<0.01$ )。与模型组比较,二甲双胍或QAF高剂量组T2DM小鼠血清中TC、TG和NEFA水平显著下降( $P<0.05, P<0.01$ ),QAF低剂量组小鼠血清TC、TG和NEFA差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表5。

**2.5 各组小鼠肝脏氧化应激指标比较** 与对照组比较,模型组T2DM小鼠肝脏中SOD、CAT和GSH活性明显下降( $P<0.01$ )。二甲双胍或QAF低、高剂量连续灌胃10周后,与模型组比较,T2DM小鼠肝脏中SOD、CAT和GSH活性明显升高( $P<0.05, P<0.01$ )。见表6。

**2.6 各组小鼠肝组织病理组织学比较** 对照组小鼠肝脏组织结构完整,表现为肝小叶规则,肝细胞体积正常、排列整齐。与对照组比较,模型组小鼠肝细胞体积明显增大,存在大量脂肪空泡,并有少量炎症细胞浸润,提示肝脏发生明显脂质变性。与模型组比较,二甲双胍组,QAF低、高剂量组小鼠肝脏脂质变性程

表2 各组小鼠体质量、肝质量和附睾脂肪质量比较

Tab.2 Comparison of mouse body weight, liver weight and epididymis fat weight among groups ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量(mg·kg <sup>-1</sup> )	体质量(g)	肝质量(g)	附睾脂肪质量(g)
对照组	-	24.32±2.68	0.99±0.09	0.17±0.03
模型组	-	48.02±4.00**	2.81±0.33**	3.19±0.35**
二甲双胍组	200	40.02±5.70#	1.76±0.27##	2.10±0.52#
QAF 低剂量组	100	46.50±5.07	1.95±0.31##	2.95±0.46
QAF 高剂量组	300	46.03±9.43	1.59±0.20##	2.78±0.72
<i>F</i> 值	-	17.62	39.42	40.34
<i>P</i> 值	-	$P<0.0001$	$P<0.0001$	$P<0.0001$

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, \*\* $P<0.01$ ; compared with model group, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ .

表3 各组小鼠FBG比较  
Tab.3 Comparison of mouse FBG among groups ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量(mg·kg <sup>-1</sup> )	给药前 FBG(mmol·L <sup>-1</sup> )	给药后 FBG(mmol·L <sup>-1</sup> )
对照组	-	5.00±0.52	6.23±0.58
模型组	-	8.45±1.79**	27.72±1.93**
二甲双胍组	200	8.67±1.37**	21.30±3.18 <sup>#</sup>
QAF 低剂量组	100	8.98±1.08**	25.32±1.29 <sup>#</sup>
QAF 高剂量组	300	8.82±1.46**	23.57±2.11 <sup>#</sup>
<i>F</i> 值	-	9.772	106.4
<i>P</i> 值	-	<i>P</i> <0.0001	<i>P</i> <0.0001

注:与对照组比较, \*\**P*<0.01;与模型组比较, <sup>#</sup>*P*<0.05。

Note: Compared with control group, \*\**P*<0.01; compared with model group, <sup>#</sup>*P*<0.05.

表4 各组小鼠FINS、ISI、HOMA-IR比较  
Tab.4 Comparison of mouse FINS, ISI and HOMA-IR among groups ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量(mg·kg <sup>-1</sup> )	FINS(ng·mL <sup>-1</sup> )	ISI	HOMA-IR
对照组	-	1.02±0.54	-1.75±0.43	0.28±0.13
模型组	-	8.24±2.62**	-5.38±0.38**	10.17±3.27**
二甲双胍组	200	4.93±2.23 <sup>#</sup>	-4.55±0.43 <sup>#</sup>	4.54±1.91 <sup>##</sup>
QAF 低剂量组	100	4.79±2.00 <sup>#</sup>	-4.73±0.39 <sup>#</sup>	5.39±2.28 <sup>##</sup>
QAF 高剂量组	300	4.73±1.57 <sup>#</sup>	-4.67±0.39 <sup>#</sup>	5.03±1.97 <sup>##</sup>
<i>F</i> 值	-	10.56	73.72	15.79
<i>P</i> 值	-	<i>P</i> <0.0001	<i>P</i> <0.0001	<i>P</i> <0.0001

注:与对照组比较, \*\**P*<0.01;与模型组比较, <sup>#</sup>*P*<0.05, <sup>##</sup>*P*<0.01。

Note: Compared with control group, \*\**P*<0.01; compared with model group, <sup>#</sup>*P*<0.05, <sup>##</sup>*P*<0.01.

表5 各组小鼠血脂代谢比较  
Tab.5 Comparison of mouse lipid metabolism among groups ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量(mg·kg <sup>-1</sup> )	TC(mmol·L <sup>-1</sup> )	TG(mmol·L <sup>-1</sup> )	NEFA(mmol·L <sup>-1</sup> )
对照组	-	3.02±0.50	0.79±0.11	3.27±0.58
模型组	-	4.68±0.36**	4.93±1.42**	8.46±1.58**
二甲双胍组	200	3.24±0.69 <sup>##</sup>	3.45±0.81 <sup>#</sup>	4.90±1.82 <sup>##</sup>
QAF 低剂量组	100	4.50±0.43	3.81±0.57	6.15±1.30
QAF 高剂量组	300	3.71±0.53 <sup>#</sup>	2.89±0.91 <sup>##</sup>	3.99±1.53 <sup>##</sup>
<i>F</i> 值	-	12.54	18.27	12.32
<i>P</i> 值	-	<i>P</i> <0.0001	<i>P</i> <0.0001	<i>P</i> <0.0001

注:与对照组比较, \*\**P*<0.01;与模型组比较, <sup>#</sup>*P*<0.05, <sup>##</sup>*P*<0.01。

Note: Compared with control group, \*\**P*<0.01; compared with model group, <sup>#</sup>*P*<0.05, <sup>##</sup>*P*<0.01.

度明显减轻。见图1。

**2.7** 各组小鼠肝脏脂质累积比较 与对照组比较, 模型组T2DM小鼠肝脏TC和TG累积增多(*P*<0.01)。与模型组比较,二甲双胍组和QAF低、高剂量组小鼠肝

脏TC和TG累积减少(*P*<0.05, *P*<0.01)。见表7。

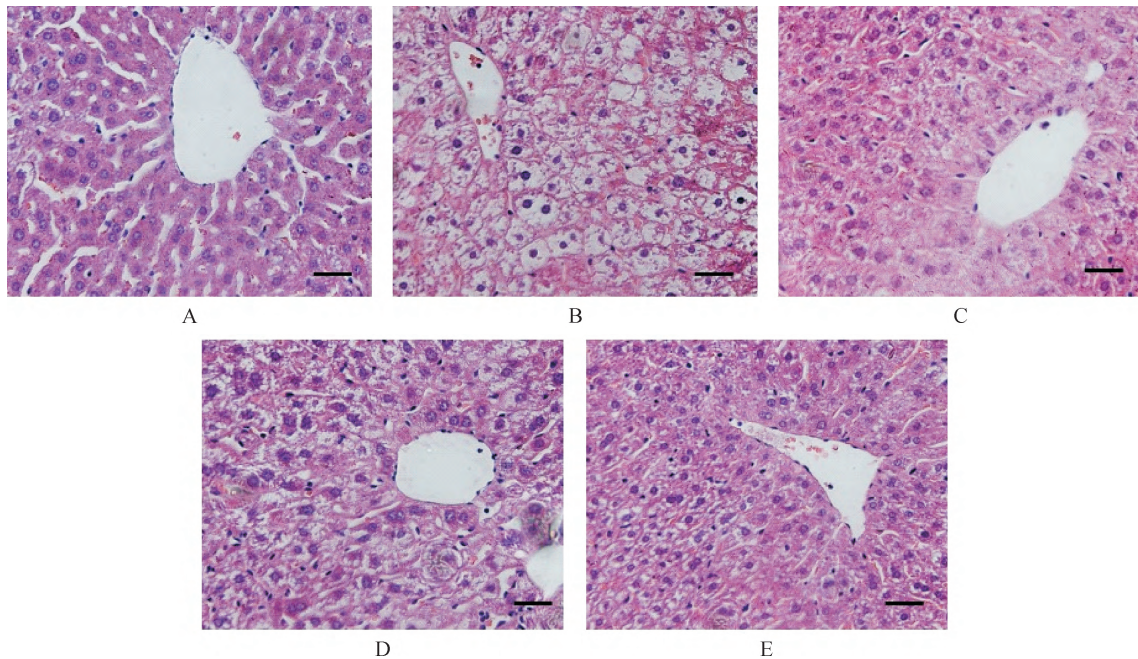
**2.8** 各组小鼠肝组织脂肪合成基因表达比较 与对照组比较, 模型组T2DM小鼠肝组织中脂肪合成基因 *Srebf1*、*Fasn*、*Scd1* 和 *Acc1* 表达显著升高(*P*<0.01)。

表6 各组小鼠肝脏氧化应激指标比较

Tab.6 Comparison of mouse hepatic oxidative stress index among groups

 $(\bar{x} \pm s, n=6)$ 

组别	剂量(mg·kg <sup>-1</sup> )	SOD(U·mg prot <sup>-1</sup> )	CAT(U·mg prot <sup>-1</sup> )	GSH(U·mg prot <sup>-1</sup> )
对照组	-	213.16±33.30	53.35±10.13	5.31±0.95
模型组	-	153.22±15.38**	37.20±2.97**	1.40±0.47**
二甲双胍组	200	200.97±9.91#	53.64±5.98##	4.46±2.32#
QAF 低剂量组	100	196.21±20.49#	49.03±5.51#	3.27±1.67#
QAF 高剂量组	300	205.68±30.35##	50.39±4.56#	5.19±1.33##
<i>F</i> 值	-	5.98	6.856	7.226
<i>P</i> 值	-	0.0016	0.0007	0.0005

注:与对照组比较, \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ 。Note: Compared with control group, \*\* $P<0.01$ ; compared with model group, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ .

注:A.对照组;B.模型组;C.二甲双胍组;D.QAF低剂量组;E.QAF高剂量组。标尺:300 μm。

Note: A. Control group; B. Model group; C. Metformin group; D. Low-dose QAF group; E. High-dose QAF group. Scale bar: 300 μm.

图1 各组小鼠肝组织病理学变化(HE染色,400×)

Fig.1 Histopathological changes of mouse liver in each group (HE staining, 400×)

与模型组比较,二甲双胍和高剂量QAF能够显著抑制T2DM小鼠肝组织*Srebfl*、*Fasn*、*Scd1*以及*Acc1*基因表达( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。见表8。

**2.9 各组小鼠肝组织AMPK和SREBP-1表达比较** 与对照组比较,模型组T2DM小鼠肝组织中p-AMPK $\alpha$ 表达显著减少,SREBP-1蛋白表达明显增多( $P<0.05$ )。与模型组比较,QAF高剂量组和二甲双胍组小鼠肝组织p-AMPK $\alpha$ 表达显著升高,SREBP-1蛋白表达显著降低( $P<0.05$ )。见图2。

### 3 讨论

T2DM主要表现为体质量增加,血糖升高以及IR<sup>[4]</sup>。本研究发现,尽管QAF提取物不能显著抑制T2DM小鼠体质量增长,但它降低了T2DM小鼠FBS水平。尤为重要的是,QAF提取物显著提高了T2DM小鼠的胰岛素敏感性,抑制了IR症状。

长期胰岛素相对缺乏不仅会引起高血糖,还经常会影响血脂代谢,主要表现为血清中TC、TG和NEFA水平增高<sup>[5]</sup>。本研究结果显示,*db/db*小鼠血清TC、TG

表7 各组小鼠肝脏脂质累积比较

Tab.7 Comparison of mouse hepatic lipid accumulation among groups

( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量(mg·kg <sup>-1</sup> )	TC(mg·g <sup>-1</sup> )	TG(mg·g <sup>-1</sup> )
对照组	-	1.00±0.10	7.48±0.77
模型组	-	1.52±0.10**	29.57±5.32**
二甲双胍组	200	1.24±0.13 <sup>#</sup>	17.81±6.22 <sup>#</sup>
QAF 低剂量组	100	1.28±0.19 <sup>#</sup>	18.57±8.25 <sup>#</sup>
QAF 高剂量组	300	1.20±0.16 <sup>##</sup>	16.07±6.31 <sup>##</sup>
F 值	-	10.75	10.63
P 值	-	P<0.0001	P<0.0001

注:与对照组比较, \*\*P<0.01;与模型组比较, <sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01。

Note: Compared with control group, \*\*P<0.01; compared with model group, <sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01.

表8 各组小鼠肝组织脂肪合成基因表达比较

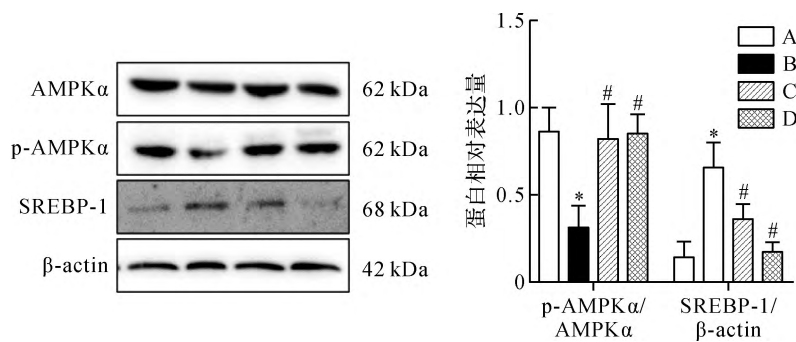
Tab.8 Comparison of mouse hepatic fat synthesis genes among groups

( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量(mg·kg <sup>-1</sup> )	<i>Srebf1</i>	<i>Fasn</i>	<i>Scd1</i>	<i>Acc1</i>
对照组	-	1.04±0.19	1.01±0.28	1.05±0.14	1.15±0.13
模型组	-	2.95±0.58**	2.21±0.11**	2.89±0.65**	2.38±0.80**
二甲双胍	200	1.72±0.51 <sup>##</sup>	1.35±0.45 <sup>##</sup>	1.82±0.46 <sup>##</sup>	1.22±0.40 <sup>##</sup>
QAF 高剂量组	300	1.67±0.41 <sup>##</sup>	0.88±0.13 <sup>##</sup>	1.50±0.51 <sup>##</sup>	1.45±0.29 <sup>#</sup>
F 值	-	12.59	26.9	14.01	7.185
P 值	-	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001

注:与对照组比较, \*\*P<0.01;与模型组比较, <sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01。

Note: Compared with control group, \*\*P<0.01; compared with model group, <sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01.



注:A.对照组;B.模型组;C.二甲双胍组;D.QAF高剂量组。与对照组比较, \*P<0.05;与模型组比较, <sup>#</sup>P<0.05。

Note: A. Control group; B. Model group; C. Metformin group; D. High-dose QAF group. Compared with control group, \*P<0.05; compared with model group, <sup>#</sup>P<0.05.

图2 各组小鼠肝组织AMPK和SREBP-1表达比较

Fig.2 Comparison of Expressions of mouse hepatic AMPK and SREBP-1 among groups

和NEFA水平明显升高, 而QAF提取物干预后能显著降低db/db小鼠血脂, 其原因可能与QAF提取物提高了db/db小鼠肝脏和外周组织胰岛素敏感性有关。

肝脏是胰岛素发挥作用的重要靶器官。当机体

发生IR时, 会导致肝脏糖脂代谢紊乱, 表现为肝脏脂质累积和糖异生增加, 从而引发血糖升高, 抑制肝脏脂质累积能有效缓解IR<sup>[16]</sup>。本研究结果发现, QAF提取物提高了肝脏抗氧化酶SOD、CAT和GSH活性, 抑

制肝脏氧化应激状态;同时能够显著缓解肝组织病理学改变。进一步结果显示,QAF提取物使T2DM小鼠肝脏TC和TG水平下降,提示QAF提取物抑制了肝脏脂质累积。

AMPK是参与生物能量代谢调节的关键分子,在肝脏脂质代谢及糖代谢中发挥核心作用,可作为治疗T2DM的潜在靶点<sup>[17]</sup>。研究表明,AMPK能对与脂质合成密切相关的转录因子SREBP-1发挥十分重要的调控作用<sup>[18]</sup>。AMPK活化能够抑制SREBP-1裂解和核移位,并下调脂质合成基因表达,从而减少肝脏脂质累积<sup>[18]</sup>。本研究结果显示,QAF提取物显著抑制SREBP-1靶基因*Srebf1*、*Fasn*、*Scd1*和*Acc1*表达以及SREBP-1(68 kDa)蛋白表达,表明QAF提取物可以抑制SREBP-1的转录活性。此外,本研究观察到QAF提取物干预后肝组织p-AMPK表达升高,提示QAF提取物促进了AMPK的活化。课题组前期研究已证实,QAF提取物中多个活性成分具有促进AMPK活化的作用,且它们抑制肝脏脂质累积的作用依赖于AMPK<sup>[11-12]</sup>。这些研究结果共同表明,QAF提取物抑制肝脏脂质累积的作用主要与促进AMPK活性有关。

综上所述,本研究结果表明,QAF提取物能够明显改善T2DM小鼠IR,其机制可能与促进AMPK活化,抑制肝脏脂质累积有关。

#### 参考文献:

#### References:

- [1] 禹博威,潘晓琼,陈君第霞,等.黄芪多糖对糖尿病动脉粥样硬化大鼠糖脂代谢的影响及血管内皮保护机制[J].浙江中医药大学学报,2021,45(5):447-453.  
YU Bowei, PAN Xiaoqiong, CHEN Jundixia, et al. Effect of Astragalus polysaccharides on glucose and lipid metabolism in diabetic atherosclerosis rats and vascular endothelial protection mechanism[J]. J Zhejiang Chin Med Univ, 2021, 45(5):447-453.
- [2] 陈小愚,王世东,陈宇,等.基于层次分析法评估2型糖尿病阴虚证辨证依据权重的研究[J].浙江中医药大学学报,2022,46(1):78-85.  
CHEN Xiaoyu, WANG Shidong, CHEN Yu, et al. Application of analytical hierarchy process to determine symptom-weight coefficient of the syndrome of Yin deficiency in type 2 diabetes mellitus[J]. J Zhejiang Chin Med Univ, 2022, 46(1):78-85.
- [3] American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2021[J]. Diabetes Care, 2021, 44(Suppl 1):S15-S33.
- [4] WARNER S O, YAO M V, CASON R L, et al. Exercise-induced improvements to whole body glucose metabolism in type 2 diabetes: the essential role of the liver[J]. Front Endocrinol(Lausanne), 2020, 11:567.
- [5] 陈叶红,斯徐伟,王晓梅,等.L-阿拉伯糖联合二甲双胍对新诊断2型糖尿病患者糖脂代谢的影响[J].中国临床药理学杂志,2021,30(5):321-325.  
CHEN Yehong, SI Xuwei, WANG Xiaomei, et al. Effects of L-arabinose combined with metformin on glycolipid metabolism in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus[J]. Chin J Clin Pharm, 2021, 30(5):321-325.
- [6] 桑婷婷,郭铨洁,郭丹丹,等.中医药通过调节肠道菌群抑制肥胖和炎症相关疾病的进展研究[J].中国中药杂志,2018,43(16):3235-3242.  
SANG Tingting, GUO Chengjie, GUO Dandan, et al. Effect of traditional Chinese medicine in inhibiting obesity and inflammatory diseases by regulating gut microbiota[J]. Chin J Chin Mater Med, 2018, 43(16):3235-3242.
- [7] 王笑笑,王思为,方月娟,等.衢枳壳不同组分体外降糖活性研究及4种黄酮组分含量分析[J].中国现代应用药学,2017,34(10):1418-1423.  
WANG Xiaoxiao, WANG Siwei, FANG Yuejuan, et al. Study on the hypoglycemic activity of different components of Quzhiqiao in vitro and analysis of four flavonoids[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2017, 34(10):1418-1423.
- [8] 王思为,蓝天,郑芳,等.衢枳壳提取物对CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化小鼠肝脏炎症及NF-κB/NLRP3炎症体通路的影响[J].中国中药杂志,2021,46(6):1474-1479.  
WANG Siwei, LAN Tian, ZHENG Fang, et al. Effect of extract of Quzhou *Aurantii Fructus* on hepatic inflammation and NF-κB/NLRP3 inflammasome pathway in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis mice[J]. Chin J Chin Mater Med, 2021, 46(6):1474-1479.
- [9] BAI Y F, WANG S W, WANG X X, et al. The flavonoid-rich Quzhou *Fructus Aurantii* extract modulates gut microbiota and prevents obesity in high-fat diet-fed mice[J]. Nutr Diabetes, 2019, 9(1):30.
- [10] WANG S W, SHENG H, BAI Y F, et al. Inhibition of histone acetyltransferase by naringenin and hesperetin suppresses txnip expression and protects pancreatic β cells in diabetic mice[J]. Phytomedicine, 2021, 88:153454.
- [11] WANG S W, SHENG H, BAI Y F, et al. Neohesperidin enhances PGC-1α-mediated mitochondrial biogenesis and alleviates hepatic steatosis in high fat diet fed mice[J]. Nutr Diabetes, 2020, 10(1):27.
- [12] WANG S W, LAN T, CHEN H F, et al. Limonin, an AMPK activator, inhibits hepatic lipid accumulation in high fat diet fed mice[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 833705.
- [13] WANG S W, LAN T, SHENG H, et al. Nobiletin alleviates nonalcoholic steatohepatitis in MCD-induced mice by regulating macrophage polarization[J]. Front Physiol, 2021, 12:687744.



- [14] WANG S W, WANG W, SHENG H, et al. Hesperetin, a SIRT1 activator, inhibits hepatic inflammation via AMPK/CREB pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89 (Pt B):107036.
- [15] 刘宝荣. 2 型糖尿病患者血脂异常与血糖水平关系的分析[J]. *糖尿病新世界*, 2020, 23(23):42-43, 46.  
LIU Baorong. Analysis of the relationship between dyslipidemia and blood glucose level in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes New World*, 2020, 23(23):42-43, 46.
- [16] YIN H, YUAN F, JIAO F, et al. Intermittent leucine deprivation produces long-lasting improvement in insulin sensitivity by increasing hepatic Gen2 expression[J]. *Diabetes*, 2022, 71(2):206-218.
- [17] GARCIA D, SHAW R J. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance[J]. *Mol Cell*, 2017, 66(6):789-800.
- [18] LI Y, XU S, Mihaylova M M, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice[J]. *Cell Metab*, 2011, 13(4):376-388.  
(收稿日期:2022-02-17)

(上接第 935 页)

- Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Volume I* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020:19.
- [14] 袁久志, 窦德强, 陈英杰, 等. 土茯苓二氢黄酮醇类成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(9):867-870.  
YUAN Jiuzhi, DOU Deqiang, CHEN Yingjie, et al. Studies on dihydroflavonol from rhizome of *Smilax glabra* [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2004, 29(9):867-870.
- [15] KIM C U, JEONG Y J, LEE P, et al. Extracellular nucleoprotein exacerbates influenza virus pathogenesis by activating Toll-like receptor 4 and the NLRP3 inflammasome[J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 2022:1-11.
- [16] LAMKANFI M, DIXIT V M. Mechanisms and functions of inflammasomes[J]. *Cell*, 2014, 157(5):1013-1022.
- [17] REBER L L, MARICHAL T, SOKOLOVE J, et al. Contribution of mast cell-derived interleukin-1 $\beta$  to uric acid crystal-induced acute arthritis in mice[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 66(10):2881-2891.
- [18] HAYDEN M S, GHOSH S. NF- $\kappa$ B in immunobiology[J]. *Cell Res*, 2011, 21:223-244.  
(收稿日期:2022-04-29)