

茯苓多糖调节2型糖尿病模型大鼠肝脏糖异生的机制研究[△]

韩思婕*, 潘翔, 朱芊芊, 张丹丹, 张涵瑞, 方敬贤, 魏琼, 刘丹, 叶晓川[#](湖北中医药大学药学院/中药资源与中药化学湖北省重点实验室, 武汉 430065)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)13-1581-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.13.08



摘要 目的 探讨茯苓多糖通过磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/叉头框转录因子O1(FoxO1)通路调节2型糖尿病模型大鼠血糖的作用和机制。方法 将SD大鼠随机分为空白对照组(不造模、不给药)、模型组(造模、不给药)、二甲双胍组(造模, 200 mg/kg)和茯苓多糖低、中、高剂量组(造模, 100、200、400 mg/kg), 每组8只。除空白对照组外, 其余各组采用高脂饲料联合链脲佐菌素构建2型糖尿病大鼠模型。于造模同时, 各给药组大鼠灌胃相应剂量的药物, 空白对照组和模型组大鼠灌胃等体积水, 每日1次, 连续灌胃42 d。实验期间, 每日观察大鼠日常状况和体质量变化。给药结束前1 d采集大鼠空腹血糖, 进行口服葡萄糖耐量试验并计算曲线下面积(AUC); 末次给药后, 计算大鼠心脏、肝脏、肾脏脏器指数; 检测糖化血红蛋白(HbA1c)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平及肝糖原含量; 采用苏木精-伊红染色观察大鼠肝脏和胰腺组织病理形态学变化并计算病理等级评分; 采用Western blot法检测大鼠肝脏磷酸化PI3K(p-PI3K)、磷酸化Akt(p-Akt)、磷酸化FoxO1(p-FoxO1)、磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶(PEPCK)、葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)蛋白表达水平。结果 与空白对照组比较, 模型组大鼠出现多饮、多食、多尿症状, 体质量、SOD、GSH-Px水平和p-PI3K、p-AKT、p-FoxO1蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$); 大鼠肝脏、肾脏脏器指数, 灌胃葡萄糖溶液0、0.5、2 h时的血糖水平、AUC, 空腹血糖水平、HbA1c水平, 血清中MDA、TC、TG、肝糖原含量, 肝脏、胰腺病理等级评分, PEPCK、G6Pase蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较, 茯苓多糖各剂量组大鼠日常情况均有所改善, 以上指标均有不同程度的逆转。结论 茯苓多糖可以通过减弱氧化应激, 上调PI3K/Akt/FoxO1通路, 从而下调糖异生关键酶PEPCK和G6Pase的蛋白表达, 抑制肝脏糖异生, 进而有效降低2型糖尿病模型大鼠的血糖水平, 调节糖脂代谢。

关键词 茯苓多糖; 2型糖尿病; 氧化应激; PI3K/Akt/FoxO1通路; 糖异生

Study on the mechanism of *Poria cocos* polysaccharides on the regulation of gluconeogenesis in liver of type 2 diabetic mellitus model rats

HAN Sijie, PAN Xiang, ZHU Qianqian, ZHANG Dandan, ZHANG Hanrui, FANG Jingxian, WEI Qiong, LIU Dan, YE Xiaochuan (College of Pharmacy/Hubei Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Resource and TCM Chemistry, Hubei University of TCM, Wuhan 430065, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effect and mechanism of *Poria cocos* polysaccharides on the regulation of blood glucose in type 2 diabetes mellitus (T2DM) model rats by phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)/protein kinase B(Akt)/forked box transcription factor O1 (FoxO1) pathway. **METHODS** SD rats were randomly divided into blank control group (no modeling, no administration), model group(modeling, no administration), metformin group(modeling, 200 mg/kg) and *P. cocos* polysaccharide low-dose, medium-dose and high-dose groups(modeling, 100, 200, 400 mg/kg), 8 in each group. Except for blank control group, other groups were given high fat diet combined with streptozotocin to construct the model of T2DM rats. At the same time, administration groups were given relevant dose of medicine intragastrically, and blank control group and model group were given constant volume of water intragastrically, once a day, for consecutive 42 days. During the experiment, general condition and bodyweight of rats were observed every day; fasting blood glucose(FBG) of rats were collected, and oral glucose tolerance test were conducted and area under curve (AUC) was calculated the day before last administration. After last medication, the heart, liver, kidney organ index were calculated; the levels of HbA1c, TC, TG, MDA, SOD, GSH-Px and hepatic glycogen content were detected. HE staining was used to observe the pathological changes of liver and pancreatic tissue, and the pathological grade score was calculated. Western blot assay was used to detect the protein expressions of p-PI3K, p-Akt, p-FoxO1, PEPCK and G6Pase in liver tissues. **RESULTS** Compared with blank control group, the rats of model group suffered from polydipsia, polyphagia and polyuria; the body weight,

[△] 基金项目 国家重点研发计划项目(No.2017YFC1703004);湖北省技术创新专项——重大项目(No.2019ACA121)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药及其制剂的药效和物质基础。E-mail:843228181@qq.com

通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:中药及其制剂的物质基础、中药新产品研发。电话:027-68890101。E-mail:yxx-cc1965@163.com

the levels of SOD and GSH-Px, the protein expressions of p-PI3K, p-Akt and p-FoxO1 were significantly decreased ($P < 0.05$); liver and kidney organ index, blood glucose level at 0, 0.5 and 2 hours after intragastric administration of glucose solution, AUC, FBG, HbA1c, serum levels of MDA, TC, TG and hepatic glycogen content, liver and pancreatic pathological grade score, the protein expressions of PEPCK and G6Pase were all increased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, the general condition of rats in *P. cocos* polysaccharide groups were all improved, and all of above indicators had been reversed to varying degrees. **CONCLUSIONS** *P. cocos* polysaccharide can downregulate protein expressions of PEPCK and G6Pase which are key enzymes of gluconeogenesis, inhibit hepatic gluconeogenesis, effectively decrease blood glucose levels and regulate glucolipid metabolism in T2DM model rats by weakening oxidative stress and upregulating PI3K/Akt/FoxO1 pathway.

KEYWORDS *Poria cocos* polysaccharides; type 2 diabetes mellitus; oxidative stress; PI3K/Akt/FoxO1 pathway; gluconeogenesis

2型糖尿病占糖尿病发病例数的90%以上,由2型糖尿病导致的并发症大多与患者的高病死率有关^[1-2]。目前,临床上用于治疗糖尿病的双胍类药物具有明显的副作用^[3]。而中药在治病救人方面有几千年的历史,更是在防治2型糖尿病及其并发症方面具有多靶点、多途径、个体化等不可替代的优势,因此,寻找标本兼治、副作用小、疗效稳定的中药及其有效成分治疗糖尿病是国内外研究的重点。

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核,具有利水渗湿、健脾、宁心的功效^[4]。糖尿病属中医“消渴症”范畴,而茯苓是中医治疗消渴症的高频用药^[5]。茯苓多糖为茯苓菌核中的主要成分,占菌核质量的70%~80%^[6],具有抗肿瘤、抗炎、保肝、调节免疫等多种药理作用^[7]。有研究报道,茯苓多糖能通过调节肠道菌群来改善肥胖小鼠的糖脂代谢,减轻肝脏脂肪变性^[8]。多项研究表明,茯苓多糖可以减轻糖尿病肾病小鼠的肾损伤^[9-11]。在生理条件下,机体血糖水平通过体内葡萄糖产生和摄取间的动态平衡来维持稳定。糖异生是将一些非糖前体,如乳酸、甘油、生糖氨基酸等转变为葡萄糖的过程,肝脏糖异生是导致内源性葡萄糖生成增加的重要原因,而2型糖尿病患者中糖异生作用异常活跃^[12]。目前已有研究证明,抑制肝脏糖异生是治疗2型糖尿病的有效策略^[13]。另有研究证实,磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)/叉头框转录因子O1(forkhead box transcription factor O1, FoxO1)信号通路可调节肝脏糖异生^[14]。本研究主要探讨茯苓多糖是否可以通过调节PI3K/Akt/FoxO1通路,抑制糖异生关键酶——磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)和葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G6Pase)的蛋白表达,进而调节2型糖尿病模型大鼠血糖,以期阐明茯苓多糖发挥降血糖的作用机制提供数据支持。

1 材料

1.1 仪器

LiDE110型凝胶成像仪购自日本Canon公司;Spark 10M型酶标仪购自瑞士Tecan公司;Centrifuge 5810R型

高速离心机购自德国Eppendorf公司;530活力型手持血糖仪购自江苏鱼跃医疗设备股份有限公司;WTM-1812D型膜分离实验设备、ST-2B-1812型微滤膜元件、V0.2-2B-1812型超滤膜元件均购自杭州沃腾膜工程有限公司;FD-1A-50型冷冻干燥机购自北京博医康实验仪器有限公司;Eclipse E100型光学显微镜、DS-U3型成像系统均购自日本Nikon公司。

1.2 药材与试剂

茯苓药材采自湖北省英山县石头咀镇,经湖北中医药大学药学院叶晓川教授鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *P. cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核。盐酸二甲双胍片(批号ABU7707,规格0.5 g/片)购自中美上海施贵宝制药有限公司;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ,批号301V021,规格1 g)购自北京索莱宝科技有限公司;三酰甘油(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、肝糖原试剂盒(批号分别为20210423、20210426、20210422、20210420、20210425、20210426、20210420)均购自南京建成生物工程研究所;苏木素-伊红(HE)染液套装、RIPA裂解液(批号分别为G1003、CR2103126)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;TBST缓冲液(批号21128946)购自合肥白鲨生物科技有限公司;兔抗磷酸化PI3K(p-PI3K)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(批号分别为ab182651、ab181602)均购自英国Abcam公司;兔抗磷酸化Akt(p-Akt)、兔抗磷酸化FoxO1(p-FoxO1)(批号分别为#4060、#9461)均购自美国CST公司;兔抗G6Pase(批号LS-C446262)购自美国LSBio公司;兔抗PEPCK(批号14892-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(批号AS1107)购自南非Aspen公司;磷酸和氢氧化钠均为食品级;水为纯水。

1.3 动物

SPF级SD大鼠购自湖北省医学实验动物中心,动物许可证号为SCXK(鄂)2020-0018,动物合格证号为42000600040888。动物实验经湖北中医药大学伦理委员会批准,批准号为HUCMS202103009。大鼠饲养于

(20±2)℃、相对湿度50%~70%、12 h明暗交替环境中,自由饮水、摄食,适应性喂养5 d后用于实验。

2 方法

2.1 茯苓多糖的制备

茯苓丁粉碎后经80%乙醇回流提取2次(提取时间分别为2、1 h),滤过,取滤渣,挥干至无醇味后用氢氧化钠溶解,常温下充分搅拌后过滤。滤液用磷酸调至pH=7,沉淀用纯水洗涤数次,滤过后的洗涤液经WTM-1812D型膜分离实验设备微滤、超滤后,与上述沉淀合并,冷冻干燥后得茯苓多糖。采用苯酚-硫酸法测得茯苓多糖含量为95.60%。

2.2 分组、造模与给药

大鼠适应性喂养5 d后,禁食4 h(每次禁食均换垫料以避免垫料内遗漏有饲料,影响禁食效果),取大鼠尾尖静脉血,用530活力型手持血糖仪检测空腹血糖,作为大鼠基础血糖值。将大鼠按照禁食4 h后基础血糖水平组间差异无统计学意义($P>0.05$)为标准,分为空白对照组、模型组、二甲双胍组(阳性对照,剂量为200 mg/kg)和茯苓多糖低、中、高剂量组(剂量分别为100、200、400 mg/kg),每组8只,各给药组的剂量依据来自前期预实验。除空白对照组外,其余各组大鼠采用高脂饲料联合STZ诱导构建2型糖尿病大鼠模型:大鼠饲喂高脂饲料,第21天时禁食不禁水12 h,根据预实验结果腹腔注射STZ 40 mg/kg;3 d后检测造模大鼠空腹血糖值均大于11.3 mmol/L,表明造模成功;继续饲喂高脂饲料至第28天,巩固造模。造模同时,模型组和空白对照组大鼠每日灌胃等体积水,各给药组大鼠每日灌胃相应剂量的药物,每日1次,连续灌胃42 d。

2.3 日常状态观察及体质量检测

实验期间观察大鼠的饮水量、尿量、饮食量、毛色、精神状态等情况,并每日测定大鼠的体质量。

2.4 空腹血糖检测和口服葡萄糖耐量试验

各组大鼠在给药前、给药后(给药结束前1 d)检测空腹血糖。口服葡萄糖耐量试验:给药前1 d禁食4 h后取大鼠尾尖静脉血,用530活力型手持血糖仪检测灌胃葡萄糖前(0 h)的血糖;然后灌胃2.5 g/kg葡萄糖,分别在灌胃0.5、2 h时检测血糖,计算口服葡萄糖耐量试验曲线下面积(area under curve, AUC): $AUC=0.25\times(\text{血糖}_{0h}+4\times\text{血糖}_{0.5h}+3\times\text{血糖}_{2h})$ 。AUC越大说明2型糖尿病模型大鼠对葡萄糖的代谢能力越弱,侧面反映糖尿病的病程。

2.5 脏器指数计算

末次给药后,取大鼠腹部主动脉血,再解剖得大鼠心脏、肝脏、肾脏组织,用生理盐水清洗、滤纸擦拭、称定质量后,置于-80℃冰箱保存。脏器指数=脏器质量/体质量×1 000。

2.6 HbA1c、TG、TC、MDA、GSH-Px、SOD水平及肝糖原含量检测

取“2.5”项下血样和肝脏组织。用肝素抗凝管取全

血2~4 mL,以1 000 r/min离心5 min,弃上清液,留沉淀的红细胞,再用生理盐水按上述方法洗涤2~3次,得压积红细胞。取压积红细胞1 mL,加冷双蒸水1.5 mL,用漩涡混匀器充分混匀1 min制得溶血液,置于-20℃冰箱保存,用于检测HbA1c水平。用普通采血管取全血5 mL,以3 000 r/min离心10 min,小心吸取上清液即为血清,置于-80℃冰箱保存,用于检测血脂指标TG、TC水平和抗氧化指标MDA、GSH-Px、SOD水平。取肝脏组织约100 mg检测肝糖原含量。各指标检测操作均严格按照相应试剂盒说明书进行。

2.7 肝脏和胰腺组织病理学观察

随机选择“2.5”项下每组3只大鼠的肝脏和胰腺组织,用4%多聚甲醛固定、梯度乙醇脱水、石蜡包埋、切片,HE染色、二甲苯透明后,于光学显微镜下观察肝细胞情况和胰岛细胞变性坏死情况,并用显微镜照相系统拍照(每个样品随机选取3个区域),进行病理学等级评分。其中肝脏病理等级评分采用Knodell组织学活动指数评分系统并参考文献[15]:I级为界面性炎症及桥接坏死的程度,按0~4分评定;II级为小叶内肝细胞变性和坏死的范围及汇管区的炎症状况,按0~4分评定;III级为纤维化程度,按0~4分评定。胰腺病理等级评分标准参考文献[16]:I级为胰岛形态损坏的程度,按0~4分评定;II级为胰岛细胞排列紊乱及细胞核游离的程度,按0~4分评定;III级为胰岛细胞数量减少及细胞坏死的程度,按0~4分评定。以上评分越接近0分代表病理程度越轻,越接近4分代表病理程度越重。

2.8 肝脏组织PI3K/Akt/FoxO1通路相关蛋白表达水平检测

采用Western blot法检测。取“2.5”项下部分冻存肝脏组织,加RIPA裂解液,冰浴彻底匀浆,将匀浆液转移至离心管中,振荡,冰浴30 min,同时用移液器反复吹打,确保匀浆液完全裂解。以12 000 r/min于4℃离心5 min,收集上清液,即为总蛋白溶液。取部分总蛋白溶液用BCA试剂盒测定总蛋白含量,剩余部分沸水浴5 min使蛋白变性,变性后置于-80℃冰箱保存,备用。取变性蛋白40 μg,采用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离目的蛋白,其中分离胶电压80 V,浓缩胶电压120 V;用0.45 μm的PVDF膜300 mA转膜90 min,用牛奶封闭1 h,分别加入p-PI3K、p-AKT、p-FoxO1、PEPCK、G6Pase和GAPDH一抗(稀释度分别为1:500、1:1 000、1:500、1:500、1:2 000、1:10 000),于4℃孵育过夜;次日,用TBST漂洗3次,加入相应二抗(稀释度为1:10 000),于常温下继续孵育1 h后,用TBST漂洗3次,滴加新鲜配制的ECL混合溶液(鲁米诺与过氧化氢体积比1:1混合)至膜的蛋白面,暗室中曝光,根据不同的光强度调整曝光条件,显影、定影。将胶片进行扫描存档,采用AlphaEase® FC软件处理系统导出目的蛋白和内参GAPDH的灰度值,采用Excel软件计算,以目的蛋

白条带与内参蛋白GAPDH条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

2.9 统计学分析

采用SPSS 23.0软件对数据进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 茯苓多糖对2型糖尿病模型大鼠日常状态和体质量的影响

实验期间,大鼠均有较强的行动力。空白对照组大鼠皮毛健康有光泽,实验前后饮水量几乎无变化。模型组大鼠表现狂躁,出现多饮、多食、多尿症状,毛色不华,部分呈浅黄褐色并伴有掉毛现象,体质量较空白对照组显著减轻($P<0.05$)。给予相应剂量药物后,二甲双胍组大鼠多饮、多食、多尿、毛色不华等状态改善,但体质量与空白对照组比较仍显著减轻($P<0.05$),并伴有便溏现象。与模型组比较,茯苓多糖低、中、高剂量组大鼠狂躁状态改善,多饮、多食、多尿、毛色不华等现象得到缓解,体质量回升,其中茯苓多糖中剂量组分别与模型组、二甲双胍组比较,以及茯苓多糖高剂量组与二甲双胍组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组大鼠体质量和脏器指数比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	体质量/g	脏器指数/(mg/g)		
		心脏	肝脏	肾脏
空白对照组	404.03±28.21	2.75±0.23	34.65±1.56	5.83±0.50
模型组	331.98±18.98 ^a	3.17±0.38	37.74±1.91 ^a	9.84±1.31 ^a
二甲双胍组	327.08±40.69 ^a	3.11±0.36	36.41±1.82	8.02±1.04 ^a
茯苓多糖低剂量组	335.91±22.57	3.07±0.40	36.82±3.87	7.10±0.94 ^b
茯苓多糖中剂量组	375.53±38.77 ^{bc}	2.82±0.79	33.49±2.74 ^b	6.64±0.46 ^b
茯苓多糖高剂量组	359.84±42.40 ^c	2.93±0.24	34.43±4.20 ^b	6.92±0.55 ^b

a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与二甲双胍组比较, $P<0.05$

3.2 茯苓多糖对2型糖尿病模型大鼠脏器指数的影响

与空白对照组比较,模型组大鼠肝脏、肾脏脏器指数均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,二甲双胍组大鼠肾脏脏器指数和茯苓多糖低、中、高剂量组大鼠肝脏(除茯苓多糖低剂量组外)、肾脏脏器指数均显著降低($P<0.05$)。结果见表1。

3.3 茯苓多糖对2型糖尿病模型大鼠口服葡萄糖耐量的影响

灌胃葡萄糖溶液0~0.5 h期间,各组大鼠的血糖水平均呈逐渐增加的趋势;而在灌胃0.5~2 h期间,其血糖水平又均呈逐渐降低的趋势。与空白对照组比较,模型组大鼠在灌胃葡萄糖溶液0、0.5、2 h时的血糖水平和AUC均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,二甲双胍组和茯苓多糖低(除0 h时外)、中、高剂量组大鼠在灌胃葡萄糖溶液0、0.5、2 h时的血糖水平和AUC均显著降低($P<0.05$)。结果见表2。

表2 各组大鼠在灌胃葡萄糖不同时间点的血糖水平和AUC比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	血糖/(mmol/L)			AUC/[mmol/(L·h)]
	0 h	0.5 h	2 h	
空白对照组	6.49±0.49	8.98±0.63	7.16±0.42	16.32±0.99
模型组	19.56±6.96 ^a	26.84±9.81 ^a	23.91±8.29 ^a	50.55±16.68 ^a
二甲双胍组	9.73±3.49 ^b	11.69±2.56 ^b	8.77±1.83 ^b	18.09±3.02 ^b
茯苓多糖低剂量组	11.06±5.10	11.50±3.19 ^b	9.50±2.16 ^b	20.63±4.34 ^b
茯苓多糖中剂量组	7.64±0.67 ^b	9.93±0.86 ^b	8.76±0.55 ^b	18.19±1.32 ^b
茯苓多糖高剂量组	8.26±1.14 ^b	13.30±3.17 ^b	9.97±1.39 ^b	21.18±3.27 ^b

a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$

3.4 茯苓多糖对2型糖尿病模型大鼠空腹血糖和HbA1c的影响

给药前,各组大鼠空腹血糖水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。给药后(给药结束前1 d),与空白对照组比较,模型组大鼠空腹血糖、HbA1c水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,二甲双胍组和茯苓多糖中、高剂量组大鼠空腹血糖水平,以及二甲双胍组和茯苓多糖中剂量组大鼠HbA1c水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表3。

表3 各组大鼠空腹血糖和HbA1c水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	空腹血糖/(mmol/L)		HbA1c/%
	给药前	给药后	
空白对照组	7.17±0.63	6.81±0.60	5.17±0.62
模型组	7.66±0.70	19.16±7.49 ^a	10.60±2.33 ^a
二甲双胍组	7.52±0.29	8.23±3.60 ^b	7.09±0.93 ^b
茯苓多糖低剂量组	7.08±0.68	10.21±2.15	9.11±1.39
茯苓多糖中剂量组	7.47±0.50	7.70±0.52 ^b	6.80±0.67 ^b
茯苓多糖高剂量组	7.12±0.42	8.53±1.23 ^b	8.37±1.23

a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$

3.5 茯苓多糖对2型糖尿病模型大鼠血脂水平、抗氧化水平及肝糖原含量的影响

与空白对照组比较,模型组大鼠血清中TC、TG、MDA水平和肝糖原含量显著升高,GSH-Px、SOD水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,二甲双胍组和茯苓多糖低、中、高剂量组大鼠TC、TG、MDA水平和肝糖原含量均显著降低,SOD水平显著升高($P<0.05$);茯苓多糖中剂量组大鼠GSH-Px水平显著升高($P<0.05$)。结果见表4。

表4 各组大鼠TC、TG、MDA、GSH-Px、SOD水平及肝糖原含量比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	血脂水平		抗氧化水平		肝糖原含量/(mg/g)
	TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	MDA/(nmol/mL)	GSH-Px/(U/mL)	
空白对照组	1.45±0.84	0.63±0.19	2.90±1.34	517.07±169.81	56.04±12.23
模型组	4.32±1.26 ^a	1.99±0.52 ^a	8.40±2.54 ^a	252.29±52.26 ^a	25.84±7.79 ^a
二甲双胍组	2.01±0.63 ^b	0.74±0.46 ^b	3.33±2.29 ^b	504.85±221.48	45.34±8.57 ^b
茯苓多糖低剂量组	2.45±0.37 ^b	0.98±0.23 ^b	5.25±1.73 ^b	361.00±96.84	55.67±8.55 ^b
茯苓多糖中剂量组	2.15±0.78 ^b	0.79±0.70 ^b	3.86±2.82 ^b	434.54±88.99 ^b	60.70±3.55 ^b
茯苓多糖高剂量组	2.21±0.90 ^b	0.94±0.48 ^b	4.36±2.42 ^b	375.29±60.70	57.81±3.18 ^b

a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$

3.6 肝脏和胰腺组织病理学观察结果

大鼠肝脏组织HE染色结果见图1。由图1所示,空白对照组大鼠肝小叶形状规则,肝细胞形态正常,肝索排列整齐、呈放射状分布。模型组大鼠肝小叶不明显,肝细胞排列散乱,肝索结构消失,肝窦扩大,细胞间呈不同程度的皱缩,导致空泡较多,可见淋巴细胞浸润。二甲双胍组大鼠肝索明显,但中央静脉周围有巨噬细胞,表明肝细胞有炎症。茯苓多糖低、中、高剂量组大鼠肝索和肝窦结构较模型组有所恢复,细胞皱缩情况均有所改善。各组大鼠肝脏病理等级评分见表5。由表5可知,与空白对照组比较,模型组大鼠肝脏病理等级评分均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,二甲双胍组和茯苓多糖低、中、高剂量组大鼠肝脏病理等级评分均显著降低($P<0.05$)。

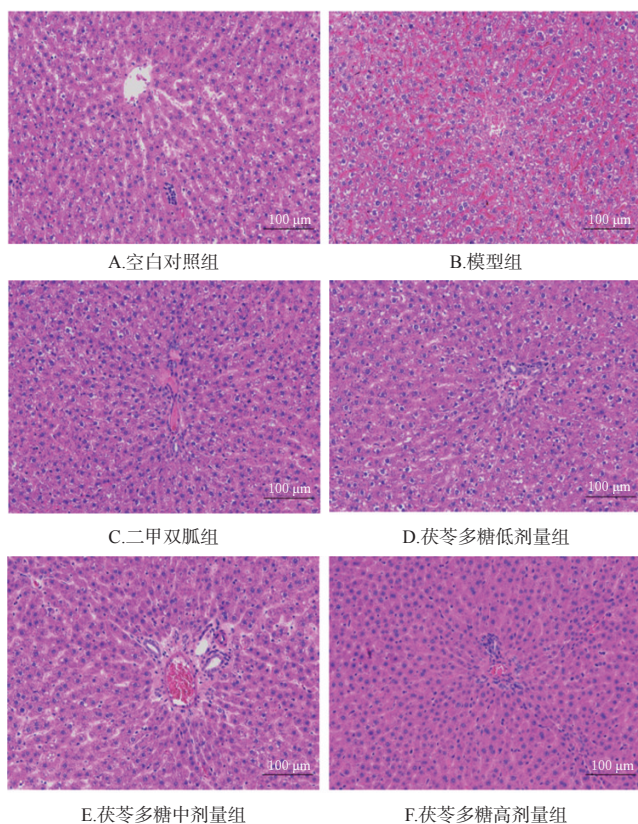


图1 各组大鼠肝脏组织病理HE染色显微图

表5 各组大鼠肝脏病理等级评分比较($\bar{x} \pm s, n=9$,分)

组别	I级	II级	III级
空白对照组	0.3±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1
模型组	2.7±0.3 ^a	2.5±0.2 ^a	2.3±0.2 ^a
二甲双胍组	0.9±0.2 ^b	1.3±0.2 ^b	0.6±0.2 ^b
茯苓多糖低剂量组	1.3±0.3 ^b	1.4±0.2 ^b	1.2±0.3 ^b
茯苓多糖中剂量组	1.1±0.3 ^b	1.1±0.2 ^b	1.0±0.3 ^b
茯苓多糖高剂量组	1.5±0.3 ^b	1.0±0.2 ^b	0.9±0.2 ^b

a: 与空白对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$

大鼠胰腺组织HE染色结果见图2。由图2所示,空白对照组大鼠胰岛形态结构完整、呈椭圆形,细胞排列整齐、孔隙较小,细胞核大小相差不大。模型组大鼠胰

岛形态被破坏、变形呈葫芦状,中央可见空亮区和许多空泡,细胞核大小不一且游离于细胞边缘。二甲双胍组和茯苓多糖低、中、高剂量组大鼠胰岛形态、细胞核情况较模型组均有所改善。各组大鼠胰腺病理等级评分见表6。由表6可知,与空白对照组比较,模型组大鼠胰腺病理等级评分均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,二甲双胍组和茯苓多糖低、中、高剂量组大鼠胰腺病理等级评分均显著降低($P<0.05$)。

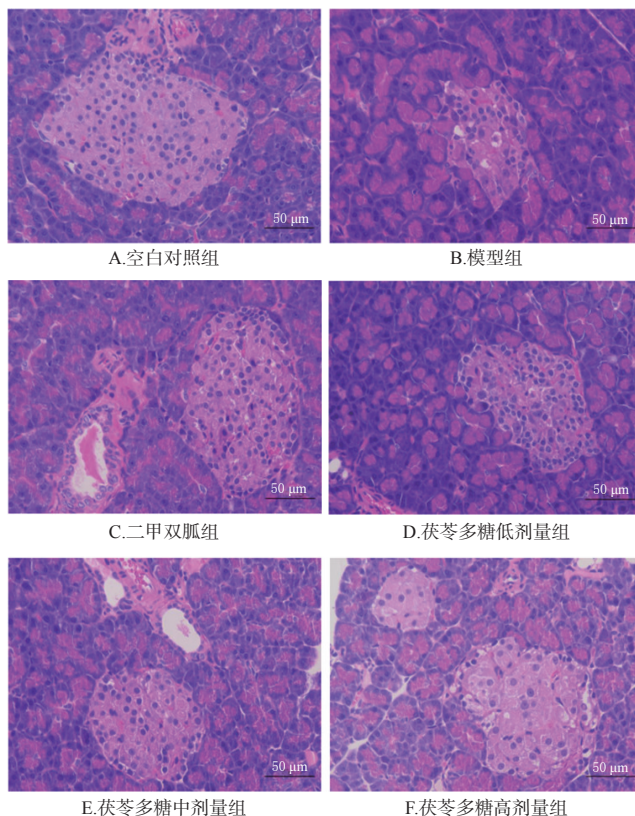


图2 各组大鼠胰腺组织病理HE染色显微图

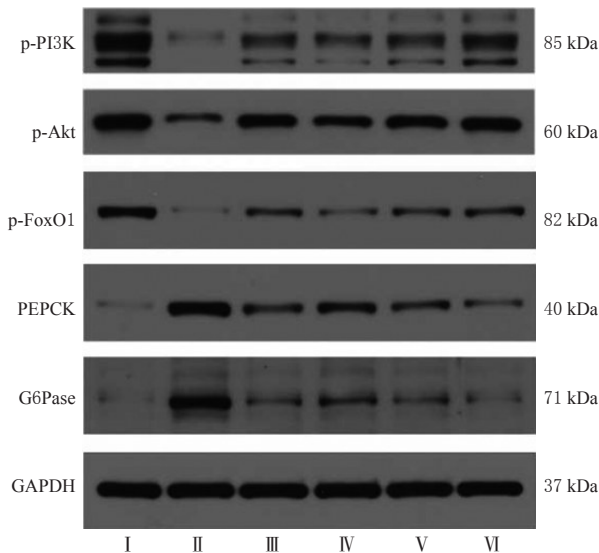
表6 各组大鼠胰腺病理等级评分比较($\bar{x} \pm s, n=9$,分)

组别	I级	II级	III级
空白对照组	0.22±0.02	0.30±0.04	0
模型组	6.12±0.42 ^a	4.03±0.30 ^a	2.71±0.12 ^a
二甲双胍组	1.13±0.13 ^b	1.17±0.21 ^b	0.76±0.18 ^b
茯苓多糖低剂量组	2.12±0.24 ^b	1.84±0.07 ^b	1.12±0.32 ^b
茯苓多糖中剂量组	1.47±0.31 ^b	1.68±0.17 ^b	1.09±0.14 ^b
茯苓多糖高剂量组	1.25±0.12 ^b	1.04±0.25 ^b	0.72±0.08 ^b

a: 与空白对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$

3.7 茯苓多糖对2型糖尿病模型大鼠肝脏组织中PI3K/Akt/FoxO1通路相关蛋白表达的影响

与空白对照组比较,模型组大鼠肝脏组织中p-PI3K、p-Akt、p-FoxO1蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),PEPCK、G6Pase蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,二甲双胍组和茯苓多糖低、中、高剂量组大鼠肝脏组织中p-PI3K、p-Akt、p-FoxO1(除茯苓多糖低剂量组外)蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$),PEPCK、G6Pase蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。结果见图3、图4。



I:空白对照组;II:模型组;III:二甲双胍组;IV:茯苓多糖低剂量组;V:茯苓多糖中剂量组;VI:茯苓多糖高剂量组

图3 各组大鼠肝脏组织中PI3K/Akt/FoxO1通路相关蛋白表达电泳图

4 讨论

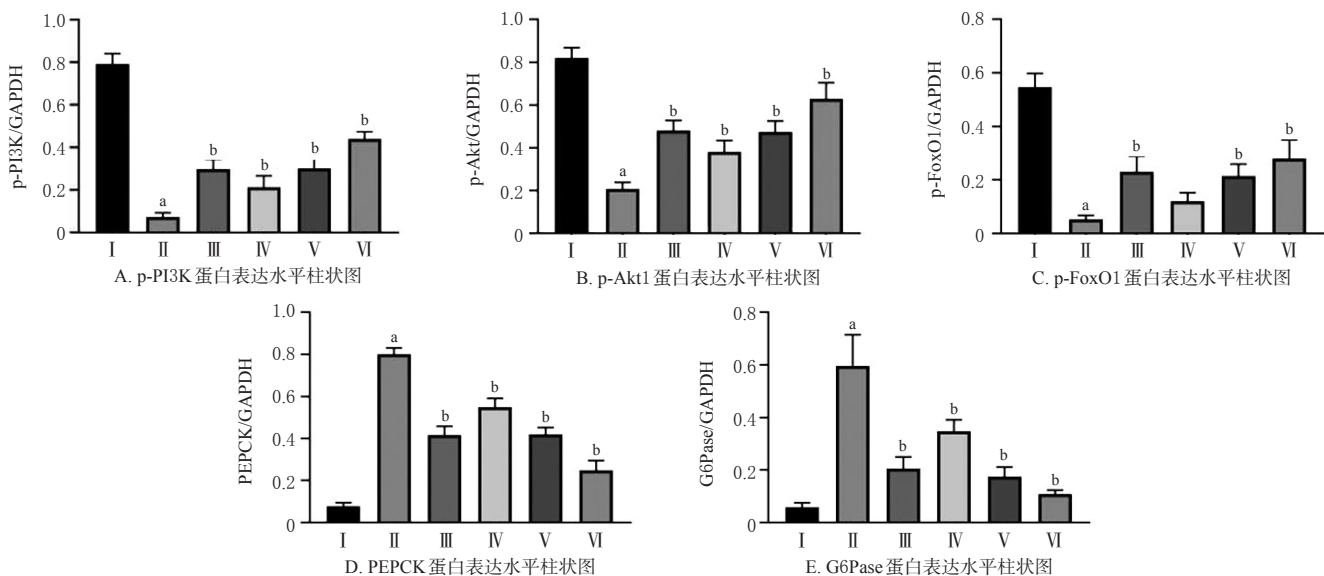
本研究采用高脂饲料联合STZ构建了2型糖尿病大鼠模型,所得模型大鼠常伴有血脂异常、体质量减轻,且伴有HbA1c水平持续升高等症状,与以往文献一致^[17]。体质量下降被认为是糖尿病的典型特征,这与葡萄糖代谢缺陷和组织蛋白过度分解有关,而HbA1c常作为糖尿病控制的监测指标^[18]。在糖尿病的发生过程中,高血糖、高胰岛素血症和游离脂肪酸升高均可诱导活性氧产生,而强氧化环境可能会导致胰岛素抵抗等生理功能障碍和糖尿病并发症发生^[19]。本研究结果显示,茯苓多糖给药后,能够恢复大鼠体质量,显著降低2型糖尿病模型大鼠的空腹血糖、HbA1c水平,改善葡萄糖耐受情况,减

轻氧化应激水平。此外,茯苓多糖还可降低2型糖尿病模型大鼠血清中的TC、TG水平,遏制糖尿病病程中因糖脂代谢异常导致的胆固醇代谢异常,减轻胰腺组织的结构破坏,从而发挥保护胰岛β细胞的作用。

肝脏在能量平衡中起着至关重要的作用,而糖尿病病程发展中容易引起肝脏相关并发症发生,严重者甚至导致死亡^[20]。因此,肝脏损伤程度和肝糖原含量间接反映了机体的胰岛素活性和糖代谢能力^[21]。本研究中,模型组大鼠肝糖原含量显著升高,肝脏病理切片显示肝细胞形态改变,肝小叶不明显,肝细胞排列散乱,肝索结构消失,肝窦扩大,表明2型糖尿病模型大鼠的肝脏损伤可能与糖脂代谢失调及长期高糖刺激引起的炎症损伤有关。茯苓多糖给药后,各剂量组大鼠的肝糖原含量显著降低,肝脏组织病理学检查显示肝索和肝窦结构得到改善,表明茯苓多糖可以改善2型糖尿病模型大鼠的肝脏损伤情况,也间接反映了茯苓多糖可以改善胰岛素活性和糖代谢能力。

PI3K信号分子调节葡萄糖的摄取和代谢,其下游的关键节点Akt磷酸化后可以调节糖异生和糖原合成^[22]。FoxO1是位于PI3K/Akt途径下游的关键因子,其转录活性受磷酸化的Akt调节,而肝脏FoxO1功能增强会导致胰岛素作用受损及肝脏糖异常增多;相反,糖尿病发展过程中会损坏PI3K/Akt通路,负调控使FoxO1去磷酸化相对激活并移位到细胞核,去磷酸化的FoxO1活性增强,从而增加糖异生^[23]。本研究结果显示,与模型组比较,茯苓多糖低、中、高剂量组大鼠p-PI3K、p-Akt、p-FoxO1蛋白表达水平均显著升高,表明茯苓多糖可以激活2型糖尿病模型大鼠肝脏PI3K/Akt/FoxO1通路。

正常生理情况下,肝脏通过葡萄糖和糖原的互相转化来维持空腹血糖的正常水平。而2型糖尿病患者的空



a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;I:空白对照组;II:模型组;III:二甲双胍组;IV:茯苓多糖低剂量组;V:茯苓多糖中剂量组;VI:茯苓多糖高剂量组

图4 各组大鼠肝脏组织中PI3K/Akt/FoxO1通路相关蛋白表达水平柱状图

腹高血糖主要是由肝脏糖异生所导致的^[24]。PEPCK 和 G6Pase 是肝脏糖异生过程中 2 种关键的限速酶,可通过抑制这 2 种酶来干预肝脏糖异生^[25]。FoxO1 是肝脏糖异生关键酶调控的上游靶点,被磷酸化的 FoxO1 能够抑制 G6Pase 和 PEPCK 的蛋白表达,从而抑制糖异生^[26]。本研究结果显示,与模型组比较,茯苓多糖低、中、高剂量组大鼠 PEPCK 和 G6Pase 蛋白表达水平均显著降低,表明茯苓多糖可以抑制肝脏糖异生。

综上所述,茯苓多糖可以通过减弱氧化应激,上调 PI3K/Akt/FoxO1 通路,从而下调糖异生关键酶 PEPCK 和 G6Pase 的蛋白表达,发挥抑制肝脏糖异生的作用,进而有效降低 2 型糖尿病模型大鼠的血糖水平,调节糖脂代谢。

参考文献

[1] LI R S, TAO A E, YANG R M, et al. Structural characterization, hypoglycemic effects and antidiabetic mechanism of a novel polysaccharides from *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl[J]. Biomedicine Pharmacother, 2020, 131: 110687.

[2] XU L N, LI Y, DAI Y, et al. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: pharmacology and mechanisms[J]. Pharmacol Res, 2018, 130: 451-465.

[3] TANNER C, WANG G, LIU N, et al. Metformin: time to review its role and safety in chronic kidney disease[J]. Med J Aust, 2019, 211(1): 37-42.

[4] 李慧君,王天合,尤朋涛,等.不同产地茯苓对肾虚下焦水肿大鼠的利尿渗湿作用研究[J].中药新药与临床药理, 2021, 32(5): 632-638.

[5] 李敏,曹淼,彭娜,等.基于中医传承辅助系统的宋代治疗消渴方剂组方规律分析[J].中医药导报, 2021, 27(7): 177-180.

[6] 卢华杰.茯苓酸性多糖的分级分离、结构分析及其生物活性研究[D].武汉:湖北中医药大学, 2014.

[7] 王悦,田双双,刘晓谦,等.茯苓多糖的提取、结构及药理作用研究进展[J].世界中医药, 2021, 16(17): 2548-2555.

[8] SUN S S, WANG K, MA K, et al. An insoluble polysaccharide from the sclerotium of *Poria cocos* improves hyperglycemia, hyperlipidemia and hepatic steatosis in ob/ob mice via modulation of gut microbiota[J]. Chin J Nat Med, 2019, 17(1): 3-14.

[9] 李佳丹,周迪夷.茯苓多糖对 db/db 小鼠肾脏保护作用及其对 p38 MAPK/PPAR- γ 信号通路的影响[J].中国中医药科技, 2019, 26(3): 346-350.

[10] 张慧儒,吕会新,康希,等.茯苓多糖抗 2 型糖尿病肾病大鼠肾间质纤维化作用研究[J].当代医学, 2016, 22(8): 1-2.

[11] 黄聪亮,郑佳俐,李凤林,等.茯苓多糖对 2 型糖尿病小鼠肾组织抗氧化能力及 Bax、Bcl-2 蛋白表达影响[J].食品与生物技术学报, 2016, 35(1): 82-88.

[12] 林心君,胡海霞,何昱霖,等.石斛合剂基于 PKB/FoxO1 通路抑制糖尿病大鼠肝糖异生的机制研究[J].湖南中医药大学学报, 2021, 41(8): 1166-1171.

[13] WU F, SHAO Q Q, XIA Q S, et al. A bioinformatics and

transcriptomics based investigation reveals an inhibitory role of Huanglian-Renshen-Decoction on hepatic glucose production of T2DM mice via PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2021, 83: 153487.

[14] 季天娇,王中元,朱云峰,等.黄芪甲苷调节 PI3K/Akt/FoxO1 通路抑制糖尿病大鼠肝糖异生[J].中国实验方剂学杂志, 2020, 26(1): 78-86.

[15] 杨焘,宋厚盼,陈哲,等.基于 SIRT1/AMPK 信号通路探讨茵陈蒿汤治疗急性酒精性肝损伤的效应及机制[J].中药药理与临床, 2022, 38(1): 36-40.

[16] 罗学志.翻白草水提物联合二甲双胍对 2 型糖尿病模型大鼠胰岛功能及形态的影响[D].荆州:长江大学, 2020.

[17] NAJAFI A, POURFARZAM M, ZADHOUSH F. Oxidant/antioxidant status in type-2 diabetes mellitus patients with metabolic syndrome[J]. J Res Med Sci, 2021, 26: 6.

[18] 乔鹏,朱亮,张华,等.基于 leptin-AMPK-ACC 通路探究西格列汀对 2 型糖尿病模型大鼠糖脂代谢的改善作用[J].中国老年学杂志, 2021, 41(6): 1301-1305.

[19] LIN X J, SHI H, CUI Y, et al. *Dendrobium* mixture regulates hepatic gluconeogenesis in diabetic rats via the phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(1): 204-212.

[20] LI Y M, LIU Y P, LIANG J J, et al. Gymnemic acid ameliorates hyperglycemia through PI3K/AKT- and AMPK-mediated signaling pathways in type 2 diabetes mellitus rats[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(47): 13051-13060.

[21] LONG X S, LIAO S T, WEN P, et al. Superior hypoglycemic activity of mulberry lacking monosaccharides is accompanied by better activation of the PI3K/Akt and AMPK signaling pathways[J]. Food Funct, 2020, 11(5): 4249-4258.

[22] DU L J, PANG B, TAN Y M, et al. Banxia Xiexin Decoction ameliorates t-BHP-induced apoptosis in pancreatic beta cells by activating the PI3K/AKT/FOXO1 signaling pathway [J]. J Diabetes Res, 2020, 2020: 3695689.

[23] GAO H S, DING L L, LIU R, et al. Characterization of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharide and its therapeutic effect on type 2 diabetic mice[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 179: 259-269.

[24] 李佳欣,陈思琦,葛鹏玲. 2 型糖尿病胰岛素抵抗研究进展[J].辽宁中医药大学学报, 2021, 23(12): 94-97.

[25] SUN X Y, CAO Z Q, MA Y Y, et al. Resveratrol attenuates dapagliflozin-induced renal gluconeogenesis via activating the PI3K/Akt pathway and suppressing the FoxO1 pathway in type 2 diabetes[J]. Food Funct, 2021, 12(3): 1207-1218.

[26] 杜国慧,刘博伟,尹福在,等.利拉鲁肽对糖尿病小鼠肝糖异生关键酶 PEPCK 及 G6pase 的表达影响及机制探讨[J].中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 98-102.

(收稿日期:2021-12-30 修回日期:2022-05-01)

(编辑:舒安琴)