

基于血浆代谢组学探究三七总皂苷对2型糖尿病小鼠的降糖作用

张金花¹, 刘汉湘¹, 刘雨轩¹, 吴敏¹, 常晋霞^{2*}, 刘文虎^{1*}

(1. 川北医学院, 药学院, 四川南充 637100; 2. 川北医学院, 基础医学与法医学院, 四川南充 637100)

摘要: 基于血浆代谢组学结合实验验证研究三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 对2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 小鼠的降糖作用。将40只C57BL/6J小鼠随机分为对照组和实验组, 对照组常规饲养, 实验组高脂饲料喂养12周后, 经腹腔注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 建立T2DM模型, 所有动物实验经川北医学院实验动物伦理委员会批准 (批准号: NSMC2022023)。造模成功小鼠随机分为模型组 (T2DM)、低剂量 [200 mg·kg⁻¹·d⁻¹] 和高剂量 [300 mg·kg⁻¹·d⁻¹] 三七总皂苷组, 灌胃6周, 每周监测小鼠体重、摄食量、进水量和空腹血糖值 (fasting blood glucose, FBG), 灌胃第5周进行口服糖耐量实验 (oral glucose tolerance test, OGTT)。摘眼球采血检测肝功能及血脂; 试剂盒检测血液肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的水平及肝脏中抗氧化系统谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的活性。基于代谢组学研究血浆中内源性代谢物变化; 使用KEGG数据库通路富集分析; Western blot检测肝脏NF- κ B通路及TNF- α 和IL-6的表达。结果显示, T2DM小鼠构建成功; 高剂量三七总皂苷 (high *Panax notoginseng* saponins, HPNS) 能够降低T2DM小鼠的空腹血糖, 低剂量三七总皂苷 (low *Panax notoginseng* saponins, LPNS) 对空腹血糖无显著影响。HPNS能够改善T2DM小鼠肝功能, 降低血脂及血液TNF- α 和IL-6的水平, 增加肝脏GSH-Px、CAT和SOD的活性。代谢组学结果显示, 模型组血浆中45种代谢物变化显著, HPNS治疗后20种代谢物显著变化且向正常组转归。通路富集表明, 花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、谷胱甘肽代谢及肉碱合成在T2DM小鼠血液中改变, HPNS可改善T2DM小鼠血液中花生四烯酸和亚油酸异常代谢。Western blot表明, HPNS能够抑制T2DM小鼠NF- κ B通路, 降低TNF- α 和IL-6的表达, 提示PNS可能通过抑制NF- κ B通路; 调节花生四烯酸和亚油酸代谢, 降低炎症因子和氧化应激水平, 改善肝功能发挥降低血糖的作用。

关键词: 三七总皂苷; 降糖作用; NF- κ B通路; 花生四烯酸代谢; 亚油酸代谢

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)04-1028-12

Mechanistic investigation on the hypoglycemic effect of *Panax notoginseng* saponins in type 2 diabetic mice based on plasma metabolomics

ZHANG Jin-hua¹, LIU Han-xiang¹, LIU Yu-xuan¹, WU Min¹, CHANG Jin-xia^{2*}, LIU Wen-hu^{1*}

(1. Department of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China; 2. School of Basic Medical Sciences & Forensic Medical, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China)

Abstract: Plasma metabolomics combined experimental verification was employed for investigating of the hypoglycemic effect of *Panax notoginseng* saponins (PNS) on type 2 diabetes mellitus (T2DM) mice. Forty C57BL/6J mice were randomly divided into control and experimental groups after one week of adaptive feeding.

收稿日期: 2023-08-01; 修回日期: 2023-09-21.

基金项目: 国家级大学生创新创业项目 (202210634038); 四川省应用基础科研项目 (2019YJ0378); 川北医学院重点发展项目 (CBY22-ZDA01); 南充市市校合作项目 (18SXHZ0402).

*通讯作者 E-mail: jinxiachang@163.com; wh_liu@csu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0934

The mice in control group were fed conventionally, and the T2DM model was established in mice of the experimental group by intraperitoneal injection of streptozotocin following twelve weeks of feeding on a high-fat diet (HFD). All experiments were approved by the Ethical Committee Experimental Animal Center of North Sichuan Medical College (NSMC2022023). After the failure cases during modeling were eliminated, the remaining mice were randomly divided into model group (T2DM), low dose [$200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$] and high dose [$300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$] PNS groups. Mice in normal and model groups were given equal amounts of normal saline by gavage. The mice were administered intragastrically with PNS for 6 weeks, and their body weight, food intake, water intake and fasting blood glucose (FBG) were measured weekly. Oral glucose tolerance test (OGTT) was performed at the 5th week of administration. The changes of liver functions and blood lipids were detected by collecting blood from eyeballs. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) levels were detected in the blood and the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were analyzed in the liver by kit, respectively. Subsequently, the changes in plasma endogenous metabolites from each group were determined based on metabolomics, and the pathway enrichment analysis of differential metabolites was performed using KEGG database. NF- κ B signaling pathway, TNF- α and IL-6 in liver were detected by western blot, respectively. The results showed that T2DM mice were successfully constructed. High dose of panax notoginseng saponins (HPNS) can reduce the FBG in T2DM mice while low dose of PNS (LPNS) has no significant effect on FBG. HPNS improves the liver function, reduces the levels of blood lipids, TNF- α and IL-6, and increases the activity of GSH-Px, CAT and SOD in liver of T2DM mice. Metabolomics results showed that 45 metabolites were significantly changed in the plasma of model group compared with control, and 20 metabolites were significantly changed after HPNS treatment. Pathway enrichment indicated that arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism, glutathione metabolism and carnitine synthesis were changed in the blood of T2DM mice, and HPNS improved the abnormal metabolism of arachidonic acid and linoleic acid in T2DM mice. Western blot showed that HPNS could inhibit the NF- κ B pathway and reduce the expression of TNF- α and IL-6 in the liver of T2DM mice, suggesting that PNS may exert the antidiabetic effect by inhibiting NF- κ B pathway, regulating arachidonic acid and linoleic acid metabolism to reduce inflammatory factors and oxidative stress, improve liver function in T2DM mice.

Key words: *Panax notoginseng* saponin; hypoglycemic effect; NF- κ B signaling pathway; arachidonic acid metabolism; linoleic acid metabolism

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是以血糖水平升高、糖脂代谢紊乱为主要特征, 且常伴有高血压、高血脂及动脉粥样硬化等多种慢性疾病的代谢型综合征。据《中国居民营养与慢性病状况报告 (2020 年)》显示, 中国 18 岁及以上人群糖尿病患病率为 11.9%, 其中 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 占 90% 以上。近年来, T2DM 发展趋向低龄化、长病程、多并发症、危害严重及医疗支出费用高等特点^[1,2]。T2DM 已成为全球性严重公共卫生问题之一。

三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 为五加科人参属三七的干燥根和根茎, 为中国特有名贵药材, 具有“参中之王”“南国神草”之美誉。现代药理证明, 三七具有活血化瘀、免疫调节、改善微循环及抑制炎症等功效^[3-6]。三七中富含皂苷、多糖、黄酮、氨基酸等化学成分, 其中三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 是三七中最主要的药效组分, 也是血管通临床使用的药用成分。据报道, 三七皂苷可通过瘦素介导的 AMPK α /STAT3 通路调控肠道微生物群, 促进产热和米色脂肪细胞重建, 进而抑制高脂饮食诱导

的肥胖^[7]。有学者认为, 三七中的单体成分人参皂苷 Rb1 和人参皂苷 Re 具有降糖和减轻糖尿病并发症的作用, 前者可促进胰岛素分泌并减少甘油三酯的积累^[8], 后者与刺激大麻素 I 型受体和 CaMKK β 激活 AMPK 信号通路、抑制胰岛素抵抗、改善葡萄糖摄取有关^[9]。然而, 迄今对三七总皂苷的降糖作用研究较少。

本实验通过 60% 脂肪供能纯化型饲料联合小剂量注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 建立 T2DM 小鼠模型, 基于代谢组学结合实验验证探究 PNS 对 T2DM 小鼠的降糖作用, 并从信号通路及炎症因子角度探究 PNS 的降糖机制, 旨在为三七总皂苷的临床应用及开发提供实验和理论依据。

材料与amp;方法

实验动物 5~6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 (16~20 g) 购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [合格证号: SCXK (京) 2021-0006], 动物实验遵循川北医学院动物伦理委员会的规定并通过动物实验伦理审查 (批准号: NSMC2022023)。饲养于川北医学院实验动

物中心, 环境温度 20~26 °C, 相对湿度~60%, 12 h 明暗交替循环, 小鼠自由摄食、饮水。动物福利符合川北医学院动物实验伦理委员会之规定。

药物及主要试剂 三七总皂苷 (含量 ≥ 90%, 批号 DST200706-054) 购于成都德思特生物技术有限公司。链脲佐菌素 (STZ, USP 级) 购于源叶生物科技; 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α , E-EL-M3063) 和白介素-6 (interleukin-6, IL-6, E-EL-M0044c) 试剂盒购于 Elabscience 生物科技; 丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT, BC1555)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST, BC1565) 试剂盒购于 Solarbio 生物科技。谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase: GSH-Px, KTB1640)、过氧化氢酶 (catalase, CAT, KTB1040) 及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD, KTB1030) 试剂盒购于 Abbkine 科技公司。抗体 TNF- α (26405-1-AP)、IL-6 (21865-1-AP)、NF- κ Bp65 (10745-1-AP)、pNF- κ Bp65 (82335-1-RR) 和 I κ B α (10268-1-AP) 购于 Proteintech 公司。

动物分组及模型构建 40 只小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为正常组 (对照组, 8 只) 和高脂组 (high fat diet, HFD, 32 只), 正常组普通饲料喂养, HFD 用 60% 脂肪供能纯化型饲料喂养 12 周 (江苏协同医药生物工程有限责任公司)。第 13 周, 小鼠禁食 10 h, 正常组按 0.1 mL·10g⁻¹ 腹腔注射柠檬酸缓冲液, HFD 组按 40 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 腹腔注射 STZ, 连续 5 天, 末次给药 1 周后, 禁食 12 h, 尾尖采血检测空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), 高脂组 FBG ≥ 11.1 mmol·L⁻¹ 视为 T2DM 模型成功, FBG < 11.1 mmol·L⁻¹ 的小鼠剔除实验。

给药方法 按照三七总皂苷注射剂血栓通单剂量 150 mg 体表面积换算, 确定小鼠尾静脉注射的临床等效剂量为 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹。依据三七总皂苷口服 10% 生物利用度换算, 确定小鼠灌胃临床等效剂量为 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹。本实验按照 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ (临床等效剂量) 和 300 mg·kg⁻¹·d⁻¹ (1.5 倍临床等效剂量) 灌胃。正常组和模型组给予等量生理盐水, PNS 用生理盐水溶解后灌胃, 每组 8 只, 剂量为 0.1 mL·10 g⁻¹, 每天一次, 持续 6 周, 每周检测小鼠体重、摄食量、饮水量及 FBG。

口服葡萄糖耐量实验 给药结束前 1 周, 小鼠禁食不禁水 12 h, 按 20 mg·10 g⁻¹ 灌胃 20% 葡萄糖, 尾尖采血, 测定 0、15、30、60、90、120 min 的 FBG, 绘制口服葡萄糖耐量实验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 曲线。

血液生化指标检测 给药结束后, 小鼠禁食不禁水 10 h, 检测 FBG。摘眼球取血于抗凝管中, 混匀, 1 500 ×g 离心 10 min, 取上清, 试剂盒检测 TNF- α 、IL-6、ALT 和 AST 水平。全自动生化分析仪检测总胆固醇

(total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 和高密度脂蛋白 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)。

肝脏 GSH-Px、CAT 及 SOD 检测 取肝脏 30 mg, 研磨匀浆, 2 000 ×g 离心 20 min, 收集上清, 按试剂盒说明检测 450 nm 波长处 OD 值, 计算 GSH-Px、CAT 和 SOD 含量。

血浆非靶标代谢组学分析

样本制备 按常规方法制备小鼠血浆样本, 保存于 -80 °C 备用。用前于 4 °C 解冻, 取 100 μ L 血浆, 加入 300 μ L 预冷甲醇-乙腈-水体系 (5:3:2, V/V), 涡旋, -20 °C 放置 1 h, 14 000 ×g 离心 10 min, 取上清, 冻干, 残渣保存于 -80 °C。分析前加入 100 μ L 乙腈-水 (乙腈:水=1:1, V/V) 复溶, 涡旋, 14 000 ×g 离心 10 min, 上清供质谱检测。取等量待检样本 (20 μ L), 混合作为质控。

色谱条件 Vanquish (美国 Thermo Fisher Scientific) 超高效液相色谱仪搭载 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μ m) 色谱柱 (美国 Waters)。流动相 A 为水 (含 5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵和 5 mmol·L⁻¹ 乙酸), 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱 (1~11 min, 2% B; 11~15.4 min, 维持 98% B; 15.4~15.6 min, 98%~2% B; 15.6~21 min, 维持 2% B; 流速 200 nL·min⁻¹。自动进样器温度 4 °C; 进样体积 2 μ L。

参照中国药典 (2020 版) 一部对血塞通制剂中三七总皂苷检测方法。取对照品 (已标示三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1 和人参皂苷 Rd 含量) 和供试品 (含三七总皂苷 25 mg) 适量, 精密称定, 加入 70% 甲醇完全溶解, 精密取对照品和供试品溶液各 10 μ L, 注入 Waters 2695-2996 高效液相色谱仪。色谱柱为 Ultimate[®] XB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 柱温 35 °C, 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为水, 洗脱梯度: 0~20 min, 20% A; 20~45 min, 20%~46% A; 45~55 min, 46%~55% A; 55~60 min, 维持 55% A; 60~64 min, 55%~90% A; 流速 1.5 mL·min⁻¹, 检测波长 203 nm。

质谱条件 Orbitrap Exploris 120 质谱仪 (Xcalibur, 美国 Thermo Fisher Scientific) 采用 FullScan MS2 模式进行一级、二级数据采集。离子传输管温度 320 °C; 喷雾电压 4.0 kV (Pos) 和 -3.5 kV (Neg); 鞘气流速 50 arb, 辅助气流速 15 arb, Full MS 分辨率 60 000, MS/MS 分辨率 15 000, 碰撞能 10/30/60。

数据分析及差异代谢物筛选 质谱数据经 Proteo Wizard 转为 mzXML 格式, 经 XCMS 软件峰对齐、峰识

别、峰过滤、峰匹配、峰面积提取及保留时间校正。生成包括质荷比 m/z 、保留时间 (t_R) 及面积的数据矩阵; 过滤缺失值超过 50% 的变量; 利用 K 临近法 ($K = 10$) 填充剩余缺失值, 总面积法归一化。根据质控计算各变量的变异系数 (coefficient of variation, CV), 将 CV 大于 30% 的变量剔除。

将所得数据矩阵导入 MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 作多变量分析, 变量经均值中心化和 Pareto scaling 标度化, 采用非监督主成分分析 (principal component analysis, PCA) 建立分类模型, 观察样本间聚类趋势及离群样本; 采用偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 建立代谢物浓度与样本间模型, 并对模型 200 次置换检验, R^2 表示模型稳定性, Q^2 表示模型预测能力。依据 PLS-DA 模型变量投影重要性 (variable important in projection, VIP) 筛选对模型分组贡献较大的变量 ($VIP > 1$), 依据显著性水平和倍数变化 (fold change, FC) 筛选差异变量, 视 $VIP > 1$ 、 $FC \geq 1.5$ 或 $FC \leq 0.67$ 且 $P < 0.05$ 的变量为差异变量。根据变量质荷比 m/z 、ppm 及 MS/MS 谱图匹配鉴定代谢物, 依据人类代谢组学数据库 (The Human Metabolome Database, HMDB) 数据库剔除外源性、药源性化合物。

通路富集分析 将差异代谢物导入 MetaboAnalyst 5.0 数据库进行通路富集分析, 富集方法为 Fisher's exact test; 拓扑学方法为 relative-betweenness centrality; 数据库为京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)。

Western blot 检测蛋白质的表达 取小鼠肝脏约 30 mg, 冰上解冻用预冷 PBS 洗 2 次, 加入 150 μ L RIPA 裂解液, 组织匀浆至完全裂解, 12 000 \times g 离心 10 min, 取上清, BCA 法测蛋白浓度。取适量蛋白, 变性、聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭、4 $^{\circ}$ C 孵育一抗至过夜、洗膜、常温孵育二抗、洗膜、显影。Image J 灰度值分析, GraphPad Prism 8.0 作图。

统计学分析 使用 SPSS 26.0 软件统计学分析, 数

据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结果

1 高效液相色谱检测三七总皂苷主要成分及含量

结果显示, 三七总皂苷的主要成分为三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1 和人参皂苷 Rd。按标示量计算, 三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1 和人参皂苷 Rd 含量分别为 6.96%、34.29%、2.65%、31.34% 和 10.19%, 符合中国药典 (2020 版) 对血塞通有效成分之规定。

2 三七总皂苷对小鼠体重、摄食量、饮水量及空腹血糖的影响

给药期间, 每周检测小鼠体重、摄食量、饮水量及 FBG 变化。结果显示, 正常组体重相对稳定且趋于增加, 模型组、高剂量和低剂量 PNS 组体重呈下降趋势。给药 5 周后, 模型组与正常组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 高、低剂量组与模型组相比无显著变化 (图 1A)。与正常组相比, 模型组摄食量显著增加 ($P < 0.001$)。给药 4 周后, 高剂量组摄食量减少, 但与模型组相比差异无统计学意义; 低剂量组摄食量随给药时间变化不明显 (图 1B)。与正常组相比, 模型组饮水量显著增加 ($P < 0.001$), 给药 5 周后高剂量组饮水量减少, 6 周后相比模型组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 低剂量组与模型组相比无显著差异 (图 1C)。给药前, 模型组、高剂量和低剂量组的 FBG 分别为 16.28 ± 0.72 、 16.11 ± 1.02 和 16.15 ± 0.64 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与正常组相比, 模型组 FBG 显著增加 ($P < 0.001$), 给药 6 周后高剂量组 FBG 为 14.58 ± 1.63 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与模型组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 低剂量组 FBG 为 15.61 ± 1.29 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与模型组相比差异无统计学意义 (图 1D)。综上, 高剂量 PNS 对 T2DM 小鼠具有降糖作用, 而低剂量的降糖作用不明显。因此, 后续仅对高剂量 PNS 降糖作用研究。

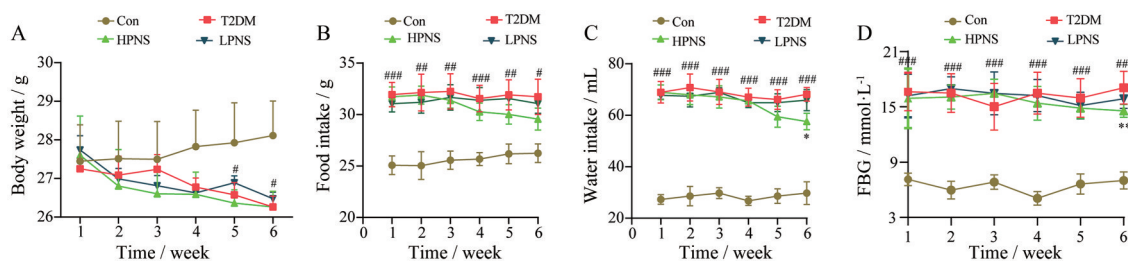


Figure 1 The effect of PNS on body weight (A), food intake (B), water intake (C) and FBG (D) in mice with T2DM. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. T2DM vs Con, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; HPNS vs T2DM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Con: Control; T2DM: Type 2 diabetes mellitus; PNS: *Panax notoginseng* saponins; FBG: Fasting blood glucose; HPNS: High *Panax notoginseng* saponins

3 三七总皂苷改善 T2DM 小鼠口服糖耐量

糖耐量显示, 20% 葡萄糖灌胃后, 正常组 15 min 内 FBG 迅速上升, 15 min 时达峰值 $17.98 \pm 2.85 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 15~30 min 内 FBG 快速下降至 $8.01 \pm 1.51 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 120 min 降为 $4.43 \pm 0.32 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。模型组和高剂量组前 15 min 内 FBG 快速上升, 15~30 min 内缓慢上升, 30 min 时达到峰值, 分别为 32.97 ± 1.07 和 $30.05 \pm 1.24 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 之后 FBG 缓慢降低, 120 min 分别为 25.28 ± 1.77 和 $20.19 \pm 2.44 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 2A)。与正常组相比, 模型组各时间点的 FBG 显著增加 ($P < 0.001$); 除 15 min 时间点外, 高剂量组 FBG 较模型组显著降低 ($P < 0.05$) (图 2A)。模型组 AUC 较正常组显著增加 ($P < 0.001$), 高剂量组 AUC 较模型组显著降低 ($P < 0.01$) (图 2B), 表明模型组小鼠糖耐量受损, 高剂量 PNS 可改善 T2DM 小鼠的糖耐量。

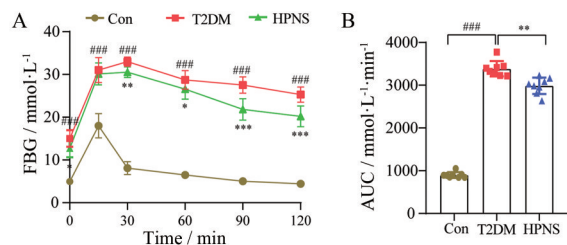


Figure 2 The effects of PNS on the glucose tolerance of T2DM mice. A: Detection of FBG by OGTT test in mice; B: AUC in OGTT test. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. T2DM vs Con, $###P < 0.001$; HPNS vs T2DM, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. OGTT: Oral glucose tolerance test; AUC: The area under the curve

4 三七总皂苷对 T2DM 小鼠血脂及肝酶的影响

肝脏是机体糖脂代谢的主要场所, 肝脏对胰岛素的敏感性降低将导致糖脂代谢异常, 肝功能受损。另一方面, 糖代谢异常诱发机体脂代谢紊乱, 导致胰岛素抵抗。与正常组相比, 模型组 TC、TG、LDL-C 显著增加 ($P < 0.001$), HDL-C 显著降低 ($P < 0.01$); AST 和 ALT 显著增加 ($P < 0.001$) (图 3A、B)。与模型组相比, 高剂量组 TC、LDL-C 和 AST 降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 TG、HDL-C 和 ALT 具有向正常组转归的趋势 (图 3A、B), 提示 PNS 对模型组血脂及肝酶有改善作用。

5 三七总皂苷对 T2DM 小鼠肝脏 GSH-Px、SOD 和 CAT 活性的影响

氧化-抗氧化系统失调是导致机体活性氧累积的重要诱因, 进而导致氧化应激, 而后者在胰岛素抵抗和糖尿病发生发展中起关键作用^[10]。结果显示, 与正常组相比, 模型组肝脏抗氧化酶 GSH-Px、SOD 和 CAT 显著降低 ($P < 0.001$)。给药 6 周后, 与模型组相比, 高剂

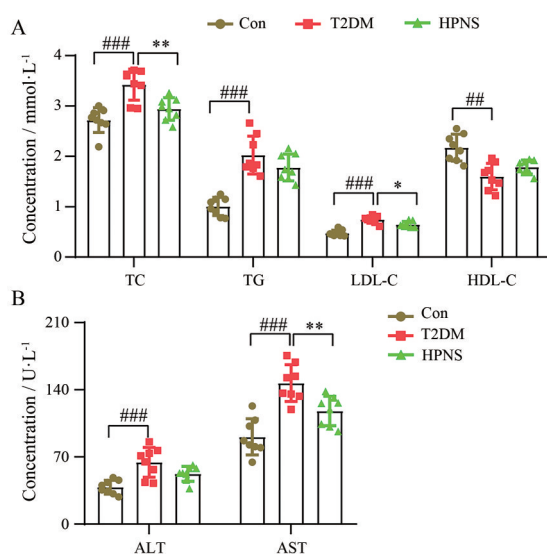


Figure 3 The effects of PNS on the blood lipids (A) and liver enzyme (B) of T2DM mice. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. T2DM vs Con, $###P < 0.01$, $####P < 0.001$; HPNS vs T2DM, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. TC: Total cholesterol; TG: Triglyceride; LDL-C: Low density lipoprotein cholesterol; HDL-C: High density lipoprotein cholesterol; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase

量组 GSH-Px 和 CAT 活性增加 ($P < 0.05$), SOD 变化不显著 (图 4), 提示 PNS 降低了 T2DM 小鼠肝脏氧化应激水平。

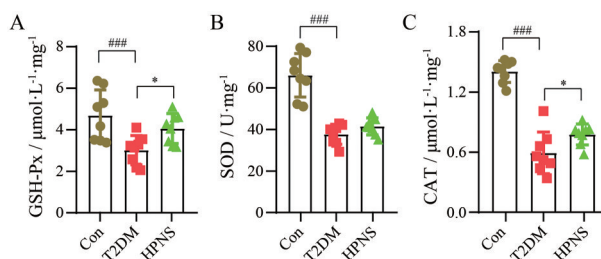


Figure 4 The effects of PNS on activities of GSH-Px (A), SOD (B) and CAT (C) in liver of T2DM mice. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. T2DM vs Con, $###P < 0.001$; HPNS vs T2DM, $*P < 0.05$. GSH-Px: Glutathione peroxidase; SOD: Superoxide dismutase; CAT: Catalase

6 三七总皂苷降低 T2DM 小鼠血液炎症因子

炎症反应是导致胰岛素抵抗的关键因素, 也是糖尿病发生发展的机制之一^[11,12]。与正常组相比, 模型组血液中炎症因子 TNF- α 和 IL-6 水平显著增加 ($P < 0.001$) (图 5A), PNS 治疗后 TNF- α 和 IL-6 水平降低, 与模型组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 5B)。

7 小鼠血浆代谢组学研究

7.1 质控分析 正负离子下质控样本的变异系数偏差在 ± 2 std (图 6A、B)。各样本间的相关性系数大于 0.95 (图 6C、D), 表明检测系统稳定可靠。

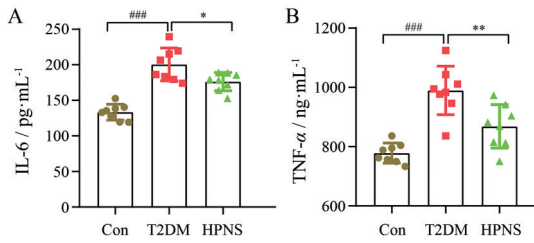


Figure 5 PNS decrease blood inflammatory factors IL-6 (A) and TNF- α (B) levels in T2DM mice. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. T2DM vs Con, $###P < 0.001$; HPNS vs T2DM, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-6: IL-6

7.2 代谢轮廓分析 基于模式识别对正常组和模型组小鼠血浆进行代谢轮廓分析。PCA结果显示,组间样本分离明显,组内聚集良好(图7A、D)。PLS-DA表明,正离子模式的 R^2Y 和 Q^2 分别为0.85和0.78(图7B);负离子模式的 R^2Y 和 Q^2 分别为0.82和0.69(图7E),表明模型可靠。置换检验表明,正负模式下, R^2Y 建模值与真实值构成的回归线截距分别为0.930和0.921; Q^2 建模值与真实值构成的回归线截距分别为-0.219和-0.244(图7C、F),表明PLS-DA模型无过拟合。PCA显示,正负模式下高剂量组代谢轮廓介于正常组与模型组之间(图7G、H),提示PNS对T2DM小鼠异常代谢具有改善作用。

7.3 潜在差异代谢物的筛选 代谢物的鉴定通过标准品库和HMDB数据库代谢物的MS/MS谱图匹配识别,鉴定的代谢物须满足 $MW_{\text{实测值}} - MW_{\text{理论值}} < \Delta 15 \text{ ppm}$,代表性代谢物的MS/MS谱图匹配如图8A、B所示。根据PLS-DA模型下 $VIP > 1.0$ 、倍数变化 $FC \geq 1.50$ 或 ≤ 0.67 且 $P < 0.05$ 筛选潜在差异代谢物45个。与正常组相比,22个代谢物在模型组中显著增加,23个代谢物显著降低(表1),代谢物的趋势变化如图9A, PNS治

疗后花生四烯酸(arachidonic acid, AA)、前列腺素类物质(prostaglandin, PGs)、肉碱衍生物及脂肪酸等20个代谢物水平显著改变且向正常组转归(图9B),提示这些代谢物在PNS对T2DM小鼠降糖中发挥了关键性作用。

7.4 通路富集及定量分析 将45个差异代谢物导入MetaboAnalyst 5.0数据库作通路富集分析,根据 P 值及通路影响值(pathway impact, PI),显示模型组花生四烯酸代谢($P = 1.73E-5$, $PI = 0.293$)、亚油酸代谢($P = 0.008$, $PI = 0.301$)显著变化,与肝脏功能相关的谷胱甘肽代谢以及与线粒体能量代谢相关的肉碱合成显示较高的PI,分别为0.112和0.143(图10A,表2)。PNS治疗后花生四烯酸代谢($P = 0.001$, $PI = 0.279$)、亚油酸代谢显著变化($P = 0.008$, $PI = 0.301$)(图10B,表3)。定量结果显示,花生四烯酸通路中,模型组AA、PGE2、PGF2 β 、PGC2、20-HETE、11,12-DiHETrE和14,15-DiHETrE较正常组显著增加,而谷胱甘肽显著减少($P < 0.05$)。PNS治疗后AA、PGE2、20-HETE、PGF2 β 和PGC2向正常组转归,谷胱甘肽、11,12-DiHETrE和14,15-DiHETrE具有向正常组转归的趋势(图10C)。同样,PNS治疗后亚油酸代谢途径中相关代谢物水平向正常组转归(图10D),提示PNS可能通过花生四烯酸和亚油酸途径调节T2DM小鼠的异常代谢。

8 三七总皂苷对T2DM小鼠肝脏炎症性分子及NF- κ B信号通路的影响

为探明PNS对T2DM小鼠炎症的影响,采用Western blot检测了肝组织中TNF- α 、IL-6及NF- κ B通路的变化(图11A、C)。结果显示,与正常组相比,模型组TNF- α 和IL-6表达显著增加($P < 0.05$),pNF- κ Bp65/NF- κ Bp65在胞浆中减少,核中增加($P < 0.05$)。PNS治

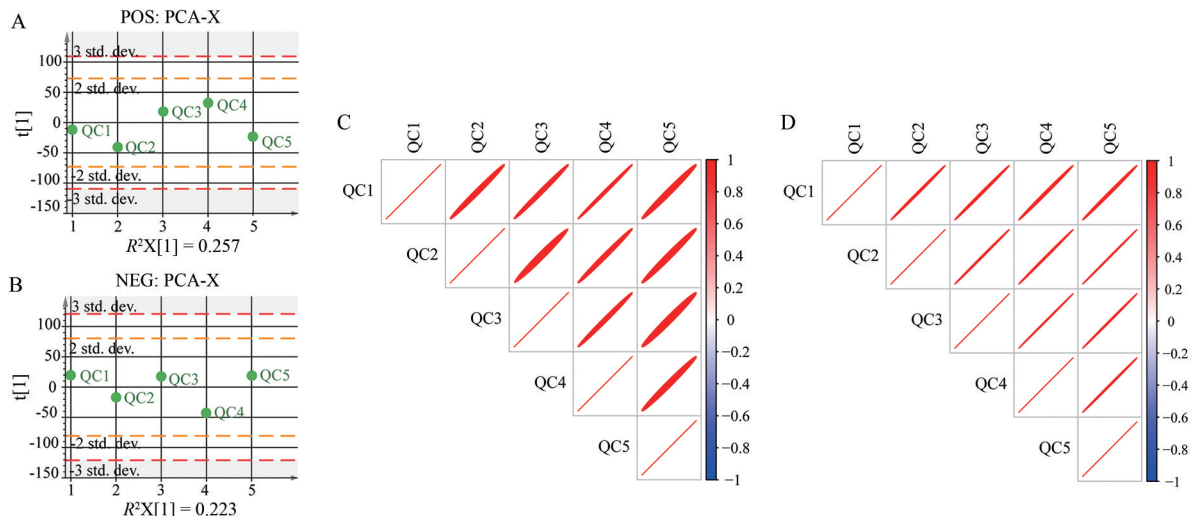


Figure 6 Data quality control analysis. A, B: PCA-X one-dimensional line plots; C, D: Spearman's correlation coefficients

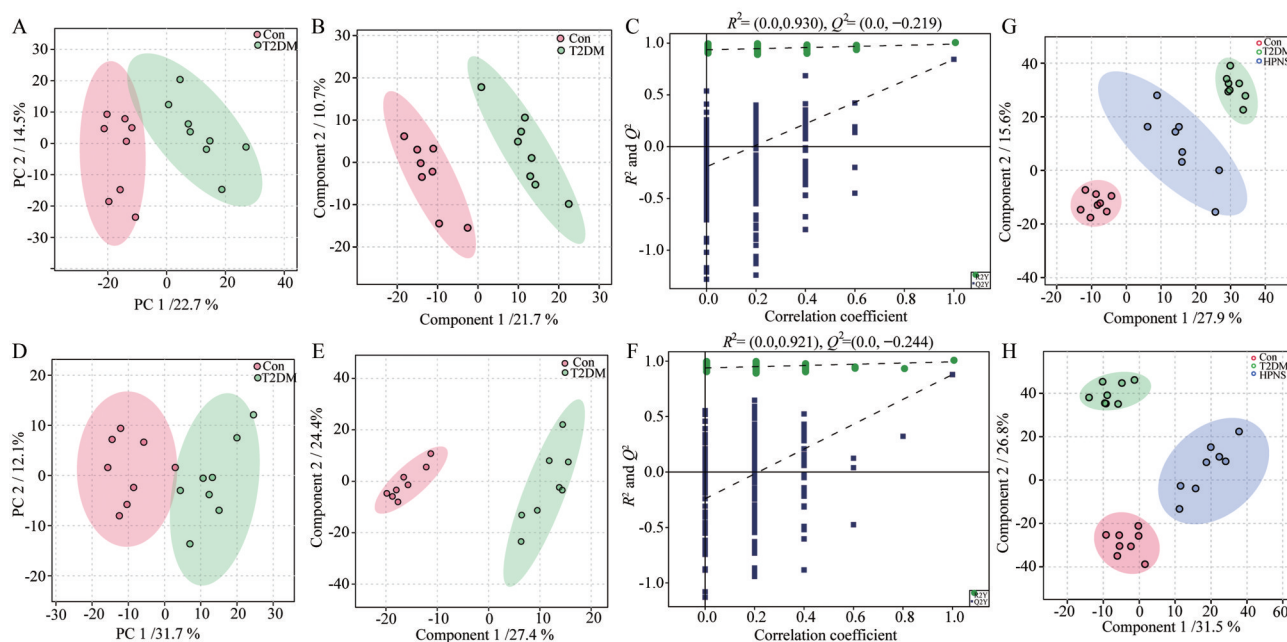


Figure 7 Multivariate statistical analysis of plasma metabolomics. A, D: PCA score plots of T2DM and control groups in ESI+ and ESI-, respectively; B, E: PLS-DA score plots of T2DM and control groups in ESI+ and ESI-, respectively; C, F: Permutation test plots of T2DM and control groups; G, H: PCA score plots of T2DM, control and HPNS groups in ESI+ and ESI-, respectively

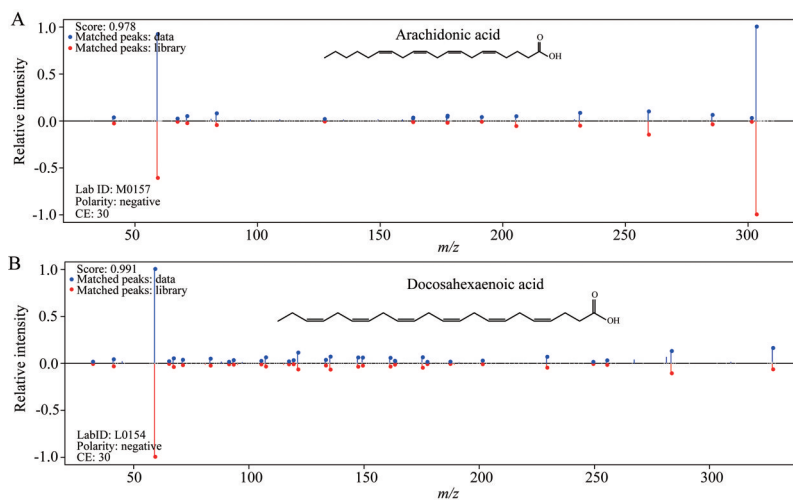


Figure 8 MS/MS spectral fragments of typical metabolites are confirmed by matching the standard library. A: Arachidonic acid; B: Docosahexaenoic acid

疗后模型组 TNF- α 和 IL-6 的表达显著降低 ($P < 0.05$), 胞浆中 pNF- κ Bp65/NF- κ Bp65 增加, 核中减少 ($P < 0.05$), 对 I κ B α 的表达无显著变化 (图 11B、D), 表明 PNS 对 T2DM 小鼠肝脏 NF- κ B 通路具有抑制作用, 且能够降低 TNF- α 和 IL-6 的表达。

讨论

皂苷是三七中的重要有效组分, 也是三七成分研究最为系统的活性物质。研究表明, 三七皂苷中的人参皂苷 Rb1 和 Re 具有降糖和减轻糖尿病并发症的作

用^[8,9]。然而, 三七总皂苷是否具有降糖作用尚不明确。血塞通是三七总皂苷制剂的通用药名, 具有活血祛瘀、通脉活络、调节微循环之功效。根据中国药典 2020 版对血塞通制剂有效成分含量要求, 三七总皂苷中三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1 及人参皂苷 Rd 的含量分别不得低于 5.00%、25.00%、2.50%、27.00% 和 5.00%。为确保三七总皂苷中单体皂苷含量符合要求, 本实验对市售三七总皂苷含量检测, 显示三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1 和人参皂苷 Rd 含量分别为 6.96%、34.29%、

Table 1 Altered metabolites in the T2DM and after PNS treatment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

No	Metabolite	Formula	Theoretical MW (<i>m/z</i>)	Calculated MW (<i>m/z</i>)	ppm	<i>t_R</i> /min	Trend	
							T2DM vs Con	HPNS vs T2DM
1	<i>L</i> -Acetylcarnitine	C ₉ H ₁₇ NO ₄	203.115 82	203.116 11	1.43	4.39	↓*	↑*
2	Propionylcarnitine	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	217.151 43	217.152 62	5.48	7.55	↓*	—
3	Glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	147.025 21	147.026 75	10.47	3.29	↓**	—
4	Arachidonic acid	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304.263 23	304.264 66	4.70	15.20	↑***	↓***
5	Uric acid	C ₅ H ₄ N ₂ O ₃	168.028 32	168.028 49	1.01	6.07	↑***	—
6	Hexanoylcarnitine	C ₁₃ H ₂₆ NO ₄	260.349 81	260.348 91	-3.46	11.34	↓*	—
7	Palmitoylcarnitine	C ₂₃ H ₄₆ NO ₄	400.342 14	400.345 82	9.19	15.46	↓*	↑**
8	Decanoylcarnitine	C ₁₇ H ₃₃ NO ₄	315.240 97	315.241 12	0.48	13.98	↓*	↑*
9	<i>N</i> 6, <i>N</i> 6, <i>N</i> 6-Trimethyl- <i>L</i> -lysine	C ₉ H ₂₀ N ₃ O ₂	188.152 48	188.152 57	0.48	3.17	↑*	—
10	Niacinamide	C ₆ H ₆ N ₂ O	122.047 65	122.048 36	5.82	5.76	↓*	—
11	cAMP	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₆ P	329.052 53	329.052 75	0.67	8.045	↓*	—
12	Glutathione	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	307.083 87	307.083 57	-0.98	5.37	↓***	—
13	Choline	C ₅ H ₁₄ NO	104.100 52	104.100 06	-4.42	3.22	↑**	—
14	Taurine	C ₂ H ₇ NO ₃ S	125.014 73	125.014 89	1.28	3.27	↑***	↑*
15	Aspartic acid	C ₄ H ₇ NO ₄	133.037 51	133.037 73	1.65	3.26	↓**	—
16	GSSG	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	612.151 93	612.153 31	2.25	7.41	↓*	—
17	Prostaglandin F2b	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	354.240 66	354.243 16	7.06	15.03	↑***	↓**
18	Amino adipic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₄	161.068 82	161.069 04	1.37	3.55	↑**	—
19	<i>N</i> 6-Acetyl- <i>L</i> -lysine	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	188.116 12	188.116 33	1.12	3.72	↑*	—
20	Tryptophan	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₂	204.089 93	204.072 07	-4.21	9.98	↑*	—
21	Kynurenic acid	C ₁₀ H ₇ NO ₃	189.052 61	189.052 89	1.48	12.23	↑**	—
22	8,11,14-Eicosatrienoic acid	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306.255 96	306.256 23	0.88	18.54	↓**	↑*
23	Prostaglandin C2	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	334.194 41	334.196 68	6.79	16.05	↑**	↓***
24	14,15-DiHETrE	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	338.213 66	338.216 90	9.58	16.38	↑***	—
25	Coenzyme Q1	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	250.120 54	250.118 08	-9.84	14.16	↓**	↑**
26	PC (16:0/16:0)	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	733.562 15	733.265 91	5.13	16.64	↑*	—
27	Prostaglandin E2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	352.224 92	352.228 98	11.53	19.59	↑***	↓***
28	20-HETE	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	320.235 11	320.230 49	-14.43	15.42	↑***	↓***
29	Palmitoleic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254.224 63	254.224 42	-0.83	17.83	↓***	—
30	Pantothenic acid	C ₉ H ₁₇ NO ₅	219.110 76	219.111 05	1.32	9.37	↓*	—
31	13,14-Dihydro-15-keto-PGE2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	352.224 93	352.225 34	1.16	13.91	↑*	—
32	Indoleacrylic acid	C ₁₁ H ₉ NO ₂	187.066 38	187.067 05	3.58	12.05	↓***	↑*
33	Testosterone sulfate	C ₁₉ H ₂₈ O ₅ S	368.165 74	368.163 53	-6.00	15.36	↑**	—
34	Tetrahydrocorticosterone	C ₂₁ H ₃₅ O ₅	350.245 71	350.242 43	-9.36	14.62	↑**	↑*
35	Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.255 93	282.255 24	-2.44	16.73	↓***	↑***
36	Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242.224 64	242.224 36	-1.16	16.29	↑***	↓***
37	Xanthurenic acid	C ₁₀ H ₇ NO ₄	205.037 57	205.036 99	-2.83	9.02	↑*	—
38	Eicosapentaenoic acid	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	302.224 69	302.224 24	-1.49	16.08	↓***	↑***
39	Tridecylic acid	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	214.193 37	214.192 76	-2.85	15.74	↑*	—
40	Docosahexaenoic acid	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	328.240 28	328.239 70	-1.77	16.64	↓**	↑***
41	3-Methylhistidine	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	169.085 13	169.084 25	-5.20	4.48	↑*	—
42	Tetradecanedioic acid	C ₁₄ H ₂₆ O ₄	258.183 11	258.183 05	-0.23	12.55	↓*	↑*
43	11,12-DiHETrE	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	338.245 73	338.234 53	-3.55	15.44	↑*	—
44	19,20-DiHDDPA	C ₂₂ H ₃₄ O ₄	362.245 75	362.245 79	0.11	14.91	↓**	↑**
45	Indoleacetic acid	C ₁₀ H ₉ NO ₂	175.066 36	175.066 08	-1.60	11.99	↓**	↑*

Table 2 Enrichment analysis of metabolic pathways in T2DM mice

Pathway name	Match status	<i>P</i> value	Pathway impact
Arachidonic acid metabolism	6/65	1.73E-5	0.293
Linoleic acid metabolism	4/17	0.008	0.301
Glutathione metabolism	1/19	0.429	0.112
Carnitine synthesis	1/16	0.376	0.143
Oxidation of branched chain fatty acids	2/21	0.120	0.066

2.65%、31.34%和10.19%,各成分含量符合中国药典(2020版)规定。

在糖尿病动物模型制备中,STZ的用量及给药

Table 3 Enrichment analysis of metabolic pathways in T2DM mice after PNS treatment

Pathway name	Match status	<i>P</i> value	Pathway impact
Arachidonic acid metabolism	3/65	0.001	0.279
Linoleic acid metabolism	4/17	0.008	0.301
Oxidation of branched chain fatty acids	2/21	0.120	0.066

方法与糖尿病分型密切相关。单次大剂量(170~200 mg·kg⁻¹)注射STZ可导致小鼠胰岛β细胞功能破坏,为T1DM理想造模方法^[13,14];若先使用高脂饲料喂养小鼠,再多次小剂量(30~70 mg·kg⁻¹)注射STZ,可

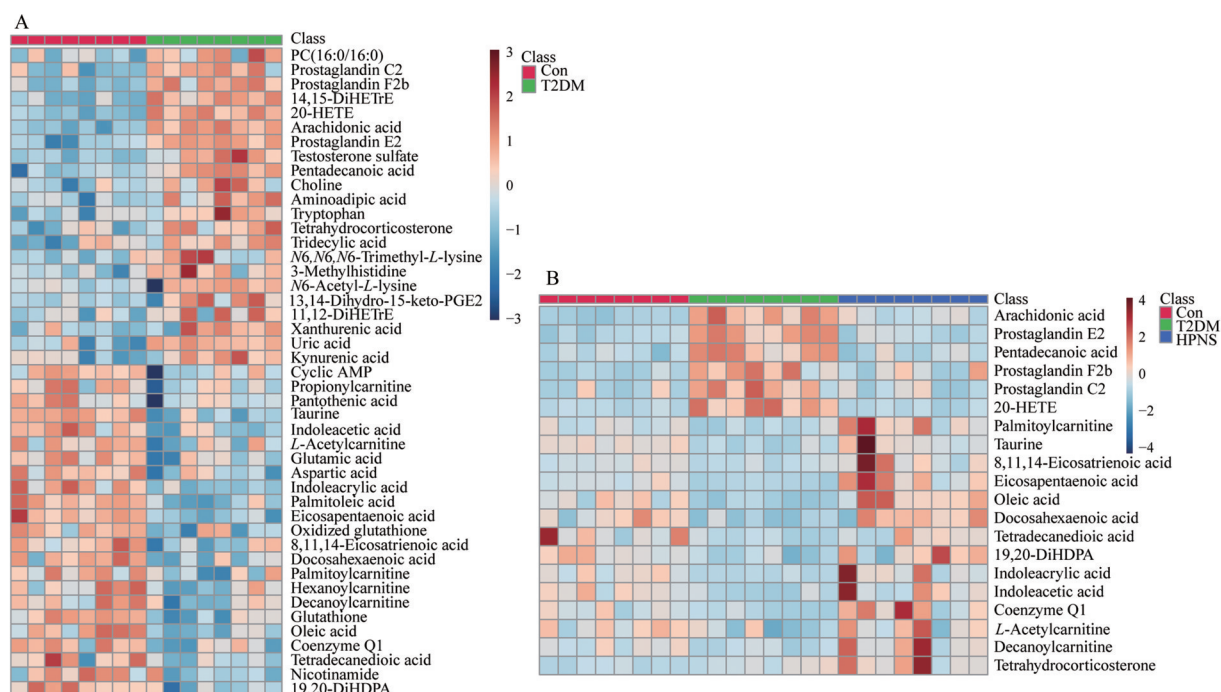


Figure 9 Heat map visualization of differential metabolites. A: T2DM vs Con; B: HPNS vs T2DM

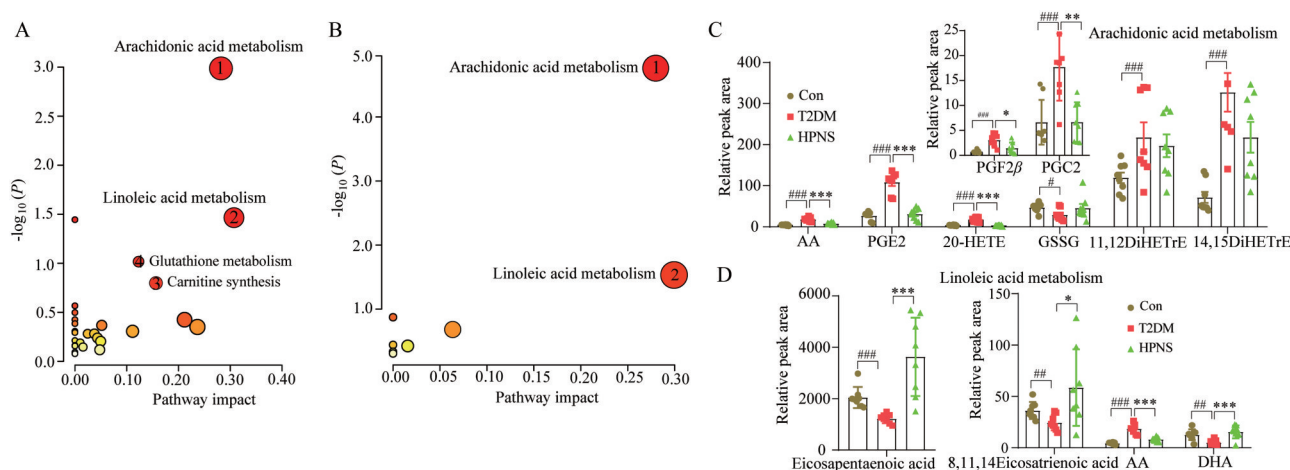


Figure 10 Pathway enrichment and quantitative analysis. *n* = 8, $\bar{x} \pm s$. A: Altered metabolic pathways in T2DM group; B: Altered metabolic pathways in T2DM group after PNS treatment; C, D: The quantification of metabolites of arachidonic acid and linoleic acid metabolism pathways. T2DM vs Con, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$; HPNS vs T2DM, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

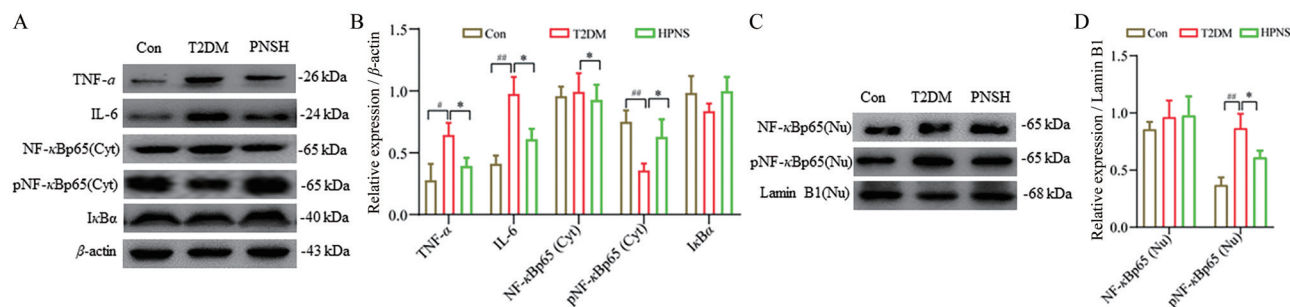


Figure 11 Analysis of NF- κ B pathway, TNF- α and IL-6 by Western blot. *n* = 8, $\bar{x} \pm s$. A, C: The detection expression of TNF- α , IL-6, NF- κ B and I κ B α in control, T2DM and PNS treatment mice liver; B, D: Quantitative analysis of these protein levels by using image J software. T2DM vs Con, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; HPNS vs T2DM, $^*P < 0.05$

破坏部分胰岛 β 细胞功能, 导致外周组织对胰岛素敏感性降低, 为T2DM理想造模方法^[13-15]。本实验采用60%脂肪供能纯化型饲料喂养C57BL/6J小鼠12周, 小鼠表现为体型肥胖, 反应迟钝, 高血脂等特征, 再用 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的STZ连续腹腔注射5天。此法高效、可控、模型稳定且成功率高达90%, 模型小鼠FBG超过 $15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 且小鼠无死亡。

胰岛素抵抗与炎症因子关系密切, 高水平的炎症因子可造成胰岛 β 细胞功能受损, 导致胰岛素抵抗。因此, 炎症被认为是诱发糖尿病的重要致病因素^[12]。临床上, 可见糖尿病患者血液中急性期反应产物和炎症因子水平的增加, 高水平的炎症因子通过“cross-talk”对胰岛素信号传导起抑制作用, 诱导胰岛素抵抗^[12,16]。IL-6和TNF- α 是重要的细胞因子, 可由免疫细胞和脂肪细胞产生, 在炎症和免疫反应中起核心调控作用。高水平的IL-6使肝脏处于应激状态, 分泌大量急性反应蛋白, 激活血管内皮和脂肪组织急性相反应, 产生胰岛素抵抗^[17]。此外, IL-6还可通过促进胰岛 β 淋巴细胞分化, 促使IgG高表达, 激活杀伤性T淋巴细胞, 导致胰岛 β 细胞功能破坏, 加重胰岛素抵抗^[18]。同样, TNF- α 可直接作用于胰岛素信号转导系统, 干扰其正常信号, 降低机体对胰岛素的敏感性。TNF- α 还可以通过刺激糖皮质激素、胰高血糖素、儿茶酚胺等其他激素的分泌, 加快糖尿病进程^[19]。众所周知, NF- κ B是机体调节炎症反应的重要核因子, 可被TNF- α 和IL等多种因子激活, 活化的NF- κ B促进p65快速入核, 进一步促进TNF- α 、IL-6及IL-1 β 的释放, 加重并持续放大炎症反应, 造成肝功异常, 导致机体对胰岛素敏感性降低^[20]。反之, 炎症因子可通过活化的NF- κ B信号诱导氧化应激, 降低GSH-Px、SOD和CAT表达, 破坏机体氧化-还原稳态^[21]。与文献一致^[18-21], 模型组NF- κ B信号被激活, IL-6和TNF- α 的水平增加, 且GSH-Px、SOD和CAT表达降低, PNS干预后NF- κ B信号被抑制, TNF- α 和IL-6水平降低, 肝脏GSH-Px和CAT表达增加, 肝功能改善, 提示PNS可能通过抑制NF- κ B信号, 降低了炎症因子水平, 进而改善肝脏功能发挥了降糖作用。

花生四烯酸是机体必需多不饱和脂肪酸, 对机体血糖的调节具有双向性, 其机制与其代谢产生的炎症因子有关。细胞水平, 低于 $15\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的花生四烯酸能够促进胰岛 β 细胞生长, $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 花生四烯酸能够抑制细胞生长, 超过 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的花生四烯酸可导致胰岛 β 细胞功能损伤^[22]。代谢层面, 花生四烯酸经COX-2和LOX途径代谢生成的前列腺素类 (prostaglandin Gs, PGs) 和羟基二十碳四烯酸类 (hydroxyeicosatetraenoic acids, HETEs) 物质, 能够直接破坏胰岛

β 细胞, 减少胰岛素分泌, 降低机体对胰岛素的敏感性, 其机制可能与致炎因子PGs的过量累积导致的胰岛 β 细胞凋亡有关^[23]。另一方面, 花生四烯酸经P450单加氧酶代谢途径生成的环氧二十碳三烯酸类 (epoxyeicosatrienoic acids, EETs)可促进胰岛素信号转导, 增强胰岛素的敏感性, 降低血糖^[24]。本实验中, 模型组小鼠血液中花生四烯酸浓度较正常小鼠增加了3.14倍, 且模型组前列腺素途径代谢物PGE₂、PGF_{2 β} 和PGC₂, 以及LOX途径代谢物20-HETE、14,15-DiHETrE和11,12-DiHETrE的水平均明显增加。通路富集证实, 花生四烯酸代谢在模型组中显著变化且具有高的通路影响值。PNS不仅降低花生四烯酸、PGE₂、20-HETE、PGF_{2 β} 及PGC₂的水平, 而且对花生四烯酸的异常代谢具有调节作用, 提示PNS可能通过调控花生四烯酸代谢中COX-2和LOX途径, 降低炎症因子水平, 保护胰岛 β 细胞功能发挥了降糖作用。遗憾的是, 本实验代谢组学检测到的EETs物质较少(可能与样本采集、检测技术及手段有关)。因此, 目前的数据尚不能预判PNS是否通过P450单加氧酶途径调控了花生四烯酸代谢。

亚油酸对清理血管胆固醇及甘油三酯发挥重要作用, 被称为“血管清道夫”。亚油酸异常减少会导致脂质堆积、代谢异常, 诱发高血脂症及肥胖等多种疾病^[25]。大数据显示, 血液中亚油酸水平与T2DM风险呈负相关, 且高水平的亚油酸不仅对合并高胆固醇血症的T2DM患者具有改善作用, 而且可恢复糖尿病患者受损的内皮细胞功能, 降低甘油三酯水平并抑制血小板聚集^[26]。结果显示, T2DM小鼠血液中亚油酸代谢通路异常, 其通路代谢物, 包括eicosapentaenoic acid、8,11,14-eicosatrienoic acid和docosahexaenoic acid (DHA)的水平降低, 而PNS可提高模型组中这些代谢物的水平, 推测PNS降血脂作用可能与改善亚油酸异常代谢有关。

作为线粒体脂肪酸 β -氧化的特定底物, 酰基肉碱对维持正常肝功能具有重要作用。酰基肉碱与脂肪酸结合使脂肪酸以酰基肉碱形式通过线粒体膜完成 β 氧化, 为机体提供能量。线粒体功能损伤时, 酰基肉碱对脂肪酸转运能力降低, 游离脂肪酸累积, 造成肝毒性。因此, 酰基肉碱可作为肝功是否正常的预判指标^[27], 不仅如此, 酰基肉碱还可提高T2DM的早期预测效能^[28]。代谢组学表明, 模型组乙酰肉碱、丙酰肉碱、己酰肉碱、棕榈酰肉碱和癸酰肉碱的水平显著降低, 且肉碱合成途径异常, PNS干预可提高乙酰肉碱、癸酰肉碱和棕榈酰肉碱的水平, 这对于改善肝脏功能, 提高机体能量供应, 调节糖脂代谢发挥了作用。

肝脏是机体糖脂代谢的重要器官, 当机体处于高糖状态时, 糖代谢紊乱, 糖耐量减退, 诱发胰岛素抵

抗^[18]。反之,糖尿病的发生提高了机体氧化应激水平,过度的氧化应激加速了糖尿病的进程,导致肝功能受损^[29]。代谢组学表明,模型组中还原性谷胱甘肽、牛磺酸、辅酶Q1降低,且肝脏中GSH-Px和CAT表达减少,PNS既提高了牛磺酸、辅酶Q1的水平,又降低了ALT和AST的水平,而且增加肝脏GSH-Px和CAT的活性,推测PNS的降糖作用可能与降低肝脏氧化应激水平,调节肝脏代谢及改善肝功能有关。

综上所述,PNS可能通过抑制NF- κ B信号,调节花生四烯酸和亚油酸代谢,以降低炎症反应、改善肝脏功能发挥降糖降脂作用。本研究为三七总皂苷临床治疗T2DM提供了实验依据,也为三七总皂苷的开发利用提供理论依据。

作者贡献: 刘文虎负责实验设计、数据分析、文章撰写及修改;张金花、刘汉湘、刘雨轩、吴敏完成实验部分;常晋霞负责部分数据分析及文章修改。

利益冲突: 本文不存在任何利益冲突。

References

- [1] Magliano DJ, Sacre JW, Harding JL, et al. Young-onset type 2 diabetes mellitus-implications for morbidity and mortality [J]. Nat Rev Endocrinol, 2020, 16: 321-331.
- [2] Serbis A, Giapros V, Kotanidou EP, et al. Diagnosis, treatment and prevention of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents [J]. World J Diabetes, 2021, 12: 344-365.
- [3] Huang YD, Chen JX, Shi Y, et al. *Panax notoginseng*: a review on chemical components, chromatographic analysis, *P. notoginseng* extracts, and pharmacology in recent five years [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2022, 47: 2584-2596.
- [4] Zhang S, Chen C, Lu W, et al. Phytochemistry, pharmacology, and clinical use of *Panax notoginseng* flowers buds [J]. Phytother Res, 2018, 32: 2155-2163.
- [5] Cui G, Li Q, Shu FF, et al. *Panax notoginseng* saponins ameliorated LPS-induced acute lung injury in mice by inhibiting the activation of NF- κ B [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 3587-3595.
- [6] Wang GR, Chen ZY, Wu H, et al. Xueshuantong improves cerebral microcirculation disorder: action mechanism based on network pharmacology and experimental validation [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 2077-2086.
- [7] Xu Y, Wang N, Tan HY, et al. *Panax notoginseng* saponins modulate the gut microbiota to promote thermogenesis and beige adipocyte reconstruction via leptin-mediated AMPK α /STAT3 signaling in diet-induced obesity [J]. Theranostics, 2020, 10: 11302-11323.
- [8] Zhou P, Xie W, He S, et al. Ginsenoside Rb1 as an anti-diabetic agent and its underlying mechanism analysis [J]. Cells, 2019, 8: 204.
- [9] Wang H, Teng Y, Li S, et al. UHPLC-MS-based serum and urine metabolomics reveals the anti-diabetic mechanism of ginsenoside Re in type 2 diabetic rats [J]. Molecules, 2021, 26: 6657.
- [10] Yarıbeygi H, Sathyapalan T, Atkin SL, et al. Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes mellitus [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 8609213.
- [11] Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha TE, et al. Diabetes mellitus and inflammation [J]. Curr Diab Rep, 2013, 13: 435-444.
- [12] Rohm TV, Meier DT, Olefsky JM, et al. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders [J]. Immunity, 2022, 55: 31-55.
- [13] Marino F, Salerno N, Scalise M, et al. Streptozotocin-induced type 1 and 2 diabetes mellitus mouse models show different functional, cellular and molecular patterns of diabetic cardiomyopathy [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24: 1132.
- [14] Wu J, Yan L. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2015, 8: 181-188.
- [15] Zhang YX, Zhang R, Yang J, et al. Relationship between fatigue caused by type 2 diabetes mellitus and 5-HT degradation in skeletal muscle [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 190-200.
- [16] Asrar Ul Haq M, Hare DL, Price SR, et al. Muscle atrophy in patients with type 2 diabetes mellitus: roles of inflammatory pathways, physical activity and exercise [J]. Exerc Immunol Rev, 2016, 22: 94-109.
- [17] Rehman K, Akash MSH, Liaqat A, et al. Role of interleukin-6 in development of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2017, 27: 229-236.
- [18] Yarıbeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, et al. Insulin resistance: review of the underlying molecular mechanisms [J]. J Cell Physiol, 2019, 234: 8152-8161.
- [19] Akash MSH, Rehman K, Liaqat A. Tumor necrosis factor-alpha: role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus [J]. J Cell Biochem, 2018, 119: 105-110.
- [20] Capece D, Verzella D, Flati I, et al. NF- κ B: blending metabolism, immunity, and inflammation [J]. Trends Immunol, 2022, 43: 757-775.
- [21] Wronka M, Krzemińska J, Młynarska E, et al. The influence of lifestyle and treatment on oxidative stress and inflammation in diabetes [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 15743.
- [22] Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, et al. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97: 11280-11285.
- [23] Aldámiz-Echevarría L, Prieto JA, Andrade F, et al. Arachidonic acid content in adipose tissue is associated with insulin resistance in healthy children [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2007, 44: 77-83.
- [24] Wu M, Wang X, Duan Q, et al. Arachidonic acid can signifi-

- cantly prevent early insulin resistance induced by a high-fat diet [J]. *Ann Nutr Metab*, 2007, 51: 270-276.
- [25] van Dam RM, Willett WC, Rimm EB, et al. Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men [J]. *Diabetes Care*, 2002, 25: 417-424.
- [26] Zhong G, Liu G, Willett WC, et al. Associations between linoleic acid intake and incident type 2 diabetes among US men and women [J]. *Diabetes Care*, 2019, 42: 1406-1413.
- [27] Miyaaki H, Kobayashi H, Miuma S, et al. Blood carnitine profiling on tandem mass spectrometry in liver cirrhotic patients [J]. *BMC Gastroenterol*, 2020, 20: 41.
- [28] Sun L, Liang LM, Gao XF, et al. Early prediction of developing type 2 diabetes by plasma acylcarnitines: population-based study [J]. *Diabetes Care*, 2016, 39: 1563-1570.
- [29] Angelis K, Yokota R, Casarini DE, et al. *Saccharomyces boulardii* modulates oxidative stress and renin angiotensin system attenuating diabetes-induced liver injury in mice [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 9189.