

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research基于 PI3K/AKT 通路探究四君子汤改善 T2DM
大鼠胰腺部位胰岛素抵抗的机制研究

Exploring the mechanism of Sijunzi decoction ameliorates pancreatic insulin resistance in T2DM rats: A focus on the PI3K/AKT pathway

杜雪珊, 薛春龙, 杨少博,
张玺雅, 任杰, 段秀俊(山西中医药大学 中药与食品工程学院, 山西
晋中 030619)DU Xue-shan, XUE Chun-long,
YANG Shao-bo, ZHANG Xi-ya,
REN Jie, DUAN Xiu-jun(College of Traditional Chinese Medicine
and Food Engineering, Shanxi University
of Traditional Chinese Medicine,
Jinzhong 030619, Shanxi Province,
China)基金项目: 山西省自然科学研究面上基金资助
项目(202203021211214); 山西中医
药大学科技创新能力培训计划“太行
本草”专项基础和应用研究基金资助
项目(2022PY-TH-51)作者简介: 杜雪珊(2000-), 女, 硕士研究生, 主
要从事中药制剂方面的研究通信作者: 段秀俊, 教授, 硕士生导师
MP: 13803469275
E-mail: dxjzhyxy@163.com

摘要:目的 探究四君子汤改善 2 型糖尿病(T2DM)大鼠胰腺胰岛素抵抗(IR)的作用及机制。方法 将 40 只 SD 大鼠分为正常组($n=10$, 正常饲料)和高糖高脂组[$n=10$, 高糖高脂饲料结合链脲佐菌素(STZ)腹腔注射构建 T2DM 模型], 造模成功的 SD 大鼠随机分为模型组、对照组($0.003\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和实验组($0.848\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 正常组和模型组灌胃蒸馏水, 其余 2 组分别灌胃相应药物, 连续给药 4 周。用血糖仪测定空腹血糖(FBG), 用试剂盒检测各组大鼠血清空腹胰岛素(FINS)、总胆固醇(TC)、总甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), 用胰腺组织检测胰腺指数(PI), 用逆转录聚合酶链式反应法检测相关蛋白 mRNA 的表达, 用蛋白印迹法检测相关总蛋白的表达。结果 模型组和实验组的 FBG 分别为(13.60 ± 0.61)和(9.73 ± 0.43) $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, FINS 分别为(15.24 ± 0.76)和(12.39 ± 1.13) $\text{mIU}\cdot\text{L}^{-1}$, TC 分别为(5.42 ± 0.41)和(3.76 ± 0.26) $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, TG 分别为(1.49 ± 0.26)和(0.65 ± 0.05) $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, HDL-C 分别为(0.82 ± 0.06)和(1.12 ± 0.08) $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, LDL-C 分别为(4.82 ± 0.43)和(3.02 ± 0.42) $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, PI 分别为(0.27 ± 0.09)%和(0.34 ± 0.02)%, INSR mRNA 表达水平分别为 0.44 ± 0.16 和 0.61 ± 0.16 , IRS-1 mRNA 表达水平分别为 0.48 ± 0.13 和 0.72 ± 0.16 , PI3K mRNA 表达水平分别为 0.62 ± 0.30 和 0.84 ± 0.12 , AKT mRNA 表达水平分别为 0.74 ± 0.20 和 0.92 ± 0.02 , GLUT4 mRNA 表达水平分别为 0.48 ± 0.22 和 0.78 ± 0.24 , GSK-3 β mRNA 表达水平分别为 1.90 ± 0.16 和 1.56 ± 0.25 , FOXO1 mRNA 表达水平分别为 1.83 ± 0.16 和 1.60 ± 0.21 , INSR 总蛋白表达水平分别为 0.59 ± 0.29 和 0.82 ± 0.18 , IRS-1 总蛋白表达水平分别为 0.65 ± 0.28 和 0.72 ± 0.16 , PI3K 总蛋白表达水平分别为 0.49 ± 0.14 和 0.74 ± 0.15 , AKT 总蛋白表达水平分别为 0.50 ± 0.17 和 0.68 ± 0.12 , GLUT4 总蛋白表达水平分别为 0.65 ± 0.28 和 0.86 ± 0.14 , GSK-3 β 总蛋白表达水平分别为 2.73 ± 0.19 和 2.50 ± 0.22 , FOXO1 总蛋白表达水平分别为 1.61 ± 0.49 和 1.21 ± 0.35 , 实验组的上述指标与模型组比较, 在统计学上差异具有统计学意义($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$)。结论 四君子汤可通过调节 PI3K/AKT 信号通路上、中、下游 7 个信号因子的表达改善 T2DM 大鼠胰腺 IR。

关键词: 四君子汤; 2 型糖尿病; PI3K/AKT 通路; 胰腺; 胰岛素抵抗

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.23.008

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)23-3350-08

Abstract: Objective To investigate the effect and underlying mechanism of Sijunzi Decoction in ameliorating insulin resistance (IR) within the pancreatic islets of rats with type 2 diabetes mellitus (T2DM).

Methods A total of 40 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly

divided into control group ($n = 10$, fed with normal diet) and high-sugar and high-fat group [$n = 30$, fed with high-sugar and high-fat diet coupled with intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) to create a type 2 diabetes mellitus (T2DM) model]. The smoothly modeled SD rats were further randomly assigned into model group, positive control group ($0.003 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and experimental group ($0.848 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$). The normal group and model group were given distilled water by gavage, while the other two groups were administered the corresponding drugs by gavage for 4 consecutive weeks. Fasting blood glucose (FBG) was measured using a blood glucose meter. Serum levels of fasting insulin (FINS), total cholesterol (TC), total triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in rats of each group were detected with commercial assay kits. The pancreatic index (PI) was calculated based on the detection of pancreatic tissue. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was employed to determine the mRNA expression levels of related proteins, and Western blotting was performed to ascertain the formulation standards of correlated total proteins. **Results** The FBG, FINS, TC, TG, HDL-C, LDL-C and PI in the model group and experimental group were (13.60 ± 0.61) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ vs. (9.73 ± 0.43) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, (15.24 ± 0.76) $\text{mIU} \cdot \text{L}^{-1}$ vs. (12.39 ± 1.13) $\text{mIU} \cdot \text{L}^{-1}$, (5.42 ± 0.41) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ vs. (3.76 ± 0.26) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, (1.49 ± 0.26) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ vs. (0.65 ± 0.05) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, (0.82 ± 0.06) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ vs. (1.12 ± 0.08) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, (4.82 ± 0.43) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ vs. (3.02 ± 0.42) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, and (0.27 ± 0.09)% vs. (0.34 ± 0.02)%, respectively. The mRNA expression levels of INSR, IRS-1, PI3K, AKT, GLUT4, GSK-3 β , and FOXO1 were 0.44 ± 0.16 vs. 0.61 ± 0.16 , 0.48 ± 0.13 vs. 0.72 ± 0.16 , 0.62 ± 0.30 vs. 0.84 ± 0.12 , 0.74 ± 0.20 vs. 0.92 ± 0.02 , 0.48 ± 0.22 vs. 0.78 ± 0.24 , 1.90 ± 0.16 vs. 1.56 ± 0.25 , and 1.83 ± 0.16 vs. 1.60 ± 0.21 , respectively. The total protein expression levels of INSR, IRS-1, PI3K, AKT, GLUT4, GSK-3 β , and FOXO1 were 0.59 ± 0.29 vs. 0.82 ± 0.18 , 0.65 ± 0.28 vs. 0.72 ± 0.16 , 0.49 ± 0.14 vs. 0.74 ± 0.15 , 0.50 ± 0.17 vs. 0.68 ± 0.12 , 0.65 ± 0.28 vs. 0.86 ± 0.14 , 2.73 ± 0.19 vs. 2.50 ± 0.22 , and 1.61 ± 0.49 vs. 1.21 ± 0.35 , respectively. Compared with the model group, all the above indicators in the experimental group showed statistically significant differences ($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** Sijunzi Decoction can improve pancreatic insulin resistance (IR) in rats with type 2 diabetes mellitus (T2DM) by regulating the expression of 7 signaling factors in the upstream, middle and downstream of the PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: Sijunzi decoction; T2DM; PI3K/AKT pathway; pancreas; insulin resistance

在全球范围内,人口老龄化与饮食结构变化共同推动糖尿病(diabetes mellitus,DM)发病率攀升,使其成为仅次于肿瘤、心血管疾病的第三大慢性非传染性疾病^[1]。在DM患者中,2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)占比超90%,核心病理为胰岛素抵抗(insulin resistance,IR)与胰岛 β 细胞分泌缺陷^[2]。IR是代谢性疾病的病理基础,外周器官胰岛素敏感性下降为其表现,而胰岛 β 细胞作为胰岛素唯一分泌源,其功能衰竭是IR进展为高血糖的关键^[3]。该选题临床相关性明确,胰腺 β 细胞功能评估是IR分层诊断与糖尿病风险预测的核心指标,可为靶向药物研发提供靶点,具有重要科研与临床转化价值。

课题组前期研究^[4-5]已表明,四君子汤能改善T2DM小鼠、大鼠胰岛素抵抗,促进胰岛素功能恢复的同时可以调节糖脂代谢紊乱。基于此,本研究拟聚焦胰腺组织,探讨四君子汤对PI3K/AKT信号通路的激活效应,通过实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应法

(reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot, WB)分析上、中、下游通路的七个因子[即胰岛素受体(insulin receptor, INSR)、胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate 1, IRS-1)、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶B(RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT)、葡萄糖转运体4(glucose transporter 4, GLUT4)、糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3 β)、叉头框蛋白O1(forkhead box protein O1, FOXO1)]的变化,以期深入阐明四君子汤改善IR的作用机制奠定基础。

材料、对象与方法

1 材料

动物 SPF级雄性SD大鼠,鼠龄6~8周,体重180~200 g,斯贝福(北京)生物技术有限公司提

供。动物许可证号:SCXK(京)2019-0010。本实验经山西中医药大学动物伦理委员会批准(伦理批号:2022DW174)。

药品与试剂 四君子汤提取物,山西中医药大学中药药剂实验室自制;盐酸二甲双胍肠溶片,规格:每片0.5 g,生产批号:1279225A8,批准文号:国药准字H20093711,河北天成药业股份有限公司生产;蒸馏水,规格:每桶10 L,购自山西吉泰和宁科技有限公司;链脉佐菌素(streptozotocin, STZ),规格:每瓶100 mg,纯度:98%,美国Sigma公司生产。柠檬酸,规格:每瓶100 g,纯度:99.5%,购自上海麦克林生化科技有限公司;柠檬酸钠,规格:每瓶500 g,纯度:99%,购自上海麦克林生化科技有限公司;无水葡萄糖,规格:每瓶500 g,纯度:98%,购自上海融禾医药科技有限公司;逆转录试剂盒、扩增试剂盒,均购自日本Takara公司;胰岛素酶联免疫检测试剂盒、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)测定试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;总RNA Trizol提取试剂盒,均购自美国赛默飞世尔科技有限公司;鼠源GAPDH单克隆抗体、兔源INSR多克隆抗体、兔源IRS-1多克隆抗体、兔源PI3K多克隆抗体、兔源AKT多克隆抗体、兔源GLUT4多克隆抗体、兔源GSK-3 β 多克隆抗体、兔源FOXO1多克隆抗体、羊抗兔IgG-HRP二抗,均购自南京巴傲得生物科技有限公司。

仪器 LEICA RM2015型切片机,德国徕卡公司产品;BX51型光学显微镜,日本奥林巴斯株式会社产品;CFX96TM Real-Time PCR仪、552BR 144491型垂直电泳仪,均为美国伯乐公司产品;Infinite F50型酶标仪,瑞士帝肯公司产品;Tanon 4200型化学发光成像系统,上海天能科技有限公司产品;LEGNDMACH 1.6R型高速冷冻离心机,美国Thermo公司产品;MM400型高通量组织研磨系统,德国Retsch公司产品;H₂O₃-H型加热制冷型金属浴,卡尤迪生物科技(北京)有限公司产品。

2 实验方法

2.1 溶液配制^[6]

四君子汤药液 取四君子汤提取物,用蒸馏水溶解,并调整浓度为1 mL药液相当于原药材0.848 g(基于本课题组前期药效预实验筛选的结果而确定)。

盐酸二甲双胍药液 取盐酸二甲双胍肠溶片去除薄膜衣后研磨成细粉,用蒸馏水溶解,并调整浓度

为1 mL药液相当于盐酸二甲双胍0.003 g。

2.2 模型构建^[7-8]

SD大鼠用正常饲料适应性饲养7 d后,采用高糖高脂饲料结合TSZ腹腔注射构建T2DM大鼠模型。造模28 d后,隔夜禁食12 h(不禁水),腹腔注射40 mL·kg⁻¹的STZ,高糖高脂饲料继续饲养72 h后,重复12 h禁食不禁水处理,实验始终在SPF级动物房环境中进行。造模过程中的SD大鼠体重逐渐减轻,饮食量和饮水量逐渐增多,符合糖尿病患者“三多一少”典型体征;通过尾静脉采血检测空腹血糖水平,当血糖值 ≥ 11.1 mmol·L⁻¹时判定造模成功。

2.3 动物分组与给药方法

SD大鼠随机分为正常组、模型组、对照组与实验组,每组10只。除正常组外,其余3组均采用高糖高脂饲料结合TSZ构建T2DM大鼠模型。治疗期间,正常组和模型组每天1次灌胃蒸馏水(给水量按照1 mL·mL⁻¹);对照组与实验组分别每天1次灌胃盐酸二甲双胍溶液(0.003 g·mL⁻¹)与四君子汤药液(0.848 g·mL⁻¹),28 d后。SD大鼠禁食不禁水12 h后,尾静脉采集血液,血糖仪测定空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)水平,灌胃给予10 mL葡萄糖溶液(1 mL·kg⁻¹)后,于0、0.5、1及2 h特定时间节点测量血糖值,计算口服葡萄糖耐量(oral glucose tolerance test, OGTT)时间曲线下面积(area under the glucose-time curve, AUC)。采集腹主动脉血样,4℃下3 000 r·min⁻¹的转速离心分离得到血清,存放于-20℃冰箱。解剖取出胰腺,冷生理盐水漂洗,测定并记录胰腺的湿重,液氮速冻,存于-80℃冰箱,进行后续生化指标分析。

2.4 主要观察指标

2.4.1 血糖仪检测FBG及OGTT指标

按“2.4”项下方法进行FBG及OGTT指标的测定。

2.4.2 ELISA法检测血清中空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)含量、稳态模型胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)及稳态模型胰岛 β 细胞功能指数(homeostasis model assessment of β -cell function, HOMA- β)指数

经采集分离得到的血清,用ELISA试剂盒检测其中FINS含量,具体步骤按照相应试剂盒说明方法操作。HOMA-IR和HOMA- β 分别根据以下公式计算:HOMA-IR = FBG $\times$ FINS/22.5 HOMA- β = 20 $\times$ FINS/(FBG-3.5)。

2.4.3 观察胰腺指数 (pancreas index, PI) 及血脂四项指标

将解剖取得的大鼠胰腺,用冷生理盐水漂洗,称湿重,计算胰腺指数。

胰腺指数 (%) = (胰腺质量 / 体质量) × 100%。

经采集分离得到的血清,按照生化试剂盒规定的检测流程,完成血脂(TC、TG、HDL - C、LDL - C)各项指标的测定工作。

2.4.4 苏木精 - 伊红 (hematoxylin - eosin staining, HE) 染色观察胰腺组织病理切片^[9]

用常规石蜡包埋法处理漂洗后的胰腺组织,将包埋好的石蜡块制备为 3 ~ 5 μm 厚度的连续切片,经 60 ℃ 恒温烤片后,采用 HE 染色法染色,于光学显微镜下观察各组大鼠胰腺组织的形态学变化。

2.4.5 RT - qPCR 法检测胰腺组织中 PI3K/AKT 通路相关蛋白 mRNA 表达^[6,10]

称取各组大鼠胰腺组织适量,加 1 mL TRIZOL 试剂冰上匀浆,按试剂盒说明书提取总 RNA。经超微量核酸蛋白检测仪检测,选取 OD (260 nm)/OD (280 nm)在 1.8 ~ 2.0 的 RNA。取 RNA 按逆转录试剂盒操作,配制 20 μL 反应体系(含 2 μg RNA、3 μL gDNA digester Mix, RNase free ddH₂O 补至 15 μL, 5 μL 4 × III M - MLV RT Mix),反应条件为 25 ℃ 5min、55 ℃ 15 min、85 ℃ 5 min。荧光定量 PCR 以 SYBR Green 为荧光标记物、GAPDH 为内参,按试剂盒配置反应体系并设置程序,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算基因相对表达量。

2.4.6 WB 法检测胰腺组织中 PI3K/AKT 通路相关总蛋白的表达^[11]

称取各组大鼠胰腺组织适量,冰上剪碎,按 30 mg 组织加 300 μL 裂解液的比例匀浆,充分裂解后以 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,收集上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度。后续依次行聚丙烯酰胺凝胶电泳、NC 膜转印,脱脂奶粉封闭后,孵育稀释比例优化的一抗(INSR 等)及 1:5 000 二抗,经 ECL 发光显影,以

Image J 软件分析条带灰度值,计算蛋白相对表达量。

2.5 亚组观察指标

2.5.1 热板法观察反应灵敏度指标、自主运动行为检测仪器观察自主活动频率指标

采用智能热板仪和自主运动检测仪,测定各组 10 只大鼠 0、28 及 56 d 的热潜伏时间及 5 min 自主运动次数。对比造模阶段(0 d vs. 28 d)、治疗阶段(28 d vs. 56 d)的组间与组内指标,记录两个阶段的热板逃避时间及自主运动次数变化。

2.5.2 观察体质量、摄食量、饮水量变化指标

实验期间统计每组 10 只大鼠 1 ~ 8 W 每天的摄食量、饮水量,对比造模阶段(0 d vs. 28 d)及治疗阶段(28 d vs. 56 d)的摄食量、饮水量、体质量,记录各阶段对应指标变化量。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料用均数 ± 标准差 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较用非配对 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 主要观察指标

1.1 大鼠 OGTT 指标

相比于正常组,模型组大鼠给予葡萄糖之后,不同时间点的血糖浓度相较给药前均有明显提升,AUC 极显著升高(*P* < 0.001);相比于模型组,对照组和实验组的 AUC 均显著降低(*P* < 0.01)。见表 1。

1.2 大鼠 FBG、血清中 FINS 含量、HOMA - IR 及 HOMA - β 指数

实验结果显示,与正常组比较,模型组大鼠的 FBG、FINS 含量及 HOMA - IR 均显著升高(*P* < 0.01),而 HOMA - β 显著降低(*P* < 0.01);与模型组比较,对照组大鼠的 FBG、FINS、HOMA - IR 均显著下降(*P* < 0.01),HOMA - β 则显著升高(*P* < 0.01);实验组大鼠的 FBG、HOMA - IR 显著下降(*P* < 0.01),

表 1 对大鼠口服葡萄糖耐量(OGTT)的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effects on oral glucose tolerance test(OGTT) in rats($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Blood Glucose (mmol · L ⁻¹)				AUC (mmol · h · L ⁻¹)
		0 h	0.5 h	1 h	2 h	
Normal	10	4.53 ± 0.37	8.16 ± 0.45	5.62 ± 0.46	4.19 ± 0.20	23.05 ± 1.53
Model	10	13.34 ± 0.87	22.89 ± 1.38	21.29 ± 0.88	19.31 ± 0.80	80.81 ± 3.94***
Control	10	7.25 ± 0.58	17.49 ± 1.07	11.87 ± 0.75	8.05 ± 0.85	46.97 ± 3.34###
Experimental	10	8.27 ± 1.15	14.91 ± 1.19	12.26 ± 0.62	9.03 ± 0.91	46.47 ± 3.61###

Compared with the normal group *** *P* < 0.001; Compared with the model group ### *P* < 0.001.

FINS 明显下降 ($P < 0.05$), HOMA - β 显著升高 ($P < 0.01$)。见表 2。

1.3 大鼠胰腺指数及血脂四项指标

对大鼠 PI 分析,与正常组比较,模型组大鼠 PI 显著下降 ($P < 0.01$),说明胰腺受损严重,长期高血糖、胰岛素抵抗脂质代谢紊乱等会破坏胰岛 β 细胞,胰腺萎缩,而使胰腺重量减小;与模型组比较,给药结束后,对照组与实验组大鼠 PI 明显升高 ($P < 0.05$)。

除高血糖外,高血压和血脂异常亦是重要致病诱因。结果发现,与正常组相比,模型组大鼠血清中 TC、TG、LDL - C 含量呈极显著升高趋势 ($P < 0.001$), HDL - C 含量呈极显著降低趋势 ($P < 0.001$)。8 周后,与模型组相比,对照组和实验组大鼠血清 TC、TG、LDL - C 含量均极显著降低 ($P < 0.001$), HDL - C 含量均极显著升高 ($P < 0.001$)。见表 3。

表 2 对大鼠空腹血糖、空腹胰岛素、稳态模型胰岛素抵抗指数、稳态模型胰岛 β 细胞功能指数 (FBG、FINS、HOMA - IR、HOMA - β) 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects on fasting blood glucose、fasting insulin、homeostasis model assessment of insulin resistance、homeostasis model assessment of β - cell function (FBG, FINS, HOMA - IR, and HOMA - β) in rats ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	FBG (mmol · L ⁻¹)	FINS (mIU · L ⁻¹)	HOMA - IR	HOMA - β
Normal	10	5.23 ± 0.51	4.82 ± 0.48	1.13 ± 0.22	55.76 ± 1.09
Model	10	13.60 ± 0.61***	15.24 ± 0.76***	9.23 ± 0.87***	30.20 ± 1.96***
Control	10	7.53 ± 0.56###	8.15 ± 1.15###	2.76 ± 0.58###	40.45 ± 1.51###
Experimental	10	9.73 ± 0.43###	12.39 ± 1.13###	5.38 ± 0.73###	39.72 ± 1.70###

Compared with the normal group *** $P < 0.001$; Compared with the model group ### $P < 0.001$.

表 3 大鼠胰腺指数及血脂四项指标 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Rat pancreatic index and four blood lipid indicators ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	PI (%)	TC (mmol · L ⁻¹)	TG (mmol · L ⁻¹)	HDL - C (mmol · L ⁻¹)	LDL - C (mmol · L ⁻¹)
Normal	10	0.39 ± 0.05	3.16 ± 0.26	0.58 ± 0.12	1.30 ± 0.11	2.11 ± 0.13
Model	10	0.27 ± 0.09**	5.42 ± 0.41***	1.49 ± 0.26***	0.82 ± 0.06***	4.82 ± 0.43***
Control	10	0.35 ± 0.04 [#]	3.82 ± 0.16###	0.62 ± 0.16###	1.20 ± 0.07###	2.56 ± 0.22###
Experimental	10	0.34 ± 0.02 [#]	3.76 ± 0.26###	0.65 ± 0.05###	1.12 ± 0.08###	3.02 ± 0.42###

Compared with the normal group ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Compared with the model group [#] $P < 0.05$, ### $P < 0.001$;

1.4 大鼠胰腺组织病理变化

HE 染色结果显示,正常组大鼠胰腺结构完整,胰岛边界清晰,细胞核大小均一、排列有序,胞浆丰富。模型组胰岛边界模糊,数量减少、体积萎缩,基底膜形态紊乱。对照组及实验组胰腺结构较模型组明显改善,细胞数量与体积回升,排列渐趋规则,仅见少量脂肪空泡。

1.5 大鼠胰腺组织 PI3K/AKT 通路相关蛋白 mRNA 表达

PCR 实验结果显示,与正常组比较,模型组大鼠 INSR、IRS - 1、GLUT4 mRNA 表达极显著降低 ($P < 0.001$), PI3K、AKT mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$), GSK - 3 β 、FOXO1 mRNA 表达极显著升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,对照组大鼠 INSR、PI3K、GLUT4 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$), IRS - 1、AKT mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$), GSK - 3 β 、

FOXO1 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$),实验组大鼠 IRS - 1 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$), INSR、PI3K、AKT、GLUT4 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$), GSK - 3 β mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$), FOXO1 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

1.6 大鼠胰腺组织 PI3K/AKT 通路相关总蛋白的表达

分析大鼠胰腺组织蛋白表达情况可知:与正常组比较,模型组大鼠的 PI3K、AKT 蛋白表达极显著下调 ($P < 0.001$), INSR、IRS1、GLUT4 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$), GSK - 3 β 蛋白表达极显著上调 ($P < 0.001$), FOXO1 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$);而与模型组相比,对照组能显著上调大鼠胰腺中 INSR、PI3K、AKT、GLUT4 的蛋白表达 ($P < 0.01$), 明显上调 IRS1 蛋白表达 ($P < 0.05$), 显著下调 GSK - 3 β 、FOXO1 蛋白表达 ($P < 0.01$);实验组能显

著上调大鼠胰腺中 IRS1、PI3K 的蛋白表达 ($P < 0.05$), 明显下调 GSK-3 β 、FOXO1 蛋白表达 ($P < 0.01$), 明显上调 INSR、AKT、GLUT4 蛋白表达 ($P < 0.05$)。见表 5 及图 1。

表 4 各组大鼠胰腺组织中磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号通路相关蛋白 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

Table 4 mRNA expression of phosphatidylinositol 3-kinase/ RAC-alpha serine/threonine-protein kinase(PI3K/AKT) signaling pathway-related proteins in pancreatic tissues of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	INSR	IRS1	PI3K	AKT	GLUT4	GSK-3 β	FOXO1
Normal	10	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.05	1.01 $\pm$ 0.13	1.01 $\pm$ 0.12
Model	10	0.44 $\pm$ 0.16***	0.48 $\pm$ 0.13***	0.62 $\pm$ 0.30**	0.74 $\pm$ 0.20**	0.48 $\pm$ 0.22***	1.90 $\pm$ 0.16***	1.83 $\pm$ 0.16***
Control	10	0.73 $\pm$ 0.18##	0.68 $\pm$ 0.19#	0.90 $\pm$ 0.07##	0.88 $\pm$ 0.04#	0.85 $\pm$ 0.21##	1.57 $\pm$ 0.24##	1.46 $\pm$ 0.30##
Experimental	10	0.61 $\pm$ 0.16#	0.72 $\pm$ 0.16##	0.84 $\pm$ 0.12#	0.92 $\pm$ 0.02#	0.78 $\pm$ 0.24#	1.56 $\pm$ 0.25##	1.60 $\pm$ 0.21#

Compared with the normal group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Compared with the model group # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

表 5 各组大鼠胰腺组织中 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Expression of PI3K/AKT signaling pathway-related proteins in pancreatic tissues of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	INSR	IRS1	PI3K	AKT	GLUT4	GSK-3 β	FOXO1
Normal	10	1.00 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.07
Model	10	0.59 $\pm$ 0.29**	0.65 $\pm$ 0.28**	0.49 $\pm$ 0.14***	0.50 $\pm$ 0.17***	0.65 $\pm$ 0.28**	2.73 $\pm$ 0.19***	1.61 $\pm$ 0.49**
Control	10	0.87 $\pm$ 0.10##	0.91 $\pm$ 0.19#	0.77 $\pm$ 0.18##	0.77 $\pm$ 0.15##	0.90 $\pm$ 0.04##	2.28 $\pm$ 0.35##	1.05 $\pm$ 0.33##
Experimental	10	0.82 $\pm$ 0.18#	0.72 $\pm$ 0.16##	0.74 $\pm$ 0.15##	0.68 $\pm$ 0.12#	0.86 $\pm$ 0.14#	2.50 $\pm$ 0.22#	1.21 $\pm$ 0.35#

Compared with the normal group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Compared with the model group # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

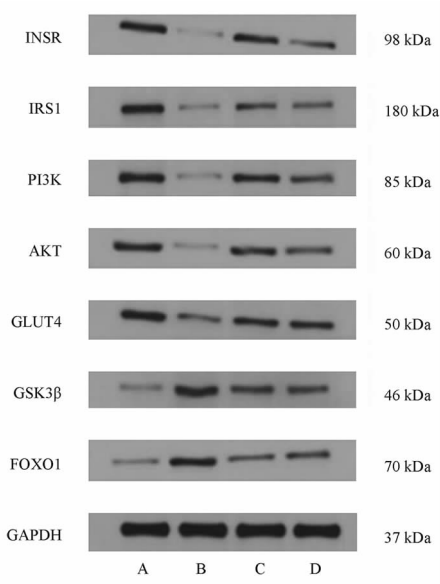


图 1 各组大鼠胰腺组织中 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达电泳图

Figure 1 Electrophoretic diagram of the expression of proteins related to the PI3K/AKT signaling pathway in pancreatic tissues of each group of rats

A: Normal group; B: Model group; C: Control group; D: Experimental group.

2 亚组观察指标

2.1 大鼠反应灵敏度及自主活动频率指标

实验将测定的 4 组大鼠热板反应灵敏度的整

体状态和自主活动频率进行组间及组内比较。其中组间比较发现,0 d,4 组大鼠反应灵敏度、整体状态比较无显著性差异 ($P > 0.05$);28 d,与正常组比较,其余 3 组大鼠反应灵敏度降低、整体状态显著变差 ($P < 0.01$);56 d,与正常组比较,模型组大鼠反应灵敏度降低、整体状态显著变差 ($P < 0.01$);与模型组比较,对照组和实验组大鼠反应灵敏度、整体状态均有显著改善 ($P < 0.01$)。组内比较发现,正常组在 0,28 及 56 d 反应灵敏度、整体状态无显著性差异 ($P > 0.05$);模型组 28,56 d 相较于 0 d,反应灵敏度降低、整体状态显著变差 ($P < 0.01$);对照组与实验组 28 d 相较于 0 d,反应灵敏度降低、整体状态显著变差 ($P < 0.01$);56 d 相较于 28 d,反应灵敏度、整体状态均有显著改善 ($P < 0.01$)。见表 6。

2.2 大鼠体质量、摄食量、饮水量变化指标

大鼠体质量结果显示:对照组和实验组在造模期间的体质变化量分别为 (52.71 ± 8.16) 和 (53.67 ± 5.82) g,与模型组比较,无显著性差异 ($P > 0.05$);对照组和实验组在给药期间的摄食变化量分别为 (141.67 ± 9.53) 和 (121.35 ± 7.45) g,与模型组比较,显著上升 ($P < 0.01$)。

大鼠摄食量与饮水量结果显示:对照组和实验组在造模期间的摄食变化量分别为 6.27 和 5.59 g,饮水

表6 各组大鼠反应灵敏度、整体状态评估表($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Evaluation table of reaction sensitivity and overall status of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Hot Plate Reaction Sensitivity/s			Spontaneous Activity Frequency;time/5 min		
		0 d	28 d	56 d	0 d	28 d	56 d
Normal	10	5.74 ± 0.42	6.16 ± 0.72	6.53 ± 1.19	90 ± 7	86 ± 3	82 ± 9
Model	10	5.80 ± 0.34	12.13 ± 1.06 ^{**ΔΔ}	12.58 ± 1.24 ^{**}	89 ± 2	61 ± 8 ^{**ΔΔ}	57 ± 6 ^{**}
Control	10	5.63 ± 0.43	12.50 ± 0.74 ^{**ΔΔ}	7.04 ± 0.67 ^{###▲▲}	86 ± 4	61 ± 6 ^{**ΔΔ}	86 ± 4 ^{###▲▲}
Experimental	10	5.77 ± 0.57	12.74 ± 0.94 ^{**ΔΔ}	7.60 ± 0.69 ^{###▲▲}	77 ± 3	58 ± 4 ^{**ΔΔ}	79 ± 2 ^{###▲▲}

Note: Compared with the normal group ^{**} $P < 0.01$; Compared with the model group ^{###} $P < 0.01$; Compared with 0 days ^{ΔΔ} $P < 0.01$; compared with 28 days ^{▲▲} $P < 0.01$.

变化量分别为 20.64 和 24.85 mL,与模型组比较,摄食变化量与饮水变化量无明显变化;对照组和实验组在给药期间的摄食变化量分别为 3.69 和 2.26 g,饮水变化量分别为 7.18 和 10.03 mL,与模型组比较,摄食变化量与饮水变化量均有所减少。

讨 论

T2DM 属“消渴”范畴,嗜食肥甘厚味是 T2DM 的诱因,长期食味厚者易阻滞中焦气机,损伤脾胃,导致脾不升清,胃不降浊,久之水谷无以正常运化,则成糟粕,壅郁生毒、生湿,湿凝成痰,最终形成“痰饮”等病理产物^[12]。四君子汤以甘平之党参为君药,健脾益肺,养血生津^[13];臣以白术燥湿健脾^[14];佐以茯苓利水渗湿^[15];甘草为使,甘温益气,调和诸药^[16],正符合脾虚湿阻型胰岛素抵抗的病机。盐酸二甲双胍是治疗 T2DM、改善胰岛素抵抗的一线药物^[17],故选择其为对照组药。

胰腺是防治 T2DM 的靶器官,OGTT、HOMA-IR、HOMA-β 及 FBG、FINS 含量是评价药物降糖效果的最直接主要的指标,TC、TG、HDL-C 及 LDL-C 含量是评价血脂状态的最主要的 4 个指标^[9],研究结果显示,与模型组比较,实验组大鼠的 AUC 极显著下降($P < 0.001$);FBG、FINS、HOMA-IR 与 HOMA-β 均极显著下降($P < 0.001$);TC、TG 与 LDL-C 均极显著下降($P < 0.001$),HDL-C 极显著升高($P < 0.001$),表明四君子汤调节 T2DM 大鼠的血糖、血脂效果显著;且实验组大鼠的胰腺组织 β 细胞数量增加,表明四君子汤具有在一定程度上修复胰腺损伤的功能;PI3K/AKT 通路是胰岛素调控血糖的核心通路,介导生长、糖脂代谢等生理过程^[18]。胰岛素结合肝细胞膜 INSR,诱导 IRS 磷酸化并激活 PI3K,进而活化 AKT^[19-21]。活化的 AKT 抑制 GSK-3β 活性以促进肝糖原合成^[22-23],其异常与 T2DM 相关^[24];同时促进

GLUT4 膜转位、抑制 FOXO1 核转位,减少肝糖异生。研究结果显示,与模型组相比,实验组大鼠胰腺组织中 INSR 等 7 个蛋白 mRNA 的表达:IRS-1 mRNA 表达显著升高($P < 0.01$),INSR、PI3K、AKT、GLUT4 mRNA 表达明显升高($P < 0.05$),GSK-3β mRNA 表达显著降低($P < 0.01$),FOXO1 mRNA 表达明显降低($P < 0.05$);实验组大鼠胰腺组织中 INSR 等 7 个蛋白总量的表达中:能显著上调 IRS1、PI3K 的蛋白表达($P < 0.01$),明显上调 INSR、AKT、GLUT4 蛋白表达($P < 0.05$),明显下调 GSK-3β、FOXO1 蛋白表达($P < 0.05$),揭示了四君子汤通过 PI3K/AKT 信号通路改善 T2DM 大鼠胰岛素抵抗的作用机制。

综上所述,四君子汤能够有效改善 T2DM 大鼠的胰岛功能,减轻胰腺组织的病理损伤程度,并且对血糖、血脂指数具有良好的调节效果。此外,研究还明确了其作用机制涉及对 PI3K/AKT 信号通路的调控,具体表现为影响该通路中 INSR、IRS-1、PI3K、AKT、GLUT4、GSK-3β、FOXO1 共 7 个因子的 mRNA 表达情况。

参考文献:

- [1] SUMIDA Y, SHIMA T, MITSUMOTO Y, et al. Epidemiology, pathogenesis, and diagnostic strategy of diabetic liver disease in Japan[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12):4337.
- [2] 陈可,张效科. 中药黄连治疗 2 型糖尿病药理机制研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2025, 27(02):94—98.
- [3] 林玉玲,李玉杰,李增一,等. 柴胡皂苷 A 调控 PI3K/Akt 通路对 2 型糖尿病小鼠胰岛素抵抗的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(04):928—931.
- [4] 段秀俊,刘培,王科,等. 四君子汤调节 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢紊乱的药效学研究[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(01):62—64.
- [5] 杜雪珊,张玺雅,薛春龙,等. 四君子汤拆方的体内外降糖调脂作用评价研究[J]. *时珍国医国药*, 2025, 36(12):2224—2231.
- [6] 董征艳,王伊楠,郭宇航,等. 四君子汤不同提取物干预糖尿病肾损伤的实验研究[J]. *山西医科大学学报*, 2020, 51(10):1086—1092.

- [7] 王伊楠,董征艳,张莉丹,等. 四君子汤梯度乙醇提取物干预2型糖尿病小鼠糖脂代谢紊乱的评价研究[J]. 中药药理与临床, 2020,36(04):93—98.
- [8] WANG Y N, LI M G, NI Z Z. Primary study on the hypoglycemic mechanism of 5 α -GLP - HV in STZ - induced type 2 diabetes mellitus mice. [J]. *Journal of biosciences*, 2018, 43 (05): 921—929.
- [9] 王立映,王建,樊亚梅,等. 3种冰片防治AMI模型大鼠的抗炎及调控HIF-1 α /VEGF[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(19):61—72.
- [10] 孔静,何友立,杨明明,等. 基于TGF- β /Smads信号通路探讨苦参碱对糖尿病肾病小鼠的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2024,40(13):1923—1927.
- [11] 肖建英,朱俊江,康桂红,等. 芍药苷减轻妊娠期糖尿病大鼠胰岛胰岛素抵抗和心肌损伤的研究[J]. 中国临床药理学杂志,2025, 41(09):1261—1267.
- [12] 张重阳,于森,陈荣昌,等. 党参药理作用的研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2024,35(05):765—770.
- [13] 顾思浩,孔维崧,张彤,等. 白术的化学成分与药理作用及复方临床应用进展[J]. 中华中医药学刊,2020,38(01):69—73.
- [14] 路平,史汶龙,杨思雨,等. 茯苓化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药,2024,46(04):1246—1254.
- [15] 李泽宇,郝二伟,李卉,等. 甘草配伍应用的药理作用及机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(14):270—282.
- [16] LIU R, CHEN Y, LIU G, *et al.* PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers[J]. *Cell Death Dis*, 2020,11(09):797—797.
- [17] 姜立娟. 经典名方玉液汤通过PI3K/AKT信号途径改善2型糖尿病胰岛素抵抗的作用及机制研究[D]. 吉林 长春:长春中医药大学,2021.
- [18] 陈琼,黄佳怡,沈贤敏,等. 基于Akt/GSK-3信号通路探讨半夏-黄连改善糖尿病胃轻瘫大鼠的作用[J]. 中国临床药理学杂志,2025,41(07):967—971.
- [19] XIE Z, ZHANG J, MA S, *et al.* Effect of Chinese herbal medicine treatment on Plasma lipid and hepatic lipid metabolism in Hetian broiler[J]. *Poultry Science*,2017,96(06):1918—1924.
- [20] GARABADU D, KRISHNAMURTHY S. Metformin attenuates hepatic insulin resistance in type - 2 diabetic rats through PI3K/Akt/GLUT - 4 signalling independent to bicuculline - sensitive GABA_A receptor stimulation[J]. *Pharmaceutical Biology*,2017,55(01):722—728.
- [21] LIU Y L, DONG M, YANG Z Y, *et al.* Anti - diabetic effect of citrus pectin in diabetic rats and potential mechanism *via* PI3K/Akt signaling pathway [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*,2016,89484—4888. 2016 - 05 - 06 [2025 - 10 - 24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27164497/>.
- [22] LIANG G, WANG F, SONG X, *et al.* 3 - Deoxyglucosone induces insulin resistance by impairing insulin signaling in HepG2 cells[J]. *Molecular Medicine Reports*,2016,13(05):4506—4512.
- [23] LIU T Y, SHI C X, GAO R, *et al.* Irisin inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis *via* the PI3K/AKT Pathway in type 2 diabetic mice and hepatocytes [J]. *Clinical science (London, England;1979)*,2015,129(10):839—850.
- [24] MARTHA L, VICTOR S M. GSK3B is increased in adipose tissue and skeletal muscle from women with gestational diabetes where it regulates the inflammatory response[J]. *PLoS ONE*,2014,9(12): e115854. 2014 - 12 - 26 [2025 - 12 - 24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25541965/>. (收稿日期 2025 - 10 - 27)

· 信息 · 书讯 · 其他 ·

《中国临床药理学杂志》公告

由于近期冒充本刊向作者发送欺诈信息的情况频发,为保护作者的权益及本刊声誉,《中国临床药理学杂志》编辑部郑重声明:

1. 本刊从不以个人名义、个人账户向作者收取任何费用或索要个人信息及联系方式等。

2. 本刊目前的唯一投稿方式为:通过工作邮箱 cjcp2025@163.com;稿件退修方式为:通过工作邮箱 cjcp2025TX@163.com;版面费通知方式为:通过工作邮箱 cjcp2025CW@163.com。

编辑部郑重提醒广大作者提高警惕,谨防上当受骗。