小檗碱改善2型糖尿病合并代谢相关脂肪性肝病的机制研究Δ

李　怡*，康舒羽，王琪文，黄曼婷，曾聪彦，童　隽，董更婷#（广州中医药大学附属中山中医院中药药理实验室/国家中药现代化工程技术研究中心-医院制剂转化分中心，广东 中山　528400）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2025）16-1975-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2025.16.04

摘　要　目的　探讨小檗碱通过调节神经酰胺改善2型糖尿病（T2DM）合并代谢相关脂肪性肝病（MAFLD）的潜在机制。**方法**　取血糖水平＞11.1 mmol/L的db/db小鼠（即T2DM模型小鼠）32只，分为模型组，小檗碱低、高剂量组[100、200 mg/（kg·d）]和二甲双胍组[300 mg/（kg·d）]，每组8只；另取wt/wt小鼠8只，作为正常对照组。各组小鼠灌胃相应药液或水，每天1次，持续6周。观察小鼠实验期间的体重变化，并分析其末周体重差异；末次给药后，观察各组小鼠的体型，检测其空腹血糖（FBG）水平和血脂指标[总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）]含量；检测其空腹胰岛素（FINS）水平并计算胰岛素抵抗指数（HOMA-IR）和胰岛素敏感性指数（ISI）；检测其肝脏质量、肝脏指数和血清肝功能指标[丙氨酸转氨酶（AST）、天冬氨酸转氨酶（ALT）]水平，观察肝组织病理学变化，检测其肝组织中脂肪酸合成相关蛋白[固醇调节元件结合蛋白1（SREBP1）、脂肪酸合酶（FASN）、乙酰辅酶A羧化酶1（ACC1）]的表达。收集正常对照组、模型组、小檗碱高剂量组小鼠血清样本，进行非靶向脂质组学分析并验证。**结果**　与模型组比较，小檗碱低、高剂量组小鼠肝组织细胞排列紊乱、脂质空泡等病理改变均得以改善；其末周体重，FBG水平，TC、TG、LDL-C含量，HOMA-IR（小檗碱低剂量组除外），肝脏质量和肝脏指数，AST、ALT水平，以及SREBP1、FASN、ACC1蛋白的表达均显著降低或下调，而HDL-C含量、FINS水平（小檗碱高剂量组除外）、ISI（小檗碱低剂量组除外）均显著升高（$P<0.05$）。共鉴定出21个潜在差异代谢物，含多种神经酰胺；上述代谢物主要富集于鞘脂代谢、甘油磷脂代谢等通路；验证实验结果显示，高剂量小檗碱可显著降低模型小鼠血清神经酰胺含量（$P<0.05$）。**结论**　小檗碱可减轻T2DM合并MAFLD小鼠的胰岛素抵抗，改善其肝脏受损和脂质沉积，上述作用可能与降低神经酰胺含量有关。

关键词　小檗碱；2型糖尿病；代谢相关脂肪性肝病；非靶向脂质组学分析；鞘脂代谢；神经酰胺

Study on the mechanism of berberine in improving diabetes mellitus type 2 combined with metabolic-associated fatty liver disease

LI Yi, KANG Shuyu, WANG Qiwen, HUANG Manting, ZENG Congyan, TONG Jun, DONG Gengting（Pharmacology Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine/Hospital Preparation Transformation Branch, National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Zhongshan 528400, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the potential mechanism of berberine improving diabetes mellitus type 2 (T2DM) combined with metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) by regulating ceramide. **METHODS** Thirty-two db/db mice with blood glucose levels＞11.1 mmol/L (T2DM model) were divided into four groups: model group, berberine low- and high-dose groups [100, 200 mg/(kg·d)] and metformin group [300 mg/(kg·d)], with 8 mice in each group. Additionally, 8 wt/wt mice were selected as the normal control group. Mice in each group were administered the corresponding drug solution or water by gavage once daily for a continuous period of 6 weeks. During the experiment, the body weight of the mice was monitored, and the differences in final body weight were analyzed. After the last administration, the body shape of the mice in each group was observed, and their fasting blood glucose (FBG) and the lipid indicators [total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C)] were measured. Fasting serum insulin (FINS) levels were also measured, and the insulin resistance index (HOMA-IR) and insulin sensitivity index (ISI) were calculated. Liver weight, liver index and serum liver function indicators [alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST)] were assessed, and hepatic histopathological changes were observed. Additionally, the expression of fatty acid synthesis-related proteins [sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1), fatty acid synthase (FASN), acetyl-

Δ **基金项目**　国家自然科学基金青年科学基金项目（No.82305119）；广东省中医药局中医药科研项目（No.20251433）；广州中医药大学校院联合科技创新基金项目（No.GZYZS2024U07）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：糖尿病及心血管活性药物评价和作用机制。E-mail：1796255334@qq.com

\# **通信作者**　助理研究员，博士。研究方向：糖尿病及心血管活性药物评价和作用机制。E-mail：donggengting@163.com

CoA carboxylase 1 (ACC1)] in liver tissue was examined. Serum samples from the normal control group, model group, and berberine high-dose group were collected for non-targeted lipidomics analysis and validation. **RESULTS** Compared with the model group, the pathological changes, including disordered liver tissue cell arrangement and lipid vacuoles, were significantly improved in the berberine low- and high-dose groups. The significant decreases or down-regulations were observed in body weight in the last week, as well as FBG, TC, TG, and LDL-C levels, HOMA-IR (except for the berberine low-dose group), liver weight, liver index, AST and ALT levels, and protein expressions of SREBP1, FASN and ACC1. Additionally, HDL-C levels, FINS (except for the berberine high-dose group), and ISI (except for the berberine low-dose group) were significantly increased ($P<0.05$). A total of 21 potential differential metabolites, including multiple types of ceramides, were identified; these metabolites were primarily enriched in sphingolipid metabolism and glycerophospholipid metabolism pathways. Verification experiments confirmed that high-dose berberine significantly reduced the serum content of ceramide in model mice ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Berberine reduces insulin resistance, improves liver damage and lipid accumulation in the T2DM combined with MAFLD mice, and these effects may be related to the reduction of ceramide content.

KEYWORDS berberine; diabetes mellitus type 2; metabolic-associated fatty liver disease; non-targeted lipidomics analysis; sphingolipid metabolism; ceramide

2型糖尿病(diabetes mellitus type 2,T2DM)是发病率较高的慢性疾病之一,给全球造成了严重的疾病负担。胰岛素抵抗(insulin resistance,IR)可累及多个脏器,是T2DM发生的核心机制,也是T2DM相关并发症发生的关键环节。代谢相关脂肪性肝病(metabolic-associated fatty liver disease,MAFLD)是T2DM常见的并发症之一,超过70%的T2DM患者合并有MAFLD[1]。研究指出,在IR状态下,肝脏糖代谢受损、脂质合成增加,导致游离脂肪酸(free fatty acid,FFA)蓄积和MAFLD形成,从而加剧代谢紊乱[2]。鞘脂是细胞膜的重要组分,参与信号转导和细胞凋亡等过程[3]。其中,神经酰胺(ceramide,Cer)作为脂质代谢的关键中间体,可通过促进肝脏、心脏等组织器官的脂质沉积,诱发IR、血脂异常及细胞凋亡[4];同时,当发生脂代谢紊乱时,肝脏Cer的合成将明显增加,从而抑制脂肪酸β氧化,促进肝脏脂肪变性和MAFLD发生[5]。

小檗碱是从中药黄连中分离提取的一种季铵生物碱,具有抗菌、抗癌、降血脂、抗糖尿病和止泻等多种药理活性,可用于肥胖、糖尿病、高脂血症、心力衰竭等症的防治[6]。临床研究表明,小檗碱可用于T2DM合并MAFLD的治疗,且在降血糖、降血脂、减轻IR方面具有积极作用[7]。基于以上特性,本课题拟进一步探究该成分对肝脏脂质堆积的改善作用,并借助非靶向脂质组学对其分子机制进行初步分析,以期为小檗碱用于T2DM相关代谢性疾病的治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括VICTOR Nivo型多功能酶标仪(美国PerkinElmer公司)、PES-QN4型双独立高电流电泳电源(广州道一科学技术有限公司)、Chemi-Doc MP型化学发光成像系统[伯乐生命医学产品(上海)有限公司]、DP08L339P型血糖仪(德国Bayer公司)、X500R Q-TOF型质谱仪(美国SCIEX公司)、Waters H Class Plus型液相色谱仪(美国Waters公司)等。

1.2 主要药品与试剂

小檗碱原料药(批号2086-83-1,纯度99%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;盐酸二甲双胍对照品(阳性对照,批号C12561877,纯度97%)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;血糖试纸(批号DP3LM3F32D)购自德国Bayer公司;血清总胆固醇(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)、丙氨酸转氨酶(alanine transaminase,ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase,AST)检测试剂盒(批号分别为A111-1-1、A110-1-1、A113-1-1、A112-1-1、C009-2-1、C010-2-1)均购自南京建成生物工程研究所;小鼠空腹胰岛素(fasting serum insulin,FINS)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(批号TAE-358M)购自天津安诺瑞康生物有限公司;小鼠Cer ELISA检测试剂盒(批号MM-47251M1)购自江苏酶免实业有限公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样缓冲液(5×)、RIPA裂解液(强)、BCA试剂盒(批号分别为A039241204、A150241220、XK357435)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(批号0000329585)购自美国Millipore公司;兔抗固醇调节元件结合蛋白1(sterol regulatory element-binding protein 1,SREBP1)、脂肪酸合酶(fatty acid synthase,FASN)、乙酰辅酶A羧化酶1(acetyl-CoA carboxylase 1,ACC1)、β-肌动蛋白(β-actin)多克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号分别为AF4728、DF6106、AF6421、AF7018、S0001)均购自美国Affinity公司。

1.3 实验动物

本研究所用动物为SPF级雄性BKS-db(db/db)小鼠(32只)和雄性BKS-wt(wt/wt)小鼠(8只),3～4周龄,体重(15±3)g,购自广东药康生物科技有限公司,生产许可证号为SCXK(粤)2023-0067。所有小鼠均饲养于广州中医药大学附属中山中医院中药药理实验室的屏障

级动物房（温度22～24 ℃、相对湿度60%～70%、每12 h光照/黑暗交替）内。本研究方案已通过该院实验动物伦理委员会审查批准（批准编号AEWC-2024350）。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

所有小鼠适应性喂养1周后，选择血糖水平＞11.1 mmol/L[8]的db/db小鼠（即T2DM模型小鼠）32只，按体重分为模型组，小檗碱低、高剂量组[100、200 mg/（kg·d），以0.5%羧甲基纤维素钠溶液为溶剂，剂量参考相关文献[9]和预实验结果设置]和二甲双胍组[300 mg/（kg·d），剂量参考临床剂量[10]和预实验结果设置]，每组8只；取wt/wt小鼠8只，作为正常对照组。各药物组小鼠灌胃相应药液，正常对照组和模型组小鼠灌胃等体积水，每天1次，持续6周。实验期间，各组小鼠均正常摄食、饮水。

2.2 体重、体型观察及取材

实验期间，每周测定各组小鼠体重并分析其末周体重差异。末次给药并禁食、不禁水6 h后，于各组小鼠尾尖取血，采用血糖仪检测其空腹血糖（fasting blood glucose，FBG）水平。随后，以异氟烷吸入麻醉各组小鼠，摘眼球取血并以颈椎脱臼法处死，观察其体型并拍照；所取血样于常温下静置1 h后，以3 500 r/min离心10 min，分离上层血清，于－80 ℃下保存，备测。剖取大鼠肝脏，观察外观并拍照；称重后，取部分用4%多聚甲醛溶液固定，其余部分于－80 ℃下保存，备测。

2.3 血脂及肝功能指标检测

取“2.2”项下各组小鼠血清样品适量，按照相应试剂盒说明书操作，使用酶标仪于特定波长下检测其血清中TC、TG、LDL-C、HDL-C含量和ALT、AST水平。同时，按下式计算肝脏指数：肝脏指数＝肝脏质量/小鼠体重×100%。

2.4 FINS检测及相关参数计算

取“2.2”项下各组小鼠血清样品适量，按照相应ELISA试剂盒说明书操作，使用酶标仪检测其血清FINS水平，并按下式计算胰岛素抵抗指数（HOME-IR）、胰岛素敏感性指数（ISI）：HOMA-IR＝（FINS×FBG）/22.5；ISI＝1/（FINS×FBG）[11]。

2.5 肝组织病理学观察

取“2.2”项下各组小鼠经4%多聚甲醛溶液固定的肝组织适量，以甲苯、乙醇梯度脱水后，行常规石蜡包埋、切片（厚度约4 μm）；取切片，经苏木精-伊红（HE）染色后，使用显微镜观察其肝组织病理学改变并拍照。

2.6 肝组织中脂肪酸合成相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.2”项下各组小鼠冻存的肝组织适量，加入RIPA裂解液（含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂），匀浆，于4 ℃下以12 000 r/min离心15 min，取上清液；上清液经BCA法测定蛋白浓度后，于100 ℃下加热10 min变性。取变性蛋白适量，进行10%SDS-PAGE分离，再转至PVDF膜上，以5%脱脂牛奶封闭1.5 h；洗膜后，加入脂肪酸合成相关蛋白（SREBP1、FASN、ACC1）和内参蛋白（β-actin）一抗（稀释度均为1∶1 000），于4 ℃下孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释度为1∶10 000），于室温下孵育1.5 h；再次洗膜后，以ECL发光液显色，并于化学发光成像系统下成像。使用Image J软件分析目的蛋白与内参蛋白的条带灰度值比值，用以表示目的蛋白的相对表达量。

2.7 潜在作用靶点挖掘与验证

2.7.1 基于非靶向脂质组学的潜在靶点挖掘

（1）样本处理：取“2.2”项下正常对照组、模型组、小檗碱高剂量组小鼠血清样品各20 μL，加甲醇225 μL，涡旋混匀5 s，加入甲基叔丁基醚750 μL，于室温下静置30 min；加水188 μL，涡旋混匀20 s，于室温下静置10 min，于4 ℃下以12 000 r/min离心15 min；取上清液700 μL，以氮气流吹干，残渣加入复溶液（异丙醇-乙腈-水，30∶65∶5，*V*/*V*/*V*）100 μL，涡旋混匀30 s，再于4 ℃下以12 000 r/min离心10 min，取上清液，备测。取上述各组样本上清液5 μL，混匀，作为质控（quality control，QC）样品，用于检验系统的稳定性。

（2）色谱与质谱条件：取上述待测样品和QC样品各适量，采用液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用（LC-Q-TOF-MS）技术进行检测。以Phenomenex Kinetex C_{18}（2.1 mm×100 mm，2.6 μm）为色谱柱，以水-乙腈-甲醇（3∶1∶1，*V*/*V*/*V*；含5 mmol/L乙酸铵）为流动相A、异丙醇（含5 mmol/L乙酸铵）为流动相B进行梯度洗脱（0～0.5 min，20%B；0.5～2 min，20%B→40%B；2～4 min，40%B→60%B；4～12.5 min，60%B→98%B；12.5～14 min，98%B；14～14.1 min，98%B→20%B；14.1～17 min，20%B）；流速为0.3 mL/min；柱温为40 ℃；进样量为1 μL。采用电喷雾离子源，于正、负离子模式下进行飞行时间质谱一、二级扫描，扫描范围分别为*m*/*z* 10～1 500、*m*/*z* 200～1 500；离子源温度为500 ℃；离子源电压分别为5 500 V（正离子）、－4 500 V（负离子）；去簇电压分别为80 V（正离子）、－80 V（负离子）；碰撞电压分别为（40±20）V（正离子）、－（40±20）V（负离子）。

（3）数据处理：收集样品的色谱、质谱信息，采用SCIEX OS软件进行峰校准、峰提取和归一化处理，并基于所获样品离子信息、保留时间等构建多变量数据矩阵。以归一化后的峰面积为变量，采用SCIEX OS软件进行无监督的主成分分析（principal component analysis，PCA）、偏最小二乘法-判别分析（partial least squares-discriminant analysis，PLS-DA）及100次置换检验，以评估模型的可靠性。对检测到的所有代谢物进行差异分析，并计算其变量重要性投影（variable importance in projection，VIP），以VIP＞1、组间差异倍数（fold change，FC）＞1.50或＜0.67、方差分析所得P＜0.05为标准，筛选潜在差异代谢物[12]；根据质谱信息，利用HMDB数据库（http://hmdb.ca/），初步确定潜在差异代谢物的结构；利用MetaboAnalyst 6.0在线平台（http://www.metaboanalyst.ca/）进行代谢通路富集分析，以通路影响（pathway impact）值＞0.10（该阈值通过路径拓扑分析计算而得）为标准，筛选潜在代谢途径[13]。

2.7.2　基于ELISA实验的潜在靶点验证

取“2.2”项下正常对照组、模型组、小檗碱高剂量组小鼠血清样品各适量，按照相应ELISA试剂盒说明书操作，使用酶标仪检测其血清中“2.7.1”项下所得潜在靶点的含量。

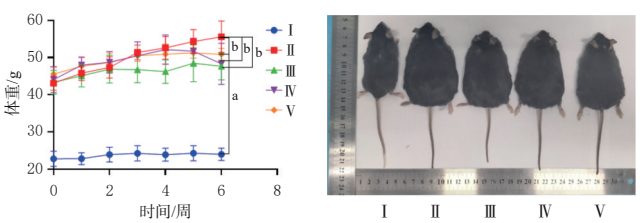
2.8　统计学方法

采用SPSS 27.0软件对数据进行统计分析。若实验数据符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　小檗碱对小鼠体重、体型、FBG水平的影响

与正常对照组[体重(23.99±1.64)g、FBG水平(5.24±1.08)mmol/L]比较，模型组小鼠体型明显肥胖，末周体重[(55.60±4.26)g]和FBG水平[(30.03±3.27)mmol/L]均显著升高($P<0.05$)；与模型组比较，二甲双胍组、小檗碱低剂量组、小檗碱高剂量组小鼠体型均有所减小，其末周体重[(47.70±3.69)、(48.30±5.54)、(50.89±1.61)g]和FBG水平[(19.89±5.77)、(23.21±5.80)、(17.85±5.30)mmol/L]均显著降低($P<0.05$)。结果见图1。



Ⅰ：正常对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：二甲双胍组；Ⅳ：小檗碱低剂量组；Ⅴ：小檗碱高剂量组；a：与正常对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较：$P<0.05$。

图1　各组小鼠体重及体型比较

3.2　小檗碱对小鼠血脂指标的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠血清TC、TG、LDL-C含量均显著升高，HDL-C含量显著降低($P<0.05$)；与模型组比较，各药物组小鼠血清TC、TG、LDL-C含量均显著降低，HDL-C含量均显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

表1　各组小鼠血清血脂水平比较($\bar{x}\pm s$,$n=8$)

组别	TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	LDL-C/(mmol/L)	HDL-C/(mmol/L)
正常对照组	5.35±1.12	1.55±0.31	2.34±0.55	5.18±0.88
模型组	8.58±1.05[a]	6.22±1.84[a]	4.16±0.90[a]	3.29±1.08[a]
二甲双胍组	5.78±0.99[b]	3.36±0.71[b]	3.14±0.45[b]	5.67±1.17[b]
小檗碱低剂量组	6.50±1.75[b]	2.04±0.51[b]	3.23±0.50[b]	6.68±0.96[b]
小檗碱高剂量组	5.31±1.15[b]	1.59±0.31[b]	3.19±0.50[b]	8.39±1.05[b]

a：与正常对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.3　小檗碱对小鼠血清FINS、HOMA-IR、ISI的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠血清FINS水平、ISI均显著降低，HOMA-IR显著升高($P<0.05$)；与模型组比较，二甲双胍组、小檗碱低剂量组小鼠血清FINS水平和小檗碱高剂量组小鼠ISI均显著升高，二甲双胍组和小檗碱高剂量组小鼠HOMA-IR均显著降低($P<0.05$)。结果见表2。

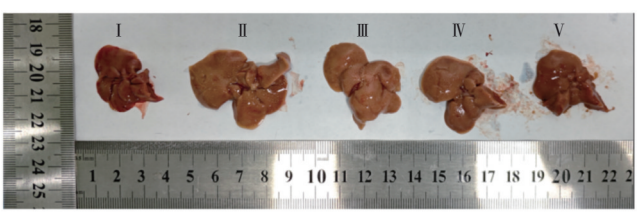
表2　各组小鼠血清FINS、HOMA-IR、ISI比较($\bar{x}\pm s$,$n=8$)

组别	FINS/(mU/L)	HOMA-IR	ISI($\times10^{-3}$)
正常对照组	22.92±4.32	5.39±1.80	8.97±2.61
模型组	18.29±2.90[a]	24.65±5.90[a]	1.90±0.48[a]
二甲双胍组	23.24±4.47[b]	20.91±8.88[b]	2.46±0.92
小檗碱低剂量组	22.50±2.87[b]	22.97±5.89	2.07±0.60
小檗碱高剂量组	19.44±1.73	15.57±5.33[b]	3.18±1.14[b]

a：与正常对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.4　小檗碱对小鼠肝脏及相关指标的影响

正常对照组小鼠肝脏较小，颜色鲜红；与正常对照组比较，模型组小鼠肝脏体积增大，且颜色偏白，其肝脏质量、肝脏指数和血清ALT、AST水平均显著升高($P<0.05$)；与模型组比较，各药物组肝脏体积有所缩小，颜色稍红，其肝脏质量、肝脏指数和血清ALT、AST水平均显著降低($P<0.05$)。结果见图2、表3。



Ⅰ：正常对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：二甲双胍组；Ⅳ：小檗碱低剂量组；Ⅴ：小檗碱高剂量组。

图2　各组小鼠肝脏外观比较

表3　各组小鼠肝脏质量、肝脏指数和血清ALT、AST水平比较($\bar{x}\pm s$,$n=8$)

组别	肝脏质量/g	肝脏指数/%	ALT/(U/L)	AST/(U/L)
正常对照组	1.12±0.10	4.36±0.29	58.57±23.01	88.67±28.66
模型组	3.39±0.16[a]	6.59±0.46[a]	154.83±33.34[a]	150.13±34.27[a]
二甲双胍组	2.75±0.29[b]	5.36±0.43[b]	84.53±36.13[b]	88.12±32.26[b]
小檗碱低剂量组	2.61±0.30[b]	4.62±0.39[b]	79.62±19.86[b]	83.05±31.52[b]
小檗碱高剂量组	2.44±0.32[b]	4.74±0.48[b]	72.79±20.31[b]	74.44±24.49[b]

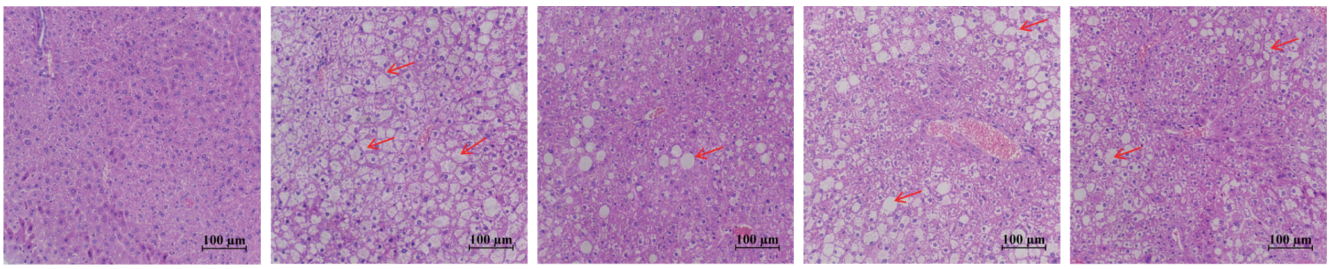
a：与正常对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.5　小檗碱对小鼠肝组织病理学的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠肝细胞结构不完整，细胞排列紊乱，脂质空泡明显，肝索结构受损严重；与模型组比较，各药物组小鼠肝细胞排列趋于整齐，脂质空泡减少，其中小檗碱高剂量组小鼠肝组织中少见脂质空泡。结果见图3。

3.6　小檗碱对小鼠肝组织中脂肪酸合成相关蛋白表达的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠肝组织中SREBP1、FASN、ACC1蛋白的表达均显著上调($P<0.05$)；与模型组比较，各药物组小鼠肝组织中SREBP1(二甲双胍组除外)、FASN、ACC1蛋白的表达均显著下调($P<0.05$)。结果见表4(限于篇幅，蛋白电泳图可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图1)。



A. 正常对照组　B. 模型组　C. 二甲双胍组　D. 小檗碱低剂量组　E. 小檗碱高剂量组

红色箭头：脂质空泡。

图3　各组小鼠肝组织病理学观察的显微图（HE染色）

表4　各组小鼠肝组织中脂肪酸合成相关蛋白表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	SREBP1/β-actin	FASN/β-actin	ACC1/β-actin
正常对照组	0.58±0.31	0.47±0.14	0.60±0.10
模型组	1.14±0.15[a]	0.95±0.09[a]	1.04±0.11[a]
二甲双胍组	0.86±0.36	0.57±0.17[b]	0.59±0.05[b]
小檗碱低剂量组	0.73±0.15[b]	0.40±0.22[b]	0.41±0.10[b]
小檗碱高剂量组	0.56±0.25[b]	0.50±0.20[b]	0.34±0.12[b]

a：与正常对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.7　潜在作用靶点挖掘与验证结果

3.7.1　潜在靶点挖掘结果

（1）多元统计分析结果：PCA结果显示，正、负离子模式下，QC样品紧密聚集，表明检验系统稳定、可靠；正常对照组、模型组、小檗碱高剂量组组内聚集良好，且组间基本分离，表明各组样品存在差异。PLS-DA结果显示，正常对照组与模型组、模型组与小檗碱高剂量组组间分离明显；由100次置换检验分析结果可知，模型未出现过度拟合，具有较好的预测能力和稳定性（限于篇幅，多元统计分析结果可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图2）。

（2）潜在差异代谢物的筛选与鉴定：从正常对照组与模型组中共检出化合物2 258个，其中表达差异明显的有550个（上调217个、下调333个）；从模型组与小檗碱高剂量组中共检出化合物2 256个，其中表达差异明显的有495个（上调188个、下调307个）；以VIP＞1、FC＞1.50或＜0.67、$P<0.05$为标准，通过比对HMDB数据库，初步确定潜在差异代谢物21个（正离子模式下18个、负离子模式下3个），包括多种Cer（限于篇幅，潜在差异代谢物鉴定结果可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附表1）。

（3）代谢通路分析：上述潜在差异代谢物主要富集于鞘脂代谢、甘油磷脂代谢、糖基磷脂酰基醇锚定生物合成、类固醇生物合成等代谢通路（限于篇幅，通路富集结果可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图3）。

3.7.2　潜在靶点的验证结果

由上述富集通路发现，潜在差异代谢物与鞘脂代谢密切关联，而Cer是鞘脂代谢的核心分子[3]，故本研究进一步对各组小鼠血清Cer含量进行检测。结果显示，与正常对照组[（44.54±4.94）ng/L]比较，模型组小鼠血清Cer含量[（70.54±5.79）ng/L]显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，小檗碱高剂量组小鼠血清Cer含量[（44.96±8.09）ng/L]显著降低（$P<0.05$）。

4　讨论

T2DM合并MAFLD的发病率较高，且临床尚无特效治疗药物，故探讨该疾病的病因病机并开发有效治疗药物具有重要意义[14]。研究显示，db/db小鼠是研究T2DM及其代谢相关肝脏病变的经典模型，在正常饲养条件下即可并发高血糖和肝脏脂质代谢紊乱[15]，因此本研究选用db/db小鼠作为T2DM合并MAFLD模型小鼠以探讨小檗碱的具体作用机制。本研究结果表明，与正常对照组小鼠比较，模型组小鼠体型肥胖，末周体重、FBG水平、肝脏质量和肝脏指数均显著升高，肝脏变大且可见明显的脂质空泡和严重受损的肝索结构；与模型组比较，小檗碱低、高剂量组小鼠上述指标均有不同程度回调，肝脏脂质沉积等病理改变明显减轻，提示小檗碱能有效改善模型小鼠的肝脏病变，恢复其糖脂代谢稳态。

在T2DM发生过程中，IR（通过HOMA-IR和ISI量化）可导致脂肪细胞葡萄糖摄取减少、脂肪分解增多，从而释放大量的FFA进入肝脏，促使TC、TG合成增加，LDL-C水平升高，以及HDL-C水平降低，从而加剧肝脏脂质沉积，引发肝细胞脂肪变性，最终形成MAFLD[16]。同时，IR可引起SREBP1蛋白表达失调，从而过度激活FASN和ACC1表达，促进脂肪从头合成，进而加剧肝脏脂质代谢紊乱及脂质沉积[17]。本研究结果表明，与正常对照组比较，模型组小鼠血清TC、TG、LDL-C含量和ALT、AST水平均显著升高，肝组织中SREBP1、FASN、ACC1蛋白的表达均显著上调，血清FINS水平、ISI、HDL-C含量均显著降低；与模型组比较，小檗碱低、高剂量组小鼠上述指标均有不同程度回调，提示小檗碱能改善模型小鼠的IR，调节其脂质代谢并改善其肝功能。上述作用的发挥可能与小檗碱下调SREBP1、FASN、ACC1蛋白的表达，进而改善肝脏脂肪酸代谢有关。

鞘脂代谢与T2DM之间具有密切关联，其中Cer是一类重要的鞘脂类分子，广泛参与细胞信号转导、凋亡、代谢调控等环节[3]。Cer作为潜在靶点，与急性肾损伤、心血管疾病、代谢性疾病密切相关，其在上述疾病治疗中的作用（尤其是在肝脏损伤治疗中的作用）备受学界

关注[18-19]。研究证实，Cer含量的异常升高会驱动肝脏脂质沉积、加速MAFLD进展[5]；同时，高表达的Cer可通过抑制胰岛素信号通路来诱导IR的发生，并通过多种途径激活SREBP1蛋白的表达，进而引发肝脏脂质代谢紊乱；此外，高表达的Cer还能抑制线粒体脂肪酸β氧化，促进脂质在肝细胞内的蓄积，最终导致脂肪性肝病的发生发展[20]。现有文献指出，小檗碱可通过调节Cer含量来影响糖原合成酶激酶3、蛋白激酶B的活性，从而改善IR[21]；小檗碱还可通过降低Cer含量来抑制核因子κB和c-Jun氨基端蛋白激酶等炎症信号通路的活化，从而发挥抗氧化、抗炎作用，减轻氧化应激、炎症对肝脏及其他组织的损害[22]。本研究通过非靶向脂质组学技术，系统分析了T2DM合并MAFLD小鼠血清代谢谱的变化及小檗碱的潜在作用靶点。PCA、PLS-DA结果显示，小檗碱高剂量组与模型组组间分离明显，提示该成分可能改变模型小鼠的脂质代谢网络；共筛选并鉴定出21个潜在差异代谢物，主要富集于鞘脂代谢、甘油磷脂代谢、糖基磷脂酰基醇锚定生物合成、类固醇生物合成等代谢通路。基于Cer与鞘脂代谢的关联[3]，本研究进一步对大鼠血清Cer含量进行了检测，结果显示，模型组小鼠血清Cer含量较正常对照组显著升高，而小檗碱高剂量组小鼠血清Cer含量较模型组显著降低，与非靶向代谢组学的分析结果一致。

综上所述，小檗碱可减轻T2DM合并MAFLD小鼠的IR，改善其肝脏受损及脂质沉积，上述作用可能与其降低Cer含量有关。本研究后续将继续探究小檗碱对鞘脂代谢的调控作用，并阐明其改善T2DM合并MAFLD的具体机制。

参考文献

[1] 陈兆斌，黄丽媛，王炳元，等. 代谢相关脂肪性肝病与2型糖尿病的关系及共病机制研究进展[J]. 临床肝胆病杂志，2023，39(10)：2454-2459.

[2] MARUŠIĆ M，PAIĆ M，KNOBLOCH M，et al. NAFLD，insulin resistance，and diabetes mellitus type 2[J]. Can J Gastroenterol Hepatol，2021，2021：6613827.

[3] JIANG J，GAO Y Q，WANG J，et al. Hepatic sphingomyelin phosphodiesterase 3 promotes steatohepatitis by disrupting membrane sphingolipid metabolism[J]. Cell Metab，2025，37(5)：1119-1136.e13.

[4] CHAURASIA B，SUMMERS S A. Ceramides in metabolism：key lipotoxic players[J]. Annu Rev Physiol，2021，83：303-330.

[5] ZHANG Y，WANG X M，LIN J，et al. A microbial metabolite inhibits the HIF-2α-ceramide pathway to mediate the beneficial effects of time-restricted feeding on MASH [J]. Cell Metab，2025，37(3)：788.

[6] 武鑫华，荀思佳，吴文轩，等. 黄连的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报，2024，52(7)：110-116.

[7] 陈浩英. 2型糖尿病伴脂肪肝患者临床治疗中予以盐酸小檗碱治疗对临床症状的改善作用[J]. 黑龙江中医药，2021，50(4)：6-7.

[8] ZHOU D Y，CHEN L J，MOU X. Acarbose ameliorates spontaneous type-2 diabetes in db/db mice by inhibiting PDX-1 methylation[J]. Mol Med Rep，2021，23(1)：72.

[9] 郝明月. 小檗碱通过调控AMPK/Nrf2通路减轻代谢相关脂肪性肝病程序性坏死的机制研究[D]. 天津：天津医科大学，2021.

[10] 马晓伟，王立哲，王相斌，等. 二甲双胍对2型糖尿病合并脑卒中患者NLRP3/caspase-1通路的影响[J/OL]. 成都医学院学报，2025：1-10[2025-04-20]. https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx filename=CDYU202504140-04&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ.

[11] 洪雨欣，张蕾，周明学，等. 清血消脂降糖方对2型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响及机制[J]. 中国药房，2025，36(1)：24-29.

[12] 唐杰，邱华明，李子祥，等. 2型糖尿病气阴两虚证大鼠血浆脂质组学探究[J/OL]. 辽宁中医杂志，2025：1-19[2025-03-20]. https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx filename=LNZY2025021401Q&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ.

[13] CHEN S J，ZHANG H S，HUANG X P，et al. Metabolomic characterization of congenital microtia：a possible analysis for early diagnosis[J]. Ann Transl Med，2022，10(24)：1330.

[14] 黄冬梅，陈秀林，林之源. 2型糖尿病合并代谢相关脂肪性肝病的研究进展[J]. 右江医学，2025，53(4)：371-376.

[15] NESTERUK M，HENNIG E E，MIKULA M，et al. Mitochondrial-related proteomic changes during obesity and fasting in mice are greater in the liver than skeletal muscles[J]. Funct Integr Genomics，2014，14(1)：245-259.

[16] 魏胜. 胰岛素抵抗替代指标(甘油三酯-葡萄糖指数和胰岛素抵抗代谢评分)与代谢功能障碍相关的脂肪性肝病的相关性研究[D]. 南昌：南昌大学，2024.

[17] BO T，GAO L，YAO Z Y，et al. Hepatic selective insulin resistance at the intersection of insulin signaling and metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease[J]. Cell Metab，2024，36(5)：947-968.

[18] SUMMERS S A. Editorial：the role of ceramides in diabetes and cardiovascular disease[J]. Front Endocrinol (Lausanne)，2021，12：667885.

[19] WEBER-STOUT M，SUMMERS S A，HOLLAND W L. Writing and erasing ceramides to alter liver disease[J]. Nat Metab，2023，5(5)：727-729.

[20] PETERSEN M C，SHULMAN G I. Roles of diacylglycerols and ceramides in hepatic insulin resistance[J]. Trends Pharmacol Sci，2017，38(7)：649-665.

[21] 夏青松. 小檗碱抑制肝脏缺氧和神经酰胺合成改善胰岛素抵抗的机制研究[D]. 武汉：华中科技大学，2023.

[22] KALMARZI R N，NALEINI S N，ASHTARY-LARKY D，et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of barberry (*Berberis vulgaris*) and its main compounds [J]. Oxid Med Cell Longev，2019，2019：6183965.

（收稿日期：2025-03-28　修回日期：2025-07-09）

（编辑：张元媛）