# 余甘子水提物对糖尿病模型大鼠脂质代谢紊乱和胰岛素抵抗的改善作用及机制研究Δ

钟绍金[1,2*]，韩珊颖[2#]，何小爱[2]，黄裕昌[3]（1.上海市第六人民医院-海口市骨科与糖尿病医院药学部，海口 570000；2.中南大学湘雅医学院附属海口医院药学部，海口 570208；3.海南省药物研究所，海口 570311）

**中图分类号** R965.1　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408(2023)03-0327-06
**DOI** 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.03.14

**摘　要　目的** 探讨余甘子水提物改善糖尿病模型大鼠脂质紊乱和胰岛素抵抗（IR）的作用及可能机制。**方法** 雄性SD大鼠进行IR造模，并随机分为模型组、阳性对照组和余甘子水提物高、中、低剂量组，另设空白组，每组各10只。余甘子水提物高、中、低剂量组大鼠分别给予800、400、200 mg/kg余甘子水提物稀释液，阳性对照组大鼠给予2.7 mg/kg吡格列酮溶液，空白组和模型组大鼠给予等体积生理盐水，每日灌胃1次，连续4周。观察大鼠一般状态并测定其体质量及血清脂代谢指标[三酰甘油（TG）、总胆固醇（TC）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）]水平；应用酶联免疫吸附法测定并计算其血清空腹胰岛素（FINS）、胰岛素抵抗指数（IRI）及胰岛素敏感指数（ISI）；通过苏木素-伊红染色观察其肝组织病理形态；通过碘酸-雪夫（PAS）染色法观察其肝组织糖原表达情况，并计算染色面积；采用Western blot法检测其肝组织中氧化物酶增殖体激活受体γ（PPARγ）、核因子κB（NF-κB）、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶（p-AMPK）蛋白表达。**结果** 与空白组比较，模型组大鼠多饮、多食、多尿现象明显，其血清中TC、TG、LDL-C、FINS水平和IRI显著升高（$P<0.05$），ISI显著降低（$P<0.05$）；肝小叶结构明显紊乱，肝细胞多发变形、肿大，且有许多脂质沉积和脂肪空泡；糖原PAS染色面积显著减小（$P<0.05$）；PPARγ、p-AMPK蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$），NF-κB蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，余甘子水提物高、中剂量组大鼠精神状态、肝组织病理形态及糖原表达情况均明显好转，以上指标水平均显著逆转（$P<0.05$）。**结论** 余甘子水提物可能通过激活PPARγ/AMPK/NF-κB信号通路，改善IR模型大鼠的糖脂代谢紊乱、肝功能和IR。

**关键词** 余甘子水提物；糖尿病；脂质代谢；胰岛素抵抗；氧化物酶增殖体激活受体γ；核因子κB；磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶

## Study on the improvement effects and mechanism of *Phyllanthus emblica* water extracts on insulin resistance and lipid metabolism disorder in diabetic model rats

ZHONG Shaojin[1,2], HAN Shanying[2], HE Xiaoai[2], HUANG Yuchang[3] (1. Dept. of Pharmacy, Shanghai Sixth People's Hospital-Haikou Orthopaedic and Diabetes Hospital, Haikou 570000, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Haikou Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University, Haikou 570208, China; 3. Hainan Institute of Pharmacy, Haikou 570311, China)

**ABSTRACT　OBJECTIVE** To investigate the improvement effects and possible mechanism of *Phyllanthus emblica* water extracts on lipid metabolism disorder and insulin resistance (IR) in diabetic model rats. **METHODS** IR model of male SD rats was established and randomly divided into model group, positive control group, *P. emblica* water extracts high-dose, medium-dose and low-dose groups, and another blank group was set up, with 10 rats in each group. *P. emblica* water extracts high-dose, medium-dose and low-dose groups were given *P. emblica* water extract diluent at the doses of 800, 400 and 200 mg/kg respectively; positive control group was given pioglitazone solution 2.7 mg/kg; blank group and model group were given the same volume of normal saline, by intragastrical administration, once a day, for consecutive 4 weeks. The general state of rats was observed, and the body mass and the levels of serum lipid metabolism indexes [triacylglycerol (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C)] were measured; fasting insulin of serum (FINS), insulin resistance index (IRI) and insulin sensitivity index (ISI) were measured and calculated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological morphology of liver tissue was observed by hematoxylin-eosin staining; the expression of glycogen in the liver was observed by periodic acid-Schiff staining, and the staining area was calculated; the protein expressions of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ), nuclear factor κB (NF-κB) and AMP-activated protein kinase (AMPK) were detected by Western blot. **RESULTS** Compared with blank group, the rats in the model group had obvious symptoms of polydipsia, polyphagia and polyuria, and the

Δ**基金项目** 海南省重点研发计划项目（No.ZDYF2020171）

＊**第一作者** 副主任中药师，硕士。研究方向：药理学。E-mail：439238735@qq.com

\# **通信作者** 副主任药师。研究方向：药理学。电话：0898-68603845。E-mail：1339566230@qq.com

serum levels of TC, TG, LDL-C, FINS and IRI were significantly increased ($P<0.05$), while ISI was significantly reduced ($P<0.05$); the structure of hepatic lobule was obviously disordered, the liver cells were deformed and enlarged, and there were many lipid deposits and fat vacuoles; PAS staining area of glycogen was significantly reduced($P<0.05$); the protein expression levels of PPARγ and p-AMPK were significantly decreased ($P<0.05$), while the protein expression level of NF-κB was significantly increased ($P<0.05$). Compared with model group, the mental state of rats, liver histopathological morphology and glycogen expression were improved significantly in *P. emblica* water extracts high-dose and medium-dose groups; the levels of the above indicators were significantly reversed ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** *P. emblica* water extracts may improve glucose and lipid metabolism disorders, liver function and IR in IR model rats, and regulate IR by activating the PPARγ/AMPK/NF-κB signaling pathway.

**KEYWORDS** *Phyllanthus emblica* water extracts; diabetes; lipid metabolism; insulin resistance; peroxisome proliferator-activated receptor γ; nuclear factor κB; phosphorylated-adenosine monophosphate

胰岛素抵抗（insulin resistance，IR）是导致糖尿病发病的核心机制之一[1]。目前研究认为，IR的发生与肝脏的糖脂代谢异常及高炎症反应水平相关，通过调节肝脏糖脂代谢、改善IR是糖尿病治疗的有效手段[2]。过氧化物酶增殖体激活受体γ（peroxidase proliferator-activated receptor γ，PPARγ）主要表达于脂肪组织，可激活下游分子蛋白腺苷酸活化蛋白激酶（AMP-activated protein kinase，AMPK）并使其发生磷酸化，进而下调其下游信号分子核因子κB（nuclear factor κB，NF-κB）表达，抑制病理形态下细胞缺氧和复氧过程中的高炎症反应水平，从而降低氧化应激反应，恢复糖脂代谢平衡。糖脂代谢异常是糖尿病患者的主要特征，因此，有研究者推测PPARγ/AMPK/NF-κB信号通路异常与糖尿病患者IR现象存在一定的联系[3]。

余甘子为藏族药食两用常用药材，是大戟科叶下珠属植物余甘子*Phyllanthus emblica* L.的干燥成熟果实，富含多糖、多酚、皂苷、维生素等多种活性成分。现代研究证实，其具有保肝、调血脂、降血糖等多重作用[4]，长期服用可达到减少体质量、降糖及调脂等功效，具有改善肥胖状态的潜力[5]。自国内学者发现余甘子提取物可以有效降低糖尿病模型小鼠血糖水平后，余甘子在糖尿病领域的应用逐渐受到关注，探索其降糖的药理机制也成为研究热点[6]。体外研究证实，余甘子醇提物中多糖成分对α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶表现出剂量依赖性的抑制活性，显示出一定的降血糖和抗氧化作用[7]。余甘子提取物中的没食子酸在细胞水平能够影响PPARγ的表达，并调节其下游信号通路[8]。既往机制研究多集中于余甘子醇提物或提取物，而临床应用余甘子均为水煎剂，其降糖机制有待进一步研究，同时亦缺少动物模型来验证。本研究以余甘子水提物对IR模型大鼠进行干预，观察其对模型大鼠糖脂代谢的影响，并从PPARγ/AMPK/NF-κB信号通路角度出发初步探索其作用机制，以期为余甘子用于防治糖尿病提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

One Touch型血糖仪购自美国强生公司；BY-R320型低速冷冻离心机购自北京白洋医疗器械有限公司；Synergy2型多功能酶标仪购自美国Bio-Tek公司；AU680型全自动生化分析仪购自贝克曼库尔特商贸（中国）有限公司；DKB-8A型电热恒温水槽购自上海精宏实验设备有限公司；7500型实时荧光定量PCR仪购自美国ABI公司；DM1000型显微镜购自德国Leica公司；Invitrogen E-Gel Imager型凝胶成像仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

### 1.2 主要药品与试剂

余甘子（产自西藏，于2021年10月采集，经海南省药物研究所黄裕昌副主任药师鉴定为大戟科叶下珠属植物余甘子*P. emblica* L.的干燥果实）；链脲佐菌素（streptozotocin，STZ；批号ST1668，含量≥98%）购自美国Sigma公司；吡格列酮片（批号20200601，规格30 mg）购自杭州中美华东制药有限公司；戊巴比妥钠（批号P11011，纯度99.03%）购自德国默克公司；Trizol试剂、逆转录试剂盒（批号分别为S0175112、A0185623）均购自美国Thermo Fisher Scientific公司；所有酶联免疫吸附测定（ELISA）所需试剂盒，包括三酰甘油（triacylglycerol，TG）测定试剂盒（批号SP230142）、总胆固醇（total cholesterol，TC）测定试剂盒（批号SP240306）、低密度脂蛋白胆固醇（low-density lipoprotein cholesterol，LDL-C）测定试剂盒（批号SP210506）、高密度脂蛋白胆固醇（high-density lipoprotein cholesterol，HDL-C）测定试剂盒（批号SP251316）、空腹胰岛素（fasting serum insulin，FINS）测定试剂盒（批号SP160708）均购自武汉赛培生物科技有限公司；BCA蛋白定量试剂盒（批号P0012）购自上海碧云天生物技术有限公司；PCR引物由生工生物工程（上海）股份有限公司设计、合成；兔源PPARγ、NF-κB、AMPK、磷酸化AMPK（p-AMPK）、β-肌动蛋白（β-actin）一抗和Alexa Fluor®488标记的山羊抗兔IgG二抗均购自

美国Abcam公司。

### 1.3 动物

SPF级健康SD大鼠80只，雄性，约12周龄，体质量（238.56±17.17）g，由海南省药品检验所提供，实验动物使用许可证号为SYXK（琼）2021-0009。大鼠饲养于温度20～26 ℃、相对湿度（55±15）%的安静环境下，避免强光照射，按需饮水、摄食，均经1周基础饲料适应性喂养，再进行后续实验。本研究经中南大学湘雅医学院附属海口医院生物医学伦理委员会审核批准，伦理批件号为2020-（伦审）-252。

## 2 方法

### 2.1 余甘子水提物的制备与给药剂量

取新鲜余甘子，以清水进行清洗，去核，以果肉10倍量（mL/g）的蒸馏水浸泡0.5 h，再煎煮2次、每次1 h，过滤提取液，合并2次滤液，减压浓缩至约100 mL体积；加入适量4%明胶水溶液，边加热边搅拌，混匀后再次过滤去渣加入3倍体积的95%乙醇，作用24 h后，过滤，取滤液，浓缩至提取物相对密度为2 g/mL，保存备用。使用前以蒸馏水进行稀释。参考文献[9]，将余甘子的成人用量（3～9 g）换算为大鼠的给药剂量，采用800、400、200 mg/kg 3个剂量给药，分别相当于成人最低给药剂量的3、1.5、0.75倍等效剂量；参考文献[10]，由吡格列酮的成人剂量换算为大鼠的给药剂量（2.7 mg/kg）。按照大鼠5 mL/kg的体积进行灌胃。

### 2.2 分组、造模与给药

将80只SD大鼠按照体质量进行随机分组，其中10只为空白组，给予基础饲料喂养；其余70只根据参考文献[11]建立IR模型：大鼠以高糖高脂饲料连续喂养4周后，提前禁食12 h，空腹称其体质量，于左腹下侧单次注射STZ（溶剂为0.1 mol/L的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液），剂量为35 mg/kg。3 d后经尾部取血检测其空腹血糖（fasting plasma glucose，FPG）水平，测得FPG水平＞16.7 mmol/L并持续至少10 d则认为造模成功。最终有62只大鼠造模成功，取造模成功的大鼠50只随机分为模型组、阳性对照组和余甘子水提物高、中、低剂量组，每组各10只。余甘子水提物各剂量组大鼠给予相应浓度的余甘子水提物稀释液，阳性对照组大鼠给予配制好的吡格列酮溶液，空白组及模型组大鼠则给予等体积的生理盐水。所有大鼠每日灌胃1次，连续4周。

### 2.3 大鼠一般状态观察及体质量测定

于实验开始时及开始后的每一周均观察并记录大鼠的精神状态、毛发光泽度、摄食、饮水、尿量及体质量变化情况。称体质量时，大鼠需在空腹条件下至少禁食12 h，但不禁水。

### 2.4 标本采集

末次灌胃后第2天，以2%戊巴比妥钠溶液对大鼠进行腹腔注射麻醉后，经腹主动脉采血，以3 000 r/min离心10 min，取上清液存于－80 ℃条件下，备用。取血后将大鼠处死，迅速取其肝组织适量，以生理盐水清洗多次，之后置于液氮中冻存约30 min，取出后冻存于－80 ℃条件下，备用。另再取肝组织适量，以4%多聚甲醛固定处理24 h，用于肝组织苏木素-伊红（HE）染色及过碘酸-雪夫（periodic acid-Schiff，PAS）染色。

### 2.5 血清脂代谢指标检测

取“2.4”项下血清适量，常规解冻后与相应试剂盒工作液充分混匀，37 ℃孵育5～10 min，用酶标仪进行测定。采用葡萄糖氧化酶法检测血清中TG水平，检测波长为510 nm；采用酶法检测血清中TC水平，检测波长为510 nm；采用直接法检测血清中LDL-C、HDL-C水平，检测波长为546 nm。

### 2.6 血清胰岛素相关指标检测及计算

取“2.4”项下血清适量，常规解冻后采用ELISA法测定血清FINS水平，严格遵从试剂盒说明书进行操作，并计算胰岛素抵抗指数（insulin resistance index，IRI）及胰岛素敏感指数（insulin sensitivity index，ISI）。IRI＝FBG×FINS/22.5，ISI＝1/（FBG×FINS），其中ISI为非正态分布，以其自然对数为最终结果。

### 2.7 肝组织病理形态观察

采用HE染色法进行观察。包埋切片：取“2.4”项下经固定处理的肝脏，进行常规石蜡包埋切片，切片厚度4 μm。脱蜡：切片经温箱适当烤干后，投入二甲苯中脱蜡处理5～10 min，待蜡彻底溶解后，再移入100%、90%、80%、70%乙醇分别处理约2 min，之后清水洗去乙醇，最后以蒸馏水处理2 min。HE染色顺序：苏木素染液染色5 s，1%盐酸-乙醇溶液分化30 s，流水冲洗至返蓝（约5 min）；伊红染液染色5 s，再经80%、90%、100%乙醇梯度脱水后，移入二甲苯中透明处理约5 min。封固：迅速擦去组织外围的二甲苯，滴入树胶，以干净的盖玻片盖在树胶上，调整盖玻片位置，待封固并晾干后，于显微镜下观察肝组织的病理形态变化并拍照。

### 2.8 肝组织中糖原表达情况观察

采用PAS染色法进行观察。取“2.7”项下脱蜡后的肝组织切片，以蒸馏水冲洗1～2 min后，用0.5%过碘酸浸泡氧化处理10 min，蒸馏水再冲洗3次，每次至少5 min；置于雪夫试剂中显色处理15 min，经流水冲洗3次，每次约5 min；苏木素复染2 min，1%盐酸-乙醇溶液分化30 s，流水冲洗至返蓝（约5 min），再通过乙醇梯度洗脱，透明和封固处理同“2.7”项下。最后，经显微镜观察并拍照后，用Image-Pro Plus 6.0软件分析肝组织中糖原染色面积（以像素点计）。肝组织糖原经PAS染为紫红色，染色面积数值越大，提示糖原密度越大、含量越高。

### 2.9 肝组织中PPARγ、NF-κB及p-AMPK蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。取“2.4”项下肝组织适量，剪碎并经裂解处理后，于2～8 ℃条件下以12 000 r/min离心12 min，吸取上层清液，通过BCA蛋白定量试剂盒测定总蛋白含量。再取蛋白30 μg，行凝胶电泳（开始为80 V电泳，待蛋白分层后调为120 V，直至目的蛋白分离），经220 mA转膜处理2 h，之后转移至硝酸纤维素酶膜上，以5%脱脂牛奶室温封闭处理2 h，分别加入PPARγ、NF-κB、AMPK、p-AMPK、β-actin一抗（内参β-actin稀释5 000倍，其他一抗稀释1 000倍），于4 ℃孵育过夜；第2天以三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液清洗10 min，重复3次，再加入IgG二抗（稀释2 000倍），室温下孵育1 h；再次重复上述清洗步骤，经ECL化学发光试剂显色处理，进行蛋白电泳系统及凝胶成像，以PPARγ、NF-κB与内参β-actin条带灰度值的比值表示这2种蛋白的表达水平，以p-AMPK与AMPK条带灰度值的比值表示p-AMPK蛋白的表达水平。

### 2.10 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行数据分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间数据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 余甘子水提物对大鼠一般状态及体质量的影响

灌胃结束后，各组大鼠的一般状态出现明显差异。空白组大鼠活泼好动，精神良好，饮食及二便正常，体毛顺滑有光泽，整体状态较好，体质量为（348.70±18.22）g。与空白组比较，模型组大鼠活动减少，精神萎靡，多饮、多食、多尿现象明显，体毛粗糙无光泽，出现掉毛现象，整体状态差，体质量[（264.54±13.61）g]显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，余甘子水提物高剂量组大鼠状态明显更佳，中剂量组大鼠状态稍次之，而低剂量组大鼠状态几乎无改善；余甘子水提物高、中剂量组大鼠体质量[（292.07±14.28）、（283.07±14.45）g]均显著升高（$P<0.05$），而低剂量组大鼠体质量[（268.66±14.21）g]相较于模型组差异无统计学意义（$P>0.05$）。

### 3.2 余甘子水提物对大鼠血清脂代谢指标的影响

与空白组比较，模型组大鼠血清中TC、TG、LDL-C水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，余甘子水提物高、中剂量组及阳性对照组大鼠血清中TC、TG、LDL-C水平显著降低（$P<0.05$）。结果见表1。

### 3.3 余甘子水提物对大鼠IR的影响

与空白组比较，模型组大鼠血清中FINS水平和IRI显著升高（$P<0.05$），ISI显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，余甘子水提物高、中剂量组及阳性对照组大鼠血清中FINS水平和IRI显著降低（$P<0.05$），ISI显著升高（$P<0.05$）。结果见表2。

**表1 各组大鼠血清中TC、TG、HDL-C、LDL-C水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，mmol/L）**

| 组别 | TC | TG | HDL-C | LDL-C |
|---|---|---|---|---|
| 空白组 | 1.18±0.24 | 0.62±0.10 | 0.88±0.15 | 0.65±0.08 |
| 模型组 | 3.17±0.60[a] | 1.76±0.23[a] | 0.83±0.16 | 1.24±0.21[a] |
| 阳性对照组 | 2.24±0.41[b] | 1.26±0.17[b] | 0.93±0.17 | 0.95±0.19[b] |
| 余甘子水提物高剂量组 | 2.31±0.41[b] | 1.19±0.15[b] | 0.90±0.17 | 0.92±0.17[b] |
| 余甘子水提物中剂量组 | 2.57±0.51[b] | 1.49±0.23[b] | 0.89±0.15 | 1.04±0.19[b] |
| 余甘子水提物低剂量组 | 3.16±0.63 | 1.80±0.31 | 0.86±0.16 | 1.21±0.22 |
| $F$ | 23.127 | 45.068 | 0.458 | 14.523 |
| $P$ | <0.001 | <0.001 | 0.806 | <0.001 |

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

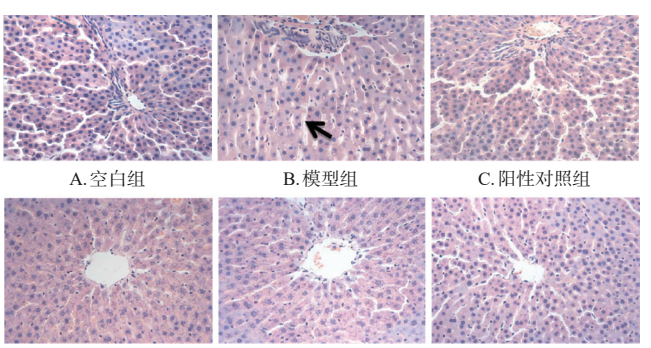
**表2 各组大鼠血清中FINS水平和IRI、ISI比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）**

| 组别 | FINS/（mU/L） | IRI | ISI |
|---|---|---|---|
| 空白组 | 16.14±1.67 | 4.08±0.51 | −4.51±0.13 |
| 模型组 | 22.88±1.83[a] | 18.97±2.21[a] | −6.05±0.11[a] |
| 阳性对照组 | 19.24±1.72[b] | 12.85±1.20[b] | −5.66±0.09[b] |
| 余甘子水提物高剂量组 | 20.26±1.71[b] | 13.16±1.28[b] | −5.69±0.10[b] |
| 余甘子水提物中剂量组 | 20.87±1.76[b] | 14.47±1.41[b] | −5.72±0.09[b] |
| 余甘子水提物低剂量组 | 22.43±1.80 | 18.06±2.10 | −6.11±0.14 |
| $F$ | 19.573 | 115.681 | 266.052 |
| $P$ | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

### 3.4 余甘子水提物对大鼠肝组织病理形态的影响

空白组大鼠肝小叶结构保持完整，细胞排列规则，形态正常，未见脂质沉积；与空白组比较，模型组大鼠肝小叶结构明显出现紊乱，肝细胞多发变形、肿大、排列紊乱，且有许多脂质沉积和脂肪空泡；与模型组比较，余甘子水提物高、中剂量组及阳性对照组大鼠肝小叶结构排列更加规整，肝细胞形态、大小基本正常，脂质沉积相对较少，未出现明显脂肪空泡，但余甘子水提物低剂量组大鼠肝组织病理形态变化改善不明显。结果见图1。



A.空白组　B.模型组　C.阳性对照组

D.余甘子水提物高剂量组　E.余甘子水提物中剂量组　F.余甘子水提物低剂量组

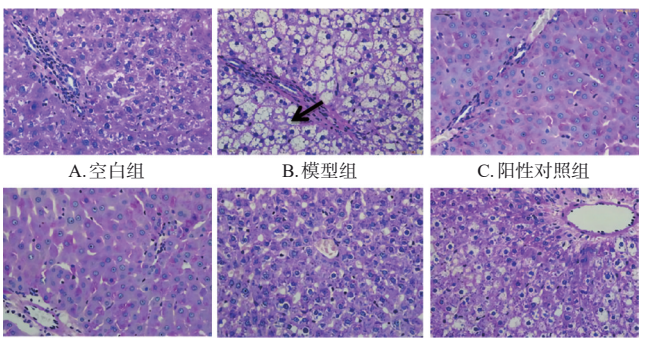
注：箭头所指为脂质沉积和脂肪空泡

**图1 各组大鼠肝组织病理形态观察显微图（HE染色，×400）**

### 3.5 余甘子水提物对大鼠肝组织糖原表达的影响

空白组大鼠肝组织中糖原位于细胞质，染色均匀、密度高，染色面积为0.384±0.010。与空白组比较，模型组大鼠肝组织糖原表达密度较低，糖原染色明显更少，且呈不均匀分布，可见大量脂滴，染色面积（0.192±

0.005）显著减小（$P<0.05$）。与模型组比较，余甘子水提物高、中剂量组及阳性对照组大鼠肝组织中糖原表达更加明显，染色增多，分布相对均匀，内部脂滴明显更少，染色面积（分别为0.306±0.008、0.268±0.011、0.299±0.007）显著增加（$P<0.05$），且余甘子水提物高、中剂量组的糖原染色面积比较差异也有统计学意义（$P<0.05$）；而余甘子水提物低剂量组糖原表达不明显，染色面积（0.206±0.005）相较于模型组差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图2。



A.空白组　B.模型组　C.阳性对照组

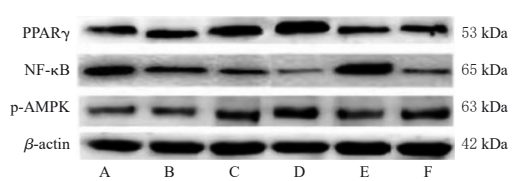
D.余甘子水提物高剂量组　E.余甘子水提物中剂量组　F.余甘子水提物低剂量组

注：箭头所指为脂滴

**图2　各组大鼠肝组织中糖原表达显微图（PAS染色，×400）**

### 3.6　余甘子水提物对大鼠肝组织中PPARγ、NF-κB及p-AMPK蛋白表达的影响

与空白组比较，模型组大鼠肝组织中PPARγ和p-AMPK蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$），NF-κB蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，余甘子水提物高、中剂量组及阳性对照组大鼠肝组织中PPARγ和p-AMPK蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$），NF-κB蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。结果见图3、表3。




A：余甘子低剂量组；B：余甘子中剂量组；C：余甘子高剂量组；D：空白组；E：模型组；F：阳性对照组

**图3　各组大鼠肝组织中PPARγ、NF-κB及p-AMPK蛋白表达电泳图**

## 4　讨论

### 4.1　IR模型大鼠造模评估

饮食中的高糖高脂易导致2型糖尿病及IR的发生[12]。发生IR的患者对葡萄糖的利用能力降低，其脂质水平会应激性变化来应对碳水化合物的损耗，故通过测定脂质水平是了解糖尿病人群IR情况的可行方法[13]。本实验中模型组大鼠的活动明显减少，精神萎靡，多饮、多食、多尿现象明显，体毛粗糙无光泽，即出现了“三多一少”糖尿病典型症状。同时，模型组大鼠血清中TC、TG及LDL-C水平显著升高，提示其脂质代谢出现异常；而血清中FINS水平和IRI显著升高，ISI显著降低，提示出现了IR现象。模型组大鼠肝小叶结构明显出现紊乱，肝细胞多发变形、肿大、排列紊乱，且有许多脂质沉积和脂肪空泡；肝组织中糖原染色面积显著减小。这说明本研究所用的高糖高脂饮食合并小剂量STZ注射的造模方法完全符合2型糖尿病典型特点并出现了明显的IR，提示造模成功。

**表3　各组大鼠肝脏组织中PPARγ、NF-κB及p-AMPK蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）**

| 组别 | PPARγ/β-actin | NF-κB/β-actin | p-AMPK/AMPK |
|---|---|---|---|
| 空白组 | 0.89±0.14 | 0.48±0.09 | 0.90±0.15 |
| 模型组 | 0.31±0.06[a] | 0.91±0.13[a] | 0.36±0.06[a] |
| 阳性对照组 | 0.71±0.11[b] | 0.64±0.11[b] | 0.74±0.11[b] |
| 余甘子水提物高剂量组 | 0.66±0.11[b] | 0.66±0.12[b] | 0.71±0.10[b] |
| 余甘子水提物中剂量组 | 0.61±0.10[b] | 0.70±0.11[b] | 0.59±0.10[b] |
| 余甘子水提物低剂量组 | 0.33±0.05 | 0.86±0.12 | 0.39±0.07 |
| $F$ | 51.516 | 19.944 | 44.054 |
| $p$ | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

### 4.2　余甘子水提物对IR模型大鼠IR的改善作用

余甘子含有丰富的多糖类、多酚类、鞣质类、黄酮类和三萜类等药用成分，兼具药用价值高和安全性好的特点[14]。既往基础研究发现，余甘子成分中水溶性没食子酸、没食子酸甲酯对白细胞介素6、肿瘤坏死因子α、单核细胞趋化蛋白1等多种炎症因子具有剂量依赖性和选择性的抑制作用[15]，并且还能通过减轻氧化应激反应，抑制高糖环境下胰岛细胞的凋亡[16]；王锐[7]研究证实，水溶性余甘子多糖在体外可明显抑制α-葡萄糖苷酶和α-淀粉酶活性，且兼具抑菌作用[17]。本研究中，余甘子水提物连续给药完成后，余甘子水提物高、中剂量组大鼠相较于模型组大鼠精神状态明显好转，“三多一少”现象明显改善，血清中TC、TG及LDL-C水平，以及FINS水平和IRI均显著降低，ISI显著升高；肝小叶结构排列更加规整，肝细胞形态、大小基本正常，脂质沉积相对较少，未出现明显脂肪空泡，肝组织PAS染色面积显著增加。这说明余甘子水提物到一定剂量后能保护肝细胞，发挥降脂、改善IR的作用。另外，本研究所用为余甘子水提物，与余甘子临床应用的水煎煮液相近，这可能是临床中应用余甘子水煎物治疗糖尿病的原因。

### 4.3　余甘子水提物对IR模型大鼠PPARγ/AMPK/NF-κB信号通路的调节作用

脂肪酸代谢紊乱和糖脂代谢损伤间关系密切。脂肪组织功能障碍时，多余的脂肪通过增加肝、胰腺、肾等非脂肪组织中额外的脂肪存储，在IR的发展中发挥关键作用[18]。PPARγ为核受体超家族成员，为配体激活型转录因子，主要表达于脂肪组织，其适量表达可维持脂肪细胞的正常分化，在人体的生理代谢及正常发育中起着

关键作用，是人体中物质代谢、氧化应激、炎症反应的重要调节因子，与肥胖、IR、糖尿病等代谢性疾病关系密切[19]。PPARγ调整糖脂代谢可能体现在以下方面[20]：（1）通过诱导脂肪细胞分化，调节与脂肪酸代谢及转运相关基因的转录。（2）PPARγ的活性与脂肪含量呈正相关，其不仅可调节脂质形成，还能维持血脂、血糖稳态。（3）在辅因子的作用下，PPARγ通过系列反应进行调节，加速活化下游的AMPK，促使多种抗氧化酶表达增加，进而清除多余的自由基以弱化应激氧化反应的程度。AMPK蛋白对糖脂代谢具有明确的调节作用，尤其是AMPK磷酸化后引起的p-AMPK蛋白表达水平上调，已被广泛认可能够改善IR；同时，基础研究亦显示，p-AMPK蛋白表达水平上调后，能够抑制其下游信号分子NF-κB的表达，抑制病理状态下细胞缺氧和复氧过程中的炎症反应，从而进一步调节IR[21]。

本研究中，与模型组比较，余甘子水提物高、中剂量组大鼠灌胃结束后肝组织中PPARγ和p-AMPK蛋白表达水平显著升高，NF-κB蛋白表达水平显著降低，提示其可能通过PPARγ/AMPK/NF-κB信号通路调节IR模型大鼠脂质代谢，进而改善其IR。既往细胞水平研究显示，余甘子提取物中的没食子酸可上调PPARγ mRNA的表达，降低NF-κB mRNA的活性，抑制脂多糖诱发的炎症反应[8]。而本研究通过IR大鼠模型证实，余甘子水提物亦可以调节PPARγ/AMPK/NF-κB信号通路，上调PPARγ蛋白的表达，调节脂肪酸代谢，促使下游的AMPK磷酸化为p-AMPK，进一步抑制其下游信号分子NF-κB表达，抑制炎症反应并改善肝糖原代谢。

综上所述，中、高剂量的余甘子水提物可能通过激活PPARγ/AMPK/NF-κB信号通路，改善糖脂代谢紊乱、肝功能和IR的发生发展。然而，余甘子水提物中活性成分包括鞣质、多酚等多种物质，本研究并未对水提物进行主要活性成分鉴定，这是本研究的不足之处，亦是未来进一步研究的方向。

## 参考文献


[1] KATSIKI N, MIKHAILIDIS D P, BANACH M. Leptin, cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus[J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(7): 1176-1188.

[2] 张荣，陈婧，黄江涛，等. 对氧磷酶-1参与调控非酒精性脂肪肝脂质代谢与胰岛素抵抗作用及机制[J]. 肝脏，2020，25(2)：149-154.

[3] 史纪芳，潘佳琪，陈梦，等. 基于PPARγ途径探讨桑叶总黄酮对妊娠期糖尿病模型大鼠糖脂代谢、炎症和氧化应激的改善作用[J]. 中国药房，2020，31(6)：671-676.

[4] 潘慧清，朱平，魏学明，等. 藏药余甘子研究概况[J]. 甘肃中医药大学学报，2019，36(2)：84-88.

[5] NAZISH I, ANSARI S H. *Emblica officinalis*-anti-obesity activity[J]. J Complement Integr Med, 2017, 15(2): 1-11.

[6] 韩刚，原海忠，董月，等. 余甘子提取物对糖尿病小鼠血糖的影响[J]. 食品科学，2009，30(9)：210-212.

[7] 王锐. 余甘子多糖体外降血糖及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发，2018，39(17)：189-192，224.

[8] 李明玺，黄卫锋，姚亮亮，等. 余甘子提取物降血糖活性及其主要成分研究[J]. 现代食品科技，2017，33(9)：96-101.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 2020年版. 北京：中国医药科技出版社，2020：186.

[10] 张新鹃，王海凤，孙永显，等. 蒲公英水提取物对2型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的作用研究[J]. 中药新药与临床药理，2021，32(1)：17-22.

[11] 甘亚利，韩晓春，刘彩红，等. 建立2型糖尿病大鼠模型的研究进展[J]. 西部中医药，2020，33(5)：152-154.

[12] FANG X, CHUNG J, OLSEN E, et al. Depletion of regulator-of-G-protein signaling-10 in mice exaggerates high-fat diet-induced insulin resistance and inflammation, and this effect is mitigated by dietary green tea extract[J]. Nutr Res, 2019, 70: 50-59.

[13] LE T, FLATT S W, NATARAJAN L, et al. Effects of diet composition and insulin resistance status on plasma lipid levels in a weight loss intervention in women[J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5(1): 1-10.

[14] YANG F, YASEEN A, CHEN B, et al. Chemical constituents from the fruits of *Phyllanthus emblica* L. [J]. Biochem Syst Ecol, 2020, 92(1): 1-6.

[15] 王淑慧，程锦堂，郭丛，等. 余甘子化学成分研究[J]. 中草药，2019，50(20)：4873-4878.

[16] 左晓霜，马定乾，方山丹，等. 余甘子中没食子酸抑制高糖诱导胰岛β细胞凋亡[J]. 昆明医科大学学报，2018，39(6)：14-21.

[17] LIU X L, ZHAO M M, LUO W, et al. Identification of volatile components in *Phyllanthus emblica* L. and their antimicrobial activity[J]. J Med Food, 2009, 12(2): 423-428.

[18] 陈思琦，李佳欣，吴鑫宇，等. 胰岛素抵抗分子机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报，2020，22(2)：87-92.

[19] 张雨点，谢锦艳，李小川，等. 木犀草素是具有PPARγ激动剂活性的新型AMPK激活剂[J]. 现代生物医学进展，2019，19(9)：1601-1607.

[20] 习雪峰，崔节荣，王勇. 余甘子对胰岛素抵抗大鼠过氧化物酶体增生物激活受体γ表达的影响[J]. 食品科学，2009，30(5)：253-256.

[21] NANDIPATI K C, SUBRAMANIAN S, AGRAWAL D K. Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance[J]. Mol Cell Biochem, 2017, 426(1/2): 27-45.


（收稿日期：2022-09-23　修回日期：2023-01-07）

（编辑：舒安琴）