

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2020.03.003

• 实验研究 •

从 AMPK/PKC 信号通路探讨盐酸药根碱促进 NCI-H716 细胞分泌 GLP-1 的作用机制^{*}

刘 谦¹ 魏世超^{2△} 徐丽君¹ 邹 欣¹ 胡茹楠²
童凤雪³ 张砾丹³ 陆付耳¹

¹华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所,武汉 430030

²华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部,武汉 430030

³华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合系,武汉 430030

摘要 目的 研究盐酸药根碱(JAT)对 NCI-H716 细胞分泌 GLP-1 的促进作用,并初步阐明 JAT 恢复内源性 GLP-1 分泌作用与 AMPK/PKC 信号通路相关。**方法** 采用 CCK-8 法检测不同浓度 JAT (6、30、60、90、150、300 $\mu\text{mol/L}$)对 NCI-H716 细胞活性的影响,筛选 150 $\mu\text{mol/L}$ JAT 作为本实验基本浓度。分别选择 JAT 低、中、高浓度(100、150、200 $\mu\text{mol/L}$)、150 $\mu\text{mol/L}$ JAT+不同浓度抑制剂 Dorsomorphin(2、10、50 $\mu\text{mol/L}$)、150 $\mu\text{mol/L}$ JAT+不同浓度抑制剂 Chelerythrine(2、10 $\mu\text{mol/L}$)对 NCI-H716 细胞进行干预,采用 CCK-8 方法检测细胞活性,酶联免疫吸附法(ELISA)测定 GLP-1 含量,RT-PCR 法检测 GLP-1 mRNA 水平,Western blot 法检测 GLP-1 蛋白表达。**结果** JAT 可促进 NCI-H716 细胞分泌 GLP-1($P<0.05$);AMPK 通路抑制剂 Dorsomorphin 和 PKC 通路抑制剂 Chelerythrine 均可抑制 JAT 的作用($P<0.05$),且抑制剂 Dorsomorphin 的作用具有浓度依赖性。**结论** JAT 通过 AMPK/PKC 信号通路促进 NCI-H716 细胞分泌 GLP-1,具有恢复内源性 GLP-1 分泌作用。

关键词 药根碱;AMPK/PKC 信号通路;NCI-H716 细胞;GLP-1

中图分类号 R285.5 **文献标识码** A

Study on the Mechanism of Jatrorrhizine Hydrochloride Promote NCI-H716 Cell Secretion GLP-1 Through AMPK/PKC Signal Pathway

LIU Qian¹, WEI Shichao^{2△}, XU Lijun¹, ZOU Xin¹, HU Runan³, TONG Fengxue³, ZHANG Lidan³, LU Fuer¹

¹ Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

² Department of Pharmacy, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

³ Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract Objective To investigate the promotion effect of jatrorrhizine hydrochloride(JAT)on the secretion of GLP-1 by NCI-H716 cells,and to preliminarily clarify the mechanism of the recovery of endogenous GLP-1 secretion is related to the AMPK/PKC signaling pathway. **Methods** NCI-H716 cells were treated with different concentrations of JAT(6,30,60,90,150,300 $\mu\text{mol/L}$),cell viability was determined by CCK-8 method,and the optimal JAT concentration was selected,150 $\mu\text{mol/L}$ JAT was screened as the basic concentration in this experiment. JAT

^{*} 国家自然科学基金项目(No. 81373448)

[△]通信作者,Corresponding author,E-mail:2356136945@qq.com

low, medium and high concentrations (100, 150, 200 $\mu\text{mol/L}$), 150 $\mu\text{mol/L}$ JAT combined with different concentrations of inhibitor Dorsomorphin (2, 10, 50 $\mu\text{mol/L}$), 150 $\mu\text{mol/L}$ JAT combined with different concentrations of inhibitor Chelerythrine (2, 10 $\mu\text{mol/L}$) were selected to intervene in the NCI-H716 cells. The cell activity was detected by CCK-8 method, the GLP-1 content was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the GLP-1 mRNA level was detected by RT-PCR method, and the protein expression was detected by Western blot method. **Results** JAT significantly promoted the secretion of GLP-1 by NCI-H716 cells, while Dorsomorphin, an inhibitor of PKC pathway, and Chelerythrine, a PKC pathway inhibitor, inhibited the JAT activity in a dose-dependent manner. **Conclusion** JAT promotes NCI-H716 cell secretion GLP-1 through AMPK/PKC signaling pathway, has the function of restoring endogenous secretion.

Key words Jatrorrhizine; AMPK/PKC signaling pathway; NCI-H716 cell; GLP-1

胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 是一种由肠道 L 细胞产生及分泌的多肽激素, 该激素以葡萄糖浓度依赖性方式促进胰岛 β 细胞分泌胰岛素, 调节血糖水平^[1]。但 GLP-1 在体内很快被二肽基肽酶-IV (DDP-IV) 分解, 所以半衰期极短, 只有 5 min 左右^[2]。因此, 寻找能够有效促进内源性 GLP-1 分泌的药物将会给 2 型糖尿病的治疗带来新的途径。目前研究^[3-4]证实, 黄连及其有效成分如小檗碱、表小檗碱、黄连碱、药根碱等均具有一定的降糖调脂功效。本课题组前期研究^[5]进一步证实黄连有效成分小檗碱、黄连碱、药根碱及其混合物可升高荷糖小鼠胰岛素和 GLP-1 水平, 并且证实其可直接作用于 L 细胞的研究模型之一的 NCI-H716 细胞而促 GLP-1 分泌, 即可恢复内源性 GLP-1 的分泌, 而且混合物的作用效果优于单一成分。在相关研究中, 小檗碱的研究最为广泛和深入^[6-8], 体内外实验均证实其可促进 GLP-1 的分泌^[9], 并主要通过 AMPK/PKC/PKA 信号通路发挥作用, 其他成分的作用机制目前尚不明确。本实验进行混合物中另一成分——盐酸药根碱 (jatrorrhizine, JAT) 相关作用及其机理的研究, 即利用 GLP-1 分泌细胞模型——来源于人低分化的盲肠腺癌 NCI-H716 细胞株, 初步探讨 JAT 恢复内源性 GLP-1 分泌的作用及其机制。通过该系列的相关研究, 将为小檗碱、黄连碱和药根碱的新药开发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

NCI-H716 细胞株购买自上海中科院细胞库, 由本实验室传代培养。

1.2 实验药品及试剂

盐酸药根碱 (JAT) 由南京普怡生物科技公司提供 (纯度 $\geq 98\%$, 批号 111022), JAT 对照品由成都普菲德生物技术有限公司提供 (批号 15050712)。AMPK

通路抑制剂 Dorsomorphin (批号 115M4736V) 和 PKC 通路抑制剂 Chelerythrine chloride (批号 C2932) 均购于美国 Sigma 公司。胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 10270-106)、GLP-1 ELISA 试剂盒 (美国 R&D Systems, 批号 P148658)、CCK-8 试剂盒 (日本同仁, 批号 BC2060)、PCR 试剂盒 (日本 Takara 公司, 批号 AK5301、AK7301)、TRIZOL [安迪福诺生物科技 (武汉) 有限公司, 批号 AB312FP1]、GLP-1 Antibody-BSA Free (美国 Novus 公司, 批号 K0920)、Anti-mouse IgG、GAPDH Mouse mAb (美国 CST 公司, 批号 6)、Color-coded Protein Marker (美国 CST 公司, 批号 00556442)、BCA 试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 181363)。

1.3 实验仪器

二氧化碳培养箱 (5810F, 美国 Nuair 公司)、酶标仪 (Synerg2, 美国 Bio-Tek 公司)、迷你离心机 (LX-200, 中国其林贝尔仪器)、漩涡混合器 (XW-80A, 中国沪西仪器)、恒温箱 (XMTD-8222, 中国天康电子)、低温高速离心机型 (Megafuge 8R, 德国 sigma 公司)、电子天平 (BT25S, 中国赛多利斯)、微量加样器 (P1000、P200、P100、P20、P2.5, 德国 Eppendorf 公司)、PCR 仪 (Mastergyde, 德国 Eppendorf 公司)、荧光定量 PCR 仪 (Stepone, 美国 Applied Biosystems 公司)、电泳仪 (DYY-6C, 美国 Bio-RAD 公司)、扫膜仪 (Odyssey 公司)。

1.4 细胞培养

将 NCI-H716 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中, 置于 37℃、含 5% CO_2 、湿度饱和的恒温细胞培养箱内培养, 每隔 2~3 d 换液或传代 1 次。

1.5 分组及给药

选取同批同代对数生长期细胞, 离心弃上清, 加入 0.02 g/L 的 BSA 溶液混悬细胞, 调整细胞密度为 1.5×10^6 个/mL, 接种于无菌 6 孔板, 每孔 2 mL, 置于

37℃、5% CO₂培养箱培养 90 min,分为最适 JAT 组、低 JAT 组、高 JAT 组、最适 JAT+高、中、低浓度抑制剂 Dorsomorphin 组(50、10、2)μmol/L、最适 JAT+高、低浓度抑制剂 Chelerythrine 组(10、2)μmol/L 及空白组,共 9 组。向 6 孔板中加入等体积、不同浓度的实验药物,空白组加入等体积 0.02 g/L BSA 溶液,置于 37℃、5% CO₂培养箱干预 36 h。收集各组细胞,提取 RNA 用于 PCR 检测,提取蛋白用于 Western blot 检测,离心上清用于酶联免疫吸附法(ELISA)检测。

1.6 检测指标

1.6.1 CCK-8 方法检测细胞活性

①选择 JAT 浓度 取对数生长期 NCI-H716 细胞按照 1×10⁴个接种于 96 孔板中,每孔加入 100 μL 细胞悬液置于 37℃、含 5%CO₂、湿度饱和的恒温细胞培养箱内培养 24 h,加入 100 μL 含不同浓度 JAT(6、30、60、90、150、300 μmol/L)的完全培养基在培养箱中继续培养 36 h,加入 10 μL CCK-8 溶液,在培养箱中孵育 4 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度,记录实验结果,计算细胞存活率。实验重复 2 次。据此结果,绘制药物浓度与吸光度曲线,选择 JAT 150 μmol/L 作为本实验基本浓度。

②不同处理对细胞活性的影响 分组同前,每组设置 6 个复孔,使用上述 CCK-8 方法检测吸光度,计算细胞存活率,根据细胞存活率计算细胞相对活性,实验重复 2 次。细胞相对活性=(实验组细胞存活率/空白对照组细胞存活率)×100%。

1.6.2 ELISA 法检测 GLP-1 蛋白含量 采用 ELISA 法检测 GLP-1 蛋白含量,分组同前,加上不加样的阴性对照组。参照 ELISA 试剂盒说明方法绘制标准曲线方程(y=1357x+30.915),同时每组取 50 μL 进行 GLP-1 含量的测定,重复 8 次。

1.6.3 PCR 法检测 GLP-1 mRNA 表达 参照 Trizol 试剂盒说明书提取 RNA,波长 260/280 nm 处分别测吸光度,鉴定 RNA 纯度,取 A_{260/280}>1.8、0.1<conc<1.0 的样品,RT-PCR 反应按照试剂盒说明书加样,逆转录合成 cDNA,反应条件为 37℃ 15 min、85℃ 5 s。配制 20 μL 体系扩增,扩增条件为 95℃ 预变性 30 s、95℃ 变性 5 s、60℃ 延伸 30 s(循环 40 次)。每个样品设置 3 个复孔,实验重复 3 次。引物设计见表 1。

1.6.4 Western blot 法检测 GLP-1 蛋白水平

①蛋白样品制备及变性 取药物干预 36 h 后的 NCI-H716 细胞于 2 mL EP 管中,每管加入 RIPA 裂解液(按照每孔裂解液 150 μL),置碎冰上裂解 30

min,4℃,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。各组吸取 80 μL,按 4:1 加入 5×Loding buffer,混匀后煮沸 15 min。

②制胶、上样及电泳 配制 18%分离胶,依次加入去离子水、30% acrylamide、1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)、10% SDS 充分混匀,再加入 10% AP 和 TEMED 后立即摇匀,并加入到 2 层玻璃板之间,去离子水液封,37℃放置 30 min,待胶凝后将水倒出,吸除多余水分;再按上述方法配制 5%浓缩胶,均匀灌胶,插入梳子,室温放置 30~60 min 后取出梳子,用水冲洗浓缩胶后放入电泳槽中,加入足够电泳缓冲液后,根据所测蛋白浓度,每孔按蛋白量 40 μg 上样;稳定电压 80 V,电泳 30 min,当染料进入分离胶后,将电压调至 120 V 继续电泳,到达凝胶底部时终止电泳。

③转膜、封闭 将转膜支架放平,依次放置滤纸、PVDF 膜、凝胶、滤纸,将凝胶面与负极相连,PVDF 膜与正极相连,接通电源,200 mA 转膜 30 min。将 PVDF 膜放入含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液,摇床上轻摇 1 h 后 TBST 洗膜。

④抗体孵育及显影 4℃一抗孵育 24 h(一抗浓度为 GLP-1 1:1000、GAPDH 1:1000),次日用 TBST 洗膜,室温孵育 1 h(二抗稀释浓度为 GLP-1 1:5000、GAPDH 1:5000),洗膜。用 Odyssey 双色红外荧光成像系统对目的条带进行扫描,用 Image J 软件进行分析。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列
GAPDH	上游:5'-GCTGAGAACGGAAGCTTGT-3'
	下游 5'-TCTCCATGGTGGTGAAGACG-3'
胰高血糖素	上游:5'-GCTGAGAACGGAAGCTTGT-3'
原基因	下游:5'-TTATAAAGTCCCTGGCGGCA-3'

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合方差齐性的采用方差分析,不符合方差齐性的采用非参数(秩和)检验;以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本药物浓度的选择

在 CCK-8 实验中,根据吸光度计算细胞存活率,吸光度越高表明细胞增殖及分泌活性物质越多,药物

毒性越小,细胞存活率越高,故选择 150 $\mu\text{mol/L}$ 的 JAT 为本实验基本浓度。见图 1。

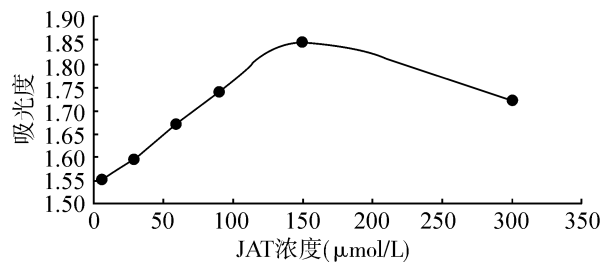
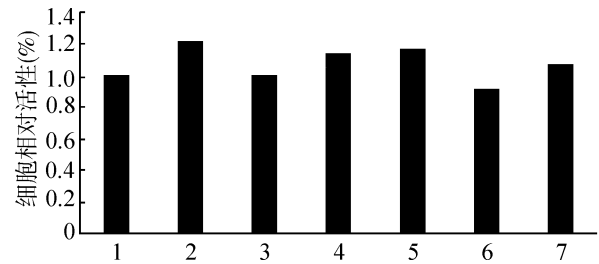


图 1 不同浓度 JAT 对细胞活性的影响

2.2 药物处理对细胞活性的影响

采用 CCK-8 方法检测细胞活性,不同处理间细胞活性比较,差异无统计学意义($P>0.05$),可视为同等条件。见图 2。



1 为空白组;2 为 JAT(150)组;3 为 JAT+Dorsomorphin (150+2)组;4 为 JAT+Dorsomorphin(150+10)组;5 为 JAT+Dorsomorphin (150+50)组;6 为 JAT+Chelerythrine(150+2)组;7 为 JAT+Chelerythrine (150+10)组

图 2 不同药物处理对细胞活性的影响

2.3 不同抑制剂对药根碱促进 NCI-H716 细胞分泌 GLP-1 的影响

ELISA 法检测 GLP-1 浓度结果显示,药根碱可明显促进 NCI-H716 细胞分泌 GLP-1,加入不同浓度的 AMPK 通路抑制剂 Dorsomorphin 和 PKC 通路抑制剂 Chelerythrine 均可抑制药根碱的这一作用,且 Dorsomorphin 的抑制作用具有浓度依赖性。此外,分别对比高浓度 Dorsomorphin 组、低浓度 Chelerythrine 组、高浓度 Chelerythrine 组与阴性对照组,无统计学差异,即可认为上述 3 组中 NCI-H716 细胞分泌 GLP-1 被完全抑制,故此 3 组不再进行 GLP-1 表达的测定。见表 2。

2.4 不同抑制剂对药根碱促进 NCI-H716 细胞 GLP-1 mRNA 表达的影响

RT-PCR 法检测 GLP-1 表达结果显示,药根碱可明显促进 NCI-H716 细胞 GLP-1 mRNA 表达,而 Dorsomorphin 可抑制药根碱的作用,且浓度越高,抑制作用越明显。见表 3。

表 2 药物对 GLP-1 分泌的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	GLP-1(pg/mL)
空白对照组	256.59±5.33
阴性对照组	112.67±1.88*
JAT(100)组	294.11±5.12*△
JAT(150)组	427.49±6.14*
JAT(200)组	391.49±4.13*△
JAT+Dorsomorphin(150+2)组	165.93±7.36*△▲
JAT+Dorsomorphin(150+10)组	137.26±6.84*△▲
JAT+Dorsomorphin(150+50)组	111.99±2.14*△▲
JAT+Chelerythre(150+2)组	111.82±1.91*△
JAT+Chelerythre(150+10)组	111.99±1.89*△

与空白对照组比较,* $P<0.05$;与 JAT(150)组比较,△ $P<0.05$;JAT+Dorsomorphin(150+2)、JAT+Dorsomorphin(150+10)、JAT+Dorsomorphin(150+50)组两两比较,▲ $P<0.05$

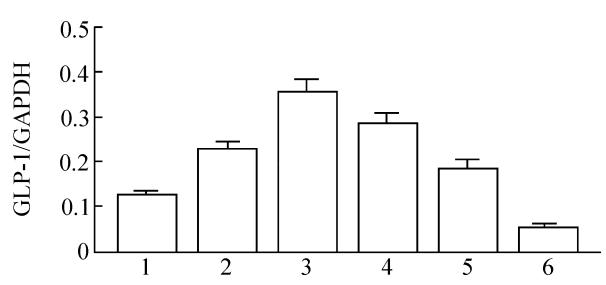
表 3 各组细胞 GLP-1 mRNA 表达($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
空白对照组	1.08±0.07
JAT(100)组	1.53±0.11*△
JAT(150)组	2.37±0.20*
JAT(200)组	2.06±0.31*△
JAT+Dorsomorphin(150+2)组	1.81±0.46*△
JAT+Dorsomorphin(150+10)组	0.66±0.11*△▲

与空白对照组比较,* $P<0.05$;与 JAT(150)组比较,△ $P<0.05$;与 JAT+Dorsomorphin(150+2)组比较,▲ $P<0.05$

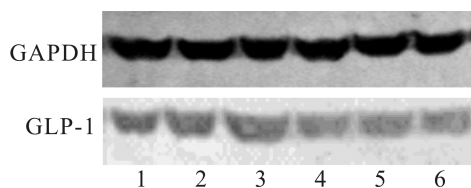
2.5 不同抑制剂对药根碱促进 NCI-H716 细胞 GLP-1 蛋白表达的影响

Western blot 法检测 GLP-1 蛋白的表达结果显示,药根碱可明显促进 NCI-H716 细胞 GLP-1 表达,且 150 $\mu\text{mol/L}$ 的药根碱效果最好,而 Dorsomorphin 可抑制药根碱的作用,且浓度越高,抑制作用越明显。见图 3 及图 4。



1 为空白对照组;2 为 JAT(100)组;3 为 JAT(150)组;4 为 JAT(200)组;5 为 JAT+Dorsomorphin(150+2)组;6 为 JAT+Dorsomorphin(150+10)组

图 3 各组细胞 GLP-1 蛋白的表达



1 为空白对照组;2 为 JAT(100)组;3 为 JAT(150)组;
4 为 JAT(200)组;5 为 JAT+Dorsomorphin(150+2)组;
6 为 JAT+Dorsomorphin(150+10)组

图 4 药物对 NCI-H716 细胞 GLP-1 蛋白表达的影响

3 讨论

GLP-1 促进葡萄糖依赖性胰岛素分泌,也能促进胰腺导管内皮细胞转为胰岛素样细胞,给予永久性胰腺上皮细胞(IMPE)GLP-1 后能促使胰岛素分泌,可保护 β 细胞避免高游离脂肪酸、高浓度葡萄糖自身代谢引起的凋亡,故 GLP-1 通过保护 β 细胞来控制血糖,并且在降低血糖同时不会导致明显低血糖,为其临床应用奠定了基础^[10]。基于 GLP-1 靶点的药物很多,现在临床上相继出现了 GLP-1 类似物类药物如索玛鲁肽和利拉鲁肽、DPP-IV 抑制剂如维格列汀和西他列汀等,此类药物临床疗效明确,尤其是在心血管方面有所获益^[11-13]。但是,GLP-1 类似物给药方式为皮下注射,即使用药频率较高,也难以保持 GLP-1 浓度稳定,且存在可能导致的副作用如胰腺炎、胃肠道不适等^[14]。而 DPP-IV 抑制剂完全依赖 GLP-1 发挥作用^[13,15],若内源性 GLP-1 分泌不足,则其药效普遍不佳。由此可见,GLP-1 类似物和 DPP-IV 抑制剂应用于临床过程中均存在严重的局限性。因此“从内求之”,促进内源性 GLP-1 分泌可能是基于 GLP-1 靶点治疗 T2DM 的突破口。

NCI-H716 细胞是人结直肠腺癌细胞,是一种由低分化的盲肠腺癌产生的细胞系,具有内分泌特性,包括嗜铬粒蛋白和胰高血糖素原的表达,并可由脂肪酸、糖调节蛋白(GRP)、胆碱能激动剂、PKA 和 PKC 活化剂刺激分泌 GLP-1^[16-17]。

腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)是一种由 α 、 β 和 γ 3 个亚单位组成的异源三聚体蛋白。AMPK 在调节机体能量代谢平衡方面起总开关作用,通过调节肝葡萄糖的转化,增强骨骼肌对葡萄糖的摄取和脂肪组织中葡萄糖的利用,以保证机体糖代谢的稳定。AMPK 及其信号通路有望成为治疗肥胖和 2 型糖尿病的新药理学靶点^[18-19]。AMPK 是促进小檗碱发挥有益作用的主要中间体^[20-21]。研究^[22]表明,AMPK 位于 p38 MAPK 上游,MAPK 通路参与了 GLP-1 分泌。在

NCI-H716 细胞中,小檗碱、AMPK 和 GLP-1 之间存在一定的相关性^[9,23]。药根碱和小檗碱同为黄连提取物,其促进 GLP-1 的分泌可能也与 AMPK 相关。Dorsomorphin(又称 Compound C)是一种有效的,可逆选择性 AMPK 抑制剂,无细胞试验中 Ki 为 109 nmol/L,对几个结构相关的激酶,包括 ZAPK、SYK、PKC θ 、PKA、和 JAK3 没有显著的抑制作用,也会抑制 I 型 BMP 受体活性。

PKC 是一种重要的调节细胞生长发育、收缩、分泌、传导、通透性、细胞外基质和基因表达等的第二信使,可以将胞外信息传递到细胞内,并且在糖尿病微血管并发症中发挥重要作用^[24-25]。有报道^[26-27]显示 PKC 依赖的途径参与调节 NCI-H716 细胞中 GLP-1 的分泌。用体外培养人肝细胞模型进行的研究^[28]表明,小檗碱通过激活 PKC 依赖通路诱导胰岛素受体的表达,说明小檗碱的作用至少在某种程度上与 PKC 依赖的途径有关。药根碱和小檗碱同为黄连提取物,其促进 GLP-1 的分泌可能也与 PKC 依赖的途径相关。Chelerythrine 是一种特异性的 PKC 通路抑制剂,Chelerythrine 以 1.5 μ mol/L 的 IC₅₀ 抑制 BclXL-Bak BH3 肽结合,并从 BclXL 中置换 Bax(一种含 BH3 的蛋白质)。

综上所述,JAT 具有恢复内源性 GLP-1 分泌的功效,该作用可被 AMPK 通路抑制剂 Dorsomorphin 和 PKC 通路抑制剂 Chelerythrine 所阻断,即与 AMPK 通路和 PKC 通路相关。有关组合物的另一成分——黄连碱,相关机理研究待续。

参 考 文 献

- [1] Fan Yi, Dong Li, Weizhi Ma, et al. GLP-1 biology and GLP-1 based antidiabetic therapy[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2013, 22(1): 7-27.
- [2] Gupta R, Walunj SS, Tokala RK, et al. Emerging drug candidates of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitor class for the treatment of Type 2 Diabetes[J]. Curr Drug Targets, 2009, 10(1): 71-87.
- [3] Jung HA, Yoon NY, Bae HJ, et al. Inhibitory activities of the form Coptidis Rhizoma against aldose reductase[J]. Arch Pharm Res, 2008, 31(11): 1405-1412.
- [4] 童凤雪, 张砾丹, 邹欣, 等. 黄连不同方法提取物治疗 2 型糖尿病大鼠的比较研究[J]. 中西医结合研究, 2019, 11(2): 78-82, 85.
- [5] 魏世超, 徐丽君, 邹欣, 等. 黄连有效成分及其组合物对荷糖小鼠胰岛素和 GLP1 (GLP-1) 分泌影响的初步研究[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(14): 1343-1347.

- [6] Yu Y, Hao G, Zhang Q, et al. Berberine induces GLP-1 secretion through activation of bitter taste receptor pathways[J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 97(2):173-179.
- [7] Zhang Q, Xiao X, Li M, et al. Berberine moderates glucose metabolism through the GnRH-GLP-1 and MAPK pathways in the intestine[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14, 188.
- [8] Lu SS, Yu YL, Zhu HJ, et al. Berberine promotes glucagon-like peptide-1(7-36)amide secretion in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *J Endocrinol*, 2009, 200(2):159-165.
- [9] Yu Y, Liu L, Wang X, et al. Modulation of glucagon-like peptide-1 release by berberine; in vivo and in vitro studies [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(7):1000-1006.
- [10] 赵超, 刘昕, 崔进, 等. GLP-1 对 2 型糖尿病 β 细胞作用机制的研究[J]. *中国医学创新*, 2013, 10(24):148-150.
- [11] 李华. 治疗 2 型糖尿病的新力量——GLP-1 类似物利拉鲁肽[J]. *求医问药*, 2012, 10(6):197-202.
- [12] 赵凤勤, 夏瑛, 赵琳, 等. 索玛鲁肽临床研究综述[J]. *黑龙江医药*, 2017, 30(6):1218-1223.
- [13] 孟艳秋, 张宇, 刘凤鑫, 等. 二肽基肽酶 IV 抑制剂的药理作用及其机制研究[J]. *现代药物与临床*, 2013, 2(28):101-109.
- [14] 蒋筠, 彭永德. 人 GLP-1 类似物治疗型糖尿病的研究进展[J]. *世界临床药物*, 2010, 31(2):74-77.
- [15] 李伟亮, 王菊仙, 吴香玫. 二肽基肽酶 IV 抑制剂的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2008, 17(20):1739-1743.
- [16] Zhu Jia-Yu, Wu Xiao-Hong. Research progress of intestinal L cells [J]. *Chinese Journal of Diabetes Mellitus*, 2012, 4(1):51-53.
- [17] Kim K, Park M, Lee YM, et al. Ginsenoside metabolite compound K stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in NCI-H716 cells via bile acid receptor activation[J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37(9):1193-1200.
- [18] 葛斌, 谢梅林, 顾振纶, 等. AMPK 作为治疗 2 型糖尿病新靶点的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(5):580-583.
- [19] 田会萍, 姚鸿萍, 王思文, 等. 基于 AMPK 的中药有效成分治疗 2 型糖尿病的研究进展[J]. *世界中医药*, 2016, 11(11):2472-2475.
- [20] Cani PD, Daubioul CA, Reusens B, et al. Involvement of endogenous glucagons-like peptide-1(7-36) amide on glycaemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats[J]. *Endocrinol*, 2005, 185(3):457-465.
- [21] Orskov C, Poulsen SS, Moller M, et al. Glucagon-like peptide-1 receptors in the subfornical organ and the area postrema are accessible to circulating glucagon-like peptide-1 [J]. *Diabetes*, 1996, 45(6):832-835.
- [22] Cheng Z, Pang T, Gu M, et al. Berberine-stimulated glucose uptake in L6 myotubes involves both AMPK and p38 MAPK[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760(11):1682-1689.
- [23] Lim GE, Brubaker PL. Glucagon-like peptide 1 secretion by the L-cell the view from within[J]. *Diabetes*, 2006, 55: S70-S77.
- [24] 赵明明, 刘丽梅. 蛋白激酶 C- β 与糖尿病肾病研究的进展 [J]. *上海交通大学学报医学版*, 2014, 34(4):551-555.
- [25] 朱邦豪, 关永源. 糖尿病合并症与蛋白激酶 C [J]. *中国药理学通报*, 2000, 16(1):4-6.
- [26] Reimer RA, Darimont C, Gremlich S, et al. A human cellular model for studying the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(10):4522-4528.
- [27] Iakoubov R, Izzo A, Yeung A, et al. Protein kinase C ζ is required for oleic acid-induced secretion of glucagon-like peptide-1 by intestinal endocrine L cells[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(3):1089-1198.
- [28] Kong WJ, Zhang H, Song DQ, et al. Berberine reduces insulin resistance through protein kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression[J]. *Metabolism*, 2009, 58(1):109-119.

(收稿日期:2020-04-17)