

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.10.007

## 小檗碱对损伤胰岛βTC6 细胞相关信号分子表达的影响\*

翟佳佳<sup>1,2</sup> 王辛<sup>2</sup> 张艺<sup>2</sup> 李茉<sup>2</sup>  
路廷之<sup>3</sup> 康健<sup>3</sup> 邹健<sup>4</sup> 李泽平<sup>5</sup> 李晓苗<sup>1Δ</sup>

(1 空军军医大学西京医院内分泌科 陕西 西安 710032; 2 西安市第九医院老年病二科 陕西 西安 710054;

3 空军军医大学微生物教研室 陕西 西安 710032;

4 解放军第 522 医院内科 河南 洛阳 471003; 5 南昌大学玛丽女王学院 江西 南昌 330031)

**摘要 目的:**探讨小檗碱在棕榈酸(palmitic acid, PA)诱导的胰岛β细胞发生凋亡时 PTEN 及 AMPK 的变化及其作用机制。**方法:**采用 1.0 mmol/L PA 诱导胰岛βTC6 细胞损伤模型,然后给予小檗碱干预。采用流式细胞术检测βTC6 细胞凋亡率,RT-qPCR 法及免疫荧光法检测在 PA 及小檗碱作用下信号转导通路分子 PTEN 及 AMPK 表达的变化。**结果:**PA 抑制βTC6 细胞的生长并诱导其凋亡,小檗碱可缓解 PA 引起的βTC6 的凋亡,对氧化应激具有保护作用;伴随着凋亡的发生,AMPK 的表达显著降低,而 PTEN 的表达显著升高,表明细胞氧化损伤严重时抑制了 AMPK 的表达及转录,而 PTEN 在βTC6 细胞的凋亡中具有促进作用;小檗碱治疗后,AMPK 的表达增多,而 PTEN 的表达下降,暗示着小檗碱通过激活 AMPK 并抑制 PTEN 的表达来增强βTC6 细胞的抗氧化能力。**结论:**小檗碱对 PA 引起的细胞凋亡有保护作用,同时小檗碱可能通过调节 AMPK 及 PTEN 的表达来发挥抗氧化作用。

**关键词:**小檗碱;棕榈酸;βTC6 细胞;AMPK;PTEN

**中图分类号:**R-33; R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)10-1835-05

## Effects of Berberine on the Expression of Signaling Molecules related with the Protection of Injured Pancreatic βTC6 Cells\*

ZHAI Jia-jia<sup>1,2</sup>, WANG Xin<sup>2</sup>, ZHANG Yi<sup>2</sup>, LI Mo<sup>2</sup>, LU Yan-zhi<sup>3</sup>, KANG Jian<sup>3</sup>, ZOU Jian<sup>4</sup>, LI Ze-ping<sup>5</sup>, LI Xiao-miao<sup>1Δ</sup>

(1 Department of Endocrinology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Geriatrics, The Ninth hospital of Xi'an, Xi'an, Shaanxi, 710054, China;

3 Department of Microbiology, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

4 Department of Internal Medicine, The 522nd hospital of People's Liberation Army, Luoyang, Henan, 471003, China;

5 Mary Queen College, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi, 330031, China)

**ABSTRACT Objective:** The aim of this study was to explore the protective effect of berberine (BBR) on the apoptosis of pancreatic βTC6 cells induced by palmitic acid (PA) as well as investigate the role of PTEN and AMPK in BBR involved βTC6 cells protection.

**Methods:** The injury of βTC6 cells was induced by treatment with 1.0 mmol/l PA, and then treated with BBR. The apoptosis of βTC6 cells was evaluated using flow cytometry. The expressions of AMPK and PTEN were estimated utilizing RT-qPCR and immunofluorescence.

**Results:** The proliferation of βTC6 cells was significantly inhibited in PA group compared with that in Con group. Meanwhile, βTC6 cells apoptosis could be induced by PA treatment while BBR attenuated this effect, indicating that BBR played a protective role in the oxidative stress of βTC6 cells.

During the occurrence of βTC6 cells apoptosis, the AMPK expression was dramatically reduced while the PTEN expression was significantly increased, suggesting that the expression and transcription of AMPK were inhibited by the severe oxidative damage of βTC6 cells.

Besides, PTEN promoted the apoptosis of βTC6 cells. Compared with the PA group, the AMPK expression was increased while the PTEN expression was declined in PA+BBR group, indicating BBR enhanced the anti-oxidative ability of βTC6 cells by activating the AMPK expression and inhibiting the PTEN expression.

**Conclusions:** BBR played a protective effect on PA-induced βTC6 cells apoptosis, and it showed anti-oxidative ability through regulating the expressions of AMPK and PTEN.

**Key words:** Berberine; Palmitic acid; Pancreatic βTC6 cells; AMPK; PTEN

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81573746)

作者简介:翟佳佳(1981-),硕士研究生,主治医师,主要研究方向:内分泌及代谢性疾病,

E-mail: 13201831069@163.com, 电话:13201831069

Δ 通讯作者:李晓苗(1966-),硕士生导师,副教授,主要研究方向:内分泌及代谢性疾病的临床及基础研究,

E-mail: xiaomiao@fmmu.edu.cn, 电话:13991886996

(收稿日期:2019-01-17 接受日期:2019-02-15)

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R587.1 Document code: A

Article ID:1673-6273(2019)10-1835-05

## 前言

目前一致认为长期高脂饮食是引发外周组织胰岛素发生抵抗的重要因素之一,高脂饮食可导致血液中游离脂肪酸(Free fatty acids, FFAs)升高,进而超过脂肪细胞的储存能力和组织对 FFAs 的氧化能力。脂肪组织的沉积又促使三酰甘油的堆积,以使得外周组织产生胰岛素抵抗及胰岛 $\beta$ 细胞分泌异常,导致 $\beta$ 细胞发生损伤甚至凋亡,称为脂毒性作用。1型糖尿病(Type 1 diabetes mellitus, T1DM)、2型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)以及细胞凋亡都是 $\beta$ 细胞进行性缺失的主要形式。大量研究提示,氧化应激是诱导细胞凋亡的重要机制之一<sup>[1,2]</sup>。UKPDS 研究显示,诊断 T2DM 时胰岛 $\beta$ 细胞功能已降至正常的 50%<sup>[3]</sup>,因此如何防止胰岛细胞损伤及恢复其功能是目前治疗 T2DM 的关键。研究表明小檗碱可以改善 db/db 小鼠和 Wistar 大鼠的糖耐量<sup>[4,5]</sup>,具有一定的糖苷酶抑制活性,可延缓葡萄糖在肠道的吸收,促进胰岛 $\beta$ 细胞株 min6 细胞的增殖和胰岛素分泌的增加<sup>[6]</sup>。目前认为腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是小檗碱抗氧化应激的重要上游分子之一。而小檗碱是否能够在 $\beta$ 细胞内激活 AMPK 的表达仍然未知。血管内皮细胞中磷酸酶-张力蛋白基因(Phosphatase and tensin homolog, PTEN)通过功能下调激活丝/苏氨酸激酶(Serine-threonine kinase, Akt)信号途径,导致细胞增殖并抑制凋亡。近期研究表明 PTEN 的下调或者缺失能够改善胰岛素靶器官的葡萄糖代谢,抑制小鼠糖尿病的发生,在胰腺特异性敲除 PTEN 可以抑制 STZ(链脲佐菌素)诱导的糖尿病发生,减少 $\beta$ 细胞凋亡,但目前其具体作用机制尚未明确<sup>[7]</sup>。在本研究中,我们通过棕榈酸诱导胰岛 $\beta$ 细胞的凋亡,观察在小檗碱干预下胰岛 $\beta$ 细胞凋亡率及 AMPK 和 PTEN 表达的变化,以初步探讨小檗碱对高 FFAs 环境下胰岛 $\beta$ 细胞的保护作用及其作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

小鼠 $\beta$ TC6 细胞株购自上海中科院细胞库;棕榈酸(PA)及小檗碱(BBR)购自科昊生物技术有限公司;AMPK、PTEN 及 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG 抗体均购自 Abcam;高糖 DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)及青链霉素混合液购自 Gibco。

### 1.2 细胞培养、分组及处理

**1.2.1 细胞培养** 小鼠 $\beta$ TC6 细胞接种于含有 10% FBS 以及 1%青链霉素混合液的高糖 DMEM 培养液中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 以及饱和湿度的二氧化碳培养箱中进行培养。根据细胞生长情况每 2-3 天换液一次。待细胞融合度达到 90% 时进行传代。

**1.2.2 实验分组与处理** 选择生长状态良好的细胞用于实验。分为对照组(Con 组),棕榈酸组(PA 组)及小檗碱组(PA+BBR 组)。其中 A 组进行常规培养;PA 组加入终浓度为 1.0 mmol/L 的棕榈酸溶液;PA+BBR 组加入终浓度为 1.0 mmol/L 的棕榈酸溶液及终浓度为 0.1  $\mu$ mol/L 的小檗碱溶液。上述各组细胞均

置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 以及饱和湿度的二氧化碳培养中培养。

### 1.3 主要实验方法

**1.3.1 AnnexinV-PI 双染流式细胞术凋亡检测** 将各组细胞消化后以 309 $\times$  g 于室温离心 5 min 后弃去上清液使用 PBS 洗涤细胞两次,然后将各组细胞收集入 EP 管中,各管加入 500  $\mu$ L Binding Buffer 轻轻重悬细胞。分别向各管中加入 5  $\mu$ L AnnexinV-FITC,在避光条件下室温反应 10 min。随后向各管中加入 5  $\mu$ L PropidiumIodide 并在避光条件下室温反应 5 min。随即进行流式检测。

**1.3.2 RT-qPCR 法检测** 利用 Trizol 试剂提取各组细胞的 RNA 并进行反转录得到 cDNA。进一步采用 SYBR Premix Ex Taq II 实时 RT-qPCR 技术在 ExicyclerTM 96 荧光定量仪中分析 mRNA 的转录水平。目的基因相对表达量的计算采用 2<sup>- $\Delta\Delta$</sup>  的方法,其中  $\beta$ -actin 的表达用于数据的归一化处理。所用引物如表 1 所示。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences
PTEN-F	GACCATAACCCACCACAGC
PTEN-R	CATTACACCAGTCCGTCCT
AMPK $\alpha$ -F	CAAGGTGTACGGAAGGCAA
AMPK $\alpha$ -R	CACGCAAATAATAGGGGTT
$\beta$ -actin-F	CTGTGCCCATCTACGAGGGCTAT
$\beta$ -actin-R	TTTGATGTCACGCACGATTTC

Note: F, forward; R, reverse; PTEN, Phosphatase and tensin homolog; AMPK, AMP-activated protein kinase.

**1.3.3 免疫荧光法** 各组细胞处理 72 h 之后制作细胞爬片,然后用 4%的多聚甲醛固定爬片 15 min。随后用 PBS 浸洗玻片 3 次,每次 5 min。滴加 0.1% TritonX-100 至玻片使其完全覆盖细胞,室温孵育 30 min。然后用 PBS 浸洗玻片 3 次,每次 5 min。滴加山羊血清于玻片上至完全覆盖细胞,室温封闭 15 min。滴加 AMPK $\alpha$ 1(1:200)及 PTEN(1:100)的一抗至完全覆盖细胞,4℃孵育过夜。弃去一抗,用 PBS 浸洗玻片 3 次,每次 5 min。滴加 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG(1:200)至完全覆盖细胞,室温孵育 60 min。弃去二抗,用 PBS 浸洗玻片 3 次,每次 5 min。滴加 DAPI 至完全覆盖细胞以复染核,避光孵育 5 min。弃去 DAPI,用 PBS 浸洗玻片 3 次,每次 5 min。最后用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,然后在荧光显微镜下观察并采集图像。

### 1.4 统计学处理

SPSS 19.0 统计学软件用于本研究数据的分析。其中均数 $\pm$ 标准差的形式为本研究所用数据的表示形式,单因素方差分析(One-way ANOVA)用于多组间差异比较, LSD-t 检验用于两两比较,当  $P < 0.05$  时认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 流式细胞仪检测细胞凋亡

使用 1.0 mmol/L 的 PA 处理  $\beta$ TC6 细胞后,用 AnnexinV-PI 双染技术检测各组细胞凋亡情况,结果如图 1 所示。可以看出,与 Con 组( $6.03 \pm 0.34$ )相比,PA( $36.46 \pm 1.52$ )可诱导  $\beta$ TC6 细胞的凋亡。与 PA 相比,BBR 组( $21.15 \pm 0.36$ ) $\beta$ TC6 细胞的凋亡情况有所缓解,说明小檗碱对氧化应激具有保护作用。

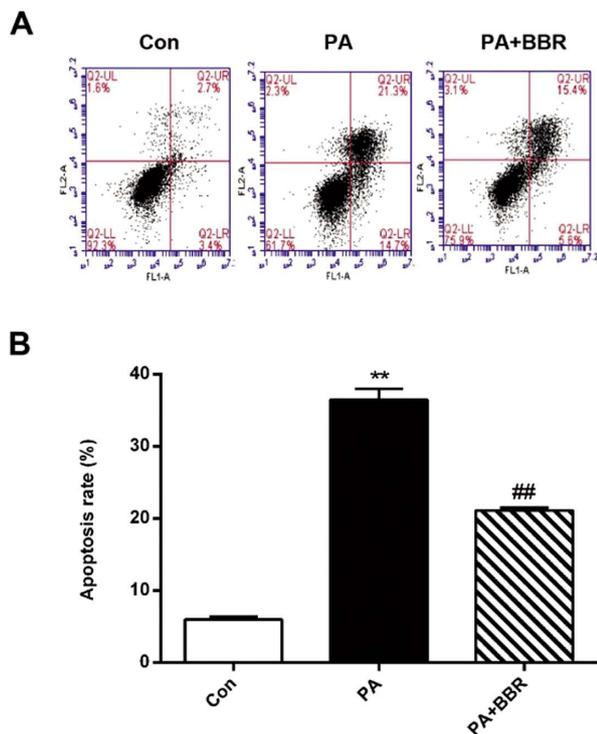


图 1 流式检测各组细胞凋亡情况

Fig.1 The apoptosis of  $\beta$ TC6 cells was evaluated by flow cytometry analysis

Note: Con, negative control; PA, Palmitic acid; BBR, berberine.

\*\* $P < 0.05$ , compared with the Con group;

# $P < 0.05$ , compared with the PA group.

### 2.2 RT-qPCR 检测各处理组相关信号转录因子 AMPK、PTEN 的变化

采用 RT-qPCR 的方法检测各组 AMPK 及 PTEN 的表达情况,结果如图 2 所示。可以发现,在转染 24 h 后,与对照组 Con( $1.00 \pm 0.06$ )相比,PA 组( $2.08 \pm 0.10$ )PTEN 的表达量显著升高。而与 PA 组相比,BBR 治疗组( $1.96 \pm 0.09$ )PTEN 的表达量没有显著变化。在转染 48 h 后,与 Con( $0.95 \pm 0.07$ )相比,PA 处理组 ( $3.40 \pm 0.30$ )PTEN 的表达量显著升高。而与 PA 组相比,BBR 治疗组 ( $2.25 \pm 0.15$ )PTEN 的表达量显著降低 (图 2A),说明 BBR 对 PTEN 的表达有抑制作用。相反地,与对照组 Con( $1.00 \pm 0.09$ )相比,AMPK 的表达在 PA( $0.86 \pm 0.02$ )及 BBR( $0.90 \pm 0.03$ )作用 24 h 后均没有显著变化。随着时间延长至 48 h,与对照组 Con( $1.01 \pm 0.10$ )相比,PA 组( $0.64 \pm 0.05$ )AMPK 的表达显著降低。而与 PA 组相比,BBR 治疗组( $0.84 \pm 0.06$ )AMPK 的表达却显著升高(图 2B)。进一步地,与对照组 Con( $1.09 \pm 0.06$ ),AMPK 的表达在 PA( $0.35 \pm 0.03$ )作用 72 h 后显著降低,而在 BBR( $0.79 \pm 0.04$ )作用 72 h 后却显著升高,表明 BBR 可以促进 AMPK 转录及表达,对 AMPK 有激活

作用。

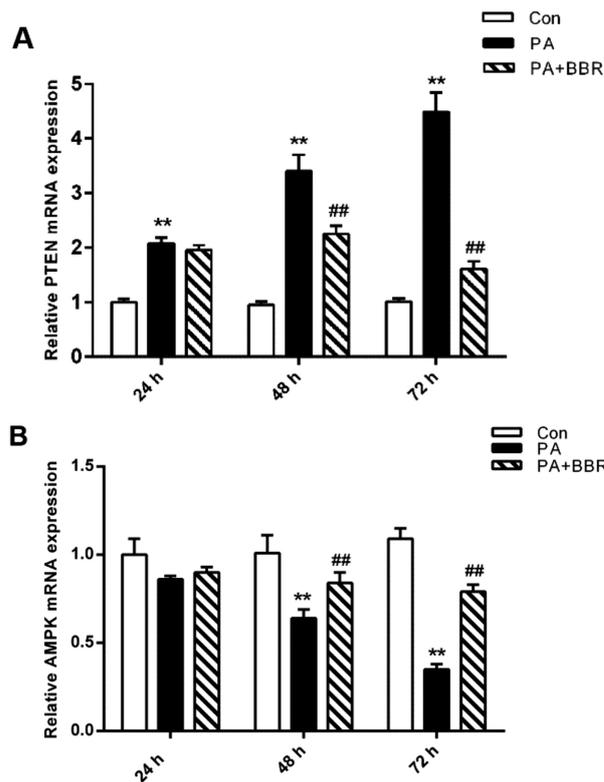


图 2 各组细胞 PTEN(A)及 AMPK(B)的 RT-qPCR 结果

Fig.2 The expressions of PTEN (A) and AMPK (B) were determined by RT-qPCR

Note: Con, negative control; PA, Palmitic acid; BBR, berberine.

\*\* $P < 0.05$ , compared with the Con group;

# $P < 0.05$ , compared with the PA group.

### 2.3 免疫荧光试验检测各处理组相关信号转录因子 AMPK 及 PTEN 表达的变化

进一步地,本研究利用免疫荧光的方法检测 AMPK 及 PTEN 表达的变化,结果如图 3 所示。可以看到,与 Con ( $1777.45 \pm 45.02$ )相比,在 PA( $1653.34 \pm 19.29$ )组 AMPK 的表达呈降低趋势,表明细胞氧化损伤严重时抑制了 AMPK 的表达及转录。在 BBR( $1441.10 \pm 18.63$ )作用后,AMPK 的表达与 PA 相比显著降低,暗示着 BBR 并不能激活 AMPK 的表达。此外,与 Con 相比 ( $1636.68 \pm 34.84$ ),PTEN 的表达在 PA ( $7725.37 \pm 128.01$ ) 处理后显著升高,而在 BBR ( $4843.22 \pm 130.05$ )作用后却显著降低,说明细胞氧化损伤严重时激活了 PTEN 的表达,并且 BBR 治疗能够抑制 PTEN。

## 3 讨论

近年来,T2DM 人群呈逐年上升的趋势,其作为代谢性疾病,发病机制十分复杂。胰岛  $\beta$  细胞是目前 T2DM 发病机制研究的热点,本研究在体外采用 1 mmol/L PA 成功诱导了  $\beta$ TC6 细胞的凋亡,表明高浓度的 PA 可促进胰岛  $\beta$  细胞的凋亡,进一步验证了“脂毒性引起胰岛细胞凋亡的重要因素”这一学说。小檗碱是一种异喹啉类生物碱,主要存在于中药黄连及云连等的根茎中。近年来,大量研究表明小檗碱具有降低血糖、调节血

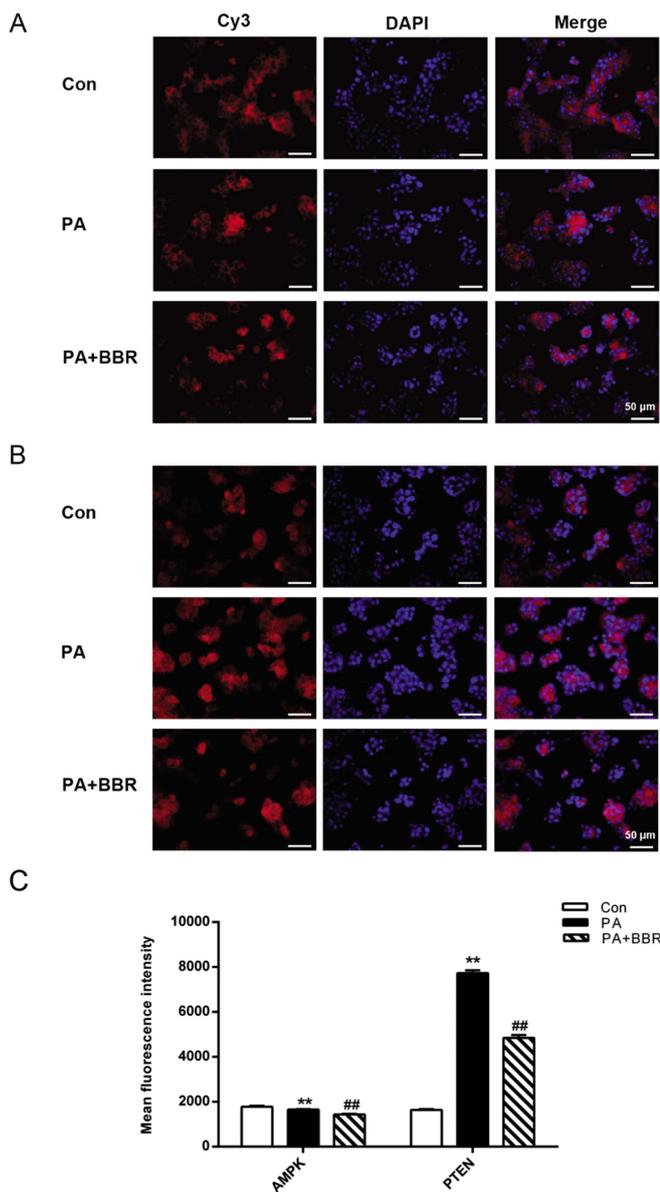


图3 免疫荧光检测各组细胞相关信号转录因子的表达情况

Fig.3 The expressions of the signaling molecules related with  $\beta$ TC6 cells in each group were estimated by immunofluorescence

Note: Con, negative control; PA, Palmitic acid; BBR, berberine.

\*\* $P < 0.05$ , compared with the Con group;

## $P < 0.05$ , compared with the PA group.

脂、改善胰岛素抵抗、抑制肠道葡萄糖吸收等多重功效<sup>[8,9]</sup>,可影响多种细胞内信号转导通路的活性。小檗碱做为黄连素的主要成分,药理作用广泛,在临床上常用于多种疾病的治疗。近年来大量的研究表明小檗碱对糖尿病具有较好的疗效,研究发现在体外培养的细胞、动物实验及人体内,小檗碱的降糖效果与二甲双胍相似。Zhang<sup>[10]</sup>等人的研究表明小檗碱有调节体温、调控代谢、促进棕色脂肪生成等作用,这再次证明了小檗碱在调控代谢方面具有重要作用。本研究通过流式细胞术检测了  $\beta$ TC6 细胞在 PA 及小檗碱作用下细胞凋亡情况,结果发现 PA 能够诱导细胞凋亡,而小檗碱作用后, $\beta$ TC6 细胞的凋亡情况有所缓解,这说明小檗碱对 PA 诱导的细胞氧化应激具有保护作用。

PTEN 是一种肿瘤抑制基因,作为具有磷酸酶活性的抑癌

基因,其在肿瘤的发生中有着重要作用<sup>[11]</sup>。体外研究证明小檗碱可以通过抑制 PTEN 的表达,激活 Akt 途径,从而引起清道夫受体(SR-A)表达的改变,进而促进泡沫细胞的形成和动脉粥样硬化的进展<sup>[12]</sup>。近期越来越多的研究已证实,PTEN 在糖尿病的发生发展中扮演重要的角色,尤其是在以肝脏、肌肉、脂肪为主的胰岛素靶器官中,PTEN 的缺失影响着葡萄糖的代谢,能够抑制小鼠糖尿病的发生<sup>[13,14]</sup>。此外,之前的研究表明 PTEN 可能参与了小檗碱减轻 FFAs 诱导的  $\beta$  细胞损害过程,暗示着 PTEN 参与了 FFAs 诱导的  $\beta$  细胞凋亡<sup>[15,16]</sup>。研究还发现小檗碱对四氧嘧啶诱导的大鼠  $\beta$  细胞株 INS-1 损伤具有一定的保护作用,并且证实 PTEN 可能通过 PI3K/AKT 信号通路来发挥作用<sup>[17]</sup>。类似地,本研究通过体外试验发现棕榈酸引起胰岛  $\beta$ TC6 细胞凋亡增加后出现 PTEN 的表达增高,暗示 PTEN 信号通路与胰岛  $\beta$ TC6 细胞的凋亡有关,而在小檗碱作用后细胞凋亡减少,PTEN 降低,进一步说明 PTEN 通路可能参与了胰岛  $\beta$ TC6 细胞的凋亡。而 PTEN 具体是通过参与哪一通路来调控胰岛  $\beta$ TC6 的细胞凋亡仍有待进一步研究。

AMPK 丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶,在真核细胞中广泛存在,有  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三种亚型。 $\alpha$  由  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  两个亚单位共同组成,其分子量为 63 kDa, $\alpha$  亚单位的 N 末端是起催化作用的核心部位,含有一个典型的丝 / 苏氨酸蛋白激酶的催化区域,C 末端则主要负责调节活性<sup>[18]</sup>。 $\alpha$  亚单位的数个位点均可被磷酸化,特别是丝氨酸 172 位点及其磷酸化对 AMPK 活性具有调节作用。越来越多的研究证明,AMPK 在小檗碱抗氧化应激的过程中发挥着重要作用<sup>[19]</sup>,尤其是在肝脏、肌肉、脂肪组织中促进葡萄糖酵解、抑制肝糖原异生等过程。通过进一步深入探索,最新的研究发现 AMPK 在氧化应激损伤中同样发挥着重要作用<sup>[20]</sup>。有证据表明,小檗碱通过激活 AMPK 抑制细胞脂质的合成<sup>[21]</sup>。在小檗碱处理的糖尿病小鼠中,可以看到 AMPK 所介导的 NOX 的下调以及 SOD 表达升高。另外有证据表明,小檗碱在小鼠动脉中促进线粒体解耦蛋白 UCP2 的表达并抑制氧化应激反应,同样具有 AMPK 依赖性<sup>[21]</sup>。此外,Xie 等人的研究证明小檗碱作用的高脂饮食小鼠的肝脏和内脏脂肪组织中,AMPK1 $\alpha$  的 mRNA 的表达水平呈现升高趋势<sup>[22]</sup>。最近的研究也发现小檗碱在高糖处理的 INS-1E 细胞和糖尿病小鼠中能够通过激活 AMPK 的表达水平来抑制氧化应激,进而恢复胰岛素分泌<sup>[23]</sup>。本研究发现在棕榈酸引起胰岛  $\beta$ TC6 细胞凋亡发生时,AMPK 的表达却呈现降低趋势,这暗示着氧化损伤可能抑制了 AMPK 的表达。而在小檗碱作用后, $\beta$ TC6 细胞的凋亡有所缓解,这表明小檗碱在发挥抗氧化应激的时候抑制了细胞的凋亡。之前的研究表明 AMPK 激活剂二甲双胍可以在脂肪前体细胞中显著抑制 PTEN 的表达,并通过 AMPK 抑制剂可以逆转二甲双胍对 PTEN 表达的抑制<sup>[24,25]</sup>。这些结果均说明 AMPK 对  $\beta$  细胞可能具有保护作用。此外,研究显示 AMPK 与 PTEN 在细胞的多种生物学活动中有密切联系,但是 AMPK 与 PTEN 的相互关系似乎在不同的细胞中存在差异。众所周知 T2DM 的发病关键在于脂代谢发生异常,进而引起胰岛  $\beta$  细胞发生损伤,从而引起以慢性高血糖为特征的代谢性疾病,长期可引发并发症,造成多系统损害,甚至导致致死以及致残的发

生。而大量研究发现小檗碱在降低血糖、降低血脂、改善胰岛素抵抗等方面均发挥作用。本研究进一步证实小檗碱对  $\beta$  细胞具有保护作用,能够阻止糖尿病  $\beta$  细胞发生进行性缺失。多种作用的特点,使得小檗碱越来越成为研究糖尿病治疗的热点药物。但其具体机制有待于进一步的研究证实。虽然本研究证实 AMPK 和 PTEN 参与了多种细胞的代谢,但 AMPK 与 PTEN 在此过程中是否作用于同一个信号通路及具体作用机制仍有待进一步研究。

#### 参考文献(References)

- [1] Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death?[J]. Science, 2005, 307: 380-384
- [2] Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, et al. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes[J]. Diabetes, 2001, 50: S154
- [3] U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group[J]. Diabetes, 1995, 44(11): 1249-1258
- [4] Lee YS, Kim WS, Kim KH, et al. Berberine, a Natural Plant Product, Activates AMP-Activated Protein Kinase With Beneficial Metabolic Effects in Diabetic and Insulin-Resistant States[J]. Diabetes, 2006, 55 (5): 2256
- [5] Zhang Z, Zhang H, Li B, et al. Berberine activates thermogenesis in white and brown adipose tissue [J]. Nature Communications, 2013, 5 (8): 5493
- [6] Byoung-Seob K, Soo Bong C, Seong Kyu P, et al. Insulin sensitizing and insulinotropic action of berberine from *Cortidis rhizoma* [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2005, 28: 1431-1437
- [7] Stile BL, Christine KM, Wei G, et al. Selective deletion of Pten in pancreatic beta cells leads to increased islet mass and resistance to STZ-induced diabetes [J]. Molecular & Cellular Biology, 2006, 26: 2772-2781
- [8] Guang N, Jie H, Yufang B, et al. Progress in diabetes research in China [J]. Journal of Diabetes, 2010, 1(3): 163-172
- [9] T C, B P, C B, et al. Hypoglycemic and insulin-sensitizing effects of berberine in high-fat diet- and streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Metabolism: clinical and experimental, 2011, 60(2): 298-305
- [10] Zhang Z, Zhang H, Li B, et al. Berberine activates thermogenesis in white and brown adipose tissue[J]. Nature Communications, 2014, 25 (5): 5493
- [11] Baker SJ. PTEN Enters the Nuclear Age[J]. Cell, 2007, 128(1): 25-28
- [12] Wenqi, Xiudan, Zheng, et al. Berberine promotes the development of atherosclerosis and foam cell formation by inducing scavenger receptor A expression in macrophage[J]. Cell Research, 2009, 19 (8): 1006-1017
- [13] Bangyan S, Ying W, Andreas S, et al. Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(7): 2082-2087
- [14] Tong Z, Fan Y, Zhang W. Pancreas-specific Pten deficiency causes partial resistance to diabetes and elevated hepatic AKT signaling[J]. Cell Research, 2009, 19(6): 710-719
- [15] 张娟, 刘文妹, 赵原, 等. 小檗碱对游离脂肪酸损伤的胰岛  $\beta$ TC3 细胞的保护作用[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16 (13): 2442-2447
- [16] 张娟, 赵原, 赵晓宏, 等. PTEN 参与小檗碱保护脂毒性损伤的胰岛  $\beta$ TC3 细胞[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(5): 810-814
- [17] 宋白利, 蒲若蕾, 孙琤, 等. 油酸对  $\beta$ TC3 细胞 PTEN mRNA 表达的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2007, 23(1): 32-34
- [18] 杨成红, 邓思思, 臧奕. DN-AMPK 腺病毒载体的构建及其在小鼠成肌细胞系 C2C12 肌管分化中的影响[J]. 生物技术通报, 2012, 4: 135-140
- [19] Wang J, Xiong X, Feng B, et al. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2014: Aspirin resistance and promoting blood circulation and removing blood stasis: current situation and prospectives [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 954863
- [20] Zhang M, Lv X, Li J, et al. Sodium caprate augments the hypoglycemic effect of berberine via AMPK in inhibiting hepatic gluconeogenesis[J]. Molecular & Cellular Endocrinology, 2012, 363: 122-130
- [21] Jean-Marie B, Nicolas A, Pascal G, et al. Inhibition of lipid synthesis through activation of AMP kinase: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine [J]. Journal of Lipid Research, 2006, 47(6): 1281-1288
- [22] Xie W, Gu D, Li J, et al. Effects and action mechanisms of berberine and *Rhizoma coptidis* on gut microbes and obesity in high-fat diet-fed C57BL/6J mice[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24520
- [23] Liu L, Liu J, Gao Y, et al. Uncoupling protein-2 mediates the protective action of berberine against oxidative stress in rat insulinoma INS-1E cells and in diabetic mouse islets [J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(13): 3246-3254
- [24] Soo Kyung L, Jung Ok L, Hae KJ, et al. Metformin sensitizes insulin signaling through AMPK-mediated PTEN down-regulation in preadipocyte 3T3-L1 cells[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2011, 112(5): 1259-1267
- [25] 吴惠玲. 小檗碱对胰岛  $\beta$  细胞的保护作用及其机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30 (12): 2213-2218