

# 金线莲苷促进骨骼肌细胞摄取葡萄糖的分子机制研究

朱碧丽<sup>1</sup>, 吴序栋<sup>1</sup>, 辛启航<sup>1</sup>, 王孟环<sup>1</sup>, 胡小鹏<sup>2,3</sup>, 贺震旦<sup>2,3</sup>, 刘立忠<sup>1</sup>

(1. 深圳大学医学部基础医学院, 广东深圳 518060) (2. 深圳大学医学部药学院, 广东深圳 518060)

(3. 深圳新型天然保健品重点实验室, 广东深圳 518060)

**摘要:** 在本研究中, 先诱导大鼠骨骼肌细胞分化为成熟的肌管细胞, 然后以肌管细胞为模型, 在胰岛素敏感和胰岛素抵抗的情况下, 通过蛋白免疫印迹的方法检测金线莲苷对蛋白激酶 Akt 和 AMPK 的活化, 以荧光标记的 2-脱氧葡萄糖为能量底物检测金线莲苷处理前后细胞对葡萄糖的摄取。结果显示在正常细胞中, 10 nM 金线莲苷作用 24 h 可显著增加 Akt(34.53%,  $p < 0.05$ )和 AMPK 的活性(149.92%,  $p < 0.05$ ), 同时促进细胞对葡萄糖的摄取(43.35%,  $p < 0.05$ )。在胰岛素抵抗的细胞中, 金线莲苷对 AMPK 的活化不受影响, 并且可改善胰岛素对 Akt 的激活作用(79.05%,  $p < 0.05$ )。在正常及胰岛素抵抗的情况下, 金线莲苷对胰岛素诱导的葡萄糖摄取都具有协同作用。这些结果表明金线莲苷可通过调控 Akt 和 AMPK 的活性改善细胞胰岛素抵抗, 促进胰岛素抵抗细胞对葡萄糖的摄取。

**关键词:** 金线莲苷; 骨骼肌细胞; 胰岛素抵抗

文章编号: 1673-9078(2018)06-18-23

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.6.003

## Molecular Mechanism of Kinsenoside in Promoting Glucose Uptake in Skeletal Muscle Cells

ZHU Bi-li<sup>1</sup>, WU Xu-li<sup>1</sup>, XIN Qi-hang<sup>1</sup>, WANG Meng-huan<sup>1</sup>, HU Xiao-peng<sup>2,3</sup>, HE Zhen-dan<sup>2,3</sup>, LIU Li-zhong<sup>1</sup>

(1.School of Medicine Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)(2.Department of Pharmacy Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)(3.Shenzhen Key Laboratory of Novel Natural Health Care Products, Shenzhen 518060, China)

**Abstract:** In this study, rat skeletal muscle myoblasts were induced to differentiate into mature myotubes. The effect of kinsenoside on the Akt and AMPK activation was examined by western blot and glucose uptake was measured by fluorescence-labeled 2-deoxyglucose in both insulin-sensitive and insulin-resistant myotubes. The results showed that in normal cells, treatment with 10 nM kinsenoside for 24 h increased the activity of Akt (34.53%,  $p < 0.05$ ) and AMPK (149.92%,  $p < 0.05$ ), and simultaneously promoted cellular uptake of glucose effectively (43.35%,  $p < 0.05$ ). In insulin resistant cells, the impaired insulin-stimulated Akt activation was ameliorated (79.05%,  $p < 0.05$ ) by kinsenoside treatment. In the case of insulin sensitive and insulin resistant state, kinsenoside exhibited synergistic effect on the insulin-induced glucose uptake. These results suggested that kinsenoside might overcome insulin resistance via modulating both Akt and AMPK activity, leading to increase glucose uptake in insulin resistant cells.

**Key words:** kinsenoside; skeletal muscle cell; insulin resistant

随着生活水平的提高, 越来越多的人患有肥胖<sup>[1]</sup>, 代谢综合征<sup>[2]</sup>、心脏病<sup>[3]</sup>和 II 型糖尿病<sup>[4]</sup>, 这些疾病的发生机制都与胰岛素抵抗(Insulin Resistance, IR)<sup>[5]</sup>有

收稿日期: 2018-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81570784、31670360); 深圳市战略性新兴产业发展专项资金资助项目 (CXZZ20150601110000604); 深圳市未来产业专项资金资助项目 (JCYJ20150324141711688)

作者简介: 朱碧丽 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 抗糖尿病药物筛选及机制研究

通讯作者: 贺震旦 (1963-), 男, 教授, 研究方向: 天然小分子药物; 刘立忠 (1972-), 男, 副教授, 研究方向: 糖尿病发病机制研究

关。2 型糖尿病状态下脂肪酸和甘油三酯在骨骼肌细胞内的累积, 导致骨骼肌对胰岛素的敏感性降低, 是引起胰岛素抵抗的重要原因<sup>[6]</sup>。由于在胰岛素刺激下, 体内超过 70% 的葡萄糖可被骨骼肌细胞摄取并利用<sup>[7]</sup>, 所以骨骼肌是摄取葡萄糖的最主要组织。胰岛素主要通过磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)信号通路进行代谢调节<sup>[8]</sup>, 磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)信号通路是胰岛素抵抗相关的一条信号通路, 与胰岛素抵抗相关的 2 型糖尿病有着不可分割的联系<sup>[8-11]</sup>。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)作为能量调控

器,在调节肝脏、脂肪和骨骼肌的糖脂代谢方面发挥着重要的作用,并且维持着能量供需平衡<sup>[12]</sup>。AMPK参与了体内葡萄糖、脂肪酸和蛋白质代谢的调节,因此在肥胖、糖尿病、代谢综合征患者的代谢调节中,AMPK是关键靶点之一<sup>[13,14]</sup>。骨骼肌的胰岛素敏感性降低是机体胰岛素抵抗的主要原因,因此临床上仍然需要能够促进骨骼肌摄取葡萄糖,降低血糖浓度,恢复机体的正常胰岛素水平,并且副作用小的药物治疗胰岛素抵抗及2型糖尿病。

金线莲苷(kinsenoside)是葡萄糖与五元内酯环的手性碳以糖苷键形式连接形成的葡萄糖苷,是金线莲的特质性成分<sup>[15]</sup>。金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)即花叶开唇兰,又名金蚕、金线兰等,是兰科开唇兰属的一种多年生的草本植物<sup>[16]</sup>,我国南方福建、台湾、广西、广东、四川和云南等省都有丰富的资源<sup>[17]</sup>,它是我国传统的珍贵药材,有清热解毒、滋补养阴降火和消炎减轻疼痛等功效<sup>[18]</sup>。在现代中药研究中,金线莲多用于糖尿病、高血脂、高血压和肿瘤等疾病的治疗<sup>[19]</sup>。据文献报道该属植物含金线莲苷的水提物有降血糖、降血脂、保护肝脏、止痛和消炎等广泛的药理活性<sup>[20,21]</sup>。随着研究的深入,金线莲的药用价值日益凸显,其治疗效果引起广泛的关注,有良好的开发前景。

本课题以大鼠骨骼肌细胞为模型,研究在正常及胰岛素抵抗情况下,金线莲苷对细胞摄取葡萄糖的促进作用。结果显示金线莲苷可通过激活Akt和AMPK来增加细胞对葡萄糖的摄取,进而改善胰岛素抵抗的情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

大鼠骨骼肌细胞系L6myc,由Dr.Amira Klip友情提供;金线莲苷,深圳大学贺震旦教授课题组提供;必需基本培养(简称 $\alpha$ -MEM),Gibco公司;磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline,简称PBS),Notlas公司;胰蛋白酶,Gibco公司;双抗,Cell Signaling Technology公司;葡萄糖(Glucose),Sigma公司;胰岛素(insulin),诺和诺德公司;抗体,Cell Signaling Technology公司;ECL发光液试剂盒(Enhanced Chemiluminescence),Bio-Rad公司;分离胶缓冲液(Resolving Gel Buffer pH 8.8),Bio-Rad公司;积沉胶缓冲液(Stacking Gel Buffer pH 6.8),Bio-Rad公司;十二烷基磺酸钠(Sodium Dodecyl Sulphate,简称SDS),Bio-Rad公司;过硫酸铵(Ammonium Persulphate,简

称APS),Amresco公司;四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine,简称TEMED),Amresco公司;Trizma碱(Trizma Base,简称Triz),Vetec公司;吐温20(Tween-20),Sangon Biotech公司。

### 1.2 仪器与设备

Purelab Ultra超纯水仪,ELGA公司;小型垂直电泳仪,美国Bio-Rad公司;CO<sub>2</sub>培养箱,广东丹利科技有限公司;超净工作台,浩瀚技术有限公司;小型台式高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;化学发光成像仪,Clinx Science Instruments公司;摇床,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;紫外分光光度计,Thermo Fisher Scientific公司;漩涡混合器,江苏金怡仪器科技有限公司;水浴锅,上海精宏实验设备有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 L6骨骼肌细胞培养

将L6myc肌母细胞从液氮中取出后,迅速置于37℃水浴中,充分融化。转移至含10%的血清和含1%双抗的 $\alpha$ -MEM培养瓶中,充分分散细胞并将培养瓶放入培养箱中(37℃、5%CO<sub>2</sub>)培养。过夜后,更换新鲜的培养基。根据细胞的生长情况,一般每两天传一次代。L6myc肌母细胞在培养瓶中的密度达到60%~70%后,消化传代( $10^4$  cells/mL),并置于诱导培养基中( $\alpha$ -MEM,2%胎牛血清,1%双抗),每两天换一次培养基。6~7d后90%以上的细胞融合为多核、长树枝状或手状的肌管细胞时,可用于实验。

#### 1.3.2 细胞处理

L6myc肌母细胞诱导分化为成熟肌管细胞后,用于实验。金线莲苷(kinsenoside)以不同浓度(10 nM,100 nM,1  $\mu$ M)分别作用细胞1 h和24 h,以胰岛素和黄连素小檗碱为对照,确定金线莲苷对骨骼肌细胞的最适浓度和时间。采用高糖高胰岛素(HGI)诱导细胞产生胰岛素抵抗。

#### 1.3.3 蛋白免疫印迹分析

于细胞中加入RIPA(使用前加入1%protease inhibitor cocktail,2%NaF和2%PMSF)裂解液,刮取细胞至冰上裂解30 min后4℃,14000 r/min高速离心15 min,将上清液吸取至EP管中。进行BCA蛋白定量,各取20  $\mu$ g蛋白样品于SDS-PAGE凝胶上进行电泳,电泳结束后进行电转。5%BSA封闭1 h后分别加入一抗4℃孵育过夜。第二天TBST洗膜三次后二抗孵育1 h,TBST洗膜三次后进行ECL法发光液显影,曝光。结果用ImageJ软件对图像进行灰度扫描处理并进行量化分析,以GAPDH作为内参,用灰度值

的比值表示相应样品所检测蛋白质的相对含量。

### 1.3.4 2-NBDG 法检测葡萄糖摄取

2-脱氧葡萄糖(2-DG)是天然 D 型葡萄糖衍生物,通过葡萄糖转运体蛋白进入细胞。2-DG 第 2 位氧原子被荧光基团 NBD 取代即形成 2-DG 的荧光类似物,即荧光标记 2-脱氧葡萄糖 (2-NBDG)。2-NBDG 激发波长为 460 nm,发射波长为 540 nm,能够被荧光酶标仪、荧光显微镜及流式细胞仪等仪器探测。细胞根据实验条件处理后,用常温 PBS 润洗后以 2-NBDG 于培养箱中孵育 30 min。PBS 润洗两次后进行读数。

### 1.4 统计分析

采用 ImageJ 软件对图像进行灰度扫描处理并进行量化分析和 GraphPad Prism 5 软件对所得的数据进行显著性分析。与对照组相比较,显著水平设定为 \* $p < 0.05$  和 # $p < 0.05$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 L6 骨骼肌细胞诱导分化的形态学观察

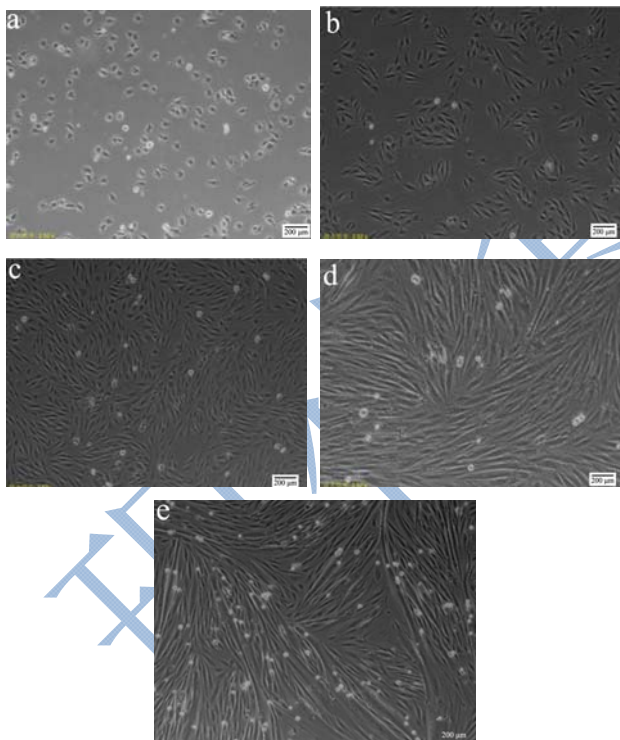


图1 骨骼肌细胞形态学观察

Fig.1 Morphological observation of skeletal muscle cells

注:(a)骨骼肌细胞接种后 6 h 的形态;(b)细胞接种后 24 h 的形态;(c)细胞接种后 48 h 的形态;(d)细胞诱导分化第 4 d 的形态;(e)细胞诱导分化第 6 d 的形态。

细胞复苏后对细胞进行培养和诱导分化,观察细胞形态。L6 骨骼肌细胞在接种的 6~8 h 会轻微贴壁,

此时细胞还未完全展开,呈单个圆形或梭形,见图 1(a)。24 h 后细胞完全展开,细胞数有所增加,见图 1(b)。48 h 后细胞密度增加,细胞出现排列现象,见图 1(c)。在 2%FBS 诱导分化培养基的作用下,第 3~4 d 细胞有规律地平行排列,细胞与细胞之间相互融合,见图 1(d)。第 6 d 时 85%以上的细胞融合成肌管细胞。肌管为光滑长条形,许多细胞核聚集在一起,位于肌管的中央,肌管之间多呈平行排列,见图 1(e)。肌管细胞为成熟的骨骼肌细胞,所以本研究以分化好的肌管细胞为模型进行各种实验。

### 2.2 金线莲苷作用细胞可显著激活 Akt 和 AMPK

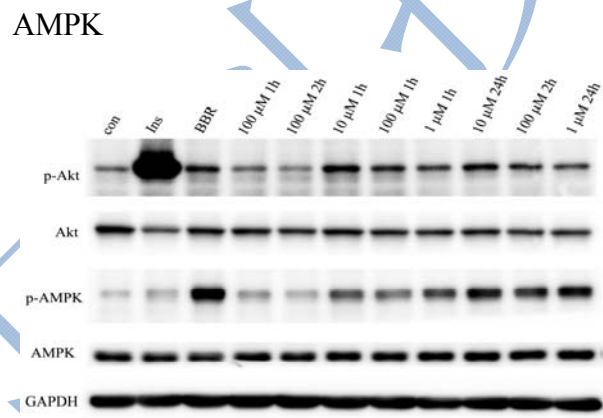


图2 金线莲苷对 Akt 和 AMPK 活性和表达的影响

Fig.2 Effects of kinsenoside on the activity and expression of Akt and AMPK

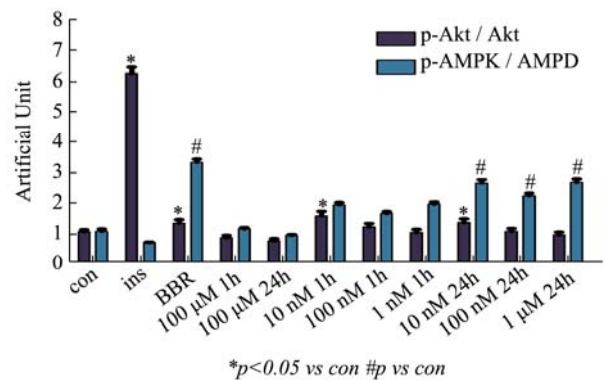


图3 Western Blot 图像量化分析

Fig.3 Quantitative analysis of Western Blot

Akt 与 AMPK 是胰岛素信号通路和 AMPK 信号通路中的重要靶点,参与细胞对葡萄糖的摄取,它们的活性高低与细胞摄取葡萄糖密切相关。金线莲苷(kinsenoside, Kin)以不同浓度(10 nM, 100 nM, 1 μM, 100 μM)分别作用细胞 1 h 和 24 h,同时以胰岛素(insulin, Ins)作用 10 min 和黄连素小檗碱(berberine, BBR)作用 1 h 作为对照组。结果显示,

与对照组相比, 金线莲苷浓度为 100  $\mu\text{M}$ , 作用 1 h 和 24 h 对 Akt(与对照组相比, 1 h 降低 15.50%,  $p>0.05$ ; 24 h 降低 26.55%,  $p>0.05$ )和 AMPK(与对照组相比, 1 h 增加 24.37%,  $p>0.05$ ; 24 h 降低 2.79%,  $p>0.05$ )均无显著激活作用, 说明高浓度的金线莲苷可能会对细胞产生毒性作用。当 10 nM、100 nM 和 1  $\mu\text{M}$  金线莲苷作用细胞 1 h 后, 与对照组相比, Akt 活性分别增加了 56.46%( $p<0.05$ )、19.79%( $p>0.05$ )、1.88% ( $p>0.05$ )。说明只有 10 nM 金线莲苷显著激活了 Akt; 10 nM、100 nM 和 1  $\mu\text{M}$  金线莲苷作用 1 h 后, 与对照组相比, AMPK 活性分别增加了 15.54%( $p>0.05$ )、71.39%( $p<0.05$ )、94.70%( $p<0.05$ ), 说明 100 nM 和 1  $\mu\text{M}$  的金线莲苷激活 AMPK 作用较好; 当 10 nM、100 nM 金线莲苷作用细胞 24 h 后, 与对照组相比, Akt 的活性分别增加了 34.53%( $p<0.05$ )、5.53%( $p>0.05$ ), 而 1  $\mu\text{M}$  金线莲苷作用后 Akt 活性降低了 6.20%( $p>0.05$ ), 说明 10 nM 激活 Akt 的效果最好。当 10 nM、100 nM 和 1  $\mu\text{M}$  金线莲苷作用 24 h 后, 与对照组相比, AMPK 的活性分别增加了 149.92%( $p<0.05$ )、114.26%( $p<0.05$ )、147.84%( $p<0.05$ ), 说明三个浓度的金线莲苷都可显著激活 AMPK, 见图 2 和图 3 (图 3 是对图 2 中各蛋白条带的定量分析结果)。结果显示, 10 nM 金线莲苷作用细胞 24 h 后对 Akt 和 AMPK 同时激活的作用最为显著, 以后的试验中均采用此条件处理细胞。

### 2.3 正常情况下金线莲苷促进细胞对葡萄糖的摄取

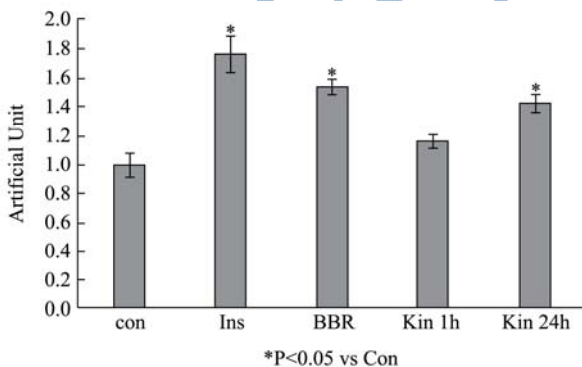


图 4 金线莲苷对细胞摄取葡萄糖的作用

Fig.4 The effect of kinsenoside on the glucose uptake of cells

与蛋白检测结果相对应, 葡萄糖吸收实验显示, 以胰岛素 (Ins) 和黄连素小檗碱 (BBR) 为参照, 10 nM 金线莲苷 (Kin) 作用细胞 1 h 即可增加细胞对葡萄糖的吸收 (与对照组相比, 增加 19.32%,  $p>0.05$ ), 但不显著; 作用 24 h 后可显著增加细胞对葡萄糖的摄

取 (与对照组相比, 增加 43.35%,  $p<0.05$ ), 见图 4。结合图 2 的结果, 我们发现 10 nM 金线莲苷短期作用 (1 h) 只能显著激活 Akt(与对照组相比, 增加 54.46%,  $p<0.05$ ), 虽然 AMPK 的活性也有增加的趋势, 但不显著, 此时金线莲苷引发的细胞对葡萄糖的摄取有轻微的增加 (与对照组相比, 增加 19.32%,  $p>0.05$ )。当 10 nM 金线莲苷作用 24 h 后, 可有效激活 Akt 和 AMPK, 同时显著增加细胞对葡萄糖的摄取 (与对照组相比, 增加 43.35%,  $p<0.05$ )。这说明金线莲苷促进细胞摄取葡萄糖需要同时激活 Akt 和 AMPK, 但是以 AMPK 活化为主, 以 Akt 活化为辅。

### 2.4 胰岛素抵抗情况下金线莲苷对 Akt 和 AMPK 的作用

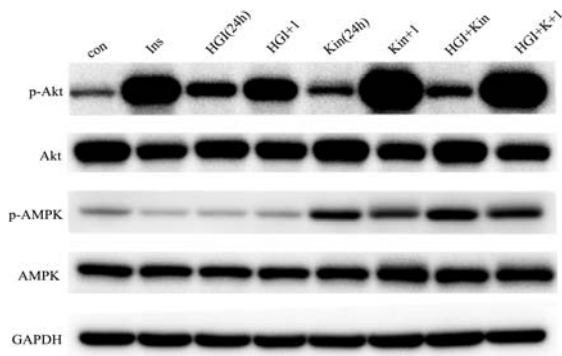


图 5 不同处理条件下 Akt 和 AMPK 活性与表达

Fig.5 Activity and expression of Akt and AMPK under different treatments

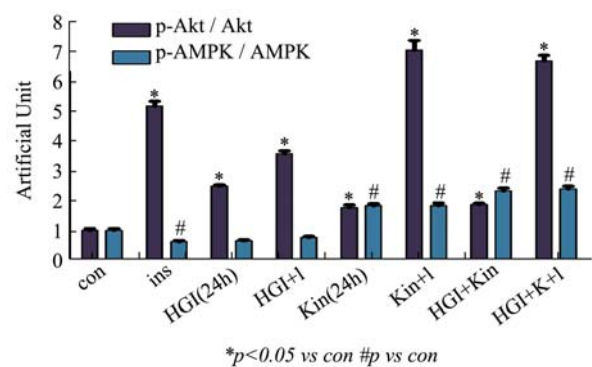


图 6 Western Blot 图像量化分析结果

Fig.6 Quantitative analysis of Western Blot

正常情况下, 胰岛素 (Ins, I) 可激活 Akt(与对照组相比, 增加 434.73%,  $p<0.05$ )。高糖高胰岛素 (High glucose high insulin, HGI) 诱导细胞胰岛素抵抗后, 与对照组比较, 虽然经胰岛素长时间处理后 Akt 本底活性较高, 但是胰岛素再刺激不能显著激活 Akt, 与对照组相比, 对胰岛素的敏感性 (胰岛素加入后 Akt 的活性变化/胰岛素加入前 Akt 的活性变化) 降低了 2.84 倍,

$p < 0.05$ 。说明胰岛素抵抗的细胞模型诱导成功。但金线莲苷 (Kin, K) 在正常和胰岛素抵抗情况下都可激活Akt(与对照组相比, 分别增加了 59.77%,  $p < 0.05$  和 79.05%,  $p < 0.05$ ) 和AMPK(与对照组相比, 分别增加了 91.48%,  $p < 0.05$  和 128.35%,  $p < 0.05$ )。更为重要的是, 金线莲苷可以改善胰岛素抵抗的情况, 恢复了胰岛素对Akt的激活作用, 与胰岛素抵抗组相比, 细胞对胰岛素敏感性增加了 1.17 倍,  $p < 0.05$ 。见图 5 和图 6 (图 6 是对图 5 中各蛋白条带的定量分析结果)。结合图 2 和图 5 的Western Blot结果, 发现胰岛素不但不能激活AMPK, 甚至对AMPK的活性有下调的作用。因为胰岛素引发的是合成代谢, 促进糖原、脂肪和蛋白的合成。而AMPK激活的是分解代谢, 促进糖原、脂肪和蛋白的分解。因此在正常情况下, 胰岛素刺激细胞后所引发的合成代谢占据优势, 对AMPK的活性有一定的抑制作用。但是在胰岛素抵抗的情况下, 胰岛素信号通路受阻, 而AMPK的激活不受影响, 这时激活AMPK后不但促进葡萄糖摄取, 还可在一定程度上改善胰岛素抵抗的作用<sup>[22]</sup>。

## 2.5 金线莲苷可改善胰岛素引发的细胞对葡萄糖的摄取

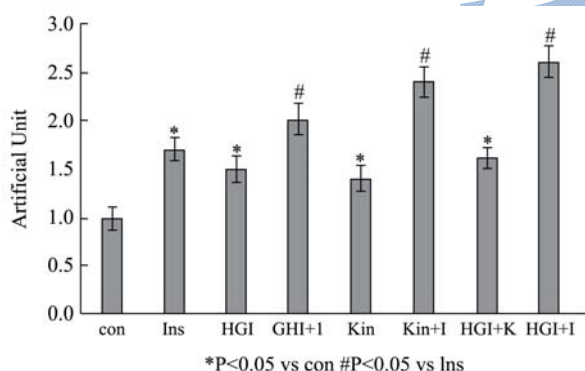


图 7 各个处理因素下葡萄糖的摄取情况

Fig.7 Glucose uptake under various treatment factors

对于正常细胞来说, 胰岛素 (Ins, I) 和金线莲苷 (Kin, K) 都可促进细胞对葡萄糖的摄取 (与对照组相比, 分别增加 72.30%,  $p < 0.05$ 、39.03%,  $p < 0.05$ )。金线莲苷与胰岛素共同作用细胞后, 可引发更多的葡萄糖吸收, 并且实验结果显示金线莲苷与胰岛素共同作用细胞时展示的是协同效应 (与胰岛素促进细胞对葡萄糖摄取相比, 增加 64.70%,  $p < 0.05$ )。高糖高胰岛素 (HGI) 诱导胰岛素抵抗后, 胰岛素促进葡萄糖摄取的作用明显减弱 (与胰岛素促进细胞对葡萄糖摄取相比, 增加 25.70%,  $p > 0.05$ ), 但是金线莲苷仍然可以很好地促进葡萄糖摄取 (与对照组相比, 增加

59.00%,  $p < 0.05$ ), 并且金线莲苷与胰岛素共同作用后, 可进一步增强胰岛素的作用 (与胰岛素促进细胞对葡萄糖摄取相比, 增加 88.70%,  $p < 0.05$ ), 见图 7。这里, 葡萄糖摄取实验与上述的蛋白检测结果相一致。高糖高胰岛素诱导胰岛素抵抗后, 本底的 Akt 活性增加, 所以导致胰岛素抵抗细胞比正常细胞在基础水平上具有较多的葡萄糖吸收。金线莲苷处理胰岛素抵抗的细胞后, 不但增强了 Akt 的活性, 还进一步增加了胰岛素对 Akt 的活化作用, 同时还显著地激活了 AMPK, 所以无论正常细胞还是胰岛素抵抗细胞, 经金线莲苷处理后可显著增加对葡萄糖的摄取。

## 3 结论

胰岛素抵抗会导致糖脂代谢紊乱, 进而引发全身性的代谢紊乱<sup>[23]</sup>。骨骼肌的胰岛素敏感性受损是机体胰岛素抵抗的主要原因。金线莲苷是金线莲的主要成分之一, 已被证明具有增强胰岛素敏感性的作用, 但其具体的分子机制尚不清楚。在本研究中, 利用金线莲提取物金线莲苷作用骨骼肌细胞。实验结果显示, 在细胞正常情况下, 金线莲苷可以增加AMPK和Akt的活性, 并且可促进骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取; 在胰岛素抵抗的细胞中, 金线莲苷可显著改善胰岛素对Akt的激活作用。在正常及胰岛素抵抗情况下, 金线莲苷都可显著激活AMPK, 从而促进细胞摄取葡萄糖。推测体内金线莲苷降糖机制如下: 金线莲苷作用细胞后, 细胞内蛋白激酶Akt与AMPK被激活, 进而促进葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)向细胞膜迁移, 并镶嵌在细胞膜上, 协助葡萄糖从细胞外转运至细胞内, 这样就降低了血糖浓度, 减少了糖毒性, 从而改善了胰岛素抵抗。本研究为应用金线莲苷治疗胰岛素抵抗和 II 型糖尿病提供了理论基础。

## 参考文献

- [1] T L Visscher, B L Heitmann, A Rissanen, et al. A break in the obesity epidemic? Explained by biases or misinterpretation of the data? [J]. Int J Obes (Lond), 2015, 39(2): 189-198
- [2] S O'Neill, L O'Driscoll. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies [J]. Obesity Reviews An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity, 2015, 16(1): 1-12
- [3] E Jokinen. Obesity and cardiovascular disease [J]. Minerva Pediatr, 2015, 67(1): 25-32
- [4] Z Shi. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. New England Journal of Medicine, 2010, 362(25): 2425

- [5] M Gierach, J Gierach, R Junik. Insulin resistance and thyroid disorders [J]. *Endokrynol Pol*, 2014, 65(1): 70-76
- [6] M F Saad, W C Knowler, D J Pettitt, et al. Sequential changes in serum insulin concentration during development of non-insulin-dependent diabetes [J]. *Lancet* (London, England), 1989, 1(8651): 1356-1359
- [7] R A DeFronzo, E Jacot, E Jequier, et al. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization [J]. *Diabetes*, 1981, 30(12): 1000-1007
- [8] M Chi, Y Ye, X D Zhang, et al. Insulin induces drug resistance in melanoma through activation of the PI3K/Akt pathway [J]. *Drug Design Development & Therapy*, 2014, 8: 255-262
- [9] Y Zhang, J Hai, M Cao, et al. Silibinin ameliorates steatosis and insulin resistance during non-alcoholic fatty liver disease development partly through targeting IRS-1/PI3K/Akt pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(3): 714-20
- [10] S Ussar, S G Vienberg, C R Kahn. Receptor antibodies as novel therapeutics for diabetes [J]. *Sci. Transl. Med.*, 2011, 3 (113): 113ps47
- [11] D Galagovsky, M J Katz, J M Acevedo, et al. The Drosophila insulin-degrading enzyme restricts growth by modulating the PI3K pathway in a cell-autonomous manner [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(6): 916-24
- [12] W B Potter, K J O'Riordan, D Barnett, et al. Metabolic regulation of neuronal plasticity by the energy sensor AMPK [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e8996
- [13] D G Hardie, K Sakamoto. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle [J]. *Physiology* (Bethesda), 2006, 21: 48-60
- [14] N Miranda, A R Tovar, B Palacios, et al. AMPK as a cellular energy sensor and its function in the organism [J]. *Revista de investigacion clinica, organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 2007, 59(6): 458-69
- [15] 蔡文燕,肖华山,范秀珍.金线莲研究进展(综述)[J].*亚热带植物科学*,2003,32(3):68-72  
CAI Wen-yan, XIAO Hua-shan, FAN Xiu-zhen. A review of research on *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Subtropical Plant Science*, 2003, 32(3): 68-72
- [16] 马志杰,胡宏友.民间药材金线莲研究动态(综述)[J].*亚热带植物科学*,2002,31(b09):27-31  
MA Zhi-jie, HU Hong-you. A review of research on the local medicinal herb "Jin-Xian-Lian" [J]. *Subtropical Plant Science*, 2002, 31(b09): 27-31
- [17] 张以忠,邓琳琼,黄丽华,等.金线莲研究的现状与展望[J].*贵州科学*,2007,25(2):81-84  
ZHANG Yi-zhong, DENG Lin-qiong, HUANG Li-hua, et al. Tatus and prospect of research on *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Guizhou Science*, 2007, 25(2): 81-84
- [18] 唐菲,张小琼,徐江涛,等.金线莲降血糖活性部位的筛选[J].*中草药*,2011,42(02):340-342  
TANG Fei, ZHANG Xiao-qiong, XU Jiang-tao, et al. Screening on hypoglycemic effective part of *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Chinese Tradition and Herbal*, 2011, 42(2): 340-342
- [19] 何春年.福建金线莲的化学成分研究[J].*北京协和医学院;中国医学科学院;清华大学医学部;中国协和医科大学*, 2004,39(10):581-583  
HE Chun-nian. Study on chemical constituents of *Anoectochilus Roxburghii* [J]. *Peking Union Medical College;Chinese Academy of Medical Sciences; Department of Medicine, Tsinghua University; Chinese Peking Union Medical College*, 2004, 39(10): 581-583
- [20] S C Cui, J Yu, X H Zhang, et al. Antihyperglycemic and antioxidant activity of water extract from *Anoectochilus roxburghii* in experimental diabetes [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2013, 65(5): 485-8
- [21] 张锦文,唐菲,张小琼,等.高效液相色谱法测定金线莲中金线莲苷的含量[J].*中国医院药学杂志*,2011, 31(4):261-263  
ZHANG Jin-wen, TANG Fei, ZHANG Xiao-qiong, et al. Determination of the content of kinsenoside in *anoectochilus roxburghii* [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2011, 31(4): 261-263
- [22] L Z Liu, S C Cheung, L L Lan, et al. Berberine modulates insulin signaling transduction in insulin-resistant cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 317(1-2): 148-153
- [23] L A Consitt, J A Bell, J A Houmard. Intramuscular lipid metabolism, insulin action, and obesity [J]. *IUBMB Life*, 2009, 61(1): 47-55

现代食品科技