

利用基因芯片技术解析海地瓜酶解液对糖尿病小鼠糖脂代谢的调控

董丽莎¹, 李妍妍², 张红燕¹, 崔晨茜¹, 韩姣姣¹, 王朝阳¹, 司开学¹, 周 君¹, 苏秀榕^{1,*}
(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 美国康奈尔大学农业与生命科学学院, 美国 纽约 伊萨卡 14850)

摘 要: 目的: 研究海地瓜酶解液对 db/db 糖尿病小鼠血糖和血脂的调节作用, 为进一步开发海地瓜提供理论依据。方法: 以 db/db 糖尿病小鼠为模型, 正常进食10周, 分别给予海地瓜酶解液, 定期测定各组小鼠的尿糖、空腹血糖、糖化血红蛋白、血清胰岛素以及血脂水平。利用基因芯片技术, 比较不同组别间肾脏基因的表达水平。并通过实时荧光定量聚合酶链式反应技术验证基因表达情况。结果: 与模型对照组相比, 各给药组均能显著降低糖尿病小鼠的尿糖、空腹血糖、糖化血清蛋白、糖化血红蛋白水平 ($P < 0.05$), 改善糖耐量水平; 显著降低总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平 ($P < 0.05$), 升高高密度脂蛋白胆固醇水平。通过基因芯片技术, 获得81个差异基因, 其中54个上调基因, 27个下调基因。实时荧光定量聚合酶链式反应结果显示, 选取的基因均与基因芯片表达水平一致。结论: 海地瓜酶解液均可显著改善 db/db 糖尿病小鼠的糖代谢与脂代谢 ($P < 0.05$), 它的作用效应可能与 $slc244$ 基因的表达水平有关。

关键词: 海地瓜酶解液; 糖尿病; 基因芯片; $slc244$ 基因

Gene Chip Analysis of the Regulatory Effect of Enzymatic Hydrolysate of Sea Cucumber (*Acaudina molpadioides*) on Glucose and Lipid Metabolism in Diabetic Mice

DONG Lisha¹, LI Yanyan², ZHANG Hongyan¹, CUI Chenxi¹, HAN Jiaojiao¹, WANG Zhaoyang¹, SI Kaixue¹, ZHOU Jun¹, SU Xiurong^{1,*}
(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;
2. College of Agriculture and Life Sciences, Cornell University, Ithaca 14850, USA)

Abstract: Objective: In order to provide a theoretical basis to make better use of *Acaudina molpadioides*, we studied the regulatory effect of an enzymatic hydrolysate of *A. molpadioides* on glucose and lipid metabolism in mice with diabetic nephropathy. Methods: db/db diabetic mice were fed normally for 10 weeks and subsequently administered with different doses of the hydrolysate for 12 weeks. Urine glucose (UG), fasting blood glucose (FBG), glycosylated hemoglobin (HbA1c), glycosylated serum protein (GSP), fasting insulin (FIN) and serum lipid levels were examined at regular intervals during the administration period. Using gene chip technology, the expression levels of related genes in the kidney were measured and compared between different groups and the results were validated using real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). Results: Compared with the model group, the hydrolysate at all doses significantly decreased UG, FBG, HbA1c and GSP ($P < 0.05$), improved oral glucose tolerance, significantly lowered serum total cholesterol (TC) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) ($P < 0.05$), and increased high density lipoprotein cholesterol (HDL-C). In addition, we identified 81 differentially expressed genes, including 54 up-regulated and 27 down-regulated genes. The expression levels measured by qRT-PCR of 11 selected genes were consistent with the results of gene chip test. Conclusion: The enzymatic hydrolysate from *Acaudina molpadioides* can significantly control glucose and lipid metabolism in db/db diabetic mice ($P < 0.05$), and the underlying mechanism may be related to $slc244$ expression level.

Keywords: sea cucumber hydrolysate; diabetes; gene chip; $slc244$ gene

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201809023

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 09-0145-09

收稿日期: 2016-12-08

基金项目: 国家农业科技成果转化项目 (2007C22030520); 浙江省重大科技专项重大农业项目 (2008C02009-II-2)

第一作者简介: 董丽莎 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品功能性。E-mail: 1848220581@qq.com

*通信作者简介: 苏秀榕 (1956—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品科学与工程。E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn

引文格式:

董丽莎, 李妍妍, 张红燕, 等. 利用基因芯片技术解析海地瓜酶解液对糖尿病小鼠糖脂代谢的调控[J]. 食品科学, 2018, 39(9): 145-153. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201809023. <http://www.spkx.net.cn>

DONG Lisha, LI Yanyan, ZHANG Hongyan, et al. Gene chip analysis of the regulatory effect of enzymatic hydrolysate of sea cucumber (*Acaudina molpadioides*) on glucose and lipid metabolism in diabetic mice[J]. Food Science, 2018, 39(9): 145-153. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201809023. <http://www.spkx.net.cn>

糖尿病是一种由于胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 伴有相对胰岛素不足或胰岛素分泌缺陷而导致的以慢性血葡萄糖水平增高为特征的代谢型疾病, 是在遗传和环境的共同作用下发生的一种慢性代谢性异常。随着社会经济的发展和人民生活水平的提高, 生活方式的改变和社会人口老龄化, 糖尿病患病率在世界范围内呈上升趋势, 已经成为继心脑血管疾病、肿瘤之后的又一严重危害人类健康的全球公共卫生问题, 也成为世界各国致死、致残并造成医疗开支增高的主要原因。糖尿病以慢性血糖水平增高为特征, 长期的高血糖可使一些组织或器官发生结构改变和功能障碍, 导致多系统损害和各种并发症的产生。

在糖尿病各种慢性并发症中, 糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是最常见的并发症之一。DN的病理生理机制目前为止仍然不是十分清楚, 总地来说是复杂的多因素作用的结果, 包括遗传、氧化应激、糖基化终末产物的沉积、血流动力学改变等。迄今为止, 针对DN的防治手段仍然集中于代谢危险因素的控制 (如严格控制血糖、血压、血脂水平)、戒烟、血管紧张素转换酶抑制剂的应用等。然而上述治疗方法并不能完全阻断DN的发展。因此有必要寻求新的治疗方法阻止或延缓DN的发生和发展。综上, 开展研制新型药物, 在积极控制血糖的同时, 关注并加强对DN的干预和治疗有着极为重要的意义^[1-2]。

自古以来, 海参就是保健食品和营养食品。明代《食草本草》中指出海参有主补元气、滋养五脏六腑和祛虚损的养生功能^[3]。清代《本草纲目拾遗》中药典籍则将海参列为补益药物^[4], 其载“海参性温补, 足敌人参, 故名海参。其味甘咸, 补肾经, 益精髓, 精痰涎, 摄小便, 壮阳疗痿, 杀疮虫”。近年来先后有中医提出以海参单用后组方治疗肿瘤^[5]、贫血^[6]和糖尿病^[7], 取得了良好的效果。海参具有很高的药用价值, 主要是由于海参中含有多种生理活性物质^[8]。

海地瓜 (*Acaudina molpadioides*) 属棘皮动物门 (Echinodermata) 海参纲 (Holothuroidea), 芋参目 (Molpadida) 尻参科 (Caudinidae), 主要分布在我国沿海海域, 资源丰富。海地瓜在近几年中逐渐被研究开发, 有关它的研究资料较少, 但有文献报道其和营养成分及经济价值高的梅花参相似^[9]。海地瓜酶解液主要有降

血脂^[10-11]、抗氧化^[12]、促进人皮肤细胞的生长和胶原蛋白的合成^[13]等作用。

本实验以高血糖和高血脂症为特点的自发性2型糖尿病db/db小鼠为研究对象, 研究了海地瓜酶解液对其糖代谢与脂代谢的影响, 并利用基因芯片和实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 技术进行验证。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

瘦素基因敲除db/db小鼠, 体质量 (36.0±2.0) g, 雄性, 40 只; db/m (25.0±1.0) g, 雄性, 10 只 (合格证号: SCXK (沪) 2007-0005, 编号: 2007000528007); 实验鼠全价颗粒饲料, 均购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

海地瓜酶解液为实验室自制^[14]。

小鼠基因表达谱芯片和杂交试剂 美国Agilent公司; 总RNA提取Trizol试剂 美国Invitrogen公司; mRNA纯化试剂盒 美国Promega公司。SYBR Premix ExTaqII试剂盒、pMD18-T载体 日本TaKaRa公司; M-MLV反转录试剂盒 加拿大BioBasic公司; 胰岛素酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 上海依科赛生物制品有限公司; 血糖、尿糖试剂盒 南京建成生物科技有限公司; 总胆固醇 (total cholesterol, TC)、总甘油三酯 (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) 试剂盒 宁波溢美生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

LuxScanTM10K-A双通道激光共聚焦扫描仪 北京博奥生物有限公司; 5424/5424R台式高速离心机、5331 PCR仪 德国艾本德股份公司; 7170型自动生化分析仪 日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及饲养

实验前全部小鼠适应饲喂1周, 称体质量并分组。10只db/m小鼠为空白对照 (C) 组; 瘦素基因敲除雄

性 db/db 小鼠40只,按空腹体质量随机分成模型(M)组、阳性药(Me)组(9.75 mg/kg甲基巴多索隆)、海地瓜酶解液低剂量(APG1)组(10 mg/kg海地瓜酶解液)、高剂量(APG2)组(60 mg/kg海地瓜酶解液),每组10只^[15]。甲基巴多索隆已用于2型糖尿病治疗4期^[16]。空白对照组与模型组灌以等量去离子水。实验期间,各组自由进食、饮水,室温保持25℃左右,光照昼夜间隔12 h,给药时间为12周。实验期间检测小鼠尿糖和血糖浓度。

1.3.2 生理生化指标的测定

1.3.2.1 行为观察和尿液收集

实验期间,每天观察小鼠毛色、神态、摄食量和行为活动等。

每2周对小鼠禁食禁水,单只置于代谢笼中收集12 h尿液,记录尿量,800 r/min离心5 min,取上清液分装,冻存于-80℃冰箱中。解冻后用于尿糖浓度等指标的测定。

1.3.2.2 尿糖浓度的测定

参照试剂盒说明书测定。

1.3.2.3 空腹血糖浓度测定

每2周,小鼠禁食12 h,眼内眦静脉取血,测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)浓度,记录血糖值随给药时间延长的变化。

1.3.2.4 葡萄糖耐量曲线的绘制

末次给药后,用葡萄糖按0.5 g/kg m_b 的量对小鼠进行灌胃,分别在0.0、0.5、1.0、2.0 h内眼内眦静脉取血,检测血清中血糖浓度,绘制葡萄糖耐量曲线^[17]。

1.3.3 血液生化指标的测定

1.3.3.1 GSP、HbA1c水平的测定

末次给药后,各组小鼠用质量分数为2%戊巴比妥钠(小鼠每千克体质量摄入的量为25 mL)麻醉,腹主动脉采血,取800 μ L全血用四元羧酸乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)抗凝,3 500 r/min离心15 min,制得血浆,采用试剂盒测定糖化血清蛋白(glycosylated serum protein, GSP)和糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)^[18]水平。

1.3.3.2 血脂水平测定

取全血于37℃水浴30 min,1 500 r/min离心10 min,分离得到上清液,制得血清,-20℃冻存,TC、TG、HDL-C、LDL-C水平的测定按照试剂盒说明书于7170型自动生化分析仪上进行^[19-20]。

1.3.3.3 胰岛素水平的测定

采用双抗体夹心ELISA法,测定小鼠血清中胰岛素(fasting insulin, FINS)的水平,并分别按公式(1)、(2)计算血清胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment, HOMA-IR)与血清胰岛素敏感指数(insulin sensitive index, ISI)。

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{FBG} \times \text{FINS}}{22.51} \quad (1)$$

$$\text{ISI} = \ln \frac{1}{\text{FINS} \times \text{FBG}} \quad (2)$$

式中:FBG为空腹血糖浓度/(mmol/L);FINS为空腹胰岛素水平/(mIU/L)。

1.3.4 基因芯片的检测

1.3.4.1 RNA的抽提与探针的制备

取液氮保存的小鼠肾脏组织100 mg彻底碾碎成粉末后,用Trizol一步法提取肾脏组织中的总RNA,经异丙醇沉淀法将RNA进行浓缩,进一步采用Nucleo Spin® RNA clean-up试剂盒对总RNA进行过柱纯化后,采用分光光度计进行定量,并通过甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测。

每5只小鼠为一组,进行总RNA等量混合,通过试剂盒进行纯化后,取2 μ g mRNA为模板,以T7 Oligo (dT) Primer为引物,在CbcScript酶的作用下合成第1条cDNA,并加外标。用RNase H将杂合链中的RNA切成短片段,用DNA聚合酶以所得RNA短片段为引物进行延伸,合成第2条cDNA,并对cDNA进行纯化。以cDNA为模板,使用T7试剂盒合成cRNA,利用试剂盒进行纯化。取2 μ g cRNA,在CbcScript II酶作用下随机引物进行反转录,所得产物利用试剂盒纯化。取上述反转录产品,以随机引物,用Cy5-dCTP和Cy3-dCTP、Klenow酶进行PCR扩增,标记产物后进行纯化,抽干。

1.3.4.2 杂交与清洗

标记的DNA溶于80 μ L杂交液中(3×柠檬酸钠缓冲液(saline sodium citrate, SSC)、0.2%十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、5×Denhardt's溶液、25%甲酰胺),于42℃杂交过夜。杂交结束后,先在42℃含0.2% SDS、2×SSC的液体中洗5 min,而后在0.2×SSC中室温洗5 min。玻片甩干后即可用于扫描。

1.3.4.3 扫描和数据分析

用双通道激光共聚焦扫描仪进行扫描。在芯片上每个基因重复3次,荧光交换后每个基因重复6次,用LuxScan3.0软件进行数据的提取,用 t 检验法来挑选差异基因。对每个扫描信号的Lowess归一化的比率值进行统计,删除荧光信号弱的基因(保留信号值不小于800的表达基因和400~800的临界表达基因的信号值)以及芯片上的阴性对照、内标、外标等冗余的数据,从剩下的基因中挑选至少有4次Ratio值的基因进行 t 检验。计算得到的 t 值如果大于0.05,则表明该基因在95%的水准上为差异表达。最后挑选差异表达基因用SAM软件进行分析,错误发现率控制在5%以内,再以1.5倍标准筛选差异表达基因进行片间校正和片内归一化及信号可信度 P 值分析、GO Terms和Pathway Miner分析。

1.3.5 qRT-PCR检测

总RNA的提取与cDNA的合成参照基因芯片检测中的RNA的提取与探针的制备^[21-22]。通过Primer 5.0软件设计qRT-PCR检测使用的引物,以16S rRNA作为内参基因。选取12个基因 β -actin、*ntrK1*、*slc2A4*、*aqp5*、*aldH1a3*、*bcaT1*、*ubd*、*akr1B3*、*slc7A13*、*nupR1*、*hdc*、*ptpN5*对其进行设计、合成特异性引物,如表1所示。20 μ L反应体系: 2 μ L cDNA, 0.8 μ L上、下游引物, 10 μ L SYBR, 用ddH₂O补齐至20 μ L。反应条件为: 92 $^{\circ}$ C 5 min, 1个循环; 92 $^{\circ}$ C 5 s, 57 $^{\circ}$ C 20 s, 40个循环。

表1 qRT-PCR引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR

基因名称	引物	长度/bp
<i>actin</i> -F	5'-TTGCTCGAAGTCTAGGGCAACATAG-3'	25
<i>actin</i> -R	5'-GGTCATGCCATCTGCGTCTG-3'	21
<i>ntrK1</i> -F	5'-GATCAACCGCCCTGCTGTAT-3'	20
<i>ntrK1</i> -R	5'-GAGCCTTTGCCCTCAGTAGG-3'	20
<i>slc2A4</i> -F	5'-CCGGACTAGGCTAGGGGATT-3'	20
<i>slc2A4</i> -R	5'-GCCCCACTTGAGGCTTTCTA-3'	20
<i>aqp5</i> -F	5'-AATCCGGCCATTACTCTGGC-3'	20
<i>aqp5</i> -R	5'-TTGTTGCTGAGCGCATTGAC-3'	20
<i>aldH1a3</i> -F	5'-GGGGCCATTACACCATGGAA-3'	20
<i>aldH1a3</i> -R	5'-GAGGGAACCCGACCTCTTTG-3'	20
<i>bcaT1</i> -F	5'-TCATCACACCCAGCCACTGTC-3'	20
<i>bcaT1</i> -R	5'-GTTTCTCCCATCCAGACGCA-3'	20
<i>ubd</i> -F	5'-GTGGTGAAGCCAGTGATGA-3'	20
<i>ubd</i> -R	5'-TCTTCGAACCTCGGAGGAGGT-3'	20
<i>akr1B3</i> -F	5'-GTGCCACCCGTACCTAACTC-3'	20
<i>akr1B3</i> -R	5'-GATCCTCCAGGAGAGACGGA-3'	20
<i>slc7A13</i> -F	5'-TCCTTGTGTGTTTGGGCTGT-3'	20
<i>slc7A13</i> -R	5'-CTGGGCCGAGAAACAAGCTA-3'	20
<i>nupR1</i> -F	5'-GACGGAGCTGGAGATAAGGC-3'	20
<i>nupR1</i> -R	5'-AGGCCTAGGTCCTGTTACA-3'	20
<i>hdc</i> -F	5'-TCCGTCTGAAGGGTCCTAATTG-3'	20
<i>hdc</i> -R	5'-GGCTCAGGACAAGGTTAGCA-3'	22
<i>ptpN5</i> -F	5'-CCAGTTTGTGCACCACGC-3'	18
<i>ptpN5</i> -R	5'-CTTGGGTAGTTGGGGTAAAGACC-3'	23

1.4 数据统计分析

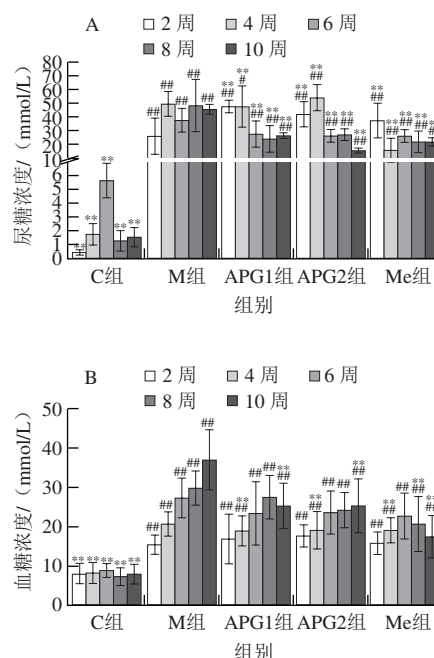
采用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析,同时进行最小显著性差异两两比较,检验显著性水平 $P<0.05$ 。实验结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 小鼠的行为变化

空白对照组小鼠精神状态良好,反应灵敏,饮食、饮水及尿量正常,皮肤有光泽,且体质量不断增加;与空白对照组相比,模型对照组小鼠出现“三多一少”症状,实验后期出现体毛枯黄、稀疏,精神萎靡,反应迟钝症状;各给药组整体情况明显优于模型组,各种症状减轻,糖脂代谢紊乱症状得到有效的改善。

2.2 海参酶解液对糖尿病小鼠空腹血糖及尿糖浓度的影响



#.与C组比较差异显著($P<0.05$); ##.与C组比较差异极显著($P<0.01$); *.与M组比较差异显著($P<0.05$); **.与M组比较差异极显著($P<0.01$)。下同。

图1 海地瓜酶解液对糖尿病小鼠尿糖(A)和血糖(B)浓度的影响
Fig. 1 Effect of hydrolysate from *Acaudina molpadioides* on UG (A) and FBG (B) in diabetic mice

如图1A、B所示,与C组小鼠相比,M组小鼠的空腹尿糖和血糖浓度均极显著升高($P<0.01$),说明糖尿病小鼠造模成功。与M组相比,从第4周开始,APG1、APG2、Me组的空腹血糖含量均极显著下降($P<0.01$)。APG1、APG2组的尿糖含量与Me组下降趋势相同。

2.3 海地瓜酶解液对糖尿病小鼠糖代谢的影响

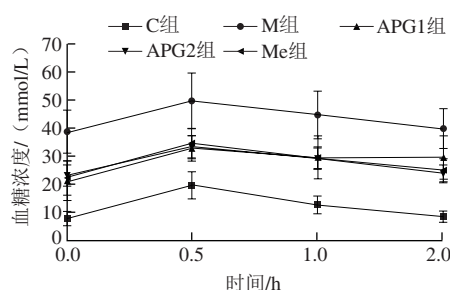


图2 海地瓜酶解液对糖尿病小鼠糖代谢的影响
Fig. 2 Effect of hydrolysate from *Acaudina molpadioides* on glucose metabolism in diabetic mice

如图2所示,在糖代谢实验中,与C组小鼠相比,M组小鼠出现耐糖量异常,给予0.5 g/kg m_0 葡萄糖在0.5 h

时血糖浓度明显升高。与M组相比, APG1、APG2、Me组都明显下降 ($P<0.01$)。且各组血糖浓度都于糖负荷0.5 h时达峰值。

表2 海地瓜酶解液对糖尿病小鼠GSP浓度和HbA1c水平的影响
Table 2 Effect of hydrolysate from *Acaudina molpadioides* on GSP and HbA1c in diabetic mice

指标	C组	M组	APG1组	APG2组	Me组
GSP浓度/(mmol/L)	2.07±0.40**	3.05±0.50**	2.11±0.77**	2.15±0.12**	2.38±0.20**
HbA1c水平/%	1.29±0.40**	5.50±0.60**	4.55±0.94**	3.92±0.68**	3.67±0.88**

注: ##.与C组比较差异极显著 ($P<0.01$); **.与M组比较差异极显著 ($P<0.01$)。下同。

如表2所示, 与C组相比, M组小鼠的GSP浓度和HbA1c水平均极显著升高。与M组相比, APG1、APG2、Me组的GSP浓度与HbA1c水平均极显著下降。其中, APG1组的下降趋势相比较其他组更明显。

2.4 海地瓜酶解液对糖尿病小鼠胰岛素分泌的影响

表3 海地瓜酶解液对糖尿病小鼠FINS、HOMA-IR、ISI水平的影响
Table 3 Effect of hydrolysate from *Acaudina molpadioides* on FINS, HOMA-IR and ISI in diabetic mice

组别	FINS水平 (mIU/L)	HOMA-IR	ISI
C组	0.30±0.88**	0.10±0.04**	-0.78±0.35**
M组	3.12±1.08**	5.01±2.02**	-4.65±0.43**
APG1组	3.40±0.30**	2.98±1.22**	-4.09±0.58**
APG2组	4.55±1.43**	4.52±1.26	-4.58±0.34**
Me组	1.76±0.29**	1.33±0.37**	-3.36±0.29**

注: #.与C组比较差异显著 ($P<0.05$)。

如表3所示, 与C组相比, M组血清中FINS、HOMA-IR水平均极显著上升, ISI极显著下降。与M组相比, APG2组能够极显著提高FINS水平; APG1组能够极显著降低HOMA-IR水平。

2.5 海地瓜酶解液对糖尿病小鼠血脂的影响

表4 海地瓜酶解液对糖尿病小鼠血脂的影响
Table 4 Effect of hydrolysate from *Acaudina molpadioides* on serum lipids in diabetic mice

组别	TC浓度	TG浓度	HDL-C浓度	LDL-C浓度
C组	1.00±0.08**	0.45±0.11**	1.50±0.37**	0.19±0.05**
M组	1.35±0.38**	1.17±0.34**	0.86±0.17**	0.40±0.04**
APG1组	1.35±0.19	1.21±0.19**	0.99±0.14**	0.23±0.04**
APG2组	1.29±0.13**	1.08±0.13**	1.29±0.08**	0.24±0.04**
Me组	1.39±0.12**	1.18±0.06**	1.08±0.18**	0.25±0.04**

如表4所示, 与C组相比, M组小鼠的TC、TG、LDL-C浓度极显著升高, HDL-C浓度极显著下降。与M组相比, APG2组能极显著降低TC、LDL-C水平。海地瓜酶解液对TG浓度无显著影响。

2.6 差异基因的筛选

2.6.1 芯片的杂交

采用非监督聚类的等阶聚类方法 (hierarchical

clustering) 对模型对照组小鼠肾脏和海地瓜给药组小鼠肾脏细胞的RNA表达做比较分析后, 选择出差异倍数大于2的差异基因 (表5)。

表5 APG2组和模型组部分差异表达基因
Table 5 Selected differentially expressed genes

差异基因	差异倍数	基因表达情况
预测基因4841 (<i>gm4841</i>)	5.82	↑
葡萄糖转运蛋白A4 (<i>slc2A4</i>)	5.44	↑
生殖同源框基因5 (<i>rhoX5</i>)	5.13	↑
水通道蛋白5 (<i>rhoX5</i>)	4.73	↑
醛脱氢酶家族1, 亚A3 (<i>aldH1a3</i>)	4.30	↑
少突胶质细胞跨膜蛋白抗体 (<i>cldN11</i>)	4.30	↑
核受体相互作用蛋白3 (<i>nriP3</i>)	4.07	↑
胞质支链氨基酸转移酶1 (<i>bcaT1</i>)	3.36	↑
Fc免疫球蛋白结合蛋白 (<i>fcgBp</i>)	3.25	↑
泛素D (<i>ubd</i>)	3.02	↑
醛糖还原酶家族成员B3 (<i>akr1B3</i>)	2.99	↑
磷酸腺苷转运体1 (<i>tap1</i>)	2.85	↑
表达序列AA467197 (<i>aa467197</i>)	2.82	↑
弹性蛋白微纤维3 (<i>emiln3</i>)	2.80	↑
细胞受体因子1 (<i>Crfl1</i>)	2.67	↑
富亮氨酸重复LGI家族, 成员2 (<i>lgi2</i>)	2.61	↑
转换相关蛋白53诱导11 (<i>trp53111</i>)	2.55	↑
尿素转运型糖蛋白A2 (<i>slc7A13</i>)	2.47	↑
黏蛋白20 (<i>muc20</i>)	2.45	↑
t细胞急性淋巴细胞白血病2 (<i>tal2</i>)	2.42	↑
RAS激活蛋白1 (<i>rasA11</i>)	2.34	↑
核内蛋白1 (<i>nupR1</i>)	2.33	↑
多聚免疫球蛋白受体 (<i>pigR</i>)	2.31	↑
妊娠带蛋白 (<i>pzp</i>)	2.28	↑
相关的蛋白二硫化物异构酶2 (<i>pdiA2</i>)	2.12	↑
组氨酸脱羧酶 (<i>hdc</i>)	2.07	↑
N-myc下游调控基因4 (<i>ndrG4</i>)	2.01	↑
结肠癌1转移相关因子	2.01	↑
纤连蛋白III型1	2.00	↑
蛋白质酪氨酸磷酸酶5	5.61	↓
淋巴细胞抗原6复杂轨迹F	3.57	↓
胰岛素生长因子2	2.21	↓
加糖受体2	2.20	↓
神经营养酪氨酸激酶1型受体	2.08	↓

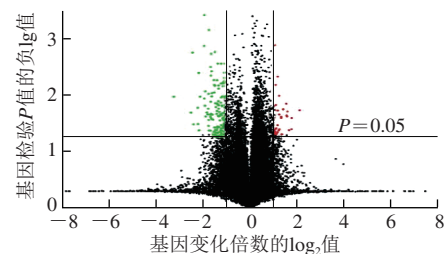


图3 小鼠肾脏基因分布火山图

Fig. 3 Volcano plot for gene distribution in mouse kidney

利用基因分布的火山图展示了食用海地瓜酶解液后的小鼠肾脏的基因表达差异性。上调差异基因为绿色, 下调差异基因为红色, 黑色为相同基因 (图3)。

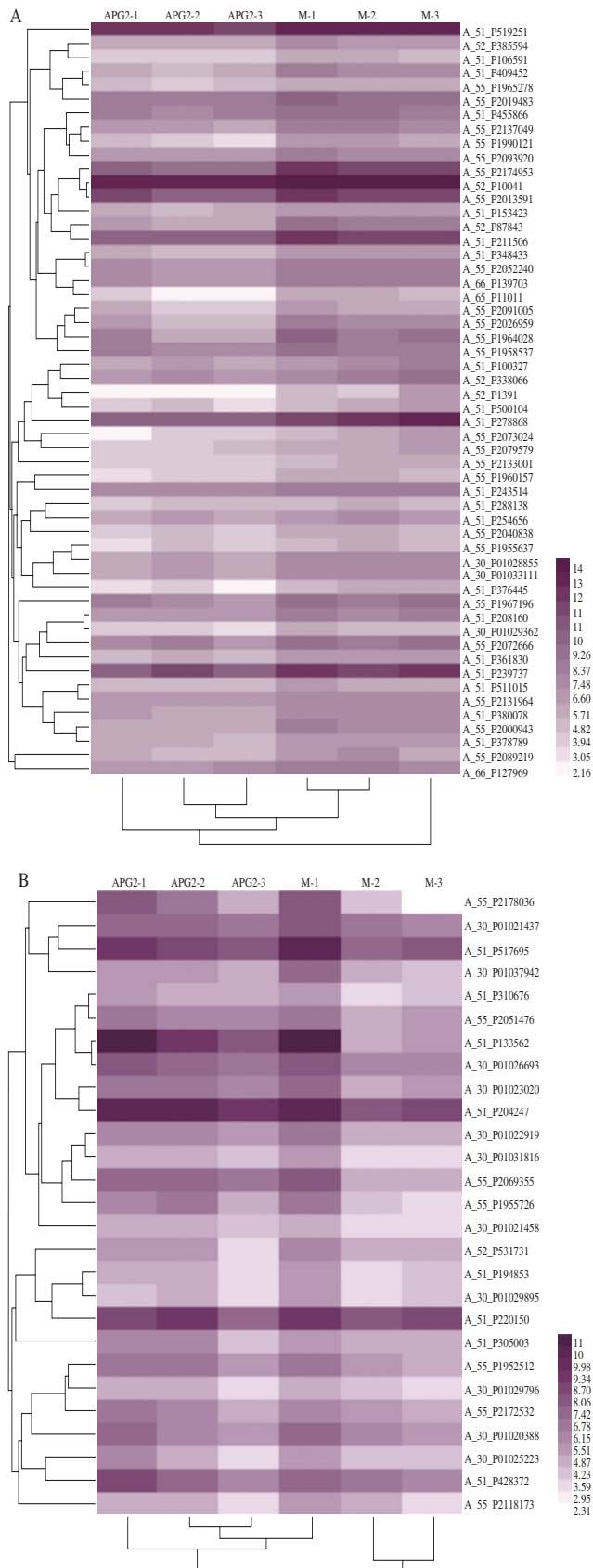


图4 小鼠肾脏上调基因(A)和下调基因(B)的聚类分析
Fig. 4 Cluster analysis of up-regulated genes (A) and down-regulated genes (B) in mouse kidney

利用Clustal W进行分析, 结果见图4。模型对照组小鼠的3个组聚集在一起, APG2的小鼠分为3个组聚集在一起, M组和APG2组存在显著差异。食用海地瓜酶解液的小鼠肾脏共有55 684个基因被筛选出, 其中差异表达基因81个, 上调基因54个, 下调基因27个。

2.6.2 差异基因的功能分析

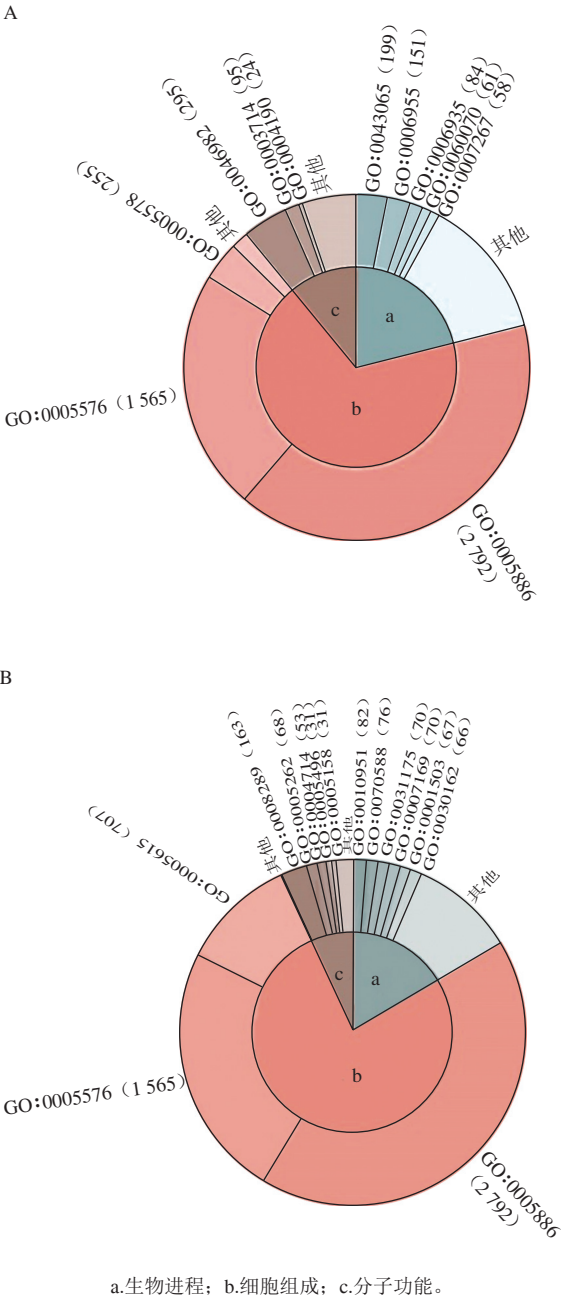


图5 上调基因(A)和下调基因(B)分布情况
Fig. 5 Distribution of up-regulated genes (A) and down-regulated genes (B)

如图5所示, 从差异基因本体分析 (gene ontology, GO) 显示小鼠肾脏差异表达基因81条。生物过程在APG2组上调基因中与新陈代谢相关的基因占12.7%,

与信号传递有关的基因占16.7%，与调控相关的基因占29%；下调基因中与新陈代谢相关的基因占13.7%，与信号传递相关的基因占7.7%，与调控相关的基因占16%。分子功能分析在APG2组上调基因中具有催化活性功能的基因占12%，具有离子运输功能的基因占14.8%，具有信号转导、分子转导、电子传递等功能的基因占22%。细胞组成元件中细胞器成分占6.7%，蛋白质等生物大分子占33%，细胞外基质占16.7%，剩余的小颗粒物质占9.6%。

表 6 差异基因的KEGG代谢通路分析

Table 6 KEGG pathway analysis of differentially expressed genes

KEGG编号	KEGG通路代谢名称	差异基因名称	基因表达情况
map04080	神经活性-配体相互作用	<i>galR2</i> <i>griN3a</i>	↓ ↓
map04010	丝裂原激活蛋白激酶信号通路	<i>ntrK1</i> <i>ptpN5</i>	↓ ↓
map05020	朊病毒病	<i>c8a</i>	↓
map05150	金黄色葡萄球菌感染	<i>fpr2</i> <i>H2-DMb1</i>	↑ ↑
map04145	吞噬体	<i>H2-DMb1</i> <i>H2-DMb2</i> <i>tap1</i>	↑ ↑ ↑
map04514	细胞黏附因子	<i>H2-DMb1</i> <i>H2-DMb2</i>	↑ ↑
map04916	黑素源生成	<i>cldN11</i> <i>fzd9</i> <i>wnt4</i>	↑ ↑ ↑
map04940	1型糖尿病	<i>H2-DMb1</i> <i>H2-DMb2</i>	↑ ↑
map05330	同种异体移植排斥	<i>H2-DMb1</i> <i>H2-DMb2</i>	↑ ↑
map00340	组氨酸代谢	<i>hdc</i> <i>aldH1a3</i>	↑ ↑
map00290	缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的生物合成	<i>bcaT1</i>	↑
map04910	胰岛素信号	<i>slc2A4</i>	↑
map00360	苯丙氨酸的新陈代谢	<i>aldH1a3</i>	↑

从KEGG差异代谢通路分析的结果（表6）显示，差异基因一共参与了13条代谢通路，主要涉及了与糖尿病形成相关的通路，与几种氨基酸的生物合成相关的通路，以及相关大分子物质分泌合成的一系列通路。

2.7 基因芯片及qRT-PCR检测结果

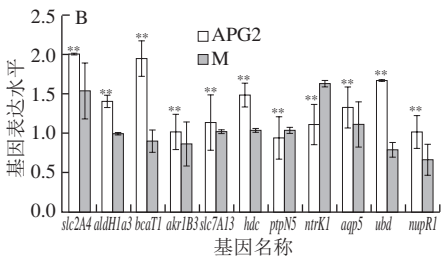
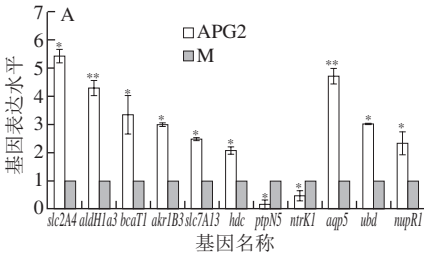


图 6 丝裂原活化蛋白激酶代谢通路关键基因在基因芯片 (A) 和 qRT-PCR (B) 中的表达水平

Fig. 6 Expression levels of the key genes in MAPK signaling pathway detected by gene chip (A) and qRT-PCR (B)

如图6所示，基因*slc2A4*、*aqp5*、*aldH1a3*、*bcaT1*、*ubd*、*akr1B3*、*slc7A13*、*nupR1*、*hdc*、在APG2组小鼠中的mRNA表达水平为上调，基因*ntrK1*、*ptpN5*在APG2组小鼠中的mRNA表达水平为下调，这与在基因芯片中的表达水平基本相同。

3 讨论

3.1 海地瓜酶解液对糖尿病小鼠糖代谢的影响

糖尿病是一种慢性内分泌代谢紊乱疾病，目前临床上用于治疗糖尿病的药物虽然效果较好，但副作用较大，不能长期应用^[23-24]。而海参作为常见的食品，具有低脂肪、高蛋白的特点，对机体更加温和、持久且无毒副作用。因此，海参治疗糖尿病引起了人们越来越多的关注。本研究发现海地瓜酶解液具有显著的调节机体糖脂代谢的作用。有研究发现海参酶解液具有显著降血糖功效^[25]。2型糖尿病中的糖代谢紊乱常体现在FBG、葡萄糖（glucose，Glu）、GSP、HbA1c等水平都有不同程度升高的现象。糖代谢紊乱所导致的机体内血糖升高，会产生IR，使机体代偿性地增加胰岛素分泌并降低胰岛素的清除^[26]。在实验中也发现了海地瓜酶解液能够显著降低*db/db*糖尿病小鼠的FBG、Glu、GSP、HbA1c等水平，表明海地瓜酶解液对*db/db*糖尿病小鼠的糖代谢紊乱具有一定的缓解作用。

3.2 海地瓜酶解液对糖尿病小鼠脂代谢的影响

血脂主要是指血浆内的胆固醇和甘油三酯，脂代谢紊乱主要表现为TC和TG水平的升高，常伴有HDL-C水平的降低与LDL-C水平的升高^[27]。2型糖尿病与脂代谢紊乱密不可分^[28]。据研究发现，2型糖尿病脂代谢紊乱的发病机制主要是由于脂蛋白酯酶活性降低，而脂蛋白酯酶的活性高低与胰岛素的分泌有关^[29-30]。实验结果表明，海地瓜酶解液能够在不同程度上降低TC、TG、LDL-C水平，升高HDL-C水平，表现出了其对脂代谢也有缓解的作用。

3.3 海地瓜酶解液对糖、脂代谢调节作用机制的探讨

目前的研究主要认为糖尿病与IR, 以及由其引起的糖脂代谢紊乱有关^[31]。在糖尿病发病过程中, 胰岛素分泌不足, 会使体内的糖代谢、脂代谢等多种代谢发生紊乱, 严重影响了患者的身心健康^[32]。而糖代谢与脂代谢之间有着非常密切的联系, 两者相辅相成, 相互作用。因此, 纠正糖脂代谢紊乱是治疗糖尿病的重要手段。

本实验建立的db/db糖尿病小鼠模型在出现糖代谢紊乱症状后, 也出现了明显的脂代谢紊乱与胰岛素抵抗现象, 说明了胰岛素抵抗、糖代谢、脂代谢之间有着密不可分的联系。同样, 脂代谢紊乱会导致IR的持续存在。当有糖代谢紊乱共同作用时, 会加速这一过程的发生。糖脂代谢紊乱均导致了胰岛β细胞一直处于高负荷工作状态下, 最终导致衰竭^[33]。糖代谢紊乱可以引起脂代谢紊乱, 因为糖脂代谢是协同的。因此, 血糖水平不仅取决于糖代谢的调节, 脂代谢水平也对其具有很大的影响。同时, 脂代谢紊乱也可加重糖代谢紊乱。脂代谢紊乱会抑制胰岛素和葡萄糖输送到靶细胞, 胰岛素通过与其受体结合来转运和利用葡萄糖, 血脂升高减少胰岛素靶组织血流量, 降低其对葡萄糖的摄取。由于IR, 胰岛素对葡萄糖输出的抑制和刺激外周组织肌肉摄取葡萄糖存在缺陷, 促使糖异生与葡萄糖的输出。本实验发现, 给db/db糖尿病小鼠不同剂量的海地瓜酶解液, 能够有效地降低尿糖、FBG、Glu、GSP、HbA1c的水平, 说明海地瓜酶解液能够减缓糖尿病小鼠的糖代谢紊乱。同时, 海地瓜酶解液也在不同程度上降低了TC、TG、LDL-C水平, 升高了HDL-C的水平, 表现出了其对脂代谢也有缓解的作用。而各组小鼠的胰岛素含量在治疗后呈现升高趋势, 大大降低了IR, 升高了ISI。了解到海地瓜酶解液对db/db小鼠的糖脂代谢紊乱有一定调节作用并能够有效治疗糖尿病之后, 本实验通过基因芯片技术从基因水平上继续探索海地瓜酶解液治疗糖尿病小鼠的作用机制。

基因芯片的实验结果表明喂食海地瓜酶解液的糖尿病小鼠与对照组小鼠基因表达出了明显差异, APG2组相对于模型组上调的基因数量明显多于下调基因的数量, 差异基因主要包括信号传递因子、能量代谢、糖代谢、脂代谢等。此次实验发现, *slc2A4*基因调节的葡萄糖转运蛋白(glucose transporters, GLUT)-4有明显的上调现象。GLUT-4是这些组织细胞的主要葡萄糖载体^[34-35]。当胰岛素与受体相结合后, 会发挥其转运葡萄糖的生理作用^[35]。许多研究表明, GLUT-4的表达或活性下降将会导致脂肪细胞对葡萄糖摄取和利用能力的减弱^[36-37]。在db/db糖尿病小鼠中, 增加GLUT-4的表达, 改善外周组织对葡萄糖的转运, 是防治糖尿病尤其是改善胰岛素抵抗的一个重要环节。从实验中可以发现, 调控GLUT-4的*slc2A4*基因在海地瓜酶解液作用的糖尿病小鼠与模型组对

比中明显上调, 这与以往的报道相一致。这表明海地瓜酶解液能够有效促进葡萄糖转运蛋白对葡萄糖的运输, 使进入细胞的葡萄糖减少, 从而达到抑制胰岛素抵抗的作用。

海地瓜酶解液对db/db糖尿病小鼠的调节作用是多种功能共同促进的结果, 不论是在降低血糖还是调节血脂上, 均能改善小鼠在糖代谢与脂代谢紊乱的多种指标。但由于酶解液的成分比较复杂, 对糖类和脂类的代谢调节作用机制比较复杂, 因此, 具体作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 方京徽, 向红丁. 脂代谢变化与糖尿病阶梯状演变的相关研究[J]. 中国医药导刊, 2008, 10(6): 830-831; 834. DOI:10.3969/j.issn.1009-0959.2008.06.011.
- [2] 邢德英, 杨旺. 猪胰脏为主对II型糖尿病疗效观察[J]. 河北中西医结合杂志, 1999, 8(6): 989. DOI:10.3969/j.issn.1008-8849.1999.06.154.
- [3] 邓岚, 王宜, 金川, 等. 糖尿病中医食疗概述及进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(10): 115-116.
- [4] 赵学敏, 闫冰. 本草纲目拾遗[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 234-235.
- [5] 陈涛, 王茂剑, 张健, 等. 海参多糖研究进展[J]. 食品工业科技, 2010, 31(7): 375-378.
- [6] 邱瑞芬, 王远红, 高群, 等. 仿刺参糖胺聚糖对骨髓抑制贫血小鼠外周血及骨髓细胞周期的影响[J]. 中国海洋药物, 2015, 34(1): 47-52.
- [7] 龙腾腾, 王静凤, 赵芹, 等. 海参对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其机制的研究[J]. 食品科学, 2012, 33(1): 252-256.
- [8] 王霞, 李妍妍, 王奇, 等. 金枪鱼胰脏酶解液对糖尿病大鼠血糖和血脂的作用[J]. 中国食品学报, 2012, 12(7): 24-28. DOI:10.3969/j.issn.1009-7848.2012.07.004.
- [9] 侯付景, 李妍妍, 金春华, 等. 白肛海地瓜和刺参体壁的比较分析[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 38-41.
- [10] 徐彩云, 苏秀榕, 李妍妍, 等. 海地瓜的营养成分及其降血脂功能[J]. 营养学报, 2009, 31(4): 384-387. DOI:10.3321/j.issn:0512-7955.2009.04.017.
- [11] SRINIVASAN K, RAMARAO P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview[J]. Indian Journal of Medical Research, 2007, 125(3): 451-472. DOI:10.1201/9781420009453.ch17.
- [12] 侯付景, 苏秀榕, 李妍妍, 等. 海地瓜的酶水解液的抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2009, 34(7): 181-184.
- [13] 姜春芳, 蔡江佳, 苏秀榕, 等. 白肛海地瓜双酶水解物的制备及其对人皮肤细胞的生长和胶原蛋白合成的作用[J]. 食品工业科技, 2014, 35(19): 180-184. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.19.030.
- [14] 李妍妍, 戴娟, 胡玲萍, 等. 仿刺参(*Apostichopus japonicus*)和海地瓜(*Acaudina leucoprocta*)体壁多肽的响应面法酶解和N末端测序[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(3): 620-627.
- [15] 吴静, 王华旻, 李晶, 等. db/db小鼠的实验室应用[J]. 生理科学进展, 2013, 44(1): 12-18. DOI:10.3969/j.issn.0559-7765.2013.01.003.
- [16] 王建中. 甲基巴多索隆治疗2型糖尿病和慢性肾脏病4期[J]. 中华肾病研究电子杂志, 2014, 3(1): 49.
- [17] 张雯, 赵旌旌, 王捷思, 等. 金耳菌丝体多糖对实验性2型糖尿病大鼠的降血糖作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(1): 49-53.
- [18] WANG Y Y, CHEN S C. A survey of evaluation and design for AUC based classifier[J]. Pattern Recognition and Artificial Intelligence, 2011, 24(1): 64-71.
- [19] 马淑青, 吕晓玲, 范辉. 紫甘薯花色苷对糖尿病大鼠血糖和血脂的影响[J]. 营养学报, 2010, 32(1): 88-90.

- [20] KONDETI V K, BADRI K R, MADDIRALA D R, et al. Effect of *pterocarpussantalinus* bark, on blood glucose, serum lipids, plasma insulin and hepatic carbohydrate metabolic enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(5): 1281-1287. DOI:10.1016/j.fct.2010.02.023.
- [21] 苏秀榕, 金春华, 李妍妍, 等. 利用微阵列基因芯片研究东海海参的生理功能[J]. *海洋与湖沼*, 2011, 42(1): 75-80.
- [22] 何伟娜, 王中华, 张迪骏, 等. 基于蛋白组学和代谢组学技术解析腐败希瓦氏菌净化水产品加工废水的生物学机制[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(5): 136-146. DOI:10.16429/j.1009-7848.2016.05.020.
- [23] ZHU C F, LI G Z, PENG H B, et al. Treatment with marine collagen peptides modulates glucose and lipid metabolism in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 2010, 35(6): 797-804. DOI:10.1139/H10-075.
- [24] KASETTI R B, RAJASEKHAR M D, KONDETI V K, et al. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of methanol: water (4:1) fraction isolated from aqueous extract of *Syzygium alternifolium* seeds in streptozotocin induced diabetic rats[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(4): 1078-1084. DOI:10.1016/j.fct.2010.01.029.
- [25] HU S W, CHANG Y G, HE M, et al. Fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber improves insulin sensitivity via activation of PI3K/PKB pathway[J]. *Journal of Food Science*, 2014, 79(7): 1424-1429.
- [26] XU Ping, CHEN Hao, WANG Yiqi, et al. Oral administration of Puerh tea polysaccharides lowers blood glucose levels and enhances antioxidant status in alloxan-induced diabetic mice[J]. *Journal of Food Science*, 2012, 77(11): 246-252. DOI:10.1111/j.1750-3841.2012.02950.x.
- [27] 王晓峰. 浅谈二型糖尿病高血脂症中医症状及因素的临床分析[J]. *才智*, 2012(1): 389.
- [28] 韩丽蓓, 杨惠民, 崔红霞, 等. 2型糖尿病血脂异常的中医证候研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2010, 33(5): 358-360.
- [29] 孟海雷, 刘怀珍, 张进军, 等. 2型糖尿病脂代谢紊乱中医药研究进展[J]. *河南中医*, 2012, 32(4): 522-525.
- [30] 李长新. 糖脂平颗粒对2型糖尿病大鼠血脂的影响[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2010, 20(1): 15-18.
- [31] 李光. 第三届中国胰岛素分泌专题研讨会简报[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2005, 21(8): 225.
- [32] 王璐璐, 逢曙光, 黄仙萍, 等. 辛伐他汀对链脲佐菌素诱导2型糖尿病大鼠血糖的影响[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2013, 34(4): 521-525.
- [33] 高璐. GLUT4与胰岛素抵抗[J]. *国外医学(内分泌学分册)*, 2002, 12(5): 308-310. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2002.05.018.
- [34] NINOMIYA J K, L'ITALIEN G, CRIQUE M H, et al. Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the third national health and nutrition examination survey[J]. *ACC Current Journal Review*, 2004, 13(4): 42-46. DOI:10.1016/j.accreview.2004.03.060.
- [35] TASKINEN M R. Diabetic dyslipidemia[J]. *Atheroscler*, 2002, 3(1): 47-51. DOI:10.1016/s1567-5688(01)00006-x.
- [36] BRYANT N J, GOVERS R, JAMES D E, et al. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4[J]. *Natural Review Molecular Cell Biology*, 2002, 3(4): 267-277. DOI:10.1038/nrm782.
- [37] WATSON R T, PESSIN J E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation[J]. *Recent Progress in Hormone Research*, 2001, 56: 175-193. DOI:10.1210/rp.56.1.175.
- [38] LIZCANO J M, ALESSI D R. The insulin signaling pathway[J]. *Current Biology*, 2002, 12(7): 236-238. DOI:10.1016/s0960-9822(02)00777-7.