

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.17.016

健脾清化方对 2 型糖尿病大鼠 基因表达谱及信号通路的影响

李俊燕¹, 陶 枫¹, 陈清光¹, 吴新星², 谭英姿¹, 陆 灏¹

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海市张衡路 528 号, 201203; 2. 上海电子信息职业技术学院)

摘要 目的 从基因转录水平角度探讨健脾清化方治疗 2 型糖尿病的可能作用机制。方法 50 只 Wistar 大鼠随机选择 40 只建立 2 型糖尿病大鼠模型, 另外 10 只大鼠作为对照组。造模成功的 30 只大鼠随机分为模型组和健脾清化方组, 每组 15 只。健脾清化方组大鼠给予健脾清化方 15 g/(kg·d) 灌胃, 模型组大鼠给予相同容量的生理盐水灌胃, 对照组大鼠不处理。各组干预时间为 4 周。于治疗前后每周检测大鼠空腹血糖 (FBG) 及给药 4 周后血脂水平; 应用 Affymetrix 基因芯片技术检测各组大鼠肝脏组织的差异表达基因; 通过基因芯片信号通路找出与健脾清化方影响 2 型糖尿病大鼠肝脏转录水平表达调控相关的信号通路和基因。结果 健脾清化方组治疗后 1、2、3、4 周 FBG 水平较本组治疗前明显降低, 并低于同时间点模型组 ($P < 0.05$); 健脾清化方组大鼠血脂水平均较模型组下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。健脾清化方能显著影响多个如胰岛素分泌通路、脂肪酸代谢通路和 TNF 信号通路等信号通路, 并能上调通路中 PCIF1、INSIG1 基因的表达。结论 健脾清化方可能通过影响多个信号通路中的基因表达来调控 2 型糖尿病大鼠肝脏基因转录水平, 从而降低血糖水平。

关键词 2 型糖尿病; 健脾清化方; 基因表达谱; 信号通路

目前 2 型糖尿病已成为继肿瘤、心脑血管疾病之后威胁人类健康和生命安全的第三位重大疾病, 其高昂的治疗费用给国家造成了巨大的经济和社会负担^[1]。因此, 寻求一种更为有效、经济的治疗方式已成为 2 型糖尿病研究领域关注的重点。健脾清化方是上海中医药大学附属曙光医院内分泌科治疗 2 型糖尿病的验方, 前期临床研究和动物实验发现, 健脾清化方有肯定的降糖疗效, 能显著降低糖化血红蛋白 (HbA1c)^[2]。本实验以 2 型糖尿病大鼠为研究对象, 通过对 2 型糖尿病大鼠肝脏组织基因表达谱的检测, 来探讨健脾清化方降糖疗效的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 Wistar 大鼠 50 只, 雄性, 体重 (80 ~

100) g, 购自上海斯莱克实验动物责任有限公司, 实验动物生产许可证: SCXK (沪) 2007-0005。饲料分为普通育成饲料和高脂高糖饲料 (普通育成饲料加 20% 炼猪油和 10% 蔗糖), 均购自上海斯莱克实验动物责任有限公司。

1.2 药物

健脾清化方由党参 15 g、黄芪 15 g、山药 15 g、黄精 15 g、黄连 3 g、黄芩 9 g、葛根 15 g、卫矛 15 g 组成, 由上海中医药大学附属曙光医院制剂科煎制, 冷冻干燥成干粉, 每克干粉相当于生药 100 g。

1.3 主要试剂及仪器

链脲佐菌素 (STZ, 美国 Sigma 公司, 批号: 1000641700); Trizol 试剂 (美国 Lifete chnologies 公司, 批号: 15596-018); RNeasy micro 试剂盒 (美国 Qiagen 公司, 批号: 74004); GeneChip 3' IVT Express 试剂盒 (美国 Affymetrix 公司, 批号: 901229); Affymetrix 芯片杂交相关试剂盒 (美国 Affymetrix 公司, 批号: 900720)。安捷伦生物分析仪 (美国 Agilent technologies 公司, 型号: 2100); 滚动杂交炉 (美国 Affymetrix 公司, 型号:

基金项目: 国家自然科学基金 (81403359); 上海市教育委员会科研创新项目 (13YZ042); 上海市卫生局科研课题 (20124076); 上海高校青年教师培养资助计划 (ZZszy12015); 上海市科学技术委员会科研计划项目 (14DZ2273200); 上海市中医药事业发展三年行动计划 (重大研究) 项目 (ZYSNXD-CC-YJXY)

* 通讯作者: luhao403@163.com, (021) 20256535

00-0331-220V); 洗涤工作站 (美国 Affymetrix 公司, 型号: 00-0079); 芯片扫描仪 (美国 Affymetrix 公司, 型号: 00-00212); 血糖仪及配套试纸 (瑞士 Roche 公司, 型号: ACCU-CHEK Active); 全自动生化分析仪 (日本日立公司, 型号: 7080)。

1.4 造模方法

参照文献 [3-4] 建立 2 型糖尿病大鼠模型。50 只大鼠适应性喂养 1 周后, 按随机数字表法选择 40 只大鼠为造模组, 喂养高脂高糖饲料和普通育成饲料混合物, 每 3 天调整这两种饲料的比例 (分别按 1: 3、1: 1、3: 1 比例), 之后完全喂养高脂高糖饲料。持续喂养 2 个月后, 造模组大鼠腹腔注射 2% STZ 溶液 30 mg/kg, 3 天后检测血糖, 选取血糖 > 16.7 mmol/L 大鼠继续喂养高脂高糖饲料, 持续 1 个月, 复核血糖, 选取血糖 > 16.7 mmol/L 大鼠进入实验; 另外 10 只大鼠作为对照组, 始终喂养普通育成饲料。

1.5 动物分组及给药

造模成功 30 只大鼠采用随机数字表法分为模型组和健脾清化方组, 每组 15 只。健脾清化方组大鼠给予健脾清化方 15 g/(kg·d) 灌胃 (大鼠每日用药量是成人剂量的 10 倍), 每日 1 次; 模型组大鼠给予相同容量的生理盐水灌胃, 每日 1 次; 对照组大鼠基础饲料喂养, 不进行其他处理。各组干预时间为 4 周。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 糖脂代谢指标 每周测定空腹血糖 (FBG), 4 周后禁食 12 h, 腹主动脉采血, 30 min 内取血清, 测定甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)。

1.6.2 全基因组表达谱芯片主要实验流程 1) 总 RNA 的抽提及质量检测: 取各组肝脏组织 100 mg, 用 Trizol 抽提样品总 RNA, 经 Agilent Bio-analyzer 进行电泳质检, 使用 RNeasy micro kit 和 RNase-Free DNase Set 纯化质检合格样品的总 RNA。

2) 样品 RNA 的放大和标记: 实验样品 RNA 采用 Affymetix 表达谱芯片配套试剂盒对样品总 RNA 中

的 mRNA 进行放大、标记和纯化, 获得带有生物素标记的 cRNA。3) 芯片杂交: 按照 Affymetix 表达谱芯片配套提供的杂交标准流程和配套试剂盒, 在滚动杂交炉中, 45℃、16 h 滚动杂交, 杂交完成后在洗涤工作站进行芯片的洗涤。4) 芯片扫描: 芯片结果采用 GeneChip Scanner3000 进行扫描, 用 Command Console Software 3.1 读取原始数据。数据经过标准化后得出健脾清化方组与模型组标记的信号比值 (Fold change), 判定标准 Fold change ≥ 2 的基因为表达显著上调基因, Fold change ≤ 0.5 为表达显著下调基因。根据样本表达谱的相似性将样本划分为不同的组别, 进行聚类分析, 以反映各组基因表达的亲远关系; 经过芯片组间 T 检验分析得到 P 值与 Fold change 值, 两个因素共同绘制火山图, 用于显示两组样品数据的显著性差异。采用 SAS 9.3 统计软件完成。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件, 计量数据以均数 ± 标准差来表示, 比较采用单因素方差分析。芯片结果质控合格的数据采用 Gene Spring Software 11.0 进行归一化处理, 所用的算法为 MAS 5.0。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间 FBG 水平比较

表 1 示, 与对照组同时间点比较, 模型组和健脾清化方组大鼠给药前和给药后 1、2、3、4 周 FBG 水平均增高 ($P < 0.05$)。健脾清化方组治疗后 1、2、3、4 周 FBG 水平较本组治疗前明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组同时间点比较, 健脾清化方组治疗后 1、2、3、4 周 FBG 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠血脂指标比较

表 2 示, 与对照组比较, 模型组和健脾清化方组大鼠 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 水平均升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 健脾清化方组大鼠 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 水平均下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠全基因表达谱检测结果

聚类分析结果显示, 模型组和对照组的表达差

表 1 各组大鼠不同时间 FBG 水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	给药前	给药后 1 周	给药后 2 周	给药后 3 周	给药后 4 周
对照组	10	4.45 ± 0.21	4.33 ± 0.28	4.60 ± 0.20	4.70 ± 0.35	5.12 ± 0.45
模型组	15	11.87 ± 3.90*	11.65 ± 5.51*	11.25 ± 4.44*	10.60 ± 3.56*	14.11 ± 3.86*
健脾清化方组	15	11.59 ± 3.55*	8.86 ± 3.64*△▲	5.93 ± 2.88*△▲	6.01 ± 2.15*△▲	7.00 ± 2.67*△▲

注: FBG, 空腹血糖; 与对照组同时间点比较, * $P < 0.05$; 与本组给药前比较, △ $P < 0.05$; 与模型组同时间点比较, ▲ $P < 0.05$

表 2 各组大鼠血脂指标比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TC	TG	HDL-C	LDL-C
对照组	10	0.96 ± 0.37	0.29 ± 0.11	0.61 ± 0.36	0.42 ± 0.09
模型组	15	1.93 ± 0.94*	1.80 ± 1.59*	1.24 ± 0.39*	0.80 ± 0.42*
健脾清化方组	15	1.48 ± 0.32* [△]	0.90 ± 0.32* ^{△△}	1.00 ± 0.23* [△]	0.63 ± 0.16* [△]

注: TC, 总胆固醇; TG, 甘油三酯; HDL-C, 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C, 低密度脂蛋白胆固醇; 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

异明显, 健脾清化方组与模型组的表达差异明显。根据基因芯片的荧光强度而获得差异表达基因, 通过分析, 在 28 000 条被检测的基因中, 与对照组比较, 模型组大鼠的肝脏组织的基因表达谱中共 1089 个基因表达发生变化, 其中 457 个基因表达上调, 632 个基因表达下调。与模型组比较, 健脾清化方作用后肝脏组织的基因表达谱中共 68 个基因表达发生变化, 其中 34 个基因表达上调, 34 个基因表达下调, 其中 PCIF 和 INSIG1 基因表达均显著上调 (FC 值分别为 1.89 和 1.70)。

2.4 信号通路分析

通过基因芯片信号通路的分析可以看出, 共有 56 条信号通路与 2 型糖尿病有关。其中脂肪酸代谢通路、PPAR 信号通路和胰岛素信号通路等均参与 2 型糖尿病的发病过程。表 3 列出的是 2 型糖尿病改变的差异基因参与的前 10 个信号通路。通过基因芯片信号通路的分析可以看出, 共有 58 条信号通路与健脾清化方影响 2 型糖尿病机制有关, 其中胰岛素分泌、脂肪酸代谢通路、TNF 信号通路等均参与健脾清化方治疗 2 型糖尿病的过程。表 4 列出的是健脾清化方改变的差异基因参与的信号通路。

3 讨论

中医学认为, 2 型糖尿病的形成与脾失健运、升清降浊失司有密切关系。饮食不制, 肥甘过用, 伤及脾胃, 气血生化乏源。中气不足, 神疲乏力。膏粱厚味, 碍于中焦, 津不上承, 口干多饮。升清降浊失常, 湿浊停滞, 形体肥胖。水谷积滞, 郁久化热, 耗气伤阴, 发为消渴。健脾清化方是根据李东垣《脾胃论》中“火与元气两不立, 一胜则一负”的理论, 以“补脾气、降阴火、升阳气”为治法, 治疗 2 型糖尿病从脾入手, 方中党参、黄芪、黄精大补中气, 黄连、黄芩清泄阴火, 葛根升提阳气, 体现了“治病不宜损人脾胃, 克伐元阳”的精髓, 也是张仲景“四季脾旺不受邪”理论的进一步应用。

中药复方具有复杂性, 由于其成分较为复杂,

表 3 2 型糖尿病改变的差异基因参与的信号通路

ID	信号通路	P 值
1	Steroid biosynthesis (类固醇生物合成通路)	1.93×10^{-8}
2	Fatty acid degradation (脂肪酸降解通路)	1.47×10^{-7}
3	Fatty acid metabolism (脂肪酸代谢通路)	1.83×10^{-7}
4	Steroid hormone biosynthesis (甾类激素生物合成通路)	7.44×10^{-7}
5	Metabolic pathways (代谢途径)	5.68×10^{-6}
6	Carbon metabolism (碳代谢通路)	1.03×10^{-5}
7	Propanoate metabolism (丙酸代谢通路)	2.18×10^{-5}
8	Terpenoid backbone biosynthesis (萜类生物合成通路)	2.77×10^{-5}
9	PPAR signaling pathway (PPAR 信号通路)	2.97×10^{-5}
10	Peroxisome (过氧化物酶体通路)	5.49×10^{-5}

表 4 健脾清化方改变的差异基因参与的信号通路

ID	信号通路	P 值
1	Glycerolipid metabolism (甘油酯代谢通路)	0.011
2	Fatty acid metabolism (脂肪酸代谢通路)	0.008
3	Metabolic pathways (代谢途径)	0.028
4	Insulin secretion (胰岛素分泌通路)	0.029
5	Fat digestion and absorption (脂肪消化与吸收通路)	0.006
6	TNF signaling pathway (TNF 信号通路)	0.042
7	Pancreatic secretion (胰腺分泌通路)	0.036
8	Glycolysis/Gluconeogenesis (糖酵解/糖异生通路)	0.002

且不同的研究方剂组成不尽相同, 这给复方制剂的降糖机理研究带来困难。本实验通过对 2 型糖尿病大鼠肝脏组织基因表达谱的检测, 筛选出了健脾清化方影响 2 型糖尿病大鼠的差异基因和信号通路。通过差异基因分析发现, PDX-4 的调节基因 PCIF1 表达显著上调。有研究显示, PCIF1 可以调节小鼠 PDX-4 蛋白的稳定性和胰岛 β 细胞的功能, 在培养的小鼠 β 细胞中, PCIF1 基因的沉默可以增加 PDX-4 的蛋白水平, 而 PCIF1 基因杂合子可以使 PDX-4 的蛋白水平保持稳态^[9]。我们前期动物实验研究发现, 健脾清化方能显著上调 PDX-4 基因的表达, 从而促进 β 细胞的增值, 使胰岛素分泌增加从而降低血糖^[9]。由此, 我们推测健脾清化方通过显著影响 PCIF1 的 mRNA 表达上调和促进胰

高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的分泌, 进而上调 PDX-1 基因的表达, 从而促进 β 细胞的增值, 使胰岛素分泌增加从而降低血糖。本研究还发现 INSIG1 与健脾清化方影响 2 型糖尿病显著相关。INSIG1 是一种跨膜蛋白, 定位于内质网中, 主要参与固醇调节元件结合蛋白 (SREBP) 调节的胆固醇的合成过程, 与肥胖相关^[7], 而肥胖正是 2 型糖尿病发病的重要危险因素。通过信号通路分析, 发现胰岛素分泌信号通路、脂肪酸代谢通路和 TNF 信号通路与健脾清化方治疗 2 型糖尿病显著相关。目前, 研究也证实胰岛素分泌信号通路、脂肪酸代谢通路和 TNF 信号通路均参与 2 型糖尿病的发生过程^[8]。

本实验结果表明, 健脾清化方能显著影响多个如胰岛素分泌通路、脂肪酸代谢通路和 TNF 信号通路等信号通路, 并能上调 PCIF1、INSIG1 基因的表达, 说明健脾清化方可能通过影响代谢通路中的某些基因的表达来降低血糖。

参考文献

[1] Long GH, Cooper AJ, Wareham NJ, et al. Healthy behavior change and cardiovascular outcomes in newly diagnosed type 2 diabetic patients: a cohort analysis of the ADDITION-Cambridge study [J]. Diabetes Care, 2014, 37(6): 1712-1720.

- [2] 朱蕴华, 张晓天, 陆灏. 60 例糖耐量低减居民中医药干预一年的临床观察 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1674-1675.
- [3] 陶枫, 朱蕴华, 陆灏. 健脾清化方对 2 型糖尿病模型大鼠胰岛素 mRNA 表达的影响 [J]. 实用 2 型糖尿病杂志, 2007, 3(3): 44-45.
- [4] 邵俊伟, 蔡逊. 高脂饮食联合链脲佐菌素建立 2 型糖尿病大鼠模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(4): 90-93.
- [5] Claiborn KC, Sachdeva MM, Cannon CE, et al. Pci1f1 modulates Pdx1 protein stability and pancreatic β cell function and survival in mice [J]. J Clin Invest, 2010, 120(10): 3713-3721.
- [6] Liu A, Desai BM, Stoffers DA. Identification of PCIF1, a POZ domain protein that inhibits PDX-1 (MODY4) transcriptional activity [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(10): 4372-4383.
- [7] 陶枫, 姚政, 陆灏, 等. 健脾方影响 2 型糖尿病患者肠促胰岛素 GLP-1 表达的临床观察 [J]. 中国药房, 2007, 18(12): 934-936.
- [8] Niewczas MA, Gohda T, Skupien J, et al. Circulating TNF receptors 1 and 2 predict ESRD in type 2 diabetes [J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(3): 507-515.

Effect of *Jianpi Qinghua Recipe* (健脾清化方) on Gene Expression Profile and Signal Pathway of Type 2 Diabetes Mellitus Rats

LI Junyan¹, TAO Feng¹, CHEN Qingguang¹, WU Xinxing², TAN Yingzi¹, LU Hao¹

(1. Shuguang Hospital, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai, 201203; 2. Shanghai Technical Institution of Electronic and Information)

ABSTRACT Objective To explore possible functional mechanism of *Jianpi Qinghua Recipe* treating type 2 diabetes mellitus at gene transcriptional level. **Methods** Randomly selected 40 from 50 Wistar rats to establish type 2 diabetes mellitus model, with the other 10 rats taken as control group. Thirty successful modeling rats were randomly divided into model group and *Jianpi Qinghua Recipe* group, with 15 rats each. Perfused rats in *Jianpi Qinghua Recipe* group with *Jianpi Qinghua Recipe* 15 g/(kg · d). Perfused rats in model group with normal saline of the same capacity, conducting nothing on rats of control group. Intervention time of each group was all for 4 weeks. Tested levels of fast blood glucose (FBG) of rats every week before and after treatment, and blood lipid level 4 weeks after treatment; Adopting Affymetrix gene chip technology to test differential expression gene of liver tissue of rats in each groups; Located signal pathways and gene related to *Jianpi Qinghua Recipe* affecting expression and regulating of level of transcription of livers of rats suffering from 2-diabetes mellitus, through gene chip signal pathways. **Results** FBG level of *Jianpi Qinghua Recipe* group decreased remarkably after treating for 1, 2, 3, 4 weeks, and was lower than that of model group at the same time point ($P < 0.05$); Blood lipid level of rats in *Jianpi Qinghua Recipe* group decreased compared with that of model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). *Jianpi Qinghua Recipe* can remarkably affect several signal pathways, such as insulin secretion pathway, fatty acid metabolism pathway and TNF signal pathway, and can up-regulate the expression of PCIF1 and INSIG1 gene in the pathways. **Conclusion** *Jianpi Qinghua Recipe* may regulate gene transcriptional level of livers of rats suffering from type 2 diabetes mellitus by affecting gene expression of multiple signaling pathways, to increase glucose levels.

Keywords type 2 diabetes mellitus; *Jianpi Qinghua Recipe*; gene expression profiling; signal pathway

收稿日期: 2014-11-18; 修回日期: 2015-03-03

编辑: 邓 媛