

天麦消渴片通过 miRNA 改善糖尿病大鼠血糖的机制

张茜,肖新华*,黎明,李文慧,于淼,张化冰,平凡,王志新,郑佳

(中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 内分泌科 卫生部内分泌重点实验室,北京 100730)

【摘要】 目的 探讨天麦消渴片对糖尿病大鼠体重、血糖、血脂和胰岛素等相关代谢指标的影响,并且利用 miRNA 表达谱芯片和实时定量 RT-PCR 探讨天麦消渴片降血糖的机制。方法 SD 大鼠通过高脂饮食/注射 STZ 法构建糖尿病大鼠模型。将 SD 大鼠分为小剂量天麦消渴片组[8只,给予 50 mg/(kg·d)的天麦消渴片粉末悬浊液]、大剂量天麦消渴片组[8只,给予 100 mg/(kg·d)的天麦消渴片粉末悬浊液]、糖尿病模型组(8只,给予等体积生理盐水)和正常对照组(8只,给予等体积生理盐水),均连续灌胃 8 周。每 2 周测定 SD 大鼠空腹血糖(FBG)和体重。7 周末进行口服糖耐量实验(OGTT),测空腹和葡萄糖负荷后血糖。8 周末测定大鼠空腹血糖、血清胰岛素和血脂水平,观察天麦消渴片对糖尿病大鼠血糖和血脂的改善作用。取大鼠胰腺组织进行 miRNA 表达谱芯片实验,并运用实时定量 RT-PCR 验证芯片结果,以期探讨天麦消渴片对糖尿病大鼠降血糖的机制。结果 干预后,大剂量天麦消渴片组大鼠较糖尿病模型组空腹血糖和 OGTT 曲线下面积(AUC)显著下降。干预 8 周后,大剂量天麦消渴片组空腹血清胰岛素(FINS)和胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)较糖尿病模型组显著降低($P < 0.01$)。干预 8 周后,大剂量天麦消渴片组大鼠总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)较糖尿病模型组显著降低($P < 0.05$)。大剂量天麦消渴片组胰腺较糖尿病模型组有 18 个 miRNA 上调,3 个 miRNA 下调。结论 天麦消渴片不仅能有效降低糖尿病大鼠 FBG,改善胰岛素敏感性,还能调节脂代谢。天麦消渴片可能是通过上调胰腺 miR-375 和 miR-30d 水平,刺激胰岛 β 细胞增殖,抑制胰岛 α 细胞增殖,增加胰岛素基因表达;上调胰腺 let-7b、let-7e、miR-142-5p 和 miR-375,抑制细胞因子及受体相互作用通路和 MAPK 通路的功能,从而改善糖尿病大鼠血糖和胰岛素抵抗状态。

【关键词】 天麦消渴片;吡考啉酸铬;糖尿病;microRNA

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 01-0001-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.01.001

Modulating effect of a chromium-containing Chinese medicine, Tianmai Xiaoke Tablet, on glucose metabolism through miRNA in diabetic rats

ZHANG Qian, XIAO Xin-hua, LI Ming, LI Wen-hui, YU Miao,
ZHANG Hua-bing, PING Fan, WANG Zhi-xin, ZHENG Jia

(Department of Endocrinology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

【Abstract】 Objective In China, the chromium-containing Chinese traditional medicine, Tianmai Xiaoke tablet (TM), is used in the treatment of type 2 diabetes mellitus. However, its mechanism of action is not fully clear yet. The aim of this study was to investigate the effect of TM on glucose metabolism in diabetic rats and to identify whether TM has

【基金项目】 国家自然科学基金青年项目(编号:81300649);国家自然科学基金面上项目(编号:81170736),国家临床重点专科(WDY2011-873);北京协和中青年基金,协和青年基金(333201022),中央高校基本科研业务费专项基金。

【作者简介】 张茜(1979-),女,助理研究员,博士,从事糖尿病研究工作。

【通讯作者】 肖新华(1962-),男,主任医师,博士生导师,从事糖尿病研究工作。E-mail: xiaoxinhua@medmail.com.cn

a direct effect on islet cells through microRNAs. **Methods** Thirty-two healthy 5-month old SPF male Sprague-Dawley rats were divided into control group, diabetic group, low dose TM group (TML), and high dose TM group (TMH). The miRNA expression profiles of pancreas samples were analyzed using microRNA array and verified by Q-PCR. **Results** Eight-week treatment with TM significantly decreased the fasting blood glucose in the diabetic rats. The blood glucose was significantly reduced in the TM-treated groups before and after oral glucose administration. Fasting insulin and HOMA-IR were suppressed in the TM-treated groups. miR-448, let-7b, miR-540, miR-296, miR-880, miR-200a, miR-500, miR-10b, miR-336, miR-30d, miR-208, let-7e, miR-142-5p, miR-874, miR-375, miR-879, miR-501, and miR-188 were up-regulated, while miR-301b, miR-134, and miR-652 were down-regulated in the TMH group. Through target gene analysis and real-time PCR verification, we found that these miRNAs, especially miR-375 and miR-30d, could stimulate insulin secretion of the pancreatic islets. **Conclusions** Our findings suggest that TM can effectively decrease FBG, enhance the sensitivity to insulin, and also modulates lipid metabolism in diabetic rats. TianMai Xiaoke Tablet may improve the blood glucose and alleviate the insulin resistance in diabetic rats through up-regulation of pancreatic miR-375 and miR-30d, promote the proliferation of islet β -cells and inhibit the proliferation of α -cells, increase the insulin gene expression, up-regulate the pancreatic let-7b, let-7e, miR-142-5p and miR-375, and suppress the function of cytokine-receptor interaction pathway and MAPK pathway.

【Key words】 Tianmai Xiaoke Tablet; Chromium picolinate; Diabetes mellitus; miRNA; Rat

天麦消渴片的主要成分是吡考啉酸铬(每片含吡考啉酸铬 1.6 mg, 即铬元素 200 μ g), 辅以天花粉、麦冬、五味子。临床研究显示, 天麦消渴片能改善糖耐量异常患者糖代谢紊乱状态^[1]; 与吡格列酮^[2]、二甲双胍^[3]、胰岛素^[4]等联用可降低糖尿病患者血糖, 改善其胰岛素抵抗。2012 年, 中日友好医院杨文英教授牵头的一项多中心、随机、双盲研究发现, 中国新诊断的 2 型糖尿病患者血清铬水平仅为正常人的一半。给与新诊断的 2 型糖尿病患者天麦消渴片, 每天 2 次, 每次 2 片(每片 120 mg) 治疗 24 周, 发现能降低 HbA1c 0.4% ~ 0.5%^[5]。天麦消渴片治疗能使治疗前血清铬水平极低亚组(血清铬浓度低于 40 ng/mL) HbA1c 水平下降 1% ~ 1.6%。这一研究为铬(III)治疗糖尿病的疗效提供了中国人群的数据。本研究旨在探讨天麦消渴片对糖尿病大鼠糖脂代谢及胰岛素敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处理

SPF 级 5 周龄雄性 SD 大鼠 32 只, 体重(270.0 \pm 4.1)g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2013-0005】, 饲养在中国医学科学院北京协和医院动物房【SYXK(京)2010-0028】。随机挑选 8 只 SD 大鼠为对照组, 其余大鼠喂以特殊的高脂饲料(每克饲料含 58% 脂肪, 25.6% 碳水化合物, 16.4% 蛋白质, 由中国医学科学院动物所提供)。高脂饲养或普通饲养 4 周后, 给予糖尿病模型组大鼠腹腔注射 40 mg/kg 体重的链脲佐菌素

(STZ)溶液。72 h 后, 测空腹血糖高于 11.1 mmol/L 的 SD 大鼠入组。分组: 糖尿病组(给予等体积生理盐水); 低剂量天麦消渴片组[给予 50 mg/(kg·d)] 和高剂量天麦消渴片组[给予 100 mg/(kg·d)], 每组 8 只。对照组 8 只给予等体积生理盐水。

1.2 相关指标测定

于开始灌胃当天, 喂药后 2、4、6、8 周测量大鼠体重、FBG(禁食 4 h 尾部取血, 葡萄糖氧化酶法)。灌胃后第 7 周行 OGTT 实验, 即大鼠禁食 6 h 后, 灌胃葡萄糖溶液(2.2 g/kg 体重), 测定 0、30、60、120 min 各时间点的血糖值, 计算 AUC, $AUC = 0.5 \times (0 \text{ min 血糖} + 30 \text{ min 血糖})/2 + 0.5 \times (30 \text{ min 血糖} + 60 \text{ min 血糖})/2 + 1 \times (60 \text{ min 血糖} + 120 \text{ min 血糖})/2$ 。灌胃后 8 周, 禁食 6 h, 处死, 摘眼球取血, ELISA 法测定 FINS(Linco Corp), 计算 HOMA-IR, $HOMA-IR = FBG \text{ (mmol/L)} \times FINS \text{ (}\mu\text{U/mL)}/22.5$ 。酶法测定 TC、TG、HDL-c 和 LDL-c。

1.3 糖尿病大鼠胰腺 miRNA 芯片

1.3.1 胰腺组织总 RNA 抽提

处死小鼠后, 立即取胰腺组织置液氮冻存备用。大剂量天麦消渴片组和糖尿病组各取 3 个样本。Trizol 法提取 RNA。紫外吸收测定法和变性琼脂糖凝胶电泳对 RNA 含量和质量进行鉴定。

1.3.2 miRNA 标记

使用 Exiqon 公司的 miRCURY 芯片标记试剂盒分别标记各组 RNA。

1.3.3 浓缩标记样品

使用 Qiagen 公司的 RneasyMini Kit 对前述标记

后的样品进行浓缩。

1.3.4 miRNA 芯片杂交

使用 Exiqon 公司的 miRCURY Array (ver. 18.0, 第七代) microarray kit 将浓缩标记样品与芯片进行杂交。这款芯片包括 miRBase 18.0 数据库中全部 54 个物种(包括脊椎动物、无脊椎动物、植物、病毒等)的所有 miRNA, 探针数目达到 3100 个, 其中包括 680 个大鼠成熟 miRNA。

1.3.5 图像扫描与分析

使用 Genepix 4000B 进行图像扫描, 635 nm 激发扫描; 扫描强度为 100%, 扫描精度为 10 μm, 图像存成 TIF 文件。各组均设三个平行样本。为了筛选天麦消渴片干预引起差异表达的 miRNA, 将大剂量天麦消渴片组与糖尿病模型组胰腺 miRNA 标准值的差异有统计学意义 (Weleh-t 检验, $P < 0.05$), 且标准值的比值 (fold change) > 2 或 < 0.5 作为表达上调或下调 miRNA, 并使用 Cluster 3.0 和 Treeview 软件对大剂量天麦消渴片组胰腺差异表达的 miRNAs 进行聚类分析。

1.4 实时定量 PCR

PCR 扩增程序如下: 95°C, 10 min; 40 个循环 (95°C, 15 s; 60°C, 60 s)。

1.5 统计学处理

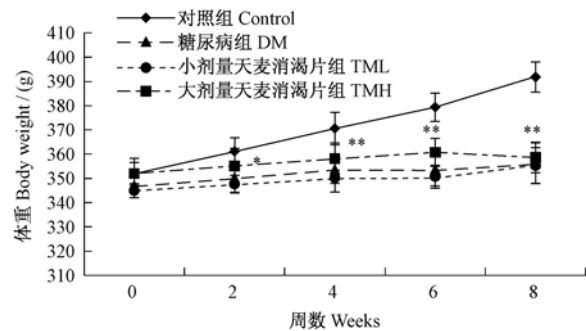
定量指标均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用 Mann-Whitey U 检验。采用 SPSS 15.0 进行数据分析。

2 结果

2.1 天麦消渴片对糖尿病大鼠体重、FBG、AUC、FINS、HOMA-IR 和血脂的影响

在给予天麦消渴片前(0 周)对照组、糖尿病组和天麦消渴组体重差异无显著性, 糖尿病组和天麦消渴片组 FBG 差异无显著性。给予天麦消渴片 2、4、6 和 8 周, 天麦组和糖尿病模型组体重显著低于较正常对照组(2 周, $P < 0.05$; 4、6 和 8 周, $P < 0.01$, 图 1)。天麦组较糖尿病模型组体组体重差异无显著性, 见表 1。提示天麦消渴片不改变糖尿病大鼠体重。天麦消渴片治疗 2、4、6 和 8 周后, 小剂量天麦组和大剂量天麦组空腹血糖较糖尿病模型组显著下降 ($P < 0.05$, 见图 2)。天麦消渴片干预 7 周, 行 OGTT 实验, 结果发现, 糖尿病模型组、小剂量天麦组和大剂量天麦组较正常对照组灌胃葡萄糖前(0 min)以及灌胃后 30、60、120 min 各时间点血糖

均显著升高 ($P < 0.01$)。小剂量天麦组和大剂量天麦组灌胃葡萄糖前(0 min)以及灌胃后 30、60、120 min 各时间点血糖值和 AUC 均显著低于糖尿病模型组 ($P < 0.05$, 见图 3, 4)。提示天麦消渴片能显著降低糖尿病大鼠空腹血糖, 改善糖耐量。天麦消渴片干预 8 周后, 糖尿病模型组和天麦组空腹胰岛素分泌、HOMA-IR、TG 和 TC 较正常组显著升高(糖尿病模型组, $P < 0.01$; 天麦组, $P < 0.05$)。天麦组较糖尿病模型组空腹胰岛素分泌、HOMA-IR、TG 和 TC 显著降低 ($P < 0.01$, 见表 1)。

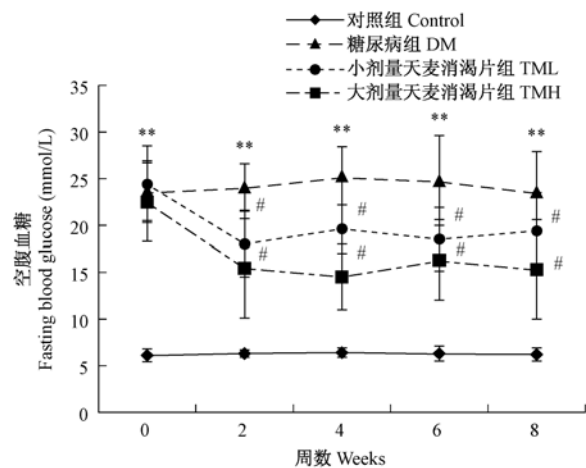


注: 与对照组比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s$, $n = 8$ 。

图 1 天麦消渴片干预前后糖尿病大鼠体重比较

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 1 Effect of Tianmai Xiaoke Tablet on the body weight of diabetic rats

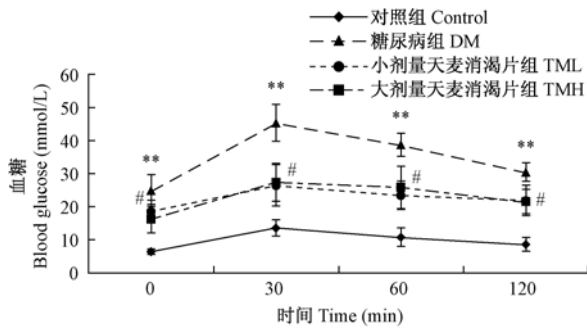


注: 与对照组比: ** $P < 0.01$; 与糖尿病模型组比: # $P < 0.05$ 。 $\bar{x} \pm s$, $n = 8$ 。

图 2 天麦消渴片干预前后大鼠空腹血糖比较

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$; Compared with the diabetic group, # $P < 0.05$.

Fig. 2 Effect of Tianmai Xiaoke Tablet on the FBG of diabetic rats



注:与对照组比: ** $P < 0.01$; 与糖尿病模型组比: # $P < 0.05$ 。
 $\bar{x} \pm s, n = 8$ 。

图3 天麦消渴片干预7周后 OGTT 血糖结果比较

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$; Compared with the diabetic group, # $P < 0.05$.

Fig. 3 Effect of Tianmai Xiaoke Tablet on blood glucose by oral glucose tolerance test in diabetic rats at 7 weeks after the drug intervention

表1 天麦消渴片干预8周后空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数和血脂的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab.1 Effect of Tianmai Xiaoke Tablet on FINS, HOMA-IR and lipid metabolic parameters in the diabetic rats at 8 weeks after drug intervention

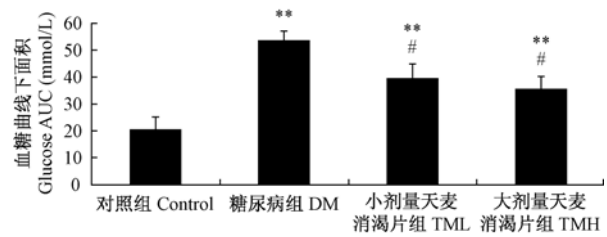
组别 Groups	空腹胰岛素 FINS ($\mu\text{IU}/\text{mL}$)	胰岛素抵抗指数 HOMA-IR	总胆固醇 TC (mmol/L)	甘油三酯 TG (mmol/L)	高密度脂蛋白 HDL (mmol/L)	低密度脂蛋白 LDL (mmol/L)
对照组 Control group	10.74 \pm 2.50	5.96 \pm 0.89	0.84 \pm 0.17	0.39 \pm 0.01	1.41 \pm 0.03	0.25 \pm 0.01
糖尿病组 Diabetic group	31.90 \pm 4.68 **	33.46 \pm 8.30 **	1.44 \pm 0.01 **	0.83 \pm 0.05 **	1.25 \pm 0.04	0.30 \pm 0.04
小剂量天麦消渴片 TML	18.74 \pm 5.38 **#	16.12 \pm 4.73 **#	1.35 \pm 0.02 **#	0.53 \pm 0.02 **#	1.21 \pm 0.03	0.28 \pm 0.03
大剂量天麦消渴片 TMH	15.79 \pm 3.75 **#	15.83 \pm 4.87 **#	1.27 \pm 0.01 **#	0.49 \pm 0.04 **#	1.19 \pm 0.06	0.29 \pm 0.08

注:与对照组比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与糖尿病模型组比: # $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the diabetic group, # $P < 0.01$.

2.2 miRNA 芯片结果

大剂量天麦消渴片组较糖尿病模型组胰腺共有 18 个 miRNA 上调, 3 个 miRNA 下调(见表 2)。实时定量 PCR 结果与芯片结果一致(见表 3)。运用 miRWalk 在线数据库对 21 个差异表达 miRNA 进行靶基因预测, 得到 391 个被以往研究证实的靶基因。为了探讨天麦消渴片干预后糖尿病大鼠胰腺差异表达的基因通路, 我们对大剂量天麦消渴片组较糖尿病模型组胰腺差异表达 miRNA 的靶基因进行了 pathway 分析。Pathway 分析结果显示, 大剂量天麦消渴片组较糖尿病模型组胰腺差异表达的 miRNA 的 391 个靶基因分为 4 个通路分类, 分别为: 细胞因子及受体相互作用, MAPK 信号通路, 2 型糖尿病和胰岛素信号通路(FDR < 0.001 且 Fold enrichment > 2.0 , 见表 4)。



注:与对照组比: ** $P < 0.01$; 与糖尿病模型组比: # $P < 0.05$ 。
 $\bar{x} \pm s, n = 8$ 。

图4 天麦消渴片干预7周后 OGTT 血糖曲线下面积(AUC)结果比较

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$; Compared with the diabetic group, # $P < 0.05$.

Fig. 4 Effect of Tianmai Xiaoke Tablet on AUC of oral glucose tolerance in the diabetic rats at 7 weeks after the drug intervention.

3 讨论

结果发现天麦消渴片能显著降低糖尿病大鼠血糖、OGTT 曲线下面积、空腹胰岛素和 HOMA-IR 值。揭示天麦消渴片能降低糖尿病大鼠血糖, 改善糖耐量和胰岛素敏感性。这与之前天麦消渴片在临床中观察到的疗效是一致的^[6,7]。天麦消渴片的主要成分是吡考啉酸铬。1997 年, Anderson 等^[9]将 180 位中国 2 型糖尿病患者分为三组: 对照组为 200 μg 吡考啉酸铬组和 1000 μg 吡考啉酸铬组。观察短期(干预 2 个月)和长期(干预 4 个月)的疗效。结果发现, 在干预 2 个月和 4 个月后, 1000 μg 吡考啉酸铬组 HbA1c, 空腹血糖, 餐后 2 h 血糖水平显著下降。干预 4 个月后, 200 μg 吡考啉酸铬组 HbA1c 显著下降^[8]。随后开展了更加大型的临床研究, 入组 833

余名中国 2 型糖尿病患者,每天 500 μg 吡考啉酸铬,干预 10 个月。结果发现吡考啉酸铬能改善空腹和餐后血糖。吡考啉酸铬也能降低 2 型糖尿病患者血胰岛素水平。Vrtovec 等^[10]给予 60 名 2 型糖尿病患者 1000 μg 吡考啉酸铬 12 周,发现吡考啉酸铬能

降低 2 型糖尿病患者血清胰岛素水平。本研究还发现天麦消渴片能显著降低糖尿病大鼠的总胆固醇和甘油三酯。揭示天麦消渴片能调节糖尿病大鼠的血脂。在以前临床试验中,也发现了天麦消渴片能降低 TG 和 TC^[11,12]。

表 2 大剂量天麦消渴片组较糖尿病模型组差异表达 miRNA

Tab. 2 Differential expression of miRNA between the high dose TM group and diabetic rat group

miRNA 名称 miRNA	倍比值 Fold-changes	P 值 P -value	染色体位置 Chromosomal location	序列 Mature sequence
rno-miR-448	2.175	0.04844	Xq14	UUGCAUAUGUAGGAUGUCCCA
rno-let-7b	3.740	0.02207	7q34	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGU
rno-miR-540	2.899	0.04278	6q32	AGGUCAGAGGUCGAUCCUG
rno-miR-296	3.054	0.02955	3q42	GAGGGUUGGGUGGAGGCUCUC
rno-miR-880	2.069	0.03130	Xq37	UACUCCAUAUCUUGAGUAG
rno-miR-200a	2.493	0.01933	5q36	UAACACUGUCUGGUAACGAUG
rno-miR-500	2.010	0.01848	Xq13	AAUGCACUUGGGCAAGGUUCA
rno-miR-10b	3.413	0.04138	3q23	CCCUGUAGAACCGAAUUUGUG
rno-miR-336	3.721	0.00746	10q22	UCACCCUCCAUAUCUAGUC
rno-miR-30d	2.531	0.01836	7q34	UGUAAACAUGCCCGACUGGAA
rno-miR-208	2.300	0.46728	15p13	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUG
rno-let-7e	3.268	0.02307	1q12	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU
rno-miR-142-5p	3.582	0.00483	10q26	CAUAAAAGUAGAAAGCACUACU
rno-miR-874	3.751	0.01429	17p14	CUGCCUUGGCCCGAGGACCG
rno-miR-375	3.412	0.02933	9q33	UUUGUUCGUUCGGCUGCGGUG
rno-miR-879	3.299	0.00634	4q12	AGAGCCUUAUAGCUCUAAGC
rno-miR-501	3.534	0.01714	Xq13	AAUCCUUUGUCCUGGGUGAA
rno-miR-188	2.609	0.03009	Xq13	CAUCCUUGCAUGGUGGAGGG
rno-miR-301b	0.354	0.05323	11q23	CAGUGCAAUGGUAUUGUCAAAAG
rno-miR-134	0.458	0.00298	6q32	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG
rno-miR-652	0.477	0.01357	Xq14	AAUGGCCCCACUAGGGUUGU

表 3 miRNA 实时定量 RT-PCR 结果

Tab. 3 Results of real time quantitative PCR of miRNA

miRNA	倍比值 Fold-changes	P 值 P value
rno-miR-448	2.51 ± 0.21	0.015
rno-let-7b	3.93 ± 0.39	0.026
rno-miR-540	3.16 ± 0.31	0.016
rno-miR-296	3.25 ± 0.48	0.021
rno-miR-880	1.93 ± 0.27	0.019
rno-miR-200a	2.61 ± 0.44	0.025
rno-miR-500	2.44 ± 0.38	0.015
rno-miR-10b	3.81 ± 0.44	0.021
rno-miR-336	3.25 ± 0.28	0.015
rno-miR-30d	2.84 ± 0.24	0.014
rno-miR-208	2.56 ± 0.36	0.023
rno-let-7e	3.23 ± 0.25	0.015
rno-miR-142-5p	3.81 ± 0.46	0.025
rno-miR-874	3.22 ± 0.31	0.018
rno-miR-375	3.16 ± 0.34	0.015
rno-miR-879	3.16 ± 0.38	0.025
rno-miR-501	3.74 ± 0.45	0.026
rno-miR-188	2.72 ± 0.38	0.017
rno-miR-301b	0.39 ± 0.013	0.017
rno-miR-134	0.41 ± 0.039	0.014
rno-miR-652	0.42 ± 0.024	0.021

microRNA(miRNA)是一类具有 21-25 个核苷酸的单链小 RNA,是非编码小分子,靶向性的作用于 mRNA,参与基因转录后的表达调控。miRNA 表达模式具有位相性和时序性。作为一种广泛存在的

对基因表达能够进行微调的分子,miRNA 通过网络调控方式,可以从整体上调控生物体的生命活动。近年来,大量研究发现,miRNA 在糖尿病的发生发展中起重要作用。

本研究发现天麦消渴片组较糖尿病模型组胰腺 miR-375 显著上调。miRNA-375 在胰腺表达^[13]。其受 Pdx-1 和 NeuroD1 调控^[14]。而 Pdx-1 和 NeuroD1 是胰腺小鼠发育过程中重要的转录因子。在斑马鱼中,抑制 miR-375 表达,导致其胰腺发育缺陷。在成熟胰岛 β 细胞,miR-375 能抑制葡萄糖诱导的胰岛素分泌^[15]。miR-375 过表达并不影响 ATP 产生,也不增加细胞内葡萄糖刺激的 Ca²⁺ 释放。miR-375 影响胰岛素分泌的最后环节。miR-375 能部分抑制肌营养素(myotrophin, Mtpn)的表达。肌营养素是一种影响胰岛素颗粒融合的蛋白。另外,miR-375 能控制胰岛素基因的表达^[16]。miR-375 敲除小鼠胰岛素分泌和清除正常,但是表现出高血糖和糖耐量受损^[17]。机制可能是 miR-375 能增加胰岛 α 细胞数量,升高血浆胰高血糖素水平,从而导致糖异生和肝糖输出增加。这种 miR-375 敲除小鼠的 β 细胞增殖减少,导致 β 细胞数量减少。miR-

表 4 差异表达的 miRNA 的 391 个靶基因 KEGG pathway 分析 (FDR < 0.001, Fold enrichment > 2.0)

Tab. 4 Pathway analysis of 391 target genes of the differentially expressed miRNA.

KEGG 编号 KEGG_ID	名称 Terms	基因数量 Counts	基因 Genes
mo04060	细胞因子与细胞因子受体相互作用 Cytokine-cytokine receptor interaction	20	EGFR, IL6, TNF, PDGFB, TGFBR1, MET, CXCL9, HGF, KITL, IL10, ACVR2A, INHBA, TNFSF11, CCR4, CXCR4, IFNG, FAS, CSF1R, ACVR1, GHR
mo04010	MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway	18	EGFR, FGFR1, TNF, PDGFB, GRB2, TGFBR1, FGF16, NR4A1, DDIT3, AKT1, MAPK1, CASP3, KRAS, MAPK14, MAPK3, FAS, MYC, GADD45A
mo04930	2 型糖尿病 Type 2 diabetes mellitus	6	MAPK1, TNF, SOCS3, SOCS1, MAPK3, MTOR
mo04910	胰岛素信号通路 Insulin signaling pathway	9	AKT1, MAPK1, KRAS, GRB2, SOCS3, SOCS1, MAPK3, MTOR, PPARGC1A

375 敲除的 ob/ob 小鼠胰腺重量降低,以代偿胰岛素抵抗的状态^[18],导致了出现严重的糖尿病症状。因此,miR-375 对胰岛 β 细胞具有多种作用,包括影响胰岛素表达和分泌, β 细胞增殖和代偿胰岛素抵抗状态等。因此,我们推测天麦消渴片能够通过上调糖尿病大鼠胰腺 miR-375,刺激胰岛 β 细胞增殖,抑制胰岛 α 细胞增殖,降低血糖。

另外,天麦消渴片组较糖尿病模型组胰腺 miR-30d 显著上调。MIN6 细胞系暴露在高糖下,miR-124a, miR-107 和 miR-30d 上调;miR-296, miR-484, miR-690 下调^[19]。miR-30d 过表达能增加胰岛素基因表达。揭示 miR-30d 可能与糖尿病状态下胰岛素合成缺陷有关。因此,我们推测天麦消渴片能通过上调糖尿病大鼠胰腺 miR-30d 的水平,增加胰岛素基因表达,降低血糖。

参 考 文 献

- [1] 张贺芳,唐艳阁,何玉洁,等. 天麦消渴片对糖耐量异常的干预研究 [J]. 中国实验方剂学杂志. 2011. 17(21):266 - 267.
- [2] 白丽华,王小强,戴卫红. 天麦消渴片和吡格列酮对初发 2 型糖尿病胰岛素抵抗的影响 [J]. 现代中西医结合杂志. 2012. 21(24): 2666 - 2667.
- [3] 苑晓焯,杨圣俊,温志谦,等. 天麦消渴片和二甲双胍联合治疗 2 型糖尿病疗效观察 [J]. 河北医药. 2011. 33(110): 1543 - 1544.
- [4] 苑晓焯,杨圣俊,温志谦,等. 天麦消渴片联合胰岛素治疗 2 型糖尿病疗效观察 [J]. 河北医药. 2011. 33(12): 1811 - 1812.
- [5] 邵聪,吕肖峰,肖新华,等. 天麦消渴片治疗中国新诊断 2 型糖尿病患者的疗效研究 [J]. 中华医学杂志. 2012. 92(22): 1522 - 1526.
- [6] Hasten DL, Hegsted M, Gilckman-Weiss EL. Effects of chromium picolinate and exercise on the body composition of the rat [J]. FASEB J, 1993, 7: A77.
- [7] Page TG, Southern LL, Ward TL, et al. Effect of chromium picolinate on growth and serum and carcass traits of growing-finisher pigs [J]. J Anim Sci, 1993, 71(3): 656 - 662.
- [8] Anderson RA, Cheng N, Bryden NA, et al. Elevated intakes of supplemental chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type 2 diabetes [J]. Diabetes, 1997, 46(11): 1786 - 1791.
- [9] Cheng N, Zhu X, Shi H, et al. Follow-up survey of people in China with type 2 diabetes mellitus consuming supplemental chromium [J]. J Trace Elem Exp Med, 1999, 12(2): 55 - 60.
- [10] Vrtovec M, Vrtovec B, Briski A, et al. Chromium supplementation shortens QTc interval duration in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Am Heart J, 2005, 149(4): 632 - 635.
- [11] Anderson RA, Kozlovsky AS. Chromium intake, absorption and excretion of subjects consuming self-selected diets [J]. Am J Clin Nutr, 1985, 41(6): 1177 - 1183.
- [12] 江澜. 微量元素铬(III)的生理功能 [J]. 渝州大学学报(自然科学版). 2000. 17(4): 74 - 76.
- [13] Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, et al. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development [J]. PLoS Biol, 2007, 5(8): e203.
- [14] Keller DM, McWeeney S, Arsenlis A, et al. Characterization of pancreatic transcription factor Pdx-1 binding sites using promoter microarray and serial analysis of chromatin occupancy [J]. J Biol Chem, 2007, 282(44): 32084 - 32092.
- [15] Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion [J]. Nature, 2004, 432(7014): 226 - 330.
- [16] El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, et al. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells [J]. Diabetes, 2008, 57(10): 2708 - 2717.
- [17] Herrera BM, Lockstone HE, Taylor JM, et al. MicroRNA-125a is over-expressed in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 Diabetes [J]. BMC Med Genomics, 2009, 2: 54.
- [18] Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, et al. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(14): 5813 - 5818.
- [19] Tang X, Muniappan L, Tang G, et al. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic β cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription [J]. RNA, 2009, 15(2): 287 - 293.

[收稿日期] 2014-09-15