

# 金线莲醇提物在斑马鱼中降血糖效果的探究

许璟瑾<sup>1</sup>, 张文娟<sup>1</sup>, 陈志永<sup>1</sup>, 李秀敏<sup>1</sup>, 潘裕添<sup>1</sup>, 王兵丽<sup>1</sup>, 欧一新<sup>1,2</sup>, 薛钰<sup>1,3\*</sup>

(1. 闽南师范大学菌物产业工程技术中心, 福建 漳州 363000; 2. 上海交通大学, 生命科学技术学院, 上海 200240; 3. 膜生物学国家重点实验室, 北京 100101)

**【摘要】 目的** 以斑马鱼为模型筛选金线莲具有降血糖效果的活性组分, 并进行初步的机理研究。**方法** 对金线莲进行分离与提取, 分成三个组分: 金线莲醇提物、大分子多糖( $\geq 5 \times 10^3$ )和小分子多糖( $< 5 \times 10^3$ )。将发育至 24 h 的斑马鱼胚胎暴露于 2% 浓度的葡萄糖溶液(2% Glu)中, 模拟急性高糖模型, 待胚胎发育至 48 h 时再分别加入三种组分, 同时继续用 2% 葡萄糖溶液处理, 72 h 时检测不同组分处理后幼鱼的组织液葡萄糖含量, 筛选出具有降血糖效果的活性组分。利用半定量 PCR 和整胚原位杂交技术检测糖代谢相关基因 mRNA 水平的表达。**结果** 本研究利用高糖胁迫构建斑马鱼糖尿病模型, 在该模型下, 糖代谢关键因子胰岛素基因(*preproinsulin*, *insulin*)、磷酸烯醇式羧基酶 1 基因(*phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*, *pck-1*)、胰腺十二指肠同源盒基因 1 (*pancreatic and duodenal homeobox 1*, *pdx-1*) 的表达都发生了明显改变, 金线莲醇提物能够改善这些基因在高糖胁迫下引起的异常表达, 甚至恢复到正常水平。**结论** 金线莲醇提物对斑马鱼高糖模型具有明显的降血糖功效, 该研究为斑马鱼作为糖尿病模型用于探索降血糖药物提供了实验思路和手段。

**【关键词】** 金线莲醇提物; 斑马鱼; 组织液葡萄糖; 高糖模型; 糖代谢基因

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 06-0021-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.06.005

## Exploration of the hypoglycemic effect of *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts on diabetic zebrafish models

XU Jingjin<sup>1</sup>, ZHANG Wenjuan<sup>1</sup>, CHEN Zhiyong<sup>1</sup>, LI Xiumin<sup>1</sup>, PAN Yutian<sup>1</sup>, WANG Bingli<sup>1</sup>, OU Yixin<sup>1,2</sup>, XUE Yu<sup>1,3\*</sup>

(1. The Engineering Technology Center of Mushroom Industry of Minnan Normal University, Zhangzhou 363000, China;

2. School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240;

3. State Key Laboratory of Membrane Biology, Beijing 100101)

**【Abstract】 Objective** The aim of this study is to explore the hypoglycemic effect of active components of *Anoectochilus roxburghii* on zebrafish models. **Methods** *Anoectochilus roxburghii* components were extracted and separated into three groups: the alcohol extraction group, macromolecular polysaccharide group ( $\geq 5 \times 10^3$ ) and small molecular polysaccharide group ( $< 5 \times 10^3$ ). Zebrafish embryos were exposed to 2% glucose solution (2% Glu) at 24 h to imitate acute hyperglycemia phenotype, and then treated with the three *Anoectochilus roxburghii* components. Based on this high-glucose model, the zebrafish embryos at 72 h were collected to detect the whole tissue glucose value. Furthermore, semi-quantitative PCR and whole mount *in situ* hybridization were performed to detect the expression of mRNA levels of

**【基金项目】**福建省自然科学基金项目资助(2015J05070);福建省高校杰出青年科研人才培养计划项目;福建省教育厅科技项目(JK2015028);福建省中青年教师教育科研项目(JA15318)。

**【作者简介】**许璟瑾(1990—),男,硕士研究生,研究方向:化学生物学。E-mail: 13123352787@163.com

**【通信作者】**薛钰(1986—),女,讲师,博士生,研究方向:细胞与发育生物学。E-mail: xueyu0614@163.com

glycometabolism-related genes. **Results** An acute diabetic zebrafish model was induced by high glucose stress. In this model, some key factors during glycometabolism such as *insulin*, *pck-1* and *pdx-1* were significantly affected, while the alcohol extracts of *Anoectochilus roxburghii* obviously reversed these abnormalities induced by high glucose stress, even to normal levels. **Conclusions** The alcohol extracts of *Anoectochilus roxburghii* has obvious hypoglycemic effect on diabetic zebrafish model. Our result suggest that *Anoectochilus roxburghii* has a potential application in the hypoglycemic drug screening.

**[ Key words ]** *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts; zebrafish; tissue glucose; hyperglycemia model; glycometabolism-related genes

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种由遗传因素和环境因素互相作用引起常见的严重代谢性疾病。其主要病因是源于体内胰岛素信号通路受损或是胰岛素靶点的敏感性降低, 导致糖代谢途径异常从而引起血液中葡萄糖含量增加, 临床上以高血糖为主要的生理病征, 同时伴随着尿糖、胰岛素缺乏或作用下降。糖尿病分为 I 型糖尿病和 II 型糖尿病, 胰岛素绝对缺失、必需依赖外源性胰岛素延续生命的患者归为 I 型糖尿病, 大部分不依赖外源性胰岛素延续生命者归为 II 型糖尿病<sup>[1-4]</sup>。在生物体内维持血糖平衡有四个非常重要的基因。胰岛素 (preproinsulin, insulin) 是调节血糖平衡的关键因子<sup>[5]</sup>, 胰岛素由胰腺中的  $\beta$  细胞合成, 通过结合位于脂肪细胞、肌肉细胞等细胞上的胰岛素受体, 调控葡萄糖转运体从胞浆移动至细胞膜上, 从而促使细胞对葡萄糖的摄取<sup>[6-8]</sup>。磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 1 (*phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*, *pck-1*) 与糖原异生、甘油异生、肥胖和糖尿病等代谢疾病密切相关<sup>[9]</sup>, 在维持葡萄糖的稳态中起关键的作用<sup>[10]</sup>。胰腺十二指肠同源盒基因 1 (*pancreatic and duodenal homeobox 1*, *pdx-1*) 大多表达于胰岛内分泌胰岛素的  $\beta$  细胞和分泌生长抑素的  $\delta$  细胞中<sup>[11]</sup>, 在调节胰腺发育和分化中起着非常重要的作用<sup>[12-13]</sup>。神经分化因子-1 (*neuronal differentiation 1*, *neurod-1*) 对胰岛  $\beta$  细胞的发育及生理功能至关重要<sup>[14]</sup>。近年来, 随着生活水平的提高和老龄化进程的加速, 糖尿病患病率呈快速上升趋势, 糖尿病尤其 II 型糖尿病已经成为继癌症、心脑血管疾病之后的严重威胁人类健康的第三大疾病<sup>[15-16]</sup>。目前, 还没有一种药物能完全治愈糖尿病, 很多西药只能控制血糖, 且有副作用。相比于西药, 中草药不仅能降血糖, 还能防止慢性并发症的发生, 有些中草药, 例如肉桂含有黄烷醇多酚抗氧化物质具有刺激胰岛  $\beta$  细胞分泌胰岛素, 降低胰岛素抵抗等功能。因此中草药在治疗糖尿病方面具有非常好的前景。

金线莲 (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.) 又名金线兰, 为兰科 (Orchidaceae), 开唇兰属 (*Anoectochilus*) 多年生珍稀药用植物。主要分布于中国福建、台湾以及东南亚地区<sup>[17-18]</sup>。有初步研究表明金线莲全草水煎液具有较好的降血糖作用<sup>[19]</sup>, 但是降血糖的活性成分和作用机理还不明确。因此本研究就地取材, 对福建金线莲具有降血糖作用的组分进行了筛选, 并且进行了初步的机理研究。

斑马鱼基因总数 (约 23 500 个) 与人类相当, 神经系统、心血管系统、内脏器官、血液以及视觉系统的发育过程在分子水平上与人的一致性高达 85%, 便于将实验数据与人类的资料相比较<sup>[20-23]</sup>, 并且具有体型小、易饲养等优点。所以本研究利用斑马鱼筛选金线莲降血糖活性组分, 通过检测四个与糖代谢相关基因在金线莲醇提物处理后的表达与高糖模型作对比, 来探究金线莲降血糖的初步机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

5 月龄性成熟 TU 品系斑马鱼 (*Danio rerio*), 雌雄各 15 条, 斑马鱼体长 3 ~ 4 cm, 由清华大学孟安明课题组惠赠, 根据 Westerfield<sup>[24]</sup> 方法在闽南师范大学菌物产业工程技术中心斑马鱼实验室繁殖培育。

实验前 1 d, 挑选已达性成熟的斑马鱼放置于交配缸内, 将雌雄鱼用隔板分开, 第 2 天清晨将隔板拔掉让其交配产卵, 待胚胎受精 30 min 后收集受精卵于含有 Holfreter 水的培养皿中, 28℃ 恒温培养。

### 1.2 主要试剂及仪器

福建金线莲 (闽南师范大学菌物产业工程技术中心培植); 丙三醇 (西陇化工); 多聚甲醛 (Sigma); PBS (Sigma) 3300 型高速离心机 (Kubota); HH-2 数显恒温水浴锅 (金坛市科析仪器有限公司); AUY320 日本岛津电子分析天平 (上海仪田精密仪器有限公司); 小型离心机 (Tiangen); Nikon SMZ18 体式荧光显微镜 (尼康); 辅理善越捷型血糖仪 (Abbott Diabetes Care)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 金线莲组分的分离与提取

准确称量 1 kg 新鲜的金线莲全草,按料液比 1:4 加入蒸馏水,粉碎,80℃ 水浴搅拌提取,离心收集上清,沉淀物重复提取两次,把两次提取液合并,上清用旋转蒸发仪蒸发浓缩至一定体积,加入 4 倍浓缩体积的无水乙醇,放置于 4℃ 冰箱沉淀过夜。第二日通过抽滤把醇沉物和醇提物分离,获得的醇提物蒸发浓缩至一定体积,真空冻干机冻干,获得组分一:金线莲醇提物;醇沉物加蒸馏水溶解滤纸过滤后经过  $5 \times 10^3$  超滤膜超滤,超滤完之后蒸发浓缩至 100 mL 左右真空冻干机冻干, $5 \times 10^3$  以上组分为组分二:大分子多糖; $5 \times 10^3$  以下组分为组分三:小分子多糖。

#### 1.3.2 金线莲具有降血糖活性组分的初步筛选

##### 1.3.2.1 药物浓度的确定

为探索金线莲各组分对斑马鱼胚胎作用的最佳浓度,进行了以下实验:实验一:受精后的胚胎分为对照组和加药组,对照组用 Holfreter 水培养至 72 h,金线莲醇提物组、大分子多糖组和小分子多糖组的加药浓度梯度都设置为 50、100、500、1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。实验二:受精后的胚胎用 Holfreter 水培养至 24 h,分为两组,对照组继续用 Holfreter 水培养,模型组置换成前期实验已经摸索确定的 2% 的葡萄糖溶液,斑马鱼幼鱼和成鱼在该浓度葡萄糖溶液胁迫下能引发急性高血糖,处理 24 h 后即发育至 48 h 时,将高糖模型组分为五组,每组 40 枚胚胎,其中模型组继续加 2% 葡萄糖溶液,另外 4 组在既加葡萄糖的同时分别加入浓度为 50、100、500、1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的金线莲提取物,每种组分都设置该浓度梯度。实验一和实验二每 12 h 记录胚胎死亡数,挑走死亡的胚胎,更换药物。每次实验做一组平行试验组,将斑马鱼胚胎置于 28℃ 恒温培养箱培养。待胚胎发育至 72 h 观察其死亡情况和发育情况并详细记录。

##### 1.3.2.2 斑马鱼组织液葡萄糖浓度的测定

受精后的胚胎用 Holfreter 水培养至 24 h 后分为两组,对照组继续用 Holfreter 水培养,模型组置换成 2% 的葡萄糖溶液,胚胎发育至 48 h 时,将高糖模型组平分分为四组,其中一个孔继续加 2% 的葡萄糖溶液,其他三个孔既加葡萄糖的同时,再分别加入三种金线莲提取物,小分子多糖浓度梯度为 30、40、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,大分子多糖和醇提物浓度梯度为 300、400、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由于幼鱼血液太少无法检测血糖浓度,所以待胚胎发育至 72 h 检测斑马鱼组织液葡萄

糖浓度。

将浸泡胚胎的药液吸干,用 Holfreter 水洗两遍,吸走死胚胎、畸形胚胎以及脱落的外膜,用 PBS 溶液洗两遍,吸三十枚胚胎转入 1.5 mL EP 管,把 EP 管中液体吸干,用 2 mL 注射器针头在 EP 管底部扎一小孔,保证胚胎不会离心出 EP 管,低速离心把 EP 管中液体甩干,用打火机灼烧 EP 管,把 EP 管底部的小孔封住,用研磨棒把斑马鱼研磨均匀,离心取上清滴在血糖试纸检测端,采用辅理善越捷型血糖仪测试并记录。

#### 1.3.3 合成相关基因克隆的引物序列

本研究中所有基因序列从 <http://zfin.org/> 上下载,引物通过软件 Primer 6.0 设计。引物序列如表 1 所示。

表 1 糖代谢相关基因的引物序列

Tab. 1 Primer sequences of the glycometabolism-related genes

基因名 Genes	引物序列 Primer sequences
<i>ins</i>	F-CAACAGGCTTCTTCTACAAC R-AACGGAGAGCATTAAAGGC
<i>pdx-1</i>	F-AAGAGGAGGACAAGAGGAG R-TTTGCCAATCTGTTTGCTAG
<i>pck-1</i>	F-ATCTGCCTGAAGGAGTGA R-CCGAAGTTATAGCCGAAGA
<i>neurod-1</i>	F-TCCGACTAGCCAAGAATA R-CATCAGCCATAACAGAATACC
<i><math>\beta</math>-actin</i>	F-ACGAACGACCAACCTAAACTCT R-TTAGACAACCTACCTCCCTTTGC

#### 1.3.4 半定量 PCR 检测糖代谢相关基因的表达

按照 (1.3.2.2) 中的方法用金线莲醇提物处理,待胚胎发育至 72 h,每组各收集 50 枚,提 total RNA,将 RNA 反转录成 cDNA,作为半定量 PCR 的模板,具体操作实验方案参照文献<sup>[25]</sup>。扩增条件:95℃ 5 min;95℃ 30 s,65℃ 30 s,之后每个循环降低 3℃,72℃ 30 s,共 6 个循环;然后再 95℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,共 26 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min;16℃ 保存 1 h。部分条件可以微调。

#### 1.3.5 整胚原位杂交实验试剂与方法

原位杂交中所用探针的制备方法,原位杂交所需要的试剂的配制方法和具体的操作步骤参照文献<sup>[25]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 金线莲三种提取物作用斑马鱼胚胎浓度的确定

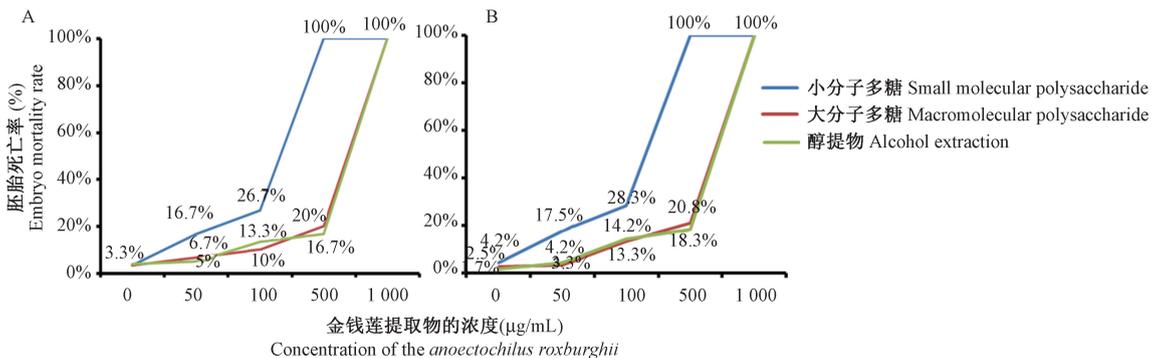
将 0.75 h 的野生型胚胎加入不同组分的金线

莲提取物,培养至 72 h,期间观察统计胚胎发育及死亡情况,其结果如图 1 A 所示;加入小分子多糖组分在 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度下,死亡率是 100%;在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时胚胎死亡率明显降低,但发育严重延缓。金线莲大分子多糖组和醇提物组在 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度时,胚胎死亡率是 100%,500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下胚胎致死率较低,且发育正常。将发育至 24 h 的胚胎加入 2% 葡萄糖溶液胁迫建立高糖模型,48 h 维持高糖的情况下加入不同组分的金线莲提取液培养至 72 h,胚胎发育状况及死亡情况如图 1B 所示;加入小分子多糖组分在 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度下,死亡率是 100%;浓度在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时虽然胚胎死亡率较低但是胚胎发育严重延缓,浓度在 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时胚胎发育正常高糖模型下,金线莲大分子多糖和醇提物在 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度时,胚胎死亡率是 100%,500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下比只加金线莲大分子多糖和醇提物的死亡率略微升高(与图 1A 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时相比),且胚胎发育正

常。综合以上两部分实验结果,本研究设置小分子多糖实验浓度梯度设为 30、40、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。金线莲大分子多糖和醇提物实验梯度设为 300、400、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 2.2 斑马鱼幼鱼组织液葡萄糖浓度的测定

按照(1.3.2.2)中的方法用三种金线莲提取物分别处理斑马鱼胚胎,待胚胎发育至 72 h,采用(1.3.2.2)中的测血糖方法筛选出具有降糖作用的金线莲组分。结果如表 2 所示:模型组即高糖组的幼鱼组织液葡萄糖浓度相比于空白对照显著升高,加入不同浓度小分子多糖的加药组,幼鱼组织液葡萄糖浓度相对于高糖组基本上没有降低;不同浓度的大分子多糖处理后的幼鱼组织液葡萄糖浓度反而有升高的趋势;只有加入醇提物后幼鱼组织液葡萄糖浓度有明显降低,并且随着醇提物浓度的升高,降糖效果越明显。由此得出初步结论:金线莲小分子多糖和大分子多糖没有降血糖效果,醇提物具有显著降血糖效果。



注:A:金线莲提取物溶解在 Holfreter 水中引起斑马鱼胚胎的致死率;B:金线莲提取物在高糖模型条件下引起斑马鱼胚胎的致死率。

图 1 不同浓度的金线莲提取物对斑马鱼胚胎死亡率的影响

Note. A: The mortality rate of zebrafish embryos induced by *Anoectochilus roxburghii* extracts dissolved in Holfreter water. B: The mortality rate induced by *Anoectochilus roxburghii* extracts under conditions of high glucose model.

Fig. 1 Effect of *Anoectochilus roxburghii* extracts in different concentrations on the mortality rate of zebrafish embryos

表 2 金线莲提取物处理后斑马鱼幼鱼组织液葡萄糖浓度(mmoL/L)

Tab. 2 Glucose concentration in the tissue fluid of zebrafish larvae after treated with different concentrations of *Anoectochilus roxburghii* extracts

组别 Groups	Ctr	2% Glu	2% Glu + 低浓度 2% Glu + A	2% Glu + 中浓度 2% Glu + B	2% Glu + 高浓度 2% Glu + C
小分子多糖 Small molecular polysaccharide	1.47 ± 0.301	3.88 ± 0.445	3.95 ± 0.423	3.82 ± 0.523	3.93 ± 0.476
大分子多糖 Macromolecular polysaccharide	1.45 ± 0.315	3.87 ± 0.437	3.90 ± 0.415	4.20 ± 0.363	4.22 ± 0.397
金线莲醇提物 Alcohol extraction	1.45 ± 0.293	3.87 ± 0.437 <sup>***</sup>	3.23 ± 0.520 <sup>#</sup>	2.78 ± 0.387 <sup>###</sup>	2.08 ± 0.075 <sup>####</sup>

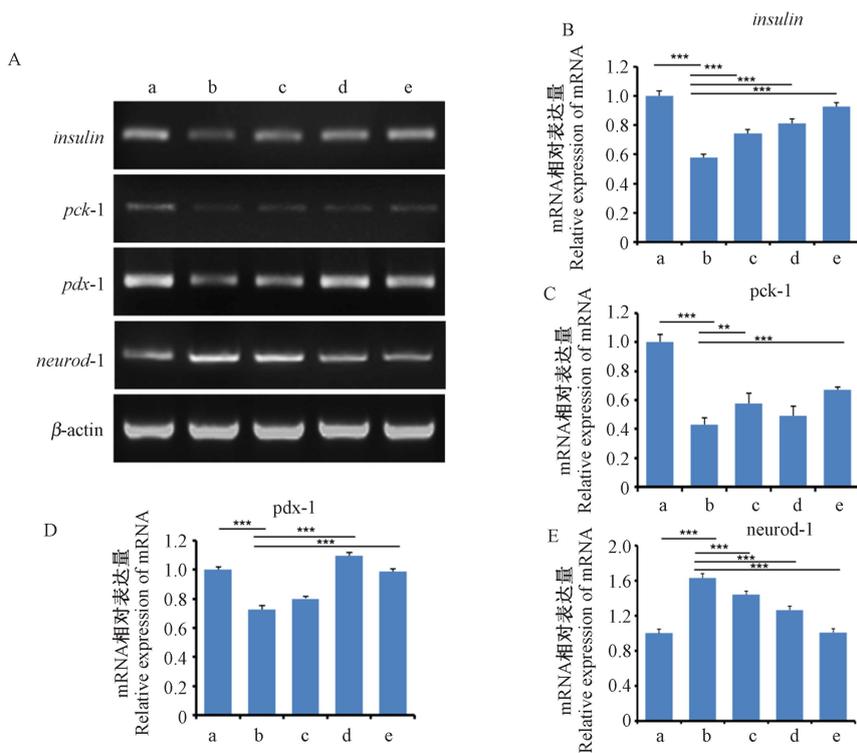
注:低浓度、中浓度、高浓度对于小分子多糖分别是 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;低浓度、中浓度、高浓度对于大分子多糖和金线莲醇提物分别是 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;高糖组与对照组相比,\*\*\* $P < 0.001$ ;加药组与高糖组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>###</sup> $P < 0.01$ ,<sup>####</sup> $P < 0.001$ 。

Note. (A) low, (B) medium, and (C) high concentrations for the small molecules polysaccharide extracts are 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The (A) low, (B) medium, and (C) high concentrations for the macromolecular polysaccharide extracts and *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts are 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The high glucose group compared with the control group, \*\*\* $P < 0.001$ . Medication group compared with the high glucose group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>###</sup> $P < 0.01$ , <sup>####</sup> $P < 0.001$ .

### 2.3 半定量 PCR 检测糖代谢相关基因的表达

按照 (1.3.2.2) 中的方法用金线莲醇提取物处理,待胚胎发育至 72 h, 每组各收集 50 枚, 提 total RNA, 反转录后进行半定量 PCR 检测 *insulin*、*pck-1*、*pdx-1*、*neurod-1* 基因的表达。以  $\beta$ -actin 为内参, 其结果如图 2 所示: 加入葡萄糖溶液进行高糖胁迫之后, *insulin*、*pck-1*、*pdx-1* 三个基因电泳条带的亮度与对照组相比明显减弱, 加药组与高糖组相比, 条带亮度总体上具有升高的趋势, 并且随着金线莲醇提取物溶液浓度的升高, 亮度越亮; *neurod-1* 基因电泳条带的亮度变化趋势则相反, 高糖组与对照组相比, 亮度明显增强, 加入金线莲醇提取物之后, 随着金线莲醇提取物浓度的升高, 亮度逐渐恢复对照水平 (图 2A)。通过 ImageJ 软件计算各个基因 mRNA 的相

对表达量, 结果如图 2B ~ D 所示: *insulin* 在高糖组中的表达只有对照组的 50%, 金线莲醇提取物处理使得 *insulin* 的表达量逐步恢复, 呈剂量依赖性, 在 500  $\mu$ g/mL 时效果达到最佳, 恢复到对照组的 90% (图 2B)。高糖胁迫下 *pck-1* mRNA 水平降低至对照组的 40%, 金线莲醇提取物处理浓度在 500  $\mu$ g/mL 时, *pck-1* 基因的表达量增加至对照组的 60%, 恢复效果显著 (图 2C)。*pdx-1* 基因在加了高糖溶液之后基因表达量是对照组的 70%, 金线莲醇提取物处理浓度在 400  $\mu$ g/mL 时效果最佳, *pdx-1* 基因的表达量超过了对照组 (图 2D)。*neurod-1* 基因加了高糖溶液之后基因表达量是对照组的 1.6 倍, 随着金线莲醇提取物浓度的升高, 在 500  $\mu$ g/mL 时基因表达量基本恢复至对照水平 (图 2E)。



注: a: 0 h + Hofreiter H<sub>2</sub>O; b: 24 h + 2% Glu; c: 24 h + 2% Glu, 48 h + 2% Glu + 300  $\mu$ g/mL 金线莲醇提取物; d: 24 h + 2% Glu, 48 h + 2% Glu + 400  $\mu$ g/mL 金线莲醇提取物; e: 24 h + 2% Glu, 48 h + 2% Glu + 500  $\mu$ g/mL 金线莲醇提取物。

图 2 金线莲醇提取物对斑马鱼胚胎糖代谢相关基因表达的影响

Note. a: 0 h + Hofreiter H<sub>2</sub>O. b: 24 h + 2% Glu. c: 24 h + 2% Glu, 48 h + 2% Glu + 300  $\mu$ g/mL *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts. d: 24 h + 2% Glu, 48 h + 2% Glu + 400  $\mu$ g/mL *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts. e: 24 h + 2% Glu, 48 h + 2% Glu + 500  $\mu$ g/mL *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts.

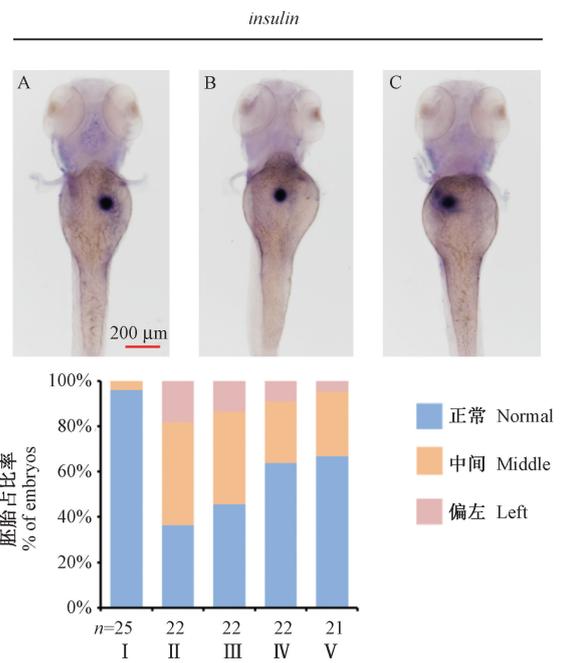
Fig. 2 Effect of *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts on the expression levels of glycometabolism-related genes in the zebrafish embryos

以上实验结果说明高糖模型下, *insulin*、*pck-1*、*pdx-1* 表达下调, 金线莲醇提物可以解除高糖对 *insulin*、*pck-1*、*pdx-1* 的抑制。该研究进一步通过整胚原位杂交检测在经过相同处理后, 以上几个基因的时空表达。

## 2.4 整胚原位杂交检测糖代谢相关基因的时空表达

按照 (1.3.2.2) 中的方法用金线莲醇提物处理, 待胚胎发育至 72 h, 检测 *insulin*、*pck-1*、*pdx-1* 和 *neurod-1* 的时空表达变化。对照组胚胎 *insulin* 基因表达正常位于胚胎躯干的右侧 (图 3 A), 高糖组有超过 80% 的比例 *insulin* 基因表达出现偏移, 其中约有 50% 的胚胎 *insulin* 表达移至躯干中间 (图 3B), 超过 30% 胚胎 *insulin* 偏移至躯干左侧 (图 3C)。加入金线莲醇提物后, *insulin* 的左右不对称表达异常随着金线莲醇提物浓度高逐渐增加而得到明显改善, *insulin* 基因表达在躯干中间和偏左胚胎随着金线莲醇提物浓度的升高逐渐减少, 在金线莲醇提物 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 效果达到最佳, 正常胚胎上升至 67%, 偏移到中间的胚胎下降到 29%, 偏移到中间胚胎仅仅只占 4% (图 3D)。进行高糖胁迫后会使 *insulin* 基因表达部位产生偏移, 使胰岛素基因表达下降, 加入金线莲醇提物之后, *insulin* 基因表达部位有明显的恢复效果, 使胰岛素基因表达得到恢复, 与半定量 PCR 结果一致。

待胚胎发育至 72 h 检测 *pck-1*、*pdx-1* 和 *neurod-1* 的时空表达。进行高糖胁迫后, 腹部轮廓高糖组比对照组染色减弱很多 (图 4A1, B1), 加入金线莲醇提物后, 随着醇提物浓度的升高, *pck-1* 的染色部位颜色逐渐变深, 并且具有浓度依赖性, 在金线莲醇提物浓度为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时基本恢复到了对照组的水平 (图 4C1-E1)。高糖组 *pdx-1* 在腹部胰腺部位染色明显比对照组浅 (图 4A2, B2), 加入金线莲醇提物之后, *pdx-1* 在腹部胰腺部位染色随着醇提物浓度的升高逐渐变深 (图 4C2-E2)。而 *neurod-1* 染色情况则与 *pck-1* 和 *pdx-1* 相反, 高糖组头部和颈部的染色相比于对照组增加了很多 (图 4A3, B3), 加入金线莲醇提物之后, 随着金线莲醇提物浓度的升高, *neurod-1* 的染色部位颜色逐渐变浅, 在浓度为 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, *neurod-1* 的染色基本恢复到了对照组的水平 (图 4C3 ~ E3)。由此我们得出结论: 在高糖模型下, 高葡萄糖溶液抑制 *pck-1* 和 *pdx-1* 基因表达的情况下, 金线莲醇提物可以促进 *pck-1* 和 *pdx-1*



注: I: 0 h + Holfreter  $\text{H}_2\text{O}$ ; II: 24 h + 2% Glu; III: 24 h + 2% Glu, 48 h + 2% Glu + 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  金线莲醇提物; IV: 24 h + 2% Glu, 48 h + 2% Glu + 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  金线莲醇提物; V: 24 h + 2% Glu, 48 h + 2% Glu + 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  金线莲醇提物。

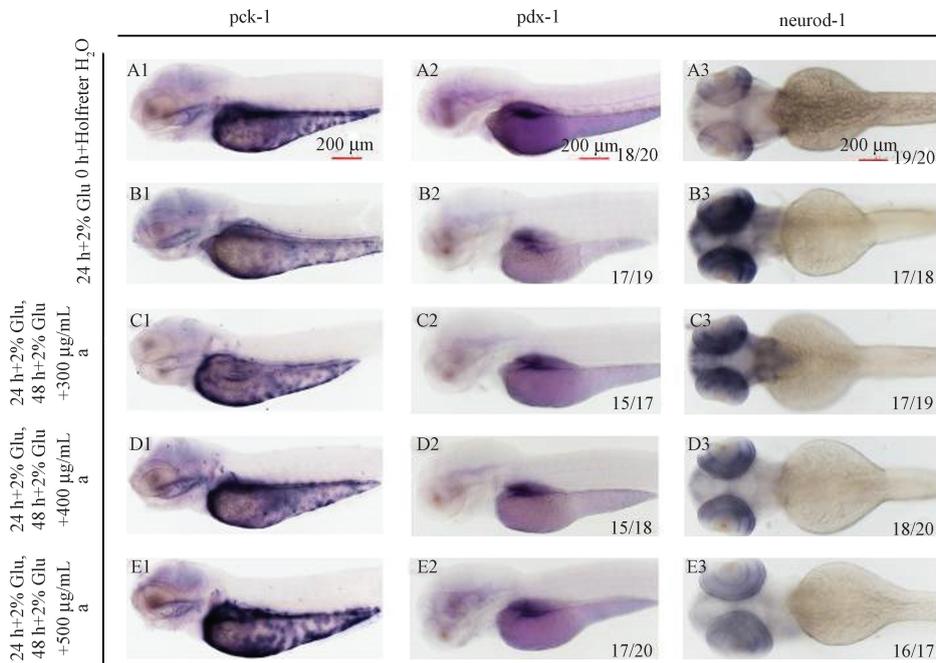
**图 3** 金线莲醇提物对斑马鱼 *insulin* 时空表达的影响  
Note. I: 0 h + Holfreter  $\text{H}_2\text{O}$ . II: 24 h + 2% Glu. III: 24 h + 2% Glu, 48 h + 2% Glu + 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts. IV: 24 h + 2% Glu, 48 h + 2% Glu + 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts. V: 24 h + 2% Glu, 48 h + 2% Glu + 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts.

**Fig. 3** The spatial and temporal expression patterns of *insulin* after treated with *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts in the zebrafish

基因的时空表达, 与上述半定量 PCR 结果一致, 金线莲醇提物对 *neurod-1* 基因的时空表达有抑制作用。

## 3 讨论

斑马鱼作为一种新兴的模式生物, 具有体型小、易饲养、繁殖周期短等其他模式生物不具备的优点, 而且在器官和基因序列上与人类都很相似, 所以很多实验室现在用斑马鱼来研究糖尿病。本研究利用斑马鱼来筛选金线莲具有降血糖的活性组分, 实验结果表明, 对斑马鱼幼鱼进行高糖胁迫, 加入金线莲醇提物组与加入其他两种组分 (小分子多糖和大分子多糖) 的斑马鱼相比较, 加入金线莲醇提物组斑马鱼幼鱼组织液内的葡萄糖浓度明显下降, 初步筛选出具有降糖作用的活性组分



注：(a) 金线莲醇提取物。

图 4 金线莲醇提取物对 *pck-1*、*pdx-1* 和 *neurod-1* 时空表达的影响

Note: (a) *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts.

Fig. 4 The spatial and temporal expression patterns of *pck-1*, *pdx-1* and *neurod-1* after treated with *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts in zebrafish

为金线莲醇提取物。接下来进行了初步的机理研究,本研究通过半定量 PCR 以及整胚原位杂交技术检测了四个糖代谢相关基因 mRNA 的表达水平,发现 *insulin*、*pck-1*、*pdx-1* 基因在加了高糖溶液之后基因表达量与对照组相比下降非常显著,并且 *Insulin* 基因的时空表达发生了偏移,但是经过金线莲醇提取物处理后 *insulin*、*pck-1*、*pdx-1* 基因的表达量与只加葡萄糖组相比明显上升,并且 *insulin* 基因的时空表达偏移率明显下降(图 2 ~ 4),而 *neurod-1* 基因 mRNA 表达则与上述三个基因恰恰相反。我们推测高糖胁迫情况下会抑制 *pdx-1* 基因的表达<sup>[26]</sup>,加入金线莲醇提取物后可以促进 *pdx-1* 基因的正常表达来维持 β 细胞的形态和正常功能,促进 *insulin* 基因的正常表达, *insulin* 基因的时空表达偏移率明显下降。另一方面,金线莲醇提取物可以促进 *pck-1* 基因的正常表达维持机体葡萄糖的稳态。加入金线莲醇提取物后 *neurod-1* 基因 mRNA 表达量下降有待进一步探究。

本研究尚存在改进之处,金线莲降血糖成分不够明确,具体是哪种物质起到降血糖的作用,还需要通过分离纯化进一步确定,此外金线莲醇提取物是通过哪种信号途径起到降血糖作用,这些问题都需

要进一步研究。

参考文献:

[ 1 ] 冯丽帅, 马旭, 王建波. 严重的糖尿病血管病变的发生机制及其动物模型制作进展 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24 (3): 327 - 331.

[ 2 ] Navarro-Casado L, Juncos-Tobarra MA, Cháfer-Rudilla M, et al. Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity. Study in rats [J]. J Androl, 2010, 31 (6): 584 - 592.

[ 3 ] 徐亮, 王家骥. II 型糖尿病发病机理的研究进展 [J]. 广东医学, 1997, 18(9): 619 - 621.

[ 4 ] Stefan N, Machicao F, Staiger H, et al. Polymorphisms in the gene encoding adiponectin receptor 1 are associated with insulin resistance and high liver fat [J]. Diabetologia, 2005, 48(11): 2282 - 2291.

[ 5 ] 相莉. 糖尿病糖脂代谢与胰岛素治疗 [D]. 中国协和医科大学, 2007.

[ 6 ] Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, et al. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes [J]. Cell, 1999, 96(3): 329 - 339.

[ 7 ] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man [J]. Diabetologia, 1985, 28(7): 412 - 419.

- [ 8 ] 寇珍珍. 胰岛素受体及其相关信号转导通路参与糖尿病性痛和炎性痛信息传递和调控的机理研究 [D]. 第四军医大学, 2014.
- [ 9 ] 张泽宾. PCK1 转录调控机制及功能性分子标记鉴定 [D]. 石河子大学, 2013.
- [ 10 ] 严晋华. 肿瘤坏死因子抑制磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因转录表达的机制探讨 [D]. 中山大学, 2007.
- [ 11 ] Perez-Villamil B, Schwartz PT, Vallejo M. The pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 is expressed in neural cells during brain development [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(8): 3857-3860.
- [ 12 ] Bretherton-Watt D, Gore N, Boam DS. Insulin upstream factor 1 and a novel ubiquitous factor bind to the human islet amyloid polypeptide/amylin gene promoter [J]. *Biochem J*, 1996, 313 (Pt 2): 495-502.
- [ 13 ] Watada H, Kajimoto Y, Umayahara Y, et al. The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells [J]. *Diabetes*, 1996, 45(11): 1478-1488.
- [ 14 ] Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107 (28): 12704-12709.
- [ 15 ] 王涤非. 胰岛素受体底物-1 在 2 型糖尿病发生发展中的作用研究 [D]. 中国医科大学, 2005.
- [ 16 ] 于海兵. 瘦素信号通路及脂联素信号通路与 2 型糖尿病的关系研究 [D]. 南方医科大学, 2015.
- [ 17 ] 曾健, 林竞成, 黄坚航. 金线莲的应用与开发 [J]. *海峡药学*, 1996, 8(4): 82-83.
- [ 18 ] 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(S1): 27-31.
- [ 19 ] 陈卓, 黄自强. 金线莲及其提取物降血糖实验研究 [J]. *福建医科大学学报*, 2000, 34(4): 350-353.
- [ 20 ] 梁锦锋, 朱勇, 张洪瑶, 等. 斑马鱼模型在药物研发早期肾脏毒性中的应用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26 (9): 30-35.
- [ 21 ] Gnügge L, Meyer D, Driever W. Pancreas development in zebrafish [J]. *Methods Cell Biol*, 2004, 76(3): 531-551.
- [ 22 ] Key B, Devine CA. Zebrafish as an experimental model: strategies for developmental and molecular neurobiology studies [J]. *Methods Cell Sci*, 2003, 25(1-2): 1-6.
- [ 23 ] 徐振华, 赵慕钧, 李载平. 斑马鱼与人类疾病模型的研究 [J]. *生命的化学*, 2002, 22(4): 376-379.
- [ 24 ] Westerfield M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. M. Westerfield, 2007.
- [ 25 ] 薛钰. 斑马鱼胚胎组织中心表达的 Bmp 信号在背腹分化中的作用 [D]. 清华大学, 2014.
- [ 26 ] Evans-Molina C, Garmey JC, Ketchum R, et al. Glucose regulation of insulin gene transcription and pre-mRNA processing in human islets [J]. *Diabetes*, 2007, 56(3): 827-835.

[收稿日期]2017-10-19

## (上接第 20 页)

- [ 7 ] 徐玉霞. 普通棉耳猕猴 MHC-I 限制性等位基因抗原分子特征分析 [D]. 南方医科大学, 2015.
- [ 8 ] 石亮, 张晨, 向志光, 等. 腺相关病毒介导的猕猴 P53 基因沉默 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(4): 53-57.
- [ 9 ] 邓怡晨, 张晨, 向志光, 等. 猕猴 B2m 基因沉默位点在细胞水平的验证 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(5): 37-41.
- [ 10 ] 王越甲, 杨炜峰, 车路平, 等. 利用优选的微卫星标记建立常用大小鼠品系的遗传监测体系 [J]. *实验动物科学*, 2014, 31 (3): 5-9, 14.
- [ 11 ] 商海涛, 魏泓, 岳秉飞, 等. 应用微卫星标记对三个昆明小鼠封闭群的遗传学研究 [J]. *实验动物科学*, 2009, 26(2): 1-6.
- [ 12 ] 商海涛, 魏泓, 岳秉飞, 等. 应用微卫星 DNA 标记对 Wistar 和 SD 大鼠封闭群的遗传学研究 [J]. *分子细胞生物学报*, 2008, 41(1): 28-34.
- [ 13 ] 丁贤明, 钱宝珍, Junichiro M, 等. 长爪沙鼠的遗传多样性分析 [J]. *遗传*, 2008, 30(7): 877-884.
- [ 14 ] 魏杰, 王吉星, 王洪, 等. 房山封闭群小型猪微卫星位点的测定 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(11): 7-12.
- [ 15 ] 禹文海, 和占龙, 鲁绍雄, 等. 基于微卫星 DNA 标记的恒河猴遗传多样性研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(3): 21-25.
- [ 16 ] 李瑞生, 李晓娟, 高蓉, 等. 食蟹猴微卫星 DNA 标记遗传监测及多态性分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(8): 27-30.
- [ 17 ] Raveendran M, Tardif S, Ross CN, et al. Polymorphic microsatellite loci for the common marmoset (*Callithrix jacchus*) designed using a cost- and time-efficient method [J]. *Am J Primatol*, 2008, 70(9): 906-910.
- [ 18 ] Katoh H, Takabayashi S, Itoh T. Development of microsatellite DNA markers and their chromosome assignment in the common marmoset [J]. *Am J Primatol*, 2009, 71(11): 912-918.
- [ 19 ] 左宝芬, 杜小燕, 霍学云, 等. 五个 C57BL/6J 小鼠生产群的微卫星检测及遗传学质量分析 [J]. *实验动物与比较医学*, 2012, 32(1): 51-55.
- [ 20 ] 王洪, 杜小燕, 徐平, 等. 上海 KM 小鼠种子群体遗传状况分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(12): 27-32.
- [ 21 ] Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314-331.

[收稿日期]2017-12-08