

三疣梭子蟹蟹黄油的降血糖作用

胡世伟, 李世杰, 姜维, 刘宇

(浙江海洋大学创新应用研究院, 浙江舟山 316022)

摘要: 为研究三疣梭子蟹蟹黄油 (egg oil from *Portunus trituberculatus*, Pt-egg oil) 对糖尿病大鼠高血糖症的改善作用及机制, 本文采用注射链脲佐菌素的方法建立糖尿病大鼠模型, 给予 100 和 400 mg/kg·bw 的 Pt-egg oil 60 d。实验结束后, 检测大鼠空腹血糖和胰岛素水平, 检测葡萄糖耐受性, 采用实时荧光定量 PCR 方法检测 Pt-egg oil 对糖尿病大鼠骨骼肌胰岛素信号通路关键基因 mRNA 表达水平, 采用 Western blotting 法检测 Pt-egg oil 对糖尿病大鼠胰岛素信号通路关键蛋白表达的影响。结果显示, 经 Pt-egg oil 饲喂后, 大鼠的空腹血糖水平显著地降低了 36.52% ($p < 0.01$), 血清胰岛素浓度增加了 40.21% ($p < 0.01$), 葡萄糖耐受性显著改善, 骨骼肌磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase, PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 和葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, Glut4) 基因 mRNA 分别显著增加了 114.52%、83.17% 和 90.06% ($p < 0.01$), 蛋白表达分别显著提高了 1.54 倍、1.61 倍和 1.37 倍 ($p < 0.01$), 细胞膜上 Glut4 蛋白表达提高了 1.27 倍 ($p < 0.01$)。表明 Pt-egg oil 能通过激活 PI3K/Akt 胰岛素信号通路起到降低糖尿病大鼠血糖的作用。

关键词: 三疣梭子蟹; 蟹黄油; 高血糖; 磷脂酰肌醇-3-羟激酶; 蛋白激酶 B; 葡萄糖转运蛋白 4

文章编号: 1673-9078(2019)05-30-36

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.5.005

The Anti-hyperglycemic Effects and Mechanism of Egg Oil from

Portunus trituberculatus

HU Shi-wei, LI Shi-jie, JIANG Wei, LIU Yu

(Innovation Application Institute Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: The aim of the present study is to investigate the effects and mechanism of egg oil from *Portunus trituberculatus* (Pt-egg oil) on hyperglycaemia improvement in diabetic mice. The diabetes model rats were established by intraperitoneal injection of streptozotocin. The diabetic rats were given Pt-egg oil at 100 and 400 mg/(kg·body weight) for 60 days, respectively. The fasting blood glucose level, serum insulin concentration, and glucose tolerance were determined. The mRNA expression of the key genes in insulin signaling in skeletal muscle of diabetic rats was measured by the quantitative real time PCR assays. The proteins expression levels in insulin signaling in skeletal muscle of diabetic rats was analyzed by Western blotting. Results showed that Pt-egg oil could significantly reduce fasting blood glucose level by 36.52% ($p < 0.01$), increase serum insulin concentration by 40.21% ($p < 0.01$), and improve glucose tolerance. The phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), and glucose transporter 4 (Glut4) gene mRNA expression in skeletal muscle increased by 114.52%, 83.17%, and 90.06%, respectively. The protein expression of these three genes increased by 1.54-fold, 1.61-fold, and 1.37-fold, respectively. Glut4 protein expression in membrane was also enhanced by 1.27-fold ($p < 0.01$). These indicated that Pt-egg oil might exhibit the effects on hyperglycaemia improvement via activation of PI3K/Akt insulin signal pathway in diabetic rats.

Key words: *Portunus trituberculatus*; egg oil; hyperglycaemia; phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase; protein kinase B; glucose transporter 4

I 型糖尿病是由于胰岛 β 细胞功能受损、胰岛素分泌减少, 导致机体血糖升高为主要特征的代谢性疾病, 约占糖尿病总人数的 5%~10%^[1]。胰岛素是机体

收稿日期: 2019-01-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41806182); 舟山市科技计划项目 (2016C41012)

作者简介: 胡世伟 (1984-), 男, 助理研究员, 研究方向: 水产品加工及贮藏工程

唯一能够起到降血糖作用的激素。机体内胰岛素对葡萄糖的代谢主要是通过磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 胰岛素信号通路发挥作用^[2]。在此信号通路中, 胰岛素与胰岛素受体/受体底物的结合, 可以激活胰岛素受体底物, 进一步激活并高表达 PI3K 蛋白, 活化的 PI3K 可以促进下游的 Akt 蛋白高表达并磷酸化, 磷酸化的 Akt 能诱导葡萄

糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, Glut4) 的高表达并向细胞膜的转位, 在细胞膜上形成通道以供葡萄糖进入细胞内被机体利用^[3]。

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 广泛分布于我国沿海地区, 因其高营养价值和高产量, 已成为我国主要的经济蟹类。据中国渔业统计年鉴, 我国 2017 年梭子蟹的海捕产量为 497,763 t, 养殖产量为 119,777 t^[4]。现阶段对梭子蟹的研究主要集中在基因测序和水产养殖方面^[5,6], 而对其加工利用的研究报道较少。我国对梭子蟹的加工处于简单加工的初级阶段, 主要是进行梭子蟹保鲜和分离蟹肉。蟹黄是梭子蟹初级加工过程中的副产物, 目前主要用于制作饲料添加剂等, 高值化利用水平较低。其它蟹类蟹黄已有一些基础性研究, 如河蟹蟹黄含有丰富的脂质, 包括丰富的磷脂、不饱和脂肪酸和虾青素等^[7]。本研究以三疣梭子蟹蟹黄为对象, 通过酶解法制备三疣梭子蟹蟹黄油 (egg oil from *Portunus trituberculatus*, *Pt-egg oil*), 研究了 *Pt-egg oil* 对糖尿病大鼠血糖的改善作用及其分子机理。为梭子蟹的高值化利用及梭子蟹蟹黄功能性食品的开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 蟹黄和实验动物

三疣梭子蟹蟹黄, 由岱山县通衢水产食品有限公司提供。SD 大鼠[许可证号: SCXK(京)2014-0001], SPF 级, 雄性, 体重 230±10 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 实验试剂

Maxima SYBR Green qRT-PCR Master mix 购自 Fermentas 公司; 兔抗鼠 PI3K、Akt、Glut4、 β -actin 多克隆抗体和山羊抗兔 IgG-HRP 购自美国 Cell signaling 公司; TRIzol 和 Western 及 IP 裂解液购自美国 Invitrogen 公司; M-MLV 购自美国 Promega 公司; 葡萄糖试剂盒、BCA 试剂盒, 购自南京建成生物科技股份有限公司; 胰岛素 ELISA 检测试剂盒, 购自美国 R&D 公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.3 实验仪器

GL-20M 型高速冷冻离心机, 上海卢湘离心机仪器有限公司产品; EPS600 电泳仪、VE-180 垂直电泳槽, 上海天能科技有限公司; PH3-3C 型 pH 计, 上海盛磁仪器有限公司; DYCP-40C 型转膜电泳仪、WD-9405A 型脱色摇床, 北京六一仪器厂; Model680

型酶标仪、iCycler iQ5 系统 Real-Time PCR 扩增仪, 美国 Bio-Rad 产品; LABOROTA 4 000 型旋转蒸发器, 德国 Heidolph 产品; Ultra Trurrax T18 basic 型高速匀浆机, 德国 Ika 公司产品。

1.4 方法

1.4.1 *Pt-egg oil* 制备

按照文献方法提取 *Pt-egg oil*^[8]。将冰鲜的三疣梭子蟹蟹黄于 45 °C 鼓风干燥箱中干燥 24 h。干蟹黄加入 6 倍质量体积比的 95% 乙醇, 低速搅拌下萃取蟹黄油 10 h。4500 r/min 离心 15 min, 上清液经旋转蒸发器 45 °C 下减压蒸馏得粗 *Pt-egg oil*。粗蟹黄油加入 2 倍体积 95% 的乙醇复溶, 7500 r/min 离心 15 min, 上清液经氮气吹干后, 加入适量无水 Na₂SO₄ 过夜, 得 *Pt-egg oil*, 保存于 -20 °C, 备用。经检测, *Pt-egg oil* 中胆固醇含量为 4.79%±0.38% (胆固醇试剂盒方法检测), 甘油三酯含量为 32.38%±1.10% (甘油三酯试剂盒方法检测), 游离脂肪酸含量为 8.61%±1.49% (脂肪酸试剂盒方法检测), 磷脂含量为 52.05%±2.24% (高效液相色谱法检测)^[8], 虾青素含量为 971.79±41.73 μ g/g (紫外分光光度法检测)^[9]。蟹黄油不饱和脂肪酸在总脂肪酸中的含量为 76.16%±1.57% (气相色谱质谱联用法检测)^[10,11], 其中多不饱和脂肪酸占比 63.02%±1.18%, EPA+DHA 占比 33.23%±0.88%。

1.4.2 动物模型建立及实验分组

雄性 SD 大鼠 80 只, 适应性喂养 7 d, 随机取 10 只作为正常对照组, 其余 70 只大鼠为造模组。禁食不禁水 12 h 后, 造模组大鼠分两次腹腔注射链脲佐菌素溶液 (临用前溶解于 pH 4.3、0.1 mM 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液), 当日剂量为 50 mg/kg, 次日 10 mg/kg。正常对照组注射等体积柠檬酸缓冲液。继续饲喂 7 d 后, 大鼠禁食不禁水 5 h, 尾静脉取血测定空腹血糖, 以血糖值不低于 16.7 mmol/L 者为造模成功。

选取造模成功的大鼠 40 只, 按体重和空腹血糖值随机分为模型对照组、阳性对照组、低剂量 *Pt-egg oil* 组和高剂量 *Pt-egg oil* 组, 每组 10 只。分组当日开始给药, 正常对照组和模型对照组灌胃生理盐水 (10 mL/kg·bw), 阳性对照组灌胃吡咯列酮溶液 (10 mg/kg·bw), 低、高剂量 *Pt-egg oil* 组灌胃 *Pt-egg oil* (100 和 400 mg/kg·bw) 1 次/d, 连续 60 d, 期间大鼠自由进食、饮水。于末次给药后, 检测大鼠空腹血糖值、口服葡萄糖耐量、血清胰岛素含量。大鼠处死后, 快速分离肌肉组织, 置于液氮中, -80 °C 保存, 备用。

1.4.3 空腹血糖测定

末次给药后, 大鼠禁食不禁水 5 h, 尾静脉取血,

常规方法分离血清, 参照葡萄糖试剂盒说明书方法检测空腹血糖浓度。

1.4.4 葡萄糖耐量检测

大鼠禁食不禁水 5 h, 灌胃葡萄糖溶液 (2 g/kg), 分别测定给葡萄糖 0、0.5、1 和 2 h 后大鼠的血糖值, 按式 1 计算血糖浓度-时间曲线下面积 (area under the curve, AUC) (单位: h·mol/L):

$$AUC=0.25\times A+0.5\times B+0.75\times C+0.5\times D \quad (1)$$

其中: A、B、C、D 分别代表灌胃葡萄糖溶液 0、0.5、1、2 h 后大鼠的血糖值。

1.4.5 血清胰岛素检测

大鼠禁食不禁水 5 h, 腹主动脉取血, 常规分离血清, 经 1:5 稀释后, 参照胰岛素 ELISA 试剂盒检测大鼠血清胰岛素水平。按式 2 和式 3 分别计算 β 细胞功能指数和胰岛素分泌指数:

$$\beta \text{ 细胞功能指数}=20\times E/(G-3.5) \quad (2)$$

$$\text{胰岛素分泌指数}=E/G \quad (3)$$

其中: G、E 分别代表空腹血糖水平和空腹胰岛素水平。

1.4.6 骨骼肌组织 PI3K/Akt/Glut4 信号通路 mRNA 相对表达量分析

采用实时荧光定量 PCR 方法 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测 *Pt-egg oil* 对糖尿病大鼠骨骼肌 PI3K、Akt、Glut4 mRNA 表达的影响。取大鼠后肢骨骼肌 0.1 g, 加入 600 mL TRIzol, 低速匀浆破碎细胞, 提取总 RNA。将 RNA 溶于 0.3 mL DEPC 水, 取适量稀释, 测定吸光度值 A_{280} 和 A_{260} , 并计算溶解后 RNA 的纯度和含量。取 1 μ g 总 RNA 在 M-MLV 逆转录酶的催化作用下逆转录成 cDNA。cDNA 于 25 mL 的反应体系中扩增, 各反应物用量参照 Maxima SYBR Green qRT-PCR Master mix 说明书要求, 反应体系包括: cDNA 模版 6 μ L (稀释 10 倍), Maxima SYBR Green qRT-PCR Master mix 12.5 μ L, 上、下游引物各 0.3 μ L, 超纯水 5.9 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 45 个循环。扩增结束后进行熔解曲线分析, 确保目的基因产物的专一性。目的基因 mRNA 表达量均以 β -actin mRNA 的量作为内参校正, 将正常对照 control 组定为 1 个单位。各目的基因引物序列使用 Primer Premier 5.0 设计。

PI3K (F: 5'-CCCATACAAGGTGTTAGCC-3', R: 3'-ACTCTGACCTGGGATACCG-5');

Akt (F: 5'-CCAGATGGTAGCCAACAGT-3', R: 3'-GATAGAGTTTGAGGAGCCG-5');

Glut4 (F: 5'-ACTAAGAGCACCGAGACCAA-3', R: 3'-CTGCCCGAAAGAGTCTAAAG-5');

β -actin (F: 5'-CAAGGCATTGCTGACAGGATG-3', R: 3'-GGTCGTCTACACCTAGTCGT-5')。

由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4.7 骨骼肌组织细胞外膜提取

参照文献方法提取大鼠骨骼肌组织的细胞外膜, 用于检测骨骼肌组织细胞外膜上 Glut4 蛋白的含量^[1]。取 3 g 骨骼肌, 冰水浴条件下低速匀浆, 裂解液包括 10 mM NaHCO₃、0.25 M 蔗糖、5 mM NaN₃ 和 100 μ M 苯甲基磺酰化氟。匀浆结束后, 1500 r/min 离心 10 min, 取上清, 重复一次; 上清液再分别经过 9000 r/min 离心 10 min 和 19000 r/min 离心 1 h 两次离心, 最后沉淀物质为细胞膜粗膜。粗膜经质量分数为 25%、30% 和 35% 的蔗糖溶液密度梯度离心 (15000 r/min 离心 16 h, 4 $^{\circ}$ C), 取 25% 蔗糖层可获得细胞外膜悬浊液。

1.4.8 骨骼肌组织 PI3K/Akt/Glut4 信号通路蛋白相对表达量分析

采用 Western blot 方法检测 *Pt-egg oil* 对糖尿病大鼠骨骼肌 PI3K、Akt、Glut4 及细胞膜上 Glut4 蛋白表达的影响。取大鼠后肢骨骼肌 0.1 g 或提取的细胞外膜悬浊液, 用 Western 及 IP 裂解液裂解细胞, 冰浴中低速匀浆提取组织中的总蛋白, 7500 r/min 离心 15 min, 取上清, BCA 试剂盒检测总蛋白的含量。取 50 μ g 总蛋白加入适量 4 \times 蛋白上样液, 沸水浴 10 min 使蛋白变性, 经 10% 的 SDS-PAGE 电泳, 将蛋白条带电转至 PVDF 膜, 5% 牛血清白蛋白封闭 2 h, 分别加入按抗体说明书稀释后的兔抗鼠 PI3K、Akt、Glut4、 β -actin 多克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。TBST 洗涤 5 次, 加入 1:1000 稀释的山羊抗兔 IgG-HRP 二抗, 室温下孵育 2 h。TBST 洗涤 5 次, 用 ECL 发光试剂盒发光, 对底片曝光、显影、定影后拍照。用 Image J 图相分析软件对条带灰度值进行定量。目的基因总蛋白表达以 β -actin 作内参进行标准化定量分析, 细胞外膜 Glut4 蛋白表达以总 Glut4 蛋白进行定量分析。

1.5 数据统计处理

数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析, 同时采用 LSD 法进行两两比较, 以 $p<0.05$ 为有显著差异。

2 结果与分析

2.1 对空腹血糖和口服葡萄糖耐受量的影响

空腹血糖和葡萄糖耐受性是评价高血糖症状的基本指标。如表 1 和图 1 所示, 模型对照组大鼠空腹血糖浓度和葡萄糖耐受性曲线下面积较正常对照组均显

著升高 ($p<0.01$), 提示糖尿病大鼠模型造模成功。经 *Pt-egg oil* 干预后, 高剂量组大鼠空腹血糖值显著下降了 36.52% ($p<0.01$), AUC 显著下降了 34.01%

($p<0.01$); 低剂量组大鼠 AUC 也显著下降了 14.78% ($p<0.05$)。结果表明 *Pt-egg oil* 具有显著的降血糖作用。

表 1 *Pt-egg oil* 对糖尿病大鼠空腹血糖和胰岛素的影响

Table 1 Effects of *Pt-egg oil* on fasting blood glucose level and insulin level in diabetic rats(n=10)

项目	正常对照组	模型对照组	阳性对照组	低 <i>Pt-egg oil</i> 组	高 <i>Pt-egg oil</i> 组
空腹血糖水平/(mmol/L)	6.34±0.26	27.55±2.41 ^{##}	18.87±1.94 ^{**}	23.70±2.08	17.49±1.22 ^{**}
血清胰岛素水平/(mU/L)	3.66±0.27	1.94±0.15 ^{##}	2.90±0.23 ^{**}	2.25±0.30	2.72±0.17 ^{**}
β 细胞功能指数	24.69±3.05	1.64±0.11 ^{##}	3.74±0.33 ^{**}	2.25±0.18 [*]	3.93±0.28 ^{**}
胰岛素分泌指数	0.58±0.02	0.07±0.00 ^{##}	0.15±0.01 ^{**}	0.10±0.01 [*]	0.15±0.01 ^{**}

注: ^{##} $p<0.01$ 与正常对照组比较; ^{*} $p<0.05$, ^{**} $p<0.01$ 与模型对照组比较。

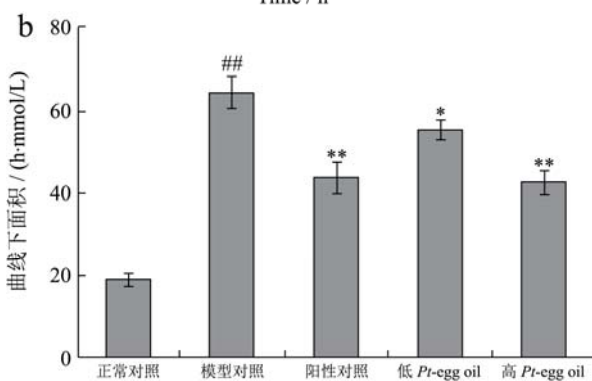
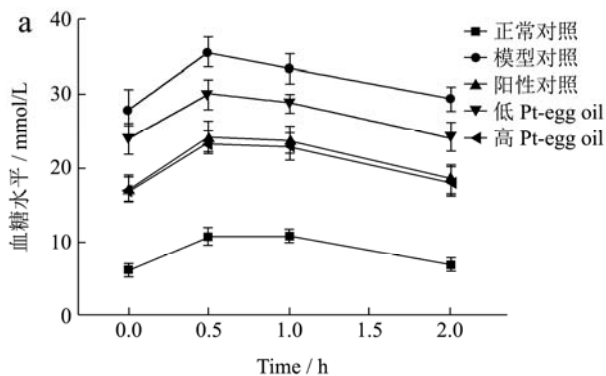


图 1 *Pt-egg oil* 对糖尿病大鼠葡萄糖耐受性的影响

Fig.1 Effects of *Pt-egg oil* on oral glucose tolerance in diabetic rats (n=10)

注: ^{##} $p<0.01$ 与正常对照组比较; ^{*} $p<0.05$, ^{**} $p<0.01$ 与模型对照组比较。

2.2 对血清胰岛素的影响

胰岛素是生物体内唯一具有降低血糖作用的激素, 对机体葡萄糖稳态具有重要的作用。如表 1 所示, 高剂量 *Pt-egg oil* 组大鼠空腹血清胰岛素含量与模型对照组相比显著增加了 40.21% ($p<0.01$)。结果提示 *Pt-egg oil* 能够显著促进胰岛 β 细胞合成与分泌胰岛素。

β 细胞功能指数和胰岛素分泌指数可以有效地反映胰岛 β 细胞功能和胰岛素分泌功能, 对评价机体葡萄糖代谢具有重要的参考价值。如表 2 所示, 与模型

对照组比较, 高剂量 *Pt-egg oil* 组大鼠 β 细胞功能指数和胰岛素分泌指数分别显著增加了 1.40 倍和 1.14 倍 ($p<0.01$), 低剂量 *Pt-egg oil* 组大鼠也显著增加了这 2 项重要参数 ($p<0.05$)。结果表明 *Pt-egg oil* 能够通过恢复模型组大鼠的胰岛 β 细胞的功能, 促进胰岛素的分泌。

2.3 对骨骼肌 PI3K/Akt 信号通路关键基因

mRNA 表达量的影响

Glut4 是胰岛素敏感外周组织中直接转运葡萄糖进入细胞的载体蛋白, 其表达量和细胞外膜上蛋白的含量直接决定了细胞对葡萄糖摄取的能力。如图 2 所示, 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠骨骼肌 Glut4 基因 mRNA 相对表达量显著下降 ($p<0.01$), 表明糖尿病大鼠骨骼肌中葡萄糖转运蛋白 Glut4 基因转录水平表达量下降, 最终导致细胞对葡萄糖的摄取能力降低, 造成高血糖症状。与模型对照组比较, 高剂量 *Pt-egg oil* 组大鼠大鼠骨骼肌 Glut4 基因 mRNA 相对表达量显著上升了 90.06% ($p<0.01$), 表明 *Pt-egg oil* 可以通过增加糖尿病大鼠骨骼肌 Glut4 基因表达促进细胞摄取葡萄糖, 起到降血糖作用。

Glut4 蛋白的表达量和活性受到上游的 PI3K/Akt 胰岛素信号通路的调节。当胰岛素信号传递时, PI3K 受到上游基因的刺激而活化, 活化的 PI3K 进一步激活 Akt, 活化的 Akt 能够促进 Glut4 由细胞质向细胞膜的移位。如图 2 所示, 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠骨骼肌 PI3K 和 Akt 基因 mRNA 相对表达量均显著下降 ($p<0.01$), 表明糖尿病大鼠骨骼肌 PI3K/Akt 胰岛素信号通路受到抑制, 不能有效地促进 Glut4 基因表达和葡萄糖转运。与模型对照组比较, 高剂量 *Pt-egg oil* 组大鼠大鼠骨骼肌 PI3K 和 Akt 基因 mRNA 相对表达量分别显著上升了 114.52%和 83.17% ($p<0.01$); 同时低剂量 *Pt-egg oil* 组大鼠骨骼肌 PI3K

基因 mRNA 相对表达量也显著增加 ($p < 0.05$)。结果表明 *Pt-egg oil* 可以通过促进病大鼠骨骼肌 PI3K/Akt 信号通路的表达, 起到降血糖的生物活性。

病大鼠骨骼肌 PI3K/Akt 胰岛素信号通路受到抑制。与模型对照组比较, 高剂量 *Pt-egg oil* 组大鼠骨骼肌 PI3K 和 Akt 蛋白的相对表达量分别显著上升了 1.54 倍和 1.61 倍 ($p < 0.01$), 表明 *Pt-egg oil* 能通过上调 PI3K/Akt 信号通路发挥降血糖作用。

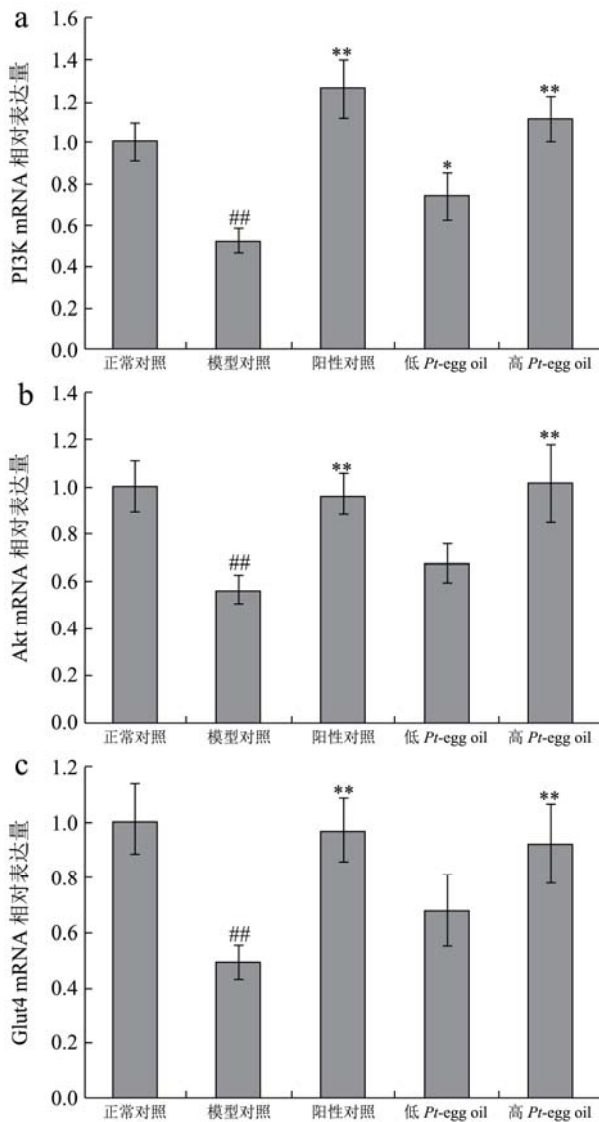


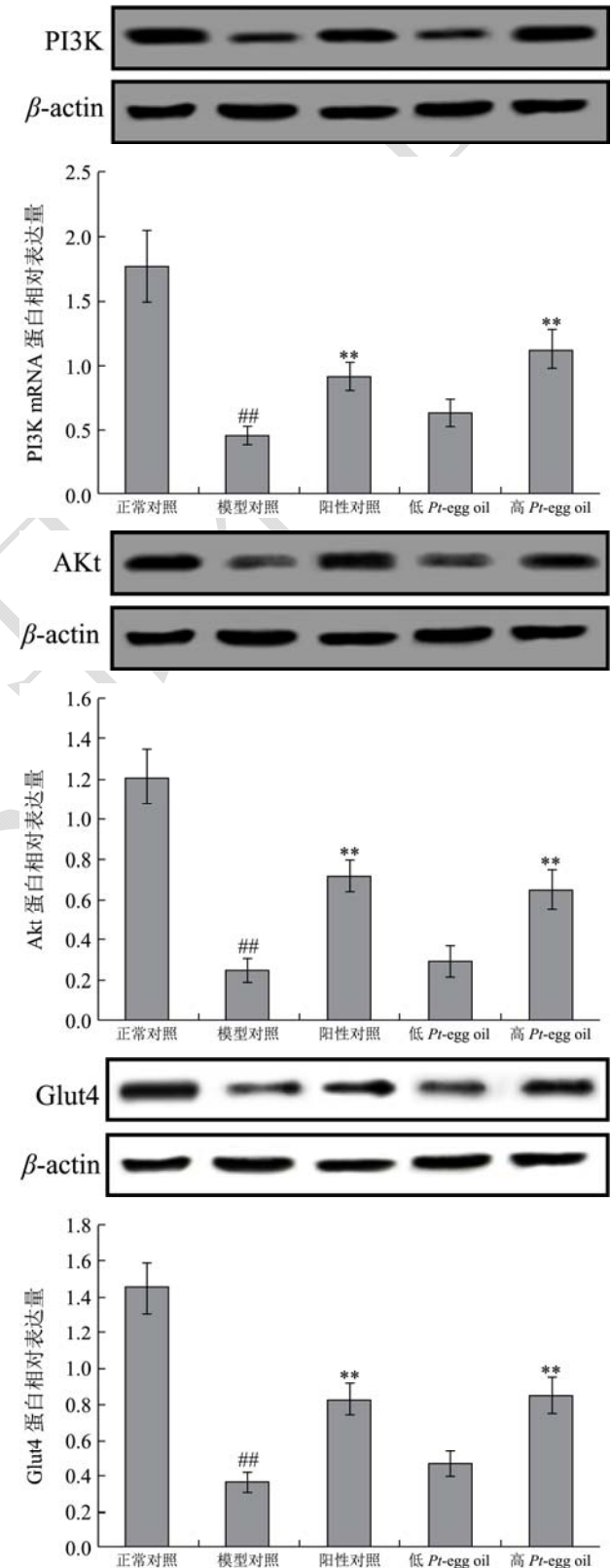
图2 *Pt-egg oil* 对糖尿病大鼠骨骼肌 PI3K/Akt 信号通路关键基因 mRNA 相对表达量的影响

Fig.2 Effects of *Pt-egg oil* on PI3K/Akt signaling key genes mRNA relative expression in the skeletal muscle of diabetic rats (n=10)

注: ^{##} $p < 0.01$ 与正常对照组比较; ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ 与模型对照组比较。

2.4 对骨骼肌 PI3K/Akt 信号通路关键蛋白和细胞外膜 Glut4 蛋白表达量的影响

Pt-egg oil 对糖尿病大鼠骨骼肌 PI3K/Akt 胰岛素信号通路关键蛋白表达的影响如图 3 所示。与正常对照组比较, 模型对照组大鼠骨骼肌 PI3K 和 Akt 蛋白的相对表达量均显著降低 ($p < 0.01$), 进一步表明糖尿



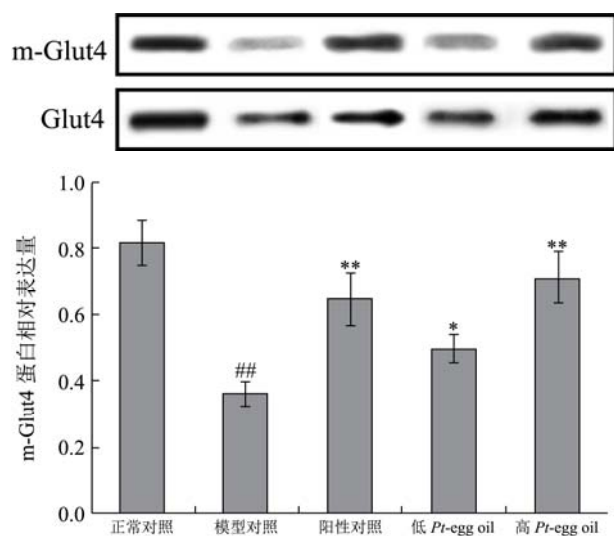


图3 *Pt-egg oil* 对糖尿病大鼠骨骼肌 PI3K/Akt 信号通路关键基因蛋白相对表达量和膜上 Glut4 蛋白表达量的影响

Fig.3 Effects of *Pt-egg oil* on PI3K/Akt signaling key genes protein relative expression and membrane Glut4 protein expression in the skeletal muscle of diabetic rats (n=10)

注: ^{##} $p < 0.01$ 与正常对照组比较; ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ 与模型对照组比较。

对骨骼肌总 Glut4 蛋白和外膜 Glut4 蛋白的检测结果显示, 模型对照组大鼠骨骼肌总 Glut4 蛋白和外膜 Glut4 蛋白相对表达量均显著降低 ($p < 0.01$), 表明糖尿病大鼠骨骼肌葡萄糖转运载体总量和有效转运载体量均呈现下降趋势。饲喂 *Pt-egg oil* 后, 与模型对照组比较, 高剂量组大鼠骨骼肌总 Glut4 蛋白和外膜 Glut4 蛋白相对表达量分别显著增加了 1.37 倍和 1.27 倍 ($p < 0.01$), 低剂量组大鼠骨骼肌外膜 Glut4 蛋白相对表达量也显著增加了 35.98% ($p < 0.05$), 表明 *Pt-egg oil* 能同时通过促进糖尿病大鼠骨骼肌 Glut4 蛋白的表达和 Glut4 蛋白向细胞膜的转位发挥降血糖活性。

3 结论

3.1 本实验采用注射链脲佐菌素的方法建立了糖尿病大鼠模型, 研究了 *Pt-egg oil* 对模型大鼠高血糖症的改善作用。结果显示, *Pt-egg oil* 能显著降低大鼠空腹血糖水平, 增加血清胰岛素浓度、 β 胰岛功能指数和胰岛素分泌指数, 改善葡萄糖耐受性。结果提示, *Pt-egg oil* 能降低糖尿病大鼠的血糖水平。

3.2 已证实, 海洋生物活性脂质能够有效地改善高血糖症, 如鱼油和虾油等^[10,12]。本文结果显示, *Pt-egg oil* 能显著地改善糖尿病大鼠的高血糖病症, 这与其高含量的活性脂质有关, 如磷脂、不饱和脂肪酸、虾青素等。*Pt-egg oil* 中 EPA 和 DHA 含量丰富, 在总脂肪酸中占比超过 30%, 与鱼油相似 (30%~40%)^[10], 高

于虾油 (20%~25%)^[11]。在鱼油与虾油中, 中性脂含量较高, 如虾油中甘油酯含量超过 95%^[9], *Pt-egg oil* 中极性脂含量较高, 磷脂占比约为 52%。虾青素在 *Pt-egg oil* 中的含量为 971 $\mu\text{g/g}$, 也超过其在虾油中的含量 (400 $\mu\text{g/g}$)^[9]。

3.3 机体骨骼肌对葡萄糖的利用量超过机体利用葡萄糖总量的 75%^[13], 因此普遍认为骨骼肌是机体消耗葡萄糖最主要的靶器官。葡萄糖进入细胞被机体利用依赖于 Glut4 蛋白, 蔡晟宇证明 Glut4 蛋白的高表达能促进机体摄取更多的葡萄糖, 有助于血糖的降低^[14]。Zhang 等证明, 提高 Glut4 蛋白转位到细胞膜的量, 能有效地缓解高血糖症状^[15]。本实验中, *Pt-egg oil* 显著地促进了糖尿病大鼠骨骼肌 Glut4 mRNA 和蛋白的表达, 同时刺激了 Glut4 蛋白细胞膜的转位, 增强了 Glut4 蛋白跨膜转运葡萄糖的能力。同时, *Pt-egg oil* 显著改善了糖尿病大鼠的葡萄糖耐受性, 降低了空腹血糖水平和胰岛素水平。表明 *Pt-egg oil* 能通过促进 Glut4 的表达和蛋白转位改善糖尿病大鼠的高血糖症状。

3.4 Glut4 的表达和转位受到上游 PI3K/Akt 胰岛素信号通路的调控。PI3K 是胰岛素受体后信号通路中最重要节点蛋白, 受上游胰岛素信号级联反应后, 可介导下游 Akt 基因的表达和活性, 活化的 Akt 能直接或间接地促进 Glut4 蛋白转位和高表达^[16]。Gao 等报道了 D-chiro-inositol 能有效地促进 PI3K 和 Akt 的表达, 以此促进 Glut4 对葡萄糖的转运, 发挥降血糖作用^[17]。Xiong 等证明 ergosterol 能通过激活 PI3K/Akt/Glut4 信号通路, 降低小鼠的血糖水平、改善葡萄糖耐受性^[18]。本研究结果显示, 经 *Pt-egg oil* 干预后, 大鼠 PI3K 和 Akt 基因 mRNA 和蛋白表达水平均显著增加, 表明 *Pt-egg oil* 能通过上调 PI3K/Akt 胰岛素信号通路促进 Glut4 向细胞膜的转位, 从而起到降低血糖的作用。

3.5 综上所述, *Pt-egg oil* 能够通过激活 PI3K/Akt/Glut4 信号通路发挥降血糖作用。

参考文献

- [1] 徐雷雷. 海参磷脂型二十碳五烯酸降血糖作用及机制的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013
XU Lei-lei. Hypoglycemic effects and mechanism of eicosapentaenoic acid riched in phosphatidylcholine on STZ-induced diabetic rats [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013
- [2] Hatem-Vaquero M, Griera M, Garcia-Jerez A, et al. Peripheral insulin resistance in ILK-depleted mice by reduction of GLUT4 expression [J]. Journal of Endocrinology,

- 2017, 234: 115-128
- [3] Yang Y, Li W, Liu Y, et al. Alpha-lipoic acid attenuates insulin resistance and improves glucose metabolism in high fat diet-fed mice [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2014, 35: 1285-1292
- [4] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广总站,中国水产学会.中国渔业统计年鉴 2018[M].北京:中国农业出版社,2018
- [5] Pan L, Hu D, Liu M, et al. Molecular cloning and sequence analysis of two carbonic anhydrase in the swimming crab *Portunus trituberculatus* and its expression in response to salinity and pH stress [J]. *Gene*, 2016, 576: 347-357
- [6] Ng'ambi JW, Li R, Mu C, et al. Dietary administration of saponin stimulates growth of the swimming crab *Portunus trituberculatus* and enhances its resistance against *Vibrio alginolyticus* infection [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 59: 305-311
- [7] 邵利平,夏文水,姜启兴,等.蟹黄油的理化性质及其营养成分分析[J].*食品工业科技*,2015,36(4):362-369
SHAO Li-ping, XIA Wen-shui, JIANG Qi-xing, et al. Analysis of physicochemical properties and nutritive and functional composition of crab oil [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(4): 362-369
- [8] 孙甜甜.高品质南极磷虾油工业化生产技术研究[D].青岛:中国海洋大学,2013
SUN Tian-tian. Studies on the industrialization technology of high quality Antarctic krill oil [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013
- [9] Skorve J, Hilvo M, Vihervaara T, et al. Effects of krill oil on endothelial function and other cardiovascular risk factors in participants with type 2 diabetes, a randomized controlled trial [J]. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 2015, 3: e000107
- [10] Sadeghi A, Djafarian K, Mohammadi H, et al. Effect of omega-3 fatty acids supplementation on insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome, Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Diabetes and Metabolic Syndrome*, 2017, 11(4-6): 157-162
- [11] Kwantes JM, Grundmann O. A brief review of krill oil history, research and the commercial market [J]. *Journal of Dietary Supplements*, 2015, 12(1): 23-35
- [12] Ivanova Z, Bjørndal B, Grigorova N, et al. Effect of fish and krill oil supplementation on glucose tolerance in rabbits with experimentally induced obesity [J]. *European Journal of Nutrition*, 2015, 54(10): 1055-1067
- [13] Voss T S, Vendelbo M H, Kampmann U, et al. Acute hypoglycemia in healthy humans impairs insulin-stimulated glucose uptake and glycogen synthase in skeletal muscle, a randomized clinical study [J]. *Diabetes*, 2017, 66(9): 2483-2494
- [14] 蔡晟宇.基于 IRS-1/PI3K/GLUT4 通路观察加味水陆二仙丹对 2 型糖尿病胰岛素抵抗的影响[D].北京:北京中医药大学,2016
CAI Sheng-yu. Effects of Jiawei Shuilu Erxiandan on insulin resistance of type 2 diabetes mellitus through IRS-1/ PI3K/ GLUT4 pathway [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2016
- [15] Zhang M, Li X, Liang H, et al. Semen cassiae extract improves glucose metabolism by promoting Glut4 translocation in the skeletal muscle of diabetic rats [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 235
- [16] Albers P H, Pedersen A J, Birk J B, et al. Human muscle fiber type-specific insulin signaling, impact of obesity and type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2015, 64(2): 485-497
- [17] Gao Y F, Zhang M N, Wang T X, et al. Hypoglycemic effect of D-chiro-inositol in type 2 diabetes mellitus rats through the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016, 433(9): 26-34
- [18] Xiong M, Huang Y, Liu Y, et al. Antidiabetic activity of ergosterol from *Pleurotus ostreatus* in KK-Ay mice with spontaneous type 2 diabetes mellitus [J]. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2018, 62(3): 1700444

(上接第 143 页)

- [21] 李晓明,姜华,李军,等.山茱萸果核中多酚的抗氧化活性研究[J].*时珍国医国药*,2012,23(4):902-903
LI Xiao-ming, JIANG Hua, LI Jun, et al. The antioxidant polyphenols from the core of *Cornus officinalis* [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2012, 23(4): 902-903
- [22] He K, Song S S, Zou Z Y, et al. The hypoglycemic and synergistic effect of loganin, morroniside, and ursolic acid isolated from the fruits of *Cornus officinalis* [J]. *Phytotherapy Research*, 2016, 30: 283-291