

豌豆低聚肽对 2 型糖尿病小鼠肝脏 PI3K/AKT/FOXO1 信号通路的调节作用

王赛, 孙婉婷, 王猛, 董雷超, 陈炫宏, 南希骏, 嵇威, 周泉城

(山东理工大学农业工程与食品科学学院食品科学系, 农产品功能化技术山东省高校重点实验室, 山东淄博 255049)

摘要: 本文旨在探究豌豆低聚肽对 2 型糖尿病(T2MD)小鼠肝脏磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/转录因子 FoxO1(PI3K/ AKT/ FOXO1)蛋白表达的影响。通过对小鼠腹腔注射链脲佐菌素(STZ), 建立 2 型糖尿病小鼠模型, 并用二甲双胍和豌豆低聚肽分别饮食干预 4 周。结果表明, 豌豆低聚肽组的小鼠糖尿病指征较模型组均有一定改善, 且成剂量依赖性, 其中高剂量组小鼠血糖降低了 23.97%, 体重增加了 12.24%, 肝脏中 PI3K、AKT、FOXO1 蛋白表达分别升高了 278.49%、21.78%、80.41%; 细胞病理学观察发现, 高剂量组能调节细胞形态, 改善糖原积累。因此, 豌豆低聚肽可调节 2 型糖尿病小鼠肝脏 PI3K/AKT/FOXO1 信号通路, 降低肝细胞损伤, 改善部分 2 型糖尿病小鼠指标。本文为豌豆蛋白的高值化利用拓宽了思路, 为豌豆低聚肽在糖尿病领域的应用提供了实践参考, 补充完善了豌豆低聚肽的糖尿病理论。

关键词: 豌豆低聚肽; 2 型糖尿病; 肝脏; PI3K/AKT/FOXO1 通路

文章编号: 1673-9078(2021)02-21-27

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.2.0713

Regulatory Effect of Pea Oligopeptide on PI3K/AKT/FOXO1 Signaling Pathway in Liver of Type 2 Diabetic Mice

WANG Sai, SUN Wan-ting, WANG Meng, DONG Lei-chao, CHEN Xuan-hong, NAN Xi-jun, JI Wei,
ZHOU Quan-Cheng

(Department of Food Science, School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology,
The Key Laboratory of Agricultural Products in Shandong Province, Zibo 255049, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effect of pea oligopeptide on the protein expression of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/FoxO1 (PI3K/ AKT/ FoxO1) in the liver of mice with type 2 diabetes mellitus (T2MD). Mice were intraperitoneally injected with streptozotocin (STZ) to establish a type 2 diabetic mouse model, and the mice were fed with metformin and pea oligopeptide for 4 weeks, respectively. The results showed that the diabetes indications of mice in the pea oligopeptide group were improved in a dose-dependent manner compared with the model group. In the high-dose group, blood glucose was decreased by 23.97%, body weight were increased by 12.24%, and the expressions of PI3K, AKT and FOXO1 proteins in the liver were increased by 278.49%, 21.78% and 80.41%, respectively. Cytopathological observation showed that the high dose group could regulate cell morphology and improve glycogen accumulation. Therefore, pea oligopeptidatin can regulate the PI3K/AKT/FOXO1 signaling pathway in the liver of mice with type 2 diabetes, which can not only reduce liver cell damage, but also improve some indicators of type 2 diabetic mice. This paper broadens the idea of high-value utilization of pea protein,

引文格式:

王赛,孙婉婷,王猛,等.豌豆低聚肽对 2 型糖尿病小鼠肝脏 PI3K/AKT/FOXO1 信号通路的调节作用[J].现代食品科技,2020,37(2): 21-27

WANG Sai, SUN Wan-ting, WANG Meng, et al. Regulatory effect of pea oligopeptide on PI3K/AKT/FOXO1 signaling pathway in liver of type 2 diabetic mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 37(2): 21-27

收稿日期: 2020-07-28

基金项目: 山东省重点研发计划(医用食品专项计划)项目(2018YYSP017); 山东省重点研发计划项目(2019GNC106084); 山东理工大学招远工业技术研究院创新研究基金(9101-219194); 山东省研究生教育项目管理项目(117009); 山东理工大学研究生教育创新团队(4053-218049; 4053-219076)

作者简介: 王赛(1995-), 女, 硕士生, 研究方向: 功能性食品; 通讯作者: 周泉城(1977-), 男, 副教授, 研究方向: 功能性食品

and provides practical reference for the application of pea oligopeptide in the field of diabetes, which can supplement and improve the diabetes theory of pea oligopeptide.

Key words: pea oligopeptide; T2MD; liver; PI3K/AKT/FOXO1 pathway

2型糖尿病是一种慢性代谢疾病,因胰岛素分泌不足,导致糖代谢异常及相关代谢紊乱。近年来,糖尿病已经成为严重威胁人们健康的疾病之一,2017年国际糖尿病联盟公布结果显示,我国糖尿病患者数为1.14亿,其中2型糖尿病患者约占其总人数的90%^[1]。世界卫生组织(WHO)预测,到2030年,糖尿病将成为世界第七大死亡原因。目前,多数患者靠服用磺脲类、 α -糖苷酶抑制剂、双胍类等药物来控制血糖^[2],而膳食摄入、营养调理等在改善2型糖尿病指标方面也发挥着重要的作用^[3,4],饮食干预也被视为糖尿病医疗管理的重要组成部分^[5]。基于2型糖尿病严重的并发症及逐年上升的发病率,寻找有效的功能性食源组分用于调理2型糖尿病已成为新的热点之一。

豌豆是世界上第四大豆类作物,富含蛋白质、膳食纤维、维生素、矿物质等多种物质^[6,7],有抗菌消炎、调和脾胃、防癌治癌等功效。豌豆蛋白的生物价(BV)为47%~63%,功效比(PER)为0.7~1.3,含有人体所需的8种必需氨基酸,且大部分均达到FAO/WHO推荐值^[8],其高蛋白(233~267 g/kg)的特点也成为各行业利用发展的好的候选者^[9]。豌豆肽有良好的抗氧化性^[10]、乳化性^[11]、泡沫稳定性^[12]、持油性^[13]等特性,是食品、医药及新型行业的主要添加原料^[14-16]。崔欣悦等^[17]研究发现,豌豆肽可一定程度上缓解胰岛素抵抗,但其具体作用机制还未有详细报道。

目前,利用抗氧化剂阻断氧化应激损伤途径,成为糖尿病的治疗中关注的热点之一^[18]。以本实验室李慧等^[19]研究的抗氧化豌豆肽为原料,经进一步处理和纯化得到豌豆低聚肽。用BALB/C小鼠构建2型糖尿病模型,并使用豌豆低聚肽饮食干预4周,以二甲双胍药物为对照组,基于现有的理论知识^[20],选取小鼠肝细胞PI3K/AKT/FOXO1信号通路为研究机制,观察各组小鼠肝脏细胞蛋白表达及形态变化情况,旨在为豌豆低聚肽在2型糖尿病的降血糖机制提供一定的数据,为后续降血糖药物分子设计提供一定的理论支撑。

1 材料与方法

1.1 原料

豌豆蛋白(水分4.60%±0.02%,蛋白质73.20%±0.23%,粗脂肪0.22%±0.01%,灰分4.62%±0.03%),烟台双塔食品股份有限公司;中性蛋白酶(酶活力

47362 U/g),济宁元素高科生物科技有限公司;BALB/C小鼠,济南金丰实验动物有限公司;三诺血糖仪、三诺试纸条,长沙三诺生物传感股份有限公司;总胆固醇(TC)试剂盒、甘油三酯(TG)试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒,上海酶联生物制药有限公司。

1.2 主要仪器设备

冷冻干燥机,FD-1A-50杭州聚同电子有限公司;精密分析天平,AL-1D4托利多仪器有限公司;离心机,TGL-16B上海安亭科学仪器厂;pH指示计,PHS-25上海仪电科学仪器股份有限公司;酶标仪,1510赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;SDS-PAGE凝胶电泳仪,BIO-RAD公司。

1.3 实验方法

1.3.1 豌豆低聚肽的制备

采用李慧等^[19]的实验方法,将豌豆蛋白中添加一定量的中性蛋白酶,在40.3℃水浴锅中震荡酶解3h,反应结束后,沸水浴灭酶10min。离心后取上清酶解液于1ku透析袋进行分离,得到分子量为1ku的豌豆小分子肽。由苏州强耀生物科技有限公司对豌豆小分子肽进一步进行采集和冷冻干燥,主要采用固相合成和反相C18柱高效液相色谱方法,用安捷伦1100柱和C18柱进行检测。得到纯度为98%,氨基酸序列为:Val-Glu-Pro-Gln的低聚肽,以此为原料进行后续实验。

1.3.2 糖尿病小鼠模型的建立

100只雄性BALB/C小鼠,适应性喂养1周,断食不断水16h,然后给予STZ(100 mg/kg,用0.1 mol/L柠檬酸缓冲液配制成1%溶液,pH 4.4)一次性腹腔注射,正常对照组腹腔注射等体积柠檬酸缓冲液。3d后小鼠断尾取血,测定血糖,以空腹血糖大于11.1 mmol/L判定糖尿病小鼠模型造模成功。

1.3.3 小鼠分组及饲养

将建模成功的糖尿病小鼠按正常组、模型组、药物组(二甲双胍组100 mg/(kg·d))、豌豆低聚肽高剂量组(肽高组,500 mg/(kg·d))、豌豆低聚肽低剂量组(肽低组,250 mg/(kg·d))进行分组,每笼5只,用苦味酸溶液进行标记。分组完成后,进行正常喂食,并对小鼠进行为期4周的灌胃实验,正常组与模型组

灌取同等体积的生理盐水。

1.3.4 小鼠体重及血糖的测定

每隔 7 d 对小鼠进行 12 h 断食, 采用小鼠尾部静脉取血, 用稳定血糖仪测定各组小鼠的空腹血糖, 同时称量并记录体重。

1.3.5 小鼠解剖指标的测定

4 周灌胃处理结束后, 先对小鼠进行眼眶取血, 放入 1.5 mL 离心管中静置 30 min 后。用 6000 r/min 离心机离心 15 min, 取上清液于 -40 °C 的冰箱中备用, 用试剂盒测定血液指标。再解剖取出小鼠的心脏、脾脏和肾脏称取重量, 计算其器官指数。

1.3.6 Western blot 检测

将小鼠肝脏组织切开, 处理后的样品加入适量浓缩 SDS-PAGE 蛋白缓冲液进行蛋白分离, 使用电压为 80~100 V 的恒压标准电泳设备, 120 V 的高电压。然后用 PVDF 膜进行膜转化, 完成后清洗 1~2 次, 4 °C 密封过夜。在原稀释液中孵育 1 h, 洗涤 5 min, 洗涤三次, 第二次抗体孵育步骤同上, 最终曝光显影。

1.3.7 小鼠肝脏细胞 HE 染色

取小鼠胰腺组织用 10% 福尔马林溶液浸泡, 用酒精梯度脱水, 并用石蜡包埋, 切片成 5 μm 碎片备用。将处理后的碎片用苏木精和伊红染色, 染色切片置于中性胶中, 在上面覆盖玻片, 在 400 倍倒置显微镜下观察肝脏组织细胞形态变化。

1.4 数据分析

每组做 3 个平行。利用 SPSS 19 数据分析, Origin 8.5 作图。

2 结果与讨论

2.1 豌豆低聚肽对糖尿病小鼠血糖及体重的影响

糖尿病小鼠建模成功后, 其小鼠各项基本指标发生了一定的变化。正常组小鼠毛色顺滑鲜亮, 眼睛有神, 日便尿排出量正常。而其余组小鼠精神萎靡, 排

尿排便增多, 体型消瘦。并在观察的同时记录小鼠四周的血糖及体重变化情况, 以便进一步分析。

由表 1 可知, 正常组鼠的体重一直增加, 模型组鼠体重(18.55±1.35 g)相较正常组鼠体重(23.36±1.20 g)明显下降($p<0.05$), 符合糖尿病患者多饮多尿、多食消瘦等特征, 间接客观的证明了实验建模成功。与模型组相比, 药物组鼠体重增长了 7.87%, 肽高组、肽低组小鼠体重分别增加了 12.24%、9.11%, 与豌豆低聚肽的剂量成正比关系, 对糖尿病小鼠体重有一定的改善作用, 但差异不明显。另一方面, 豌豆低聚肽对糖尿病小鼠的血糖也有一定调节作用, 如图 1。正常组鼠的空腹血糖在 6.0 以下, 而模型组鼠的空腹血糖在 16.0 以上, 证明实验糖尿病模型建造成功, 且正常组与模型组血糖四周变化稳定, 排除了饮食、灌胃、环境等因素的影响。药物干预后, 小鼠血糖降低了 46.74% ($p<0.01$), 肽高组和肽低组血糖分别降低了 23.97%、13.01% ($p<0.05$), 且与添加剂量正相关, 这与崔欣悦等^[17]研究结果相符, 豌豆肽能增加葡萄糖的消耗量, 有效缓解胰岛素抵抗的形成, 对糖尿病症状起到一定调节作用。而本研究中的结果可能与豌豆低聚肽氨基酸组成有一定关系, 豌豆低聚肽中的缬氨酸为必需氨基酸, 可与体内异亮氨酸和亮氨酸协同作用, 促进身体正常生长, 修复组织, 调节血糖, 并提供所需能量。而谷氨酸、谷氨酰胺可为机体提供必需的氮源, 促使肌细胞内蛋白质合成, 为糖尿病小鼠补充了一定氨基酸成分, 因此可在一定程度上调节糖尿病小鼠的消瘦、血糖等指标。

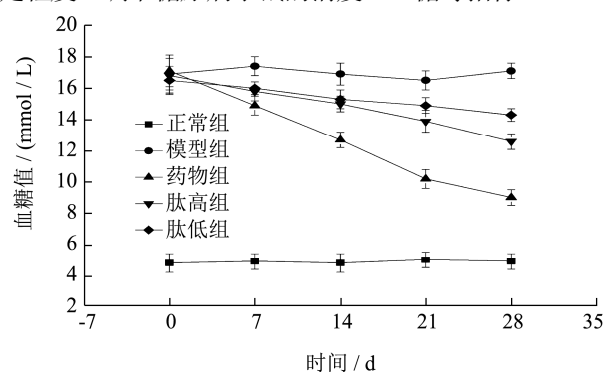


图 1 各组小鼠 4 周血糖变化情况

Fig.1 The changes of blood glucose in each group at 4 weeks

表 1 各组小鼠 4 周体重变化情况

Table 1 The weight change of mice in each group at 4 weeks (n=5, $\bar{x}\pm s$)

组别	初始体重/g	第一周/g	第二周/g	第三周/g	第四周/g
正常组	20.03±1.21	20.31±1.30	20.99±1.22	22.01±1.14	23.36±1.20
模型组	20.12±1.03	19.78±1.42	19.54±1.20	18.93±1.34	18.55±1.35
药物组	19.98±1.15	19.83±1.24	19.68±1.32	19.85±1.41	20.01±1.29
肽低组	20.06±1.07	19.73±1.38	19.55±1.25	19.82±1.23	20.24±1.31
肽高组	20.10±1.11	19.93±1.33	19.78±1.24	20.14±1.32	20.83±1.27

表 2 各组小鼠血脂四项变化情况

Table 2 The four changes of blood lipid in mice of each group (n=5, $\bar{x}\pm s$)

组别	TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	HDL-C/(μ mol/L)	LDL-C/(mmol/L)
正常组	2.09±0.12	1.26±0.13	316.91±0.12	0.43±0.11
模型组	4.24±0.13	3.69±0.12	389.40±0.10	1.89±0.14
药物组	2.61±0.10	1.60±0.14	341.92±0.13	0.78±0.12
肽低组	3.74±0.11	3.52±0.12	364.40±0.12	1.41±0.13
肽高组	3.36±0.11	2.80±0.13	352.41±0.12	1.22±0.12

2.2 豌豆低聚肽对糖尿病小鼠血液生化指标

的影响

糖脂代谢紊乱是糖尿病的主要生理变化之一，能直接或间接的参与着动脉粥样硬化的发生与发展，成为糖尿病心脑血管疾病的主要高危因素^[21]。近年来，血脂检测已成为糖尿病及其并发症筛查、诊断的一项重要指标，在观测血清脂质代谢中发挥着重要作用。

从表 2 中可以看出，糖尿病小鼠的血脂四项较正常组而言，均有所升高，这与之前的研究资料^[22]相符，印证了糖尿病模型的建立成功。进行药物和豌豆低聚肽干预后，血脂四项均有不同程度的降低，与模型组相比，其中药物组 TC 水平 (2.61 mmol/L)、TG 水平 (1.60 mmol/L) 及 LDL-C 水平 (0.78 mmol/L) 三项血脂指标改善效果最为显著 ($p<0.01$)，且最接近正常组，此结果与参考文献结果一致，也间接保证了药物剂量干预的合理性^[23]。豌豆低聚肽样品组的血脂调节结果与干预剂量成正比关系，与模型组相比，豌豆低聚肽高剂量组降血脂效果显著 ($p<0.05$)，TC 含量降低了 20.75%，TG 含量降低了 24.11%，HDL-C 含量降低了 9.49%，LDL-C 含量降低了 35.44%。其中，模型组与肽低组 TG 水平处于中度危害水平，肽高组可调节至轻度危害水平，药物组 TG 水平则与正常组无显著性差异 ($p>0.05$)。刘忆梅等^[24]研究发现，灌胃 5~15 mg/(kg·d) 时，大豆蛋白肽的降血脂作用显著，这与本文中豌豆低聚肽一定浓度时可以改善糖尿病血脂相符。

2.3 豌豆低聚肽对糖尿病小鼠肝脏 PI3K/AKT

/FOXO1 蛋白表达的影响

肝脏是主要的胰岛素靶器官，在维持葡萄糖稳态中具有重要地位，而 PI3K/AKT 信号通路是体内重要的细胞信号通路。之前的研究发现^[25,26]，肝脏中胰岛素信号的传导与 PI3K/AKT 通路相关蛋白的表达有关，在葡萄糖转运、糖原合成、糖酵解和糖异生的调

节等方面发挥一定的作用。

a 正常组 模型组 药物组 肽低组 肽高组

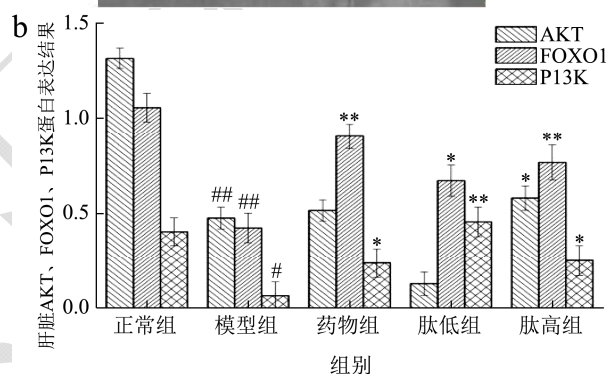
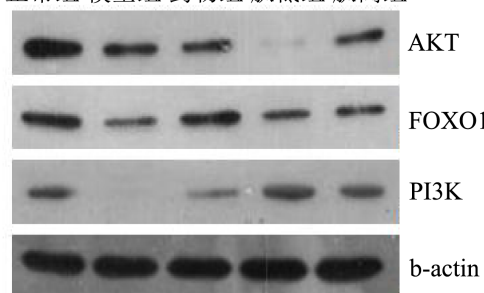


图 2 各组小鼠肝脏 PI3K、FOXO1、AKT 的表达结果

Fig.2 The expression results of PI3K, FOXO1 and AKT in liver of mice in each group (n=5, $\bar{x}\pm s$)

注：a: Western blot 测定蛋白表达图；b: 蛋白含量结果计算图。与正常组相比：#表示 $p<0.05$ ，有显著差异，##表示 $p<0.01$ ，有极显著差异；与模型组相比：*表示 $p<0.05$ ，有显著差异，**表示 $p<0.01$ ，有极显著差异。

小鼠肝脏组织 Western blot 检测结果如图 2 所示。与正常组相比，模型组小鼠肝脏的 PI3K 和 AKT 表达显著降低。使用药物和样品干预后，蛋白表达较模型组而言均有不同程度改善，药物组改善效果最为显著，肝脏中 PI3K、AKT、FOXO1 蛋白表达分别升高了 259.09%、18.34%、112.92%，而肽高组的蛋白表达结果好于肽低组，肽高组中肝脏中 PI3K、AKT、FOXO1 蛋白表达分别升高了 278.49%、21.78%、80.41%，其中，药物组和肽高组在 PI3K 及 FOXO1 蛋白表达上升结果都极显著 ($p<0.01$)。PI3K 的蛋白表达在一定程度上会影响 AKT 蛋白表达结果，而肽低组肝脏中 AKT 蛋白表达结果降低，这可能与 Mora 等^[27]人研究

发现的肝脏胰岛素受体活性低影响 AKT 活性有关, 此推论还需要进一步证实。FOXO1 是 PI3K/AKT 蛋白的下游信号因子, 当上游信号转导因子 AKT 的表达升高后, FOXO1 的表达也有所改善, 并参与细胞生长发育、代谢和细胞凋亡等活动。

2.4 豌豆低聚肽对糖尿病小鼠肝脏细胞形态变化的影响

肝细胞作为肝脏的主要功能细胞, 能影响肝脏正常的生理功能, 如调节多种营养物质、分泌和储存胆汁、解毒和排泄代谢产物等。取各组小鼠的肝细胞进行 HE 染色, 在 400 倍光学显微镜下观察其细胞形态、细胞间隙等病理结构, 结果如图 3 所示。

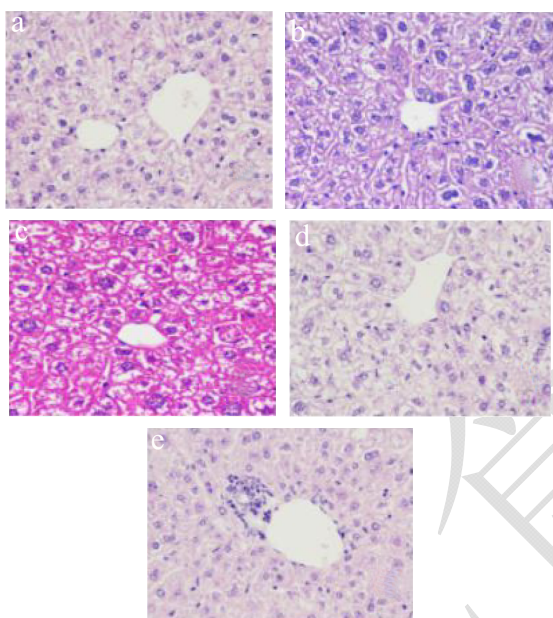


图 3 各组小鼠肝脏 HE 染色结果 (×400)

Fig.3 The HE staining results of mice liver in each group (×400)

注: a: 正常组; b: 模型组; c: 药物组; d: 肽低组; e: 肽高组。

正常组的肝细胞排列整齐、紧密, 细胞形态饱满, 肝小叶形态完整, 而模型组肝细胞的胞间隙变大, 细胞核大小不均, 胞质间有少量的紫红色糖原颗粒, 形态有所改变, 这与刘仕琦等^[28]建立的肝脏糖尿病模型相符。干预后, 药物组肝脏细胞间隙较模型组明显变小, 细胞形态也有所改善, 肽高组和肽低组细胞改善情况成剂量依赖性, 肽高组肝细胞排列整齐, 糖原沉积情况有所缓和, 但仍有少量细胞间隙。结合肝细胞信号通路表达结果来看, 上游信号转导因子 PI3K-AKT 表达受影响后, 无法正常的磷酸化下游转录因子 FOXO1, 导致肝糖代谢的异常, 进一步影响肝细胞的衰老、凋亡^[29]。而药物和豌豆低聚肽干预后, 能改善

蛋白表达结果, 进而减缓肝细胞损伤, 这与肝脏细胞 HE 染色后形态呈现结果一致。

2.5 豌豆低聚肽对糖尿病小鼠重要器官的影响

各组小鼠解剖后各个重要器官指数计算结果见表 3, 正常组相比, 模型组小鼠心脏器官指数增加了 9.25%, 脾脏器官指数增加了 30.26%, 肾脏器官指数增加了 24.32%, 其中脾脏、肾脏器官指数显著增加 ($p<0.05$), 此结果可能是糖尿病小鼠体型消瘦、部分器官受损所导致。与模型组相比, 小鼠器官指数在饮食干预后得到了一定的调节, 其中脾脏改善效果最为显著 ($p<0.05$), 药物组升高了 21.05%, 肽高组升高了 13.13%, 此结果与张敏佳等^[30]研究结果一致, 豌豆低聚肽中的谷氨酸和谷氨酰胺都具有很好的免疫调节功能, 对免疫器官起到一定的保护作用, 从而调节了肽高组小鼠器官指数的变化。另一方面, 各组小鼠的器官指数变化且变化均在合理范围内, 这样侧面反映了实验所用的剂量合理, 未对各组重要器官产生影响, 心脏、脾脏和肾脏均无异常变化, 不影响其正常生活及活性。

表 3 各组小鼠重要器官指数的结果

Table 3 The changes of important organ index of mice in each

group (n=5, $\bar{x}\pm s$)			
组别	心脏/%	脾脏/%	肾脏/%
正常组	0.54±0.01	0.76±0.02	0.74±0.01
模型组	0.59±0.03	0.99±0.02	0.92±0.02
药物组	0.56±0.02	0.83±0.01	0.92±0.03
肽低组	0.58±0.01	0.87±0.01	0.91±0.02
肽高组	0.57±0.02	0.86±0.02	0.91±0.01

3 结论

豌豆低聚肽作为饮食干预 2 型糖尿病的原料, 可以有效的调节血糖、体重等指标特征, 改善对 2 型糖尿病小鼠肝脏 PI3K/AKT/FOXO1 蛋白表达情况。由实验数据可知, 二甲双胍作为常规性治疗 2 型糖尿病的药物, 其治疗后各项指标均变化显著, 其中药物组血糖降低了 46.74%, 体重增长了 7.87%, 血脂四项也均趋于正常组, 肝脏中 PI3K、AKT、FOXO1 蛋白表达分别升高了 259.09%、18.34%、112.92%, 细胞学形态排列整齐、糖原积累减少; 而豌豆低聚肽干预剂量与 2 型糖尿病指标的改善效果成正比关系, 高剂量组的小鼠体重、血糖、血脂四项均有所改善, 肝脏中 PI3K/AKT/FOXO1 信号通路表达升高, 肝细胞状况有

所缓和。且药物组与豌豆低聚肽高、低剂量组均未对小鼠心脏、脾脏、肾脏的器官指数产生异常影响。为豌豆蛋白的高值化利用提供了实践参考, 拓宽了豌豆低聚肽在糖尿病领域的应用。

参考文献

- [1] Cho N H, Shaw J E, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2018, 138: 271-281
- [2] 耿傲蕾. 2 型糖尿病患者药物治疗现状及药学服务干预效果[J]. *中国现代药物应用*, 2019, 13(13): 156-157
GENG Ao-lei. Current situation of drug therapy and intervention effect of pharmaceutical care in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Chinese Journal of Modern Drug Application*, 2019, 13(13): 156-157
- [3] 陈思贝, 蒋红英, 龚明娇, 等. 糖尿病的饮食干预[J]. *医药与临床*, 2019, 10(20): 18
CHEN Si-bei, JIANG Hong-ying, GONG Ming-jiao, et al. Dietary interventions for diabetes [J]. *Remedies & Clinice*, 2019, 10(20): 18
- [4] 高嘉良, 魏军平. 饮食干预治疗糖尿病的最新研究进展[J]. *中国临床保健杂志*, 2014, 17(3): 332-336
GAO Jia-liang, WEI Jun-ping. The latest research progress of diet intervention to treat diabetes [J]. *Chinese Journal of Clinical Healthcare*, 2014, 17(3): 332-336
- [5] Hilal G, Nuray N U, Muslum G, et al. Long-term treatment with a beta-blocker timolol attenuates renal-damage in diabetic rats via enhancing kidney antioxidant-defense system [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2014, 395(1): 177-186
- [6] 薛文通, 康玉凡. 食用豆类加工实用技术手册[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2015
XUE Wen-tong, KANG Yu-fan. *Practical Technical Manual for Processing Edible Beans* [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2015
- [7] Rungruangmaitree R, Jiraungkoorskul W. Pea, *Pisum sativum*, and its anticancer activity [J]. *Pharmacogn Rev*, 2017, 11(21): 39-42
- [8] 李媛媛, 张惠, 薛文通. 豆类制备生物活性肽的功能特性及研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2016, 30(7): 4-8
LI Yuan-yuan, ZHANG Hui, XUE Wen-tong. Functional properties and research progress bioactive peptides prepared from legumes [J]. *Cereals & Oils*, 2016, 30(7): 4-8
- [9] F Roy, J I Boye, B K Simpson. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: pea, chickpea and lentil [J]. *Food Research International*, 2010, 43(2): 432-442
- [10] Trisha L P, Chibuike C U, Rotimi E A. Effect of cationic property on the *in vitro* antioxidant activities of pea protein hydrolysate fractions [J]. *Food Research International*, 2011, 44(4): 1069-1074
- [11] Asli C K. Encapsulation of black pepper seed oil using maltodextrin and pea protein [J]. *Food Science and Technology International*, 2020, 26(5): 369-378
- [12] Mohanan A, Nickerson M T, Ghosh S. Utilization of pulse protein-xanthan gum complexes for foam stabilization: the effect of protein concentrate and isolate at various pH [J]. *Food Chemistry*, 2020, 316: 126282
- [13] Angie C Y L, Tom W, Robert T T, et al. Physicochemical and functional properties of protein isolates obtained from several pea cultivars [J]. *Cereal Chemistry*, 2016, 94(1): 89-97
- [14] Madan L V, Dhanya B S, Sukriti V R, et al. Carbohydrate and protein based biopolymeric nanoparticles: current status and biotechnological applications [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154(1): 390-412
- [15] Wu C, Wang J M, Ma W C, et al. Preheat-stabilized pea proteins with anti-aggregation properties [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 155: 1288-1295
- [16] Sneha M B, Oluwatobi S O, Nandakumar K, et al. Biopolymers-application in nanoscience and nanotechnology [J]. *Recent Advances in Biopolymers*, 2016, 3: 47-72
- [17] 崔欣悦, 张瑞雪, 周明, 等. 豌豆肽缓解胰岛素抵抗抗形成效果探究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(12): 145-148
CUI Xin-yue, ZHANG Rui-xue, ZHOU Ming, et al. Effect of pea oligopeptides on relieving insulin resistance [J]. *Science and Technology of Food*, 2019, 40(12): 145-148
- [18] Naziroglu M, Butterworth P. Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes [J]. *Can J Appl Physiol*, 2005, 30(2): 172-185
- [19] 李慧, 王琪, 付鑫, 等. 豌豆蛋白挤出物制备抗氧化肽工艺优化及其分离[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(6): 165-169
LI Hui, WANG Qi, FU Xin, et al. Optimization of preparation technology and separation of antioxidant peptides from pea protein extrudate [J]. *Science and Technology of Food*, 2018, 39(6): 165-169
- [20] 李中南, 方朝晖, 熊园园, 等. 丹蛭降糖胶囊对糖尿病大鼠肝脏 PI3K/AKT 信号通路的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2015, 49(9): 67-70
LI Zhong-nan, FANG Zhao-hui, XIONG Yuan-yuan, et al.

- The influence of "Danzhi Jiangtang Capsule" on the PI3K/AKT signaling pathways in the liver of diabetic rats [J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 49(9): 67-70
- [21] 徐立民.血清血脂四项与 2 型糖尿病的关系探讨[J].临床与实践,2013,17(1):41-42
XU Li-min. Study on the relationship between serum lipids and type 2 diabetes mellitus [J]. Clinical & Practice, 2013, 17(1): 41-42
- [22] 刘秀英.血清血脂四项变化与 2 型糖尿病的关系[J].内蒙古中医药,2014,33(4):80-81
LIU Xiu-ying. Relationship between four changes of serum lipid and type 2 diabetes mellitus [J]. Meimenggu Traditional Chinese Medicine, 2014, 33(4): 80-81
- [23] 张健,俞敏.二甲双胍对糖尿病患者血脂的影响[J].深圳中西医结合杂志,2015,25(1):21-22
ZHANG Jian, YU Min. Effect of metformin on blood lipid in diabetic patients [J]. Shenzhen Journal of Integrated Chinese and Western Medicine, 2015, 25(1): 21-22
- [24] 刘忆梅,陈朝晖.大豆蛋白肽降血脂功能性的研究[J].大豆通报,2004,3:22
LIU Yi-mei, CHEN Zhao-hui. Study on lipid lowering function of soybean protein peptide [J]. Soybean Bulletin, 2004, 3: 22
- [25] 吴沁璇.六味地黄汤水提醇溶部位对 2 型糖尿病模型大鼠肝脏 PI3K/AKT 信号通路的影响[D].长沙:湖南中医药大学, 2015
WU Qin-xuan. Effect of water extract and alcohol soluble fraction of Liuwei dihuang decoction on PI3K/Akt signaling pathway in liver of type 2 diabetic rats [D]. Changsha: Hunan University of traditional Chinese Medicine, 2015.
- [26] 刘博,于春江,孟祥宝,等.芪蛭降糖胶囊对 2 型糖尿病大鼠肝组织中 InsR,PI3K,GLUT2,p-JNK 蛋白表达的影响[J].中国中药杂志,2016,11:1978-1982
LIU Bo, YU Chun-jiang, MENG Xiang-bao, et al. Effect of Qulu-Jiangtang Capsule on the expression of InsR, PI3K, GLUT2, p-JNK proteins in liver tissues of type 2 diabetic rats [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 11: 1978-1982
- [27] Mora A, Lipina C, Tronche F, et al. Deficiency of PDK1 in liver results in glucose intolerance, impairment of insulin-regulated gene expression and liver failure [J]. Biochemical Journal, 2005, 385(3): 639-648
- [28] 刘仕琦,李冀,王艳.七味白术散对糖尿病小鼠肝脏组织 PI3K-Akt 信号通路的调节作用[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(20): 153-160
LIU Shi-qi, LI Ji, WANG Yan. Regulatory effect of Qiwei Baizhusan on liver tissue insulin PI3K/AKT signal pathway in diabetic mice [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2020, 26(20): 153-160
- [29] 冯璐,孙志梅,陈雅静,等.Foxo1 与肝糖代谢的研究现状[J].中国临床药理学杂志,2019,35(19):2468-2475
FENG Lu, SUN Zhi-mei, CHEN Ya-jing, et al. Research status of Foxo1 and liver glucose metabolism [J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2019, 35(19): 2468-2475
- [30] 张敏佳,刘文颖,贾福怀,等.豌豆肽对环磷酰胺致免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J].食品与发酵工业,2018,44(8):135-140
ZHANG Min-jia, LIU Wen-fu, JIA Fu-lin, et al. Effect of pea peptide on immune function in immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(8): 135-140

(上接第 78 页)

- [18] Naito Y, Hino K, Bono H, et al. CRISPR direct: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites [J]. Bioinformatics, 2015, 31(7): 1120-1123
- [19] Tettelin H, Carbone M L A, Albermann K, et al. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VII [J]. Nature, 1997, 387(6632): 81-84
- [20] Eauclore S F, Zhang J, Rivera C G, et al. Combinatorial metabolic pathway assembly in the yeast genome with RNA-guided Cas9 [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43: 1001-1015
- [21] Yang P, Wu Y, Zheng Z, et al. CRISPR-Cas9 approach constructing cellulase *sestc*-engineered *Saccharomyces cerevisiae* for the production of orange peel ethanol [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2436
- [22] Diderich J A, Le Onie M Raamsdonk, Kruckeberg A L. Physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* from which hexokinase II has been deleted [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1587-1593