

熟小米醇溶蛋白改善糖尿病小鼠血糖代谢紊乱的分子机制

付永霞^{1,2}, 张凡³, 刘振宇⁴, 王晗², 郭尚¹, 沈群^{2*}

(¹山西农业大学 山西功能食品研究院 太原 030031

²中国农业大学食品科学与营养工程学院 国家粮食产业(青稞深加工)技术创新中心
植物蛋白与谷物加工北京市重点实验室 国家果蔬加工工程技术研究中心 北京 100083

³北京一轻研究院有限公司 北京 101111

⁴四川大学轻工科学与工程学院 成都 610065)

摘要 目的:基于肝脏转录组学分析熟小米醇溶蛋白改善糖代谢的分子机制。方法:采用转录组学技术检测熟小米干预后糖尿病小鼠肝脏基因的表达图谱变化。结果:与模型组小鼠相比,熟小米醇溶蛋白干预引起小鼠肝脏中 1758 个基因显著上调,198 个基因显著下调。表明熟小米醇溶蛋白的干预显著改变了糖尿病小鼠的肝脏基因表达谱。经 KEGG 功能注释分析,发现熟小米醇溶蛋白干预后改变的差异基因主要聚集在与脂质代谢和碳水化合物代谢相关的通路上。对差异基因进行 KEGG 通路富集分析,结果显示磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路是富集最显著的糖代谢相关信号通路,其中包含 27 个显著上调和 1 个显著下调的差异基因。本研究旨在阐明熟小米醇溶蛋白发挥降糖作用的分子机制,为开发针对糖尿病或者血糖异常人群的功能食品提供基础数据。

关键词 小米; 醇溶蛋白; 转录组学; 差异基因; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路

文章编号 1009-7848(2024)07-0147-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.07.015

近年来,随着糖尿病患者数量不断增加,糖尿病已成为全球公共卫生的主要问题之一。目前糖尿病分为 1 型糖尿病、2 型糖尿病、妊娠型糖尿病以及其它类型糖尿病,其中 2 型糖尿病占比最高,占糖尿病总人数高达 95% 以上,主要表现为血糖浓度升高和胰岛素抵抗^[1-2]。饮食干预可以有效预防或缓解糖尿病的发展进程。Tuomilehto 等^[3]证实改变生活方式,比如通过饮食干预和加强锻炼可以降低糖尿病的风险。Norris 等^[4]发现通过增加糖耐量受损患者日常的蔬菜摄入,降低其酒精和单糖摄入量,同时超重人群通过控制体重,可以将糖尿病的风险率降低 31%~46%。此外,Ris eru 等^[5]发现用不饱和脂肪酸替换饮食中的饱和脂肪和反式脂肪酸后,可以提高机体胰岛素敏感性,有助于降低罹患 2 型糖尿病的风险。Esposito 等^[6]则发现食用全谷物、水果、蔬菜等食物有助于降低患糖尿病的风险。

小米是一种禾本科、狗尾草属植物,目前主要

种植在亚洲和非洲的干旱和半干旱地区,是世界上产量最高的谷物之一,在世界粟米产量中排名第二^[7-8]。全小米干预可以有效改善糖耐量受损患者的血糖代谢,尤其是餐后葡萄糖,且 20%~48% 添加量的小米饲料均可以显著缓解高脂膳食联合链脲佐菌素(Streptozocin,STZ)引起的糖尿病大鼠糖代谢异常^[9-10],这与小米中淀粉、蛋白质、酚类物质等营养成分的功能密不可分^[11-13]。考虑到小米通常在蒸煮后食用,本团队前期研究以熟小米醇溶蛋白(Prolamin from cooked foxtail millet,PCFM)为研究对象,发现 PCFM 干预显著调节了糖尿病小鼠的糖代谢相关指标的异常,比如空腹血糖、胰岛素、葡萄糖耐量等,进而改善糖尿病引起的血糖代谢失调。PCFM 干预改变了糖尿病小鼠的肠道菌群组成并缓解了血清代谢物水平紊乱,这有助于其对血糖代谢的调节作用^[14]。此外,PCFM 干预能够减少肝脏中甘油三酯(Triglyceride,TG)水平,缓解肝功能受损;还可能通过肝脏来调节糖尿病小鼠的血糖代谢异常。因此,有必要从肝脏基因表达水平变化这一角度来分析 PCFM 作用于糖尿病小鼠的分子机制。

转录组测序主要用于识别经干预处理后基因

收稿日期: 2023-07-26

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-07-13.5)

第一作者: 付永霞,女,博士,助理研究员

通信作者: 沈群 E-mail: shenqun@cau.edu.cn

表达量的改变,即信使核糖核酸(mRNA)的表达水平的变化^[15-16]。转录组测序是一种可以快速且全面获取物种中特定的细胞或组织在某一生理状态下的几乎所有转录本和基因序列的手段,在糖尿病及其并发症等复杂疾病的诊断和干预中发挥了重要的作用^[17-18]。本文的研究内容是在PCFM干预结束后,收集小鼠肝脏进行转录组测序,利用二代测序平台研究PCFM对肝脏基因表达水平的影响,以筛选出在PCFM干预下发生变化的差异表达基因,同时对所有差异表达基因进行KEGG富集分析,找出关键信号通路以及差异表达基因,为进一步研究PCFM改善糖尿病小鼠血糖代谢的潜在分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小米(名称:东方亮),山西东方亮科技股份有限公司;SPF级雄性C57BL/6J小鼠,4周龄,(18±2)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供;高脂饲料(D12492)、低脂饲料(D12450J),美国Research Diets公司;STZ,美国Sigma Aldrich公司;TRIzol试剂,美国英杰生命技术有限公司;TruSeq™ RNA样品制备试剂盒,美国Illumina公司;脱氧核糖核酸酶I(DNase I),日本TaKaRa公司;SuperScript™ 双链cDNA合成试剂盒,美国英杰生命技术有限公司。

1.2 仪器与设备

NanoDrop2000超微量紫外/可见分光光度计、TBS-380微型荧光计,赛默飞世尔科技公司;2100型生物分析仪,安捷伦科技有限公司;NovaSeq 6000型测序系统,美国Illumina公司。

1.3 试验方法

1.3.1 熟小米醇溶蛋白的制备 用磨粉机将小米研磨成粉,过60目筛,加入一定比例的正己烷($M/V=1:5$),并于37℃水浴搅拌4h,在25℃下静置30~60min,舍弃上层的正己烷,收集脱脂小米粉,通风干燥以去除残留的正己烷,所得小米粉即为生小米粉。随后,将生小米粉与蒸馏水混合($M/V=1:5$),沸水浴10min,待冷却后以10000 r/min的转速离心10min并收集沉淀^[19]。将获得的沉淀物在鼓风干燥箱中干燥(43℃,24h)可以得到熟小

米粉。将熟小米粉以1:7(M/V)的比例分散在70%乙醇中,在37℃下水浴振荡2h后,以8000 r/min的转速离心15min后收集上清液。然后,对上清液进行透析。透析结束后,将透析液离心(7000 r/min,5min)得到沉淀。最后,将沉淀物冷冻干燥即可获得熟小米醇溶蛋白,蛋白质含量为85%^[19]。

1.3.2 动物实验 动物实验得到了中国农业大学动物伦理委员会的批准,伦理审查编号为AW01089102-4。所有小鼠均适应性培养1周,根据体质量随机选取8只小鼠分配到正常组(Con)并喂以标准饲料(D12450J)。其它小鼠被喂食高脂肪饮食(HFD,D12492)。所有小鼠都在固定环境条件中喂养,温度(22±1)℃,湿度(60±10)%,光照/黑暗循环为12h/12h,饮食和水可以自由输入。喂食HFD4周后,在第5周腹腔注射90mg/kg体质量的STZ诱导糖尿病模型^[20]。同时,对Con组所有小鼠腹腔注射等剂量的柠檬酸缓冲液。1周后测量所有小鼠的空腹血糖。首先将小鼠禁食6h,然后剪尾采血,使用血糖仪检测空腹血糖水平。从HFD组选择空腹血糖大于11.1mmol/L的小鼠,即为糖尿病小鼠^[21-22]。将筛选得到的糖尿病小鼠随机分为模型组(T2DM,生理盐水, $n=8$)和PCFM组(熟小米醇溶蛋白,200mg/kg体质量, $n=8$),正常组小鼠每天给予生理盐水。5周干预结束后,将小鼠禁食6h。然后将小鼠处死并解剖,用镊子收集肝脏样本用于转录组学分析。

1.4 RNA抽提

使用TRIzol法从肝脏组织样本中提取总RNA,在1%的琼脂糖凝胶上检查并确认RNA的降解和污染情况,并分别用2100生物分析仪和ND-2000超微量分光光度计评估提取得到的RNA样品的纯度,保证所获得的用于转录组测序的RNA样品符合以下条件: $OD_{260/280}=1.8\sim 2.2$, $OD_{260/230}\geq 2.0$, $RIN\geq 6.5$, $28S:18S\geq 1.0$,总量 $> 2\mu\text{g}$ 。

1.5 文库建立和测序

混合的RNA样品被用于RNA文库的构建和Illumina测序。RNA样品用DNase I处理,以降解除任何可能的DNA污染。然后通过使用oligo(dT)磁珠(用于真核生物)富集mRNA。首先mRNA与破碎缓冲液混合后被破碎成短的片段(约200

bp)。使用随机六聚体引物合成 cDNA 的第一链。然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA 聚合酶 I 来合成第 2 条链。双链的 cDNA 用磁珠纯化。然后进行末端重组和 3' 端单核苷酸 A (腺嘌呤) 添加。最后,测序适配器被连接到片段上,通过 PCR 扩增来富集这些片段,并筛选 200~300 bp 的条带。在质控步骤中,使用 TBS380 对样品库进行定量。文库产物由 Illumina HiSeq xten/NovaSeq 6000 进行测序并产生原始测序数据,测序读长为 PE 150。

1.6 转录组测序分析

经过过滤,原始测序数据被处理成高质量的数据,然后被映射到参考序列(<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/mm10/chromosomes/>)和/或参考基因集(<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/mm10/bigZips/>)。这一过程生成了用于后续转录本组装、表达量计算等目的的 mapped data (reads)。同时,对转录组测序的比对结果进行了质量评估。基因和转录本表达水平的定量分析是通过 RSEM 软件进行量化,并使用 FPKM 方法进行归一化处理。随后使用 edgeR 软件包(<http://www.r-project.org/>)识别不同样本的差异表达基因。当 1 个基因同时满足 $P < 0.05$ 和 \log_2FC (差异倍数) ≥ 2 时,则视为该基因为差异表达基因。基于 KEGG 通路数据库对差异基因进行富集分析。当通路显著性 P 值小于 0.05,则可以认为是在差异表达基因中显著富集的 KEGG 通路。

1.7 数据分析

图表采用 Graphpad 8.0 进行绘制。 T 检验 (Student's t test) 用于计算组间差异显著性,若 $P < 0.05$,则认为两组间存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 转录组测序数据与比对分析

前期研究发现,PCFM 能显著改善高脂膳食联合 STZ 诱导的糖尿病小鼠的血糖代谢异常。此外,PCFM 干预还显著降低了糖尿病小鼠的肝脏 TG 水平,并通过降低 AST 和 ALT 水平 ($P < 0.01$) 改善了肝功能,这提示本研究 PCFM 的降糖作用可能与其对肝脏功能的改善有关^[1]。为进一步深入研究 PCFM 如何通过作用于肝脏进而发挥改善糖代谢的作用,对 Con 组、T2DM 组和 PCFM 组小鼠的肝脏进行转录组测序分析。相比于参考基因组,转录组测序共得到 402 249 166 个 reads,经质控后,低质量的测序目数被去除,Con、T2DM 以及 PCFM 组分别得到 135 808 100,128 956 366,137 484 700 个高质量的 reads (表 1)。另外,Q20 和 Q30 分别表示测序质量高于 99.0% 和 99.9% 的碱基在总碱基中所占的百分比。通常情况下,当 Q20 超过 85%,且 Q30 超过 80% 时,即可满足测序质量的要求。根据表 1 显示,本研究所得的转录组测序序列的 Q20 和 Q30 均达到了高质量测序的标准。此外,在高质量 reads 中,所有样品的唯一比对率均超过 74%,表明本测序结果可信。

表 1 样本测序质量和序列比对

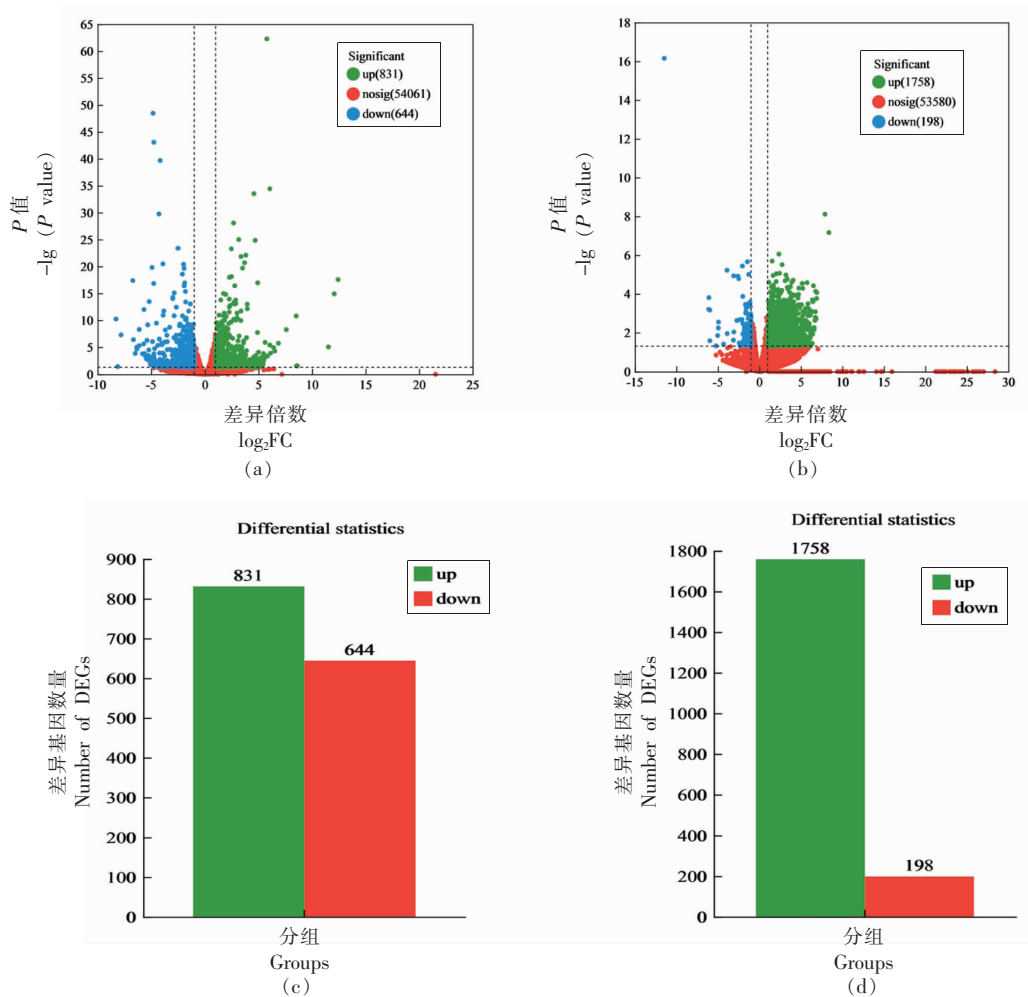
Table 1 Sample sequencing quality and sequence mapping

样本	总 reads 数	高质量 reads	Q20/%	Q30/%	GC 含量/ %	比对到参考基因组唯 一位置的 reads	比对率/%
T2DM-1	40 783 226	40 783 226	98.23	94.83	48.72	33 879 456	83.07
T2DM-2	41 948 394	41 948 394	98.25	94.84	48.03	33 420 443	79.67
T2DM-3	43 490 760	43 490 760	98.19	94.82	47.81	32 273 775	74.21
Con-1	45 210 894	45 210 894	98.30	95.03	47.35	33 705 763	74.55
Con-2	47 994 830	47 994 830	98.20	94.75	45.93	35 996 133	75.00
Con-3	40 610 316	40 610 316	98.39	95.30	48.06	32 135 488	79.13
PCFM-1	43 970 132	43 970 132	98.26	94.87	46.34	32 265 549	73.38
PCFM-2	42 362 072	42 362 072	98.29	94.84	47.50	34 225 693	80.79
PCFM-3	47 270 274	47 270 274	98.29	94.94	49.21	39 773 493	84.14

2.2 差异表达基因分析

基于 $P < 0.05$ 和 \log_2FC (差异倍数) ≥ 2 对 3 组间的差异表达基因进行筛选,结果如图 1 所示。与正常组小鼠相比,糖尿病引起了小鼠肝脏中共计 1 475 个基因的变化,包括 831 个基因的显著

上调,以及 644 个基因的显著下调。PCFM 干预后,糖尿病小鼠肝脏中的基因也出现了显著上、下调。其中,与 T2DM 组相比,PCFM 组中共计 1 758 个基因出现显著上调,198 个基因显示出显著下调,合计 1 956 个基因。



注:图 a, c 为 Con vs. T2DM;图 b, d 为 T2DM vs. PCFM。

图 1 不同组别的差异表达基因分析

Fig.1 Differentially expressed genes

2.3 PCFM 对肝脏基因生物学过程的影响

进一步利用 KEGG 数据库对 T2DM 和 PCFM 组之间的差异表达基因进行功能注释分析,明确组间差异表达基因的基本功能,结果如图 2 所示。研究发现,在经过 PCFM 干预后导致表达量变化的基因中,有 61 个差异基因富集于与脂质代谢相关的通路,40 个差异基因富集于与碳水化合物代谢相关的通路。基于此,进一步明确 PCFM 改善糖

尿病小鼠血糖代谢的功能,与肝脏中脂质代谢和碳水化合物代谢的差异基因调控之间,存在显著相关性。

2.4 KEGG 富集分析

通过 KEGG 功能富集分析可以获得该基因集中的基因/转录本主要参与的代谢通路。T2DM 和 PCFM 组之间的差异表达基因所富集的信号通路,如图 3 所示。选取 20 条信号通路为基准,可以

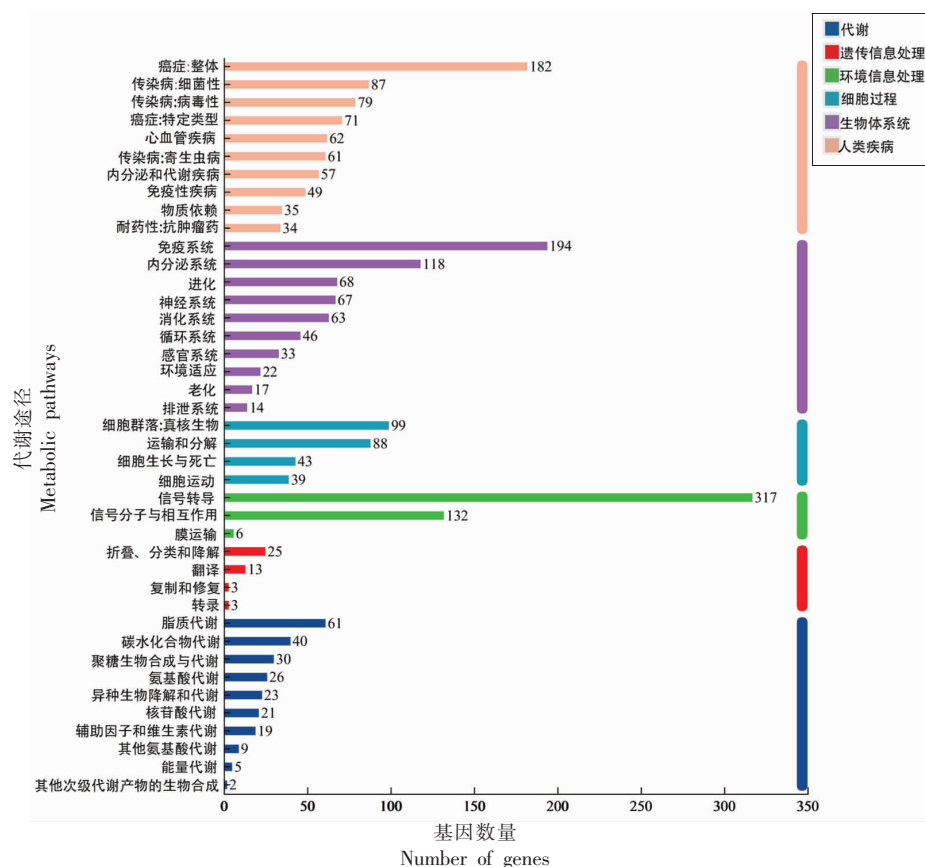


图 2 KEGG 通路的功能注释分析

Fig.2 Analysis of functional annotation of KEGG pathways

看到表达量差异基因参与了多种不同疾病的调控,其中包括与糖代谢相关的信号通路,如 PI3K/AKT 信号通路。PCFM 处理后富集在 PI3K-AKT 信号通路上的差异表达基因,如表 2 所示,包括 cAMP 反应元件结合蛋白 3 类似物 1(*Creb3l1*)、兔 I 型胶原蛋白 $\alpha 2$ (*Col1a2*)、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 delta(*Pik3cd*)、VI 型胶原蛋白基因 $\alpha 1$ (*Col6a1*)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 3(*Akt3*)、IV 型胶原蛋白基因 $\alpha 1$ (*Col4a1*)、血清/糖皮质激素调节激酶 1(*Sgk1*)、内皮一氧化氮合成酶 3(*Nos3*)、白细胞介素-7(*Il-7*)、热休克蛋白 90 β 1(*Hsp90b1*)、免疫球蛋白 G1(*Ighg1*)、整合素 $\alpha 8$ (*Iga8*)、血小板源性生长因子受体 α (*Pdgfra*)、血管性血友病因子(*Vwf*)、血小板衍生长因子受体 β (*Pdgfrb*)、表皮生长因子(*Egf*)、VI 型胶原 A3(*Col6a3*)、碱性成纤维细胞生长因子(*Fgf2*)、成纤维细胞生长因子受体 1(*Fgfr1*)、免疫球蛋白 G2b(*Ighg2b*)、肿瘤抑制素 M 受体(*Osmr*)、VI 型胶原蛋

白 $\alpha 5$ (*Col6a5*)、免疫球蛋白重常数 $\gamma 2c$ (*Ighg2c*)、层粘连蛋白 A5(*Lama5*)、层粘连蛋白 $\beta 2$ (*Lamb2*)、VI 型胶原蛋白 $\alpha 2$ (*Col6a2*)、 $\alpha 1$ -I 型胶原(*Col1a1*)、小鼠催乳素 3b1(*Prl3b1*)、白细胞介素-7 受体(*Il7r*)和层粘连蛋白 $\gamma 1$ (*Lamc1*)。

基于以上筛选得到的差异表达基因,进一步对其中富集于 PI3K-AKT 信号通路的差异基因可能参与的蛋白翻译进行分析,结果如图 4 所示。差异表达基因被映射到 KEGG 途径上,其中黄色背景框中标注了参与整个 PI3K-AKT 信号通路的蛋白,而红色边框则表示相关蛋白的表达显著上调。其中,一个节点上的蛋白翻译可能由多个差异基因的表达所影响。作为胰岛素信号传导的主要途径,PI3K/AKT 信号通路在生物体的生长、葡萄糖平衡、脂质代谢、蛋白质合成、细胞增殖和存活等关键细胞过程中发挥重要作用^[23]。由图 5 可知,PCFM 干预处理后,位于 PI3K 上游的蛋白受体酪氨酸激酶(RTK)、Toll 样受体 2/4(TLR2/4)、B 细胞

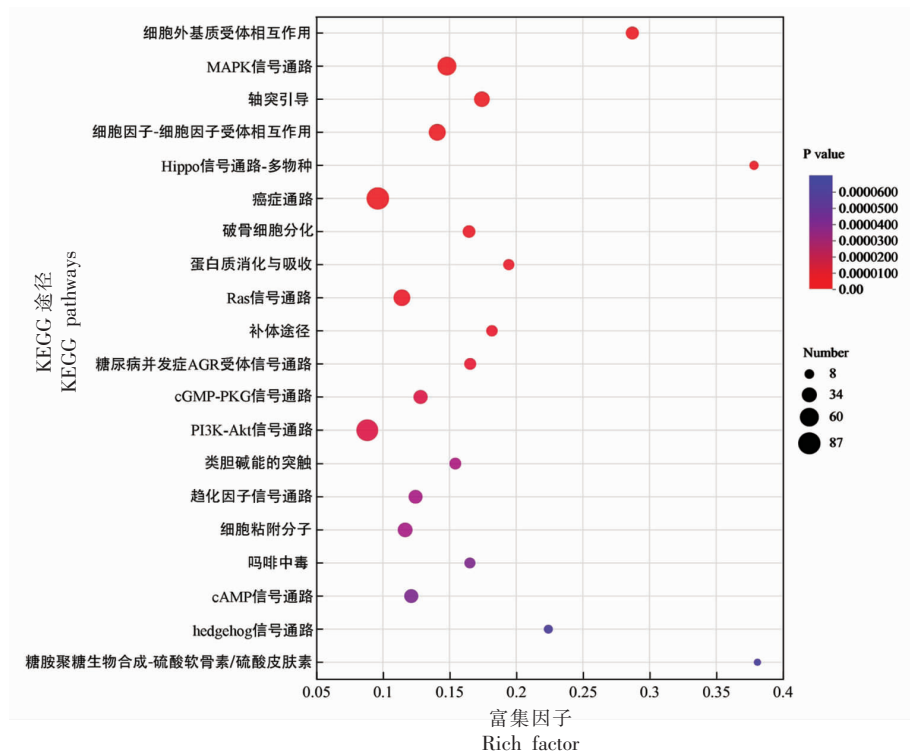


图 3 T2DM 和 PCFM 组间差异表达基因的 KEGG 通路富集分析

Fig.3 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes between T2DM and PCFM groups

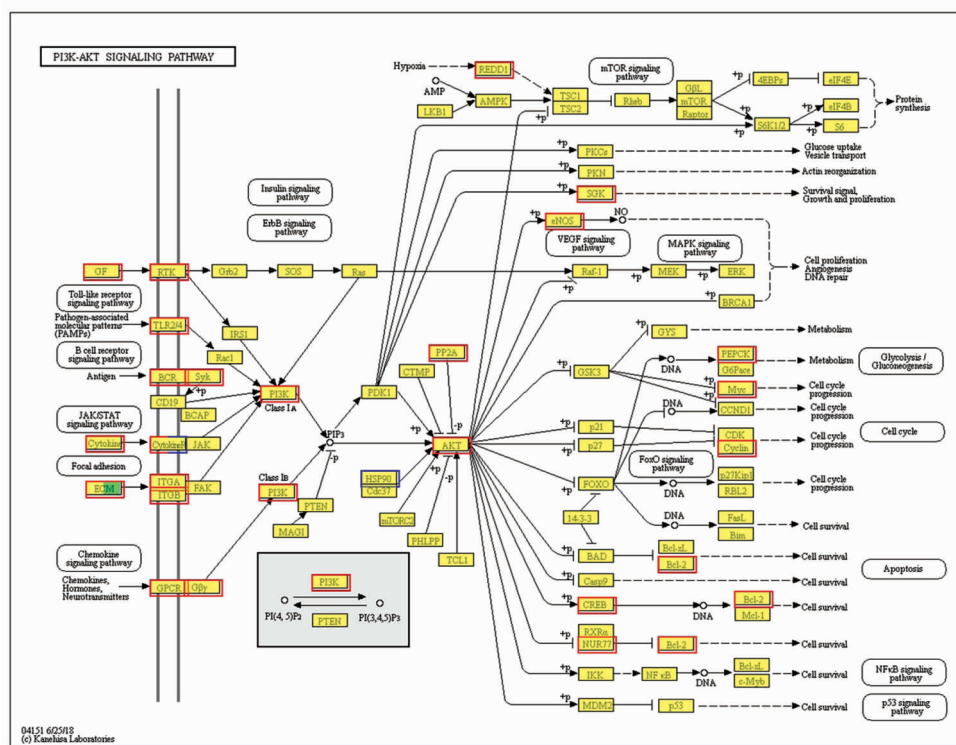
表 2 T2DM 和 PCFM 组间富集在 PI3K-AKT 信号通路上的差异表达基因

Table 2 Differentially expressed genes enriched in PI3K-AKT signaling pathway between T2DM and PCFM groups

基因名称	通路名称	基因描述	log ₂ (差异倍数)	调节
<i>Creb3l1</i>	PI3K/AKT 通路	cAMP 反应元件结合蛋白 3 类似物 1	2.367380856	上调
<i>Col1a2</i>	PI3K/AKT 通路	兔 I 型胶原蛋白 α2	3.570550479	上调
<i>Pik3cd</i>	PI3K/AKT 通路	磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 delta	2.009302536	上调
<i>Col6a1</i>	PI3K/AKT 通路	VI 型胶原蛋白基因 α1	3.090027268	上调
<i>Akt3</i>	PI3K/AKT 通路	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 3	3.409888566	上调
<i>Col4a1</i>	PI3K/AKT 通路	IV 型胶原蛋白基因 α1	2.31594339	上调
<i>Sgk1</i>	PI3K/AKT 通路	血清/糖皮质激素调节激酶 1	2.647934871	上调
<i>Nos3</i>	PI3K/AKT 通路	内皮一氧化氮合成酶 3	2.718304185	上调
<i>Il7</i>	PI3K/AKT 通路	白细胞介素-7	4.296773077	上调
<i>Hsp90b1</i>	PI3K/AKT 通路	热休克蛋白 90β1	-1.144817154	下调
<i>Ighg1</i>	PI3K/AKT 通路	免疫球蛋白 G1	4.780029321	上调
<i>Itga8</i>	PI3K/AKT 通路	整合素 α8	2.849114525	上调
<i>Pdgfra</i>	PI3K/AKT 通路	血小板源性生长因子受体 α	2.940168968	上调
<i>Vwf</i>	PI3K/AKT 通路	血管性血友病因子	3.000386023	上调
<i>Pdgfrb</i>	PI3K/AKT 通路	血小板衍生生长因子受体 β	2.747730107	上调
<i>Egf</i>	PI3K/AKT 通路	表皮生长因子	4.064238005	上调
<i>Col6a3</i>	PI3K/AKT 通路	VI 型胶原 A3	3.126275823	上调
<i>Fgf2</i>	PI3K/AKT 通路	碱性成纤维细胞生长因子	2.70614457	上调
<i>Fgfr1</i>	PI3K/AKT 通路	成纤维细胞生长因子受体 1	2.032017422	上调

(续表 2)

基因名称	通路名称	基因描述	log ₂ (差异倍数)	调节
<i>Ighg2b</i>	PI3K/AKT 通路	免疫球蛋白 G2b	3.496707571	上调
<i>Osmr</i>	PI3K/AKT 通路	肿瘤抑制素 M 受体	2.955433083	上调
<i>Col6a5</i>	PI3K/AKT 通路	VI型胶原蛋白 α5	6.166613349	上调
<i>Ighg2c</i>	PI3K/AKT 通路	免疫球蛋白重链常数 γ2c	2.777888421	上调
<i>Lama5</i>	PI3K/AKT 通路	层粘连蛋白 A5	2.700738883	上调
<i>Lamb2</i>	PI3K/AKT 通路	层粘连蛋白 β2	3.719672757	上调
<i>Col6a2</i>	PI3K/AKT 通路	VI型胶原蛋白 α2	3.623141572	上调
<i>Col1a1</i>	PI3K/AKT 通路	α1-I 型胶原	3.719737648	上调
<i>Prl3b1</i>	PI3K/AKT 通路	小鼠催乳素 3b1	6.520822277	上调
<i>Il7r</i>	PI3K/AKT 通路	白细胞介素-7 受体	4.296773077	上调
<i>Lamc1</i>	PI3K/AKT 通路	层粘连蛋白 γ1	2.283246885	上调



注:差异表达基因被映射到 KEGG 途径上;黄色背景框中标注了参与整个 PI3K-AKT 信号通路的蛋白;红色边框的节点代表差异基因显著上调了相关蛋白的表达。

图 4 PI3K-Akt 信号通路图

Fig.4 PI3K-AKT signaling pathway

受体(BCR)、脾脏酪氨酸激酶重组蛋白(SYK)、细胞因子 R(CytokineR)、整合素 α 和整合素 β(IT-GA/ITGB)以及细胞外基质(ECM)的 mRNA 表达水平均显著上调,导致 PI3K 亚基 IA 的 mRNA 表达水平也显著上调。同时,G 蛋白偶联受体(GPCR)和 G 蛋白 βγ 亚基(Gβγ)的 mRNA 表达水平上调,使得 PI3K 亚基 IB 的 mRNA 表达水平

显著上调。此外,PCFM 处理后热休克蛋白 90 (HSP90)的 mRNA 表达水平显著下调,而蛋白磷酸酶 2A(PP2A)的 mRNA 表达水平显著上调。研究表明,AKT 的氨基酸残基 229-239 与 HSP90 的中间结构域结合后,可调节细胞的生长和凋亡。因此,通过抑制 AKT 和 HSP90 的结合,可导致 AKT 的脱磷酸化,降低 AKT 激酶的活性,从而诱导细

胞凋亡^[24]。此外,被激活的 PP2A 可去磷酸化 AKT, 进而抑制 AKT 参与的信号转导通路^[25]。本研究显示,AKT 的 mRNA 表达水平显著上调,表明 PI3K 的作用显著强于 HSP90 和 PP2A。

3 讨论与结论

肝脏是糖代谢的中心,肝功能失调可能导致包括糖尿病在内的各种疾病^[26]。PCFM 的干预明显改变了糖尿病小鼠的肝脏基因表达谱。与未经干预的糖尿病小鼠相比,PCFM 处理组共引起了 1 956 个差异基因表达水平的变化,其中显著上调了 1 758 个基因,显著下调了 198 个基因。KEGG 通路富集分析发现上调的差异表达基因在 PI3K-AKT 信号通路上富集最为显著。PCFM 干预使得 PI3K-AKT 信号转导通路中 *Creb3l1*、*Col1a2*、*Pik3cd*、*Col6a1*、*Akt3*、*Col4a1*、*Sgk1*、*Nos3*、*Il7*、*Hsp90b1*、*Ighg1*、*Itga8*、*Pdgfra*、*Vwf*、*Pdgfrb*、*Egf*、*Col6a3*、*Fgf2*、*Fgfr1*、*Ighg2b*、*Osmr*、*Col6a5*、*Ighg2c*、*Lama5*、*Lamb2*、*Col6a2*、*Col1a1*、*Prl3b1*、*Il7r* 和 *Lamc1* 共 30 个差异表达基因的显著上调。*Pik3cd* 和 *Akt3* 的上调可能激活了 PI3K/AKT 信号通路。在 PI3K/AKT 通路的胰岛素信号传导过程中,PI3K 起着关键作用,它是一个异源二聚体,由 p85 和 p110 两个亚基构成^[27]。当 PI3K 与胰岛素受体在目标组织上结合,胰岛素受体底物 (Insulin receptor substrate, IRS) 在细胞膜上发生磷酸化,引起 IRS 与 PI3K 的 p85 亚基结合并形成结合产物,进一步激活 PI3K 的 p110 亚基。经过磷酸化后,PI3K 合成三磷酸磷脂酰肌醇 (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate, PIP3),然后 PIP3 将胰岛素信号传递给下游分子 AKT。作为糖尿病的治疗靶点,AKT2 在胰岛素作用的靶器官或组织中,如脂肪、骨骼肌和肝脏中表达较高。如果敲除小鼠的 *AKT2* 基因,会导致外周胰岛素抵抗,进而降低肌肉对葡萄糖的摄取利用能力,从而发展为 T2DM^[28-30]。此外,与郑淑娟等^[31]关于橄榄苦苷改善 db/db 小鼠糖尿病的肝脏转录组学结果一致,PCFM 干预也引起了 *Col1a2*、*Itga8*、*Col6a3*、*Ighg2b*、*Ighg2c*、*Col1a1* 以及 *Il7r* 基因的上调。*Hsp90b1* 与 AKT 的磷酸化与去磷酸化密切相关。未来仍需要进一步深入探究转录组学分析所获得的结果,揭示 PCFM 通过

PI3K-AKT 信号通路缓解 2 型糖尿病的分子机制。

参 考 文 献

- [1] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus[J]. *Diabetes Care*, 2014, 37(1): S81-S90.
- [2] BAENA-DIEZ J M, PENAFIEL J, SUBITANA I, et al. Risk of cause-specific death in individuals with diabetes: A competing risks analysis [J]. *Diabetes care*, 2016, 39(11): 1987-1995.
- [3] TUOMILEHTO J, LINDSTROM J, ERIKSSON J G, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2001, 344(18): 1343-1350.
- [4] NORRIS S L, ZHANG X P, AVENELL A, et al. Long-term nonpharmacological weight loss interventions for adults with prediabetes (Review)[J]. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2005, 2(2): CD005270.
- [5] RISERUS U, WILLETT W, HU F B. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes [J]. *Progress in Lipid Research*, 2009, 48(1): 44-51.
- [6] ESPOSITO K, CHIODINI P, MAIORINO M, et al. Which diet for prevention of type 2 diabetes? A meta-analysis of prospective studies [J]. *Endocrine*, 2014, 47(1): 107-116.
- [7] SALEH A, ZHANG Q, CHEN J, et al. Millet grains: Nutritional quality, processing, and potential health benefits [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2013, 12(3): 281-295.
- [8] RAVI S. Neglected millets that save the poor from starvation [J]. *Leisa India*, 2004, 6(1): 1-8.
- [9] REN X, YIN R Y, HOU D Z, et al. The glucose-lowering effect of foxtail millet in subjects with impaired glucose tolerance: A self-controlled clinical trial [J]. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1509.
- [10] REN X, WANG L, CHEN Z, et al. Foxtail millet improves blood glucose metabolism in diabetic rats through PI3K/AKT and NF-kappaB signaling pathways mediated by gut microbiota [J]. *Nutrients*, 2021, 13(6): 1837.
- [11] FU Y X, YIN R Y, LIU Z, Y et al. Hypoglycemic

- effect of prolamin from cooked foxtail millet (*Setaria italica*) on streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Nutrients*, 2020, 12: 3452.
- [12] FU Y X, YIN R Y, GUO E H, et al. Protein isolates from raw and cooked foxtail millet attenuates development of type 2 diabetes in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2021, 65(6): 2000365.
- [13] FU Y X, ZHANG F, LIU Z Y, et al. Improvement of diabetes-induced metabolic syndrome by millet prolamin is associated with changes in serum metabolomics[J]. *Food Bioscience*, 2021, 44: 101434.
- [14] YIN R Y, FU Y X, YOUSAF L, et al. Crude and refined millet bran oil alleviate lipid metabolism disorders, oxidative stress and affect the gut microbiota composition in high-fat diet-induced mice[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2021, 57(5): 2600–2610.
- [15] LI H L, SHI X D, JIANG H, et al. CMap analysis identifies atractyloside as a potential drug candidate for type 2 diabetes based on integration of metabolomics and transcriptomics[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(13): 7417–7426.
- [16] JIANG Y H, JIANG L Y, WANG Y C, et al. Quercetin attenuates atherosclerosis via modulating oxidized LDL-induced endothelial cellular senescence[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 512.
- [17] 刘雪梅, 刘德亮, 曾霖, 等. 基于转录组测序技术探讨活血降糖干预糖尿病肾病的机制[J]. *世界中医药*, 2021, 16(14): 2120–2128.
- LIU X M, LIU D L, ZENG L, et al. Mechanism of Huoxue Jiangtang drink in the intervention of diabetic nephropathy based on transcriptome sequencing technology[J]. *World Chinese Medicine*, 2021, 16(14): 2120–2128.
- [18] ZHU X A, QIU Z R, WEN O Y, et al. Hepatic transcriptome and proteome analyses provide new insights into the regulator mechanism of dietary avicularin in diabetic mice[J]. *Food Research International*, 2019, 125: 108570.
- [19] XIAO Y P, LIU Y, LAI Z H, et al. An integrated network pharmacology and transcriptomic method to explore the mechanism of the total Rhizoma Coptidis alkaloids in improving diabetic nephropathy[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 270: 113806.
- [20] 陈静. 小米主要营养成分快速检测模型建立及其降压功效研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- CHEN J. Study on rapid determination of main nutrition compositions and hypotensive effect of foxtail millet [D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [21] LI H, LI Y X, XIANG L W, et al. GDF11 attenuates development of type 2 diabetes via improvement of islet β -cells function and survival[J]. *Diabetes*, 2017, 66(7): 1914–1927.
- [22] YUAN Q C, ZHAN B Y, CHANG R, et al. Antidiabetic effect of casein glycomacropeptide hydrolysates on high-fat diet and STZ-induced diabetic mice via regulating insulin signaling in skeletal muscle and modulating gut microbiota[J]. *Nutrients*, 2020, 12(1): 220.
- [23] FRUMAN D, CHIU H, HOPKINS B, et al. The PI3K pathway in human disease[J]. *Cell*, 2017, 170(4): 605–635.
- [24] 干文娟, 冯一中, 李峰. 胰腺癌中 p-Akt, HSP90 的表达及其临床意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2011, 27(6): 598–602.
- GAN W J, FENG Y Z, LI F. Expression of p-Akt and HSP90 and their clinical significance in pancreatic carcinoma[J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2011, 27(6): 598–602.
- [25] 吴若兰, 张越, 俞润华, 等. 蛋白磷酸酶 2A 对机体能量代谢影响的研究进展[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2020, 40(11): 1530–1535.
- WU R L, ZHANG Y, YU R H, et al. Effect of protein phosphatase 2A on energy metabolism[J]. *Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Science)*, 2020, 40(11): 1530–1535.
- [26] LI J, LUO M, LUO Z, et al. Transcriptome profiling reveals the anti-diabetic molecular mechanism of *Cyclocarya paliurus* polysaccharides: Anti-diabetic molecular mechanism of *Cyclocarya paliurus* polysaccharides[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 55: 1–8.
- [27] GUO H F, GERMAN P, BAI S S, et al. The PI3K/AKT pathway and renal cell carcinoma[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2015, 42(7): 343–353.
- [28] FRANKE T, KAPLAN D, CANTLEY L, et al. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate[J]. *Science*,

- 1997, 275(5300): 665–668.
- [29] MORA A, KOMANDER D, VAN A, et al. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2004, 15(2): 161–170.
- [30] 姜立娟, 李玉国, 崔巍, 等. PI3K/Akt 信号通路参与中药防治 2 型糖尿病胰岛素抵抗的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(9): 5405–5408.
- JIANG L J, LI Y G, CUI W, et al. Research progress of traditional Chinese medicine improving insulin resistance of type 2 diabetes mellitus by PI3K/Akt signal pathway[J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2021, 36(9): 5405–5408.
- [31] 郑淑娟, 谢子鑫, 方靖靖, 等. 橄榄苦苷改善 db/db 小鼠糖尿病的肝脏转录组学及生物信息学分析[J]. *食品科学*, 2022, 43(16): 186–193.
- ZHENG S J, XIE Z X, FANG J J, et al. Hepatic transcriptomics and bioinformatics analysis of oleuropein alleviating diabetes in db/db mice[J]. *Food Science*, 2022, 43(16): 186–193.

Molecular Mechanism of Cooked Foxtail Millet Prolamin in Improving Glucose Metabolism Disorder in Diabetes Mice

Fu Yongxia^{1,2}, Zhang Fan³, Liu Zhenyu⁴, Wang Han², Guo Shang¹, Shen Qun^{2*}

(¹*Shanxi Institute for Functional Food, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031*

²*College of Food Science and Nutritional Engineering, National Center of Technology Innovation (Deep Processing of Highland Barley) in Food Industry, Key Laboratory of Plant Protein and Grain Processing, National Engineering Research Center for Fruit and Vegetable Processing, China Agricultural University, Beijing 100083*

³*Beijing Industrial Technology Research Institute Ltd., Beijing 101111*

⁴*College of Biomass Science & Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065*)

Abstract Previous studies have shown that prolamin from cooked foxtail millet (PCFM) can effectively improve glucose metabolism disturbances in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice. The current study aimed to investigate the molecular mechanism by which PCFM enhances glucose metabolism, focusing on liver transcriptomics. The results showed that, compared to the control group, the livers of mice treated with PCFM exhibited significant up-regulation of 1 758 differentially expressed genes and down-regulation of 198 genes. KEGG functional annotation analysis revealed that these genes were associated with pathways related to lipid and carbohydrate metabolism. Furthermore, the KEGG pathway enrichment analysis highlighted the phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway as the most significantly enriched pathway involved in glucose metabolism, with 27 genes up-regulated and one down-regulated after PCFM intervention. This study aims to elucidate the molecular mechanisms underlying the hypoglycemic effects of PCFM and provide a foundation for the development of functional foods targeting hypoglycemia.

Keywords foxtail millet; prolamin; transcriptome; differential gene; PI3K/AKT signaling pathway