· 基础研究 ·

参芪复方调控 GK 大鼠生物钟相关基因 Id2、Usp2 的实验研究

晁俊¹ 张翕宇² 刘桤³ 谢春光³

摘要 目的 采用基因芯片技术探索参芪复方减少 2 型糖尿病血糖波动的内在机制。方法 30 只自发性 2 型糖尿病 (GK) 大鼠适应性喂养 4 周后, 随机分为模型组、参芪复方组 (参芪组) 和西格列汀组 (西药组), 每组 10 只, 另设 10 只 Wistar 大鼠为正常组。参芪复方组给予参芪复方浸膏灌胃, 西药组给予西格列汀混悬液灌胃, 空白组、模型组给予生理盐水灌服, 连续给药 8 周。药物干预期间观察大鼠一般状态, 并根据体重变化及时调整灌胃量, 每周 1 次测 1 日内 8:00、10:00、14:00、16:00、18:00 5 个时间点的血糖情况, 计算每日血糖平均水平 (MBG)、每日平均血糖的标准差 (SDBG)、最大血糖波动幅度 (LAGE)。实验第 8 周处死大鼠, 采集血液标本, 采用放免法和 ELISA 法测定血清胰岛素 (INS)、胰高血糖素 (GC) 水平。应用基因芯片技术检测 DNA 结合抑制剂 2 (Id2) 及泛素特异性加工酶 2 (Usp2) 水平, 同时采用实时荧光 PCR 检测 Id2、Usp2 mRNA 表达水平。结果 造模期间, 各组 GK 大鼠随着周龄增长, 出现精神萎靡, 反应迟缓, 动作缓慢的现象, 参芪组能改善 GK 大鼠多食、多饮现象。与正常组比较, 模型组 INS 水平、Usp2 mRNA 表达水平降低, GC、MBG、SDBG、LABG 均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 西药组 INS 水平升高, GC 水平降低 ($P < 0.01$); 参芪组、西药组 Usp2 mRNA 表达升高, MBG、SDBG、LABG 及 Id2 mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。同时参芪组 GC、SDBG、LABG 水平高于西药组 ($P < 0.01$)。结论 参芪复方可能通过调节生物钟相关基因 Id2、Usp2 减少血糖波动。

关键词 参芪复方; DNA 结合抑制剂 2; 泛素特异性加工酶 2; 生物钟基因; 血糖波动

Experimental Study on Regulation of Circadian Clock-related Genes Id2 and Usp2 of GK Rats by Shenqi Compound CHAO Jun¹, ZHANG Xi-yu², LIU Ya³, and XIE Chun-guang³ 1 College of Greater Health and Intelligent Engineering, Chengdu Medical College, Chengdu (610500); 2 Clinical College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610075); 3 Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610075)

ABSTRACT Objective To explore the internal mechanism of Shenqi Compound to reduce blood glucose fluctuation of type 2 diabetes by gene chip technology. **Methods** Thirty spontaneous type 2 diabetes mellitus (GK) rats were randomly divided into model group, Shenqi Compound group (Shenqi group) and sitagliptin group with adaptive feeding for 4 weeks, 10 rats in each group. And another 10 Wistar rats were recruited as normal group. The Shenqi group was given the Shenqi compound extract, the sitagliptin group was given the sitagliptin suspension, and the blank group and the model group were given normal saline. All drugs were administered by gavage, and the course was 8 weeks. During the drug intervention, the general state of the rats was observed, and the amount of gavage was adjusted in time according to the weight change. Once a week, blood glucose was measured at 8:00, 10:00, 14:00, 16:00, and 18:00 in a day. At the same time, the

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81503566)

作者单位: 1. 成都医学院大健康与智能工程学院 (成都 610500); 2. 成都中医药大学临床医学院 (成都 610075); 3. 成都中医药大学附属医院内分泌科 (成都 610075)

通讯作者: 刘桤, Tel: 028-87765517, E-mail: liuyaya918@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.202108.29.243

average daily blood glucose level (MBG), the standard deviation of the average daily blood glucose (SDBG), and the maximum blood glucose fluctuation range (LAGE) were calculated. In the 8th week of the experiment, the rats were sacrificed and blood samples were collected. The levels of serum insulin (INS) and glucagon (GC) were measured by radioimmunoassay and ELISA. The gene chip technology was used to detect DNA binding inhibitor 2 (Id2) and ubiquitin-specific processing enzyme 2 (Usp2), and real-time fluorescent PCR was used to detect the expression levels of Id2 and Usp2 mRNA. **Results** During the modeling period, it could be seen that as the age of each group of GK rats increases, the rats showed signs of lethargy, slow response, and slow movement. However, the Shenqi group could improve the phenomenon of polyphagia and polydipsia of GK rats. Compared with the normal group, the expression levels of INS and Usp2 mRNA in the model group decreased, and the GC, MBG, SDBG, and LABG all increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the level of INS in the sitagliptin group increased, while the level of GC decreased ($P < 0.01$). The expression of Usp2 mRNA in the Shenqi group and the sitagliptin group increased, and the expression of MBG, SDBG, LABG and Id2 mRNA were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). At the same time, the levels of GC, SDBG and LABG in the Shenqi group were higher than those in the sitagliptin group ($P < 0.01$). **Conclusion** Shenqi Compound may reduce blood glucose fluctuations by regulating the circadian clock-related genes Id2 and Usp2.

KEYWORDS Shenqi Compound; DNA binding inhibitor 2; ubiquitin-specific peptidase 2; circadian clock-related genes; glucose fluctuation

2 型糖尿病 (type 2 diabetes, T2DM) 是复杂的代谢疾病, 由于遗传易感性和环境触发因素之间的相互作用而产生。最近研究发现, 轮班工作, 睡眠不足或社交时差导致的昼夜节律紊乱是与 T2DM 发展有关的环境触发因素^[1]。除了昼夜节律的环境破坏之外, 核心生物钟组分如 CLOCK 和 BMAL1 的基因突变还可以促进 T2DM 和 β 细胞衰竭的发展^[2]。DNA 结合抑制剂 2 (inhibitor of DNA binding 2, Id2) 是在许多成人组织中节律性表达的螺旋-环-螺旋转录阻遏物, 并在其 RNA 和蛋白质表达中显示昼夜节律^[3]。泛素特异性加工酶 2 (ubiquitin specific peptidase 2, Usp2) 是一种重要的去泛素化酶, 通过特异性识别靶蛋白, 使靶蛋白去泛素化并阻碍其降解, 以调控细胞内靶蛋白数量和活性, 从而参与细胞功能的调节, 研究发现 Usp2 参与了生物钟及昼夜节律的调控^[4]。参芪复方是谢春光教授临床治疗糖尿病及其并发症的有效经验方, 前期研究证明了其能减少血糖波动, 平稳降糖, 改善胰岛素抵抗、抑制胰岛 β 细胞凋亡、保护胰岛功能^[5,6]。本研究运用基因芯片技术进一步探索参芪复方在减少 T2DM 血糖波动的内在机制, 发现其与生物钟相关基因 Id2、Usp2 的相关性。

材料与方

1 动物 自发性 2 型糖尿病 GK 大鼠 30 只, 体重 300~320 g, SPF 级, 雄性, 5 月龄, 由上海

斯莱克实验动物有限责任公司 (中国科学院上海实验动物中心) 提供, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2012-0002。Wistar 大鼠 10 只, 体重 240~260g, SPF 级, 雄性, 5 月龄, 由成都达硕实验动物有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (川) 2015-030。本研究经成都中医药大学附属医院伦理审核, 审批号: CAP2012004287。

2 饲养环境及饲料 动物饲养于四川省中医药科学院实验动物中心, 饲养环境温度为 22~23 °C, 湿度为 55%~60%。每天光照/黑暗时间为 12 h/12 h。普通饲料由四川省中医药科学院实验动物中心提供; 高脂饲料配方为: 普通饲料 88.2%, 精炼猪油 10%, 胆固醇 1.5%, 猪胆盐 0.3%, 由四川省中医药科学院实验动物中心加工。

3 药物 参芪复方药物组成 (成人 1 日剂量): 人参 15 g 黄芪 15 g 生地 10 g 天花粉 10 g 山茱萸 10 g 丹参 10 g 山药 10 g 制大黄 6 g; 参芪复方浸膏: 1 mL 浸膏含原生药 10 g, 由四川省中医药研究院中医研究所药剂科生产, 批号: 20161117; 磷酸西格列汀片 (100 mg/片, 默沙东公司生产, 生产批号: 150922), 灭菌乳钵中研成细末, 加入蒸馏水 30 mL 混匀制备混悬液。

4 主要试剂及仪器 大鼠胰岛素 (insulin, INS) ELISA 试剂盒, 大鼠胰高血糖素 (glucagon, GC) ELISA 试剂盒, 反转录试剂: ReverTraAce qPCR Kit (TOYOBO); 定量 PCR 试剂, Low Input Quick Amp

Labeling Kit, One-Color, 货号: p/n 5190-2305; RNA Spike-In Kit, One-Color, 货号: p/n 5188-5282; Gene Expression Hybridization Kit, 货号: p/n 5188-5242; Gene Expression Wash Buffer Kit, 货号: p/n 5188-5327。强生稳豪倍易型血糖仪(美国强生公司); RM2245 型全自动切片机(德国 Leica Microsystems Nussloch GmbH 公司); BMJ-A 型病理组织包埋冷冻台(常州市中威电子仪器有限公司); 安捷伦微阵列扫描仪(货号: p/n G2565BA or G2565CA)、不锈钢杂交室(货号: p/n G2534A)、分子杂交炉(货号: p/n G2545A)、安捷伦微阵列杂交室用杂交炉旋转器(货号: p/n G2530-60029)、无核酸酶微量液管(1.5mL, 货号: p/n MCT-150-C)均购自安捷伦科技有限公司; 磁性搅拌棒($\times 2$, 货号: p/n 401435)、磁性搅拌板($\times 2$, 货号: p/n 6795-410)购自康宁公司; 微型离心机, 货号: p/n Pico17(赛默飞世尔科技有限公司); 定量 PCR 仪, 型号(ABI)。

5 造模及干预方法 30 只 GK 大鼠适应性喂养 4 周后, 测 2 次随机血糖 ≥ 11.1 mmol/L 纳入本实验, 使用安全随机法将 30 只大鼠分为模型组、参芪复方组(参芪组)和西格列汀组(西药组), 每组 10 只, 另设 10 只 Wistar 大鼠为正常组, 共 4 组。正常组给予普通饲料, 模型组、参芪复方组、西格列汀组(西药组), 均每日给予高脂饲料, 连续 4 周, 每日最大血糖波动幅度(largest amplitude of glycemic excursions, LAGE) >4.4 mmol/L 为成功建立 2 型糖尿病大鼠血糖波动模型^[7], 建模成功率 100%。进入正式实验后, 连续给药 8 周, 正常组、模型组均按 5 mL/(kg·d) 灌服生理盐水; 参芪组按 1.44 g/(kg·d) 灌服参芪复方浸膏; 西药组按 16 mg/(kg·d) 灌服西格列汀片混悬液, 大鼠的日服剂量均为成人 10 倍。每周定时测小鼠体重, 并根据体重变化及时调整灌胃量。

6 检测指标及方法

6.1 一般情况 观察每日各组大鼠的皮毛色泽、精神状态、饮水、摄食、体重状态等基本情况观察。

6.2 血糖情况检测 使用取血针进行大鼠尾静脉针刺采用, 用血糖仪测试。正常 Wistar 大鼠在最后处死时测定 1 次血糖即可; GK 大鼠: 预饲养 4 周, 从第 2 周开始, 每周测定 1 次血糖; 开始用药后的 8 周, 每周测定 1 日内 8:00、10:00、14:00、16:00、18:00 5 个时间点的血糖情况。根据 5 点血糖值, 计算平均血糖水平(mean blood glucose, MBG)、平均血糖的标准差(standard deviation of

blood glucose, SDBG)、LAGE 来表示血糖波动情况^[8,9]。MBG 为所有为 5 个时间点血糖的平均值, SDBG 为 5 次血糖的标准差, LAGE 为日内最高和最低血糖值之差。

6.3 血清胰岛素及血清胰高血糖素检测 给药 8 周后, 禁食不禁水 8 h, 麻醉剂为 10% 水合氯醛, 根据大鼠体重, 按 0.35 g/kg 标准腹腔注射麻醉。暴露腹主动脉, 插入一次性无菌头皮针, 每只大鼠采血 8~10 mL, 血液标本每 10 只为一组, 以 3 500 r/min 离心 15 min, 分离血清, 取上清液, 放置于 -20 °C 冰箱保存, 采用放免法和 ELISA 法测定血清 INS、GC。

6.4 Id2、Usp2 基因芯片检测 处死动物后, 迅速剪开胸腹腔, 取胰腺组织, 标记后投入液氮中, 置于 -80 °C 的低温保存, 用于基因芯片检测。芯片检测组包括正常组、模型组、参芪组、西药组, 每组有 3 个样本的生物学重复。基因芯片名称为 Agilent 小鼠全基因 4*44K 芯片(design ID: BH170048), 由上海伯豪生物技术有限公司提供。芯片制备过程: 采用 Invitrogen 的 Trizol 进行总 RNA 的提取, 使用 QIAGEN RNeasyKit 纯化总 RNA, 荧光标记, 芯片杂交, 芯片洗涤和扫描。将芯片数据扫描后进行归一化处理并进行 t 检验以筛选差异基因, 以扫面值变异倍数(fold change, FC)进行差异基因的上调和下调的判断。FC >2 表示基因表达上调, FC 值越大说明基因上调越明显; FC <1 为基因表达下调, FC 值越小说明基因下调越明显。

6.5 Id2、Usp2 实时荧光定量 PCR 检测 实时荧光定量 PCR 的基本原理就是样本核酸扩增呈指数增长, 在反应体系和条件完全一致的情况下, 样本 DNA 含量与扩增产物的对数成正比, 由于反应体系中的荧光染料或荧光标记物(荧光探针)与扩增产物结合发光, 其荧光量与扩增产物量成正比, 由此通过荧光量的检测就可以测定样本核酸量。引物由甲方采用 Primer Express 3.0.1 软件设计, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。其中 Id2 引物名称为 A_43_P11685-F、A_43_P11685-R, 序列为 5'-GAGCTTATGTGCAATGACAGCAA-3'、5'-AAGGAAAAAGTCCCCAAATGC-3'。Usp2 引物名称为 A_44_P407259-F、A_44_P407259-R, 引物序列为 5'-ACGAACCAGCAAGCTCACAA-3'、5'-CAAA TTCTCTCAAGTCCAGGTCTCT-3'。

7 统计学方法 对数据采用 SPSS 20.0 进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合参数检验者, 采用单因素分差分析, 不符合者, 采用非参数检验方

法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 动物一般情况 GK 大鼠躯干部分浅棕黄色, 头部、四肢白色, Wistar 大鼠毛色较白且更有光泽。适应性饲养 4 周, GK 大鼠精神状态较好, 皮毛光亮, 反应敏捷。造模开始, 与正常组比较, GK 大鼠饮水量偏多, 摄食量偏少, 体重偏低。各组 GK 大鼠, 随周龄增长, 出现精神萎靡, 反应迟缓, 动作缓慢的现象。

实验过程中有个别大鼠的尾尖部有坏死现象, 坏死部位会自动脱落, 考虑由于测血糖次数过多引起。模型组大鼠在实验第 7 周 (第 44 天) 死亡 1 只, 死亡解剖后, 发现有肝脓肿表现, 可能是由于感染引起的肝脓肿导致死亡。

2 各组大鼠 INS、GC 水平比较 (表 1) 与正常组比较, 模型组 INS 水平降低, GC 水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 西药组 INS 水平升高, GC 水平降低 ($P < 0.01$), 参芪组虽然 INS 水平升高, GC 水平降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。同时参芪组 GC 水平高于西药组 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠 INS、GC 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	INS (ng/mL)	GC (pg/mL)
正常	10	0.54 ± 0.10	175.42 ± 33.60
模型	9	0.34 ± 0.13*	567.93 ± 76.75*
参芪	10	0.44 ± 0.09	500.26 ± 77.80 [△]
西药	10	0.50 ± 0.10 [△]	379.13 ± 93.97 [△]

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.01$; 与西药组比较, [▲] $P < 0.01$

3 各组大鼠血糖波动比较 (表 2, 3) 与正常组比较, 模型组大鼠血糖水平平均升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 参芪组及西药组灌胃 4、8 周末血糖水平降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与西药组比较, 在灌胃 8 周末参芪组血糖更高 ($P < 0.05$)。

与正常组比较, 模型组的 MBG、SDBG、LABG 均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 参芪组、西药组 MBG、SDBG、LABG 均明显降低 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠血糖波动比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	灌胃前	灌胃 4 周末	灌胃 8 周末
正常	10	5.5 ± 1.0	5.5 ± 1.0	6.1 ± 1.2
模型	9	23.1 ± 5.2*	23.7 ± 3.5*	24.7 ± 2.7*
参芪	10	21.8 ± 2.2	19.7 ± 3.8 [△]	20.7 ± 3.1 ^{△△▲}
西药	10	20.9 ± 2.8	19.5 ± 3.6 ^{△△}	18.6 ± 1.0 ^{△△}

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与西药组比较, [▲] $P < 0.05$

表 3 各组大鼠 MBG、SDBG、LAGE 水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	MBG	SDBG	LAGE
正常	10	5.07 ± 0.95	0.67 ± 0.45	1.87 ± 1.24
模型	9	21.47 ± 2.18*	2.62 ± 0.53*	7.35 ± 1.44*
参芪	10	18.77 ± 1.40 [△]	1.92 ± 0.80 ^{△▲}	5.22 ± 2.06 ^{△▲}
西药	10	17.68 ± 0.62 [△]	1.10 ± 0.33 [△]	3.05 ± 0.99 [△]

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.01$; 与西药组比较, [▲] $P < 0.01$

参芪组 SDBG、LABG 水平高于西药组 ($P < 0.01$)。

4 Id2、Usp2 基因芯片检测结果比较 (表 4) Id2 在模型组 - 正常组虽然上调, 但上调趋势不明显, 在参芪组 - 模型组、西药组 - 模型组均下调; Usp2 在模型组 - 正常组下调, 在参芪组 - 模型组、西药组 - 模型组均上调。

表 4 Id2、Usp2 的基因芯片结果 [P (FC)]

基因	模型组 / 正常组	参芪组 / 模型组	西药组 / 模型组
Id2	0.31 (1.33)	0.02 (0.37)	0.02 (0.38)
Usp2	0.07 (0.20)	0.02 (3.81)	0.14 (6.20)

注: FC 值 > 2 为上调, FC 值 < 1 为下调

5 Id2、Usp2 实时荧光定量 PCR 检测结果比较 (表 5、6) Id2 在模型组 - 正常组上调, 上调趋势不明显, 在参芪组 - 模型组、西药组 - 模型组均下调; Usp2 在模型组 - 正常组下调, 在参芪组 - 模型组、西药组 - 模型组均上调。与正常组比较, 模型组 Usp2 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 参芪组、西药组 Id2 mRNA 表达降低, Usp2 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。

表 5 Id2、Usp2 的定量 PCR 结果 [P (FC)]

基因	模型组 / 正常组	参芪组 / 模型组	西药组 / 模型组
Id2	0.33 (1.36)	0.01 (0.26)	0.04 (0.46)
Usp2	0.30 (0.18)	0.01 (5.29)	0.02 (11.34)

表 6 各组 Id2、Usp2mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Id2 mRNA	Usp2 mRNA
正常	10	0.1110 ± 0.0469	0.0371 ± 0.0149
模型	9	0.1510 ± 0.0418	0.0066 ± 0.0039*
参芪	10	0.0391 ± 0.0094 [△]	0.0351 ± 0.0111 [△]
西药	10	0.0697 ± 0.0199 [△]	0.0752 ± 0.0296 [△]

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$

讨 论

国际糖尿病联盟发布的《餐后血糖管理指南》^[10]明确指出血糖波动促进糖尿病慢性并发症的发生发展, 因此, 目前糖尿病的降糖治疗更注重“精细降糖, 平稳达标”。中医药具有整体调节机体内环境的独特

优势, 中医学“脾”的概念包括了现代医学脾脏和胰脏的功能, 即“脾胰同源”^[11]。中药通过健脾运脾, 恢复脾的散精之功, 达到调节血糖稳态的作用。参芪复方由以人参、黄芪为君药, 补益脾气, 臣以山药, 增强补脾之功, 并能补肾固精, 天花粉、生地、山茱萸共奏补肺肾阴精, 生津润燥, 佐以丹参、大黄活血祛瘀, 使血脉通畅。本实验在探索参芪复方减少血糖波动内在基因机制的过程中, 发现其在调控生物钟节律上发挥作用。

昼夜节律的周期约为 24 h, 几乎在所有生物体中都有表现, 下丘脑视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) 参与协调哺乳动物生理、代谢和行为的日常节律活动。最近的研究表明, 小鼠 SCN 中非神经元和神经元细胞的独特昼夜节律特性^[12]。昼夜节律计时系统由下丘脑视交叉上核中的中央大脑时钟和各种外周组织时钟组成。昼夜节律计时系统负责协调许多日常过程, 包括人体葡萄糖代谢的日常节律。中央时钟调节食物摄入、能量消耗和全身胰岛素敏感性, 这些动作由局部外围时钟进一步微调。具体而言, 时钟基因突变、暴露于人工光暗周期、睡眠不安、轮班工作和社交时差是可能导致昼夜节律紊乱的因素^[13]。稳定的昼夜节律组织对于胰岛 β 细胞特别重要, 在睡眠阶段抑制胰岛素产生和分泌以预防低血糖, 并在活动摄食阶段激活胰岛素的产生和分泌以避免高血糖^[14]。 β 细胞功能受到昼夜节律失调和睡眠限制的影响。葡萄糖耐量已被证明会受到昼夜节律、昼夜节律错位、严重睡眠限制、昼夜节律错位与睡眠限制的损害^[15]。

Id2 是在许多哺乳动物组织中节律性表达的螺旋-环-螺旋转录阻遏物。实验研究证明了 Id2 在小鼠昼夜节律系统的输入途径, 核心时钟功能和输出途径中的作用^[16,17]。Id2 基因缺失 (Id2^{-/-}) 小鼠表现出改变的摄食和运动节律, 如表现出自发活动水平较低, 喂养和运动活动时间延长, 雄性 Id2^{-/-} 小鼠表现出葡萄糖耐量、葡萄糖敏感性增强, 基础胰岛素水平较低和葡萄糖刺激的胰岛素分泌水平也较低, 雄性 Id2^{-/-} 小鼠的骨骼肌的葡萄糖摄取增加可能有助于胰岛素敏感性的升高^[18]。

泛素特异性蛋白酶 (ubiquitin specific proteases, USPs) 构成去泛素化酶的主要家族, 其作为多种生物过程的多功能调节剂, 包括细胞周期调控, 信号传导, 转录调节和线粒体动力学。其中 Usp2 有两种剪接变体, 即 Usp2A (Usp2-69) 和 Usp2B (Usp2-45)。Usp2A 在巨噬细胞中下调与代谢疾病相关的基

因, 提示 Usp2 在巨噬细胞中具有特定的抗糖尿病作用。在巨噬细胞中表达的 Usp2A 轻微显著地改善肥胖个体的胰岛素敏感性, 因此, 巨噬细胞中 Usp2A 具有作为 T2DM 治疗靶点的潜力^[19]。在动物实验中, Usp2 缺陷型小鼠在昼夜变化时对光更敏感, Usp2 与时钟蛋白复合物相关联, 并且稳定 BMAL1, BMAL1 通过其对 CLOCK/BMAL1 调节基因的转录作用调节对傍晚光照的敏感性^[20]。Usp2 与时钟蛋白和去泛素 PERIOD1 (PER1) 相关, 通过门控其核进入和积累来调节 PER1 功能, Usp2 缺失的小鼠在时钟功能上显示缺陷^[21]。经研究, Usp2 被鉴定为空腹诱导型和时钟调节型去泛素化酶。Usp2 刺激肝脏糖异生维持正常葡萄糖稳态。Usp2 通过诱导肝脏 11 β -羟类固醇脱氢酶 1 (hydroxysteroid dehydrogenase 1, HSD1) 表达和糖皮质激素信号传导来调节饮食诱导的肥胖症的全身葡萄糖耐量^[22]。

时钟基因作为昼夜节律基因的自动调节转录-翻译循环, 驱动每个细胞的昼夜节律, 对于生理需求至关重要^[23]。生物钟基因与糖尿病的相关性已被公认, 但这种联系的机制仍然需要进一步探索, 包括生物钟核心基因及其外周相关基因与胰岛 β 细胞功能, 胰岛素敏感性, 胰岛素抵抗之间的联系等。通过本研究可以推测, 参芪复方可能通过下调 Id2、上调 Usp2 基因表达水平调节昼夜节律, 以减少血糖波动, 为 T2DM 提供了新的治疗靶点。

利益冲突: 本文不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Reddy AB, O' Neill JS. Healthy clocks, healthy body, healthy mind[J]. Trends Cell Biol, 2010, 20(1): 36-44.
- [2] Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes[J]. Nature, 2010, 466 (7306): 627-631.
- [3] Mathew D, Zhou P, Pywell CM, et al. Ablation of the Id2 gene results in altered circadian feeding behavior, and sex-specific enhancement of insulin sensitivity and elevated glucose uptake in skeletal muscle and brown adipose tissue[J]. PLoS One, 2013, 8 (9): e73064.
- [4] 茅幸, 张志刚, 吴慧娟. 泛素特异性加工酶 2 的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2012, 32 (5):

- 400–405.
- [5] 殷丽平, 杜联, 谢春光, 等. 参芪复方对实验性 2 型糖尿病大血管病变胰岛素抵抗的干预作用 [J]. 成都中医药大学学报, 2010, 33 (3): 54–56.
- [6] 李辉, 谢春光, 朱天民. 参芪复方对 GK 大鼠胰岛 β 细胞凋亡和诱导型一氧化氮合酶表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19 (1): 166–167.
- [7] 中华医学会内分泌学分会. 糖尿病患者血糖波动管理专家共识 [J]. 药品评价, 2017, 14 (17): 5–8.
- [8] 周健, 贾伟平. 血糖波动的评估方法及研究进展 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2010, 26 (3): 261–264.
- [9] 李强, 李鹏杰. 血糖波动的意义及临床评估方法 [J]. 中国实用内科杂志, 2009, 29 (9): 876–878.
- [10] 周健, 贾伟平. 2011 国际糖尿病联盟餐后血糖管理指南解读 [J]. 中国医学前沿杂志 (电子版), 2012, 4 (3): 75–78.
- [11] 刘桢, 康健, 高泓. 从“脾胰同源”论血糖波动的中医辨治思路 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42 (7): 1246–1247.
- [12] Wen S, Ma D, Zhao M, et al. Spatiotemporal single-cell analysis of gene expression in the mouse suprachiasmatic nucleus [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23 (3): 456–467.
- [13] Stenvers DJ, Scheer FAJL, Schrauwen P, et al. Circadian clocks and insulin resistance [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15 (2): 75–89.
- [14] Boden G, Ruiz J, Urbain JL, et al. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion [J]. *Am J Physiol*, 1996, 271 (2 Pt 1): E246–E252.
- [15] Mason IC, Qian J, Adler GK, et al. Impact of circadian disruption on glucose metabolism: implications for type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2020, 63 (3): 462–472.
- [16] Duffield GE, Watson NP, Mantani A, et al. A role for Id2 in regulating photic entrainment of the mammalian circadian system [J]. *Curr Biol*, 2009, 19 (4): 297–304.
- [17] Ward SM, Fernando SJ, Hou TY, Duffield GE (2010) The transcriptional repressor Id2 can interact with the canonical clock components CLOCK and BMAL1 and mediate inhibitory effects on mPer1 expression [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (50): 38987–39000.
- [18] Mathew D, Zhou P, Pywell CM, et al. Ablation of the Id2 gene results in altered circadian feeding behavior, and sex-specific enhancement of insulin sensitivity and elevated glucose uptake in skeletal muscle and brown adipose tissue [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (9): e73064.
- [19] Natsuko S, Kimura S, Miyamoto T, et al. Macrophage ubiquitin-specific protease 2 modifies insulin sensitivity in obese mice [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2017, 9: 322–329.
- [20] Scoma HD, Humby M, Yadav G, et al. The Deubiquitylating enzyme, Usp2, is associated with the circadian clockwork and regulates its sensitivity to light [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (9): e25382.
- [21] Yang Y, Duguay D, Fahrenkrug J, et al. Usp2 regulates the intracellular localization of PER1 and circadian gene expression [J]. *J Biol Rhythms*, 2014, 29 (4): 243–256.
- [22] Matthew MM, Li S, Ma D, et al. Ubiquitin-specific protease 2 regulates hepatic gluconeogenesis and diurnal glucose metabolism through 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 [J]. *Diabetes*, 2012, 61 (5): 1025–1035.
- [23] Barbosa Vieira TK, da Rocha Leão M, Pereira LX, et al. Correlation between circadian rhythm related genes, type 2 diabetes, and cancer: insights from metanalysis of transcriptomics data [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 526: 111214.
- (收稿: 2019–03–27 在线: 2021–10–18)
责任编辑: 汤 静