

中老年食蟹猴群中糖尿病相关基因的表达状态

张秀娟¹, 李学家¹, 夏机良¹, 颜孙兴², 季芳¹, 张艳春¹, 刘晓明^{1,2}, 彭白露^{1,2,*}

(1. 广东省昆虫研究所, 广东 广州 510260; 2. 广东蓝岛生物技术有限公司, 广东 广州 510555)

摘要: 该研究选择 10 岁以上健康中老年食蟹猴 138 只, 按空腹血糖值(FPG)将其分为低血糖组、血糖正常组和高血糖组。采用全自动血液生化仪分别检测各组血清中总胆固醇(TCHO)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的水平变化; 采用荧光定量 PCR 分析食蟹猴外周血白细胞中 37 个糖尿病相关基因的 mRNA 表达情况。结果表明, 血清血脂水平 HDL-C、LDL-C、TCHO 和 TG 都与 FPG 分组无显著相关性($P > 0.05$), 而外周血白细胞中 *ACE*、*ACLY*、*PRKCB1*、*SLC2A4*、*SNAP23*、*VAPA*、*IGF2BP2*、*IFNG* 8 个基因的 mRNA 表达水平随 FPG 的升高而显著上调($P < 0.05$)。

关键词: 食蟹猴; 血脂; 外周血白细胞; 糖尿病; 基因表达

中图分类号: R587.1; Q959.848; R-332 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2011)03-0300-07

Expression status of diabetes-associated genes in middle and aged cynomolgus monkeys

ZHANG Xiu-Juan¹, LI Xue-Jia¹, XIA Ji-Liang¹, YAN Sun-Xing², JI Fang, ZHANG Yan-Chun, LIU Xiao-Ming^{1,2}, PENG Bai-Lu^{1,2,*}

(1. Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China; 2. GuangDong Landau Biotechnology Co., LTD, Guangzhou 510555, China)

Abstract: A total of 138 middle and aged cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) (above 10 years) were classified into three groups based on fasting plasma glucose (FPG) values, specifically low FPG, normal FPG, and high FPG group. Total cholesterol (TCHO), triglycerides (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were detected in blood by automatic biochemical analyzer. The mRNA expressions of 37 diabetes-associated genes were analyzed with Real-time PCR in monocytes isolated from monkey peripheral blood. No significant correlation between the four serum lipid indicators HDL-C, LDL-C, TCHO, TG and FPG ($P > 0.05$) were found. However, the expressions of *ACE*, *ACLY*, *PRKCB1*, *SLC2A4*, *SNAP23*, *VAPA*, *IGF2BP2*, and *IFNG* were significantly enhanced when FPG increased ($P < 0.05$).

Key words: Cynomolgus monkey; Serum Lipid; Peripheral blood leucocytes; Diabetes; Gene expression

糖尿病是一种慢性代谢性疾病, 其中 90% 以上的患者为 2 型糖尿病。据世界卫生组织(WHO, 2009)估计, 全世界有超过 2.2 亿的糖尿病患者, 2030 年可能会增加到 3.6 亿。糖尿病已成为仅次于癌症、心脑血管病的人类第三大疾病。

2 型糖尿病患者容易引发各种并发症, 如糖尿病肾病、视网膜病变等, 而且糖尿病是导致心血管疾病最重的因素之一。目前, 我国主要将空腹血糖、

糖耐量 2 h 血糖, 以及随机血糖水平作为诊断糖尿病的依据。新近, 美国糖尿病协会(ADA)提出新增糖化血红蛋白(HbA1c) 6.5%作为诊断糖尿病新标准, 将 HbA1c 处于 5.7%~6.4%之间者以及空腹血糖受损和糖耐量受损的个体统称为糖尿病风险增高人群。然而, 上述指标很难检测糖尿病的早前期, 鉴于糖尿病的高危害性和难治愈性, 因此, 需要寻找新的糖尿病早前期诊断方法和技术, 以便对糖尿

收稿日期: 2011-02-17; 接受日期: 2011-04-19

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划研究项目(2011ZX093073-024); 广州市重大科技专项项目(2010U1-E00811); 广东省自然科学基金项目(10451026001004520)

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: pengbailu@hotmail.com

第一作者简介: 张秀娟(1979-), 女, 研究方向: 灵长类实验动物学; E-mail: hallen6424@tom.com

病进行更早发现和更早防治。

随着人们对糖尿病发病机理的不断认识,从分子生物学水平对糖尿病的早期诊断和风险预警已有可能。若能掌握糖尿病相关基因在糖尿病发病进程中的表达模式,再结合血糖等常规检测指标,有望更好地对糖尿病进行风险预警和早期诊断。近年来,有研究糖尿病相关基因的多态性来预测糖尿病风险(Jeon et al, 2010);外周血白细胞中基因表达情况可间接反映个体糖尿病状况(Kaizer et al, 2007; Takamura et al, 2007; Jin et al, 2011)。

非人灵长类动物食蟹猴的生物学特性、生理、遗传、解剖特征等与人非常相似。Tigno et al(2004)发现自发性 2 型糖尿病食蟹猴,在发病过程中也经历与人类 2 型糖尿病相似的胰岛素抵抗、糖代谢异常和高胰岛素血症等阶段。近年来,食蟹猴越来越多地被用于糖尿病相关研究中。为了调查一些糖尿病相关基因与糖尿病发病病程关系,本研究以 138 只中老年食蟹猴为主要研究对象,以空腹血糖(FPG)为分组依据,检测其常规血液生化指标。同时,采用荧光定量 PCR 分析其外周血白细胞中糖尿病相关基因的表达情况与 FPG 的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择 10 岁以上中老年健康、普通饲养的食蟹猴共计 138 只(其中雄性 65 只,雌性 73 只),广东蓝岛生物技术有限公司提供食蟹猴。

1.2 血清生化指标的测定与实验动物分组

血清样本的采集:食蟹猴禁食 14~16 h 后,隐静脉采血 3 mL,置于促凝管中,室温放置 30 min,4 000 r/min 离心 20 min 分离血清,立即检测 FPG、TCHO、TG、HDL-C 和 LDL-C 五项指标(日立 7020 全自动生化分析仪)。

实验动物分组:以中老年食蟹猴 FPG 为因变量,对 FPG 进行正态分布检验,剔除极值,FPG 数值基本接近于正态分布。参考本实验室对食蟹猴血糖值的调查分析(Hao et al, 2011),本研究根据 FPG 值将研究对象分为三组,即低血糖组(第 1 组)(FPG < 3.20 mmol/L)、血糖正常组(第 2 组)(3.20 mmol/L < FPG < 5.50 mmol/L)和高血糖组(第 3 组)(FPG > 5.50 mmol/L)。

1.3 提取外周血白细胞总 RNA 及其 cDNA 的制备
股静脉采血 3 mL 置于含肝素抗凝管中,将其

与 15 mL 红细胞裂解液(Ma et al, 2007)(1.6 mmol/L EDTA, 10 mmol/L KHCO₃, 153 mmol/L NH₄Cl, pH 7.4)混匀,冰上放置 30 min,201 g 离心 5~10 min 收集外周血白细胞,Trizol 法(Invitrogen)提取外周血白细胞总 RNA,通过凝胶电泳检测 RNA 的质量,并计算其浓度。取大约 0.5 μg RNA,用 EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 将 RNA 逆转录成 cDNA,所得 cDNA 于 -20 °C 保存 备用。

1.4 荧光定量 PCR 反应

37 个糖尿病相关基因可在食蟹猴外周血白细胞中有效表达(郝香芬,待发表),因此,本研究采用荧光定量 PCR 检测这 37 个糖尿病相关基因在中老年食蟹猴外周血白细胞中的 mRNA 表达状况。这 37 个基因按功能分为如下 6 类:

代谢酶类:ACE、ACLY、G6PD、GSK3B、HMOX1、IDE、PRKCB1、PYGL;受体、通道和运输蛋白类:AQP2、CCR2、CEACAM1、CTLA4、GCCR、ICAM1、NSF、RAB4A、SELL、SLC2A4、SNAP23、STX4、STXBP2、TNFRSF1A、VAMP3、VAPA;分泌因子类:AGT、IFNG、INS、TNF;信号转导类:IGFBP5、PIK3C2B、PIK3R1、IκBα;转录因子类:NEUROD1、PPARGC1、IGF2BP2;肥胖相关:CDKN2B、FTO。

以 GAPDH 作内参(Sluijter et al, 2007),所有糖尿病相关基因和内参的 PCR 产物长度均在 200~300 bp 之间。采用 SYBR Green 染料(TaKaRa)在 Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System 上进行荧光定量 PCR,荧光定量 PCR 为 20 μL 反应体系:10 μL SYBR® Premix Ex Taq™ (2×),0.4 μL PCR Forward Primer(10 μmol/L),0.4 μL PCR Reverse Primer(10 μmol/L),2 μL cDNA,7.2 μL ddH₂O。荧光定量 PCR 反应步骤:(1)95 °C, 30 s;(2)95 °C, 5 s; 60 °C, 34 s, 共 40 个循环;(3)溶解曲线分析采用系统默认设置(即 95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min; 95 °C, 15 s; 60 °C, 15 s; 速度为 1.6 °C/s)。所有基因 PCR 产物均纯化回收,并测序验证,并将测序结果与华大基因食蟹猴数据库中相应基因比对验证。所有荧光定量 PCR 反应均重复三次。

1.5 数据处理和分析

采用 Applied Biosystems StepOne™ Software v2.1 对荧光定量 PCR 结果进行初步分析,以低血糖组为参照样本,2^{-C_t}法分析各基因的相对表达量,相关数据以 $\bar{x} \pm S$ 表示。用软件 SPSS 17.0 单因素方

差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 中老年食蟹猴血清血糖与血脂的关系

本研究分析了4个脂代谢相关血液生化指标与FPG水平的关系(表1), 统计结果表明, FPG在3组之间差异极显著($P < 0.01$), 而 HDL-C、LDL-C、

TCHO 和 TG 都与 FPG 无明显相关性($P > 0.05$)。

2.2 糖尿病相关基因在中老年食蟹猴中的表达分析

去除无扩增荧光信号、溶解曲线差、 $Ct < 8$ 或 $Ct > 35$ 及 $Ct > 13$ 的荧光定量PCR反应, 采用 2^{-Ct} 法计算各基因相对于低血糖组食蟹猴中相应基因的表达量, 结果如表2、3所示。在高能量膳食诱导的小批量食蟹猴的全病程糖尿病模型中可检

表1 不同FPG组与4个生化指标的统计分析($\bar{x} \pm S$) (mmol/L)

Tab. 1 Statistical analysis of different FPG groups and four blood lipid biochemical indicators($\bar{x} \pm S$)

组别 Group	FPG	TCHO	HDL-C	LDL-C	TG
第 1 组 Group (N=20)	2.66±0.37	2.60±0.68	1.36±0.45	0.69±0.33	0.85±0.42
第 2 组 Group (N=86)	4.28±0.57	2.67±0.65	1.35±0.40	0.78±0.37	0.79±0.26
第 3 组 Group (N=32)	6.36±0.58	2.55±0.65	1.23±0.39	0.78±0.30	0.84±0.33
	$P < 0.001$	$P = 0.672$	$P = 0.906$	$P = 0.403$	$P = 0.414$
P-Value	$P < 0.001$	$P = 0.861$	$P = 0.375$	$P = 0.487$	$P = 0.904$
	$P < 0.001$	$P = 0.222$	$P = 0.091$	$P = 0.963$	$P = 0.415$

表2 与FPG显著相关的8个糖尿病相关基因的相对表达量分析($\bar{x} \pm S$)

Tab. 2 Relative expression analysis of eight diabetes related genes significantly associated with FPG($\bar{x} \pm S$)

符号 Symbol	GenBank 登录号 Accession No	表达水平 Expression level	样本数 Samples	相对表达量 Relative quantity		
				第 1 组 Group	第 2 组 Group	第 3 组 Group
ACLY	DQ147961	低	23	0.65±0.16	0.42±0.13	0.89±0.22
		中	32	0.83±0.38	0.85±0.18	2.41±0.16
		高	33	1.24±0.47	2.10±0.48	3.82±0.36
		总体平均值	88	0.93±0.38	1.37±0.79	1.86±1.27 ^{a,b}
PRKCB1	XM_001095880	低	20	0.83±0.2	0.67±0.16	0.97±0.22
		中	31	1.19±0.26	1.42±0.33	2.16±0.55
		高	34	1.93±0.32	2.80±0.56	4.04±0.53
		总体平均值	85	1.36±0.61	1.88±0.95	2.52±1.37 ^{a,b}
SLC2A4	XM_001107391.2	低	11	0.82±0.11	1.87±0.48	0.26±0.20
		中	11	1.03±0.02	4.25±0.48	1.22±0.20
		高	15	1.52±0.23	10.51±3.01	14.16±9.90
		总体平均值	37	1.03±0.02	5.54±4.10	8.70±10.21 ^{a,b}
SNAP23	AB172037	低	17	0.95±0.31	0.66±0.23	1.60±0.26
		中	28	1.31±0.38	1.55±0.56	2.88±0.45
		高	14	1.59±0.21	4.63±1.15	4.75±0.65
		总体平均值	59	1.42±0.74	1.94±1.60	3.16±1.30 ^{a,b}
VAPA	AB174175	低	29	0.59±0.11	0.69±0.17	1.38±0.43
		中	35	1.16±0.35	1.42±0.27	2.46±0.31
		高	25	1.57±0.36	2.57±0.36	4.12±0.29
		总体平均值	89	1.36±0.35	1.56±0.79	2.29±1.16 ^{a,b}
IFNG	NM_001032905	低	33	0.64±0.12	0.51±0.28	0.66±0.07
		中	31	1.04±0.25	1.72±0.38	1.78±0.36
		高	20	2.47±0.49	4.87±1.99	4.75±1.61
		总体平均值	84	1.52±0.78	1.69±1.76	2.74±2.09 ^a
IGF2BP2	XM_001095005.2	低	30	0.52±0.10	0.44±0.20	0.62±0.06
		中	20	1.09±0.25	1.80±0.79	1.87±0.70
		高	31	4.01±0.32	4.77±1.79	7.86±2.78
		总体平均值	81	2.84±1.69	2.63±3.03	3.99±3.86 ^a
ACE	AY348177	低	25	0.82±0.21	0.55±0.38	1.09±0.61
		中	19	1.08±0.23	2.91±0.99	5.49±0.25
		高	22	1.58±0.54	7.76±1.96	17.36±3.82
		总体平均值	66	1.42±0.43	3.66±3.43	9.61±13.38 ^a

此表中数值分别为其相对于低血糖组的表达量, 数据用 $\bar{x} \pm S$ 表示, 采用 SPSS17.0 One-Way ANOVA 分析组间差异, 其中数值上标字母 a 表示第 1 组与第 2 组相比, 差异显著($P < 0.05$); b 表示第 2 组与第 3 组相比, 差异显著($P < 0.05$)。

Gene relative expression was compared with the expression of gene respectively in low FPG group, data indicated as $\bar{x} \pm S$. Differences between groups were analyzed by SPSS17.0 One-Way ANOVA. Superscript letters "a" $P < 0.05$ for relative quantity of group II/group III were considered statistically significant, and "b" $P < 0.05$ for relative quantity of group I/group III were considered statistically significant between gene relative expression quantity normal blood sugar and high blood sugar group $P < 0.05$, "b" that high glucose group compared with the low blood glucose.

表 3 29 个糖尿病相关基因在中老年食蟹猴群中的相对表达量分析($\bar{x} \pm S$)Tab. 3 Relative expression analysis of 29 diabetes-associated genes in middle or aged cynomolgus monkeys ($\bar{x} \pm S$)

符号 Symbol	GenBank 登录号 Accession No	表达水平 Expression level	样本数 Samples	相对表达量 Relative quantity		
				第 组 Group	第 组 Group	第 组 Group
G6PD	XM_001095273	低	29	0.85±0.22	0.70±0.20	0.56±0.15
		中	23	0.95±0.26	1.69±0.33	1.24±0.18
		高	27	1.32±0.13	5.63±1.40	2.92±0.73
		总体平均值	79	1.15±0.46	2.58±2.29	1.64±1.19
GSK3B	XM_001110547	低	30	0.79±0.21	0.46±0.09	0.46±0.10
		中	28	0.99±0.26	0.77±0.14	0.93±0.11
		高	23	1.16±0.31	1.47±0.39	1.45±0.30
		总体平均值	81	1.09±0.46	0.90±0.49	0.80±0.37
HMOX1	XM_001113241	低	18	0.80±0.17	0.62±0.18	0.87±0.17
		中	36	1.18±0.18	1.52±0.24	1.39±0.23
		高	37	2.31±0.24	3.07±0.88	2.96±0.15
		总体平均值	91	1.37±0.76	2.05±1.09	1.78±0.82
IDE	XM_001090017	低	22	0.98±0.23	0.74±0.13	1.17±0.28
		中	32	1.01±0.25	1.53±0.35	1.95±0.32
		高	17	2.45±0.33	2.99±0.57	3.83±0.71
		总体平均值	71	1.71±0.75	1.61±0.92	2.09±1.01
PYGL	XM_001102253	低	29	0.89±0.23	0.43±0.17	0.44±0.15
		中	28	1.81±0.79	2.13±0.89	1.52±0.36
		高	20	4.06±1.34	5.63±1.62	9.75±3.96
		总体平均值	77	2.77±1.54	2.30±2.19	3.66±4.76
AQP2	XM_001110572	低	19	0.98±0.32	0.74±0.25	0.17±0.07
		中	20	1.03±0.25	2.61±0.88	1.92±0.68
		高	17	1.52±0.12	7.65±2.15	8.92±4.58
		总体平均值	56	1.53±0.45	3.23±2.96	3.55±4.69
CCR2β	AF013958	低	21	1.13±0.41	0.72±0.10	0.36±0.06
		中	25	3.31±0.74	2.52±0.88	1.04±0.24
		高	20	6.32±0.35	11.48±3.48	7.01±1.40
		总体平均值	66	3.45±2.36	4.76±4.98	2.99±3.27
CEACAM1	NM_001712	低	30	1.09±0.39	0.64±0.23	0.37±0.17
		中	23	1.66±0.14	2.24±1.04	2.65±0.70
		高	18	2.56±0.31	7.32±1.79	7.03±0.93
		总体平均值	71	1.88±0.82	2.95±3.30	3.05±3.16
CTLA4	AF344846	低	31	0.77±0.21	0.53±0.11	0.59±0.12
		中	33	1.24±0.32	1.56±0.46	2.16±0.32
		高	20	3.26±0.37	5.13±1.31	5.10±1.65
		总体平均值	84	1.74±1.26	1.91±1.77	2.23±2.20
GCGR	XM_001111894	低	9	0.91±0.30	0.51±0.18	1.30±0.26
		中	13	1.18±0.22	1.61±0.46	4.05±0.22
		高	15	5.48±0.62	7.83±2.68	7.92±0.29
		总体平均值	37	3.28±2.55	4.47±3.93	4.18±2.46
ICAM1	NM_001047135	低	18	0.89±0.21	0.69±0.18	1.01±0.16
		中	25	1.27±0.31	1.57±0.37	2.42±0.59
		高	24	4.71±0.44	4.36±1.04	10.23±3.05
		总体平均值	67	2.69±1.65	2.44±1.71	4.04±4.28
NSF	XM_001105450	低	22	0.86±0.22	0.66±0.16	0.94±0.16
		中	38	1.07±0.24	1.41±0.29	1.49±0.12
		高	15	2.32±0.13	2.66±0.44	2.80±0.55
		总体平均值	75	1.54±0.68	1.31±0.65	1.78±0.86

续表

符号 Symbol	GenBank 登录号 Accession No	相对表达量 Relative quantity				
		表达水平 Expression level	样本数 Samples	第 组 Group	第 组 Group	第 组 Group
RAB4A	XM_001082985	低	33	0.91±0.24	1.14±0.31	0.91±0.23
		中	32	1.40±0.25	2.16±0.33	2.02±0.58
		高	24	2.27±0.15	3.66±0.62	4.17±0.74
		总体平均值	89	1.56±0.57	2.16±1.12	2.15±1.28
SELL	NM_001042763	低	28	0.99±0.34	0.76±0.19	0.70±0.10
		中	50	1.76±0.18	1.45±0.31	1.43±0.27
		高	27	1.98±0.25	2.82±0.85	2.62±0.50
		总体平均值	105	1.27±0.47	1.75±0.95	1.44±0.66
STX4	XM_001111716	低	23	0.68±0.14	0.66±0.24	0.74±0.22
		中	39	1.46±0.36	1.63±0.30	1.37±0.26
		高	39	1.83±0.39	3.76±1.20	3.53±1.13
		总体平均值	101	1.46±0.36	2.31±1.57	2.01±1.33
STXBP2	XM_001097163	低	32	0.79±0.05	0.63±0.21	0.72±0.21
		中	22	0.95±0.07	1.60±0.20	1.57±0.28
		高	22	1.97±0.14	3.25±0.88	3.25±1.11
		总体平均值	76	1.40±0.46	1.60±1.22	1.67±1.11
TNFRSF1A	XM_001118232	低	21	0.71±0.13	0.65±0.20	0.72±0.21
		中	20	1.05±0.28	1.34±0.24	1.48±0.37
		高	21	1.98±0.35	4.35±1.72	4.31±1.81
		总体平均值	62	1.45±0.88	2.21±1.94	2.00±1.83
VAMP3	XM_001095950	低	38	0.77±0.10	0.70±0.18	0.82±0.22
		中	36	1.63±0.43	1.47±0.32	1.43±0.30
		高	20	3.69±0.84	3.26±0.79	2.79±0.71
		总体平均值	94	1.93±1.36	1.35±0.93	1.75±0.90
AGT	XM_001107315	低	22	0.75±0.24	0.73±0.39	0.78±0.50
		中	19	1.35±0.51	2.34±0.84	3.35±1.52
		高	21	4.80±1.82	6.90±1.74	10.01±2.53
		总体平均值	62	3.07±2.22	3.23±2.92	4.54±4.42
INS	J00336	低	25	1.04±0.35	0.63±0.29	0.48±0.29
		中	16	2.67±0.56	1.44±0.23	1.55±0.30
		高	24	3.80±0.00	4.17±1.71	5.28±1.02
		总体平均值	65	2.34±1.28	2.29±1.99	2.12±2.10
TNF	NM_001047149.1	低	35	0.58±0.14	0.36±0.11	0.52±0.17
		中	43	0.98±0.13	0.87±0.15	1.28±0.22
		高	15	1.32±0.26	2.23±0.42	2.57±0.41
		总体平均值	93	0.98±0.33	0.78±0.59	1.39±0.83
IGFBP5	XM_001087426	低	11	0.93±0.28	1.52±0.10	1.58±0.24
		中	12	1.15±0.35	6.11±2.18	2.12±0.21
		高	11	2.13±0.12	22.85±7.59	5.17±1.09
		总体平均值	34	1.95±1.35	10.53±10.39	3.11±2.49
PIK3C2B	AB172565	低	22	0.60±0.19	0.47±0.24	0.23±0.13
		中	19	1.13±0.17	1.90±0.51	1.18±0.52
		高	18	3.45±0.34	4.65±0.43	7.25±2.74
		总体平均值	59	2.09±1.09	1.51±1.68	3.08±3.72
PIK3R1	XM_001088964	低	28	0.76±0.15	0.71±0.14	0.67±0.15
		中	35	0.99±0.23	1.91±0.54	1.38±0.26
		高	23	3.28±0.23	4.27±1.29	3.55±1.04
		总体平均值	86	2.31±1.29	1.90±1.36	2.15±1.60

续表

符号 Symbol	GenBank 登录号 Accession No	相对表达量 Relative quantity				
		表达水平 Expression level	样本数 Samples	第 组 Group	第 组 Group	第 组 Group
IkB α	XM_001087248	低	28	0.94 \pm 0.24	0.94 \pm 0.14	1.02 \pm 0.21
		中	28	2.05 \pm 0.20	1.48 \pm 0.21	1.82 \pm 0.22
		高	26	3.94 \pm 0.75	2.39 \pm 0.47	2.54 \pm 0.18
		总体平均值	82	2.02 \pm 1.26	1.59 \pm 0.71	1.62 \pm 0.51
NEUROD1	XM_001101024	低	22	0.90 \pm 0.28	1.25 \pm 0.35	0.47 \pm 0.22
		中	20	1.60 \pm 0.31	3.67 \pm 1.22	3.52 \pm 1.31
		高	22	2.98 \pm 0.33	12.59 \pm 5.80	15.54 \pm 4.17
		总体平均值	64	2.78 \pm 1.33	5.29 \pm 6.00	6.19 \pm 7.05
PPARGC1	XM_001105289	低	25	1.17 \pm 0.15	1.46 \pm 0.37	0.69 \pm 0.39
		中	15	2.15 \pm 0.23	3.13 \pm 0.99	4.68 \pm 1.85
		高	N=25	5.86 \pm 0.48	12.11 \pm 5.18	10.79 \pm 3.76
		总体平均值	N=65	2.76 \pm 1.64	6.28 \pm 6.08	6.97 \pm 8.56
CDKN2B	XM_001107391.2	低	N=42	0.64 \pm 0.18	0.54 \pm 0.22	0.45 \pm 0.18
		中	N=28	1.66 \pm 0.22	2.06 \pm 0.61	1.54 \pm 0.84
		高	N=19	2.99 \pm 0.35	7.86 \pm 3.93	4.67 \pm 1.32
		总体平均值	N=89	2.31 \pm 1.39	2.60 \pm 3.45	1.71 \pm 1.86
FTO	XM_001092038.2	低	N=23	0.57 \pm 0.16	0.64 \pm 0.18	0.56 \pm 0.08
		中	N=12	1.21 \pm 0.11	1.73 \pm 0.69	0.99 \pm 0.17
		高	N=13	2.85 \pm 0.21	4.38 \pm 0.62	3.54 \pm 1.17
		总体平均值	N=48	2.27 \pm 1.14	1.64 \pm 1.56	1.62 \pm 1.54

测到有 37 个糖尿病相关基因有效表达(郝香芬, 待发表), 其中每个基因均有其独特的表达模式(在不同的发病阶段中有不同的表达状态)。然而, 可能由于个体遗传差异造成在大样本群体中的集合, 使某一基因的表达状态在群体中出现较宽的分布。为便于对糖尿病风险程度的评估, 我们将这一分布状态划分为高表达水平、中等表达水平和低表达水平。

从表 2、3 可以得出, 37 个糖尿病相关基因的总平均表达水平普遍存在标准偏差比较大的现象, 经 SPSS17.0 软件统计分析获得 *ACE*、*ACLY*、*PRKCB1*、*SLC2A4*、*SNAP23*、*VAPA*、*IGF2BP2*、*IFNG* 等 8 个基因的总表达水平随空腹血糖的升高而显著上调($P > 0.05$), 详见表 2。而其他基因的表达模式与 FPG 分组无显著相关性(详见表 3)。各个基因按照基因表达量的正态分布将食蟹猴群分为三类表达水平方式, 数据统计结果显示此三类表达水平随 FPG 的表达趋势与总体平均表达趋势呈现一致。

3 讨论

目前临床上主要以血糖为检测糖尿病的主要指标, 而 2 型糖尿病临床前期症状隐匿, 从正常血糖到间歇餐后高血糖, 最后发展到持续性空腹高血糖, 从无糖尿到有糖尿, 从无症状到有症状、无并

发症到有并发症, 一般要经历一段比较长的时间。目前关于糖尿病风险预警和早期诊断的方法和手段, 主要是根据种族、年龄、腰围、腰臀围比、血压、糖尿病家族史、饮食和运动习惯等制成危险因素计量表, 或根据口服葡萄糖耐量试验、餐后血糖、空腹胰岛素及糖化血红蛋白对糖尿病风险进行预测。新公布的 2010 年版《中国 2 型糖尿病防治指南》仍采用口服葡萄糖耐量试验对糖尿病前期人群进行筛查。因此, 利用现有临床检测手段很难对糖尿病进行早发现、早治疗。

2 型糖尿病在发病进程中会出现糖脂代谢异常。大量研究表明, 其中 HDL-C 就是一个重要指标, 50% 的胰岛素抵抗的 2 型糖尿病患者和妊娠期糖尿病患者都存在 HDL-C 水平显著降低(Ledet et al, 1979; Bartha et al, 2000), 降低的 HDL-C 进而通过一系列的信号通路来降低 LDL-C 对内皮介导的血管扩张作用的抑制(Matsuda et al, 1993), 故 HDL-C 具有抗动脉粥样硬化作用, 并与心血管疾病的发生呈负相关。HDL-C 还可以保护 β 细胞免受胆固醇对其的损伤、应激引起的细胞凋亡和胰岛炎症的发生, 从而可能作为一种药物来预防和治疗 T2DM(Kruit et al, 2010)。本研究虽然也统计发现在中老年食蟹猴群中随着血糖水平的升高, HDL-C 水平有不断减

低的趋势,但却无统计意义上的显著差异($P > 0.05$),而 TCHO、LDL-C 和 TG 无变化趋势和统计相关性,在正常波动范围内,这说明了通过检测与糖尿病高度相关的传统临床检测指标,也无法为 2 型糖尿病风险预警找到合适的参考指标。

外周血白细胞取材方便,对机体无创伤性伤害,是一种理想的临床诊断材料。本研究所采用的荧光定量 PCR 方法具有较高的灵敏性,一些在外周血白细胞中表达丰度较低的基因都被检测到,这为进一步的研究这些基因在 T2DM 发病进程中的表达变化提供了有利的工具。本研究以传统临床检测指标——空腹血糖值为主要分组依据,检测并分析了 37 个糖尿病相关基因在随机抽取的中老年食蟹猴中的表达与 FPG 水平的相关性,结果发现:ACE、ACLY、PRKCB1、SLC2A4、SNAP23、VAPA、IGF2BP2、IFNG 等 8 个基因的表达水平随空腹血糖的升高而显著上调($P < 0.05$)。这些基因在糖尿病的发生发展中都有着重要的作用(Vassilopoulos et al, 2009; Zeggini et al, 2007),如 ATP 柠檬酸裂解酶(ATP

citrate lyase, ACLY)位于细胞质,是糖代谢一关键基因,依赖 ATP 将柠檬酸裂解为乙酰辅酶 A。研究表明,ACLY 活性水平对葡萄糖诱导胰岛素分泌有重要促进作用(MacDonald et al, 2009; Guay et al, 2007),在 T2DM 患者的胰岛中该酶活性和 mRNA 水平较正常人显著减低(约 55%)(MacDonald et al, 2009),而在本研究中发现在食蟹猴血液样本中血糖高组该基因表达水平上调,这是一个很有趣的现象,可能与糖代谢紊乱时期、表达组织不同或人猴差异有关,我们对该基因在糖尿病发病进程中的表达模式还在进一步的关注中。

本研究是对中老年食蟹猴群体的血液样本中 37 个糖尿病相关基因的表达状态进行的分子生物学调查。结果表明,在传统生化指标难以对正常食蟹猴进行糖尿病风险评估时,我们却可从个体的糖尿病相关基因的表达状态发现其潜在的糖尿病风险信息。如果这些信息与群体自发或诱发的糖尿病每一阶段结果相对应,则可从中遴选出健康预期和糖尿病风险预警的部分候选指标。

参考文献:

- Bartha JL, Comino-Delgado R, Martinez-Del-Fresno P, Fernandez-Barrios M, Bethencourt I, Moreno-Corral L. 2000. Insulin-sensitivity index and carbohydrate and lipid metabolism in gestational diabetes [J]. *J Reprod Med*, **45**(3): 185-189.
- Guay C, Madiraju SR, Aumais A, Joly E, Prentki M. 2007. A role for ATP-citrate lyase, malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion [J]. *J Biol Chem*, **282**(49): 35657-35665.
- Hao XF, Wang YL, Li XJ, Ji F, Peng BL, Rao JH, Liu XM. 2011. The investigation of the basal glucose in cynomolgus [J]. *Sichuan J Zool*, [郝香芬, 万玉玲, 李学家, 季芳, 彭白露, 饶军华, 刘晓明. 2011. 食蟹猴的基础血糖值调查[J]. *四川动物*, **30**(1): 111-114.]
- Jeon JP, Shim SM, Nam HY, Ryu GM, Hong EJ, Kim HL, Han BG. 2010. Copy number variation at leptin receptor gene locus associated with metabolic traits and the risk of type 2 diabetes mellitus [J]. *BMC Genomics* **11**: 426.
- Jin LS, Hao XF, Peng BL, Zhang YC, Wan YL, Ji F, Xia JL, Liu XM. 2011. Differential expression of six obesity-related genes with different disease phases of T2DM cynomolgus monkey [J]. *Zool Res*, **32**(1):50-55.[靳丽莎, 郝香芬, 彭白露, 张艳春, 万玉玲, 季芳, 夏机良, 刘晓明. 2011. 六个肥胖相关基因在食蟹猴 2 型糖尿病不同发病时期的差异表达[J]. *动物学研究*, **32**(1):50-55.]
- Kaizer EC, Glaser CL, Chaussabel D, Banchereau J, Pascual V, White PC. 2007. Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**(9): 3705-3711.
- Kruit JK, Brunham LR, Verchere CB, Hayden MR. 2010. HDL and LDL cholesterol significantly influence β -cell function in type 2 diabetes mellitus [J]. *Curr Opin Lipidol*, **21**(3): 178-185.
- Ledet T, Neubauer B, Christensen NJ, Lundbaek K. 1979. Diabetic cardiopathy [J]. *Diabetologia*, **16**(4): 207-209.
- Ma J, Dempsey AA, Stamatiou D, Marshall KW, Liew CC. 2007. Identifying leukocyte gene expression patterns associated with plasma lipid levels in human subjects [J]. *Atherosclerosis*, **191**(1): 63-72.
- MacDonald MJ, Longacre MJ, Langberg EC, Tibell A, Kendrick MA, Fukao T, Ostenson CG. 2009. Decreased levels of metabolic enzymes in pancreatic islets of patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, **52**(6): 1087-1091.
- Matsuda Y, Hirata K, Inoue N, Suematsu M, Kawashima S, Akita H, Yokoyama M. 1993. High density lipoprotein reverses inhibitory effect of oxidized low density lipoprotein on endothelium-dependent arterial relaxation [J]. *Circ Res*, **72**(5): 1103-1109.
- Sluimer JC, Kisters N, Cleutjens KB, Volger OL, Horrevoets AJ, van den Akker LH, Bijnens AP, Daemen MJ. 2007. Dead or alive: gene expression profiles of advanced atherosclerotic plaques from autopsy and surgery [J]. *Physiol Genomics*, **30**(3): 335-341.
- Takamura T, Honda M, Sakai Y, Ando H, Shimizu A, Ota T, Sakurai M, Misu H, Kurita S, Matsuzawa-Nagata N, Uchikata M, Nakamura S, Matoba R, Tanino M, Matsubara K, Kaneko S. 2007. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **361**(2): 379-384.
- Tigno XT, Gerzanich G, Hansen BC. 2004. Age-related changes in metabolic parameters of nonhuman primates [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **59**(11): 1081-1088.
- Vassilopoulos S, Esk C, Hoshino S, Funke BH, Chen CY, Plocik AM, Wright WE, Kucherlapati R, Brodsky FM. 2009. A role for the CHC22 clathrin heavy-chain isoform in human glucose metabolism [J]. *Science*, **324**(5931): 1192-1196.
- Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS, McCarthy MI, Hattersley AT. 2007. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes [J]. *Science*, **316**(5829): 1336-1341.