

中 文 摘 要

糖尿病（DM）是一种慢性代谢紊乱疾病，由胰岛素分泌不足或工作障碍引起，特点是血糖水平的升高。糖尿病患者中 90%为II型糖尿病（T2DM）。糖尿病的发生和发展过程中往往会伴随着心脑血管疾病、肾病、糖尿病视网膜病变、糖尿病病足以及神经病变等各种并发症的产生。临床上用于治疗糖尿病的降糖药物具有不同程度的副作用，生物活性肽因其活性高、副作用小、易吸收等特点成为新型降糖药物开发的热点。目前，国内外降糖多肽的研究取得了一定的进展，但是其具体的降糖机制研究还不够深入。DCHP 是实验室前期从胡萝卜中提取的一种活性肽，前期研究发现 DCHP 能够抑制 α -葡萄糖苷酶活性（ $IC_{50}=10.91\ \mu M$ ），具有体外降糖作用，但在生物体内的降糖功能及机制尚不明确。

T2DM 是一种由多因素引起的代谢性疾病，与糖脂代谢紊乱，氧化应激损伤、胰岛素信号通路受损等过程密切相关。其中，氧化应激会导致胰岛 β 细胞功能损伤及胰岛素抵抗，诱发糖尿病及其并发症的形成，所以抗氧化剂也是糖尿病治疗的一个方向和策略。

本论文利用秀丽隐杆线虫模型，评价 DCHP 的降糖功效、抗氧化作用并进一步探究其降糖机制可能的作用靶点。得到如下结果：

1、线虫寿命实验证明，0-100 $\mu g/mL$ DCHP 对正常培养条件下的 *daf-2* 突变体线虫的寿命基本没有影响，并且对线虫的食物 OP50 的增殖也没有显著影响。

2、通过对线虫体内乳酸、葡萄糖、糖原含量测定以及 2-NBDG 葡萄糖摄取实验表明 50 $\mu g/mL$ DCHP 可以降低 *daf-2* 线虫体内的葡萄糖含量，增加乳酸生成量，促进糖原合成和对葡萄糖的摄取能力，起到对糖代谢的调控作用，进而改善糖代谢紊乱。

3、DCHP 能够减少 *daf-2* 线虫肠道脂褐素的积累，改善虫体的运动能力，延长了健康寿命，且 50 $\mu g/mL$ DCHP 对高糖诱导氧化应激条件下线虫寿命的延长作用可能是通过对 DAF-16 基因的激活实现的。

4、通过对线虫抗氧化能力的测定，结果表明与高糖处理组对比，50 $\mu g/mL$ DCHP 显著上调抗氧化相关基因的表达水平，提高线虫体内抗氧化酶 SOD 活性（ $P<0.001$ ）、GSH 含量（ $P<0.001$ ），并降低 MDA 的含量（ $P<0.05$ ），从而降低氧化应激水平。

5、利用生物膜层干涉技术证明了 *daf-2* 线虫组织裂解液中存在与 DCHP 相互作

用的蛋白。后经质谱分析，表达纯化差异蛋白 CYP-33C1，生物膜层干涉实验表明 CYP-33C1 与 DCHP 两个蛋白之间有相互作用，亲和力常数 KD 为 9.24 μ M。初步证明 DCHP 降血糖的潜在靶点有可能是细胞色素 P450 家族的 CYP-33C1 蛋白。

关键词：胡萝卜多肽；秀丽隐杆线虫；糖代谢；氧化应激

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disorder caused by insufficient insulin secretion or work disorders, characterized by elevated blood glucose levels. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) was found in 90% of the patients. The onset and development of diabetes is often accompanied by complications such as cerebrovascular disease, kidney disease, diabetic retinopathy, diabetic foot, and neuropathy. The hypoglycemic drugs used in clinical treatment of diabetes have different degrees of side effects, and bioactive peptides have become the hot spot in the development of new hypoglycemic drugs because of their high activity, low side effects and easy absorption. At present, the research of hypoglycemic peptides has made some progress at home and abroad, but the mechanism of hypoglycemic peptides is not deep enough. DCHP is a kind of active peptide extracted from carrot in the early stage of laboratory. It was found that DCHP can inhibit α -glucosidase activity ($IC_{50}=10.91\ \mu M$) and has hypoglycemic effect in vitro, but its hypoglycemic function and mechanism in vivo are still unclear.

T2DM is a metabolic disease caused by many factors, which is closely related to the disorder of glucose and lipid metabolism, oxidative stress injury and impaired insulin signaling pathway. Among them, oxidative stress can lead to the damage of Islet β -cell function and insulin resistance, and induce the formation of diabetes mellitus and its complications, so antioxidants are also a direction and strategy for the treatment of diabetes mellitus.

In this study, we used the *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) model to evaluate the hypoglycemic and antioxidant effects of DCHP and explore the possible targets of its hypoglycemic mechanism. The results are as follows:

1. The life test of nematode proved that 0-100 $\mu g/mL$ DCHP had no effect on the longevity of *daf-2* mutant under normal culture condition, and had no significant effect on the proliferation of food OP50.
2. The determination of lactate, glucose, glycogen content in nematodes and the 2-NBDG glucose uptake experiment showed that 50 $\mu g/mL$ DCHP could decrease the glucose content of *daf-2* nematode, increase the production of lactic acid, promote the

synthesis of glycogen and the uptake of glucose, and regulate the metabolism of glucose, and then improve the glucose metabolism disorder.

3. DCHP could reduce the accumulation of lipofuscin in the gut of *daf-2* nematode, improve the movement ability and prolong the healthy life span. Moreover, the effect of 50 µg/mL DCHP on the longevity of *C. elegans* under high glucose-induced oxidative stress may be due to the activation of *DAF-16* gene.

4. By measuring the antioxidant capacity of nematodes, the results showed that Compared with the high glucose treatment group, 50 µg/mL DCHP significantly up-regulated the expression level of antioxidant related genes, increased the activity of SOD ($P < 0.001$) and the content of GSH ($P < 0.001$) in the nematode, the content of MDA was decreased ($P < 0.05$), so the level of oxidative stress was decreased.

5. The protein interacting with DCHP in the tissue lysate of *daf-2* nematode was proved by the interference technique of biomembrane layer. The differential protein CYP-33C1 was expressed and purified by mass spectrometry, and the interaction between CYP-33C1 and DCHP was demonstrated by the interference experiment of biofilm layer, the affinity constant K_D of CYP-33C1 and DCHP was 9.24 µM. It was suggested that the potential target of DCHP for hypoglycemic effect might be CYP-33C1 protein of cytochrome P450 family.

Key words: Carrot polypeptide; *Caenorhabditis elegans*; Glucose metabolism; Oxidative stress

中英文缩略词表

英文缩略词	英文全文	中文翻译
DCHP	Carrot polypeptide	胡萝卜多肽
T2DM	Diabetes Mellitus Type 2	II 型糖尿病
PKC	Protein kinase C	蛋白激酶 C
IR	Insulin resistance	胰岛素抵抗
<i>C. elegans</i>	<i>caenorhabditis elegans</i>	秀丽隐杆线虫
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
NGM	nematode growth medium	线虫生长培养基
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction	实时定量聚合酶链式反应
GLUT	Glucose transporter	葡萄糖转运蛋白
ROS	Reactive oxygen species	活性氧自由基
SOD	Superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
GSH	Glutathione	谷胱甘肽
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
CAT	Catalase	过氧化氢酶

目 录

中文摘要	I
ABSTRACT	III
中英文缩略词表	V
1 绪论	1
1.1 糖尿病	1
1.1.1 糖尿病的类型	2
1.1.2 糖尿病的危害	2
1.1.3 糖尿病的治疗	3
1.1.4 氧化应激与糖尿病	4
1.2 生物活性肽	5
1.2.1 生物活性肽的定义及功能	5
1.2.2 降糖多肽的研究进展	5
1.3 秀丽隐杆线虫	6
1.3.1 线虫简介及其生物学特征	6
1.3.2 秀丽隐杆线虫与 T2DM 模型研究	7
1.4 研究目的及意义	8
2 DCHP 对秀丽隐杆线虫糖代谢的影响	10
2.1 前言	10
2.2 实验材料	10
2.2.1 线虫类型	10
2.2.2 实验试剂	10
2.2.3 实验仪器	10
2.3 实验方法	11
2.3.1 DCHP 蛋白的表达和纯化	11
2.3.2 相关溶液及培养基的配制	11
2.3.3 线虫的培养与给药	11
2.3.4 <i>E.coli</i> OP50 的培养	12
2.3.5 线虫总蛋白的提取	12

2.3.6 <i>E. coli</i> OP50 增殖检测	13
2.3.7 DCHP 最佳药物浓度的筛选	13
2.3.8 线虫体内葡萄糖含量的测定	13
2.3.9 线虫体内乳酸含量的测定	14
2.3.10 线虫体内糖原含量的测定	14
2.3.11 线虫总 RNA 的提取	14
2.3.12 实时定量 PCR	14
2.3.13 2-NBDG 摄取实验	15
2.3.14 数据处理与分析	15
2.4 实验结果	15
2.4.1 DCHP 蛋白的纯化	15
2.4.2 DCHP 对 <i>E. coli</i> OP50 增殖的影响	16
2.4.3 DCHP 给药浓度的确定	17
2.4.4 <i>daf-2</i> 线虫体内葡萄糖含量的测定	17
2.4.5 <i>daf-2</i> 线虫体内乳酸含量的测定	18
2.4.6 <i>daf-2</i> 线虫体内糖原含量变化及糖原合酶基因的表达	19
2.4.7 DCHP 对 <i>daf-2</i> 线虫葡萄糖摄取的影响	19
2.5 讨论	20
3 DCHP 对秀丽隐杆线虫氧化应激的保护作用	22
3.1 前言	22
3.2 实验材料	22
3.2.1 线虫类型	22
3.2.2 实验试剂	22
3.2.3 实验仪器	22
3.3 实验方法	22
3.3.1 高糖条件下秀丽隐杆线虫寿命的测定	22
3.3.2 脂褐素含量的测定	23
3.3.3 SOD、MDA、GSH 的测定	23
3.3.4 线虫总 RNA 的提取	23
3.3.5 实时定量 PCR	23
3.3.6 数据处理与分析	24

3.4 实验结果	24
3.4.1 DCHP 对高糖条件下秀丽隐杆线虫寿命的影响	24
3.4.2 DCHP 对线虫肠道脂褐素积累的影响	26
3.4.3 DCHP 对 <i>daf-2</i> 和 <i>daf-16</i> 突变体线虫抗氧化能力的影响	27
3.4.4 DCHP 对 <i>daf-2</i> 线虫抗氧化基因表达水平的影响	29
3.5 讨论	30
4 DCHP 对秀丽隐杆线虫降糖机制初探	32
4.1 前言	32
4.2 实验材料	32
4.2.1 线虫类型	32
4.2.2 实验试剂	32
4.2.3 实验仪器	32
4.3 实验方法	33
4.3.1 生物膜层干涉技术	33
4.3.2 质谱鉴定及分析	33
4.3.3 CYP-33C1 与 DCHP 体外相互作用验证	33
4.4 实验结果	35
4.4.1 <i>daf-2</i> 线虫中, DCHP 的互作蛋白鉴定与分析	35
4.4.2 CYP-33C1 的重组表达纯化	38
4.4.3 CYP-33C1 与 DCHP 相互作用研究	40
4.5 讨论	40
5 总结与展望	42
参考文献	43
附 录	51
致 谢	54
个人简况及联系方式	55
承 诺 书	56
学位论文使用授权声明	57

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/887200102013010050>