

活血解毒方对糖尿病大鼠视网膜病变 内皮素-1 表达的影响

姚青^{1,2}, 韩静¹, 黄黎明¹, 余俊达¹, 王伟^{1*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 宁夏医科大学, 银川 750004)

[摘要] 目的:探讨活血解毒方对糖尿病大鼠视网膜病变血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ, AngⅡ)和内皮素-1(endothelin-1, ET-1)的影响。方法:采用链脲佐菌素(65 mg·kg⁻¹)1次性 ip 的方法建立糖尿病大鼠模型,随机分为模型组和活血解毒方高、中、低剂量组(15.4, 7.70, 3.85 g·kg⁻¹)及导升明组(0.167 g·kg⁻¹), ig 给药,20 周后处死,取血清检测 AngⅡ和 ET-1 的含量。摘除眼球应用免疫组织化学标记抗生蛋白连菌素法(LSAB)法检测大鼠视网膜全层 ET-1 的表达。取大鼠视网膜组织,采用实时聚合酶链反应 Real-time PCR 检测 ET-1 mRNA 的表达。结果:糖尿病模型组大鼠血清 AngⅡ和 ET-1 含量分别为(417.95 ± 156.11), (330.12 ± 81.59) ng·L⁻¹, 比正常组升高(P < 0.01)。糖尿病模型组大鼠视网膜 LSAB 法标记染色病理切片中 ET-1 蛋白的表达升高,积分吸光度(IA)为(53.45 ± 15.67),与正常组相比(12.76 ± 3.27)显著升高(P < 0.01),活血解毒方各剂量组及导升明组与模型组相比显著降低(P < 0.01)。模型组 ET-1 mRNA 的表达显著高于正常组,活血解毒方各剂量组的表达明显低于模型组,与模型组相比有显著性差异。结论:活血解毒方可能通过降低视网膜 ET-1 的表达,延缓糖尿病大鼠视网膜病变的发展。

[关键词] 活血解毒方; 糖尿病视网膜病变; 内皮素-1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0169-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120813.1129.050.html>

[网络出版时间] 2012-08-13 11:29

Effect of Huoxue Jiedu Formula on Endothelin-1 in Retina of Diabetic Rats

YAO Qing^{1,2}, HAN Jing¹, HUANG Li-ming¹, YU Jun-da¹, WANG Wei^{1*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Huoxue Jiedu formula on angiotensinⅡ(AngⅡ) and

[收稿日期] 20120307(011)

[基金项目] 国家重大新药创制课题(2009ZX09103-320);科技部国际科技合作项目(2008DFA30610)

[第一作者] 姚青,博士研究生在读,讲师,从事中药药理学研究,Tel:18910378726,E-mail:yaoqing726@163.com

[通讯作者] *王伟,博士,教授,博士生导师,从事中药药理学研究,Tel:010-64286283,E-mail:wangwei26960@126.com

[参考文献]

- [1] 王灿. 脑脉舒康胶囊对短暂性脑缺血动物模型的影响[D]. 郑州:河南中医学院,2005.
- [2] 胡国恒,祝美珍. 活血化瘀法防治脑缺血损伤的理论探讨[J]. 中华中医药杂志,2008,23(6):513.
- [3] 蔡紫峰,杨卓. 脑缺血损伤的研究进展[J]. 继续医学教育,2004,18(4):53.
- [4] McConkey D J, Nutt L K. Calcium flux measurements in apoptosis[J]. Methods Cell Biol,2001,66:229.

- [5] 刘明,孙建宁,董世芬,等. 大鼠脑缺血不同时间脑能量代谢的变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):218.
- [6] 王志琪,王晓洪,陈立峰,等. 加味芎归汤对大鼠全脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):206.
- [7] 王垣芳,孙富家,刘同慎. 鸭跖草水提取物对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床,2011,27(3):67.

[责任编辑 聂淑琴]

endothelin-1 (ET-1) in retina of diabetic rats. **Method:** A single intraperitoneal injection of streptozotocin ($65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was used to induce diabetic rats. Model rats were randomly divided into diabetes mellitus (DM) group, Huoxue Jiedu formula groups ($15.4, 7.70, 3.85 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Doxium group ($0.167 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). The normal group and model group were given normal water by intragastric administration. All rats were killed after 20 weeks. The serum Ang II and ET-1 levels were measured. Immunological histochemistry assay was used to observe the express of ET-1. The expressive abundance of ET-1 mRNA in rat's retina were detected by real-time quantitative PCR. **Result:** The levels of Ang II and ET-1 in serum of model group were (417.95 ± 156.11), (330.12 ± 81.59) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, which was higher than control group. The retinal ET-1 protein expression and ET-1 mRNA were significantly higher in DM rats than in control group ($P < 0.01$). The levels of ET-1 in serum of Huoxue Jiedu formula groups were lower than those in model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of ET-1 in Huoxue Jiedu formula groups depressed evidently ($P < 0.01$) and the expression of ET-1 mRNA were reduced than those in model groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Huoxue Jiedu formula medicine can reduce the expression of ET-1 in retina of diabetic rats.

[**Key words**] Huoxue Jiedu formula; diabetic retinopathy; endothelin-1

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是一种微血管疾病,其主要特征是毛细血管阻塞和视网膜缺血。研究表明,视网膜组织中有独立的肾素血管紧张素系统,且具备了肾素血管紧张素系统(renin-angiotensinsystem, RAS)的全部组分,视网膜病变的严重程度与RAS的活性相关^[1]。内皮素-1(endothelin-1, ET-1)是一种具有强烈缩血管效应的多肽,是影响视网膜病变血流动力学的血管活性物质之一。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)是 ET-1 基因表达、合成和分泌的强效刺激因子,可刺激 ET-1 mRNA 的表达^[2]。糖尿病患者由于长期机体代谢紊乱,微循环缺氧等导致血管内皮细胞损伤,引起 ET-1 的表达调控失常,刺激 ET-1 的产生释放增加,导致视网膜血流量的降低,从而促进糖尿病视网膜病变的发生发展^[3]。本实验通过对糖尿病大鼠视网膜病变早期干预,观察活血解毒方对血 Ang II, ET-1 和视网膜组织中 ET-1 蛋白和 mRNA 表达的影响,揭示活血解毒方防治 DR 的机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体重(250 ± 20)g, 78 只。购自北京维通利华实验动物中心, 许可证号 SCXK(京)2006-0009。动物在北京中医药大学实验动物中心 SPF 实验室饲养。

1.2 药品与试剂 活血解毒方由三七和黄连等组成, 由北京中医药大学药学院制备, 用时制成 $0.77 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水溶液。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 美国 Sigma 公司, 批号 S0130), 导升明(西安利君制药有限公司, 批号 20000713), 放免试剂盒购自北京康源瑞得生物技术有限公司, ET-1 多克隆抗体

(Abcam 公司, 935794), SYBR green PCR 试剂盒(美国 ABI 公司, 1102263), 逆转录酶和 Taq 酶(均购自 Fermentens 公司, 00077554), PCR 引物由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。

1.3 仪器 Free Style 型培利舒坦血糖仪(美国雅培公司), PRISM 7700 Sequence Detector(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立 STZ 溶解于 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠溶液(冰盒中新鲜配制, pH 4.5), 大鼠禁食 12 h, 以 $65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量 1 次性 ip STZ, 诱导糖尿病模型。对照组 ip 等量的溶剂。1 周后尾静脉采血检测血糖, 以禁食 6 h 血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 者为糖尿病模型。

2.2 分组与给药 选取糖尿病模型大鼠 65 只, 随机分为糖尿病模型组和活血解毒方高、中、低剂量组 ($15.4, 7.70, 3.85 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及导升明组 ($0.167 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 另设正常对照组 13 只。每天 ig 给药, 共 20 周, 大鼠自由饮水, 颗粒饲料喂养, 每月检测血糖 1 次。

2.3 检测指标及方法

2.3.1 血清 Ang II 和 ET-1 的含量 2% 戊巴比妥钠 ip 麻醉大鼠后, 腹主动脉取血, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后取血清, 按试剂盒说明, 用放免法测定 Ang II 和 ET-1 的含量。

2.3.2 视网膜切片标本免疫组织化学染色 动物处死后将大鼠右眼固定在 4% 多聚甲醛溶液 ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4 磷酸盐缓冲液稀释, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存) 中, 采用 LSAB 法, 兔抗大鼠 ET-1 多抗 1:100。石蜡

切片脱蜡,梯度乙醇水化;流水漂洗 5 min, PBS 洗 2 次(各 5 min), 3% H₂O₂ 氧化 15 min 以清除内源性过氧化物酶,流水漂洗 5 min, PBS 洗 2 次(各 5 min);滴加一抗,4 ℃,湿盒孵育 24 h 后, PBS 洗 3 次(各 5 min);滴加二抗,室温孵育 2 h, PBS 洗 3 次(各 5 min);DAB 显色 2 min,流水洗 3 次;苏木素复染 10 s,流水洗 10 min;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。光学显微镜下观察、拍照, Image-Pro-Plus 6.0 图像分析软件进行半定量分析。

2.3.3 提取大鼠视网膜总 RNA 及反转录反应

Trizol 一步法提取总 RNA。反转录反应体系:总 RNA 3 μg, OligodT 1 μL, dNTP (10 mmol·L⁻¹, 含 4 种) 1 μL, 5 × Buffer 4 μL, 逆转录酶 0.5 μL, 加入经 DEPC 处理的无菌水至 20 μL;反应条件:45 ℃ 反应 1 h, 95 ℃ 5 min 终止反应。反应结束后, -20 ℃ 冰箱保存备用。

2.3.4 Real-time PCR 反应 从 GenBank 获得目的基因 mRNA 的全长序列,利用引物和探针设计软件 Primer 5.0 设计引物序列。经过 Blast 分析,引物序列具有特异性。以 β-actin 为内对照进行 Real-time PCR

反应。引物序列:β-actin:上游 β-actin 5'-ATCATGTTTGAGACCTCAAC-3', 下游 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTC-3'; ET-1 上游 5'-TTCCCGTGATCTTCTCTCTGC-3', 下游 5'-TCTGCTTGGCAGAAATTC-3'。反应体系:cDNA 1 μL, 上游引物(20 μmol·L⁻¹) 0.5 μL, 下游引物(20 μmol·L⁻¹) 0.5 μL, 2 × SYBR Green I 1 μL, 2 × mix 12.5 μL。加无菌水至 25 μL。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 32 个循环。反应结束后,得到每份样品中 ET-1 进行 PCR 扩增时达到阈值时的 Ct 值,通过 β-actin 校正,得到每份样品中 ET-1 的相对表达量即 Quantity (ET-1/β-actin)。

2.4 统计学方法 实验数据用 SPSS 16.0 统计软件分析比较,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数间比较采用 One-Way ANOVA 检验,以 $P < 0.05$ 为存在统计学差异。

3 结果

3.1 各组大鼠给药前后血糖的比较 糖尿病大鼠各剂量给药组血糖给药前与给药后与模型组比较无显著性差别。见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间点血糖的变化($\bar{x} \pm s, n = 13$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	给药前	4 周	8 周	12 周	16 周	20 周
正常	-	5.3 ± 0.5	5.9 ± 0.8	5.7 ± 0.3	6.4 ± 2.4	4.9 ± 0.2	5.5 ± 0.6
模型	-	30.1 ± 4.6 ²⁾	28.8 ± 5.6 ²⁾	23.1 ± 1.5 ²⁾	21.5 ± 5.3 ²⁾	23.5 ± 3.9 ²⁾	22.1 ± 4.3 ²⁾
活血解毒方	15.4	30.4 ± 4.3 ²⁾	27.3 ± 5.1 ²⁾	22.7 ± 1.5 ²⁾	22.7 ± 1.4 ²⁾	20.2 ± 2.6 ²⁾	20.2 ± 1.8 ²⁾
	7.70	30.6 ± 4.2 ²⁾	24.9 ± 1.8 ²⁾	20.7 ± 1.6 ²⁾	21.1 ± 1.6 ²⁾	20.9 ± 2.4 ²⁾	20.1 ± 4.5 ²⁾
	3.85	30.5 ± 4.2 ²⁾	26.1 ± 4.6 ²⁾	22.6 ± 1.9 ²⁾	21.8 ± 2.3 ²⁾	20.9 ± 4.7 ²⁾	19.9 ± 1.4 ²⁾
导升明	0.167	30.4 ± 3.8 ²⁾	27.2 ± 2.2 ²⁾	23.5 ± 1.4 ²⁾	23.6 ± 1.4 ²⁾	21.9 ± 4.8 ²⁾	21.2 ± 2.9 ²⁾

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$;与模型组相比³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

3.2 各组大鼠血清 Ang II 和 ET-1 的比较 糖尿病模型组大鼠血清 Ang II 和 ET-1 与正常组大鼠相比显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。活血解毒方各剂量组和导升明组血清 Ang II 和 ET-1 均比糖尿病模型组大鼠降低,其中 ET-1 的含量与模型组相比有显著性差异($P < 0.01$),见表 2。

表 2 活血解毒方给药 20 周对糖尿病大鼠血清

Ang II 和 ET-1 的影响($\bar{x} \pm s, n = 13$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ang II	ET-1
正常	-	245.72 ± 63.19	224.86 ± 30.77
模型	-	417.95 ± 156.11 ²⁾	330.12 ± 81.59 ²⁾
活血解毒方	15.4	343.30 ± 120.67	157.34 ± 36.01 ³⁾
	7.70	399.80 ± 185.34	194.61 ± 50.23 ³⁾
	3.85	399.04 ± 185.34	203.61 ± 40.48 ³⁾
导升明	0.167	405.54 ± 79.74	172.51 ± 47.06 ³⁾

3.3 各组大鼠视网膜 ET-1 蛋白及 ET-1mRNA 的表达 大鼠视网膜免疫组织化学显示模型组 ET-1 表达 IA 明显比正常组高($P < 0.01$),活血解毒方各剂量组 ET-1 的表达明显低于模型组,与模型组相比有统计学意义($P < 0.01$)。另外,与正常组相比,糖尿病大鼠模型组的 ET-1mRNA 的表达升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组相比,活血解毒方各剂量组及导升明组的 ET-1mRNA 值均下调,与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

4 讨论

ET-1 是由日本学者 Yanagisawa 从猪的主动脉内皮细胞培养液中分离纯化出来的一种由 21 个氨基酸组成血管活性多肽,具有很强的收缩血管及促进平滑肌细胞增殖的作用^[4]。血管内皮细胞在正

表 3 活血解毒方给药 20 周对糖尿病大鼠视网膜 ET-1 表达及 ET-1mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ET-1 表达 /IA	ET-1mRNA
			相对表达量 ET-1/ β -actin/($\times 10^{-2}$)
正常	-	12.76 \pm 3.27	0.31 \pm 0.13
模型	-	53.45 \pm 15.67 ¹⁾	0.86 \pm 0.35 ¹⁾
活血解毒方	15.40	20.48 \pm 5.52 ³⁾	0.33 \pm 0.15 ³⁾
	7.70	21.19 \pm 4.99 ³⁾	0.19 \pm 0.08 ³⁾
	3.85	31.25 \pm 10.47 ³⁾	0.40 \pm 0.16 ³⁾
导升明	0.167	24.20 \pm 5.35 ³⁾	0.25 \pm 0.11 ³⁾

常情况下储备微量 ET-1,在微循环障碍、组织缺氧和凝血酶等因素刺激下可增加 ET-1 的合成和释放^[5]。

Ang II 是糖尿病动物模型视网膜中的上调因子,高糖可诱导体外视网膜内皮细胞中 Ang II 的表达增加,近年来研究发现,Ang II 在眼内亦可合成并在高糖环境下被活化,给糖尿病大鼠服用 Ang II 的 AT12R 拮抗剂如氯沙坦能阻断这一作用并延缓 DR 进展^[6]。

活血解毒方由三七、黄连等药物组成,针对糖尿病视网膜病变阴虚内热、络脉瘀阻之病机,本方可滋阴清热,活血通络。前期研究发现活血解毒方可改善糖尿病视网膜血流状态,降低糖尿病大鼠视网膜 VEGF 的表达,增加 PEDF 的表达^[7]。

本实验中,糖尿病模型组大鼠血清中 Ang II 和 ET-1 的含量增加,同时免疫组化和 Real-time PCR 检测也发现大鼠视网膜全层 ET-1 蛋白和 mRNA 的表达增加,说明糖尿病大鼠模型 Ang II 和 ET-1 的水平是上调的。给予活血解毒方干预的糖尿病大鼠血清中 Ang II 和 ET-1 的含量下降,尤其是 ET-1 的下降较为明显,同时活血解毒方各剂量组大鼠视网膜

全层 ET-1 的 IA 也显著降低,与模型组相比有显著性差异。Real-time PCR 也提示活血解毒方各剂量组与模型组相比 ET-1mRNA 表达也有明显降低。

Ang II 是 ET 基因表达、合成和分泌的强效刺激因子,可刺激 ET-1mRNA 的表达,从而使视网膜血流抵抗指数增加,视网膜血流下降,促进 DR 的发生发展^[2]。因此,活血解毒方可能是通过抑制 Ang II 及 ET-1 的表达,对糖尿病大鼠视网膜组织起到一定的保护作用。而活血解毒方是否是通过影响肾素血管紧张素系统而起作用有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Franken A A, Derkx F H, Man in'tVeld A J, et al. High plasma prorenin in diabetes mellitus and its correlation with some complications[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1990, 71 (4) : 1008.

[2] 刘鹤南,陈晓隆. 血管紧张素 II 和血管内皮生长因子在视网膜新生血管中的表达及意义[J]. 国际眼科杂志, 2010, 10 (8) : 1481.

[3] 陈晓隆,李娟,底煜,等. 糖尿病大鼠视网膜内皮素-1 的表达[J]. 眼科新进展, 2011, 31 (1) : 5.

[4] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells[J]. Nature, 1988, 332 (6163) : 411.

[5] 尚海峰,张建国,杨景武,等. 糖尿病大鼠视网膜组织中缺氧诱导因子-1 α 、内皮素-1 的表达研究[J]. 中国现代医药杂志, 2009, 11 (6) : 85.

[6] 刘旭阳,张清炯. 眼病的细胞和分子生物学基础[M]. 北京:科学出版社, 2010: 230.

[7] 姚青,韩静,黄黎明,等. 活血解毒方对糖尿病大鼠视网膜 PEDF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (23) : 162.

[责任编辑 聂淑琴]