

糖痹康对糖尿病大鼠血清神经性因子及坐骨神经神经性因子基因表达的影响

王佳, 刘铜华*

(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:探讨糖痹康对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病周围神经病变(diabetic penipheral neuropathy, DPN)大鼠神经生长因子基因表达的影响。方法:用 STZ 建立糖尿病大鼠模型,分为正常组、模型组、弥可保组、糖痹康低、中、高剂量组。连续给药 8 周后处死大鼠,用 ELISA 法测定血清神经生长因子(NGF)活性,实时荧光定量 PCR 法检测坐骨神经中 NGF 基因的表达。结果:与模型组比较,糖痹康中、高剂量组血清 NGF 水平均显著增高($P < 0.01$),坐骨神经 NGF 基因含量显著增高($P < 0.01$)。结论:糖痹康能增加糖尿病大鼠 NGF 蛋白及基因的表达,从而起到对周围神经的保护作用。

[关键词] 糖尿病周围神经病变;糖痹康;链脲佐菌素;神经生长因子

[中图分类号] R 285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)06-0160-04

The Influences of Tangbikang on the Oxidative Stress in Rats with Diabetic Peripheral Neuropathy

WANG Jia, LIU Tong-hua*

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influences of Tangbikang on the serum nerve growth factor(NGF) concentration and NGF mRNA expression in sciatic nerve in rats with diabetic penipheral neuropathy (DPN). **Method:** 70 SD rats were randomly divided into two groups: normal control 10 and diabetic penipheral neuropathy 60 by weight. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of STZ, $55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The diabetic models were affirmed upon blood glucose $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. And the diabetic rats were randomly divided into five groups: model group, methycobal treatment group, Tangbikang different dose treatment groups. After drug administration for 8 days, all the rats were sacrificed at week 8; The blood serum was obtained and NGF were detected; The sciatic nerve NGF gene was detected by the Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). All statistical calculations were made using the SPSS16.0 statistical package. **Result:** After the treatment by the middle and high dose of Tangbikang, the NGF level ($P < 0.01$, $P < 0.01$) in the blood serum increased greatly. The expression of NGF gene incresed ($P < 0.01$). **Conclusion:** Tangbikang can increase the NGF protein and gene expression to play an important role of peripheral nerve protection.

[Key words] diabetic peripheral neuropathy; Tangbikang; streptozotocin; nerve growth factor

[收稿日期] 2010-02-24

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技专项(2009ZX09103)

[第一作者] 王佳,博士研究生,研究方向:中医药防治糖尿病及其并发症, Tel:13718878743, E-mial:wangjia-amy@126.com

[通讯作者] *刘铜华, Tel:(010)64286642, E-mail:thliu@tom.com

有 30% 至 50% 的糖尿病患者存在糖尿病周围神经病变 (Diabetic penipheral neuropathy, DPN)^[1], 它是糖尿病的慢性并发症和主要致残因素。DPN 最常累及的神经是感觉神经和交感神经, 这些神经病变与神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 的关系密切。NGF 是众多神经营养因子中重要的一员, 它对神经元的生长、修复、再生具有重要意义^[2]。中医药在治疗 DPN 上具有一定的优势, 糖痹康是在传统经方黄芪桂枝五物汤(《金匱要略·血痹虚劳病脉证并治》)基础上, 结合现代研究成果和临床经验创制的中药新药, 本研究通过观察糖痹康对血清 NGF 蛋白以及坐骨神经 NGF 基因的表达式的影响, 探讨其治疗大鼠 DPN 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器 光学显微镜 (奥林巴斯, 型号 L340099); ONE TOUCH 血糖仪 (Lifescan, U. S. A.), 全自动酶标仪 (STAT FAX 2100 Awareness Technology Inc. USA); SLAN 双通道荧光定量 PCR 仪 (上海宏石医疗科技有限公司); Takara TP600 型梯度 PCR 仪 (Takara, JPN); T6 紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司); 凝胶紫外分析仪 (JY02S 型, 北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.2 药品和试剂 链尿佐菌素 (Streptozotocin, STZ) (Sigma, 批号 S0130); 弥可保 (卫材药业, 批号

080826A); NGF Elisa 试剂盒 (R&D Systems Inc. USA); TRIZOL (Inventrogen Inc. USA); DEPC (Amresco Inc. USA); 琼脂糖 (Biowes Inc. SPN); 糖痹康: 由黄芪、女贞子、桂枝、赤芍、黄芩、黄连、水蛭组成。

1.3 造模、分组与给药 SD 大鼠 70 只, 体重 (200 ± 20)g, 雄性。大鼠禁食 12 h 后, STZ 用 0.1 mol·L⁻¹ 枸橼酸缓冲液 (pH4.4) 配成 1% 的浓度, 以 55 mg·kg⁻¹ ip。72h 后测定血糖值, 选持续血糖水平 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹ 以上者为造模成功。成模大鼠按体重随机分为模型组、弥可保组 (17.5 mg·kg⁻¹), 糖痹康低、中、高剂量组 (分别为 4.28, 8.56, 17.12 g·kg⁻¹), 正常组 (生理盐水 10 mL·kg⁻¹)。各组 10 只均 ig, 1 次/d, 连续 2 个月。均自由取食、饮水。

1.4 记录大鼠一般状态 观察大鼠的精神状态、体毛、饮水量、二便体重及活动情况等。

1.5 血清 NGF 检测 采用 ELISA 法测定大鼠血清 NGF 的含量, 按试剂盒说明操作。

1.6 坐骨神经 NGF mRNA 表达检测 应用实时荧光定量 PCR 检测 NGF mRNA 的表达。

1.6.1 引物合成 根据 NIBC 数据库中的 NGF 基因序列及 β-actin 基因序列, 以 PrimerPremier 5.0 软件设计引物 (表 1), 由北京擎科生物技术有限公司合成。

表 1 本实验中所用引物序列

Primer 名称	序列 (5' to 3')	碱基数	产物长度/bp
β-actin 190/193	FW: GAAGTGTGACGTTGACATCCG	21	282
	RV: GCCTAGAAGCATTGCGGTTG	20	
NGF-B 656/657	FW: CGGCTTTGGTGACTGGATAG	20	104
	RV: TGAGGACCAGACGACAGG	20	

1.6.2 总 RNA 制备 处死大鼠, 暴露坐骨神经, 放入冻存管, 置于液氮中, 转到 -80 °C 冰箱保存备用。提总 RNA 时, 从 -80 °C 冰箱取冰冻坐骨神经约 30 mg, 用 TRIZOL 通用型 RNA 快速提取试剂盒, 提取样品 RNA, 最后加入 30 μL 无 RNase 的水, 溶解 RNA。经凝胶电泳后, 使用紫外分光光度仪检测提取总 RNA 的质量和浓度, 要求 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8 ~ 2.0, 并计算 RNA 含量。

1.6.3 cDNA 的合成 RNA 3 μg, 引物 (50 μmol·L⁻¹) T18 4.0 μL, DEPC 处理 H₂O 至 25 μL, 混匀, 70 °C 5 min, 立即冰浴, 5 × buffer 8.0 μL, dNTP (10 mmol·L⁻¹) 4 μL, RNase Inhibitor (MBI) 1 μL, 混匀,

37 °C 5 min, M-MuLV (MBI) 2.0 μL, 42 °C 60 min, 70 °C 10 min, 合成的 cDNA 置于 -80 °C 保存备用。

1.6.4 定量 PCR 检测 25 μL 体系 取 0.2 mL 薄壁 PCR 管, 分别编号, 加入 cDNA/ ddH₂O 1 μL, 10 mmol·L⁻¹ 引物 FW/RV 0.5 μL, 2 × PCR Mix 12.5 μL, Eva green 1 μL, ddH₂O 10 μL, 混匀, 置于 SLAN 荧光定量 PCR 仪中, 条件: 95 °C 5 min 预变性后, 95 °C 20 s ~ 55 °C 20 s ~ 72 °C 25 s (荧光检测), 40 个循环, 反应完数据保存。由溶解曲线判断 PCR 反应的特异性。每个组别做 3 次定量检测, 记录 CT 值, 计算 CT 均值、ΔCT、ΔΔCT 和 2^{-ΔΔCT}。

1.6.5 PCR 产物检测 20 μL 体系 取 0.2 mL 薄壁

PCR 管, 编号。向各管中加入含染料 $2 \times$ PCR TaqMix $10 \mu\text{L}$; 加入正反向引物各 $0.5 \mu\text{L}$, 向管中加入混合的 cDNA 各 $1 \mu\text{L}$ 。各管补加水至 $20 \mu\text{L}$ 。混匀, 置于 TP600 型 PCR 仪中。 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s , 40 个循环 5 min $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pause, 取扩增产物各 $8 \mu\text{L}$, DL2000 分子质量标准 $5 \mu\text{L}$ /泳道。1% 琼脂糖凝胶 120 V 电压下电泳 25 min , 用凝胶紫外分析仪观察, 分析目的条带的特异性。

1.7 统计学处理 用 SPSS 16.0 系统进行数据分析, 数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 其中 PCR 的 CT 值经转换后用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 相对表达法比较^[3], $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖痹康对 DPN 大鼠一般状态的影响 造模后, 大鼠逐渐出现不同程度的进食增加、尿量增多、活动明显迟缓、消瘦、精神不振、体毛缺乏光泽等高血糖表现, 后期还出现了多种糖尿病并发症, 如溃疡、白内障等, 以上情况在弥可保组和糖痹康各治疗组有不同程度的改善。

2.2 糖痹康对 DPN 大鼠血清 NGF 水平的影响 模型组血清 NGF 水平显著降低。与模型组比较, 糖痹康中、高剂量组可以显著提高血清 NGF 水平 ($P < 0.01$), (表 2)。

2.3 PCR 产物鉴定 从 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳 可以看出样品 PCR 产物条带清晰, 无杂带, 阴性对照无条带, 说明引物与底物反应具有特异性,

(图 1)。

表 2 糖痹康对 DPN 大鼠血清 NGF 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	NGF / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	—	680.11 ± 21.86
模型	—	$120.98 \pm 13.47^{(2)}$
弥可保	1.75×10^{-2}	$146.78 \pm 12.41^{(2)}$
糖痹康	4.28	127.71 ± 8.86
	8.50	$150.80 \pm 10.28^{(2)}$
	17.12	$155.78 \pm 13.09^{(2)}$

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)。

2.4 扩增效率一致性分析 样本 cDNA 梯度稀释为 $1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$ 倍, 加阴性对照, 分别应用相关引物进行实时荧光定量 PCR 扩增, 实验中每样本均做 3 个复孔, 所有计算采用每个样本所得的平均循环数值, 做出标准曲线。NGF 和 β -actin 对应的直线相关系数 R^2 分别为 0.999 3 和 0.998 1, 表明其扩增效率一致, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 相对定量方法适合于本试验。

2.5 糖痹康对 DPN 大鼠坐骨神经 NGF 基因表达的影响 运用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 相对定量差异法统计各组与模型组 NGF 基因表达的差异。正常组、弥可保组、糖痹康低、中、高组的 NGF 基因表达显著升高 (分别是模型组的 14.78 倍、4.66 倍、6.27 倍、4.93 倍、5.81 倍, $P < 0.01$), 与血清 NGF 蛋白表达结果一致 (见表 3)。

表 3 糖痹康对 DPN 大鼠坐骨神经 NGF 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	NGF 平均 CT	β -actin 平均 CT	ΔCT	$\Delta\Delta\text{CT}$	相对模型组 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$
正常	24.36 ± 0.12	24.87 ± 0.23	-0.52 ± 0.26	-3.29 ± 0.56	$14.78 \pm 6.33^{(2)}$
模型	23.84 ± 0.29	21.15 ± 0.02	2.70 ± 0.31	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
弥可保	21.84 ± 0.15	21.16 ± 0.18	0.68 ± 0.06	-2.02 ± 0.28	$4.66 \pm 1.01^{(2)}$
糖痹康	23.36 ± 0.11	22.89 ± 0.10	0.47 ± 0.11	-2.22 ± 0.40	$6.27 \pm 2.02^{(2)}$
	23.23 ± 0.15	22.75 ± 0.21	0.48 ± 0.30	-2.22 ± 0.20	$4.93 \pm 0.62^{(2)}$
	23.21 ± 0.24	22.90 ± 0.15	0.31 ± 0.33	-2.39 ± 0.25	$5.81 \pm 1.02^{(2)}$

注: $\Delta\text{CT} = \text{CT}(\text{NGF}) - \text{CT}(\beta\text{-actin})$, $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}(\text{各组}) - \Delta\text{CT}(\text{模型组})$ 。

3 讨论

NGF 是最早被发现的神经营养因子, 其结构、生理特性已被研究得较为清楚。NGF 是一种相对分子质量为 27KD 的多肽, 主要的生物学特性在于促进神经元的分化发育和轴突的生长, 抑制神经元的凋亡, 维持神经的生理功能, 促进神经创伤的修复等方

面。DPN 的发病机制尚未完全明了, 病因并非是单一因素, 其中与神经营养因子缺乏密切相关。研究表明, DPN 时, 内源性 NGF 的减少引起神经痛觉减退, 外源性 NGF 的摄入能够修复受损的神经, 能够防止 STZ 糖尿病大鼠感觉神经病变引起的行为和表现异常^[4-5]。DPN 时, NGF 蛋白及其受体表达减少,

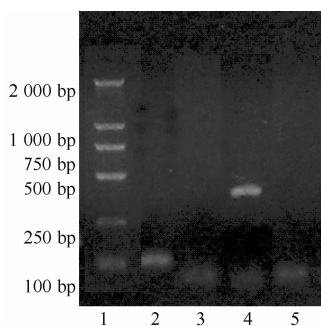


图 1 1% 琼脂糖凝胶电泳图

1: DL2000 DNA ladder; 2: NGF (104 bp); 3: NFG
空白对照; 4: β -actin (282 bp); 5: β -actin 空白对照

同样发现周围神经中的 NGF 基因表达也减少。

根据 DPN 病因病机和临床表现可将其归于中医“消渴”、“痹证”、“痿证”等范畴^[6], 属本虚标实。病机为“气阴不足, 毒瘀阻络”应以益气养阴、解毒化瘀通络为治则, 临床以黄芪桂枝五物汤化裁汤剂治疗 DPN 病变报道达 200 余篇, 结果表明疗效确切。在传统经方黄芪桂枝五物汤基础上组成具有益气养阴、解毒化瘀通络功效的方剂糖痹康, 方中黄芪益气实卫; 桂枝温经通阳; 女贞子补肝肾阴; 黄芪、女贞子合用气阴双补, 黄芪、桂枝相伍补气通阳; 赤芍散瘀止痛; 黄芩、黄连二药参合, 清热燥湿, 泻火解毒; 水蛭破血, 逐瘀; 全方配伍, 共奏益气养阴、解毒化瘀通络之效。

综上所述, 具有益气养阴、解毒化瘀通络的中药

糖痹康对大鼠 DPN 的确有疗效, 其能诱导 DPN 大鼠体内 NGF 蛋白及其基因的高表达, 使周围神经的结构和功能得到了保护, 这可能是其治疗 DPN 的一个重要靶点之一。

[参考文献]

- [1] Anjali D Deshpande, Marcie Harris-Hayes, Mario Schootman. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications[J]. *Phys Ther*, 2008, 8(11):1254.
- [2] Pittenger G, Vinik A. Nerve Growth Factor and Diabetic Neuropathy[J]. *Exp Diabetes Res*, 2003, 4(4):271.
- [3] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $[-\Delta\Delta C(T)]$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402.
- [4] Anand P, Terenghi G, Warner G. *et al.* The role of endogenous nerve growth factor in human diabetic neuropathy[J]. *Nat Med*, 1996, 2(6):703.
- [5] Goss J R, Goins W F, Lacomis D. *et al.* Herpes simplex-mediated gene transfer of nerve growth factor protects against peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetes in the mouse [J]. *Diabetes*, 2002, 51(7): 2227.
- [6] 果会玲, 姚增全. 糖尿病性周围神经病变的中医药治疗[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2009(6):28.

[责任编辑 何伟]