

丹蛭降糖胶囊对实验性糖尿病模型大鼠 pref-1 mRNA 表达的影响

方朝晖^{1*}, 夏长青², 苏晓燕³, 贾典荣¹

(1. 安徽中医学院第一附属医院, 安徽 合肥 230031;

2. 杭州市余杭区中医院, 杭州 311100; 3. 淮南联合大学, 安徽 淮南 232001)

[摘要] 目的: 观察丹蛭降糖胶囊对小剂量链脲佐菌素(STZ)加高热量饮食诱导的实验性糖尿病模型大鼠脂肪组织前脂肪细胞因子-1(preadipocyte factor-1, pref-1) mRNA 表达的影响。方法: 雄性 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、治疗组(马来酸罗格列酮组、丹蛭降糖胶囊组), 空白组喂以基础饲料, 模型组与治疗组注射小剂量 STZ 并喂以高热量饲料, 提取大网膜脂肪组织总 RNA, 采用 RT-PCR 技术扩增 pref-1 基因片段, 检测其表达水平。结果: 丹蛭降糖胶囊能降低模型大鼠空腹胰岛素(Fins)含量, 降低 pref-1 mRNA 表达, 提高胰岛素敏感指数(ISI)。结论: 丹蛭降糖胶囊对实验性糖尿病模型大鼠脂肪分化功能有显著改善作用, 提示 pref-1 可能是其治疗 2 型糖尿病的一个作用靶点。

[关键词] 糖尿病; 脂肪分化; 丹蛭降糖胶囊; 前脂肪细胞因子-1

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0064-04

Effects of Danzhijiangtang Capsule on Experimental Diabetes Animal Model in Rats of Pref-1 mRNA Expression

FANG Zhao-hui^{1*}, XIA Chang-qing², SU Xiao-yan³, JIA Dian-rong¹

(1. Department of Endocrinology, the First Hospital of Anhui Traditional Chinese Medicine College, Hefei 230031, China; 2. Yuhang District Chinese Medicine Hospital, Hangzhou 311100, China; 3. Huainan Union University, Huainan 232001, China)

[Abstract] **Objective:** Experimental Study of DanzhiJiangtang Capsule(DJC) 's Effect on diabetic rats induced by low-dose streptozotocin (STZ) and high-energy diet. Preadipocyte factor-1 mRNA 's expression was used for observation. **Methods:** Male Wistar rats were randomly divided into blank group, model group and treatment groups(rosiglitazone maleate group and DJC group), Normal diet was used to feed the blank group. Model group and treatment groups were injected with STZ and fed high-calorie feed. Total RNA was extracted from omental adipose tissue using RT-PCR amplified pref-1 gene fragment to detect the level of its expression. **Results:** DJC lowered the FIns content of model rats, reducing the expression of pref-1 mRNA to improve the ISI. **Conclusion:** DJC has the effect of significant improvement for experimental diabetes on rat adipose differentiation. It indicates pref-1 may be a target for the treatment of type 2 diabetes.

[Key words] diabetes; adipose differentiation; DJC; preadipocyte factor-1

[收稿日期] 2009-08-11

[基金项目] 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项(06-07LP22);安徽省自然科学基金项目(070413130);安徽省十一五科技攻关项目(08010302184)

[通讯作者] * 方朝晖, E-mail: fangzhaohui@medmail.com.cn

肥胖被认为是糖尿病发生的独立危险因素, 流行病学和实验研究已证明: 约 3/4 的 2 型糖尿病 (T2DM) 患者在起病时存在肥胖现象^[1]。多项研究表明, 在肥胖发展为糖尿病的过程中, 脂肪细胞的分化功能起着至关重要的作用。前脂肪细胞因子-1 (pref-1) 主要的生理功能为抑制脂肪分化, 造成脂肪代谢障碍^[2~3]。本研究通过观察具有益气养阴活血功效的中药复方丹蛭降糖胶囊对实验性糖尿病模型大鼠脂肪组织 pref-1 mRNA 表达的影响, 探讨中药对 T2DM 的多途径、多靶点的综合调节作用。

1 材料

1.1 实验动物 Wistar 雄性大鼠 48 只, 3 月龄, 体重 (200 ± 20) g, 由安徽省安立实验动物有限公司提供批号: SCXK(苏) 2007-0036。

1.2 药物及试剂 马来酸罗格列酮(葛兰素史克有限公司生产, 4 mg/片, 批号: 06020090); 丹蛭降糖胶囊(DJC) (由太子参、地黄、牡丹皮、泽泻、水蛭等组成, 安徽中医学院第一附属医院中药制剂中心生产, 批号为 20060601); STZ(美国 Sigma 公司); RT-PCR 试剂盒 (Promega 公司); Taq 酶 (Promega 公司); dNTP (Promega 公司); DNA Marker (TaKaRa 公司)。

1.3 主要仪器 血糖仪, 美国强生公司; 台式高速离心机, 德国 Eppendorf; UV-754 紫外分光光度计, 上海第三分析仪器厂; 电泳仪, 美国 BIO-RAD 公司; ATC 201 型 PCR 扩增仪, 美国 APPOLO 公司; 温度梯度基因扩增仪, 德国 MIONETRA; 凝胶成像系统, 江苏省捷达科技发展有限公司; PCR 反应管, Axygen 公司。

2 方法

2.1 动物分组及造模

2.1.1 动物分组 48 只大鼠基础饲料适应性饲养 1 周, 基础饲料(蛋白质 23%, 碳水化合物 53%, 脂肪 5%) 购自安徽省安立实验动物有限公司。48 只大鼠随机抽取 12 只大鼠作为空白组 (blank, B 组), 其余均予以造模, 将造模成功的 32 只大鼠随机分为模型组 (model, M 组)、马来酸罗格列酮组 (rosiglitazone maleate, R 组)、丹蛭降糖胶囊组 (DJC + R 组), 其中 M 组 10 只、R 组 11 只、D 组 11 只。

2.1.2 动物模型制作 明暗周期 12/12 h, 自由摄食、饮水, 空白组继续喂以基础饲料至实验结束。模型组、马来酸罗格列酮组和丹蛭降糖胶囊组喂以高脂饲料 4 周。实验前测各组大鼠血糖均正常, 除空

白组外, 其余 3 组高脂饲料(基础饲料添加 28% 蔗糖、20% 炼猪油、1% 胆固醇和 0.25% 胆酸盐等混合形成, 购自安徽省安立实验动物有限公司) 喂养 4 周后, 均按 25 mg · kg⁻¹ 的剂量向每只大鼠尾 iv STZ (溶于 0.1 mmol · L⁻¹ 柠檬酸缓冲液, pH4.4)。造模成功的标准为: 造模 72 h 后, 予以禁食 12 h, 行口服糖耐量实验, 按 2 g · kg⁻¹ ig 20% 葡萄糖溶液, 以糖负荷 2 h 血糖 11.1 mmol · L⁻¹ 或随机血糖 16.7 mmol · L⁻¹ 为造模成功。造模成功后, 除空白组外, 其余各组继续喂以高热量饲料至实验结束。

2.2 给药方法 R 组和 D 组均给予马来酸罗格列酮 4 mg · kg⁻¹ · d⁻¹[4] ig, D 组在此基础上加用丹蛭降糖胶囊 0.47 g · kg⁻¹ · d⁻¹ (成人剂量的 6.3 倍) ig, B 组与 M 组予生理盐水 5 mL · kg⁻¹ · d⁻¹, 共 4 周。

2.3 生化指标的检测 治疗前后尾静脉采血, 采用血糖仪测定大鼠的血糖; 空腹血清胰岛素水平 (Fins) 水平测定, 采用放免法; 胰岛素敏感性指数 (ISI) 以空腹血糖 (FPG) 与 Fins 乘积的倒数表示, ISI = In[1 / (FINS × FPG)]。

2.4 RT-PCR 检测脂肪组织 pref-1 mRNA 表达

2.4.1 脂肪组织总 RNA 的提取 全身麻醉后无 RNase 操作提取腹部大网膜, 肾脏周围脂肪组织 50 mg, 生理盐水漂洗, 标本编号记录后液氮速冻保存备用。按 Rneasy Mini Kit 试剂盒说明书进行, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察总 RNA 提取情况。

2.5.2 RT-PCR 按照试剂盒使用方法进行: 逆转录用 20 μL 反应体系进行, 其中包括 5 μL 的总 RNA、MgCl₂ 4 μL、10 × Buffer 2 μL、AMV Reverse Transcriptase 0.62 μL、dNTP Mixture 2 μL、Oligi(dT) Primer 1 μL、Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor 0.5 μL。PCR 反应用 1 μL cDNA 进行扩增 (-actin 作为内参对照), 加入 PCR 反应体系中, 包括 10 × PCR Buffer 2.5 μL、ddH₂O 16.8 μL、Taq(5.0 U · μL⁻¹) 0.2 μL、dNTP(2.0 mmol · L⁻¹) 2.5 μL、上下游引物(10 μM) 各 1 μL; PCR 扩增 35 个循环包括: 94 °C 变性 40 s、51 °C 退火 40 s、72 °C 延伸 40 s。1% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物, 取出凝胶, 在紫外观察灯下观察结果, 拍片。拍照后应用捷达凝胶成像系统进行面积灰度扫描, 以条带光密度值代表其表达量。大鼠 pref-1、-actin 引物设计: 采用 Prime5 软件设计, 根据 Gen Bank 设计引物, 由上海生物工程

公司合成, 具体序列见表 1。

表 1 PCR 扩增上游和下游引物核酸序列

名称	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'
Ref1(254bp)	5-AGA CCT TCA ACA CCC CAG-3	5-CAC GAT TTT CCT CTC ACC-3
-actin(539bp)	5-CCACT CCC ATC CTC TAA G-3	5-CIG TCC GAT CIG CIC CAA-3

2.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。

3 结果

3.1 对大鼠血糖、空腹胰岛素和胰岛素敏感指数的影响 从表 2~3 可见, 造模后, 与空白组比较, 模型组、各治疗组大鼠血糖和 FINS、ISI 均有显著差异 ($P < 0.01$)。治疗后, 与空白组相比较, 各组大鼠血糖和 FINS 仍明显高于空白组 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各治疗组大鼠血糖改善不多 ($P > 0.05$); FINS 明显降低、ISI 明显升高 ($P < 0.01$), 丹蛭降糖胶囊组优于马来酸罗格列酮组 ($P < 0.05$)。

表 2 对各组大鼠血糖的影响 (̄±s)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	n	造模后 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)		治疗后 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	
			0h	2h	0h	2h
B组	—	11	5.22 ± 1.11	6.18 ± 1.31	5.34 ± 1.23	6.09 ± 1.35
M组	—	9	9.33 ± 1.17 ¹⁾	15.04 ± 1.76 ¹⁾	9.49 ± 1.62 ¹⁾	15.18 ± 1.96 ¹⁾
R组	40	9	9.26 ± 1.39 ¹⁾	15.03 ± 1.64 ¹⁾	8.37 ± 1.34 ¹⁾	14.56 ± 1.74 ¹⁾
R+DC	470	10	9.29 ± 1.31 ¹⁾	14.97 ± 1.61 ¹⁾	8.21 ± 1.48 ¹⁾	14.31 ± 1.51 ¹⁾

注: 与 B 组比较¹⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 3 对各组大鼠 FINS 和 ISI 的影响 (̄±s)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	n	造模后		治疗后	
			Fins ($\text{mIU} \cdot \text{L}^{-1}$)	ISI	Fins ($\text{mIU} \cdot \text{L}^{-1}$)	ISI
B组	—	11	16.55 ± 1.45	-4.18 ± 1.14	16.73 ± 1.38	-4.23 ± 1.15
M组	—	9	31.09 ± 2.24 ²⁾	-5.18 ± 1.21 ¹⁾	31.79 ± 1.86 ¹⁾	-5.19 ± 1.21 ¹⁾
R组	40	9	31.89 ± 2.38 ¹⁾	-5.20 ± 1.24 ¹⁾	26.08 ± 1.06 ^{1, 2)}	-4.92 ± 1.24 ^{1, 2, 3)}
R+DC组	470	10	31.40 ± 2.18 ¹⁾	-5.18 ± 1.22 ¹⁾	25.38 ± 1.66 ^{1, 2)}	-4.74 ± 1.41 ^{1, 2, 3)}

注: 与 M 组比较²⁾ $P < 0.01$; 与 R 组比较³⁾ $P < 0.05$; ⁴⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.2 对大鼠脂肪组织 Pref-1 mRNA 表达量的影响

从见表 4 可见, 模型组、各治疗组大鼠脂肪组织 pref-1 mRNA 表达水平高于空白组 ($P < 0.01$), 各治疗组低于模型组 ($P < 0.01$), 丹蛭降糖胶囊组大鼠脂肪组织 pref-1 mRNA 的表达水平低于马来酸罗格列酮组 ($P < 0.01$)。

4 讨论

pref-1 属于类表皮生长因子家族成员, 在脂肪细胞中的表达具有高度的特异性。研究表明, pref-

1 mRNA 高度表达于小鼠的 3T3-L1 前脂肪细胞系, 然而随着脂肪细胞的分化, 其表达可迅速下调^[5], pref-1 mRNA 持续高表达可明显抑制脂肪细胞分化, 说明 pref-1 在前脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化过程中是一个重要的抑制性分子标志。pref-1 主要的生理功能为抑制脂肪分化, pref-1 mRNA 表达异常会导致脂肪细胞的分化障碍, 进而出现脂代谢障碍, 糖代谢异常, 引起糖耐量减低和糖尿病的发生。

表 4 大鼠脂肪组织 pref-1 mRNA 的表达水平的比较 (̄±s)

组别	n	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	pref-1 mRNA (样本强度 / 内参强度)
B	11	—	0.60 ± 0.03
M	9	—	3.58 ± 0.12 ¹⁾
R	9	4.0	3.14 ± 0.31 ^{1, 2)}
R+DJC	10	470	2.27 ± 0.23 ^{1, 2, 4)}

我们既往的研究表明, 气虚阴亏血瘀是 T2DM 的主要病机, 阴虚是 DM 病机发生的实质, 气虚则是 T2DM 不愈之症结, 而瘀血既是其病理产物也是其病因, 是其并发症的关键, 故以益气养阴活血法为主进行组方是治疗 T2DM 的首选方案^[6~8]。选择具有益气养阴活血作用的中药太子参、生地黄、丹皮、菟丝子、泽泻、水蛭等组成中药复方 DJC。本方中太子参补益脾肾之气, 生地黄滋养脾肾之阴, 菟丝子补肾固精; 丹皮、水蛭行气活血, 化瘀通络; 泽泻清热泻痰浊。全方阴阳互济, 补通兼施, 寒温并调, 补不碍邪, 攻不伤正, 共奏益气养阴, 活血化瘀之功。本实验结果表明丹蛭降糖胶囊能显著改善实验性糖尿病大鼠模型的 Fins、ISI, 有效降低大鼠脂肪组织 pref-1 mRNA 的表达。提示: 中药可能通过改善脂肪细胞的分化功能, 脂肪组织对胰岛素敏感性增加, 摄取血清中脂质的能力增强, 改善了糖尿病的脂毒性, 从而减轻脂肪组织的胰岛素受体, 降低血糖。本研究结果显示 pref-1 可能是具有益气养阴活血之功的中药复方治疗 T2DM 的一个作用靶点, 其具体机制有待进一步阐明。

[参考文献]

- [1] 王志静, 任铁生, 王梅松等肥胖与糖尿病发病的关系 [J]. 中国慢性病预防与控制, 1999, 7(1): 26.
- [2] Mei B, Zhao L, Chen L, Sul HS. Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing [J]. Biochem J, 2002, 364: 137.