

丹蛭降糖胶囊对胰岛素抵抗大鼠 PPAR- γ mRNA 表达的影响

方朝晖^{1*}, 王佑民², 王开成¹, 郭彦³, 刘玲², 胡国平²

(1. 安徽中医学院第一附属医院, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽医科大学第一附属医院, 安徽 合肥 230021;
3. 安徽医学高等专科学校, 安徽 合肥 230061)

[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胰岛素抵抗(IR)模型大鼠大网膜脂肪细胞过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ) 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、丹蛭降糖胶囊高剂量+马来酸罗格列酮组、丹蛭降糖胶囊低剂量组、丹蛭降糖胶囊高剂量组), 正常组喂以普通饲料, 模型组与治疗组注射小剂量 STZ 并喂以高热量饲料, 常规测定各组大鼠治疗前后的空腹血糖(FPG)和治疗后各组大鼠的空腹血清胰岛素水平(FIns), 计算胰岛素敏感性指数(ISI), 提取大网膜脂肪组织总 RNA, 采用逆转录 PCR 技术扩增 PPAR- γ 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 FPG 水平和 FIns 含量, 增加 PPAR- γ mRNA 表达, 提高 ISI。结论: 丹蛭降糖胶囊对大鼠 IR 有显著的改善作用, 提示其机制与中药复方的作用是多途径靶点的, 可能与提高 IR 大鼠脂肪细胞 PPAR- γ 基因的表达有关。

[关键词] 胰岛素抵抗; 丹蛭降糖胶囊; 过氧化物酶体增殖物激活受体- γ

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)04-0036-04

Experimental Study of Danzhi Jiangtang Capsule's Effect on PPAR- γ mRNA's Expression of Greater Omental Adipocyte in IR Rats

FANG Zhao-hui¹, WANG You-min², WANG Kai-cheng¹, GUO Yan³, LIU Ling², HU Guo-ping²

(1. The First Affiliated Hospital of Anhui College of TCM, Hefei 230031, China;

2. Endocrine Department of the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230021, China;

3. Anhui Medical College, Hefei 230061, China)

[Abstract] **Objective:** Investigate Danzhi Jiangtang Capsule's effect on peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) mRNA's expression in greater omental adipocyte in insulin resistance(IR) rats which were induced by low dose of streptozotocin(STZ) and high calorie food. **Methods:** Male Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, greating group. The rats of normal group were fed with common food while the others with high calorie food and injected with low dose of STZ. Fasting plasma glucose(FPG) level and fasting insulin(FIns) level of all rats were measured by routine methods, and insulin sensitivity index(ISI) was calculated accordingly. At the end of experimental treatment, the total mRNAs of greater omental adipose tissues were extracted and the genic fragments of PPAR- γ were amplified in order to detect their expression levels. **Results:** Danzhi Jiangtang Capsule could reduce the FPG level and FIns level in model rats, increase the PPAR- γ mRNA's expression and enhance ISI effectively. **Conclusions:** Danzhi Jiangtang Capsule can ameliorate IR conditon of the model rats and its mechanism is probably related to its effect of enhancing the genic expressional level of PPAR- γ .

[Key words] insulin resistance; Danzhi Jiangtang Capsule; PPAR- γ

[收稿日期] 2005-05-31

[基金项目] 国家中医药管理局中药新药开发专项课题(DIX025A)

[通讯作者] 方朝晖, Tel: (0551) 3171097; E-mail: Fangzhaohui@medmail.com.cn

目前已知核转录因子过氧化物酶体增生物激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ) 与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR) 密切相关^[1], 但中医药对 PPAR- γ 表达的影响尚未有相关报道。我们的前期研究表明, 丹蛭降糖胶囊对 IR 大鼠有较好的改善作用, 为进一步探讨其改善 IR 的作用机理, 本实验观察了丹蛭降糖胶囊对小剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ) 加高热量饮食诱导的 IR 模型大鼠大网膜脂肪细胞 PPAR- γ mRNA 表达的影响。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 正常 Wistar 雄性大鼠 69 只, 体重 200 ± 20 g, 由河南医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号为 3212。基础饲料: 蛋白质占 23%, 碳水化合物占 53%, 脂肪占 5%; 购自安徽医科大学动物房。高热量饲料由基础饲料加猪油、麻油、鸡蛋和花生等混合而成(在 10000g 基础饲料中加入 150g 食盐, 50g 白糖, 2000g 猪油, 400g 麻油, 2000g 花生, 900g 鸡蛋, 碳水化合物 48%, 脂肪 22%, 蛋白质 20%), 自行配置。丹蛭降糖胶囊, 为安徽中医学院第一附属医院内制剂, 由药物制剂中心生产(批号为: 030125), 制备工艺为: 取太子参 1000g, 地黄 800g, 牡丹皮 800g, 泽泻 600g, 菟丝子 400g, 水蛭 100g 六味药材饮片加水浸泡 0.5h, 煎煮提取三次, 第一次加 10 倍量水煎煮 1.5h, 第二次、第三次加 8 倍量水煎煮提取 1h。合并提取液过滤, 减压浓缩至 4: 1, 加入 1% 壳聚糖醋水溶液搅匀, 冷藏静置絮凝 24h, 减压过滤, 滤液真空浓缩至相对密度为 1.05~ 1.10(60℃), 喷雾制粒, 干燥整粒, 充填抛光, 包装成 1000 粒胶囊。质检指标结论: 按本品制剂质量标准草案和中国药典 2000 年版一部附录 X IIC 微生物限度检查检验均符合规定。每粒胶囊含提取物 0.5g。马来酸罗格列酮片, 由葛兰素史克(天津) 有限公司生产(批号为: 03110001), 规格为 4mg/片。链脲佐菌素, 美国 sigma 公司产品, 由北京夏斯生物技术有限公司提供。¹²⁵I 胰岛素放射免疫试剂盒, 为中国原子能科学研究院同位素研究所产品。RNeasy Mini Kit 为 QIAGEN 公司产品, Taq 酶(含反应缓冲液) 、dNTP、AMV 反转录酶、核糖核酸酶抑制剂均购自 Promega 公司, 引物由广州瑞真生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 IR 大鼠模型的建立^[2] 18 月龄 Wistar 雄性

大鼠造模前先用基础饲料适应性饲养一周。明暗周期 12/12h, 自由摄食、饮水, 空白组 9 只继续喂以基础饲料至实验结束。模型组及治疗组喂以高热量饲料, 共计 4 周。然后按 25mg/kg 体重的剂量一次性腹腔内注射 STZ(溶于 0.1mmol/L 柠檬酸缓冲液, pH4.4)。造模成功的标准为: 于 72h 后禁食 12h 按 2g/kg 体重灌喂 20% D-葡萄糖溶液, 做口服糖耐量实验, 0 和 120min 血糖分别大于 7.0 和 11.1mmol/L。选择造模成功的 IR 大鼠 50 只, 分为模型组及治疗组, 继续喂以高热量饲料至实验结束, 治疗组同时灌胃给药, 空白组与模型组灌服生理盐水。

1.2.2 分组 分 6 组, 即: 空白组、模型组、治疗组(马来酸罗格列酮组、丹蛭降糖胶囊高剂量+ 马来酸罗格列酮组、丹蛭降糖胶囊低剂量组、丹蛭降糖胶囊高剂量组。中药高剂量组按临床成人剂量 12 倍即 1080mg/kg 灌胃给药, 中药低剂量组按临床成人剂量 6 倍即 540mg/kg 灌胃给药。), 除空白组 9 只外, 其余每组 12 只大鼠, 治疗持续时间 30d(其中治疗过程中死亡 15 只, 故最后每组有 9 只纳入统计数据。)

1.2.3 生化指标的检测 治疗持续时间 30d, 末次给药后禁食 12h 测血糖。血糖的测定采用美国雅培公司 Soft. Tact™“舒泰”血糖仪, 检测治疗前后大鼠的血糖。血清胰岛素水平测定采用放免法。胰岛素敏感指数测定按照李光伟的计算方法^[3], $ISI = \ln 1 / (FPG \times FIns)$ 。($\ln = \log e$, $FPG =$ 血糖, $FIns =$ 空腹胰岛素)

1.2.4 脂肪组织总 RNA 提取 全身麻醉后无 RNase 操作提取大网膜处脂肪组织约 30mg 速冻以尽量保持新鲜, 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。RNA 电泳进行验证, 如果 28SRNA: 18SRNA 约等于 2: 1, 则说明 RNA 提取成功并且 RNA 没有降解。

1.2.5 RT-PCR (1) 引物的设计: 大鼠 PPAR γ 、 β -actin(内参照) 引物设计参照 Gene Bank 网站发表的 DNA 序列自行设计。鼠 β -actin 上游引物: 5' GCCATGTACGTAGCCATCCA 3', 下游引物 5' AACCGCTCATTGCCGATAGT 3'; 扩增片段长度为 373bp。鼠 PPAR γ 上游引物: 5' CTGGCCTCCCTG-ATGAATAA 3', 下游引物 5' GCCTGCTCCACTGA-GAATA 3', 扩增片段长度为 205bp。(2) 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 逆转录(RT): a. 在 0.2mlEp 管配制 RT-PCR 反应液, 全量 20 μ L[模板 RNA 1 μ L, 5 \times

Reverse Transcritase Buffer 4 μ L, dNTP 8 μ L, RNasin 2 μ L (40U/ μ L), 下游引物 2.2 μ L, AMV2 μ L, 用无 RNA 酶水补至 20 μ L]。b. 以 3000rpm 离心 15s 后, 室温下静置 10min。c. 放入 PCR 仪中, 45 $^{\circ}$ C 下反应 1.5h, 99 $^{\circ}$ C 下 5min 灭活 AMV。d. 冰水冷却 5min。-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

聚合酶链反应 PCR: 在已消毒 0.2mlEp 管中配制反应液, 全量为 50 μ L [cDNA10 μ L, dNTP2 μ L, TaKaRa Ex Taq (5U/ μ L) 0.5 μ L, 10 \times Ex Taq Buffer (含 Mg²⁺) 5 μ L, 上游引物 1.2 μ L, 下游引物 0.3 μ L, ddH₂O 31 μ L]。轻轻弹打混匀后 3000rpm 离心 15s, 采用下列条件: a. 94 $^{\circ}$ C 预变性 1min; b. 94 $^{\circ}$ C 变性 30s; c. 57 $^{\circ}$ C 复性 30s; d. 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min; e. 72 $^{\circ}$ C 再延伸 4min。重复 b、c、d 三步 30 个循环。

1.2.6 光密度扫描测定 对电泳后凝胶拍摄的照片用凝胶成像系统进行分析, 用 PPAR γ 基因片段和 β -actin 二者扩增条带的吸光峰面积积分比值的大小反映 PPAR γ 表达水平的高低。

1.2.7 统计方法 所有数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组均数之间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 造模前后及给药前后各组动物空腹血糖的变化 造模后, 模型组及各给药组空腹血糖明显增加, 并具有非常显著性差异 ($P < 0.01$); 治疗后, 中药低剂量组与空白组比较大鼠空腹血糖有明显差异 ($P < 0.05$), 其余各用药组与空白组比较空腹血糖差异不明显 ($P > 0.05$), 但与模型组比较, 空腹血糖明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中中西药合用组血糖最低, 但各治疗组间差异无统计学意义。见表 1。

表 1 造模后和治疗 30d 后各组动物空腹血糖的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 (mg/kg)	FBG (mmol/L)	
		造模后	治疗 30d 后
空白组	—	5.41 \pm 1.31	5.68 \pm 1.61
模型组	—	9.23 \pm 1.57 ²⁾	9.33 \pm 1.89 ²⁾
丹蛭降糖胶囊组	540	8.61 \pm 1.45 ²⁾	7.89 \pm 2.48 ¹⁾
丹蛭降糖胶囊组	1080	8.79 \pm 1.51 ²⁾	7.41 \pm 1.71 ³⁾
马来酸罗格列酮组	0.8	9.33 \pm 1.15 ²⁾	6.91 \pm 1.52 ²⁾
中西药合用组	丹蛭降糖胶囊 1080 马来酸罗格列酮 0.8	9.26 \pm 1.65 ²⁾	6.66 \pm 1.95

注: 与空白组比较: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较: ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (下同)。

2.2 对各组动物血清胰岛素水平、胰岛素敏感性指

数的影响 与空白组比较, 除中西药合用组外, 各给药组大鼠 FIns, ISI 均有明显差异 ($P < 0.01$ 或 0.05); 与模型组比较, 除中药低剂量组外, 各给药组 FIns, ISI 均有明显差异 ($P < 0.01$ 或 0.05)。见表 2。

表 2 治疗 30d 各组大鼠血清胰岛素、胰岛素敏感性指数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 (mg/kg)	FIns (mU/L)	ISI
空白组	—	24.97 \pm 5.61	-5.10 \pm 0.22
模型组	—	43.86 \pm 9.68 ²⁾	-5.96 \pm 0.15 ¹⁾
丹蛭降糖胶囊组	540	36.88 \pm 9.09 ²⁾	-5.76 \pm 0.39 ²⁾
丹蛭降糖胶囊组	1080	33.56 \pm 7.26 ^{2,3)}	-5.65 \pm 0.38 ³⁾
马来酸罗格列酮组	0.8	32.10 \pm 7.65 ^{1,4)}	-5.59 \pm 0.19 ⁴⁾
中西药合用组	丹蛭降糖胶囊 1080 马来酸罗格列酮 0.8	28.79 \pm 12.13 ⁴⁾	-5.26 \pm 0.26 ⁴⁾

2.3 总 RNA 结果 见图 1。见溴酚蓝移至胶的 2/3 处, 停止电泳, 取出凝胶于紫外分析仪下观察, 可见两条带, 后面条带从亮度、宽度约是前面的 2 倍, 即 28sRNA:18sRNA = 2:1, 说明提取的 RNA 未降解, 后续扩增结果亦证明 RNA 提取成功。

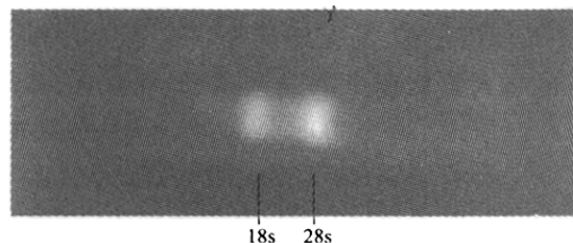


图 1 大鼠网膜脂肪细胞总 RNA 电泳结果

2.4 对大鼠网膜脂肪组织转录因子 PPAR γ mRNA 表达量的影响 见表 3, 图 2。治疗后, 与空白组比较, 模型组表达显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 除中药低剂量组外, 其余各治疗组表达量均明显增加 ($P < 0.01$ 或 0.05), 以中西药合用组增加最为显著。

表 3 治疗 30d 各组大鼠 PPAR γ mRNA 表达量 (与 β -actin 的亮度比值) 的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 (mg/kg)	亮度比值
空白组	—	0.685 \pm 0.059
模型组	—	0.604 \pm 0.017 ²⁾
丹蛭降糖胶囊组	540	0.642 \pm 0.066
丹蛭降糖胶囊组	1080	0.650 \pm 0.061 ³⁾
马来酸罗格列酮组	0.8	0.676 \pm 0.036 ⁴⁾
中西药合用组	丹蛭降糖胶囊 1080 马来酸罗格列酮 0.8	0.680 \pm 0.048 ⁴⁾

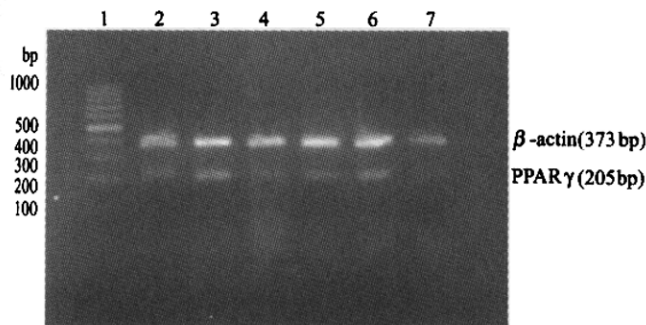


图2 丹蛭降糖胶囊给药30d对IR大鼠大网膜脂肪组织
转录因子PPAR γ mRNA表达量的影响

1. Markers; 2. 空白组; 3. 模型组; 4. 丹蛭降糖胶囊低剂量组; 5. 丹蛭降糖胶囊高剂量组; 6. 马来酸罗格列酮组; 7. 中西药合用组。

3 讨论

丹蛭降糖胶囊由太子参、丹皮、生地黄、泽泻、菟丝子、水蛭组成的复方制剂。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,使肾络通畅;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升高FIns、ISI,有效减轻IR程度,并呈剂量依赖性。丹蛭降糖胶囊高剂量能有效地增加PPAR- γ mRNA的表达,从而改善脂肪组织的IR。提示中药复方改善IR是多方面、多途径的综合作用,并侧重于中医整体症候的改善。本实验初步阐明了丹蛭降糖胶囊能够通过增加PPAR- γ mRNA表达、增强胰岛素敏感性而防治IR的作用机理,为临床应用中中医益气养阴活血法防治IR提供了理论依据,而其他可能机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Shulman G I. Cellular mechanisms of insulin resistance[J]. J Clin Invest, 2000, 106: 171-176.
- [2] 司晓晨, 尚文斌, 卞慧敏, 等. 链脲佐菌素加高脂膳食诱导2型糖尿病大鼠模型[J]. 安徽中医临床杂志, 2003, 15(5): 383-395.
- [3] 李光伟, 潘孝仁, Lilliojas, 等. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数[J]. 中华内科杂志, 1993, 32(10): 656.