

糖脂清颗粒对 2 型糖尿病大鼠心肌组织 AT1R 表达影响的实验研究

顾震宇¹ 王旭¹ 洪兵² 尚文斌¹ 滕士超³ 徐奚如³ 俞晶华¹

(1.南京中医药大学,江苏南京 210023; 2.南京中医药大学附属淮安中医院,江苏淮安 223001;
3.江苏省中医院,江苏南京 210029)

摘要 目的:观察糖脂清颗粒对 2 型糖尿病大鼠心肌组织血管紧张素 II 1 型受体(AT1R)蛋白和 mRNA 表达的影响,探讨其干预 2 型糖尿病大鼠心肌纤维化的机制。方法:雄性 SD 大鼠,采用高糖高脂饲料和一次性小剂量(30mg/kg) 2%链脲佐菌素(STZ)溶液腹腔注射制作 2 型糖尿病模型。将模型大鼠分为模型组、厄贝沙坦组和糖脂清颗粒高、中、低剂量组,另取 5 只正常大鼠设为正常组,分别给药或生理盐水 8 周后,检测心肌组织 AT1R 蛋白及 mRNA 的表达。结果:糖脂清高、中剂量组大鼠心肌组织 AT1R 蛋白及 mRNA 表达明显低于模型组,糖脂清低剂量组 AT1R mRNA 表达也较模型组显著降低。结论:糖脂清颗粒通过抑制心肌组织 AT1R 蛋白及 mRNA 的表达,抑制糖尿病大鼠心肌纤维化的发展。

关键词 糖脂清颗粒 糖尿病心肌纤维化 AT1R 实验研究

中图分类号 R587.105 文献标识码 A 文章编号 1672-397X(2014)12-0083-03

糖尿病心脏病是糖尿病心脏病的一类特异性病变。目前研究认为,心肌间质纤维化在糖尿病心脏病的发生发展中起着重要的作用,而心肌间质纤维化可能与肾素-血管紧张素系统激活(RAS)、细胞因子、内皮素等多种因素有关。本研究以心肌组织的血管紧张素 II 1 型受体(AT1R)为切入点,探讨糖脂清颗粒对 2 型糖尿病大鼠心肌纤维化的作用机制。

1 实验材料

1.1 实验动物 健康 SD 雄性大鼠,清洁级,4~5 周龄,体重 180~220g,由南京中医药大学动物实验中心提供,许可证:scxk 浙 20080033。每笼 3 只,分笼饲养,湿度 40%~60%,室温 16~26℃。

1.2 主要药物和试剂 糖脂清颗粒(药物组成:黄精、枸杞、泽兰、僵蚕、鬼箭羽等),南京中医药大学附属医院制剂室制备提供。厄贝沙坦片(0.15g/片),赛诺菲(杭州)制药有限公司,国药准字:J20080061。高糖高脂饲料由南京中医药大学动物试验中心提供。拜安捷 2 血糖仪及血糖试纸条(拜耳公司),链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司),蛋白定量试剂盒(BIO-RAD 公司),牛血清白蛋白(Sigma 公司),兔抗鼠 AT1R、 β -actin 单克隆抗体(美国 Santa cruz 公司),过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(丹麦 Dako 公司),Western Blotting Electro Chemiluminescence (Amersham 公司),总 RNA 提取试剂 Trizol reagent(美国 Invitrogen 公司),分子量标准品 DNA marker(DL2000bp,大连 TaKaRa 公司),逆转录酶 M-MLV 和 Oligo (dT) 引物(美国 Promega 公司),PCR 所需试剂(日本 TaKaRa 公司)。

2 实验方法

2.1 造模与分组 大鼠适应性喂养 1 周后,以高脂高糖饲料

喂养,喂养 8 周后一次性 2%链脲佐菌素(STZ)溶液 30mg/kg 腹腔注射,3d 后尾尖采血,测随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 确定为糖尿病模型大鼠。

选取 5 只正常大鼠作为正常组;2 型糖尿病模型大鼠随机分为 5 组,模型组、厄贝沙坦组和糖脂清高、中、低剂量组。中药剂量按人体重 70kg,大鼠平均体重 500g 体表面积计算。模型组及正常组灌服生理盐水 1mL/100g,糖脂清高、中、低剂量组给药剂量分别为 19.4、9.7、4.85g/(kg·d),厄贝沙坦组给药剂量为 10mg/(kg·d)。各组大鼠每日固定时段灌胃给药 1 次,连续用药 8 周。

2.2 心肌组织样本的制备 用 10%的水合氯醛腹腔注射麻醉迅速开胸取出心脏,以冰生理盐水冲洗干净,去除大血管、心房、右心室,快速切留适量心尖组织,经液氮速冻后,冻存于-80℃冰箱中。

2.3 Western Blotting 检测大鼠心肌组织 AT1R 蛋白的表达

提取大鼠心肌总蛋白,采用 BCA 法测定样品蛋白质的浓度,进行 SDS-PAGE 转膜,转膜完毕后,用 PBS-T 洗膜 2 次,5min/次。使用阻断剂 37℃孵育 1h,置于 1:1000 稀释的特异性抗体反应液,4℃过夜。弃一抗,用 PBS-T 洗膜 3 次,5min/次。加入含 1:5000 稀释的过氧化物酶酶联二抗反应液,37℃摇动孵育 2h。化学发光、显影和定影,显影之后分析所测电泳条带的性质。 β -Actin 作为内参照。

2.4 RT-PCR 检测大鼠心肌组织 AT1R mRNA 的表达 取心肌组织进行 mRNA 的提取,经鉴定浓度和纯度符合实验要求后,进行 cDNA 第一链合成,取 5 μ L RNA 加入 2 μ L 的 oligo (dT)15,70℃温浴 5min 后,立刻取出至冰上冷却,加入反转录

基金项目:江苏省科技厅自然科学基金项目(BK2011817);国家教育部博士点基金资助项目(20133237110004)

体系 (5× RT buffer 5μL, dNTP 1.25μL, RNA 酶抑制剂 0.625μL, M-MLV 反转录酶 1μL, 无菌水 10.125μL), 总体积为 25μL, 37℃温育 60min, 再 70℃、15min 灭活反转录酶的活性, 反转录成 cDNA 之后 4℃保存备用。根据 Gene Bank 数据库中 mRNA 序列, 用 Primer5 软件设计相关引物。PCR 反应体系: 模板, 8μL; 正反引物各 1μL; 10 倍浓度 buffer (含 Mg²⁺) 2.5μL; 10mmol/L dNTP 0.5μL; ddH₂O 11.5μL; Taq 酶 0.5μL。总共 25μL。PCR 反应条件: 第一阶段 95℃, 5min, 预变性; 第二阶段, 94℃、30s, 56℃、35s, 72℃、45s, 共 35 个循环; 第三阶段, 72℃, 10min, 4℃, 保存。β-Actin 作为内参照。PCR 扩增引物序列见表 1。

表 1 PCR 扩增引物序列

基因	引物序列	扩增片段长度	退火温度
AT1R	S: 5'-3' GAGAGGATTCGTGCTTGAG	464bp	57℃
	A: 5'-3' TAAGTCAGCCAAGGCGAGAT		
β-Actin	S: 5'-3' TGATGCCATCCTGCTCTGGA CCT	577bp	54℃
	A: 5'-3' CCGGACTCATCTACTCTGCTTG		

2.5 统计学方法 全部数据采用 SPSS11.0 统计软件分析。计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析和 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠心肌组织 AT1R 蛋白的表达 见表 1, 图 1。模型组大鼠心肌组织 AT1R 表达明显增加, 与正常组相比有显著性差异 ($P < 0.01$); 糖脂清高、中剂量组大鼠心肌组织 AT1R 的表达明显低于模型组 ($P < 0.01$); 糖脂清低剂量组与模型组相比降低, 但无显著性差异 ($P > 0.05$); 糖脂清各剂量组与厄贝沙坦组相比无明显差异 ($P > 0.05$)。

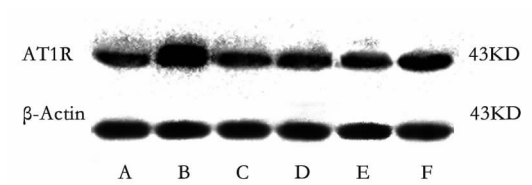


图 1 各组大鼠心肌组织 AT1R 蛋白表达

(A: 正常组; B: 模型组; C: 厄贝沙坦组; D: 糖脂清高剂量组; E: 糖脂清中剂量组; F: 糖脂清低剂量组)

表 2 各组大鼠心肌组织 AT1R 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	AT1R
正常组	5	0.57±0.17
模型组	5	1.05±0.18**
厄贝沙坦组	5	0.62±0.18▲▲
糖脂清高剂量组	5	0.62±0.13▲▲
糖脂清中剂量组	5	0.67±0.14▲▲
糖脂清低剂量组	5	0.80±0.14

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ▲▲ $P < 0.01$ 。

3.2 各组大鼠心肌组织 AT1R mRNA 的表达 见图 2、表 2。模型组大鼠心肌组织 AT1R mRNA 表达明显增加, 与正常组相比有显著性差异 ($P < 0.01$); 糖脂清高、中剂量组大鼠心肌组织 AT1R mRNA 的表达显著低于模型组 ($P < 0.01$); 糖脂清低剂量组与模型组相比也明显降低 ($P < 0.05$); 糖脂清各剂量组与厄贝沙坦组相比无明显差异 ($P > 0.05$)。

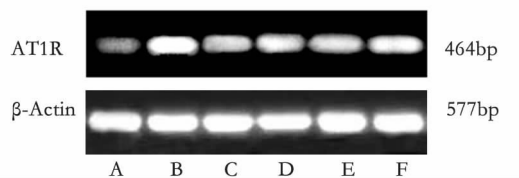


图 2 心肌组织 AT1R 基因表达

(A: 正常组; B: 模型组; C: 厄贝沙坦组; D: 糖脂清高剂量组; E: 糖脂清中剂量组; F: 糖脂清低剂量组)

表 3 各组大鼠心肌组织 AT1R mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	AT1R
正常组	5	0.49±0.08
模型组	5	0.89±0.05**
厄贝沙坦组	5	0.60±0.11▲▲
糖脂清高剂量组	5	0.62±0.14▲▲
糖脂清中剂量组	5	0.68±0.09▲▲
糖脂清低剂量组	5	0.73±0.10▲

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ 。

4 讨论

本实验采用的造模方法和药物干预疗程 (8 周), 参考了文献 [1-5] 关于 2 型糖尿病大鼠心肌病变的研究而制定。糖尿病大鼠心肌病变的产生一般发生在造模成功后 6~8 周。朱禧星等 [1] 发现, 在 STZ 造模成功糖尿病大鼠 4 周病程时, 糖尿病大鼠心肌线粒体开始肿胀变性, 8 周时心肌酶含量明显降低, 心肌病变显著, 心肌排列不齐、断裂和心肌收缩带形成等。张芳林等 [2] 观察心肌超微结构, 证实 2 型糖尿病大鼠心脏病变出现于模型建立后 1.5 个月, 并随着病程延长而加重。另有国外文献报道, STZ 诱导糖尿病大鼠心肌细胞超微结构的改变在 8~12 周, 心功能改变发生在 6~14 周 [3-5]。

血管紧张素 II (Ang II) 是肾素-血管紧张素系统 (RAS) 的主要活性肽, 通过组织细胞膜上的 AT1R 来发挥生理学作用, 并与 TGF-β1、CTGF、ET 之间相互作用, 共同促进糖尿病心肌病的发生和发展。通过与 Ang II 结合, AT1R 被激活, 促进尼克酰胺腺嘌呤二核苷 (NADPH) 氧化酶合成 ROS, 并进一步激活下游的核因子-κB (NF-κB) 信号蛋白发挥生物学作用, 其可能的机制有如下 3 点: (1) 促进细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 和血管细胞黏附 1 (VCAM-1) 的生成, 引起血管内皮损伤, 并且通过 ERK 促进内皮素 (ET) 的表达, 引起血管的收缩; Ang II 调节 ET-1 及细胞外基质 (ECM) 表达, 促进了心肌肥厚和纤维化 [6]。 (2) 通过激活转化生长因子 (TGF-β1)、结缔组织生长因子 (CTGF) 蛋白活性诱导心肌细胞肥厚、凋亡及间质纤维化, 导致心脏主动和被动舒张功能损伤 [7]。 (3) Ang II 与心肌成纤维细胞上的 AT1 受体结合还能刺激心肌成纤维细胞增生, 导致心肌间质胶原合成增加 [8]。

糖尿病心肌病属于中医“消渴”“心悸”“胸痹”等范畴, 主要由消渴病日久迁延所致。导师王旭教授根据中医“瘀热”和“久病入络”的理论, 认为其基本病机是气阴两虚、痰瘀阻络, 并确立了“益气养阴、化痰祛瘀”的治疗原则, 创立了中药复方糖脂清颗粒, 用于糖尿病心肌病的防治。

本实验采取 Western Blotting 和 RT-PCR 的实验方法, 观测糖脂清颗粒对 AT1R 的影响, 发现糖脂清颗粒对 2 型糖尿

当归-川芎配伍对急性血瘀证大鼠血液流变学的影响

孔德平¹ 吴颖² 汤倩¹ 吴德康²

(1.南京医科大学附属南京妇幼保健院,江苏南京 210004; 2.南京中医药大学,江苏南京 210029)

摘要 目的:比较当归-川芎药对不同配比对急性血瘀证大鼠血液流变学的影响。方法:SD大鼠随机分为空白组、模型组和归芎不同配比给药组,分别灌胃相应药物或生理盐水,连续7d,于灌胃第3日除空白组外其余各组采用皮下注射盐酸肾上腺素和冰水浴复制急性血瘀证模型,第7日给药后30min测定各组大鼠全血黏度、血浆黏度、血沉和红细胞压积。结果:与空白组比较,模型组血液流变学各项指标均有明显升高;与模型组比较,归芎不同配比组均能明显降低全血黏度值($1s^{-1}$)、血浆黏度值、血沉,其中归芎3:2组有极显著作用。结论:当归-川芎不同配比对急性血瘀证大鼠血液流变学均有不同程度的改善,为阐明当归-川芎药对配伍的科学性提供一定依据。

关键词 血瘀 当归 川芎 血液流变学 实验研究

中图分类号 R271.113.05

文献标识码 A

文章编号 1672-397X(2014)12-0085-02

痛经为妇科血瘀证临床常见多发病症,常影响妇女正常工作和生活。当归-川芎配伍是临床常用的养血活血药对,具有养血补血、活血祛瘀的功效,大凡血虚、血瘀之证均可选用,尤为血虚兼血瘀者所宜。当归偏养血和血,川芎偏行血散血,二药配对使用,可增强养血活血之功效。许多养血类方剂如佛手散、四物汤及其衍化方、八珍汤等都含有归芎药对,并且该药对也独自成方如佛手散、神验胎动方和芎归散^[1-3]。经统计,本院中医科治疗妇科血瘀证亦常用此药对。当归-川芎药对根据病情的不同,常采用不同配比。本实验选取本院中医科治疗妇科血瘀证痛经时五种常用配比(当归-川芎 2:1、3:2、1:1、2:3、1:2)以及当归、川芎单味药进行研究,观察不同配比归芎药对对急性血瘀证模型大鼠血液流变学指标的影响,为

研究妇科血瘀证方剂的配伍规律提供一定依据,进一步验证归芎药对配伍使用的科学性与合理性。

1 实验材料

1.1 动物 SD大鼠90只,雌性,体重(200±20)g,由上海斯莱克动物实验有限责任公司提供,合格证号:SCXK(沪)2008-0033。

1.2 药物 当归为伞形科植物当归的干燥根(泰州仁济中药饮片有限公司,批号:20110210);川芎为伞形科植物川芎的干燥根茎(泰州仁济中药饮片有限公司,批号:20110401)。药材均经南京中医药大学中药鉴定教研室吴德康教授鉴定。

1.3 试剂 盐酸肾上腺素(上海禾丰制药有限公司,批号:W110102);肝素钠注射液(常州千红生化制药股份有限公司,

基金项目:南京市科技发展计划(药学项目)(2011YX011)

病大鼠心肌AT1R蛋白及其mRNA的表达有抑制作用,该作用与厄贝沙坦相比无明显差异,因此,糖脂清颗粒具有类似厄贝沙坦抑制AT1R的作用,从而影响下游通路,抑制心肌纤维化的发展。

5 参考文献

- [1] 朱禧星,周晓朋,何德华,等.链脲佐菌素糖尿病大鼠的心脏病变.中华内分泌代谢杂志,1992,8(4):222
- [2] 张芳林,李果.2型糖尿病性心脏病变早期相关基因的筛选和分析.中华内科杂志,2002,41(8):530
- [3] Ed W Thompson. Structural manifestations of diabetic cardiomyopathy in the rat and its reversal by insulin treatment. American Journal of Anatomy,1988,182(3):270
- [4] Fein FS, Kornstein LB, Strobeck JE, et al. Altered myocardial mechanics in diabetic rats. Circ Res, 1980, 47(6):922
- [5] Tahiliani AG, Vadlamudi RV, McNeill JH. Prevention and reversal of altered myocardial function in diabetic rats by insulin treatment. Can J Physiol Pharmacol, 1983, 61(4):516

- [6] Copaja Soto M, Valenzuela R, Saldana A, et al. Early expression of monocyte chemoattractant protein-1 correlates with the onset of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in rats with distinct angiotensin-converting enzyme polymorphism. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2008, 9(3):154

- [7] Connelly KA, Kelly DJ, Zhang Y, et al. Functional, structural and molecular aspects of diastolic heart failure in the diabetic (mRen-2)27 rat. Cardiovasc Res, 2007, 76(2):280

- [8] Dong B, Yu QT, Dai HY, et al. Angiotensin-converting enzyme-2 overexpression improves left ventricular remodeling and function in a rat model of diabetic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol, 2012, 59(8):739

第一作者:顾震宇(1981-),男,博士研究生,讲师,研究方向:中西医结合治疗内分泌与代谢病。

通讯作者:王旭, njzywangxu@126.com

收稿日期:2014-08-15

编辑:吴宁