

滋阴补肾方药对糖尿病大鼠骨中一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响

齐锦生* 李恩* 薛智权* 凌亦凌*

摘要 目的:观察链脲佐菌素复制的糖尿病模型大鼠骨密度与骨组织中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA 表达的相关性,探讨糖尿病骨质疏松的发病机制及滋阴补肾方的防治机理。方法:6 月龄 SD 大鼠随机分为正常对照组、病理模型组、病理模型中药治疗组、病理模型氨基胍治疗组 4 组,检测体重、血糖,12 周后取股骨、胫骨用双能 X 线骨密度仪测骨密度值,采用组织学及逆转录-多聚酶链式反应技术观察骨组织形态及骨中 iNOS mRNA 表达的变化。结果:病理模型组骨密度值明显降低,骨组织形态学呈退行性变化,骨 iNOS mRNA 表达增多;中药治疗组的骨密度值明显升高,骨组织形态学明显改善,骨中 iNOS mRNA 表达少,与氨基胍治疗组相当。结论:糖尿病骨质疏松骨中的 iNOS mRNA 的异常表达可能是其发病的重要机制之一,抑制骨中 iNOS mRNA 表达,可能是滋阴补肾方药防治糖尿病骨质疏松的重要途径。

主题词 糖尿病/中医药疗法 一氧化氮合酶/血液 @ 滋阴补肾方

骨质疏松(OP)是糖尿病(DM)的常见并发症。孔令芳等报道其发病率为 62.5%,而女性发病率较高^[1],发病机制尚未完全阐明。近年来发现一氧化氮(NO)及其一氧化氮合酶(NOS)在参与和促进 OP 病理生理过程中,占有举足轻重的作用^[2]。本研究拟用链脲佐菌素(STZ)复制大鼠糖尿病模型^[3],观察滋阴补肾方药在防治糖尿病 OP 中骨密度、骨组织形态与骨中诱导型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA 表达的相关性,以期阐明糖尿病 OP 发生的病理机制及中药防治的机理。

1 材料和方法

1.1 动物:6 月龄 SD 雌性大鼠 51 只,体重 234.16±28.78g,由湖北省同济医科大学实验动物学部提供(动物合格证书:医动字第 19-020 号)。

1.2 主要仪器:双能 X 线骨密度仪(美国 LUNER 公司产品);TL-16R 台式高速冷冻离心机(上海离心机机械研究所产);紫外分光光度计 UV1601(日本岛津公司产品);PCR 热循环仪 100 型(MJ Reacher INC 公司产品);美国强生血糖仪等。

1.3 实验药物:滋阴补肾方药由牡丹皮 10g、熟地黄 20g、何首乌 10g、山药 15g、山茱萸 10g 等 10 味药物组成,药物均购于石家庄市乐仁堂,加蒸馏水 500ml 浸泡 2h,煮沸 30min,过滤。药渣加 300ml 蒸馏水,煮沸 20min,过滤。合并两次滤液后浓缩成 1g/ml 生药浓度药液。

1.4 主要试剂:链脲佐菌素(Sigma 公司产品);异硫氰酸胍(Promega 公司产品);焦碳酸二乙酯(DEPC, Sigma 公司产品);AccessQuick™ RT-PCR System 试剂盒(Promega 公司产品);氨基胍(AG,北京化学试剂公司产品)。

1.5 引物:基因序列查自 Gene Bank。应用专业引物设计软件 Primer primer 5.0 设计而成,由上海生物工程公司合成。具体序列如下:

iNOS

上游:5'-AGGAGCGAGTTGTGGATTGT-3'

下游:5'-GTGAGGTTTTGGCTGAGTGA-3'

扩增产物为 124pb, T_m 为 58.5~55.6℃, β-actin

上游:5'-GAGACCTTCAAGACCCAGCC-3'

下游:5'-TCGGGGCATCGGAACCGCTCA-3'

扩增产物为 443pb, T_m 为 52~65℃

1.6 方法与步骤

1.6.1 分组与模型复制:将 51 只大鼠随机分为 4 组,即正常对照组(9 只)、AG 治疗组(13 只)、中药组(16 只)及病理组(13 只),后 3 组腹腔内一次注射 STZ (0.04g/kg 体重,溶于 0.1mol/L 枸橼酸钠/枸橼酸缓冲溶液, pH4.4,新鲜配制,浓度 0.01g/ml)溶液,制成糖尿病模型:血糖高于 13mmol/L,尿糖(+++)以上。以上 4 组正常饲料喂养,正常对照组和病理组自由饮水。中药治疗组按人和动物间体表面积折算的等效剂量比值^[4]。每只大鼠 3ml/天,中药灌喂(含生药 1g/ml)。AG 治疗组用稀释成 3‰的 AG 溶液灌养。在 20~25℃室温下,持续饲养 12 周,并分别在 6 周和 12 周时检测血糖、尿糖、体重 1 次。

1.6.2 标本采集:动物饲养 12 周后,禁食 12 小时,股动脉放血处死,取血清置于-70℃冰箱,存放备用。冰上迅速剥离动物股骨及胫骨,每组取 3 只动物的右侧股骨和胫骨,置于 10%甲醛溶液中固定,脱钙,HE 染

* 河北医科大学生化教研室,石家庄市中山东路 361 号 (050017)

收稿日期:2002-09-28;修回日期:2002-11-20

表1 各组大鼠骨密度、血糖、体重变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	胫骨密度(g/cm ²)	股骨密度(g/cm ²)	血糖(mmol/L)	体重(g)
正常组	9	0.216±0.015 [*]	0.239±0.024 [*]	4.42±0.56 [*]	298.67±33.20 [*]
病理组	13	0.180±0.013	0.194±0.014	22.34±5.09	203.77±27.07
AG组	13	0.207±0.014 [*]	0.225±0.015 [*]	15.21±4.75 [*]	249.85±35.35 [*]
中药组	16	0.210±0.014 [*]	0.230±0.020 [*]	16.05±4.24 [*]	268.38±28.36 [*]

与病理组比较, * $P < 0.01$

色,制成病理切片;对其余右侧股骨及胫骨进行BDM检测;左侧股骨放入塑料袋,迅速投入液氮中保存,待测骨组织中iNOS mRNA。

1.6.3 组织总RNA提取及纯度鉴定:从-70℃冰箱取出股骨标本后,剔除软组织,采用异硫氰酸胍一步法提取总RNA。取股骨头松质骨少许,按10ml/g组织加入异硫氰酸胍裂解液(4mol/L异硫氰酸胍,25mmol/L柠檬酸钠,0.5% SLS,0.1mol/L β-ME),冰浴中匀浆。加入1/10体积的2.0mol/L NaAC(pH4.0),等体积饱和酚,1/5体积氯仿/异戊醇(49:1),混匀,冰浴15分钟。4℃,12000r/min离心20分钟,分离上层水相,加入等体积异丙醇,混匀,-20℃放置1小时,4℃,12000r/min离心15分钟,去上清,加2倍体积70%乙醇洗涤沉淀,4℃,12000r/min离心15分钟,去上清,风干,加入10μl无菌三蒸水溶解。取1μl RNA溶液,经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA的纯度和完整性,紫外灯下观察并照相。取1μl经稀释后于260nm和280nm测定光密度,计算RNA含量及OD_{260nm}/OD_{280nm}比值以确定其纯度,选取OD_{260nm}/OD_{280nm}比值大于1.8的RNA样品进行逆转录-多聚酶链式(RT-PCR)反应。

1.6.4 RT-PCR反应:根据AccessQuick™ RT-PCR System试剂盒说明进行操作。用2μg总RNA进行RT-PCR反应。采用2对引物在同一体系中进行。50μl反应体系包括:2×AccessQuick™ Master Mix 25μl, 20pmol Primer目的基因,正负链各2μl,20pmol β-actin Primer,正负链各2μl, RNA溶液按其浓度加总量为2μg,用DEPC处理后的三蒸水加到总体积为50μl,然后加1μl(5U) AMV反转录酶,轻摇混匀。反应条件为42℃30min, 95℃3min; 94℃45s, 57℃45s, 72℃45s, 30个循环;然后72℃6min,反应结束后0℃保存。

1.6.5 RT-PCR产物的电泳分析:取PCR产物10μl进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,电泳结束,紫外灯下观察照相,对照片进行面积灰度扫描,以密度代表其表达量,计算出目的基因的相对表达量。目的基因的相对表达量:目的基因的密度/β-actin基因的密度。

1.7 统计学方法:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验,秩和检验,用SAS统计软件包统计分析处理。

表2 各组大鼠实验前后体重和血糖变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	血糖(mmol/L)
AG组	实验前	13	231.74±37.72
	实验后	13	249.85±35.35
中药组	实验前	16	248.00±24.54
	实验后	16	268.38±28.36 [*]
病理组	实验前	13	228.60±30.50
	实验后	13	203.77±27.07 [*]

与本组实验前比较, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$

2 结果

2.1 AG及滋阴补肾方药对大鼠骨密度、血糖和体重的影响:表1示,病理组与正常组比较,股骨骨密度、胫骨骨密度、血糖及体重变化均有非常显著性差异($P < 0.01$),模型复制成功。AG组、中药组分别与病理组比较,股骨骨密度及胫骨骨密度均明显升高,血糖均降低,体重均增加(P 均 < 0.01)。AG组与中药组比较,均无显著性差异。

2.2 各组实验前后血糖、体重变化比较:表2示,中药组用药后比用药前体重增加($P < 0.05$),血糖降低($P < 0.01$);AG组用药前后比较,体重无显著性差异($P > 0.05$),血糖用药后比用药前下降($P < 0.01$);病理组实验后比实验前体重降低($P < 0.05$),血糖无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 HE染色:正常大鼠股骨及胫骨的骨小梁丰富,壁厚,股骨干骺端以纵向排列的骨小梁为主,骨小梁之间有横向的骨小梁连接,骨小梁表面可见成队状排列的成骨细胞(OB);病理组骨小梁稀疏,变薄,骨髓腔扩大,部分区域骨小梁消失,股骨干骺端横向骨小梁稀少,骨髓腔内可见较多的脂肪颗粒,骨小梁表面OB稀少;AG组、中药组与病理组比较,骨小梁数目较多,骨小梁壁变厚,扩大的骨髓腔有所恢复,脂肪颗粒减少。

2.4 总RNA提取结果:A260/A280比值为1.8~2.0之间。1.5%琼脂糖凝胶电泳显示:18S、28S两条带清晰,且后者的亮度和宽度为前者的2倍。5S带很暗,无其它大分子条带,表明总RNA无降解及蛋白质污染。

2.5 各组骨组织中iNOS mRNA表达比较:表3示,正常对照组OP中iNOS mRNA无表达或不能检测出。

表 3 各组大鼠股骨中 iNOS mRNA 表达相对灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	iNOS mRNA
正常对照组	9	—
病理组	13	1.0496 $\pm$ 0.0832*
中药组	13	0.4271 $\pm$ 0.0109 Δ
AG 治疗组	16	0.5324 $\pm$ 0.0622 Δ

* 与正常对照组比较, $P < 0.01$; Δ 与病理组比较, $P < 0.01$

病理组可见 iNOS mRNA 高表达;而中药组和 AG 组 iNOS mRNA 的表达量均显著低于病理组($P < 0.01$)。中药组与 AG 组比较,无统计学差异($P > 0.05$)。

3 讨论

已有研究表明,STZ 糖尿病大鼠模型的胰岛损伤和胰岛素分泌衰竭与大量 NO 产生有关;同时该模型血内的单核细胞释放白介素 1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF)等细胞因子增加^[5~8]。iNOS 可被细胞因子、内毒素等许多体液性物质所诱导,且 iNOS 被诱导后,活性可持续达 20h,合成纳摩尔(nmol)水平的 NO^[9],iNOS 是引起体内 NO 过量产生的主要基础^[10]。体外实验发现,OB、破骨细胞(OC)共培养时,在 IL-1、TNF- α 、干扰素 γ (IFN- γ)的联合作用下,可激发生成 50~70 倍的 NO,经证实 NO 主要来自 OB 系^[11]。过高浓度的 NO 对 OB、OC 均有细胞毒作用^[12,13],可使 OC 前体细胞大量凋亡,抑制 OB 的成熟、分化及其功能。Xia 等^[14]用电子顺磁共振(ESR)技术揭示 NOS 能同时催化 NO 和超氧阴离子(O_2^-)生成,Beckmen 等在 1990 年发现并模拟生理条件下 NO 与 O_2^- 反应生成过氧亚硝基阴离子(peroxynitrite, ONOO $^-$)产物,而 ONOO $^-$ 可引起很强的氧化性损伤,它可能是 NO 过量生成时导致细胞损伤的关键物质。故 O_2^- 、NO 和 ONOO $^-$ 三者相互调制以及与生物分子反应可能成为参与调节细胞功能的重要因素。

中医学认为,肾为“先天之本,内舍之阴”,“消渴之疾,皆起于肾”,因此,滋阴补肾为糖尿病治疗的原则之一。本研究中的方药主要由熟地黄、何首乌、牡丹皮、枸杞子、山药、山茱萸、麦门冬、地骨皮、知母和薏苡仁 10 味中药组成,方中熟地黄能滋阴补肾,为君药;枸杞子、山药、牡丹皮、何首乌、麦门冬、山茱萸均能增强滋阴补肾之功效,为臣药;地骨皮、知母和薏苡仁为佐使药,诸药合用,共奏滋阴补肾之功效。现代药理研究表明,熟地黄中的梓醇有降糖作用。何首乌、牡丹皮、麦门冬、山茱萸、山药均有抗氧化的作用。

本实验结果表明,滋阴补肾方药与 AG 对增加骨密度,降低血糖,增加体重均有显著作用。滋阴补肾方

药在降低血糖,增加体重方面效果明显。BMD、骨形态学变化与骨中 iNOS mRNA 表达的变化相一致。表明骨中 iNOS mRNA 高表达可能是造成糖尿病 OP 重要的内在机制之一。AG 为 iNOS 的选择性抑制剂,可特异性抑制 iNOS 的活性及表达,从而达到防治 OP 的目的。滋阴补肾方药能防治 OP 发生,可能与抑制 iNOS 的活性及 mRNA 的表达,使 NO、 O_2^- 和 ONOO $^-$ 三者产生减少,起到抗氧化作用有关。与 AG 相比,中药在防治 OP 发生的同时,有更明显的增强体质作用,符合多靶点相关集合作用的中药作用机理。

参考文献

- 1 孔令芳,徐衡.糖尿病性骨质疏松 64 例骨密度检查及临床分析.中国实用内科杂志,1995,15(3):153.
- 2 萧劲夫,李昂,薛延.骨质疏松的一氧化氮机制研究.中国骨质疏松杂志,2001,7(2):175-177.
- 3 张炜真,于世凤,郑麟蕃.糖尿病大鼠牙槽骨骨密度的变化.中华口腔医学杂志,1997,32(1):49-51.
- 4 徐叔云,卞如谦,陈修主编.药理实验方法学,第 2 版.北京:人民卫生出版社,1994:1535-1536.
- 5 Medaniel ML, Kwon G, Hill JR, et al. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. Proc Soc Exp Biol Med, 1996, 211(1):24-32.
- 6 祁忠华,林善锁.早期糖尿病大鼠肾脏诱生型一氧化氮合酶基因表达.中华内分泌代谢杂志,1998,14(1):41.
- 7 Stevens RB, Sutherland DE, Ansit JD, et al. Insulin down-regulates the inducible nitric oxide synthase pathway; nitric oxide as cause and effect of diabetes. J Immunol, 1997, 159(11):5329-5335.
- 8 Corbett JA, Kwon G, Turk J, et al. IL-1 β induces the coexpression of both NOS and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by NO. Biochemistry, 1993, 32(50):13767-13770.
- 9 Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, et al. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. Hypertension, 1994, 23(6Pt2):1121-1131.
- 10 钟慈声,孙安阳主编.一氧化氮的生物医学.上海:上海医科大学出版社,1997,107-108.
- 11 Van't Hof RJ, Ralston SH, Johnston PW, et al. Nitric oxide's function in bone cells. Curr Opin Orthop, 1997, 8:19-24.
- 12 Robert J, de Marco G, Gangula P, et al. Cytokine induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. J Bone Miner Res, 1997, 12:1797-1801.
- 13 Kikkawa I, Saito S, Tomminaga K, et al. Lipopolysaccharide(LPS) stimulates the production of tumor necrosis factor(TNF)- α and expression of inducible nitric oxide synthase(iNOS) by osteoclasts(OC) in murine bone marrow cell culture. Microbiol Immunol, 1998, 42(9): 591-598.
- 14 Xia Y, Dawson VL, Dawson TM et al. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(13):6770-6771.