

参芪复方对糖尿病早期大血管病变大鼠白色脂肪过氧化物酶体增生物激活受体 γ 的影响

张红敏¹ 谢春光² 陈世伟³ 谢毅强⁴

(1. 四川大学华西医院中西医结合科及中药药理研究室, 成都市外南国学巷37号, 610041;

2. 成都中医药大学中医内科教研室; 3. 河南省食品药品监督管理局; 4. 成都中医药大学2003级博士研究生)

[摘要] **目的** 观察参芪复方对糖尿病早期大血管病变大鼠白色脂肪过氧化物酶体增生物激活受体 γ (PPAR γ) 的影响。**方法** 模型组、雷米普利组、参芪复方低剂量组、高剂量组及正常对照组分别给予相应受试物32天。实时定量 RT-PCR 法检测脂肪 PPAR γ 和脂联素 mRNA 的表达。**结果** 参芪复方低剂量组、高剂量组大鼠的 PPAR γ 及其下游靶基因脂联素 mRNA 表达量均较模型组明显增加, 且二者呈明显正相关关系。**结论** 上调和活化 PPAR γ 可能是参芪复方抗糖尿病早期大血管病变的作用机制之一。

[关键词] 参芪复方; 2型糖尿病; 大血管病变; 过氧化物酶体增生物激活受体 γ

Effect of Shenqi Compound Recipe on the Expression of PPAR γ in White Adipose Tissue of Rats with Macrovascular Complication in Earlier Stage of Diabetes

ZHANG Hong-min¹, XIE Chun-guang², CHEN Shi-wei³, et al.

(1. West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041; 2. Chengdu University of Chinese Medicine; 3. Henan Food and Drug Administration of Henan Province)

ABSTRACT Objective To study the effect of Shenqi Compound Recipe (SCR) on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in white adipose tissue of rats with macrovascular complication in earlier stage of diabetes. **Methods**

Corresponding substance was given to rats in model group, Ramipril group, normal control group and low or high dosage of SCR groups respectively for 32 days. The expression of PPAR γ and adiponectin mRNA was tested by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Results** The expression of PPAR γ and adiponectin mRNA increased obviously in low and high dosage of SCR groups as compared with model group. There was positive correlation between expression of PPAR γ and adiponectin mRNA.

Conclusion SCR can prevent macrovascular complication in earlier stage of diabetes, which might be relevant to its up-regulating and activating PPAR γ .

Key Words Shenqi Compound Recipe; Type 2 diabetes; Macrovascular complication; Peroxisome proliferator-activated receptor γ

目前认为, 脂肪组织是一种高效的自分泌、旁分泌和内分泌器官, 在机体的糖、脂代谢、血管、免疫甚至组织再生等内环境稳定调节中起重要作用^[1,2]。脂联素是一种主要由白色脂肪组织分泌的蛋白^[3], 在血浆中浓度很高, 作用于不同的组织、细胞, 从多方面影响2型糖尿病(T2DM)及其大血管病变的形成与发展^[4], 具有抗炎及抗T2DM大血管病变的作用。过氧化物酶体增生物激活受体 γ (PPAR γ) 是一种配体激活型核转录因子, 主要在脂肪组织表达, 对维持脂肪细胞正常分化和胰岛素敏感性起重要作用^[5]。脂联素基因上有 PPAR 反应元件, 是 PPAR γ 的靶基因之一^[6]。本研究以能体现 T2DM 常用治法——益气养阴、活血化瘀的参芪复方为模型药物, 观察了其对白色脂肪组织 PPAR γ 及其靶基因脂联素的影响, 来探讨其抗糖尿病性早期动脉粥样硬化的可能作用机理。

1 材料

1.1 实验动物

4月龄雄性无特定病原体 (SPF) 级自发性糖尿病 Goto-Kakizaki (GK) 大鼠50只及正常 Wistar 大鼠12只 (上海斯莱克实验动物有限责任公司), 2~3只/笼饲养于四川大学华西公共卫生学院屏障级实验动物中心的 IVC 系统内。饲养温度: (22±1) °C, 湿度: 59%~61%, 每天光照与黑暗时间各为12小时。所用笼具、饲料、垫料、饮水均高压灭菌 (15磅、20分钟)。实验期间, 动物自由摄食、饮水。

1.2 主要药品与试剂

参芪复方 (由人参15g, 黄芪15g, 山药10g, 山茱萸10g, 生地黄10g, 丹参10g 等组成, 由四川大学华西药学院药厂提取并制成干燥粉。1g 干燥粉相当于原生药10g, 批号: 20031008); 雷米普利片 (Aventis Pharma S.P.A 生产, 批号: L420); L-N-硝基精氨酸甲酯 (L-NAME, Sigma 公司); 胆固醇及猪胆盐 (成都科龙化工试剂厂); 总 RNA 提取试剂 (美国 Invitrogen 公司), 实

时定量 PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司];反转录第一条 cDNA 链合成试剂盒(加拿大 Fermentas MBI 公司);PCR 引物[宝生物工程(大连)有限公司, PAGE 纯度级];琼脂糖(Biowest Agarose, 西班牙);100 bp DNA Ladders(加拿大 Fermentas MBI 公司)。

1.3 主要仪器

荧光实时多波长 PCR 仪(BIO-RAD), 紫外-可见分光光度计(岛津 BioSpec-mini), 普通 PCR 仪(Biometra)。

2 方法

2.1 分组及造模方法

大鼠适应性饲养1周后, 血糖值在11.1 mmol/L 以上的 GK 大鼠44只被随机分为模型组、雷米普利组、参芪复方低剂量组、参芪复方高剂量组, 每组11只;另取 SPF 级 Wistar 大鼠11只作为正常对照组。除正常对照组外, 其他各组大鼠以10 mg·kg⁻¹·d⁻¹腹腔注射 L-NAME, 同时喂饲高脂饲料(普通饲料88.2%、精炼猪油10%、胆固醇1.5%、猪胆盐0.3%)。正常对照组喂饲普通饲料, 1 ml·kg⁻¹·d⁻¹腹腔注射生理盐水, 连续4周。

2.2 给药方法

造模同时开始给药, 周期32天。正常对照组及模型组按5 ml·kg⁻¹·d⁻¹灌服无菌水(该过程中模型组大鼠死亡3只)。雷米普利组按1 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌服雷米普利悬液;参芪复方低剂量组按0.72 g·kg⁻¹·d⁻¹(相当于成人剂量的5倍, 即人的等效剂量, 成人按60 kg 计)灌服中药混悬液;参芪复方高剂量组按2.88 g·kg⁻¹·d⁻¹(相当于成人剂量的20倍, 即人等效剂量的4倍)灌服中药混悬液。

2.3 取材

32天后处死动物, 处死前12小时禁食不禁水, 迅速剥离肾周白色脂肪, 立即放于液氮中待测。

2.4 观察指标及检测方法

2.4.1 白色脂肪 PPAR- γ 和脂联素 mRNA 水平检测

采用实时定量 RT-PCR 法。按 Trizol 试剂的使用操作步骤, 从约100 mg 大鼠白色脂肪中提取总 RNA。根据 A260/A280 的比值及凝胶电泳检测总 RNA 的纯度。以总 RNA 1.5 μ g 为逆转录反应模板, 采用随机引物, 按照反转录试剂盒的操作说明在普通 PCR 仪上进行逆转录, 合成第一条 cDNA 链, 总的反应体积是20 μ l。再以2 μ l 逆转录反应产物为模板, 按照荧光实时定量 PCR 试剂盒的说明, 冰上配置20 μ l 的 PCR 反应体系, 各引物终浓度为0.2 mM。各基因扩增引物序列为: β actin (GeneBank Accession No. NM_031144) 正

义: 5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGA-3', 反义: 5'-TAGAGCCACCAATCCACACA-3', 产物长度104 bp; PPAR γ (GeneBank Accession No. NM_013124) 正义: 5'-ATGGAGCCTAAGTTTGAGTTTGCTG-3', 反义: 5'-GATGTCCTCGATGGGCTTCAC-3', 产物长度: 138 bp; 脂联素 (GeneBank Accession No. NM_144744) 正义: 5'-GGAACTTGTGCAGGTTGGATG-3', 反义: 5'-GGGTCACCTTAGGACCAAGAA-3', 产物长度141 bp; 实时定量 PCR 扩增条件: 95℃ 预变性90秒后, 进行95℃变性5秒、59℃退火10秒、72℃延伸15秒(此阶段采集荧光信号), 45个循环。基因丰度以目的基因与内参照 β actin 基因扩增过程中荧光信号强度达到临界阈值所需要的循环数(Ct)值之比表示, Ct 值越小, mRNA 的丰度越高。

2.4.2 荧光定量 PCR 产物融解曲线分析 各组所有样本的目的基因及 β actin 完成45个 PCR 扩增循环后进行 PCR 产物融解曲线收集, 以确定产物纯度。融解曲线收集条件: 95℃ 5秒、59℃ 60秒各1次, 然后以59℃ 10秒为起点, 共72个循环, 每循环增加0.5℃, 各循环均采集荧光信号10秒, 最后4℃保存。

2.5 统计学方法

计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多样本均数的两两比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 如果方差齐采用 LSD, 方差不齐采用 Tamhane's T₂统计方法。两变量的关联性采用线性相关分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 参芪复方对白色脂肪 PPAR γ 和脂联素 mRNA 表达的影响

3.1.1 参芪复方对白色脂肪 PPAR γ 和脂联素 mRNA 表达的影响 附表示, 模型组白色脂肪 PPAR γ 和脂联素 mRNA 表达量与正常对照组相比显著降低($P < 0.01$)。各治疗组表达量与模型组相比均有明显提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。参芪复方高剂量组、低剂量组与雷米普利组比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。

3.1.2 白色脂肪 PPAR γ 和脂联素 mRNA 定量 PCR 产物融解曲线 从 mRNA 实时定量 PCR 扩增产物融解曲线图可以看出, 白色脂肪 PPAR γ 、脂联素 mRNA 经实时定量 RT-PCR 扩增后, 融解曲线显示单一峰, 表明产物单一, 显示荧光定量 PCR 的 Ct 值准确。

3.2 白色脂肪 PPAR γ 与脂联素 mRNA 表达的相关性分析

将各组所有大鼠的白色脂肪 PPAR γ 与脂联素 mRNA 表达丰度进行了相关分析, 得到直线方程 $y =$

附表 各组大鼠白色脂肪 PPAR γ 和脂联素 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量(mg $\text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Ct 值之比 (PPAR γ / β actin)	Ct 值之比 (adiponectin/ β actin)
正常对照组	11	—	1.29 $\pm$ 0.17	0.79 $\pm$ 0.13
模型组	8	—	1.61 $\pm$ 0.14 $\Delta\Delta$	0.99 $\pm$ 0.12 $\Delta\Delta$
雷米普利组	11	1	1.35 $\pm$ 0.19**	0.86 $\pm$ 0.13*
参芪复方低剂量组	11	720	1.44 $\pm$ 0.17 Δ^*	0.88 $\pm$ 0.12*
参芪复方高剂量组	11	2880	1.32 $\pm$ 0.16**	0.83 $\pm$ 0.11**

与正常对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

0.11 + 0.54 $\bar{x}$, 相关系数 $r = 0.802$, $P < 0.01$ 。可知, 随着 PPAR γ mRNA 表达的增加, 脂联素 mRNA 表达也相应增加。

4 讨论

GK 大鼠是1975年由日本 Tohoku 大学学者选择葡萄糖耐受不良的 Wistar 大鼠近亲繁殖而成, 是公认的自发性 T2DM 大鼠模型^[7]。本研究参考了大量国外文献^[8,9]报道的方法, 在自发性 T2DM GK 大鼠模型基础上, 腹腔注射 L-NAME 同时喂饲高脂饲料, 成功复制出了糖尿病早期大血管病变, 国内少见此种造模方法的报道。

PPAR γ 在内源性或外源性配体的作用下, 与配体结合被活化, 活化后的 PPAR γ 与视黄醛 X 受体 (RXR) 结合形成异二聚体, PPAR γ RXR 二聚体和目的基因 DNA 启动子上的 PPAR 反应元件序列结合, 介导目的基因 mRNA 的转录。PPAR γ 激活可以增加多种靶基因, 如脂联素、脂蛋白脂酶、脂肪酸结合蛋白、脂肪酸合成酶、葡萄糖转运蛋白-4等的表达^[10], 促进白色脂肪细胞分化, 增加小脂肪细胞的数量而减少大脂肪细胞的数量^[11]。成熟的小脂肪细胞表达较多的胰岛素受体和葡萄糖转运蛋白-4, 增加对胰岛素的反应性并有利于促进葡萄糖摄取^[12]。PPAR γ 不仅调控脂肪细胞分化, 还可诱导已经分化的脂肪细胞凋亡^[13]。体外实验证明, PPAR γ 激活可以降低 TNF- α 基因表达, 抑制 TNF- α 刺激的脂肪分解, PPAR γ 激活可能阻断了 TNF- α 在信号传导途径中对胰岛素受体及胰岛素受体底物磷酸化的抑制作用^[14]。

本研究结果显示, 模型组大鼠具有低度炎症状态和大血管病变特征, PPAR γ 白色脂肪组织中的表达量较正常对照组明显下降, 提示脂肪组织 PPAR γ 的正常表达对预防 T2DM 大血管病变非常重要。参芪复方可以部分恢复模型 GK 大鼠脂肪组织 PPAR γ mRNA 表达。测定核转录因子的活化比其表达更具意义, 较好的测定核转录因子活化的方法是 EMSA, 但价格昂贵。本实验未直接检测 PPAR γ 的活化, 但在检测 PPAR γ 基因 mRNA 表达的同时检测了其下游靶基因

脂联素 mRNA 的表达情况, 并把 PPAR γ 与脂联素 mRNA 表达情况做了相关性分析。结果显示, 二者具有正相关关系, 与文献报道^[6]一致。如果, PPAR γ 仅表达升高, 而不被激活的话, 参芪复方干预组的脂联素 mRNA 表达可能也不会增加, 因此, PPAR γ 与脂联素 mRNA 表达的正相关关系, 提示 PPAR γ 在表达增高的情况下, 同时存在被激活的情况。因此, 上调和激活 PPAR γ 并通过上述机制改善胰岛素抵抗, 进而减缓 T2DM 及其大血管病变进程, 可能是参芪复方抗糖尿病早期大血管病变作用机制之一, 但仍需进一步证实。

参考文献

[1] Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. Trends Endocrinol Metab, 2000, 11(8) : 327~332.

[2] Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. Proc Nutr Soc, 2001, 60(3) : 329~339.

[3] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. J Biol Chem, 1995, 270(45) : 26746~26749.

[4] Ouchi N, Kihara S, Funahashia T, et al. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. Curr Opin Lipidol, 2003, 14(6) : 561~566.

[5] Kubota N, Terauchi Y, Miki H, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. Mol Cell, 1999, 4(4) : 597~609.

[6] Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, et al. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. Diabetes, 2003, 52(7) : 1655~1663.

[7] Ostenson CG, Khan A, Abdel-Halim SM, et al. Abnormal insulin secretion and glucose metabolism in pancreatic islets from the spontaneously diabetic GK rat. Diabetologia, 1993, 36(1) : 3~8.

[8] Zhao Q, Egashira K, Inoue S, et al. Vascular endothelial growth factor is necessary in the development of arteriosclerosis by recruiting/activating monocytes in a rat model of long-term inhibition of nitric oxide synthesis. Circulation, 2002, 105(9) : 1110~1115.

蛋白原是链状化合物,在血浆中能形成网状结构,从而
影响血液流动。纤维蛋白原增高在高血压血瘀证形成
中起“网络血细胞作用”,促进血栓形成。

2.5 血管内皮细胞的损伤

从血管内皮细胞角度看,高血压病患者存在着血管
内皮细胞的损伤^[16]。血管内皮细胞不仅有抗凝、促
进脂质分解等项功能,而且还能合成各种生物活性物
质,参与调节血管平滑肌的舒缩和血管张力。舒血管物
质主要有前列环素(PGE)和内皮细胞源舒张因子
(EDRF),收缩血管物质主要有内皮素和内皮细胞源
收缩因子(EDCF)。血管内皮细胞损伤,导致舒血管物
质合成释放减少,缩血管物质生成释放占优势,从而出
现外周阻力增大和微循环障碍,血压随之升高。同时,
血管内皮细胞一旦受损,即可合成释放多种促凝物质,
包括组织因子及凝血因子V、XII的激活物等,组织因子
是一种表现蛋白,与VII_a结合后,可进一步激活IX及X
因子,从而启动凝血连锁反应,促进血液凝固,血液处
于高凝状态。内皮细胞损伤还可释放血小板激活因子、
遗传性假性血友病因子,促进血小板的黏附与聚集。而
血液凝固性增高及血小板黏附聚集亦参与了高血压病
发生发展的病理生理过程。

总之,高血压病血瘀证的病理,不论是中医还是现
代医学,都认为是多种因素共同作用的结果。中医认
为,高血压病血瘀证有气滞致瘀、气虚致瘀、肝热致瘀、
痰浊致瘀、阳亢致瘀、阳虚致瘀,其形成贯穿整个病的
始终。而现代医学认为,主要反映在微循环功能状态、
血液流变学、血小板功能、血脂水平、血管内皮细胞异
常等方面,而这些因素则为中医血瘀证的病理实质。因
此,高血压病血瘀证在理论上是可行的,在治疗上是有效
的。

参考文献

[1]袁肇凯.高血压病血瘀辨证与舌尖微观的初步研究.中医杂

志,1982,23(11):65~66.

- [2]王阶,姚魁武.血瘀证证候实质研究进展与思考.中国医药
学报,2003,18(8):490~493.
- [3]蒋瑞峰.甲襞微循环障碍与中医血瘀证之关系探讨.新中
医,1983,15(8):48~49.
- [4]邢俊武,钱士明.高血压患者的外周微循环变化.现代中西
医结合杂志,2003,12(1):58~59.
- [5]陈小燕,郑碧辉,韦瑞焕.高血压病Ⅱ期甲襞微循环与中医
血瘀证.光明中医,2001,16(5):21~23.
- [6]欧亚龙,郑碧辉,韦瑞焕.高血压病血瘀关系的实验研究.四
川中医,1991,9(6):3~4.
- [7]李学江.高血压病患者左室肥厚与血液黏度的关系.临床心
血管病杂志,1992,8(1):52.
- [8]丁琪,朱静雯,林美琴.从红细胞变形性和一氧化氮的变化
探讨“证”与“病”的关系.安徽中医临床杂志,1999,11(5):
304~305.
- [9]程文立,乔占兵,陈郁生,等.原发性高血压患者红细胞流变
学异常与血瘀证关系临床研究.中国医药学报,2002,17
(9):563.
- [10]王琰,郝炜新,陶丽华.测定原发性高血压血瘀证患者红细
胞变形性和聚集性的临床意义.微循环学杂志,1999,9(3):
45~46.
- [11]夏云,戴闰柱.血5-羟色胺在某些心血管病中的作用.中华
医学杂志,1987,67(2):115~116.
- [12]周志泳,左保华,常清康,等.高血压病患者血小板聚集功
能.中国高血压杂志,1994,2(4):248~249.
- [13]吾相铭,潘宜智,洪小苏,等.血小板活化在高血压中的临
床意义.中国高血压杂志,1994,2(1):40~42.
- [14]叶和军,林求诚.高血压病血瘀证与血小板内游离Ca²⁺、血
浆TXB₂、6-keto-PGF_{1α}系统关系临床研究.实用中西医结
合临床,2001,(1):7~8.
- [15]李家增.血栓形成与临床医学.长沙:湖南科学技术出版
社,1991:94~194.
- [16]祝之明,刘光耀,周正友,等.高血压病血管内皮细胞损害
与血脂过氧化反应的关系.临床心血管病杂志,1991,(7):
71~72.

(收稿日期:2007-01-22)

(上接第551页)

- [9] Kataoka C, Egashira K, Ishibashi M, et al. Novel anti-
inflammatory actions of amlodipine in a rat model of
arteriosclerosis induced by long-term inhibition of nitric oxide
synthesis. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(2):
768~774.
- [10] El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, et al. Reconstitution of
insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires
expression of both PPARGgamma and C/EBP alpha. J Biol
Chem, 1999, 274(12):7946~7951.
- [11] Hallakou S, Deane L, Foulle A. Pioglitazone induces in
vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat.
Diabetes, 1997, 46(9):1393~1399.

- [12] Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, et al. Troglitazone
increases the number of small adipocytes without the change
of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. J Clin
Invest, 1998, 101(6):1354~1361.
- [13] Klier SA, Sundseth SS, Jones SA, et al. Fatty acids and
eicosanoids regulate gene expression through direct
interactions with peroxisome proliferator-activated receptors
alpha and gamma. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(9):
4318~4323.
- [14] Miles PD, Romeo OM, Higo K, et al. TNF-alpha-induced
insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone.
Diabetes, 1997, 46(11):1678~1683.

(收稿日期:2005-09-13;修回日期:2006-11-10)