

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.10.014

实验研究

参芪复方对糖尿病大血管病变大鼠胸主动脉差异基因表达的影响

马晖, 谢春光*

(成都中医药大学, 四川省成都市十二桥路 37 号, 610075)

摘要 目的 探讨参芪复方防治糖尿病大血管病变的可能分子机制。方法 160 只自发性 2 型糖尿病 GK 大鼠给予高脂饲料喂养 12 周建立糖尿病大血管病变模型, 随机分成模型组、西药组、参高组、参中组、参低组, 每组 32 只。另设 32 只 Wistar 大鼠为空白组。造模后西药组给予二甲双胍片 0.1 g/(kg·d) 灌胃, 参高、中、低组分别给予参芪复方 2.88、1.44、0.72 g/(kg·d) 灌胃, 空白组和模型组给予生理盐水 5 ml/(kg·d) 灌胃, 各组均灌胃 16 周。分别在给药前及给药第 8、16 周时检测空腹血糖; 第 8、16 周时采用 Masson 染色观察胸主动脉病理形态, 计算胶原纤维/血管壁面积 (PVCA/LA); 16 周时进行差异基因筛选。结果 与空白组同时间比较, 模型组在给药前及给药 8、16 周时大鼠空腹血糖升高, 第 8、16 周时 PVCA/LA 明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 第 16 周时西药组和参高、中、低组大鼠空腹血糖低于同时间模型组, PVCA/LA 均显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。参中组与模型组、模型组与空白组共同存在的显著性差异基因共 15 个, 其中与糖尿病血管病变有关的基因为 Elavl1、Lama4, 且参中组 Elavl1、Lama4 基因较模型组下调。结论 参芪复方防治糖尿病大血管病变作用机理可能与下调胸主动脉 Elavl1、Lama4 基因表达, 从而抑制血管新生, 减少胶原纤维产生有关。

关键词 糖尿病大血管病变; 参芪复方; 胸主动脉; 差异基因

糖尿病大血管病变指糖尿病合并中等以上动脉如主动脉、冠状动脉、脑基底动脉、肾动脉及周围动脉粥样硬化, 导致高血压病、冠心病、脑血管病变和下肢血管病变, 是糖尿病致死致残的重要原因^[1]。糖尿病患者除了糖代谢受损以外, 常伴有肥胖、脂代谢异常、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、血管内皮细胞损伤、血液高凝状态、氧化应激增强、体内低度炎症状态等一系列代谢紊乱, 都与糖尿病大血管病变密切相关^[2]。前期研究已证明, 参芪复方有抗氧化和抗炎作用, 能有效改善实验动物的血糖、血脂、胰岛素和细胞凋亡状况, 修复受损大血管内皮细胞^[3]。本研究观察参芪复方对糖尿病大血管病变大鼠胸主动脉病理学的影响, 并采用全转录组表达谱芯片进行差异基因筛选, 进一步探索参芪复方防治糖尿病大血管病变的可能分子机制。

基金项目: 国家自然科学基金 (81273749); 四川省教育厅基金 (14ZB0102)

* 通讯作者: xcg718@aliyun.com, (028) 87769902

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级自发性 2 型糖尿病雄性 GK 大鼠 160 只, 7~8 周龄, 体重 (250 ± 20) g, 上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2012-0002。SPF 级雄性 Wistar 大鼠 32 只, 7~8 周龄, 体重 (160 ± 15) g, 成都达硕实验动物有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (川) 2013-24。由成都达硕实验动物有限公司提供普通饲料 (碳水化合物 71%, 脂肪 4.5%, 蛋白 20%) 及高脂饲料 (普通饲料 88.2%, 精炼猪油 10.0%, 胆固醇 1.5%, 猪胆盐 0.3%)。

1.2 实验药品、试剂及仪器

参芪复方组成: 黄芪 15 g, 人参 15 g, 山药 10 g, 生地黄 10 g, 山萸肉 10 g, 天花粉 10 g, 丹参 10 g, 熟大黄 6 g, 制备成浸膏, 每 1 ml 浸膏含 1.44 g 生药, 由成都中医药大学附属医院药剂科生

产; 盐酸二甲双胍片 (格华止), 中美上海施贵宝制药有限公司, 批号: 1407082。水合氯醛, 成都科龙化工试剂厂, 批号: 20131012; Masson 三色染色试剂盒, 珠海贝索生物技术有限公司, 货号: BA4079A/B; GeneChip® Rat Genome 230 2.0 芯片, Affymetrix 公司, 货号: 902416; Ovation FFPE WTA System, NuGEN 公司, 货号: 3403。稳态血糖仪, 强生医疗器材有限公司; 数码三目摄像显微镜, 麦克奥迪实业集团有限公司, 型号: BA400Digital; 图像分析系统, 美国 Media Cybernetics 公司, 型号: Image-Pro Plus 6.0。

1.3 建模、分组及给药方法

160 只 GK 大鼠参照文献 [4] 方法并结合预实验结果喂养高脂饲料连续 12 周建立糖尿病大血管病变大鼠模型。采用随机数字表法将大鼠分为模型组、西药组及参高、中、低组, 每组 32 只。32 只 Wistar 大鼠作为空白组, 给予普通饲料喂养。12 周后西药组给予二甲双胍片 0.1 g/(kg·d) 灌胃, 参高、中、低组分别给予参芪复方 2.88、1.44、0.72 g/(kg·d) 灌胃, 空白组和模型组给予生理盐水 5 ml/(kg·d) 灌胃。各组均灌胃 16 周。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 一般情况 观察各组大鼠的毛色、精神状态、行为活动、反应、排泄等情况。

1.4.2 空腹血糖 各组大鼠于给药前及给药第 8、16 周末各处死 9 或 10 只。处死前禁食不禁水 8 h, 一次性无菌针刺取大鼠尾尖血, 用血糖仪检测。

1.4.3 胸主动脉病理 Masson 染色 分别于给药第 8、16 周末每组取 6 只大鼠采用 10% 水合氯醛 350 mg/kg 腹腔注射麻醉, 无菌条件下剪取胸主动脉标本 2 cm, 其中 1 cm 投入已备好的盛有 4% 多聚甲醛溶液的冻存管中固定组织。切片脱蜡至水; Weigert 铁苏木素染 5 min; 1% 盐酸酒精分化; 丽春红酸性品红染液染 10 min; 染后均流水冲洗。磷酸钼溶液处理约 1 min, 直接用苯胺蓝染液复染

5 min; 1% 冰醋酸处理 1 min, 95% 酒精脱水多次; 无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 供镜检及计算各切片样本胶原纤维/血管壁面积 (PVCA/LA)。

1.4.4 胸主动脉差异基因分析 另取约 1 cm 胸主动脉标本置于冻存管后投入液氮中保存, 用于表达谱芯片检测, 采用 Takara RNAiso Plus Kit 并且根据标准操作流程进行样品的总 RNA 抽提、纯化, 利用 GeneChip® Rat Genome 230 2.0 芯片, 完成 18 张芯片大鼠全转录组差异基因分析。

1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 进行统计分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。符合正态分布者采用单因素方差分析, 不符合正态分布者采用非参数检验方法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

实验过程中因相互撕咬、感染、灌胃操作等原因死亡共计 14 只, 其中参中、低组各死亡 3 只, 其余各组均死亡 2 只。空白组大鼠一般状态良好, 摄食量、饮水量正常, 皮毛光泽, 反应灵敏。模型组大鼠皮毛枯槁, 精神萎靡, 反应迟钝, 摄食量、饮水量、尿量明显增多。各治疗组皮毛色泽、性情温顺、精神状态等基本状况优于模型组。参高、中、低组大鼠饮水量较西药组减少; 参中组大鼠精神状态优于参高组和参低组。

2.2 各组大鼠不同时间空腹血糖比较

表 1 示, 与空白组同时间比较, 其余各组在给药前及给药第 8、16 周末大鼠空腹血糖显著升高 ($P < 0.01$)。第 8 周末参低组大鼠空腹血糖较模型组显著降低, 第 16 周末西药组和参高、中、低组大鼠空腹血糖亦低于同时间模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 第 16 周末西药组空腹血糖亦明显低于同时间参高组 ($P < 0.05$), 而参高、中、低组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间空腹血糖比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	给药前	第 8 周	第 16 周
空白组	4.84 ± 0.46 (10)	4.91 ± 0.71 (10)	4.62 ± 0.75 (10)
模型组	24.55 ± 6.85* (10)	22.91 ± 5.45* (10)	27.78 ± 6.35* (10)
西药组	20.71 ± 4.25* (10)	21.39 ± 5.47* (10)	15.50 ± 5.78*△△ (10)
参高组	22.22 ± 5.10* (10)	23.77 ± 4.02* (10)	21.60 ± 3.67*△▲ (10)
参中组	22.17 ± 5.30* (10)	21.70 ± 6.38* (10)	20.57 ± 3.63*△ (9)
参低组	21.98 ± 5.91* (10)	19.00 ± 5.30*△ (10)	21.31 ± 3.76*△ (9)

注: 与空白组同时间比较, * $P < 0.01$; 与模型组同时间比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与西药组同时间比较, ▲ $P < 0.05$; () 内为鼠数

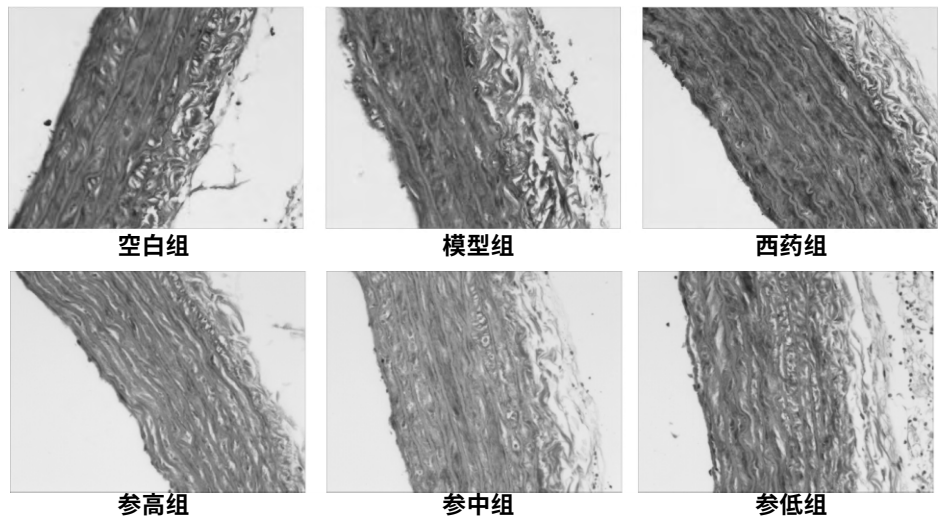


图 1 各组大鼠第 16 周时胸主动脉 Masson 染色比较 (×200)

2.3 各组大鼠胸主动脉 Masson 染色及 PVCA/LA 比较

图 1 示,第 16 周时空白组主动脉中膜少量蓝染胶原纤维;模型组可见主动脉中膜蓝染胶原纤维增多;西药组、参高组与参中组主动脉壁间弹性纤维及细胞排列略显紊乱,程度介于空白组和模型组之间;参低组主动脉胶原纤维增多,程度类似模型组。表 2 示,与空白组比较,除参高组外,其余各组大鼠第 8 周和 16 周时 PVCA/LA 明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,各治疗组第 8 周和 16 周时 PVCA/LA 均显著下降 ($P < 0.01$)。参高、中、低组各时间点 PVCA/LA 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),参高组各时间点 PVCA/LA 明显低于西药组,而参低组各时间点明显高于西药组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠不同时间胸主动脉原纤维/血管壁面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 8 周	第 16 周
空白组	6	0.15 ± 0.012	0.15 ± 0.020
模型组	6	0.87 ± 0.048 **	0.91 ± 0.017 **
西药组	6	0.30 ± 0.018 **△	0.31 ± 0.035 **△
参高组	6	0.17 ± 0.006 △▲	0.19 ± 0.031 △▲
参中组	6	0.27 ± 0.009 *△	0.27 ± 0.012 *△
参低组	6	0.42 ± 0.010 **△▲▲	0.41 ± 0.006 **△▲▲

注:与空白组同时时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组同时时间比较, △ $P < 0.01$; 与西药组同时时间比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

2.4 各组大鼠胸主动脉差异基因比较

综合以上结果,参中组在改善大鼠一般状态、胸主动脉病理以及降糖方面效果最好,故选取参中组与模型组进行差异基因比较,每组样本生物学重

复为 3 个,满足统计学分析要求。表 3、表 4 示,选择差异倍数 > 2 且 P 值 < 0.05 的全部差异基因进行组间比较,得到参中组与模型组、模型组与空白组共同存在的显著性差异基因共 15 个,依次为 Fry, Csnk1d, Trpc4ap, Lama4, Csnk1a1, Matn2, Tnrc6a, Elavl1, Ranbp1, Abi1, Creb5, Larp4b, Man2a1, Nsg1, LOC685067。其中 12 条在模型组与空白组比较表达上调,而参中组比模型组下调;2 条在模型组与空白组比较表达下调,而参中组与模型组比较表达上调。15 个基因中与糖尿病血管病变有关的基因为 Elavl1、Lama4。

表 3 各组大鼠胸主动脉差异基因条目数

组别	P 值	差异倍数	差异基因总数	上调基因总数	下调基因总数
模型组 V 空白组	< 0.05	> 2	219	188	31
参中组 V 模型组	< 0.05	> 2	168	35	133
西药组 V 模型组	< 0.05	> 2	68	41	2

表 4 15 个差异基因在各组差异表达情况

差异基因	模型组 VS 空白组	参中组 VS 模型组
Fry	上调	下调
Csnk1d	上调	下调
Trpc4ap	上调	下调
Lama4	上调	下调
Csnk1a1	上调	上调
Matn2	上调	下调
Tnrc6a	上调	下调
Elavl1	上调	下调
Ranbp1	上调	下调
Abi1	上调	下调
Creb5	上调	下调
Larp4b	上调	下调
Man2a1	上调	下调
Nsg1	下调	上调
LOC685067	下调	上调

3 讨论

现代医学认为,糖尿病大血管病变存在糖脂代谢紊乱、氧化应激增强等因素导致血小板聚集黏附,管壁通透性增高,胆固醇和脂蛋白浸润沉积于动脉内膜下,血管慢性炎症损伤与血管修复持续进行,诱发血管病理性新生^[2]。高糖损伤血管内皮细胞,可引起血管内皮生长因子(VEGF)和血管活性物质的表达或激活紊乱、中膜血管平滑肌细胞的功能、结构发生改变,成为具有增殖及分泌功能的细胞^[3],胶原纤维及弹力纤维增多,造成血管粥样硬化、管腔狭窄^[4]。自发性2型糖尿病GK大鼠为近交系,病程发展特点与人类糖尿病类似,表现为轻中度高血糖、中度胰岛素抵抗,病程晚期出现糖尿病视网膜病变、神经血管病变等并发症,适合建立糖尿病动脉粥样硬化模型^[5]。高血糖使动脉血管管壁的胶原蛋白糖基化,与其他蛋白质的结合性加强,导致动脉管壁增厚、弹性减退。胶原纤维主要含胶原蛋白,故主动脉中PVCA/LA和动脉粥样硬化相关^[6]。

本研究结果显示,与空白组比较,模型组血糖显著升高,中膜蓝染胶原纤维增多,PVCA/LA显著升高,符合糖尿病大血管病变特征。而第16周时参芪复方各剂量组大鼠空腹血糖显著降低,参高组与参中组主动脉壁间弹性纤维及细胞排列略显紊乱,程度介于空白组和模型组之间,PVCA/LA明显降低,并且以参中组效果与西药组最为接近。说明参芪复方能有效降低主动脉纤维化,减轻粥样硬化,效果以中剂量最佳。

基因芯片技术具有大规模、高通量的特点,为研究中药复方防治糖尿病大血管病变各环节和各阶段共同表达的基因群提供了强有力的工具^[7]。本次实验采用大鼠全表达谱芯片对大鼠主动脉组织RNA样本进行转录水平检测,在各组共同差异基因中与糖尿病血管病变有关的为Elavl1(又名HuR基因)、Lama4。HuR是Hu家族中至今唯一在人组织中除神经组织外广泛表达的蛋白,可以与VEGF、环氧化酶2(COX-2)、细胞周期蛋白A(CyclinA)等mRNA结合,增强其蛋白表达,从而对肿瘤的增殖分化、细胞凋亡、侵袭转移、血管新生和免疫逃避发挥广泛作用^[8]。本实验模型组Elavl1上调,参中组下调,推测参芪复方可能通过下调Elavl1,降低VEGF的表达,抑制血管病理性新生。Lama4是层粘连蛋白(LN)α4亚基,主要

参与了肿瘤迁移过程中细胞间质的降解、细胞微环境改变等步骤,可以作为肝癌、肺癌、喉癌等肿瘤侵袭和转移的新标志物 and 治疗的分子靶标^[9]。糖尿病视网膜病变过程中,Lama4使细胞外基质中LN的过度表达,促进视网膜微血管内皮细胞增生、毛细血管瘤形成,并导致毛细血管闭锁、基底膜增厚等病变^[10]。本实验模型组Lama4上调,参中组下调,结合主动脉切片Masson染色结果推测参芪复方可能通过下调Lama4抑制LN,从而减轻糖尿病大血管胶原纤维增生与硬化。

中医学认为,糖尿病大血管病变类似消渴变证之“脉痹”。本病本虚标实,因气阴两虚日久而生痰瘀,痰瘀留恋脉道,造成脉道拘急、坚硬的病理状态,更令气血津液不能畅行;痰浊瘀血滋生附着,脉道拘急进行性加重。参芪复方立法益气养阴,活血化瘀,方中君药人参、黄芪补气,气行则津行,痰浊自消;臣药山药、山萸肉、天花粉、生地黄,补肺、脾、肾之阴,阴足则气充,使血行流畅;丹参、熟地黄消散瘀血,直接缓解脉道拘急状态。本研究结果显示,参芪复方可改善糖尿病大血管病变,其机制可能与下调Elavl1、Lama4基因表达,抑制血管新生,减少胶原纤维产生,促进受损内皮细胞修复有关。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会糖尿病慢性并发症调查组. 全国糖尿病患者慢性并发症及其相关危险因素10年回顾性调查分析[J]. 中国糖尿病杂志,2003,11(4):232-238.
- [2] 纪立农. 对2型糖尿病的大型临床实验结果的解读和分析[J]. 中国糖尿病杂志,2008,16(11):642-647.
- [3] 刘桢,谢春光,庄灿,等. 参芪复方对GK大鼠2型糖尿病大血管病变内皮保护作用的实验研究[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(6):1163-1165.
- [4] 胡泊洋,江道峰,王张. 自发性2型糖尿病动物模型GK大鼠的发病特征研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(10):203-207.
- [5] DORONZO G, VIRETTO M, RUSSO I, et al. Effects of high glucose on vascular endothelial growth factor synthesis and secretion in aortic vascular smooth muscle cells from obese and lean Zucker rats[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(8):9478-9488.
- [6] 孙文宇,孙霞,周志强,等. 外膜平滑肌细胞分裂增殖参与移植动脉硬化早期形成的研究[J]. 山东中医药大学学报(医学版),2005,43(3):247-250.
- [7] 衡先培,黄国良,修玲玲. 糖尿病大血管病变[M]. 北京:人民军医出版社,2011:31.

[] 顾菲菲,高炜,蒋捷,等. 基因芯片在同型半胱氨酸诱导动脉粥样硬化基因表达谱变化中的应用 [] . 中国动脉硬化杂志,2004,12(4) :433-437.

[] MRENA J, WIKSTEN JP, KOKKOLA A, et al. Prognostic significance of cyclinA ingastric cancer [] . Int J Cancer, 2006,119(8) :1897-1901.

[] 郭振华、李群、龚朝晖,等. LAMA4 基因对喉癌细胞增殖和侵袭的调控机制 [] . 浙江医学,2014,34(10) :863-866.

[] 潘琳,李光伟,周水平,等. 细胞外基质纤维连接蛋白和层粘连蛋白在糖尿病大鼠视网膜微血管病变表达的研究 [] . 中华糖尿病杂志,2004,12(1) :56-59.

Effect of *Shenqi Compounds* (参芪复方) on Differential Gene Expression in Thoracic Aorta of Rats with Diabetic Great Vascular Complications

MA Hui, XIE Chunguang

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Sichuan 610075)

ABSTRACT Objective To explore the possible molecular mechanism of *Shenqi Compounds* (参芪复方) in preventing and treating diabetic great vascular complications. **Methods** Totally 160 Goto-Kakizaki (GK) rats with spontaneous type 2 diabetes were given high-fat diet for 12 weeks to establish diabetic great vascular complications model. The rats were then randomly divided into model group, western medicine group, *Shenqi* high, middle and low groups, with 32 rats in each group. Other 32 Wistar rats were set as blank group. After modeling, the western medicine group was given 0.1 g/(kg · d) of diformin tablet for gavage, while the *Shenqi* high, middle and low groups were respectively given 2.88, 1.44 or 0.72 g/(kg · d) of *Shenqi Compounds* for gavage. The blank and model group were given 5 ml/(kg · d) of saline for gavage. The medication were all for 16 weeks. Fasting blood-glucose was examined before giving medicine and in the 8th and 16th week during treatment. In the 8th and 16th week, Masson stain was adopted to observe pathomorphism of thoracic aorta and calculated perivascular circumferential area/lumen area (PVCA/LA) . Differential genes screening was conducted in the 16th week. **Results** Compared with the blank group at the same time point, fasting blood-glucose of rats increased before and in the 8th and 16th week during giving medicine, and PVCA/LA remarkably increased in the 8th and 16th week in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); In the 16th week, fasting blood-glucose of rats in the western medicine group and *Shenqi* high, middle and low groups were lower than that in the model group at the same time point and PVCA/LA all remarkably decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) . There were in total 15 remarkable common differential genes between the *Shenqi* middle group and the model group, and the model and the blank group. Among them, *Elavl1* and *Lama4* were genes that had relationship with diabetic great vascular complications. *Elavl1* and *Lama4* genes in the *Shenqi* middle group decreased. **Conclusion** The possible functional mechanism of *Shenqi Compounds* in preventing and curing diabetic great vascular complications might be related with down-regulating *Elavl1* and *Lama4* gene expression in thoracic aorta and therefore inhibiting angiogenesis and reducing collagen fibers producing.

Keywords diabetic great vascular complications; *Shenqi Compounds*; thoracic aorta; differential genes

(收稿日期: 2016 - 11 - 29; 修回日期: 2017 - 03 - 06)

编辑: 邓 媛

特色王氏热透灸免费公益培训

一、王氏热透灸的特点

1. 药艾条直径 4 cm, 长 10 cm, 单根最长可燃烧 3 个小时, 可以多根并用 (3—16 根) 燃烧温度高达 500 余度; 2. 有专用灸器; 3. 无烟艾灸; 4. 大面积、短时间、近距离、高温、药力峻、强渗透、施用后即有灸感 (透肉、透筋、透骨); 5. 充分展现古灸大法四两拨千斤的太极功力。

二、该技术可应用于针灸康复科、疼痛科、肾病科、肿瘤科、治未病科等。

热透灸创始人王廷峰简介:

安徽省阜阳市东方针灸医院院长; 安徽省师带徒指导老师; 安徽省阜阳市颍淮基层名中医; 曾出版《扶阳化脓灸法》、《扁鹊灸法治顽疾》、《中国灸法》、在中国中医报连载化脓灸系列文章, 擅长化脓灸疗法、王氏热透灸疗法治病, 临床施灸均获良效。



扫码免费培训