

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.19.017

左归丸对妊娠糖尿病大鼠胎鼠出生体重的影响

王悦尧¹, 王永辉^{2*}, 李艳彦², 柴智², 高丽², 周然²

(1. 成都中医药大学基础医学院, 四川省成都市十二桥路 37 号, 611137; 2. 山西中医学院)

摘要 目的 观察左归丸对妊娠糖尿病大鼠胎鼠出生体重的影响及可能作用机制。方法 SD 大鼠受孕后随机分为正常对照组、妊娠糖尿病组、胰岛素干预组、左归丸干预组、联合干预组, 每组 10 只。受孕当日除正常对照组外其余各组大鼠腹腔注射链尿佐菌素 45 mg/kg 建立妊娠糖尿病大鼠模型。于妊娠第 3 天开始左归丸干预组、联合干预组给予左归丸 10 g/(kg·d) 灌胃, 正常对照组和妊娠糖尿病组灌胃等量蒸馏水, 每日 1 次; 胰岛素干预组、联合干预组给予诺和灵 R 20 IU/(kg·d) 皮下注射, 每日 1 次, 至孕 18 天。孕 19 天解剖大鼠, 称胎鼠体重, 检测血清、皮质酮、胎盘 11 β -羟基类固醇脱氢酶 2 (11 β -HSD2) mRNA 和蛋白表达。结果 与正常对照组比较, 妊娠糖尿病组大鼠血清皮质酮水平明显升高, 胎鼠体重、胎盘 11 β -HSD2 mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与妊娠糖尿病组比较, 胰岛素干预组、联合干预组大鼠血清皮质酮水平明显降低, 胎鼠体重升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 左归丸干预组的胎鼠体重比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 联合干预组胎盘 11 β -HSD2 mRNA 和蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)。结论 左归丸可以改善妊娠糖尿病病理状态对胎鼠体重的影响, 联合胰岛素效更佳, 其机制可能是通过上调 11 β -HSD2 的表达、降低皮质酮浓度有关。

关键词 左归丸; 妊娠糖尿病; 胎鼠体重; 11 β -羟基类固醇脱氢酶 2; 皮质酮

妊娠糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 属于病理妊娠的一种, 它不仅影响孕妇本身的激素水平和代谢, 增加妊娠高血压疾病的风险, 还会由此导致胎儿发育的异常, 引起胎儿宫内生长受限及宫内窘迫、低体重儿等后果。宫内生长受限是 GDM 的重要并发症之一, 其发病率为 3% ~ 10%, 在我国发病率平均为 6.39%^[1]。引起宫内生长受限的一个重要因素就是胎儿在宫内接触了过多的糖皮质激素^[2]。正常状态下, 胎盘 11 β -羟基类固醇脱氢酶 2 (11 β -HSD2) 为避免胎儿暴露于过量的糖皮质激素水平提供了屏障作用, 保证胎儿正常生长发育。一旦子宫内糖皮质激素浓度过高或胎盘 11 β -HSD2 活性下降, 则可引起宫内生长受限等不良反应^[3]。本研究通过建立 GDM 大鼠模型, 观察左归丸干预后对 GDM 大鼠皮质酮、胎鼠重量及胎盘 11 β -HSD2 mRNA 和蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康的生育期 SD 雌性大鼠 100 只, SPF 级, 10 周龄, 体重 220 ~ 260 g; 雄性大鼠 50 只, SPF 级, 12 周龄, 体重 300 ~ 340 g。实验动物许可证号 SCXK (京) 2009-0017, 由中国食品药品检定研究院提供。明暗循环, 自由饮食, 温度 25℃、湿度 50% ~ 60% 条件下饲养。

1.2 药物、试剂与仪器

左归丸 (河南省宛西制药股份有限公司, 批号: 130510); 诺和灵 R 笔芯 (丹麦诺和诺德公司, 国药准字 J20121010); 链尿佐菌素 (STZ, 美国 Sigma 公司, 批号: 040M1357); 皮质酮酶联免疫试剂盒 (批号: 1403221) 购自上海西唐生物科技有限公司; Trizol 提取试剂盒 (批号: 14596-026, Invitrogen 公司); 溴化乙锭 (批号: 201406-C15, 上海生工生物工程股份有限公司); 琼脂糖 (批号: 20140601, 上海生工生物工程股份有限公

基金项目: 山西省国际科技合作项目 (2012081055-2)

* 通讯作者: wyh766188@sina.com

司); RT-PCR 反应试剂盒 (批号: F-415XL, Thermo 公司); 兔抗人 11 β -HSD2 抗体 (Santa Cruz 公司, 批号: L0909); 兔抗人 β -actin 抗体 (美国 Bioworld 公司, 批号: AA32121)。Accu-CHEK Active 罗氏乐康全活力型血糖测定仪 (德国罗氏诊断有限公司); 7900HT Fast 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); H6-4 微型电泳槽 (上海精益有机玻璃制品仪器厂); YXJ-2 离心机 (湘仪离心机仪器有限公司); 凝胶成像系统 (上海复日科技有限公司); TU-1901 紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司)。

1.3 动物分组及给药方法

雌鼠每日生理盐水灌胃使其适应。1 周后, 禁食不禁水 12 h, 剪尾取血测空腹血糖, 以血糖值 ≤ 6.1 mmol/L 作为纳入研究。以雌、雄比例 2: 1 合笼过夜, 次日晨检雌鼠阴道涂片镜检见精子者, 定为受孕。将孕鼠按体重采用随机数字表法分为正常对照组、妊娠糖尿病组、胰岛素干预组、左归丸干预组、联合干预组, 每组 10 只。除正常对照组外, 其余各组于受孕当日禁食 12 h 后, 经腹腔注射 STZ 45 mg/kg 特异性损伤胰岛 β 细胞, 复制妊娠糖尿病模型^[4]。于妊娠第 3 天测孕鼠血糖, 若血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 则建模成功。胰岛素干预组 5 只成模, 其余 3 组各有 6 只造模成功。于妊娠第 3 天开始左归丸干预组、联合干预组给予左归丸 10 g/(kg·d) 灌胃, 正常对照组和妊娠糖尿病组灌胃等量蒸馏水, 每日 1 次; 胰岛素干预组、联合干预组给予诺和灵 R 20 IU/(kg·d) 皮下注射, 每日 1 次, 至孕 18 天。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 胎鼠重量 于末次给药后禁食 12 h, 将各组大鼠称重, 处死大鼠, 腹主动脉取血, 分离血清; 剥离出胎盘及胎儿, 用电子天平称量并记录胎鼠重量。

1.4.2 孕鼠皮质酮浓度 采用酶联免疫吸附法检测, 按试剂盒说明书操作步骤测定。

1.4.3 胎盘 11 β -HSD2 mRNA 表达水平 采用实时定量 PCR 技术, 取胎盘组织 100 mg, 用 Trizol 一步法提取总 RNA。逆转录反应以总 RNA 2 μ l 为模板, 11 β -HSD2 和 β -actin 基因采用 OligodT 为逆转录引物, 总反应体系为 10 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 15 min, 85 $^{\circ}$ C 水浴 5 s 合成 cDNA 链。PCR 反应以逆转录产物 2 μ l 为模板, 引物由上海生工生物技术有限公司合成, β -actin: 上游 5'-CGTAAAGACCTCTATGC-

CAACA3', 下游 5'-AGCCACCAATCCACACAGAG3', 163 bp; 11 β -HSD2: 上游 5'-TCAAGACAGAG-GCAGTGAATAATG3', 下游 5'-CATGCAAGTGCT-CAATGTAGTCT3', 120 bp。加入上游、下游引物各 1 μ l, 总反应体系 25 μ l。PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 循环 1 次, 95 $^{\circ}$ C 退火 5 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共循环 40 次。产物半定量分析以 β -actin 为内参照, 目的基因相对于内参基因的变化倍数即 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 做半定量分析。

1.4.4 胎盘 11 β -HSD2 蛋白表达水平 在 50 mg 组织中加入 0.5 ml 蛋白裂解液, 超声匀浆, 10000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 取上清, 加入等体积的 2 $\times$ SDS Buffer, 95 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, 迅速冰浴, 10000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 收集上清, 采用 Western blot 法检测。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 计量数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。数据资料呈正态分布, 经方差齐性分析后, 各组间均数比较应用单因素方差分析, 两组之间的比较选择 *LSD-t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清皮质酮水平比较

表 1 示, 与正常对照组比较, 妊娠糖尿病组大鼠血清皮质酮水平明显升高 (P < 0.01); 与妊娠糖尿病组比较, 胰岛素干预组、左归丸干预组大鼠、联合干预组大鼠血清皮质酮水平均明显降低 (P < 0.05 或 P < 0.01), 但胰岛素干预组、左归丸干预组大鼠血清皮质酮水平仍高于正常对照组 (P < 0.05 或 P < 0.01), 而联合干预组大鼠血清皮质酮水平与正常对照组比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。

表 1 各组大鼠血清皮质酮水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	皮质酮 (ng/ml)
正常对照组	10	13.20 $\pm$ 3.84
妊娠糖尿病组	6	78.03 $\pm$ 12.52 **
胰岛素干预组	5	57.84 $\pm$ 17.19 ** Δ
左归丸干预组	6	38.03 $\pm$ 14.53 ** $\Delta\Delta$
联合干预组	6	21.00 $\pm$ 8.87 $\Delta\Delta$

注: 与正常对照组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01; 与妊娠糖尿病组比较, Δ P < 0.05, $\Delta\Delta$ P < 0.01

2.2 各组大鼠胎鼠体重比较

表 2 示, 正常对照组胎鼠的体重明显大于妊娠糖尿病组 (P < 0.01); 胰岛素干预组和联合干预

组的胎鼠体重均显著大于妊娠糖尿病组 ($P < 0.05$), 左归丸干预组的胎鼠体重与妊娠糖尿病组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠胎鼠体重比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	胎鼠数量	胎鼠体重
正常对照组	10	47	1.46 ± 0.25
妊娠糖尿病组	6	32	$0.89 \pm 0.06^*$
胰岛素干预组	5	43	$1.11 \pm 0.08^\Delta$
左归丸干预组	6	30	0.98 ± 0.04
联合干预组	6	39	$1.20 \pm 0.12^\Delta$

注: 与正常对照组比较, $* P < 0.01$; 与妊娠糖尿病组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 各组大鼠胎盘组织 11 β -HSD2 mRNA 和蛋白表达比较

表 3 示, 妊娠糖尿病组胎盘 11 β -HSD2 mRNA 和蛋白表达均显著低于正常对照组 ($P < 0.05$); 与妊娠糖尿病组比较, 联合干预组胎盘 11 β -HSD2 mRNA 和蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 左归丸干预组和胰岛素干预组的胎盘 11 β -HSD2 mRNA 和蛋白表达水平与妊娠糖尿病组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠胎盘组织 11 β -HSD2 mRNA 和蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	11 β -HSD2 mRNA	11 β -HSD2 蛋白
正常对照组	10	1.23 ± 0.36	0.405 ± 0.108
妊娠糖尿病组	6	$0.66 \pm 0.05^*$	$0.234 \pm 0.075^*$
胰岛素干预组	5	0.81 ± 0.44	0.293 ± 0.055
左归丸干预组	6	0.92 ± 0.45	0.315 ± 0.065
联合干预组	6	$0.97 \pm 0.11^\Delta$	$0.397 \pm 0.155^\Delta$

注: 与正常对照组比较, $* P < 0.05$; 与妊娠糖尿病组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

中医学认为, 妊娠糖尿病引发的胎儿生长受限属于“胎萎不长”范畴。肾藏精主生殖, 肾精的关键作用体现在其盛衰决定着人体的生长、发育与生殖。《素问·上古天真论》对此作出经典性阐述: “女子七岁, 肾气盛, 齿更发长; 二七而天癸至, 任脉通, 太冲脉盛, 月事以时下, 故有子; ……丈夫八岁, 肾气实, 发长齿更; 二八肾气盛, 天癸至, 精气溢泻, 阴阳和, 故能有子; ……八八则齿发去。”对于男性和女性而言, 都是在肾气充盛的前提下, 身体开始发育, 出现“齿更发长”的现象。《素问·金匱真言论》曰“精者, 身之本也。”《女科经纶·引女科集略》说“女之肾脉系于胎, 是母之真气, 子之所赖也。”若肾气不足,

肾精匮乏, 冲任精血不足, 胎失濡养, 使胎儿发育迟缓不长, 故多数医家以补肾气、滋肾阴法治疗。本研究所选用的左归丸出自《景岳全书》, 方中以熟地黄为君药填真阴滋肾水, 臣以枸杞子、山萸肉助其力, 加上龟甲胶、鹿角胶为血肉有情之品, 其中龟甲胶偏补阴以滋肾水, 鹿角胶偏补阳而暖胞宫、养胚胎, 两胶合力, 沟通任督二脉, 益精填髓。本方深寓“阳中求阴”之意, 为“壮水之主”第一方, 菟丝子、川牛膝补肾强筋骨, 山药能滋脾胃、补后天, 共收滋肾填阴之效。

研究发现^[8], 胎儿过多的接触糖皮质激素会导致胎儿生长受限, 因为糖皮质激素有诱导糖异生关键酶合成而增加肝糖输出、抑制胎儿肝外组织摄取与利用葡萄糖, 而胎儿宫内发育的能量主要由葡萄糖提供, 发育组织对葡萄糖摄取与利用的障碍是胎儿生长受限重要病因之一。本研究结果显示, 妊娠糖尿病组的胎鼠重量低于正常对照组, 与临床上高血糖孕妇易产巨大儿不符。其原因可能为孕妇在轻度高血糖时, 其高血糖通过胎盘循环可以刺激胚胎胰岛 β 细胞增殖, 胰岛素合成能力增强, 引起胰岛 β 细胞发育过度导致细胞增生和肥大, 这些因素会导致胎儿生物合成增加, 巨大儿的发生率也大大增加。但是当母亲孕期严重糖尿病时, 极高的血糖使胚胎 β 细胞不能产生足够的胰岛素而耗竭, 胎儿出现低胰岛素血症, 血糖摄取下降, 胎儿蛋白合成受限, 最终引起体重下降。

11 β -HSD2 作为糖皮质激素代谢过程中的一种活性酶, 其活性的高低与血中糖皮质激素 (人体内主要为氢化可的松, 啮齿类动物体内为皮质酮) 相关^[9]。Sampath-Kumar 等^[10]研究发现, 胎儿生长受限的胎儿胎盘 11 β -HSD2 活性仅为适当孕龄出生体质量正常新生儿胎盘的一半; Ellen Struwe 等^[11]研究发现, 胎儿生长受限的胎盘 11 β -HSD2 mRNA 表达下降。在本实验中, 胰岛素和左归丸干预后, 胎盘 11 β -HSD2 mRNA 和蛋白表达有所增加, 胎鼠重量也随之上升, 并且联合用药干预组显著高于单用左归丸或胰岛素干预。推测在胰岛素的基础上加用左归丸不但可以降低血清皮质酮, 还可以明显上调 11 β -HSD2 mRNA 表达, 二者具有协同作用, 左归丸可能是通过 11 β -HSD2 调节糖皮质激素的代谢进而实现对胎鼠出生体重的影响。

参考文献

- [1] 乐杰. 妇产科学 [M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 130.

- [4] Dalziel SR, Walker NK, Parag V, et al. Cardiovascular risk factors after antenatal exposure to betamethasone: 30-year follow-up of a randomized controlled trial [J]. Lancet, 2005, 365(9474): 1856-1862.
- [5] Koppw. Role of High-insulinogenic nutrition in the etiology of gestational diabetes mellitus [J]. Med Hypotheses, 2005, 64(1): 101-103.
- [6] 丁国莲. 宫内高糖环境对子代亲源性基因印记的影响及其遗传效应机制的研究 [J]. 杭州: 浙江大学, 2011: 3.
- [7] 林彬, 刘俊, 徐先明. 胎盘与 11 β -HSD 病理妊娠的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(1): 165-167.
- [8] 徐爱群. 多疗程糖皮质激素治疗早产的临床评价及对

胎盘 11 β -HSD2 调控作用研究 [J]. 成都: 四川大学, 2007.

- [9] Dy J, Guan H, Sampath-Kumar R, et al. Placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is reduced in pregnancies complicated with idiopathic intrauterine growth restriction: evidence that this is associated with an attenuated ratio of cortisone to cortisol in the umbilical artery [J]. Placenta, 2008, 29(2): 193-200.
- [10] Struwe E, Berzl GM, Schild RL, et al. Simultaneously reduced gene expression of cortisol-activating and cortisol-inactivating enzymes in placentas of small-for-gestational-age neonates [J]. AM J Obstet Gynecol, 2007, 197(1): 43.

Effect of Zuogui Wan (左归丸) on Fetal Rats Birth Weight of Gestational Diabetes Mellitus Rats

WANG Yueyao¹, WANG Yonghui², LI Yanyan², CHAI Zhi², GAO Li², ZHOU Ran²

(1. Basic Medical College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan Province, 611137; 2. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effect and possible mechanism of *Zuogui Wan* on fetal rats birth weight of gestational diabetes mellitus (GDM) rats. **Methods** Pregnant SD rats were randomly divided into normal control group, GDM group, insulin intervention group, *Zuogui Wan* intervention group and combined intervention group, 10 rats in each group. On the day of conception, rats of these groups were injected intraperitoneally with streptozocin 45 mg/kg to establish GDM rat models except rats of normal control group. From the third day of conception, *Zuogui Wan* intervention group and combined intervention group were given *Zuogui Wan* 10 g/ (kg · d) by gavage. Normal control group and GDM group were given equivalent distilled water by gavage, once each day. Insulin intervention group and combined intervention group were given Novolin R 20IU/ (kg · d) by subcutaneous injection, once each day, until 18 days of conception. On the 19th day of conception, rats were anatomized. Weigh fetal rats, detect serum corticosterone, placenta 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 (11 β -HSD2) mRNA and the expression of protein. **Results** Compared with normal control group, serum corticosterone in GDM group increased; fetal rats weight, placenta 11 β -HSD2 mRNA and the expression of protein decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with GDM group, serum corticosterone in insulin intervention group and combined intervention group decreased; fetal rats weight increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Fetal rats weight in *Zuogui Wan* intervention group had no significant difference ($P > 0.05$). Placenta 11 β -HSD2 mRNA and the expression of protein in combined intervention group increased ($P < 0.05$). **Conclusion** *Zuogui Wan* could improve the effect of GDM pathological state on fetal rats weight. It was more effective to combine with insulin. The mechanism may relate to up-regulate the expression of 11 β -HSD2 and decrease the concentration of corticosterone.

Keywords *Zuogui Wan*; gestational diabetes mellitus; fetal rats weight; 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2; corticosterone

(收稿日期: 2015-01-08; 修回日期: 2015-07-10)

编辑: 邓媛

欢迎邮购 《中医杂志》 光盘合订本

1951-1986 年 (4 张光盘) 480 元; 1987-1994 年 (1 张光盘) 260 元; 1995-2004 年 (1 张光盘) 280 元; 2005-2013 年 (1 张光盘) 300 元。

光盘合订本为计算机用数据光盘, 收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容, 可对所有文章进行任意字检索, 方便实用。汇款地址: 北京市东直门内南小街 16 号中医杂志社北京医海林音像书店, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632; 网址: <http://www.jtcm.net.cn>