

牛膝多糖对糖尿病大鼠脑组织保护作用及其机制※

● 张 杰* 杨旭东 宋高臣

摘 要 目的:探讨牛膝多糖对糖尿病大鼠脑组织保护作用及其作用机制。方法:将 Wistar 大鼠随机分为 5 组,A:正常对照组;B:模型组;C:牛膝低剂量组;D:牛膝中剂量组;E:牛膝高剂量组。8 周后,HE 染色观察脑组织病理变化,琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡,RT-PCR 观察 p53 基因的表达。结果:与模型组相比,牛膝多糖治疗组脑组织形态明显改善,脑组织细胞凋亡含量明显减少,p53 基因的表达明显减少。结论:牛膝多糖对糖尿病大鼠脑组织有明显保护作用,其机制可能与抑制细胞凋亡及 p53 基因的表达有关。

关键词 牛膝多糖 糖尿病性神经病变 细胞凋亡 p53 基因

牛膝系苋科牛膝属植物。其味甘苦酸性平,入肝、肾经,具有补肝肾、强筋骨、逐瘀通经、引血下行之功效。现代药学研究认为牛膝具有降血糖、利尿、抗菌、抗生育,以及抗肿瘤和增强免疫功能等多种药理作用^[1-3]。本实验通过研究牛膝多糖对链脲佐菌素(Streptozotocin,STZ)诱导的糖尿病大鼠脑组织的保护作用并通过 RT-PCR 观察 p53 基因的表达,为临床应用牛膝多糖治疗糖尿病性神经病变提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物 健康 Wistar 大鼠雌雄各半,体重 200-220g。

1.2 主要试剂 Trizol、DEPC(美国 Gibco 公司),RT-PCR 试剂盒(大连宝生物有限公司),链脲佐菌素(美国 Sigma 公司)。

※基金项目 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No: 11511427)

*作者简介 张杰,女,医学硕士。研究方向:糖尿病发病与治疗的分子生物学机制。获奖情况:2010 年黑龙江省高校科学技术进步奖三等奖一项。发表论文:《姬松茸多糖对 2 型糖尿病大鼠代谢及抵抗素基因表达的影响》等。承担课题:黑龙江省卫生厅科研课题(No:2009-4133)

•作者单位 黑龙江省牡丹江医学院(157011)

1.3 大鼠模型的制备、分组 随机选取大鼠 50 只。其中 40 只,给予高热量饮食 8 周后,尾静脉一次性注射 STZ 注射剂 15mg/kg。剩余 10 只,给予基础饲料 8 周后,注射相同体积的柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液。注射 2d 后,内眦静脉丛采血,以 $11.1\text{mmol/L} \leq \text{FBG} < 33.3\text{mmol/L}$ 且伴有糖耐量减退者为大鼠模型成功标准。将造模成功的大鼠随机分为 4 组:B 组:模型对照组,C 组:牛膝多糖低剂量 $[0.5\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$,D 组:牛膝多糖中剂量 $[1.5\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$,E 组:牛膝多糖高剂量 $[2.5\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$,继续高脂高糖饮食 12 周;A 组:正常对照组(喂饲基础饲料的 10 只)。

1.4 HE 染色 取材后经 10% 甲醛固定 24h,梯度酒精脱水、二甲苯透明、常规石蜡包埋、切片,厚度为 $4-5\mu\text{m}$,裱于干净的载玻片上,经甲苯脱蜡后,进行 HE 染色,于光学显微镜下观察脑组织的病理变化。

1.5 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡 取冻存脑组织 $0.3-0.5\text{cm}^3$ 剪碎放入研钵,倒入液氮,磨成粉末,加 $50\mu\text{l}$ 细胞裂解液,于 37°C 水浴保温过夜后,室温 $12000\text{r}/\text{min}$ 离心 5min ,将上清液转移至另一洁净的微量离心管。用酚:氯仿:异戊醇 = 25:24:1 的溶液和氯仿等份各抽提 1 次。在上清液中加入 1/10 体积 3mol/L 醋酸钠和 2 倍体积冷乙醇,于 -20°C 沉淀过夜。 4°C , $12000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min ,弃上清液。室温晾干,加入 $20\mu\text{l}$ TE 缓冲液,加入 $1\mu\text{l}$ RNA 酶,

37℃保温1h。加入4μl 样品缓冲液,混匀,立即加到含有质量浓度为0.5g/L 溴化乙啶的质量分数为1.8%的琼脂糖凝胶样品孔中,室温,电压2V/cm,于0.5×TBE 缓冲液中电泳1~2h,紫外灯下照像并记录实验结果。

1.6 大鼠脑组织 P53 RT-PCR p53 引物,上游:5'-TTCTCTCCCCAACAATGAGG-3';下游:5'-TCTGTGAAGCAGCACCATTG-3',扩增片段531bp。β-actin 上游引物:5'-ATGTGGCACCACACCTTCTA-3',下游:5'-CGTCATACTCCTGCTTGC TG-3',扩增片段838bp。反应条件:94℃预变性5min;变性30s(94℃),退火30s(58℃),延伸1min(72℃),共30个循环,最后72℃延伸7min。琼脂糖凝胶电泳,紫外线灯下观察,用Molecular-Ana-lyst TM 软件进行吸光度容积定量分析,内标β-Actin 为参比对照。

1.7 统计学分析 计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据用SPSS 11.0 软件包处理,多组间数据比较采用方差分析。

2 结果

2.1 HE 染色显微镜观察脑组织结构 光镜下可见正常对照组神经元胞体呈圆形,胞膜清晰完整,无变形、水肿胞质无明显嗜伊红染色;模型组多数神经原出现肿胀、变形,胞膜不清,核固缩,核溶解,胞质嗜伊红染色,细胞周围间隙增宽,水肿空泡形成,神经元间隙扩大;牛膝多糖治疗组神经细胞及间质细胞有水肿,核仁清晰,胞膜完整,神经元排列较整齐。结果说明牛膝多糖对糖尿病大鼠脑组织的损伤具有保护作用。

2.2 大鼠脑组织 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡 正常对照组:DNA 电泳后只出现一条距加样孔很近的大分子条带,电泳无ladder 出现,发生凋亡的细胞数非常少;模型组:DNA 电泳后出现排列成梯状的数条条带(ladder),ladder 颜色较深,发生凋亡的细胞数明显增多;牛膝多糖低剂量组:出现较短的ladder,且ladder 颜色较浅(+),发生凋亡的细胞数增多;牛膝多糖高、中剂量组:只出现一条距加样孔很近的大分子条带,电泳无ladder 出现,发生凋亡的细胞数非常少(图1)。

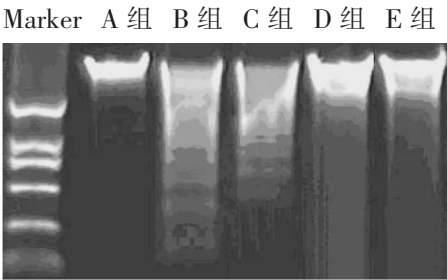


图1 各组 DNA ladder 情况

2.3 各组 p53 基因表达对比 与对照组相比,不同浓度牛膝多糖治疗组,抑癌基因 p53 基因表达逐渐降低,以牛膝多糖高剂量组最明显(见表1)。

表1 各组 p53 表达情况($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	样本数	p53/β-Actin
正常对照组	10	0.27 ± 0.02
模型组	10	0.48 ± 0.04*
牛膝多糖低剂量组	10	0.43 ± 0.04**
牛膝多糖中剂量组	10	0.34 ± 0.02**
牛膝多糖高剂量组	10	0.32 ± 0.01**

注:与对照组比较, **P<0.01, *P<0.05

3 讨论

糖尿病性神经病变(diabetic neuropathy, DNP)是糖尿病的重要并发症,其发病机制尚不明确,但细胞凋亡的作用已受到人们的关注。细胞凋亡又称为程序性细胞死亡(Programed cell death, PCD),是在精密调节下的细胞主动死亡过程,在个体发育生长过程中起重要作用。细胞凋亡的触发因素很多,有研究发现,在特定情况下,活化的p53 作为转录因子,可以直接启动细胞凋亡相关基因的表达^[4~6],促进细胞凋亡。所以 p53 基因可能与 DNP 的发生发展有密切关系。

本实验结果提示:①细胞凋亡可能是引起糖尿病性脑神经病变的一种重要方式;②脑细胞凋亡在糖尿病性脑神经病变过程中起重要作用;③牛膝多糖可以降低糖尿病大鼠脑组织细胞凋亡,其机制可能是通过降低脑组织 p53 基因的表达从而抑制细胞凋亡。本实验结果为阐明糖尿病性脑神经病变分子机制提供了新的实验依据,并对牛膝多糖应用于糖尿病引起的脑神经病变提供了新的实验依据。

(下转第57页)

伤骨折后“瘀血不散,筋脉失养”是本病重要原因。中医认为肾藏精,精生髓而充于骨,故骨之发育、成长荣枯与肾精盛衰有密切关系。《素问·阴阳应象大论》:“肾主骨髓”。《素问·逆调论》:“肾不生则髓不能满。”股骨头坏死的病位在肾、脾、经络。肾虚脾虚是根本,血瘀阻滞是关键。病机为多虚多瘀,故应予补肾健脾,化瘀通络法治疗^[7]。早期治疗的目的是阻止疾病的发展,防止股骨头塌陷,各种不同的治疗方法用于改变疾病的自然进程,促进坏死骨的修复。中医药在治疗股骨头坏死中具有一定的优势,股骨头坏死症常规的辨证用药重点在于骨和痹,活血和补肾为常用的治疗原则。在国内,齐振熙等^[8]通过动物实验证明活血化瘀药物可以对抗激素的作用,有效防治股骨头的坏死。Li等^[9]指出古复生胶囊可通过增加纤溶酶原激活剂和NO的水平机制治疗激素性股骨头坏死。Chen等^[10]指出承载丸能够使激素性股骨头坏死骨细胞脂肪小滴减少,微循环得到改善,骨矿密度增加,骨质量、骨强度不同程度增加,雌激素的低水平状态也得到改善。

“何氏骨科”以传统中医理论为基础,结合“何氏骨科”的指导思想,“治骨先治肉”、“重视有形之血,更重视无形之气”,利用中药外敷结合口服药治疗本症,内外结合,通过活血化瘀、舒筋通络,可改善血液流变性,降低血液粘稠度,加速血液循环;补气健脾、填精益髓滋补肝肾,以资气血生化之源;散瘀止痛、补肝益肾、强筋壮骨,促进新骨的形成,加速坏死区骨细胞代谢及新骨生长的修复重建,使髋关节的功能得到最大程度的恢复,减少了股骨头的进一步塌陷的发生。中医药活血化瘀的理论和实践进行保守治疗是

有利而无弊的。中药活血药物可以扩张毛细血管,改善血循环状况。外用中药可以有效地促进局部组织的血液循环,消除软组织的炎症反应,达到深病浅治的目的^[11]。

参考文献

- [1] 郎凤萍,黄永勋,黄宏,等. 股骨头坏死 1425 例治疗效果回顾性分析[J]. 中国组织工程研究与临床康复. 2008,12(33):6500-6504.
- [2] 黄克勤,黄宏,郎凤萍,等. 股骨头坏死非手术的疗学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006.
- [3] Ficat RP. Idiopathic bone necrosis of the femoral head[J]. J Bone Joint Surg(Br) 1985;67:3.
- [4] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[M]. 南京:南京大学出版社,1995:297-299.
- [5] Yuan P, He X, Zhao H, et al. Experimental study on gufusheng in treatment of steroid-induced ischemic necrosis of femoral head in rabbits[J]. J Tradit Chin Med 2005,25(4):300-303.
- [6] Jones JP. epidemiological risk factors for non-traumatic osteonecrosis[J]. Der Orthopde 2000 May,29(5):370-379.
- [7] 时水治. 补肾健脾化瘀通络法治疗股骨头坏死的经验[J]. 北京中医,2007,26(9):572-573.
- [8] 齐振熙,曹阳. 不同治法防治激素性股骨头缺血性坏死的实验研究[J]. 中国骨伤,2002,15(2):77-78.
- [9] Li Y, Chen J, Zhang Z, et al. The experimental study on treatment of glucocorticoid-induced ischemic necrosis of femoral head by gu fu sheng capsule[J]. Journal Of Traditional Chinese Medicine,2004,24(4):303-307.
- [10] Chen Y, Huang K, Lang F, et al. Experimental study on cheng zai wan for treatment of necrosis of the femoral head[J]. Journal Of Traditional Chinese Medicine,2003,23(4):292-298.
- [11] 熊屹,孙成榆. 活血消肿止痛膏治疗软组织损伤 1800 例[J]. 中国骨伤,1997,9(2):44.

(上接第 59 页)

参考文献

- [1] 崔瑛,侯士良. 怀牛膝预防动脉粥样硬化的实验研究[J]. 基层中药杂志,1998,12(1):30.
- [2] 李宗锐,李电东. 牛膝多糖的免疫调节作用[J]. 药学报 1997,32(12):881-887.
- [3] 李海泉. 牛膝多糖降糖作用实验研究[J]. 安徽医药,2004,10(5):326-327.

- [4] O'Leary KA, Mendrysa SM, Vaccaro A, et al. MDM2 regulates P53 independently of p19 (ARF) in homeostatic tissues[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(1):186-191.
- [5] Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, et al. DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53 [J]. Oncogene, 2001, 20(18):2225-2234.
- [6] Vousden KH. p53 in health and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(4):275-283.