

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-03-0194-03

薏苡仁多糖对 2 型糖尿病大鼠主动脉  
内皮素 1 基因表达的影响徐梓辉<sup>1</sup>, 周世文<sup>2</sup>, 陈卫<sup>1</sup>, 徐静<sup>1</sup>, 钱桂生<sup>3</sup>, 汤建林<sup>2</sup>, 黄永平<sup>2</sup>, 陈维中<sup>3</sup>, 徐颖<sup>2</sup>, 应懿<sup>2</sup>, 王璐<sup>2</sup>

(第三军医大学新桥医院 1. 内分泌科, 2. 国家药品临床研究机构, 3. 全军呼吸内科研究所, 重庆市 400037)

[关键词] 病理学与病理生理学; 2 型糖尿病; 内皮素 1; 薏苡仁多糖; 大鼠; 主动脉; 基因表达

[摘要] 目的 观察薏苡仁多糖对实验性糖尿病血管并发症大鼠主动脉内皮素 1 mRNA 表达调控的影响。方法 采用链脲佐菌素腹腔注射(75 mg/kg)和高热量饲料喂养建立 2 型糖尿病并发动脉粥样硬化大鼠模型,应用 RT-PCR 半定量分析大鼠主动脉内皮素 1 mRNA 的表达变化。结果 模型组大鼠主动脉内皮素 1 mRNA 表达量为  $0.72 \pm 0.10$ , 明显高于正常组的  $0.39 \pm 0.01$  ( $P < 0.01$ ), 经给药处理 6 个月后, 与模型组的表达量比较, 各给药组大鼠主动脉内皮素 1 mRNA 有不同程度的下调( $P < 0.05$ ), 其中薏苡仁多糖注射组的表达量  $0.49 \pm 0.12$  与模型对照组比较有非常显著性差异( $P < 0.01$ )。结论 糖尿病血管并发症的发生可能与内皮素 1 mRNA 表达上调有关, 薏苡仁多糖保护糖尿病血管内皮损伤可能与其下调内皮素 1 mRNA 表达的作用相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effect of Coixan on Expression of Endothelin-1 mRNA of Arota in Experimental Type 2 Diabetic Rats

XU Zhi-Hui<sup>1</sup>, ZHOU Shi-Wen<sup>2</sup>, CHEN Wei<sup>1</sup>, XU Jing<sup>1</sup>, QIAN Gui-Sheng<sup>3</sup>, TANG Jian-Lin<sup>2</sup>, HUANG Yong-Ping<sup>2</sup>, CHEN Wei-Zhong<sup>3</sup>, XU Ying<sup>2</sup>, YING Yi<sup>2</sup>, and WANG Lu<sup>2</sup>

(1. Department of Endocrinology, 2. Department of Pharmacology, 3. Institute of Respiratory Disease of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 430007, China)

[KEY WORDS] Type 2 diabetes; Endothelin-1; Coixan; Arota; Gene Expression; Rat

[ABSTRACT] Aim To explore the effect of coixan on endothelin-1 (ET-1) gene expression of type 2 diabetic model on rat arota. Methods The experimental type 2 diabetic rats were yielded by i. p streptozotocin (75 mg/kg) and feeding hyperotrophic foods, then to observe ET-1 gene expression by RT-PCR. Results After 6 months of i. p streptozotocin, the ET-1 gene expression  $0.72 \pm 0.10$  on rat arota enhanced obviously, the comparison between normal group  $0.39 \pm 0.01$  ( $P < 0.01$ ), ET-1 mRNA gene expression of administered groups downregulate ( $P < 0.05$ ), and the ET-1 gene expression of coixan i. p group  $0.49 \pm 0.12$  showed more significant difference than the model control group ( $P < 0.01$ ). Conclusion Diabetic vascular complication may be related to upregulation of ET-1 mRNA gene expression, Coixan decreased ET-1 mRNA gene expression.

有关糖尿病时血浆或尿液中内皮素 1 (endothelin-1) 水平的变化已有报道<sup>[1]</sup>, 多数报道发现糖尿病时血浆内皮素 1 水平升高, 尿液中内皮素 1 排泄增加, 伴有慢性并发症时尤为明显。一般认为糖尿病时血浆内皮素 1 水平升高是内皮细胞损伤的标志<sup>[2]</sup>。我们研究发现薏苡仁多糖有改善糖尿病大鼠糖脂代谢异常<sup>[3]</sup>, 对四氧嘧啶致胰岛细胞损伤具有一定的保护作用<sup>[4]</sup>。在此基础上我们观察薏苡仁多糖对糖尿病血管并发症大鼠血管内皮素 1 mRNA 表达的影响。

## 1 材料与方法

## 1.1 试剂和仪器

RNA 提取试剂盒 (Tripure Boehringer Mannheim 公司), Rnase 抑制剂和 M-MLV (Promega 公司), Pfu DNA 聚合酶 (上海生物工程技术服务有限公司), DEPC (焦碳酸二乙酯) Roche 公司, 小分子质量 DNA marker (上海复华公司), 其他试剂均为分析纯。PCR 仪 (Sigma 公司), 凝胶成像系统和电泳装置 (Bio-Rad 公司), 电子天平 (Saitroius 公司)

## 1.2 动物及分组

取出生 3 天的成年 Wistar 大鼠 20 窝, 10 只/窝, 除留 20 只作为正常组外, 其余按照体重 75 mg/kg 腹腔注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ), 2 天后, 血糖符合要求的大鼠随机再分为模型组、氨基胍组、阿卡波糖组、薏苡仁多糖 iv 组和 ⑤ 组, 每组 20 只, 除正常

[收稿日期] 2005-01-10 [修回日期] 2006-01-23

[基金项目] 国家自然科学基金资助 (30200362)

[作者简介] 徐梓辉, 副主任医师, 副教授, 主要从事糖尿病及其并发症的防治研究, 联系电话 023-68774625, E-mail 为 zihuixu@yahoo.com.cn。通讯作者周世文, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药理及毒理研究, 联系电话 023-68755311, E-mail 为 zhoushiwen@mail.tmmu.com.cn。

组给予普通饲料,其余各组均给予高热量饲料,与此同时各给药组同时给予相应药物。种类、剂量及给药方法见表 1。

除正常组之外,其余各组大鼠均腹腔注射 2 mL/kg 体重配制;灌胃给药按 5 mL/kg 体重配制,给药时间为 6 个月,成活率在 90% 以上。

分 组	处理因素及方法	
正常组	蒸馏水	5.0 mL/(kg·d) 灌胃给药
模型组	蒸馏水	5.0 mL/(kg·d) 灌胃给药
氨基胍组	氨基胍	10.0 mg/(kg·d) 灌胃给药
阿卡波糖组	阿卡波糖	10.0 mg/(kg·d) 灌胃给药
薏苡仁多糖 iv 组	薏苡仁多糖	2.0 mg/(kg·d) 腹腔注射
薏苡仁多糖 ③组	薏苡仁多糖	20.0 mg/(kg·d) 灌胃给药

### 1.3 组织标本收集

大鼠经速眠新肌肉注射麻醉,常规消毒,打开胸腔暴露心脏取血后,立即取主动脉部分,剪开血管腔,用无菌生理盐水漂洗血迹后,投入液氮中,冻存备用。

### 1.4 引物

参考文献[5],内皮素 1 上游引物 P1 为 5'-CGT TGC TCC TGC TCC TCC TTG ATG G-3',长 25 bp;下游引物 P2 为 5'-AAG ATC CCA GCC AGC ATG GAG AGC G-3',长 25 bp;RT-PCR 扩增产物长 546 bp。 $\beta$ -actin 上游引物 P3 为 5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAG-3',长 21 bp;下游引物 P4 为 5'-TAA AGC CAT GCC AAA TGT CTC -3',长 21 bp;扩增产物长 331 bp。由上海生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.6 总 RNA 提取及鉴定

按照 RNA 提取试剂盒 Tripure 操作指南一步法提取样品总 RNA。取 100 mg 组织放在经高温高压消毒的研钵中,加入液氮研碎后,转入 Ep 管中,加入 1 mL Tripure,振荡 30 s,再加氯仿(0.2 L/L Tripure)混匀,4℃ 12 000×g 离心,取上清加等体积异丙醇混匀,4℃ 12 000×g 离心,沉淀以 75% 乙醇洗涤,50  $\mu$ L 无菌 TE 重溶,紫外分光光度仪测定 260/280 nm 比值(检测 RNA 样本的纯度),根据公式:RNA(mg/L)= 计算样本浓度

加样前使各样品中总 RNA 含量一致,1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性。样品保存于-75℃ 以备分析。

### 1.7 逆转录聚合酶链反应检测

取总 RNA 2 ng,加随机引物 1  $\mu$ L(浓度为 1 pmol/L),混匀,70℃ 变性 5 min 后,立即置冰浴,加 5

×buffer 5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1.25  $\mu$ L, RNasin 0.5  $\mu$ L、M-MLVR 1  $\mu$ L(200 U/ $\mu$ L),加 DEPC 水充分混匀,总体积 25  $\mu$ L。经 40℃ 60 min 逆转录后,95℃ 5 min 破坏逆转录中残余酶,将逆转录产物置于-75℃ 保存备用。

取逆转录产物 1  $\mu$ L,分别进行内皮素 1 和  $\beta$ -actin 的 PCR 反应,内皮素 1 引物(10 pmol/L)各 1  $\mu$ L, $\beta$ -actin 引物各 1  $\mu$ L,10×buffer 5  $\mu$ L, pfu DNA polymerase 1  $\mu$ L,加 DEPC 水至 50  $\mu$ L,混匀后进入 PCR 循环:首次变性 94℃ 2 min,94℃ 变性 1 min→58℃ 退火 40 s→72℃ 延伸 90 s,循环 35 次,结束前 75℃ 延伸 10 min。

### 1.8 PCR 产物电泳

取内皮素 1 PCR 产物 15  $\mu$ L,进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,电泳缓冲液为 5×TBE,电压 5 V/cm,时间 35 min,经 0.5 mg/L EB 染色 35 min,紫外照相摄片,再经 Quantity One 软件分析,与内参照  $\beta$ -actin 表达进行对比(内皮素 1/ $\beta$ -actin)。因  $\beta$ -actin 在各组织中均匀表达,故可用  $\beta$ -actin 的光密度值进行标准校正,分析大鼠主动脉内皮素 1 mRNA 的相对表达量。

### 1.9 统计学处理

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验, $P < 0.05$  为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 质量鉴定

所测定 RNA 的 260/280 nm 比值在 1.6~1.8 之间,符合 Tripure 试剂要求。1.0% 琼脂糖凝胶电泳发现 28S 和 18S 两条电泳带清晰,前者约为后者的 2 倍,说明所提 RNA 无降解。

### 2.2 薏苡仁多糖以实验性糖尿病血管并发症大鼠主动脉内皮素 1 mRNA 表达的影响

以大鼠内皮素 1 特异引物进行逆转录聚合酶链反应扩增,结果发现,各组大鼠样品中内对照  $\beta$ -actin 的量基本一致,表明各组大鼠样品中的 RNA 模板浓度是一致的,具有可比性。模型组大鼠内皮素 1 mRNA/ $\beta$ -actin mRNA 比值为 0.72±0.10,较正常组的 0.39±0.01 明显增加( $P < 0.05$ ),经给药物 6 个月后,薏苡仁多糖腹腔注射组、薏苡仁多糖灌胃组、氨基胍组、阿卡波糖组大鼠内皮素 1 mRNA/ $\beta$ -actin mRNA 比值分别为 0.49±0.12、0.58±0.13、0.46±0.12、0.51±0.13,与模型组大鼠的比较均有不同程度的下调( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。其下调程度与其降糖水平具有一定的相关性。

### 3 讨论

内皮素的作用可归纳为两类:一类主要包括血管收缩、气管收缩作用,其缩血管作用主要是通过升高细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度、激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统使血管紧张素③增加和激活磷脂酶 C 使 PGI<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub> 和 TXA<sub>2</sub> 等合成增加,另一类主要指内皮素引起的短暂血管扩张作用以及体内以致血小板聚集的作用<sup>[6]</sup>。内皮素在糖尿病患者中含量增高,有血管并发症者又较无血管并发症者高。糖尿病高血糖通过三条途径致内皮素释放增加:糖尿病患者进餐后,血糖升高,内皮素释放相应增高<sup>[7]</sup>;糖尿病患者由于长期高血糖可导致红细胞膜微粘度增高,而引起微循环障碍,也可导致内皮细胞损伤,使内皮素释放增高,持续高血糖状态,由于严重的葡萄糖毒性,致内皮细胞凋亡较正常加快,内皮细胞损伤严重,内皮素释放增加<sup>[8]</sup>;另外,内皮素有促进糖元分解和生糖作用,高葡萄糖环境可促使内皮细胞释放内皮素<sup>[9]</sup>。糖尿病时的高甘油三酯血症可以导致内皮素释放增加<sup>[10]</sup>,血浆内皮素增高,加速了糖尿病血管并发症的发生发展。

大量体内外实验已证实,内皮素对大多数血管有收缩作用,增加血管外周阻力和平均动脉压,减少肾血流量及肾小球滤过率,同时也增强血管平滑肌对其他血管收缩物质如去甲肾上腺素的收缩反应,使血压升高<sup>[11]</sup>。

糖尿病患者血浆内皮素长期升高可引起心、脑、肾及毛细血管的持久痉挛和收缩,病变的严重程度密切相关<sup>[12]</sup>,并致管壁平滑肌增生和官腔狭窄。在对糖尿病合并冠心病、心绞痛、急性心肌梗死的研究中,发现内皮素上升的幅度与心肌内皮素参与了 As 发生发展,在 As 的损伤过程中,成纤维细胞和细胞外基质都起实质性作用。已有研究证实内皮素在体外诱导成纤维细胞移行和复制,这一效应被证明是通过内皮素 A 型受体实现的。另有研究表明内皮素促增殖作用与胰岛素样生长因子在人胎盘细胞的作用有协同效应。内皮素还有促微血管血栓形成的作用,因此可通过这种方式促使急性冠状动脉综合征的发生。内皮素 B 型受体具有抗血小板聚集的效应,提示内皮素对前血小板血栓形成效应是通过

内皮素 A 受体介导的。以上证据表明内皮素在冠状动脉粥样硬化中的起始及发展中都起重要的作用。此外,内皮素的收缩冠状动脉的作用,使冠状动脉血流减少,提高了血小板的聚集和血栓的形成,都可能加速了 As 的形成。

我们的实验发现,薏苡仁多糖对糖尿病血管并发症大鼠血管内皮素 1 mRNA 上调具有抑制作用,我们分析这可能与薏苡仁多糖调节脂质代谢异常,特别是 TG 代谢异常有关;另一方面多糖作为免疫调节剂有抗氧自由基的作用,保护血管内皮免受自由基的损伤<sup>[13]</sup>;蛋白非酶糖基化容易在血管内皮形成的 AGE,沉积在血管内皮的 AGE 又能刺激分泌多种因子,加剧内皮的损伤,前面我们的研究发现薏苡仁多糖有抑制蛋白非酶糖基化的作用。我们猜测薏苡仁多糖通过这些途径抑制糖尿病血管并发症大鼠血管内皮素 1 mRNA 上调,从而对糖尿病血管并发症具有一定的防治作用。

#### [参考文献]

- [1] Takahashi K, Gbatei M, Lam H, et al. Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus[J]. *Diabetologia*, 1990, **33**: 306
- [2] Ferri C. Circulating endothelin-1 level increased during euglycemic hyperinsulinemic clamp in lean NIDDM man[J]. *Diab Care*, 1995, **18**: 226-231
- [3] 徐梓辉,周世文,黄林清,袁林贵. 薏苡仁多糖对实验性 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. *中国糖尿病杂志*, 2002, **10** (1): 45-8
- [4] 徐梓辉,周世文,黄林清. 薏苡仁多糖对四氧嘧啶致大鼠胰岛细胞损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2000, **18** (6): 639-42
- [5] Jones LG, Gause KC, Meier KE. Effects of endothelin on mitogen-activated protein kinase activity and protein synthesis in isolated adult feline cardiac myocytes[J]. *Life Sci*, 1996, **58** (7): 617-630
- [6] Imai T, Hirata Y, Emori T. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells[J]. *Hypertension*, 1992, **19** (6): 753-758
- [7] 黄珍萍,贺汉昌,林碧. 胰岛素、甘油三酯、血糖对糖尿病患者血浆内皮素的影响[J]. *中华内分泌杂志*, 1999, **15** (5): 283-285
- [8] Lorenzi M, Cagliero E, Toledo S. Glucose toxicity for human endothelial cells in culture: delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated death[J]. *Diabetes*, 1985, **34**: 621-628
- [9] 汤健,唐朝枢,杨军. 内皮素. 第 1 版,北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1994: 252
- [10] Piatti P, Monti L, Conti M. Hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia are potent inducers of endothelin-1 release in humans[J]. *Diabetes*, 1996, **45**: 316
- [11] 曾正陪,唐丹,孙梅厉. 血浆内皮素与糖尿病血管病变的关系[J]. *中华内科杂志*, 1994, **33** (7): 469-472
- [12] 石湘云,费宇行,赵云涛. 急性心肌梗死和内皮素测定的临床与基础研究[J]. *中华内科杂志*, 1993, **32** (6): 384-387
- [13] 徐梓辉,周世文,黄林清. 薏苡仁多糖对实验性糖尿病大鼠红细胞免疫, T 淋巴细胞群的影响[J]. *湖南中医学院学报*, 2001, **21** (1): 17-9 (此文编辑 胡必利)