

淡豆豉提取物对2型糖尿病大鼠主动脉 iNOS, eNOS mRNA 表达的影响

刘 姣, 田义龙, 王益红, 窦玉红, 牛丽颖, 王鑫国

(河北医科大学 中医学院中药药理教研室 河北省实验动物重点实验室, 河北 石家庄 050091)

摘要:为观察淡豆豉提取物对 NO/NOS 系统的影响, 探讨其对 2 型糖尿病大鼠大血管保护作用的机制。采用高糖高脂饲料喂养加小剂量链尿佐菌素腹腔注射的方法复制 2 型糖尿病大鼠模型, 给药 56 d 后检测大鼠空腹血糖 (FBG)、血清胰岛素 (FIN), 计算胰岛素敏感指数 (ISI), 放免法检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及一氧化氮 (NO) 水平, RT-PCR 法检测主动脉内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) mRNA 表达。结果显示: 淡豆豉提取物能显著降低 T2DM 大鼠 FBG、FIN、TNF- α 、NO 水平, 显著提高 ISI, 显著降低 iNOS mRNA 表达, 对 eNOS mRNA 表达则无明显影响。淡豆豉提取物可影响 2 型糖尿病大鼠 NO/NOS 系统, 并可能通过此途径对 2 型糖尿病大鼠大血管产生保护作用。

关键词:淡豆豉提取物; 2 型糖尿病; 大血管病变; 一氧化氮合酶

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)01-0115-04

Effects of Semen Sojae Preparatum Extract on the Expression of iNOS and eNOS mRNA in Aorta of Rats with Type 2 Diabetes Mellitus

LIU Jiao, TIAN Yi-long, WANG Yi-hong, DOU Yu-hong, NIU Li-ying, WANG Xin-guo

(TCM Pharmacology Teaching and Research Section in the School of Chinese Medicine of Hebei Medical University; Key Laboratory of Experimental Animal of Hebei Province, Shijiazhuang 050091, Hebei, China)

Abstract: To study the effect of Semen Sojae Praeparatum (SSP) extract on the NO/NOS system in T2DM rats. A T2DM rat model was developed by means of high-sugar, high-fat feed and raperitoneal injection of low-dose streptozotocin; after 56 days drug administration, the levels of fasting blood-glucose (FBG) and fasting serum insulin (FIN) in the rats were detected, insulin sensitivity index (ISI) was calculated; serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and nitric oxide (NO) level were detected by radioimmunoassay. And the expression of aortic endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA was detected by RT-PCR. The levels of FBG, FIN, TNF- α and NO in T2DM rats were decreased lowered substantially, ISI was increased significantly, iNOS mRNA expression was markedly reduced, and eNOS mRNA expression was not obviously affected by SSP extract. These results suggest that SSP extract can affect the expression of iNOS mRNA and the level of NO in the T2DM rats, and may play a role in the protection against macrovascular disease of large vessels in T2DM rats.

Key words: SSP extract; T2DM; Large-vessel disease; NOS

近年来, 糖尿病已经成为继肿瘤、心血管疾病之后第三大严重威胁人类健康的慢性疾病, 因糖尿病并发症导致死亡的人数也呈逐年增加趋势, 其中, 大血管病变是糖尿病患者的主要死因。现代研究表明, 糖尿病大血管病变与血管内皮受损密切相关, NO/NOS 体系的功能紊乱在其中起着非常重要的作用。淡豆豉 (Semen Sojae Praeparatum, SSP) 为豆科植物大豆经发酵制得的药食兼用药物。研究发现淡豆豉具有降糖及改善糖耐量的作用^[1], 且可以改善 2 型糖尿病的胰岛素抵抗, 调节糖尿病大鼠 NO 分泌, 对血管内皮有一定保护作用^[2-3], 但其缓

解内皮损伤的作用机制不明。该研究通过观察淡豆豉对高糖高脂饲料加小剂量链尿佐菌素诱导的 2 型糖尿病 (T2DM) 模型大鼠 NO/NOS 系统的调节作用, 探讨其对大鼠大血管保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 动物 wistar 大鼠, 清洁级, 雄性, 体重 180 ~ 200 g, 由河北省实验动物中心提供, 实验动物使用许可证 SYXK (冀) 2006-0047。饲养温度 20 ~ 23℃, 湿度 45% ~ 60%, 过氧乙酸溶液消毒环境。

收稿日期: 2011-10-10

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (C2009001061); 河北科学技术研究与发展计划项目 (11231005D)。

第一作者简介: 刘姣 (1978 -), 女, 硕士, 讲师, 主要从事中药药理学教学及科研工作。E-mail: fairypc_lj@163.com。

通讯作者: 王鑫国 (1966 -), 男, 教授, 主要从事中药药理学教学及科研工作。E-mail: wangxinguozy@163.com。

1.1.2 药物 链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 购自美国 Sigma 公司。淡豆豉 (Semen Sojae Preparatum, SSP), 由该实验室在《中国药典》(2005 年版) 制法的基础上, 对其工艺参数进行量化、优选后炮制而成。阳性药罗格列酮片 ($4 \text{ mg} \cdot \text{片}^{-1}$), 成都恒瑞制药有限公司, 批号: 080301。

1.1.3 试剂 RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司; Trizol 购自美国 Invitrogen 公司; PCR 引物序列: iNOS 上游引物: $5'-\text{GATCAATAACCTGAAGCCG}-3'$, 下游引物 $5'-\text{GCCC TTTTTCCTC-CATAGG}-3'$, 预扩增片段 578 bp; eNOS 上游引物 $5'-\text{GCAAAGCTCTCTCCATTCTCC}-3'$, 下游引物 $5'-\text{TC-CATATGCTGCTAGA AATCG}-3'$, 预扩增片段 752 bp; β -actin 上游引物 $5'-\text{GAGGGAAATCGTG CGT-GAC}-3'$, 下游引物 $5'-\text{CTGGAAGGTGACAGTGAG}-3'$, 预扩增片段 445 bp。

1.1.4 仪器 SUPER GLUCOCARD II 型京都血糖仪, 日本 ARKRAY, Inc; 721 分光光度计, 上海第三分析仪器厂; Eppendorf minispin 型离心机、Eppendorf 5417R 型离心机、Eppendorf 蛋白核酸定量测定仪、Eppendorf PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; Biorad 凝胶成像仪, 美国 Biorad 公司; DYY-8C 型电泳仪、DYCP-31D 水平电泳槽, 北京六一仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 动物造模 选取雄性 wistar 大鼠 50 只, 用高糖高脂饲料 (10% 猪油、20% 蔗糖、1% 胆酸盐、2.5% 胆固醇、66.5% 常规饲料) 喂养, 28 d 后腹腔注射链脲佐菌素 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重。另取大鼠 10 只, 常规饲料喂养, 28 d 后腹腔注射等容量枸橼酸缓冲液。3 d 后尾部取血, 测空腹血糖, 选取血糖值 $>7.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的大鼠为 2 型糖尿病模型大鼠。

1.2.2 分组与处理 血糖值正常大鼠为正常对照组 (NC), 将造模成功大鼠按血糖值分为模型对照组 (T2DM)、淡豆豉低剂量组 (SSPL, $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、淡豆豉高剂量组 (SSPH, $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 及阳性药罗

格列酮组 (RSG, $1.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 每组 10 只。各组大鼠每日灌胃给药 (蒸馏水) 1 次, 给药容量为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重, 连续 56 d。末次给药后禁食 12 h, 断头取血, 离心分离血清。快速剪取主动脉, 用高温灭酶的铝箔纸密封包裹, -80°C 冻存。

1.2.3 指标检测 血清指标检测: 分光光度法测定空腹血糖 (FBG), 放免法测定胰岛素 (FIN)、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、一氧化氮 (NO)。计算胰岛素敏感指数 (ISI): $\text{ISI} = \ln[1/(\text{FIN} \times \text{FBG})]$ 。

逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR): Trizol 法提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 进行 PCR 扩增。RT-PCR 条件: iNOS: 94°C 3 min 预扩增; 94°C 50 s, 58°C 50 s, 72°C 70 s, 循环 35 次; 72°C 延伸 10 min; eNOS: 退火温度为 54°C , 其余条件同 iNOS; β -actin: 退火温度为 65°C , 循环次数为 25 次, 其余条件同 iNOS; 反应结束后, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 用 Biorad 凝胶成像仪记录电泳图形, 最后用 QuantityOne 图像分析系统检测各组目的基因 β -actin 基因的灰度值, 以二者比值代表目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.3 数据分析

采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 LSD- t 检验。

2 结果与分析

2.1 对血糖、胰岛素及胰岛素敏感指数的影响

从表 1 结果可见, 模型对照组较正常对照组血糖水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型对照组血糖水平相比, 淡豆豉低剂量组出现降低 ($P < 0.05$), 淡豆豉高剂量组明显降低 ($P < 0.01$)。模型对照组大鼠较正常对照组胰岛素水平明显升高 ($P < 0.01$), 胰岛素敏感指数明显降低 ($P < 0.01$); 与模型对照组相比, 各给药组胰岛素水平均明显降低 ($P < 0.01$), 胰岛素敏感指数均明显提高 ($P < 0.01$)。

表 1 淡豆豉提取物对 2 型糖尿病大鼠血糖、胰岛素及胰岛素敏感指数的影响
Table 1 The effects of SSP extract on FBG, FIN and ISI in T2DM rats ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	血糖 FBG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	胰岛素 FIN/ $\mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$	敏感指数 ISI
空白组 NC	$4.25 \pm 0.82^{**}$	$6.77 \pm 1.49^{**}$	$-3.32 \pm 0.30^{**}$
模型组 T2DM	10.47 ± 1.36	35.12 ± 2.86	-5.90 ± 0.14
淡豆豉低剂量组 SSPL	$9.28 \pm 1.08^{*}$	$21.83 \pm 2.66^{**}$	$-5.30 \pm 0.15^{**}$
淡豆豉高剂量组 SSPH	$7.43 \pm 1.09^{**}$	$12.81 \pm 2.32^{**}$	$-4.53 \pm 0.23^{**}$
罗格列酮组 RSG	$6.92 \pm 1.05^{**}$	$11.37 \pm 1.80^{**}$	$-4.34 \pm 0.24^{**}$

与模型组相比, $^{**} P < 0.01$, $^{*} P < 0.05$; 下同。

Compared with T2DM, $^{**} P < 0.01$, $^{*} P < 0.05$; the same below.

2.2 对 TNF-α 的影响

从表 2 结果可见,模型对照组较正常对照组血清 TNF-α 水平明显升高($P < 0.01$);各给药组较模型对照组血清 TNF-α 水平均明显降低($P < 0.01$),各给药组间血清 TNF-α 水平无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 对 NO 的影响

从表 2 结果可见,模型对照组较正常对照组血清 NO 水平明显升高($P < 0.01$);各给药组较模型对照组血清 NO 水平均明显降低($P < 0.01$),各给药组间血清 NO 水平无显著性差异($P > 0.05$)。

表 2 淡豆豉提取物对 2 型糖尿病大鼠血清 TNF-α 和 NO 水平的影响

Table 2 Effects of SSP extract on serum TNF-α and NO in T2DM rats ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	TNF-α/ng·mL ⁻¹	NO/μmol·L ⁻¹
空白组 NC	0.66 ± 0.13 **	25.93 ± 5.21 **
模型组 T2DM	1.03 ± 0.19	38.73 ± 6.92
淡豆豉低剂量组 SSPL	0.84 ± 0.15 **	30.34 ± 4.59 **
淡豆豉高剂量组 SSPH	0.82 ± 0.13 **	25.68 ± 6.62 **
罗格列酮组 RSG	0.82 ± 0.13 **	26.61 ± 4.98 **

2.4 对主动脉 iNOS,eNOS mRNA 表达的影响

从图 1 结果可见,模型对照组较正常对照组 iNOSmRNA 表达明显升高($P < 0.01$),各给药组间 iNOS mRNA 表达无显著性差异($P > 0.05$);各给药组较模型对照组主动脉 iNOS mRNA 表达明显降低($P < 0.01$)。各给药组 eNOS mRNA 表达比模型对照组有升高趋势但无统计学意义($P > 0.05$)。

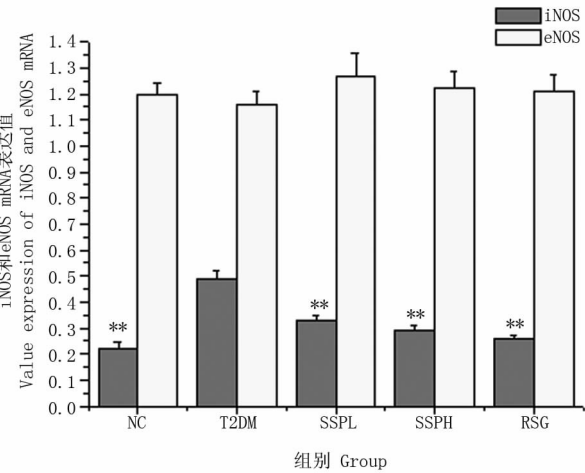


图 1 淡豆豉提取物对糖尿病大鼠主动脉 iNOS 和 eNOS mRNA 表达的影响
Fig.1 Effect of SSP extract on the expression of iNOS and eNOS mRNA in the aorta of T2DM rats

3 讨论

糖尿病是一种以血糖代谢紊乱为特点的常见慢性疾病,其中 90% 以上为 2 型,血管病变是其重要并发症^[4]。糖尿病所致的血管病变主要与糖代谢障碍及脂代谢障碍等密切相关。该研究采用高糖高脂饲料喂养加小剂量 STZ 腹腔注射的方法建立 T2DM 大鼠模型,该模型符合高血糖、高胰岛素血症、胰岛素敏感性降低等 T2DM 特征。实验结果显示,淡豆豉提取物能显著降低 T2DM 模型大鼠空腹血糖,但不增加空腹血清胰岛素的分泌,反而对其有降低作用,且能明显提高胰岛素敏感指数。证明淡豆豉提取物不是通过加强促胰岛素分泌作用控制血糖,而是通过提高靶组织的胰岛素敏感性来实现其降糖作用。

TNF-α 是一种具有多种生物学功能的细胞因子。有研究表明,伴有血管病变的 T2DM 患者血清中 TNF-α 含量明显高于无血管病变的 T2DM 患者。增多的 TNF-α 对血管内皮细胞可直接产生细胞毒作用,破坏内皮细胞结构和功能的完整性,使内皮细胞分泌血管活性物质平衡失调,造成 NO 的合成与分泌紊乱^[5]。由此可见 TNF-α 参与或影响了 T2DM 血管病变的形成。实验结果显示,T2DM 大鼠血清 TNF-α 水平明显升高,提示模型大鼠可能出现血管病变;经淡豆豉提取物干预后,血清 TNF-α 水平均明显降低。由此推测,淡豆豉可能通过降低血清 TNF-α 水平而对 T2DM 大鼠的大血管产生保护作用。

NO 是血管内皮细胞分泌的一种内皮衍生舒张因子,其产生需要一氧化氮合酶(NOS)的催化。现代研究发现,在 T2DM 早期,由于机体代偿性作用及内皮素等刺激会引起 NO 释放增加,而高水平的 NO 会对血管产生损害作用,是诱发血管病变的危险因素^[6-7]。在 T2DM 大血管病变过程中,NO 合成的关键因子 NOS 的表达也发生了一系列改变,在其中起主要作用的是内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)。eNOS 合成的 NO 数量较少且寿命极短,但却维持着内皮细胞正常的舒缩功能。有研究表明,在 T2DM 初期,高糖和高胰岛素均能刺激 eNOS 表达代偿性增加^[8-9],但这种高表达维持的时间较短,且随着病程的发展 eNOS 表达会受到抑制。在该研究中,各给药组 eNOS mRNA 的表达与模型组相比,有上升的趋势但并无统计学意义,且各组之间也均未表现出统计学意义,因此无法判断淡豆豉是否对 2 型糖尿病大鼠主动脉 eNOS 的表达存在影响。

正常情况下,血管内皮细胞 iNOS 表达极少,而高糖、高胰岛素及细胞因子(肿瘤坏死因子,白介素等)均可刺激其高表达。iNOS 受刺激表达升高后,可产生大量 NO,且持续时间较长,T2DM 高水平的 NO 主要归因于 iNOS 的过度表达。iNOS 诱导合成的 NO 虽然在早期对糖尿病血管内皮产生过保护,但其大多数时候发挥的还是氧化损伤与细胞毒作用。并且 iNOS/NO 途径还会对 eNOS/NO 途径产生抑制,负反馈调节 eNOS 低表达^[9],参与血管功能紊乱的发生,在 T2DM 早期血管并发症发生、发展中发挥较为重要的作用。实验结果显示,模型组大鼠的 iNOS mRNA 表达明显高于正常组及给药组,说明 T2DM 大鼠血管病变早期存在 iNOS 过度表达的情况,其高 NO 水平也很可能归因于此。经淡豆豉提取物干预后,iNOS mRNA 的表达及 NO 的水平明显下降,说明淡豆豉可抑制 T2DM 大鼠主动脉 iNOS 的过度表达,并可能通过此途径降低 NO 水平。

通过对以上结果的综合分析,推测淡豆豉可能通过降低 T2DM 大鼠的血糖、胰岛素及 TNF- α 水平,抑制 iNOS 过度表达,降低 NO 水平,减轻其过氧化损伤及细胞毒作用,从而对 T2DM 大鼠的大血管产生保护性作用。

参考文献

- [1] 牛丽颖,常淑凤,刘姣,等. 淡豆豉正丁醇提取物对糖尿病大鼠血糖及糖耐量的影响[J]. 时珍国医国药,2008,19(6):1398-1399. (Niu L Y, Chang S F, Liu J, et al. Effect of n-butanol extracts from Semen Sojae Praeparatum on blood glucose and glucose tolerance in diabetic rats[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2008, 19(6):1398-1399.)
- [2] 白霞,牛丽颖,刘姣,等. 淡豆豉防治早期动脉粥样硬化大鼠血管损伤的机制研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(1):170-171. (Bai X, Niu L Y, Liu J, et al. Effect and mechanism of Semen Sojae Praeparatum on vascular injury in early atherosclerosis rats[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2008, 19(1):170-171.)
- [3] 牛丽颖,刘姣,崔力剑,等. 淡豆豉对早期动脉粥样硬化大鼠血管内皮损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床,2007,23(5):120-122. (Niu L Y, Liu J, Cui L J, et al. The protective effect of Semen Sojae Praeparatum on vascular injury in early atherosclerosis rats[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Material Medica, 2007, 23(5):120-122.)
- [4] Kanbak G, Akalin A, Dokumacioglu A, et al. Cardiovascular risk assessment in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome: role of biomarkers[J]. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, 2011, 5:7-11.
- [5] Makino N, Maeda T, Sugano M, et al. High serum TNF- α level in type 2 diabetic patients with microangiopathy is associated with eNOS down-regulation and apoptosis in endothelial cells[J]. Journal of Diabetes and its Complication, 2005, 19:347-355.
- [6] Kobayashi T, Kamata K. Effect of chronic insulin treatment on NO production and endothelium-dependent relaxation in aortae from established STZ-induced diabetic rats[J]. Atherosclerosis, 2001, 155:313-320.
- [7] 赵怀兵,党瑜华. 诱导型一氧化氮合酶对大鼠心肌梗死后心室重构的影响[J]. 中国临床康复,2006,10(16):46-48. (Zhao H B, Dang Y H. Effect of inducible nitric oxide synthase on ventricular remodeling in rats after myocardial infarction[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006, 10(16):46-48.)
- [8] 何敏,徐济良,吴锋. 2 型糖尿病大鼠主动脉内皮细胞氧化损伤及缬沙坦的保护作用[J]. 中国药理学通报,2007,23(3):354-358. (He M, Xu J L, Wu F. Aortic endothelial cells injury induced by oxidative stress in type 2 diabetes rats and the protective effect of valsartan[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2007, 23(3):354-358.)
- [9] Malvshv E, Poirer O, Moreau R. Interaction between eNOS and iNOS in aortas and superior mesenteric arteries in portal hypertensive rats[J]. De Biologie Vasculaire, 2003, 38:63.
- [5] Ye Y, Chou G X, Mu D D, et al. Screening of Chinese herbal medicines for antityrosinase activity in a cell free system and B16 cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 129(3):387-390.
- [6] Yoon K N, Alam N, Lee K R, et al. Antioxidant and antityrosinase activities of various extracts from the fruiting bodies of *Lentinus lepideus*[J]. Molecules, 2011, 16(3):2334-2347.
- [7] Chang L W, Juang L J, Wang B S, et al. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(4):785-790.
- [8] Zhu Y J, Song K K, Li Z C, et al. Antityrosinase and antimicrobial activities of trans-cinnamaldehyde thiosemicarbazone[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(12):5518-5523.
- [9] 徐光域,颜军,郭晓强,等. 硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用[J]. 食品科学,2005,26(8):342-346. (Xu G Y, Yan J, Guo X Q, et al. The betterment and apply of phenol-sulphate acid method[J]. Food Science, 2005, 26(8):342-346.)
- [10] 李华. 大豆残渣中大豆皂苷含量的分析方法[J]. 分析试验室, 2008, 27(S1):333-334. (Li H. Analysis methods of soyasaponin in soya bean leavings[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2008, 27(S1):333-334.)
- [11] Chen Q X, Kubo I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by Quercetin[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2002, 50(14):4108-4112.
- [12] 杜志云,徐学涛,潘文龙,等. 姜黄素类化合物及姜黄素衍生物对酪氨酸酶抑制作用的研究[J]. 日用化学工业,2008,38(3):172-175. (Du Z Y, Xu X T, Pan W L, et al. Study of inhibition of curcuminoids and curcumin derivatives on tyrosinase[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2008, 38(3):172-175.)
- [13] 陈燕军,张毅贞,卢汝梅,等. 正交试验法优选从豆制品下脚料中提取大豆皂苷的工艺[J]. 中草药,2001,32(7):602-604. (Chen Y J, Zhang Y Z, Lu R M, et al. Optimization of processes for recovery of soyasaponins from bean product waste by orthogonal design[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2001, 32(7):602-604.)

(上接第 114 页)