

沙棘总黄酮对糖尿病大鼠心肌晚期糖基化终产物及其受体 mRNA 表达的影响

赵伟¹, 孙国志¹, 李荣侠², 张晓龙³

(1. 佳木斯大学, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 哈尔滨市动物卫生防疫站, 黑龙江 哈尔滨 150069;
3. 黑龙江省畜牧技术服务中心, 黑龙江 哈尔滨 150001)

中图分类号: S856.5

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2009)06-0104-03

关键词: 沙棘总黄酮; 晚期糖基化终产物及其受体 mRNA; 糖尿病; 大鼠

摘要: 为观察沙棘总黄酮对患糖尿病及并发心脏病大鼠的影响, 采用腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 复制糖尿病大鼠模型, 将成模大鼠随机分为沙棘总黄酮组、氨基胍组、糖尿病组、糖尿病组与正常对照组每天灌服纯化水。14周后检测各组大鼠血糖、糖化血红蛋白、血清和心肌晚期糖基化终产物及其受体 mRNA 水平。试验结果表明: 与糖尿病组相比, 沙棘总黄酮组大鼠血糖值、糖化血红蛋白值、血清和心肌晚期糖基化终产物含量、心肌晚期糖基化终产物受体 mRNA 表达水平均下降 ($P < 0.01$)。因此, 说明沙棘总黄酮具有良好降血糖和糖化血红蛋白作用, 还可降低血清、心肌中晚期糖基化终产物含量及心肌晚期糖基化终产物受体 mRNA 的表达水平。

目前, 晚期糖基化终产物 (advanced glycosylation end-products, AGEs) 及其受体 (receptor for advanced glycosylation end products, RAGE) 在糖尿病及其并发症中的作用越来越受到重视。晚期糖基化终产物是指糖的醛基与蛋白质的氨基在非酶催化的化学反应下生成的一类物质; 晚期糖基化终产物受体是一种膜蛋白, 属于免疫球蛋白家族。研究发现, 晚期糖基化终产物可通过直接的病理作用及与受体结合的间接作用导致机体的病理变化。

沙棘是蒙古族和藏族群众的常用中药材。现代医学研究表明, 沙棘具有抗癌、抑制肿瘤、降血脂、增强免疫力、抗衰老等药理作用。试验旨在观察沙棘总黄酮对患糖尿病及并发心脏病大鼠的影响, 为糖尿病及其并发症的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

链脲佐菌素、氨基胍 (AG) 等, 均购自 Sigma 公司; 沙棘总黄酮, 购自河北神兴集团; One Touch 血糖仪及试纸条, 由美国 Lifescan 公司生产; 糖化血红蛋白试剂盒, 购自南京建成生物工程公司; 总 RNA 提取试剂 Trizol, 逆转录试剂盒、DNA Marker 等, 购自宝生

生物工程 (大连) 有限公司; 引物, 由上海生工生物工程技术有限公司协助合成。Biometra PCR 仪 (Germany) 和 Tc1-20M 高速台式冷冻离心机 (中国)。

1.2 动物模型制造及分组

雄性 Waster 大鼠, 体重 200~240 g, 由佳木斯大学实验动物中心提供。将大鼠随机分为试验组和正常对照组。腹腔单次注射链脲佐菌素 (浓度为 1%, 用枸橼酸缓冲液配成), 60 mg/kg, 72 h 后测血糖, 将随机血糖 16.7 mmol/L 的大鼠作为糖尿病大鼠; 3 d 后将糖尿病大鼠随机分成糖尿病组、氨基胍组、沙棘总黄酮组、氨基胍组灌服氨基胍 100 mg/d, 沙棘总黄酮组灌服沙棘总黄酮 20 mg/d, 糖尿病组、正常对照组灌服纯化水 20 mg/d; 14 周后处死大鼠, 检测所需指标。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 血糖的测定 取大鼠尾静脉血, 采用葡萄糖氧化酶法用 One Touch 血糖仪及试纸条测定。

1.3.2 糖化血红蛋白的测定 按照糖化血红蛋白试剂盒要求进行测定。

1.3.3 血清晚期糖基化终产物的测定 采用荧光光谱法进行血清晚期糖基化终产物的测定, 测定完血清总蛋白 (考马斯亮兰法) 后用 Tris-HCl (pH 值为 7.4) 缓冲液调节蛋白含量为 1 mg/mL, 再用荧光分光光度计测定其荧光值, 结果以 AUF/mg (每毫克蛋白的荧光值) 表示。

1.3.4 心肌晚期糖基化终产物的测定 参照 Monnier 方法, 用荧光分光光度计测定上清液的荧光值, 并以

收稿日期: 2009-03-17

基金项目: 黑龙江省科技厅攻关项目 (PC07S08); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (11541363); 佳木斯大学科研资助项目 (S51)

作者简介: 赵伟 (1974-), 男, 实验师, 硕士。

0.1 mol/L CaCl_2 缓冲液的荧光值为一个任意荧光单位,结果以 AUF/mg表示。

1.3.5 心肌晚期糖基化终产物受体 mRNA 水平的测定 RT-PCR法。

总 RNA 的提取及检测。Trizol 一步抽提法提取总 RNA。

逆转录反应体系。Total RNA 2 μL (1 μg)、Reverse Transcription 10 \times Buffer 2 μL 、dNTP Mixture (10 mmol/L) 2 μL 、 MgCl_2 (25 mmol/L) 4 μL 、Ribonuclease Inhibitor (40 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) 0.5 μL 、Oligo (dT) 15 Primer (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 1 μL 、AMV Reverse Transcriptase (15 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) 1 μL 、Nuclease - Free Water to a final volume of 20 μL , 45 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 50 min, 99 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 5 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

PCR 反应体系。first - strand cDNA reaction 5 μL 、cDNA reaction dNTPs (10 mmol/L) 4 μL 、 MgCl_2 (25 mmol/L) 3 μL 、10 \times PCR Buffer 5 μL 、晚期糖基化终产物受体 upstream primer (20 pmol/ μL) 2 μL 、晚期糖基化终产物受体 downstream primer (20 pmol/ μL) 2 μL 、Taq DNA Polymerase (5 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) 0.5 μL 、Nuclease - Free Water to a final volume 50 μL 。94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。引物序列是根据已克隆大鼠晚期糖基化终产物受体 cDNA 的完整序列,利用 Primer Premier 5.0 引物软件设计的。晚期糖基化终产物受体上游引物为 5' - CTACCGAGTC - CGAGTCTACC - 3', 下游引物为 5' - CACCTTCAG - GCTCAACCA - 3', 片段长度为 401 bp; β -action 上游引物为 5' - GAGGGAAA TCGTGC GTGAC - 3', 下游引物 5' - CTGGAAGGTGGACAGTGAG - 3', 片段长度为 445 bp。

RT-PCR 阳性判定。用凝胶成像分析系统分析、记录靶条带光密度积分值。目的基因为 401 bp 荧光带,内参 β -action 为 445 bp 荧光带。晚期糖基化终产物受体表达量 = 晚期糖基化终产物受体靶条带光密度积分值 / β -action 靶条带光密度积分值。

1.4 统计分析

应用 SPSS16.0 统计分析软件进行数据统计与分析,数据以平均值 \pm 标准误表示。组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 血糖及糖化血红蛋白的测定结果 (见表 1)

由表 1 可知:沙棘总黄酮组血糖值明显低于糖尿病组 ($P < 0.01$),且效果略优于氨基胍组;糖尿病组血糖明显高于正常对照组,说明糖尿病模型复制成功 ($P < 0.01$);沙棘总黄酮组糖化血红蛋白值明显低于糖尿病组 ($P < 0.01$),且效果明显优于氨基胍组。

2.2 血清及心肌晚期糖基化终产物的测定结果

表 1 各组血糖及糖化血红蛋白的测定结果

组别	数量 只	血糖 / (mmol \cdot L $^{-1}$)	糖化血红蛋白
正常对照组	10	5.54 \pm 1.80	15.02 \pm 2.61
糖尿病组	8	25.61* \pm 0.79	32.68* \pm 4.73
沙棘总黄酮组	10	19.06 \pm 0.66	21.15 \pm 2.74
氨基胍组	9	21.49 \pm 0.88	28.60 \pm 3.91

注: *表示与正常对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$), 表示与糖尿病组相比差异极显著 ($P < 0.01$), 表示与沙棘总黄酮组相比差异极显著 ($P < 0.01$);糖化血红蛋白的测定结果为每 10 g 血红蛋白的 OD 值。

沙棘总黄酮组血清晚期糖基化终产物含量明显低于糖尿病组 ($P < 0.01$),但与氨基胍的作用效果相似 ($P > 0.05$)。沙棘总黄酮可明显降低心肌晚期糖基化终产物含量 ($P < 0.01$),但与氨基胍的作用效果相似 ($P > 0.05$)。

2.3 晚期糖基化终产物受体 mRNA 水平的分析结果 (见图 1 和表 2)

经核酸蛋白分析仪测定,各组大鼠心肌总 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.6 ~ 2.0 之间,1% 琼脂糖凝胶电泳可见清晰的 18S 和 28S 条带。RT-PCR 产物与 DL-2 000 Marker 各带的位置相比均与目的片段相符。用凝胶成像分析系统测算电泳带的吸光度值,以 β -action 作为内参校正后计算相应表达量。

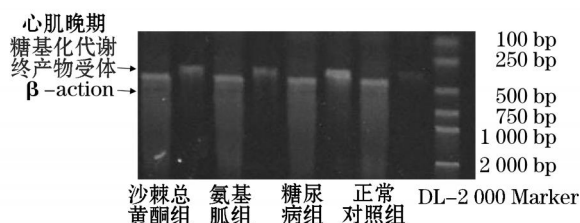


图 1 各组心肌晚期糖基化终产物受体 mRNA 表达水平

表 2 各组晚期糖基化终产物及心肌晚期糖基化终产物受体 mRNA 表达水平的测定结果

组别	数量 只	血清晚期糖基化终产物 / (AUF \cdot mg $^{-1}$)	心肌晚期糖基化终产物 / (AUF \cdot mg $^{-1}$)	心肌晚期糖基化终产物受体 mRNA
正常对照组	10	6.56 \pm 0.67	361.08 \pm 43.98	0.19 \pm 0.10
糖尿病组	8	25.46* \pm 1.03	527.25* \pm 67.08	0.63* \pm 0.08
沙棘总黄酮组	10	12.46 \pm 0.66	458.38 \pm 56.62	0.35 \pm 0.10
氨基胍组	9	12.50 \pm 0.36	438.58 \pm 47.18	0.30 \pm 0.09

注: *表示与正常对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$), 表示与糖尿病组相比差异极显著 ($P < 0.01$), 表示与沙棘总黄酮组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。

由表 2 可知,沙棘总黄酮组心肌晚期糖基化终产物受体 mRNA 水平明显低于糖尿病组 ($P < 0.01$),其作用效果与氨基胍的作用效果相似 ($P > 0.05$)。

3 讨论

研究表明,持续高血糖可引起蛋白质非酶糖化作用增强,最终导致晚期糖基化终产物的产生和累积。晚期糖基化终产物具有类似“清道夫”的作用,可通过糖化反应损伤、血管内皮损伤、形成修饰蛋白等作用造成直接的病理损伤;还可与受体结合激活多个信号传导通路,促进多种细胞因子的合成与释放,促使糖尿病及其并发症的发生发展。

中药在治疗糖尿病及其并发症方面有着悠久的历史,而这些治疗作用可能与其抑制蛋白质非酶糖化作用相关,这对相关药物及其有效组分的进一步研究有着重要意义。在糖尿病造模过程中可发现,糖尿病大鼠出现多食、多尿、血糖升高、消瘦等症状,试验后期更为明显。在试验过程中,部分大鼠死亡,可能与

一次大剂量腹腔注射链脲佐菌素及灌胃周期过长对大鼠刺激较大有关。通过与具有明确抑制晚期糖基化终产物交联作用的氨基胍相比,沙棘总黄酮可有效降低糖尿病大鼠的血糖值,从而降低高糖环境对血清晚期糖基化终产物含量增加造成的影响,进而减小蓄积的糖基化终产物所造成的一系列损伤。此外,沙棘总黄酮还可减弱蛋白质的非酶糖化反应,降低糖化血红蛋白值、血清与心肌晚期糖基化终产物含量,且其对糖化血红蛋白的作用明显强于氨基胍,并可减少心肌晚期糖基化终产物受体的表达,提示沙棘总黄酮对糖尿病、心脏病的疗效可能是抑制非酶糖化,调节心肌晚期糖基化终产物受体 mRNA 表达水平,减弱晚期糖基化终产物与其受体的结合,从而减轻晚期糖基化终产物对糖尿病大鼠心肌组织的损伤。(011)

不同浓度的大蒜溶液对小鼠小肠黏膜上皮内淋巴细胞和杯状细胞数量的影响

张玉仙¹,王文利¹,陈耀星²,王子旭²,李然²,张凡健¹

(1.北京农业职业学院,北京 102442; 2.中国农业大学,北京 100094)

中图分类号: S865.1

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2009)06-0106-02

关键词: 大蒜; 小鼠; 黏膜免疫; 淋巴细胞; 杯状细胞

摘要: 试验利用组织化学法和图像分析法研究不同浓度的大蒜溶液对小鼠小肠黏膜上皮内淋巴细胞、杯状细胞数量的影响。选用 8 周龄 Balb/c 小鼠 (均为雄鼠) 50 只,随机分成 5 组,每组 10 只,分别饲喂 5 种不同浓度的大蒜溶液,80 mL/d,试验期为 10 d。试验结果显示:各试验组小鼠小肠黏膜上皮内淋巴细胞数量由十二指肠向空肠、回肠逐渐减少;杯状细胞的数量由十二指肠向空肠、回肠逐渐增加。1% 浓度的大蒜溶液对小鼠小肠黏膜上皮内淋巴细胞、杯状细胞数量的影响明显高于对照组、2% 组、5% 组、10% 组,且差异极显著 ($P < 0.01$)。

人们对大蒜作为杀菌剂、杀虫剂、解毒剂、调味剂、增产剂和品质改善剂的研究较多,却忽略了大蒜对动物肠道黏膜屏障功能的影响。健全良好的黏膜是预防有害抗原物质入侵机体的重要保证,其中肠道黏膜上皮细胞的特有结构和独特的免疫体系发挥着极为重要作用。杯状细胞分泌黏液,保护肠黏膜,阻止毒素与上皮细胞直接接触,对肠黏膜完整性有较好的保护作用,是构成肠道机械屏障的结构之一。肠黏膜上皮内淋巴细胞是肠黏膜免疫系统中最先接触抗原的免疫活性细胞,在肠黏膜的抗感染免疫、保持肠

上皮细胞的完整性及调节外来抗原免疫应答方面均有重要作用。因此,肠黏膜上皮内淋巴细胞和杯状细胞共同形成了机体抗感染的第一道防线。试验主要研究大蒜溶液对小鼠小肠黏膜上皮内淋巴细胞和杯状细胞数量的影响,进而阐明大蒜对小鼠肠黏膜免疫功能的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组

8 周龄 Balb/c 小鼠 (均为雄鼠) 50 只,由中国医学科学院实验动物研究中心提供,清洁级,体重为 (38 ± 2) g。将其随机分成 5 组,即对照组 (每天饮自来水 80 mL)、1% 大蒜组 (每天饮新鲜的 1% 大蒜溶液 80 mL)、2% 大蒜组 (每天饮新鲜的 2% 大蒜溶液 80 mL)、5% 大蒜组 (每天饮新鲜的 5% 大蒜溶液

收稿日期: 2008-06-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471247; 30671514)

作者简介: 张玉仙 (1971-),女,讲师,硕士。

通讯作者: 陈耀星 (1965-),男,教授,博士,博士生导师。