

六味地黄丸对糖尿病模型大鼠血管组织中HO-1的影响^Δ

吕小辉^{1*},王 喆²,孙佳瑜¹,蔡智刚¹,张瑞鹏³,单爱云^{1#}(1.深圳市福田区中医院,广东深圳 518033;2.中南大学湘雅医学院,长沙 410013;3.深圳清华大学研究院,广东深圳 518067)

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)31-4379-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.31.18

摘要 目的:探讨六味地黄丸对糖尿病模型大鼠血管中血红素加氧酶1(HO-1)的影响。方法:将大鼠随机分为正常组、模型组、六味地黄丸组(14 g/kg,每天ig给药)和HO-1抑制剂锌原卟啉(10 μmol/kg,隔日ip给药)+六味地黄丸组(14 g/kg,每天ig给药),每组12只。除正常组外,其余各组大鼠均ip链脲佐菌素诱导糖尿病模型。成模后,各给药组大鼠给予相应药物,正常组和模型组大鼠隔日ip生理盐水,连续4周。检测大鼠尾动脉收缩压(SBP)和心率;观察六味地黄丸对苯肾上腺素(PE)刺激的胸主动脉血管环收缩反应的影响和乙酰胆碱(Ach)、硝普钠(SNP)刺激的胸主动脉血管环舒张反应的影响;并检测血管组织中HO-1 mRNA及其蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠SBP升高,主动脉血管环对Ach刺激的舒张反应减弱、对PE刺激的收缩反应增强($P<0.05$);血管组织中HO-1 mRNA及其蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,六味地黄丸组大鼠主动脉血管环对Ach刺激的舒张反应增强,对PE刺激的收缩反应减弱,且血管组织中HO-1 mRNA及其蛋白表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与六味地黄丸组比较,联用药组大鼠SBP持续升高、对Ach刺激的舒张反应持续减弱($P<0.05$),血管组织中HO-1 mRNA及其蛋白水平差异无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠间比较,心率差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论:六味地黄丸可改善糖尿病模型大鼠血管反应性失调,这可能与高表达血管组织中HO-1有关。

关键词 六味地黄丸;糖尿病;血红素加氧酶1;血管功能;大鼠

Effects of Liuwei Dihuang Pills on HO-1 in Vascular Tissue of Diabetic Model Rats

LYU Xiaohui¹, WANG Zhe², SUN Jiayu¹, CAI Zhigang¹, ZHANG Ruipeng³, SHAN Aiyun¹(1.Shenzhen Futian District TCM Hospital, Guangdong Shenzhen 518033, China; 2.Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China; 3.Shenzhen Research Institute of Tsinghua University, Guangdong Shenzhen 518067, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of Liuwei dihuang pills on heme oxygenase 1 (HO-1) in vascular tissue of diabetic model rats. METHODS: Rats were randomly divided into normal group, model group, Liuwei dihuang pills group (14 g/kg, ig, s.i.d) and HO-1 inhibitor zinc protoporphyrin (ZPP, 10 μmol/kg, ip, q.o.d)+Liuwei dihuang pills (14 g/kg, ig, s.i.d) group, with 12 rats in each group. Except for normal group, those groups were given streptozotocin intraperitoneally to induce diabetic model. After modeling, treatment groups were given relevant medicines, and normal group and model group were given normal saline intraperitoneally every 2 days for consecutive 4 weeks. The systolic blood pressure (SBP) of caudal artery and heart rate in rats were detected; the effects of Liuwei dihuang pills on the contraction response of thoracic aortic rings (TARs) irritated by phenylephrine (PE) were observed as well as the effects on the relaxation response of TARs irritated by acetylcholine (Ach) and sodium nitroprussiate (SNP); mRNA and protein expression of HO-1 in vascular tissue were examined. RESULTS: Compared with normal group, SBP of model group increased, and the relaxation response of TARs to Ach irritation decreased while the contraction response of TARs to PE irritation increased ($P<0.05$). There was no statistical significance in mRNA and protein expression of HO-1 in vascular tissue ($P>0.05$). Compared with model group, the relaxation response of TARs to Ach irritation increased in Liuwei dihuang pills group, while the contraction response of TARs to PE irritation decreased; mRNA and protein expression of HO-1 increased in vascular tissue ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with Liuwei dihuang pills group, SBP of drug combination group increased continuously, while the relaxation response of TARs to Ach irritation decreased continuously ($P<0.05$). There was no statistical significance in mRNA and protein expression of HO-1 in vascular tissue ($P>0.05$). There was no statistical significance in heart rate among those groups ($P>0.05$). CONCLUSIONS: Liuwei dihuang pills can improve vascular reactivity disorder of diabetic model rats, which is likely related to the expression up-regulation of HO-1 in vascular tissue.

KEYWORDS Liuwei dihuang pills; Diabetes; Heme oxygenase 1; Vascular function; Rats

糖尿病是危害人类健康的重大疾病之一,由糖尿病继发的脂肪代谢紊乱而引起的血管病变是其造成死亡的主要原因

Δ 基金项目:深圳市科技研发基金(No. JCYJ2014041414500-7216)

* 主管药师。研究方向:临床药学。E-mail:22181265@qq.com

通信作者:主任药师。研究方向:药事管理。E-mail:253010652@qq.com

因,早期对血管进行保护是降低心脑血管疾病发生率的主要手段^[1]。我国传统中药六味地黄丸由熟地黄、山茱萸(制)、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻等药材组成,主要用于肾阴亏损、头晕耳鸣、腰膝酸软等症的治疗。研究发现,六味地黄丸不仅对泌尿生殖系统、免疫调节系统和血液循环系统有一定调节作用,对血管损伤也有一定的保护作用^[1],但其作用的机制不甚明确。血红素加氧酶1(HO-1)是体内血红素代谢的限速酶,其代

谢产物是重要的生理性氧自由基清除剂。HO-1是机体保护性酶,正常情况下维持一定的表达量,同时也是可诱导酶,在一定的诱导因素(如药物、环境改变等)下可诱导其表达量的增加^[2]。本实验主要观察六味地黄丸对糖尿病大鼠主动脉功能和血管组织中HO-1表达的影响,同时给予HO-1蛋白功能特异性拮抗剂锌原卟啉(ZnPP),探讨六味地黄丸对糖尿病大鼠血管调节功能与HO-1蛋白的相关性。

1 材料

1.1 仪器

ACCU-CHEK 血糖仪(美国 Roche 公司);T100 聚合酶链式反应(PCR)仪、BioradGel Doc XR 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);CODA 无创血压仪(美国 Kent 公司)。

1.2 药品与试剂

六味地黄丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司,批号:20150415,规格:20 g/100 粒);吡啶美辛(湖北健源化工有限公司,批号:53-86-1);苯肾上腺素(PE,湖北巨胜科技有限公司,批号:59-42-7);乙酰胆碱(Ach,上海沪鼎科技有限公司,批号:9000-81-1);硝普钠(SNP,湖北帝鑫化工有限公司,批号:13755-38-9);链脲佐菌素(STZ,批号:S0130)、ZnPP(批号:282820)购自美国 Sigma 公司;实验所用试剂均为化学纯。

1.3 动物

Wistar 大鼠,48 只,SPF 级,♀ ♂ 各半,体质量 220~260 g,购于广东省医学实验动物中心[许可证号:SCXK(粤)2013-0002]。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将大鼠随机分为正常组、模型组、六味地黄丸组和 ZnPP+六味地黄丸组,每组 12 只。除正常组外,其余各组大鼠均 ip STZ(50 mg/kg)诱导糖尿病模型,4 d 后剪尾取血,以血糖>16 mmol/L 确定为造模成功。成模后,六味地黄丸组大鼠每天 ig 六味地黄丸(14 g/kg)1 次,连续 4 周;ZnPP+六味地黄丸组大鼠每天 ig 六味地黄丸(14 g/kg)1 次,并隔日 ip ZnPP(10 μmol/kg)1 次,连续 4 周;正常组和模型组大鼠隔日 ip 生理盐水,连续 4 周。

2.2 血压与心率的检测

用大鼠无创血压计监测尾动脉收缩压(SBP),同时监测大鼠心率以排除心率对血压的影响。

2.3 血管环的制备

大鼠麻醉后放血处死,开胸,取出心肺组织放入 KRB 缓冲液中,往液体中灌注混合气体(95% O₂+5% CO₂)。仔细分离胸主动脉,剪取胸主动脉血管环,其中一段血管放入 Trizol 溶液中,另一段血管放入-80℃冰箱中用于检测 HO-1 的表达,剩下的一段放入 KRB 缓冲液中用于血管张力的检测^[3]。

2.4 胸主动脉血管张力的检测

将制备好的血管环经 KRB 缓冲液平衡后,加入 1×10⁻⁵ mol/L 吡啶美辛清除环氧化酶产物。将血管一端固定,另一端连接换能器,当血管环在 15 min 内将张力升到 2 g 时,每 15 min 换一次液,待基础张力稳定后开始实验。实验结束后将血管环置于恒温干燥箱中烘烤至质量不再变化,记录干质量,用以标化张力。各组大鼠血管环分别给予 10⁻⁶ mol/L PE、Ach、SNP 刺激,观察血管环对 PE 的收缩反应和对 Ach、SNP 的舒张反应。收缩反应用每毫克血管环干质量的克张力(g/mg)表示,舒张反应结果用给血管舒张剂前、后对 PE 刺激后血管收缩反应的百分比表示。

2.5 胸主动脉血管 HO-1 mRNA 表达的检测

采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法。将血管冷冻研磨后,Trizol 裂解胸主动脉,提取胸主动脉总 mRNA,在梯度 PCR

仪上反转录成 cDNA,鉴定其完整性后进行 PCR 扩增。引物序列:HO-1 上游引物序列为 5'-CACTCTGGAG-ATGACACCT-GAG-3',下游引物序列为 5'-GTGTTCTCTGTGCAGCATCA-CC-3',250 bp;β-actin 上游引物序列为 5'-TCTGTGTGGATT-GTGGCTCTA-3',下游引物序列为 5'-CTGCTTGCTGATCCA-CATCTG-3',250 bp。反应体系:PCR Master Mix (2×) 5 μl,上、下游引物各 0.2 μl,cDNA 0.6 μl,DEPC 水 4 μl。两步法反应条件:95℃、10 min,95℃、15 s,60℃、1 min,39 个循环。采用 2^{-ΔΔC_t}法计算目的基因的相对表达量。

2.6 胸主动脉血管 HO-1 蛋白表达的检测^[4]

采用 Western blot 法。取胸主动脉,将胸主动脉液氮冷冻后在蛋白提取液中进行研磨,低温离心(16 873×g) 15 min,取上清,制备成蛋白样品,用二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒检测各样本蛋白浓度。调整各组的蛋白质上样量(40 μg),行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离,电转膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗(1:1000),4℃过夜。加入 HRP 标记的 IgG 二抗(1:5000)孵育 1 h 后洗膜,加入发光液后凝胶成像。通过 Image J2x 软件进行灰度值分析,以 HO-1 与内参 β-actin 条带灰度值的比值表示 HO-1 的相对表达量。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两组间的比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 六味地黄丸对大鼠尾动脉 SBP 与心率的影响

与正常组比较,模型组大鼠尾动脉 SBP 显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,六味地黄丸组大鼠尾动脉 SBP 有所下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。加入 ZnPP 后六味地黄丸的作用被反转,ZnPP+六味地黄丸组大鼠 SBP 较六味地黄丸组明显升高($P < 0.05$)。各组大鼠的心率差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠尾动脉 SBP 和心率测定结果见表 1(1 mm Hg=0.133 kPa)。

表 1 各组大鼠尾动脉 SBP 和心率测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 1 SBP of caudal artery and heart rate of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	SBP, mm Hg	心率,次/min
正常组	114.45 ± 15.21	150.24 ± 15.32
模型组	138.57 ± 13.45*	155.65 ± 13.56
六味地黄丸组	125.42 ± 16.72	151.21 ± 15.68
ZnPP+六味地黄丸组	140.27 ± 19.32**	148.16 ± 17.91

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与六味地黄丸组比较,** $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. Liuwei dihuang pills group, ** $P < 0.05$

3.2 六味地黄丸对大鼠血管张力的影响

与正常组比较,模型组大鼠胸主动脉血管环对 Ach 刺激内皮依赖性的舒张反应减弱,而对 PE 刺激收缩反应增强($P < 0.05$)。与模型组比较,六味地黄丸组大鼠胸主动脉血管环对 PE 刺激收缩反应减弱,对 Ach 刺激内皮依赖性的舒张反应增强($P < 0.05$)。当给予 HO-1 蛋白特异拮抗剂 ZnPP 后,ZnPP+六味地黄丸组大鼠胸主动脉血管环对 Ach 刺激的舒张反应减弱,且弱于模型组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果提示,六味地黄丸能够降低 PE 对血管的收缩反应和增强 Ach 刺激内皮依赖性的血管舒张反应;使用 ZnPP 抑制剂后反转了六味地黄丸的作用。各组大鼠间比较,主动脉血管环对 SNP 内皮依赖性的舒张反应差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血管张力测定结果见表 2。

表2 各组大鼠血管张力测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 2 The vascular tone of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	PE, g/mg	Ach, %	SNP, %
正常组	0.81 ± 0.12	67 ± 11	63 ± 10
模型组	0.92 ± 0.13*	44 ± 9*	58 ± 13
六味地黄丸组	0.82 ± 0.17 [#]	58 ± 6 [#]	62 ± 11
ZnPP+六味地黄丸组	0.90 ± 0.16*	32 ± 8** [#]	59 ± 12

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$

3.3 六味地黄丸对血管组织中HO-1 mRNA及其蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠血管组织中HO-1 mRNA及其蛋白表达有所增强,但差异无统计学意义($P > 0.05$);与模型组比较,六味地黄丸组和ZnPP+六味地黄丸组大鼠血管组织中HO-1 mRNA及其蛋白表达增强($P < 0.01$),并显著高于正常组($P < 0.01$)。结果提示,六味地黄丸可以使大鼠血管中HO-1基因高表达。各组大鼠血管组织中HO-1 mRNA及其蛋白表达测定结果见表3,蛋白表达电泳图见图1。

表3 各组大鼠血管组织中HO-1 mRNA及其蛋白表达测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 3 mRNA and protein expression of HO-1 in vascular tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	HO-1 mRNA	HO-1 蛋白
正常组	52.34 ± 13.46	1.25 ± 0.24
模型组	60.18 ± 12.34	1.32 ± 0.27
六味地黄丸组	110.14 ± 13.46*** [#]	3.82 ± 0.62*** [#]
ZnPP+六味地黄丸组	110.14 ± 13.46**	4.01 ± 0.71**

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.01$

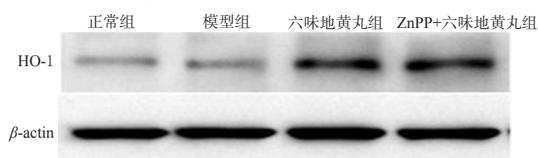


图1 各组大鼠血管组织中HO-1蛋白表达电泳图

Fig 1 The protein expression electrophoregrams of HO-1 in vascular tissue of rats in each group

4 讨论

高血糖可以引起血管内皮细胞的损伤,主要表现为血管内皮损伤和血管壁弹性等功能的改变,因此早期对血管内皮进行保护,是预防高糖引起血管功能改变继而引起继发性疾病的有效措施^[4]。近几年来关于HO-1与糖尿病及其并发症的关系的研究备受关注,HO-1是细胞内源性保护蛋白,是血红素代谢的关键酶和限速酶,其代谢产物有一氧化碳(CO)、胆绿素以及游离的2价铁离子^[5],这些代谢产物都是重要的生物效应分子,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡等作用^[6]。HO-1/CO信号通路与血管内皮保护功能有着密切的关系,研究表明,HO-1能够促进血管内皮细胞增殖^[7],减少血管内皮细胞凋亡^[8]、修复内皮损伤^[9]。用维生素E或丙丁酚进行治疗的STZ大鼠肾小球上皮细胞、系膜细胞和毛血管内腔活性氧的含量变化与HO-1的变化相一致^[10],这提示HO-1能够影响糖尿病引起的肾脏氧化损伤,因此促进体内HO-1的表达对内皮细胞损伤有保护作用。

六味地黄丸组方来至东汉张仲景所著的《金匱要略》,具有滋阴益肾的作用。现代医学研究发现六味地黄丸具有降低血糖、血脂和抗氧化等作用^[11]。在本实验中笔者通过给予HO-1蛋白特异性抑制剂ZnPP(与HO-1蛋白特异性结合,只影

响蛋白功能的发挥,不影响蛋白基因的表达)来考察六味地黄丸对血管调节作用与HO-1蛋白的关系:若给予ZnPP后能够反转六味地黄丸对糖尿病大鼠血管功能的作用,则说明六味地黄丸对糖尿病大鼠血管的调节作用与HO-1蛋白有关,反之则无关。本研究结果显示,模型组大鼠血管功能紊乱,血管张力减弱;六味地黄丸组大鼠血管功能有所改善,并同时检测到大鼠胸主动脉组织中HO-1 mRNA和蛋白表达量均升高;当给予HO-1蛋白抑制剂ZnPP后,虽反转了六味地黄丸对糖尿病大鼠血管功能的改善作用,但胸主动脉组织中HO-1 mRNA和蛋白表达量同样升高。以上结果提示,六味地黄丸对糖尿病大鼠血管功能的改善作用与高表达血管组织中HO-1有一定相关性。

综上,六味地黄丸对糖尿病大鼠血管损伤有一定的保护作用,其机制可能与高表达血管组织中HO-1有关。虽然单纯提高血管组织中HO-1的表达还达不到对高糖致血管损伤的治疗作用,但是在糖尿病早期和发展过程中给予六味地黄丸能够起到延缓血管并发症和辅助治疗糖尿病的作用。

参考文献

- [1] 于洋,赵玉丹,王艳杰,等.六味地黄丸含药血清对软脂酸诱导人脐静脉内皮细胞损伤抗氧化的机制[J].中国老年学杂志,2014,5(34):2794.
- [2] Leopold JA. Antioxidants and coronary artery disease: from pathophysiology to preventive therapy[J]. *Coron Artery Dis*, 2015, 26(2):176.
- [3] 邢邯英,凌亦凌,孟爱宏,等.褪黑素改善内毒素血症大鼠血管反应性[J].生理学报,2005,57(3):367.
- [4] 李雪峰,孙明谨,胡清,等.2型糖尿病并微血管病患者肿瘤坏死因子- α 的测定及临床意义[J].实用诊断与治疗杂志,2006,20(10):715.
- [5] Ryter SW, Choi AM. Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2002, 4(4):625.
- [6] Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway[J]. *Drug Metab Rev*, 2006, 38(4):769.
- [7] Magdalena K, Krzysztof S, Jozef D, et al. Role of heme oxygenase-1 in postnatal differentiation of stem cells: a possible cross-talk with microRNAs[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(11):1827.
- [8] Travis DH, Anupam A, James FG. The mononuclear phagocyte system in homeostasis and disease: a role for heme oxygenase-1[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(11):1770.
- [9] Bulger EM, Garcia I, Maier RV. Induction of heme-oxygenase-1 inhibits endothelial cell activation by endotoxin and oxidant stress[J]. *Surgery*, 2003, 134(2):146.
- [10] Jian C, George D, Kazuyoshi I, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 combined with increased adiponectin lowers blood pressure in diabetic spontaneously hypertensive rats through a reduction in endothelial cell dysfunction, apoptosis and oxidative stress[J]. *Int J Mol Sci*, 2008, 9(12):2388.
- [11] 傅万山,杨解人,丁伯平,等.六味地黄丸对肾上腺皮质激素型阴虚小鼠的药效学研究[J].皖南医学院学报,2002, 21(1):11.

(收稿日期:2016-02-24 修回日期:2016-05-05)

(编辑:林静)