

六味地黄丸对 OLETF 大鼠胰腺凋亡相关基因 bcl-2 和 Bax 表达的影响

薛耀明¹, 罗仁², 朱波¹, 张燕¹, 潘永华¹, 李晨钟¹

(1. 南方医科大学南方医院内分泌代谢科, 广东 广州 510515; 2. 南方医科大学南方医院中医内科, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的:探讨六味地黄丸对自发性 2 型糖尿病大鼠胰腺组织凋亡相关基因 bcl-2 和 Bax 表达的影响。方法:OLETF 大鼠(自发性 2 型糖尿病)40 只,随机分为六味地黄丸治疗组和模型组,每组 20 只;另同系 LETO 大鼠(非糖尿病)10 只作为正常对照组。六味地黄丸治疗组于大鼠 8 周龄起,用六味地黄丸按 $2.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,余组用等量蒸馏水灌胃。每周记录大鼠体质量;采用口服葡萄糖耐量试验监测血糖;定期处死大鼠,分离胰腺并称重;采用逆转录-聚合酶链反应检测 bcl-2 和 Bax 在胰腺组织中的表达。结果:大鼠 40 周龄时,六味地黄丸治疗组 bcl-2 mRNA 的表达水平为 (1.25 ± 0.07) ,较模型组 (1.01 ± 0.16) 明显增高 ($P < 0.01$);Bax mRNA 的表达水平为 (0.57 ± 0.11) ,较模型组 (1.18 ± 0.28) 有明显降低 ($P < 0.01$)。六味地黄丸治疗组的胰腺/体重比,较模型组增高,但差异无统计学意义。六味地黄丸治疗组的糖负荷能力明显高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:六味地黄丸在转录水平可上调 bcl-2 mRNA 的表达,下调 Bax mRNA 的表达,可能具有抗细胞凋亡的作用。

[关键词] 糖尿病, 2 型; 凋亡; 基因, bcl-2; 基因, Bax; 六味地黄汤; 大鼠, OLETF

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2005)06-0455-04

Effects of Liuwei Dihuang Pills on expressions of apoptosis-related genes bcl-2 and Bax in pancreas of OLETF rats

XUE Yao-Ming¹, LUO Ren², ZHU Bo¹, ZHANG Yan¹, PAN Yong-Hua¹, LI Chen-Zhong¹

(1. Department of Endocrinology and Metabolism, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province 510515, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province 510515, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of Liuwei Dihuang Pills (LWDHP) on expressions of apoptosis-related genes bcl-2 and Bax in pancreas of OLETF rats. Methods: Forty male OLETF rats were randomly divided into LWDHP-treated group and untreated group. Another ten male LETO rats were included in normal control group. OLETF rats in the LWDHP-treated group were given LWDHP ($2.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) orally since the age of 8 weeks and the rats in the other two groups were given distilled water orally. Body weights of rats were recorded weekly and blood glucose concentration was determined by oral glucose tolerance test (OGTT). Pancreas weights were recorded after rats were killed and the expression levels of bcl-2 mRNA and Bax mRNA were detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results: In the LWDHP-treated group, the expression of bcl-2 mRNA in the pancreas of rats at the age of 40 weeks (1.25 ± 0.07) was much higher than that in the untreated group (1.01 ± 0.16), $P < 0.01$. Bax mRNA level in the LWDHP-treated group (0.57 ± 0.11) was obviously lower than that in the untreated group (1.18 ± 0.28), $P < 0.01$. There was no significant difference of pancreas-to-body weight ratios between the

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30371839); 广东省重点科技攻关资助项目(社会发展公关 2003C34424); 广东省科技计划资助项目(2004B30701011)

[作者简介] 薛耀明(1963-), 男, 教授, 主任医师。

Correspondence to: Prof. XUE Yao-Ming. E-mail: brightxue@163.com

LWDHP-treated group and the untreated group. The ability of glucose tolerance was improved in the LWDHP-treated group. Conclusion: LWDHP can up-regulate the expression of bcl-2 and down-regulate the expression of Bax at transcription level, which maybe contribute to the anti-apoptosis effects of LWDHP.

KEY WORDS diabetes mellitus, type 2; apoptosis; gene, bcl-2; gene, Bax; Liuwei Dihuang Decoction; rats, OLETF

J Chin Integr Med, 2005, 3(6):455-458

六味地黄丸(Liuwei Dihuang Pills, LWDHP)是中医治疗糖尿病的传统方剂,至今仍在临床上被广泛应用。基础和临床研究都显示,六味地黄丸可明显改善糖尿病发病过程中的葡萄糖代谢异常及胰岛素抵抗^[1,2]。胰岛素抵抗和胰岛功能受损是 2 型糖尿病的两个基本发病环节。细胞凋亡是导致胰岛功能受损的主要原因^[3,4]。但有关六味地黄丸与胰岛细胞凋亡的研究尚未见报道。本实验以自发性糖尿病动物模型 OLETF (Otsuka long-evans Tokushima fatty) 大鼠及其同系非糖尿病 LETO (Long-evans Tokushima Otsuka) 大鼠为研究对象,进行 36 周的实验观察,探讨了六味地黄丸对凋亡相关基因 bcl-2 和 Bax 在大鼠胰腺组织中表达的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组 4 周龄雄性 OLETF 大鼠 40 只和 LETO 鼠 10 只(日本大冢制药株式会社德岛研究所提供)。OLETF 大鼠随机分为 2 组,即六味地黄丸治疗组和模型组,每组 10 只。同系非糖尿病 LETO 大鼠 10 只作为正常对照组。

1.2 实验药物和仪器 六味地黄浓缩丸,北京同仁堂制药厂产品;稳豪血糖仪及血糖试纸,美国强生公司产品;bcl-2, Bax 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物由上海博亚生物技术公司合成。

1.3 动物饲养方法 所有大鼠均在无特定病原体条件下单笼饲养,予以标准饲料喂养,自由取食和饮水。环境温度 22~25℃,每 12 h 光照与黑暗循环交替。

1.4 给药方法 六味地黄丸加入蒸馏水,搅拌加热后弃去沉渣,留汤液灌胃,浓度为 0.6~0.8 g/ml,按 2.4 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,1 d 次;模型组与正常对照组用等量蒸馏水灌胃,1 d 次。

1.5 口服葡萄糖耐量试验 实验前禁食 15 h,不禁水,按 2 g/kg 予以 30% 葡萄糖溶液灌胃。采用剪尾法,于空腹时及糖负荷后 30、60、90、120 min 时采血测血糖值(强生稳豪血糖仪)。

1.6 葡萄糖曲线下面积(area under the curve, AUC)计算 葡萄糖 AUC = (空腹血糖值 + 餐后

2 h 血糖值) / 2 + 餐后 0.5 h 血糖值 + 餐后 1 h 血糖值 + 餐后 1.5 h 血糖值

1.7 标本采集及指标检测 每周称量大鼠体质量。于 8、32 和 40 周龄时分批处死大鼠,用 3% 戊巴比妥钠按 1 ml/kg 予以麻醉,剖腹,分离胰腺,用滤纸吸干水分后称重,置于液氮中保存,待检。取胰腺组织 20 mg,用 TRIzol Reagent 提取总 RNA,在 20 μl 反应体系中进行逆转录反应。反应产物用于聚合酶链反应扩增。bcl-2 退火温度 58℃,34 个循环,上游引物:5' GCTACGAGTGGGATACTGGAG 3',下游引物:5' GACAGCCAGGAGAAATCAAAC 3',扩增片段长度 559 bp; Bax 退火温度 52℃,32 个循环,上游引物:5' CATCCAGGATCGAGCAGAGAG 3',下游引物 5' AGCAAAGTAGAAGAGGGCAACC 3',扩增片段长度为 262 bp;内参照 GAPDH 退火温度 58℃,34 个循环,上游引物:5' CCTTCATTGACCTCAACTACATGG 3',下游引物:5' GCAGTGATGGCATGGACTGTG GT 3',扩增片段长度 442 bp。反应产物琼脂糖凝胶电泳观察,UVIband 凝胶图像分析系统分析电泳结果。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,计量资料均数用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,计数资料组间率比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 六味地黄丸对 OLETF 大鼠血糖的影响 六味地黄丸治疗组 2 h 餐后血糖(postprandial blood glucose, PBG)在大鼠 40 周龄为(12.0 ± 3.0) mmol/L,较模型组(14.8 ± 3.2) mmol/L 明显降低($P < 0.01$)。六味地黄丸治疗组 AUC 自大鼠 30 周龄开始,较模型组逐步降低($P < 0.05$)。六味地黄丸治疗组和模型组的 AUC 始终明显高于正常对照组($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 六味地黄丸对胰腺/体重比的影响 大鼠 32 周龄前,各组大鼠胰腺/体重比的比较无明显差异。大鼠 40 周龄时,六味地黄丸治疗组和模型组的胰腺/体重比较正常对照组大鼠明显升高($P < 0.01$)。六味地黄丸治疗组胰腺/体重比在 32、40 周

龄时均高于模型组,但差异无统计学意义。见表 2。

表 1 3 组大鼠血糖值及 AUC

Tab 1 Blood glucose concentration and AUC of rats in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	PBG 2 h (mmol/L)	AUC (mmol/L)
Normal control group (LETO)			
at age of 30 weeks	7	7.5 ± 0.9	28.8 ± 1.7
at age of 34 weeks	4	8.6 ± 1.2	30.6 ± 1.7
at age of 40 weeks	4	7.9 ± 1.2	29.8 ± 0.6
Untreated group (OLETF)			
at age of 30 weeks	17	10.5 ± 1.9	46.5 ± 4.4
at age of 34 weeks	14	13.7 ± 4.2	57.6 ± 10.2
at age of 40 weeks	14	14.8 ± 3.2	63.4 ± 8.9
LWDHP-treated			
at age of 30 weeks	20	9.4 ± 2.3	40.4 ± 10.3*
at age of 34 weeks	14	11.6 ± 3.1	47.4 ± 11.1*
at age of 40 weeks	14	12.0 ± 3.0**	54.0 ± 10.9*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs untreated group at age of the same weeks; $P < 0.01$ vs normal control group at age of the same weeks

表 2 3 组大鼠胰腺/体重比

Tab 2 Pancreas-to-body weight ratio of rats in 3 groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	n	Pancreas-to-body weight ratio
Normal control group (LETO)		
at age of 8 weeks	3	0.17 ± 0.02
at age of 32 weeks	3	0.20 ± 0.01
at age of 40 weeks	4	0.19 ± 0.02
Untreated group (OLETF)		
at age of 8 weeks	3	0.16 ± 0.04
at age of 32 weeks	3	0.15 ± 0.06
at age of 40 weeks	3	0.14 ± 0.02**
LWDHP-treated		
at age of 32 weeks	5	0.19 ± 0.02
at age of 40 weeks	7	0.16 ± 0.01**

** $P < 0.01$ vs normal control group at age of the same weeks

2.3 六味地黄丸对 bcl-2 和 Bax 基因表达的影响

各组大鼠 bcl-2 mRNA 表达水平均随周龄增加而降低,但这种变化无统计学差异。大鼠 32 周龄时,正常对照组 bcl-2 mRNA 表达水平最高,六味地黄丸治疗组次之,模型组最低,但差异不具有统计学意义。大鼠 40 周龄时,模型组大鼠 bcl-2 mRNA 表达水平明显低于六味地黄丸治疗组和正常对照组 ($P < 0.01$),而六味地黄丸治疗组与正常对照组 bcl-2 mRNA 表达水平的比较则无统计学差异。各组大鼠 Bax mRNA 表达水平均随周龄增加而升高,但同组内不同周龄间的比较无统计学差异。大鼠 8 周龄时,正常对照组 Bax mRNA 表达水平与模型

组比较,亦无统计学差异。大鼠 32、40 周龄时,六味地黄丸治疗组和正常对照组 Bax mRNA 表达水平均明显低于模型组 ($P < 0.01$),而六味地黄丸治疗组与正常对照组之间的比较则无统计学差异。见表 3。

表 3 3 组大鼠 bcl-2 和 Bax mRNA 表达水平

Tab 2 Expression levels of bcl-2 and Bax mRNAs of rats in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	bcl-2 mRNA	Bax mRNA
Normal control group (LETO)			
at age of 8 weeks	3	1.48 ± 0.19	0.26 ± 0.05
at age of 32 weeks	3	1.42 ± 0.20	0.28 ± 0.12**
at age of 40 weeks	4	1.33 ± 0.11**	0.41 ± 0.08**
Untreated group (OLETF)			
at age of 8 weeks	3	1.36 ± 0.22	0.23 ± 0.04
at age of 32 weeks	3	1.11 ± 0.06	1.31 ± 0.10
at age of 40 weeks	3	1.01 ± 0.16	1.18 ± 0.28
LWDHP-treated			
at age of 32 weeks	5	1.29 ± 0.17	0.28 ± 0.17**
at age of 40 weeks	7	1.25 ± 0.07**	0.57 ± 0.11**

** $P < 0.01$ vs untreated group at age of the same weeks

3 讨论

六味地黄丸具有降低糖尿病动物血糖、血脂、游离脂肪酸^[1,2]、抗氧化及清除自由基的作用^[5]。大量研究表明,糖、脂代谢紊乱,尤其是氧化应激与胰岛细胞的凋亡有着密切的关系^[6]。本实验从凋亡相关基因表达的角度探讨了六味地黄丸对胰岛细胞凋亡的作用。

实验发现,经六味地黄丸干预的大鼠,其糖负荷能力较模型组明显改善,无论是负荷后 2 h 血糖还是 AUC,六味地黄丸治疗组都明显低于模型组,表明六味地黄丸可推迟糖调节功能受损出现的时间,具有改善糖代谢的能力。实验中,OLETF 大鼠空腹血糖随病程进展无明显变化,此为 OLETF 大鼠的生理特点,与国外同类研究报道一致^[7]。

胰岛中绝大部分是具有分泌胰岛素能力的胰岛细胞。凋亡是胰岛细胞死亡的主要形式,细胞数量的减少可能是导致 2 型糖尿病细胞功能障碍的主要原因^[3]。减少凋亡对于维持胰岛细胞功能具有重要的意义。本实验中,六味地黄丸治疗组大鼠胰腺/体重比与模型组比较,有增高的趋势,这可能是六味地黄丸调节凋亡相关基因,从而保护胰岛的一个表现。

六味地黄丸能明显上调 OLETF 大鼠胰腺中 bcl-2 基因在转录水平的表达,下调 Bax 基因的表

达。bcl-2 和 Bax 都属于 bcl-2 超家族的成员,是细胞凋亡途径中一组重要的调节基因。bcl-2 能抑制细胞凋亡,为凋亡抑制相关基因;Bax 有促进凋亡的作用,为凋亡促进相关基因。两者及其家族其他成员共同构成了一个复杂的相互作用的网络,精细地调控着细胞凋亡。本实验结果提示,六味地黄丸可能通过上调 bcl-2 的表达,同时抑制 Bax 的表达,从而发挥抑制胰岛 细胞凋亡的作用。六味地黄丸对于凋亡相关基因影响的机制目前尚不清楚,可能与其改善胰岛素抵抗,降低血脂、游离脂肪酸产生的脂毒性及抑制氧化应激有关。但也可能存在对凋亡调节基因直接的调控作用,尚需进一步的实验证实。

[参考文献]

- 1 张汝学,周金黄,张永祥,等.去胸腺对大鼠糖代谢的影响及地黄寡糖对其的调节作用[J].中国药理学通报,2002,18(2):194-197.
- 2 王 敏.六味地黄丸合用消渴丸对糖尿病大鼠血糖及血脂代谢的实验研究[J].中华实用中西医杂志,2003,3(16):1086-1088.
- 3 Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, *et al*. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2003, 52(1): 102-110.
- 4 Butler AE, Janson J, Ritzel R, *et al*. Accelerated apoptosis overcomes increased replication to cause -cell loss in diabetes in mice transgenic for h-IAPP[J]. Diabetes, 2002, 51 (Suppl 2): A7.
- 5 胡合营,郑军萍.糖尿病患者血中 SOD 含量变化与维生素 E、六味地黄丸关系的临床观察[J].放射免疫学杂志,2001,14(3):140-141.
- 6 Maechler P, Jornot L, Wollheim CB. Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells[J]. J Biol Chem, 1999, 274(39): 27905-27913.
- 7 Kawano K, Hirashima T, Mori S, *et al*. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain [J]. Diabetes, 1992, 41(11): 1422-1428.

[收稿日期] 2005-08-15 [本文编辑] 黄文华 周庆辉

《药学服务与研究》2006 年征订启事

《药学服务与研究》杂志是第二军医大学主管和主办的我国第一本有关药学服务方面的全国性专业学术期刊。主要报道药学尤其是药学服务的研究进展和实践,介绍国内外药学领域的新知识、新技术、新方法和新成就,为安全、有效、经济用药提供理论和实践信息。

本刊学术性强,图文并茂,印刷装帧精美。读者对象为从事医药卫生工作的中高级科研、医疗、教学、管理、生产、营销机构的人员和高等医药院校的师生。本刊创刊于 2001 年 12 月,现在已经成为中国科技核心期刊、中国科技论文统计源期刊、中国生物学数据库核心期刊,中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,并已被国际著名检索期刊和数据库,如化学文摘(Cheical Abstracts,美国)、文摘杂志(《VINITI》,俄罗斯)、国际药学文摘(International Pharmaceutical Abstracts,美国)和 Elsevier 文献数据库[Elsevier Bibliographic Databases,荷兰,该数据库包括著名的荷兰《医学文摘》(EM)]收录和利用,也被国内很多大型数据库和文摘类期刊收录和利用。

本刊国内外公开发行人,邮发代号 4-706。2006 年将改为双月刊,每双月 30 日出版。大 16 开本,正文 80 页,国内每期(册)定价 10.00 元,全年 60.00 元。敬请读者及时到当地邮局订阅,也可直接汇款至本杂志社订阅,免邮寄费。地址:上海市长海路 174 号;邮编:200433。电话:021-65519829、021-25074639;传真:021-65519829; E-mail: PharmCR@yaoxue.net