

·基础研究·

绞股蓝总皂甙对2型糖尿病大鼠
脑神经生长因子基因表达的影响包海花¹ 郭新民¹ 聂影¹ 崔荣军¹

摘要 目的:研究绞股蓝总皂甙(Gps)对2型糖尿病大鼠脑神经生长因子(nerve growth factor,NGF)mRNA表达的影响。方法:随机选取以不同剂量的Gps灌胃的2型糖尿病大鼠,以生理盐水灌胃的2型糖尿病大鼠及正常对照组大鼠各10只,用RT-PCR法测定脑神经生长因子mRNA的表达。结果:2型糖尿病大鼠脑神经生长因子mRNA表达下降,服用绞股蓝总皂甙的2型糖尿病大鼠脑神经生长因子mRNA表达上调。结论:绞股蓝总皂甙能增加2型糖尿病大鼠脑神经生长因子基因的表达。

关键词 绞股蓝总皂甙;2型糖尿病大鼠;神经生长因子;基因表达

中图分类号:R49, R587.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-04-0328-02

Effect of Gypenosides preparation on expression of nerve growth factor gene of cerebrum in type 2 diabetic rats/BAO Haihua, GUO Xinmin, NIE Ying, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006,21(4): 328—329

Abstract Objective: To study the effect of Gypenosides on the expression of the brain nerve growth factor mRNA in type 2 diabetic rats. **Method:** Selecting type 2 diabetic rats with gastric filling of various dosage of Gypenosides and Physiological saline, ten rats in each group and ten normal rats as control, the expression of brain NGF mRNA was measured with by RT-PCR. **Result:** The mRNA expression of Brain NGF in type 2 diabetic groups were lower than that of normal group ($P < 0.05$), and the Gypenosides groups were higher than that of type 2 diabetic model ($P < 0.05$). **Conclusion:** Gypenosides can increase the mRNA expression of brain NGF in type 2 diabetic rats.

Author's address Mudanjiang Medical College, Mudanjiang, Heilongjiang Province, 157011

Key words Gypenosides; type 2 diabetic rats; nerve growth factor; gene expression

糖尿病性神经病变(diabetic neuropathy,DNP)是糖尿病患者的重要并发症,直接影响2型糖尿病患者的康复。其发病机制尚不明确,目前缺乏有效的治疗药物。有研究表明,神经生长因子(nerve growth factor,NGF)与DNP的发生发展密切相关^[1]。本试验应用RT-PCR技术,观察绞股蓝总皂甙(Gypenosides,Gps)对2型糖尿病大鼠NGF mRNA表达的影响,为糖尿病的临床用药筛选及康复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Trizol/DEPC(美国Gibco公司);RT-PCR试剂盒(大连宝生生物有限公司);琼脂糖、溴化已锭(EB)、链脲佐菌素(streptozocin,STZ)(美国Sigma公司);绞股蓝总皂甙(西安天一技术有限公司)。引物按参考文献^[2],由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2 动物造模及分组

健康Wistar大鼠^[3]50只,2月龄,雌雄各半,体重200—250g,适应性喂养7天,随机选取10只为

正常组,给予基础饲料,8周后注射0.75ml/kg柠檬酸钠—柠檬酸缓冲液;其余40只给予高热量饮食8周,尾静脉一次性注射相同体积STZ溶液(15mg/kg),72h后葡萄糖氧化酶法测空腹血糖,以血糖值高于11.1mmol/L而低于33.3mmol/L为造模成功,造模成功者随机分为糖尿病模型组、大剂量Gps治疗组、中剂量Gps治疗组、小剂量Gps治疗组,每组10只大鼠。

1.3 给药方法

Gps按30、60、120mg/kg·d分为小、中、大三个剂量,室温下,蒸馏水溶解灌胃,模型组及正常组同时灌服等体积生理盐水,治疗周期为6周。

1.4 标本采集与测定

1.4.1 取材:灌胃6周末,乙醚麻醉,断颈处死大鼠,取脑组织100mg,置于含液氮研钵中,加入1ml Trizol充分研磨,抽提匀浆后移入1.5ml Eppendorf管

1 牡丹江医学院,黑龙江牡丹江,157011

作者简介:包海花,女,实验师

收稿日期:2005-07-05

中,冰上静置 5min。每管加入 0.2ml 氯仿,剧烈震荡 15s,冰上静置 2—3min,12000r/min,4℃,离心 5min。吸取上层水相,置于另一新 Ep 管中,加入 0.5ml 异丙醇,轻摇混匀,冰上静置 10min,12000r/min,4℃,离心 5min。弃上清,每管加入 1ml 75%乙醇(DEPC 水配制),4℃,8000r/min,离心 5min。弃乙醇,超净工作台上室温干燥 10min,加入 20μl DEPC 水,溶解 RNA。

1.4.2 大鼠脑组织总 RNA 完整性和纯度的鉴定: 甲酰胺 10μl,37% 甲醛 3.5μl,10×MOPS 2μl,RNA 样品液 4.5μl 混匀,1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统观察 28srRNA 与 18srRNA 的分离情况,鉴定其完整性。紫外分光光度计检测 RNA 样品 A260/A280,鉴定其纯度。

1.4.3 大鼠脑组织 NGF RT-PCR cDNA 第一链合成按试剂盒说明操作,反应结束后取逆转录产物 20μl,Mg²⁺6μl,10×缓冲液 8μl,NGF 上下游引物各 1μl,内参照上下游引物各 1μl,Taq 酶 2.5U,灭菌水 63.5μl。离心混匀后,按如下条件扩增:94℃ 3min;94℃ 30s,57℃ 30s,72℃ 1min,30 个循环后 72℃ 10min。结束后,取 PCR 产物 5μl,加 2μl 上样缓冲液,在 90V 电压下于 1.5%的琼脂糖凝胶电泳,电泳缓冲液为 0.5×TBE 电泳完毕后,用美国 UVP GDS—8000 型凝胶成像系统成像并用密度扫描分析 PCR 产物带。为消除系统及定量误差,NGF mRNA 的表达水平以相对光密度表达量即 NGF/GAPDH 的比率来计算。

1.5 统计学分析

各组数据用 SPSS 11.0 软件处理,实验结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果与讨论

大鼠脑组织总 RNA 中 28srRNA 与 18srRNA 的条带清晰,提示大鼠脑组织总 RNA 分离完整(图 1)。紫外分光结果显示所有样品 A260/A280 均在 1.8—2.0 之间。

扩增后得到 GAPDH 200bp 和 NGF 506bp 两个片段,GAPDH 为内参照,与 NGF 的扩增条件完全一致。其琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示。图像分析结果显示,与正常对照组相比 2 型糖尿病各组大鼠 NGF 的基因表达减少 ($P < 0.01$),Gps 各组与模型组比较 NGF mRNA 的表达增加 ($P < 0.05$)。但是三种剂量之间差异无显著性意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

近年来认识到在 DNP 的发病机制中神经营养

图 1 大鼠脑组织总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

图 2 大鼠脑组织 NGF 基因 mRNA 表达产物电泳结果

表 1 不同浓度 Gps 作用下各组大鼠脑 NGF mRNA 基因的表达

组别	动物数(只)	NGF/GAPDH
正常对照组	10	0.73±0.04
糖尿病模型组	10	0.30±0.02 ^①
大剂量治疗组	10	0.41±0.05 ^{①②}
中剂量治疗组	10	0.44±0.01 ^{①②}
小剂量治疗组	10	0.40±0.06 ^{①②}

①与正常对照组比较 $P < 0.01$; ②与糖尿病模型组比较 $P < 0.05$

因子缺乏起着重要的作用,因而直接影响糖尿病患者的康复治疗,其中 NGF 在 DNP 发病中的作用正逐步得到证实。

NGF 的生物活性主要是维持交感神经和感觉神经的生长发育及功能,涉及脑某些神经元及胶质细胞的生理过程^[4]。并且在组织创伤后起修复作用^[5-6]。本实验结果提示 2 型糖尿病模型组大鼠脑 NGF mRNA 表达明显下降,低于正常对照组。提示 NGF mRNA 表达下降与 DNP 发生密切相关。而绞股蓝组大鼠脑 NGF mRNA 的表达显著高于 2 型糖尿病组,说明绞股蓝总皂甙能够上调 NGF mRNA 表达,这可能是其防治 DNP 的机制之一。

参考文献

- [1] 葛志华,王春艳,刘红艳,等. NGF 在 bd/db 自发性糖尿病小鼠颌下腺的表达[J].解剖学报,2002,33(6):647.
- [2] 顾晓松,丁斐,徐炜岚,等. 大鼠坐骨神经损伤后 NGF 基因表达的变化[J].解剖学报,2000,31:45.
- [3] 张芳林,李果,刘优萍,等. 地塞米松诱发的大鼠胰岛素抵抗模型[J].中国应用生理学杂志,2002,18(1):99.
- [4] 苏刚,刘贵麟. 神经生长因子在神经再生中的作用研究进展[J].实用儿科临床杂志,2003,18(2):138.
- [5] 陈恒胜,曾琳,龙在云,等. 蛇毒神经生长因子对大鼠坐骨神经损伤功能恢复的量效作用 [J]. 第三军医大学学报,2003,25(15):1349.
- [6] 刘芬,王廷华,李明,等. NGF、BDNF 和 NT-3 在背根节卫星细胞的表达[J]. 四川大学学报(医学版),2003,34(1):36.