

·基础研究·

分米波对 2 型糖尿病大鼠主动脉基质金属蛋白酶-9 表达的影响

刘宽芝¹ 吕海莉² 靳陶然¹

摘要 目的:观察分米波对 2 型糖尿病大鼠主动脉 MMP-9 表达的影响,探讨分米波治疗糖尿病大血管病变的可行性。**方法:**将 60 只 SD 大鼠随机分为 4 组,即正常对照组(A 组)、糖尿病模型组(B 组)、糖尿病罗格列酮治疗组(C 组)和糖尿病分米波治疗组(D 组)。应用高脂饲料加小剂量链脲佐菌素建立 2 型糖尿病大鼠模型,用逆转录-聚合酶链反应检测 MMP-9 mRNA 的表达,并观察各组成模后 4 周、8 周和 12 周 MMP-9 表达的变化。**结果:**糖尿病组大鼠主动脉 MMP-9 mRNA 的表达呈增高趋势,分别是正常组的 1.15、1.30、1.45 和 1.99 倍;罗格列酮治疗组 MMP-9 mRNA 表达量分别比模型组降低 26.80%、27.16%和 46.46%;分米波治疗组分别比模型组降低 25.90%、26.08%和 43.35%。**结论:**分米波照射同罗格列酮一样能降低 2 型糖尿病大鼠主动脉 MMP-9 mRNA 的表达,提示分米波对糖尿病大血管病变有一定治疗作用。

关键词 分米波;基质金属蛋白酶-9;2 型糖尿病;罗格列酮

中图分类号:R493,R587.1,R454.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-09-0790-03

Effect of decimeter wave on matrix metalloproteinase-9 expression in type 2 diabetes rats/LIU Kuanzhi,LU Haili,JIN Taoran//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(9): 790—792

Abstract Objective:To explore the feasibility of decimeter wave therapy in diabetic macroangiopathy through observing the effect of decimeter wave on matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression.**Method:** Sixty SD rats were divided randomly into normal control group (group A),type 2 diabetes mellitus (T2DM)model group (group B),T2DM with rosiglitazone group (group C) and T2DM with decimeter wave group (group D). Type 2 diabetic rat model was established by high-fat diet and low dose of STZ. The MMP-9 mRNA expression in arterial wall was observed by RT-PCR. Meanwhile the changes of MMP-9 mRNA expression were observed after 4,8 and 12 weeks of T2DM respectively. **Result:**MMP-9 mRNA in DM rats was 1.15,1.30,1.45 and 1.99 times higher than that of control rats at week 0,4,8 and 12 after DM. MMP-9 mRNA dropped by 26.80%,27.16% and 46.46% in rosiglitazone group and 25.90%,26.08% and 43.35% after treatment for 4,8 and 12 weeks respectively.**Conclusion:** Similar to rosiglitazone, decimeter wave could decrease the expression of MMP-9 mRNA. It was suggested that decimeter wave may treat diabetic macroangiopathy.

Author's address Dept. of Endocrine, The Third Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050001

Key words decimeter wave; matrix metalloproteinase-9; type 2 diabetes mellitus; rosiglitazone

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)大血管病变的基本病理变化是动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS),而基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9,MMP-9)表达增加可引起血管基底膜Ⅳ型胶原的过度降解,为 AS 的始动因素^[1],是目前内分泌代谢领域研究的热点之一。分米波照射可改善局部血液循环,改善组织缺氧,使代谢过程加强、局部组织营养改善。本研究中,动态观察了 2 型糖尿病大鼠主动脉 MMP-9 表达的变化及分米波治疗对其的影响,旨在探讨分米波治疗糖尿病大血管病变的可行性,为其在临床上应用提供实验依据。

选取体重 180—200g 雌性 SD 大鼠(河北省实验动物中心提供)66 只,随机取 10 只作为正常对照组(A 组,n=10),另取 56 只应用高脂饲料(基础饲料中加入 1%胆固醇、0.35%胆酸和 5%熟猪油)喂养,4 周后腹腔注射 30mg/kg 链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)。注射 STZ 2 周后,选取血糖>7.8mmol/L,且伴有胰岛素敏感性降低者为 2 型糖尿病大鼠模型(共 50 只)^[2]。成模后随机分为糖尿病模型组(B 组,n=20)、糖尿病罗格列酮(rosiglitazone,RSG)组(C 组,n=15)和糖尿病分米波治疗组(D 组,n=15)。B 组分别

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

1 河北医科大学第三医院内分泌科,石家庄,050001

2 邯郸市邯钢医院老干部科

作者简介:刘宽芝,女,博士,主任医师,教授

收稿日期:2006-06-22

于成模 0 周、4 周末、8 周末和 12 周末分 4 批杀死大鼠, 每批 5 只大鼠。C、D 组分别于成模 4 周末、8 周末和 12 周末分 3 批杀死大鼠, 每批 5 只大鼠。

1.2 干预治疗方法

A 组: 普通饲料喂养, 每日与 C 组等容积的自来水灌胃。B 组: 高脂饲料喂养, 每日与 C 组等容积的自来水灌胃。C 组: 高脂饲料喂养, 每日 RSG 3mg/kg 灌胃。D 组: 高脂饲料喂养, 采用 TMA-A 型双频微波热疗机, 频率 915MHz, 功率 8W, 辐射距离 10cm, 每日 1 次, 每次 10min。干预 12 周。

1.3 RT-PCR 分析主动脉 MMP-9 mRNA 表达

采用异硫氰酸胍一步法提取主动脉组织中总 RNA。在逆转录酶催化下合成 cDNA, 以适量 cDNA 为模板在 Taq DNA 聚合酶催化下进行 PCR 扩增。MMP-9 的上下游引物分别为: 5'-AACCTGCG-TATTTCCAT-3' 和 5'-GCTGTACCCTTGGTCTGG-3', 扩增产物为 326 bp; 内参照物 GAPDH 的上下游引物为: 5'-CCCACGGCAAGTTCAACGGCA-3' 和 5'-TGGCAGGTTTCTCCAGGCGGC-3', 扩增产物为 606 bp。引物由上海生物工程公司合成。MMP-9 的扩增条件为: 95℃ 1min; 94℃ 1min, 55.5℃ 1min, 72℃ 1min, 30 次循环; 最后 72℃ 延伸 6min。反应产物 10μl 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下分析结果并照相。

1.4 血凝指标测定

纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)、抗凝血酶-Ⅲ(antithrombin-Ⅲ, AT-Ⅲ) 和纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 的测定采用发色底物显色法。

1.5 统计学分析

应用 SPSS11.0 统计软件, 实验结果以均数±标准差表示, 计量资料组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 定量 RT-PCR

与正常组相比较, 各时间点模型组大鼠主动脉壁中 MMP-9 mRNA 的表达呈增高趋势, 且随着病程的延长增加越明显, 于成模 0、4、8 和 12 周时分别是正常组的 1.15、1.30、1.45 和 1.99 倍。经干预后 MMP-9 mRNA 表达量均降低, 于治疗 4、8 和 12 周时, 罗格列酮治疗组分别降低 26.80%、27.16% 和 46.46% (图 1); 分米波治疗组分别降低 25.90%、26.08% 和 43.35% (图 2)。

2.2 血凝指标的变化

见表 1。糖尿病大鼠的 FIB 和 PAI-1 的水平较

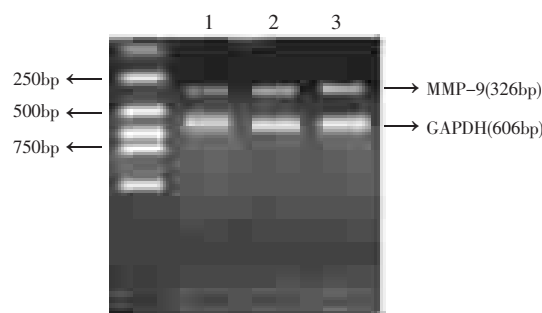


图 1 罗格列酮治疗组大鼠主动脉 MMP-9 mRNA 表达
1 糖尿病 4 周 2 糖尿病 8 周 3 糖尿病 12 周

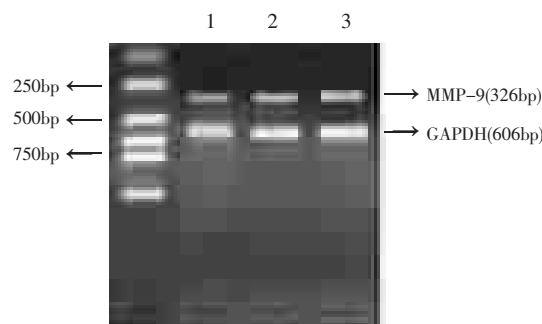


图 2 分米波治疗组大鼠主动脉 MMP-9 mRNA 表达
1 糖尿病 4 周 2 糖尿病 8 周 3 糖尿病 12 周

表 1 各组大鼠纤维蛋白原、抗凝血酶-Ⅲ、纤溶酶原激活物抑制剂-1 变化的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	FIB(g/L)	AT-Ⅲ(%)	PAI-1(AU/ml)
A 组	3.03±0.37	115±9.0	0.43±0.09
B 组			
0 周	4.03±0.52	87±9.1 ^②	0.95±0.10 ^②
4 周	4.06±0.56 ^①	86±9.3 ^②	0.95±0.41 ^②
8 周	4.10±0.61 ^①	84±9.6 ^②	0.97±0.32 ^②
12 周	4.19±0.64 ^②	83±9.6 ^②	0.98±0.23 ^②
C 组			
4 周	3.64±0.35	94±9.6	0.63±0.11
8 周	3.42±0.41 ^③	98±10.3	0.58±0.18 ^③
12 周	3.32±0.33 ^④	104±10.3 ^③	0.55±0.24 ^④
D 组			
4 周	3.60±0.28	91±10.4	0.69±0.22
8 周	3.46±0.31 ^③	96±11.2	0.60±0.12 ^③
12 周	3.38±0.29 ^③	102±9.5 ^③	0.58±0.17 ^{④⑤}

与 A 组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$; 与 B 组比较: ③ $P<0.05$, ④ $P<0.01$; 与 C 组比较: ⑤ $P<0.05$

高, 而 AT-Ⅲ的水平较低。与糖尿病模型组大鼠比较, 两治疗组大鼠的 FIB 和 PAI-1 水平均降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$), AT-Ⅲ水平升高 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。说明分米波具有一定的抗凝作用。

3 讨论

MMP-9 亦称明胶酶 B, 是正常及受损血管壁中表达量较大的一类 MMP。MMP-9 可由多种细胞分泌, 在 AS 病变中, MMP-9 主要由增生的血管平滑肌细胞(extracellular matrix, VSMC)和斑块中单核/巨噬细胞分泌, 其具有广泛的底物特性, 主要底物是 IV

型胶原和明胶^[3]。MMP-9 降解Ⅳ型胶原(血管基底膜的主要结构成分)后,促进循环中的单核细胞穿过内皮细胞屏障进入内膜下,并被激活转化为巨噬细胞、释放一系列细胞因子。由巨噬细胞分泌的 MMP-9 可为 VSMC 从中膜移入内膜并进行增殖扫清基质障碍,从而参与 AS 的发生、发展过程^[4],MMP-9 的表达活性可间接反映 AS 的进展程度。因此,本研究选择 MMP-9 作为检测指标。Uemura 等^[5]用明胶酶谱及 Western 印迹分析提示,在啮齿类糖尿病动物模型中 MMP-9 水平在血管组织和血浆中显著增高。然而美国学者 Portik-DV^[6]在 T2DM 患者冠脉搭桥术中切取的内乳动脉壁的 MMP-9 含量及活性下降,并提出了 T2DM AS 患者血管壁的 MMP-9 含量的时间依赖性学说,即 T2DM 患者 AS 早期其动脉壁 MMP-9 的含量增加,引发早期 AS,而 AS 后期 MMP-9 表达和活性降低,进一步促进 AS 的发展。说明在 AS 形成的过程中,ECM 合成和降解的速率在疾病的不同阶段有所改变^[7]。本实验 RT-PCR 结果显示,糖尿病大鼠主动脉 MMP-9 mRNA 表达较正常对照组明显增高,并且随着糖尿病病程的延长呈进行性增加。

RSG 是作用最强的噻唑烷二酮类药物,是过氧化物酶体增殖体激活受体 γ 的激动剂,近来研究表明,RSG 除可降糖外,还具有大血管的保护作用^[8],因此本研究以 RSG 作为阳性对照药物。

分米波是一种高频电磁波,在其作用下体内的离子、带电胶体或偶极子 in 高频电场中振动或旋转运动时互相摩擦或与周围媒质摩擦时均能产生热效应^[9],局部温度升高后,刺激血管周围的自主神经间质神经网,引起轴突反射,导致血管扩张,从而促进局部血液循环,增强局部代谢,增加氧及营养物质的供给,及时清除代谢产物,促进组织代谢。分米波照射又能使体内带电颗粒沿高频电场的力线分布排列,通过改变物质的理化特性使机体产生特殊的反应,此种非热效应有利于修复组织损伤和加速组织再生。本研究结果显示,分米波照射和罗格列酮一样可抑制 MMP-9 的基因表达,从而抑制血管平滑肌细胞的增殖、迁移,并且防止胶原蛋白和弹性蛋白降

解而维持纤维帽的完整、稳定 AS 斑块。因此,MMP-9 基因表达受到抑制可能是分米波防治糖尿病大血管病变的分子机制之一。本研究结果显示,糖尿病模型组大鼠 FIB、PAI-1 水平高于正常对照组,而 AT-Ⅲ 低于对照组,说明糖尿病大鼠的血液处于高凝状态,分米波照射同罗格列酮一样可降低 FIB、PAI-1 水平,并增加 AT-Ⅲ 的含量。

4 结论

分米波可以降低糖尿病大鼠主动脉 MMP-9 的基因表达,并改善高凝状态,对糖尿病大血管病变有一定的治疗作用,但有关分米波治疗在糖尿病动脉粥样硬化方面的作用机制,仍有待进一步的探讨。

参考文献

- [1] Li Z, Li L, Zielke HR, et al. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesion[J]. Am J Pathol, 1996, 148(1): 121—128.
- [2] Luo J, Quan J, Tsai J, et al. Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. Metabolism, 1998, 47(6): 663—668.
- [3] 孙新华, 林淑艳, 曲冬. 氦-氖激光对兔正畸牙移动牙周组织中基质金属蛋白酶-9 表达的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26(3): 139—142.
- [4] Dollery CM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease[J]. Circ Res, 1995, 77(5): 863—868.
- [5] Uemura S, Matsushita H, Li W, et al. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress[J]. Circ Res, 2001, 88(12): 1291—1298.
- [6] Portik-DV, Anstadt MP, Hu T Chinson J, et al. Evidence for a matrix metalloproteinase induction/activation system in arterial vasculature and decreased synthesis and activity in diabetes[J]. Diabetes, 2002, 51(10): 3063—3068.
- [7] 于滢, 杨向红. 基质金属蛋白酶与动脉粥样硬化及斑块破裂的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(6): 592—595.
- [8] Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice [J]. J Clin Invest, 2000, 106(4): 523—531.
- [9] 郭万学, 陈子元, 缪鸿石. 理疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984. 238—256.