

新葛根芩连汤对糖尿病大鼠海马 ZO-1 及 JAM-1 蛋白表达的影响^{*}

袁有才¹ 魏光明^{2**}

(1. 陕西中医药大学, 陕西咸阳 712046; 2. 空军军医大学第二附属医院, 陕西 西安 710038)

摘要:目的 观察新葛根芩连汤对糖尿病大鼠海马区 ZO-1 及 JAM-1 蛋白表达的影响。方法 大鼠随机分为空白组、高脂饮食组、高脂饮食组高脂造模, 1 月后腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病模型, 存活大鼠分为模型组、对照组、新葛根芩连汤大、中、小剂量组, 给予相应药物治疗, 8 周后检测海马区 ZO-1 及 JAM-1 蛋白。结果 与空白组比较, 模型组大鼠海马区 ZO-1 明显减低($P < 0.01$)、JAM-1 明显增高($P < 0.01$)。与模型组比较, 各治疗组均有不同程度改善, 新葛根芩连汤中剂量组效果最明显($P < 0.01$)。结论 新葛根芩连汤促可逆紧密连接蛋白 ZO-1 及 JAM 蛋白的表达, 从而保护血脑屏障。

关键词:糖尿病; 新葛根芩连汤; ZO-1 蛋白; JAM 蛋白

中图分类号:R277 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1340(2019)06-0078-03

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2019.06.021

糖尿病常引起全身多系统损害, 近年来糖尿病脑损害逐渐受到重视, 糖尿病不仅易引起脑卒中, 而且易导致记忆力减退等高级皮层功能障碍。其发生的原因涉及高血糖、血管因素、自由基、神经元变性等多种因素, 其核心病理因素仍不明。而本课题组发现新葛根芩汤对糖尿病脑损害有一定的防治作用, 其原因可能与保护血脑屏障有关^[1], 本研究进一步从紧密连接蛋白揭示其作用机理。

1 材料

1.1 动物 从西安交通大学实验动物中心购入雄性 SPF 级 SD 大鼠 120 只, 体重 $200\text{g} \pm 20\text{g}$, 合格证书号 SCXK(陕)2012-003。

1.2 试剂 试验药物 ZO-1 抗体、JAM 抗体 购自 Proteintech Group 公司。链脲佐菌素(STZ), 1g/支, 购自 Sigma 公司; 浙江大冢制药有限公司生产的西洛他唑片: (50mg/片, 批号: 130901P)。在陕西中医药大学附属医院中草药房购入新葛根芩连汤饮片, 由粉葛根 12g、熊胆粉 1.5g、川黄连 6g、黄芩 9g、草石斛 12g、云南三七粉 3g 组成。药液制

备: 葛根、黄连、黄芩、石斛按 39g 生药加水 400ml 煎煮 2 小时, 浓缩为含生药 0.65g/ml 的水煎剂, 4℃ 冰箱冷藏。灌胃时取预计量的水煎剂加热, 溶入相应比例的熊胆粉、三七粉制成含生药 0.725g/ml 的新葛根芩连汤混悬液灌胃, 中小剂量按比例稀释。

1.3 实验仪器 蛋白垂直电泳槽、蛋白湿转仪, 均为产自 Biorad 公司; 血糖仪产自德国拜耳公司; 电子天平 BSI24S 是北京赛多利仪器系统有限公司产品。

2 方法

2.1 动物模型建立及给药方法 大鼠适应性喂养 3 天, 随机分出 15 只作为空白对照组(第 1 组, 纯净水 1ml/100g 灌胃), 给予普通基础饲料喂养; 其余 105 只作为 2 型糖尿病造模组给予高糖高脂饲料喂养(77.5% 基础饲料、10% 猪油、2.5% 胆固醇、10% 蔗糖), 4 周后一次性腹腔注射链脲佐菌素 45mg/kg STZ(溶于 0.1mmol/L 柠檬酸盐缓冲液, pH = 4.2), 72h 后尾静脉采血测血糖达到 16.7 mmol/L 的大鼠认为糖尿病模型建立成功^[2], 继续

* 基金项目: 陕西省教育厅自然基金项目(18JK0215)

** 通讯作者: 魏光明, 主治医师。E-mail: wgm712083@126.com

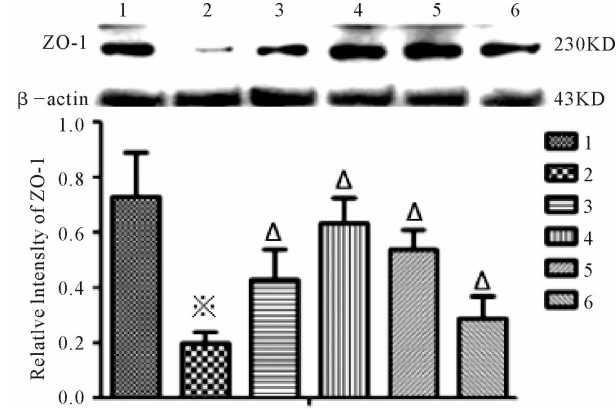
分为模型组(第2组,纯净水1ml/100g灌胃)、新葛根芩连汤大剂量组(第3组,0.725g/ml/100g灌胃)、中剂量(第4组,0.363g/ml/100g灌胃)、小剂量组(第5组,0.183g/ml/100g灌胃)、西洛他唑对照组(第6组,1.67mg/ml/100g灌胃),每组19只。造模后7天再次测血糖,血糖仍达标者进入药物干预,连续8周。

2.2 Western-blot 检测紧密连接蛋白 zo-1/JI-AM 表达 每组取6只大鼠尾静脉采血后脱臼处死,迅速断头取脑,冰盘分离海马组织液氮罐冷冻(左右侧分别放入不同冻存管),采集结束后移入-80℃冰箱,用20倍体积蛋白抽提液,冰上匀浆,10000r/min离心5min,分离上层溶液,BCA蛋白定量试剂盒测定样品的蛋白浓度,10% SDS-PAGE 胶分离后,电转移至 PVDF 膜,加入一抗、二抗孵育,ECL 法显色,凝胶成像分析系统摄像分析。

2.3 统计方法 数据均以 $\bar{x} \pm S$ 表示,数据处理采用中文 spss17.0 软件,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 新加葛根芩连汤对 ZO-1 表达的影响 与空白组比较模型组 ZO-1 表达明显减少($P < 0.01$);与模型组比较各干预组 ZO-1 表达均明显增强($P < 0.01$),其中新加葛根芩连汤中、小剂量组

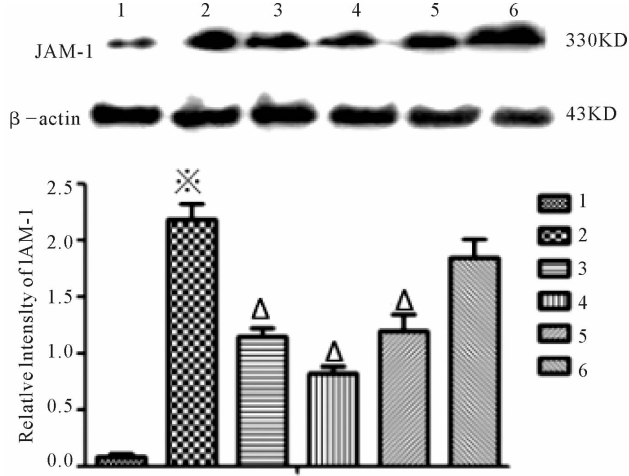


注:※与1组比较 $P < 0.01$, Δ 与2组比较 $P < 0.01$,
1组:空白组;2组:模型组;3组:中药大剂量组;
4组:中药中剂量组;5组:中药小剂量组;6组:西药组。

图1 大鼠海马中 ZO-1 表达比较图

3.2 新加葛根芩连汤对 JAM-1 表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠海马 JAM-1 表达明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,经药物治疗各组 JAM-1 表达均不同程度减低,以新加葛根芩连汤

中剂量组表达最显著($P < 0.01$),西药对照组无明显差异($P > 0.05$)。



注:※与1组比较 $P < 0.01$, Δ 与2组比较 $P < 0.01$,
1组:空白组;2组:模型组;3组:中药大剂量组;
4组:中药中剂量组;5组:中药小剂量组;6组:西药组。

图2 大鼠海马中 JAM-1 表达比较图

4 讨论

血脑屏障损害是糖尿病脑损害的重要靶点,微血管损害是糖尿病脑损害的重要部分,其特点是由血管内皮细胞与紧密连接组成血脑屏障的第一道屏障。紧密连接是脑微血管内皮细胞间的特殊连接结构,一般由三种跨膜蛋白、胞浆粘附蛋白、细胞骨架蛋白和胞质信号组成,在脑微血管内皮细胞间形成致密的连接结构,有物理屏障和电子屏障作用。胞浆粘附蛋白是最早被发现的紧密连接粘附蛋白,分为 ZO-1,ZO-2,ZO-3 等3种亚型,相互协同组成紧密连接的脚手架平台,是紧密连接的支持结构基础。连接黏附分子是发现较晚的一个糖基化的跨膜免疫球蛋白,由胞外的两个免疫球蛋白样区域、一个跨膜区域、胞浆区的一个 C 端区域组成。分为 JAM-1,JAM-2 和 JAM-3 等3种亚型,可直接与 ZO-1 连接。研究显示绝大部分内皮细胞表面均有 JAM 表达,JAM 的主要功能是调节血脑屏障的渗透性。所以 ZO-1、JAM-1 在血脑屏障中起重要作用。

本次研究显示糖尿病模型大鼠8周时,大鼠海马区 ZO-1 降低和 JAM-1 升高,药物干预后降低的 ZO-1 蛋白表达明显增强,JAM-1 表达降低,因此推论糖尿病脑损害模型中血脑屏障损害与紧密连接蛋白的异常表达有关。已有研究显示新加葛根芩连汤可以改善糖尿病血脑(下转第91页)

管内皮素(ET)水平^[16],增加脑血流量^[17]。因此,以上诸穴合用,能够从多个方面改善脑供血情况,保护脑神经,提高脑能量代谢,从而改善后循环缺血所致的眩晕和其他神经症状。

本研究属于单中心研究,且由于设备技术以及经费的限制,观察指标比较单一,观察时间偏短,结果有可能会有一定偏倚,尚有待多中心、大规模的临床试验来进一步证实。

参考文献

- [1]李焰生. 中国后循环缺血的专家共识[J]. 中华内科杂志, 2006, 45(9):786-787.
- [2]中华医学会神经病学分会. 眩晕诊治专家共识[J]. 中华神经科杂志, 2010, 43(5):369-374.
- [3]中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则[S]. 北京:人民卫生出版社,1993:24.
- [4]中华中医药学会. 中医体质分类与判定[J]. 中华养生保健(上半月), 2009(9).
- [5]沈雪勇. 经络腧穴学[M]. 2版. 北京:中国中医药出版社,2008:41-254.
- [6]张介宾. 景岳全书[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:392.
- [7]邓华, 张选国. 后循环缺血性眩晕患者中医体质分析[J]. 陕西中医, 2017, 38(8):1008-1009.
- [8]刘芳. 针刺颅底组穴治疗后循环缺血性眩晕的临床研究[D]. 2016.
- [9]程红亮, 胡培佳, 张闻东, 等. 通督调神针法治疗后循环缺血性眩晕临床研究[J]. 中医药临床杂志, 2013

(3):208-210.

- [10]郭俊杰. 针刺“头五穴”加辨证取穴治疗后循环缺血性眩晕的临床研究[D]. 2016.
- [11]王颖, 杨俊. 针刺风池、风府穴对中风后遗症患者脑血流速度的影响[J]. 中医药临床杂志, 2005, 17(3):251-253.
- [12]董翔翔, 张萌, 孙晓峰. 针刺风池、天柱对椎-基底动脉供血不足的影响[J]. 中国针灸, 2005, 25(12):841-843.
- [13]Li W H, Yu J, Lin Y P, et al. 电针内关、百会对缺血再灌注损伤大鼠 CHOP 和 caraspase-12 基因表达的影响[J]. Journal of Acupuncture and Tuina Science, 2017, 15(1):8-13.
- [14]房雅楠, 隋汝波, 张磊. 针刺完骨穴对血管性痴呆大鼠海马炎性细胞因子的影响. 西安交通大学学报(医学版), 2016, 37(4):586-589.
- [15]赖新生, 黄泳, 唐安戌, 等. 病理状态下针刺百会穴对脑功能成像特征的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(5):410-413
- [16]吴远华, 朱广旗, 林兴友, 等. 针刺曲池、太冲对高血压病患者血中 ET 和 ACE 的影响及疗效探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 12(24):1080-1083
- [17]王国明, 李面霞, 温峰云, 等. 大冲穴对椎基底动脉供血不足患者血流速度的影响[J]. 中国针灸, 2011, 31(3):216-218.

(收稿日期:2019-07-03 编辑:巩振东)

(上接第79页)屏障的损害^[1],本次研究综合显示新加葛根芩连汤中剂量组对 ZO-1 和 JAM-1 表达调节最有效。另外,因 JAM-1 主要是电荷屏障,可能是糖尿病大鼠血脑屏障破坏时对其他跨膜蛋白减少的代偿性增高。

葛根芩连汤是经典方,近年研究显示对糖尿病有较好的效果^[3-4]。课题组在此基础上加入石斛、熊胆粉、三七形成新加葛根芩连汤,增强养阴活血开窍功能,更适于糖尿病脑病的治疗,前期研究有较好的临床效果^[5],药理研究显示对糖尿病大鼠血糖、体重、PI3K-AKT 通路、血脑屏障等有明确效应^[6-7],本次研究进一步明确新加葛根芩连汤对紧密连接蛋白 ZO-1 和 JAM-1 表达调节具有较好的调节作用。

参考文献

- [1]袁有才, 张效科, 问莉娜, 等. 新葛根芩连汤对糖尿病大鼠血脑屏障通透性及 occludin/claudins-5 蛋白

表达的影响[J]. 时珍国医国药, 29(9):66-69.

- [2]刘继平, 程玥, 关健健, 等. 七福饮对糖尿病脑病大鼠认知功能及神经病理改变的影响[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(5):15.
- [3]赵林华, 姬航宇, 冀博文, 等. 葛根芩连汤治疗糖尿病理论探讨[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(2):280-283.
- [4]金莉, 安文灿, 安文铎. 葛根芩连汤治疗糖尿病 120 例[J]. 长春中医药大学学报, 2012, 28(2):315-315.
- [5]薛久开. 新加葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病认知障碍的临床疗效观察[D]. 成都:成都中医药大学, 2016.
- [6]袁有才, 张效科, 高碧峰, 等. 新葛根芩连汤对糖尿病大鼠海马 HIF-1 α 及 VEGF 的影响[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(2):269-271.
- [7]袁有才, 高碧峰, 王飞, 等. 新葛根芩连汤对糖尿病大鼠海马 PI3K/AKT/CREBmRNA 表达的影响[J]. 四川中医, 2018, 36(10):31-33.

(收稿日期:2019-07-10 编辑:方亚利)