

左归丸对 GDM 大鼠胎盘组织 11β-HSD1 表达的影响

王悦尧¹, 王永辉², 许凯霞², 柴智², 高丽², 周然^{2*}
(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 山西中医学院, 太原 030619)

[摘要] **目的:**探讨左归丸对妊娠糖尿病大鼠胎盘组织 11β-羟基类固醇脱氢酶 1 (11β-HSD1) 基因表达水平的影响。**方法:**育龄雌性 SD 大鼠受孕后随机分为正常妊娠组 (C)、妊娠糖尿病组 (GDM)、胰岛素干预组 (INS)、左归丸干预组 (ZGW)、左归丸联合胰岛素干预组 (F), 每组 10 只; 受孕当日 GDM 组和 3 个干预组按 45 mg·kg⁻¹ ip 链脲佐菌素 (STZ) 复制妊娠糖尿病模型。并于孕 4 d 开始给药干预 (左归丸 10 g·kg⁻¹ ig, 胰岛素 20 U·kg⁻¹ ih)。孕 19 d 断头取血, 葡萄糖氧化酶法测定血糖; 酶联免疫吸附法检测血清皮质酮、胰岛素; 采用 RT-qPCR 技术检测胎盘 11β-HSD1 基因 mRNA 的表达水平, 并进行定量分析。**结果:**与正常妊娠组比较, GDM 组血糖水平、血清胰岛素浓度、皮质酮水平、胎盘 11β-HSD1 基因 mRNA 的表达水平均明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与妊娠糖尿病组比较, 左归丸干预组血糖水平、血清胰岛素浓度、皮质酮水平、胎盘 11β-HSD1 基因 mRNA 的表达水平均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但仍高于正常妊娠组, 联合组治疗效果优于左归丸组。**结论:**左归丸可降低妊娠期糖尿病大鼠血糖水平, 胎盘部位有 11β-HSD1 基因的表达, 妊娠糖尿病病理状态可影响 11β-HSD1 基因在胎盘的表达水平, 左归丸有下调 11β-HSD1 基因表达水平的作用, 推测可能是其改善 GDM 大鼠胰岛素抵抗的机制之一。

[关键词] 左归丸; 妊娠糖尿病; 胎盘; 11β-羟基类固醇脱氢酶 1
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)11-0127-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110127

Effects Zuogui Wan on mRNA Expression of 11β-HSD1 in Placenta of Gestational Diabetes Mellitus Rats
WANG Yue-yao¹, WANG Yong-hui², XU Kai-xia², CHAI Zhi², GAO Li², ZHOU Ran^{2*} (1. *Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China*; 2. *Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Zuogui Wan on the mRNA expression of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11β-HSD1) in placenta of gestational diabetes mellitus (GDM) rats. **Method:** Pregnant reproduction age SD rats were randomly divided into 5 groups: the normal pregnancy (C) group, the GDM control (GDM) group, the diabetes insulin treated (INS) group, Zuogui Wan treated (ZGW) group and Zuogui Wan combined insulin treated (F) group. The GDM was induced except the C group by injecting streptozocin (STZ) abdominally at 45 mg·kg⁻¹. The rats in the three treated groups received the treatment of Zuogui Wan and/or insulin from injecting STZ until 19-day pregnant. Glycemia was detected by using the glucose oxidase method. The corticosterone and insulin in blood serum were detected by using ELISA kit. The mRNA expression level of 11β-HSD1 in placenta was evaluated by RT-qPCR, and the quantitative analysis was conducted. **Result:** Compared with the C group, the glycemia, serum insulin, corticosterone level and placental 11β-HSD1 mRNA expression level increased in the GDM group ($P < 0.01$). Compared with the GDM group, the glycemia level, serum insulin, corticosterone level and placental 11β-HSD1 mRNA expression level decreased significantly in AGW and F groups, but the results were higher than those in the C group. Moreover, the effect is better in F group. **Conclusion:** Zuogui Wan could reduce the level of glycemia in diabetic rats. The mRNA expression of 11β-HSD1 was found in placental and could be influenced by GDM. Zuogui Wans have the improving effects on the glycemic status of GDM rats, which may be related to reducing the placental 11β-HSD1 gene expression level.

[Key words] Zuogui Wan; gestational diabetes mellitus; placenta; 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1

[收稿日期] 20141212(010)
[基金项目] 山西省科技厅科研创新重点团队建设项目(2012081018)
[第一作者] 王悦尧, 博士, 从事方剂效用及其物质基础研究, Tel:0351-2272276, E-mail: wangyueyaos@126.com
[通讯作者] * 周然, 博士, 教授, 博士生导师, 从事方剂效用及其物质基础研究, Tel:0351-2272276, E-mail: zhour58@sohu.com

妊娠糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是妊娠期间发现或发病的以血糖升高为临床表现的一种代谢性疾病。已发现 GDM 妊娠者较正常妊娠者具有较高的血清 11 β -羟基类固醇脱氢酶 1(11 β -HSD1)水平。胎盘 11 β -HSD1 主要分布于蜕膜处绒毛膜的滋养层细胞及蜕膜细胞,11 β -HSD1 能将无活性的糖皮质激素代谢产物(可的松、脱氢皮质酮)转化为有活性的糖皮质激素(人体内主要为氢化可的松,啮齿类动物体内为皮质酮)^[1]。糖皮质激素可以诱导胰岛素抵抗(insulin resistance, IR),因此推测 GDM 的发病机制之一即胰岛素抵抗就可能与 11 β -HSD1 的水平升高有关。Koppw 等^[2]研究也发现,胎盘 11 β -HSD1 mRNA 的表达与 GDM 的关系十分密切。因此,降低胎盘组织 11 β -HSD1 mRNA 的表达成为改善 GDM 病理状态的一个途径。

糖尿病属于中医“消渴”的范畴,而妊娠糖尿病发生在妊娠这一特定时期,故可将其定义为“妊娠期消渴”。早在春秋战国时代,即已认识到先天禀赋不足,是引起消渴病的重要内在因素。《灵枢·五变》说:“五脏皆柔弱者,善病消瘴”,其中尤以阴虚体质最易罹患。许凯霞等^[3]研究发现补肾方左归丸可以通过影响肝脏胰岛素受体 mRNA 表达、瘦素受体 mRNA 表达及脂肪组织脂联素 mRNA 表达等与 IGT 发病有关的关键基因表达的来实现改善 IR 的作用。本研究通过建立 GDM 大鼠模型,并进行了干预,观察干预后大鼠的血糖、皮质酮、胰岛素及胎盘 11 β -HSD1 mRNA 的表达,旨在探讨在 GDM 发生过程中,左归丸对 GDM 大鼠胎盘 11 β -HSD1 mRNA 的表达影响与胰岛素抵抗发生的关系。

1 材料

1.1 动物 健康的生育期 SD 雌性大鼠(10 周龄,体重 220 ~ 260 g),雄性大鼠(12 周龄,体重 300 ~ 340 g),合格证号 SCXK(京)2009-0017,由中国食品药品检定研究院提供。12/12 h 明暗循环,自由饮食,温度 25 ℃、湿度 50% ~ 60% 条件下饲养,雌鼠每日生理盐水 *ig* 使其适应。

1.2 药物及试剂 左归丸(河南省宛西制药股份有限公司,批号 130510),诺和灵 R 笔芯(丹麦诺和诺德公司,国药准字 J20121010);链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号 040M1357),柠檬酸(C₆H₈O₇·H₂O)、柠檬酸钠(C₆H₅Na₃O₇·2H₂O)(天津市科密欧化学试剂公司),葡萄糖氧化酶法试剂盒(批号 1403282),大鼠胰岛素酶联免疫试剂盒(批号 1403211),皮质酮酶联免疫试剂盒(批号 1403221)

均购自上海西唐生物科技有限公司;Trizol 提取试剂盒(上海生工公司),引物由上海生工生物工程技术服务有限公司,RT-PCR 反应试剂盒(美国 ABI 公司)。

1.3 仪器 Accu-CHEK Active 罗氏乐康全活力型血糖测定仪(德国罗氏诊断有限公司),7900HT Fast 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),H6-1 型微型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂),YXJ-2 型离心机(湘仪离心机仪器有限公司),FR-980A 生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司),TU-1901 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

2 方法

2.1 造模及给药 适应性喂养 1 周后,禁食不禁水 12 h,剪尾取血测空腹血糖,血糖值 ≤ 6.1 mmol·L⁻¹ 作为纳入标准。以雌、雄比例 2:1 合笼过夜,次日晨雌鼠阴道涂片镜检见精子者,定为受孕。将孕鼠随机分 5 组,每组 10 只,即正常妊娠组(C)、妊娠糖尿病组(GDM)、胰岛素干预组(INS)、左归丸干预组(ZGW)、左归丸联合胰岛素干预组(F)。除正常妊娠组外,其余 4 组于受孕当日禁食 12 h 后,经 *ip* STZ 45 mg·kg⁻¹,特异性损伤胰岛 β 细胞,复制妊娠糖尿病模型。正常妊娠组 *ip* 柠檬酸缓冲液。于妊娠第 3 天测孕鼠血糖,若血糖值 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹,则建模成功。药物干预组孕鼠于妊娠第 3 天开始给药:左归丸按 10 g·kg⁻¹ 体重 *ig*,正常妊娠组和妊娠糖尿病组 *ig* 蒸馏水,1 日 1 次;胰岛素 20 U·kg⁻¹ *ih*,1 日 1 次。至孕 18 d。

2.2 取材与指标检测 于末次给药后禁食 12 h,将各组大鼠称重,处死大鼠,腹主动脉取血,分离血清;剥离出胎盘。采用酶联免疫吸附法按试剂盒说明书操作步骤测定孕鼠血糖、胰岛素、皮质酮。胰岛素抵抗指数 HOMA-RA = FBG $\times$ FINS/22.5,胰岛素敏感指数 ISI = ln[1/(FBG $\times$ FINS)]。

2.3 采用 RT-qPCR 技术 检测胎盘 11 β -HSD1 的 mRNA 表达水平,取胎盘组织 100 mg,用 Trizol 一步法提取总 RNA。逆转录反应以总 RNA 2 μ L 为模板,11 β -HSD1 和 β -肌动蛋白(β -actin)基因采用 OligodT 为逆转录引物,总反应体系为 10 μ L,37 ℃ 水浴 15 min,85 ℃ 水浴 5 s 合成 cDNA 链。PCR 反应以逆转录产物 2 μ L 为模板,引物序列见表 1,加入上游、下游引物各 1 μ L,总反应体系 25 μ L。PCR 扩增条件为 95 ℃ 变性 10 s,循环 1 次,95 ℃ 退火 5 s,60 ℃ 延伸 40 s,共循环 40 次。

表 1 11β-HSD1,β-actin 基因引物序列

Table1 Primers of 11β-HSD1,β-actin gene sequences		
基因类别	引物序列	扩增片段 /bp
β-actin	上游 5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3'	163
	下游 5'-AGCCACCAATCCACACAGAG-3'	
11β-HSD1	上游 5'-GCAGAGCGATTGTGTGTGAG-3'	123
	下游 5'-GCTTCTTCGCACAGAGTGGATA-3'	

2.4 PCR 产物定量分析 运用 Delta-delta Ct 法对目的基因进行相对定量分析。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,分析数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数比较应用单因素方差分析,该数据资料为完全随机设计资料,呈正态分布,经方差齐性分析后,两组之间的比较选择 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠妊娠前后血糖水平的影响 孕前 5 组大鼠血糖的差异无统计学意义;孕 3 d 后 GDM 组、左归丸干预组血糖水平均显著高于正常妊娠组 ($P < 0.01$),GDM 组与左归丸干预组的差异无统计学意义;孕 19 d 后 GDM 组血糖水平显著高于正常妊娠组 ($P < 0.01$),左归丸干预组血糖水平显著低于 GDM 组 ($P < 0.01$),但仍高于正常妊娠组 ($P < 0.01$);联合干预组和正常妊娠组没有差异。见表 2。

表 2 左归丸对 GDM 大鼠模型血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Zuogui Wan on level of FPG in GDM rats ($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	血糖值/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$		
		孕前	孕 3 d	孕 19 d
正常	6	4.61 ± 0.81	4.61 ± 0.87	6.13 ± 1.39
妊娠糖尿病	6	5.19 ± 0.82	20.11 ± 2.30 ²⁾	22.58 ± 3.28 ²⁾
胰岛素	5	4.97 ± 0.94	21.78 ± 3.07 ²⁾	10.26 ± 1.57 ^{2,4)}
左归丸	6	4.93 ± 0.77	19.25 ± 1.65 ²⁾	16.78 ± 2.68 ^{2,4)}
联合干预	6	5.02 ± 0.83	21.73 ± 3.23 ²⁾	8.70 ± 1.31 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与妊娠糖尿病组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;胰岛素剂量为 $20 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$,左归丸剂量为 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (表 3~4 同)。

3.2 对大鼠血清胰岛素的影响 妊娠糖尿病组与正常组比较,血清胰岛素显著升高 ($P < 0.01$);左归丸干预组和联合干预组血清胰岛素均显著低于妊娠糖尿病组 ($P < 0.01$),与正常妊娠组比较没有差异。妊娠糖尿病组胰岛素抵抗指数较正常组显著升高 ($P < 0.01$),3 个干预组胰岛素抵抗指数较妊娠糖

尿病组都降低,并且有显著性差异 ($P < 0.01$);联合干预组胰岛素抵抗指数较左归丸干预组和胰岛素干预组指数降低 ($P < 0.01$)。妊娠糖尿病组胰岛素敏感指数较正常对照组显著降低 ($P < 0.01$),3 个干预组胰岛素敏感指数较妊娠糖尿病组升高,有显著性差异 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 左归丸对 GDM 大鼠模型血清胰岛素的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of Zuogui Wan on level of serum insulin in GDM rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	空腹胰岛 / $\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}$	胰岛素抵抗指数 / $\text{mol} \cdot \text{U} \cdot \text{L}^{-2}$	胰岛素 敏感指数
正常	6	5.95 ± 2.86	1.81 ± 0.49	-3.67 ± 0.32
妊娠糖尿病	6	15.78 ± 2.52 ²⁾	15.68 ± 2.34 ²⁾	-5.85 ± 0.15 ²⁾
胰岛素	5	16.30 ± 2.56	7.36 ± 1.21 ⁴⁾	-5.09 ± 0.16 ⁴⁾
左归丸	6	8.61 ± 1.26 ⁴⁾	6.45 ± 1.55 ⁴⁾	-4.95 ± 0.24 ⁴⁾
联合干预	6	9.68 ± 3.39 ⁴⁾	3.32 ± 0.80 ⁴⁾	-4.29 ± 0.24 ⁴⁾

3.3 对大鼠血清皮质酮的影响 妊娠糖尿病组血清皮质酮浓度较正常组显著升高 ($P < 0.01$);胰岛素干预组皮质酮浓度较妊娠糖尿病组降低 ($P < 0.05$),但仍高于正常妊娠组 ($P < 0.01$);左归丸干预组皮质酮浓度较妊娠糖尿病组降低 ($P < 0.01$),但仍高于正常妊娠组 ($P < 0.05$);联合干预组皮质酮浓度较妊娠糖尿病组降低 ($P < 0.01$),且与正常组相比没有差异。见表 4。

表 4 左归丸对 GDM 大鼠模型血清皮质酮的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of Zuogui Wan on level of corticosterone in GDM rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	皮质酮/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	6	13.20 ± 3.84
妊娠糖尿病	6	78.03 ± 12.52 ²⁾
胰岛素	5	57.84 ± 17.19 ^{2,3)}
左归丸	6	38.03 ± 14.53 ^{1,4)}
联合干预	6	21.00 ± 8.87 ⁴⁾

3.4 对大鼠胎盘组织 11β-HSD1 mRNA 表达的影响 妊娠糖尿病组胎盘 11β-HSD1 mRNA 的表达水平显著高于正常妊娠组 ($P < 0.01$);胰岛素干预组 11β-HSD1 mRNA 的表达水平较妊娠糖尿病组降低,没有显著性差异;左归丸干预组和联合用药干预组 11β-HSD1 mRNA 的表达水平较妊娠糖尿病组降低 ($P < 0.01$),但仍高于正常妊娠组。见图 1。

4 讨论

实验结果显示,妊娠糖尿病组大鼠空腹血糖、胰岛素、胰岛素抵抗指数、皮质酮、11β-HSD1 mRNA 表达均显著高于正常妊娠大鼠,在进行分组药物干预

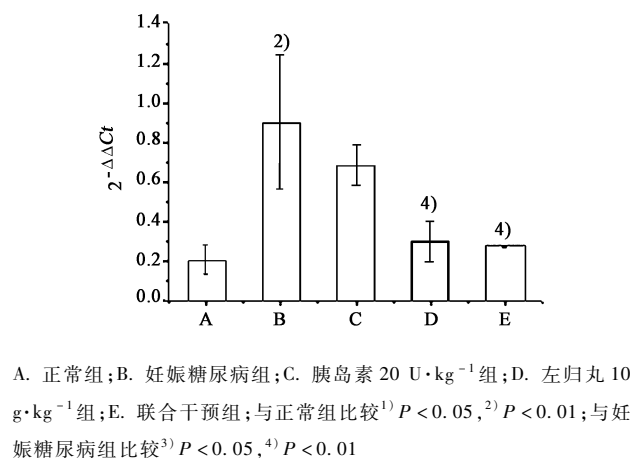


图 1 左归丸对 GDM 大鼠模型胎盘 11β-HSD1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Effects of Zuogui Wan on level of placental 11β-HSD1 mRNA in GDM rats ($\bar{x} \pm s$)

后,都有不同程度的下降。3 个干预组中,联合干预组效果最好,其在降低血糖、胰岛素和皮质酮方面与正常组没有差异,比单用胰岛素或左归丸效果显著。在 11β-HSD1 mRNA 表达定量方面,胰岛素干预组与 GDM 模型组没有差异,而左归丸干预组与联合干预组则明显低于 GDM 组,且与正常妊娠组没有差异,推测在胰岛素的基础上加用左归丸可以明显下调 11β-HSD1 mRNA 表达。11β-HSD1 作为糖皮质激素代谢过程中的一种活性酶,其活性的高低与血中糖皮质激素的浓度呈正相关。本实验结果显示,在左归丸干预后,胎盘 11β-HSD1 mRNA 表达下调,血中糖皮质激素浓度下降,胰岛素抵抗的程度减轻,血糖得到改善,推测左归丸对 11β-HSD1 的影响可能是改善 GDM 胰岛素抵抗的机制之一。

GDM 是孕期常见的并发症之一,其确切发病机制尚未完全清楚,但公认妊娠期有生理适应性改变的 IR 状态存在,而在 GDM 时 IR 状态加重。以往认为,妊娠期发生的 IR 与胎盘分泌大量拮抗胰岛素的激素有关,如胎盘催乳素、胎盘生长激素、雌激素、孕激素等^[4]。近年许多研究者将目光集中在几个新的潜在的 IR 候选因子上,其中 11β-HSD1 是研究的热点。11β-HSD1 主要分布于胎盘蜕膜处的绒毛膜滋养层细胞和蜕膜细胞,绒毛小叶滋养细胞层亦有散在分布,前者部位表达主要可能参与分娩发动的胎膜破裂,后者部位主要参与局部糖皮质激素的调控。

研究表明 11β-HSD1 的过表达能导致胰岛素抵抗、肥胖和高血压^[5]。在对 GDM 孕妇的研究中也发现胎盘 11β-HSD1 mRNA 表达明显升高,且与 IR 程度呈正相关^[6]。11β-HSD1 表达升高的小鼠更易

得发生 2 型糖尿病和心血管疾病。基因敲除的小鼠,即使给予高脂饮食亦不会形成胰岛素抵抗、内脏脂肪沉积等代谢异常综合征^[7]。最新研究表明,在单纯二甲双胍干预的 2 型糖尿病患者中,同时给予 11β-HSD1 抑制剂干预后,能够明显改善患者的空腹血糖,糖化血红蛋白,高脂血症及高甘油三酯血症等症状^[8]。目前 11β-HSD1 有效抑制剂和其作用机制是研究糖尿病的干预热点,GDM 与 2 型糖尿病有着相似的病理基础,即胰岛素抵抗在发病过程中起主要作用,关于 2 型糖尿病的干预的新靶点,可为妊娠期糖尿病的干预可提供新的方向。

综上所述,左归丸可以降低 GDM 大鼠的血糖、胰岛素和皮质酮,有明显的改善胰岛素抵抗的作用,推测左归丸可能是通过下调胎盘 11β-HSD1 mRNA 的表达水平来起作用的。由此可见,11β-HSD1 可作为 GDM 的监测指标来估计 IR 的程度及衡量干预效果,且可作为研究抗糖尿病药物的新靶点。

[参考文献]

[1] Bujalska J, Draper N, Michailidou Z, et al. Hexose-6-phosphate dehydrogenase confers oxo-reductase activity upon 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 [J]. J Mol Endocrinol, 2005, 34 (3) : 675-684.

[2] Koppw. Role of High-insulinogenic nutrition in the etiology of gestational diabetes mellitus [J]. Med Hypotheses, 2005, 64 (1) : 101-103.

[3] 许凯霞,王永辉,杨向竹,等. 补肾方剂对子代小鼠非特异性免疫功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (9) : 161-164.

[4] 塔娜,李佳,魏波,等. 共轭亚油酸对妊娠糖尿病大鼠胎盘脂联素基因表达影响的研究 [J]. 现代妇产科进展, 2010, 19 (5) : 339-342.

[5] Munoz R, Carvajal C, Escalona A, et al. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is over expressed in subcutaneous adipose tissue of morbidly obese patients [J]. Obes Surg, 2009, 19 (6) : 764-770.

[6] Catalano P M, Hoegh M, Minjum J, et al. Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism [J]. Diabetologia, 2006, 49 (7) : 1677-1685.

[7] Liu Y J, Nakagawa Y, Wang Y, et al. Increased glucocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type1 expression in hepatocytes may contribute to the phenotype of type2 diabetes in db/db mice [J]. Diabetes, 2005, 54 (1) : 32-40.

[8] Hollis G, Huber R. 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition in type 2 diabetes mellitus [J]. Diabetes Obes Metab, 2011, 13 (1) : 1-6.

[责任编辑 周冰冰]