

亦有作用^[8]。笔者从苦瓜果肉中提取的苦瓜素为水溶性蛋白质,体外实验显示出良好的抗 CVB₃ 效果^[2]。本实验结果显示,苦瓜素可明显降低 CVB₃ 感染小鼠的死亡率,提高其生存率,减轻心肌组织的病变程度,并且通过抑制 CVB₃ RNA 复制,在病毒复制的分子水平具有明显的抗病毒作用,使急性期心肌组织病毒滴度明显降低。苦瓜素组血清肌钙蛋白-T 明显低于模型组,表明苦瓜素治疗组小鼠心肌损伤程度明显减轻。结果提示苦瓜素可能成为一种有效的抗 CVB₃ 感染的药物,对 BALB/C 小鼠 CVB₃ 心肌炎具有肯定的抗病毒及保护心肌的作用,但其抗病毒的具体机制是直接抑制 CVB₃ 病毒复制,还是通过增强机体的免疫功能而起抗病毒作用,有待进一步研究。

References:

[1] NG T B, Chang W Y, Yeung H W. Proteins with abortifacient, ribosome inactivation, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from Cucurbitacea plants [J]. *Gen*

Pharmacol, 1992, 23: 579-584.

- [2] Li S J, Zhang B L, Den H, *et al.* The study of anti-coxsackieviral B₃ infection in HaLa with momordicin *in vitro* [J]. *Bull Hunan Med Univ* (湖南医科大学学报), 1999, 6(24): 246-247.
- [3] Li S J, Den H, Wang Z, *et al.* The establish of method for detection of coxsackievirus B₃ RNA by quantitative differential reverse transcription and polymerase chain reaction [J]. *J Hengyang Med Coll—Health Sciences* (衡阳医学院学报·医学版), 2000, 28(2): 128-130.
- [4] Rezkalla S, Kloner R A, Khatib G, *et al.* Beneficial effects of captopril in acute coxsackievirus B₃ murine myocarditis [J]. *Circulation*, 1990, 81: 1039-1040.
- [5] Liu P P, Mason J W. Advances in the understanding of myocarditis [J]. *Circulation*, 2001, 104: 1076-1082.
- [6] Lee H S, Huang P L, Nara P L, *et al.* MAP₃₀: A new inhibitor of HIV-1 infection and replication [J]. *FEBS Lett*, 1990, 272: 12-16.
- [7] Lee H S, Huang P Z, Huang P L, *et al.* Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type I by anti-HIV plant proteins MAP₃₀ and GAP₃₁ [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 8818-8822.
- [8] Bourinbaier A S, Lee S. The activity of plant-derived antiretroviral proteins MAP₃₀ and GAP₃₁ against herpes simplex viral infection *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 219: 923-927.

糖肾平对糖尿病小鼠基因表达的调控作用

任敏¹, 王兴², 徐思², 郝晓锋¹

(1. 康弘药业集团·成都法玛基因科技有限公司, 四川 成都 610036; 2. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

中药药理研究是目前中药现代化研究的瓶颈之一。由于中药是群体化合物,相对西药复杂化,具有多效性、多途径、多靶点的特点,对其中不同成分功能效果的解读是一个极其浩大的工程,利用目前的研究手段无法解决这一问题。基因芯片具有高通量,同时检测成千上万个基因表达的水平,将其运用于中药药理的研究日益得到关注,本实验即利用该技术探讨中药糖肾平对糖尿病小鼠肝脏和肾脏两个重要代谢器官基因表达水平的调控情况及相关信息研究。

1 材料

1.1 动物:清洁级 C57BL/6J 小鼠,四周龄,雄性(北京大学医学实验中心提供),30 只,单笼喂养,室温 18℃~25℃,相对湿度 50%~80%,自由摄食饮水,普通饲料,造模用高脂高糖饲料(美国 CH-IRON)提供。

1.2 药品与试剂:糖肾平胶囊(主要由大黄、水蛭、女贞子等组成,成都康弘制药有限公司生产,批号

031106)。水饱和苯酚(美国 Sigma)。8-羟基喹啉、1,4-二硫苏糖醇(上海生工试剂厂)。cDNA Synthesis System (Roche) 转录试剂盒(美国 Ambion 公司)。Biotin-14-CTP(美国 life technology 公司)。M03 基因芯片(美国 Mergen 公司)。

1.3 仪器:血糖仪与血糖试纸(美国惠好公司),MICRO-4 型杂交仪(英国 HYBAID 公司),418T 型芯片扫描仪(美国 AFFYMETRIX 公司)。

2 方法

2.1 I 型糖尿病动物模型的建立:将 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组,每组 10 只,正常对照组给予正常饲料,模型组给予高脂高糖饲料,药物组给予高脂高糖饲料及糖肾平。动物实验开始初采尾静脉血测定血糖,各组用相应饲料喂养 12 周,禁食 12 h 后采尾静脉血测定血糖,根据以往实验的结果,药物组加糖肾平浸膏粉 0.8 g/kg(人日剂量的 20 倍),ig 给药,每日 1 次,给药 15 d,末次用药后,3 组动物按相

收稿日期:2004-02-17

作者简介:任敏(1963—),女,副研究员,分子免疫专业,目前主要从事功能基因以及药理生物信息学的研究。

同方法取血测血糖。

2.2 靶组织采集:将各组动物的肝脏和肾脏分离后迅速投入到液氮中,后转移至 -80 ℃ 保存备用。

2.3 探针制备:各组靶组织等量混匀后用常规方法获得总 RNA,通过逆转录得到 cDNA,进而体外转录获得 CY3 标记的 RNA 探针。

2.4 芯片杂交:每种组织取等量探针与小鼠基因芯片杂交,32 ℃ 过夜后分别用 1×SSC、0.2×SSC、0.1×SSC 清洗 3 次,每次 20 min,快速吹干后扫描。

2.5 数据分析:用 IMAGE N 软件处理数据,背景值设为 100,表达值低于 100 为无效值,表达值减去背景值为有效表达值或表达丰度;将同一种基因在正常组的表达丰度与模型组的表达丰度的比值以及正常组的表达丰度与治疗组的表达丰度的比值进行丰度分析。

3 结果

3.1 造模与治疗前后血糖的变化:正常小鼠血糖平均值在 7 mmol/L 以下,血糖在 11.1 mol/L 以上表示造模成功,各组血糖值结果见表 1。

3.2 肝脏、肾脏组织总 RNA 与探针:肝脏与肾脏

组织得到 28 S 和 5 S 两个明显条带的总 RNA (图 1-A),表明肝脏和肾脏组织 RNA 未降解,质量好,用于标记的探针成弥漫状,主要集中于 0.5~2 kb 之间 (图 1-B)。

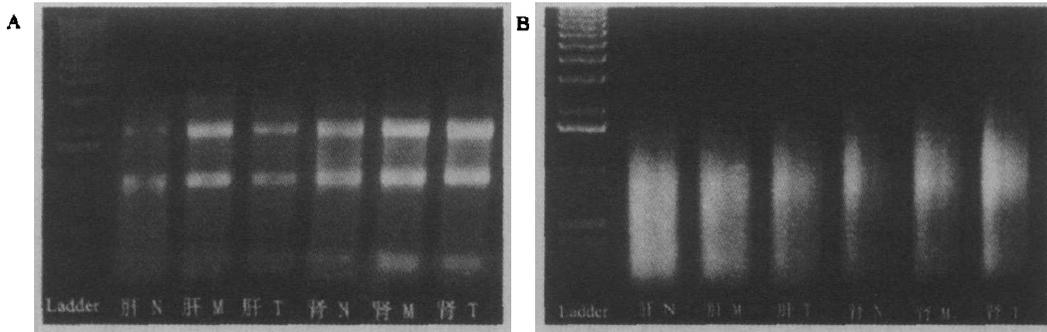
3.3 杂交数据:探针与 M03 芯片杂交后,得到正常、模型和糖肾平治疗后的基因表达谱。正常组与模型组基因表达丰度差异在 2 倍以上者肝组织有 339 个,肾组织有 187 个;其中经药物治疗后能有效调控或逆转即表达丰度与正常比值接近 1±0.2 的为药理作用的相关靶基因,在肝组织中得到 36 个基因,肾组织中中得到 32 个基因,见表 2 和表 3。

表 1 糖肾平对糖尿病小鼠血糖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 1 Effect of Tangshenping on blood glucose of diabetes mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /(g·kg ⁻¹)	血糖水平/(mmol·L ⁻¹)		
		造模前	造模后	给药后
正常	—	3.1±1.0	4.3±1.1	4.1±1.5
模型	—	3.6±1.3	22.7±5.3**	25.0±5.2**
糖肾平	0.8	2.7±0.8	24.8±5.5**	16.4±8.7**△

与正常组比较: **P<0.01; 与模型组比较: △P<0.01

**P<0.01 vs normal group; △P<0.01 vs model group



N-正常组 M-模型组 T-糖肾平组
N-normal group M-model group T-Tangshenping group

图 1 肝和肾组织总 RNA (A) 和探针 (B) 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis pattern of total RNA of liver and kidney (A) and probe (B)

表 2 糖肾平对肝组织相关靶基因的调控作用

Table 2 Regulation of Tangshenping on relative target gene in liver tissue

基因编号	基因名称	表达丰度			丰度分析	
		正常组 (N)	模型组 (M)	治疗组 (T)	±(N·M)	±(N·T)
Mm. 4349	carboxyl ester lipase	20 896.04	7 091.75	17 562.60	-2.95	-1.19
Mm. 6559	asialoglycoprotein receptor 1	22 485.16	11 136.86	18 919.52	-2.02	-1.19
Mn. 18516	H3 histone, family 3B zinc finger protein PZF (Pzf) mRNA	4 108.01	8 347.56	3 485.29	2.03	-1.18
Mm. 22066	complete cds	148.94	57.78	128.97	-2.58	-1.15
Mm. 21071	ADP-ribosylation-like 2	279.88	570.07	251.61	2.04	-1.11
Mm. 3328	myosin light chain, alkali, nonmuscle	1 477.97	627.95	1 338.42	-2.35	-1.10
Mm. 20878	Widely-interspaced zinc finger motifs	305.91	698.57	277.59	2.28	-1.10
Mm. 22173	Selectin, platelet (p-selectin) ligand	545.45	1 200.94	496.27	2.20	-1.10
Mm. 2146	ancient ubiquitous protein	812.99	385.61	747.88	-2.11	-1.09
Mm. 21092	butyrate-induced transcript 1	3 337.11	1 449.01	3 092.50	-2.30	-1.08
Mm. 34216	Unc-51 like kinase 1 (C. elegans)	1 296.77	2 594.94	1 203.75	2.00	-1.08
Mm. 18203	embryonic ectoderm development	277.34	124.67	262.03	-2.22	-1.06
Mm. 28705	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 5	364.90	179.01	344.81	-2.04	-1.06
Mm. 6590	sulfotransferase-related protein SULT-X2	646.52	165.43	615.38	-3.91	-1.05

续表 2

基因编号	基因名称	表达丰度			丰度分析	
		正常组 (N)	模型组 (M)	治疗组 (T)	±(N : M)	±(N : T)
Mm. 1276	retinal S-antigen APT-binding cassette, sub-family C	119.53	240.54	115.33	2.01	-1.04
Mm. 41002	(CFTR/MRP), member 6 tumor-suppressing subchromosomal	171.83	911.00	166.37	5.30	-1.03
Mm. 23697	transferable fragment 3	319.12	1 250.05	310.89	3.92	-1.03
Mm. 30357	ferritin light chain 2	23 547.89	8 447.18	22 969.41	-2.79	-1.03
Mm. 4956	fibroblast growth factor 4 UDP-Gal: betaGlcNAc beta	76.86	161.42	75.16	2.10	-1.02
Mm. 6628	1,4-galactosyltransferase, polypeptide 3 brain and reproductive organ-expressed	1 264.78	629.10	1 239.45	-2.01	-1.02
Mm. 22543	protein (Bre) mRNA, complete cds	233.60	514.85	229.92	2.20	-1.02
Mm. 196253	Ubiquitin specific protease 16	218.98	107.32	218.00	-2.04	-1.00
Mm. 182628	RAD21 homolog (S. pombe)	704.91	225.68	713.37	-3.12	1.01
Mm. 4236	B-cell receptor-associated protein 29	324.78	150.25	337.96	-2.16	1.04
Mm. 143166	Ngg1 interacting factor 3-like 1 (S. pombe)	208.59	446.24	219.52	2.14	1.05
Mm. 38313	RIKEN cDNA 1810036E22 gene	147.39	296.47	156.79	2.01	1.06
Mm. 2464	Hypothetical protein, MNCb-3350 Hermansky-Pudlak syndrome 4 homolog	201.99	95.84	216.17	-2.11	1.07
Mm. 4052	(human)	207.50	427.34	222.86	2.06	1.07
Mm. 22660	RAB18, member RAS oncogene family	277.30	86.39	306.49	-3.21	1.11
Mm. 856	transmembrane 4 superfamily member 1	377.04	181.33	417.35	-2.08	1.11
Mm. 20934	homeodomain interacting protein kinase 2	3 452.72	1 092.11	3 936.23	-3.16	1.14
Mm. 31325	growth differentiation factor 15	460.86	990.14	538.99	2.15	1.17
Mm. 42578	Ribosomal protein L13//Dilution 1 : 5	13 733.71	27 908.35	16 098.55	2.03	1.17
Mm. 20190	phospholipase A2, group 1B, pancreas	602.58	253.05	719.05	-2.38	1.19
Mm. 34407	MAD homolog 7 (Drosophila)	587.18	194.22	703.65	-3.02	1.20
Mm. 28123	Fas-activated serine/threonine kinase	104.55	231.59	125.97	2.22	1.20

表 3 糖肾平对肾组织相关靶基因的调控作用

Table 3 Regulation of Tangshenping on relative target gene in kidney tissue

基因编号	基因名称	表达丰度			丰度分析	
		正常组 (N)	模型组 (M)	治疗组 (T)	±(N : M)	±(N : T)
Mm. 42767	Ribosomal protein S17 src homology 2 domain-containing	15 750.62	6 018.13	13 318.76	-2.62	-1.18
Mm. 20908	transforming protein D	976.24	475.69	838.39	-2.05	-1.16
Mm. 2952	flap structure specific endonuclease 1 solute carrier family 10 (sodium/bile acid	540.63	260.20	465.12	-2.08	-1.16
Mm. 104295	cotransporter family), member 1	117.68	240.20	102.33	2.04	-1.15
Mm. 2253	kallikrein 3, plasma Guanine nucleotide binding protein, beta 2,	69.40	209.31	60.56	3.02	-1.15
Mm. 5305	related sequence 1	1 924.73	884.57	1 703.58	-2.18	-1.13
Mm. 26879	RAD23b homolog (S. cerevisiae)	96.68	290.40	88.21	3.00	-1.10
Mm. 10717	huntingtin-associated protein 1	287.17	117.80	263.22	-2.44	-1.09
Mm. 4608	Plasmacytoma variant translocation 1	111.10	247.31	102.29	2.23	-1.09
Mm. 153783	pantophysin Immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain	4 475.35	1 957.80	4 263.47	-2.29	-1.05
Mm. 218842	of IgM)	503.49	1 598.28	482.57	3.17	-1.04
Mm. 38756	p300/CBP-associated factor	117.80	434.26	114.90	3.69	-1.03
Mm. 40511	DAL1P	2 412.53	1 091.08	2 428.74	-2.21	1.01
Mm. 2840	G-protein coupled receptor 25	90.23	357.36	91.44	3.96	1.01
Mm. 27822	apolipoprotein B editing complex 2 C-type (calcium dependent, carbohydrate	100.95	205.04	102.51	2.03	1.02
Mm. 47384	recognition domain) lectin, superfamily					
Mm. 47384	member 6	187.54	81.23	192.08	-2.31	1.02
Mm. 103736	odorant receptor S46 gene coactivator-associated arginine	1 972.83	761.41	2 027.38	-2.59	1.03
Mm. 41705	methyltransferase 1	2 967.82	1 165.62	3 061.05	-2.55	1.03
Mm. 29404	Ste-20 related kinase cortical thymocyte receptor (X. laevis CTX)	125.93	252.34	132.23	2.00	1.05
Mm. 143757	like Williams-Beuren syndrome chromosome	110.70	343.97	116.49	3.11	1.05
Mm. 34213	region 14 homolog (human)	5 147.04	1 833.68	5 448.55	-2.81	1.06
Mm. 75467	calcitonin receptor-like	223.11	61.43	238.31	-3.63	1.07
Mm. 116721	calcium binding protein, 140 kDa	512.43	1 025.32	550.90	2.00	1.08
Mm. 27208	Expressed sequence AU022428 CASP2 and RIPK1 domain containing	128.73	344.04	138.72	2.67	1.08
Mm. 17493	adaptor with death domain	612.43	295.30	676.95	-2.07	1.11
Mm. 17980	Heme oxygenase (decycling) 1	4 240.16	10 873.64	4 735.36	2.56	1.12
Mm. 3459	D site albumin promoter binding protein	1 658.09	823.53	1 855.11	-2.01	1.12
Mm. 57219	natriuretic peptide receptor 3 neuroblastoma, suppression of	43.19	138.92	49.54	3.22	1.15
Mm. 9404	tumorigenicity 1 platelet-activating factor acetylhydrolase,	187.49	418.65	216.49	2.23	1.15
Mm. 24199	isoform 1b, alpha2 subunit viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)	76.50	156.26	90.65	2.04	1.18
Mm. 103806	induced gene 1	191.02	617.24	226.60	3.23	1.19

4 讨论

糖尿病的病因至今不明,Ⅱ型糖尿病的发病与遗传、饮食、环境等综合因素有关,与内分泌、免疫等功能失调有重要关系。C57BL/6J 小鼠是一种有向心性肥胖和Ⅱ型糖尿病基因倾向的近交系动物,通过长期给予高脂高糖饲料可诱导出Ⅱ型糖尿病模型,与人类的发病机制相似^[1]。肝脏和肾脏是重要的糖代谢器官,同时也具有内分泌免疫调节功能,如正常肾组织表达某些细胞因子,如白细胞介素-6(IL-6)、转化生长因子-β(TGF-β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α),他们即分泌细胞因子,又是细胞因子的靶器官,进入血液可引起全身性效应,几乎所有器官和组织均可作为其生物作用的靶点,各细胞因子相互制约、相互调节,形成一个网络,共同参与生命活动。

本实验所用芯片包括 9 300 个基因位点,与正常组比较,模型组肝脏基因丰度值升高或下调 2 倍以上的基因有 339 个,肾脏组织基因有 187 个,可见众多的基因参与了Ⅱ型糖尿病的发病,是一个多途径、综合因素导致的疾病。经过糖肾平治疗后有变化的基因部分恢复到正常小鼠的水平,从表 2 和表 3 中发现有很多基因与代谢有关,其中基本恢复到正常表达水平的基因多与免疫反应的因子或细胞有关,如肝组织的 B 细胞受体相关蛋白、转运片段等,肾组织的 G 蛋白折叠受体、免疫球蛋白重链等,说明Ⅱ型糖尿病的发病与免疫系统的失调有很大的关系。糖肾平可能通过对免疫系统的多途径调控从而

较好地控制血糖,另外,本实验对用药后基因谱的分析还发现,经糖肾平有效逆转的基因多为膜上受体,尤其与能量代谢的受体有关,如钙离子结合蛋白、转铁蛋白、激酶等。糖肾平作为中药复方制剂,成分十分复杂,本实验从基因水平观察到其作用的发挥是多途径,多靶点。同时与前期工作比较还观察到不同的器官基因表达谱的变化有明显不同^[2],可能与器官的特异性及药物对不同器官作用靶向不同有关,由于基因芯片数据量浩大,怎样对其进行归类整理,分析基因变化之间的关联关系,找出关键作用点,仍是目前面临的巨大挑战。也许经过大量的实验,积累相当的数据后,借助计算机这一强大的现代工具,寻找规律性的变化,可以帮助科研工作者发现疾病的致病基因,同时也为筛选新药创造一条崭新的途径^[3,4]。

References:

- [1] Surwit R S, Kuhn C M, Cochran C. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice [J]. *Diabetes*, 1988, 37: 1163.
- [2] Li P H, Wang X, Yan Z Y, et al. The effects of Tangshenping Capsules on the gene expression of diabetic mice [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 2003, 18(4): 253-255.
- [3] Schulte J H, Schramm A, Pressel T. et al. Microarray-analysis: a new approach to study the molecular mechanisms of thermo-chemotherapy [J]. *Klin Padiatr*, 2003, 215(6): 298-302.
- [4] Wang Z, Du Q, Wang F. Microarray analysis of gene expression on herbal glycoside recipes improving deficient ability of spatial learning memory in ischemic mice [J]. *J Neurochem*, 2004, 88(6):1406-1415.

《中国药房》杂志 2005 年征订启事

《中国药房》杂志是中华人民共和国卫生部主管,中华医院管理学会和中国药房杂志社主办的国家级、国内外公开发行的药学综合性刊物。主要设有改革与探索、药业专论、市场经纬、实验研究、药房管理、医院制剂、药物经济学、用药分析、临床药学、药理与临床、药品检验、不良反应监测、综述讲座、药师之友、中药视窗、业界风采、药品荟萃、OTC 在线、OTC 讲座等栏目。

《中国药房》杂志系“全国中文核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊”、“中国期刊全文数据库收录期刊”、“《国际药学术摘》(IPA)收录期刊”、“中国期刊方阵双效期刊”。

《中国药房》杂志自 2005 年元月起由月刊改为半月刊,版面由 A4 开本每期 64 页扩版为 80 页,每月中旬、月底出版。每期定价 7.00 元,全年 168 元。邮发代号:78-33。欢迎广大读者到当地邮局订阅,若因故漏订,请直接汇款至本刊发行部补订。

地址:重庆市渝中区大坪正街 129 号四环大厦 8 层 邮编:400042

电话:(023) 68583926 68586827 传真:(023) 68588817 68586827

E-mail: info@china-pharmacy.com.cn