

实验研究

渴痹康对糖尿病大鼠脊髓水平降钙素基因
相关肽含量变化的影响陈丁生¹ 文琛² 朱丽霞² 蒋瑾² 逯波² 王昕²

摘要 为了观测糖尿病大鼠脊髓水平降钙素基因相关肽(CGRP)含量的变化及渴痹康的疗效,用免疫组织化学方法结合图像分析。结果(1)造模 3 个月的糖尿病组(DM 组)脊髓背角浅层 CGRP 的相对含量较正常组(ND 组)明显下降($P<0.001$),经渴痹康治疗后 CGRP 含量明显高于 DM 组($P<0.001$)。造模 6 个月时 CGRP 含量与造模 3 个月相似。(2)造模 3 个月的 DM 组与 ND 组相比,脊髓腹角 CGRP 阳性运动神经元所占百分比显著减少,强度明显减弱($P<0.001$)。经渴痹康治疗后,CGRP 阳性运动神经元所占百分比与正常大鼠相似($P<0.05$),但强度减弱($P<0.01$)。说明糖尿病大鼠脊髓背角浅层及腹角 CGRP 含量均下降,渴痹康治疗对这种变化具有一定的防治作用。

关键词 糖尿病/代谢 降钙素基因相关肽/代谢 @ 渴痹康

降钙素基因相关肽(CGRP)是一个含有 37 个氨基酸的神经肽,为神经系统内最丰富的神经肽之一,它广泛分布于中枢和外周神经系统。在中枢,它分布于与感觉有关的很多脑区;在外周,感觉和运动神经都存在含 CGRP 的神经纤维;在植物神经系统,CGRP 存在于交感和副交感节前神经纤维,以及各种非肾上腺素能非胆碱能的节后纤维,如此广泛的分布表明 CGRP 具有多种生理作用^[1,2]。CGRP 含量改变会使神经系统的功能发生异常,如胃肠道肽能神经 CGRP 含量的下降,可影响胃肠道的蠕动而表现胃轻瘫、便秘、腹泻等^[3]。

众多的文献表明用链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠坐骨神经神经肽(如 SP、CGRP)含量下降^[4~9],背根神经节(DRG)CGRP 的表达也下降,并认为这些改变可能导致疼痛性糖尿病神经病变,使外周炎症反应发生改变。我们已经观察到渴痹康治疗能延缓糖尿病大鼠痛敏症状的出现,对运动神经传导速度减慢也有较好的防治作用^[10]。渴痹康的治疗机理是什么?与改善 CGRP 含量有无关系?而且少见有关糖尿病大鼠脊髓

背角浅层伤害性初级感觉神经末梢及脊髓腹角 CGRP 含量变化的报道。为此我们采用免疫组织化学方法对糖尿病大鼠脊髓水平 CGRP 含量的变化及渴痹康的疗效进行了观察。

1 材料和方法

材料:链脲佐菌素(STZ)为美国 Sigma 公司产品;CGRP 抗血清为英国 Cambridge 公司产品;SP 试剂盒为美国 ZYMED 公司产品。

模型建立及分组:选用体重 150~200g,2 月龄的健康 Wistar 雄性大鼠,由中国中医研究院医学动物中心提供。大鼠在禁食 24 小时后按 60mg/kg 体重腹腔注射用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液新鲜配制的 2%链脲佐菌素溶液,1 周后测定血糖,凡血糖值 ≥ 16.7 mmol/L 者列为糖尿病研究鼠,然后根据血糖水平分糖尿病模型组(DM 组)和渴痹康治疗组(KBK 组)各 9 只。另设正常对照组(ND 组)8 只,大鼠饲养期间饮水及饲料不加限制。

治疗:KBK 组喂含 8%渴痹康的饲料,渴痹康由黄芪、丹参、生地黄等中药组成。

免疫组织化学 LSAB(链酶卵白素-生物素)技术:动物分别在造模后 3 个月和 6 个月用乌拉坦轻度麻醉,断头、用磨平的注射器针头推出脊髓迅速浸入新鲜配制的 4%多聚甲醛液中固定 24 小时(4℃),然后换入 15%的蔗糖溶液中 48 小时(4℃)。修块,留取腰膨大段,恒冷箱切片,片厚 20 μ m。参照 SP 试剂盒内说明书介绍的实验方法进行实验。

脊髓背角浅层 CGPP 含量变化的测定:用 MPV-TASPLUS 多功能图像分析仪(德国 Leitz 公司产品)进行图像分析,由中国科学院生物物理研究所协助测定。测量参数:框架面积为 1010.54 μ m²,测量物镜 16 $\times$,投影镜 10 $\times$,吸收波长为 550nm。测量方法:每个标本均分外、中、内 3 个部位,每个部位移动测量框架,随机取 5 个视野,测得值平均后打印均值。测量内容包括面积和吸光度。根据面积和吸光度计算出相对含量。

脊髓腹角 CGRP 阳性运动神经元含量变化的测

1 首都医科大学宣武医院老年病医疗研究中心,北京市宣武区长椿街 45 号(100053)

2 中国中医研究院针灸研究所

收稿日期:1999-12-01

表1 各组大鼠脊髓背角 CGRP 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数	外部	中部	内部	平均
ND	3月	5	69.73 $\pm$ 0.49	68.77 $\pm$ 1.21	72.57 $\pm$ 2.61	70.35 $\pm$ 1.29
	6月	3	65.80 $\pm$ 2.34	62.41 $\pm$ 1.42	72.19 $\pm$ 0.58	66.80 $\pm$ 1.22
DM	3月	6	45.40 $\pm$ 1.79*	45.40 $\pm$ 1.34*	44.45 $\pm$ 1.78*	45.08 $\pm$ 1.35*
	6月	3	38.72 $\pm$ 1.97*	38.72 $\pm$ 0.82*	31.99 $\pm$ 1.07*	36.48 $\pm$ 1.03*
KBK	3月	10	59.21 $\pm$ 1.07 $\Delta\Delta$	58.22 $\pm$ 0.94 $\Delta\Delta$	59.29 $\pm$ 1.09 $\Delta\Delta$	58.91 $\pm$ 0.93 $\Delta\Delta$
	6月	3	52.89 $\pm$ 0.66 Δ	51.37 $\pm$ 1.41 $\Delta\Delta$	57.61 $\pm$ 0.80 $\Delta\Delta$	53.95 $\pm$ 0.68 $\Delta\Delta$

与ND组同时时间比较,* $P<0.001$;与DM组同时时间比较, $\Delta P<0.01$, $\Delta\Delta P<0.001$

定:在光学显微镜下先计算 CGRP 阳性运动神经元数目,根据其强度差异分为弱阳性(+)和强阳性(++)两类;然后退片,行苏木精复染2分钟,计算同一视野(腹角IX层)所有从形态上判断属于运动神经元的数目;后者与前者之差即为 CGRP 阴性(-)运动神经元数目。

统计学处理:脊髓背角浅层 CGRP 相对含量的变化采用 t 检验,腹角 CGRP 含量的变化采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 造模后糖尿病大鼠脊髓背角 CGRP 的变化及渴痹康的疗效:造模3个月DM组大鼠脊髓背角I、II层CGRP的相对含量,从外部、中部、内部和整体水平看,与月龄匹配的ND组相比较均显著减少(P 均 <0.001);经渴痹康治疗后与DM组比较明显减轻(P 均 <0.001)。造模6个月时各组大鼠脊髓背角 CGRP 相对含量与3个月时比较差异无显著性(P 均 >0.05)。见表1。

2.2 造模后糖尿病大鼠脊髓腹角 CGRP 阳性运动神经元的变化及渴痹康的疗效:表2示,造模3个月的DM组大鼠脊髓腹角 CGRP 阳性运动神经元所占百分比显著减少,强度明显减弱,与月龄匹配的ND组相比差异有极显著(P 均 <0.01)。经渴痹康治疗后与ND组比较,阳性细胞所占百分比差异无显著性($P>0.05$),但强阳性细胞所占比例减少($P<0.01$)。

表2 大鼠脊髓腹角 CGRP 阳性运动神经元的变化

组别	动物数	细胞数	强阳性(%)	弱阳性(%)	阴性(%)
ND	5	262	37(14.12)	56(21.37)	169(64.51)
DM	6	326	7(2.15)	42(12.88)	277(84.97)
KBK	10	539	23(4.27)	188(34.88)	328(60.85)

3 讨论

本文的研究结果表明,3个月DM组脊髓背角浅层外部、中部、内部及整体平均水平 CGRP 含量较月龄匹配的ND组均明显下降,这与文献报道的糖尿病大鼠背根节(DRG) CGRP 的表达及合成均下降、坐骨神经 CGRP 的含量也下降是一致的^[4~9]。究其原因,一

与 CGRP 表达、合成、运输下降有关。糖尿病时,一方面由于多元醇旁路激活、山梨醇、果糖蓄积于神经内,导致神经水肿,神经局部缺血,氧供应不足,直接损伤 CGRP 的表达和/或运输^[6,7]。另一方面糖尿病营养代谢紊乱,周围组织神经生长因子(NGF)表达合成减少,又因轴索 NGF 运输障碍,使到达 DRG 的 NGF 减少, CGRP 信使 RNA(mRNA)下降, CGRP 合成减少^[5,11]。二与 CGRP 释放增加有关,我们的研究已证实糖尿病大鼠 DRG 神经元胞浆内钙离子水平较正常大鼠明显升高^[12],而神经细胞钙水平上升将促使神经递质/调质^[13]。

DM 组脊髓腹角 CGRP 阳性运动神经元所占比例及强度,较月龄匹配的ND组明显下降,这和我们在背角所观察到的结果相一致。有研究表明,肌肉切除早期引起运动神经元 CGRP 含量明显增加,但这种增加在运动神经元长期失去靶肌肉的营养后, CGRP 含量明显下降。糖尿病是一种以糖、脂肪、蛋白质代谢紊乱为特点的慢性消耗性疾病,长时间可使坐骨神经支配的靶组织发生营养不良,靶组织表达及合成 NGF 减少,另外糖尿病还可使轴索运输发生异常,使运动神经元从周围组织摄取 NGF 下降。由此导致糖尿病大鼠腹角运动神经元 CGRP 表达减少、含量下降。

渴痹康治疗可减轻DM大鼠脊髓水平 CGRP 含量的下降。究其原因,首先渴痹康是由益气养阴、活血通络补肾的药物所组成,具有改善微循环和血液流变,促进组织耐缺氧的能力,用其治疗能改善神经局部缺血缺氧,使神经肽的表达和/或运输趋于正常。其次,坐骨神经 CGRP 的表达及合成与多元醇旁路的激活密切相关,应用醛糖还原酶抑制剂——Imirestat 能减轻 CGRP 的缺损^[7],而渴痹康中的黄芪、丹参均被证明具有抑制醛糖还原酶活性的作用^[14],故渴痹康可能通过抑制多元醇旁路来促使 CGRP 的表达与合成。第三,我们的研究已证实渴痹康能完全抑制糖尿病大鼠 DRG 神经元胞浆内钙离子水平上升^[12],从而能减轻 CGRP 的释放。总之,渴痹康的作用机理可能是多方面的,它是否还通过其它机制产生效应有待进一步研究。

综上所述,DM 大鼠脊髓背角浅层 CGRP 含量、腹角 CGRP 阳性运动神经元比率及强度均减少,与坐骨神经 CGRP 含量的变化是一致的。渴痹康治疗能防治这种下降,详细机理有待进一步研究。

参考文献

- 1 Ishida — Yamamoto A, Tohyama M. Calcitonin Gene — Related peptide in the nervous tissue. *Prog Neurobiol*, 1989, 33(5 — 6): 335 — 386.
- 2 Poyner DR. Calcitonin gene — related peptide: multiple actions, multiple receptors. *Pharmacol Ther*, 1992, 56(1): 23 — 51.
- 3 Belai A, Burnstock G. Selective damage of intrinsic calcitonin gene — related peptide — like immunoreactive enteric nerve fibers in streptozotocin — induced diabetic rats. *Gastroenterology*, 1987, 92(3): 730 — 734.
- 4 Apfel SC, Arezzo JC, Brownlee M, et al. Nerve growth factor administration protects against experimental diabetic sensory neuropathy. *Brain Res*, 1994, 634(1): 7 — 12.
- 5 Fernyhough P, Diemel LT, Brewster WJ, et al. Deficits in sciatic nerve neuropeptide content coincide with a reduction in target tissue nerve growth factor messenger RNA in streptozotocin — diabetic rats; effects of insulin treatment. *Neuroscience*, 1994, 62(2): 337 — 344.
- 6 Brewster WJ, Diemel LT, Leach RM. Reduced sciatic nerve substance P and calcitonin gene — related peptide in rats with short — term diabetes or central hypoxaemia co — exist with normal

messenger RNA levels in the lumbar dorsal root ganglia. *Neuroscience*, 1994, 58(2): 323 — 330.

- 7 Diemel LT, Stevens EJ, Willars GB, et al. Depletion of substance P and calcitonin gene — related peptide in sciatic nerve of rats with experimental diabetes; effects of insulin and aldose reductase inhibition. *Neurosci. Lett*, 1992, 137(2): 253 — 256.
- 8 Diemel LT, Brewster WJ, Fernyhough P, et al. Expression of neuropeptides in experimental diabetes; effects of treatment with nerve growth factor or brain — derived neurotrophic factor. *Brain Res Mol Brain Res*, 1994, 21(1 — 2): 171 — 175.
- 9 Rittenhouse PA, Marchand JE, Chen J, et al. Streptozotocin — induced diabetes is associated with altered expression of peptide — encoding mRNAs in rat sensory neurons. *Peptides*, 1996, 17(6): 1017 — 1022.
- 10 陈丁生, 莫孝荣, 吉长福, 等. 渴痹康防治糖尿病性神经病变的实验研究. *中国医药学报*, 1997, 12(3): 29.
- 11 Hellweg R, Hartung HD. Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus; A possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J Neurosci Res*, 1990, 26(2): 258 — 267.
- 12 陈丁生, 田德全, 朱丽霞, 等. 电针治疗对糖尿病大鼠背根节神经元内钙的影响. *中国学术期刊文献*, 1999, 5(5): 647 — 648.
- 13 Smith SJ, Augustine GJ. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends Neurosci*, 1988, 11(10): 458 — 464.
- 14 张家庆, 周云平. 部分中药或其成分对大鼠晶体醛糖还原酶的抑制作用. *中国中药杂志*, 1989, 14(9): 45 — 47.

• 征 文 •

●“中国中医药学会内科脾胃病专业委员会第十三次学术交流会”定于 2001 年 9 月中旬在天津市举行, 参加会议交流者将授予继续教育学分, 现征文如下。

征文范围: 功能性胃肠疾病及脾胃病急症、胃食管返流性疾病、慢性浅表性胃炎、萎缩性胃炎、胆汁反流胃炎、消化性溃疡、慢性结肠炎、急性慢性肝炎、酒精性肝病、急性慢性胆囊炎、胆石症、急性慢性胰腺炎、肝硬化等疾病的古代文献整理、现代文献综述、中医理论探讨、名老中医经验报道、疑难病证临床经验总结、个人临床体会、临床研究和实验研究等。特别欢迎脾胃病急症的临床与实验研究方面的内容论文。论文要求以 2000 — 3000 字为宜, 请附个人简历及 200 字左右的论文内容摘要。征稿请于 2001 年 6 月底前寄至北京东城区美术馆后街 23 号、北京中医医院李乾乾、张声生收, 邮编: 100010。

●由中国中医药学会内科分会心病专业委员会主办的“第五届全国中医心病学术研讨会”将于 2001 年 10 月下旬在北京召开。大会主题: 提高中医诊治心病临床疗效, 现征文如下。

征文内容: 中医诊治心病的新思路、新方法、新技能; 诊治心病的临床研究、文献学研究、基础研究、实验研究、非药物疗法、诊治心病的不良反应的评估; 中医诊治心病的中成药的学术介绍。会议将邀请专家做特别演讲。来稿要求未公开发表过, 论文一式两份并写明作者姓名、性别、年龄、职务、职称、工作单位、地址、邮编、电话等, 论文经专家评审后, 将收入论文集并由正式出版社出版, 并统一颁发论文证书。请作者自留底稿。来稿请于 2001 年 8 月 30 日前寄至北京东直门内北新仓 18 号基础所韩学杰收, 邮编: 100700, 电话: (010) 64014411 — 2540。

●福建省中医药学会、泉州市中医药学会主办的“中国泉州 —— 东南亚中医药学术研究会(第六届)”拟定于 2001 年 10 月在泉州市安溪举行, 现征文如下。

征文内容: 新世纪中医药发展战略研讨以及中医药、中西医结合治疗的新思路、新进展; 老中医经验总结; 常见病、多发病的治疗新方法、新思路及特色医疗; 非药物疗法经验总结; 新药开发、科研思路研讨及成果介绍。征稿日期: 2001 年 6 月 30 日止。文稿务请加盖单位公章, 论文录用后, 优秀者推荐给正式出版物发表, 余者将汇编《福建中医药》2001 年增刊出版, 未录用者恕不退稿。参会代表由福建省中医药学会颁发论文证书, 并授予继续教育学分。来稿请寄至福建省泉州市中医院林永禧、庄丹红收, 邮编: 362000, 电话: (0595) 2204875, 传真: (0595) 2207117。

●为纪念《中国针灸》杂志创刊 20 周年, 由中国针灸学会、《中国针灸》杂志社拟于 2001 年 8 月举办“回顾与展望 —— 新世纪针灸发展趋势研讨会”, 现征文如下。

征文范围: 总结近百年来针灸学领域的各项研究成就的综述性文章; 回顾近百年来针灸发展的史料性文章; 名针灸家学术思想总结, 针灸刊物、针灸教育、针灸医院的发展历程, 近代乃至现代针灸发展大事记; 近百年来产生并发展的针灸治疗方法的总结, 如头针、耳针、眼针、鼻针、唇针、面针、腹针、背针、手针、腕踝针等; 总结和交流针灸治疗各科疾病的经验与方法; 交流与展示各种针灸医疗仪器的研制与临床应用。来稿以 1500 — 4000 字为宜。来稿须未公开发表, 文章加盖单位公章, 每份稿件需附寄审稿费 30 元。入选论文在《中国针灸》2001 年增刊发表, 其中优秀者将刊登在《中国针灸》2001 年第 8 期(纪念《中国针灸》杂志创刊 20 周年专刊)。参会者将由中国针灸学会和《中国针灸》杂志社共同颁发证书。论文入选且参加会议者, 将给予继续教育学分 8 — 12 分。征文截止日期 2001 年 4 月 31 日。会议时间: 2001 年 8 月 10 日 — 13 日, 会议地点: 山西省太原市或五台山(待定)。会议期间还将聘请著名针灸专家石学敏教授、陈汉平教授、杨长森教授进行专题讲座; 会后组织针灸特效疗法演示、新九针学习班等活动。具体内容可见会议通知, 函索即寄。联系地址: 北京东直门内北新仓 18 号、《中国针灸》编辑部, 邮编: 100700, 电话: 010- 64014411 转 2946, 传真: 010- 84014607, E-mail: webmaster@ciacupuncture.com。

●中国中医药学会拟定于 2001 年 9 月在河南省开封市召开“全国第五届专科病及特色疗法临床经验学术研讨会”, 现征文如下。

征文范围: 中西医专科病及特色疗法、民族特色医药的理论研究、实验研究、文献综述等; 21 世纪中医、中西医结合研究的方向、思路、突破点, 新病种的发现和诊疗经验; 专科专病的治疗经验总结、药物开发、新药运用、老药新用、古方新用、临床护理等经验总结; 当地名医名家临床经验、民间特色疗法、单方、验方总结; 绿色药物开发、食疗、茶饮防治研究的经验; 内病外治、针灸、理疗、贴敷等临床经验; 各种新疗法、新成果、新药物的临床验证, 推广应用等。征文要求: 文稿限 1000 字以内, 附 800 字摘要, 及 150 字个人小传。加盖公章, 不退稿。文稿务于 2001 年 8 月 15 日前寄河南省开封市第一中医院糖尿病医院韩建涛收, 电话: (0378) 2870044, 同时每篇文章寄 20 元评审费, 文章经专家评审录用后, 编入大会论文集《全国第五届专科病及特色医疗集萃》一书, 并邀请作者出席会议, 由中国中医药学会颁发论文证书和继续教育学分证书。