

实验研究

复方连竹胶囊对糖尿病大鼠微血管病变防治作用的实验研究

段文卓¹ 宫海民² 王家富³ 丁 怡¹ 刘同美¹ 王建英¹ 李曰庆⁴

摘要 目的:复制糖尿病(DM)大鼠模型,研究中药复方对 DM 大鼠微血管病变的影响及其作用机制,探讨防治 DM 并发症的有效途径。方法:采用组织培养、生化技术和放射免疫分析方法测定各指标。结果:(1)DM 组血糖、糖化血红蛋白(GHb)、尿蛋白、醛糖还原酶(AR)活性、丙二醛(MDA)含量和血管平滑肌细胞(VSMC)³H-TdR 掺入率均明显高于正常对照组($P < 0.05$);(2)DM 组血浆 NO₂⁻ 含量明显低于正常对照组($P < 0.05$);(3)中药治疗组以上各指标均较 DM 组有明显改善,除尿量、尿蛋白外,其余指标与正常对照组比较无显著性差异($P > 0.05$)。结论:该中药复方可明显减轻 DM 大鼠并发的微血管病变,对 DM 并发症有较好的治疗作用。

主题词 糖尿病/中医药疗法 糖尿病血管病/预防和控制
④ 复方连竹胶囊

糖尿病(DM)作为严重危害人们健康的常见病、多发病,尤其是作为老年人的易患疾病,严重降低了人们的生活质量,给社会带来极大负担,因此是目前医学界亟待解决的重要课题。糖尿病致死致残的主要原因是其严重的微血管病变并发症,表现为糖尿病肾病、糖尿病眼病和神经病变,在 I 型和 II 型 DM 患者中微血管并发症发病率分别达 30% 和 20%,是危害极大的医学难题。DM 并发微血管病变的发病机理尚未完全阐明,但近来的大量研究表明,DM 并发症的发生与高血糖、蛋白非酶糖基化、氧化应激损伤及多元醇通路激活等因素密切相关。本研究自拟了活血化瘀、补肾益气、软坚散结中药为主的中药复方连竹胶囊,观察该中药复方对 DM 大鼠微血管病变中肾脏及视网膜病变的影响及其作用机制,为进一步进入临床应用提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型的复制与分组:实验动物选用 8 周龄健

康雄性 Wistar 大鼠,体重 200~220g,由山东大学医学部实验动物中心提供。将大鼠适应性喂养 1 周,用 0.1mol/L 枸橼酸钠缓冲液(pH4.5)将链脲佐菌素(STZ, Sigma 产品)配成 0.45% 的溶液,按 50mg/kg 体重单次腹腔注射,72h 后取大鼠尾静脉血查空腹血糖(BG)值达 16.7mmol/L 者即被纳入实验组。共选择 20 只动物,随机分为中药治疗组和 DM 组,同时以体重、鼠龄相匹配的正常大鼠 10 只作为正常对照组。中药治疗组:将复方连竹胶囊配方的中药碾成粉末,按大鼠体表面积换算成等效剂量(21.6g/kg),与饲料混合喂饲大鼠 10 周,自由饮水。DM 组:用普通饲料喂饲大鼠 10 周,自由饮水。正常对照组:普通大鼠饲料喂饲 10 周。

1.2 取材:喂饲结束后将大鼠置于代谢笼内收集 24h 尿液。用 3% 戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔注射麻醉,左颈总动脉插管取血,分离血浆及血清。开胸摘取肾主动脉条,纵行切开,截成约 5mm 长的血管段,置于 20% DMEM 培养液中,37℃ 5%CO₂ 孵育 6h,留取组织培养液,置-20℃冻存备用。摘取肾脏、眼球固定于 10% 中性甲醛固定液中用于病理切片形态学观察。

1.3 测定指标:血浆醛糖还原酶(AR)活性测定参照 Vander、Chakrabarti^[1,2] 的方法,测定 AR 的辅酶—还原型辅酶 2(NADPH)的吸光度示 AR 活性。蛋白质测定采用改良 Lowry 法。

全血糖化血红蛋白(GHb)测定:采用微柱亲和层吸法。

血清脂质过氧化物——丙二醛(MDA)含量测定:测定脂质过氧化降解产物 MDA 含量,采用 721 分光光度计,按试剂盒说明测定血清中 MDA 值。

表 1 各组大鼠体重、血糖、24h 尿量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	血糖(mmol/L)	24h 尿量(ml)
DM 组	10	218.67±26.22*	24.64±7.94**	107.8±12.8*
中药治疗组	10	255.17±25.65△	10.87±5.97△△	69.0±19.2△*
正常对照组	10	253.67±25.12	9.62±4.97	18.5±4.8

与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 DM 组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

基金项目:山东省中医药管理局科研基金资助课题(96021)

1 潍坊医学院病理生理教研室,山东省潍坊市奎文区 29180 信箱(261042)

2 潍坊市市中医院内科

3 泰山医学院

4 北京中医药大学东直门医院

收稿日期:2001-11-14;修回日期:2002-04-02

表2 各组大鼠AR活性、GHb、MDA和尿蛋白含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	AR活性(u/g·Hb)	GHb(%)	MDA(nmol/ml)	尿蛋白(mg/24h)
DM组	10	3.87±2.22**	5.85±1.28**	4.68±0.17*	23.28±7.18**
中药治疗组	10	1.87±0.65△△	3.93±1.60△	2.66±1.96△	15.67±5.11△*
正常对照组	10	1.67±5.12	3.27±0.68	2.65±1.19	8.81±4.32

与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与DM组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

24h尿蛋白测定:采用考马斯亮兰法测定尿蛋白。

血浆NO含量:取血浆0.5ml,按Green^[3]等方法,用Greiss试剂测NO的代谢产物NO₂⁻含量,间接反映NO含量。

血管平滑肌细胞(VSMC)³H-TdR掺入率:取培养的第三代VSMC,以 2×10^4 /ml细胞接种于24孔板,24h后更换20%DMEM同步细胞12h。然后每孔注入20%DMEM800μl,再分别加入留取的中药治疗组、DM组及正常对照组的组织培养液各200μl/孔。设1ml 20%DMEM组织培养液为空白对照组,以上每组均为8孔。再加入³H-TdR 2uci/孔,继续孵育16h,收集细胞,以液闪仪测定各组VSMC的³H-TdR掺入率,间接反映VSMC内的DNA合成量。

形态学观察:将肾脏和眼球固定于10%中性甲醛溶液中24h后,丙酮脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制成5μm切片,分别进行HE染色和PAS染色,以观察肾脏及视网膜病理改变。

1.4 统计学处理:所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和Q检验统计方法。

2 结果

2.1 各组大鼠生化指标比较:复方连竹胶囊对DM大鼠体重、血糖、尿量均有影响。实验结果表明,中药治疗组大鼠体重明显高于DM组($P<0.05$),而血糖、尿量均明显低于DM组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),体重、血糖与对照组比较无显著性差异($P>0.05$)。见表1。

2.2 各组大鼠AR活性、GHb、MDA和尿蛋白含量比较:从实验结果可以看出,中药复方可明显降低DM大鼠的AR活性、GHb和MDA含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$),能显著改善肾脏功能,表现为尿蛋白含量明显降低($P<0.05$)。见表2。

2.3 各组大鼠血浆NO₂⁻含量和VSMC内³H-TdR掺入率比较:NO₂⁻为NO的代谢产物,反映NO的含量。³H-TdR掺入率反映VSMC中DNA合成速率,体现VSMC的增殖效应。中药治疗组血浆NO₂⁻含量明显高于DM组($P<0.05$),VSMC内³H-TdR掺入率明显低于DM组($P<0.05$),而与正常对照组比较无显著性差异($P>0.05$)。见表3。

2.4 形态学比较:观察显示DM组大鼠肾脏有弥漫

表3 各组大鼠NO₂含量和³H-TdR掺入率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NO ₂ ⁻ (μmol/L)	³ H-TdR掺入率(cpm)
DM组	10	2.08±0.21*	12729.8±1437.97*
中药治疗组	10	2.43±0.33△	11893.3±1387.25△
正常对照组	10	2.64±0.28	10909.6±1255.89

与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与DM组比较,△ $P<0.05$

性肾小球硬化、肾小球系膜区增宽、肾小球基底膜增厚及近端肾小管上皮细胞呈空泡变性等病理改变;视网膜毛细血管基底膜明显增厚,间质中有大量炎性细胞浸润,而中药治疗组大鼠肾脏和视网膜的病理改变均较DM组大鼠明显减轻。

3 讨论

结果表明,复方连竹胶囊能明显降低DM大鼠的血糖、GHb、MDA和AR活性,增加血浆NO含量、减少VSMC的增殖及明显降低尿蛋白含量,提示该中药复方对DM并发的肾脏和视网膜病变有较好的防治作用。本方由黄芪、黄连、玉竹、葛根、大黄、蜂胶等补气养阴、软坚散结、活血化瘀中药组成。经现代药理研究证实,黄芪、黄连、玉竹等均具有一定的降血糖、抑制AR活性和抗脂质过氧化作用,而大黄、葛根等可抑制蛋白非酶性糖化和肾小球系膜增殖^[4,5],因此对糖尿病并发微血管病变有一定的防治作用。

糖尿病并发症患者肾脏、视网膜在长期高血糖作用下体内超氧化物歧化酶(SOD)等抗氧化酶生成减少,造成体内氧自由基增多,其最终产物为MDA,MDA增多可致细胞膜的蛋白质、核酸、脂类发生交联,使细胞膜变性,细胞突变、死亡^[6]。该中药复方中黄芪、黄连等有抗脂质过氧化作用,因此能降低血清中MDA含量,具有使细胞免受损伤的保护作用。此外,蛋白质、核酸等大分子物质在高糖状态下可发生糖基化,早期可逆反应生成糖化血红蛋白,晚期不可逆反应生成糖基化终末产物,增多的糖化血红蛋白可改变易损组织结构,引起组织功能下降^[7]。该中药复方中大黄、葛根等能抑制蛋白非酶基糖化,因此能降低糖尿病大鼠的糖化血红蛋白含量,从而保护肾脏、视网膜的组织结构,使其维持正常功能。NO在体内有重要的生物学功能,一方面作为抗细胞增生因子,抑制细胞外基质

蛋白积聚,增加肾小球系膜细胞中金属蛋白酶活性,促进细胞外基质的分解^[8];另一方面作为内源性 VSMC 增殖抑制剂,抑制 VSMC 增殖。因此,当 NO 浓度下降时,VSMC 增生增加,表现为肾小球基底膜增厚、系膜基质增生,导致肾小球硬化。而中药治疗组大鼠血浆 NO 含量明显增高、VSMC 细胞内 DNA 合成量减少,说明该中药复方能通过增加 NO 含量,有效抑制血管 VSMC 增殖,从而明显改善肾脏和视网膜的结构损伤。已有大量研究表明,长期高血糖可激活细胞内多元醇代谢通路,造成细胞功能损伤。而 AR 是该通路的关键限速酶,是造成细胞渗透性损伤的重要因素^[9]。该中药复方中玉竹、黄芪等均具有一定的降血糖、抑制 AR 活性的作用,因此能有效降低血浆 AR 活性,对肾脏、视网膜的组织细胞有保护作用。

综上所述,可认为复方连竹胶囊能通过多种作用机制如降血糖、抗脂质过氧化、减少蛋白非酶性糖基化和抑制 AR 活性等发挥其药理作用,从而保护糖尿病并发症易发组织如肾脏和视网膜的组织细胞的结构和功能,使糖尿病并发微血管病变症状减轻。因此,我们认为该方剂值得进一步深入探讨,从而为防治糖尿病慢性并发症寻找有效的途径。

参考文献

1 Vander Jagt DL, Robinson B, Taylor KK, et al. Aldose reductase from

human skeletal and heart muscle. Interconvertible form related by thiol-disulfide exchange. J Biol Chem, 1990, 265(34): 20982-20987.

2 Chakrabarti S, Sima AA, Nakajima T, et al. Aldose reductase in the BB rat: isolation, immunological identification and localization in the retina and peripheral nerve. Diabetologia, 1987, 30(4): 244-251.

3 Green LC, Wagner DA, Glugowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem, 1982, 126(1): 131-138.

4 张家庆,周云平. 部分中药或其成分对大鼠 AR 的抑制作用. 中国中药杂志, 1989, 14(9): 45-47.

5 黄翠玲. 大黄对糖尿病大鼠肾组织非酶促糖基化的影响. 中国糖尿病杂志, 1996, 4(2): 103-106.

6 周向华,徐峰,李经才,等. 褪黑素、自由基与衰老. 国外医学老年医学分册, 1997, 18(5): 193-196.

7 Tomino Y, Wang LN, Fukui M, et al. Glomerular nonenzymatic glycosylation and lipid peroxide are increased in the early phase of streptozotocin-induced diabetic rats prior to major histopathologic alterations. Nephron, 1991, 59(4): 632-636.

8 Trachtman H, Del Pizzo R, Futterweit S, et al. Taurine attenuates renal disease in chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. Am J Physiol, 1992, 262(1 Pt 2): F117-123.

9 Kato N, Mizuno K, Matsubara A, et al. Effect of long-term treatment with a new aldose reductase inhibitor, (2S,4S)-6-fluoro-2',5'-dioxospiro-[chroman-4,4'-imidazolidine]-2-carboxamide (SNK-860), on peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. J Diabetes Complications, 1994, 8(1): 27-32.

出类拔萃 全凭实力

—— 规模 · 品质 · 价格 · 服务 ——

我们完全以实力取胜。
多的选择, 美廉的产品, 便捷的通路,
完善的服务, 尽在如此实力间。
选择东华,
得到更多!

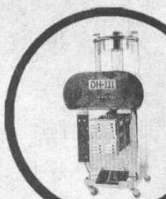
- ◆ 6大系列
- ◆ 25种型号任您选择
- ◆ 30个办事处遍布全国
- ◆ 100位维修工程师为您服务

● 诚征各省总代理 ●

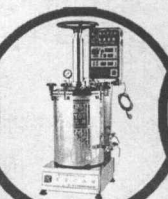
东华牌煎药机



DHL-ZY3
3+1 煎药包装组合机



DHL-III
分档可调包装机



DHL-D II 3
无压循环煎药机



DHL-C1
1+1 煎药包装一体机



DHL-C2
2+1 煎药包装一体机

医院药店 煎药首选



東華集團

北京东华原医疗设备有限公司 天津东华国际贸易有限公司 地址 北京市朝阳区安定路35号安华发展大厦630/628室 热线电话 (010)64423480 64436400 64418135 64418139

传真: 64423476 邮编: 100029 E-mail: trade@donghuagroup.com sales@donghuagroup.com 网址: www.donghuagroup.com

(广告编号, 200208-18)