

蜂贝化瘀胶囊对糖尿病微血管病变相关指标的影响

段文卓¹ 宫海民² 金光香¹ 李曰庆³

(1. 潍坊医学院病理生理教研室, 山东省潍坊市奎文区胜利街688号, 261042;

2. 山东省潍坊市中医院; 3. 北京中医药大学东直门医院)

[摘要] **目的** 观察蜂贝化瘀胶囊对2型糖尿病(DM)大鼠微血管病变的作用及机理。**方法** 将Wistar大鼠分为正常对照组、DM模型组、中药治疗组、中药对照组和西药对照组,测定各组大鼠血糖、血脂、脂质过氧化物、糖基化终末产物、醛糖还原酶(AR)及相关基因表达的变化。**结果** DM模型组大鼠血糖、甘油三酯、糖化血红蛋白、AR活性、丙二醛和T细胞凋亡率均明显上升,T细胞中Fas配体(FasL)、脂肪细胞中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)基因表达均明显增高,中药治疗组大鼠以上指标显著降低,与DM模型组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。**结论** 蜂贝化瘀胶囊能有效降低2型DM模型组大鼠的血糖、血脂、糖化血红蛋白、AR活性和丙二醛含量,减少相关基因表达和T细胞凋亡率,对2型DM微血管病变有较好的治疗作用。

[关键词] 蜂贝化瘀胶囊;2型糖尿病;微血管病变

Effect of Fengbei Huayu Capsule on Diabetic Microangiopathy-Related Indexes

DUAN Wen-zhuo¹, GONG Hai-min², JIN Guang-xiang¹, et al.

(1. Stuff room of pathophysiology, Weifang Medical College, Shandong 261042; 2. Weifang Hospital of Chinese Medicine in Shandong Province)

ABSTRACT **Objective** To study effects and mechanism of Fengbei Huayu Capsule on microangiopathy caused by diabetes (DM) in Rats. **Methods** Wistar rats were divided into five groups including the control group, DM model group, Chinese medicine treatment group, positive Chinese medicine treatment control group and positive western medicine treatment control group. Serum glucose, blood fat, lipid peroxidation, dead end product of glycosylation, aldose reductase (AR) and related gene expressions were determined. **Results** The DM model group of rats showed increase of serum glucose, triglyceride, glycosylated hemoglobin, activity of AR and malonaldehyde (MDA) as well as the increase of gene expression of FasL and TNF- α and apoptosis rates of T cells. However, the tested targets in Chinese medicine treatment group significantly decreased ($P < 0.05$) after the treatment with Chinese medicine. **Conclusion** Fengbei Huayu Capsule could effectively decrease related gene expression and diabetes-caused increase of serum glucose, blood fat, lipid peroxidation, glycosylated hemoglobin, activity of AR and MDA, as well as apoptosis rates of T cells in DM rats. It has good therapeutic effects on microangiopathy caused by diabetes.

Key Words Fengbei Huayu Capsule; Type-2 Diabetes; Microangiopathy

糖尿病(DM)的严重并发症是微血管发生动脉粥样硬化(AS)性病变,导致组织器官缺血、缺氧,细胞变性坏死,重要器官功能障碍等。目前的化学药物虽有一定的治疗效果,但成本高、副作用大,因此我们根据中医治疗2型DM气阴两虚兼瘀证“化瘀散结、益气养阴”的治则,自拟了具有活血化瘀、软坚散结、益气养阴、补肾益精功效的蜂贝化瘀胶囊,观察该中药复方对DM大鼠血糖、血脂、脂质过氧化物、糖基化终末产物、醛糖还原酶(AR)活性、相关基因表达的影响及治疗作用,以阐明该中药复方对DM微血管病变治疗作用的可能机制。

1 材料

1.1 实验动物

6周龄健康雄性Wistar大鼠56只,由山东大学医学院实验动物中心提供,体重为(145±5.09)g。

——(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

基金项目:山东省中医药科技发展计划项目(2001-2-76)

通讯作者:段文卓, dwenzhy@tom.com, (0536) 2602858

1.2 药品与试剂

链脲佐菌素(STZ):Sigma公司;卡托普利:潍坊制药有限公司,批号20020204;参芪降糖颗粒:鲁南制药集团股份有限公司,批号20020701;蜂贝化瘀胶囊全方组成比例:蜂胶6%、浙贝母6%、生地黄19%、菟丝子15%、丹参13%、黄芪19%、黄精11%、葛根11%等,按配方比例,取各味药加水煎煮滤过,滤液浓缩至相对密度1.35,过30目筛制颗粒,干燥,16目筛整粒,装入胶囊即得,每粒重0.3g,每克相当于原生药材3g,由潍坊市中医院制剂室提供。

糖化血红蛋白测试盒:美国Bio-Rad公司;丙二醛测试盒:南京建成生物工程研究所;核酸杂交试剂盒:武汉博士德生物制品有限公司;总RNA提取试剂盒:北京邦定泰克生物技术有限公司。

1.3 实验仪器

One Touch 200型血糖仪:美国Lifescan公司;液闪计数器:西安262厂;FACSscan型流式细胞检测仪:

美国 BD 公司;Trilux 液闪仪;芬兰 Wadac 公司;UV-240自动记录分光光度计;日本岛津制作所。

2 方法

2.1 2型 DM 大鼠模型的建立

用 0.1mol/L 枸橼酸钠缓冲液(pH4.4)将 STZ 配成 0.45%的溶液,按 30mg/kg 体重单次腹腔注射 50 只,72 小时后查大鼠空腹血糖值达 7.0mmol/L 者即纳入实验组,然后服用高热量饲料(基础饲料中加入蔗糖和猪油)。喂养 6 周后进行药物干预。同时以体重相匹配的正常大鼠 6 只作为正常对照组。

2.2 分组及给药

将入选的 DM 大鼠随机分为 4 组,每组 8 只。(1) DM 模型组(模型组):给予与中药治疗组药量等量的蒸馏水(300ml/kg);(2) 中药治疗组(蜂贝化痰胶囊组):给予蜂贝化痰胶囊 300mg 药粉/kg 体重;(3) 中药对照组(参芪降糖颗粒组):给予参芪降糖颗粒 54mg 药粉/kg 体重;(4) 西药对照组(卡托普利组):给予卡托普利 4.5mg/kg 体重。正常对照组给予与中药治疗组药物等量的蒸馏水(300ml/kg)。

以上药物剂量均为按大鼠体表面积换算公式计算出的等效剂量,喂药时灌胃 2 周与喂服 1 周交叉进行,以利于食道黏膜的修复,共给药 8 周。喂服方法:将每日剂量的药物粉末和少量饲料制成混合饲料单个喂养大鼠,喂完后再给予基础饲料。各组均自由饮水,每周检测空腹血糖 1 次。自给药时间起达 8 周末时将大鼠称重、麻醉、手术分离颈总动脉,插管收集血液,分离血浆与血清。迅速摘取脾脏组织,液氮冷冻备用。摘取脂肪组织,固定于 4% 多聚甲醛中以备做原位杂交测定。

2.3 检测指标及方法

AR 活性测定:参照 Vander、Chakrabarti^[1,2] 等的方法,测定 AR 的辅酶一还原型辅酶 2(NADPH) 的吸光度示 AR 活性。

全血糖化血红蛋白(GHbA_{1c})测定:采用微柱亲和层析法。

T 细胞凋亡率测定:取抗凝血(2%EDTA 抗凝) 1.5ml,采用 PI 染色法:取 2×10⁶ 细胞,加入 70%冷乙

醇,PBS 冲洗,加入 PI 50mg/ml,0.1%TritonX-100,0.1mol/L EDTA-Na₂,RNase 50 μg/ml,用流式细胞仪采集 1 万个细胞检测 T 细胞凋亡率;脾脏 T 淋巴细胞 Fas 配体(FasL) mRNA 表达测定:Trizol 法提取脾脏组织总 RNA,mRNA 抽提,mRNA 反转录分别按试剂盒说明操作,PCR 扩增按常规方法进行。然后取 PCR 产物 20 μl,2%琼脂糖凝胶电泳,置入数码成像分析系统检测是否有非特异性扩增。再根据各组 PCR 产物的 Ct 值(Ct 值指每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数,Ct 值越小样本中的起始拷贝数越高),计算每一样品和其内参 β 肌动蛋白(βactin)对照的相对含量(βactin 是一种在细胞中普遍表达且表达量恒定的通用内参照模板,因此通过两种扩增产物的比值来定量 mRNA 的表达情况)。

脂肪细胞肿瘤坏死因子 α(TNF-α mRNA 测定:取大鼠脂肪组织,切成 3mm 的组织块,用固定液(40g/L 多聚甲醛、0.1mol/LPBS、0.1%DEPE, pH7.0~7.4)固定 2 小时。常规脱水、浸蜡包埋、切片,切片厚度为 6 μm。采用核酸杂交法测定,按说明书操作;封片,显微镜观察,细胞浆呈紫蓝色为 TNF-α mRNA 表达阳性。

2.4 统计学方法

应用 SPSS 10.0 统计软件处理实验结果,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 σ 检验。

3 结果

3.1 蜂贝化痰胶囊对 2 型 DM 大鼠体重、血糖及血脂的影响

表 1 示,用 STZ 及高热量饮食诱导后各组大鼠血糖值均明显升高(>7.0mmol/L),逐渐出现多饮、多食、多尿及体重降低等典型 2 型 DM 症状。给药治疗 8 周,测得模型组大鼠体重明显降低,血糖和血脂明显高于正常对照组,蜂贝化痰胶囊组和参芪降糖颗粒组、卡托普利组体重明显升高,血糖和血脂含量较模型组显著降低($P<0.05$)。组间比较,蜂贝化痰胶囊组以上指标明显低于参芪降糖颗粒组和卡托普利组($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠体重、血糖和血脂比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	给药剂量(mg/kg)	体重(g)	血糖(mmol/L)	甘油三酯(mmol/L)	胆固醇(mmol/L)
正常对照组	6	300	406.00±43.09	3.57±0.71	0.49±0.09	1.20±0.17
DM 模型组	8	300	341.10±37.94	8.35±2.48	0.82±0.15	1.42±0.21
参芪降糖颗粒组	8	54	374.42±45.21*	5.91±1.83*	0.62±0.38*	1.35±0.33*
卡托普利组	8	4.5	384.13±55.80*	6.54±2.04*	0.60±0.32*	1.28±0.30*
蜂贝化痰胶囊组	8	300	398.38±37.93▲	4.18±1.28▲	0.61±0.21▲	1.31±0.23▲

与 DM 模型组比较,* $P<0.05$;与参芪降糖颗粒组比较,△ $P<0.05$;与卡托普利组比较,▲ $P<0.05$

表2 各组大鼠 AR 活性、GHbA_{1c} 和丙二醛含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	给药剂量(mg/kg)	AR 活性(U/g·Hb)	GHbA _{1c} (%)	丙二醛(nmol/ml)
正常对照组	6	300	0.89±0.16	6.10±1.41	2.91±0.94
DM 模型组	8	300	1.21±0.25	9.03±0.98	5.95±0.97
参芪降糖颗粒组	8	54	1.14±0.22*	6.68±1.31*	4.15±1.02*
卡托普利组	8	4.5	1.11±0.24*	6.80±1.36*	4.21±0.83*
蜂贝化瘀胶囊组	8	300	0.95±0.27*△▲	6.53±0.96*△▲	3.99±1.11*△▲

与 DM 模型组比较, * $P < 0.05$; 与参芪降糖颗粒组比较, △ $P < 0.05$; 与卡托普利组比较, ▲ $P < 0.05$

表3 各组大鼠相关基因表达和 T 细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	给药剂量(mg/kg)	FasL Ct	β _{actin} Ct	相对比值(FasL/β _{actin})	T 细胞凋亡率(%)
正常对照组	6	300	21.11±2.19	16.19±2.30	1.32±0.18	1.85±1.33
DM 模型组	6	300	23.18±2.23	26.10±0.63	0.89±0.10	9.83±4.02
参芪降糖颗粒组	6	54	21.14±2.28	18.68±1.31	1.19±0.39*	3.26±0.71*
卡托普利组	6	4.5	21.05±1.47	18.23±1.85	1.17±0.20*	6.39±0.80*
蜂贝化瘀胶囊组	6	300	21.94±2.41	18.37±4.08	1.25±0.31*△▲	2.57±0.79*△▲

与 DM 模型组比较, * $P < 0.05$; 与参芪降糖颗粒组比较, △ $P < 0.05$; 与卡托普利组比较, ▲ $P < 0.05$

3.2 蜂贝化瘀胶囊对2型DM大鼠AR活性、GHbA_{1c}及丙二醛含量的影响

表2示,与正常对照组比较,模型组大鼠AR活性、GHbA_{1c}和丙二醛含量明显升高($P < 0.05$)。药物治疗8周3个用药组的上述3个指标较模型组均有明显下降($P < 0.05$),蜂贝化瘀胶囊组与参芪降糖颗粒组、卡托普利组之间差异亦有显著性意义($P < 0.05$)。

3.3 蜂贝化瘀胶囊对2型DM大鼠FasL、TNF-α及T细胞凋亡率的影响

表3示,药物治疗8周末时抽取血样进行相关基因表达测定表明,DM模型组大鼠T细胞FasL的mRNA表达和T细胞凋亡率明显高于正常对照组,3组药物治疗组FasL的表达和T细胞凋亡率均低于DM模型组($P < 0.05$),组间比较,蜂贝化瘀胶囊组明显低于参芪降糖颗粒组和卡托普利组($P < 0.05$)。对脂肪细胞中TNF-α的mRNA表达测定表明,显微镜下正常对照组表达为阴性,DM模型组表达为强阳性,蜂贝化瘀胶囊组表达为弱阳性。

4 讨论

本实验结果表明,蜂贝化瘀胶囊通过以下作用机制发挥了治疗作用,改善多元醇代谢通路:高血糖可激活细胞内多元醇代谢通路,使AR活性增高,山梨醇在细胞内堆积,破坏细胞膜结构与功能的完整性^[3]。而黄芪能降低山梨醇含量,抑制多元醇代谢;葛根素对AR有明显的抑制作用并可改善糖代谢^[4]。可见该中药复方通过改善组织细胞的多元醇通路代谢减轻了细胞损伤。

抑制蛋白非酶性糖基化,改善脂蛋白代谢:高血糖可致血浆脂蛋白发生非酶性糖基化,使蛋白质发生交联,血管刚性和通透性增高;糖基化终产物与受体结合

而激活NF-κB和/或AP-1核转录因子,参与细胞改变和损伤^[5]。本方中黄芪具有抑制蛋白非酶性糖基化作用,葛根除能抑制AR活性外,还能改善脂蛋白代谢^[6],因此具有较好的抗蛋白非酶性糖基化作用。

抗氧化应激损伤:高血糖可使体内超氧化物歧化酶生成减少,超氧阴离子产生增多,灭活血管舒张因子NO,致血管舒张性减弱^[7]。氧自由基可攻击细胞膜,引发多价不饱和脂肪酸生成丙二醛,使细胞膜的蛋白质、核酸、脂质交联,细胞变性、突变或死亡^[8]。而黄芪、蜂胶等有抗脂质过氧化、抑制肾小球系膜细胞增殖的作用;黄精、丹参、菟丝子可提高机体的免疫功能,清除H₂O₂等,因此具有较强的抗氧化能力。

从分子水平上调靶细胞的功能基因:高血糖可致多基因改变,引起胰岛素抵抗和分泌障碍,导致胰岛素受体底物基因缺失^[9];脂肪细胞中TNF-α基因表达增强可抑制胰岛素信号转导^[10];FasL基因表达增强能升高T细胞凋亡率,诱导细胞凋亡^[11]。本方中蜂胶、黄芪、生地黄、菟丝子等能抑制凋亡基因FasL表达,降低T细胞凋亡率;还能抑制TNF-α表达,减少炎症介质介导的胰岛素抵抗,从而有效减轻了微血管病变。

参考文献

[1] Vander Jagt DL, Robison B, Taylor KK, et al. Aldose reductase from human skeletal and heart muscle. Interconvertible forms 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] 刘长山,董砚虎,王家富.中药黄芩甙与黄连素对糖尿病鼠醛糖还原酶活性作用的观察.中国糖尿病杂志,1996,4(2):

163~166.

- [4]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.
- [5]Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, et al. Activation of receptor for advanced glycation end products: A mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. Circ Res, 1999, 84(5):489~497.
- [6]李妮.葛根素注射液对糖尿病病人糖化血红蛋白、丙二醛及超氧化物歧化酶的影响.广西医学,1997,19(6):963~965.
- [7]Kashiwagi A, Asahina T, Nishio Y, et al. Glycation, oxidative stress, and scavenger activity: glucose metabolism and radical scavenger dysfunction in endothelial cells. Diabetes, 1996, 45(suppl 3):s84~86.

- [8]周向华.褪黑素、自由基与衰老.国外医学·老年医学分册,1997,18(5):193~196.
- [9]薛静,温晶华,李英.细胞凋亡与糖尿病肾病.中国中西医结合杂志,2001,21(8):492~496.
- [10]Coughlan MT, Oliva K, Georgiou HM, et al. Glucose-induced release of tumor necrosis factor- α from human placental and adipose tissues in gestational diabetes mellitus. Diabet Med, 2001, 18(11):921~927.
- [11]Phelouzat MA, Arbogast A, Laforge T, et al. Excessive apoptosis of mature T lymphocytes is a characteristic feature of human immune senescence. Mech Aging Dev, 1996, 88(1-2):25~38.

(收稿日期:2006-05-09;修回日期:2006-08-20)

养肝熄风方药对脑缺血大鼠神经干细胞增殖的影响

赵永厚¹ 唐红敏¹ 唐宇平¹ 杨云柯¹ 范越¹ 顾喜喜¹ 蔡定芳²

(1. 复旦大学附属中山医院中西医结合科,上海市枫林路180号,200032;

2. 复旦大学中西医结合研究所神经病学研究室)

本研究观察中医养肝熄风方药对缺血脑损伤大鼠侧脑室下区(SVZ)细胞增殖及 nestin 阳性细胞表达的影响。

1 材料和方法

12周龄 SD 雄性大鼠,体重250~280g,由中国科学院上海分院实验动物中心提供。行右侧大脑中动脉线栓法(MCAO)造模,方法如下:大鼠以10%水合氯醛(0.36g/kg,腹腔注射)麻醉,正中切开颈部皮肤,分离颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,电凝并剪断颈外动脉分支。暂时夹闭颈总动脉和颈内动脉,结扎颈外动脉远心端并剪切口,插入4-0尼龙线,并疏松结扎,剪断颈外动脉,拉直颈外动脉并使之与颈内动脉呈一直线,缓慢推进尼龙线,直到遇到阻力为止,使尼龙线进入颈内动脉18~20mm,松开颈总动脉,2小时后拔线再灌注。动物直肠温度维持在37~38℃。假手术动物不插入尼龙线。

将动物随机分为假手术组、模型组、养肝熄风组。缺血30分钟时养肝熄风组大鼠按20ml/kg 体重给予200%养肝熄风水煎醇提液灌胃。此后分别于造模后第2、4、6、8天重复灌胃给药1次。造模后第5、6、12、13、19、20天所有大鼠腹腔注射 BrdU (50mg/kg)。根据实验需要分别于第7、14、21天处死各组动物,进行各项指标检测。每组每个时间点上各15只大鼠用于神经功能评分和脑梗死体积检测,10只用于免疫组化检测。

养肝熄风方药(地黄饮子加减)由熟地黄、山茱萸、麦冬、肉苁蓉、巴戟天、枸杞子、白芍等组成。按2:2:2:2:2:2:2比例称重。将生药浸入10倍体积的蒸馏水浸泡2小时;煮沸后文火煎1小时,过滤;再加10倍体积的蒸馏水,煮沸后文火煎1小时;重复上一步骤;将3次过滤液合并,水浴浓缩成100%药液,过滤;置于磁力搅拌器上,边搅拌边加入3倍量无水乙醇,继续搅拌过夜;过滤,2000转/分钟离心30分钟;上清液经100℃水浴蒸发尽乙醇,最后制成200%水煎醇提液;高压灭菌,4℃保存。

2 结果 (C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Database. http://www.cnki.net

2.1 实验药物对大鼠缺血脑损伤神经功能缺损评分的影响

大鼠以右侧的 Horner 征和左侧的前肢偏瘫为主;两组大鼠术后第21天的神经功能缺损和第1天相比要明显改善,差异有显著性意义($P < 0.05$);养肝熄风组大鼠在第7、8、9、16天的神经功能缺损评分要明显低于模型组($P < 0.05$)。

2.2 实验药物对大鼠缺血脑损伤脑梗死灶体积的影响

TTC 染色结果显示,假手术组大鼠脑组织正常;急性脑缺血2小时、再灌第7天,各组大鼠脑梗死灶位于缺血侧的额顶叶皮层和纹状体。模型组大鼠脑梗死灶通常从第2脑片延伸至第5脑片,最大梗死范围出现于第3、4脑片(前凶附近),养肝熄风组再灌后第7天脑梗死灶体积小于模型组,差异有显著性意义($P < 0.01$)。

2.3 实验药物对大鼠缺血脑损伤神经干细胞增殖的影响

术后第7天,假手术组大鼠 SVZ 可见少量 nestin 阳性细胞;缺血性损伤使 SVZ 的 nestin 表达明显增多,术后第7、14、21天所有缺血组与假手术组比较,SVZ 的 nestin 表达均显著增加($P < 0.01$);模型组术后第7天 SVZ 的 nestin 阳性细胞较第14、21天明显增多($P < 0.01$);与模型组相比,养肝熄风组可以明显增加缺血损伤后第7天 SVZ 的 nestin 阳性细胞数($P < 0.05$);SVZ 的 nestin 阳性细胞为紧密排列的球形。术后第7、14、21天,所有缺血组与假手术组比较,BrdU 阳性细胞均有显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,养肝熄风组可以促进缺血损伤后第14、21天 SVZ 的神经干细胞增殖($P < 0.01$);BrdU 阳性细胞核深染,为椭圆形;养肝熄风组大鼠术后第7天,在 SVZ 可见 nestin 与 BrdU 双标的阳性细胞。

3 讨论

养肝熄风方药是单成分强力溶栓改善微循环制剂,它能显著改善 MCAO 大鼠神经功能缺损,减少脑梗死体积,说明养肝熄风方药对于急性脑缺血损伤具有一定的保护作用。

(收稿日期:2007-07-10)