

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.13.016

抵当汤及其拆方对糖尿病大鼠心肌病变的影响

张 凯¹, 储全根^{2*}, 刘新萍², 吴元洁², 毕华剑², 刘德胜², 董妍妍²

(1. 安徽中医药大学中西医结合临床学院, 安徽省合肥市梅山路 103 号, 230038; 2. 安徽中医药大学中医临床学院)

摘要 目的 观察抵当汤及其拆方对糖尿病大鼠心肌病变的疗效。方法 105 只 SD 大鼠采用单次腹腔注射链脲佐菌素 55 mg/kg 溶液制备糖尿病大鼠模型, 将造模成功的 100 只大鼠随机分为模型组、抵当汤组、桃仁大黄组、水蛭虻虫组和缬沙坦组, 每组 20 只; 另以 10 只正常 SD 大鼠作为对照组。抵当汤组、桃仁大黄组和水蛭虻虫组灌胃相应中药 10 g/(kg·d), 缬沙坦组灌胃缬沙坦胶囊 80 mg/(kg·d), 对照组和模型组灌胃等量蒸馏水, 每天 1 次。8 周后光镜下观察各组大鼠左心室心肌组织 HE 染色情况; Masson 染色观察心肌纤维化改变, 并计算心肌组织胶原面积占总面积的比值; 电镜观察心肌细胞超微结构变化。结果 HE 染色结果显示, 模型组大鼠左心室心肌细胞肥大, 排列紊乱, 并有炎症细胞浸润; 抵当汤组和缬沙坦组心肌细胞排列较整齐, 细胞间隙减小, 间质和血管周围细胞外基质减少。与对照组比较, 模型组心肌组织胶原面积/总面积升高 ($P < 0.01$); 抵当汤组胶原面积/总面积较模型组显著降低 ($P < 0.01$), 而桃仁大黄组和水蛭虻虫组胶原面积/总面积无明显变化 ($P > 0.05$)。电镜心肌细胞超微结构结果显示, 模型组肌节显示模糊不清, 肌原纤维溶解, 甚至消失; 抵当汤组和缬沙坦组肌节显示整齐, 线粒体形态呈椭圆形, 结构大致正常。结论 抵当汤能改善糖尿病大鼠心肌纤维化的病理程度, 对糖尿病心肌病具有防治作用。

关键词 糖尿病; 心肌病变; 抵当汤; 缬沙坦胶囊

目前糖尿病的心血管并发症已成为糖尿病患者死亡的主要原因^[1], 其治疗主要以西药为主, 但相关药物所致糖脂代谢紊乱等副作用明显。抵当汤出自东汉张仲景《伤寒杂病论》, 具有活血逐瘀通络之效。有研究显示, 抵当汤对糖尿病的不同阶段及多种并发症如肾病、视网膜病变、冠心病、脑梗死等均有疗效^[2-4]。本研究通过建立糖尿病大鼠模型, 从病理形态学途径观察抵当汤及其拆方早期干预对糖尿病大鼠心肌病变的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 药物制备

抵当汤由桃仁 25 g、熟大黄 15 g、水蛭 10 g、虻虫 10 g 组成, 中药统一购自亳州市中药材市场, 以 10 倍量的水浸泡 2 h, 煮沸 1 h, 滤过, 药渣再用 8 倍量的水煮沸 1 h, 滤过, 合并 2 次滤液并浓缩成含生药 3 g/ml 的溶液; 拆方分为桃仁 25 g 和

熟大黄 15 g 组, 水蛭 10 g 和虻虫 10 g 组, 煎煮方法同上, 生药含量均为 3 g/ml。上述 3 种药液均加入 0.3% 苯甲酸钠防腐剂, 装瓶, 置 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠 115 只, 清洁级, 体重 (200 ± 20) g, 由安徽省实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK-(皖) 2011-002。

1.3 主要试剂、仪器

链脲佐菌素 (美国 Sigma 公司, 100 mg/支, 批号: 20130320546); 缬沙坦胶囊 (北京诺华制药有限公司, 80 mg/粒, 批号: X1319); 10% 水合氯醛 (上海苏懿化学试剂有限公司, 批号: 20120210)。血糖仪 (德国贝朗公司); BX51 光学显微镜 (Olympus 公司); Image Pro Plus 6.0 图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司); JEM-4230 型透射电镜 (日本 JEOL 公司)。

1.4 动物分组及处理方法

115 只大鼠按体重区组随机分为对照组 (10

基金项目: 国家自然科学基金 (81273645)

* 通讯作者: chuquangen@sohu.com, (0551) 65169031

只) 和造模组 (105 只)。造模组大鼠禁食不禁水 24 h 后, 单次 55 mg/kg 链脲佐菌素腹腔注射, 按照文献 [6] 提供的方法制备糖尿病大鼠模型。72 h 后用血糖仪以尾静脉法测血糖, 以随机血糖 > 16.7 mmol/L 作为糖尿病模型的判断标准。造模成功的大鼠共 100 只, 按体重区组随机分为模型组、抵当汤组、桃仁大黄组、水蛭虻虫组和缬沙坦组, 每组 20 只。从造模成功后的第 2 天起灌胃, 抵当汤组、桃仁大黄组和水蛭虻虫组在灌胃前用蒸馏水将煎剂配成浓度为 1 g/ml 的混悬溶液, 按 10 ml/kg 每天灌胃 1 次; 缬沙坦组按 80 mg/kg 每天 1 次灌胃缬沙坦胶囊; 对照组和模型组灌胃等量蒸馏水, 每天 1 次。于第 8 周末以 10% 水合氯醛按 3.5 ml/kg 腹腔注射麻醉后取材。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 HE 染色 取左心室心肌组织以 4% 多聚甲醛固定 5 天, 常规脱水, 石蜡包埋切片, 切片厚 5 μ m, HE 染色, 光学显微镜观察摄片。

1.5.2 Masson 染色 切片脱蜡至水后, 放入 Bouin's 液中, 37℃ 温箱内作用 2h, 流水冲洗至切片上黄色消失; Weiger's 铁苏木素染 10 min, 1% 盐酸酒精分化数秒, 丽春红酸性品红染 10 min, 1% 磷钼酸水溶液处理约 5 min, 亮绿复染 5 min, 1% 冰醋酸 1 min, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片; 光学显微镜观察摄片。每个切片随机选取 3 个视野 ($\times 200$), 用 Image Pro Plus 6.0 图像分析系统计算胶原面积占总面积的比值。

1.5.3 电镜标本制备 用双面刀片将少量左心室心肌组织切成 1~2 mm³ 大小, 置于 4℃、2.5% 戊二醛溶液中固定过夜, 常规冲洗后以 1% 锇酸后固定, 在冲洗后用 50%、70%、90% 和 100% 乙醇梯度脱水, 环氧树脂包埋后超薄切片, 最后用醋酸铀及柠檬酸铅双重染色, 在透射电镜下观察大鼠心肌细胞的超微结构变化。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对多组间数据进行单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

灌胃至 8 周末, 模型组死亡 8 只, 抵当汤组死亡 4 只, 桃仁大黄组、水蛭虻虫组各死亡 5 只, 缬沙坦组死亡 3 只, 对照组无死亡。

2.1 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果比较

对照组大鼠左心室心肌细胞排列整齐、致密, 结构清晰, 细胞外间质较少, 可见少量成纤维细胞; 模型组大鼠左心室心肌细胞肥大, 排列紊乱, 细胞间隙增大, 间质和血管周围细胞外基质增多, 成纤维细胞增多, 并有炎症细胞浸润; 抵当汤组和缬沙坦组与模型组相比, 左心室心肌细胞排列较整齐, 细胞间隙减小, 间质和血管周围细胞外基质减少; 水蛭虻虫组和桃仁大黄组与模型组比较, 左心室心肌组织有改善, 但不及抵当汤组明显。

2.2 各组大鼠心肌组织 Masson 染色结果比较

光镜下对照组大鼠左心室心肌组织胶原纤维含量少, 分布均匀, 心肌纤维排列整齐; 模型组心肌组织胶原含量明显增多, 心肌纤维排列紊乱; 与模型组相比, 抵当汤组心肌组织胶原组织含量较少, 心肌纤维排列较规整; 水蛭虻虫组及桃仁大黄组与模型组相比, 心肌组织胶原含量减少, 但不及抵当汤组大鼠心肌组织胶原面积/总面积明显。表 1 示, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织胶原面积/总面积明显升高 ($P < 0.01$); 抵当汤组、缬沙坦组与模型组比较, 大鼠心肌组织胶原面积/总面积明显降低 ($P < 0.01$); 与缬沙坦组比较, 抵当汤组大鼠心肌胶原面积/总面积下降更加明显 ($P < 0.05$); 水蛭虻虫组和桃仁大黄组与模型组比较, 大鼠心肌胶原面积/总面积无明显变化 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠左心室心肌组织胶原面积/总面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	胶原面积/总面积
对照组	10	1.673 $\pm$ 0.510
模型组	12	3.671 $\pm$ 0.617*
抵当汤组	16	2.777 $\pm$ 0.761 Δ $\blacktriangle$
水蛭虻虫组	15	3.341 $\pm$ 0.638
桃仁大黄组	15	3.196 $\pm$ 0.673
缬沙坦组	17	2.933 $\pm$ 0.550 Δ

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与缬沙坦组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

2.3 各组大鼠电镜心肌细胞超微结构比较

对照组大鼠左心室心肌组织肌节显示整齐, 线粒体膜完整, 无肿胀, 嵴清晰, 无弯曲、断裂; 模型组左心室心肌组织肌节显示模糊不清, 肌原纤维溶解, 甚至消失, 线粒体肿胀, 部分线粒体空泡变性, 嵴模糊不清、紊乱, 甚至断裂; 抵当汤组和缬沙坦组左心室心肌组织肌节显示整齐, 线粒体形态呈椭圆形, 结构大致正常; 水蛭虻虫组和桃仁大黄

组左心室心肌组织肌节显示稍紊乱, 线粒体肿胀, 嵴排列略不规整, 部分断裂。

3 讨论

糖尿病属于中医学“消渴”“消瘴”范畴。我们认为, 糖尿病的中医基本病机是内有燥热, 在此基础上的脉络损伤和瘀阻不通是糖尿病及其并发症的主要发病机理。长期糖尿病会引起心肌纤维化、微血管病变、心肌炎症及氧化应激等, 最终引起糖尿病心肌病。前期研究发现, SD 大鼠单次腹腔注射链脲佐菌素可以迅速制备糖尿病模型, 经过 3 周, 产生明显的心肌病变^[8]。

抵当汤方中桃仁苦甘平, 有活血化瘀、润肠通便之功; 大黄性苦寒, 有清热泻下、活血化瘀之功; 水蛭咸苦平, 有破血逐瘀通络之功; 虻虫苦微寒, 其破血逐瘀之功与水蛭相同而作用更为猛烈。该方药味精炼、组方严谨、应用广泛、疗效可靠。动物研究显示, 抵当汤早期干预可延缓糖尿病大鼠视网膜病变的发展^[9]。临床观察发现, 抵当汤能降低胰岛素抵抗, 从而改善糖代谢, 抵当汤加减对糖尿病肾病尿微量蛋白有改善作用, 并对降低血糖、血压、血脂具有一定的疗效^[2,4]。本研究中将抵当汤分为全方组和具有化瘀泻热作用的桃仁大黄组、逐瘀通络作用的水蛭虻虫组, 以西药缬沙坦胶囊作为对照, 观察抵当汤全方及其拆方对糖尿病心肌病变的影响。研究结果显示, 模型组大鼠 HE 染色显示左心室心肌细胞肥大、扭曲, 细胞间隙增大, 间质和血管周围细胞外基质增多; Masson 染色显示左心室心肌间质胶原纤维增生; 电镜观察显示左心室心肌细胞排列稀疏、断裂, 线粒体呈现退行性改变, 提示糖尿病模型大鼠心肌发生了明显病

变。对大鼠的心肌细胞超微结构进行观察, 发现模型大鼠左心室心肌细胞线粒体的改变和肌节的整齐度存在明显差异, 抵当汤全方组线粒体最完整, 肌节排列最整齐, 拆方组次之, 说明抵当汤对糖尿病大鼠心肌细胞超微结构有保护作用, 并且以全方效果最佳, 具有泻热化瘀作用的桃仁、大黄配伍和具有逐瘀通络作用的水蛭、虻虫配伍均不及全方, 这一结果与心肌纤维化的改变一致。

综上所述, 抵当汤早期干预可有效减轻糖尿病导致的心肌损伤, 有助于改善糖尿病心肌病变的预后, 其机制可能与其对心肌细胞超微结构的保护、减轻心肌纤维化、干预心肌重塑有关, 但其具体的细胞分子机制复杂, 尚需进一步研究加以证实。

参考文献

- [1] Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension and cardiovascular disease: an update [J]. Hypertension, 2001, 37(4): 1053-1059.
- [2] 田佳星, 赵林华, 周强, 等. 抵当汤加减治疗糖尿病肾病微量蛋白尿的回顾性分析 [J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2012, 19(6): 7-10.
- [3] 全小林, 张昆, 段军, 等. 经方在糖尿病治疗中的运用 [J]. 中医杂志, 2002, 43(11): 868-870.
- [4] 张玉辉. 抵当汤对 37 例 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(2): 161-162.
- [5] 张春虹, 臧伟进, 徐静, 等. 建立糖尿病心肌病动物模型方法的实验研究 [J]. 卫生研究, 2006, 35(6): 707-711.
- [6] 刘新萍, 张凯, 储全根, 等. 不同剂量链脲佐菌素腹腔注射制备大鼠糖尿病心肌病模型的病理学观察 [J]. 生物学杂志, 2013, 30(6): 14-17.
- [7] 李春深, 常柏, 苗戎, 等. 抵当汤早期干预对糖尿病大鼠视网膜 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响 [J]. 北京中医药, 2012, 32(2): 129-134.

The Effect of *Didang Decoction* (抵当汤) and Its Disassembled Formula on Myocardial Lesion in Diabetic Rats

ZHANG Kai¹, CHU Quangen², LIU Xinping², WU Yuanjie², BI Huajian², LIU Desheng², DONG Yanyan²

(1. School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese medicine, Anhui Province, 230038;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Anhui University of Chinese medicine)

ABSTRACT Objective To observe the curative effect of *Didang Decoction* and its disassembled formula on myocardial lesion in diabetic rats. **Methods** Totally 105 SD rats were injected streptozotocin solution intraperitoneally with 55mg/kg to prepare the diabetic rat model, 100 rats of successful model were randomly divided into model group, *Didang Decoction* group, Taoren (*Semen Pruni persicae*) Dahuang (*Radix Rumici Japonici*) group, Shuizhi (*Leech*) Mangchong (*Tabanus*) group and valsartan group, with 20 in each group. The other 10 normal SD rats served as the control group. *Didang Decoction* group, Shuizhi Mangchong group and Taoren Dahuang group gavage corresponding Chinese medicine 10g/(kg·d), valsartan group gavage valsartan capsule 80mg/(kg·d), the control group and the model group were perfused with distilled water, 1 time a day. After 8 weeks, HE staining in left ventricular myocardium tissue of the rats in each group would be observed under light microscope; the changes of

myocardial fibrosis are observed by Masson staining, and the collagen area of myocardium is calculated; ultrastructure changes of myocardial cells are observed by electron microscope. **Results** The results of HE staining show that the left ventricular myocardial cells in the model group are enlarged and arranged in disorder, and there is inflammatory cells infiltration; The arrangement of myocardial cells in the *Didang Decoction* group and valsartan group is relatively neat, the intercellular space is decreased, interstitial and perivascular extracellular matrix is decreased. Compared with the control group, the ratio of the collagen area to the total area of myocardium in the model group is increased ($P < 0.01$); The ratio of the collagen area to the total area in the *Didang Decoction* group is significantly decreased than that in the model group ($P < 0.01$), however it is of no significant change in the Taoren Dahuang group and Shuizhi Mangchong group ($P > 0.05$). The results of electron microscopy observation of myocardial ultrastructure are as follows: In the model group, the myocomma shows blurred, myofibrillar dissolves, or even disappears; In the *Didang Decoction* group and valsartan group, the myocomma shows neat, the mitochondrial morphology is oval and the structure is roughly normal. **Conclusion** *Didang Decoction* can improve the pathological degree of myocardial fibrosis in diabetic rats, which can have preventive and therapeutic effect against diabetic cardiomyopathy.

Keywords diabetes; myocardial lesion; *Didang Decoction*; valsartan capsules

(收稿日期: 2014-09-10; 修回日期: 2015-03-13)

编辑: 邓 媛

欢迎订阅 2015 年《中医杂志》

《中医杂志》是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的全国性中医药综合性学术期刊。1955 年创刊以来始终坚持“以提高为主, 兼顾普及”的办刊方针, 是我国中医界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊之一, 是中国中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊。2009 年被中国期刊协会评为“新中国 60 年有影响力的期刊”。2011 年和 2013 年分别荣获“国家新闻出版政府奖期刊提名奖”, 并且是唯一获此荣誉的中医类期刊。2013 年被国家新闻出版总署评为“中国百强科技期刊”。

本刊主要栏目中当代名医和临证心得分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验; 临床研究介绍中医药治疗的新方法、新成果; 学术探讨、思路与方法、专家论坛、病例讨论、综述、百家园等栏目, 提供最新学术观点、研究成果与治疗方法, 成为学习中医药、研究中医药, 不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》为半月刊, 每月 2 日和 17 日出版, 每期 15.00 元。读者可以到全国各地邮局办理订阅手续(邮发代号: 2-698), 也可以与本刊读者服务部联系邮购, 邮购免邮费。电话: 010-64035632。国外发行: 中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱, 邮编: 100044, 代号: M140)。

本社地址: 北京市东直门内南小街 16 号, 邮编: 100700, 网址: <http://www.jtcm.net.cn>。

首届国医大师、院士学术思想及临床经验研讨会征文通知

国医大师及院士是我国德高望重、医术精湛的名医大家, 中医理论造诣深厚, 学术成就卓越, 临床经验丰富。为了促进国医大师及院士学术思想和临床经验的传承, 更好地促进中医药事业发展, 不断提高广大中医临床医师的诊治水平, 《中医杂志》将设专栏报道国医大师及院士经验。同时, 配合专栏拟定于 2015 年第 4 季度举办国医大师、院士学术思想及临床经验研讨会, 现公开进行征文。优秀来稿将陆续在《中医杂志》“国医大师与院士”专栏公开发表。征文要求如下。

1. 征文内容: 1) 国医大师及院士学术思想、临床经验、诊疗特长的总结与整理; 2) 国医大师及院士中医、中西医结合诊治典型病例的探讨; 3) 国医大师及院士治疗临床常见病、疑难病、危重病的用药经验; 4) 国医大师及院士对中医药事业发展、中医理论、中医药科研及临床研究的思考等。

2. 征文要求: 1) 内容必须来自于两院院士和国家中医药管理局正式公布的两届国医大师; 2) 未正式公开发表过的论文; 3) 论文务求主题鲜明、资料详实; 4) 文章作者应是国医大师亲传弟子、院士弟子、工作室(站)或工作团队; 5) 稿件篇幅在 5000 字以内, 摘要 150~300 字, 关键词 3~8 个, 请注明作者姓名、职称、具体通讯地址、邮政编码、电子信箱、手机号码等; 6) 来稿同时, 请附上国医大师或院士两寸照片和 400 字以内小传; 7) 论文邮件主题以“作者姓名+国医大师(或院士)姓名”命名。请用 Word 文档以附件的形式发送至邮箱 tcm64035632@163.com。收到必复, 1 周内若无回复, 请与编辑部联系; 8) 详情可登录 www.jtcm.net.cn 查询, 截稿日期: 2015 年 10 月 15 日。

3. 联系方式: 地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号中医杂志社, 邮编: 100700, 联系电话: (010) 64014411 转 3045, 64035632, 联系人: 侯建春, 手机 13691096692。