

丹参多酚酸对糖尿病大鼠血液流变学的改善作用及其机制研究

魏玉敏¹, 谷宏伟¹, 刘永丹²

1. 哈尔滨医科大学附属第一医院 药学部, 黑龙江 哈尔滨 150070

2. 黑龙江省医院 神经内科, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 考察丹参多酚酸对糖尿病大鼠血液流变学的改善作用, 并探讨其作用机制。**方法** SD大鼠随机分为对照组和模型组, 其中对照组10只, 模型组30只。进行糖尿病模型诱导后, 造模成功的大鼠随机分为模型组以及丹参多酚酸1.79、5.26 mg/kg组, 每组10只。丹参多酚酸组ip注射用丹参多酚酸盐1.79、5.26 mg/kg (以丹参乙酸镁计), 模型组、对照组ip同体积蒸馏水, 给药容积均为2.76 mL/kg, 1次/d, 连续给药14 d。取血测定血液流变学指标和红细胞膜表面生物学特性指标。**结果** 与模型组比较, 丹参多酚酸1.79、5.26 mg/kg组全血黏度3、全血黏度50、红细胞电泳时间、血沉方程K值均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, 丹参多酚酸1.79、5.26 mg/kg组唾液酸含量显著升高 ($P < 0.05$), 丹参多酚酸5.26 mg/kg组 Na^+ - K^+ -ATP酶活性、SOD水平均显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** 丹参多酚酸盐通过增加红细胞膜表面唾液酸含量、提高红细胞膜抗氧化能力来改善糖尿病大鼠的血液流变学特性。

关键词: 丹参多酚酸; 血液流变学; 红细胞膜表面生物学特性; 改善作用

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2016)04-0419-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2016.04.003

Improvement of salvianolic acids on hemorheology of diabetic rats and its mechanism

WEI Yu-min¹, GU Hong-wei¹, LIU Yong-dan²

1. Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150070, China

2. Department of Neurology, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To study the improvement of salvianolic acids on hemorheology of diabetic rats and to explore its mechanism. **Methods** SD rats were randomly divided into control and model groups. And there were 10 rats in the control group, and 30 rats in the model group. Diabetes model were induced. Diabetic rats were randomly divided into model group and salvianolic acids (1.79 and 5.26 mg) groups, and each group had 10 rats. Rats in salvianolic acids groups were ip administered with Depsides Salts from *Salvia miltiorrhiza* in Lyophilized Powder for injection 1.79 and 5.26 mg (magnesium acetate as index), and those in control and model groups were ip administered with the same volume of normal saline. The volume was 2.76 mL/kg, the treatment were carried out once daily, and lasted for 14 d. The indexes of hemorheology and surface characteristics of erythrocyte membrane were determined. **Results** Compared with the model group, the whole blood viscosity 3, whole blood viscosity 50, erythrocyte electrophoretic time, and ESR equation K values in salvianolic acids (1.79 and 5.26 mg/kg) groups were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01). Compared with the model group, the contents of sialic acid in salvianolic acids (1.79 and 5.26 mg/kg) groups were significantly increased ($P < 0.05$), and Na^+ - K^+ -ATP enzyme activities and SOD levels in salvianolic acids (5.26 mg/kg) group were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Salvianolic acids can increase sialic acid contents of red cell surface, enhance antioxidant capacity of erythrocyte membrane, and improve hemorheology characteristics of diabetic rats.

Key words: salvianolic acids; hemorheology; surface biological characteristics of red cell membrane; improvement

糖尿病是以血糖代谢紊乱为特征的内分泌系统疾病。高血糖影响血液流变学表征, 而血液流变学的异常又与红细胞的变形能力相关^[1]。红细胞结构简单, 其生物学特性主要由胞膜决定, 所以研究红

收稿日期: 2015-11-09

基金项目: 黑龙江省青年科学基金资助项目 (QC2015122)

作者简介: 魏玉敏 (1978—), 女, 黑龙江人, 学士, 主管药师。Tel: (0451)85553624 E-mail: 42229166@qq.com

细胞膜的生物学特性与血液流变学的相关变化有着重要的意义。丹参乙酸镁是从丹参中发现的一个多酚酸盐化合物,能够改善血液循环,控制血栓的发生率^[2]。本实验通过对糖尿病大鼠血液流变指标和红细胞膜表面生物学特性指标的考察,分析丹参多酚酸盐对糖尿病大鼠红细胞的影响及其作用机制。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠,40 只,体质量(200±26)g,由北京维通利华实验动物技术公司提供,许可证号 SCXK(京)2012-0001。普通饲料购于梅河口市四海宏达动物蛋白饲料公司。

1.2 受试药物

注射用丹参多酚酸盐(上海绿谷制药有限公司,100 mg/瓶,含丹参乙酸镁 80 mg,批号 20140035),MES PBS 缓冲液(天津百伦斯生物技术有限公司,批号 20141203),甲苯磺酰氟(PMSF,南京奥多福尼生物科技有限公司,批号 20141108),Tris-HCl(南京奥多福尼生物科技有限公司,批号 20150304)。脂肪乳剂(自制,脂肪含量占 59%、蛋白质 25%、其余成份为碳水化合物等。聚山梨酯 80 2 mL,胆固醇 0.5 g,谷氨酸钠 0.1 g,猪油 2 g,丙基硫氧嘧啶 0.1 g,丙烯乙二醇 3 mL,蔗糖 0.5 g,果糖 0.5 g)。

1.3 仪器

THERMO Multiskan FC 全自动酶标仪(赛默飞世尔科技公司),UV 1701 双光束紫外-可见分光光度计(上海奥析科学仪器有限公司),低温超速离心机(美国 BC 公司),JA11003N 分析天平(上海精密仪器公司),台式离心机(成都分析仪器厂),Z 系列全自动血液流变测试仪(南京志伦科技有限公司),MTN-360plus 全自动生化仪(长春市曼特诺医疗器械有限公司)。

1.4 试剂

总胆固醇测定试剂盒(COD-PAP 法,中生北控生物科技股份有限公司,批号 11503220),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20150714)、Na⁺-K⁺-ATP 酶试剂盒、唾液酸试剂盒、巯基试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20150406)均购自南京建成生物工程研究所。

2 方法

2.1 糖尿病模型的制备

SD 大鼠随机分为对照组和模型组,其中对照

组 10 只,模型组 30 只。模型组大鼠 ig 脂肪乳剂 11.4 mL/kg,1 次/d。从第 14 天起,ip 小剂量四氧嘧啶,共 3 次,第一次 120 mg/kg,后两次均为 100 mg/kg,每次注射间隔时间 36 h。最后一次 ip 四氧嘧啶 72 h 后,吸入性乙醚麻醉,每只眼丛取血约 2 mL,用葡萄糖氧化酶法测量空腹血糖(FBG)水平。然后 ip 0.4 U 胰岛素(Sigma 公司, I-5500)。分别于 2.5、5 h 后 ig 25%葡萄糖溶液 10 mL/kg,对葡萄糖耐受量进行测试。测得模型组平均空腹血糖值为(14.6±3.4) mmol/L,对照组空腹血糖平均值为(3.42±0.6) mmol/L,符合世界卫生组织认定的糖尿病诊断标准(空腹血糖值>6.1 mmol/L)。

2.2 分组给药

造模成功的大鼠随机分为模型组以及丹参多酚酸高、低剂量组,每组 10 只。丹参多酚酸盐剂量按大鼠体表面积折算为以丹参乙酸镁计 1.79、5.26 mg/kg。丹参多酚酸组 ip 注射用丹参多酚酸盐 1.79、5.26 mg/kg(以丹参乙酸镁计),模型组、对照组 ip 同体积蒸馏水,给药体积均为 2.76 mL/kg,1 次/d,连续给药 14 d。

2.3 红细胞膜的制备

于末次给药后空腹 24 h,吸入性乙醚麻醉眼丛取血。取新鲜肝素抗凝血 4 mL,3 000 r/min 离心 5 min,将上清液分离,除去白血细胞和血小板,然后以 1:5 的比例用等渗 PBS 溶液稀释,1 500 r/min 条件下离心 5 min,除去上清液,重复 3 次,得纯红细胞悬浮液。以 1:40 的比例向红细胞悬浮液中添加 5 mmol/L Tris-HCl 预冷溶液(pH 7.4),同时添加少量 0.1 mmol/L PMSF 抑制蛋白,在 90 Hz 频率下超声处理 10 min。置于 4 ℃ 的条件下的冰箱中静置 4 h 后,将所得红细胞溶解后的血液以 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,再加入 5 mmol/L Tris-HCl 溶液(pH 7.4),以 12 000 r/min 离心 10 min,反复洗涤 3 次,最后得到近透明的膜。将其按照 1:1 的比例悬浮在 PBS 溶液中。膜蛋白定量后,留存代用。

2.4 血液流变学指标检测

取肝素抗凝血 5 mL,用 Z 系列全自动血液流变测试仪进行半量分析,测定血浆黏度、全血黏度、红细胞压积和红细胞变形指数等指标。

2.5 红细胞膜表面生物学特性测定

红细胞膜表面 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的测定采用紫外分光光度法。红细胞膜表面唾液酸、巯基含量

的测定根据试剂盒说明书方法。红细胞膜表面 SOD、MDA 水平检测根据试剂盒说明书方法。

2.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件处理所得数据，选用单因素方差分析进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 丹参多酚酸对糖尿病大鼠血液流变学的影响

与对照组比较，模型组大鼠血浆黏度、全血黏度 3、全血黏度 50、纤维蛋白原、红细胞电泳时间、血沉方程 K 值均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)；与模型组比较，丹参多酚酸 1.79、5.26 mg/kg 组全血黏

度 3、全血黏度 50、红细胞电泳时间、血沉方程 K 值均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，见表 1。

3.2 丹参多酚酸对糖尿病大鼠红细胞膜表面特性的影响

与对照组比较，模型组大鼠 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶活性、唾液酸含量以及 SOD 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，丹参多酚酸 1.79、5.26 mg/kg 组唾液酸含量显著升高 ($P < 0.05$)，丹参多酚酸 5.26 mg/kg 组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶活性、SOD 水平均显著升高 ($P < 0.01$)，见表 2。

表 1 丹参多酚酸对糖尿病大鼠血液流变学的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effects of salvianolic acids on hemorheology of diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血浆黏度/(mPa·s)	全血黏度 3/(mPa·s)	全血黏度 30/(mPa·s)	全血黏度 50/(mPa·s)
对照	—	1.33±0.30	10.33±0.40	6.71±0.30	4.70±0.30
模型	—	1.75±0.30 [▲]	19.31±0.60 ^{▲▲}	9.96±0.30	7.59±0.40 ^{▲▲}
丹参多	1.79	1.36±0.30	14.33±0.50 [*]	7.14±0.30	6.90±0.30 [*]
酚酸	5.26	1.35±0.30	13.31±0.60 [*]	5.10±0.30	4.59±0.70 [*]
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	全血黏度 100/(mPa·s)	全血黏度 180/(mPa·s)	还原黏度 3/(mPa·s)	还原黏度 30/(mPa·s)
对照	—	5.39±0.40	4.35±0.30	34.44±11.80	10.43±0.70
模型	—	6.67±0.50	6.33±0.40	37.13±4.90	9.17±4.70
丹参多	1.79	5.73±0.60	4.61±0.30	35.54±12.50	7.76±0.90
酚酸	5.26	5.67±0.90	4.32±1.40	36.13±15.90	9.17±0.70
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	还原黏度 50/(mPa·s)	还原黏度 100/(mPa·s)	还原黏度 180/(mPa·s)	红细胞压积/%
对照	—	7.91±0.90	7.37±0.60	5.46±0.40	45.00±3.60
模型	—	7.39±0.90	5.74±1.40	3.79±0.40	50.00±3.90
丹参多	1.79	7.03±0.70	6.11±2.50	3.97±0.40	49.00±3.60
酚酸	5.26	9.49±0.90 [*]	5.74±0.50	4.79±0.40	46.00±3.90
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	红细胞沉降率/(mm·h ⁻¹)	纤维蛋白原/(g·L ⁻¹)	红细胞聚集指数	红细胞电泳时间/s
对照	—	3.00±0.40	3.64±0.40	13.47±1.30	23.56±1.40
模型	—	30.00±6.70	5.34±0.90 [▲]	11.36±1.00	32.13±3.30 [▲]
丹参多	1.79	5.00±2.60	4.13±0.40	11.43±1.30	12.14±1.50 ^{**}
酚酸	5.26	19.00±3.70 ^{**}	2.84±0.90 ^{**}	11.06±1.00	16.13±3.30 [*]
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	红细胞变形指数/%	血沉方程 K 值	红细胞刚性指数	
对照	—	5.14±0.50	9.97±4.00	0.95±0.70	
模型	—	3.79±0.40	491.50±17.00 ^{▲▲}	0.67±0.60	
丹参多	1.79	4.41±0.40	40.30±10.00 [*]	0.79±0.50	
酚酸	5.26	5.76±0.40	13.50±17.00 [*]	0.47±0.60	

与对照组比较：[▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ ；与模型组比较：^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 2 丹参多酚酸对糖尿病大鼠红细胞膜表面特性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effects of salvianolic acids on surface characteristics of erythrocyte membrane in diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	巯基/(mmol·mg ⁻¹)	唾液酸/(mmol·mg ⁻¹)	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶/ ($\mu\text{molPi}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	MDA/(mmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)
对照	—	0.07±0.03	3.63±1.70	1.33±0.70	5.9±2.1	13.70±4.90
模型	—	0.04±0.01	1.69±0.70 [▲]	0.76±0.40 ^{▲▲}	10.9±4.6 ^{▲▲}	9.98±4.30 [▲]
丹参多	1.79	0.05±0.03	2.86±0.40 [*]	0.89±0.30	7.1±3.1	8.94±3.60
酚酸	5.26	0.06±0.03	3.98±0.40 [*]	1.21±0.60 [*]	7.3±3.7	12.10±4.10 ^{**}

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

注射用丹参多酚酸盐由丹参提取精制,对二磷酸腺苷诱导的大鼠血小板聚集具有抑制作用,能明显改变血液流变学和血流动力学特征^[3]。目前丹参多酚酸盐药理作用的研究主要集中在降低红细胞聚集指数、纤维蛋白原,提高红细胞变形指数,对抗血小板聚集等改善微循环等作用机制方面,未见其对红细胞膜表面的生物学特征影响的报道。本实验通过建立糖尿病动物模型,改变了血液流变学特征,升高血液黏度,并对这种病理状态进行及时的药物干预,考察了用药后红细胞表面特征指标的变化与血液流变学之间的关系,阐明了丹参多酚酸盐对红细胞膜的作用机制。

红细胞膜中磷脂所占比例很大,以脂肪酸的形式存在,且多数为不饱和脂肪酸。而在机体代谢过程中产生的过氧化物,易使细胞膜中的脂肪酸氧化成饱和形式。饱和形式的脂肪酸使细胞膜的流动降低,黏度增大,在实验中体现在红细胞压积和沉降率的改变过程上^[4]。

红细胞是一种最易遭受自由基损伤的细胞。生理情况下,红细胞内存在较完善的抗氧化体系,以维持平衡状态,但病理状态破坏平衡状态。本实验中 SOD 通过催化过氧阴离子发生歧化反应,对抗和阻断氧自由基对红细胞造成的损害,从而改善了红细胞膜表面的氧化特性。与模型组比较,丹参多酚酸 5.26 mg 组 SOD 水平均显著升高 ($P < 0.05$)。

红细胞膜表面唾液酸含量的变化可能与老化细胞的处理机制有关,有研究表明应用唾液酸酶消除

红细胞膜唾液酸,导致红细胞聚集性增加。唾液酸为 *N*-乙酰神经胺酸或醇羟基的衍生物,位于细胞膜糖蛋白侧链末端^[5],是细胞膜表面受体的重要组成部分。红细胞处于高血糖等病理状态时,其膜表面的唾液酸含量明显降低,与模型组比较,丹参多酚酸 1.79、5.26 mg 组唾液酸含量显著升高 ($P < 0.05$)。红细胞膜 ATP 酶活性降低以及红细胞内相应离子浓度发生改变^[6]。

综上所述,丹参多酚酸对糖尿病大鼠血液流变学具有改善作用,其作用机制可能是通过增加红细胞膜表面唾液酸含量、提高红细胞膜抗氧化能力实现的。

参考文献

- [1] 王磊,肖洪彬,牛雯颖,等.流式细胞术对 2 型糖尿病大鼠红细胞凋亡的研究 [J].中国医学物理学杂志,2015,32(5):660-663.
- [2] 侯瑞英.丹参乙酸镁对高糖诱导的细胞内氧化损伤的保护作用及其机制研究 [D].长沙:中南大学,2010.
- [3] 章红艳,章兰芳,吴艳华.注射用丹参多酚酸盐在早期糖尿病肾病治疗中的应用 [J].医学综述,2015,21(15):2867-2869.
- [4] 牛雯颖,袁良杰,张禹,等.丹参注射液对老龄大鼠红细胞膜组分的影响 [J].中国实验方剂学杂志,2013,19(11):183-186.
- [5] 袁洪亮.龙葵多糖对 H22 荷瘤小鼠红细胞膜功能的影响 [J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2011,27(1):7-11.
- [6] 张贞,李克明.丹参多酚酸盐对早期糖尿病肾病患者血清 SOD、MDA 的影响 [J].中医临床研究,2014,6(18):53-55.