

力,进而阻止纤维蛋白的凝固,抑制血栓的形成;由于凝血酶还是调节多种细胞功能的活化剂,其可与血小板结合从而刺激血小板释放活性物质,导致血栓形成,故 rH也可通过此途径抗血栓形成。

本研究采用 FeCl₃作为化学物质损伤血管壁进而形成血栓。FeCl₃不仅价廉易得,且对血管的损伤作用可靠,已为不少学者采用^[6]。血管内膜被 FeCl₃损伤后,暴露出内皮下胶原纤维,诱发血小板的黏附、聚集,继而形成血栓。文献报道 FeCl₃引起的动脉血栓形成主要成分是血小板、红细胞及纤维蛋白等^[7]。本研究证实 rH具有强大的抗 FeCl₃诱发大鼠 MCA血栓形成的作用。

另外,脑梗死急性期局部血小板聚集的同时血液凝固系统被活化,大量凝血酶产生并在脑血管内形成纤维蛋白血栓,同时,血小板黏附、聚集引起血管收缩从而导致脑微循环的障碍^[8]。Kawai等给 MCA闭塞大鼠模型应用新型选择性凝血酶抑制剂(argatroban),发现用药 1 d后,微血栓数目减少、脑血流改善、梗死灶缩小,3 d后神经症状改善^[9]。本研究中 rH亦可能通过此机制间接改善脑缺血程度。

致谢:南开大学汪和睦教授对本项研究给予热情支持与帮助。

References

- [1] Markwardt F. The development of hirudin as an antithrombotic drug [J]. *Thromb Res*, 1994, 74(1): 1-23.
- [2] Lu L, Li X Y, Han G Z, *et al*. Experimental study on *in vivo* anticoagulant activity of r-hirudin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(6): 520-522.
- [3] Jiang S Y, Li G X, Han G Z. Pharmacokinetic study with r-hirudin in rats [J]. *Asian J Drug Metab Pharmacokin*, 2003, 3(2): 129-133.
- [4] Liu X G, Xu L N. A rat MCA thrombosis model for evaluation of thrombolytic and antithrombotic agents [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1995, 30(9): 662-667.
- [5] Tamura A, Graham P I, McCulloch J, *et al*. Fatal cerebral ischemia in the rat: description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1981, 1: 53-56.
- [6] Margareta E, David G, Stefan E. Antithrombotic effects and bleeding time of thrombin inhibitors and warfarin in the rats [J]. *Thromb Res*, 1999, 94: 187-197.
- [7] Kud K D, Jakubowski J A, Smith T. Antithrombotic mechanisms involved in prevention of ferric chloride-induced arterial thrombosis in rats [J]. *Proc Am Soc Exp Biol*, 1990, 4: A1228.
- [8] Yu Y F, Dong G S. White blood cell, platelet as well as thrombin and microcirculation dysfunction [J]. *Foreign Med Sci- Cerebrovascu Dis* (国外医学·脑血管疾病分册), 2001, 9(4): 222-224.
- [9] Kawai H, Yukis H, Sugimoto J, *et al*. Effects of a thrombin inhibitor, argatroban, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, 278(2): 780-785.

葛根素对糖尿病大鼠血清 sICAM-1 ox-LDL 和血浆 TNF-α 水平的影响

茅彩萍^{*}, 顾振纶^{*}, 曹 莉, 许夕慧

(苏州大学医学院 药理教研室, 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007)

高血糖不仅是各型糖尿病的共同特征性病变,而且长期高血糖又往往导致高胰岛素血症,也是导致糖尿病血管病变的主要危险因素。研究发现细胞间黏附分子(ICAM-1)和氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)在糖尿病血管并发症如糖尿病动脉粥样硬化(AS)发生机制中起着至关重要的作用^[1,2]。肿瘤坏死因子(TNF-α)能促进血管内皮细胞表达分泌

ICAM-1等黏附分子,介导炎症细胞与内皮细胞的黏附^[3],而且这一作用在晚期糖基化终产物(AGEs)的协同作用下尤为突出^[4]。葛根素(puerarin, Pue)是从野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤 *P. thomsonii* Benth. 的根中提取的主要有效成分之一,现代药理研究表明 Pue具有活血化瘀、改善微循环、抑制醛糖还原酶活性等作用,临

* 收稿日期: 2004-04-02

基金项目: 江苏省中医药管理局科研基金资助项目 (H-028)

作者简介: 茅彩萍 (1968-), 女, 江苏张家港人, 副教授, 博士, 主要从事中药药理学研究。

Tel (0512) 65125270 E-mail Maoep1018@sina.com.cn

* 通讯作者 Tel (0512) 65190599 E-mail zhenlun.2003@163.com

床治疗冠心病、心绞痛、心肌梗死及糖尿病肾病等已取得了一定的疗效。另有报道 Pue 在体外可抑制蛋白质非酶糖化产物的产生^[5],笔者以往所做实验已表明其在体内也具有抑制蛋白质非酶糖化的作用,进而设想其是否能够通过抑制蛋白质的非酶糖化反应等途径来抑制内皮细胞表达黏附分子,降低某些有害炎症因子的高度表达,以达到保护内皮细胞的作用。本实验探讨 Pue 对以链脲佐菌素 (STZ) 诱导的糖尿病大鼠血糖、可溶性细胞间黏附分子 (sICAM-1)、ox-LDL 及 TNF-α 等相互影响糖尿病血管并发症产生的因素的调节作用,以此改善内皮细胞的功能,阻止糖尿病血管并发症发生和发展的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂: Pue (纯度 90%),由湖南金农生物资源股份有限公司提供;氨基胍 (AG)、STZ 为 Sigma 公司产品,临用前用枸橼酸缓冲液配成 1% STZ 溶液。血糖测定试剂盒,卫生部上海生物制品研究所;TNF-α 放射免疫分析测试药盒,北京东亚免疫技术研究所;sICAM-1 酶联免疫测试药盒,上海森雄科技实业有限公司;ox-LDL 酶联免疫测试药盒,上海荣盛试剂公司。

1.2 仪器: 于 68 型冷冻离心机,Beckman 公司;752 型分光光度计,上海第三分析仪器厂;电热恒温水槽,上海医疗仪器七厂;SN-682 型放射免疫 γ-计数器,中国科学院原子核研究所日环仪器厂。

1.3 动物: 清洁级雄性 SD 大鼠,由苏州大学医学院实验动物中心提供,实验动物使用许可证号: SYXK (苏) 2002-0037,实验动物生产许可证号: SCXK (苏) 2002-008。

1.4 实验方法

1.4.1 糖尿病大鼠模型的制备: 健康雄性 SD 大

鼠,体重为 180~220 g,禁食 12 h 后按文献方法^[6]并略作改进,一次性 ip STZ 60 mg/kg,空白对照组仅 ip 等量枸橼酸缓冲液,72 h 后眼底静脉丛取血,用葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖值,若空腹血糖值 ≥ 16.7 mmol/L,尿糖为 + + + ~ + + + +,确定为糖尿病大鼠。

1.4.2 实验分组、给药及指标检测: 糖尿病大鼠按血糖值范围分为 5 组: 即模型组 (DM) 组、AG 治疗组 (0.1 g/kg)、Pue 大、中、小剂量 (0.5、0.25、0.125 g/kg) 治疗组,另取 8 只大鼠作为正常对照组。各组动物每日 ig 给药 1 次,正常对照组和 DM 组 ig 自来水 10 mL/kg,连续给药 12 周。实验期间,大鼠自由饮水进食。大鼠禁食 15 h 后以 20% 乌拉坦 ip 麻醉,腹主动脉取血,分离血清,以葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖,ELISA 法测定 sICAM-1 和 ox-LDL 的水平,在含有 EDTA-Na₂ 与抑肽酶 (10 μL: 15 μL) 的试管中加全血 3 mL,3 000 r/min 离心 10 min,取血浆用放免法检测 TNF-α 的水平。

1.4.3 统计方法: 数据均用 SPSS 软件进行统计,两组间比较用方差分析 (ONE-WAY ANOVA) 中的最小显著差法 (LSD)。

2 结果

造模 12 周后,DM 组大鼠空腹血糖值较正常对照组明显升高 ($P < 0.01$),Pue 大、中剂量治疗后可显著降低糖尿病大鼠的空腹血糖值,与 DM 组比较差异显著 ($P < 0.01$);造模 12 周后,DM 组大鼠血清 sICAM-1、ox-LDL 水平及血浆中 TNF-α 水平明显升高,与正常对照组比较差异显著 ($P < 0.01$),而 Pue 大剂量组及 AG 组均可降低这些细胞因子的水平 ($P < 0.01$),Pue 中剂量组也有较明显的作用 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

3 讨论

表 1 Pue 对 STZ 诱导的糖尿病大鼠空腹血糖、血清中 sICAM-1、ox-LDL 水平及血浆中 TNF-α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effects of Pue on fasting blood glucose, sICAM-1 and ox-LDL levels in serum, and TNF-α level in plasma of diabetic rats induced by STZ ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	剂量/(g·kg ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)	sICAM-1/(pg·mL ⁻¹)	ox-LDL/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)
正常对照	8	-	6.0 ± 0.5	0.5 ± 0.12	9.26 ± 2.35	3.75 ± 1.62
DM	7	-	20.9 ± 3.4 *	0.92 ± 0.28 *	22.15 ± 3.58 *	7.92 ± 1.43 *
AG	7	0.1	19.6 ± 1.7	0.68 ± 0.20 ▲	16.33 ± 2.41 ▲	4.66 ± 1.98 ▲
Pue	8	0.5	16.8 ± 1.0 ▲	0.59 ± 0.24 ▲	14.72 ± 3.69 ▲	4.53 ± 2.02 ▲
	8	0.25	17.3 ± 1.0 ▲	0.70 ± 0.08 ▲	18.2 ± 3.93 ▲	5.9 ± 1.87 ▲
	7	0.125	18.3 ± 2.1	0.8 ± 0.32	21.07 ± 2.55	6.25 ± 2.46

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

** $P < 0.01$ vs normal control group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs DM group

研究表明慢性高血糖是糖尿病血管并发症最为危险的因素之一,因此有效控制糖尿病患者的血糖,

则可明显减少和延缓糖尿病血管并发症的发生和发展。本实验结果表明,Pue 可有效地降低糖尿病大鼠

的血糖,这无疑对缓解糖尿病及其并发症的发生和发展是有利的。

糖尿病时高浓度葡萄糖能促进细胞介导的低密度脂蛋白过氧化形成 ox-LDL, ox-LDL可形成大量的泡沫细胞,并可诱导内皮细胞凋亡,且具有很强的细胞毒性,可致内皮细胞表达黏附分子及对单核细胞的化学趋向作用促使单核细胞聚集,使内皮细胞脱落,导致内皮细胞的功能状态改变,并通过动脉壁各种基质表达促进 AS的形成^[7]。糖尿病时血管内皮细胞受损,则易受 TNF- α 、白细胞介素(IL)等炎症刺激因子及 AGEs等刺激因素的影响, ICAM等黏附分子呈高度表达,且分泌至血液中的量亦同步增加,因此我们将本实验血清中可溶性的 sICAM作为检测指标,定量反映 ICAM表达量的高低。实验结果显示:糖尿病大鼠血清 ox-LDL sICAM-1水平均有明显增高,且 sICAM-1与 ox-LDL水平呈正相关,提示 ox-LDL和 sICAM-1水平变化参与了糖尿病血管病变的发生,并进一步促进了 AS形成^[8,9],而 Pue 治疗后可明显降低糖尿病大鼠血清中过高的 sICAM-1和 ox-LDL水平,从而降低了 ox-LDL对内皮细胞的毒性作用,阻止 sICAM-1的高度表达进一步损伤血管内皮细胞。

糖尿病患者长期高血糖状态能加速和大量形成 AGEs, AGEs刺激单核细胞表达与释放 TNF- α ,其释放量随 AGEs形成的增多而增加;一定浓度的 TNF- α 在体外能诱导 ICAM-1的高度表达,而 AGEs则能同步刺激 TNF- α ICAM-1两者的高度表达;TNF- α 是一种具有多种生物学功能的细胞因子,与胰岛素抵抗和糖尿病的发生和发展都有着密切的关系^[10]。本实验结果显示, Pue可显著降低糖

尿病模型大鼠血浆 TNF- α 和血清 sICAM-1水平,其机制可能部分与 Pue在降低血糖的同时抑制蛋白质非酶糖化反应的发生有关,其确切机制有待进一步研究。

References

- [1] Zhou H, Dong X L, Nan G Z. ICAM-1 and diabetic chronic complications [J]. *Foreign Med Sci- Pathophysiol Clin Med* (国外医学·生理病理科学与临床分册), 2002, 26(7): 294-296.
- [2] Steinberg D, Lewis A. Conner memorial lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis [J]. *Circulation*, 1997, 95(4): 1062-1071.
- [3] Mackay C R, Imhof B A. Cell adhesion in the immune system [J]. *Immunol Today*, 1993, 14(3): 99-102.
- [4] Baud L, Fouqueray B. Growth hormone and somatostatin in glomerular injury [J]. *J Nephrol*, 1999, 12(1): 18-23.
- [5] Wang J, Chen M, Cao Y, et al. Effect of Kokonein and Ginkgo flavone on protein nonenzymatic glycosylation [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2000, 16(1): 13-14.
- [6] Zhang J T. *Modern Methodology in Pharmacological Experiment* (现代药理实验方法学) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Press, 1998.
- [7] Ed W, Weber P C, Weber C. Monocytic cell adhesion to endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoprotein is mediated by distinct endothelial ligands [J]. *Atherosclerosis*, 1998, 136(2): 297-303.
- [8] Ferri C, Ddesideri G, Baldoncini R, et al. Early activation of vascular endothelium in nonobese, nondiabetic essential hypertensive patients with multiple metabolic abnormalities [J]. *Diabetes*, 1998, 47(4): 660-667.
- [9] Albertini J R, Velensi P, Lormeau B, et al. Elevated concentration of soluble E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 in NIDDM. Effect of intensive insulin treatment [J]. *Diabetes Care*, 1998, 21(6): 1008-1013.
- [10] Zhou Y R. Effect of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the mechanism of insulin resistance [J]. *Foreign Med Sci- Immunology* (国外医学·免疫学分册), 2002, 25(5): 276-279.

美国 ALPHA实验室认可

美中国际合作中国企业

葡萄籽提取物

(原花青素 $\geq$ 95%)

专业生产厂家

电话: 0086-022-26721040; 26723305; 26737125

传真: 0086-022-26721041

网址: <http://www.jf-natural.com>

Tianjin Jianfeng Natural Product R & D Co., Ltd

天津尖峰天然产物公司

天津北辰科技园科园路