

而与 LTL 组作用接近;对于 APO 引起的自发活动增强,UMHS 及 JLY 和 LTL 的作用相近。对于 APO 引起的血浆与脑内 DA 含量的改变,UMHS 与 JLY 均能给予校正,使其接近正常值水平。

References:

[1] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理学实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991.

[2] Du Y S. Monoamine mechanism of hyperkinetic syndrome

[J]. *Foreign Med Sci—Paediatr* (国外医学·儿科学分册), 1995, 22: 116.

[3] Lindon J C, Holmes E, Nicholson J K. So what's the deal with metabonomics? [J]. *Anal Chem*, 2003, 75(17): 384A-391A.

[4] Liu C X, Li C, Lin D H, et al. Significance of metabonomics in drug discovery and development [J]. *Asian J Drug Metab Pharmacokinet*, 2004, 4(2): 87-96.

[5] Liu C X. Significance of metabonomics in traditional Chinese medicines [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(6): 601-605.

葛根素对糖尿病大鼠主动脉内皮形态功能的影响

茅彩萍, 顾振纶, 许夕慧, 曹 莉

(苏州大学医学院 药理教研室、苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007)

摘要:目的 探讨链脲佐菌素 (STZ) 诱导的糖尿病 (DM) 大鼠血管内皮细胞形态和功能变化, 及葛根素 (Pue) 对其的影响。方法 以 STZ 诱导 DM 大鼠模型, 将 DM 大鼠随机分为 DM 模型组、不同剂量 Pue 治疗组 (0.5、0.25、0.125 g/kg, ig) 和氨基胍治疗组 (0.1 g/kg, ig), 另设一正常对照组; 分别于给药 8 周、12 周时, 以葡萄糖氧化酶法测定血糖, 放免法测定血浆内皮素-1 (ET-1), 硝酸还原酶法测定一氧化氮 (NO)、一氧化氮合酶 (NOS) 的水平, 并取主动脉作光镜和电镜观察。结果 DM 大鼠血糖、血浆 ET-1 水平明显升高, 而 NO、NOS 水平明显下降; 且 8 周时光镜下可见主动脉内皮细胞肿胀, 有的突向腔面; 电镜下内皮细胞线粒体明显肿胀、空泡变, 12 周内皮细胞广泛坏死脱落, 病变加重。Pue 治疗组血糖、血浆 ET-1 含量明显降低, 而 NO、NOS 水平显著上升, 主动脉内皮病变也明显减轻。结论 Pue 可通过降低 DM 大鼠血糖, 调节 ET-NO 间动态平衡, 对主动脉内皮细胞损伤产生一定的保护作用。

关键词:糖尿病; 内皮细胞; 内皮素; 一氧化氮; 葛根素

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)03-0402-04

Effect of puerarin on morphology and function of aortic endothelium in diabetic rats

MAO Cai-ping, GU Zhen-lun, XU Xi-hui, CAO Li

(Department of Pharmacology, Suzhou Institute of Chinese Materia Medica, Medical College of Suzhou University, Suzhou 215007, China)

Key words: diabetic mellitus (DM); endothelial cell; endothelin; nitric oxide (NO); puerarin (Pue)

糖尿病血管并发症 (diabetic vascular complications, DVC) 以全身血管损害为特点, 而血管内皮细胞损伤是血管病变的一个重要原因。研究表明内皮素-一氧化氮 (ET-NO) 间的动态平衡对维持内皮细胞的正常形态功能及血流动力学等起着重要作用, 糖尿病时高血糖引起蛋白非酶糖化和氧化应激增加、血液流变学异常、蛋白激酶 C 激活等均参与损伤血管内皮细胞, 致使血管平滑肌细胞过度增殖, ET-NO 平衡失调, 血管功能障碍和动脉粥样硬化形成, 进一步加重 DVC 的发生发展^[1]。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。前期研究表明 Pue 可通过下调肾脏蛋白激酶 C (PKC) 活性来改善糖尿病大鼠高血糖状态下引起的肾脏形态和功能损伤, 对糖尿病大鼠肾脏病变有一定的保护作用^[2]; Pue 还可在降低糖尿病大鼠血糖的同时, 降低血清中可溶性细胞间黏附分子 (SICAM-1)、氧化低密度脂蛋白 (OX-LDL) 和血浆中肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 的含量, 控制 DVC 的发生发展^[3]。本研究以 STZ 诱

收稿日期: 2004-06-19

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, 江苏苏州人, 副教授, 博士, 主要从事中药药理学的研究。

Tel: (0512) 65125270 E-mail: Maocp1018@sina.com.cn

导 DM 大鼠模型,观察不同病程时 DM 大鼠血糖、内皮素-1 (ET-1)、一氧化氮 (NO)、一氧化氮合酶 (NOS) 水平的变化、主动脉超微结构改变,以及 Pue 对上述指标的影响,以此探讨糖尿病大鼠血管内皮损伤的机制和葛根素对此的防治作用。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂:葛根素 (Pue),棕黄色粉末 (纯度 90%),由湖南金农生物资源股份有限公司提供;氨基胍 (aminoguanidine, AG)、链脲佐菌素 (STZ),Sigma 公司产品,临用前用柠檬酸缓冲液配成 1% 的 STZ 溶液。血糖测定试剂盒,卫生部上海生物制品研究所产品;ET 放射免疫分析测试药盒,北京东亚生物制品公司产品;NO、NOS 测试药盒,南京聚力生物医学工程研究所产品。

1.2 仪器:J-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),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),Leica 2135 石蜡切片机,Olympus 显微镜;H-600 型电子显微镜 (日立公司)。

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 糖尿病大鼠模型的建立、分组及给药:健康雄性 SD 大鼠,体重为 180~220 g,禁食 12 h 后按文献方法^[4]并略作改进,一次性 ip STZ 60 mg/kg 制备大鼠模型,空白对照组仅 ip 等量柠檬酸缓冲液,72 h 后眼底静脉丛取血,用葡萄糖氧化酶法测定血糖,若血糖值 ≥ 16.7 mmol/L,尿糖为 +++~++++ 者,确定为糖尿病大鼠。将糖尿病大鼠随机分为 5 组:即模型组 (DM 组),Pue 大、中、小剂量组 (0.5、0.25、0.125 g/kg),AG 治疗组 (0.1 g/kg),另取 8 只大鼠作为正常对照组。在注射 STZ 4 d 后,各组大鼠分别每日 ig 给予相应的药物 1 次,连续给药 12 周。

1.5 取材与指标测定:分别于给药 8 周、12 周时,大鼠禁食 15 h 后,麻醉,腹主动脉取血,分离血清测定血糖、硝酸还原酶法测定 NO 和 NOS 的水平;并取 3 mL 注入含抑肽酶的抗凝管中,4 $^{\circ}$ C 3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆,放免法检测 ET-1 的水平。取血后处死大鼠,分离主动脉,以眼科剪纵向剪开动脉,并将内表面朝上贴于滤纸上,用生理盐水冲洗,置福尔马林液固定,HE 染色进行光镜检查,另剪取约 1 cm 长主动脉,放入 4% 戊二醛固定,1% 锇酸固定,乙醇梯度脱水,包埋剂渗透包埋,切片,经

醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色,制作电镜标本。

1.6 统计方法:数据均用 SPSS10.0 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

2.1 各组大鼠空腹血糖的变化:各组大鼠给药后 8 周和 12 周,结果表明:大、中剂量 Pue 治疗后糖尿病大鼠血糖值较 DM 模型组显著降低 ($P < 0.05$),但仍高于正常组。说明 Pue 具有明显的降血糖作用,但尚不能使血糖恢复到正常水平。见表 1。

表 1 Pue 对 STZ 诱导的糖尿病大鼠空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Pue on fasting blood glucose in diabetic rats induced by STZ ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /(g · kg ⁻¹)	8 周		12 周	
		动物 /只	血糖 /(mmol · L ⁻¹)	动物 /只	血糖 /(mmol · L ⁻¹)
正常	—	8	5.9 ± 0.7	8	6.0 ± 0.5
DM 模型	—	8	22.3 ± 2.7**	7	20.9 ± 3.4**
AG	0.1	8	20.7 ± 2.4**	7	19.6 ± 1.7**
Pue	0.5	8	19.2 ± 1.5**▲▲	8	16.8 ± 1.6**▲▲
	0.25	8	19.7 ± 2.3**▲	8	17.3 ± 1.0**▲▲
	0.125	8	20.4 ± 3.0**	7	18.3 ± 2.1**

与正常组比较: ** $P < 0.01$

与 DM 模型组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs normal group

▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs DM model group

2.2 血浆 ET-1、血清 NO 和 NOS 水平的变化:8 周、12 周时糖尿病大鼠血浆 ET-1 明显升高,血清 NO 含量明显降低,与正常组比较 ($P < 0.01$),Pue 大、中剂量组及 AG 组均可明显降低 ET-1 水平,明显提高 NO 和 NOS 水平 ($P < 0.01, 0.05$),见表 2。

2.3 主动脉形态学变化

2.3.1 主动脉光镜观察结果:8 周时糖尿病大鼠主动脉有不同程度的内膜增厚病灶,局部主要由排列紊乱的平滑肌组成,病灶表面内皮细胞肿胀,有的向腔面突起,内弹力板局部厚薄不均;Pue 治疗后,主动脉内皮细胞肿胀程度减轻,内弹力板较平直,内皮下纤维组织轻度增生。12 周时,糖尿病大鼠主动脉内皮细胞有的脱落、甚至坏死,内弹力板厚薄不均或分层,中膜浅层平滑肌细胞增生,中层弹力板与平滑肌细胞间排列紊乱;Pue 治疗组主动脉内膜较平坦,内皮细胞扁平,内弹力板较平直,中弹力板与平滑肌细胞之间较整齐相间排列,接近于正常。

2.3.2 主动脉超微结构变化:8 周时糖尿病大鼠内皮细胞内线粒体肿胀、空泡变明显;Pue 治疗组内皮细胞也有轻度线粒体的肿胀、空泡变。12 周时,糖尿

表 2 Pue 对 STZ 诱导的糖尿病大鼠血浆 ET-1、血清 NO 和 NOS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Pue on plasma ET-1, serum NO, and NOS levels in diabetic rats induced by STZ ($\bar{x} \pm s$)

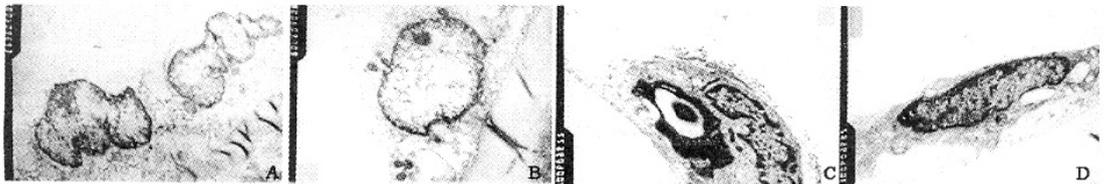
组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	8 周			12 周				
		动物/只	ET-1/(pg·mL ⁻¹)	NO/(μmol·L ⁻¹)	NOS/(U·mL ⁻¹)	动物/只	ET-1/(pg·mL ⁻¹)	NO/(μmol·L ⁻¹)	NOS/(U·mL ⁻¹)
正常	—	8	80.4±12.5	76.3±5.4	0.81±0.21	8	77.2±18.4	79.8±7.6	0.72±0.14
DM 模型	—	8	114.5±19.3**	54.6±3.8**	0.52±0.11**	7	125.1±25.6**	48.2±6.9**	0.43±0.10**
AG	0.1	8	96.2±13.1▲	69.8±6.1▲▲	0.64±0.25▲▲	7	88.6±17.2▲▲	65.4±7.2▲▲	0.59±0.08▲▲
Pue	0.5	8	88.6±13.7▲▲	66.9±7.3▲▲	0.63±0.07▲	8	84.1±16.4▲▲	61.5±7.4▲▲	0.58±0.12▲▲
	0.25	8	95.8±16.2▲	62.7±5.4	0.60±0.16	8	97.3±20.1▲	56.3±6.4▲	0.54±0.10▲
	0.125	8	110.3±17.2	56.5±4.9	0.53±0.22	7	106.2±18.4	52.6±7.0	0.48±0.17

与正常组比较: **P<0.01; 与 DM 模型组比较: ▲P<0.05 ▲▲P<0.01

**P<0.01 vs normal group; ▲P<0.05 ▲▲P<0.01 vs DM model group

病大鼠可见主动脉内膜增厚,内皮细胞线粒体肿胀、空泡变性明显、有的游离内弹力膜,有的核边集似凋亡。内皮细胞下间隙增宽,其胞浆内也可见空泡,有自溶现象,并有较正常明显增多的糖原颗粒,细胞浆内吞饮小泡明显增多,细胞核周池增宽,细胞周围有较多基质和细纤维,内弹力板厚薄不均匀,可见断裂,中膜浅层平滑肌增生,多突起,排列紊乱,平滑肌

细胞间基质和纤维增多,可见平滑肌细胞穿越内弹力板断裂处进入内膜,且此类平滑肌细胞内常无密斑、密体结构,表明此类平滑肌细胞有向纤维细胞转化趋势;Pue 治疗组内皮细胞线粒体有不同程度肿胀、少见空泡变性,无内皮细胞坏死脱落现象,内弹力板厚薄较均匀,Pue 大剂量组主动脉内皮细胞超微结构基本正常(图 1)。



A-模型组(8周) B-Pue 0.5 g/kg 组(8周) C-模型组(12周) D-Pue 0.5 g/kg 组(12周)

A-model group (8 weeks) B-Pue 0.5 g/kg group (8 weeks) C-model group (12 weeks) D-Pue 0.5 g/kg group (12 weeks)

图 1 电镜下观察 Pue 对 STZ 诱导的糖尿病大鼠主动脉内皮细胞超微结构的影响

Fig. 1 Effects of Pue on aortic endothelium ultrastructure in diabetic rats induced by STZ under electron microscope

3 讨论

ET-NO 系统是血管内皮细胞的重要调节系统,对维持血管正常的生理功能(形态、通透性、收缩与舒张功能)起着重要作用。糖尿病时高血糖等因素引起血管内皮细胞受损,ET-NO 系统功能失调,并最终导致 DVC 的产生[5]。ET-1 主要由内皮细胞产生,是目前已知作用最强和维持时间最持久的一种缩血管物质,是调节血管通透性的重要因子,并与其他因子如血管表皮生长因子(VEGF)、NO 等共同作用[6,7],NO 是由 NOS 催化 L-精氨酸与氧分子经多步氧化还原反应生成,NOS 是 NO 合成过程中的关键酶。诱导型 NOS(iNOS)在受到细胞因子刺激时,通过启动基因转录合成 iNOS,进而生成高浓度的 NO,高浓度 NO 是损伤胰岛 β 细胞的终末因子,而血清 NO 水平代表体内 NO 水平。由于糖尿病慢性并发症的原发病损在血管(如视网膜、肾脏、心脏、神经等部位的血管),而血管内皮细胞损伤是血管病变的始动环节,高血糖时血管内皮细胞

形态学的变化在 DVC 中起重要作用[8]。

本实验结果发现在不同病程中,糖尿病大鼠血糖、血浆 ET-1 明显升高,NO、NOS 水平明显下降,电镜下 8 周时糖尿病大鼠主动脉内皮细胞只出现线粒体肿胀、空泡变,而 12 周时内皮细胞则有大量坏死脱落现象,表明随病程的延长,其内皮细胞病变是由量变到质变的过程,此时,血管中膜平滑肌细胞穿越内弹力膜进入内膜层,并有向纤维细胞转化的趋势,提示了血管内皮细胞损伤后内膜增厚的原因,同时内皮细胞脱落,内膜裸露,可见血浆蛋白附着物黏附在内皮细胞上,而血液成分黏附到血管壁上,是引起血小板聚集和血栓形成等血管病变的始动环节,也是动脉粥样硬化、DVC 发病中的关键因素之一[9]。Pue 治疗后糖尿病大鼠血糖、血浆 ET 水平下降明显,而血清 NO 及 NOS 水平提高,从而抑制某些细胞的异常生长增殖,抑制细胞外基质(ECM)合成。电镜下 Pue 治疗组大鼠主动脉未见内皮细胞坏死脱落现象,但内皮细胞内仍可见线粒体有不同

程度肿胀和空泡变,12周后主动脉内皮细胞病变程度较8周时有较大改善。本实验结果表明Pue对糖尿病大鼠主动脉内皮细胞结构和功能损伤均具有一定的保护作用,该作用的产生可能与Pue降低糖尿病大鼠血糖,调节ET-NO动态平衡,改善内皮功能,提高血管自身保护机制有关。提示Pue对预防或减轻DVC病变无疑是有益的。

References:

- [1] Guo L X, Wang R P. Endothelin converting enzyme, endothelin-1 and diabetic vascular complications [J]. *Chin J Diabetes* (中国糖尿病杂志), 2000, 8(5): 301-303.
- [2] Mao C P, Gu Z L, Cao L. Effects of puerarin on renal protein kinase C activity in diabetic rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(10): 1141-1144.
- [3] Mao C P, Gu Z L. Effects of puerarin on sICAM-1, ox-LDL levels in serum and TNF- α level in plasma of diabetic rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 86-88.
- [4] Zhang J T. *Modern Methology in Pharmacological Experiments* (现代药理实验方法学) [M]. Beijing: Beijing Medical College and Peking Union Medical College United Press, 1998.
- [5] Du X L, Sun Y, Chen L, et al. Effect of high-glucose and high-insulin on the adhesive function of vascular endothelial cells [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 1998, 14(1): 66-70.
- [6] Chen S, Apostolova M D, Cherian M C, et al. Interaction of endothelin-1 with vasoactive factors in mediating glucose-induced increased permeability in endothelial cells [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(8): 1311-1321.
- [7] Moncada, Palmer R M, Higgs E A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology [J]. *Pharmacol Rev*, 1991, 43(2): 109-142.
- [8] Duan W Z, Wang J F, Ding Y, et al. Effect of hyperglycemia on vascular endothelium-dependent relaxation in rats [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 1998, 14(5): 488-491.
- [9] Cohen X, Lin S K. Ramipril induces delayed endothelial preconditioning against free radical injury via heart protein synthesis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 27: 156-162.

何首乌中二苯乙烯苷在大鼠体内的药动学

孙江浩,袁志芳,王春英,许慧君,张兰桐*

(河北医科大学药学院 药物分析教研室,河北 石家庄 050017)

摘要:目的 建立大鼠血浆及组织匀浆中二苯乙烯苷的RP-HPLC测定方法,研究何首乌中二苯乙烯苷在大鼠体内的药动学及组织分布。方法 色谱条件:用Diamondsil™ C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),乙腈-甲醇-水(15:18:67)为流动相,体积流量1.0 mL/min,检测波长320 nm。大鼠iv二苯乙烯苷20、10 mg/kg及ig二苯乙烯苷100、50 mg/kg,于不同时间点取血浆及组织,HPLC法测二苯乙烯苷血药浓度及在组织中的浓度。数据用3P97软件拟合,计算药动学参数。结果 大鼠iv不同剂量二苯乙烯苷后药动学模型为二室开放模型;ig不同剂量二苯乙烯苷后药动学模型符合一室模型;大鼠iv及ig二苯乙烯苷后,在体内分布广泛,大鼠iv二苯乙烯苷后以肝、心、肺中分布较高;ig二苯乙烯苷后心、肾中分布较高。结论 建立了大鼠血浆及组织匀浆中二苯乙烯苷的RP-HPLC测定方法,阐明了二苯乙烯苷在大鼠体内的药动学特征及组织分布情况。方法简便快速,结果准确可靠。

关键词:反相高效液相色谱法;何首乌;二苯乙烯苷;药动学

中图分类号:R285.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)03-0405-04

Pharmacokinetics of stilbene glycoside from *Polygonum multiflorum* in rats *in vivo*

SUN Jiang-hao, YUAN Zhi-fang, WANG Chun-ying, XU Hui-jun, ZHANG Lan-tong

(Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Key words: RP-HPLC; *Polygonum multiflorum* Thunb.; stilbene glycoside; pharmacokinetics

二苯乙烯苷(2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯 2-O- β -D-葡萄糖苷)是中药何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 中分离得到的羟基蒽醌类化合物,具有明显降低大鼠血清中总胆固醇以及抗氧化、清除自由基等药理作用^[1~3]。何首乌原药材及多种含何首乌的制剂均以二苯乙烯苷作为质量控制指标。笔者曾

采用HPLC法研究了二苯乙烯苷在小鼠体内的药动学特征,并在研究过程中获得一体内代谢物,确定其为二苯乙烯苷的葡萄糖醛酸结合物^[4]。本实验自何首乌中分离提取二苯乙烯苷单体成分,进一步研究其在大鼠体内的药动学及组织分布情况。

1 材料与方法

收稿日期:2004-05-10

作者简介:孙江浩(1980—),男,河北医科大学药学院2001级硕士研究生,研究方向为中药有效成分的药动学研究。

*通讯作者 Tel: (0311) 6265625 Fax: (0311) 6052053 E-mail: zhanglantong@263.net