

抵挡汤早期干预对2型糖尿病大鼠大血管病变的影响及其机制

潘从清¹, 常柏¹, 李巧芬², 杨振华², 常宝成¹, 孟东¹, 陈莉明¹, 李春深^{2*}

1. 天津医科大学代谢病医院, 天津 300070

2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要:目的 观察抵挡汤早期干预对糖尿病大鼠大血管病变的影响及其机制。方法 采用高脂饲料喂养及链尿佐菌素(STZ)诱导方法制备2型糖尿病大鼠模型,大鼠分成对照组,模型组,抵挡汤早期(给予STZ前4周给药)、中期(与STZ同时给药)及晚期(给予STZ后4周给药)干预组(每天均ig给予抵挡汤3.24 g/kg 1次),阳性药吡咯列酮(2.7 mg/kg)和辛伐他汀(1.8 mg/kg)组,各组给药至给予STZ后24周。免疫组化染色法观察大鼠主动脉细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)的表达,Western blotting法检测主动脉核因子- κ B(NF- κ B)及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白表达。结果 与模型组比较,抵挡汤早期和中期干预组、辛伐他汀组大鼠主动脉ICAM-1表达减少($P < 0.05$);抵挡汤早期干预组与辛伐他汀组主动脉VCAM-1表达减少($P < 0.05$);抵挡汤早期和中期干预组主动脉NF- κ B及MMP-9蛋白表达明显降低($P < 0.05$),其中以抵挡汤早期干预组效果最显著。结论 抵挡汤早期干预有效降低NF- κ B调控的靶基因ICAM-1、VCAM-1及MMP-9蛋白表达,可能是其延缓2型糖尿病大鼠大血管病变发展的重要机制之一。

关键词: 抵挡汤; 2型糖尿病; 大血管病变; 细胞间黏附分子-1; 血管细胞黏附分子-1; 核因子- κ B; 基质金属蛋白酶

中图分类号: R285.5; R977.15 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)08-1013-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.018

Early intervention of Didang Decoction on macroangiopathy in type 2 diabetic rats and its mechanisms

PAN Cong-qing¹, CHANG Bai¹, LI Qiao-fen², YANG Zhen-hua², CHANG Bao-cheng¹, MENG Dong¹, CHEN Li-ming¹, LI Chun-shen²

1. Tianjin Medical University Metabolic Diseases Hospital, Tianjin 300070, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To observe the effects of the early intervention with Didang Decoction (DDD) on macroangiopathy in type 2 diabetic rats. **Methods** The type 2 diabetic rat model was established using high-fat diet and Streptozotocin (STZ), and the rats were divided into control, model, Pioglitazone (2.7 mg/kg), Simvastatin (1.8 mg/kg), early-, mid-, and late-term DDD-intervene groups (ig administered with 3.24 g/kg DDD once daily, before 4 weeks, at the same time, and after 4 weeks of STZ administration, respectively), the rats in each group were administered until 24 weeks of STZ administration. The immunohistochemical and pathological changes of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in the aorta were observed, and the expression of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) in aorta was detected using Western blotting. **Results** Compared with the model group, the ICAM-1 expression decreased in early- and mid-term DDD-intervene groups, and Simvastatin group ($P < 0.05$), the VCAM-1 expression decreased in early-term DDD-intervene and Simvastatin groups ($P < 0.05$), the protein expression of NF- κ B and MMP-9 was lower in early- and mid-term DDD-intervene groups ($P < 0.05$), and it is the most obvious in early-term DDD-intervene group. **Conclusion** The contents of ICAM-1 and VCAM-1 as well as the protein expression of NF- κ B and MMP-9 in type 2 diabetic rats decrease after early-term DDD-intervene, which could regulate NF- κ B signaling pathway to delay the development of diabetic macroangiopathy.

Key words: Didang Decoction; type 2 diabetes; macroangiopathy; intercellular cell adhesion molecule-1; vascular cell adhesion molecule-1; NF- κ B; matrix metalloproteinases-9

收稿日期: 2012-06-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973753)

作者简介: 潘从清(1965—),男,医学博士,主要研究方向为糖尿病及并发症的临床和基础研究。E-mail: cq.pan@163.com

*通信作者 李春深 Tel: (022)59596201 E-mail: lichunshen@126.com

糖尿病大血管病变是糖尿病患者致死、致残的主要因素之一。单纯控制血糖不足以阻止大血管病变的发生和发展^[1]。而动脉粥样硬化的发生与发展中的并发症均伴随炎症细胞（单核细胞、巨噬细胞等）、炎症蛋白（细胞因子、趋化因子等）和血管细胞的炎症反应^[2]。抵挡汤（Dedang Decoction, DDD）出自《金匱要略》，由桃仁、水蛭、虻虫、大黄组成，具有活血通络、逐瘀攻下功效，对糖尿病血管内皮功能具有很好的干预作用^[3]，但其作用机制研究较少。本实验通过检测抵挡汤早期干预对链脲佐菌素（STZ）致糖尿病大鼠单核细胞、巨噬细胞趋向性的关键环节——核因子- κ B（NF- κ B）及其调控的靶基因细胞间黏附分子-1（ICAM-1）、血管细胞黏附分子-1（VCAM-1）、基质金属蛋白酶-9（MMP-9）的影响，探讨其调节糖尿病大鼠大血管病变的可能机制。

1 材料

1.1 药物与试剂

抵挡汤生药（桃仁 10 g、水蛭 10 g、虻虫 10 g、大黄 6 g），购于天津中医药大学第一附属医院药剂科，按传统工艺制备水煎剂^[3]，减压浓缩至含生药 1 g/mL，4 °C 保存备用；吡格列酮（批号 100634-200401），武田制药有限公司，规格为 4 mg/片；辛伐他汀（批号 09128），辉瑞制药有限公司，规格 10 mg/片。STZ，美国 Sigma 公司；胰岛素放免测定试剂盒，天津九鼎医学生物工程有限公司；ICAM-1 一抗、辣根过氧化物酶（HRPO）标记羊抗兔 IgG 二抗、5%牛血清白蛋白（BSA）、链霉亲和素-生物素复合物（SABC）、二氨基联苯胺（DAB）试剂，武汉博士德公司；VCAM-1 一抗，Santa Cruz 公司；NF- κ B、MMP-9 一抗，美国 Abbiotec 公司。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠，4 周龄，体质量（100.30±2.19）g，天津实验动物中心提供，动物合格证号：SCXK（津）2005-001。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

采用高脂饲料喂饲结合注射 STZ 方法制备大鼠糖尿病模型^[4]：大鼠以高脂饲料饲养 8 周后，单次 ip 给予 STZ 30 mg/kg，3 d 后检测随机血糖水平，血糖值高于 16.7 mmol/L 为模型制备成功。将大鼠随机分成对照组，抵挡汤早期、中期、晚期干预组，吡格列酮组、辛伐他汀阳性对照组，每组 20 只，剔除造模不成功的大鼠（其中抵挡汤早期、中期、晚

期干预组和辛伐他汀组各剔除 2 只，模型组和吡格列酮组各剔除 1 只）。所有给药组均以体表面积折合成等效剂量给药。抵挡汤早期、中期、晚期干预组分别于 ip STZ 前 4 周、ip STZ 同时、ip STZ 后 4 周 ig 给予抵挡汤生药 3.24 g/kg，2 个阳性对照组在 ip STZ 的同时分别 ig 给予吡格列酮（2.7 mg/kg）、辛伐他汀（1.8 mg/kg），每天给药 1 次，各组均给药至 ip STZ 后 24 周。

2.2 样本采集

实验末大鼠隔夜禁食，股动脉取血，离心分离血清，-20 °C 保持备用。颈椎脱臼处死，迅速剖取大鼠胸主动脉组织，一部分胸主动脉以 4%多聚甲醛溶液 4 °C 固定，用于免疫组化检测，另一部分分别放入不同冻存管中，置于液氮 1 d 后转移至-80 °C 冰箱中保存，用于 Western blotting 检测。

2.3 指标检测

2.3.1 2 型糖尿病大鼠一般状况与血糖检测 观察大鼠的一般精神状态、自由饮食及饮水等情况，分别于实验开始、实验第 12、24 周检测大鼠空腹血糖。

2.3.2 免疫组化法检测 ICAM-1 和 VCAM-1 表达 将在 4%多聚甲醛中固定的大鼠主动脉取出，流水冲洗，采用卵蛋白-生物素复合技术，免疫组化染色后显微镜观察 ICAM-1 和 VCAM-1 阳性表达。用计算机-图像分析仪对免疫组化载玻片图像中的阳性反应部位进行积分光密度分析，每张载玻片随机选取 3 个图像，取其平均值作为每张载玻片的积分光密度值；每条主动脉采集 3 张载玻片图像的积分光密度值，取平均值作为该主动脉的积分光密度值，每组取 8 条主动脉标本进行统计学分析。

2.3.3 Western blotting 法检测 NF- κ B 和 MMP-9 蛋白表达 用 RAPA 裂解液裂解各组大鼠主动脉组织，提取总蛋白，聚丙烯酰胺变性凝胶分离蛋白，12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）电泳，湿法转膜法将蛋白转移至硝酸纤维素膜上，经 5%脱脂奶粉封闭；加入 1：200 稀释的 NF- κ B 及 MMP-9 一抗，室温结合 2 h。洗涤后加入 1：10 000 辣根过氧化物酶标记二抗，等比例混合显色基质 A 液和 B 液，静置 2 min 放入暗盒曝光显影，用凝胶图像分析所得电泳图的平均光度值。

2.4 统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分

析, 两两比较时, 组间方差齐采用 LSD 法, 方差不齐采用 Dunnett's T3 法。

3 结果

3.1 对 2 型糖尿病大鼠血糖水平的影响

与对照组相比, 模型组大鼠血糖水平明显升高 ($P < 0.05$), 提示造模成功。与模型对照组相比, 抵挡汤各组 and 辛伐他汀组血糖无显著变化, 提示抵挡汤和辛伐他汀无明显降血糖作用; 吡格列酮组大鼠血糖明显降低 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

3.2 对 2 型糖尿病大鼠胸主动脉 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响

与对照组相比, 模型组大鼠胸主动脉 ICAM-1

和 VCAM-1 表达明显上调 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 抵挡汤早期和中期干预组、辛伐他汀组 ICAM-1 表达下调 ($P < 0.05$), 抵挡汤早期干预组和辛伐他汀组 VCAM-1 表达显著下调 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

3.3 对 2 型糖尿病大鼠胸主动脉 NF- κ B 和 MMP-9 蛋白表达的影响

与对照组相比, 模型组大鼠胸主动脉 NF- κ B 及 MMP-9 蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 抵挡汤早期、中期干预组 NF- κ B 及 MMP-9 蛋白表达明显下调 ($P < 0.05$), 其中抵挡汤早期干预组效果最明显。结果见表 2。

表 1 抵挡汤对 2 型糖尿病大鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of DDD on blood glucose level of type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物 / 只	血糖 / (mmol·L ⁻¹)		
			给药 0 周	给药 12 周	给药 24 周
对照	—	20	5.34 ± 1.24	5.96 ± 1.31	5.85 ± 1.08
模型	—	19	25.95 ± 3.46 [▲]	28.33 ± 4.36 [▲]	27.66 ± 3.11 [▲]
抵挡汤早期干预	3.24	18	27.80 ± 4.68	27.05 ± 5.24	26.70 ± 6.64
抵挡汤中期干预	3.24	18	27.29 ± 6.62	25.38 ± 8.25	26.12 ± 8.14
抵挡汤晚期干预	3.24	18	28.15 ± 5.57	24.46 ± 5.10	25.48 ± 6.23
吡格列酮	0.002 7	19	27.95 ± 3.46*	14.95 ± 3.58*	10.95 ± 3.64*
辛伐他汀	0.001 8	18	28.02 ± 2.65	27.29 ± 6.43	26.12 ± 7.15

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$, 下表同
[▲] $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group, same as below

表 2 抵挡汤对 2 型糖尿病大鼠胸主动脉 ICAM-1、VCAM-1 和 NF- κ B、MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of DDD on expression of ICAM-1 and VCAM-1, and NF- κ B and MMP-9 protein in thoracic aorta of type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	ICAM-1	VCAM-1	NF- κ B	MMP-9
对照	—	108.4 ± 10.3	74.3 ± 3.7	12.20 ± 0.35	3.57 ± 0.71
模型	—	946.1 ± 49.2 [▲]	671.5 ± 53.4 [▲]	22.15 ± 1.07 [▲]	15.33 ± 2.34 [▲]
抵挡汤早期干预	3.24	683.0 ± 25.2*	521.8 ± 32.8*	14.89 ± 0.61*	5.53 ± 0.55*
抵挡汤中期干预	3.24	727.2 ± 53.7*	628.0 ± 39.1	16.05 ± 0.73*	7.30 ± 2.80*
抵挡汤晚期干预	3.24	872.3 ± 43.8	659.3 ± 34.1	19.64 ± 0.89	13.80 ± 1.91
吡格列酮	0.002 7	801.3 ± 32.4	656.1 ± 31.2	16.27 ± 0.65*	12.40 ± 0.44
辛伐他汀	0.001 8	710.1 ± 46.3*	546.0 ± 26.3*	18.11 ± 0.63	6.83 ± 0.21*

4 讨论

由于动脉粥样硬化加速而造成的糖尿病患者的心血管疾病发病率和致死率的增加是糖尿病的严重后果。严格控制血糖虽可减少 1 型糖尿病患者心血管疾病的发生, 但对 2 型糖尿病患者的效果却

与此不同^[5]。在静止期的细胞中, NF- κ B 二聚体与其抑制蛋白 I κ Bs 结合而处于非激活状态, 当其激活后可调节 160 余种基因的表达, 其中许多基因的表达产物如炎症因子及细胞因子等参与了动脉粥样硬化的过程^[6]。NF- κ B 的不适当激活是引起炎症

和氧化损伤的关键步骤, 控制 NF- κ B 的不适当激活是治疗动脉粥样硬化的重要策略之一。NF- κ B 信号转导通路是影响单核细胞(或)巨噬细胞趋向性的关键环节。由血管壁低密度脂蛋白(LDL)的修饰到引发炎症、趋化因子的释放、内皮细胞表面黏附分子的表达, 这些程序导致单核细胞向待损害部位聚集, 其中均有 NF- κ B 参与。在早期 LDL 修饰和炎症脂质介质形成过程中有几种很重要的酶均受 NF- κ B 调控^[7], 同时 NF- κ B 在炎症应答时调控多种黏附分子的表达, 如 ICAM-1、VCAM-1 等, 而这些黏附分子都参与了动脉粥样硬化的发展过程^[8]。MMP 属于锌依赖性内肽酶家族, 可降解细胞外基质成分, 并可能因此重塑血管组织和影响斑块的稳定性^[9]。细胞外基质的降解是单核细胞和(或)巨噬细胞迁移到组织的必要过程, 此过程的关键酶是 MMP-9, 受 NF- κ B 调控^[10]。动脉粥样硬化斑块肩区因巨噬细胞(泡沫细胞)浸润最明显, MMP-9 活性最高, 细胞外基质降解最严重, 成为斑块的最薄弱区, 降低 MMP-9 的活性可延缓动脉粥样斑块的发生和发展^[11]。因此检测 2 型糖尿病动物模型的 MMP-9 具有重要意义。各种促炎分子在动脉粥样硬化部位的明显表达与动脉粥样硬化的炎症反应学说相一致^[12]。

糖尿病大血管病变属于中医“消渴”变证, 瘀血贯穿糖尿病病程始终, 中医认为糖尿病血管病变的发生是因消渴日久、气阴两虚, 以致气虚行血无力, 阴虚脉道失濡而滞涩, 终致瘀血阻滞脉道而成。因此, 气阴两虚、瘀血阻滞是糖尿病血管病变发生、发展的基本病机。抵挡汤是治疗蓄血实证的经典破血逐瘀名方, 具有活血通络、逐瘀攻下之功效。方中水蛭咸苦性平, 入肝、膀胱二经, 专攻逐恶血瘀血, 破血癥积聚; 虻虫破血逐瘀之力更峻; 大黄荡涤邪热, 导瘀下行; 桃仁破血行血^[13]。本研究发现抵挡汤早期干预后大鼠胸主动脉 ICAM-1 与 VCAM-1 阳性表达不同程度地下调, NF- κ B 和 MMP-9 表达明显下调, 表明抵挡汤早期干预可能通过调控 NF- κ B 信号通路, 调节促炎因子表达而影响炎症反应, 这是否是抵挡汤预防和延缓糖尿病大血管病变的形成和发展重要机制之一, 尚待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Emofsson M, Siegbann A. Platelet-derived growth factor-B and monocyte chemoattractant protein 1 induce human peripheral blood monocytes to express tissue factor [J]. *Thromb Res*, 1996, 83(4): 307-320.
- [2] Tayal D, Goswami B, Tyagi S, *et al.* Interaction between dyslipidaemia, oxidative stress and inflammatory response in patients with angiographically proven coronary artery disease [J]. *Cardiovasc J Afr*, 2012, 23(1): 23-27.
- [3] 常 柏, 潘从清, 孟 东, 等. 抵挡汤对 2 型糖尿病患者血管内皮功能影响的临床研究 [J]. *天津中医药*, 2011, 28(6): 457-458.
- [4] 杨小玉, 陆付耳, 黄 琳, 等. 小檗碱对胰岛素抵抗大鼠氧化应激和内质网应激的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(9): 1138-1142.
- [5] Parathath S, Grauer L, Huang L S, *et al.* Diabetes adversely affects macrophages during atherosclerotic plaque regression in mice [J]. *Diabetes*, 2011, 60(6): 1759-1769.
- [6] Collins T, Cybulsky M I. NF-kappa B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(3): 255-284.
- [7] Tsuchiya K, Yoshimoto T, Hirono Y, *et al.* Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 expression via a nuclear factor- κ B-dependent pathway in rat preadipocytes [J]. *American J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 291(4): E771-E778.
- [8] De Winther M P, Kanters E, Kraal G, *et al.* Nuclear factor κ B signaling in atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(5): 904-914.
- [9] Mulder H. Matrix metalloproteinases: Keys to healthier blood vessels in diabetes? [J] *J Endocrinol*, 2011, 210(1): 1-2.
- [10] 周水平, 全小林, 朴信映, 等. 络通对糖尿病大鼠视网膜病变的作用及机理探讨 [J]. *中日友好医院学报*, 2000, 14(6): 313-316.
- [11] 曹好好, 刘环芹, 杨 鹏, 等. 穿心莲有效成分对巨噬细胞 MMP-2、MMP-9 表达和活性的影响 [J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2011, 40(6): 670-673.
- [12] Knoflach M, Messner B, Shen Y H, *et al.* Non-toxic cadmium concentrations induce vascular inflammation and promote atherosclerosis [J]. *Circ J*, 2011, 75(10): 2491-2495.
- [13] 王 珍, 罗爱鄂. 抵挡汤加味治疗子宫内位症 80 例 [J]. *广西中医药*, 2009, 32(1): 19-20.