抵当芪桂汤对糖尿病大鼠血清 TGF-β1 及胰岛组织超微结构的影响

杨景锋[1] 任艳芸[2] 冷 伟[1] 赵天才[1] 夏米娜[1]
(1.陕西中医学院,陕西咸阳 712046; 2.陕西中医学院附属医院,陕西咸阳 712000)

摘 要 目的:观察抵当芪桂汤对 STZ 诱导糖尿病大鼠血清 TGF-β1 含量及胰岛组织超微结构变化的影响,探讨抵当芪桂汤防治糖尿病大鼠胰岛 β 细胞功能减退的机理。方法:80 只成年雌性 SD 大鼠随机抽取 10 只为空白组,其余 70 只大鼠,禁食不禁水 12h 后予 STZ 60mg/kg 一次性腹腔注射建模。选取 50 只成模大鼠随机分为模型组、西药组、中药常量组、中药大剂量组、中西药组,分别给予相应药物干预。给药 8 周末,检测各组大鼠血清 TGF-β1 含量,观察胰岛组织超微结构变化。结果:与模型组比较,各给药组大鼠空腹血糖均明显降低,中西药组空腹血糖最低;各给药组大鼠血清 TGF-β1 含量均降低,中药常量组血清 TGF-β1 含量最低;胰岛组织超微结构的改善以西药组及中药常量组最为明显。结论:抵当芪桂汤可能通过降低糖尿病大鼠血清 TGF-β1 含量,调节胰岛 β 细胞功能,防止胰岛组织纤维化,从而改善胰岛功能状态,达到防治糖尿病的目的。

关键词 糖尿病 抵当芪桂汤 转化生长因子 病理学 实验研究
中图分类号 R587.105 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2014)05-0077-03

糖尿病(Diabetes Mellitus,DM)是由于胰岛 β 细胞分泌胰岛素缺陷及(或)其生物学作用障碍引起的以高血糖为特征的内分泌代谢性疾病。胰岛 β 细胞功能减退是 2 型糖尿病主要的发病机制之一,故其功能状态是反应糖尿病发病及病情变化的一个重要指标。研究发现,持续高糖的内环境引发患者体内发生一系列病理生理变化,导致胰岛组织慢性纤维化[1],使胰岛 β 细胞功能逐渐下降。本实验通过观察抵当芪桂汤对 STZ 诱导的糖尿病大鼠血清转化生长因子(TGF-β1)含量及胰岛组织超微结构变化的影响,探讨中药制剂抵当芪桂汤防治糖尿病大鼠胰岛 β 细胞功能减退的机理。

基金项目:陕西省教育厅专项科研计划项目(11JK0675);陕西省重点学科资助项目

基,起到抗氧化作用;葛根具有清除氧自由基抗脂质过氧化、抗血小板聚集、抗肿瘤等多种作用;水蛭可降低脑细胞的凋亡,减少神经元的不可逆损伤;地龙具有抗血栓、增强免疫、抗氧化等作用;全蝎抗血栓、抗氧化;灵芝抗氧化,提高记忆力;石菖蒲清除氧自由基,抑制神经元凋亡。本实验说明祛风通窍方在一定程度上减弱了 OFR 对线粒体编码的 COXⅡ基因表达的影响,使 COX 活性改善,发挥抗氧化的作用,从而对线粒体起着保护功能,此作用存在一定的量效关系。

5 参考文献

[1] 时文远,王正君,张海燕.2-VO 法建立大鼠空间学习记忆障碍模型的探讨.中国中医急症,2009,18(12):2032
[2] 张岗,王发渭.血管性痴呆的基础实验研究进展.军医进修学院学报,2010,31(7):734
[3] 田先翔,梅琼彬,杨伟峰.大鼠血管性痴呆模型的制作.湖北中医学院学报,2007,9(1):19
[4] 陈小燕. 尼莫地平对血管性痴呆认知功能的影响. 海峡医学,2009,21(5):168
[5] 林绍敏,吴静,王梅平.尼莫地平用于治疗血管性痴呆的疗效观察.海峡医学,2009,21(10):101
[6] 尹燕霞.尼莫地平辅助治疗血管性痴呆的临床疗效分析.临床研究,2011,9(6):248
[7] 李梨,周岐新,石京山,等.脑缺血再灌注对小鼠脑细胞色素 C 氧化酶亚基Ⅱ mRNA 表达的影响及淫羊藿苷的作用. 第三军医大学学报,2006,7(28):685
[8] 柏干荣,陆松敏,李萍,等.三七皂苷 Rg1 对失血性休克大鼠肠上皮细胞线粒体损伤保护作用的研究. 中国药学杂志,2003,9(38):665
[9] 常富业,王永炎,高颖.玄府概念诠释(六)——玄府为神机运转之道路门户.北京中医药大学学报,2005,28(5):12
[10] 白雪. 王明杰教授治疗中风的临床经验. 中国中医急症,2005,14(11):1083

第一作者:白雪(1972-),女,医学硕士,主任中医师,研究方向:中西医结合脑病的基础与临床研究。bx7246@163.com

收稿日期:2014-01-20
编辑:吴 宁

1 实验材料

1.1 动物 健康 Sprague-Dawley 大鼠 80 只，雌性，由西安交通大学医学院实验动物中心[许可证号：SCXK(陕)2007-001]提供。

1.2 药物 抵当芪桂汤，药物组成：生黄芪 30g、桂枝 10g、酒大黄 10g、炒白芍 15g、鬼箭羽 20g、水蛭 6g，药物由陕西中医学院附属医院提供并制备煎液。格列齐特：80mg/片，天津华津制药厂生产，批号 2E738T。

1.3 试剂与仪器 链脲佐菌素（Streptozotocin，STZ），美国 Sigma 公司；TGF-β1 ELISA 试剂盒由西安永峰生物试剂有限公司提供；尿糖试纸、罗氏血糖试纸由德国罗氏诊断有限公司提供；透射电镜(JEM-2000EXII)，日本光学电子公司出品。

2 实验方法

2.1 造模与分组、给药 80 只大鼠，适应性喂养 1 周，随机选取 10 只作为空白组，一次性腹腔注射等量柠檬酸缓冲液；其余 70 只大鼠，禁食不禁水 12h 后予 STZ 60mg/kg 一次性腹腔注射，72h 后测其血糖值≥16.9mmol/L，尿糖(+++)及以上者为造模成功。选取 50 只成模大鼠随机分为模型组、西药组、中药常量组、中药大剂量组和中西药组，每组 10 只。空白组、模型组灌胃蒸馏水 2mL，西药组灌胃 20mg/(kg·d)格列齐特混悬液 2mL，中药常量组灌胃含生药量 9.48g/(kg·d)的抵当芪桂汤浓缩液 2mL，中药大剂量组灌胃含生药量 18.96g/(kg·d)的抵当芪桂汤浓缩液 2mL，中西药组灌胃 9.48g/(kg·d)抵当芪桂汤浓缩液 1mL，半小时后予 20mg/(kg·d) 格列齐特混悬液 1mL。每日 1 次，连续 8 周。

2.2 指标检测 造模成功后及灌胃第 8 周末，尾静脉采血测血糖值，股静脉采血，酶联免疫法测血清 TGF-β1 含量。每组分别选取 3 只，于胰尾部剪取胰腺组织，分别切片，分别于光镜及透射电镜下观察胰岛组织病理结构变化及超微结构的改变。

2.3 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析，计量数据采用($\bar{x}\pm s$)表示，多组之间的比较采用单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异具有显著性意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠干预前后血糖变化 与空白组比较，各组造模大鼠血糖均明显升高($P<0.05$)；干预 8 周后，各治疗组大鼠空腹血糖均较干预前下降，且均明显低于模型组($P<0.05$)，以中西药组为最低。见表 1。

表 1 各组大鼠药物干预前后空腹血糖变化情况($\bar{x}\pm s$) mmol/L

组别	干预前		干预后	
	动物数	血糖	动物数	血糖
空白组	10	7.71±1.06	10	7.17±0.64$^{\triangle}$
模型组	10	26.34±3.03*	8	30.34±1.81*
西药组	10	24.30±3.91*	10	21.33±4.64$^{*\triangle\#}$
中药常量组	10	25.30±4.77*	9	22.32±4.35$^{*\triangle}$
中药大剂量组	10	26.27±3.72*	9	27.46±2.17$^{*\triangle}$
中西药组	10	24.06±3.32*	8	20.85±3.14$^{*\triangle\#}$

注：与同时期空白组比较，$^{*}P<0.05$；与同时期模型组比较，$\triangle P<0.05$；与同时期中药常量组比较，$\#P>0.05$。

表 2 各组大鼠药物干预后血清 TGF-β1 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	TGF-β1(pg/mL)
空白组	10	12.27±1.01$^{\triangle}$
模型组	8	19.92±3.16*
西药组	10	14.96±1.59$^{*\triangle\#}$
中药常量组	9	14.99±1.17$^{*\triangle}$
中药大剂量组	9	17.36±1.22$^{*\triangle\#}$
中西药组	8	15.33±0.85$^{*\triangle\#}$

注：与空白组比较，$^{*}P<0.05$；与模型组比较，$\triangle P<0.05$；与中药常量组比较，$\#P>0.05$。

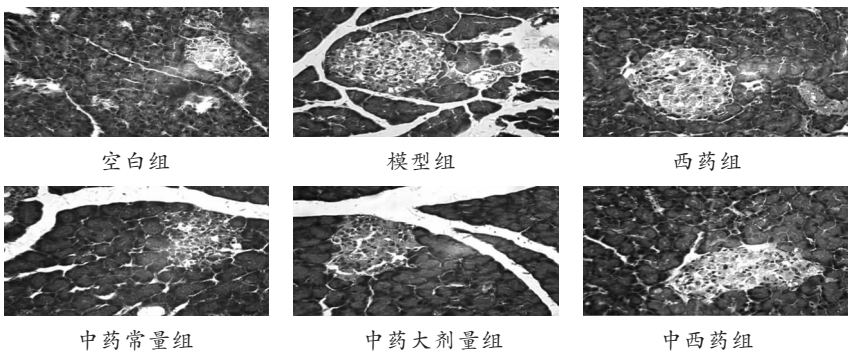

图 1 各组大鼠胰岛组织病理结构变化(10×40)

3.2 各组大鼠干预前后血清 TGF-β1 含量变化 与空白组比较，各组造模大鼠血清 TGF-β1 含量均明显升高($P<0.05$)。干预 8 周后，与模型组比较，各治疗组大鼠血清 TGF-β1 含量均明显降低($P<0.05$)，其中以西药组降低最为明显。见表 2。

3.3 各组大鼠胰岛组织结构的改变 光镜下空白组大鼠胰岛组织结构完整，外形饱满规则，细胞界限清楚，胰岛细胞呈团索状分布，细胞核呈卵圆形，核仁清晰可见，细胞染色均匀。模型组大鼠胰岛萎缩，胞浆明显减少，胰岛 β 细胞排列紊乱，空泡明显，核仁形态不规则，部分细胞核固缩，甚至缺如。中药大剂量组表现接近于模型组，胰岛萎缩，胰岛 β 细胞稍紊乱，有空泡形成，可见少数核固缩。中西药组胰岛组织稍萎缩，胞浆略减少，胰岛 β 细胞排列略显紊乱，有大小不等的空泡，少数细胞核固缩。西药组及中药常量组亦可见中西药组表现，但胰岛 β 细胞排列较中西药组规则，有少量空泡形成，个别细胞核固缩。见图 1。

3.4 胰岛组织超微结构变化 电镜下空白组胰岛 β 细胞形态规则，细胞核清晰可见，核膜光滑，核内染色质均匀，细胞内有大量分泌颗粒，线粒体无肿胀，嵴稍紊乱，数量较多。模型组外分泌部线粒体数目减少，部分形态不规则，有少量空泡，嵴模糊，部分线粒体嵴消失。中药大剂量组胰岛 β 细胞形态不规则，胞内分泌颗粒模糊不清，线粒体明显肿大、变形、数目减少，线粒体嵴模糊不清。中药常量组外分泌部线粒体

稍肿胀,嵴紊乱。西药组胰岛β细胞体积稍变小,胞核形态略不规则,未见固缩,胞内可见大量分泌颗粒,线粒体数目有所减少,线粒体可见少量空泡样变,未变形,内质网清晰。中西药组胰岛β细胞体积稍变小,胞核稍变形,线粒体肿胀、变形、数目有所减少,线粒体嵴较清晰,部分脂肪滴已溶解,可见中性粒细胞。见图2。

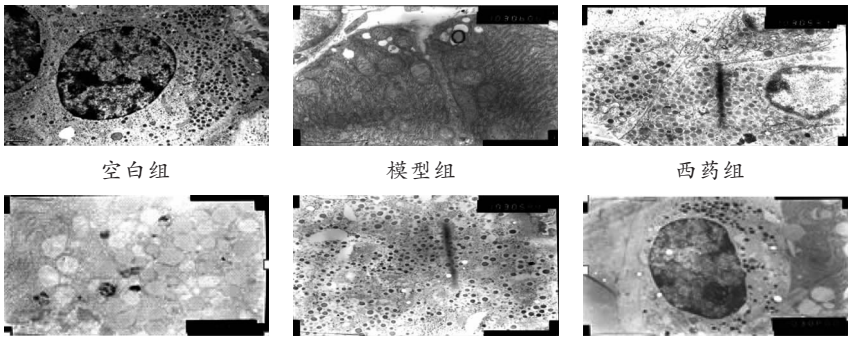

图2 各组大鼠胰岛组织超微结构变化(×15000)

4 讨论

2型糖尿病患者和模型动物普遍存在胰岛纤维化现象[2]。胰岛纤维化可导致胰岛正常的组织结构受到破坏,从而使胰岛功能降低,β细胞数量减少,分泌胰岛素减少。TGF-β1是导致胰岛组织纤维化的主要因子之一[3]。研究显示:(1)高血糖状态可导致TGF-β1产生增多[4],损伤血管,从而使局部TGF-β1水平上调,激活下游多种信号途径,刺激血管平滑肌细胞增殖和迁移[5],导致胰岛纤维化变;(2)高血糖可促进胰腺星状细胞增殖和活化,胰腺星状细胞通过蛋白激酶C-380有丝分裂原活化蛋白激酶通路,最终导致胰岛组织纤维化[6];(3)糖尿病微血管病变使胰腺局部缺血,导致胰腺纤维化,胰岛素分泌减少,糖代谢的紊乱,致脂质代谢紊乱,"脂毒性"也是导致胰岛β细胞损伤的重要因素;(4)"糖毒性"、"脂毒性"作用下,体内产生过多的自由基损伤细胞,通过脂肪酸的过氧化反应使得细胞膜完整性破坏,通透性增强,胰岛β细胞逐渐坏死。

中医学虽无糖尿病病名,但依其症状,可归为"消渴病"范畴。传统认为消渴病的基本病机为阴虚燥热。我们经过长期的临床观察,发现现代2型糖尿病多以气虚血瘀为基本病机,并贯穿于病变全过程,治当以益气养阴、化瘀通络为法。临床上我们以《伤寒论》抵当汤和《金匮要略》黄芪桂枝五物汤化裁组成抵当芪桂汤治疗本病,取得了较好的疗效[7]。该方由生黄芪、炒白芍、桂枝、水蛭、酒大黄、鬼箭羽等组成。方中生黄芪益气,炒白芍养阴生津,二者合为君药,共奏益气养阴生津之效;酒大黄、水蛭化瘀通络,桂枝温通经脉,共为臣药;佐以鬼箭羽活血化瘀,使血行而不滞,有利于瘀血的祛除。诸药合用补益而不壅滞,活血而不伤正,共奏益气养阴、化瘀通络之功。既往实验研究也发现该方对糖尿病大鼠血清HbAl、cvWF有降低作用,对糖尿病心肌病变有防治作用[8-9]。本次实验结果提示:随着药物干预性治疗的进行,格列齐特在降低血清TGF-β1含量方面优于中药,但在改善胰岛组织功能方面与中药常量组相当,在降低血糖方面不及中药加西药组。中药常量组整体疗效明显优于中药大剂量组。其机制可能为通过降低血糖,使"糖毒性"、"脂毒性"逐渐缓解,阻断了血清TGF-β1的表达,延缓了胰岛组织的纤维化进程,使胰岛β细胞的功能得到保护,从而达到治疗效果。单就降糖而言中西药组疗效最佳,可能与中西药物间的协同作用有关。中药大剂量组疗效不及常量组,提示中药治病也有严格的量效关系。

综上所述,中药制剂抵当芪桂汤不仅能降低STZ诱导的糖尿病大鼠的空腹血糖,还能通过影响糖尿病大鼠TGF-β1的表达,阻止胰岛组织进一步纤维化变,调节胰岛β细胞功能状态,而达到防治糖尿病的目的。

5 参考文献

[1] Lacraz G,Giroix MH,Kassis N,et al.Iendothelial activation and oxidative stress gene expression is reduced by IL-1Ra treatment in the type2 diabetic GK rat.PLoS One,2009,4(9):e69631

[2] 吴同智,孙子林,翟清,等.胰岛纤维与2型糖尿病.中国糖尿病杂志,2009,17(5):399

[3] 殷俊梅,孙子林.糖尿病胰岛纤维化分子机制研究进展.中华糖尿病杂志,2010,2(2):151

[4] 李志平,闫爽,姜福丽,等.血管内皮祖细胞与糖尿病微血管病变研究进展.现代生物医学进展,2012,12(8):1597

[5] Sartore S,Chiavegato A,Faggin E,et al.Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling:form innocent by stander to active participant.Circ Res,2001,89(12):1111

[6] 贺佳佳. 胰腺内分泌与外分泌之间的相互作用. 医学研究生学报,2012,25(5):544

[7] 杨景锋,赵天才,任艳芸,等.抵当芪桂汤治疗2型糖尿病30例.陕西中医学院学报,2010,33(4):45

[8] 杨景锋,赵天才,任艳芸,等.抵当芪桂汤对STZ诱导糖尿病大鼠心肌VEGF mRNA表达的影响.中药材,2011,34(3):420

[9] 赵天才,杨景锋,李月红,等.抵当芪桂汤对STZ诱导糖尿病大鼠vWF、HbA1c的影响.中国中医基础医学杂志,2010,16(5):390

第一作者:杨景锋(1970-),男,硕士学位,教授,主要从事经方防治糖尿病及其并发症研究。yangjingfeng1970@126.com

收稿日期:2014-01-29

编辑:吴 宁

中医药学——中华文明的结晶,世界文化的瑰宝!