

周络通胶囊对糖尿病周围神经病变小鼠坐骨神经糖基化终末产物及受体的影响

张会欣¹, 魏刚¹, 王宏涛¹, 朱慧明¹, 崔庆飞¹, 魏雄伟¹, 高学东^{2*}

(1. 河北以岭医药研究院, 河北省络病重点实验室, 国家中医药管理局重点研究室, 石家庄 050035;
2. 石家庄以岭药业股份有限公司, 石家庄 050035)

[摘要] 目的: 观察周络通胶囊对糖尿病周围神经病变(DPN)小鼠的作用及对晚期糖基化终末产物(AGEs)及其受体的影响。方法: 40只KK/Upj-Ay小鼠随机分为模型组、周络通胶囊高、中、低剂量组(6.85, 3.43, 1.71 g生药·kg⁻¹), 另设10只C57BL/6小鼠对照组。灌胃给药12周, 观察一般情况, 测定空腹血糖(FBG)及糖化血红蛋白(HbA1c); 测定运动神经传导速度(MNCV); 光镜及电镜观察坐骨神经形态学变化; 荧光分光光度法测定坐骨神经中AGEs含量; 荧光定量PCR和Western blot法测定坐骨神经AGEs受体(RAGE)表达。结果: 周络通胶囊能不同程度改善模型小鼠症状, 高剂量组能降低FBG和HbA1c($P < 0.05$, $P < 0.01$); 3组均能提高MNCV($P < 0.05$, $P < 0.01$); 减轻坐骨神经病理损伤; 降低AGEs含量及RAGE mRNA和蛋白的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 周络通胶囊对DPN有明显的改善作用, 其机制可能与降低周围神经AGEs形成、抑制RAGE表达有关。

[关键词] 周络通胶囊; 糖尿病周围神经病变; 糖基化终末产物; 糖基化终末产物受体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0168-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0935.026.html>

[网络出版时间] 2012-10-12 9:35

Effects of Zhouluotong Capsule on Advanced Glycation End Products and its Receptor of Diabetic Peripheral Neuropathy in Mice

ZHANG Hui-xin¹, WEI Gang¹, WANG Hong-tao¹, ZHU Hui-ming¹,
CUI Qing-fei¹, WEI Xiong-wei¹, GAO Xue-dong^{2*}

(1. Hebei Yiling Medicine Institute, Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Network Disease of Hebei Province, Shijiazhuang 050035, China;
2. Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical CO., LTD, Shijiazhuang 050035, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Zhouluotong capsule (ZLT) on diabetic peripheral neuropathy (DPN) and advanced glycation end products (AGEs) and its receptor in mice. **Method:** Forty KK/Upj-Ay mice were randomly divided into model, ZLT (6.85, 3.43, 1.71 g·kg⁻¹). Another ten C57BL/6 mice were as control group. Mice were given intragastrically for 12 weeks. The general appearance, fasting blood-glucose (FBG) and glycosylated hemoglobin (HbA1c) were observed. Motor nerve conduction velocity (MNCV) was observed. Pathological changes of sciatic nerve were observed by light microscope and electron microscope. The content of AGEs was examined by fluorospectrophotometry. The expression of AGEs receptor (RAGE) was examined by Real Time PCR and Western blot. **Result:** ZLT could ameliorate the symptom of model mice. High-dose ZLT could decrease FBG and HbA1c ($P < 0.05$, $P < 0.01$). MNCV were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$)

[收稿日期] 20120523(002)

[基金项目] 国家“十二五”重大新药创制科技重大专项(2011ZX09101-004-02); 河北省中医药管理局科研计划项目(2011041)

[第一作者] 张会欣, 博士, 高级工程师, 从事临床前新药研究与开发, Tel:0311-85901732, E-mail: hxzhang76@sohu.com

[通讯作者] *高学东, 副主任中医师, 从事新药研究与开发临床研究, Tel:0311-85901715, E-mail: gxd88@sohu.com

and pathological lesions were alleviated in ZLT group. The content of AGE were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression of RAGE mRNA and protein were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** ZLT has protective effects on DPN of mice via suppressing the expression of AGE, RAGE.

[**Key words**] Zhouluotong capsule; diabetic peripheral neuropathy; advanced glycation end products; advanced glycation end products receptor

糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)是糖尿病最为常见慢性并发症之一,糖尿病病程超过10年,DPN发病率就可高达90%。临床表现主要为四肢远端及躯干部分麻木疼痛及感觉障碍,已成为糖尿病患者丧失劳动能力的主要原因之一^[1]。目前对DPN仍无特效的治疗方法,药物治疗仅为辅助治疗。尽管DPN的发病机制尚未明确,但近来研究认为,高糖引起的非酶糖基化导致晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)的形成是DPN形成的重要原因之一,AGEs形成后一方面可以直接致病,还可以与AGEs受体(advanced glycation end products receptor, RAGE)结合致病^[2]。周络通胶囊是在临床经验方基础上开发的中药制剂,以黄芪、桂枝、当归、生地、黄芩、细辛等组方,共奏益气养阴,通络止痛之效,目前正在进行III期临床研究,初步研究表明周络通治疗DPN安全有效。本实验采用自发性II型糖尿病KK/Upj-Ay小鼠模型,观察周络通胶囊对AGEs形成及其受体表达的影响,为周络通胶囊的开发研究提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 KK/Upj-Ay小鼠,30~40g;C57BL/6小鼠,25~30g,均为SPF级,雄性,12周龄,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,动物许可证号SCXK(京)2009-0004。

1.2 药品与试剂 周络通胶囊(石家庄以岭药业股份有限公司,批号20100501);糖化血红蛋白(HbA1c)试剂盒(南京建成生物研究所,批号20111013);羟脯氨酸检测试剂盒(南京建成生物研究所,批号20110702);糖基化终末产物受体(RAGE)引物(上海生工生物技术公司合成);兔抗鼠多克隆抗体RAGE(Santa Cruz公司,sc-365154)。

1.3 仪器 7080全自动生化分析仪(日立);BL-420F生理记录仪(成都泰盟);荧光分光光度计(北京万拓公司);7300荧光定量PCR仪(ABI公司);凝胶成像分析仪(Biorad)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 KK/Upj-Ay小鼠,40只,按

空腹血糖值(FBG)分为4组:模型组、周络通高、中、低剂量组,另设C57BL/6小鼠为对照组,每组10只动物。周络通高、中、低剂量组分别灌胃给予(按生药量计,下同)6.85,3.43,1.71 g·kg⁻¹的周络通胶囊,对照组和模型组给予等体积的蒸馏水,每日1次,连续12周。

2.2 一般观察 观察小鼠一般情况,每周1次记录体重、摄食、摄水、尿量。

2.3 FBG及HbA1c测定 每月1次测定FBG;给药结束取血,按试剂盒的要求测定血液中的HbA1c含量。

2.4 坐骨神经传导速度(MNCV)测定^[3-4] 给药结束后,小鼠麻醉后俯卧位固定,连接生理记录仪,在右侧坐骨切迹插入刺激电极,在踝部(远端)和左足底第2趾间分别插入记录电极,记录双通道复合动作电位[以两对记录电极间距离S(mm)除以两通道复合动作电位潜伏期之差 Δt (ms)来计算MNCV]。每间隔1min,重复电刺激3次取其平均值,计算其MNCV。

2.5 形态学变化 取小鼠坐骨神经,置于甲醛中固定,进行HE染色;置于戊二醛中,电镜观察其超微结构。

2.6 荧光分光光度法测定坐骨神经中AGEs含量^[5] 取坐骨神经100mg,剪碎,制备匀浆,离心后,在沉淀中加入氯仿-甲醇4℃过夜,经冲洗后用含V型胶原酶(290 U·mL⁻¹)的HEPES液37℃震荡消化24h,离心,取上清,370nm/440nm波长(发射波长/激发波长)下荧光分光光度计测定荧光强度。AGEs含量以每1mg羟脯氨酸(HYP)所含荧光强度为一个任意单位,用AU(arbitraryunit)表示,即AU/mg HYP。

2.7 荧光定量PCR方法测定RAGE mRNA的表达

取小鼠坐骨神经,提取总RNA后进行逆转录反应,qPCR扩增,以GAPDH作为内参照。RAGE引物上游:5'-TGGCAAAGAAACACTCGTG-3',下游:5'-AGGAGAAGGTAGGATGGGTTTC-3',产物片段119bp;GAPDH引物:上游:5'-TGCTGAG TATGTCTGG AGTC-3',下游:5'-TGCTGAGTATGTCTG TGGACTC-

3',产物片段 143 bp。扩增完毕后,进入分析界面,将对照组设定为 1,与对照组进行比较后的相对定量值 RQ 用于统计分析。

2.8 Western blot 法检测 RAGE 蛋白的表达 取小鼠坐骨神经,提取胞浆蛋白,电泳转移至 PVDF 膜,脱脂奶粉封闭,加入 RAGE、GAPDH 一抗(1:200),后加入相应的二抗(1:1 000),暗室,化学发光法显影。GAPDH 作为内参照,对条带进行扫描,用目的蛋白吸光度/内参照吸光度进行统计分析。

2.9 统计学分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 软件进行 ANOVA 分析处理和 Dunnett 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 一般体征 与对照组比较,模型组小鼠体重明显高于对照组($P < 0.01$);周络通组小鼠体重低于

模型组,高剂量于第 10 周起即有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);模型组小鼠摄食、摄水量均高于对照组,周络通组小鼠摄食、摄水量均低于模型组。其中,模型组、周络通低、中、高剂组各有一只小鼠死亡。见表 1~3。

3.2 FBG 及 HbA1c 的变化 模型组 FBG 明显高于对照组,周络通高剂量组在治疗 12 周时 FBG 明显降低($P < 0.05$);模型组 HbA1c 明显高于正常组,给药治疗 12 周后,与模型组比较,周络通高剂量组 HbA1c 明显降低($P < 0.01$)。见表 4。

3.3 坐骨神经传导速度的变化 与对照组比较,模型组 MNCV 明显减慢($P < 0.01$),周络通低、中、高剂量组 MNCV 与模型组比较明显增快($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

表 1 周络通胶囊对 KK 小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	体重/g				
			药前	第 4 周	第 8 周	第 10 周	第 12 周
对照	-	10	25.12 ± 1.05 ²⁾	26.65 ± 1.11 ²⁾	28.23 ± 1.05	29.31 ± 2.50	30.40 ± 2.76
模型	-	9	34.35 ± 1.97	36.47 ± 2.08	42.16 ± 2.82	45.17 ± 3.29	46.94 ± 2.25
周络通	1.71	9	35.22 ± 2.09	37.37 ± 2.20	41.47 ± 2.67	43.99 ± 3.32	44.62 ± 3.58
	3.439	9	34.68 ± 1.70	36.79 ± 1.80	40.67 ± 2.67	42.94 ± 3.72	43.92 ± 3.67
	6.85	9	35.12 ± 2.74	37.27 ± 2.92	40.63 ± 1.50	42.01 ± 1.64 ¹⁾	42.22 ± 1.48 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 4~5 同)。

表 2 周络通胶囊对 KK 小鼠摄水量的影响

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	摄水量/g/只				
		药前	第 4 周	第 8 周	第 10 周	第 12 周
对照	-	3.2	3.4	5.30	5.00	5.6
模型	-	13.1	13.9	17.00	18.00	19.5
周络通	1.71	13.7	13.9	14.9	14.8	14.9
	3.43	14.1	14.6	13.9	14.1	13.8
	6.85	14.2	12.7	11.9	11.8	12.4

表 3 周络通胶囊对 KK 小鼠摄食量的影响

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	摄食量/g/只				
		药前	第 4 周	第 8 周	第 10 周	第 12 周
对照	-	2.5	2.5	3.20	3.80	4.2
模型	-	5.1	5.6	5.80	6.20	6.8
周络通	1.71	5.3	6	6.1	5.9	5.9
	3.43	5.1	5.7	5.7	5.3	5.3
	6.85	5.3	5.7	5.7	5.5	5.2

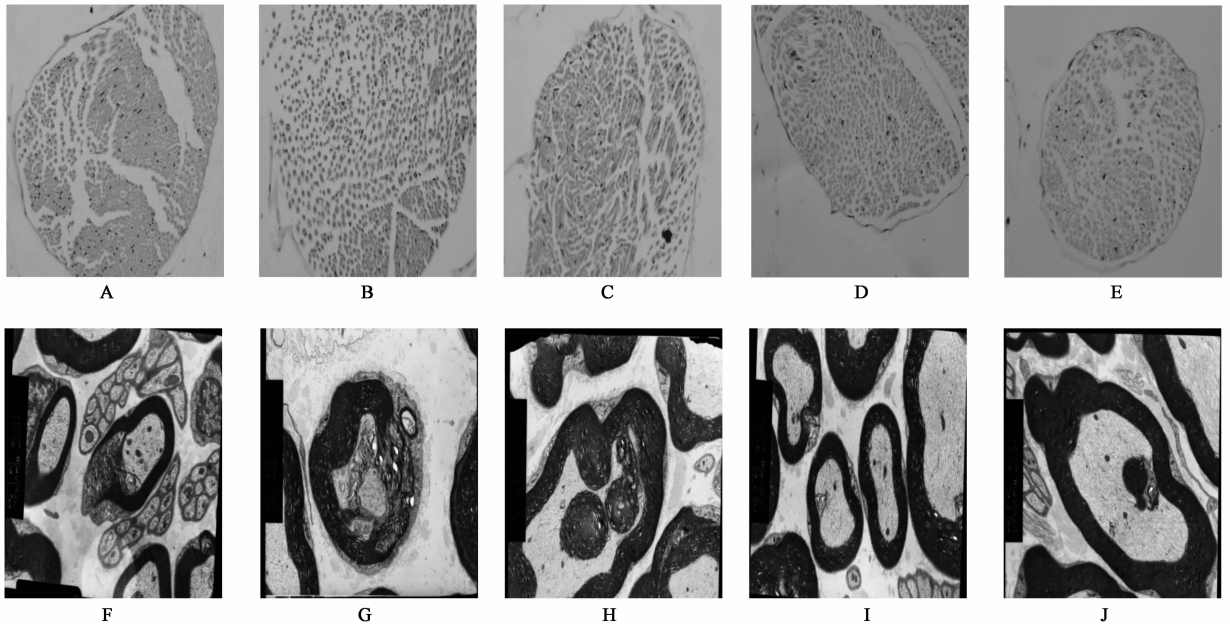
表 4 周络通胶囊对 KK 小鼠 FBG, HbA1c, MNCV 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	FBG/ $mmol \cdot L^{-1}$				HbA1c /%	MNCV / $m \cdot s^{-1}$
			药前	第 4 周	第 8 周	第 12 周		
对照	-	10	5.99 ± 1.33 ²⁾	4.98 ± 0.89 ²⁾	5.97 ± 1.01 ²⁾	6.12 ± 0.98 ²⁾	3.98 ± 0.78 ²⁾	24.85 ± 4.23 ²⁾
模型	-	9	12.59 ± 2.68	11.92 ± 2.84	12.57 ± 3.51	11.47 ± 2.89	9.53 ± 1.29	5.20 ± 1.49
周络通	1.71	9	12.06 ± 2.08	11.96 ± 1.64	11.80 ± 1.91	10.32 ± 1.89	9.12 ± 0.99	7.71 ± 1.81 ¹⁾
	3.43	9	13.50 ± 1.50	13.29 ± 2.87	10.92 ± 2.90	10.18 ± 2.77	8.90 ± 0.82	9.74 ± 1.83 ²⁾
	6.85	9	12.08 ± 2.13	11.92 ± 2.28	10.13 ± 1.32	8.58 ± 1.47 ¹⁾	6.35 ± 1.14 ²⁾	10.71 ± 1.81 ²⁾

3.4 形态学观察 HE 染色显示对照组髓鞘与轴索清晰,结构正常;模型组部分坐骨神经轴索退变,崩解,轴索与髓鞘混为一体,卵圆体形成;周络通能明显改善上述变化。电镜显示正常组小鼠坐骨神经毛细血管的管腔规则,髓鞘结构完整,施万细胞正常,轴索内有大量的微丝、微管、滑面内质网、线粒体结构完整;模型组毛细血管内皮肿胀增生、管腔狭窄,神经纤维层局部增厚、不规则,或局部增生到轴索里,轴索变细甚至轴索闭锁;无髓神经纤维空化、不规则、出现髓样小体、线粒体肿胀。周络通组毛细血管内皮细胞轻度肿胀,有髓神经纤维髓鞘板层轻度局

部增厚,神经纤维内膜胶原纤维轻度增多,线粒体轻度肿胀空化,以高剂量组最为明显。见图 1。

3.5 坐骨神经 AGEs 含量、RAGE 表达 模型组比对照组 AGEs 含量明显增加 ($P < 0.01$),周络通能显著降低 AGEs 含量 ($P < 0.05, P < 0.01$);模型组小鼠坐骨神经 RAGE mRNA 表达明显高于对照组 ($P < 0.01$),与模型组比较,周络通组 RAGE mRNA 表达水平均明显下降 ($P < 0.01$);Western blot 结果显示模型组 RAGE 蛋白表达明显高于对照组 ($P < 0.01$),与模型组比较,周络通中、高剂量组 RAGE 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$)。见表 5。



A, F. 正常组;B, G 模型组;C, H. 周络通 1.71 g·kg⁻¹组;D, I. 周络通 3.43 g·kg⁻¹组;E, J. 周络通 6.85 g·kg⁻¹组

图 1 周络通胶囊对 DPN 小鼠坐骨神经结构的影响 (A-E. HE 染色, ×200; F-J. 电镜 ×5 000)

表 5 周络通胶囊对 KK 小鼠坐骨神经 AGEs 含量、RAGE 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	AGEs /AU/mgHYP	RAGE	
				mRNA	蛋白
对照	-	10	10.49 ± 1.86 ²⁾	1.09 ± 0.09 ²⁾	0.25 ± 0.04 ²⁾
模型	-	9	24.70 ± 4.46	6.26 ± 0.22	0.81 ± 0.09
周络通	1.71	9	19.30 ± 4.09 ¹⁾	4.57 ± 0.21 ²⁾	0.75 ± 0.11
	3.43	9	16.91 ± 3.12 ²⁾	1.81 ± 0.17 ²⁾	0.58 ± 0.08 ¹⁾
	6.85	9	15.62 ± 2.97 ²⁾	1.56 ± 0.26 ²⁾	0.51 ± 0.08 ¹⁾

4 讨论

目前并没有经典的 DPN 动物模型,在实验中我们采用了自发性 II 型糖尿病 KK/U_{pj}-Ay 小鼠,该小鼠具有高血糖、高度胰岛素抵抗的特点^[6],本实验结果显示模型组 KK 小鼠坐骨神经传导速度明显减慢,光镜观察到部分坐骨神经轴索退变,崩解,轴索

与髓鞘混为一体,电镜观察到毛细血管内皮肿胀,神经纤维板层局部增厚,轴索变细甚至轴索闭锁,无髓神经纤维空化等,表明 KK/U_{pj}-Ay 小鼠出现了明显的周围神经损害,符合 DPN 的病理特点,提示了 KK/U_{pj}-Ay 小鼠出现了 DPN,也为今后 DPN 的研究提供了新的模型。

DPN 是由血糖代谢异常慢慢发展形成的一种糖尿病的慢性并发症,因此降低血糖仍是防治 DPN 的基本措施之一^[7]。我们观察到周络通胶囊在治疗 12 周时高剂量显示了很好的降糖效果,糖化血红蛋白亦明显下降,表明周络通能控制血糖水平,缓解症状,促进病情好转。同时我们观察到周络通能显著提高坐骨神经传导速度,神经传导速度减慢的主要原因与糖尿病引起的神经纤维、神经纤维髓鞘及 Ranvier 结功能和结构的损伤密切相关^[8],我们在观察到小鼠神经传导速度提高的同时,电镜还发现周络通组神经纤维内膜胶原纤维明显减少,施万细胞轻度空化,有髓神经纤维髓鞘板层增厚也有说改善,二个结果互相印证,表明周络通能够改善 DPN 小鼠的功能及结构,提示了周络通对 DPN 的防治作用。

DPN 的发病机制尚未阐明,普遍认为高糖引起多元醇途径激活、非酶糖基化导致 AGEs 形成、氧化应激、蛋白激酶 C 调节异常等是 DPN 形成的主要病理生理基础。近年来许多研究表明,高糖引起的非酶糖基化导致 AGEs 的形成在 DPN 中有着重要的作用^[2],无论是糖尿病动物或者糖尿病患者均被发现周围神经组织中 AGEs 水平显著增高^[9],AGEs 导致糖尿病神经病变的机制主要是:AGEs 本身对神经组织和微血管结构蛋白的直接修饰作用;与细胞膜上 AGEs 受体(RAGE)结合后激活细胞内信号传导而产生效应,抑制 AGEs/RAGE 轴可以明显缓解糖尿病周围神经病变^[10]。本实验结果显示模型组小鼠坐骨神经 AGEs 含量、RAGE 表达明显升高,周络通能显著降低 AGEs,RAGE 表达,表明周络通对 DPN 的防治作用与抑制非酶糖基化导致 AGEs 形成有关。周络通抑制 AGEs,RAGE 表达,可以抑制 AGEs 对坐骨神经中蛋白质的运输和功能,抑制 AGEs 与 RAGE 结合,减轻坐骨神经损伤,提高神经传导速度,改善神经病变。

[参考文献]

[1] 邱作成,张振国,李志钢,等. 糖尿病周围神经病变病因病机浅析及治法探讨[J]. 中国实验方剂学杂

志,2010,16(17):255.

- [2] E I-Mesallamy H O, Hamdy N M, Ezzat O A, et al. Levels of soluble advanced glycation end product-receptors and other soluble serum markers as indicators of diabetic neuropathy in the foot[J]. J Investig Med, 2011, 59(8):1233.
- [3] 姚鸿萍,封卫毅,魏友霞,等. 大鼠坐骨神经传导速度测定的方法学考察[J]. 中国药房,2011,22(1):18.
- [4] 孙玉华,徐磊,张兰兰,等. 复方杞鹰颗粒治疗糖尿病周围神经病变的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):208.
- [5] Monnier V M, Vishwanath V, Frank K E, et al. Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence[J]. N Engl J Med, 1986, 314(7):403.
- [6] Iwai M, Kanno H, Tomono Y, et al. Direct renin inhibition improved insulin resistance and adipose tissue dysfunction in type 2 diabetic KK-A(y) mice[J]. J Hypertens, 2010, 28(7):1471.
- [7] Miranda Massari J R, Gonzalez M J, Jimenez F J, et al. Metabolic correction in the management of diabetic peripheral neuropathy: improving clinical results beyond symptom control[J]. Curr Clin Pharmacol, 2011, 6(4):260.
- [8] Berghs S, Aggujaro D, Dirx R J, et al. beta IV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system[J]. J Cell Biol, 2000, 151(5):985.
- [9] Karachalias N, Babaei-Jadidi R, Ahmed N, et al. Accumulation of fructosyl-lysine and advanced glycation end products in the kidney, retina and peripheral nerve of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Biochem Soc Trans, 2003, 31(6):1423.
- [10] Wada R, Nishizawa Y, Yagihashi N, et al. Effects of OPB-9195, anti-glycation agent, on experimental diabetic neuropathy[J]. Eur J Clin Invest, 2001, 31(6):513.

[责任编辑 聂淑琴]