

# 醒胰降糖灵对实验性糖尿病大鼠血小板参数及P-选择素含量的影响

朱向东<sup>1\*</sup>, 李荣科<sup>1</sup>, 丁文君<sup>2</sup>, 骆文郁<sup>1</sup>

(1. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省中医药研究院暨甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050)

[摘要] 目的: 探讨醒胰降糖灵对实验性糖尿病大鼠血小板参数及P-选择素含量的影响。方法: 用链脲佐菌素(STZ)一次性 ip 65 mg·kg<sup>-1</sup>, 并连续7 d sc 甲状腺素诱发大鼠实验性糖尿病模型, 至14 d, 选取成模大鼠以醒胰降糖灵干预21 d后, 用放射免疫法测定P-选择素的含量。结果: 模型组大鼠血小板参数及P-选择素含量显著升高( $P < 0.01$ ), 醒胰降糖灵组可明显降低血小板参数( $P < 0.01$ ), 并能一定程度地降低P-选择素含量。结论: 醒胰降糖灵可降低实验性糖尿病大鼠血小板参数及P-选择素含量, 其作用机制可能与醒胰降糖灵参与抑制血小板活化、降低微血管的高凝状态有关。

[关键词] 醒胰降糖灵; 糖尿病; 血小板参数; P-选择素

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)05-0055-03

## Effects of Xingyi Jiangtangling on the Parameters of Platelet and P-selectin in Diabetic Rats

ZHU Xiang-dong<sup>1\*</sup>, LI Rong-ke<sup>1</sup>, DING Wen-jun<sup>2</sup>, LUO Wen-yu<sup>1</sup>

(1. GanSu University of TCM, Lanzhou 730000, China;

2. GanSu Province Academy of Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Xingyi Jiangtangling on the of parameters of platelet and P-selectin in diabetic rats. **Methods:** The model of diabetic rat was established by subabdominal injection with streptozotocin 65 mg·kg<sup>-1</sup> and then concomitant hypodemic injection with thyroxine, once a day, from 1<sup>st</sup> to 7<sup>th</sup> day. After treating with Xingyi Jiangtangling for 21 days, the content of P-selectin in the experimental rats was detected by radioimmunoassay. **Result:** Compared with normal group, the parameters of platelet and P-selectin in the diabetic rats were significantly increased ( $P < 0.01$ ). However, that of the treated group was significantly declined, compared with model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Xingyi Jiangtangling could decline the parameters of platelet and P-selectin in the diabetic rat. Its molecular mechanism might be related to restraining the activation of platelet and mitigating hypercoagulation in microcirculation.

[Key words] Xingyi Jiangtangling; diabetes; parameters of platelet; P-selectin

糖尿病(Diabetes mellitus, DM)是一种慢性代谢障碍性疾病, 由于体内胰岛素缺乏或相对缺乏, 形成

持续性的高血糖的病症<sup>[1]</sup>。其持续性的高血糖状态可以导致一些组织器官的代谢异常, 继而产生功能障碍及形态上的改变, 其中糖尿病特征性微血管病变成为糖尿病致盲、晚期肾脏病变的主要原因, 严重影响患者的生活质量。而传统医学则将糖尿病归于“消渴病”的范畴, 强调“三消皆本于肾”(明·张介宾《类经》)、“治肾为急”(明·赵献可《医贯》), 且活血化

[收稿日期] 2008-10-27

[基金项目] 甘肃省教育厅资金资助项目(0505-07)

[通讯作者] \* 朱向东, Tel: (0931) 3231961; E-mail: zhuxiangdong33@163.com

療法要贯穿糖尿病治疗的始末, 本实验用中医证与西医病相结合的动物模型, 采用具有滋阴补肾、益气活血等功效且临床疗效较佳的醒胰降糖灵干预治疗, 从血小板参数及 P-选择素含量的变化, 探讨醒胰降糖灵对糖尿病微血管病变的调控作用。

## 1 实验材料

**1.1 动物** SPF 级 2 月龄 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体重(200±20)g, 由甘肃中医学院 SPF 实验中心提供。动物合格证号: NO. 0001558。

**1.2 药品及试剂** 醒胰降糖灵由生地、山药、山茱萸、泽泻、丹皮、茯苓、黄芪、五味子、水蛭等中药组成, 上述药材均购自兰州黄河药材市场, 由甘肃中医学院药学院中药炮制教研室常规水煎制, 生药含量为 2.79 g·mL<sup>-1</sup>; 盐酸二甲双胍片购自天津市力生制药股份有限公司; 链脲佐菌素注射液(STE, 美国 Sigma 公司提供, 南京建成生物公司分装); 甲状腺素购自上海长城生物技术有限公司; 葡萄糖试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司, 批号 061025); 大鼠 P-选择素试剂盒(上海西唐生物科技有限公司, 批号 061023); cAMP、cGMP 放射免疫分析试剂盒(上海中医药大学同位素室, 批号 061021)。

**1.3 主要仪器** PR 电子精密天平 PR2003(北京赛多利斯天平有限公司); XYJ80-2 电动离心机(金坛市恒丰仪器厂); 7230G 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); 荧光倒置显微镜 LX70-141(金坛市恒丰仪器厂); FJ-2008 自动 γ 免疫计数器(西安二六二厂)。

## 2 实验方法

**2.1 动物的分组和喂养** 先用市售消毒灭菌颗粒饲料喂养 1 周, 待适应环境、体重开始增加时进行实验。将 60 只大鼠按体重编号, 以随机数字表法抽取 16 只为正常对照组, 其余 44 只为糖尿病造模组按文献<sup>[2~4]</sup>改进造模。所有动物在统一条件下(室温 19~24℃, 相对湿度 40%左右)普通饲料喂养, 自由饮水。每周称体重, 观察食量、尿量及精神状态等。

**2.2 动物造模** 将 STZ 用 pH=4.2 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液临时配制成 2% 的溶液, 按 65 mg·kg<sup>-1</sup> 的剂量给糖尿病造模组大鼠一次性 ip, 并连续 sc 甲状腺素(T<sub>4</sub>) 0.2 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 共 14 d, 从第 3d 开始, 每隔(3~4)d 检测空腹 8 h 血糖值。14 d 后随机抓取正常对照组和糖尿病造模组各 8 只大鼠。摘取眼球取血, 1 mL 测血糖, 其余均加入 EDTA 抗凝剂制成血

浆, 取 0.1 mL 血浆加入 2 mL 无水乙醇, 振摇 1 min, 静置 5 min, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。将上清液倒入指形管, 残渣再加入 75% 乙醇 1 mL 摇匀, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。合并上清液, 于 60℃ 烘箱烘干, 待残渣干后放入 4℃ 保存。测量时用 1.0 mL 醋酸缓冲液溶解, 取 0.1 mL 用放免法测其血浆 cAMP、cGMP 含量。若模型组大鼠 cGMP 含量降低、cAMP/cGMP 比值明显升高, 并且血糖值均大于 11.0 mmol·L<sup>-1</sup>, 则提示肾阴虚型糖尿病大鼠造模成功。

**2.3 分组给药** 选取造模成功的 24 只大鼠称重, 按体重编号按随机数字表法分为 3 组, 分别为模型对照组、阳性药对照组、中药治疗组。正常对照组、模型对照组分别 ig 等体积(10 mL·kg<sup>-1</sup>) 生理盐水; 阳性药对照组每日 ig 盐酸二甲双胍片的水溶液 0.27 g·kg<sup>-1</sup>; 中药治疗组每日 ig 醒胰降糖灵 25.11 g·kg<sup>-1</sup> (相当于人等效剂量的 3 倍。成人药量: 93 g·d<sup>-1</sup>, 大鼠等效剂量为: 93 × 0.018 × 5 = 8.37 g·kg<sup>-1</sup>), 1 次·d<sup>-1</sup>, 连续 ig 21 d。

**2.4 取材** 治疗 21 d 后, 禁食 ≥10h, ip 2% 戊巴比妥钠生理盐水溶液 40 mg·kg<sup>-1</sup> 麻醉, 股静脉取血, 并收集全血 6 mL, 其中取 0.5 mL, 加入盛有 cellpeck 稀释液的专用抗凝管中混匀后用 Sysmex kx-21 血液分析仪在 7 h 内计数血小板参数及红细胞参数, 余血静置待凝后离心, 留存血清, 置于 -20℃ 保存, 于 1 周内进行检测。

**2.5 指标检测** 取大鼠静脉血清测定血糖(Glu)。P-选择素采用 ELISA 法检测, 具体操作按试剂盒说明书进行。红细胞平均体积、血小板参数采用 Sysmex kx-21 血液分析仪测定。血浆总 cAMP、cGMP 的含量用放免分析药盒测定。

**2.6 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件处理。用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。组间均数比较采用单因素方差分析检验, P < 0.05 为有统计学意义。

## 3 实验结果

**3.1 肾阴虚糖尿病造模组大鼠的一般表征** 造模后大鼠伴有消瘦、毛无光泽、活动频度增加、多饮、多尿、大便干结等肾阴虚糖尿病症状。

**3.2 各组大鼠血糖及血浆总 cAMP、cGMP 含量和 cAMP/cGMP 比值结果比较** 由表 1 可见, 造模组血糖明显升高(P < 0.01), cAMP 含量无明显变化, 而 cGMP 含量明显降低(P < 0.01), cAMP/cGMP 明显升高(P < 0.01), 有显著性差异, 说明实验造模成功。

表 1 两组大鼠血糖及血浆总 cAMP、cGMP 含量和 cAMP/cGMP 比值结果比较( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	血糖	cAMP( $\text{pm}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	cGMP( $\text{pm}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	cAMP/cGMP
空白对照组	4.43 $\pm$ 0.47 <sup>2)</sup>	72.59 $\pm$ 6.93	105.92 $\pm$ 4.11 <sup>2)</sup>	0.68 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>
模型组	13.15 $\pm$ 2.31	60.58 $\pm$ 3.86	30.30 $\pm$ 2.15	2.00 $\pm$ 0.11

注:与模型对照组比较:<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , (下同)

**3.3 各组大鼠血清血糖、P-选择素的比较** 由表 2 可见,模型组空腹血糖显著升高( $P < 0.01$ ),P-选择素含量显著升高( $P < 0.01$ )。而醒胰降糖灵干预治疗后,空腹血糖明显下降( $P < 0.01$ ),P-选择素降低,但统计不显著。

表 2 各组大鼠血清血糖、P-选择素的比较( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量 ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	血糖 ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	P-选择素 ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
正常对照组	—	5.81 $\pm$ 1.31 <sup>2)</sup>	0.052 $\pm$ 0.035 <sup>2)</sup>
模型组	—	11.23 $\pm$ 1.57	0.170 $\pm$ 0.036
二甲双胍组	0.27	6.67 $\pm$ 1.95 <sup>2)</sup>	0.117 $\pm$ 0.066
醒胰降糖灵组	25.11	6.91 $\pm$ 1.52 <sup>2)</sup>	0.128 $\pm$ 0.092

**3.4 各组大鼠血小板参数的比较** 由表 3 可见,肾阴虚糖尿病大鼠血小板参数明显升高( $P < 0.01$ )。醒胰降糖灵和二甲双胍均可使模型大鼠的血小板参数明显降低( $P < 0.01$ ),红细胞平均体积各组之间无明显差异。

表 3 各组大鼠血小板参数(MPV、PC)、红细胞平均体积的比较( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量 ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	血小板平均 容积( $\text{fL}$ )	血小板计数 ( $10^9\cdot\text{L}^{-1}$ )	红细胞平均 体积( $\text{fL}$ )
正常对照组	—	7.98 $\pm$ 0.49 <sup>2)</sup>	736 $\pm$ 72 <sup>2)</sup>	58.78 $\pm$ 1.51
模型组	—	8.90 $\pm$ 0.10	910 $\pm$ 81	59.55 $\pm$ 1.33
二甲双胍组	0.27	8.20 $\pm$ 0.32 <sup>2)</sup>	759 $\pm$ 64 <sup>2)</sup>	59.09 $\pm$ 1.40
醒胰降糖灵组	25.11	8.28 $\pm$ 0.25 <sup>2)</sup>	772 $\pm$ 78 <sup>2)</sup>	59.12 $\pm$ 1.45

## 4 讨论

糖尿病为现代病名,中医归属于“消渴病”的范畴,古今医家均认为肾阴不足兼肝脾失调、痰瘀阻滞是肾阴虚型糖尿病的基本病机。醒胰降糖灵主要由六味地黄丸加黄芪、水蛭、五味子等药组成,其中六味地黄丸滋阴补肾,补中有泻,寓泻于补,通补开合;加黄芪增强补虚益气,与山药、茯苓、泽泻合用益气扶脾,渗利脾湿,杜绝湿滞生痰;地黄与丹皮合用,清

热凉血,既养阴生津,又清泻虚火;水蛭逐瘀,对既成的血行不畅有通行作用;五味子散中有敛,敛中有散,补而不滞,散而不伤正,与山茱萸、泽泻合用,调肝益肾,促进脾的运化。全方合用,共达滋阴补肾、调肝益脾、除痰活血之功,较单纯的六味地黄丸治疗肾阴虚型糖尿病更切合实际。

大量研究表明,高糖抑制内皮细胞 DNA 合成,糖脂代谢紊乱,蛋白的糖基化和缺氧状态下自由基的影响等,可引起血管壁内皮损伤<sup>[5]</sup>,损伤的内皮细胞释放出多种血管活性物质,导致血小板激活、凝血及纤溶异常。血中静止状态的血小板受到生物或物理因素刺激(如血管内皮损伤后释放的活性物质等),其胞浆内颗粒膜糖蛋白释放与质膜融合,血小板膜表面糖蛋白发生重排和构象变化,成为活化血小板,活化的血小板所释放的大量活性物质又进一步加重血小板聚集,促进血栓形成及血管病变的发生、发展。P-选择素存在于静止的血小板 $\alpha$ 颗粒膜上,当血小板活化时进入血浆可作为血小板活化的特异性标志<sup>[6]</sup>。本研究结果表明,经醒胰降糖灵治疗后,肾阴虚糖尿病大鼠的血小板参数水平明显降低,P-选择素含量也有一定程度降低,说明醒胰降糖灵可抑制血小板的活化,从而调节微血管高凝状态,减缓微血管病变的发展。但对于其确切的作用途径尚有待于进一步探讨。

## [参考文献]

- [1] 叶任高.内科学[M].北京:人民卫生出版社,2002:798-799.
- [2] 杨巍,罗春元,于春雷,等.不同剂量 STZ 诱导小鼠糖尿病模型的发病机制[J].吉林大学学报(医学版),2006,32(3):432-437.
- [3] 陈小野.实用中医证候动物模型学[M].北京:中国协和医科大学、北京医科大学联合出版社,1993:27-29.
- [4] 吴文莉,马威,薛莎,等.肾阴虚型糖尿病动物模型的研制[J].湖北中医学院学报,1999,1(3):117-138.
- [5] Richard AC. Dysfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus[J]. Circulation, 1993, 67: 87.
- [6] 周水列,邱莲女,赵湘,等.2型糖尿病患者血小板活化与微血管病变的关系[J].中华检验医学杂志,2001,24(4):223-226.