

活络育阴方对糖尿病性脑梗死大鼠脑组织高级糖基化终产物受体表达的影响

李丰衣¹, 李福荣², 张继国², 朱良珍², 祝世功³, 孙保亮^{2*}

(1. 中国人民解放军第三〇二医院, 北京 100039;
2. 泰山医学院, 山东 泰安 271016; 3. 北京大学医学部, 北京 100083)

[摘要] 目的: 建立糖尿病性脑梗死大鼠模型, 观察对比高级糖基化终产物受体(RAGE)在模型大鼠中的表达及活络育阴方对其的影响。方法: 选 SD 大鼠以高脂高糖饮食, 腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导建立糖尿病模型, 在此基础上再用线栓法制作大脑中动脉栓塞(MCAO)模型; 利用形态学等方法, 观察不同剂量和不同时间活络育阴方对糖尿病性脑梗死的脑保护作用; 用 ABC 免疫组化方法观察活络育阴方对糖尿病性脑梗死模型大鼠脑损伤后 RAGE 表达的影响。结果: 活络育阴方治疗糖尿病性脑梗死大鼠, 在不同剂量和不同时间内大鼠脑组织 RAGE 表达均明显降低。结论: 活络育阴方可能通过下调 RAGE 表达, 对糖尿病性脑梗死大鼠的神经损伤起到保护作用。

[关键词] 高级糖基化终产物受体; 糖尿病; 脑梗死

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)04-0050-04

Influence of Huoluoyuyinfang Decoction Upon RAGE Receptor Expression in Rat Brain Tissue with Diabetes and Cerebral Embolism

LI Feng-yi¹, LI Fu-rong², ZHANG Ji-guo², ZHU Liang-zhen², ZHU Shi-gong³, SUN Bao-liang^{2*}

(1. The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China; 2. Taishan Medical College, Taian 271016, China;
3. The Medical College of Beijing University, Beijing 100083, China)

[Abstract] **Objective:** To set up a rat model of diabetic cerebral embolism, in order to observe and compare the expression of advanced glycosylation end product receptor (RAGE) in rat brain and effects about Huoluoyuyinfang Decoction on it. **Methods:** SD rats were fed on a diet enriched in fat and fructose and the rats were injected intraperitoneally with a low-dose streptozocin (STZ) to induce hyperglycemia. Then set up middle cerebral artery occlusion (MCAO) by ligation. Morphology and other methods were applied to observe the protective effect of Huoluoyuyinfang at different doses and different times. Immunohistochemical ABC method was employed to observe the effect of Huoluoyuyinfang on RAGE in rat brain of cerebral infarction due to diabetes. **Results:** For different dosages and stages, the RAGE expression was significantly decreased in the brain tissue by Huoluoyuyinfang. **Conclusion:** Huoluoyuyinfang Decoction may decrease the expression of RAGE and play an important protecting role against diabetic neurological impairment.

[Key words] RAGE; diabetes; cerebral infarction

[收稿日期] 2008-03-17

[基金项目] 山东省中医药科研基金(2003-133)

[通讯作者] * 孙保亮, Tel: (0538) 6235860; E-mail: blsun88@163.com

由糖尿病所引发的脑梗死患者日益增多,发病率为非糖尿病患者的 2~4 倍,复发率、致残率和死亡率很高^[1]。糖尿病患者脑卒中的发病时间比非糖尿病患者早 10 年,其主要发生在成年发病的 2 型糖尿病^[2]。因此,复制一个理想的糖尿病并发脑梗死动物模型,对糖尿病并发脑梗死的临床与实验研究有重要意义。我们首先通过高糖高脂饮食诱发高胰岛素血症和胰岛素抵抗,再通过注射低剂量链脲佐菌素(STZ)打击胰腺功能,导致胰腺代偿性分泌胰岛素的功能障碍,诱发高血糖症;在此基础上线栓法行大脑中动脉栓塞(MCAO)后成功复制糖尿病并发脑梗死动物模型。本实验在前期临床与实验研究的基础上^[3~4],研究活络育阴方对糖尿病性脑梗死大鼠高级糖基化终产物受体(RAGE)的影响,探讨其治疗糖尿病性脑梗死的作用机制。

1 材料

1.1 动物和饲料 SD 大鼠 80 只,清洁级,雌雄各半,周龄 6 周,体重 180~230 g,由山东大学医学院实验动物中心提供(鲁动质字 04102)。所有大鼠 12h 光照,单笼饲养。

普通饲料:由标准粉、麸皮、鱼皮粉等组成;高脂饲料:每 100 g 饲料中含标准粉 17.65 g,大豆粉 10.10 g,麸皮 7.10 g,玉米粉 12.10 g,鱼粉 2.15 g,食盐 0.15 g,酵母粉 0.15 g,猪油 15.10 g,蔗糖 10.10 g,奶粉 5.10 g,麻油 5.10 g,鸡蛋 10.10 g,花生 5.10 g。饲料由江苏省协同医药生物工程责任有限公司提供(苏 A 饲监字 20022009)。

1.2 药品和试剂 活络育阴方(血竭粉 1.5 g 冲服,海蛤壳 30 g,瞿麦 20 g,川芎 15 g,生蒲黄 15 g,生地 15 g,黄精 15 g,砂仁 10 g,土鳖虫 10 g)购自山东中医药大学附属医院,经生药专家鉴定,按复方配比量称取中药,以传统煎煮方法制成煎剂,浓缩(每 mL 含生药 3.5 g)备用,实验时用蒸馏水稀释为所需浓度灌胃。中汇糖脉康,为中国中医科学院中汇制药有限公司生产,批号 97 卫药准字 2-011 号。甘油三酯(TG)试剂盒(北京福瑞生物工程公司,批号:040702);血清游离脂肪酸(NEFA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:040630);总胆固醇(TC)试剂盒(北京福瑞生物工程公司,批号 040702);胰岛素放射免疫分析盒(解放军总医院科技开发中心放免所,批号 200427225);链脲佐菌素(STZ)(美国 Sigma 公司);柠檬酸(开封化学试剂总厂,批号 20020713);柠

檬酸三钠(江苏徐州试剂二厂,批号 20020927)。

2 方法

2.1 糖尿病模型制作及动物分组 大鼠适应喂养 1 周,随机分为 3 组:正常对照组 12 只,普通饲料喂养,正常饮水;高脂高糖组 12 只,高脂饲料喂养,3% 果糖饮水;模型组 56 只,高脂饲料喂养,3% 果糖饮水;模型组 4 周后采用腹腔注射(ip)STZ 制备糖尿病模型,术前 10 h 禁食不禁水,1 次 STZ $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip (溶于 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 4.5 的柠檬酸缓冲液),用强生 ONE TOUCH II 血糖仪测定大鼠尾尖血血糖,24 h 内血糖浓度 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的大鼠,稳定 5 d 后,作为成功的糖尿病模型^[5]。

2.2 糖尿病脑梗死模型制作 在魏氏^[6]的基础上加以改进。将模型组 ip STZ 造模 6 周后存活的 40 只(糖尿病造模后死亡 16 只)大鼠,采用线栓法行大脑中动脉栓塞(MCAO),术前 24 h 禁食不禁水,10% 水合氯醛 $0.35 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ip 麻醉,颈部正中切口,结扎甲状腺动脉和翼腭动脉并电凝切断,咬断舌骨,暴露视野,结扎颈外动脉的远端和近端,自颈外动脉离心端切口,插入 4-0 钝头单股尼龙线,经颈总动脉分叉处进入颈内动脉,然后插入大脑中动脉,进线深度约 $(17.0 \pm 0.5) \text{ mm}$ 。实验中保持恒温 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$,观察梗死后动作行为改变和梗死区的改变。

2.3 分组给药 将 MCAO 造模成功后存活的 36 只(术中及术后死亡 4 只)大鼠,取 4 只作免疫组化,将剩余 32 只随机分为 4 组,活络育阴方治疗组 1($1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、活络育阴方治疗组 2($4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、中汇糖脉康组($3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和糖尿病性脑梗死模型组,每组 8 只;正常对照组 12 只。活络育阴方组和中汇糖脉康组分别 ig 煎剂,正常对照组和糖尿病性脑梗死模型组 ig 等容积蒸馏水,每日灌胃 2 次,治疗观察 4 周。

2.4 行为学观察、标本采集及指标检测方法

2.4.1 血糖、血脂、胰岛素检测 高脂高糖造模 4 周后,正常对照组、高脂高糖组和糖尿病模型组大鼠测体重、体长以计算 Lee's 指数,眼眦静脉取血测血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、游离脂肪酸(NEFA)。ip STZ 造模 6 周后大鼠禁食 12 h 后,截尾取血用罗氏试纸测大鼠的空腹的血糖(FBG),同时检测空腹胰岛素(FINS)和胰岛素敏感性($1/\text{FBG} \cdot \text{FINS}$)。

2.4.2 糖尿病性脑梗死动物模型神经功能损害程

度分级 线栓法行 MCAO 后, 观察大鼠动作行为改变。根据 Okada 分级标准进行: 0 级无神经功能障碍; 1 级轻度神经功能障碍, 如强迫性转身, 一侧前肢无力等; 2 级能自行站立, 但步行困难, 伴不完全性偏瘫; 3 级非支持不能站立; 4 级无自发性活动或死亡。

2.4.3 免疫组化 MCAO 24 h 后, 随机选取存活的脑梗死大鼠 4 只和正常对照组大鼠 4 只, 以 10% 水合氯醛麻醉, 打开胸腔, 暴露心脏, 剪开右心房, 首先灌注 0.9% 生理盐水约 200 mL, 用含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.4) 缓冲液 200 mL 进行灌注固定, 断头取脑, 以视交叉为中心相当于前联合连续脑片继续固定(4~ 6) h, 常规脱水, 透明, 浸蜡, 包埋, HE 染色, 观察脑梗死大鼠梗死区变化。

2.4.4 RAGE 检测 治疗观察 4 周后采用抗生物素

-生物素-过氧化物酶复合物法(ABC) 制作脑片。RAGE 免疫组化试剂盒由中山生物试剂公司提供。按说明书操作, DAB 显色, 镜下控制反应时间, 双蒸水终止反应, 脱水、透明、封片, 显微镜观察。RAGE 阳性细胞为胞浆呈棕褐色, 以阳性细胞数/10×40 高倍镜视野表示。每只动物随机取 2 张切片, 每张切片缺血侧随机观察 5 个视野。

2.5 数据分析和统计处理 所有实验数据采用($\bar{x} \pm s$) 表示。统计分析采用 SPSS11.0 软件包, 组间差异采用配对 *t* 检验, 显著性水平 $P < 0.05$ 。

3 结果

3.1 糖尿病模型制作结果

3.1.1 糖尿病模型造模 4 周后大鼠体重、Lee's 指数、血清甘油三酯、血清游离脂肪酸、总胆固醇的检测 结果见表 1。

表 1 糖尿病模型造模 4 周后大鼠的各项指标($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	体重(g)	Lee's 指数	TG(mmol·L ⁻¹)	NEFA(mmol·L ⁻¹)	TC(mmol·L ⁻¹)
正常对照组	12	372.80 ± 32.61	248.33 ± 7.77	0.83 ± 0.10	1.01 ± 0.11	1.85 ± 0.14
高脂高糖组	12	438.23 ± 40.55 ¹⁾	310.89 ± 7.86 ²⁾	1.53 ± 0.23 ²⁾	1.77 ± 0.22 ²⁾	2.75 ± 0.67
糖尿病模型组	56	429.94 ± 36.16 ¹⁾	324.93 ± 8.93 ²⁾	1.49 ± 0.37 ²⁾	1.84 ± 0.27 ²⁾	2.76 ± 0.70 ¹⁾

注: 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)

从表 1 中可以看出糖尿病模型造模 4 周后高脂高糖组和糖尿病模型组大鼠体重、Lee's 指数、TG 和 NEFA 较正常对照组均显著增高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表明高脂高糖饮食可致血脂增加, 导致肥胖。

3.1.2 糖尿病模型造模 10 周后大鼠空腹血糖、空腹胰岛素、胰岛素敏感性的检测 如表 2 所示, 高脂高糖组和糖尿病模型组较正常对照组的血糖、胰岛素水平显著升高($P < 0.01$), 胰岛素敏感性下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。说明高脂高糖饮食不仅可引起脂肪的堆积, 还会导致胰岛素敏感性的下降, 通过 STZ 的作用最终可使血糖、胰岛素升高, 符合 2 型糖尿病的特征。

表 2 糖尿病模型造模 10 周后大鼠空腹的各项指标($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	FBG(mmol/L)	FINS(mU/L)	I/FPG.FINS
正常对照组	12	4.82 ± 0.71	18.78 ± 6.27	0.019 2 ± 0.003 9
高脂高糖组	12	6.34 ± 0.75 ²⁾	29.91 ± 7.98 ²⁾	0.012 3 ± 0.001 7 ¹⁾
糖尿病模型组	40	10.03 ± 1.02 ²⁾	40.16 ± 9.76 ²⁾	0.002 3 ± 0.000 6 ²⁾

3.1.3 糖尿病模型造模 10 周大鼠糖尿病症状观察 糖尿病模型组存活的 44 只大鼠全部出现典型糖尿病慢性改变, 空腹血糖浓度均高于 16.7 mmol·L⁻¹。

3.2 糖尿病性脑梗死模型制作结果

3.2.1 糖尿病性脑梗死模型大鼠神经功能损害程度评价 MCAO 后, 所有存活动物按 Okada 分级标准进行神经功能损害程度评价, 1 级及以上为神经功能障碍。结果正常对照组均为 0 级。糖尿病性脑梗死模型组 36 只大鼠中, 0 级 4 只; 1 级 5 只; 2 级 10 只; 3 级 11 只; 4 级 6 只。经 Ridit 检验两组之间有显著性差异($P < 0.05$)。神经功能障碍出现成功率为 88.8%, 与文献报道^[6] 接近。

3.2.2 糖尿病性脑梗死模型大鼠病理变化 正常对照组大鼠脑组织病理切片显示, 脑组织形态大致正常, 未见显著的病理改变; 脑梗死大鼠病理切片显示, 有栓塞病灶, 栓子分布多在大脑中动脉的细小分支上, 尤以皮质部多见, 梗塞灶数目不一, 经伊红染色发现梗塞灶局部神经纤维肿胀, 有高嗜伊红性改变等。

3.3 活络育阴方对糖尿病性脑梗死大鼠脑组织 RAGE 表达的影响 正常对照组见极少 RAGE 阳性表达细胞, 模型组 RAGE 免疫阳性细胞数随病程呈上升趋势, RAGE 阳性细胞主要分布缺血半暗带区。表达反应产物在细胞内呈棕褐色, 清晰可辨。活络

育阴方组和中汇糖脉康组治疗 4 周后,大鼠脑组织 RAGE 表达均明显降低,结果见表 3。

表 3 免疫组化各组 RAGE 免疫阳性细胞数($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 (g·kg ⁻¹)	RAGE 免疫阳性细胞数	
			ig 2 周	ig 4 周
正常对照组	12	—	2.41 ± 0.65 ²⁾	2.40 ± 0.71 ²⁾
糖尿病性脑梗死模型组	8	—	16.91 ± 2.32	19.74 ± 2.68
活络育阴方治疗组 1	8	1.5	10.18 ± 3.26 ²⁾	11.94 ± 1.62 ²⁾
活络育阴方治疗组 2	8	4.5	8.51 ± 2.50 ²⁾	10.74 ± 2.46 ²⁾
中汇糖脉康组	8	3.0	13.78 ± 2.15 ¹⁾	15.18 ± 2.34 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01

4 讨论

糖尿病性脑梗死属中医消渴合并中风范畴。消渴病久治不愈,由气累血,因虚致瘀,痰瘀互结,蕴久生毒,羁恋于络中,导致络脉为病,是消渴合并中风的病理基础。消渴病久多见气血不足之象,若气血不足则血行迟滞,血不足则络脉失养,从而导致气虚血滞,痰瘀互结,阻于络中,因虚致实而成络病。所谓“最虚之处,便是容邪之处”。络愈虚,邪愈滞,以致虚实夹杂,正虚邪恋,血瘀痰凝结于络中,壅阻络道,邪毒久郁深伏于孙络、缠络,则形成中风之疾。

活络育阴方是我们经筛选并结合自己临床经验组成的治疗糖尿病合并脑梗死的中药复方制剂,具有滋阴补肾、活络化瘀等功效,临床用于治疗糖尿病合并脑梗死,总有效率为 80.00%^[3];实验研究证明活络育阴方可明显降低糖尿病大鼠血浆 TC、TG 和低密度脂蛋白(LDL),表明活络育阴方有良好的降血脂作用,且糖尿病大鼠血液流变性有很好的改善^[4]。药理研究表明^[7],血竭粉、黄连、生地等具有良好的降血糖作用;川芎、蒲黄等具有增加冠脉血流量、抗血小板聚集和抗血栓、改善血液循环的作用;生地可以促进血红蛋白和红细胞的生成,改善外周循环;海蛤壳、生地等含有多种人体所必需的氨基酸、维生素和微量元素。从以上药物的综合作用以及实验结果分析,活络育阴方对 2 型糖尿病的治疗作用通过多环节、多靶点的调节而发挥其防治作用的。本实验在前期临床与实验研究的基础上进一步探讨活络育阴方防治糖尿病性脑梗死的作用机制。

RAGE 是细胞表面分子的免疫球蛋白超家族成员之一,RAGE 及高级糖基化终产物(AGE)在缺血应激介导的神经细胞功能失调和细胞凋亡中起重要作用。脑组织 RAGE mRNA 的过度表达可激发 AGE 结

合位点及淀粉肽与 RAGE 结合后产生一系列细胞生物反应(如氧化应激反应和活化核因子 KB 诱导的各种细胞因子产生),促发 RAGE 介导的 β 淀粉肽对神经元和脑组织中巨噬细胞、星形胶质细胞的氧化应激损伤。

高血糖是引起蛋白非酶糖基化的直接因素,并且蛋白非酶糖化的程度随着血糖的升高而加重,降低血糖最直接的效应是减低早期蛋白非酶糖基化产物的形成,从而阻止 AGEs 的产生,并抑制其与受体的相互作用。本实验观察到活络育阴方对糖尿病性脑梗死模型大鼠有明显的降血糖作用,且与糖脉康组及模型组比较均有显著意义(P < 0.05),说明活络育阴方可能通过降低血糖以减轻 RAGE 过度表达对脑血管系统的损害。有实验已经证明阻断 RAGE 将起到脑保护作用^[8]。本实验发现活络育阴方在不同剂量、不同时间内对大鼠脑组织中 RAGE 表达均明显降低,反映该方起到了在高血糖状态下及 RAGE 介导的应激反应所致的缺血、缺氧状态中对受损脑组织的保护作用。在症状方面模型组大鼠有消瘦、多尿、精神萎靡不振、反应迟钝等表现,而治疗组大鼠多尿症状较轻,反应动作较模型组灵敏。如何阻断 RAGE 的表达将在未来研究糖尿病合并脑梗死中起到重要作用,活络育阴方在本实验中展示的作用机制有待于进一步研究、探讨。

[参考文献]

- [1] 杨明功. 糖尿病流行现状及防治对策[J]. 疾病控制杂志, 2000, 4(3): 193-196.
- [2] 第十七届国际糖尿病大会简介[J]. 中华糖尿病杂志, 2001, 9(1): 60-62.
- [3] 李丰衣, 南征. 活络育阴汤治疗糖尿病合并脑梗死的临床研究[J]. 山东中医药大学学报, 2002, 26(2): 120.
- [4] 李丰衣, 赵晓民, 朱良珍. 活络育阴方治疗糖尿病模型大鼠的实验观察[J]. 泰山医学院学报, 2004, 25(2): 109-111.
- [5] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 478.
- [6] 魏文石, 吴笃初, 吕传真, 等. STZ 诱导慢性糖尿病大鼠大脑中动脉梗死模型的建立[J]. 中国临床神经科学, 2000, 8(3): 226-228.
- [7] 沈映君. 中药药理学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 368.
- [8] Yamamoto Y, Kato I, Doi T, et al. Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice[J]. Clin Invest, 2001, 108: 261-268.