

醒胰降糖灵对实验性糖尿病大鼠臀大肌中 环化腺苷酸 环化鸟苷酸含量的影响

李荣科^{*}, 李应东, 丁文君, 王志旺, 骆文郁
(甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 目的: 探讨醒胰降糖灵对实验性糖尿病大鼠臀大肌中环化腺苷酸(cAMP)、环化鸟苷酸(cGMP)含量的影响。方法: 用链脲佐菌素(STZ)一次性腹腔注射 $65\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 并连续 7 d 皮下注射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, 用放射免疫方法检测大鼠臀大肌中 cAMP、cGMP 的含量。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠臀大肌中 cAMP、cGMP 含量有显著下降($P < 0.01$), 醒胰降糖灵组与造模组比较有明显升高($P < 0.01$)。结论: 醒胰降糖灵可阻抑实验性糖尿病大鼠臀大肌中 cAMP、cGMP 含量的下降, 其作用机制可能与醒胰降糖灵参与胰岛素受体后水平信息转导有关。

[关键词] 醒胰降糖灵; 糖尿病; 臀大肌; 环磷酸腺苷; 环磷酸鸟苷

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)05-0066-03

Effects of Xingyi Jiangtang Ling on the Contents of cAMP, cGMP in the Ectogluteus of Diabetic Rats

Li Rong-ke^{*}, Li Ying-dong, DING Wen-jun, WANG Zhi-wang, LUO Wen-yu
(Gansu University of TCM, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Xingyi Jiangtang Ling on the content of cAMP, cGMP in of diabetic rats. **Methods:** The model of diabetic rat was established with streptozotocin $65\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ip and then concomitant hypodermic injection with thyroxine, once a day, lasting 7 days. After treated with Xingyi Jiangtang Ling for 21 days, the content of cAMP, cGMP in the ectogluteus of all experimental rats was detected by radioimmunoassay. **Results:** Compared to normal group, the content of cAMP, cGMP in the ectogluteus of diabetic rats was significantly declined ($P < 0.01$). However, that of treated group was significantly increased, compared with model group($P < 0.01$). **Conclusion:** Xingyi Jiangtang Ling could decrease the content of cAMP, cGMP in the ectogluteus of diabetic rat from decreasing. Its molecular mechanism might be related to regulate the signal transduction of insulin receptor.

[Key words] Xingyi Jiangtang Ling; diabetes; ectogluteus; cAMP; cGMP

胰岛素抵抗和(或)胰岛素分泌缺陷是 2 型糖尿病的主要病机, 胰岛素属多肽类激素, 分子较大, 一般认为它不易进入靶细胞而只作用于膜受体, 通过

第二信使而产生生物效应, 但对于胰岛素作用的第二信使问题, 多年来未取得统一看法^[1]。本实验用中医证与西医病相结合的动物模型, 采用醒胰降糖灵干预治疗, 从胰岛素外周靶组织臀大肌中环化腺苷酸(cAMP)、环化鸟苷酸(cGMP)含量的变化, 探讨醒胰降糖灵对胰岛素受体后水平第二信使的调控作用。

[收稿日期] 2007-09-04

[基金项目] 甘肃省教育厅资金资助项目(0505-07)

[通讯作者] * 李荣科, Tel: (0931) 8765326; E-mail: Rongk197@

126.com

1 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。动物合格证编号: NO. 0001558。

1.2 药品及试剂 醒胰降糖灵由六味地黄丸加黄芪、五味子、水蛭等药组成, 药材均购自兰州黄河药材市场, 由甘肃中医学院药学系中药炮制教研室常规水煎制, 生药含量为 2.79 g·mL⁻¹; 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(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(Glu)试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司, 批号: 061025); ¹²⁵I-胰岛素(INS)放射免疫分析药盒(北京科美东雅生物技术有限公司, 批号: 061021); 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 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 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 8 只为正常对照组, 其余 52 只按文献^[2,4]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 将链脲佐菌素(STZ)用 pH 值 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⁻¹ 的剂量给造模组大鼠一次性腹腔注射, 并连续 sc 甲状腺素(T₄) 0.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 7 d, 从第 3 天开始, 每隔(3~4) d 检测空腹 8 h 血糖值。至 14 天, 选取血糖值在(11.0~16.7) mmol·L⁻¹ 之间, 伴有消瘦、生长发育迟缓, 体温升高, 毛无光泽, 活动频度增加、反应迟钝、多饮、多食、多尿, 大便干结等肾阴虚证表现者为造模成功者。

2.3 分组给药 选取造模成功的 24 只大鼠称重, 按体重编号依照随机数字表法分为 3 组, 分别为模型对照组、阳性药、中药治疗组。正常对照组、模型

对照组均 ig 生理盐水 10 mL·kg⁻¹; 阳性药组每日 ig 盐酸二甲双胍片的水溶液 0.27 g·kg⁻¹; 中药治疗组每日 ig 醒胰降糖灵 25.11 g·kg⁻¹ (醒胰降糖灵成人量: 93 g·d⁻¹; 查成人与动物间按体表面积折算的等效计量比值计算, 大鼠用药剂量为: 93×0.018×5=8.37 g·kg⁻¹), 1 次/d, 连续 21 d。

2.4 组织取材 治疗 21 d 后, 禁食 ≥10 h, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠生理盐水溶液 40 mg·kg⁻¹ 麻醉, 股静脉取血, 按照指标以及试剂盒的要求分别留存血浆和血清。然后将大鼠俯卧于鼠板上切开双侧臀部皮肤, 钝性分离出臀大肌, 快速放入干冰中保存。将臀大肌组织放入盛有 2 mL 50 mmol·L⁻¹ pH4.75 醋酸缓冲液的试管内(冰浴), 匀浆, 加入 2 mL 无水乙醇, 混匀, 静置 5 min, 3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min。将上清液倒入小瓶内, 再用 75% 乙醇 2 mL 洗沉淀, 匀浆分散, 混匀, 3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min。合并上清液, 于 60℃烘箱烘干, 待残渣干后放入 4℃保存。

2.5 指标检测 取大鼠静脉血清测定血糖(Glu)、血胰岛素(Ins)按放射免疫分析药盒操作步骤进行。胰岛素敏感指数(ISI), 采用李光伟^[5]计算方法以空腹血糖与空腹胰岛素乘积倒数的自然对数来表示, 即 ISI = ln/(空腹血糖×空腹胰岛素)。臀大肌中 cAMP、cGMP 的含量用放免分析药盒测定。测量时用 1.0 mL 醋酸缓冲液溶解残渣, 然后取 0.1 mL 样本与乙酸化试剂 5 μ L ¹²⁵I-cAMP 标准或者 ¹²⁵I-cGMP 标准 100 μ L, 抗血清 100 μ L 混匀, 4℃冰箱过夜后, 加入羊抗兔 IgG 100 μ L, 兔血清 100 μ L, 摇匀, 室温静置(2~3)h, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 吸弃上清液, 留下沉淀, 在自动 γ 计数器上测定。将所得值乘以稀释的倍数得出数值。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件处理。数据用均数±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 结果

3.1 各组大鼠血清血糖、胰岛素及胰岛素敏感指数的比较 由表 1 看出, 与模型组比较治疗组空腹血糖及胰岛素明显下降(P<0.01), 胰岛素敏感指数有明显升高(P<0.05)。

3.2 各组大鼠臀大肌中 cAMP、cGMP 含量的比较 由表 2 看出, 与正常组比, 模型组大鼠臀大肌中 cAMP、cGMP 含量有显著下降(P<0.01), 醒胰降糖灵组, 与造模组比较有明显升高(P<0.01)。

表 1 各组大鼠血清血糖、胰岛素及胰岛素敏感指数的比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	血糖 ($mmol \cdot L^{-1}$)	胰岛素 ($mU \cdot L^{-1}$)	胰岛素 敏感指数
正常对照组	—	5.81 ± 1.31 ²⁾	24.97 ± 5.61 ²⁾	-5.11 ± 0.21 ¹⁾
模型对照组	—	11.23 ± 1.57	45.68 ± 9.21	-5.87 ± 0.14
二甲双胍组	0.27	6.67 ± 1.95 ²⁾	28.10 ± 7.65 ²⁾	-5.19 ± 0.26 ¹⁾
醒胰降糖灵组	25.11	6.91 ± 1.52 ²⁾	25.79 ± 12.13 ²⁾	-5.23 ± 0.19 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 2 各组大鼠臀大肌中 cAMP、cGMP 含量的比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	cAMP ($pmol \cdot mL^{-1}$)	cGMP ($pmol \cdot mL^{-1}$)
正常对照组	—	72.58 ± 6.92 ²⁾	52.35 ± 6.73 ²⁾
模型对照组	—	30.75 ± 8.02	28.43 ± 5.21
二甲双胍组	0.27	55.40 ± 9.16 ²⁾	50.01 ± 7.48 ²⁾
醒胰降糖灵组	25.11	57.84 ± 7.54 ²⁾	51.22 ± 6.93 ²⁾

4 讨论

糖尿病属中医“消渴病”的范畴,古今医家均以肾阴不足为主,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,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;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;五味子与山茱萸、泽泻合用,

调肝益肾。全方合用,共达滋阴补肾、调肝益脾、除痰活血之功。

cAMP、cGMP 广泛存在于动物机体的各种组织中,相当于第二信使。国内外的研究表明,用链脲佐菌素腹腔内一次性大剂量注射所建立的糖尿病模型属于 2 型糖尿病^[2]。目前通过增加外周组织对葡萄糖的摄取、利用以及胰岛素受体后水平信息转导物质,是拮抗 2 型糖尿病胰岛素抵抗研究的重点。本研究结果表明,经用醒胰降糖灵治疗后,大鼠臀大肌中 cAMP 和 cGMP 含量比模型组有显著升高($P < 0.01$),说明醒胰降糖灵可阻抑实验性糖尿病大鼠臀大肌中 cAMP/cGMP 含量的下降,其作用机制可能与醒胰降糖灵参与胰岛素受体后水平信息转导有关,其确切的作用途径尚有待于进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 杨宝锋,苏定冯.药理学[M].北京:人民卫生出版社,2005.379-380.
- [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] 李光伟,潘孝仁.检测人群胰岛素敏感性的一项新指数[J].中华内科杂志,1993,32(10):656.