

# 大黄对糖尿病大鼠血管病变保护机制的实验研究

田凤胜<sup>1\*</sup>, 李振彬<sup>2</sup>, 王元松<sup>1</sup>, 苏秀海<sup>1</sup>, 李文东<sup>1</sup>, 王晓蕴<sup>1</sup>

(1. 河北医科大学附属沧州中西医结合医院内分泌科, 河北 沧州 061001;

2. 白求恩国际和平医院中西医结合内科, 河北 石家庄 050023)

[摘要] 目的: 探讨大黄对糖尿病血管病变的保护机制。方法: 制备糖尿病大鼠模型, 并给予大黄干预, 8 周后, 取血测定一氧化氮(NO) 及内皮素-1(ET-1)。取胸主动脉环观察不同累积浓度的乙酰胆碱(Ach) 对去甲肾上腺素(NE) 引起的血管收缩的抑制率。另留取一段胸主动脉制备病理切片, SP 法免疫组化染色, 观察细胞间黏附分子-1(ICAM-1) 及血管细胞间黏附分子-1(VCAM-1) 的阳性表达。结果: 大黄组与模型组相比能明显抑制升高的血浆 ET-1( $P < 0.05$ ); 升高 NO 的水平( $P < 0.05$ ); 但均达不到正常组的水平( $P < 0.05$ )。模型组血管环对 NE 的收缩反应明显强于正常对照组及大黄组( $P < 0.05$ ), 且大黄组对 NE 的收缩反应亦强于正常对照组( $P < 0.05$ )。在相同 Ach 浓度下, 模型组及大黄组胸主动脉环对 Ach 的舒张作用明显弱于正常组( $P < 0.05$ ), 而大黄组强于模型组( $P < 0.05$ )。大黄组能明显抑制糖尿病大鼠胸主动脉 ICAM-1 及 VCAM-1 表达( $P < 0.05$ )。结论: 大黄具有降低大鼠 ET-1 及升高 NO 的作用, 能够保护糖尿病大鼠内皮依赖的血管舒张功能, 且能够抑制 ICAM-1 及 VCAM-1 的表达, 具有抗动脉硬化作用。

[关键词] 大黄; 糖尿病; 胸主动脉; 内皮

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)02-0063-04

## Vascular Protective Effects of Da Huang in Diabetes Mellitus Rats

TIAN Feng-sheng<sup>1\*</sup>, LI Zhen-bin<sup>2</sup>, WANG Yuan-song<sup>1</sup>, SU Xiu-hai<sup>1</sup>, LI Wen-dong<sup>1</sup>, WANG Xiao-yun<sup>1</sup>

(1. Endocrinology Department, Affiliated Cangzhou Traditional-western Combination Medical Hospital of Hebei Medical University, Cangzhou 061001, China; 2. Traditional-western Combination Medical Department, International Peace Hospital of Bethun, Shijiazhuang 050023, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective mechanism of Chinese Herb-Da Huang on the vascular disease in diabetes mellitus(DM) rats. **Methods:** The DM rat model was made. Da Huang was given to treatment group. 8 weeks later, blood sample was taken to test nitric oxide(NO) and endothelin-1(ET-1). Thoracic aortic rings to observe the ratio of different concentration of Ach inhibit contraction caused by NE. Took down another part of aorta to make pathology slice, method of SP immunohistochemistry staining, observed the expression of ICAM-1 and VCAM-1. **Result:** Da Huang group obviously decreased plasma ET-1 and increased the level of NO compared with Diabetes group ( $P < 0.05$ ), but could not reach the level of the normal control group ( $P < 0.05$ ). The expression of ICAM-1 and VCAM-1 could be obviously inhibited in Da Huang group compared with diabetes contrast group. But obviously stronger than normal control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Chinese medicine Da Huang could decrease the level of ET-1 and increase the level of NO in diabetes rats, they have the function of protect the endothelium of vessel, and could inhibit the expression of ICAM-1 and VCAM-1, act as the role of anti-atherosclerosis.

[Key words] Da Huang; diabetes; thoracic aorta; endothelium

[收稿日期] 2007-07-31

[通讯作者] \* 田凤胜, Tel: (0317) 6987188; E-mail: cztianfsh@sian.com

糖尿病合并血管病变是糖尿病的慢性并发症之一,是糖尿病致残致死的最主要原因。糖尿病的血管病变是动脉粥样硬化(AS)的形成和发展过程,糖尿病作为一个独立的危险因素,会加速动脉硬化的进程,而血管内皮细胞的损伤是动脉粥样硬化发生的始环节<sup>[1]</sup>。免疫学证明 AS 是炎症性疾病<sup>[2]</sup>。多种炎性细胞因子的过度释放是动脉粥样硬化形成的重要步骤已经被广泛接受<sup>[3]</sup>。随着研究深入,发现清热类中药不仅仅限于传统理论中的抗菌消炎作用,而涉及到了炎症反应的多个环节,这就为清热类中药防治 AS 提供了药理学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与仪器** 健康雄性清洁级 SD 大鼠 50 只,体重(180~220)g,由河北医科大学实验动物中心提供(动物合格证号:DK0506-0023);链脲佐菌素(STZ)、乙酰胆碱(Ach)、去甲肾上腺素(NE)、柠檬酸钠均为美国 Sigma 公司产品;内皮素-1(ET-1)试剂盒(北京东亚生物制品公司);一氧化氮(NO)试剂盒:南京聚力生物医学工程研究所;细胞间黏附分子-1(ICAM-1)及血管细胞间粘附分子-1(VCAM-1):武汉博士德公司产品;血管灌流装置:齐齐哈尔玻璃仪器厂;超级恒温浴槽:上海浦东荣丰科学仪器有限公司;TGL-16G 低温离心机:上海安亭科学仪器厂;722 型光栅分光光度计:上海第三分析仪器厂;罗康全活力型血糖仪:德国罗氏诊断有限公司;RM6240B/C1.36 生物信号采集系统:成都仪器厂;JZ101 肌肉张力换能器:高碑店新航机电设备公司;HPIAS-1000 彩色病理图文分析系统:同济医科大学千屏影像公司;大黄:(品种为:药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 产于四川,用制大黄)常规煎剂  $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的建立** 50 只大鼠随机分为两组,正常组 12 只,造模组 38 只。造模组大鼠禁食 12 h 后按文献方法<sup>[4,5]</sup>略作改进,一次性腹腔注射 STZ  $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (STZ 临用前用 0.1 M 柠檬酸钠缓冲液配成浓度为 1% pH=4.2 的溶液),正常组腹腔注射等量的柠檬酸钠缓冲液。72 h 后尾静脉取血,测血糖  $\geq 16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、尿糖+++~++++,确定为糖尿病大鼠。

**1.2.2 分组及给药** 成模后,随机抽取 24 只分为模型组(12 只)及大黄组(12 只)。大黄组给予  $10\text{ g}$  生药/kg 体重<sup>-1</sup>灌胃,其余两组每日给予同等剂量纯

净水灌胃。

**1.2.3 标本的留取** 连续 8 周后,禁食 12 h 以 3% 戊巴比妥( $80\text{ mg}/\text{kg}$ )腹腔注射麻醉,迅速开腹,分离腹主动脉,从腹主动脉采血,取 2 ml 分离血清,测定 NO;同时在含有 EDTA- $\text{Na}_2$ :抑肽酶(30  $\mu\text{L}$ :40  $\mu\text{L}$ )的试管中加入全血 3 mL,低温离心机离心  $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,离心 10 min,取血浆放免法测定 ET-1。

**1.2.4 大鼠胸主动脉血管环张力测定** 参照文献[6]大鼠取血后,迅速打开胸腔,切取胸主动脉段,置于已通有 95%  $\text{O}_2$ +5%  $\text{CO}_2$  混合气体(至少 30 min)  $4\text{ }^\circ\text{C}$  的 Krebs 液的培养皿中,分离周围组织,剪成长约 3 mm 的动脉环。悬置于盛有 5 mL Krebs 液的血管浴槽内,恒温( $37\pm 0.5$ ) $^\circ\text{C}$ ,标本一端固定于浴槽底部,另一端与连接 RM6240B/C1.36 生物信号软件分析系统的 JZ101 肌张力换能器连接。于浴槽底部持续通入 95%  $\text{O}_2$ +5%  $\text{CO}_2$  的混合气体,静息负荷 2.0 g,平衡 60 min,每 20 min 换液 1 次,实验用  $10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 Ach 检测内皮完整性,选择能抑制由  $0.62\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NE 引起血管收缩 30% 以上的血管用于实验。以  $0.62\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NE 引起血管最大收缩为 100%,计算不同浓度 Ach 对血管的舒张率。

**1.2.5 石蜡切片与免疫组化测定** 留取胸主动脉时,另留取一段以 4% 多聚甲醛固定,洗涤、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、片厚 5 mm,SP 法免疫组化染色,应用彩色病理图文分析系统计算病理切片组织中阳性染色面积与视窗面积的百分比。

**1.3 统计学处理** 数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示,应用 SPSS 11.0 统计软件系统中方差分析,自身前后对照比较应用配对  $t$  检验。

## 2 结果

**2.1 血糖的变化** 经灌胃治疗 8 周后,模型对照组与大黄组各剩 10 只大鼠。各组治疗前后血糖无明显变化,见表 1。

表 1 治疗前后血糖的变化

组别	n	剂量 ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	空腹血糖( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
			治疗前	治疗 8 周后
正常组	12	—	$6.24\pm 0.80$	$7.62\pm 2.03$
模型对照组	10	—	$25.49\pm 4.30$	$25.31\pm 5.33$
大黄组	10	10	$24.20\pm 4.14$	$22.43\pm 3.94$

**2.2 ET-1 及 NO 的变化** 经过 8 周后,模型对照组及大黄组与正常组相比血浆 ET-1 明显升高,NO 明显下降,其差别有统计学意义( $P< 0.05$ );大黄组与

模型对照组相比血浆 ET-1 明显下降, NO 明显升高, 其差别有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 治疗 8 周后血浆 ET-1 及 NO 的变化

组别	n	剂量 (g·kg <sup>-1</sup> )	ET-1 (pg·mL <sup>-1</sup> )	NO (μmol·L <sup>-1</sup> )
正常组	12	—	96.90 ± 9.96	75.60 ± 4.89
模型对照组	10	—	123.42 ± 10.19 <sup>1)</sup>	53.44 ± 3.77 <sup>1)</sup>
大黄组	10	10	109.33 ± 9.68 <sup>1,2)</sup>	66.25 ± 3.96 <sup>1,2)</sup>

注: 与正常组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型对照组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$  (表 3 同)

2.3 血管环在 NE 刺激下的最大收缩坪值及血管内皮依赖的舒张效应 见表 3。

表 3 胸主动脉环在 NE 刺激下的最大收缩坪值及血管内皮对 Ach 浓度依赖的舒张效应 (%)

组别	n	剂量 (g·kg <sup>-1</sup> )	NE 最大收缩坪值	不同 Ach 浓度下舒张效应 (%)			
				10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>
正常组	12	—	98.17 ± 11.37	17.80 ± 3.35	27.44 ± 2.90	41.75 ± 3.54	58.41 ± 4.87
模型对照组	10	—	123.90 ± 9.99 <sup>1)</sup>	5.47 ± 1.13 <sup>1)</sup>	10.65 ± 3.77 <sup>1)</sup>	21.53 ± 4.66 <sup>1)</sup>	31.71 ± 5.26 <sup>1)</sup>
大黄组	10	10	113.10 ± 6.66 <sup>1,2)</sup>	8.91 ± 1.75 <sup>1,2)</sup>	17.58 ± 2.80 <sup>1,2)</sup>	30.76 ± 4.51 <sup>1,2)</sup>	43.87 ± 3.90 <sup>1,2)</sup>

2.4 胸主动脉 ICAM-1 及 VCAM-1 的表达 正常组仅见较少的棕黄色颗粒状阳性染色物质 (图 1A 及图 2A); 模型对照组可见大量的棕黄色颗粒状阳性染色物质, 部分融合成片 (图 1B 及图 2B), 阳性染色百分比明显高于正常组 ( $P < 0.01$ ); 大黄组棕黄色颗粒状阳性染色物质明显低于模型对照组 ( $P < 0.05$ ), 但高于正常组 ( $P < 0.05$ ) (见图 1C、图 2C 及表 4)。

2.3.1 对最大收缩坪值的影响 大鼠胸主动脉环在用  $0.62 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NE 刺激下收缩, 约 2 min 后, 血管环收缩张力达峰值, 模型对照组对 NE 收缩反应明显强于正常对照组及大黄组 ( $P < 0.05$ ), 且大黄组对 NE 的收缩反应亦强于正常组 ( $P < 0.05$ )。

2.3.2 对 Ach 舒张效应的影响 当各组收缩达坪值后, 然后按递增浓度给药法分别给予 Ach ( $10^{-8} \sim 10^{-5}$ )。结果显示, 各组胸主动脉环呈浓度依赖性抑制 NE 引起的血管收缩。在相同 Ach 累积浓度下, 模型对照组及大黄组对胸主动脉环的舒张作用明显弱于正常组 ( $P < 0.05$ ), 模型对照组对胸主动脉环的舒张作用亦明显弱于大黄组 ( $P < 0.05$ )。

表 4 各组大鼠胸主动脉壁 ICAM-1 及 VCAM-1 的阳性表达 (%)

组别	n	剂量(g·kg <sup>-1</sup> )	ICAM-1	VCAM-1
正常组	12	—	2.79 ± 1.37	5.19 ± 1.64
模型对照组	10	—	33.14 ± 6.58 <sup>1)</sup>	39.28 ± 4.27 <sup>1)</sup>
大黄组	10	10	22.84 ± 3.52 <sup>1,2)</sup>	19.00 ± 2.53 <sup>1,2)</sup>

注: ICAM-1 及 VCAM-1 数据经 Levene 法检验方差不齐, 故组间多重比较选用 Dunnett's T3 检验。与正常组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型对照组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

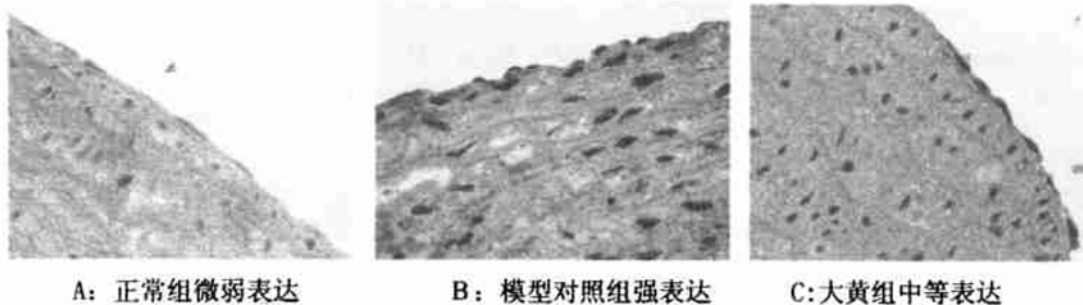


图 1 胸主动脉 ICAM-1 的表达 (× 400)

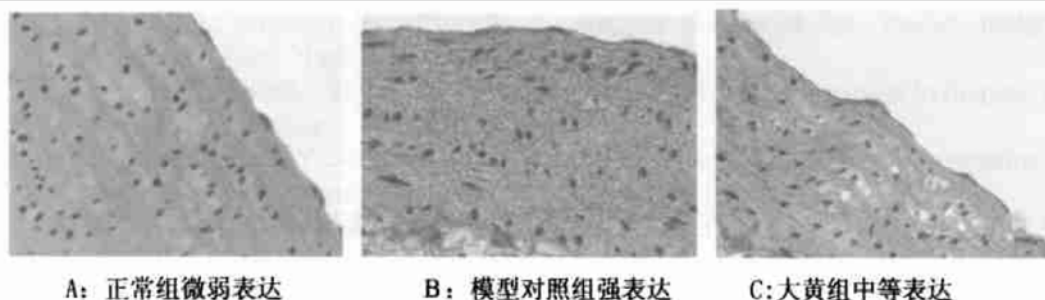


图 2 胸主动脉 VCAM-1 的表达 (× 400)

### 3 讨论

糖尿病血管病变是糖尿病的慢性并发症之一,是糖尿病患者致残、致死的最主要因素。糖尿病血管病变与非糖尿病血管病变病理改变相似:即动脉粥样硬化。所不同之处为前者病理改变重,发病年龄轻,进展快<sup>[7]</sup>。

近年来内皮功能不全被认为是动脉粥样硬化形成的早期特征。研究表明,高血糖、蛋白非酶糖基化、氧化应激等在糖尿病血管病变中发挥了重要作用。ET-1 与 NO 的平衡失调介导了血管内皮的损伤并导致血流动力学紊乱。而血流动力学及血液流变学异常及内皮细胞损伤是各种糖尿病血管并发症的共同病理表现及重要原因<sup>[8]</sup>。由于内皮细胞功能的受损,导致 ET-1 及 NO 的分泌失衡。本研究结果表明大黄组大鼠血浆 ET-1 分泌较模型对照组显著降低,差别有显著意义;大黄组大鼠血清 NO 分泌较模型对照组显著升高,差别有显著意义。表明大黄在抑制糖尿病大鼠 ET-1 的升高的同时,还可以升高血清 NO 的水平,从而保护血管内皮功能。但是对 ET-1 及 NO 作用仍不能达到正常大鼠水平。

离体血管环实验是一个用来评价血管功能的经典实验,能够较好地反映血管内皮依赖性和非依赖性舒张功能。我们研究表明,糖尿病大鼠胸主动脉环对肾上腺素能受体激动剂 NE 呈收缩增强,与正常组大鼠相比有显著性差异,与 ZHU<sup>[9]</sup> 等人研究一致。对浓度依赖的 Ach 舒张反应下降,而应用大黄的模型大鼠,可降低收缩增强趋势,且其对浓度依赖的 Ach 的舒张反应提高,表明其对血管内皮细胞具有保护作用。

随着分子免疫学的研究进展,越来越多的证据显示动脉粥样硬化过程是一个慢性炎症过程<sup>[3]</sup>。有专家指出,糖尿病不仅是一个高血糖的疾病,还是一种血管性疾病,也是一种炎症性疾病,已被视为与冠心病具有同等危险的冠心病等危症<sup>[10]</sup>。且研究表明,动脉粥样硬化的发生发展与 ICAM-1 及 VCAM-1 等黏附分子的过度表达有关<sup>[11]</sup>。我们研究发现糖尿病大鼠胸主动脉高度表达 ICAM-1 及 VCAM-1,而

大黄可以明显抑制血管 ICAM-1 及 VCAM-1 的表达。表明 ICAM-1 及 VCAM-1 在糖尿病大鼠动脉硬化的发生发展中扮演了重要角色,而大黄通过抑制血管 ICAM-1 及 VCAM-1 的表达。而具有防治糖尿病性动脉硬化的作用。

综上所述,大黄抗糖尿病动脉硬化作用是多层次、多角度的。

### [参考文献]

- [ 1 ] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[ J ]. Nature, 1993, 62( 29 ): 801.
- [ 2 ] Ross R. Atherosclerosis: an inflammation disease[ J ]. N Engl J Med, 1999, 340( 2 ): 115-126.
- [ 3 ] Fang L, Wei H, Mak KH, *et al.* Marker of low-grade inflammation and soluble cell adhesion molecules in Chinese patients with coronary artery disease[ J ]. Cardiol, 2004, 20( 14 ): 1433-1438.
- [ 4 ] 张均田. 现代药理实验方法学[ M ]. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1998. 981.
- [ 5 ] 于德民, 吴 锐, 尹 澹, 等. 实验性链脲佐菌素动物模型的研究[ J ]. 中国糖尿病杂志, 1995, 3( 2 ): 105-109.
- [ 6 ] 龙超良, 汪 海, 肖文彬. 吡那地尔抗高血压治疗后对扩血管药物反应的变化[ J ]. 中国药理学通报, 1997, 13( 3 ): 308-311.
- [ 7 ] Cormier J, Cormier F, Fichelle J. Arterial disease of the lower limbs in diabetic patients[ J ]. Rev Prat, 1995, 45( 1 ): 50.
- [ 8 ] Porta M, Selba ML, Molinatti P, *et al.* Endothelial cell function in diabetic microangiopathy[ J ]. Diabetologia, 1992, ( 5 ): 161.
- [ 9 ] Zhu BH, Guan YY. Contractile responses of diabetic rat aorta to phenylephrine at different stage of diabetic duration[ J ]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22( 5 ): 445-449.
- [ 10 ] 李 慧, 邹大进. 2 型糖尿病及肥胖与慢性炎症因子[ J ]. 第二军医大学学报, 2003, 24( 11 ): 1246.
- [ 11 ] Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, *et al.* Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease case; The Atherosclerosis Risk In Communities ( ARIC ) study[ J ]. Circulation, 1997, 96( 12 ): 4219-4225.