

止消通脉宁对糖尿病大鼠肾脏多元醇代谢和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性影响的研究

杨 君¹, 秦 英², 吕仁和², 张家俊²

(1 海军总医院, 北京 100037; 2 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2000)05-0035-03

止消通脉宁由生芪、细生地、鬼箭羽、夏枯草、三七、莪术、熟大黄等药物组成, 是治疗糖尿病肾病(DN)的有效方剂, 临床研究表明, 给予早期 DN 患者口服止消通脉宁颗粒剂每日 2~3 次, 每次 5g, 治疗 8 周后可明显改善临床症状, 降低血糖、血脂, 并可减少尿蛋白和尿白蛋白排泄率, 改善肾脏功能^[1]。目前认为多元醇通路活性增强是 DN 发生、发展的重要机制之一。本实验采用链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病大鼠, 观察了止消通脉宁及醛糖还原酶抑制剂 Sorbinil 对糖尿病大鼠肾组织山梨醇、肌醇含量和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性变化的作用。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器 异氰酸苯酯为德国产品, STZ、肌醇、山梨醇、半乳糖醇、ATP- Na_2 、孔雀绿、哇巴因均为 Sigma 产品, 乙腈为天津四友试剂厂产品, 止消通脉宁颗粒剂由东直门医院提供。722 型分光光度计、Gilson 高效液相色谱仪(色谱条件: 303 型溶剂泵, 116 型紫外检测器, U6K 进样阀, Water 电脑控制系统, C_{18} 反向柱。流动相为乙腈: 乙醇: 水 = 45: 22: 33, 流速 1.0ml/min, 紫外检测波长 240nm, 灵敏度 0.04A UFS, 进样量 5 μ l, 柱温 $20 \pm 1^\circ\text{C}$)。

1.2 动物及分组 40 只雄性 SD 大鼠随机分出 10 只为正常对照组, 另 30 只采用一次

性腹腔内注射 STZ(65mg/kg) 制造糖尿病模型(标准: 注射 STZ48h 后, 空腹血糖 $\geq 16.67\text{mmol/L}$), 随机分为糖尿病模型组; 止消通脉宁治疗组(5g/kg/d); sorbinil 治疗组(10mg/kg/d)。第 8 周末时将大鼠断头处死, 速取双侧肾脏, 去除肾盂、肾包膜, 液氮速冻后, 存于 -70°C 冰箱中保存待用。

1.3 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性测定^[2] 取少量肾皮质和外髓, 称重后用组织匀浆缓冲液(含蔗糖 0.2mmol/L、Tris-HCL 0.02mmol/L, pH7.40), 组织重量与组织匀浆缓冲液比为 1:40, 在玻璃匀浆器中制备匀浆, 直接用粗制肾组织匀浆加于酶反应管中(总量 1.0ml), 反应液中各化合物浓度为: NaCl 100、 $\text{Mg}-\text{Cl}_2$ 2.5、KCl 10、EDTA 2.0、ATP Na_2 1.0 或哇巴因 0.2(单位: mmol/L), 37°C 水浴中反应 30min, 速加无机磷显色剂 2.5ml(含 0.02% 孔雀绿、0.55% 钼酸铵和 0.1% TWEEN-20), 再加 24% 柠檬酸钠 0.2ml, 室温反应 30min, 用波长 660nm 比色测光密度, 计算无机盐含量, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性为不含哇巴因与含哇巴因两管之差值, 单位为 mmol Pi/g 湿重组织/h, 每次作标准曲线, 各反应管均作复管。

1.4 肾组织山梨醇和肌醇含量测定 采用高效液相色谱法(HPLC)。取适量肾皮质和外髓称重后, 加入冷双蒸水 1.0ml 匀浆, 在匀浆液中加 2.4ml 冷乙醇, 摇匀, 4°C 放置 30min 后, 10000g 离心 15min(4°C), 弃去沉

淀, 上清液备用。利用多元醇游离羟基和异氰酸苯酯反应进行样品衍生^[3]。上清液中加入 6nmol/L 半乳糖醇作为内标, 冷冻干燥, 加入 70 μ l 吡啶和 20 μ l 异氰酸苯酯, 置 55 $^{\circ}$ C 水浴 1h。冷却 1min 后加入 20 μ l 甲醇, 再 55 $^{\circ}$ C 水浴 5min, 以除去过量的衍生剂。加入 90 μ l 吡啶, 摇匀, 4000rpm 离心 5min 后, 取上清液 5 μ l 进行 HPLC 测定。山梨醇及肌醇含量采用峰高内标法定量, 以每 g 湿重组织表示。

1.5 统计学分析 计量资料值以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组样本均数比较, 采用方差分析。

2 结果

2.1 止消通脉宁对糖尿病大鼠肾组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响 从表 1 看出, 注射 STZ 8 周后, 糖尿病模型组与正常对照组比较, Na⁺-K⁺-ATP 酶活性显著降低 ($P < 0.05$), 而用止消通脉宁和 Sorbinil 治疗后, Na⁺-K⁺-ATP 酶活性显著升高(与模型组相比 $P < 0.05$), 两治疗组间无显著差异 ($P > 0.05$) (见表 1)。

表 1 各组动物 Na-K-ATP 酶活性 (mmol pi/g 湿重组织/h) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	Na ⁺ -K ⁺ -ATP ⁺ 酶活性
正常对照组	0.58 \pm 0.12
模型组	0.34 \pm 0.20 [*]
止消通脉宁组	0.49 \pm 0.16 [△]
Sorbinil 组	0.47 \pm 0.19 [△]

注: ^{*}与正常对照组相比 $P < 0.05$; [△]与模型组相比 $P < 0.05$

2.2 止消通脉宁对糖尿病大鼠肾组织山梨醇和肌醇含量的影响 由表 2 看出, 造模 8 周后, 糖尿病模型组肾脏山梨醇含量较正常对照组明显升高 ($P < 0.01$), 而肌醇含量则明显降低 ($P < 0.01$); 用止消通脉宁和 Sorbinil 治疗后, 山梨醇含量明显降低 ($P < 0.01$), 两治疗组间无明显差异 ($P > 0.05$); 止消通脉宁组肾脏肌醇含量显著高于糖尿病模型组 ($P < 0.01$), 但 Sorbinil 组肌醇含量

与糖尿病模型组比较无明显改善 ($P > 0.05$) (见表 2)。

表 2 各组动物肾组织山梨醇和肌醇含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	山梨醇 (μ mol/g)	肌醇 (μ mol/g)
正常对照组	0.62 \pm 0.07	10.24 \pm 1.53
模型组	2.43 \pm 0.11 [*]	6.26 \pm 1.31 [*]
止消通脉宁组	0.67 \pm 0.10 [△]	9.05 \pm 1.07 [△]
Sorbinil 组	0.78 \pm 0.08 [△]	7.32 \pm 1.24

注: ^{*}与正常对照组相比 $P < 0.01$; [△]与模型组相比 $P < 0.01$

3 讨论

近年来认为, DN 发病机理与高血糖状况下醛糖还原酶活性增高, 山梨醇积聚, 以及由此引起的肌醇减少、Na⁺-K⁺-ATP 酶活性降低等变化有关。醛糖还原酶抑制剂能减少组织内山梨醇的蓄积, 已逐渐用于防治 DN 等糖尿病并发症。已报道有醛糖还原酶抑制剂作用的中药有黄芩甙、黄连素、甘草、丹参、黄芪、黄芩甙、葛根素、水飞蓟宾、龙胆草、槲皮素、柚皮素等^[4,5], 但尚无关于中药复方的研究报道。本文研究了止消通脉宁对 DN 多元醇代谢的影响, 结果发现 STZ 诱导的糖尿病大鼠 8 周后肾组织山梨醇含量明显升高、肌醇含量明显降低, 这与国内外研究结果相一致。用止消通脉宁治疗后, 可显著降低肾组织山梨醇含量、增加肌醇含量, 而 Sorbinil 虽可降低肾组织山梨醇含量, 但对肌醇含量的提高则无明显效果, 说明中药复方止消通脉宁除了通过抑制醛糖还原酶活性改善多元醇代谢外, 还可能存在其它途径影响肌醇的代谢。

我们据国外报道的测定坐骨神经、晶体多元糖醇的方法^[3], 采用异氰酸苯酯为衍生剂, 选用半乳糖醇作内标, 用高效液相色谱法 (HPLC) 测定了大鼠肾组织多元糖醇的含量, 这在国内尚无报道。结果表明, 该法可将多元糖醇与杂质很好地分离, 检测灵敏度高, 稳定性强, 操作方法简单易行, 可用于肾组织

和其它组织多元糖醇的测定。

本实验还测定了各组大鼠肾组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性,结果表明,造模 8 周后,糖尿病大鼠肾组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性显著降低,而用止消通脉宁和 Sorbinil 治疗后均可提高 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性,两治疗组间差异不显著。说明醛糖还原酶抑制剂可以改善 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性,而中药复方止消通脉宁有与之相同的作用。

本研究从多元醇代谢角度说明了止消通脉宁治疗 DN 的作用机制。

参考文献:

[1] 吕仁和,高彦彬,王越,等. 止消通脉宁治疗糖尿病肾病的临床与实验研究[M]. 第二届糖

尿病(消渴病)国际学术会议论文集,北京:中国中医药出版社. 1996. 51~ 55.

[2] Lanzetta PA. The determination of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ ase activity [J]. *Anal Biochem*, 1979, 100: 95.

[3] Ichitomo MW, Motoya K, Hiroshi W, et al. Analysis of sorbitol, Galactitol and myoinositol in lens and sciatic nerve by High-performance liquid chromatography [J]. *Anal Biochem*, 1988, 173: 39.

[4] 张家庆,周云平. 部分中药或其成分对大鼠晶体醛糖还原酶的抑制作用[J]. *中国中药杂志*, 1989, 14(9): 557~ 559.

[5] 毛晓明,张家庆. 槲皮素等中药提取物对醛糖还原酶的抑制作用[J]. *中国中药杂志*, 1993, 18(10): 623~ 624.