

· 基础研究 ·

通脉降糖胶囊对糖尿病性大鼠周围神经病变的影响

杨文强 于炎冰 徐晓利 任鸿翔 张 黎

摘要 目的 观察通脉降糖胶囊对糖尿病性大鼠周围神经病变的影响。**方法** 40 只 Wistar 大鼠按随机数字表法分为通脉降糖胶囊组、甲钴胺组、模型组和正常组, 每组 10 只。除正常组外, 各组采用链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 腹腔注射法制备糖尿病性大鼠周围神经病变模型, 造模过程中模型组大鼠死亡 1 只。成模后第 8 周各组给药, 通脉降糖胶囊组按 10 mL/kg 给予通脉降糖胶囊 (0.23 g 生药/mL) 灌胃, 甲钴胺组按 10 mL/kg 给予甲钴胺与生理盐水的混悬液 (0.05 mg/mL) 灌胃, 至第 12 周末。同时模型组和正常组给予等量的蒸馏水灌胃。检测各组大鼠周围神经传导速度; 进行足迹步态分析; 免疫组化染色观察表皮内神经纤维变化; HE 染色法观察胫神经组织病理学改变。**结果** (1) 与正常组比较, 模型组大鼠神经传导速度减慢, 足迹步态参数足印长 (print length, PL)、足中间三指宽 (intermediary toe spread, ITS) 和足印宽 (toe spread, TS) 值增加, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 通脉降糖胶囊组和甲钴胺组神经传导速度增快, PL、ITS 值降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 且通脉降糖胶囊组神经传导速度优于甲钴胺组 ($P < 0.05$)。(2) 免疫组化染色显示: 模型组表皮内神经纤维染色模糊, 稀疏零散, 不易辨认, 局部无神经纤维显示; 甲钴胺组神经纤维走形不规则, 数量减少, 染色较浅, 局部无神经纤维显示; 通脉降糖胶囊组神经纤维走形不规则, 数量减少, 断断续续, 稀疏零散。(3) HE 染色显示: 模型组大鼠胫神经组织严重水肿, 髓鞘缺失, 难以辨认, 局部有空泡变性, 轴索水肿, 部分轴索分离、变性; 甲钴胺组胫神经水肿, 髓鞘肿胀, 不易辨认, 轴索局部分离; 通脉降糖胶囊组胫神经水肿, 髓鞘模糊, 轴索肿胀。**结论** 通脉降糖胶囊可以改善糖尿病性大鼠的周围神经病变。

关键词 通脉降糖胶囊; 糖尿病性周围神经病变; 动物实验

Effect of Tongmai Jiangtang Capsule on Experimental Diabetic Peripheral Neuropathy Rats
YANG Wen-qiang, YU Yan-bing, XU Xiao-li, REN Hong-xiang, and ZHANG Li Department of Neurosurgery, China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Tongmai Jiangtang Capsule (TJC) on experimental diabetic peripheral neuropathy (DPN) rats. **Methods** Forty Wistar rats were divided into the TJC group, the mecobalamin treatment group, the model group, and the normal group according to random digit table, 10 in each group. Except rats in the normal group, DPN rat model was prepared using intraperitoneally injecting streptozotocin (STZ) in the rest rats. One rat in the model group died during the modeling. Different drugs were administered by gastrogavage to rats in corresponding groups from the 8th week after successful modeling. TJC (0.23 g crude drugs/mL, 10 mL/kg) was administered to rats in the TJC group by gastrogavage. Suspension of mecobalamin and normal saline (10 mL/kg, 0.05 mg/mL) was administered by gastrogavage to rats in the mecobalamin treatment group to the end of the 12th week. Meanwhile, equal volume of distilled water was administered by gastrogavage to rats in the model group and the normal group. Peripheral nerve conduction velocity was detected in each group. Gait analysis was performed. Changes of intraepidermal nerve fiber were observed by immunohistochemical assay. Pathological changes of tibial nerve tissue were observed using HE staining. **Results** (1) Compared with the normal group, the

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81173424, 81373796)

作者单位: 中日友好医院神经外科 (北京 100029)

通讯作者: 张 黎, Tel: 010-84205032, E-mail: 18910586699@189.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2016.07.0831

nerve conduction velocity was slowed down; print length (PL), intermediary toe spread (ITS), and toe spread (TS) were added in the model group, with statistical difference ($P < 0.01$). Compared with the model group, nerve conduction velocity was speeded; PL and ITS decreased in the TJC group and the mecobalamin treatment group, with statistical difference ($P < 0.01$). Besides, the nerve conduction velocity was superior in the TJC group than in the mecobalamin treatment group, with statistical difference ($P < 0.05$). (2) Immunohistochemical results showed, the staining of intraepidermal nerve fiber was not clear and dispersedly distributed in the model group, with no nerve fiber staining in local regions. Nerve fibers were not regular in lesser amount and shallow stained in the mecobalamin treatment group, with no nerve fiber staining in local regions. Nerve fibers were not regular in lesser amount and dispersedly distributed in the TJC group. (3) HE staining showed that tibial nerve tissue was severely swollen with swollen myelin sheath in the model group. It was difficult to identity myelin sheath. Vacuole degenerated in local regions. Swollen axon could be seen. Partial axons were separated and degenerated. In the mecobalamin treatment group tibial nerve tissue was edematous with swollen myelin sheath. It was difficult to identity myelin sheath. Axons were locally separated. In the JMC group tibial nerve tissue was swollen with unclear myelin sheath and swollen axons. Conclusion TJC could improve peripheral neuropathy of diabetic rats.

KEYWORDS Tongmai Jiangtang Capsule; diabetic peripheral neuropathy; animal experiment

糖尿病性周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 是糖尿病最为常见的慢性并发症,严重影响患者生活质量^[1,2]。中医学研究认为瘀血阻络是导致糖尿病血管神经并发症产生和加重的根本原因^[3]。现代药理研究证实,活血化瘀药可以改善糖尿病微血管病变,能解除微血管痉挛,加速微循环,增加四肢周围神经的供血和营养,促进末梢血管神经的代谢,促进损伤的周围神经的恢复^[4],起到镇静、止痛的效果,有利于 DPN 的恢复。通脉降糖胶囊是已经上市的中药制剂,主要作用是益气健脾、养阴清热、活血通络。已有临床研究表明,其可以改善 DPN 患者的麻木、疼痛等主观症状,但目前相关的实验证据仍不充分^[5,6]。本研究采用腹腔注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 的方法制备实验性糖尿病大鼠模型,采用通脉降糖胶囊治疗,从神经功能学、神经组织病理学方面,明确其对 DPN 的作用疗效。

材料与方法

1 动物 40 只健康雄性 Wistar 大鼠,SPF 级,8 周龄,体重 180 ~ 200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK (京) 2009 - 0015。饲养于中日友好医院实验动物中心,温度 20 ~ 23 °C,充足给水,自由进食。

2 药物 通脉降糖胶囊 (0.4g/粒,保定步长天浩制药有限公司生产,批号:20140912065);甲钴胺片 (0.5 mg/片,卫材药业有限公司生产,批号:140803)。

3 试剂及仪器 STZ,美国 Sigma 公司生产,

批号:101003791;PGP 9.5 神经标记物,美国 EPitomics Inc 公司生产,批号:12071380;4% 多聚甲醛溶液,北京宝信科技有限公司生产,批号:1205547;柠檬酸、二水合柠檬酸钠,由广东西陇化工公司生产,批号:1201092;UltraEasy 血糖仪,美国强生公司;pH 计,意大利 Hanna 公司;YSD-4G 型生理实验多用仪,上海益联公司;SLY-B 型生理记录仪,上海益联公司;直径 4 mm 皮肤活检器,购自北京东西仪公司。

4 动物分组及造模 40 只 8 周龄 Wistar 雄性大鼠按随机数字表法分为通脉降糖胶囊组、甲钴胺组、模型组和正常组,每组 10 只。大鼠适应性喂养 1 周后,除正常组外,各组禁食 24 h,按 60 mg/kg 剂量腹腔注射 STZ,STZ 浓度为 1%,溶解于 pH 值为 4.5、新鲜配制的柠檬酸 - 二水合柠檬酸钠缓冲液中。48 h 时后通过大鼠尾静脉取血测定血糖,凡血糖值 > 16.7 mmol/L,即认定糖尿病模型造模成功^[7,8]。模型组大鼠 1 只在成模 10 周时死亡,余大鼠均正常存活至 12 周末。

5 给药方法 糖尿病模型成模 8 周末,通脉降糖胶囊组按 10 mL/kg 给予通脉降糖胶囊 (0.23 g 生药/mL) 灌胃、甲钴胺组按 10 mL/kg 给予甲钴胺与生理盐水的混悬液 (0.05 mg/mL) 灌胃,药物剂量按 75 kg 成人表面积换算剂量,相当于临床成人等效剂量。持续给药至 12 周末。

6 检测指标及方法

6.1 神经传导速度检测 将大鼠以 2% 苯巴比妥钠 5 mL 腹腔注射麻醉后,剥离显露坐骨神经,采用

YSD-4G 型生理实验多用于近端给予电刺激(电压 2V,波宽 20 ms),同时采用 SLY-B 型生理记录仪于远端记录电信号,通过测量电刺激传导距离与传导时间,计算神经传导速度^[9]。

6.2 足迹步态分析 设计大鼠足印行走箱,让大鼠在足印行走箱内行走,进行足迹描记^[10]。足印测试装置为自制长方形木盒,长 50 cm,宽 10 cm,高 10 cm。测试时,先在测试盒的底面铺以白纸,大鼠两后足蘸墨水后,立即放入行走箱,大鼠从放入端走到暗处端,选择较清晰的足印测量足印长(print length, PL)、足印宽(toe spread, TS)、足中间三指宽(intermediary toe spread, ITS)检测。

6.3 表皮内神经纤维变化 无菌条件下,用皮肤活检器于大鼠后肢外踝上方 1cm 处进行皮肤组织活检^[11],获得表皮、真皮及包括汗腺在内的组织标本。活检组织取下后,用 4%多聚甲醛常规固定,制作石蜡组织切片,以 PGP 9.5 进行免疫组化染色,观察表皮内神经纤维的形态、分布及数量。

6.4 胫神经组织病理观察 以 2% 苯巴比妥钠 5 mL 腹腔注射麻醉后,打开右后肢跗管,切取右后肢跗管处 1cm 左右的胫神经组织,用 4%多聚甲醛常规固定,制作石蜡切片,通过 HE 染色法观察胫神经轴索及髓鞘的组织病理学改变。

7 统计学方法 数据采用 SPSS 21.0 统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组神经传导速度比较(表 1) 与正常组比较,模型组神经传导速度减慢($P < 0.01$);与模型组比较,甲钴胺组和通脉降糖胶囊组神经传导速度均增快($P < 0.01$),且通脉降糖胶囊组神经传导速度优于甲钴胺组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组神经传导速度比较 (m/s, $\bar{x} \pm s$)		
组别	<i>n</i>	神经传导速度
正常	10	82.77 $\pm$ 3.21
模型	9	37.72 $\pm$ 4.06 *
甲钴胺	10	53.05 $\pm$ 3.21 Δ
通脉降糖胶囊	10	57.45 $\pm$ 4.70 $\Delta\blacktriangle$

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与甲钴胺组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

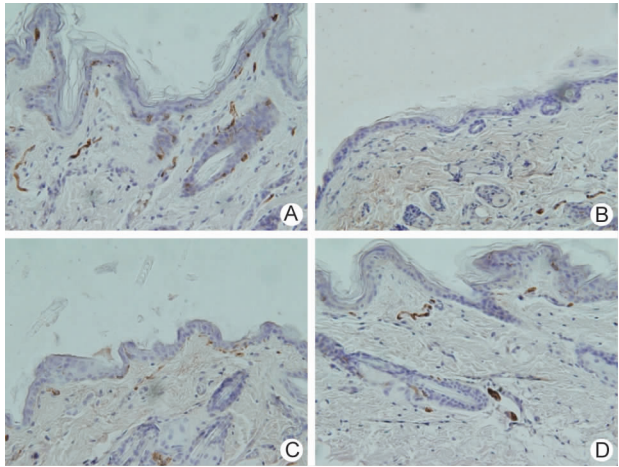
2 各组足迹步态参数比较(表 2) 与正常组比较,模型组 PL、ITS 和 TS 值增加($P < 0.01$);与模型

组比较,甲钴胺组和通脉降糖胶囊组 PL 和 ITS 降低($P < 0.01$),TS 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组足迹步态参数比较 (mm, $\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	PL	ITS	TS
正常	10	21.17 $\pm$ 0.15	10.61 $\pm$ 0.12	17.03 $\pm$ 0.15
模型	9	22.74 $\pm$ 0.19 *	11.49 $\pm$ 0.14 *	17.67 $\pm$ 0.17 *
甲钴胺	10	22.19 $\pm$ 0.44 Δ	10.76 $\pm$ 0.18 Δ	17.50 $\pm$ 0.22
通脉降糖胶囊	10	22.12 $\pm$ 0.36 Δ	10.80 $\pm$ 0.23 Δ	17.55 $\pm$ 0.85

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

3 各组大鼠表皮内神经纤维变化(图 1) 正常组神经纤维呈现明显的棕黄色染色,神经走行规则,分布均匀;模型组表皮内神经纤维染色模糊,稀疏零散,不易辨认,局部无神经纤维显示;甲钴胺组胫神经纤维走行不规则,数量减少,染色较浅,局部无神经纤维显示;通脉降糖胶囊组胫神经纤维走行不规则,数量减少,断断续续,稀疏零散。



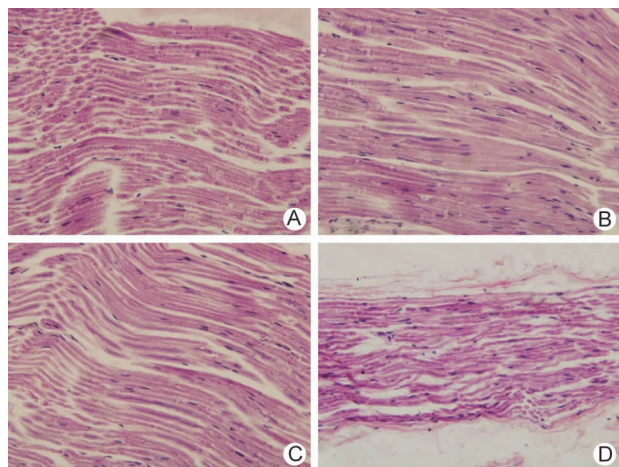
注:A 为正常组;B 为模型组;C 为甲钴胺组;D 为通脉降糖胶囊组

图 1 各组大鼠表皮内神经纤维变化 (PGP 9.5, $\times 40$)

4 各组胫神经组织病理学变化(图 2) 正常组神经轴索清晰可见,髓鞘分布均匀清晰,呈鱼刺骨样。模型组大鼠胫神经组织严重水肿,髓鞘缺失,难以辨认,局部有空泡变性,轴索水肿,部分轴索分离、变性;甲钴胺组胫神经水肿,髓鞘肿胀,不易辨认,轴索局部分离;通脉降糖胶囊组胫神经水肿,髓鞘模糊,轴索肿胀。

讨 论

DPN 是糖尿病最为常见的神经系统并发症,发病机制目前尚不完全清楚。高血糖、高血脂、血液的高黏高凝状态、微血管内皮增生、基底膜增厚、管腔狭窄及



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为甲钴胺组; D 为通脉降糖胶囊组

图 2 各组大鼠周围神经组织病理学的变化
(HE 染色, $\times 40$)

闭塞、血栓形成等,均可导致神经组织缺血缺氧而发病,DPN 早期病理改变主要表现为神经纤维脱髓鞘和轴突变性。理想的 DPN 动物实验模型对于研究 DPN 的发病机制和治疗途径是非常必要的。目前用于研究的 DPN 动物模型都是在建立糖尿病模型成功后得到的^[8]。随着糖尿病病程的进展,逐渐出现神经功能或形态学的变化,从而成为成功的 DPN 动物模型。一般认为糖尿病周围神经病变模型的研究以糖尿病模型成模 8 周时较为适当^[7,8],通过动物实验筛选的可靠的神经功能观察指标包括:足迹步态参数、神经传导速度、表皮内神经纤维及周围神经组织病理学观察等^[12]。

通脉降糖胶囊是临床上治疗糖尿病的有效药物,主要成分为黄芪、太子参、玄参、葛根、山药、苍术、冬葵果、黄连、丹参、水蛭、绞股蓝,主要作用是益气健脾、养阴清热、活血通络。临床上对通脉降糖胶囊的研究表明,其可以改善糖尿病周围神经病患者的麻木、疼痛等主观症状^[5,6],但鲜有涉及神经功能及形态学的研究。本研究采用 STZ 诱导法成功建立糖尿病大鼠模型后,应用通脉降糖胶囊治疗 4 周,并以临床上治疗 DPN 的常用药物甲钴胺片作为阳性对照,观察通脉降糖胶囊对 DPN 相关周围神经病变指标的影响。糖尿病大鼠成模后逐渐出现多饮、多食、多尿、体重下降等糖尿病代谢症状,随着病程的进展,逐渐出现周围神经病变。治疗后与模型组比较,通脉降糖胶囊组神经传导速度明显增快,差异有统计学意义;足迹步态参数 PL 和 ITS 降低,差异有统计学意义,TS 差异无统计学意义;经表皮内神经纤维

及周围神经组织病理学证实,治疗后与模型组比较,表皮内神经纤维形态、数量改善,周围神经病理损伤亦得到改善。甲钴胺是改善神经损伤的常用药物,可以改善神经细胞能量代谢,修复受损神经,在此用于对照。本实验发现,通脉降糖胶囊和甲钴胺片均可以改善 DPN 大鼠足迹步态参数、神经传导速度,但通脉降糖胶囊对于神经传导速度的效果改善优于甲钴胺片。

实验结果证实,通脉降糖胶囊在改善糖尿病性周围神经病变的神经功能、神经组织结构方面具有明显的作用,是防止糖尿病神经病变的有效药物,为临床应用通脉降糖胶囊治疗 DPN 提供实验证据。而通脉降糖对糖尿病周围神经病变的具体作用途径尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 徐春主编. 糖尿病并发症治疗[M]. 北京:人民军医出版社, 2014:101-102.
- [2] 冯峰,邹庆玲. 中药治疗糖尿病周围神经病变临床疗效观察[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(8): 218-223.
- [3] 陈可冀主编. 实用血瘀证学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1999:500-501.
- [4] 谷淑敬,张兰. 从“瘀”论治糖尿病周围神经病变的临床研究现状[J]. 实用中医内科杂志, 2011, 25(8): 22-23.
- [5] 张爱旗,王会芳,李志茹. 通脉降糖胶囊治疗糖尿病周围神经病变临床观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(10): 1077-1080.
- [6] 徐静,陈朋. 通脉降糖胶囊治疗糖尿病神经病变疗效分析[J]. 中医药临床杂志, 2013, 25(4): 313-314.
- [7] 王宇石,巨名飞,饶明俐. 糖尿病周围神经病动物模型的建立、病理观察及巴曲酶保护作用研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24(1): 26-29.
- [8] 严哲琳,刘铜华,杨丽霞. 糖尿病周围神经病变的动物模型建立概况[J]. 国际中医中药杂志, 2009, 31(4): 369-373.
- [9] 封卫毅,姚鸿萍,魏友霞,等. 大鼠坐骨神经传导速度测定的方法学比较[J]. 中国糖尿病杂志, 2010, 18(10): 786-789.
- [10] 孙宇楠,李二平,董世芬,等. 实验性糖尿病周围神经病变大鼠模型的步态行为分析[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12): 14-19.
- [11] Lauriss G, Cornblathb DR, Johanssonc O, et al. EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy [J]. Eur J Neurol, 2005, 12(10): 747-758.
- [12] 甄雪克,张黎,于炎冰. 糖尿病大鼠动物模型建立及周围神经病变指标的观察[J]. 中华神经外科杂志, 2014, 30(3): 309-311.

(收稿:2015-02-13 修回:2015-11-15)