

· 基础研究 ·

丹瓜方对糖尿病动脉粥样硬化大鼠炎症标志物及内皮细胞功能的影响

杨柳清¹ 李 亮¹ 衡先培¹ 黄苏萍² 潘旭东¹

摘要 目的 观察丹瓜方对高脂糖尿病动脉粥样硬化大鼠炎症标志物及内皮细胞功能的影响。**方法** 选取 GK 自发性糖尿病鼠 40 只,以高脂饲养联合代谢抑制丙基巯氧嘧啶及内皮型一氧化氮合酶(NOS)抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯,塑造高脂糖尿病动脉硬化模型。将糖尿病成模鼠按体重分层、再按血糖由高至低根据随机数字表法分为丹瓜方组[8 mL/(kg·d)]、二甲双胍组[150 mg/(kg·d)]、辛伐他汀组[2 mg/(kg·d)]、模型组[无菌水,8 mL/(kg·d)],每组 10 只。另取同龄、体重可比 Wistar 大鼠 10 只作为正常组并饲以常规饲料。灌胃给药,每日 1 次,干预 24 周。检测炎症标志物 hs-CRP、IL-6 及血管内皮因子内皮型一氧化氮(eNO)、内皮素 1(ET-1)及 TNF- α 及其 mRNA 表达,血管性血友病因子(vWF)及其 mRNA 表达。**结果** 与正常组比较,模型组空腹血糖、HbA1c、TC、LDL-C、hs-CRP 及 TNF- α 水平升高,NO 水平降低($P < 0.01$),TNF- α 、vWF 免疫组化阳性率及 TNF- α mRNA 表达升高($P < 0.01$)。与模型组比较,各用药组 FBG、TC、LDL-C 降低,二甲双胍组 hs-CRP 及 TNF- α 水平降低,NO 水平及 vWF mRNA 表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),丹瓜方组 HbA1c、TG、hs-CRP、TNF- α 及 TNF- α 免疫组化阳性率降低,NO 水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),辛伐他汀组 TNF- α 免疫组化阳性率降低,3 组 TNF- α mRNA 的表达降低($P < 0.01$)。与二甲双胍组比较,丹瓜方组 TC、LDL-C 降低($P < 0.01$)。**结论** 丹瓜方对合并高血脂的动脉粥样硬化糖尿病鼠的部分血管炎症标志物具有多层次干预作用,对血管内皮细胞功能有一定改善作用。

关键词 丹瓜方;糖尿病;动脉粥样硬化;炎症标志物;内皮细胞

Effects of Dangua Recipe on Inflammatory Markers and Endothelial Cell Functions in Diabetic Rats with Arteriosclerosis YANG Liu-qing¹, LI Liang¹, HENG Xian-pei¹, HUANG Su-ping², and PAN Xu-dong¹ 1 Department of Endocrinology, Fujian Provincial People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350004); 2 Fujian Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350108)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Dangua Recipe (DGR) on inflammatory markers and endothelial cell functions in hyperlipidemia diabetic rats with atherosclerosis (AS). **Methods** Forty spontaneous diabetic GK rats were fed with high fat diet combined propylthiouracil and N-nitro-L-arginine methyl ester to establish hyperlipidemia diabetic AS rat model. Diabetic rats were divided into 4 groups by random digit table (first stratified by body weight and then sequenced by blood glucose from high to low), i.e., the DGR group [8 mL/(kg·d)], Metformin group [150 mg/(kg·d)], Simvastatin group [2 mg/(kg·d)], the model control group [sterile water, 8 mL/(kg·d)], 10 in each group. Ten Wistar rats of the same age and body weight were recruited as the normal group and fed with routine diet. Drugs were administered by gastrogavage, once per day for 24 weeks. Levels of high sensitive C reactive pro-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81173179,81473550,81403329);福建省科技社会发展重点项目(No. 2012Y0037);福建省卫生厅中医药科研重点实验室基金(No. wztn 201304);陈可冀中西医结合发展基金资助项目(No. CKJ2009004);福建中医药大学重点学科专项(No. X2014037)。

作者单位:1. 福建中医药大学附属人民医院即福建省人民医院内分泌科(福州 350004);2. 福建中医药大学中西医结合研究院(福州 350108)

通讯作者:衡先培, Tel: 13067366157; E-mail: hengxianpei@hotmail.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20170426. 081

tein (hs-CRP), IL-6, endogenous nitric oxide (eNO), and endothelin-1 (ET-1) were detected. von Willebrand factor (vWF) and TNF- α and their mRNA expressions were also measured. Results Compared with the normal group, the levels of fasting blood glucose (FBG), hemoglobin A1c (HbA1c), total cholesterol (TC), LDL-C, hs-CRP, and TNF- α increased ($P < 0.01$) and NO decreased ($P < 0.01$) in the model group. The immunohistochemical positive rate of TNF- α and vWF and the expression of TNF- α mRNA increased ($P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group, the levels of FBG, TC, LDL-C decreased in each treatment group; the levels of hs-CRP and TNF- α decreased, the expression levels of NO and vWF mRNA increased in the Metformin group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the levels of HbA1c, TG, hs-CRP, TNF- α , and TNF- α immunohistochemical positive rate decreased, and the NO level increased in the DGR group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the positive expression rate of TNF- α decreased in Simvastatin group; the TNF- α mRNA expression was reduced in 3 treatment groups ($P < 0.01$). Compared with Metformin group, the levels of TC and LDL-C decreased in the DGR group ($P < 0.01$). Conclusions DGR intervened partial vascular inflammatory markers in hyperlipidemia diabetic rats with AS at multiple levels. It also had some positive effects on the function of vascular endothelial cells.

KEYWORDS Dangua Recipe; diabetic mellitus; atherosclerosis; inflammatory marker; endothelial cell

《中国糖尿病防治指南》指出糖尿病患者群的血管疾病年发病率比年龄及性别相同的非糖尿病患者群高 2 ~ 3 倍^[1]。在 HbA1c 水平 $> 5\%$ 的患者中, HbA1c 水平每升高 1%, 男性全因死亡相对风险为 1.24, 女性为 1.28, 日后发生心血管病的危险增加 21%^[2]。糖尿病里程碑研究 ACCORD 的研究结果表明, 严格的强化降糖^[3]、强化降压^[4]、联合降脂^[5]均不能进一步提高糖尿病大血管病变获益。高脂饲养的 GK 糖尿病鼠联合代谢抑制及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂处理 24 周, 能造成持续高而稳定的血糖水平^[6]和典型的动脉硬化形态学改变, 丹瓜方对此模型具有显著抗动脉硬化作用^[7], 并显著降低其血液 ROS 水平及动脉 NF- κ B 阳性表达和 NF- κ B mRNA 的表达^[8]。前期研究还表明, 丹瓜方能降低糖尿病患者冠心病风险预测指标——TNF- α ^[8]及尿微量白蛋白(microalbumin, MA)^[9]水平; 并能消除高糖的细胞毒性^[10]、恢复高糖中细胞生长的正常周期^[11], 保护细胞骨架以拮抗秋水仙碱的细胞毒性^[12]。本实验则观察丹瓜方对联系糖尿病与动脉硬化的关键中间环节——血管内皮细胞和微炎症状态的影响。

材料与方法

1 动物 SPF 级自发性糖尿病 GK 大鼠 40 只, 13 周龄, 雄性, 体重(347 ± 25)g。由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。SPF 级 Wistar 大鼠 10 只, 13 周龄, 雄性, 体质量(363 ± 12)g。上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。许可证号: SCXK2007—0005。按 5 只/笼饲养于独立通气笼具(IVC)系统内。

温度: (22 ± 1) °C, 湿度(50 ± 5)%, 每天光照与黑夜时间各为 12 h。实验期间灌胃、解剖等操作均在超净工作台内进行, 换水、添加饲料等由专人负责管理。普通饲料: 水分 9.20%、粗蛋白 22.00%、粗脂肪 5.28%、粗灰分 5.20%、粗纤维 4.10%、无氮浸出物 50.00%、钙 1.24%、磷 0.92%、赖氨酸 1.34%、蛋氨酸+胱氨酸 0.72%, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供。高脂饲料: 普通饲料 87.63%、精炼猪油 10.00%、胆固醇 2.00%、猪胆盐 0.30%、丙基硫氧嘧啶 0.07%, 由福建省医学科学研究所实验动物中心提供。所有饲料均进行高温消毒与辐射照射处理。本实验方案经福建中医药大学医学伦理委员会审核通过[No.[2015]福中医伦理审字第(015)号]。

2 试剂 丹瓜方制剂由丹参、瓜蒌、川芎、郁金、赤芍、薤白、白僵蚕组成, 药物比例为 3:3:2:2:2:2:1。由福建中医药大学附属人民医院药剂科生产, 加工成含原生药 1:1 的液体, 即浓度为 1 g/mL, 批号: 20100608。二甲双胍片(0.25 g/片)由上海信谊药厂有限公司生产, 批号: 091226B。辛伐他汀片(20 mg/片)由广州南欣制药有限公司生产, 批号: 2117091。丙基硫氧嘧啶片(PTU, 50 mg/片)由上海朝晖药业有限公司生产, 批号: 091206。N-硝基-L-精氨酸甲酯(NG-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)由上海天齐生物科技有限公司生产, 批号: A0015。诺和灵 N(300 IU/支)由诺和诺德公司生产, 批号: DVG1587。高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)ELISA 试剂盒, 上海研吉生物科技有限公司; 内皮素(ET-1)ELISA 试剂盒、一氧化氮(eNO)ELISA 试剂盒, 白介素 6(IL-6)ELISA 试剂盒、TNF- α ELISA 试剂盒, 上

海西唐生物科技有限公司;兔抗大鼠血管性血友病因子(von Willebrand factor AND diabetes, vWF)单克隆抗体,货号 Ab994,英国 Abcam 有限公司;兔抗大鼠 TNF- α 单克隆抗体,货号 250844, Abbiotec 公司;RNA 抽提试剂(Trizol),美国 Invitrogen 公司;无水乙醇、氯仿、异丙醇,国药集团化学试剂有限公司;RT 试剂(RevertAid First strand cDNA Synthesisei Kit), Fermentans 公司;Real-time PCR 反应试剂(SYBRmix),美国 Bio-Rad 公司。

3 仪器 DXC 800 自动生化检测仪,美国贝克曼公司;HA-8160 糖化血红蛋白测定仪,日本京都爱来公司;微量血糖测试仪,雅培公司;YP2001N 电子天平,上海精密科学仪器有限公司;BM-VII 生物组织包埋机,湖北省宏业医用仪器有限公司;TS-12U 生物组织自动脱水机,湖北省宏业医用仪器有限公司;DDL-5 低速冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;RM2135 切片机,德国 Leica 公司;BX40 光学显微镜,日本 Olympus 公司;REGIVS MODEL150 柯尼卡 DR 系统,北京思科信息有限责任公司;ELX808 酶标仪,美国宝特公司;DU-640 蛋白核酸分析仪,美国贝克曼公司;CFX-96 荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-RAD 公司;Tanon 2500 凝胶成像系统,天能公司;Himac CF 16RX 冷冻高速离心机, HITACHI;keyWrice-D C3i muLtifunction 高速离心机,美国 Thermo 公司。

4 造模、分组及干预方法 GK 大鼠适应性驯养 2 周后,连续 2 日测定随机血糖。两次血糖均值达到或超过 11.1 mmol/L 的 GK 大鼠被视为糖尿病成模大鼠。40 只 GK 大鼠全部成模并获得稳定持续的高血糖^[6]。全部 GK 大鼠均每日喂饲含 PTU 高脂饲料,并腹腔注射 NOS 抑制剂 L-NAME, 10 mg/(kg·d),连续 14 日,诱导产生动脉粥样硬化。24 周后,经显微形态观察及超微结构分析,目标鼠动脉粥样硬化成模率 100%^[7]。将造模成功大鼠按体重分层,再按血糖由高至低根据随机数字表法进行分组,分为模型组[8 mL/(kg·d)]、二甲双胍组[150 mg/(kg·d)]、辛伐他汀组[2 mg/(kg·d)]、丹瓜方组[8 mL/(kg·d)],每组 10 只;以上药物用量均按照 50 kg 成人每日每公斤常规用药量的 5 倍计算得出。灌胃给药,每日 1 次。另取同龄、体重可比 Wistar 大鼠 10 只作为正常组。正常对照组喂饲普通饲料。从基线血糖开始每 4 周测 1 次随机血糖。干预 24 周。

5 观测指标及方法 观察大鼠毛发、活动情况、精神状态、体重、食量等。观测 FBG、体重变化及血脂等。24 周后,全部大鼠禁食 12h,以 10% 水合氯醛

(0.3 mL/100 g)腹腔注射。麻醉成功后沿腹部正中中线剖开腹腔,仔细分离腹主动脉,常规腹主动脉采血约 10~12 mL 置于离心管中,在 37℃ 恒温水浴箱中放置 30 min 后,3 000 r/min 离心 10 min,吸取上层血清, -20℃ 保存备用。另采 1 mL 血,加入 10% 的 EDTA 二钠 20 μ L 和抑肽酶 20 μ L,混匀,4℃ 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 -20℃ 保存备用。取血后迅速采摘胸主动脉,冰上除去主动脉周围组织及动脉腔内积血,部分放入 RNA 液中保存,备检信使核糖核酸(mRNA)。

5.1 ET-1、NO、TNF- α 、IL-6、hs-CRP 检测 均用 ELISA 法检测,具体操作按照说明书。

5.2 主动脉 TNF- α 及 vWF 检测 采用免疫组化法检测。标本于 4% 多聚甲醛/0.1 mol/L PBS (pH 7.0~7.6)固定 30~60 min, PBS 清洗 2 min/次 $\times$ 2 次,5℃ 进行组织脱水,常规石蜡包埋、切片,切片厚度 4 μ m,置防脱片剂多聚赖氨酸处理过的载玻片上,捞片后置烤箱 58~60℃ 进行烘烤 30~60 min 使切片紧密黏附。磷酸缓冲液(PBS 0.01 mol/L, pH 7.4)冲洗 5 min/次 $\times$ 2 次。用新配制 3% H₂O₂ 1 份 + 蒸馏水 10 份混合,室温 5~10 min 以灭活内源性酶。蒸馏水洗 2 min/次 $\times$ 3 次。将切片侵入 0.01 mol/L 枸橼酸盐(pH 6.0),微波炉加热至沸腾后断电,间隔 5~10 min 后反复 1 次,冷却后 PBS (pH 7.2~7.6)洗涤 2 次,室温置 5 min 左右, PBS (pH 7.2~7.6)洗涤 2~3 次。滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min 左右,甩去切片上多余液体,不洗。滴加适当稀释(1:100)的一抗 37℃ 标记 1 h。PBS (pH 7.2~7.6)洗涤 2~3 次。滴加二抗,20~37℃ 20 min, PBS (pH 7.2~7.6)洗涤 5 min 连续 4 次。取 1 mL 蒸馏水,分别加入 DAB 试剂盒中试剂 A (Buffer, 20 $\times$)、试剂 B (DAB substrate, 20 $\times$)、试剂 C (DAB Chromogen, 20 $\times$)各 1 滴,混匀后加至各组标本的切片并于 37℃ 反应 10~30 min。脱水透明、树脂胶封片。显微镜下观察细胞中有棕黄色颗粒者为阳性细胞表达。

5.3 主动脉 TNF- α 及 vWF mRNA 的表达检测 采用 Real-time PCR 检测。(1)总 RNA 提取:称取组织 0.1 g 放入装有 1 mL Trizol 的 10 mL 离心管中,在冰浴条件下制成匀浆,然后转移至一新的 1.5 mL 离心管内。加入 200 μ L 氯仿,用力颠倒混匀,室温静置 10 min。4℃, 14 000 r/min 离心 20 min。移取上清至另一 1.5 mL 离心管中,加入等体积异丙醇,混匀后 -20℃ 沉淀 1 h。4℃, 14 000 r/min 离心 20 min 后,

弃上清。加入 1 000 μL 75% 乙醇洗涤沉淀。4 $^{\circ}\text{C}$, 14 000 r/min 离心 10 min, 仍弃上清。加入 10 μL DEPC-water 至沉淀物完全溶解, 进行紫外线及电泳分析测试其纯度与浓度。(2) 逆转录制备 cDNA: 取 Total RNA 2 μg 加入到 0.2 mL PCR 管中。加入 Oligo dT 1 μL 用 DEPC-water 补充体积至 12 μL 。混匀后 70 $^{\circ}\text{C}$ 孵 5 min, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 置 5~10 min。依次加入 5 $\times$ reaction buffer 4 μL 、RibolockTMRi bonuclease Inhibitor 1 μL 、10 mmol/L dNTP mix 2 μL 。混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 置 5 min, 加入 Add RevertAidTmM-M μLV Reverse Transcriptase 1 μL , 最终容积为 20 μL 。混匀后 42 $^{\circ}\text{C}$ 置 60 min, 再 70 $^{\circ}\text{C}$ 置 10 min。(3) 引物的设计与合成: 从 Genbank 中查询大鼠相关基因的 mRNA 序列, 输入 Primer 5.0 引物设计软件以设计上、下游引物序列。引物序列如下: 18sRNA: 上游: 5'-AACGTCTGCCCTATCAACTTTTCG-3'; 下游: 5'-CTGCTGCCTTCCTTGGATGTG-3', 扩增长度 130 bp。TNF- α : 上游: 5'-CCACCACGCTCTTCTGTC-TACTG-3'; 下游: 5'-CTCCGCTTGGTGGTTTGC-TAC-3', 扩增长度 176 bp。vWF: 上游: 5'-GGATGG-GAACGAGAAGAGGC-3'; 下游: 5'-AGGT-GACGATGTGCCGAGTG-3', 扩增长度 236 bp。将设计序列输入 NCBI“BLAST”进行比对, 上、下游引物匹配率均为 100%。委托上海威奥生物技术有限公司合成、PAGE 纯化。(4) Real-time PCR 扩增 cDNA: 取 RT 产物 1 μL 。依次加入 SYBR Premix Ex Taq 10.0 μL 、Primer 10.4 μL 、Primer 20.4 μL 、DdH₂O 8.2 μL 。将预试验的 PCR 产物以 10 倍浓度梯度进行稀释, 选择 1/10 000, 1/100 000, 1/1 000 000, 1/10 000 000 浓度的稀释产物作为标准品模版, 进行荧光定量 PCR 反应并同时在荧光定量 PCR 仪中输入以上 4 个浓度数值。通过这 4 个标准品生成的反应数据, 软件 Rotor-Gene 6.0 根据反应的荧光实时监控数据和标准品的浓度关系, 生成标准曲线。通过此标准曲线来计算在标准曲线所划定的 CT 值。

6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行数据处理, 连续变量表示为 $\bar{x} \pm s$ 表示, 正态性检验用 Shapiro-Wilk。多样本均数的两两比较采用单因素方差分析, 方差齐采用 LSD, 方差不齐采用 Games-Howell 统计方法; 属非正态分布者以“中位数(四分位间距)[M(IQR)]”来表示, 用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 FBG、HbA1c、TC、TG、LDL-C 水平比较(表 1) 二甲双胍组、辛伐他汀组各有 1 只灌胃失败死亡; 二甲双胍组、模型组各有 1 只相互撕咬死亡; 模型组 1 只因极度营养不良自行死亡。干预 24 周后, 模型组 FBG、HbA1c、TC 及 LDL-C 高于正常组($P < 0.01$); 与模型组比较, 各用药组 FBG、TC、LDL-C 降低, 丹瓜方组 HbA1c、TG 降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与二甲双胍组比较, 丹瓜方组 TC、LDL-C 降低($P < 0.01$)。

2 各组血清 hs-CRP、TNF- α 、IL-6、NO、ET-1 水平比较(表 2) 与正常组比较, 模型组 hs-CRP 及 TNF- α 水平升高, NO 水平降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 二甲双胍组、丹瓜方组 hs-CRP 及 TNF- α 水平降低, NO 水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。各组间 IL-6 及 ET-1 含量比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 各组 TNF- α 免疫组化阳性表达及 TNF- α mRNA 表达比较(图 1、2、表 3) TNF- α 的阳性表达主要位于内膜内皮细胞及中膜平滑肌的胞浆中, 可见褐色染色颗粒。正常组内膜与中膜呈阴性。模型组为强阳性, 内膜与中膜均可见密集成片的深褐色颗粒。辛伐他汀组呈阳性, 内膜可见较多的褐色染色颗粒, 与模型组比较略弱。二甲双胍组与丹瓜方组呈弱阳性, 可见散在褐色染色颗粒。与正常组比较, 模型组 TNF- α 免疫组化阳性率及 TNF- α mRNA 的表达升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 辛伐他汀组及丹瓜方组 TNF- α 免疫组化阳性率降低, 3 组 TNF- α mRNA 的表达降低($P < 0.01$)。

表 1 各组 FBG、HbA1c、TC、TG 及 LDL-C 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FBG (mmol/L)	HbA1c (%)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
正常	10	3.0 $\pm$ 0.5	5.4 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.3
模型	8	10.8 $\pm$ 0.7 *	9.8 $\pm$ 1.0 *	16.4 $\pm$ 1.1 *	1.8 $\pm$ 0.9	13.7 $\pm$ 1.3 *
二甲双胍	8	6.4 $\pm$ 0.6 $\Delta\Delta$	8.0 $\pm$ 1.1	11.7 $\pm$ 0.9 $\Delta\Delta$	1.0 $\pm$ 0.4	9.2 $\pm$ 0.9 $\Delta\Delta$
辛伐他汀	9	7.5 $\pm$ 1.8 $\Delta\Delta$	8.3 $\pm$ 1.5	10.6 $\pm$ 1.9 $\Delta\Delta$	1.3 $\pm$ 0.4	8.2 $\pm$ 1.9 $\Delta\Delta$
丹瓜方	10	6.3 $\pm$ 1.0 $\Delta\Delta$	7.5 $\pm$ 0.9 $\Delta\Delta$	9.9 $\pm$ 0.8 $\Delta\Delta\Delta$	0.8 $\pm$ 0.2 Δ	7.3 $\pm$ 1.1 $\Delta\Delta\Delta$

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与二甲双胍组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 各组血清炎症标志物比较 $[\bar{x} \pm s / M(IQR)]$

组别	n	hs-CRP(μg/L)	TNF-α(pg/ mL)	IL-6(pg/ mL)	NO(μmol/L)	ET-1(pg/ mL)
正常	8	1.87 ± 0.24	59.60 ± 16.55	1.77 (1.09,3.91)	6.73 ± 1.34	1.39 ± 0.58
模型	8	2.57 ± 0.17 *	89.59 ± 16.27 *	2.01 (1.15,2.59)	4.01 ± 0.87 *	2.41 ± 0.81
二甲双胍	8	2.24 ± 0.18 ^{△△}	61.15 ± 32.96 ^{△△}	1.55 (0.64,2.48)	5.53 ± 1.32 [△]	2.00 ± 0.97
辛伐他汀	8	2.39 ± 0.27	74.55 ± 10.20	2.52 (2.06,4.29)	5.05 ± 1.86	2.37 ± 1.39
丹瓜方	8	2.29 ± 0.21 [△]	65.59 ± 15.40 [△]	1.70 (1.23,2.01)	5.01 ± 1.30 ^{△△}	1.71 ± 0.32

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;试剂盒设置每列 8 孔,故每组取 8 个标本

表 3 各组主动脉 TNF-α 免疫组化阳性表达和 TNF-α mRNA 表达比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	TNF-α	TNF-α mRNA
正常	10	11.18 ± 0.94	32.92 ± 0.11
模型	8	24.85 ± 2.59 *	39.10 ± 0.39 *
二甲双胍	8	20.33 ± 2.09	33.13 ± 1.89 [△]
辛伐他汀	9	17.17 ± 3.41 [△]	33.32 ± 0.49 [△]
丹瓜方	10	16.63 ± 4.03 [△]	32.99 ± 0.03 [△]

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$

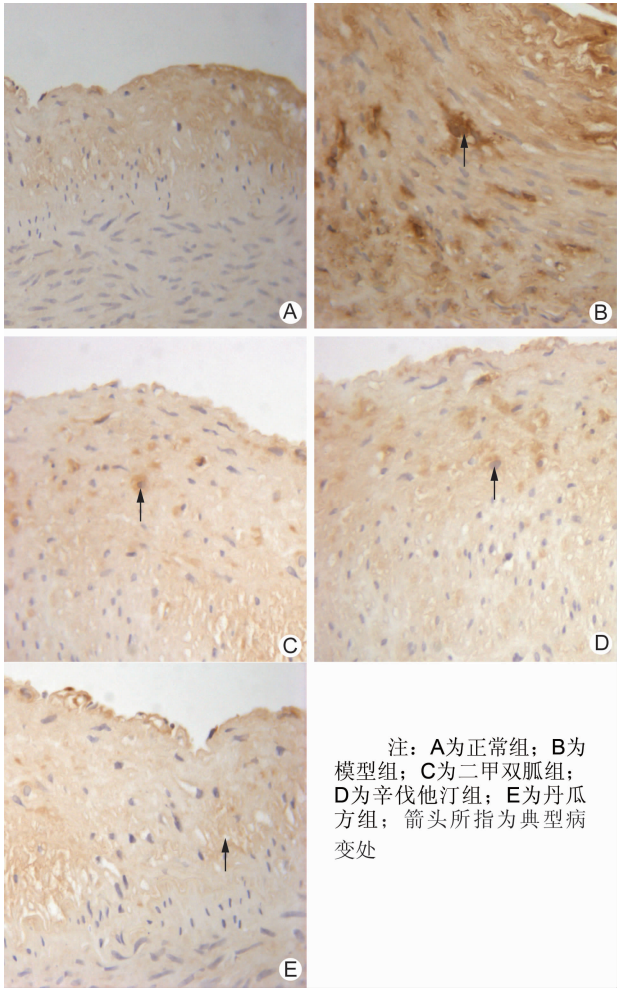


图 1 各组主动脉 TNF-α 免疫组化结果 (×100)

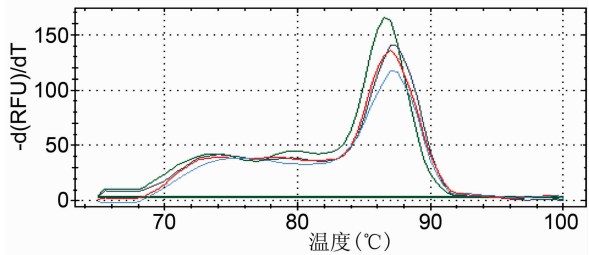


图 2 各组主动脉 TNF-α 溶解曲线

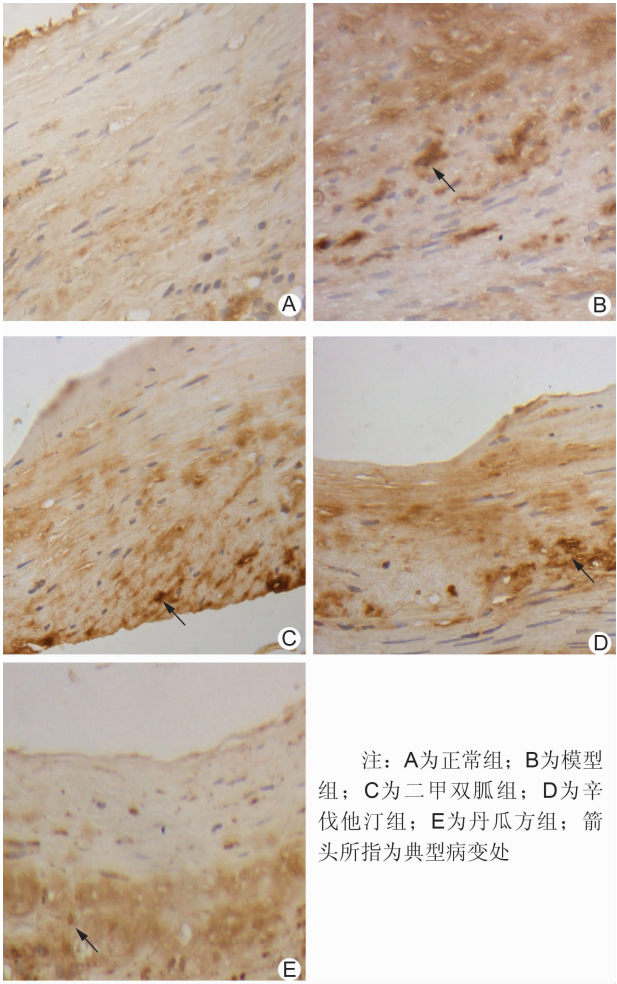


图 3 各组主动脉 vWF 免疫组化结果 (×100)

4 各组 vWF 免疫组化阳性表达及 vWF mRNA 表达比较(图 3、4,表 4) vWF 的阳性表达主要位于内 膜内皮细胞及中膜平滑肌的胞浆中。正常组内膜与中 膜呈弱阳性;模型组为强阳性,内膜与中膜均见密集成

表 4 各组主动脉 vWF 免疫组化阳性表达和 vWF mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	vWF	vWF mRNA
正常	10	5.67 ± 1.50	29.06 ± 2.42
模型	8	13.47 ± 0.25 *	26.36 ± 0.93
二甲双胍	8	12.01 ± 0.83	29.40 ± 2.17 Δ
辛伐他汀	9	13.18 ± 1.52	27.78 ± 1.40
丹瓜方	10	11.87 ± 0.43	26.74 ± 1.57

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

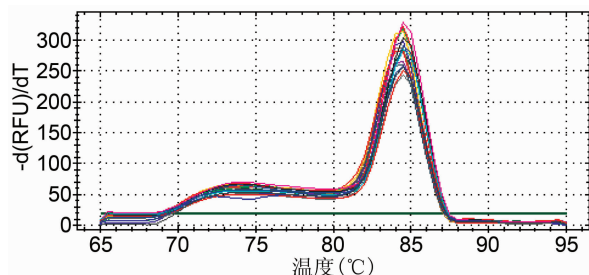


图 4 各组主动脉 vWF 溶解曲线

片的深褐色染色颗粒;辛伐他汀组、二甲双胍组与中药组呈阳性,内膜可见较多的褐色染色颗粒,但较模型组略弱。与正常组比较,模型组 vWF 免疫组化阳性率升高($P < 0.01$),vWF mRNA 表达则差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,二甲双胍组 vWF mRNA 表达升高($P < 0.05$)。

讨 论

既往研究已经证实具有清润通络、化痰活血功效的丹瓜方,能多层次干预氧化应激反应^[6,13],并且对糖尿病动脉硬化有益^[7]。本文研究表明,丹瓜方对高脂糖尿病动脉硬化复合模型鼠,可降低循环血液中的 hs-CRP 和 TNF- α ,并减少主动脉 TNF- α 免疫组化阳性表达和 TNF- α mRNA 表达,显示出多层次的非特异性抗炎活性。冠状动脉富含脂质部分的 AS 斑块中都有 TNF- α 阳性物质^[14]。TNF- α 诱导细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 表达上调,并促进细胞内 ROS 的产生和 p38 磷酸化,及 NF- κ B 转位^[15]。TNF- α 诱导清道夫受体 A (scavenger receptor class A, SR-A) 和凝集素样氧化低密度脂蛋白受体-1 的表达,而 IL-6 只诱导 SR-A 的表达,阻断 NF- κ B 信号通路降低 TNF- α 诱导的泡沫细胞形成和 SR-A 的表达^[16]。山药提取物通过下调 MAPK/Akt/NF- κ B 信号通路以阻断 TNF- α 诱导的黏附分子的表达^[17]。当归中的海松酸可抑制 TNF- α 诱导的 MMP-9 产生,并通过下调 NF- κ B 和 AP-1 以抑制人主动脉平滑肌细

胞 (HSMC) 的迁移^[18]。丹瓜方同时下调 TNF- α 与 NF- κ B,可能在糖尿病动脉硬化病理中形成良性循环。

NO 舒张血管平滑肌,可抑制中性粒细胞趋化和单核细胞、血小板黏附于血管内皮,其水平主要受基因多态性的影响^[19],但在糖尿病时内皮细胞受损使其生物利用度下降^[20]。体外培养证实丹瓜方逆转不同浓度高糖的细胞毒性^[10]。本研究表明丹瓜方有效维持糖尿病动脉硬化模型活体血液 NO 水平,进一步印证了其内皮细胞保护活性。血管性血友病因子 (von Willebrand factor AND diabetes, vWF) 是血浆中的一种具有黏附功能的多亚基糖蛋白,被认为是反映血管内皮损伤的特异性标志物^[21],也是冠心病的重要标志物^[22]。Soares AL 等^[23]对 2 型糖尿病的研究发现,凝血因子 VIII (FVIII) 在有轻度动脉硬化的 B 组和显著动脉硬化的 C 组较无动脉硬化的 A 组显著升高,仅 C 组患者 vWF 和纤维蛋白原也升高。UKPDS 结果表明,二甲双胍具有多重大血管益处^[24]。研究证实二甲双胍治疗有益于空腹血糖受损患者的稳态调节,包括降低纤溶酶原激活物抑制物-1 及 vWF 等,从而对大血管得益做出贡献^[25]。二甲双胍加罗格列酮显著降低 2 型糖尿病患者 hs-CRP、vWF、E 选择素水平^[26]。本研究表明丹瓜方降低高脂糖尿病动脉硬化模型鼠升高 vWF 免疫组化阳性表达较二甲双胍更为显著。

糖尿病的中医学病因病机为气血津液代谢失调、痰浊易生,久则痰瘀互结,脉络失养。丹瓜方是基于痰瘀同治的原则治疗糖尿病及并发症的中药复方。丹瓜方以丹参、瓜蒌为君,化痰活血并举。丹参性微寒又兼养营血,瓜蒌性寒而润,二者配合清热祛邪又能护营阴,活血化瘀,标本同治。以赤芍、郁金、川芎、白僵蚕为臣,增强活血化痰祛邪之力。另以薤白等辛通开痹之品为佐使。全方清润通络、痰瘀同治。研究表明,丹参提取物能降低 vWF、hs-CRP、ICAM-1、ET-1、TNF- α 水平,不仅具有改善内皮损伤和抗炎的作用,还能改善糖脂代谢^[27]。川芎具有减少心肌损伤、减轻内皮损伤,改善心肌供血^[28]。瓜蒌、薤白能降低 NO、CRP 水平,具有抗氧化、保护血管内皮的作用^[29]。本研究结果表明可降低循环血液中的 hs-CRP 和 TNF- α ,并减少主动脉 TNF- α 免疫组化阳性表达和 TNF- α mRNA 表达,对血管内皮功能有一定的保护作用。

本研究仅炎症因子与内皮功能方面探讨了丹瓜方抗糖尿病动脉粥样硬化的机制,观测的靶点还不够全面,展示中药复方多靶点作用机制还不够充分,存在一定的局限性,有待进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 年版) [J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 6 (7): 447-498.
- [2] Khaw KT, Wareham N, Bingham S, et al. Association of hemoglobin A1c with cardiovascular disease and mortality in adults: the European prospective investigation into cancer in Norfolk [J]. Ann Intern Med, 2004, 141 (6): 413-420.
- [3] Riddle MC, Ambrosius WT, Brillon DJ, et al. Epidemiologic relationships between A1C and all-cause mortality during a median 3.4-year follow-up of glycemic treatment in the ACCORD trial [J]. Diabetes Care, 2010, 33 (5): 983-990.
- [4] ACCORD Study Group, Cushman WC, Evans GW, et al. Effects of intensive blood pressure control in type 2 diabetes mellitus [J]. N Engl J Med, 2010, 362 (17): 1575-1585.
- [5] ACCORD Study Group, Ginsberg HN, Elam MB, et al. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus [J]. N Engl J Med, 2010, 362 (17): 1563-1574.
- [6] 衡先培, 黄苏萍, 程心玲, 等. 丹桂方干预糖尿病动脉粥样硬化大鼠糖脂代谢及氧化应激研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33 (2): 244-251.
- [7] 黄苏萍, 林如辉, 陈文列, 等. 丹瓜方对糖尿病大鼠胸主动脉超微结构影响的初步观察 [J]. 福建中医药大学学报, 2011, 21 (2): 19-22.
- [8] 衡先培, 褚克丹, 林青, 等. 丹瓜方对血糖控制不良 2 型糖尿病患者 TNF- α 的干预研究 [J]. 福建中医学院学报, 2009, 19 (2): 9-12, 21.
- [9] 翁冬, 衡先培, 郑海霞. 芩蒺通脉方治疗 2 型糖尿病痰瘀证患者尿 MA 及血、尿 β 2-MG 的临床观察 [J]. 光明中医, 2010, 25 (12): 2257-2259.
- [10] Heng XP, Chen KJ, Hong ZF, et al. Glucose endothelial cytotoxicity and protection of Dan Gua-Fang, a Chinese herb prescription in HUVEC in hyperglycemia medium [J]. J Diabetes Complications, 2009, 23 (5): 297-303.
- [11] Heng XP, Chen KJ, Hong ZF, et al. Toxicity features of high glucose on endothelial cell cycle and protection by Dan Gua-Fang in ECV-304 in high glucose medium [J]. Chin J Integr Med, 2013, 19 (8): 596-602.
- [12] Heng XP, Chen KJ, Hong ZF, et al. Anti-colchicine cytotoxicity enhanced by Dan Gua-Fang, a Chinese herb prescription in ECV304 in mediums [J]. Chin J Integr Med, 2011, 17 (2): 126-133.
- [13] 衡先培, 陈可冀, 洪振丰, 等. 高糖培养 ECV304 内 ROS 含量变化及丹瓜方影响的研究 [J]. 光明中医, 2008, 23 (5): 551-555.
- [14] 梁萍, 孙雷, 唐建武. 细胞间黏附分子、血管细胞黏附分子和肿瘤坏死因子 α 在人动脉粥样硬化病灶中的表达及意义 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (4): 427-429.
- [15] Byeon HE, Um SH, Yim JH, et al. Ohioensin F suppresses TNF- α -induced adhesion molecule expression by inactivation of the MAPK, Akt and NF- κ B pathways in vascular smooth muscle cells [J]. Life Sci, 2012, 90 (11-12): 396-406.
- [16] Hanna RN, Shaked I, Hubbeling HG, et al. NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis [J]. Circ Res, 2012, 110 (3): 416-427.
- [17] Hashizume M, Mihara M. Atherogenic effects of TNF- α and IL-6 via up-regulation of scavenger receptors [J]. Cytokine, 2012, 58 (3): 424-430.
- [18] Suh SJ, Kwak CH, Chung TW, et al. Pimaric acid from *Aralia cordata* has an inhibitory effect on TNF- α -induced MMP-9 production and HASMC migration via down-regulated NF- κ B and AP-1 [J]. Chem Biol Interact, 2012, 199 (2): 112-119.
- [19] Salimi S, Naghavi A, Firoozrai M, et al. Association of plasma nitric oxide concentration and endothelial nitric oxide synthase T-786C gene polymorphism in coronary artery disease [J]. Pathophysiology, 2012, 19 (3): 157-162.
- [20] Zobali F, Cakici I, Karasu C. Effects of peroxynitrite on the reactivity of diabetic rat aorta [J]. Pharmacology, 2001, 63 (1): 58-64.
- [21] 李淑英, 魏刚, 李岳华, 等. 血糖、血压水平对 2 型糖尿病患者血管内皮损伤的影响 [J]. 天津医科大学学报, 2009, 15 (3): 405-407.
- [22] van Loon JE, Kavousi M, Leebeek FW, et al. von Willebrand factor plasma levels, genetic variations, and coronary heart disease in an older population [J]. J Thromb Haemost, 2012, 10 (7): 1262-1269.
- [23] Soares AL, Kazmi RS, Borges MA, et al. Elevated plasma factor VIII and von Willebrand factor in women with type 2 diabetes: inflammatory reaction, endothelial perturbation or else? [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2011, 22 (7): 600-605.
- [24] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) [J]. Lancet, 1998, 352 (9131): 837-853.
- [25] Krysiak R, Okopien B. Hemostatic effects of metformin in Simvastatin-treated volunteers with impaired fasting glucose [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2012, 111 (6): 380-384.
- [26] Schöndorf T, Musholt PB, Hohberg C, et al. The fixed combination of pioglitazone and metformin improves biomarkers of platelet function and chronic inflammation in type 2 diabetes patients: results from the PIOfix study [J]. J Diabetes Sci Technol, 2011, 5 (2): 426-432.
- [27] 赵春娟, 马玉清, 郭杨志, 等. 丹参提取物药理作用研究进展 [J]. 光明中医, 2014, 29 (9): 2013-2015.
- [28] 金玉青, 洪远林, 李建蕊, 等. 川芎的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药与临床, 2013, 4 (3): 44-48.
- [29] 刘锴, 韩林涛, 薛大权, 等. 瓜蒌薤白药对的研究进展 [J]. 湖北中医药大学学报, 2014, 16 (6): 111-114.

(收稿: 2015-10-24 修回: 2016-03-08)

责任编辑: 汤 静

英文责编: 张晶晶