

· 论 著 ·

速降糖对实验性糖尿病大鼠周围神经病变防治作用的实验研究

吴 洁

(第三军医大学西南医院老年科, 重庆 400038)

摘要:目的 研究速降糖对实验性糖尿病大鼠周围神经病变的防治作用,为临床用药和进一步开发提供更多实验理论依据。方法 以链脲佐菌素(STZ)诱发糖尿病周围神经病变模型。连续治疗 8 周后,检测血液流变学的变化、神经传导速度的改变、海马区神经生长因子(NGF)表达情况、神经病理超微结构的改变等。结果 速降糖和西药各治疗组全血粘度以及红细胞聚集指数、刚性指数较模型组显著降低($P<0.01$),治疗组的 MNCV 和 SNCV 均较模型组加快($P<0.05$),各治疗组海马区 NGF 阳性细胞数较模型组增加($P<0.01$),治疗组有髓神经纤维病理超微结构改变较模型组轻。结论 速降糖对实验性糖尿病大鼠周围神经病变具有一定的防治作用。

关键词:速降糖;实验性糖尿病;周围神经病变;超微结构**中图分类号:**R587.1**文献标识码:**A**文章编号:**1671-8348(2010)11-1377-03

Experimental investigation of the protective effect on the diabetic peripheral neuropathy of SJT

WU Jie

(Department of Geriatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract:Objective To investigate the mechanism of the protective effect on the diabetic peripheral neuropathy of SJT and provide an experimental basis for further investigating and clinical use. **Methods** The diabetes rats were induced by injecting Streptozotocin(STZ). After eight weeks, the hemorrheology, the nerve conduction velocity, expression of NGF, and ultrastructure of each group were tested. **Results** The whole blood viscosity, index of red cell(RBC) aggregation and index of RBC rigidity of the high dosage group significantly decreased than those of model group. The NCV of the high dosage group was distinctly faster than that of the model group. Compared with the model group, SJT could obviously increase the expression of NGF in the hippocampus. The high dosage group could markedly protect ultrastructure of myelinated nerve. **Conclusion** SJT can significantly improve the function of nerve and protect the ultrastructure of myelinated nerve.

Key words:Su-Jiang-Tang; experimental diabetes mellitus; peripheral neuropathy; ultrastructure

糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)是糖尿病(DM)的常见慢性并发症之一,并且随着 DM 病程的延长,DPN 的发生率明显增加^[1]。目前西医治疗 DPN 以降糖治疗为主,西药单一的成分仅能针对发病机制中的某一环节,难以有效兼顾并发症。而中医从整体出发,有利于标本兼顾,因此中医药对 DM 并发症的防治具有一定的优势。速降糖经多年的临床观察,证实对 DPN 患者具有良好的疗效。本研究旨在为其临床治疗 DPN 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2.5~3 个月龄健康雄性 Wistar 大鼠 70 只,体质量 180~220 g,由同济医学院实验动物中心提供,微生物控制等级为 I 级。

1.2 主要试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)为美国 sigma 公司产品,批号 AB0162-010921,0℃保存,用 0.1 mol/L(pH4.4)的柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液冰浴下配制 0.3%的 STZ 溶液,现配现用。柠檬酸钠缓冲液由北京试剂二厂生产。神经生长因子(NGF)SABC 免疫组化试剂盒,即用型,编号 SA1021,购自武汉博士德生物工程有限公司,低温保存。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制作 大鼠购回后随机分装,5 只/笼,适应性喂养 3 d,随机挑选 10 只作为正常组,其余 60 只造模。大鼠禁食不禁水 12 h 后称重、测血糖、编号。将 STZ 在冰浴环境放入事先配好的 0.1 mol/L 柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液(pH4.4)

中,配制成 0.3%的 STZ 溶液。STZ 按照 50 mg/kg 剂量一次性进行左侧腹腔注射,正常对照组以等剂量缓冲液进行左侧腹腔注射。72 h 后剪尾测大鼠血糖,选血糖大于 16.7 mmol/L 作为成模鼠,共成模 62 只。喂养 6~8 周后,即成为早期 DPN 大鼠模型。

1.3.2 动物分组 将 62 只成模鼠随机分为模型组(12 只)、速降糖小剂量组(小剂量组,10 只)、速降糖大剂量组(大剂量组,10 只)、二甲双胍组(西药 I 组,10 只)、二甲双胍加甲钴胺片组(西药 II 组,10 只),加上正常组(10 只),共 6 组 62 只大鼠进入实验。

1.3.3 治疗方法 造模成功并分组后,各组大鼠即开始按 1 mL/100 g 剂量灌胃治疗。正常组和模型组灌服 0.9%生理盐水;小剂量组灌服浓度为 75%的速降糖合剂;大剂量组灌服浓度为 225%的速降糖合剂;西药 I 组灌服浓度为 1.5%的二甲双胍混悬液;西药 II 组灌服浓度为 1.5%二甲双胍和 0.05%甲钴胺片的混悬液。药物剂量根据人民卫生出版社出版、陈奇主编的《中药药理实验方法》,按动物与人体表换算法求得(低剂量相当于成人普通剂量,大剂量为成人剂量的 3 倍)。上述 6 组大鼠每日灌胃治疗 1 次,均不限制进食及饮水,治疗周期为 8 周。

1.3.4 标本采集 治疗 8 周后,大鼠禁食不禁水 12 h,注射麻醉,用电极刺入法测量左侧感觉及运动神经传导速度。钝性分离暴露出右侧坐骨神经中段和腓肠神经,截取腓肠神经 5~6

表 1 各组大鼠血液流变学参数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	全血黏度(mPas)		红细胞	
		高切	低切	聚集指数	刚性指数
正常组	10	2.58±0.76 [△]	12.01±2.51 [△]	6.31±1.78 [△]	2.01±0.39 [△]
模型组	12	7.25±2.44 [*]	23.33±3.29 [*]	9.98±2.12	4.23±1.01
小剂量组	10	5.42±0.83 ^{#*}	19.38±3.78 ^{#*}	7.99±1.23 [#]	3.39±0.93
大剂量组	10	2.84±0.75 [△]	13.42±3.26 [△]	6.79±1.69 [△]	2.22±0.56 [△]
西药 I 组	10	5.38±0.79 [#]	18.89±3.45 [#]	7.87±2.01 [#]	3.31±0.91
西药 II 组	10	2.93±0.81 [△]	13.39±3.87 [△]	6.81±1.89 [△]	2.32±0.87 [△]

与模型组比较, #: $P < 0.05$; Δ : $P < 0.01$; 与大剂量组比较, *: $P < 0.05$ 。

mm,用戊二醛固定作电镜形态学观察。以摘除眼球法采血行血液流变学检测。固定大鼠,用 4%多聚甲醛溶液灌注后取脑,并于 20%蔗糖液中浸置 24~48 h(4℃)。冰冻冠状连续切片,按 SABC 免疫组化染色试剂盒作 NGF 测定。

1.3.5 观察指标及检测方法

1.3.5.1 血液流变学检测 血液流变学用 R80 血液粘度仪检测。

1.3.5.2 运动及感觉神经传导速度的测定 使用新版 BL-410 生物机能实验系统,采用电极刺入法测定^[2]。

1.3.5.3 免疫组化指标检测 用 SABC 免疫组化法检测海马区 NGF 表达,由武汉博士德生物工程有限公司完成。结果采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统进行定量分析,每张标本按顺序选 10 个视野,最后以每组的均值进行比较。

1.3.5.4 腓肠神经有髓神经纤维超微结构观察 取材,固定于 2.5%戊二醛/磷酸缓冲固定液中 6 h,Sorensen's 磷酸缓冲液冲洗 12 h 过夜。再用 1%锇酸固定 2 h,丙酮系列脱水,环氧树脂 618 浸透包埋,超薄切片,使用 HITACHI H-600 透射电镜观察并照相。

1.4 统计学方法 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素多个样本均数的比较用方差分析,方差不齐时用两样本均数比较的 t 检验,多样本均数两两比较采用 q 检验。所有数据均经 SPSS 12.0 统计软件处理,并对相应数据进行相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 速降糖对 DM 大鼠血液流变学的影响 模型组与正常组比较,全血粘度以及红细胞聚集指数、刚性指数均较正常组显著升高($P < 0.01$)。小剂量组及西药 I 组红细胞聚集指数较模型组显著改善($P < 0.05$),而刚性指数无显著变化。大剂量组和西药 II 组各项指数较模型组显著降低($P < 0.01$)。大剂量组与西药 II 组比较,各指标无显著性差异,见表 1。

2.2 速降糖对 DM 大鼠神经传导速度的影响 治疗组与模型组的 MNCV 和 SNCV 均较正常组减慢($P < 0.05$),尤其模型组与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。大剂量组与西药 II 组均较模型组加快($P < 0.05$),大剂量组与西药 II 组比较,SNCV 差异无统计学意义。大剂量组与正常组比较 MNCV 与 SNCV 差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.3 速降糖对 DM 大鼠海马区 NGF 表达的影响 光镜下正常组海马被染色区 NGF 阳性细胞呈棕色颗粒,分布密集,清晰可见。各治疗组次之。模型组海马区 NGF 阳性细胞颗粒稀

疏,分布杂乱。定量结果,治疗组和模型组海马 NGF 阳性细胞数较正常组明显减少($P < 0.01$)。治疗组较模型组 NGF 含量增加($P < 0.01$),大剂量组明显优于小剂量组、西药组($P < 0.01$),见表 3。

表 2 各组大鼠神经传导速度比较($\bar{x} \pm s$, mL/s)

组别	n	运动神经传导速度 (MNCV)	感觉神经传导速度 (SNCV)
正常组	10	51.21±8.71 [*]	49.70±5.91 [*]
模型组	12	34.03±2.23 [#]	35.12±4.10 [#]
小剂量组	10	35.91±1.92 ^{△*}	37.10±4.04 ^{△*}
大剂量组	10	40.12±3.53 ^{#△}	42.53±3.81 ^{#△}
西药 I 组	10	35.83±2.34 ^{△*}	37.36±3.92 ^{△*}
西药 II 组	10	37.14±2.92 ^{#△}	38.12±3.61 ^{*△}

与正常组比较, #: $P < 0.05$; Δ : $P < 0.01$; 与模型组比较, Δ : $P < 0.05$; 与大剂量组比较, *: $P < 0.05$ 。

表 3 治疗后各组大鼠海马区 NGF 免疫反应阳性细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	阳性细胞数(个/mm ²)
正常组	10	55.84±2.95 [△]
模型组	10	35.92±2.28 [#]
小剂量组	10	40.22±3.01 ^{△*}
大剂量组	10	49.31±2.75 ^{#△}
西药 I 组	10	39.98±2.97 ^{#*}
西药 II 组	10	46.03±2.17 ^{#△*}

与正常组比较, #: $P < 0.01$; 与模型组比较, Δ : $P < 0.01$; 与大剂量组比较, *: $P < 0.05$ 。

2.4 速降糖对 DM 大鼠有髓神经纤维病理超微结构的影响 正常组大鼠有髓神经纤维神经髓鞘板层结构完整、清晰,神经轴突内电子密度均匀,未见无颗粒囊泡状结构。模型组大鼠有髓神经纤维髓鞘发生分离、变性融合,板层结构紊乱,轴突内电子密度不均匀,可见无颗粒囊泡状结构。小剂量组大鼠有髓神经纤维髓鞘部分发生分离,轴突内电子密度不均匀,可见无颗粒囊泡状结构。大剂量组大鼠有髓神经纤维髓鞘板层结构基本完整,但神经轴突内电子密度不均匀,可见无颗粒囊泡状结构。西药 I 组大鼠有髓神经纤维髓鞘部分发生分离,轴突内电子密度不均匀,可见无颗粒囊泡状结构。西药 II 组大鼠有髓神经纤维髓鞘未见明显分离,但神经轴突内可见无颗粒囊泡状

结构。

3 讨 论

传统中医理论认为,DPN 的病机是本虚标实,本虚主要在于脾肾亏虚,气阴两虚;标实在于燥热、痰湿、血瘀等。本虚标实互为影响,相互转化,加速本病的病变发展。速降糖主要由黄芪、黄连、山茱萸和山药等药物组成。有研究表明,这些药物能够降低血糖,改善微循环状态,纠正代谢异常,有利于 DPN 的防治^[3-5]。前期的实验研究已证实,速降糖可以降低 DM 大鼠血糖,因此,选用二甲双胍为西药 I 组,观察在无其它损伤因素时,单纯降糖是否能够预防 DPN 的发生。

本实验发现,模型组大鼠全血粘度及红细胞聚集指数、刚性指数均较正常组显著升高。大剂量组和西药 II 组与模型组相比,各项指标明显改善,而大剂量组与西药 II 组两组间无显著性差异。速降糖改善血液流变性的机制可能是通过降低血糖、抑制血小板聚集、扩张血管、清除自由基、保护血管内皮等环节实现,从而可以从改善微循环角度防治 DPN 的进展。本实验也同时证实了“瘀血痰浊可止于不治之中”的中医理论。

NGF 是神经系统最重要的生物活性分子之一,是交感神经元、感觉神经元和中枢部分胆碱能神经元生长、发育、存活、维持功能所必需的营养因子。在 DM 早期,NGF 参与的交感和感觉神经元即可被累及而发生病理变化。胰岛素(胰岛素原)与 NGF 在结构和功能上有一些相似之处,在 DM 时胰岛素所介导的免疫反应可能引起 NGF 的减少^[6]。根据 NGF 酶构法及 NGF mRNA 表达所测定的结果,发现在动物虹膜、心脏、颌下腺、脾脏及包膜、脑和神经节等组织中均含有丰富的 NGF^[7]。有实验证实,无论是 DM 模型还是 DPN 患者,其各组织或血中的 NGF 水平均明显下降,并且内生 NGF 水平随着病程进展而逐步降低,在神经病变严重的患者,NGF 水平的降低更明显^[8-9]。因此,组织中 NGF 阳性表达的多少,可以反映神经病变的损害程度。本实验研究选择检测 NGF 含量丰富的大鼠海马区 NGF 的免疫组化表达,以各组间平行比较,可以反映出动物体内 NGF 水平下降的程度及其与神经损害程度的关系。通过实验发现,模型组大鼠海马区 NGF 含量显著下降,治疗组均能在一定程度上增加其含量,尤其大剂量组效果

更明显,优于西药组。结合各组神经功能测定及微观结构病理改变状况,可以证实 NGF 在组织中含下降的程度与神经的损害程度呈正相关,从而说明 NGF 确有防治 DPN 的作用。因此,速降糖可以通过促进神经营养因子表达,防治和改善 DPN,但其具体机制尚需进一步研究。

综上所述,速降糖对 DPN 有良好的防治作用,其机制可能如下:(1)改善血液流变学,从而改善神经的供血、供氧;(2)促进 NGF 的表达,从而调节神经元生长、发育、存活以及维持其正常功能。

参考文献:

- [1] 于化梅. 2 型糖尿病周围神经病变的临床分析[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(13): 1145.
- [2] 隋国良. 卡托普利对糖尿病大鼠坐骨神经结构和功能的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2001, 17(4): 246.
- [3] 梅全喜. 现代中药药理手册[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 76.
- [4] 张家庄. 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): 45.
- [5] 刘长山. 中药黄芩甙与黄连素对糖尿病大鼠醛糖还原酶活性作用的观察[J]. 中国糖尿病杂志, 1996, 4(3): 163.
- [6] 杨光燃. 神经生长因子与糖尿病神经病变[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2001, 4(3): 163.
- [7] 贾军宏. 神经生长因子与糖尿病神经病变[J]. 中国糖尿病杂志, 1998, 6(1): 42.
- [8] Faradji V, Wsotelo J. Lower serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy [J]. Acta Neurol Scand, 1990, 81: 402.
- [9] Rask CA. Biological actions of nerve growth factor in the peripheral nervous system[J]. Eur Neurol, 1999, 41(Suppl 1): 14.

(收稿日期: 2010-01-25)

(上接第 1376 页)

- of oral corticosteroids on bone mineral density in asthmatic patients; a 4-year longitudinal study[J]. Chest, 2001, 120(5): 1468.
- [4] Jørgensen NR. The prevalence of osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease; a cross sectional study[J]. Respir Med, 2007, 101(1): 177.
 - [5] Lung Health Study Research Group. Effect of inhaled triamcinolone on the decline in pulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease[J]. N Engl J Med, 2000,

343(26): 1902.

- [6] Sin DD, Man JP, Man SF. The risk of osteoporosis in Caucasian men and women with obstructive airways disease [J]. Am J Med, 2003, 114: 10.
- [7] Mc Garvey LP. TORCH Clinical Endpoint Committee. Ascertainment of cause-specific mortality in COPD; operations of the TORCH Clinical Endpoint Committee[J]. Thorax, 2007, 62(5): 411.

(收稿日期: 2010-01-25)