

抵当芪桂汤对 STZ 诱导糖尿病大鼠血浆 TXB₂ 和血小板表面 CD62_p、CD63 的影响

赵天才 杨景锋 任艳芸 张永宜 刘飞飞

【摘要】 目的 观察抵当芪桂汤对糖尿病大鼠血浆血栓素 B₂ (Thromboxane B₂, TXB₂) 含量及血小板表面 α 颗粒膜糖蛋白 (alpha-granular membrane glycoprotein, CD62_p) 和血小板溶酶体膜蛋白 (lysosome intact membrane protein, CD63) 表达的影响。**方法** 70 只大鼠按随机数字表法抽取 10 只空白组,其余大鼠用链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 复制糖尿病模型,选取成模大鼠按随机数字表法分为模型组、格列美脲组、抵当芪桂汤大量组、抵当芪桂汤常量组,给予相应干预 10 周后,测定血浆 TXB₂ 含量及血小板表面 CD62_p、CD63 的表达。**结果** 干预 10 周后,与 E 组比较,B 组、C 组、D 组大鼠血浆 TXB₂ 含量及血小板表面 CD62_p、CD63 表达率明显降低,有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论 抵当芪桂汤可通过降低糖尿病大鼠血浆 TXB₂ 含量和血小板表面 CD62_p、CD63 表达率,抑制血小板活化、改善微循环而阻止或延缓糖尿病血管病变的发生和发展。

【关键词】 糖尿病; 抵当芪桂汤; CD62_p; CD63; TXB₂

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.09.004

Effects of Didang Qigui Decoction on blood plasma TXB₂ and platelet surface CD62_p/CD63 in STZ-induced diabetes rats ZHAO Tian-cai, YANG Jing-feng, REN Yan-yun, et al. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Corresponding author: YANG Jing-feng, E-mail: yangjingfeng1970@126.com

【Abstract】 Objective To observe therapeutic effects of Didang Qigui Decoction upon rats with diabetes that is induced by streptozotocin (STZ) by examining the levels of TXB₂ in blood plasma and granule membrane glycoprotein (CD62_p), lysosomal integral membrane protein (CD63) in platelet surface. **Method** 10 out of 70 female rats are chosen randomly as the blank control group (group A), then the rest are induced by STZ, waiting to develop diabetes rats which, afterwards, are divided randomly into model group (group B), glimepiride group (group C), maximum dosage group of the Decoction (group D), and Didang Qigui Decoction normal-dose group (group E). 10 weeks intervention is given to all the above groups and the levels of TXB₂ in blood plasma and CD62_p, CD63 in platelet surface in each group are measured. **Result** After 10 weeks of intervention, comparing with group E, the levels of TXB₂ in blood plasma and CD62_p, CD63 in platelet surface were decreased in group B, group C and group D ($P < 0.05$). **Conclusion** It is possible that Didang Qigui Decoction restrains platelet activation and improves microcirculation by reducing blood plasma TXB₂ and platelet surface CD62_p, and CD63 content and further prevents or delays the occurrence and development of diabetic angiopathy.

【Key words】 Diabetic mellitus; Didang Qigui Decoction; CD62_p; CD63; TXB₂

基金项目:陕西省自然科学基金研究计划(2011JM4017);陕西省教育厅专项科研计划(11JX06751)

作者单位:712046 咸阳,陕西中医学院中医临床医学[赵天才、杨景锋、张永宜(硕士研究生)];陕西中医学院附属医院肾病科(任艳芸);河南省洛阳新区人民医院内一科(刘飞飞)

作者简介:赵天才(1955-),硕士,教授。研究方向:经方防治糖尿病及其并发症研究。E-mail:ztc9905@aliyun.com

通讯作者:杨景锋(1970-),硕士,副教授。研究方向:中医药防治糖尿病及其并发症研究。E-mail:yangjingfeng1970@126.com

糖尿病血管病变(diabetic angiopathy, DA)是糖尿病最常见的慢性并发症,包括大血管病变和微血管病变,是糖尿病致死、致残的主要原因之一。研究认为长期高血糖使血管内皮细胞的膜蛋白发生非酶糖基化,可直接损伤内皮细胞。内皮细胞损伤后,激活血小板,血小板的高黏附、高聚集状态造成微循环淤滞及广泛微血栓的形成,导致组织缺氧引起微血管病变^[1],而 CD62_p、CD63 和 TXB₂ 的高表达参与了 DA 的发生发展。本实验通过检测抵当芪桂汤对 STZ 诱导糖尿病大鼠血清 CD62_p、CD63 和 TXB₂ 表达的影响,进一步探讨本方防治 DA 发生发展的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雌性 SD 大鼠 70 只(购自西安交通大学实验动物中心,许可证号:SCXK 陕 2007-001),体质量(200±20)g;抵当芪桂汤(生黄芪 30 g、桂枝 10 g、酒大黄 10 g、炒白芍 15 g、鬼箭羽 20 g、水蛭 6 g)水煎浓缩液(水煎成含生药为 0.948 g/ml 和 1.896 g/ml 的两种药液,置 4℃ 冰箱存储备用);格列美脲(2 mg/片,北京赛诺菲—安万特制药有限公司,产品批号:B1020)临用前研细末,加蒸馏水配成质量浓度为 0.02 mg/ml 的混悬液(4℃ 冰箱保存备用),链脲佐菌素(美国 Sigma 公司);TXB₂ 放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所以);异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的 CD61 抗体(CD61-FITC)、藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)标记的抗 CD62_p 的单克隆抗体(CD62_p-PE)、藻红蛋白标记的抗溶酶体膜糖蛋白 CD63 的单克隆抗体(CD63-PE)及同型对照藻红蛋白标记的免疫抗体(immunoglobulin G1-PE, LgG1-PE)试剂盒(均购自北京博奥森生物科技有限公司);流式细胞仪(Beckman Coulter, 型号:FC500)。

1.2 动物分组及造模

70 只大鼠,适应性喂养 1 周后,按随机数字表法抽取 10 只为空白组(A 组)。其余大鼠禁食不禁水 12 小时,按 60 mg/kg 腹腔注射 1% STZ 溶液(STZ 溶于 0.1 mol/L, pH 值 4.4 的柠檬酸缓冲液中,配制成 1% 浓度)造模。造模 72 小时后,尾静脉采血测血糖,随机血糖≥16.9 mmol/L 者为模型复制成功。选取成模大鼠 40 只按随机数字表法分为 4 组,每组 10 只:模型组(B 组)、格列美脲组(C 组)、抵当芪桂汤大量组(D 组)、抵当芪桂汤常量组(E 组)。各组

大鼠造模后第 4 天开始灌胃给药,1 次/天,连续 10 周。A 组、B 组灌服蒸馏水 1 ml/100 g;C 组,灌服 0.02 mg/ml 格列美脲混悬液 1 ml/100 g;D 组灌服含抵当芪桂汤生药量 1.896 g/ml 的水煎浓缩液 1 ml/100 g;E 组灌服含抵当芪桂汤生药量 0.948 g/ml 的水煎浓缩液 1 ml/100 g。

1.3 指标检测

于干预第 10 周末,禁食不禁水 12 小时后称体重,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉动物,下腔静脉采血法取血 3 ml,用 109 mmol/L 的枸橼酸钠按照 1:9 的比例抗凝,1200 r/min 离心 10 分钟,提取富含血小板的血浆,取 3 支试管并标记,在 3 支试管中各加入 CD61-FITC 2 μl,分别在不同试管中加入 CD62_p-PE、CD63-PE、LgG1-PE 各 10 μl,再各加入抗凝全血 10 μl 富含血小板血浆及 80 μl PBS 液,室温避光孵育 30 分钟,加入 2% 多聚甲醛的 PBS 500 μl,于 1 小时上机检测,用阴性对照管(CD61-FITC + LgG1-PE)调整电压合格后,对测定管检测,检测标 CD62_p-PE 和 CD63-PE;用 CD61 设门,分析 CD61 门中表达 CD62_p 和 CD63 的阳性率,再对血小板进行活化分析:CD62_p 阳性率 = (CD61 门中标记上 CD62_p 血小板 - LgG1 血小板)/CD61 门中全部血小板 100%;CD63 阳性率 = (CD61 门中标记上 CD63 血小板 - LgG1 血小板)/CD61 门中全部血小板 100%。同时取抗凝全血 2 ml 送陕西中医学院附属医院用放射免疫法检测血浆 TXB₂ 含量。

1.4 统计学处理

所有数据用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干预后各组大鼠血浆 TXB₂ 含量的测定结果

干预 10 周后,与 A 组比较,其余各组大鼠血浆 TXB₂ 含量明显增高($P < 0.05$);与 B 组比较,各干预组大鼠血浆 TXB₂ 含量均降低($P < 0.05$),其中 E 组和 C 组更明显($P < 0.05$),E 组优于 C 组($P < 0.05$)。如表 1 所示。

2.2 干预 10 周后各组大鼠血小板表面 CD62_p 和 CD63 表达率的测定结果

干预 10 周后,与 A 组比较,B 组大鼠血小板表面 CD62_p 和 CD63 表达率明显升高($P < 0.05$);与 B 组比较,各治疗组大鼠血小板表面 CD62_p 和 CD63 表达率较低($P < 0.05$);与 C 组比较,E 组和 D 组大

鼠血小板表面 CD62_p 和 CD63 表达率较低 ($P < 0.05$); 与 D 组比较, E 组大鼠血小板表面 CD62_p 和 CD63 表达率明显降低 ($P < 0.05$)。如表 2 所示。

表 1 干预 10 周后各组大鼠血浆 TXB₂ 含量 ($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

组别	例数	TXB ₂ 含量
A 组	8	75.094 ± 13.147
B 组	7	351.02 ± 62.121 ^a
C 组	8	168.998 ± 38.385 ^{ab}
D 组	8	248.0925 ± 56.643 ^{ab}
E 组	8	99.02625 ± 21.024 ^{abc}

注:与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 C 组比较, ^c $P < 0.05$ 。(A 组,空白组;B 组,模型组;C 组,格列美脲组;D 组抵当芪桂汤大量组;E 组,抵当芪桂汤常量组;下表同)

表 2 治疗后各组大鼠血小板表面 CD62_p 和 CD63 表达率 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	例数	CD62 _p	CD63
A 组	8	0.094 ± 0.021	0.095 ± 0.019
B 组	7	0.771 ± 0.136 ^a	0.729 ± 0.146 ^a
C 组	8	0.564 ± 0.104 ^{ab}	0.524 ± 0.128 ^{ab}
D 组	8	0.336 ± 0.069 ^{abc}	0.318 ± 0.064 ^{abc}
E 组	8	0.191 ± 0.045 ^{abcd}	0.162 ± 0.039 ^{abcd}

注:与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 C 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 D 组比较, ^d $P < 0.05$ 。

3 讨论

糖尿病血管病变(diabetic angiopathy, DA)是糖尿病最常见的慢性并发症,CD62_p 和 CD63 的高表达参与了糖尿病血管病变的发生和发展^[2]。血栓素 A₂(Thromboxane A₂, TXA₂)主要在血小板中生成和释放,具有强烈的缩血管和促血小板聚集作用,被认为是体内血小板活化的特异性标志物之一。若 TXA₂ 分泌增多即可引起血小板聚集,甚至血栓形成、循环障碍等病理变化^[3]。TXA₂ 在 30 秒后迅速降解为稳定的 TXB₂,故通常测其代谢产物代表其含量。

糖尿病血管病变属中医“血痹”、“消渴脉痹”范畴;尽管流行病学资料显示,近年来该病发病率以惊人的速度在递增,但临床具备“多饮、多食、多尿、

消瘦”等“三多一少”症状者并不多见,多数患者是在健康体检或因并发症出现时才被发现。由于症状多不典型,给中医辨证带来困难,难以以“阴虚燥热”的病机理论为指导进行“三消”分治。结合长期临床观察,课题组认为其基本病机为气阴两虚、络脉瘀阻,治疗当以益气养阴,化瘀通络为法。临床应用《伤寒论》抵当汤和《金匱要略》黄芪桂枝五物汤化裁组成的抵当芪桂汤(由生黄芪、炒白芍、桂枝、水蛭、酒大黄、鬼箭羽等组成),具有益气养阴、化瘀通络之功,用以治疗糖尿病及其慢性并发症取得了较好的临床疗效。前期研究证实其在改善糖尿病临床症状、缓解并发症及改善血管损伤方面疗效确切^[4-6]。方中生黄芪益气,炒白芍养阴生津,二者合为君药,共奏益气养阴生津之效;酒大黄、水蛭化瘀通络,桂枝温通经脉,共为臣药;佐以鬼箭羽活血化瘀,使血行而不滞,有利于瘀血的祛除。诸药合用补而不滞,活血而不伤正,共奏益气养阴,化瘀通络之功。本实验研究显示,抵当芪桂汤能够有效降低 STZ 诱导糖尿病大鼠血浆 TXB₂ 含量,抑制血小板表面 CD62_p 和 CD63 表达,且效果明显优于格列美脲,提示抵当芪桂汤可能通过抑制或延缓血小板活化,改善血小板功能,阻止广泛微血栓的形成而起到防治糖尿病血管病变的作用。

参 考 文 献

- [1] 卢芙蓉,沈霖,秦铀,等. 2 型糖尿病患者血小板膜糖蛋白 Ib/IX/V 复合物表达的研究[J]. 中国全科医学,2008,11(6): 470-473.
- [2] 池晓霞,陈剑雄,盖俊惠. 非 INS 依赖型糖尿病患者血小板活化与微血管病变关系初探[J]. 放射免疫学杂志,2009,22(2):140-142.
- [3] 李萍,弥曼,杜洪霞,等. 亚硝酸钠对糖尿病大鼠血小板聚集功能的影响[J]. 南方医科大学学报,2010,30(1):193-194.
- [4] 杨景锋,赵天才,任艳云,等. 抵当芪桂汤对链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠心肌超微结构的影响[J]. 中国全科医学,2010,13(48):1201-1203.
- [5] 杨景锋,赵天才,任艳芸,等. 抵当芪桂汤对 STZ 诱导糖尿病大鼠心肌 VEGFmRNA 表达的影响[J]. 中药材,2011,34(3): 420-424.
- [6] 杨景锋,赵天才,王祥森,等. 抵当芪桂汤对链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠心肌 CTGF、 α -SMA 表达的影响[J]. 时珍国医国药,2012,23(2):363-364.

(收稿日期:2013-07-09)

(本文编辑:董历华)