

通心络对 2 型糖尿病肾病大鼠纤溶调节因子 PAI-1 表达的影响

邹大威 高彦彬 李娇阳 周盛楠 张娜 吴晓明 田年秀 王晓磊 朱智耀

【摘要】 目的 观察通心络对 2 型糖尿病肾病大鼠血流变、纤溶调节因子表达的影响。**方法** 采用高脂饲料联合小剂量链脲佐菌素建立 2 型 DN 大鼠模型,随机分为模型组和通心络组各 10 只,设立 10 只正常 SD 大鼠为空白组;予通心络干预 16 周后,大鼠腹主动脉取血,测定空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、血清尿素氮(urea nitrogen, BUN)、血清肌酐(serum creatinine, Scr)、全血黏度(高切、低切)、血浆黏度、血小板聚集率、血浆纤维蛋白原、组织型纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA)及纤溶酶原激活剂抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠 FBG、BUN、Scr 均明显升高($P < 0.05$);全血黏度(高切、低切)、血浆黏度、血小板聚集率、血浆纤维蛋白原及 PAI-1 明显升高, t-PA 明显降低。与模型组比较,通心络组 BUN、Scr 均明显降低($P < 0.05$),高、低切变率下的全血黏度、血浆黏度、血浆纤维蛋白原含量、血小板聚集率及 PAI-1 水平明显降低($P < 0.05$),但对 FBG、tPA 水平没有明显的影响。**结论** 通心络可保护 2 型糖尿病肾病大鼠肾功能、减轻肾脏病理损伤;抗凝、降纤改善肾脏局部微循环灌注可能是其延缓 DN 进展的作用机制。

【关键词】 糖尿病肾病; 通心络; 纤溶; 组织型纤溶酶原激活剂; 纤溶酶原激活物抑制物-1

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.12.004

Effects of Tongxinluo on PAI-1 level in rats with type 2 diabetic nephropathy ZOU Dawei, GAO Yanbin, LI Jiaoyang, et al. Capital Medical University, School of Traditional Chinese Medicine & Beijing Key Laboratory of TCM Collateral Disease Theory Research, Beijing 100069, China
Corresponding author: GAO Yanbin, E-mail: dfyynfm@163.com

【Abstract】 Objective To explore effects of Tongxinluo on hemorheology and PAI level in rats with type 2 diabetic nephropathy. **Methods** The rat model of type 2 diabetes mellitus was induced by injection of low-dose of streptozocin after having high-fat diet. Diabetic rats were randomly divided the model group ($n=10$) and the Tongxinluo group ($n=10$). Normal SD rats ($n=10$) were used as the control group. After intervention with Tongxinluo for 8 weeks, fasting blood glucose (FBG), serum creatinine (Scr), serum urea nitrogen (BUN), tissue plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) and hemorheology indexes were detected. **Results** Compared with control group, FBG, Scr, BUN, hemorheology indexes in the model group were significantly increased while the PAI-1 was decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, BUN and Scr were significantly decreased ($P < 0.05$),

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2012CB518602);国家自然科学基金青年科学基金(81302951)

作者单位:100069 北京,首都医科大学中医药学院 中医络病研究北京市重点实验室[邹大威、高彦彬、李娇阳(硕士研究生)、周盛楠(硕士研究生)、张娜(博士研究生)、吴晓明(博士研究生)、田年秀(博士研究生)、王晓磊(硕士研究生)、朱智耀]

作者简介:邹大威(1982-),女,博士,讲师,主治医师。研究方向:中医药防治糖尿病研究。E-mail:sy_evergreen2012@163.com

通信作者:高彦彬(1960-),博士,教授,主任医师,博士生导师。研究方向:中医药防治糖尿病研究。E-mail:dfyynfm@163.com

hemorheology indexes and PAI-1 levels were significantly decreased ($P < 0.05$), but the FBG and tPA level had no obvious influence. **Conclusion** *TongXinLuo* can protect renal function and alleviate renal pathological damage in type 2 diabetic nephropathy rats. Anticoagulation, defibrigen and improving local microcirculation perfusion may be the mechanisms of delaying DN progression.

【Key words】 Diabetic nephropathy; *Tongxinluo*; Hemorheology; Tissue plasminogenemia activator; Plasminogen activator inhibitor-1

最新发表于《美国医学会杂志》(JAMA)的一项研究显示,2013 年中国大陆成年人糖尿病的总患病率约为 10.9%,糖尿病前期的患病率为 35.7%^[1]。2 型糖尿病并发肾病的患病率为 34.7%^[2],也是糖尿病患者致死致残的主要原因。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最主要的微血管并发症,糖尿病患者血液处于高凝高粘状态,由于血液黏度增高,血流缓慢,组织血液灌注量减少,致使组织缺血缺氧,局部代谢产物蓄积,导致肾内微循环障碍。本研究在络病学说指导下,基于中医学“同病异治”理论,旨在探讨通心络对 2 型糖尿病肾病肾内微循环、肾脏病理及肾功能的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,动物合格证号:SCXK(京)2012-0001,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 干预药物与试剂

链脲佐菌素(streptozocin, STZ),通心络超微粉(主药为人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍等,由河北以岭医药研究院有限公司提供),链脲佐菌素(美国, sigma),大鼠组织型纤溶酶原激活物 Elisa 试剂盒(CSB-E07917r,武汉华美),大鼠纤溶酶原激活物抑制因子(CSB-E07948r,武汉华美)。

1.3 仪器

CareSens POP 血糖仪(爱科来国际商贸有限公司),自动血液流变仪(LBY-N6K,北京普利生仪器有限公司),毛细血管黏度针(LBY-NW1,北京普利生仪器有限公司),血凝仪(C2000-4,北京普利生仪器有限公司),毛细管离心机(KH-120M,日本),台式离心机(TGL-16,上海安亭科学仪器厂),血小板聚集仪(LBY-NJ4,北京普利生仪器有限公司),卓越 320/330 全自动生化分析仪(上海科华实验系统有限公司)。

1.4 实验方案

本实验采用高脂饲料联合小剂量链脲佐菌素

建立 2 型 DN 大鼠模型,随机选取 SD 大鼠 10 只为空白组,其余 20 只大鼠予以高脂饲料饲养 4 周后,禁食 12 小时,按照 35 mg/kg 体重一次性腹腔注射 1% 的链脲佐菌素,72 小时后大鼠尾静脉取血测血糖,空腹血糖(fasting blood glucose, FBG) ≥ 16.7 mmol/L 视为糖尿病模型建立成功。造模成功的 SD 大鼠随机分为模型组(10 只,等量蒸馏水灌胃),通心络组[10 只,生药 0.4 g/(kg·d)灌胃];空白组(10 只,等量蒸馏水灌胃),实验期间自由进食饮水,连续给药 16 周。

1.5 标本收集及指标检测

给药 16 周末,各组大鼠尾静脉取血测定血糖。禁食 12 小时后,次日清晨末次给药后以 10% 的水合氯醛麻醉(0.35 mL/100 g),腹主动脉取血,部分血样用 3.8% 的枸橼酸钠抗凝,抗凝全血用于血小板、全血黏度的测定;部分血样 3000 r/min 离心 15 分钟以分离血浆,用于血浆黏度和血浆纤维蛋白含量的测定。部分血样不抗凝静置 2 小时后分离血清测定肌酐、血清尿素氮及纤溶调节因子测定。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(ONE WAY ANOVA),计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),多重比较,若方差齐采用 LSD 检验,方差不齐采用 Tamhane's T2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 通心络对 2 型 DN 大鼠血糖、体重、肾功能的影响

如表 1 所示,与空白组相比,模型组大鼠的血糖明显升高($P > 0.05$)、体重(body weight, BW)明显降低($P < 0.05$),通心络能升高 2 型 DN 大鼠体重,但对血糖没有影响($P > 0.05$)。与空白组相比,模型组大鼠的血肌酐、血尿素氮明显升高($P < 0.05$);通心络给药 16 周能够降低 DN 大鼠血肌酐、血尿素氮($P < 0.05$),提示通心络能够保护 2 型 DN 大鼠肾功能。

表 1 通心络对 2 型 DN 大鼠血糖、体重及肾功能的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	FBG (mmol/L)	BW (g)	BUN (mmol/L)	Scr (umol/L)
空白组	8	5.58±0.61	601.46±22.48	5.62±0.35	30.13±1.55
模型组	8	29.68±2.36 ^a	371.54±26.17 ^a	19.18±1.45 ^a	77.38±2.26 ^a
通心络组	8	29.40±2.40	422.80±10.07 ^b	14.68±1.00 ^b	58.63±1.41 ^b

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

表 2 通心络对 2 型 DN 大鼠血液流变学的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	全血黏度(mPa·s)		血浆黏度(mPa·s)	纤维蛋白原(g/L)	血小板聚集率(%)
		10 s ⁻¹ (低切)	200 s ⁻¹ (高切)			
空白组	8	6.26±1.35	3.53±0.23	1.23±0.29	2.99±0.80	43.13±3.46
模型组	8	11.27±1.83 ^a	6.09±0.35 ^a	1.60±0.34 ^a	5.83±1.13 ^a	51.39±5.34 ^a
通心络组	8	8.13±0.86 ^b	5.06±0.88 ^b	1.31±0.15 ^b	4.53±1.20 ^b	45.23±5.23 ^b

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。



注:A:空白组 B:模型组 C:通心络组

图 1 通心络对 2 型糖尿病大鼠肾组织超微结构的影响(Bar=1 μm, ×10000)

2.2 通心络对 2 型 DN 大鼠血液流变学的影响

如表 2 所示,与空白组相比,糖尿病大鼠高、低切变率下的全血黏度、血浆黏度、血浆纤维蛋白原含量、血小板聚集率均明显升高($P<0.05$)。与模型组相比,通心络干预降低上述血流变指标($P<0.05$),提示通心络可通过改变血液流变学特性,降低血液的高凝状态,增加肾组织的血液供应,改善肾内微循环。

2.3 通心络对 2 型 DN 大鼠纤溶调节因子 t-PA 及 PAI-1 表达的影响

如表 3 所示,与空白组相比,模型组血浆组织型纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, t-PA)降低,血浆纤溶酶原抑制物-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)增高;与模型组相比,给药 16 周时通心络组的血浆 T-PA 表达有升高的趋势($P>0.05$),PAI-1 明显降低($P<0.05$)。提示通心络可通过降低血浆 PAI-1 水平,改善 DN 晚期大鼠纤溶活性,增加肾组织的血液供应,改善肾内微循环。

表 3 通心络对 2 型 DN 大鼠纤溶调节因子 t-PA、PAI-1 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	t-PA (ng/mL)	PAI-1 (ng/mL)
空白组	8	6.23±3.68	3.90±3.68
模型组	8	3.10±2.41 ^a	25.94±17.89 ^a
通心络组	8	3.43±1.31	11.95±5.29 ^b

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.4 通心络对 2 型 DN 大鼠肾组织超微结构的影响

透射电镜观察可见:空白组肾小球、肾小管及肾间质结构清楚,肾小球基底膜均匀一致,足突排列整齐清晰,细胞外基质区大小及系膜细胞数量正常;模型组:肾小球基底膜节段性不规则增厚,足突变形、低平甚至脱落,系膜基质区扩大,系膜细胞增多,肾间质区可见纤维化表现。通心络组较模型组的病理变化程度有所减轻。见图 1。

3 讨论

本实验采用高糖高脂饮食加小剂量链脲佐菌

素注射建立 2 型 DN 动物模型, DN 以肾小球硬化及肾间质纤维化为主要病理特征, 临床表现为尿蛋白增多及肾功能进行性恶化, 本实验表明通心络具有保护肾功能、改善肾脏病理的作用。

DN 是糖尿病最常见的微血管并发症, 是导致终末期肾病的主要原因之一。目前认为, DN 会引起血管内皮细胞结构及功能损伤, 导致内皮细胞源性血管活性因子表达失调、血管舒缩功能失调、抗凝功能降低, 纤溶活性下降。血液流变学是反映血液循环的重要指标, 其变化反映血液黏滞性及凝固性的改变^[3]。本实验表明 DN 动物模型的全血黏度、血浆黏度、血小板聚集率以及纤维蛋白原均明显增加, 血液处于高粘高凝状态; 通心络干预可增加肾脏血流, 改善 DN 大鼠肾内微循环。tPA 和 PAI-1 是纤溶系统中非常关键的一对活性物质, tPA 是纤溶酶源激活剂, 而 PAI-1 是丝氨酸蛋白酶抑制剂, 可迅速与 tPA 结合使其失去活性, 抑制纤溶酶原转化为纤溶酶, 抑制血浆纤溶活性。另外, 纤溶酶减少可抑制细胞外基质的降解, 促进细胞外基质积聚, 进一步加重肾小球硬化和肾间质纤维化^[4]。本研究显示通心络能够减少血浆 PAI-1 含量, 增强纤溶活性, 减轻 DN 大鼠肾纤维化, 延缓 DN 进展。

DN 临床发病呈进行性进展, 迁延难愈, 易滞易瘀, 与络脉的结构运行及功能、发病特点相一致。吴以岭院士^[5]认为糖尿病肾病病机是气阴两虚、阴虚燥热、阴阳两虚, 消渴的早期是肺燥、胃热多见, 后期为肾虚, 并继发他脏病变, 影响气、血、水的运行, 导致气滞、血瘀、水停为病, 邪阻于肾络, 则肾络不畅, 从而产生络脉郁滞、络脉瘀阻、络脉瘀塞、络息成积等主要病理变化。本病属于“久病入络”“久病多瘀”, 可归属于“络病”范畴。瘀血内阻是糖尿病肾病的基本病理改变, 病在络脉是糖尿病肾病的中心环节。通心络是吴院士在络病理论指导下研发的中药复方, 主要成分包括人参、水蛭、全蝎、赤芍、蝉蜕、土鳖虫、蜈蚣、檀香、降香、乳香、酸枣仁、冰片等十二味中药, 全方有益气通络、活血化瘀之效。人参为君药, 气旺则血行, 肾络通畅, 水蛭入络活血、全蝎搜风通络止痉共为臣药; 佐以蝉蜕、土鳖虫、蜈蚣等通络虫类药收活血温通, 通络止痉之功, 冰片为使药。临床研究表明, 通心络能够降低 DN 患者尿蛋白、保护肾功能, 改善血流变特性^[6-7]。中药药理研究表明人参具有抗纤维化的作用, 全蝎、赤芍、水蛭具有抗凝、抗血栓、促纤溶、抑制血小板聚集的作用^[8-10]; 土鳖虫、降香具有抗凝血作用^[11-12]。通心络能够改善

DN 大鼠血液高凝高粘状态, 这与其他活血通络复方的研究是一致的^[13-15]。络病是冠心病及糖尿病微血管并发症等重大疾病的共性病理基础。通心络治疗冠心病疗效确切, 同时能够降低 DN 大鼠尿蛋白、保护肾功能, 其对心、肾的共同保护作用体现了中医“异病同治”的大法^[16]。

综上, 通心络具有抗凝、降纤的作用, 可降低血液的高凝高黏状态, 改善肾脏局部微循环灌注, 改善 DN 大鼠肾脏病理及保护肾功能, 延缓 DN 进展。

参 考 文 献

- [1] Wang L, Gao P, Zhang M, et al. Prevalence and Ethnic Pattern of Diabetes and Prediabetes in China in 2013[J]. JAMA, 2017, 317(24):2515-2523.
- [2] 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版)[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2015, 7(3):30.
- [3] 郭宏纪, 吴旭芳. 糖尿病患者的血流变、血脂、纤维蛋白原等各项指标的变化情况分析[J]. 中华全科医学, 2015, 13(11):1888-1889.
- [4] 韩业宏, 许筠. 血浆 tPA 和 PAI-1 与糖尿病肾病的关系[J]. 广东医学, 2013, 34(10):1631-1632.
- [5] 吴以岭. 络论[M]. 北京:中国科学技术出版社, 2010.
- [6] 李桂娥, 卢满祥, 苏翠娟, 等. 通心络对糖尿病肾病血流变学和尿蛋白的影响[J]. 现代食品与药品杂志, 2006, 16(5):22-23.
- [7] 龙轩, 王锋, 黄昶荃. 通心络胶囊治疗糖尿病肾病的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2010, 10(1):73-80.
- [8] 潘雪, 马端鑫, 李燕, 等. 水蛭药理作用的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2015, 43(14):24-25.
- [9] 史磊, 张天锡, 杜聪颖, 等. 中药全蝎活性成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(4):89-91.
- [10] 陆小华, 马晓, 王建, 等. 赤芍的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(4):595-602.
- [11] 王立娜, 王颖, 朱明珠, 等. 土鳖虫的活性成分及药理研究进展[J]. 化工时刊, 2017, 31(6):34-36.
- [12] 郭丽冰, 黄丽容, 赵丽华, 等. 降香行气止痛、活血止血有效部位的药理筛选[J]. 中药材, 2007, 30(6):696-698.
- [13] 白璐, 张江华, 张晋升, 等. 益气养阴活血通络方对糖尿病肾病患者糖、脂代谢及血流变的影响[J]. 河北中医药学报, 2016, 31(3):9-11.
- [14] 杨芳, 李敬林, 生生, 等. 益气解毒活络中药复方对早期糖尿病肾病大鼠血流变和纤维蛋白原的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(2):265-267.
- [15] 吴中秋, 谭宏文, 丁敏, 等. 逐瘀通络粉对早期糖尿病肾病患者血流变及尿微量白蛋白排泄率的影响[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(10):31-33.
- [16] 刘红利, 郎艳松, 王宏涛. 通心络胶囊治疗心血管疾病研究进展[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(15):1769-1772.

(收稿日期: 2017-09-26)

(本文编辑: 王馨瑶)