

# 丹蛭降糖胶囊对糖尿病动脉硬化模型大鼠胸主动脉 p22phox mRNA、p47phox mRNA 表达的影响

罗云<sup>1</sup>, 方朝晖<sup>2</sup>

1. 杭州市余杭区中医院, 浙江 杭州 311106; 2. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031

**[摘要]** 目的: 探讨益气养阴活血方丹蛭降糖胶囊 (DJC) 对糖尿病大血管病变的作用机制。方法: SD 雄性大鼠 60 只, 适应性喂养 1 周, 随机分为空白对照组 10 只与造模组 50 只。空白对照组予普通饲料喂养。造模组按 70 万 IU/kg 的总剂量灌胃维生素 D3, 分 3 天给完, 同时高脂饲料喂养, 诱发快速动脉硬化化的大鼠模型, 4 周以后, 采用 35 mg/kg 链脲佐菌素 (STZ) 腹腔注射, 诱发糖尿病合并动脉硬化大鼠模型, 最终造模成功的大鼠随机分为模型组, DJC 低、中、高剂量组, 分别予以相应药物灌胃, 疗程 12 周。检测治疗前后大鼠空腹血糖 (FBG)、胸主动脉 p22phox mRNA 及 p47phox mRNA 的表达。结果: 与空白对照组比较, 模型组大鼠治疗前后 FBG 水平显著升高, 胸主动脉 p22phox mRNA、p47phox mRNA 表达水平升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与治疗前比较, DJC 中、高剂量组大鼠 FBG 降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, DJC 中、高剂量组大鼠 FBG 水平降低, 胸主动脉 p22phox mRNA、p47phox mRNA 表达降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与 DJC 低剂量组比较, DJC 中、高剂量组大鼠 FBG 水平较低, 胸主动脉 p22phox mRNA、p47phox mRNA 表达较低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 丹蛭降糖胶囊能够降低糖尿病大鼠 FBG, 降低胸主动脉 p22phox mRNA 和 p47phox mRNA 的表达, 抑制氧化应激, 从而有效防治和延缓糖尿病大血管病变。

**[关键词]** 糖尿病大血管并发症; 丹蛭降糖胶囊; 益气养阴活血; p22phox mRNA; p47phox mRNA; 动物实验; 大鼠

**[中图分类号]** R587.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 08-0005-04

**DOI:** 10.13457/j.cnki.jncm.2018.08.002

## Danzhi Jiangtang Capsules Has Effect on the Expression of p22phox mRNA and p47phox mRNA of Thoracic Aorta in Model Rats with Diabetic Arteriosclerosis

LUO Yun, FANG Zhaohui

**Abstract:** **Objective:** To explore the mechanism of Yiqi Yangyin Huoxue prescription and Danzhi Jiangtang capsules (DJC) on diabetic macroangiopathy. **Methods:** After conducting adaptive feeding to 60 cases of male SD rats for one week, divided them into the blank control group and the modeling group randomly, 10 cases and 50 cases in each group respectively. The blank control group was fed with normal diet. The modeling group was given vitamin D3 with a total dose of 700, 000 IU/kg by gavage in 3 days and was fed with high fat diet meanwhile to induce and establish rat models with rapid arteriosclerosis. After 4 weeks, 35 mg/kg STZ intraperitoneal injection was used to induce and establish rat models with diabetes and arteriosclerosis. Those rats with successful modeling were randomly divided into the model group, the DJC groups of low, middle and high dose, and were given corresponding drugs by gavage respectively for a course of 12 weeks. Detected the expression of fasting blood glucose (FBG) and p22phox mRNA and p47phox mRNA of thoracic aorta in rats before and after treatment. **Results:** Compared with that in the blank control group, the level of FBG in the model group was increased more significantly before and after treatment, and expression levels of p22phox mRNA and p47phox mRNA of thoracic aorta were increased, differences being significant ( $P < 0.01$ ). Levels of FBG in the DJC groups of middle and high dose were decreased when compared with those before treatment, the difference being significant ( $P < 0.01$ ). Compared with those in the model group, the levels of FBG and expression levels of p22phox mRNA and p47phox mRNA of thoracic aorta in the DJC groups of middle and high dose were decreased, differences being significant ( $P < 0.01$ ). Compared with those in the DJC group of low

**[收稿日期]** 2018-03-09

**[基金项目]** 国家中医药管理局中医药重点学科项目 (20091221); 国家科技部十二五科技支撑计划新安医学传承与发展研究项目 (2012BA126B00)

**[作者简介]** 罗云 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗内分泌代谢病学。

dose, levels of FBG and expression levels of p22phox mRNA and p47phox mRNA of thoracic aorta in the DJC groups of middle and high dose were lower, differences being significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Danzhi Jiangtang capsules can reduce fasting plasma glucose of rats with diabetes, reduce the expression of p22phox mRNA and p47phox mRNA of thoracic aorta, and inhibit oxidative stress, so as to effectively prevent, treat and delay diabetic macroangiopathy.

**Keywords:** Diabetic macrovascular complications; Danzhi Jiangtang capsules; Yiqi Yangyin Huoxue prescription; p22phox mRNA; p47phox mRNA; Animal experiment; Rats

糖尿病患病率及患病人数急剧上升,成为继心脑血管疾病、肿瘤之后第3大对人类健康构成严重危害的非传染性疾病。糖尿病大血管病变是糖尿病的主要并发症之一,主要累及心、脑、下肢等外周大血管,是糖尿病致死致残的主要原因。既往研究证实益气养阴活血方丹蛭降糖胶囊(DJC)可以降低血糖,调控血脂,改善胰岛素抵抗,调控炎症因子,防治糖尿病血管并发症<sup>[1-6]</sup>。本研究探讨DJC对糖尿病动脉硬化模型大鼠p22phox、p47phox mRNA表达的影响及其作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 健康雄性SD大鼠60只,清洁级,体质量( $210.45 \pm 4.26$ )g,由安徽省实验动物中心提供[SCXK(皖):2011-002]。动物饲养在安徽中医药大学第一附属医院实验中心动物房,室内温度控制在 $18 \sim 22^\circ\text{C}$ ,湿度 $40\% \sim 70\%$ ,分笼喂养,给予充足的饲料及饮用水。

**1.2 药物和试剂** DJC(安徽中医药大学第一附属医院,批号:20131126);链脲佐菌素(STZ)(美国Sigma公司); $0.1 \text{ mmol/L}$ 柠檬缓冲液(北京夏斯生物技术有限公司);柠檬酸/柠檬酸钠(国药集团化学试剂有限公司);引物(invitrogen公司); $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (华绿渊生物公司);dNTP(Promega公司);两步法qRT-PCR试剂盒(Thermo公司);SOD、GSH-px、ET、一氧化氮(NO)检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司)。

**1.3 仪器** 血糖仪、试纸(美国强生公司);普通PCR仪(杭州晶格科学仪器有限公司);电泳仪(Tanon EPS 300型);全自动生化分析仪(日本日立公司);高速台式冷冻离心机(安徽嘉文仪器设备有限公司);三洋 $-80^\circ\text{C}$ 低温冰柜(日本SANYO公司);温度梯度基因扩散仪(德国MIONETRA);紫外凝胶成像系统(北京科创锐新生物科技有限公司);微量移液器、排枪(德国Eppendorf);切片机(德国LEICA公司);全自动封闭式组织脱水机、包埋机、组织漂烘仪(常州市中威医疗仪器有限公司)。

**1.4 造模及分组** SD雄性大鼠60只,适应性喂养1周,随机分为空白对照组10只与造模组50只。空白对照组予普通饲料喂养。造模组按 $70 \text{ IU/kg}$ 的总剂量灌胃维生素D3,分3天给完,同时高脂饲料喂养,诱发快速动脉硬化大鼠模型<sup>[7]</sup>。4周以后,采用 $35 \text{ mg/kg}$  STZ腹腔注射,诱发糖尿病合并动脉硬化大鼠模型。注药72 h以后,所有大鼠禁食不禁水12 h测量血糖,同时,随机选取空白组大鼠1只和模型组大鼠2只并处死,取胸主动脉 $2 \sim 3 \text{ cm}$ ,用于观察主动脉粥样硬化

病变及其程度,将出现动脉硬化病变及血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol/L}$ 确定为造模成功<sup>[8]</sup>。模型大鼠继续给予高脂饲料喂养一直到实验结束为止。最终造模成功的大鼠总共有39只,将这些大鼠按照随机化原则分为4组,分别为模型组,丹蛭降糖胶囊(DJC)低、中、高剂量组,大鼠数量分别为9、10、10、10只。

**1.5 给药方法** 按单位体质量剂量来算,大鼠的等效剂量相当于人的6.3倍<sup>[9]</sup>。将等效剂量定为DJC中剂量,DJC中剂量的 $1/2$ 、 $2$ 倍分别为DJC低剂量和高剂量,计算出DJC低、中、高剂量分别为 $0.235$ 、 $0.470$ 、 $0.940 \text{ g/(kg} \cdot \text{d)}$ 。空白对照组和模型组予生理盐水 $5 \text{ mL/(kg} \cdot \text{d)}$ 灌胃,灌胃时间均为12周。

**1.6 胸主动脉病理组织学检测** 分离胸主动脉,取 $2 \sim 3 \text{ cm}$ ,置于 $10\%$ 中性福尔马林缓冲液。酒精脱水,中性树胶封片,常规石蜡切片,HE染色,光镜观察血管内皮细胞的损伤程度。

**1.7 空腹血糖(FBG)测定** 药物治疗前后,用美国强生血糖仪测定大鼠尾静脉血糖。

**1.8 胸主动脉 p22phox mRNA、p47phox mRNA 表达检测** 取大鼠胸主动脉,提取总RNA后进行逆转录反应,qRNA扩增,以GAPDH作为内参。p22phox引物上游:5'-TTGTTGCAGGAGTGCTCATC-3',下游:5'-TGGGCCATTTCTGTGTGTA-3',产物片段 $282 \text{ bp}$ ;p47phox引物上游:5'-CCCAGCGACAGATTAGAAGC-3',下游:5'-TGACTGCCTCCTCATCCT-3',产物片段 $475 \text{ bp}$ ;GAPDH引物上游:5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTG-3',下游:5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3',产物片段 $496 \text{ bp}$ 。采用自动电泳凝胶成像分析仪分析。

**1.9 统计学方法** 采用SPSS17.0软件处理,正态分布计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,非正态分布的数据通过对数变换使其接近正态分布;多个均数间比较采用方差分析,两样本比较采用 $t$ 检验;计数资料用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠一般情况** 造模过程中,总共有9只大鼠没有达到高血糖标准;模型组死亡1只,发现腹部有撕咬伤口,考虑打斗致死;DJC低剂量组死亡1只,发现尾部破溃糜烂,考虑继发感染致死;DJC高剂量组死亡1只,未发现特殊异常,死因无法判断。最后结束时,空白对照组、模型组、DJC低剂量组、DJC中剂量组、DJC高剂量组的数量分别为:9、8、9、10、9只。

2.2 糖尿病动脉硬化大鼠模型的评价 见图1,图2。HE染色切片显示,空白对照组(A)大鼠主动脉内膜光滑,无局部缺损;内皮细胞完整;中膜层平滑肌细胞排列整齐,无增生现象。造模组(B)大鼠主动脉内膜有明显损伤,连续性被破坏;内皮细胞部分脱落,细胞体积和细胞间的连接间隙增大;中膜平滑肌排列紊乱,内皮细胞受损明显,说明造模成功。

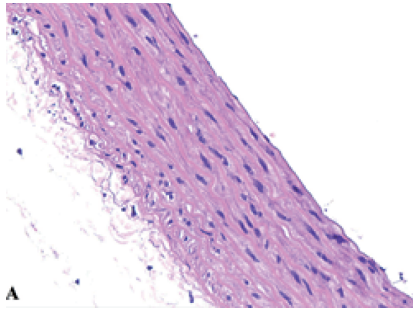


图1 空白对照组大鼠胸主动脉组织 HE 染色切片结果(x400)

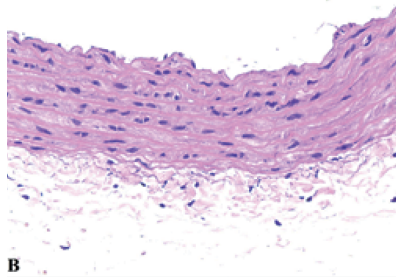


图2 造模组大鼠胸主动脉组织 HE 染色切片结果 (x400)

2.3 各组大鼠治疗前后 FBG 水平比较 见表1。与空白对照组比较,模型组大鼠治疗前后 FBG水平显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与治疗前比较, DJC 中、高剂量组大鼠 FBG降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,治疗后 DJC 中、高剂量组大鼠 FBG水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与 DJC 低剂量组比较,治疗后 DJC 中、高剂量组大鼠 FBG水平较低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表1 各组大鼠治疗前后 FBG 水平比较( $\bar{x} \pm s$ ) mmol/L

组别	n	治疗前	治疗后
空白对照组	9	4.89 ± 0.78	4.49 ± 0.52
模型组	8	21.01 ± 3.12 <sup>①</sup>	20.23 ± 2.45 <sup>①</sup>
DJC 低剂量组	9	21.00 ± 3.04	19.71 ± 2.81
DJC 中剂量组	10	20.82 ± 3.11	14.57 ± 3.34 <sup>②③④</sup>
DJC 高剂量组	9	20.76 ± 3.24	14.73 ± 3.00 <sup>②③④</sup>

与空白对照组比较, ① $P < 0.01$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.01$ ; 与 DJC 低剂量组比较, ③ $P < 0.05$ ; 与治疗前比较, ④ $P < 0.01$

2.4 各组大鼠 p22phox mRNA、p47phox mRNA 表达比较 见表2,图3。与空白对照组比较,模型组大鼠胸主动脉 p22phox mRNA、p47phox mRNA 表达水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较, DJC 低、中、高剂量组大鼠胸主动脉 p22phox mRNA、p47phox mRNA 表达降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与 DJC 低剂量组比较, DJC 中、高剂量组大鼠胸主动脉 p22phox mRNA、p47phox mRNA 表达较低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表2 各组大鼠 p22phox mRNA、p47phox mRNA 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	p22phox mRNA	p47phox mRNA
空白对照组	9	0.50 ± 0.02	0.49 ± 0.02
模型组	8	1.09 ± 0.04 <sup>①</sup>	1.09 ± 0.02 <sup>①</sup>
DJC 低剂量组	9	0.84 ± 0.01 <sup>②</sup>	0.89 ± 0.04 <sup>②</sup>
DJC 中剂量组	10	0.70 ± 0.03 <sup>②③</sup>	0.71 ± 0.02 <sup>②③</sup>
DJC 高剂量组	9	0.65 ± 0.02 <sup>②③</sup>	0.67 ± 0.04 <sup>②③</sup>

与空白对照组比较, ① $P < 0.01$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.01$ ; 与 DJC 低剂量组比较, ③ $P < 0.01$

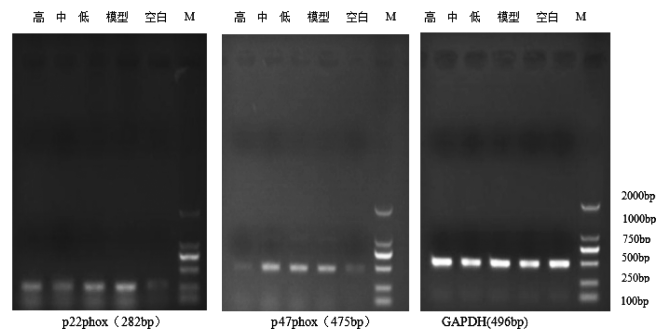


图3 各组大鼠 p22phox mRNA、p47phox mRNA 表达结果

### 3 讨论

血管内皮功能损伤是糖尿病血管并发症的发病基础,也是2型糖尿病(T2DM)大血管病变一个重要的初始步骤<sup>[9]</sup>。糖尿病患者长期的高糖状态及持续的血糖波动,导致体内抗氧化活性物质减少,氧化应激引起血管内皮炎症,损伤血管内皮功能<sup>[10]</sup>。有研究结果显示,高糖状态通过上调促血管生成素2(Ang-2)表达,下调血管内皮生长因子(VEGF)表达,抑制血管内皮细胞形成血管样结构的能力<sup>[11]</sup>。血浆内皮素-1(ET-1)、NO是反映内皮功能的重要指标,NO是血管舒张因子,ET-1可收缩各种血管,两种因子的相互协调维护正常的血管张力,若此种平衡被打破,导致内皮依赖性血管舒张功能受损,促成或加重血管病变<sup>[12]</sup>。

氧化应激是机体在受到内外环境有害因素刺激后,体内的活性氧簇被诱发生成,起初机体自身调节机制可以将其清除,但随着生成的日益增多,过剩的那部分便会对机体造成巨大的

损害。血管组织中的氧化应激可以造成血管内皮功能损伤,导致内皮依赖性舒张功能损伤<sup>[13]</sup>。高糖诱导细胞凋亡的主要因素是氧化应激。在高糖环境下,活性氧(ROS)形成增多,通过激活多元醇、蛋白激酶 C(PKC)、JNK、PI3K/AKT 等信号通路诱发内皮细胞造成内皮功能障碍<sup>[14]</sup>。超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)是反映机体抗氧化能力的常用指标,糖尿病合并血管并发症患者 SOD 和 GSH-px 水平会出现不同程度的降低<sup>[15]</sup>。NADPH 氧化酶是一种过氧化物酶,是体内 ROS 的重要来源之一。p22phox、p47phox 是 NADPH 的两个重要亚基, p22phox、p47phox mRNA 的表达水平与体内氧化应激的强弱有密切的关系。

方朝晖教授针对 T2DM 大血管病变做了诸多的理论文献研究,在总结前人经验的基础上,并结合多年的临床实践积累,认为 2 型糖尿病大血管病中医病机多为“气虚阴亏血瘀”,治疗当以益气养阴活血为大法,据此创制出丹蛭降糖胶囊。丹蛭降糖胶囊以牡丹皮、水蛭行气活血,化瘀通络;太子参补益脾胃之气;生地黄滋养脾胃之阴,菟丝子补肾固精;泽泻清热泻痰浊。全方阴阳互济,补通兼施,寒温并调,补不碍邪,攻不伤正,共奏益气养阴、活血通络之功。

本研究结果显示,丹蛭降糖胶囊干预 12 周后,能够降低糖尿病大鼠血糖,降低胸主动脉 p22phox mRNA 和 p47phox mRNA 的表达,抑制氧化应激,提示丹蛭降糖胶囊在防治糖尿病大血管并发症上具有广大前景,值得临床推广应用。

#### [参考文献]

- [1] 陈明卫,夏同佳,方朝晖,等.丹蛭降糖胶囊改善高脂饮食诱导的肥胖大鼠骨骼肌胰岛素抵抗机制的初步研究[J].中华临床医师杂志:电子版,2014,8(9):1697-1702.
- [2] 方朝晖,赵进东,鲍陶陶,等.丹蛭降糖胶囊对 2 型糖尿病患者 FINS 和 IRI 作用有效性的系统评价[J].世界中医药,2014,9(12):1679-1681.
- [3] 刘珊珊,李中南,许成群,等.丹蛭降糖胶囊对糖尿病大鼠血清 TNF- $\alpha$  和 CXCL-5 的影响[J].安徽中医药大学学报,2014,33(6):58-61.
- [4] Zhao Huifang, Yan Liu, Jian Liu, et al. Effect of Danzhi-jiangtang capsule on monocyte chemoattract protein-1 mRNA expression in newly diagnosed diabetes subclinical vascular lesions[J]. World Gastroenterol, 2013, 19(19): 2963-29683.
- [5] 江婷,方朝晖,郭呈林,等.丹蛭降糖胶囊联合生活方式干预 2 型糖尿病患者颈动脉斑块的临床观察[J].成都中医药大学学报,2014,37(1):56-59.
- [6] 吴吉萍,方朝晖,倪英群.益气养阴活血中药对 2 型糖尿病合并血管病变的干预研究[J].安徽医药,2014,18(4):735-737.
- [7] 温进坤,韩梅,杜玮南,等.一种快速建立大鼠动脉粥样硬化模型的实验方法[J].中国老年学杂志,2001,21(1):50-52.
- [8] 魏伟.药理实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2010:212.
- [9] 刘毅,李志梁,江腾春,等.黄芪多糖对 2 型糖尿病患者内皮功能的影响[J].中国当代医药,2015,22(3):110-112.
- [10] 王亚双,吕肖锋,张敏郁,等.血糖波动对 2 型糖尿病下肢血管病变患者血管内皮功能的影响及危险因素分析[J].解放军医药杂志,2014,26(8):21-24,28.
- [11] 林雪松,汪乐,乔亮.高糖及晚期糖基化终末产物环境对血管内皮细胞血管样结构形成的影响[J].上海交通大学学报:医学版,2014,34(5):596-602.
- [12] 郭敏,王玉晶,邱文丽,等.痛风患者血管内皮功能及颈动脉粥样硬化的临床研究[J].现代生物医学进展,2015,15(3):499-502.
- [13] 胡海燕,李跃艳,李春霞,等.ATP 敏感钾通道在丹参酮 II A 对抗高糖诱导血管内皮功能损伤中的作用[J].中国老年学杂志,2015,35(1):174-176.
- [14] 任蓓,潘澄,林鹏,等.高糖诱发氧化应激导致血管内皮细胞凋亡机制研究[J].海峡药学,2013,25(6):268-271.
- [15] 毛达勇,吕军,周有利,等.2 型糖尿病并血管病变患者血浆 GSH-PX、SOD、NO、NOS 含量的变化[J].微循环学杂志,2005,15(2):59-60.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)