

实验研究

归龙汤对糖尿病血管病变大鼠免疫机制的影响

魏丹蕾¹ 周毅业¹ 李思宁² 简小兵¹ 陶有青³ 王文英¹ 符路娣⁴ 赖圆瑾⁵

(1 广州市中医医院内分泌科, 广州, 510130; 2 广州中医药大学第一附属医院心血管科, 广州, 510405; 3 世界中医药学会联合会, 北京, 100101;

4 广州中医药大学实验动物中心, 广州, 510006; 5 广州中医药大学附属广州中医院内分泌科, 广州, 510130)

摘要 目的:探讨归龙汤对糖尿病血管病变大鼠免疫的影响。方法:将 80 只大鼠随机分为空白对照组、模型对照组、西洛他唑组、归龙汤(低、中、高)剂量组,并造糖尿病血管病变大鼠模型。空白对照组和模型对照组的大鼠每日喂饲蒸馏水;西洛他唑组每日喂饲西洛他唑片 1.67 mg/kg;归龙汤组予以不同剂量的归龙汤灌胃。用药 56 d 后,牺牲实验大鼠,测定大鼠血清中血糖及免疫指标的水平,同时取大鼠主动脉弓下段 2~3 cm 主动脉,在光镜下观察主动脉粥样硬化病变及其程度。结果:糖尿病血管病变大鼠的免疫指标中 IgM、IgA 和 C3 升高, IgG 降低。低、中、高剂量的归龙汤均能使糖尿病血管病变大鼠的免疫指标恢复正常。结论:归龙汤能够有效调节糖尿病血管病变大鼠免疫失衡状态。

关键词 归龙汤;糖尿病血管病变;免疫;大鼠

Effect of Guilong Decoction on Immune Mechanism of Rats with Diabetic AngiopathyWei Danlei¹, Zhou Yiye¹, Li Si'ning², Jian Xiaobing¹, Tao Youqing³, Wang Wenying¹, Fu Ludi⁴, Lai Yuanjin⁵

(1 Guangzhou Hospital of TCM, Guangzhou 510130, China; 2 The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese

Medicine, Guangzhou 510405, China; 3 World Federation of Chinese Medicine Societies, Beijing 100101, China;

4 Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 5 The Affiliated Guangzhou

TCM Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510130, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of Guilong decoction on the immune mechanism of rats with diabetic angiopathy. **Methods:** Eighty rats were randomly divided into blank control group, model control group, cilostazol group, Guilong (low, middle, high dose) group. Models of rats with diabetic angiopathy were made. Rats in the blank control group and the model control group were daily fed with distilled water. The cilostazol group daily fed rats with 1.67 mg/kg cilostazol; Guilong decoction group gave different doses of Guilong decoction. After 56 days, the experimental rats were killed, and the blood glucose and immune indices in serum of rats were detected. The atherosclerotic aortic lesions were observed under the microscope. **Results:** IgM, IgA and C3 immune indexes of diabetic angiopathy in rats were increased, IgG was decreased. The high, middle and low dose Guilong decoction could return the immune index in rats with diabetic angiopathy to normal. **Conclusion:** Guilong decoction can effectively regulate the immune imbalance of rats with diabetic angiopathy.

Key Words Guilong decoction; Diabetic angiopathy; Immune; Rats

中图分类号: R285.5; R587.1; R392.11 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.11.032

糖尿病足是糖尿病的严重并发症,具有患病率高、危害性大、可防难治的特点,加强对糖尿病足的早期干预有着非常重要的现实意义^[1]。大量的研究表明糖尿病及糖尿病足与免疫密切相关^[2-4],因此,通过调节糖尿病足患者的免疫状态,是防治该病的途径之一。为此,本研究建立糖尿病血管病变大鼠动物模型,用具有温阳养血活血作用的归龙汤对糖尿病血管病变大鼠进行干预,观察大鼠免疫相关指标: IgM、IgG、IgA、C3、C4 的水平变化,探讨归龙汤对糖尿病血管病变大鼠免疫因素的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 由广州中医药大学实验动物中心提供。SPF 级 SD 大鼠 80 只,雌雄各半,体质量 150~180 g,鼠龄 6~8 周。

1.2 药物与制剂

1.2.1 西洛他唑片 规格: 50 mg/片(国药准字 H20040579 号,西安大恒制药生产)。

1.2.2 归龙汤 组成: 当归尾 10 g, 赤芍 15 g, 桂枝 10 g, 地龙 12 g, 路路通 12 g, 细辛 6 g, 银杏叶 12 g。制法: 由广州市中医医院煎药室浓缩煎煮成汤剂,再分别配

成含生药浓度为 4 g/mL 煎剂作归龙汤高剂量,含生药浓度为 2 g/mL 煎剂作归龙汤中剂量,含生药浓度为 1 g/mL 煎剂作归龙汤低剂量,然后放入 4 ℃ 冰箱备用。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组 分为空白对照组($n=10$),模型对照组($n=10$),西洛他唑组($n=15$)、归龙汤低剂量组($n=15$)、归龙汤中剂量组($n=15$)、归龙汤高剂量组($n=15$)。

1.3.2 糖尿病血管病变大鼠模型制备 随机抽取 70 只大鼠给予高糖高脂饲料(普通饲料 67.5%、蔗糖 20%,精炼猪油 10%、胆固醇 2.0%、猪胆盐 0.3%,丙基硫氧嘧啶 0.2%),并给予 10 mg/(kg·d)一氧化氮合成酶(Nitric Oxidesynthase, NOS)抑制剂-L-精氨酸甲酯(L-NAME)灌胃;其余 10 只大鼠作为空白对照组予普通饲料饲养;每只大鼠共饲养 28 d。第 29 d,所有高糖高脂饮食大鼠禁食 ≥ 10 h 后腹腔注射 STZ 25~30 mg/kg,空白对照组大鼠注入同体积的柠檬酸钠缓冲液。注射后 72 h,测各鼠 FBG 或 OGTT-2hBG。FBG ≥ 7.8 mmol/L 或 2hBG ≥ 11.1 mmol/L 的提示糖尿病大鼠造模成功。糖尿病大鼠按体重和血糖值分入模型对照组、西洛他唑组、归龙汤低、中、高剂量组,继续喂饲高糖高脂饲料及 L-NAME 灌胃,连续 28 d,翌日检测所有大鼠的空腹血糖,同时抽取 2 只模型对照组大鼠并处死,取主动脉弓下段 2~3 cm 主动脉,用于观察主动脉粥样硬化病变及其程度,判断糖尿病血管病变大鼠是否成模。

1.3.3 糖尿病血管病变大鼠成模标准 从以下两方面判定糖尿病血管病变大鼠模型是否成功。1)血糖:FBG ≥ 7.8 mmol/L 或 2hBG ≥ 11.1 mmol/L。2)取实验大鼠主动脉弓下段 2~3 cm 主动脉,主动脉于 10% 中性甲醛溶液中固定 48 h 后进行脱水、石蜡包埋后切片作常规 HE 染色,在光镜下观察主动脉粥样硬化病变及其程度。光镜下如可见内皮细胞肿胀,其下聚集大量泡沫细胞,平滑肌细胞排列紊乱,弹力纤维断裂,血栓形成,证实动脉内膜粥样硬化典型病变。

1.3.4 给药方法 糖尿病血管病变大鼠成模后,空白对照组和模型对照组每日喂饲蒸馏水,西洛他唑组每日喂饲西洛他唑片 1.67 mg/kg,归龙汤高、中、低剂量组每日分别给予高、中、低剂量的归龙汤 4 mL 灌胃,共用药 56 d。

1.3.5 血清标本采集和检测 给药至第 56 天禁食 ≥ 10 h,第 57 天用血糖仪测全血 FBG 后,对照组和药物组分别静脉注射 2.78 mol/L 葡萄糖溶液或葡萄糖-药物混合液 20 mL/kg 后 2 h,测 2 hBG,随后喂食至

22:00。全部实验动物禁食 ≥ 10 h,翌日取血,血标本于 1 h 内以 3 000 r/min 离心 10 min,取血清保存于 -20 ℃ 冰箱内待测,所有标本收集完成后同批测定以减少批间差异。采用常规生化、ELISA 或 RIA 方法检测各组大鼠 FBG、IgM、IgG、IgA、C3、C4。

1.3.6 统计学方法 采用 SPSS 11.5 数据统计软件进行数据处理,计量资料分别采用配对 t 检验和组间 t 检验或方差分析;计量资料采用 χ^2 检验;等级资料采用秩和检验,分别统计实验数据的统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病血管病变大鼠造模成功后大鼠存活情况

按照实验设计,造模前,空白对照组和模型对照组分别入选 10 只,其他 4 组各入选 15 只。但由于本实验在糖尿病血管病变大鼠成模前未对高血糖等因素予以干预,在糖尿病大鼠或糖尿病血管病变大鼠成模前,除空白对照组外,其余 5 组均有实验大鼠死亡或被处死,故实际用药大鼠相应减少。实验不同阶段大鼠的数量详见表 1。

表 1 实验不同阶段各组内大鼠的数量(只)

组别	造模前预设	糖尿病血管病变大鼠成模时	实验结束时
空白对照组	10	10	10
模型对照组	10	8	7
西洛他唑组	15	15	13
归龙汤低剂量组	15	13	12
归龙汤中剂量组	15	14	11
归龙汤高剂量组	15	13	13

表 2 糖尿病大鼠成模时各组空腹血糖水平的比较 (mmol/L)

组别	只数	空腹血糖
空白对照组(S1)	10	5.95 $\pm$ 0.24
模型对照组(S2)	8	25.6 $\pm$ 2.86*
西洛他唑组(S3)	15	23.6 $\pm$ 3.09*
归龙汤低剂量组(S4)	13	25.58 $\pm$ 1.57*
归龙汤中剂量组(S5)	14	24.55 $\pm$ 2.27*
归龙汤高剂量组(S6)	13	23.96 $\pm$ 2.94*

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$ 。

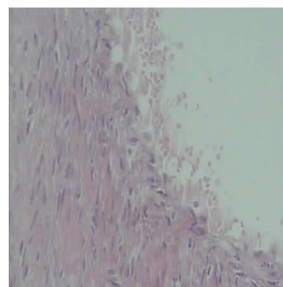


图 1 主动脉血管内皮细胞肿胀增生

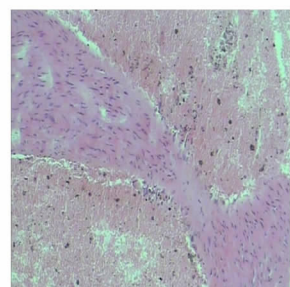


图 2 主动脉内血栓形成

表 3 用药前后各组糖尿病血管病变大鼠空腹血糖水平的比较 (mmol/L)

组别	糖尿病血管病变大鼠成模时 FBG	用药结束后 FBG
空白对照组	5.56 ± 0.44	5.48 ± 0.55
模型对照组	26.99 ± 3.25 *	25.05 ± 2.19 *
西洛他唑组	25.21 ± 3.58 *	24.79 ± 3.65 *
归龙汤低剂量组	26.46 ± 2.35 *	25.92 ± 3.39 *
归龙汤中剂量组	26.65 ± 3.30 *	24.51 ± 2.31 *
归龙汤高剂量组	25.85 ± 3.16 *	24.37 ± 3.22 *

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 糖尿病血管病变大鼠模型评价

2.2.1 血糖水平评价 模型对照组、西洛他唑组、归龙汤低剂量组、归龙汤中剂量组、归龙汤高剂量组的空腹血糖均大于 7.8 mmol/L,与空白对照组比较,明显升高,差异有统计学意义,但这 5 个组之间的空腹血糖差异无统计学意义,见表 2。

2.2.2 主动脉粥样硬化病变及其程度 光镜下观察大鼠主动脉标本,可见内皮细胞肿胀增生,主动脉内血栓形成(见图 1 和图 2),说明造模成功。

2.3 归龙汤对糖尿病血管病变大鼠 FBG 的影响 表 3 提示与空白对照组相比,其他各组在用药前和用药后的空腹血糖均明显升高,且有统计学意义,但西洛他唑组及归龙汤低、中、高剂量组的组内空腹血糖在用药前后差异无统计学意义,说明西洛他唑片和归龙汤都

不具降血糖作用。

2.4 归龙汤对糖尿病血管病变大鼠免疫指标的影响

表 4 中模型对照组、西洛他唑组及归龙汤低、中、高剂量组与空白对照组的免疫指标比较后提示,糖尿病血管病变大鼠存在 IgM、IgA 和 C3 升高, IgG 降低, C4 变化不明显,大部分免疫指标的变化,说明糖尿病血管病变大鼠的机体存在免疫异常。经使用归龙汤后,归龙汤低、中、高剂量组的 IgM、IgG、IgA 和 C3 与空白对照相应的免疫指标的水平无统计学意义,说明低、中、高剂量的归龙汤均能使糖尿病血管病变大鼠的免疫指标恢复正常。使用低、中、高剂量的归龙汤均能降低 IgM,这 3 组的 IgM 水平较模型对照组低,且差异有统计学意义。低、中、高剂量的归龙汤组均能升高 IgG,与模型对照组的 IgG 比较,归龙汤中、高剂量组更为明显,且差异有统计学意义。归龙汤的不同剂量组均能降低糖尿病血管病变大鼠的 IgA 和 C3,在降低 IgA 方面,与模型对照组比较有差异,且有统计学意义,但不同剂量的归龙汤 3 组间无统计学意义;与模型对照组比较,只有中、高剂量的归龙汤能够有效降低 C3。与模型对照组比较,西洛他唑组的 IgA 有降低,且比较有统计学意义,但不能降低 IgM、C3 或升高 IgG,说明西洛他唑片不能从总体上改善糖尿病血管病变大鼠免疫异常状态。

表 4 各组用药后免疫指标水平的比较 (g/L)

组别	只数	IgM	IgG	IgA	C3	C4
空白对照组	10	1.72 ± 0.38	13.02 ± 2.37	1.79 ± 0.62	0.97 ± 0.16	0.23 ± 0.11
模型对照组	7	2.57 ± 0.46 *	10.54 ± 2.26 *	2.86 ± 0.59 *	1.23 ± 0.27 *	0.31 ± 0.13
西洛他唑组	13	2.43 ± 0.51 *	10.29 ± 2.15 *	2.38 ± 0.64 * [△]	1.27 ± 0.24 *	0.29 ± 0.16
归龙汤低剂量组	12	1.97 ± 0.39 ^{△▲}	12.24 ± 2.46 [▲]	2.03 ± 0.52 [△]	1.16 ± 0.28	0.27 ± 0.12
归龙汤中剂量组	11	1.83 ± 0.42 ^{△▲}	13.17 ± 2.32 ^{△▲}	1.74 ± 0.58 [△]	0.94 ± 0.13 ^{△▲■}	0.24 ± 0.15
归龙汤高剂量组	13	1.78 ± 0.36 ^{△▲}	13.06 ± 2.24 ^{△▲}	1.83 ± 0.67 [△]	0.98 ± 0.16 ^{△▲■}	0.23 ± 0.14

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与模型对照组比较, [△] $P < 0.05$;与西洛他唑组比较, [▲] $P < 0.05$;与归龙汤低剂量组比较, [■] $P < 0.05$ 。

3 讨论

糖尿病与免疫的关系已有诸多的研究,免疫调节异常可能在糖尿病发生发展过程中起核心作用^[5-7]。近年来随着对糖尿病足研究的深入,大量的研究表明糖尿病的血管病变与周围神经病变均与免疫密切相关^[8-10]。糖尿病足患者可能存在免疫系统的损害,其表现为一种渗出性和坏死性炎症,全身及局部可能存在免疫失衡^[11]。徐冬岩^[12]研究显示单纯糖尿病组和糖尿病足部感染组血清 IgG 较健康老年人组明显下降,且以单纯糖尿病组下降更为显著, IgA 和 IgM 水平在 3 组间无统计学意义。本课题组在前期研究中也发现:与单纯糖尿病患者及健康人比较,0 级糖尿病足患

者存在明显的免疫失衡状态^[13]。这些研究提示我们改善糖尿病足者免疫失衡状态,可以早期干预糖尿病足和预防糖尿病足溃疡的发生。

中医学认为阳气损伤是糖尿病足形成的重要病机^[14]。归龙汤为当归四逆汤加味而成,其中当归四逆汤出自张仲景的《伤寒论》,当归四逆汤具有温经散寒、养血通脉功效^[15]。归龙汤在当归四逆汤的基础上加银杏叶、地龙、路路通,去木通、甘草、大枣组成,诸药合用,活血通络而无伤阴之弊,寒温并用既不温燥耗津,又不寒凉留滞,共奏温阳养血,活血通络之功。

本研究证实具有温阳养血活血作用的归龙汤能够

(下接第 1527 页)

靶点、多途径、多作用的结果。温病湿热模型的湿与热偏重不同^[12]也影响着 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量^[13]。有报道表明在轮状病毒感染时宿主发生特异性和非特异性免疫反应,而 IL-6、IL-1 β 以及 TNF- α 是感染早期非特异性及随后发生的抗原特异性免疫间的功能性桥梁,在不同时期其含量也不同^[14]。实验药物的剂量对中医药治疗疾病也有重要影响^[15]。

通过实验可以认定王氏连朴饮加滑石、黄芩;茵达日-4 味汤在解除湿热症状上有切实可靠的作用。对腹腔炎症反应引起的发热及炎症反应,在动物模型治疗后期各项体征监测都有好转。中药治疗组对温病发热炎症反应模型血清 TNF- α 检测 P 值 <0.01 ,有明显统计学意义,蒙药治疗组对温病发热炎症反应模型血清 TNF- α 、IL-6 比较可看出 $P<0.01$ 、 $P<0.05$,有显著统计学意义。此结果进一步揭示了王氏连朴饮加滑石、黄芩;茵达日-4 味汤在抗炎中分子生物学的作用机制。中药治疗组对温病发热炎症反应模型血清 IL-1 β 、IL-6 检测 $P>0.05$,无统计学意义;蒙药治疗组对温病发热炎症反应模型血清 IL-1 β 、 $P>0.05$ 不具有统计学意义,推测这可能与 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 在机体中作用时间、在血清中存在时段不同有关,或药物达到预定效果治疗时间不够等有关。

参考文献

- [1]周璇,程方平.清热化湿方对温病湿热证模型大鼠血清 TNF- α IL-1 β SIgA 的影响[J].辽宁中医药大学学报,2007,9(2):142-143.
- [2]陈奇.中药药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,1994:436-437.

(上接第 1523 页)

降低糖尿病血管病变大鼠的 IgM、提升其 IgG,有效调节了糖尿病血管病变大鼠免疫状态。

参考文献

- [1]陆再英,钟南山.内科学[M].7 版.北京:人民卫生出版社,2008:659-660.
- [2]王云飞,阙华发.不同中医证型糖尿病足坏疽患者血管内皮与血小板及免疫功能指标的变化[J].上海中医药大学学报,2010,24(2):37-40.
- [3]周有利,毛达勇.2 型糖尿病并血管病变患者免疫功能研究[J].微循环学杂志,2004,14(3):56-57.
- [4]林敏,陈平.2 型糖尿病足坏疽患者血清免疫球蛋白及 IgG 亚类的观察[J].四川医学,2002,23(9):904-905.
- [5]GUPTA D,VARMA S,KHANDELWAL R L. Long term effects of tumor necrosis factor alpha treatment to ninsulin signaling pathway in HepG2 cells and HepG2 cells overexpressing constitutively active Akt/PKB[J]. J Cell Bio Chem,2007,100(3):593-607.
- [6]周智广.应重视糖尿病免疫学的研究与应用[J].中国糖尿病杂志,2006,14(4):241-242.

- [3]吴仕九,杨运高,杨钦河,等.温病湿热证动物模型的研制及清热祛湿法机理的探讨[J].中国中医药科技,1999,6(2):65-67,5.
- [4]林兴栋,刘叶,李华锋,等.2 种不同生物致病因子致温病湿热证动物模型分子免疫学特征研究[J].新中医,2012,44(12):135-137.
- [5]张志明,刘叶,金冬梅.温病湿热证与免疫功能关系的研究进展[J].中华中医药学刊,2014,32(1):99-101.
- [6]武凯歌,文小敏,洪冰,等.王氏连朴饮对脾胃湿热证大鼠血清 IL-2、IL-6 等的影响[J].江苏中医药,2010,42(5):71-72.
- [7]唐晓峰,薛漫清,王晖,等.大鼠发热模型及发热机制的研究进展[J].广东药学院学报,2009,25(3):327-封3.
- [8]Kozak W,Kluger MJ,Soszynski D,et al. IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice[J]. Ann N Y Acad Sci,1998,29(856):33-34.
- [9]周林,杨慧,艾有生,等.中药单体抗 TNF- α 介导的炎症反应机制研究进展[J].南昌大学学报:医学版,2013,53(3):72-75,78.
- [10]田中秋,邓立普. TNF- α 、IL-6 在全身炎症反应综合征表达的研究进展[J].蛇志,2008,20(4):275-278.
- [11]赵威,宋群利,叶仁群,等.加味胃苓汤治疗湿热型原发性肾病综合征水肿期疗效及其对炎症因子的影响[J].广州中医药大学学报,2014,31(1):28-31.
- [12]何雪萍,吕军影,阙铁生,等.清热祛湿法对温病湿热证大鼠舌及胃组织 AQP-1 表达的影响[J].时珍国医国药,2014,25(6):1515-1519.
- [13]温珠明,曾代文.炎症性肠病湿热转化的免疫学基础研究[J].实用医院临床杂志,2013,10(3):50-53.
- [14]布月青,董胜英.轮状病毒肠炎 IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α 的变化及意义[J].实用预防医学,2006,13(4):859-861.
- [15]谭永振,武凯歌,张竞之,等.王氏连朴饮对脾胃湿热证大鼠行为、肾上腺指数及血清 Cort 的影响[J].现代生物医学进展,2012,12(14):2622,2623-2625.

(2014-05-27 收稿 责任编辑:徐颖)

- [7]周智广.再谈糖尿病免疫学研究趋向[J].临床医药实践,2008,18(5):70-71.
- [8]马西文,常志文.补体与糖尿病血管病变[J].中国老年学杂志,2009,29(9):1174-1176.
- [9]李妮,周微雅,王虹.细胞免疫和体液免疫在糖尿病周围神经病变患者免疫状态的观察[J].中华临床医药杂志,2001,2(7):1-4.
- [10]渠胜英,施晓红.免疫细胞因子在 2 型糖尿病周围神经病变大鼠血清中的表达[J].中国糖尿病杂志,2014,22(3):264-267.
- [11]Acosta JB,del Barco DG,Vera DC,et al. The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds[J]. Int wound J,2008,5(4):530-539.
- [12]徐冬岩.老年 2 型糖尿病感染患者血清免疫学指标观察[J].中国老年学杂志,2006,26(7):908.
- [13]张兰蓉,魏丹蕾,周毅业,等.0 级糖尿病足中医证型与凝血和免疫因子的相关性研究[J].世界中医药,2014,9(8):1017-1019.
- [14]奚九一,李真,范冠杰,等.糖尿病中医防治指南糖尿病足[J].中华中医药现代远程教育,2011,9(19):140-143.
- [15]许济群,王绵之.方剂学[M].上海:上海科学技术出版社,2007:85.

(2014-08-01 收稿 责任编辑:张文婷)