

• 论著 •

中药降糖通脉方对 2 型糖尿病大鼠凝血和纤溶功能影响的实验研究

郑承红¹, 彭 聪¹, 黄 蓓²

(1. 武汉市中西医结合医院, 湖北 武汉 430022; 2. 孝感市中医院, 湖北 孝感 432000)

【摘要】 目的 观察 2 型糖尿病大鼠凝血和纤溶活性及降糖通脉方的干预作用。方法 将 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、糖尿病模型组、胰激肽原酶组及降糖通脉方组, 每组 10 只。经尾静脉注射链脲佐菌素 (STZ) 并以高糖高脂饲料喂养诱导制备 2 型糖尿病大鼠模型。采用发色底物法检测大鼠血浆凝血酶激活的纤溶抑制物 (TAFI) 水平; 用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定主动脉组织型纤溶酶原激活物 (t-PA) 及其抑制物纤溶酶原激活物抑制剂 1 (PAI-1) 的 mRNA 表达。结果 糖尿病模型组血浆 TAFI 水平和主动脉 PAI-1 mRNA 表达均较正常对照组明显增高, 主动脉 t-PA mRNA 表达较正常对照组明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与糖尿病模型组比较, 胰激肽原酶组和降糖通脉方组 TAFI 水平和 PAI-1 mRNA 表达均明显下降, t-PA mRNA 表达明显增高, 且降糖通脉方组作用明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 2 型糖尿病大鼠存在血栓前状态且纤溶功能受抑制; 降糖通脉方能明显改善纤溶功能及血栓前状态, 其疗效优于胰激肽原酶。

【关键词】 降糖通脉方; 中药; 糖尿病, 2 型; 大鼠; 凝血酶激活的纤溶抑制物; 组织型纤溶酶原激活物; 纤溶酶原激活物抑制剂 1

中图分类号: R285.5; R587.1 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.06.004

A study of protective effect of Jiangtang Tongmai prescription (降糖通脉方) on coagulation and fibrinolysis in type 2 diabetic rats ZHENG Cheng-hong*, PENG Cong, HUANG Bei. *Wuhan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wuhan 430022, Hubei, China

【Abstract】 Objective To observe the coagulation and fibrinolysis states of type 2 diabetic rats and the intervention effects of Jiangtang Tongmai prescription (降糖通脉方). Methods Wistar rats were randomly divided into four groups: normal control, diabetic model, pancreatic kininogenase (PK), and Jiangtang Tongmai prescription groups (each $n = 10$). The diabetic rat models were induced by streptozotocin (STZ) intravenous injection into the tail vein and treated with high-sugar-fat-diet. The plasma thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels of diabetic rats were measured by luminescence substrate method, and the expression levels of tissue type plasminogen activator (t-PA) mRNA and plasminogen activator inhibitors-1 (PAI-1) mRNA of aorta were measured by reverse transcriptive-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results Compared with the normal control group, the plasma TAFI level and the expression level of aorta PAI-1 mRNA were increased evidently, and the aorta t-PA mRNA expression was decreased significantly in the diabetic model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the diabetic model group, after treatment in the PK and Jiangtang Tongmai prescription groups, TAFI level and PAI-1 mRNA expression were decreased, and t-PA mRNA expression was increased obviously, being more significantly in Jiangtang Tongmai prescription group than PK group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Conclusion Pre-thrombotic and fibrinolytic function restraine states exist in type 2 diabetic rats. Jiangtang Tongmai prescription can ameliorate coagulation and fibrinolytic abnormality. Its curative effect is better than that of PK.

【Key words】 Jiangtang Tongmai prescription; Chinese medicinal material; type 2 diabetes mellitus; rat; thrombin activatable fibrinolysis inhibitor; tissue type plasminogen activator; plasminogen activator inhibitors-1

糖尿病血管病变是常见的糖尿病慢性并发症, 据统计, 2 型糖尿病患者发生冠心病、脑血管意外的风险是非糖尿病患者的 2~4 倍^[1]。目前糖尿病血管

病变的病理机制尚未完全阐明, 其发生发展除了受长期慢性高血糖、脂质代谢紊乱、内皮细胞功能紊乱等因素的影响外, 越来越多的研究表明, 血液凝固和纤溶异常在其中也扮演了重要的角色。组织型纤溶酶原激活物 (t-PA) 及其抑制物纤溶酶原激活物抑制剂 1 (PAI-1) 是体内凝血和纤溶系统的一对重要

基金项目: 湖北省卫生科研项目 (鄂卫函[2005]455 号)

作者简介: 郑承红 (1966 -), 女 (汉族), 湖北省人, 医学博士, 副教授, Email: chzheng28@yahoo.com.cn.

平衡因子,其变化可以反映机体凝血和纤溶功能状态。新近研究发现,凝血酶激活的纤溶抑制物(TAFI)作为一种抑制纤溶系统激活的羧基肽酶,与代谢综合征和糖尿病等密切相关,其活性的增高明显增加了心脑血管事件的发生率^[2-3]。中医药作为治疗糖尿病并发症的一种有效手段,一直受到人们的关注。本实验中拟应用降糖通脉方进行干预治疗,旨在观察 2 型糖尿病大鼠凝血和纤溶活性的改变及降糖通脉方的干预作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料:链脲佐菌素(STZ)为美国 Sigma 公司产品(批号:2101401);降糖通脉方由小檗碱(南京白敬宇制药有限责任公司,批号:060909)、川芎嗪(北京市燕京药业有限责任公司,批号:070101)、女贞子叶提取物(三九黄石制药厂提供)组成;胰激肽原酶(怡开)为常州千红生化制药有限公司产品(批号:061215);TAFI 试剂盒(美国 ADI 公司产品,批号:072701);TRIzol(上海赛百盛基因技术有限公司),RNA 逆转录试剂盒(美国 MBI Fermentas 分子生物学公司),Taq 酶(美国 Promega 公司)。

1.2 动物分组和糖尿病大鼠模型的建立:SPF 级雌性 Wistar 大鼠 50 只,体重 190~210 g,购于湖北省实验动物研究中心[许可证号 SCXK(鄂)2003-0005]。按随机数字表法分为正常对照组(10 只)及模型组(40 只)。模型组大鼠喂以高糖高脂饲料,并经尾静脉单次注射 STZ 30 mg/kg 制备糖尿病模型,以血糖达到糖尿病诊断标准并维持 1 周作为制模成功标准。最后成模动物 30 只,再随机分为糖尿病模型组、胰激肽原酶组、降糖通脉方组 3 组,每组 10 只。各组均按体表面积折算法换算给药量,并于制模后灌服给药,胰激肽原酶组灌服 15 mg/ml 胰激肽原酶水溶液 2 ml;降糖通脉方组灌服 62 mg/ml 降糖通脉方混合液 2 ml;模型组与正常对照组灌服生理盐水 2 ml。各组每日灌胃 1 次,连续 8 周。于治疗结束后将大鼠禁食 8 h 以上,麻醉大鼠并处死,取其主动脉备用。

1.3 血浆 TAFI 检测:TAFI 检测采用发色底物法,操作步骤按照试剂盒说明书进行。

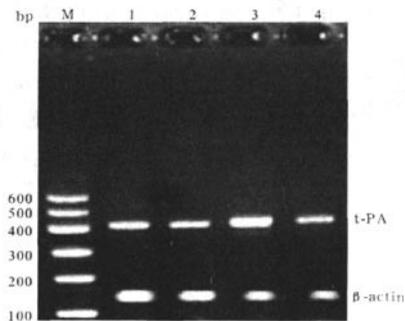
1.4 RNA 提取与 t-PA、PAI-1 的 mRNA 表达测定:采用 TRIzol 常规一步法提取主动脉总 RNA,紫外分光光度计测定波长为 260 nm 和 280 nm 处的吸光度(A)值,要求 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0,根据 A_{260} 计算总 RNA 含量,-20 °C 保存备用。用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定 t-PA 和 PAI-1 的

mRNA 表达,按试剂盒说明书步骤操作。t-PA 引物序列:上游为 5'-GCTCAGCAGAGGGAGTGA-3',下游为 5'-AGGATTGTGGGAGGATGG-3',特异性扩增片段大小为 412 bp;PAI-1 引物序列:上游为 5'-GGGGTCTGTATCCCTGTA-3',下游为 5'-CATCGGCTTCTGAATGTA-3',特异性扩增片段大小为 353 bp;以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参照,引物序列:上游为 5'-CCCATCTATGAGGGTTAC-3',下游为 5'-TCACGCACGATTTCC-3',特异性扩增片段大小为 143 bp。引物均由上海生物工程技术公司合成。PCR 反应条件:94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 30 s, β -actin 47 °C 退火 30 s,t-PA 58 °C 退火 30 s,PAI-1 56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,扩增循环次数为 30 次,然后 72 °C 末次延伸 3 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳并鉴定后,用凝胶成像分析系统分析,以 t-PA、PAI-1 与 β -actin 的条带积分 A 值比值表示其 mRNA 表达水平。

1.5 统计学处理:采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,实验数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

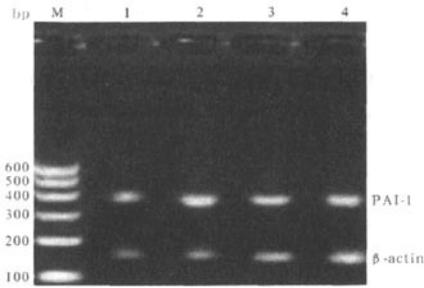
2 结果

图 1~2 及表 1 结果显示,与正常对照组比较,糖尿病模型组大鼠血浆 TAFI 水平、主动脉 PAI-1 mRNA 表达均明显增高,t-PA mRNA 表达明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与糖尿病模型组比较,胰激肽原酶组和降糖通脉方组 TAFI 水平和 PAI-1 mRNA 表达明显下降,t-PA mRNA 表达明显增高,且胰激肽原酶组降低 TAFI 水平和 PAI-1 mRNA 表达及增加 t-PA mRNA 表达的作用较降糖通脉方组明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



M:Marker;1,正常对照组;2,降糖通脉方组;
3,胰激肽原酶组;4,糖尿病模型组

图 1 各组大鼠主动脉 t-PA mRNA 表达凝胶电泳图



M: Marker; 1: 正常对照组; 2: 降糖通脉方组; 3: 胰激肽原酶组; 4: 糖尿病模型组

图 2 各组大鼠主动脉 PAI-1 mRNA 表达凝胶电泳图

表 1 各组大鼠血浆 TAFI 水平及主动脉 t-PA 和 PAI-1 的 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	TAFI(mg/L)	t-PA mRNA	PAI-1 mRNA
正常对照组	10	2.10 ± 0.86	1.45 ± 0.21	1.10 ± 0.13
糖尿病模型组	10	39.13 ± 11.66 ^a	0.99 ± 0.18 ^b	1.42 ± 0.16 ^b
胰激肽原酶组	10	31.29 ± 8.34 ^{cd}	1.16 ± 0.23 ^{bc}	1.22 ± 0.15 ^{cd}
降糖通脉方组	10	24.39 ± 5.92 ^{acf}	1.30 ± 0.19 ^{de}	1.14 ± 0.16 ^{de}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与糖尿病模型组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与胰激肽原酶组比较,^e $P < 0.05$,^f $P < 0.01$

3 讨论

2 型糖尿病常伴有高血糖、胰岛素抵抗及高脂血症等代谢紊乱,这些病理改变可引起血管内皮损伤和功能障碍、血小板功能异常、凝血和纤溶活性异常,导致血栓前状态,易形成血栓并造成血管损伤。

生理情况下,机体纤溶和抗纤溶过程处于动态平衡^[4]。维持凝血与纤溶系统动态平衡是降低血栓性疾病发生的重要环节,制约血栓形成的主要机制之一是纤维蛋白的溶解。血栓形成时,纤维蛋白含量增加,刺激血管内皮细胞合成 t-PA 增多,t-PA 迅速与纤维蛋白及纤溶酶原结合,加速纤维蛋白凝块的溶解。糖尿病患者体内血糖升高,能量代谢紊乱,可造成血管内皮细胞缺血、缺氧、损伤和功能障碍,使由内皮细胞分泌的 t-PA 合成和释放明显减少,因而 PAI-1 活性相对增加,致使不能激活足量的纤溶酶原,使纤溶功能受到抑制,机体出现血栓前状态并导致血栓的形成^[5-6]。另外,高血糖、高胰岛素血症及脂质代谢紊乱可直接促进内皮细胞 PAI-1 合成和增强血浆 PAI-1 活性,使肝脏合成 PAI-1 增加,从而导致 t-PA 水平及纤溶活性的进一步降低^[7-8]。

TAFI 是 1995 年 Bajzar 等^[9]发现的一种蛋白酶原,它可被凝血酶激活,具有抑制纤溶系统活性的作用。TAFI 属含锌的金属羧基肽酶,在肝脏合成后

以酶原形式分泌到血浆,也存在于血小板内,在血小板激活时释放进入血液。当血液处于血栓前状态时,TAFI 被凝血酶-凝血酶调节蛋白复合物激活,转变成有酶活性的 TAFI α 。TAFI α 可特异性裂解与纤溶酶原有高亲和力结合位点的纤维蛋白羧基末端的赖氨酸残基,从而抑制纤溶酶原的活化,下调纤溶活性,通过抑制纤溶,保护局部形成的血栓不被过早溶解,促进了血栓进一步形成^[10],导致了血管病变的发生发展。TAFI α 有很强的抗纤溶作用,当血浆中的 TAFI α 浓度为 1.0 nmol/L 时,即可使血浆 t-PA 触发的纤溶时间延长至最大值的一半,这仅为正常血浆 TAFI 浓度的 2%^[9]。

研究发现,降糖通脉方中小檗碱及女贞子叶提取物具有明显的降低血糖、调节血脂水平等多种作用^[11-12];川芎嗪具有扩张血管、抗血小板黏附和聚集、防止血栓形成等作用,能显著升高 t-PA 活性,降低 PAI-1 水平,具有提高纤溶活性的作用^[13]。本课题组前期研究也证实,降糖通脉方能明显降低血糖、胰岛素及血脂水平,减轻体重,改善糖尿病大鼠糖脂代谢紊乱及胰岛素抵抗状况^[14]。

本实验中糖尿病大鼠血浆 TAFI 水平显著增高,主动脉 t-PA mRNA 表达降低,PAI-1 mRNA 表达则显著增高,表明糖尿病状态下存在血栓前状态,同时纤溶活性降低。用降糖通脉方治疗后,血浆 TAFI 水平及主动脉 PAI-1 mRNA 表达明显降低,t-PA mRNA 表达明显增加,恢复了 t-PA/PAI-1 的动态平衡状态,提示降糖通脉方具有抑制血栓前状态、改善纤溶活性的作用,可在一定程度上预防和延缓糖尿病血管病变的发生发展,有助于减少糖尿病血栓性疾病的发生。

参考文献

- [1] Ali Raza J, Movahed A. Current concepts of cardiovascular diseases in diabetes mellitus[J]. Int J Cardiol, 2003, 89(2-3): 123-134.
- [2] Hori Y, Gabazza EC, Yano Y, et al. Insulin resistance is associated with increased circulating level of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in type 2 diabetic patients [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(2): 660-665.
- [3] Hryszko T, Malyszko J, Malyszko JS, et al. A possible role of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in disturbances of fibrinolytic system in renal transplant recipients [J]. Nephrol Dial Transplant, 2001, 16(8): 1692-1696.
- [4] Tousoulis D, Antoniadis C, Tountas C, et al. Vitamin C affects thrombosis/fibrinolysis system and reactive hyperemia in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease [J]. Diabetes Care, 2003, 26(10): 2749-2753.
- [5] Geiger M, Binder BR. Plasminogen activation in diabetes mellitus, kinetics of plasmin formation with tissue plasminogen

activator and plasminogen from individual diabetic donors and with in vitro glucosylated plasminogen[J]. *Enzyme*, 1988, 40(2-3):149-157.

[6] 杨洁红, 张宇燕, 王华峰. 养阴益气活血方对培养人脐静脉内皮细胞抗凝和纤溶功能的作用[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(1):3-5.

[7] 张悦, 苏胜偶. 纤溶活性与 2 型糖尿病及其大血管病变[J]. *国外医学内分泌学分册*, 2005, 25(增刊 1):42-44.

[8] 吴沃栋, 许耘红, 谭佩仪. D-二聚体及与纤溶酶原激活物抑制剂-1 比值评价合并糖耐量减低急性冠状动脉综合征患者纤溶受抑的研究[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(8):472-475.

[9] Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(24):14477-14484.

[10] Wang W, Boffa MB, Bajzar L, et al. A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(42):27176-27181.

[11] 王本祥. 现代中药药理与临床[M]. 天津:天津科技翻译出版公司, 2005:189-1377.

[12] 张家庆. 最近几年中医药防治糖尿病研究进展[J]. *中西医结合学报*, 2007, 5(4):373-377.

[13] 刘会田, 刘钧, 王祥, 等. 川芎嗪对 42 例代谢综合征患者血栓前状态的影响[J]. *临床内科杂志*, 2005, 22(7):489-490.

[14] 郑承红, 柯淑红, 马威, 等. 降糖通脉方对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢影响的实验研究[J]. *中华中医药杂志*, 2006, 21(5):309-310.

(收稿日期:2009-06-15)

(本文编辑:李银平)

• 基层园地 •

顽固性多发性脑囊虫病 5 例驱虫治疗体会

黄永斌

(甘肃省成县中医院, 甘肃 成县 742500)

【关键词】 脑囊虫病, 多发性, 顽固性; 阿苯达唑; 吡喹酮; 驱囊虫汤

中图分类号: R532.33 **文献标识码:** B **DOI:** 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.06.005

脑囊虫病是猪绦虫的囊尾蚴寄生于人体脑组织所引起的病症。甘肃省成县位于西北陇南山区, 为脑囊虫病患者的多发地区之一。现将本院近两年来收治的 5 例顽固性多发性脑囊虫病患者的驱虫治疗情况报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料: 选择 2007—2008 年在本院住院的脑囊虫病 5 例, 其中男 4 例, 女 1 例; 12 岁 1 例, 35~55 岁 4 例; 均符合陈敏章和邵丙杨^[1]主编的《中华内科学》中脑囊虫病诊断标准。

1.2 治疗方法: ①驱虫治疗: 5 例患者均先给予史克肠虫清(阿苯达唑)18 mg, 每日分 2 次口服, 10 d 为 1 个疗程, 间隔 14 d 后进行下个疗程, 连用 6 个疗程无效者改用吡喹酮(南京制药有限公司, 国药准字 H32021380)180 mg/kg, 分 4 d 口服, 每日 1 次, 连用 4 d 为 1 个疗程, 间隔 60 d 后进行下个疗程, 连用 3~4 个疗程。②脱水剂、抗癫痫药与激素的应用。③中药治疗: 驱囊虫汤(药物组成: 乌梅 10 g, 鹤虱 30 g, 南瓜子 50 g, 陈皮 10 g, 半夏 10 g, 僵蚕 10 g, 全蝎 10 g, 桃仁 6 g, 红花 6 g, 甘草 6 g)每日 1 剂, 连用 3 个月。

作者简介: 黄永斌(1962-), 男(汉族), 甘肃省人, 主治医师。

续服用 3 个月。

1.3 治疗结果: 5 例患者治疗结束后全部治愈, 治愈率 100%。

1.4 典型病例: 患者男性, 52 岁, 有从事屠宰作业家族史, 因抽搐反复发作 3 个月、加重 10 d, 先后在外院多次就医无效而转入本院。入院时查体: 全身多发性皮下小结节, 质软易活动, 头颅磁共振成像(MRI)示多发性脑囊虫病。住院后即每日共给予阿苯达唑 1 350 mg, 早晚 2 次分服, 连用 10 d, 间隔 14 d 后进行下个疗程, 服药期间辅以甘露醇、地塞米松、清开灵、血塞通静脉滴注, 卡马西平口服, 连服 3 个疗程后, 复查头颅 MRI 示囊虫数量有所减少; 继续加强治疗 3 个疗程后患者病情加重, 出现癫痫大发作持续状态, 伴尿失禁、昏迷, 经脱水、镇静抢救后调整治疗方案, 予吡喹酮 180 mg/kg, 每日 2 次分服, 连用 4 d 为 1 个疗程, 间隔 60 d 后进行下个疗程, 治疗 3 个疗程后头颅 MRI 示囊虫基本排出, 继续强化治疗 2 个疗程, 头颅 MRI 示无异常, 康复出院, 治疗期间仍继续上述辅助治疗, 同时坚持服用驱囊虫汤。

2 讨论

脑囊虫病的治疗主要为病源治疗、对症治疗和手术治疗, 以病源治疗为重

要。病源治疗的驱虫药主要有阿苯达唑和吡喹酮^[1]。阿苯达唑为高效低毒驱虫药, 可用于各种类型的囊虫病, 即使服用大剂量对人体血糖亦无影响^[2]; 吡喹酮为广谱抗蠕虫药, 药毒性小, 人体不良反应少且症状轻而短暂^[2]。本组 5 例患者驱虫治疗结果显示, 吡喹酮为顽固性多发性脑囊虫病疗效确切而安全的驱虫药, 服用常规量、延长疗程治疗可使患者完全康复, 不留后遗症; 而阿苯达唑对脑囊虫病的驱虫疗效远不及吡喹酮, 对顽固性多发性脑囊虫病的治疗即使加大剂量、增加疗程, 仍然无效。另有报道, 对脑囊虫所致颅高压患者鞘内注射地塞米松, 可直接选择性作用于脉络丛抑制脑脊液分泌; 还能有效控制囊虫变态反应, 迅速降低颅高压并避免其反跳^[3]。

参考文献

[1] 陈敏章, 邵丙杨. 中华内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 3966, 1389.

[2] 耿洪业, 王少华. 实用药物治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 188, 189, 199.

[3] 田俊巧, 孟淑田, 李淑芝, 等. 鞘内注射地塞米松治疗脑囊虫病颅高压[J]. *中国危重病急救医学*, 1996, 8(11):700.

(收稿日期:2009-08-22)

(本文编辑:李银平)