

• 实验研究 •

芪归糖痛宁颗粒调节炎性因子预防 糖尿病周围神经病变的机制研究

李道卫¹, 中国明², 王浩¹, 江爱娟², 王靓², 尤良震¹, 王芹¹, 何莹¹

(1. 安徽中医药大学中西医结合临床学院, 安徽 合肥 230038;

2. 安徽中医药大学研究生部, 安徽 合肥 230038)

[摘要]目的 通过观察芪归糖痛宁颗粒预防性给药对相关炎性因子的影响, 探究其改善糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)的机制。方法 将120只SD大鼠分为正常组, 模型组, 芪归糖痛宁颗粒高、中、低剂量组和甲钴胺组, 采用链脲佐菌素腹腔注射联合高脂饲料喂养法复制糖尿病大鼠模型, 预防性给予相应药物8周, 以运动神经传导速度(motor nerve conduction velocity, MNCV)和摆尾温度阈值评价DPN的改善情况, 采用酶联免疫吸附法测定大鼠血清基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase 1, MMP-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1(interleukin 1, IL-1)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)含量。结果 与正常组比较, 模型组大鼠摆尾温度阈值显著升高($P < 0.05$), MNCV显著下降($P < 0.05$), 血清MMP-1、TNF- α 、IL-1和MCP-1均显著升高($P < 0.05$)。芪归糖痛宁颗粒对DPN大鼠的MNCV、摆尾温度阈值及血清MMP-1、TNF- α 、IL-1和MCP-1的效应具有明显的剂量依赖性($P < 0.05$), 不同剂量对不同指标的效应呈现不同的量效关系; 不同剂量芪归糖痛宁颗粒与甲钴胺对DPN大鼠的MNCV、摆尾温度阈值及血清MMP-1、TNF- α 和IL-1的效应相比较, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 芪归糖痛宁颗粒能预防DPN, 其机制与调控复杂的炎性因子网络有关, 其效应具有明显的剂量依赖性。

[关键词]糖尿病周围神经病变; 芪归糖痛宁颗粒; 炎性因子; 运动神经传导速度; 摆尾温度阈值

[中图分类号]R587.2; R285.5 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2015.05.019

糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)是糖尿病最常见的并发症之一, 糖尿病病程5、10、20年后DPN发生率分别达到30%、60%、90%^[1], 主要临床特征为四肢远端(尤其下肢)对称性感觉、运动障碍, 可出现肢体冷凉、麻木、疼痛、乏力等症状, 严重影响患者生活质量。中医药治疗DPN立足于整体观念和辨证论治, 研究^[2]表明, DPN的中医证型以气虚血瘀证为主。芪归糖痛宁颗粒为临床验方, 具有益气活血、通络止痛之功效。既往研究^[3-5]表明, 益气活血法治疗DPN疗效确切。本实验通过复制DPN大鼠模型, 在芪归糖痛宁颗粒干预后, 观察坐骨神经传导速度, 同时检测血清基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase 1, MMP-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、单核细胞趋化因子-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)含量变化, 探讨芪归糖痛宁

颗粒改善DPN的作用机制, 以期为临床应用该方防治DPN提供实验依据和研究基础。

1 材料

1.1 实验药物 芪归糖痛宁颗粒(黄芪30g, 鸡血藤15g, 当归、葛根、生地黄各12g, 延胡索、威灵仙各9g): 由安徽中医药大学第一附属医院制剂中心提供, 批号20140914; 甲钴胺: 中国卫材药业有限公司, 批号130825A; 高脂高糖饲料根据配方^[6]配制, 每100g饲料中含有淀粉17.5g, 大豆粉、蔗糖、鸡蛋各10.0g, 麸皮7.0g, 玉米粉12.0g, 鱼粉2.5g, 食盐、酵母粉各0.5g, 猪油15.0g, 奶粉、麻油、花生各5.0g, 由安徽中医药大学动物房加工。

1.2 实验动物 SD大鼠120只, 体质量220~280g, 清洁级。购自安徽省实验动物中心, 生产许可证号: SCXK(皖)2011-002。

1.3 试剂及仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ): 购于Sigma公司, 批号20140505422; MMP-1、TNF- α 、IL-1、MCP-1酶联免疫分析试剂盒: 批号E-30641, 上海源叶生物科技有限公司提供; Powerlab8/30生物信号采集系统: 澳大利亚

基金项目: 国家自然科学基金项目(81273646)

作者简介: 李道卫(1987-), 男, 硕士研究生

通信作者: 中国明, shengm_66@163.com

ADInstruments 生产。

2 方法

2.1 动物分组及模型复制 取上述 SD 雄性大鼠 120 只,随机选取 15 只作为正常组,予以普通饲料喂养。其余大鼠适应性喂养 2 周后,采用高脂喂饲联合 STZ 的方法^[6]复制糖尿病大鼠模型,即高脂喂饲 4 周后,大鼠禁食 12 h,用 pH 4.5 的 0.1 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液稀释 STZ,按 35 mg/kg 腹腔注射给药,72 h 后空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 者作为 STZ 诱导的糖尿病大鼠模型,低于此值者 4 d 后第 2 次按 35 mg/kg 腹腔注射 STZ,测定血糖以确定模型是否复制成功,结果共获得 90 只糖尿病模型大鼠。将糖尿病模型大鼠随机分为模型组,甲钴胺对照组,芪归糖痛宁颗粒高、中、低剂量组。

2.2 给药剂量与方法 对芪归糖痛宁颗粒高、中、低剂量组大鼠分别按每日 9.0、4.5、2.25 g/kg 剂量(分别相当于成人临床用量的 18、9、4.5 倍)灌胃给药,甲钴胺组大鼠接受甲钴胺(0.225 mg/kg)灌胃给药,正常组和模型组大鼠接受同容积蒸馏水灌胃,连续给药 8 周。实验期间除正常组外,其他组大鼠给予高脂饲料喂养。

2.3 大鼠摆尾温度阈值的测定 给药后 8 周,将大鼠宽松地限制在笼内,露出其尾部,用恒温加热仪(每分钟加热 2 ℃)加热水温,水温从 20 ℃开始时将鼠尾浸入水中约 2 cm,鼠尾因水温增高而摆动并露出水面时记录水温,此时水温即为摆尾温度阈值。

2.4 坐骨神经传导速度测定 用药 8 周末,麻醉大鼠,在左坐骨切迹插入电极,在踝部(远端)和左足底第二趾间分别插入记录电极并与 Powerlab 8/30 生物信号记录系统连接,记录远近端坐骨神经产生动作电位的潜伏期,测定两记录电极间的距离,并计算运动神经传导速度(motor nerve conduction velocity, MNCV)。MNCV=记录电极之间的距离(cm)/动作电位潜伏期(s),比较各组大鼠 MNCV 的变化。

2.5 大鼠血清 MMP-1、TNF- α 、IL-1、MCP-1 含量测定 在给药第 8 周腹主动脉取血,采用酶联免疫吸附法测定 MMP-1、TNF- α 、IL-1、MCP-1 含量,严格按照酶联免疫分析试剂盒说明书操作。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。连续型变量采用“均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)”进行统计学描述。由于这是非均衡设计的组合实验,按研究目的拆分成 3 个组合。①正常组和模型组:采用两个独立样本 *t* 检验;②模型组和芪归糖痛宁高、中、低剂量组:采用单因素方差分析考察量效关系,组间均数多重比较采用 LSD 检验(方差齐时)或

Dunnnett's *T*₃ 检验(方差不齐时);③甲钴胺组和芪归糖痛宁高、中、低剂量组:采用单因素方差分析,组间均数多重比较采用 LSD 检验或 Dunnnett's *T*₃ 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠摆尾温度阈值和 MNCV 比较 ①模型因素的影响:与正常组比较,模型组大鼠的摆尾温度阈值显著升高($P<0.05$),MNCV 显著下降($P<0.05$)。②芪归糖痛宁颗粒的量效关系:芪归糖痛宁颗粒对 DPN 大鼠的 MNCV 和摆尾温度阈值的效应具有明显的剂量依赖性(MNCV: $F=7.30$, $P=0.001$;摆尾温度阈值: $F=262.60$, $P=0.000$),其中低剂量芪归糖痛宁颗粒升高 DPN 大鼠 MNCV 的效应最显著,高剂量芪归糖痛宁颗粒降低摆尾温度阈值的效应最显著。③芪归糖痛宁颗粒与甲钴胺的效应比较:不同剂量芪归糖痛宁颗粒和甲钴胺对 DPN 大鼠 MNCV 和摆尾温度阈值的效应相比较,差异均具有统计学意义(MNCV: $F=3.16$, $P=0.040$;摆尾温度阈值: $F=492.53$, $P=0.000$),其中低、中剂量芪归糖痛宁颗粒对 DPN 大鼠 MNCV 的效应与甲钴胺相当($P>0.05$),低、中、高剂量芪归糖痛宁颗粒降低 DPN 大鼠摆尾温度阈值的效应均不及甲钴胺($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 MNCV 和摆尾温度阈值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	MNCV/(m/s)	摆尾温度阈值/s
正常	8	39.85 \pm 5.81	33.68 \pm 0.57
模型	8	30.93 \pm 3.04*	49.62 \pm 0.52*
甲钴胺	8	43.25 \pm 2.76	42.29 \pm 0.38
芪归糖痛宁颗粒低剂量	8	45.47 \pm 8.16#	48.58 \pm 0.35# Δ
芪归糖痛宁颗粒中剂量	8	40.10 \pm 8.38#	46.53 \pm 0.38# Δ
芪归糖痛宁颗粒高剂量	8	36.21 \pm 4.43 Δ	44.68 \pm 0.24# Δ

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与甲钴胺组比较, $\Delta P<0.05$ 。

3.2 各组血清 MMP-1、TNF- α 、IL-1 和 MCP-1 含量比较 ①模型因素的影响:与正常组比较,模型组大鼠血清 MMP-1、TNF- α 、IL-1 和 MCP-1 均显著升高($P<0.05$)。②芪归糖痛宁颗粒的量效关系:芪归糖痛宁颗粒对 DPN 大鼠血清 MMP-1、TNF- α 、IL-1 和 MCP-1 的效应均具有明显的剂量依赖性(MMP-1: $F=20.30$, $P=0.000$; TNF- α : $F=18.35$, $P=0.000$; IL-1: $F=10.08$, $P=0.000$; MCP-1: $F=8.93$, $P=0.000$),其中芪归糖痛宁颗粒中剂量降低 DPN 大鼠血清 MMP-1 和 TNF- α 的效应最优,低剂量降低血清 IL-1 的效应最优,高剂量降低血清 MCP-1 的效应最优。③芪归糖痛宁颗粒和甲钴胺的效应比较:低、中、高剂量芪归糖痛宁颗粒对 DPN

大鼠血清 MMP-1、TNF- α 和 IL-1 的效应与甲钴胺比较,差异均具有统计学意义(MMP-1: $F=6.06$, $P=0.003$; TNF- α : $F=8.74$, $P=0.000$; IL-1: $F=4.21$, $P=0.014$),其中芪归糖痛宁颗粒中剂量降低血清 MMP-1 和 TNF- α 的效应显著优于甲钴胺 ($P<0.05$),芪归糖痛宁颗粒高、低剂量降低血清

MMP-1 和 TNF- α 的效应与甲钴胺相当 ($P>0.05$),低剂量降低血清 IL-1 的效应显著优于甲钴胺组 ($P<0.05$);不同剂量芪归糖痛宁颗粒降低血清 MCP-1 的效应与甲钴胺比较,差异均无统计学意义 ($F=0.775$, $P=0.518$)。见表 2。

表 2 各组血清 MMP-1、TNF- α 、IL-1 和 MCP-1 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MMP-1/(ng/L)	TNF- α /(ng/L)	IL-1/(ng/L)	MCP-1/(ng/L)
正常	8	98.51 \pm 7.54	83.63 \pm 2.64	59.81 \pm 5.23	152.06 \pm 3.22
模型	8	109.12 \pm 5.69*	94.24 \pm 4.82*	76.11 \pm 6.99*	182.33 \pm 16.68*
甲钴胺	8	97.30 \pm 6.94	85.86 \pm 3.43	67.43 \pm 8.69	158.43 \pm 9.68
芪归糖痛宁颗粒低剂量	8	94.21 \pm 10.85#	79.26 \pm 9.85#	56.42 \pm 5.06# Δ	161.23 \pm 10.50#
芪归糖痛宁颗粒中剂量	8	83.30 \pm 4.01# Δ	73.06 \pm 1.15# Δ	63.93 \pm 10.46#	161.95 \pm 5.99#
芪归糖痛宁颗粒高剂量	8	95.73 \pm 6.20#	84.68 \pm 3.92#	64.55 \pm 5.07#	156.05 \pm 8.08#

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与甲钴胺组比较, $\Delta P<0.05$ 。

4 讨论

糖尿病是由于体内胰岛素的绝对或相对不足而引起的一系列代谢紊乱。世界卫生组织的一项前瞻性研究表明,到 2030 年将会有 3.53 亿糖尿病患者^[7]。DPN 是糖尿病最常见的并发症之一。目前,相关研究已经证实,糖尿病及其所并发的病变(如心血管疾病和神经组织病变等)为一系列低等慢性炎症。DPN 的发生、发展中存在着大量的炎症细胞的聚集,导致大量炎症因子(TNF- α 、IL-1、MCP-1 等)与蛋白酶(如 MMP-1)表达分泌于各相关组织细胞外基质中,从而导致一系列组织重建事件(如血管化、基质弹性蛋白降解、胶原蛋白大量分泌和组成改变等)的发生。TNF- α 是一种主要由单核巨噬细胞产生的具有广泛生物活性的细胞因子,可诱导 IL-1、IL-6、C 反应蛋白的合成,从而引起 DPN。与 IL 和 C 反应蛋白相比,TNF- α 与神经病变之间的关联性更强^[8]。在 db/db DPN 模型小鼠的脊髓背角,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 MCP-1 的水平均有所增加^[9],在 STZ 诱导的糖尿病大鼠脊髓中,IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达会增强^[10]。综上,炎症因子在 DPN 发病中起到重要作用。本实验采用 STZ 联合高脂饲料的方法复制糖尿病大鼠模型,结果显示:与正常组比较,糖尿病模型大鼠 MNCV 明显降低,摆尾温度阈值升高,血清 MMP-1、TNF- α 、IL-1 和 MCP-1 均显著升高。结果表明 DPN 模型复制成功,且血清炎症因子可能参与了 DPN 的发生发展。

DPN 为西医病名,中医没有相应病名,但古代文献中早有相关记载^[11]。中医临床根据其主症诊断为“消渴病·麻木”“消渴病·痿证”“消渴病·痹证”,统称为“消渴病·痿痹”^[12]。其主要病机是以气虚、阴虚、阳虚失充为本,以瘀血、痰浊阻络为标,

血瘀以其不同的程度而贯穿于 DPN 整个病程的始终^[13]。因此,在新安医学理论指导下,遵循益气养阴、活血通络的治疗原则,创制院内制剂芪归糖痛宁颗粒。方中黄芪大补脾胃元气,令气旺血行、瘀去络通;当归甘以缓之,故专能补血,辛以散之,故又能行血,补中有动,行中有补,化瘀不伤血,与黄芪同用,治本为主,共为君药;葛根升阳、生津止渴;生地黄清热凉血、养阴生津,助黄芪、当归益气活血生津而为臣药;鸡血藤活血补血,延胡索辛散活血、行气、止痛,共为佐药;威灵仙,祛风通络、止痛,能通行十二经脉,有使药物直达病所之功,可为使药之用。

本实验通过对 DPN 大鼠给予芪归糖痛宁颗粒高、中、低剂量灌胃给药,观察芪归糖痛宁颗粒的量效关系。结果显示,芪归糖痛宁颗粒对 DPN 大鼠的 MNCV 和摆尾温度阈值的效应具有明显的剂量依赖性,对 DPN 大鼠血清 MMP-1、TNF- α 、IL-1 和 MCP-1 的效应也均具有明显的剂量依赖性,不同剂量对不同指标的效应呈现不同的量效关系。另外本实验还设置了阳性对照药甲钴胺组,观察芪归糖痛宁颗粒与阳性对照药甲钴胺相比较的意义,结果也显示,不同剂量芪归糖痛宁颗粒与甲钴胺对不同指标的效应也呈现相似或明显不同的效应。结果表明,芪归糖痛宁颗粒能够改善 DPN,其机制可能是通过调控炎症因子发挥作用,对其剂量一效应关系的诠释尚需结合 DPN 与炎症因子损伤之间的复杂关系。

参考文献:

- [1] Deli G, Bosnyak E, Pusch G, et al. Diabetic neuropathies: diagnosis and management[J]. Neuroendocrinology, 2013,98(4): 267-280.
- [2] 洪梅,张兰,姜维娜. 糖尿病周围神经病变(DPN)中医证

- 型分布与相关因素关系研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012,14(4):120-121.
- [3] 江鹏,杨思鹏,齐保险,等. 益气活血通络法治疗糖尿病周围神经病变 52 例[J]. 安徽中医药大学学报, 2014, 33(5):33-35.
- [4] 方朝晖,赵进东. 芪归糖痛宁颗粒治疗糖尿病周围神经病变临床观察[J]. 中医药临床杂志, 2012,24(2):126-128.
- [5] 范丽红,舒仪琼. 芪归糖痛宁颗粒治疗糖尿病周围神经病变的疗效观察[J]. 陕西中医学院学报, 2014, 37(1): 26-28.
- [6] 洪丽莉,许冠荪,申国明,等. SD大鼠2型糖尿病模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2005,15(6):379-381.
- [7] Yach D, Stuckler D, Brownell KD. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes[J]. Nat Med, 2006,12(1):62-66.
- [8] Empl M, Renaud S, Erne B, et al. TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies[J]. Neurology, 2001,56(10):1371-1377.
- [9] Ren PC, Zhang Y, Zhang XD, et al. High-mobility group box 1 contributes to mechanical allodynia and spinal astrocytic activation in a mouse model of type-2 diabetes[J]. Brain Res Bull, 2012, 88(4):332-337.
- [10] Talbot S, Chahmi E, Dias JP, et al. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy [J]. J Neuroinflammation, 2010, 7(1):36.
- [11] 陈海燕,刘怀珍. 糖尿病周围神经病变的中医研究[J]. 西部中医药, 2014,27(3):138-140.
- [12] 吕仁和,赵进喜. 糖尿病及其并发症中西医诊治学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2009:641.
- [13] 庞国明,闫镛,朱璞,等. 糖尿病周围神经病变中医诊疗规范初稿[J]. 中华中医药杂志, 2010,25(2):260-264.
- (收稿日期:2015-09-17;编辑:曹健)

Action Mechanism of Qiguitangtongning Granule in Regulating Inflammatory Factors to Prevent Diabetic Peripheral Neuropathy

LI Dao-wei¹, SHEN Guo-ming², WANG Hao¹, JIANG Ai-juan², WANG Liang², YOU Liang-zhen¹, WANG Qin¹, HE Ying¹

(1. Clinical School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China; 2. Graduate Division, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China)

[Abstract]Objective To investigate the effects of prophylactic administration of Qiguitangtongning Granule on related inflammatory factors and to explore its action mechanism in improving diabetic peripheral neuropathy (DPN). **Methods** One hundred and twenty Sprague-Dawley rats were randomly divided into six groups: normal control group, model group, high-, medium-, and low-dose Qiguitangtongning Granule groups, and methylcobalamin group. A rat model of diabetes was reproduced using intraperitoneally injected streptozotocin combined with high-fat feed. Prophylactic administration of corresponding drugs was performed for 8 weeks. Motor nerve conduction velocity (MNCV) and tail-flick threshold temperature were used to evaluate the improvement in DPN. Enzyme linked immunosorbent assay was applied to determine the serum levels of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 1 (IL-1), and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) in rats. **Results** Compared with the normal control group, the model group had significantly increased tail-flick threshold temperature ($P < 0.05$), significantly reduced MNCV ($P < 0.05$), and significantly increased serum levels of MMP-1, TNF- α , IL-1, and MCP-1 ($P < 0.05$). In DPN rats, the effects of Qiguitangtongning Granule on MNCV, tail-flick threshold temperature, and serum MMP-1, TNF- α , IL-1, and MCP-1 were significantly dose-dependent ($P < 0.05$), and the dose-effect relationship varied between different doses and indices; different doses of Qiguitangtongning Granule and methylcobalamin had significantly different effects on MNCV, tail-flick threshold temperature, and serum MMP-1, TNF- α , and IL-1 in DPN rats ($P < 0.05$). **Conclusion** Qiguitangtongning Granule can prevent DPN. Its action mechanism may involve regulating the complicated inflammatory factor network, and its effect has a significant dose dependence.

[Key words] diabetic peripheral neuropathy; Qiguitangtongning Granule; inflammatory factor; motor nerve conduction velocity; tail-flick threshold temperature