

# 糖痛方对糖尿病大鼠肢体缺血再灌注后 肝肾 ICAM-1 和 MPO 表达的影响

黄 达 李鸣镝 郑亚琳 王秋虹 林 兰

**摘 要** **目的** 观察糖痛方对糖尿病大鼠肢体缺血再灌注后血浆、肝、肾细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和髓过氧化物酶(MPO)表达的影响,并探讨其保护作用机制。**方法** 采用链脲佐菌素(STZ)糖尿病大鼠模型,饲养1个月通过暂时阻断腹主动脉、髂总动脉和股动脉造成肢体缺血再灌注模型,随机分组后灌胃给药8周,检测各组大鼠血浆、肝、肾 ICAM-1 和 MPO 的表达情况。**结果** 与正常组大鼠比较,模型组大鼠血浆、肝、肾 ICAM-1 和 MPO 表达水平明显升高,经糖痛方治疗后,ICAM-1 和 MPO 表达水平明显下降。**结论** 糖痛方能够降低糖尿病大鼠肢体缺血再灌注后血浆、肝、肾 ICAM-1 和 MPO 的表达水平。

**关键词** 糖尿病 缺血再灌注 MPO ICAM-1

[中图分类号] R332 [文献标识码] A

**Influence of Tangtongfang on ICAM-1 and MPO in Liver and Kidney of Diabetic Rats Suffering from Ischemia-reperfusion Injury of Limb (DRSIRIL).** Huang Da, Li Mingdi, Zheng Yalin, et al. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

**Abstract Objective** To observe the expression level of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and myeloperoxidase (MPO) in plasma, liver and kidney of DRSIRIL treated by Tangtongfang, and to explore the protective mechanism. **Methods** Diabetic rats were induced by streptozotocin (STZ) and fed for one month. DRSIRIL model was made by keeping abdominal aorta, common iliac artery and femoral artery blocked temporarily. Grouped randomly, administered intragastrically for eight weeks, the rats of different groups were killed to detect the expression of ICAM-1 and MPO in plasma, liver and kidney. **Results** Compared with normal rats, the expression levels of ICAM-1 and MPO in plasma, liver and kidney of DRSIRIL were obviously higher. The expression levels of ICAM-1 and MPO decreased significantly after DRSIRIL were treated by Tangtongfang. **Conclusion** Tangtongfang can reduce the expression level of ICAM-1 and MPO in plasma, liver and kidney of DRSIRIL.

**Key words** Diabetes; Ischemia-reperfusion; MPO; ICAM-1

肢体缺血再灌注损伤(ischemic reperfusion injury of limb, IRIL)是临床上常见的病理生理过程,断肢再植、肢体主要供血动脉修补术、下肢血栓再通术以及骨外科长时间使用止血带等均可以引起 IRIL。研究表明,IRIL 不仅可以引起肢体远端组织严重损伤,而且可以导致远隔脏器功能障碍,甚至出现多脏器衰竭,其中肝、肾是最常见的两个受损器官<sup>[1, 2]</sup>。由于糖尿病患者体内存在明显的氧化应激状态并且常合并周围血管病变等并发症,因此与非糖尿病患者相比,临床上糖尿病患者更容易发生 IRIL 并且损伤程度也更为严重<sup>[3]</sup>。目前 IRIL 的实验研究主要针对正

常大鼠,对糖尿病大鼠的研究很少,本实验在糖尿病大鼠肢体缺血再灌注模型的基础上采用糖痛方治疗,并设立模型组和正常对照组,通过检测各组大鼠血浆、肝、肾 ICAM-1 和 MPO 的表达水平,探讨肢体缺血再灌注后糖尿病大鼠肝肾损伤的作用机制以及糖痛方的保护机制。

## 材料与方法

1. 实验材料:(1)实验动物:健康雄性 SD 大鼠 70 只,体重  $180 \pm 20$ g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,饲养于中国中医科学院广安门医院动物房。(2)实验药物:糖痛方:由黄芪、桂枝、白芍、川芎、细辛、姜黄、土鳖虫组成。每 30 付中药熬成 1000ml 液体(A液),A液使用纯净水稀释 1 倍为 B 液,B液稀释 1 倍为 C 液。(3)主要试剂和设备:链脲佐菌素(Sigma 公司),精蛋白锌胰岛素注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司),Rat sICAM-1/CD54 ELISA 试剂盒(R&D Systems 公司),MPO 试剂盒(南京建成生物工程研究所),ICAM-1(G-5)(Santa 公司),MPO(M-17)(Santa 公司),7160 全

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173445)

作者单位:100053 北京,中国中医科学院广安门医院内分泌科

通讯作者:林兰,主任医师、博士生导师,电子信箱:linlan05@

163.com

自动生化仪(日本日立公司),STAT FAX 2100 全自动酶标仪(Awareness Technology 公司),小鼠/山羊超敏二步法免疫组化检测试剂(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

2. 模型制备:(1)糖尿病模型制备:从 70 只 SD 大鼠中随机选择 12 只作为正常对照组,剩余 58 只大鼠禁食不禁水 12h,使用 pH 4.2 的柠檬酸盐缓冲液配制浓度为 2% 的链脲菌素(STZ)溶液,按 60mg/kg 的剂量腹腔注射,72h 后测定大鼠尾尖血糖,以随机血糖持续  $>16.7\text{mmol/L}$  作为糖尿病大鼠成模标准。造模期间,1 只大鼠死亡,4 只大鼠血糖未达标,对于血糖  $>27\text{mmol/L}$  的大鼠予精蛋白锌胰岛素 1~2IU,每天 1 次皮下注射,以排除血糖因素影响并降低大鼠死亡率。(2)下肢缺血再灌注模型制备<sup>[4,5]</sup>:糖尿病大鼠饲养 1 个月后,使用 3% 戊巴比妥钠麻醉,沿腹壁正中中线切开长约 3cm 切口,钝性剥离腹主动脉和右侧髂总动脉,使用动脉夹夹闭腹主动脉和右侧髂总动脉;另沿右侧腹股沟韧带剪开长约 2cm 切口,钝性剥离股动脉,使用动脉夹夹闭股动脉,计时 3h 后打开动脉夹恢复下肢血供,逐层缝合肌肉、皮肤,使用青霉素抗感染。手术过程及术后 7 天死亡 11 只大鼠,42 只造模成功。

3. 分组给药:术后 7 天,待伤口基本愈合后开始分组灌胃给药。模型大鼠 42 只,随机分为 4 组:模型组( $n=10$ )、糖痛方小剂量组( $n=10$ )、糖痛方中剂量组( $n=11$ )和糖痛方大剂量组( $n=11$ )。糖痛方小、中、大剂量组按  $0.78\text{ml}/(100\text{g} \cdot \text{d})$  分别灌服 C 液、B 液、A 液(分别相当于成人剂量的 3.5、7.0 及 14.0 倍),模型组和正常对照组( $n=12$ )按  $0.78\text{ml}/(100\text{g} \cdot \text{d})$  灌服纯净水。灌胃 8 周,期间死亡 2 只大鼠。

4. 指标检测:灌胃 8 周后,使用 3% 戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血(2 只取血失败,3 只出现溶血,47 只取血成功),3000r/min 离心 15min 分离血浆,采用 Elisa 法检测血浆 sICAM-1 水平,比色法检测血浆 MPO 水平。然后截取肝脏、肾脏部分组织,放入 10% 甲醛磷酸盐溶液中固定,经脱水、透明、浸蜡、包埋后制作石蜡切片;采用二步法免疫组化染色,操作步骤严格按照试剂说明书进行,200 倍显微镜下拍照。

5. 统计学方法:实验数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 18.0 统计软件。首先进行正态性检验,结果显示各组数据均满足正态性;采用单因素方差分析(one-way ANO-

VA),对于满足方差齐性的数据,两两比较选择 LSD 检验,不满足方差齐性的数据,两两比较选择 Dunnett T3 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 血浆 sICAM-1 和 MPO 水平:与正常对照组比较,模型组大鼠血浆 sICAM-1 和 MPO 水平明显升高( $P < 0.01$ )。经糖痛方治疗后大鼠血浆 sICAM-1 和 MPO 水平下降,其中与模型组比较,糖痛方中、大剂量组 sICAM-1 水平明显下降( $P < 0.01$ ),糖痛方小、中、大剂量组 MPO 水平明显下降( $P < 0.01$ )。与糖痛方小剂量组比较,糖痛方大剂量组 sICAM-1 和 MPO 水平明显下降( $P < 0.01$ ,表 1)。

表 1 各组大鼠血浆 sICAM-1 和 MPO 的表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | n  | sICAM-1 (pg/ml)                                     | MPO (U/L)                              |
|---------|----|-----------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 正常对照组   | 11 | 2629.07 $\pm$ 670.66                                | 25.94 $\pm$ 5.04                       |
| 模型组     | 9  | 7594.11 $\pm$ 1578.70 **                            | 61.24 $\pm$ 9.79 **                    |
| 糖痛方小剂量组 | 10 | 6062.96 $\pm$ 1067.41 **                            | 48.77 $\pm$ 5.06 **#                   |
| 糖痛方中剂量组 | 7  | 4788.98 $\pm$ 617.56 **#                            | 40.05 $\pm$ 9.21 **# $\Delta$          |
| 糖痛方大剂量组 | 10 | 3700.29 $\pm$ 607.89 **# $\Delta$ $\Delta$ $\Delta$ | 37.98 $\pm$ 7.86 **# $\Delta$ $\Delta$ |

与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.01$ ;与糖痛方小剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与糖痛方中剂量组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

2. 肝脏 ICAM-1 和 MPO 的表达:模型组大鼠肝脏 ICAM-1 表达水平明显升高,主要表达于肝小叶中央静脉和肝血窦内皮细胞表面,经糖痛方小、中、大剂量治疗后肝脏 ICAM-1 表达水平逐渐下降,正常大鼠肝脏表达少量 ICAM-1(图 1)。模型组 MPO 表达水平升高,主要表达于中央静脉周边的肝细胞,经糖痛方治疗后肝脏 MPO 表达水平有所下降,正常大鼠肝脏基本不表达 MPO(图 2)。

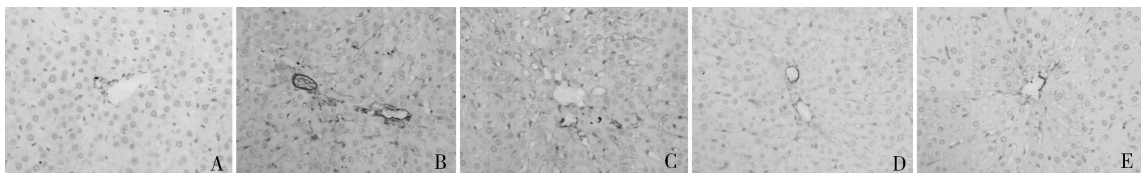


图 1 各组大鼠肝脏免疫组化 ICAM-1 表达( $\times 200$ )

A. 正常对照组;B. 模型组;C. 糖痛方小剂量组;D. 糖痛方中剂量组;E. 糖痛方大剂量组

3. 肾脏 ICAM-1 和 MPO 的表达:模型组大鼠肾脏 ICAM-1 表达水平明显升高,主要表达于肾小球内皮细胞和肾小管上皮细胞,经糖痛方小、中、大剂量治疗后肾脏 ICAM-1 表达水平逐渐下降,正常大鼠

肾脏表达少量 ICAM-1(图 3)。模型组肾脏 MPO 表达水平明显升高,主要表达于肾小管上皮细胞,经糖痛方小、中、大剂量治疗后肾脏 MPO 表达水平逐渐下降,正常大鼠肾脏表达少量 MPO(图 4)。

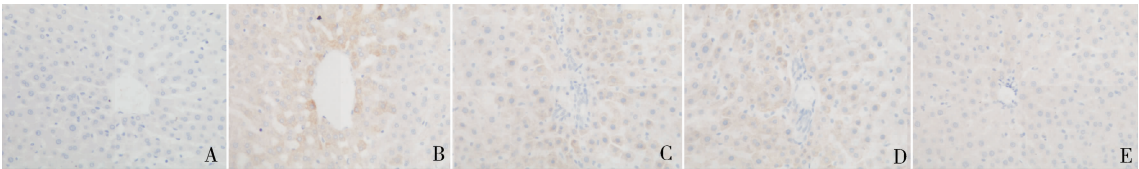


图2 各组大鼠肝脏免疫组化 MPO 表达(×200)  
A. 正常对照组;B. 模型组;C. 糖痛方小剂量组;D. 糖痛方中剂量组;E. 糖痛方大剂量组

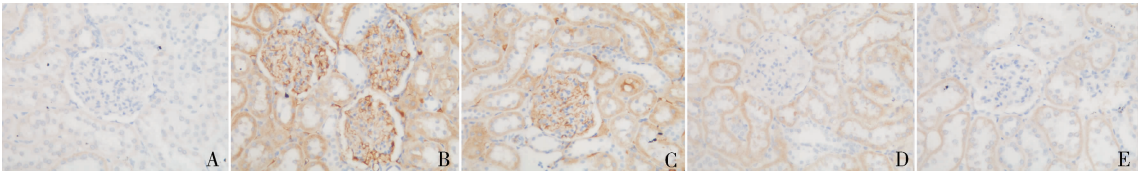


图3 各组大鼠肾脏免疫组化 ICAM-1 表达(×200)  
A. 正常对照组;B. 模型组;C. 糖痛方小剂量组;D. 糖痛方中剂量组;E. 糖痛方大剂量组

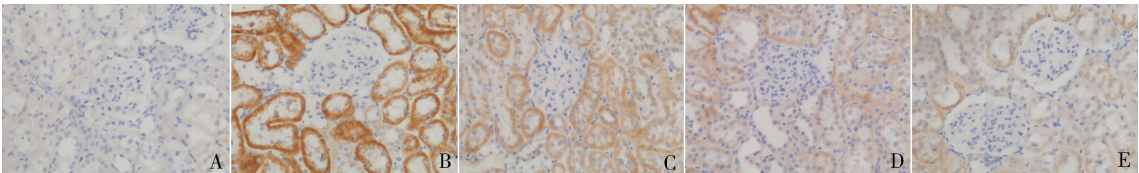


图4 各组大鼠肾脏免疫组化 MPO 表达(×200)  
A. 正常对照组;B. 模型组;C. 糖痛方小剂量组;D. 糖痛方中剂量组;E. 糖痛方大剂量组

讨 论

肢体缺血再灌注损伤(IRIL)是指各种原因引起的肢体缺血在血流恢复后机体组织器官损伤加重的病理生理过程,IRIL 不仅可以导致肢体局部缺血组织损伤加重,而且可以引起远隔器官损伤,其中肝、肾是临床上常见的两个受损器官。IRIL 形成的主要机制包括氧自由基损伤、炎症和微循环障碍等<sup>[6]</sup>。安英等<sup>[1]</sup>发现 IRIL 可以导致大鼠肝内炎性细胞浸润,肝细胞变性、坏死。血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶升高,肝脏超氧化物歧化酶(SOD)活性升高和丙二醛(MDA)下降。廉稳等<sup>[2]</sup>发现 IRIL 可以导致大鼠肾小球充血、水肿。血浆肌酐、尿素氮、黄嘌呤氧化酶(XOD)、MDA 升高,SOD 下降。以上研究表明肢体再灌注对肝、肾的损伤机制与氧化应激和炎症反应密切相关,本实验选择 ICAM-1 和 MPO 两项指标在于进一步探讨肢体缺血再灌注后糖尿病大鼠肝、肾的损伤机制以及糖痛方的保护机制。

实验结果表明,与正常组大鼠比较,模型组大鼠血浆、肝、肾中 ICAM-1 和 MPO 表达水平升高,经糖痛方小、中、大剂量治疗后,ICAM-1 和 MPO 表达水平逐渐下降。ICAM-1 是免疫球蛋白超家族成员之

一,主要介导炎性细胞与血管内皮细胞的黏附反应。静息状态下,ICAM-1 在血管内皮细胞、白细胞上呈低水平表达。炎症状态下,ICAM-1 的表达水平迅速上调<sup>[7]</sup>。MPO 是含血红素辅基的血红素蛋白酶,其主要功能是催化生成氧自由基,可以反应组织的氧化应激状态。实验结果显示,模型组大鼠肝肾组织 ICAM-1 和 MPO 表达明显增高,说明肢体缺血再灌注后糖尿病大鼠肝肾组织存在明显的氧化应激和炎症状态,这可能是导致肝肾组织损伤的重要机制之一。

糖痛方是由黄芪桂枝五物汤加减变化而成,组成包括黄芪、桂枝、白芍、川芎、细辛、姜黄、土鳖虫,主要用于治疗糖尿病周围神经病变和下肢血管病变。药理研究表明方中多位中药可以通过多种途径减轻缺血再灌注损伤。其中黄芪可以通过抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-10、caspase-3、Bax mRNA 的表达水平减轻肝肾缺血再灌注损伤<sup>[8,9]</sup>。姜黄可以通过降低研究缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )和中性粒细胞浸润减轻肝肾缺血再灌注损伤<sup>[10,11]</sup>。川芎内酯 A 可以降低心肌缺血再灌注后心肌乳酸脱氢酶和 MDA 的含量,并提高心肌 SOD 的活性<sup>[12]</sup>。川芎挥发油可以增加脑缺血

再灌注模型大鼠谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、一氧化氮合酶(NOS)、SOD 含量,并降低 MDA 表达水平<sup>[13]</sup>。土鳖虫能增强缺血再灌注后脑组织中 SOD 和谷胱甘肽(GSH)含量并降低 MDA 的含量<sup>[14]</sup>。白芍总苷可以通过提高 GRP78 的表达水平减轻心肌缺血再灌注损伤<sup>[15]</sup>。桂枝蒸馏液可以通过降低心肌脂质过氧化物生成并提高 SOD 活力减轻离体灌流鼠心肌缺血再灌注损伤。TNF- $\alpha$ 、IL-10、ICAM-1 等指标主要反映炎症状态,GSH-Px、NOS、SOD、MPO、MDA 等指标主要反映氧化应激状态,caspase-3、Bax mRNA 等指标主要反映细胞凋亡状态。本结果表明,糖痛方可以通过降低肢体缺血再灌注后糖尿病大鼠血浆、肝、肾组织 ICAM-1 和 MPO 的表达水平减轻肝肾组织损伤。结合以往研究结果,其保护作用机制与降低肝肾组织氧化应激、炎症和细胞凋亡密切相关。

#### 参考文献

- 1 安英,杨宁江,李强,等.灯盏花素预适应对大鼠肢体缺血再灌注肝损伤的保护作用[J].实用医学杂志,2013,29(4):543-545
- 2 廉稳,门秀丽,赵利军,等.缺血后处理对大鼠肢体缺血再灌注后肾组织的保护作用[J].中外医学研究,2013,11(19):1-3
- 3 任春久,张瑶,崔为正,等.氧化应激在 2 型糖尿病发病机制中的作用研究进展[J].生理学报,2013,65(6):664-673
- 4 Alipour M, Gholami MR, Jafari AI, et al. Intraperitoneal aminoguanidine improves sciatic nerve ischemia-reperfusion injury in male sprague-dawley rats[J]. Cell Mol Neurobiol, 2011, 31(5): 765-773
- 5 Wang Y, Schmeichel AM, Iida H, et al. Ischemia-reperfusion injury causes oxidative stress and apoptosis of Schwann cell in acute and

- chronic experimental diabetic neuropathy[J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(11-12): 1513-1520
- 6 冷梅,李红,王晋军,等.肢体缺血再灌注损伤的防治[J].光明中医,2013,28(6):1218-1219
- 7 林庆宾,张俐. CAM-1 在脊髓缺血再灌注损伤中的作用进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2009, 17(12): 68-70
- 8 陈宜方,桂定坤,陈建国,等.黄芪水煎剂对肾缺血再灌注损伤大鼠肾小管细胞凋亡的影响[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(6): 1293-1295
- 9 殷涛,毕旭东,庞世刚,等.黄芪对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(8): 1368-1371
- 10 陈晚平,杨尽晖,李珂,等.姜黄素对肝缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19(1): 37-40
- 11 年建华,陆逸庭,黄华平,等.姜黄素对大鼠肾缺血再灌注损伤及 HIF-1 $\alpha$  表达的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2012, 22(12): 943-945
- 12 高伟,肖永庆.川芎内酯 A 预处理对大鼠离体心脏缺血再灌注所致血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(18): 1448-1451
- 13 盛艳梅,孟宪丽,李春雨,等.川芎挥发油对大鼠大脑皮层神经细胞体外存活及脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 536-538
- 14 贺卫和,曾嵘,成细华.土鳖虫提取液对脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(4): 43-44
- 15 郭道华,韦颖梅,王小静,等.白芍总苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用及对 GRP78 表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(5): 556-558

(收稿日期:2014-02-22)

(修回日期:2014-03-24)

## 使用链脲佐菌素造模对 1 型糖尿病大鼠调节性 T 细胞的影响

高永亮 卢觅佳 杨红忠 黄敏聪 宣尧仙

**摘要** **目的** 研究使用链脲佐菌素造模 1 型糖尿病大鼠发病机制与调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)数量和功能变化的关系。**方法** 使用链脲佐菌素(streptozocin, STZ)对健康 SD 大鼠造模,分别选取造模成功大鼠和健康大鼠各 12 只,各项体征均符合成模标准后,分别选取模型和健康大鼠各 6 只(雌雄各半)解剖,取脾脏、胸腺和外周血使用流式细胞仪检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>(Tregs)水平状况,剩余大鼠解剖取脾脏分选 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞后检测其免疫抑制功能。**结果** 两组大鼠脾脏、胸腺和外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>水平比较无统计学差异( $P>0.05$ ),自体 and 异体大鼠 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞增殖率比较无统计学差异

基金项目:国家科技重大专项基金资助项目(2011ZX09301-003);浙江省重点实验室专项基金资助项目(2010F10026)

作者单位:310013 杭州,浙江省医学科学院安全性评价研究中心

通讯作者:宣尧仙,电子信箱:nndsve@mail.hz.zj.cn