

清化消瘀法对糖尿病及并发症脑缺血再灌注损伤的干预研究[※]

● 雷 跃^{1*} 曾庆明² 黄科军²

摘 要 目的:探讨清化消瘀法及其组方对糖尿病及并发症脑缺血再灌注损伤的作用机制。方法:从临床及动物实验两个方面,研究清化消瘀方对炎症细胞因子(PPAR γ 、Leptin、TNF- α 、PAI-1、IL-6)、核转录因子(NF- κ Bp65)、细胞间粘附因子(ICAM-1)表达的影响。结果:清化消瘀方在促进PPAR γ 的表达,下调Leptin、TNF- α 、PAI-1、IL-6、IL-6mRNA的表达,抑制NF- κ Bp65的活性、下调ICAM-1的表达,均优于对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:清化消瘀法及其组方是治疗糖尿病及其并发症脑缺血再灌注损伤的有效中药复方。

关键词 清化消瘀法 糖尿病 炎症细胞因子 核转录因子 细胞间粘附因子

当前随着我国经济的发展,糖尿病发病率的不断上升及糖尿病人群老龄化,糖尿病性脑卒中的发病率呈逐年上升趋势,据文献报道,糖尿病患者较非糖尿病患者更易发生缺血性脑卒中,但较少发生出血性脑卒中。随着研究的不断深入,发现糖尿病是卒中的一个重要危险因素,可使脑血管疾病和外周动脉疾病的发生危险增加,还有研究发现糖尿病患者与非糖尿病患者相比除了卒中死亡率增加外,其预后不良,包括与卒中有关的痴呆和卒中复发的危险均明显增高^[1~4]。清化消瘀方是笔者经过长期临床实践总结及试验,研制出的用于治疗2型糖尿病及并发症脑缺血再灌注损伤的临床有效方剂,为进一步揭示其作用机理,研究如下:

1 临床资料

1.1 一般资料 选择2007年10月~2009年10月,深圳市福田区中医院、深圳市罗湖区中医院住院的60例2型糖尿病(T2DM)患者,均符合1999年WHO糖尿病诊断标准,按随机表法将病例随机分为治疗组和对照组。治疗组30例,男16例,女14例;年龄35岁

~65岁,平均为 (47.7 ± 4.2) 岁,对照组30例,男15例,女15例,年龄35岁~65岁,平均为 (46.4 ± 5.1) 岁。两组治疗前均衡性检验,入选对象的性别、构成比、年龄、病程、体重指数等差异无显著性意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 治疗方法 对照组30例,常规西药治疗:糖尿病:二甲双胍(格华止,中美上海施贵宝制药有限公司生产),500mg,每次一片,每日三次;脂质代谢紊乱者按不同类型分别给予不同调节脂质代谢药物;高血压患者按要求给予降压治疗;有其他情况者按临床常规处理。治疗组30例,在西药常规治疗同时服用清化消瘀方(黄芪、太子参、山药、黄精、生首乌、生地、茯苓、泽泻、鬼箭羽、丹参、山楂、僵蚕、大黄等),每剂水煎至100ml,早晚分两次口服,每日一剂。治疗均以一个月为1疗程。

1.3 观察指标 (1)主要理化指标:血压、血脂、空腹血糖。(2)免疫组化法、原位杂交法检测过氧化物酶体增殖物激活受体亚型 γ (PPAR γ)、瘦素(Leptin)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、I型纤溶酶原激活物抑制因子(PAI-1)、白介素-6(IL-6)及其mRNA表达水平。免疫组化、原位杂交试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司和北京鼎国生物技术有限责任公司,免疫组化、原位杂交按照试剂说明书进行试验操作。(结果见表1、2、3、4)。

※基金项目 深圳市罗湖区科技局科研项目(No:200815)

*作者简介 雷 跃,女,主任医师。长期从事中医药临床工作。

•作者单位 1.广东省深圳市第四人民医院;2.广东省深圳市罗湖区中医院(518001)

1.4 标本取材 提取治疗前后人体腹部皮下脂肪组织,严格无菌操作。取组织后用含 1%的 DEPC、PH 为 7.2~7.4 的 3% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片待检。原位杂交做冰冻切片。

表 1 两组治疗前后血脂、血糖、血压比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	FBG (mmol/L)	SBP (mmHG)	RBP (mmHG)
治疗组	30	干预前	2.94 ± 1.66	5.76 ± 1.98	9.92 ± 1.62	148.60 ± 6.80	96.30 ± 2.60
	30	干预后	1.88 ± 0.79■	4.59 ± 1.51●	8.78 ± 1.22●	130.80 ± 4.80■	85.10 ± 2.80●
对照组	30	干预前	3.05 ± 1.69	5.81 ± 1.87	10.03 ± 1.38	146.30 ± 4.30	92.40 ± 3.80
	30	干预后	2.15 ± 0.81■	4.55 ± 1.60■	9.01 ± 0.98■	132.20 ± 3.60■	84.60 ± 2.90■

注:与对照组比较,● $P < 0.05$,治疗前后比较■ $P < 0.01$ 。

表 2 两组治疗前后证候改善情况及体重指数比较($\bar{x} \pm s$)

症 状	n	证候 n(%)		体重指数	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗组	30	36.8 ± 5.7	13.5 ± 2.6●■	27.8 ± 2.4	24.8 ± 2.6●■
对照组	30	37.4 ± 5.2	19.4 ± 3.3■	27.5 ± 2.7	25.2 ± 2.8■

注:与对照组比较,● $P < 0.05$,治疗前后比较■ $P < 0.01$ 。

表 3 治疗前后 PPAR γ 、Leptin、TNF- α 变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PPAR γ (阳性率)		Leptin(μ g/L)		TNF- α (mmol/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗组	30	27.63 ± 5.17	35.00 ± 5.43●■	12.03 ± 2.18	7.32 ± 2.19●■	28.34 ± 8.53	18.63 ± 6.74●■
对照组	30	28.23 ± 3.78	32.46 ± 4.21▲	11.50 ± 3.36	8.48 ± 4.06■	27.76 ± 5.33	20.52 ± 8.16■

注:与对照组比较,★ $P < 0.01$,● $P < 0.05$,治疗前后比较■ $P < 0.01$,▲ $P < 0.05$ 。

表 4 治疗前后 PAI-1、IL-6、IL-6mRNA 变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PAI-1(阳性率)		IL-6(pg/L)		IL-6mRNA	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗组	30	35.86 ± 8.76	17.13 ± 7.24●■	17.37 ± 8.31	15.24 ± 5.11●▲	2.87 ± 0.09	1.06 ± 0.05▲
对照组	30	35.47 ± 9.25	20.87 ± 9.36■	17.28 ± 9.26	16.47 ± 5.32▲	2.86 ± 0.11	1.11 ± 0.07▲

注:与对照组比较,★ $P < 0.01$,● $P < 0.05$,治疗前后比较■ $P < 0.01$,▲ $P < 0.05$ 。

通过对上述 60 例患者的观察,我们研究发现治疗组加服该复方后,能明显改善患者的症状体征及体重指数,与治疗前及对照组相比有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),治疗组与对照组均能够促进 PPAR γ 的表达,下调 Leptin、TNF- α 、PAI-1、IL-6、IL-6mRNA 的表达,与治疗前相比均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),与对照组相比,治疗组在促进 PPAR γ 的表达,下调 Leptin、TNF- α 、PAI-1、IL-6、IL-6mRNA 的表达方面均优于对照组,相比有

1.5 统计学处理 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$,前后比较采用 ANOVA 方差分析并进行方差齐性检验,方差齐采用配对 t 检验,否则采用 t 检验;多组比较采用方差分析。计算 P 值, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

2 动物实验

2.1 实验材料 (1)110 只 SD 雄性大鼠,SPF 级,体重 240 ± 20g,2~3 月龄。由广东省医学实验动物中心提供。清化消痰汤剂(由我院中药制剂室提供),NF- κ Bp65 试剂盒、ICAM-1 试剂盒、STZ、DAB 显色液均邮购于武汉博士德生物工程有限公司。

2.2 实验方法 (1)动物分组:在 EXCEL2000 中用

“=RAND()”命令随机分为以下5组:空白对照组($n=8$)、假手术组($n=8$)、局灶性脑缺血再灌注组($n=24$)、糖尿病局灶性脑缺血再灌注组($n=24$)、清化消瘀方组($n=24$),后三组每组又进一步分为缺血2小时再灌注6h、12h、24h三个亚组,各亚组每组8只。余22只为补充备用组。(2)给药方法:各组大鼠均于术前3周开始灌胃,按1.2ml/100g体重计算(按体表面积折算),治疗组给予灌服清化消瘀方组,其余各组按同剂量计算予生理盐水,每12h给药一次,直至处死。(3)造模:糖尿病动物模型制备:禁食8h大鼠左下腹腔内注射STZ 55mg/kg,稳定3d后,用血糖仪测定大鼠尾尖血血糖,空腹血糖 $>16.7\text{mol/L}$ 的大鼠判定为糖尿病大鼠,空白对照组、假手术组、局灶性脑缺血再灌注组大鼠腹腔注射等容积的无菌枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。局灶性脑缺血再灌注动物模型制备:采用在Zea longa等基础上改良的颈内动脉线栓加环扎法,缺血时间为2h。空白对照组未做任何处理,假手术组仅分离CCA、

ECA、ICA及迷走神经,并不插入线栓,余同手术组。(4)动物取材:大鼠不同分组于再灌注后规定时间点麻醉后,断头取脑,在前后视交叉之间,取3mm厚冠状切片,制成石蜡切片,片厚 $4\mu\text{m}$ 。
2.3 检测方法 免疫组化染色法检测NF- $\kappa\text{Bp}65$ 、ICAM-1的表达。阳性细胞记数方法和评分标准采用阳性强度和阳性率相结合的计分法。ICAM-1定量采用显微计数法,每张脑切片在光镜下(200倍)随机选取缺血区内10非重叠视野,进行。ICAM-1阳性血管计数,取均值即阳性血管T视野,每组数据计算均值与标准差。(结果见表5、6)。
2.4 统计学处理 数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用析因设计的方差分析,研究分组、再灌注时间的作用及两者的交互作用;模型组各时间段的比较、各组同一时间点及总体比较用单因素方差分析(Bonferroni法);方差不齐时,用Tamhane's T2法。两样本比较用t检验。检验水准 $\alpha=0.01$ 或0.05,统计软件采用SPSS13。

表5 各组NF- $\kappa\text{Bp}65$ 阳性评分结果(分, $\bar{x}\pm s$)

组别	n(只)	时间点		
		缺血再灌注6h	缺血再灌注12h	缺血再灌注24h
空白对照组	8	1.19 \pm 0.02	1.19 \pm 0.02	1.19 \pm 0.02
假手术组	8	1.23 \pm 0.03	1.23 \pm 0.02	1.21 \pm 0.05
脑缺血再灌注组	8	3.03 \pm 0.17 [▲]	2.87 \pm 0.14 [▲]	2.50 \pm 0.11 ^{▲■}
糖尿病脑缺血再灌注组	8	3.56 \pm 0.17 [▲]	3.03 \pm 0.13 [▲]	2.74 \pm 0.19 [▲]
清化消瘀方组	8	2.64 \pm 0.12 ^{▲■}	2.27 \pm 0.13 ^{▲■}	1.99 \pm 0.09 ^{▲■}

注:与假手术组比较[▲] $P<0.05$,与对照组比较[■] $P<0.01$ 或0.05。

表6 各组ICAM-1阳性血管数目($\bar{x}\pm s$)

组别	n(只)	时间点		
		缺血再灌注6h	缺血再灌注12h	缺血再灌注24h
脑缺血再灌注组	8	20.15 \pm 3.30	32.23 \pm 4.12	47.05 \pm 5.10
糖尿病脑缺血再灌注组	8	36.30 \pm 4.82	47.31 \pm 5.88	58.30 \pm 6.54
清化消瘀方组	8	15.05 \pm 1.17 [▲]	24.74 \pm 2.04 [▲]	33.50 \pm 3.01 [▲]

注:与对照组比较[▲] $P<0.05$ 。

结果发现空白对照组、假手术组脑组织NF- $\kappa\text{Bp}65$ 表达微弱,与假手术组相比,脑缺血再灌注组、糖尿病脑缺血再灌注组、清化消瘀方组的NF- $\kappa\text{Bp}65$ 的阳性表达增加($P<0.01$);清化消瘀方组NF- $\kappa\text{Bp}65$ 表达低于脑缺血再灌注组、糖尿病脑缺血再灌

注组($P<0.05$);空白对照组、假手术组未见ICAM-1阳性表达。脑缺血再灌注组、糖尿病脑缺血再灌注组表达增加,清化消瘀方组ICAM-1免疫阳性血管数较脑缺血再灌注组、糖尿病脑缺血再灌注组著减少($P<0.05$)。

3 讨论

笔者通过长期的临床实践观察及实验研究,在糖尿病气阴两虚为本,燥热、瘀血为标的传统中医病因病机基础上,更提出了痰湿不仅是糖尿病的病理产物,更是导致和加重糖尿病的主要病机的理论,认为痰湿阻碍气机,影响脏腑功能;痰湿产生瘀血,痰瘀互结;痰湿加重糖尿病并发症并贯彻病程的始终。

瘀血与痰浊同源异流,生理上津血同源,病理上则“血不利则为水”(《金匱要略》),瘀血阻滞脉络,影响水湿津液输布,水泛日久则为痰湿。糖尿病其病已久,其治亦难,理属疑难之怪证,因而痰瘀互结之机较易形成。故《医宗粹言》说:“先因伤血,血逆则气滞,气滞则生痰”;而《血证论》更是直言:“血积既久,亦能化为痰水。”其治疗当从整体观念出发,在辨证论治的同时注重从痰从瘀论治,提出清化痰热,活血化瘀为主要治法即清化消痰法,并研制出复方中药制剂清化消痰方用于治疗 2 型糖尿病(气阴两虚、痰瘀互结型),前期临床研究发现^[5-9]该方能改善其氧化应激状态,阻断糖化修饰进程,减少晚糖基化终产物形成,明显降低 2 型糖尿病合并高脂血症患者血糖、调整脂质代谢紊乱、改善该类患者临床症状。

清化消痰方由黄芪、太子参、山药、黄精、生首乌、生地、茯苓、泽泻、鬼箭羽、丹参、山楂、僵蚕、大黄等药组成,黄芪健脾化痰、益气生津止渴;太子参补气又能生津,为糖尿病既补稍清之上品;山药益气养阴,补脾肺肾,为平补气阴之良药;黄精滋肾润肺、补脾益气,故有补虚而止渴之效。生首乌有补肾润肠通便之效;生地善能清热养阴,生津润燥。以上药物配伍共奏益气养阴,止渴生津之功,平补而无燥热之虞。茯苓利水渗湿,健脾安神,利水而不伤正,无寒热之偏;泽泻利水渗湿,化痰祛浊;鬼箭羽活血散瘀,临床体会尤善祛糖尿病之瘀血;丹参活血祛瘀,消微散结,为活血化瘀之要药;山楂通行气血,化瘀散结;僵蚕化痰散结,大黄酒制活血祛瘀,清泄湿热而无苦寒太过之忧。泽泻、茯苓,利水化痰祛浊而无伤阴之偏;鬼箭羽丹参山楂僵蚕,活血和血而无破血耗血之损。诸药合用,共奏清化痰热,益气养阴,活血化瘀之功。我们在临床及研究中进一步发现泽泻淡渗能降血脂,泄肾中湿浊

痰浊;丹参既活血化瘀,又行水化痰,更强心、降脂、利尿,能改善肾脏血液循环,是治疗气阴两虚、痰瘀互结型糖尿病肾病的效药;僵蚕“祛风散寒,燥湿化痰,温行血脉”(《本草求真》),能“祛血中之痰”,研末冲服于辨证方中,多能加强降脂、降糖效果。我们认为“血不利则为水”是瘀可化湿成水,反之“水不利则为血”乃水可聚湿成瘀。因此化其瘀则水易行,利其水而瘀易泄,活血利水,不可偏废。

通过上述临床及动物实验研究,发现该方能够促进 PPAR γ 的表达,下调 Leptin、TNF- α 、PAI-1、IL-6、IL-6mRNA 的表达,降低糖尿病脑缺血再灌注损伤大鼠 NF- κ Bp65、ICAM-1 的表达,在对糖尿病并发脑卒中有治疗作用,在转录水平进一步阐明了清化消痰法及其组方抗糖尿病及并发症脑缺血再灌注损伤的作用机制。

参考文献

- [1] Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: Epidemiology, pathophysiology, and management [J]. JAMA, 2002, 287: 2570-2581.
- [2] Goldstein LB, Adams R, Becker K, et al. Primary prevention of ischemic stroke: A statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association [J]. Circulation, 2001, 103: 163-182.
- [3] Luchsinger JA, Tang MX, Stern Y, et al. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort [J]. Am J Epidemiol, 2001, 154: 635-641.
- [4] Hankey GJ, Jamrozik K, Broadhurst RJ, et al. Long-term risk of first recurrent stroke in the Perth Community Stroke Study [J]. Stroke, 1998, 29: 2491-2500.
- [5] 周晓, 张炜宁, 曾庆明, 等. 清化消痰方治疗 2 型糖尿病合并高脂血症 36 例临床观察. 湖南中医杂志, 2003, 9(3): 301-301.
- [6] 曾庆明, 张炜宁, 周晓, 等. 2 型糖尿病合并高脂血症患者氧化应激状态及清化消痰方干预作用研究. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(7): 579-580.
- [7] 张炜宁, 曾庆明, 周晓, 等. 清化消痰方对 2 型糖尿病合并高脂血症患者氧化修饰过程的影响. 中国中医药科技, 2004, 11(6): 325-326.
- [8] 曾庆明, 张炜宁, 周晓, 等. 略论痰湿是糖尿病的重要病机. 湖南中医药导报, 2004, 10(12): 1-3.
- [9] 曾庆明, 张炜宁. 略论化痰祛浊是治疗糖尿病的重要法则. 江西中医药, 2004, 12: 11-13.