

[药 理]

缩泉胶囊改善糖尿病小鼠膀胱功能

范平龙, 连大卫, 徐伟君, 扶丽君, 黄 萍, 操红缨*
(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 研究缩泉胶囊(乌药、益智仁、山药)对糖尿病小鼠膀胱病变的改善作用及其作用机制。**方法** 60 只小鼠随机分为正常组($n=8$)及建模组($n=52$),后者采用高脂饲料喂养加腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病模型,将造模成功小鼠($n=32$)随机分为模型组,甲钴胺片组,缩泉胶囊低、高剂量组。观察缩泉胶囊对糖尿病小鼠空腹血糖值(FBG)、糖化血清蛋白(GSP)水平及一般情况的影响;测定膀胱漏尿点压(BLPP),并对膀胱进行组织病理学染色;利用荧光双标法检测 P 物质及 NK1 受体表达。**结果** 各组 FBG、GSP、体质量、摄食量和饮水量无明显差异,高剂量缩泉胶囊可以显著降低小鼠尿量。与模型组相比,缩泉胶囊治疗后能显著升高 BLPP、P 物质、NK1 受体表达,并能明显改善小鼠膀胱组织形态学。**结论** 缩泉胶囊改善糖尿病小鼠膀胱病变,其机制可能与上调膀胱组织中 P 物质及 NK1 受体表达有关。

关键词: 缩泉胶囊;糖尿病膀胱病变;P 物质;NK1 受体

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)01-0001-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.01.001

Improvement of Suoquan Capsules on bladder function of diabetic mice

FAN Ping-long, LIAN Da-wei, XU Wei-jun, FU Li-jun, HUANG Ping, CAO Hong-ying*
(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the improving effect of Suoquan Capsules (*Linderae Radix*, *Alpiniae oxyphyllae Fructus* and *Dioscoreae Rhizoma*) on mice with diabetic cystopathy and its mechanism of action. **METHODS** Sixty mice were randomly assigned into normal group ($n=8$) and model group ($n=52$); the diabetic models of the latter were induced by high-fat feeding combined with streptozotocin (STZ) injection, then modeled mice ($n=32$) were randomly divided into model, Mecobalamin Tablets, low- and high-dose Suoquan Capsules groups. The influences of Suoquan Capsules on fasting blood glucose (FBG), glycated serum protein (GSP) level and general conditions were observed. The bladder leak point pressure (BLPP) was determined. Histopathological staining was performed on urinary bladder. And the expressions of substance P and NK1 receptor were detected by double immunofluorescent staining. **RESULTS** There were no significant differences in FBG, GSP, body weight, food intake and water consumption among various groups. The high-dose Suoquan Capsules significantly decreased urine volume of mice. Compared with the model group, the treatment with Suoquan Capsules markedly increased BLPP, the expressions of substance P and NK1 receptor were significantly increased, and the histopathology of bladder in mice was obviously improved. **CONCLUSION** Suoquan Capsules improves the diabetic cystopathy in mice, and its mechanism maybe related to the up-regulation of substance P and NK1 receptor expressions in bladder tissue.

KEY WORDS: Suoquan Capsules; diabetic cystopathy; substance P; NK1 receptor

收稿日期: 2016-09-12

基金项目: 国家自然科学基金(81673676)

作者简介: 范平龙(1992—),男,硕士生,从事中药复方药理研究。E-mail: 18770036440@163.com

*通信作者: 操红缨,女,教授,从事中药新药与保健品开发。Tel: (020) 39358046, E-mail: 1171629708@qq.com

糖尿病膀胱病变 (diabetic cystopathy, DCP) 是糖尿病患者常见的泌尿系统并发症, 通常表现为膀胱感觉功能下降、膀胱容量增加、尿排空能力减弱等^[1-6]。目前, 临床上治疗 DCP 大多是在控制血糖的基础上加用神经营养药物、改善神经微循环的药物或抗氧化剂等, 见效慢, 治疗效果不理想。缩泉丸出自《妇人良方》, 由乌药、益智仁、山药组成, 具有温肾祛寒, 缩尿止遗的功效, 现代医学临床常加减配伍或与其他药物、其他方法合用, 用以治疗小儿遗尿^[7]、夜尿症^[8]、尿失禁^[9]等下尿路症状, 所治疗病症与糖尿病膀胱病变所引起的临床症状相似。本实验建立糖尿病小鼠模型, 观察缩泉胶囊对小鼠糖尿病膀胱病变的影响, 并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 C57BL/6 小鼠, 雄性, 体质量 20 ~ 22 g, 由广东省医学实验动物中心提供, 在广州中医药大学实验动物中心饲养及实验, 许可证号 SCXK (粤) 2013-0002。

1.2 药物与试剂 缩泉胶囊 (湖南汉森制药有限公司, 批号 130512); MD 45% 高脂纯化配方饲料 (江苏美迪森生物医药有限公司, 批号 1503026); 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 美国 Sigma 公司, 批号 031M1287V); 甲钴胺片 (弥可保) (卫材 [中国] 药业有限公司, 批号 140405A); 柠檬酸 (天津市福晨化学试剂厂, 批号 00116); 柠檬酸三钠 (天津市大茂化学试剂厂, 批号 00110); 糖化血清蛋白 (GSP) 测试盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 20150713); GTX30169 抗 NK1 受体兔多克隆抗体 (美国 GeneTex 公司); GTX10353 抗 P 物质豚鼠多克隆抗体 (美国 GeneTex 公司); 6090-02 山羊抗豚鼠 IgG (H + L) (美国 Southern-Biotech 公司); 4030-31 山羊抗兔 IgG-Alexa Fluor 647 (美国 SouthernBiotech 公司); D9542 DAPI 染液 (美国 Sigma 公司)。

1.3 主要仪器 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司, 型号 EL204); 罗氏活力型血糖仪及配套试纸 (ACCU-CHEK ACTIVE, 型号 GC14926924); 移液枪 (赛默飞世尔仪器有限公司, 型号 ZX57486); 纯水机 [锐思捷, 型号 RODZ-50 (H) -RE]; 高温灭菌柜 (HIRAYAMA 公司, 型号 HVE-50); 多功能酶标仪 (瑞士 TECAN 公司, 型号 Sunrise); 尿动力学检查仪 (加拿大 Laborie 公司, 型号 Laborie UDS-94); 倒置荧光

显微镜 (日本 Nikon 公司, 型号 TE2000-U); 激光共聚焦扫描显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司, 型号 LSM710)。

2 方法

2.1 动物建模与分组 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 60 只, 随机分为正常组 ($n = 8$) 及建模组 ($n = 52$)。试验期间, 正常组给予普通饲料, 建模组给予 MD 45% 高脂纯化配方饲料。饲养 4 周后, 禁食不禁水 12 h, 建模组按 200 mg/kg 剂量腹腔注射 2% 的 STZ 溶液, 正常组注射等容积的柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲溶液。注射 3 d 后, 小鼠禁食不禁水 8 h 后检测空腹血糖值, 空腹血糖值达 10.5 mmol/L 视建模成功, 将建模成功小鼠 ($n = 32$) 随机分为模型组, 阳性组 [甲钴胺片 0.2 mg/(kg · d)], 缩泉胶囊低、高剂量组 [分别为 900、3 600 mg/(kg · d)], 每组 8 只。

2.2 给药方式及一般情况检测 建模成功 8 周后给予受试药品 [0.2 mL/(10 g · d)], 空白组和模型组给予等容积蒸馏水, 每天 1 次, 连续 28 d。于给药前一周、给药后每周记录进食量、饮水量及 5 h 尿量, 给药前 1 d 及末次给药后禁食不禁水 12 h, 尾尖采血测定小鼠空腹血糖值 (FBG)。

2.3 指标检测及方法

2.3.1 膀胱漏尿点压 (BLPP) 检测 给药 4 周结束后, 小鼠以乌拉坦麻醉, 仰卧位固定。沿下腹部正中中线剪一小口, 暴露膀胱。将采血针从膀胱顶插入, 小荷包缝合, 连接三通阀, 一端连接压力传感器作为膀胱测压管, 另一端连接灌注泵作为灌注管。排空动物膀胱尿液, 测压管与压力传感器相连, 灌注管与微量注射泵相连, 泵水体积流量为 50 μ L/min。体内置零后, 开启微量注射泵向膀胱内灌注生理盐水, 观察尿道外口有无液体溢出。液体溢出时记录的膀胱压即为 BLPP, 同时停止灌注。

2.3.2 糖化血清蛋白含量检测 膀胱漏尿点压测定完成后, 使用普通采血管对小鼠进行腹主动脉取血, 静置 1 ~ 2 h 后, 离心取上清。严格按照 GSP 试剂盒操作说明, 测定小鼠血清中 GSP 含量。

2.3.3 膀胱组织 HE 染色及 Masson 染色 小鼠采血完毕后, 无菌分离膀胱, 纵切将其分成 3 部分, 取其中两部分立即固定于多聚甲醛溶液, 常规脱水、包埋、切片、脱蜡。再分别进行 HE 染色和 Masson 染色, 使用光学显微镜观测各组小鼠膀胱组织的组织形态学变化。

2.3.4 膀胱组织免疫荧光双标染色 剩余一部分膀胱组织用无菌 Kerbs 液冲洗后,滤纸吸干,使用 OCT 包埋剂固定于包埋盒中,迅速保存于液氮中,并转移至-80℃冰箱。取膀胱组织固定于冰冻切片机进行切片,用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次(每次 5 min)后,置于封闭液中,室温封闭 30 min,封闭结束后将切片取出,继续使用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次(每次 5 min),然后将切片分别加入豚鼠抗 P 物质与兔抗 NK1 受体中,所有一抗经 0.01 mol/L PBS 稀释 200 倍后,在 4℃孵育过夜。孵育结束后将切片取出,经 0.01mol/L PBS 漂洗 3 次(每次 10 min)后,加入山羊抗豚鼠 IgG (H+L) 二抗及山羊抗兔 IgG-Alexa Fluor 647 二抗的混合液,37℃孵育 1.5 h 后,PBS 洗涤 3 次(每次 10 min),封片剂封片,置于激光共聚焦扫描显微

镜下观察,并拍照。

2.4 数据处理 实验数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,实验数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。多组间比较时,各组观察值服从正态分布或近视正态分布,并且各组间的方差具有齐性,采用单因素方差分析。荧光双标图片使用 Image J 软件进行半定量分析。 $P < 0.05$ 视为具有显著性差异。

3 实验结果

3.1 缩泉胶囊对糖尿病小鼠 FBG 及 GSP 的影响 与正常组相比较,模型组在开始给药前及结束给药后的 FBG 均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),以及给药后小鼠 GSP 明显上升($P < 0.01$);与模型组相比,各给药组小鼠 FBG 及 GSP 水平无显著性差异($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 缩泉胶囊对糖尿病小鼠 FBG 及 GSP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 1 Influences of Suoquan Capsules on the fasting blood glucose (FBG) and glycosylated serum protein (GSP) in diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	FBG/(mmol·L ⁻¹)		GSP/(mmol·L ⁻¹)
		给药前	给药后	
正常组	—	5.48 ± 0.47	6.05 ± 0.53	1.839 0 ± 0.089 6
模型组	—	11.20 ± 4.12 [#]	13.64 ± 4.40 ^{##}	2.117 2 ± 0.101 8 ^{##}
阳性组	0.2	11.03 ± 5.22	12.58 ± 4.63	2.094 5 ± 0.158 6
缩泉胶囊高剂量组	3 600	12.21 ± 5.70	13.66 ± 5.21	2.154 1 ± 0.036 4
缩泉胶囊低剂量组	900	11.76 ± 4.27	13.95 ± 5.94	2.080 9 ± 0.140 4

注:与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

3.2 缩泉胶囊对糖尿病小鼠体质量、摄食量、饮水量及尿量的影响 模型组小鼠给药前及给药期间体质量与正常组相比显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),摄食量、饮水量及尿量与均显著增加($P <$

0.05 或 $P < 0.01$);各给药组与模型组相比,体质量、摄食量及饮水量无显著性差异($P > 0.05$);阳性组及缩泉胶囊高剂量组在给药 3 周及 4 周后,尿量与模型组相比显著降低($P < 0.05$)。见表 2~5。

表 2 缩泉胶囊对糖尿病小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8, g$)

Tab. 2 Influence of Suoquan Capsules on the body weight of diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 8, g$)

组别	给药前	给药 1 周后	给药 2 周后	给药 3 周后	给药 4 周后
正常组	30.24 ± 0.68	30.13 ± 0.67	29.90 ± 0.63	29.44 ± 0.52	29.15 ± 0.46
模型组	26.66 ± 0.75 ^{##}	26.55 ± 0.72 ^{##}	26.56 ± 0.76 ^{##}	26.56 ± 0.74 ^{##}	27.06 ± 0.67 [#]
阳性组	26.45 ± 0.84	26.81 ± 0.74	26.95 ± 0.79	26.94 ± 0.73	27.09 ± 0.75
缩泉胶囊高剂量组	26.50 ± 0.64	26.48 ± 0.60	25.36 ± 0.75	26.69 ± 0.80	27.34 ± 0.66
缩泉胶囊低剂量组	26.41 ± 0.49	26.58 ± 0.47	26.45 ± 0.55	26.66 ± 0.58	27.14 ± 0.70

注:与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

表 3 缩泉胶囊对糖尿病小鼠摄食量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8, g$)

Tab. 3 Influence of Suoquan Capsules on the food intake of diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 8, g$)

组别	给药前	给药 1 周后	给药 2 周后	给药 3 周后	给药 4 周后
正常组	3.80 ± 0.14	3.99 ± 0.13	4.07 ± 0.15	3.73 ± 0.16	3.94 ± 0.20
模型组	5.41 ± 0.18 ^{##}	5.10 ± 0.14 ^{##}	4.94 ± 0.14 ^{##}	5.06 ± 0.11 ^{##}	5.13 ± 0.13 ^{##}
阳性组	5.41 ± 0.22	4.99 ± 0.13	5.11 ± 0.11	5.24 ± 0.09	5.14 ± 0.07
缩泉胶囊高剂量组	4.90 ± 0.18	5.25 ± 0.12	4.90 ± 0.11	5.08 ± 0.11	5.03 ± 0.11
缩泉胶囊低剂量组	5.29 ± 0.20	5.11 ± 0.10	5.10 ± 0.07	5.23 ± 0.11	4.98 ± 0.12

注:与正常组比较,^{##} $P < 0.01$

表 4 缩泉胶囊对糖尿病小鼠饮水量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8, \text{mL}$)

Tab. 4 Influence of Suoquan Capsules on the water consumption of diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n=8, \text{mL}$)

组别	给药前	给药 1 周后	给药 2 周后	给药 3 周后	给药 4 周后
正常组	4.30 ± 0.12	4.43 ± 0.12	4.50 ± 0.12	4.30 ± 0.11	4.42 ± 0.17
模型组	6.10 ± 0.30 ^{##}	6.45 ± 0.18 ^{##}	6.17 ± 0.18 ^{##}	6.29 ± 0.23 ^{##}	6.24 ± 0.20 ^{##}
阳性组	6.00 ± 0.26	5.92 ± 0.24	6.07 ± 0.23	6.21 ± 0.18	5.92 ± 0.15
缩泉胶囊高剂量组	5.91 ± 0.26	5.87 ± 0.21	5.73 ± 0.21	5.85 ± 0.26	5.88 ± 0.09
缩泉胶囊低剂量组	6.07 ± 0.25	5.95 ± 0.20	5.92 ± 0.20	6.05 ± 0.20	5.83 ± 0.25

注：与正常组比较，^{##} $P < 0.01$

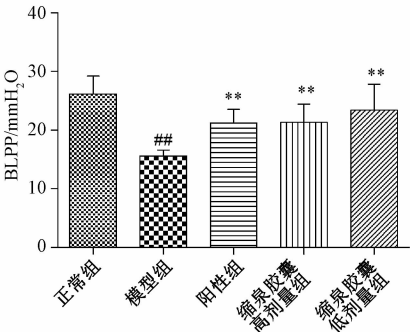
表 5 缩泉胶囊对糖尿病小鼠尿量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8, \text{mL}$)

Tab. 5 Influence of Suoquan Capsules on the urine volume of diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n=8, \text{mL}$)

组别	给药前	给药 1 周后	给药 2 周后	给药 3 周后	给药 4 周后
正常组	2.24 ± 0.10	2.32 ± 0.06	2.25 ± 0.09	2.47 ± 0.10	2.37 ± 0.09
模型组	4.64 ± 0.35 ^{##}	4.77 ± 0.15 ^{##}	4.74 ± 0.21 ^{##}	5.22 ± 0.26 ^{##}	4.80 ± 0.21 ^{##}
阳性组	4.70 ± 0.30	4.68 ± 0.32	4.46 ± 0.31	4.42 ± 0.25 [*]	4.12 ± 0.29 [*]
缩泉胶囊高剂量组	4.56 ± 0.31	4.48 ± 0.27	4.07 ± 0.25	4.30 ± 0.33 [*]	4.08 ± 0.26 [*]
缩泉胶囊低剂量组	4.61 ± 0.29	4.56 ± 0.28	4.52 ± 0.30	4.51 ± 0.28	4.51 ± 0.25

注：与正常组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$

3.3 缩泉胶囊对糖尿病小鼠 BLPP 的影响 与正常组相比，模型组小鼠 BLPP 显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组小鼠 BLPP 显著上升 ($P < 0.01$)。见图 1 (1 mmH₂O = 0.009 8 kPa)。



注：与正常组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$

图 1 缩泉胶囊对糖尿病小鼠 BLPP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 1 Influence of Suoquan Capsules on the bladder leak point pressure (BLPP) in diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.4 缩泉胶囊对糖尿病小鼠膀胱组织形态学的影响 正常组小鼠膀胱组织肌束排列有序，肌束之间充满丰富的胶原蛋白及弹性蛋白，且结构致密；模型组小鼠膀胱组织中，肌细胞肥大，肌束排列紊乱，肌束间间隙显著增大，间隙间胶原纤维少，胶原蛋白及弹性蛋白松散。与模型组相比，缩泉胶囊可以明显改善膀胱肌束的排列、肌束之间致密度及胶原纤维的含有量，且高剂量优于低剂量。见图 2。

3.5 免疫荧光双标 P 物质及 NK1 受体表达情况 与正常组相比，模型组膀胱组织中 P 物质受体的

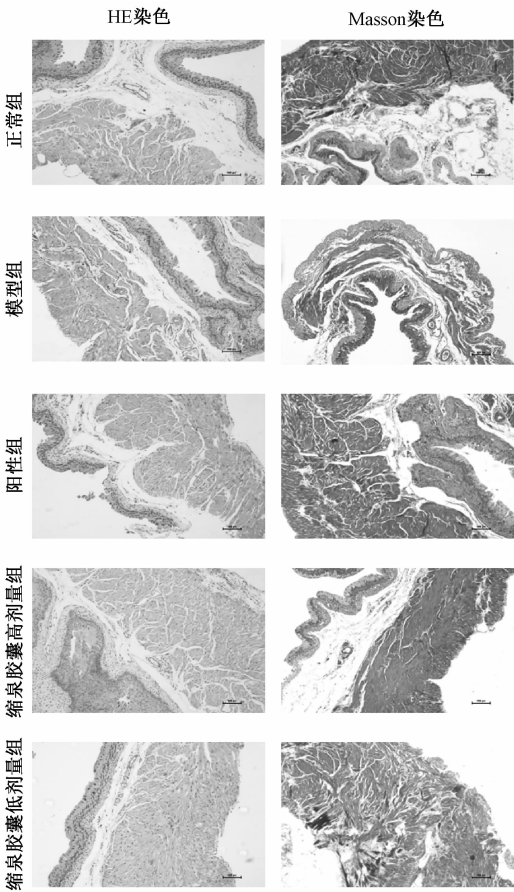


图 2 缩泉胶囊对糖尿病小鼠膀胱组织形态学的影响 (HE & Masson, $\times 100$)

Fig. 2 Influence of Suoquan Capsules on the histopathology of bladder in diabetic mice (HE & Masson, $\times 100$)

表达强度、NK1 受体的表达强度及 P 物质/NK1 受体共表达强度均显著下降 ($P < 0.01$)；与模型组

相比，各给药组膀胱中 P 物质受体，NK1 受体表达强度及 P 物质/NK1 共表达强度均显著升高

表 6 缩泉胶囊对糖尿病小鼠 P 物质及 NK1 受体表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab. 6 Influences of Suoquan Capsules on the expressions of substance P and NK1 receptor in diabetic mice($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	P 物质表达强度	NK1 受体表达强度	P 物质/NK1 共表达强度
正常组	—	0.427 4 ± 0.067 2	0.546 5 ± 0.201 3	0.406 5 ± 0.060 7
模型组	—	0.157 5 ± 0.025 6 ^{##}	0.187 5 ± 0.067 1 ^{##}	0.137 4 ± 0.027 2 ^{##}
阳性组	0.2	0.342 9 ± 0.042 4 ^{**}	0.353 0 ± 0.048 9 ^{**}	0.327 7 ± 0.056 9 ^{**}
缩泉胶囊高剂量组	3 600	0.363 7 ± 0.052 1 ^{**}	0.375 5 ± 0.053 2 ^{**}	0.335 1 ± 0.057 0 ^{**}
缩泉胶囊低剂量组	9 00	0.292 7 ± 0.060 1 ^{**}	0.450 6 ± 0.065 7 ^{**}	0.278 1 ± 0.048 9 ^{**}

注：与正常组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$

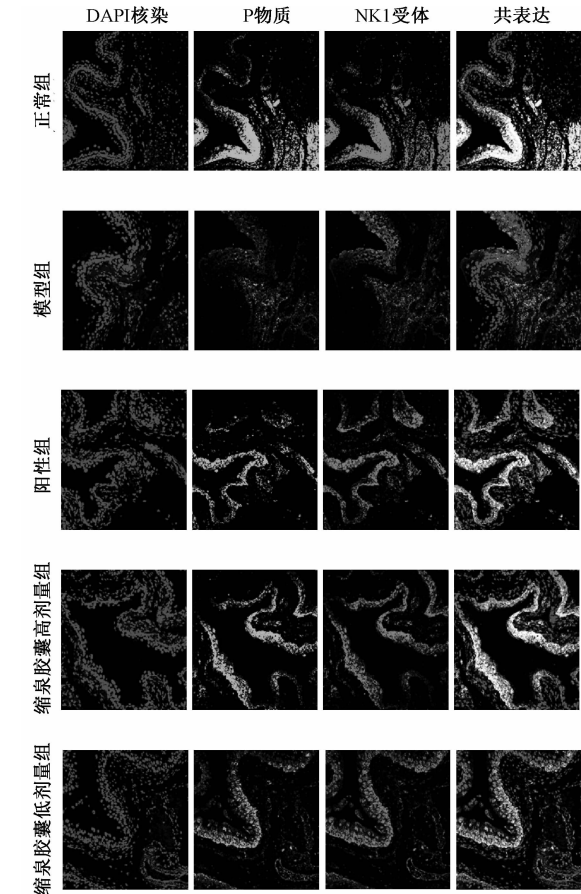


图 3 缩泉胶囊对糖尿病小鼠 P 物质及 NK1 受体表达的影响（免疫荧光法， $\times 100$ ）

Fig. 3 Influences of Suoquan Capsules on the expressions of substance P and NK1 receptor in diabetic mice (immunofluorescence staining, $\times 100$)

4 讨论

为了探讨缩泉胶囊对糖尿病膀胱病变是否有治疗作用，本实验通过高脂饲料喂养联合 STZ 腹腔注射建立糖尿病模型。研究表明，模型组出现典型的糖尿病“三多一少”症状，并在建模 12 周后，模型组小鼠血清中糖化血清蛋白水平明显高于正常组小鼠，说明糖尿病模型建立成功。通过

BLPP 的测定及膀胱组织形态学观测表明，12 周糖尿病小鼠，膀胱 BLPP 明显低于正常组，膀胱组织形态学发生改变。

经过缩泉胶囊治疗 4 周后，糖尿病小鼠血糖及糖化血清蛋白水平并无明显改善，但显著减少尿量，对膀胱组织形态学及 BLPP 也有明显改善。说明缩泉胶囊对糖尿病膀胱的治疗作用并不是通过调节血糖水平来达到的，可能与其神经传导的改善有关。

糖尿病膀胱病变的致病机制复杂且因素多，目前将其发病原因主要归为肌源性及神经源性两大类，其中神经源性病变日益受到关注。P 物质是一种十一氨基酸多肽，属于速激肽大家族，主要调控 NK1、NK2、NK3 受体的生物学功能^[10-11]，其中 NK1 受体与 P 物质结合能力最强^[12]。当糖尿病发生时，膀胱上皮中 TRPV1 通道被抑制，泌尿道上皮细胞释放 P 物质减少且与逼尿肌中 NK1 受体结合率下降，神经信号传递受到阻碍，平滑肌收缩功能减弱^[13-14]，最终导致糖尿病膀胱的病变^[15-18]。本研究采用免疫荧光双标法观察缩泉胶囊对糖尿病小鼠膀胱中 P 物质及 NK1 受体表达水平的影响，结果显示，缩泉胶囊可显著升高糖尿病小鼠膀胱组织中 P 物质、NK1 受体表达水平和共表达强度，从而改善糖尿病小鼠膀胱功能，恢复其 BLPP，缓解糖尿病膀胱病变的加深。

综上所述，缩泉胶囊可能通过上调糖尿病膀胱中 P 物质及 NK1 受体表达水平，进而改善糖尿病小鼠膀胱功能，达到治疗糖尿病膀胱病变的作用。

参考文献：

[1] Moller C F. Diabetic cystopathy. I: A clinical study of the frequency of bladder dysfunction in diabetics[J]. *Dan Med Bull*, 1976, 23(6): 267-278.
[2] Moller C F, Olesen K P. Diabetic cystopathy. IV: Micturi-

- 6