

- inflammatory drug decreases acute postoperative pain more than either drug alone[J]. *J Am Dent Assoc*, 2014, 145(9): 966-968.
- [20] 江永伟, 张 晗, 徐 斌, 等. 针刺及针药复合镇痛的研究进展[J]. *世界中医药*, 2020, 15(21): 3184-3187.
- [21] Shetty N, Patil A K, Ganeshkar S V, et al. Comparison of the effects of ibuprofen and acetaminophen on PGE2 levels in the GCF during orthodontic tooth movement: a human study[J]. *Prog Orthod*, 2013, 14(1): 6.
- [22] Lee Y S, Kim H, Brahim J S, et al. Acetaminophen selectively suppresses peripheral prostaglandin E2 release and increases COX-2 gene expression in a clinical model of acute inflammation[J]. *Pain*, 2007, 129(3): 279-286.
- [23] Chou T C, Chang L P, Li C Y, et al. The antiinflammatory and analgesic effects of baicalin in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia[J]. *Anesth Analg*, 2003, 97(6): 1724-1729.
- [24] Chen S Z, Chen G R, Shu S, et al. Metabolomics analysis of baicalin on ovalbumin-sensitized allergic rhinitis rats[J]. *R Soc Open Sci*, 2019, 6(2): 181081.
- [25] Hayden M S, Ghosh S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines[J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(3): 253-266.
- [26] Shen J, Cheng J Z, Zhu S G, et al. Regulating effect of baicalin on IKK/I κ B/NF- κ B signaling pathway and apoptosis-related proteins in rats with ulcerative colitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 73: 193-200.
- [27] Mancini F, Landolfi C, Muzio M, et al. Acetaminophen down-regulates interleukin-1 β -induced nuclear factor- κ B nuclear translocation in a human astrocytic cell line [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 353(2): 79-82.

水蛭冻干粉对糖尿病肾病大鼠瘀血阻络证相关指标的干预作用

杨 帆¹, 李雅纯¹, 郭 帅¹, 陈志强^{1,2*}

(1. 河北中医学院, 河北 石家庄 050091; 2. 河北省中医院, 河北 石家庄 050011)

摘要:目的 研究水蛭冻干粉对糖尿病肾病大鼠瘀血阻络证相关指标的干预作用, 探讨其对糖尿病肾脏损伤保护的机制。**方法** 大鼠以高脂饲料联合腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 35 mg/kg 进行造模, 给予水蛭冻干粉灌胃 16 周, 第 16 周后留取大鼠血、尿、肾组织行进一步检测。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠血糖、24 h 尿蛋白定量、肾功能、肾脏指数、血脂、血液流变学、凝血常规及可溶性 P 选择素、vWF 水平均升高 ($P<0.01$), 肾脏组织病理出现损伤; 与模型组比较, 水蛭冻干粉各剂量组均可改善上述指标 ($P<0.05$, $P<0.01$), 肾脏病理损失减轻, 但对血糖水平无明显影响 ($P>0.05$)。**结论** 水蛭冻干粉可通过纠正大鼠脂代谢紊乱、改善血液流变学及凝血-纤溶功能异常, 抑制血小板过度活化, 减轻内皮细胞损伤, 进而降低大鼠尿蛋白排泄, 改善肾功能, 减轻肾脏病理损伤, 从而发挥肾脏保护作用。

关键词: 水蛭冻干粉; 糖尿病肾病; 血液流变学; 凝血常规; 可溶性 P 选择素; vWF

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)09-3017-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.09.051

糖尿病肾病是糖尿病最常见的微血管并发症之一, 其发病率正逐年上升, 据国外报道, 20%~40% 的糖尿病患者合并糖尿病肾病^[1-2]。而我国糖尿病肾病导致终末期肾病的比例也日渐增加, 现已成为中老年人终末期肾病的首要原因^[3]。

中医学认为瘀血阻滞肾脏络脉是糖尿病肾病的主要病机之一^[4]。因此, 化瘀通络、消除络脉瘀血是治疗糖尿病肾病之关键。然而络病之瘀多病根深伏, 病情顽缠, 属沉

痼疾, 非一般草木之品所能取效, 必藉以虫类药搜邪剔络, 因虫类之品为血肉之质, 又有动跃攻冲之性, 体阴用阳, 能深入隧络, 直达病所, 攻剔痼结之瘀痰, 旋转阳动之气, 从而使络痹易开, 结邪易去。为此, 本实验选择了“在破血药中功列第一, 只破瘀血而不伤新血”的水蛭作为研究对象。课题组前期研究已经证实了糖尿病肾病大鼠瘀血阻络证的存在^[5], 故本实验以此大鼠模型为基础, 通过灌胃给予水蛭冻干粉, 观察其对糖尿病肾病大鼠瘀血阻

收稿日期: 2020-11-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81373804); 河北省科研能力提升重点项目 (KTZ2019024)

作者简介: 杨 帆 (1983—), 男, 博士, 研究方向为慢性肾脏病的中医药治疗。Tel: 13831192776, E-mail: hbxydc@163.com

* **通信作者:** 陈志强 (1962—), 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事慢性肾脏病的临床及科研工作。Tel: 13930486188, E-mail: chenzhqi2011@163.com

络证相关指标的干预作用。

1 材料

1.1 动物 48只雄性SD大鼠,SPF级,体质量60~80g,4~5周龄,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物许可证号SCXK(京)2016-0006。大鼠在温度(24±1)℃,相对湿度50%~70%条件下,给予普通饲料,适应性饲养1周后开始实验。

1.2 试剂与药物 水蛭冻干粉(批号Z10970056),购自重庆多普泰制药股份有限公司,每1克水蛭冻干粉相当于56个抗凝血酶活性单位。链脲佐菌素(STZ,批号04081408),购自美国Enzo Life Sciences公司;大鼠尿蛋白定量测试盒(批号C035-2-1),购自南京建成生物工程研究所;大鼠纤维蛋白原(vWF)ELISA试剂盒(批号F1713),购自上海西唐生物科技有限公司;大鼠P选择素ELISA试剂盒(批号SXR058),购自上海森雄科技实业有限公司;高脂饲料(蛋白质24.2%,碳水化合物42.1%,脂肪25.4%,总热量比4.7kcal/g)、普通饲料(蛋白质21.1%,碳水化合物60.6%,脂肪4.5%,总热量比3.6kcal/g),购自北京博泰宏达生物技术有限公司。

1.3 仪器 DT-2000型电子天平(常熟双杰测试仪器厂);大鼠代谢笼(上海科端生物科技有限公司);稳豪型血糖仪[强生(中国)有限公司];全自动血细胞分析仪(日本Sysmex公司);ACLTOP700型凝血分析仪(美国Beckman公司);7600-020型全自动大型生化分析仪(日本日立公司);全自动血液流变仪(上海寰熙医疗器械有限公司);MICROM-340E型石蜡切片机(德国Zeiss公司);TEC-2800型自动组织包埋机(上海精密仪器仪表有限公司);全自动酶标仪(美国BioTek公司);BX63+DP72型正置研究级显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 模型建立 采用随机数字表法随机选取8只大鼠作为正常组,给予普通饲料喂养,其余40只大鼠给予高脂饲料喂养6周后禁食不禁水12h,腹腔注射1%新鲜配制的STZ溶液(35mg/kg),正常组大鼠腹腔注射等体积溶媒(0.1mmol/L柠檬酸缓冲液,pH4.3),72h后尾静脉取血测量血糖值,随机血糖≥16.7mmol/L视为糖尿病造模成功^[6]。其中血糖不达标者1只,死亡2只,予以剔除。

2.2 分组及给药 将造模成功的大鼠随机分为模型组(10只),水蛭冻干粉低、中、高剂量组(各9只),造模成功后随即给予药物干预,其中水蛭冻干粉低、中、高剂量组分别灌胃给予0.3、0.6、1.2g/kg水蛭冻干粉^[7-8],正常组及模型组灌胃给予等量饮用水,连续给药16周。

2.3 标本收集 大鼠于注射STZ后第3天及药物干预第4、8、12、16周放入代谢笼,自由饮食,留取24h尿液,并记录各组大鼠体质量、饮水量、尿量。水蛭冻干粉干预16周后,所有大鼠禁食不禁水12h,腹腔注射10%水合氯醛(0.3mL/100g)深度麻醉,仰卧位固定后,股主动脉穿刺取血待测。剖开腹腔,快速取出大鼠肾脏,剥去被膜,

称定质量,留取部分肾皮质于4%中性甲醛溶液中固定,用于组织染色及病理观察。

2.4 检测指标

2.4.1 一般情况 观察各组大鼠注射STZ后第3天及药物干预第4、8、12、16周体质量、饮水量、尿量变化情况。

2.4.2 24h尿蛋白定量 将大鼠尿液于4℃、3500r/min条件下离心10min,取上清,按照尿蛋白定量试剂盒说明检测尿蛋白水平,根据大鼠24h尿量计算24h尿蛋白定量。

2.4.3 肾脏指数 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后称定各组大鼠体质量,剖开腹腔快速剥离肾脏被膜,冰冷的生理盐水冲洗后,称定右肾质量,计算肾脏指数。

2.4.4 肾功能、血脂水平 采用全自动大型生化分析仪检测血清尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、尿酸(UA)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平;采用凝血分析仪检测血浆凝血酶原时间(PT)、国际标准化比值(INR)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、血浆纤维蛋白原(Fib)、抗凝血酶Ⅲ(AT-Ⅲ)水平。

2.4.5 血液流变学 将部分血液注入含肝素抗凝剂试管,使血液和抗凝剂混匀,采用全自动血液流变分析仪检测大鼠血液流变学变化。

2.4.6 血浆可溶性P选择素、vWF水平 将部分血液于4℃、1500r/min条件下离心10min,分离得到血浆,采用双抗体夹心ABC-ELISA法检测各组大鼠血浆vWF、可溶性P选择素水平。

2.4.7 肾组织病理形态学 肾脏组织于4%多聚甲醛溶液中固定24h,经脱水、石蜡包埋、切片(4μm)后,分别用苏木精-伊红(HE)和Masson染色,通过光学显微镜以盲法进行肾组织的形态学评估,并应用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件检测Masson染色的肾脏病理切片的胶原沉积量。

2.5 统计学分析 通过SPSS 26.0软件进行处理,先对各数据进行正态性检验,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐时采用单因素方差分析,组间比较采用LSD检验;方差不齐时采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 水蛭冻干粉对大鼠一般情况的影响 正常组大鼠体质量增加,反应灵敏,活动自如,毛色光亮洁白;模型组大鼠出现多饮、多尿、多食,形体消瘦,反应迟钝,精神萎靡,毛色枯黄无光泽,并且部分大鼠出现脓疮、腹部包块等;水蛭冻干粉组上述情况有明显改善,体质量增加,活动量增加,毛色变白有光泽。在药物干预过程中模型组大鼠死亡3只,水蛭冻干粉低剂量组大鼠死亡2只,水蛭冻干粉中、高剂量组大鼠各死亡1只。

3.2 水蛭冻干粉对大鼠体质量的影响 STZ注射后3d,各组大鼠体质量比较无明显变化($P > 0.05$);正常组大鼠

体质量随时间增长逐步增加,与同时间点正常组比较,模型组大鼠体质量降低 ($P<0.01$);与同时间点模型组比较,16 周后水蛭冻干粉中、高剂量组大鼠体质量增加

表 1 水蛭冻干粉对大鼠体质量的影响 (g, $\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	3 d	4 周	8 周	12 周	16 周
正常组	8	274.38±14.44	335.63±19.41	405.38±18.59	450.25±20.03	474.50±24.22
模型组	10	277.71±10.42	274.29±15.14**	286.57±25.38**	291.57±38.33**	302.43±45.35**
水蛭冻干粉低剂量组	9	267.57±10.80	280.29±12.71	293.43±20.09	308.00±29.92	323.43±37.05
水蛭冻干粉中剂量组	9	271.50±10.71	285.00±13.41	301.13±24.35	319.63±32.27	337.13±37.86 [#]
水蛭冻干粉高剂量组	9	268.88±12.86	285.75±13.55	300.75±20.72	320.75±32.58	345.00±36.53 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

3.3 水蛭冻干粉对大鼠饮水量的影响 与同时间点正常组比较,模型组大鼠饮水量增多 ($P<0.01$);与同时间点模型组比较,12 周后水蛭冻干粉中、高剂量组大鼠饮水量减少 ($P<0.05$, $P<0.01$),16 周低剂量组大鼠饮水量减少 ($P<0.05$),见表 2。

表 2 水蛭冻干粉对大鼠饮水量的影响 (mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	3 d	4 周	8 周	12 周	16 周
正常组	8	28.63±4.41	23.75±5.18	25.63±7.29	23.75±6.41	27.50±3.96
模型组	10	130.71±9.32**	149.29±14.27**	170.71±14.27**	183.57±18.19**	201.71±21.25**
水蛭冻干粉低剂量组	9	123.51±17.25	147.14±11.13	160.71±13.67	172.86±12.54	178.57±11.44 [#]
水蛭冻干粉中剂量组	9	123.15±12.80	143.75±12.46	160.63±14.99	163.12±12.80 [#]	163.76±14.33 ^{##}
水蛭冻干粉高剂量组	9	120.00±8.02	141.25±17.27	159.37±18.41	160.62±18.07 [#]	159.38±16.99 ^{##}

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

3.4 水蛭冻干粉对大鼠尿量的影响 与同时间点正常组比较,模型组大鼠尿量增多 ($P<0.01$);与同时间点模型组比较,12 周后水蛭冻干粉中、高剂量组大鼠尿量减少 ($P<0.05$, $P<0.01$),16 周低剂量组大鼠尿量减少 ($P<0.05$),见表 3。

表 3 水蛭冻干粉对大鼠尿量的影响 (mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	3 d	4 周	8 周	12 周	16 周
正常组	8	22.00±2.87	18.00±2.07	20.25±2.96	19.75±3.85	22.50±4.93
模型组	10	120.00±13.23**	142.86±12.54**	165.71±17.18**	172.86±20.79**	192.71±18.25**
水蛭冻干粉低剂量组	9	117.86±14.10	137.86±12.20	154.29±14.27	165.71±10.58	175.71±9.89 [#]
水蛭冻干粉中剂量组	9	117.50±11.39	136.88±9.61	153.13±11.93	155.00±13.63 [#]	157.75±13.25 ^{##}
水蛭冻干粉高剂量组	9	111.88±8.43	133.75±19.04	150.00±19.27	152.50±16.69 [#]	153.00±13.47 ^{##}

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

3.5 水蛭冻干粉对大鼠肾功能、24 h 尿蛋白定量、肾脏指数的影响 与正常组比较,模型组大鼠 BUN、Scr、UA 水平,24 h 尿蛋白定量,肾脏指数均呈剂量依赖性降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),见表 4。

表 4 水蛭冻干粉对大鼠肾功能、24 h 尿蛋白定量、肾脏指数的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	Scr/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	BUN/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	UA/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	24 h 尿蛋白量/mg	肾脏指数
正常组	8	24.36±2.70	7.82±0.82	61.38±5.57	5.76±1.54	0.28±0.04
模型组	10	50.10±4.11**	16.05±0.70**	108.03±7.85**	42.44±5.93**	0.59±0.04**
水蛭冻干粉低剂量组	9	43.80±5.89 [#]	13.95±1.77 ^{##}	99.89±4.90 [#]	34.79±5.29 ^{##}	0.47±0.09 ^{##}
水蛭冻干粉中剂量组	9	38.03±5.83 ^{##}	12.05±1.54 ^{##}	91.46±8.17 ^{##}	29.13±4.96 ^{##}	0.41±0.05 ^{##}
水蛭冻干粉高剂量组	9	31.49±5.90 ^{##}	10.07±1.35 ^{##}	76.97±8.78 ^{##}	25.83±5.91 ^{##}	0.39±0.04 ^{##}

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

3.6 水蛭冻干粉对大鼠肾组织病理形态学的影响 如图 1 所示,正常组大鼠肾组织结构正常,无毛细血管腔扩张,无肾小球肥大或萎缩,基底膜无增厚,系膜细胞无增生,肾间质无炎性细胞浸润;模型组大鼠肾小球体积增大,肾小囊腔变窄,基底膜弥漫增厚,系膜基质增多,肾小管上皮肿胀,管腔狭窄,炎性细胞浸润,部分出现纤维化;与模型组比较,水蛭冻干粉各剂量组大鼠肾组织病理损伤均

有一定程度减轻。如图 2 所示,与正常组比较,模型组大鼠胶原纤维沉积增加 ($P<0.01$);与模型组比较,水蛭冻干粉各剂量组肾间质及肾小球胶原沉积减少 ($P<0.01$)。

3.7 水蛭冻干粉对大鼠空腹血糖、血脂水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠 FBG、TC、TG、LDL-C 水平均升高 ($P<0.01$);与模型组比较,水蛭冻干粉各剂量组大鼠 TC、TG、LDL-C 水平降低 ($P<0.01$),FBG 水平略有下降,但

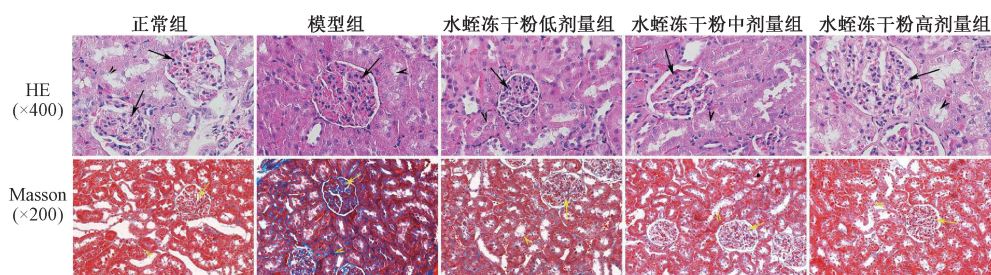
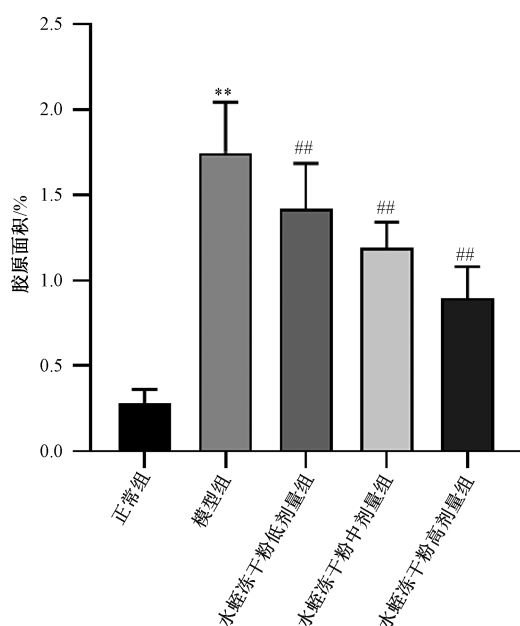


图1 各组大鼠肾组织病理形态



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

图2 水蛭冻干粉对大鼠肾组织胶原沉积的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8\sim 10$)

差异无统计学意义 ($P>0.05$); 各组大鼠血清 HDL-C 水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 5。

3.8 水蛭冻干粉对大鼠血液流变学的影响 与正常组比较, 模型组大鼠全血黏度 (低切、中切、高切)、血浆黏度及红细胞聚集指数均升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 水蛭冻干粉各剂量组大鼠全血黏度 (低切、中切、高切)、血浆黏度及红细胞聚集指数水平均呈剂量依赖性降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见表 6。

3.9 水蛭冻干粉对大鼠凝血功能的影响 与正常组比较, 模型组大鼠 PT、APTT、FIB、AT-III、INR 水平均升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 水蛭冻干粉各剂量组大鼠 PT、APTT、FIB、AT-III、INR 水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 各组大鼠血浆 TT 比较无差异 ($P>0.05$), 见表 7。

3.10 水蛭冻干粉对大鼠血浆可溶性 P 选择素、vWF 水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血浆可溶性 P 选择素、vWF 水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 水蛭冻干粉各剂量组大鼠血浆可溶性 P 选择素、vWF 水平均降低 ($P<0.01$), 见表 8。

4 讨论

糖尿病肾病病程绵长, 迁延难愈, 多为久病痼疾。久

表5 水蛭冻干粉对大鼠空腹血糖、血脂水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	FBG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)
正常组	8	5.36±0.62	2.72±0.29	1.09±0.08	1.96±0.14	1.19±0.10
模型组	10	29.32±2.95**	6.00±0.75**	3.72±0.56**	0.85±0.08	2.72±0.25**
水蛭冻干粉低剂量组	9	28.23±2.75	5.48±0.63	2.70±0.19##	0.83±0.05	2.32±0.23##
水蛭冻干粉中剂量组	9	27.96±2.46	4.20±0.51##	2.07±0.18##	0.89±0.09	1.96±0.12##
水蛭冻干粉高剂量组	9	28.24±2.04	3.54±0.35##	1.54±0.25##	0.90±0.09	1.59±0.21##

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

表6 各组大鼠血液流变学的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	全血黏度/(mPa·s)			血浆黏度/(mPa·s)	红细胞聚集指数
		低切	中切	高切		
正常组	8	6.29±0.56	3.38±0.44	2.62±0.34	0.85±0.09	1.38±0.20
模型组	10	13.97±1.42**	5.99±0.65**	4.82±0.30**	2.69±0.44**	3.74±0.38**
水蛭冻干粉低剂量组	9	11.64±0.89##	5.46±0.48#	4.45±0.45	2.34±0.23##	3.19±0.19##
水蛭冻干粉中剂量组	9	10.12±0.75##	4.67±0.47##	3.49±0.45##	1.82±0.17##	2.90±0.31##
水蛭冻干粉高剂量组	9	8.35±0.38##	3.91±0.22##	3.09±0.25##	1.21±0.12##	2.42±0.20##

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

病多虚, 久病入络, 气虚无以推动血行形成瘀血导致肾络瘀阻。现代研究也证实, 糖尿病肾病患者几乎 100% 存在瘀血的病理状态^[9], 且多存在糖脂代谢紊乱及凝血-纤溶系统紊乱^[10], 血液流变学和血流动力学的异常^[11-12], 内皮细胞

功能障碍^[13], 血液理化性质的改变。鉴于“瘀血阻络”贯穿糖尿病肾病发生发展的始终^[14-15], 因此, 化瘀通络、保持络脉气血通畅和肾络无损是治疗糖尿病肾病之关键。水蛭是常用的活血化瘀通络中药, 主要含有蛋白质及多肽类

表 7 水蛭冻干粉对大鼠凝血功能的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	PT/s	APTT/s	TT/s	FIB/(mg·L ⁻¹)	AT-Ⅲ/%	INR
正常组	8	9.68±0.44	19.74±1.12	39.14±4.40	287.47±12.01	142.21±7.73	1.03±0.09
模型组	10	7.60±0.41**	15.32±0.83*	36.01±2.69	427.08±20.64**	118.22±4.60**	0.71±0.05**
水蛭冻干粉低剂量组	9	8.11±0.54 [#]	16.21±0.60 [#]	37.81±2.89	373.99±20.29 ^{##}	125.97±6.58 [#]	0.79±0.06 [#]
水蛭冻干粉中剂量组	9	8.61±0.37 ^{##}	16.77±0.49 ^{##}	35.97±2.51	332.75±18.20 ^{##}	127.97±5.78 ^{##}	0.83±0.05 ^{##}
水蛭冻干粉高剂量组	9	8.95±0.38 ^{##}	17.03±0.31 ^{##}	37.68±2.77	309.04±14.54 ^{##}	135.04±5.71 ^{##}	0.88±0.04 ^{##}

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

表 8 水蛭冻干粉对大鼠血浆可溶性 P 选择素、vWF 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	P-选择素/(ng·mL ⁻¹)	vWF/%
正常组	8	54.88±3.17	85.61±5.41
模型组	10	78.61±4.55**	139.49±7.34**
水蛭冻干粉低剂量组	9	72.22±2.83 ^{##}	122.04±7.01 ^{##}
水蛭冻干粉中剂量组	9	66.63±3.05 ^{##}	117.58±5.33 ^{##}
水蛭冻干粉高剂量组	9	62.05±5.02 ^{##}	105.68±6.30 ^{##}

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

分子等抗凝血成分，此外还包含一些小分子化合物和微量元素^[16]，其中水蛭素是迄今发现的最强的凝血酶特异性抑制剂^[17]。

高血糖是糖尿病的主要特征，脂代谢异常是糖尿病的独立危险因素，而“脂质”具有“肾毒性”^[18]。肾小球系膜细胞中存在低密度脂蛋白受体，当低密度脂蛋白与受体结合后可诱导系膜细胞增殖及基质沉积^[19]；同时低密度脂蛋白也可与肾小球基底膜上的负电荷相结合，使负电荷屏障破坏，从而增加了肾小球基底膜的通透性^[20]。另外凝血指标的改变反映了血浆凝血酶及凝血因子活性增高，凝血酶能够明显促进肾小球系膜细胞和上皮细胞增殖^[21]，同时可导致血液流变学异常，而血液黏度增高可进一步干扰肾脏微循环，加重其缺血缺氧状态，继而通过提高基底膜通透性加重血浆蛋白漏出^[22]。本研究结果显示，高脂饲料联合小剂量腹腔注射 STZ 复制的糖尿病肾病大鼠存在明显的糖脂代谢紊乱、血液流变学及凝血-纤溶功能异常；水蛭冻干粉能改善大鼠血液流变学及凝血-纤溶功能异常，纠正脂代谢紊乱，但对血糖水平无明显影响。

长期的糖脂代谢紊乱可引起血小板功能异常、内皮损伤及功能障碍^[23-24]。P 选择素是细胞粘附分子选择素家族的主要成分，是反映血小板活化的金标准^[25]，与肾脏疾病关系密切^[26]。高血糖能刺激血小板膜上高表达 P 选择素，介导血小板与内皮细胞、白细胞的粘附及微血管内血栓形成。vWF 是反映内皮细胞损伤及功能障碍的敏感指标^[27]，当血管内皮细胞受损时，vWF 向循环血液中释放增加并随血液沉积在肾小球基底膜上，同时内皮细胞表面 vWF 还可与血小板膜上的受体结合，介导血小板粘附于内膜下基质，增加微血栓形成，而微血栓形成势必加剧血管内皮细胞的损伤。本研究结果显示，模型组大鼠血浆可溶性 P 选择素、vWF 水平均升高；水蛭冻干粉干预后可溶性 P 选择素、vWF 水平降低，表明水蛭冻干粉能抑制血小板活化，

减轻内皮细胞损伤。

综上所述，水蛭冻干粉可通过纠正脂代谢紊乱、改善大鼠血液流变学及凝血-纤溶功能异常，抑制血小板过度活化，减轻内皮细胞损伤，进而改善大鼠多饮多尿多食症状，降低尿蛋白排泄，改善肾功能，减轻肾脏病理损伤，从而发挥肾脏保护作用。

参考文献：

- [1] Kumar A, Mittal R. Mapping Txnip: Key connexions in progression of diabetic nephropathy[J]. *Pharmacol Rep*, 2018, 70(3): 614-622.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会微血管并发症学组. 中国糖尿病肾脏疾病防治临床指南[J]. *中华糖尿病杂志*, 2019, 11(1): 15-28.
- [3] Hou J H, Zhu H X, Zhou M L, et al. Changes in the spectrum of kidney diseases: an analysis of 40,759 biopsy-proven cases from 2003 to 2014 in China[J]. *Kidney Dis (Basel)*, 2018, 4(1): 10-19.
- [4] Bai L, Huo B B, Chen Z Q, et al. Effect of Huayu Tongluo herbs on reduction of proteinuria via Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway in diabetic rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 3054145.
- [5] 徐 晶, 马二卫, 白 璐, 等. 糖尿病肾病大鼠模型瘀血阻络证的确认[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2014, 15(1): 1; 12-15.
- [6] 李志杰, 张 悦. 糖尿病肾病动物模型的研究进展[J]. *生命科学*, 2011, 23(1): 90-95.
- [7] 谢永祥, 史 伟, 龙春莉, 等. 基于 iTRAQ 技术探讨水蛭干预 IgA 肾病大鼠模型蛋白质组学研究[J]. *临床肾脏病杂志*, 2019, 19(3): 202-207.
- [8] 吴晶魁, 杨 乔, 李洋洋, 等. 水蛭通过 p38MAPK 信号通路对早期动脉粥样硬化大鼠 VSMCs 的影响[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(16): 3191-3197.
- [9] 刘玉宁, 陈以平. 糖尿病肾病肾小球硬化症的中医病机探讨[J]. *新中医*, 2003, 35(7): 8-9.
- [10] Sobel B E, Schneider D J. Platelet function, coagulopathy, and impaired fibrinolysis in diabetes[J]. *Cardiol Clin*, 2004, 22(4): 511-526.
- [11] Mushtaq M, Abdul Mateen M, Kim U H. Hyperglycemia associated blood viscosity can be a nexus stimuli [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2019, 71(1): 103-112.
- [12] Chung S M, Oh J H, Moon J S, et al. Critical shear stress is associated with diabetic kidney disease in patients with type 2

- diabetes[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 908.
- [13] 张留弟, 李群益, 施孝金. 血管内皮功能障碍与 2 型糖尿病研究进展[J]. 上海医药, 2014, 35(23): 45-48; 52.
- [14] 胡筱娟, 秦 艳, 刘恬园, 等. 糖尿病肾病中医证型与肾络瘀阻相关性临床探讨[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(1): 91-92.
- [15] 卞 镒, 李敬林, 董天宝. 从瘀论治糖尿病肾病[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(10): 1266-1267.
- [16] Hildebrandt J P, Lemke S. Small bite, large impact-saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* [J]. *Naturwissenschaften*, 2011, 98(12): 995-1008.
- [17] Kvist S, Min G S, Siddall M E. Diversity and selective pressures of anticoagulants in three medicinal leeches (Hirudinida: Hirudinidae, Macrobellidae) [J]. *Ecol Evol*, 2013, 3(4): 918-933.
- [18] 袁伟杰, 吴 灏. 脂质肾毒性在肾脏疾病发生发展中的作用[J]. 继续医学教育, 2006, 20(5): 32-35.
- [19] Abrass C K. Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease[J]. *Am J Nephrol*, 2004, 24(1): 46-53.
- [20] 胡明昌, 蔡 毅, 陈荣华. 脂质代谢异常的肾毒性研究[J]. 国外医学 (儿科学分册), 1990(6): 303-308.
- [21] Grandaliano G, Choudhury G G, Biswas P, et al. Mitogenic signaling of thrombin in mesangial cells: role of tyrosine phosphorylation[J]. *Am J Physiol*, 1994, 267(4): 528-536.
- [22] Sung K C, Ryu S, Lee J Y, et al. Urine albumin/creatinine ratio below 30 mg/g is a predictor of incident hypertension and cardiovascular mortality [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(9): e003245.
- [23] 吴甜甜, 王文娟. 糖尿病肾病与血小板相关参数的研究进展[J]. 实验与检验医学, 2018, 36(3): 293-296.
- [24] 石 磊, 张力辉. 血管性血友病因子、血小板颗粒膜蛋白 140 与糖尿病肾病[J]. 临床荟萃, 2010, 25(1): 84-86.
- [25] Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2003, 170(2): 191-203.
- [26] 王 锋, 汪年松, 唐令途, 等. P 选择素在糖尿病肾病中的意义[J]. 中华糖尿病杂志, 2005, 13(6): 452-453.
- [27] Makin A J, Blam A D, Chung N A, et al. Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells[J]. *Eur Heart J*, 2004, 25(5): 371-376.

肉苁蓉多糖对肺癌细胞 A549 生物学行为的影响

樊黎丽, 孟 泳, 赵润杨, 王艳梅, 唐引引
[河南省中医院 (河南中医药大学第二附属医院), 河南 郑州 450000]

摘要: **目的** 探讨肉苁蓉多糖对肺癌细胞 A549 生物学行为的影响。**方法** 将肺癌细胞 A549 分为对照组, 肉苁蓉多糖 100、200、400 ng/mL 组, si-NC 组, si-LINC01410 组, 肉苁蓉多糖 400 ng/mL+pcDNA 组, 肉苁蓉多糖 400 ng/mL+pcDNA-LINC01410 组。MTT 法检测 A549 细胞增殖率, 克隆形成实验检测 A549 细胞克隆能力, 流式细胞术检测 A549 细胞凋亡率, Transwell 法检测 A549 细胞迁移及侵袭能力, RT-qPCR 法检测 A549 细胞中 LINC01410 mRNA 表达。**结果** 肉苁蓉多糖可以抑制 A549 细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭能力、LINC01410 mRNA 表达 ($P<0.05$), 促进细胞凋亡, 并呈剂量依赖性。抑制 LINC01410 表达后, A549 细胞生长、迁移和侵袭能力受到抑制 ($P<0.05$)。过表达 LINC01410 可以逆转肉苁蓉多糖对 A549 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。**结论** 肉苁蓉多糖可能通过降低 LINC01410 表达从而抑制肺癌细胞活性、克隆形成、迁移和侵袭能力, 并促进细胞凋亡。

关键词: 肉苁蓉多糖; 肺癌细胞 A549; LINC01410; 增殖; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)09-3022-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.09.052

肺癌是我国发病率和致死率第一位的恶性肿瘤, 肺癌的治疗手段有免疫、手术及化疗等^[1]。研究表明, 传统中药及其成分在肺癌的治疗中具有较大优势, 可提高肺癌疗效^[2-3]。肉苁蓉是我国名贵药材, 其主要成分包括苯乙醇总苷、多糖、环烯醚萜类、生物碱和木脂素类等。研究发现,

肉苁蓉苯乙醇总苷能降低肝癌 H22 荷瘤小鼠肝脏损伤, 并对其肿瘤生长有抑制作用^[4]。肉苁蓉活性成分麦角甾苷能够抑制裸鼠移植瘤模型肿瘤生长及大肠癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡^[5]。肉苁蓉多糖可能通过增加自然杀伤细胞和白细胞介素 2 (IL-2) 的活性抑制 Lewis 肺癌和 S180 肉瘤细

收稿日期: 2020-11-12

基金项目: 河南省中医药科学研究专项课题项目 (2019JDZX057)

作者简介: 樊黎丽 (1976—), 女, 副主任医师, 研究方向为呼吸内科。E-mail: wuaaty@163.com