

# 糖尿病模型大鼠红细胞内山梨醇浓度与心肌损伤的相关性研究

田恩圣\*(淄博市食品药品检验所, 山东 淄博 255000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2334-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.12

**摘要** 目的:研究糖尿病模型大鼠红细胞内山梨醇浓度与心肌损伤的相关性。方法:大鼠腹腔注射链脲佐菌素52 mg/kg建立糖尿病模型,按血糖水平和体质量均分为4组,每组8只,分别为第3、6、9、12周组,于分组后对应时间测定模型大鼠的血糖、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、磷酸肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)含量和红细胞内山梨醇的浓度(初始浓度和终浓度);称体质量,处死,取心脏观察病理变化。另设正常大鼠为空白对照组进行比较。结果:与空白对照组比较,第3、6、9、12周组大鼠体质量明显降低、血糖水平明显增加、红细胞内山梨醇初始浓度和终浓度均明显增加( $P<0.01$ ),AST、CK、LDH含量均明显增加( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与第3周组比较,第6、9、12周组大鼠的山梨醇终浓度和LDH含量均明显增加( $P<0.01$ )。与空白对照组比较,第3周组大鼠心肌组织病理变化不大,第6周组大鼠开始心肌纤维部分嗜酸变性,出现坏死等现象,随着时间的延长,心脏损伤越严重。结论:糖尿病模型大鼠红细胞内山梨醇可作为判断心脏损害发生的先行指标,其浓度越大,心肌损伤越严重。

**关键词** 糖尿病;红细胞;山梨醇;心肌损伤;大鼠

## Correlation of Erythrocyte Sorbitol Concentration and Myocardial Injury in Diabetic Rats

TIAN En-sheng(Zibo Institute for Food and Drug Control, Shandong Zibo 255000, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study the correlation of erythrocyte sorbitol concentration with myocardial injury in diabetic rats. **METHODS:** Diabetic rats model were induced by intraperitoneal injection of 52 mg/kg streptozocin. The model rats were divided into 4 groups according to blood glucose and body weight with 8 rats in each group, i.e. 3rd, 6th, 9th, 12th week groups. The contents of blood glucose, AST, CK, LDH and the blood concentrations (initial concentration and final concentration) of erythrocyte sorbitol were determined at corresponding time points. They were sacrificed after weighing. The heart samples were collected to observe pathological change, and compared with normal rats in blank control group. **RESULTS:** Compared with blank control group, the body weight of rats decreased significantly in 3rd, 6th, 9th, 12th week groups, while the blood glucose, initial and final concentrations of sorbitol increased significantly ( $P<0.01$ ) and the contents of AST, CK and LDH also increased significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with 3rd week group, sorbitol final concentration and LDH content increased significantly in 6th, 9th, 12th week groups ( $P<0.01$ ). Compared with blank control group, there was no significant pathological change in myocardial tissue in 3rd week group, and part of myofibrosis became acidophilic and showed signs of degeneration and necrosis in 6th week group. Heart injury was increasing as time went on. **CONCLUSIONS:** Erythrocyte sorbitol in diabetic rats can be used as a leading indicator for heart damage occurs, the higher the concentration, the severer myocardial injury.

**KEY WORDS** Diabetes methitus; Erythrocyte; Sorbitol; Myocardial injury; Rats

维他昔布作为一种新型化合物,其用于治疗人关节炎引起的疼痛和炎症等症状,目前处于研究阶段。通过对维他昔布 $P$ 值的研究可以推测,维他昔布是亲脂性药物,但 $\lg P$ 值较小,表明其在体内吸收较差,而药物本身需要有适宜脂溶性和水溶性以便于通过生物膜的脂质双分子层以达到较好的体内吸收<sup>[3]</sup>。由维他昔布的化学结构分析,维他昔布含有含氮的咪唑环、吡啶环以及芳环,其中,芳环的疏水性可能起主导作用,使其表现出了亲脂性。因此在制剂研究中需要加入表面活性剂增加药物的水溶性,使药物的水溶性和脂溶性适宜,以促进药物在体内的吸收。在多种介质中的平衡溶解度的试验显示,维他昔布在0.5%十二烷基硫酸钠溶液中的平衡溶解度最

大,也就是说十二烷基硫酸钠作为表面活性剂可以增加维他昔布的水溶性。本试验为维他昔布片的处方研究和下一步溶出度的研究提供了初步的依据。

### 参考文献

- [1] 刘璐,崔颖,张秋燕.磺胺二甲嘧啶的溶解度及油水分配系数的研究[J].中国药房,2008,19(10):750.
- [2] 胡荣,黄华,杜洋,等.佐米曲普坦在不同pH条件下的平衡溶解度和表观油水分配系数[J].重庆医科大学学报,2010,35(8):1 235.
- [3] 姚媛,廖琼峰,曾丽英,等.新穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯表观油水分配系数的测定及pH值对其的影响[J].中药材,2009,32(10):1 610.

\* 主管药师,硕士。研究方向:糖尿病。电话:0533-3585083。E-mail:zbyjtes@163.com

(收稿日期:2012-08-24 修回日期:2012-11-26)

糖尿病(Diabetes mellitus, DM)是一种内分泌代谢疾病,以血糖异常升高,糖、脂肪、蛋白质等代谢紊乱和慢性进行性神经、血管病变为特征。随着人类社会生活水平的提高,其患病率明显增加,病死率仅次于癌症、冠心病、高血压,已经成为全世界共同面临的主要公共健康问题之一。DM慢性并发症涉及全身所有组织及器官,如2型DM患者心血管疾病发生率是一般人群的2~4倍,且起病早、预后差,是2型DM患者的主要死因<sup>[1]</sup>;长期高血糖状态可引发一系列的慢性并发症,主要包括大血管并发症和微血管并发症;此外心脏植物神经病变与DM患者心律失常有重要关系,是导致DM患者心性猝死的原因之一<sup>[2]</sup>。由于DM引发的心脏疾病预后差、致死率高,及早预警疾病的发生显得尤为重要,但目前临床上的检测手段存在不同程度的滞后性,可能会延误最佳预防与治疗时间。有研究<sup>[3-9]</sup>表明,DM患者体内由于血糖异常升高、体内代谢紊乱,造成了红细胞内山梨醇的聚积。笔者希望通过测定红细胞内山梨醇的浓度,研究其与心肌损伤的相关性,为临床及早预警DM引发的心肌损伤提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

754N紫外-可见分光光度计(上海分析仪器厂);BT124S电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);Cobas 6000全自动生化分析仪(德国罗氏公司);BX51生物显微镜(日本Olympus公司)。

### 1.2 药品与试剂

链脲佐菌素(美国Sigma公司,批号:024K1211,纯度:>98%);变色酸(天津福晨化学试剂厂,批号:20080228);高碘酸(天津科密欧化学试剂有限公司,批号:20080228);血糖测定试剂盒(保定长城临床试剂公司,批号:20090914);山梨醇(天津福晨化学试剂厂,批号:20070707,纯度:99.8%);所用试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

成年Wistar大鼠,♀♂各半,体质量200~220 g,由山东鲁抗医药股份有限公司提供,动物许可证号:SCXK(鲁)2008-0001。

## 2 方法与结果

### 2.1 建模<sup>[6]</sup>与分组

取大鼠60只,禁食16 h后,一次性腹腔注射链脲佐菌素(0.1 mmol/L柠檬酸缓冲液配制,pH 4.2)52 mg/kg;7 d后,大鼠禁食12 h眶静脉取血,肝素抗凝,2 500 r/min离心10 min,取血浆测定血糖。将空腹血糖≥16 mmol/L的大鼠选为DM模型大鼠。将入选的模型大鼠按血糖水平和体质量均分为4组,即第3、6、9、12周组,每组8只,同时另选取8只正常大鼠作为空白对照组。

### 2.2 山梨醇标准液的配制

准确称取山梨醇100 mg,用蒸馏水溶解至100 ml,作为贮备液。取少量贮备液,用蒸馏水稀释成0.1 mg/ml的标准液。

### 2.3 山梨醇浓度的检测方法<sup>[6-7]</sup>

大鼠禁食12 h后眶静脉取血,分离红细胞并洗涤3次,取红细胞加蒸馏水破膜,沉淀蛋白,离心取上清液0.5 ml,蒸馏水

稀释1倍,加入50 μl高碘酸溶液,避光保存10 min;再加入50 μl亚硝酸钠溶液,混匀后,静置10 min;最后加入2 ml变色酸-浓硫酸溶液,混匀后,沸水浴30 min。取出放冷至室温,用紫外-可见分光光度计在570 nm波长处检测吸光度。同时,取蒸馏水1 ml作空白对照;取蒸馏水0.9 ml,加入标准液0.1 ml作标准对照。根据山梨醇标准对照的吸光度与测定管的吸光度,计算红细胞内山梨醇的浓度。

### 2.4 指标检测

将“2.1”项下建模后的4组大鼠分为第3、6、9、12周组,分别于建模后(初始浓度)和建模给药后相应时间(终浓度)取对应大鼠禁食12 h,眶静脉取血,按“2.3”项下方法测定红细胞内山梨醇的初始浓度和终浓度。采用Cobas 6000全自动生化分析仪测定大鼠血糖、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、磷酸肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)含量。称体质量后处死大鼠,迅速摘取大鼠心脏及附属组织,用福尔马林(35%~40%的甲醛水溶液)固定,石蜡包埋,切片后作苏木精-伊红(HE)染色,观察心肌纤维、心脏血管、心脏周围神经及心肌内膜的病理改变。实验过程中,第9周组大鼠有1只死亡。各组大鼠红细胞内山梨醇浓度、处死前体质量、血糖水平比较见表1;血浆中AST、CK、LDH含量比较见表2;心脏病理切片见图1。

表1 各组大鼠红细胞内山梨醇浓度、处死前体质量、血糖水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Comparison of sorbitol concentration, body weight before died, blood glucose in each group of rats( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	山梨醇浓度,mmol/L		处死前体质量,g	血糖,mmol/L
		初始浓度	终浓度		
空白对照组	8	12.36 ± 3.66	11.53 ± 0.74	256.13 ± 15.50	3.36 ± 0.41
第3周组	8	18.70 ± 4.25*	47.17 ± 1.58*	182.36 ± 10.23*	27.23 ± 6.65*
第6周组	8	17.62 ± 3.59*	67.73 ± 5.31**	162.32 ± 15.77*	25.23 ± 7.48*
第9周组	7	17.68 ± 3.03*	75.18 ± 6.19**	163.15 ± 12.54*	26.83 ± 5.62*
第12周组	8	18.15 ± 3.86*	74.37 ± 7.71**	156.83 ± 9.65*	25.06 ± 3.35*

与空白对照组比较: \* $P < 0.01$ ;与第3周组比较: # $P < 0.01$

vs. blank control group: \* $P < 0.01$ ; vs. 3rd week group: # $P < 0.01$

表2 各组大鼠血浆中AST、CK、LDH含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Comparison of the contents of AST, CK and LDH in each group of rats( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	AST,U/L	CK,U/L	LDH,U/L
空白对照组	8	104.8 ± 18.9	50.6 ± 10.7	823.1 ± 137.4
第3周组	8	123.6 ± 22.4*	74.4 ± 19.1*	1 083.5 ± 226.8*
第6周组	8	267.1 ± 37.7**	128.7 ± 14.2**	2 011.3 ± 416.4***
第9周组	7	289.3 ± 53.0**	153.7 ± 20.1**	2 170.3 ± 364.5***
第12周组	8	326.5 ± 49.4**	184.8 ± 22.6**	2 739.2 ± 506.5***

与空白对照组比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与第3周组比较: # $P < 0.01$

vs. blank control group: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; vs. 3rd week group: # $P < 0.01$

由表1可知,与空白对照组比较,第3、6、9、12周组大鼠红细胞内山梨醇初始浓度、终浓度和血糖水平均明显增加,处死前体质量明显减小( $P < 0.01$ )。与第3周组比较,第6、9、12周组大鼠红细胞内山梨醇终浓度明显增加( $P < 0.01$ ),与时间呈正相关。

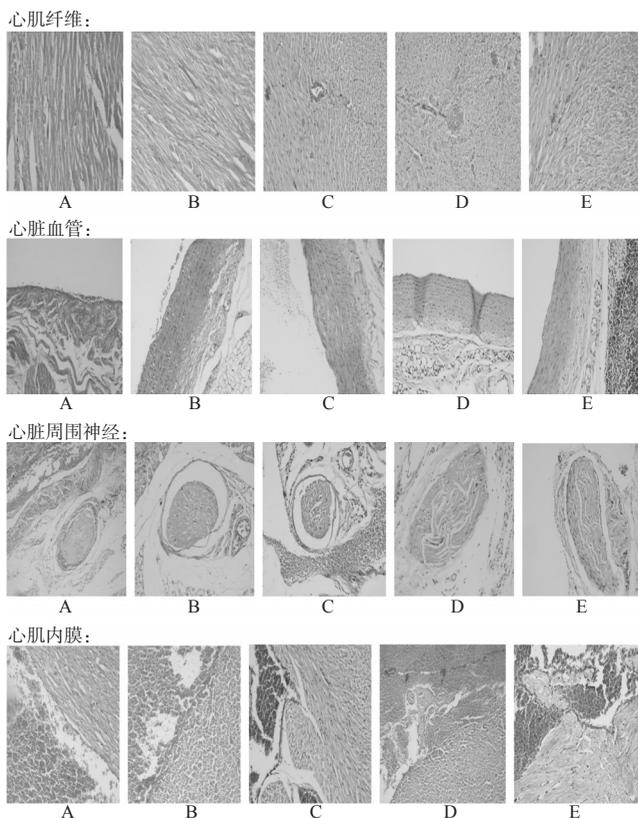


图1 各组大鼠心脏病理切片(20×20)

A.空白对照组;B.第3周组;C.第6周组;D.第9周组;E.第12周组

Fig 1 Pathological section of heart in each group of rats(20×20)

A. blank control group; B. 3rd week group; C. 6th week group; D. 9th week group; E. 12th week group

由表2可知,与空白对照组比较,第3、6、9、12周组大鼠血浆中AST、CK和LDH含量均明显增加( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),且与时间呈正相关。与第3周组比较,第6、9、12周组大鼠血浆中LDH含量均明显增加( $P < 0.01$ ),亦与时间呈正相关。

由图1可知,与空白对照组比较,第3周组大鼠心脏病理变化不大,从第6周开始,可见心肌纤维部分嗜酸变性,随着时间的延长,出现坏死;间质毛细血管增厚,心脏周围神经脱髓鞘,并出现坏死;第9周、第12周组大鼠心脏损伤更为严重,部分大鼠出现心肌内膜脱落。

综上所述,DM模型大鼠首先是红细胞内山梨醇浓度增加,早期并未引起心脏细胞的损害,心肌酶AST、CK、LDH和心脏的病理改变不甚明显;但随着时间的延长,红细胞内山梨醇维持高浓度甚至继续增加,导致心脏损害,血浆中心肌酶含量增加,心脏出现器质性病变。

### 3 讨论

DM患者红细胞内山梨醇浓度增加初期,由于机体的代偿作用,并不影响细胞的各种功能。但随着时间的延长,由于山

梨醇脱氢酶的活力并未呈比例地相应增加,山梨醇又由于自身极性因素不易通过细胞膜,造成了山梨醇的聚积。这引发一系列的连锁反应,导致心肌细胞缺血缺氧,三磷酸腺苷(ATP)的生成减少,无氧酵解增强,乳酸堆积等,LDH含量亦随之增加<sup>[8]</sup>。CK的生理作用是转移高能磷酸键,故此时,CK发挥作用予以代偿,因此心肌缺血后CK含量亦增加<sup>[9]</sup>。长期冠状动脉硬化和高糖对心肌细胞的毒害作用,致使部分心肌细胞死亡,AST、LDH和CK释放入血,检测其在血浆中的含量,可以反映DM引发的心肌损害的程度。

DM引发的心脏损害是临床上引发DM患者死亡的主要原因之一,如何及早判断心脏损害并进行积极治疗显得尤为重要。目前临床上采用生化检测、彩超、心电图等检测手段存在明显的滞后性,进而错过疾病的最佳治疗时间。通过本文研究发现,DM模型大鼠红细胞内山梨醇浓度的增加先于组织或器官病变的发生,因此笔者认为红细胞内山梨醇浓度增加可以作为判断心脏损害发生的先行指标,对DM性心脏病的提前诊断和治疗具有重要意义。

### 参考文献

- [1] 童钟杭.糖尿病与心血管[J].心脑血管病防治,2003,3(2):1.
- [2] Ewing DJ, Neilson JM, Shapiro CM, *et al.* Twenty four hour heart rate variability: effects of posture, sleep, and time of day in healthy controls and comparison with bedside tests of autonomic function in diabetic patients[J]. *Br Heart J*, 1991, 65(5): 239.
- [3] Kador PF, Kinoshita JH. Role of aldose reductase in the development of diabetes-associated complications[J]. *Am J Med*, 1985, 79(5a): 8.
- [4] Tilton RG, Baier LD, Harlow JE, *et al.* Diabetes-induced glomerular dysfunction: links to a more reduced cytosolic ratio of NADH/NAD<sup>+</sup>[J]. *Kidney Int*, 1992, 41(4): 778.
- [5] Cohen MP. Aldose reductase, glomerular metabolism, and diabetic nephropathy[J]. *Metabolism*, 1986, 35(4 Suppl 1): 55.
- [6] 徐淑云.现代药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:981-994.
- [7] Malone JI. Red cell sorbitol: an indication of diabetic control[J]. *Diabetes*, 1980, 29(1): 861.
- [8] 成细华,喻嵘,吴勇军,等.左归降糖舒心方对转基因2型糖尿病MKR鼠心肌损伤的保护作用[J].*中草药*, 2011, 42(2): 343.
- [9] 黄川锋,阮耀.黄芪对早期糖尿病大鼠心肌组织一氧化氮含量和一氧化氮合成酶活性的影响[J].*时珍国医国药*, 2009, 20(2): 430.

(收稿日期:2012-11-02 修回日期:2012-12-08)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅