

复方川芎滴丸对糖尿病肾病模型大鼠血液流变学及血气的影响

孙昕*, 刘卫*(解放军第88医院药剂科, 山东泰安 271000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)07-0909-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.13

摘要 目的:探讨复方川芎滴丸对糖尿病肾病(DN)模型大鼠血液流变学及血气的影响。方法:将60只大鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组[厄贝沙坦片,0.013 g/(kg·d)]和复方川芎滴丸高、中、低剂量组[0.4、0.2、0.1 g/(kg·d)],每组10只。除正常对照组外,其余各组大鼠均以高糖高脂饲料+ip链脲佐菌素的方法复制DN模型。成模7 d后,各给药组大鼠每天ig相应药物1次,10 mL/kg;正常对照组和模型组大鼠ig等体积纯化水。64 d后,测定大鼠血液流变学指标[全血黏度(高、中、低切)、血浆黏度、全血还原黏度]和血气指标(二氧化碳分压、氧分压、血红蛋白含量、氧饱和度、氧合血红蛋白占总蛋白的比例),苏木精-伊红染色观察大鼠肾脏组织病理变化。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠血液流变学各指标和二氧化碳分压均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),氧分压、血红蛋白含量、氧饱和度、氧合血红蛋白占总蛋白的比例均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),肾脏组织损伤严重。与模型组比较,除复方川芎滴丸低剂量组大鼠二氧化碳分压、氧分压、血红蛋白含量改善不显著外,其余各给药组大鼠上述指标均显著改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$),大鼠肾脏组织损伤也不同程度地减轻。结论:复方川芎滴丸可显著改善DN模型大鼠异常的血液流变学状态,降低血液黏度,改善微循环,提高血液运输氧的能力,且对DN大鼠的肾脏组织形态有一定的改善作用。

关键词 复方川芎滴丸;糖尿病肾病;血液流变学;血气;肾脏组织病理;大鼠

Effects of Compound *Ligusticum chuanxiong* Drop Pill on Hemorheology and Blood Gas in Model Rats with Diabetic Nephropathy

SUN Xin, LIU Wei (Dept. of Pharmacy, the 88th Hospital of PLA, Shandong Tai'an 271000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the effects of Compound *Ligusticum chuanxiong* drop pill on hemorheology and blood gas in model rats with diabetic nephropathy (DN). **METHODS:** 60 rats were randomly divided into normal control group, model group, positive control group [Irbesartan tablet, 0.013 g/(kg·d)] and Compound *L. chuanxiong* drop pill high-dose, medium-dose, low-dose groups [0.4, 0.2, 0.1 g/(kg·d)], 10 in each group. Except for normal control group, rats in other groups were given high-sugar high-fat feed and intraperitoneally injected streptozotocin to reduce DN model. After 7 d modeling, rats in each group received related drugs intragastrically, once a day, 10 mL/kg; normal control group and model group received equal volume of purified water intragastrically. After 64 d, hemorheology indicators [whole blood viscosity (high-shear, medium-shear and low-shear), plasma viscosity, whole blood reduced viscosity] and blood gas indicators (carbon dioxide partial pressure, oxygen partial pressure, hemoglobin content, oxygen saturation, ratio of oxygenated hemoglobin to total protein) of rats were determined, hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological changes in kidney tissue. **RESULTS:** Compared with normal control group, hemorheology indicators and carbon dioxide partial pressure in model group were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), oxygen partial pressure, hemoglobin content, oxygen saturation, ratio of oxygenated hemoglobin to total protein were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), with severe kidney damage. Compared with model group, except the improvement of carbon dioxide partial pressure, oxygen partial pressure, hemoglobin content in rats were not significant in Compound *L. chuanxiong* drop pill low-dose group, the

[3] 中华本草编委会.中华本草:第5卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:3969.

[4] 邓书鸿,聂磊.中药药效关系的分析方法及数据处理技术研究进展[J].中药材,2010,33(11):1819-1823.

[5] 韦建华,陈君,蔡少芳,等.倒地铃化学成分研究:1[J].中草药,2011,42(8):1509-1511.

[6] 陈君,韦建华,蔡少芳,等.倒地铃有效部位化学成分研究[J].中药材,2013,36(2):228-230.

[7] 陈帅,王慧竹,薛健飞,等.栀子金花丸HPLC指纹图谱及其与体外抗氧化活性的相关性分析[J].中国药房,2016,27(22):3077-3080.

[8] 张彦飞,李智萌,赵利利,等.两头尖的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2016,27(3):399-401.

[9] 宋潇,谢昭明,黄丹,等.茯苓皮药材的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2015,26(15):2019-2111.

[10] 李生茂,刘琳,谭睿,等.市售沙棘HPLC指纹图谱一致性及抗氧化活性谱效关系[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(11):43-48.

* 副主任药师。研究方向:中药制剂。电话:0538-8839573。E-mail:s8839675@163.com

通信作者:主任药师,博士。研究方向:药理学、医院药学。电话:0538-8839841。E-mail:Liutrunk@163.com

(收稿日期:2016-08-24 修回日期:2016-11-06)

(编辑:林静)

above-mentioned indicators in other medicine groups were significantly improved ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the kidney tissue damage was improved to varying degree. CONCLUSIONS: Compound *L. chuanxiong* drop pill can significantly improve the hemorheology indicators of DN model rats, reduce blood viscosity, improve microcirculation and capacity of the blood to transport oxygen, and has certain improvement effect on kidney tissue morphology of DN rats.

KEYWORDS Compound *Ligusticum chuanxiong* drop pill; Diabetic nephropathy; Hemorheology; Blood gas; Kidney tissue pathology; Rats

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是由糖尿病引起的一种肾脏损伤性疾病,是导致糖尿病患者死亡的重要因素,且该病在我国的发病率日益升高^[1]。DN发病机制复杂,现代药理研究表明血流动力学改变在DN的发生发展过程中起到重要作用^[2-4]。复方川芎滴丸是解放军第88医院的院内制剂,2005年获新药证书[批准文号:济制字(2011)B02045],处方主要由川芎和当归两味中药组成,具有活血化瘀、通脉止痛的功效,临床上主要用于心脑血管疾病的治疗,安全有效^[5]。但据近几年的临床观察和医师反馈,该药能够改善DN患者的肾脏生理机能。为验证其药效,本研究通过检测分析DN模型大鼠的血液流变学指标和血气指标,并结合肾脏病理形态学变化,探究复方川芎滴丸对DN模型大鼠的影响,以期为扩大其临床应用提供实验参考。

1 材料

1.1 仪器

B600A型医用低速离心机(河北省安新县白洋离心机厂);稳豪型血糖仪[强生(中国)有限公司];BS224S Sartorius型精密电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);SA-6000型全自动血流变测试仪(北京赛科希德科技发展有限公司);Roche Cobas b 221型血气分析仪(瑞士罗氏诊断产品有限公司)。

1.2 药品与试剂

复方川芎滴丸(中国人民解放军第88医院制剂室自制,批号:20151216,规格:10 mg/丸);厄贝沙坦片(杭州赛诺菲安万特民生制药有限公司,批号:4A241,规格:150 mg/片);链脲佐菌素(STZ,上海源叶生物科技有限公司,批号:GN0517BA14,纯度:≥98.5%);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

Wistar大鼠60只,SPF级,♂,体质量180~220 g,由山东大学实验动物中心提供[动物合格证号:SCXK(鲁)20130009]。

2 方法

2.1 分组与造模

先将大鼠在湿度和温度均适宜的环境下适应性饲养1周,饲养期间自由进食、饮水。饲养结束后,将大鼠按体质量随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组和复方川芎滴丸高、中、低剂量组,每组10只。正常对照组大鼠给予普通饲料喂养,其余各组大鼠给予高糖高脂饲料喂养进行造模。56 d后禁食不禁水12 h,然后造模组

大鼠ip STZ溶液(35 mg/kg),正常对照组大鼠ip等体积枸橼酸缓冲液。3 d后断尾取血测大鼠空腹血糖(FBG)值,若 $FBG \geq 16.7$ mmol/L,且伴有饮水量、尿量增加者视为造模成功^[6-7]。成模后,造模组大鼠继续给予高糖高脂饲料,持续7 d。

2.2 给药

成模7 d后开始给药。给药量按大鼠与人体系数计算^[8],阳性对照组大鼠ig厄贝沙坦片0.013 g/(kg·d),为人临床等效剂量;复方川芎滴丸高、中、低剂量组大鼠分别ig复方川芎滴丸0.4、0.2、0.1 g/(kg·d),分别为人临床用剂量的2、1、0.5倍,10 mL/kg;正常对照组与模型组大鼠给予等体积纯化水。每天给药1次,连续给药64 d。

2.3 指标检测

给药结束后,各组大鼠禁食不禁水12 h,然后ip 10%水合氯醛溶液(3 mL/kg)麻醉,使用一次性注射器腹主动脉采血2 mL,肝素抗凝。排空注射器里的空气然后橡皮块封堵针头,30 min内注入血气分析仪分析二氧化碳分压、氧分压、血红蛋白含量、氧饱和度、氧合血红蛋白占总蛋白比例等血气指标。另用抗凝的真空采血管采血4 mL,利用全自动血流变测试仪对全血高、中、低切黏度,血浆黏度,全血还原黏度等血液流变学指标进行测定。取血后将大鼠处死,取肾组织,常规石蜡包埋后行苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察肾组织病理变化。

2.4 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件对数据进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 复方川芎滴丸对DN模型大鼠血气的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠二氧化碳分压明显升高($P < 0.01$),氧分压、血红蛋白含量、氧饱和度和氧合血红蛋白占总蛋白的比例明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,除复方川芎滴丸低剂量组大鼠二氧化碳分压、氧分压和血红蛋白含量变化不显著外,其余各给药组大鼠上述血气指标均显著改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表1(1 mmHg=0.133 kPa)。

3.2 复方川芎滴丸对DN模型大鼠血液流变学的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠全血黏度(高、中、低切)、血浆黏度和全血还原黏度均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示DN模型大鼠出现血流动力学异常现

象。与模型组比较,各给药组大鼠上述血液流变学指标均显著改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$),结果见表2。

表1 各组大鼠血气指标测定结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab 1 Determination results of blood gas indicators of rats in each group($\bar{x}\pm s, n=10$)

分组	二氧化碳分压, mmHg	氧分压, mmHg	血红蛋白含量, g/dL	氧饱和度, %	氧合血红蛋白占总蛋白比例, %
正常对照组	38.6±1.4	96.7±1.5	15.6±0.4	97.8±1.1	98.5±0.2
模型组	55.7±0.6**	74.6±0.7**	13.5±0.2*	86.3±1.3**	90.4±0.7**
阳性对照组	40.7±0.8**	93.4±0.9**	14.3±0.5*	94.1±0.3**	95.5±0.6**
复方川芎滴丸高剂量组	39.9±0.5**	95.2±1.6**	14.6±0.3*	94.8±0.8**	97.2±0.9**
复方川芎滴丸中剂量组	43.6±0.9**	92.7±0.8*	14.1±0.4*	93.3±0.4**	94.4±0.5**
复方川芎滴丸低剂量组	48.9±0.8	86.5±0.9	13.7±0.2	91.8±0.9*	93.6±0.3*

注:正常对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

Note: vs. normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

表2 各组大鼠血液流变学指标测定结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab 1 Determination results of hemorheology indicators of rats in each group($\bar{x}\pm s, n=10$)

分组	全血黏度, mPa·s			血浆黏度, mPa·s	全血还原黏度, mPa·s
	300 s ⁻¹	115 s ⁻¹	1 s ⁻¹		
正常对照组	2.65±0.05	3.12±0.08	0.51±0.06	9.56±0.12	1.32±0.07
模型组	5.21±0.10**	5.94±0.14**	1.67±0.13**	16.44±0.28**	3.03±0.02*
阳性对照组	3.20±0.07**	3.58±0.05**	0.99±0.03**	10.89±0.17**	1.87±0.08*
复方川芎滴丸高剂量组	2.93±0.13**	3.45±0.07**	0.78±0.05**	9.79±0.20**	1.47±0.04*
复方川芎滴丸中剂量组	3.23±0.08**	3.65±0.09**	1.03±0.02*	11.43±0.25**	2.11±0.10*
复方川芎滴丸低剂量组	3.81±0.12**	5.14±0.11*	1.46±0.06*	13.32±0.35*	2.49±0.05*

注:正常对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

Note: vs. normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

3.3 复方川芎滴丸对DN模型大鼠肾组织病理的影响

正常对照组大鼠肾形状大小正常、结构完整,肾小球系膜细胞、系膜区及系膜基质未见异常,肾间质内无炎细胞浸润、充血或纤维化,肾间质血管壁及肾小管形态未见异常。模型组大鼠可见肾小球体积显著增大,系膜细胞增生,系膜区增宽,系膜基质增多,肾间质出现炎细胞浸润及血管壁增厚的病理现象。与模型组比较,阳性对照组大鼠肾小球及肾小管结构基本正常,系膜细胞、系膜区及系膜基质未见明显异常,肾间质无明显炎细胞浸润或纤维化;复方川芎滴丸高、中剂量组大鼠肾脏组织形态均有所好转,肾间质内未见炎细胞浸润或纤维化,肾间质血管壁未见显著增厚,肾小球及肾小管结构基本正常,这2组与阳性对照组病理变化相似;复方川芎滴丸低剂量组大鼠肾小球系膜区轻度增宽,系膜基质可见轻度增多、间质内出现局部炎细胞浸润,但好于模型组,结果见图1。

4 讨论

DN的发生发展与血流动力学改变密切相关^[9]。在高血糖状态下,体内的血糖不能被机体充分吸收,由此导致肾小球滤过超负荷而肾小管不能完全重吸收,随着

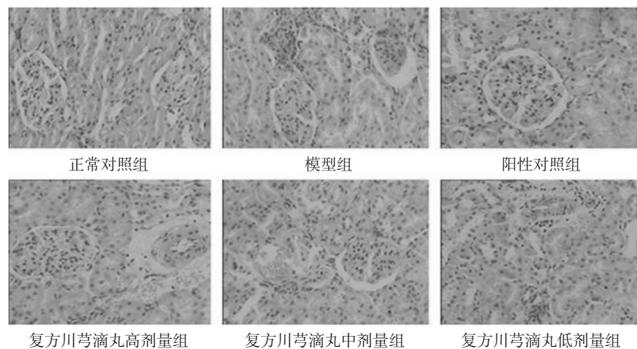


图1 各组大鼠肾组织病理切片图(HE染色,×100)

Fig 1 Graphs of kidney tissue pathological section of rats in each group(HE staining, ×100)

病情的发展,形成恶性循环,最终会导致肾小球出现高灌注、高内压和高滤过状态。这3种病理状态的出现,使得入球小动脉变得过分松弛,入球小动脉阻力低于出球小动脉阻力,进而引起肾小球功能的受损。肾小球的高灌注、高内压和高滤过状态还会使机体的血液黏稠度增加并使血液呈高凝状态,机体中的血小板高度聚集造成血液流通不畅。加之糖尿病患病日久,导致肾脏血管壁加厚、管腔变窄阻塞,进而引起肾脏毛细血管功能受损、粥样硬化,最终导致DN的发生。本研究采用高糖高脂饲料并ip STZ的方法复制DN大鼠模型,与正常对照组比较,模型组大鼠全血黏度(高、中、低切)、血浆黏度、全血还原黏度均明显增加,提示模型组大鼠的血液流变学异常,表明DN造模成功。厄贝沙坦是一种有效的、具有口服活性的选择性血管紧张素II受体(AT1亚型)拮抗药,其对AT1的选择性拮抗作用导致了血浆肾素、AT1水平的升高和血浆醛固酮水平的降低。厄贝沙坦对糖尿病早期肾病具有逆转或延缓病情进展的作用^[10-12],故本研究以其为阳性药物。

中医学认为DN的病机是因瘀血阻滞于肾络,在中医学上治疗DN通常以活血、化瘀、通络为主^[13-15]。本研究用复方川芎滴丸的处方出自宋代的《太平惠民和剂局方》,由川芎和当归两味中药组成。方中川芎既能活血化瘀,又能行气止痛,为“血中之气药”。现代药理研究表明,川芎具有扩张血管、降低血管阻力、抑制血小板聚集和改善微循环的作用^[16]。方中当归辛行温通,具有活血行气、补血止痛的功效。现代药理研究表明,当归具有降低血液黏稠度、抗血栓、扩张血管、增加血流量的作用^[16]。本研究结果显示,复方川芎滴丸能够明显降低DN模型大鼠的全血黏度、全血还原黏度、血浆黏度和二氧化碳分压($P<0.05$ 或 $P<0.01$),显著提高血红蛋白含量、氧合血红蛋白占总蛋白比例、氧分压和血氧饱和度($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示复方川芎滴丸能够改善DN模型大鼠的血液流变性及提高血液载氧的能力,并明显改善DN大鼠的肾组织病理状态。

综上所述,笔者采用检测血液流变学及血气指标并

液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中靛蓝的浓度及药动学研究

孔树佳*,李砚文*(昆明医科大学第三附属医院/云南省肿瘤医院药剂科,昆明 650118)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)07-0912-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.14

摘要 目的:建立测定大鼠血浆中靛蓝浓度的方法,研究靛蓝在大鼠体内的药动学特征。方法:将18只大鼠随机分为低、中、高剂量组,每组6只,分别ig 10、20、40 mg/kg的靛蓝溶液。分别于给药前和给药后0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、10、12、16、24、48、72 h眼眶采全血0.3 mL,分离血浆,甲醇沉淀后采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定靛蓝的血药浓度。色谱柱为Agilent Poroshell EC-C₁₈,流动相为甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液(95:5, V/V),流速为0.4 mL/min;以多反应监测(MRM)模式进行定量分析,用于监测的离子对(*m/z*)为263.1~218.8(靛蓝)和237.2~194.1(卡马西平,内标);采用DAS 3.0软件计算药动学参数。结果:靛蓝检测质量浓度的线性范围为0.5~100 ng/mL($r=0.9999$),日内、日间RSD均小于9%($n=5$),低、中、高质量浓度的质控样品的基质效应分别为(98.25±3.71)%、(102.23±2.64)%、(102.29±3.79)%($n=5$)。靛蓝在低、中、高剂量组大鼠体内的 t_{max} 分别为(8.6±1.1)、(9.2±0.8)、(9.5±0.8) h, c_{max} 分别为(30.9±8.6)、(44.9±10.1)、(96.1±17.4) ng/mL, $t_{1/2}$ 分别为(14.9±2.1)、(16.3±2.9)、(15.3±3.7) h,AUC_{0-72h}分别为(366.6±83.4)、(694.9±105.8)、(1 223.42±108.7) ng·h/mL。结论:本方法灵敏度高、特异性好,可用于大鼠血浆样品中靛蓝的含量测定;靛蓝在大鼠体内药动学特征符合非房室模型。

关键词 靛蓝;液相色谱-串联质谱法;大鼠;血浆;药动学

Concentration Determination of Indigo in Rats' Plasma by LC-MS/MS and Its Pharmacokinetics Study

KONG Shujia, LI Yanwen (Dept. of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Yunnan Provincial Tumor Hospital, Kunming 650118, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the concentration determination of indigo in rats' plasma, and study the pharmacokinetic characteristics in rats *in vivo*. METHODS: 18 rats were randomly divided into low-dose, medium-dose, high-dose

联合肾组织病理学观察的方法,探讨了复方川芎滴丸对DN模型大鼠的影响。结果证明,该药具有抵抗糖尿病肾损伤的作用,但是具体的作用机制有待进一步探索。

参考文献

- [1] 范文君,祝菁菁,黄韻宇,等.我国糖尿病肾病的流行现状及其危险因素[J].中国慢性病预防与控制,2013,21(6):748-751.
- [2] 蔡菊芳,黄明龙,王少峰,等.彩超对糖尿病肾血流动力学改变的观察分析[J].中华全科医学,2012,10(6):954-955.
- [3] 郑洪新.中医基础理论专题研究[M].北京:人民卫生出版社,2009:103.
- [4] 孙昕,俞惠琴.芎归滴丸对大鼠脑血流量的影响[J].山东医药工业,1994,18(4):44-45.
- [5] 孙昕,魏强,俞惠琴.芎归滴丸毒理学研究[J].中草药,1998,29(12):820-821.
- [6] 石光,石岩,孙晓波,等.糖尿病肾病大鼠模型制备方法与模型建立标准研究[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(7):171-173.
- [7] 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):90-94.

- [8] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:31.
- [9] 段立鸣,肖艳,张杰丹.参川芎嗪注射液联合大剂量黄芪注射液治疗糖尿病肾病的临床观察[J].中国药房,2013,24(12):1094-1095.
- [10] 钟同环.厄贝沙坦治疗糖尿病肾病的疗效观察[J].医学信息,2014(23):151.
- [11] 胡金梅,张松,张厚兴,等.厄贝沙坦治疗糖尿病肾病的疗效观察[J].中国医药导报,2010,7(2):59-60.
- [12] 王玉华,刘群娣,苏晔.不同剂量厄贝沙坦治疗糖尿病肾病的疗效观察[J].中国医药导刊,2011,13(6):1021-1022.
- [13] 张婷,高彦彬.中医药治疗糖尿病肾病研究进展[J].世界中医药,2014,9(5):679-683.
- [14] 孙树良,郑杨.活血化瘀法治疗糖尿病肾病临床观察[J].辽宁中医学院学报,2006,8(2):84-85.
- [15] 金玉青,洪远林,李建蕊,等.川芎的化学成分及药理作用研究进展[J].中药与临床,2013,4(3):44-48.
- [16] 刘医辉,杨世英,马伟林,等.当归药理作用的研究进展[J].中国当代医药,2014,21(22):192-196.

* 主管药师,硕士。研究方向:临床药物治疗、药事管理。电话:0871-68217128。E-mail:vampireicecream@163.com

通信作者:主治医师。研究方向:肿瘤危重症治疗。电话:0871-68185656-2036。E-mail:liyw20008@163.com

(收稿日期:2016-07-08 修回日期:2016-12-03)

(编辑:林 静)