

## · 基础论著 ·

# 复方血栓通胶囊对糖尿病大鼠唾液腺影响的研究

李小姣 肖新华 李平 马超 张丁

**【摘要】 目的** 观察不同剂量复方血栓通对糖尿病大鼠唾液腺的影响。**方法** 正常雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 30 只,随机分为 4 组:正常组、糖尿病组、小剂量血栓通组、大剂量血栓通组。分别行苏木精-伊红(HE)染色、末端脱氧核苷酸转移酶介导 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL 法)、血管内皮生长因子(VEGF)免疫组织化学染色,观察大鼠颌下腺及腮腺的形态学变化、细胞凋亡及 VEGF 表达情况,作统计学分析。**结果** (1)HE 染色:光镜下糖尿病组颌下腺和腮腺较正常组有明显的腺泡及导管萎缩,未见炎性细胞浸润灶。大小剂量血栓通组腺泡及导管萎缩程度较糖尿病组轻。(2)Tunel 检测细胞凋亡:糖尿病组颌下腺和腮腺细胞凋亡高于其他三组。①颌下腺:正常组细胞凋亡数与大小剂量血栓通组无差组。②腮腺:血栓通组细胞凋亡数均高于正常组,且小剂量血栓通组高于大剂量血栓通组。(3)VEGF 免疫组化:①颌下腺:糖尿病组 VEGF 表达明显高于其他三组。正常组低于大小剂量血栓通组。②腮腺:糖尿病组 VEGF 表达高于其他三组。大剂量血栓通组 VEGF 表达 > 正常组 > 小剂量血栓通组。**结论** 复方血栓通胶囊对糖尿病大鼠唾液腺病变有一定的缓解作用。

**【关键词】** 糖尿病; 涎腺; 细胞凋亡; 血管内皮生长因子类; 复方血栓通胶囊

**Research of the effect of Fufang Xueshuantong capsule for the salivary glands of diabetic rats** LI Xiao-jiao, XIAO Xin-hua, LI Ping, MA Chao, ZHANG Ding. Department of Stomatology, The Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China  
Corresponding author: ZHANG Ding, Email: dingz77@sina.com

**【Abstract】 Objective** To explore the therapeutic effect of salivary glands of diabetic rats treated by different doses of Fufang Xueshuantong capsule. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into four groups: normal group, diabetic group, small dose Xueshuantong group, and large dose Xueshuantong group. Morphological changes, apoptotic cells and expression of VEGF were observed by HE staining, TUNEL *in situ* labeling and VEGF immunohistochemical staining. Statistical analyses were conducted to confirm these results. **Results** (1) HE staining: the atrophy of salivary glands and the significant morphological changes in acinar and duct. It was showed a certain degree of recovery that the acinar and duct atrophy extent become alleviate in the submandibular gland and parotid of Xueshuantong treatment groups compared with diabetic group. (2) Apoptotic cells in Tunel: The percentage of apoptotic cells was significantly increased in diabetic group than that in other three groups. ①Submandibular gland: There was no significant difference between normal group and Xueshuantong treatment groups. ②Parotid gland: Apoptotic cells significantly decreased in normal group than that in Xueshuantong treatment groups. Apoptotic cells of small dose treatment group were more than large dose treatment group. (3) VEGF immunohistochemical staining: ①Submandibular gland: The expression percentage of VEGF was significantly increased in diabetic group than that in other three groups. The normal group got significantly decreased VEGF expression compared to the Xueshuantong treatment groups. ②Parotid gland: The expression percentage of VEGF was significantly increased in diabetic group than that in other three groups. The expression percentage of VEGF of the large dose treatment group > the normal group > the small dose treatment group. **Conclusions** Fufang Xueshuantong capsule may be protective factors for the atrophy of salivary glands of diabetic rats.

**【Key words】** Diabetes mellitus; Salivary glands; Apoptosis; Vascular endothelial growth factor A; Fufang Xueshuantong capsule

糖尿病是以高血糖为特征的代谢紊乱综合征,也是全球发病率最高的疾病之一。糖尿病慢性并发症的范围广,几乎可累及全身的器官和组织,其基本的病理变化为微血管病变和大血管病变。口渴、多饮是糖尿病典型口腔临床症状之一<sup>[1]</sup>。目前国内外研究主要关注于糖尿病口腔并发症的发生机制,而很少有关于其防治的研究。复方血栓通胶囊是纯中药制剂,有改善微循环、清除自由基、调节凝血状态、改善血流动力学状态等效果<sup>[2-3]</sup>。本文通过观察各组糖尿病大鼠唾液腺的变化,探讨血栓通对糖尿病大鼠唾液腺的影响。

## 材料和方法

1. 实验动物及材料:选用5周龄健康雄性SD大鼠30只,体重180~220 g,由北京协和医院动物实验中心提供。分笼饲养在北京协和医院实验动物中心清洁级动物房内,自由饮食。室内通风良好,室温保持18~22℃,相对湿度为40%~70%。随机分为四组:正常对照组(5只)、糖尿病组(5只)、小剂量复方血栓通(广东众生药业,国家医疗经营许可证编号:Z20030017)组(10只)、大剂量复方血栓通组(10只),适应性喂养1周后,高脂肪饮食喂养2周,腹腔注射新鲜配制的链脲佐菌素(STZ)(Sigma-Aldrich公司)溶液制备糖尿病模型,正常组腹腔注射生理盐水(按30 mg/kg注射)。注射后3 d尾尖采血测空腹血糖>15 mmol/L,尿糖+++以上,造模成功。造模成功后,小剂量血栓通组(900 mg/kg血栓通)每只大鼠喂1.5 ml/d。大剂量血栓通组(1800 mg/kg血栓通)每只大鼠喂1.5 ml/d。在18~22℃室温下持续喂养3个月。

2. 实验方法:用2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,分别取颌下腺和腮腺。将标本固定于4%多聚甲醛液中,常规乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋。将包埋好的蜡块做厚度为6 μm连续切片,每隔30张取相邻5张,作HE染色、TUNEL(Roth公司)标记及VEGF免疫组化(Santa公司)用。

TUNEL法:石蜡切片脱蜡,梯度乙醇脱水,蒸馏水漂洗3次。蛋白酶K于37℃消化30 min,磷酸盐(PBS)漂洗2 min×3次。滴加TUNEL混合液50 μl/片,37℃温箱内湿盒孵育1 h。PBS漂洗2 min×3次。滴加碱性磷酸酶偶联的抗荧光抗体(Coverter-POD),37℃温箱内湿盒孵育30 min。PBS漂洗2 min×3次。二氨基联苯氨(DAB)-过氧化氢显色剂室温下显色1 min,光镜下监视。PBS充分冲洗,终止显色。滴加苏木素复染,自来水冲洗,脱水封片。

VEGF免疫组化法:石蜡切片脱蜡,梯度乙醇脱水,

蒸馏水漂洗3次。3%过氧化氢室温静置10 min,PBS漂洗2 min×3次。微波预热EDTA修复液(pH 9.0)3 min,微波加热12 min,取出置于冷水中冷却,PBS漂洗2 min×3次。封闭液封闭40 min。

甩去封闭液后滴加一抗(1:300稀释)50 μl,4℃冰箱过夜。PBS漂洗2 min×3次。滴加二抗(PV9002 DAB bulk kit)50 μl,室温孵育静置30 min。PBS漂洗2 min×3次。DAB显色剂室温下显色1 min,光镜下监视。PBS充分冲洗,终止显色。滴加苏木素复染,自来水冲洗,脱水封片。

3. 计数:细胞计数:每个动物样本取一张切片,每张切片随机选10个视野,读取细胞凋亡数及VEGF阳性细胞表达数,读数3次,取平均值,计算每张切片的细胞凋亡数和VEGF阳性细胞表达数。

凋亡细胞计数标准:在同一灰度值下,细胞凋亡切片用Image J软件转换为伪彩图片,计数染为红色细胞的数目。

VEGF阳性细胞计数标准:细胞质或核内见淡黄色细颗粒明显高于背景色者为阳性细胞。

4. 统计学分析:使用SPSS 16.0统计软件包对实验数据进行分析。数据用中位数表示,两组间差异显著性比较用两独立样本的非参数检验(Wilcoxon-Mann-Whitney test),多组间采用多组样本的非参数检验(Kruskal-Wallis test),自由度=1,χ<sup>2</sup>值>3.84即P<0.05表示为差异具有统计学意义。在得到差异具有统计学意义,进一步进行两两比较。

## 结 果

1. HE染色光镜下观察颌下腺及腮腺的形态学改变:光镜下糖尿病大鼠颌下腺和腮腺较正常大鼠有明显的组织学改变。正常组:导管及腺泡细胞密集、边界整齐,胞膜完整。偶见腺叶、导管及各种腺泡萎缩。糖尿病组:颌下腺和腮腺均出现明显的导管及腺泡萎缩,间隙增宽。腺泡间红染明显,细胞排列不整齐,呈簇状堆集。腺组织趋于减少,结缔组织明显增加,可见纤维及血管增多。血栓通组:颌下腺和腮腺腺泡及腺管萎缩程度均较糖尿病组轻(图1,2)。

2. TUNEL检测细胞凋亡:凋亡细胞在四组的导管细胞、腺泡细胞中均有分布。阳性反应物质分布在导管细胞、腺泡细胞的细胞核中。(1)颌下腺:糖尿病组细胞凋亡数高于正常组和大小剂量血栓通组。正常组与大小剂量血栓通组比较,细胞凋亡数无明显差异(P>0.05)(图3)。(2)腮腺:糖尿病组细胞凋亡数高于正常对照组。糖尿病组与大小剂量血栓通组组间比较,糖尿病组细胞凋亡数高于用药组。正常组与大小剂

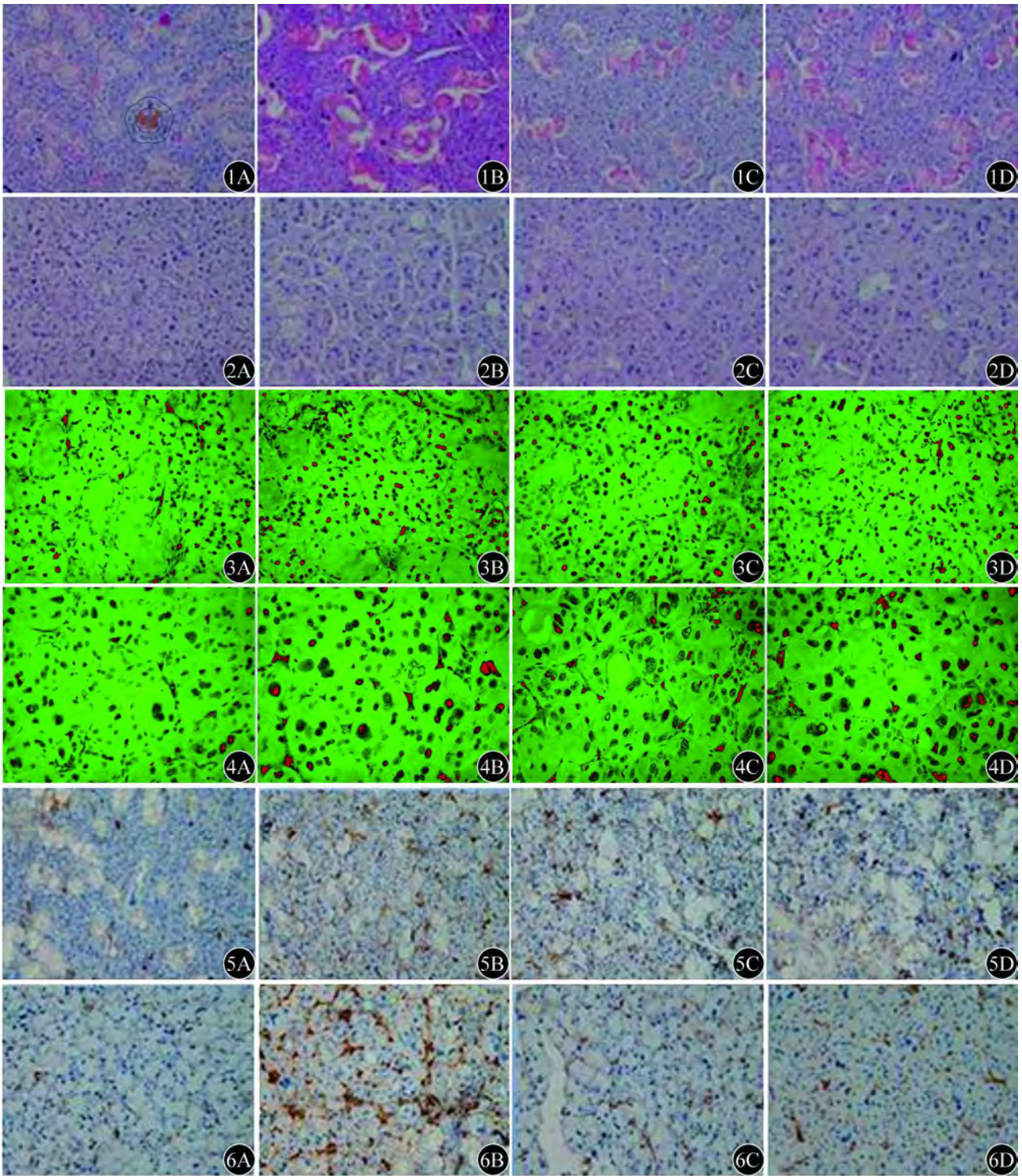


图1 颌下腺(HE×200)。1A: 正常组; 1B: 糖尿病组; 1C: 小剂量血栓通组; 1D: 大剂量血栓通组 图2 腮腺(HE×200)。2A: 正常组; 2B: 糖尿病组; 2C: 小剂量血栓通组; 2D: 大剂量血栓通组 图3 颌下腺细胞凋亡(TUNEL法染色×400)。3A: 正常组; 3B: 糖尿病组; 3C: 小剂量血栓通组; 3D: 大剂量血栓通组 图4 腮腺细胞凋亡(TUNEL法染色×400)。4A: 正常组; 4B: 糖尿病组; 4C: 小剂量血栓通组; 4D: 大剂量血栓通组 图5 颌下腺细胞VEGF表达(免疫组化×200)。5A: 正常组; 5B: 糖尿病组; 5C: 小剂量血栓通组; 5D: 大剂量血栓通组 图6 腮腺细胞VEGF表达(免疫组化×200)。6A: 正常组; 6B: 糖尿病组; 6C: 小剂量血栓通组; 6D: 大剂量血栓通组

量血栓通组组间分别比较,正常组细胞凋亡数低于大小剂量血栓通组。大小剂量血栓通组组间比较,小剂

量血栓通组细胞凋亡数高于大剂量血栓通组( $P < 0.05$ )(图4,表1)。

表1 各组大鼠唾液腺细胞凋亡统计

组别	只数	给药剂量	颌下腺凋亡阳性 细胞中位数	腮腺凋亡阳性 细胞中位数
正常组	5	-	46.0 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>
糖尿病组	5	-	76.5	65 <sup>b</sup>
小剂量血栓通组	5	900 mg/kg	44.5 <sup>a</sup>	25 <sup>ab</sup>
大剂量血栓通组	8	1800 mg/kg	49.0 <sup>a</sup>	21 <sup>abc</sup>

注:与糖尿病组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与正常组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与小剂量血栓通组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

3. VEGF 免疫组化结果:(1)颌下腺:糖尿病组高于正常组、大小剂量血栓通组;正常组 VEGF 表达显著低于大小剂量血栓通组;小剂量血栓通组与大剂量血栓通组无明显差异( $P > 0.05$ )(图5)。(2)腮腺:糖尿病组高于正常组、大小剂量血栓通组;正常组高于小剂量血栓通组,低于大剂量血栓通组;小剂量血栓通组 VEGF 表达低于大剂量血栓通组( $P < 0.05$ )(图6)(表2)。

表2 各组大鼠唾液腺细胞 VEGF 阳性统计

组别	只数	给药剂量	颌下腺 VEGF 阳 性细胞中位数	腮腺 VEGF 阳 性细胞中位数
正常组	3	-	17 <sup>a</sup>	23.5 <sup>a</sup>
糖尿病组	3	-	26 <sup>b</sup>	40.0
小剂量血栓通组	4	900 mg/kg	21 <sup>ab</sup>	18.0 <sup>ab</sup>
大剂量血栓通组	4	1800 mg/kg	21 <sup>ab</sup>	25.0 <sup>ac</sup>

注:与糖尿病组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与正常组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与小剂量血栓通组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

据报道,复方血栓通胶囊有促进血流量和溶解血凝块的作用,并能够改善肾小球基底膜的结构,减少尿蛋白分泌,从而对糖尿病大鼠<sup>[4]</sup>和早期糖尿病肾病患者<sup>[5]</sup>起到保护作用。

研究发现实验性糖尿病小鼠和大鼠,其颌下腺<sup>[6]</sup>和腮腺<sup>[7]</sup>组织萎缩,局部坏死。糖尿病时,唾液腺发生形态学改变,推测这一系列变化与实验性糖尿病病理状态有关,由于糖尿病糖代谢紊乱导致激素及微血管的变化,从而降低了多器官系统的功能;已有研究表明,糖尿病时持续高血糖导致微血管病变,造成组织缺血缺氧;缺氧导致葡萄糖氧化减少,无氧酵解增加,ATP 生成不足及 ATP 利用障碍造成能量代谢障碍,导致组织损伤<sup>[8]</sup>。该结果与我们在 HE 染色,光镜下观察的结果基本一致,糖尿病大鼠颌下腺和腮腺较正常大鼠有明显组织学改变。即糖尿病时唾液腺较正常大鼠可见腺叶萎缩,间隙增宽,腺泡间红染明显,细胞排列不整齐,呈簇状堆集,小叶间结缔组织明显增加。

本实验中糖尿病组与血栓通组间比较,糖尿病组细胞凋亡数均高于用药组,这说明大小剂量血栓通治

疗会降低颌下腺和腮腺细胞凋亡率,对于颌下腺,大小剂量血栓通对其恢复效果无差异;对于腮腺,大剂量血栓通较小剂量血栓通疗效佳。总体效果看,小剂量血栓通较大剂量血栓通对于糖尿病大鼠唾液腺凋亡的作用好。据文献报道,颌下腺属于厌氧代谢,腮腺是有氧代谢<sup>[9]</sup>。我们推测相对于腮腺细胞,颌下腺细胞对糖尿病导致的缺氧状态更为耐受。在应用血栓通抑制毛细血管通透性增加,改善组织缺氧状态后,颌下腺凋亡细胞数目明显减少,与正常组无差异。因此本实验结果提示应用血栓通对糖尿病进行控制可以减缓糖尿病对口腔唾液腺的破坏。

VEGF 的表达上调是受多种因素调节,其中最主要的诱导因素是缺氧<sup>[10]</sup>。糖基化终产物(AGEs)的堆积,也可刺激 VEGF 的表达<sup>[11]</sup>。增高的 VEGF 促进了缺血组织侧支血管的建立,阻止组织因缺血而坏死,这可能是机体的一种代偿性反应,但 VEGF 过多的表达,也可能是糖尿病肾病、糖尿病视网膜病、糖尿病神经病变等糖尿病并发症的重要影响因素。本研究中颌下腺大小剂量血栓通组 VEGF 表达显著低于糖尿病组而高于正常组,大小剂量组间无明显差异,这说明不论大剂量血栓通还是小剂量血栓通都对糖尿病大鼠颌下腺 VEGF 的表达均起到抑制作用,对颌下腺功能的微血管病变有一定的缓解效果。在腮腺中正常组高于小剂量血栓通组,低于大剂量血栓通组。这说明小剂量血栓通对于糖尿病大鼠腮腺 VEGF 的表达抑制作用较大剂量血栓通强,对于腮腺的微血管病变的治疗效果较大剂量血栓通好。因为 VEGF 有促进毛细血管新生的作用<sup>[12]</sup>,因此血栓通达到一定剂量之后其改善病变组织血液循环的作用可能被其促进血管新生的作用掩盖。其生理学意义还需要其他数据支持。

本实验初步告诉我们,血栓通可以减缓糖尿病造成的大鼠颌下腺及腮腺中细胞凋亡增加及 VEGF 异常表达,可以配合糖尿病的治疗,减缓并发症的发生。而且上述作用与血栓通的剂量相关。并且由于颌下腺和腮腺的代谢性质不同,药物的效果也存在一定的差异。以上实验结果在一定程度上反映出该药能够对糖尿病导致的唾液腺病变起到缓解作用。其确切的治疗效果和作用机制,有待进一步的临床试验观察,以提供更充分的证据,为糖尿病口腔并发症的临床用药提供支持。

## 参 考 文 献

- [1] Chavez EM, Taylor GW, Borrell LN, et al. Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2000, 89:305-311.
- [2] 施燕,屠庆年.三七总苷对糖尿病肾病模型大鼠血管内皮生长因子及骨形成蛋白-7 的影响. 医药导报, 2007, 26:477-480.
- [3] 陈超. 复方血栓通胶囊治疗糖尿病视网膜病变疗效观察. 实用中医临床医学, 2002, 2:34.

[4] 邢玉微,唐文佳,邹俊杰,等. 复方血栓通胶囊对糖尿病大鼠肾脏的保护作用. 第二军医大学学报,2010,10:1091-1094.

[5] 郎江明,曹海伟,魏爱生. 血栓通与抵克立得治疗早期糖尿病肾病的对比研究. 中国中西医结合杂志,1998,18:727-729.

[6] Ibuki FK, Simões A, Nogueira FN. Antioxidant enzymatic defense in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats: a temporal study. Cell Biochem Funct,2010,28:503-508.

[7] Kasayama S, Ohba Y, Oka T. Epidermal growth factor deficiency associated with diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86: 7644-7648.

[8] Mahay S, Adegate E, Lindley MZ, et al. Streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus alters the morphology, secretory function and acyl lipid contents in the isolated rat parotid salivary gland. Mol Cell Biochem,2004,261:175-181.

[9] Singh R, Barden A, Mori T, et al. Advanced glycation end-products: a review. Diabetologia,2001,44:129-146.

[10] 杨绪枫,汪年松. 血管内皮生长因子与糖尿病肾病的研究进展[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2011,5:6707-6710.

[11] Duh E, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox. Diabetes,1999,48:1899-1906.

[12] Roberts WC, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. J Cell Sci,1995,108:2369-2379.

(收稿日期:2012-07-16)

(本文编辑: 戚红丹)

李小姣,肖新华,李平,等. 复方血栓通胶囊对糖尿病大鼠唾液腺影响的研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2013,7(2):677-681.

