

甲钴胺、格列齐特及其联合用药对糖尿病大鼠周围神经病变的治疗作用

封卫毅¹, 侯家玉¹, 陈伟^{2*}, 王晶¹

(¹ 北京中医药大学中药学院药理学教研室 北京 100102; ² 河北医科大学中医系, 石家庄 050000)

【摘要】 目的: 研究甲钴胺与格列齐特及其联合用药对链脲佐菌素(STZ)糖尿病大鼠周围神经病变的影响。方法: 动物灌胃给药, 连续8周, 观察药物对链脲佐菌素糖尿病大鼠刺激痛阈、坐骨神经传导速度、糖化血红蛋白和糖化血清蛋白含量、血液流变学参数及坐骨神经醛糖还原酶活性和 Na^+ , K^+ -ATP酶活性等指标的影响。结果: 与糖尿病模型组大鼠相比, 各给药组大鼠尾机械刺激痛阈均显著性改善, 坐骨神经传导速度明显性提高, 醛糖还原酶活性降低, Na^+ , K^+ -ATP酶活性提高; 格列齐特及格列齐特与甲钴胺联合用药均可降低血液中的糖化蛋白水平; 此外, 格列齐特还可降低红细胞最大聚集指数; 甲钴胺和格列齐特联合用药与两药单用相比, 未观察到明显性差异。结论: 甲钴胺与格列齐特及其联合用药对治疗STZ糖尿病大鼠周围神经病变具有治疗作用, 但两药合用未显示出明显的疗效增强作用。

【关键词】 甲钴胺; 格列齐特; 糖尿病; 周围神经病变; 大鼠; 联合用药

【中图分类号】 R965 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2003)02-0167-05

糖尿病引起的神经病变与视网膜病变以及肾病并称为糖尿病三大并发症。周围神经病变是糖尿病最常见的神经病变, 患者可出现疼痛、感觉障碍、皮肤溃疡、肌肉萎缩等许多临床症状, 不但严重影响病人生活质量, 而且造成巨大的经济和社会负担。

对于糖尿病外周神经病变的治疗目前还缺乏特效药物, 目前临床上多以控制血糖结合神经保护药物等联合应用进行防治, 其中格列齐特和甲钴胺是最常用的药物之一。目前有关甲钴胺等治疗糖尿病外周神经病变的报道多限于临床观察^[1-4], 涉及作用机制方面的研究较少, 而对于这种以格列齐特控制血糖结合甲钴胺保护神经进行联合应用的治疗效果尚未见报道。因此, 本文利用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)糖尿病大鼠, 对格列齐特与甲钴胺治疗糖尿病周围神经病变的作用进行研究, 并探讨两者联合应用是否有疗效增强作用。

1 实验材料

动物: 8周龄wistar雌性大鼠, 体重150~220g, 由中国医学科学院实验动物研究所繁育场提供。

试剂: 链脲佐菌素, sigma公司产品, 邦定公司分装; 甲钴胺(弥可保), 日本卫材株式会社, 批号: 000671; 格列齐特(达美康), 法国施维雅药厂、天津华津制药厂合作生产, 批号: 010416。

仪器: 生理数据记录系统 Mac/Lab400 (澳大利亚ADI公司); VC-10 双道记忆示波器 (日本光电公司); one touch 稳捷基础倍加型血糖仪 (美国强生集团理康公司); 血液粘度仪 (LG-R-80) 和红细胞变形/聚集仪 (LG-B-190) 北京世帝公司; 荧光分光光度计: 日立 MPF-4 型荧光分光光度计。

2 实验方法

2.1 STZ 大鼠模型及分组

大鼠禁食12h, 链脲佐菌素溶于0.1 mol/L柠檬酸缓冲液(pH 4.5)配成1%的溶液, 以70~75 mg/kg 剂量给大鼠腹腔注射, 72h后眼眶取血, 测定血糖, 选择血糖在16 mmol/L以上的模型动物平行分组。对照组仅给予柠檬酸缓冲液平行进行实验。

实验分为5组: 对照组、模型组、格列齐特组(25 mg/kg)、甲钴胺组(175 μ g/kg)、格列齐特+甲钴

胺联合应用组 (25 mg/kg + 175 u/kg)。药物以 0.5%CMC-Na 溶液配制成适当浓度的混悬液,以 1 ml/100g 每天一次灌胃给药,连续给药 8 周。模型组、对照组用 CMC-Na 溶液灌胃。

2.2 一般指标观察

动态监测动物体重、尾静脉取血,血糖仪监测血糖。每 2~3 周测定一次。8 周时颈总动脉取血,采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定糖化血清蛋白和糖化血红蛋白含量。

2.3 痛阈测定

机械挤压大鼠尾部一定部位而产生大鼠嘶叫,测定此压力大小作为机械刺激痛阈。每 2 周测定一次。

2.4 坐骨神经传导速度(MNCV)测定

将清醒大鼠俯卧位固定,刺激电极置于股骨大粗隆与坐骨结节之间坐骨神经传出部位,记录电极置于踝关节坐骨神经经过处,刺激电极和记录电极均采用针电极。参考电极为针电极,置于刺激电极和记录电极之间的皮下,与记录电极相距 1 cm。用单脉冲方波刺激,波宽 0.1 ms,刺激强度 1.2 倍阈值。每两个刺激之间间隔 5 s 以上。严格控制室温 (20±0.5)℃,并保持动物体温 37℃。计算机记录刺激神经开始到记录电极处肌肉出现诱发电位的时间,此时间即为潜伏期。测定刺激电极到记录电极之间的距离。代入公式: MNCV (m/s) = 刺激电极与记录电极间的距离/潜伏期^[5]。

2.5 对血液流变学的影响

大鼠用 10%水合氯醛麻醉,颈总动脉采血,肝素 (20 u/1 ml) 抗凝。用抗凝血进行红细胞变形性和聚集性的测定。取抗凝血及 2000 r/min 离心血浆进行血液粘度和血浆粘度的测定。

2.6 坐骨神经中醛糖还原酶 (AR) 活性和 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性测定

取大鼠坐骨神经,冷生理盐水冲洗、称重后,加入 1.5 ml 的冷生理盐水匀浆,匀浆液 4℃条件下 2000 r/min, 10 min 离心,所得上清液按文献方法进行 AR 活性测定^[9]。Na⁺, K⁺-ATP 酶活性测定采用购自南京建成生物工程研究所的试剂盒,严格依照说明进行操作。

2.7 统计方法

采用单因素方差分析进行组间比较。

3 实验结果

3.1 对STZ 大鼠体重及血糖、糖化血清蛋白和糖化血红蛋白含量的影响

造模前各组动物体重均无明显性差异,造模后各造模组动物血糖也无明显性差别;从造模后 2 周开始,模型组动物体重明显低于对照组。2 周和 4 周时,甲钴胺组大鼠体重高于模型组且具有统计学意义 ($P<0.05$),其他各组均与模型组无明显性差别。试验期间模型组血糖一直明显高于对照组,格列齐特和联合用药组均表现出降血糖作用,甲钴胺则未表现出降血糖作用 (数据略)。8 周时,模型组大鼠糖化血清蛋白和糖化血红蛋白含量较对照组显著性升高,格列齐特单用或联合应用显示出明显性降低作用,甲钴胺则无明显影响 (表 1)。

Tab 1. Effects of methylcobalamin, gliclazide and combined application of both on non-enzymatic glycation level in streptozotocin diabetic rats ($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	Glycosylated serum protein (mg/ml)	Glycosylated haemoglobin (OD/10 g protein)
Normal control	11	0.31±0.05 **	22.79±5.52 **
Diabetic control	14	0.63±0.11	33.04±4.33
Gliclazide	12	0.49±0.16 *	29.13±2.64 *
Methylcobalamin	12	0.53±0.14	32.71±4.25
Gliclazide+methylcobalamin	10	0.46±0.14 **	28.64±3.62 *

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with diabetic control

3.2 对STZ 大鼠尾机械刺激痛阈的影响

从造模后第 4 周开始,与对照组相比,模型组大鼠机械刺激痛阈值明显性降低,各给药组均表现出一定的对抗作用,但联合用药未见作用有明显增强 (表 2)。

3.3 对STZ 大鼠坐骨神经MNCV 的影响

从造模两周开始,模型组大鼠坐骨神经传导速度较对照组明显减慢,各给药组则对这种传导速度减慢均具有明显性改善作用;在造模两周时,联合应用组传导速度与格列齐特组有明显性差异,随着造模给药时间的延长,格列齐特和甲钴胺单用与联合应用之间未见明显性差异 (表 3)。

3.4 对STZ 大鼠红细胞变形性和红细胞聚集性及血液粘度的影响

模型组大鼠红细胞变形能力与对照组相比无明显性变化,但聚集性明显增强;格列齐特可使红

细胞最大聚集指数显著性降低 ($P<0.05$), 但曲线下面积无明显性变化。模型组和给药组大鼠全血

粘度及血浆粘度与模型组相比均无显著性差异。见表 4、表 5。

Tab 2. Effects of methylcobalamin, gliclazide and combined application of both on pain threshold to mechanical stimulation($\times 200\text{g}$) in streptozotocin diabetic rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

Groups	Dose	2 w	4 w	6 w	8 w
Normal control		11.0 \pm 2.2 [*]	8.6 \pm 1.7 ^{**}	11.0 \pm 2.5 ^{**}	11.2 \pm 1.9 ^{**}
Diabetic control		8.9 \pm 2.7	4.2 \pm 1.4	4.2 \pm 1.9	3.5 \pm 1.4
Gliclazide	25 mg/kg	9.8 \pm 2.3	8.5 \pm 1.7 ^{**}	8.5 \pm 1.8 ^{**}	8.6 \pm 2.1 ^{**}
Methylcobalamin	175 u/kg	9.6 \pm 2.1	7.6 \pm 1.3 ^{**}	6.7 \pm 1.8 ^{**}	6.8 \pm 2.8 ^{**}
Gliclazide+methylcobalamin	25 mg/kg+175 u/kg	9.5 \pm 1.2	7.6 \pm 2.1 ^{**}	8.0 \pm 2.2 ^{**}	8.3 \pm 2.1 ^{**}

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ compared with diabetic control

Tab 3. Effects of methylcobalamin, gliclazide and combined application of both on motor conduction velocity of sciatic nerve(m/s) in streptozotocin diabetic rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

Groups	Dose	Before administration	2 w	4 w	6 w	8 w
Normal control		48.36 \pm 3.19	50.60 \pm 3.68 ^{**}	54.69 \pm 4.00 ^{**}	53.04 \pm 3.35 ^{**}	54.24 \pm 2.41 ^{**}
Diabetic control			44.57 \pm 3.02	43.63 \pm 3.31	42.64 \pm 2.61	45.64 \pm 1.70
Gliclazide	25 mg/kg		47.52 \pm 3.36 ^{*△}	48.41 \pm 2.18 ^{**}	51.02 \pm 5.16 ^{**}	50.40 \pm 2.45 ^{**}
Methylcobalamin	175 u/kg		49.26 \pm 4.68 ^{**}	47.61 \pm 3.19 [*]	49.97 \pm 3.49 ^{**}	52.83 \pm 3.20 ^{**}
Gliclazide+methylcobalamin	25 mg/kg+175 u/kg		51.78 \pm 2.13 ^{**}	48.91 \pm 2.94 ^{**}	48.81 \pm 3.87 ^{**}	52.71 \pm 2.72 ^{**}

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ compared with diabetic control.

Tab 4. Effects of methylcobalamin, gliclazide and combined application of both on erythrocyte deformability and erythrocyte aggregation in streptozotocin diabetic rats($\bar{x}\pm s$)

Groups	Dose	n	Erythrocyte deformability		Erythrocyte aggregation	
			MAXDI	SSS	MAXDI	SSS
Normal control		8	0.769 \pm 0.028	385.2 \pm 17.6	0.640 \pm 0.237 ^{**}	120.4 \pm 48.5 [*]
Diabetic control		10	0.797 \pm 0.030	399.7 \pm 21.0	1.080 \pm 0.270	195.9 \pm 81.2
Gliclazide	25 mg/kg	11	0.787 \pm 0.029	395.0 \pm 18.1	0.808 \pm 0.146 [*]	155.5 \pm 27.6
Methylcobalamin	175 u/kg	10	0.786 \pm 0.023	395.6 \pm 16.3	0.967 \pm 0.235	192.6 \pm 46.5
Gliclazide+methylcobalamin	25 mg/kg+175 u/kg	7	0.790 \pm 0.015	394.4 \pm 11.0	0.859 \pm 0.360	169.8 \pm 71.9

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ compared with diabetic control

Tab 5. Effects of methylcobalamin, gliclazide and combined application of both on blood viscosity in streptozotocin diabetic rats($\bar{x}\pm s$)

Groups	Dose	n	Blood viscosity(mPa \cdot s)			Plasma viscosity(mPa \cdot s)	
			200 s ⁻¹	30 s ⁻¹	5 s ⁻¹	1 s ⁻¹	100 s ⁻¹
Normal control		8	4.30 \pm 0.52	5.91 \pm 0.74	10.82 \pm 1.53	25.95 \pm 4.08	1.15 \pm 0.09
Diabetic control		10	4.34 \pm 0.43	5.97 \pm 0.57	10.86 \pm 1.15	25.97 \pm 3.50	1.23 \pm 0.08
Gliclazide	25 mg/kg	11	4.30 \pm 0.66	5.97 \pm 0.91	11.02 \pm 1.75	26.56 \pm 4.62	1.23 \pm 0.14
Methylcobalamin	175 u/kg	10	4.53 \pm 0.48	6.21 \pm 0.63	11.46 \pm 1.35	27.40 \pm 4.33	1.23 \pm 0.13
Gliclazide+methylcobalamin	25 mg/kg+175 u/kg	7	4.80 \pm 1.33	6.55 \pm 1.41	11.82 \pm 1.66	27.96 \pm 3.46	1.19 \pm 0.11

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ compared with diabetic control

3.5 对STZ 大鼠坐骨神经 AR 及 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响

结果显示, 糖尿病模型组大鼠坐骨神经 AR 活性显著性增强。与模型组相比, 给药组 AR 活性明显性降低。STZ 大鼠坐骨神经 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性与正常大鼠相比明显性降低, 各给药组均对这种降低具有明显改善作用, 但联合用药组的作用未见有明显增强(见表 6)。

Tab 6. Effects of methylcobalamin, gliclazide and combined application of both on aldose reductase activity and Na^+ , K^+ -ATPase activity of sciatic nerve in streptozotocin diabetic rats($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	Dose	Aldose reductase activity (U/mg protein)	Na^+ , K^+ -ATP activity ($\mu\text{molPi/mg/h}$)
Normal control	12		10.04 \pm 3.74 **	0.865 \pm 0.075 **
Diabetic control	12		14.39 \pm 3.48	0.329 \pm 0.144
Gliclazide	10	25 mg/kg	10.78 \pm 3.91 *	0.740 \pm 0.263 **
Methylcobalamin	10	175 μ /kg	10.24 \pm 1.82 **	0.764 \pm 0.482 *
Gliclazide+ methylcobalamin	10	25 mg/kg + 175 μ /kg	10.39 \pm 4.82 *	0.820 \pm 0.353 **

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with Diabetic control

4 讨论

糖尿病周围神经病变的发生涉及到多种病理生理机制^[7], 高血糖引起的醛糖还原酶活性增高、非酶糖基化水平增高以及血液流变学的改变等, 都是糖尿病神经病变发生的重要原因。醛糖还原酶活性增高可使多元醇通路激活, 引起神经组织“伪缺氧”、脂质代谢紊乱、自由基生成增多以及 Na^+ , K^+ -ATPase 活性降低等, 引起血管和神经细胞功能障碍。蛋白非酶促糖化反应涉及许多血浆和组织蛋白, 由于蛋白糖化后其构象发生变化, 使其生理功能受到严重影响。而血液流变学的改变, 也会影响到神经组织的供血供氧, 进而引起神经组织功能及结构的改变。

有文献显示, 格列齐特可抑制 STZ 糖尿病大鼠运动神经传导速度的减慢, 具有清除自由基和抑制肿瘤坏死因子生成的作用, 防止有髓纤维面积的减少, 增加纤维密度, 减少轴突/髓磷脂的比率 (axon/myelin ratio)^[8]; 此外, 临床研究显示, 格列齐特对糖尿病微血管病变的发生具有一定的防治作用, 这可能也是其改善糖尿病神经病变症状的原因之一^[3]。甲钴胺可提高 STZ 糖尿病大鼠的神经传导速度而不影响坐骨神经山梨醇和肌醇的含量^[9], 给 STZ 糖尿病大鼠肌肉注射甲钴胺, 每日 500 mg/kg, 连续 16 周, 可明显减少神经组织节段性脱髓鞘早期节旁脱髓鞘的发生率, 对于糖尿病引起的有髓神经纤维密度、神经纤维直径、有髓神经纤维轴直径的减少都具有保护作用^[10]。

本次实验结果证实, 甲钴胺、格列齐特及其联合用药对于糖尿病引起的痛觉异常及运动神经传导速度减慢均具有防治作用。其中格列齐特的作用可能与其降低血糖、抑制 AR 活性、降低蛋白糖

基化水平、降低红细胞最大聚集指数及增强 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性等有关。曾有文献认为甲钴胺对坐骨神经山梨醇和肌醇的含量无影响^[8], 本次实验结果显示, 甲钴胺对糖尿病大鼠血糖、蛋白糖基化水平及血液流变学参数虽无明显性影响, 但可降低坐骨神经醛糖还原酶活性, 并可增强坐骨神经 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性, 说明对多元醇代谢有一定的影响。

在本次实验中, 对于所观察的血糖、蛋白糖基化水平、AR 活性、 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性等指标, 甲钴胺和格列齐特联合用药虽然均有较明显的改善作用, 但与两药单独应用相比, 未见到有非常明显的疗效增强作用。

参考文献

[1] 刘光伟 (Liu GW). 甲钴胺治疗糖尿病神经病变的临床观察 [J]. 中华内科杂志 (Chin J Intern Med), 1999, 38(1): 14-17

[2] 刘莉 (Liu L), 王修乾 (Wang XQ). 甲钴胺治疗糖尿病神经病变临床观察 [J]. 中国慢性病预防与控制 (Chin J Prev Control Chron Non Comm Dis), 2000, 8(6): 249-249

[3] 杨文英 (Yang WY), 甘佩珍 (Gan PZ), 金之欣 (Jing ZX), 等. 格列齐特对糖尿病微血管病变的影响—多中心 3 年前瞻性研究 [J]. 中华内分泌代谢杂志 (Chin J Endocrinol Metab), 2001, 17(3): 144-147.

[4] 马书平 (Ma SP), 赵志刚 (Zhao ZG). 甲钴胺对糖尿病周围神经病变体感诱发电位潜时的影响 [J]. 中国实用内科杂志 (Chin J Pract Intern Med), 1999, 19(7): 425-426.

[5] 张晓晨 (Zhang XC), 金锦娣 (Jing JD), 顾受良 (Gu SL), 等. 蛭英方对糖尿病性周围神经炎的药效学研究 [J]. 中成药 (Chin Tradit Pat Med), 2002, 24(7): 522-525.

[6] 周云平 (Zhou YP), 张家庆 (Zhang JQ). 醛糖还原酶 (AR) 的荧光光度法测定及其在糖尿病大鼠晶体 AR 测定中的应用 [J]. 中华内分泌代谢杂志 (Chin J Endocrinol Metab), 1989, 5(7): 159-161.

[7] Sima AAF, Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy: an update. Diabetologia, 1999, 42: 773-788.

[8] Qiang X, Satoh J, Sagara M, et al. Gliclazide inhibits diabetic neuropathy irrespective of blood glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rats. Metabolism, 1998, 47(8): 977-981

[9] Sonobe M, Yasuda H, Hatanaka I, et al. Methylcobalamin improves nerve conduction in streptozotocin-diabetic rats without affecting sorbitol and myo-inositol contents of sciatic nerve. Horm Metab Res, 1988, 20(11): 717-718.

[10] Yagihashi S, Tokui A, Kashiwamura H, et al. In vivo effect of methylcobalamin on the peripheral nerve structure in streptozotocin diabetic rats. Horm Metab Res, 1982, 14(1): 10-13

Prevention of Peripheral Neuropathy in Streptozotocin Diabetic Rats by Methylcobalamin, Gliclazide and Combined Application of Both

FENG Wei-Yi, HOU Jia-Yu, CHEN Wei, WANG Jing
Department of Pharmacology, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China

【ABSTRACT】 AIM: To investigate the effects of methylcobalamin, gliclazide and combined application of both on diabetic peripheral neuropathy in streptozotocin diabetic rats. **METHOD:** Drugs were administrated orally for 8 weeks. Effects of drugs on pain threshold to mechanical stimulation, sciatic nerve conduction velocity, glycated hemoglobin and glycated serum protein content, rheologic parameters, aldose reductase activity and Na⁺, K⁺-ATPase activity of streptozotocin diabetic rats were determined. **RESULT:** Compared with diabetic group, pain threshold to stimulation was improved, sciatic nerve conduction velocity was increased, aldose reductase activity was depressed and Na⁺, K⁺-ATPase activity was increased in each administrated group. Glycated hemoglobin and glycated serum protein contents were decreased in gliclazide and combination group. In addition, erythrocyte maximal aggregation index was decreased in gliclazide group. Compared with methylcobalamin or gliclazide group, remarkable difference was not observed in combination group. **CONCLUSION:** Methylcobalamin, gliclazide and combined application of both could prevent peripheral neuropathy in streptozotocin diabetic rats. More effective action was not observed in drug combination group. **【KEY WORDS】** Methylcobalamin; Gliclazide; Diabetic; Peripheral neuropathy; Combined application

·研发动态·

世界十大制药公司新药研发加大投入

新药研究与开发是现代制药企业的生命线,新品种研究与开发的成败,决定着企业的兴衰,新品种的开发上市的数量与质量是企业实力的标志,据有关报道,目前世界上每个品种从研究开发到上市的时间在延长(从 10 年到 15 年),约耗资金 3~5 亿美元,在 5000 个进入临床的化合物当中,大概只有 5 种能进入人体试验阶段,在这 5 个化合物中上市的可能只有 1 个。

专利药品开发耗时耗资非常大,尽管如此,世界十大制药公司为了企业的发展,非常重视新药开发,加大研发的资金投入。

各大公司投入研发资金如下:

公司名称	预算投入资金(亿美元)
辉瑞	47
葛兰素史克	40
阿斯利康	27
默克	29
强生	25
百时美施贵宝	22
诺华	23
安万特	29
法玛西亚	23
雅培	15.7

(摘自《中国医药技术与市场》)