

## 方药研究

## 化湿方对糖尿病大鼠肾组织非酶糖化及氧化干预作用的实验研究

梁苹茂<sup>1</sup> 张国霞<sup>2</sup> 朱小棣<sup>1</sup> 董承超<sup>1</sup> 吴深涛<sup>1</sup> 郑开梅<sup>2</sup>

**摘要** 目的:研究化湿方治疗糖尿病肾病的可能机制。方法:分别用化湿方、氨基胍处理糖尿病大鼠,12 周后测肾皮质晚期糖化终产物(AGEs)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、尿白蛋白排泄率、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN),观察肾组织形态。结果:化湿方能减少糖尿病大鼠肾皮质 AGEs 表达,提高 SOD 活性、降低 MDA 含量,减少尿白蛋白排泄率,改善肾功能、改善肾组织形态。结论:化湿方是较理想的中药非酶糖化抑制剂并具有抑制氧化应激反应的功能,其作用不依赖于降低血糖。

**主题词** 糖尿病肾病/中医药疗法 @ 化湿方 @ 非酶糖化

### Experimental Study on Intervene Action of Huashi Recipe on Non-Enzymic Glycation and Oxidation in the Renal Tissue of Diabetic Rats

Liang Pingmao<sup>1</sup>, Zhang Guoxia<sup>2</sup>, Zhu Xiaodi<sup>1</sup>, et al.

(1. First Affiliated Hospital of Tianjin TCM College, Tianjin 300193; 2. Basic Medicine Department of Tianjin TCM College)

**Objective:** To study on the mechanism of Huashi Recipe for treatment of diabetic nephrosis. **Methods:** The diabetic rats were treated by Huashi Recipe and aminoguanidine respectively, and 12 weeks later, advanced glycation endproducts (AGEs) in the renal cortex and MDA, SOD in the renal tissue, excretion rate of urinary albumin, blood creatinine (Scr) and urea nitrogen levels were determined and form of the renal tissue was observed. **Results:** Huashi Recipe could decrease expression of AGEs in the renal cortex, increase SOD activity, reduce MDA content and excretion rate of urinary albumin, improve renal function and form of the renal tissue. **Conclusion:** Huashi Recipe is a more ideal TCM non-enzyme glycation inhibitor with the function of inhibiting oxidation stress response, which does not depend on decrease of blood glucose.

**Key Words** Diabetic nephrosis/TCM therapy @ Huashi Recipe @ non-enzyme glycation

非酶糖化是在无需酶的参与下,葡萄糖和蛋白质氨基酸结合的反应。晚期糖化终产物(AGEs)在糖尿病时积聚速度明显加快,是导致糖尿病肾病等慢性并发症的主要原因之一,并且非酶糖化和氧化互相联系,共同促进和加重糖尿病并发症发展。本研究观察了化湿方对糖尿病大鼠肾组织非酶糖化和脂质过氧化的干预作用,并同非酶糖化抑制剂氨基胍进行了比较。

#### 1 材料

1.1 动物:雄性 Wistar 大鼠,体重(220±30)g,由中国协和医科大学动物部提供。

1.2 药物:化湿方组成:藿香 15g,佩兰 15g,陈皮 15g,清半夏 10g,大腹皮 10g,厚朴 15g,荷叶 10g,黄芩 15g。上药按一定比例称取后,经水煮过滤浓缩至每毫升含生药 3g,装入瓶中密封。由天津中医学院药厂制剂室提供。

1.3 试剂:链脲佐菌素(STZ,分析纯)为 Sigma 公司

产品。抗 AGEs 单克隆抗体购自日本 Kumamoto 抗体研究所。超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。氨基胍(分析纯)为上海恒业试剂有限公司产品。其余试剂均为分析纯。LD5-2A 型离心机由北京医用离心机厂生产。日本岛津 UV-240 型紫外可见分光光度仪。

#### 2 方法

2.1 分组及处理:取雄性 Wistar 大鼠普通饲料适应性饲养 1 周,随机分成空白对照组 10 只及糖尿病待造模组 32 只。将 STZ 溶于 pH4.5 的柠檬酸钠缓冲溶液中,制成 1%STZ 溶液微孔滤膜过滤备用,以 60mg/kg 量尾静脉注射。72 小时后测定空腹血糖,凡空腹血糖  $\geq 13.9$ mmol/L 进入模型成功组,将其再随机分成化湿方组 11 只、氨基胍组 10 只、糖尿病非治疗组 11 只。空白对照组和糖尿病非治疗组自由进食饮水。化湿方组以成人剂量的 20 倍(15ml·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)灌服药液,每日 1 次。氨基胍组以 100mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>剂量灌胃,每日 1 次。

2.2 标本留取:将大鼠按以上方法处理 12 周后,放入代谢笼中留取 24 小时尿样,股动脉取抗凝血(肝素抗凝)及非抗凝血各 5ml 备用。然后迅速剥取两侧肾脏。

基金项目:天津市高等学校科研基金资助(97535A)

1 天津中医学院第一附属医院内分泌科,天津市南开区鞍山西道 311 号(300193)

2 天津中医学院基础医学部

收稿日期:2004-11-17;修回日期:2004-12-16

剥去包膜,生理盐水漂洗,沿正中矢状面剖开,放入生理盐水中漂洗2次,滤纸吸干称重后,其中左、右各一半放入10%中性福尔马林中,留待测定肾组织AGEs。左侧一半放入另一10%福尔马林中固定,留待做肾组织病理。右侧一半放入液氮中,后转移到-80℃冰箱中,留待测定肾组织SOD及MDA。取肾组织块以电子天平(万分之一)称重,用眼科小剪刀将组织剪成小碎块,放入玻璃匀浆管以3000转/分离心10分钟,留取上清液测定SOD及MDA。

2.3 指标测定:肾皮质AGEs,免疫组化S-P法。肾组织SOD,邻苯三酚自氧化法<sup>[1,2]</sup>。肾组织MDA,齐凤菊等改良的八木国夫法<sup>[3]</sup>。血糖,葡萄糖氧化酶法。血肌酐(SCr),苦味酸法。尿素氮(BUN),酶动力法。尿白蛋白排泄率,免疫比浊法。肾组织形态学观察:从固定液中取出肾组织,脱水、包埋、切片(4μm)做HE染色和PAS染色,光镜下观察。图像分析:切片在光镜的统一放大倍数下,将图像输入图像分析系统,设置相等的检测窗口面积,随机选10个视野检测AGEs阳性面积与窗口面积百分比,所得数据进行统计学处理。

2.4 统计学处理:检测结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理采用单因素方差分析和 $t$ 检验。

### 3 结果

3.1 肾组织非酶糖化和脂质过氧化检测结果:表1示,各实验组大鼠肾皮质AGEs水平较空白对照组明显升高,表明糖尿病大鼠肾组织非酶糖化增强。化湿方和氨基胍均降低了糖尿病大鼠肾皮质AGEs水平,与糖尿病非治疗组比较差异有显著性( $P < 0.01$ )。氨基胍组AGEs水平较化湿方组略低,但无统计学意义。各实验组大鼠肾组织SOD活性下降,MDA含量增高。经化湿方治疗后SOD活性升高,MDA含量下降,与糖尿病非治疗组比较差异有显著性( $P < 0.05$ ),但仍不及空白对照组。氨基胍组SOD活性略有升高,MDA含量略有降低,但与糖尿病非治疗组相比无统计学意义。

3.2 血糖、尿白蛋白排泄率、肾功能检测结果:表2示,各实验组大鼠血糖均较空白对照组明显升高,化湿方组和氨基胍组血糖虽较糖尿病非治疗组降低,但无统计学意义,表明各实验用药无明显降糖作用。各实验组尿白蛋白排泄率与空白对照组相比明显升高,经化湿方治疗后与糖尿病非治疗组比较明显降低( $P < 0.05$ ),经氨基胍治疗后结果略优于化湿方组,但两组比较无统计学意义。各实验组SCr、BUN均较空白对照组升高,治疗后化湿方组较糖尿病非治疗组明显降低( $P < 0.01$ ),氨基胍组无明显变化。

3.3 肾脏形态学改变:光镜下可见糖尿病非治疗组大鼠肾脏部分肾小球系膜区较空白对照组明显增宽,系膜细胞、系膜基质增生,基底膜增厚,毛细血管腔狭窄,偶见闭塞。化湿方组和氨基胍组肾小球系膜区轻度增宽,血管有轻度受压现象。

### 4 讨论

传统观点认为,治疗糖尿病应从阴虚肺燥、胃火炽盛、肾阴阳两虚立论。徐正正在对不同病程糖尿病患者的证候特征进行了研究后,提出湿邪(内滞)证在糖尿病患者中具普遍性,糖尿病迁延难愈,很可能与黏腻停滞的湿邪之毒深蕴于内有关,因而中医治疗糖尿病有必要随时关注湿邪<sup>[4]</sup>。我们以往的工作表明,2型糖尿病中医辨证属痰湿型者为数不少,针对湿浊为患用雷氏芳香化浊法加味(藿香、佩兰、陈皮、清半夏、大腹皮、厚朴、荷叶、苍术等)治疗,能够取得降低血糖、调节血脂的良好疗效<sup>[5,6]</sup>。雷氏芳香化浊法源于清代雷丰《时病论》,虽名曰法,实为方剂,治五月霉湿,壅遏上中气分之证,后有人用此疗湿温病湿重热轻、困阻中焦之候。我们在前期临床基础上,为了解该方加味对糖尿病的治疗作用除降糖外是否还存在其他干预机制,在方中去除了有降糖作用的组分如苍术,重新配制,取名化湿方,观察该方对蛋白非酶糖化和氧化的干预作用。方中君药藿香、佩兰芳香以化其浊;臣药清半夏、陈皮辛

表1 各组大鼠肾皮质AGEs、MDA、SOD测定结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 鼠数 | AGEs(%)       | MDA含量(nmol/mg) | SOD活性(U/mg)  |
|---------|----|---------------|----------------|--------------|
| 空白对照组   | 10 | 1.770±0.361   | 0.673±0.063    | 1.931±0.039  |
| 糖尿病非治疗组 | 11 | 16.622±3.373  | 0.981±0.108    | 0.902±0.086  |
| 化湿方组    | 11 | 2.798±0.676** | 0.821±0.159*   | 0.985±0.066* |
| 氨基胍组    | 10 | 2.743±1.213** | 0.882±0.264    | 0.917±0.065  |

与糖尿病非治疗组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。表2同

表2 各组大鼠血糖、尿白蛋白排泄率、肾功能检测结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 鼠数 | 血糖(mmol/L) | 尿白蛋白排泄率(mg/24h) | SCr(μmol/L)  | 血BUN(mmol/L) |
|---------|----|------------|-----------------|--------------|--------------|
| 空白对照组   | 10 | 5.23±1.23  | 0.24±0.23       | 38.80±8.23   | 7.92±4.06    |
| 糖尿病非治疗组 | 11 | 21.22±3.25 | 0.72±0.47       | 53.36±6.05   | 12.73±6.15   |
| 化湿方组    | 11 | 20.95±3.80 | 0.37±0.26*      | 40.80±7.77** | 8.48±0.94**  |
| 氨基胍组    | 10 | 20.85±3.25 | 0.32±0.15*      | 54.11±8.37   | 13.64±4.32   |

燥以化其湿;佐药大腹皮宽胸腹,厚朴畅脾胃,得气机宽畅,湿浊不易凝留;使药荷叶升清,清气升则湿浊自降。诸药配伍,君臣佐使井然,升降开阖有序,湿郁日久,有化热之虞,故加黄芩。共奏除湿祛痰、化浊清热之效。

蛋白非酶糖化和氧化应激反应促进糖尿病肾病等慢性并发症的发生和发展<sup>[7-8]</sup>,阻止 AGEs 生成是防止糖尿病肾病的重要环节。本实验以非酶糖化抑制剂氨基胍作为阳性对照药,观察了化湿方对糖尿病大鼠肾皮质非酶糖化的影响。结果表明,化湿方降低 AGEs 表达,其作用强度与氨基胍大致相同,提示化湿方是较理想的中药非酶糖化抑制剂。自由基与糖尿病的关系日益受到人们的重视。MDA 是脂质过氧化物的代谢毒性产物,其值可反映脂质过氧化水平。2 型糖尿病患者 MDA 含量增高。各实验组大鼠肾组织 MDA 含量较空白对照组明显升高,而 SOD 活性明显降低,说明糖尿病大鼠存在着脂质过氧化对机体的损害,用化湿方治疗后能显著降低 MDA 含量,提高 SOD 活性,提示该方能降低脂质过氧化对机体的损伤。这可能是该方防治糖尿病肾病的机理之一。

实验表明,化湿方和氨基胍均无降糖作用,提示化湿方抑制蛋白非酶糖化不依赖于降低血糖。化湿方能有效降低尿白蛋白排泄率,其作用与氨基胍相似,提示

该方具有治疗糖尿病肾病的作用。同时经化湿方治疗后,SCr、BUN 明显下降,氨基胍组 SCr、BUN 无明显变化,说明化湿方能明显地恢复肾功能。

糖尿病肾病病理改变为肾小球肥大、系膜扩张、细胞外基质聚集,这可能和高血糖引起各种细胞代谢紊乱如蛋白非酶糖化、脂质过氧化等有关。本实验证实,化湿方可减轻糖尿病大鼠肾小球系膜增生,改善毛细血管腔受压,修复糖尿病大鼠肾组织病理损害。综上所述,可望将该方用于糖尿病肾病的防治。

#### 参考文献

- 1 徐淑云,卞如谦,陈修.药理学实验方法学,第 3 版.北京:人民卫生出版社,2001:535~536.
- 2 陈奇,邓之龙,张世玮,等.中药药理研究方法学.北京:人民卫生出版社,1993:951~953.
- 3 齐凤菊,周玖,陈媛,等.血浆丙二醛含量的测定方法——改良的木国夫法.第一军医大学学报,1986,6(2):152~153.
- 4 徐正正.不同病程糖尿病患者的证候特征.中医杂志,2000,41(1):44~45.
- 5 梁萃茂.雷氏芳香化浊法治疗 2 型糖尿病临床观察.天津中医,1997,14(4):157~158.
- 6 梁萃茂,张国霞.雷氏芳香化浊法加味治疗 2 型糖尿病黎明现象 57 例临床研究.湖南中医杂志,2001,17(2):16~17.
- 7 Brownlee M. Glycation and diabetic complications. Diabetes, 1994, 43(6):836~841.
- 8 Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes, 1991, 10(4):405~412.

## 关于召开中医药学术发展大会暨中华中医药学会理事、会员及海外会员高层论坛的通知

为促进中医药学术发展,弘扬中医药文化,探索中医药在新世纪、新形势下的创新和发展之路,探讨中医药现代化的思路、方法、途径与目标,中华中医药学会拟于 2005 年 11 月上旬在浙江杭州举办“中医药学术发展大会暨中华中医药学会理事、会员及海外会员高层论坛”,会议期间召开中华中医药学会理事会。会议由中华中医药学会主办、浙江康莱特药业有限公司协办。现将有关事项通知如下。

一、会议内容:1. 特别演讲:邀请国内著名专家及院士,针对中医药学术发展中的重大问题发表演讲;2. 专题报告:邀请基础理论及临床各学科带头人报告学科发展思路及最新进展;3. 交流研讨:组织与会专家、学者针对中医药各有关学术领域的关键问题进行交流研讨。

二、征文范围:1. 中医药学特色和优势的研究;2. 中医药学防治重大疾病的研究成果;3. 关于中医药学基础理论和临床技术创新的研究;4. 中医药发展的思路、方法及规律探讨;5. 名老中医经验继承和整理研究;6. 中医学诊疗常规和疗效评定标准研究;7. 中西医结合比较研究;8. 中医药现代化概念探讨;9. 中医药现代化途径和步骤研究;10. 中医药现代化目标与评价研究;11. 中医药现代化与保持中医药特色的关系探讨;12. 中国传统文化与中医药学关系的研究;13. 运用多学科理论、技术与方法研究中医药的成果。

三、征文要求:1. 论文应具有科学性、创新性、实用性,论点明确,论据充分,结构严密,层次分明,文字精练;2. 论文字数 3 000 字左右,摘要 150~200 字,请在正文、摘要上注明作者姓名、单位、地址、邮编、电话、手机并加盖公章;3. 论文及摘要请提供打印稿,文稿请按 Word 格式录入,并附 3.5 英寸软盘,同时将论文以电子邮件方式发送至:gzdhlp@sohu.com;4. 请自留底稿,恕不退稿;5. 征文截止日期:2005 年 9 月 20 日。

#### 四、联系方式

联系人:高扬、王淑英,电话:010-61212828,传真:010-61210755,地址:北京市朝阳区樱花园东街甲 1 号,中华中医药学会学术部,邮编:100029

电子信箱:gzdhlp@sohu.com

## 2005 海峡两岸及港澳地区中医药学术研讨会通知

为了探讨我国中医药学领域面临的一系列热点和难点问题,促进海峡两岸及港澳地区中医药学的共同发展与进步,推进港、澳、台与内地中医药界同仁之间深层次的交流与合作,大力弘扬中医药特色,值中国中医研究院建院 50 周年之际,将于 2005 年 10 月中旬在北京召开“2005 海峡两岸及港澳地区中医药学术研讨会”,现将会议有关事项通知如下。

征文内容:中医药学的基础研究;中医药学临床各种常见病、疑难病、危重病的治疗经验总结;中医和中西医结合临床治疗的新成果、新技术、新经验;中医药临床特色经验与特种技术的应用;非药物疗法在临床中的应用研究;中医药现代化研究的新思路、新技术、新方法;中医药标准化与国际化研究;中医药知识产权保护;中医药资源保护、合理利用及可持续发展;现代科学技术与中医药研究;中药新药及健康相关产品的研究、开发与应用;中医药产业及贸易的现代化与国际化;中医药人才培养;其他。

征文要求:论文内容真实、可靠,具备科学性、先进性、实用性,且尚未公开发表过;全文 3 000 字左右,并请附 800 字中文摘要;来稿免收审稿费,请务必注明作者姓名、工作单位、通讯地址、邮编和联系电话;寄全文、摘要各 1 份(A4 纸)和录入的 3.5 寸软盘(用 Word 录入)1 张或由 E-mail 发送;来稿经专家评审,合格并参加会议交流者将在正式出版物上刊出;论文截稿日期:2005 年 9 月 10 日。

会议期间将安排如下活动:(1)首届中医药创新与发展院士论坛:从事中医药基础和临床研究、中西医结合、天然药物研究及在自然科学与生命科学领域关注中医药事业发展的中国科学院和中国工程院院士汇聚一堂,让与会代表零距离地接受国家级医学学者及科学大师们的思想和智慧,为与会代表同院士近距离沟通交流,建立与院士的密切联系创造不可多得良机;(2)全国名老中医疑难病临床论坛:邀请国家中医药管理局认定的 500 名名老中医中的专家同与会代表长期积累下来的宝贵经验及独特的学术思想,为与会代表与名老中医创造拜师识证的双向沟通机会。

详情敬请垂询:010-64011765、64073111,联系人:吕燕,地址:北京市东直门内南小街 16 号中国中医研究院科技合作中心,邮编:100700

E-mail:lyyan001@sohu.com