

文章编号: 1004-4353(2017)03-0230-03

朝医方“千金文武汤”有效组分对 糖尿病肾病模型的影响

关琪轩¹, 吴婧¹, 王鹤霖², 杨贺然³, 郭建鹏^{1,4*}

(1. 延边大学药学院; 2. 延边大学医学院; 吉林 延吉 133000; 3. 吉林市人民医院, 吉林 吉林 132000;
4. 长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室(延边大学), 吉林 延吉 133000)

摘要: 为考察朝医方“千金文武汤”特定配比的有效组分对糖尿病肾病模型的影响, 采用链脲佐菌素结合高脂饲料建立小鼠糖尿病肾病模型, 并给予低、中、高剂量的受试品; 连续给药 8 周后, 以空腹血糖值、肾重指数、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)以及肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 为指标对小鼠肾脏进行检测. 结果显示: 与对照组相比, 受试品能显著降低小鼠空腹血糖值, 改善肾重指数, 增加肾脏组织 SOD 的活性, 降低肾脏组织 MDA 的含量. 这表明“千金文武汤”有效组分对糖尿病肾病小鼠的肾脏损害有一定的保护作用, 该机理可能与其增强组织的抗氧化能力和调节体内炎症因子水平有关.

关键词: 朝药复方; 糖尿病肾病; 氧化应激

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

Effect of effective components of “Qianjin Wenwu Tang” on diabetic kidney disease models

GUAN Qixuan¹, WU Jing¹, WANG Helin², YANG Heran³, GUO Jianpeng^{1,4*}

(1. College of Pharmacy, Yanbian University; 2. College of Medicine, Yanbian University; Yanji 133000, China;
3. Jilin People's Hospital, Jilin 132000, China; 4. Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain &
Functional Molecules (Yanbian University), Ministry of Education, Yanji 133000, China)

Abstract: The specific ratio of effective component which effects on the diabetic and kidney disease (DKD) animal models for a kind of Korean medical prescription named “Qianjin Wenwu Tang” is evaluated. The DKD models was established by means of streptozotocin combined with high fat diet, furthermore, the low, medium and high dose of gavage were for 8 weeks. The levels of blood glucose, renal weight index, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and tumor necrosis factor α (TNF- α) were used target to observe the kidney abnormalities and oxidative damage. Compared with the control group, the test substance could significantly decrease the blood glucose level, improve the renal weight index, increase the activity of SOD in kidney tissue and decrease the content of MDA. The effective components of “Qianjin Wenwu Tang” imply protective effect on the kidney damage of mice for DKD models, thus, the mechanism may be related with enhance the antioxidant capacity and regulate the level of inflammatory factors in the body.

Keywords: Chaoyao compound; diabetic kidney disease; oxidative stress

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病严重的微血管并发症, 已成为终末期肾

脏病的常见原因, 也是糖尿病患者主要死因之一^[1]; 因此, 防治 DKD 意义重大. 朝医传统方“千

金文武汤”(《东医四象新编》·元成庵)由葛根、黄芩、山药、藁本、五味子、桔梗、升麻、白芷、麦门冬等药味组成^[2],方中:葛根清热解毒,生津止渴;黄芩收敛肺元,清热解毒;藁本发散表邪,祛风止痛;升麻发散风热,解毒升阳;麦门冬补肺和润肺;五味子健肺直肺;山药和桔梗壮肺;白芷祛风解表止痛。上述方中各药合用,具有补肺敛肺、养胃生津、健脾固肾、利水消肿的功效,主治“太阴人”“下消”症。临床研究^[3]表明,应用“千金文武汤”治疗DKD,患者的症状得到显著改善。本文以“千金文武汤”提取、纯化得到的有效组分提取物(以下简称,千金汤)作为受试样品,考察其对小鼠I型DKD模型的作用及其机理。

1 实验材料

1.1 主要试剂与仪器

SOD试剂盒(南京建成生物工程研究所,A001-1);MDA试剂盒(南京建成生物工程研究所,A003-2);TNF- α ELISA试剂盒(伊莱瑞特生物科技有限公司,E-EL-M0049c);链尿佐菌素(Sigma生物技术公司)。

1.2 受试样品

千金汤有效组分及重量配比为总多糖100份、总黄酮10份、总皂苷7份,由长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室制备(批号为20161103、20161109、20161115)。制备方法:处方药味以30%乙醇为溶剂回流提取,提取液采用吸附澄清法精制,精制液用D101型大孔吸附树脂进行纯化;采用30%乙醇洗脱液进行洗脱分离,收集洗脱液,干燥后即得。

2 实验方法

2.1 模型制备与分组

选取体重为 (20 ± 2) g的6周龄昆明小鼠(SPF级),用普通饲料常规适应性饲养一周后检测血糖和尿蛋白,均为阴性者用于实验。随机分为正常组10只和造模组70只。造模组小鼠禁食不禁水12 h以上,以浓度为 $17.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的链脲佐菌素(Streptozotocin,STZ)柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 4.5),按 $55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给予腹腔注射,隔日注射,共5次,同时以高脂饲料喂养^[4];正常组注射等量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,标准饲料饮食。2

周后,连续3天测空腹血糖值,出现饮水量加大、排尿量加大并且血糖值高于 $11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的试验小鼠视为模型成功。模型小鼠随机分为低、中、高剂量给药组(65 、 130 、 $260 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和模型组对照组,每组10只^[5]。各给药组给予相应的千金汤,正常组和模型对照组给予同体积的5%羧甲基纤维素钠溶液,每天1次,连续给药8周。

2.2 样本采集及指标测定

停止给药后,禁食、不禁水24 h,收集24 h内的总尿量,精密称体重,尾静脉采血测空腹血糖^[6-7];解剖后取出右肾精细称重,并计算相对肾重指数;取右侧肾脏,匀浆,离心,取上清液, 4°C 保存备用。

2.2.1 SOD活性以及MDA含量检测 SOD作为一种重要的抗氧化剂,其消除自由基的能力与活性成正比。本文采用总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒测定肾脏组织中的SOD活力。

MDA是细胞膜脂质过氧化的终产物之一,其含量可间接反映脂质过氧化的程度。小鼠肾脏组织中MDA含量的测定按MDA试剂盒上规定的操作方法进行。

2.2.2 血清TNF- α 含量的测定 麻醉小鼠,眼球取血, 4°C 静置2 h, 4°C $2\,500 \text{ r/min}$ 离心20 min,收集血清, -70°C 保存备用。依照ELISA试剂盒说明书,用酶标仪测小鼠血清中TNF- α 的值。

3 实验结果

3.1 对小鼠空腹血糖的影响

由表1可知:与正常组相比,模型组的空腹血糖值显著升高($P < 0.01$),血糖值均高于 $11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;给药2周后给药组的血糖值有一定程度下降,给药8周后给药组的血糖值显著降低,与模型组小鼠空腹血糖值相比具有极显著性差异,并呈现量效关系,且给药高剂量组的空腹血糖值接近正常组。这说明千金汤在一定程度上可以维持小鼠肾脏损伤后的空腹血糖值。

3.2 对小鼠肾重指数的影响

由表2可知,与正常组比较,模型组的肾重指数显著升高($P < 0.01$),表明肾脏有不同程度的增大。给药组的肾重指数与模型组相比均降低,且具有极显著差异,表明千金汤针对DKD所引起的肾脏异常增大有控制作用。

表 1 千金汤对小鼠空腹血糖的影响($\bar{x}\pm SD$, mmol·L⁻¹, n=6)

组别	空腹血糖值		
	造模后	2 周后	8 周后
正常	5.36±0.49	5.46±0.45	5.39±0.20
模型	13.26±0.60 [#]	16.85±0.71 [#]	17.94±0.49 [#]
高剂量	14.11±0.34 [#]	9.18±0.52 ^{##}	5.07±0.35 ^{##}
中剂量	13.60±0.68 [#]	11.37±0.60 ^{##}	7.40±0.36 ^{##}
低剂量	13.69±0.85 [#]	12.15±0.95 ^{##}	9.18±0.45 ^{###}

注: # 表示模型组与正常组比较有极显著性差异($P<0.01$); * 表示给药组与模型组比较有显著性差异($P<0.05$); ** 表示给药组与模型组比较有极显著性差异($P<0.01$)

3.3 对小鼠肾脏 SOD 活性的影响

由表 2 可知,与正常组相比,模型组的 SOD

表 2 提取物对小鼠肾脏各项指标的影响($\bar{x}\pm SD$, mmol·L⁻¹, n=6)

组别	(肾重/体重)/(mg/g)	SOD/(U/mgprot)	MDA/(nmol/mgprot)	TNF-α/(μg/L)
正常	6.905±0.333	0.165±0.005	0.109±0.014	0.116±0.029
模型	8.058±0.340 [#]	0.121±0.007	0.165±0.024	1.292±0.284
高剂量	7.232±0.094 ^{##}	0.140±0.011 ^{##}	0.121±0.003 ^{##}	0.087±0.011 ^{##}
中剂量	7.298±0.125 ^{##}	0.137±0.007 ^{##}	0.138±0.008 ^{##}	0.165±0.094 ^{##}
低剂量	7.776±0.200 ^{##}	0.135±0.009 ^{##}	0.147±0.006 ^{##}	0.896±0.068 ^{##}

注: # 表示模型组与正常组比较有极显著性差异($P<0.01$); * 表示给药组与模型组比较有极显著性差异($P<0.01$)

4 讨论

高血糖是 DKD 发生发展的重要因素,其可能机理包括:机体大部分组织可以通过减少葡萄糖的输入来保护自身免遭高血糖的破坏,而内皮细胞没有这种葡萄糖诱导的自动调节的反应功能^[8],从而导致内皮细胞内葡萄糖与代谢中产物的持续升高,致使内皮细胞损伤并加速其凋亡;葡萄糖氧化过程中伴有大量氧自由基和活性氧产生^[9],造成氧化应激而损伤血管内皮,从而改变肾脏血流流变学,引起肾单位结构、功能等改变,促使 DKD 发生发展。

SOD 能够保护肾脏细胞,避免其受过氧化损伤。糖尿病能够导致病变性肾脏内 SOD 的降低,进而降低清除自由基的能力,逐步致使细胞产生过氧化损伤,这也是糖尿病引起 DKD 的一个决定性步骤。本文中给药组小鼠在千金汤的干预下,其 SOD 活性有显著性提升。给药组中低、中、高 3 组的 SOD 含量依次升高,且呈剂量依赖性,表明

含量降低,表明模型组有不同程度的肾脏组织损伤。给药组的 SOD 含量均高于模型组,具有显著性差异,且呈量效关系。

3.4 对小鼠肾脏 MDA 含量的影响

由表 2 可知,与正常组相比,模型组的 MDA 含量升高。给药组与模型组相比其 MDA 含量均降低($P<0.01$),并呈量效关系。这表明千金汤具有降低肾脏组织 MDA 含量的作用。

3.5 对小鼠血清 TNF-α 含量的影响

由表 2 可知,与正常组相比,模型组的肾脏组织中血清 TNF-α 水平显著上升,给药组的 TNF-α 水平均显著低于模型组($P<0.01$)。这表明千金汤对 DKD 导致的肾脏组织中小鼠血清 TNF-α 含量异常升高具有抑制作用。

千金汤有利于保护肾脏细胞避免过氧化损伤。本文模型动物肾脏组织 MDA 含量显著增高,表明其肾脏中发生了明显的氧化应激损伤。给药组的 MDA 含量显著低与模型组。给药组中低、中、高 3 组的 MDA 含量依次降低,且呈剂量依赖性,表明千金汤有助于降低过氧化损伤。TNF-α 是具有多种效能的前炎性细胞因子,由单核巨噬细胞产生,参与免疫细胞的激活,能够诱发炎症反应^[10],研究表明炎症参与 DKD 的发展可加速糖尿病综合症的发生^[11]。除此,TNF-α 还能刺激系膜细胞产生氧自由基,从而使过氧化脂质代谢产物增多,造成细胞内膜和基底膜损伤,产生蛋白尿。本文实验表明,给药组与模型组相比,小鼠肾脏中 TNF-α 水平明显下降,且给药组高、中、低 3 组中,高剂量组的 TNF-α 含量远低于中剂量和低剂量组。这一结果说明,千金汤对于炎症的发生有一定的抑制作用。

6 结论

本研究通过对延边地区道路周边滑坡灾害易发程度分析得出以下结论: ①由层次分析法得出, 在 6 个影响滑坡发生的因子(坡度、地质、土壤、土地利用、坡向和断层)当中, 坡度、地质和土壤的影响相对较大. ②从图 11 可以看出, 道路 500 m 内发生滑坡的概率比较大, 因此该范围内应作为重点防范区域. ③由图 8 可以看出, 延边州的安图县西南部(长白山区域)、龙井东南部与朝鲜交界处、延吉与和龙东南部地区的道路周边危险区域分布较多, 应重点防范. 本文结果可为延边地区防范山体滑坡灾害提供科学依据. 本文在研究中仅仅考虑了影响滑坡发生相对较大的因子, 没有考虑其他因子的影响, 比如降水量; 因此, 今后将利用 BP 神经网络模型与 AHP 相结合的方法, 结合相关多种因子进行研究, 以期望得到更准确的结果.

参考文献:

[1] 周云, 李伍平, 浣石, 等. 防灾减灾工程[M]. 北京: 中

国建筑工业出版社, 2007: 152-153.

- [2] 段永侯. 我国地质灾害的基本特征与发展趋势[J]. 第 4 纪研究, 1999, 19(3): 208-216.
- [3] 郭弘. 刍议山体滑坡的成因及治理措施[J]. 科技致富向导, 2012, 14: 401-402.
- [4] 张云丰, 金素月, 安怀德, 等. 基于 GIS 的长白山地区山体滑坡易发程度分析[J]. 延边大学学报(自然科学版), 2013, 47(4): 12-20.
- [5] 曲家媛. 基于 P-S-R 模型的延边州生态安全评价研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2010: 12-14.
- [6] 李巍岳, 刘春, Scaioni M, 等. 基于滑坡敏感性与降雨强度-历时的中国浅层降雨滑坡时空分析与模拟[J]. 中国科学: 地球科学, 2017, 47(4): 473-484.
- [7] Saaty T L. The Analytic Hierarchy Process[M]. New York: McGraw-Hill, 1980: 11-76.
- [8] 朱茵, 孟志勇, 阚叔愚. 用层次分析法计算权重[J]. 北方交通大学学报, 1999, 23(5): 119-122.
- [9] 李天斌, 陈明东, 王兰生. 滑坡实时跟踪预报[M]. 成都: 成都科技大学出版社, 1999: 3-6.
- [10] 黄润秋. 20 世纪以来中国的大型滑坡及其发生机制[J]. 岩石力学与工程学报, 2007, 26(3): 433-454.
- [11] 汤国安, 刘学军, 闫国年, 等. 地理信息系统教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 213-214.

(上接第 232 页)

参考文献:

- [1] 魏晓, 欧三桃. 综合防治, 延缓进展: 2014 年版《中国糖尿病肾病防治专家共识》解读[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(1): 1-3.
- [2] 郑明昱, 延光海, 崔海英. 中国朝医学·古籍精选卷[M]. 延吉: 延边大学出版社, 2015.
- [3] 金香男. 朝医千金文武汤加减治疗太阴人消渴病[J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(22): 150-150.
- [4] 贾跃伟, 刘晓萍, 于业军, 等. 不同途径骨髓基质干细胞移植治疗小鼠糖尿病效果[J]. 青岛大学医学院学报, 2010, 46(3): 255-257.
- [5] 张媛媛, 侯卫平, 袁发. EGCG 对肾脏疾病保护作用的研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(11): 1022-1024.
- [6] 钱溢. 精选中药小复方对糖尿病肾病小鼠肾脏保护作用的研究[D]. 长春市: 长春中医药大学, 2014.
- [7] Shan X, Edward C, Shweta D, et al. Mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 controls mitochondrial fission and cell sensitivity to stress-induced apop-

tosis through regulation of MiD49 protein[J]. Molecular Biology of the Cell, 2016, 27(2): 349.

- [8] Cifarelli V, Geng X, Styche A, et al. C-peptide reduces high-glucose-induced apoptosis of endothelial cells and decreases NAD(P)H-oxidase reactive oxygen species generation in human aortic endothelial cells[J]. Diabetologia, 2011, 54(10): 2702-2712.
- [9] Natarelli L, Ranaldi G, Leoni G, et al. Nanomolar caffeic acid decreases glucose uptake and the effects of high glucose in endothelial cells[J]. Plos One, 2015, 10(11): e0142421.
- [10] 郭景珍, 李平, 万方, 等. 糖肾方对 II 型糖尿病肾病模型 OLETF 大鼠 IL-10、TNF- α 、DA 调控作用观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, 12(12): 1044-1047.
- [11] 韩鹏飞, 李洪志, 于晶, 等. 姜黄素及其类似物通过抑制炎症因子对糖尿病肾病小鼠的治疗作用[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1): 77-81.