

益智提取物抗糖尿病肾病有效部位的筛选

谢毅强, 刘婧*, 韦祎, 邢明泉, 尹德辉, 朱叶
(海南医学院, 海口 571199)

[摘要] **目的:**比较益智不同极性提取部位对糖尿病肾病(DN)的保护作用,筛选其有效部位,为DN的治疗提供实验依据。**方法:**采用链脲佐菌素建立DN小鼠模型, DN小鼠分为正常组(按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃水)、模型组(按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃水)、厄贝沙坦组(按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给药)和益智提取物组(石油醚部位、三氯甲烷部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位,按 $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃给药),定期观察小鼠的血糖及血生化,定时测定尿量及尿蛋白排泄量,确定益智抗DN的有效部位。**结果:**与正常组比较,其余各组小鼠血糖显著升高,且这6组间无显著性差异;随着给药时间的延长,各药物组血糖并无明显降低,与模型组无差异。与正常组相比,模型组的24 h尿蛋白明显升高;与模型组相比,各给药组则明显降低。与正常组比较,各组小鼠体重显著减轻,相对肾重显著增加;药物干预后,与模型组比较,各药物组小鼠体重显著增加,相对肾重明显降低。与正常组相比,给药后各组小鼠的血清肌酐(SCr)和血尿素氮(BUN)升高明显;与模型组相比,各药物组小鼠的SCr和BUN降低明显。益智的石油醚部位优于其他部位,能显著减少DN小鼠尿蛋白的排出并降低SCr和BUN;24 h尿蛋白,SCr, BUN分别为 $(1.99\pm 0.21)\text{ mg}$, $(121.16\pm 9.66)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $(7.70\pm 0.41)\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,对DN肾功能具有良好的保护作用。**结论:**益智石油醚部位为抗DN的有效部位。

[关键词] 益智;有效部位;糖尿病肾病;血糖;白蛋白尿;相对肾重

[中图分类号] R285.5; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0114-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030114

Screening of Effective Fraction for Anti-diabetic Nephropathy by *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* Extract

XIE Yi-qiang, LIU Qiang*, WEI Yi, XING Ming-quan, YIN De-hui, ZHU Ye (Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

[Abstract] **Objective:** To screen effective part of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* by comparing protective effect of different polar extract parts on diabetic nephropathy (DN). **Method:** Streptozotocin was adopted to establish a mice model of DN, DN mice were divided into the normal group and the model group by *ig* water of $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, the irbesartan group (*ig* by $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* extract groups (*ig* petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol fractions by $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), various extraction sites interventions were regularly observed blood glucose and blood biochemistry, timed and measured urinary protein excretion in urine, in order to determine effective part of its anti-diabetic nephropathy. **Result:** Compared with the normal group, blood glucose of other groups significantly increased without significant difference among these six groups; with extension of administration time, blood glucose of each drug group did not significant decrease. Compared with the normal group, 24 h urine protein of the model group significantly increased, this index of each treatment group significantly reduced by comparing with the model group. Body weight significantly reduced and relative kidney increased significantly of each group by comparing with the normal group, after drug intervention, each treatment group had opposite effect by comparing with the model group. After administration, serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN) of each group increased significantly by comparing with the

[收稿日期] 20140602(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360586);海南省自然科学基金项目(812186,814290);海南省中药现代化专项(ZY201332);海口市重点科技项目(2013-50);海南医学院科研培育基金项目(HY 2012-009);海南省高等学校优秀中青年骨干教师项目(2013)

[第一作者] 谢毅强,教授,博士,从事中医药防治内分泌及代谢疾病的临床与实验研究, Tel:13036001921, E-mail: mxieyiqiang@163.com

[通讯作者] *刘婧,博士,副教授,从事新药药理研究, Tel:13198997446, E-mail: haiyiqeen@163.com

normal group, but this index of each treatment group had oppsite effect by comparing with the moedl group. Petroleum ether part of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* showed better results than other parts, its urine protein, BUN and SCr decreased significantly. Urine protein in 24 h, SCr and BUN were (1.99 ± 0.21) mg, (121.16 ± 9.66) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and (7.70 ± 0.41) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** It is suggested that petroleum ether fraction of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* may be the effective fraction for anti-diabetic nephropathy.

[Key words] *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*; effective fraction; diabetic nephropathy; blood glucose; albuminuria; relative kidney weight

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病主要微血管病变之一。尿蛋白的出现则表明病情已经很严重,是糖尿病致死的主要原因之一^[1]。中医将糖尿病肾病命名为消渴肾病,由于DN治疗困难,单用西药或中药疗效均不尽人意^[2]。益智是海南四大南药之一,作为缩泉丸的主要组分,具有温补肾阳、温化肾气的作用,对糖尿病肾病,尤其是多尿期有较好的疗效^[3]。吴德玲等^[4-5]对益智仁中多糖和总黄酮进行了含量测定,但有效部位的相关报道甚少。为明确益智抗糖尿病肾病的作用及其药效物质基础,本实验拟提取益智中不同极性化学部位,建立DN小鼠模型,比较益智不同极性提取部位对DN的保护作用,为DN的治疗提供实验依据。

1 材料

GS-15R型低温离心机(Beckman公司),DW-40L262型低温冰箱(海尔),120FR型全自动生化分析仪(日本东芝),PL203型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),I型悦准血糖仪(上海鱼跃),AU600型自动生化分析仪(日本奥林巴斯公司)。益智购自海南省海口市国瑞堂医药公司,经海南医学院药学院王勇研究员鉴定为姜科植物益智 *Alpinia oxyphylla* 的干燥成熟果实;链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司),聚山梨酯-80(tween-80,西安悦来医药科技有限公司),厄贝沙坦(安博维,赛诺菲公司,批号2A205)。

健康雄性KM小鼠56只,体重 (22 ± 2) g, SPF级,长沙市天勤生物技术有限公司提供,合格证号SCXK(湘)2009-0012,常规适应性饲养1周,无不良反应者进入实验。

2 方法与结果

2.1 益智提取物的制备 取益智100 g,粉碎,过1号筛,置于2 L圆底烧瓶中,加乙醇600 mL回流提取2次,每次1 h,纱布滤过,合并2次滤液,于 <60 °C减压回收,浸膏加适量水混悬均匀,分散至100 mL,依次用石油醚(60~90 °C)、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取,分离各层,分别减压回收溶剂,得各化学部

位。将各部位配成含5% tween-80的稳定混悬液使用。根据各部位的出膏率,制备成生药质量浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液备用。

2.2 造模^[4] 精密称取STZ粉剂150 mg,溶于pH 4.8柠檬酸缓冲液15 mL中,得 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。动物适应性喂养1周后,禁食12 h,模型组KM小鼠1次性腹腔注射STZ(剂量 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),正常组腹腔注射等量无菌柠檬酸缓冲液。注药后72 h尾尖取血,测定血糖,血糖 $>16.17 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 者确定为糖尿病诱导成功,此后每周定期监测血糖及24 h尿蛋白,持续出现蛋白尿的小鼠视为DN造模成功。

2.3 分组及给药 模型成功后,将小鼠随机分组,包括正常组、模型组、厄贝沙坦组、益智提取物组(石油醚部位)、益智提取物组(三氯甲烷部位)、益智提取物组(乙酸乙酯部位)、益智提取物组(正丁醇部位),每组8只。小鼠给药剂量按人与动物体表面积折算^[4],小鼠给药剂量相当于成人药量的9倍。正常组、模型组按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃水,厄贝沙坦组按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃,益智提取物组(石油醚部位)、益智提取物组(三氯甲烷部位)、益智提取物组(乙酸乙酯部位)、益智提取物组(正丁醇部位)分别按 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药。各组每日灌胃1次,不限制饮食和水,干预周期为4周,期间不使用胰岛素及其他降血糖的药物。

2.4 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 13.0软件进行统计分析,多样本均数的比较采用单因素方差分析,两两比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.5 观测指标

2.5.1 血糖 利用血糖仪及配套试纸于第4个周末小鼠尾尖取血测定血糖1次,严格按说明书执行,见表1。表明与正常组比较,各组小鼠血糖显著升高,且这6组间无显著性差异。随着给药时间的延长,各药物组血糖并无明显降低,与模型组无差异。

2.5.2 尿蛋白 4周末,用小鼠代谢笼收集24 h尿液,计24 h尿量,充分混匀后,于 $1300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心

5 min, 收集上清液, 通过 120FR 型全自动生化分析仪测定 24 h 尿蛋白量。结果显示与正常组相比, 模型组的 24 h 尿蛋白定量给药后明显升高; 与模型组相比, 给药 4 周后各给药组则明显降低, 见表 2。

2.5.3 肾脏指数 精密称取小鼠体重, 无菌操作摘取右肾, 去掉被膜, 加生理盐水冲洗, 用滤纸吸干血迹, 称取右侧肾脏质量, 按肾脏指数 = 肾重/体重计算。结果表明与正常组比较, 各组小鼠体重显著减轻, 相对肾重显著增加; 药物干预后, 与模型组比较,

各药物组小鼠体重显著增加, 肾脏指数明显降低, 见表 3。

2.5.4 肾功能 小鼠摘眼球取血, 制备血清。血样送至海南医学院附属医院检验科, 通过 AU600 型全自动生化分析仪检测血清肌酐 (serum creatinine, SCr) 和血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)。结果表明与正常组相比, 给药后各组小鼠的 SCr 和 BUN 升高明显; 与模型组相比, 各药物组小鼠的 SCr 和 BUN 降低明显, 见表 4。

表 1 益智不同极性提取部位对 DN 小鼠空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of different polar extracts from *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* on fasting blood glucose of DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	血糖/mmol·L ⁻¹		
		给药前	给药 2 周	给药 4 周
正常	-	7.89 ± 0.77	7.61 ± 0.93	7.45 ± 0.84
模型	-	23.60 ± 1.63 ²⁾	24.53 ± 1.46 ²⁾	24.95 ± 0.83 ²⁾
厄贝沙坦	10	22.17 ± 1.01 ²⁾	23.54 ± 1.01 ²⁾	24.71 ± 1.38 ²⁾
益智(石油醚部位)	20	22.56 ± 0.96 ²⁾	23.76 ± 0.82 ²⁾	24.93 ± 0.91 ²⁾
益智(三氯甲烷部位)	20	22.11 ± 1.03 ²⁾	22.60 ± 0.89 ²⁾	23.36 ± 0.52 ²⁾
益智(乙酸乙酯部位)	20	22.65 ± 0.41 ²⁾	23.28 ± 0.43 ²⁾	23.83 ± 0.42 ²⁾
益智(正丁醇部位)	20	22.13 ± 0.64 ²⁾	22.81 ± 0.66 ²⁾	23.32 ± 0.71 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与模型组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01; 与厄贝沙坦组比较⁵⁾ P < 0.05 (表 2~4 同)。

表 2 益智不同极性提取部位对 DN 小鼠 24 h 尿蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of different polar extracts from *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* on 24 h urine protein of DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	尿蛋白/mg		
		给药前	给药 2 周	给药 4 周
正常	-	0.029 ± 0.06	0.028 ± 0.05	0.023 ± 0.02
模型	-	0.54 ± 0.06 ²⁾	1.71 ± 0.13 ²⁾	7.29 ± 1.41 ²⁾
厄贝沙坦	10	0.37 ± 0.07 ²⁾	1.33 ± 0.08 ²⁾	1.74 ± 0.17 ^{2,4)}
益智(石油醚部位)	20	0.43 ± 0.06 ²⁾	1.36 ± 0.05 ²⁾	1.99 ± 0.21 ^{2,4)}
益智(三氯甲烷部位)	20	0.43 ± 0.04 ²⁾	1.73 ± 0.08 ²⁾	3.10 ± 0.38 ^{2,4)}
益智(乙酸乙酯部位)	20	0.41 ± 0.01 ²⁾	1.79 ± 0.08 ²⁾	3.57 ± 0.33 ^{2,4)}
益智(正丁醇部位)	20	0.40 ± 0.02 ²⁾	1.66 ± 0.08 ²⁾	4.25 ± 0.27 ^{2,4)}

表 3 益智不同极性提取部位对 DN 小鼠肾重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of different polar extracts from *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* on kidney weight of DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肾脏指数/mg·g ⁻¹		
		给药前肾重/g	给药后肾重/g	肾脏指数/mg·g ⁻¹
正常	-	21.27 ± 0.67	22.67 ± 0.62	10.28 ± 2.15
模型	-	21.42 ± 0.66	20.92 ± 0.70	15.36 ± 1.32 ¹⁾
厄贝沙坦	10	20.01 ± 0.58	21.12 ± 0.71	12.66 ± 0.63 ^{1,3)}
益智(石油醚部位)	20	21.38 ± 0.73	22.75 ± 1.03	12.37 ± 0.54 ^{1,3)}
益智(三氯甲烷部位)	20	21.74 ± 0.61	22.33 ± 0.56	13.94 ± 0.69 ^{1,3)}
益智(乙酸乙酯部位)	20	21.87 ± 0.46	22.37 ± 0.54	13.58 ± 0.62 ^{1,3)}
益智(正丁醇部位)	20	21.89 ± 0.51	22.58 ± 0.43	13.35 ± 0.57 ^{1,3)}

3 讨论

DN 的病变累及肾小球、肾小动脉、肾小管及间

质组织, 临床以持续白蛋白尿为主要特征, 伴有肾小球滤过率下降, 导致终末期肾病, 最终需要透析或肾

表 4 益智不同极性提取部位对 DN 小鼠 SCr 和 BUN 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Effects of different polar extracts from *Alpinia Oxyphyllae Fructus* on SCr and BUN of DN mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	给药 2 周		给药 4 周	
		SCr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	SCr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
正常	-	70.24 ± 1.81	6.02 ± 0.48	74.09 ± 7.16	5.65 ± 0.42
模型	-	115.61 ± 8.51 ²⁾	13.77 ± 1.08 ²⁾	157.73 ± 6.14 ²⁾	15.42 ± 0.71 ²⁾
厄贝沙坦	10	96.99 ± 3.03 ^{1,3)}	6.96 ± 0.35 ⁴⁾	109.51 ± 7.83 ²⁾	7.52 ± 0.40 ⁴⁾
益智(石油醚部位)	20	97.69 ± 2.40 ^{1,4)}	7.22 ± 0.50 ⁴⁾	121.16 ± 9.66 ^{2,4,5)}	7.70 ± 0.41 ^{1,4)}
益智(三氯甲烷部位)	20	110.32 ± 4.47 ^{2,3,5)}	11.47 ± 0.62 ^{2,5)}	135.41 ± 6.34 ^{2,4,5)}	11.91 ± 0.77 ^{2,3,5)}
益智(乙酸乙酯部位)	20	114.48 ± 9.42 ^{2,3,5)}	12.37 ± 0.53 ^{2,5)}	134.58 ± 5.39 ^{2,4,5)}	12.95 ± 0.54 ^{2,3,5)}
益智(正丁醇部位)	20	111.98 ± 4.35 ^{2,3,5)}	12.53 ± 0.57 ^{2,5)}	131.14 ± 0.99 ^{2,4,5)}	12.83 ± 0.47 ^{2,3,5)}

脏移植^[5]。西医对 DN 的治疗尚无特效药^[6-7], 主要以控制饮食、改变生活方式为主, 药物治疗根据患者个体化特点, 采取平稳降糖、控制血压和调节脂代谢紊乱及应用血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)或(和)血管紧张素 II 受体阻滞剂(ARB)等综合治疗措施, 延缓 DN 的发生和发展^[8-10]。厄贝沙坦是目前治疗早期 DN 的主要药物, 通过抑制血管紧张素 II, 使激肽水平升高, 导致肾血管扩张, 使过高的肾小球过滤率降至正常, 能减少蛋白的排泄和抑制尿中细胞因子并抑制肾脏肥大, 进而延缓肾硬化的发生^[11]。中医对 DN 的病机及症状早有论述, 认为是消渴日久, 缠绵不愈, 耗气伤血, 阴损及阳, 脏腑虚损所致。病变脏腑主要有肝、脾、肾, 并涉及气血水三者^[12]。益智为中医临床常用药材, 具有暖肾固精缩尿、温脾止泻摄唾的功能, 用于治疗腹中冷痛、口多唾涎、肾虚遗尿、小便频数、遗精白浊等证^[13], 具有保护神经、抗炎和抗老年痴呆等活性^[14]。益智的化学成分多样, 其中倍半萜类化合物为主要特征成分。本文对益智化学提取物进行了抗 DN 的作用研究。当肾功能低下时, 会导致代谢中产物如尿素、肌酐等在血中浓度升高, 测定这些代谢中产物的浓度可初步估计肾脏功能。本文利用 STZ 大剂量注射制备 KM 小鼠 DN 模型, 给药 4 周后, 与正常组相比, 模型组小鼠的尿蛋白升高, SCr 和 BUN 含量显著升高, 与文献报道一致^[15]。研究发现石油醚部位组的 SCr 和 BUN 显著低于模型组, 显示出良好的保护肾脏作用, 提示石油醚部位是益智抗 DN 的有效部位。

[参考文献]

[1] 陈名道, 潘长玉, 杨立通, 等. 2 型糖尿病血糖控制未达标患者现状调查报告[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2011, 27(8): 625-630.
[2] 朱辟疆, 刁金因. 糖尿病肾病中西药治疗研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(3):

189-194.
[3] 邓义卫, 韦国麟. 缩泉丸治疗遗尿症临床应用和实验研究概况[J]. 黑龙江医药, 2012, 25(1): 129-132.
[4] 徐淑云, 卞如谦, 陈修. 药理试验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1239.
[5] 陈慎仁, 郭海婷. 糖尿病肾病的诊断与评估[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(8): 13-17.
[6] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes [J]. Diabetes Care, 2012, 35(S1): S11-S63.
[7] 杨晓燕, 潘兴华, 阮光萍, 等. 干细胞移植治疗糖尿病肾病[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(1): 150-155.
[8] 谢绍锋, 黄莉吉, 刘超. 糖尿病肾病防治的临床研究进展[J]. 江苏医药, 2013, 39(1): 90-92.
[9] Ascic-Buturovic B, Kacila M, Kulic M. Effects of aggressive approach to the multiple risk factors for diabetic nephro-pathy on proteinuria reduction in diabetes type 2 patients [J]. Bosn J Basic Med Sci, 2009, 9(1): 44-48.
[10] 曲荣广, 胡宝祥. 糖尿病肾病药物治疗进展[J]. 中国社区医师: 医学专业, 2012, 14(34): 30-32.
[11] Dai H Y, Zheng M, Tang R N, et al. Inhibition of integrin-linked kinase by angiotensin II receptor antagonist, irbesartan attenuates podocyte injury in diabetic rats [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(5): 888-893.
[12] 钱焯. 糖尿病肾病的中医证治[J]. 光明中医, 2013, 28(3): 637-639.
[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 273-274.
[14] 陈萍, 王培培, 焦泽滔, 等. 益智仁的化学成分及药理活性研究进展[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 617-623.
[15] 姜子超, 曲萍, 顾昊武, 等. 生物钟紊乱对糖尿病小鼠脏器损伤的影响[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2012, 33(3): 304-307.

[责任编辑 刘德文]