

生地黄、山茱萸水提液及其含药血清 对体外糖基化产物生成的影响

吕高虹, 许惠琴*, 农伟虎, 吕兴

(南京中医药大学药学院教学实验中心, 南京 210046)

[摘要] 目的: 观察生地黄, 山茱萸水提液及其含药血清对体外糖基化产物生成的影响。方法: 200 mmol·L⁻¹ 的葡萄糖与牛血清白蛋白组成反应系统, 37 °C 温孵, 分别加入生地黄, 山茱萸及其配伍水提液, 含药血清, 测早期糖化蛋白(果糖胺)及晚期糖基化产物(AGEs), 计算抑制率(inhibitory rate, IR), 及半数抑制率(IC₅₀)。结果: 山茱萸, 生地黄, 山茱萸, 生地黄配伍分煎及合煎的早期糖化产物(果糖胺) IC₅₀ 分别为 0.104, 0.159, 0.146, 0.077 g·L⁻¹; 晚期糖基化产物(AGEs) IC₅₀ 分别为 0.175, 0.221, 0.143, 0.076 g·L⁻¹。提示生地黄, 山茱萸水提液对早期和晚期糖化产物均有一定抑制作用。此外生地黄, 山茱萸含药血清对早期糖化蛋白 IC₅₀ 分别为: 37.9%, 49.1%, 52.8%, 31.6%; 对晚期糖基化产物 IC₅₀ 分别为: 78.5%, 92.3%, 82.9%, 73.2%。表明生地黄-山茱萸含药血清对果糖胺与 AGEs 也都具有一定的抑制作用, 且生地黄-山茱萸合煎组抑制果糖胺和 AGEs 的 IC₅₀ 优于其他组。结论: 生地黄山茱萸配伍对抑制果糖胺和 AGEs 具有协同作用。

[关键词] 生地黄; 山茱萸; 水提液; 含药血清; 果糖胺; 晚期糖基化产物

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0159-05

[doi] 10.11653/syfy2013120159

Effects of Rehmanniae Radix, Corni Fructus Water Extract and Drug-containing Serum on the Glycosylation Products

LV Gao-hong, XU Hui-qin*, NONG Wei-hu, LV Xin

(Research Center of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the Rehmanniae Radix and Corni Fructus water extracts and drug-containing serum on the proliferation of advanced glycation and generated products (AGEs). **Method:** The reaction system composed of 200 mmol·L⁻¹ glucose and bovine serum albumin was added to the Rehmanniae Radix and Corni Fructus and its water extracts with different compatibility drug-containing serum to determine early glycated protein (fructosamine) at 530 nm after two weeks at 37 °C incubation; the excitation wavelength of 360 nm and emission wavelength at 460 nm were used for the determination of AGEs fluorescence value (F) at 37 °C after four weeks of incubation. **Result:** Rehmanniae Radix and Corni Fructus water extracts and drug-containing serum had a certain inhibitory effect on fructosamine and AGEs, and Rehmannia dride rhizome and common macrocarpium fruit decoction group inhibited fructosamine and AGEs more obvious than other groups. **Conclusion:** Rehmanniae Radix and Corni Fructus with different compatibility have a synergistic effect on the inhibition of fructosamine and AGEs.

[Key words] Rehmanniae Radix; Corni Fructus; water extract contained serum; fructosamine; advanced glycation end products.

[收稿日期] 20121113(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073111)

[第一作者] 吕高虹, 硕士, 从事内分泌药理研究, Tel: 13851756021, E-mail: lgh1900@163.com

[通讯作者] * 许惠琴, 教授, 博士生导师, 从事内分泌药理研究, Tel: 13951800763, E-mail: hqx@sina.com

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见而又最难治的血管并发症^[1], 虽然糖尿病肾病发生发展的确切病理机制目前尚不十分详尽, 但比较公认的假说是在长期高血糖状态下, 葡萄糖分子可与体内蛋白质发生非酶糖基化反应, 形成不可逆的强活性物质—晚期糖基化终产物 (AGEs) 的结果^[2]。

生地黄-山茱萸药对见于《金匱要略》“肾气丸”、《医学衷中参西录》“滋滕饮”等方, 主治消渴证。现代中医专家赵进喜教授针对糖尿病肾病皆有肾虚、精微不固的病机经常选用此药对^[3]。本实验室前期的整体动物实验研究发现, 生地黄-山茱萸配伍给药能改善糖尿病大鼠血糖水平、抑制蛋白尿、控制血脂、减少尿糖代谢, 其中以两者配比比例 2:1 时效果最佳^[4], 本研究在此基础上, 选择生地黄-山茱萸药对 (2:1) 水提液及其含药血清, 考察其对体外糖基化产物的影响, 探讨其治疗糖尿病肾病的可能机制。

1 材料

1.1 药材与提取液制备 生地黄, 产地: 河南, 安徽井泉集团中药饮片有限公司 批号 20110202。山茱萸, 产地: 浙江, 安徽丰原铜陵中药饮片有限公司, 批号 110301。以上药材经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定, 分别为玄参科多年生草本植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥的块根和山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉。

1.1.1 生地黄水提液 将生地黄适量粉碎后过 40 目筛, 进行 3 次提取。合并各次提取液, 浓缩至 1.5 g·mL⁻¹ 生药。

1.1.2 山茱萸水提液 山茱萸药材适量加 12 倍量的水提取 2 次, 合并提取液, 浓缩至 1.5 g·mL⁻¹ 生药。

1.1.3 生地黄-山茱萸分煎液 将上述浓缩的生地黄、山茱萸提取液按 2:1 的比例混合均匀即得。

1.1.4 生地黄-山茱萸合煎液 将生地黄、山茱萸药材以 2:1 的比例, 按生地黄水提液提取方法提取即得。

1.2 药物与试剂 氨基胍 (aminoguanidine, Sigma 公司, 批号 MW09081), 葡萄糖 [D (+) Glucose, Sigma 公司, 批号 G-8270], 牛血清白蛋白 (albumin bovine, BSA, Sigma 公司)。磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4, 福州迈新生物技术开发有限公司, 批号 10112803)。叠氮钠 (NaN₃, Sigma 公司)。

1.3 动物 清洁级 SD 大鼠 10 只, 220 ~ 240 g, 由浙江省实验动物中心提供, 实验动物质量合格证 0019723。

1.4 仪器设备 MCo-20AIC 型 CO₂ 培养箱 (日本 SANYO 公司), A1301026 型低温高速离心机 (上海艾测电子科技有限公司), Synekgy HT 型酶联免疫检测仪 (美国 BIO-Tek 公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备 选取 SD 大鼠, 随机分为 4 组 (生地黄, 山茱萸, 生地黄-山茱萸分煎液, 生地黄-山茱萸合煎液), 每组 2 只大鼠。各组每天 ig 给药 2 次, 每次给药容积均为 10 mL·kg⁻¹ (质量浓度 1.5 g·mL⁻¹); 另设空白对照组 2 只, 每天灌服等体积蒸馏水。连续给药 5 d 后, 禁食 8 h, 于第 6 天末次给药 1 h 后颈动脉取血, 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 分离血清, 合并同组血清, 于 56 °C 水浴中灭活补体 30 min, 经 0.22 μm 微孔滤器除菌, -20 °C 保存备用。使用时用空白血清稀释至所需浓度。

2.2 体外牛血清白蛋白糖化系统 取葡萄糖终浓度为 200 mmol·L⁻¹, 牛血清白蛋白终质量浓度 40 g·L⁻¹, 该反应系统用 3 mmol·L⁻¹ NaN₃ 防腐。

2.3 生地黄-山茱萸水提液及含药血清对体外牛血清白蛋白糖化系统作用 分别加入生地黄水提液、山茱萸水提液、生地黄-山茱萸分煎水提液和生地黄-山茱萸合煎水提液, 使其终质量浓度分别为 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001 g·L⁻¹, 及各水提液含药血清, 体积分数分别为 100%, 80%, 60%, 50%, 40%, 20%, 10%。用氨基胍作阳性对照。按下式计算抑制率 (inhibitory rate, IR), 并计算半数抑制率 (IC₅₀)。

$$IR = \left[1 - \frac{\text{水提液 } A - \text{对照}_{(4)} A - \text{对照}_{(5)} A}{\text{对照}_{(1)} A - \text{对照}_{(2)} A - \text{对照}_{(3)} A} \right] \times 100\%$$

$$IR = \left[1 - \frac{\text{含药血清 } A - \text{对照}_{(4)} A - \text{对照}_{(5)} A}{\text{对照}_{(1)} A - \text{对照}_{(2)} A - \text{对照}_{(3)} A} \right] \times 100\%$$

3 结果

3.1 生地黄-山茱萸水提液对果糖胺的影响 生地黄水提液、山茱萸水提液、生地黄-山茱萸分煎液和合煎液对果糖胺都具有一定抑制作用, 且呈明显的量效关系, IC₅₀ 山茱萸为 0.104 g·L⁻¹, 生地黄为 0.159 g·L⁻¹, 2 药分煎为 0.146 g·L⁻¹, 2 药合煎为 0.077 g·L⁻¹, 氨基胍 IC₅₀ 为 0.044 g·L⁻¹, 因此对果糖胺的抑制作用由强及弱依次为氨基胍 > 生地黄-山茱萸合煎 > 山茱萸水提液 > 生地黄-山茱萸分煎 > 生地黄水提液。见表 1。

3.2 生地黄-山茱萸含药血清对果糖胺的影响

生地黄水提液、山茱萸水提液、生地黄-山茱萸分煎液和合煎液含药血清对果糖胺都具有一定抑制作用,且呈明显的量效关系,山茱萸含药血清、生地黄含药血清、生地黄-山茱萸分煎含药血清、生地黄-山茱萸合煎含药血清、氨基胍 IC₅₀ 分别为 37.9% ,49.1% ,52.8% ,31.6% ,21.1%。由此可见,对果糖胺的抑制作用由强及弱依次为氨基胍 > 生地黄-山茱萸合煎含药血清 > 山茱萸含药血清 > 生地黄含药血清 > 生地黄-山茱萸分煎含药血清。见表 2。

3.3 生地黄、山茱萸水提液对晚期糖基化产物 (AGEs) 的影响 生地黄水提液、山茱萸水提液、生地黄-山茱萸分煎液和合煎液对 AGEs 都具有一定抑制作用,且呈明显的量效关系,山茱萸 IC₅₀ 为 0.175 g·L⁻¹,生地黄 IC₅₀ 为 0.221 g·L⁻¹,分煎 IC₅₀

为 0.143 g·L⁻¹,合煎 IC₅₀ 为 0.076 g·L⁻¹,氨基胍 IC₅₀ 为 0.007 g·L⁻¹,因此对晚期糖基化产物 (AGEs) 的抑制作用由强及弱依次为氨基胍 > 生地黄-山茱萸合煎 > 生地黄-山茱萸分煎 > 山茱萸水提液 > 生地黄水提液。见表 3。

3.4 生地黄-山茱萸含药血清对晚期糖基化产物 (AGEs) 的影响 生地黄水提液、山茱萸水提液、生地黄-山茱萸分煎液和合煎液含药血清对 AGEs 都具有一定抑制作用,且呈明显的量效关系。山茱萸含药血清、生地黄含药血清、生地黄-山茱萸分煎含药血清、生地黄-山茱萸合煎含药血清、氨基胍 IC₅₀ 分别为 78.5% ,92.3% ,82.9% ,73.2% ,55.3%。由此可见,对 AGEs 的抑制作用由强及弱依次为氨基胍 > 生地黄-山茱萸合煎含药血清 > 山茱萸含药血清 > 生地黄-山茱萸分煎含药血清 > 生地黄含药血清。见表 4。

表 1 生地黄,山茱萸水提液对果糖胺的抑制率 (n=3)

组别	不同质量浓度水提液对果糖胺的抑制率/%							IC ₅₀ /g·L ⁻¹
	1 g·L ⁻¹	0.5 g·L ⁻¹	0.1 g·L ⁻¹	0.05 g·L ⁻¹	0.01 g·L ⁻¹	0.005 g·L ⁻¹	0.001 g·L ⁻¹	
山茱萸	71	63.1	51.1	46	29.5	16.5	5.7	0.104
生地黄	68.2	56.8	44.9	43.2	30.1	11.9	5.7	0.159
生地黄,山茱萸分煎	69.9	59.7	47.2	39.2	27.8	13.6	4.5	0.146
生地黄,山茱萸合煎	76.7	62.5	52.3	48.9	34.7	18.8	11.4	0.077
氨基胍	82.4	73.9	56.8	44.3	40.3	30.7	13.1	0.044

表 2 生地黄,山茱萸水提液含药血清对果糖胺的抑制率 (n=3)

组别	不同稀释比例含药血清对果糖胺的抑制率/%							IC ₅₀ /%
	100%	80%	60%	50%	40%	20%	10%	
山茱萸	93.7	83.1	76.1	54.2	47.2	44.4	23.2	37.9
生地黄	85.9	80.3	66.9	52.8	33.8	28.9	14.7	49.1
生地黄,山茱萸分煎	86.6	69.7	66.9	44.4	36.6	27.5	10.6	52.8
生地黄,山茱萸合煎	107	88.7	84.5	60.6	50	47.2	28.9	31.6
氨基胍	113.4	102.8	90.1	86.6	64.1	47.9	34.5	21.1

表 3 生地黄,山茱萸水提液对晚期糖基化产物 (AGEs) 的抑制率 (n=3)

组别	不同质量浓度水提液对 AGEs 抑制率/%							IC ₅₀ /g·L ⁻¹
	1 g·L ⁻¹	0.5 g·L ⁻¹	0.1 g·L ⁻¹	0.05 g·L ⁻¹	0.01 g·L ⁻¹	0.005 g·L ⁻¹	0.001 g·L ⁻¹	
山茱萸	74.4	57.2	42.7	34.1	17.9	14.5	3.4	0.175
生地黄	69.2	53.8	43.6	29.1	23.1	17.1	-5.1	0.221
生地黄,山茱萸分煎	74.4	63.2	42.7	34.2	25.6	14.5	0	0.143
生地黄,山茱萸合煎	91.5	71.8	48.7	37.6	23.1	17.1	0	0.076
氨基胍	106	91.5	77.8	68.4	54.7	46.2	31.6	0.007

表 4 生地黄,山茱萸水提液含药血清对 AGEs 的抑制率(n = 4)

组别	不同稀释比例含药血清对 AGEs 的抑制率/%							IC ₅₀ /%
	100%	80%	60%	50%	40%	20%	10%	
山茱萸	60.6	52.8	42.5	31.5	26	13.4	11	78.5
生地黄	52.8	44.9	29.1	29.1	13.4	5.5	0	92.3
生地黄,山茱萸分煎	60.6	47.2	40.2	32.3	13.4	11	5.5	82.9
生地黄,山茱萸合煎	68.5	50.4	44.9	37	24.4	21.3	13.4	73.2
氨基胍	84.3	68.5	58.3	41.7	29.1	26.8	21.3	55.3

4 讨论

AGEs 的生成是正常体内存在的一种自然化学反应,即氨基酸和还原糖生成稳定的 Amadori 产物,这一反应由 Maillard 在 1912 年首次发现^[5],称为 Maillard 反应。Maillard 反应发生在体外或体内蛋白质等物质的氨基与糖的醛基上,不需酶的催化,但是一个极为复杂的过程。首先蛋白质分子和糖类发生缩合反应,生成不稳定的薛夫碱(Shiff bases),而后薛夫碱可发生分子内的重排而生成较为稳定的阿马多里(Amadori)重排产物。上述两步反应均为可逆性反应,生成的产物称为早期糖基化产物。此后该产物缓慢地经过一系列脱水、氧化及化学重排,产生高度活性的羰基化合物,如 3-脱氧葡萄糖酮醛(3-deoxyglucosone, 3-DG),进而与蛋白质的自由氨基起反应,凝聚形成不可逆的终末产物,称之为晚期糖基化终产物(AGEs)^[6]。

本实验主要考察生地黄-山茱萸水提液及其含药血清对体外糖基化产物生成的影响,采用的对照药氨基胍,是目前研究得最多的非酶糖化抑制剂^[7]。实验结果发现,氨基胍作为 AGEs 抑制剂,作用效果十分明显;山茱萸能抑制体外 AGEs 的生成,与文献报道一致^[8-9];而生地黄-山茱萸配伍相比较于单味药,无论在抑制果糖胺还是抑制 AGEs 作用都更加显著,说明两药配伍具有一定的协同作用。另外,生地黄、山茱萸水提液分煎,然后单纯地按照 2:1 混合的水提液,对果糖胺和 AGEs 也具有一定的抑制作用,但效果不如合煎组,说明生地黄、山茱萸合煎,其某些化学成分可能发生了改变,产生了新的有效物质,亦或是提高了某些有效物质的比例,究竟是哪些物质起的作用,需要进一步的考证。

中药成分复杂,既有有效成分也有许多其他成分和杂质,这些非有效成分往往会干扰体外实验结果。利用含药血清代替中药粗提物作为药物载体,可以有效地避免直接用中药粗提物带来的诸多问题。中药血清药理学的出现在很大程度上克服了中

药复方及粗提物在体外研究时的不便,具有可控性好,重复性高,可以减少各种干扰因素的影响,使得中药复方药理作用机制的深入研究成为可能^[10]。另外,含药血清不仅能反应药物中可吸收部分的直接作用,而且能反应药物成分在机体作用下形成的代谢产物和药物诱生的机体内源性物质的间接效果^[11]。这些优点都将提高研究结果的可靠性和可信度。诚然,中药血清药理学还存在诸多问题,但是随着这些问题的解决、方法更进一步的成熟和完善,利用它直接的、快速的、敏感的、准确的作用等特点,将会广泛用于复方药物的评价;同时随着化学分析手段的不断完善,复方中有效成分的逐步确认,其药理作用机制也将一一被揭晓^[12]。

本实验主要通过 AGEs 体外生成模型,来探讨生地黄、山茱萸及其配伍对体外模型中中间产物果糖胺和 AGEs 的抑制作用,实验结果显示含药血清基本与直接加水提液一致,符合中医药理论,同时说明生地黄-山茱萸 2:1 配伍确实具有协同作用,与临床以生地黄作为君药,山茱萸为臣药的用药方式基本一致。为生地黄、山茱萸体外抑制 AGEs 的物质基础研究提供参考。

[参考文献]

[1] Valmadrid C T, Klein R, Moss S E, et al. The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus [J]. Arch Intern Med, 2000, 160(8): 1093.

[2] 张蕙芬. 实用糖尿病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 305.

[3] 杨敏. 中药药对治疗糖尿病肾病临证撷菁[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(4): 462.

[4] 农伟虎, 许惠琴. 糖基化终末产物与糖尿病肾病的产生机制[J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(2): 195.

[5] 许曼音, 陈钰, 沈志祥. 糖尿病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 214.

黄芩汤预防伊立替康所致迟发性腹泻的研究

吴琼^{1,2}, 叶华², 朱宇珍², 郭蒙^{1,2}, 郑学宝^{2*}

(1. 广东医学院药理教研室, 广东 湛江 524023;

2. 广东医学院广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023)

[摘要] 目的:探讨中药复方黄芩汤对伊立替康(CPT-11)所致小鼠迟发型腹泻的预防作用。方法:健康雄性 ICR 小鼠 40 只随机分为 5 组,腹泻组 ip 伊立替康连续 5 d 制备迟发性腹泻模型,正常组等量生理盐水代替,黄芩汤低(5 g·kg⁻¹)、中(10 g·kg⁻¹)、高(20 g·kg⁻¹)剂量组 ip 伊立替康前 1 d 分别按剂量 ig 给药,连续用药 8 d,观察迟发性腹泻发生情况及体重变化;实验第 9 天将小鼠处死,取血、结肠、盲肠、空肠、回肠组织。光镜下根据 Chiu 肠黏膜损伤评分方法对肠组织进行分级;Griess 法检测肠组织匀浆液一氧化氮(NO)含量;免疫组化法测定增殖细胞核抗原(PCNA)表达水平;瑞士-吉姆萨染色法测定中性粒细胞数。结果:小鼠腹腔注射 CPT-11 后,出现明显的迟发性腹泻。黄芩汤中、高剂量组小鼠腹泻发生率较腹泻组显著降低($P < 0.05$);体重下降率较腹泻模型组降低;肠黏膜损伤程度比腹泻模型组显著降低,盲肠及结肠的中、高剂量组损伤较腹泻组显著且降低($P < 0.05$),与剂量呈一定的量效关系;结肠的 NO 表达含量明显增加且 PCNA 表达减少($P < 0.05$);还可增加血中性粒细胞数量($P < 0.01$)。结论:黄芩汤通过改善肠黏膜损伤程度、增加肠组织 NO 含量和减少 PCNA 表达,从而对 CPT-11 所致迟发性腹泻具有预防作用,还可缓解中性粒细胞减少症。

[关键词] 伊立替康;迟发性腹泻;黄芩汤;预防

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0163-06

[doi] 10.11653/syfy2013120163

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130412.0938.004.html>

[网络出版时间] 2013-04-12 9:38

Experimental Study on Preventive Effect of Huangqin Tang on Irinotecan Induced Delayed Diarrhea

WU Qiong^{1,2}, YE Hua², ZHU Yu-zhen², GUO Meng^{1,2}, ZHENG Xue-bao^{2*}

(1. Department of Medicine, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;

[收稿日期] 20121205(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772701);广东省科技计划项目(2011B03170065);广东省建设中医药强省项目(20112144);湛江市科技攻关项目(2009C3104003)

[第一作者] 吴琼, 硕士, 从事抗肿瘤和抗炎免疫药理学研究, Tel:0759-2388405, E-mail: wqzs2006@163.com

[通讯作者] * 郑学宝, 博士, 教授, 从事中药及中药复方药理学研究工作, Tel:0759-2388405, E-mail: xuebaozheng@sina.com

[6] Vlassara H, Bucala R, Strikerl. Pathogenic effects of advanced glycosylation: Biochemical, biologic and clinical implications for diabetes and aging [J]. Lab Invest, 1994, 70(2):138.

[7] 梁煜, 胡勇. 不同治法对糖尿病大鼠肾组织非酶糖基化及肾脏保护作用的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9):191.

[8] 许惠琴, 朱荃, 李祥, 等. 7 味中药对体外非酶糖化终产物生成的抑制作用 [J]. 中草药, 2002, 33(2):145.

[9] 刘洪, 许惠琴, 胡永杰. 山茱萸环烯醚萜总苷对糖尿

病血管并发症大鼠血清糖基化终产物-肽(AGE-P)水平的影响 [J]. 世界科学技术——中医药现代化基础研究, 2003, 5(6):51.

[10] 黄臣虎, 陆茵, 高尧军, 等. 中药血清药理学研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):266.

[11] 米永杰, 李健. 中药血清药理学研究概述 [J]. 四川解剖学杂志, 2006, 14(4):34.

[12] 杨仙凌. 中药血清药理学研究方法应用现状及展望 [J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(5):662.

[责任编辑 聂淑琴]