

## 不同治法对糖尿病大鼠肾组织非酶糖化及肾脏保护作用的影响

梁煜\*, 胡勇

(遵义医学院附属医院, 贵州 遵义 563000)

**[摘要]** 目的:观察活血化瘀药、益气养阴药、化痰利湿药对糖尿病大鼠晚期糖基化终产物(AGEs)的影响。方法:采用链脲佐菌素(STZ)糖尿病大鼠模型,随机分为正常组、模型组、活血化瘀组、益气养阴组、化痰利湿组、综合组及氨基胍组,ig 给药 6 周,观察各治疗组对糖尿病大鼠肾组织 AGEs 及肾脏保护作用的影响。结果:与正常对照组比较,糖尿病大鼠空腹血糖、肾系数、尿素氮、肌酐及肾皮质 AGEs 明显上升( $P < 0.01$ ),各中药治疗组可不同程度抑制糖尿病大鼠肾皮质 AGEs 沉积( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),并对肾脏有保护作用。结论:活血化瘀药、益气养阴药、化痰利湿药可通过抑制糖尿病大鼠肾皮质 AGEs 沉积及对肾脏的保护作用,延缓糖尿病慢性并发症的进一步发展。

**[关键词]** 活血化瘀药;益气养阴药;化痰利湿药;糖尿病并发症;晚期糖基化终产物

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0191-04

## Effect of Different Treatment on Advanced Glycation End Products in Kidney and Renoprotection in Diabetic Rats

LIANG Yu\*, HU Yong

(Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of herbs of activating blood circulation, herbs of replenishing Qi and Yin and herbs of removing dampness on advanced glycation end products(AGEs) in kidney and renoprotection for diabetic rats. **Method:** The model rats suffering from diabetes were induced by streptozocina (STZ). The diabetic rats were treated by herbs of activating blood circulation, herbs of replenishing Qi and Yin and herbs of removing dampness for six weeks respectively. The AGEs in kidney of diabetic rat were investigated. **Result:** Compared with the normal group, fasting blood glucose, kidney weight/body weight, blood ureanitrogen, serum creatinine and AGEs in cortex of kidney in diabetic rats were increased greatly. After treated by Chinese herbs, AGEs were decreased and the kidneys were protected. **Conclusion:** Herbs of activating blood circulation, herbs of replenishing Qi and Yin and herbs of removing dampness may delay the development of diabetes complications through inhibiting AGEs in kidney of diabetic rat.

**[Key words]** herbs of activating blood circulation; herbs of replenishing Qi and Yin; herbs of removing dampness; diabetes; advanced glycation end products

糖尿病长期高血糖可引起体内蛋白糖化,大量蛋白非酶糖化产物转化为不可逆的糖化终产物(advanced glycation end products, AGEs)。研究表明,AGEs 的蓄积与糖尿病各种并发症的发生有密切

关系<sup>[1]</sup>。因此,抑制 AGEs 的生成对预防糖尿病慢性并发症的发生、发展有重要意义。我们观察了活血化瘀药、益气养阴药、化痰利湿药对糖尿病大鼠肾组织 AGEs 水平的影响及对肾脏的保护作用。

### 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 SD 大鼠 70 只,雄性,体重 180 ~ 220 g (购自日本 Charles River 公司,合格证号 CRL2006-013)。

**[收稿日期]** 20101104(001)

**[通讯作者]** \*梁煜, Tel: 13518524018, E-mail: liang721126@hotmail.com

**1.2 仪器和试剂** RF-5000 荧光分光光度计(日本岛津),1240 紫外分光光度计(日本岛津),日本京都血糖仪,氨基胍(批号 A56108),HEPES(批号 H3375),V 型胶原酶(批号 C9263)及 STZ(批号 S0130)均为 Sigma 公司产品,尿素氮(BUN,批号 DG920)及肌酐试剂盒(Scr,批号 PKS097)为日本和光纯药株式会社产品。

**1.3 药物制备及剂量** 活血化瘀组中药由丹参、川芎、益母草、赤芍组成,益气养阴组中药由太子参、黄芪、山药、生地黄组成,化痰利湿组中药由苍术、厚朴、泽泻、茯苓组成,以上药物均购自日本津村株式会社。经日本富山医科药科大学和汉药研究所柴原直利教授鉴定,丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的根及根茎,川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎,益母草为唇形科植物益母草 *Leonurus hetephyllns* Sweet 的全草,赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall 的根,太子参为石竹科植物孩儿参 *Pseudostearia heterophylla* (Miq.) Pax ex Paxet Hoffm. 的根,黄芪为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的根,山药为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thumb. 的根茎,生地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的块根,苍术为菊科植物北苍术 *A. chinensis* (DC.) Koidz 的根茎,厚朴为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. Et Wils. 的根皮及枝皮,泽泻为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 的块茎,茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的菌核。

以上各组 4 味药用药比例均等,实验动物按临床用量 10 倍给药,各组分别制备成中药水煎液(水煎 2 次,药液混合浓缩至  $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),各组给药剂量为  $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ;综合组中药包含以上各组药物,各用药比例均等,制备成中药水煎液( $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),给药剂量为  $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,氨基胍制备成蒸馏水溶液( $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 随机分出正常组 10 只,其余动物用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  枸橼酸钠缓冲液(pH 4.5)将链脲佐菌素(STZ)配成 0.45% 的溶液,按  $65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  体重一次性 ip 建立糖尿病模型(标准:注射 STZ 48 h 后,取大鼠尾静脉血查空腹血糖  $\geq 11.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。将造模成功的大鼠随机分为糖尿病模型组、氨基胍组、活血化瘀组、益气养阴组、化痰利湿组、综合组,并于次日开始 ig 给药,正常组和模型对照组 ig 蒸馏水,连续给药 6 周。

### 2.2 观察指标及方法

**2.2.1 于治疗用药第 6 周后测定体重及空腹血糖** 以戊巴比妥钠  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip 麻醉大鼠,腹主动脉取血约 3 mL,速取肾脏,分离肾皮质,称质量,制备肾组织匀浆待测 AGEs。

**2.2.2 肾皮质 AGEs 测定** 采用 Monnier<sup>[2]</sup> 等方法,将肾皮质剪碎,匀浆,离心去上清,沉淀中加氯仿-甲醇去脂,4℃ 摇振过夜,经水化冲洗,在 HEPES 缓冲液中过夜,加入 280 UV 型胶原酶,37℃ 震荡消化 24 h。离心取上清液,于波长 370/420 nm 处测定荧光强度,以含 280 UV 型胶原酶的 HEPES 缓冲液作为空白标准管,用  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的牛血清白蛋白绘制蛋白标准曲线,肾皮质中 AGEs 含量以  $\text{AUF} \cdot \text{mg}^{-1}$  表示。

**2.3 统计学分析** 各组数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,SPSS 10.0 统计软件进行数据分析,单因素方差分析, $P < 0.05$  有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 各组动物空腹血糖(FBG),肾系数,BUN,Scr** 表 1 显示,糖尿病模型组 FBG,肾系数,BUN,Scr 显著升高,与正常组相比有统计学差异( $P < 0.01$ )。肾系数:与模型组比较,活血化瘀组、综合组有统计学差异( $P < 0.01, P < 0.05$ ),余治疗组无差异。BUN 与模型组比较,综合组及活血组有统计学差异( $P < 0.01$ ),余治疗组无显著差异。Scr 与模型组

表 1 不同治法方药对大鼠空腹血糖、肾系数、尿素氮、肌酐的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	FBG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	肾系数 $\times 10^3$	BUN/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Scr/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	$6.06 \pm 1.51$	$6.65 \pm 0.37$	$6.09 \pm 0.15$	$23.47 \pm 2.67$
模型	-	$32.87 \pm 9.78^{4)}$	$12.49 \pm 1.65^{4)}$	$10.18 \pm 0.96^{4)}$	$36.49 \pm 5.10^{4)}$
氨基胍	0.05	$22.40 \pm 10.40^{4)}$	$12.47 \pm 2.25^{4)}$	$8.97 \pm 1.17^{4)}$	$33.89 \pm 4.60^{4)}$
活血化瘀	10	$21.44 \pm 9.04^{4)}$	$9.97 \pm 1.66^{4,2)}$	$7.67 \pm 1.07^{2)}$	$30.11 \pm 5.25$
益气养阴	10	$31.32 \pm 5.53^{4)}$	$12.68 \pm 1.35^{4)}$	$7.90 \pm 0.95^{3)}$	$32.16 \pm 3.08^{4)}$
化痰利湿	10	$28.54 \pm 9.53^{4)}$	$13.16 \pm 2.45^{4)}$	$7.92 \pm 1.08^{3)}$	$32.44 \pm 3.21^{4)}$
综合	30	$22.13 \pm 8.48^{4)}$	$10.45 \pm 2.18^{1,4)}$	$7.13 \pm 0.74^{2)}$	$29.80 \pm 4.07^{1)}$

注:与模型组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与正常组相比<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 同)。

比较,除综合组有统计学差异( $P < 0.01$ ),余治疗组无显著差异。

**3.2 各组动物肾组织 AGEs** 表 2 显示,糖尿病模型组 AGEs 显著升高,与正常组相比有统计学差异( $P < 0.01$ )。与模型组比较,氨基胍组、活血化瘀组及综合组有统计学差异( $P < 0.05$ ),益气养阴组和化痰利湿组无显著差异。

表 2 各组动物肾组织 AGEs 比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	AGEs/ $\text{AUF} \cdot \text{mg}^{-1}$
正常	-	$3.68 \pm 0.54$
模型	-	$5.93 \pm 0.27^{1)}$
氨基胍	0.05	$4.73 \pm 1.11^{3)}$
活血化瘀	10	$4.85 \pm 0.96^{3)}$
益气养阴	10	$5.04 \pm 0.68^{2)}$
化痰利湿	10	$4.99 \pm 0.89^{2)}$
综合	30	$4.75 \pm 0.18^{3)}$

#### 4 讨论

在糖尿病状态下,体内葡萄糖及果糖与多种蛋白质等物质发生非酶促糖基化反应生成不稳定的 schiff 碱,并进一步形成比较稳定的,但仍然可逆的 Amadori 类早期产物,这些早期糖化产物再经过缓慢、复杂的重排,最后形成不可逆的 AGEs<sup>[3]</sup>。研究表明,AGEs 不仅可以直接影响细胞和组织功能,参与疾病的产生,也可以通过与特异受体结合,发生反应来改变蛋白质和细胞功能,导致机体的病理变化<sup>[4]</sup>。糖尿病的各种慢性并发症被认为与晚期糖基化产物有密切关系<sup>[5]</sup>,AGEs 浓度的升高与糖尿病及其并发症也密切相关<sup>[6-7]</sup>。本实验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,但因其毒副作用,限制了在临床上的使用。

糖尿病及其慢性并发症的临床表现复杂多变,其发病多因饮食不节,嗜食肥甘,或情志郁结,以致脾胃积热化火,耗气伤阴,致气阴不足。滋腻厚味还可碍脾,脾不运湿,津凝为痰。又可因情志郁结,致气行不畅,不能布津,津停为痰,可见痰浊亦是糖尿病发展过程中的重要病理产物。从糖尿病的生理病理变化来看,除了糖代谢紊乱导致的高血糖外,还可见高胆固醇血症、高脂血症、高脂蛋白血症等脂肪代谢紊乱和蛋白质代谢紊乱<sup>[8-9]</sup>,类似这些指标在中医理论中可归属“痰浊”的范畴,而脂代谢紊乱和蛋白质代谢紊乱与糖尿病各种慢性并发症的发生有密切

关系。糖尿病病程日久,符合中医“久病必瘀”、“久病入络”的观点。通过对糖尿病患者血液流变学的分析,也发现存在不同程度的血液流变学改变,如血黏度增加,血流减慢,血流瘀滞,抗凝机制异常,自由基产物增加等<sup>[10-11]</sup>。故糖尿病及其慢性并发症的病机临床多表现为气阴两虚、痰湿内蕴及瘀血阻滞等<sup>[12]</sup>。

本研究选择益气养阴药、活血化瘀药和化痰利湿药,所选用药物也是临床治疗糖尿病同类药物中使用频率最高的<sup>[13]</sup>,观察其对糖尿病大鼠肾组织 AGEs 水平的影响,以了解中药防治糖尿病及其慢性并发症的可能途径。

实验结果表明,第 6 周后,糖尿病大鼠肾组织 AGEs、BUN 及 Scr 显著升高,运用中药和氨基胍治疗后,AGEs、BUN 及 Scr 水平均降低。各中药治疗组中,尤以活血化瘀组、综合组降低 AGEs 水平较为明显,化痰利湿组次之,其中综合组作用最强并且还表现在对糖尿病大鼠 BUN 和 SCr 的改善上。除 AGEs 改变外,糖尿病大鼠在第 6 周末还可见明显肾脏肥大,肾质量/体重明显增加,各治疗组中除活血组和综合组对糖尿病大鼠肾质量/体重比值较模型组有不同程度改善外,余治疗组均无明显作用。在治疗过程中,各治疗组对糖尿病大鼠血糖有不同程度下降,但均不显著。可以认为中药对糖尿病及其慢性并发症的治疗并非通过控制血糖,抑制蛋白非酶糖化可能是其延缓糖尿病及并发症发生发展的途径之一。

#### [参考文献]

- [1] Monnier V M, Sell D R, Nagaraj R H, et al. Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia [J]. *Diabetes*, 1992, 41(suppl 2):36.
- [2] Monnier V M, Vishwanath V, Frank K E, et al. Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence [J]. *N Engl J Med*, 1986,314(7): 403.
- [3] Vlassara H, Bucala R, Strikerl. Pathogenic effects of advanced glycosylation: Biochemical, biologic and clinical implications for diabetes and aging [J]. *Lab Invest*, 1994,70:138.
- [4] Niwa T. Dialysis-related amyloidosis: pathogenesis focusing on AGE modification [J]. *Semin Dial*, 2001, 14(2): 114.

## 理肺化纤方对肺纤维化大鼠的防治作用 和对肺功能及血清、组织羟脯氨酸含量的影响

杨成林, 周语平\*

(甘肃中医学院, 兰州 730000)

**[摘要]** 目的:以经方升降散为基础,加味组成理肺化纤方,研究理肺化纤方对肺纤维化的防治作用以及对肺纤维化大鼠肺功能及血清和组织羟脯氨酸含量的影响。方法:Wistar 大鼠 100 只,体重(200±20)g,雌雄各半,随机分为 5 组,每组 20 只。模型组与各治疗组实验大鼠气管内注入博莱霉素 A5 复制肺纤维化模型,正常对照组和模型组给等容积生理盐水 ig、理肺化纤方治疗组给药剂量为 4.41 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>、强的松对照组给药剂量为 1.05 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>、强的松合理肺化纤方治疗组给等量的强的松和理肺化纤方水煎液 ig,实验分两批,分别于 7,28 d 末次给药后,采用 Anires2005 动物肺功能分析系统测试肺功能和样本碱水解法检测实验大鼠的血清和组织羟脯氨酸(Hyp)的含量。结果:肺组织病理学方法观察苏木精-伊红及 Masson 染色切片,观察显示造模成功,检测实验大鼠的肺功能用力肺活量(FVC)、最大呼出量(PEF)和第 0.25 s 用力呼出容积占用力肺活量百分比(FEV 0.25/FVC%)、最大通气量(MVV)等指标表明各治疗组与模型组对比肺功能和血清及组织 Hyp 含量均有显著改善,以中西药结合组效果更为明显。结论:理肺化纤方能明显改善肺纤维化大鼠的肺功能和降低血清及组织 Hyp 含量,尤其在加用激素强的松治疗时能明显减轻肺纤维化大鼠的肺纤维化程度。

**[关键词]** 理肺化纤方;肺纤维化;肺功能;羟脯氨酸

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0194-05

## Prevention and Treatment of Pulmonary Fibrosis by Lifei Huaxian Prescription and its Influence on Lung Function and Content of Hydroxyproline

YANG Cheng-lin, ZHOU Yu-ping\*

(Gansu College of Traditional Chinese medicine, Lanzhou 730000, China)

**[收稿日期]** 20101209(003)

**[基金项目]** 甘肃省卫生厅中医药科研项目(甘科鉴字[2009]043号)

**[第一作者]** 杨成林, Tel:15117078625, E-mail:503282482@qq.com

**[通讯作者]** \*周语平, Tel:0931-8765600, E-mail:zypjwc@163.com

- [5] Bonnardel-Phu E, Wantier J L, Vicaut E, et al. Advanced glycation end products are involved in microvascular permeability changes observed in microcirculation of diabetic rats *in vivo* [J]. J Mal Vasc, 2000, 25(2):122.
- [6] Amano S, Kaji Y, Oshika T, et al. Advanced glycation end products in human optic nerve head [J]. Br J Ophthalmol, 2001, 85(1):52.
- [7] Fridman E A. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications [J]. Diabetes Care, 1999, 22(suppl 2): B65.
- [8] 刘立群. 2 型糖尿病合并脑血管病与脂代谢紊乱的关系 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2006, 8(14):655.
- [9] 马博清, 魏立明, 霍丽梅, 等. 2 型糖尿病的血脂代谢异常 [J]. 中华临床医药, 2002, 13(3):36.
- [10] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 11 版. 北京:人民卫生出版社, 2004:952.
- [11] 陆筱云, 练向阳, 王敏. 糖尿病患者血液流变学改变与分析 [J]. 重庆医学, 2006, 35(2):162.
- [12] 梁煜, 胡勇. 糖尿病及其并发症辨证论治体会 [J]. 陕西中医, 2008, 29(6):768.
- [13] 梁煜, 胡勇. 中药复方治疗糖尿病及其慢性并发症用药规律探讨 [J]. 江苏中医药, 2008, 40(12):87.

[责任编辑 聂淑琴]