

· 配伍 ·

知母-黄柏药对盐炙前后配伍对2型糖尿病大鼠 糖脂代谢的影响

范顺明, 张春玲, 王佳琪, 李星, 罗婷, 余凌英*

(成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室, 成都 611137)

[摘要] 目的: 考察知母-黄柏药对盐炙前后配伍对2型糖尿病(T2DM)大鼠糖脂代谢的影响。方法: 采用高脂高糖饮食联合小剂量链脲佐菌素(STZ)制备T2DM大鼠模型, 模型大鼠随机分为6组, 分别为模型组, 二甲双胍组(200 mg·kg⁻¹), 生知母-生黄柏组, 盐知母-盐黄柏组, 生知母-盐黄柏组, 盐知母-生黄柏组(6.48 g·kg⁻¹); 另设同周龄喂食普通饲料大鼠为空白组。各组大鼠按剂量连续灌胃给药30 d后, 检测大鼠空腹血糖(FBG), 空腹血清胰岛素(FINS), 糖化血清蛋白(GSP), 肝糖原含量, 血脂[总胆固醇(TC), 甘油三酯(TG), 脂蛋白胆固醇(LDL-C/HDL-C)], 游离脂肪酸(NEFA), 脂肪细胞因子[瘦素、脂联素(ADP)], 肾功能[尿素氮(BUN)和肌酐(CRE)]等指标的变化, 计算胰岛素敏感指数(ISI)与胰岛素抵抗指数(HOMA-IR); 同时, 采用苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠胰腺、肝脏和肾脏组织形态学变化。结果: 与模型组比较, 知母-黄柏盐炙前后各配伍药对均能不同程度的降低T2DM大鼠FBG, GSP, TC, TG, LDL-C, NEFA, 瘦素, BUN, CRE水平及HOMA-IR, 升高FINS, HDL-C, ADP, 肝糖原含量及ISI, 且以盐知母-盐黄柏药对调节T2DM大鼠糖脂代谢的效果最为显著; 各配伍药对均能一定程度的改善糖尿病大鼠胰腺、肝脏和肾脏组织病理学变化, 其中盐知母-盐黄柏药对修复病理损伤的作用最佳。结论: 知母-黄柏药对盐炙前后配伍对T2DM大鼠均有降糖调脂的作用, 其中以盐知母-盐黄柏药对的降糖调脂综合药效最优。

[关键词] 药对; 知母-黄柏; 盐炙; 2型糖尿病; 糖脂代谢; 肾脏功能; 脂肪细胞因子

[中图分类号] R22; R943.1; R28; R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)03-0022-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202048

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200721.1410.008.html>

[网络出版日期] 2020-7-21 16:17

Effect of Compatibility of Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex Couplet Medicines on Glucolipid Metabolism in Type 2 Diabetic Rats Before and After Salt-processing

FAN Shun-ming, ZHANG Chun-ling, WANG Jia-qi, LI Xing, LUO Ting, YU Ling-ying*

(Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of compatibility of Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex couplet medicines on glucolipid metabolism in type 2 diabetic rats before and after salt-processing. **Method:** The type 2 diabetic rat model was induced by high-fat and high-glucose diet combined with low dose streptozotocin (STZ), the model rats were randomly divided into six groups, including the model group, metformin group (200 mg·kg⁻¹), and different compatibility groups of raw and salt-processed of Anemarrhenae Rhizoma and Phellodendri Chinensis Cortex (6.48 g·kg⁻¹). In addition, The same week old rats fed with normal diet were set as the blank group. After 30 d of continuous intragastric administration, changes of fasting blood glucose (FBG), fasting serum insulin (FINS), glycosylated serum protein (GSP), hepatic

[收稿日期] 20200524(004)

[基金项目] 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-SC-41)

[第一作者] 范顺明, 在读硕士, 从事中药炮制学和中药新制剂、新技术研究, Tel: 028-61800196, E-mail: 1771747245@qq.com

[通信作者] *余凌英, 博士, 副教授, 从事中药炮制学和中药新制剂、新技术研究, Tel: 028-61800196, E-mail: yuly26@163.com

glycogen, blood lipid [total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C)], nonesterified fatty acid (NEFA), adipocytokines [adiponectin (ADP) and leptin], kidney function [blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE)] and other indicators of rats from different groups were detected, and the insulin sensitivity index (ISI) and insulin resistance index (HOMA-IR) were calculated, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes of pancreas, liver and kidney of rats from different groups. **Result:** Compared with the model group, compatibility of Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex couplet medicines before and after salt-processing all could decrease the levels of FBG, GSP, TC, TG, LDL-C, NEFA, leptin, BUN, CRE and HOMA-IR, and increase the contents of FINS, HDL-C, ADP, hepatic glycogen and ISI, among which the compatibility of salt-processed Anemarrhenae Rhizoma and salt-processed Phellodendri Chinensis Cortex had the most significant effect on regulating glucolipid metabolism in type 2 diabetic rats. The compatibility of all couplet medicines could improve the histopathological changes of pancreas, liver and kidney in type 2 diabetic rats, among which the compatibility of salt-processed Anemarrhenae Rhizoma and salt-processed Phellodendri Chinensis Cortex had the most prominent effect on repairing pathological damage. **Conclusion:** The compatibility of Anemarrhenae Rhizoma and Phellodendri Chinensis Cortex before and after salt-processing can improve glucolipid metabolism in type 2 diabetic rats, while the comprehensive effect of salt-processed Anemarrhenae Rhizoma and salt-processed Phellodendri Chinensis Cortex on lowering glucose and regulating lipid is the best.

[Key words] couplet medicines; Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex; processed with salt; type 2 diabetes mellitus (T2DM); glucolipid metabolism; kidney function; adipocytokines

2型糖尿病(T2DM)是一种由于胰岛素分泌相对不足或胰岛素抵抗而引起糖类、脂类和蛋白质等物质代谢紊乱的全身性慢性疾病,T2DM的主要表现特征为持续的血糖升高,并伴有血脂异常^[1]。据统计,全球约有4.51亿糖尿病患者,其中约90%为T2DM患者,随着生活方式与饮食结构的改变,近年来T2DM的发病率呈现快速上升的趋势^[2-3]。

中医药防治糖尿病的历史悠久。T2DM属于中医学“消渴病”的范畴,其基本病机为阴虚燥热,以阴虚为本,燥热为标。知母-黄柏药对最早出自金·李杲《兰室秘藏》,两药配伍使用时,每相须而行,相互促进,共奏滋阴清热、泻火解毒之功,是治疗消渴的经典药对^[4]。现代药理学研究也证实了知母-黄柏药对可以有效改善T2DM胰岛素抵抗,调节糖脂代谢^[5]。同时,有研究表明知母经盐炙后能增强滋阴清热^[6]、降血糖^[7]的作用,黄柏经盐炙后滋阴清热的作用也有所增强^[8]。但既往对知母、黄柏盐炙品的研究仅限于单味药,而关于知母、黄柏盐炙后配伍药对的降糖药效研究则尚未见相关报道。因此,本实验拟考察药对知母-黄柏盐炙前后配伍对T2DM大鼠在降糖及调节脂质紊乱方面的影响,以期为中医治疗糖尿病配伍使用知母-黄柏药对时能合理选择炮制品提供参考依据。

1 材料

ACCU-CHEK performa型血糖仪及其配套的血糖试纸[罗氏诊断(上海)有限公司],BSA224S型1/1万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],TGL-16G型高速低温离心机(上海安亭科学仪器厂),3011型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),CHA-S型恒温振荡器(常州国华电器有限公司),5型多功能炒货机(常州迈斯机械有限公司)。

盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号ABF2551),链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,批号WXBC8740V),大鼠血清胰岛素酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒[依科赛生物科技(太仓)有限公司,批号21I269];总胆固醇(TC),糖化血清蛋白(GSP),甘油三酯(TG),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),肝糖原,肌酐(CRE),尿素氮(BUN),游离脂肪酸(NEFA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号依次为20191111, 20191112, 20191111, 20191112, 20191108, 20191112, 20191118, 20191118, 20191108);大鼠脂联素(ADP)和瘦素ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号分别为TYARXDJUIR, 8N9XY4V61G),非加碘盐(中盐天津市长芦盐业有限公司,批号20190419),柠檬

酸钠缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号20190410);黄柏饮片(四川省中药饮片有限责任公司,批号171124,产地四川),知母饮片(四川新荷花中药饮片股份有限公司,批号1811009,产地河北),经成都中医药大学胡昌江教授鉴定,分别为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* 的干燥树皮,百合科植物 *Anemarrhena asphodeloides* 的干燥根茎。

SPF级雄性SD大鼠,体质量180~200 g,由成都达硕实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(川)2015-030,实验大鼠均饲养于温度20~25℃,相对湿度40%~60%的动物房内,自由摄食和饮水,昼夜节律正常。本文所涉及的动物实验经成都中医药大学动物实验伦理委员会批准,批准号TCM-2016-312。

2 方法

2.1 知母、黄柏盐炙品的制备 依照2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)及本课题前期的实验考察研究,制备知母、黄柏的盐炙品。

2.1.1 盐知母 取生知母100 g,加盐水(含盐2 g)60 mL拌匀,闷润约60 min,至药透水尽,置炒货机内,150℃条件下炒制20 min,取出,放凉。成品色黄、微带焦斑,味微咸。

2.1.2 盐黄柏 取生黄柏100 g,加盐水(含盐3 g)30 mL拌匀,闷润约60 min,至药透水尽,置炒货机内,160℃条件下炒制15 min,取出,放凉。成品色深黄、偶有焦斑,味苦、微咸。

2.2 盐炙前后配伍药对的水煎液制备 药对的量按2020年版《中国药典》知母与黄柏饮片项下的人体推荐用量(知母12 g和黄柏12 g)进行配比,即取生知母+生黄柏、盐知母+生黄柏、生知母+盐黄柏、盐知母+盐黄柏适量,置于圆底烧瓶中,加10倍量水浸泡30 min,于冷凝回流装置中煎煮1 h,过滤,药渣加8倍量水继续煎煮1 h,过滤,合并滤液,减压浓缩制成质量浓度为0.648 g·mL⁻¹的药液,4℃冰箱保存,用于动物灌胃给药。

2.3 2型糖尿病大鼠模型的制备^[9] 将100只大鼠适应性喂养3 d,从中随机选取10只作为空白组,给予基础饲料正常喂养。其余90只大鼠均以高脂高糖饲料(10%猪油,20%蔗糖,2%胆固醇,1%胆酸钠,67%基础饲料)进行饮食诱导。喂养4周后,禁食不禁水12 h,空白组大鼠按10 mL·kg⁻¹注射柠檬酸钠缓冲液,其余大鼠按剂量45 mg·kg⁻¹腹腔注射STZ柠檬酸钠溶液(STZ质量浓度为10 g·L⁻¹)。药物诱导72 h后,尾尖采血测空腹血糖(FBG),并以

FBG>16.7 mmol·L⁻¹视为造模成功的标准^[10]。

2.4 动物分组及给药 造模成功的大鼠随机分为模型组,盐酸二甲双胍片组(简称二甲双胍组),生知母-生黄柏组,盐知母-盐黄柏组,生知母-盐黄柏组,盐知母-生黄柏组,每组12只(其中2只备用)。根据动物与人体表面积折算的等效剂量比率^[11],以大鼠6.3倍于成人剂量(按70 kg成人每天1剂计算)换算得到等效剂量,该剂量3倍即为知母-黄柏药对的受试剂量(6.48 g·kg⁻¹)。各配伍药对组予以上述剂量灌胃,二甲双胍组按200 mg·kg⁻¹给予盐酸二甲双胍片水溶液灌胃,模型组和空白组灌胃给予生理盐水,给药体积均为10 mL·kg⁻¹,每天1次,连续给药30 d。给药期间,各组大鼠给予基础饲料喂养,自由饮水。

2.5 样本采集 给药30 d后,所有大鼠禁食不禁水12 h,用10%水合氯醛按3 mL·kg⁻¹进行腹腔麻醉,股动脉采血,室温静置20 min,于4℃,3 500 r·min⁻¹离心15 min(离心半径6.2 cm),分离血清,分装在离心管中,-80℃冻存,用于检测各项指标;采血后立即解剖大鼠,取肝脏、肾脏和胰腺组织,用生理盐水冲洗表面的血渍,滤纸吸干后,取一部分肝脏组织于锡箔纸中-80℃冻存待测,其余肝脏用甲醛-乙酸-乙醇固定液(FAA)固定,胰腺和肾脏组织用4%多聚甲醛固定后进行病理切片检测。

2.6 血糖相关指标检测

2.6.1 FBG检测 于给药的第0,30天,各组动物禁食不禁水12 h,尾尖采血,检测大鼠的FBG。

2.6.2 空腹血清胰岛素(FINS),GSP和肝糖原含量检测 取2.5项下冻存的血清与肝脏组织,严格按照试剂盒说明采用ELISA测定FINS水平,生化法测定血清GSP及肝糖原含量。按相应公式计算胰岛素敏感指数(ISI)和胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),即 $ISI = \ln [1/(FBG \times FINS)]$; $HOMA-IR = FBG \times FINS / 22.5$ 。

2.7 血脂及NEFA相关指标检测 取2.5项下冻存的血清,严格按照试剂盒说明采用生化法测定血清TC,TG,HDL-C和LDL-C水平,乙酰辅酶A合成酶-乙酰辅酶A氧化酶法测定血清NEFA水平。

2.8 脂肪细胞因子检测 取2.5项下冻存的血清,严格按照试剂盒说明采用ELISA测定血清ADP和瘦素水平。

2.9 肾功能指标检测 取2.5项下冻存的血清,严格按照试剂盒说明采用肌氨酸氧化酶法测定血清

CRE和BUN水平。

2.10 胰腺、肝脏和肾脏病理变化分析 取2.5项下固定的胰腺、肝脏和肾脏组织,经梯度乙醇脱水、石蜡包埋,制成3~5 μm病理切片,苏木素-伊红(HE)染色后在光学显微镜下观察,分析评价各组标本组织形态学改变。

2.11 统计学分析 采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,各组实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验; $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对血糖相关指标的影响 连续给药30 d后,各组大鼠FINS, GSP, 肝糖原及给药前后FBG水平的

变化见表1,2。结果与空白组相比,模型组大鼠FINS,肝糖原含量及ISI显著降低($P<0.01$),而FBG(第30天较第0天FBG稍增加),GSP水平及HOMA-IR则显著升高($P<0.01$)。表明给予高脂高糖饲料合并STZ诱导后的T2DM大鼠血糖维持着较高水平,胰岛素水平下降,且胰岛素敏感性降低,出现明显的胰岛素抵抗特征。与模型组相比,各给药组大鼠肝糖原含量和ISI显著升高($P<0.01$);除生知母-生黄柏组外,其余给药组大鼠FINS水平均不同程度升高,且变化较为明显($P<0.05, P<0.01$);各给药组大鼠FBG, GSP及HOMA-IR水平均显著降低($P<0.01$)。比较知母与黄柏盐炙前后各配伍药对组的降糖药效,以盐知母-盐黄柏组的FBG水平降低幅度最大,作用最佳。

表1 知母-黄柏盐炙前后配伍对T2DM大鼠FBG及FINS水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of compatibility of Anemarrhenae Rhizoma and Phellodendri Chinensis Cortex on FBG and FINS levels in T2DM rats before and after salt-processing($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹			FINS/μg·L ⁻¹	ISI	HOMA-IR
		第0天	第30天	降低幅度			
空白		6.21±0.41	5.37±0.60	0.84	0.302±0.045	-0.454±0.154	0.069±0.011
模型		23.98±2.23 ²⁾	26.86±2.70 ²⁾	-2.88	0.191±0.012 ²⁾	-1.739±0.139 ²⁾	0.255±0.037 ²⁾
盐知母-盐黄柏	6.48	22.63±1.11	15.04±1.90 ⁴⁾	7.59	0.245±0.035 ⁴⁾	-1.344±0.146 ⁴⁾	0.172±0.024 ⁴⁾
生知母-生黄柏	6.48	23.19±1.31	20.61±1.81 ⁴⁾	2.58	0.219±0.025	-1.528±0.124 ⁴⁾	0.200±0.029 ⁴⁾
盐知母-生黄柏	6.48	22.37±1.81	20.34±2.32 ⁴⁾	2.03	0.227±0.033 ³⁾	-1.472±0.186 ⁴⁾	0.196±0.036 ⁴⁾
生知母-盐黄柏	6.48	22.01±1.88	18.66±1.50 ⁴⁾	3.35	0.234±0.036 ³⁾	-1.452±0.142 ⁴⁾	0.187±0.025 ⁴⁾
二甲双胍	0.20	23.38±2.07	16.72±2.15 ⁴⁾	6.66	0.236±0.042 ³⁾	-1.416±0.189 ⁴⁾	0.178±0.028 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2~5同)。

表2 知母-黄柏盐炙前后配伍对T2DM大鼠血清GSP及肝糖原含量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of compatibility of Anemarrhenae Rhizoma and Phellodendri Chinensis Cortex on serum GSP and hepatic glycogen contents in T2DM rats before and after salt-processing($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GSP/mmol·L ⁻¹	肝糖原/mg·g ⁻¹
空白		2.03±0.24	18.94±3.35
模型		3.14±0.32 ²⁾	8.89±1.45 ²⁾
盐知母-盐黄柏	6.48	2.05±0.36 ⁴⁾	12.39±2.42 ⁴⁾
生知母-生黄柏	6.48	2.33±0.20 ⁴⁾	11.64±2.12 ⁴⁾
盐知母-生黄柏	6.48	2.25±0.13 ⁴⁾	11.81±2.25 ⁴⁾
生知母-盐黄柏	6.48	2.20±0.19 ⁴⁾	12.07±1.22 ⁴⁾
二甲双胍	0.20	2.52±0.27 ⁴⁾	12.96±1.45 ⁴⁾

3.2 对血脂及NEFA相关指标的影响 连续给药30 d后,各组大鼠血清TC, TG, LDL-C, HDL-C和NEFA水平检测结果见表3。与空白组相比,模型组

大鼠TC, TG, LDL-C及NEFA水平显著升高($P<0.01$),而HDL-C水平则显著降低($P<0.01$),表明T2DM大鼠机体发生了脂质代谢紊乱。与模型组相比,各给药组大鼠TC, TG, LDL-C及NEFA水平均不同程度降低($P<0.05, P<0.01$),而HDL-C水平则显著升高($P<0.01$)。另外,从各配伍药对调节T2DM大鼠脂代谢的作用趋势来看,盐知母-盐黄柏组的调脂效用稍强一些。

3.3 对T2DM大鼠脂肪细胞因子的影响 连续给药30 d后,各组大鼠血清ADP与瘦素水平的检测情况见表4。结果显示,与空白组相比,模型组大鼠的ADP水平显著降低($P<0.01$),而瘦素的水平则显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,各给药组大鼠的ADP水平不同程度升高($P<0.05, P<0.01$),而瘦素水平则显著降低($P<0.01$)。综合比较各配伍药对组的数据,发现以盐知母-盐黄柏组调节脂肪细胞因子水平的作用更佳。

表3 知母-黄柏盐炙前后配伍对T2DM大鼠血脂及NEFA水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of compatibility of Anemarrhenae Rhizoma and Phellodendri Chinensis Cortex on blood lipid and NEFA levels in T2DM rats before and after salt-processing($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC	TG	LDL-C	HDL-C	NEFA
空白		2.31±0.38	0.55±0.15	0.75±0.17	1.99±0.31	0.36±0.04
模型		3.28±0.50 ²⁾	1.90±0.46 ²⁾	1.56±0.27 ²⁾	1.16±0.27 ²⁾	0.93±0.13 ²⁾
盐知母-盐黄柏	6.48	2.41±0.49 ⁴⁾	0.97±0.28 ⁴⁾	1.02±0.27 ⁴⁾	1.64±0.30 ⁴⁾	0.62±0.10 ⁴⁾
生知母-生黄柏	6.48	2.58±0.54 ⁴⁾	1.04±0.31 ⁴⁾	1.16±0.28 ⁴⁾	1.51±0.18 ⁴⁾	0.70±0.12 ⁴⁾
盐知母-生黄柏	6.48	2.51±0.41 ⁴⁾	1.01±0.26 ⁴⁾	1.15±0.23 ⁴⁾	1.53±0.32 ⁴⁾	0.67±0.18 ⁴⁾
生知母-盐黄柏	6.48	2.44±0.43 ⁴⁾	1.11±0.27 ⁴⁾	1.10±0.16 ⁴⁾	1.59±0.14 ⁴⁾	0.63±0.12 ⁴⁾
二甲双胍	0.20	2.73±0.26 ³⁾	1.25±0.28 ⁴⁾	1.25±0.17 ³⁾	1.54±0.30 ⁴⁾	0.56±0.09 ⁴⁾

表4 知母-黄柏盐炙前后配伍对T2DM大鼠脂肪细胞因子的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of compatibility of Anemarrhenae Rhizoma and Phellodendri Chinensis Cortex on adipocytokines in T2DM rats before and after salt-processing($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ADP/ng·L ⁻¹	瘦素/μg·L ⁻¹
空白		263.75±38.15	3.24±0.45
模型		126.79±22.70 ²⁾	5.75±0.77 ²⁾
盐知母-盐黄柏	6.48	207.01±31.88 ⁴⁾	4.15±0.94 ⁴⁾
生知母-生黄柏	6.48	188.92±31.15 ³⁾	4.36±0.71 ⁴⁾
盐知母-生黄柏	6.48	196.25±37.94 ⁴⁾	4.36±0.90 ⁴⁾
生知母-盐黄柏	6.48	200.36±30.10 ⁴⁾	4.32±0.77 ⁴⁾
二甲双胍	0.20	212.71±33.83 ⁴⁾	4.37±1.05 ⁴⁾

3.4 对肾脏功能指标的影响 连续给药30 d后,各组大鼠血清BUN及CRE水平检测情况见表5。结果与空白组相比,模型组大鼠BUN及CRE水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,各给药组大鼠的BUN及CRE水平均有不同程度的降低($P<0.05, P<0.01$)。从各配伍药对组的综合数据来看,以盐知母-盐黄柏组改善肾功能的作用最优。

表5 知母-黄柏盐炙前后配伍对T2DM大鼠肾功能相关指标的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of compatibility of Anemarrhenae Rhizoma and Phellodendri Chinensis Cortex on kidney function indexes in T2DM rats before and after salt-processing($\bar{x}\pm s, n=10$)

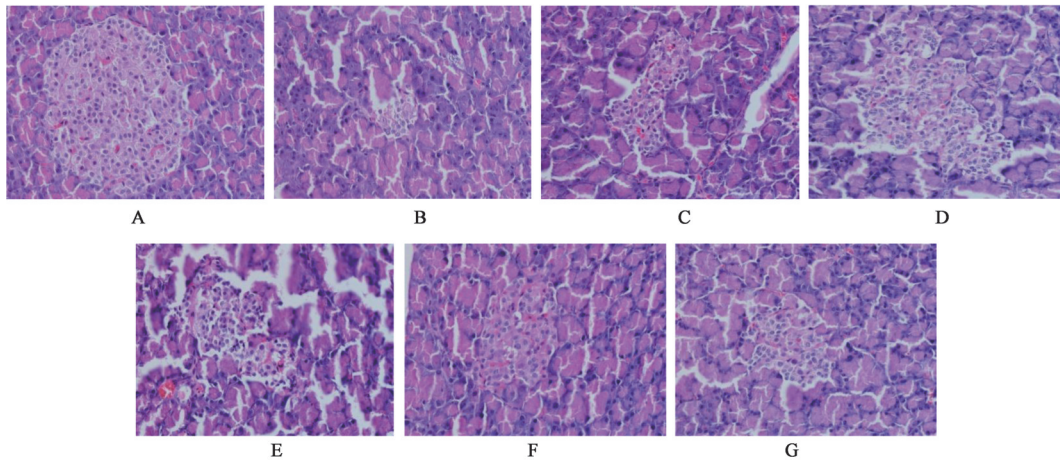
组别	剂量/g·kg ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	CRE/μmol·L ⁻¹
空白		5.84±0.57	24.30±4.84
模型		11.69±1.23 ²⁾	40.16±6.82 ²⁾
盐知母-盐黄柏	6.48	8.45±1.39 ⁴⁾	29.12±6.50 ⁴⁾
生知母-生黄柏	6.48	9.18±1.04 ⁴⁾	31.48±8.10 ³⁾
盐知母-生黄柏	6.48	9.05±1.51 ⁴⁾	30.70±7.72 ⁴⁾
生知母-盐黄柏	6.48	8.83±1.07 ⁴⁾	31.42±4.43 ³⁾
二甲双胍	0.20	7.73±0.83 ⁴⁾	27.35±6.96 ⁴⁾

3.5 对胰腺、肝脏和肾脏组织病理形态的影响

3.5.1 胰腺组织 各组大鼠胰腺组织的HE染色情况见图1。结果发现空白组胰腺腺泡结构正常,胰岛形态正常、大小适中,胰岛细胞胞浆饱满、无变性坏死,胰岛未见间质增生及炎细胞浸润。模型组可见较为严重的胰岛萎缩,包括胰岛数量减少、尺寸变小,胰岛细胞固缩、胞核密集,与空白组比较,改变明显。二甲双胍组胰岛萎缩程度较模型组稍轻,胰岛内细胞数量增多,胰岛细胞变性程度略减轻。各配伍药对组较模型组胰岛萎缩现象有所改善,胰岛内细胞数量增多,且胰岛细胞胞浆增加,形状规则,胰岛细胞变性减缓,其中以盐知母-盐黄柏组病变的改善情况最明显。

3.5.2 肝脏组织 肉眼观察空白组大鼠肝脏呈鲜红色,表面光滑。模型组大鼠肝脏呈灰红色,表面有不规则的密集小点。各配伍药对组及二甲双胍组大鼠肝脏呈暗红色,表面有少许小点。HE染色情况见图2。结果发现空白组肝索排列整齐,肝细胞形态正常,间质未见增生及炎细胞浸润。模型组肝脏组织结构紊乱,部分肝细胞脂肪变性,出现脂滴样空泡,并伴有局部炎细胞浸润。各给药组可不同程度地改善模型大鼠肝脏的病理形态,与模型组比较,其肝索排列较整齐,脂肪变性和炎细胞浸润症状有所减轻;其中盐知母-盐黄柏组和生知母-盐黄柏组减轻大鼠肝脏病变的作用更佳。

3.5.3 肾脏组织 空白组肾脏肾小球形态、大小正常,包膜及系膜未见增厚,系膜细胞未见增生,肾小管上皮细胞形态正常,未见变性坏死,肾脏间质未见炎细胞浸润。模型组肾小球体积减小,肾小管上皮细胞肿胀、空泡变性及坏死脱落,并且伴有炎性细胞浸润,与空白组比较,改变明显。二甲双胍组、盐知母-盐黄柏组、生知母-盐黄柏组较模型组大鼠肾小球大小、形态趋于正常,肾小管上皮细胞肿胀、



A. 空白组; B. 模型组; C. 二甲双胍组; D. 盐知母-盐黄柏组; E. 生知母-生黄柏组; F. 盐知母-生黄柏组; G. 生知母-盐黄柏组(图2,3同)

图1 知母-黄柏盐炙前后配伍对T2DM大鼠胰腺病理形态的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Histopathological effect of compatibility of *Anemarrhenae Rhizoma* and *Phellodendri Chinensis Cortex* on pancreas in T2DM rats before and after salt-processing(HE, ×400)

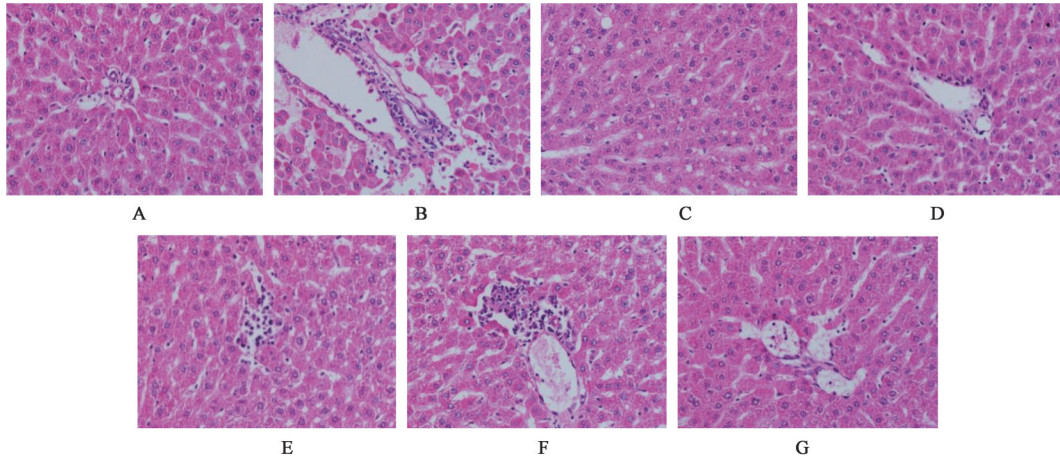


图2 知母-黄柏盐炙前后配伍对T2DM大鼠肝脏病理形态的影响(HE, ×400)

Fig. 2 Histopathological effect of compatibility of *Anemarrhenae Rhizoma* and *Phellodendri Chinensis Cortex* on liver in T2DM rats before and after salt-processing(HE, ×400)

空泡变性等病理变化有所改善。其余各给药组较模型组大鼠肾脏病变程度稍有好转。见图3。

4 讨论

知母-黄柏具有悠久的用药历史,是较为典型治疗消渴病的药对。现代研究表明,知母-黄柏药对中的芒果苷、知母皂苷、多糖类及小檗碱等有效成分具有明显的降血糖、调血脂等作用,且在改善T2DM胰岛素抵抗等方面也有积极作用^[5,12-13]。有研究发现知母经盐炙后芒果苷、知母皂苷等含量增加,降糖效果显著增强^[14];黄柏具有明显的降糖作用^[15],但其盐炙品的降糖效用却研究甚少。本课题组前期考察知母-黄柏药对盐炙前后对其滋阴清热作用的影响时,发现该药对经盐炙后滋阴清热作用一定程度的增强,对阴虚大鼠病理状况改善明显。根据

传统炮制理论,盐炙可引药下行,增强滋阴降火的作用,益于消渴病的治疗。基于此,系统比较知母-黄柏盐炙前后配伍药对降糖调脂的药效差异,以探讨降糖效值最佳的药对,是本研究主要考察的科学问题。

糖尿病是由诸多因素导致的慢性代谢性疾病,其中以T2DM为主要类型,并且随着病情的发展机体常出现心肝肾组织损伤、神经及视网膜病变等一系列并发症。其患病率正逐年增长,严重威胁着人们的生命健康。糖尿病属中医学“消渴”范畴,其治则当以滋阴清热、益气生津止渴为主^[16]。中药治疗糖尿病相较于化学药品作用温和、持久且毒副反应少,能发挥整体调控优势,达到标本兼顾的治疗效果。因此,中药干预对改善T2DM患者的健康及生

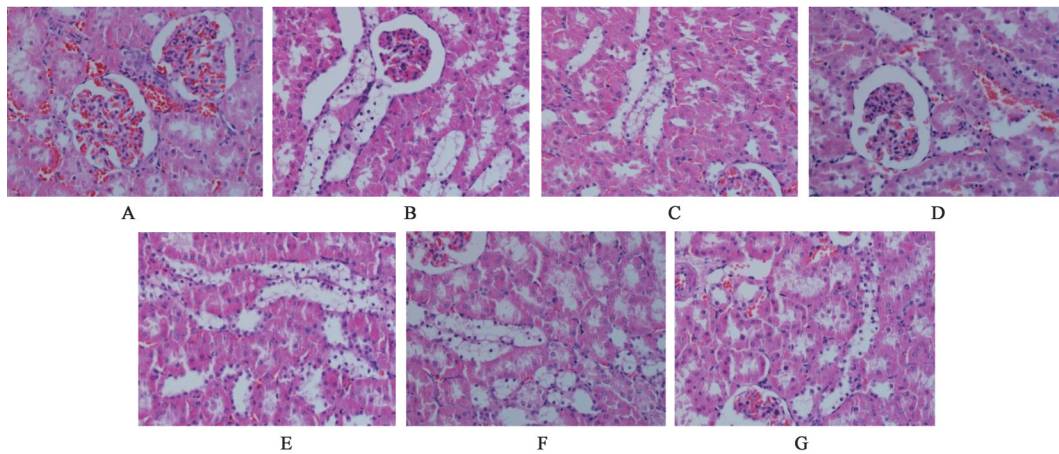


图3 知母-黄柏盐炙前后配伍对T2DM大鼠肾脏病理形态的影响(HE, ×400)

Fig. 3 Histopathological effect of compatibility of *Anemarrhenae Rhizoma* and *Phellodendri Chinensis Cortex* on kidney in T2DM rats before and after salt-processing(HE, ×400)

活质量、减少致残率等都具有特殊意义。由于高能量饮食(高脂高糖饲料)能诱导胰岛素抵抗,再结合小剂量注射STZ可破坏部分胰岛 β 细胞,使胰岛素分泌减少,能较好地模拟T2DM的发病过程^[17]。故本实验采用高能量饮食联合注射STZ的方法诱导制备T2DM大鼠模型。结果发现造模后大鼠的血糖显著升高,体质量明显减轻,并表现出多饮、多食、多尿等典型的T2DM临床症状,提示模型复制成功。而知母-黄柏盐炙前后配伍药对均能有效改善这些症状,明显降低T2DM大鼠FBG和GSP水平,并提高FINS水平,改善T2DM大鼠胰腺组织病变并抑制胰岛细胞变性,其中二者盐炙后配伍药对降糖作用表现最佳。

T2DM患者常伴随着脂代谢紊乱,NEFA升高及组织内TG过度堆积等病理过程,从而导致机体肝脏、脂肪和外周组织等靶器官对胰岛素的敏感性降低,进一步引起胰岛素抵抗^[18]。血脂异常是脂代谢紊乱的特征表现之一,主要为血清中TG,TC,LDL-C及NEFA水平升高和HDL-C水平降低。调节脂代谢紊乱是防治T2DM的重要措施^[19]。本研究发现知母-黄柏盐炙前后配伍药对都能不同程度地降低T2DM大鼠血清TG,TC,LDL-C及NEFA水平,升高HDL-C水平。说明各配伍药对均能有效改善T2DM大鼠脂代谢紊乱,其中以盐知母-盐黄柏药对调节效果最为突出,这可能是盐知母、盐黄柏在盐制增效的基础上,药对配伍使用协同增强了调脂的效果。

ADP与瘦素均是由脂肪组织分泌的主要能量调节信号,同T2DM的发生发展密切相关。有研究发现^[20-21],ADP是一种由脂肪细胞分泌的内源性蛋

白质或生物活性多肽,具有提高胰岛素敏感性、抗高血糖、抗炎,以及通过抑制糖异生、增加脂肪酸氧化进而调节脂代谢等多种作用;瘦素是一种脂肪细胞分泌的蛋白质激素,通过作用于下丘脑代谢的中枢调节系统,发挥调节食欲、减少能量摄取、促进能量消耗及抑制脂肪合成的作用。本研究发现T2DM模型大鼠瘦素水平显著升高,而ADP水平显著降低,同文献报道基本一致;而各配伍药对均能调节ADP与瘦素趋向于正常水平发展,其中盐知母-盐黄柏药对调节脂肪细胞因子的效用相对较优。

肝脏是调节机体糖脂代谢及能量代谢的重要器官,T2DM机体存在血糖异常及脂质代谢紊乱,肝内脂质堆积,通常会引发肝脏组织病理损伤。当肝细胞受损时,肝内糖原合成酶体系遭受破坏,导致肝糖原合成受阻,肝糖原含量下降^[22];另外,30%~40%的T2DM患者常伴发着肾脏损伤,即糖尿病肾病,是糖尿病常见并发症^[23]。糖尿病肾病是导致糖尿病患者发展至终末期肾功能衰竭及死亡的重要原因,其中血清BUN和CRE水平是反映肾功能的主要检测指标^[24]。本研究发现T2DM模型大鼠肝糖原含量显著降低,BUN及CRE水平显著升高,提示模型大鼠出现了肝肾损伤。各配伍药对能够明显的升高肝糖原含量,降低BUN及CRE水平;有效改善了T2DM大鼠肝脏病理学改变和脂肪变性;且可不同程度修复T2DM所造成的肾组织病变。说明各配伍药对均能不同程度的修复T2DM引起的肝肾损伤,但盐知母-盐黄柏药对效果最佳。

综上所述,知母-黄柏盐炙前后配伍药对均具有降血糖、调节脂质代谢紊乱的作用,但降糖调脂综合药效则以知母和黄柏均盐炙后的配伍药对为最

佳,其机制可能与改善胰岛素抵抗、调节脂肪细胞因子、修复胰腺及肝肾组织损伤等有关。据研究分析,知母与黄柏配伍后并没有新化合物产生^[12],而二者经盐炙后其多种成分的含量会发生相应变化,如知母皂苷B II,芒果苷,小檗碱及巴马汀等成分的含量会有一定程度增加。但关于知母-黄柏药对盐炙后增强降糖调脂作用的物质基础尚不明确,后续还需进一步探索研究。

[参考文献]

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2018, 10(1): 4-67.
- [2] CHO N H, SHAW J E, KARURANGA S, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2018, 138:271-281.
- [3] ASHCROFT F M, RORSMAN P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years [J]. Cell, 2012, 148(6): 1160-1171.
- [4] 丁元庆.《兰室秘藏》应用知母黄柏之浅识[J]. 中医函授通讯, 1995, 14(2): 14-15.
- [5] 金惠杰, 邱昆成, 李嘉华, 等. 药对知母-黄柏对胰岛素抵抗的改善作用[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(7): 1020-1024.
- [6] 吴莹, 宋泽璧, 徐月, 等. 知母盐炙前后滋阴作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24): 211-214.
- [7] 吴莹, 宋泽璧, 高慧, 等. 知母盐制前后降血糖作用及其机制[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(23): 1977-1980.
- [8] 张凡, 徐珊, 刘蓬蓬, 等. 黄柏不同炮制品对甲亢型肾虚模型大鼠甲状腺和肾上腺皮质功能的影响[J]. 中国药房, 2017, 28(1): 27-30.
- [9] HAN X Y, YANG Y F, METWALY A M, et al. The Chinese herbal formulae (Yitangkang) exerts an antidiabetic effect through the regulation of substance metabolism and energy metabolism in type 2 diabetic rats [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 239: 111942.
- [10] 王瑾, 冉倩, 王琳, 等. 基于16S rRNA技术分析黄连酒蒸前后对正常及2型糖尿病大鼠肠道微生物的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(22): 92-102.
- [11] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 70-73.
- [12] 邱昆成. 药对知母-黄柏的降糖作用及基于液质联用技术的化学物质研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [13] 刘静, 党院霞, 高英, 等. 知母-黄柏药对有效部位群改善2型糖尿病大鼠认知功能障碍的药效及机制研究[J]. 中草药, 2017, 48(19): 4037-4043.
- [14] 王晓婷, 闫丽, 孙冬月, 等. 知母盐制后增量成分对HepG-2细胞葡萄糖消耗的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(16): 1694-1696.
- [15] KIM H J, KONG M K, KIM Y C. Beneficial effects of Phellodendri Cortex extract on hyperglycemia and diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. BMB Rep, 2008, 41(10): 710-715.
- [16] 姜妍, 汪悦. 浅议周仲瑛教授治疗糖尿病的“三热论”[J]. 环球中医药, 2016, 9(11): 1394-1395.
- [17] 汪悦, 杨阳, 郭颖华. 高能量饮食联合STZ诱导2型糖尿病肾病动物模型研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(92): 84-86.
- [18] 张可锋, 高雅, 曹后康, 等. 基于AMPK/SREBP-1通路研究狗肝菜多糖对高脂饮食大鼠糖脂代谢的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(10): 1777-1782, 1814.
- [19] 李爱云, 杨京, 张昕宇, 等. 小檗碱治疗2型糖尿病降血糖机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(22): 219-226.
- [20] 孟祥云, 郭树明, 杨丽霞. 中药植物多糖对2型糖尿病胰岛素抵抗的作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(8): 220-225.
- [21] 李远, 章秋, 刘安诺, 等. 血清瘦素/脂联素比值与2型糖尿病患者轻度认知功能障碍相关性研究[J]. 中国全科医学, 2017, 20(8): 928-934.
- [22] 尚付梅, 李三强, 卢华杰, 等. 小鼠酒精性肝损伤过程中肝糖原的表达变化[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(9): 818-820.
- [23] WENG J P, BI Y. Epidemiological status of chronic diabetic complications in China [J]. Chin Med J (Engl), 2015, 128(24): 3267-3269.
- [24] 张瑶, 黄乙芸, 王少清. 营养不良-炎症综合征与糖尿病肾病患者病情进展的关系研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(6): 877-881.

[责任编辑 刘德文]