

治疗糖尿病中药有效组分配伍比例的筛选与验证

王晓^{1,2}, 曲晓波¹, 刘博², 王鑫², 宋莲莲², 徐惠波^{2*}

(1. 长春中医药大学药学院, 长春 130117; 2. 吉林省中医药科学院, 长春 130012)

[摘要] **目的:** 运用均匀设计结合药理模型的方法筛选黄连总生物碱与三七总皂苷组合物(HS组合物)的最佳配伍比例, 观察该剂量HS组合物对糖尿病并发症的影响。**方法:** 以黄连总生物碱、三七总皂苷为研究对象, 根据均匀设计方案选用 $U_6(6^2)$ 表分组设计, 以小鼠血糖、血浆凝血酶原时间(PT), 活化部分凝血酶原时间(APTT)为筛选指标, 回归分析获得最佳剂量配比。采用高糖高脂结合链脲佐菌素诱导2型糖尿病大鼠模型, 将大鼠分为空白组, 模型组, 二甲双胍组($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), HS组合物组(黄连总生物碱 $360 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 三七总皂苷 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 灌胃给药10周, 通过观察各组大鼠血糖、糖耐量并计算血糖曲线下面积(AUC), 甘油三酯(TG), 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)与低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), 血液流变学指标以及胰腺、心脏、肾脏、视网膜的病理变化, 验证该组合物对糖尿病并发症的作用。**结果:** HS组合物的小鼠给药最佳配伍比例为黄连总生物碱 $625 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + 三七总皂苷 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。验证实验显示, 与空白组比较, 模型组小鼠空腹血糖及血脂水平显著升高($P < 0.01$), HDL-C显著降低($P < 0.01$); 全血高、中、低切黏度均显著升高($P < 0.01$), 胰腺、心脏、肾脏、视网膜损伤程度较重; 与模型组比较, 二甲双胍组于给药第6, 8, 10周血糖明显降低($P < 0.05, P < 0.01$), HS组合物组第2, 4, 8, 10周空腹血糖水平明显降低($P < 0.05, P < 0.01$), 血清中TG及LDL-C值明显降低($P < 0.05, P < 0.01$), HDL-C, HDL-C/LDL-C值显著升高($P < 0.01$), 全血高切黏度与全血中切黏度均显著降低($P < 0.01$); 病理结果显示, HS组合物能减轻大鼠胰腺、心脏、肾脏以及视网膜的损伤。**结论:** HS组合物最佳配伍剂量对高糖高脂结合链脲佐菌素诱导的大鼠糖尿病并发症具有良好的抑制作用。

[关键词] 糖尿病并发症; 黄连总生物碱; 三七总皂苷; 均匀设计; 配伍比例

[中图分类号] R2-0; R285; R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)21-0045-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192136

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190717.1052.005.html>

[网络出版时间] 2019-07-18 15:51

Screening and Verification of Compatibility Proportion of Effective Components from Traditional Chinese Medicine of Diabetes

WANG Xiao^{1,2}, QU Xiao-bo¹, LIU Bo², WANG Xin², SONG Lian-lian², XU Hui-bo^{2*}

(1. School of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Jilin Academy of Chinese Medical Sciences, Changchun 130012, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the best compatibility proportion of total alkaloids of Coptidis Rhizoma and Notoginseng Radix et Rhizoma total saponins (HS composition) by uniform design and pharmacological model and to observe the effect on diabetic complications. **Method:** The total alkaloids of Coptidis Rhizoma and Notoginseng Radix et Rhizoma total saponins were used as the research objects, $U_6(6^2)$ table was choosed for grouping design. The content of triglyceride fasting blood-glucose (FBG), prothrombin time (PT) and active partial thromboplastin time (APTT) was chosen as index. The best dose ratio was obtained by multipleregression analysis. Rats with type 2 diabetes mellitus induced by high-fat diet combined streptozotocin were divided into blank group, model group, metformin group ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), HS composition group (total alkaloids of Coptidis

[收稿日期] 20190509(019)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301031); 吉林省科技发展计划项目(20170311012YY)

[第一作者] 王晓, 硕士, 从事糖尿病及糖尿病并发症研究, E-mail: wangxiao_box@163.com

[通信作者] * 徐惠波, 研究员, 从事中药基础及应用开发研究, E-mail: xhb_6505@163.com

Rhizoma 360 mg·kg⁻¹ + Notoginseng Radix et Rhizoma total saponins 40 mg·kg⁻¹). Rats were administered orally for 10 weeks. By observing the blood glucose, glucose tolerance, area under the curve (AUC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein (HDL-C) and low-density lipoprotein (LDL-C), hemorheological indexes and pathological changes of pancreas, heart, kidney and retina in rats of each group, the effect of this composition on diabetic complications was verified. **Result:** Combination of 625 mg·kg⁻¹ total alkaloids of Coptidis Rhizoma and 60 mg·kg⁻¹ Notoginseng Radix et Rhizoma total saponins was the optimal dosage ratio of HS composition. The validation test showed that compared with blank group, the fasting blood glucose and lipid levels in the model group were significantly increased ($P < 0.01$), and HDL-C was decreased ($P < 0.01$). The hemorheology indexes of whole blood were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, the FBG in metformin group were significantly reduced at week 6, 8, 10 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, HS combination group 2, 4, 8, 10 weeks significantly lower fasting glucose levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$), serum TG, LDL-C significantly lower values ($P < 0.05$, $P < 0.01$), HDL-C, HDL-C/LDL-C values were significantly increased ($P < 0.01$), whole blood high shear viscosity and whole blood viscosity were significantly reduced ($P < 0.01$). HS composition could reduce the blood sugar and lipid content, reduce the whole blood viscosity, and reduce the damage of pancreas, heart, kidney and retina. **Conclusion:** The optimum compatibility dose of HS composition have a good therapeutic effect on diabetic complication rats induced by high-fat diet and streptozotocin.

[**Key words**] diabetic complication; total alkaloids of Coptidis Rhizoma; Notoginseng Radix et Rhizoma total saponins; uniform design; compatibility proportion

糖尿病已成为全球性的公共卫生问题,由于长期高血糖引起的微血管、大血管并发症是糖尿病患者致死、致残的主要原因,因此,在糖尿病的治疗过程中,控制血糖的同时针对血管性病变的治疗至关重要。目前临床对于糖尿病并发症尚无明确治疗药物,治疗手段主要针对其高血糖进行降糖处理^[1-2],并发症出现后再合用针对并发症的药物对症治疗。多年临床试验证明,中药对糖尿病及糖尿病并发症的治疗具有其独特的优势。现代药理学研究显示,黄连及其生物碱类成分对糖尿病有良好的改善作用,可通过改善肠道微生态^[3]、抑制胰岛素抵抗^[4]、调控线粒体功能^[5]等途径对糖尿病及其并发症起到缓解和治疗作用。三七作为传统的中药,其皂苷类成分具有扩张血管、增加局部血流量^[6]、促进血管内皮细胞增殖^[7]等作用,可通过多种途径改善糖尿病心脏病^[8]、糖尿病肾病^[9]以及糖尿病视网膜病变^[10]。

本课题组前期研究证实,黄连总生物碱对链脲佐菌素诱导的高血糖小鼠模型具有良好的降血糖活性,三七总皂苷能延长小鼠凝血时间,降低血液黏度。若将二者配伍,充分利用黄连总生物碱与三七总皂苷的降血糖、调血脂活性及抑制血管病变的作用,在降低糖尿病患者血糖的同时抑制并发症的发生发展,从而达到治疗目的。因此,本实验将黄连总生物碱与三七总皂苷联合应用,采用统计学模型

“均匀设计法”与药理动物模型相结合筛选黄连总生物碱-三七总皂苷组合物的最佳配伍比例,通过高糖高脂结合链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型验证该配伍比例组合物对糖尿病及其并发症的干预作用,并为其进一步的研究与开发奠定基础,尝试解决糖尿病并发症临床缺少针对性治疗药物问题。

1 材料

1.1 动物与饲料 170 只 SPF 级雄性 ICR 小鼠,体质量 18 ~ 22 g,合格证号 SCXK(吉)2016-0003; 40 只 SPF 级 Wistar 大鼠,雌雄各半,体质量 180 ~ 200 g,合格证号 SCXK(吉)2016-0003。动物均购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司,于屏障系统饲养,恒温恒湿,12 h 明暗交替,所有动物自由进食饮水。高糖高脂饲料由北京华卓康生物科技股份有限公司提供,合格证编号 No. 11003800014447。本实验经过吉林省中医药科学院动物伦理委员会批准实施,伦理审批号 JLSZKYDWLL2018-003。

1.2 药物和试剂 黄连总生物碱和三七总皂苷均由吉林省中医药科学院提供;盐酸二甲双胍片(白云山汤明东泰药业,批号 170803);血塞通胶囊(云南维和药业股份有限公司,批号 20150301);链脲佐菌素(美国 Sigma 公司,批号 WXBC7268V);肝素钠(上海上药第一生化药业有限公司,批号 1702101);葡萄糖测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号 183661);苏木素-伊红(HE)染色液(武汉

金宏生物科技发展有限责任公司,批号 618111);血浆凝血酶原时间 (PT) 试剂盒,活化凝血酶原时间 (APTT) 试剂盒 (上海太阳生物技术有限公司,批号分别为 105376, 1122101);甘油三酯 (TG) 试剂盒 (潍坊三维生物工程集团有限公司,批号 170901);高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 试剂盒,低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 试剂盒 (深圳迈瑞生物医疗电子有限公司,批号分别为 142018003, 142018004)。

1.3 仪器 PB-10 型 pH 计 (赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司);BGM506 型血糖仪 (中国深圳家康科技有限公司);FB-40 型血液凝固分析仪 (山西亚森实业有限公司);GF-D800 型半自动生化分析仪 (山东高密彩虹分析仪器有限公司);CS-600B 型全自动生化分析仪 (中国长春迪瑞实业有限公司);FASCO-3010 型全自动血液流变分析仪 (中国维多生物工程研究所);HC-3618R 型高速冷冻离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司);RM2255 型高精密全自动切片机,EG 1130 型修切冷台 (德国 Leica 公司);BX51 OLMPUS 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司);YR-21 型染色机 (湖北孝感亚光电子有限公司)。

2 方法

2.1 运用均匀设计法筛选最佳剂量

2.1.1 均匀设计方案 根据均匀设计方案,选用 $U_6(6^2)$ 均匀设计表,将黄连总生物碱与三七总皂苷的剂量作为两因素,以 X_a 代表黄连总生物碱,以 X_b 代表三七总皂苷,两成分的剂量各取 6 个水平。根据前期研究取得结果,令 X_a, X_b 在各自的剂量范围内递增,结合 $U_6(6^2)$ 表设定给药方案。见表 1。

表 1 HS 组合物配伍剂量的均匀设计方案

Table 1 Scheme of dosage and proportion of HS composition based on uniform design

组别	黄连总生物碱 (X_a)	三七总皂苷 (X_b)	总剂量 mg·kg ⁻¹
配伍 1	125	160	285
配伍 2	225	310	535
配伍 3	325	110	435
配伍 4	425	260	685
配伍 5	525	60	585
配伍 6	625	210	835

2.1.2 均匀设计法筛选降糖作用最佳剂量 ICR 小鼠 90 只,适应性喂养 5 d 后,按体质量随机分为空白组与造模组,过夜禁食 12 h,造模组动物按

150 mg·kg⁻¹ 剂量腹腔注射链脉佐菌素 (溶于 pH 4.4 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中,并于配制后 30 min 内注射完毕),空白组注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (10 mL·kg⁻¹)。注射链脉佐菌素 72 h 后,造模动物禁食 5 h 测量空腹血糖,并按血糖及体质量各组均衡的原则将造模动物随机分为 8 组:模型组、盐酸二甲双胍组 (盐酸二甲双胍 220 mg·kg⁻¹),HS 组合物配伍 1 组、配伍 2 组、配伍 3 组、配伍 4 组、配伍 5 组、配伍 6 组 (给药剂量与均匀设计方案一致)。分组后每天按照上述剂量给药 1 次,连续灌胃给药 7 d,空白组与模型组给予等体积蒸馏水,于给药第 7 天动物禁食,末次给药 1 h 后眼眶后静脉丛取血,半自动生化分析仪测定动物空腹血糖值。

2.1.3 均匀设计法筛选抗凝血作用最佳剂量 ICR 小鼠 80 只,适应性喂养 5 d 后,按体质量随机分为 8 组:空白组、血塞通组 (血塞通 290 mg·kg⁻¹),HS 组合物配伍 1 组、配伍 2 组、配伍 3 组、配伍 4 组、配伍 5 组、配伍 6 组 (给药剂量与均匀设计方案一致)。分组后连续灌胃给药 7 d,空白组与模型组给予等体积蒸馏水 (10 mL·kg⁻¹)。于末次给药 1 h 后眼眶后静脉丛取血,血液凝固分析仪测定血浆 PT 及 APTT 值。

2.2 验证试验

2.2.1 造模与给药 根据均匀设计剂量筛选结果确定分组及给药方案。取 Wistar 大鼠 40 只,适应性喂养 1 周后,随机分为空白组 ($n = 10$) 与造模组 ($n = 30$),空白组以普通饲料喂养,造模组以高糖高脂饲料喂养。4 周后各组大鼠禁食 16 h,造模组大鼠腹腔注射链脉佐菌素 35 mg·kg⁻¹ (溶于 pH 4.4 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中,并于配制后 30 min 内注射完毕),空白组大鼠注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (10 mL·kg⁻¹)。造模 1 周后大鼠尾静脉采血测量随机血糖,以血糖 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹ 视为造模成功。将造模成功大鼠随机分为模型组、盐酸二甲双胍组 (盐酸二甲双胍 150 mg·kg⁻¹) 与 HS 组合物组 (黄连总生物碱 360 mg·kg⁻¹,三七总皂苷 40 mg·kg⁻¹) 给药剂量为均匀设计分析得出的小鼠最佳配伍剂量按照体表面积折算法折算至大鼠剂量得出。分组后各组大鼠每天灌胃给药,空白组与模型组灌胃等体积蒸馏水,连续给药 10 周。

2.2.2 葡萄糖氧化酶法检测血糖 每 2 周测 1 次血糖值,动物禁食 12 h 后尾静脉采血,血糖仪测量动物空腹血糖。

2.2.3 口服糖耐量实验 大鼠禁食 12 h 后灌胃葡

葡萄糖 ($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 尾静脉采血, 血糖仪测定灌胃葡萄糖 0, 30, 60, 120 min 时大鼠血液中葡萄糖浓度, 绘制糖耐量曲线, 采用近似梯形法计算口服糖耐量试验血糖曲线下面积 (AUC)。

2.2.4 血液流变学指标检测 末次给药 1 h 后将动物麻醉 (腹腔注射乌拉糖 $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 腹主动脉取血, 血液流变学分析仪检测血液流变学指标。

2.2.5 血生化检测 TG, HDL-C 及 LDL-C 的含量全自动生化分析仪分析血液中 TG (酶法), HDL-C (直接法) 与 LDL-C (直接法) 含量, 计算 HDL-C/LDL-C。具体实验方法参照试剂盒说明书。

2.2.6 HE 染色观察大鼠组织病理学变化 取大鼠胰腺、心脏、肾脏以及眼球固定于 10% 甲醛溶液, 常规洗涤、脱水、石蜡包埋、切片, HE 染色, 光镜下观察各脏器病理变化。

2.3 统计学方法 使用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 均匀设计试验采用多元逐步回归分析, 以 $\alpha = 0.05$ 为显著水准进行统计检验。

3 结果

3.1 均匀设计法筛选最佳剂量

3.1.1 HS 组合物各配比小鼠血糖的影响 与空白组比较, 模型组小鼠血糖显著升高 ($P < 0.01$), 表明 STZ 成功诱导了小鼠高血糖模型。与模型组比较, 盐酸二甲双胍组与各配伍组血糖均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 HS 组合物对小鼠空腹血糖值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of HS composition on fasting blood glucose in mice

($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	配伍比例 /mg·kg ⁻¹	血糖 /mmol·L ⁻¹	血糖下降 率/%
空白	-	9.97 ± 1.57	-
模型	-	34.59 ± 8.81 ¹⁾	-
盐酸二甲双胍	220	24.82 ± 5.06 ³⁾	28.2
配伍 1	125 + 160	26.81 ± 6.66 ²⁾	22.5
配伍 2	225 + 310	21.33 ± 8.07 ³⁾	38.3
配伍 3	325 + 110	20.90 ± 5.64 ³⁾	39.6
配伍 4	425 + 260	18.42 ± 8.12 ³⁾	46.8
配伍 5	525 + 60	17.86 ± 6.31 ³⁾	48.4
配伍 6	625 + 210	20.13 ± 4.87 ³⁾	41.8

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 4~7 同)。

3.1.2 HS 组合物各配比小鼠凝血时间的影响 与空白组比较, 配伍 5 组, 配伍 6 组 PT 值显著升高 ($P < 0.01$), 配伍 4 组, 配伍 5 组及配伍 6 组 APTT 值明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 HS 组合物对小鼠 PT 及 APTT 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of HS composition on PT and APTT in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	配伍比例 /mg·kg ⁻¹	PT /s	APTT /s
空白	-	9.07 ± 0.40	26.09 ± 3.51
血塞通	290	9.59 ± 0.83	24.47 ± 1.80
配伍 1	125 + 160	9.53 ± 0.43	26.28 ± 3.67
配伍 2	225 + 310	9.07 ± 0.26	24.78 ± 1.89
配伍 3	325 + 110	8.46 ± 0.48	26.03 ± 2.43
配伍 4	425 + 260	9.17 ± 0.76	30.30 ± 5.78 ¹⁾
配伍 5	525 + 60	9.98 ± 0.80 ²⁾	41.90 ± 8.18 ²⁾
配伍 6	625 + 210	10.01 ± 1.40 ²⁾	33.61 ± 5.44 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.1.3 配伍比例筛选分析结果 以空腹血糖下降百分率为指标对组合物各配比组进行多元回归分析, 得到回归方程 $Y = 0.000\ 006\ 9Xa^2 + 0.003\ 639\ 8Xa + 0.000\ 001\ 7Xb^2 - 0.000\ 003\ 7XaXb + 0.034\ 838\ 9$; 根据该方程, 当 $Xa = 625 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $Xb = 60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, $Y = 49.3$, 即当黄连总生物碱 $625 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 三七总皂苷 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 血糖下降百分率达 49.3%, 组合物降糖效应最佳。分别以 PT 值作为筛选指标, 对均匀设计试验各组进行回归分析, 得到回归方程 $Y = 0.000\ 103\ 3\ Xa^2 - 0.022\ 618\ 8\ Xa + 0.000\ 008\ 5Xb^2 - 0.000\ 024\ 3Xb + 10.277\ 215\ 0$, 根据方程计算结果提示当 $Xa = 625 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $Xb = 60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, $Y = 10.74$, 即 PT = 10.74 s, 组合物产生最佳效应。以 APTT 作为筛选指标, $Y = 0.000\ 237\ 9\ Xa^2 + 0.056\ 695\ 2\ Xa + 0.000\ 069\ 1\ Xb^2 - 0.000\ 396\ 4XaXb + 23.500\ 688\ 3$ 。根据方程计算结果提示当 $Xa = 625 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $Xb = 60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, $Y = 46.85$, 即 APTT = 46.85 s, 组合物产生最佳效应。故组合物小鼠灌胃给药的最佳剂量确定为黄连总生物碱 $625 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + 三七总皂苷 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。按照剂量体表面积折算法计算得大鼠剂量为黄连总生物碱 $360 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + 三七总皂苷 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

3.2 最佳剂量验证试验

3.2.1 对大鼠血糖水平的影响 给药前, 造模大鼠

空腹血糖值均显著高于空白组 ($P < 0.01$), 与空白组比较, 模型组大鼠空腹血糖在试验期间持续升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 二甲双胍组于给药第 6,

8, 10 周血糖均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, HS 组合物组第 2, 4, 8, 10 周空腹血糖水平均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

表 4 HS 组合物对大鼠空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of HS composition on fasting blood glucose in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	血糖/mmol·L ⁻¹					
		0 周	2 周	4 周	6 周	8 周	10 周
空白	-	5.19 ± 0.47	5.34 ± 0.26	5.18 ± 0.45	5.70 ± 0.48	6.14 ± 0.44	5.97 ± 0.51
模型	-	8.73 ± 2.52 ¹⁾	9.42 ± 3.21 ¹⁾	9.87 ± 3.09 ¹⁾	16.25 ± 3.09 ¹⁾	16.24 ± 4.11 ¹⁾	16.98 ± 2.52 ¹⁾
盐酸二甲双胍	150	8.33 ± 1.33	9.07 ± 2.11	11.33 ± 2.46	12.58 ± 4.47 ²⁾	10.53 ± 3.38 ³⁾	11.98 ± 5.44 ³⁾
HS 组合物	360 + 40	8.72 ± 2.22	6.30 ± 0.79 ³⁾	7.38 ± 1.70 ²⁾	11.95 ± 7.08	9.70 ± 2.89 ³⁾	10.25 ± 2.94 ³⁾

3.2.2 对大鼠口服糖耐量的影响 与空白组比较, 模型组大鼠在灌胃葡萄糖后各时间点血糖水平均显著升高 ($P < 0.01$); 盐酸二甲双胍组与 HS 组合物组灌胃葡萄糖后 0, 30, 60, 120 min 血糖水平均显著低于模型组 ($P < 0.01$), 模型组 AUC 显著高于空白组 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 二甲双胍组与 HS 组合物组 AUC 显著降低 ($P < 0.01$)。见表 5。

大鼠血清中 TG 水平显著升高 ($P < 0.01$), HDL-C 显著降低 ($P < 0.01$), HDL-C/LDL-C 明显低于空白组 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 盐酸二甲双胍组 TG 值明显降低 ($P < 0.05$), HDL-C 明显升高 ($P < 0.05$), HDL-C/LDL-C 明显升高 ($P < 0.05$); HS 组合物组动物血清中 TG 及 LDL-C 值明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), HDL-C, HDL-C/LDL-C 显著升高 ($P < 0.01$)。见表 6。

3.2.3 对大鼠血脂的影响 与空白组比较, 模型组

表 5 HS 组合物对大鼠口服糖耐量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of HS composition on oral glucose tolerance in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	血糖/mmol·L ⁻¹				AUC /mmol·h·L ⁻¹
		0 min	30 min	60 min	120 min	
空白	-	6.01 ± 0.49	8.82 ± 1.35	8.47 ± 0.55	6.58 ± 0.62	15.56 ± 0.859
模型	-	16.98 ± 2.52 ¹⁾	31.13 ± 3.59 ¹⁾	33.14 ± 0.39 ¹⁾	28.44 ± 3.05 ¹⁾	58.89 ± 3.36 ¹⁾
盐酸二甲双胍	150	11.39 ± 5.71 ³⁾	17.99 ± 4.46 ³⁾	23.35 ± 6.39 ³⁾	19.49 ± 8.14 ³⁾	39.10 ± 10.67 ³⁾
HS 组合物	360 + 40	10.58 ± 3.43 ³⁾	24.05 ± 5.48 ³⁾	28.26 ± 4.29 ³⁾	22.36 ± 4.77 ³⁾	47.05 ± 8.24 ³⁾

表 6 HS 组合物对大鼠血脂水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of HS composition on serum lipid level in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	HDL-C/mmol·L ⁻¹	LDL-C/mmol·L ⁻¹	HDL-C/LDL-C
空白	-	1.07 ± 0.23	1.09 ± 0.18	0.52 ± 0.08	2.14 ± 0.49
模型	-	1.65 ± 0.84 ¹⁾	0.60 ± 0.19 ¹⁾	0.44 ± 0.15	1.45 ± 0.61 ¹⁾
盐酸二甲双胍	150	0.87 ± 0.22 ²⁾	1.07 ± 0.39 ³⁾	0.44 ± 0.17	2.61 ± 1.11 ²⁾
HS 组合物	360 + 40	0.65 ± 0.23 ³⁾	0.82 ± 0.14 ³⁾	0.32 ± 0.10 ²⁾	2.75 ± 0.63 ³⁾

3.2.4 对大鼠血液流变学指标的影响 与空白组比较, 模型组大鼠全血高、中、低切黏度均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 二甲双胍组全血中切黏度明显降低 ($P < 0.05$), HS 组合物组全血高切黏度与全血中切黏度均显著降低 ($P < 0.01$)。见表 7。

鼠胰腺内胰岛组织结构完整, 胰岛数量较多, 散在分布, 呈圆形或类圆形, 胰岛内细胞数量多, 细胞胞浆丰富。模型组大鼠胰腺内胰岛数量较少, 稀疏分布, 呈不规则形, 胰岛内细胞数量少, 细胞胞浆减少; 与空白组比较, 胰岛数量减少, 胰岛内细胞数量减少, 胰岛萎缩。盐酸二甲双胍组大鼠胰岛呈小圆形, 数

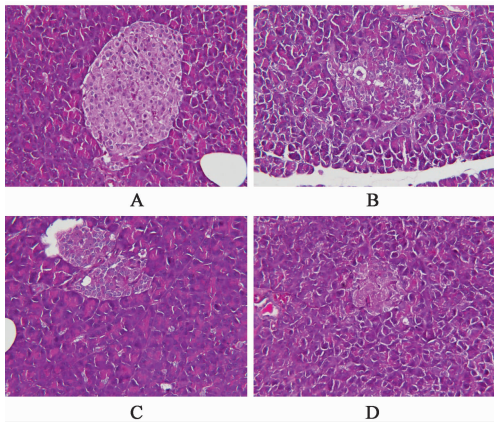
3.2.5 对各组大鼠组织形态学的影响 空白组大

表 7 HS 组合物对大鼠血液流变学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effect of HS composition on hemorheology of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	全血高切黏度 (200 s ⁻¹)	全血中切黏度 (30 s ⁻¹)	全血低切 黏度(3 s ⁻¹) mPa·s
空白	-	3.76 ± 0.52	4.52 ± 0.82	6.68 ± 1.98
模型	-	4.68 ± 0.40 ¹⁾	5.92 ± 0.61 ¹⁾	9.99 ± 1.40 ¹⁾
盐酸二甲双胍	150	4.39 ± 0.22	5.37 ± 0.33 ²⁾	8.82 ± 1.24
HS 组合物	360 + 40	3.97 ± 0.34 ³⁾	4.85 ± 0.54 ³⁾	8.69 ± 1.60

目较少,胰岛体积小,胰岛内细胞数量少,相较于模型胰岛数量有增加。HS 组合物组大鼠胰岛数目较少,胰岛体积增大,胰岛内细胞数量增多。见图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 二甲双胍组; D. HS 组合物组(图 2~4 同)

图 1 HS 组合物对大鼠胰腺组织病理学的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of HS composition on pancreas histopathology of rats (HE, ×400)

空白组大鼠心脏可见轻微心内膜心肌间质疏松,心肌细胞状态基本较好,大部分心肌纤维排列整齐,间隙紧密有序。模型组大鼠心肌组织学发生显著改变,心肌间质疏松、水肿,心肌全层细胞染色不均,心肌细胞胞浆紊乱、细胞间边界不明显和细胞核大小不规则,少数心肌细胞核固缩,心肌细胞肿胀、变性,心肌间质疏松;与空白组比较,心肌组织受累较重。盐酸二甲双胍组大鼠心内膜心肌组织肿胀、变性,染色不均,比较模型组心肌受累面积减小,有效减轻心肌细胞形态改变。HS 组合物组大鼠可见心肌染色不均,心肌间质充血,比较模型组,心肌损伤程度减轻。见图 2。

空白组大鼠肾脏基本正常,肾小球囊清晰可见,管上皮细胞呈立方状,长柱状红染,肾脏皮质、髓质无炎症细胞浸润。模型组大鼠肾脏可见明显病变,表现为中重度肾小球增大,系膜基质增生明显,局部

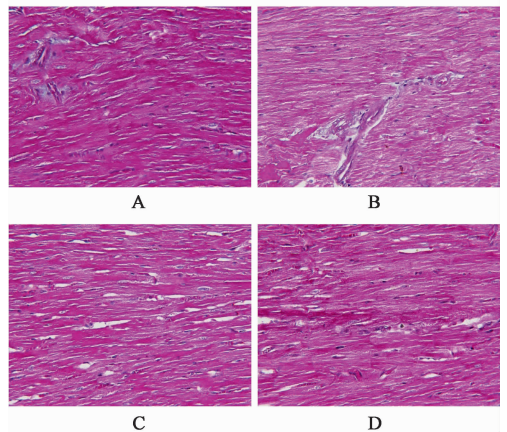


图 2 HS 组合物对大鼠心肌组织病理学的影响(HE, ×400)

Fig. 2 Effect of HS composition on myocardial histopathology of rats(HE, ×400)

可见球囊融合,上皮细胞空泡化;与空白组比较,肾脏损伤较为明显。盐酸二甲双胍组大鼠肾脏可见轻重不一的肾小球肾小管病变,重者肾小球增大,系膜基质增生,多个肾小管管腔明显,上皮细胞空泡化;肾小球、肾小管的病变的轻于模型组。HS 组合物组动物肾脏内肾小管变性轻-中度肾小球肾小管病变,肾小球、肾小管的病变程度轻于模型组。见图 3。

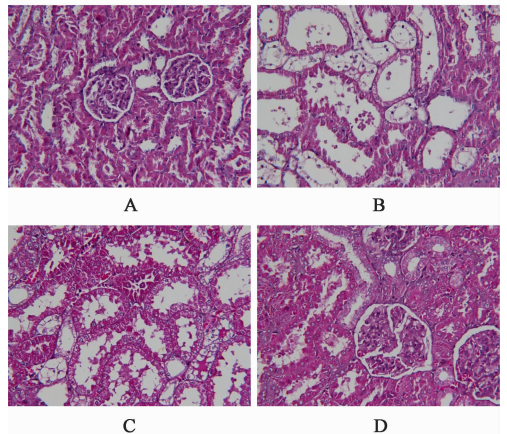


图 3 HS 组合物对大鼠肾脏组织病理学的影响(HE, ×400)

Fig. 3 Effect of HS composition on kidney histopathology of rats (HE, ×400)

空白组大鼠视网膜各层结构排列整齐,层次清晰,神经纤维层呈水平排列,神经节细胞层单层排列,结构整齐。模型组大鼠视网膜神经纤维层增厚、水肿;神经节细胞数量减少,细胞核固缩;内丛状层水肿明显,内核层胞体疏松,空泡样变性;外核层胞体排列疏松。盐酸二甲双胍组大鼠视网膜各层结构排列较为整齐,层次清晰;神经纤维层部分增厚,可见水肿;神经节细胞层可见部分细胞空泡样变性,数量减少。HS 组合物组大鼠视网膜各层结构排列较

为整齐,层次清晰;神经纤维层部分增厚;神经节细胞层可见部分细胞空泡样变性,数量减少;可见少量空泡样变性。见图 4。

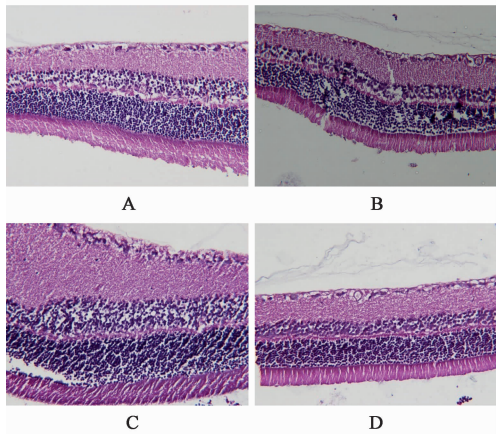


图 4 HS 组合物对大鼠视网膜组织病理学的影响(HE, ×400)
Fig.4 Effect of HS composition on retina histopathology of rats (HE, ×400)

4 讨论

近年来,糖尿病在我国流行形式越来越严峻,据报道中国成年糖尿病患者数量为 1.14 亿,且仍在增长^[11]。糖尿病患者的长期高血糖引起的一系列的并发症是导致糖尿病患者死亡的主要原因。对于糖尿病并发症,尽早的发现、治疗并遏制其发展至关重要。

近年来在对中药降糖成分的研究中,小檗碱一直颇受关注,其能通过降低糖尿病患者的胰岛素抵抗^[12]、抑制炎症和氧化应激^[13]、调节腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路^[14]、调节还原型辅酶 II(NADPH)活性^[15]等作用改善糖尿病并发症。有研究表明^[16],黄连中其他生物碱成分对糖尿病同样具有治疗作用,且黄连生物碱还具有调节血脂水平的作用^[17]。三七总皂苷制剂在心脑血管方面疾病中的治疗作用已经得到多年临床证实,其活血化瘀作用毋庸置疑。此外三七总皂苷可以调节高脂饮食糖尿病大鼠的血脂异常^[18],并能降低升糖负荷和胰岛素抵抗指数^[19]、抗血小板聚集^[20]。因此,本实验尝试通过黄连总生物碱与三七总皂苷组合应用,利用中药多途径、多靶点的作用特点,发挥清胃泻火、益气活血之功效,达到控制血糖、延缓糖尿病并发症发生发展的目的。

糖脂代谢紊乱导致血液黏度增加是糖尿病心脏病、糖尿病肾病以及糖尿病视网膜病变共同的发病基础。高血糖会导致糖尿病患者出现血脂、凝血功能及血液流变学的异常,致使血液呈高凝状态^[21],

从而产生微循环障碍。因此,本实验选用血糖及 PT,APTT 作为均匀设计的药效学考察指标,以明确 HS 组合物对糖尿病动物血糖以及凝血功能的影响,筛选出 HS 组合物的最佳配伍比例;采用高糖高脂结合链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠模型验证 HS 组合物最佳配伍比例对糖尿病及其并发症的改善作用。实验结果显示,给予 HS 组合物组动物血糖、血脂水平以及血液流变学指标明显降低,高密度脂蛋白水平升高;主要脏器组织病理显示,动物造模 10 周后,由于血糖持续升高,胰腺内胰岛数量及胰岛内细胞数量均明显减少,胰岛萎缩;心肌组织可见心肌间质疏松、水肿,心肌细胞肿胀、变性,心肌间质疏松;肾脏组织显示肾小球增大,系膜基质增生,并可见球囊融合,上皮细胞空泡化;视网膜神经纤维层增厚、水肿,神经节细胞数量减少,细胞核固缩,内丛状层水肿明显,内核层胞体疏松,空泡样变性,外核层胞体排列疏松。而给予 HS 组合物组动物胰腺损伤程度明显轻于模型组,心脏、肾脏以及视网膜损伤程度与模型组比较程度均较轻。说明 HS 组合物能够保护胰岛细胞,在降低糖尿病大鼠血糖、减轻血糖波动的同时降低动物血脂含量,调节糖尿病导致的糖脂代谢异常,降低血液黏度,从而改善糖尿病引起的血液高凝状态,减轻微循环障碍,保护内皮组织,保证脏器的血液供应,从而缓解糖尿病对心脏、肾脏及视网膜造成的进一步损害,抑制糖尿病并发症的发生和发展。其深入的作用机制仍在进一步研究中。

[参考文献]

- [1] 刘彤彤,肖琴,盛军庆,等. 基于 nano-LC-LTQ/Orbitrap-MS 筛选黄芩-黄连药对干预 2 型糖尿病 KKAY 小鼠的骨骼肌差异表达蛋白[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(17):126-131.
- [2] 陈一君,吴庆光,刘颖,等. 黄连解毒汤单独用药及联合用药对 2 型糖尿病治疗效果的 Meta 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(10):212-220.
- [3] 翟若男,陈腾,简桂花,等. 益气活血方防治糖尿病肾病足细胞损伤的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2019,37(3):583-585,776.
- [4] 黄泽禹,陈娟,陈清杰. 小檗碱调控线粒体功能改善 2 型糖尿病引起的肝脏脂质代谢紊乱[J]. 华中科技大学学报:医学版,2019,48(1):53-57.
- [5] 黄娟,胡维,林湘东. 盐酸小檗碱对 2 型糖尿病胰岛素抵抗的改善作用及其机制[J]. 中国老年学杂志,2018,38(17):4130-4132.

- [6] 崔祥,陶金华,江曙,等. 黄连提取物与肠道菌群的相互作用研究[J]. 中草药,2018,49(9):2103-2107.
- [7] YAN Q F, TAN P Z, LIU Q T, et al. Influence of Panax Notoginseng Saponins on serums ICAM-1 in patients with acute cerebral infarction [J]. Chin J Pract Nerv Dis, 2008,2(1):56-57.
- [8] SHI Q H, XIANG J, ZHU X Y, et al. Protective effects of Chinese herbal medicine Naoshuantong on neurovascular unit in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. J Chin Integr Med, 2012,10(10):1135-1139.
- [9] 贾卓雅,石凯行,范彦芳,等. 丹皮酚联合三七总皂苷对大鼠糖尿病心肌纤维化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(6):133-138.
- [10] 乔园,段惠惠,黄建梅,等. 三七总皂苷对高糖诱导大鼠视网膜微血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 北京中医药大学学报,2015,38(5):318-322,361.
- [11] 杨文英. 中国糖尿病的流行特点及变化趋势[J]. 中国科学:生命科学,2018,48(8):812-819.
- [12] Memon M A, Khan R N, Riaz S, et al. Methylglyoxal and insulin resistance in berberine-treated type 2 diabetic patients [J]. J Res Med Sci, 2018,23:110.
- [13] MA X, CHEN Z, WANG L, et al. The Pathogenesis of diabetes mellitus by oxidative stress and inflammation: its inhibition by berberine [J]. Front Pharmacol, 2018, 9:782.
- [14] 田硕,吴丽丽,张卫华,等. 基于 AMPK/ACC 信号通路探讨夏枯草提取物调节 ZDF 大鼠脂代谢的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(9):82-88.
- [15] Paul M, Hemshekhar M, Kemparaju K, et al. Berberine mitigates high glucose-potentiated platelet aggregation and apoptosis by modulating aldose reductase and NADPH oxidase activity [J]. Free Radic Biol Med, 2018,130:196-205.
- [16] MA H, HU Y, ZOU Z, et al. Antihyperglycemia and antihyperlipidemia effect of protoberberine alkaloids from *Rhizoma Coptidis* in HepG2 cell and diabetic KK-Ay mice [J]. Drug Dev Res, 2016,77(4):163-170.
- [17] 郑建雷,李忠杰,孙渴望,等. 三七总皂苷对高脂饮食糖尿病大鼠炎症因子和主动脉脂质代谢的影响[J]. 浙江医学,2018,40(15):1662-1666.
- [18] 侯宏,李学刚,李平,等. 黄连生物碱的提取纯化及降脂作用[J]. 长春中医药大学学报,2011,27(1):7-8.
- [19] CHEN Z H, LI J, LIU J, et al. Saponins isolated from the root of *Panax notoginseng* showed significant anti-diabetic effects in KK-Ay mice [J]. Am J Chin Med, 2008,36(5):939-951.
- [20] 郭爽,张强,田志浩,等. 三七总皂苷联用阿司匹林对后者抗血小板凝集作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(9):116-120.
- [21] Henry M L, Davidson L B, Wilson J E, et al. Whole blood aggregation and coagulation in db/db and ob/ob mouse models of type 2 diabetes [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2008,19(2):124-134.

[责任编辑 孙丛丛]