

黄芪六一汤抗糖尿病肾病的药效组分筛选研究

王群¹, 唐甜甜¹, 刘文^{1,2}, 吴增光¹, 张楠楠¹, 陈晓兰¹, 韩伟¹, 金阳²

1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550005

2. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 对黄芪六一汤中黄芪总皂苷、黄芪总黄酮、黄芪多糖及甘草酸、甘草总黄酮、甘草多糖分别进行提取、分离, 并筛选具有防治糖尿病肾病作用的药效组分。方法 单因素法筛选树脂型号、上样浓度和体积、洗脱溶剂及用量建立大孔吸附树脂法对黄芪总皂苷、总黄酮进行富集分离; 运用碱液萃取法对甘草酸、甘草总黄酮进行分离, 采用水提醇沉法对黄芪多糖、甘草多糖进行纯化。12周龄雄性 db/m 小鼠8只作为对照组, 将12周龄雄性 db/db 小鼠随机分为模型组、黄芪六一汤和各组分的高、低剂量(临床等效剂量的4、1倍)组, 小鼠一般情况及血生化指标以盐酸罗格列酮片(RSG)为阳性对照; 尿白蛋白(U-Alb)水平以缬沙坦分散片(API)为阳性对照, 每组8只。各组小鼠分别在ig给药12周前、后, 称质量。禁食12h, 自由饮水, 收集24h尿液, 马斯亮蓝法检测24h U-Alb浓度; 尾静脉采血测空腹血糖(FBG); 摘取眼球取血, 采用全自动生化分析仪检测血清血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)含量。对照组、模型组及黄芪六一汤高、低剂量组小鼠肾组织经固定、石蜡包埋切片, Masson染色后, 光学显微镜下观察。结果 制得的黄芪总黄酮、黄芪总皂苷、黄芪多糖、甘草酸、甘草总黄酮、甘草多糖质量分数分别为(70.58±2.16)%、(72.97±1.06)%、(67.12±2.60)%、(81.02±1.04)%、(53.56±1.63)%、(64.62±1.27)%。与模型组比较, 给予黄芪六一汤治疗后的各组小鼠肾纤维化程度较轻; 与给药前比较, 模型组小鼠体质量显著减轻($P<0.05$), 甘草总黄酮高、低剂量和甘草多糖低剂量组体质量显著降低($P<0.05$ 、 0.01), 其他给药组无显著差异; 与模型组比较, 黄芪六一汤、黄芪总皂苷、黄芪多糖、黄芪总黄酮、甘草酸FBG、24h U-Alb显著降低($P<0.05$ 、 0.01), 黄芪总皂苷、黄芪六一汤、黄芪总黄酮、甘草酸组Scr显著降低($P<0.05$ 、 0.01), 黄芪六一汤、黄芪多糖、甘草酸、黄芪总黄酮组BUN显著降低($P<0.05$ 、 0.01), 黄芪六一汤、黄芪总皂苷、甘草酸、黄芪多糖高剂量组TG显著降低($P<0.05$ 、 0.01), 黄芪六一汤、黄芪总皂苷、黄芪总黄酮、黄芪多糖组TC显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。结论 各组分确定的制备工艺稳定、科学、可行; 黄芪总皂苷、黄芪总黄酮、黄芪多糖、甘草酸可能是黄芪六一汤防治糖尿病肾病的药效物质基础。

关键词: 黄芪六一汤; 大孔树脂; 碱液萃取; 糖尿病肾病; 黄芪总皂苷; 黄芪总黄酮; 黄芪多糖; 甘草酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)04-0730-16

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.04.007

Pharmacodynamic screening of active constituents of Huangqi Liuyi Decoction to against diabetic nephropathy

WANG Qun¹, TANG Tiantian¹, LIU Wen^{1,2}, WU Zengguang¹, ZHANG Nannan¹, CHEN Xiaolan¹, HAN Wei¹, JIN Yang²

1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550005, China

2. Key Laboratory of Pharmaceutical Formulations in Guizhou Province, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective The total astragaloside (TA), total flavonoids of astragalus (TFA), astragalus polysaccharide (AP), glycyrrhizic acid (GA), total flavonoids of glycyrrhiza (TFG) and glycyrrhiza polysaccharide (GP) in Huangqi Liuyi Decoction (HLD) were extracted and separated respectively, and the effective components with the effect of preventing and treating diabetes nephropathy were screened. **Methods** Single factor method was used to screen resin type, sample concentration and volume, elution solvent and dosage. A macroporous adsorption resin method was established to enrich and separate TA and TFA. Using alkaline extraction method to separate GA and TFG, purifying AP and GP using water extraction and alcohol precipitation. Eight 12 weeks old male db/

收稿日期: 2024-03-07

基金项目: 贵州省普通高等学校青年科技人才成长项目(黔教合KY字[2022]257号); 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2023]一般416); 2023年度贵州中医药大学学术新苗项目(贵科合学术新苗[2023]-13号); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(黔卫健函[2024]24号)

第一作者: 王群(1988—), 女, 博士, 讲师, 主要从事药效物质基础与药物代谢动力学研究。E-mail: gywq198856@163.com

m mice were used as control group. The 12 weeks old male db/db mice were randomly divided into model group, and high-dose and low-dose groups of HLD and each component (4 or 1 times the clinical equivalent dose), the general situation and blood biochemical indicators of mice were compared with rosiglitazone hydrochloride tablets (RSG) as positive controls, urinary albumin (U-Alb) levels were measured using valsartan dispersible tablets (API) as a positive control, with eight mice in each group. Each group of mice was weighed before and after 12 weeks of ig administration. Fasting for 12 hours, drinking water freely, collecting urine for 24 hours, and detecting the concentration of U-Alb for 24 hours using the Maas Brilliant Blue method. Tail vein blood collection for FBG measurement. Eye extraction and blood collection were performed, and serum creatinine (Scr), urea nitrogen (BUN), triglycerides (TG), and total cholesterol (TC) levels were detected using a fully automated biochemical analyzer. The renal tissues of mice in the control group, model group, and high-dose and low-dose groups of HLD were fixed, paraffin embedded, and sectioned. After Masson staining, they were observed under an optical microscope. **Results** The mass fraction of TA, TFA, AP, GA, TFG, and GP were $(70.58 \pm 2.16)\%$, $(72.97 \pm 1.06)\%$, $(67.12 \pm 2.60)\%$, $(81.02 \pm 1.04)\%$, $(53.56 \pm 1.63)\%$, and $(64.62 \pm 1.27)\%$. Compared with model group, the degree of renal fibrosis in each group of mice treated with HLD was milder. Compared with before administration, the body weight of the model group mice decreased significantly ($P < 0.05$), while the body weight of the high and low doses of TFG and low doses of GP decreased significantly ($P < 0.05, 0.01$), and there was no significant difference in the other administration groups. Compared with the model group, FBG and 24-hour U-Alb in HLD, TA, AP, TFA, GA group were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), while the Scr of TA, HLD, TFA, and GA groups was significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), the BUN of HLD, AP, GA, and TFA groups was significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), the TG level of HLD, TA, GA, and AP groups also showed a significant decrease ($P < 0.05, 0.01$). TG significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), while TC significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$) in the HLD, TA, TFA, and AP groups. **Conclusion** The TA, TFA, GA and AP are the main ingredients in HLD against diabetic nephropathy.

Key words: Huangqi Liuyi Decoction; macroporous adsorptive resin; alkaline extraction; diabetic nephropathy; total astragaloside; total flavonoids of astragalus; astragalus polysaccharide; glycyrrhizic acid

糖尿病肾病是糖尿病常见的微血管并发症,临床表现为持续性水肿、蛋白尿、高血压、肾功能下降等症状,最终导致末期肾衰竭。早期诊断和治疗糖尿病肾病具有十分重大的意义^[1-4]。中药应用于糖尿病肾病的治疗越来越广泛,在改善糖尿病肾病客观指标及远期疗效方面都显示了其独特优势^[5-6]。黄芪六一汤始载于《太平惠民和剂局方》,具有大补肺气、滋益肾水、调和脾胃的功效,由黄芪60 g、甘草10 g组成。黄芪能抑制肾间质纤维化形成,降低糖尿病肾病大鼠血清中细胞生长因子、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,具有减缓糖尿病肾病发展进程的功^[7];而甘草可通过降糖、调脂及抗肾脏氧化应激等作用,起到防治糖尿病肾病的功效^[8]。研究表明,黄芪六一汤能抑制肾小管上皮细胞葡萄糖重吸收,具有降低糖尿病小鼠空腹血糖(FBG)和糖化血红蛋白、抑制肾纤维化病变的作用^[9-10]。

中药在临床上多以饮片入药,饮片及其制剂质量不易控制;且中药多成分、多靶点的优势难以体现,严重阻碍了中药复方的深入研究及新药开发。根据复方的功能主治筛选出每一味中药发挥复方药效的有效组分或部位,进一步将有效组分制备成

一定程度上能代替中药复方的简化系统,并探讨组分配伍替代饮片配伍的可行性,可有效解决这一问题^[11]。研究表明^[12-15],黄芪、甘草中主要包括皂苷、黄酮和多糖类成分,本课题基于“组方中药”理念,结合相关分离技术对黄芪六一汤中各组分分别进行提取、分离,并运用2型糖尿病肾病小鼠模型,筛选黄芪六一汤中抗糖尿病肾病的药效组分,对经方黄芪六一汤进行二次开发与研究,可为中药传统经方的深层次开发与运用提供有益的思路和理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

201-2AB 电热鼓风干燥器(天津市泰斯特仪器有限公司);THZ-82 水浴恒温振荡器(常州市中贝仪器有限公司);DRHH-S4 数据恒温水浴锅(上海市双捷实验设备有限公司);KQ-300DE 数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);Lc-2040C3D 高效液相色谱仪、UV-2700 紫外可见分光光度计[岛津仪器(苏州)有限公司];ELSD 800 蒸发光散射检测器(杭州瑞析科技有限公司);cobacc501 罗氏全自动生化分析仪(Roche 公司);三诺血糖仪(长沙三诺生物传感技术有限公司);Allegra X-30 R 低温高速离心机(美国贝克曼公司)。

1.2 药物及主要试剂

黄芪(批号170805、170823、170901)、甘草(批号170805、170823、170901),四川盛世锦荣药业有限公司。黄芪、甘草经贵州中医药大学谢军丽讲师鉴定分别为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 干燥根和根茎。

盐酸罗格列酮片(RSG,批号210623,贵州圣济堂制药有限公司);缙沙坦分散片(API,批号220201,山东益健药业有限公司)。

尿白蛋白(U-Alb)检测试剂盒(批号20180416)、血肌酐(Scr)检测试剂盒(批号20180108)、尿素氮(BUN)检测试剂盒(批号20171215)、总胆固醇(TC)检测试剂盒(批号20181005)、三酰甘油(TG)检测试剂盒(批号20171203),均购自南京建成生物工程研究所。黄芪甲苷(批号201610,质量分数 $\geq 97\%$)、甘草酸(批号201619,质量分数 $\geq 98\%$)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号101606,质量分数 $\geq 97\%$)、芒柄花苷(批号201608,质量分数 $\geq 98\%$)、毛蕊异黄酮(批号201618,质量分数 $\geq 98\%$)、芒柄花素(批号201504,质量分数 $\geq 98\%$)、甘草苷(批号201607,质量分数 $\geq 98\%$)、无水-D葡萄糖(批号201506)均购于中国食品药品检定院。双氧水(成都金山化学试剂有限公司);乙腈、甲醇(色谱级),其余试剂均为分析纯。

1.3 实验动物

共计144只小鼠,其中136只10周龄雄性db/db小鼠,体质量(49.39 ± 9.82)g;8只同周龄db/m小鼠,体质量(28.44 ± 1.67)g,购自南京大学模式动物研究所,实验动物生产许可证号SCXK(苏)2018-0008,饲养于通风良好、室温 $18 \sim 25$ °C、相对湿度 $50\% \sim 70\%$ 、按常规定期消毒的动物房,按每笼4只分装,由专人饲养管理。小鼠人性化饲养,自由饮水及饲料。喂养2周,以12周龄的db/db小鼠作为模型组,同周龄db/m小鼠作为对照组。动物实验经贵州医科大学实验动物伦理委员会许可,动物伦理号NO.1902092,实验操作和处理严格遵循国际准则。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、甘草酸、甘草苷对照品,甲醇定容至10 mL量瓶中,质量浓度分别为0.505、0.507、0.519、0.523、0.522、0.503、

0.506 mg·mL⁻¹,备用。

多糖以无水葡萄糖作为对照品,超纯水溶解,定容质量浓度为0.987 0 mg·mL⁻¹,备用。

2.2 检测方法

2.2.1 黄芪黄酮部位的检测方法^[16] HPLC检测方法:C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm,Waters),检测波长为260 nm,柱温40 °C,体积流量1 mL·min⁻¹,流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸水(B),梯度洗脱:0~20 min,6%→40% A;20~30 min,40% A;30~35 min,40%→80% A;35~46 min,80%→6% A。

UV检测方法:精密移取适量待测样品溶液,以毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液为参比溶液,在260 nm波长下测定吸光度(A)值。

2.2.2 黄芪皂苷部位的检测方法 HPLC检测方法:C₁₈色谱柱(Waters,150 mm×4.6 mm,5 μm,Ireland,WAT04509),流动相:乙腈(A)-水(B)为32:68,蒸发光散射检测器,漂移管温度50 °C,氮气3.0 Bar,柱温40 °C,进样量10 μL,体积流量为1 mL·min⁻¹。

UV检测方法:精密移取适量待测样品溶液,以黄芪甲苷对照品溶液为参比溶液,在535 nm波长下测定其A值,重复3次。

2.2.3 甘草酸及甘草黄酮部位的检测方法 HPLC检测方法:色谱柱:C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm,Waters);流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸水(B),检测波长为237 nm,柱温40 °C,进样量10 μL,体积流量为1 mL·min⁻¹,梯度洗脱:0~15 min,20%→40% A;15~21 min,40%→90% A;21~35 min,90%→20% A。

UV检测方法:精密移取1 mL待测样品溶液,以甘草苷对照品溶液为参比溶液,分别加入1 mL的10% KOH溶液,70%乙醇加至刻度线,反应20 min,在200~800 nm波长扫描,得到最大吸收波长为337 nm。

2.2.4 多糖的检测方法 分别取供试样品和无水葡萄糖对照品溶液各1 mg,加入5%苯酚溶液1 mL,立刻加入5 mL的硫酸溶液,水浴加热20 min,取出迅速冷却至室温,在490 nm波长下检测其A值。

2.3 各组分的制备工艺

运用大孔吸附树脂对黄芪总皂苷、总黄酮进行富集分离;运用碱液萃取法对甘草酸、甘草总黄酮进行分离;采用水提醇沉法对黄芪多糖及甘草多糖进行精制,制备工艺流程见图1。

2.3.1 黄芪醇提取方法的确定 影响黄芪皂苷及

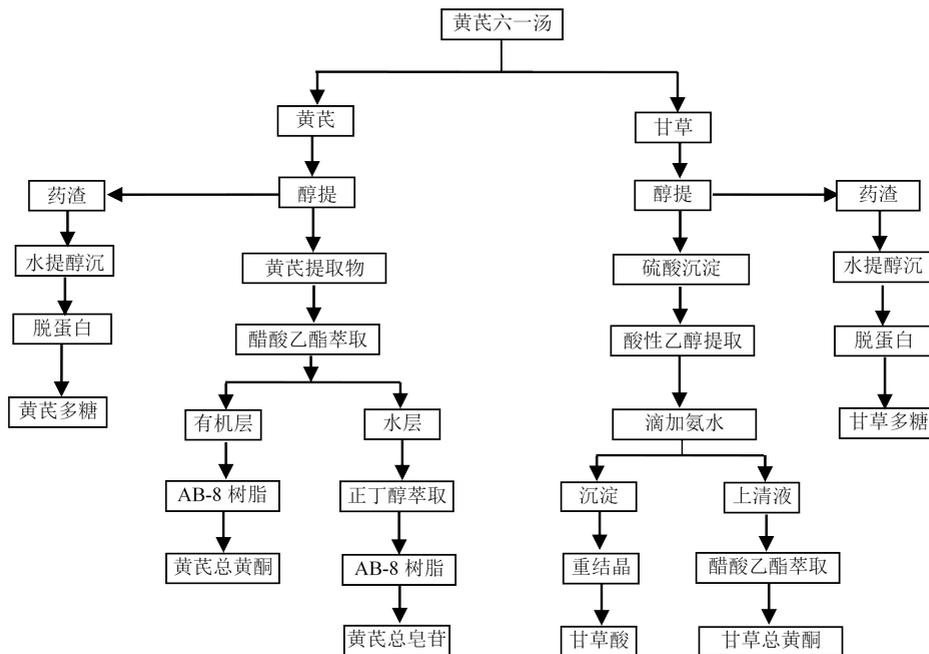


图1 各组分的制备工艺

Fig. 1 Preparation technology of each component

黄酮提取的因素主要有提取溶剂种类、提取溶剂的用量、提取时间、次数等。故采用正交实验设计^[17], 采用“2.2项”下方法, 测定黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的质量分数作为评价指标; 对乙醇体积分数(40%、60%、80%)、固液比(1:6、1:8、1:10)、提取时间(1、2、3 h)、次数(1、2、3次)等因素进行考察, 所确定的黄芪醇提方法为: 8倍量80%乙醇, 提取3次, 每次提取2 h。根据优选出来的最佳提取工艺, 平行操作

3次, 实验结果见表1。

2.3.2 甘草醇提取方法的确定 采用氨水碱化的乙醇溶液对甘草有效成分进行提取。采用正交实验设计^[18], 以甘草酸、甘草苷为评价指标; 对溶剂种类(40%、60%、80%)、固液比(1:6、1:8、1:10)、提取时间(1、2、3 h)、氨水浓度(0.1%、0.3%、0.5%)进行考察。所确定的甘草提方法为: 加入6倍量80%乙醇, 0.3%的氨水, 提取3次, 提取3 h。平行操作3次, 实验结果见表2。

表1 黄芪醇提工艺验证结果

Table 1 Results of ethanol extraction process of *Radix Astragali*

| 试验号 | 称样量/g | 出膏率/% | 黄芪甲苷/ (mg·g ⁻¹) | 毛蕊异黄酮葡萄糖苷/ (mg·g ⁻¹) | 芒柄花苷/ (mg·g ⁻¹) | 毛蕊异黄酮/ (mg·g ⁻¹) | 芒柄花素/ (mg·g ⁻¹) |
|-------|----------|-------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 10.062 5 | 26.57 | 8.47 | 1.99 | 0.76 | 0.47 | 0.24 |
| 2 | 10.093 2 | 25.98 | 8.35 | 1.98 | 0.75 | 0.51 | 0.26 |
| 3 | 10.058 1 | 27.08 | 8.45 | 1.91 | 0.76 | 0.48 | 0.24 |
| 均值 | / | 26.54 | 8.43 | 1.96 | 0.76 | 0.48 | 0.25 |
| RSD/% | / | 2.07 | 0.78 | 2.10 | 0.78 | 3.71 | 4.28 |

表2 甘草醇提工艺验证结果

Table 2 Results of ethanol extraction process of *Glycyrrhiza uralensis*

| 试验号 | 称样量/g | 出膏率/% | 甘草酸/mg | 甘草酸/(mg·g ⁻¹) | 甘草苷/mg | 甘草苷/(mg·g ⁻¹) |
|-------|-------|-------|--------|---------------------------|--------|---------------------------|
| 1 | 10.05 | 27.86 | 312.78 | 31.11 | 85.51 | 8.50 |
| 2 | 10.03 | 27.61 | 320.98 | 31.99 | 82.86 | 8.26 |
| 3 | 10.06 | 26.95 | 328.64 | 32.66 | 84.02 | 8.35 |
| 均值 | / | 27.47 | 320.80 | 31.92 | 84.13 | 8.37 |
| RSD/% | / | 1.71 | 2.47 | / | 1.58 | / |

2.4 黄芪总黄酮的分离精制

2.4.1 树脂型号的筛选 黄芪醇提取液(浓缩至 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),用4倍量醋酸乙酯萃取4次,合并萃取液,除去醋酸乙酯,配制成质量浓度为 $2.17 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的上样溶液。以 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 体积流量上样,采用“2.2.1项”下方法,测定流出液中各指标成分含量,以分别考察树脂 D101、DA-201、AB-8、DM130、聚酰胺对黄芪总黄酮的吸附率、解吸率的影响。结果得知,AB-8对指标成分吸附率最优,且解吸率最

佳,故选择AB-8作为本实验的分离纯化树脂,实验结果见图2。

2.4.2 上样体积的考察 称取AB-8树脂6g(以干树脂计),加入质量浓度为 $2.17 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的上样溶液,以 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 体积流量上样,每个床容积(BV)10 mL为1份流出液,共计15份。采用“2.2.1项”下方法,测定流出液中各指标成分含量。结果得知,样品上样6BV时开始漏出,15BV时基本饱和。为减少样品的泄露,选择上样体积为60 mL,即为6 BV,结果见图3。

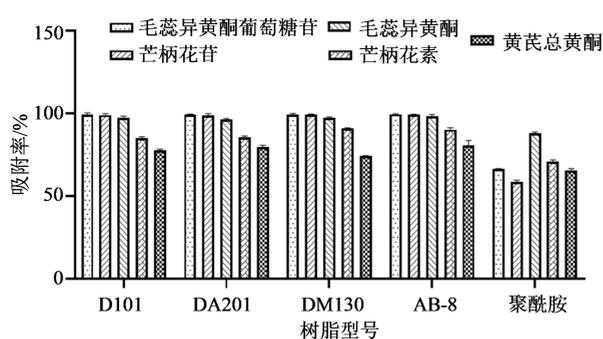


图2 不同大孔树脂对各指标成分分离纯化效率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of different macroporous resins on separation efficiency of each component ($\bar{x} \pm s, n=3$)

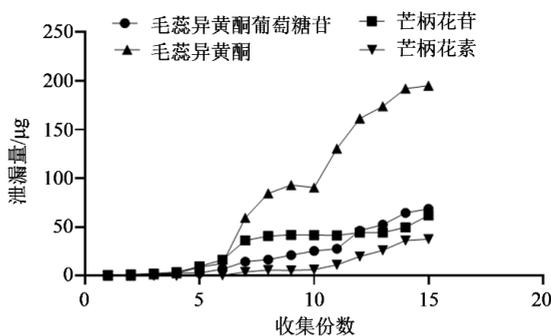
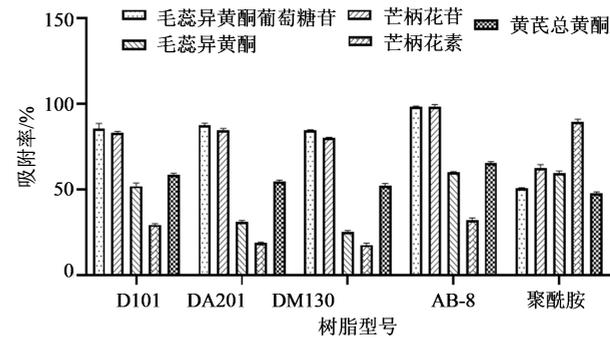
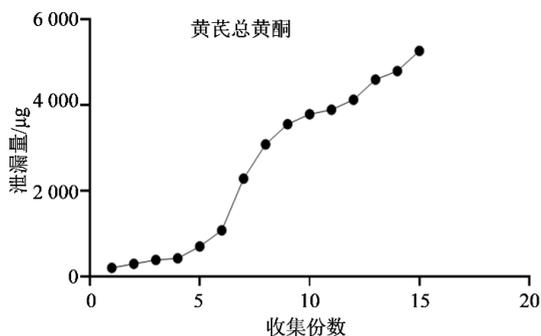


图3 AB-8树脂动态吸附泄露曲线

Fig. 3 Dynamic adsorption curve of AB-8 resin

2.4.3 上样质量浓度的考察 称取AB-8树脂6g,样品分别以 0.45 、 0.61 、 1.18 、 2.17 、 $4.17 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 等不同质量浓度、 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 体积流量上样,收集流出液,平行操作3次,采用“2.2.1项”下方法,测定流出液中各指标成分含量。结果得知,随着上样液质量浓度的增加,黄芪总黄酮的吸附量及吸附率呈现先增加后降低趋势,质量浓度 $2.17 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时吸附率最高,而后降低,为避免药物泄露和浪费树脂,选取上样质量浓度为 $2.17 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果见图4。

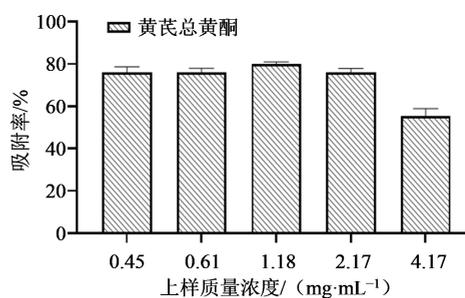


图4 样品浓度对AB-8树脂吸附效率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of sample concentration on adsorption efficiency of AB-8 resin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.4.4 洗脱溶剂的考察 称取AB-8树脂6g,样品以 $2.17 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度上样,上样体积为60 mL,体积流量 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,分别以10%、30%、50%、70%、90%的乙醇及水作为洗脱剂,以 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 体积流量进行洗脱,按每份25 mL收集泄漏液,每个浓度洗

脱液4份,测定泄漏液中各指标成分的含量,绘制泄漏曲线。结果得知,总黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮主要分布在30%的乙醇洗脱液中;芒柄花苷主要分布在30%~50%的乙醇洗脱液中。水洗

部分指标成分含量较少,但水洗可去除大量多糖、蛋白质等极性较大的杂质,故先以5BV水溶液洗脱后,再用30%的乙醇洗脱指标成分,结果见图5。

2.4.5 洗脱剂用量的考察 称取AB-8树脂6g,样品以 $2.17\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度上样后,先以100 mL纯水洗脱至无色后;用30%乙醇200 mL、 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 进行洗脱,收集漏出液,每份10 mL,共15份,测定各指标成分含量。结果得知,总黄酮及毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷在第12份洗脱剂(12BV)时洗脱完毕;毛蕊异黄酮在第14份洗脱剂(14BV)时洗脱完毕;芒柄花素在第9份洗脱剂(9BV)时洗脱完毕,综合考虑,为避免溶剂浪费、提高洗脱效益,确定洗脱剂的用量为120 mL,即12BV,结果见图6。

2.4.6 验证试验 黄芪总黄酮最佳分离纯化工艺是:AB-8树脂,洗脱溶剂为12BV的30%乙醇,上样量6BV,上样质量浓度 $2.17\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,洗脱速率 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。3批黄芪中试样品分离纯化得总黄酮质量分数为 $(70.58\pm 2.16)\%$ 。其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素质量分数分别为 $(1.67\pm 0.08)\%$ 、 $(0.91\pm 0.09)\%$ 、 $(1.45\pm 0.10)\%$ 、 $(0.32\pm 0.02)\%$ 。

2.5 黄芪总皂苷的分离精制

2.5.1 树脂型号的筛选 取上述“3.3.1”项下的黄芪醋酸乙酯萃取液中的水层溶液,用4倍水饱和的

正丁醇萃取4次,合并正丁醇层,回收正丁醇。取30 mL黄芪总皂苷的萃取溶液(总皂苷质量浓度为 $3.82\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)上样,采用“2.2.2项”下方法,测定流出液中各指标成分含量,分别考察D101、DA-201、AB-8、DM130等树脂对黄芪总皂苷的吸附率、解析率。结果见图7,不同树脂对黄芪总皂苷的吸附、解析效果顺序为:AB-8>DM130>D101>DA201,不同树脂对黄芪甲苷的吸附效果顺序为:AB-8>DM130>DA201>D101,解析效果顺序为:AB-8>D101>DA201>DM130。综合黄芪总皂苷、黄芪甲苷的吸附和解析率,选择AB-8树脂作为纯化树脂。

2.5.2 上样体积的考察 称取AB-8树脂6g,样品(总皂苷质量浓度为 $3.82\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)以 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的体积流量上样,按每份10 mL收集流出液,共计15份。采用“2.2.2项”下方法,测定流出液中各指标成分含量,绘制泄漏曲线,得到树脂动态吸附曲线。结果见图8,流出液中黄芪总皂苷、黄芪甲苷的含量随着上样量的增加而增加,上样量在第6份之前各成分的吸附曲线上升缓慢,第7份以后吸附曲线开始上升,因此,为减少样品的泄露,更好的利用树脂,则上样的体积选择50 mL,即为5BV。

2.5.3 上样质量浓度的考察 称取AB-8树脂6g,不同质量浓度的样品(黄芪总皂苷质量浓度分别为

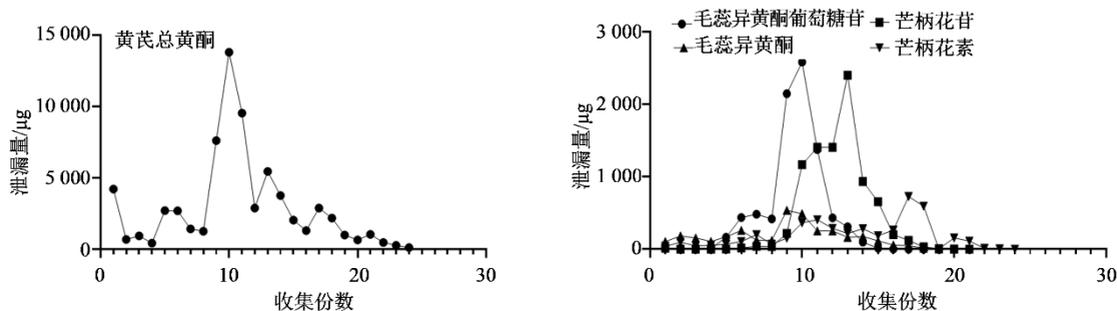


图5 不同洗脱剂对指标成分洗脱效率的影响

Fig. 5 Effect of different eluents on elution efficiency of index components

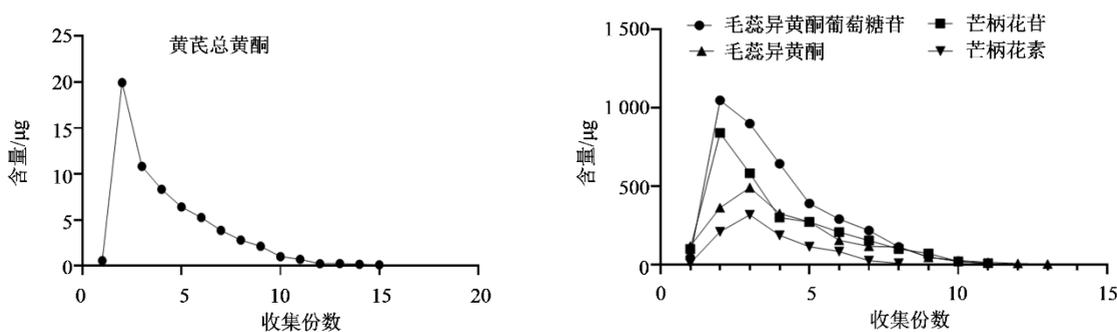


图6 洗脱剂用量对指标成分洗脱效率的影响

Fig. 6 Effect of eluent dosage on elution efficiency of index components

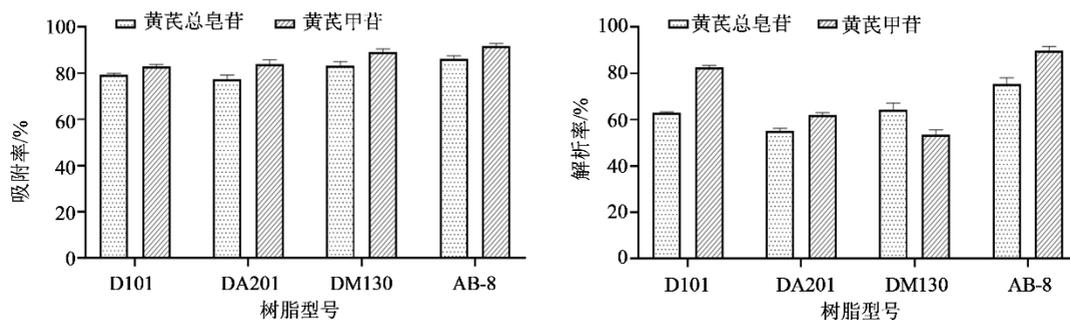


图7 不同树脂对各指标成分分离纯化效率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of different macroporous resins on separation efficiency of each component ($\bar{x} \pm s, n=3$)

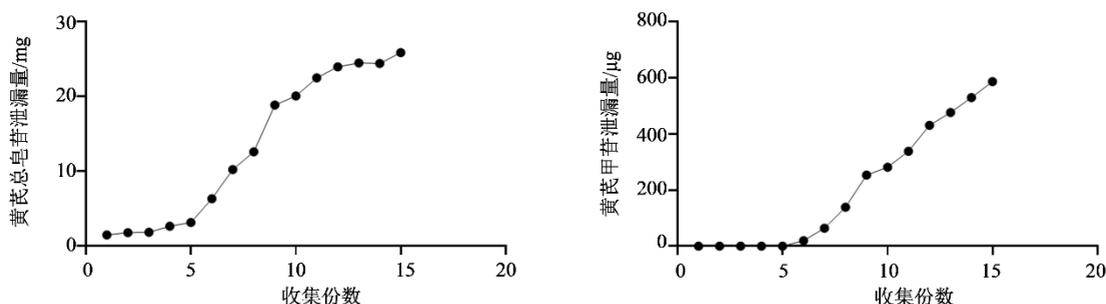


图8 AB-8树脂动态吸附泄露曲线

Fig. 8 Dynamic adsorption curve of AB-8 resin

0.96、2.73、3.82、5.23 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，相应的黄芪甲苷质量浓度为0.024 9、0.089 8、0.125 4、0.171 7 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ），以 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的体积流量上样，收集流出液，检测流出液中指标成分的含量。结果见图9，随着上样浓度的增加，树脂对药物的吸附量逐渐增加，但浓度越大，药物的泄露量就越多，吸附率反而下降。当质量浓度为 $3.82 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时树脂的动态吸附量趋近饱和，吸附率为70.45%，因此，确定上样质量浓度为 $3.82 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5.4 洗脱溶剂的考察 称取 AB-8 树脂 6 g，样品以 $3.82 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度（以总皂苷计）上样后，上样体积 50 mL，分别用水、10%、30%、50%、70%、90% 乙醇，各 100 mL 进行洗脱，每 25 毫升收集 1 份，检测流出液中指标成分的含量。结果见图 10，黄芪总皂

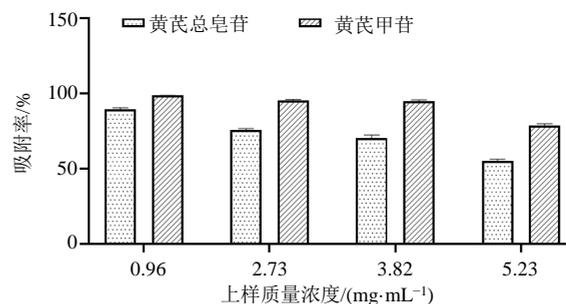


图9 不同上样质量浓度对各成分吸附率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effect of different sample concentration on adsorption rate of each component ($\bar{x} \pm s, n=3$)

苷和黄芪甲苷主要存在于 50%~70% 的乙醇洗脱液中，且 50% 的洗脱液中含量最高，因此选 50% 的乙醇作为洗脱液。

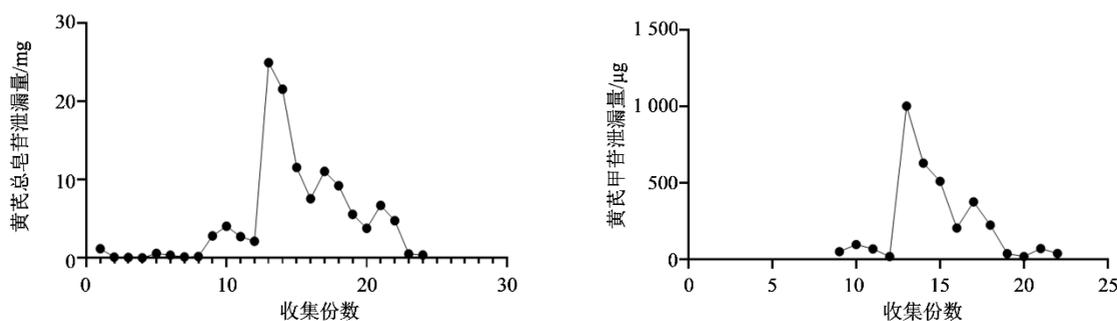


图10 不同洗脱剂对指标成分洗脱效率的影响

Fig. 10 Effect of different eluents on elution efficiency of index components

2.5.5 洗脱剂用量的考察 称取 AB-8 树脂 6 g, 样品以 $3.82 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度(以总皂苷计)上样后, 上样体积 50 mL, 先以 50 mL 水将树脂洗脱至无色, 再用 50% 乙醇以 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 进行洗脱, 收集洗脱液,

每份 10 mL, 共 15 份, 检测流出液中指标成分的含量。结果见图 11, 黄芪总皂苷在第 12 份基本被完全洗脱, 黄芪甲苷第 11 份洗脱液中未被检出, 故选取 120 mL 作为洗脱液的体积(12BV)。

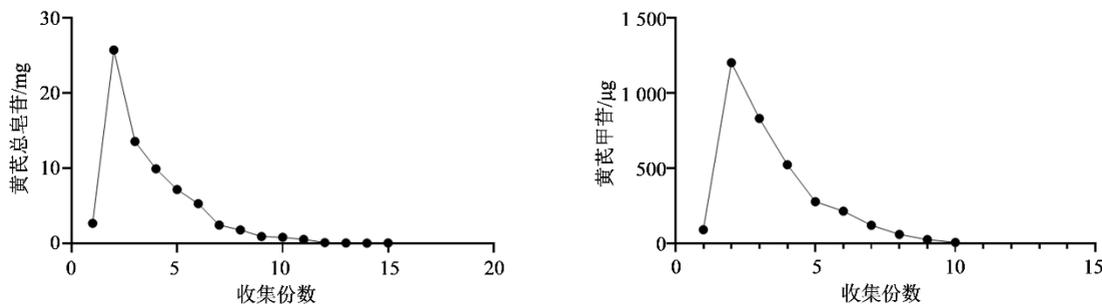


图 11 洗脱剂用量对指标成分洗脱效率的影响

Fig. 11 Effect of eluent dosage on elution efficiency of index components

2.5.6 验证试验 黄芪总皂苷最佳分离精制工艺是: 上样量 5BV, 上样质量浓度 $3.82 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 先以 5BV 水进行洗脱至无色, 再用 12BV 的 50% 乙醇以 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 进行洗脱。3 批黄芪中试样品分离纯化得黄芪总皂苷质量分数为 $(72.97 \pm 1.06)\%$, 其中含黄芪甲苷 $(2.72 \pm 0.1)\%$ 。

2.6 黄芪多糖的分离精制

取经醇提过的黄芪药渣, 采用水提醇沉法得到黄芪多糖粗品。取其粗品, 用超纯水配制成质量浓度 $8.73 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 取 500 mL 多糖粗品溶液, 离心去除沉淀, 加入 sevag 试剂(三氯甲烷: 正丁醇 = 5: 1) 对其进行脱蛋白处理, 离心除去蛋白和有机试剂后, 氨水调节 pH 到 8.0, 加入相当于溶液体积的 20% 的双氧水, 置于 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴中反应 60 min, 反应结束后取出, 冷却至室温, 离心除去沉淀后, 溶液加入乙醇进行醇沉, 静置过夜, 离心, 取沉淀真空干燥, 即得黄芪多糖精制品。3 批黄芪中试样品分离精制得黄芪多糖质量分数为 $(67.12 \pm 2.60)\%$ 。

2.7 甘草酸、甘草总黄酮及多糖的分离精制

取“2.1.2”项下甘草醇提取液, 回收乙醇, 浓缩至 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (以生药量计), 加入硫酸调节 pH 至 3~4 使其沉淀完全, 滤过, 分离得到沉淀, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥。取适量干燥沉淀, 加入适量盐酸酸化的 95% 乙醇 (pH 为 3~4) 使其完全溶解, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡提取后, 冷却至室温, 滴加氨水, 使其完全沉淀, 滤过, 得沉淀(甘草酸粗品)和上清液(甘草黄酮部位), 沉淀加入冰醋酸重结晶, 抽滤即可甘草酸精制品。上清液用醋酸乙酯萃取, 收集上层溶液, 用 5% 碳酸钠溶液萃取除杂, 收集上层溶液, 干燥, 得到甘草黄酮。甘草多糖分离纯化工艺按上述“2.6”项下

方法。3 批甘草中试样品分离精制得甘草酸质量分数为 $(81.02 \pm 1.04)\%$, 甘草总黄酮质量分数为 $(53.56 \pm 1.63)\%$, 其中甘草苷质量分数为 $(0.11 \pm 0.02)\%$, 甘草多糖质量分数为 $(64.62 \pm 1.27)\%$ 。

2.8 各组分抗糖尿病肾病的药效实验

2.8.1 分组与给药 12 周龄雄性 db/m 小鼠 8 只作为对照组, 将 12 周龄雄性 db/db 小鼠随机分组, 每组 8 只。黄芪六一汤制备方法: 黄芪、甘草加 10 倍量水提取 3 次, 每次 1 h, 提取液浓缩成干浸膏(黄芪总皂苷质量分数为 6.32%, 黄芪总黄酮质量分数为 1.58%, 黄芪多糖质量分数为 13.09%, 甘草酸质量分数为 2.28%) 给药。黄芪六一汤临床生药用量分别为黄芪 $60 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ 、甘草 $10 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$, 合用 $70 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[10], 黄芪六一汤按上述用量换算 db/db 小鼠给药用量; 小鼠一般情况及血生化指标以 RSG 为阳性对照; U-Alb 指标以 API 为阳性对照; 黄芪六一汤及各组分高、低剂量组分别为临床等效剂量的 4、1 倍, 具体分组与给药剂量见表 3。各组均连续 ig 给药, 每天 1 次, 共 12 周, 对照组给予同体积蒸馏水。

2.8.2 标本收集 各组小鼠分别在给药 12 周前、后, 称质量。禁食 12 h, 自由饮水, 收集 24 h 尿液, 马斯亮蓝法检测 24 h 尿蛋白(24 h U-Alb)浓度; 尾静脉采血测空腹血糖(FBG); 10% 水合氯醛 ip 麻醉, 摘取眼球取血, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用, 采用全自动生化分析仪检测血清 Scr、BUN、TG、TC 含量。对照组、模型组及黄芪六一汤高、低剂量组小鼠肾组织经固定、石蜡包埋切片, Masson 染色后, 光学显微镜下观察。

2.8.3 数据统计分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计

表3 各组给药剂量
Table 3 Oral dosage of each group

| 组别 | 剂量/ (mg·kg ⁻¹) | 组别 | 剂量/ (mg·kg ⁻¹) |
|-------|-------------------------------|-------|-------------------------------|
| 黄芪六一汤 | 4 246.67 | 甘草总黄酮 | 105.64 |
| | 1 061.67 | | 26.41 |
| 黄芪总皂苷 | 233.32 | 甘草多糖 | 102.65 |
| | 58.33 | | 25.66 |
| 黄芪总黄酮 | 90.27 | RSG | 0.61 |
| | 22.57 | API | 12.13 |
| 黄芪多糖 | 566.75 | 对照 | / |
| | 141.69 | 模型 | / |
| 甘草酸 | 64.73 | | |
| | 16.18 | | |

分析采用SPSS 23(美国)单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA)。

2.9 药效实验结果

2.9.1 病理检查结果 对照、模型小鼠肾外形见图12。结果显示,12周龄db/db小鼠双肾较对照组小鼠明显肿大,肾表面不光滑,形状不规则。

病理切片图胶原纤维、黏液、软骨呈蓝色,胞浆、肌肉、纤维素、红细胞呈红色,胞核呈蓝黑色,主要是用来观察样品内纤维化病变。结果显示,糖尿病肾病模型小鼠肾小球基底膜及肾小管间质可见大量胶原纤维(蓝色),并显著多于对照组,胶原纤维沉积明显,肾小球内系膜基质增生,呈弥漫性或团块状,肾小球毛细血管基底膜弥漫增厚,肾组织病变明显。结合生化指标检测结果得知,12周龄

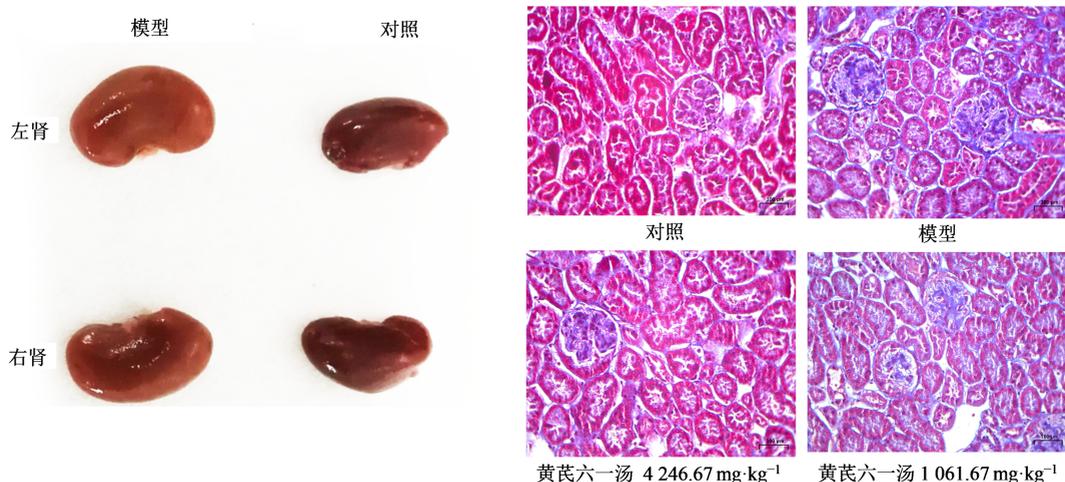


图12 各组小鼠肾外形观察及肾组织超微结构图(Masson, ×400)

Fig. 12 Appearance and pathological sectioning of kidney of mice in each group (Masson, ×400)

db/db小鼠可作为糖尿病肾病小鼠模型。给予黄芪六一汤治疗后的各组小鼠肾纤维化程度较轻,为下一步药效组分的筛选奠定了基础。

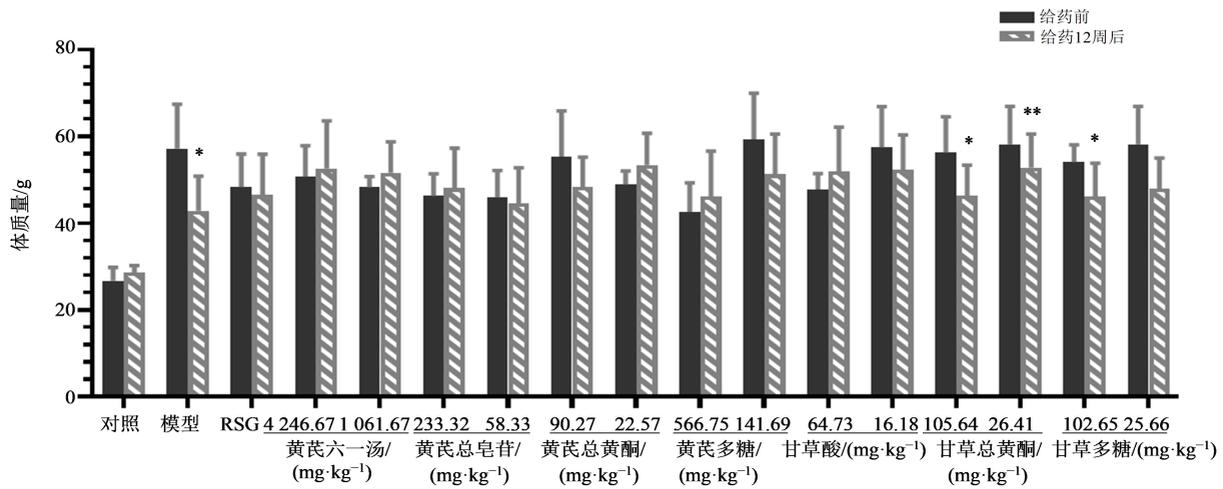
2.9.2 小鼠一般情况 对照组小鼠精神状态好,饮水、饮食与大小便正常,皮毛光泽,体质量逐渐增加。与给药前比较,模型组小鼠体质量减轻显著($P < 0.05$),行动迟缓,呈明显的“三多一少”糖尿病症状,多饮、多尿、多食、体质量下降;后期出现体毛稀疏、暗淡、反应迟钝,精神萎靡等症状。与给药前比较,甘草总黄酮高、低剂量和甘草多糖低剂量组体质量显著降低($P < 0.05$ 、 0.01),其他给药组无显著差异。结果见图13。

2.9.3 指标检测 各组小鼠FBG结果见图14。与对照组比较,模型组FBG显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,黄芪六一汤、黄芪总皂苷、黄芪多糖、

甘草酸高、低剂量组及黄芪总黄酮高剂量组FBG显著降低($P < 0.05$ 、 0.01);黄芪总黄酮低剂量及甘草总黄酮、甘草多糖高、低剂量组无显著性差异。与阳性药RSG组比较,其余各给药组FBG均有显著性差异($P < 0.05$)。

各组小鼠Scr结果见图15。与对照组比较,模型组Scr显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,黄芪总皂苷、黄芪六一汤、黄芪总黄酮、甘草酸高、低剂量组Scr显著降低($P < 0.05$ 、 0.01);黄芪多糖、甘草总黄酮、甘草多糖高、低剂量给药组无显著性差异。与阳性药RSG组比较,黄芪六一汤及黄芪总黄酮高剂量组Scr无显著差异。

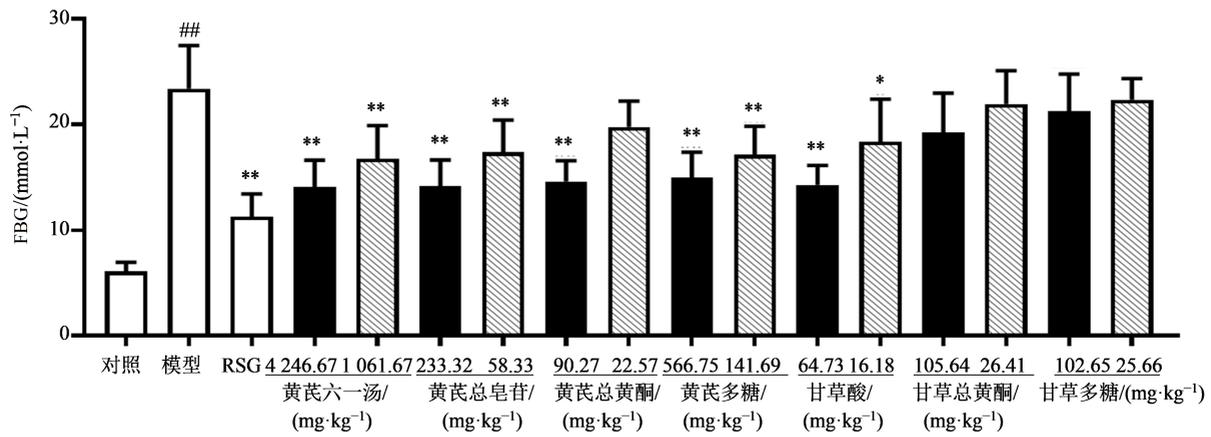
各组小鼠BUN结果见图16。与对照组比较,模型组BUN显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,黄芪六一汤、黄芪多糖、甘草酸低、高剂量组及黄芪



与给药前比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs before administration.

图 13 各组小鼠给药 12 周前、后的体质量 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

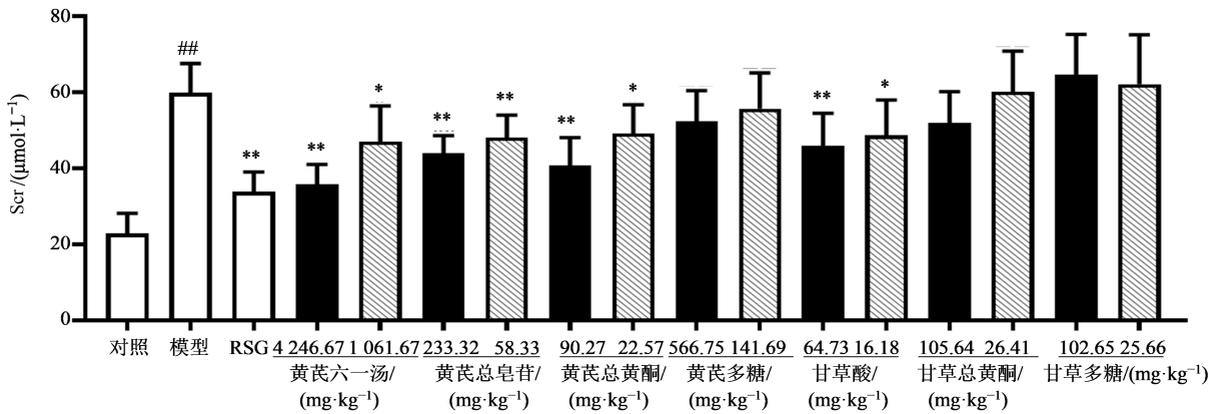
Fig. 13 Weight of mice in each group before and after 12 weeks of administration ($\bar{x} \pm s, n=8$)



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

图 14 给药 12 周后各组小鼠 FBG 的检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 14 FBG of each group after 12 weeks of administration ($\bar{x} \pm s, n=8$)



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

图 15 给药 12 周后各组小鼠 Scr 的检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 15 Results of Scr of each group after 12 weeks of administration ($\bar{x} \pm s, n=8$)

总黄酮高剂量组BUN显著降低($P < 0.05, 0.01$), 黄芪总黄酮低剂量及黄芪总皂苷、甘草总黄酮、甘草多糖高、低剂量给药组无显著性差异。与阳性药RSG组比较, 黄芪六一汤、黄芪多糖、甘草酸高剂量给药组BUN无显著差异。

各组小鼠TG结果见图17。与对照组比较, 模型组TG显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 黄芪六一汤, 黄芪总皂苷, 甘草酸高、低剂量组及黄芪多糖高剂量组TG显著降低($P < 0.05, 0.01$); 黄芪多糖低剂量及黄芪总黄酮、甘草总黄酮、甘草多糖高、低剂量给药组无显著性差异。与阳性药RSG组比较, 其余各给药组TG均有显著性差异。

各组小鼠TC结果见图18。与对照组比较, 模型组TC显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 黄芪六一汤、黄芪总皂苷、黄芪总黄酮、黄芪多糖高剂量

组TC显著降低($P < 0.05, 0.01$)。与阳性药RSG组比较, 其余各给药组TC均有显著性差异($P < 0.05$)。

各组小鼠24 h U-Alb结果见图19。与对照组比较, 模型组24 h U-Alb显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 黄芪六一汤, 黄芪总皂苷, 黄芪多糖, 甘草酸低、高剂量组及黄芪总黄酮高剂量组24 h U-Alb显著降低($P < 0.05, 0.01$); 黄芪总黄酮低剂量及甘草总黄酮、甘草多糖组无显著性差异。与阳性药API组比较, 黄芪六一汤、黄芪总皂苷、黄芪多糖高剂量组24 h U-Alb无显著差异。实验结果得知, 黄芪总皂苷、黄芪总黄酮、黄芪多糖、甘草酸可能是黄芪六一汤中防治糖尿病肾病的主要药效组分。

3 讨论

黄芪总黄酮、黄芪总皂苷主要的分离、纯化方式为大孔吸附树脂富集法。大孔吸附树脂主要以

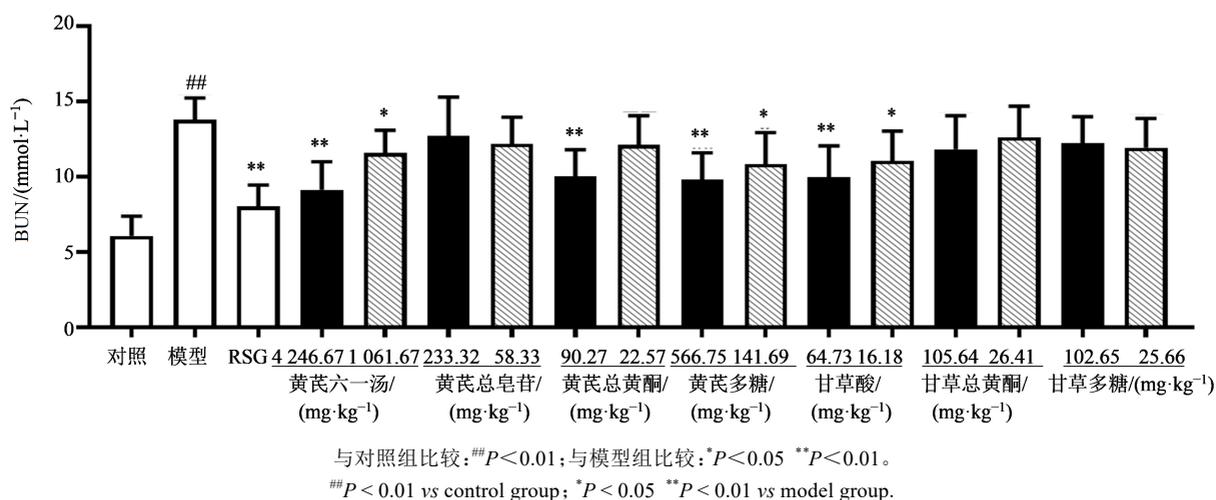


图16 给药12周后各组小鼠BUN的检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 16 Results of BUN of each group after 12 weeks of administration ($\bar{x} \pm s, n=8$)

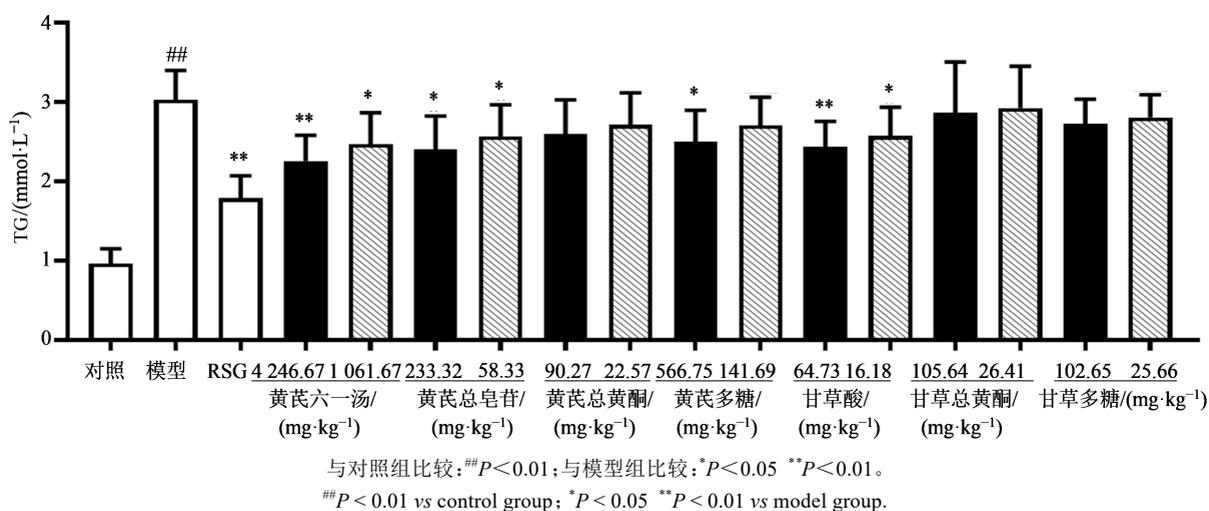
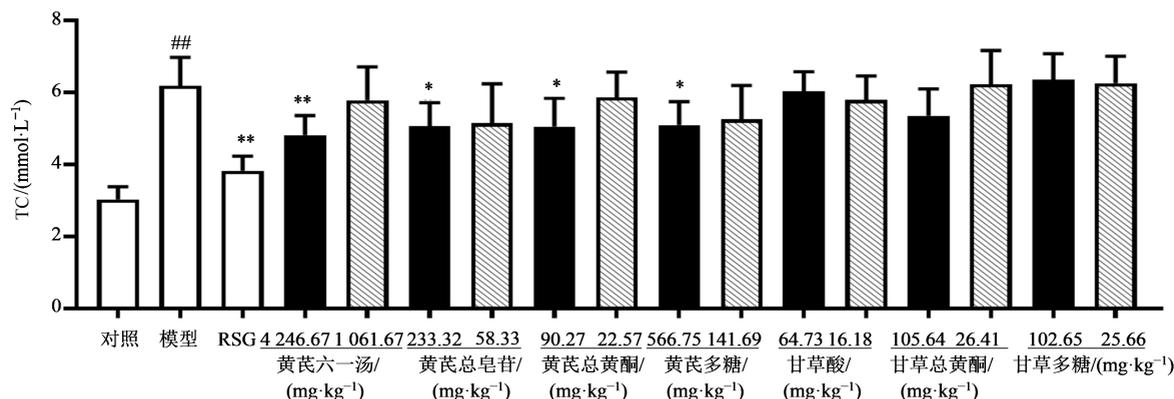


图17 给药12周后各组小鼠TG的检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

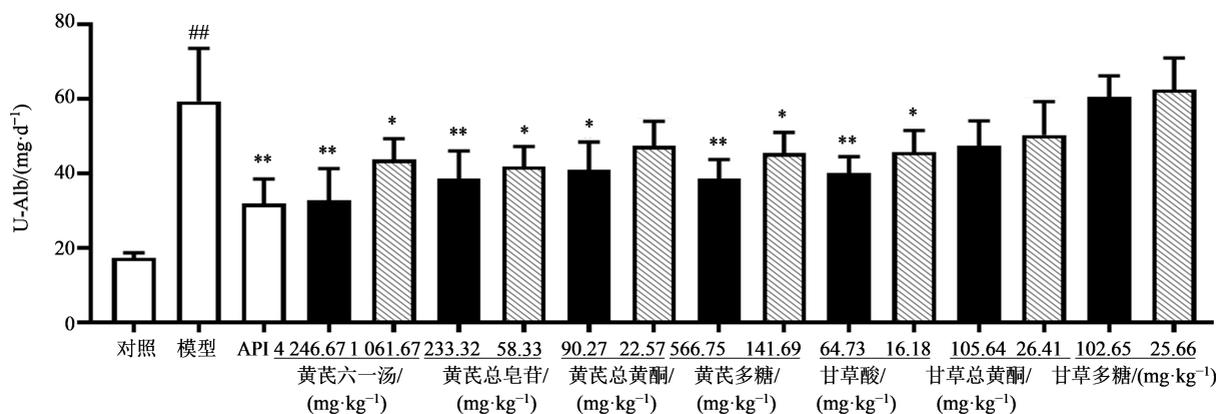
Fig. 17 Results of TG of each group after 12 weeks of administration ($\bar{x} \pm s, n=8$)



与对照组比较: ##*P*<0.01; 与模型组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01。
##*P*<0.01 vs control group; **P*<0.05 ***P*<0.01 vs model group.

图 18 给药 12 周后各组小鼠 TC 的检测结果 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 18 Results of TC of each group after 12 weeks of administration ($\bar{x}\pm s, n=8$)



与对照组比较: ##*P*<0.01; 与模型组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01。
##*P*<0.01 vs control group; **P*<0.05 ***P*<0.01 vs model group.

图 19 给药 12 周后各组小鼠 24 h U-Alb 的检测结果 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 19 Results of 24 h U-Alb of each group after 12 weeks of administration ($\bar{x}\pm s, n=8$)

吸附性和分子筛的原理对物质进行分离纯化,具有吸附性能好,吸附容量大,可重复利用等优点。影响大孔吸附树脂分离效果的因素有树脂上样量、样品浓度、洗脱速率等因素^[19-21]。本研究根据黄芪总黄酮和黄芪总皂苷极性的差异,先采用醋酸乙酯萃取出黄酮类成分,再利用正丁醇萃取皂苷类成分,最后用大孔树脂进一步对黄芪总黄酮、黄芪总皂苷进行纯化富集^[22],通过对大孔吸附树脂类型、上样量、样品浓度、洗脱速率等因素的优化,确定相应工艺参数。甘草酸、甘草总黄酮在酸性冷水中难溶,调节溶液的 pH 值,可制得甘草酸和甘草总黄酮粗品,甘草酸采用冰醋酸重结晶法制备得精制产品,甘草总黄酮粗品采用醋酸乙酯与碱性水溶液多次萃取除杂得精制产品^[23-24]。采用水提醇沉法初步得到黄芪多糖、甘草多糖粗品,而水作为提取溶剂,大量的极性物质也会一并被提取出来,如蛋白质、色

素、无机盐等。极大地影响了多糖的质量分数,进一步去除杂质很重要。本实验选择除蛋白质的经典方法 sevag 法及能脱去色素的双氧水法^[25-28],对黄芪多糖、甘草多糖粗品进行进一步的纯化。

db/db 小鼠是美国 Jackson 实验室从 C57BL/6J 小鼠中筛选的瘦素受体基因缺陷的突变系,具有自发形成 2 型糖尿病的特性,其发病过程与人类 2 型糖尿病非常相似。该小鼠 4 周龄后逐渐出现肥胖、高血脂、高血糖、糖尿等糖尿病症状,8~12 周龄开始出现糖尿病肾病并发症^[29]。实验结果显示,12 周龄 db/db 小鼠较对照组小鼠 FBG、BUN、Scr、TC、TG、24 hU-Alb 显著升高,肾病理组织切片显示,12 周龄 db/db 小鼠肾组织病变明显。故实验以 12 周龄 db/db 小鼠作为糖尿病肾病小鼠模型,同周龄 db/m 小鼠为对照组。

糖尿病是以高血糖为主要病理变化,伴有多种

代谢异常的临床综合征,如血脂代谢紊乱。糖尿病肾病是糖尿病常见的并发症,表现为持续性蛋白尿、水肿、肾功能下降等症状,尤其以持续性蛋白尿最为突出,是疾病临床诊断的重要指标。在药效中,需考察各给药组对小鼠血糖、代谢、肾功能的影响作用,故以FBG、Scr、BUN、TG、TC、24 h U-Alb作为药效指标。RSG属于噻唑烷二酮类的药物,其主要作用是增加机体对胰岛素的敏感性,以降低血糖。临床上主要用于2型糖尿病的治疗,故本实验以RSG作为阳性对照药,以考察各给药组对于血糖及继发性肾病变的改善作用。但根据相关文献^[30-31],考察药物对尿蛋白指标的影响,多以API作为阳性对照药。临床上API能抑制去甲肾上腺素释放,以促进激肽、前列腺素等合成,扩张周围血管以改善肾脏血液灌注,也能扩张出球小动脉,从而改善肾小球内高压及高滤过状态;减少蛋白尿,从而减缓慢性肾脏病的进展,更为贴合临床用药实际,故在考察各给药组对模型小鼠蛋白尿的改善作用时,采用API作为阳性对照药。

糖尿病是以糖代谢失常为主的一种常见内分泌性代谢疾病。中医将其归属为“消渴”范畴,认为其基本病机为阴津亏耗,燥热偏盛,肾阴亏虚为本,肺胃燥热为标,继而发病。而糖尿病肾病是糖尿病常见的微血管并发症,易发展成末期肾衰竭,严重威胁患者健康^[32]。黄芪六一汤出自《太平惠民和剂局方》,从古一直沿用至今,由临床上常用于治疗糖尿病的中药黄芪、甘草所组成。该方上行化生津液、大补肺气、滋益肾水;中焦调和脾胃、消解内蕴积热;外固腠理,两药合用生津液、补元气、解百毒。现代研究表明^[33-35],黄芪六一汤可能通过改善新陈代谢通路从而对2型糖尿病起到治疗作用,且能显著降低糖尿病大鼠FBG、糖化血红蛋白、升高胰岛素水平,改善胰岛损害。本实验在黄芪六一汤的基础上,采用现代提取、分离手段及药效实验,筛选黄芪及甘草中的抗糖尿病肾病组分。从实验结果得知,黄芪总皂苷、黄芪总黄酮、黄芪多糖、甘草酸可能是黄芪六一汤中防治糖尿病肾病的主要药效组分。其中,黄芪总皂苷及甘草酸高、低剂量组对FBG、Scr、BUN、TG、24 h U-Alb均有改善作用,疗效呈剂量相关性。黄芪总黄酮对Scr、TC改善效果较好,疗效呈剂量相关性。黄芪多糖对FBG、BUN、U-Alb均有改善作用,对于BUN的改善作用较其他组分效果好。由此可知,黄芪总皂苷、黄芪总黄酮、黄芪多糖、甘草酸对不同的生化指标,药效趋势存在

一定差异。研究表明^[36-38],黄芪甲苷为黄芪总皂苷主要活性成分,具有减少肾小管上皮细胞凋亡、肾小球系膜细胞、保护足细胞等作用,可延缓糖尿病肾病的肾纤维化进展。黄芪总黄酮主要涉及炎症反应过程、氧化应激过程、凋亡与自噬等生物过程,能通过调节AGE-RAGE、PI3K/Akt、VEGF、IL-17和MAPK等信号通路来发挥治疗肾病综合征的作用^[39-41]。黄芪多糖能增强肾组织对胰岛素的敏感性,改善胰岛素信号通路障碍,能降低肾皮质*NF- κ B* mRNA水平,上调*I κ B* mRNA表达,通过调节游离脂肪酸引起的小鼠足细胞凋亡,减轻蛋白尿^[42]。甘草酸对糖尿病大鼠肾小球损伤具有一定的保护作用,其机制可能是通过抑制糖尿病大鼠肾小球 α -SMA的表达,抑制肾小球系膜细胞的增殖,降低系膜基质积聚,从而减轻糖尿病肾脏肾小球病理损害^[8]。不同的组分对于保护糖尿病肾病疗效及机制各有不同。

黄芪总皂苷、黄芪总黄酮、黄芪多糖、甘草酸提取及分离工艺稳定、可靠、重复性良好,可用于各组分的制备。黄芪总皂苷等4个组分能延缓肾损伤病变发展进程,对肾脏具有保护作用,可能是黄芪六一汤抗糖尿病肾病的主要有效物质基础,实验结果可为中药抗糖尿病肾病的新药研发及临床运用奠定坚实的基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hou X Y, Du K R, Yang X J, et al. Progress in the study of chronic inflammatory mechanism of diabetic nephropathy [J]. *Adv Clin Med*, 2022, 12(7): 6019-6025.
- [2] Appel G. Detecting and controlling diabetic nephropathy: What do we know? [J]. *Cleveland Clin J Med*, 2013, 80(4): 209-217.
- [3] 余萍, 刘欢, 李刚. 基于数据挖掘技术对2型糖尿病肾病进展的影响因素分析 [J]. *中南药学*, 2021, 19(4): 741-745.
Yu P, Liu H, Li G. Influence factors for type 2 diabetic nephropathy development by data mining technology [J]. *Cent South Pharm*, 2021, 19(4): 741-745.
- [4] 刘裔凯, 罗说明, 邓敏, 等. 糖尿病肾病诊断与治疗新进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(8): 688-691, 706.
Liu Y K, Luo S M, Deng M, et al. Progress in diagnosis and treatment of diabetic nephropathy [J]. *Chin J Arterioscler*, 2020, 28(8): 688-691, 706.
- [5] 张雪辰, 王镁. 中药药对治疗糖尿病肾病的药理作用及临床应用研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25

- (9): 228-234.
Zhang X C, Wang M. Research progress on pharmacological effect and clinical application of traditional Chinese medicinal pair in treatment of diabetic nephropathy [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(9): 228-234.
- [6] 陈常云, 陈君, 李艳婷. 经方防治糖尿病肾病研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17(24): 133-135.
Chen C Y, Chen J, Li Y T. Research progress of classical prescription in preventing and treating diabetic nephropathy [J]. Chin Med Mod Dist Educ China, 2019, 17(24): 133-135.
- [7] Meng X, Wei M M, Wang D, et al. *Astragalus* polysaccharides protect renal function and affect the TGF- β /Smad signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J Int Med Res, 2020, 48(5): 300060520903612.
- [8] Cheng L, Cao S, Qu M, et al. Licorice and its main components on the treatment of diabetes and its complications: A review of *in vivo* and *in vitro* studies [J]. Asian J Tradit Med, 2019, 5(6): 280-294.
- [9] 温丽敏, 许燕玲, 李振, 等. 黄芪六一汤对2型糖尿病大鼠降糖作用的机制研究 [J]. 中药材, 2018, 41(3): 699-702.
Wen L M, Xu Y L, Li Z, et al. Study on the effects and mechanism of *Astragalus* Liuyi Decoction on type 2 diabetes mellitus rats [J]. J Chin Med Mater, 2018, 41(3): 699-702.
- [10] 许燕玲, 郑媛嘉, 李振, 等. 黄芪六一汤对2型糖尿病模型大鼠肾小管上皮葡萄糖重吸收的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 114-121.
Xu Y L, Zheng Y J, Li Z, et al. Effect of Huangqi Liuyi Tang on glucose re-absorption via renal tubular epithelial cells in type 2 diabetes model rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2017, 23(11): 114-121.
- [11] 崔向微, 张贵君. 组分中药与中药现代化 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1290-1291.
Cui X W, Zhang G J. Component traditional Chinese medicine and modernization of traditional Chinese medicine [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2009, 20(5): 1290-1291.
- [12] 蒋亚超. 基于中药组分配伍理论的生脉分散片成型工艺及质量标准研究 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2016.
Jiang Y C. Study on the forming process and quality standard of Shengmai dispersible tablet based on the theory of component compatibility of Chinese medicine [D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2016.
- [13] Ibrahim L F, Marzouk M M, Hussein S R, et al. Flavonoid constituents and biological screening of *Astragalus bombycinus* Boiss [J]. Nat Prod Res, 2013, 27(4/5): 386-393.
- [14] 刘路, 李凯, 胡阳, 等. 黄芪有效成分抗骨质疏松症作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(4): 1321-1328.
Liu L, Li K, Hu Y, et al. Research progress on anti-osteoporosis mechanism of active components in *Astragali Radix* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(4): 1321-1328.
- [15] 贾梦楠, 李天娇, 包永睿, 等. 基于"质-量"双标的甘草质量分析方法研究 [J]. 中草药, 2023, 54(22): 7306-7312.
Jia M N, Li T J, Bao Y R, et al. Research on quality analysis method of *Glycyrrhiza uralensis* based on "quality-quantity" double standard [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(4): 1321-1328.
- [16] 王波, 周围, 刘小花, 等. 基于超高效液相色谱对黄芪中5种主要黄酮类化合物的快速检测 [J]. 分析化学, 2016, 44(5): 731-739.
Wang B, Zhou W, Liu X H, et al. Rapid separation and determination of 5 kinds flavonoids in *Astragali Radix* based on ultra-performance convergence chromatography [J]. Chin J Analyt Chem, 2016, 44(5): 731-739.
- [17] 刘少静, 盛耀光, 马晓娇, 等. 黄芪中总黄酮的提取纯化工艺研究 [J]. 化学工程师, 2018, 5: 9-12.
Liu S J, Sheng Y G, Ma X J, et al. Optimization of the extraction and purification technologies of total flavonoids from *Radix Astragali* [J]. Chem Engin, 2018, 5: 9-12.
- [18] 申美伦, 梁业飞, 刘广欣, 等. 甘草黄酮提取分离方法的研究进展 [J]. 中成药, 2021, 43(1): 154-159.
Shen M L, Liang Y F, Liu G X, et al. Research progress on extraction and separation methods of flavonoids from *Glycyrrhiza licorice* [J]. Chin Tradit Patent Med, 2021, 43(1): 154-159.
- [19] 谢秋情, 潘馨. 大孔吸附树脂纯化细梗香草原皂苷的工艺研究 [J]. 广州化工, 2019, 47(11): 70-74.
Xie Q Q, Pan X. Study on purification process of total saponins in *Lysimachia capillipes* hemsl. by macroporous resin [J]. Guangzhou Chem Ind, 2019, 47(11): 70-74.
- [20] 张玲忠, 张贵华, 段维杰. 大孔吸附树脂在中药活性成分分离纯化中的应用 [J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(14): 51-56.
Zhang L Z, Zhang G H, Duan W J. Application of macroporous resin in the extraction and purification of active components of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacy, 2019, 28(14): 51-56.
- [21] 王春怡, 李卫民, 高英. 大孔吸附树脂精制黄芪总皂苷工艺研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(9): 44-47.
Wang C Y, Li W M, Gao Y. Study on purification of

- Astragalus* total saponins with macroporous resin [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2017, 19(9): 44-47.
- [22] 谢娟平, 党鑫. 犁头草黄酮含量的测定与分离 [J]. *浙江农业科学*, 2018, 59(3): 377-379.
- Xie J P, Dang X. Determination and separation of flavonoids in plough grass [J]. *J Zhejiang Agric Sci*, 2018, 59(3): 377-379.
- [23] 赵伟镭, 师清芝, 唐星. 甘草中甘草酸和甘草苷的提取纯化工艺研究 [J]. *中国药房*, 2009, 20(6): 426-429.
- Zhao Y L, Shi Q Z, Tang X. Study on the extraction and purification for glycyrrhizic acid and liquiritin from *Radix et rhizoma glycyrrhizae* [J]. *China Pharm*, 2009, 20(6): 426-429.
- [24] 史高峰, 徐静, 周宝华, 等. 甘草酸单铵盐的制备及纯化新工艺研究 [J]. *食品工业科技*, 2011, 32(4): 324-326.
- Shi G F, Xu J, Zhou B H, et al. Study on new process for the production and purification of monoammonium glycyrrhizinate [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2011, 32(4): 324-326.
- [25] 汪荣斌, 秦亚东, 周娟娟. 青钱柳叶多糖双氧水脱色工艺研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, 18(9): 60-62.
- Wang R B, Qin Y D, Zhou J J. Study on the decoloring process of folium cyclocaryae paliuri polysaccharide by hydrogen peroxide [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2016, 18(9): 60-62.
- [26] 秦亚东, 汪荣斌, 周娟娟. 白芍多糖脱色工艺研究 [J]. *中成药*, 2015, 37(12): 2783-2787.
- Qin Y D, Wang R B, Zhou J J. Study on decoloration technology of *Paeonia lactiflora* polysaccharide [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2015, 37(12): 2783-2787.
- [27] 殷凯, 李湘洲, 张胜, 等. 长沙青皮竹多糖脱蛋白质方法研究 [J]. *食品与机械*, 2013, 29(6): 176-178.
- Yin K, Li X z, ZHANG S, et al. Study on deproteinization methods of polysaccharide from *Bambusa textilis* var. *persistens*. B.M. Yang leaves [J]. *Food Mach*, 2013, 29(6): 176-178.
- [28] 周鸿立, 李春华, 张英俊. 透析法精制玉米须多糖工艺的研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2010, 44(10): 81-83.
- Zhou H L, Li C H, Zhang Y J. Study on dialysis for refining polysaccharide from *Stigma Maydis* [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2010, 44(10): 81-83.
- [29] Ponchiardi C, Mauer M, Najafian B. Temporal profile of diabetic nephropathy pathologic changes [J]. *Curr Diabetes Rep*, 2013, 13(4): 592-599.
- [30] 刘智君, 徐锦, 梁志敏, 等. 滇黄精多糖对低浓度链脲佐菌素所致的糖尿病肾病小鼠的影响 [J]. *中医药导报*, 2021, 27(1): 12-15.
- Liu Z J, Xu J, Liang Z M, et al. Effect of *Polygonatum yunnanensis* polysaccharide on diabetic nephropathy mice caused by low concentration of streptozotocin [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 27(1): 12-15.
- [31] 龚丽, 黄寅鑫, 谢韶妍, 等. 百令胶囊联合缬沙坦治疗糖尿病肾病临床疗效及安全性的Meta分析 [J]. *广州中医药大学学报*, 2021, 38(5): 1061-1066.
- Gong L, Huang Y L, Xie S Y, et al. Meta-analysis of clinical efficacy and safety of bailing capsules combined with valsartan in the treatment of diabetic kidney disease [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*, 2021, 38(5): 1061-1066.
- [32] 胡稀, 韦凤, 蒙钰洁, 等. 糖尿病肾病中药治疗新进展 [J]. *临床合理用药*, 2023, 16(24): 177-181.
- Hu X, Wei F, Meng Y J, et al. New progress in treatment of diabetic nephropathy with traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Clin Ration Drug Use*, 2023, 16(24): 177-181.
- [33] 常越, 徐姣, 闫嵩, 等. 黄芪六一汤对2型糖尿病治疗效果的转录组学研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 3(14): 2760-2766.
- Chang Y, Xu J, Yan S, et al. Transcriptomics of therapeutic effect of Huangqi Liuyi decoction in treating type 2 diabetes [J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 3(14): 2760-2766.
- [34] 陈玉兴, 黄雪君, 杜铁良, 等. 黄芪六一汤对糖尿病大鼠血糖、胰岛素、糖化血红蛋白、细胞形态影响随机平行对照研究 [J]. *实用中医内科杂志*, 2014, 28(9): 113-116, 134.
- Chen Y X, Huang X J, Du T L, et al. Randomized parallel group study on the effect of huangqiliuyi decoction on blood sugar, insulin, glycosylated hemoglobin, cell morphology of diabetic rats [J]. *J Pract Tradit Chin Intern Med*, 2014, 28(9): 113-116, 134.
- [35] Chen X, Wang H, Jiang M Q, et al. Huangqi (astragalus) decoction ameliorates diabetic nephropathy via IRS1-PI3K-GLUT signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(8): 2491-2501.
- [36] Ju Y H, Su Y, Chen Q Q, et al. Protective effects of Astragaloside IV on endoplasmic reticulum stress-induced renal tubular epithelial cells apoptosis in type 2 diabetic nephropathy rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 84-92.
- [37] Chen X, Yang Y, Liu C X, et al. Astragaloside IV ameliorates high glucose-induced renal tubular epithelial-mesenchymal transition by blocking mTORC1/p70S6K signaling in HK-2 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2): 709-716.
- [38] 刘长青, 黄书佳, 蒋典. 黄芪甲苷联合氯沙坦对糖尿病大鼠肾组织PI3K/Akt/NF-κB通路的影响 [J]. *中南药*

- 学, 2019, 17(10): 1626-1630.
- Liu C Q, Huang S J, Jiang D. Effect of astragaloside combined with losartan on PI3K/Akt/NF- κ B pathway in diabetic rat kidney [J]. Cent South Pharm, 2019, 17(10): 1626-1630.
- [39] 祝高红, 王筱雯, 戚畅, 等. 黄芪总黄酮通过调控 miR-378 对高糖诱导的 HK-2 细胞炎症因子水平的影响 [J]. 免疫学杂志, 2019, 35(8): 653-658.
- Zhu G H, Wang X W, Qi C, et al. The regulatory effect of *Astragalus* total flavonoids on high glucose-induced inflammatory factors in HK-2 cells through miR-378 [J]. Immunol J, 2019, 35(8): 653-658.
- [40] Jiang, Z P, Wei G M, Li Z, et al. Flavonoids from the roots of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. prevent development of diabetic nephropathy *in vitro* [J]. Lat Am J Pharm, 2014, 33(2): 339-343.
- [41] 张王宁, 高耀, 李科, 等. 基于网络药理学的黄芪总黄酮治疗肾病综合征的机制研究 [J]. 药学学报, 2018, 53(9): 1429-1441.
- Zhang W N, Gao Y, Li K, et al. Exploration into the mechanism of total flavonoids of *Astragali Radix* in the treatment of nephrotic syndrome based on network pharmacology [J]. Acta Pharm Sin, 2018, 53(9): 1429-1441.
- [42] Zhang Y W, Wu C Y, Cheng J T. Merit of *Astragalus* polysaccharide in the improvement of early diabetic nephropathy with an effect on mRNA expressions of NF- κ B and IkappaB in renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 114(3): 387-392.

[责任编辑 兰新新]