

离,释放出游离形式染料木素、大豆素和黄豆素,这3种形式的异黄酮可被肠道有效吸收。本研究结果表明,大豆异黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用很强,均强于具有降糖减肥效用的绿茶和乌龙茶。其对 α -葡萄糖苷酶抑制活性由强到弱顺序为金雀异黄素>大豆素>黄豆苷元>染料木苷>大豆苷和黄豆苷,说明异黄酮环状结构的羟基和双键在酶抑制作用中起重要作用。根据双倒数作图确定抑制类型结果为非竞争性抑制作用,金雀异黄素对 α -葡萄糖苷酶抑制的米氏常数为 $2.72 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$,较小,说明大豆异黄酮与 α -葡萄糖苷酶亲和能力较强,抑制活性较高。大豆异黄酮广泛存在于大豆和豆制品中,这种存在形式也为人类摄入时的安全性提供了可靠

保证。因此,大豆异黄酮有望成为防治糖尿病的新的天然健康食品和药物。

References:

- [1] Mooradian A D, Thurman J E. Drug therapy of postprandial hyperglycemia [J]. *Drugs*, 1999, 57(1): 19-29.
- [2] Kim J S, Kwon C S, Son K H. Inhibition of α -glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(11): 2458-2461.
- [3] Quan J S, Yin X Z, Jin M, et al. Effects of soybean hypocotyl extract on blood sugar, blood lipid and lipid peroxides in diabetic rats [J]. *J Med Sci Yanbian Univ* (延边大学医学学报), 2001, 24(4): 243-244.
- [4] Kudou S, Fleury Y, Welti D, et al. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill) [J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(9): 2227-2233.
- [5] Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, et al. Isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*) [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(1): 177-178.

六味地黄制剂对糖尿病肾病大鼠肾功能的影响

吕妍,王新,唐方

(天津医科大学总医院 中医科,天津 300052)

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的严重并发症和主要死亡原因。目前尚缺乏有效的防治DN的手段。如何有效地治疗DN,延缓肾脏功能减退的进程,是广大临床医师必须面对并亟待解决的难题。本课题组通过观察六味地黄制剂对DN大鼠肾脏功能的影响,旨在阐释中医经典方药延缓和控制DN的作用机制。

1 材料

1.1 动物:雄性SD大鼠,平均体重(250 ± 20)g,批号SCXK(京)2002-0001,购自北京大学医学部。

1.2 药物:链脲佐菌素(STZ)购自Sigma公司;六味地黄制剂由天津乐仁堂制药厂提供,批号C058011。

1.3 试剂:尿蛋白试纸,购自广州市珠江生化试剂有限公司;尿蛋白、尿素氮(BUN)、血清肌酐酐(SCr、尿肌酐(UCr)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.4 主要仪器:乐康全活力型血糖仪及试纸,德国;TL-18M台式高速冷冻离心机,上海;H ZS-H水浴振荡器,上海;UV-Vis8500型紫外分光光度计,上海。

2 方法

2.1 实验分组、模型制备及给药:将45只实验大鼠在10%水合氯醛ip麻醉下行右侧肾脏结扎术,结扎肾动脉、肾静脉、输尿管。2周后,将术后大鼠随机分为对照组、模型组及给药组,每组15只。模型组和给药组大鼠禁食18h后,按50mg/kg ip 2% STZ(2g STZ溶于0.1mmol/L枸橼酸缓冲液中, pH 4.2)诱导糖尿病,再随机分为2周、4周和8周组,每组各5只。对照组ip等量枸橼酸缓冲液。对照组和模型组ig等量蒸馏水,给药组ig六味地黄制剂24.9g/kg(相当于人体给药量的10倍),每天2mL。各组均ig给药8周。造模注射48~72h后,以血糖 $\geq 13.6 \text{ mmol/L}$,尿蛋白+++为造模成功。模型成功率90%。各组大鼠于模型成功后,自由饮水2、4、8周,终止试验。分别称体重,留取24h尿样,尾静脉取血测血糖,股动脉取血,分离血清,冷藏备用。

2.2 观测指标:各组分别采用CBB法进行尿蛋白定量;采用苦味酸法测定SCr和UCr;采用二乙酰-肟法测定BUN,紫外分光光度计比色检测。计算肌酐消除率($\text{UCr} \times 24 \text{ h 尿量} / \text{SCr}$)。

2.3 统计学处理:采用 SPSS 统计软件,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用方差分析。

3 结果

3.1 体重的变化:模型建立 8 周期间,正常大鼠体重明显增加,动作自如,反应灵敏,毛发光泽。模型组大鼠相对消瘦,皮毛枯燥,倦怠,行动迟缓,多饮多食,多尿。而给药组大鼠上述症状明显轻于模型组,但差异无显著性 ($P>0.05$),说明六味地黄制剂对 DN 大鼠体重无明显改善作用。

3.2 血糖的变化:与对照组相比,注射 STZ 后,模型组与给药组 2、4、8 周血糖值均显著升高,差异显著 ($P<0.05$)。六味地黄制剂组大鼠血糖值明显降低,与模型组比较差异显著 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 六味地黄制剂对 DN 大鼠血糖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)
Table 1 Effect of Liuwei Dihuang Preparation on blood glucose of DN rat ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	血糖值/(mmol · L ⁻¹)		
	2 周	4 周	8 周
对照	5.26±0.89	5.46±0.50	5.36±0.56
模型	28.89±1.74*	24.17±1.37*	28.02±9.01*
给药	14.65±2.28*△	15.80±5.27*△	20.60±6.82*△

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: △ $P<0.05$
* $P<0.05$ vs control group; △ $P<0.05$ vs model group

3.3 24 h 尿蛋白定量的变化:造模第 2、4、8 周后,模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量较对照组显著增加 ($P<0.05$),给药治疗 2、4、8 周后 24 h 尿蛋白定量不仅较模型组显著降低,4、8 周 24 h 尿蛋白定量并显著低于对照组。见表 2。

表 2 六味地黄制剂对 DN 大鼠 24 h 尿蛋白定量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)
Table 2 Effect of Liuwei Dihuang Preparation on 24 h urine protein quota of DN rat ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	24 h 尿蛋白/mg		
	2 周	4 周	8 周
对照	3.44±1.26	6.06±1.12	6.30±1.08
模型	13.01±5.21*	24.84±5.52*	17.44±6.00*
给药	7.62±4.13△	4.75±2.37△	3.33±2.53△

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: △ $P<0.05$
* $P<0.05$ vs control group; △ $P<0.05$ vs model group

3.4 肌酐清除率的变化:造模后第 2 周,各组肌酐清除率差异不显著。4~8 周后,模型组显著升高 ($P<0.05$),经六味地黄制剂治疗后肌酐清除率明显降低,与模型组比较差异显著 ($P<0.05$),8 周后肌酐清除率明显低于对照组,见表 3。

3.5 血清 BUN 的变化:造模后第 4 周,模型组及给药组的血清 BUN 水平明显高于对照组 ($P<$

0.05),与模型组相比,经中药治疗 4 周后,给药组 BUN 水平虽然呈下降趋势,但两组间差异不显著 ($P>0.05$),见表 4。

表 3 六味地黄制剂对 DN 大鼠肌酐清除率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Effect of Liuwei Dihuang Preparation on creatinine clearance rate of DN rat ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	肌酐清除率/(mL · 24 h ⁻¹)		
	2 周	4 周	8 周
对照	126.28±87.07	665.05±256.85	1 314.19±413.33
模型	890.74±507.69	2 122.87±681.80*	2 343.37±1 066.88*
给药	766.86±333.75	1 060.95±202.42△	612.84±182.69*△

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: △ $P<0.05$
* $P<0.05$ vs control group; △ $P<0.05$ vs model group

表 4 六味地黄制剂对 DN 大鼠 BUN 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)
Table 4 Effect of Liuwei Dihuang Preparation on BUN of DN rat ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	BUN/(mg · L ⁻¹)		
	2 周	4 周	8 周
对照	381.32±48.38	254.67±25.91	219.60±23.61
模型	388.37±38.12	477.66±148.15*	400.66±105.04*
给药	384.14±47.32	448.40±59.09*	384.84±48.08*

与对照组比较: * $P<0.05$
* $P<0.05$ vs control group

4 讨论

现代医学对 DN 的发病机制进行了广泛的研究,越来越多的临床实验研究证明, DN 的发病机制是多因素综合作用的结果,其中糖代谢异常,肾脏血流动力学的改变,多种细胞因子参与及遗传因素等均起到非常重要的作用^[1]。早期多采用严格控制血糖、降压、给予低蛋白饮食等治疗方法,晚期由于出现尿毒症或肾功能衰竭,可采取透析疗法或肾移植等,因肾移植疗法存在肾源难寻、个体排斥反应、费用昂贵等诸多问题,故总的治疗效果尚不满意。

祖国医学在治疗 DN 方面有一定的优势。中医将糖尿病归于消渴症范畴。其基本病机特点是“本虚标实”。本虚指正气的亏虚,即五脏的气血阴阳的虚损。标实即痰湿,湿热与瘀血。DN 是在糖尿病气阴两虚的基础上发展而来,病久累及脾肾,脾失健运,水谷不运,肾主水失常,封藏失司,导致气化不利,水液输布失常,病久则入络,久虚必有瘀。因此选用滋补肝肾经典处方——六味地黄制剂治疗 DN。六味地黄制剂出自宋代医家钱仲阳所著《小儿药证直诀》一书,由熟地、山茱萸、山药、泽泻、丹皮、茯苓 6 味药材组成,具有滋补肾阴之功效,其中熟地黄滋肾阴,

(下转第 1411 页)

度及光强度单因子或综合作用刺激的敏感性较中午强,同样这种敏感性差异也表现在春夏季和秋冬季节的差异。

两条方程共同表明:1)在室内试验条件下,随温度和湿度升高,反应的山蛭数量增多,表明山蛭喜欢高温高湿环境条件。2)随着光强度增加反应山蛭数减少,表明山蛭喜暗,怕光环境条件,上述结果与山蛭生物学特性一致。两条方程也有不同之处; Y_1 方程表明温度、湿度作用差异不大。 Y_2 方程表明湿度作用最大,温度次之而温度湿度有交互作用。

从表1看出,最好的组合为:24℃、RH 98%、0.48 lx;25℃、RH 88%、0.7 lx;最差的组合为:12℃、RH 50%、37 lx;中等组合为:19℃、RH 88%、9.5 lx;17℃、RH 81%、23 lx。

3 讨论

温度、湿度、光强度是重要的气候因子。对动物生长、发育、繁殖行为有重要作用。就单因子而言,极端温度、湿度、光强度,对山蛭都是有害的。如8~9℃海南山蛭不活动,9℃停止觅食行为^[4]。中午直射太阳光强烈刺激下,海南山蛭身体高度缩短,两吸盘不能吸附物体,身体卷流成团,脱水、分泌黏液,0.5 h后会死亡^[4]。光润金线蛭当水温14~15℃时才开始活动,16~18℃较活跃,20~25℃最活跃^[5]。在气温7℃,水温6.5℃水蛭不活动。

关于山蛭对各种物理、化学和生物(包括宿主)刺激反应,有不同表现形式,其中动物(包括人)呼(吹)出的暖湿气流通过山蛭时,山蛭对此暖湿气流最敏感,反应较迅速,可作为山蛭对环境因素刺激反应的最好指标^[1,4]。

本研究在25℃、0.79 lx条件下山蛭对不同湿度的反应,在25℃、RH 98%条件下山蛭对不同光强度的反应。在一定湿度和光强度下山蛭对温度的不同反应已有报道,即山蛭爬向30~35℃的热试管^[2],30~35℃热试管的辐射热到达一定距离的山蛭时,山蛭感受到25~30℃,与本次实验结果也基本一致。自然状态是温度、湿度、光强度共同的综合作用。因此,山蛭对3个因子综合作用,更接近实际,有重要应用价值,为田间棚架内饲养山蛭提供控制温度、湿度、光强度提供依据。

本室内温、光、湿3因素对山蛭作用研究结果,与野外自然状态,山蛭种群数量动态与气候因素关系研究表明^[6],影响海南山蛭种群数量主要气候因素是月雨量、月雨日数和风速,这些因素的本质是湿度(水分)问题,与本实验的3因素最优组合24℃、RH 98%、0.48 lx一致。湿度是重要因素。

References:

- [1] Stammers F M G. Observation on the behaviour of land leeches (*Haemadipsa*) [J]. *Parasitology*, 1950, 40: 237-246.
- [2] Tan E G. The adaptation of leech (*Haemadipsa hainana*) to temperature and soil humidity [J]. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2001, 21(3): 458-461.
- [3] Tan E G, Liang Y J. Expression of haemadin HS gene in methylotrophic yeast *Pichia Pastoris* [J]. *Acad J Sun Yat-sen Univ Med Sci* (中山医科大学学报), 2002, 23(1): 21-23.
- [4] Tan E G, Chen J, Huang L Y. The behavior of *Haemadipsa hainana* and its ecological significance [J]. *Nat Sci J Hainan Univ* (海南大学学报:自然科学版), 1994, 12(1): 25-32.
- [5] Tan E G, Pan Z G, Huang L Y. Relationship between population dynamic of freshwater leech *Whitmania laevis* and chemical factors of water [J]. *J Appl Ecol* (应用生态学报), 2002, 13(5): 593-595.
- [6] Tan E G, Liang Q J. Studies on the relationship between the population dynamic of *Haemadipsa hainana* and climatic factors [J]. *Acta Eco Sin* (生态学报), 2000, 20(4): 611-614.

(上接第1380页)

益精髓;山药滋脾补肾;山茱萸滋阴养肝,共成肝、脾、肾三阴并补之功;茯苓、泽泻健脾利水消肿;丹皮清虚热,活血化瘀;现代药理学研究证明,六味地黄制剂可以降低血糖,减轻肾脏肥大和高滤过,改善肾功能,抗过氧化损伤来防治DN^[2~4]。

本实验结果显示:注射STZ后动物皆出现糖尿病“三多一少”的典型症状。模型组动物体重明显减轻,血糖升高,尿蛋白排泄率增加,肌酐清除率、BUN明显升高,经六味地黄制剂治疗后,与模型组相比血糖、肾脏功能有明显的改善,提示六味地黄制剂可以降低血糖,调整糖代谢紊乱,改善肾脏功能,对糖尿病肾病有一定的防治作用。但其治疗DN

的机制及改善肾脏病变的作用有待于进一步的研究。

References:

- [1] Liu Z H, Li L S. Inflammatory mechanism of diabetic nephropathy [J]. *Chin J Nephrol* (中华肾脏病杂志), 1999, 15(2): 120-123.
- [2] Qiu Xia. Clinical application and analysis of Liuwei Rehmannia Pill [J]. *Mod Med Health* (现代医药卫生), 2002, 18(9): 797.
- [3] Xi Y P. 48 Examples of Liuwei Rehmannia Pill with plus treatments I on diabetic nephropathy [J]. *Clin J Anhui Tradit Chin Med* (安徽中医临床杂志), 2002, 14(11): 5.
- [4] Lai Y Z, Huang Z W. New development of modern study on Liuwei Rehmannia Pill (Decoction) [J]. *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 1999, 1: 13-15.