

鼠的心肌梗死范围。当心肌细胞受损时,细胞膜通透性增高,胞内酶大量释放进入血液中,导致血清心肌酶 LDH 的活性升高。因而,血清 LDH 活性可以间接反映心肌缺血损害范围和严重程度^[8]。本实验结果表明,拟人参皂苷元可使急性心肌缺血大鼠血清 LDH 活性明显降低,与其缩小心肌梗死范围相吻合。

造成心肌缺血的原因有很多,其中由于冠脉栓塞导致的冠脉血流量不足是一个重要原因。血液黏度增高可促进血栓形成。血液黏度升高的情况下,血液阻力增大导致流速减慢,血液瘀滞。而在血液瘀滞状态下,血小板与白细胞的黏附性与聚集性增强,凝血系统易于活化,纤溶系统以及血管内皮的抗血栓功能等变化,皆十分有利于血栓的形成,且不利于侧支循环的建立。冠状动脉内血栓形成是大多数急性心肌梗死的病理生理基础,血栓形成的机械性梗阻,使相应心肌发生持久而严重的缺血坏死。现代医学研究认为,临床缺血性心脑血管疾病多有血液黏度增高、凝血时间缩短的现象。因此,降低血黏度、延长凝血时间的药物将抑制血栓的形成,从而可以减缓心肌缺血程度,减少冠心病的发作。现代药理学研究表明,绝大部分具有活血祛瘀作用的中药均可改善血液流变学的各项指标,如降低血液黏滞度,呈现抗凝作用等^[9]。本实验结果提示中、低剂量的拟人参皂苷元可显著延长小鼠凝血时间,并维持至 4 h,而高剂量则作用不明显,其是否与阿司匹林的抗凝血作

用机制相似以及拟人参皂苷元抗心肌缺血的详细机制有待于进一步研究。

References:

- [1] Tian J M, Li H, Ye J M, et al. Effect of ginsenoside Rg₂ on chemical myocardial ischemia in rats [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(12): 1191-1192.
- [2] Shen Z Q, Wu L O, Lei W Y, et al. Effects of ginsenoside-Rg₁ on adhesion of neutrophil to platelets [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(2): 138-140.
- [3] Li Y K, Ning K Y, Liang R, et al. An improved myocardial ischemia model by rat coronary artery ligation [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2005, 14(4): 427-428.
- [4] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991.
- [5] Johns T, Olson B. Experimental myocardial infarction: A method of coronary occlusion in small animals [J]. *Ann Surg*, 1954, 140(4): 675-682.
- [6] Xu D, Martin P, Ohara M, et al. Upregulation of aquaporin-waterchannel expression in chronic heart failure rat [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99: 1500-1505.
- [7] Rao P S, Cohen M V, Mueller H S. Production of free radicals and lipid peroxides in early experimental myocardial ischemia [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1983, 15: 713.
- [8] Chou T C, Yang S P, Pei D. Amlodipine inhibit proinflammatory cytokines and free radical production and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide/interferon-gamma stimulated cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Jpn J Pharmacol*, 2002, 89(2): 157.
- [9] Li Y K. *Methodology in Pharmacological Experiment of Chinese Materia Medica* (中药药理实验方法学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1991.

黄芪提取物对体外蛋白非酶糖化的抑制作用

杨 芳,杜俊蓉*,郑小媛,余 彦,陈小瑞

(四川大学华西药学院 药理教研室,四川 成都 610041)

近年来的研究表明糖尿病的高血糖状态能加速非酶糖化 (nonenzymatic glycosylation, NEG) 反应,引起非酶糖化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 在体内蓄积,从而诱发一系列糖尿病并发症,如糖尿病肾病、白内障、神经病变等^[1]。这些严重的糖尿病并发症是导致糖尿病患者致残、致死的主要病因。因此寻找安全有效的 AGEs 生成抑制剂对防治糖尿病并发症具有重要意义。豆科植物黄芪具有补气升阳、益卫固表、利水消肿的功

效,是历代医家治疗“消渴症”中药复方中的常用药材。现代药理学研究显示黄芪对糖尿病从血糖、胰岛素的释放,免疫功能的调节,到并发症的防治等方面都有一定疗效^[2]。本研究采用不同方法观察黄芪水提取物对体外 AGEs 形成的影响。

1 材料

1.1 试剂和药物:牛血清白蛋白, Sigma 公司;邻苯二胺 (OPD), Sigma 公司;氯化硝基四氮唑蓝 (NBT), 上海伯奥精细化工有限公司,批号:

收稿日期:2006-10-13

基金项目:四川大学辐射物理及技术教育部重点实验室开放基金资助项目 (LF04004)

* 通讯作者 杜俊蓉 Tel: (028) 85503938 E-mail: dujr07@gmail.com

20050110;叠氮钠 (NaN_3),天津市科密欧化学试剂开发中心,批号:20050128;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:ZB-2301。弗氏完全佐剂,美国 Pierce 公司,批号:E163215。Activated CNBr-Sepharose 4B 亲和色谱柱,美国 Pharmacia 公司。氨基胍, Sigma 公司,批号:396494。PVDF 膜,瑞士 Roche 公司。蛋白质相对分子质量标准品, MBI Fermentas 公司。DAB 显色试剂盒,美国 Vector lab 公司。蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao。购自北京同仁堂成都分店,由华西药学院陈维鉴定。其余试剂均为市售分析纯。

1.2 实验动物:成年新西兰兔,健康一级,雌雄兼用,购自四川大学华西实验动物中心。常规饲养于本室动物房,自由摄食、饮水。

1.3 仪器:UV-2102 C 型紫外可见分光光度计,美国 UNIC 公司。HH. BII. 420-BS 型电热恒温培养箱,上海跃进医疗器械厂。荧光检测仪 (HTS 7000),美国 PERKIN ELMER 公司。酶标仪 (Model 550),垂直电泳系统 Mini PROTEAN 2&3 Cell,美国 BIO-RAD 公司。R-201 型旋蒸仪,上海申顺生物科技有限公司。10 ATVP 高效液相色谱仪,日本岛津公司,美国奥泰 2000ES 型蒸发光散射检测器。

2 方法

2.1 黄芪提取物制备:适量饮片用 3 倍量蒸馏水浸泡 1 h 后,回流提取两次,每次 30 min,合并滤液,减压浓缩制得黄芪提取物,按照《中国药典》2005 年版 HPLC-蒸发光散射检测器测定提取物中黄芪甲苷质量分数为 0.06%。黄芪提取物 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。临用前,用蒸馏水配制黄芪提取物溶液,滤过除菌后使用。

2.2 非酶糖化系统的建立:参照文献方法^[3]并稍作修改。在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中加入葡萄糖,牛血清白蛋白,使其终浓度分别为 500 mmol/L 和 50 mg/mL, 0.02% NaN_3 抗菌。加入黄芪水提取物使其终质量浓度分别为 1.0、0.5、0.1、0.01 mg/mL。同时另设空白组,即不加药物完整的非酶糖化系统;阳性组,即 50 mmol/L 氨基胍对照组。37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 1 个月。

2.3 疫苗和抗血清的制备及纯化:参考文献方法进行^[4]。将孵育 2 个月的 BSA-AGEs 液透析处理后,与弗氏完全佐剂 (1:1) 充分乳化混匀,免多点 sc 2

mL,每周 1 次,第 4 次免疫后 10 d 颈总动脉取血,3 000 r/min 离心收集抗血清,用饱和硫酸铵沉淀后,通过 Activated CNBr-Sepharose 4B 亲和色谱柱纯化抗体,非竞争性 ELISA 法测定抗体效价,免疫前血清作为对照血清。

2.4 对果糖胺生成的抑制作用^[5]:孵育 1 周后,取各组反应液 20 μL ,分别加入 1 mL NBT 试液,37 $^\circ\text{C}$ 水浴,严格控制反应时间,以 10% 醋酸溶液中止反应。在 530 nm 处测定 5 min 和 15 min 时的吸光度 (A) 值。按下式计算各药物的抑制率。

$$\text{抑制率} = [1 - (\text{给药 } A_{15} - \text{给药 } A_5) / (\text{对照 } A_{15} - \text{对照 } A_5)] \times 100\%$$

2.5 对 AGEs 生成的抑制作用,参考文献方法^[5]并稍作修改。

2.5.1 荧光检测:各组反应液 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 个月,用荧光检测仪(激发波长 370 nm 发射波长 440 nm)检测 AGEs 的荧光吸光度值 (F)。按下式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{对照 } F - \text{给药 } F) / \text{对照 } F \times 100\%$$

2.5.2 酶联免疫反应 (ELISA) 检测:将反应液各 100 μL 加入 96 孔板,3 个复孔。4 $^\circ\text{C}$ 过液,除去孔内液体,洗板 4 次,每孔加入 100 μL 适度稀释后的自制兔抗血清。37 $^\circ\text{C}$ 保温 2 h 后,除去孔内液体,洗板 4 次,每孔加入 100 μL 酶标抗体,37 $^\circ\text{C}$ 保温 2 h 后,除去孔内液体,洗板 4 次,每孔加 100 μL OPD 底物液,37 $^\circ\text{C}$ 避光反应 10 min,每孔加 50 μL 硫酸终止反应。在酶标仪 490 nm 波长处读取 A 值。按下式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{对照 } A - \text{给药 } A) / \text{对照 } A \times 100\%$$

2.5.3 免疫杂交分析:将非酶糖化蛋白样品与 $5 \times$ 上样缓冲液混合,95 $^\circ\text{C}$ 加热 5 min, 7.5% SDS-PAGE 电泳,将蛋白电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封膜后,加入自制兔抗血清 (1:5 000) 室温孵育 1 h,洗膜后加入 HPR 标记羊抗兔二抗 (1:2 000) 室温孵育 1 h, DAB 显色、照相。设置不加一抗的 BSA 阴性对照组。

2.6 统计学方法:计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间比较采用单因素方差分析 (ONE-WAY ANOVA),所有数据均采 SPSS 11.5 统计软件包统计。

3 结果

3.1 抗血清的 ELISA 分析:ELISA 结果显示目的蛋白 (BSA-AGEs) 免疫 5 周后,血清中产生了高效价的抗体,稀释度为 1:5 000 以上。

3.2 药物对体外果糖胺生成的抑制作用:黄芪提取物对体外果糖胺的生成具有浓度依赖性的抑制作用,其中 0.5、1.0 mg/mL 黄芪提取物的抑制作用与空白对照组比较有显著差异 ($P < 0.05, 0.01$),而 1.0 mg/mL 黄芪提取物的抑制率显著高于 50 mmol/L 氨基胍 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

3.3 药物对体外 AGEs 生成的干预作用

3.3.1 荧光值测定:0.01~1.0 mg/mL 黄芪提取物对体外非酶糖基化体系的荧光值具有显著的降低作用 ($P < 0.01$),与氨基胍比较均没有显著差异。结果见表 2。

表 1 黄芪水提取物对体外果糖胺生成的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Inhibition of *Radix Astragali* water extract on formation of fructosamines *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	A ₁₅₋₄₅	抑制率/%
空白对照	—	0.25 ± 0.01	—
氨基胍	50 mmol · L ⁻¹	0.22 ± 0.01	13.33 ± 3.33
黄芪水提取物	1.0 mg · mL ⁻¹	0.17 ± 0.02 ^{***}	33.07 ± 6.66
	0.5 mg · mL ⁻¹	0.20 ± 0.02 [*]	18.93 ± 7.26
	0.1 mg · mL ⁻¹	0.21 ± 0.03	9.33 ± 2.31
	0.01 mg · mL ⁻¹	0.22 ± 0.01	10.40 ± 2.12

与空白对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与氨基胍组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank control group

$P < 0.05$ vs aminoguanidine group

表 2 黄芪水提取物对体外 AGEs 生成 (荧光) 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Inhibition of *Radix Astragali* water extract on AGE formation (fluorescence) *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	荧光值	抑制率/%
空白对照	—	1 008.7 ± 145.2	—
氨基胍	50 mmol · L ⁻¹	456.5 ± 7.8 ^{**}	54.74 ± 0.77
黄芪水提取物	1.0 mg · mL ⁻¹	464.3 ± 14.5 ^{**}	53.97 ± 1.43
	0.5 mg · mL ⁻¹	444.5 ± 20.5 ^{**}	55.93 ± 2.03
	0.1 mg · mL ⁻¹	528.7 ± 13.1 ^{**}	47.59 ± 1.29
	0.01 mg · mL ⁻¹	509.7 ± 12.4 ^{**}	49.47 ± 1.23

与空白对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs blank control group

3.3.2 ELISA 检测:0.01~1.0 mg/mL 黄芪水提取物对体外 AGEs 生成均有显著的抑制作用 ($P < 0.01$),其中 1.0 mg/mL 黄芪水提取物的抑制率与氨基胍比较没有显著差异。结果见表 3。

3.3.3 免疫杂交分析:各质量浓度黄芪水提取物对体外 AGEs 生成均有明显抑制作用。结果见图 1。

4 讨论

表 3 黄芪水提取物对体外 AGEs 生成 (ELISA) 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Inhibition of *Radix Astragali* water extract on AGE formation (ELISA) *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	A 值	抑制率/%
空白对照	—	1.45 ± 0.01	—
氨基胍	50 mmol · L ⁻¹	1.09 ± 0.01 ^{**}	24.64 ± 1.86
黄芪水提取物	1.0 mg · mL ⁻¹	1.15 ± 0.01 ^{**}	20.46 ± 0.59
	0.5 mg · mL ⁻¹	1.27 ± 0.08 ^{***}	12.39 ± 5.44
	0.1 mg · mL ⁻¹	1.30 ± 0.05 ^{***}	10.23 ± 3.16
	0.01 mg · mL ⁻¹	1.25 ± 0.01 ^{***}	13.72 ± 0.56

与空白对照组比较: ** $P < 0.01$

与氨基胍组比较: # $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs blank control group

$P < 0.05$ vs aminoguanidine group



0-BSA 1-空白对照 2~5-1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/mL 黄芪水提取物 6-50 mmol/L 氨基胍
0-BSA 1-control 2~5-1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/mL *Radix Astragali* water extract 6-50 mmol/L aminoguanidine

图 1 黄芪水提取物对体外 AGEs 生成的抑制作用 (免疫杂交)

Fig. 1 Inhibition of *Radix Astragali* water extract on AGE formation *in vitro* (Western blotting)

体内蛋白质的非酶糖基化反应与很多慢性疾病的病理机制有关,如动脉粥样硬化、老年痴呆、衰老以及糖尿病并发症等。通过阻断非酶糖化反应从而防治上述疾病的发生发展是近年来药物治疗学领域的新策略,也取得了一些进展,如很多实验研究证明氨基胍可通过抑制 AGEs 形成,有效防治实验动物糖尿病视网膜病变等并发症^[1,6],但由于其副作用太大,临床应用受限。而中药治疗糖尿病具有悠久的历史,正确应用现代药理学方法,深入系统地研究中药防治糖尿病及其并发症的有效物质基础及作用机制,是推进中药现代化进程的重要工作。

AGEs 是指蛋白质、脂质和核酸等大分子在没有酶催化的条件下,自发地与葡萄糖或其他还原性单糖反应所生成的稳定的共价化合物。如糖的游离醛基或酮基攻击蛋白质上氨基形成 schiff 碱,经重排、脱水、缩合产生 AGEs。AGEs 化学成分复杂,是多种不同化合物的总称,包含羧甲基赖氨酸 [N⁻(carboxymethyl) lysine]、苯妥西定 (pentosidine)、蛋白交联产物 (protein cross-links) 等类别。AGEs 是由荧光物质和非荧光物质组成的混合物,因此本实验用荧光分光光度法测定荧光 AGEs 物质,通过

NBT 显色反应检测早期非荧光产物果糖胺,经自制抗体的 ELISA 检测总的 AGEs 的量。实验结果显示氨基胍可显著抑制体外荧光 AGEs 和总 AGEs 形成,但对非荧光 AGEs 未见明显影响,这可能与氨基胍选择性作用于某些 AGEs 组分,或是氨基胍只抑制非酶糖化过程中某些阶段的产物形成有关^[4];此外,本实验结果表明黄芪提取物对荧光和非荧光 AGEs 的形成均有浓度依赖性的抑制作用,其中对荧光 AGEs 的抑制作用与氨基胍相似,在高质量浓度时对总 AGEs 的抑制作用也与氨基胍相似,而对早期非荧光 AGEs 的抑制作用强于氨基胍。

黄芪的化学成分主要包括黄酮类、有机酸类、皂苷类、多糖类、氨基酸等^[7],本实验采用热水煎煮制备的黄芪提取物应主要包含黄芪的水溶性组分。有文献报道黄酮中的槲皮素、有机酸中的阿魏酸等化合物可抑制体外非酶糖化反应^[8,9]。结合现代分离纯化技术和成分示踪技术,研究黄芪抑制 AGEs 生成的有效成分及其对 AGEs 相关疾病的防治作用正在进行中。

References:

[1] Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, et al. Aminoguanidine

prevents diabetes induced arterial wall protein cross-linking [J]. *Science*, 1986, 232(27): 1629-1632.

[2] Dang H X, Tang D C. Progress of pharmacological function study of astragalus on the treatment of diabetic mellitus [J]. *J Chin Med Pharmacol* (中医学报), 2002, 30(3): 69-71.

[3] Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low density lipoprotein [J]. *Diabetes*, 1985, 34(9): 938-941.

[4] Miyazawa N, Kawasaki Y, Fujii J, et al. Immunological detection of fructated proteins *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biochem J*, 1998, 336: 101-107.

[5] Kihou T, Usui S, Hirano K, et al. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(1): 200-205.

[6] Matsumoto K, Ikeda K, Horiuchi S, et al. Immunochemical evidence for increased formation of advanced glycation end products and inhibition by aminoguanidine in diabetic rat lenses [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 241(2): 352-354.

[7] Hou T Z. *Herbal Extracts* (中草药提取物) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2004.

[8] Ge Y, Zhang J Q, Zhou Y P. The inhibitory of some Chinese herbs or its components on albumin nonenzymatic glycosylation [J]. *Acad Sec Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 1995, 16(4): 333-336.

[9] Sui L R, Hou F Y, Miao C S, et al. Inhibitory effects of some Chinese herb components on nonenzymatic glycosylation *in vitro* [J]. *J N Bethune Univ Med Sci* (白求恩医科大学学报), 1998, 24(6): 585-586.

华佗再造丸治疗缺血性中风随机对照试验的 Meta 分析

蔡业峰, 许 越, 郭建文, 张新春, 李伟峰, 梁伟雄, 黄 燕*

(广州中医药大学第二附属医院 脑病中心, 广东 广州 510120)

华佗再造丸的处方起源于冉氏家族, 历经 200 余年中医临床实践, 其中成药于 1985 年由广州奇星药厂研制成功, 并于 1990、1995、2000 年连续三届以保密处方产品收载于《中国药典》, 成为中风类首选药物。华佗再造丸经药理研究和临床观察证明, 具有保护中风患者的脑细胞免受损害和修复其受损的脑细胞以及激活其脑细胞代偿功能, 还对神经干细胞的增殖、分化和迁移有促进作用, 能够用于预防中风、治疗中风、中风后遗症, 以及冠心病心绞痛等。在国内大量地应用于心脑血管疾病的治疗。

本研究利用循证医学 Meta 分析的方法, 对国内外发表的华佗再造丸治疗缺血性中风临床疗效的文献进行严格的方法学质量评价和 Meta 分析, 以进

一步评价华佗再造丸治疗缺血性中风的临床疗效和安全性, 并系统回顾与总结该类临床试验的研究质量和存在的问题等。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 研究对象的确定: 国内外发表的研究华佗再造丸治疗中风病临床疗效的随机对照文献。数据库: 国外(语种限制为英文): Medline 光盘数据库(1966—2006.5), EMBase 光盘数据库(1984—2006.5), Cochrane Library。国内: 中国生物医学文献数据库(CBM, 1979—2006.10), 中国学术期刊全文数据库(CNKI, 1994—2006.10)和中文科技期刊全文数据库(VIP, 1989—2006.10)。检索方法: 国外

收稿日期: 2007-01-26

基金项目: 国家十五攻关重点项目 (2004BA721A02)

* 通讯作者 黄 燕 Tel: 13380068906 E-mail: Stroketc15@yahoo.com.cn