

黄连解毒汤对体内外晚期糖基化终产物形成的影响

邓远雄^{1,2}, 何丽华¹, 万思婷¹, 陈波², 谢青季², 陈玉霜¹, 赵冰清¹, 陈蓉¹

1. 湖南师范大学医学院, 湖南 长沙 410013

2. 湖南师范大学 化学生物学及中药分析教育部重点实验室, 湖南 长沙 410081

摘要: **目的** 探讨黄连解毒汤对体内外晚期糖基化终产物 (AGEs) 形成的影响。**方法** 链脲佐菌素 (ip 给药) 建立糖尿病大鼠模型, 以不同剂量 (0.5、1.0 g/kg) 黄连解毒汤 ig 给药 90 d 后, 检测血糖、糖化血红蛋白, 血浆和肾组织中的果糖胺和 AGEs 水平。将不同浓度的黄连解毒汤与葡萄糖和牛血清白蛋白孵育 21 d, 用荧光光度法测定 AGEs 的荧光值。**结果** 黄连解毒汤能明显降低糖尿病大鼠的血糖和糖化血红蛋白水平 ($P < 0.01$), 抑制血浆和肾组织的果糖胺和 AGEs 的生成 ($P < 0.01$), 并呈明显的剂量依赖性。黄连解毒汤对体外 AGEs 的生成也有明显的抑制作用, 并有一定的剂量依赖性。**结论** 黄连解毒汤对体内外 AGEs 的生成均有明显的抑制作用, 这可能是黄连解毒汤治疗糖尿病并发症的机制之一。

关键词: 黄连解毒汤; 晚期糖基化终产物; 糖化血红蛋白; 果糖胺; 糖尿病

中图分类号: R286.72 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)01-0130-04

Effects of Huanglian Jiedu Decoction on formation of advanced glycation end products *in vivo* and *in vitro*

DENG Yuan-xiong^{1,2}, HE Li-hua¹, WAN Si-ting¹, CHEN Bo², XIE Qing-ji², CHEN Yu-shuang¹, ZHAO Bing-qing¹, CHEN Rong¹

1. Medical College of Hunan Normal University, Changsha 410013, China

2. Key Laboratory of Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research, Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

Key words: Huanglian Jiedu Decoction; advanced glycation end products; glycosylated hemoglobin; fructosamine; diabetes mellitus

糖尿病是一种常见的、严重危及人类健康的全身慢性代谢性疾病, 根据世界卫生组织的数据统计, 全球现已有 2.46 亿糖尿病患者^[1]。糖尿病的发生发展往往伴随多种并发症, 如心脑血管系统、肾、视网膜及神经系统等慢性病变, 严重影响患者的生活, 甚至威胁患者的生命。糖尿病肾病及血管病变是糖尿病患者主要的致死、致残原因, 其中血管病变包括大血管病变和微血管病变^[2]。大量研究表明, 晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGEs) 是诱发糖尿病血管病变的重要致病因素^[3]。AGEs 是还原糖 (如葡萄糖等) 与蛋白质、氨基酸、肽的游离氨基端通过非酶促糖化作用形成的不可逆聚合物^[4]。AGEs 与其受体晚期糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation end

products, RAGE) 结合后, 可激活细胞内一系列信号传导途径, 如蛋白激酶 C (PKC)、核因子- κ B (NF- κ B), 导致其分泌大量致炎性因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、细胞黏附分子、白细胞介素等, 导致血管内皮细胞受损, 进而导致糖尿病血管病变的发生^[5]。因此, 抑制 AGEs 形成是预防和治疗糖尿病血管病变及肾病等糖尿病并发症的重要环节。

黄连解毒汤 (Huanglian Jiedu Decoction, HJD) 出自《外台秘要》, 由黄连、黄芩、黄柏和栀子 4 味中药组成, 是中医清热解毒的经典方剂。具有泻火解毒之功效, 主治一切实热火毒、三焦热盛之证, 临床用于大热烦躁、口燥咽干、错语不眠、热病吐衄、外科痈疽疔毒等。现代研究表明, 黄连解毒汤不但具有抗菌、抗炎作用, 还具有降血糖、调血脂、

收稿日期: 2010-05-20

基金项目: 湖南省中医药局项目 (2008083); 湖南师范大学化学生物学及中药分析教育部重点实验室开放基金 (KLCBTCMR2009-03); 湖南师范大学创新项目 (043-0094); 湖南师范大学博士科研启动基金 (BQ-221)

作者简介: 邓远雄 (1968—), 湖南桂东人, 博士, 副教授, 主要研究方向为药理学和药动学。E-mail: dyxdjy@126.com

抗氧化和神经保护作用。研究发现黄连解毒汤对糖尿病及其并发症具有较好的治疗效果^[6-7]。为进一步探讨黄连解毒汤治疗糖尿病并发症的机制,本实验研究了黄连解毒汤对糖尿病大鼠体内晚期糖基化中间产物血清果糖胺(fructosamine, FMN)和糖化血红蛋白(GHb)水平以及AGEs在血清和肾中形成的影响,并观察了黄连解毒汤对体外蛋白质非酶糖基化的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雄性SD大鼠,体质量为180~220 g,由湖南师范大学医学院实验动物中心提供,合格证号:SCXK(湘)2007—0011。

1.2 药品

黄连、黄芩、黄柏和栀子均购于长沙市老百姓大药房,符合《中国药典》2010版一部有关规定,经湖南师范大学医学院生药教研室牟玲丽博士鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根茎,唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 除去栓皮的干燥树皮,茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。黄连解毒汤的制备方法:取黄连、黄芩、黄柏和栀子按3:2:2:3的比例混合,加10倍量水,煎煮1 h,共煎3次。滤液合并,离心后浓缩干燥即得,收率为20%(含黄芩苷58.39 mg/g, HPLC测定)。体外试验用的黄连解毒汤加一定量的水超声溶解,高速离心(15 000 r/min),取上清液用于实验。

1.3 试剂

链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ), Sigma公司,临用前用枸橼酸缓冲液配制;血糖测定试剂盒,北京荣盛生物技术有限公司;小牛血清白蛋白(BSA), Sigma公司;NaN₃, 南京化学试剂一厂;FMN、糖化血红蛋白试剂盒,南京建成生物工程研究所;其余试剂均为分析纯;水为超纯水。

1.4 仪器

J68型冷冻离心机, Beckman公司;高速冷冻离心机(Centrifuge 5417 CPR);荧光分光光度计(Spectra Max Gemini, 美国MD公司);全波段酶标仪(Type1500 Multiskan Spectrum, Thermo公司);721型分光光度计(上海分析仪器厂)。

1.5 造模与分组

取健康雄性SD大鼠,禁食12 h后按文献方法^[8]

并略作改进,一次性ip STZ 50 mg/kg,对照组给予等量的枸橼酸缓冲液,72 h后眼底静脉丛取血,用血糖试剂盒测定空腹血糖,血糖值 ≥ 11.1 mmol/L的动物确定为糖尿病大鼠。将糖尿病大鼠按血糖值范围随机分为黄连解毒汤高、低剂量(1.0、0.5 g/kg)组和模型组,每组8只。黄连解毒汤组大鼠每日ig给药1次,连续90 d。

1.6 检测指标

1.6.1 血糖测定 末次给药后禁食12 h,眼眶取血测空腹血糖(葡萄糖氧化酶法)。

1.6.2 血浆及肾组织 FMN 测定 末次给药后大鼠禁食12 h, 20%乌拉坦ip麻醉后,颈动脉取血4 mL,用肝素抗凝,分离血浆。取肾脏,在冰浴中研碎,制成100 g/L肾组织匀浆,低温离心。取血浆及肾匀浆上清,按试剂盒要求测定FMN。肾组织匀浆用考马斯亮蓝法进行蛋白定量。

1.6.3 GHb 测定 常规制备溶血液后, GHb试剂盒测定GHb水平,以每10 g血红蛋白吸光度(A)值表示。

1.6.4 血浆及肾组织 AGEs 测定 参考文献方法^[9-10],用荧光分光光度计测定血浆及肾组织匀浆上清荧光强度,激发波长370 nm,发射波长440 nm,狭缝3 nm。考马斯亮蓝法进行样品蛋白定量。以含BSA(1.0 g/L)的PBS的荧光值为1个自定义荧光单位(arbitrary units of fluorescence, AUF),样品的AGEs生成量以此折算(即样品荧光值/PBS荧光值)。

1.7 黄连解毒汤体外抑制AGEs形成

参考文献方法^[11],在PBS中加入5 g/L BSA、4.5 g/L葡萄糖,加入NaN₃防腐,再加入黄连解毒汤,使其终浓度(以黄芩苷计)分别为1、0.5、0.1 μ mol/L。以葛根素作为阳性对照药^[10]。同时设对照:①不加黄连解毒汤的完整糖基化系统(模型组);②加黄连解毒汤(1 μ mol/L)但不含BSA(无蛋白组);③加黄连解毒汤(1 μ mol/L)但不含葡萄糖(无糖组)。每组设5个复孔,糖基化和各对照体系均在37℃恒温、密封条件下反应。21 d后,测定各管的糖化白蛋白的荧光值。

1.8 统计学处理

结果以均数 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 对血糖、GHb及血浆、肾脏 FMN 的影响

模型组大鼠血糖值、GHb、血浆及肾脏 FMN 均明显高于对照组($P < 0.01$),说明糖尿病大鼠模

型复制成功。与模型组相比,黄连解毒汤均能够明显降低糖尿病大鼠的血糖和 GHb 水平 ($P<0.05$ 、 0.01),其中黄连解毒汤高剂量作用非常显著 ($P<$

0.01)。黄连解毒汤低剂量能显著降低血浆及肾脏 FMN 水平 ($P<0.05$),高剂量非常显著降低血浆及肾脏 FMN 水平 ($P<0.01$),结果见表 1。

表 1 黄连解毒汤对糖尿病大鼠血糖、GHb 以及血浆、肾脏中 FMN 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effects of HJD on blood glucose, GHb, and FMN in plasma and renal of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)	GHb/(AUF·mL ⁻¹)	FMN	
				血浆/(mmol·L ⁻¹)	肾脏组织/(mmol·g ⁻¹)
对照	—	5.43±0.48	20.88±3.56	1.81±0.37	0.31±0.06
模型	—	23.67±1.89 [△]	38.73±3.47 [△]	4.52±0.28 [△]	0.77±0.16 [△]
黄连解毒汤	0.5	19.77±3.80**	32.66±4.09**	3.83±0.31*	0.58±0.17*
	1.0	14.31±3.16**	26.60±3.12**	2.91±0.26**	0.48±0.09**

与对照组比较: [△] $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 表 2 同

[△] $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group, Table 2 is same

2.2 对血浆及肾脏 AGEs 生成的影响

模型组血浆及肾脏 AGEs 生成量均明显高于对照组 ($P<0.01$)。黄连解毒汤对大鼠血浆及肾脏 AGEs 的生成均有明显的抑制作用,高剂量作用非常显著 ($P<0.01$),结果见表 2。

表 2 黄连解毒汤对糖尿病大鼠血浆和肾脏组织中 AGEs 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effects of HLD on AGEs in plasma and renal of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	AGEs/(AUF·mL ⁻¹)	
		血浆	肾脏组织
对照	—	2.28±0.53	6.03±0.98
模型	—	5.89±0.76 [△]	15.68±2.41 [△]
黄连解毒汤	0.5	4.82±0.73*	8.82±2.03**
	1.0	3.69±0.52**	6.97±1.33**

2.3 对体外 AGEs 生成的影响

黄连解毒汤对体外非酶糖基化体系的荧光值具有明显的降低作用 ($P<0.01$),1、0.5 μmol/L 黄连解毒汤对蛋白质体外非酶糖基化反应具有明显的抑制作用,作用与阳性药葛根素作用接近,结果见表 3。

3 讨论

AGEs 是由体内的葡萄糖、果糖及 6-磷酸葡萄糖等酮糖与体内多种蛋白质,尤其是长寿命蛋白质(如胶原蛋白、基质蛋白等)发生非酶催化的糖基化作用而形成的, GHb 和 FMN 是 AGEs 形成过程中产生的中间产物。AGEs 是公认的糖尿病血管病变(包括大血管和微血管病变)的致病因子,大量研究表明,糖尿病患者体内存在高水平 AGEs 或 AGEs 中间产物^[12]。AGEs 在组织中形成和沉积后,引起

表 3 黄连解毒汤对体外 AGEs 生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of HJD on AGEs formation in vitro ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	加药量	荧光值
无糖	—	198.29±28.53
无蛋白	1.0 μmol·L ⁻¹	157.49±20.85
模型	1.0 μmol·L ⁻¹	467.54±67.92 [△]
黄连解毒汤	0.1 μmol·L ⁻¹	442.75±66.31
	0.5 μmol·L ⁻¹	383.40±46.62**
	1.0 μmol·L ⁻¹	248.77±39.56**
葛根素	1 mg·mL ⁻¹	218.27±30.37**

与无糖组比较: [△] $P<0.01$; 与模型组比较: ** $P<0.01$

[△] $P<0.01$ vs sugar-free group; ** $P<0.01$ vs model group

组织的老化和功能衰退,在晶状体表现为白内障;在结缔组织表现为组织弹性降低、硬度增加,血管基底膜的糖基化则与老年性血管病变和糖尿病微血管病变有关。AGEs 与血管壁中的蛋白形成共价交联,导致血管结构和功能的损害^[13];同时, AGEs 还能促进血管内皮细胞膜上阴离子多糖蛋白的降解,增加血管通透性,破坏血管内皮的屏障作用^[14-15]。低密度脂蛋白(LDL)的糖基化修饰与高血脂症、糖尿病心血管并发症有密切关系。在糖尿病患者,糖基化的速度与正常人相比大大加快,与糖尿病微血管并发症密切相关^[16]。因此 AGE 与糖尿病心血管疾病的发生发展关系十分密切。本研究检测了黄连解毒汤对糖尿病大鼠体内 AGEs 及其中间产物(FMN, GHb)形成的影响,并研究黄连解毒汤在体外对蛋白质非酶糖基化反应的抑制作用。

本研究结果表明,黄连解毒汤能明显降低血糖、抑制糖尿病大鼠体内 AGEs 及其中间产物 FMN 和

GHb 的形成;黄连解毒汤在体外也能显著抑制蛋白质的非酶糖基化,最终抑制 AGEs 的生成。大量研究表明,许多具有抗氧化作用的天然药物成分,如槲皮素、西红花酸、荞麦花黄酮等具有良好的抑制 AGEs 的作用,而且抑制 AGEs 是这些药物成分治疗糖尿病并发症的主要机制之一^[8-9, 11, 17]。黄连解毒汤由黄芩、黄连、栀子和黄柏 4 味中药组成,黄芩含有黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和木蝴蝶素等多种黄酮类成分;栀子含有西红花苷、西红花酸和栀子苷等成分,其中的西红花酸和西红花苷具有强大的抗氧化作用,而栀子苷也具有一定的抗氧化作用。因此推测黄连解毒汤中大量的具有良好的抗氧化作用的成分通过抑制糖尿病过程中 AGEs 的生成,从而发挥治疗糖尿病并发症的作用。黄连解毒汤治疗糖尿病及其并发症的确切作用机制仍有待深入研究。

参考文献

- [1] 贺星,田红,徐颂,等. 糖尿病治疗药物的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(3): 129-133.
- [2] Zimmet P, Albeti K G, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic [J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 782-787.
- [3] Ahmed N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2005, 67(1): 3-21.
- [4] Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging [J]. *Recent Prog Horm Res*, 2001, 56: 1-21.
- [5] Yan S F, Ramasamy R, Naka Y, et al. Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond [J]. *Circ Res*, 2003, 93(12): 1159-1169.
- [6] 邓远雄, 刘晓东, 刘李, 等. 黄连解毒汤对糖尿病大鼠肠道二糖酶活性的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1127-1130.
- [7] 邓远雄, 杨昌华, 牟玲丽. 黄连解毒汤中黄芩苷和汉黄芩苷在糖尿病大鼠体内的药动学 [J]. 中草药, 2008, 39(2): 227-231.
- [8] 韩淑英, 陈晓玉, 王志路, 等. 荞麦花总黄酮对体内外蛋白质非酶糖基化的抑制作用 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(11): 1242-1244.
- [9] 徐向进, 张家庆, 黄庆玲. 槲皮素对糖尿病大鼠肾脏非酶糖基化及氧化的抑制作用 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 1998, 14(1): 34-37.
- [10] Brownlee M, Vlassara H, Kooney T, et al. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking [J]. *Science*, 1986, 232(9168): 1629-1633.
- [11] 王雅娟, 钱之玉, 沈祥春. 西红花酸对体外蛋白质非酶糖基化的抑制作用 [J]. 中草药, 2005, 36(8): 1202-1205.
- [12] Wautier M P, Massin P, Guillausseau P J, et al. N-(carboxymethyl) lysine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients [J]. *Diabetes Metab*, 2003, 29(1): 44-52.
- [13] Rojas A, Morales M A. Advanced glycation and endothelial functions: A link towards vascular complications in diabetes [J]. *Life Sci*, 2004, 76(7): 715-730.
- [14] Ido Y, Chang K C, Lejeune W S, et al. Vascular dysfunction induced by AGE is mediated by VEGF via mechanisms involving reactive oxygen species, guanylate cyclase, and protein kinase C [J]. *Microcirculation*, 2001, 8(4): 251-263.
- [15] Moore T C, Moore J E, Kaji Y, et al. The role of advanced glycation end products in retinal microvascular leukostasis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(10): 4457-4464.
- [16] Neeper M, Schmidt A M, Brett J, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(21): 149982-150041.
- [17] 向敏, 钱之玉, 周成华. 西红花酸对糖尿病大鼠体内晚期糖基化终产物的形成及其受体表达的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(4): 448-452.