

attenuates atherosclerotic lesions in ApoE deficient mouse model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 159: 84-92.

[11] Zhang Y, Zhang L, Geng Y, *et al.* Hawthorn fruit attenuates atherosclerosis by improving the hypolipidemic and antioxidant activities in apolipoprotein e-deficient mice [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2014, 21(2): 119-128.

[12] Poon I K, Lucas C D, Rossi A G, *et al.* Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 166-180.

[13] Da S V K, de Freitas B S, Da S D A, *et al.* Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin, and mitochondrial fission protein DNMI1L expression levels in rats with brain iron overload: implications for neuroprotection [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(1): 222-233.

[14] Yoo R J, Kim M H, Woo S K, *et al.* Monitoring of macrophage accumulation in statin-treated atherosclerotic mouse model using sodium iodide symporter imaging system[J]. *Nucl Med Biol*, 2017, 48: 45-51.

[15] Qin W, Lu Y, Zhan C, *et al.* Simvastatin suppresses apoptosis in vulnerable atherosclerotic plaques through regulating the expression of p (53), Bcl-2 and Bcl-xL [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2012, 26(1): 23-30.

# 藏药四味姜黄方对 STZ 诱导糖尿病肾病大鼠模型的剂量配比关系的初步研究

童 东<sup>1</sup>, 王文倩<sup>1</sup>, 罗 煜<sup>1</sup>, 苏丝雨<sup>1</sup>, 周 奎<sup>1</sup>, 周邦华<sup>1</sup>, 曾 勇<sup>1</sup>, 赖先荣<sup>2\*</sup>  
(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611137)

**摘要:** **目的** 开展藏药四味姜黄方的剂量配比关系研究, 探索其处方剂量配比关系对糖尿病肾病 (DN) 大鼠的保护作用及其机制。**方法** 除正常组外, 其余大鼠均使用 60 mg/kg 体质量的链脲佐菌素 (STZ) 一次性腹腔内注射法复制糖尿病模型, 待 DN 模型成功后将其分为模型组、二甲双胍阳性组、四味姜黄方 8 个不同剂量配比组 (采用均匀设计法), 按给药剂量表每天灌胃给予相应药物 1 次, 连续给药 4 周。使用血糖仪测空腹血糖 (FBG), 化学法检测血清尿素氮 (BUN)、尿酸 (UA)、肌酐 (Scr) 和总蛋白 (TP) 浓度, ELISA 试剂盒检测转化生长因子-β1 (TGF-β1) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 水平, 电镜下观察肾脏病理形态学变化及测定肾小球基底膜厚度。采用主成分分析 (PCA)、多元逐步回归分析 (MSRA) 等多元分析方法, 对配比剂量-药效学结果进行剂量配比关系分析。**结果** 各给药组的各项药效学指标均有不同程度的改善。MSRA 结果表明 BUN、肾指数、FBG、肾小球基底膜厚度、VEGF、Scr 和 UA 7 项指标水平与剂量配比存在多元一次线性关系或多元二次非线性关系, 其回归方程有显著性意义 ( $P < 0.05$ ); TGF-β1 和 TP 水平与剂量配比间无明显线性或非线性关系, 其回归方程无显著性意义 ( $P > 0.05$ ); 在均匀设计取值范围内的全局寻优比较, 大鼠模型的优化配比剂量为姜黄: 小檗皮: 余甘子: 蒺藜 = 1: 2: 1: 2。**结论** 四味姜黄方各剂量比对 DN 的各项指标均有不同程度的改善, 这可能与降低 BUN、肾指数、FBG、肾小球基底膜厚度、VEGF、Scr 和 UA 等指标的水平有关。

**关键词:** 藏药; 四味姜黄方; 糖尿病肾病; 剂量配比; 药效学; 多元分析

中图分类号: R285.5      文献标志码: A      文章编号: 1001-1528(2018)03-0516-09  
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.03.003

## Preliminary study of the dose-proportion relation of Tibetan medicine Siwei Jianghuang Prescription on diabetic nephropathy rats induced by STZ

TONG Dong<sup>1</sup>, WANG Wen-qian<sup>1</sup>, LUO Yu<sup>1</sup>, SU Si-yu<sup>1</sup>, ZHOU Kui<sup>1</sup>, ZHOU Bang-hua<sup>1</sup>, ZENG Yong<sup>1</sup>, LAI Xian-rong<sup>2\*</sup>  
(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. College of Ethnomedicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**收稿日期:** 2017-08-22  
**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目 (81473427)  
**作者简介:** 童 东 (1990—), 女, 硕士生, 从事中药药效与毒理研究。Tel: 18382188293, E-mail: 2365975228@ qq.com  
**\* 通信作者:** 赖先荣 (1971—), 男, 副研究员, 从事中药及民族药创新药物研究。Tel: (028) 61800074, E-mail: vegf@ qq.com

**ABSTRACT: AIM** To investigate the dose-proportion relation of Tibetan medicine Siwei Jianghuang Prescription (SJP) for protective effects on diabetic nephropathy (DN), and the underlying mechanism. **METHODS** Diabetes mellitus rats induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) (60 mg/kg) were randomly divided into model group, metformin support group, and eight SJP groups with dose-proportion variation (with reference to the uniform design method) for corresponding drug administration once a day, for four weeks. Measurement of fasting blood glucose (FBG) by a blood glucose meter, the concentrations of blood urea nitrogen (BUN), uric acid (UA), serum creatinine (SCr) and total protein (TP) by chemical methods, serum transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) by ELISA kits were conducted, the pathological morphology observation and glomerular basement membrane thickness detection by electron microscope were accomplished as well. Principal components analysis (PCA) and multivariate progressive regression analysis (MSRA) were employed to analyze the relationship between the dose-proportion to pharmacodynamics. **RESULTS** The resultant indexes revealed variant pharmacological improvement in each treatment group. MSRA results showed that the levels of BUN, renal index, FBG, glomerular basement membrane thickness, VEGF, Scr, and UA had correlative relations with a multiple linear or a multiple non-linear in all groups, which regression equation had a statistical significance ( $P < 0.05$ ); TGF- $\beta$ 1 level and total protein index with the dose-proportion had no linear or non-linear relation, which the regression equation statistical showed non-significance ( $P > 0.05$ ). In the global optimization comparison around the range of uniform design, the optimal dosage of the rats model was *Curcumae Longae Rhizoma* : *Berberidis dictyophyllae Cortex* : *Phyllanthi Fructus* : *Tribuli Fructus* = 1 : 2 : 1 : 2. **CONCLUSION** Siwei Jianghuang Prescription shows better therapeutic effects on DN, which may be related to reducing the levels of BUN, renal index, FBG, glomerular basement membrane thickness, VEGF, Scr and UA. **KEY WORDS:** Tibetan medicine; Siwei Jianghuang Prescription (SJP); diabetic nephropathy (DN); dose-proportion; pharmacodynamics; multiple analysis

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN), 是糖尿病最常见的慢性并发症之一, 也是导致终末期肾衰竭的主要原因<sup>[1]</sup>, 其病理特点为早期肾小球高滤过, 毛细血管通透性改变, 细膜细胞和细膜基质增多, 肾小球基底膜增厚, 细胞外基质 (ECM) 沉积, 继而肾小球硬化、纤维化, 最终导致肾功能恶化, 因此, DN 的早期防治尤为重要<sup>[2-3]</sup>。藏医学者将 DN 归属于“京尼萨库”病的范畴<sup>[4]</sup>, “京尼”意为尿频, “萨库”意为消耗体能的混浊之液, 认为小便频繁、尿液混浊、消耗体能是该病的本质特征。藏医《四部医典·秘诀医典》记述本病“尿迹之处蝇蜂皆集聚”与糖尿病人的尿液易招来昆虫的特征相近, 采用小檗皮、姜黄、余甘子、蒺藜组成“四味姜黄方”煎浓汤进行治疗, 现代研究表明这些药物对糖尿病及其并发症 (包括 DN) 的症状有明显的改善作用<sup>[5-8]</sup>。然而,《四部医典》和《蓝琉璃》等藏医经典原著仅记载了处方各药味的名称, 没有记载具体的药物剂量, “有药无量”, 难以在临床上推广应用, 而西南六省区藏药标准及部颁标准 1995 年版中收录的处方剂量配比也有差异, 而中医认为“处方不传之秘

在于剂量”, 因此本研究基于药效学试验开展“四味姜黄方”不同剂量配比对 DN 的疗效评价具有重要意义, 有利于进一步指导藏医临床用药。

1 材料与仪器

1.1 仪器 HPLC 色谱仪 (Agilent 1260 型, 配备在线脱气机、自动进样器、二极管阵列检测器、柱温箱, 美国安捷伦公司); 色谱柱: Capcell Pak C<sub>18</sub>-MG II (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m, 日本资生堂公司); 优普纯水制造系统 (型号 UPH-I-10T, 成都超纯科技有限公司); 血糖仪 (ACCCU-CHEK Performa, 罗氏卓越型, 配套血糖试纸及一次性采血针, 罗氏诊断产品 [上海] 有限公司生产); 全波长多功能读数仪 (VARIOSKAN FLASH 2.4.3, 美国 Thermo 公司); 恒温培养振荡器 (ZHWHY-100H, 上海智城分析仪器制造有限公司); 透射电镜 (H-600IV, 日本日立公司)。

1.2 药品与试剂 姜黄为姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的干燥根茎, 余甘子为大戟科植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的干燥成熟果实, 蒺藜为蒺藜科植物蒺藜 *Tribulus terrestris* L. 的干燥成熟果实, 以上 3 味药材均购自成都市国际商贸城药材市

场,经成都中医药大学赖先荣副研究员检验,符合2015年版《中国药典》(一部)正文项下有关规定。小檗皮,产地西藏,由西藏甘露藏药厂提供,经成都中医药大学范刚副研究员 DNA 条形码鉴定其品种,为藏医临床使用的小檗科植物刺红珠 *Berberis dictyophylla* Franch. 的干燥茎中皮层,符合六省区藏药标准小檗皮药材项下的有关规定。含有量测定用四味姜黄汤散样品,由成都中医药大学民族医药学院提供,按中华人民共和国卫生部药品标准(藏药第一册,1995 年版)该品种项下制法配制,姜黄 15 g、小檗皮 12.5 g、余甘子 25 g、蒺藜 25 g。没食子酸对照品(批号 110831-201204)、盐酸药根碱对照品(批号 110733-201108)、盐酸巴马汀对照品(批号 110732-201309)、盐酸小檗碱对照品(批号 110713-201212)和姜黄素对照品(批号 110823-201004)由中国食品药品检定研究院提供,供含有量测定用;木兰花碱对照品(CAS 为 2141-09-5,99.77%) and 鞣花酸对照品(CAS 为 476-66-4, MF 为 C14H6O8, 99.65%)由四川赛因斯特生物科技有限公司提供;磷酸,乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。盐酸二甲双胍(批号 20160120,贵州圣济堂制药有限公司),在使用时用双蒸水配成 20 mg/mL 的溶液;STZ(批号 S-0130, Sigma 公司);血尿素氮试剂盒(批号 20161111)、血肌酐试剂盒(批号 20160803)、血尿酸试剂盒(批号 20161118)及血清总蛋白定量试剂盒(批号 20161115)均购自南京建成生物科技有限公司;TGF-β1 试剂盒(批号 21F305)和 VEGF 试剂盒(批号 21F322)购自依科赛生物科技(太仓)有限公司。

1.3 试验动物 66 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质质量 220 ~ 250 g,由成都达硕试验动物有限公司中心提供,生产许可证号:SCXK(川)2015~030。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法测定藏药四味姜黄汤散中 7 种成分的含有量

2.1.1 色谱条件 Capcell Pak C<sub>18</sub>-MGII (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.1% 磷酸水溶液,梯度洗脱(见表 1);检测波长为 270 nm (0 ~ 60 min) 和 430 nm (60 ~ 70 min,姜黄素);体积流量 0.8 mL/min;进样量 10 μL;柱温 30 ℃。其中理论塔板数按没食子酸、盐酸小檗碱和姜黄素峰计算应不低于 2 000、5 000、4 000。

表 1 四味姜黄汤散 HPLC 梯度洗脱条件  
Tab. 1 HPLC conditions of gradient elution for SJP powder

t/min	A 乙腈/%	B 0.1% 磷酸溶液/%
0	3	97
8	3	97
15	17	83
20	17	83
33	19	81
38	25	75
48	25	75
70	80	20

2.1.2 对照品溶液的制备 取各对照品适量,精密称定,置于量瓶中,加 90% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得没食子酸 1.248 0 mg/mL、木兰花碱 1.420 0 mg/mL、鞣花酸 0.378 0 mg/mL、盐酸药根碱 0.118 0 mg/mL、盐酸巴马汀 0.079 9 mg/mL、盐酸小檗碱 0.490 8 mg/mL 和姜黄素 0.302 0 mg/mL 对照品贮备液。分别精密吸取上述对照品贮备液 1 mL,放入同一 10 mL 量瓶中,加 80% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得没食子酸 124.80 μg/mL、木兰花碱 142.00 μg/mL、鞣花酸 37.80 μg/mL、盐酸药根碱 11.80 μg/mL、盐酸巴马汀 7.99 μg/mL、盐酸小檗碱 49.08 μg/mL、姜黄素 30.20 μg/mL 的混合对照品溶液,避光冷藏备用。

2.1.3 供试品溶液制备 按处方比例精密称定四味姜黄汤散供试品 0.5 g,置具塞锥形瓶中,加入盐酸 90% 甲醇溶液(2:100,体积比)50 mL,摇匀,称重,超声 20 min,冷却再称重,用同一溶剂补足减失质量,摇匀,滤过,续滤液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。将供试品溶液,混合对照品溶液分别按“2.1.1”项下色谱条件,进样 10 μL。结果显示,供试品色谱呈现与(混合)对照品色谱保留时间相应的色谱峰。如图 1。

2.1.4 含有量测定 按处方比例取实验室自制四味姜黄汤散供试品 0.5 g,各 3 份,精密称定,按“2.1.2”项下供试品溶液制备方法制备,照“2.1.1”项下色谱条件测定,计算含有量,见表 2。结果测得四味姜黄汤散中没食子酸、木兰花碱、鞣花酸、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱和姜黄素的含有量分别为 7.648 2、13.802 4、3.729 0、0.931 6、0.678 9、4.678 0、3.789 0 mg/g。

2.2 四味姜黄汤不同剂量配比对 DN 大鼠的影响

2.2.1 均匀设计法设计四味姜黄汤不同剂量配比组 参考药品标准收载的处方各药味临床用药剂量范围,以最低用量的 1/2 为低限,最高用量以人用临床剂量的 2 倍为高限,大鼠按人用量的 10 倍量

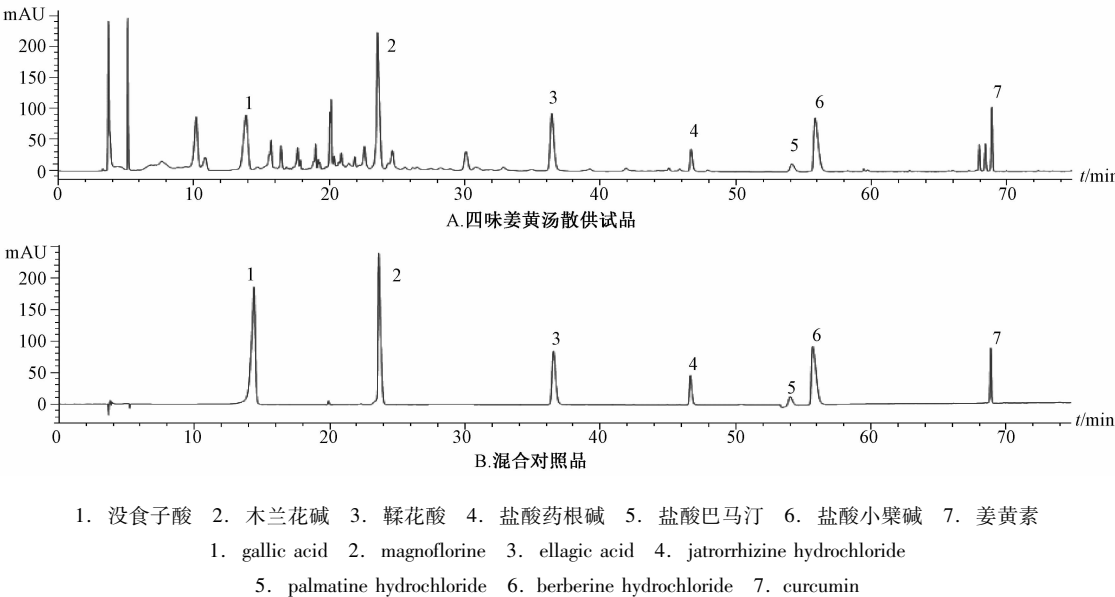


图1 四味姜黄汤散供试品和混合对照品高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms for Siwei Jianghuang Powder (SJP) and mixed reference substance

表 2 四味姜黄汤散含有量测定结果 (n=3)

Tab. 2 Content determination results of SJP powder(n=3)

	样品 1/ (mg·g <sup>-1</sup> )	样品 2/ (mg·g <sup>-1</sup> )	样品 3/ (mg·g <sup>-1</sup> )	平均值/ (mg·g <sup>-1</sup> )
没食子酸	7.649 6	7.626 3	7.668 7	7.648 2
木兰花碱	13.795 9	13.834 7	13.776 7	13.802 4
鞣花酸	3.746 5	3.711 6	3.728 9	3.729 0
盐酸药根碱	0.929 1	0.944 2	0.921 5	0.931 6
盐酸巴马汀	0.675 0	0.684 8	0.676 9	0.678 9
盐酸小檗碱	4.685 5	4.679 7	4.668 8	4.678 0
姜黄素	3.772 0	3.793 9	3.801 0	3.789 0

作为等效剂量（大鼠标准体质量0.2 kg、成年人标准体质量 70 kg），采用均匀设计表 U8\*（8<sup>4</sup>）建立 4 因素 8 水平配比剂量矩阵<sup>[9]</sup>。不同配比剂量表如表 3，按不同配比组剂量称取药物，按藏医临床传统用法，加水提取 3 次，第 1 次加水 12 倍量，浸泡 1 h，煎煮 1 h，趁热滤过，药渣加水再煎煮 2 次，每次加水 10 倍量，每次 1 h，趁热滤过，合并滤液，浓缩至所需的浓度。

表 3 四味姜黄方不同配比剂量

Tab. 3 Different dose-proportion of SJP

配比 组号	姜黄/ (g·kg <sup>-1</sup> )	小檗皮/ (g·kg <sup>-1</sup> )	余甘子/ (g·kg <sup>-1</sup> )	蒺藜/ (g·kg <sup>-1</sup> )
1	0.2	0.4	1.4	3.2
2	0.6	0.8	3.0	2.8
3	1.0	1.2	1.0	2.4
4	1.4	1.6	2.6	2.0
5	1.8	0.2	0.6	1.6
6	2.2	0.6	2.2	1.2
7	2.6	1.0	0.2	0.8
8	3.0	1.4	1.8	0.4

注:采用 U8\*（8<sup>4</sup>）均匀设计表

2.2.2 糖尿病肾病大鼠模型的建立 66 只雄性 SD 大鼠适应性饲养 1 周后，随机分组，选取 6 只大鼠作为正常组，其余为糖尿病模型组，禁食不禁水 12 h，模型组以 60 mg/kg 体质量单次腹腔注射 1% 的 STZ（临用前溶解于 0.1 mol/L，4 ℃，pH 4.5 的无菌柠檬酸钠缓冲液），正常组注射同样剂量柠檬酸钠缓冲液，4 h 后给模型组灌以 50% 葡萄糖（2 g/kg），防止大鼠低血糖死亡，72 h 后尾尖采血测空腹血糖，以空腹血糖 > 16.7 mmol/L 为糖尿病造模成功。模型建立成功后，每 2 周分别在模型组和正常组随机抽取 6 只大鼠禁食不禁水收集 24 h 尿液，分别测定血糖、尿蛋白以摸索早期 DN 形成时间。在 10 周时血糖 > 16.7 mmol/L，尿蛋白含有量 ≥ 20 mg/24 h，表明已形成早期糖尿病肾病<sup>[10-11]</sup>。

2.2.3 分组与给药 取未造模的大鼠 6 只作为正常组，早期糖尿病肾病造模成功的 60 只大鼠随机分为模型组、二甲双胍组、四味姜黄方 8 个配比剂量组，模型组和正常组灌胃生理盐水，其余各组灌胃相应药物，所有组均按 10 mL/kg 体质量给药，每天 1 次，连续给药 30 d。

2.2.4 标本收集 给药 30 d 后，动物禁食不禁水 12 h 测末次血糖、体质量，用 20% 乌拉坦（7 mL/kg）经腹腔注射麻醉大鼠后，腹主动脉取血，室温放置，3 000 r/min 离心 15 min，取上清液测定血清中 FBG、BUN、Scr、UA、TP、TGF-β1 和 VEGF 含有量。同时，快速取出左侧肾脏，去除包膜，称

重，计算肾指数（肾指数 = 肾质量 ÷ 体质量），另每组选取 2~3 只大鼠的部分肾组织用 2.5% 戊二醛溶液固定，进行超微结构观察及测定肾小球基底膜厚度，电镜结果见图 2。

图 2 显示，正常对照组大鼠肾小球基底膜厚薄均匀，足细胞排列整齐，基质均匀无增厚，足突间未见沉积物；模型组基底膜明显增厚，并可见电子

致密物沉积，足细胞足突数量减少、融合，部分已消失溶解。与模型组比较，二甲双胍组、藏药四味姜黄方各配伍组干预后能够有效改善病理损伤，肾小球基底膜厚度有所减少。其中二甲双胍组、第 3 组和第 5 组对 DN 大鼠肾小球结构损伤的保护作用更为明显。

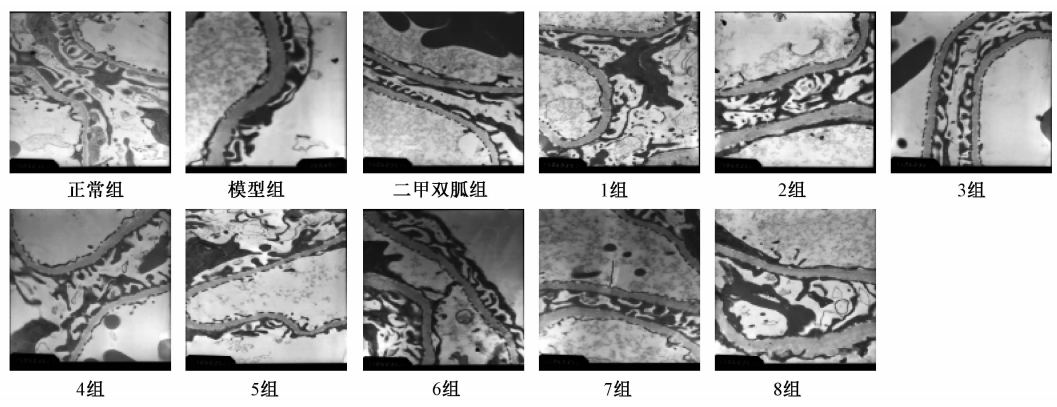


图 2 四味姜黄方对 DN 大鼠肾脏病理形态学的影响 (TEM, ×15 000)  
Fig. 2 Effect of SJP on renal pathological morphology of DN rats (TEM, ×15 000)

3 数据处理

3.1 统计分析 应用 SPSS 22.0 软件对四味姜黄方对 DN 大鼠药效学数据进行统计，试验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行组间差异性比较，方差齐者进行 LSD 检验，方差不齐者进行 Tamhane's T2 检验， $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

表 4 的结果表明，与正常组比较，模型组的 BUN 水平升高有显著性意义 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，二甲双胍组、四味姜黄方各配比剂量组 (配比第 8 组除外) 的 BUN 水平降低有显著性意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与正常组比较，模型组的增加有显著性意义 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，二甲双胍组、四味姜黄方配比第 1、3 组的肾指数水平降低有显著性意义 ( $P < 0.05$ )，其余配比剂量组无显著性变化 ( $P > 0.05$ )，有降低趋势。与正常组比较，模型组的 FBG 水平升高有显著性意义 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，二甲双胍组、四味姜黄方各配比剂量组的 FBG 水平降低有显著性意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与正常组比较，模型组的 VEGF 水平升高有显著性意义 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，二甲双胍组、四味姜黄方各配比剂量组 (配比第 7、8 组除外) 的 VEGF 水平降低有显著性意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )，其余配比剂量

组无显著性变化 ( $P > 0.05$ )，有降低趋势。与正常组比较，模型组的肾小球基底膜厚度增加有显著性意义 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，二甲双胍组、四味姜黄方配比第 3、5 组的肾小球基底膜厚度降低有显著性意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )，其余配比剂量组无显著性变化 ( $P > 0.05$ )，有降低趋势。

表 5 的结果表明，与正常组比较，模型组的 Scr 水平升高有显著性意义 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，二甲双胍组、四味姜黄方各配比剂量组 (配比第 1、8 组除外) 的 Scr 水平降低有显著性意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与正常组比较，模型组的 TGF- $\beta 1$  水平升高有显著性意义 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，二甲双胍组、四味姜黄方各配比剂量组 (配比第 7、8 组除外) 的 TGF- $\beta 1$  水平降低有显著性意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与正常组比较，模型组的 UA 水平升高有显著性意义 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，二甲双胍组、四味姜黄方各配比剂量组 (配比第 4 组除外) 的 UA 水平降低有显著性意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与正常组比较，模型组的 TP 水平降低有显著性意义 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，二甲双胍组、四味姜黄方各配比剂量组 (配比第 2 组除外) 的 TP 水平升高有显著性意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

表 4 四味姜黄方对 DN 大鼠的药效学数据 ( I ,  $\bar{x} \pm s$  ,  $n = 6$ )  
Tab. 4 Pharmacodynamic data of SJP in DN rats ( I ,  $\bar{x} \pm s$  ,  $n = 6$ )

组别	BUN/(mmol·L <sup>-1</sup> )	肾指数(×10 <sup>-3</sup> )	FBG/(mmol·L <sup>-1</sup> )	VEGF/(pg·mL <sup>-1</sup> )	肾小球基底膜厚度/μm
1 组	7.2±0.8**	5.38±0.46*	23.1±5.0*	21.9±7.9**	0.318 2±0.040 0
2 组	6.6±2.3**	5.54±1.12	23.6±5.5*	24.2±11.6**	0.286 1±0.034 8
3 组	6.9±1.4**	5.59±0.53*	22.6±5.6*	23.4±5.3**	0.259 6±0.037 7*
4 组	6.5±1.3**	6.40±2.42	24.5±3.2**	23.2±8.6**	0.282 9±0.030 9
5 组	5.7±1.5**	5.79±0.60	22.5±2.9**	32.5±14.1*	0.269 7±0.034 5*
6 组	7.4±1.4**	5.91±0.97	21.4±2.0**	36.4±11.1*	0.282 8±0.031 7
7 组	10.2±0.9*	5.85±0.57	24.7±4.4*	37.1±15.2	0.270 7±0.037 3
8 组	9.3±3.0	5.57±0.96	22.8±2.6**	43.3±27.7	0.294 7±0.023 4
二甲双胍组	3.6±0.8**	5.35±0.52*	26.4±2.0**	12.4±1.8**	0.259 2±0.021 3**
正常组	3.4±0.6	2.47±0.14	5.3±0.7	14.3±2.3	0.181 0±0.026 3
模型组	11.3±0.8▲▲	6.45±0.83▲▲	32.0±1.5▲▲	54.4±3.2▲▲	0.293 5±0.038 0▲▲

注:与正常组比较,▲▲ $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

表 5 四味姜黄方对 DN 大鼠的药效学数据 ( II ,  $\bar{x} \pm s$  ,  $n = 6$ )  
Tab. 5 Pharmacodynamic data of SJP in DN rats ( II ,  $\bar{x} \pm s$  ,  $n = 6$ )

组别	Scr/(μmol·L <sup>-1</sup> )	TGF-β1/(mg·mL <sup>-1</sup> )	UA/(μmol·L <sup>-1</sup> )	TP/(g·L <sup>-1</sup> )
1 组	198.7±22.0	73.3±13.7**	193.6±63.8*	61.4±7.2*
2 组	130.5±65.6*	70.6±21.4*	233.6±97.4*	66.3±15.4
3 组	171.5±34.5*	78.3±11.3**	229.8±57.2*	59.8±4.8**
4 组	140.8±29.0**	77.3±14.7*	241.9±151.4	58.9±4.1**
5 组	139.1±35.8**	76.8±2.5**	199.7±52.0*	59.6±3.9**
6 组	160.1±25.1**	86.9±8.2*	237.5±92.8*	60.5±3.8**
7 组	170.4±6.8*	80.7±29.2	143.3±33.9**	63.8±5.1**
8 组	194.6±26.1	78.3±18.5	172.0±24.4*	61.2±8.9*
二甲双胍组	113.7±31.0**	62.2±2.3**	146.2±19.4**	60.3±2.4**
正常组	103.5±31.3	58.1±4.7	119.9±39.6	65.0±2.0
模型组	222.8±35.2▲▲	97.1±5.0▲▲	410.4±151.1▲▲	52.9±2.1▲▲

注:与正常组比较,▲▲ $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

3.2 主成分分析 主成分分析(principal components analysis, PCA)是通过降维过程考察多个定量数值变量间相关性的一种多元统计方法,用较少的指标来代替和综合反映原来较多的信息,这些综合后的指标就是可以代表原来多指标的主成分<sup>[12-15]</sup>。因此,采用 PCA 法对表 4~5 进行数据挖掘,能够发现有效干预早期糖尿病肾病的四味姜黄方最佳剂量配比组及其作用机制。由于不同药效学数据具有量纲单位、数量级差异,有必要采用适当的数据标准化变换方法进行无量纲化处理,以解决数据可比性问题。通过对主成分的方差贡献率进行比较,结果表明反正切标准化变换后的数值在[-1,1]内,各指标均处于同一数量级,主成分的方差贡献率最大,可以解释 88% 的主成分差异的来源,适合进行综合对比评价。

图 3 表示经过降维处理后 8 个不同配比剂量组主成分得分在二维空间的分布情况,图中横坐标表示每个配比组的第一主成分得分值,纵坐标表示每个配比组的第二主成分得分值。图中区域 1 表示模

型组的主成分得分区域、区域 2 表示各给药组的主成分得分区域、区域 3 表示空白组的主成分得分区域、区域 4 为离群的 2 个配比给药组的主成分得分区域。从图中可以明显看出区域 1 与区域 3 之间的距离最大,结合药效学指标,说明模型组造模成功,各项 DN 指标较空白组有明显改变;区域 2 及区域 4 包括了所有的给药组,与区域 1 的距离较近、与区域 3 的距离较远,说明各给药组的各项 DN 指标较模型组有不同程度的改善,但是难于恢复到正常水平。

图 3 还采用 Orange Canvas 软件的 k-means 聚类方法插件将所有样本分为 7 组(C1~C7):C1 组包含 6 个样本,即空白组的所有 6 个样本;C5 组包含 6 个样本,即模型组的所有 6 个样本;C3 组包含 19 个样本,与 C1 组的距离相对较小,说明改善较小;C2、C4、C6、C7 包含 35 个样本,与 C1 组的距离相对较大,说明改善较明显。

综上所述,结合药效学指标,说明各给药组对各项 DN 指标有不同程度的改善,但是难于恢复到

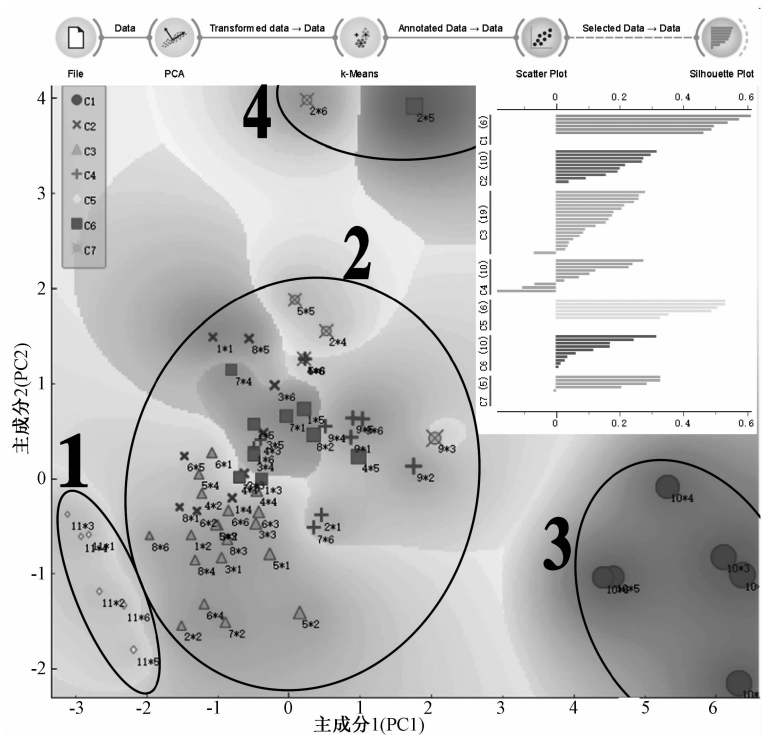


图3 四味姜黄方药效学标准化数据的主成分分析-得分图（Orange Canvas 软件，11 组 66 个样本）

Fig. 3 PCA scores of standardized pharmacodynamics data of SJP（Orange Canvas software, 11 groups, 66 samples）

正常水平，也说明作为 DN 作为糖尿病重要并发症的难治性。

3.3 多元逐步回归分析 采用 DPS 7.0 软件对四味姜黄方不同配比剂量（表 3）与药效学数据（表 4~5）的均值进行多元逐步回归分析，以姜黄的

配比剂量为  $X_1$ 、小檗皮的配比剂量为  $X_2$ 、余甘子的配比剂量为  $X_3$ 、蒺藜的配比剂量为  $X_4$ ，各指标的结果为  $Y$ ，多元逐步回归分结果见表 6。 $P < 0.05$  表示回归方程具有显著性意义， $P > 0.05$  表示回归方程不具有显著性意义，结果如表 6。

表 6 四味姜黄方配比剂量-药效学数据的多元逐步回归结果

Tab. 6 MSRA results for the herbal dosage-pharmacodynamics data of SJP

相关指标	回归方程	回归方程显著性(P)
BUN 水平	$Y = 9.4804 \times X_4$	0.0336
肾指数	$Y = 4.7085 + 0.3961 \times X_2 + 0.3149 \times X_1 \times X_4$	0.0014
FBG 水平	$Y = 18.0150 + 2.6165 \times X_2 + 1.0491 \times X_3 + 0.2645 \times X_4 \times X_4 - 0.6922 \times X_2 \times X_3$	0.0046
肾小球基底膜厚度	$Y = 0.3200 - 0.0184 \times X_1 \times X_4$	0.0147
VEGF 水平	$Y = 23.0292 + 8.9458 \times X_1 - 7.4083 \times X_2$	0.0010
Scr 水平	$Y = 228.4672 - 25.3797 \times X_1 \times X_4 - 4.9355 \times X_3 \times X_4$	0.0223
UA 水平	$Y = 168.1194 + 22.8779 \times X_2 \times X_4$	0.0263
TGF-β1 水平	-	>0.05
TP 水平	-	>0.05

表 6 的结果表明，BUN 水平、肾指数、FBG 水平、肾小球基底膜厚度、VEGF 水平、Scr 水平、UA 水平 7 指标与剂量配比存在多元一次线性关系或多元二次非线性关系，其回归方程有显著性意义 ( $P < 0.05$ )；TGF-β1 水平、TP 水平 2 个指标与剂量配比无明显的线性或非线性关系，其回归方程无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。

将各药味的配比剂量输入表 6 所列的各多元逐

步回归方程，进行取值范围内的全局优选，综合比较后得出大鼠用配比剂量为姜黄：小檗皮：余甘子：蒺藜为 0.2 g：0.4 g：0.2 g：0.4 g，将此剂量按药理学体型系数公式折算为成人用剂量为 1.944 g：3.888 g：1.944 g：3.888 g，结合小檗皮的成人用剂量为 3~5 g，折算为成人用每日剂量为姜黄：小檗皮：余甘子：蒺藜为 2 g：4 g：2 g：4 g，其药味剂量比例为姜黄：小檗皮：余甘

子：蒺藜为 1：2：1：2。

4 讨论与结论

DN 是糖尿病慢性微血管并发症之一，其症状可见：肾小球纤维化，肾小球毛细血管基底膜增厚、系膜扩张，细胞外基质增加，导致临床出现蛋白尿，渐进性肾功能损害，水肿，晚期出现严重肾功能衰竭。DN 的发生发展与细胞外的基质增加和堆积密切相关，研究表明随糖尿病肾病的进展，DN 大鼠血清中 VEGF 水平逐渐升高，促进新生血管的生成，改变了肾脏的微血管结构，参与了糖尿病肾病的发生<sup>[16-17]</sup>。VEGF 是一种高度特异性的血管内皮生长因子，通过改变血管内皮细胞功能与结构、增加肾小球毛细血管的通透性、促进细胞外基质的合成而参与 DN 的病程进展。临床研究表明，在 DN 早期时糖尿病患者尿 VEGF 水平即上调，且患者尿 VEGF 水平与 DN 病变进展具有临床相关性，糖尿病患者尿 VEGF 的高表达水平导致肾小球滤过膜结构的病理性改变，造成白蛋白等大分子通过<sup>[18]</sup>，同时增加细胞外基质的合成<sup>[19]</sup>。四味姜黄方主要由姜黄、小檗皮、余甘子、蒺藜 4 味药组成，本研究以一次性腹腔注射 STZ 诱导的 DN 大鼠为模型，以肾功能参数评价四味姜黄方不同剂量配比对 DN 大鼠肾损伤的保护作用，结果表明各配比剂量组分能够显著改善血尿素氮、肾指数、血糖、血肌酐、血尿酸等肾功能参数的异常情况。其中以姜黄：小檗皮：余甘子：蒺藜为 0.2 g：0.4 g：0.2 g：0.4 g 时效果最佳，此外从透射电镜的结果得知模型组大鼠的肾小球基底膜大部分增厚，细膜细胞明显增殖以及足细胞结构破坏。此组分干预后能有效的保护肾小球固有的细胞结构与功能的损伤，为了进一步研究该组分对抗 DN 大鼠肾损伤的作用机制，本实验进行了 VEGF 的测定，研究发现此组分能够有效拮抗 VEGF 的活性，对抗肾小球基底膜增厚。综上所述，四味姜黄方对 DN 大鼠肾损伤有保护作用，其部分作用机制为抑制 VEGF 的活化。

本研究采用 Orange Canvas、Unscrambler、DPS 及 SPSS 等多元数据统计学分析软件，采用 PCA、MSRA 等多种统计方法，对试验数据及结果进行综合分析，全局寻优得出大鼠用配比剂量为姜黄：小檗皮：余甘子：蒺藜为 0.2 g：0.4 g：0.2 g：0.4 g，折算为人用每日剂量为姜黄：小檗皮：余甘子：蒺藜为 2 g：4 g：2 g：4 g，其药味剂量配比为姜黄：小檗皮：余甘子：蒺藜为 1：2：1：2，而《藏药部颁标准（1995 年版）第一册》收录了四

味姜黄汤散，其人用每日剂量比例为姜黄：小檗皮：余甘子：蒺藜为 6：5：10：10，十八味诃子利尿丸的人用每日剂量比例为姜黄：小檗皮：余甘子：蒺藜为 2：2：3：2，与本研究优化的药味剂量比例均有不同，可能是因为本研究优化的药味剂量比例适宜于 DN，因此在下一步研究中将验证该优选剂量配比的有效性及其作用机制，进一步指导临床用药。

参考文献：

[ 1 ] Forbes J M, Cooper M E. Mechanisms of diabetic complications [J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(1): 137-188.

[ 2 ] 陈 娟, 张明华, 章 丽, 等. 牡丹皮苷/酚组分对糖尿病肾病大鼠肾损伤的保护作用及其机制研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(11): 1990-1998.

[ 3 ] Li J J, Kwak S J, Jung D S, *et al.* Podocyte biology in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int Suppl*, 2007(106): S36-S42.

[ 4 ] 王智森, 陆付耳. 中藏医对糖尿病病因病机的认识[J]. 中西医结合研究, 2011, 3(6): 313-316.

[ 5 ] 田 华, 母传贤, 尤丽菊, 等. 姜黄素对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用及其机制[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2013, 39(4): 747-750, 866.

[ 6 ] 张 燕, 孟宪丽, 岳丽珺, 等. 藏药小檗皮对糖尿病模型小鼠血糖水平影响的初步研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(19): 3619-3622, 3607.

[ 7 ] 胡 炜. 余甘子提取物对糖尿病大鼠肌肉和脂肪组织胰岛素信号通路的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(11): 2007-2010.

[ 8 ] 张素军, 冯尚彩. 蒺藜皂苷对正常和 2 型糖尿病大鼠餐后血糖水平的影响[J]. 实用药物与临床, 2012, 15(1): 1-3.

[ 9 ] 赖先荣, 吴秦西, 向永臣, 等. 均匀设计优选藏药如达胃宁的组方[J]. 中国药房, 2010, 21(19): 1734-1736.

[ 10 ] 李晓萍 李 进, 黄学宽. 槲芪降糖汤对糖尿病肾病大鼠肾脏 TGF-β1 及 VEGF 表达的影响[J]. 中成药, 2013, 35(3): 450-455.

[ 11 ] 芝 敏, 胡兰英, 徐佩茹. 2 型糖尿病肾病大鼠模型的建立及其肾脏病理特点[J]. 新疆医学, 2012, 42(12): 13-17.

[ 12 ] 赖先荣, 周邦华, 杜明胜, 等. 6 种黄连饮片中 6 种生物碱的 RP-HPLC 含量测定及与“治消渴”药效学的谱-效关系分析[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(24): 4579-4586.

[ 13 ] 赵 磊, 李继海, 朱大洲, 等. 5 种鹿茸营养成分的主成分分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(9): 2571-2575.

[ 14 ] 万星火, 檀亦丽. 主成分分析原始数据的预处理问题[J]. 中国卫生统计, 2005, 22(5): 327-329.

[ 15 ] 代晓琳, 马学强, 王甜甜. 改进的主成分分析法对拟南芥基因的分析[J]. 微型机与应用, 2015, 34(14): 51-53, 57.



- [16] Lan T, Liu W, Xie X, *et al.* Berberine suppresses high glucose-induced TGF- $\beta$ 1 and fibronectin synthesis in mesangial cells through inhibition of sphingosine kinase 1/AP-1 pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 697 (1-3): 165-172.
- [17] Tufro A, Veron D. VEGF and Podocytes in diabetic nephropathy[J]. *Semin Nephrol*, 2012, 32(4): 385-393.
- [18] 李晓萍, 李 进, 黄学宽. 植芪降糖汤对糖尿病肾病大鼠肾脏 TGF- $\beta$ 1 及 VEGF 表达的影响[J]. 中成药, 2013, 35 (3): 450-455.
- [19] 刘 圣, 余 娜, 张小力, 等. 小檗碱对早期糖尿病肾病大鼠肾组织 TGF- $\beta$ 1/SnoN 表达失衡及其 Smad 信号通路的调控作用[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(23): 3604-3610.

## 黄芩-黄连药对防治 *D*-半乳糖痴呆小鼠的作用机制

章常华<sup>1</sup>, 刘彤彤<sup>1</sup>, 邓可众<sup>1</sup>, 陈颖翀<sup>2</sup>, 林贵兵<sup>1</sup>, 叶荷平<sup>3</sup>, 涂秀英<sup>1</sup>, 盛军庆<sup>4\*</sup>  
(1. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004; 2. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004; 3. 江西中医药大学生命科学院, 江西 南昌 330004; 4. 南昌大学生命科学学院, 江西 南昌 330031)

**摘要:** **目的** 研究黄芩-黄连药对对 *D*-半乳糖痴呆小鼠学习记忆能力的改善作用, 并探讨其可能作用机制。**方法** 皮下注射 *D*-半乳糖 100 mg/kg 每天 1 次, 连续 8 周诱导小鼠痴呆模型, 与此同时分别灌胃黄芩-黄连药对 5、10、20 g 生药/kg, 吡拉西坦 0.75 g/kg, 正常组给予等量蒸馏水。在给药后 4、8 周时用 Morris 水迷宫检测学习记忆能力, 并于试验结束时测定血浆总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平, 以及脑海马组织乙酰胆碱酯酶 (AChE) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性。**结果** 连续注射 *D*-半乳糖 4、8 周后, 黄芩-黄连药对能显著缩短 *D*-半乳糖痴呆小鼠在定向航行和空间探索的潜伏期 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。连续注射 *D*-半乳糖 8 周, 黄芩-黄连药对可非常显著升高血浆 SOD 活性和降低 MDA 水平 ( $P < 0.01$ ), 同时, 可降低脑组织 AChE 活性, 并升高 GSH-Px 活性 ( $P < 0.01$ )。**结论** 黄芩-黄连药对对老年性痴呆有一定的防治作用, 其机理可能与其降低氧化应激水平和增加脑海马组织乙酰胆碱浓度有关。

**关键词:** 黄芩-黄连药对; *D*-半乳糖; 痴呆; 改善

**中图分类号:** R285.5                      **文献标志码:** A                      **文章编号:** 1001-1528(2018)03-0524-06

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2018.03.004

## Preventive and therapeutic mechanism of the herbal pair, *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma* on dementia-like mice induced by *D*-galactose

ZHANG Chang-hua<sup>1</sup>, LIU Tong-tong<sup>1</sup>, DENG Ke-zhong<sup>1</sup>, CHEN Ying-chong<sup>2</sup>, LIN Gui-bing<sup>1</sup>, YE He-ping<sup>3</sup>, TU Xiu-ying<sup>1</sup>, SHENG Jun-qing<sup>4\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 2. Ministry of Education Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 3. School of Life Sciences, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 4. School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China.)

**ABSTRACT:** **AIM** To investigate the preventive effects of herbal pair, *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma* (SC), on Alzheimer's disease (AD), and its mechanism of action. **METHODS** Dementia mice induced by 8-week s. i. d subcutaneous injection of *D*-galactose (100 mg/kg), were simultaneously given respective, intragastric administration of SC crude drug at doses of 5, 10, 20 g/kg, or piracetam support at 0.75 g/kg, and isometri-

**收稿日期:** 2017-11-17  
**基金项目:** 国家自然科学基金 (81460622, 81774194, 81260660); 江西省自然科学基金 (20151BAB205077, 20171BAB205095, 20151BAB205079); 江西省卫生和计划生育委员会科研计划项目 (2016A024)

**作者简介:** 章常华 (1977—), 男, 博士, 副教授, 从事药理学教学科研工作。Tel: (0791) 87118919, E-mail: zhangch305@126.com

**\*通信作者:** 盛军庆 (1978—), 女, 博士, 副教授, 从事生物学教学科研工作。Tel: (0791) 83969530, E-mail: shengqingjun@163.com