

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%)和鞣花酸对照品(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 C₁₈-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

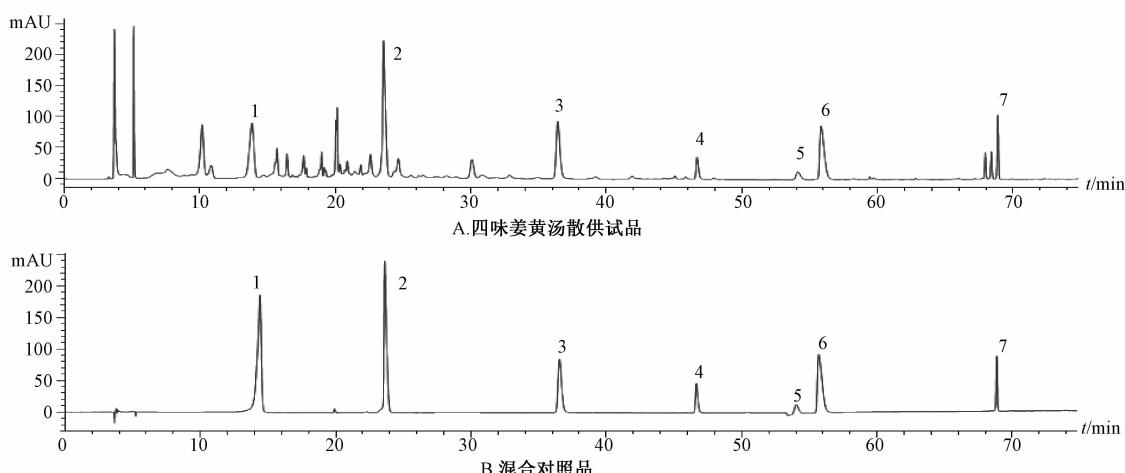
2.1.2 对照品溶液的制备 取各对照品适量,精密称定,置于量瓶中,加90%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得没食子酸1.248 0 mg/mL、木兰花碱1.420 0 mg/mL、鞣花酸0.378 0 mg/mL、盐酸药根碱0.118 0 mg/mL、盐酸巴马汀0.079 9 mg/mL、盐酸小檗碱0.490 8 mg/mL和姜黄素0.302 0 mg/mL对照品贮备液。分别精密吸取上述对照品贮备液1 mL,放入同一10 mL量瓶中,加80%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得没食子酸124.80 μg/mL、木兰花碱142.00 μg/mL、鞣花酸37.80 μg/mL、盐酸药根碱11.80 μg/mL、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



1. 没食子酸 2. 木兰花碱 3. 鞣花酸 4. 盐酸药根碱 5. 盐酸巴马汀 6. 盐酸小檗碱 7. 姜黄素
1. gallic acid 2. magnoflorine 3. ellagic acid 4. jatrorrhizine hydrochloride
5. palmatine hydrochloride 6. berberine hydrochloride 7. curcumin

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/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	样品2/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	样品3/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	平均值/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
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*^(8⁴) 建立 4 因素 8 水平配比剂量矩阵^[9]。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	姜黄/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	小檗皮/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	余甘子/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	蒺藜/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
组号				
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*^(8⁴) 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 °C, 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^[10-11]。

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。

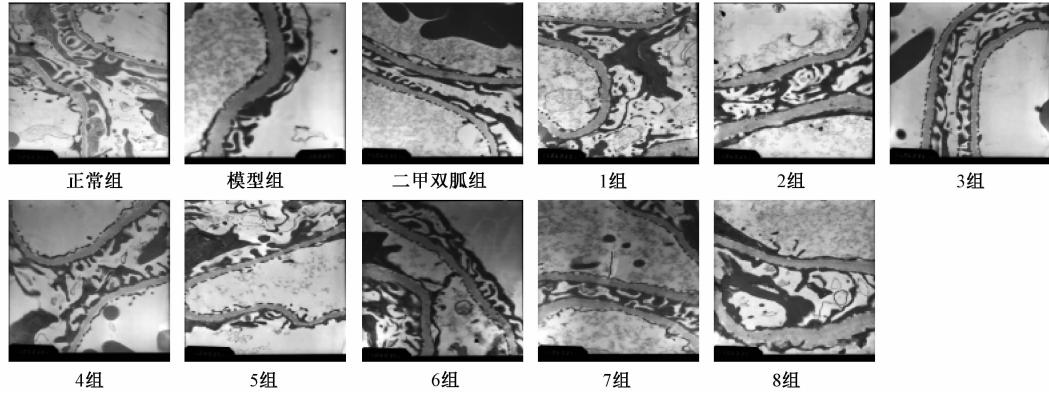


图 2 四味姜黄方对 DN 大鼠肾脏病理形态学的影响 (TEM, $\times 15\,000$)

Fig. 2 Effect of SJP on renal pathological morphology of DN rats (TEM, $\times 15\,000$)

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-β1 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-β1 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 ⁻¹)	肾指数($\times 10^{-3}$)	FBG/(mmol·L ⁻¹)	VEGF/(pg·mL ⁻¹)	肾小球基底膜厚度/ μm
1组	7.2 \pm 0.8 **	5.38 \pm 0.46 *	23.1 \pm 5.0 *	21.9 \pm 7.9 **	0.3182 \pm 0.0400
2组	6.6 \pm 2.3 **	5.54 \pm 1.12	23.6 \pm 5.5 *	24.2 \pm 11.6 **	0.2861 \pm 0.0348
3组	6.9 \pm 1.4 **	5.59 \pm 0.53 *	22.6 \pm 5.6 *	23.4 \pm 5.3 **	0.2596 \pm 0.0377 *
4组	6.5 \pm 1.3 **	6.40 \pm 2.42	24.5 \pm 3.2 **	23.2 \pm 8.6 **	0.2829 \pm 0.0309
5组	5.7 \pm 1.5 **	5.79 \pm 0.60	22.5 \pm 2.9 **	32.5 \pm 14.1 *	0.2697 \pm 0.0345 *
6组	7.4 \pm 1.4 **	5.91 \pm 0.97	21.4 \pm 2.0 **	36.4 \pm 11.1 *	0.2828 \pm 0.0317
7组	10.2 \pm 0.9 *	5.85 \pm 0.57	24.7 \pm 4.4 *	37.1 \pm 15.2	0.2707 \pm 0.0373
8组	9.3 \pm 3.0	5.57 \pm 0.96	22.8 \pm 2.6 **	43.3 \pm 27.7	0.2947 \pm 0.0234
二甲双胍组	3.6 \pm 0.8 **	5.35 \pm 0.52 *	26.4 \pm 2.0 **	12.4 \pm 1.8 **	0.2592 \pm 0.0213 **
正常组	3.4 \pm 0.6	2.47 \pm 0.14	5.3 \pm 0.7	14.3 \pm 2.3	0.1810 \pm 0.0263
模型组	11.3 \pm 0.8 **▲▲	6.45 \pm 0.83 **▲▲	32.0 \pm 1.5 **▲▲	54.4 \pm 3.2 **▲▲	0.2935 \pm 0.0380 **▲▲

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/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	TGF- β 1/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	UA/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	TP/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
1组	198.7 \pm 22.0	73.3 \pm 13.7 **	193.6 \pm 63.8 *	61.4 \pm 7.2 *
2组	130.5 \pm 65.6 *	70.6 \pm 21.4 *	233.6 \pm 97.4 *	66.3 \pm 15.4
3组	171.5 \pm 34.5 *	78.3 \pm 11.3 **	229.8 \pm 57.2 *	59.8 \pm 4.8 **
4组	140.8 \pm 29.0 **	77.3 \pm 14.7 *	241.9 \pm 151.4	58.9 \pm 4.1 **
5组	139.1 \pm 35.8 **	76.8 \pm 2.5 *	199.7 \pm 52.0 *	59.6 \pm 3.9 **
6组	160.1 \pm 25.1 **	86.9 \pm 8.2 *	237.5 \pm 92.8 *	60.5 \pm 3.8 **
7组	170.4 \pm 6.8 *	80.7 \pm 29.2	143.3 \pm 33.9 **	63.8 \pm 5.1 **
8组	194.6 \pm 26.1	78.3 \pm 18.5	172.0 \pm 24.4 *	61.2 \pm 8.9 *
二甲双胍组	113.7 \pm 31.0 **	62.2 \pm 2.3 **	146.2 \pm 19.4 **	60.3 \pm 2.4 **
正常组	103.5 \pm 31.3	58.1 \pm 4.7	119.9 \pm 39.6	65.0 \pm 2.0
模型组	222.8 \pm 35.2 **▲▲	97.1 \pm 5.0 **▲▲	410.4 \pm 151.1 **▲▲	52.9 \pm 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^[12-15]。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

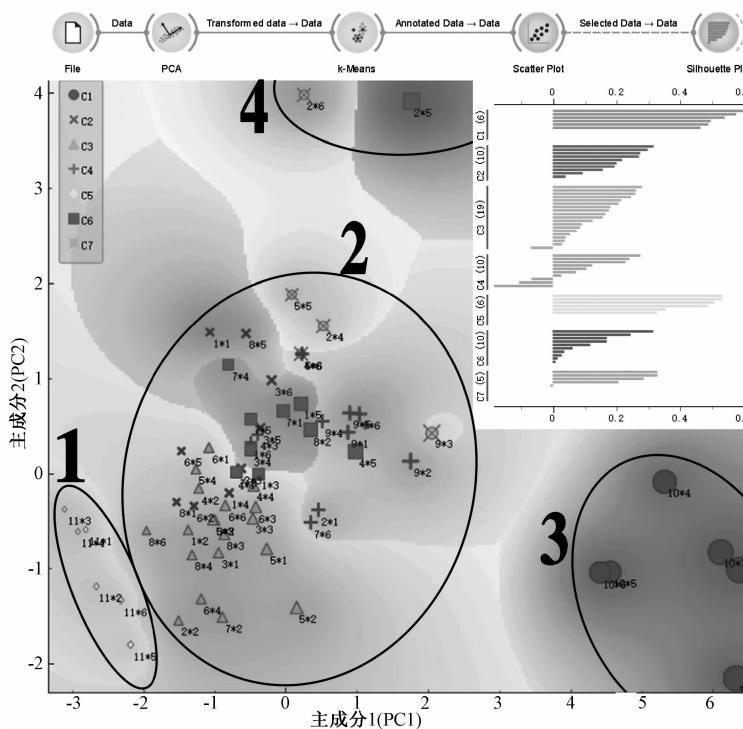


图3 四味姜黄方药效学标准化数据的主成分分析-得分图 (Orange Canvas 软件, 11组 66个样本)

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	$Y = 9.4804 \times X_4$	0.033 6
肾指数	$Y = 4.7085 + 0.3961 \times X_2 + 0.3149 \times X_1 \times X_4$	0.001 4
FBG水平	$Y = 18.0150 + 2.6165 \times X_2 + 1.0491 \times X_3 + 0.2645 \times X_4 \times X_4 - 0.6922 \times X_2 \times X_3$	0.004 6
肾小球基底膜厚度	$Y = 0.3200 - 0.0184 \times X_1 \times X_4$	0.014 7
VEGF水平	$Y = 23.0292 + 8.9458 \times X_1 - 7.4083 \times X_2$	0.001 0
Scr水平	$Y = 228.4672 - 25.3797 \times X_1 \times X_4 - 4.9355 \times X_3 \times X_4$	0.022 3
UA水平	$Y = 168.1194 + 22.8779 \times X_2 \times X_4$	0.026 3
TGF- β 1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- β 1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^[16-17]。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^[18]，同时增加细胞外基质的合成^[19]。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. 楚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- β 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. 楚芪降糖汤对糖尿病肾病大鼠肾脏 TGF- β 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- β 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¹, 刘彤彤¹, 邓可众¹, 陈颖翀², 林贵兵¹, 叶荷平³, 涂秀英¹, 盛军庆^{4*}

(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-hua¹, LIU Tong-tong¹, DENG Ke-zhong¹, CHEN Ying-chong², LIN Gui-bing¹, YE He-ping³, TU Xiu-ying¹, SHENG Jun-qing^{4*}

(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