

平糖舒目散治疗糖尿病的作用机制初探

司进辉¹ 任 晓² 张彦廷²

(1 河北华健天诚科技开发有限公司, 石家庄, 050026; 2 华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 石家庄, 050015)

摘要 目的:通过醛糖还原酶高通量模型对中药方剂平糖舒目散的筛选,探寻其治疗糖尿病的作用机制。方法:用高通量醛糖还原酶筛模型来筛选平糖舒目散,研究方剂平糖舒目散对醛糖还原酶的抑制作用。结果:平糖舒目散对醛糖还原酶有较强的抑制作用,其半数抑制浓度是 0.8 g/L。结论:中药方剂平糖舒目散治疗糖尿病慢性并发症的作用机制之一是抑制醛糖还原酶活性。

关键词 糖尿病/并发症;醛糖还原酶;高通量筛选;平糖舒目散

Exploration on Mechanism of Pingtang Shumu Powder in Treating Diabetes

Si Jinhui¹, Ren Xiao², Zhang Yanting²

(1 Hebei Huajian Tiancheng Pharmaceutical Technology Co., Shijiazhuang 050026, China; 2 Huabei Medical Group New Drug Research and Development Co., Shijiazhuang 050015, China)

Abstract Objective: To explore the mechanism of Chinese prescription Pingtang Shumu powder in treating diabetes by screening it in high-flux aldose reductase models. **Methods:** High-flux aldose reductase model was used to screen Pingtang Shumu powder, so as to study on its exhibition effect on aldose reductase. **Results:** Pingtang Shumu powder had strong exhibition effect on aldose reductase with the I₅₀ of 0.8g/L. **Conclusion:** The mechanism of Chinese prescription of Pingtang Shumu powder treating chronic complications of diabetes is to exhibit the activity of aldose reductase.

Key Words Diabetes; Complications; Aldose reductase; High-flux screening; Pingtang Shumu powder

中图分类号:R285.5;R255.4 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.02.027

国际糖尿病联合会的数据显示,目前,全球糖尿病患者接近 2.5 亿人,到 2025 年将达 3 亿^[1]。糖尿病发展到中期以后,眼睛、外周神经、肾脏等多种易损器官内发生的微血管病变,都与人体在长期高血糖状况下,葡萄糖代谢分支路径被激活,醛糖还原酶活性异常升高关联密切。醛糖还原酶就成了延缓和防治糖尿病并发症的关键因素^[2]。

张运华主任医师从医 40 余载,熟谙岐黄,以平糖舒目散加减(“治疗糖尿病慢性视网膜病变的中药制剂及制备方法”,专利号:第 270124 号)治疗糖尿病,对防治糖尿病性视网膜病变及其他慢性并发症的如神经病变等也有很好的治疗作用。平糖舒目散是用该专利核心方药物配伍制得的纯中药散剂,在临床上治疗糖尿病慢性并发症,屡有效验。为探寻平糖舒目散的作用机制,我们在国家科技部新药筛选技术平台重大专项(编号:2002AA2AZ343D)、国家“十五”重大攻关项目(编号:2004AA2Z38784)资助支持下,建立的糖尿病及其并发症评价体系中

的高通量药物筛选(HTS)模型之糖尿病药物筛选模型上做了平糖舒目散抑制醛糖还原酶活性的测试研究,现做如下报道。

1 材料

1.1 平糖舒目散药物组成 密蒙花 9 g,天花粉 10 g,桑叶 9 g,菊花(杭白菊)8 g,山茱萸(去核生用)6 g,红花 5 g,木贼 3 g,以上 7 味,混匀粉碎,收集药粉,包装。规格:6 g/包。2 次/d,1 包/次,口服。以上药物均由河北赞皇张运华名老中医诊所提供,经过河北省食品药品检定院中药室赵晓春主任药师鉴定为正品。

1.2 主要试剂 醛糖还原酶(从非电击致死猪眼睛的晶状体中,实验参与人员自己提取,经硫酸铵分级沉淀处理得到);辅酶 NADPH(南京奥多福尼生物科技有限公司);硫酸锂(南京化学试剂有限公司);甘油醛(德国 Sigma 公司)。槲皮素(河北省食品药品检定院)。

1.3 主要仪器 SHB-III T 循环水式多用真空泵

基金项目:河北省科技攻关计划课题(编号:07276101D-7)

作者简介:司进辉(1976.10—),男,毕业于北京中医药大学,主要研究方向:中医验方防治糖尿病、并发症及中药材标准化种植及疗效判定,《世界中医药》杂志第二届编委,地址:河北华健天诚科技开发有限公司,河北省石家庄市裕华区建华东路 188 号,邮编:050026,E-mail:sijin-huiysh@126.com

通信作者:张彦廷,(1968—),高级工程师,地址:华北制药集团新药研究开发有限责任公司,E-mail:htzhang200688@163.com

(郑州长城科工贸有限公司); DZF-6093 型真空干燥箱 (天津天有利科技有限公司); TGL-20M 型台式冷冻离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); LABOROTA-4000 型旋转蒸发器 (德国 HeidLph 公司); Christ 牌 ALPHAI-CD 冷冻干燥机 (德国 marin Christ 公司); SZ-1 快速混匀器 (上海上登实验设备有限公司); Victor² 1420 多功能测定仪 (美国 PF 公司)。

2 方法

2.1 平糖舒目散筛选用的样品制备

2.1.1 预试验样品制备 平糖舒目散按成人日用药量的 1/5 倍来备料配药,按平糖舒目散药量的 22 倍加 60% 乙醇,分 3 次提取,提取时间分别 2 h, 1.5 h,45 min,过滤合并 3 次提取的药液,浓缩至密度 1.12,加入 20 mL 纯净水振荡摇匀后,依次分别加入 20 mL 乙酸乙酯、正丁醇萃取,将平糖舒目散分离成 3 种:乙酸乙酯相、正丁醇相和水相,各吸取 2 mL 蒸干称量后,都用二甲基亚砜为溶剂,溶解成溶液,按浓度梯度依次稀释成 1/3 倍、1/9 倍、1/27 倍、1/81 倍、1/243 倍、1/729 倍的药液,分别吸取 2.5 μL 平行样 3 个、7.5 μL 平行样 3 个,制得预实验筛选用样品 108 个。

2.1.2 量效关系、与阳性对照药对比研究的试验样品制备 用纯净水作溶媒提取,药液浓缩至稠膏后,依次用 90% ,60% ,30% ,50% 的浓度梯度的乙醇精制过滤,4 种药液加剩下的沉淀物,离心冷冻蒸干后,得到平糖舒目散组分¹、组分²、组分³、组分⁴、组分⁵ 共 5 种组分,精密称量后,加二甲基亚砜溶解,分别吸取 2.5 μL 平行样 3 个、7.5 μL 平行样 3 个。共有 360 个样品供筛选。

2.2 醛糖还原酶活性测定原理及醛糖还原酶抑制

剂活性测定方法 在 NADPH 的参与下,醛糖还原酶将 DL-甘油醛催化还原成甘油,与此对应 NADPH 在同一时间被转化为 NADP⁺,而剩余的还原态 NADPH 在 340 nm 处仍有特征吸收^[3],醛糖还原酶活性的测定就这样,通过测定 340 nm 处光密度的下降速率的变化值来间接地得以实现。采集非电击致死 1 h 内的猪眼睛,冰块保存带回实验室,入冰柜保存。筛选用醛糖还原酶,临时从采挖的猪眼睛晶状体中提取。反应在多孔板中进行,样品孔中加入 NaPi 缓冲液(浓度:50 mmol/L,酸碱度:pH 6.4)、适量的酶液和样品液,共 46 μL;对照孔以水代替样品溶液;空白孔以水代替样品液并以 NaPi 缓冲液代替酶液,在 36.5 ℃ 保温 12 min^[3]。各孔加入 34 μL 的 Li₂SO₄(浓度:1.0 mol/L),6.5 μL 的 DL-甘油醛(浓度:40 mmol/L)和 5.5 μL 的 NADPH (浓度:1.8 mmol/L),开始化学还原反应。每 min 被检测物吸收掉的光密度值的减少量 ΔA,是用 Victor² 1420 多功能测定仪测定 340 nm 处被检测物吸收掉的光密度数值变化获得。

抑制率 = [(ΔA 对照 - ΔA 样品)/(ΔA 对照 - ΔA 空白)] × 100%。

3 结果

3.1 预实验平糖舒目散样品研究结果 预实验平糖舒目散分离得到的 3 个不同相,分别制备 48 个样品,确定各自的浓度后,在高通量药物筛选模型上进行筛选,参照筛选化学药物数据的处理和分析方法作初步的评价,结果:乙酸乙酯相组分、正丁醇相组分对醛糖还原酶有抑制作用较强。(表 1)

3.2 平糖舒目散提取物抑制醛糖还原酶(AR)的量效关系研究结果(表 2) 表 2 中的平糖舒目散提取物,是本文中“2.1.1 量效关系、与阳性对照药对比

表 1 预实验平糖舒目散样品研究结果

组分名称	浓度	第一次检测物吸收掉的光密度	第二次检测物吸收掉的光密度	总变化量	抑制率%	平均抑制率%
乙酸乙酯组分	2.1 g/L	0.959	0.915	0.044	66.13%	67.41%
		0.907	0.868	0.039	74.19%	
		0.986	0.937	0.047	61.29%	
正丁醇组分	1.8 g/L	1.076	1.031	0.045	64.52%	76.34%
		1.018	0.981	0.037	77.42%	
		1.093	1.071	0.022	87.10%	
水组分	3.9 g/L	1.089	1.028	0.061	38.7%	40.83%
		1.093	1.033	0.060	40.3%	
		1.090	1.032	0.058	43.5%	
平均值	SD	S/N	信噪比			
空白	0.023	0.001				
对照	0.085	0.005	3.529			

研究的试验样品制备”法得到的平糖舒目散组分3。结果显示平糖舒目散对醛糖还原酶的半数抑制浓度是0.8 g/L。

表2 平糖舒目散提取物抑制醛糖还原酶
(AR)的量效关系研究结果

平糖舒目散浓度(g/L)	1.6	1.2	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05
对AR的抑制率/%	97	60	49	11	5	4	4

3.3 与阳性对照药的对比研究结果 单一化合物槲皮素能抑制醛糖还原酶的活性,多数研究者选择其为阳性对照^[4]。用水提取得到的平糖舒目散药液浓缩物中用60%浓度梯度的乙醇精制处理得到的平糖舒目散组分3与阳性对照药槲皮素统一用甲基亚砷做溶剂,配成浓度1 g/L、2.0 g/L的溶液,共4个样品。(表3)

表3 与阳性对照药的对比研究结果

测试样品	浓度	抑制率/%
槲皮素	1 g/L	95%
槲皮素	2 g/L	100%
平糖舒目散	1 g/L	56%
平糖舒目散	2.0 g/L	79%

4 讨论

中药成分复杂,即使只有一味药,常常也是多类成分并存,也可看做是一个小复方^[5],方剂学常说“单药不成方”。方剂是运用药物治病的进一步发展和提高^[6]。

罹患糖尿病时,在长期高血糖状态下,醛糖还原酶活性会异常性增高,来代偿性分解人体血液中多余的葡萄糖,多元醇通路就被激活,此代偿性的分解路线的最终产物之一是山梨醇,它极性大,不易被人体组织细胞转运出去,久而久之导致山梨醇在人体组织晶状体、神经、肾脏、视网膜等糖尿病人体易损器官细胞内堆积,使易损器官细胞的代谢与功能受到损害,是导致糖尿病慢性并发症的重要原因之一^[7],抑制醛糖还原酶就有可能有效延缓防止糖尿病慢性并发症的发生。中医能治疗消渴症(糖尿病)药物,在分子、细胞水平上必然表现出某种作用^[8]。张运华等人认为,治疗糖尿病不能拘泥于消渴病“阴虚燥热”这一病机,一味使用阴柔滋补之品养阴清热。糖尿病及其伴随的慢性并发症更多的是火郁于内,主要郁滞在脾胃肠,是以邪实为主。在临床治疗上采用清、下二法。据此,张运华等人以平肝

清热,活血养肝为治疗大法发明了平糖舒目散治疗糖尿病。

现代药理药化研究^[9]中已证实,密蒙花中的黄酮类物质(密蒙花苷等)、苯乙醇苷类物质(洋丁香苷等)和皂苷类成分均显示出醛糖还原酶抑制作用,桑叶可通过增加胰岛素的释放和抑制α-糖苷酶的活性,抑制血糖上升,可防治和治疗糖尿病^[10]。天花粉具有胰岛素样作用,有五种降血糖有效成分^[11]。平糖舒目散对糖尿病小鼠具有显著的降糖作用,并能一定程度改善“三多”现象^[12]。

高通量药物筛选方法实现了药物筛选的快速、微量^[13]。本文借助高通量药物筛选模型,尝试由微观角度来研究平糖舒目散,寻找平糖舒目散的作用靶点,探寻从反向药理学来阐明平糖舒目散发挥疗效的化学物质基础。本次筛选结果显示:对醛糖还原酶抑制作用平糖舒目散能呈较好的量效关系,其对醛糖还原酶的半数抑制浓度是0.8 g/L,从具体分子和细胞功能变化上看,平糖舒目散发挥临床疗效的作用机制可能与其抑制醛糖还原酶有关。

参考文献

[1]丁学屏. 糖尿病血管神经并发症的中医辨证规律探讨[J]. 上海中医药杂志,2006,40(10):12.

[2]冯长根,张琳霞,刘霞. 中草药来源的醛糖还原酶抑制剂的研究进展[J]. 中国中药杂志,2005,30(19):1497.

[3]任晓,董悦生,张华,等. 微生物来源的醛糖还原酶抑制剂 FO1_195A 的研究[J]. 河北大学学报:自然科学版,2006,26(1):8.

[4]李友宾,常海涛,李萍,等. 21 种中药不同提取部位对人醛糖还原酶抑制剂的抑制作用[J]. 北京大学学报:医学版,2004,36(1):107.

[5]肖崇厚. 中药化学[M]. 上海:上海科技出版社,1987:3.

[6]许济群,王绵之. 方剂学[M]. 上海:上海科技出版社,1984:6.

[7]张运华. 治疗糖尿病慢性视网膜病变的中药制剂及制备方法:中国. 200410064515. 4[P]. 2006-06-28.

[8]杜冠华. 高通量筛选[M]. 北京:化学工业出版社,2002:235.

[9]韩澎,崔亚君,郭洪祝,等. 密蒙花化学成分及其活性研究[J]. 中草药,2004,35(10):1086.

[10]孙莲,孟磊,阎超,等. 桑叶的降血糖活性成分和药理作用[J]. 中草药,2002,33(5):471.

[11]仇伟欣. 天花粉药理学研究进展[J]. 中国中医药息杂志,1996,3(6):13.

[12]白玉,卢春玲,王会肖,等. 建立小鼠糖尿病模型考察降糖胶囊的药理作用[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(8):61.

[13]杜冠华. 高通量药物筛选与中药现代化研究[J]. 中成药,1992,21(5):268.