

編號：CCMP95-TP-042

中西藥合併用於改善糖尿病腎臟病變之 藥效及毒性評估

劉怡旻
大仁科技大學

摘 要

研究目的：

本計劃針對中西藥合併用於改善糖尿病腎臟病變之藥效及毒性進行評估。

研究方法：

將「五苓散」(由茯苓、桂枝、白朮、豬苓及澤瀉組成)或是與原處方組成比例相同的個別單味藥和西藥已知具有腎臟保護作用的血管張力素接受器阻斷劑 Irbesartan (Aprovel®)，以適當的口服劑量，採用個別投藥或是合併用藥，一天給藥一次，連續 3 個月的方式，投予至由 streptozotocin (STZ) 所誘導的第 1 型糖尿病大鼠體內。實驗期間定期評估大鼠的血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐酸(creatinine)濃度的變化，並檢測尿素氮(urea nitrogen)及尿肌酐(ucreatinine)的數值。藉由尿液微量白蛋白(urine albumin)及 24 小時尿微量白蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAER)數值的改變，同時配合離體腎臟的組織病理切片，評估糖尿病大鼠腎細胞腫脹及傷害的程度。此外，運用免疫組織化學染色(immunohistochemistry staining)觀察待測藥物對糖尿病大鼠腎臟中與細胞外基質生長有關的轉化生長因子(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)以及膠原蛋白(collagen IV)表現量的影響。

結果與討論：

在 2.5 g/kg/day 的劑量下，「五苓散」具有與 Irbesartan (15 mg/kg/day) 類似的作用，可緩解糖尿病高血糖引致的腎臟病變；而茯苓是「五苓散」改善糖尿病腎病變療效的主要組成藥物。此外，「五苓散」與 Irbesartan 在臨床常用劑量減半的情況下合併投藥，對於糖尿病大鼠的高尿素氮(BUN)以及高血清肌酐酸(serum creatinine)的症狀同樣地具有減緩的效果。糖尿病大鼠原先多尿、高尿蛋白(urine

proteins)和 24 小時尿微量白蛋白排泄率(UAER)過速以及腎臟腫大的現象亦可在「五苓散」與 Irbesartan 各自於使用劑量減半再合併投藥的情況下出現改善的效果；此種中西藥合併的給藥法同時可降低糖尿病大鼠腎臟中轉化生長因子(TGF- β 1)以及膠原蛋白過度表現的現象並具有減緩腎球體間質細胞持續擴大的效力。可是，在兩種藥物使用劑量沒有減半的情況下，「五苓散」與 Irbesartan 合併投藥對於改善糖尿病腎臟病變的藥效並沒有產生作用加強的效果；可知「五苓散」對於 Irbesartan 所具有的腎臟保護的藥效能產生協同的作用(synergistic effect)。

關鍵詞：中西藥合併、五苓散、血管張力素接受器阻斷劑、糖尿病腎病變

Number: CCMP95-TP-042

Evaluation of the Efficacy and the Associated Toxicity Induced by Western Medicine and Traditional Chinese Medicine Combination on the Diabetic Nephropathy

I-Min Liu

Tajen University

ABSTRACT

Aim:

The aims of the study were on the evaluation of the efficacy and the associated toxicity induced by combination with Western medicine and traditional Chinese medicine on the diabetic nephropathy.

Method:

Wulingsan (Hoelen Five Herb Formula), the tradition Chinese prescription composed of Poria, Cinnamomum, Atractylodes, Polyporous and Alisma, and Irbesartan, the angiotensin II receptor antagonist, as well as the two kinds of medicine combination were given orally once a day into streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats for 3 months. During the experimental period, changes on the concentrations of blood urea nitrogen (BUN) and plasma creatinine were investigated; in addition, the levels of urea nitrogen and creatinine were estimated. Also, the extent of kidney damage will be determined by the levels of urine microalbumin and 24-hour urinary albumin excretion rate (UAER). Biopsy was further performed to evaluate the pathology of nephrotoxicity. Furthermore, the influences of the tested medicine on the levels of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), a protein related with extracellular matrix synthesis, as well as the changes of collagen IV, were determined by immunohistochemistry staining. Moreover, the imperial herbs composed of Wulingsan for the improvement of diabetic nephropathy was clarified in the present study.

Results & Discussion:

Similar with the effect of Irbesartan at the dosage of 15 mg/kg/day, Wulingsan at dose of 2.5 g/kg/day has the ability to ameliorate the diabetic nephropathy, and Poria is the imperial herb composed of Wulingsan for the amelioration of diabetic nephropathy. Underlying treat STZ-diabetic rats with the combination regimen in which Wulingsan and Irbesartan was at each dose in half of the clinical commonly used dosage, the high levels of BUN and plasma creatinine were reduced and the syndromes of polyurine as well as the abnormal in the concentrations of urine microalbumin and UAER could be ameliorated. In addition to reduce the high expression of TGF- β 1 and collagen IV in kidneys of diabetic rats, this combination regimen also possesses the activity to alleviate the degree of mesangial expansion. But, these benefit action on diabetic nephropathy was not obtained if Wulingsan and Irbesartan were combined at each clinical used dose. These results indicated that Wulingsan could produce synergistic effect on kidney protection related with Irbesartan.

Keywords: Western medicine and traditional Chinese medicine combination, Wulingsan, Irbesartan, Diabetic nephropathy

壹、前言

糖尿病(Diabetes mellitus)是由於患者體內的胰島素(insulin)分泌不足或作功不良，對醣類的利用能力減低甚至於完全無法利用，而造成血糖過高，尿中有糖的現象，同時也造成蛋白質和脂肪的代謝不正常，病人常會有口乾、多尿、疲倦、體重減輕等症狀[1, 2]。通常第 1 型糖尿病是一種自體免疫疾病，患者較為年輕且跟遺傳因素有密切之關係[1]。而第 2 型糖尿病患者多為成年人，好發在四十歲之後，尤其是五十五歲之後發生。第 2 型糖尿病原是因為胰島素分泌不足及身體產生胰島素抗阻性所導致，即是身體對胰島素無法產生良好的反應，所以無法正常代謝血糖[2]。事實上，糖尿病是相當錯綜複雜的全身性代謝疾病所引起的慢性併發症，包括：血管病變、眼睛病變、神經病變及腎臟病變。糖尿病腎病變(Diabetic Nephropathy)主要以腎小球基底膜增厚、基質增加、系膜細胞增生及腎小球毛細血管硬化等微血管病變為特徵，為血管內膜功能異常的結果；一旦病人發生明顯的蛋白尿，腎臟排除尿毒素能力會持續下降，終成發展至末期腎病，如果不經妥善的療護，將會有致死的可能[3, 4]。糖尿病病患初步估計，在台灣大約有百餘萬的患者，已經成為導致慢性腎衰竭疾病的最主要原因。因此，針對糖尿病病患高血糖的緩解以及相關性併發症的預防及治療已成為全球一個重要的健康課題。

腎素—血管張力素系統(renin-angiotensin-aldosterone system, RAS)在人體內扮演一個非常重要的角色，負責血管張力，鹽份及水分的平衡。正常狀況下，肝臟製造血管張力素原，經由腎臟分泌腎素的作用，產生血管張力素 I (angiotensin I)，再經由血管張力素轉化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)的作用，變成血管張力素 II (angiotensin II)，而它再作用於血管張力素受體 AT₁，而產生血管收縮和正腎上腺素(norepinephrine)醛固酮(aldosterone)以及腦下垂體後葉加壓素(vasopressin)分泌增加的效果。所以當 RAS 系統過度活化時，則會造成高血壓、左心室肥大及血管內皮細胞等器官之傷害。事實上，血管張力素 II 若過度活化，將會藉由腎臟出球小動脈的收縮而造成腎絲球內壓的上升和過濾率的上升，造成腎絲球通透性增加，導致蛋白尿。同時血管張力素 II 本身也會造成腎臟組織的發炎反應及纖維化[5-7]。

很多研究顯示血管張力素轉化酶抑制劑(angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI)，可以減少心臟衰竭、心肌梗塞、冠狀動脈心臟病、周邊血管疾病、糖尿病與其他心血管疾病之病患的罹病率及死亡率。原因是 ACEI 可以抑制血管張力素 II 之生成，對血管張力素受體 AT₁ 及 AT₂ 的作用降低，所以血管張力素 II 的作用，如血管收縮等作用減少。但是，ACEI 同時會抑

制 bradykinin 之分解，bradykinin 可以促進血管的擴張，增加一氧化氮的產生，及減少腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor- α)的活性與內皮細胞的死亡。所以當心臟缺血、心肌梗塞、心臟衰竭時，bradykinin 濃度上升具有保護心臟的效果，減少心肌梗塞的範圍；但也因為 bradykinin 的上升，而使病人有咳嗽及血管水腫等副作用[6,7]。早於 1993 年 Collaborative study 指出：Captopril 對第 1 型糖尿病腎臟病變的病人，具有腎臟器官保護的作用[6]。1997 年 REIN study 指出 Ramipril 對非糖尿病腎臟病病人，可以穩定腎功能，降低慢性腎衰竭發生的機率[8]。血管張力素接受器阻斷劑(angiotensin II type 1 receptor blocker, ARB)與 ACEI 同樣作用在 RAS 上，常被大家認為二者作用相似是可以互換的，但事實上，二者還是有差異性的存在：ARB 是選擇性的阻斷血管張力素 II 作用 AT₁ 上，相對的血管張力素 II 對 AT₂ 的作用增加。在大型的臨床試驗顯示 ARB 在第 2 型糖尿病的腎臟病變有顯著之成效：RENAAL study 中，針對第 2 型糖尿病腎病變的病人，Losartan 能平均降低 35% 蛋白尿，在腎功能惡化方面，則可降低 16% 風險[9]；IDNT study 亦指出，Irbesartan (Aprovel®; 300 mg/day) 可降低第 2 型糖尿病腎病變的病人腎功能惡化的機率達 19% [10]；在 IRMA trial 中，Irbesartan (300 mg/day) 可降低蛋白尿(macroalbuminuria)的機率達 68% [11]。雖然在非糖尿病腎病及第 1 型糖尿病方面，ARB 是否具有腎臟保護作用，較缺乏大型的臨床試驗印證，然而在由 streptozotocin (STZ) 所誘導的第 1 型糖尿病大鼠，Irbesartan 可以調降腎臟中轉化生長因子(transforming growth factor, TGF)- β 1 的基因表現，達到緩解腎細胞腫脹的作用[12]。轉化生長因子(TGF- β 1)會促進纖維細胞增殖，並參與細胞外基質(extracellular matrix, ECM)的形成、積聚。可知，ACEI 和 ARB 具腎臟保護作用，能延緩腎功能損害的進展。

「五苓散」為收載於固有典籍之著名的經方之一，由茯苓、桂枝、白朮、豬苓、澤瀉五味藥材組成，具有利水滲濕、溫陽化氣的作用[13]。方中白朮、豬苓、澤瀉、茯苓等藥，均為體液調整劑，可去胃腸內之停水，使利尿增加而消浮腫；豬苓、澤瀉治口渴，與茯苓為伍，並有鎮靜之效；桂枝通陽化氣能蒸化三焦，發散表邪，治氣之上衝，並助他藥之利尿功能。對於糖尿病患者而言，此處方能緩解急慢腎炎，預防尿道感染[14-17]。但是，目前有關此處方應用於代謝性疾病(metabolic disease)的科學研究報告仍顯不足。事實上，中國對於糖尿病的文獻記載，可以說是很早的；在兩千五百年前，《黃帝內經》就有了糖尿病的記載。其後，《金匱要略》中即有「消渴證」的記載，紀錄的症狀與現代醫學的糖尿病完全相同[18、19]。但由於文化背景和理論體系所導致的差異，加上中藥自身的複雜性，使得現代科學技術尚難以完全解明中藥作用的本質、作用機轉及藥性理論。慶幸地，近年來許多學者遵循中醫理論體系，應用現代科學技術與方法，對糖

尿病作了大量的研究工作，發現，以中藥合併西藥的療法，不但可以使病人的血糖控制更為理想。而且可以預防或是改善患者因罹患糖尿病引致的合併症；顯示出中藥的研製、開發及生產蘊藏著極大的優勢[20]。

臨床上，發生糖尿病腎病變的危險機率，第 1 型糖尿病患者大約有 30%，第 2 型糖尿病患者大約有 10%[21]。因此，本項計畫擬以當代的科學方法包括血尿素氮(blood urea nitrogen)、血肌酐酸(creatinine)濃度變化的檢測以及探討腎臟中具腎功能調節作用因子的基因表現，同時配合離體腎臟的組織病理切片所得結果，來驗證「五苓散」應用於改善第 1 型糖尿病腎病變的藥效及可能作用機轉，藉以印證中醫傳統理論，協助中醫現代及中藥科學化的建立。事實上，Irbesartan 具有非血壓依賴性的腎臟保護作用，在肝、腎功能受損以及老年人並不用刻意調整劑量，與其他 ARB 比較，Irbesartan 具有較高吸收率(60%~80%)[22-24]。因此，本計畫亦會針對「五苓散」合併 Irbesartan 後用於緩解第 1 型糖尿病腎臟病變之藥效及毒性進行評估，確定中西藥合併後其療效及可能引致之副作用，藉以釐清中西藥併用於改善第 1 型糖尿病腎病變的藥效及安全性的參考。

貳、材料與方法

一、實驗動物

8 週大的 Wistar 品系的雄性大鼠購自國家動物中心，飼養在本校以空調維持在室溫約 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 的動物室。

二、第 1 型糖尿病大鼠的誘導

將 8 週的 Wistar 雄性大鼠空腹 72 小時後，於腹腔注射 pentobarbital 30 mg/kg。待大鼠麻醉後，經股靜脈注射 60 mg/kg streptozotocin (STZ)。於 72 小時後，抽取靜脈血，利用葡萄糖試劑(glucose kit)，經由自動分析儀(Quick-Lab, Chemistry Analyzer)得知血糖值。當大鼠的血糖值大於 400 mg/dl，並有糖尿病的三多症狀出現(多吃、多喝、多尿)，即視為第 1 型糖尿病大鼠。

三、給藥方式

(一) 評估「五苓散」及 irbesartan 合併使用後，對於改善第 1 型糖尿病大鼠腎臟傷害的有效性。

利用購自 GMP 藥廠的科學濃縮製劑，採胃管給藥，一天一次的方式，將「五苓散」和 Irbesartan 以適當的劑量(「五苓散」的人體建議劑量為 24 g/kg/day；Irbesartan (Aprovel®, Sanofi/Bristol-Myers)的人體建議劑量為 150 mg/kg/day)，分別以單獨或是合併給藥的方式投與至第 1 型糖尿病大鼠。

為了避免產品差異性影響評估，本計畫所使用的「五苓散」濃縮散劑分別選用通過中醫藥委員會查核為合格之中藥 GMP 藥廠-A 藥廠股份有限公司以及 B 藥廠股份有限公司的產品進行相關性實驗，所得結果較具客觀性。

計畫將分為五組進行，以人體建議劑量為參考，各組給藥劑量設計如下：

- 空白組：給予溶劑(RO 水)處理
- 「五苓散」：24 g/kg/day
- Irbesartan：150 mg/kg/day
- 「五苓散」和 Irbesartan 各以常用劑量合併投藥
五苓散：24 g/kg/day；Irbesartan：150 mg/kg/day
- 「五苓散」和 Irbesartan 各以常用劑量的半量合併投藥
「五苓散」：12 g/kg/day；Irbesartan：75 mg/kg/day

有關劑量換算法採用衛生署健康食品減肥功能評估草案方式，依據體重 60 kg 之成人除以受試物之每日人體建議攝取量，即可得每公斤體重之建議攝取量，再乘以實驗動物相對於人體之

代謝係數，即可得該實驗動物每日攝取劑量。大白鼠相對於人體之代謝係數為 6.25，小白鼠為 9.01。

計算式表示如下：

大白鼠每公斤體重之攝取劑量 = 人體建議攝取量 ÷ 體重 60 kg × 6.25

小白鼠每公斤體重之攝取劑量 = 人體建議攝取量 ÷ 體重 60 kg × 9.01

經由換算投予至 STZ 糖尿病大鼠的劑量如下：

- 「五苓散」：2.5g/kg/day
- Irbesartan：15 mg/kg/day
- 「五苓散」和 Irbesartan 各以常用劑量合併投藥
- 五苓散：2.5 g/kg/day；Irbesartan：15 mg/kg/day
- 「五苓散」和 Irbesartan 各以常用劑量的半量合併投藥
- 五苓散：1.25 g/kg/day；Irbesartan：7.5 mg/kg/day

(二) 解明「五苓散」是藉由何種組成藥物達到改善糖尿病腎臟病變之療效，亦即主藥的確認。

利用購自 GMP 中藥廠(B 藥廠股份有限公司)的科學濃縮製劑，採胃管給藥，一天一次的方式，將與「五苓散」原處方組成比例相同的個別單味藥，分別以單獨給藥的方式投與至第 1 型糖尿病大鼠的體內，針對改善糖尿病大鼠的腎損傷進行藥效評估。組成「五苓散」的茯苓、桂枝、白朮、豬苓及澤瀉的比例分別為 3:2:3:3:5 [13]。採用上述衛生署健康食品減肥功能評估草案方式換算各個藥物投予至 STZ 糖尿病大鼠的劑量，結果如下：

- 豬苓：0.5 g/kg/day
- 澤瀉：0.8 g/kg/day
- 茯苓：0.5 g/kg/day
- 桂枝：0.3 g/kg/day
- 白朮：0.5 g/kg/day

四、檢測指標及方法

餵食期間(三個月)定期進行下列實驗：

- (一) 每日記錄 STZ 糖尿病大鼠體重、飲水、攝食之變化。
- (二) 每星期取大鼠血漿和尿液，用全自動生化分析儀(HITACH-7150, Japan).測定血糖、血漿肌酐酸(creatinine)、血尿素氮(BUN)以及尿肌酐酸(ucreatinine)濃度的變化，並計算尿液肌酐清除率 (creatinine clearance, Ccr) (ml/min) = 尿肌酐濃度 × 每分鐘尿量 / 血漿肌酐酸濃度，結果用體重校正。尿液微量白蛋白 (urine microalbumin)採用放射免疫法測定，並計算 24 小時尿微量白蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAER)($\mu\text{g}/24\text{h}$) = 尿白蛋白含

量($\mu\text{g}/\text{mL}$) \times 24小時尿量(mL)。

待實驗結束，將動物全部犧牲，由頸動脈採血檢驗腎臟生化功能，並剖腹取腎臟，進行病理變化的分析。並利用免疫組織化學染色(immunohistochemistry staining, IHC)對腎臟轉化生長因子(TGF- β_1)及膠原蛋白(collagen IV)的蛋白表現量進行評估。

五、病理檢查

離體腎臟秤重後將臟器固定於 10%的中性福馬林(formaldehyde)液中，在同一位置上分割出各一小塊，放入包埋盒中，脫水一夜後進行石蠟包埋，置於-20 $^{\circ}\text{C}$ 並接著進行切片(厚度約為 5 μm)，放入烘箱內，使石蠟烘乾固定，以 periodic acid-Schiff (PAS)/hematoxylin 染色。最後蓋片、陰乾，利用顯微鏡進行病理變化的觀察，並以半定量分析的方式進行組織病理學的評量分析。腎臟間質細胞擴大指數(mesangial expansion index, MEI)給分的範圍由“0”到“3”分：“0”代表正常腎絲球體；“1”代表間質細胞擴大的範圍不超過 50%腎絲球體；“2”代表間質細胞擴大的範圍延伸為 50~75%腎絲球體；“3”代表間質細胞擴大的範圍約為 75~100%腎絲球體[25]。由每一隻大鼠的 50 個腎絲球體所得平均數來進行得分的計算。病理變化的評量分析，則委請病理專科醫師，在不清楚本實驗設計的情況下對所有切片進行評估比較，再以所得平均值來進行各組之間的差異性分析。

六、免疫組織化學染色(immunohistochemistry staining, IHC)

腎臟組織以 10%中性福馬林固定後，經過修整後置入石蠟包埋，切成 4 μm 切片經 xylene 脫蠟及不同濃度之酒精脫水處理，以 0.1 mmol/l acetic acid 煮沸處理 30 秒後靜置於室溫下 20 分鐘，之後加入 3% H_2O_2 去除內源性過氧化，先以 mouse IgG 作用後再加入腎臟轉化生長因子(TGF- β_1)或是膠原蛋白(collagen IV)抗體(購自 Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)。利用卵白素-生物素方法(avidin-biotin complex)標記抗體抗原免疫複合物，試劑為 Avidin Biotinylated enzyme complex (購自 Vectastain R ABC reagent, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)，以 diaminobenzidine (DAB) 呈色，最後以蘇木紫(hematoxylin)染色完成後封片。

七、統計分析

本計畫實驗結果之數據，以 one-way ANOVA analysis 分析變異數，再以 Scheffe's multiple range test 檢定其間差異之顯著性，凡 p 值小於 0.05 以下，則認為其差異據統計意義。

參、結果

一、連續給予「五苓散」及 Irbesartan 對糖尿病大鼠血中葡萄糖、膽固醇及血壓的影響

如表一所示，連續餵食糖尿病大鼠待測藥物 3 個月後，大鼠高血糖的狀況並不會因給予任何一種藥物治療而有改善的現象。此外，待測藥物並不會影響大鼠血中膽固醇以及三酸甘油酯的濃度。在單獨處理 Irbesartan (15 mg/kg/day)或是「五苓散」(1.25 g/kg/day)合併 Irbesartan (7.5 mg/kg/day)餵食的糖尿病大鼠，血壓有下降的趨勢。但是，單獨給予「五苓散」處理的糖尿病大鼠，不論是在 1.25g/kg/day 或是 2.5 g/kg/day 的劑量作用下，血壓偏高的情形仍然存在。

二、連續給予「五苓散」及 Irbesartan 對糖尿病大鼠腎功能相關生化指數的影響

連續餵食糖尿病大鼠 Irbesartan (15 mg/kg/day) 3 個月後，尿素氮(BUN)以及血清肌酸酐(serum creatinine)明顯地降低。雖然「五苓散」的作用不等同 Irbesartan (15 mg/kg/day)所產生的效果，但是「五苓散」亦具有減緩糖尿病大鼠高尿素氮(BUN)以及高血清肌酸酐(serum creatinine)的效力。即使是在藥物使用劑量減半再合併投藥的情況下，亦即連續 3 個月使用 1.25 g/kg/day「五苓散」合併 7.5 mg/kg/day Irbesartan，仍具有減緩糖尿病大鼠高尿素氮(BUN)以及高血清肌酸酐(serum creatinine)的效力。但是，連續 3 個月餵食糖尿病大鼠 Irbesartan (15 mg/kg/day)以及「五苓散」(2.5 g/kg/day)並沒有作用加強的效果；請參照表一所示數據。

事實上，糖尿病大鼠的尿量、尿蛋白(urine proteins)以及 24 小時尿白蛋白排泄率(UAER)有偏高的趨勢；同時，糖尿病大鼠的腎臟有肥大的現象。給予糖尿病大鼠 Irbesartan (15 mg/kg/day)連續 3 個月後，大鼠原先多尿以及高尿蛋白(urine proteins)和 UAER 過速的情形即有減緩的現象；腎臟腫大的現象亦有改善 (請參照表二所示數據)。此外，Irbesartan (15 mg/kg/day)亦能改善糖尿病大鼠原先肌酸酐清除率(creatinine clearance)偏低的現象。單獨給予糖尿病大鼠「五苓散」(2.5 g/kg/day) 3 個月後，亦能產生類似 Irbesartan (15 mg/kg/day)的作用，但效果不像 Irbesartan (15 mg/kg/day)來得明顯。即使是在藥物使用劑量減半再合併投藥的情況下，亦即使用 1.25 g/kg/day「五苓散」合併 7.5 mg/kg/day Irbesartan，給藥 3 個月後仍具有改善糖尿病大鼠原先多尿以及高尿蛋白(urine proteins)和 UAER 過速的效力。可是，在藥物使用劑量沒有減半的情況下合併投藥(即 15 mg/kg/day Irbesartan 合併 2.5 g/kg/day「五苓散」)並沒有產生作用加強的效果；請參照表二所示數據。

三、連續給予「五苓散」及 Irbesartan 對糖尿病大鼠腎臟病理學的影響

由組織病理學檢查顯示，相對於正常大鼠(圖一 A)，於糖尿病大鼠的腎球體間質細胞可見明顯擴大的現象(圖一 B)。連續單獨餵食糖尿病大鼠 Irbesartan (15 mg/kg/day)3 個月後，腎球體間質細胞擴大的情形則有改善的現象(圖一 C)。單獨給予糖尿病大鼠「五苓散」(2.5 g/kg/day) 3 個月後，亦能產生類似 Irbesartan (15 mg/kg/day)的作用，但效果不像 Irbesartan (15 mg/kg/day)來得明顯(圖一 D)。但是，連續 3 個月餵食糖尿病大鼠 Irbesartan (15 mg/kg/day)以及「五苓散」(2.5 g/kg/day)，合併藥物減緩糖尿病大鼠腎球體間質細胞擴大的效力並沒有比單獨給藥所產生的效果強(圖一 E)。可是，即使是在藥物使用劑量減半再合併投藥的情況下，亦即連續 3 個月使用 1.25 g/kg/day「五苓散」合併 7.5 mg/kg/day Irbesartan，仍可產生類似 Irbesartan (15 mg/kg/day)單獨給藥的效力，具有改善糖尿病大鼠腎球體間質細胞擴大的作用(圖一 F)。各組實驗大鼠腎臟間質細胞擴大指數(MEI)的變化(如圖一 G)所示。

四、連續給予「五苓散」及 Irbesartan 對糖尿病大鼠腎臟中轉化生長因子(TGF- β_1)以及膠原蛋白(collagen IV)表現量的影響

相對於正常大鼠(圖二 A)，糖尿病大鼠腎臟中轉化生長因子以及膠原蛋白均有過度表現的現象(圖二 B)。Irbesartan (15 mg/kg/day)連續給藥 3 個月後，糖尿病大鼠腎臟中原先過度表現的轉化生長因子以及膠原蛋白則有緩減的情形(圖二 C)。雖然連續 3 個月給予糖尿病大鼠「五苓散」(2.5 g/kg/day)亦具有改善糖尿病大鼠腎臟中轉化生長因子以及膠原蛋白過度表現的作用，但是效果不像 Irbesartan (15 mg/kg/day)來得明顯(圖二 D)。此外，連續 3 個月餵食糖尿病大鼠 Irbesartan (15 mg/kg/day)以及「五苓散」(2.5 g/kg/day)，此項合併藥物對於減緩糖尿病大鼠腎臟轉化生長因子以及膠原蛋白過度表現的效力並沒有比個別單獨給藥所產生的效果強(圖二 E)。但是，即使是在藥物使用劑量減半再合併投藥的情況下，亦即連續 3 個月使用 1.25 g/kg/day「五苓散」合併 7.5 mg/kg/day Irbesartan，仍可產生類似 Irbesartan (15 mg/kg/day)單獨給藥的效力(圖二 F)。

五、連續給予組成「五苓散」的單味藥對糖尿病大鼠血液生化指數的影響

單獨餵食茯苓(0.5 g/kg/day)、桂枝(0.3 g/kg/day)或是白朮(0.5 g/kg/day)的糖尿病大鼠連續 3 個月後，大鼠高血糖的狀況雖然有調降的趨勢，但是與同時處理溶劑(RO 水)的糖尿病大鼠所得數據相比較並沒有統計上的異差(表三)。此外，組成「五苓散」處方的各個單味藥並不會影響大鼠血中膽固醇以及三酸甘油酯的濃度(表三)。

六、連續給予組成「五苓散」的單味藥對糖尿病大鼠腎功能相關生化指數的影響

相對於處理溶劑(RO 水)的糖尿病大鼠，連續餵食茯苓(0.5 g/kg/day) 3

個月後，糖尿病大鼠原先現量較高的尿素氮(BUN)以及血清肌酸酐(serum creatinine)可明顯地降低(表三)。雖然桂枝(0.3 g/kg/day)或是白朮(0.5 g/kg/day)亦具有減緩糖尿病大鼠減緩糖尿病大鼠高尿素氮(BUN)以及高血清肌酸酐(serum creatinine)的作用，但是效力不似茯苓(0.5 g/kg/day)所產生的效果(表三)。連續單獨餵食豬苓(0.5 g/kg/day)或是澤瀉(0.8 g/kg/day) 3 個月後，糖尿病大鼠的高尿素氮(BUN)以及高血清肌酸酐(serum creatinine)的情形並沒有改善的情形(表三)。

事實上，「五苓散」的組成單味藥並不具有改善糖尿病大鼠多尿的藥效。可是單獨給予糖尿病大鼠茯苓(0.5 g/kg/day) 連續 3 個月後，大鼠原先 UAER 過速的情形不但有減緩的趨勢，腎臟腫大的情形亦有改善的現象。此外，茯苓(0.5 g/kg/day)具有改善糖尿病大鼠原先肌酸酐清除率(creatinine clearance)偏低的效力(表四)。組成「五苓散」的其他單味藥，包括豬苓(0.5 g/kg/day)、澤瀉(0.8 g/kg/day) 桂枝(0.3 g/kg/day)和白朮(0.5 g/kg/day)，則不具有改善糖尿病大鼠原先 UAER 過速以及腎臟腫大的藥效；亦無法提高糖尿病大鼠的肌酸酐清除率(表四)。

七、連續給予組成「五苓散」的單味藥對糖尿病大鼠對糖尿病大鼠腎臟病理學的影響

連續單獨餵食茯苓(0.5 g/kg/day) 3 個月後，產生類似「五苓散」(2.5 g/kg/day)單獨給藥的效力，可緩解糖尿病大鼠腎球體間質細胞擴大的現象(圖三 C 和 D)。桂枝(0.3 g/kg/day)或是白朮(0.5 g/kg/day)單獨作用 3 個月後，亦具減緩糖尿病大鼠腎球體間質細胞擴大的效力，但效果不像茯苓(0.5 g/kg/day)所產生的藥效來得明顯(圖三 G 和 H)。可是，豬苓(0.5 g/kg/day)或是澤瀉(0.8 g/kg/day)單獨作用，改善糖尿病大鼠腎球體間質細胞擴大的效力並不明顯(圖三 E 和 F)。各組實驗大鼠腎臟間質細胞擴大指數(MEI)的變化如(圖三 I)所示。

八、連續給予組成「五苓散」的單味藥對糖尿病大鼠腎臟中轉化生長因子(TGF- β_1)以及膠原蛋白(collagen IV)表現量的影響

連續 3 個月單獨給予糖尿病大鼠茯苓(0.5 g/kg/day)後，大鼠腎臟原先過度表現的轉化生長因子及膠原蛋白的表現量趨於減緩(圖四 F 及圖五 F)，可是效果不像「五苓散」(2.5 g/kg/day)所產生的作用來得明顯(圖四 C 及圖五 C)。相較於處理溶劑(RO 水)的糖尿病大鼠，桂枝(0.3 g/kg/day)或是白朮(0.5 g/kg/day)單獨給藥連續 3 個月後亦具減緩糖尿病大鼠腎臟中轉化生長因子以及膠原蛋白過度表現的效力；可是，兩者所產生的藥效不像茯苓(0.5 g/kg/day)的作用來得明顯(圖四 G、H 及圖五 G、H)。然而，不論是豬苓(0.5 g/kg/day)或是澤瀉(0.8 g/kg/day)，並沒有減緩糖尿病大鼠腎臟轉化生長因子以及膠原蛋白過度表現的能力(圖四 D、E 及圖五 D、E)。

肆、討論

糖尿病腎病變(diabetic nephropathy)是糖尿病病患嚴重的併發症和死因之一，其病理變化包括腎臟細胞增生、細胞肥大和細胞外間質增生；最後導致腎臟纖維化及末期腎病(end-stage renal disease)。因此，針對糖尿病病患高血糖的緩解以及相關性併發症的預防及治療已成為一個重要的課題。

藉由本計畫的施行所得結果發現：中醫所指原先具有利水滲濕及溫陽化氣作用的傳統方劑「五苓散」，在臨床常用劑量下與西藥臨床已知具有腎臟保護作用的血管張力素接受器阻斷劑(ARB)，Irbesartan (Aprovel®)，具有緩解糖尿病高血糖引致腎臟病變的效果；此為「五苓散」新療效的解明。此外，由實驗結果發現：「五苓散」與 Irbesartan 在臨床常用劑量減半的情況下合併投藥，亦即使用 1.25 g/kg/day 「五苓散」合併 7.5 mg/kg/day Irbesartan，連續 3 個月後，對於 STZ 所誘導的第 1 型糖尿病大鼠原先高尿素氮(BUN)以及高血清肌酸酐(serum creatinine) 的症狀同樣地具有減緩的效果。此外，糖尿病大鼠原先多尿、高尿蛋白(urine proteins) 和 UAER 過速以及腎臟腫大的現象亦可在「五苓散」與 Irbesartan 各自於使用劑量減半再合併投藥的情況下出現改善的作用。可是，在兩種藥物使用劑量沒有減半的情況下合併投藥，亦即 15 mg/kg/day Irbesartan 合併 2.5 g/kg/day 「五苓散」的使用劑量，對於改善糖尿病腎臟病變的藥效並沒有產生作用加強的效果。事實上，在高糖的狀態下，會因轉化生長因子(TGF- β_1)或是第二型血管張力素以及其他因子的大量生成，進而誘發 cyclin-dependent kinase (CDK) 抑制蛋白 p21^{cip1} 和 p27^{kip1} 的表現。因 CDK 抑制蛋白會和調控細胞週期 G1 期的 cyclin 形成複合體，使其失去活性而無法使細胞週期由 G1 期進入 S 期，以致細胞無法進行複製，最後導致腎絲球環間膜(mesangial)細胞肥大 [26]；而血管張力素接受器阻斷劑(ARB)能阻斷這條訊息傳導路徑的活化作用。是否「五苓散」亦具有與血管張力素接受器阻斷劑(ARB)的類似作用，能干擾 CDK 抑制蛋白影響細胞週期的能力，以至於「五苓散」與 Irbesartan 在全劑量投藥時彼此會去競爭同樣的目標路徑，因此看不到藥效加乘的效果；但是在劑量減半的情況下，兩者競爭 CDK 抑制蛋白的效力不似全劑量投藥時來得強，反而「五苓散」對於 Irbesartan 所具有的腎臟保護的作用能產生藥效增強的效果。因此，合併使用 Irbesartan 及「五苓散」之全劑量組不見有產生藥效加乘效果之可能原因值得日後再進一步探討。

另外，轉化生長因子(TGF- β_1)能夠刺激膠原蛋白(collagen IV)及纖維網狀蛋白(fibronectin)的表現，並抑制細胞外基質(extracellular matrix)被分解 [27]；可知轉化生長因子(TGF- β_1)在腎臟纖維化的過程扮演重要的角色。為了佐證「五苓散」的這項療效，進一步對糖尿病大鼠腎臟進行病理觀察與轉化生長因子(TGF- β_1)以及膠原蛋白(collagen IV)表現量的評估。實驗結果也發現「五苓散」與 Irbesartan 藉由臨床減半劑量的合併使用對於 STZ 所誘

導的第 1 型糖尿病大鼠仍可產生類似 Irbesartan 單獨給藥的效力，具有改善糖尿病大鼠腎臟中轉化生長因子(TGF- β_1)以及膠原蛋白過度表現及減緩腎球體間質細胞持續擴大的作用。可知，於常用劑量減半的情況下合併投藥，「五苓散」與 Irbesartan 具有藥效協同的作用。因此，「五苓散」可降低 Irbesartan 的臨床使用劑量，達到緩解糖尿病腎臟病變的作用。

方劑的組成原則，根據臨床實踐經驗分為主(君)藥、輔(臣)藥、佐藥、使藥(即引藥)四個部份：主藥是一個方劑的主要組成部分，輔藥、佐藥、使藥，都是輔助藥。所以，方劑的組成，也可簡要概括為主藥和輔助藥兩個部分。事實上，對於傳統方劑研究，除了應從整個處方之藥理作用上作考量外，個別藥材之藥理解析將有助於中藥現代化的發展。「五苓散」是由茯苓、桂枝、白朮、豬苓及澤瀉等五味藥材組成；方中白朮、豬苓、澤瀉、茯苓等藥具利尿滲濕之效。因此，本計劃進一步利用市售的科學濃縮製劑，針對組成「五苓散」的個別單味藥對改善糖尿病腎病變的藥效進行評估，以解明待測方劑是藉由何種組成藥物達到改善腎臟病變之療效。實驗結果發現，「五苓散」的組成單味藥皆不具有改善糖尿病大鼠多尿的藥效；可能與方中白朮、豬苓、澤瀉、茯苓等藥具利尿作用與桂枝能發散表邪以助他藥之利尿功能有關。但是在各個藥物單獨的作用下，茯苓(0.5 g/kg/day)對於大鼠原先 UAER 過速的情形及腎臟腫大的現象具有改善的效果。此外，茯苓確實具有改善糖尿病大鼠腎臟中轉化生長因子(TGF- β_1)與膠原蛋白過度表現以及減緩腎球體間質細胞持續擴大的能力。然而組成「五苓散」的其他單味藥包括則不似茯苓具有改善糖尿病腎病變的效力；可知茯苓是「五苓散」改善糖尿病腎病變療效的主要組成藥物，至於白朮、豬苓、澤瀉及桂枝等藥材則是扮演輔助藥的角色。

事實上，有關茯苓的臨床研究較少，藥理研究也進行不多，但自古以來茯苓應用於延年益壽的作用，『神農本草經』列之為上藥。已知茯苓所含成分主要為多醣類- β -茯苓聚糖(β -pachyman)及三萜類化合物-乙醯茯苓酸(pachymic acid)；其中 β -茯苓聚糖(β -pachyman)具有顯著增加免疫功能的作用[28, 29]。血糖會使血液中自由基增加，易造成內皮細胞的損傷。此外，高血糖亦可促使纖維網狀蛋白以及血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor)的表現量增加，進而帶動血管增生；若再配合血糖最終代謝產物(advanced glycosylation end products)在血管壁的堆積，則糖尿病引致之血管性病變的機會則大為提高。曾有研究指出，藉由體外試驗發現茯苓的乙醇萃取液能顯著抑制人類單核球(human peripheral blood monocytes)分泌轉化生長因子(TGF- β_1)的作用[30]。因此，茯苓延緩糖尿病腎病變的療效是否藉由所含的多醣體提升腎細胞的防衛功能或是減緩轉化生長因子(TGF- β_1)的過度表現而達成，值得再進行探討。

伍、結論與建議

本計畫結果發現具有利水滲濕及溫陽化氣作用的常用方劑-「五苓散」具有緩解糖尿病腎臟病變的新療效；不但有利於糖尿病治療藥物的開發，對於提供發展中藥的新方向和新用途亦具益助。此外，「五苓散」與 Irbesartan 具有協同作用，可降低 Irbesartan 的臨床使用劑量。本項計畫的完成有助於證實「五苓散」以及 Irbesartan 併用於糖尿病腎病變改善之藥效，並提供產官學各界有關中藥服用及中西藥合併服用劑量之評估。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP95-TP-042 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. Gillespie KM. Type 1 diabetes : pathogenesis and prevention. CMAJ 2006, 175 : 165-170.
2. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and β -cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. Diabetologia 2003, 46 : 3-19.
3. Fujisawa T, Ikegami H, Ogihara T. Diabetic complications and their features in the elderly. Nippon Rinsho 2006, 64 : 112-116.
4. 腎病症候，行政院衛生署中醫藥委員會，2000。
5. Leehey DJ, Singh AK, Alavi N, Singh R. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. Kidney Int 2000, 58 (Suppl 77) : S93-98.
6. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on diabetic nephropathy. N Engl J Med 1993, 329 : 1456-1462.
7. Cao Z, Bonnet F, Davis B, Allen TJ, Cooper ME. Additive hypotensive and anti-albuminuric effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin receptor antagonist in diabetic spontaneously hypertensive rats. Clin Sci 2001, 100 : 591-599.
8. The GISEN Group. Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. Lancet 1997, 349 : 1857-1863.
9. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S; RENAAL Study Investigators. Effects of Losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. N Engl J Med 2001; 345 : 861-869.
10. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, Ritz E, Atkins RC, Rohde R, Raz I; Collaborative Study Group. Renoprotective effect of the angiotensin receptor antagonist Irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. N Engl J Med 2001; 345 : 851-860.
11. Nakao N, Yoshimura A, Morita H, Takada M, Kayano T, Ideura T. Combination treatment of angiotensin II receptor blocker and angiotensin-converting-enzyme inhibitor in non-diabetic renal disease-a randomized controlled trial. Lancet 2003; 361 : 117-124.
12. Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, Allen TJ, Boner G, Cao Z. Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension. Diabetologia 2001; 44 : 874-877.

13. 臺灣中醫藥整合與前瞻，行政院衛生署中醫藥委員會，2003。
14. 鄭延辰、吳中明，五苓散臨床應用近況，山東中醫藥大學學報，1994。
15. 劉崇喜，臨床方劑藥理與應用，泓京出版社，2006。
16. 沈映君，中藥藥理學，知音出版社，2005。
17. 中華中藥典，行政院衛生署中醫藥委員會，2004。
18. 黃帝內經素問，人民衛生出版社，北京，1963。
19. 漢張機金匱要略，人民衛生出版社，北京。
20. 臺灣中醫藥整合與前瞻，行政院衛生署中醫藥委員會，2003。
21. Agras PI, Kinik ST, Cengiz N, Baskin E. Type 1 diabetes mellitus associated with nephrotic syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006; 19 : 1045-1048.
22. Toop MJ. Angiotensin-Converting Enzyme (ACE). Relationship to insulin dependent diabetes and microangiopathy. *Diabetic Med* 1986; 3 : 455-460.
23. Liu BC, Chen Q, Luo DD, Sun J, Phillips AO, Ruan XZ, Liu NF. Mechanisms of irbesartan in prevention of renal lesion in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24 : 67-73.
24. Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001; 345 : 870-888.
25. Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor β 1. *Nature* 1990; 346 : 371-374.
26. Wolf G. Cell cycle regulation in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2000, 77 : S59-S66.
27. Hong SW, Isono M, Chen S, Iglesias-De La Cruz MC, Han DC, Ziyadeh FN. Increased glomerular and tubular expression of transforming growth factor- β 1, its type II receptor, and activation of the Smad signaling pathway in the db/db mouse. *Am J Pathol* 2001; 158 : 1653-1663.
28. Wang Y, Zhang M, Ruan D, Shashkov AS, Kilcoyne M, Savage AV, Zhang L. Chemical components and molecular mass of six polysaccharides isolated from the sclerotium of *Poria cocos*. *Carbohydr Res* 2004, 339 : 327-334.
29. Wang Y, Zhang L, Li Y, Hou X, Zeng F. Correlation of structure to antitumor activities of five derivatives of a beta-glucan from *Poria cocos* sclerotium. *Carbohydr Res* 2004, 339 : 2567-2574.
30. Yu SJ, Tseng J. Fu-Ling, a Chinese herbal drug, modulates cytokine secretion by human peripheral blood monocytes. *Int J Immunopharmacol* 1996 18 : 37-44.

表、圖、榮

表一 連續 3 個月給予「五苓散」及 Irbesartan 對糖尿病大鼠血液生化指數以及血壓的影響

Groups	Plasmagluco- (mg/dl)	Plasmacholesterol (mg/dl)	Plasmatriglyceride (mg/dl)	Bloodureanitrogen (mg/dl)	Serumcreatinine (mg/dl)	Systolichloodpressure (mmHg)
Normalrats						
Vehicle	92.8±2.4	70.2±3.1	98.4±11.2	17.2±1.4	0.29±0.01	102.3±3.7
STZ-diabeticrats						
Vehicle	413.2±4.4 ^a	112.6±4.3 ^a	349.2±12.3 ^a	336. ±2.1 ^a	0.43±0.02 ^a	137.5±4.6 ^a
Irbesartan(15mg/kg/day)	408.6±3.7 ^a	109.4±4.1 ^a	327.4±13.8 ^a	23.7±1.6 ^{a,b}	0.33±0.01 ^{a,b}	116.6±4.2 ^{a,b}
A 廠「五苓散」(2.5g/kg/day)	406.7±3.9 ^a	110.3±4.6 ^a	33.12±14.6 ^a	26.2±1.9 ^{a,b}	0.36±0.01 ^{a,b}	136.3±3.5 ^a
B 廠「五苓散」(2.5g/kg/day)	404.8±4.1 ^a	111.2±3.7 ^a	342.3±10.9 ^a	26.9±2.3 ^{a,b}	0.36±0.02 ^{a,b}	138.1±4.7 ^a
A 廠「五苓散」(2.5g/kg/day) + Irbesartan(15mg/kg/day)	410.3±3.8 ^a	108.3±4.2 ^a	321.6±12.4 ^a	28.3±2.6 ^{a,b}	0.38±0.01 ^{a,b}	117.4±3.2 ^{a,b}
B 廠「五苓散」(2.5g/kg/day) + Irbesartan(15mg/kg/day)	417.2±4.5 ^a	101.2±3.5 ^a	324.3±14.2 ^a	27.6±1.8 ^{a,b}	0.39±0.02 ^a	118.3±4.1 ^{a,b}
A 廠「五苓散」(1.25.g/kg/day) + Irbesartan(7.5mg/kg/day)	396.4±3.9 ^{a,b}	107.9±4.5 ^a	336.8±13.5 ^a	25.8±1.7 ^{a,b}	0.35±0.01 ^{a,b}	122.4±3.3 ^{a,b}
B 廠「五苓散」(1.25g/kg/day) + Irbesartan(7.5mg/kg/day)	394.7±3.6 ^{a,b}	108.2±4.4 ^a	345.7±11.6 ^a	25.4±2.2 ^{a,b}	0.34±0.01 ^{a,b}	124.6±3.7 ^{a,b}

每組數據為 6~8 隻大鼠所得平均值，以 mean ± se 表示。^aP<0.05，各組數據相較於以溶劑(RO 水)處理之正常大鼠所得數值；
^bP<0.05，各組數據與以溶劑處理之 STZ 大鼠所得數據之比較。

表二 連續給予「五苓散」及 Irbesartan 對糖尿病大鼠腎功能相關生化指數的影響

Group	Treatment duration (weeks)	Urine volume (ml/day)	Ccr (ml/minperkg)	Urine proteins (mg/day)	UAER (mg/day)	Kidney weight (g/100gBW)
Normal Vehicle	4	10.9±2.8 ^b	8.0±0.3 ^b	8.5±1.2 ^b	2.8±0.2 ^b	0.7±0.1 ^b
	8	11.4±3.2 ^b	8.2±0.6 ^b	9.1±1.6 ^b	2.7±0.2 ^b	
	12	12.1±3.5 ^b	8.1±0.4 ^b	8.7±0.8 ^b	2.9±0.3 ^b	
STZ-diabetic rats Vehicle	4	26.9±2.5 ^a	6.1±0.3 ^a	15.3±2.1 ^a	4.3±0.7 ^a	1.3±0.3 ^a
	8	30.2±2.8 ^a	5.6±0.3 ^a	17.5±2.6 ^a	5.8±0.9 ^a	
	12	35.6±3.2 ^a	4.8±0.5 ^a	19.4±3.2 ^a	6.5±0.6 ^a	
Irbesartan(15mg/kg/day)	4	18.7±3.1 ^{ab}	7.5±0.6 ^b	11.4±1.8 ^{ab}	3.8±0.5 ^a	0.8±0.2
	8	22.1±2.4 ^{ab}	6.7±0.4 ^{ab}	12.7±2.6 ^{ab}	4.2±0.7 ^a	
	12	24.4±2.7 ^{ab}	6.2±0.2 ^{ab}	13.2±2.1 ^{ab}	4.7±0.6 ^{ab}	
A 廠「五苓散」(2.5g/kg/day)	4	23.6±3.3 ^a	6.8±0.4 ^a	13.3±2.5 ^a	4.4±0.4 ^a	0.9±0.1
	8	26.4±2.9 ^a	5.9±0.3 ^a	14.8±2.3 ^a	4.9±0.6 ^a	
	12	29.1±3.2 ^a	5.5±0.5 ^a	15.6±3.1 ^a	5.2±0.8 ^a	
B 廠「五苓散」(2.5g/kg/day)	4	24.2±3.4 ^a	6.6±0.7 ^a	13.8±2.4 ^a	4.6±0.3 ^a	0.9±0.2
	8	27.8±2.5 ^a	6.0±0.5 ^a	15.1±1.9 ^a	5.0±0.7 ^a	
	12	29.5±2.8 ^a	5.4±0.4 ^a	15.8±2.2 ^a	5.3±0.5 ^{ab}	
A 廠「五苓散」(2.5g/kg/day) + Irbesartan(15mg/kg/day)	4	25.3±3.1 ^a	6.2±0.4 ^a	14.9±2.6 ^a	5.0±0.6 ^a	1.1±0.2
	8	28.6±3.2 ^a	5.8±0.3 ^a	16.3±3.1 ^a	5.4±0.4 ^a	
	12	32.4±2.8 ^a	4.9±0.5 ^a	17.8±2.8 ^a	5.9±0.5 ^a	
B 廠「五苓散」(2.5g/kg/day) + Irbesartan(15mg/kg/day)	4	26.2±3.4 ^a	6.0±0.8 ^a	14.2±1.9 ^a	4.7±0.5 ^a	1.0±0.3
	8	29.4±2.8 ^a	5.7±0.4 ^a	15.9±2.1 ^a	5.3±0.4 ^a	
	12	33.9±3.5 ^a	5.1±0.5 ^a	17.3±2.5 ^a	5.8±0.7 ^a	
A 廠「五苓散」(1.25.g/kg/day) + Irbesartan(7.5mg/kg/day)	4	19.2±2.9 ^{ab}	6.9±0.7 ^a	13.4±2.3 ^a	4.5±0.3 ^a	0.8±0.3
	8	23.2±3.4 ^{ab}	6.0±0.5 ^a	15.6±1.8 ^a	5.2±0.6 ^a	
	12	25.6±2.7 ^{ab}	5.7±0.4 ^a	16.1±2.1 ^a	5.4±0.4 ^{ab}	
B 廠「五苓散」(1.25g/kg/day) + Irbesartan(7.5mg/kg/day)	4	18.9±3.2 ^{ab}	6.4±0.3 ^a	13.6±1.9 ^a	4.5±0.5 ^a	0.8±0.2
	8	24.1±3.8 ^{ab}	5.9±0.6 ^a	14.7±2.7 ^a	4.9±0.3 ^a	
	12	25.6±2.5 ^{ab}	5.2±0.5 ^a	15.9±2.3 ^a	5.3±0.6 ^a	

每組數據為 6~8 隻大鼠所得平均值，以 mean ±se 表示。Ccr, creatinine clearance; UAER, urinary albumin excretion rate; BW, body weight。

^aP<0.05，各組數據相較於以溶劑(RO 水)處理之正常大鼠於各個時間點所得數值；^bP<0.05，各組數據與以溶劑處理之 STZ 大鼠於各個時間點所得數據之比較。

表三 連續 3 個月給予「五苓散」及其組成處方單味藥對糖尿病大鼠血液生化指數的影響

Groups	Plasma glucose (mg/dl)	Plasma cholesterol (mg/dl)	Plasma triglyceride (mg/dl)	Blood urea nitrogen (mg/dl)	Serum creatinine (mg/dl)
Normal rats					
Before treatment	90.2 ± 3.4 ^b	67.5 ± 4.1 ^b	94.2 ± 7.6 ^b	15.9 ± 1.8 ^b	0.25 ± 0.02 ^b
After 12-weeks of vehicle treatment	91.3 ± 2.1 ^b	69.4 ± 3.1 ^b	98.4 ± 11.2 ^b	17.2 ± 1.4 ^b	0.29 ± 0.01 ^b
STZ-diabetic rats					
Before treatment	408.2 ± 4.3 ^a	112.7 ± 3.6 ^a	343.5 ± 10.2 ^a	33.1 ± 2.5 ^a	0.41 ± 0.05 ^a
After 12-weeks treatment					
Vehicle	416.8 ± 4.1 ^a	118.4 ± 4.5 ^a	352.3 ± 11.8 ^a	35.2 ± 2.6 ^a	0.46 ± 0.02 ^a
「五苓散」(2.5 g/kg/day)	405.9 ± 4.7 ^a	112.3 ± 3.9 ^a	340.2 ± 10.5 ^a	25.3 ± 2.4 ^{a,b}	0.34 ± 0.03 ^{a,b}
豬苓(0.5 g/kg/day)	417.2 ± 3.9 ^a	119.2 ± 4.1 ^a	353.2 ± 10.2 ^a	33.6 ± 3.1 ^a	0.45 ± 0.04 ^a
澤瀉(0.8 g/kg/day)	415.4 ± 3.7 ^a	117.4 ± 3.7 ^a	349.3 ± 8.4 ^a	32.8 ± 3.6 ^a	0.46 ± 0.03 ^a
茯苓(0.5 g/kg/day)	407.3 ± 4.2 ^a	114.1 ± 4.3 ^a	341.4 ± 10.9 ^a	26.4 ± 3.2 ^{a,b}	0.38 ± 0.02 ^{a,b}
桂枝(0.3 g/kg/day)	410.2 ± 7.5 ^a	117.2 ± 3.8 ^a	346.2 ± 9.7 ^a	27.5 ± 3.8 ^a	0.40 ± 0.04 ^a
白朮(0.5 g/kg/day)	412.4 ± 4.5 ^a	116.4 ± 4.2 ^a	345.7 ± 8.6 ^a	28.1 ± 4.3 ^a	0.42 ± 0.04 ^a

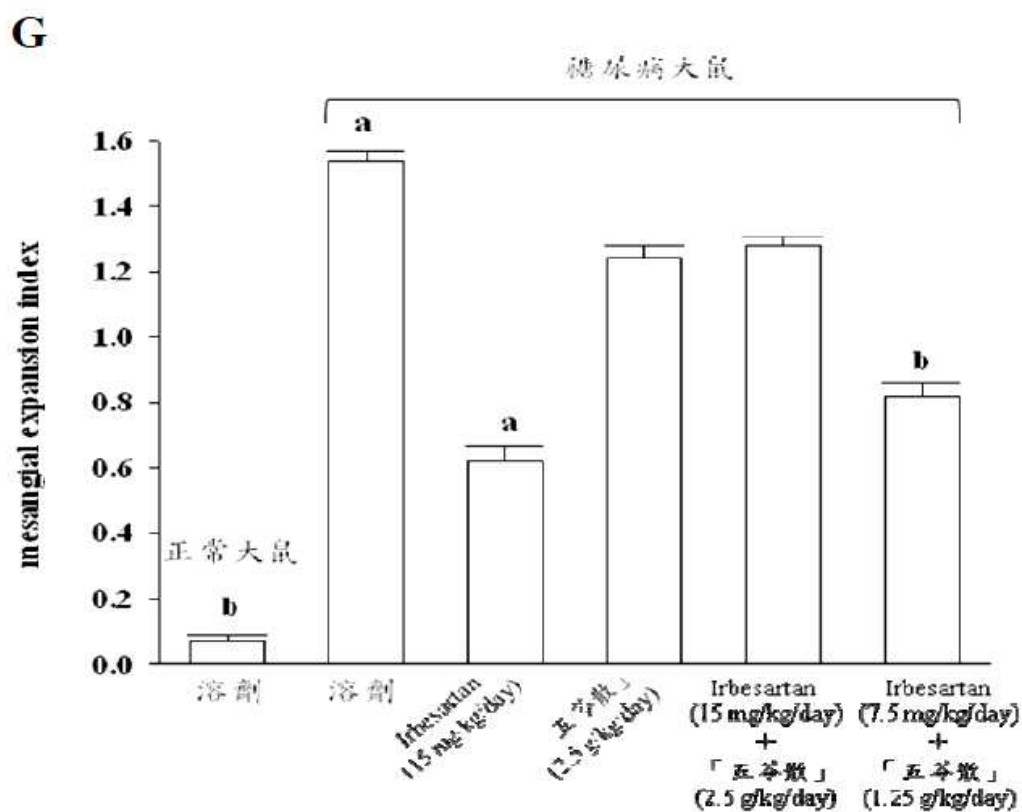
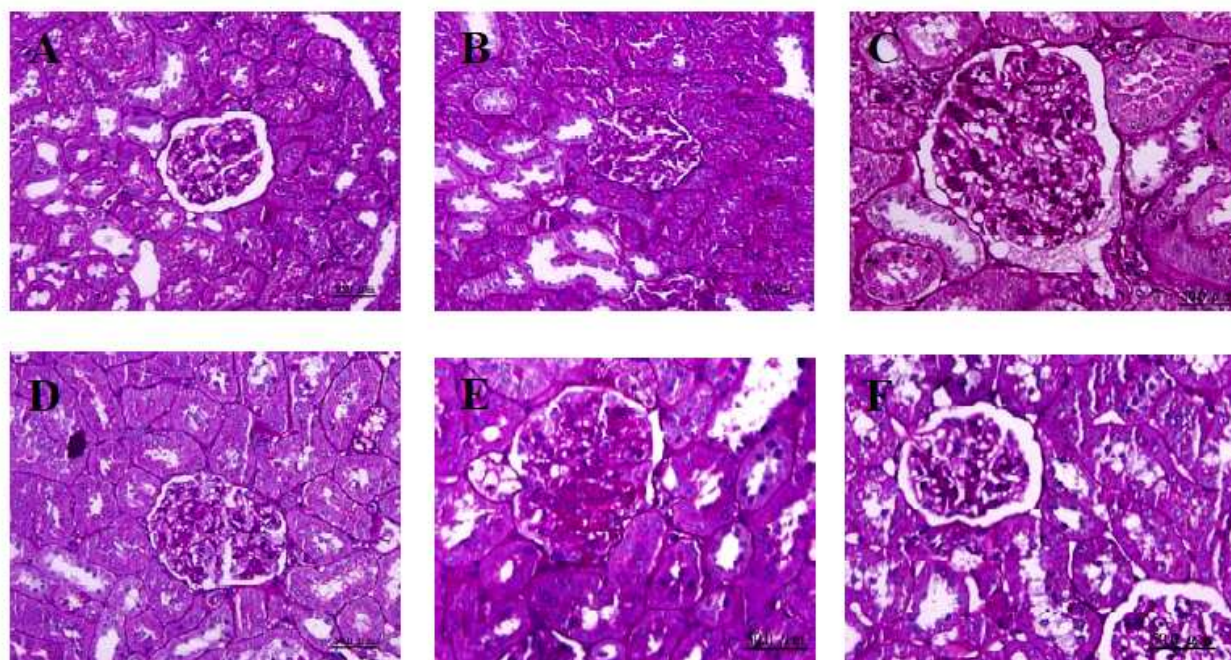
每組數據為 6~8 隻大鼠所得平均值，以 mean ± se 表示。^aP<0.05，各組數據相較於以溶劑(RO 水)處理之正常大鼠所得數值；^bP<0.05，各組數據與以溶劑處理之 STZ 大鼠所得數據之比較。

表四 連續 3 個月給予「五苓散」及其組成處方單味藥對糖尿病大鼠腎功能相關生化指數的影響

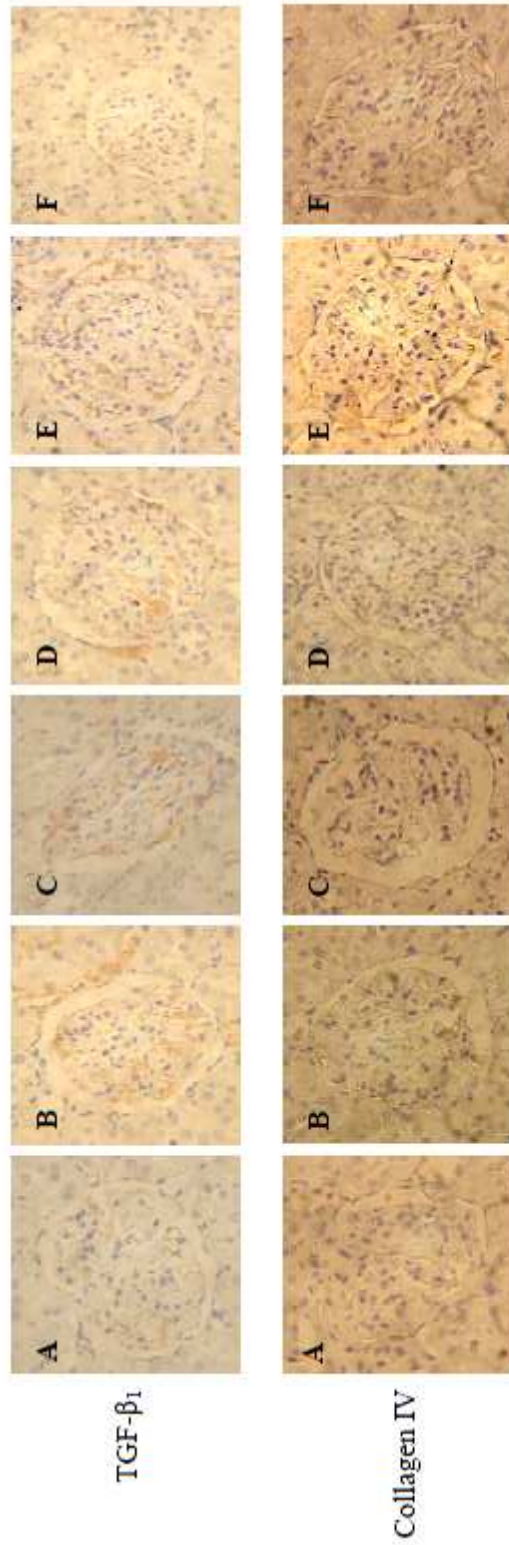
Groups	Urine volume (ml/day)	Ccr (ml/min per kg)	UAER (mg/day)	kidney weight (g/100 g BW)
Normal rats				
Before treatment	11.2 ± 2.6 ^b	8.1 ± 0.3 ^b	2.9 ± 0.4 ^b	—
After a 12-weeks of vehicle treatment	11.8 ± 3.1 ^b	8.3 ± 0.4 ^b	3.1 ± 0.3 ^b	0.7 ± 0.2 ^b
STZ-diabetic rats				
Before treatment	27.4 ± 2.8 ^a	6.2 ± 0.5 ^{a,b}	4.3 ± 0.7 ^a	—
After 12-weeks treatment				
Vehicle	36.2 ± 2.9 ^a	4.4 ± 0.3 ^a	7.1 ± 0.8 ^a	1.3 ± 0.2 ^a
「五苓散」(2.5 g/kg/day)	29.1 ± 3.4 ^{a,b}	5.8 ± 0.5 ^{a,b}	4.8 ± 0.4 ^{a,b}	0.9 ± 0.1
豬苓(0.5 g/kg/day)	42.6 ± 3.5 ^a	4.5 ± 0.3 ^a	6.8 ± 0.6 ^a	1.2 ± 0.2
澤瀉(0.8 g/kg/day)	38.1 ± 2.8 ^a	4.3 ± 0.5 ^a	6.9 ± 0.7 ^a	1.2 ± 0.3
茯苓(0.5 g/kg/day)	40.3 ± 4.2 ^a	5.6 ± 0.4 ^{a,b}	5.1 ± 0.6 ^{a,b}	1.0 ± 0.2
桂枝(0.3 g/kg/day)	32.4 ± 3.5 ^a	4.6 ± 0.5 ^a	6.6 ± 0.5 ^a	1.1 ± 0.2
白朮(0.5 g/kg/day)	35.8 ± 3.6 ^a	4.7 ± 0.6 ^a	6.5 ± 0.7 ^a	1.1 ± 0.2

每組數據為 6~8 隻大鼠所得平均值，以 mean ± se 表示。Ccr, creatinine clearance; UAER, urinary albumin excretion rate; BW, body weigh.

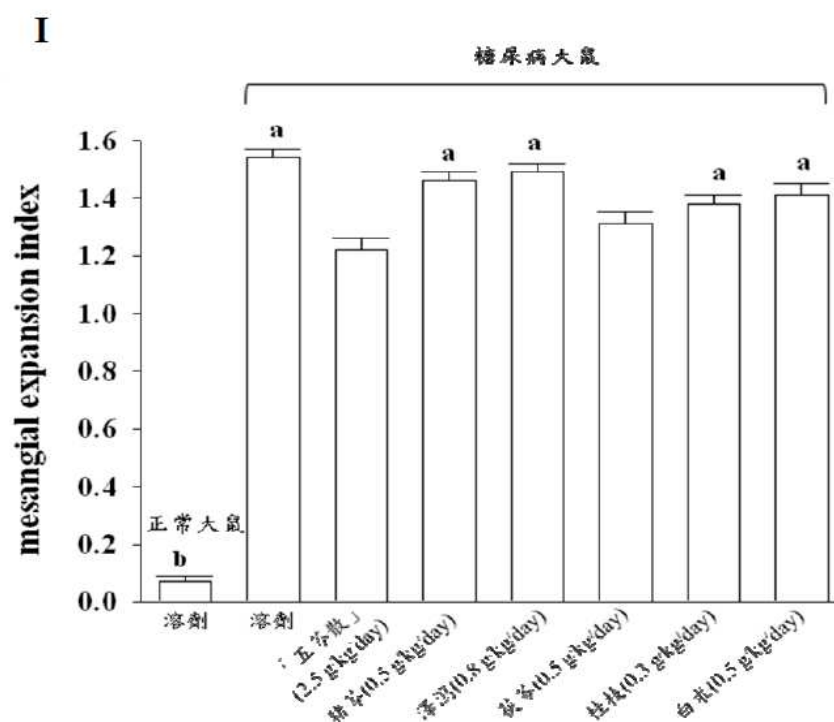
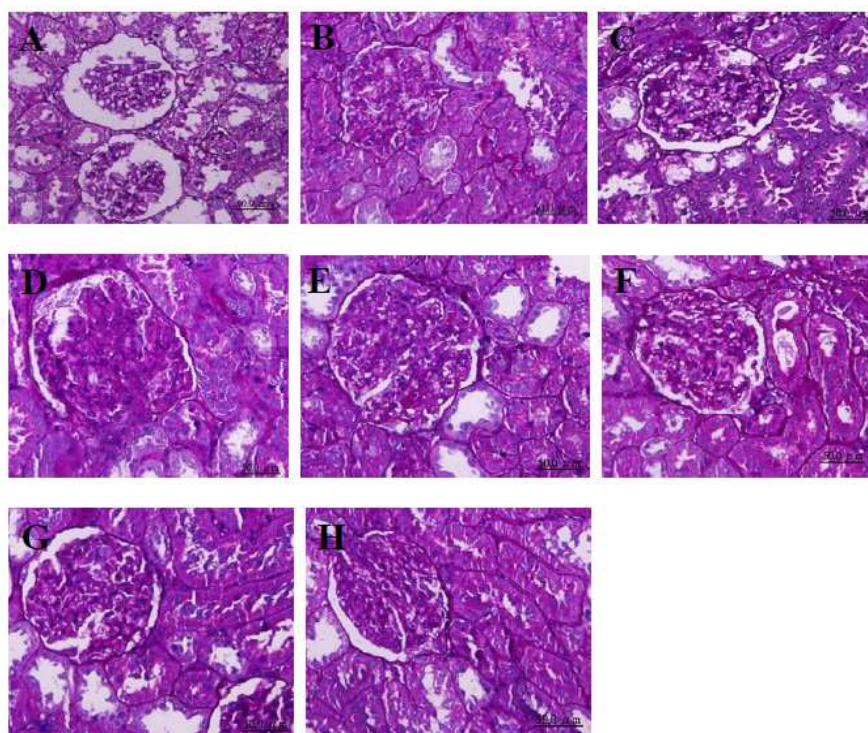
^aP<0.05，各組數據相較於以溶劑(RO 水)處理之正常大鼠所得數值；^bP<0.05，各組數據與以溶劑處理之 STZ 大鼠所得數據之比較。



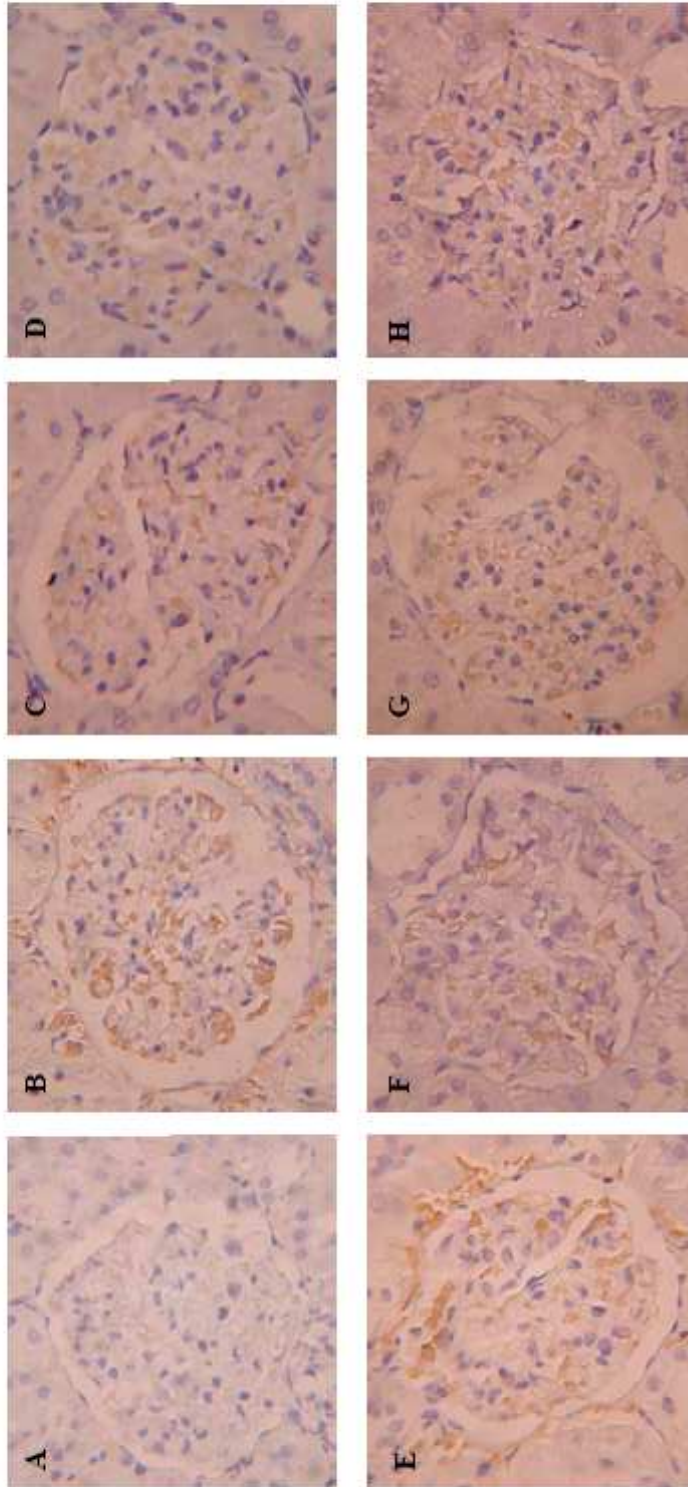
(圖一) 連續餵食待測藥物 3 個月後，大鼠離體腎臟病理切片(400X)結果。A: 餵食溶劑 (RO 水)的正常大鼠；B: 餵食溶劑(RO 水)的STZ糖尿病大鼠；C: 餵食 Irbesartan (15 mg/kg/day)的STZ糖尿病大鼠；D: 餵食「五苓散」(2.5 g/kg/day)的STZ糖尿病大鼠；E: 餵食 Irbesartan (15 mg/kg/day)合併「五苓散」(2.5 g/kg/day)的STZ糖尿病大鼠；F: 餵食 Irbesartan (7.5 mg/kg/day)合併「五苓散」(1.25 g/kg/day)的STZ糖尿病大鼠；G: 各組實驗大鼠腎臟間質細胞擴大指數。每組數據為 5 隻大鼠所得平均值，以 mean \pm se 表示。^aP<0.05, ^bP<0.01,各組數據與以溶劑處理之 STZ 大鼠所得數據之比較。



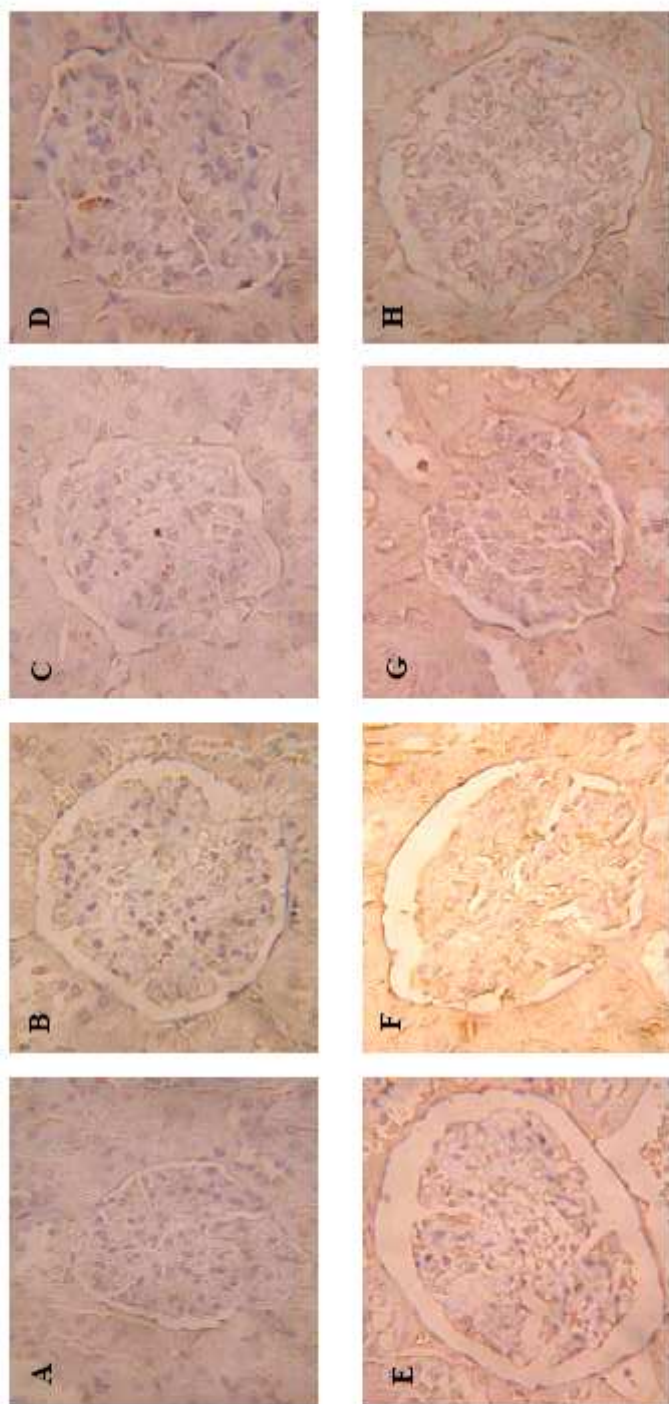
(圖二) 連續餵食待測藥物 3 個月後，大鼠離體腎臟轉化生長因子(IGF-β₁)以及膠原蛋白(collagen IV)免疫組織化學染色結果(400X)。A: 餵食溶劑(RO 水)的正常大鼠；B: 餵食溶劑(RO 水)的 STZ 糖尿病大鼠；C: 餵食 Irbesartan (15 mg/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；D: 餵食「五苓散」(2.5 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；E: 餵食 Irbesartan (15 mg/kg/day)合併「五苓散」(2.5 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；F: 餵食 Irbesartan (7.5 mg/kg/day)合併「五苓散」(1.25 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠。



(圖三) 連續餵食待測藥物 3 個月後，大鼠離體腎臟病理切片(400X)結果。A: 餵食溶劑(RO 水)的正常大鼠；B: 餵食溶劑(RO 水)的 STZ 糖尿病大鼠；C: 餵食「五苓散」(2.5 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；D: 餵食豬苓(0.5 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；E: 餵食澤瀉(0.8 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；F: 餵食茯苓(0.5 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；G: 餵食桂枝(0.3 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；H: 餵食白朮(0.5 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；I: 各組實驗大鼠腎臟間質細胞擴大指數。每組數據為 5 隻大鼠所得平均值，以 mean ± se 表示。^aP<0.05, ^bP<0.01, 各組數據與以「五苓散」(2.5 g/kg/day)處理之 STZ 大鼠所得數據之比較。



(圖四) 連續餵食待測藥物 3 個月後，大鼠離體腎臟轉化生長因子(TGF-β₁)免疫組織化學染色結果(400X)。A: 餵食溶劑(RO 水)的正常大鼠；B: 餵食溶劑(RO 水)的 STZ 糖尿病大鼠；C: 餵食「五苓散」(2.5 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；D: 餵食豬苓(0.5 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；E: 餵食澤瀉(0.8 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；F: 餵食茯苓(0.5 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；G: 餵食桂枝(0.3 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；H: 餵食白朮(0.5 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠。



(圖五) 連續餵食待測藥物 3 個月後，大鼠離體腎臟膠原蛋白(collagen IV)免疫組織化學染色結果(400X)。A: 餵食溶劑(RO 水)的正常大鼠；B: 餵食溶劑(RO 水)的 STZ 糖尿病大鼠；C: 餵食「五苓散」(2.5 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；D: 餵食豬苓(0.5 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；E: 餵食澤瀉(0.8 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；F: 餵食茯苓(0.5 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；G: 餵食桂枝(0.3 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠；H: 餵食白朮(0.5 g/kg/day)的 STZ 糖尿病大鼠。