

ISSN 3105-6768 (print)

ISSN 3105-6776 (online)

智慧中医学

Intelligent Chinese Medicine

2025年 第1卷 第1期

(双月刊)



OPEN ACCESS



扫码阅读

智慧中医学

编委会

主 编

洪子辰

副主编

王 强 刘姚洋 兰 琪

张玉涵 崔 颖 陶雨欣

李 伟 陆明哲 任 静

(以上排名不分先后顺序)

编委会助理

钟 萌

编辑出版

澳门中外医药出版社有限公司

地址

澳门巴掌围斜巷 19 号 7 楼 D

电话

00853-68819699

邮箱

QuestPress@hotmail.com

网站

zhzyx.scionline2025.com

出版时间

2025 年 10 月

智慧中医学

Intelligent Chinese Medicine

2025 年 第 1 卷 第 1 期 (双月刊)

目 次

◆ 药理研究

珍珠粉有效成分促进肛瘘大鼠术后创面愈合的作用机制研究

..... 李锦文, 张珊珊 (1)

荔枝核总黄酮抑制 NLRP3 炎症小体减轻小鼠急性肝损伤的作用

..... 李星炜 (6)

宣白承气汤对痰热腑实型哮喘大鼠肺组织病理损伤及 Th1/Th2

失衡影响 张清清, 郭柯伟 (12)

◆ 方药纵横

黄芪赤风汤指纹图谱建立及主要成分含量测定

..... 刘 承, 袁晚月, 王旭民 (18)

基于 BMSCs 淫羊藿 - 仙茅 - 巴戟天角药抗骨质疏松药效物质

提取工艺研究 郭 辰, 王晓迪 (25)

低共熔溶剂提取山里红多糖工艺优化研究

..... 颜若铭, 王子轩, 曾 怡 (30)

珍珠粉有效成分促进肛瘘大鼠术后创面愈合的作用机制研究

李锦文, 张珊珊

辽宁中医医院, 辽宁沈阳, 110003

摘要: **目的** 观察珍珠粉在肛瘘大鼠术后创面恢复的药物促进机制, 探讨其影响机制。**方法** 造模 30 只 SD 大鼠, 使其形成肛瘘术后创面, 将未造模成功的大鼠剔除, 按随机数字表法随机分为珍珠粉组、碳酸钙组、对照组, 每组 8 只。珍珠粉组每日点涂珍珠粉末于肛瘘大鼠创面, 碳酸钙组每日应用碳酸钙外敷于肛瘘大鼠创面, 对照组每日用生理盐水冲洗肛瘘大鼠创面, 连续干预 14 d。各组于应用药物治疗后的第 3 天、第 7 天、第 14 天于肛瘘大鼠创面取材, 比较 3 组之间的创面毛细血管含量、TGF- β 及 VEGF 的表达水平。**结果** 与对照组相比, 珍珠粉组可以增加创面组织中 VEGF 和 TGF- β 的表达 ($P < 0.05$), 以上差异具有统计学意义。**结论** 珍珠粉可以显著促进肛瘘大鼠术后创面的愈合, 其提高 VEGF 和 TGF- β 的含量和活性, 促进新生肉芽组织的生成可能是其发挥促进创面愈合的作用途径之一。

关键词: 珍珠粉; 肛瘘术后; 创面愈合

肛瘘是肛肠科三种常见疾病之一, 其治疗方法国内外均以手术为主^[1-2], 肛瘘术后创面的愈合及修复是手术的延续, 同时也是决定手术成败的关键因素。由于肛瘘创面位置特殊, 术后创面愈合缓慢是临床常见问题, 课题组前期在临床观察中发现^[3], 珍珠粉对肛瘘术后创面愈合有加速肉芽组织生长并缩短愈合时间的作用, 具有疗效优势, 但是尚缺乏在生物学层面的系统作用机制阐明。研究表明珍珠粉是通过参与细胞 DNA 的代谢, 加速血管的修复, 具有促进伤口愈合的效果^[4]。本实验基于前期工作^[3]的成果, 建立肛瘘术后大鼠模型, 并通过检测血管表皮生长因子 (VEGF), 转化生长因子 (TGF- β) 的含量表达, 就其机制展开实验探索, 以阐释珍珠粉促进肛瘘大鼠术后创面愈合的作用, 为临床应用提供实验依据, 并可能为其他学科术后创伤愈合提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

SPF 级 SD 雄性大鼠 30 只, 鼠龄 11~12 周龄, 体质量 (200 \pm 20) g 购于辽宁长生生物技术股份有限公司, 所有大鼠均在 SPF 级动物中心分笼饲养, 环境温度 20~23 $^{\circ}$ C, 相对湿度 50%~70%, 人工建立 12h 明暗周期。由实验中心提供 SPF 级鼠饲料自由喂养, 高温灭菌饮水, 保持通风及清洁。实验动物许可证号 21000042021066, 本动物实验

过程均遵守实验动物福利伦理相关法规和各项规定。适应性饲养 1 周后进行肛瘘造模, 经过肛瘘造模剔除后, 成功造模的肛瘘术后大鼠有 24 只。按随机数字表分为 3 组: 模型对照组、碳酸钙组、珍珠粉组, 每组 8 只。

1.2 药物和试剂、仪器

碳酸钙生产厂家为北京振东康远制药有限公司, 珍珠粉生产厂家为河北橘井药业有限公司。生理盐水生产厂家为沈阳志鹰制药厂。10%水合氯醛生产厂家为福州韦伯康生物科技有限公司。5%葡萄糖注射液, 上海百特医疗用品有限公司。无水乙醇、95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇国药集团 (沈阳) 化学试剂有限公司。抑肽酶、5%多聚甲醛、防脱载玻片、盖玻片、苏木素-伊红染色液, 辽宁中医药大学中医分子生物学实验室。TRIzol, INVITROGEN 公司中国代理。二甲苯、石蜡, 国药集团 (沈阳) 化学试剂有限公司。大鼠转化生长因子 (TGF- β) ELISA 试剂盒, AMEKO 公司中国代理。微量移液器, 美国热电公司。-20 $^{\circ}$ C 冰箱, 中国海尔有限公司。切片机, 德国徕卡公司 (LEICARM2235 型)。石蜡包埋机, 德国徕卡公司 (EG1150H)。数码显微镜, 日本 OLYMPUS 公司 (OLYMPUS BX41 型)。烘片机, 德国徕卡公司 (HI1220)。生物显微镜, 日本 OLYMPUS 公司 (CHA 型)。生化培养箱, 上海森信实验仪器有限公司 (SHP-150)。超薄切片机, 瑞典 LKB 公司

(LKBV 型)。透射电子显微镜, 日本电子公司 (JEM-100CX II 型)。净化工作台, 苏州安泰空气技术有限公司。酶标仪, 奥地利 AnthosLabtec Instruments (antho2010 型)。

1.3 方法

1.3.1 造模

造模前 24h 禁食, 给予等比例糖盐水饮用。将 30 只大鼠称量体质量后, 按照每克体质量给予 10%水合氯醛 0.35mL 的剂量麻醉大鼠后, 采用 0.6cm 直径注射针头, 经大鼠直肠向肛周 3 点或 9 点位以 30°~45°注射感染液 1mL (大鼠新鲜粪便 10g, 加 0.9%氯化钠注射液 30mL, 混匀, 纱布过滤, 现配现用) 形成约直径 1cm 皮丘, 48h 后观察大鼠肛周, 见肛周皮肤隆起、按压有波动感, 行切开排脓术, 1~2 周可见瘘口形成, 可触及明显瘘道, 取局部组织病理送检, 镜下所见与人体瘘道组织具有高度相似性, 造模成功 24 只。

1.3.2 实验步骤

珍珠粉组每日换药, 应用棉球蘸取珍珠粉末, 紧紧外敷于肛瘘大鼠肛门口创面, 碳酸钙组每日换药, 应用棉球蘸取碳酸钙粉末, 紧紧外敷于肛瘘大鼠肛门口创面, 对照组每日应用生理盐水 5mL 冲洗肛瘘大鼠创面分泌物。各组以上操作每日 1 次, 连续 14d。

1.3.3 样本采集

在肛瘘术后的第 3、7、14 天分别对各组大鼠在麻醉状态下取材创面肉芽组织, 操作动作尽量轻柔, 防止人为损伤肉芽组织。以滤纸吸干水分后, 肉眼观察局部瘘管组织。用 5%多聚甲醛固定后。取部分黏膜组织于抑肽酶中浸泡, 放入 TRIzol 中浸泡, 然后存放于 -70℃冰箱中备用。另一部分 70%酒精中保存待用, 以 HE 染色观察各组大鼠肠黏膜的组织形态学变化。等待第 14 天创面取材实验周期结束以后, 适宜温度静置后, 存放于 -70℃冰箱中备用, 以 ELISA 方法检测各组肛瘘大鼠局部创面组织中 TGF- β 的表达情况。VEGF 的表达采用双抗体夹心法酶联合免疫吸附试验测定, 大鼠最后一次取材后处死。

1.3.4 光镜标本制备

石蜡切片制备: 将固定好的肛瘘大鼠瘘管标本组织取出, 经自来水下冲洗后经全自动脱水机脱水, 将其依次放入 50%的乙醇, 60min; 70%乙

醇, 60min; 80%乙醇, 60min; 95%乙醇, 60min; 95%乙醇, 60min; 100%乙醇, 60min; 100%乙醇, 60min 进行梯度脱水。脱水后, 用二甲苯透明, 肛瘘大鼠瘘管标本浸于石蜡中 20min, 用石蜡置换出二甲苯, 滤纸吸干表面液体, 标本浸蜡后置于 60℃融化的液体石蜡中, 石蜡凝固后, 标本成型。将蜡块用刀片修整成规整的性状, 使用轮转式切片机将蜡块切成 5 μ m 的薄片, 将切片投入到水温 45℃的展片机的水槽中, 借水的张力和温度, 使蜡带自然展平, 将蜡片轻置于载玻片的中段, 将切片对应的组织编号标记。将载片浸入二甲苯 I 20min, 洗去石蜡。载片浸入二甲苯 II 10min。无水酒精 5min, 洗去二甲苯。无水酒精 II 5min。按顺序入 95%、80%、70%、50%酒精中各 5min, 脱蜡后进行 HE 染色: 进入苏木精溶液染色 30min 后, 用自来水洗去浮色。1%盐酸酒精分色, 洗去不应上色 (如细胞质) 部分。然后用自来水冲洗 30min 以上。0.5%~1%伊红溶液复染 1~10min, 使胞质染成红色。按顺序经 95%酒精 I、II 中脱水兼分化伊红颜色各 1min。放入无水酒精中彻底脱水 4~5min (I、II 各 2min)。先入二甲苯 I 1min 透明, 再入二甲苯 II 彻底透明 5min; 用中性树脂胶封固。在载玻片上加 1~2 滴树脂胶, 加盖玻片封固。封固后, 贴标签备用。

1.3.5 指标检测

采用 ELISA 法检测肛瘘大鼠创面组织中转化生长因子 (TGF- β) 及血管表皮生长因子 (VEGF) 的水平。将 4%的多聚甲醛常规灌注固定, 取材并置 20%蔗糖溶液 (4℃) 中过夜。蜡块制作。切片, 贴片。0.01 MKPBS 清洗 5min \times 3 后; 加入配好的 0.3%的过氧化氢甲醇溶液 (甲醇 80mL+0.01 MKPBS 100mL+30%过氧化氢) 30min, 以消除内源性过氧化物酶的影响, 0.01 MPBS 清洗 5min \times 3; 加入配好的 0.3% Triton X100 (30%Triton X100+0.01 MKPBS 100 mL) 30min, 以增加细胞的通透性, 0.01MKPBS 清洗 5min \times 3; 加入用血清稀释液 (牛血清白蛋白 1.00g+0.01MKPBS 100 mL+叠氮钠 0.08 g) 稀释的一抗, 4℃存放 24~48h; 吸去抗体, 0.01MKPBS 洗 5min \times 3; 加入 0.01MKPBS 稀释的二抗, 室温孵育 2h, 0.01MKPBS 洗 5min \times 3; 加入 ABC 复合物之类的抗体, 室温孵育 2h, 0.01MKPBS 洗 5min \times 3; 蒸馏水迅速冲 3 次; 加入

显色液,进行免疫组织化学显色,时间一般不超过30min,可不时在显微镜下进行观察,待细胞着色而背底颜色较淡时马上吸去显色液,用蒸馏水迅速冲3次后加入0.01MKPBS终止反应;梯度酒精脱水之后,封片,拍照。

1.4 统计学方法

运用 SPSS21.0 统计学软件处理转化生长因子(TGF-β)及血管表皮生长因子(VEGF)数值,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,组间比较采用 χ^2 检验,多组间比较采用配对t检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 病理组织学改变

(1)模型对照组:可见非特异性炎性肉芽组织构成,壁外层有大量纤维组织,有较多中性白细胞浸润,有多核异物巨细胞反应和较多单核细胞出现。

(2)碳酸钙组:可见非特异性炎性肉芽组织构成,壁外层有大量纤维组织,可见少量中性白细胞浸润,少量嗜酸性细胞浸润。(3)珍珠粉组:柱状上皮细胞排列整齐,可见到散在的杯形细胞,黏膜肌层薄厚均匀无异常改变,无糜烂溃疡、炎症浸润、充血水肿。见图1。

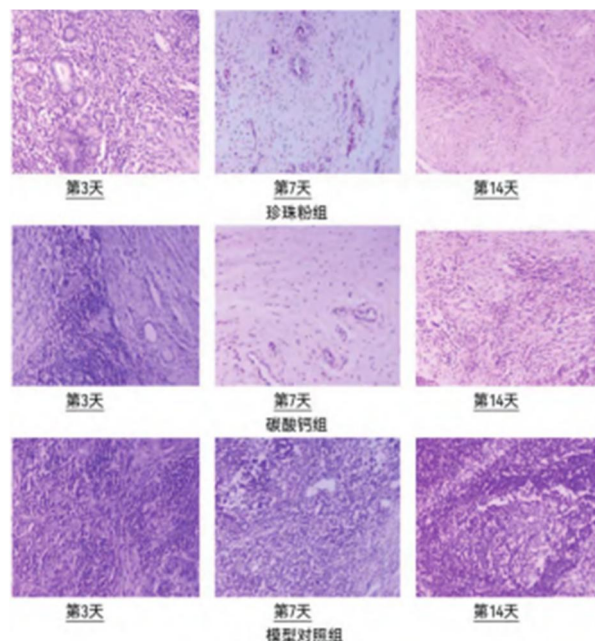


图1 各组大鼠术后创面毛细血管及成纤维细胞病理组织学改变(HE染色,×200)

2.2 免疫组化结果

2.2.1 转化生长因子(TGF-β)的灰度值表达

结果显示珍珠粉组转化生长因子(TGF-β)的表达结果高于碳酸钙及对照组,第14天的数值在各组间的差异有统计学意义($P < 0.05$),且珍珠粉组的转化生长因子(TGF-β)的表达随时间增加而增强,第7天与第14天的组间差异有统计学意义($P < 0.05$),珍珠粉组第3天与第7天的组间差异无统计学意义($P > 0.05$),提示珍珠粉组在应用时有时间差异,在应用第3天以后才有明显的转化生长因子(TGF-β)高表达。见表1,图2。

表1 各组大鼠转化生长因子(TGF-β)的灰度值比较

组别	n	TGF-β		
		造模后第3天	造模后第7天	造模后第14天
珍珠粉组	8	0.110±0.008ab	0.185±0.016abc	0.251±0.027abc
碳酸钙组	8	0.109±0.013a	0.147±0.014a	0.223±0.029a
对照组	8	0.094±0.013	0.123±0.017	0.147±0.015

注:a与对照组比较, $P < 0.05$;b与碳酸钙组比较, $P < 0.05$;c与造模后第3天比较, $P > 0.05$ 。

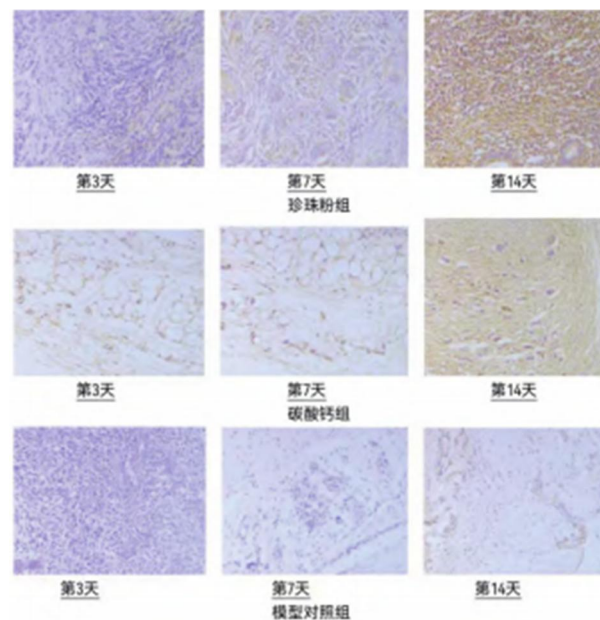


图2 各组大鼠创面TGF-β表达(免疫组化,×400)

2.2.2 血管表皮生长因子(VEGF)的灰度值表达

结果显示珍珠粉组血管表皮生长因子(VEGF)的表达结果高于碳酸钙及对照组,第14

天的数值在各组间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且珍珠粉组的血管表皮生长因子 (VEGF) 的表达随时间增加而增强, 第 3 天、第 7 天与第 14 天的组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示珍珠粉在应用第 3 天时, 即可促进血管表皮生长因子 (VEGF) 的高表达。见表 2, 图 3。

表 2 各组大鼠血管表皮生长因子 (VEGF) 的灰度值比较

组别	n	VEGF		
		造模后第 3 天	造模后第 7 天	造模后第 14 天
珍珠粉组	8	0.121±0.011ab	0.196±0.017abc	0.245±0.025abc
碳酸钙组	8	0.106±0.015a	0.154±0.008a	0.213±0.013a
对照组	8	0.091±0.012	0.136±0.018	0.160±0.013

注: a 与对照组比较, $P < 0.05$; b 与碳酸钙组比较, $P < 0.05$; c 与造模后第 3 天比较, $P < 0.05$ 。

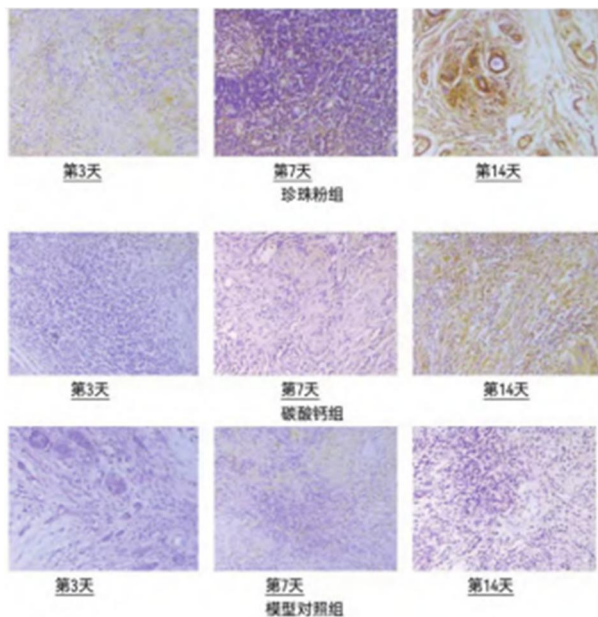


图 3 各组大鼠创面 VEGF 表达 (免疫组化, $\times 400$)

3 讨论

肛瘻是肛管直肠瘻的简称, 指肛管或直肠因病理原因形成的与肛门周围皮肤相通的一种异常管道, 是一种常见的肛门直肠疾病, 而且复发率较高^[5]临床治疗以手术为主, 但肛瘻手术切口一般不予缝合, 术后易受到肠内外细菌感染、创腔切口大小、排便、全身代谢性疾病^[6]血液循环不畅等各类

因素影响而愈合缓慢, 西医治疗主要针对上述因素对症处理, 愈合时间仍较长, 如何有效促进术后愈合是临床需要解决的难点, 中医对肛瘻的研究历史悠久, 在促进肛瘻术后切口愈合方面有其独特优势。早在春秋时期, 就可见中医对肛瘻的文字记载,《山海经·中山经》云:“仓文赤尾, 食者不痢, 可以为瘻”^[7]。自秦汉至今, 有大量流传于世的医学经典例如《五十二病方》《金匱要略》《神农本草经》《针灸甲乙经》《太平圣惠方》等书中, 对肛瘻的认知发展描述详细, 形成一套完整的理论体系。中医外科认为, 肛瘻术后形成的创面属于中医疮疡的范畴, 其病机为“脉络崩断, 金刃所伤”, 术后正气受损, 经脉不通, 气血瘀滞, 不达于腠理, 疮口不敛, 创面失养, 新肌难生。^[8]在肛瘻术后切口恢复的不同阶段治疗上, 以气血贯穿始终, 特别在恢复后期, 多以生肌收口为主治则。在治疗方法上, 中药外敷由于操作简单, 易于普及, 在临床中较常应用^[9]。其采用中药散剂涂抹在创面的方式, 有利于药物保留减少摩擦, 适用于肛瘻术后创面的换药。现代医学研究证明, 外敷法可使血浆内多种生长因子, 炎症因子向外渗出, 这些渗出物质即可稀释毒素^[10]又可以促进创面愈合。

珍珠在我国的采集和利用可追溯到两千年以前, 历代医药文献对其功用都有明确记载, 明《本草纲目》:“珍珠粉归心、肺经, 味甘、寒、咸, 具有安神定惊、解毒生肌、清肝除翳等功效”。现代药理学研究显示, 珍珠粉主要由 95% 以上的碳酸钙和 5% 以下的有机质组成, 有机质包括氨基酸、牛磺酸等多种微量元素^[11], 现代医学研究认为, 珍珠粉中的氨基酸通过参与细胞 DNA 代谢, 保护黏膜屏障, 提高创面血液循环状态, 增强免疫抗病能力^[12], 珍珠粉中碳酸钙为主的钙盐可以抑制炎性细胞再生, 减少创面感染概率^[13]其多种微量元素还可促进胶原细胞的生长发育, 增强肌肤再生能力。在肛瘻术后的临床应用上, 外用药物珍珠粉颗粒细小, 在切口发挥功效的基础上减少刺激, 在切口处形成一层保护层, 杜绝了肠道内外部细菌影响, 另一方面, 珍珠粉的清热解毒生肌功效, 可以预防切口感染。^[14]珍珠粉具有良好

的抗炎、抗菌作用,其解毒生肌功效在内科疾病的溃疡部分显示良好的疗效,在妇科、儿科等临床治疗也广泛应用^[15]。

研究表明,细胞生长因子在创面修复的炎症反应期、肉芽增殖期、上皮化生期都起核心的作用,主要包括血管内皮生长因子(VEGF)、转化生长因子(TGF- β)等^[16]。VEGF即人寡肽-11,是一种分子量为34~35kD的糖蛋白,属于胱氨酸结合生长因子中的血小板衍生生长因子家族。分布在血管内皮细胞表面,它们是重要的信号转导蛋白,促进内皮细胞增殖,促进血管发生和血管生成,当血液循环不足时,

可参与恢复组织供氧系统。^[17]TGF- β 是一种多效性细胞调节因子,属于转化生长因子超家族的多功能细胞因子,是免疫应答过程中释放的首批细胞因子之一,在调节炎症过程、免疫调节和协调随后的愈合反应中起关键作用^[18]。

本次实验研究结果显示,珍珠粉组术后第7天、第14天的VEGF和TGF- β 的指标表达明显高于碳酸钙组,两组灰度值比较差异有统计学意义,且观察组治疗后肉芽组织、毛细血管的生长情况显著优于对照组。由此可以推断,珍珠粉的作用极可能与提高VEGF和TGF- β 的含量和活性,促进新生肉芽组织的生成有关。通过本次研究,可为中医外治法治疗肛瘘术后促进愈合机制提供科学的依据。本研究也存在一定的局限,我们相信随着基础实验研究的广泛开展,将来在珍珠粉促进肛瘘术后创面愈合的方面还会有更深入的研究,促进珍珠粉有更加广阔的应用前景。

参考文献

- [1] AGGARWAL V, DHINGRA R, SINGH G, et al. Surgical management and therapeutic prospectus of anal fistula: a review[J]. *Int Surg J*, 2015, 2(2): 125-129.
- [2] 王彦芳, 于洪顺, 武永锋, 等. 肛瘘治疗术式的研究现状[J]. *医学综述*, 2018, 24(24): 4903-4907.
- [3] 毕聪文, 李师. 外用珍珠粉对肛瘘湿热下注证术后创面愈合的影响[J]. *山西中医*, 2019, 35(9): 50-51.
- [4] 韩珮, 张春椿, 熊耀康. 珍珠粉临床应用的最新研究进展[J]. *中医学报*, 2011, 26(7): 835-837.
- [5] 林家威, 黄顺荣, 冯泽荣. 肛瘘手术治疗的研究进展[J]. *中国临床新医学*, 2015, 8(4): 375-378.
- [6] 马志琼, 黄小瑜, 何娇. 肛周脓肿或肛瘘术后影响创面愈合质量的危险因素分析[J]. *临床误诊误治*, 2020, 33(2): 76-80.
- [7] 思履. 彩色图解山海经[M]. 北京: 中国华侨出版社, 2012: 199.
- [8] 郑春菊, 王业皇. 肛瘘术后创面愈合的中医学研究进展[J]. *世界中西医结合杂志*, 2014, 9(2): 207-209.
- [9] 陆德铭, 陆金根. 实用中医外科学[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2010: 320.
- [10] 冯鑫, 周永梅, 房德敏. 中药对伤口愈合干预作用的机制研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(8): 1498-1501.
- [11] 晏桂敏. 淡水珍珠的质量标准和 HPLC-指纹图谱研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [12] 张凯丽. 循证标准化护理在长时间侧卧位心脏手术患者术中压疮预防中的应用[J]. *中国临床护理*, 2019, 11(1): 8-10, 14.
- [13] 李俊霞, 王玉华, 王兰平, 等. 目标管理对手术患者术中及术后压疮感染的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(12): 1904-1907.
- [14] 黄秀芳. 珍珠粉预防性治疗产妇产会阴侧切缝合术后切口感染的临床效果[J]. *临床合理用药*, 2019, 12(10): 97-98.
- [15] 莫明月, 林江, 韦明婵. 珍珠粉解毒生肌作用与临床应用研究进展[J]. *广西中医药大学学报*, 2015, 18(3): 77-79.
- [16] 方笑丽, 王建民, 江宗兴. 中医药促进肛瘘术后创面愈合的研究进展[J]. *中医药临床杂志*, 2015, 27(2): 289-291.
- [17] PASQUALETTI G, DANESI R, DEL TACCAM, et al. Vascular endothelial growth factor pharmacogenetics: a new perspective for anti-angiogenic therapy[J]. *Pharmacogenomics*, 2007, 8(1): 49-66.
- [18] 谢昌营, 赵晓娟, 吴成成, 等. 肛门洗剂对肛瘘模型大鼠 TGF- β 1/p-Smad3/MMP-1 信号通路蛋白的影响[J]. *中成药*, 2016, 38(1): 167-169.

荔枝核总黄酮抑制 NLRP3 炎症小体减轻小鼠急性肝损伤的作用

李星炜

广西中医药大学附属医院, 广西南宁, 530200

摘要: **目的** 探讨荔枝核总黄酮对急性肝损伤的保护作用, 及抑制 NOD 样受体家族 3 (NOD-like receptor family 3, NLRP3) 炎症小体活化相关的机制。**方法** 将昆明小鼠随机分为空白组, 模型组, 联苯双酯组, MCC950 组, 荔枝核总黄酮高、低剂量组。除空白组外, 其余以腹腔注射 0.2% CCl₄-花生油溶液诱发小鼠急性肝损伤, 观察各组小鼠肝功能, 肝脏组织形态, 肝组织活性氧簇 (ROS) 水平, 并以 Western blot 法检测肝组织中 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达变化。**结果** 与空白组相比, 模型组小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆汁酸 (TBA) 含量, 肝组织中 ROS 水平均显著升高 ($P<0.05$), 肝组织中硫氧还蛋白结合蛋白 (TXNIP)、NLRP3、半胱氨酸蛋白酶 -1 前体 (pro-caspase-1)、白细胞介素 -1 β 前体 (pro-IL-1 β)、白细胞介素 -1 β (IL-1 β) 蛋白表达显著增加 ($P<0.05$), 肝脏组织损伤程度严重; 与模型组相比, 荔枝核总黄酮剂量组显著降低 CCl₄ 所致急性肝损伤的小鼠血清中 ALT、AST、TBA 水平 ($P<0.05$), 降低肝组织中 ROS 水平 ($P<0.05$), 并减轻肝组织结构损伤, 降低 HE 染色的形态学评分 ($P<0.05$)。荔枝核总黄酮高剂量与 MCC950 组均显著下调了 NLRP3 炎症小体相关蛋白 TXNIP、NLRP3、pro-caspase-1、pro-IL-1 β 、IL-1 β 表达 ($P<0.05$)。**结论** 荔枝核总黄酮减轻了 CCl₄ 引发的小鼠急性肝损伤, 其机制可能与抑制 NLRP3 炎症小体活化参与的炎症反应有关。

关键词: 荔枝核总黄酮; 急性肝损伤; 四氯化碳; NLRP3

急性肝损伤 (acute liver injury, ALI) 是由有毒物质、高热、病毒性肝炎等多种原因导致肝脏细胞急性损伤的临床综合征^[1]。中医临床治疗急性肝损伤有悠久的历史, 对该类型疾病积累了丰富的治疗经验。中医对该疾病有“药毒”“黄疸”“胁痛”“积聚”等描述, 认为急性肝损伤的发生, 多与饮食不节、体虚劳倦、情志失调、外感邪毒等有关, 病机主要为湿邪蕴结肝脾, 肝胆失疏, 脾胃不健, 气滞血瘀^[2]。《黄帝内经》从该病的病机角度提出“甘缓以补肝体”的治疗原则, 近代医家多以疏肝健脾、活血化瘀的法则对急性肝损伤进行药物治疗^[3-4]。

荔枝核为无患子科植物荔枝 *Litchichinensis* Sonn. 的干燥成熟种子, 其性温, 味甘, 无毒, 归肝、胃经, 可疏肝理气, 散滞祛寒, 治肝经之疝疾^[5]。荔枝核被发现有缓解肝纤维化、减轻肝细胞损伤^[6]、抑制鸭乙型肝炎病毒复制的作用^[7]。荔枝核中主要含有黄酮、皂苷、多糖、酚酸、萜烯和多酚等活性成分, 荔枝核总黄酮 (lychee Seed flavonoids, TFL) 是荔枝核主要活性成分之一, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理活性^[8]。荔枝核总黄酮是发挥肝

保护作用的主要活性成分, 能减轻二甲基亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化及四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化^[9], 其作用机制与影响 TLR-IL-1R 通路及 NF- κ Bp65 通路相关^[10-11]。NF- κ B 是重要的炎症信号通路, 调节着下游的 IL-1 β 等多种炎症因子的分泌, 更重要的是, 肝脏 NOD 样受体家族蛋白 3 (NOD-like receptor family 3, NLRP3) 炎症小体是 NF- κ B 的重要下游炎症调节位点, 其活化能增加 IL-1 β 的分泌^[12], 在急性肝损伤中, NLRP3 炎症小体的活化是导致肝组织损伤和炎症反应的关键因素之一^[13]。荔枝核总黄酮能减轻肝脏的长期慢性损伤导致的肝纤维化, 但其对急性肝损伤的保护作用尚未明确; 此外, 其他研究人员报道了荔枝核总黄酮的肝保护作用机制与控制炎症的 NF- κ B 相关, 但对该通路下游参与急性肝损伤的 NLRP3 炎症小体的影响尚未明确。因此, 有必要从抑制 NLRP3 炎症小体的角度, 研究荔枝核总黄酮的肝保护作用及其机制, 为进一步阐释荔枝核总黄酮对急性肝损伤的响及其作用机制提供依据。

1 实验材料

1.1 动物

SPF级昆明种小鼠，体质量18~22g，雌雄各半，由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供，生产许可证号SCXK湘2019-0004，批号NO.430727211101252667。实验动物通过广西中医药大学实验动物委员会批准。

1.2 药品

荔枝核总黄酮的提取与YAN等^[14]一致，所得提取物中总黄酮含量为65%；联苯双酯滴丸（北京协和药厂，批号：20201212）；四氯化碳（tetrachloromethane, CCl₄）（天津市恒兴化学试剂制造有限公司，批号：20190901）；NLRP3抑制剂MCC950（上海皓元生物医药科技有限公司，批号：100320）；花生油（山东鲁花集团有限公司，批号：AC2020/05/25）。

1.3 试剂

丙氨酸氨基转氨酶（Alanine aminotransferase, ALT）测试盒（批号：20210723）、天门冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase, AST）测试盒（批号：20210706）、总胆汁酸（total bile acid, TBA）测试盒（批号：20210724），均购买于南京建成生物工程研究所；活性氧（reactive oxygen species, ROS）荧光法测试盒（批号：3LT4SKS6KY）购买于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；NLRP3抗体（批号：33663A15）购买于美国Thermo公司，硫氧还蛋白结合蛋白抗体（thioredoxin interacting protein, TXNIP，批号：GR3285543-7）和半胱氨酸蛋白酶-1前体抗体（procysteinyI aspartate specific proteinase-1, pro-caspase-1，批号：GR3285543-10）购买于美国abcam公司，白细胞介素1 β 前体/白细胞介素-1 β 抗体（pro interleukin 1 beta/Interleukin-1 β , pro-IL-1 β /IL-1 β ，批号：00091835）购买于武汉三鹰生物技术有限公司；二抗HRP标记的羊抗兔IgG（批号：BST16A25C16A54）购买于博士德生物技术有限公司；SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒（批号：12042121208）、BeyoECL Star极超敏ECL化学发光试剂盒（批号：052021211018）均购买于碧云天生物有限公司。

1.4 仪器与设备

Thermostat C恒温孵育器，德国Eppendorf公司产品；Multiskan SkyHigh全波长酶标仪，美国赛默飞世尔科技公司产品；EclipseCi-L显微镜，

日本尼康株式会社产品；Criterion蛋白印迹系统及ChemiDoc MP全能型成像分析仪，均为美国Bio-Rad公司产品。

2 实验方法

2.1 分组和给药

将小鼠随机分为空白组、模型组、联苯双酯组（150mg/kg）、荔枝核总黄酮低剂量组（180mg/kg）、高剂量组（360mg/kg）、MCC950组（NLRP3抑制剂，10mg/kg），每组10只。除MCC950组外，各组动物每天1次灌胃给药，连续10d；MCC950组于注射CCl₄前1h腹腔注射完成给药。各组小鼠在末次给药后1h以10mL/kg腹腔注射0.2%CCl₄-花生油溶液，诱发小鼠急性肝损伤，同时正常组腹腔注射花生油溶剂。诱发肝损伤后18h，以水合氯醛麻醉小鼠，眼眶后静脉丛取血用于血清生化检测。之后脱颈椎处死小鼠，迅速剥离小鼠肝脏。

2.2 肝功能指标检测

将小鼠血液静置30min后，25℃,3000 r/min离心15min，分离血清。检测小鼠血清中ALT、AST、TBA，严格按照试剂盒说明书操作。

2.3 肝组织中ROS水平检测

取约0.5g的新鲜肝组织，根据活性氧荧光法测试盒的说明，采用酶消化法制备单细胞悬液，加入DCFH-DA探针后37℃避光孵育1h，离心去除未进入细胞内的DCFH-DA后，将收集好的细胞沉淀物重悬，在500nm激发波长，525nm发射波长下检测荧光值。以空白组平均值为基准将结果标准化，计算各组动物肝脏相对ROS水平。

2.4 肝组织病理学观察

取肝脏组织约1cm×1cm×1cm固定于10%中性甲醛中，石蜡包埋，切片，经苏木精-伊红（hematoxylin-eosin staining, HE）法染色后，通过显微镜观察小鼠肝组织病理学变化，按照以下标准对肝损伤程度进行分级评分^[15]：0级：肝小叶结构正常，肝索结构清晰可辨，肝细胞形态正常，边界清晰；1级：肝细胞排列疏松，可见区域性或弥漫性的轻度肝细胞水肿变性，少量炎症细胞浸润；2级：中重度水肿变性、胞质疏松，范围较广，细胞空泡变性或者脂变，少量炎症细胞浸润；3级：肝结构紊乱，呈现弥漫性的中重度肝细

胞变性，伴有肝小叶内散在的、仅累及单个至几个肝细胞的局灶状坏死，聚集性炎性细胞浸润；4级：肝细胞变性，坏死病灶较重累及全小叶未超1/3，炎细胞浸润；5级：累及肝小叶大部分或多个肝小叶的大范围坏死，肝正常结构全部或大部被破坏，并伴有炎细胞浸润。

2.5 Western Blot 检测肝组织中 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达

从-80℃冻存的肝组织中随机抽取每组8个样本，根据全蛋白提取试剂盒提取小鼠肝组织总蛋白，用BCA法测定蛋白含量。将蛋白样本变性、电泳、转膜后，分别使用NLRP3(1:500)、TXNIP(1:2000)、pro-caspase-1(1:2000)、pro-IL-1β/IL-1β(1:1000)、GAPDH(1:2000)一抗，4℃孵育过夜。后用HRP-羊抗兔IgG(1:10000)置于摇床中室温孵育2h，加入ECL试剂后进行显影。利用Image J软件分析条带灰度，以目的蛋

白条带与内参GAPDH蛋白条带灰度值的比值，对目的蛋白进行定量。

2.6 数据统计

运用SPSS22.0进行数据统计分析，定量数值以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，用t检验对两组数据进行比较；病理切片评级结果采用秩和检验方法比较组间差异。以P<0.05认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 荔枝核总黄酮减轻 CCl₄ 导致的小鼠急性肝损伤

与空白组比较，模型组小鼠血清ALT、AST、TBA水平均显著升高(P<0.05)；与模型组相比，TFL各个剂量组，以及NLRP3抑制剂MCC950组小鼠血清中ALT、AST、TBA水平均显著降低(P<0.05)，表明小鼠肝功能得到改善。见表1。

表1 各组小鼠血清ALT、AST、TBA比较(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	TBA(μmol/L)
空白组	6.60±1.56	14.51±1.66	1.86±0.68
模型组	2868.20±2851.12 ^Δ	504.14±370.53 ^Δ	10.98±8.10 ^Δ
联苯双酯组	209.25±227.85 [☆]	133.77±125.85 [☆]	4.66±3.70 [☆]
TFL 低剂量组	282.89±284.06 [☆]	62.74±40.08 [☆]	4.10±3.28 [☆]
TFL 高剂量组	142.75±136.36 [☆]	77.83±49.55 [☆]	2.90±1.58 [☆]
MCC950组	24.46±13.16 [☆]	26.13±5.81 [☆]	3.03±1.41 [☆]

注：Δ与空白组比较，P<0.05；☆与模型组比较，P<0.05。

3.2 荔枝核总黄酮降低急性肝损伤小鼠的肝组织 ROS 水平

与空白组比较，模型组小鼠肝组织ROS水平显著升高(P<0.05)；与模型组相比，TFL低高剂量组小鼠肝组织ROS水平显著减少(P<0.05)，表明TFL可以减轻急性肝损伤小鼠氧化应激水平。见表2。

表2 各组小鼠肝组织ROS水平比较(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	ROS
空白组	1.00±0.17
模型组	1.82±0.55 ^Δ
联苯双酯组	1.37±0.40 [☆]
TFL 低剂量组	0.77±0.21 [☆]
TFL 高剂量组	1.11±0.23 [☆]
MCC950组	1.50±0.30

注：Δ与空白组比较，P<0.05；☆与模型组比

较，P<0.05。

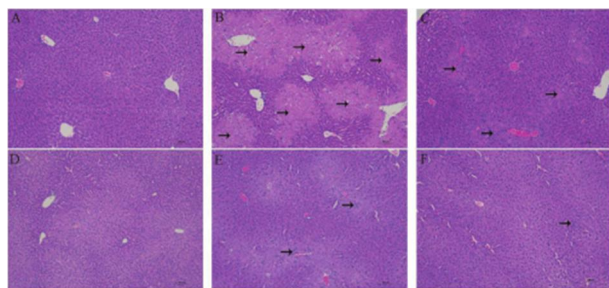
3.3 TFL 减轻 CCl₄ 引发的小鼠肝脏组织结构损伤

模型组小鼠可见肝细胞空泡变性，大片肝细胞坏死，伴有炎性细胞浸润，肝小叶结构紊乱，肝索结构丧失；TFL各个剂量组小鼠肝组织肝细胞坏死明显减轻，此外，HE染色病理分级结果如表3所示，与空白组比较，模型组小鼠肝组织病理学评分显著升高(P<0.05)，与模型组比较，TFL各个剂量组小鼠肝组织病理学评分显著降低(P<0.05)。见图1。

表3 各组小鼠肝脏组织HE染色的形态学评分比较(n=10, $\bar{x} \pm s$) 单位：分

组别	肝损伤评分
空白组	0
模型组	4.50±0.71 ^Δ
联苯双酯组	2.70±0.95 [☆]
TFL 低剂量组	1.78±0.97 [☆]
TFL 高剂量组	2.70±0.67 [☆]
MCC950组	1.50±0.84 [☆]

注：△与空白组比较， $P<0.05$ ；☆与模型组比较， $P<0.05$ 。

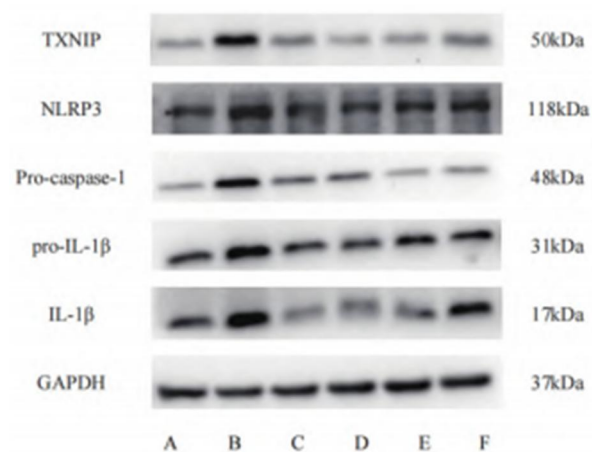


注：A.空白组；B.模型组；C.联苯双酯组；D.TFL低剂量组；E.TFL高剂量组；F.MCC950组。黑色箭头指示出现细胞坏死区域。

表4 小鼠肝组织中 TXNIP、NLRP3、pro-caspase-1、pro-IL-1 β 、IL-1 β 蛋白表达水平比较 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	TXNIP	NLRP3	pro-caspase-1	pro-IL-1 β	IL-1 β
空白组	0.49 \pm 0.16	1.09 \pm 0.16	0.85 \pm 0.23	0.99 \pm 0.28	1.02 \pm 0.34
模型组	0.97 \pm 0.51 Δ	1.76 \pm 0.30 Δ	1.37 \pm 0.59 Δ	1.28 \pm 0.24 Δ	1.69 \pm 0.75 Δ
联苯双酯组	0.54 \pm 0.18 \star	1.12 \pm 0.27 \star	0.78 \pm 0.31 \star	1.09 \pm 0.26	1.01 \pm 0.48 \star
TFL 低剂量组	0.66 \pm 0.26	1.10 \pm 0.16 \star	1.30 \pm 1.38	0.84 \pm 0.26 \star	0.90 \pm 0.32 \star
TFL 高剂量组	0.51 \pm 0.20 \star	1.16 \pm 0.30 \star	0.84 \pm 0.33 \star	0.89 \pm 0.26 \star	0.99 \pm 0.46 \star
MCC950 组	0.57 \pm 0.12 \star	1.10 \pm 0.34 \star	0.80 \pm 0.21 \star	0.91 \pm 0.33 \star	1.03 \pm 0.31 \star

注：△与空白组比较， $P<0.05$ ；☆与模型组比较， $P<0.05$ 。



注：A. 空白组；B. 模型组；C. 联苯双酯组；D.TFL低剂量组；E.TFL高剂量组；F.MCC950组。

图2 各组小鼠肝组织中 TXNIP、NLRP3、pro-caspase-1、pro-IL-1 β 、IL-1 β 蛋白表达水平比较

4 讨论

在临床中，几乎所有的急慢性肝病均有肝气郁结的症状。疏肝解郁、行气导滞是肝病最常用

的治疗方法，即古人所谓“木郁达之”^[16]。将理气药荔枝核应用于肝病的治疗，是全国名老中医罗伟生教授在多年的临床实践中总结出的宝贵经验。研究表明，荔枝核具抗急性肝损伤的作用，其提取液预处理可缓解小鼠急性酒精性肝损伤^[17]。且经大量实验研究发现，其活性成分荔枝核总黄酮治疗肝脏疾病的功效明显强于皂苷等其他活性成分，尤其是在对肝纤维化的治疗作用方面，大量研究均报道了 TFL 良好的抗肝纤维化效果。在 CCl₄ 诱发的肝纤维化大鼠模型^[18]，及胆总管结扎致继发性胆汁淤积性肝纤维化大鼠模型中^[19]，TFL 均表现出良好地减轻肝脏纤维化病变，减轻肝组织损伤的作用。此外，体外运用 TFL 干预大鼠肝星状细胞 HSC-T6 培养物，能显著抑制肝星状细胞的活化，减少细胞外胶原相关蛋白的表达^[20]。上述研究都很好地说明了 TFL 对肝脏长期慢性损伤的缓解效果，本研究则在 CCl₄ 诱发的急性肝损伤动物模型中，观察到 TFL 能降低血清 AST、ALT、TBA 水平，改善肝脏组织结构，这为 TFL 的保肝作用提供了直接的实验证据。CCl₄ 诱发的肝损伤是筛选不同药物保肝活性的

经典实验性肝损伤模型，通过直接或间接刺激肝细胞引起肝细胞损伤，这与临床上的人类 ALI 非常相似^[21]。其毒性作用源于被肝脏同工酶细胞色素 P450 代谢为高反应性三氯甲基自由基和三氯甲氧基过氧基自由基，导致较高水平的 ROS 的发生^[22]。CCl₄ 引发的氧化应激直接导致肝细胞坏死和凋亡，释放损伤相关分子模式 (DAMP)，这些 DAMPs 通过模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 激活肝脏中的先天免疫细胞，产生促炎介质并放大炎症反应，从而导致加重 ALI^[23-24]。作为重要的 PRRs, NLRP3 炎症小体是介导免疫炎症和细胞死亡的关键影响因子，在肝脏炎症过程中起重要作用。ROS 作为 NLRP3 炎症小体活化的重要触发因子，引起氧化应激调节蛋白硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX) 与 TXNIP 解离，TXNIP 随之与 NLRP3 结合，激活 NLRP3 炎症小体^[25]。研究表明，肝损伤主要是炎症细胞攻击肝细胞的结果^[26]，NLRP3 的活化募集 pro-caspase-1 并使之活化，触发 pro-IL-1 β 转化为成熟的 IL-1 β 并大量分泌，增强肝脏炎症反应，加重肝细胞的破坏和肝损伤^[27]。既往研究也发现活化的 NLRP3 炎症小体出现在多种肝脏疾病中，如酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、肝癌和药物性肝损伤^[28-30]。因此对抗炎症小体的激活是肝损伤治疗的潜在手段，如 JIMENEZ^[31]通过沉默 NLRP3 炎症小体的激活来治疗急性和慢性肝炎；刘晓东等^[32]发现多穗柯总黄酮抑制炎症小体介导的炎症反应是其发挥对急性肝损伤保护作用的重要机制。本研究发现使用 TFL 的小鼠肝组织的 TXNIP 蛋白表达量降低，这可能与 TFL 组小鼠肝脏 ROS 水下降有密切关系。更重要的是，TFL 组小鼠肝组织的 pro-caspase-1、pro-IL-1 β 、IL-1 β 蛋白表达水平均显著降低，尤其是 IL-1 β 蛋白表达水平略低于 NLRP3 抑制剂 MCC950 组，提示 TFL 的保肝作用与抑制 NLRP3 炎症小体的活化，从而抑制炎症因子参与肝损伤级联反应有密切关系。值得注意的是，一方面，消除 ROS 可以通过减少解离的 TXNIP，降低 NLRP3 炎症小体的活化程度；另一方面，TFL 略强于 NLRP3 抑制剂 MCC950 的抑制炎症因子成熟的作用，也提示其可能对 NLRP3 有直接的抑制作用。因此，TFL 在急性肝损伤中抑制 NLRP3 炎症小体的具

体方式还有待深入探索。

本研究表明 TFL 对化学物质导致的急性肝损伤具有保肝新效果，并减少肝脏活性氧的生成及抑制 NLRP3 炎症小体的活化。但 TFL 是否直接抑制 NLRP3 炎症小体，还是通过消除 ROS，间接减少 NLRP3 炎症小体的活化，还有待进一步研究。本研究提供了 TFL 抗急性肝损伤的实验证据，为 TFL 的开发利用及中药防治肝损伤提供了科学支持。

参考文献

- [1] 杨毅, 陈德昌.重症医学病理生理紊乱诊断与治疗临床思路[M].上海: 上海科学技术出版社, 2019: 179.
- [2] 于泽鹤, 胡巍巍, 巨晓宁, 等.解毒护肝方抑制 NLRP3 炎症小体活化缓解对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤[J].河北中医药学报, 2022, 37(1): 1-5.
- [3] 匡子禹.中医药治疗药物性肝损伤的系统评价及用药规律分析[D].北京: 北京中医药大学, 2021.
- [4] 王晓慧, 杨波, 周忠光, 等.药食两用中药及活性成分抗肝损伤研究进展[J].辽宁中医药大学学报, 2021, 23(5): 138-141.
- [5] 曾昭龙.实用临床中药学[M].2版.郑州: 河南科学技术出版社, 2020: 220.
- [6] 黄景珠, 莫庸, 黄继杰, 等.荔枝核提取液预处理对小鼠急性酒精性肝损伤的缓解作用[J].广西医学, 2019, 41(11): 1406-1409.
- [7] 谢志春.荔枝核、莨菪花和罗浮粗叶木抗鸭乙肝病毒及护肝作用的实验性研究[D].南宁: 广西医科大学, 2012.
- [8] 陈建清, 林穗金, 郑妮.荔枝核总黄酮对急性肺损伤大鼠胆碱能抗炎通路的影响[J].中国医院药学杂志, 2016, 36(23): 2051-2054.
- [9] 欧士钰, 杜凌, 韦捷, 等.荔枝核总黄酮通过 JAK2/STAT3 信号通路抗大鼠肝纤维化的实验研究[J].检验医学与临床, 2022, 19(23): 3216-3219.
- [10] 成秋宸, 覃雯, 卓朗, 等.荔枝核总黄酮对两种肝纤维化大鼠模型的作用比较[J].医药导报, 2020, 39(9): 1179-1184.
- [11] 曹杰.荔枝核总黄酮对肝纤维化病理相关因子表达的影响[D].桂林: 桂林医学院, 2018.
- [12] ZHAO J, HE B, ZHANG S, et al. Ginsenoside Rg1 alleviates acute liver injury through the induction of autophagy and suppressing NF- κ B/NLRP3

- inflammasome signaling pathway [J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2021, 18 (6): 1382-1389.
- [13] LI Q, TAN Y, CHEN S, et al. Irisin alleviates LPS-induced liver injury and inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome and NF- κ B signaling [J]. *Journal of Receptor And Signal Transduction Research*, 2021, 41 (3): 294-303.
- [14] YAN J, FENG Y, FANG X, et al. Anti-liver fibrosis effects of the total flavonoids of litchi semen on CCl₄-induced liver fibrosis in rats associated with the upregulation of retinol metabolism[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2022, 60 (1): 1264-1277.
- [15] 杨帆, 魏小果, 赵鑫, 等.白头翁皂苷 B4 对四氯化碳致急性肝损伤模型小鼠的保护作用及机制研究[J]. *中药材*, 2021, 44(12): 2938-2942.
- [16] 季光, 高月求, 邢练军.海派中医肝病名家医案集[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2018: 13.
- [17] 黄景珠, 莫庸, 黄继杰, 等.荔枝核提取液预处理对小鼠急性酒精性肝损伤的缓解作用[J]. *广西医学*, 2019, 41(11): 1406-1409.
- [18] 冯茵怡, 严炯艺, 夏星, 等.荔枝核总黄酮对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化的影响及作用机制和潜在 Q-marker 的预测[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(23): 5722-5731.
- [19] 赵永忠, 成秋宸, 卢青, 等.荔枝核总黄酮治疗胆汁淤积性肝纤维化大鼠的实验研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2015, 23(2): 137-139.
- [20] 覃桂金, 赵永忠, 刘燕秀, 等.荔枝核总黄酮干预大鼠肝星状细胞核因子 κ B 核转位及相关蛋白表达的研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2018, 26(7): 535-539.
- [21] GAO Z, YUAN F, LI H, et al. The ameliorations of *Ganoderma applanatum* residue polysaccharides against CCl₄ induced liver injury[J]. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 2019, 137: 1130-1140.
- [22] ISLAM M A, AI MAMUN M A, FARUK M, et al. Astaxanthin ameliorates hepatic damage and oxidative stress in carbon tetrachloride-administered rats [J]. *Pharmacognosy Research*, 2017, 9 (Suppl 1): S84-S91.
- [23] LIN L, QUE R, SHEN Y, et al. Saikosaponin d alleviates carbon tetrachloride induced acute hepatocellular injury by inhibiting oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation in the HL-7702 cell line [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17 (6): 7939-7946.
- [24] MARTIN S J. Cell death and inflammation: the case for IL-1 family cytokines as the canonical DAMPs of the immune system [J]. *The FEBS Journal*, 2016, 283 (14): 2599-2615.
- [25] ZHANG X, ZHANG J H, CHEN X Y, et al. Reactive oxygen species-induced TXNIP drives fructose-mediated hepatic inflammation and lipid accumulation through NLRP3 inflammasome activation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22 (10): 848-870.
- [26] ZHAO J, HU H, WAN Y, et al. Pien Tze Huang Gan Bao ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic injury, oxidative stress and inflammation in rats [J]. *Experimental And Therapeutic Medicine*, 2017, 13 (5): 1820-1826.
- [27] ZHAO J, HE B, ZHANG S, et al. Ginsenoside Rg1 alleviates acute liver injury through the induction of autophagy and suppressing NF- κ B/NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2021, 18 (6): 1382-1389.
- [28] DU, Y C, LAI, L, ZHANG, H, et al. Kaempferol from *Penthorum chinense* Pursh suppresses HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling and NLRP3 inflammasome activation in acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. *Food Funct*, 2020, 11 (9): 7925-7934.
- [29] 陈玮钰, 张荣臻, 舒发明, 等.肝细胞癌中调节性细胞死亡方式研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(7): 89-93.
- [30] 马婷婷, 马骁. NLRP3 炎症体在肝脏疾病中的作用及研究进展[J]. *临床消化病杂志*, 2022, 34(5): 395-399.
- [31] JIMENEZ CALVENTE C, DEL PILAR H, TAMEDA M, et al. MicroRNA 223 3p Negatively Regulates the NLRP3 Inflammasome in Acute and Chronic Liver Injury [J]. *Molecular Therapy: The Journal of The American Society of Gene Therapy*, 2020, 28 (2): 653-663.
- [32] 刘晓东, 温雯静, 赵志军.多穗柯总黄酮对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *医药导报*, 2020, 39(12): 1626-1630.

宣白承气汤对痰热腑实型哮喘大鼠肺组织病理损伤及 Th1/Th2 失衡影响

张清清, 郭柯伟

山东中医药学院, 山东济南, 250355

摘要: **目的** 观察宣白承气汤对痰热腑实型哮喘大鼠肺组织病理损伤情况及血清中 Th1/Th2 失衡的影响。**方法** 将 50 只 Wistar 雄性大鼠随机分为空白组、模型组、定喘汤组、宣白承气汤组、地塞米松组, 每组 10 只。利用卵清蛋白(OVA)诱导哮喘模型, 并施加痰热腑实因素, 造模成功后, 实验组按体质量 1.5mL/100g 分别给予定喘汤、宣白承气汤和地塞米松溶液, 空白对照组与模型组按等比例给予 0.9%氯化钠溶液, 1 次/d, 连续用药 14d 后, 观察各组大鼠一般情况; 记录各组大鼠体质量、肛温及代谢情况; HE 染色观察大鼠肺组织病理改变情况, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)比较大鼠血清中 Th1 细胞因子白细胞介素(IL)-4 和 Th2 细胞因子干扰素- γ (IFN- γ)的含量。**结果** 空白组大鼠一般状态良好, 毛发柔顺光泽, 呼吸节律均匀平稳, 四肢温和, 体质量呈稳定增长趋势, 肛温无异常增高, 日均进食进水量平稳, 大便量多质润; 模型组大鼠精神状态差, 毛发粗糙凌乱, 呼吸节奏加快, 可闻及哮鸣音, 且抓挠口鼻频率增高, 周围可见淡黄色黏性分泌物, 体质量增长趋势较空白组减缓, 且整体体质量偏低, 肛温较空白组显著升高($P<0.01$), 日均进食进水量显著下降($P<0.01$), 24h 排便量明显减少($P<0.01$)且质地坚硬; 定喘汤组大鼠精神状态良好, 毛发较模型组平整, 口鼻处少见黏性分泌物, 偶见喘息气急、搔鼻、打喷嚏, 呼吸节律随给药时间延长趋于平稳, 体质量增长与模型组相近, 给药后肛温明显降低($P<0.05$), 日均进水量较模型组稍有升高($P>0.05$), 进食量稍有增多($P<0.05$), 24h 排便量增多($P>0.05$)且质地变软; 宣白承气汤组大鼠服药后整体状态良好, 毛发光泽平整, 口鼻黏性分泌物减少, 呼吸喘息急促等症状相应改善, 大鼠哮鸣音减少, 抓挠口鼻频率低, 体质量增长趋势较模型组更缓, 且整体体质量小于模型组($P<0.01$), 给药后大鼠肛温显著降低($P<0.01$), 日均进食量进水量均增多($P<0.01$), 大便质软量多($P<0.01$); 地塞米松组大鼠用药 1 周期间各项状态较为稳定, 继续用药后虽喘息气促明显改善, 口鼻分泌物减少, 但大鼠性情逐渐暴躁, 肌肉僵直, 皮肤松垮, 毛发杂乱枯燥, 体质量较模型组显著减少($P<0.01$), 肛温明显降低($P<0.01$), 日均进水量稍有增多($P>0.05$), 给药 1 周后日均进食量显著减少($P<0.01$), 继续给药后日均进食量稍有减少($P>0.05$), 24h 排便量增多($P>0.05$), 且质稀软。组织病理切片显示空白组大鼠未见炎性病理改变, 模型组可见明显炎性浸润, 治疗后定喘汤组、宣白承气汤组、地塞米松组大鼠肺组织病理情况均有所缓解; ELISA 结果显示模型组大鼠血清 Th1 细胞因子 IFN- γ 水平较空白组显著下降($P<0.01$), Th2 细胞因子 IL-4 水平较空白组显著升高($P<0.01$), 经宣白承气汤给药后大鼠 IFN- γ 水平显著升高($P<0.01$), IL-4 水平显著降低($P<0.01$)。**结论** 宣白承气汤可以通过泄热通腑的方法治疗痰热腑实型哮喘, 改善哮喘症状, 缓解大鼠肺组织病理损伤, 改变血清中 IL-4 和 IFN- γ 的含量, 从而调节 Th1/Th2 失衡。

关键词: 宣白承气汤; 痰热腑实; 哮喘; 病理改变; Th1/Th2

支气管哮喘(bronchial asthma, BA)简称哮喘, 是由多种免疫细胞及其因子介导的伴有反复发作的喘息、气急、胸闷或咳嗽等临床特征的具有复杂免疫机制的慢性气道炎症, 受遗传因素、环境因素和免疫因素的多重影响^[1-2]。根据 2019 年最新流行病学调查显示, 我国 20 岁以上成人哮

喘患病率已高达 4.2%, 全国患病总人数已达 4570 万^[3], 目前由于人口老龄化和社会环境问题, 我国哮喘的患病人数仍在逐年增长。既往研究已经表明, 哮喘的发生伴随着 T 淋巴细胞向辅助性 T 淋巴细胞(T helper cell, Th) 2 分化, 并释放一系列相关细胞因子, 从而扰乱 Th1/Th2 平衡, 启动

过敏性哮喘的免疫反应^[4-5]。因此,纠正 Th1/Th2 失衡状态成为治疗哮喘的一大靶点。本实验通过分析痰热腑实型哮喘大鼠应用宣白承气汤治疗前后 Th1/Th2 类细胞因子表达的变化,探讨宣白承气汤对痰热腑实型哮喘的治疗效果,以及其对纠正 Th1/Th2 相关细胞因子水平并改善免疫平衡的作用。

1 材料

1.1 实验动物

本实验选用 5~6 周 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 50 只,体质量为 140~160g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[实验动物使用许可证号:北京 SCXK(京)2021-0011],并于山东中医药大学动物实验中心饲养,动物房温度(23±2)℃,相对湿度 20%~40%,昼夜 12h 明暗交替,食水自由摄取。实验动物的使用与操作均符合山东中医药大学动物保护委员会关于实验动物操作与动物福利的要求(伦理审查号:SDUTCM20201204001)。

1.2 实验试剂、药品与仪器

4%多聚甲醛溶液(上海国药集团化学试剂有限公司,30525-89-4);1%戊巴比妥钠溶液(Sigma, 201912);无水乙醇(上海国药集团化学试剂有限公司,100092683);卵清白蛋白(美国 Sigma 公司, A8040);氢氧化铝(上海国药集团化学试剂有限公司, 20200226);复方地芬诺酯片(常州康普药业有限公司, 1701023);地塞米松(Solarbio, D8040);定喘汤水煎剂(炙麻黄、白果、款冬花、清半夏、桑白皮、苏子、杏仁、黄芩、甘草),宣白承气汤水煎剂(生石膏、杏仁、瓜蒌皮、生大黄)均购自山东新中鲁中医院中药房;电子体温计(OMRON, MC-347);压缩空气雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司, 403K);大鼠白细胞介素 4(IL-4)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(CUSABIO, CSB-E04635r);大鼠 γ 干扰素(IFN- γ)ELISA 试剂盒(CUSABIO, CSB-E04579r);恒温鼓风箱(华德利科学器材有限公司, PWT-P42);离心机(techcomp, CT15RT)。

2 方法

2.1 动物分组

将 50 只大鼠考虑体质量因素随机平均分成 5 组,分别为空白组、模型组、定喘汤组、宣白承气汤组、地塞米松组,每组 10 只。

2.2 动物造模

2.2.1 建立哮喘模型

各组大鼠适应性饲养 1 周后开始正式实验,适应性饲养期间各组大鼠给予普通饲料、普通饮水。正式实验第 1 天至第 35 天为造模期,第 22 天至第 35 天为给药期。

实验开始第 1 天、第 8 天和第 15 天模型组、定喘汤组、宣白承气汤组、地塞米松组大鼠分别给予腹腔注射抗原液(含卵清白蛋白 100mg 及氢氧化铝 100mg)1mL 致敏,第 22 天用浓度为 1% 的卵清白蛋白雾化激发,30min/次,1 次/d,连续 14d。空白组大鼠腹腔注射及雾化激发均以等量 0.9%氯化钠溶液代替。

2.2.2 建立痰热腑实证模型

参考文献[6-9],模型组、定喘汤组、宣白承气汤组、地塞米松组大鼠自实验第 1 天开始予高脂高糖低纤维饲料[脂肪 15%,蔗糖 15%,纤维 3%,购于北京科澳协力饲料有限公司,SCXK(京)

2019-0003]喂养,并将特制脂肪乳(每 500mL 含猪油 20g、胆固醇 10g、猪胆盐 2g、吐温 8020mL、1, 2 丙二醛 20mL)按 5mL/kg 加至大鼠日常饮水中,至第 35 天实验结束;并于实验第 8 天开始用浓度 15mg/kg 的复方地芬诺酯混悬液干预灌胃,1 次/d,每次 1.5mL/100g,至第 35 天实验结束;第 22 天开始将造模组大鼠放入恒温鼓风箱,温度设置为(38±2)℃,湿度 35%~45%,30min/次,2 次/d,至实验结束。

2.3 药物干预

实验第 22 天开始,定喘汤组、宣白承气汤组大鼠分别用定喘汤、宣白承气汤 1.6mL/(100g·d)煎剂灌胃,地塞米松组用地塞米松溶液 0.05mg/(100g·d)灌胃,持续用药至第 35 天实验结束。空白组、模型组大鼠用 0.9%氯化钠溶液 1.6mL/(100g·d)代替灌胃。

2.4 大鼠的一般情况观察

观察实验各组大鼠一般情况(包括精神状态、

皮毛色泽),呼吸状况(包括口、鼻等部位的分泌物、咳喘情况),排泄状况(包括大便量、色、质改变),并测量记录其体质量、肛温、饮水量、饮水量。

2.5 大鼠血清的收集

各组大鼠末次给药 24h 后,将大鼠麻醉,暴露腹腔,在腹主动脉分叉处向心端 1~3mm 处作为穿刺点,负压采血。室温静置 2h 后,以 3000r/min×15min 离心,取上清液分离至干净 EP 管中,-80℃保存备用。

2.6 大鼠肺组织的收集

将取血完成后的大鼠沿腹部正中中线剪开至胸部,暴露肺组织后迅速剪下右肺,置于 4%多聚甲醛固定液中备用。

2.7 大鼠肺组织 HE 染色

将置于 4%多聚甲醛固定液中 24h 以上的肺组织进行梯度脱水、石蜡包埋、常规切片、HE 染色及封片,在光学显微镜(NIKON, H550S)下观察各组大鼠肺组织病理变化情况,并采集图像分析。

2.8 血清中 IL-4 和 IFN- γ 含量检测

采用 ELISA,按照试剂盒说明书检测 IL-4 和 IFN- γ 在血清中的含量。

2.9 统计学方法

各组实验计量数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS22.0 软件对数据进行统计学分析并用 GraphPad Prism9.0 进行作图。满足正态分布和方差齐性分析的各组数据运用 one-way ANOVA 检验组间差异,运用 SNK-q 检验进行两两间比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况比较

与空白组相比模型组大鼠毛发枯燥凌乱,精神状态差,口鼻及耳尖较红,耳部毛细血管明显,偶有鼻出血现象,呼吸节律加快,并可闻及哮鸣音,抓挠口鼻频率高,周围可见淡黄色黏性分泌物。

与模型组相比定喘汤组大鼠整体精神状态良好,毛发较平整,口鼻黏性分泌物减少,偶有喘

息气急、搔鼻、打喷嚏,呼吸节律随用药时间延长而呈现平稳状态。宣白承气汤组大鼠整体状态良好,毛发光泽平整,口鼻黏性分泌物减少,出血症状减少,呼吸较平稳,且哮鸣音减少。地塞米松组大鼠用药 1 周后各项状态较为稳定,继续用药后大鼠性情暴躁,肌肉僵直,皮肤松垮,毛发杂乱枯燥。

3.2 各组大鼠体质量变化情况比较

空白组大鼠在实验过程中体质量呈稳定上升趋势;模型组大鼠随着造模程度的加深,体质量上涨趋势减缓;给药开始后定喘汤组和宣白承气汤组大鼠体质量均较模型组增长缓慢,地塞米松组大鼠给药后体质量大幅下降。见表 1。

3.3 各组大鼠肛温变化情况

空白组大鼠在实验全程肛温较为恒定,无过高或过低肛温出现;造模开始后模型组大鼠肛温明显上升,且随造模深入肛温持续升高($P < 0.01$);给药后定喘汤组、宣白承气汤组和地塞米松组大鼠肛温均下降,其中宣白承气汤组下降最为显著($P < 0.01$),定喘汤组次之($P < 0.05$),地塞米松组下降幅度不及前两组。见表 2。

3.4 各组大鼠代谢情况比较

3.4.1 各组大鼠日均饮水量比较

空白组大鼠日均饮水量水平较为稳定,无明显上升下降;造模开始后模型组大鼠日均饮水量逐步下降($P < 0.01$);给药后定喘汤组、宣白承气汤组大鼠日均饮水量均升高,其中宣白承气汤组大鼠升高最明显($P < 0.01$)。见表 3。

3.4.2 各组大鼠日均进食量比较

空白组大鼠日均进食量水平较为稳定,无明显上升下降;造模开始后各造模组大鼠日均进食量均显著降低(均 $P < 0.01$);给药后定喘汤组和宣白承气汤组大鼠日均进食量小幅增长,其中宣白承气汤组增加较为显著($P < 0.01$),定喘汤组增加幅度不及宣白承气汤组($P < 0.05$);地塞米松组给药后第 1 周(即第 4 周)日均进食量较模型组显著下降($P < 0.01$),给药第 2 周日均进食量与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 4。

3.4.3 各组大鼠给药后排泄情况比较

模型组大鼠日均排便量较空白组明显降低

($P<0.05$), 提示腑实证模型造模成功; 给药后定喘汤组、宣白承气汤组和地塞米松组大鼠日均排便量较模型组均有不同程度增多, 其中宣白承气

汤组显著增多 ($P<0.01$), 定喘汤组和地塞米松组大鼠排便量虽有增多, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 5。

表 1 各组大鼠体质量变化情况比较 ($\bar{x} \pm s$) 单位: g

组别	n	第 1 天	第 8 天	第 15 天	第 22 天	第 29 天	第 35 天
空白组	6	207.4±4.37	257±3.93	314.13±7.50	335.07±15.85	352.13±15.10	376.73±22.50
模型组	6	200.75±5.73	250.35±2.43**	295.88±7.67**	323.45±8.69	328.85±7.78*	352.97±7.46
定喘汤组	6	193.77±3.62	240.2±2.66###	294.57±8.82	320.43±9.99	325.58±10.09	344.08±13.36
宣白承气汤组	6	184.98±3.40	234.3±2.49###	278.17±5.18#	299.72±4.04###	305.25±3.29#	327.34±5.09###
地塞米松组	6	204.1±4.16	251.67±4.20	308.2±6.12#	333.83±6.62	272.1±14.41###	269.06±15.30###

注: *与空白组比较, $P<0.05$; **与空白组比较, $P<0.01$; #与模型组比较, $P<0.05$; ##与模型组比较, $P<0.01$ 。

表 2 各组大鼠肛温变化情况比较 ($\bar{x} \pm s$) 单位: °C

组别	n	第 1 天	第 8 天	第 15 天	第 22 天	第 29 天	第 35 天
空白组	6	37.27±0.16	37.32±0.19	37.27±0.10	37.28±0.53	37.22±0.33	37.32±0.26
模型组	6	37.45±0.41	37.42±0.18	38.35±0.15**	38.48±0.26**	38.7±0.15**	38.77±0.33**
定喘汤组	6	37.27±0.12	37.33±0.12	38.43±0.10	38.23±0.59	37.47±0.23###	37.5±0.46#
宣白承气汤组	6	37.32±0.15	37.427±0.19	38.37±0.21	38.33±0.64	37.4±0.24###	37.43±0.18###
地塞米松组	6	37.28±0.19	37.38±0.19	38.38±0.17	37.88±0.77	37.88±0.29#	37.85±0.33

注: **与空白组比较, $P<0.01$; #与模型组比较, $P<0.05$; ##与模型组比较, $P<0.01$ 。

表 3 各组大鼠日均饮水量比较 ($\bar{x} \pm s$) 单位: g

组别	n	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周
空白组	6	75.89±4.43	75.87±4.23	74.92±4.86	75.22±3.99	73.98±4.39
模型组	6	76.46±4.23	57.09±4.29**	55.09±0.59**	45.10±4.16**	43.75±4.51**
定喘汤组	6	76.53±2.04	58.83±3.08	55.29±1.60	50.07±0.99	52.82±3.57
宣白承气汤组	6	76.21±4.71	59.62±3.28	55.90±1.08	59.15±1.35###	58.53±3.58###
地塞米松组	6	75.25±2.77	57.83±3.99	56.748±2.29	49.43±1.41	48.76±3.00

注: **与空白组比较, $P<0.01$; ##与模型组比较, $P<0.01$ 。

表 4 各组大鼠日均进食量比较 ($\bar{x} \pm s$) 单位: g

组别	n	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周
空白组	6	22.07±0.58	22.43±0.70	22.03±0.63	19.62±0.67	19.77±0.79
模型组	6	22.05±0.31	16.55±1.33**	17.61±0.38**	13.44±0.29**	13.012±0.63**
定喘汤组	6	22.28±0.53	16.73±1.40	17.53±0.37	14.85±0.74	15.28±0.55#
宣白承气汤组	6	21.99±0.30	16.52±0.42	17.59±0.20	15.87±0.56###	17.06±0.84###
地塞米松组	6	22.31±0.84	16.98±0.87	17.43±1.20	8.18±1.16###	11.68±1.11

注: **与空白组比较, $P<0.01$; #与模型组比较, $P<0.05$; ##与模型组比较, $P<0.01$ 。

表 5 各组大鼠给药后排泄情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	单位: g 便量
空白组	5	8.55±0.63
模型组	5	5.43±0.55*
定喘汤组	5	6.86±1.07
宣白承气汤组	5	8.20±0.45###
地塞米松组	5	7.69±1.04

注: *与空白组比较, $P<0.05$; ##与模型组比

较, $P<0.01$ 。

3.5 各组大鼠肺组织病理学改变

镜下观察: 空白组未见炎性细胞浸润, 肺泡扩张良好, 支气管黏膜正常; 模型组可见肺泡壁大面积增厚, 肺泡腔受挤压而塌陷, 并伴有大量嗜酸性粒细胞及淋巴细胞浸润, 偶见支气管周围淋巴细胞灶性浸润, 细支气管上皮细胞脱落, 杯状细胞增生等典型支气管哮喘病理表现。

与模型组相比, 用药后定喘汤组可见淋巴细胞及粒细胞浸润减少, 肺泡壁小面积增厚, 细支气管上皮细胞脱落; 宣白承气汤组可见淋巴细胞及粒细胞浸润减少, 少量细支气管上皮细胞脱落; 地塞米松组可见少量淋巴细胞浸润, 大面积肺泡壁增厚, 细支气管上皮细胞脱落。见图 1。

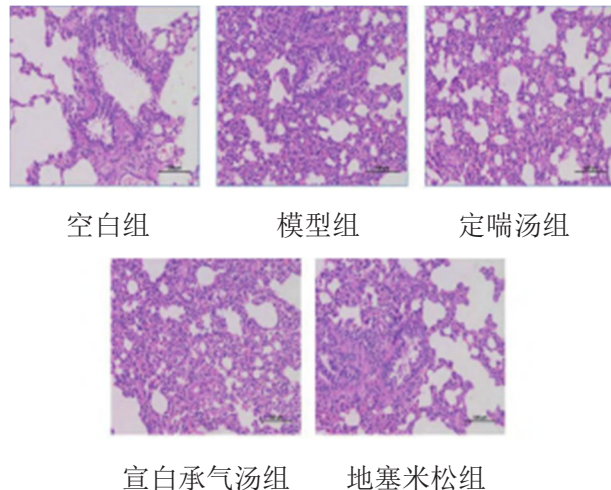


图 1 各组大鼠肺组织病理结果 (HE×20)

3.6 各组大鼠血清中 IL-4 和 IFN- γ 水平比较

与空白组相比, 模型组大鼠 Th2 细胞因子 IL-4 水平显著上升 ($P < 0.01$), Th1 细胞因子 IFN- γ 水平显著下降 ($P < 0.01$); 经给药治疗后, 定喘汤组、宣白承气汤组和地塞米松组 IL-4 水平均较模型组下降 (均 $P < 0.01$), 其中, 宣白承气汤组下降最明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 另外, 3 组 IFN- γ 水平均较模型组上升 (均 $P < 0.01$), 其中, 地塞米松组上升最明显 ($P < 0.01$)。见表 6。

表 6 各组大鼠血清 IL-4、IFN- γ 水平比较

($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	IL-4	IFN- γ
空白组	6	8.92±1.71	0.63±0.05
模型组	6	42.43±2.92**	0.13±0.02**
定喘汤组	6	18.59±2.76##	0.31±0.03##
宣白承气汤组	6	12.93±1.07##\$\$	0.41±0.04##\$\$
地塞米松组	6	16.26±1.91##\$△△	0.52±0.02##\$\$

注: **与空白组比较, $P < 0.01$; ##与模型组比较, $P < 0.01$; \$与定喘汤组比较, $P < 0.05$; \$\$与定喘汤组比较, $P < 0.01$; △△与宣白承气汤组比较, $P < 0.01$ 。

4 讨论

研究表明, 在支气管哮喘的形成过程中, T 淋巴细胞扮演着重要角色, 当 T 淋巴细胞受到一系列相关细胞因子刺激时, 会导致其向 Th2 分化, 从而打破 Th1/Th2 间的平衡, 当两者数量失常时, 免疫系统就会遭到损害, 免疫细胞功能紊乱, 导致自身组织的结构和功能损坏, 最终导致慢性哮喘的发生^[4-5]。Th2 型细胞因子包括 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-13 等, 在哮喘患者体内这些因子水平显著升高, 促使气道炎症细胞的浸润积累和 IgE 的生成, 同时降低 Th1/Th2 比率, 控制 Th1 细胞的活性; 反之, Th1 通过产生 IFN- γ 和 IL-2 等因子, 从而达到抑制哮喘发作的目的, 且活化巨噬细胞有效地消除外界感染物, 同时还能促使细胞毒性 T 细胞的分离, 从而防止 Th2 细胞的炎症反应^[10]。

而在中医学中, 哮喘当属“哮病”“喘证”范畴, 中医学历来认为哮喘病机不外乎素体痰饮内伏于肺, 即张仲景在《金匱要略》中所言: “膈上病痰, 满喘, 咳唾……必有伏饮”, 再由外邪、饮食不节、情志不遂等因素诱发所致, 即《症因脉治·哮病》所言: “偶有七情之犯, 饮食之伤, 或外有时令之风寒束其肌表, 则哮喘之症作矣”。其证型虽并不统一, 但总体不外乎寒热虚实, 其中痰热壅肺证在临床调查中被普遍采纳, 其症状常表现为痰鸣如吼、喘息气粗、痰黄黏稠等一派实热之象, 除此之外, 由于肺与大肠相表里, 肺气不宣可致大肠传导失司, 还会出现大便燥结的症状, 反之大肠腑气不通也会影响到肺气的宣降功能, 引起喘咳胸闷, 加重哮喘, 造成痰热兼腑实的征象。

因此, 由“肺与大肠相表里”引发的“肺肠合病”理应“肺肠合治”。其中最具有代表性的莫过于吴鞠通所创宣白承气汤, 该方仅用石膏、大黄、杏仁、瓜蒌四药, 上能祛痰定喘, 下能通腑泄热, 是“肺肠合治”的代表方剂。且临床上多采用此方治疗痰热壅盛或伴有腑实证的肺系疾病, 如廖文豪^[11]运用宣白承气汤加减方治疗临床急性加重期慢性阻塞性肺疾病肺热腑实证, 发现

其可以改善患者临床症状及肺功能指标,并降低炎症因子分泌;包春秀等^[12]应用加味宣白承气汤联合西医常规疗法治疗痰热闭肺型肺炎支原体肺炎,发现其可以促进肠道 sIgA 分泌,修复肠黏膜免疫屏障,从而改善肺部炎症状态;李娥等^[13]采用宣白承气汤加减辅助治疗痰热壅肺型重症肺炎,使患者全身炎症反应程度降低;蔡海荣等^[14]发现宣白承气汤可以缓解重症肺炎患者高热、气喘、咳嗽等症状并且对炎症因子具有明显抑制作用。

另外,现代药理学研究表明宣白承气汤可以通过调节免疫细胞分化治疗哮喘^[15],因此本课题组在此基础上模拟建立痰热腑实型哮喘模型,研究发现模型大鼠肺组织 HE 染色出现了炎性细胞浸润、气道上皮损伤脱落、肺泡壁增厚、杯状细胞增生等典型哮喘病理改变,且 Th2 细胞因子 IL-4 显著升高, Th1 细胞因子 IFN- γ 显著降低,而经宣白承气汤治疗后,肺组织炎性细胞浸润明显减轻,肺泡扩张良好,肺泡壁增厚得到缓解,气道上皮损伤明显减轻,同时能够显著上调 IFN- γ 水平,下调 IL-4 水平,从而纠正 Th1/Th2 失衡状态,起到减轻哮喘症状治疗哮喘的作用。

参考文献

- [1] VERCELLI D. Gene-environment interactions in asthma and allergy: the end of the beginning[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2010, 10(2): 145-148.
- [2] PFEFFERLE PI, PINKENBURG O, RENZ H. Fetal epigenetic mechanisms and innate immunity in asthma[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2010, 10(6): 434-443.
- [3] HUANG K W, YANG T, XU J Y, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: A national cross-sectional study[J]. *Lancet*, 2019, 394(10196): 407-418.
- [4] LIANG Z J, TANG F L. The potency of lncRNA MALAT1/ miR-155/CTLA4 axis in altering Th1/Th2 balance of asthma[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(2): BSR20190397.
- [5] ZHAO S M, WANG H S, ZHANG C, et al. Repeated herbal acupoint sticking relieved the recurrence of allergic asthma by regulating the Th1/Th2 cell balance in the peripheral blood[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 1879640.
- [6] 周永学, 王郁金, 闫曙光, 等. 硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP-cAMP-PKA-AQP3 信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(24): 99-104.
- [7] KAKINO M, TAZAWA S, MARUYAMA H, et al. Laxative effects of agarwood on low-fiber diet-induced constipation in rats[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2010, 10: 1-8.
- [8] BARONE M, TANZI S, LOFANO K, et al. Dietary-induced ER β upregulation counteracts intestinal neoplasia development in intact male ApcMin/1 mice[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(2): 269-274.
- [9] 蔚永运, 申亚峰, 赵楠. 涤痰通腑汤对脑梗死大鼠的保护作用[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2013, 27(4): 341-343.
- [10] 历凯. 止喘汤对哮喘模型作用机制的实验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2007: 13-16.
- [11] 廖文豪. 基于“肺与大肠相表里”理论运用宣白承气汤加减方治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期(肺热腑实证)的临床研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2021: 49.
- [12] 包春秀, 姜永红. 加味宣白承气汤对痰热闭肺型肺炎支原体肺炎患儿肠道菌群及 sIgA 水平的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2022, 56(7): 53-58.
- [13] 李娥, 陈荣, 吕佳杰. 宣白承气汤治疗痰热壅肺型重症肺炎效果及对 PCT、IL-13 的影响研究[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(8): 242-244.
- [14] 蔡海荣, 庄杰钦, 陈燕虹, 等. 宣白承气汤治疗重症肺炎的疗效观察[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(10): 2455-2456.
- [15] 孙明月, 兰明月, 杨阳, 等. 宣白承气汤治疗支气管哮喘的网络药理学分析[J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(10): 1386-1393.

黄芪赤风汤指纹图谱建立及主要成分含量测定

刘 承, 袁晚月, 王旭氏

黑龙江中医药学院, 黑龙江哈尔滨, 150040

摘要: **目的** 建立 10 批黄芪赤风汤供试品溶液的指纹图谱, 以及对方中芍药内酯苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷 7 种主要成分进行测定。**方法** 采用 Diamonsil C₁₈ (2) 色谱柱 (4.6mm×250mm, 5μm); 使用 0.05%甲酸水 (B) -5%四氢呋喃 95%乙腈 (D) 为流动相进行梯度洗脱; 流量: 1 mL/min; 柱温: 23℃, 进样量: 10 μL。基于 HPLC-ELSD 法, 漂移管温度: 60℃, 柱温: 30℃, 进样量: 20μL。**结果** 10 批黄芪赤风汤供试品共标出 16 个共有峰, 其相似度均在 0.9 以上, 并对毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、芍药苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷、毛蕊异黄酮、芍药内酯苷分别进行指认; 基于 HPLC-ELSD 法: 10 批黄芪赤风汤其相似度均在 0.903 以上。且 7 种主要成分在各自的加样范围中线性关系良好, 各自加样回收率 RSD≤3%, 含量为: 芍药内酯苷 (9.58±1.70) mg/g、芍药苷 (8.36±0.78) mg/g、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (0.77±0.11) mg/g、芒柄花苷 (0.16±0.06) mg/g、毛蕊异黄酮 (0.50±0.06) mg/g、芒柄花素 (0.25±0.05) mg/g、黄芪甲苷 (0.30±0.10) mg/g。**结论** 本研究建立的黄芪赤风汤指纹图谱分析方法可信度高、稳定, 可用于黄芪赤风汤的质量控制及含量测定。

关键词: 黄芪赤风汤; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 含量测定

黄芪赤风汤是调和气血的重要古方, 出自清代王清任的《医林改错》^[1]。方中黄芪为君, 赤芍为臣, 防风为佐引经, 助君臣调和气血。全方补散并用、温凉并行, 共奏活血补气之功^[2]。配伍精妙, 尽显调治气血之大义。古时已在外科疮疡、斑疹, 内科痹症、男子不育等因气血失和所造成的多方面疾病有广泛应用。探究黄芪赤风汤的现代应用在此有重要意义。

当代科学研究通过古籍, 对黄芪赤风汤的应用加以规范化、科学化, 为该方大规模临床应用开辟了新道路。例如, 刘舒毓等^[3]通过建立大脑中动脉栓塞模型, 证明了黄芪赤风汤可以减轻脑组织病理变化, 促进脑血管生成, 调动血脑屏障功能, 治疗脑梗死; 且多个实验证明该方可改善 IgA 肾病患者症状且无不良反应发生^[4-6]; 李琼^[7]探索到黄芪赤风汤对脓毒症弥散性血管内凝血有着独特的治疗方式。除上述例子, 黄芪赤风汤的药效在皮肤病、内分泌类疾病领域均有研究证明。

为了加大黄芪赤风汤的推广力度, 早日确

定该方的质量标准, 本研究拟通过高效液相法建立指纹图谱, 对方中主要成分进行含量测定来达到该目的。为确立该方质量标准提供实验基础。

1 仪器与材料

Waters e2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Waters 2998 PDA 检测器 (美国 Waters 公司); Waters 2424 ELSD 检测器 (美国 Waters 公司); GA-10 型低噪音空气泵 (北京中兴汇利科技发展有限公司); MS105DU 分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); CP224C 型分析天平 (奥豪斯仪器有限公司); KQ-150DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); SY-5000 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); HHS 型电热恒温水浴锅 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

黄芪甲苷 (批号: 110781-202118)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号: 111920-201907)、芒柄花素 (批号: 111703-201504)、芍药苷 (批号: 110736-

202044)、升麻素(批号:111710-200602)、5-O-甲基维斯阿米醇苷(批号:111523-201811)均购自中国食品药品检定研究院;毛蕊异黄酮(批号: MUST-20092110)、芒柄花苷(批号: MUST-21032101)、芍药内酯苷(批号: MUST-20131601)均购自成都曼斯特生物科技有限公司。

实验所用黄芪(产地:黑龙江、内蒙古、山西、甘肃等)、赤芍(产地:内蒙古、北京、安徽、黑龙江等)、防风(产地:黑龙江、内蒙古、山东、河南等),均购自黑龙江修生堂药业有限公司,由黑龙江中医药大学王振月教授鉴定,符合2020版《中华人民共和国药典》规定。10批药材的产地见表1。

表1 10批黄芪赤风汤所用药材产地

批号	黄芪	赤芍	防风
S1	黑龙江 讷河	北京 顺义	河南 内黄
S2	山西 太原	甘肃 临洮	内蒙古 呼伦贝尔
S3	吉林 抚松	黑龙江 黑河	山东 济宁
S4	内蒙古 赤峰	内蒙古 赤峰	河南 禹州
S5	黑龙江 大庆	内蒙古 呼伦贝尔	河南 安阳
S6	山西 太原	北京 顺义	内蒙古 二连浩特
S7	山西 忻州	甘肃 临洮	山西 长治
S8	内蒙古 赤峰	内蒙古 呼伦贝尔	内蒙古 海拉尔
S9	甘肃 岷县	安徽 亳州	黑龙江 齐市
S10	甘肃 张掖	北京 顺义	河南 济宁

甲酸(批号:50144,北京Dikma公司);乙腈(批号:204197,美国Thermo Fisher公司);甲醇(批号:203512,美国Thermo Fisher公司);四氢呋喃(批号:20210829,天津市富宇精细化工有限公司);正丁醇(批号:20211213,天津市富宇精细化工有限公司);氨水(批号:20210910,天津市恒兴化学试剂制造公司),娃哈哈纯净水(批号:20201223,吉林省娃哈哈饮料有限公司)。

2 方法与结果

2.1 基于HPLC-PDA法的方法与结果

2.1.1 色谱条件^[8-9]

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (2) 色谱柱

(4.6mm×250mm, 5μm);流动相: 0.05%甲酸水(B)-5%四氢呋喃-95%乙腈(D);梯度洗脱程序见表2;流量:1mL/min;柱温:25℃,波长:251nm;进样量:10μL。

2.1.2 溶液制备

对照品溶液制备:精密称取标准品芍药苷3.6mg、芒柄花苷4.4mg、5-O-甲基维斯阿米醇苷1.8mg、毛蕊异黄酮葡萄糖苷1.6mg、升麻素2.3mg、芒柄花素6.3mg、芍药内酯苷1.5mg、毛蕊异黄酮10mg、没食子酸6.1mg,各对照品置入5mL容量瓶中,加甲醇,混匀,定容至刻度。即得对照品溶液。精密吸取各对照品溶液适量,振荡均匀,即得混合对照品溶液。所配制的对照品溶液均置于4℃条件下保存。

表2 梯度洗脱程序

时间/min	0.05%甲酸水(B)	5%四氢呋喃-95%乙腈(D)
0	90%	10%
12	80%	20%
14	80%	20%
19	77%	23%
65	37%	63%

供试品溶液制备:以黄芪赤风汤中3种药材15:3:2的比例,取适量药材,加入8倍蒸馏水浸泡30min,回流提取1h,3次,反复滤过,合并滤液,旋转蒸发至适当体积,使用水浴锅60℃蒸干,得到烘干粉。回流提取适用于少量药材提取且提取成分损耗少,故选择该法。精密称取150mg黄芪赤风汤烘干粉,放入5mL容量瓶中,加入75%甲醇,超声20min,静置,定容至刻度,取0.22μm微孔滤膜滤过溶液,即得^[10]。

2.1.3 方法学考察

精密度考察实验:取同一批供试品溶液,使用2.1.1项下的色谱条件,样品测定6次,以芒柄花苷(12号峰)为参照,测得共有峰保留时间RSD在0.14%~0.28%,峰面积RSD在0.42%~1.25%,表示仪器精密度良好。

重复性实验:取同一批黄芪赤风汤烘干粉6份,每份150mg,按照2.2.2项下方法制备溶液,

在 2.1.1 项色谱条件下，测定样品，以芒柄花苷（12 号峰）为参照，测得共有峰保留时间 RSD 在 0.05%~0.21%，峰面积 RSD 在 0.76%~2.85%，表明该方法有良好的重复性。

稳定性实验：取同一批供试品溶液，在 0、2、4、6、12、24h 时，在 2.1.1 项下的色谱条件进行样品测定，以芒柄花苷（12 号峰）为参照，测得共有峰保留时间 RSD 在 0.00%~0.17%，峰面积 RSD 在 0.66%~1.24%，表明供试品溶液在 24h 内具有良好稳定性。

2.1.4 建立指纹图谱及共有峰指认

将 10 批黄芪赤风汤供试品溶液色谱图录入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012A）版》，以 S1 为参照图谱，采用平均数法，设置时间窗为 0.5。进行多点校正，Mark 峰匹配，通过软件形成指纹图谱，见图 1。

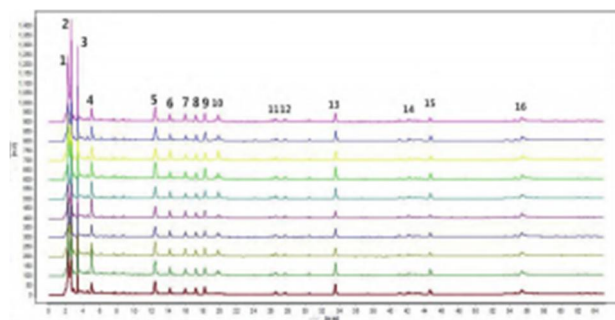
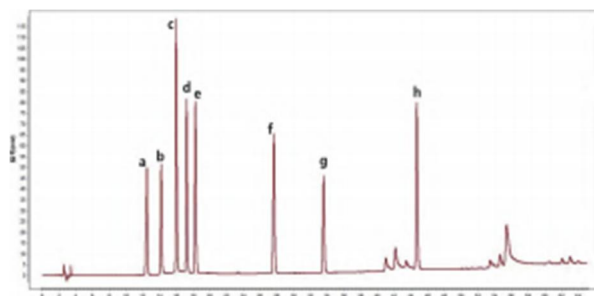


图 1 10 批黄芪赤风汤供试品溶液指纹图谱



注：a. 芍药内酯苷；b. 芍药苷；c. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷；d. 升麻素；e. 5-O-甲基维斯阿米醇苷；f. 芒柄花苷；g. 毛蕊异黄酮；h. 芒柄花素。

图 2 对照品色谱图

经系统计算，10 批供试品溶液其相似度在 0.967~0.996。结果见表 3。10 批供试品溶液指纹图谱中，可标定出共有指纹峰 16 个，并对其中 8 个指纹峰进行指认：5 号峰为芍药内酯苷，6 号峰为芍药苷，7 号峰为毛蕊异黄酮葡萄糖苷，8 号峰为升麻素，9 号峰为 5-O-甲基维斯阿米醇苷，12 号峰为芒柄花苷，13 号峰为毛蕊异黄酮，15 号峰为芒柄花素。以 5-O-甲基维斯阿米醇苷（9 号峰）为内参比峰各共有峰的峰面积及保留时间见表 4。

表 3 10 批黄芪赤风汤供试品溶液相似度

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.985	S6	0.967
S2	0.996	S7	0.995
S3	0.987	S8	0.985
S4	0.973	S9	0.996
S5	0.976	S10	0.987

表 4 10 批黄芪赤风汤供试品溶液的峰面积及保留时间

编号	保留时间 /min	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	保留时间 RSD/%	峰面积 RSD/%
1	2.62	1613.43	2127.95	2322.69	1541.53	1480.55	2500.50	2500.50	1959.86	1375.83	1972.53	0.19	21.78
2	3.39	1061.42	1456.63	1545.78	982.73	1073.54	1643.80	1643.80	1332.51	795.90	1312.50	0.42	22.96
3	3.83	287.81	209.03	208.84	218.48	192.40	189.79	189.79	230.14	257.96	151.97	0.94	17.93
4	5.03	646.19	1425.22	899.51	692.12	887.57	968.79	968.79	714.52	581.23	788.55	0.72	28.13
5	12.46	823.59	1041.16	912.56	726.19	735.00	1212.35	1212.35	794.67	686.82	909.65	0.60	21.3
6	14.18	332.95	426.97	362.70	315.00	366.50	360.28	360.28	517.60	279.22	322.20	0.20	18.27
7	15.97	281.36	369.68	408.68	243.89	353.06	357.55	357.55	242.96	218.68	237.73	0.17	22.47
8	17.20	326.80	333.65	295.83	247.56	262.41	334.13	334.13	299.89	256.41	286.34	0.41	11.42
9	18.31	405.19	389.04	436.82	326.74	386.71	543.01	543.01	380.63	5.01	455.14	0.51	39.05
10	19.58	53.23	63.68	52.74	38.05	36.58	89.90	89.90	55.30	62.31	70.51	0.18	30.08
11	26.56	168.66	213.96	192.82	135.53	130.45	194.52	194.52	179.73	49.64	176.13	0.25	29.26
12	27.64	114.92	122.36	146.51	94.87	124.35	132.54	132.54	136.14	83.54	113.31	0.08	16.02
13	33.59	615.48	737.25	476.06	505.59	385.13	717.61	717.61	510.42	467.14	585.72	0.10	21.43
14	43.42	119.39	27.55	61.27	26.40	84.98	81.90	81.90	75.90	62.12	99.67	0.20	40.46
15	44.69	301.19	371.76	219.21	250.55	179.24	357.03	357.03	237.90	211.49	299.05	0.06	24.61
16	55.35	448.59	450.78	450.69	454.47	459.19	458.22	458.22	456.15	442.81	462.15	0.25	1.29

2.1.5 聚类分析

将10批黄芪赤风汤供试品的各色谱峰峰面积值导入SIMCA14.1软件中,通过HCA分析各峰面积,可以得到图3。图中根据各成分含量进行分析归类。由图可得,S2、S6、S7为第1类,S9为第2类,S1、S4、S5、S10、S3、S8为第3类。

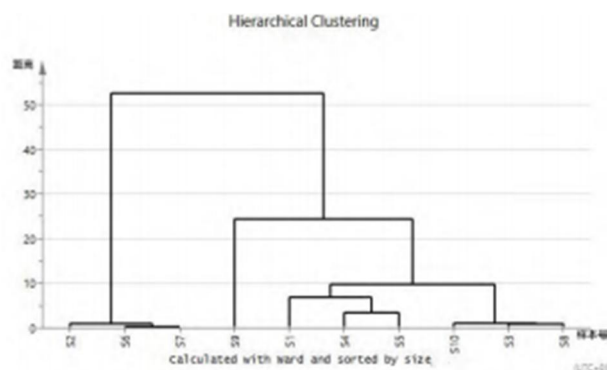


图3 10批黄芪赤风汤样本聚类分析图

2.2 基于HPLC-ELSD法的方法与结果

2.2.1 色谱条件^[11-13]

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (2) 色谱柱(4.6mm×250mm, 5μm); 流动相: 0.05%甲酸水(A)-5%四氢呋喃95%乙腈(B); 梯度洗脱(0~5min, 95%~38%A, 5%~52%B; 5~50min, 38%~38%A, 52%~52%B); 流量: 1mL/min; 柱温: 30℃; 漂移管温度: 60℃; 进样量: 20μL。

2.2.2 溶液制备

对照品溶液制备: 精密称取黄芪甲苷对照品1mg 置入5mL容量瓶,加甲醇,振荡混匀,定容至刻度,即得。所配制储备液置于4℃条件下保存。

供试品溶液制备: 取黄芪赤风汤烘干粉,精密称取适量,置入10mL容量瓶,加75%甲醇,超声20min,放置冷却,振摇均匀,定容至刻度。0.22μm微孔滤膜过滤,滤液放置于水浴锅上蒸干。加10mL纯净水完全溶解,加入40mL水饱和的正丁醇溶液,充分振荡混匀,静置萃取,分层后弃去下层废液,反复4次。合并4次正丁醇萃取溶液,加入20mL氨水,振荡洗涤,反复2次。取得溶液,水浴锅蒸干。蒸干后加入甲醇完全溶解,置入5mL容量瓶中,加甲醇至刻度定容,

0.22μm微孔滤膜过滤,即得。

2.2.3 方法学考察

精密度考察实验: 取同一批供试品溶液,在2.2.1项下的色谱条件进行样品测定6次,以4号峰(黄芪甲苷)为参照,测得共有峰保留时间RSD为0.12%,峰面积RSD为0.67%,表明仪器精密密度良好。

重复性实验: 取同一批黄芪赤风汤烘干粉6份,每份150mg,按照2.2.2项下方法制备溶液,以4号峰(黄芪甲苷)为参照,在2.2.1项色谱条件下,测定样品,测得共有峰保留时间RSD为0.23%,峰面积RSD为0.97%,表明该方法有良好的重复性。

稳定性实验: 取同一批供试品溶液,在0、2、4、6、12、24h时,以4号峰(黄芪甲苷)为参照,在2.2.1项下的色谱条件进行样品测定,测得共有峰保留时间RSD为0.07%,峰面积RSD1.13%,表明供试品溶液在24h内具有良好稳定性。

2.2.4 建立指纹图谱及共有峰指认

取10批供试品溶液,在2.2.1项色谱条件下测定样品,将相关数据导入2012年版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件,以S2为参照图谱,黄芪甲苷为参照峰进行全峰谱匹配,采用平均数法,时间窗为0.5,通过软件形成对照指纹图谱(见图4)。

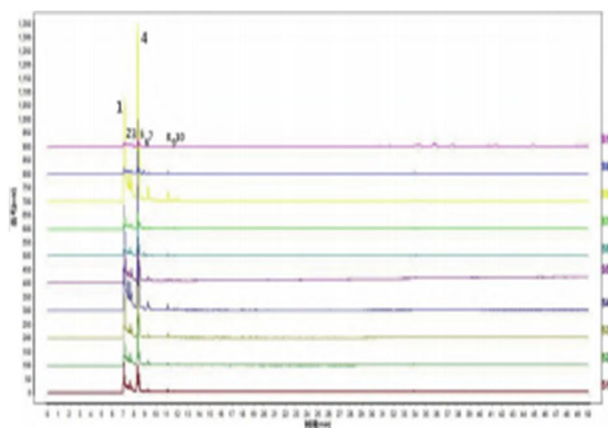


图4 10批黄芪赤风汤指纹图谱

经软件计算,10批供试品溶液相似度在0.878~1.000(见表5)。将对照品HPLC指纹图谱(见图5)与黄芪赤风汤供试品溶液图谱进行比

对(见图4)。10批样品中,可以标记出10个共有峰,其中,4号峰为黄芪甲苷色谱峰。各共有峰的峰面积及保留时间见表6。

表5 10批黄芪赤风汤溶液相似度

样品	相似度	样品	相似度
S1	1.000	S6	0.912
S2	0.903	S7	0.981
S3	0.976	S8	0.967
S4	0.935	S9	0.914
S5	0.980	S10	0.965

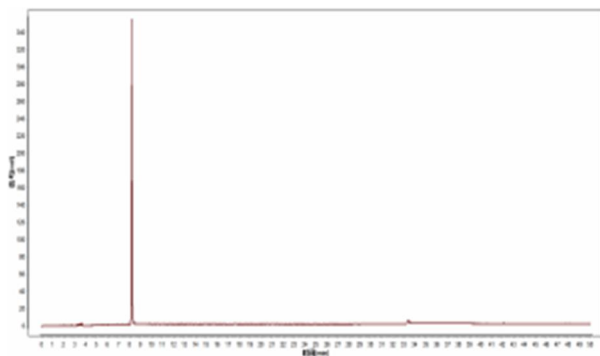


图5 黄芪甲苷对照品色谱图

表6 10批黄芪赤风汤供试品溶液峰面积及保留时间

编号	保留时间/min	S1-S10										保留时间	峰面积	匹配
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%	RSD/%	数目
1	7.13	784 217.63	445 043.22	1 065 746.50	2 550 806.25	889 326.06	273 320.56	268 516.84	2 676 186.50	212 375.22	59 738.11	0.20	102.79	10
2	7.46	208 321.64	232 158.98	179 410.66	727 542.69	270 666.38	95 326.56	99 177.88	722 526.63	62 519.73	30 560.26	0.21	97.18	10
3	7.67	247 884.05	238 008.97	305 829.41	381 175.22	295 270.66	211 164.44	95 642.38	425 275.06	75 336.81	45 889.95	0.20	55.16	10
4	8.32	548 542.63	820 035.25	1 011 182.56	332 6952.5	808 432.88	462 357.97	268 926.97	2 894 822.25	334 107.19	188 613.80	0.17	104.42	10
5	8.46	415 154.63	280 685.53	448 752.28	989 634.00	330 361.59	201 731.56	129 187.20	1 273 772.13	109 063.66	10 991.07	0.33	96.73	10
6	8.90	4 419.15	36 888.52	24 255.09	114 731.98	26 120.30	68 711.71	10 096.64	91 325.83	55 955.20	9 209.85	0.23	84.98	10
7	9.26	78 966.90	119 039.29	92 581.77	250 530.86	111 342.11	36 954.12	14 419.38	357 228.56	21 750.12	14 097.61	0.25	102.46	10
8	11.13	53 387.55	35 311.29	88 377.43	115 722.27	51 814.95	33 391.27	20 848.73	191 864.52	28 219.31	7 663.76	0.28	88.92	10
9	11.75	18 345.74	14 897.86	24 686.91	43 924.04	18 073.30	10 567.13	8 767.06	69 956.30	9 661.17	8 226.09	0.27	86.95	10
10	12.01	10 694.00	15 932.79	17 330.79	52 429.94	19 633.36	5 984.24	3 548.52	37 515.21	4 605.69	4 560.39	0.33	93.50	10

2.3 方中主要成分含量测定^[14-18]

2.3.1 计算考察标准曲线及线性关系

制备好按照“2.1.2”项下制备的混合对照品溶液和“2.2.2”项下的对照品溶液,将二者分别按照“2.1.1”和“2.2.1”项下的条件进行测定,分别进样0.5、1、2.5、5、10、20、30、35 μ L。以进样量(单位为 μ L)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制出标准曲线。根据线性回归方程分析,黄芪赤风汤各成分在各自的进样量范围中,与峰面积的线性关系良好。结果见表7。

2.3.2 加样回收率实验

取3组各测试成分含量已知的黄芪赤风汤烘干粉,各组3份,每份0.3g。随机选择样品,分别按照已知含量烘干粉中各测试成分的50%、100%及150%加入对应标准品。按照“2.1.2”

及“2.2.2”项下方法制备溶液,按照“2.1.1”和“2.2.1”项下色谱条件进样测试。通过生成图谱,计算出各测试成分的含量。结果见表8。结果表示所有测试成分加样回收率RSD \leq 3%,回收率良好。

表7 黄芪赤风汤各测试成分的标准曲线及线性范围

分析物	标准曲线	r^2	线性范围/ μ g
芍药内酯苷	$Y=1 \times 10^6 X + 8 797.4$	1.000 0	0.043 3~3.034 9
芍药苷	$Y=1 \times 10^6 X + 32 093$	0.999 9	0.104 0~7.280 4
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=3 \times 10^6 X + 26 211$	0.999 8	0.015 4~1.079 4
芒柄花苷	$Y=3 \times 10^6 X + 19 579$	0.999 8	0.010 6~0.742 0
毛蕊异黄酮	$Y=5 \times 10^6 X - 902.3$	0.999 7	0.004 8~0.337 4
芒柄花素	$Y=6 \times 10^6 X + 291 019$	0.999 0	0.007 6~0.531 3
黄芪甲苷	$Y=2 \times 10^6 X + 370 920$	0.999 0	0.095 0~4.750 0

表8 黄芪赤风汤中各测试成分的加样回收率 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

分析物	C/mg	加入浓度 /mg	检测浓度 /mg	回收率 /%	RSD/%	平均回收率 /%
芍药内酯苷	3.07	1.57	4.69	103.42	1.73	102.13
		3.13	6.29	102.96	1.90	
		4.70	7.77	100.01	1.98	
芍药苷	2.92	1.47	4.38	99.57	1.86	100.15
		2.94	5.86	100.16	1.94	
		4.41	7.36	100.73	1.47	
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.23	0.15	0.38	99.40	1.86	99.89
		0.26	0.49	99.13	1.65	
		0.39	0.62	101.71	2.05	
芒柄花苷	0.07	0.05	0.12	96.35	1.95	98.76
		0.08	0.15	99.95	2.04	
		0.12	0.19	99.99	1.95	
毛蕊异黄酮	0.11	0.07	0.18	98.09	1.89	99.23
		0.18	0.29	100.42	1.34	
		0.23	0.34	99.18	1.81	
芒柄花素	0.05	0.04	0.09	96.92	1.41	97.78
		0.07	0.12	97.91	2.19	
		0.10	0.15	98.51	1.88	
黄芪甲苷	0.09	0.05	0.14	99.16	2.18	99.79
		0.11	0.20	99.67	1.93	
		0.19	0.28	100.55	2.15	

2.3.3 黄芪赤风汤主要成分的含量测定

取黄芪赤风汤烘干粉 10 批,按照“2.1.2”及“2.2.2”项下方法制备溶液,按照“2.1.1”和“2.2.1”项下色谱条件进样测试。计算出 10 批供试品溶液中测试成分的平均含量。结果见表 9。对比《中华人民共和国药典》2020 年版中标准,各测试成分均符合标准。

表9 黄芪赤风汤测试成分含量

分析物	测试成分平均含量 (mg/g)
芍药内酯苷	9.58±1.70
芍药苷	8.36±0.78
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.77±0.11
芒柄花苷	0.16±0.06
毛蕊异黄酮	0.50±0.06
芒柄花素	0.25±0.05
黄芪甲苷	0.30±0.10

3 讨论

本研究通过对不同产地的黄芪赤风汤药材随机组合建立 10 批供试品溶液,运用 HPLC 法分析成分,对主要药效成分进行含量测定,以期为

黄芪赤风汤的质量标准提供一定的实验基础。

3.1 供试品溶液制备及色谱条件的选择

通过考察比较各种提取溶剂,及考虑实际生产过程成本,拟采用水提取,烘干制粉。供试品溶液制备时,针对紫外可见分光光度计与蒸发光散射原理不同采取不同的供试品溶液制备方法。

色谱条件选择:本研究色谱条件拟定分为基于 HPLC-PDA 法和 HPLC-ELSD 法两种。经实际研究,二者均采用 Diamonsil C₁₈ (2) 色谱柱 (4.6mm×250mm, 5μm)。基于前者时,采用梯度洗脱程序进行成分测定。同时,紫外光谱下,对比 230、235、240、250、251nm 等检测波长下的指纹图谱,图谱现实检测波长为 251nm 时所能展现内容最多,且各峰分离较好,图谱清晰,故选择波长 251nm 为最终检测波长。研究组分别考察流动相为乙腈和水;乙腈和 0.05%甲酸水;0.05%甲酸水和 5%四氢呋喃-95%乙腈图谱分离状况,确定采用 0.05%甲酸水和 5%四氢呋喃-95%乙腈为流动相。对比 10、20、30μL 不同进样量下图谱,图谱无较大区别,选择进样量为 10μL。比较不同柱温,选择柱温为 25℃。流量确定为 1mL/min。黄芪甲苷仅在紫外末端有微弱吸收,采用紫外检

测器对结果影响较大, 故而选择蒸发光散射检测器。基于 HPLC-ELSD 法时, 仍然使用梯度洗脱程序。对比 23、25、30℃ 不同柱温后, 确定柱温为 30℃。流动相拟定为 0.05% 甲酸水和 5% 四氢呋喃 95% 乙腈。比较 10、20、30 μ L 不同进样量下图谱, 选择进样量为 20 μ L, 流量为 1 mL/min。经过测试, 在此色谱条件下得到的指纹图谱, 图谱峰分离良好, 图谱图像稳定。

3.2 图谱分析及含量测定

在 HPLC-PDA 方法检测下, 10 批供试品溶液其相似度均在 0.967 以上, 标记出 16 个共有峰; HPLC-ELSD 方法检测下, 10 批供试品溶液相似度均在 0.878 以上, 标记出 10 个共有峰。说明该 10 批药材差异度小, 质量稳定。聚类分析结果显示, 10 批供试品溶液的分类与药材产地有一定关系, 且与黄芪、赤芍产地关系更为紧密, 据此选择芍药内酯苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素以及黄芪甲苷 7 种成分进行含量测定。因目前还未有该方的含量测定标准, 故采用的是方中药物在《中华人民共和国药典》(2020 年版) 中含量标准。根据线性回归方程分析, 黄芪赤风汤各成分在各自的进样量范围中, 与峰面积的线性关系良好。通过对 10 批样品成分含量计算, 结果表示黄芪赤风汤中的各地药材在地域上存在差异, 但均符合《中华人民共和国药典》标准, 其对具体药效的影响, 需要进一步探究。

4 结语

综上所述, 上文条件下得到的黄芪赤风汤指纹图谱稳定, 信息较为完整, 含量测定方式简便。所建立的研究方法高效稳定、重复性良好, 结果可靠, 可为黄芪赤风汤的质量标准制定提供一定参考价值。

参考文献

[1] 陈吉全. 庞景三教授运用黄芪赤风汤治病经验[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(9): 2639-2641.

[2] 孙闯, 李丹, 陈晖, 等. 孙冰教授应用黄芪赤风汤经验举隅[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2019, 36(6): 635-636.

[3] 刘舒毓, 王秋月, 刘树民. 黄芪赤风汤对脑梗死大鼠模型的治疗作用及对脑组织 ZO-1、Claudin-5、P-gp、MRP1 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(6): 65.

[4] 王允亮. 基于导师临床经验的中医药治疗慢性肾脏病蛋白尿的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.

[5] 王如梦. 加味黄芪赤风汤对 IgA 肾病患者蛋白尿及尿 TGF- β 1、MCP-1 的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.

[6] CHANG M Y, YANG B, LI L S, et al. Modified Huangqi Chifeng Decoction Attenuates Proteinuria by Reducing Podocyte Injury in a Rat Model of Immunoglobulin a Nephropathy[J]. Front Pharmacol, 2021, 26 (12): 714584.

[7] 李琼. 脓毒症弥散性血管内凝血的中医证型分析及相关因素的回顾性研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.

[8] 王志, 刘洋, 袁波. HPLC 法同时测定黄芪桂枝五物汤中 6 种有效成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(7): 791-797.

[9] 岳显文, 鲍慧玮, 朱跃亚, 等. 白城产防风中 3 种活性成分含量测定[J]. 人参研究, 2021, 33(4): 33-35.

[10] 王秋月, 刘舒毓, 刘树民. 黄芪赤风汤的提取工艺研究[J]. 华西药学杂志, 2022, 37(3): 311-314.

[11] 胡晨泽. 养心氏片 HPLC-ELSD 指纹图谱的建立及 6 个成分的含量测定[J]. 中国药师, 2022, 25(6): 1121-1125.

[12] 杜茂波, 张敏, 沈硕, 等. 黄芪中黄芪甲苷含量测定的新方法探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 132-137.

[13] 李婷, 程显隆, 王郡瑶, 等. HPLC-ELSD 法同时测定芪蛭通络胶囊中 2 个皂苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(4): 720-726.

[14] 陈勇, 杨欢. 黄芪甲苷在液体制剂中含量测定优化方法的探索[J]. 中国药物评价, 2022, 39(2): 122-124.

[15] WANG C J, HE F, HUANG Y F, et al. Discovery of chemical markers for identifying species, growth mode and production area of Astragali Radix by using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry [J]. Phytomedicine, 2020, 67: 153155.

[16] 曲别军长, 俸明康, 张绍山, 等. 基于多指标成分评价川西高原野生川赤芍的质量[J]. 中草药, 2022, 53(18): 5842-5850.

[17] KAFLE B, BAAK J, BREDE C. Quantification by LC-MS/MS of astragaloside IV and isoflavones in Astragali radix can be more accurate by using standard addition [J]. Phytochem Analysis, 2021, 32 (4): 466-473.

[18] CAO Q W, DU J, LUO J P, et al. Optimization of determination methods of astragaloside IV and analysis of contents of astragaloside IV in different origin and grade [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44 (13): 2813-2819.

基于 BMSCs 淫羊藿 - 仙茅 - 巴戟天角药 抗骨质疏松药效物质提取工艺研究

郭辰, 王晓迪

辽宁中医药大学附属二院, 辽宁沈阳, 110847

摘要: **目的** 筛选淫羊藿-仙茅-巴戟天角药抗骨质疏松药效物质的最佳提取工艺。**方法** 采用正交设计, 选取提取时间、料液比、乙醇浓度为考察因素, 以 BMSCs 细胞增殖率结合淫羊藿苷、总黄酮含量为考察指标, 筛选淫羊藿-仙茅-巴戟天角药抗骨质疏松药效物质的最佳提取工艺, 并对最佳提取条件进行验证。**结果** 兼顾生产效率和节约能源, 优选出淫羊藿-仙茅-巴戟天角药药效物质的最佳提取条件为提取时间 1.5h, 乙醇浓度 55%, 溶剂用量 10 倍。验证实验结果 BMSCs 细胞增殖率、淫羊藿苷及总黄酮含量与工艺考察结果非常接近。**结论** 该方法在保证淫羊藿-仙茅-巴戟天角药治疗骨质疏松的药效基础上, 结合淫羊藿苷及总黄酮含量进行综合评价, 优化提取工艺, 使得实验结果更科学合理。

关键词: 淫羊藿-仙茅-巴戟天; 角药; BMSCs; 骨质疏松症; 正交设计; 提取工艺

世界卫生组织定义骨质疏松症(osteoporosis, OP)为一种全身骨骼疾病, 以骨量低、骨组织微结构破坏, 骨脆性增加, 易发生骨折为主要特征的代谢性疾病。为世界范围常见的骨骼疾病之一。在我国绝经期女性约 30%患有骨质疏松症, 60 岁以上女性发病率约为 30%~50%, 老年男性约 20%~30%, 因此, 骨质疏松症已成为我国面临的重要公共卫生问题^[1]。

骨质疏松症属于中医“骨痿”范畴, 肾“主骨, 生髓”, 从肾论治为中医治疗骨质疏松症常用治法, 而淫羊藿、仙茅、巴戟天等均为补肾健骨常用中药。

淫羊藿、仙茅补肾壮阳, 助命门而调冲任, 辅以辛而微温之巴戟天, 温助肾阳, 强筋骨, 助肾添精, 柔而不燥, 以助二仙温养之力, 三药呈三足鼎立, 互为犄角, 称为角药, 属于对药范畴^[2]。《景岳全书》有记载, 此角药与熟地、枸杞、肉苁蓉等合用, 以补肾助阳, 治疗阳痿等疾病^[3]。淫羊藿-仙茅-巴戟天抗骨质疏松主要活性成分为淫羊藿苷等黄酮类化合物, 以及仙茅苷、水晶兰苷等, 以上成分可促进成骨转化, 抑制破骨细胞生成, 改善骨微结构, 从而发挥抗骨质疏松作用^[4-7]。

本实验通过正交实验设计, 以体外药效试验 BMSCs 细胞增殖率、淫羊藿苷及总黄酮含量为考察指标, 对淫羊藿-仙茅-巴戟天角药提取工艺进

行筛选, 以期筛选出淫羊藿-仙茅-巴戟天角药最佳提取工艺。

1 材料

1.1 药品与试剂

淫羊藿(Epimedium brevicornu Maxim.)、仙茅(Curculigo orchoides Gaertn.)、巴戟天(Morinda officinalis How)均购于东北大药房, 批号分别为 2301022、2011163、2203292。经辽宁中医药大学李峰教授鉴定, 符合 2020 年版《中华人民共和国药典》相关要求。芦丁对照品、淫羊藿苷对照品(江苏永健医药科技有限公司)批号分别为 103082、202112; 乙腈(美国 Fisher 公司); 水为娃哈哈纯净水; 其他试剂为分析纯; 胰蛋白酶、胎牛血清(赛业生物科技有限公司); 培养液(上海源培生物科技有限公司); PBS 缓冲液、DMSO(HyClone 公司)。

1.2 实验细胞

大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)(购自广州赛业有限公司), 批号: 090405B01。

1.3 仪器

ZHSY-50S 型振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司); SKM 型数显恒温电热套(山东鄄城华鲁电热仪器有限公司); BSA224S-CW 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司); UV-1200 紫外可见分光光度计(上海美析仪器有限公

司); 高效液相色谱仪(美国 Agilent); 0.45 μm 微孔滤膜(美国 Millipore); HERA cell 150i 型 CO_2 培养箱、1281 cell 型超净工作台(美国 Thermo); IX71 型倒置相差显微镜(日本 Olympus); Multiskan Fc 型酶标仪(赛默飞世尔上海仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 淫羊藿-仙茅-巴戟天角药总黄酮含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备

用电子分析天平精密称取芦丁对照品适量, 用甲醇充分溶解稀释成质量浓度为 $0.38\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 备用。

2.1.2 芦丁标准曲线的建立

精密吸取芦丁对照品溶液 0.25、0.5、1.0、2.0、2.5、3.0mL, 分别置于 25mL 容量瓶中, 加 1mL8% NaNO_2 , 摇匀后放置 6min, 加 1mL8% $\text{AL}(\text{NO}_3)_3$, 摇匀后放置 6min, 加 10mL10% NaOH , 加甲醇定容至刻度。摇匀, 放置 15min。以甲醇溶液为空白参比, 在 510nm 波长处进行检测, 以芦丁含量为横坐标 (X), 吸光度为纵坐标 (A) 进行回归, 得方程 $A=11.082X+0.115$ ($r=0.9991$)。结果显示, 芦丁在 $0.0038\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\sim 0.0456\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与吸光度 A 呈良好线性关系。见图 1。

2.2 淫羊藿-仙茅-巴戟天角药淫羊藿苷含量的测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6mm \times 250mm, 5 μm); 检测波长: 270nm; 柱温 30 $^\circ\text{C}$; 流速 $1.0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 流动相乙腈 (A) : 水 (B) =35% : 65%。

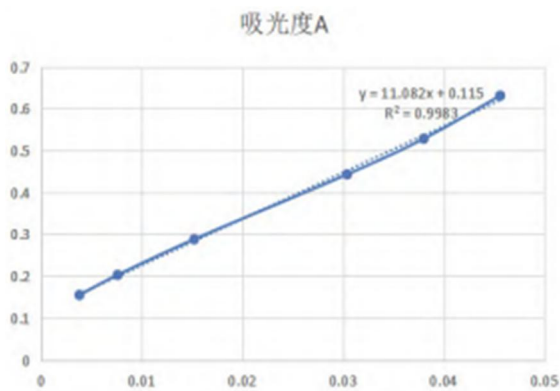


图 1 芦丁标准曲线

2.2.2 对照品溶液的制备

取淫羊藿苷对照品适量, 用电子分析天平精密称, 用甲醇充分溶解并稀释后, 制备成质量浓度为 $0.716\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 备用。

2.2.3 淫羊藿苷标准曲线的建立

根据预实验所得出的数据, 我们将淫羊藿苷对照品原液依次稀释 2、4、8、10、15、20 倍得到系列淫羊藿苷对照品溶液, 其浓度依次为 0.358、0.179、0.0895、0.0716、0.0477、0.0358 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。精密吸取对照品溶液 $5.0\mu\text{L}$, 注入液相色谱仪中, 记录色谱峰面积。以进样量 X(μg) 为横坐标, 色谱峰面积 Y 为纵坐标经线性回归, 得回归方程为: $Y=1185.5X+173.73$ ($r=0.9995$)。结果表明, 淫羊藿苷在 0.179~1.79 μg 范围内与色谱峰面积呈良好线性关系。见图 2。

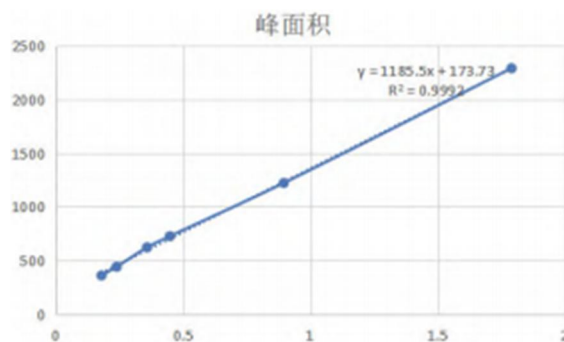


图 2 淫羊藿苷标准曲线图

2.3 BMSCs 的培养及增殖率检测

2.3.1 细胞培养

BMSCs 按细胞贴壁培养方法, 接种于含有 10% 胎牛血清培养液的培养基中, 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、湿度为 70%~80% 的条件下进行培养。隔 2~3d 换液、传代, 取对数期细胞做实验。

2.3.2 MTT 法检测细胞增殖率

取对数期生长的 BMSCs 细胞, 细胞计数后调整其浓度为 $(5\sim 10)\times 10^4/\text{mL}$ 。每孔加入 $150\mu\text{L}$ 细胞悬液, 接种于 96 孔板, 待细胞生长至 70% 融合度时, 分别标记 24、48、72h, 于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、湿度为 70%~80% 的条件下继续培养 24h 后, 实验组加入药液 $200\mu\text{L}$, 空白对照组加入相同体积的培养液, 继续培养至预定时间。用酶标仪在 560nm 处进行检测, 测定吸光度 (OD)。计算药物对细胞的增殖率, 细胞增殖率 = (实验组 OD 值 / 对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

2.4 淫羊藿-仙茅-巴戟天角药总黄酮提取工艺考察

2.4.1 正交试验设计

淫羊藿-仙茅-巴戟天角药 27g, 即淫羊藿、仙茅、巴戟天各 9g。根据预试验结果确定了对淫羊藿苷及总黄酮含量影响显著的 3 个主要因素, 即乙醇浓度 (A)、提取时间 (B)、料液比 (C) 为考察因素, 每个因素依次设计 3 个水平, 按照 L₉ (3⁴) 设计正交试验。因素水平见表。按含量测定方法, 测定 9 份样品中淫羊藿苷含量及总黄酮含量; 另将 9 份样品配制成浓度为 0.001g(生药)·mL⁻¹ 的含药培养液, 作用于 BMSCs 并测得细胞增殖率。见表 1。

表 1 因素水平

水平	因素		
	A. 乙醇浓度 /%	B. 时间 /h	C. 料液比
1	35	1	1 : 10
2	55	1.5	1 : 15
3	75	2	1 : 20

2.4.2 正交试验结果及方差分析

以 MTT 增殖率为基础, 结合淫羊藿苷含量及总黄酮含量综合分析正交试验结果及方差分析。药效学指标 MTT 增殖率权重占比 60%, 淫羊藿苷含量及总黄酮含量权重占比均为 20%, 采用归一化法按各指标不同权重计算综合评分。结果见表 2—表 3。

表 2 正交实验设计及直观分析结果

序号	A	B	C	D	总黄酮含量 / μg	淫羊藿苷含量 /ng	MTT 增殖率 /%	综合评分
1	1	1	1	1	18.01	486.21	80.76	76.44
2	1	2	2	2	27.07	579.31	85.82	86.45
3	1	3	3	3	30.45	613.21	88.14	90.46
4	2	1	2	3	40.61	498.62	79.72	85.99
5	2	2	3	1	42.63	651.02	85.55	95.09
6	2	3	1	2	34.51	675.71	79.86	88.35
7	3	1	3	2	34.92	641.09	66.85	78.71
8	3	2	1	3	31.53	572.81	76.05	81.58
9	3	3	2	1	45.61	716.82	67.62	86.03
		K ₁		84.450	80.380	82.123	85.853	
		K ₂		89.810	87.707	86.157	84.503	
		K ₃		82.107	88.280	88.087	86.010	
		R		7.703	7.900	5.964	1.507	

表 3 方差分析

因素	综合评分				
	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
A	93.562	2	22.726	19.000	P<0.05
B	116.419	2	28.278	19.000	P<0.05
C	55.554	2	13.494	19.000	—
Error	4.117	2	1	19.000	—

由直观分析及方差分析结果可知, 影响提取工艺的因素顺序为 B>A>C, 其中乙醇浓度 (A)、提取时间 (B) 均有显著影响 (P<0.05), 为主要影响因素。溶剂用量 (C) 无显著影响。兼顾生产效率和节约能源, 优选工艺条件为 A₂B₂C₁, 即 10 倍量 55%乙醇, 提取 1.5h。

2.4.3 验证实验

以优选的提取条件进行验证实验, 结果 MTT 增殖率的平均值为 84.85%, 淫羊藿苷含量平均值为 641.3ng, 总黄酮含量平均值 41.8 μg , 与正交试验结果非常接近。

3 讨论

中医学认为, 肾其充在骨, 可藏精生髓。肾精为肾阳生化之源, 天癸随着年龄增长逐渐竭绝, 肾阳亦随肾精逐渐亏虚, 肾阳无法温煦, 气血推动无力, 骨络失于濡养, 骨髓化生不足, 骨量减少, 而致 OP。《医方考》记载: “腰脊不举, 骨枯髓减者, 枯涸之极也。肾主骨, 故曰骨痿。” 肾虚为骨痿的主要病因。骨痿有多种中医辨证分型, 肾阳虚型为临床常见证型。肾阳主温煦机体, 肾阳亏虚, 血寒凝滞, 导致脉络痹阻, 发而为病, 治疗当以补肾阳, 强筋骨为主。淫羊藿擅温补命门之火; 仙茅, 为少数的有毒补益药, 长于闭精, 短于动火, 使精不易泄, 二者配伍相得益彰。巴戟天, 既益元阳, 复填阴水, 亦入心经, 生脾胃之气, 脾为气血生化之源, 运化水谷精微, 使筋骨得以濡养^[8]。三药为温肾壮阳强筋健骨常用药。“淫羊藿-仙茅-巴戟天” 角药现代临床多有应用, 如张伯讷教授在三药基础上配伍当归、黄柏、知母组成二仙汤, 成为治疗女性围绝经期病证的名方, 用于治疗闭经、早衰、绝经后骨质疏松症等^[9-10]。仝小林院士^[11]运用此角药

治疗心肾阳衰型慢性疾病。

骨髓间充质干细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) 是存在于骨髓中的多向分化潜能干细胞, 具有自我增殖、多向分化等作用^[12]。BMSCs 的成脂分化与成骨分化不平衡是形成骨质疏松症的重要原因之一, 所以在筛选治疗骨质疏松症药物方面, 研究其对 BMSCs 的增殖、成骨及成脂分化等的影响, 已成为目前常用的研究思路。大量文献报道表明, “淫羊藿-仙茅-巴戟天”角药中各组成药物, 可以通过激活成骨相关信号通路及调节相关基因的表达, 进而诱导 BMSCs 增殖、迁移及成骨分化以防治骨质疏松症。如张锦明等^[13]通过灌胃给药骨质疏松小鼠淫羊藿苷, 得知其能够促进小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化及抑制成脂分化指标的表达, 改善骨髓微环境, 促进骨形成, 显著改善骨质疏松症状。也有实验证明淫羊藿苷能够促进大鼠脂肪干细胞成骨分化, 并抑制成脂分化^[14]。邓宇等^[15]研究发现淫羊藿苷通过提高 Notch1 受体及相关蛋白表达量, 激活 Notch 信号通路, 促进 BMSCs 增殖分化。另有研究发现淫羊藿苷能抑制破骨细胞分化从而减少破骨细胞数量, 减少骨吸收产生的陷窝数, 有效抑制骨吸收^[16]。王勤俭等^[17]通过体外培养 BMSCs 诱导成骨分化, 发现仙茅苷达到一定浓度可显著提高 BMSCs 增殖活力, 且仙茅苷组细胞 ALP 活性明显上调, 自噬体数量增加, 并推测其作用机制可能与自噬活性相关。仙茅苷黑酚类酚苷为仙茅另一有效成分, 研究发现其能够增强大鼠骨密度并抑制破骨细胞 F-Actin 环形成, 减缓骨丢失^[18]。毛竹君等^[19]研究发现淫羊藿-仙茅药对能下调或维持 miR-144 水平, 增加 IRS1 mRNA 和蛋白表达, 提高高糖介导的成骨细胞活性, 促进增殖。同时淫羊藿-仙茅药对可协同调节糖代谢, 提高尿液中牛磺酸和谷氨酸含量, 从而促进成骨形成和破骨细胞凋亡, 治疗骨丢失^[20]。赖满香等^[21]通过分离培养 SD 大鼠 BMSCs, 并筛选巴戟天多糖含药血清最佳作用浓度进行实验, 实验发现巴戟天多糖含药血清能够增强碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性, 上调 Cbfa-1 mRNA 水平, 促进 BMSCs 成骨分化。还有实验将绝经后骨质疏松大鼠作为研究对象, 通过研究巴戟天寡糖对其血清骨转化相关指标和骨组织结构的影响, 发现巴戟天寡糖组大鼠 BALP、PINP 水平显著上调, 并且 OPG 蛋白和 mRNA 水平明显上调, RANKL 蛋白及 mRNA 水平明显下调, 大鼠骨量增加, 骨组织微结构得以明显改善,

以发挥抗骨质疏松的作用^[22]。

通过文献查阅, 得知“淫羊藿-仙茅-巴戟天”角药中主要药效组分包括黄酮类、酚苷类、生物碱类、糖类等, 抗骨质疏松药效物质主要为黄酮类成分淫羊藿苷、淫羊藿次苷、淫羊藿总黄酮等, 其中淫羊藿总黄酮可与西药合用抗 OP, 如骨营养剂或戊酸雌二醇等^[23-25]; 酚苷类仙茅苷、苔黑酚类酚苷等^[26-27], 以及巴戟天多糖、巴戟天寡糖、巴戟天总蒽醌等^[28-29]。仙茅还可分离出仙茅多糖, 有实验团队将其纯化成新型多糖 COP70-3 等, 体内实验证明 COP70-3 能促进骨强度和骨韧性的恢复, 从而缓解骨质疏松症状, 后续体外实验发现仙茅多糖能上调原代成骨细胞中 ALP 表达水平, 提高成骨细胞矿化速率^[30-31]。有研究发现巴戟天提取物能提高去卵巢骨质疏松大鼠骨密度和骨钙含量, 促进钙沉积, 有效阻止骨丢失^[32]。角药中的主要化学成分淫羊藿苷和仙茅苷有协同抑制破骨细胞骨架构建的作用, 且淫羊藿可有效制衡仙茅苷毒性^[33-34]。但目前针对此角药提取工艺方面的报道较少。因复方中化学成分复杂且相互影响, 药效物质组分的含量并不等同于药物疗效。提取工艺考察时若仅考察药效物质组分的含量, 则所筛选的提取工艺并不一定能使提取物达到最佳药效。因此本实验通过正交设计试验, 以药效学效应指标 BMSCs 细胞增殖率为主, 结合药效物质组分含量进行综合评价, 筛选出了“淫羊藿-仙茅-巴戟天”角药在优先保证其抗骨质疏松效用前提下的药效组分最佳提取工艺为提取时间 1.5h, 乙醇浓度 55%, 溶剂用量 10 倍。希望这一实验结果, 能够为“淫羊藿-仙茅-巴戟天”角药的临床应用及进一步深入研究提供科学依据。

参考文献

- [1] 马远征, 王以朋, 刘强, 等. 中国老年骨质疏松症诊疗指南(2018)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(12): 1541-1567.
- [2] 杨发贵. “角药”启微[J]. 河南中医, 1999(2): 55.
- [3] 张介宾. 景岳全书下[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959.
- [4] 刘佩, 梁润英. 中医药防治原发性骨质疏松症研究进展[J]. 中医学报, 2022, 37(10): 2122-2130.
- [5] 郭宏刚, 顾玉彪, 谢兴文, 等. 仙茅苷防治骨质疏松症相关作用机制的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(2): 200-202.

- [6] 王宥涵, 贺宝荣. 水晶兰苷对破骨细胞生成的抑制作用[J]. 中国药业, 2020, 29(9): 83-86.
- [7] ZHANG Z, ZHANG Q Y, YANG H, et al. Monotropein isolated from the roots of *Morinda officinalis* increases osteoblastic bone formation and prevents bone loss in ovariectomized mice[J]. *Fitoterapia*, 2016, 110: 166-172.
- [8] 陈士铎. 本草新编[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2011: 5, 68-69, 120-121, 160-161.
- [9] 王彩虹, 杨璐, 陈文霞, 等. 二仙汤合右归汤联合序贯疗法对肾虚型卵巢早衰患者的临床疗效[J]. 中成药, 2020, 42(7): 1760-1764.
- [10] 鞠洋, 邬波, 曲宁宁. 二仙汤治疗绝经后骨质疏松症临床效果观察[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(3): 199-202.
- [11] 方心怡, 苗润宇, 王涵. 全小林运用仙茅、淫羊藿、巴戟天助阳经验[J]. 吉林中医药, 2021, 41(2): 173-175.
- [12] 曹天媛, 倪志明, 刘新宇, 等. 中医药调控 BMSCs 成骨分化防治骨质疏松症的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(11): 1669-1674.
- [13] 张锦明, 田滢舟, 赵玲, 等. 淫羊藿苷促进骨髓间充质干细胞成骨分化缓解小鼠骨质疏松的机制[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(19): 2991-2996.
- [14] 吴梅剑宗, 秦佳佳, 刘海全. 不同浓度淫羊藿苷对大鼠脂肪干细胞成骨分化相关因子的体外研究[J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(12): 1249-1256.
- [15] 邓宇, 陈廖斌. 淫羊藿苷通过激活 Notch 信号通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的实验研究[J]. 中医学报, 2017, 32(12): 2393-2398, 2403.
- [16] 李伟娟, 谢保平, 石雨颖, 等. 从 ER α /RANK 通路探讨淫羊藿苷抑制破骨细胞分化作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 121-126.
- [17] 王勤俭, 张睿昕, 张攀, 等. 仙茅苷调节 lncRNAMEG3/miR-181a-5p 通路对骨质疏松大鼠成骨细胞自噬的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(10): 1409-1414, 1465.
- [18] 刘梦琴, 张奇, 朱露琳, 等. 仙茅苷黑酚类酚苷对去卵巢大鼠骨代谢和破骨细胞形成分化的影响[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(2): 99-107.
- [19] 毛竹君, 柴可夫. 淫羊藿-仙茅药对调控 miRNA-144 保护高糖介导成骨细胞的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(3): 965-970.
- [20] 蒋益萍, 夏天爽, 张志伟, 等. 淫羊藿和仙茅有效部位配伍防治骨质疏松的代谢组学研究[J]. 药学服务与研究, 2018, 18(5): 326-331.
- [21] 赖满香, 冯娟, 阮志燕, 等. 巴戟天多糖含药血清对骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 Cbfa-1 mRNA 表达的影响[J]. 中国医药科学, 2017, 7(15): 27-30.
- [22] 庄文德, 陈浩彦, 陈振, 等. 巴戟天寡糖对绝经后骨质疏松大鼠血清骨转化指标和骨组织结构的影响及其机制研究[J]. 环球中医药, 2023, 16(5): 838-845.
- [23] 李志文, 刘元禄, 杨永菊, 等. 补肾阳中药有效成分治疗骨质疏松症作用机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(10): 135-141.
- [24] 张冬雪, 曲帅, 王明月, 等. 淫羊藿总黄酮联合骨营养剂抗骨质疏松作用探讨[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(12): 1797-1804.
- [25] 肖平, 侯平, 林正坚, 等. 淫羊藿总黄酮和戊酸雌二醇对骨质疏松症大鼠 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(6): 818-824.
- [26] 周芳, 姚萌, 吴倩, 等. 仙茅的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(8): 2238-2247.
- [27] 刘梦琴, 张奇, 朱露琳, 等. 仙茅苷黑酚类酚苷对去卵巢大鼠骨代谢和破骨细胞形成分化的影响[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(2): 99-107.
- [28] 周妍妍, 周晓洁, 闫博文, 等. 巴戟天化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(10): 1-5.
- [29] 王洪英, 毛敏, 齐小雪, 等. 巴戟天总蒽醌对去卵巢大鼠骨质疏松的影响[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(A2): 29-30, 33.
- [30] WANG X, ZHANG M, ZHANG D, et al. Structural elucidation and anti-osteoporosis activities of polysaccharides obtained from *Curculigo orchoides* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 203: 292-301.
- [31] WANG X, ZHANG M, ZHANG D, et al. An O-acetyl-glucomannan from the rhizomes of *Curculigo orchoides*: Structural characterization and anti-osteoporosis activity in vitro [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 174: 48-56.
- [32] 胡英勇, 尹耀庭, 刘月平. 巴戟天提取物对去卵巢大鼠骨质疏松症的防治作用[J]. 湖南中医杂志, 2019, 35(11): 139-141.
- [33] 郭元晖, 薛黎明, 聂燕, 等. 淫羊藿苷和仙茅苷协同抑制破骨细胞的形成、分化和骨吸收功能[J]. 药学实践杂志, 2013, 31(4): 262-266.
- [34] 朱芳芳, 杨明华, 陈婉姬, 等. 不同配伍比例仙茅-淫羊藿药对的毒性与含量相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 175-177.

低共熔溶剂提取山里红多糖工艺优化研究

颜若铭, 王子轩, 曾 怡

黑龙江中医药学院, 黑龙江哈尔滨, 150040

摘要: 目的 优化超声辅助低共熔溶剂提取山里红总多糖工艺并考察其抗氧化活性。方法 以多糖含量为指标, 低共熔溶剂种类、摩尔比、料液比、含水量和超声时间为影响因素, 采用超声单因素分析和响应面方法优化低共熔溶剂提取山里红总多糖的工艺参数, 并以 DPPH 自由基和·OH 自由基清除能力对其抗氧化活性进行评价。

结果 山里红总多糖成分的最佳提取工艺: 以氯化胆碱-丙二醇为低共熔溶剂, 摩尔比为 1:3, 料液比为 1:20, 含水量为 20.12%, 超声时间为 38.98min。在此工艺下, 山里红总多糖含量可达到 (523.49±8.79) mg/g。在抗氧化实验中, 山里红多糖对 DPPH 自由基清除作用的 IC₅₀ 为 1.33, 对·OH 自由基清除的 IC₅₀ 为 1.23。**结论** 超声辅助低共熔溶剂优化的多糖提取工艺提取率高且工艺稳定, 山里红多糖具有较好的抗氧化作用。

关键词: 山里红; 总多糖; 低共熔溶剂; 响应面优化实验

山里红为蔷薇科山楂属山里红 (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br.) 的干燥成熟果实, 主要分布于我国东北地区, 具有消食健胃、行气散瘀和化浊降脂的功效, 有较高的药用和保健价值^[1-2]。近年的研究发现山里红具有显著的抗氧化作用, 但其研究主要围绕山里红总酚和总黄酮类成分, 山里红多糖类成分的抗氧化研究相对较少^[3]。多糖是自然界中存在的聚合度超过 10 个单糖的生物大分子, 广泛存在于植物体内。已报道的多糖提取方法多以水为溶剂, 采用水提醇沉方法提取的多糖往往出现水溶性杂质多、提取效率较低、消耗溶剂量大等缺点^[4-5]。本文首次采用一种由氢受体与氢供体按适当比例合成的新型绿色提取溶剂——低共熔溶剂 (deep eutectic solvent, DESs) 提取多糖。低共熔溶剂是指由一定化学计量比的氢键受体和氢键供体组合而成的两组分或三组分低共熔混合物, 已作为一种新型的绿色反应介质被广泛用于萃取分离、无机合成、有机合成和离子凝胶等领域, 具有成本低廉、易于制备、毒性低、能耗低、合成简单等优点^[6-7]。本实验采用超声辅助低共熔溶剂提取山里红多糖, 通过星点-响应面法优化提取工艺, 并对其体外抗氧化活性进行评价, 为将其开发为天然抗氧化剂以及充分利用野生资源提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

THC-20B 超声波提取设备 (济宁天华超声波

电子仪器有限公司); MS105 分析天平 (梅特勒-托利多国际贸易有限公司); DHG-9055104 电热恒温鼓风干燥箱 (上海道瀚实业有限公司); SynergyMX 酶联免疫检测仪 (上海光谱仪器有限公司); HJ-1 磁力加热搅拌器 (天津市滨海新区大港红杉实验设备厂)。

1.2 药材与试剂

山里红果实 (黑龙江省哈尔滨市, 批号 20221024); D-无水葡萄糖 (含量以 99.8%计, 中国食品药品检定研究院, 批号: 110833-201908); 氯化胆碱 (98%分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司, C805027); 甜菜碱 (99%超级纯, 上海麦克林生化科技有限公司, 批号: B802317); 浓硫酸 (98%分析纯, 天津市致远化学试剂有限公司, 批号: 20220302); 异丙醇 (天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号: 20100629); 1, 2-丙二醇 (批号: P815581); 乳酸 (批号: D830784); 乙二醇 (批号: E808735); 乙醇 (天津市东丽区新中村, 批号: 20220508); 甘油 (天津市天力化学试剂有限公司, 批号: 20220702); 水杨酸 (天津巴斯夫化工有限公司, 批号: 20200915); DPPH (Biotopped, 批号: 20220416); 乙酸 (天津市富宇精细化工有限公司, 批号: 20210308); 以上试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 样品制备

取山里红药材 (过 60 目筛) 0.1g, 精密称量, 加入适量的 DESs 溶液, 超声提取, 离心后备用。

2.2 标准曲线建立

采用苯酚-硫酸法测定多糖含量,取葡萄糖标准品 2.5mg,加水溶解,定容,振荡摇匀得 0.10mg/mL 的对照品溶液。精密移取 20、40、60、80、120、200 μ L 于玻璃试管中,分别加蒸馏水溶液稀释至 200 μ L,再依次加入 900 μ L 显色液(5%苯酚溶液与 98%浓硫酸混合制成,体积比为 2:7),经混匀后 80 $^{\circ}$ C 水浴锅中水浴加热 10min,然后置冷水浴 5min,于波长 490nm 处用酶标仪检测吸光度。以吸光度为纵坐标,以标准品浓度为横坐标绘制标准曲线。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验

精密称取山里红 1 份,按照“2.1”项下方法制备样品溶液,按“2.2”项下方法分别连续测定 6 次吸光度,测定山里红多糖的吸光度并计算 RSD 值。

2.3.2 稳定性试验

精密称取山里红药材 1 份,分别在 0、0.5、1、1.5、2h 测定山里红多糖的吸光度并计算 RSD 值。

2.3.3 重复性试验

精密称取同一批山里红药材 6 份,按照“2.1”项下方法制备样品溶液,按“2.2”项下方法分别测定吸光度,测定山里红多糖的吸光度并计算 RSD 值。

2.4 山里红多糖含量测定

精密称定山里红药材适量,按照“2.2”项下多糖的标准曲线步骤进行实验,按以下公式计算,测定山里红多糖含量。

$$\text{总多糖含量} = (n \times C \times V) / m$$

其中 m 为山里红药材质量(g),C 为样品浓度(mg/mL),V 为样品体积(mL),n 为稀释倍数。根据实际测量值,将 C、V、m 和 n 的数值代入公式中,得山里红总多糖含量。

2.5 DESs 试剂筛选

选取氯化胆碱和甜菜碱为氢键受体,乙二醇、甘油、乳酸、异丙醇、丙二醇、甘油、乙酸 7 种物质为氢键供体,分别在摩尔比 1:3、料液比 1:25、含水量 20% 的条件下提取山里红总多糖成分,DESs 试剂不同组合及性状见表 1。

表 1 DESs 试剂不同组合及性状

溶剂序号	氢键受体	氢键供体	摩尔比例	外观与性状
1	甜菜碱	乙酸	1:3	无色透明澄清液体
2	甜菜碱	乙二醇	1:3	无色透明澄清液体
3	氯化胆碱	甘油	1:3	无色透明澄清液体
4	甜菜碱	甘油	1:3	无色透明澄清液体
5	氯化胆碱	异丙醇	1:3	无色透明澄清液体
6	甜菜碱	乳酸	1:3	浅黄色澄清液体
7	氯化胆碱	乙二醇	1:3	无色透明澄清液体
8	氯化胆碱	乙醇	1:3	无色透明澄清液体
9	氯化胆碱	1, 2- 丙二醇	1:3	无色透明澄清液体
10		水		无色透明澄清液体
11		50% 乙醇		无色透明澄清液体

2.6 单因素考察

采用超声提取法分别比较不同摩尔比(1:2、1:3、1:4、1:5 和 1:6)、不同料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25)、不同含水量(10%、20%、30%、40%、50%、60%) 和不同超声时间(10、20、30、40、50min) 下山里红总多糖含量,确定提取工艺参数。

2.7 响应曲面法优化

通过单因素实验可知,摩尔比、料液比、含水量和超声时间对抗氧化成分提取率均有不同程度的影响。本实验选取超声时间、料液比、DESs 溶剂

含水量为考察因素,利用 Design-Expert 8.06 软件,并且采用三因素三水平的 Box-Behnken 响应曲面进行实验设计,同时对数据进行分析,结果见表 2。

表 2 响应曲面法实验设计

水平	A. 含水量 /%	B. 料液比 / (g/mL)	C. 超声时间 /min
-1	10	1:15	20
0	20	1:20	40
1	30	1:25	60

2.8 多糖成分抗氧化研究

2.8.1 DPPH 自由基清除实验

取 2 份山里红多糖提取物样品溶液 30 μ L,一

份加入 170μL 乙醇溶液作为空白组，另一份样品加入同体积含 0.3mmol/L DPPH 的乙醇溶液，避光反应 30min 后，震荡混匀，于波长 517nm 处测定吸光度值。计算公式如下：

$$\text{DPPH 清除率}(\%) = \{1 - (A_1 - A_2) / A_0\} \times 100\%$$

式中： A_0 为乙醇与样品溶液的总吸光度值， A_1 为单加样品溶液的吸光度值， A_2 为 DPPH 和提取溶剂混合的吸光度值。

2.8.2 ·OH 自由基清除能力

山里红多糖提取物按顺序分别加入 6mmol/L 硫酸亚铁溶液、水杨酸-乙醇溶液各 0.2mL，再加入不同浓度的样品溶液 0.2mL，再加入 6mmol/L 的双氧水溶液 0.2mL，37℃ 水浴反应 1h，于波长 510nm 处测定混合物的吸光度值。

$$\cdot\text{OH 自由基清除率}(\%) = \{1 - (A_1 - A_2) / A_0\} \times 100\%$$

式中： A_1 为不同样品溶液的吸光度值， A_0 为空白组吸光度值， A_2 为样品本底吸光度值。

2.9 统计学分析

运用 GraphPad Prism 对实验结果进行统计学分析和作图，采用 Design-Expert 软件分析响应面数据。

3 结果

3.1 标准曲线绘制

回归方程为 $Y = 41.564X + 0.0828$ ， $R^2 = 0.999$ 。多糖质量在 0~0.10mg 范围内线性关系良好。

3.2 方法学考察结果

经测定山里红多糖的精密度 RSD 值为 0.74%，稳定性 RSD 值为 2.42%，重复性 RSD 值为 1.08%。

3.3 DESs 试剂筛选结果

由图 1 可知，不同组合 DESs 提取山里红总多糖含量比较，氯化胆碱-丙二醇提取率优于其他组合，其提取率为 50%乙醇的 2.51 倍，水的 2.19 倍，因此，最优 DESs 试剂组合为氯化胆碱-丙二醇。

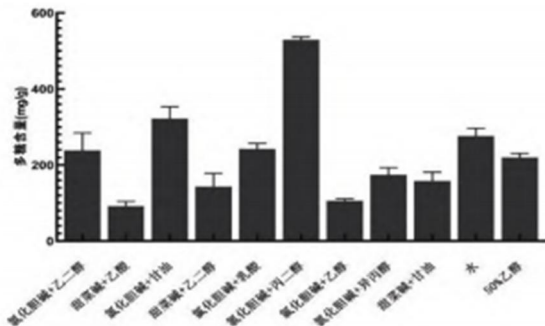


图 1 DESs 筛选结果

3.4 单因素最优提取条件结果

由图 2 可知，DESs 试剂摩尔比为 1：3、料液比为 1：20、含水量为 20%及超声时间为 50min 时提取的多糖含量最高，由此确定山里红多糖提取工艺参数。

3.5 响应曲面法实验结果

3.5.1 模型拟合与方差分析

表 3 模型拟合与方差分析

序 号	A. 含水 量 / %	B. 料液比 / (g/mL)	C. 超声时 间 / min	总多糖含量 / (mg/g) 实测值	预测值
1	10	0.06	40	393.61	384.44
2	30	0.06	40	327.31	312.16
3	10	0.04	40	304.91	320.06
4	30	0.04	40	392.06	401.22
5	10	0.05	20	458.85	447.34
6	30	0.05	20	444.06	438.55
7	10	0.05	60	407.88	413.39
8	30	0.05	60	419.56	431.07
9	20	0.06	20	339.90	360.56
10	20	0.04	20	388.13	384.47
11	20	0.06	60	347.76	351.41
12	20	0.04	60	372.86	352.19
13	20	0.05	40	528.41	534.93
14	20	0.05	40	530.68	534.93
15	20	0.05	40	503.19	534.93
16	20	0.05	40	529.19	534.93
17	20	0.05	40	525.47	534.93

根据表 3 结果，使用 Design-Expert8.0.6 程序进行回归分析，得到多糖含量的二次回归方程： $Y = 644.93 + 2.22A - 6.17B - 10.36C - 38.36AB + 6.62AC + 5.78BC - 110.02A^2 - 180.44B^2 - 102.33C^2$ 。其中，A、B、C 分别代表 3 个影响因素的水平，即含水量、料液比和超声时间。该方程模型可以预测在不同参数组合下的多糖提取率，通过改变不同的因素水平获得多糖提取率的最优值。

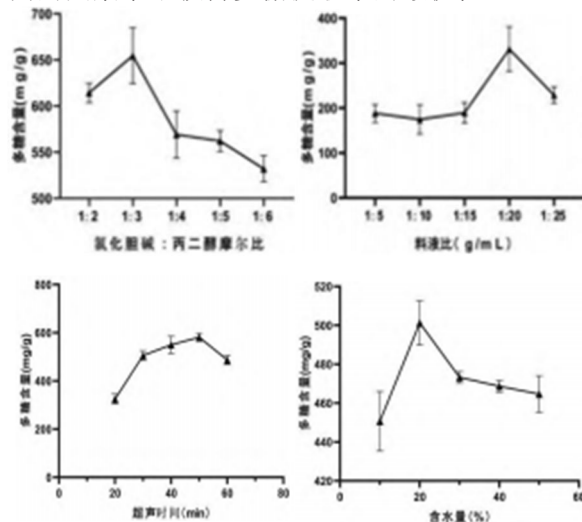


图2 摩尔比、料液比、含水量、超声时间对山里红多糖提取含量的影响

从表4可知,模型 $P < 0.05$,表明此模型差异存在统计学意义,相关系数为 $R^2 = 0.9816$,表明其理论误差和实验实际结果之间存在显著相关性。山里红总多糖的模型失拟项系数为 $R^2_{adj} = 0.9579$,说明该模型能解释 95.79%的响应值变化。而失拟项 F 值为 0.78,此差异并无统计学意义 ($P > 0.05$),表明此模型的拟合程度好,可用此模型预测山里

红多糖的最佳提取工艺。

3.5.2 响应曲面图分析

使用 Design-Expert 软件对数据进行分析,等高曲线表示各因素间相互作用的程度,椭圆代表相互影响能力,结果显示,3种因素对山里红总多糖提取率影响的顺序为 $A < B < C$,其中,对提取率影响最大的因素为超声时间,其次为料液比和含水量。见图3。

表4 总多糖回归方程模型方差分析结果

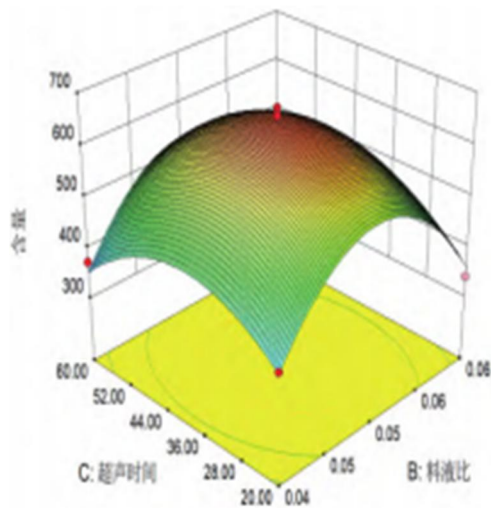
项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	差异
模型	65 291.53	9	29 358.98	41.47	<0.000 1	**
A	39.39	1	39.39	0.056	0.820 3	
B	304.80	1	304.80	0.43	0.532 7	
C	858.12	1	858.12	1.21	0.307 3	
AB	5 886.17	1	5 886.17	8.31	0.023 5	
AC	175.14	1	175.14	0.25	0.634 2	
BC	133.76	1	133.76	0.19	0.676 9	
A ²	50 961.81	1	50 961.81	71.98	<0.000 1	**
B ²	46 239.22	1	46 239.22	193.62	<0.000 1	*
C ²	44 086.36	1	44 086.36	3.71	<0.000 1	
残差	4 956.22	7	708.03			
失拟项	1 833.71	3	611.24	0.78	0.562 3	
纯误差	3 122.51	4	780.63			
总值	65 291.53	16				

注:*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$; $R^2 = 0.9816$, $R^2_{adj} = 0.9579$ 。

(523.49 ± 8.79) mg/g,理论值为 534.93mg/g,偏差为 2.3%。

3.7 山里红多糖抗氧化活性检测结果

本实验对最优工艺条件提取的山里红多糖样品进行自由基清除实验考察。实验结果显示,在 DPPH 自由基清除实验中山里红多糖提取物的 IC_{50} 为 1.33,在 $\cdot OH$ 自由基清除实验中山里红多糖提取物的 IC_{50} 为 1.23 (拟合曲线: DPPH 自由基清除实验: $Y = 79.518X - 55.841$, $R^2 = 0.9965$; $\cdot OH$ 自由基清除实验: $Y = 53.536X - 16.012$, $R^2 = 0.9995$, Y 为清除率, X 为多糖浓度)。见表 5。



3.6 山里红多糖成分提取方法验证工艺

经软件分析,山里红总多糖最佳提取工艺为料液比 1:20,含水量 20.12%,超声时间 38.98min。在此工艺下,山里红总多糖组分的含量为

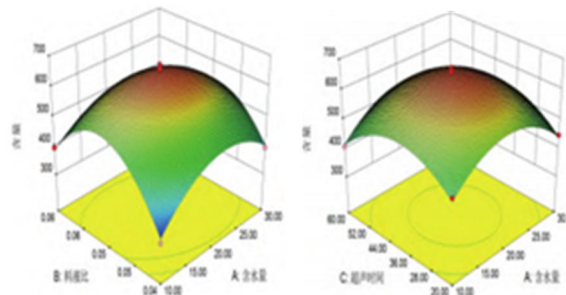


图3 不同因素对山里红多糖含量影响的响应曲

面图

表5 山里红多糖抗氧化作用结果

样品	浓度/(mg/mL)	多糖含量/(mg/g)	DPPH 自由基清除率 /%	·OH 自由基清除率 /%
1	0.87	58.16	14.56	30.26
2	1.12	74.78	31.32	44.42
3	1.57	104.69	69.68	67.87
4	2.35	157.05	89.71	87.68
5	7.85	523.49	93.59	96.79

4 讨论与结论

低共熔溶剂最早由 Abbott 等在 2003 年提出^[8], 因其具有良好的生物降解性和生物相容性等优点而备受关注^[9]。近年来, DESs 在分析、催化和有机合成等方面的应用逐渐广泛, 尤其是 DESs 被用于从各种植物材料中提取和分离生物活性化合物, 如酚酸、黄酮、生物碱和多糖等化学成分均能获得较高的提取效率^[10-11]。超声辅助萃取与 DESs 相结合是一种高效、绿色的天然产物萃取方法, 可为山里红多糖的绿色开发提供新方向^[12]。本研究采用超声辅助低共熔溶剂提取山里红多糖, 通过单因素和星点-响应面法优化提取工艺, 筛选结果显示, 氯化胆碱-丙二醇为最佳低共熔溶剂组合, 在优选的最佳提取工艺条件下, 提取的山里红多糖含量可达到 (523.49±8.79) mg/g。体外抗氧化实验表明, 山里红多糖具有较强的清除 DPPH 和·OH 自由基的活性, 本研究为山里红多糖的抗氧化作用机制研究及其大健康产品的开发提供参考。

参考文献

- [1] 罗猛, 胡骄阳, 宋卓悦, 等. 山里红总黄酮季节动态及其与气候因子相关性分析[J]. 植物研究, 2016, 36(3): 476-480.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 版(一部) [S]. 北京: 化学工业出版社, 2020: 33.
- [3] 王存堂, 李子钰, 张福娟, 等. 山楂属果实不同组织乙醇提取物的抗氧化成分及性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(16): 117-122.
- [4] 张慧慧, 李灿, 刘会平, 等. 肉桂多糖的提取纯化及体外抗氧化和降血糖活性分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(7): 15-24.
- [5] 王浩南, 吴雨蒙, 张永清, 等. 丹参与根部多糖抗氧化活性及其组成研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(11): 38-43.
- [6] 黄敏, 戴妙琪, 曾朝喜, 等. 天然低共熔溶剂在天然聚多糖加工中的应用研究进展[J]. 生物加工过程, 2023, 21(6): 608-615.
- [7] 刘伟, 王晓雨, 周玉溪, 等. 低共熔溶剂在植物多糖提取中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2023, 44(24): 1-11.
- [8] SHAHBAZ K, BAGH FSG, MJALLI FS. Prediction of refractive index and density of deep eutectic solvents using atomic contributions[J]. Fluid Phase Equilib, 2013, 354: 304-311.
- [9] ABBOTT AP, CAPPER G, DAVIES DL, et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures[J]. Chem Commun, 2003, 1: 70-71.
- [10] CAO J, YANG M, CAO FL. Tailor-made hydrophobic deep eutectic solvents for cleaner extraction of polyphenyl acetates from Ginkgo biloba leaves[J]. J Clean Prod, 2017, 152: 399-405.
- [11] NAM MW, ZHAO J, LEE MS. Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from Flos sophorae[J]. Green Chem, 2015, 17: 1718-1727.
- [12] 王玉, 程超, 张红妮, 等. 低共熔溶剂提取玉米花粉黄酮类化合物及其抗氧化性分析[J]. 食品科技, 2023, 48(6): 195-201.



智慧中医学

Intelligent Chinese Medicine

编委会

主编

洪子辰

副主编

王 强 刘姚洋 兰 琪

张雨涵 崔 颖 陶雨欣

李 伟 陆明哲 任 静

(以上排名不分先后顺序)

编委会助理

钟萌

编辑出版

澳门中外医药出版社有限公司

地址

澳门巴掌围斜巷19号7楼D

电话

00853-68819699

邮箱

QuestPress@hotmail.com

网站

zhzyx.scionline2025.com

Editorial Board

Editor-in-chief

Hong Zichen

Deputy Editor-in-Chief

Wang Qiang, Liu Yaoyang, Lan Qi

Zhang Yuhuan, Cui Ying, Tao Yuxin

Li Wei, Lu Mingzhe, Ren Jing

(The above rankings are not in order)

Assistant to the Editorial Board

Zhong Meng

Editing and Publishing

Macau Sino-Foreign Medical Publishing Limited

Address

7th Floor,D, No.19,Palawak Lane, Macau

Telephone

00853-68819699

Email

QuestPress@hotmail.com

Web site

zhzyx.scionline2025.com