

大鼠舌象扫描电镜探究不同姜汁制黄连的差异性

邓玉芬, 钟凌云*

(江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**通过SD大鼠舌象扫描电镜超微结构观察不同姜汁炮制黄连药性差异性变化。**方法:**将大鼠随机分为正常组、生黄连组、鲜姜制黄连组、干姜制黄连组、鲜姜汁组、干姜汁组,分别灌服相应水煎液3个星期,沿大鼠舌根剪下舌头,按常规扫描电镜样本处理,然后通过扫描电镜观察各组大鼠舌象超微结构。**结果:**与正常组比较,生黄组、鲜姜黄连、干姜黄连在数值降低上存在极显著性差异($P < 0.01$)。且大鼠舌象罩状乳突和丝状乳突的角质化及剥落程度不及正常组明显。干姜汁组在数值上升上具有显著性差异($P < 0.05$),丝状乳突和罩状乳突的剥落及角质化程度也是最明显的。与生黄连组比,鲜姜黄连、干姜黄连组在数值上升上存在显著性差异($P < 0.05$),干姜组、鲜姜组在数值上升上存在极显著性差异($P < 0.01$)。罩状乳突和丝状乳突的角质化及剥落程度明显。与鲜姜制黄连比较,干姜黄连组丝状乳突数值存在上升趋势,且乳突剥落及角质化程度更明显。与干姜汁组比较,鲜姜汁组丝状乳突存在数值降低的趋势,且乳突剥落及角质化程度不及干姜汁明显。**结论:**姜制黄连与生黄连组的大鼠舌象显微结构存在显著性差异,其结果提示,黄连经姜制后寒性得到缓和,符合中医理论中的“制”理论,且药性寒热的变化可以通过舌象扫描电镜的显微结构得以体现。同时,干姜的热性强与鲜姜也能通过大鼠舌象变化得以体现。为姜制黄连的炮制机制研究奠定了基础。

[关键词] 黄连; 姜制黄连; 舌象; 扫描电镜

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0006-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010006

Explore Differences in Coptidis Rhizome Processed with Different Ginger Juice by Tongue Scanning Electron Microscopy in Rats

DENG Yu-fen, ZHONG Ling-yun*

(School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** Through to observe the medicinal difference changes in Coptidis Rhizome (CR) processed by different ginger juice through ultrastructural tongue scanning electron microscopy (SEM) in SD rats. **Method:** The rats were randomly divided into normal group, raw CR group, CR processed by fresh ginger group (FGRC), RC processed by dried ginger group (RCDG), fresh ginger juice group (FG) and dry ginger group (DG), respectively took corresponding solution for three weeks. Their tongues were cut off along tongue roots, and processed according to the conventional SEM sample methods, and their ultrastructure was observed by SEM. **Result:** Compared with the normal group, there was extremely significant differences in numerical lowering between CR group, FGRC group and DGRC group ($P < 0.01$). Keratinization and spalling degree of tain mastoid and filamentous mastoid were not as obvious as normal group. DG group had significant difference in the value increase ($P < 0.05$), and their spalling and keratinization of filamentous mastoid and tain mastoid were also the most obvious. Compared with CR group, there was significant difference in value increase in FGRC group and DGRC group ($P < 0.05$). There was extremely significant difference in value increase in DG group and FG group

[收稿日期] 20150104(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260643);江西省主要学科学术和技术带头人培养计划项目(20133BCB22006);江西中医药大学研究生创新专项资金项目(JZYC14B07)

[第一作者] 邓玉芬, 硕士, 从事中药炮制工艺与机制研究, Tel:18565721270, E-mail:592209445@qq.com

[通讯作者] *钟凌云, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制研究, Tel:0791-87118939, E-mail:ly1638163@613.com

($P < 0.01$), and the keratinization and spalling degree of tain mastoid and filamentous mastoid were obvious. Compared with FGRC group, the value of filamentous mastoid was in a rise trend in DGRC, and its mastoid keratinization and spalling degree were more obvious. Compared with DG group, the value of filamentous mastoid was in a decline trend in FG group, and its mastoid spalling and keratinization degree were not so obvious.

Conclusion: DGRC there was significant difference in tongue microstructure between CR processed by ginger groups and raw CR group. The results suggest that the cold property of CR can be relieved after processing with ginger, in line with the ‘processing’ theory of traditional Chinese medicine, and the changes in medicinal cold and hot properties can be reflected from the microstructure of tongue in SEM. At the same time, DG and FG have hot properties, which can be also reflected from the microstructure changes in SEM, laying a solid foundation for the processing mechanism of ginger-processed CR.

[**Key words**] Coptidis Rhizoma; Coptidis Rhizome processed by ginger juice; tongue; scanning electron microscopy

生姜 *Zingiber officinale* 是姜科 Zingiberaceae 植物姜 *Z. officinale* 的新鲜根茎, 又称鲜姜, 其味辛, 微温, 归肺、脾、胃经, 具有解表散寒、温中止呕、化痰止咳之功, 干姜是姜科植物姜 *Z. officinale* 的干燥根茎, 具有温中散寒, 回阳通脉, 温肺化饮、温经止血的功效^[1]。自古以来, 姜制黄连在选用辅料姜上对干姜和鲜姜的选用并未作出明确界定。黄连是毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis*, 三角叶黄连 *C. deltoidea* 或云连 *C. teeta* 的干燥根茎^[2]。

现代医学认为, 舌是一个神经血管分布十分丰富的肌性器官, 当人体发生疾病, 舌的病理改变即首当其冲, 使舌色和舌形态方面发生改变, 这些变化是进行舌色和临床疾病相关性研究的主要内容^[3]。中药药性 (medicinal behavior of Chinese medicine) 是用以反映中药作用的若干性质和特性^[4]。传统炮制理论中认为姜制能缓解黄连的寒性。本实验通过大鼠舌象的扫描电镜超微结构的变化对黄连姜制后药性变化进行探究, 为姜制黄连的炮制机制研究奠定基础。

1 材料

1.1 动物 SD 雄性大鼠, 体重 180 ~ 220 g, 共 48 只, 由常州卡文斯实验动物有限公司, 合格证号 SCXK(苏)2011-0003。

1.2 药物及试剂 黄连购于江西樟树天齐堂中药饮片有限公司, 产地为四川, 经江西中医学院中药鉴定教研室褚小兰教授鉴定为毛茛科植物黄连 *C. chinensis* 的干燥根茎。戊二醛 (国药集团化学试剂有限公司), 生理盐水, 水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20130907)。

1.3 仪器 S-570 型扫描电子显微镜 (日本日立公司), Raynger ST 型红外测温仪 (美国 Raytek 公司),

中药粉碎机 (长沙旭朗粉碎机械有限公司), RE52CS 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂), SHZ-D(III) 循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限公司)。

2 方法

2.1 黄连及其炮制品制备 黄连原药材, 剔除杂质, 抢水洗净, 润透, 切成薄片, 然后干燥, 除去碎屑, 得生黄连饮片。由前期优选黄连工艺研究结果, 分别制备干姜黄连饮片和鲜姜黄连饮片。取黄连片 100 g, 加入 10% 的鲜姜汁拌匀, 稍闷润, 待姜汁被吸尽后, 置炒制容器内, 使药材表面温度保持在 120 °C 左右, 炒制 15 min 后取出晒凉, 筛去碎屑。取干姜 3.33 g, 加 10 倍量的水浸泡 60 min。保持微沸 30 min, 滤过, 滤渣加 8 倍量水, 微沸煎煮 30 min, 滤过, 合并 2 次滤液, 浓缩至 10 mL, 称取生黄连 100 g, 加入 10% 的干姜汁拌匀, 稍闷润, 待姜汁被吸尽后, 置炒制容器内, 使药材表面温度保持在 120 °C 左右, 炒制 15 min 后取出晒凉, 筛去碎屑。

2.2 样品的制备 将生黄连、鲜姜黄连、干姜黄连各饮片置于粉碎机中粉碎, 过 50 目筛。精密称取生黄连、干姜黄连、鲜姜黄连粉末 (过 50 目筛) 各 150 g, 加 10 倍量水, 浸泡 60 min 后煎煮, 微沸 30 min 后, 过滤, 药渣中再加 8 倍量水煎煮, 微沸 30 min 后过滤, 合并 2 次滤液, 浓缩至质量浓度约为 1 g·mL⁻¹, 即生黄连、干姜黄连、鲜姜黄连各制得水煎液 150 mL。4 °C 储存备用。

取干姜 33.33 g, 10 倍量的水浸泡 60 min 后煎煮, 微沸 30 min 后, 过滤, 药渣加 8 倍量水煎煮, 微沸 30 min 后过滤, 合并 2 次滤液, 浓缩至 100 mL, 得干姜汗。

称取 100 g 鲜姜洗净, 捣汁, 过滤, 滤渣加适量

的水,再次压榨捣汁,过滤。合并 2 次滤液,即得每 1 mL 含生药 1 g 的鲜姜汁。

2.3 不同制品黄连对大鼠舌象的影响

2.3.1 分组及给药 将大鼠随机分为 6 组(正常组、生黄连组、鲜姜黄连组、干姜黄连组、鲜姜汁组、干姜汁组)每组 4 只动物,取 100% 的生黄连、干姜黄连、鲜姜黄连、鲜姜汁、干姜汁水煎液进行灌胃,每次给药 4 mL(约含生药 4 g),正常组给与相应容积的生理盐水,1 次/d,连续给药 3 个星期,给药期间常规自由喂养,给水。

2.3.2 动物取材及舌象观察 正常组、生黄连组、干姜黄连组、鲜姜黄连组、鲜姜汁组、干姜汁组大鼠于灌胃第 22 天,脱颈椎处死,迅速用镊子将舌拉出,从舌根部用剪刀剪下,生理盐水清洗舌体后用 2.5% 戊二醛溶液固定。

2.3.3 舌体样本制备 舌体经取材(取样品观察面)-漂洗(生理盐水)-固定(2.5% 戊二醛固定 2 h 以上)-漂洗(0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲盐液,3 次,45 min)-固定(1% 锇酸固定 2 h)-乙醇脱水(50%, 70%, 90%, 95% 各 15 min,换醋酸异戊酯 15 min)-干燥(冷冻干燥)等步骤常规制造扫描电镜样本^[5],用日立 S-570 型扫描电镜观察各组舌体显微结构。

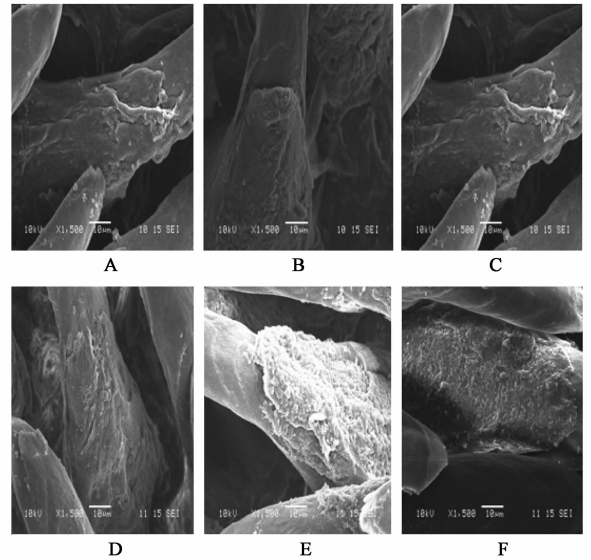
3 结果

3.1 对大鼠舌体丝状乳头密度的影响 与正常组比较,生黄连组、干姜黄连组、鲜姜黄连组丝状乳头密度依次降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与生黄连组比较,干姜黄连组、鲜姜黄连组丝状乳头密度较高,干姜汁、鲜姜汁丝状乳头密度高于所有黄连组和正常组黄连,且存在显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1,图 1。

表 1 不同黄连炮制品对大鼠舌体丝状乳头密度的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1 Effects of different processed products of Coptidis Rhizoma on tongue body filiform papillae density in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	丝状乳头密度
正常	-	107.00 ± 2.16
生黄连	18	88.75 ± 1.71 ¹⁾
鲜姜黄连	18	91.75 ± 0.96 ^{2,3)}
干姜黄连	18	93.50 ± 1.29 ^{2,3)}
鲜姜汁	18	114.25 ± 1.71 ^{1,4)}
干姜汁	18	116.75 ± 1.71 ^{1,4)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与生黄连组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。



A. 正常组;B. 生黄连组;C. 干姜黄连组;D. 鲜姜黄连组;E. 干姜汁组;F. 鲜姜汁组(图 2 同)

图 1 不同黄连炮制品对大鼠舌体丝状乳头角质化程度的影响(电镜,×15 000)

Fig.1 Effects of different processed products of Coptidis Rhizoma on tongue body filiform papillae keratinization in rats (electron microscope, ×15 000)

3.2 对大鼠舌体丝状乳头角质化程度的影响 生黄连、干姜黄连、鲜姜黄连组与正常组比较,大鼠舌体丝状乳头根部角质化程度不明显,角质层较薄,且角质脱落现象不明显或无脱落现象;干姜黄连、鲜姜黄连组相对于生黄连组,角质层较厚,角质脱落现象较明显;干姜汁、鲜姜汁组相对于生黄连组,乳头根部表面粗糙,脱落十分明显,角质层厚,较之正常组更明显。见图 1。

3.3 对大鼠舌体蕈状乳头角质化程度的影响 生黄连组、干姜黄连组、鲜姜黄连组与正常组比较,蕈状乳头角质化层较薄较少,且脱落现象没有正常组明显;干姜黄连、鲜姜黄连与生黄连组比较,乳头周围角质化层厚而多;干姜汁、鲜姜汁黄连组与生黄连组比较,中央部位裂纹多且脱落明显,周围角质化层较多,较之正常组更明显。见图 2。

4 讨论

临床实践证明在疾病的发展过程中舌的变化迅速而又鲜明,凡脏腑的虚实、气血的盛衰、津液的盈亏、病情的浅深、预后的好坏都能较为客观地从舌象上反映出来^[6]。中医理论中认为,心开窍于舌,舌象反映了人体脏腑及功能的状况。舌诊在《伤寒杂病论》,《医理真传》,《伤寒观舌心法》,《敖氏伤寒金镜录》等著作中用以诊断伤寒证和温病证^[7]。陈

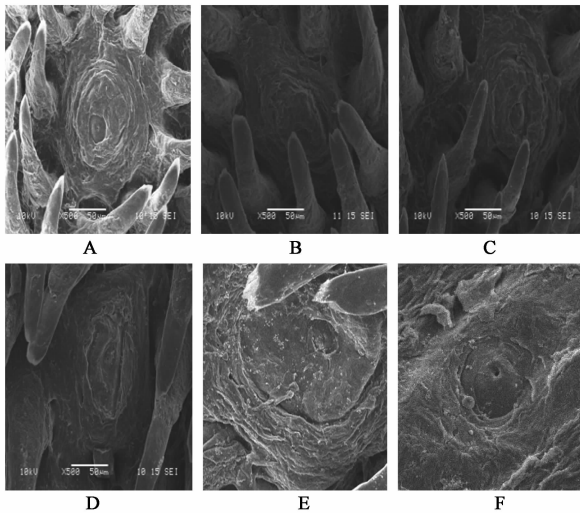


图 2 不同黄连炮制品对大鼠舌体蕈状乳头角质化程度的影响(电镜, ×500)

Fig. 2 Effects of different processed products of *Coptidis Rhizoma* on tongue body mushroom nipple keratinization in rats (electron microscope, ×500)

小野等^[8]运用扫描电镜技术观察长期热证造模的大鼠舌体发现,热证组动物丝状乳头软角质减少,角质化上皮剥脱明显。刘志彬等^[9]通过扫描电镜观察寒热证造模的大鼠舌体表面细微结构发现,寒证组大鼠舌体表面丝状乳头密度较低、角质化程度较低,蕈状乳头角质化程度也较低;热证组大鼠舌体表面丝状乳头密度较高、角质化程度高,蕈状乳头角质化程度也较高。孙莹莹等^[10]研究发现,电镜观察大鼠舌体的结构发现,与生黄连组比较,寒性较弱的酒黄连组大鼠舌体丝状乳头密度高,丝状乳头和蕈状乳头角质化程度重;寒性较强的胆黄连组大鼠舌体丝状乳头密度低,丝状乳头和蕈状乳头角质化程度弱。并且证明了舌象扫描电镜可作为研究寒热性药物的一个特异性指标。

本实验采用大鼠的舌象扫描电镜研究不同姜汁辅料炮制黄连后,黄连药性的变化。实验结果发现,与正常组比较,生黄连组、干姜黄连组、鲜姜黄连组丝状乳头密度依次降低,且蕈状乳突和丝状乳突的角质化程度及剥落情况不及正常组明显;与生黄连组比较,干姜黄连组、鲜姜黄连组、干姜汁、鲜姜汁

组丝状乳头密度较高,且存在显著性差异,干姜黄连、鲜姜黄连组较生黄连蕈状乳突和丝状乳头周围角质化层厚而多,剥落明显。此结果说明,黄连经姜制后,寒性得到缓和。干姜汁、鲜姜汁丝状乳头密度高于所有黄连组和正常组,且存在显著性差异。干姜汁组和鲜姜汁组与生黄连组比较,其乳头周围角质化层厚而多,中央部位裂纹多且脱落明显,周围角质化层较多,较之正常组更明显。干姜汁组与鲜姜汁组在丝状乳突数值上虽不存在显著性差异,但干姜汁组有高于鲜姜汁组的趋势,且干姜汁组的剥落跟角质化程度最明显,且丝状乳突数值也最高。这与中医理论中干姜性热,鲜姜性温相吻合。寒性中药黄连经热、温性辅料干姜、鲜姜炮制后,寒性得到缓和,实验结果与传统炮制理论中的“从制”一致,同时也证明大鼠舌象变化能客观反映黄连药性寒凉的变化,为下一步姜黄连的炮制机制研究打下基础。

[参考文献]

- [1] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2014;44, 146.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010;285.
- [3] 刘新华. 肝纤维化不同病理分期舌色变化的临床与实验研究[D]. 济南:山东中医药大学, 2003.
- [4] 雷载权, 张廷模. 中华临床中医学. 上卷[M]. 北京:人民卫生出版社, 1998;63.
- [5] 黄晓红, 张奇亚. 扫描电镜细胞制备样品方法改进[J]. 电子显微学报, 2003, 22(6): 671-672.
- [6] 朱文锋. 中医诊断学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2002;70.
- [7] 刘友章, 丁站新, 宋雅芳. 试析伤寒学与温病学在舌诊上的差异性[J]. 中医药通报, 2007, 6(2): 28-29.
- [8] 陈小野, 邹世洁, 王震, 等. 大鼠长期热证造模的舌扫描电镜观察[J]. 广西中药, 1998, 1(2): 42-45.
- [9] 刘志斌, 倪丽. 寒热证大鼠舌体表面的扫描电镜观察[J]. 福州大学学报:自然科学版, 2007; 35(5): 780-784.
- [10] 孙莹莹, 钟凌云, 龚千锋. 基于大鼠舌体表面扫描电镜探讨黄连及其炮制品寒热药性[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(1): 54-55.

[责任编辑 周冰冰]