

表明丹参 miRNA 经高温水煎后,其 miRNA 可能被破坏,无法被人体吸收;在生地黄处理组中,b 组和 B 组同时检测到 miR5140,miR5137 和 miR5141 的表达(图 2),由此验证了生地黄经水煎后,部分 miRNA 不会被破坏,并且可通过消化道进入人体血液中。

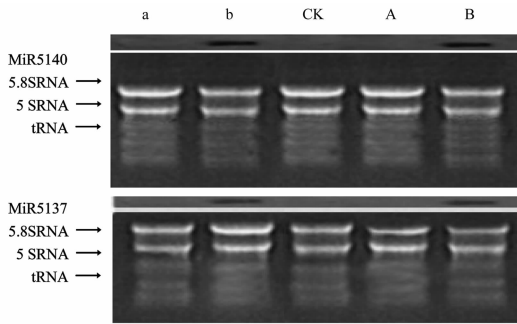


图 2 miRNA 表达分析

4 讨论

随着分子生物学的发展,对 miRNAs 的研究已经成为目前一大热点,由于植物中的 miRNA 是一种仅由 19~24 个核苷酸组成的短链核糖核酸,同时在植物中,miRNA 会被进行甲基化修饰,即在其两端加上甲基,把它“加固”,因此其结构非常牢固,因而植物 miRNA 分子不容易被破坏^[6]。南京大学张辰宇小组研究发现^[4],植物所含有的 miRNA 能够通过消化道进入人体血液和器官组织,进一步研究发现给小鼠注射大量的 miR168a(他们发现的 10 余种 miRNA 之一),发现小鼠的低密度脂蛋白受体结合蛋白(low density lipoprotein receptor adapter protein 1,LDLRAP1)受到了调控,影响了胆固醇的代谢过程。因此,中药中所含的 miRNA,可能是其一类新的活性成分^[7],在中药治疗疾病时作为一种干预因素参与了对疾病的治疗。中药 miRNA 可能是中药作用的有效成分和物质基础,miRNA 相关机制可能是中药疗效的作用机制之一。

因此,本研究选取在化学成分、药理活性、临床制剂和临床用途等方面已进行研究和探讨的中药材丹参和地黄作为研究对象^[8-11],通过 Northern blot 直接验证的方法,验证了丹参、生地黄植物体内 miRNA 的存在,并验证了服用生地黄水煎剂,生地黄的 miR5140, miR5137, miR5141 等 3 种 miRNA 可通过消化道进入人体。这为研究中药中 miRNA 在治疗疾病过程中的作用机制提供了参考。

随着 Solexa 等高通量测序技术的快速发展以及生物信息学的逐步完善,对 miRNA 的研究分析会更加简便、全面、深入。通过对 miRNA 的研究,有助于我们研究丹参、地黄中 miRNA 在药理作用中发挥的作用机制,为研究其药效提供新的思路和策略。

[参考文献]

- [1] Llave Cesar, Xie Zhixin, Kasschau Kristin D. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of arabidopsis miRNA [J]. Science, 2002, 297(5589): 2053.
- [2] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 [J]. Cell, 1993, 75(5): 843.
- [3] Zhang B, Pan X, Cobb G P, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. Dev Biol, 2007, 302(1): 1.
- [4] Lin Zhang, Dongxia Hou, Xi Chen, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA [J]. Cell Research, 2011, 22(2012): 107.
- [5] 郑培明, 吴锦霞, 顾金保, 等. 白纹伊蚊 miRNA 的分离、鉴定及表达谱的初步分析 [J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(4): 677.
- [6] 王波, 冯晓黎, 张富春. 植物中 microRNA 的合成及在发育和抗逆中的作用 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(3): 581.
- [7] 李沧海, 姜廷良. 微小核糖核酸在中药研究中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 279.
- [8] 刘静, 戴忠, 王钢力, 等. 丹参活性成分及相关分离分析方法研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 288.
- [9] 杨光义, 叶方, 雷震, 等. 正交试验设计优选丹参半仿生集成提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 40.
- [10] 傅超美, 张臻, 廖婉, 等. 丹参在化妆品领域的应用前景 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 239.
- [11] 郭建华, 田成旺, 张铁军, 等. 鲜地黄中梓醇及水苏糖的闪式提取工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 13.

[责任编辑 聂淑琴]

忍冬原生质体分离条件研究

刘颖, 郭明晔, 王朝阳, 白根本*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] **目的:** 探讨忍冬原生质体分离的最佳条件, 为忍冬原生质体培养、细胞融合以及遗传转化提供大量优质的原生质体。**方法:** 分别对忍冬原生质体分离过程中的若干影响因子如: 酶液组成、酶解方式、酶解时间、酶解温度、渗透压进行比较分析, 以确定最佳的分离条件。**结果:** 确定了最优化的忍冬原生质体分离条件, 即以生长旺盛的疏松的忍冬愈伤组织作为分离原生质体所需材料, 以 1.5% 纤维素酶 + 0.25% 果胶酶作为分离原生质体所用酶液, 以含有 $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇作为渗透保护剂的细胞-原生质体清洗液 (CPW) 溶液进行酶液的配制, 于 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置条件下酶解 12 h。**结论:** 利用该实验所确定的忍冬原生质体最佳分离条件可获得大量优质的原生质体, 为后续忍冬细胞融合以及遗传转化等实验奠定良好的实验基础。

[关键词] 忍冬; 愈伤组织; 酶解; 原生质体分离

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0125-05

Researches on Isolation Conditions of Protoplasts of *Lonicera japonica*

LIU Ying, GUO Ming-ye, WANG Chao-yang, BAI Gen-ben*

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To find out the best isolation conditions of protoplasts of *Lonicera japonica*. **Method:** Some influence factors on isolation of protoplasts, such as composition of enzyme solution, methods, hours and temperature of enzyme dissolving, osmotic pressure, and so on, were compared and analyzed to find out the best conditions of protoplasts isolation of *L. japonica*. **Result:** The callus flourishing well of *L. japonica* was used as materials for protoplasts isolation. $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ mannitol + 1.5% cellulose Onozuka R-10 + 0.25% pectolase Yakult Y-23 was the best composition of enzyme solution, which was dissolved in cell protoplast wash medium (CPW) solution. 12-hour enzyme dissolving at $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ was the best methods of protoplasts isolation. And standing was better than shaking. **Conclusion:** Abundant and superior protoplasts of *L. japonica* can be obtained under the best isolation conditions that this study has found out which will give the necessary help for protoplasts culture, cell fusion and genetic transformation of *L. japonica*.

[Key words] *Lonicera japonica*; callus; enzyme dissolving; protoplasts isolation

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花, 具有清热解毒、凉散风热、广谱抗菌及抗病毒等功效, 临床上用于治疗多种疾病^[1-2]。据不完全统计, 全国的中医药方剂中有 1/3 都用到了金银花。此外, 金银花在营养保健方面也具有很大的开发应用潜力, 如以金银花

为材料已开发出金银花茶、金银花露等饮料以及牙膏、痱子粉等日用品, 深受市场欢迎。

近些年来, 对忍冬属植物的研究主要集中在药理药效以及化学成分分析等方面^[1-3]。而生物技术在忍冬属植物研究中的应用起步较晚, 多个领域的研究还比较缺乏。目前为止, 对于忍冬原生质体分离、培养以及融合等方面的研究尚属空白。植物原生质体是指除去细胞壁后, 被质膜包被的“裸露的细胞”^[4]。近些年来, 随着原生质体研究的深入开展, 发现原生质体在植物生理学、体细胞遗传学、基因工程以及作物育种等许多领域均具有很好的应用潜力。首先, 由于每个原生质体均具有该个体的

[收稿日期] 20120508(010)

[第一作者] 刘颖, 讲师, 博士研究生, 从事分子生药学研究, Tel: 010-84738646, E-mail: liuyliwd@vip.sina.com

[通讯作者] * 白根本, Tel: 010-84738646, E-mail: baigb@263.net

全部遗传信息,因此离体培养的原生质体给予适当的培养条件后仍具备分化再生成完整植株的能力^[5]。且在原生质体再生植株的过程中较易发生无性系变异,对其进行人工理化诱导,则可在单细胞水平上筛选出有利用价值的突变体植株^[6]。其次,原生质体是遗传转化的理想受体材料,可以有目的的向原生质体中转入特定基因,从而改良植物的性状^[7]。再次,通过原生质体融合还可以克服远缘杂交的不亲和障碍,获得有价值的杂种后代^[8]。然而,以上所有原生质体的应用操作必须建立在原生质体有效分离,并获得大量优质的原生质体的基础之上。

本文以忍冬作为研究对象,从多个方面对其原生质体的分离进行了研究,并确定了最优化的分离条件,将为忍冬原生质体培养以及在此基础上开展的遗传转化、良种选育等研究提供大量优质的原生质体材料来源。

1 材料

1.1 植物 本实验室诱导并继代保存的生长旺盛且疏松的忍冬愈伤组织。

1.2 试剂 纤维素酶(Onozuka R-10)、果胶酶(Yakult Y-23)购于北京拜尔迪生物技术有限公司。

KH_2PO_4 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KI, 无水 CaCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 甘露醇等化学试剂均为分析纯,购于北京拜尔迪生物技术有限公司。

1.3 仪器 SW-CJ-1CU 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),MLS-3750 型高压蒸气灭菌锅(日本三洋电机公司),DHZ-D 型冷冻恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂),HPG-280BX 型光照培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司),Olympus 普通复式光学显微镜,Anke TGL-16G 离心机,Eppendorf 微量移液器。

2 方法

2.1 忍冬愈伤组织的继代培养 采用 6,7-V 培养基作为基本培养基,添加 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6 BA。每隔 30 d 继代培养 1 次。

2.2 不同酶液组合对忍冬原生质体分离的影响 用于原生质体分离的酶液成分如表 1 所示,各处理均用 CPW-13% 甘露醇溶液配制,经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,备用。

将生长旺盛的疏松的忍冬愈伤组织转移至装有滤纸的无菌培养皿中,用接种勺将其拨散;准确称取愈伤组织 100 mg 12 份(每个酶液组合 3 个重复),装入无菌 1.5 mL eppendorf 管中;按照 10:1 的比例

表 1 忍冬原生质体分离所用各酶液组合 %

No.	纤维素酶	果胶酶
	Onozuka R-10	Yakult Y-23
1	1.0	0.25
2	1.5	0.25
3	1.0	0.50
4	1.5	0.50

加入表 1 中各酶液,用 Parafilm 封口;置于 28 ℃ 恒温培养箱中,于黑暗条件下静置酶解 12 h;60 目细胞筛网过滤后,加入 5 mL CPW-13% 甘露醇溶液洗涤;将滤液收集于 15 mL 锥形离心管中,1 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min;弃上清,将沉淀用 8 mL CPW-25% 蔗糖溶液悬浮后,沿管壁缓慢在蔗糖层上面加入 2 mL CPW-13% 甘露醇溶液,800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min;小心吸取界面上的原生质体悬浮液,置于另一离心管中,加入 5 mL CPW-13% 甘露醇溶液,1 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min;收集沉淀,重新溶于 1 mL MS 液体培养基或 CPW-13% 甘露醇溶液中;台盼蓝染色;血球计数板分别进行死活细胞计数;计算原生质体活力及产量。

2.3 不同酶解时间及酶解温度对忍冬原生质体分离的影响 以生长旺盛且疏松的忍冬愈伤组织作为实验材料,以表 1 中 2 号酶液作为实验用酶液,设置了 8,10,12,14 h 共 4 种酶解时间,25,28 ℃ 2 种酶解温度,共计 8 种处理,各处理分别进行 3 个重复。其他实验步骤同 2.2。

2.4 不同渗透压对忍冬原生质体分离的影响 以生长旺盛且疏松的忍冬愈伤组织作为实验材料,以 25 ℃ 作为酶解温度,设置了 7 种渗透压条件,即甘露醇 0.6,0.65,0.7,0.75,0.8,0.85,0.90 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,分别用含有以上浓度甘露醇的 CPW 溶液进行表 1 中 2 号酶液的配制,并作为实验用酶液,每种酶液各进行 3 个重复。其他实验步骤同 2.2。

2.5 缓慢振动酶解方式对忍冬原生质体分离的影响 以生长旺盛且疏松的忍冬愈伤组织作为实验材料,以表 1 中 2 号酶液作为实验用酶液,以 25 ℃ 作为酶解温度,考察 40 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 酶解方式下酶解 6,8,10,12 h 的酶解效果,每处理各进行 3 个重复。其他实验步骤同 2.2。

2.6 忍冬原生质体产量和活力的计算方法 本实验中采用台盼蓝染色的方法进行原生质体的死活鉴别,台盼蓝是一种酸性染料,其不容易穿过活细胞的质膜进入胞内,却能渗入到死细胞内。因此,利用台

盼蓝染液进行染色后,死亡的原生质体着色,而活的原生质体不着色,从而可以区分死活原生质体。

$$\text{原生质体活力} = \frac{\text{活的原生质体数}}{\text{原生质体总数}} \times 100\%$$

$$\text{原生质体密度(1 mL 原生质体悬液中的原生质体个数)} \\ = 4 \text{ 个大格中的原生质体数} \times 10^4/4$$

因为每种不同的处理均称取了 100 mg 的实验材料,所以当以个/gfw 表示原生质体产量时,计算方法如下:

$$\text{原生质体产量(个/gfw)} = \text{原生质体密度} \times 10$$

3 结果与分析

3.1 忍冬愈伤组织的继代培养 采用 2.1 中提供的培养基配方对忍冬的愈伤组织进行继代培养,愈伤组织生长旺盛、迅速,颜色为白黄色。随着继代次数的增加,愈伤组织会进一步疏松,可用于原生质体的分离。

3.2 不同酶液组合对忍冬原生质体分离的影响 不同酶液组合对忍冬原生质体分离的影响实验结果见表 2。

表 2 酶液成分对忍冬原生质体分离效果的影响

酶液组合	原生质体活力/%	原生质体产量/ $\times 10^5$ 个/gfw
1	85.1b	10.68c
2	89.5a	30.26a
3	77.3c	18.75b
4	79.3c	21.38b

注:多重比较采用 SSR 法,不同小写字母表示差异达到 $\alpha = 0.05$ 的显著水平(表 3~5 同)。

根据表 2 结果,发现无论原生质体活力还是原生质体产量,2 号酶液组合均要显著好于其他组合,原生质体活力可以达到 89.5%,而原生质体产量可以达到 30.26×10^5 个/gfw。因此,综合考虑原生质体产量和活力两个方面的因素,确定了 2 号酶液组合,即 1.5% 纤维素酶 + 0.25% 果胶酶为最佳酶液组合。

3.3 不同酶解时间以及酶解温度对忍冬原生质体分离的影响 在 25, 28 °C 条件下分别静置酶解 8, 10, 12, 14 h 后,忍冬原生质体的分离情况见表 3。

根据表 3 结果,发现随着酶解时间的延长,无论是在 25 °C 条件下,还是在 28 °C 条件下,忍冬原生质体的活力和产量均表现出先升后降的趋势。就原生质体活力而言,当酶解时间为 12 h 时,忍冬原生质体的活力达到最高峰,为 90% 左右,当酶解时间继续延长至 14 h 后,原生质体活力会有所下降。

就原生质体产量而言,25 °C 条件下,酶解 12 h

表 3 不同酶解时间以及酶解温度对忍冬原生质体分离的影响

酶解时间/h	25 °C		28 °C	
	原生质体活力/%	原生质体产量/ $\times 10^5$ 个/gfw	原生质体活力/%	原生质体产量/ $\times 10^5$ 个/gfw
8	81.2c	24.2b	88.4a	16.7c
10	85.8b	25.3b	89.7a	32.5a
12	90.4a	37.0a	90.1a	28.4b
14	85.9b	13.0c	81.6b	16.5c

忍冬原生质体的产量可以达到峰值,为 37.0×10^5 个/gfw,而在 28 °C 条件下,酶解 10 h 忍冬原生质体的产量即可达到峰值,为 32.5×10^5 个/gfw。因此,当酶解温度较高时,可适当缩短酶解的时间。

综上,在 25 °C 条件下酶解 12 h,或者在 28 °C 条件下酶解 10 h 均能取得较好的效果,但二者相比较,前者更好。

3.4 不同渗透压对忍冬原生质体分离的影响 采用含有不同浓度甘露醇的 CPW 工作液进行酶液配制,以考察不同渗透压对忍冬原生质体分离的影响,结果见表 4。

表 4 不同渗透压对忍冬原生质体分离的影响

甘露醇浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	原生质体活力/%	原生质体产量/ $\times 10^5$ 个/gfw
0.60	80.7c	32.59a
0.65	78.5d	31.75a
0.70	85.6b	31.75a
0.75	87.6a	29.72b
0.80	88.3a	28.45b
0.85	87.0a	19.31c
0.90	73.0e	10.67d

根据表 4 结果,发现随着甘露醇浓度的递增,忍冬原生质体的活力基本上呈现出先升后降的趋势,而原生质体的产量则出现递减的趋势。

就原生质体活力而言,当甘露醇浓度递增至 $0.80 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时出现峰值,为 88.3%,此后甘露醇浓度继续增加,而原生质体活力则开始下降。

就原生质体产量而言,当甘露醇浓度为 $0.60 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时产量最高,为 32.59×10^5 个/gfw,随着甘露醇浓度的递增,原生质体产量逐渐下降,当甘露醇浓度为 $0.90 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,原生质体产量降至最低,为 10.67×10^5 个/gfw。

根据镜下观察到的现象,发现较高的甘露醇浓度的确不能很好的起到原生质体的渗透保护作用,会造成原生质体的破坏。

综上,同时考虑原生质体活力及产量两个方面的因素,认为甘露醇浓度为 $0.70 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有利于忍冬原生质体的分离。

3.5 缓慢振动酶解方式对忍冬原生质体分离的影响

在 $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 缓慢振动条件下进行忍冬原生质体的分离,酶解时间分别为 6,8,10,12 h,结果见表 5。

表 5 缓慢振动酶解方式对忍冬原生质体分离的影响

转速 / $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$	酶解时间 / h	原生质体活力 / $\%$	原生质体产量 / $\times 10^5 \text{ 个/gfw}$
40	6	71.3c	11.96c
40	8	84.1a	17.07b
40	10	85.6a	21.75a
40	12	79.9b	17.87b

根据表 5 结果,发现随着酶解时间的延长,忍冬原生质体的活力和产量均呈现出先升后降的趋势,且均在 $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 酶解 10 h 时达到峰值,原生质体活力为 85.6%,产量为 $21.75 \times 10^5 \text{ 个/gfw}$ 。

但是,与表 3 中静置酶解的效果相比较,发现无论在原生质体活力方面还是在原生质体产量方面, $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 缓慢振动条件下酶解的效果均比不上静置酶解的效果,静置酶解原生质体活力可以达到 90% 左右,而产量更是可以高达 $37 \times 10^5 \text{ 个/gfw}$ 左右。因此,确定 $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 酶解方式并不适合于忍冬原生质体的分离。

4 小结与讨论

从酶液组合、酶解时间、酶解温度、渗透压以及酶解方式 5 个方面对忍冬原生质体的分离进行了研究,并确定了最优化的分离条件,即以多次继代后生长旺盛且疏松的忍冬愈伤组织作为分离原生质体的材料,以 1.5% 纤维素酶 + 0.25% 果胶酶作为最佳酶液,以含有 $0.70 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇的 CPW 溶液进行酶液的配制,在静置条件下酶解 12 h。以此条件获得的忍冬原生质体完整、透明,质量良好。

近些年来,对于植物原生质体分离的研究多以无菌培养获得的无菌苗作为实验材料^[9-10],而本文采用生长旺盛的忍冬愈伤组织作为材料来源。愈伤组织为脱分化的细胞团,具有旺盛的分生分裂能力。利用愈伤组织分离获得的原生质体保留了愈伤组织的特性,与无菌苗相比较其更适应离体培养的环境,且可塑性更强,更容易诱导再生。就酶液组合而言,

目前的研究多采用纤维素酶和果胶酶不同浓度组合,但有些报道中还用到了离析酶^[10-11]。由于本实验中用到的材料是疏松的愈伤组织,细胞之间结合并不十分紧密,所以在实验过程中未使用离析酶。在进一步的研究中也可尝试添加离析酶,以考证其是否有利于以愈伤组织作为实验材料的忍冬原生质体的分离。就渗透保护情况而言,在本实验中过高的渗透压,如 $0.85 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及 $0.90 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的确不能很好的起到渗透保护作用,会出现大量的原生质体的破坏;而其他的甘露醇水平,特别是 0.7, 0.75, 0.80 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对于原生质体分离的影响差异并不十分显著,均能较好的起到渗透保护作用,但是综合比较原生质体活力和产量两个方面的因素, $0.70 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 效果更好。目前的研究报道中,不同植物进行原生质体分离时,适合的甘露醇浓度并不十分一致,这可能与植物材料本身有关^[12-13]。就酶解方式而言,有些植物进行原生质体分离时,缓慢振动的酶解方式似乎产量更高^[7],这与本实验的结果并不一致。在本实验中, $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的酶解方式显然比不上静置酶解方式。究其原因,一方面可能与分离原生质体的材料来源有关,由于本实验中用到的材料是愈伤组织,其特点与分化成熟的植物细胞相去甚远,而在震荡过程中这些脱分化细胞容易受到机械损伤,所以影响了原生质体的活力及产量;另一方面,也可能与植物本身有关,不同植物细胞结构差异较大,对于机械剪切力的忍受能力也自然不同。而就忍冬愈伤组织而言,缓慢振动的酶解方式并不适合于分离原生质体。

本课题组多年以来一直从事忍冬基因克隆以及遗传转化等相关研究工作,并取得了一定的进展^[14-15]。而原生质体由于其本身结构上的特点,已经成为遗传转化等相关研究工作的优良材料来源。近些年来,关于忍冬原生质体分离的研究未见报道,本实验全面且综合的考察了忍冬原生质体的分离条件,这将为以忍冬原生质体作为实验材料的细胞融合操作以及遗传转化操作提供必要的帮助和参考。

[参考文献]

[1] 秦双双,袁媛,胡国强,等. 金银花及其变种有效成分含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15):81.

[2] 杨欣,李洪波,陈诚,等. 金银花药性与功效的文献考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18):220.

零陵香水溶性多糖组分的 GC-MS 分析

刘长松, 张贵君*, 张智圆, 李奇豫, 董文茜, 李景松, 张雅楠
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 鉴定零陵香水溶性多糖组分, 为建立专属性的质量评价指标和中药药效组分新药研发奠定基础。方法: 采用水提醇沉法制备零陵香粗多糖, Sevag 法除蛋白、H₂O₂ 脱色、透析得到精制多糖, 衍生化后用 GC-MS 分析。结果: 零陵香水溶性多糖主要组分依次为鼠李糖醇-阿拉伯糖-核糖-葡萄糖-木糖, 其相对含量比例为 1.03: 9.17: 4.74: 18.95: 17.11。结论: GC-MS 联用法可快速鉴定零陵香水溶性多糖组分。

[关键词] 零陵香; 水溶性多糖; 药效组分; GC-MS; 质量评价

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0129-03

Analysis of Water-soluble Polysaccharide Components from Herba Lysimachiae Foenum-graeti by GC-MS

LIU Chang-song, ZHANG Gui-jun*, ZHANG Zhi-yuan, LI Qi-yu,
DONG Wen-xi, LI Jing-song, ZHANG Ya-nan

(School of Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** Identifying the water-soluble polysaccharide components of Herba Lysimachiae

[收稿日期] 20120310(001)

[第一作者] 刘长松, 硕士, Tel: 15201391423, E-mail: changsong1104@yeah.net

[通讯作者] * 张贵君, 教授/博导, 从事中药鉴定方法学、中药药效组分及药效组分质量评价体系研究, E-mail: guijunzhang@163.com

- [3] 于静, 邓雁如, 陈奇, 等. HPLC 测定金银花及金芪降糖片中 6 种成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 57.
- [4] 孙勇如. 植物原生质体培养 [M]. 北京: 科学出版社, 1991: 172.
- [5] 张红梅, 王俊丽. 植物原生质体游离、培养及应用 [J]. 河北林果研究, 2002, 17(2): 376.
- [6] 李志勇. 细胞工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2006: 42.
- [7] 张学英, 葛会波, 刘艳萌, 等. 草莓原生质体分离条件的研究 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(6S): 147.
- [8] 周国海, 陈雪香, 雷勇, 等. 虎杖原生质体分离纯化及电融合初步研究 [J]. 西北植物学报, 2008, 28(6): 1145.
- [9] 张胜珍, 客绍英, 马作东, 等. 崧蓝叶肉原生质体游离与纯化研究 [J]. 中药材, 2009, 32(5): 664.
- [10] 廖嘉明, 王伯初, 王益川, 等. 拟南芥叶肉原生质体分离条件的优化研究 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(6): 1271.
- [11] 刘昕, 余斌, 陈晓燕, 等. 提高甘草原生质体游离产量及分裂频率的研究 [J]. 草地学报, 2011, 19(2): 294.
- [12] 刘剑锋, 程云清, 陈智文. 高山红景天叶肉原生质体分离培养与植株再生 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1127.
- [13] 张小红, 闵东红, 邵景侠. 小麦愈伤组织诱导及原生质体的分离与纯化 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(21): 49.
- [14] Xiaoxiao Peng, Weidong Li, Wenquan Wang, et al. Cloning and characterization of a cDNA coding a hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyl transferase involved in chlorogenic acid biosynthesis in *Lonicera japonica* [J]. Planta Med, 2010, 76: 1921.
- [15] Xiaoxiao Peng, Weidong Li, Wenquan Wang, et al. Identification of *Lonicera japonica* by PCR-RFLP and allele-specific diagnostic PCR based on sequences of internal transcribed spacer regions [J]. Planta Med, 2009, 76: 497.

[责任编辑 邹晓翠]

Foenum-graeti, to establish the quality of specificity evaluation index and Chinese medicine's active components alignment, which laid the foundation of new drug development. **Method:** The preparation of polysaccharides was extracted by the methods of water extracting-alcohol precipitating, then Sevag method sinking in protein, H_2O_2 bleaching and the use of dialysis method refined. The derivative change of the refined polysaccharide was analyzed by GC-MS. **Result:** The polysaccharide of Herba Lysimachiae Foenum-graeti is composed of rhamnitol, arabinose, ribose, glucose, and xylose, the proportion of it is 1.03:9.17:4.74:18.95:17.11. **Conclusion:** GC-MS could rapidly ascertain the water-soluble polysaccharide components of Herba Lysimachiae Foenum-graeti. The water-soluble polysaccharide of Herba Lysimachiae Foenum-graeti can be used as a component of the quality evaluation index and drug components of the new drug research based material.

[**Key words**] Herba Lysimachiae Foenum-graeti; water-soluble polysaccharide; active components alignment; GC-MS; quality evaluation

零陵香始载于《嘉佑本草》，其味甘、淡，性平，功能行气止痛，驱蛔。中医临床用其配伍的煎剂治疗伤寒、感冒头痛、胸腹胀满、鼻塞、牙痛等^[1]。研究资料表明：零陵香有抑制流感病毒作用^[2]，对其药效成分的分析主要是挥发油类^[3]。本文采用 GC-MS 联用法对零陵香水溶性多糖组分进行了分析，旨在建立其专属性的质量评价指标并为中药药效组分^[4]新药研发提供依据。

1 材料

TRACE DSQ 型 GC-MS(美国 Thermo 公司), BS 224S/210S 型分析天平, TU-1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), 透析袋(截留相对分子质量为 3 500), 化学试剂均为分析纯。

零陵香为报春花科植物灵香草 *Lysimachia foenum-graetum* Hance. 的干燥全草, 市售品, 由北京中医药大学张贵君教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 多糖的提取与精制 取零陵香 50 g, 依次分别用 10 倍量的石油醚、10 倍量的乙醇回流脱脂。取药渣挥干溶剂, 用 10 倍量水煎煮 2 次, 合并水煎液并浓缩至 200 mL, 离心 10 min ($3\ 000\ r \cdot \min^{-1}$), 取上清液, 加入乙醇至醇含量为 80%, 4 ℃ 静置 24 h, 滤过。滤渣用丙酮、乙醚、乙醇适量依次洗涤, 干燥, 得粗多糖。

取粗多糖加适量蒸馏水溶解, 加入等量 Sevag 试剂, 振摇 20~30 min, 静置, 离心, 重复多次, 取上清液在 280 nm 处无紫外吸收^[5]。用氨水将多糖液调 pH 至 8, 慢慢滴加 30% H_2O_2 至多糖溶液呈浅黄色, 50 ℃ 水浴 2 h, 透析 24 h, 冻干, 得淡黄色多糖。

2.2 多糖组分的分析

2.2.1 GC-MS 条件 DB-5 型石英毛细管柱(0.25

$\mu\text{m} \times 0.25\ \text{mm} \times 30\ \text{m}$), 进样口温度 250 ℃, 流量 $1\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 离子源温度 250 ℃。升温程序: 120 ℃ 保持 5 min, $20\ \text{℃} \cdot \text{min}^{-1}$ 至 220 ℃, 保持 5 min, $10\ \text{℃} \cdot \text{min}^{-1}$ 至 250 ℃ 保持 10 min。右进样口温度 250 ℃, 分流比 1:10, 进样量 1 μL , 扫描范围 m/z 20~600, 溶剂延迟 2 min, 见图 1。

2.2.2 零陵香多糖的乙酰化 取零陵香 10 mg, 精密称定, 溶于 3 mL $2\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三氟乙酸中, 100 ℃ 水浴 8 h, 60 ℃ 减压蒸干。加入少量甲醇减压蒸干, 反复 3 次除尽三氟乙酸。水解产物中加入 10 mg 盐酸羟胺和 0.7 mL 吡啶, 90 ℃ 水浴 30 min, 冷却至室温, 再加入 1 mL 乙酸酐, 90 ℃ 水浴 30 min, 冷却至室温后取上清液, 减压浓缩至干。乙酰化产物溶于 1 mL 氯仿中, 上机测定。

2.2.3 多糖组分分析 根据供试品各峰保留时间与标准质谱尼斯特谱库(NIST)对照分析, 确定其多糖主要组分依次为鼠李糖醇-阿拉伯糖-核糖-葡萄糖-木糖。采用归一化法进行数据处理, 计算出该多糖峰面积的组合百分比为 1.03:9.17:4.74:18.95:17.11(表 1)。

3 讨论

零陵香中挥发油类和色素类物质含量较高, 所以需脱脂处理。多糖除蛋白的方法主要有三氟乙酸法和 Sevag 法^[6]、等电点沉淀法、加热变性法、膜过滤法。等电点沉淀法和膜过滤法效率低且要求高, 加热变性法和单一等电点不能满足除尽蛋白质的目的。对三氟乙酸法和 Sevag 法考察后发现, 后者效率更高且能完全除尽蛋白质。用 H_2O_2 法脱色, 既可以脱去结合型色素又可以脱去游离型色素, 脱色效果较好, 但在实验过程中要注意控制温度、pH、脱色时间等条件, 以防止多糖降解^[7]。气质联用是目前国际上分析糖类的有效手段, 采用该技术首先要

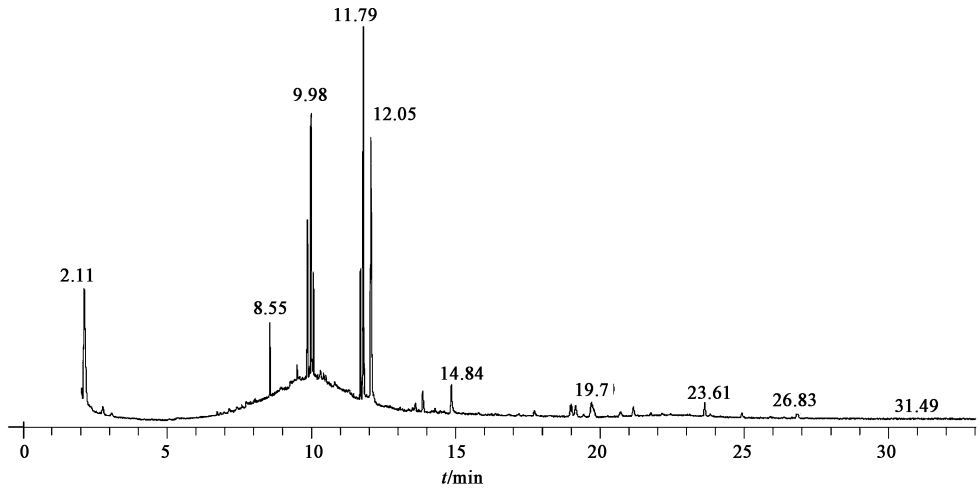


图1 零陵香多糖组分乙酰化总离子流色谱图

表1 零陵香多糖乙酰化衍生物 GC-MS 分析

名称	t_R /min	单糖衍生物	峰面积/%
鼠李糖醇	9.49	1,4-diacetyl-3-acetoxymethyl-2,5-methylene- β -D-rhamnitol 1,4-二乙酰基-3-乙酰氧甲基-2,5-亚甲基- β -鼠李糖醇	1.03
阿拉伯糖	9.98	<i>D</i> -arabinonitrile, 2,3,4,5-tetraacetate 2,3,4,5-四乙酰化- <i>D</i> -氨基阿拉伯糖	9.17
核糖	10.05	<i>D</i> -ribonitrile, 2,3,4,5-tetraacetate 2,3,4,5-四乙酰化- <i>D</i> -氨基核糖	4.74
葡萄糖	11.79	2,3,4,5,6-penta- <i>O</i> -acetyl- <i>D</i> -gluconitrile 2,3,4,5,6-五- <i>O</i> -乙酰基- <i>D</i> -氨基葡萄糖	18.95
木糖	12.05	<i>D</i> -xylonitrile, 2,3,4,5-tetraacetate 2,3,4,5-四乙酰化- <i>D</i> -氨基木糖	17.11

分解多糖。TFA 酸度强,低浓度即可完全水解多糖,且其有很好的挥发性,加入少量的甲醇在旋转蒸干水解液时即可除去^[8],相对于硫酸处理更易控制损失更小。之后将多糖衍生化成为具有挥发性和热稳定性的物质,目前常用的衍生化方法有三甲基硅烷衍生法、糖腈乙酰酯衍生法。后者相对前者具有衍生物制备简便、试剂易得和操作简单等优点,并且每种糖都能得到单一的色谱峰,没有异构峰产生,具有定性和定量准确的优点^[9]。

本实验根据供试品各峰保留时间与标准质谱尼斯特谱库(NIST)对照分析得出零陵香多糖主要由鼠李糖醇、阿拉伯糖、核糖、葡萄糖、木糖组成,其峰面积的百分比为 1.03:9.17:4.74:18.95:17.11。

[参考文献]

[1] 沈国芳. 零陵香及其混淆品的比较鉴别[J]. 中药材, 1998,2(2):72.

- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:2470.
- [3] 李向日,林瑞超. 不同产地零陵香挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 中成药,2007,29(6):853.
- [4] 张贵君,罗容,王奕洁. 中药药效组分理论与中药组分子学[J]. 中药材,2007,30(2):125.
- [5] 李雪华,龙盛京,谢云峰,等. 龙眼多糖荔枝多糖的分离提取及其抗氧化作用的探讨[J]. 广西医科大学学报,2004,21(3):342.
- [6] 赵俊凌,马洁,李戈,等. 齿瓣石斛多糖提取及脱蛋白工艺研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(11):2841.
- [7] 刘洋,吴兆华,高慧媛,等. 金钱草多糖的分离纯化与结构研究[J]. 沈阳药科大学学报,2008,4(4):282.
- [8] 石磊,张冬梅,齐洁,等. 柳茶多糖的分离纯化及气相色谱-质谱分析[J]. 时珍国医国药,2009,20(9):2191.
- [9] 白妮斯,张静. 气相色谱分析多糖衍生化方法的研究与比较[J]. 食品工业科技,2011,2:322.

[责任编辑 邹晓翠]

· 药物代谢 ·

复方盐酸小檗碱结肠定位片在大鼠体内的释药行为研究

邹海艳¹, 李朝霞¹, 王玉蓉^{2*}, 王地¹

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] **目的:**研究复方盐酸小檗碱结肠定位片在大鼠体内的释药行为,评价其结肠定位释药特性。**方法:**分别将复方盐酸小檗碱结肠定位片($\Phi=3\text{ mm}$)和盐酸小檗碱混悬液大鼠灌胃给药,以巴马汀为内标,采用HPLC分别测定大鼠血浆和胃肠道组织中盐酸小檗碱的含量,分析22 h内各时间点药物在胃肠道组织中的分布和血浆药物浓度,计算药物的相对靶向释药指数(DDI)。**结果:**盐酸小檗碱在血浆和胃肠道组织中的线性范围分别为 $0.02\sim 0.40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r>0.998$)和 $0.05\sim 10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r>0.999$);复方结肠定位片组药物释放行为具有明显的时滞,药物主要分布于大鼠盲肠和结肠组织,结肠组织的 C_{\max} 和 $AUC_{0-22\text{ h}}$ 分别为混悬液组的3.1,3.6倍,大鼠胃、近端小肠、远端小肠、盲肠和结肠组织的DDI值依次为0.00,0.23,1.17,2.36,8.55。**结论:**复方盐酸小檗碱结肠定位片具有较好的结肠定位释药特性。

[关键词] 复方结肠定位片; 盐酸小檗碱; 组织分布; 相对靶向释药指数

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0132-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120731.1111.011.html>

[网络出版时间] 2012-07-31 11:11

Study on Release Characteristics of Compound Berberine Hydrochloride Colon Specific Tablets in Rats

ZOU Hai-yan¹, LI Zhao-xia¹, WANG Yu-rong^{2*}, WANG Di¹

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the release characteristics of compound berberine hydrochloride colon specific tablets in rats. **Method:** The rats were administrated orally with the colon-specific tablets of diameter 3 mm and berberine hydrochloride (BH) suspension respectively. After administration, the rat's plasma and gastrointestinal tissues were collected at different time points within 22 h. The berberine in biosamples was determined by HPLC, using palmatine as internal standard. Drug delivery index (DDI) was calculated. **Result:** BH in plasma and gastrointestinal tissues showed good linear relationship in the range of $0.02\sim 0.40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r>0.998$) and $0.05\sim 10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r>0.999$) respectively. The release of BH in tablets mainly distributed in rat's caecum and colon and showed an obvious lag time. The value of C_{\max} and $AUC_{0-22\text{ h}}$ in rat's colon were 3.1 times and 3.6 times of BH suspension group respectively. The DDI of the tablets was 0.00, 0.23, 1.17, 2.36, 8.55 in the rats' gastric, proximal and distal small intestinal, caecal, colonic tissue, respectively. **Conclusion:** The compound berberine hydrochloride tablet is a carrier for targeting the drug to the colon.

[Key words] compound colon specific tablets; berberine hydrochloride; tissue distribution; drug delivery index

[收稿日期] 20120408(007)

[基金项目] 国家“十一”五科技支撑计划项目(2006BAI09B08-14)

[第一作者] 邹海艳,博士,讲师,从事中药质量控制的研究, Tel:010-83911671, E-mail: bwzhy@sina.com

[通讯作者] *王玉蓉,教授,博导,从事中药新剂型与新技术的研究, Tel:010-84738607, E-mail: yurong.wang@163.com

慢性溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 又称非特异慢性溃疡性结肠炎,是一种炎症性肠病,具有病变范围广泛、病情反复发作、迁延不愈,癌变可能性大等特点,已被世界卫生组织列为现代难治病之一。我国 UC 的发病率逐年增加,研究抗 UC 的新药也成为热点^[1-2]。本课题前期采用乙酸和三硝基苯磺酸/乙醇所致的 UC 模型大鼠,将盐酸小檗碱和木香水提物灌肠给药,发现其在改善由腹泻状态和大便隐血、修复结肠组织和抑制结肠炎症因子等方面的药效优于口服给药^[3-4]。

课题组前期以盐酸小檗碱 (berberine hydrochloride, BH) 和木香水提物为模型药物,果胶、瓜耳豆胶为酶触骨架材料,制粒压制成片芯,采用 Eudragit L100 和 Eudragit S100 (1:4) 包肠溶衣制备了复方盐酸小檗碱 pH-菌群触发型结肠定位片 ($\Phi = 6 \text{ mm}$)^[5]。由于药片体积较大在大鼠体内评价困难,根据大片的工艺制备了直径 3 mm 的复方盐酸小檗碱结肠定位小片,并完成了体外释药行为的研究。本实验以上述小片为模型药物,采用盐酸小檗碱混悬液为对照,对大鼠灌胃后,22 h 内血药浓度及药物在大鼠胃肠道组织的结肠定位释药行为进行了研究。

1 材料

1.1 仪器 岛津高效液相色谱仪 (LC-20AT 四元泵、CTO-10ASVP 柱温箱、SPD-20A 紫外检测器),赛多利斯 BT25S 型 1/10 万电子分析天平, pH S-3C 精密酸度计 (上海伟业仪器厂), G16 型医用高速离心机 (白洋离心机厂), Sigma 1-15P 小型台式离心机, S10 型高速匀浆机 (天津汇科仪器设备有限公司)。

1.2 试药 复方盐酸小檗碱结肠定位片 ($\Phi = 3 \text{ mm}$, 自制), 盐酸小檗碱 (四川省什邡鸿运生物化工有限公司), 盐酸小檗碱对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 0713-200107), 盐酸巴马汀对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110732-200907), 乙腈 (色谱纯, Fisher Scientific), 娃哈哈纯净水, 其余试剂均为分析纯。

1.3 动物 Wistar 大鼠, 雄性, 体重 (300 ± 20) g, 合格证号 SCXK (京) 2006-0009, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.033 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ (血浆样品 29:71, 组织样品 28:72), H₃PO₄ 调 pH 3.0, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长

345 nm。

2.2 对照品及内标溶液的配制 精密称取 BH 和盐酸巴马汀 (内标) 对照品各 10.0 mg, 分别置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 400.0 mg·L⁻¹ 的储备液。将 BH 储备液用甲醇稀释配制成一系列质量浓度的标准溶液。盐酸巴马汀贮备液用甲醇稀释配制成质量浓度分别为 20.0, 2.0 mg·L⁻¹ 的内标工作溶液。

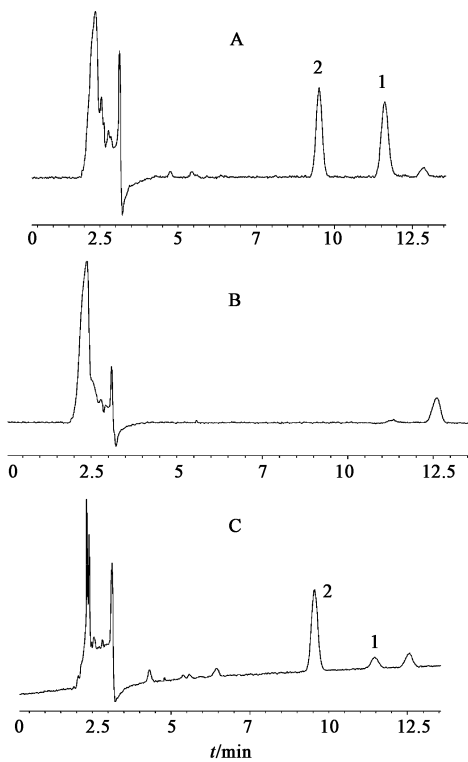
2.3 样品的制备

2.3.1 血浆样品预处理 取 2.0 mg·L⁻¹ 的内标工作液 10 μL , 置于 5 mL 离心管中, 挥干, 加入大鼠血浆样品 2.0 mL, 涡旋 30 s, 加入 5% 异丙醇-二氯甲烷 2.0 mL 萃取, 反复振摇, -20 °C 冷冻 12 h, 取出, 室温下解冻, 3 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 分取有机相置离心管中, 40 °C 减压挥干, 加入 200 μL 甲醇复溶, 取 20 μL 进样。

2.3.2 组织样品预处理 取 20.0 mg·L⁻¹ 的内标工作液 10 μL , 置于 0.5 mL 离心管中, 挥干。分别取上述大鼠胃、近端小肠、远端小肠、盲肠和结肠组织于室温下解冻, 剪碎, 加 5 倍量生理盐水匀浆, 4 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 100 μL 加至上述离心管中, 加入 300 μL 甲醇, 涡旋混合 30 s, -20 °C 冷冻 12 h 沉淀蛋白, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液 10 μL 进行 HPLC 分析。

2.4 动物分组与给药 Wistar 大鼠 48 只, 雄性, 随机分成 2 组, 每组 24 只, 给药前禁食不禁水 12 h。BH 组大鼠灌胃给予盐酸小檗碱混悬液, 每只 1.5 mL (含 BH 6.7 mg); 复方结肠定位片组大鼠乙醚轻度麻醉后, 聚乙烯插管灌胃给药, 每只 1 片。各组大鼠分别于给药后 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 22 h 用 10% 水合氯醛麻醉, 剪开腹腔, 腹主动脉取血, 血浆置肝素化采血管中, 振摇, 迅速离心 (3 500 r·min⁻¹, 10 min), 取上清液, -20 °C 冷冻, 备用。取血后将大鼠胃肠道分为胃、近端小肠 (小肠上 2/3 段, PSI)、远端小肠 (小肠下 1/3 段, DSI)、盲肠和结肠 5 段, 分别取出, 用润湿的剪刀剪开, 生理盐水清洗后, 滤纸吸干, 称重, 置冻存管中 -20 °C 冷冻, 备用。

2.5 专属性试验 取大鼠血浆和各组织样品, 分别按 2.3.1 和 2.3.2 项下处理, HPLC 检测。对照品及内标溶液、大鼠空白和给药后血浆和各组织的色谱图分别见图 1, 2。由图可知大鼠血浆和各组织中的内源性物质对小檗碱和内标物的色谱峰无干扰。



A. 空白血浆加 BH 对照品和内标(1-BH 2-巴马汀);
B. 空白血浆样品; C. 给药后血浆样品

图 1 大鼠血浆 HPLC

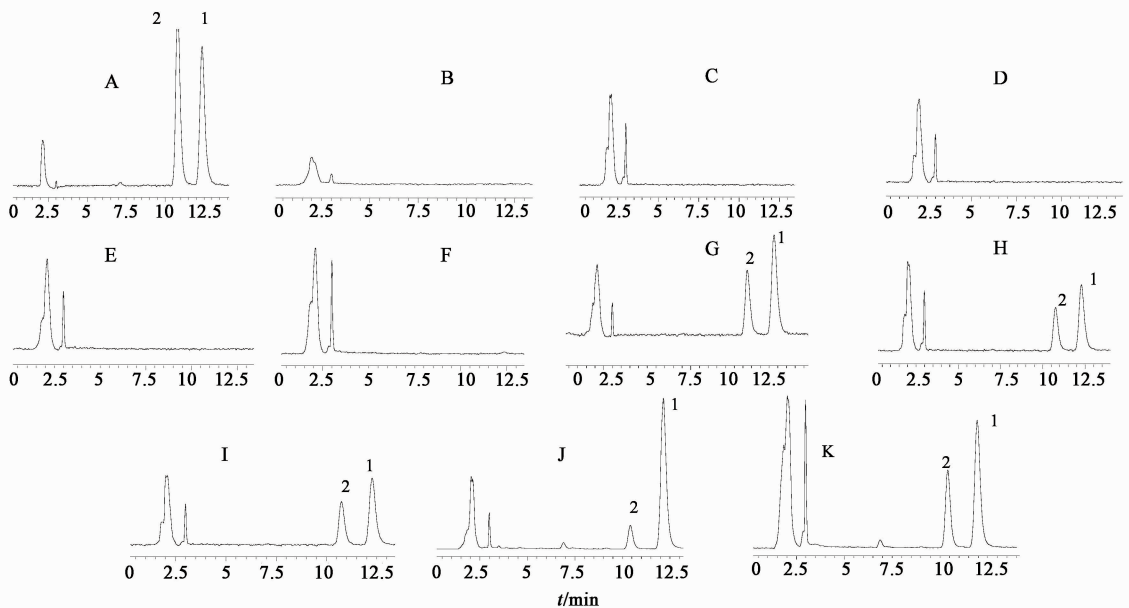
2.6 标准曲线 精密量取 BH 系列标准溶液各 10 μL , 置于 0.5 mL 离心管中, 加入内标工作液 10 μL , 挥去溶剂。取大鼠空白血浆 2.0 mL、胃肠道各空白组织匀浆 0.1 mL, 分别按 2.3.1 和 2.3.2 项下操作, 制成 6 个质量浓度的样品, 每个质量浓度进行 3 样本分析, 以小檗碱峰面积 A_s 与内标峰面积 A_i 之比 $Y(A_s/A_i)$ 对待测物浓度 C 进行回归, 得各生物样品的标准曲线方程和相关系数。结果见表 1。本方法中各生物样品的定量限为 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 大鼠各生物样品中 BH 测定的标准曲线和相关系数 ($n=3$)

生物样品	线性范围 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	回归方程	r
血浆	0.02 ~ 0.40	$Y = 8.7249C - 0.0332$	0.9988
胃组织	0.05 ~ 10.0	$Y = 2.0043C - 0.0836$	0.9999
近端小肠组织	0.05 ~ 10.0	$Y = 1.9520C - 0.1041$	0.9999
远端小肠组织	0.05 ~ 10.0	$Y = 2.0095C - 0.1296$	0.9999
盲肠组织	0.05 ~ 10.0	$Y = 1.9176C - 0.0653$	1
结肠组织	0.05 ~ 10.0	$Y = 2.0541C - 0.0464$	0.9997

2.7 回收率和精密度

2.7.1 血浆样品 取大鼠空白血浆 2.0 mL, 按 2.3.1 项下制备 QC 样品, 低、中、高质量浓度分别为



A. 内标和 BH 对照品(1-BH 2-巴马汀); B. 空白胃组织; C. 空白近端小肠组织; D. 空白远端小肠组织; E. 空白盲肠组织;
F. 空白结肠组织; G. 胃组织样品; H. 小肠上组织样品; I. 远端小肠组织样品; J. 盲肠组织样品; K. 结肠组织样品

图 2 大鼠胃肠道组织 HPLC

0.02, 0.10, 0.40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 每个浓度进行 5 样本分析, 连续 3 d, 根据当日的标准曲线计算方法的回收率与精密度 (RSD), 结果为 3 个质量浓度的血浆样

品日内 RSD 3.2% ~ 8.0%; 日间 RSD 1.4% ~ 5.8%; 方法回收率 100.0% ~ 101.6%。

2.7.2 组织样品 取大鼠各段空白胃肠道组织的

匀浆液 0.1 mL,按 2.3.2 项下分别制备 3 个质量浓度的质控样品(BH 的质量浓度分别为 0.05, 0.50, 10.00 mg·L⁻¹)的质控(QC)样品。每个浓度进行 5 样本分析,连续 3 d,根据当日的标准曲线计算 QC 样品的测得浓度,进行方差分析,求得本方法的回收率与精密性(RSD),结果表明 3 个质量浓度的各组织样品日内 RSD 0.4% ~ 9.3%;日间 RSD 1.3% ~ 7.9%;方法回收率为 92.4% ~ 109.0%。

2.8 稳定性试验 考察了各生物样品,低、中、高 3 个浓度 1 个月内经过 2 次反复冻融,以及样品处理后室温放置 24 h 的稳定性,每个浓度进行 5 个样本分析,室温稳定性 RSD 1.1% ~ 10.6%;冻融稳定性 RSD 1.3% ~ 11.9%。

2.9 数据处理 采用相对靶向释药指数(drug delivery index, DDI)^[6],以 BH 组为对照,计算复方结肠定位片组大鼠胃、近端小肠、远端小肠、盲肠和结肠组织的 DDI,对复方结肠定位片的定位释药特性进行评价。

$$DDI = \frac{AUC_1/AUC_2}{AUC_3/AUC_4}$$

其中 AUC₁ 和 AUC₂ 分别为复方结肠定位片组和 BH 组大鼠各组织中药物浓度-时间曲线下面积, AUC₃ 和 AUC₄ 分别为复方结肠定位片组和 BH 组大鼠血药浓度-时间曲线下面积。AUC_{0-22 h} 采用梯形法求算, C_{max} 和 T_{max} 为实测值。

3 结果

3.1 胃肠道组织中的药物分布 大鼠分别给予盐酸小檗碱混悬液和复方结肠定位片后,22 h 内各时间点胃肠道组织中小檗碱的分布分别见图 3,4。与 BH 组相比,复方结肠定位片组药物在大鼠胃肠道组织的分布情况有所不同:①复方结肠定位片组 2 h 于大鼠胃肠道各组织中未检测到小檗碱,药物分布存在明显的时滞;②复方结肠定位片组各时间点大鼠胃和近端小肠组织基本无小檗碱的分布,药物主要分布于大鼠盲肠和结肠;③复方结肠定位片组在大鼠结肠组织中小檗碱高于 BH 组,其 C_{max} 和 AUC_{0-22 h} 分别为 BH 组的 3.1,3.6 倍。说明复方结肠定位片在大鼠胃、近端小肠不释放,片剂转运至盲、结肠部位后,大量释放药物。

3.2 血浆中药物浓度的变化 BH 混悬液和复方盐酸小檗碱结肠定位片经大鼠口服给药后血药浓度-时间曲线见图 5。复方结肠定位片给药后,2 h 大鼠血浆中未检测到小檗碱, T_{max} 为 6 h,具有明显的时滞, C_{max} 为 (0.25 ± 0.01) mg·L⁻¹, AUC_{0-22 h} 为

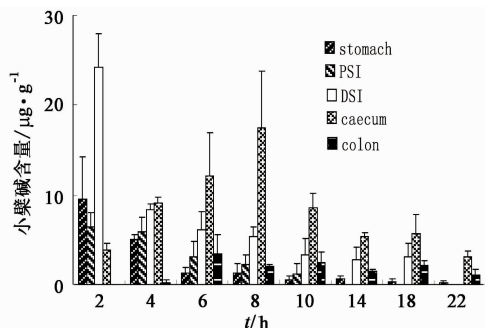


图 3 BH 组大鼠胃肠道组织中小檗碱的分布 ($\bar{x} \pm s_e, n=3$)

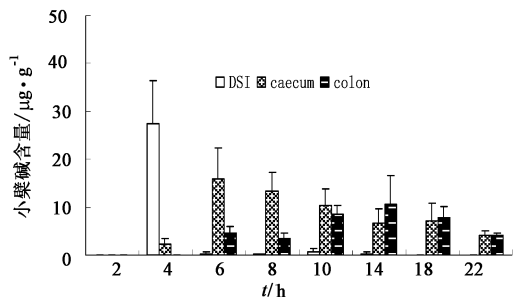


图 4 复方结肠定位片组大鼠胃肠道组织中小檗碱的分布 ($\bar{x} \pm s_e, n=3$)

4.16 mg·h⁻¹·L⁻¹,明显低于 BH 组 [C_{max} = (1.13 ± 0.01) mg·L⁻¹, AUC_{0-22 h} = 10.00 mg·h⁻¹·L⁻¹]; 与 BH 组相比,复方结肠定位片组大鼠血药浓度相对较恒定, T_{max} 延长, C_{max} 降低,其药代动力学行为具有缓控释制剂的释药特点。

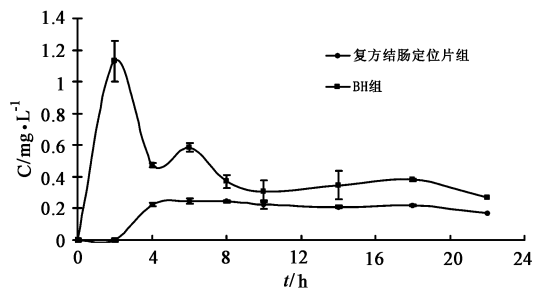


图 5 各组大鼠给药后的血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s_e, n=3$)

3.3 相对靶向释药指数的计算 与 BH 组比较,复方结肠定位片组大鼠胃、近端小肠、远端小肠、盲肠和结肠组织的 DDI 值依次为 0.00, 0.23, 1.17, 2.36, 8.55。结肠组织的 DDI 值分别是远端小肠和盲肠的 7.3, 3.6 倍,表明复方盐酸小檗碱结肠定位片具有较好的结肠定位释药特性。

4 讨论

4.1 口服结肠定位给药系统(OCDDS)的体内评价 须整体给药,使用小型动物给药困难,因此 OCDDS 的体内研究多选择犬作动物模型。因盐酸小檗碱在犬体内吸收差,较大剂量有毒副作用^[7],而大鼠是

与人体消化道的解剖结构、生化环境比较接近、廉价的动物,因此本实验选择大鼠进行体内研究。为便于给药,将直径 6 mm 的大片改为直径 3 mm 的小片,可通过聚乙烯插管顺利灌胃给药。

4.2 复方盐酸小檗碱结肠定位片结合了 pH 控制型和菌群触发型 OCDDS 的释药机制,盐酸小檗碱及其复方结肠定位片均采用 Eudragit L100 和 Eudragit S100(1:4)包肠溶衣,衣膜在酸性条件下不溶解,可使药片顺利通过胃,而不受胃排空时间的影响,且具有延迟释药特性。复方结肠定位片组给药后 2~4 h,在大鼠胃和小肠内可见变形的药片,药片吸水膨胀成球形。当片剂到达小肠时,pH 升高,衣膜逐渐溶解开始释药。

4.3 曾测定了各组大鼠给药后,胃、近端小肠、远端小肠、盲肠和结肠内容物中药量-时间曲线,并进行了相关的方法学考察^[8]。结果显示 BH 组大鼠给药后胃和小肠内容物中的药量逐渐减少,4 h 在盲肠和结肠内容物中开始检测到小檗碱的分布;而复方结肠定位片组大鼠各内容物中 2 h 未检出小檗碱,4 h 于远端小肠开始检出,6 h 在大鼠结肠内容物中检测到小檗碱的分布;复方结肠定位片组 22 h 内结肠内容物中的分布量为 BH 组的 3.9 倍,也证实了该片剂的药物释放具有明显的时滞,于小肠末端开始释药,主要释放大鼠盲肠和结肠。

4.4 小檗碱口服后的血药浓度较低,本实验采用萃取法富集样品,曾采用 9% SDS-氯仿,20% 氨水-氯仿、20% 氨水-乙醚,氯仿、1% NaOH-氯仿、5% 异丙醇-二氯甲烷等溶剂萃取,用含氯仿的溶剂萃取时,乳化现象严重,通过比较最终确定采用 5% 异丙醇-二氯甲烷,萃取比例为 1:1,并采用 -20 ℃ 冷冻 12 h,室温下解冻后离心(3 500 r·min⁻¹,5 min),发现破乳效果较好,冷冻前后样品稳定性无明显变化,低、中、高浓度 BH 的血浆萃取回收率分别为

(86.9 ± 9.2)%, (98.1 ± 5.9)%, (99.3 ± 3.1)%, 符合相关要求。

4.5 选择巴马汀为内标,一方面由于巴马汀和小檗碱的结构相近,在常用溶剂中具有相似的溶解性。在萃取过程中能较好的跟踪待测成分,降低试验误差。此外,根据文献和化学结构分析小檗碱在生物体内不能代谢生成该化合物。采用 5% 异丙醇-二氯甲烷(1:1)萃取时,巴马汀的萃取回收率为(89.5 ± 1.9)% (n = 5),RSD 2.0 %,符合相关要求。

[参考文献]

- [1] 江学良,崔慧斐. 溃疡性结肠炎治疗的新思路[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(4): 319.
- [2] 殷胜骏,韩涛,薛新丽,等. 溃疡性结肠炎临床用药聚类分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(6):77.
- [3] 于海食,洪纓,王玉蓉,等. 肠安康新组方结肠定位给药治疗溃疡性结肠炎的适应性研究[J]. 中国药理学通报,2009,25(增刊):275.
- [4] 于海食,洪纓,王玉蓉,等. 肠安康新方胃肠分解给药对大鼠乙酸性结肠炎的影响[J]. 北京中医药大学学报,2010,29(6):385.
- [5] 肖尧,王玉蓉,马劲,等. 盐酸小檗碱酶触型结肠定位片的制备[J]. 北京中医药大学学报,2008,31(12): 847.
- [6] Richard N F, Barbara H, Lonmei R, et al. Colonic delivery of dexamethasone from a prodrug accelerates healing of colitis in rats without adrenal suppression[J]. Gastroenterology, 1995,108(6):1688.
- [7] 盛美萍,孙洪,王宏. 盐酸小檗碱在 Beagle 狗静脉注射和口服药动学研究[J]. 中国药理学通报,1993,9(1):64.

[责任编辑 邹晓翠]

· 药理 ·

愤怒应激对衰老大鼠认知功能的影响及机制分析

赵君玫, 詹向红*, 张娜, 杨雪, 李伟
(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:研究愤怒应激对 *D*-半乳糖(*D*-gal)诱导的脑老化模型大鼠认知功能的影响及机制。方法:将 Wistar 大鼠随机分成正常对照组、愤怒模型组、*D*-gal 模型组、愤怒 + *D*-gal 模型组及攻击鼠,颈后部 sc 1% *D*-gal 生理盐水溶液,注射容量为 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,正常对照组注射同体积生理盐水,连续注射 6 周。愤怒组、愤怒 *D*-gal 组,从第三周始进行愤怒刺激实验,把愤怒模型组大鼠单独放入鼠笼中,随机放进一只入侵鼠,用纱布包裹止血钳钳夹入侵鼠尾,入侵鼠对模型组大鼠发起攻击,双方互相撕咬对峙,每天刺激时间为 20 min,连续 4 周。第 37 天开始 Morris 水迷宫实验测试,6 d 后处死解剖大鼠,收集脑组织进行超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、脂褐素(LPF)检测;同时对大脑皮质及海马区进行病理学观察。结果:与正常对照组相比,愤怒模型组、*D*-gal 模型组、愤怒 + *D*-gal 模型组脑 SOD 活性明显降低($P < 0.01$),MDA,LPF 含量明显升高($P < 0.01$),空间学习记忆能力明显降低($P < 0.05$);行为活动和学习记忆功能减退差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$);病理学检测结果显示,与正常对照组相比,愤怒模型组、*D*-gal 模型组、愤怒 + *D*-gal 模型组大脑皮质和海马区均出现不同程度的病理变化,其中愤怒 + *D*-gal 模型组病变最为明显。结论:愤怒应激对 *D*-gal 诱导的脑老化模型大鼠的行为活动和认知功能具有减退作用。

[关键词] 愤怒; *D*-半乳糖; 脑老化; 认知功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0137-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120731.1110.010.html>

[网络出版时间] 2012-07-31 11:10

Effect of Anger Stress on the Learning Behaviour and Mechanism Investigation in Aging Model Rats

ZHAO Jun-mei, ZHAN Xiang-hong*, ZHANG Na, YANG Xue, LI Wei
(Traditional Chinese Medicine College of Henan, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and mechanism of anger stress on behavior and memory in the *D*-gal induced brain aging model rats. **Method:** Wistar rats were randomly divided into control group, anger model group, *D*-gal group, anger + *D*-gal group, and attack rats. The *D*-gal group and anger + *D*-gal group were administered ip 1% *D*-gal physiological saline solution (PSS) 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹. The control group and anger model group were ip given the same volume of PSS for 6 weeks. From the third weeks, the anger model group and anger + *D*-gal group accepted the anger stimulation test for 4 weeks. Each rat in anger model group was placed into one cage and accepted the attack from the invade rat, the tail of invade rat was clamped by using haemostat packed with bandage, two rats bite each other 20 min per day. Morris water maze test was carried out in the 37 days. Six days later all rats were executed and the brain tissue was collected for measurement of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), lipofuscin (LPF), meanwhile, pathological changes were observed on cerebral cortex and seahorse. **Result:** Compared with control group, the behavior and memory significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the brain tissue SOD activity was significantly reduced ($P < 0.01$) and MDA,

[收稿日期] 20111231(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973695,30772686);河南省自然科学基金项目(0511044400,411045500)

[第一作者] 赵君玫,副教授,从事情志与衰老相关疾病的研究,Tel:13623858181,E-mail:zhyyzm@163.com

[通讯作者] *詹向红,教授,博士生导师,从事情志与衰老相关疾病的研究,Tel:0371-65962406,E-mail:zxh@163.com

LPF content were obviously increased ($P < 0.01$) in the anger model group, *D*-gal group and anger + *D*-gal group. Furthermore, pathological study showed that the cerebral cortex and seahorse in the anger model group, *D*-gal group and anger + *D*-gal group appeared pathological changes compared with control group, the pathological changes in anger + *D*-gal group were most obvious. **Conclusion:** The anger stress has the negatively effects on behavior and memory in the *D*-gal induced brain aging model rats.

[**Key words**] anger stress; *D*-gal; brain aging; behavior and memory

脑老化是指脑生长、发育、成熟到衰老过程中的后一阶段,包括一系列生理的、心理的、形态结构和功能的变化,以脑部功能的降低、减弱和消失为特征。一般认为,脑老化是机体内环境共同作用的结果,是神经系统衰老的表现,严重影响思维,认知、记忆、定向等功能,其中学习记忆能力减退最为突出。就人类而言,随着社会的进步,生活节奏加快、社会竞争日益激烈,人们的心理波澜和情绪冲突越来越多,与社会心理因素有关的疾病逐渐成为加速衰老的重要因素。而情绪应激是心理应激的常见应激源。有研究显示持久的情绪应激导致机体神经内分泌免疫功能紊乱能够加速衰老过程^[1]。

D-半乳糖(*D*-gal)脑老化模型在一定程度上较好地模拟了自然衰老的改变,目前被广泛应用于衰老、脑老化和相关药物筛查的研究领域^[2]。本研究在(*D*-gal)脑老化模型的基础上,引入愤怒情绪刺激,以衰老自由基学说和脑老化学说为出发点,以*D*-gal 诱导的脑老化大鼠为对象,探讨愤怒对脑老化模型大鼠行为活动和学习能力及抗氧化功能的影响,为愤怒诱导脑老化过速提供病因学实验依据。

1 材料

1.1 试剂 *D*-gal[分析纯,生工生物工程(上海)有限公司,批号 1884B11,使用时用生理盐水配成 1% 的生理盐水溶液],丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20080308)、脂褐素(LPF)试剂盒(批号 20080310)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20080308)均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物 Wistar 大鼠,清洁级,体重(270 ± 10)g,雄性,3 月龄,由河北医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证 SCXK(冀)2003-1-003。

1.3 仪器 Morris 水迷宫(自制),TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),F-4500 荧光分光光度计(日本日立),36012 型光学显微镜(日本奥林巴斯)

2 方法

2.1 动物分组和造模 取 Wistar 大鼠,随机分成 4 组,即正常对照组、愤怒模型组、*D*-gal 模型组、

愤怒 + *D*-gal 模型组及攻击鼠,每组 10 只。颈部皮下注射 1% *D*-gal 生理盐水溶液,注射容量为 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,空白对照组注射同体积生理盐水,连续注射 6 周。愤怒模型组和愤怒 + *D*-gal 模型组每天进行愤怒刺激试验,即采用夹尾间接激怒法引入愤怒刺激,从第 3 周始进行愤怒刺激实验,把愤怒模型组和愤怒 + *D*-gal 模型组大鼠单独放入鼠笼中,随机放进一只入侵鼠,用纱布包裹止血钳,钳夹入侵鼠尾,入侵鼠对模型组大鼠发起攻击,双方互相撕咬对峙,每天刺激时间为 20 min,连续 4 周。第 37 天进行 Morris 水迷宫实验,6 d 后处死大鼠,收集脑组织进行 SOD, MDA, LPF 检测;同时另取对侧大脑组织,用 10% 甲醛溶液固定,进行石蜡包埋切片。

2.2 Morris 水迷宫实验 Morris 水迷宫为直径 100 cm 圆形水池,高 60 cm,内置一无色有机玻璃平台,没于水面下 1~2 cm。水面上均匀地洒满白色塑料泡沫,水池等距离地分为 4 个象限,站台位于某一象限的中央。实验时,水迷宫周围参照物不变,水温 20~22 ℃,记录大鼠寻台时间(searching platform latency, SPL);每天每只动物测 4 次:将大鼠面向池壁分别于 4 个不同的入水点放入水池,使其自由游泳,记录大鼠寻找平台的时间作为定位学习记忆成绩。60 s 内找不到平台,记为 60 s,并将动物放到平台上熟悉 10 s,休息 30 s,进行下一次测试,本实验为期 6 d。

2.3 生化指标检测 实验至第 7 周,冰台上快速取左半脑,冷生理盐水清洗,脑组织称重,制备 10% 脑组织生理盐水匀浆液,分别使用亚硝酸盐法、硫代巴比妥酸比色法、荧光法检测脑组织内 SOD, MDA, LPF 活性。

2.4 组织学检查 实验至第 7 周,取各组大鼠右大脑半球,置 10% 甲醛溶液固定,常规脱水、浸蜡、石蜡包埋、连续切片、HE 染色,随机选取切片,在光镜下对大脑皮层和海马区进行组织学观察。

2.5 统计学分析 各项数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,所有资料的统计分析均用 SPSS 16.0 软件包完成。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对脑老化大鼠模型脑组织 SOD 活力, MDA, LPF 含量和游泳时间的影响 与正常对照组相比,愤怒模型组、*D*-gal 模型组、愤怒 + *D*-gal 模型组大脑 SOD 活性均明显降低 ($P < 0.01$), MDA, LPF 的含量均显著升高 ($P < 0.01$)。与正常对照组相比,愤怒模型组、*D*-gal 模型组、愤怒 + *D*-gal 模型组在 Morris 水迷宫游泳时间均明显延长 ($P < 0.05, P < 0.01$),

说明造模成功。与正常对照组相比,愤怒模型组、*D*-gal 模型组、愤怒 + *D*-gal 模型组空间学习行为差异显著 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与 *D*-gal 模型组比较,愤怒 + *D*-gal 模型组空间学习行为显著降低 ($P < 0.05$), 见表 1。结果提示 *D*-gal、愤怒刺激均可引起机体脑部 SOD 活性, MDA 和 LPF 含量的改变。*D*-gal 可导致大鼠脑老化, 愤怒刺激也可引起脑老化, 同时采用愤怒 + *D*-gal 刺激可加速大鼠脑老化过程。

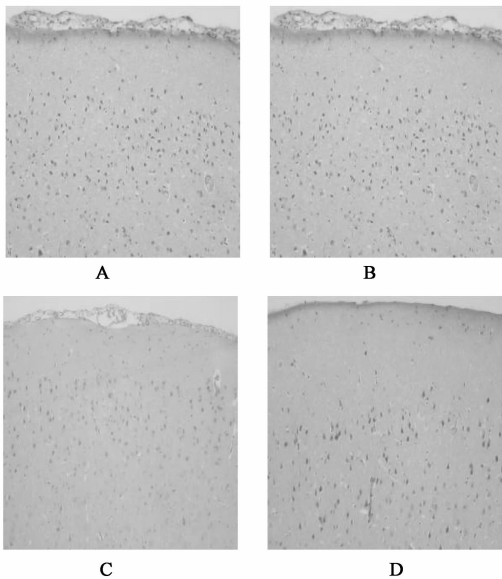
表 1 对脑老化模型大鼠脑组织 SOD 活性, MDA, LPF 含量、游泳时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	SOD/ $U \cdot mL^{-1}$	MDA/ $nmol \cdot mg^{-1}$	LPF/ $\mu g \cdot g^{-1}$	SPL/s
正常对照	78.67 ± 2.09	27.27 ± 1.74	21.70 ± 3.27	8.07 ± 2.28
愤怒模型	73.91 ± 1.62 ²⁾	46.29 ± 2.31 ²⁾	30.75 ± 5.66 ²⁾	15.09 ± 7.02 ¹⁾
<i>D</i> -gal 模型	74.23 ± 2.45 ²⁾	48.57 ± 3.81 ²⁾	31.37 ± 4.75 ²⁾	16.29 ± 6.03 ¹⁾
愤怒 + <i>D</i> -gal 模型	63.78 ± 3.04 ^{2,4)}	80.69 ± 5.36 ^{2,4)}	57.63 ± 3.79 ^{2,4)}	23.22 ± 9.46 ^{2,3)}

注: 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 *D*-gal 模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对脑组织病理学的影响 光镜下可见正常对照组大鼠大脑皮质髓质分界清晰, 神经细胞形态正常; 愤怒模型组大脑皮质区中部分神经细胞轻度萎缩, 神经细胞周围有空泡形成; *D*-gal 模型组中大脑皮质层变薄, 其中以颗粒层、锥体细胞层萎缩较为明显, 正常神经细胞数量明显减少, 部分神经细胞周围可见空泡形成; 愤怒 + *D*-gal 模型组可见大脑皮质层明显变薄, 以颗粒层、锥体细胞层萎缩最为明显, 正常神经细胞数量大量减少, 神经胶质细胞轻度增生, 皮质血管数量减少。见图 1。

楚, 核仁明显; 愤怒模型组中海马 CA1 区神经细胞排列尚紧密、整齐; *D*-gal 模型组中海马 CA1 区神经细胞排列尚整齐, 细胞轻度减少; 愤怒 + *D*-gal 模型组大鼠海马 CA1 区病变显著, 光镜下可见神经细胞排列较为松散, 细胞结构模糊, 胞体肿胀, 部分细胞核固缩、深染。由此可见, 愤怒 + *D*-gal 模型组中大脑皮质区和海马 CA1 区的病理变化最显著, 见图 2。



A. 正常对照组; B. 愤怒模型组;

C. *D*-gal 模型组; D. 愤怒 + *D*-gal 模型组 (图 2 同)

图 1 各组大鼠脑组织染色 (HE, $\times 200$)

各组大鼠海马 CA1 区光镜下可见, 正常对照组中神经细胞排列紧密、均匀、整齐, 细胞丰富, 核膜清

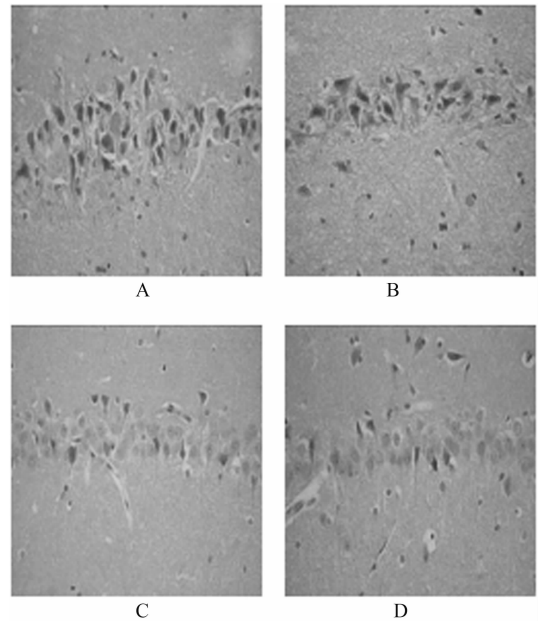


图 2 各组大鼠海马 CA1 区组织染色 (HE, $\times 400$)

4 讨论

中医学认为人的精神活动以五脏精气为物质基础, “人有五脏化五气, 以生喜怒悲忧恐” (《素问·阴阳应象大论篇》)。七情正常则五脏气血和利, 精气充沛, 功能正常。七情太过则会使脏腑气机升降失常, 气、血、精、津运行逆乱受阻, 从而使五脏功能异

常,加速衰老进程,本研究便是基于以上中医理论,探讨愤怒对脑衰老过程的影响的病因、病理、分子生物学机制。

Morris 水迷宫实验是检测大鼠认知水平的重要方法,大鼠经过训练后,学会寻找固定位置的隐蔽平台,形成稳定的空间位置认知记忆,其储存机制主要涉及边缘系统大脑皮层相关脑区,其中海马是认知记忆的关键部位,参与应激过程下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic pituitary adrenal, HPA)轴的抑制性调节,促进应激状态下亢进的 HPA 轴恢复到基础水平,而且它不仅是 HPA 轴应激反应的高位调节中枢,更是受应激累及的最为敏感区域^[3]。在 Morris 水迷宫测试中,随训练时间的延长,大鼠寻台时间缩短,与正常对照组相比,愤怒 + D-gal 模型组寻台时间显著增加,提示愤怒可以导致海马神经细胞受损,使认知记忆能力下降,从病因学方面揭示了愤怒加快大脑老化的病理机制。

自由基是一类非常活跃的化学物质,其中最重要的是氧自由基,它可聚集体表、心脏、血管、肝脏和脑细胞中。如果沉积在脑细胞时,会引起老年人神经官能不全,导致记忆、智力障碍以及抑郁症,甚至老年性痴呆等,是造成人类衰老和疾病的元凶^[4]。衰老的自由基理论是 Dr. Harman 于 1955 年在美国的原子能委员会提出的,衰老是由于自由基对细胞成分的有害进攻造成的,这里所说的自由基,主要就是氧自由基,维持体内适当水平的抗氧化剂和自由基清除剂可以延长寿命和推迟衰老^[5]。SOD 是体内天然存在的超氧自由基清除因子,但是随着年龄的增长和某些体外因素会造成机体和脑组织自由基产生超过机体正常清除自由基的能力,从而使机体组织造成伤害,导致衰老。

MDA 是多不饱和脂肪酸过氧化物的降解产物,机体内 MDA 水平升高会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,且具有细胞毒性。形成黄褐色的色素颗粒。神经细胞中出现时可导致神经退行性变化。所以,测定 MDA 的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接反映出细胞损伤的程度。

LPF 是指细胞胞浆内出现的一种棕褐色色素颗粒,它是细胞器碎片中不饱和脂肪过氧化的产物。一旦聚集过多便影响脏器功能,使人渐渐衰老。出现在脑细胞上,便会引起智力和记忆力的减退;聚集在血管壁,则会发生血管纤维性病变,引起高血压、动脉硬化、心脏病。脂褐素沉积在人体各组织器官细胞中,导致细胞代谢减缓,活性下降,从而造成人

体器官功能衰退表现为衰老。

所以,选择测量 SOD 活性,MDA 和 LPF 的含量可以反映出机体的抗氧化能力,是公认评价衰老的生化指标^[6]。在本次实验中,愤怒 + D-gal 模型组 SOD 活性显著降低,MDA 和 LPF 含量显著升高,从氧化自由基水平的基础上证实了愤怒加重脑老化损伤的程度。

此外,对模型大鼠皮质区和海马组织学研究结果显示,与其余各组相比,愤怒 + D-gal 模型组出现了明显的皮质变薄、颗粒层、锥体细胞层萎缩,神经细胞被非神经细胞所替代的病变;同时,海马 CA1 区神经细胞排列紊乱,细胞结构模糊,胞体肿胀,胞核染色变浅等典型的病理改变。这些变化从病理学水平揭示了愤怒病因刺激加快了脑老化的速度。

脑为髓海,元神之府。其神明作用有赖于全身气机的通调。而气机的通调依赖于肝疏泄功能正常。肝又调畅情志,因而情志不畅,愤愤不平,必然影响全身气机的通调,伤及脏腑,脑失濡养,从而加速大脑老化。

我们的实验研究从认知能力、机体抗氧化能力以及脑细胞病变的水平上揭示出,愤怒情志长期积累和 D-gal 长期刺激均可造成机体认知能力的下降、体内自由基产生过多,甚至造成脑组织病变。反复愤怒刺激可加快 D-gal 大鼠的脑老化的进程,加重脑组织的病变:使脑组织 SOD 活性下降,脑组织 MDA,LPF 含量升高,导致脑组织中过氧化损伤与抗氧化系统之间的平衡失调;从而影响脑的功能活动;使大脑皮质和海马神经元结构出现拟老化改变。由此可见,舒缓情志,调养生机,是延缓衰老特别脑老化的一项重要措施。

[参考文献]

- [1] 詹向红,李伟,赵君玫,等. 慢性愤怒应激对大鼠衰老进程及其神经内分泌免疫机制的影响[J]. 中华中医药杂志,2010,25(1):111.
- [2] 王威,李崧,董会萍,等. 不同剂量 D-半乳糖致昆明小鼠脑老化模型实验的研究[J]. 中国老年学杂志,2009,29(3):260.
- [3] 陈淑媛,贺薇,石玉秀. 海马-HPA 轴-PTSD 的相关性[J]. 中外医疗,2010,25:187.
- [4] 刘磊,刘金钢. 氧自由基在胆管癌形成过程中的作用[J]. 解剖科学进展,2011,17(6):590.
- [5] 赵保路. 自由基、营养、天然抗氧化剂与衰老[J]. 生物物理学报,2010,26(1):26.
- [6] 栾增强,曹文富. 抗氧化延缓衰老中药研究进展[J]. 广东医学,2011,32(5):668.

[责任编辑 聂淑琴]

北柴胡正丁醇部位保肝作用及其化学成分特征初步研究

卫冰, 李晓坤, 杨云*, 王启帅
(河南中医学院药学院, 郑州 450008)

[摘要] **目的:** 研究北柴胡正丁醇萃取部位对小鼠急性肝损伤的保护作用并对其化学成分特征进行初步研究。**方法:** 采用腹腔注射四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤, 以柴胡正丁醇萃取部位高、中、低剂量(20, 10, 4 g·kg⁻¹)同时预防给药 7 d, 检测空白组、模型组、对照组、不同剂量柴胡正丁醇萃取部位组小鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT), 天冬氨酸转氨酶(AST)活性, 同时测定肝组织中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性; 建立并分析北柴胡正丁醇萃取部位 HPLC 色谱图。**结果:** 北柴胡正丁醇萃取部位是以柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 为主要成分的柴胡总皂苷, 可有效抑制造模小鼠血清中 ALT, AST 的升高($P < 0.05$), 同时可提高造模小鼠肝组织中 SOD 的活力, 降低肝组织中 MDA 的含量($P < 0.05$)。**结论:** 北柴胡正丁醇萃取部位对于小鼠急性肝损伤具有保护作用, 其化学成分以柴胡皂苷类为主。

[关键词] 正丁醇萃取; 急性肝损伤; 四氯化碳; HPLC; 柴胡皂苷

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0141-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120731.1038.003.html>

[网络出版时间] 2012-07-31 10:38

Liver Protective Effect and Chemical Constituent Features of n-butanol Extraction from *Bupleurum chinense*

WEI Bing, LI Xiao-kun, YANG Yun*, WANG Qi-shuai

(College of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of n-butanol extraction from *Bupleurum chinense* on acute liver injury in mice induced by carbon tetrachloride (CCl₄) and to have a preliminary study on the features of its chemical constituent. **Method:** Preventive administration of total saikosaponin from *B. chinense* (high dose, middle dose, low dose) on acute liver injury mice induced by CCl₄ (ig) lasted for 7 d, then detect the serum AST and ALT activity and liver tissue MDA content and SOD activity in all groups (blank group, model group, control group and saikosaponins groups), meanwhile construct determination and analysis of HPLC chromatogram of n-butanol extraction of *B. chinense* were carried out. **Result:** Total saikosaponin which mainly contained saikosaponin a (SSa) and saikosaponin d (SSd) was the main constituent of n-butanol extraction of *B. chinense* and it could significantly decrease ALT and AST activity in serum ($P < 0.05$) and meanwhile it could obviously enhance the activity of SOD and reduce the contents of MDA in liver ($P < 0.05$). **Conclusion:** The n-butanol extraction of *B. chinense* has protective effects on acute liver injury induced by CCl₄ in mice and its main constituent was total saikosaponin.

[Key words] n-butanol extraction; acute liver injury; CCl₄; HPLC; saikosaponin

[收稿日期] 20120211(008)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI006A10);河南省科技成果转化(092201310001)

[第一作者] 卫冰, 硕士研究生, 从事中药及制剂中活性成分研究及新药开发研究, E-mail: weibing3381@126.com

[通讯作者] * 杨云, 硕士生导师, 教授, Tel: 0371-65680605, E-mail: yyun@china.com.cn

北柴胡为伞形科植物柴胡的干燥根,具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气之功效^[1],为中医治疗少阳病的要药。现代研究证实北柴胡的水提物和醇提物具有抗肝组织纤维化及保护肝细胞的作用^[2-5],并对人肝癌细胞具有明显的抑制作用^[6],但水提物和醇提物中尚含有大量的黄酮类成分、糖类成分及挥发性成分,因此无法判断是哪类化学成分在发挥作用。为此本研究通过对北柴胡醇提部位进行纯化处理,以正丁醇萃取部位作为研究对象,考察其对急性小鼠肝损伤的保护作用并借助 HPLC 分析技术,分析正丁醇萃取部位主要化学成分的特征,初步判断柴胡保肝作用与其所含化学成分的相关性。

1 材料

1.1 仪器 SUMMIT 高效液相色谱仪配备“CHROMELEONTM”工作站(美国 DIONEX 公司),2000WS 蒸发光散射检测器(美国 ALLTECH 公司),Chromafinger™2005 色谱指纹图谱系统解决方案软件(珠海科曼中药研究有限公司),Hydro-RP80A 色谱柱(广州 Phenomenex 公司),METTLER AE240 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),BS210S 型电子天平(北京赛多利斯天平公司),SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂),PT2100 型内切式组织匀浆机(美国 Polytron),3-18K 型高速冷冻离心机(德国 Sigma),LDZ5-2 低速自动离心机(北京京立),旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),电热恒温水浴平衡锅(北京长风仪器仪表公司),UV-2000 型紫外-可见分光光度计(尤尼科上海仪器有限公司)。

1.2 试剂及药材 丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品(批号 20100529),联苯双酯滴丸(浙江万邦药业有限公司,批号 090906),色谱乙腈(美国 TIDEA 公司),四氯化碳(分析纯,天津四友),实验前用食用花生油配成 0.2% 的四氯化碳植物油溶液,柴胡皂苷 a 对照品(saikosaponin a,SSa)、柴胡皂苷 d 对照品(saikosaponin d,SSd)(本实验室自制^[7],HPLC 峰面积归一化法含量测定均大于 98%)。

柴胡样品(辽宁大连),经河南中医学院生药教研室董诚明教授鉴定为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根。

1.3 动物 SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,(20 ± 2) g,河南医科大学实验动物中心,动物许可

证 SCXK(豫)2005-001,分笼饲养于河南中医学院动物实验中心,温度(24 ± 1) °C,相对湿度 30% ~ 50%,颗粒饲料喂养,自由饮水。

2 方法

2.1 柴胡总皂苷提取液的制备 取北柴胡粗粉(过 40 目筛)201.0 g,分别加 8 倍量和 6 倍量的 95% 乙醇回流提取两次,每次 1 h,减压过滤,合并滤液,减压回收乙醇至膏状。正丁醇饱和水 1 000 mL 捏溶(超声助溶 20 min),水饱和正丁醇萃取 3 次(等量萃取),合并萃取液,减压回收正丁醇。浸膏加生理盐水 201 mL 溶解(超声助溶 5 min),离心 3 min(3 000 r·min⁻¹),沉淀加蒸馏水 201 mL 溶解(超声助溶 5 min),离心 3 min(3 000 r·min⁻¹),合并,混匀,减压浓缩至 201 mL,即得质量浓度为 1.0 g·mL⁻¹ 的药液(每毫升药液相当于 1.0 g 生药。水溶液中柴胡总皂苷的含量经测定为 11.20 g·L⁻¹)。其他剂量按比例稀释得到。

2.2 动物分组 SPF 级小鼠 60 只,随机分成 6 组,即空白组、模型组、阳性药物组、柴胡提取物高、中、低剂量组(各组均为 10 只)。

2.3 剂量设计及造模 阳性药物组给予联苯双酯(以 0.5% CMC-Na 配成 7.5 g·L⁻¹,给药剂量 0.15 g·kg⁻¹),柴胡提取物高、中、低剂量组分别给予相当生药质量浓度为 1.0,0.5,0.2 g·mL⁻¹,给药量 20 mL·kg⁻¹(给药剂量分别为 20,10,4 g·kg⁻¹)。空白组及模型组给予等体积生理盐水。ig 给药,连续 7 d。末次给药后禁食不禁水,2 h 后,空白组 ip 植物油 10 mL·kg⁻¹,除空白组外,其余各组均腹腔注射^[8-9]0.2% 四氯化碳植物油溶液 10 mL·kg⁻¹。造模 18 h 后眼球取血,冷冻高速离心机离心(2 000 r·min⁻¹,离心 4 min),分离血清。按照 ALT 和 AST 试剂盒的操作规程测定血清中 ALT 和 AST 的活力水平。取小鼠肝脏用冰生理盐水漂洗数次后,滤纸拭干,称取 0.5 g,加入冰生理盐水 4.5 mL,用内切式组织匀浆机进行匀浆,制成 10% 的肝组织匀浆,低速自动平衡离心机内 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液 2 mL,备用。1% 的肝组织匀浆液由 10% 的肝组织匀浆与生理盐水按 1:9 的比例稀释而成。按 SOD,MDA 和考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒的方法分别检测肝组织中 SOD 的活力和 MDA 的含量。

2.4 正丁醇部位化学成分特征分析

2.4.1 HPLC 色谱条件 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱,洗脱程序为 0 min:15% A,85% B;15 min:30% A,70% B;25 min:35% A,65% B;

40 min:45% A,55% B;60 min:50% A,50% B;70 min:15% A,85% B。记录时间60 min;恢复平衡时间10 min。检测器蒸发光散射检测器;漂移管温度110℃;空气流速3.0 L·min⁻¹。进样量10 μL。柱温30℃。

2.4.2 对照品溶液的制备 分别取3 mg SSa和SSd,精密称定,置5 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密称定柴胡粉末1 g,精密量取甲醇40 mL,超声提取1 h,滤过,残渣加5 mL甲醇洗涤,合并滤液并80℃水浴挥干,剩余物以10 mL蒸馏水溶解,饱和正丁醇萃取3次,每次10 mL,合并正丁醇萃取液,80℃水浴挥干,残渣以5 mL甲醇溶解并定容于量瓶内,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过即得

2.5 统计方法 采用统计软件SPSS 13.0 for windows对各组数据进行单因素方差分析,各组实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 药理实验结果与分析 在7 d试验期内,各组实验小鼠活动正常,毛色光亮,进食饮水正常,未见粪便的异常改变。与空白组比较,肝损伤模型组及所有治疗组小鼠血清中ALT和AST活性均显著升高($P < 0.05$),表明小鼠急性肝损伤模型建立成功。与模型组相比,预防给药联苯双酯组和柴胡提取物高剂量治疗组均能有效抑制肝损伤小鼠血清中ALT和AST的升高($P < 0.05$)。见表1。

表1 柴胡提取物对急性肝损伤小鼠血清中ALT和AST活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
空白	-	25.40 ± 4.58 ¹⁾	30.30 ± 5.76 ¹⁾
模型	-	47.80 ± 4.29 ²⁾	89.90 ± 6.21 ²⁾
联苯双酯	0.15	30.10 ± 4.07 ^{1,2)}	47.70 ± 8.25 ^{1,2)}
柴胡提取物	20	31.60 ± 3.03 ^{1,2)}	51.60 ± 8.34 ^{1,2)}
	10	45.50 ± 4.35 ²⁾	84.90 ± 8.71 ²⁾
	4	47.70 ± 5.19 ²⁾	89.30 ± 7.69 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与空白组比较²⁾ $P < 0.05$ (表2同)。

与空白组相比,模型组小鼠肝组织中MDA含量显著升高,SOD活性显著降低($P < 0.05$),提示造模组小鼠肝脏出现脂质过氧化,造模成功。与模型组相比,联苯双酯组及20 g·kg⁻¹的柴胡提取物组可显著抑制肝损伤小鼠肝组织中MDA的升高及SOD活性的降低($P < 0.05$),10 g·kg⁻¹柴胡提取物组的

SOD活性水平也显著升高($P < 0.05$),见表2。

表2 柴胡提取物对急性肝损伤小鼠肝组织中SOD活性和MDA水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹
空白	-	285.89 ± 25.10 ¹⁾	4.08 ± 1.57 ¹⁾
模型	-	102.82 ± 17.83 ²⁾	7.37 ± 1.19 ²⁾
联苯双酯	0.15	256.39 ± 22.76 ^{1,2)}	4.50 ± 0.72 ¹⁾
柴胡提取物	20	221.98 ± 22.91 ^{1,2)}	5.51 ± 1.13 ^{1,2)}
	10	197.48 ± 18.37 ^{1,2)}	7.81 ± 1.32 ²⁾
	4	95.34 ± 22.86 ²⁾	7.71 ± 1.23 ²⁾

表1,2的结果提示,给予一定剂量的柴胡提取物可增强小鼠抗氧化及清除氧自由基的能力,可用于预防治疗CCl₄所致小鼠急性肝损伤。

3.2 HPLC图谱分析 所建立HPLC系统适应性良好,方法学考察结果显示精密度、稳定性、重复性均符合实验要求^[10]。SSa,SSd及样品HPLC色谱图见图1~3。以图1~2作为参照,可以得出图3中15号峰和17号峰分别为SSa和SSd,且含量较高,结合柴胡皂苷的性质,可以明确正丁醇萃取部位是以SSa和SSd为主的柴胡总皂苷。

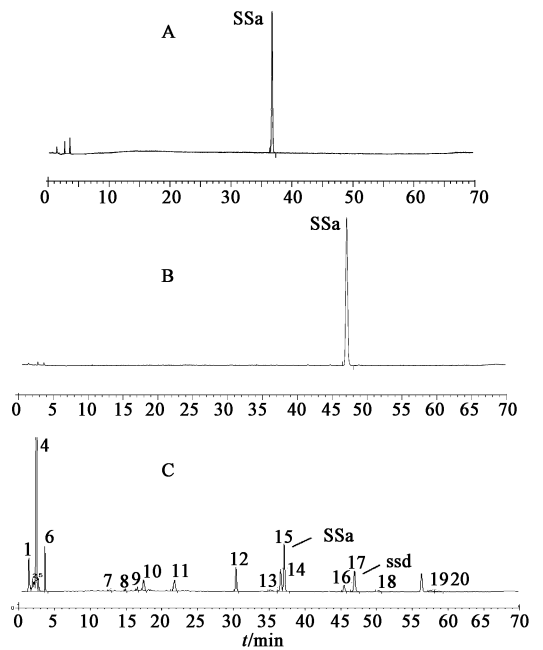


图1 SSa对照品(A),SSd对照品(B),柴胡样品正丁醇萃取部位(C)色谱图

柴胡提取物中皂苷含量的测定方法如下:取2.2项下的水溶皂苷浓缩液0.2 mL(相当于0.2 g生药量),水浴70℃挥干溶剂,剩余物适量甲醇溶解,并转移至25 mL量瓶中,定容至刻度。按标准曲

线的测定方法进行含量测定,测得皂苷浓缩液中的总皂苷含量为 $11.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

在进行 SOD 活力测定前,根据试剂盒的要求需对最佳的肝组织取样量进行选择,本实验的具体过程如下:随机抽取一个肝组织匀浆液,比较不同的取样量(10, 30, 50 μL)的抑制率,最后取抑制率为 50.8% 的一管作为最佳取样量(10 μL)。

如果以小鼠肝组织中的 SOD 活力水平和 MDA 含量以及血清中 ALT 和 AST 作为评价指标,则当给药剂量达到 $20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时(按生药计,相当于人体推荐剂量的 15.5 倍。相当于给予 $224 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的柴胡总皂苷,约为 LD_{50} 的 $1/21^{[11]}$),柴胡提取物可有效地对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤起到保护作用。笔者分析柴胡提取物对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用机制如下:抑制机体脂质过氧化作用的发生,主要的途径为一方面抑制机体内超氧阴离子自由基的形成;一方面激活和增强超氧化物歧化酶的活性,从而加快消除机体内多余的超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2$);另一方面对生物细胞膜产生保护作用,较少自由基与生物细胞膜的接触,有效避免自由基对细胞膜的破坏。

药理实验结果表明,柴胡正丁醇萃取部位对小鼠急性肝损伤具有保护作用,进一步的正丁醇萃取部位 HPLC 色谱分析结果显示该部位是以 SSa 和 SSd 为主要化学成分的柴胡总皂苷类,提示 SSa 和 SSd 与柴胡保肝作用有着密切联系,但是它们是不是柴胡总皂苷保肝作用的主要成分从目前的研究程度来看还不得而知,因此有必要进行更为深入的探讨。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2005:198.
- [2] 石慧,谢东浩.春柴胡及北柴胡水提部位对急性肝损伤小鼠的保护作用[J].南京中医药大学学报,2009,25(6):461.
- [3] 谢东浩,袁冬平,蔡宝昌,等.春柴胡及北柴胡对二甲亚硝胺所致大鼠肝纤维化的保护作用比较[J].中国医院药学杂志,2008,28(23):2006.
- [4] 李宛实,延光海,李镭.北柴胡乙醇提取物对急性肝损伤小鼠肝脏的保护作用及成分分析[J].延边大学医学学报,2010,33(2):105.
- [5] 黄幼昇,黄伟,孙荣.柴胡皂苷对肝脏的药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):298.
- [6] 宋景贵,肖正明,李师鹏,等.柴胡提取物对人肝癌细胞和小鼠 S-180 肉瘤的抑制作用[J].山东中医药大学学报,2001,25(4):299.
- [7] 田润涛.河南北柴胡 LC 指纹图谱研究及中药色谱指纹图谱技术探讨[D].郑州:河南中医学院,2004.
- [8] 李夏,段冷昕,王楠娅,等.鹿茸多肽对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国药学杂志,2007,42(24):1864.
- [9] 蔡秀江,丁安伟,闫冰,等.二至丸保肝活性成分群对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(20):113.
- [10] 王启帅,杨云,肖功胜,等.北柴胡 HPLC-ELSD 指纹图谱的建立及色谱数据的分析[J].中成药,2011,33(3):373.
- [11] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海人民出版社,1977:1832.

[责任编辑 聂淑琴]

抗骨增生胶囊对大鼠骨性关节炎的实验研究

周军^{1,2}, 刘晓海^{1,2}, 宋亚玲^{1,2}, 吕耀中^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001;

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001)

[摘要] **目的:**探讨抗骨增生胶囊(KGZSJN)对实验性大鼠骨关节炎(OA)的影响。**方法:**大鼠膝关节腔注射 4% 木瓜蛋白酶建立 OA 模型, 50 只大鼠分为 5 组, 即正常组, 模型组, KGZSJN 3 个剂量 ig 给予(0.24, 0.48, 0.96 g·kg⁻¹)。末次注射木瓜蛋白酶 1 周后, 开始给药。6 周后处死动物, 切取膝关节, 进行组织学观察, 并检测关节滑膜超氧化物歧化酶(SOD), 丙二醛(MDA)活性以及血清一氧化氮(NO), 一氧化氮合酶(NOS), 白介素-1 β (IL-1 β), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平。**结果:**KGZSJN 可以明显改善 OA 的膝关节病变; KGZSJN 提高关节滑膜 SOD 的活性, 降低关节滑膜 MDA 水平; KGZSJN 降低血清 NO, NOS, IL-1 β , TNF- α 的水平。**结论:**KGZSJN 能有效防治大鼠实验性 OA, 其效应在一定范围内呈剂量依赖性, 其机制可能为提高关节滑膜 SOD 的活性, 降低关节滑膜 MDA, 抑制血清 NO, NOS, IL-1 β , TNF- α 水平。

[关键词] 抗骨增生胶囊; 骨性关节炎; 机制研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0145-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120727.1038.006.html>

[网络出版时间] 2012-07-27 10:38

Effects and Mechanism of Kanggu Zengsheng Jiaonang on Osteoarthritis in Rats

ZHOU Jun^{1,2}, LIU Xiao-hai^{1,2}, SONG Ya-ling^{1,2}, LV Yao-zhong^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2*}

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Company Limited, Lianyungang 222001, China;

2. State Key Laboratory of Pharmaceutical New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Kanggu Zengsheng Jiaonang (KGZSJN) on experimental osteoarthritis in rats. **Method:** Animal models of osteoarthritis were obtained in rats by intra-articular injection of 4% papain for three times. Fifty rats were divided into five groups as normal group, model group, and three KGZSJN treatment groups. The animals began receiving drug orally every day one week after the last injection of papain. Six weeks later, all the animals were sacrificed for analysis. Histological examinations were performed on the articular cartilage. In the same time, the activities of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in synovium were measured, the levels of nitric oxide (NO), nitric oxide synthase (NOS), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were measured respectively. **Result:** KGZSJN could significantly reverse cartilage degeneration, and enhanced the activity of SOD in synovium, KGZSJN reduced the activity of MDA in synovium, and the levels of NO, NOS, IL-1 β , TNF- α in serum. **Conclusion:** KGZSJN can provide some protection in a dose-dependent manner in this model. The mechanisms are related to the reduction of expression of MDA, NO, NOS, IL-1 β , TNF- α , and enhance the activities of SOD.

[Key words] Kanggu Zengsheng Jiaonang; osteoarthritis; mechanism

[收稿日期] 20111021(007)

[基金项目] 国家科技“973 计划”项目(2010CB735604)

[第一作者] 周军, 药理学硕士, 工程师, 主要从事新药药理学研究, Tel:0518-85521946, E-mail: zj272000@sohu.com

[通讯作者] * 萧伟, 博士, 研究员, 从事中药制剂的研究与开发, Tel:0518-85521933, E-mail: wzhzh - nj@tom.com

骨关节炎(OA)是一种多发于老年人的慢性退行性骨关节疾病,以关节软骨的退行性变,伴有半月板和滑膜病变为主要病理改变的疾患^[1]。属于中医学骨痹、痹证范畴。近年来,中医药治疗 OA 有很大进展,研究者从不同的侧面、不同的观测指标为中医药治疗 OA 提供了客观依据^[2]。抗骨增生胶囊(KGZSJN)由熟地黄、肉苁蓉、淫羊藿、女贞子、骨碎补和鸡血藤等组成,主要功效为补腰肾,强筋骨,活血止痛,用于 OA 肝肾不足、瘀血阻络证,关节肿胀、麻木、疼痛、活动受限等。目前,KGZSJN 主要用于颈椎病等关节退行性疾病的治疗^[3],但对 OA 研究报道较少,且其作用机制不明。本实验通过建立大鼠 OA 模型,观察 KGZSJN 对 OA 的作用,并探讨其作用机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,浙江省实验动物中心,许可证号 SCXK(浙)2008-0033,在标准实验室条件下饲养。

1.2 药品及试剂 KGZSJN(江苏康缘药业股份有限公司,批号 100201),木瓜蛋白酶(Sigma 公司,批号 P3250),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(20101203),丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20101201),一氧化氮(NO)试剂盒(批号 20101229),一氧化氮合酶(NOS)试剂盒(批号

20101227)均由南京建成生物工程研究所提供;肿瘤坏死因子(TNF- α)放免试剂盒(批号 20110105),白细胞介素 1 β (IL-1 β)放免试剂盒提供(批号 20110108),均由北京华英生物技术研究所提供。

1.3 仪器 DNM-9602G 型酶标仪(北京普朗新技术有限公司),UV-2550 型紫外分光光度仪,(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 模型的制备、分组及给药 参考文献方法制备 OA 大鼠模型^[4]。SD 大鼠随机分为正常组、OA 模型组、KGZSJN 低、中、高 3 个剂量(0.24,0.48,0.96 g·kg⁻¹),每组 10 只。除正常组外,每鼠双膝关节注射 4% 的木瓜蛋白酶生理盐水溶液 0.15mL,每隔 3 d 注射 1 次,连续 3 次。正常组每鼠双膝关节注射生理盐水 0.15 mL。末次注射木瓜蛋白酶后 1 周,开始给药,KGZSJN 低、中、高剂量组 ig 给予 0.24,0.48,0.96 g·kg⁻¹,正常组和模型组 ig 给予等体积的生理盐水,每天 1 次,连续 6 周。

2.2 检测指标

2.2.1 膝关节形态学观察 实验结束后剖取左膝关节,经 10% 甲醛溶液固定,常规取材,脱水,石蜡包埋,制片(4 μ m 厚),HE 染色,由病理专业人员在光学显微镜下阅片,检查滑膜炎症和软骨的侵蚀等病变,进行软骨 Mankin's 评分^[5],评分标准见表 1。

表 1 关节软骨 Mankin's 评分标准

软骨结构	分值/分	软骨细胞	分值/分	染色程度	分值/分	潮线完整性	分值/分
光整如常	0	数量如常	0	正常	0	完整	0
表面不规则裂隙	1	数量弥漫性增多	1	染色轻度减退	1	多重潮线	1
裂隙深达移行层	2	大量簇集样细胞团	2	染色中度减退	2	软骨血管入侵潮线	2
裂隙深达辐射层	3	数量明显减少	3	染色重度减退	3		
裂隙深达钙化层	4	染色完全消失	4				
软骨层脱落	5						

2.2.2 关节滑膜 SOD 和 MDA 的检测 切开右膝关节,切取关节滑膜,置匀浆管匀浆,-20 $^{\circ}$ C 保存。用紫外分光法测定 SOD 的活性,硫代巴比妥法测定 MDA。

2.2.3 血清细胞因子 NO, NOS, IL-1 β , TNF- α 的检测 实验结束腹主动脉采血 5 mL,分离血清,-20 $^{\circ}$ C 保存。用硝酸还原酶法测定 NO,紫外分光法测定 NOS,放免法测定 IL-1 β 和 TNF- α 。

2.3 统计学分析 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 11.5 进行组间 *t* 检验比较。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 膝关节形态学观察以及 Mankin's 评分 正常组关节软骨完整,滑膜组织排列规则。OA 模型组关节软骨表面不平滑,滑膜细胞明显增生,并可见明显的炎细胞浸润。KGZSJN 治疗组形态学变化程度较 OA 模型组有所减轻,主要表现为关节软骨退行性变程度减轻,周围软组织炎症减轻。结果见图 1 和图 2。同时,按 Mankin's 评分标准评分并进行统计,结果显示:与模型组相比 KGZSJN 0.48,0.96 g·kg⁻¹ 组均降低了 Mankin's 评分 ($P < 0.05, P < 0.01$),见表 2。

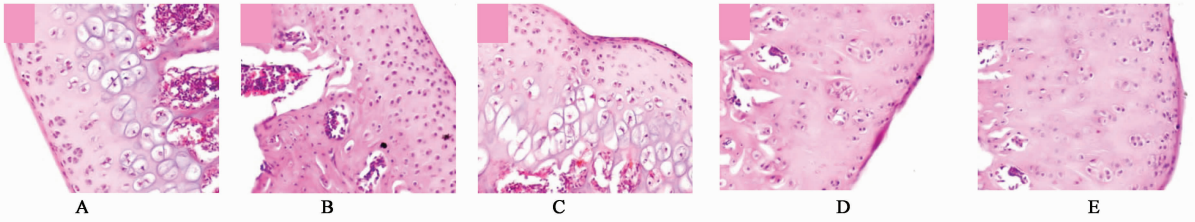
A. 正常组;B. 模型组;C. KGZSJN 0.24 g·kg⁻¹组;D. KGZSJN 0.48 g·kg⁻¹组;E. KGZSJN 0.96 g·kg⁻¹组(图2同)

图1 KGZSJN对OA大鼠膝关节软骨形态学的影响(HE染色,×200)

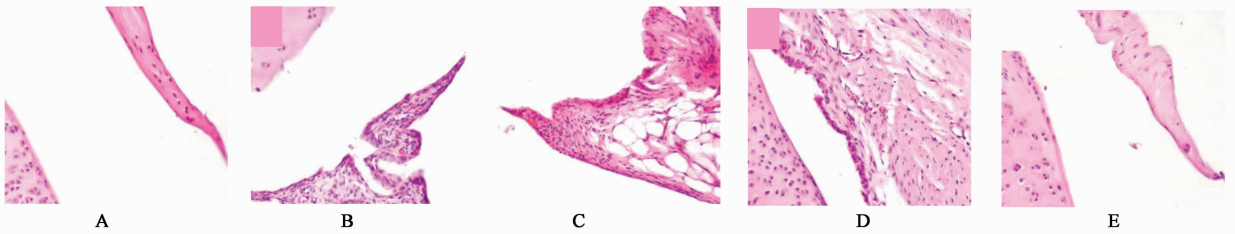


图2 KGZSJN对OA大鼠膝关节滑膜形态学的影响(HE染色,×200)

表2 各组关节软骨的Mankin's评分($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Mankin's 评分/分
正常	-	0
OA 模型	-	6.14 ± 0.94
OA + KGZSJN	0.24	5.71 ± 1.26
	0.48	4.91 ± 1.09 ¹⁾
	0.96	3.34 ± 1.12 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 KGZSJN对OA大鼠关节滑膜SOD和MDA的影响 模型组大鼠关节滑膜SOD明显降低,与正常组相比差异显著($P < 0.05$)。KGZSJN(0.48, 0.96 g·kg⁻¹)组可以明显提高SOD活性,与模型组相比差异显著($P < 0.05, P < 0.01$);同时模型组大鼠关节滑膜MDA明显升高,与正常组相比差异显著($P < 0.05$)。KGZSJN(0.96 g·kg⁻¹)组可以明显降低MDA的含量,与模型组相比差异显著($P < 0.05$)。见表3。

3.3 KGZSJN对血清细胞因子NO, NOS, IL-1 β ,

表4 KGZSJN对OA大鼠血清NO, NOS, IL-1 β , TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	NOS/U·mL ⁻¹	IL-1 β / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- α / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	11.80 ± 1.72	20.28 ± 2.58	0.27 ± 0.02	1.16 ± 0.31
OA 模型	-	13.44 ± 1.59 ¹⁾	23.23 ± 2.20 ¹⁾	0.30 ± 0.03 ¹⁾	1.56 ± 0.37 ¹⁾
OA + KGZSJN	0.24	13.26 ± 2.07	22.93 ± 2.59	0.30 ± 0.06	1.21 ± 0.25 ²⁾
	0.48	11.58 ± 1.93 ²⁾	19.95 ± 2.02 ³⁾	0.26 ± 0.02 ³⁾	0.98 ± 0.34 ³⁾
	0.96	11.11 ± 1.86 ³⁾	19.42 ± 2.16 ⁴⁾	0.25 ± 0.03 ⁴⁾	0.87 ± 0.37 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.001$ 。

4 讨论

目前制作OA动物模型主要有手术方法、药物

表3 KGZSJN对OA大鼠关节滑膜SOD和MDA的影响

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹
正常	-	14.79 ± 0.38	15.33 ± 2.71
OA 模型	-	14.42 ± 0.37 ¹⁾	17.78 ± 2.28 ¹⁾
OA + KGZSJN	0.24	14.39 ± 0.44	17.36 ± 2.96
	0.48	14.91 ± 0.48 ²⁾	15.29 ± 3.03
	0.96	15.05 ± 0.53 ³⁾	14.87 ± 2.79 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

TNF- α 的影响 模型组大鼠血清NO, NOS, IL-1 β , TNF- α 水平明显升高,与正常组相比差异显著($P < 0.05$)。KGZSJN(0.48, 0.96 g·kg⁻¹)可以明显降低NO, NOS, IL-1 β 的活性,与模型组相比差异显著($P < 0.05 \sim P < 0.001$)。KGZSJN 3个剂量组可降低血清TNF- α 的含量($P < 0.05 \sim P < 0.001$),并呈剂量依赖性。见表4。

注射和关节制动等方法。本实验采用膝关节内注入木瓜蛋白酶的方法复制骨关节炎模型,造模后病理

学显示,膝关节软骨表面不平滑,出现多个裂隙,软骨细胞排列不整齐,并可见核固缩或核碎裂;滑膜细胞明显增生、排列紊乱,滑膜组织充血水肿,毛细血管增生,并可见明显的炎细胞浸润,这些改变符合骨性关节炎的病理学特征,提示造模成功。

KGZSJN 由熟地黄、肉苁蓉、淫羊藿、女贞子、骨碎补和鸡血藤等组成,可以清除氧自由基,使退变椎间盘内蛋白质合成增加,修补退变中的胶原纤维;抑制单核细胞和巨噬细胞产生 IL-1,改善软骨细胞功能,推迟细胞退行性病变^[6]。本实验结果表明,OA 大鼠 ig KGZSJN 后,膝关节损伤较模型组明显减轻,主要表现为关节软骨退行性变程度减轻,周围软组织炎症略有减轻,浸润炎细胞数量减少,提示 KGZSJN 具有改善 OA 病变的作用。

OA 的发病机制尚不明确,目前认为它既是一种退行性过程,又有慢性炎症参与^[7]。氧自由基损伤是关节衰老和变性的重要因素,刘春芳等报道,降低血清中 NO 和 MDA 含量,增强 SOD 活性,可以延缓和抑制骨关节炎小鼠软骨退行性改变和滑膜炎症^[8]。本实验结果表明,KGZSJN 可以提高大鼠关节滑膜 SOD 活性,降低关节滑膜 MDA 水平,提示 KGZSJN 通过具有清除氧自由基,从而促进关节软骨退变的恢复的作用。现代分子生物学研究表明,细胞因子在 OA 发病中起着重要的作用^[9]。Antonella Fioravanti 等报道,IL-1 β 可诱导软骨组织的降解并且抑制软骨细胞基质的合成,IL-1 β 也可促进软骨细胞分泌促炎性细胞因子、趋化因子、基质金属蛋白酶(MMPs)和 NO 等,加重软骨的破坏^[10]。本实验结果表明,KGZSJN 可以抑制 OA 大鼠血清 NO, NOS, IL-1 β , TNF- α 的表达,从而减轻细胞因子和炎性因子介导的软骨损害。

综上所述,KGZSJN 可以改善 OA 大鼠膝关节的

退行性改变,具有防治 OA 的作用,其机制可能为提高关节滑膜 SOD 的活性,清除氧自由基;降低关节滑膜 MDA 水平,抑制氧化反应;抑制血清炎性因子 NO, NOS, IL-1 β , TNF- α 的表达,减轻 OA 诱发的免疫炎性反应。

[参考文献]

- [1] 韩国栋,蒋再轶,谭洁,等. 仙灵骨葆胶囊联合盐酸氨基葡萄糖片治疗膝骨性关节炎[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):263.
- [2] 任婕. 消痹灵注射液对退行性骨性关节炎的防治作用及其机理研究[D]. 武汉:湖北中医学院,2009.
- [3] 陈履平,李龙. 抗骨增生胶囊治疗膝骨性关节炎的临床观察[J]. 实用临床医药杂志,2010,14(15):98.
- [4] 胡爱心,陈廖斌,汪晖,等. 黄芪多糖对大鼠骨关节炎的影响[J]. 武汉大学学报:医学版,2008,29(2):157.
- [5] 范李. 辛伐他汀防治骨关节炎的实验研究[D]. 武汉:华中科技大学,2010.
- [6] 赵晓勇,苏江宁,孙喜龙,等. 抗骨增生胶囊与葡立胶囊联用对兔颈椎间盘退变的影响[J]. 中国康复医学杂志,2005,20(12):894.
- [7] 余建华,张衡. 独活寄生汤治疗膝骨关节炎临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):215.
- [8] 刘春芳,林娜,陈卫衡,等. 骨痹散防治小鼠膝骨关节炎的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(1):55.
- [9] 吴银松. 辛伐他汀对骨性关节炎软骨保护作用的实验研究[D]. 西安:第四军医大学,2007.
- [10] Antonella F, Giulia C, Angela P, et, al. Effect of hydrostatic pressure of various magnitudes on osteoarthritic chondrocytes exposed to IL-1 β [J]. Indian J Med Res,2010,132:209.

[责任编辑 聂淑琴]

三拗汤对哮喘小鼠变应性气道炎症的影响及其成分分析

马春华¹, 汪姗姗², 马世平^{1*}, 范欣生^{2*}

- (1. 中国药科大学中药药理教研室, 南京 210009;
2. 南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] **目的:**评价三拗汤对哮喘小鼠变应性气道炎症的影响,并对全方成分进行分析。**方法:**BALB/c 小鼠 60 只,随机分为正常组、模型组、三拗汤高、中、低剂量(7.2, 3.6, 1.8 g·kg⁻¹)组、地塞米松组(0.75 mg·kg⁻¹)。各组小鼠(除空白组)于第 1, 8 天腹腔、皮下分别给予 0.1 mL 的致敏液(0.2 mL 致敏液含卵蛋白 OVA 0.1 mg, Al(OH)₃ 0.02 mg), 第 15~28 天各组(除空白组)给予 5% 的 OVA 雾化,每次雾化 20 min,每次雾化前 30 min 各组小鼠按体重给予相应的药物;空白组以等体积生理盐水代替致敏液,且生理盐水雾化相同的时间。相应的药物治疗 2 周后,取血做嗜酸细胞计数(EOS),取肺泡灌洗液(BALF)做细胞分类计数。采用超高效液相-四级杆串联飞行时间质谱(UPLC-QTOFMS)鉴定其化学成分。**结果:**三拗汤中剂量组使哮喘小鼠血中 EOS 的含量明显的降低($P < 0.01$),三拗汤高、低剂量组使哮喘小鼠血中的 EOS 含量有所降低($P < 0.05$),三拗汤高、中、低剂量使 BALF 中的 EOS 明显下降($P < 0.01$, $P < 0.05$),从三拗汤全方中初步鉴定了 22 个化合物。**结论:**三拗汤对哮喘小鼠变应性气道炎症有明显的抑制作用,其全方主要化学成分为生物碱、黄酮、皂苷成分,这些化学组分与其发挥抗哮喘小鼠变应性气道炎症有密切的关系。

[关键词] 三拗汤; 变应性气道炎症; 成分分析

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0149-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120727.1036.002.html>

[网络出版时间] 2012-07-27 10:36

Effects of Sanao Decoction on Allergic Airway Inflammation in Asthma Mouse and its Component Analysis

MA Chun-hua¹, WANG Shan-shan², MA Shi-ping^{1*}, FAN Xin-sheng^{2*}

- (1. Department of Pharmacology of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Sanao decoction on allergic airway inflammation in asthma mouse and its component analysis. **Method:** Sixty BALB/c mice were divide into six groups: normal group, model group, Sanao decoction high, middle, low dose (7.2, 3.6, 1.8 g·kg⁻¹), positive group (0.75 mg·kg⁻¹), mice in each group (except those in the normal group) were sensitized with 0.2 mL sensitized solution [0.2 mL sensitized solution contains 0.1mg OVA and 0.02 mg Al(OH)₃] during the period from 15 to 28 day, and given corresponding drugs 30 min later, mice were atomized with 5% OVA; mice in normal group were sensitized with physiological saline and were atomized with physiological saline. Samples of blood were collected for

[收稿日期] 20120519(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072748);“十一五”国家科技支撑计划(2006BAI06A02);江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

[第一作者] 马春华, 硕士研究生, 从事中药及复方药理学研究, Tel: 18762407521, E-mail: 705018816@qq.com

[通讯作者] * 马世平, 教授, 博士生导师, 从事中药精神神经药理学研究, Tel: 13951975195, E-mail: spma@cpu.edu.cn

* 范欣生, 研究员, 博士生导师, 从事方剂配伍规律研究, Tel: 13851526269, E-mail: fanxsh126@126.com

counting numbers of eosinophilic granulocyte (EOS), and broncho alveolar lavage fluid (BALF) was collected for counting inflammatory cells. UPLC-TOFMS was used to analyze its chemical compositions. **Result:** Sanao decoction could obviously reduce numbers of EOS ($P < 0.01$, $P < 0.05$), in blood and BALF ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and 22 compounds in Sanao decoction could be identified. **Conclusion:** Sanao decoction can obviously inhibit allergic airway inflammation in asthma mouse, 22 compounds which are related to effect of Sanao decoction are belong to alkaloids, flavonoids, saponins.

[**Key words**] Sanao decoction; allergic airway inflammation; component analysis

支气管哮喘是一种常见的呼吸道疾病,是由嗜酸性粒细胞、肥大细胞和 T 淋巴细胞等多种炎性细胞参与的气道慢性炎症。气道嗜酸细胞浸润及气道病理改变是哮喘疾病临床改变重要的标志^[1],三拗汤出自《太平惠民和剂局方·卷二》,由麻黄、杏仁和甘草组成,具有宣肺止咳平喘之功。方中以麻黄为君,宣肺平喘,发散风寒;杏仁为臣,味苦泻降,性温发散;麻杏配伍,宣降肺气,甘草和药。其药理作用及物质基础一直是中医药理论、临床实践中值得探讨的课题^[2-4]。本实验在前期研究基础^[5]上,重在研究三拗汤对变应性气道炎症影响,并利用 UPLC-TOFMS 从三拗汤中鉴定了 22 个化学组分,这些化学组分与三拗汤发挥抗哮喘小鼠变应性气道炎症药理活性密切相关。

1 材料

1.1 仪器与试剂 UPLC Acquity™ 系统 (Waters 公司), Synapt™ Q-TOF 质谱仪 (Waters 公司), 配有 Lock-spray 接口, 电喷雾离子源 (ESI); S-888F 型超声波雾化器 (中外合资南京道芬电子有限公司), FAH04N 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), LDZS-2 自动平衡离心机 (北京医用离心机厂)。

麻黄、甘草、杏仁 (购自南京益丰大药房, 批号 20111128) 均经南京中医药大学吴德康教授鉴定为正品。三拗汤水煎液高、中、低剂量: 0.72, 0.36, 0.18 g·L⁻¹; 地塞米松 (天津天药药液股份有限公司, 批号 100605); OVA (上海伯奥生物科技有限公司, 批号 110209); 氢氧化铝凝胶 (扬州市星斗药业有限公司, 批号 090803); 嗜酸性粒细胞计数液 (南京建成生物工程研究所, 批号 20111014); 快速瑞姬氏染液 (南京建成科技有限公司, 批号 20120106); 氯化钠注射液 (0.9%) (山东华鲁制药有限公司, 批号 B08110807); 盐酸麻黄碱 (171241-200506)、甲基麻黄碱 (171247-200301)、苦杏仁苷 (A0093) 均购自中国药品生物制品检定所; 甘草酸、甘草素、异甘草素、芒柄花素、甘草皂苷 G₂、甘草皂苷 A₃ (自制, 经

HPLC 面积归一化法测定, 纯度 >98%)。

1.2 动物 SPF 级 BALB/c 小鼠 60 只, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 雌雄各半。购自苏州工业园区爱而麦特科技有限公司, 动物合格证号 2013839。

2 方法

2.1 UPLC 检测条件 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸-水 (A) 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~8 min, 95%~80% A, 8~12 min, 80%~70% A, 12~15 min, 70%~65% A, 15~18 min, 65% A, 18~21 min, 65% A~20% A, 21~23 min, 20%~5% A, 23~24 min, 5% A, 25 min, 95% A); 柱温 30 °C; 流速 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL。

2.2 TOF-MS 检测条件 ESI 源, 扫描方式 ESI± 模式, 毛细管电压 3 kV, 锥孔电压 40 V, 离子源温度 120 °C, 脱溶剂气温度 350 °C, 锥孔气流量 50 L·h⁻¹, 脱溶剂气流量: 600 L·h⁻¹, 碰撞能量 (6~40 V), 离子能量 1 V; 采用全离子扫描方式, 质量扫描范围 m/z 100~1 000。

2.3 供试品制备 精密称取麻黄 6 g, 杏仁 9 g, 甘草 3 g, 加 8 倍量蒸馏水, 浸泡 1 h, 回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并滤液, 过八层滤布, 减压浓缩至 100 mL, 得三拗汤, 取三拗汤 1.5 mL, 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清过 0.22 μm 滤膜, 即得三拗汤供试品。

2.4 对照品溶液的制备 分别精密称取麻黄碱、甲基麻黄碱、甘草酸、甘草素、异甘草素、芒柄花素、苦杏仁苷、甘草皂苷 G₂、甘草皂苷 K₂ 对照品适量以 70% 甲醇配制质量浓度为 28 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.5 小鼠过敏性哮喘模型的建立及给药 将小鼠随机分为 6 组: 模型组、三拗汤高、中、低剂量组 (7.2, 2.7, 1.35 g·kg⁻¹)、空白组、阳性药地塞米松 (0.75 mg·kg⁻¹) 组。每组 10 只, 雌雄各半。除空白组外, 各组动物于第 1, 8 天, 每只皮下、腹腔注射 0.1 mL 致敏液 (0.2 mL 致敏液含 OVA 0.1 mg, Al(OH)₃ 0.02 mg), 第 15~28 天 5% OVA 溶液雾

化,每次雾化 20 min。空白组以等体积生理盐水代替致敏液,并用生理盐水雾化。15 ~ 28 d 雾化,每次雾化前 30 min ig 给药^[2]。

2.6 血液细胞学检查 末次激发 24 h 后,小鼠眼眶取血 1 mL 左右,取 20 μ L 血混匀于 0.38 mL EOS 计数液中,在光学显微镜进行嗜酸粒细胞计数。另取血液适量涂片固定,瑞姬染液染色,显微镜下读取 200 个白细胞,统计各类白细胞个数,计算各类白细胞所占百分比。

2.7 BALF(肺泡灌洗液)细胞学检查 取已处死动物,打开胸腔,结扎左支气管肺门部;分离气管,于气管环状软骨下方剪一 V 型切口,插入气管插管,结扎固定,以 1.5 mL 生理盐水分 3 次灌洗,每次 0.5 mL。取一滴灌洗液至血细胞计数池中,静置后显微镜下读白细胞总数。1 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 室温下离心 10 min,吸出上清液,取沉淀涂片固定,瑞姬氏染液染色,显微镜下读取 200 个白细胞,统计各类白细胞个数,计算各类白细胞所占百分比。

2.8 统计方法 实验数据利用 SPASS 11.5 进行统计,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 对哮喘小鼠血液嗜酸粒细胞数的影响 与正常组相比,模型组血中 EOS 有显著差异($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性对照组、三拗汤高、中剂量组 EOS 含量降低($P < 0.01$),低剂量组有所降低($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 对血液中各类细胞百分比的影响 血液中淋巴细胞百分比,模型组与空白对照组比较显著降低($P < 0.01$);阳性药组与模型组比较有所升高($P < 0.05$)。中性粒细胞百分比各给药组与模型组比较均无差异。嗜酸粒细胞百分比,模型组较空白组显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组、三

表 1 三拗汤对血液中嗜酸粒细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	嗜酸粒细胞数/ $\times 10^9/\text{L}$
空白	-	0.00 \pm 0.00
模型	-	11.63 \pm 4.17 ²⁾
地塞米松	7.5×10^{-4}	2.38 \pm 1.77 ⁴⁾
三拗汤	7.2	5.22 \pm 3.90 ⁴⁾
	3.6	2.63 \pm 1.19 ⁴⁾
	1.8	6.75 \pm 0.31 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

拗汤中剂量组显著降低($P < 0.01$),三拗汤高、低剂量组有所降低($P < 0.05$),见表 2。

表 2 不同剂量三拗汤对血液中炎细胞比例的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	淋巴细胞	中性粒细胞	嗜酸粒细胞
空白	-	62.50 \pm 8.22	37.19 \pm 8.38	0.31 \pm 0.46
模型	-	50.75 \pm 8.24 ¹⁾	28.00 \pm 8.74 ¹⁾	21.25 \pm 5.30 ²⁾
地塞米松	7.5×10^{-4}	58.80 \pm 8.25 ³⁾	35.81 \pm 7.11	4.06 \pm 2.78 ⁴⁾
三拗汤	7.2	56.61 \pm 8.01	29.77 \pm 9.19	13.61 \pm 5.97 ³⁾
	3.6	58.29 \pm 5.67	35.75 \pm 5.43	5.90 \pm 2.59 ⁴⁾
	1.8	56.06 \pm 5.79	30.63 \pm 7.21	13.31 \pm 4.56 ³⁾

3.3 三拗汤对哮喘小鼠 BALF 炎细胞计数的影响

与空白组比较,模型组白细胞总数、淋巴细胞数及嗜酸粒细胞数有显著性差异($P < 0.01$),中性粒细胞有统计学差异($P < 0.05$);而与模型组比较,白细胞总数、淋巴细胞数地塞米松组、三拗汤高、中、低剂量组给药后显著降低($P < 0.01, P < 0.05$);中性粒细胞和单核细胞数,地塞米松组较模型组显著降低($P < 0.01$),其他各给药组给药后较模型组无明显差异;嗜酸粒细胞地塞米松,三拗汤高、中、低剂量组给药后显著降低($P < 0.01, P < 0.05$),见表 3。

表 3 三拗汤对 BALF 中白细胞总数以及各炎症细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	白细胞总数	淋巴细胞数	中性粒细胞数	单核细胞	嗜酸粒细胞数
空白	-	19.63 \pm 5.58	2.47 \pm 1.60	2.59 \pm 1.51	14.53 \pm 4.18	0.04 \pm 0.07
模型	-	29.88 \pm 3.68 ²⁾	7.8 \pm 4.49 ²⁾	4.81 \pm 1.63 ¹⁾	13.88 \pm 3.87	3.98 \pm 1.97 ²⁾
地塞米松	7.5×10^{-4}	10.50 \pm 5.90 ⁴⁾	2.29 \pm 2.08 ⁴⁾	2.09 \pm 1.59 ⁴⁾	5.49 \pm 2.21 ⁴⁾	0.63 \pm 0.62 ⁴⁾
三拗汤	7.2	19.00 \pm 12.01 ⁴⁾	4.13 \pm 2.35 ³⁾	3.61 \pm 2.93	9.93 \pm 6.66	1.33 \pm 1.52 ⁴⁾
	3.6	19.50 \pm 8.62 ⁴⁾	4.09 \pm 2.14 ³⁾	3.28 \pm 2.51	10.95 \pm 6.46	0.60 \pm 0.60 ⁴⁾
	1.8	24.13 \pm 5.38 ³⁾	4.53 \pm 2.53	4.14 \pm 2.53	13.77 \pm 3.35	1.69 \pm 1.05 ³⁾

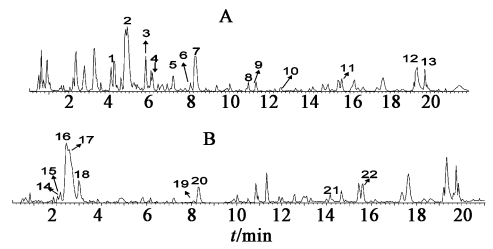
3.4 三拗汤全方化学成分分析

3.4.1 三拗汤全方化学成分鉴定 采用 UPLC-

QTO-MS 方法进行成分鉴定, 通过色谱保留时间 (t_R)、质谱碎片离子 (m/z)、紫外吸收特征 (λ_{max}), 并结合相关参考文献^[6-10] 确定了其中 22 个色谱峰信号的化学成分。实验结果见表 4。总离子流图见图 1。

3.4.2 三拗汤全方化学成分鉴定方法 全方化学成分鉴定分为两种方法: 第一种方法是与对照品比较鉴定; 第二种方法与文献比较鉴定。

3.4.2.1 与对照品比较鉴定, 以鉴定峰 2 为例。 在相同的 UPLC-TOFMS 条件下样品中的峰 2 ($t_R = 4.90, m/z = 456.1496$) 与对照品苦杏仁苷 ($t_R = 4.90, m/z = 456.1496$) 比较, 峰 2 与苦杏仁苷对照品具有相同的保留时间 ($t_R = 4.90$), 从而鉴定峰 2



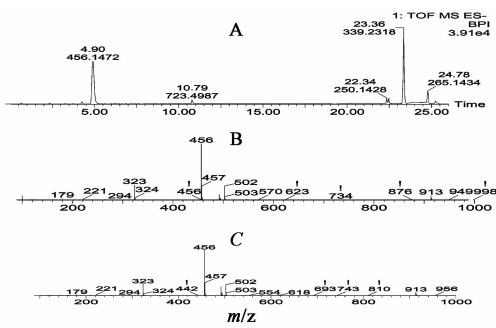
A. 负离子模式采集总离子流图; B. 正离子模式采集总离子流图

图 1 三拗汤全方总离子流

为苦杏仁苷, 并以峰 2 的一级质谱碎片离子 323 与苦杏仁苷对照品的一级质谱碎片离子 323 相同来进一步证明峰 2 即为苦杏仁苷。苦杏仁苷的色谱图及一级质谱及峰 2 的一级质谱图见图 2。

表 4 三拗汤全方成分分析

峰号	t_R /min	成分	分子式	紫外吸 收/nm	[M-H] ⁻ m/z				[M+H] ⁺ m/z			
					检测的 分子量 /Da	理论 分子量 /Da	分子量 精确度 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	MS ⁿ [二级 碎片]	检测的 分子量 /Da	理论 分子量 /Da	分子量 精确度 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	MS ⁿ [二级 碎片]
1	4.62	catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	210	289.070 4	289.07 12	-1.7	245,205				
22												
2	4.90	amygdalin ¹⁾	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	220	456.149 6	456.150 6	-1.9	323				
3	5.97	epicatechin ¹⁾	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	210	289.071 7	289.071 2	1.4	245,205				
4	6.16	vicenin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	287	593.147 8	593.150 6	-4.7	593,234	595.166 4	595.166 3	0.0	595,315
5	7.18	schaftoside/Isoschaftoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	215	563.137 1	563.140 1	-6.0	563,391	565.156 1	565.156 7	0.7	565,257
6	8.05	liquiritin apioside	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	276	549.160 0	549.160 8	1.1	[417,255]				
7	8.28	isoliquritn apioside	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	363	549.155 4	549.156 8	-2.7	549,255				
8	10.94	licuraside	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	361	549.157 3	549.160 8	-5.8	549,255				
9	11.33	formononetin ¹⁾	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	248	267.064 3	267.065 3	-5.2	266				
10	13.29	licorice saponin ¹⁾	C ₄₂ H ₆₃ O ₁₆	250	823.140 2	823.141 6	-1.7	823				
11	15.60	licorice saponin G2 ¹⁾	C ₄₈ H ₆₂ O ₁₇	252	837.390 6	837.390 7	-1.6	[775,625]				
12	19.35	licorice saponin H2 ¹⁾	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	252	821.396 1	821.396 0	0.1	821 [351]				
13	19.67	glycyrrhizin acid/Licorice saponin K2	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	252	821.396 0	821.396 5	0.6	821 [351]				
14	2.05	[norpseudoephedrine-CH ₃]- edrine	C ₉ H ₁₂ N	210					134.095 2	134.096 0	-3.4	117
15	2.17	[norephedrine - CH ₃]-	C ₉ H ₁₂ N	210					134.096 6	134.097 0	-3.0	117
16												
14	2.44	norpseudoephedrine	C ₉ H ₁₃ NO	210					148.111 8	148.112 6	-4.4	133,117
17	2.59	norephedrine	C ₉ H ₁₃ NO	210					148.112 0	148.112 6	-4.1	133,117
18	2.98	methylephedrine ¹⁾ /methylepseudoephedrine	C ₁₁ H ₁₇ NO	210					180.138 3	180.138 8	2.2	162,147
19	8.09	isoliquritigenin ¹⁾	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	228					257.080 3	257.081 4	-4.3	257
20	8.29	liquiritigenin ¹⁾	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	215					257.082 5	257.001 4	-5.4	257
21	11.34	ononin	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	238					431.131 5	431.134 2	-6.3	431.269
22	14.63	licorice saponin A3 ¹⁾	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	248					985.480 1	985.447 0	-2.9	985,647



A. 苦杏仁苷对照品的色谱图;B. 苦杏仁苷对照品的一级质谱图(负离子模式);C. 峰2的一级质谱图(负离子模式)

图2 苦杏仁苷的色谱图及一级质谱及峰2的一级质谱图

3.4.2.2 没有对照品与文献比较鉴定,以鉴定峰21为例。峰21($t_R = 13.29, m/z = 823.1402$),通过查找相关文献^[11],初步鉴定为芒柄花苷,通过峰21的一级质谱图中的特征碎片离子与文献报道的为芒柄花苷特征性碎片离子比较,发现二者具有相同的特征性碎片离子 $m/z = 269$,所以鉴定峰21即为芒柄花苷,峰21的一级质谱图见图3。

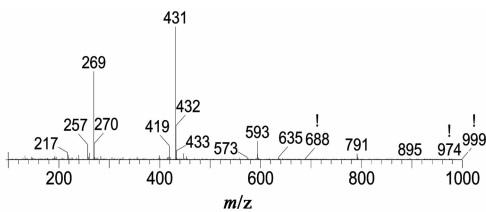


图3 峰21的一级质谱图(负离子模式)

4 讨论

本文通过探讨三拗汤对哮喘小鼠变应性气道炎症的影响,发现三拗汤能显著的改善哮喘小鼠变应性气道炎症。利用UPLC-TOFMS从三拗汤中鉴定了22化学成分,这些化学成分包括生物碱、黄酮、皂苷等,如麻黄碱、甘草酸、甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、芒柄花素、苯甲酸和苦杏仁苷等,这些化学成分与三拗汤抗哮喘小鼠变应性气道炎症有着一定的关系,对于三拗汤抗哮喘小鼠变应性气道炎症的物质基础及其配伍后量的变化有待进一步深入的研究。

[参考文献]

[1] 中华医学会呼吸病学会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗及教育和管理方案)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(3):132.

[2] 许惠琴,顾鹏程,范欣生,等. 三拗汤及其类方对RSV诱导的哮喘小鼠气道反应性的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2010, 11(15):702.

[3] 冯里,徐立,范欣生,等. 三拗汤及类方挥发油对卵蛋白致敏哮喘豚鼠模型的效应评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(5):35.

[4] 汪珊珊,冯理,徐立,等. 三拗汤及加味对致大鼠哮喘模型气道炎症的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(6):542.

[5] 周玲,范欣生,吴德康,等. 三拗汤及其组方药材挥发性成分比较分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(2):1.

[6] 孟翔宇,宋凤瑞,刘志强,等. 麻黄中主要化合物的串联质谱研究[J]. 质谱学报, 2002, 27:55.

[7] Christine A Hugheya, Bruce Wilcox, Carina S, et al. Capillary liquid chromatography-mass spectrometry for the rapid identification and quantification of almond flavonoids[J]. J Chromatography A, 2008, 1192, 259.

[8] Yan-Jing Li, Jun Chen, Ying Li, et al. Screening and characterization of natural antioxidants in four Glycyrrhiza species by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of flight tandem mass spectrometry [J]. J Chromatography A, 2011:1218, 8181.

[9] Mohamed A Farag, Andrea Porzel, Ludger A Wessjohann. Comparativemetabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques[J]. Phytochemistry, 2012, 76:60.

[10] Brian T Schaneberg, Sara Crockett, Erdal Bedir, et al. The role of chemical fingerprinting application to Ephedra[J]. Phytochemistry, 2003, 62:911.

[11] 段天璇,马长华,王文全,等. HPLC-MS法鉴定甘草的指纹图谱[J]. 中国药师, 2009, 12(4):414.

[责任编辑 聂淑琴]

蜘蛛香对高脂血症大鼠血脂及肝功能的影响

陈朝勇, 闫智勇*, 李少华, 陈冲, 左长英

(西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

[摘要] 目的: 探讨蜘蛛香对高脂血症大鼠血脂及肝功能的影响。方法: 清洁级 SD 大鼠, 除正常组外, 其余各组采用高脂饲料喂养 25 d 建立高脂血症大鼠模型后, 洛伐他汀组按 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 每日 ig 给予一次洛伐他汀溶液, 蜘蛛香醇提物低、中、高 3 个剂量组每日分别按相当于生药 1.25, 2.5, 5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 给药 1 次, 造模各组仍喂食高脂饲料。2 周后, 检测血清胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)及肝组织 TC, TG。结果: 高脂饲料诱导后, 模型对照组大鼠血清及肝组织中 TC, TG, LDL-C 较空白对照组显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且血清 ALT, AST 也显著升高 ($P < 0.05$)。洛伐他汀, 蜘蛛香醇提物给药后, 均能显示显著降低血清及肝组织的 TG, 肝组织中 TC 及血清中 ALT, AST 的作用 ($P < 0.01$)。结论: 蜘蛛香能降低实验性高脂血症大鼠血脂, 并能保护高脂血症动物的肝功能。

[关键词] 蜘蛛香; 高脂血症大鼠; 血脂; 肝功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0154-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120727.1036.001.html>

[网络出版时间] 2012-07-27 10:36

Effect of the Extract of *Valeriana jatamansi* on the Blood Lipid and Liver Function in Experimental Hyperlipidemia Rats

CHEN Chao-yong, YAN Zhi-yong*, LI Shao-hua, CHEN Chong, ZUO Chang-ying

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of the extract of *Valeriana jatamansi* Jones on the blood lipid and liver function in experimental hyperlipidemia rats. **Method:** All the rats, except for the normal group, were fed with high-fat diets for 25 days to establish hyperlipidemia model. Then lovastatin group was given lovastatin at the doses of $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ once a day, and *V. jatamansi* high, medium, and low group were respectively given the alcohol extract of *V. jatamansi* at the doses of 1.25, 2.5, 5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ equivalently to the crude *V. jatamansi* by intragastric administration once a day. After administration, every group was still fed with high-fat diets. Two weeks later, the serum level of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and liver TC, TG was detected. **Result:** the TC, TG, LDL-C levels in the serums and livers in model rats were higher than these in normal rats ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the serum levels of ALT and AST also increased significantly ($P < 0.05$). Both lovastatin and the alcohol extract of *V. jatamansi* showed significantly decreased TG level in serum and liver ($P < 0.01$), the TC level in liver ($P < 0.01$) and the ALT and AST in serum ($P < 0.01$). **Conclusion:** *V. jatamansi* can regulate blood lipids level, and protect liver in hyperlipidemia rats.

[Key words] *Valeriana jatamansi*; experimental hyperlipidemia rats; blood lipid; liver function

[收稿日期] 20120314(002)

[基金项目] “重大新药创制”国家科技重大专项“十一五”计划(2009ZX09103-370);教育部中央高校基本科研业务费专项资金(WJTU09CX063, SWJTU09ZT29)

[第一作者] 陈朝勇, 硕士研究生, 从事中药药理学研究, E-mail: cychen1989@163.com

[通讯作者] * 闫智勇, 博士, 教授, 从事中药药理学研究, Tel: 028-66367214, E-mail: yzhiy@swjtu.edu.cn

蜘蛛香系败酱科缬草属植物蜘蛛香的根茎和根,2010年版《中国药典》(一部)称其“功能理气止痛、消食止泻、祛风除湿、镇静安神,用于脘腹胀痛、食积不化、腹泻痢疾、风湿痹痛、腰膝酸软、失眠^[1]”。高脂血症为临床上常见病、多发病,随着人们生活水平不断提高,生活方式也随之发生改变,其发病率逐年增加,严重威胁着人们的生命健康。本研究通过高脂饮食建立实验性高脂血症大鼠模型,探讨了蜘蛛香对高脂血症大鼠血脂水平及肝功能的影响,从而为其防治高脂血症及其相关疾病提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠,雌雄各半,体重(170±10)g,由成都达硕生物科技有限公司提供。合格证号SCXK(川)2008-24。

1.2 药物 蜘蛛香,购于贵州遵义药材市场,经由西南交通大学生命科学与工程学院宋良科副教授鉴定,确认为败酱科缬草属植物蜘蛛香(*Valeriana jatamansi* Jones)药材的根及根茎。洛伐他汀胶囊(20 mg/粒),江苏大洋制药有限公司生产,批号091201。

1.3 试剂 蛋黄粉(批号20110319),江苏西美食品科技有限公司生产;胆固醇(批号110204),安徽天启化工有限公司生产;牛胆盐(批号20110318),北京奥博星生物技术有限责任公司生产;羧甲基纤维素钠(CMC-Na,批号20100813),成都市科龙化工试剂厂生产;总胆固醇(TC,批号20110303)、甘油三酯(TG,批号20110302)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C,批号0110312)和高密度脂蛋白胆固醇试剂盒(HDL-C,批号20110303),均为北京北化康泰临床试剂有限公司生产;丙氨酸转氨酶(ALT,批号20110601)和天冬氨酸转氨酶试剂盒(AST,批号20110530),均为南京建成生物工程研究所生产。

1.4 仪器 RE52-86A旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),BS 224S 1/万精密电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),DY89-II电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司),TGL-16台式高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),Multiskan Spectrum全波长酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司)。

2 方法

2.1 药物的制备 蜘蛛香乙醇提取物:蜘蛛香药材分别加10倍量80%乙醇、40 KHz超声90 min提取

两次,合并两次滤液,40℃旋蒸挥去乙醇,用0.5% CMC-Na溶液配成分别含生药0.3, 0.15, 0.075 g·mL⁻¹的高、中、低3种浓度。洛伐他汀溶液:用0.5% CMC-Na将洛伐他汀配成0.2 g·L⁻¹的溶液。以上药物密封,置4℃冰箱中冷藏备用。

2.2 动物模型的制备 大鼠适应实验环境3 d后,随机分出10只(雌雄各半)为空白对照组,喂饲普通饲料;其余大鼠喂饲高脂饲料^[2](78.8%基础饲料+10%猪油+10%蛋黄粉+1%胆固醇+0.2%胆盐),进行高脂血症动物模型造模。

2.3 分组及给药 造模25 d后,将造模大鼠随机分为5组(模型对照组、洛伐他汀组、蜘蛛香乙醇提取物高、中、低剂量组),每组10只,雌雄各半,加造模前分出的空白对照组共6组。空白组仍喂饲普通饲料,其他组仍喂饲高脂饲料,同时给药,其中蜘蛛香乙醇提取物低、中、高3个剂量组分别按1.25, 2.5, 5 g·kg⁻¹每日ig给药1次;洛伐他汀组按3 mg·kg⁻¹给予洛伐他汀每日ig给药1次;模型对照组和空白对照组分别ig等体积的0.5% CMC-Na溶液,各组连续给药14 d。

2.4 指标检测

2.4.1 血清TC, TG, HDL-C, LDL-C测定 最后1次ig后禁食12 h,不禁水,股动脉取血,高速冷冻离心机4 000 r·min⁻¹离心10 min^[3],取上清液制得血清样本。按检测试剂盒说明方法,用全波长酶标仪,测定血清TC, TG, HDL-C, LDL-C含量。

2.4.2 血清ALT, AST测定 按上述方法得血清,按检测试剂盒说明方法测定血清ALT, AST活性。

2.4.3 肝组织TC, TG测定^[4] 各组大鼠取血后,迅速取出肝,冰生理盐水冲洗、滤纸吸湿后,称取湿重0.3 g左右,按质量体积比1:9加入预冷的生理盐水,冰水中用电动匀浆机制成10%肝匀浆,高速冷冻离心机4℃6 000 r·min⁻¹离心5 min,取上清制得肝组织匀浆。按检测试剂盒说明方法,测定肝组织TC, TG含量。

2.5 数据处理 采用SPSS 13.0对数据进行单因素方差分析,进行各组间比较,后采用t检验。各组实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 具有统计学差异。

3 结果

3.1 对大鼠血清、肝组织脂质生化指标的影响

3.1.1 对大鼠血清TC, TG, 肝组织TC, TG的影响

由表1可见,模型对照组血清及肝组织TC含量明显高于空白对照组($P < 0.01$),血清及肝组织TG也显著高于空白对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模

型对照组相比,洛伐他汀及蜘蛛香高、中、低剂量对血清 TC 含量的影响均无显著性差异,蜘蛛香中、低剂量都具有降低肝组织 TC 的作用($P < 0.01$),蜘蛛

香高、中剂量均能降低血清 TG 含量($P < 0.01$),而对于肝组织 TG,蜘蛛香 3 个剂量组都具有明显的降低作用($P < 0.01$)。

表 1 蜘蛛香对实验性高脂血症大鼠血清、肝组织 TC, TG 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

mmol·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	血清 TC	肝组织 TC	血清 TG	肝组织 TG
空白对照	-	1.42 ± 0.33	0.57 ± 0.13	1.98 ± 0.38	0.92 ± 0.27
模型对照	-	3.49 ± 0.82 ²⁾	1.93 ± 0.63 ²⁾	2.64 ± 0.45 ¹⁾	1.90 ± 0.32 ²⁾
洛伐他汀	0.003	3.33 ± 0.66	1.47 ± 0.36	0.95 ± 0.15 ⁴⁾	1.82 ± 0.32
蜘蛛香醇提物	5	3.43 ± 1.01	1.93 ± 0.64	1.22 ± 0.57 ⁴⁾	1.05 ± 0.25 ⁴⁾
	2.5	3.59 ± 0.58	0.70 ± 0.24 ⁴⁾	1.13 ± 0.48 ⁴⁾	0.44 ± 0.18 ⁴⁾
	1.25	4.23 ± 1.21	1.03 ± 0.37 ⁴⁾	2.55 ± 0.78	0.33 ± 0.11 ⁴⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型对照组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.1.2 对大鼠血清 LDL-C, HDL-C 的影响 由表 2 可见,模型对照组血清 LDL-C 含量明显高于空白对照组($P < 0.01$),与模型对照组比较,蜘蛛香 3 个剂量组血清 LDL-C 含量都没有显著变化;而对于血清 HDL-C 含量,模型对照组和空白对照组没有统计学差异,阳性药洛伐他汀组及蜘蛛香高、中剂量组却明显降低($P < 0.01$)。

表 2 蜘蛛香对实验性高脂血症大鼠血清 LDL-C, HDL-C 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

mmol·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LDL-C	HDL-C
空白对照	-	1.19 ± 0.30	0.55 ± 0.14
模型对照	-	2.23 ± 0.68 ²⁾	0.64 ± 0.19
洛伐他汀	0.003	2.63 ± 0.60	0.34 ± 0.05 ⁴⁾
蜘蛛香醇提物	5	2.37 ± 0.77	0.38 ± 0.08 ⁴⁾
	2.5	2.67 ± 0.63	0.39 ± 0.05 ⁴⁾
	1.25	3.06 ± 0.81	0.60 ± 0.20

3.2 对大鼠血清 ALT, AST 活性的影响 由表 3 可见,模型对照组血清 ALT, AST 活性明显高于正常组。与模型对照组比较,蜘蛛香高、中剂量能显著降低血清 ALT 活性($P < 0.01$),中剂量能显著降低血清 AST 活性($P < 0.01$)。

表 3 蜘蛛香对实验性高脂血症大鼠血清

ALT, AST 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

U·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT	AST
空白对照	-	8.50 ± 1.70	12.43 ± 1.76
模型对照	-	12.05 ± 2.17 ¹⁾	18.31 ± 2.43 ²⁾
洛伐他汀	0.003	8.14 ± 1.44 ³⁾	10.14 ± 2.53 ⁴⁾
蜘蛛香醇提物	5	4.91 ± 2.25 ⁴⁾	16.60 ± 4.80
	2.5	6.41 ± 2.55 ⁴⁾	9.89 ± 2.75 ⁴⁾
	1.25	9.63 ± 5.94	14.31 ± 2.63

4 讨论

高脂血症是导致动脉粥样硬化和冠心病等多种心脑血管疾病发生的重要因素^[5]。目前临床常用西药长期服用均有一定的副作用,且停药后血脂回升情况也较普遍。而中药降血脂作用在中医药理论指导下,具有疗效稳定,副作用小的一些特点^[6]。本课题组前期在对蜘蛛香的研究中,发现蜘蛛香醇提物给药组实验动物饮食正常、精神良好,但较其他组动物体重明显减轻的现象,启示了本实验研究。

从现代医学研究来讲,高脂血症为血脂异常或血脂紊乱的惯称,是指人体内血液中一种或多种脂质成分异常升高,超出正常范围。血脂是指血液中所含脂类的总称,包括:甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)及其酯、磷脂和游离脂肪酸等。血脂在与血浆中的蛋白质结合,形成溶解度大的脂蛋白复合体而运输。各种脂蛋白可分为 4 类:乳糜微粒(CM)、极低密度脂蛋白(VLDL)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)。TC, TG 为血管粥样斑块的构成物质,LDL 可进入血管内壁而促使 TC 沉积,增高的血浆胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)可通过改变凝血系统和纤溶系统的功能,促进血栓形成,加快动脉粥样硬化的形成和发展,从而导致心血管疾病的发生^[7]。

从本实验结果可以看出,模型对照组血清 TC, TG, LDL-C 及肝组织中 TC, TG 含量较空白对照组明显增高,说明本实验中高脂血症模型复制成功。蜘蛛香高、中剂量组能够显著降低实验性高脂血症大鼠血清中的 TG,高、中、低剂量均能显著降低肝组织中 TG,中、低剂量对肝组织 TC 也有明显的降低作用,这表明中药蜘蛛香具有一定的降低实验性高脂血症大鼠血脂的作用,其中对肝组织、血清 TG 和血清 TC 的降低作用比较明显。由于脂蛋白错综复杂

“通利大肠”对 COPD 大鼠气道重构的影响

全贞雪, 钟相根, 李宇航*, 张前, 贾旭, 解华, 周晓卫, 马小鑫,
刘晓辉, 田彦, 王蔚, 刘蕾, 刘妙, 王毅, 徐云, 田浩君
(北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

[摘要] 目的: 观察“通利大肠”对慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型大鼠肺组织的基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、转化生长因子- β (TGF- β)蛋白表达和细胞信号转导分子 Smad3mRNA, Smad7mRNA 基因水平变化, 从气道重构角度探讨 COPD“从肠论治”的效应机制。方法: 用气管注射脂多糖加熏香烟联合造模方法建立 COPD 大鼠模型, 随机分为正常组、模型组、治肠组、治肺组及肺肠同治组。正常组、模型组灌胃 10 mL·kg⁻¹ 纯净水, 各给药组灌胃相应中药(治肠组、治肺组、肺肠同治组的药量分别为 1.50, 4.25, 5.75 g·kg⁻¹), 连续 14 d。用免疫组化法测量肺组织中 MMP-9, TGF- β 蛋白阳性表达面积比率, 用实时荧光定量 PCR 法测定肺组织 Smad3 和 Smad7 的 mRNA 水平。结果: ①与正常组比较, 模型组大鼠肺组织 MMP-9 和 TGF- β 表达增强, 蛋白阳性面积比率值分别为 1.231% 和 3.002%, Smad3mRNA 水平升高至 14.804, Smad7mRNA 水平降低至 0.2 ($P < 0.01$)。②与模型组比较, 治肠组肺组织 MMP-9, TGF- β 分别为 0.944% 和 1.989%, 二者表达减少, Smad3mRNA 水平降低, Smad7mRNA 水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。③与治肺组比较, 肺肠同治组的肺组织 TGF- β 表达和 Smad3mRNA 水平减少, 而 Smad7mRNA 水平升高至 0.784 ($P < 0.01$), MMP-9 的表达则有减少的趋势。结论: 通利大肠或在治肺的基础上增加通利大肠, 能抑制慢性阻塞性肺疾病模型大鼠的气道重构, 从而减轻气道阻塞, 改善通气障碍及肺功能, 这可能是 COPD“从肠论治”效应产生的作用环节之一。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 宣白承气汤; 从肠论治; 气道重构

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0157-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120731.0956.001.html>

[网络出版时间] 2012-07-31 9:56

[收稿日期] 20111204(012)

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划(973计划)项目(2009CB522704)

[第一作者] 全贞雪, 博士研究生, 从事《伤寒论》辨证论治规律研究, Tel: 010-64510283, E-mail: qzx1122@126.com

[通讯作者] *李宇航, 博士生导师, 教授, 从事《伤寒论》辨证论治规律研究, Tel: 010-64287002, E-mail: liyuhang@bucm.edu.cn

的网状代谢过程, 影响 TC, TG 代谢的因素较多, 其机制有待进一步研究。

ALT 主要存在于肝细胞浆中, 而在肝细胞损害、坏死甚至在细胞变性时会释放到血清中使血清 ALT 升高, 为最敏感的肝功能检测指标之一。AST 在心肌中含量最高, 其次为肝脏, 当肝损伤时, 血清中 AST 可明显升高。通过检测血清 ALT, AST 的变化, 发现模型对照组血清 ALT, AST 较空白对照组显著升高, 说明高脂血症大鼠肝功能受到损伤。蜘蛛香高、中剂量组 ALT, 中剂量组 AST 的活性较模型对照组显著降低, 其余各组也均有降低的趋势, 说明蜘蛛香醇提物具有保护高脂条件所造成的大鼠肝损伤的作用。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:345.

- [2] GB15193.1-94. 食品安全性毒理学评价程序和方法[S]. 2003, 2:35.
- [3] 谭梦晖, 于波, 谷颖敏, 等. 香青兰不同部位提取物对大鼠实验性高脂血症的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21):209.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002:1202.
- [5] Ahmed M H, Saad R A, Osman M H. Ezetimibe: effective and safe treatment for gylsypidaemia associated with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Expert Opin Drug Saf, 2006, 5(3):487.
- [6] 李凤玲, 孙健, 杜力军. 近年来不同中药剂型降血脂药效概述[J]. 中国中医药信息杂志, 1995, 2(5):14.
- [7] 陈修. 心血管药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989:89.

[责任编辑 聂淑琴]