

四物汤不同提取工艺对血虚模型小鼠造血功能的影响

何瑶¹, 傅超美^{1*}, 毛茜¹, 游宇¹, 胡慧玲¹, 杨玲²

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041)

[摘要] 目的: 探讨四物汤水提工艺、水提醇沉工艺及 50% 乙醇渗漉工艺对血虚模型小鼠造血功能的影响。方法: 将小鼠随机分为 6 组, 即空白对照组、模型组、阳性(复方阿胶浆)组、四物汤药物组 1 号(水提组)、2 号(水提醇沉组)、3 号(50% 乙醇渗漉组)。四物汤药物组每日 ig 给予四物汤 1, 2, 3 号(12 g 生药·kg⁻¹), 阳性组给予复方阿胶浆(20 mL·kg⁻¹), 正常对照组与模型组给予等容量生理盐水, 连续给药(生理盐水)8 d。除空白对照组外, 其余各组分别于第 2, 5 日 sc 乙酰苯肼 20, 40 mg·kg⁻¹, 从第 5 日起, 每日 ip 环磷酰胺 40 mg·kg⁻¹, 连续 4 d。空白对照组同时注射等容量生理盐水。检测四物汤不同提取工艺药物组对血虚小鼠外周血象、脾脏和胸腺指数、骨髓有核细胞数的作用。结果: 四物汤药物组 1, 2, 3 号均能升高血虚小鼠红细胞数、血红蛋白含量、白细胞数及骨髓有核细胞数, 其中水提组和 50% 乙醇渗漉组差异性显著($P < 0.05$); 四物汤药物组 1, 2, 3 号均能显著增加血虚小鼠脾脏指数和胸腺指数($P < 0.01$), 其中水提组、50% 乙醇渗漉组有强于水提醇沉组的趋势。结论: 由 3 种提取工艺制得的四物汤对改善血虚模型小鼠的造血功能均有作用, 以水提组和 50% 乙醇渗漉组较优。

[关键词] 四物汤; 提取工艺; 血虚小鼠; 造血功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0198-04

Effects of Siwu Decoction with Different Extracting Techniques on Hematopoietic Function in Mice with Blood Deficiency

HE Yao¹, FU Chao-mei^{1*}, MAO Qian¹, YOU Yu¹, HU Hui-ling¹, YANG Ling²

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
2. School of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Siwu decoction with different extracting techniques including water extract, water extract and alcohol precipitate, and 50% ethanol percolation on hematopoietic function in mice with blood deficiency. **Method:** The mice were randomly divided into six groups: normal group, model group, positive group, water extract group, water extract and alcohol precipitate group, 50% ethanol percolates group. The Siwu decoction groups were treated with the dosage of 12 g·kg⁻¹, positive group was given Fufang E-Jiao Jiang 20 mL·kg⁻¹, normal group and model group were given physiological saline, for 8 days. Except normal group, every group received subcutaneous injection with APH in the second and fifth day with the dosage of 20, 40 mg·kg⁻¹ respectively. From the fifth day, every group received peritoneal injection with CTX 40 mg·kg⁻¹ every day for four days. The normal group was given physiological saline. Then, the peripheral hemogram, index of spleen and thymus, blood mononuclear cell (BMC) were detected in different groups. **Result:** All Siwu decoction groups could enhance the number of red blood cell (RBC), white blood cell (WBC), BMC and the content of HGB, and the effects of water extract group and 50% ethanol percolates group were more obvious ($P < 0.01$) meanwhile Siwu decoction groups could increase index of spleen and thymus ($P < 0.01$). **Conclusion:** Siwu decoction can improve the hematopoietic function in mice with blood deficiency, and the

[收稿日期] 20111021(017)

[基金项目] 四川省科技厅支撑计划(2008JY0083)

[第一作者] 何瑶, 助教, 硕士研究生, 从事中药新制剂、新剂型、新技术和新工艺研究, Tel: 13882280308, E-mail: heyao3231@163.com

[通讯作者] * 傅超美, 教授, 博士生导师, 从事中药新制剂、新剂型、新技术和新工艺研究, E-mail: chaomeifu@126.com

water extract group and 50% ethanol percolates group were better than water extract and alcohol precipitate group.

[Key words] Siwu Tang; extraction technology; blood deficiency mice; hematopoietic function

四物汤渊源于《仙授理伤续断秘方》,自古以来被誉为“补血之专方,调经之良剂”,是中医临床补血调经的常用经典方剂。目前,四物汤已发展成膏剂、合剂、片剂、颗粒剂等多种中成药剂型,通过对历版《中国药典》、《中成药部颁标准》等所收载四物制剂标准的查阅^[1-5],发现其提取工艺有水提、水提醇沉、乙醇渗漉等方法。有关四物制剂工艺研究的文献报道中^[6-8],多以单一成分(芍药苷)或干膏收率为评价指标,也有学者考察四物汤不同配伍比例和提取方法对卵巢颗粒细胞增殖的影响^[9],结合四物汤补血药效筛选其提取工艺的研究尚未见报道。本文基于四物汤复方多成分、整体调节作用的特性,在对其指纹图谱研究的同时,就其不同提取工艺对血虚模型小鼠造血功能的影响进行了研究,以期结合药效作用优选出四物汤补血作用显著的提取工艺。

1 材料

1.1 仪器 MEK-6318K型全自动血细胞分析仪(日本光电仪器公司);奥林巴斯-CX21生物显微镜(日本);血细胞计数板(25格×16格)(上海求精生化试剂仪器有限公司)。

1.2 试剂与药品 四物汤的处方组成药物经成都中医药大学中药鉴定教研室鉴定均为正品,即熟地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 干燥块根的炮制加工品;当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels 的干燥根;白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall 的干燥根;川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎,经检查均符合《中国药典》2010年版一部各项规定;环磷酰胺(cyclophosphamidum, CTX)(上海华联制药有限公司,批号010116);乙酰苯肼(acetyl phenyl hydrazine, APH)(上海试剂三厂,批号20020920);肝素钠注射液(heparin sodium injection)(上海第一生化药业有限公司,批号20040205);复方阿胶浆(山东东阿阿胶股份有限公司)。

1.3 动物 昆明种小鼠,雌雄各半,体重18~22 g,由四川省医学科学院实验动物研究所提供,合格证号SCXK(川)2008-24。

2 方法

2.1 四物汤不同提取工艺药液的制备^[1-5]

2.1.1 水提工艺样品制备 参照中成药地方标准

上升国家标准部分(外科妇科分册)四物膏(Ws-10876(ZD-0876)-2002)项下工艺制备。

2.1.2 水提醇沉工艺样品制备 参照《中国药典》2005年版一部四物合剂项下工艺制备。

2.1.3 50%乙醇渗漉工艺样品制备 参照《中国药典》2000年版一部四物合剂项下工艺制备

2.2 抗环磷酰胺和乙酰苯肼联用所致血虚小鼠试验^[10-14]

2.2.1 小鼠分组 将小鼠随机分为6组,即空白对照组、模型组、阳性(复方阿胶浆)组、四物汤药物组1号(水提组)、2号(水提醇沉组)、3号(50%乙醇渗漉组)。

2.2.2 给药及造模 四物汤以成人每日服用60 g为标准,换算得到四物汤药物组每日 ig 给予四物汤1,2,3号按生药量计为12 g·kg⁻¹,阳性组给予复方阿胶浆(20 mL·kg⁻¹),正常对照组与模型组给予等容量生理盐水,连续给药(生理盐水)8 d。除空白对照组外,其余各组分别于第2,5日 sc 乙酰苯肼20,40 mg·kg⁻¹,从第5日起,每日 ip 环磷酰胺40 mg·kg⁻¹,连续4 d。空白对照组同时 ip 等容量生理盐水。

2.2.3 试验数据的记录与测定 每日分别记录每组小鼠的体征特点;于第8天末次给药2 h后,眼眶取血,测定各组小鼠血液中的红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、白细胞(WBC)值;取血后,立即脱颈白处死小鼠,取出脾脏、胸腺,称重,计算脾脏指数与胸腺指数;分离股骨取骨髓,计数骨髓中的有核细胞数(BMC)。

2.3 统计学分析 采用SPSS 15.0统计软件对试验数据进行统计学分析,试验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较用 *t* 检验法, *P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠的体征变化 模型组小鼠第4天出现行动缓慢,团缩、毛蓬竖而少光泽,面、眼、耳、尾苍白而凉,阳性组与各四物汤药物组小鼠行动敏捷,腰背平直,毛色正常,尾圆色粉红,与正常小鼠差别不明显。

3.2 对血虚小鼠模型 RBC, HGB, WBC, BMC 的影响 四物汤各组药物和复方阿胶浆阳性组与模型组相比较,对环磷酰胺和乙酰苯肼联用所致的血虚小鼠外周血中 RBC, HGB, WBC 以及 BMC 降低均有升高的作用。在升高 RBC 方面,水提、50%乙醇渗漉

组与模型组相比有显著性差异 ($P < 0.01$), 水提组有高于其余各组的趋势; 在增加 HGB 方面, 水提组、50% 乙醇渗漉组与模型组比较有差异 ($P < 0.05$), 而水提醇沉组无差异, 但有升高的趋势; 在升高 WBC 方面, 50% 乙醇渗漉组与模型组相比有显著性

差异 ($P < 0.01$), 水提组有差异 ($P < 0.05$), 而水提醇沉组无差异; 在增加 BMC 方面, 四物汤水提组、50% 乙醇渗漉组与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.01$), 水提组有高于其余各组的趋势, 而水提醇沉组与模型组比则无差异。见表 1。

表 1 四物汤不同提取工艺对血虚小鼠模型 RBC, HGB, WBC, BMC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	RBC/ $\times 10^{12}/L$	HGB/ $g \cdot L^{-1}$	WBC/ $\times 10^9/L$	BMC/ $\times 10^9/L$
空白	-	10.32 \pm 0.94 ⁴⁾	130.3 \pm 12.4 ⁴⁾	7.90 \pm 0.67 ⁴⁾	10.07 \pm 1.55 ⁴⁾
模型	-	6.55 \pm 0.86 ²⁾	95.0 \pm 13.8 ²⁾	3.13 \pm 0.59 ²⁾	4.74 \pm 0.68 ²⁾
复方阿胶浆	20 mL \cdot kg ⁻¹	9.07 \pm 1.25 ^{2,4)}	111.8 \pm 13.5 ^{1,3)}	4.47 \pm 0.64 ^{2,4)}	8.16 \pm 0.89 ^{2,4)}
四物汤水提	12	7.87 \pm 0.88 ^{2,4)}	111.4 \pm 9.5 ^{1,3)}	4.15 \pm 0.57 ^{2,3)}	7.82 \pm 0.35 ^{2,4)}
四物汤水提醇沉	12	6.82 \pm 1.21 ^{2,3)}	100.9 \pm 23.4 ²⁾	3.89 \pm 0.49 ²⁾	5.20 \pm 0.77 ²⁾
四物汤 50% 乙醇渗漉	12	7.73 \pm 0.87 ^{2,4)}	112.3 \pm 14.1 ^{2,3)}	4.15 \pm 0.40 ^{2,4)}	6.54 \pm 0.71 ^{2,4)}

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 同)。

3.3 四物汤对血虚模型小鼠脾脏指数、胸腺指数
四物汤各药物组与模型组相比, 均有显著性差异 ($P < 0.01$), 能显著增加血虚小鼠脾脏指数和胸腺指数, 四物汤水提组、50% 乙醇渗漉组均有高于水提醇沉组的趋势。见表 2。

表 2 四物汤对血虚模型小鼠脾脏指数、胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	脾脏指数/ $mg \cdot (10 g)^{-1}$	胸腺指数/ $mg \cdot (10 g)^{-1}$
空白	-	52.69 \pm 7.58 ⁴⁾	16.89 \pm 2.29 ⁴⁾
模型	-	28.37 \pm 5.60 ²⁾	9.38 \pm 2.93 ²⁾
复方阿胶浆	20 mL \cdot kg ⁻¹	41.29 \pm 7.26 ^{2,4)}	13.18 \pm 3.48 ^{1,4)}
四物汤水提	12	50.46 \pm 7.23 ⁴⁾	13.09 \pm 2.04 ^{2,4)}
四物汤水提醇沉	12	47.10 \pm 8.62 ^{1,4)}	12.93 \pm 3.40 ^{2,4)}
四物汤 50% 乙醇渗漉	12	50.66 \pm 3.12 ⁴⁾	13.10 \pm 0.82 ^{2,4)}

4 讨论

4.1 中医血虚证动物模型的制作方法最早始于 20 世纪 70 年代的放血疗法, 此后相继有放射性损伤、化学损伤、营养性饥饿等方法造成的血虚证模型^[15]。本试验考虑到四物汤所治血虚证范围较广泛而复杂, 结合各种造模方法的机制与操作本身的优缺点, 最终选择综合造模法即 APH 和 CTX 联合造模。此外, 鉴于外周血中的红细胞数、血红蛋白含量、白细胞数能反映血虚时血细胞在数量和功能上的变化、骨髓有核细胞数能反映骨髓造血功能上的变化、胸腺和脾脏指数与造血免疫功能密切相关, 故选择了这些与血液营血功能密切相关的指标来研究血虚小鼠病理生理变化。

3.2 中药复方制剂疗效的好坏, 提取工艺是重要的

影响因素之一, 四物汤不同提取工艺对血虚模型小鼠造血功能的影响试验中, 综合各项检测指标, 可以看出水提组和 50% 乙醇渗漉组优于水提醇沉组。3 种工艺间最大的区别是水提醇沉组采用了乙醇沉淀法, 虽可除去提取液中大量的淀粉、黏液质等杂质, 提高成品稳定性与外观质量, 减少服用量, 但也会导致有效成分的损失, 且醇沉工艺耗时较长、成本较高。因此接下来有必要采用 HPLC、LC-MS 等技术对 3 种不同提取工艺制备的提取液及醇沉所除去的沉淀物进行化学成分的分析, 结合四物汤中有效成分含量、其他药效学指标、生产成本等, 进一步筛选出制备工艺合理、质量稳定可控、临床疗效显著的提取工艺。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:649.
 [2] 中国药典. 一部[S]. 2005:422.
 [3] 中国药典. 一部[S]. 2000:433.
 [4] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂第七册)[S]. 北京:人民卫生出版社,1998:42.
 [5] 国家食品药品监督管理局. 中成药地方标准上升国家标准[S]. 北京:化学工业出版社,2001:679.
 [6] 干玲玲. 四物胶囊水提工艺优化研究[J]. 长春中医药大学学报,2009,25(1):22.
 [7] 王守愚,史公良,姜连英. 四物颗粒剂的提取工艺研究[J]. 中草药,2006,37(6):869.
 [8] 伍勇,贺福元,曹燕,等. 星点设计-效应面优化法对四物汤醇沉工艺的研究[J]. 中国医药导报,2009,6(3):17.

猕猴桃水提物诱导二相酶产生及抗氧化的机制研究

运晨霞¹, 李可成², 王坤^{1*}, 朱博¹, 肖艳芬¹, 余晓玲¹, 韦海宏¹, 黄燕¹, 吴光¹

(1. 广西中医学院微生物与免疫学教研室, 南宁 530001;

2. 柳州市人民医院检验科, 广西柳州 545000)

[摘要] 目的: 本实验以人胃腺癌细胞株 SGC-7901 为模型, 用猕猴桃水提物含药血清进行干预, 探讨猕猴桃水提物诱导二相酶产生及抗氧化的机制。方法: 取正常 SD 大鼠随机分为猕猴桃水提物高、中、低剂量组(用猕猴桃水提物溶液 46.8, 31.2, 15.6 g·kg⁻¹ ig)和正常对照组(ig 给予生理盐水)。连续 14 d, 每天 ig 2 次, 于末次给药 1 h, 腹主动脉取血制备猕猴桃水提物含药血清。取对数生长期的 SGC-7901 细胞, 在不同时间段分别给予相应的含药血清进行干预。用免疫组化法检测 SGC-7901 细胞内活化状态的核因子相关因子 2(Nrf2)的细胞定位; RT-PCR 法检测猕猴桃水提物高剂量组含药血清对 SGC-7901 细胞内二相酶 mRNA 水平的影响。结果: 免疫组化法染色观察结果显示与正常对照组相比, 猕猴桃水提物含药血清低、中、高剂量组均可提高 Nrf2 细胞核内的表达水平, 颜色从浅黄色变为棕黄色。经积分统计学分析差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。RT-PCR 检测结果显示与正常对照组相比较, 猕猴桃水提物可明显诱导二相酶谷氨酰半胱氨酸合成酶催化亚单位(GCLC)基因的表达($P < 0.05$), 且诱导谷胱甘肽-S-转移酶(GST)-P1 和 GST-T1 基因表达作用差异有高度显著性($P < 0.01$), 但对二相酶 GST-M1 和醌氧化还原酶(NQO1)基因水平影响不大。结论: 猕猴桃水提物可促使 Nrf2 进入核内, 导致二相酶的表达增加, 具有诱导细胞解毒抗氧化作用。

[关键词] 猕猴桃水提物; 抗氧化作用; 核因子相关因子 2; 二相酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0201-04

Study on the Antioxidant Mechanism of *Actinidia chinensis* Aqueous Extract via Inducing the Produce of Phase 2 Enzymes

YUN Chen-xia¹, LI Ke-cheng², WANG Kun^{1*}, ZHU Bo¹, XIAO Yan-fen¹,
YU Xiao-ling¹, WEI Hai-hong¹, HUANG Yan¹, WU Guang¹

(1. Department of Microbiology and Immunology, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China; 2. Clinical Laboratory, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545000, China)

[收稿日期] 20111010(003)

[基金项目] 广西教育厅一般项目(200810LX004)

[第一作者] 运晨霞, 医学硕士, 副教授, 从事中药抗肿瘤免疫药理研究, Tel: 13768889539, E-mail: 305358474@qq.com

[通讯作者] *王坤, 教授, 从事中药免疫药理研究, Tel: 13978815716, E-mail: Wangkk1022@sina.com

[9] 禹良艳, 华永庆, 朱敏, 等. 四物汤及其组成药对对大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 141.

[10] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 251.

[11] 高月. 血虚证实质及四物汤反证研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(4): 58.

[12] 路晓钦, 高月. 四物汤及其三味药组方对 γ 射线照射致血虚证小鼠造血系统的影响[J]. 中国实验方剂学

杂志, 2001, 7(6): 35.

[13] 李宗铎, 李文超. 妇康丸微粒与药粉药理作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(6): 36.

[14] 马增春, 高月. 四物汤对环磷酰胺所致血虚证小鼠造血细胞作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(5): 13.

[15] 梁毅, 鲁新华, 陈如泉. 中医血虚证研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 1999, 6(1): 16.

[责任编辑 聂淑琴]