

基于药理指标评价子芩与枯芩对大肠湿热证的作用差异

张方蕾, 赵佳文, 胡江慧, 肖锐钰, 谢颖, 雷林, 刘艳菊*
(湖北中医药大学药学院, 湖北省中药炮制技术工程研究中心, 武汉 430065)

[摘要] **目的:** 比较子芩与枯芩对大鼠大肠湿热证的药效差异, 通过现代药理实验验证将黄芩分为子芩与枯芩分别入药的科学性。**方法:** 将大鼠随机分为空白组, 模型组, 子芩低、高剂量组 ($0.9, 3.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 黄芩组 ($0.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 枯芩低、高剂量组 ($0.9, 3.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 复方黄连素片组 ($0.045 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每组 8 只。选择大肠湿热证大鼠模型, 选择体温、胸腺指数、脾脏指数、回肠病理切片、结肠病理切片、炎症因子以及分泌型免疫球蛋白 (SIg) A 含量为指标评价子芩与枯芩对大肠湿热证的治疗作用, 综合评价子芩与枯芩的药效差异。采用偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 对 2 种饮片抗大肠湿热证药理指标进行统计学分析。**结果:** 不同剂量的子芩和枯芩均能降低大肠湿热证模型大鼠的体温、胸腺指数和脾脏指数、血清炎症因子白细胞介素 (IL)-2, IL-6, IL-1 β 和肠黏膜 SIgA 含量, 且大部分具有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与等剂量枯芩组比较, 相应剂量子芩组效果更好, 且大部分具有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。PLS-DA 结果显示子芩与枯芩各聚类于一侧。**结论:** 子芩与枯芩对大肠湿热证均具有治疗作用, 但两者的作用强度有明显差异, 子芩优于枯芩, 验证了古方中用子芩专泻大小肠下焦之火的科学性。

[关键词] 黄芩; 子芩; 枯芩; 大肠湿热证; 偏最小二乘法-判别分析; 炎症因子; 分泌型免疫球蛋白 A

[中图分类号] R22; R24; R28; C37; TS193; R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)07-0057-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20192154

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190718.1826.008.html>

[网络出版时间] 2019-07-19 10:51

Evaluation of Different Effect of Pith-nodcayed and Pith-decayed Products of Scutellariae Radix on Large Intestine Damp-heat Syndrome Based on Pharmacological Indexes

ZHANG Fang-lei, ZHAO Jia-wen, HU Jiang-hui, XIAO Kun-yu, XIE Ying, LEI Lin, LIU Yan-ju*
(Engineering Research Center of Processing Technology of Traditional Chinese Medicine in Hubei Province, School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the pharmacodynamic effects of pith-nodcayed and pith-decayed products of Scutellariae Radix on rats with large intestine damp-heat syndrome, and to demonstrate the scientificness of dividing Scutellariae Radix into pith-nodcayed and pith-decayed products as medicines by modern pharmacological test. **Method:** Rats were randomly divided into blank group, model group, low-and high-dose group of pith-nodcayed products ($0.9, 3.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), low-and high-dose group of pith-decayed products ($0.9, 3.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Scutellariae Radix group ($0.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), compound berberine tablets group (positive drug group, $0.045 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and 8 rats in each group. Taking model rats with large intestine damp-heat syndrome, the body temperature, thymus index, spleen index, pathological sections of colon and ileum, inflammatory factors and Secretary immunoglobulin (SIg) A content were selected as indexes to evaluate the therapeutic effect of pith-

[收稿日期] 20190429(020)

[基金项目] 国家科技部基础性工作专项(2014FY111100-2); 国家中医药管理局 2015 中药炮制技术传承基地建设项目(国中医药规财发[2015]21 号)

[第一作者] 张方蕾, 在读博士, 讲师, 从事中药炮制相关研究, E-mail: 270527432@qq.com

[通信作者] * 刘艳菊, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制工艺及质量标准研究, Tel: 027-68890231, E-mail: lyj1965954@sohu.com

nodecayed and pith-decayed products on large intestine damp-heat syndrome, and make comprehensive evaluation of the difference in efficacy between them. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) was employed to analyze the pharmacological indexes of these two products against large intestine damp-heat syndrome. **Result:** Pith-nodecayed and pith-decayed products of *Scutellariae Radix* with different doses could reduce the body temperature, thymus index, spleen index, contents of interleukin (IL) -2, IL-6, IL-1 β in serum and SIgA content in intestinal mucosa, and most of them had significant differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the isodose group of pith-decayed products, the effect of corresponding dose group of pith-nodecayed products was better, and most of them had significant differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$). PLS-DA results indicated that there were significant differences in the pharmacological effects of pith-nodecayed and pith-decayed products, and they were clustered on one side, respectively. **Conclusion:** Both of pith-nodecayed and pith-decayed products of *Scutellariae Radix* have therapeutic effect on large intestine damp-heat syndrome with distinctly different strength of action, and pith-nodecayed products is superior to pith-decayed products, which verify the scientific nature of pith-nodecayed products was specializedly used to treat bowel disease in ancient times.

[**Key words**] *Scutellariae Radix*; pith-nodecayed products of *Scutellariae Radix*; pith-decayed products of *Scutellariae Radix*; large intestine damp-heat syndrome; partial least squares-discriminant analysis; inflammatory factors; secretory immunoglobulin A

黄芩为唇形科植物黄芩的干燥根,为临床常用中药,具有清热解毒、燥湿泻火、止血、安胎之功效,用于治疗湿温、暑湿、肺热咳嗽等证^[1-3]。黄芩在中医药古籍及 1970 年代前临床应用中均分为枯芩和子芩。根据黄芩生长规律,生长至 3 年以上者,其根部上段(老根)木心出现中空、腐朽,下段仍然致密、坚实。一般将中空和坚实两部分分开后分别入药。即由坚实的黄芩根部切制而得饮片称为子芩,由中空、腐朽根部制备的饮片称为枯芩。古籍中多有记载,陶弘景在《本草经集注》^[4]云:“圆者名子芩为胜,破者名宿芩,其腹中皆烂,故名腐肠,惟取深色坚实者为好”。明代李时珍曰:“宿芩乃旧根,多中空,外黄内黑,即今所谓片芩。子芩乃新根,多内实,即今所谓条芩”^[5]。清代《本草易读》又记载:“中枯而飘者名枯芩,泻肺利气,止嗽化痰,除风热,清肌表宜之。细实而坚者名子芩,泻大肠火,除湿止痢,养阴退阳”^[6]。可见,各代医家将中空发黑、外表黄棕色、似腐木的老根称为枯芩,善清肺火;将中实色青、外表黄色、似细条的嫩根称为子芩,善清大肠火。现今临床用黄芩不再分为枯芩和子芩,其科学性至今鲜见研究报道。查阅文献仅见不同产地、不同年限的黄芩化学成分及药理作用差异研究^[7-12]。

本课题组前期采用 UPLC 对枯芩与子芩的化学成分进行了比较,显示两者差异较大^[13];还比较了两者对肺炎链球菌以及肺炎大鼠模型的药效学差异,验证了“枯芩善清上焦之热”的合理性^[14]。本实验拟对“子芩善去下焦之火”进行验证,选择大肠

湿热证模型大鼠,比较子芩与枯芩的药效作用差异,通过现代药理学方法阐释黄芩分为子芩与枯芩的必要性和合理性,为临床精准用药提供参考,并为保留传统的黄芩饮片规格提供实验依据。

1 材料

SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司),LDZF-30KB-II 型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂),GZX-9146 MBE 型数显鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),360 ES 系列电子天平(瑞士 Precisa 公司),Q-500B6 型高速多功能粉碎机(上海冰都电器有限公司),BS224S 型电子分析天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司),AKSW-V-08 型超纯水机(成都唐氏康宁科技发展有限公司),HZ100 型恒温培养摇床(武汉瑞华仪器设备有限公司),R101-OA 型电热恒温培养箱(上海琅玕实验设备有限公司),5810R 型离心机(德国 Eppendorf 公司),MDF-86V340E 型 -80 ℃ 医用低温保存箱(安徽中科都菱商用电器股份有限公司)。

大肠埃希菌标准株(广州军区武汉总医院,批号 ATCC25922),复方黄连素片(太极集团四川绵阳制药有限公司,批号 Z51020212),戊巴比妥钠(广州捷倍斯生物科技有限公司,批号 1609GYD403),蛋白酶抑制剂(大连美仑生物技术有限公司,批号 MB3095),5% 二甲基亚砜(DMSO,武汉赛维尔生物科技有限公司,批号 WGD2650),5% *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF,国药集团药业股份有限公司,批号

81007718), 10% 血琼脂培养基、营养肉汤培养基(青岛海博生物技术有限公司, 批号分别为 HBPM0153, HB0108-4); 白细胞介素(IL)-2, IL-6, IL-1 β , 分泌型免疫球蛋白(SIg)A 试剂盒(武汉伊莱瑞特科技股份有限公司, 批号依次为 R0015c, R0015c, R0012c, R0875c); 子芩饮片(产地河南, 批号 20161217)和枯芩饮片(产地河南, 批号 20161207)均购自湖北天济中药饮片有限公司, 经湖北中医药大学杨红兵教授鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根; 高脂高糖饲料(湖北省疾病预防控制中心, 普通饲料加猪油 5 kg, 蛋黄粉 2.5 kg, 胆固醇 500 g, 胆酸钠 0.2 g, 糖 7.5 kg 配制而成)。

SPF 级 Wistar 雄性大鼠, 共 64 只, 体质量 180 ~ 200 g, 由湖北省实验动物研究中心提供, 合格证号 SCXK(鄂) 2015-0018, 实验动物质量合格证编号 42000600027267, 使用标准饲料和饮用水, 在室内温度保持(22 \pm 1) $^{\circ}$ C, 相对湿度 40% ~ 50% 的环境中适应性喂养 1 周后开始实验。本文所涉及的动物实验均符合湖北中医药大学伦理学规定。

2 方法

2.1 样品制备^[15-16] 取子芩、枯芩饮片适量, 加入 10 倍量水浸泡 30 min, 煮沸 30 min, 过滤, 药渣加 8 倍量水煮沸 30 min, 过滤, 合并滤液, 水浴浓缩后冷冻干燥, 备用。

2.2 菌液制备^[17-19] 将真空冻干保存的大肠埃希菌标准株用液体培养基溶解, 接种于普通琼脂培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 挑取典型菌落接种于新鲜肉汤培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。将传代后的菌落接种至新鲜肉汤培养基中, 置于振荡培养箱中, 于 37 $^{\circ}$ C, 120 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 18 h。将培养的带菌血清肉汤培养基离心(3 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min), 弃去上清液, 收集细菌沉淀, 用少量生理盐水溶解细菌沉淀, 将此菌液作为原菌液, 用无菌生理盐水稀释至 1×10^{-2} , 1×10^{-4} , 1×10^{-6} , 1×10^{-8} , 1×10^{-10} CFU $\cdot \text{mL}^{-1}$ 系列浓度。分别取上述不同浓度的菌液 10 μL , 接种于血琼脂平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 选取菌落数为 30 ~ 300 个的平板计数, 计算原菌液浓度, 用生理盐水将原菌液精确配至浓度为 1.0×10^9 CFU $\cdot \text{mL}^{-1}$, 备用。

2.3 分组 使用随机数字表法, 将 64 只雄性 Wistar 大鼠随机分为空白组, 模型组, 子芩低、高剂量组(0.9, 3.6 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 枯芩低、高剂量组(0.9, 3.6 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 黄芩组(0.9 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 复方黄连素片组(阳性药组, 0.045 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 8 只。适应性喂养 1 周后开始造模, 定时定量饮食、饮水并观察

大鼠。实验前 3 d 每日早晚各测量体温 1 次, 取其平均值作为正常基础体温。

2.4 大肠湿热证大鼠模型的制备^[20-24] 空白组单独饲养于温度 26 $^{\circ}$ C 左右, 湿度 55% ~ 65% 的适宜环境, 每日饲喂普通饲料。其余各组饲养条件同空白组, 每日饲喂高脂高糖饲料, 共 10 d。第 18 天除空白组外, 其余各组置于温度(35 \pm 1) $^{\circ}$ C, 相对湿度 80% ~ 85% 的高温高湿环境内, 持续 10 h, 连续 5 d 后移入自然环境。第 23 天灌胃大肠埃希菌悬浊液, 每天 1 次, 连续 3 d。第 26 天子芩低、高剂量组, 枯芩低、高剂量组, 黄芩组和复方黄连素片组分别按相应剂量灌胃给药; 模型组灌胃生理盐水, 每天 1 次, 连续 7 d。第 31 天开始禁食不禁水, 第 33 天腹腔注射 0.4% 戊巴比妥钠溶液麻醉取样。

2.5 大肠湿热证大鼠病理指标的测定

2.5.1 行为学及体温 每日观察大鼠的呼吸、活动、饮食、毛色、精神、大小便等情况; 每日早晚监测大鼠体温。

2.5.2 胸腺指数和脾脏指数 迅速解剖麻醉后大鼠, 将胸腺和脾脏冲洗干净并吸干表面水分后精确称重, 计算胸腺指数和脾脏指数, 计算公式分别为胸腺指数 = (胸腺质量/大鼠体质量) \times 10, 脾脏指数 = (脾脏质量/大鼠体质量) \times 10。

2.5.3 大鼠回肠、结肠的病理切片 将大鼠结肠、回肠组织用 4% 甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 切片, 苏木素-伊红(HE)染色, 光镜下观察结肠、回肠组织病理变化。

2.5.4 炎症因子 使用无添加抗凝剂的采血管采取血液 2 mL, 3 500 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离得血清, 血清采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定炎症因子 IL-2, IL-6 和 IL-1 β 的含量。采取结肠 2 cm, 使用止血钳结扎两端, 并注射 0 $^{\circ}$ C 的蛋白酶抑制剂溶液 2 mL, 反复轻轻搓揉几下, 挤压肠管的内容物, 于 4 $^{\circ}$ C, 1 万 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 分离上清液于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 以备肠黏膜 SIgA 含量的测定。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件对各组数据进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 先进行正态性检验和方差齐性检验, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠行为学变化 空白组大鼠活跃, 毛发光泽, 食欲好, 大小便正常。随着造模时间的推移, 模型组部分大鼠出现体温升高, 行动迟缓, 食欲不振, 饮水量减少, 肛周红肿, 并出现黏液便, 味臭。各

给药组大鼠治疗前大鼠症状同模型组,给予不同剂量的子芩、枯芩、黄芩以及复方黄连素片治疗后症状逐渐减轻。

3.2 大鼠体温变化 大鼠在实验前 3 d 基础肛温稳定。与空白组相比,其他各组大鼠经高脂高糖及高温高湿造模后体温显著升高 ($P < 0.01$),经大肠埃希菌感染后体温亦显著升高 ($P < 0.01$);与模型

组相比,给药第 3 天子芩高剂量组、枯芩高剂量组、黄芩组、复方黄连素片组大鼠体温均有不同程度降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),给药第 5 天各给药组大鼠体温均有不同程度降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);给药第 3,5 天时,与等剂量枯芩组相比,子芩高、低剂量组大鼠体温均有不同程度降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠造模前后的体温变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Changes of body temperature in rats of each group before and after modeling ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	体温/℃					
		基础	高脂高糖	高温高湿	给药	给药第 3 天	给药第 5 天
空白	-	36.98 ± 0.01	37.15 ± 0.16	37.16 ± 0.07	37.84 ± 0.05	37.93 ± 0.8	37.25 ± 0.01
模型	-	37.00 ± 0.14	37.46 ± 0.03	38.09 ± 0.09 ¹⁾	38.98 ± 0.09 ¹⁾	39.09 ± 0.03 ¹⁾	39.24 ± 0.05 ¹⁾
子芩	0.9	37.08 ± 0.07	37.48 ± 0.06	38.16 ± 0.05 ¹⁾	39.13 ± 0.20 ¹⁾	38.95 ± 0.10 ⁴⁾	38.05 ± 0.06 ^{3,5)}
	3.6	37.15 ± 0.01	37.38 ± 0.07	38.09 ± 0.04 ¹⁾	39.20 ± 0.01 ¹⁾	38.15 ± 0.07 ^{3,5)}	37.65 ± 0.12 ^{3,4)}
枯芩	0.9	37.18 ± 0.06	37.45 ± 0.08	38.29 ± 0.80 ¹⁾	39.33 ± 0.01 ¹⁾	39.21 ± 0.08	38.95 ± 0.09 ²⁾
	3.6	37.20 ± 0.08	37.58 ± 0.11	38.18 ± 0.08 ¹⁾	39.25 ± 0.10 ¹⁾	38.70 ± 0.40 ²⁾	38.31 ± 0.05 ³⁾
黄芩	0.9	37.43 ± 0.05	37.55 ± 0.09	38.31 ± 0.70 ¹⁾	39.33 ± 0.50 ¹⁾	38.18 ± 0.04 ³⁾	37.65 ± 0.14 ³⁾
复方黄连素片	0.045	37.12 ± 0.09	37.24 ± 0.08	38.18 ± 0.70 ¹⁾	39.40 ± 0.60 ¹⁾	37.96 ± 0.06 ³⁾	37.42 ± 0.24 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与等剂量枯芩组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 胸腺指数和脾脏指数变化 与空白组相比,模型组大鼠的胸腺指数和脾脏指数均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,子芩高剂量组、子芩低剂量组、枯芩高剂量组、黄芩组、复方黄连素片组大鼠的胸腺指数和脾脏指数均显著降低 ($P < 0.01$);与等剂量枯芩组相比,相应剂量子芩组大鼠的胸腺指数和脾脏指数均有不同程度降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。说明子芩抗大肠湿热证炎症作用优于枯芩。见表 2。

表 2 各组大鼠胸腺指数和脾脏指数的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

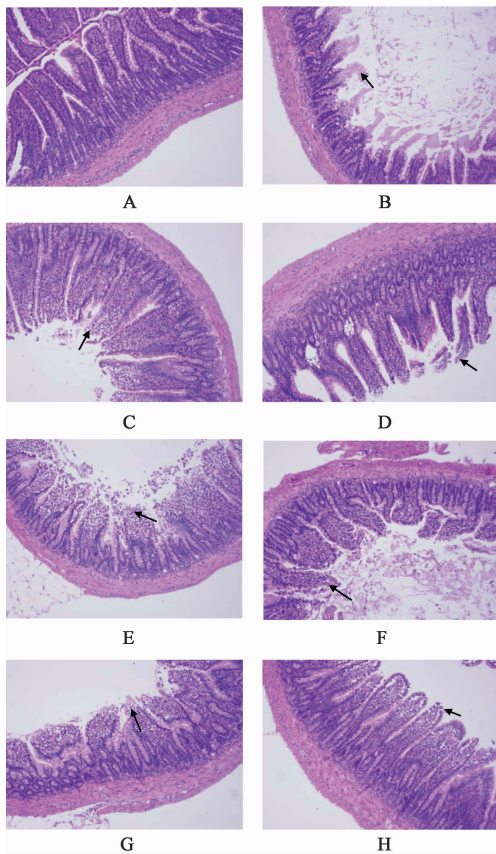
Table 2 Changes of thymus index and spleen index of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	mg·g ⁻¹	
		胸腺指数	脾脏指数
空白	-	1.36 ± 0.11	1.72 ± 0.08
模型	-	2.17 ± 0.08 ¹⁾	2.92 ± 0.04 ¹⁾
子芩	0.9	1.77 ± 0.06 ^{2,4)}	2.00 ± 0.04 ^{2,4)}
	3.6	1.67 ± 0.09 ^{2,3)}	1.93 ± 0.07 ^{2,4)}
枯芩	0.9	2.04 ± 0.10	2.85 ± 0.07
	3.6	1.86 ± 0.06 ²⁾	2.46 ± 0.07 ²⁾
黄芩	0.9	1.80 ± 0.09 ²⁾	2.02 ± 0.09 ²⁾
复方黄连素片	0.045	1.53 ± 0.16 ²⁾	1.81 ± 0.06 ²⁾

注:与空白组相比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比²⁾ $P < 0.01$;与等剂量枯芩组相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 回肠和结肠的病理观察 各组大鼠回肠切片染色情况见图 1。结果发现空白组大鼠肠组织整体结构完整,绒毛隐窝结构清晰,黏膜上皮结构完整,上皮细胞无脱落,黏膜层未见炎症细胞。模型组大鼠肠组织整体结构异常,肠绒毛数量明显减少,并可见大量绒毛坏死;坏死区域组织形态消失,只见红染物质。子芩低剂量组大鼠肠组织整体结构轻度异常,部分绒毛结构不完整,黏膜上皮细胞可见明显脱落;黏膜层未见炎症细胞。子芩高剂量组大鼠肠组织整体结构轻度异常,绒毛数量减少,部分绒毛结构不完整,黏膜上皮细胞可见明显脱落;黏膜层未见炎症细胞。枯芩低剂量组大鼠肠组织整体结构异常,大量绒毛结构不完整,黏膜层糜烂脱落严重,肠腔可见大量脱落细胞碎屑。枯芩高剂量组大鼠肠组织整体结构异常,肠绒毛数量减少,大量绒毛结构不完整,黏膜上皮细胞脱落严重,肠腔可见大量脱落细胞碎屑。黄芩组大鼠肠组织整体结构轻度异常,部分绒毛结构不完整,黏膜上皮细胞可见明显脱落;黏膜层未见炎症细胞。复方黄连素片组大鼠肠组织整体结构基本正常,绒毛隐窝结构清晰,部分黏膜上皮细胞可见脱落;黏膜层未见炎症细胞。

各组结肠切片染色情况见图 2。结果发现空白组大鼠肠组织整体结构正常,黏膜层隐窝结构清晰,



A. 空白组; B. 模型组; C. 子芩低剂量组; D. 子芩高剂量组; E. 枯芩低剂量组; F. 枯芩高剂量组; G. 黄芩组; H. 复方黄连素片组(图 2 同)

图 1 各组大鼠的回肠形态观察(HE, ×100)

Fig. 1 Observation of ileum morphology of rats in each group (HE, ×100)

杯状细胞数量正常,无明显减少,炎症细胞数量无明显增多。模型组大鼠肠组织整体结构异常,部分黏膜层结构紊乱,隐窝消失,只见纤维结缔组织,如图 2(B)黑色箭头所示;部分稍正常区域黏膜层杯状细胞数量明显减少,如图 2(B)红色箭头所示。子芩低剂量组大鼠肠组织整体结构轻度异常,黏膜层隐窝结构不太清晰,部分黏膜上皮细胞可见脱落,如图 2(C)黑色箭头所示;部分黏膜层杯状细胞数量减少,如图 2(C)红色箭头所示。子芩高剂量组大鼠肠组织整体结构轻度异常,部分黏膜上皮细胞可见脱落,杯状细胞数量减少,如图 2(D)黑色箭头所示。枯芩低剂量组大鼠肠组织整体结构异常,部分黏膜层隐窝结构紊乱,黏膜上皮脱落,如图 2(E)黑色箭头所示;黏膜下肌层排列稀疏,如图 2(E)红色箭头所示。枯芩高剂量组大鼠肠组织整体结构异常,部分黏膜层结构紊乱,黏膜上皮脱落,并可见炎症细胞浸润,如图 2(F)红色箭头所示;黏膜下肌层排列疏松,如图 2(F)黑色箭头所示。黄芩组大鼠肠组织整体

结构轻度异常,黏膜层结构基本正常,隐窝结构清晰,杯状细胞数量正常;黏膜层可见少量炎症细胞浸润,如图 2(G)黑色箭头所示;黏膜下层可见少量中性粒细胞浸润,如图 2(G)红色箭头所示。复方黄连素片组大鼠肠组织整体结构基本正常,黏膜层隐窝结构清晰,部分区域杯状细胞数量减少,如图 2(H)黑色箭头所示;组织炎症细胞无明显增多。

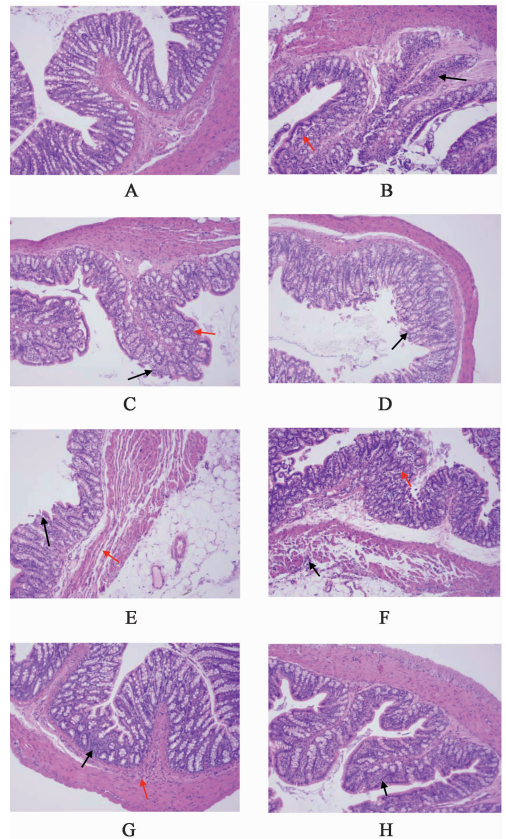


图 2 各组大鼠的结肠形态观察(HE, ×100)

Fig. 2 Observation of colon morphology of rats in each group (HE, ×100)

3.5 炎症因子检测 各组大鼠的炎症因子 IL-1 β , IL-2, IL-6 含量和肠黏膜 SIgA 含量变化见表 3。结果发现与空白组相比,模型组大鼠上述 4 项指标均显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,子芩高剂量组、子芩低剂量组、枯芩高剂量组、黄芩组、复方黄连素片组大鼠上述 4 项指标均显著降低($P < 0.01$)。与等剂量枯芩组相比,相应剂量子芩组大鼠上述 4 项指标显著下降($P < 0.01$)。

3.6 数据分析 上述结果表明子芩和枯芩的药效具有显著性差异。为了更加直观地反映子芩与枯芩的药效差异,采用 SIMCA-P 14.1 软件对相关实验数据进行偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)处理。将子芩高剂量组和枯芩高剂量组大鼠的胸腺指数、

表 3 各组大鼠致炎因子含量的检测 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-2	IL-6	IL-1 β	SigA
空白	-	115.87 \pm 0.01	53.86 \pm 0.01	23.99 \pm 0.09	990.87 \pm 0.03
模型	-	142.76 \pm 0.01 ¹⁾	107.05 \pm 0.01 ¹⁾	91.54 \pm 0.03 ¹⁾	1 552.45 \pm 0.01 ¹⁾
子芩低剂量	0.9	130.27 \pm 0.01 ^{2,3)}	97.22 \pm 0.01 ^{2,3)}	73.83 \pm 0.02 ^{2,3)}	1 285.25 \pm 0.02 ^{2,3)}
子芩高剂量	3.6	122.65 \pm 0.01 ^{2,3)}	87.23 \pm 0.01 ^{2,3)}	62.70 \pm 0.03 ^{2,3)}	1 196.25 \pm 0.01 ^{2,3)}
枯芩低剂量	0.9	135.80 \pm 0.01 ²⁾	105.60 \pm 0.02	91.00 \pm 0.02	1 404.81 \pm 0.03 ²⁾
枯芩高剂量	3.6	129.21 \pm 0.01 ²⁾	101.26 \pm 0.01 ²⁾	82.69 \pm 0.02 ²⁾	1 333.92 \pm 0.01 ²⁾
黄芩	0.9	123.97 \pm 0.01 ²⁾	93.09 \pm 0.01 ²⁾	73.36 \pm 0.02 ²⁾	1 273.30 \pm 0.01 ²⁾
复方黄连素片	0.045	123.07 \pm 0.01 ²⁾	87.74 \pm 0.01 ²⁾	63.88 \pm 0.03 ²⁾	1 083.18 \pm 0.03 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与等剂量枯芩组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

脾脏指数数据导入软件,得到图 3;将这两组大鼠的 IL-1 β , IL-2, IL-6, SigA 含量数据导入软件,得到图 4。结果发现子芩高剂量组与枯芩高剂量组明显分开,各聚一侧;同法处理子芩低剂量组和枯芩低剂量组相应数据,所得结果与图 3,4 一致。这也进一步说明子芩与枯芩药效存在显著差异。

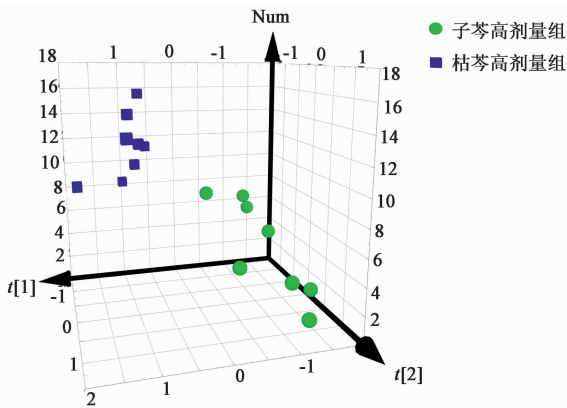


图 3 子芩高剂量组和枯芩高剂量组大鼠胸腺指数、脾脏指数的 PLS-DA 得分

Fig. 3 PLS-DA scores of thymus index and spleen index of rats in high-dose groups of pith-noddecayed and pith-decayed products of Scutellariae Radix

4 讨论

黄芩为常用中药,临床应用广泛。按中药功能分类,属于清热泻火药;按西药功效分类,属于广谱抗菌药。在中医药古籍和现代早期临床上黄芩被分为子芩和枯芩分别使用,子芩主泻大肠湿热,枯芩主清肺胃上焦之热,药效确切。但 2015 年版《中国药典》和目前各地方炮制规范均未将子芩和枯芩进行区分,致使临床均使用黄芩。分析形成这一现状的原因主要有 2 个,①经济趋使。目前使用的黄芩饮片主要来自两年生黄芩(实为子芩),质坚实,黄芩

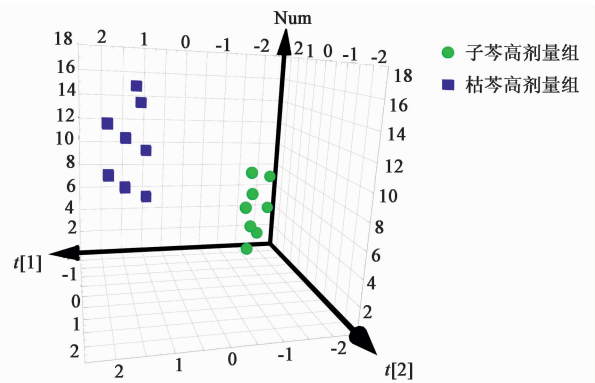


图 4 子芩高剂量组和枯芩高剂量组大鼠炎症因子及 SigA 含量的 PLS-DA 得分

Fig. 4 PLS-DA scores of inflammatory factors and SigA contents of rats in high-dose groups of pith-noddecayed and pith-decayed products of Scutellariae Radix

苷含量高;而 3 年以上生黄芩会出现部分中空、腐朽(枯芩),黄芩苷含量低,故而市场流通少、使用少;对药农来说 2 年采收经济效益更高。②市场误导法规,法规引导市场。由于市场上的黄芩均为两年生子芩,导致《中国药典》制定黄芩标准时,未能区分枯芩和子芩;根据现行标准黄芩苷含量要求,子芩能全部达到,而枯芩大多达不到。因此枯芩逐渐退出市场、退出临床。

本课题组前期已经完成了子芩和枯芩对肺炎链球菌以及肺炎大鼠模型的药效学差异研究^[10],验证了“枯芩善清上焦之热”;本研究则继续对“子芩善去下焦之火”进行验证。本课题组采用现代药理学研究手段对子芩和枯芩的药效学进行对比研究,以期通过更全面的药效指标验证传统用药规格的合理性,为临床精准用药提供饮片保证,同时为黄芩分为子芩和枯芩分别制定饮片质量标准提供实验依据。本研究根据黄芩的主治功能,特别是子芩善清大肠

湿热,选用了大肠湿热证大鼠模型。大肠湿热证是由于外感暑湿热毒之邪或饮食不节或进腐败之物,而致湿热蕴结大肠,传导功能失职所致。表现为腹泻,便下黏液脓血,腹痛,里急后重,肛门灼热、小便短赤等。脾虚泄泻虽然也表现有腹泻,但从病因、病机及临床表现上均与大肠湿热证不同。脾虚则水湿不运,流注肠中则大便稀溏;脾失运化则生化不足,出现纳差、倦怠。因此脾虚泄泻与大肠湿热是完全不同的病证,不符合黄芩的主治功能。慕澜等^[20]采用综合因素造模(饮食+气候环境+致病生物因子)复制大肠湿热证动物模型,陈阳等^[21]采用高糖高脂饲料饲养,置于高湿高热环境,灌胃给与大肠埃希菌建立大肠湿热证大鼠模型。综合以上文献,本研究采用“高糖高脂+高温高湿+大肠埃希菌”复合因素建立大鼠大肠湿热证模型。造模后,模型大鼠出现体温升高、肛门周围和尾根部黏有黏液便、粪便黄褐色且略臭、体质量减轻、食欲减退等症状,所复制的大鼠模型从病因、病机、病理变化和临床特点都与中医大肠湿热症状相符,而黄芩则是治疗大肠湿热证的首选药物。

胸腺指数和脾脏指数高低取决于脏器中淋巴细胞增殖的程度,是一个粗略估计免疫功能强弱的指标。免疫功能低下,肠道局部免疫功能受到一定抑制,最终引起肠道黏膜的损伤。例如丘富安等^[22]研究参芪多糖对鸡空肠黏膜免疫功能的保护作用也采用了胸腺指数和脾脏指数来表达肠黏膜的免疫功能强弱。大肠湿热证模型一般选用主要病变部位回肠和结肠进行肠黏膜屏障研究^[23]。例如文艳巧等^[24]探讨郁金散对大肠湿热证模型大鼠肠道组织的影响时,选择回肠、结肠组织中的胃肠激素含量为指标。因此,本研究选择上述指标进行评价研究。

IL-2 是一种激活 T 细胞,并维持 T 细胞分化和增殖的 T 细胞生长因子,同时参与炎症或自身免疫性反应,也参与抗体反应、造血和肿瘤监视,具有双向免疫调节作用^[25]。IL-6 是一种多功能炎性细胞因子,是炎性介质重要组成部分,其可以通过抑制巨噬细胞产生 IL-1 和肿瘤坏死因子而在细菌内毒素诱导的炎症中起细胞保护和抗炎作用^[26]。IL-1 β 是一种重要的炎症介质,主要在炎症过程中诱发炎症反应的发生,其可以激活炎症细胞去释放炎症介质,从而引起以巨噬细胞、粒细胞浸润为病理表现的肺部炎症^[27]。SIgA 是人类黏膜免疫当中的主要抗体,作为肠黏膜上的主要免疫球蛋白,是肠道黏膜上的第一道防线,对各种内源共生菌及外源入侵的病

原体都有抵抗作用^[28]。因此,本研究选取 IL-2, IL-6, IL-1 β 以及 SIgA 含量为评价指标进行对比研究。

综上所述,本实验以大肠湿热证大鼠为模型,检测体温,胸腺指数和脾脏指数,回肠和结肠病理切片,炎症因子 IL-2, IL-6, IL-1 β 及肠黏膜 SIgA 含量,结果发现同剂量比较,子芩组大鼠各项指标明显优于枯芩,且大部分具有显著性差异;同时,PLS-DA 处理后发现子芩与枯芩各聚类于一侧,这也进一步说明两者药效差异明显,分开使用更为合理。

[参考文献]

- [1] 肖培根. 新编中药志:1 卷[M]. 北京:化学工业出版社,2002.
- [2] 宋万志. 药用黄芩的资源研究[J]. 药学报,1981, 16(2):139-144.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:301-302.
- [4] 陶弘景. 本草经集注[M]. 北京:人民卫生出版社,1994:264.
- [5] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:人民卫生出版社,1985:780.
- [6] 汪切庵. 本草易读:卷三[M]. 北京:人民卫生出版社,1987:28.
- [7] 王祎,江源. 野生黄芩有效成分含量的地理差异及与气候因素的关系[J]. 北京师范大学学报:自然科学版,2018,54(5):645-649.
- [8] 罗燕子. 中药黄芩的化学成分及药理作用的相关研究进展[J]. 临床合理用药杂志,2018,11(30):180-181.
- [9] 李津津. 中药黄芩药理作用的研究进展[J]. 内蒙古中医药,2018,37(10):117-118.
- [10] 苏青,吴婷婷,黄雅兰,等. 黄芩提取物制备过程中化学成分及药效的变化规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(14):1-6.
- [11] 曹慧娟,李君,孙淑军,等. 黄芩素对人肺腺癌 A549 细胞的药效作用及机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(2):98-103.
- [12] 苏慧,霍雨佳,扶垭东,等. 基于 HPLC 和 HSGC 结合的黄芩酒制前后饮片特征图谱表征[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(2):14-18.
- [13] 赵佳文,瞿领航,刘艳菊,等. 多成分含量测定结合 UPLC 指纹图谱及其模式判别评价子芩与枯芩质量[J]. 中药材,2017,40(9):2101-2106.
- [14] 赵佳文,涂济源,石坤,等. 基于抗菌活性及病理指标评价子芩与枯芩对肺炎的药效学差异[J]. 中草药,2018,49(17):4064-4070.

- [15] 黄黎,叶文华,蔡波文,等. 黄芩汤及其组成药物药理作用的初步研究[J]. 中国中药杂志,1990,15(2):51-53.
- [16] 李琦,章军,崔文金,等. 黄芩饮片标准汤剂的制备和质量标准评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(7):36-40.
- [17] 智晓艳,崔恩慧,范云鹏,等. 14种中药及其复方的体外抗菌活性[J]. 西北农业学报,2014,23(7):114-119.
- [18] 石浩,王仁才,王琰,等. 黄芩抑菌物的提取工艺及抑菌稳定性[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2019,45(2):199-204.
- [19] 余琼,白志川,孟德胜,等. 23种中草药提取物对肺炎链球菌的抗菌作用研究[J]. 中国药房,2011,22(23):2135-2136.
- [20] 慕澜,魏连波,罗炳德,等. 大肠湿热证模型大鼠血清部分白细胞介素含量的变化[J]. 中国中西医结合消化杂志,2003,11(5):262-263.
- [21] 陈阳,崔波,范燕豪,等. 葛根芩连汤中各成分在正常与大肠湿热证模型大鼠的肠吸收差异研究[J]. 中国中药杂志,2019, doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20190318.506.
- [22] 丘富安,任喆,郑纪元,等. 参芪多糖口服液对鸡空肠黏膜免疫功能的保护作用[J]. 中国兽医科学,2017,47(11):1441-1449.
- [23] 姚万玲. 大肠湿热证实质及郁金散对其治疗作用机理研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2017.
- [24] 文艳巧,姚万玲,杨朝雪,等. 郁金散对大肠湿热证模型大鼠血清及肠道组织胃肠激素的影响[J]. 畜牧兽医学报,2017,48(6):1140-1149.
- [25] 翟志敏. IL-2对免疫激活和免疫耐受的双向调节作用[J]. 中国药理学通报,2013,29(3):319-322.
- [26] 陈勇,张捷平,余文珍,等. 石斛合剂对糖尿病肾病小鼠TNF- α 及IL-6表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(18):107-112.
- [27] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京:科学出版社,2000:77-84.
- [28] 冯贵仁,单丽娟. 石榴皮水煎剂对中医大肠湿热证模型小鼠血清IL-1 β 、IL-6和SIgA的影响[J]. 新疆中医药,2010,28(1):14-16.

[责任编辑 刘德文]