

DOI:10.16040/j.cnki.cn15-1101.2016.08.130

加味葛根芩连汤治疗大鼠急性放射性肠炎的实验研究

石玮¹ 华海清² 王晓萍² 王兴华³ 孙新臣⁴ 谢胜⁵

(1.广西中医药大学第一附属医院肿瘤科 南宁 530023 2.解放军第81医院全军肿瘤中心 南京 210002;

3.南京中医药大学 南京 210029 4.江苏省人民医院放射治疗科 南京 210029;

5.广西中医药大学第一附属医院脾胃病科 南宁 530023)

摘要 目的:研究加味葛根芩连汤对大鼠高能射线诱导的肠损伤组织形态学、肠道组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血浆内毒素和肠道免疫功能的影响。方法:将64只清洁级SD大鼠随机分为4组,即加味葛根芩连汤组(n=16)、复方谷氨酰胺肠溶胶囊组(n=16)、模型对照组(n=16)和正常组(n=16)。加味葛根芩连汤组、复方谷氨酰胺肠溶胶囊组分别灌胃给予药物,模型对照组和正常组给予生理盐水,1次/d,于造模前3d开始给药直至造模后d4,连续给药7d。观察各组肠黏膜形态学指标、肠道组织TNF- α 含量、血浆内毒素、小肠IgA(+)的浆细胞数量。结果:加味葛根芩连汤组和复方谷氨酰胺肠溶胶囊组小肠绒毛高度、黏膜厚度、全层厚度及直肠黏膜厚度、全层厚度明显高于或厚于模型对照组($P<0.05$);肠道组织TNF- α 含量和血浆内毒素显著低于模型对照组($P<0.05$);加味葛根芩连汤组肠道组织TNF- α 含量显著低于复方谷氨酰胺肠溶胶囊组($P<0.05$);加味葛根芩连汤组和复方谷氨酰胺肠溶胶囊组小肠IgA(+)的浆细胞数量显著多于模型对照组($P<0.05$)。结论:加味葛根芩连汤能有效保护放射对大鼠肠黏膜引起的损伤,促进大鼠肠上皮细胞的修复,减轻肠道炎症反应和抑制肠道内毒素移位,保护肠道机械屏障和免疫屏障功能。

关键词 加味葛根芩连汤 急性放射性肠损伤 实验研究

中图分类号 R516.1

文献标识码 B

文章编号 1006-0979(2016)08-0134-02

近年来放射肿瘤学发展迅猛,大约有70%的癌症患者在病程中接受过放射治疗,放射治疗在肿瘤综合治疗中所占比重达25%之多^[1],成为肿瘤治疗的重要组成部分。

1 实验材料和方法

1.1 实验动物和分组 清洁级SD大鼠64只,雄性,体重180~220g,由南京江宁区青龙山动物繁殖场提供,实验动物使用许可证号:SCXK(浙)20030001。动物随机分为4组,即加味葛根芩连汤组(A组,n=16)、复方谷氨酰胺肠溶胶囊组(B组,n=16)、模型对照组(C组,n=16)和正常组(D组,n=16)。

1.2 实验药物 (1)加味葛根芩连汤颗粒剂:由江阴天江药业有限公司生产,药物组成:葛根、黄芩、黄连、白芍、炒白术、防风、木香、陈皮、诃子、石榴皮、炙甘草等。使用前加适量纯净水配制成溶液。(2)复方谷氨酰胺肠溶胶囊:由地奥集团成都药业股份有限公司生产。加适量纯净水配制成溶液。

1.3 试剂和仪器设备 (1)试剂:①大鼠(Rat)肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA试剂盒,美国ADL公司产品;②显色基质试剂盒,厦门市萤试剂试验厂有限公司生产;③IgA免疫组化染色试剂盒,中杉金桥公司生产;④即用型快速免疫组化MaxVision™试剂盒,福州迈新生物公司生产。(2)主要仪器设备:酶标仪,Molecular Devices公司产品,型号:spectra max 340pc。

1.4 造模方法 造模前大鼠禁食12h,除正常组16只动物外,其余大鼠用10%水合氯醛(0.4mL/100g)腹腔注射麻醉后,四肢固定于手术板上,以6M高能X线直线加速器给予全腹部(上至胸骨剑突,下至耻骨联合)照射,腹部给予1cm组织补偿,照射面积8.5cm×8.5cm,源皮距100cm,照射剂量9Gy,放射剂量率为500cGy/min,照射时间1.77min。

1.5 给药方法:A组以加味葛根芩连汤灌胃(1mL/100g,每毫升含药量5.9g),1次/d。以同样方法,B组予复方谷氨酰胺肠溶胶囊配制的溶液(1mL/100g),C组和D组给予生理盐水(1mL/100g)。于照射前3d开始给药至造模后4d,连续给药7d。

1.6 检测指标

1.6.1 肠黏膜形态学观察:各组大鼠于造模后d4用10%水合氯醛(0.4mL/100g)麻醉后无菌剖腹,取回肠末段和直肠中段(固定相应同样部位取材2cm),蒸馏水洗净内容物,10%福尔马林固定24h,石蜡包埋,切片后常规HE染色,光镜下观察各组小肠、大肠大体情况,用图像分析仪、康克新柏图像分析软件随机全盲测量小肠绒毛高度、黏膜和全层厚度,直肠黏膜及全层壁厚度。

1.6.2 肠道组织TNF- α 含量测定:每只大鼠剪取0.2g小肠组织,分别

加入2mL生理盐水,以研磨器研磨成组织匀浆,1000g离心10min,取上清液,按照肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA试剂盒说明书测定。

1.6.3 血浆内毒素测定:抽取腹腔静脉血1mL注入去热源的肝素抗凝管中,以1000r/min低温离心10min,取上清液,加入血液处理剂制成6倍稀释液,于70℃恒温水浴锅中加热10min,常温4000g离心10min,取上清液,按照显色基质试剂盒说明书测定。

1.6.4 小肠IgA(+)的浆细胞数量观察:取回肠末段(固定相应同样部位取材2cm),蒸馏水洗净内容物,10%福尔马林固定24h,石蜡包埋。石蜡切片(厚度4 μ m)微波中档脱蜡修复10min,冷却,用PBS液(0.01mol/L,pH7.4)冲洗3次×5min;10%的正常山羊血清封闭,室温孵育10min,倾去血清,滴加1:50~100比例稀释的一抗,37℃孵育1h;PBS冲洗5min×3次;滴加即用型快速免疫组化MaxVision™试剂,37℃或室温孵育10~15min,PBS冲洗5min×3次,滴加新鲜配制的显色剂(DAB),显微镜下观察3~5min,自来水充分冲洗,苏木精复染,自来水冲洗返蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,显微镜观察。

1.7 统计学方法:所有数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,运用SPSS11.5统计软件包对数据进行方差分析,方差不齐时采用Wilcoxon秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 腹部照射后加味葛根芩连汤组(A组)、复方谷氨酰胺肠溶胶囊组(B组)和模型对照组(C组)三组大鼠于d3起均有不同程度的腹泻,3~4d为黏液血便,其中C组大鼠较A组和B组大鼠明显精神差,不爱活动,进食明显减少,皮毛欠光泽,黏液血便量多且腹泻伴大量未消化食物残渣。A组死亡2只大鼠,死亡率12.5%;B组死亡5只大鼠,死亡率31.25%;C组死亡5只大鼠,死亡率31.25%;D组无大鼠死亡。A组死亡率比B、C组死亡率低,差异非常显著($P<0.01$)。

表1 各组大鼠小肠形态学指标比较($\bar{x}\pm s$, μ m)

组别	n	绒毛高度	黏膜厚度	全层厚度
A组	14	338.50±44.49* \blacktriangle	516.14±75.31* \blacktriangle	638.07±64.30* \blacktriangle
B组	11	315.81±45.38 \blacktriangle	513.59±62.93 \blacktriangle	626.09±45.08 \blacktriangle
C组	11	223.77±17.71	400.27±58.54	541.91±51.62
D组	16	343.83±12.65	529.08±54.12	656.33±52.93

注:与C组比较,* $P<0.01$;与B组比较, $\blacktriangle P>0.05$;与D组比较, $\blacklozenge P>0.05$;与C组比较, $\blacktriangle P<0.01$;与D组比较, $\blacklozenge P>0.05$ 。

2.2 肠道组织TNF- α 和血浆内毒素:A组肠道组织TNF- α 表达量和血浆内毒素浓度明显低于C组,差异显著($P<0.05$);与B组比较,肠

道组织 TNF- α 表达量有所降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 血浆内毒素浓度差异不显著($P > 0.05$); 与 D 组比较, A 组两项指标差异均不显著($P > 0.05$)。

2.3 小肠黏膜 IgA(+)浆细胞数量: A 组每根绒毛 IgA(+)的浆细胞数量明显多于 C 组, 差异显著($P < 0.05$), 与 B 组和 D 组比较差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

放射性肠损伤是腹盆部肿瘤放疗过程中最棘手的并发症之一。目前西医治疗放射性肠损伤多以止泻、抗炎等对症处理为主, 缺乏特效药物或治疗方法, 总体疗效欠佳, 需采取综合的治疗方法以提高疗

效^[2]。针对急性放射性肠损伤湿热毒邪内蕴的病机特点, 我们创制了加味葛根苓连汤治疗本病。本方是在东汉名医张仲景《伤寒论》中葛根苓连汤基础上化裁而来, 由葛根、黄芩、黄连、白芍、炒白术、防风、木香、陈皮、诃子、石榴皮、炙甘草等十一味中药组成, 全方具有清热解毒、健脾燥湿、调气导滞、涩肠止泻之功。

参考文献

- [1] DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer: Principles and Practice of Oncology[C]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- [2] Earnest DL. 放射性直肠炎 [J]. 国外医学肿瘤学分册, 1991, 18(5): 285-287.

研究丹参药材中丹参素含量测定的不同提取方法

蔡薇

DOI:10.16040/j.cnki.cn15-1101.2016.08.131 (福建省立医院药学部 福州 350001)

摘要:目的: 探究丹参药材中丹参素含量测定的不同提取方法。方法: 研究采用高效液相色谱法, 对超声提取、水煎提取以及索氏提取丹参素含量测定的方法进行比较分析。结果: 经过对丹参药材中丹参素含量测定的不同提取方法的探讨, 可以发现索氏提取能够促进完全水解, 测得的丹参素含量最多。结论: 采用索氏提取法对丹参药材中丹参素含量进行测定不仅具有准确性与可靠性, 而且测得的丹参素含量较高, 在丹参的质量控制中有一定的应用价值, 值得参考。

关键词: 丹参药材; 丹参素; 含量测定; 提取方法

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

文章编号: 1006-0979(2016)08-0135-01

作为一种常见的唇形科植物, 丹参具有极高的药用价值, 不仅能够活血通经、祛风止痛, 而且具有凝神清心的功效, 在冠心病、心绞痛等治疗过程中得到了有效的应用。丹参素作为丹参药材的重要组成部分, 在丹参类药物制剂、注射剂中应用广泛^[1]。本次研究对丹参药材中丹参素含量测定的不同提取方法进行分析, 现将研究结果作一汇报:

1 材料与方法

1.1 材料: 本次研究中采用的高效液相色谱仪为 LC310, 由山东金普分析仪器有限公司提供, 研究用丹参药材由仲景宛西制药股份有限公司提供, 甲醇采用的是色谱纯, 其余试剂采用分析纯。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件: 色谱柱为 Varian 气相色谱柱, 规格为 4.5mm×250mm; 流动相为甲醇与 0.5%的冰乙酸按照 1:5 比例混合, 检测波长 280nm; 流量 0.6mL/min, 进样量 20 μ L^[2]; 丹参素理论塔板数为 12000。

1.2.2 制备标准曲线: 取丹参素对照品, 加水配制成为不同浓度的含丹参素溶液, 分别为 0.0193mg/mL、0.0385mg/mL、0.0783mg/mL、0.1539mg/mL 以及 0.1935mg/mL, 进样 20 μ L 测定, 回归方程为 $y = 22631835x - 16639$, $r = 0.9948$, 在 0.0193~0.193mg/mL 范围内丹参素峰面积与浓度具有良好的线性关系。

1.2.3 超声提取: 选取 3 份 1g 丹参粗粉, 并于每份中加入 20mL 左右水, 采用超声法处理 10min、20min、30min, 提取液进行离心, 过滤后加入蒸馏水使其定容为 25mL, 按上述条件测定处理不同时间丹参素含量。

1.2.4 水煎提取: 取 10g 丹参, 加入 10 倍量的水反复煎煮 3 次, 2h/次, 经过过滤, 定容至 200mL, 按上述条件测定处理不同时间丹参素含量。

1.2.5 索氏提取: 取丹参 1g, 加入 100mL 水, 采用索氏法进行提取, 每 2h 取样一次^[3], 0.5mL/次, 提取后要补充适量水分, 取样 10 次后, 按上述条件测定处理不同时间丹参素含量^[4]。

2 结果

2.1 超声提取: 提取时间 10min 丹参素含量 0.5553mg/g, 提取时间 20min 丹参素含量 0.6342mg/g, 提取时间 30min 丹参素含量 0.6135mg/g。超声提取时间 20min, 丹参素基本提取完全。

2.2 水煎提取: 第一次测定丹参素含量为 1.8543mg/g, 第二次为

1.0533mg/g, 第三次为 0.4739mg/g。说明煎煮法测定的丹参素含量为 0.4730mg/g。

2.3 索氏提取: 索氏提取法共提取 10 次, 以 16~18h 的丹参素含量最高, 达到 24.4633mg/g。

3 讨论

近年来, 丹参药物以较高的药用价值在临床医学中得到了广泛应用。丹参药物共包含脂溶性与水溶性两种成分, 其中水溶性成分以酚酸类为主, 丹参素作为一种酚酸类物质, 在丹参注射剂、复方丹参滴丸中有着有效的应用, 因此对丹参素含量的检测有着重要的意义。本次研究中分别采用 3 种提取方法对丹参素含量进行测定, 可以发现索氏提取法对丹参素的提取量最高, 可以达到 24.4633mg/g, 其次为水煎提取法, 超声提取丹参素含量最低。丹参中含有大量的酚酸类物质, 丹参素则为咖啡酸的水解物, 与咖啡酸能够化缩成为迷迭香酸^[5], 分子之间的缩合, 有利于紫草酸、紫草酸乙的形成, 当其处于加热条件下能够实现水解进而生成丹参素, 从而使测定的丹参素含量得到增加。超声法检测不含加热过程, 只能对丹参药物中游离状态的丹参素进行测定, 水煎法尽管有加热过程, 但加热时间短, 仅有部分出现水解, 索氏提取法经过水解后的丹参素, 能测定的丹参素含量较高。综上所述, 在对丹参药材中丹参素含量进行测定时, 可优先选用索氏提取法, 增加丹参素的提取含量, 确保测定结果的准确性与可靠性, 为临床医学提供可靠依据。

参考文献

- [1] 董洋洋. 高效液相色谱法测定丹参药材中丹参素含量研究[J]. 科学与财富, 2015, 21(11):226-227.
- [2] 李爱勇, 吴宝, 刘红旭, 等. 参元益气活血胶囊中丹参素的测定及药物代谢动力学研究[J]. 北京中医药, 2015, 31(3):180-182.
- [3] 杨炳火, 夏崇才, 周英琼, 等. 正交试验设计优化超声煎煮法提取丹参中丹参素的研究[J]. 环球中医药, 2014, 19(12):926-928.
- [4] 刘敏彦, 赵韶华, 盖潇桦, 等. 丹参不同提取方法中水溶性成分含量的比较研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 18(5):1186-1187.
- [5] Chocron S, Nicholls A E, Brill A, et al. Modeling unidirectional composites by bundling fibers into strips with experimental determination of shear and compression properties at high pressures[J]. Composites Science & Technology, 2014, 101(8):32-40.