

李红伟,徐若颖,周宁,等. 盐益智仁-盐小茴香药对止泻活性部位筛选及“谱效”关系研究[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 48-59.

Li HW, Xu RY, Zhou N, et al. Screening of active antidiarrheal components and study of the “spectrum-effect” relationship of salt-processed *Alpiniae oxyphyllae Fructus-Foeniculi Fructus* medicines [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 48-59.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.006

盐益智仁-盐小茴香药对止泻活性部位筛选 及“谱效”关系研究

李红伟^{1,2,3}, 徐若颖¹, 周宁¹, 曹彦刚¹, 田连起¹, 石延榜¹, 李凯^{1,2,3*}

(1.河南中医药大学, 郑州 450046; 2.豫药全产业链研发河南省协同创新中心, 郑州 450046;
3.河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 郑州 450046)

【摘要】 目的 筛选盐益智仁-盐小茴香药对(YZYH)止泻活性部位,并通过“谱效”关系研究推测其药效物质基础和质量标志物。方法 制备大鼠脾肾虚泄泻模型,测定盐益智仁-盐小茴香药对石油醚(YZYH-L)、乙酸乙酯(YZYH-M)、水(YZYH-H)3部位药效指标,包括体重、肛温、腹泻潜伏期(diarrhea incubation period, DIP)、腹泻指数(diarrheal index, DI)等行为学指标及一氧化氮合成酶(nitric oxide synthetase, NOS)、环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)、磷酸肌酸激酶(creatine phosphate kinase, CPK)等生化指标;建立不同部位高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)图谱,采用灰色关联法分析各部位化学成分与止泻药效指标间的“谱效”关系。结果 与空白对照组大鼠相比,15 d后,模型组大鼠出现泄泻证主症关键病理指标—水样便,同时,伴随食后腹胀、食欲不振和弓背等脾阳和肾阳虚泄泻的次症典型特征;给与治疗药物后,泄泻主症和次症均有不同程度的改善,其中阳性药、YZYH-M部位第28天后泄泻模型大鼠关键指标DIP极显著延长($P < 0.01$)、DI极显著降低($P < 0.01$),以及脾、肾阳虚泄泻的次症典型特征代表性指标体重、24 h摄食、饮水量、肛温和血清生化指标NOS、cGMP、CPK等活性的调节作用均较其它给药组好;“谱效”关系研究表明茴香醛、4号色谱峰等成分与DIP、DI、NOS、cGMP、CPK 5个药效指标的关联度重要。结论 YZYH-M部位为药对止泻活性部位,其作用机制与抑制胃肠功能亢进和调节机体能量代谢与免疫相关;茴香醛及4号峰作为药对的质量标志物。

【关键词】 盐益智仁-盐小茴香药对;止泻作用;活性部位;“谱效”关系;灰色关联法;茴香醛

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)07-0048-12

Screening of active antidiarrheal components and study of the “spectrum-effect” relationship of salt-processed *Alpiniae oxyphyllae Fructus-Foeniculi Fructus* medicines

LI Hongwei^{1,2,3}, XU Ruoying¹, ZHOU Ning¹, CAO Yangang¹, TIAN Lianqi¹, SHI Yanbang¹, LI Kai^{1,2,3*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao, Henan Province, Zhengzhou 450046. 3. Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

[基金项目] 河南省科技攻关(232102311214, 242102310542); 河南省科技研发计划联合基金(优势学科培育类)项目(232301420073)。

[作者简介] 李红伟(1979—),男,副教授,硕士生导师,研究方向:中药炮制机理及饮片标准化研究。E-mail: lhw20130819@126.com

[通信作者] 李凯(1982—),男,教授,博士生导师,研究方向:中药炮制机理及饮片标准化研究。E-mail: cpulikai@163.com

[Abstract] Objective To screen the active antidiarrheal components of salt-processed *Alpiniae oxyphyllae Fructus-Foeniculi Fructus* medicines (ZYH) and investigate its pharmacological basis and quality markers by examining its “spectrum-effect” relationship. **Methods** A spleen and kidney yang deficiency model of diarrhea was established in rats. The pharmacodynamic indexes of ZYH in petroleum ether, ethyl acetate, and water fractions were measured, including behavioral indicators such as body weight, anal temperature, diarrhea incubation period (DIP), diarrhea index (DI), and biochemical indicators such as nitric oxide synthase (NOS), cGMP, and creatinine phosphokinase (CPK). We analyzed the components of ZYH by high performance liquid chromatography, and analyzed the “spectrum-effect” relationship between the chemical components and the antidiarrheal efficacy indicators using the grey correlation method. **Results** Compared with the blank control group, rats in the model group developed watery stools after 15 days, which was the key pathological index of the main syndrome of diarrhea. Rats in the model group also developed abdominal distension, loss of appetite, and back arching, as secondary symptoms of spleen and kidney yang deficiency diarrhea. Administration of the therapeutic drugs improved both the main and secondary symptoms of diarrhea. The positive drug and ZYH-M significantly prolonged DIP ($P < 0.01$) and decreased DI ($P < 0.01$) after 28 days. These key indexes of diarrhea, as well as body mass, 24 h food intake, water intake, anal temperature, and the serum biochemical indexes NOS, cGMP, CPK were all improved in the positive drug and ZYH-M groups. Examination of the spectral effect relationship showed that anisaldehyde, chromatographic peak 4, and other components were correlated with the pharmacodynamic indexes of DIP, DI, NOS, cGMP, and CPK. **Conclusions** The ethyl acetate fraction was the active antidiarrheal fraction of salt-processed *Alpiniae oxyphyllae Fructus-Foeniculi Fructus* medicines. It acts by inhibiting gastrointestinal hyperfunction, regulating energy metabolism and immunity. Ingredients such as anisaldehyde and peak 4 served as quality indicators for its antidiarrheal effect.

[Keywords] salt-processed *Alpiniae oxyphyllae Fructus-Foeniculi Fructus* medicines; antidiarrheal effect; active site; “spectrum-effect” relationship; grey correlation method; anisaldehyde

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

泄泻是排便频率增加,大便稀溏或排出未消化食物,甚至泻出水样便为主症的病证,是中医常见疾病,中医辩证治疗常常取得较好疗效^[1]。中医认为脾肾阳虚为最常见证型,缘由患者长期饮食不节,或因年老病久迁延,脾胃受损,日久伤肾,命门火衰,脾失温煦,水谷不化,运化无权,则发为泄泻,治疗以温肾健脾、固涩止泻为法,中医临床治疗常以补骨脂和肉豆蔻药对为主方加减配伍,但补骨脂“性本大燥,毒”,肉豆蔻“辛香颇动恶心,服之欲吐”,同时,现代临床应用发现补骨脂存在诸多风险,能引起过敏、皮肤毒性及光敏等症状^[2];肉豆蔻有拟精神活性、低血压和心动过速等毒副反应^[3],故二者临床应用为历代中医药学家所忌。团队长期致力于盐炙对补骨脂-肉豆蔻药对治疗脾肾阳虚泄泻研究,在此基础上,挖掘古今中医药文献,结合现代药效学研究,筛选出安全性高,且可显著改善脾肾阳虚泄泻大鼠病理状态的盐益智仁-盐小茴香药对(ZYH)^[4-5]。

ZYH 用于治疗脾肾阳虚泄泻,可见于清代《医略六书》载“椒朴丸”方,前期药理学研究明确了 ZYH 可显著改善脾肾阳虚泄泻大鼠的病理指标,但药对的活性部位、物质基础和质量标志物还不清

楚,因此,本研究利用 HPLC 图谱技术,通过药效学研究筛选 ZYH 止泻活性部位,采用灰色关联法研究其药效物质基础和质量标志物,为 ZYH 的临床应用提供科学支撑。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠,雄性,145 只,6 周龄,体重 190 ~ 230 g,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司 [SCXK(鲁)2019-0003]。动物饲养于河南中医药大学 SPF 级动物室 [SYXK(豫)2020-0004],动物室温度(23±4)℃,相对湿度(45±5)%,光照周期为明/暗 12 h/12 h。动物实验研究由河南中医药大学实验动物伦理委员会审批同意(DWLLGZR2022 02193),实验动物按 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

食盐(批号 C201912280211,纯度≥99.1%),中盐长江盐化有限责任公司;圆柚酮(批号 DST210710-254,GC≥97%),德思特生物技术有限公司;芦丁(批号 MUST-12040302,纯度≥98%),成都曼思特生物科技有限公司;杨牙黄素(批号 PRF21051005,HPLC≥98%),成都普瑞法科技开发

有限公司;反式茴香脑(批号 Y24N6S6391,纯度 $\geq 98\%$)、白杨素(批号 X2406C4947, HPLC $\geq 98\%$)、茴香醛(批号 H04J10Z78823, HPLC $\geq 98\%$)均购自上海源叶生物科技有限公司;氢化可的松注射液(批号 2106203),国药集团容生制药有限公司;四神丸(批号 20201101),山西华康药业股份有限公司;胃泌素(GAS)、胃动素(MTL)、环磷酸鸟苷(cGMP)、一氧化氮合成酶(NOS)、磷酸肌酸激酶(CPK)ELISA 试剂盒(批号 202112),江苏酶免实业有限公司;乳酸脱氢酶(LDH,批号 20220119)、琥珀酸脱氢酶(SDH,批号 20220216)、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶(批号 20220114)、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶(批号 20220111)试剂盒,索莱宝生化试剂盒事业部;甲醇、甲酸、乙腈均为色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司。

益智(批号 210406)、小茴香(批号 210406)及番泻叶(批号 210403)均购自河南省庄霖农业科技有限公司,经河南中医药大学付钰副教授分别鉴定为姜科植物益智 *A. oxyphylla* Miq.、伞形科植物茴香 *F. vulgare* Mill. 的干燥成熟果实及豆科植物狭叶番泻 *Cassia angustifolia* Vahl. 的干燥小叶。盐益智仁、盐小茴香分别按照前期盐炙工艺优化实验结果制备,盐益智仁:取净益智仁,用 20% 的食盐水(100 kg 益智仁用食盐 2 kg)拌匀,闷润 5 h,置炒制容器内,255 °C 炒制 9 min,出锅,放凉;盐小茴香按照参考文献^[6]制备。

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, PDA (photodiode array) 检测器,美国安捷伦科技有限公司;GTR16-2 型高速冷冻离心机,北京时代北利离心机有限公司;BT25S 型十万分之一电子分析天平,赛多利斯科学仪器有限公司;EPOCH 酶标仪,美国 BioTek Instruments, Inc.。

1.3 实验方法

1.3.1 受试药液制备

将盐益智仁、盐小茴香捣碎,过 1 号药典筛。分别取盐益智仁、盐小茴香粉末各 400 g,按参考文献^[5]制备 ZZYH 水煎液,并于 45 °C 真空减压浓缩至适量体积,加入等体积石油醚反复萃取,至萃取液无色,萃取液于 45 °C 真空减压浓缩至浸膏,于 60 °C 真空干燥箱中干燥,得 ZZYH-L 部位;石油醚萃取后剩余部分,加入等体积乙酸乙酯反复萃取至萃取液无色,回收溶剂,浓缩至浸膏,于 70 °C 真空干燥,得 ZZYH-M 部位;萃取后剩余部位水浴蒸干得到

ZZYH-H 部位。以上 ZZYH 各萃取部位均用含 0.1% 聚山梨酯-80 的水溶解至 0.60 g/mL (按生药计)^[5]。

1.3.2 四神丸混悬液、番泻叶水煎液制备

取适量四神丸,打粉,过 6 号筛,加水均匀混合配制得四神丸混悬液(0.2 g/mL)。

取番泻叶适量,浸泡 30 min,加水煮沸 10 min,用 2 层纱布滤过,滤液于 45 °C 下减压浓缩至生药质量浓度 1 g/mL 的番泻叶水煎液^[5]。

1.3.3 分组、造模及给药

SD 大鼠适应性喂养 3 d 后,随机分为 6 组,每组 9 只,分别为空白对照组、模型组、阳性药组、ZZYH-L 组、ZZYH-M 组、ZZYH-H 组,除空白对照组外,其它各组大鼠每天上午灌胃给予氢化可的松注射液(15.0 mg/kg),连续 14 d 相继出现软稀便,以及肾虚泄泻的次症典型特征(脐腹冷痛—弓背表现),表明模型出现肾虚,并从第 15 天开始每天上午灌胃冰番泻叶水煎液(10.0 g/kg),连续 21 d 出现溏泄,且部分大鼠有不同程度的脾胃虚弱泄泻次症典型特征,表现为食后腹胀、食欲不振,甚至脱肛情况,表明模型出现脾阳虚特征,空白对照组给予同等体积纯化水^[5]。

除空白对照组和模型组外,其余各给药组从第 15 天开始灌胃给药,阳性药组给予四神丸混悬液(2.0 g/kg),其余 3 组按生药 6.0 g/kg 剂量分别给药,连续给药 21 d,空白对照组和模型组给予等体积纯化水。

1.3.4 指标检测

(1) 大鼠体重、摄食量、饮水量、肛温

实验期间每 7 d 统计大鼠体重、24 h 摄食量、24 h 饮水量、肛温。

(2) DIP、DI

第 15、21、28 和 35 天,从给完番泻叶水煎剂后开始计时,至出现稀便或黏液便之间的时间为腹泻潜伏期时间,连续观察 5 h。

腹泻指数 = 稀便率 \times 平均稀便级。稀便率 = 稀便数 / 粪便总数 $\times 100\%$,稀便级为稀便污染的滤纸所形成的污迹直径定级^[6]。大鼠给药后更换滤纸,连续观察给药后 3 h 内的排便情况,计算腹泻指数。

(3) 生化指标检测

按 ELISA 试剂盒说明书操作,检测各组大鼠血清 MTL、GAS、NOS、cGMP、CPK 水平;取各组大鼠肝组织按试剂盒检测 LDH、SDH、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} -$

Mg²⁺-ATPase 活性。

1.3.5 HPLC 图谱建立

(1) 对照品溶液制备

分别精密称取圆柚酮、杨牙黄素、白杨素、反式茴香脑、茴香醛、芦丁适量,加甲醇溶解并定容至 5 mL 容量瓶中,得质量浓度分别为 0.830、0.520、1.065、2.000、2.000、0.700 mg/mL 的单一对照品储备液,再分别精密量取上述单一对照品储备液适量至 5 mL 容量瓶中,甲醇稀释至刻度,得混合对照品母液,将混合对照品母液逐级稀释,得一系列不同质量浓度的混合对照品溶液,待测。

(2) 供试品溶液制备

将盐益智仁、盐小茴香捣碎,过 1 号药典筛。分别取盐益智仁与盐小茴香各 10 g,精密称定,按文献方法^[5]制备水煎液,减压浓缩至 100 mL,8000 r/min 离心 20 min,取上清液按“1.3.1”方法得到各部位干燥样品,分别加 50% 含水甲醇溶解并定容至 100 mL,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,即分别得到 ZYH 石油醚部位(ZYH-L)、乙酸乙酯部位(ZYH-M)和水部位(ZYH-H)供试品溶液。每个样品均平行制备 3 份。

(3) 色谱条件

色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为 A:乙腈-B:0.1% 甲酸水,梯度洗脱条件:0~20 min,95%~94% B;20~34 min,94%~92% B;34~40 min,92%~90% B;40~42 min,90%~80% B;42~72 min,80%~60% B;72~77 min,60%~25% B;77~80 min,25%~21% B;80~85 min,21% B;85~98 min,21%~95% B;98~100 min,95% B;流速 0.8 mL/min;检测波长 254 nm;进样量 2.0 μL;柱温 30 °C。

(4) 方法学考察

对圆柚酮、杨牙黄素、白杨素、反式茴香脑、茴香醛、芦丁的线性关系、专属性、精密度、重复性、稳定性和加样回收率进行考察,考察结果用相对标准偏差(RSD)表示。

1.4 统计学方法

采用灰色关联法,将分析样品分别与其脾肾阳虚泄泻指标 DIP、DI、NOS、cGMP、CPK 相关联,计算关联度^[7]。药理学指标评价应用 SPSS 22.0 软件对数据进行处理,检测结果用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。灰色关联度评价规则:应用 SPSS 22.0

软件对数据进行处理,检测结果高于 0.700 为重要因素,处于 0.500~0.700 之间为比较重要因素,其余为不重要因素^[8]。

2 结果

2.1 止泻作用考察

2.1.1 大鼠症状与体征情况

与空白对照组大鼠相比,造模 7 d 后,模型组及各给药组大鼠反应迟钝、精神萎靡、毛发暗淡变黄,出现蜷缩弓背等情况;造模 15 d 后,模型组大鼠出现泄泻证主症的关键病理指标—水样便,同时,伴随脾胃虚弱泄泻次症典型特征——食后腹胀、食欲不振;肾阳虚泄泻的次症典型特征脐腹冷痛—弓背等,表明造模成功^[5]。

各给药组大鼠给药后,阳性药组、ZYH-M 组大鼠腹泄泻症状明显减轻,其它给药组大鼠部分略有减轻;所有给药组大鼠弓背、食欲等脾、肾阳虚泄泻次症典型特征也得到改善。

2.1.2 体重、24 h 摄食、饮水量

脾胃虚弱泄泻次症典型特征表现为食后腹胀、食欲不振,因此,体重、24 h 摄食量、饮水量变化可衡量脾阳虚运化失司、纳差情况^[5,9]。与空白对照组大鼠相比,模型组大鼠第 7 天开始摄食量明显下降,第 21 天开始饮水量明显升高,体重显著降低($P < 0.05$),表明脾阳虚运化失司,造模兼有脾阳虚特征;与模型组大鼠相比,各给药组大鼠 21 d 后体重均呈增高趋势,其中阳性药组、ZYH-M 组大鼠给药后摄食量明显增加,ZYH-M 组饮水量明显降低,体重显著增高($P < 0.01$),表明 ZYH-M 部位明显改善模型大鼠的脾阳虚病理指标。体重结果见表 1,24 h 摄食、饮水量见表 2。

2.1.3 DIP、DI

依据《中药新药临床研究指导原则》中 DIP、DI 为泄泻证的关键检测指标,除空白对照组外,其它各组大鼠第 15、21、28、35 天灌胃番泻叶后均出现泄泻现象;与模型组相比,给药后,阳性药组、ZYH-M 组大鼠第 28 天后 DIP 极显著延长($P < 0.01$)、DI 极显著降低($P < 0.01$),说明 ZYH-M 部位为止泻的活性部位。结果见表 3。

2.1.4 肛温

肾虚证常伴有体温下降次症,肛温可反映肾阳虚形寒肢冷情况^[10],与空白对照组大鼠相比,模型组大鼠第 7 天开始肛温极显著下降($P < 0.01$);与

模型组相比, 给药后阳性药组、ZYH-M 组大鼠第 28 ~ 35 天肛温显著升高, 说明 ZYH-M 部位显著改善模型大鼠的肾阳虚泄泻次症病理指标。见表 4。

2.1.5 生化指标

CPK 是肌肉中一种特异性酶, 其活性变化可直接影响肌肉能量来源, 为脾虚证指标, 脾阳虚模型

大鼠血清 CPK 活性低于正常大鼠^[11]。与空白对照组大鼠相比, 模型组大鼠血清 CPK 水平显著降低 ($P < 0.01$); 给药后, 与模型组相比, 阳性药组、ZYH-M 组大鼠血清 CPK 水平显著升高 ($P < 0.01$), 进一步说明 ZYH-M 部位明显改善模型大鼠的脾阳虚病理指标。

表 1 各组大鼠平均体重变化情况 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Average body weight of rats in each group

组别 Groups	体重/g Body weight					
	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
空白对照 Blank control	238.67±7.57	256.44±11.82	284.78±11.64	333.89±13.52	346.67±14.65	368.89±16.76
模型 Model	232.00±8.56	244.89±10.25*	243.33±21.17**	240.67±18.74**	250.33±17.95**	266.00±16.73**
阳性药 Positive drug	234.13±6.22	239.78±15.00	240.89±25.77	259.33±17.68###	271.89±19.34##	314.00±19.10##
ZYH-L	236.78±8.14	244.22±11.02	254.44±16.71	247.89±10.95	252.56±11.09	282.11±14.38#
ZYH-M	240.22±7.29	241.56±8.85	260.44±13.54#	250.00±15.22	280.56±15.39##	333.67±17.56##
ZYH-H	235.11±7.22	244.00±12.43	250.56±15.16	251.78±12.00	263.33±11.49	279.44±14.54

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

表 2 各组大鼠 24 h 平均摄食、饮水量变化情况 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 24 h average food and water intake of rats in each group

组别 Groups	24 h 摄食量/g Food intake in 24 h						24 h 饮水量/g Water intake in 24 h					
	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
空白对照 Blank control	32.21	29.39	30.00	27.51	35.17	37.29	53.44	50.33	41.83	45.85	50.65	53.06
模型 Model	27.03	16.52	15.19	15.55	17.69	18.33	38.25	31.42	40.00	61.58	73.79	78.81
阳性药 Positive drug	29.98	19.31	14.46	17.83	22.52	27.89	48.71	37.02	32.90	66.41	63.51	63.09
ZYH-L	27.98	18.84	16.02	16.91	20.28	19.75	32.52	33.37	39.99	56.71	67.65	67.50
ZYH-M	28.38	20.65	15.14	19.96	23.59	31.94	41.84	30.36	28.82	61.14	57.40	51.87
ZYH-H	27.25	20.52	14.50	18.18	19.11	22.04	29.35	32.07	35.68	53.63	69.59	71.37

表 3 各组大鼠 DIP、DI 变化情况 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 3 Diarrhea incubation period and Diarrhea index of rats in each group

组别 Groups	DIP/min				DI			
	15 d	21 d	28 d	35 d	15 d	21 d	28 d	35 d
空白对照 Blank control	/	/	/	/	/	/	/	/
模型 Model	148.00±15.68	138.00±11.94	167.89±9.78	189.56±13.46	1.20±0.25	1.29±0.30	1.28±0.15	1.11±0.26
阳性药 Positive drug	149.22±13.59	156.44±9.83###	196.22±13.59##	223.67±12.51##	1.15±0.26	0.97±0.19#	0.67±0.16###	0.48±0.17##
ZYH-L	156.56±18.76	139.56±9.46	177.00±12.83	197.44±10.30	1.15±0.39	1.06±0.28	1.11±0.25	1.13±0.20
ZYH-M	155.78±10.95	147.00±14.53	199.56±18.08##	236.11±22.87##	1.43±0.56	1.17±0.17	0.59±0.10###	0.42±0.23##
ZYH-H	151.78±18.12	140.78±8.42	177.67±17.31	201.78±15.47#	1.17±0.41	1.04±0.33	1.10±0.29	0.87±0.23#

注: 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

下丘脑 NOS/cGMP 信号传导系统作用增强(即肾阳虚使 NOS 活性增强,催化 L-精氨酸生成过量的 NO,导致 cGMP 生成量增大)是肾阳虚证的主要表现之一^[12]。与空白对照组大鼠相比,模型组大鼠血清 NOS、cGMP 水平显著升高($P < 0.01$);给药后,与模型组相比,阳性药组、YZYH-M 组大鼠血清 NOS、cGMP 水平显著降低($P < 0.01$),进一步说明 ZYH-M 部位能够明显改善模型大鼠的肾阳虚病理指标。

脾肾阳虚泄泻证伴随有胃肠运动亢进和能量

代谢紊乱,表征能量代谢指标常以肝组织 LDH、SDH、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 活性进行评价^[12]。其中, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 也是肾功能的重要表征指标之一^[9]。与空白对照组大鼠相比,模型组大鼠肝组织 LDH、SDH、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 活性显著降低;给药后,与模型组相比,阳性药组、YZYH-M 组大鼠肝组织 LDH、SDH、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 活性均显著升高($P < 0.01$),MTL、GAS 水平极显著降低($P < 0.01$),从而抑制胃肠功能亢进。结果见表 5 和表 6。

表 4 各组大鼠肛温变化情况($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 4 Rat anal temperature in each group

组别 Groups	肛温/°C Anal temperature					
	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
空白对照 Blank control	37.66±0.21	37.52±0.14	37.64±0.11	37.50±0.07	37.69±0.18	37.71±0.16
模型 Model	37.56±0.18	35.41±0.80**	34.59±1.12**	35.46±1.08**	35.44±0.77**	36.07±0.60**
阳性药 Positive drug	37.60±0.19	36.06±0.56	34.70±1.36	35.52±0.70	37.09±0.48#	37.37±0.37##
YZYH-L	37.66±0.22	35.53±0.91	35.03±1.30	35.14±0.75	36.57±0.65	36.79±0.39
YZYH-M	37.53±0.14	35.82±0.74	35.00±0.71	35.88±0.75	37.13±0.73#	37.39±0.33##
YZYH-H	37.58±0.17	35.74±1.06	35.03±1.33	35.48±0.72	36.89±0.66	37.11±0.72

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the blank control group, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

表 5 各组大鼠血清 NOS、cGMP、CPK 水平($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 5 Detection of NOS, cGMP and CPK in serum of rats in each group

组别 Groups	NOS/($\mu\text{mol/L}$)	cGMP/(nmol/L)	CPK/(pg/mL)	MTL/(pg/mL)	GAS/(pg/mL)
空白对照 Blank control	155.82±15.00	68.28±4.52	138.50±4.89	774.19±21.29	604.38±29.11
模型 Model	178.26±11.36**	78.58±8.42**	127.00±9.17**	843.94±21.81**	687.88±36.76**
阳性药 Positive drug	146.04±10.12##	69.78±6.24#	137.26±7.37##	795.05±22.29##	626.79±33.53##
YZYH-L	169.11±17.58	76.06±6.90	129.19±9.25	819.59±22.71	685.71±29.89
YZYH-M	143.19±11.46##	63.14±6.93##	148.88±9.30##	769.70±22.32##	581.61±33.48##
YZYH-H	162.56±18.69#	77.92±8.72	134.27±10.31	814.69±30.69#	676.24±35.22

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the blank control group, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

表 6 各组大鼠肝组织 LDH、SDH、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 活性($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 6 Activities of LDH, SDH, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ in liver tissues of rats in each group

组别 Groups	LDH/(U/mg)	SDH/(U/g)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}/(\text{U/g})$	$\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}/(\text{U/g})$
空白对照 Blank control	179.87±4.22	7599.26±782.78	1098.26±67.90	1269.50±63.56
模型 Model	161.03±8.96**	6067.94±684.94**	943.51±58.50**	1077.63±92.72**
阳性药 Positive drug	175.62±7.36##	7435.35±988.03##	1090.49±88.15##	1203.18±121.16#
YZYH-L	164.95±7.17	6565.95±897.55	1007.25±84.84	1055.20±123.52
YZYH-M	178.70±11.26##	8061.57±637.51##	1183.11±125.73##	1307.02±96.64##
YZYH-H	164.24±10.39	6577.31±1392.90	977.23±130.77	1033.63±143.93

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the blank control group, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

2.2 HPLC 图谱

2.2.1 方法学考察

圆柚酮、杨芽黄素、白杨素、反式茴香脑、茴香醛、芦丁专属性考察色谱图见图 1, 结果显示各组分分离度良好, 无干扰; 各组分线性关系、精密度、稳定性、重复性、加样回收率考察结果见表 7, 结果显示该方法良好。

2.2.2 ZYH 各部位共有峰信息

分别将 ZYH 各部位供试品溶液 HPLC 谱图导

入“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”中, 设置参照图谱, 时间窗宽度均设为 0.1, 按中位数法生成对照图谱, 并进行多点校正和全谱峰匹配。得到 ZYH 各部位 3 个平行样品共有峰, 共有峰信息见表 8, ZYH 不同部位 HPLC 图谱叠加图见图 2。由表 8 可知, ZYH 石油醚部位、乙酸乙酯部位、水部位分别有 8、23、19 个共有峰, 经对照品比对鉴定 19、28、29、31、32、33 号峰分别为芦丁、茴香醛、白杨素、反式茴香脑、杨芽黄素、圆柚酮, 各部位样品 6 种成分含量见表 8。

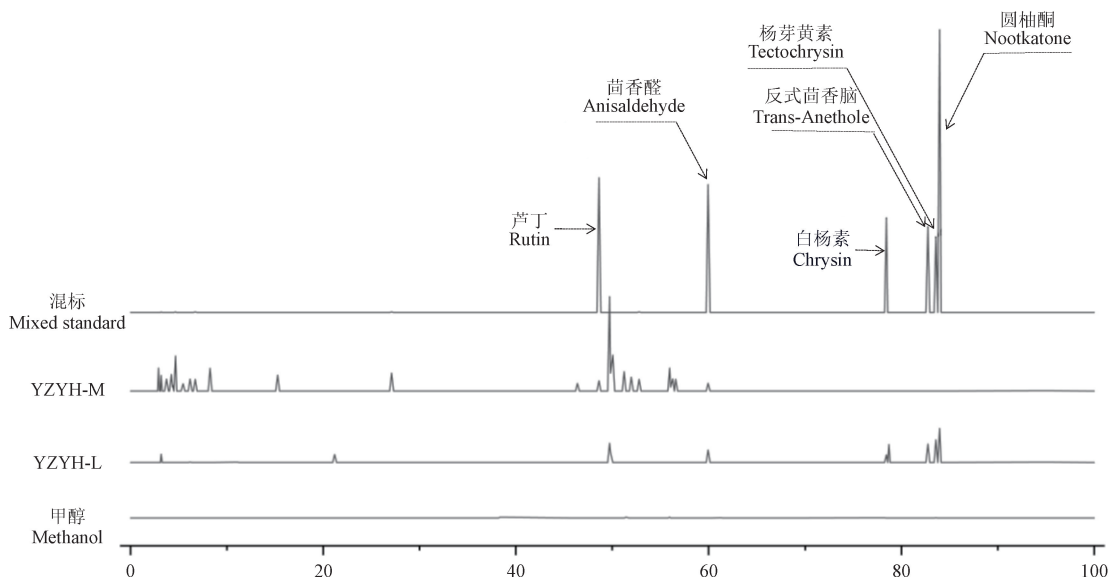


图 1 专属性考察结果

Figure 1 Specific investigation results

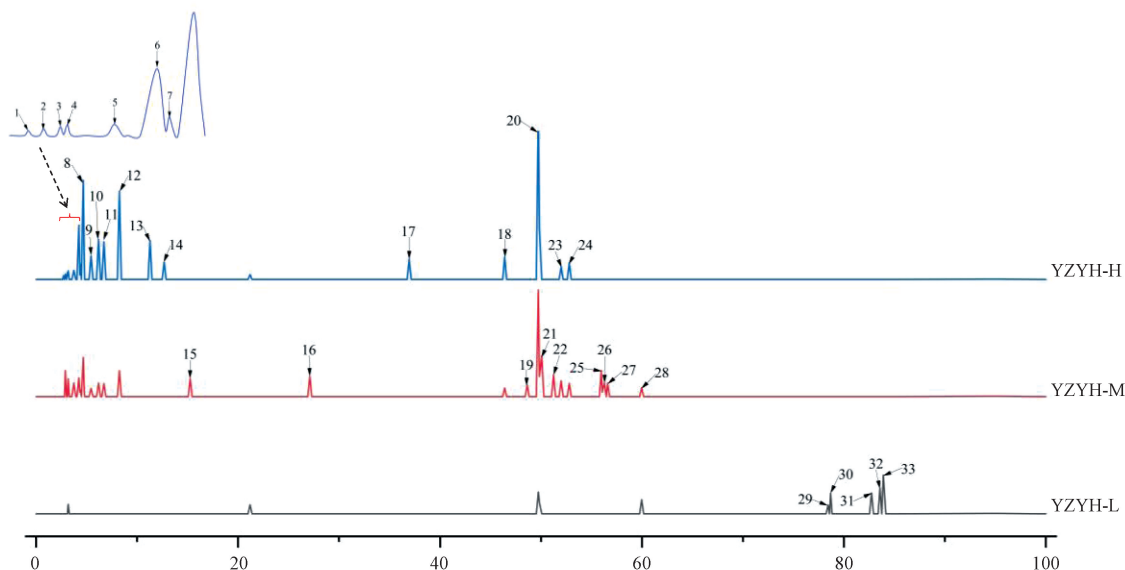


图 2 ZYH 不同部位供试品溶液 HPLC 图谱叠加图

Figure 2 Overlay of HPLC chromatograms of different fraction of ZYH

表 7 方法学考察结果
Table 7 Methodological investigation results

成分 Compound	回归方程 Regression equations	r	RSD(n=6)/%				
			线性范围/($\mu\text{g}/\text{mL}$) Linear range	精密度 Precision	稳定性 Stability	重复性 Repeatability	加样回收率 Recovery
圆柚酮 Nootkatone	Y = 4133.9X + 29.669	0.9997	5.19 ~ 166.00	0.51	2.65	2.21	2.80
杨牙黄素 Tectochrysin	Y = 7403.9X - 2.0908	0.9995	3.25 ~ 26.00	1.13	1.70	1.71	2.65
白杨素 Chrysin	Y = 11870X - 10.838	0.9990	1.96 ~ 21.30	1.05	2.99	1.69	3.59
反式茴香脑 Trans-Anethole	Y = 19705X + 19.433	0.9999	0.31 ~ 10.00	2.35	2.53	2.50	4.77
茴香醛 Anisaldehyde	Y = 7997.4X + 3.2563	0.9998	1.40 ~ 40.00	0.96	0.89	1.99	2.40
芦丁 Rutin	Y = 4872.9X + 0.4389	0.9998	3.50 ~ 70.00	2.05	1.43	0.16	1.48

表 8 YZYH 各部位样品共有峰信息 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 8 Common peak information of samples from different fraction of YZYH

峰号 Chromatographic peak	RT/min	峰面积/($\text{mAU} * \text{S}$) Peak area		
		YZYH-L	YZYH-M	YZYH-H
1	2.720	-	-	13.412 \pm 5.839
2	2.903	-	55.413 \pm 2.787	16.063 \pm 6.063
3	3.101	-	-	19.077 \pm 3.368
4	3.185	19.959 \pm 0.956	37.563 \pm 3.376	20.800 \pm 2.406
5	3.735	-	27.145 \pm 2.791	20.235 \pm 1.298
6	4.240	-	35.600 \pm 5.942	125.878 \pm 5.168
7	4.388	-	13.932 \pm 0.514	38.111 \pm 3.889
8	4.668	-	77.607 \pm 8.622	229.966 \pm 25.706
9	5.444	-	16.706 \pm 1.311	60.093 \pm 7.073
10	6.183	-	23.548 \pm 6.115	99.470 \pm 9.757
11	6.716	-	22.432 \pm 6.231	94.145 \pm 9.216
12	8.255	-	49.888 \pm 6.671	214.186 \pm 16.593
13	11.287	-	-	91.382 \pm 5.774
14	12.682	-	-	42.877 \pm 4.072
15	15.268	-	37.660 \pm 3.531	-
16	27.108	-	46.547 \pm 2.184	-
17	36.965	-	-	51.177 \pm 5.037
18	46.389	-	17.061 \pm 2.080	43.812 \pm 6.961
19	48.617	-	26.569 \pm 1.562	-
20	49.728	38.135 \pm 10.180	209.870 \pm 42.047	441.318 \pm 43.637
21	50.067	-	86.187 \pm 6.624	-
22	51.230	-	49.599 \pm 2.985	-
23	51.985	-	36.308 \pm 5.938	29.829 \pm 2.179
24	52.795	-	29.004 \pm 0.752	43.341 \pm 6.050
25	55.967	-	59.197 \pm 1.821	-
26	56.228	-	32.810 \pm 4.243	-
27	56.587	-	32.472 \pm 4.344	-
28	59.958	31.916 \pm 2.406	23.454 \pm 5.038	-
29	78.429	17.569 \pm 0.582	-	-
30	78.684	44.584 \pm 1.501	-	-
31	82.731	53.396 \pm 3.116	-	-
32	83.570	52.786 \pm 1.008	-	-
33	83.904	82.900 \pm 7.778	-	-

注：“-”表示样品中未检测到该信号。

Note: “-” indicates that the signal is not detected in the sample.

表 9 YZYH 各部位 6 种成分含量($\bar{x}\pm s, \mu\text{g/g}, n=3$)

Table 9 Content of 6 components in each fraction of YZYH

成分 Compound	YZYH-L	YZYH-M	YZYH-H
芦丁 Rutin	-	26.81±1.60	-
茴香醛 Anisaldehyde	17.11±1.01	10.21±0.05	-
白杨素 Chrysin	12.46±0.24	-	-
反式茴香脑 Trans-Anethole	7.93±1.01	-	-
杨牙黄素 Tectochrysin	38.88±1.71	-	-
圆柚酮 Nootkatone	64.38±9.41	-	-

注:“-”表示样品中未检测到该信号。

Note:“-” indicates that the signal is not detected in the sample.

2.3 YZYH 止泻作用“谱效”关系

DIP、DI、NOS、cGMP、CPK 指标与脾肾阳虚泄泻关系较为密切,故选择 YZYH-L、YZYH-M、YZYH-H 组大鼠第 35 天 DIP、DI 及血清 NOS、cGMP、CPK 水平为参考序列,YZYH 各部位 HPLC 图谱共有峰峰面积数据为比较序列进行灰度关联分析,结果见表 10。

关联度的大小反映因子的重要性,关联度越大,表明因子的作用越大,其评价也越好。本研究结果表明,关联度>0.700 以上的化学成分种类以 YZYH-M 部位最多,进一步表明该部位为止泻活性部位。茴香醛与 4 号色谱峰与 5 个药效指标的关联度均>0.7,说明二者与药对止泻作用密切相关。

表 10 各共有峰与 DIP、DI、NOS、cGMP、CPK 的灰色关联度

Table 10 Relevancy between each common peak and DIP, DI, NOS, cGMP, CPK

峰号 Chromatographic peak	RT/min	DIP		DI		NOS		cGMP		CPK	
		关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order
1	2.720	0.601	24	0.599	21	0.594	16	0.601	16	0.601	18
2	2.903	0.710	9	0.607	20	0.673	15	0.663	15	0.712	9
3	3.101	0.590	25	0.590	22	0.585	22	0.591	17	0.591	25
4	3.185	0.904	1	0.741	1	0.842	1	0.833	1	0.901	1
5	3.735	0.760	6	0.676	6	0.729	5	0.738	5	0.763	5
6	4.240	0.683	11	0.672	8	0.694	10	0.703	10	0.688	11
7	4.388	0.711	8	0.668	12	0.727	6	0.738	4	0.717	8
8	4.668	0.702	10	0.672	7	0.716	9	0.727	8	0.708	10
9	5.444	0.682	12	0.682	4	0.693	11	0.702	11	0.687	12
10	6.183	0.669	14	0.668	11	0.677	13	0.685	13	0.673	14
11	6.716	0.670	13	0.668	13	0.678	12	0.686	12	0.674	13
12	8.255	0.667	15	0.676	5	0.674	14	0.683	14	0.671	15
13	11.287	0.588	28	0.588	25	0.583	25	0.589	20	0.589	28
14	12.682	0.589	27	0.588	23	0.583	23	0.589	19	0.590	26
15	15.268	0.607	18	0.514	27	0.569	28	0.563	28	0.601	19
16	27.108	0.607	22	0.514	32	0.569	32	0.563	33	0.600	23
17	36.965	0.589	26	0.588	24	0.583	24	0.589	18	0.590	27
18	46.389	0.719	7	0.670	9	0.732	4	0.747	3	0.727	7
芦丁 Rutin	48.617	0.607	21	0.514	31	0.569	31	0.563	31	0.600	22
20	49.728	0.763	4	0.688	3	0.752	2	0.765	2	0.772	3
21	50.067	0.607	19	0.514	26	0.569	29	0.563	29	0.601	20
22	51.230	0.607	20	0.514	30	0.569	30	0.563	30	0.600	21
23	51.985	0.761	5	0.669	10	0.725	8	0.733	6	0.762	6
24	52.795	0.775	2	0.653	14	0.726	7	0.730	7	0.774	2
25	55.967	0.607	23	0.514	33	0.569	33	0.563	32	0.600	24
26	56.228	0.608	17	0.514	29	0.569	27	0.564	27	0.601	17
27	56.587	0.608	16	0.514	28	0.570	26	0.564	26	0.601	16
茴香醛 Anisaldehyde	59.958	0.773	3	0.702	2	0.739	3	0.723	9	0.766	4
白杨素 Chrysin	78.429	0.586	33	0.620	18	0.591	21	0.584	25	0.583	33

续表 10

峰号 Chromatographic peak	RT/min	DIP		DI		NOS		cGMP		CPK	
		关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order
30	78.684	0.586	32	0.620	17	0.591	20	0.584	24	0.583	32
反式茴香脑 Trans-Anethole	82.731	0.586	30	0.622	15	0.592	17	0.585	21	0.583	30
杨芽黄素 Tectochrysin	83.570	0.586	31	0.620	19	0.591	19	0.584	23	0.583	31
圆柚酮 Nootkatone	83.904	0.587	29	0.620	16	0.592	18	0.584	22	0.583	29

3 讨论

3.1 模型评价与活性部位筛选

本研究脾肾阳虚泄泻大鼠模型采用“番泻叶+氢化可的松”复合法建立,造模 15 d 后,模型组大鼠出现水样便;21 d 后,模型组大鼠 DIP 明显缩短、DI 明显升高,均出现明显泄泻等宏观表征。

益智仁盐制前后水提物均能使番泻叶所致小鼠的 DIP 延长 ($P < 0.05$),抑制家兔离体肠肌的收缩 ($P < 0.01$),活性部位为脂溶性部位^[13];益智仁 95% 乙醇提取物和 90% 乙醇洗脱液均能显著对蓖麻油致急性腹泻、大黄诱导慢性腹泻和离体豚鼠回肠收缩的发病时间延迟,明显降低湿便率,对胃肠推进有显著的抑制作用^[14]。以上研究表明益智仁止泻的活性部位及药效物质基础的极性相对偏小,同时,进一步说明 ZYH-M 部位为止泻活性部位。

益智仁主治肾阳虚证,尤以肾虚遗尿、小便频数的多尿证见长,可显著改善缺血/再灌注诱导的急性肾功能衰竭(acute respiratory failure, ARF)下调所致的多尿证,其机制是通过恢复肾 Na^+/K^+ -ATPase 的表达水平^[9]。益智仁通过介导胆碱能、肾上腺素能和组胺等受体,调节 NOS、MTL 和 GAS 等水平发挥止泻活性^[15];小茴香挥发油拮抗乙酰胆碱作用,缓解胃肠道痉挛^[14]。盐小茴香与盐补骨脂配伍,能有效缓解能量代谢紊乱病症—脂肪性腹泻、渗透性利尿、营养不良和体重减轻的症状^[4]。结合本实验对脾肾阳虚中脾阳虚、肾阳虚和能量代谢等指标的检测和分析,说明 ZYH-M 部位治疗通过脾肾阳虚泄泻的机制是通过调节模型大鼠的脾阳虚和肾阳虚指标,以及能量代谢指标来实现的。

3.2 “谱效”关系—药效物质基础及质量标志物

现有文献表明,益智仁止泻作用与其所含的二苯庚烷、倍半萜和黄酮类成分有关,其中黄酮类代

表性成分有杨芽黄素等,倍半萜类代表性成分为圆柚酮;杨芽黄素可减轻氯化氨甲酰胆碱引起十二指肠收缩,分子对接表明杨芽黄素对腹泻相关的钠氢交换蛋白 3 和水通道蛋白 4 表达具有较强的抑制作用^[16];小茴香盐炙后促进补骨脂-小茴香药对中黄酮类成分煎出,增强止泻作用,代表性成分芦丁^[13];以上研究表明,杨芽黄素、圆柚酮和芦丁可能是 ZYH 止泻的活性成分。同时,益智仁盐炙炮制过程中白杨素含量相对降低,圆柚酮含量呈上升趋势且小肠吸收增大,盐炙促进圆柚酮入血吸收,增加其生物利用度^[17-18];益智仁盐炙后缩泉丸的入血成分为杨芽黄素、白杨素、圆柚酮等^[19];此外,小茴香精油通过抑制转录因子(nuclear factor kappa B, NF- κ B)的表达来减轻醋酸诱导的大鼠结肠炎,酚类成分通过免疫调节和抗氧化特性对肠上皮细胞发挥保护作用^[20-21]。

本实验研究结果圆柚酮、杨芽黄素、白杨素、反式茴香脑、芦丁关联度在 0.560~0.620 范围内,表明以上成分在药对止泻活性中具有比较重要的作用。综上,ZYH-M 部位为 ZYH 治疗脾肾阳虚泄泻证的活性部位,其作用机制可能是通过调节 MTL、GAS 等胃肠肽类激素,抑制胃肠功能亢进,并调节机体能量代谢和免疫,以及细胞保护作用实现的。茴香醛及 4 号峰与其止泻作用的关联度较强,而圆柚酮、杨芽黄素、白杨素、反式茴香脑、芦丁也表现比较重要的关联性。但 4 号峰等代表性成分尚未鉴定出,还需进一步研究确定。

参考文献:

- [1] 王楷,侯雨君,宋玮,等.泄泻中医证候动物模型研究进展[J].中国实验动物学报,2021,29(6):823-829.
WANG K, HOU Y J, SONG W, et al. Research progress on animal model construction and evaluation of different TCM syndromes of diarrhea [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29

- (6): 823-829.
- [2] 郭兆娟, 李品, 康倩君, 等. 补骨脂肝毒性的安全性分析及思考 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(5): 2616-2621.
GUO Z J, LI P, KANG Q J, et al. Safety analysis and consideration on hepatotoxicity of *Psoralea corylifolia* L [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(5): 2616-2621.
- [3] 范蒙蒙, 张雨, 李红伟, 等. 肉豆蔻曲代替麸煨肉豆蔻组成方新二神丸的止泻作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(1): 48-57.
FAN M M, ZHANG Y, LI H W, et al. Study on the antidiarrheal effect of the new "Ershen pills" composed of nutmeg koji instead of bran stewed nutmeg [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(1): 48-57.
- [4] ZHOU N, LI Z, WANG J J, et al. Correlation analysis between extracts and endogenous metabolites to characterise the influence of salt-processing on compatibility mechanism of ' *Psoraleae Fructus* & *Foeniculi Fructus* ' [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 270: 113782.
- [5] 徐若颖, 豆市蓉, 曹彦刚, 等. 盐炙对益智仁-小茴香药对止泻作用的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(4): 351-355.
XU R Y, DOU S R, CAO Y G, et al. The effect of salt-processing on the antidiarrheal efficacy of *Alpiniae oxyphyllae Fructus*-*Foeniculi Fructus* medicines [J]. Chin J Hosp Pharm, 2023, 43(4): 351-355.
- [6] 李小雅, 朱佳源, 吴仪, 等. 泄泻肾阳亏虚证小鼠模型的建立与验证 [J]. 中医杂志, 2022, 63(14): 1368-1373.
LI X Y, ZHU J Y, WU Y, et al. Model building and validation of diarrhea mice with kidney-Yang depletion syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 63(14): 1368-1373.
- [7] 毋启桐, 王金金, 杨安南, 等. 基于盐炙前后成分煎出差异与止泻作用相关性探讨补骨脂丸增效机制 [J]. 中草药, 2021, 52(21): 6493-6500.
WU Q T, WANG J J, YANG A N, et al. To explore synergistic mechanism of Buguzhi Pills based on correlation between antidiarrheal effect and difference of ingredients before and after salt processing [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(21): 6493-6500.
- [8] 时艳杰, 赵玥, 张颖, 等. 基于灰色关联分析方法对射干米泔水炮制品抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌谱-效关系的研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(8): 1882-1885.
SHI Y J, ZHAO Y, ZHANG Y, et al. Spectrum-activity relationships of Shegan (*Belamcanda chinensis*) Processing with Rice-washed Water Inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) upon grey relational analysis [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(8): 1882-1885.
- [9] KIM E J, LEE Y J, AHN Y M, et al. Renoprotective effect of *Alpiniae oxyphyllae Fructus* on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure [J]. Arch Pharm Res, 2013, 36(8): 1004-1012.
- [10] 张利棕, 方明笋, 杨伟吉, 等. Lewis 大鼠下丘脑中肾阳虚相关 mRNA 表达及超微结构观察 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(5): 511-515.
ZHANG L Z, FANG M S, YANG W J, et al. Changes of the mRNA expression of "kidney Yang deficiency"-related genes and ultrastructural observation of the hypothalamus in Lewis rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(5): 511-515.
- [11] 王颖, 王辉, 郑小伟. 基于核磁共振技术的脾气虚证、脾阳虚证血浆代谢组学研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(8): 2270-2274.
WANG Y, WANG H, ZHENG X W. NMR-spectroscopy-based metabolomic study on plasma of rats with spleen-qi deficiency pattern and spleen-Yang deficiency pattern [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2013, 28(8): 2270-2274.
- [12] 潘新, 胡昌江, 耿媛媛, 等. 脾肾虚泄泻大鼠模型造模方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(23): 4658-4663.
PAN X, HU C J, GENG Y Y, et al. Research on building method of spleen kidney Yang deficiency diarrhea rats model [J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(23): 4658-4663.
- [13] 李兴华. 益智仁温脾止泻作用及盐炙对其影响的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2009.
LI X H. Study on the effect of Yi Zhi Ren on warming the spleen and stopping diarrhea and the effect of salt baking on it [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2009.
- [14] 张思超, 安丽君, 钟佩茹, 等. 小茴香挥发油对小鼠胃排空和肠推进的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2019, 38(5): 473-477.
ZHANG S C, AN L J, ZHONG P R, et al. Effects of essential oil of fennel on gastric emptying and small bowel peristalsis in mice [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2019, 38(5): 473-477.
- [15] WANG S, ZHAO Y, ZHANG J, et al. Antidiarrheal effect of *Alpinia oxyphylla* Miq. (Zingiberaceae) in experimental mice and its possible mechanism of action [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 168: 182-190.
- [16] ZHANG J, WANG S, LI Y, et al. Anti-diarrheal constituents of *Alpinia oxyphylla* [J]. Fitoterapia, 2013, 89: 149-156.
- [17] 舒雪纯, 胡璇, 于福来, 等. HPLC 测定益智仁及其盐炙炮制品中白杨素和圆柚酮含量 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(10): 2231-2236.
SHU X C, HU X, YU F L, et al. Content determination of chrysin, nootkatone with Non-processed or Salt-processed alpiniae oxyphyllae fructus fruits by HPLC [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2019, 21(10): 2231-2236.
- [18] 吴珊珊, 李梦琪, 郑凯旋, 等. 益智仁盐炙有效部位中圆柚酮大鼠在体肠吸收 [J]. 中药药理学与临床, 2016, 32(5): 65-68.
WU S S, LI M Q, ZHENG K X, et al. The characteristic of nootkatone of effective parts from *Alpiniae oxyphyllae Fructus* after salt processing *in situ* intestinal absorption in rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2016, 32(5): 65-68.
- [19] 李梦琪, 龚晓猛, 吴珊珊, 等. 益智仁盐炙后缩泉丸入血成

分的分析 [J]. 中成药, 2017, 39(8): 1675-1678.

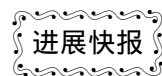
LI M Q, GONG X M, WU S S, et al. Analysis of constituents migrating to blood in Suoquan Pills after stir-frying with salt-water of *Alpinia oxyphylla* [J]. Chin Tradit Pat Med, 2017, 39(8): 1675-1678.

[20] REZAYAT S M, DEHPOUR A R, MOTAMED S M, et al. *Foeniculum vulgare* essential oil ameliorates acetic acid-induced colitis in rats through the inhibition of NF- κ B pathway [J].

Inflammopharmacology, 2018, 26(3): 851-859.

[21] YAKUT H I, KOYUNCU E, CAKIR U, et al. Preventative and therapeutic effects of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts against necrotizing enterocolitis [J]. J Food Biochem, 2020, 44(8): e13284.

[收稿日期]2024-01-16



中和外周循环的 IL1 β 可减缓慢病毒感染 OPTNE478G 肌萎缩侧索硬化症小鼠模型的进展

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种不可逆的神经退行性疾病, 大部分患者一旦发病, 仅有三到五年存活期, 且目前没有安全有效的延缓该疾病进展的药物。因此, 迫切需要开发一种基于症状的治疗方法, 以提高 ALS 患者的生存率并改善他们的生活质量。据报道, 炎症状态, 尤其是白细胞介素 1 β (IL1 β) 升高, 在 ALS 进展中起关键作用。本研究通过中和外周循环 IL1 β 可减缓 ALS 小鼠模型的进展。

通过将携带 OPTNE478G (视神经蛋白, ALS 患者的一种突变) 的慢病毒微量注射到小鼠的运动皮层内制备 ALS 小鼠模型。先前的研究发现, ALS 小鼠模型中 IL1 β 分泌显著升高。本文通过尾静脉注射抗 IL1 β 抗体中和外周循环 IL1 β , ELISA 和 RT-PCR 检测到 IL1 β 的蛋白和基因表达水平降低, TUNEL 检测到神经细胞死亡, MAP2 和 CASP3 的免疫荧光染色发现神经元细胞凋亡, GFAP 染色发现星形胶质细胞的数量减少。在旋转杆试验、握力试验、平衡木试验和足迹试验中, 发现抗 IL1 β 治疗后的 ALS 小鼠肌肉力量和运动功能增强。

该模型显示神经炎症可加快 ALS 的进展。同时, ALS 小鼠表现出神经炎症和 IL1 β 分泌升高。中和外周循环 IL1 β 后, ALS 小鼠表现出神经细胞的死亡和星形胶质细胞增生减少, 肌肉力量和运动能力得到改善。综上所述, 阻断 IL1 β 是减缓 ALS 进展的有效策略。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊 (*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(1): 18-25. <http://doi.org/10.1002/ame2.12297>).