

菝葜不同工艺提取物对慢性盆腔炎大鼠的治疗作用

仇萍^{1,2}, 盛孝邦¹, 邱赛红³

(1. 湖南农业大学, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南正清制药集团股份有限公司, 湖南 长沙 410018;

3. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410007)

摘要:目的 对菝葜不同工艺提取物治疗妇科盆腔炎的药理作用进行对比研究, 为确定菝葜的最佳提取工艺提供参考。方法 采用不同工艺制备菝葜提取物, 观察其对常见妇科感染菌的体外抑菌作用; 子宫注射混合菌液法制备大鼠盆腔炎模型, 观察菝葜不同工艺提取物对子宫炎症、组织病理学及血液流变学各指标的影响。结果 不同工艺菝葜提取物对多种妇科感染菌均有一定的抑菌作用; 对子宫内膜炎症均有较好抑制作用, 能减轻子宫肿胀及组织的病变程度, 并能降低模型大鼠全血黏度和全血还原黏度。结论 不同工艺制备的菝葜提取物均对妇科炎症有一定的治疗作用, 以水提醇沉工艺制备的提取物作用最为明显。

关键词:菝葜; 慢性盆腔炎; 抑菌

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)12-2046-04

菝葜 *Smilax china* L. 为《中国药典》2010 年版收载品, 具有祛风利湿, 解毒散瘀的功效, 用于筋骨酸痛, 小便淋漓, 带下量多, 疔疮痈肿等。其叶外用治疗疔疮、烫伤。临床上被广泛用于妇科炎症, 也用于肿瘤治疗^[1]。菝葜化学成分复杂, 主要含有黄酮和二苯乙烯类等成分^[2,3]。目前, 以菝葜提取物为主要组分的妇科炎症治疗药品有金刚藤糖浆、金刚藤颗粒、金刚藤片、金刚藤胶囊、三金片、金鸡胶囊、复方菝葜颗粒等。但对金刚藤治疗妇科炎症的药效学研究未见报道, 本实验研究了菝葜不同工艺提取物——水提物、水提醇沉物及其残渣、金刚藤糖浆的体外抑菌试验和对盆腔炎模型的治疗作用。

1 材料

1.1 药材: 菝葜由湖南省怀化正好制药有限公司提供, 经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定, 系百合科植物菝葜 *Smilax china* L. 的干燥根茎。

1.2 受试药物的制备

1.2.1 菝葜水提物: 取菝葜药材, 粉碎后过 20 目筛备用, 称取 1 000 g 粗粉, 加 12 倍量水提取 2 h, 11 倍量水再提取 2 h, 合并滤液, 减压浓缩得浸膏, 每克浸膏相当于原药材 3.623 g (含黄酮以芦丁计为 14.6%)。

1.2.2 菝葜水提醇沉物: 取菝葜水提物适量, 加 5 倍量 95% 乙醇, 静置, 滤过, 滤液减压浓缩得浸膏, 每克浸膏相当于原药材 13.807 g (含黄酮以芦丁计为 31.7%)。

1.2.3 菝葜水提醇沉残渣: 即水提醇沉后所得沉淀物, 每克残渣相当于原药材 6.879 g (含黄酮以芦丁计为 3.6%)。

1.2.4 金刚藤糖浆 (湖南正好制药有限公司): 称取菝葜 1 000 g 粗粉, 加水提取 2 次, 12 倍量水提取 2 h, 11 倍量水再提取 2 h, 合并滤液, 减压浓缩至生药 0.25 g/g, 40% 乙醇醇沉, 静置 24 h, 滤过, 减压回收乙醇至无醇味, 每克浸膏相当于原药材 6.556 g (含黄酮以芦丁计为 18.9%)。

1.3 对照药物: 甲硝唑 (批号 051108-1), 广东康美药业股份有限公司; 左氧氟沙星 (批号 1060001), 广州白云山制药股份有限公司; 地塞米松 (批号 060238), 天津药业集团有限公司。

1.4 菌株: 金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏杆菌、铜绿假单胞菌、奇异变形杆菌、白色念珠菌均为湖南省疾病预防控制中心提供的试验标准菌株, 由湖南中医药大学微生物教研室保种繁殖。

1.5 动物: SD 大鼠, 雌性, 购自上海西普尔-必凯实验大鼠有限公司, 使用许可证号: SYXK (湘) 2003-0001。

2 方法

2.1 不同工艺菝葜提取物对常见妇科感染菌的体外抑菌作用: 采用平板抑菌试验。制备普通肉汤琼脂和沙氏培养基 (白色念珠菌培养用) 无菌平板, 平皿内培养基厚约 4 mm; 将以上各菌株用适宜的液体培养 18 h 后做 1:100 稀释。分别取稀释菌液

收稿日期: 2010-04-12

作者简介: 仇萍 (1965-), 女, 湖南省怀化市人, 高级工程师, 在读博士, 湖南正清制药集团股份有限公司总工程师, 长期从事药品的研发、工艺技术及生产管理工作, 先后获得新药证书 6 个, 发明专利 11 个, 获得省科技进步奖, 省优秀发明人称号, 研究方向为药用植物种质资源研究与利用。Tel: 13973161359 Fax: (0731)88807044 E-mail: qiu_zq@vip.163.com

1 mL 均匀涂布于平板表面。每种菌设 2 个平板;用直径为 6 mm 的无菌打孔器垂直并等距离在平板上打孔 4 个;每个孔内加入 0.2 mL 不同工艺制备的菝葜提取物,质量浓度均为含生药 2 g/mL;将平皿置 37 °C 培养 24 h 后取出,测量各药物抑菌环直径 (mm) 和给药孔周围细菌生长情况。

2.2 不同工艺菝葜提取物对盆腔炎大鼠的治疗作用:参照文献方法^[4,5],取 200 g 左右的成年健康雌性大鼠,造模大鼠分别从左、右子宫向卵巢方向注入含大肠杆菌 6×10^6 CFU/mL 的菌液 0.4 mL;假手术组大鼠仅暴露子宫,不做宫内注射。术后第 10 天,将造模大鼠随机分为 6 组,即模型组、菝葜水提取物组、水提醇沉物组、金刚藤糖浆组、甲硝唑组、左氧氟沙星+地塞米松组;另设正常大鼠对照组。造模后第 11 天开始给药,不同给药组分别给予相当于生药量 10 g/kg 的菝葜提取物。每天 ig 给药 1 次,连续给药 15 d。末次给药后 24 h,颈总动脉采血,测各血液流变学指标。采血后的大鼠打开腹腔,从左、右子宫向卵巢方向注射美蓝溶液,观察输卵管开口处美蓝溶液流出情况,以有无美蓝液流出判断其是否通畅,计算输卵管通畅率。取出子宫称质量,计算子宫指数,然后用 4% 甲醛液固定,供病理组织形态学检查。病理学检查的病变程度按以下标准判断:(1) 上皮细胞变性、坏死:“-”无变性、坏死;“+” $< 1/3$ 的少许细胞变性或脱落;“++”明显的上皮变性、坏死或脱落;“+++”上皮细胞变性、坏死几乎遍及全层。(2) 炎细胞浸润:“-”无炎细胞浸润;“+”少量散在或灶性炎细胞;“++”较多的炎细胞;“+++”全层弥漫性炎细胞浸润。(3) 宫腔粘连、闭塞:“-”无粘连、闭塞;“+”粘连 $< 1/3$;“++”粘连 $1/3 \sim 2/3$;“+++”严重粘连甚至闭塞。(4) 结缔组织增生:“-”无增生;“+”黏膜层成纤维细胞增多;“++”结缔组织增生深及肌层;“+++”全层结缔组织增生。

3 结果

3.1 对常见妇科感染菌的体外抑菌作用比较:平板抑菌环结果见表 1。结果表明,菝葜生药质量浓度为 2 g/mL 时,水提醇沉物的抑菌谱最广,对金黄色葡萄球菌有明显抑制作用,对大肠埃希氏杆菌、铜绿假单胞菌、奇异变形杆菌均有一定的抑制作用。水提物和金刚藤糖浆对金黄色葡萄球菌和大肠埃希氏杆菌也有一定的抑制作用。水提醇沉物残渣部分对 4 种细菌均无抑菌作用。各样品对白色念珠菌(真菌)均无抑制作用。

表 1 4 种菝葜提取物平板抑菌试验结果

Table 1 Bacteriostatic test of four extracts from rhizome of *S. china*

菝葜提取物	抑菌环直径/mm				
	金黄色葡萄球菌	大肠埃希氏杆菌	铜绿假单胞菌	奇异变形杆菌	白色念珠菌
水提物	8.1-8.2	6.9-7.0	±	±	-
水提醇沉物	11.9-12.0	9.4-9.5	6.4-6.5	7.5-7.6	-
水提醇残渣	-	-	-	-	-
金刚藤糖浆	6.9-7.0	6.4-6.5	±	±	-

“±”:加药孔周围菌落数减少,但未形成明显抑菌环;“-”:菌落生长无变化

“±” indicates that dosing reduces the number of colonies around the hole, but no obvious inhibition zone formed;“-” indicates no change in colony growth

3.2 对盆腔炎模型治疗作用的比较:水提物、水提醇沉物及金刚藤糖浆 3 种菝葜提取物均能减轻炎症肿胀带来的子宫质量增加,使子宫指数增加;输卵管通畅率较模型组均提高,不同工艺菝葜提取物的作用经比较无明显差异。结果见表 2。

表 2 不同菝葜提取物对盆腔炎大鼠子宫指数及输卵管通畅率的影响

Table 2 Effect of different extracts from rhizome of *S. china* on uterine index and tubal patency of pelvic inflammatory rats

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物/只	子宫指数/%	输卵管通畅率/%
对照	-	10	0.21 ± 0.07	100.0
假手术	-	7	0.24 ± 0.06	100.0
模型	-	10	0.44 ± 0.10 ^{△△}	40.0
水提物	40	9	0.23 ± 0.04 ^{* *}	55.6
水提醇沉物	40	9	0.25 ± 0.08 ^{* *}	66.7
金刚藤糖浆	40	9	0.26 ± 0.11 ^{* *}	77.8
甲硝唑	0.04	9	0.26 ± 0.12 ^{* *}	66.7
左氧氟沙星+地塞米松	0.03+0.001	9	0.22 ± 0.05 ^{* *}	88.9

与对照组比较:△△ $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

△△ $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

子宫病理学检查结果显示,对照组和假手术组大鼠子宫壁各层结构清晰,除偶见散在的上皮细胞脱落及内膜轻度充血外,未见其他异常;模型组大鼠可见子宫上皮细胞损伤严重,内膜有较多以淋巴细胞和嗜酸性粒细胞为主的炎细胞浸润,并有纤维结缔组织增生,个别腔壁无法分清结构层次,部分管腔粘连或闭塞;服用菝葜提取物和采用左氧氟沙星治疗的大鼠,病变程度与模型组比较均有较明显减轻,上皮细胞坏死情况明显好转,内膜中炎性细胞数量减少,管腔粘连、狭窄的情况也有较大的改善;服用甲硝唑虽然病变程度有所减轻,但作用不及其他药物。将病变程度“-、+、++、+++”分别计分为“0、1、2、3”进行统计学分析,结果表明,菝葜提取物和左氧氟沙星组大鼠的病变程度计分均较模型组显

著下降 ($P < 0.05, 0.01$), 而甲硝唑组的差异则无显著性。从病理组织学改变来看, 水提物和水提醇沉物强于金刚藤糖浆。见表 3。

3.3 对盆腔炎大鼠血液流变学的影响: 与对照组比较, 模型组的全血黏度、血浆黏度和全血还原黏度均明显增加, 表明大鼠存在血液流变学异常。与模型组比较, 菝葜水提物、水提醇沉物及金刚藤糖浆均有降低模型大鼠全血黏度及全血还原黏度的作用, 但

对血浆黏度及红细胞压积的影响不明显。左氧氟沙星加地塞米松对改善血液流变学各指标的作用非常明显。甲硝唑的作用则明显不及其他药物。不同工艺的菝葜提取物改善模型大鼠血液流变学的作用均明显强于甲硝唑, 其改善血液流变学的作用主要表现在影响全血黏度, 而对血浆黏度及红细胞压积作用不明显, 各提取物对血液流变学影响作用强度比较, 以水提醇沉物略有优势。结果见表 4。

表 3 子宫病理学检查结果

Table 3 Test results of uterine pathology

组别	动物/只	上皮细胞变性坏死				炎症细胞浸润				宫腔粘连、阻塞				结缔组织增生				P 值
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
对照	10	9	1	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	< 0.01
假手术	7	6	1	0	0	5	1	0	0	7	0	0	0	7	0	0	0	< 0.01
模型	10	0	4	4	2	0	3	5	2	2	5	3	0	1	6	3	0	-
水提物	9	2	5	2	0	1	7	1	0	2	7	0	0	2	7	0	0	< 0.05
水提醇沉物	9	2	5	2	0	1	6	2	0	2	7	0	0	2	7	0	0	< 0.05
金刚藤糖浆	9	1	6	2	0	1	5	3	0	2	6	1	0	2	6	1	0	< 0.05
甲硝唑	9	0	7	2	0	1	6	2	0	2	6	1	0	2	5	2	0	-
左氧氟沙星+地塞米松	9	2	5	2	0	3	6	0	0	8	1	0	0	7	2	0	0	< 0.01

表 4 不同菝葜提取物对盆腔炎大鼠血液流变学指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of different extracts from rhizome of *S. china* on hemorheological index of pelvic inflammatory rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	全血黏度/(mPa·s)			血浆黏度/(mPa·s)
		低切 (5 s ⁻¹)	中切 (10 s ⁻¹)	高切 (120 s ⁻¹)	(120 s ⁻¹)
对照	-	15.09 ± 1.56	10.91 ± 2.51	4.69 ± 0.32	1.31 ± 0.22
模型	-	24.44 ± 4.10 ^{△△}	17.15 ± 3.22 ^{△△}	6.55 ± 0.89 ^{△△}	1.58 ± 0.21 ^{△△}
假手术	-				
水提物	40	18.22 ± 4.06 ^{**}	12.29 ± 2.29 ^{**}	4.74 ± 0.43 ^{**}	1.44 ± 0.10
水提醇沉物	40	15.66 ± 2.41 ^{**}	11.38 ± 2.00 ^{**}	4.57 ± 0.29 ^{**}	1.55 ± 0.32
金刚藤糖浆	40	16.88 ± 2.01 ^{**}	11.77 ± 1.78 ^{**}	5.51 ± 0.80 ^{**}	1.48 ± 0.20
甲硝唑	0.04	22.00 ± 2.56	15.01 ± 1.62 [*]	5.42 ± 0.92 ^{**}	1.64 ± 0.14
左氧氟沙星+地塞米松	0.03+0.001	18.58 ± 2.33 ^{**}	13.21 ± 1.10 ^{**}	5.20 ± 0.47 ^{**}	1.34 ± 0.10 [*]

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	全血还原黏度/(mPa·s)			红细胞压积/%
		低切 (5 s ⁻¹)	中切 (10 s ⁻¹)	高切 (120 s ⁻¹)	
对照	-	29.98 ± 2.69	21.86 ± 5.46	8.31 ± 0.81	45.6 ± 4.3
模型	-	50.69 ± 11.57 ^{△△}	35.10 ± 7.58 ^{△△}	12.09 ± 2.30 ^{△△}	46.4 ± 4.5
假手术	-	35.45 ± 6.20	23.55 ± 3.73	8.01 ± 2.24	46.5 ± 4.2
水提物	40	38.78 ± 13.16 ^{**}	25.41 ± 8.02 ^{**}	8.38 ± 1.85 ^{**}	45.6 ± 5.9
水提醇沉物	40	32.43 ± 5.36 ^{**}	22.82 ± 3.52 ^{**}	7.91 ± 0.82 ^{**}	45.3 ± 3.0
金刚藤糖浆	40	37.24 ± 7.50 ^{**}	25.21 ± 5.80 ^{**}	10.26 ± 2.34 ^{**}	43.2 ± 4.7
甲硝唑	40	45.77 ± 5.32	30.54 ± 3.27	9.65 ± 2.04	45.9 ± 1.8
左氧氟沙星+地塞米松	0.03+0.001	36.05 ± 5.86 ^{**}	25.11 ± 2.71 ^{**}	8.64 ± 1.10	48.8 ± 2.0

与对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较: $* P < 0.05$ $** P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group; $* P < 0.05$ $** P < 0.01$ vs model group

4 讨论

盆腔炎系指女性子宫颈以上盆腔生殖器(包括子宫体部、输卵管、卵巢)和盆腔腹膜及其邻近结缔组织感染引起的临床综合征, 为妇科常见病, 其病因较为复杂。现代医学则认为此症与细菌感染有关, 链球菌、葡萄球菌和大肠杆菌为常见的主要致病菌。目前认为, 慢性盆腔炎的药物治疗仍主要以抗菌消炎、改善病灶周围血氧供应和增强机体免疫力为

主^[4]。本研究结果表明不同工艺制备的菝葜提取物在抑菌、改善血液流变学及减轻子宫炎症方面具有一定作用, 表明菝葜制剂用于治疗妇科炎症具备较好的药理学基础。

对菝葜不同提取物药理作用结果进行对比分析显示, 在抑菌、改善血液流变学及减轻子宫炎症及病理改变方面, 均以水提醇沉物的作用更为明显, 这一结果可为菝葜制剂在进行工艺的改进与提高时提供参

考。对不同工艺菝葜提取物总黄酮定量测定结果也显示以水提醇沉物总黄酮的量最高,故由此推测,总黄酮有可能是菝葜用于治疗妇科炎症的主要有效部位。

参考文献:

- [1] 曾晓霞,陈锡林.菝葜传统应用和现代研究概况[J].中草药,2008,39(6):952-954.
[2] 赵钟祥,冯育林,阮金兰,等.菝葜化学成分及其抗氧化活

- 性的研究[J].中草药,2008,39(7):975-977.
[3] 邵波,郭洪祝,果德安.菝葜中黄酮和二苯乙烯类成分的研究[J].中草药,2009,40(11):1700-1703
[4] 闻莉,张三元,李莉,等.大鼠慢性盆腔炎模型的技术要求及模型特点[J].浙江中西医结合杂志,2001,11(8):484-486
[5] 张小丽,张静云,陈瑞明,等.盆炎宁对混合菌液致大鼠慢性盆腔炎治疗作用的实验研究[J].中药药理与临床,21(2):37-39

人参皂苷 G_K 对心脏蛋白激酶 C 信号转导通路的影响

高艳,刘汉清,苗宁舒,陈方芳,李桂生*

(烟台大学药学院,山东烟台 264005)

摘要:目的 观察人参皂苷 G_K 对心脏蛋白激酶 C 信号转导通路的影响,并探讨其作用机制。方法 采用 oligo GEArray 基因芯片技术观察人参皂苷 G_K 对心脏基因表达的影响;采用放射免疫法观察人参皂苷 G_K 对体外培养的新生 SD 大鼠心肌细胞蛋白激酶 C 活性的影响;采用 Straub's 蛙心灌流法观察人参皂苷 G_K 对蟾蜍离体心脏心肌收缩力的影响。结果 人参皂苷 G_K 可使小鼠心脏基因表达谱发生明显改变,明显上调 Prkc α、Prkc ε 基因表达;可明显增加心肌细胞蛋白激酶 C 活性,并促进其从细胞浆向细胞膜移位,佛波醇酯和白屈菜亦碱分别能加强和抑制该作用;能够明显增强蟾蜍离体心脏的心肌收缩力,肾上腺素能受体阻断剂拉贝洛尔能抑制该作用。结论 人参皂苷 G_K 可激活心脏蛋白激酶 C 系统,可能是肾上腺素能受体激动剂。

关键词:人参皂苷 G_K; 蛋白激酶 C; 肾上腺素能受体; 心肌收缩力

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)12-2049-03

人参皂苷是人参及其同属植物(三七、西洋参等)的主要药理活性成分,具有多种药理活性^[1-2]。按照传统中医主治病症分析,心血管系统是人参皂苷主要生物学效应器官之一。人参皂苷 G_K 属二萜型皂苷,是人参皂苷在体内发生作用的主要成分之一^[3-5]。蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是一组富含丝氨酸和苏氨酸残基的蛋白激酶,激活后可使目标蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化,参与心脏多条信号转导通路^[6-8]。关于人参皂苷 G_K 对心脏 PKC 信号转导通路的影响目前尚未见报道。本实验旨在观察人参皂苷 G_K 对心脏 PKC 信号转导通路的影响并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药物、试剂与仪器:人参皂苷 G_K (质量分数>98%) 由山东绿叶天然药物研究开发有限公司提供,oligo GEArray 基因芯片(上海康成生物技术有限公司),PKC 检测试剂盒(Gibco 公司),DMEM 培养液(Sigma 公司),胶原酶(Sigma 公司),盐酸拉贝洛尔注射液(江苏天禾迪赛诺制药有限公司),

其他常用试剂均为国产分析纯。肌张力换能器,多道生理记录仪(RM 6240C,成都仪器厂制造)。

1.2 动物:蟾蜍(15~22 g)购自烟台师范学院;昆明种小鼠(18~22 g),新生 SD 大鼠(1~3 d)由山东绿叶制药有限公司动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(鲁)20090009。

2 方法

2.1 人参皂苷 G_K 对心脏 PKC 基因表达的影响:oligo GEArray 基因芯片测定由上海康成生物技术有限公司完成,过程简述如下:健康雄性小鼠 6 只,体质量 20~25 g,随机分为对照组(给予溶剂)和人参皂苷 G_K (5 mg/kg,由前期实验确定)组,尾 iv 给药,连续给药 3 d,末次给药后 30 min,脱臼处死动物,取出心脏,冰生理盐水中挤出心室内余血后立即投入液氮中备用。Trizol 试剂法抽提 RNA,获得的 RNA 溶液 -70 °C 保存。紫外分光光度法测定浓度和纯度,变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。探针合成芯片杂交、洗膜严格按照试剂盒说明书进行,使用芯片配套软件对原始数据进行分析,

收稿日期:2010-08-30

基金项目:山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助(2007BS02022)

作者简介:高艳(1984-),女,山东日照人,烟台大学药学院 2008 级药理学研究生,研究方向为抗损伤药物的筛选及其机制研究。

* 通讯作者 李桂生(1967-),男,烟台大学药学院副教授,研究方向为药物化学和新药开发。

Tel: (0535) 2108899 E-mail: guisheng@lu.ye.cn