

瓜蒌薤白半夏汤不同提取部位对心肌细胞保护作用比较研究

薛慧文^{1#}, 李建锋^{1#}, 傅旒旒¹, 赵启韬^{2*}

1. 山东中医药大学 药学院, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学 基础医学院, 山东 济南 250355

摘要: 目的 比较瓜蒌薤白半夏汤(GXB)不同提取部位对缺血缺氧心肌细胞的保护作用, 初步探寻该经典方剂干预胸痹、心痛的物质基础。方法 称取瓜蒌 240 g、薤白 90 g、半夏 120 g, 50%乙醇回流提取, 分别用石油醚、氯仿、醋酸乙酯、水饱和正丁醇、水 5 种不同极性溶剂萃取, 得到相应提取部位, 及药渣水煎液部位。培养大鼠原代心肌细胞, 制备缺血缺氧模型, 给予系列浓度(100、10、1、0.1、0.01 mg/mL)的 GXB 6 种提取部位及瓜蒌皮注射液(阳性对照, 100、50、25、5、1 mg/mL)。MTT 法检测细胞存活率, 倒置显微镜观察细胞形态变化, 生化试剂盒检测培养液中肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)活性。结果 与对照组比较, 模型组细胞凋亡、坏死明显, 细胞存活率显著降低, 细胞培养液中 CK、CK-MB 的活性显著升高($P < 0.05$); 质量浓度均为 0.1 mg/mL 的 GXB 水饱和正丁醇部位、水溶性部位及药渣水煎部位可以显著逆转缺血缺氧心肌细胞的生长状态、存活率以及培养液中 CK、CK-MB 活性($P < 0.05$); 石油醚、氯仿及醋酸乙酯部位处理的细胞, 与模型组无明显差异。结论 GXB 的水饱和正丁醇、水溶性及药渣水煎部位对缺血缺氧损伤的心肌细胞具有显著的保护作用。

关键词: 瓜蒌薤白半夏汤; 心肌细胞; 缺血缺氧; 提取部位; 肌酸激酶(CK); 肌酸激酶同工酶(CK-MB)

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)01-0067-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.01.011

Comparison about protective effect of different ingredients extracted from Gualou-Xiebai-Banxia Decoction on cardiomyocytes induced by ischemia-hypoxia

XUE Huiwen¹, LI Jianfeng¹, FU Nini¹, ZHAO Qitao²

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine College of Pharmacy, Jinan 250355, China

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine College of Basic Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: objective To compare the protective effect of each part of Gualou-xiebai-banxia Decoction on cardiomyocytes induced by ischemia-hypoxia, and initially explore the material basis of this classical prescriptions intervention on thoracic obstruction and heartache. **Methods** Weighting 240 g *trichosanthes kirilowii*, 90 g *allium macrostemon* and 120 g *pinellia ternata* for preparation. After 50% ethanol reflux extraction, five different polar solvents including petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, and water were used for extraction to obtain their extracts from different sites and decocting part of drug residue. Primary rat myocardial cells were cultured to establish ischemic anoxia model, and a series of concentrations (100, 10, 1, 0.1 and 0.01 mg/mL) of six GXB extracts and gualoupi injection (positive control, 100, 50, 25, 5, 1 mg/mL) were added for treatment. The survival rate of cells was detected by MTT and the morphological changes were observed under inverted microscope, biochemical reagent kit was used to test creatine kinase (CK) and reatine kinase isoenzyme (CK-MB) activity in the liquid culture. **Results** Compared with control group, the cells in the model group showed apoptosis and necrosis, cell viability significantly decreased, and the activity of CK and CK-MB in cell culture medium increased significantly ($P < 0.05$). The treatment of water saturated n-butanol site, water soluble site and decocting site of drug residue of 0.1 mg/mL can significantly reverse the growth state, survival rate and myocardial enzyme activity of ischemic and anoxic cardiomyocytes ($P < 0.05$). However, the cells treated with petroleum ether, chloroform and ethyl acetate had no significant difference with the hypoxia ischemia group. **Conclusion** The water saturated n-butanol site, water soluble site and decocting site of drug residue of GXB have significant protective effects on myocardial cells injured by ischemia and hypoxia.

收稿日期: 2017-07-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(81173164、81573852); 山东省教育厅高等学校科研项目(J110LF54)

#第一作者: 薛慧文(1994—), 女, 山东济南人, 硕士研究生, 研究方向为中药防治心血管疾病的有效成分及作用机制

李建锋, 硕士研究生, 研究方向为中药防治心血管疾病的有效成分及作用机制

*通信作者: 赵启韬(1970—), 女, 副教授, 硕士生导师 E-mail: qitaozhao@163.com Tel: (0531)89628501

Key words: Gualou-xiebai-banxia Decoction; cardiomyocytes; hypoxia ischemia; extraction site; CK; CK-MB

瓜蒌薤白半夏汤 (Gualou-Xiebai-Banxia Decoction, GXB) 出自东汉著名医家张仲景所著《金匱要略》, 具有通阳散结、祛痰活血、行气止痛之效^[1], 是中医治疗胸痹、心痛的经典方剂。长期的中医临床实践证明, GXB 是防治痰浊壅塞型冠心病、心绞痛等安全、有效的方剂^[2-3]。

本课题组前期研究发现, 对于冠心病痰浊壅塞证模型大鼠, GXB 在降低血脂的同时, 显著逆转了其心电图 Δ ST 值变化, 减小心肌梗死面积, 降低血浆中肌酸激酶 (CK)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、 α -羟基丁酸脱氢酶 (HBDH) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 5 项心肌酶活性, 表现出明显的保护作用^[4]。然而, 该经典方剂发挥药效的物质基础仍不明确。为筛选 GXB 保护心肌缺血缺氧的有效部位, 进一步阐明 GXB 的药效物质基础, 本研究培养大鼠原代心肌细胞, 采用乙醇回流提取法和有机溶剂萃取法, 制备了 GXB 不同部位的提取物, 比较研究各组分对缺血缺氧的心肌细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物

新生 1~3 d Wistar 大鼠, 雌雄兼用, 由山东大学实验中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK 2014 (鲁) -0007。

1.2 药品与主要试剂

瓜蒌、薤白、半夏, 均购自山东中医药大学中鲁医院, 经山东中医药大学郭庆梅教授鉴定, 均为正品且质量上佳; 瓜蒌皮注射液 (上海第一生化制药厂, 批号 A1A031); 二甲基亚砜 (DMSO, 批号 20150127)、胰蛋白酶 (批号 24579), 均购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司, 批号 1616964); 高糖 DMEM 培养液 (美国 Gibco 公司, 批号 1645799); 噻唑蓝 (MTT, 美国 Amresc 公司, 批号 20150219); CK、CK-MB 试剂盒, 均购自南京建成生物有限科技公司, 批号分别是 140871、150441; 95%乙醇、石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇均为分析纯试剂, 批号分别为 20140201、20140320、20141006、20131208、20131126, 购自天津市富宇精细化工有限公司。

1.3 瓜蒌薤白半夏汤各组分的制备

将瓜蒌、薤白、半夏干燥粉碎, 过 40 目筛。分别称取瓜蒌 240 g、薤白 90 g、半夏 120 g 于 5 000 mL

圆底烧瓶, 依次用 8、8、6 倍量的 50%乙醇加热回流提取 3 次, 过滤合并 3 次提取液。回收乙醇, 减压浓缩, 真空干燥, 得到乙醇提取物干膏。将干膏溶于蒸馏水, 浓度约为 1.5 g 生药/mL, 溶解摇匀, 转入分液漏斗中, 加入 3 倍量体积的石油醚, 振摇, 静置 2 h, 直到溶液完全分层后, 保留上层的石油醚萃取液, 取出下层水溶液, 用相同方法再萃取 2 次。合并 3 次的石油醚萃取液, 减压浓缩, 回收石油醚, 真空冷冻干燥, 得石油醚部位。依次用氯仿、醋酸乙酯、水饱和正丁醇对萃取后的水溶液按上述方法各萃取 3 次, 并将各自萃取液合并, 减压浓缩, 回收萃取溶剂, 真空冷冻干燥, 得氯仿部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位。萃取后, 将剩余的水溶液减压浓缩, 真空干燥, 得到水溶性部位。将剩余的药渣分别用 12、10 倍量的蒸馏水煎煮两次, 每次 1 h, 过滤合并水煎液, 减压浓缩并真空干燥, 得药渣水煎液部位。

2 方法

2.1 心肌细胞的提取与培养

取 1~3 d 龄的 wistar 大鼠乳鼠, 雌雄兼用。75%酒精中浸泡 10 s 后在无菌条件下取出心脏, 立即放入预冷的 PBS 液中, 反复清洗 3 次。轻轻将心肌组织剪碎至大约 1 mm³, 转移到 50 mL 的离心管中, 加入 5 倍体积的 0.1%胰蛋白酶, 密封后放入 37 °C 水浴恒温振荡器, 消化 8 min。反复消化多次, 直至组织碎块消化基本完全。第一次消化的细胞悬液弃去, 收集其他细胞悬液至离心管中, 及时加入数滴胎牛血清终止消化。收集所有的细胞悬液, 混匀, 以 200 目细胞筛过滤。滤液收集于 15 mL 离心管中, 1 000 r/min、4 °C 离心 10 min。弃掉上清, 加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液, 轻轻吹打成单细胞悬液, 转移至培养皿中, 差速贴壁 90 min。吸出未贴壁细胞, 根据不同实验的需要调整细胞密度, 接种于 0.1%明胶预先铺好的不同规格培养皿中, 并加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 5-Brdu。置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后细胞第一次换液。

2.2 细胞分组及加药

将心肌细胞分为 4 组, 对照组、模型组和 GXB 石油醚、氯仿、醋酸乙酯、水饱和正丁醇、水溶性、药渣水煎部位系列浓度 (100、10、1、0.1、0.01 mg/mL) 组、瓜蒌皮注射液系列浓度 (阳性对照, 100、50、25、5、1 mg/mL) 组。对照组细胞以含

10% FBS 的高糖 DMEM 培养液置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中正常培养。模型组细胞以不含血清的高糖 DMEM 置入三气培养箱 (5% CO₂、94% N₂、1% O₂) 中培养 12 h。GXB 及瓜蒌皮注射液组在模型组的基础上, 培养液中添加相应浓度的药物, 置于三气培养箱中培养 12 h。

2.3 细胞存活率的检测

细胞接种于 96 孔板中, 分组处理同“2.2”项, 每种处理设 5 个复孔。细胞处理结束后, 在每孔中加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 于 5% CO₂、37 °C 培养箱中孵育。4 h 后轻轻吸去孔内的培养液, 然后每孔加入 150 μL 的 DMSO。在酶标仪上震荡 15 min, 使结晶物充分的溶解。490 nm 波长处检测各孔的吸光度 (A) 值, 计算各组心肌细胞的存活率。

2.4 细胞形态观察

倒置相差显微镜观察 0.1 mg/mL GXB 各提取部位、25 mg/mL 瓜蒌注射液对细胞的形态的影响并拍照。

2.5 细胞培养液中 CK、CK-MB 活性测定

收集“2.3”项中各组心肌细胞的培养液, 4 °C、2 000 r/min 离心 20 min 后取上清, 采用半自动生化分析仪, 按照生化试剂盒说明书操作检测上清中 CK、CK-MB 的活性。

2.6 数据处理

采用 SPSS 21.0 统计学软件对各组数据进行统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 组间资料

比较采用单因素方差分析 One way-ANOVA, 方差分析后的两两比较采用 SNK-*q* 检验。

3 结果

3.1 GXB 不同部位提取物的制备结果

从 450 g GXB 生药提取的各部位质量如表 1 所示, 药渣水煎液与水溶性部位颜色均为黄棕色, 两部分质量合计为 39.128 g, 提取率为 8.69%, 为 GXB 最主要的部分, 也是最大极性部位; 水饱和正丁醇部位为棕色, 质量为 4.848 g, 提取率为 1.077%, 属于高极性成分; 醋酸乙酯部位、氯仿部位均为棕红色, 颜色、极性、以及提取率均相似, 属于中等极性成分; 石油醚部位颜色为棕黑色, 质量为 2.246 g, 主要含有低极性成分。

表 1 GXB 不同部位提取物的制备结果

Table 1 Preparation results of extracts from different parts of GXB

样品	质量/g	占生药量/%
生药	450	—
石油醚部位	2.246	0.499
氯仿部位	0.633	0.141
醋酸乙酯部位	0.683	0.152
水饱和正丁醇部位	4.848	1.077
水溶性部位	27.912	6.200
药渣水煎部位	11.216	2.490

3.2 对缺血缺氧心肌细胞存活率的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$), 只有 50% 左右。与模型组

表 2 各组心肌细胞的存活率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Survival rate of cardiomyocytes in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	细胞存 活率/%	组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	细胞存 活率/%	组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	细胞存 活率/%	组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	细胞存 活率/%
对照	—	100	对照	—	100	对照	—	100	对照	—	100
模型	—	48.88±1.40*	模型	—	48.85±1.11*	模型	—	48.24±0.87*	模型	—	50.86±0.56*
GXB 石油	100.00	49.59±1.20	GXB 氯仿	100.00	49.46±1.30	GXB 醋酸	100.00	49.37±1.29	GXB 水饱和	100.00	51.62±1.26
醚部位	10.00	49.96±1.01	部位	10.00	49.35±1.00	乙酯部位	10.00	49.22±1.10	正丁醇部位	10.00	62.90±1.44 [#]
	1.00	49.63±0.92		1.00	48.92±0.87		1.00	49.40±1.19		1.00	64.23±0.78 [#]
	0.10	50.04±0.97		0.10	49.07±1.34		0.10	48.57±1.34		0.10	67.31±1.35 [#]
	0.01	49.55±1.22		0.01	48.99±1.11		0.01	48.31±1.03		0.01	51.01±1.57
对照	—	100	对照	—	100	对照	—	100			
模型	—	50.40±1.01*	模型	—	46.52±1.03*	模型	—	39.13±0.99*			
GXB 水溶	100.00	52.52±1.22	GXB 药渣	100.00	49.77±1.33	瓜蒌注射液	100	45.91±1.92			
性部位	10.00	59.28±1.26 [#]	水煎部位	10.00	54.38±1.47 [#]		50	50.72±2.03			
	1.00	61.43±1.34 [#]		1.00	56.80±1.06 [#]		25	62.49±3.49 [#]			
	0.10	62.77±1.26 [#]		0.10	57.34±0.97 [#]		5	41.28±3.00			
	0.01	51.34±1.50		0.01	50.92±1.16		1	37.39±1.44			

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

比较, 100、10、1、0.1 mg/mL GXB 水饱和正丁醇、水溶性、药渣水煎部位显著提高细胞存活率 ($P < 0.05$), 且以 0.1 mg/mL 效果最好, 细胞存活率达到 67.31%、62.77%、57.34%; 瓜蒌注射液组也具有一定的保护作用, 最佳有效保护浓度为 25 mg/mL, 细胞存活率达到 62.49% ($P < 0.05$)。石油醚、氯仿、醋酸乙酯部位各浓度细胞存活率均在 50% 左右, 没有显著的保护作用。

3.3 对缺血缺氧的细胞形态的影响

倒置相差显微镜下观察, 对照组心肌细胞成簇

生长, 细胞簇数量较多, 呈放射状生长, 细胞间相互连接同步搏动, 而且搏动有力, 折光性较强。模型组心肌细胞皱缩, 胞浆颗粒增加, 搏动减弱甚至消失, 突起缩短, 损伤严重的开始死亡。在心肌细胞缺血缺氧的同时加入不同浓度的水饱和正丁醇、水溶性、药渣水煎部位及瓜蒌注射液, 细胞的形态比模型组有明显的好转, 细胞数量增加, 细胞间连接增多, 细胞内颗粒有所减少, 搏动节奏有所恢复。而加入不同浓度的石油醚、氯仿及醋酸乙酯部位, 细胞的形态比模型组无明显好转。结果见图 1。

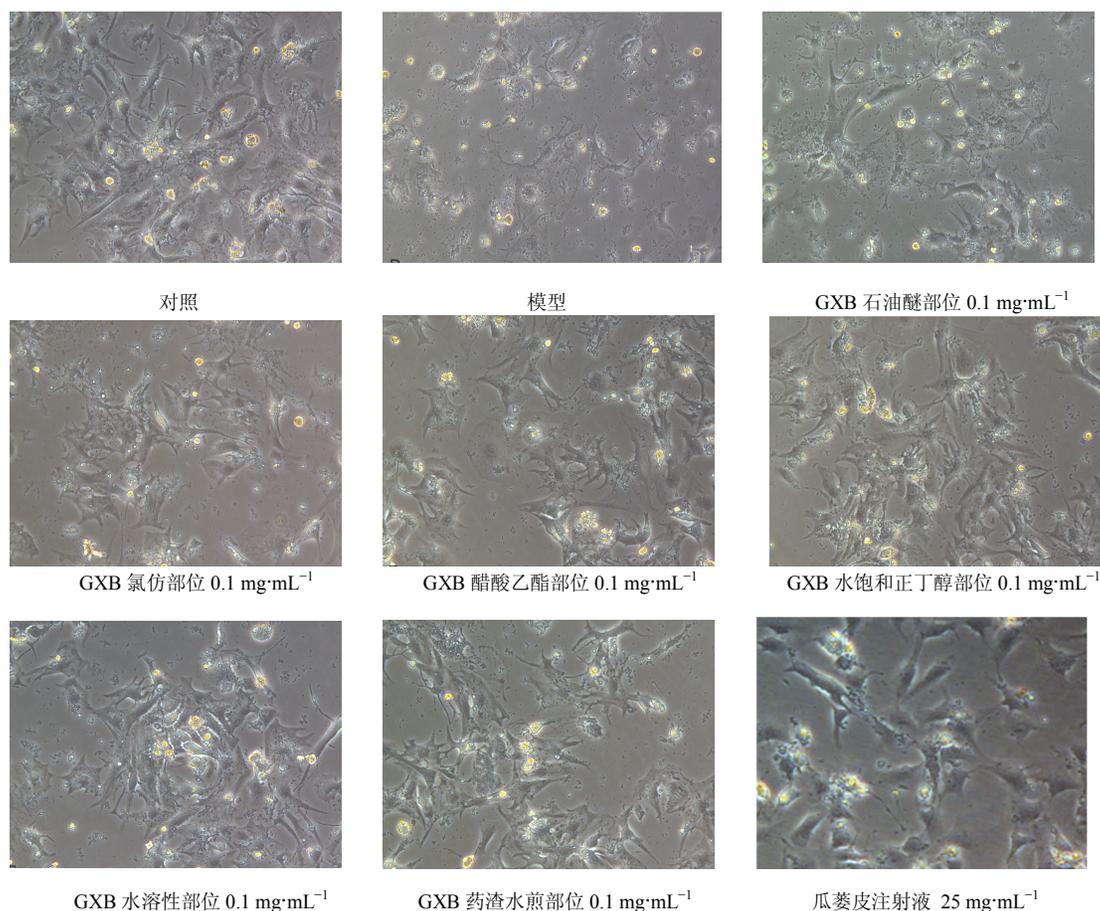


图 1 GXB 不同部位对缺血缺氧心肌细胞生长状态的影响 ($\times 200$)

Fig. 1 Effect of different extraction sites from GXB on growth state of ischemic and anoxic cardiomyocytes ($\times 200$)

3.4 对 CK、CK-MB 活性的影响

CK、CK-MB 是组织器官特异酶, 主要存在于心肌和骨骼肌组织, 是两种最重要的心肌酶^[5]。生理状态下, 血清 CK、CK-MB 活性很低, 血清 CK 及 CK-MB 活性升高表明心肌细胞的破裂、坏死。同理, 细胞培养上清液中 CK、CK-MB 的水平, 能反应出培养的心肌细胞的损伤程度。

如表 3、4 所示, 缺血缺氧心肌细胞培养液中

CK、CK-MB 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$), 表明该组细胞有部分坏死、破裂, 导致心肌酶释放到血清中。培养液中添加 GXB 的水饱和正丁醇、水溶性、药渣水煎部位后, CK、CK-MB 活性降低, 说明这些部位能有效的保护心肌细胞的完整性, 且均以 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度最佳, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$)。石油醚、氯仿、醋酸乙酯部位组细胞 CK、CK-MB 的释放量与模型组比较显著不显著。

表3 各组心肌细胞培养液CK的活性 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Activity of CK in myocardial cell culture medium of each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)
对照	—	8.25±1.00	对照	—	7.56±0.76	对照	—	7.67±1.51
模型	—	16.21±1.43*	模型	—	22.47±2.27*	模型	—	20.38±2.73*
GXB 石油	100.00	15.09±1.15	GXB 氯仿	100.00	22.38±0.99	GXB 醋酸	100.00	17.03±1.90
醚部位	10.00	14.98±1.82	部位	10.00	20.13±2.88	乙酯部位	10.00	19.15±1.31
	1.00	16.38±1.09		1.00	22.05±2.23		1.00	22.04±0.61
	0.10	17.78±3.03		0.10	22.75±2.38		0.10	22.74±0.96
	0.01	16.79±1.87		0.01	20.62±1.00		0.01	22.97±1.91
组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)
对照	—	8.09±1.57	对照	—	8.02±1.28	对照	—	9.39±1.87
模型	—	21.53±2.56*	模型	—	16.49±1.20*	模型	—	17.81±0.86*
GXB 水饱和	100.00	19.40±1.10	GXB 水溶性	100.00	14.08±1.71	CXB 药渣	100	16.96±1.93
正丁醇部位	10.00	18.48±1.75	部位	10.00	14.59±2.24	水煎部位	50	16.79±2.17
	1.00	17.23±1.12 [#]		1.00	13.94±2.36		25	15.03±1.85
	0.10	16.52±0.85 [#]		0.10	11.95±2.43 [#]		5	13.07±1.75 [#]
	0.01	18.62±0.87		0.01	15.33±1.54		1	17.04±1.52

与对照组比较: *P<0.05; 与模型组比较: [#]P<0.05

*P < 0.05 vs control group; [#]P < 0.05 vs model group

表4 各组心肌细胞培养液CK-MB的活性 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 activity of CK-MB in myocardial cell culture medium of each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	CK-MB/(U·L ⁻¹)	组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	CK-MB/(U·L ⁻¹)	组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	CK-MB/(U·L ⁻¹)
对照	—	4.68±0.37	对照	—	5.03±0.25	对照	—	4.99±0.19
模型	—	10.89±0.94*	模型	—	10.12±0.86*	模型	—	11.23±0.71*
GXB 石油	100.00	10.86±1.35	GXB 氯仿	100.00	10.02±1.32	GXB 醋酸乙	100.00	11.75±0.88
醚部位	10.00	10.96±2.38	部位	10.00	10.20±2.01	酯部位	10.00	9.76±0.45
	1.00	9.36±1.53		1.00	9.99±1.47		1.00	10.70±0.91
	0.10	10.86±1.12		0.10	9.89±0.41		0.10	10.61±2.84
	0.01	10.95±1.17		0.01	9.78±0.92		0.01	11.90±0.23
组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	CK-MB/(U·L ⁻¹)	组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	CK-MB/(U·L ⁻¹)	组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	CK-MB/(U·L ⁻¹)
对照	—	3.98±0.90	对照	—	4.03±0.60	对照	—	4.21±1.28
模型	—	13.12±0.89*	模型	—	10.69±2.02*	模型	—	12.87±1.75*
GXB 水饱和正	100.00	10.76±0.97 [#]	GXB 水溶	100.00	8.60±0.73	CXB 药渣水	100	10.78±2.20
丁醇部位	10.00	8.71±1.00 ^{##}	性部位	10.00	7.58±0.60 [#]	煎部位	50	10.65±0.60
	1.00	8.17±1.08 ^{##}		1.00	8.09±0.61		25	9.10±1.31 [#]
	0.10	7.55±0.46 ^{##}		0.10	7.29±1.45 [#]		5	8.50±1.50 [#]
	0.01	10.72±0.42 [#]		0.01	9.94±1.12		1	11.52±1.55

与对照组比较: *P<0.05; 与模型组比较: [#]P<0.05

*P < 0.05 vs control group; [#]P < 0.05 vs model group

4 讨论

目前, 各类心血管疾病发病率逐年上升。心肌缺血是多种心血管疾病的常见症状, 也是导致该类疾病患者的最直接死因。GXB 是中医治疗“胸痹、心痛”的传统方剂, 使用历史 200 多年。张仲景在《金匱要略·胸痹心痛短气病脉证并治第九》篇中载有“胸痹不得卧, 心痛彻背者, 瓜蒌薤白半夏汤主之”^[1,6]。

《金匱要略》中记载该方的用法及用量是: 栝楼实 1 枚(捣), 薤白 3 两, 半夏半升, 白酒 1 斗。上 4 味同煮, 取 4 升, 温服 1 升, 日 3 服。本课题组参考了《中国度量衡史》、邓中甲的《方剂学》^[7], 依据东汉与现代计量单位的差异, 参考中医临床的实际用量, 并结合课题组前期研究结果, 对该方的剂量设定为: 全瓜蒌 24 g、薤白 9 g、半夏 12 g。因古法是用白酒煎煮, 确定该方的提取工艺为: 50% 乙醇加热回流提取, 回收乙醇, 然后用不同极性的溶剂依次萃取, 得到不同的组分。本研究首次按照中药化学的常规方法, 依据中医古籍记载的炮制方法, 系统分离制备了经典方剂的瓜蒌薤白半夏汤不同极性部位。

本研究发现, 对于缺血缺氧状态下的心肌细胞, GXB 的不同组分表现出了不同的保护效果。与对照组比较, 其中水饱和和正丁醇、水溶性及药渣水煎部位在缺氧状态下, 可明显抑制细胞死亡, 维持心肌细胞的正常搏动, 提高存活率, 表现出显著的保护作用, 而且该保护作用具有剂量依赖效应。而石油醚、氯仿及醋酸乙酯部位则效果不明显。本研究结果表明, 在离体细胞层次上, 活性成分在 GXB 不同部位分布不均衡。

现有的中药化学研究中, 未见对 GXB 整体化学成分的研究报道。根据周欣、时岩鹏、栾阳和徐剑锟等学者分别对瓜蒌、薤白、半夏 3 种药材的成分研究报道, 推测 GXB 的水溶性、药渣水煎部位可能主要含有核苷类、氨基酸类、糖类成分^[8-10]; 水饱和和正丁醇部位可能含有糖苷类、三萜及苷类成分^[10-12]。但众所周知, 由于在炮制过程中发生了复杂的化学变化, 中药复方的化学成分并不等于方中单味药中化学成分的简单加和。因此, 揭示 GXB

中保护缺血缺氧心肌细胞的活性成分, 尚需大量细致的研究。

本研究是本课题组系列研究的一部分, 前期利用大鼠模型系统评估了该方对心肌缺血的干预效果^[4]。本研究在离体细胞层次上系统评估了 GXB 不同部位干预缺血缺氧的效果, 探寻这一经典古方的物质基础。在今后的研究中, 拟对水饱和和正丁醇、水溶性及药渣水煎部位 3 种有效组分, 利用色谱技术继续进行分离, 得到更为精细的化学成分。并在动物、细胞层次依次验证其对心肌缺血的保护效果, 以求最终明确这一经典古方的有效成分干预胸痹、心痛的物质基础与作用机制。

参考文献

- [1] 李克光. 金匱要略译释 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993: 240-242.
- [2] 陈丽娜, 王化良. 瓜蒌薤白半夏汤治疗胸痹研究进展 [J]. 河南中医, 2012, 32(9): 1254-1256.
- [3] 郭雁, 李鑫辉, 易亚乔, 等. 瓜蒌薤白半夏汤防治冠心病的概况 [J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(5): 109-112.
- [4] 荀丽英, 李航, 高兆慧, 等. 瓜蒌薤白半夏汤调节血脂及心肌保护作用的实验研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2014, 38(6): 59.
- [5] 郑洪新. 张元素医学全书 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006, 3-595.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 中药新药治疗胸痹(冠心病心绞痛)的临床研究指导原则 [S]. 1993.
- [7] 邓中甲. 方剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 220.
- [8] 周欣, 汤洪波, 龚小见, 等. 半夏药材水溶性成分的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 12(6): 1635-1637.
- [9] 康小冬, 吴学芹, 张鹏. 薤白的化学成分研究 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(2): 97-99.
- [10] 时岩鹏, 姚庆强, 刘拥军, 等. 栝楼化学成分的研究及其 α -菠菜甾醇的含量测定 [J]. 中草药, 2002, 33(1): 14-16.
- [11] 栾阳, 张慧, 康廷国. 掌叶半夏脂溶性成分 GC-MS 研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 30(2): 52-54.
- [12] 徐剑锟, 张天龙, 易国卿, 等. 半夏化学成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(6): 429-433.