

## 酒蒸草苁蓉炮制工艺优化及炮制前后对肾阳虚小鼠药效的比较研究

杨雪晶<sup>1</sup>, 张伟娜<sup>1</sup>, 周游<sup>1</sup>, 张茹<sup>1</sup>, 宋辉<sup>2</sup>, 徐蓓蕾<sup>1</sup>, 曲中原<sup>1</sup>, 李文兰<sup>1,2\*</sup>

1. 哈尔滨商业大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

**摘要:** **目的** 优化酒蒸草苁蓉的炮制工艺, 对比草苁蓉生品与酒蒸品对肾阳虚小鼠的药效差异, 并初步探讨其补肾阳作用机制。 **方法** 以单因素实验为基础, 采用层次分析法-熵权法联合 Box-Behnken 设计响应面法, 以草苁蓉纳拉昔、总多糖、还原糖、醇溶性浸出物、水溶性浸出物含量及外观性状为综合评价指标, 考察闷润时间、黄酒用量、蒸制时间、烘干温度对酒蒸草苁蓉质量的影响; 采用氢化可的松构建肾阳虚小鼠模型, 观察小鼠一般状态、脏器指数及病理形态, 检测血清中环磷酸腺苷(cAMP)、皮质醇(CORT)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、丙二醛(MDA)、环磷酸鸟苷(cGMP)水平及cAMP/cGMP值; 运用蛋白免疫印迹法测定肾组织中丝氨酸/苏氨酸激酶1(Akt1)、表皮生长因子受体(EGFR)的蛋白表达水平, 初步探索其补肾阳作用机制。 **结果** 酒蒸草苁蓉的最佳炮制工艺为: 闷润3h、黄酒用量72%、蒸制8h; 草苁蓉生品与酒蒸品均能改善肾阳虚小鼠的生理功能及病理状态, 提高肾脏及睾丸指数, 升高血清cAMP、CORT水平及T-SOD活性, 降低MDA、cGMP含量, 提高cAMP/cGMP值, 并可不同程度调节肾组织Akt1、EGFR蛋白表达, 且酒蒸品的作用效果优于生品。 **结论** 优化所得的酒蒸草苁蓉炮制工艺稳定可行; 草苁蓉经酒蒸炮制后, 补肾阳作用显著增强, 其作用机制可能与调节EGFR/PI3K/Akt信号通路相关。

**关键词:** 草苁蓉; 酒蒸; 层次分析法-熵权法; Box-Behnken 设计响应面法; 草苁蓉纳拉昔; 肾阳虚证; EGFR/PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2026)06-2057-13

DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2026.06.017

## Optimization of wine-steaming processing for *Boschniakia rossica* and efficacy comparison in kidney-*yang*-deficiency mice before and after processing

YANG Xuejing<sup>1</sup>, ZHANG Weina<sup>1</sup>, ZHOU You<sup>1</sup>, ZHANG Ru<sup>1</sup>, SONG Hui<sup>2</sup>, XU Beilei<sup>1</sup>, QU Zhongyuan<sup>1</sup>, LI Wenlan<sup>1,2</sup>

1. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Research Center on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

**Abstract: Objective** To optimize the processing technology of wine-steamed *Boschniakia rossica*, compare the pharmacological effects of raw and wine-steamed *B. rossica* on mice with kidney yang deficiency, and preliminarily explore the mechanism of its kidney yang tonifying effect. **Methods** Based on single-factor experiments, the AHP-entropy weight method combined with Box-Behnken design response surface methodology was used to investigate the effects of soaking time, wine dosage, steaming time, and drying temperature on the quality of wine-steamed *B. rossica*, with the contents of boschnalosite, total polysaccharides, reducing sugar, alcohol-soluble extract, water-soluble extract, and appearance as comprehensive evaluation indicators. Hydrocortisone was used to establish a mouse model of kidney yang deficiency. The general state, organ index, and pathological morphology of the mice were observed, and the levels of cAMP, CORT, T-SOD, MDA, cGMP in serum and the cAMP/cGMP value were detected. Western blotting was used to determine the protein expression levels of Akt1 and EGFR in kidney tissue, and the mechanism of its kidney yang tonifying effect was preliminarily explored. **Results** The optimal processing technology of wine-steamed *B. rossica* was: soaking for 3 h, wine dosage of 72%, and steaming for 8 h. Both raw and wine-steamed *B. rossica* could improve the physiological function and pathological

收稿日期: 2026-03-07

基金项目: 黑龙江省自然科学基金联合基金培育项目(PL2025H207)

作者简介: 杨雪晶, 博士, 讲师, 从事中药药效物质与质量评价研究。E-mail: yangxuejing@hrbcu.edu.cn

\*通信作者: 李文兰, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: lwldzd@163.com

state of mice with kidney yang deficiency, increase the kidney and testis index, increase the levels of cAMP and CORT in serum and T-SOD activity, decrease the contents of MDA and cGMP, increase the cAMP/cGMP value, and regulate the expression levels of Akt1 and EGFR proteins in kidney tissue to varying degrees. The effect of wine-steamed *B. rossica* was significantly better than that of raw *B. rossica*. **Conclusion** The optimized processing technology of wine-steamed *B. rossica* is stable and feasible. The kidney yang tonifying effect of *B. rossica* is significantly enhanced after wine-steaming, and its mechanism may be related to the regulation of the EGFR/PI3K/Akt signaling pathway.

**Key words:** *Boschniakia rossica* (Cham. et Schlecht.) Fedtsch; wine-steamed; AHP-entropy weight method; Box-Behnken design-response surface method; boschnaloside; kidney-yang deficiency syndrome; EGFR/PI3K/Akt signaling pathway

草苁蓉为列当科植物草苁蓉 *Boschniakia rossica* (Cham. et Schlecht.) Fedtsch 的干燥全草, 始载于唐代《新修本草》<sup>[1]</sup>。其味甘、酸, 性温, 归肾、大肠经, 具有补肾壮阳、润肠通便之功效, 常用于肾虚阳痿、腰膝冷痛、不孕不育、肠燥便秘等症。草苁蓉素有“不老草”之美誉<sup>[2]</sup>, 作为传统朝药与蒙药, 因其良好的抗衰老作用而被广泛应用<sup>[3-4]</sup>。该药材主要含环烯醚萜苷类、苯丙素苷类及多糖等多种活性成分, 具有抗炎、抗氧化、抗衰老、调节代谢等多种药理活性<sup>[1,5-7]</sup>, 其抗肿瘤活性近年来也持续受到学者关注<sup>[8-10]</sup>。

黄酒作为常用炮制辅料, 应用历史已逾千年, 其与药材生品相互作用, 可实现增强靶向递送、调和药性、提升疗效及降低毒性的效果。已有研究证实, 酒制法可增强药材对肝肾的补益作用, 并能提高生物活性化合物(苷类、有机酸、生物碱等)的溶解度<sup>[11]</sup>。草苁蓉在民间常作为肉苁蓉的替代品使用, 二者均可用酒蒸法炮制, 但由于草苁蓉与肉苁蓉基源不同, 其有效成分组成及药理作用存在显著差异<sup>[12-13]</sup>。若盲目套用肉苁蓉的酒蒸工艺, 可能导致草苁蓉有效成分大量流失或转化, 降低临床用药效果, 这不仅限制了草苁蓉药效的精准发挥, 也制约了其独特药用价值的开发利用。因此, 深入研究草苁蓉酒蒸炮制工艺, 制定科学、规范的炮制标准, 对保障其临床应用的安全性及有效性具有重要意义。

本实验以草苁蓉为研究对象, 采用层次分析法(AHP)-熵权法(EWM)结合 Box-Behnken 响应面法(BBD-RSM), 以外观性状、草苁蓉纳拉昔含量、总多糖含量、还原糖含量及水浸出物、醇浸出物得率为综合评价指标, 对草苁蓉酒蒸炮制工艺进行优化。在此基础上, 采用氢化可的松诱导建立肾阳虚小鼠模型, 比较草苁蓉生品与酒蒸品对肾阳虚小鼠的改善作用, 并初步探讨其可能的作用机制。本研

究结果可为草苁蓉酒蒸炮制工艺标准的制定提供数据支撑, 为其临床科学合理应用奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); UV-5800 紫外可见分光光度计(上海五相仪器仪表有限公司); HH-2 电热恒温水浴锅(天津天泰仪器有限公司); LE204E/02 分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; MK-20RB 台式离心机(湖南博达睿科仪器有限公司); ZHBF-RE 旋转蒸发仪(上海夏丰实业有限公司); KQ-500B 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司); DHG-9070 电热恒温鼓风干燥箱(上海申贤恒温设备厂); RT-6100 酶标分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司); Mini-Protean 电泳槽、PowerPac-HC 电泳仪(美国 BIO-RAD 公司); TS-2 脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); C300 凝胶成像系统(美国 Azure Biosystem); Echo Revolve 显微镜(艾普拜生物科技有限公司)。

### 1.2 药品及试剂

草苁蓉样品为哈尔滨商业大学馆藏标本, 分别产自黑龙江(批号 H230901、H230902)和吉林(批号 H230903), 经哈尔滨商业大学药学院李文兰教授鉴定为列当科植物草苁蓉 *Boschniakia rossica* (Cham. et Schlecht.) Fedtsch 的干燥全草。对照品草苁蓉纳拉昔(批号 BBP05993, 质量分数 98%)购自西力生物有限公司; D-无水葡萄糖对照品(批号 S17HB195198)购自上海源叶生物有限公司; 氢化可的松注射液(批号 20230612)购自天津金耀药业有限公司; 金匮肾气丸(批号 202207706)购自哈药集团世一堂制药厂。

乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯(德国 Merck 公司); 水为娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司); 黄酒(酒精度 16%)产自浙江塔牌绍兴酒有限公司;

超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (批号 20231206)、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (批号 20231207) 购自南京建成生物工程研究所; 环磷酸腺苷 (cAMP) 试剂盒 (批号 202311) 由江苏晶美生物科技有限公司提供; 环磷酸鸟苷 (cGMP) 试剂盒 (批号 1001887-2)、Cortisol 试剂盒 (批号 1001959-2) 均购自上海酶联生物科技有限公司; BCA 蛋白定量/浓度测定试剂盒 (批号 MA0082-2-Jul-26I) 购自大连博格林生物科技有限公司; 飞克特超敏 ECL 发光液 (批号 MA0186-1-Sep-261)、5×蛋白上样缓冲液 (批号 MA0003-D-Oct-301)、RIPA 裂解液 (批号 MA0151-Jul-251)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (批号 030623231124)、丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (Akt1) 抗体 (批号 061423231201)、表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体 (批号 030623231124) 均购自美仑生物; Fermentas Marker (批号 #26616) 购自 labshare 公司; Tris (批号 202303)、聚山梨酯 20 (批号 202208)、氯化钠 (批号 2022510)、甘氨酸 (批号 202304)、SDS (批号 202307) 均购自天津市恒兴化学试剂制造有限公司; 其他试剂均为分析级。

### 1.3 动物

SPF 级雄性 KM 小鼠 60 只, 8 周龄, 体质量 (26.65±1.80) g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 实验动物生产合格证号 SCXK (辽) 2020-0001。小鼠在 SPF 环境中适应性喂养 1 周, 温度为 (22±2) °C, 相对湿度为 45%~55%, 明暗周期为 12 h/12 h, 自由饮食。动物实验经哈尔滨商业大学实验动物伦理委员会批准 (批准文号 HSDYXY-2024099)。

## 2 方法与结果

### 2.1 草苳蓉炮制工艺

取草苳蓉生药材, 净制, 切至长 1 cm 左右小段, 干燥。与一定比例的 70% 黄酒 (黄酒与水按体积比 7:3 配制) 充分拌匀, 闷润, 置蒸制容器内, 蒸至表面黑褐色、内部无硬心, 取出, 烘干, 即得酒蒸草苳蓉。分别取草苳蓉生品与炮制品, 粉碎, 过 50 目筛, 备用。

### 2.2 草苳蓉纳拉昔的含量测定

**2.2.1 色谱条件** 采用 X Bridge Shield RP C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈 (A)-0.2% 甲酸溶液 (B), 梯度洗脱 0~12 min, 20% A; 12~15 min, 20%→100% A; 15~20 min, 100% A; 体积流量 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 260 nm; 柱

温 30 °C; 进样量 10 μL。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取草苳蓉纳拉昔对照品适量, 加甲醇配制成质量浓度为 1.0 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 备用。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密称取草苳蓉粉末 0.2 g 置于具塞锥形瓶内, 加入甲醇 5 mL, 摇匀, 称质量, 密塞, 超声 (500 W、40 kHz) 30 min, 放冷, 用甲醇补足缺失的质量, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

**2.2.4 专属性考察** 将对照品溶液、各供试品溶液、空白溶剂按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 结果如图 1 所示, 各样品中草苳蓉纳拉昔出峰时间一致且空白没有干扰, 表示专属性良好。

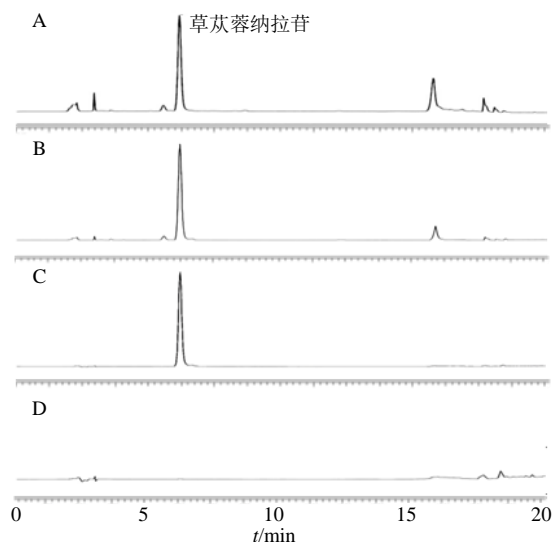


图 1 草苳蓉生品 (A)、酒制草苳蓉 (B)、草苳蓉纳拉昔对照品溶液 (C)、空白溶剂 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of raw *B. rossica* (A), wine-processed *B. rossica* (B), reference solution of boschnaloside (C), and blank solvent (D)

**2.2.5 线性关系考察** 取“2.2.2”项下对照品溶液适量, 用甲醇逐级稀释, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以草苳蓉纳拉昔的质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 拟合得回归方程  $Y=0.4645X+1.2348$ ,  $r=0.9999$ , 线性范围 6.25~800.00 μg·mL<sup>-1</sup>。

**2.2.6 精密度考察** 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液 10 μL, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 连续进样 6 次, 测得草苳蓉纳拉昔峰面积 RSD 值为 0.02%。结果表明仪器精密度良好。

**2.2.7 稳定性考察** 吸取“2.2.2”项下供试品溶液适量, 于室温条件下放置 0、2、4、6、8、24 h 后

按照“2.2.1”项下色谱条件进样, 草苈蓉纳拉昔峰面积的 RSD 值为 0.86%, 表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

**2.2.8 重复性考察** 称取草苈蓉粉末 6 份, 精密称定, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样, 记录峰面积, 计算草苈蓉纳拉昔含量的 RSD 值为 0.43%。结果表明该方法重复性良好。

**2.2.9 加样回收率考察** 称取已知草苈蓉纳拉昔含量的草苈蓉粉末 6 份, 每份 0.01 g, 精密称定, 分别加入与样品中成分含量相同的对照品, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样, 记录峰面积并计算各份样品的加样回收率。草苈蓉纳拉昔的加样回收率分别为 99.68%、96.47%、98.29%、99.46%、100.06%、96.93%, RSD 值为 1.53%。结果表明该方法准确度良好。

### 2.3 浸出物的含量测定

醇溶性浸出物和水溶性浸出物依照《中国药典》2025 年版四部通则 2201 浸出物测定法测定<sup>[4]</sup>。

### 2.4 总多糖含量测定

**2.4.1 对照品溶液的制备** 精密称取 *D*-无水葡萄糖对照品适量, 加水溶解, 配制质量浓度为 0.100 2 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.4.2 供试品溶液的制备** 精密称取草苈蓉粉末 0.200 0 g, 依次用石油醚、无水乙醇超声提取 30 min (500 W、40 kHz), 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取沉淀, 蒸干。加水超声 2 次, 每次 30 min, 滤过, 取滤液, 浓缩, 加入乙醇使含醇体积分数达 80% 以上, 混匀, 静置 24 h 后抽滤, 乙醇洗涤, 挥干, 加水溶解, 即得。

**2.4.3 线性关系考察** 精密吸取“2.4.1”项下对照品溶液适量, 逐级稀释, 苯酚-硫酸法显色, 于 490 nm 波长下测吸光度 (*A*) 值, 以质量浓度为横坐标, *A* 值为纵坐标, 拟合回归方程  $Y=0.0752X-0.0639$ ,  $r=0.9998$ , 线性范围 1.43~12.88 μg·mL<sup>-1</sup>。

**2.4.4 精密度考察** 精密吸取“2.4.1”项下对照品溶液适量, 经显色后, 连续检测 6 次, 记录 *A* 值, 计算 RSD 值为 0.07%, 结果表明仪器精密度良好。

**2.4.5 稳定性考察** 精密吸取“2.4.2”项下供试品溶液适量, 经显色后, 分别于 0、30、60、90、120、150 min 时测定 *A* 值, 计算 RSD 值为 0.17%, 表明供试品溶液稳定性良好。

**2.4.6 重复性考察** 称取 6 份草苈蓉粉末样品, 精密称定, 按照“2.4.2”项下方法制备供试品溶液, 显色后分别测定 *A* 值, 计算每份样品中总多糖含量的 RSD 值为 1.30%, 表明该方法重复性良好。

**2.4.7 加样回收率考察** 取已知总多糖含量的草苈蓉粉末 6 份, 精密称定, 加入与样品中总多糖含量相同的对照品, 按照“2.4.2”项下方法制备供试品溶液, 显色后分别测定 *A* 值并计算每份样品总多糖的加样回收率分别为 97.87%、96.81%、98.21%、104.48%、98.68%、101.51%, RSD 值为 2.88%, 结果表明该方法准确度良好。

### 2.5 还原糖含量测定

**2.5.1 对照品溶液的制备** 精密称取 *D*-无水葡萄糖对照品适量, 加水溶解, 配制质量浓度为 1.050 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.5.2 供试品溶液的制备** 精密称取各草苈蓉粉末 0.100 0 g 置于具塞锥形瓶内, 加入 25 mL 蒸馏水, 摇匀, 称质量, 密塞, 超声 (500 W、40 kHz) 30 min, 放冷, 用水补足减失的质量, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

**2.5.3 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 试液的配制** 精密称取 92.500 0 g 酒石酸钾钠, 用 250 mL 热水溶解, 依次加入 DNS 3.15 g、2 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 131 mL、2.5 g 的结晶苯酚和 2.5 g 的亚硫酸钠, 搅拌至完全溶解, 冷却后转入 500 mL 量瓶内, 定容, 转移至棕色瓶中, 密封, 于 4 °C 下放置 1 周后使用。

**2.5.4 线性关系考察** 精密吸取“2.5.1”项下对照品溶液适量, 逐级稀释, 加 DNS 试液, 显色。在 520 nm 波长下测定 *A* 值, 以质量浓度为横坐标, *A* 值为纵坐标, 得回归方程  $Y=0.7724X-0.0362$ ,  $r=0.9997$ , 线性范围 8.4~50.4 μg·mL<sup>-1</sup>。

**2.5.5 精密度考察** 精密吸取“2.5.1”项下对照品溶液适量, DNS 比色法显色, 连续测量 6 次 *A* 值的 RSD 值为 0.06%, 表明仪器精密度良好。

**2.5.6 稳定性考察** 精密吸取“2.5.2”项下供试品溶液 1 mL, 显色后, 分别在 0、30、60、90、120、150 min 时测定其 *A* 值, 计算 RSD 值为 1.31%, 表明供试品溶液稳定性良好。

**2.5.7 重复性考察** 取草苈蓉粉末 6 份, 精密称定, 按照“2.5.2”项下方法制备供试品溶液, 显色后测定 *A* 值, 计算还原糖含量的 RSD 值为 1.81%, 表明该方法重复性良好。

**2.5.8 加样回收率考察** 取已知还原糖含量的草

茯苓粉末 6 份，精密称定，分别加入与样品中还原糖含量相同的 D-无水葡萄糖对照品，经显色后，测定 A 值，计算还原糖的加样回收率分别为 96.65%、99.15%、97.22%、98.41%、101.35%、97.17%，RSD 值为 1.77%，表明该方法准确度良好。

## 2.6 酒蒸草苡蓉外观评价

饮片的外观性状同样是消费者在购买时考虑的重要因素之一。根据炮制过程中草苡蓉的外观变化，对其外观进行评分<sup>[15-16]</sup>，具体评分标准详见表 1。

表 1 酒制草苡蓉外观性状评分标准

Table 1 Evaluation criteria of appearance traits of wine-processed *B. rossica*

项目	1 分	2 分	3 分
颜色	棕黄色、棕褐色	深棕色、深褐色	黑褐色、黑色
气味	无酒香气	微有酒香气	有酒香气
断面	白色	黄白色	棕黄色、棕褐色
口感	质硬，较苦涩	质硬，较苦略涩	质较硬，略苦微甜，微有酒味

## 2.7 AHP-EWM 权重的计算

**2.7.1 AHP 确定权重系数** 结合文献对草苡蓉中药效物质与作用关联的研究报道、临床应用情况及指标的实际测得性和稳定性等对各指标进行重要性排序<sup>[1,5-8,12,17]</sup>，最终确定草苡蓉纳拉昔=总多糖>水浸出物>醇浸出物>外观性状>还原糖的顺序，根据 AHP 理论判断矩阵 1~9 标度，对同一层次内 *n* 个指标的相对重要程度进行打分建立优

先判断矩阵<sup>[18-19]</sup>，数据见表 2。矩阵最大特征值为 6.471，一致性比例因子 (CI) 为 0.094。一致性指标 CR 值为 0.075<0.1，表明判断矩阵满足一致性检验，权重系数有效。根据表 2 评分结果，AHP 法计算得到草苡蓉纳拉昔、总多糖、水浸出物、醇浸出物、外观性状、还原糖 6 项指标权重系数 ( $W_j^A$ ) 分别为 0.308 4、0.308 4、0.174 4、0.126 3、0.048 4、0.034 0。

表 2 指标成对比较的判断矩阵

Table 2 Matrix of judgments for pairwise comparisons of indicators

评价指标	草苡蓉纳拉昔	总多糖	水浸出物	醇浸出物	外观性状	还原糖
草苡蓉纳拉昔	1	1	3	4	5	6
总多糖	1	1	3	4	5	6
水浸出物	1/3	1/3	1	2	6	7
醇浸出物	1/4	1/4	1/2	1	5	6
外观性状	1/5	1/5	1/6	1/5	1	2
还原糖	1/6	1/6	1/7	1/6	1/2	1

**2.7.2 EWM 确定权重系数** 依据文献报道<sup>[20]</sup>，各项指标首先通过极值法进行无量纲化处理，为各个指标无量纲化处理后得到的标准数据，又经归一化、熵值、差异系数计算，得到草苡蓉纳拉昔、总多糖、水浸出物、醇浸出物、外观性状、还原糖 6 项指标权重系数 ( $W_j^E$ ) 分别为 0.166 6、0.166 8、0.166 8、0.166 8、0.177 2、0.166 8。

**2.7.3 综合权重系数及综合评分的计算** 将 AHP 法得到的和 EWM 法结合得到草苡蓉纳拉昔、总多糖、水浸出物、醇浸出物、外观性状、还原糖的综合权重系数 ( $W_j$ ) 分别为 0.308 2、0.308 5、0.174 5、0.126 4、0.048 2、0.034 0，并计算综合评分 (OD)。

$$W_j = \frac{W_j^A W_j^E}{\sum_{j=1}^n W_j^A W_j^E}$$

OD=草苡蓉纳拉昔×0.308 2+总多糖×0.308 5+水浸出物×0.174 5+醇浸出物×0.126 4+外观性状×0.048 2+还原糖×0.034 0

## 2.8 单因素实验

**2.8.1 闷润时间考察** 取草苡蓉生品 6 份，各 100 g，加入 90% 的黄酒 (质量体积比)，拌匀，闷润不同时间 (1、2、3、4、5、6 h) 后，蒸制 6 h，取出后 50 °C 烘干，平行 3 次求均值，计算综合评分，结果见表 3。当闷润时间为 3 h 时，酒蒸草苡蓉的综合评分最高，故确定后续草苡蓉闷润时间 2~4 h 进行

表 3 闷润时间对 OD 值的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effects of moistening time on OD value ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

闷润时间/h	草苈蓉纳拉昔/%	总多糖/%	水浸出物/%	醇浸出物/%	外观性状	还原糖/%	OD 值
1	1.689 9±0.072 3	1.744 9±0.034 7	19.116 4±2.238 9	10.529 8±1.002 5	7	8.346 8±1.235 8	6.347 1
2	1.787 2±0.008 9	1.769 4±0.187 4	21.051 1±3.672 1	10.411 8±1.023 6	7	8.623 3±0.138 3	6.716 7
3	1.827 4±0.134 5	2.161 3±0.108 3	22.535 1±2.325 0	12.778 2±1.637 1	8	9.389 2±0.450 2	7.482 3
4	2.137 8±0.012 3	2.079 0±0.072 4	22.309 7±2.753 4	10.905 8±0.926 8	9	9.338 6±0.237 4	7.323 1
5	1.992 6±0.039 2	1.824 2±0.025 7	21.626 8±2.635 1	10.453 8±2.618 0	7	8.348 0±0.092 3	6.893 4
6	1.739 1±0.129 0	2.029 1±0.146 8	20.910 4±3.112 8	10.011 0±1.221 7	8	8.892 9±0.322 4	6.764 2

优化。

**2.8.2 黄酒用量考察** 取草苈蓉生品 6 份, 每份 100 g, 加入不同质量体积比的黄酒 (10%、30%、50%、70%、90%、110%), 拌匀, 闷润 3 h 后, 蒸

制 6 h, 取出后 50 °C 下烘干, 平行 3 次求均值, 计算综合评分, 结果见表 4。当加入质量体积比为 70% 黄酒时, 综合评分最高, 故确定酒蒸草苈蓉加入黄酒量的优化范围为 50%~90%。

表 4 黄酒用量对 OD 值的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effects of amount of yellow wine on OD value ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

黄酒用量/%	草苈蓉纳拉昔/%	总多糖/%	水浸出物/%	醇浸出物/%	外观性状	还原糖/%	OD 值
10	1.832 0±0.034 7	1.827 6±0.173 4	27.328 9±2.638 7	9.523 1±1.942 8	7	11.387 1±0.782 9	7.825 6
30	2.074 6±0.123 1	1.805 3±0.053 8	27.332 4±1.362 7	9.542 9±0.783 3	7	10.327 8±1.332 0	7.860 6
50	2.123 4±0.342 0	1.922 1±0.164 6	28.832 7±2.009 2	9.629 3±0.934 8	8	12.247 9±1.372 9	8.294 5
70	2.013 8±0.083 4	2.296 3±0.024 0	29.983 2±3.020 6	10.323 4±1.729 4	9	12.239 0±0.932 4	8.715 9
90	1.923 4±0.278 9	2.028 2±0.264 7	28.839 8±2.683 1	10.272 2±1.500 0	9	11.370 3±1.034 7	8.369 8
110	1.832 0±0.243 0	2.103 0±0.130 2	27.397 3±1.921 8	8.748 3±1.348 1	8	10.723 8±2.738 1	7.850 2

**2.8.3 蒸制时间考察** 取草苈蓉生品 5 份, 每份 100 g, 加入质量体积比 70% 黄酒, 拌匀, 闷润 3 h 后, 蒸制不同时间 (2、4、6、8、10 h), 取出后 50 °C 下烘干, 平行 3 次求均值, 计算综合评分, 结果见表 5。当蒸制时间为 8 h 时综合评分最高, 故确定酒蒸草苈蓉蒸制时间优化范围为 6~10 h。

**2.8.4 烘干温度考察** 取草苈蓉生品 6 份, 每份 100 g, 加质量体积比 70% 的黄酒, 闷润 3 h 后, 蒸制 8 h, 取出分别于 40、50、60、70、80、90 °C 条件下烘干, 平行 3 次求均值, 计算综合评分, 结果见表 6。结果发现干燥温度对综合评分影响不明显。

后续选择烘干温度 60 °C。

## 2.9 BBD-RSM 法优化草苈蓉炮制工艺

**2.9.1 试验设计及结果** 在单因素实验的基础上, 以闷润时间 (A)、黄酒用量 (B)、蒸制时间 (C) 为考察因素, 以 OD 值为评价指标, 设计 3 因素 3 水平共计 17 次实验, 实验方案、设计及结果如表 7 所示。

**2.9.2 模型拟合和方差分析** 应用 Design-Expert 13 软件对表 7 中的数据进行多元回归拟合, 以 A、B、C 为自变量, 综合评分为因变量, 得到回归方程  $Y=9.38-0.016 7 A+0.064 8 B+0.101 4 C+0.118 0$

表 5 蒸制时间对 OD 值的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effects of steaming time on OD value ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

蒸制时间/h	草苈蓉纳拉昔/%	总多糖/%	水浸出物/%	醇浸出物/%	外观性状	还原糖/%	OD 值
2	1.792 3±0.078 2	1.599 8±0.189 2	24.649 0±2.462 0	9.766 5±0.536 7	9	13.720 4±0.834 1	7.482 0
4	1.934 7±0.137 9	2.394 1±0.190 1	23.624 6±2.030 5	9.345 8±0.078 8	9	14.014 5±0.998 7	7.548 9
6	1.973 4±0.062 4	2.536 1±0.067 8	24.113 0±1.324 8	10.785 5±1.462 9	10	12.782 9±1.734 0	7.878 2
8	2.324 9±0.134 6	2.782 6±0.117 6	29.977 1±2.846 2	11.042 9±0.891 3	11	14.792 0±1.822 5	9.234 9
10	2.237 2±0.159 0	3.579 9±0.181 1	26.300 0±3.889 0	9.062 3±0.523 6	11	12.743 2±0.955 9	8.492 2

表 6 烘干温度对 OD 值的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 6 Effects of drying temperature on OD value ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

烘干温度/°C	草苻蓉纳拉昔/%	总多糖/%	水浸出物/%	醇浸出物/%	外观性状	还原糖/%	OD 值
40	2.127 4±0.111 2	2.346 5±0.672 4	31.704 9±1.547 2	10.067 0±0.823 3	12	13.324 7±2.457 8	9.216 0
50	2.324 7±0.006 9	2.370 1±0.359 0	30.148 7±2.459 8	10.237 2±1.640 0	12	13.739 9±0.738 2	9.048 1
60	2.172 9±0.157 8	2.690 4±0.142 1	31.033 5±2.458 8	11.742 9±0.927 8	12	13.376 4±0.976 6	9.432 5
70	1.934 7±0.09 4	2.588 0±0.043 5	32.645 2±3.947 0	9.745 6±0.600 3	12	12.347 9±0.788 1	9.321 3
80	1.932 6±0.07 1	2.755 6±0.285 6	31.339 9±1.937 5	11.090 3±2.672 9	11	12.593 6±1.000 5	9.274 7
90	1.834 6±0.47 8	2.533 8±0.129 2	32.856 3±2.748 6	10.235 4±2.957 2	11	13.024 1±0.507 4	9.347 3

表 7 响应面试验设计及结果

Table 7 Response surface experimental design and results

序号	A/h	B/%	C/h	草苻蓉纳拉昔/%	总多糖/%	水浸出物/%	醇浸出物/%	外观性状	还原糖/%	OD 值
1	2	50	8	2.466 8	1.828 5	28.048 8	10.647 9	9	11.926 8	8.404 1
2	4	50	8	2.131 8	1.673 5	27.137 3	9.079 5	10	11.324 9	7.923 4
3	2	90	8	2.140 8	1.516 2	28.657 1	9.260 0	9	12.972 5	8.173 5
4	4	90	8	2.295 7	1.884 1	29.596 7	10.318 5	9	13.104 9	8.637 0
5	2	70	6	2.328 0	1.595 9	28.045 8	8.368 7	11	11.706 0	8.089 8
6	4	70	6	1.682 5	1.960 1	27.797 0	9.646 1	10	9.785 5	8.007 8
7	2	70	10	2.725 2	1.472 7	27.851 9	10.345 9	11	11.903 1	8.397 0
8	4	70	10	1.956 6	2.191 4	29.305 3	8.987 3	9	11.758 6	8.362 4
9	3	50	6	1.888 5	1.637 7	27.212 1	11.617 1	7	8.769 1	7.939 7
10	3	90	6	2.304 0	1.767 8	28.457 1	8.367 1	8	10.913 3	8.035 5
11	3	50	10	2.112 2	1.874 8	29.732 6	9.067 3	8	8.516 4	8.239 0
12	3	90	10	1.686 2	2.161 2	30.836 1	10.618 5	7	13.242 4	8.697 1
13	3	70	8	2.285 1	2.388 6	31.778 0	11.575 8	11	13.026 9	9.422 7
14	3	70	8	2.676 1	2.305 3	31.174 6	10.754 1	12	12.832 2	9.349 9
15	3	70	8	2.395 4	2.414 5	31.624 9	10.966 4	10	12.418 0	9.292 0
16	3	70	8	1.835 3	2.506 2	32.266 5	11.577 7	11	13.953 7	9.437 4
17	3	70	8	2.353 0	2.385 4	31.722 0	11.775 2	10	13.234 1	9.416 9

$AB+0.005 9 AC+0.022 6 BC-0.556 4 A^2-0.135 7 B^2-0.153 3 C^2$ ; 回归模型方差分析结果见表 8。模型  $P<0.000 1$ ,  $F=147.58$ , 表明模型具有显著性差异;  $R^2=0.994 8$ ,  $R_{Adj}^2=0.988 0$  均大于 0.98, 失拟项  $F=1.16$ ,  $P=0.429 5>0.05$ , 不显著, 说明模型构建合理, 可用于分析炮制工艺优化的实验结果与预测最佳炮制工艺。根据一次项系数绝对值大小, 各因素对酒蒸草苻蓉炮制工艺的影响顺序为  $C>B>A$ 。因素  $B$ 、 $C$  对综合评分有极显著性差异 ( $P<0.01$ ); 二项式中,  $AB$ 、 $BC$  均显著 ( $P<0.05$ ), 说明闷润时间和黄酒用量、黄酒用量和蒸制时间之间的交互作用较强;  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  均呈显著影响 ( $P<0.000 1$ ), 表明这 3 种因素和综合评分呈一定的线性关系。应用 Design-Expert 13 软件绘制各因素交互作用的响应面图, 见图 2。根据模型拟合结果得出最佳炮制

工艺为闷润时间 3.016 h, 黄酒质量体积比为 72.761%, 蒸制时间为 8.351 h。在此条件下, 结合生产实际, 确定最佳炮制工艺为闷润 3 h, 黄酒质量体积比 72%, 蒸制 8 h。

**2.9.3 最佳工艺验证** 取 3 批次草苻蓉生品, 按上述最佳炮制工艺进行验证, 结果见表 9, 3 次试验平均综合评分为 9.281 8, RSD 为 0.89%, 表明建立的酒蒸草苻蓉炮制工艺稳定、可行。响应面模型综合评分预测值为 9.410, 实际值和预测值之间差距较小, 表明回归模型准确可靠, 具有较好的预测性。草苻蓉酒蒸前后对比图见图 3。

## 2.10 草苻蓉提取物治疗肾阳虚证的药效学研究

**2.10.1 药液的制备** 酒蒸草苻蓉的制备: 取草苻蓉生品 50 g, 加质量体积比 72% 黄酒, 闷润 3 h 后, 置蒸制容器内, 蒸制 8 h, 取出烘干, 粉碎, 过筛,

表 8 响应面方差分析

Table 8 Response surface ANOVA

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	5.33	9	0.592 5	147.58	<0.000 1	A <sup>2</sup>	1.30	1	1.30	324.70	<0.000 1
A	0.002 2	1	0.002 2	0.557 4	0.479 6	B <sup>2</sup>	1.24	1	1.24	309.05	<0.000 1
B	0.134 4	1	0.134 4	33.47	0.000 7	C <sup>2</sup>	1.58	1	1.58	349.21	<0.000 1
C	0.329 1	1	0.329 1	81.98	<0.000 1	残差	0.028 1	7	0.004 0		
AB	0.222 9	1	0.222 9	55.51	0.000 1	失拟项	0.013 0	3	0.004 3	1.16	0.429 5
AC	0.000 6	1	0.000 6	0.139 9	0.719 5	绝对误差	0.015 1	4	0.003 8		
BC	0.032 8	1	0.032 8	8.17	0.024 4	总离差	5.36	16			

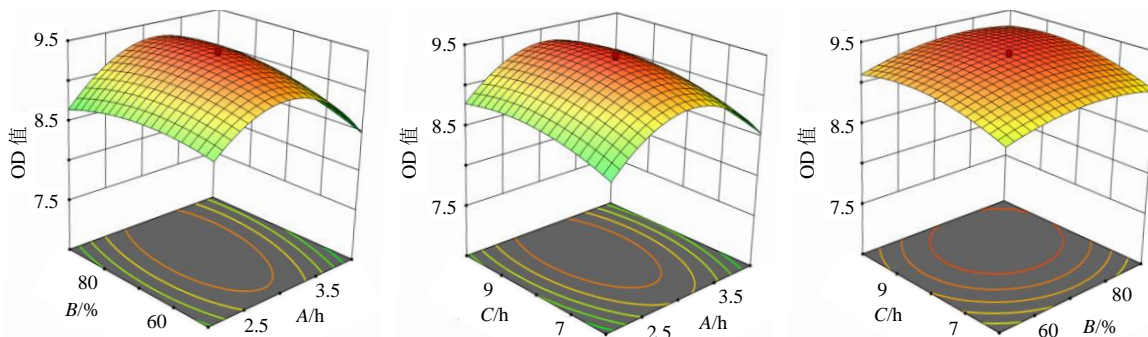


图 2 各因素间交互作用的响应面图

Fig. 2 Response surface plots of interaction effects between factors

表 9 验证试验结果

Table 9 Verification test results

序号	草苁蓉纳拉昔/%	总多糖/%	水浸出物/%	醇浸出物/%	外观性状	还原糖/%	OD 值
1	2.453 4	2.417 4	31.216 8	11.389 4	10	10.632 7	9.232 4
2	2.684 3	2.368 4	31.477 5	10.753 5	11	12.839 4	9.376 8
3	2.273 7	2.426 4	30.765 4	11.976 6	10	12.428 4	9.236 3

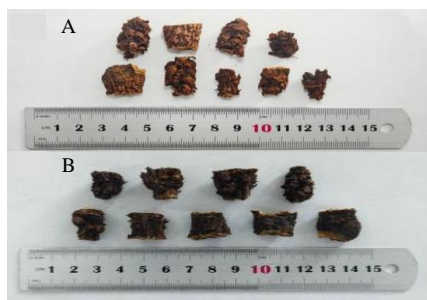


图 3 草苁蓉生品 (A) 和草苁蓉酒蒸品 (B) 外观对比图  
Fig. 3 Comparison of appearance of raw *B. rossica* (A) and wine-steamed *B. rossica* (B)

备用。草苁蓉药液制备：草苁蓉粉末加 10 倍量的水加热回流提取 3 次，滤过，合并滤液，浓缩至质量浓度为 0.808 g·mL<sup>-1</sup>，备用。阳性对照药液的制备：将金匱肾气丸用研钵研磨至细粉，用蒸馏水配制成

质量浓度为 0.275 g·mL<sup>-1</sup> 的药液，备用。

**2.10.2 动物分组、造模及给药** 小鼠适应性喂养 7 d 后随机分为对照组、模型组、金匱肾气丸（阳性药）组、生草苁蓉组和酒草苁蓉组，每组各 12 只。除对照组外，其余组均连续 15 d ip 氢化可的松注射液（10 mg·kg<sup>-1</sup>）诱导肾阳虚模型，对照组 ip 等量 0.9%氯化钠溶液<sup>[21]</sup>。当观察到小鼠出现背部明显脱毛，毛发枯疏无光泽；弓背、少动、迟钝；伴有持续性便溏；体质量增长缓慢甚至下降，肛温显著低于对照组，同时食欲、饮欲减退，且上述各项体征同步出现并连续稳定维持 3 d，即可判定肾阳虚模型制备成功。从造模成功第 2 天开始，对照组和模型组 ig 等量蒸馏水，生草苁蓉组和酒草苁蓉组分别 ig 相应水煎液（5.3 g·kg<sup>-1</sup>），阳性药组 ig 金匱肾气丸药液（1.8 g·kg<sup>-1</sup>），连续给药 15 d。

草苁蓉给药剂量按照 FDA 推荐的人与小鼠给药剂量体表面积法换算, 换算系数为 12.33, 已知草苁蓉成人每日口服剂量为 15~30 g<sup>[22]</sup>, 本研究统一以成人日服最大剂量 30 g 作为换算基准。为客观对比草苁蓉炮制前后的药效差异, 统一设定生品与炮制品给药剂量。同时参考陈民等<sup>[21]</sup>的研究最终确定小鼠给药剂量为 5.3 g·kg<sup>-1</sup>。

**2.10.3 脏器指数测定** 末次给药后禁食不禁水 12 h, 称质量取血后处死小鼠, 取肾脏和睾丸, 精密测定肾脏和睾丸的湿质量, 记录数据并计算脏器指数。结果如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肾脏指数显著降低 ( $P<0.05$ ), 睾丸指数呈下降趋势; 与模型组相比, 阳性药组、生草苁蓉组和酒草苁蓉组小鼠的肾脏指数均显著升高 ( $P<0.05$ 、0.01), 睾丸指数有上升趋势。

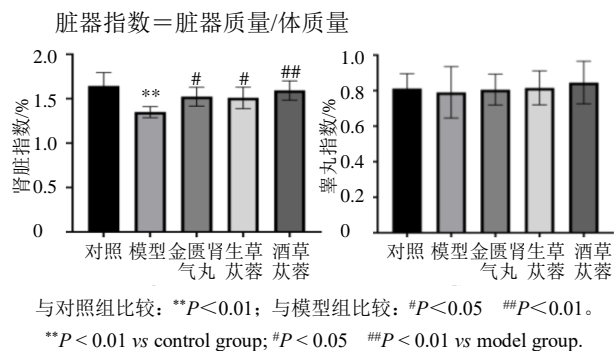


图 4 各组小鼠肾脏及睾丸指数 ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Fig. 4 Kidney and testis indices of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

**2.10.4 组织病理学检查** 取各组小鼠同侧肾脏和睾丸, 分别置于 4%多聚甲醛中固定, 使用乙醇脱水, 浸泡在石蜡中使其形成石蜡块, 切片切片后于二甲苯中脱蜡, 苏木精-伊红 (HE) 染色后经酸液处理, 用水漂洗, 封片剂封固, 在显微镜下观察肾脏和睾丸病理学改变。

(1) 肾脏组织病理学的影响: 对照组小鼠肾脏组织未见明显炎性细胞浸润, 肾小球大小、形态结构

基本正常, 边界清晰, 肾小球未见明显萎缩, 肾小管内部刷状缘结构完整, 未见明显扩张管型等变性; 与对照组相比, 模型组小鼠肾脏可见部分肾小球明显萎缩, 肾小管内部刷状缘结构部分消失, 存在肾小管扩张和管腔增大现象; 与模型组相比, 金匱肾气丸组和酒草苁蓉组小鼠肾脏组织轻度异常, 未见明显炎性细胞浸润, 肾小球内毛细血管增生, 组织结构清晰, 肾小管内部刷状缘结构完整, 肾小管未见明显萎缩; 与模型组相比, 生草苁蓉组小鼠肾脏组织中肾小球萎缩、肾小管扩张、管腔增大等病理变化均略有减轻, 但仍明显可见, 见图 5。

(2) 睾丸组织病理学的影响: 对照组小鼠睾丸组织结构完整, 被膜光滑无缺, 组织曲细精管未见明显萎缩, 各级生精细胞数量丰富且排列紧致有序; 与对照组相比, 模型组小鼠睾丸组织结构不完整, 被膜粗糙有缺, 组织曲细精管各级生精细胞数量减少, 细胞排列紊乱, 曲细精管腔内间质出现空隙; 与模型组相比, 金匱肾气丸组和酒草苁蓉组小鼠睾丸组织整体结构基本正常, 组织曲细精管各级生精细胞数量丰富排列较规则, 未见明显脱落坏死, 组织曲细精管轻度萎缩, 组织未见明显炎性细胞浸润, 睾丸间质少; 与模型组相比, 生草苁蓉组小鼠睾丸组织整体结构异常相似, 各病理变化略有减轻, 但弱于阳性药组和炮制组, 见图 6。

**2.10.5 血清生化检测** 眼眶静脉丛取血后, 于 4 °C 条件下 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清, 于 -80 °C 保存。使用酶联免疫检测法测定小鼠血清中 CORT、cAMP、cGMP 的表达水平, 并计算 cAMP/cGMP 值。用羟胺法测定小鼠血清中 T-SOD 活性, TBA 法测定 MDA 含量, 结果见图 7。

与对照组相比, 模型组血清中 CORT、cAMP 的表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ), MDA、cGMP 含量显著增加 ( $P<0.01$ ), T-SOD 的活性显著降低 ( $P<0.01$ ), cAMP/cGMP 值减小 ( $P<0.01$ ), 表明小鼠的肾虚模型构建成功。与模型组相比, 金匱肾气丸

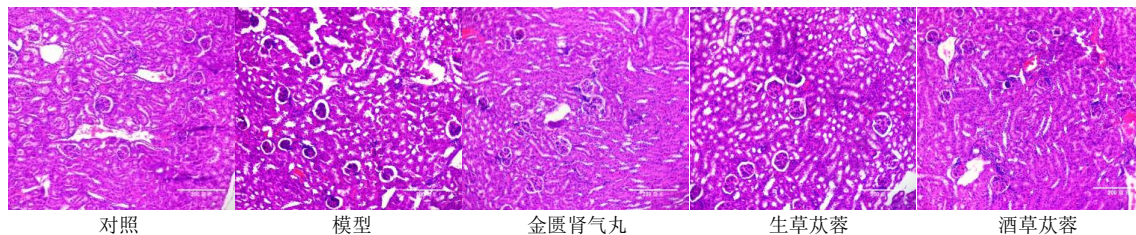


图 5 各组小鼠肾脏组织 HE 染色结果 ( $\times 200$ )

Fig. 5 HE staining results of renal tissues in each group of mice ( $\times 200$ )

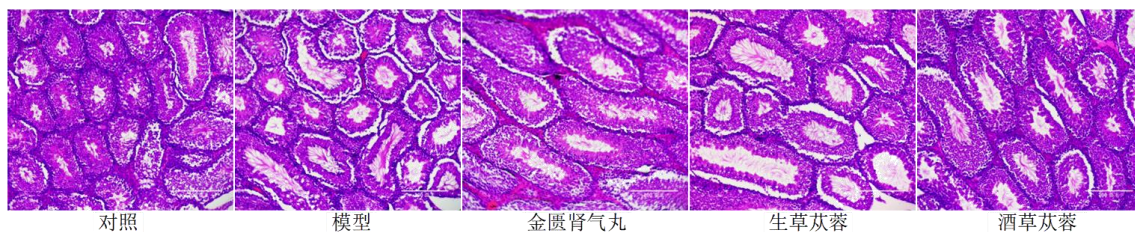
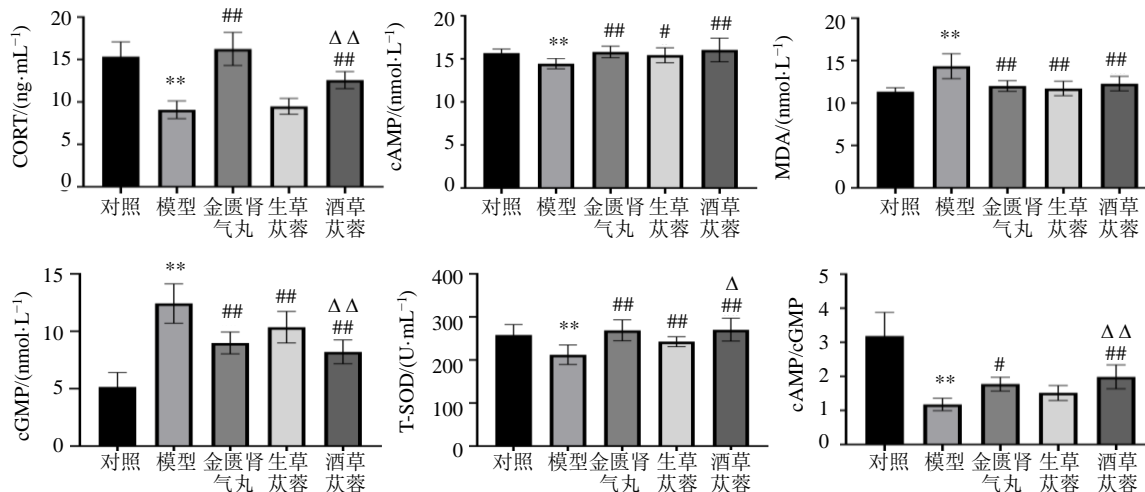


图 6 各组小鼠睾丸组织 HE 染色结果 (×200)

Fig. 6 HE staining results of testicular tissues in each group of mice (×200)



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; 与生草苁蓉组比较: Δ $P < 0.05$  ΔΔ $P < 0.01$ 。

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group; Δ $P < 0.05$  ΔΔ $P < 0.01$  vs raw *B. rossica* group.

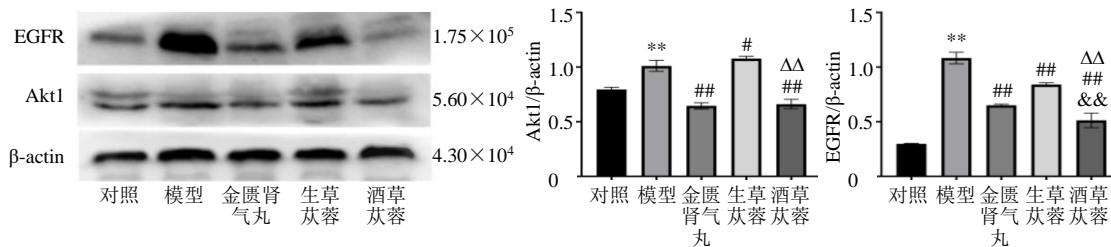
图 7 各组小鼠血清生化指标与 cAMP/cGMP 比值检测结果 (x̄ ± s, n=12)

Fig. 7 Biochemical indicators and cAMP/cGMP ratio in serum of mice in each group (x̄ ± s, n=12)

组、生草苁蓉组和酒草苁蓉组的小鼠血清中 CORT、cAMP 的含量增加, MDA、cGMP 表达下调, T-SOD 的活性增强, cAMP/cGMP 值增大。与生草苁蓉组相比, 酒草苁蓉组 CORT 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ), T-SOD 活性增强 ( $P < 0.05$ ), MDA、cAMP 含量呈增加趋势, cGMP 显著降低 ( $P < 0.01$ ), cAMP/cGMP

比值增大 ( $P < 0.05$ )。

**2.10.6 蛋白印迹法测定肾脏中 Akt1 和 EGFR 蛋白的表达** 参照常百金<sup>[23]</sup>的方法, 采用蛋白印迹法对肾脏中 Akt1 和 EGFR 蛋白的表达进行测定, 结果如图 8 所示。与对照组相比, 模型组小鼠肾脏中的 Akt1 和 EGFR 蛋白的表达显著上升 ( $P < 0.01$ );



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; 与生草苁蓉组比较: ΔΔ $P < 0.01$ ; 与金匮肾气丸组比较: && $P < 0.01$ 。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group; ΔΔ $P < 0.01$  vs raw *B. rossica* group; && $P < 0.01$  vs Jinkui Shenqi Pill group.

图 8 各组小鼠肾脏中 Akt1 和 EGFR 蛋白表达 (x̄ ± s, n=3)

Fig. 8 Expression of Akt1 and EGFR protein in kidneys of mice in each group (x̄ ± s, n=3)

与模型组相比,金匱肾气丸组与酒草苳蓉组小鼠肾脏中的 EGFR 和 Akt1 表达均显著下降 ( $P < 0.01$ ),生草苳蓉组 EGFR 表达显著下调 ( $P < 0.01$ );与金匱肾气丸组相比,酒草苳蓉组 EGFR 蛋白的相对表达量显著降低 ( $P < 0.01$ )。与生草苳蓉组相比,酒草苳蓉组 Akt1 和 EGFR 蛋白的相对表达量显著降低 ( $P < 0.01$ )。以上结果证实,酒草苳蓉对肾阳虚小鼠的改善作用可能是通过调节 EGFR/PI3K/Akt 信号通路,下调 Akt1 和 EGFR 蛋白的表达来实现。

### 3 讨论

草苳蓉富含多种活性成分,近年来相关研究多集中于其环烯醚萜苷类与多糖类成分,2 者已被证实具有显著的抗肿瘤、抗氧化等药理活性,其中,草苳蓉纳拉昔是草苳蓉中代表性环烯醚萜苷类成分之一,可作为其质量评价的重要特征性指标,具备良好的研究基础与应用潜力<sup>[5-6,24]</sup>。还原糖既是多糖在特定条件下的降解产物,也是其发挥药效的重要存在形式,通过监测其含量变化,可明确炮制过程中多糖的分解与转化规律,进而判断酒蒸工艺对多糖水解的促进作用。浸出物含量可直接反映有效成分的溶出效率,且草苳蓉临床应用兼具泡酒与水煎 2 种方式,醇溶性与水溶性浸出物均具有重要评价意义。中药饮片外观性状是鉴别药材真伪、评价品质优劣的直观核心指标,亦是保障临床疗效稳定的关键前提,契合中医药“辨状论质、质效相关”的传统质量评价理念。因此,本研究最终选取草苳蓉纳拉昔含量、总多糖含量、还原糖含量、醇溶性浸出物得率、水溶性浸出物得率及外观性状,作为酒蒸草苳蓉炮制工艺的综合评价指标。

本研究采用层次分析法与熵权法联用确定指标权重,兼顾主观经验判断与客观数据信息,有效融合 2 种赋权方法的优势,使各指标权重分配更为科学合理。在单因素实验基础上,以上述多项指标为综合评价依据,采用 BBD-RSM 法设计试验,通过层次分析法-熵权法计算综合权重并构建综合评分模型,利用多元二次回归方程拟合各因素与响应值间的函数关系,优化得到草苳蓉最佳酒蒸工艺条件:闷润 3 h,黄酒用量 72%,蒸制 8 h。经 3 批平行实验验证,综合评分均值为 9.281 8,与模型预测值高度接近,表明该模型预测精度良好,优化后的炮制工艺稳定、可行、可靠,为酒蒸草苳蓉炮制工艺的标准化与规范化提供了实验数据支撑<sup>[25]</sup>。

肾阳虚为中医临床常见证候,其核心病机为肾阳亏虚,机体温煦、推动、固摄等功能减退,致使脏腑、经络、气血失于温养濡润,进而表现出一系列虚寒征象,临床常见畏寒肢冷、神疲乏力、性欲及生殖功能减退、腰膝冷痛等症状<sup>[26]</sup>。糖皮质激素可通过抑制促肾上腺皮质激素释放,减少内源性类固醇激素分泌,从而诱导类似肾阳虚的病理表现<sup>[27]</sup>,其中氢化可的松为构建肾阳虚动物模型的常用造模剂。本实验采用氢化可的松诱导 KM 小鼠建立肾阳虚模型,模型小鼠各项指标变化与文献报道一致,提示造模成功<sup>[28]</sup>。草苳蓉为民间常用补肾壮阳药物,其主要活性成分可通过多靶点、多通路发挥整体调节作用。与模型组相比,经草苳蓉干预后,小鼠肾阳虚相关指标均得到明显改善:肾脏脏器指明显增高,睾丸指数上升,肾脏组织炎性浸润、肾小管扩张及管腔增大等病理改变缓解,睾丸组织结构完整性提高、细胞排列更为规整,曲细精管腔及间质间隙缩小;血清中 CORT、cAMP 水平显著上升,MDA、cGMP 含量降低,T-SOD 活性升高,cAMP/cGMP 值亦显著提高。且酒蒸草苳蓉组对上述指标的改善作用显著优于生草苳蓉组,提示酒蒸炮制可增强草苳蓉温补肾阳之效,与《证类本草》所载“酒,主行药势”及中药“酒制增效”传统理论相一致。

Akt1 与 EGFR 蛋白在肾脏功能调控中具有重要作用。Akt1 作为关键调控激酶,通过磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)-Akt 信号级联传导信号,参与调控细胞生长与存活过程<sup>[29]</sup>,对维持肾脏正常生理功能至关重要,其活性异常与急性肾损伤、肾纤维化等多种肾脏病变密切相关<sup>[30-31]</sup>。EGFR 作为 Akt1 上游调控靶点,参与肾脏发育、肾小球滤过功能维持及肾小管损伤后的细胞增殖与修复过程。EGFR 与配体结合后发生二聚化并激活自身激酶活性,通过招募 PI3K 等下游信号复合物进一步激活 Akt1,活化的 Akt1 继续向下游传递信号,进而维持肾脏正常生理功能并修复病理损伤。本实验结果显示,氢化可的松诱导的肾阳虚小鼠肾脏组织中 Akt1 与 EGFR 蛋白表达均显著升高;金匱肾气丸及酒草苳蓉干预后,二者表达水平明显下降,生草苳蓉组 EGFR 表达显著下降,金匱肾气丸组与酒草苳蓉组蛋白表达水平均低于草苳蓉生品组,进一步证实酒蒸草苳蓉温补肾阳作用优于生品。

综上所述,本研究成功优化了酒草苳蓉的炮制工艺参数。草苳蓉生品与酒草苳蓉均可有效改善肾

阳虚小鼠相关病理指标, 其中酒草苁蓉作用更为显著, 其作用机制可能与调控 EGFR/PI3K/Akt 信号通路、改善肾脏病理损伤及调节体内氧化应激与环核苷酸平衡密切相关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Hu T T, Li M C, Zhang X Y, et al. Combination of mass spectrometry analysis and bioinformatic analysis for characterizing anti-inflammation active components from *Boschniakia rossica* and the targets [J]. *J Chromatogr A*, 2025, 1739: 465544.
- [2] 中华人民共和国林业行业标准 LY/T 3434-2025, 草苁蓉 [S]. 2025.  
Forestry Industry Standard of the People's Republic of China LY/T 3434-2025, *Boschniakia rossica* [S]. 2025
- [3] 张航, 王辉, 杨树东. 草苁蓉的本草考证及药理研究 [J]. *长春中医药大学学报*, 2016, 32(1): 40-42.  
Zhang H, Wang H, Yang S D. Herbalogical study and pharmacological effect of *Boschniakia rossica* [J]. *J Changchun Univ Chin Med*, 2016, 32(1): 40-42.
- [4] 白贞芳, 刘勇, 王晓琴. 列当属、肉苁蓉属和草苁蓉属植物传统药理学调查 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(23): 4548-4552.  
Bai Z F, Liu Y, Wang X Q. Investigation of ethnic medicinal plants *Orobanche*, *Cistanche* and *Boschniakia* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2014, 39(23): 4548-4552.
- [5] Yang M H, Li X F, Du X Y, et al. Ultrasound-Assisted extraction and purification of polysaccharides from *Boschniakia rossica*: Structural Characterization and antioxidant potential [J]. *Ultrason Sonochem*, 2025, 118: 107364.
- [6] Lin L C, Lee L C, Huang C, et al. Effects of boschnaloside from *Boschniakia rossica* on dysglycemia and islet dysfunction in severely diabetic mice through modulating the action of glucagon-like peptide-1 [J]. *Phytomedicine*, 2019, 62: 152946.
- [7] Zhao Z H, Jia M J, An Y N, et al. The protective effect of *boschniakia rossica* extract on free radical-induced oxidative damage of biomolecules and establishment of a method for determining the content of oleanolic acid [J]. *Foods*, 2025, 14(10): 1658.
- [8] 董学花, 朱洁波, 延光海, 等. 草苁蓉环烯醚萜苷联合 5-氟尿嘧啶对人肝癌 SMMC-7721 细胞 EMT 的抑制作用 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(5): 1038-1042.  
Dong X H, Zhu J B, Yan G H, et al. Inhibitory effect of Iridoid glycosides from *Boschniakia rossica* combined with 5-fluorouracil on EMT in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2020, 31(5): 1038-1042.
- [9] 董学花, 延光海, 朱洁波, 等. 草苁蓉环烯醚萜苷联合 5-氟尿嘧啶对人肝癌 HepG2、SK-Hep1 细胞上皮间质转化的抑制效果研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(17): 4498-4505.  
Dong X H, Yan G H, Zhu J B, et al. Inhibitory effects of iridoid glycosides from *Boschniakia rossica* combined with 5-fluorouracil on human hepatoma HepG2 and SK-Hep1 cells epithelial-mesenchymal transition [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(17): 4498-4505.
- [10] 许惠仙, 徐慧, 全吉淑, 等. 草苁蓉环烯醚萜苷对大鼠肝脏癌前病变的抑制作用及其机制 [J]. *吉林大学学报 (医学版)*, 2025, 51(4): 887-895.  
Xu H X, Xu H, Quan J S, et al. Inhibitory effect of iridoid glycosides from *Boschniakia rossica* on hepatic preneoplasia of rats and its mechanism [J]. *J Jilin Univ Med Ed*, 2025, 51(4): 887-895.
- [11] Li J B, Sun C, Hou A J, et al. Exploring wine-processing: A distinctive classic technique in TCM [J]. *RSC Adv*, 2025, 15(53): 45157-45176.
- [12] Fan L Y, Ren J. Traditional uses, chemical constituents and pharmacological effects of *Boschniakia rossica*: A systematic review [J]. *Trop J Pharm Res*, 2019, 18(12):2643-2651.
- [13] Liu X F, Yang Z C, Han M J, et al. Bioactive components, pharmacological properties, and applications of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma: A comprehensive review [J]. *Nutrients*, 2025, 17(9): 1501.
- [14] 中国药典[S]. 四部. 2025.  
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2025.
- [15] 李捷. 基于化学轮廓分析和“辨状论质”对肉苁蓉产地加工与炮制工艺的研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2021.  
Li J. Study on Processing Technology of *Cistanches herba* based on chemical profile analysis and “quality discrimination by characters” [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [16] 中国药典[S]. 一部. 2025.  
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2025.
- [17] 刘莉园, 张钊, 葛乃嘉, 等. 草苁蓉多糖对脂多糖诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞炎症反应的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56(18): 1479-1485.  
Liu L Y, Zhang Z, Ge N J, et al. Effect of *Boschniakia rossica* polysaccharides on LPS-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages [J]. *Chin Pharm J*, 2021, 56(18):

- 1479-1485.
- [18] 王晓丽, 沈哲苑, 李丽萍, 等. 基于正交试验结合基准关联度和 AHP-熵权法优化经典名方黄连汤提取工艺 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 4804-4811.  
Wang X L, Shen Z Y, Li L P, et al. Optimization of extraction process for classical prescription Huanglian Decoction based orthogonal test, standard relation and analytic hierarchy process combined with entropy method [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(15): 4804-4811.
- [19] 夏提古丽·塔西买买提, 赵媛, 刘艺, 等. 熵权法-层次分析法结合 Box-Behnken 响应面法优化雪莲益肾方的提取工艺 [J]. 中国药房, 2023, 34(15): 1858-1862.  
Xiatiguli · T, Zhao Y, Liu Y, et al. Optimization of the extraction process for Xuelian yishen formula by the combination of entropy weight method-analytic hierarchy process with Box-Behnken response surface methodology [J]. China Pharm, 2023, 34(15): 1858-1862.
- [20] 梅佳华, 查学志, 柯瑾, 等. 基于 AHP-熵权法及化学计量学的虎力散提取工艺研究 [J]. 中草药, 2025, 56(13): 4643-4653.  
Mei J H, Zha X Z, Ke J, et al. Research on extraction process of Hulisian based on AHP-entropy weight method and chemometrics [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(13): 4643-4653.
- [21] 陈民. 草苈蓉两种主要活性成分分离及其对小鼠肾虚证的初步研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2020.  
Chen M. Separation of two main active components of *Boschniakia rossica* and its preliminary study on kidney-yang deficiency syndrome in mice [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2020.
- [22] 吉林省中药材标准 [S]. 第一册. 2019.  
Chinese Materia Medica Standards of Jilin Province [S]. Volume I. 2019.
- [23] 常百金. 基于“产地-成分-疾病-靶点”互作网络的北柴胡功效成分解析及共享靶点研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.  
Cang B J. Study on the analysis of efficacy components and common targets of *Bupleurum Chinense* DC based on “origin-component-disease-target” interaction network [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2023.
- [24] 崔香丹, 郑峰, 朱洁波, 等. 草苈蓉环烯醚萜苷对肝癌抑制作用 [J]. 中国公共卫生, 2018, 34(4): 521-524.  
Cui X D, Zheng F, Zhu J B, et al. Inhibitive effect of iridoid glycosides from *Boschniakia rossica* on apoptosis of liver cancer cells [J]. Chin J Public Health, 2018, 34(4): 521-524.
- [25] 刘绍姜, 钟凌云, 张弘毅, 等. 基于 AHP-CRITIC 法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选盐麸泻泻炮制工艺及药效研究 [J]. 中草药, 2025, 56(8): 2773-2785.  
Liu S J, Zhong L Y, Zhang H T, et al. Study on optimization of processing technique and pharmacological effects of *Alismatis Rhizoma* with salt bran, bran using AHP-CRITIC method combined with response surface methodology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(8): 2773-2785.
- [26] Li H, Wang Y Q, Zheng W, et al. High fat diet exacerbated glycolipid metabolism disorder in kidney Yang deficiency rats by interfering with IRS 1-PI3K (p85)-Akt-GLUT 4 pathway [J]. Lipids Health Dis, 2025, 24(1): 313.
- [27] 钱宏梁. 糖皮质激素诱发小鼠药源性证候评价及其肾上腺皮质功能的物质基础研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.  
Qian H L. Evaluation of drug-induced syndromes in mice by glucocorticoids and the material basis study of their adrenocortical function [D]. Shanghai: SHUTCM, 2019.
- [28] 杜利莉, 章丹宁, 薛梅, 等. 中医证候动物模型建立及评价方法研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2025, 41(1): 11-18.  
Du L L, Zhang D N, Xue M, et al. Research on establishment and evaluation methods of animal model of TCM syndromes [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2025, 41(1): 11-18.
- [29] McKenna M, Balasuriya N, Zhong S S, et al. Phosphoform specific substrates of protein kinase B (AKT1) [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 8: 619252.
- [30] Kim I Y, Lee M Y, Park M W, et al. Deletion of Akt1 promotes kidney fibrosis in a murine model of unilateral ureteral obstruction [J]. BioMed Res Int, 2020, 2020(1): 6143542.
- [31] Lin H Y H, Chen Y, Chen Y H, et al. Tubular mitochondrial AKT1 is activated during ischemia reperfusion injury and has a critical role in predisposition to chronic kidney disease [J]. Kidney Int, 2021, 99(4): 870-884.