

# 桂枝茯苓胶囊抑制小鼠离体子宫收缩效应及其物质基础评价

王振中<sup>1,2</sup>, 范麒如<sup>2</sup>, 奚霞<sup>2</sup>, 赵祎武<sup>2</sup>, 毕宇安<sup>2</sup>, 萧伟<sup>2\*</sup>, 段金廛<sup>1</sup>

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046; 2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001)

**摘要:**目的 分析评价桂枝茯苓胶囊及各分离部位对小鼠离体子宫痛经模型收缩的拮抗效应, 并探讨物质基础与效应之间的关系。方法 采用萃取法分离制备各部位样品; 采用小鼠离体子宫收缩模型评价该方及各部位的生物效应; 采用 LC-UV-MS-MS 法对具有显著活性的醋酸乙酯部位的主要色谱峰进行分析鉴定。结果 桂枝茯苓胶囊拮抗子宫平滑肌收缩的活性部位主要为醋酸乙酯部位, 通过与对照品对照及质谱特征对醋酸乙酯部位色谱峰进行了归属和指认, 鉴定了其中 8 个化合物分别为没食子酸、苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷、1, 2, 3, 4, 6-O-没食子酰葡萄糖、苯甲酸、苯甲酰芍药苷、丹皮酚。结论 桂枝茯苓胶囊中醋酸乙酯部位是治疗痛经的有效部位, 为进一步研究桂枝茯苓胶囊的效应物质基础及建立以有效成分为基础的质量标准提供了依据。

**关键词:** 桂枝茯苓胶囊; 离体子宫; 痛经模型; 效应物质; HPLC-MS

**中图分类号:** R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)04-0609-03

桂枝茯苓胶囊由东汉张仲景《金匮要略》中桂枝茯苓丸经过剂型改革而来, 其组成为桂枝、茯苓、桃仁、丹皮、芍药, 具有活血化瘀、消徵散结之功。临床上常用于卵巢囊肿、子宫内膜异位症、子宫肌瘤、慢性盆腔炎等妇科血瘀证的治疗<sup>[1-3]</sup>。近年来, 该方用于治疗原发性痛经也取得较好的疗效<sup>[4]</sup>, 但其治疗痛经的效应物质基础研究未见报道。为建立以有效成分为基础的质量标准, 进行桂枝茯苓胶囊生物效应与物质基础的相关性研究具有重要的意义。

本实验以离体子宫收缩模型评价桂枝茯苓胶囊各分离部位的生物效应; 采用 LC-UV-MS-MS 技术对该方及各部位化学成分进行了分析鉴定; 初步分析探讨了桂枝茯苓胶囊对小鼠离体子宫的生物效应与化学成分的相关性, 为阐明复方效应物质及建立以有效成分为指标的质量标准奠定了基础。

## 1 材料

1.1 药物与试剂: 桂枝茯苓胶囊, 江苏康缘药业股份有限公司, 批号 070810; 苯甲酸雌二醇注射液, 天津金耀氨基酸有限公司, 批号 060931; 缩宫素注射液, 上海第一生化药业有限公司, 批号 060105; 乙腈(色谱纯, 美国 Tedia 公司); 其余试剂均为分析纯。没食子酸、苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷、1, 2, 3, 4, 6-O-没食子酰葡萄糖、苯甲酸、苯甲酰芍药苷、丹皮酚均购自中国药品生物制品检定所。

1.2 动物: 昆明种清洁级雌雄未孕小鼠, 18~22 g,

由南京中医药大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(苏)2002-0031。

1.3 仪器: TSZ-04 离体组织灌流系统, FSG-01 压力传感器, PowerLab/8s 多道生理记录仪, Chart 4.2 数据分析软件, 澳大利亚 AD Instruments 公司; Milli-Q Plus 超纯水装置, 美国 Millipore 公司; Delta320 pH 指示计, 梅特勒-托利公司; Finnigan TSQ 液相色谱质谱联用仪, 美国 Thermo Electron 公司。

## 2 方法

2.1 样品制备<sup>[5]</sup>: 取桂枝茯苓胶囊内容物, 加入适量去离子水加热提取 2 次, 每次 30 min, 合并煎液, 滤过后分别用石油醚、醋酸乙酯、水饱和正丁醇萃取, 萃取液分别回收得浸膏, 作为石油醚、醋酸乙酯、正丁醇部位, 水层与煎煮液混合, 浓缩成浸膏, 作为水提部位。药物均以 10% DMSO 去离子水溶解。

2.2 小鼠离体子宫收缩实验<sup>[6,7]</sup>: 取未孕雌性小鼠, 实验前连续 3 d ip 苯甲酸雌二醇 10 mg/kg, 以同步子宫周期并增加子宫对缩宫素的敏感性。于第 4 天取出小鼠子宫, 置 Locke's 溶液中清洗, 用细线分别扎住子宫颈端及两侧卵巢端, 一端固定于浴槽底部, 另一端连接在张力换能器上。置于含溶液 20 mL 恒温浴槽中, 温度为 (37 ± 0.1) °C, 通入 95% O<sub>2</sub> 及 5% CO<sub>2</sub> 混合气体, 通过调节螺母加 1 g 的负荷, 平衡 40 min, 待子宫收缩稳定, 自发节律恢复

\* 收稿日期: 2008-11-25

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (2006BAI11B03); 江苏省科技发展计划资助项目 (BE200461)

作者简介: 王振中 (1968—), 男, 黑龙江省人, 高级工程师, 硕士, 在读博士生, 研究方向为复方中药物物质基础与作用机制研究。

Tel.: (0518) 85521956 E-mail: wzzhz@tom.com

\*通讯作者 萧伟 Tel: (0518) 85521956 Fax: (0518) 85522017

后,开始实验。

预先记录 5~10 min 正常收缩曲线,随后加入缩宫素注射液 5 U/L,作用 15 min 后再加入各受试药物,采用加倍累加给药法,每次给药间隔 10 min。各样品质量浓度分别为 6.25、12.5、25、50、100 μg/mL,以 10% DMSO 去离子水为对照组。

2.3 色谱条件:色谱柱为 Alltima C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);乙腈(A)-0.2% 冰醋酸水溶液(B)系统梯度洗脱,0~60 min,A 5%~55%;检测波长:230 nm;柱温:30;体积流量:1 mL/min;进样量:10 μL。

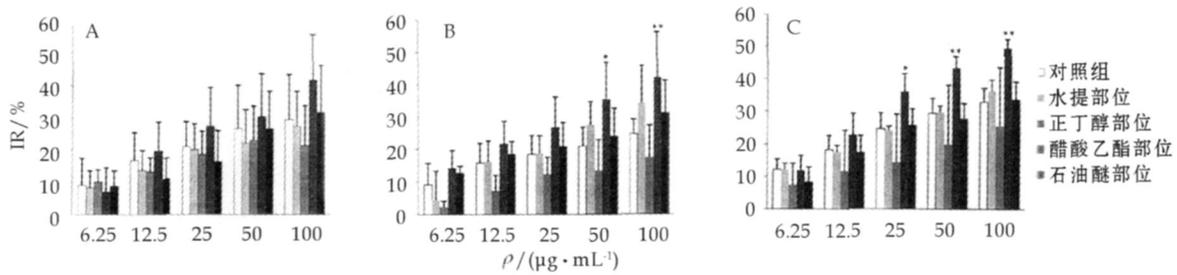
2.4 质谱条件:负离子扫描模式,喷雾电压:3 200 V;载气温度:320;扫描质子范围:m/z 100~1 000。

2.5 数据处理:以 Chart 4.2 软件统计给药前及给药后子宫的收缩频率、收缩幅度及平均肌张力,以缩宫素引起子宫平滑肌条稳定持续收缩后 10 min 内

各指标为 100%,计算抑制子宫收缩率[IR,IR=(给药前参数-给药后参数)/给药前参数×100%]。所有数据运用 SPSS 11.0 进行统计分析。

### 3 实验结果

3.1 不同提取物对小鼠离体子宫平滑肌收缩的影响:如图 1-A 所示,各提取部位均对小鼠离体子宫收缩频率有一定影响,醋酸乙酯部位抑制作用优于其他部位,但与对照组比较无显著性差异。如图 1-B 所示,与对照组比较,醋酸乙酯部位(50、100 μg/mL)对小鼠离体子宫收缩幅度的抑制作用具有显著性差异(P<0.05、0.01)。如图 1-C 所示,与对照组比较,桂枝茯苓胶囊醋酸乙酯部位(25、50、100 μg/mL)对小鼠离体子宫收缩平均肌张力的抑制作用具有显著性差异(P<0.05、0.01)。综上分析,桂枝茯苓胶囊醋酸乙酯提取部位对缩宫素引起的小鼠离体子宫平滑肌持续性收缩呈现显著的抑制活性,并呈现剂量依赖性趋势。



与对照组比较: \* P<0.05 \*\* P<0.01

\* P<0.05 \*\* P<0.01 vs control group

图 1 桂枝茯苓胶囊不同提取物对小鼠离体子宫收缩频率(A)、幅度(B)、平均肌张力(C)的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Fig. 1 Effect of different extracts from Guizhi Fuling Capsula on contractive frequency (A), amplitude (B), and mean tension (C) of uterine contraction of mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

3.2 不同提取物化学成分分析:取醋酸乙酯部位供试品溶液及各对照品溶液进行 LC-UV-MS-MS 检测。由质谱解析结果与对照品的保留时间、质谱图的对比,通过对比醋酸乙酯部位、对照品色谱图保留时间、总离子流图及质谱碎片离子(m/z),并结合相关参考文献数据<sup>[8-10]</sup>确定了其中 8 个色谱峰分别为没食子酸、苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷、1,2,3,4,6-O-没食子酰葡萄糖、苯甲酸、苯甲酰芍药苷、丹皮酚。

### 4 讨论

流行病学研究表明原发性痛经是目前妇科最常见疾病,其发病率在 20%~90%。近年研究发现,缩宫素与原发性痛经的发病有关,痛经患者体内缩宫素水平远较非痛经妇女高,被认为是原发性痛经致病原因之一<sup>[11]</sup>。缩宫素可引起离体子宫强烈而

持续的收缩,这种收缩类似于痛经子宫强烈收缩,因而常被用于痛经模型的工具药物<sup>[12]</sup>。目前其主要治疗药物包括 NSAIDs 及 COX-2 选择性抑制剂,PGs 合成酶抑制剂,PGs 受体拮抗剂,缩宫素和加压素 V1a 受体拮抗剂等<sup>[13]</sup>。

本研究结果表明,桂枝茯苓胶囊醋酸乙酯部位可以显著抑制缩宫素诱导的子宫剧烈收缩,尤其对收缩幅度、平均肌张力的抑制作用较为明显,且呈剂量依赖趋势;对醋酸乙酯部位的鉴定确定了 8 个化合物,较好地验证了具有松弛平滑肌作用的物质基础,如主要成分芍药苷、芍药内酯苷对大鼠离体子宫平滑肌的自发性收缩和催产素诱发的收缩均有抑制作用<sup>[14]</sup>,为阐明桂枝茯苓胶囊的效应物质及作用机制研究奠定了基础,为其制备工艺优化提供了一定理论指导,同时为建立以效应成分为基础的质量标

准提供了一定实验依据。

参考文献:

[1] 郑秀娟,周一波,胡美旭. B超引导下穿刺配合米非司酮与桂枝茯苓胶囊治疗卵巢巧克力囊肿 57 例分析 [J]. 浙江临床医学, 2007, 9(5): 624-625.  
 [2] 张丽帆,祝育德,闫彩平. 桂枝茯苓胶囊合参芪片治疗子宫内膜异位症的临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(9): 859-860.  
 [3] 范春茹. 桂枝茯苓胶囊治疗痛经举隅 [J]. 上海中医药杂志, 2003, 37(3): 63.  
 [4] 孙卫华,赵琳,田小平,等. 桂枝茯苓胶囊治疗原发性痛经 90 例临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(12): 1121.  
 [5] 夏厚林,吴希,董敏,等. 香附不同溶剂提取物对痛经模型的影响 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(5): 773-775.  
 [6] Crankshaw DJ. Pharmacological techniques for the *in vitro* study of the uterus [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2001, 45: 123-126.  
 [7] 华永庆,段金廛,朱荃,等. 缩宫素诱导的小鼠离体痛经

模型的实验方法研究 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(4): 489-493.  
 [8] 林佳,徐丽珍,刘江云. 中药桂枝的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2006, 28(2): 961-963.  
 [9] 胡斌,杨益平,叶阳. 茯苓化学成分研究 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 655-658.  
 [10] 高小荣,田庚元. 芍药化学成分研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15(6): 416-418.  
 [11] 华永庆,洪敏,朱荃. 原发性痛经研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2003, 19(1): 62-64.  
 [12] Sun H Y, Cao Y X, Liu J, et al. The establishment of the dysmenorrhea model in mice [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2002, 18(2): 233-235.  
 [13] 迟晓丽,刘国云,周文霞,等. 原发性痛经的治疗药物和治疗靶点研究进展 [J]. 军事医学科学院院刊, 2007, 31(5): 470-472.  
 [14] Hsu C S, Yang J K, Yang L L. Effect of "Dang-Qui-Shao-Yao-San" a Chinese medicinal prescription for dysmenorrhea on uterus contractility *in vitro* [J]. *Phytomedicine*, 2006, 13(122): 94-100.

## 注射用黄芪多糖对 - 期非小细胞肺癌放疗患者免疫功能的影响

金璋,沈洁\*

(温州市第二人民医院 放疗科,浙江 温州 325000)

**摘要:**目的 观察注射用黄芪多糖对 - 期非小细胞肺癌放疗患者细胞免疫功能的影响。方法 采用随机分组方法将 30 例 - 期非小细胞肺癌放疗患者分为对照组(单纯放疗组)和治疗组(联合注射用黄芪多糖)各 15 例,并观察两组治疗前后患者外周血 T 淋巴细胞亚群(CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>)、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>和 NK 淋巴细胞的变化情况。结果 对照组放疗后 CD8<sup>+</sup>细胞和 NK 淋巴细胞比例较放疗前轻微增加,其他检测指标较放疗前均略下降,差异无显著性(P>0.05)。而治疗组治疗后 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、NK 淋巴细胞比例、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值明显提高,并明显高于治疗前和对照组(P<0.01)。结论 注射用黄芪多糖可明显改善 - 期非小细胞肺癌放疗患者的细胞免疫功能。

**关键词:**黄芪多糖;非小细胞肺癌;免疫功能

**中图分类号:**R286.91 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)04-0611-02

肺癌是我国常见的恶性肿瘤,大部分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),其中 75% 患者确诊时已失去手术机会。放射治疗是肺癌治疗的一个重要手段,特别对中晚期 NSCLC。然而单纯放射治疗疗效很差,5 年生存率仅为 5%~10%,中位生存时间为 10~15 个月。影响预后的因素很多,但据文献报道影响生存期、生存质量的一个主要原因为机体经放、化疗后免疫功能低下<sup>[1]</sup>。前期研究表明注射用黄芪多糖可以缓解癌症患者相关疲劳症状,改善患者免疫功能<sup>[2]</sup>,本观察采用注射用黄芪多糖来提高 - 期 NSCLC 放疗患者的免疫功能,为临床应用提供参考。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料:观察本科自 2006 年 8 月至 2007 年

8 月收住的 30 例 - 期 NSCLC 病人,30 例肺癌患者均经细胞学或病理确诊,其中鳞癌 21 例,腺癌 8 例,腺鳞癌 1 例;男性 21 例,女性 9 例;年龄 48~73 岁,中位年龄 63.5 岁。放疗前卡氏功能状态(KPS) 70 分,预计生存期>3 个月,并随机分为治疗组与对照组,两组年龄、性别和癌症分期均无明显差异,具有可比性。

1.2 治疗方法:所有病例放疗均采用直线加速器 6MV - X 线三野等中心照射,分割剂量每次 200 cGy,5 次/周,肿瘤累积剂量 60~64 Gy。对照组完成常规放疗,治疗组于放疗当天开始同时以注射用黄芪多糖(天津赛诺制药有限公司,批号 060701) 250 mg 加入生理盐水 500 mL 中静脉滴注,每日 1 次,连用 21 d。间隔 1 周后重复应用,如此进行直

\* 收稿日期:2008-10-17

作者简介:金璋(1976 - ),男,浙江温州人,主治医师,在读硕士研究生,从事肿瘤放疗专业近 10 年。E-mail: jzking1976@sohu.com