

• 药剂与工艺 •

基于体外溶出度与抗肝纤维化作用效应动力学的冬虫夏草粉碎度研究

白金霞^{1,2}, 韩晋², 戴领^{1,2}, 徐和^{1,2}, 申宝德², 尹蓉莉^{1*}, 袁海龙^{2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 中国人民解放军第302医院, 北京 100039

摘要: **目的** 从血清药理学的角度, 结合体外溶出度实验, 研究冬虫夏草用于抗肝纤维化最佳的粉碎度。 **方法** 冬虫夏草粉碎后分别过 100、150、200、300 目筛, 制成不同粉碎度的冬虫夏草粉样品, 结合腺苷的体外溶出度实验, 采用体外肝纤维化细胞模型, 不同粉碎度的冬虫夏草粉大鼠 ig 给药后, 以大鼠含药血清对 HSC-T6 细胞增殖的影响为指标, 采用效应动力学方法研究不同粉碎度的冬虫夏草粉对肝纤维化细胞的抑制作用。 **结果** 粉碎度为 200~300 目冬虫夏草粉腺苷累积溶出度较好, 冬虫夏草粉含药血清具有较好的抑制 HSC-T6 细胞增殖的作用, 200~300 目冬虫夏草粉含药血清对 HSC-T6 抑制的效应动力学曲线下面积较大。 **结论** 基于体外溶出度与效应动力学的方法可用于冬虫夏草治疗肝纤维化的粉碎度研究, 粉碎度以 200~300 目最优。

关键词: 冬虫夏草; 粉碎度; 腺苷; HSC-T6; 效应动力学; 肝纤维化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)20-2823-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.20.007

Studies on grinding degree of *Cordyceps sinensis* based on *in vitro* dissolution and pharmacodynamics of anti-hepatic fibrosisBAI Jin-xia^{1,2}, HAN Jin², DAI Ling^{1,2}, XU He^{1,2}, SHEN Bao-de², YIN Rong-li¹, YUAN Hai-long²

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China

Abstract: **Objective** To study the optimum particle size of *Cordyceps sinensis* for liver fibrosis in combination with *in vitro* dissolution experiment from serum pharmacology. **Methods** To prepare the powder samples with different grinding degrees, *Cordyceps sinensis* was crushed through 100-, 150-, 200-, and 300-mesh sieves. The *in vitro* dissolution of adenosine was measured at different time points. Meanwhile, the powder sample was ig administered to rats, and pharmacodynamic approach was adopted to study the inhibition of medicated serum on HSC-T6 proliferation. **Results** The accumulative *in vitro* dissolution of *C. sinensis* by 200—300 meshes was higher than that of other meshes. Medicated serum could significantly inhibit HSC-T6 cell proliferation. The AUC of HSC-T6 inhibition kinetics of medicated serum crushed to 200—300 meshes was significantly higher than that in other groups. **Conclusion** The *in vitro* dissolution and pharmacodynamic method could be used for the study on different particle sizes of *C. sinensis* for anti-hepatic fibrosis, and 200—300 meshes are the optimal particle size.

Key words: *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; grinding degree; adenosine; HSC-T6; pharmacodynamics; liver fibrosis

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 为麦角科真菌寄生在鳞翅目蝙蝠蛾科昆虫蝙蝠蛾幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体, 其性味甘平, 能

滋肺补精益气, 具“保肺益肾、止血化痰、已劳嗽”之功, 药理研究表明冬虫夏草具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖、抗氧化等多种药理作用^[1], 近年来的

收稿日期: 2013-05-28

基金项目: 国家新药创制重大专项 (2011ZX09201-201-14, 2011ZX09201-201-35); 国家自然科学基金资助项目 (81073069)

作者简介: 白金霞, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。E-mail: jxbaitree@163.com

*通信作者 尹蓉莉 Tel: 13689056666 E-mail: yinronglili@163.com

袁海龙 Tel: (010)66933367 E-mail: yhlpharm@126.com

研究发现冬虫夏草单用或配伍应用具有良好的抗肝纤维化作用^[2-3],冬虫夏草资源日渐稀缺,价格昂贵,单用或复方应用多以原粉入药^[4-5],且原粉入药药材的粉碎度直接关系有效成分的溶出度及药物在体内的生物利用度,因此研究冬虫夏草合理的粉碎粒径,找到充分发挥药效与有效成分溶出的最佳粉碎粒径对提高疗效、节约冬虫夏草资源尤为重要。

中药有效成分复杂,针对某种特定的病症往往是多种成分综合作用的结果,冬虫夏草在临床上虽有较好的抗肝纤维化疗效,但其起效成分及作用机制尚不十分明确^[6],因此仅仅以其量为指标研究冬虫夏草粉碎度的方法不能完全反应临床疗效。血清药理学不但反映了中药及其代谢产物的药理作用,且能反映可能由药物诱生的机体内源性成分所产生的间接作用,更接近药物在体内环境产生的真实过程,有助于对中药发生药效作用的物质进行整体研究^[7-8]。本实验通过测定不同粉碎粒径冬虫夏草中腺苷的体外溶出度,同时测定冬虫夏草在动物体内代谢后含药血清对肝纤维细胞的生物效应,并通过比较分析,建立一种以化学溶出度与效应动力学相结合的方法,研究冬虫夏草用于肝纤维化的最佳粉碎粒径。

1 仪器与材料

LC—20AT 高效液相色谱仪 SPD—M20A 检测器(日本岛津公司);ZRS—6 智能溶出仪(天津市光学仪器厂);BAS—124S 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);XDS—1B 倒置生物显微镜(北京京瑞天下科技有限公司);Forma Series II 水套 CO₂ 培养箱(Thermo Fisher);Multiskan GO 全波长酶标仪(Thermo Scientific)。

腺苷对照品(中国药品生物制品鉴定所,批号 110879-200202,质量分数≥99.0%);胎牛血清(美国 HyClone 公司,批号 DPEO166);二苯基四氮唑蓝(MTT,批号 1324B37)、二甲基亚砜(DMSO,批号 20120305224)均购自美国 Amresco 公司;冬虫夏草,经解放军第 302 医院袁海龙研究员鉴定为麦角菌科真菌冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体;甲醇为色谱纯,水为二次蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠,由中国人民解放军军事医学科学院提供,动物许可证号:SCXK-(军)2007-004,雄性,体质量(200±20)g。饲养实验室为解放军第

302 医院动物实验中心,温度保持在 21~23℃,相对湿度为(55±5)%。

2 方法与结果

2.1 冬虫夏草粉的制备

取 40 g 冬虫夏草,用 JSP—350A 型高速多功能破碎机粉碎,分别过 100、150、200、300 目筛,制成不同粒度(100~150 目、150~200 目、200~300 目、<300 目)的冬虫夏草粉样品。

2.2 腺苷定量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Alltima™ C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为水-甲醇(85:15);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 260 nm;柱温 25℃。

2.2.2 对照品储备液的制备 取腺苷对照品适量,精密称定,加 90%甲醇制成含腺苷 23 μg/mL 的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取冬虫夏草粉 0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 90%甲醇 40 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 120 W, 40 kHz) 40 min,取出,放冷,再称定质量,用 90%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 1 mL,置 5 mL 量瓶中,用 90%甲醇稀释至刻度,摇匀。

2.2.4 专属性考察 分别吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,目标峰在(13.1±0.08)min 处出峰,供试品中腺苷与其他组分色谱峰达到基线分离,专属性良好。色谱图见图 1。

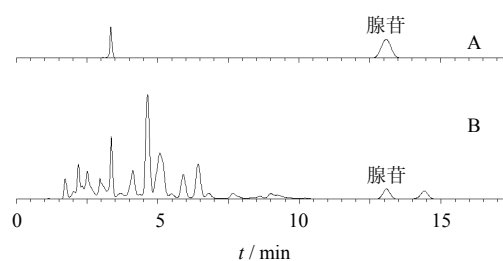


图1 腺苷对照品(A)和冬虫夏草粉样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of adenosine reference substance (A) and sample of *C. sinensis* (B)

2.2.5 线性关系考察 准确吸取含腺苷 23 μg/mL 对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加 90%甲醇至刻度,按“2.2.1”项下色谱条件测定,以腺苷质量浓度(X)对峰面积(Y)作线性回归,绘制标准曲线。腺苷回归方程为 $Y=$

45.209 $X-1.5213$, $r=0.9990$, 表明其在 $0.46\sim 2.3\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 精密吸取质量浓度为 $1.38\ \mu\text{g/mL}$ 的腺苷对照品溶液, 批内平行测定 6 次, 每次 $10\ \mu\text{L}$, 计算精密度, RSD 为 0.28%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取供试品溶液, 于 0、1、2、4、8 h 测定峰面积, 结果显示, 供试品溶液在 8 h 内峰面积基本不变, RSD 为 1.26%, 结果表明, 供试品溶液在 8 h 内较稳定。

2.2.8 加样回收率试验 取已测定 ($0.528\ \text{mg/g}$) 的供试品 6 份, 分别精密加入腺苷对照品各 $0.138\ \text{mg}$ ($23\ \mu\text{g/mL}\times 6\ \text{mL}$)。按供试品溶液的制备方法及其“2.2.1”项下色谱条件测定, 计算回收率。腺苷的平均回收率为 96.98%, RSD 为 2.29%。

2.3 腺苷溶出速度的测定

取粉碎度分别为 $100\sim 150$ 目、 $150\sim 200$ 目、 $200\sim 300$ 目、 <300 目的冬虫夏草粉各 6 份, 每份 $0.5\ \text{g}$, 按《中国药典》2010 年版二部附录 XC 溶出度测定法第三法, 量取 $200\ \text{mL}$ 经脱气处理的蒸馏水, 注入各溶出杯内, 转速为 $75\ \text{r/min}$, 依法操作, 分别于 5、10、15、20、30、45、60 min 时取样 $2\ \text{mL}$ (并同时补加相同体积的溶出介质), 立即用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜滤过, 续滤液作为供试品溶液; 分别吸取溶出液、对照品溶液各 $10\ \mu\text{L}$ 进样分析, 记录色谱峰面积, 按外标法计算供试品溶液中腺苷的质量浓度, 并计算平均累积溶出率, 结果见图 2。腺苷的溶出度随粒径的变化而变化, 冬虫夏草粉碎度为 $200\sim 300$ 目指标成分腺苷具有较好的溶出度。

2.4 含药血清的效应动力学

2.4.1 动物分组与取样 雄性 SD 大鼠 30 只, 随机

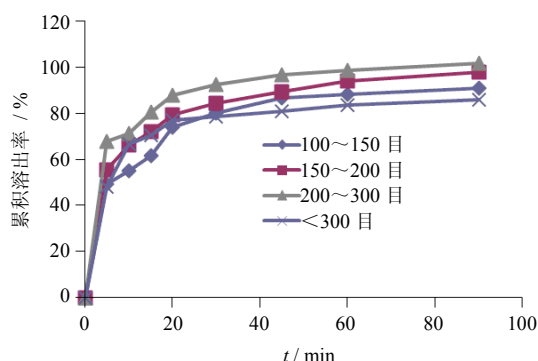


图 2 不同粒度冬虫夏草累积溶出率 ($n=6$)

Fig. 2 Accumulated dissolution rate of *C. sinensis* with different particle sizes of ($n=6$)

分为 5 组: 给药组 (I~IV) 分别单次 ig 给以粉碎度为 $100\sim 150$ 目、 $150\sim 200$ 目、 $200\sim 300$ 目、 <300 目的冬虫夏草混悬液 $6\ \text{g/kg}$, 空白对照组 (K) 单次 ig 给以等量生理盐水。分别于给药前和给药后 0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h, 无菌条件下, 自眼眶后静脉丛取血, 立即以 $8000\ \text{r/min}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 $20\ \text{min}$ 分离上层血清, $56\ ^\circ\text{C}$, 灭活处理 $30\ \text{min}$, 滤过除菌^[9], 置于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

2.4.2 HSC-T6 细胞的分离与培养 按文献方法^[10] 分离大鼠肝星状细胞, 并用 10%胎牛血清 DMEM 培养基, 以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 的细胞浓度接种, 置于培养箱中培养, 每 3 d 更换 1 次培养液, 直至细胞长至亚单层, 弃去培养液, 0.25% 胰蛋白酶- 0.02% EDTA 消化液 $37\ ^\circ\text{C}$ 下消化 $3\sim 5\ \text{min}$, 用培养液以 ($1\times 10^5\sim 2\times 10^5/\text{mL}$ 的细胞浓度接种到新培养瓶中, 进行传代培养, 传代周期为 $2\sim 3\ \text{d}$ 。

收集细胞用 0.4% 台盼蓝溶液鉴定 HSC-T6 的活力, 结果显示活细胞占 95%以上; Desmin 免疫细胞化学 SP 法染色对细胞纯度进行鉴定, 结果显示原代阳性细胞为 90%以上, 传代阳性细胞为 95%以上。对新分离的 HSC-T6 在相差显微镜下观察, 为折光很强的圆球, 24 h 后多数细胞贴壁, 呈圆形、椭圆形, 48 h 后大部分细胞伸展生长, 72 h 后可见部分细胞呈现多角伪足及典型的星状外观。传代后细胞在接种 4 h 后, 细胞均贴壁, 12 h 后细胞伸展生长, 约 3 d 后可长成亚单层。

2.4.3 含药血清添加量考察 取培养 24 h 的 HSC-T6 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶- 0.02% EDTA 消化, 以 $1\times 10^4/\text{mL}$ 的细胞浓度接种于 96 孔培养板中, 每孔体积 $200\ \mu\text{L}$, 细胞培养 24 h 后, 弃去上清, 换无血清培养基, 温育 ($37\ ^\circ\text{C}$) 48 h。弃去上清, 细胞单层铺满孔底后, 随机分成 6 组: 5%、10%、20% 空白血清组, 5%、10%、20% 含药血清组, 每组设 6 个平行孔。空白血清组、含药血清组分别加入含相应体积分数血清的 DMEM 培养基, 每孔体积为 $200\ \mu\text{L}$ 。作用 48 h 后, 吸除上清液, 每孔加入 $5\ \text{mg/mL}$ 的 MTT 液 $20\ \mu\text{L}$, 继续孵育 4 h, 加入 DMSO $200\ \mu\text{L}$, 振荡 $10\ \text{min}$ 后, 在 $490\ \text{nm}$ 波长下, 用酶联免疫检测仪测定各孔吸光度 (A) 值。实验结果见表 1。可知, 给药组 3 种体积分数的血清对 HSC-T6 细胞的增殖有抑制作用, 且呈体积分数依赖性, 与空白血清组相比具有显著性差异 ($P<0.05$)。故体系中加入含药血清的体积分数为 20%。

表1 不同体积分数含药血清对 HSC-T6 增殖的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of medicated serum at different concentration on proliferation of HSC-T6 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

血清体积分数 / %	A 值	
	空白血清组	含药血清组
5	1.775 ± 0.01	1.480 ± 0.02 [△]
10	1.805 ± 0.01	1.376 ± 0.01 [△]
20	1.818 ± 0.02	1.244 ± 0.01 [△]

与空白血清组比较: $\Delta P < 0.05$

$\Delta P < 0.05$ vs blank serum group

2.4.4 含药血清对 HSC-T6 细胞的抑制效应
HSC-T6 细胞接种于 96 孔板, 加入 20% 不同粒径冬虫夏草粉灌胃给药的含药血清, 每组设 6 个平行孔, 作用 48 h, 按“2.4.3”项下方法处理, 在 490 nm 波长下, 用酶联免疫检测仪测定各孔 A 值。计算不同粉碎粒径冬虫夏草粉溶出液对 HSC-T6 细胞的抑制效应。

不同粉碎度冬虫夏草粉含药血清对 HSC-T6 细胞的抑制率 [抑制率 = $(A_0 - A_1) / A_0$, A_0 为空白对照组 A 值, A_1 为含药血清组 A 值] 的效应-时间曲线见图 3, 冬虫夏草含药血清在 24 h 内可明显抑制 HSC-T6 的增殖, 粉碎度为 200~300 目组的含药血清抑制效果较好, 4 组的 AUC_E 分别为 (400.84 ± 29.56)、(564.13 ± 32.71)、(651.55 ± 27.02)、(475.91 ± 39.12) (%·h), 且 I、II、III、IV 组之间具有显著性差异 ($P < 0.01$)。24 h 时 III 组的含药血清对 HSC-T6 的抑制率分别是 I、II、IV 组的 1.96、1.27、1.42 倍。

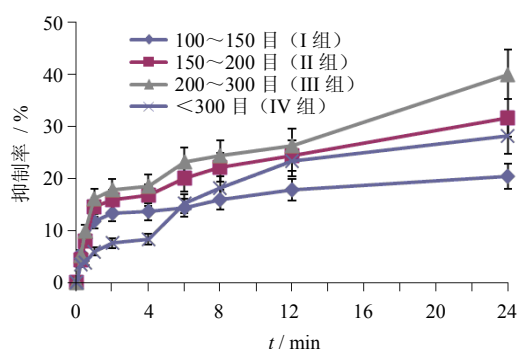


图3 含药血清对 HSC-T6 抑制率的效应-时间曲线
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 3 Effect-time curves of inhibitory rate of medicated serum on HSC-T6 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3 讨论

现代药学研究认为, 中药疗效与其所含有效成分的溶出度有很大关系, 由于冬虫夏草多以原粉入药, 对药材本身而言, 有效成分的溶出主要受细胞壁、细胞膜和溶剂接触面积的影响, 由图 2 可以看出, 冬虫夏草粉的粉碎度为 200~300 目时腺苷的溶出量较粉碎度为 100~150 目、150~200 目、<300 目的冬虫夏草粉增加明显, 这可能是因为冬虫夏草具有较厚的细胞壁, 有效成分溶出缓慢, 而粉碎度为 200~300 目的药材细胞壁被破坏, 成分溶出不受细胞壁与细胞膜的限制, 使得有效成分溶出量增加^[11], 而粉碎度 <300 目时冬虫夏草中的有效成分可能被部分破坏, 以致指标成分腺苷的溶出小于粉碎度 200~300 目冬虫夏草粉的溶出, 且对 HSC-T6 细胞的抑制作用也较差。

药物经口服以后在体内发生一系列变化, 有的是药物本身物质发挥作用, 有的是经过肝脏代谢的物质发挥作用, 有的是通过第二信使间接起作用。本实验将效应动力学应用于血清药理学研究冬虫夏草抗肝纤最佳的粉碎粒径, 能更好地反映药物在体内环境中产生药理效应的真实过程。用体外分离培养的 HSC-T6 作为肝纤维化细胞模型, 可避免异种动物血清对细胞生长的影响^[12], 实验结果表明, 冬虫夏草粉血清具有较好的抑制 HSC-T6 细胞增殖的作用。

注重中药紧缺资源的基础研究具有重要意义, 原粉入药的药材经一定程度粉碎后有利于提高药物溶出度和溶出速率, 进而达到用药剂量更小、生物利用度更高、药效发挥作用更迅速的目的。本实验将化学成分溶出与药效学研究相结合, 以评价不同粉碎度冬虫夏草的质量变化及药效差异, 优选其抗肝纤维化的最佳粉碎粒径, 这种研究方法使中药原粉入药药材的粉碎度研究更具有科学性、合理性。

参考文献

- [1] 李凤荣. 冬虫夏草的化学成分及药理学研究概况 [J]. 内蒙古中医药, 2010, 29(17): 102-105.
- [2] 吴建良, 刘成海. 冬虫夏草对肝纤维化的作用 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2001, 11(6): 382-384.
- [3] 朱家漩, 王宝恩, 王泰龄. 冬虫夏草对实验性免疫损伤肝纤维化的预防和治疗作用 [J]. 中华消化杂志, 1994, 14(6): 333-336.
- [4] 蔺武, 刘心娟, 魏南, 等. 复方鳖甲软肝片抗肝纤维化疗效的系统评价 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志,

- 2007, 16(1): 69-72.
- [5] 翁超明. 金水宝的药用价值及临床应用 [J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(4): 75.
- [6] 吴建良, 薛惠明, 刘成海, 等. 冬虫夏草对肝纤维化小鼠白细胞介素4与Y干扰素表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(6): 106-109.
- [7] Friedman S L, Lalazar A, Crong L, *et al.* HSC-T6 cells, an immortalized rat hepatic satellite cell line [J]. *Hepatology*, 1997, 26(4): 338-356.
- [8] 窦志华, 罗琳, 候金燕, 等. 茵陈蒿汤保肝作用的血清药理学研究 [J]. 中国现代应用药理学, 2012, 29(10): 868-871.
- [9] 刘成海, 刘平, 刘成, 等. 抗肝纤维化有效中药复方血清药理学方法探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(4): 16-19.
- [10] 张艺军, 杨希山, 吴平生, 等. 一种简便又经济的肝脏贮脂细胞分离方法 [J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(4): 304-306.
- [11] 丁志平, 孙毅坤, 乔延江. 不同粒径黄连粉体中小檗碱体外溶出研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2004, 5(27): 60-62.
- [12] 李长秦, 季金文, 郑旭锐, 等. 加味四逆散含药血清对HSC 凋亡影响的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(9): 1854-1856.