

• 药理与临床 •

纹党米炒前后体外抗氧化活性及干预脾虚泄泻大鼠的药效对比研究

帖晓燕¹, 张云鹤¹, 张文广¹, 王 丹¹, 辛国雄¹, 李 芸^{1*}, 胡芳弟²

1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

2. 兰州大学, 甘肃 兰州 730000

摘要:目的 研究纹党 *Codonopsis Radix* 米炒前后体外抗氧化活性变化规律及干预脾虚泄泻大鼠的药效差异。方法 采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 和 2,2-氮杂双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 2 种方法, 考察纹党米炒前后体外抗氧化活性的变化规律。建立脾虚泄泻大鼠模型, 给予硫酸阿托品注射液、纹党和米炒纹党水提液进行干预, 记录各组大鼠体重; 计算各组大鼠脾脏指数和胸腺指数; 采用 ELISA 法检测各组大鼠血清中胃动素 (motilin, MTL)、胃泌素 (gastrin, GAS)、血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP)、淀粉酶 (amylase, AMS)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和 IL-10 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察各组大鼠十二指肠、空肠组织病理改变情况, 比较纹党米炒前后治疗脾虚泄泻大鼠在免疫调节和消化吸收方面的疗效差异。结果 体外抗氧化结果显示, 纹党、米炒纹党的清除 DPPH 自由基半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 分别为 (0.041±0.110)、(0.029±0.140) g/mL; 其清除 ABTS 自由基 IC₅₀ 分别为 (0.038±0.050)、(0.029±0.100) g/mL。药效结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠体重、胸腺指数、脾脏指数、TNF- α 、IL-10、MTL、GAS、VIP 及 AMS 水平明显下降 ($P<0.05$), IL-6 水平明显上升 ($P<0.05$), 小肠病理切片结果显示十二指肠、空肠病变严重。与模型组比较, 各给药组脾脏指数及血清 TNF- α 、IL-10、IL-6 水平均具有明显差异 ($P<0.05$); 除纹党低剂量组胸腺指数, 纹党中、低剂量组与米炒纹党低剂量组 MTL 水平以及纹党低剂量组 GAS 水平在统计学上没有差异外, 其余各给药组均可使大鼠胸腺指数、MTL、GAS、VIP 及 AMS 水平明显上升 ($P<0.05$), 各给药组十二指肠、空肠病变不同程度地恢复。与相同剂量生品组比较, 米炒纹党高、中剂量组脾脏指数及米炒纹党高、低剂量组胸腺指数明显上升 ($P<0.05$), 米炒纹党高、中、低剂量组 TNF- α 、IL-10、GAS 及 VIP 水平, 米炒纹党高剂量组 MTL 水平以及米炒纹党中剂量组 AMS 水平明显上升 ($P<0.05$), 米炒纹党高、中剂量组 IL-6 水平明显下降 ($P<0.05$)。结论 纹党米炒后抗氧化活性增强; 纹党生熟饮片对脾虚泄泻大鼠免疫调节和消化吸收方面均具有明显治疗作用, 且米炒品明显强于生品, 可能与调节 TNF- α 、IL-6、IL-10 水平密切相关, 说明米炒纹党增强和胃健脾止泻的科学性、合理性。

关键词: 纹党; 米炒纹党; 抗氧化; 和胃健脾止泻; 消化吸收功能; 免疫调节功能

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)22-6871-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.22.012

Comparative study on effects of *Codonopsis Radix* before and after stir-baking with rice on anti-oxidation *in vitro* and regulation of immune function and digestive absorption in diarrhea rats with spleen deficiency

TIE Xiao-yan¹, ZHANG Yun-he¹, ZHANG Wen-guang¹, WANG Dan¹, XIN Guo-xiong¹, LI Yun¹, HU Fang-di²

1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To comparative the effects of Wendang (*Codonopsis Radix*) before and after stir-baking with rice on the antioxidation *in vitro* and regulation of immune function and digestive absorption in diarrhea rats with spleen deficiency. **Methods** DPPH and ABTS methods were used to investigate the changes of antioxidant activity of *Codonopsis Radix* before and after

收稿日期: 2021-06-21

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1706303); 全国中药特色技术传承人才培养项目 (T20184828005)

作者简介: 帖晓燕 (1995—), 女, 硕士研究生, 从事中药炮制与制药工艺研究。Tel: 18153675913 E-mail: 1194570175@qq.com

*通信作者: 李 芸 (1973—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药化学成分分离分析、中药加工炮制工艺研究与中药大健康产品开发。

Tel: 13893362959 E-mail: liyunherb@163.com

stir-baking with rice. The model of diarrhea of rats with spleen deficiency was established. The sulfate injection and water extract of *Codonopsis Radix* before and after stir-baking with rice were given for intervention, body weight of rats in each group was recorded, spleen index and thymus index of rats in each group were calculated. Levels of MTL, GAS, VIP, AMS, TNF- α , IL-6, and IL-10 in serum of each group of rats were determined by ELISA. HE staining method was used to observed the pathological changes of duodenum and jejunum of each group of rats. The effects of *Codonopsis Radix* before and after stir-baking with rice on diarrhea of spleen deficiency rats in terms of immune regulation, digestion and absorption were compared. **Results** Results of antioxidation *in vitro* showed that IC₅₀ of scavenging DPPH free radical of *Codonopsis Radix* before and after stir-baking with rice were (0.041 $\pm$ 0.110) and (0.029 $\pm$ 0.140) g/mL, IC₅₀ of scavenging ABTS free radical were (0.038 $\pm$ 0.050) and (0.029 $\pm$ 0.100) g/mL. Compared with control group, body weight, thymus index, spleen index, TNF- α , IL-10, MTL, GAS, VIP and AMS levels in model group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the level of IL-6 was significantly increased ($P < 0.05$). The pathological changes of duodenum and jejunum were severe in model group. The treatment of each experimental group had different effects on spleen index, TNF- α , IL-10 and IL-6 as compared to model group. There was no statistical difference in thymus index between low-dose *Codonopsis Radix* group, the level of MTL was not statistically different between medium- and low-dose *Codonopsis Radix* groups and low-dose *Codonopsis Radix* after stir-baking with rice group, and level of GAS in low-dose *Codonopsis Radix* group had no statistically difference. All the other groups could significantly increase the thymus index, MTL, GAS, VIP and AMS levels in rats ($P < 0.05$). The pathological changes of duodenum and jejunum were ameliorated in different degrees in each treatment group. Compared with same dose group, spleen index of high- and medium-dose *Codonopsis Radix* after stir-baking with rice group and thymus index of high- and low-dose *Codonopsis Radix* after stir-baking with rice group were significantly increased ($P < 0.05$). The levels of TNF- α , IL-10, GAS and VIP in high-, medium- and low-dose *Codonopsis Radix* after stir-baking with rice groups, MTL level in high-dose *Codonopsis Radix* after stir-baking with rice group, and AMS levels in medium- dose *Codonopsis Radix* after stir-baking with rice group were significantly increased ($P < 0.05$), the level of IL-6 in high- and medium-dose *Codonopsis Radix* after stir-baking groups with rice was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Antioxidant activity of *Codonopsis Radix* was enhanced after stir-baking with rice. Raw and cooked slices of *Codonopsis Radix* have obvious therapeutic effects on diarrhea in rats with spleen deficiency in terms of immune regulation, digestion and absorption. *Codonopsis Radix* after stir-baking with rice is obviously stronger than raw products, which may be closely related to the regulation of levels of TNF- α , IL-6 and IL-10, which demonstrates that *Codonopsis Radix* after stir-baking with rice can harmonize stomach, invigorate and relieve diarrhea scientifically and reasonably.

Key words: *Codonopsis Radix*; *Codonopsis Radix* after stir-baking with rice; anti-oxidant; harmonizing stomach, invigorating and relieving diarrhea; digestive absorption; immune function

党参为典型的多基原中药，为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.、素花党参 *C. pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L. T. Shen 或川党参 *C. tangshen* Oliv. 的干燥根^[1]。现代药理学研究表明，其具有免疫调节、抗菌、抗肿瘤、抗溃疡、改善心血管功能、抗氧化、抗衰老等作用^[2-3]，对脾肺气虚、中气不足、脾胃虚弱、热病伤津等均有良好的疗效。纹党为素花党参的干燥根，是甘肃文县特产，其有效成分含量居各类党参之首，是党参中的上品。历代本草典籍及各省炮制规范中记载党参的炮制方法有米炒、蜜炙、麸炒、蜜麸炒、清炒、土炒、蜜蒸、清蒸等^[4-5]，其中米炒品是临床最常用的炮制品。《中国药典》2020 年版一部党参项下仅收载了党参和米炒党参 2 种饮片规格，但只对生品党参饮片的功效进行了阐述，未收载米炒党参的功效，“十三五”规划教材《中药炮制学》明确指出党

参米炒后气变清香，和胃健脾止泻作用增强。目前，党参生品化学成分和药理作用研究报道较多，有关米炒党参药效及作用机制研究尚未见报道，更未见纹党的相关报道。

党参气味甘、平，生用长于益气生津、气血双补，米炒后气变清香，和胃健脾止泻作用增强^[6]，用于脾胃虚弱、食少、便溏等^[7]。米炒是加固体辅料炒的常见炮制方法之一，党参与米共炒可以增强药物和胃健脾止泻的作用。因此，本研究以中医临床为指导，选择最优且更能契合中医用药历史的纹党为研究对象，采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 和 2,2-氮杂双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS) 2 种方法，考察纹党米炒前后体外抗氧化活性的变化规律，并结合最常用的用药方式即汤剂，研究炮制对其“和胃”和“健脾止泻”功效相关药效指标的影响，从宏观动物系统药效学验

证和评价纹党米炒后和胃健脾止泻作用是否增强,为进一步阐释米炒党参“生熟异治”的作用机制和指导临床精准用药提供理论依据。

1 材料

1.1 药材

纹党药材购自甘肃省陇南市文县仁和农副产品公司,经甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任中药师鉴定为桔梗科植物素花党参 *C. pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L. T. Shen 的干燥根。

1.2 动物

6 周龄 SPF 级 Wistar 大鼠 144 只,雌雄各半,体质量 (200±20) g,购自甘肃中医药大学实验动物中心,动物许可证号 SCXK(甘)2015-0002,饲养于甘肃中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房,温度 18~22 °C,相对湿度 50%~60%。所有动物实验遵循甘肃中医药大学有关实验动物管理和使用的规定,均符合 3R 原则。

1.3 药品与试剂

DPPH(批号 1989-66-4)购自东京化成工业株式会社;ABTS(批号 A6000020001)购自上海生工生物工程股份有限公司;无水乙醇、过硫酸钾均为分析纯;水为娃哈哈纯净水;利血平注射液(批号 1911091)购自天津金耀药业有限公司;硫酸阿托品注射液(批号 61909042)购自遂成药业股份有限公司;大鼠胃动素(motilin, MTL)ELISA 试剂盒(批号 L200811647)、大鼠血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)ELISA 试剂盒(批号 L200907040)、大鼠胃泌素(gastrin, GAS)ELISA 试剂盒(批号 L200907043)购自武汉优尔生商贸有限公司;淀粉酶(amylase, AMS)ELISA 试剂盒(批号 09/2020)购自南京建成生物工程研究所;大鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒(批号 A30600115)、大鼠 IL-10 ELISA 试剂盒(批号 A31090324)购自杭州联科生物技术有限公司;大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA 试剂盒(批号 222131-001)购自美国 Invitrogen 公司;4%多聚甲醛通用型组织固定液(批号 69111800)购自北京兰杰柯科技有限公司;苏木素-伊红(HE)染色剂、分化液、返蓝液(批号分别为 G1005、G1005-3、G1005-4)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.4 仪器

KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器

有限公司);BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司);MH-1000 型电热套(北京科伟永兴仪器有限公司);DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);HHS-11S 型数显恒温水浴锅(上海宜昌仪器筛筛厂);TG16B 型台式高速离心机(金坛市科析仪器有限公司);Epoch 酶标仪(美国 BioTeK 公司);RT-3100C 型全自动洗板机(雷杜生命科技有限公司);KD-BM 型包埋机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);2016 型切片机(德国 Leica 公司);RX50 型显微镜(宁波舜宇仪器有限公司);XB-20 型雪花制冰机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 纹党参饮片的炮制

2.1.1 纹党参饮片(生饮片)的炮制 将纹党药材去除杂质,洗净,盖过纹党药材的水量浸泡 15~20 min,闷润 3 h,切制长度为 2~4 mm 的厚片,置于烘干室 50 °C 干燥^[8],取出备用。

2.1.2 米炒纹党参饮片(熟饮片)的炮制 取纹党参饮片,用米拌炒至表面深黄色,取出,筛去米,放凉(100 kg 党参,用大米 20 kg),备用^[1]。该过程由“陇原工匠”杨锡仓主任中药师指导完成。

2.2 抗氧化活性测定

2.2.1 供试品溶液制备 分别取纹党、米炒纹党粉末(过 3 号筛)约 2.5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加入 250 mL 蒸馏水,回流提取 2 次,每次 1.5 h,共 2 次,滤过,合并续滤液,减压浓缩至 0.1 g/mL 的溶液,即得。

2.2.2 DPPH 自由基清除能力测定^[9] DPPH 用无水乙醇配制成浓度为 0.1 mmol/L 的工作液,将供试品溶液稀释制成 0.10、0.08、0.06、0.04、0.02 g/mL 的溶液,精密吸取样品溶液和 DPPH 工作液各 100 μ L 于 96 孔板中,避光静置 30 min 后,采用酶标仪测定 517 nm 处的吸光度(A)值,以维生素 C 为阳性对照,计算 DPPH 自由基清除率,DPPH 的清除能力用半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)表示。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = [A_0 - (A_i - A_1)] / A_0$$

A₀ 为未加样品的 DPPH A 值;A_i 为样品与 DPPH 反应后的 A 值;A₁ 为溶剂与 DPPH 的 A 值

2.2.3 ABTS 自由基清除能力测定^[10] 将用纯净水配制的 7 mmol/L ABTS 溶液 5 mL 和 2.45 mmol/L K₂S₂O₈ 溶液 5 mL 混合产生 ABTS⁺自由基,避光室

温静置 12~16 h, 得 ABTS 工作液, 备用。使用前取 ABTS 工作液 1 mL, 加纯净水稀释至该溶液在 734 nm 处 A 值为 0.700 ± 0.002 , 现用现配。于 96 孔板中分别精密加入不同质量浓度 (0.10~0.02 g/mL) 的样品溶液 40 μ L, 加入 ABTS 工作液 160 μ L, 避光静置 6 min 后, 采用酶标仪测定 734 nm 处的 A 值, 计算 ABTS 自由基清除率, ABTS 的清除能力用 IC_{50} 表示。

$$ABTS \text{ 自由基清除率} = [A_0 - (A_i - A_1)] / A_0$$

A_0 为未加样品的 ABTS A 值; A_i 为样品与 ABTS 反应后的 A 值; A_1 为溶剂与 ABTS 的 A 值

2.3 和胃健脾止泻药效对比研究

2.3.1 纹党、米炒纹党水提液的制备 根据本课题组前期研究, 称取纹党、米炒纹党饮片各 312 g, 加入 10 倍量水, 回流提取 1 h, 滤过, 连续回流 2 次, 合并 2 次滤液, 水浴浓缩至 1.62 g 生药/mL, 即浓缩至 505 mL, 于 -20°C 保存, 备用。

2.3.2 分组、造模及给药 将适应性饲养 7 d 后的 144 只 Wistar 大鼠, 按随机数字表分成 9 组, 每组 16 只, 分别记为对照组、模型组、阿托品 (0.5 mg/kg) 组、黄丸纹党高、中、低剂量 (16.2、10.8、5.4 g/kg) 组及米炒纹党高、中、低剂量 (16.2、10.8、5.4 g/kg) 组。除对照组外, 其余各组大鼠 ip 利血平 (0.5 mg/kg)^[11], 1 次/d, 持续造模 15 d; 对照组常规饲养, 自由进食饮水。模型复制成功后, 阿托品组 ip 硫酸阿托品注射液^[11], 纹党和米炒纹党高、中、低剂量组 ig 纹党和米炒纹党水提液 (20 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 15 d。给药期间, 除对照组外, 其余各组继续造模。

2.3.3 大鼠一般状态观察 分别观察各组大鼠造模前后及给药治疗后的一般状态, 包括体质量、进食量、活动情况、精神状态、大便及是否存在脱肛现象等。给药第 15 天各组大鼠均禁食, 自由饮水, 记录末次给药 24 h 后大鼠体质量。

2.3.4 样本采集 末次给药 24 h 后, 大鼠 ip 10% 水合氯醛麻醉, 心脏采血并静置 30 min, 4°C 、3500 r/min 离心 15 min, 取上清液, 于 -80°C 保存备用, 采血完成后脱颈椎处死大鼠。

2.3.5 脏器指数的测定 摘取完整脾脏和胸腺, 去掉筋膜及脂肪组织, 用滤纸吸干脏器表面血污, 分别称定质量, 计算脾脏及胸腺指数。

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量} / \text{体质量}$$

2.3.6 ELISA 检测各指标含量 取各组经心脏采集

处理得到的血清样品, 按 ELISA 试剂盒说明书检测 MTL、GAS、VIP、AMS、TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平。

2.3.7 小肠组织切片的制作与观察 摘取小肠, 立即用 0.9% 氯化钠溶液冲洗干净, 分别从十二指肠 (距离幽门口 5 cm 处)、空肠 (距离幽门口 20 cm) 取 $2\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 全层组织块, 在 4% 多聚甲醛固定液中固定 1 周, 然后石蜡包埋、切片、烘焙, 进行 HE 染色, 于显微镜下观察并拍照。

2.3.8 统计学处理 数据均采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计算 IC_{50} 值时, 使用 Probit 方法进行回归分析, 拟合得相应的方程 $\text{Probit}(p) = \text{Intercept} + Bx$, 再通过 χ^2 检验后得到 IC_{50} 值 ($\text{Probit} = 0.50$ 时提取液的质量浓度)。药效数据结果若符合正态分布, 则数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐, 则多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA); 数据不符合正态分布且方差不齐则用 W-H 秩和检验。

3 结果

3.1 抗氧化活性

许多中药化学成分具有抗氧化活性, 不同的化学成分可能通过不同的机制作用于氧化剂, 因此一种孤立的方法很难完全评估复杂样品的抗氧化能力^[12], 本研究通过 2 种体外抗氧化活性评价方法考察纹党米炒前后的抗氧化活性变化情况。纹党米炒前后抗氧化活性见图 1, 样品的抗氧化活性呈剂量相关性, 维生素 C、纹党及米炒纹党对 DPPH、ABTS 自由基的清除率随样品溶液质量浓度的增大而增大, 计算纹党、米炒纹党的清除 DPPH 自由基 IC_{50} 分别为 (0.041 ± 0.110) 、 (0.029 ± 0.140) g/mL; 其清除 ABTS 自由基 IC_{50} 分别为 (0.038 ± 0.050) 、 (0.029 ± 0.100) g/mL, IC_{50} 值越小表示提取液的抗氧化活性越强, 2 种体外抗氧化实验均表明米炒纹党抗氧化活性优于纹党, 证明纹党米炒可显著增强其抗氧化活性。

3.2 大鼠一般状态观察

如图 2 和表 1 所示, 对照组大鼠在实验过程中行为状态正常, 皮毛浓密且有光泽, 行动敏捷, 饮食正常, 扎堆现象不明显, 体质量正常增长等。与对照组相比, 模型组大鼠的表现有眯眼、倦卧嗜睡、体毛稀疏且失泽, 反应迟钝并伴倦怠懒动, 大便溏泄明显, 出现弓背等现象, 表明造模成功; 体质量明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠体毛稀疏失泽、眯眼、少食怠动、消瘦倦卧、大

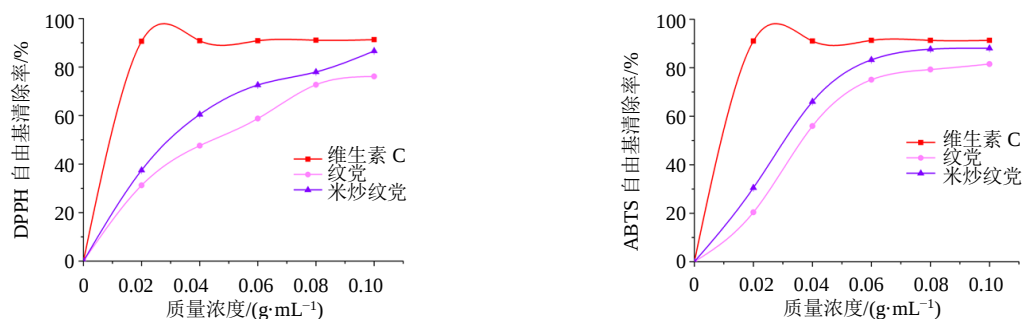


图 1 纹党米炒前后的抗氧化活性

Fig. 1 Anti-oxidant activity of *Codonopsis Radix* before and after stir-baking with rice

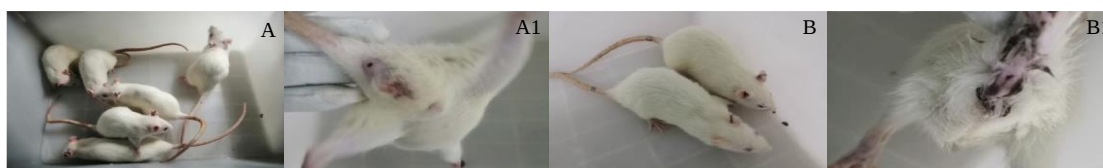


图 2 对照组 (A, A1) 与模型组 (B, B1) 大鼠的一般状态

Fig. 2 General state of rats in control group (A, A1) and model group (B, B1)

表 1 纹党米炒前后对脾虚泄泻大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

Table 1 Effect of *Codonopsis Radix* before and after stir-baking with rice on body weight in diarrhea rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g		
		造模前	造模后	给药后
对照	—	180.95 ± 11.81	191.29 ± 13.99	186.09 ± 11.89
模型	—	181.28 ± 10.03	159.65 ± 19.46 [△]	161.46 ± 15.47 [△]
阿托品	5 × 10 ⁻⁴	180.01 ± 17.78	157.42 ± 18.41 [△]	186.11 ± 11.54 [*]
纹党	16.2	182.21 ± 27.12	163.45 ± 23.66 [△]	181.39 ± 24.72 [*]
	10.8	174.87 ± 24.12	161.17 ± 22.17 [△]	188.33 ± 14.97 [*]
	5.4	180.93 ± 10.69	163.65 ± 28.79 [△]	183.19 ± 27.77 [*]
米炒纹党	16.2	186.75 ± 12.93	159.85 ± 13.11 [△]	198.55 ± 15.56 ^{*#}
	10.8	181.95 ± 11.69	161.33 ± 21.89 [△]	189.04 ± 21.30 [*]
	5.4	187.57 ± 13.65	168.07 ± 17.15 [△]	183.53 ± 18.03 [*]

与对照组比较: [△] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与相同剂量生品组比较: [#] $P < 0.05$, 下表同

[△] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs same dose of raw product group, same as below tables

便溏泄(或时干时稀)等症状逐渐减轻且活动度趋于正常,体质量明显升高($P < 0.05$);与相同剂量生品组比较,米炒纹党高剂量组体质量显著升高($P < 0.05$)。表明纹党和米炒纹党对利血平致脾虚泄泻大鼠体质量有改善作用,且米炒纹党效果更佳。

3.3 指标检测

3.3.1 对大鼠脏器指数的影响 如表 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠脾脏指数、胸腺指数明显降低($P < 0.05$),表明造模成功。与模型组比较,各给药组脾脏指数明显升高($P < 0.05$);除纹党低剂量组外,其余各给药组胸腺指数明显升高($P < 0.05$);与相同剂量生品组比较,米炒纹党高、中剂量组脾脏指数明显升高($P < 0.05$),米炒纹党高、低剂量组胸腺指数明显升高($P < 0.05$)。表明纹党

及米炒纹党对脾虚泄泻大鼠脾脏及胸腺均有保护作用,且米炒品的保护作用更佳。

3.3.2 对大鼠免疫、炎症因子相关指标的影响 如表 3 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清 TNF- α 及 IL-10 水平明显降低($P < 0.05$),IL-6 水平明显升高($P < 0.05$),表明造模成功。与模型组比较,各给药组大鼠血清 TNF- α 及 IL-10 水平明显升高($P < 0.05$),IL-6 水平明显降低($P < 0.05$);与相同剂量生品组比较,米炒纹党高、中、低剂量组大鼠血清 TNF- α 及 IL-10 水平明显升高($P < 0.05$),米炒纹党高、中剂量组大鼠血清 IL-6 水平明显降低($P < 0.05$)。表明纹党及米炒纹党对免疫炎症相关指标方面具有一定的调节作用,且米炒品的调节作用更为显著。

表 2 纹党米炒前后对脾虚泄泻大鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)Table 2 Effect of *Codonopsis Radix* before and after stir-baking with rice on organ index in diarrhea rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	脾脏指数/(mg·g ⁻¹)	胸腺指数/(mg·g ⁻¹)
对照	—	3.25±0.12	2.18±0.15
模型	—	2.28±0.16 [△]	1.14±0.29 [△]
阿托品	5×10 ⁻⁴	3.02±0.21*	1.98±0.25*
纹党	16.2	2.74±0.17*	1.62±0.32*
	10.8	2.55±0.23*	1.55±0.37*
	5.4	2.54±0.16*	1.46±0.30
米炒纹党	16.2	2.95±0.28* [#]	1.81±0.30* [#]
	10.8	2.76±0.13* [#]	1.76±0.21*
	5.4	2.71±0.17*	1.64±0.25* [#]

表 3 纹党米炒前后对脾虚泄泻大鼠血清中 TNF-α、IL-6 及 IL-10 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)Table 3 Effect of *Codonopsis Radix* before and after stir-baking with rice on TNF-α, IL-6 and IL-10 levels in serum of diarrhea rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	71.44±2.27	36.14±2.75	37.39±2.32
模型	—	41.54±2.42 [△]	59.58±2.38 [△]	18.59±1.43 [△]
阿托品	5×10 ⁻⁴	68.04±2.39*	38.03±2.16*	36.68±2.42*
纹党	16.2	57.11±2.84*	48.56±3.44*	30.16±2.43*
	10.8	54.06±3.54*	48.15±2.94*	27.13±3.02*
	5.4	51.11±2.70*	52.98±2.57*	30.17±2.23*
米炒纹党	16.2	65.81±2.93* [#]	44.71±2.65* [#]	33.62±1.81* [#]
	10.8	64.18±3.03* [#]	40.73±1.66* [#]	36.20±2.43* [#]
	5.4	57.40±2.61* [#]	49.13±3.74*	30.14±1.47* [#]

3.3.3 对大鼠消化吸收相关指标的影响 如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清 MTL、GAS、VIP 及 AMS 水平明显降低 ($P < 0.05$), 表明造模成功; 与模型组比较, 除纹党中、低剂量组与米炒纹党低剂量组对 MTL 及纹党低剂量组对 GAS 影响没有统计学意义外, 其余各给药组大鼠血清 MTL、GAS、VIP 及 AMS 水平均明显升高 ($P < 0.05$)。与相同剂量生品组比较, 对于血清 MTL, 米炒纹党高剂量组优于纹党对应剂量组 ($P < 0.05$); 对于血清

GAS 及 VIP, 米炒纹党对应剂量组均具有显著差异 ($P < 0.05$); 对于血清 AMS, 米炒纹党中剂量组优于纹党对应剂量组 ($P < 0.05$)。表明纹党及米炒纹党对消化吸收相关指标方面具有不同程度的调节作用, 且米炒品的调节作用更为显著。

3.3.4 对大鼠小肠组织病理学的影响 如图 3、4 所示, 对照组大鼠十二指肠与空肠上皮细胞排列整齐, 细胞膜完整, 细胞顶端有排列整齐紧凑的微绒毛结构, 细胞间隙正常。与对照组比较, 模型组大

表 4 纹党米炒前后对脾虚泄泻大鼠血清中 MTL、GAS、VIP 及 AMS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)Table 4 Effect of *Codonopsis Radix* before and after stir-baking with rice on MTL, GAS, VIP and AMS levels in serum of diarrhea rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	MTL/(pg·mL ⁻¹)	GAS/(pg·mL ⁻¹)	VIP/(pg·mL ⁻¹)	AMS/(U·L ⁻¹)
对照	—	4 032.03±436.74	207.32±15.20	478.80±34.37	433.12±30.92
模型	—	3 266.96±223.21 [△]	99.37±10.16 [△]	368.70±33.74 [△]	317.35±24.36 [△]
阿托品	5×10 ⁻⁴	3 950.70±373.04*	181.03±11.27*	460.18±21.46*	401.23±27.34*
纹党	16.2	3 624.20±228.12*	148.11±21.05*	421.84±38.93*	364.35±33.98*
	10.8	3 482.79±382.40	133.51±16.33*	419.62±29.15*	356.89±34.72*
	5.4	3 403.07±337.02	102.36±12.25	405.02±33.41*	350.33±19.92*
米炒纹党	16.2	3 892.51±383.10* [#]	167.46±17.93* [#]	458.18±24.13* [#]	388.45±24.55*
	10.8	3 706.14±230.99*	183.20±12.01* [#]	465.08±27.03* [#]	405.49±28.08* [#]
	5.4	3 519.56±299.04	164.40±15.97* [#]	445.49±26.51* [#]	367.90±26.85*

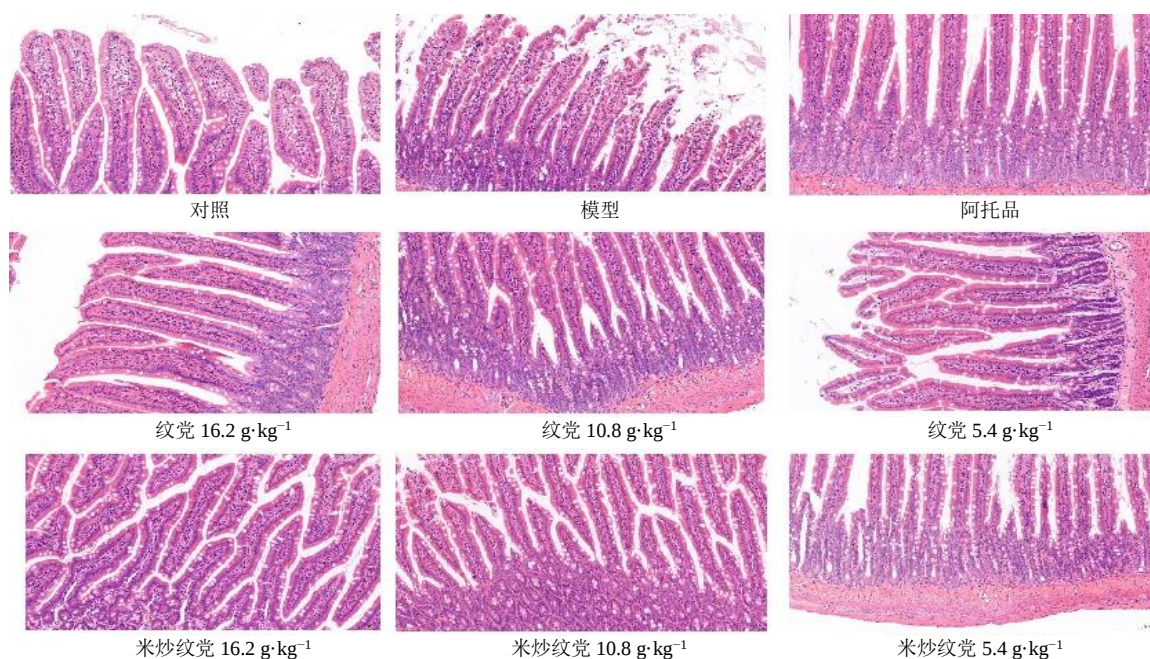


图 3 各组大鼠空肠组织病理切片图 (HE, ×200)

Fig. 3 Pathological sections of jejunum of rats in each group (HE, × 200)

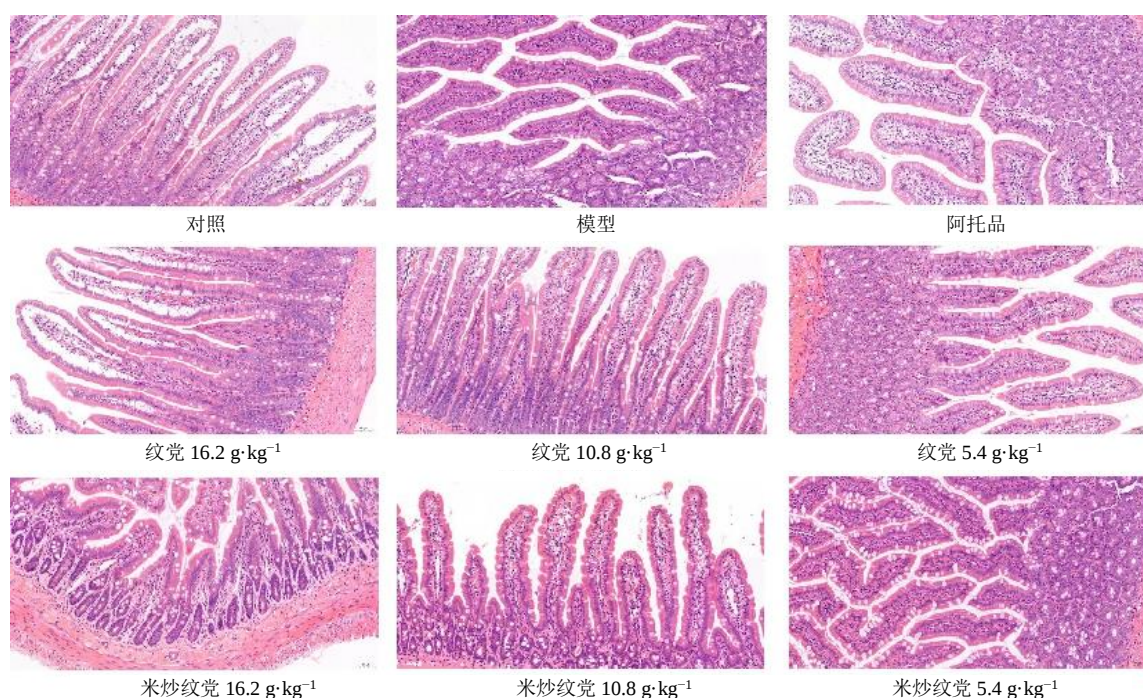


图 4 各组大鼠十二指肠组织病理切片图 (HE, ×200)

Fig. 4 Pathological section of duodenum of rats in each group (HE, × 200)

鼠十二指肠和空肠黏膜上皮细胞顶端微绒毛稀疏, 部分脱落, 长短不一, 细胞间连接复合体被破坏, 桥粒结构基本消失, 胞间连接松散并出现降解, 十二指肠肠腺萎缩, 结构不完整。与模型组比较, 阿托品组、纹党高剂量组和米炒纹党高、中剂量组黏

膜层肠上皮结构完整, 上皮细胞形态结构正常、排列紧密, 固有层肠腺丰富; 纹党中剂量组和米炒纹党低剂量组部分黏膜层肠上皮结构不完整, 可见大量上皮细胞脱落, 但程度较模型组有所减轻; 与相同剂量生品组比较, 米炒纹党高、中剂量组黏膜层

肠上皮结构更为完整。

4 讨论

党参具有清除自由基、抗衰老、抗氧化的作用^[13]。本研究采用 DPPH 和 ABTS 2 种方法评价了纹党米炒前后抗氧化活性,结果表明米炒可显著增强纹党体外抗氧化活性。Cai 等^[14]发现,党参水提物可降低 D-半乳糖诱导的衰老小鼠血清中丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性,其抗衰老作用可能与微小 RNA(miRNA)靶向作用有关。此外,研究发现,党参多糖可通过拮抗 D-半乳糖降低小鼠体内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性以及 GSH 水平,提高丙二醛水平,进而发挥抗衰老作用,其机制可能与增强机体免疫功能、清除自由基及抗脂质过氧化有关^[15],且硫酸化修饰可增强党参多糖的抗氧化活性^[16]。

脾胃为气血生化之源,脏腑经络之根,是人体赖以生存的仓禀,故称“脾为后天之本”。同时,脾居中焦,为人体气机升降之枢纽,又是人体抗御病邪的重要防卫机构。若脾失健运,则会引起出现水谷精微运化障碍,表现为消瘦、气血衰少、倦怠、眩晕、水肿等脾虚湿困症状。纹党为党参中的上品,自古以来便因其“健脾运而不燥,滋胃阴而不湿,润肺而不犯寒凉,养血而滋腻,鼓舞清阳振动中气而无燥之弊”而广泛应用于临床,常用于治疗脾肺气虚、中气不足、脾胃虚弱、热病伤津等。清《时病论》曰“米炒,治脾土虚寒泄泻”^[17],米炒是加固体辅料炒的常见炮制方法之一,党参与米共炒可以增强药物和胃健脾止泻的作用。

脾虚证是脾胃病最多见的证型之一,脾虚动物模型的建立对于脾胃病的研究意义重大。脾虚动物模型建立的方法主要分为病因模型(如苦寒泻下法、饮食失节法、劳倦过度法等单病因模型;苦寒泻下结合劳倦过度法、劳倦过度结合饮食不节法等双病因模型;五味偏食加控制饮食结合劳倦过度法等多病因模型)、病理模型(如利血平法、新斯的明法、秋水仙碱法等)和病症结合模型^[18]。本研究采用利血平复制脾虚模型是利用化学药的不良反应产生类似脾虚的临床表现,也是脾虚实验研究的常用模型^[19]。利血平属于肾上腺能神经阻断剂,用药后交感神经系统的功能受到遏制,副交感神经系统的功能相对占优势,从而出现体质量减轻、腹泻、耐寒力差等与临

床脾虚证相似的症状^[20]。张帆等^[21]采用利血平建立脾虚证小鼠动物模型探讨参苓白术散治疗脾虚泄泻的作用机制时发现,利血平致脾虚泄泻模型小鼠出现皮毛无光泽、拱背、扎堆、活动减少、倦卧、嗜睡、便溏、肛周污秽、食量减少、消瘦等症状,且血清 D-木糖及 AMS 含量均明显降低。利血平所致的脾虚大鼠模型在一定程度上反映了类似的病理改变,其表现和中医脾虚证有高度的相符性,且此模型干预因素简单,可控性好,易于重复^[18]。本研究采用 ip 利血平复制脾虚泄泻大鼠模型,经过 15 d 造模后观察大鼠体征变化,发现模型组大鼠懒动、拱背、精神倦怠、嗜卧、眯眼现象严重,毛色或枯黄或稀少,受惊动时无神、抓取时挣扎无力,便溏、泄泻严重、受激排便率增高,体质量明显下降,模型组大鼠各项指标基本符合中华中医药学会脾胃病分会制定的“中医虚证参考标准”及“脾虚模型标准”^[22]。结合模型组大鼠体质量、脾脏指数、胸腺指数及血清 MTL、GAS、AMS、VIP 等指标均与对照组大鼠具有显著性差异,表明脾虚泄泻大鼠模型制备成功。

脏器指数是衡量机体免疫功能的初步指标,脾脏及胸腺指数的改变可直观反映机体及细胞免疫水平的变化。利血平致脾虚泄泻模型大鼠的脾脏指数与胸腺指数明显降低,与对照组比较有显著性差异,表明脾虚可使机体免疫力下降。TNF- α 是由单核巨噬细胞产生的免疫调节多肽细胞因子,在介导炎症中起着重要作用;IL-6 主要由活化的巨噬细胞、淋巴细胞及上皮细胞分泌,在慢性肠道炎症中,IL-6 的过度表达会影响肠上皮细胞的电解质分泌,使其通透性增加,使中性粒细胞浸润到炎症部位^[23];IL-10 主要由 CD4⁺ Th2 辅助细胞亚群产生,是细胞免疫反应的负性调节因子^[24];本研究发现,利血平致脾虚泄泻模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-10 水平明显降低,IL-6 水平明显升高,表明脾虚可使机体免疫功能下降;纹党米炒后可显著增加脾虚泄泻小鼠的脾脏及胸腺指数,能够调节脾虚泄泻模型大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 水平,显著改善脾虚泄泻大鼠的免疫功能,有效地降低 IL-6 和提高 TNF- α 、IL-10 水平,提示党参及米炒党参对机体有很好的免疫保护作用。研究发现,党参多糖是增强机体免疫能力的主要生物活性成分^[25],党参中的免疫活性成分可能通过调控 TNF、转录因子 p65 (RELA)、IL-10、IL-6 等靶点, T 细胞受体信号通路,核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide-binding

oligomerization domain, NOD) 样受体信号通路等多个途径发挥增强机体免疫功能的作用^[26]。

MTL 是产生于十二指肠和空肠的一种肽类激素,其主要功能是影响胃和肠道的蠕动,并能刺激胃蛋白酶和胰液的分泌及胆囊的收缩^[27],若水平异常,则能够诱发胃肠道功能紊乱。作为调节胃肠功能的另一种激素,GAS 在消化道运动、食物的吸收和代谢、正常免疫功能的发挥等方面有着重要调节作用,通过结合相应受体,促进胃肠道中胃蛋白酶、胃酸、胰酶的合成,还能促进胃肠道粘膜组织生长,促进上皮组织中多种细胞的增殖、分化,调节胃、肠及胰腺中 DNA、RNA、蛋白质的合成,具有营养胃肠道的作用^[28]。AMS 是一种重要的消化酶,主要由唾液腺和胰腺分泌,淀粉酶分泌不足,机体的消化功能必然受到影响。VIP 是调节中枢神经系统与胃肠运动收缩连接的重要脑肠肽,由肠道神经元释放,在消化系统的主要作用是舒张肠道平滑肌,并使食管下段括约肌、肠道平滑肌和肛门内括约肌松弛,同时又可促进肠道水分和电解质的分泌^[29]。VIP 分泌异常可致胃肠动力和分泌功能紊乱,引起肠道平滑肌规律性运动障碍,肠道分泌物增多,进而导致腹泻^[30]。本研究发现,模型组大鼠血清 MTL、GAS、AMS 及 VIP 水平均显著低于对照组,各给药组大鼠血清 MTL、GAS、AMS 及 VIP 水平均有不同程度升高,且米炒纹党在改善消化吸收功能方面优于纹党。

综上,纹党及米炒纹党可升高脾虚泄泻小鼠 AMS、MTL、GAS、VIP、TNF- α 、IL-10、脾脏指数和胸腺指数水平,降低 IL-6 水平,从而减轻脾虚泄泻症状,且米炒纹党和胃健脾止泻作用更为显著,表明米炒纹党增强和胃健脾止泻的科学性、合理性。引起纹党及米炒纹党在免疫调节和消化系统方面的作用差异可能的机制为辅料大米气味甘、性平,具补中益气、健脾和胃、止泻痢等功效,与纹党共炒后,气变清香,醒脾开胃作用增强;纹党米炒后,产生了与健脾止泻作用相关的化学成分,具体变化后续采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2020: 293-294.
- [2] Qin T, Ren Z, Liu X P, et al. Study of the selenizing

Codonopsis pilosula polysaccharides protects RAW264.7 cells from hydrogen peroxide-induced injury [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125: 534-543.

- [3] Li J K, Wang T, Zhu Z C, et al. Structure features and anti-gastric ulcer effects of inulin-type fructan CP-A from the roots of *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf [J]. *Molecules*, 2017, 22(12): 2258.
- [4] 帖晓燕, 张云鹤, 辛国雄, 等. 党参米炒炮制及其药理作用研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(4): 140-145.
- [5] 王清浩, 王云, 张雪, 等. 基于“表里关联”的米炒党参炮制过程质量传递规律研究 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2848-2855.
- [6] 龚千锋. 中药炮制学 [M]. 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 151.
- [7] 郝艳艳. 党参不同炮制品化学成分和健脾益气作用的差异及机制研究 [D]. 太原: 山西省中医药研究院, 2019.
- [8] 周玥. 党参炮制原理及质量标准研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [9] 刘希达, 韩娜, 刘志惠, 等. 覆盆子抗氧化和 α -葡萄糖苷酶抑制活性成分研究 [J]. 中草药, 2021, 52(17): 5226-5232.
- [10] 张海丰, 臧皓, 沈鹏, 等. 草苁蓉正丁醇萃取物的抗氧化活性及物质基础初步研究 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 382-388.
- [11] 赵宁. 理中丸和四君子汤与脾虚证方证相关性的实验研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2006.
- [12] Marazza J A, Nazareno M A, de Giori G S, et al. Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* [J]. *J Funct Foods*, 2012, 4(3): 594-601.
- [13] Azman K F, Zakaria R. D-Galactose-induced accelerated aging model: An overview [J]. *Biogerontology*, 2019, 20(6): 763-782.
- [14] Cai J G, Ashraf M A, Luo L M, et al. Effects of *Codonopsis pilosula* water extract on MicroRNA expression profile in D-galactose-induced senile mice [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2017, 30(3): 1179-1183.
- [15] 许爱霞, 张振明, 葛斌, 等. 党参多糖抗衰老作用机制的实验研究 [J]. 中国现代应用药学, 2006, 23(8): 729-731.
- [16] Liu C, Chen J, Li E T, et al. The comparison of antioxidative and hepatoprotective activities of *Codonopsis pilosula* polysaccharide (CP) and sulfated CP [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 24(2): 299-305.
- [17] 吴仪洛. 本草从新 [M]. 北京: 中国书店出版社, 1985: 21.

- [18] 陈琦. 中药药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1074-1090.
- [19] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 162-163.
- [20] 郭文峰, 高小玲, 李茹柳, 等. 利血平致大鼠脾虚模型尿 D-木糖排泄率与肠黏膜三磷酸腺苷水平的研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2008, 16(4): 211-214.
- [21] 张帆, 伍春, 明海霞, 等. 参苓白术散对利血平所致脾虚小鼠血清蛋白质组影响 [J]. 中成药, 2013, 35(12): 2586-2591.
- [22] 张声生, 胡玲, 李茹柳. 脾虚证中医诊疗专家共识意见 (2017) [J]. 中医杂志, 2017, 58(17): 1525-1530.
- [23] 曹秀红, 张学彦, 张晓娜. 白介素在溃疡性结肠炎发病机制中的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(30): 3143-3148.
- [24] Imaoka A, Shima T, Kato K, *et al.* Anti-inflammatory activity of probiotic *Bifidobacterium*: Enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(16): 2511-2516.
- [25] Zhao X N, Hu Y L, Wang D Y, *et al.* The comparison of immune-enhancing activity of sulfated polysaccharides from *Tremella* and *Condonopsis pilosula* [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 98(1): 438-443.
- [26] 陈冬梅, 蒙洁, 刘佳佳, 等. 基于网络药理学的党参增强免疫功能机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(2): 184-187.
- [27] 方振雄, 方永奇. 舒肝健胃汤加吗丁啉对功能性消化不良患者胃动素、胃泌素的影响 [J]. 中国中医药科技, 2010, 17(4): 287-288.
- [28] 张玲霞, 庄坤, 张沥, 等. 血清胃蛋白酶原和胃泌素-17与萎缩性胃炎关系的研究 [J]. 陕西医学杂志, 2014, 43(3): 279-282.
- [29] 陈旻丹, 胡京红, 马捷, 等. 脾虚四号方含药血清对功能性腹泻脾虚证大鼠离体结肠平滑肌细胞的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(4): 297-301.
- [30] 闫兴丽, 洪纓, 石晋丽, 等. 蜘蛛香环烯醚萜对肠易激综合征模型大鼠胃肠敏感性和胃肠激素的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(8): 546-549.

[责任编辑 李亚楠]