

基于多指标-响应面法优选甘草制巴戟天工艺及其总寡糖体外抗氧化活性研究

刘梦云^{1,3}, 闫小景⁴, 王 宸¹, 朱丽君¹, 朱建光^{1,2,3}, 康 乐¹, 田连起¹, 魏 玉¹, 李红伟^{1,2,3*}, 李 凯^{1,2,3*}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046
2. 豫药全产业链研发河南省协同创新中心, 河南 郑州 450046
3. 河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 河南 郑州 450046
4. 漯河市第二人民医院, 河南 漯河 462000

摘要: 目的 优选甘草制巴戟天 *Morindae Officinalis Radix Praeparata* 的最佳炮制工艺, 并考察其炮制前、后总寡糖对雄性小鼠睾丸支持细胞 (TM4) 氧化损伤的保护作用。方法 采用多指标-响应面法, 以 *D*-果糖、*D*(+)-无水葡萄糖、蔗糖、蔗糖三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖共 6 种糖类成分的含量为评价指标, 利用层次分析法 (analytical hierarchy process, AHP)-熵权法计算各评价指标的权重系数和综合评分; 进一步利用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 考察甘草用量、闷润时间、煎煮时间对甘草制巴戟天炮制工艺的影响, 优选最佳炮制工艺; 按照最佳炮制工艺制备甘草制巴戟天, 并评估甘草制前、后巴戟天总寡糖对 H₂O₂ 诱导的 TM4 细胞氧化应激损伤的保护作用。结果 甘草制巴戟天的最佳炮制工艺为 100 g 生巴戟天饮片, 甘草用量 8 g, 闷润时间 1.0 h、煎煮时间 35 min。药效实验结果表明, 甘草制巴戟天总寡糖可显著增强谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性 ($P < 0.01$)、减少丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 含量 ($P < 0.05$), 且抗氧化应激损伤作用优于生品总寡糖。结论 运用 AHP-熵权法结合 BBD-RSM 优选制巴戟天炮制工艺, 结果准确、可行; 药效实验结果为巴戟天甘草制的合理性提供实验依据。

关键词: 制巴戟天; 炮制工艺; 寡糖; 响应曲面法; 氧化损伤; 层次分析法; 熵权法; *D*-果糖; *D*(+)-无水葡萄糖; 蔗糖; 蔗糖三糖; 耐斯糖; 1^F-果呋喃糖基耐斯糖; Box-Behnken 设计-响应面法; 谷胱甘肽过氧化物酶; 过氧化氢酶; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)23-7989-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.23.007

Optimal processing technology of *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* processed *Morindae Officinalis Radix* with multi-indicator-response surface methodology and antioxidant effect evaluation

LIU Mengyun^{1,3}, YAN Xiaojing⁴, WANG Chen¹, ZHU Lijun¹, ZHU Jianguang^{1,2,3}, KANG Le¹, TIAN Lianqi¹, WEI Yu¹, LI Hongwei^{1,2,3}, LI Kai^{1,2,3}

1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Henan Province, Zhengzhou 450046, China
2. Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao, Henan Province, Zhengzhou 450046, China
3. Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine, Henan Province, Zhengzhou 450046, China
4. Luohe Second People's Hospital, Henan Province, Luohe 462000, China

收稿日期: 2024-06-20

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82404865); 河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) 项目 (242102310542)

作者简介: 刘梦云 (1992—), 女, 汉族, 河南信阳人, 博士, 讲师/校聘教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药饮片炮制及其质量标准研究。

E-mail: liumengyun218@163.com

*通信作者: 李红伟 (1979—), 男, 汉族, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药炮制技术及化学成分分离研究。

Tel: (0371)65962746 E-mail: lhw20091068@sina.com

李 凯 (1982—), 男, 河南许昌人, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药炮制机制研究。

Tel: (0371)65962746 E-mail: cpulikai@163.com

Abstract: Objective To optimize the processing technology of Gancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, GRR) processed Bajitian (*Morindae Officinalis Radix*, MOR) and compare the effects of MOR oligosaccharides on the oxidative damage of testicular support (TM4) cells in male mice before and after processing. **Methods** A multi-index-response surface methodology was used, with *D*-fructose, *D*(+)-glucose, sucrose, kestose, nystose, and 1^F-fructofuranosylnystose as evaluation indicators. Analytical hierarchy process (AHP)-entropy weighting method was used to calculate the weight of each indicator and determine the comprehensive score (OD). Furthermore, Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM) was used to investigate the effects of GRR dosage ratio, moistening time and decoction time on the processing technology of MOR. The processed MOR was prepared according to the optimal processing technology to evaluate the protective effect of MOR oligosaccharides on oxidative stress damage induced by hydrogen peroxide in male mice testicular support cells. **Results** The best processing parameters were 100 grams raw MOR and 8 g GRR dosage for moistening for 1 h, decocting time was 35 min. The results of pharmacodynamic experiments demonstrated that GRR processed MOR oligosaccharides had significantly enhanced GSH-Px, CAT and SOD enzyme activities, reduced MDA contents ($P < 0.05$), and had stronger antioxidative effects than the raw MOR oligosaccharides. **Conclusion** In this experiment, the AHP-entropy weighting method combined with BBD-RSM was used to optimize the process parameters of GRR processed MOR, which was accurate and feasible. And the results of pharmacodynamic experiments could provide experimental basis for the rationality of GRR processed MOR.

Key words: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* processed *Morindae Officinalis Radix*; processing technology; oligosaccharides; response surface methodology; oxidative damage; analytical hierarchy process method; entropy weighting method; *D*-fructose; *D*(+)-glucose; sucrose; kestose; nystose; 1^F-fructofuranosylnystose; Box-Behnken design-response surface method; glutathione peroxidase; catalase; superoxide dismutase; malonaldehyde

巴戟天来源于茜草科巴戟天属植物巴戟天 *Morinda officinalis* How 的干燥根，其味甘、辛，性微温，归肾、肝经，具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的传统功效，为我国“四大南药”之一。中医临床主要用于治疗阳痿遗精、宫冷不孕、月经不调、风湿痹痛等病症^[1]。现代研究表明^[2]，巴戟天中主要活性成分为糖类、环烯醚萜类、蒽醌类等成分，具有抗抑郁、抗氧化、抗炎、增强免疫力、改善生殖等药理作用。巴戟天中糖类成分含量较高，其寡糖类成分（如蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖等）已被证明具有抗抑郁、改善生殖、抗氧化等作用^[3-4]，已成为目前研究的热点。

巴戟天始载于《神农本草经》中，被列为上品，历代本草均有记载。明代时期甘草制的应用较为突出，如《景岳全书》《先醒斋医学广笔记》分别记载了巴戟天“甘草汤炒”和“甘草制煮”的历史炮制方法^[5]。《中国药典》2020 年版收载的巴戟天炮制方法主要有盐制、甘草制等^[1]，其功效各有不同，如巴戟天经盐蒸制后，引药入肾，补肾壮阳作用增强；经甘草汁煮制后，脾肾双补作用增强^[6]。现代研究表明，巴戟天经炮制后化学成分和药效会发生不同程度的变化，如巴戟天经甘草制后寡糖成分含量增加^[7-8]；对改善脾肾阳虚模型和肾阳虚模型大鼠的肾功能和下丘脑-垂体-性腺轴作用较为显著^[6,9]等。本课题组前期曾采用 H₂O₂ 诱导雄性小鼠睾丸支持细

胞（TM4）氧化应激损伤模型，验证了巴戟天盐制品和蒸制品具有抗生殖氧化应激活性，并揭示其作用机制可能是巴戟天寡糖通过调控 Kelch 样 ECH 相关蛋白-核因子红系 2 相关因子 2/抗氧化反应元件（Kelch like ECH associated protein-NF E2 related factor 2/antioxidant response element, Keap1-Nrf2/ARE）通路下游的超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、血红素氧合酶-1（heme oxygenase-1, HO-1）等抗氧化酶水平，而发挥抗生殖氧化应激作用的^[10]；但关于甘草制巴戟天寡糖是否具有同样的药理药效作用，还有待进一步研究，且目前未见相关文献报道。

目前，国家及各省、市的炮制规范虽收录了制巴戟天饮片及其炮制方法，但均缺少细化统一的炮制工艺参数。少数研究采用正交试验设计和星点设计-效应面法分别对制巴戟天炮制工艺进行了优选，但结果却各不相同^[11-12]；层次分析法（analytical hierarchy process, AHP）-熵权法结合 Box-Behnken 设计-响应面法（Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM）是一种在优选饮片炮制工艺中应用较为广泛的方法，其具有决策人的主观判断和待评价各项指标的客观信息，可提高数据的合理性和工艺参数的科学性，能比较准确地从药效物质角度，更加公正地评价饮片炮制工艺的相关参数。因此，本实验拟以 *D*-果糖、*D*(+)-无水葡萄糖、

蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖 6 种糖类成分为考察指标, 采用 AHP-熵权法结合 BBD-RSM 优选制巴戟天的炮制工艺参数, 并比较其在甘草制前、后对 H₂O₂ 诱导的 TM4 细胞氧化损伤的保护作用, 为巴戟天甘草制的合理性提供理论依据。

1 仪器和材料

1.1 仪器

CBM-20A 型高效液相色谱仪、ELSD-16 型高效液相色谱仪蒸发光散射检测器, 岛津仪器(苏州)有限公司; BT25S 型十万分之一分析天平, 赛多利斯科技仪器有限公司; FA2104B 型电子天平, 上海越平科学仪器制造有限公司; DHG-9030A 型鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; YF-114B 型四两装高速中药粉碎机, 浙江瑞安市永历制药机械有限公司; 药典筛, 浙江上虞市五四仪器筛具厂; K-Q500V 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; UPR-II-10TNZP 型优普系列超纯水机, 四川优普超纯科技有限公司。Eclipse TE2000-5 型倒置显微镜, 日本尼康公司。

1.2 试药

巴戟天药材, 来源于广东肇庆巴戟天种植基地, 为 5 年生栽培品; 甘草购于药店, 为 2 年生栽培品, 二者经河南中医药大学李凯教授鉴定, 分别为茜草科巴戟天属植物巴戟天 *M. officinalis* How 的干燥根和豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。

对照品 *D*-果糖(批号 J07J12R136787)、*D*(+)-无水葡萄糖(批号 S17HB195198)、蔗糖(批号 M21IB210367)、蔗果三糖(批号 O09IB227896)、耐斯糖(批号 O09IB227897)、1^F-果呋喃糖基耐斯糖(批号 T19J10S90778), 均购自于上海源叶生物科技有限公司, 质量分数均为 98%。乙腈, 色谱级, 安徽天地高纯溶剂有限公司; 三乙胺, 色谱级, 成都市科隆化学品有限公司; 无水乙醇, 分析级, 天津市富宇精细化工有限公司, 实验用水为去离子水。正常 TM4 细胞购于上海基斯德诺生物科技有限公司; DMEM/F-12 (1:1) 培养基(批号 8121562)、青霉素-链霉素双抗(批号 15140-122)均购于美国 Gibco 公司; 30% H₂O₂(批号 201904002)、维生素 E (VE, 批号 S12201001210), 浙江医药股份有限公司新昌制药厂; 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 试剂盒(批号 20211014)、丙

二醛 (malonaldehyde, MDA) 试剂盒(批号 20210818)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 试剂盒(批号 20211015)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒(批号 20210817)均购于南京建成生物工程研究所; CCK-8 试剂盒, 美国 GLP Bio 公司。

2 方法与结果

2.1 甘草制巴戟天的制备

按照《中国药典》2020 年版一部巴戟天项下规定进行炮制。称取甘草饮片适量, 加 15 倍水浸泡 30 min, 加水煎煮 2 次, 每次 60 min, 浓缩至 150 mL, 滤过, 合并滤液(约 300 mL), 即得甘草煎煮液; 另称取巴戟天(已除去木心)饮片 50 g, 加入到甘草煎煮液中, 搅拌均匀, 闷润, 煎煮至甘草汁吸尽, 放入 50 °C 电热恒温鼓风干燥箱中干燥, 即得甘草制巴戟天。所得甘草制巴戟天饮片呈扁圆柱形短段; 表面暗灰色或黑褐色, 具纵纹和横裂纹; 断面紫色或淡紫色; 气微, 味甘、微涩。

2.2 指标成分含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取 *D*-果糖、*D*(+)-无水葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖对照品适量, 用体积分数为 60% 乙腈溶解, 定容至 5 mL, 制成质量浓度分别为 1.226、0.420、1.006、1.046、1.042、1.008 mg/mL 的混合对照品溶液, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取 0.5 g 生巴戟天或甘草制巴戟天样品粉末(过 50 目筛), 精密称定质量, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50 mL 50% 乙醇, 称定质量, 静置 30 min, 超声(功率 200 W、频率 40 kHz)提取 20 min, 用 50% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 离心, 上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Waters XBridge® Amide 柱 (250 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 流动相为 0.2% 三乙胺乙腈溶液 (A)-0.2% 三乙胺水溶液 (B), 梯度洗脱程序: 1~10 min, 75%~70% A; 10~20 min, 70% A; 20~45 min, 70%~60% A; 45~60 min, 60% A; 60~63 min, 60%~75% A; 63~75 min, 75% A; 进样量 20 μL; 柱温 35 °C; ELSD 漂移管温度 75 °C; 氮气体积流量 2.00 L/min。混合对照品、生巴戟天饮片和甘草制巴戟天饮片的 HPLC-ELSD 图见图 1。

2.2.4 线性观察考察及检测限和定量限的测定 取

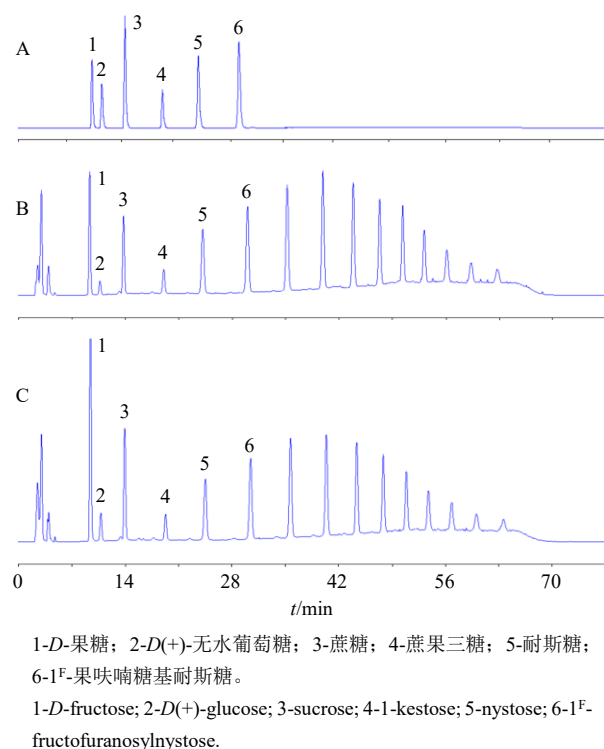


图 1 混合对照品 (A)、生巴戟天饮片 (B) 和甘草制巴戟天饮片 (C) 的 HPLC-ELSD 图

Fig. 1 HPLC-ELSD of mixed reference substances (A), raw (B) and glycyrrhiza processed (C) MOR samples

“2.2.1”项下制备的混合对照品溶液,分别精密量取 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 至 1.0 mL 量瓶中,用 50%乙醇定容至 1 mL,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录各对照品的峰面积。以各对照品峰面积的对数值 (Y) 对各对照品进样质量的对数值 (X) 进行线性回归,得到各指标成分的回归方程、相关系数 (r) 及线性范围分别为 D -果糖 $Y=1.4177X+5.0142$, $r=0.9991$, $2.452\sim24.520\mu\text{g}$; $D(+)$ -无水葡萄糖 $Y=1.6764X+4.9556$, $r=0.9994$, $0.840\sim8.400\mu\text{g}$; 蔗糖 $Y=1.0958X+5.4693$, $r=0.9994$, $2.012\sim20.120\mu\text{g}$; 蔗果三糖 $Y=1.3428X+5.0735$, $r=0.9991$, $2.092\sim20.920\mu\text{g}$; 耐斯糖 $Y=1.3035X+5.1033$, $r=0.9992$, $2.084\sim20.840\mu\text{g}$; 1^F-果呋喃糖基耐斯糖 $Y=1.3730X+5.1894$, $r=0.9990$, $2.016\sim20.160\mu\text{g}$; 结果表明各对照品在各自线性范围内线性关系良好。

将混合对照品溶液不断稀释后进样测定,检测限依据 3 倍噪音的峰响应值 (信噪比 $S/N=3:1$) 和称样量计算,定量限依据 10 倍噪音的峰响应值 ($S/N=10:1$) 和称样量计算。结果得到 D -果糖、 $D(+)$ -无水葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果

呋喃糖基耐斯糖的检测限分别为 0.090、0.032、0.020、0.025、0.020、0.042 μg , 定量限分别为 0.300、0.110、0.065、0.090、0.080、0.140 μg 。

2.2.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液,稀释 10 倍后按“2.2.3”项下色谱条件连续进样 6 次,测得 D -果糖、 $D(+)$ -无水葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖和 1^F-果呋喃糖基耐斯糖峰面积的 RSD 分别为 0.92%、2.57%、1.42%、1.17%、2.64%、2.00%,结果表明该仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一甘草制巴戟天供试品溶液,分别于制备后的 0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、24.0、48.0 h,按“2.2.3”项下色谱条件进样分析,测得 D -果糖、 $D(+)$ -无水葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖峰面积的 RSD 分别为 1.68%、2.63%、1.26%、2.65%、2.76%、2.44%,结果表明供试品溶液在 48.0 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批甘草制巴戟天样品 6 份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进样分析,测得 D -果糖、 $D(+)$ -无水葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖质量分数的 RSD 分别为 1.79%、2.54%、1.63%、1.30%、2.05%、1.56%,结果表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已测知各指标成分含量的甘草制巴戟天饮片粉末 (过 50 目筛) 6 份,每份 0.25 g,分别按 100%水平精密加入对应量的混合对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进行测定,记录各指标成分的峰面积,计算其质量浓度及加样回收率,测得 D -果糖、 $D(+)$ -无水葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖的平均加样回收率分别为 98.96%、99.79%、99.80%、99.31%、100.61%、100.66%,RSD 分别为 1.93%、1.10%、1.94%、1.79%、1.11%、0.90%,表明该方法准确性良好。

2.3 综合评分方法的建立

2.3.1 AHP 法计算各评价指标的主观权重系数 (W_{ji}) 本实验采用 Yaahp 11.0 软件,以 D -果糖、 $D(+)$ -无水葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖质量分数为评价指标,根据各评价指标的显著性将 6 种糖类成分质量分数作为中间层权重指标予以量化,并确定各成分指标的先后顺序为耐斯糖 > 蔗糖 > 1^F-果呋喃糖基耐斯糖 > D -果糖 > 蔗果三糖 > $D(+)$ -无水葡萄糖。以综合评分作为决策目标,运用

一致性矩阵法构建评价指标两两比较的优先判断矩阵，并计算各指标成分的 W_{j1} 。结果通过 AHP 法确定 6 种糖类成分的 W_{j1} 分别为 0.127、0.044、0.216、0.088、0.376、0.149，最大特征值 $\lambda_{\max}=6.0434$ 。对
 各权重系数进行一致性检验，结果随机一致性比率（CR）=0.060<0.1，说明矩阵的一致性检验结果可以接受，即所得的权重系数合理有效，可用于甘草制巴戟天炮制工艺优选的综合评分。结果见表 1。

表 1 指标成分对比较优先判断矩阵

Table 1 Decision matrix of paired comparison of indexes

指标成分	优先判断矩阵						W_{j1}
	D-果糖质量分数	D(+)-无水葡萄糖糖质量分数	蔗糖质量分数	蔗果三糖质量分数	耐斯糖质量分数	1 ^F -果呋喃糖基耐斯糖质量分数	
D-果糖	1	5/2	1/2	5/4	1/3	5/4	0.127
D(+)-无水葡萄糖	2/5	1	1/5	1/2	1/9	2/7	0.044
蔗糖	2	5	1	5/2	5/9	5/4	0.216
蔗果三糖	4/5	2	2/5	1	2/9	4/7	0.088
耐斯糖	3	9	9/5	9/2	1	9/4	0.376
1 ^F -果呋喃糖基耐斯糖	4/5	7/2	4/5	7/4	4/9	1	0.149

2.3.2 熵权法计算各评价指标的客观权重系数 (W_{j2})
 按照文献方法^[13]，对各评价指标质量分数的原始数据进行标准化和归一化处理，并计算各评价指标的 W_{j2} 。结果显示，本实验各评价指标均为正向指标，各评价指标数据经标准化、归一化、信息熵计算，得出 D-果糖、D(+)-无水葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖的 W_{j2} 分别为 0.232、0.122、0.199、0.145、0.198、0.104。

2.3.3 复合权重系数 (W_j) 及综合评分的计算 采用乘法合成归一法公式^[13]计算得到 D-果糖、D(+)-无水葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖的 W_j 分别为 0.160、0.030、0.240、0.070、0.410、0.090。根据公式计算综合评分，并以综合评分为最终评价指标进行甘草制巴戟天炮制工艺优化。

$$\text{综合评分} = \sum_{i=1}^m 100W_jY_j/Y_{j\max}$$

Y_j 为各组评价指标质量分数， $Y_{j\max}$ 为各组评价指标质量分数的最大值

2.4 甘草制巴戟天炮制工艺的单因素考察

按照“2.1”项下方法进行甘草制巴戟天样品的

炮制，以综合评分为决策目标，初步筛选影响甘草制巴戟天饮片的 3 个因素：甘草用量（4%、6%、8%、10%、12%）、闷润时间（0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h）、煎煮时间（20、25、30、35、40 min）。采用单因素实验方法，确定每个因素的优化区间，结果见表 2~4。可见，随着甘草用量、闷润时间和煎煮时间的增加，其综合评分均呈先增加后降低的趋势，当甘草用量为 8%、闷润时间为 1.0 h、煎煮时间为 35 min 时，各自的综合评分最高。故选取甘草用量 6%~10%、闷润时间 0.5~1.5 h、煎煮时间 30~40 min 作进一步工艺优化研究。

2.5 BBD-RSM 优选甘草制巴戟天饮片炮制工艺

2.5.1 BBD-RSM 设计方案及结果 在前期单因素考察的基础上，单次试验以 50 g 的生巴戟天饮片为原料，选择甘草用量（ X_1 ）、闷润时间（ X_2 ）、煎煮时间（ X_3 ）为考察因素，每个因素设置 3 个水平，见表 5。以甘草制巴戟天饮片中 D-果糖、D(+)-无水葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖共 6 种糖类成分质量分数的综合评分为评价指标，利用 Design-Expert 13.0 软件试验设计表安排

表 2 甘草用量比例对综合评分的影响

Table 2 Effect of glycyrrhiza dosage ratio on comprehensive score

甘草用量/ %	质量分数/(mg·g ⁻¹)						综合 评分
	D-果糖	D(+)-无水葡萄糖	蔗糖	蔗果三糖	耐斯糖	1 ^F -果呋喃糖基耐斯糖	
4	5.282	5.880	10.312	11.291	22.533	20.808	42.79
6	8.281	5.250	10.872	11.217	30.559	21.169	50.12
8	16.791	5.929	30.279	12.767	61.014	22.346	91.49
10	11.343	6.342	20.369	12.509	40.577	21.787	67.10
12	29.301	5.149	5.653	10.196	7.048	16.995	39.77

表 3 闷润时间对综合评分的影响
Table 3 Effect of moistening time on comprehensive score

闷润时 间/min	质量分数/(mg·g ⁻¹)						综合 评分
	D-果糖	D(+)-无水葡萄糖	蔗糖	蔗果三糖	耐斯糖	1 ^F -果呋喃糖基耐斯糖	
0.5	8.281	6.451	6.531	10.273	5.073	17.724	23.65
1.0	9.673	6.439	12.853	11.701	30.349	21.353	57.67
1.5	10.556	5.412	14.635	12.349	34.972	21.354	55.01
2.0	8.281	5.250	10.872	11.217	30.559	21.169	48.92
2.5	10.892	5.560	6.692	10.393	9.677	17.741	21.55

表 4 煎煮时间对综合评分的影响
Table 4 Effect of decoction time on comprehensive score

煎煮时 间/min	质量分数/(mg·g ⁻¹)						综合 评分
	D-果糖	D(+)-无水葡萄糖	蔗糖	蔗果三糖	耐斯糖	1 ^F -果呋喃糖基耐斯糖	
20	17.189	7.336	57.260	13.740	50.864	24.486	59.03
25	31.045	8.018	52.940	13.890	51.354	24.363	64.70
30	23.530	6.413	83.156	13.651	60.764	24.796	69.23
35	41.005	8.701	276.499	13.411	71.690	24.718	99.73
40	38.706	8.098	69.640	13.803	39.210	24.743	62.29

表 5 BBD-RSM 试验设计及结果
Table 5 Design and results of BBD-RSM test

试验号	$X_1/\%$	X_2/h	X_3/min	质量分数/(mg·g ⁻¹)						综合 评分
				D-果糖	D(+)-无水葡萄糖	蔗糖	蔗果三糖	耐斯糖	1 ^F -果呋喃糖基耐斯糖	
1	6 (-1)	1.0 (0)	30 (-1)	25.28	7.30	43.89	22.88	42.88	43.47	75.33
2	10 (+1)	1.5 (+1)	35 (0)	30.49	12.62	42.72	23.01	44.56	43.80	80.41
3	8 (0)	1.5 (+1)	30 (-1)	27.76	9.40	43.29	23.80	43.63	43.10	72.66
4	8 (0)	1.0 (0)	35 (0)	32.28	13.14	42.00	22.80	43.78	43.10	93.84
5	8 (0)	0.5 (-1)	30 (-1)	30.60	10.75	42.63	22.64	42.95	42.04	72.43
6	8 (0)	1.0 (0)	35 (0)	37.32	8.23	37.11	21.09	42.50	42.98	94.56
7	10 (+1)	1.0 (0)	40 (+1)	43.03	8.00	37.64	23.16	40.44	44.69	74.94
8	8 (0)	1.0 (0)	35 (0)	31.46	6.74	43.48	21.84	40.35	40.41	96.28
9	8 (0)	1.0 (0)	35 (0)	36.70	8.01	43.99	22.62	43.80	43.25	97.08
10	10 (+1)	0.5 (-1)	35 (0)	42.35	14.15	50.36	25.68	51.09	50.45	78.92
11	6 (-1)	1.0 (0)	40 (+1)	43.43	14.89	48.71	24.96	52.93	49.00	80.02
12	8 (0)	1.5 (+1)	40 (+1)	24.98	8.06	45.04	23.97	45.57	44.80	79.58
13	10 (+1)	1.0 (0)	30 (-1)	46.13	16.52	47.33	24.50	53.44	54.92	78.92
14	6 (-1)	0.5 (-1)	35 (0)	49.98	17.17	47.29	25.49	52.44	54.60	78.33
15	8 (0)	0.5 (-1)	40 (+1)	31.82	11.75	36.47	25.25	45.77	43.69	78.99
16	6 (-1)	1.5 (+1)	35 (0)	40.87	9.31	51.74	25.35	52.53	54.13	84.02
17	8 (0)	1.0 (0)	35 (0)	27.44	9.52	33.75	23.17	41.25	40.24	94.76

17 次试验，6 项评价指标的测定结果见表 5。

2.5.2 数据处理与分析 利用 Design-Expert 13.0 软件对表 5 中的实验数据进行多元回归拟合，得到二次多元回归方程：综合评分 = $95.300 - 0.062 X_1 - 0.750 X_2 + 2.020 X_3 + 1.700 X_1 X_2 + 0.580 X_1 X_3 + 1.340 X_2 X_3 - 7.870 X_1^2 - 9.760 X_2^2 - 9.380 X_3^2$ ， $R^2 = 0.9813$ 。

方差分析 (表 6) 结果显示，该二项式拟合模型 $F = 40.81$ ， $P < 0.0001$ ，该模型极具显著性；该方程的失拟项 F 值为 3.02， P 值为 $0.1567 > 0.05$ ，失拟项不显著；表明该回归方程在整个回归区域内的拟合情况良好。各因素对甘草制巴戟天炮制工艺影响程度为煎煮时间(X_3) > 闷润时间(X_2) > 甘草用量(X_1)。

2.5.3 最佳炮制工艺条件确定及其验证 利用 Design-Expert 13.0 软件作出各因素交互作用的三维响应面和等高线，结果如图 2 所示。煎煮时间 (X_3) 与闷润时间 (X_2) 的曲面较陡，交互作用较强；甘草用量 (X_1) 与闷润时间 (X_2) 的曲面较缓，交互

作用较弱。进一步优化回归模型上的试验参数，得出甘草制巴戟天的最佳炮制工艺参数为甘草用量 7.88%、闷润时间 1.03 h、煎煮时间 35.42 min，综合评分为 95.43。结合实际操作进行改进：甘草用量 8%、闷润时间 1.0 h、煎煮时间 35 min。

表 6 BBD-RSM 试验的方差分析
 Table 6 Variance analysis of BBD-RSM test

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1 209.92	9	134.44	40.81	<0.000 1	X_1^2	261.11	1	261.11	79.26	<0.000 1
X_1	0.03	1	0.03	0.01	0.487 0	X_2^2	401.12	1	401.12	121.76	<0.000 1
X_2	4.49	1	4.49	1.36	0.232 4	X_3^2	370.21	1	370.21	112.38	<0.000 1
X_3	32.75	1	32.75	9.94	0.013 7	残差	23.06	7	3.29		
X_1X_2	11.58	1	11.58	3.52	0.102 9	失拟项	16.00	3	5.33	3.02	0.156 7
X_1X_3	1.35	1	1.35	0.41	0.541 9	纯误差	7.06	4	1.77		
X_2X_3	7.21	1	7.21	2.19	0.182 6	总误差	1 232.98	16			

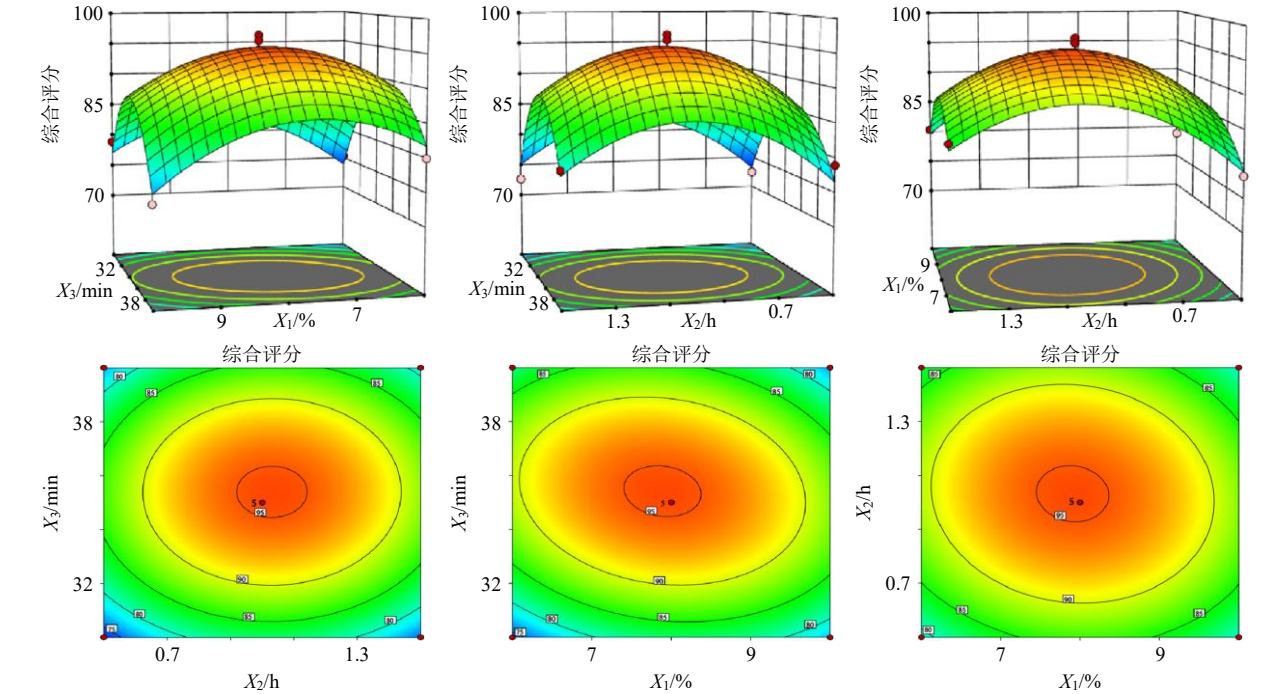


图 2 各因素交互作用对综合评分的影响

Fig. 2 Influence of each factor on comprehensive score

根据最佳炮制工艺，平行制备 3 份甘草制巴戟天饮片，测定各评价指标并计算综合评分，工艺验证结果见表 7。得出 D-果糖、D(+)-无水葡萄糖、蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖的平均质量分数分别为 35.64、14.31、49.88、22.36、40.71、48.91 mg/g，RSD 分别为 1.53%、2.33%、3.16%、2.22%、2.15%、1.92%，综合评分的平均值为 96.55，RSD 为 1.20%。表明本实验采用的 BBD-RSM 优选甘草制巴戟天的最佳炮制工艺，具有可行性和实用性。同时，与生巴戟天比较，甘草制后糖

类成分的含量均有所增加，表明甘草制能够提高巴戟天中糖类成分的含量。

2.6 对 H₂O₂ 诱导的 TM4 细胞氧化应激损伤模型的保护作用

2.6.1 总寡糖的制备 生巴戟天总寡糖和甘草制巴戟天总寡糖的制备，均参照本课题组前期建立的方法^[14]。经计算得出，生品总寡糖得率为 4.82%，质量分数为 93.21%；甘草制品总寡糖得率为 5.90%，质量分数为 95.36%。

2.6.2 细胞培养 将 TM4 细胞接种于 DMEM/F-12

表 7 工艺验证结果 (n = 3)
Table 7 Results of process verification experiments (n = 3)

验证样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)						综合 评分
	D-果糖	D(+)-无水葡萄糖	蔗糖	蔗果三糖	耐斯糖	1 ^F -果呋喃糖基耐斯糖	
生品	27.52	6.35	38.12	19.72	35.00	45.31	—
炮制品 1	35.96	14.68	48.49	21.79	40.47	50.65	96.83
炮制品 2	35.19	14.04	49.57	22.69	39.71	48.83	94.85
炮制品 3	35.78	14.20	51.59	22.59	41.95	47.25	97.97
平均值	35.64	14.31	49.88	22.36	40.71	48.91	96.55
RSD/%	1.53	2.33	3.16	2.22	2.15	1.92	1.20

培养基(含 10%胎牛血清和青霉素-链霉素双抗),于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育培养,取对数生长期细胞用于实验。

2.6.3 CCK-8 试剂盒法检测 TM4 细胞存活率 将 TM4 (3×10⁵ 个/mL) 细胞接种于 96 孔板,待细胞生长至融合状态时,弃掉培养液,每孔加入 200 μL 含不同质量浓度总寡糖的无血清培养基,即分别设置对照组(加入等体积的无血清培养基)、模型组(加入 H₂O₂ 0.6 mmol/L,干预 3 h)、总寡糖(生、甘草制巴戟天)+H₂O₂ 组(先加不同质量浓度的总寡糖,使其终质量浓度分别为 1.56、3.13、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00 μg/mL,干预 6 h 后,再加造模剂 H₂O₂ 0.6 mmol/L 干预 3 h),平行 3 孔,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,轻摇混匀后,孵育 1 h,于 450 nm 波长处检测吸光度(A)值,计算细胞存活率,结果见表 8。与模型组比较,随着总寡糖质量浓度的不断升高,生品总寡糖和制品总寡糖的细胞存活率均呈现先升高后降低趋势,在质量浓度为 25.00 μg/mL 时细胞存活率最高。这表明在一定的质量浓度范围内巴戟天生品总寡糖与甘草制品总寡糖对 H₂O₂ 所致的 TM4 细胞氧化应激损伤均具有一定的保护作用,在质量浓度为 25.00 μg/mL 时其保护效果最佳。

细胞存活率 = $A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$

2.6.4 巴戟天甘草制前、后总寡糖对 TM4 细胞形态的影响 将 TM4 (3×10⁵ 个/mL) 细胞接种于 6 孔板,加入完全培养基培养至细胞融合状态时,弃掉培养液,每孔加入 200 μL 含总寡糖的无血清培养基,即分别设置对照组(加入等体积的无血清培养基)、模型组(加入 H₂O₂ 0.6 mmol/L,干预 3 h)、总寡糖(生、甘草制巴戟天)+H₂O₂ 组(先加不同质量浓度总寡糖,使其终质量浓度为 25.00 μg/mL,干预 6 h 后,再加 H₂O₂ 0.6 mmol/L 干预 3 h),平行

表 8 巴戟天甘草制前、后总寡糖对 TM4 细胞存活率的影响 (x̄ ± s, n = 3)

Table 8 Effect of raw and processed MOR oligosaccharides on viability of TM4 cells (x̄ ± s, n = 3)

组别	剂量/(μg·mL ⁻¹)	细胞存活率/%
对照	—	99.52 ± 0.54
模型	—	82.69 ± 2.14
生巴戟天总寡糖	1.56	85.48 ± 3.70
	3.13	84.30 ± 1.34
	6.25	85.87 ± 3.14
	12.50	91.68 ± 6.64
	25.00	94.39 ± 7.23
	50.00	87.17 ± 4.22
甘草制巴戟天总寡糖	100.00	87.41 ± 3.51
	200.00	89.82 ± 1.43
	1.56	90.01 ± 3.99
	3.13	90.37 ± 3.20
	6.25	88.15 ± 3.88
	12.50	94.09 ± 12.44
	25.00	96.15 ± 12.09
	50.00	94.19 ± 10.04
	100.00	93.69 ± 8.49
	200.00	92.25 ± 8.37

3 孔,置于倒置显微镜下观察各组 TM4 细胞的形态。由图 3 可知,正常 TM4 细胞为贴壁细胞、呈梭形,细胞连接成簇状均匀散落分布;当加入 0.6 mmol/L 的 H₂O₂ 干预细胞后,细胞数量明显减少,细胞形态发生改变,细胞边缘模糊、皱缩结团;与模型组比较,给予生巴戟天总寡糖和甘草制巴戟天总寡糖后,细胞数量明显升高,细胞形态得到明显改善,且甘草制巴戟天总寡糖组细胞数量多于生巴戟天总寡糖组。

2.6.5 TM4 细胞中 SOD、GSH-Px、CAT 活性及 MDA 水平检测 “2.6.4”项下各组观察完各组 TM4 细胞形态后,将培养基弃去,预冷 PBS 清洗 3 遍,每孔

加细胞裂解液 250 μL，冰上裂解 30 min，刮下细胞，于 12 000 r/min 离心（离心半径为 8.5 cm）15 min，收集细胞上清液。按试剂盒说明书进行操作，测定细胞中 SOD、GSH-Px、CAT 活性及 MDA 水平，结果见表 9。与对照组比较，模型组 SOD、GSH-Px、

CAT 活性明显降低（ $P<0.05$ 、 0.01 ），MDA 水平明显升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，巴戟天生品与干燥炮制品总寡糖均能显著提高 SOD、GSH-Px、CAT 活性（ $P<0.05$ 、 0.01 ），降低 MDA 水平（ $P<0.01$ ），其中，甘草制巴戟天总寡糖药效明显优于生品。

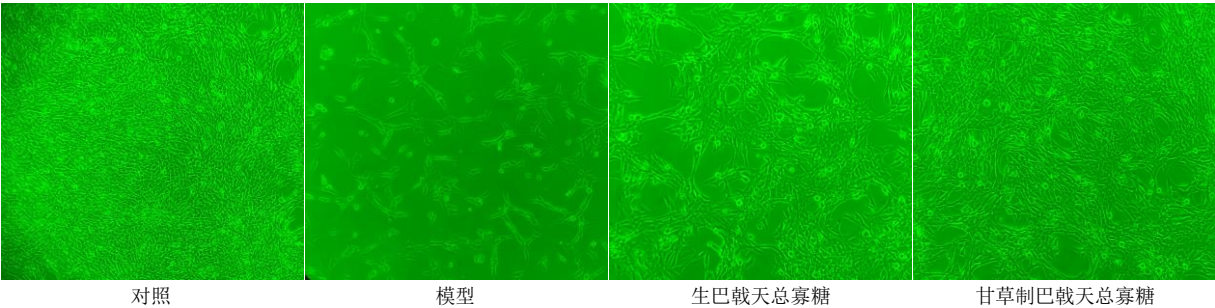


图 3 巴戟天甘草制前、后总寡糖对 TM4 细胞形态的影响 (×200)

Fig. 3 Effect of raw and processed MOR oligosaccharides on morphology of TM4 cells (× 200)

表 9 巴戟天甘草制前、后总寡糖对 H₂O₂ 诱导的 TM4 细胞氧化应激损伤模型的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 9 Effects of raw and processed oligosaccharides on H₂O₂-induced oxidative stress injury model in TM4 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	GSH-Px/(μmol·mL ⁻¹)	CAT/(U·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
对照	53.07±5.89	66.44±5.94	1.49±1.52	1.09±0.24
模型	31.73±1.86 [#]	22.41±5.78 ^{##}	0.44±1.53 ^{##}	1.78±0.47 ^{##}
生巴戟天总寡糖	53.87±8.31 [*]	67.17±1.87 ^{**}	1.62±1.22 ^{**}	1.40±0.21 [*]
甘草制巴戟天总寡糖	73.07±1.12 ^{**}	73.70±3.19 ^{**}	2.77±1.03 ^{**}	1.24±0.60 ^{**}

与对照组比较：[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较：^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ 。

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group.

3 讨论

巴戟天虽含有糖类、蒽醌类、环烯醚萜类、氨基酸类等众多活性成分，但糖类成分含量较大，可达 50%^[15]，主要包括单糖、寡糖和多糖。其中，寡糖类成分（蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖等）是巴戟天中最具代表性的成分，因其结构独特、口服无毒，是一种天然植物寡糖，具有较强的生物活性，而且与巴戟天补肾阳的传统功效密切相关^[10]。且耐斯糖的含量测定在《中国药典》2020 年版中被作为评价巴戟天饮片质量的主要评判依据，在多数巴戟天炮制工艺研究文献中，也将其选为评价指标之一^[16]。*D*-果糖和 *D*(+)-无水葡萄糖为单糖类成分，课题组曾在巴戟天炮制过程中发现^[17]，随着炮制时间的延长，巴戟天炮制品中的单糖类成分含量逐渐增加，且其与体外抗氧化自由基活性的关联度较大。故本实验选取 *D*-果糖、*D*(+)-无水葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖 6 种糖类成分作为甘草制巴戟天炮制工艺优选的控制指标成分。

实验过程中曾以 6 种糖类成分为评价指标对制

巴戟天的炮制工艺进行了单因素考察，本实验基于单因素考察结果选取甘草用量、煎煮时间、闷润时间作为考察因素，并利用 AHP-熵权法-响应面法加以优化，结果响应面预测的甘草用量与文献报道基本一致^[18]。本实验采用 AHP 和熵权法将主观赋权和客观赋权相结合，可从不同角度全面评价各指标信息，使实验结果更加科学合理。

基于多因素影响下的炮制工艺优化中，采用 BBD-RSM 可通过拟合各影响因素与综合评分之间的函数关系，建立多元二次方程；本实验结果所得出的各因素二次项极具显著性，且三维曲面图清晰显示了各因素之间的交互作用和预测的最佳工艺，指向性较强，工艺验证结果与预测值相差不大，表明该模型准确性较高，能应用于饮片炮制工艺的优化。BBD-RSM 图显示，煎煮时间与闷润时间的曲面较陡，甘草用量与闷润时间的曲面较缓。说明甘草用量、闷润时间和煎煮时间均对制巴戟天中糖类成分的含量有影响，其中煎煮时间对甘草制巴戟天糖类成分的含量影响最大，达到显著水平（ $P<0.05$ ）；甘草用量和闷润时间的影响较小。

睾丸是精子产生的重要器官,附睾是精子成熟的重要场所,附睾中的精子含有大量的多不饱和脂肪酸、蛋白质和 DNA,其易被氧化应激损伤^[19]。TM4 细胞与其相邻的细胞连接形成并维持睾丸血睾屏障结构和功能的完整性,是调控精子发生的关键体细胞,支持细胞连接功能损伤是导致雄性生殖功能障碍的主要因素之一^[20]。H₂O₂ 的氧化性很强,能够穿透细胞膜使细胞产生较多的活性氧,产生氧化应激反应,导致细胞坏死或凋亡从而引发疾病。H₂O₂ 诱导细胞氧化应激损伤模型已在各种疾病病理研究中广泛应用,且课题组前期已对造模剂 H₂O₂ 浓度、造模时间、造模方式等进行了考察。故本实验基于前期研究,采用 H₂O₂ 诱导 TM4 细胞氧化应激损伤模型,考察甘草制前、后巴戟天总寡糖对其保护作用,结果巴戟天生品与甘草制品总寡糖均具有保护 TM4 细胞氧化损伤的作用,与文献报道的巴戟天寡糖具有促进精子生成作用^[10]的结论基本一致。

本研究得出巴戟天甘草制品保护细胞氧化损伤效果优于生品,笔者推测,可能是由于巴戟天经甘草汁炮制后,糖类成分溶出增多,其免疫功能增强,通过减少活性氧的释放从而起到保护氧化损伤的作用,其具体药理作用机制有待进一步研究。

综上所述,本研究运用多指标-响应面法对甘草制巴戟天的炮制工艺进行了优选与验证,为甘草制巴戟天饮片的质量标准和开发利用提供数据支撑;探讨了甘草制前、后巴戟天总寡糖对 TM4 细胞氧化损伤的保护作用,为巴戟天甘草制的合理性和有效性提供科学依据。

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: 204.

[2] 黄清霞,覃川娴,何泽源,等. 巴戟天化学成分、药理作用及质量标志物预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(7): 251-258.

[3] Yue J H, Xia W X, Wang Y S, et al. Isolation, phytochemistry, characterization, biological activity, and application of *Morinda officinalis* How oligosaccharide: A review [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2024, 76(5): 437-461.

[4] 刘凯,马江,何新. 基于 Citespace 的巴戟天研究进展和热点可视化分析 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(10): 2399-2411.

[5] 李嘉俊,黄燕秋,赵斌,等. 巴戟天炮制历史沿革及现代研究 [J]. 现代中医药, 2024, 44(5): 10-15.

[6] 史辑,景海漪,黄玉秋,等. 巴戟天及其不同炮制品对脾肾阳虚模型大鼠的改善作用比较 [J]. 中国药房, 2016, 27(13): 1756-1758.

[7] 景海漪,史辑,崔妮,等. 巴戟天炮制前后寡糖类成分 HPLC-CAD 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(10): 1412-1417.

[8] 狄士文,周灿,廖莎,等. 不同炮制去心法对巴戟天多糖含量的影响 (I) [J]. 医药导报, 2017, 36(12): 1386-1390.

[9] Li C M, Dong J, Tian J C, et al. LC/MS/MS determination and pharmacokinetic study of iridoid glycosides monotropein and deacetylasperulosidic acid isomers in rat plasma after oral administration of *Morinda officinalis* extract [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(2): 163-168.

[10] Liu M Y, Luo Z H, Chen Z E, et al. Quality markers for processed products of *Morinda officinalis* How based on the "oligosaccharides-spectrum-effect" [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 208: 114403.

[11] 史辑,黄玉秋,耿彤彤,等. 星点设计-效应面法优选制巴戟天炮制工艺 [J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(12): 81-85.

[12] 王林海,周灿,廖莎. 基于水晶兰苷含量优选制巴戟天炮制工艺 [J]. 中国药师, 2017, 20(1): 176-178.

[13] 石双慧,王梦琳,魏晓彤,等. AHP-熵权法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选黄精酒制工艺及其炮制前后药效对比研究 [J]. 中草药, 2023, 54(14): 4467-4480.

[14] 丁平,刘梦云. 一种巴戟天炮制品寡糖组合物及其制备方法及应用: CN113768942A [P]. 2021-12-10.

[15] 田少雄,孙树周. 不同巴戟天炮制品中糖的分布与含量测定 [J]. 中国当代医药, 2011, 18(5): 42-43.

[16] 朱露林,沈姝,易晓薇,等. 不同产地及种植年限巴戟天中 6 种寡糖类成分的定量分析 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4348-4352.

[17] 刘梦云,车晓颖,刘秋怡,等. 基于质量标志物和抗氧化药效的盐巴戟天蒸制时间及特色质量标准研究 [J]. 中国药房, 2023, 34(9): 1048-1052.

[18] 李倩,朱水娣,刘硕,等. 炮制对巴戟天中蒽醌类成分的影响 [J]. 中成药, 2015, 37(6): 1284-1288.

[19] 张万生,潘晓燕,李质馨,等. 新温肾生精饮对环孢霉素致小鼠附睾组织氧化应激和精子损伤的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(4): 79-83.

[20] 杨焱娜,张长城,常言语,等. 雌激素受体 α 下调导致小鼠睾丸 TM4 支持细胞连接功能损伤的作用机制 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(9): 1718-1724.

[责任编辑 郑礼胜]