

生白术健脾有效部位及活性成分的分离鉴定

上官琨瑶¹, 尹露莹², 贾梦鑫¹, 杨 鹏², 于 猛^{2*}, 邹忠梅^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

摘 要: **目的** 探讨生白术发挥健脾作用的有效部位及化学成分。**方法** 采用“ig 番泻叶+疲劳游泳+饥饱失常”的方法复制脾虚大鼠模型, 给予生白术水提物、多糖及除糖部位治疗, 通过一般行为学特征、小肠推进率及胃内残留率、消化吸收功能、体液代谢功能、组织病理结构和神经递质等指标, 评价生白术治疗脾虚的有效部位; 进一步采用 HP-20 型大孔树脂柱色谱制备除糖部位不同体积分数乙醇洗脱组分, 通过 α -二氟甲基鸟氨酸 (difluoromethylornithine, DFMO) 诱导的大鼠小肠上皮细胞 (intestinal epithelial cell-6, IEC-6) 生长抑制模型, 评价不同浓度乙醇洗脱组分对细胞活力的影响; 最后采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 技术对有效组分进行化学成分表征, 并定向分离主要化学成分, 评估其对 DFMO 诱导的 IEC-6 细胞活力的影响。**结果** 生白术水提物及其除糖部位主要通过调节神经递质水平、促进胃肠动力、修复组织损伤和提高消化吸收能力、炎症因子水平显著改善脾虚大鼠的症状; 除糖部位中 90%乙醇洗脱组分 (CT-90E) 在 0.1~0.15 mg/L 可逆转 DFMO 所致的 IEC-6 细胞生长抑制; CT-90E 组分中的 8-表白术内酯 (12.5~100 μ mol/L)、白术内酯 II (50~100 μ mol/L)、白术内酯 I (25~50 μ mol/L) 及邻苯二甲酸 (12.5~50 μ mol/L) 可逆转 DFMO 诱导的 IEC-6 细胞生长抑制。**结论** 生白术水提物治疗脾虚药效显著, 除糖部位是其治疗脾虚的活性部位, 其中 CT-90E 组分可促进肠黏膜的修复, 而 8-表白术内酯、白术内酯 II、白术内酯 I 及邻苯二甲酸为 CT-90E 组分中修复肠黏膜的主要活性成分。

关键词: 生白术; 脾虚; 除糖部位; IEC-6; UPLC-Q-TOF/MS; 8-表白术内酯; 白术内酯 II; 白术内酯 I; 邻苯二甲酸

中图分类号: R284.1; R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)09-3058-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.09.004

Isolation and identification of active fractions and chemical components with spleen-invigorating effect from raw rhizomes of *Atractylodes macrocephala*

SHANGGUAN Kunyao¹, YIN Luying², JIA Mengxin¹, YANG Peng², YU Meng², ZOU Zhongmei²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To explore the active fractions and chemical components with spleen-invigorating effect from raw rhizomes of *Atractylodes macrocephala*. **Methods** The rat model of spleen-deficiency was replicated by the method of “ig senna leaves + fatigued swimming + abnormal hunger and satiety”, Which was treated with water extract from raw rhizomes of *A. macrocephala*, polysaccharides and non-polysaccharide parts. The effective fractions of raw rhizomes of *A. macrocephala* in treating spleen deficiency were evaluated using various indicators, including general behavioral characteristics, gastrointestinal (GI) transit rate, gastric residual rate, digestive and absorption functions, water and fluid metabolism, tissue pathological structure, and neurotransmitters of rats with spleen-deficiency. The non-polysaccharide part was subjected to chromatography on a HP-20 macroporous resin column eluted with different concentrations of aqueous ethanol. The intestine epithelial cell (IEC-6) growth inhibition model induced by α -difluoromethylornithine (DFMO) was applied to assay the cell viability of the obtained fractions. The chemical constituents in the active fraction were analyzed by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry

收稿日期: 2025-02-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82073992); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2023-I2M-2-006)

作者简介: 上官琨瑶 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为前药合成、代谢与作用机制研究。E-mail: shanguankunyao@163.com

*通信作者: 于 猛, 硕士生导师, 副研究员, 研究方向为中药代谢组学及质量评价。E-mail: myu@implad.ac.cn

邹忠梅, 博士生导师, 研究员, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: zmzou@implad.ac.cn

(UPLC-Q-TOF/MS). The main constituents were isolated and evaluated for their impact on IEC-6 cell viability induced by DFMO.

Results The water extract and non-polysaccharide part from raw rhizomes of *A. macrocephala* significantly improved the symptoms of spleen-deficiency rats, mainly by regulating neurotransmitter levels, promoting gastrointestinal motility, repairing tissue damage, enhancing digestive and absorption capabilities, and modulating inflammatory factors. The 90% ethanol-elution fraction from non-polysaccharide part (CT-90E) at concentrations of 0.1—0.15 mg/L could reverse the growth inhibition of IEC-6 cells induced by DFMO. The main components in CT-90E, including 8-epiatylenolide (12.5—100 $\mu\text{mol/L}$), atractylenolide II (50—100 $\mu\text{mol/L}$), atractylenolide I (25—50 $\mu\text{mol/L}$), and phthalic acid (12.5—50 $\mu\text{mol/L}$) could reverse the growth inhibition of IEC-6 cells induced by DFMO. **Conclusion** The water extract of raw rhizomes of *A. macrocephala* exhibits significant effect in treating spleen deficiency, with the non-polysaccharide part identified as the active part responsible for treating spleen deficiency. Among the fractions of non-polysaccharide part, CT-90E promotes the repair of intestinal mucosa, with 8-epiatylenolide, atractylenolide II, atractylenolide I, and phthalic acid identified as the main active components responsible for mucosal repair.

Keywords: raw rhizomes of *Atractylodes macrocephala* Koidz.; spleen deficiency; non-polysaccharide part; IEC-6; UPLC-Q-TOF/MS; 8-epiatylenolide; atractylenolide II; atractylenolide I; phthalic acid

脾虚是中医理论中常见的病理状态,指脾脏功能减弱,导致脾气不足、脾阳虚弱或脾血亏损,从而影响脾的运化、传输和吸收功能。脾虚的症状多种多样,包括食欲不振、消化不良、腹胀、乏力、便溏等。作为“后天之本”,脾在人体内发挥着至关重要的作用,不仅主运化水湿,还协助气血的生成与流通。脾虚的发生,往往与不良的饮食习惯、情志失调、过度劳累等因素密切相关。白术为菊科苍术属植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎,其性温,味甘、苦,具有健脾益气,燥湿利水等功效,常用于治疗脾虚食少,腹胀泄泻,为“健脾补气第一要药”。检索中国方剂数据库治疗脾虚的方剂发现,白术出现的频率位于首位^[1]。目前,已有多项研究表明,生白术具有健脾功效^[2-4],其中白术内酯I可能是其发挥健脾功效的主要化学成分^[5]。然而,生白术治疗脾虚的药效物质及作用机制尚不清楚。

现代药理研究多采用注射利血平^[6]或 ig 番泻叶^[7]等单因素造模法研究脾虚证,但此类造模方法导致模型症状单一,难以准确反映脾虚的临床表现,且成功率较低。因此,结合苦寒泻下、饥饱失常和疲劳过度的方法^[8],采用复合因素建立脾虚大鼠模型更能模拟脾虚证的表型。胃肠黏膜损伤是脾虚的主要病理变化之一,脾虚可导致大鼠小肠隐窝上皮细胞(intestinal epithelial cell, IEC-6)增殖受到抑制,影响胃肠黏膜的修复过程。发挥健脾益气作用的中药可促进 IEC-6 增殖^[9]、迁移^[10]和分化^[11],从而修复小肠黏膜。此外,多胺(如腐胺、精脒和精胺)在肠黏膜修复中发挥重要作用, α -二氟甲基鸟氨酸(difluoromethylornithine, DFMO)通过抑制多胺合

成导致细胞内多胺耗竭,从而抑制细胞生长,因此 DFMO 诱导的 IEC-6 细胞生长抑制模型可作为研究黏膜损伤修复机制的病理模型^[12]。

本研究模拟临床脾虚状态,采用复合因素建立脾虚大鼠模型,从大鼠一般体征、胃肠传输功能、生化指标及胃肠组织病理形态等确定生白术治疗脾虚的药效部位,通过 DFMO 诱导的 IEC-6 细胞生长抑制模型筛选药效部位经大孔树脂分离后的活性组分;采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术对活性组分中的化学成分进行鉴定,并定向分离主要化合物;应用 DFMO 诱导的 IEC-6 生长抑制模型对主要化学成分的活性进行验证,明确生白术发挥健脾作用的成分,为生白术的临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(SPF 级,体质量 180~220 g)购自北京维通利华实验动物有限公司,动物许可证编号 SYXK(京)2017-0020,于中国医学科学院药用植物研究所动物实验中心饲养。大鼠在室温 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度(50 $\pm$ 10)%、在光照时间为 8:00~18:00 时的环境中自由饮食饮水,适应 7 d 后开始实验。动物实验经中国医学科学院药用植物研究所实验动物伦理委员会批准(批准号 SLXD-20210824019)。

1.2 细胞

大鼠小肠隐窝上皮细胞 IEC-6 购自上海酶研生物科技有限公司。

1.3 药材与试剂

生白术饮片(批号 SBZ202005)购自安徽亳州

永刚饮片厂有限公司,产地浙江省磐安县,经安徽省中医药科学院亳州中医药研究所所长刘耀武教授鉴定为菊科植物白术 *A. macrocephala* Koidz.的根茎;番泻叶(批号 20200911)购自北京本草方源药业集团有限公司,产地云南,药材与饮片均保存于国家中药化合物库。

多潘立酮(批号 LJ2H45)购自西安杨森制药有限公司;4%多聚甲醛通用型组织固定液(批号 20201201)购自北京长惠恒远生物科技有限公司;阿拉伯胶(批号 729J022)购自北京索莱宝科技有限公司;活性炭粉(批号 C12535790)购自上海麦克林生化科技有限公司;水合氯醛(批号 H1821050)购自上海阿拉丁试剂有限公司;大鼠胃动素(motilin, MTL)、血管活性肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)、胃泌素(gastrin, GAS)、水通道蛋白 3(aquaporin 3, AQP3)、肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)酶联免疫试剂盒(批号 202112)均购自北京长惠恒远生物科技有限公司;D-木糖试剂盒(批号 20220412)购自北京索莱宝科技有限公司;无水乙醇和 95%乙醇(批号 20210520)购自天津北联精细化学品开发有限公司;磷酸(批号 216188)、丙酮(批号 20200904)购自北京市通广精细化工公司;HPLC 级乙腈、甲醇及甲酸购自美国 Fisher 公司;屈臣氏蒸馏水;二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自北京索莱宝科技有限公司(货号 D8370);DFMO 购自美国 Sigma 公司(货号 D193);腐胺(putrescine, PUT)购自美国 Sigma 公司(货号 D13208);噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)购自上海碧云天生物技术股份有限公司(货号 081020201118);DMEM(dulbecco's modified eagle medium)高糖培养基购自美国 Gibco 公司(货号 8121270);南美胎牛血清(FBS)购自德国 PAN-Biotech 公司(货号 ST30-3302),磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)购自美国 Hyclone 公司(货号 SH30256.01B);0.25%胰蛋白酶溶液(EDTA)购自美国 Gibco 公司(货号 25200-072);青链霉素混合液(100 $\times$)细胞培养专用双抗(PS)购自北京索莱宝科技有限公司(货号 P1400);重组人胰岛素(Insulin)购自北京索莱宝科技有限公司(货号 I8830)。

1.4 仪器

MSA125P-100-DU 型电子分析天平(德国

Sartorius 公司);U-2910 型双光束紫外分光光度计(日本日立公司);YF-111B 型粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司);QL-901 微型涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Infinite F50 型酶标分析仪(瑞士 Tecan 公司);SHK-III 型循环水式多用真空泵(郑州科泰实验设备有限公司);LegendMicro17R 型高速低温离心机;DHG-9070A 型电热鼓风干燥箱(上海恒科学仪器有限公司);KQ-118B 型超声振荡仪(昆山市超声仪器有限公司);R-200 型低温旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司);LGJ-185 型冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司);DZTW 型调温电热套(北京市永光明医疗仪器有限公司);-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱(美国 Thermo 公司);JXFSTPRP-CL 型全自动样品冷冻研磨仪(上海净信科技公司);RM2235 型病理切片机(德国 Leica 公司);JB-P7 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);CKX41 型倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司);MCO-15AC 型 CO_2 恒温细胞培养箱(日本 SANYO 公司);ZHJH-C1115B 型超净工作台(上海智成分析仪器制造有限公司);超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱(美国 Waters 公司,SYNAPT G2 HDMS);S0200-230V-EU 型涡旋混合仪(美国 Labnet 公司)。

2 方法

2.1 药物提取及部位的制备

2.1.1 番泻叶水提物的制备 称取番泻叶 300 g,加入 15 倍量蒸馏水,浸泡 30 min,加热回流提取 10 min,趁热过滤(12 层纱布),重复提取 3 次,合并滤液,减压浓缩至 0.8 g 生药/mL。

2.1.2 生白术水提物及不同部位的制备 称取生白术饮片 12 kg,粉碎,加 10 倍量蒸馏水,浸泡 12 h,加热回流提取 2 次,每次 2 h,趁热滤过(12 层纱布),合并滤液。取 1/10 体积滤液真空抽滤,减压浓缩后冷冻干燥,得到生白术水提物(SBZ),得率 68.3%。

取上述剩余滤液,减压浓缩至 0.2 g 生药/mL,用 95%乙醇进行醇沉,醇沉终体积分数为 70%,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h 后真空抽滤,反复醇沉 2 次,合并抽滤后的醇溶液,减压浓缩,冷冻干燥,即为生白术除糖部位,得率 21.4%;醇沉得到的沉淀依次用丙酮、无水乙醇冲洗 3 次,冷冻干燥,得到生白术多糖部位,得率为 46.8%。

2.1.3 生白术除糖部位不同组分的制备 取上述

生白术除糖部位 2 400 g 溶于蒸馏水中, 经过 HP-20 型大孔树脂, 依次用蒸馏水及 30%、60%、90%乙醇洗脱, 每个部位洗脱 6 个柱体积, 洗脱液经减压浓缩, 冷冻干燥, 得到 4 个组分 CT-W、CT-30E、CT-60E 和 CT-90E, 得率分别为 23.04%、0.81%、0.19%和 0.13%。

2.2 脾虚动物实验

2.2.1 脾虚大鼠模型的复制 将 48 只 SD 大鼠随机分为对照组 ($n=8$) 和脾虚模型组 ($n=40$)。脾虚模型的建立分为 2 个阶段。第 1 阶段: 模型组大鼠 ig 番泻叶提取物, 每日 1 次 (8.0 g 生药/kg), 连续 10 d; 第 2 阶段: 11~17 d, 每日游泳至疲劳 1 次, 水温 (22 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ ^[13], 且给予饥饱失常刺激 (每日 9:00 时给食, 次日 9:00 时停食)。造模 17 d 后, 乙醚麻醉大鼠, 眼眶取血, 测定大鼠血清 D-木糖。根据大鼠体质量、粪便状态、饮食饮水量及血清 D-木糖含量等指标判断脾虚模型是否成功。对照组大鼠给予等体积生理盐水, 自由饮食。

2.2.2 动物分组及给药 在治疗期间 (14 d), 将 40 只模型组大鼠分为 5 组: 模型组、阳性药多潘立酮组 (5 mg/kg) 和生白术水提物组 (4.32 g 生药/kg)、多糖组 (4.32 g 生药/kg)、除糖组 (4.32 g 生药/kg)。连续给药 14 d, 每日 1 次。给药期间, 除对照组外, 其余各组大鼠每天疲劳游泳及饥饱失常。对照组大鼠给予相同体积的蒸馏水。

2.2.3 动物取材及样本预处理 所有大鼠分别于末次给药后禁食不禁水 12 h, 麻醉前 1 h 每只大鼠 ig D-木糖溶液 (10 mL/kg), 随后 ip 4%水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血, 置于含肝素钠抗凝剂的采血管和普通采血管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 3 500 r/min 离心 20 min, 取上清分装, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存。剖取大鼠胸腺、脾脏组织, 称定质量后置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存。剖取大鼠小肠、胃及结肠组织, 用生理盐水冲净内容物, 滤纸吸干, 分为 2 份, 一份放于冻存管中, 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 用于试剂盒检测; 另一份置于 4%多聚甲醛组织固定液中固定, 用于苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色。

2.2.4 游泳时间测定 于实验前 (0 d)、造模后 (17 d)、给药后 (31 d), 将大鼠置于 (22 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 水温的塑料缸中进行游泳时间测定。水深为 60 cm, 记录大鼠入水后鼻尖没入水中且连续 10 s 无法浮出水面的时间。

2.2.5 肠道推进运动及胃排空运动 末次给药后

各组大鼠禁食不禁水 12 h, ig 2 mL 10%活性炭溶液, 20 min 后麻醉, 取幽门到盲肠段小肠, 测定小肠推进率。取胃, 称量胃全质量, 沿胃大弯剪开, 用生理盐水清洗胃内容物后, 称量胃净质量, 胃全质量减去胃净质量即为胃内残留物质量。

小肠推进率 = 活性炭推进距离 / 小肠总长度

胃内残留率 = 胃内残留物质量 / 活性炭溶液质量

2.2.6 D-木糖、神经递质、炎症因子的测定 按试剂盒操作说明书测定各组大鼠血清或血浆中 D-木糖、MTL、GAS、VIP、TNF- α 、IL-10 水平。

2.2.7 AQP3 含量的测定 (1) 将结肠组织样本用 PBS 冲洗。(2) 将组织块称定质量, 记录后剪碎成小块。(3) 将组织按 1:9 的比例加入预冷的 PBS 匀浆, 匀浆时保持 4 $^{\circ}\text{C}$ 。(4) 吸取匀浆液到离心管, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 按照血液试剂盒指标的方法进行生化指标的检测。

2.2.8 脏器系数 解剖取脾脏和胸腺, 生理盐水洗净后称定质量, 计算脾脏指数和胸腺指数^[14]。

脾脏指数 = 脾脏质量 / 体质量

胸腺指数 = 胸腺质量 / 体质量

2.2.9 胃和小肠组织病理变化观察 实验结束后, 解剖取胃和小肠, 于 4%多聚甲醛溶液中固定, 进行 HE 染色, 于显微镜下观察大鼠胃和小肠的病理改变。

2.3 IEC-6 细胞实验

2.3.1 细胞培养 IEC-6 细胞培养于含 10% FBS、1% PS 和 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素的 DMEM 培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的恒温培养箱中培养 48~72 h, 观察细胞生长情况, 当细胞生长至对数生长期时, 即可进行传代。

2.3.2 培养基及药物的制备 DMEM 完全培养基 (cDMEM): DMEM 空白培养基含 10% FBS、1% PS 和 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素。含 0.5% FBS 的培养基: DMEM 空白培养基含 0.5% FBS、1% PS 和 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素。MTT 由 PBS 配制成 5 mg/mL MTT 溶液, 室温避光溶解, 滤过除菌后分装, 冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。DFMO 由 PBS 配制浓度为 100 mmol/L 的母液, 阳性药 PUT 由 DMSO 配制浓度为 20 mmol/L 的母液, 受试药使用 DMSO 将其溶解配制成质量浓度为 100 mg/mL 的 CT-W、CT-30E、CT-60E、CT-90E 母液, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内密封保存。各受试药由 PBS 溶液稀释成所需浓度, 每组 DMSO 终含量均为 0.1%, 药物现配现用。

2.3.3 造模时间的确定 取对数生长期的 IEC-6 细

胞,以 5×10^4 个/mL 的细胞密度接种至 96 孔细胞培养板内,置于培养箱培养 24 h 后弃去培养液 cDMEM。设置对照组、模型组和阳性药组腐胺,其中对照组每孔加入不含药液及造模剂的培养液,模型组和阳性药组每孔同时加入含终浓度 2.5 mmol/L 的造模剂 (DFMO),阳性药组加入含终浓度 20 μ mol/L PUT 的培养液,每组设置 5 个复孔。分别培养 8、24、48 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 10 μ L,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 4 h 后,加入 150 μ L DMSO,振荡混匀 10 min,使用酶标仪于 492 nm 波长下检测各组吸光度 (*A*) 值。

2.3.4 生白术不同极性组分及主要化学成分的细胞毒性测定及对细胞增殖的影响 (DFMO 负荷实验) 在细胞毒性实验中,将处于对数生长期的 IEC-6 细胞以 5×10^4 个/mL 的细胞密度接种于 96 孔板中,使用 cDMEM 于培养箱培养 24 h 后弃去培养液。设置不同实验组:对照组每孔加入不含药液及造模剂的培养液,阳性药组 (PUT) 加入含终浓度 20 μ mol/L PUT 的培养液,不同极性组分 (CT-W、CT-30E、CT-60E、CT-90E) 受试药组加入含终质量浓度 12.5、6.25、0.625、0.312 和 0.156 mg/mL 的药物培养液,CT-90E 主要成分 (白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、8-表白术内酯、邻苯二甲酸和白术内酰胺) 受试药组加入 100 μ L 含不同终浓度的药物培养液,每组设 5 个复孔,培养 48 h 后,应用 MTT 法于 492 nm 波长下检测各组 *A* 值。

排除药物对细胞的毒性作用后,进行 DFMO 负荷实验。与细胞毒性实验相比,增加模型组,模型组和给药组每孔同时加入含终浓度 2.5 mmol/mL DFMO 的培养液,每组设 5 个复孔,培养 48 h 后,应用 MTT 法于 492 nm 波长下检测各组 *A* 值。

2.4 CT-90E 中化学成分分析

2.4.1 色谱条件 采用 Waters ACQUITY UPLC 系统色谱柱为 CORTECS UPLC T3 色谱柱 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.6 μ m),流动相为含 0.1% 的甲酸水 (A) - 乙腈 (B),梯度洗脱: 0~1 min, 30%~40% B; 1~2 min, 40%~45% B; 2~3 min, 45%~46% B; 3~4 min, 46%~48% B; 4~6 min, 48%~50% B; 6~9 min, 50%~70% B; 9~10 min, 70%~80% B; 10~12 min, 80%~30% B; 体积流量 0.3 mL/min,柱温 40 $^{\circ}$ C,样品室温度 20 $^{\circ}$ C,进样 5 μ L。

2.4.2 质谱条件 采用 Waters SYNAPT G2 HDMS 系统,以氮气作为雾化、锥孔气;电喷雾电离 (ESI):

正、负离子模式;飞行管检测模式: W 型;毛细管电压: 正离子模式 3.0 kV,负离子模式 2.3 kV;锥孔电压 40 V;提取锥孔电压 5 V;离子源温度 100 $^{\circ}$ C;脱溶剂气温度 400 $^{\circ}$ C;反向锥孔气流: 50 L/h;脱溶剂气流 600 L/h;扫描时间 1 s;扫描时间间隔 0.15 s;质荷比范围 *m/z* 50~1 200;数据采集模式: continuum;灵敏性: normal;动态范围: extended;数据采集过程中采用 2 ng/L 的亮氨酸-脑啡肽溶液进行实时精确质量校正 (正离子模式: *m/z* 556.2771,负离子模式: *m/z* 554.2615)。

2.5 CT-90E 中主要成分分离鉴定

CT-90E (3 g) 进行硅胶柱色谱分离,以石油醚-醋酸乙酯 (100:0~0:100) 梯度洗脱,通过 TLC 合并相似成分得到 4 个流分 (Fr. A~D)。经 UPLC-Q-TOF/MS 检测后,确定目标成分所在流分。Fr. A (1.5 g) 进行硅胶柱色谱分离,以石油醚-醋酸乙酯 (100:0~0:100) 梯度洗脱,通过 TLC 合并相似成分得到 5 个亚流分 (Fr. A.1~A.5),Fr. A.1 经过重结晶方法得化合物 **41** (21 mg),Fr. A.2 经过重结晶方法得化合物 **18** (30 mg),Fr. A.4 经过重结晶方法得化合物 **30** (10 mg)。Fr. B (500 mg) 通过半制备 HPLC (t_R =22 min, 80%乙腈) 得化合物 **28** (15 mg)。Fr. D (500 mg) 进行 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱,以氯仿-甲醇 (1:1) 为溶剂洗脱,得到 3 个亚流分 (Fr. D.1~D.3)。Fr. D.1 通过半制备 HPLC (t_R =35 min, 76%乙腈) 得化合物 **46** (8 mg)。Fr. D.3 通过半制备 HPLC (60%乙腈) 得化合物 **20** (t_R =38 min, 11 mg)。

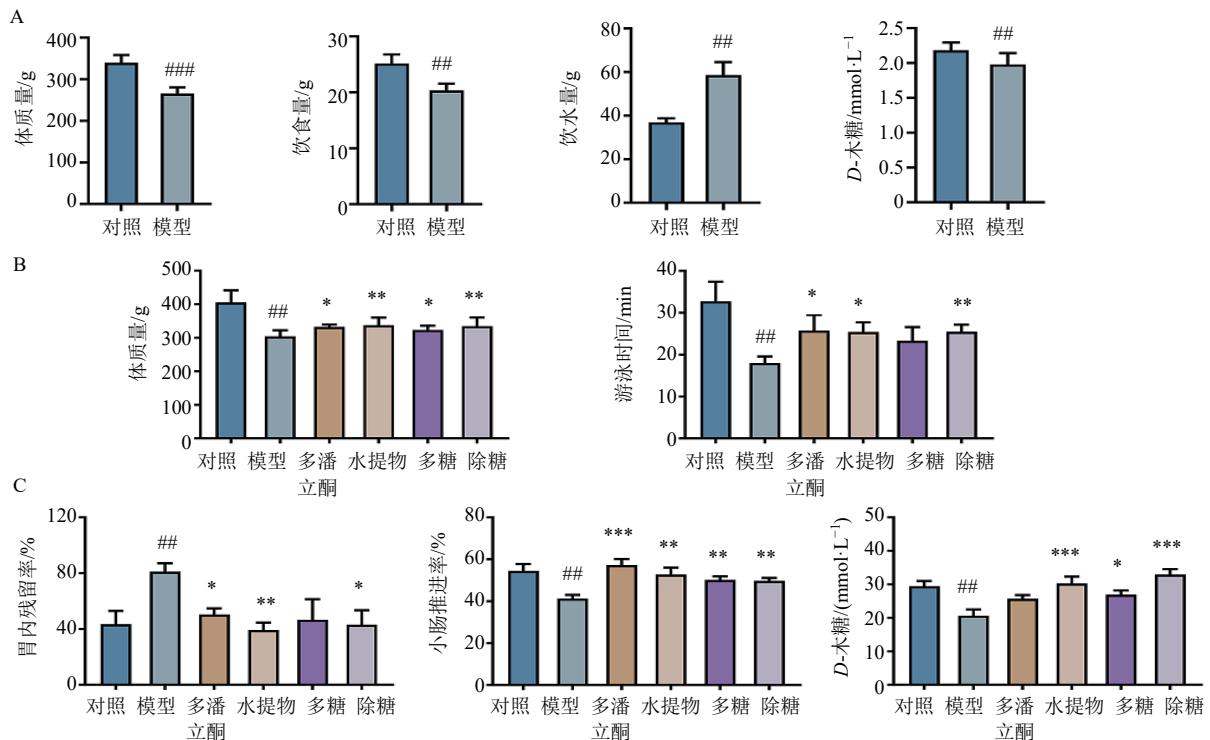
2.6 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 5 统计软件进行数据分析,组间两两比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 代表组间具有统计学差异,且差异具有显著性统计学意义。

3 结果

3.1 生白术水提物及不同部位健脾作用比较

3.1.1 一般体征及胃肠功能 参照文献方法^[8]采用“番泻叶+疲劳游泳+饥饱失常”三因素复合造模的方法复制脾虚大鼠模型。造模 17 d 后,大鼠出现毛发干枯、倦怠懒动、消瘦、虚弱、弓背、眯眼、大便溏泄、小便赤黄等症状。如图 1-A 所示,与对照组相比,模型组大鼠体质量、饮食量、血清 *D*-木糖含量均显著降低 ($P < 0.01$),饮水量显著增多 ($P <$



A-“番泻叶+饥饿失饱+疲劳游泳”的造模方法对大鼠体质量、饮食饮水量、D-木糖含量的影响；B-给药后大鼠体质量及游泳时间；C-给药后大鼠血清 D-木糖含量、小肠推进率及胃内残留率；与对照组相比：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ ；与模型组相比：^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

A-effects of “senna leaf + hunger and satiation disorder + fatigue swimming” modeling method on body weight, diet and water intake, D-xylose content of rats B-body weight and swimming time of rats after administration C-serum D-xylose content, small intestine thrust rate and gastric residual rate of rats after administration; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

图 1 生白术水提取物、多糖部位及除糖部位对脾虚大鼠一般特征及胃肠吸收和运动功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

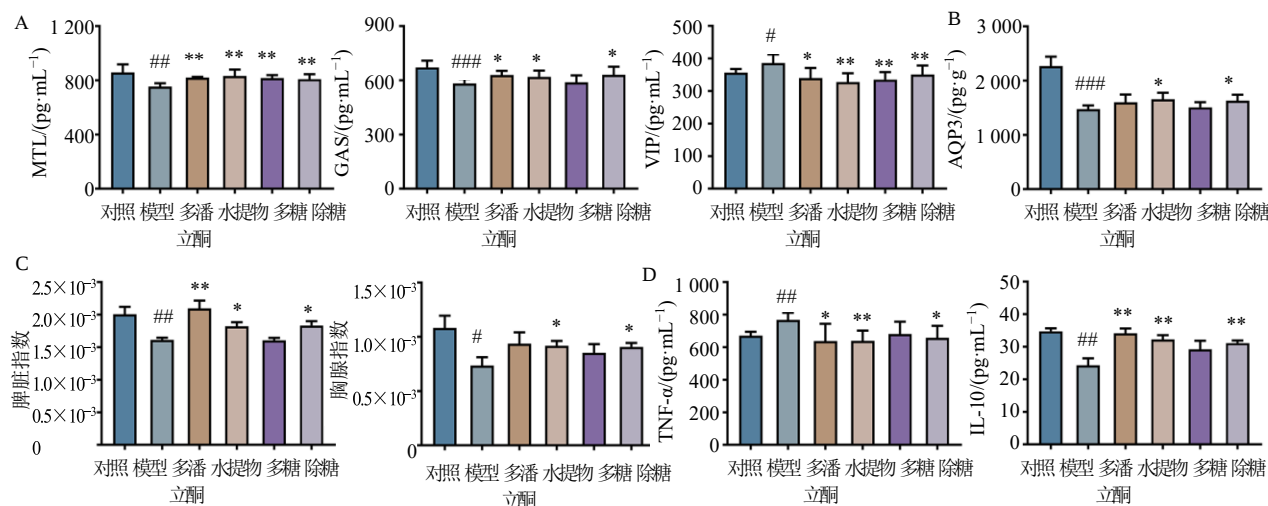
Fig. 1 Effects of water extract, polysaccharide part and non-polysaccharide part from raw rhizomes of *A. macrocephala* on general characteristics, gastrointestinal absorption and motor function of rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

0.01)，表明脾虚模型大鼠复制成功。

脾虚大鼠分别给予生白术水提取物、多糖部位、除糖部位治疗 14 d 后，如图 1-B 所示，与对照组大鼠相比，模型组大鼠的体质量和游泳时间显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组相比，生白术水提取物组和除糖组大鼠的体质量和游泳时间均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，药效和阳性药相当；多糖组大鼠体质量显著升高 ($P < 0.05$)，但游泳时间无明显改善。如图 1-C 所示，与对照组相比，脾虚模型组大鼠血清 D-木糖含量及小肠推进率显著降低 ($P < 0.01$)，胃内残留率显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组相比，生白术水提取物组和除糖组均能显著增加脾虚大鼠血清 D-木糖含量 ($P < 0.001$) 及小肠推进率 ($P < 0.05$)，降低大鼠胃内残留率 ($P < 0.05$ 、 0.01)。多糖组能够显著增加大鼠血清 D-木糖含量和小肠推进率 ($P < 0.05$ 、 0.01)，而对脾虚大鼠胃内高残留率有降低趋势，但无统计学意义。阳性药多潘立酮能够显著降低脾虚

大鼠的胃内残留率 ($P < 0.05$)，增加小肠推进率 ($P < 0.001$)，但对血清 D-木糖含量无改善作用。结果表明，生白术水提取物、多糖部位及除糖部位均可改善脾虚大鼠的一般体征及胃肠吸收和运动功能，且除糖部位药效显著优于多糖部位，与阳性药多潘立酮和生白术水提取物相当。

3.1.2 对脾虚大鼠生化指标的影响 MTL、GAS 是调节胃肠功能的兴奋性神经递质，可引起胃强烈收缩和小肠明显的蠕动。VIP 是胃肠抑制性神经递质之一，具有松弛胃肠道平滑肌、抑制胃肠道蠕动的的作用。AQP3 参与肠道内水液的分泌与重吸收，其含量降低可引起肠道水液重吸收障碍，从而导致大便溏泄。如图 2-A 和 2-B 所示，与对照组相比，模型组大鼠血清 MTL、GAS 水平及结肠 AQP3 含量显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)，血浆 VIP 水平显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组相比，水提取物组和除糖组可显著升高脾虚大鼠血清 MTL 水平 ($P < 0.01$)、



A-神经递质水平; B-水通道蛋白水平; C-脏器系数; D-炎症因子水平; 与对照组相比: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组相比: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。

A-neurotransmitter level; B-aquaporin level; C-organ coefficient; D-inflammatory factor level; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

图 2 生白术水提取物、多糖部位及除糖部位对脾虚大鼠生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effects of water extract, polysaccharide part and non-polysaccharide part from raw rhizomes of *A. macrocephala* on biochemical index in rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

GAS 水平 ($P < 0.05$) 和结肠 AQP3 含量 ($P < 0.05$), 降低血浆 VIP 含量 ($P < 0.01$), 与阳性药多潘立酮组相当; 多糖组可显著升高脾虚大鼠血清 MTL 含量 ($P < 0.01$), 降低血浆 VIP 含量 ($P < 0.01$), GAS 和 AQP3 含量有升高趋势, 但无统计学意义。结果表明, 生白术水提取物及除糖部位对脾虚大鼠神经递质和水通道蛋白水平均有调节作用。

如图 2-C 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠脾脏系数和胸腺系数显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 血清中 TNF- α 含量显著升高 ($P < 0.01$), IL-10 含量显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 水提取物组和除糖组均可显著改善上述指标, 多糖组则无显著性改善作用。结果表明, 生白术水提取物及其除糖部位均有助于增强脾虚大鼠的免疫功能, 多糖部位无显著改善效果。

3.1.3 对脾虚大鼠胃肠道组织病理形态的影响
如图 3-A 所示, 对照组大鼠胃黏膜结构正常, 层次清楚, 未见明显的病理变化; 模型组大鼠胃黏膜表面上皮细胞出现脱落, 浅层血管扩张出血, 水肿明显, 局灶性黏膜浅层坏死, 并出现炎性浸润。给药治疗后, 与模型组相比, 生白术水提取物组、多糖组、除糖组及多潘立酮组大鼠胃黏膜损伤有不同程度的减轻。

如图 3-B 所示, 对照组大鼠小肠黏膜完整, 上

皮细胞排列整齐, 未见炎性浸润; 模型组大鼠小肠绒毛排列紊乱, 上皮细胞脱落, 肠腺减少, 出现少量炎性浸润; 给药治疗后, 与模型组相比, 各给药组小肠绒毛相对完整, 基本恢复正常, 说明生白术水提取物、多糖部位、除糖部位及多潘立酮均对修复肠道黏膜及改善肠道炎性病理有良好效果。

3.2 生白术除糖部位不同组分对 DFMO 诱导 IEC-6 生长抑制的影响

如图 4-A 所示, 诱导 8 h 时, 模型组未观察到显著抑制作用; 而诱导 24、48 h 后, DFMO 的抑制作用显著增强, 其中 48 h 时的抑制作用更加明显。阳性药腐胺在 24、48 h 拮抗 DFMO 的作用显著, 且 48 h 时改善作用更加明显。因此本实验选择造模时间为 48 h。

采用不同质量浓度的 CT-W、CT-30E、CT-60E、CT-90E 处理 IEC-6 细胞 48 h 后进行 MTT 检测, 结果如图 4-B 所示, CT-W 部位在质量浓度低于 12.5 mg/L 时对正常 IEC-6 细胞无毒性, CT-30E 和 CT-90E 在低于 6.25 mg/L 时对正常 IEC-6 细胞无毒性, 而 CT-60E 在低于 0.156 mg/L 时对正常 IEC-6 细胞无毒性, 因此选择 0.10、0.125、0.15 mg/L 质量浓度对 DFMO 诱导 IEC-6 生长抑制模型进行活性对比筛选。

如图 4-C 所示, 与对照组相比, 模型组细胞增

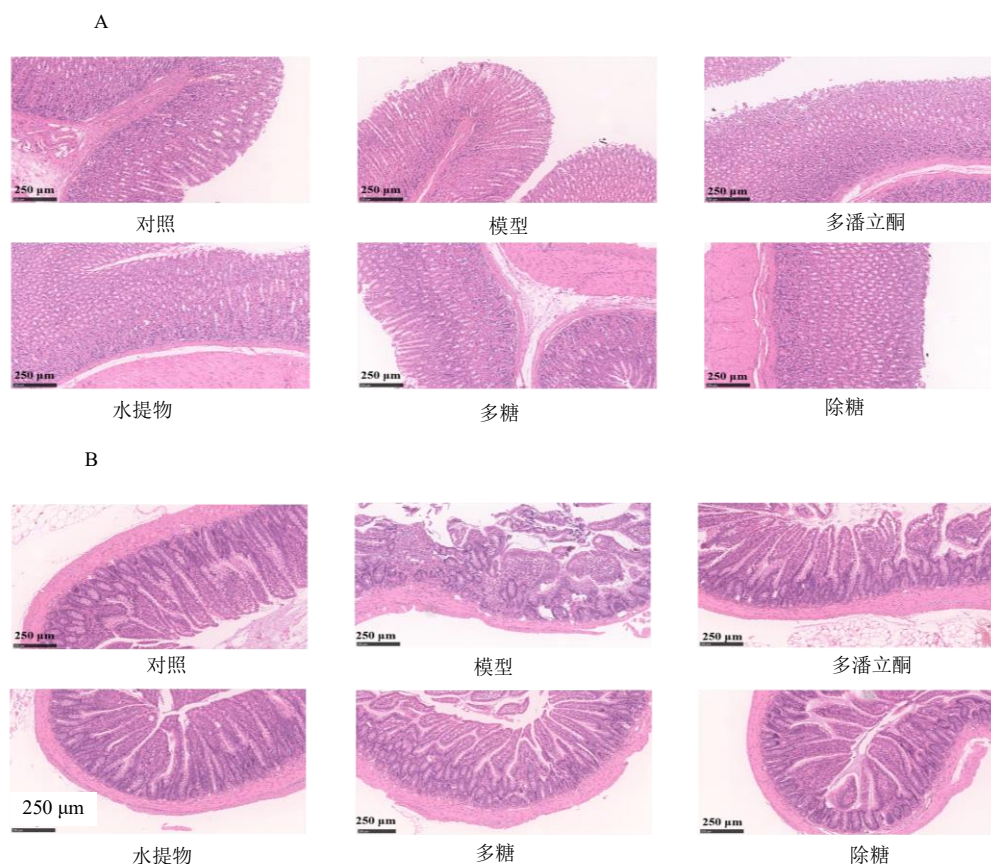


图 3 生白术水提物、多糖部位及除糖部位对脾虚大鼠胃 (A) 及小肠 (B) 组织病理形态的影响 (×100)

Fig. 3 Effect of water extract, polysaccharide part and non-polysaccharide part from raw rhizomes of *A. macrocephala* on pathological changes of gastric (A) and small intestinal (B) tissue in rats with spleen deficiency (×100)

殖被显著抑制,说明 DFMO 生长抑制模型建立成功。选择 0.15、0.125、0.10 mg/L 对生白术除糖部位的不同极性组分进行药效筛选,结果显示,CT-90E 组分在质量浓度为 0.1~0.15 mg/L 时,可逆转 DFMO 所致的 IEC-6 细胞生长抑制,效果优于其他组分。

3.3 应用 UPLC-Q-TOF/MS 方法鉴定 CT-90E 中的化学成分

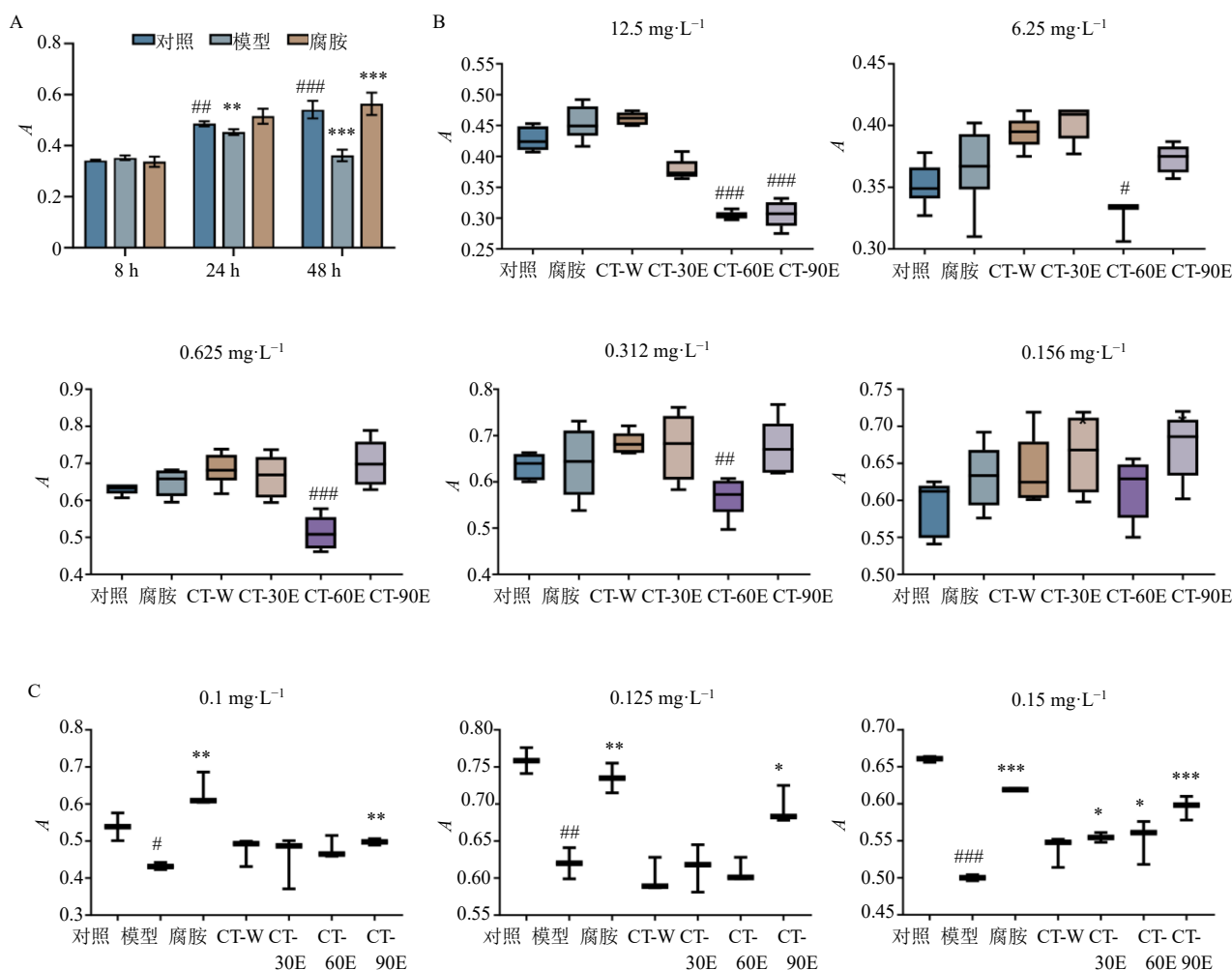
采用优化的 UPLC-Q-TOF/MS 色谱质谱条件,对 CT-90E 的化学成分进行定性分析,得到的基峰图如图 5 所示。通过保留时间、精确相对分子量、多级质谱碎片离子,以及与数据库 (Pubchem、MassBank 等) 进行比对,最终鉴定了 44 个化合物的结构 (表 1),包括倍半萜类 19 个、寡糖类 6 个、脂肪酸类 5 个、磷脂类 2 个、黄酮类 1 个、香豆素类 1 个、氨基酸类 2 个、其他类 8 个。

3.4 CT-90E 中主要化合物的分离和结构鉴定

在 UPLC-Q-TOF/MS 的引导下,采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、半制备 HPLC 及

重结晶等多种分离方法,对 CT-90E 中相对含量较高的成分进行分离纯化,得到 6 个单体成分 (“2.5”项下化合物),对应表 1 中的编号分别为化合物 18、20、28、30、41、46,并利用波谱解析和理化性质等对化合物的结构进行鉴定,见图 6。

化合物 18: 白色粉末,溶于二氯甲烷,紫外 254 nm 下显示为暗斑,10%浓硫酸乙醇溶液加热显紫红色 (105 °C),HR-ESI-MS m/z : 249.138 0 $[M+H]^+$ (计算值 249.148 6, $C_{15}H_{21}O_3$),推测分子式为 $C_{15}H_{20}O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 1.57~1.52 (1H, m, H-1a), 1.30 (1H, td, $J = 13.0, 4.9$ Hz, H-1b), 1.68~1.65 (2H, m, H₂-2), 2.36 (1H, ddt, $J = 13.2, 4.3, 1.9$ Hz, H-3a), 2.04~2.01 (1H, m, H-3b), 1.92~1.88 (1H, m, H-5), 2.67 (1H, dd, $J = 13.1, 3.2$ Hz, H-6a), 2.41 (1H, td, $J = 13.1, 1.6$ Hz, H-6b), 2.22 (1H, d, $J = 13.4$ Hz, H-9a), 1.48 (1H, d, $J = 13.4$ Hz, H-9b), 1.76 (3H, d, $J = 1.4$ Hz, H₃-13), 1.02 (3H, s, H₃-14), 4.86 (1H, brd, $J = 1.6$ Hz, H-15a), 4.64 (1H, brd, $J = 1.6$ Hz,



A-造模时间对正常 IEC-6 细胞的生长抑制作用; B-细胞毒性作用; C-细胞增殖作用; 与对照组相比: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; CT-W-除糖部位的水洗脱组分, CT-30E-除糖部位的 30%乙醇洗脱组分, CT-60E-除糖部位的 60%乙醇洗脱组分, CT-90E-除糖部位的 90%乙醇洗脱组分。

A-growth inhibition effect of modeling time on normal IEC-6 cells; B-cytotoxicity effect; C-cell proliferation effect: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs normal group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group; CT-W-water-elution fraction from non-polysaccharide part, CT-30E-30% ethanol-elution fraction from non-polysaccharide part, CT-60E-60% ethanol-elution fraction from non-polysaccharide part, CT-90E-90% ethanol-elution fraction from non-polysaccharide part.

图 4 生白术除糖不同极性组分对 DFMO 诱导 IEC-6 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of different polarity components from non-polysaccharide part from raw rhizomes of *A. macrocephala* on viability of IEC-6 cells induced by DFMO ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

H-15b); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 42.4 (C-1), 23.5 (C-2), 37.1 (C-3), 150.2 (C-4), 52.8 (C-5), 25.6 (C-6), 163.1 (C-7), 105.5 (C-8), 52.1 (C-9), 37.7 (C-10), 122.5 (C-11), 174.5 (C-12), 8.1 (C-13), 17.1 (C-14), 107.1 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **18** 为白术内酯III。

化合物 **20**: 白色粉末, 溶于二氯甲烷, 紫外 254nm 下显示为暗斑, 10%浓硫酸乙醇溶液加热显棕色, HR-ESI-MS m/z : 230.153 2 [M+H]⁺ (计算值

230.154 5, C₁₅H₂₀NO), 推测分子式为 C₁₅H₁₉NO。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 2.31 (1H, m, H-1a), 2.04 (1H, ddd, $J = 13.0, 12.9, 5.4$ Hz, H-1b), 1.64 (2H, m, H-2), 2.36 (1H, ddt, $J = 13.3, 3.8, 2.1$ Hz, H-3a), 1.69 (1H, m, H-3b), 1.57 (1H, m, H-5), 2.63 (1H, dd, $J = 16.5, 3.8$ Hz, H-6a), 2.46 (1H, dd, $J = 16.5, 15.3$ Hz, H-6b), 5.48 (1H, s, H-9), 1.87 (3H, d, $J = 1.9$ Hz, H₃-13), 0.90 (3H, s, H₃-14), 4.62 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-15a), 4.88 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-15b); ¹³C-NMR (150

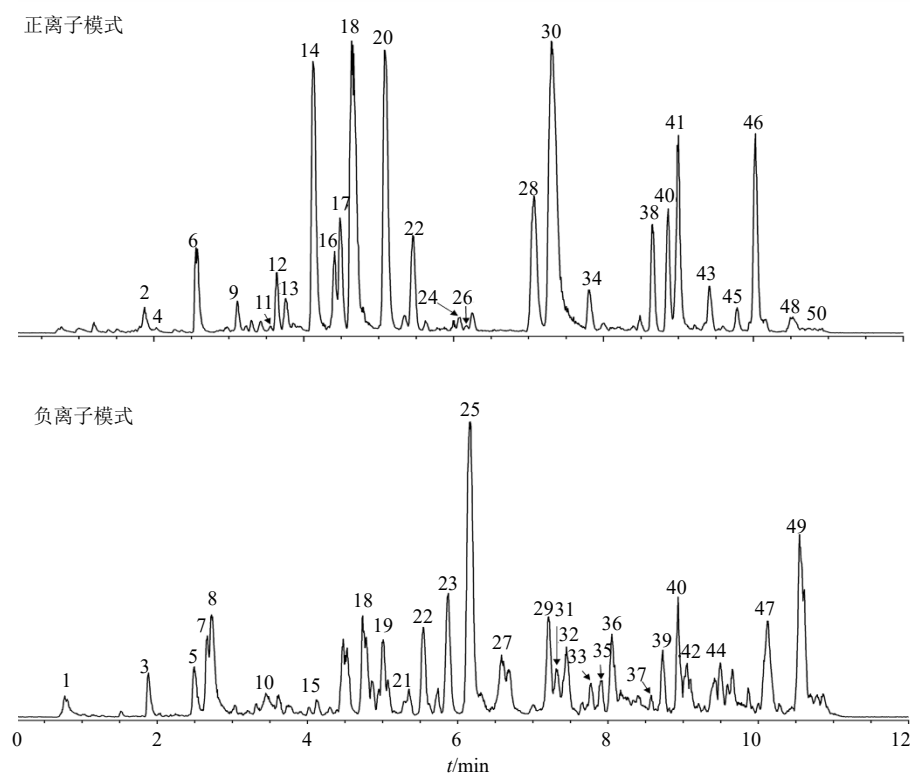


图 5 基于 UPLC-Q-TOF/MS 的生白术 CT-90E 组分 BPI 色谱图

Fig. 5 BPI chromatograms of CT-90E fraction from raw rhizomes of *A. macrocephala* based on UPLC-Q-TOF/MS method

表 1 UPLC-Q-TOF/MS 鉴定 CT-90E 中的化学成分

Table 1 Chemical components in CT-90E identified by UPLC-Q-TOF/MS

峰号	t_R/min	化合物名称	分子式	离子模式	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)
1	0.77	麦芽七糖	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{36}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1151.376 1	1151.372 5	3.1
2	1.87	木犀草素	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	287.056 3	287.055 6	2.4
3	1.88	二水合米屈肼	$\text{C}_6\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	181.125 1	181.126 7	-8.8
4	2.03	十四烷基柠檬酸	$\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_7$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	389.254 9	389.253 9	2.6
5	2.49	4,6-二羟基-3,3a-二氢白术烯内酯 III	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	281.138 3	281.138 9	-2.1
6	2.56	7-羟基香豆素	$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	163.041 3	163.039 5	-3.4
7	2.67	4,6-二羟基-3,3a-二氢白术烯内酯 III 异构体	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	281.138 3	281.138 9	-2.1
8	2.72	6,9-二羟基-3,3a-二氢白术烯内酯 III	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	281.138 3	281.138 9	-2.1
9	3.11	6-羟基白术内酯 I	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	249.149 4	249.149 1	1.2
10	3.44	3,3a-二氢白术内酯 III 异构体	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	249.147 4	249.149 1	-6.8
11	3.55	3 β -羟基苍术酮	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	233.152 7	233.154 2	-6.4
12	3.64	赖氨酸正亮氨酸	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	276.194 0	276.192 3	6.2
13	3.76	白术内酯 III 异构体	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	231.138 9	231.138 5	1.7
14	4.12	3,3a-二氢白术内酰胺	$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	232.171 4	232.170 1	5.6
15	4.12	3,3a-二氢白术内酯 III	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	249.147 4	249.149 1	-6.8
16	4.41	未鉴定成分	—	$[\text{M}+\text{H}]^+$	318.208 9	—	—
17	4.48	(2S,5R)-2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]噁烷-3,4,5-三醇	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{NO}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	274.179 5	274.180 7	-4.4
18	4.64	白术内酯 III*	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$	231.138 9	231.138 5	1.7
19	5.01	3,3a-二氢白术内酯 III 异构体	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	249.147 4	249.149 1	-6.8

表 1 (续)

编号	t _R /min	化合物名称	分子式	离子模式	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差 (×10 ⁻⁶)
20	5.08	白术内酰胺*	C ₁₅ H ₁₉ NO	[M+H] ⁺	230.155 2	230.154 5	3.0
21	5.35	十四烷基琥珀酸异构体	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	[M-H] ⁻	313.237 1	313.237 9	-2.6
22	5.45	(E)-胡椒脂素	C ₁₉ H ₂₅ NO ₃	[M+H] ⁺	316.190 0	316.191 3	-4.1
	5.54		C ₁₉ H ₂₅ NO ₃	[M-H] ⁻	314.175 5	314.175 6	-0.3
23	5.88	十四烷基琥珀酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	[M-H] ⁻	313.237 8	313.237 9	-0.3
24	6.00	3β-乙酰氧基-白术内酯 I	C ₁₇ H ₂₁ O ₄	[M+H] ⁺	289.143 7	289.144 0	-1.0
25	6.16	十四烷基琥珀酸异构体	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	[M-H] ⁻	313.237 1	313.237 9	-2.6
26	6.17	苍术酮	C ₁₅ H ₂₀ O	[M+H] ⁺	217.157 6	217.159 2	-7.4
27	6.58	(2R)-2-氨基-5-羟基戊酸	C ₁₀ H ₂₂ N ₂ O ₆	[M-H] ⁻	265.140 1	265.140 0	0.4
28	7.07	8-表白术内酯*	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	[M+H] ⁺	233.152 7	233.154 2	-6.4
29	7.21	异戊酰基蔗糖异构体	C ₃₂ H ₅₄ O ₁₅	[M+HCOO] ⁻	723.349 4	723.343 9	7.6
30	7.30	白术内酯 II*	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	[M+H] ⁺	233.152 7	233.154 2	-6.4
31	7.31	异戊酰基蔗糖异构体	C ₃₂ H ₅₄ O ₁₅	[M+HCOO] ⁻	723.345 9	723.343 9	2.8
32	7.45	2-(3-羟基-4a-甲基-8-亚甲基八氢萘-2-亚基)-丙酸酯	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	[M-H] ⁻	249.147 4	249.149 1	-6.8
33	7.77	15,16-二羟基十八烷酸	C ₁₈ H ₃₆ O ₄	[M-H] ⁻	315.255 2	315.253 5	5.3
34	7.80	溶血磷脂酰胆碱 (18:2/0:0)	C ₂₆ H ₅₁ NO ₇ P	[M+H] ⁺	520.337 0	520.340 3	-6.4
35	7.92	未鉴定成分	—	[M-H] ⁻	330.207 5	—	—
36	8.05	异戊酰基蔗糖	C ₃₂ H ₅₄ O ₁₅	[M+HCOO] ⁻	723.345 9	723.343 9	2.8
37	8.17	异戊酰基蔗糖异构体	C ₃₂ H ₅₄ O ₁₅	[M+HCOO] ⁻	723.345 9	723.343 9	2.8
38	8.65	溶血磷脂酰胆碱 (16:0/0:0)	C ₂₄ H ₅₁ NO ₇ P	[M+H] ⁺	496.340 5	496.340 3	0.4
39	8.73	未鉴定成分	—	[M-H] ⁻	378.206 7	—	—
40	8.86	(2S,3S)-2-[[[(2S,3S)-2-[(2S,3R)-2-氨基-3-羟基丁酰基]氨基]-3-甲基戊酰基]氨基]-3-甲基戊酸	C ₁₆ H ₃₁ O ₅ N ₃	[M+H] ⁺	346.234 6	346.234 2	1.2
	8.93			[M-H] ⁻	344.221 6	344.218 5	9.0
41	9.00	白术内酯 I*	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	[M+H] ⁺	231.138 9	231.138 5	1.7
42	9.10	异戊酰基蔗糖异构体	C ₃₂ H ₅₄ O ₁₅	[M+HCOO] ⁻	723.345 9	723.343 9	2.8
43	9.41	(2S,5R)-2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]噁烷-3,4,5-三醇	C ₁₄ H ₃₃ NO ₈	[M+H] ⁺	344.226 0	344.228 4	-7.0
44	9.49	未鉴定成分	—	[M-H] ⁻	342.201 7	—	—
45	9.78	白术内酯 I 异构体	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	[M+H] ⁺	231.138 9	231.138 5	1.7
46	10.03	邻苯二甲酸*	C ₈ H ₆ O ₄	[M+H-H ₂ O] ⁺	149.023 2	149.023 9	-4.7
47	10.12	未鉴定成分	C ₄₁ H ₆₂ O ₁₃ S	[M-H] ⁻	793.384 0	793.383 3	0.9
48	10.51	3β-羟基桉叶烷-4(15),7(11)-二烯-8α,12-内酯	C ₃₄ H ₆₈ O ₁₉	[M+H] ⁺	780.439 3	780.435 5	4.9
49	10.55	未鉴定成分	—	[M+H] ⁻	807.406 6	—	—
50	10.92	6-(2-辛氧基-丙酰氧基)-3,8-二硫杂-环戊[a]茚-2-羧酸-4-辛氧基联苯-4-酯	C ₄₆ H ₅₈ O ₆ S ₂	[M+H] ⁺	771.388 7	771.375 3	4.4

*为定向分离的化合物。

*directionally separated compound.

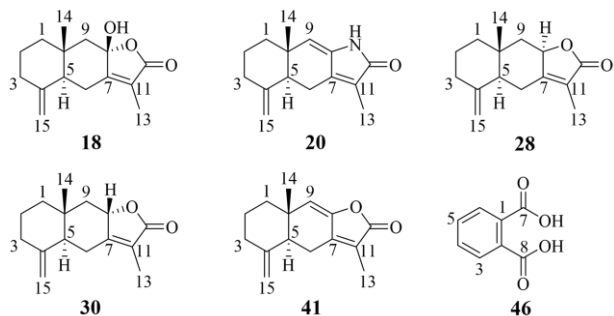


图 6 CT-90E 组分中主要化合物的结构

Fig. 6 Structures of main compounds isolated in CT-90E

MHz, CDCl₃) δ: 39.4 (C-1), 22.5 (C-2), 36.4 (C-3), 148.9 (C-4), 49.1 (C-5), 23.3 (C-6), 135.5 (C-7), 141.7 (C-8), 121.2 (C-9), 38.2 (C-10), 125.0 (C-11), 173.4 (C-12), 8.4 (C-13), 18.6 (C-14), 107.2 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **20** 为白术内酰胺。

化合物 **28**: 白色粉末, 溶于二氯甲烷, 紫外 254 nm 下显示为暗斑, 10%浓硫酸乙醇溶液加热显棕色, HR-ESI-MS *m/z*: 233.152 7 [M+H]⁺ (计算值 233.154 2, C₁₅H₂₁O₂), 推测分子式为 C₁₅H₂₀O₂。¹H-

NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 1.61~1.56 (1H, m, H-1a), 1.38 (1H, td, J = 12.6, 6.6 Hz, H-1b), 1.67~1.61 (2H, m, H₂-2), 2.41~2.36 (1H, m, H-3a), 2.03~2.01 (1H, m, H-3b), 1.93~1.88 (1H, m, H-5), 2.78 (1H, dd, J = 13.9, 3.8 Hz, H-6a), 2.46~2.42 (1H, m, H-6b), 4.99 (1H, dd, J = 12.0, 6.4 Hz, H-8), 2.29 (1H, dd, J = 12.0, 6.4 Hz, H-9a), 1.11 (1H, t, J = 12.0 Hz, H-9b), 1.79 (3H, s, H₃-13), 0.93 (3H, s, H₃-14), 4.88 (1H, brd, J = 1.6 Hz, H-15a), 4.66 (1H, brd, J = 1.6 Hz, H-15b); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 41.8 (C-1), 23.5 (C-2), 38.0 (C-3), 150.1 (C-4), 51.1 (C-5), 26.6 (C-6), 165.8 (C-7), 79.9 (C-8), 48.6 (C-9), 37.3 (C-10), 120.6 (C-11), 177.3 (C-12), 8.1 (C-13), 16.6 (C-14), 107.3 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **28** 为 8-表白术内酯。

化合物 **30**: 白色粉末, 溶于二氯甲烷, 紫外 254 nm 下显示为暗斑, 10%浓硫酸乙醇溶液加热显紫红色, HR-ESI-MS m/z : 233.152 7 [M+H]⁺ (计算值 233.154 2, C₁₅H₂₁O₂), 推测分子式为 C₁₅H₂₀O₂。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 1.62~1.57 (1H, m, H-1a), 1.49~1.46 (1H, m, H-1b), 1.68~1.63 (2H, m, H₂-2), 2.69~2.62 (1H, m, H-3a), 2.39~2.36 (1H, m, H-3b), 2.12~2.04 (1H, m, H-5), 2.77~2.73 (1H, m, H-6a), 2.29 (1H, dd, J = 13.4, 10.0 Hz, H-6b), 5.24~5.17 (1H, m, H-8), 2.55 (1H, dd, J = 12.9, 5.5 Hz, H-9a), 1.27 (1H, dd, J = 12.9, 8.7 Hz, H-9b), 1.83 (3H, s, H₃-13), 0.69 (3H, s, H₃-14), 4.91 (1H, brd, J = 1.6 Hz, H-15a), 4.88 (1H, brd, J = 1.6 Hz, H-15b); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 43.6 (C-1), 24.6 (C-2), 37.5 (C-3), 149.4 (C-4), 43.7 (C-5), 25.7 (C-6), 165.4 (C-7), 79.3 (C-8), 45.4 (C-9), 36.5 (C-10), 121.5 (C-11), 177.5 (C-12), 8.3 (C-13), 21.7 (C-14), 108.4 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **30** 为白术内酯II。

化合物 **41**: 白色粉末, 溶于二氯甲烷, 紫外 254 nm 下显示为暗斑, 10%浓硫酸乙醇溶液加热显蓝色, HR-ESI-MS m/z : 231.138 4 [M+H]⁺ (计算值 231.138 0, C₁₅H₁₉O₂), 推测分子式为 C₁₅H₁₈O₂。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 1.71~1.67 (1H, m, H-1a), 1.65~1.60 (1H, m, H-1b), 1.75~1.71 (2H, m, H₂-2), 2.41~2.34 (2H, m, H₂-3), 2.14~2.06 (1H, m, H-5), 2.76 (1H, dd, J = 17.1, 4.0 Hz, H-6a), 2.64~2.60 (1H, m, H-6b), 5.67 (1H, s, H-9), 1.88 (3H, d, J = 1.9

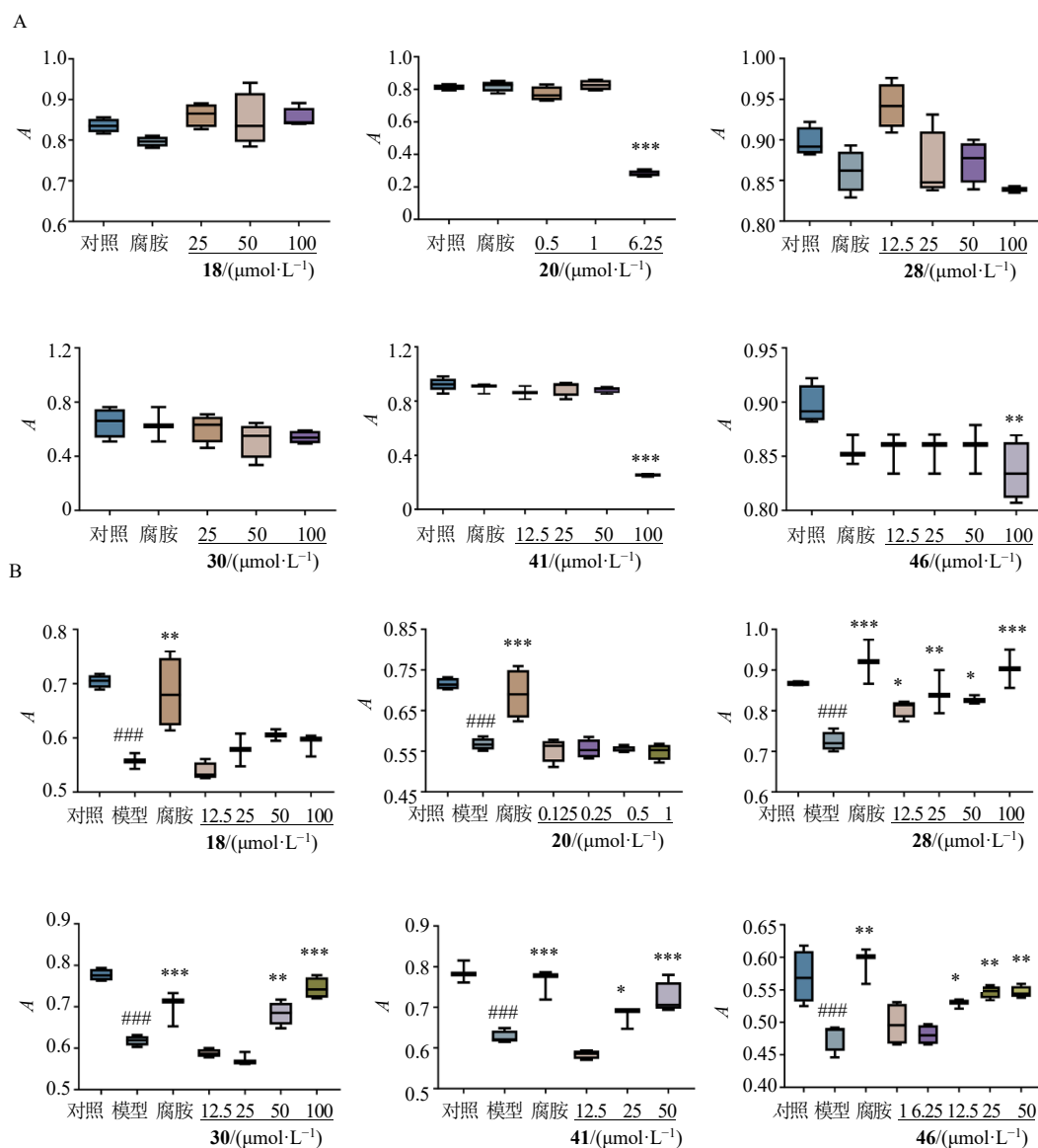
Hz, H₃-13), 0.96 (3H, s, H₃-14), 4.92 (1H, brd, J = 1.6 Hz, H-15a), 4.69 (1H, brd, J = 1.6 Hz, H-15b); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 40.1 (C-1), 24.3 (C-2), 37.2 (C-3), 150.3 (C-4), 49.0 (C-5), 23.6 (C-6), 149.5 (C-7), 149.5 (C-8), 121.4 (C-9), 39.2 (C-10), 120.7 (C-11), 173.2 (C-12), 8.3 (C-13), 18.6 (C-14), 107.5 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **41** 为白术内酯I。

化合物 **46**: 无色油状物, 溶于二氯甲烷, 紫外 254 nm 下显示为暗斑, 10%浓硫酸乙醇溶液加热显棕色, HR-ESI-MS m/z : 189.008 4 [M+Na]⁺ (计算值 189.008 7, C₈H₆NaO₄), 推测分子式为 C₈H₆O₄。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.68~7.60 (2H, m, H-3, 6), 7.59~7.57 (2H, m, H-4, 5); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 130.8 (C-1, 2), 128.4 (C-3, 6), 132.8 (C-4, 5), 168.7 (C-7, 8)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **46** 为邻苯二甲酸。

3.5 CT-90E 中主要成分的活性验证

3.5.1 细胞毒性的测定 采用不同浓度的白术内酯III (**18**)、白术内酰胺 (**20**)、8-表白术内酯 (**28**)、白术内酯II (**30**)、白术内酯I (**41**)和邻苯二甲酸 (**46**)处理 IEC-6 细胞, 进行 MTT 检测, 考察活性成分对正常 IEC-6 细胞的活力的影响。结果如图 7-A 所示, 化合物 **18** 和 **30** 给药浓度在 25~100 μ mol/L 对 IEC-6 细胞无毒性; 化合物 **28** 给药浓度在 12.5~100 μ mol/L 对 IEC-6 细胞无毒性; 化合物 **20** 浓度低于 1 μ mol/L 时对 IEC-6 细胞无毒性; 化合物 **41** 和 **46** 给药浓度在 12.5~50 μ mol/L 对 IEC-6 细胞无毒性。

3.5.2 对 DFMO 诱导 IEC-6 生长抑制的影响 如图 7-B 所示, 与对照组相比, 模型组细胞增殖显著被抑制 ($P < 0.001$), 表明 DFMO 诱导的 IEC-6 细胞生长抑制模型成功。与模型组比较, 化合物 **28** 在浓度为 12.5~100 μ mol/L 时可逆转 DFMO 所致的 IEC-6 细胞生长抑制, 化合物 **30** 在浓度为 50~100 μ mol/L 时可逆转 DFMO 所致的 IEC-6 细胞生长抑制, 化合物 **41** 在浓度为 25~50 μ mol/L 时可逆转 DFMO 所致的 IEC-6 细胞生长抑制, 化合物 **46** 在浓度为 12.5~50 μ mol/L 时可逆转 DFMO 所致的 IEC-6 细胞生长抑制; 但化合物 **18** 和 **20** 无显著改善作用。结果表明, 化合物 **28** (12.5~100 μ mol/L)、**30** (50~100 μ mol/L)、**41** (25~50 μ mol/L) 和 **46** (12.5~50 μ mol/L) 可促进 DFMO 诱导的 IEC-6 细胞增殖。



A-细胞毒性作用; B-细胞增殖作用; 与对照组相比: ### $P<0.001$; 与模型组相比: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。

A-cytotoxicity effect; B-cell proliferation effect; ### $P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group.

图 7 CT-90E 中主要成分对 DFMO 诱导 IEC-6 的细胞活力影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 7 Effect of main components in CT-90E on viability of IEC-6 cells induced by DFMO ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

白术归脾、胃二经，作为“补气健脾”第一要药，自古以来被医者们用于调理脾胃^[18]。根据中国方剂数据库的检索，治疗脾虚的方剂中，高频使用的首位药物即为白术，然而，生白术在治疗脾虚中的药效物质基础尚未得到阐明。中医理论认为，脾虚症状主要源于脾气不足，导致其无法正常行使生理功能。常见的诱因包括饮食不洁、不规律，过度劳累或久病损伤脾气等因素。本研究采用“番泻叶ig+疲劳游泳+饥饱失常”三重因素造模的方法，

经过 17 d 的处理，成功复制了脾虚大鼠模型^[8]。此模型动物表现出毛色干枯、倦怠懒动、体形消瘦、身体无力、弓背、眯眼、大便溏泄、小便赤黄等典型脾虚症状，同时血清 D-木糖含量显著下降，表明模型复制成功。力竭游泳时间作为评价大鼠运动耐力的客观指标，在药物抗疲劳研究中得到了广泛应用，具有重要的参考价值^[19]。脾虚引起的胃肠功能障碍主要表现为胃肠道黏膜屏障损伤、消化吸收功能障碍、胃肠动力减弱以及胃肠激素紊乱等，这些变化是脾虚相关胃肠功能障碍的关键因素。通过体

质量变化和血清中 *D*-木糖含量的检测,可以有效评价肠道的消化吸收功能^[20];而胃内残留率和小肠推进率则有助于反映脾虚大鼠胃肠动力的强弱^[21]。此外,肠道神经递质对胃肠运动有重要调节作用,兴奋性神经递质如 MTL 和 GAS 的减少,或者抑制性神经递质 VIP 的过度分泌,都可能导致胃肠动力的障碍。GAS 能够调节消化道的功能,维持消化道结构的完整性,其含量异常可提示消化道功能处于紊乱状态^[22]。MTL 主要促进胃肠运动,其含量减少会导致胃排空障碍^[23],而 VIP 则通过放松平滑肌来抑制胃肠道运动,其过度分泌可能进一步加重胃肠动力的减弱^[24]。因此,脾虚相关的胃肠功能紊乱,常常伴随着这些神经递质的变化,从而导致消化吸收功能的进一步下降。本研究发现,脾虚大鼠表现出游泳时间减少、体质量和血清 *D*-木糖含量降低,胃内残留率升高,小肠推进率降低,胃和小肠组织出现病理性损伤。此外,血清 GAS 和 MTL 水平下降,而 VIP 水平升高,这些结果表明脾虚大鼠存在消化吸收功能障碍和胃肠动力减弱。经过治疗后,生白术水提物组和除糖组大鼠的各项指标均得到改善,与阳性药多潘立酮药效相当。

AQP3 参与肠道内水液的分泌与重吸收,研究证实,脾虚可造成大鼠腹泻,腹泻大鼠的 AQP3 表达显著降低,且随着腹泻持续时间的延长,AQP3 水平进一步下降^[25],表明肠道 AQP3 含量降低可引起肠道水液重吸收障碍,从而导致便秘。与本研究结果相一致,生白术水提物及其除糖部位可显著增加结肠 AQP3 含量,提示生白术水提物除糖部位可能是改善脾虚大鼠水液代谢障碍的主要药效部位。

先前研究发现,脾虚导致机体胃肠黏膜免疫力低下,而免疫器官脾脏与胸腺对于维持机体免疫功能发挥重要作用^[26],另外,细胞因子 TNF- α 和 IL-10 在免疫调节中也扮演重要角色^[27-28]。本研究发现脾虚大鼠的胸腺和脾脏指数降低,血清中的 TNF- α 和 IL-10 水平异常,表明其免疫器官及功能受到损伤。生白术水提物及其除糖部位能够有效提高脾虚大鼠的免疫器官指数,并调节免疫相关细胞因子的水平,从而有助于改善免疫功能。而多糖部位在这方面则未表现出明显的改善效果。以上结果表明生白术水提物的除糖部位可能是增强脾虚大鼠免疫功能的主要药效部位。

为进一步研究生白术除糖部位中的健脾活性组分,将除糖部位经过 HP-20 型大孔吸附树脂分离,

得到 4 个组分 CT-W、CT-30E、CT-60E、CT-90E。采用 DFMO 诱导的 IEC-6 细胞生长抑制模型,考察除糖部位大孔树脂不同体积分数乙醇洗脱组分对 IEC-6 细胞增殖的影响。多胺(包括腐胺、精胺和精胺)对肠粘膜损伤修复过程-细胞增殖有重要的调控作用。本研究采用腐胺作为阳性对照,从而验证生白术有效成分是否通过调控细胞内多胺含量影响胃肠黏膜修复从而发挥健脾通便作用。结果发现,CT-90E 组分可显著逆转 DFMO 对 IEC-6 细胞的抑制,提示 CT-90E 组分可促进脾虚肠黏膜的修复,可能是生白术健脾活性组分。

采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对 CT-90E 的化学成分进行全面表征,共鉴定出 44 个化学成分,定向分离获得 6 个主要化合物,验证其对 IEC-6 细胞活性的影响。结果发现,化合物 28、30、41 和 46 可显著逆转 DFMO 诱导的 IEC-6 细胞生长抑制,药效与阳性药 PUT 相似,提示其促进细胞增殖作用与多胺有关。

综上,生白术水提物和除糖部位可明显改善脾虚大鼠症状,表明除糖部位可能是生白术治疗脾虚的有效部位。进一步通过 DFMO 诱导的 IEC-6 生长抑制模型考察生白术除糖部位大孔树脂不同浓度乙醇洗脱组分的活性,发现 CT-90E 为活性组分。在分析该组分成分后对定向分离得到的 6 个主要成分进行活性验证,结果显示白术内酯 I、白术内酯 II、8-表白术内酯和邻苯二甲酸 4 个成分可显著逆转 DFMO 诱导的 IEC-6 细胞生长抑制,可能为生白术发挥健脾作用的主要成分。但多糖及 CT-90E 组分中是否存在其他治疗脾虚的活性成分仍不明确,后续将进一步比较多糖其他化学成分的药效作用差异,为明确白术治疗脾虚的药效物质提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 周琳. 基于数据挖掘方法的脾虚文献研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2015.
- [2] 李尧. 不同白术饮片对脾虚湿困证大鼠胃肠功能及肠道菌群的影响 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.
- [3] 赵文龙, 杨彦华, 贾天柱. 白术生、制品对脾虚大鼠血清 SS, GAS, CHE 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 212-215.
- [4] 白珺, 李斌, 冉小库, 等. 白术对脾虚动物利水作用研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(9): 28-32.
- [5] 张凤杰, 刘薇薇, 徐世红. 白术的健脾作用探讨 [J].

- 内蒙古中医药, 2014, 33(9): 90-91.
- [6] Wang R J, Peng Y, Meng H, *et al.* Protective effect of polysaccharides fractions from Sijunzi decoction in reserpine-induced spleen deficiency rats [J]. *RSC Adv*, 2016, 6(65): 60657-60665.
- [7] 黄文武, 彭颖, 王梦月, 等. 四君子汤及其单味药水煎液对脾虚大鼠肠道菌群的调节作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(11): 8-15.
- [8] 王梅, 武英茹, 王越欣, 等. 不同米炒党参对脾虚大鼠胃肠道功能、免疫功能、水液代谢的影响 [J]. 中药材, 2021, 44(11): 2566-2570.
- [9] 胡灿, 李茹柳, 莫全毅, 等. 白术和黄芪不同提取部位对小肠上皮细胞增殖的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(2): 156-160.
- [10] 宋厚盼, 李茹柳, 王一寓, 等. 白术提取物对 IEC-6 细胞迁移过程多胺信号通路钙离子调控的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(5): 1361-1367.
- [11] 罗蒙, 伍婷婷, 李茹柳, 等. 白术多糖对小肠上皮细胞屏障及黏附连接蛋白表达的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(4): 533-539.
- [12] Rao J N, Liu L, Zou T T, *et al.* Polyamines are required for phospholipase C-gamma1 expression promoting intestinal epithelial restitution after wounding [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(1): G335-G343.
- [13] 陈磊, 向欢, 邢婕, 等. 补中益气汤干预脾虚证模型大鼠脾脏 ¹H NMR 代谢组学机制研究 [J]. 药学学报, 2014, 49(9): 1320-1325.
- [14] Zhang W L, Li N, Shen Q, *et al.* Establishment of a mouse model of cancer cachexia with spleen deficiency syndrome and the effects of atractylenolide I [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(2): 237-248.
- [15] 李滢, 杨秀伟. 生白术化学成分研究 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(4): 382-386.
- [16] 王保德, 余亦华, 滕宁宁, 等. 双表白术内酯的结构鉴定 [J]. 化学学报, 1999, 57(9): 1022-1025.
- [17] Jaiswal A K, Kushawaha A K, Pandey S, *et al.* Halogen-free oxidation of aryl ketones and benzyl nitrile derivatives to corresponding carboxylic acids by using NaOH/TBHP in aqueous medium [J]. *Tetrahedron*, 2023, 136: 133359.
- [18] 左军, 张金龙, 胡晓阳. 白术化学成分及现代药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(10): 6-9.
- [19] 邓炳楠, 孙景然, 金宏, 等. 网纹甜瓜对游泳小鼠抗疲劳作用的影响 [J]. 解放军预防医学杂志, 2018, 36(8): 974-976.
- [20] 宋玲, 李晗, 高云航, 等. 参苓健脾胃颗粒对利血平诱导的脾虚型大鼠消化、吸收的影响 [J]. 云南中医中药杂志, 2024, 45(6): 80-87.
- [21] 杨红莲, 段玉红, 钱笑音. 黄连对脾虚大鼠胃肠运动功能及胃动素、胃泌素的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(11): 75-77.
- [22] 姜宇珺, 张北雪, 马善鹏, 等. 4 种不同来源的苍术和白术对偏于实证的脾虚大鼠药效学比较研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(8): 142-146.
- [23] 刘玉强, 许晨曦, 贾蕊, 等. 苍术中三种单体化合物对脾虚模型大鼠疗效研究 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(2): 382-386.
- [24] Ergün Y, Oğülener N. Evidence for the interaction between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in the mouse gastric fundus [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299(3): 945-950.
- [25] 周薇, 向龙. 不同程度腹泻大鼠结肠中 AQP3 表达的改变 [J]. 系统医学, 2017, 2(7): 14-19.
- [26] 赵荣华, 谢鸣, 李聪, 等. 肝郁、脾虚和肝郁脾虚证模型大鼠的免疫功能变化 [J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(12): 821-824.
- [27] 李焰, 杨小燕, 黄其春, 等. 银杏叶复方对脾虚证小鼠细胞因子、免疫球蛋白和血浆内几种神经肽含量的影响 [J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(6): 82-87.
- [28] Xiao Q, Zhao L, Jiang C, *et al.* Polysaccharides from *Pseudostellaria heterophylla* modulate gut microbiota and alleviate syndrome of spleen deficiency in rats [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 20217.

[责任编辑 王文倩]