

生脉饮多糖提取工艺优化及对脾虚模型大鼠肠道功能调节作用的研究^Δ

游宇^{1*}, 罗林², 陈哲杰², 林美斯², 许何英², 熊波², 傅超美², 谢恬^{3#}(1. 成都中医药大学公共卫生学院, 成都 611137; 2. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 3. 杭州师范大学整合药学院, 杭州 311121)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0493-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.13

摘要 目的: 优化生脉饮多糖的提取工艺, 并探讨生脉饮及其多糖对脾虚模型大鼠肠道功能的调节作用。方法: 采用硫酸苯酚法测定多糖含量, 并计算多糖提取率; 以此为考察指标, 采用单因素试验和正交试验, 对生脉饮多糖提取工艺的料液比、提取时间、提取温度、提取次数进行优化, 并进行验证试验。将 80 只雄性 SD 大鼠随机分为空白组, 模型组, 生脉饮低、中、高剂量组(350、700、1 400 g/L, 按生药量计)和生脉饮多糖低、中、高剂量组(24.5、49、98 g/L, 按生药量计), 每组 10 只。除空白组外, 其余各组大鼠均灌胃大黄水煎液 10 mL/kg 复制脾虚模型, 每天 1 次, 连续 15 d。自第 16 天起, 空白组和模型组大鼠均灌胃等容水, 其余各组大鼠均灌胃相应药液, 每天 1 次, 连续 10 d。观察各组大鼠的一般情况, 记录体质量, 并采用间苯三酚法或酶联免疫吸附测定法检测其血清 D-木糖、胃泌素(GAS)、血管活性肠肽(VIP)含量。结果: 生脉饮多糖最优提取工艺为料液比 1:10(g/mL)、提取时间 45 min、提取温度 80 ℃、提取次数 1 次。验证试验结果显示, 3 次提取的多糖提取率分别为 7.43%、7.64%、7.80%(RSD=1.01%, n=3)。造模后, 除空白组外的其余各组大鼠均出现了大便溏稀、体形消瘦、食量减小等症状, 且其体质量和血清 D-木糖含量均较空白组显著降低($P<0.01$)。末次给药后, 各给药组大鼠上述症状均有不同程度的改善, 且除模型组外的其余各组大鼠的体质量以及各组大鼠血清 D-木糖含量均较同组造模前或给药前显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与空白组比较, 模型组大鼠体质量和血清 GAS 含量均显著降低, 血清 VIP 含量显著增加($P<0.01$); 与模型组比较, 生脉饮中剂量组和生脉饮多糖低、高剂量组大鼠体质量以及生脉饮中、高剂量组和生脉饮多糖低、中剂量组大鼠血清 D-木糖、GAS 含量均显著增加, 生脉饮各剂量组和生脉饮多糖低、中剂量组大鼠血清 VIP 含量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论: 优化的生脉饮多糖提取工艺稳定、可行。生脉饮及其多糖可有助于恢复脾虚模型大鼠的肠道功能, 这种作用可能与其调节肠道 GAS、VIP 等因子分泌有关。

关键词 生脉饮; 多糖; 多糖提取率; 提取工艺; 正交试验; 脾虚模型; 胃泌素; 血管活性肠肽; 大鼠

Study on the Optimization of the Extraction Technology of Shengmai Yin Polysaccharide and Its Regulation Effects on Intestinal Function of Spleen Deficiency Model Rats

YOU Yu¹, LUO Lin², CHEN Zhejie², LIN Meisi², XU Heying², XIONG Bo², FU Chaomei², XIE Tian³(1. School of Public Health, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 3. Holistic Integrative Pharmacy Institutes, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Shengmai Yin polysaccharide, and to investigate the regulation effects of Shengmai Yin and its polysaccharide on intestinal function of spleen deficiency model rats. METHODS: The contents of polysaccharide were determined by phenol-sulfuric acid method, and the extraction rate of polysaccharide was calculated. Using extraction rate of Shengmai Yin polysaccharide as investigation index, single factor and orthogonal tests were used to optimize material-liquid ratio, extraction time, extraction temperature and extraction times of Shengmai Yin polysaccharide. Validation test was also conducted. Totally 80 male SD rats were randomly divided into blank group, model group, Shengmai Yin low-dose, medium-dose and high-dose groups (350, 700, 1 400 g/L, by crude drug), Shengmai Yin polysaccharide low-dose, medium-dose and high-dose groups (24.5, 49, 98 g/L, by crude drug), with 10 rats in each group. Except for blank group, other groups were given *Rheum palmatum* water decoction 10 mL/kg to induce spleen deficiency model, once a day, for consecutive 15 d. Since the 16th day, blank group and model group were given isovolumic water intragastrically, while other groups were given corresponding drugs, once a day, for consecutive 10 d. The general status of rats and body weights were recorded in each group.

Δ 基金项目: 四川省教育厅科研计划项目(No. 川教函[2017]819 号-18ZB0194)

* 讲师, 博士研究生。研究方向: 中药新制剂、新剂型及新工艺。电话: 028-61800064。E-mail: 415416295@qq.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 中药新技术、新制剂及新剂型、绿色化学、中西医结合药物。电话: 0571-28868269。E-mail: xbs@dljg.sina.net

The serum contents of D-xylose, gastrin (GAS) and vasoactive intestinal peptide (VIP) were detected by phloroglucinol method or ELISA. RESULTS: The optimal extraction technology of Shengmai Yin polysaccharide was material-liquid ratio 1:10(g/mL), extraction time 45 min, extraction temperature 80 ℃, extracting for 1 time. Results of validation test showed that extraction rates of the

polysaccharide in 3 times were 7.43% , 7.64% , 7.80% (RSD=1.01% , $n=3$). After modeling, except for blank group, other groups suffered from loose stools, thin body and reduced food intake, and the body weight and serum level of *D*-xylose were decreased significantly compared with blank group ($P<0.01$). After last medication, above symptoms of administration groups were improved to different extents. Except for model group, body weight and serum contents of *D*-xylose in other groups were increased significantly than those before modeling or before medication ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with blank group, body weight and serum content of GAS were decreased significantly in model group, while serum content of VIP was increased significantly ($P<0.01$). Compared with model group, body weight of Shengmaiyin medium-dose group and Shengmaiyin polysaccharide low-dose and high-dose groups, serum contents of *D*-xylose and GAS in Shengmaiyin medium-dose and high-dose groups and Shengmaiyin polysaccharide low-dose and medium-dose groups were increased significantly, while serum contents of VIP in Shengmaiyin groups and Shengmaiyin polysaccharide low-dose and medium-dose groups were all decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: The optimized extraction technology of Shengmaiyin polysaccharide is stable and feasible. Shengmaiyin and its polysaccharide contribute to the recovery of intestinal function of spleen deficiency model rat, the effects of which may be associated with the secretion regulation of GAS and VIP.

KEYWORDS Shengmaiyin; Polysaccharide; Extraction rate of polysaccharide; Extraction technology; Orthogonal test; Spleen deficiency model; Gastrin; Vascoactive intestinal peptide; Rats

生脉饮为中医经典名方,首载于金代张元素的《医学启源》,云“麦门冬气寒,味微苦甘,治肺中伏火,脉气欲绝。加五味子、人参二味,为生脉饮,补肺中元气不足,须用之”。该方在中医临床上应用历史悠久,已成为治疗心血管疾病的常用方,且其相关研究也多集中在心血管疾病治疗方面^[1]。生脉饮组方中人参(为炮制品“红参”)、麦冬、五味子均含有大量多糖,对肠道具有一定的调节作用,如人参多糖能够改善气虚模型大鼠的肠道菌群失调^[2];麦冬多糖(MDG-1)对糖尿病小鼠和非糖尿病小鼠的肠道微生态平衡均具有一定的调节作用^[3-5],同时还可改善膳食诱导的肥胖模型小鼠的肠道菌群多样性,促进肠道益生菌的繁殖^[6];五味子多糖可改善5-氟尿嘧啶引起的小鼠肠道黏膜炎症^[7],同时还可促进肠道双歧杆菌的生长^[8]。然而,目前有关生脉饮及其多糖对肠道功能调节作用的研究尚未见报道。为此,本研究在优化生脉饮多糖提取工艺的基础上,以脾虚模型大鼠为对象,考察了生脉饮及其多糖对脾虚泄泻致肠道菌群紊乱大鼠相关指标的影响,并初步探索两者对大鼠肠道的调节作用,以期为该方的进一步开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Varioskan Flash 2.4.3型全波长多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);U-1810型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);Alleregra X30R型多功能台式高速冷冻离心机[贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司]。

1.2 药材与试剂

红参饮片(批号:1602008)、麦冬饮片(批号:1604042)、五味子饮片(批号:1603102)、大黄饮片(批号:1606080)均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司;葡萄糖对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号:MUST-17012905,纯度: $\geq 98\%$);*D*-木糖(成都科龙

化工试剂厂,批号:2015080101,规格:25 g);*D*-木糖检测试剂盒(间苯三酚法,批号:20170111)、胃泌素(GAS)试剂盒[酶联免疫吸附测定(ELISA)法,批号:20170113]、血管活性肠肽(VIP)试剂盒(ELISA法,批号:20170113)均购自南京建成生物工程研究所;萘酮、硫酸等其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

SPF级雄性SD大鼠,7周龄,体质量为200~220 g,购自成都达硕实验动物有限公司[动物生产许可证书:SCXK(川)2015-030]。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精确称取干燥至恒定质量的葡萄糖对照品10 mg,置于100 mL量瓶中,加水溶解并定容,得质量浓度为0.1 mg/mL的葡萄糖对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 按质量比1:2:1的比例称取红参、麦冬、五味子饮片各适量,混合,以水为溶剂按料液比1:8[质量(以各药材质量总和计)体积比,g/mL,下同]提取2次,每次45 min,提取温度为80 ℃。提取液滤过后,合并,低温蒸发浓缩至原体积的17%,加4倍体积的95%乙醇,于4 ℃冰箱中静置过夜后,抽滤,依次用乙醇、丙酮、乙醚洗涤(各2次),经冷冻干燥后,即得生脉饮多糖。精密称取上述多糖0.5 g,加水溶解并定容至100 mL量瓶中,滤过,取滤液,即得供试品溶液。

2.1.3 空白对照溶液 以水作为空白对照溶液。

2.1.4 硫酸-萘酮溶液 取萘酮0.1 g,加80%硫酸溶液100 mL,溶解,即得(现用现配)。

2.2 生脉饮多糖含量测定方法的建立

采用硫酸苯酚法^[9]测定生脉饮多糖的含量。

2.2.1 标准曲线的绘制 分别精密吸取“2.1.1”项下葡萄糖对照品溶液0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL至离心管中,加水至2.0 mL(质量浓度为0.021 0~0.094 5

mg/mL),再精密加入新配制的硫酸-萘酮溶液6 mL,于沸水浴中静置20 min后,取出,放至冷水中冷却至室温,采用紫外-可见分光光度计于625 nm波长处测吸收度。以葡萄糖质量浓度(x ,mg/mL)为横坐标、吸收度(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=8.36x-0.042$ ($R^2=0.9993$),结果表明葡萄糖检测质量浓度线性范围为0.0210~0.0945 mg/mL。

2.2.2 精密度试验 精密量取“2.1.1”项下葡萄糖对照品溶液1.2 mL至离心管中,加水至2.0 mL,按“2.2.1”项下方法处理并重复测定其吸收度6次。结果,葡萄糖吸收度的RSD为1.25% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.3 稳定性试验 精密量取“2.1.2”项下供试品溶液1.2 mL,加水至2.0 mL,按“2.2.1”项下方法处理并于处理后的1、2、3、4、5、6 h时测定其吸收度。结果,葡萄糖吸收度的RSD为1.35% ($n=6$),表明供试品溶液在6 h内稳定性良好。

2.2.4 重复性试验 取各药材饮片适量,共6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,精密量取1.2 mL,加水至2.0 mL,按“2.2.1”项下方法处理后测定其吸收度并计算质量浓度。结果,葡萄糖质量浓度的RSD为1.83% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.5 加样回收率试验 精密量取“2.1.2”项下已知质量浓度的供试品溶液0.5 mL,共6份,分别加入葡萄糖对照品溶液0.5 mL,加水至2.0 mL,按“2.2.1”项下方法处理并测定其吸收度,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.043 1	0.050 0	0.091 5	96.80	93.70	2.10
0.043 1	0.050 0	0.089 4	92.60		
0.043 1	0.050 0	0.088 5	90.80		
0.043 1	0.050 0	0.090 2	94.20		
0.043 1	0.050 0	0.091 1	96.00		
0.043 1	0.050 0	0.089 0	91.80		

2.3 生脉饮多糖提取率计算

取生脉饮多糖适量,按“2.2”项下方法测定含量后,按如下公式计算多糖提取率:多糖提取率= $c_1V_1n/m \times 100\%$ (式中, c_1 为葡萄糖质量浓度, V_1 为待测样品溶液体积, n 为稀释倍数, m 为药材质量)。

2.4 生脉饮多糖提取工艺筛选

2.4.1 单因素试验 (1)料液比:按质量比1:2:1的比例精密称取红参、麦冬、五味子饮片5份,混合,以水为提取溶剂按料液比1:4、1:6、1:8、1:10、1:12提取2次,每次45 min,提取温度为80 ℃。提取液按“2.1.2”项下方法(从“提取液滤过后,合并”开始操作,下同)处理后,按“2.2”项下方法测定多糖含量,再按“2.3”项下方法计算多糖提取率,结果见图1A。由图1A可知,生脉饮多糖提取率随着水加入量的增加而升高,当料液比为1:10后趋于平稳,故选择料液比1:6、1:8、1:10进行后续考

察。(2)提取时间:按质量比1:2:1的比例精密称取红参、麦冬、五味子饮片5份,混合,以水为提取溶剂按料液比1:8提取2次,每次提取时间分别为30、45、60、75、90 min,提取温度为80 ℃。提取液按“(1)”项下处理、测定并计算多糖提取率,结果见图1B。由图1B可知,生脉饮多糖提取率随着提取时间的延长而升高,当提取时间为60 min后趋于平稳,故选择提取时间30、45、60 min进行后续考察。(3)提取温度:按质量比1:2:1的比例精密称取红参、麦冬、五味子饮片5份,混合,以水为提取溶剂按料液比1:8提取2次,每次45 min,提取温度分别为60、70、80、90、100 ℃。提取液按“(1)”项下处理、测定并计算多糖提取率,结果见图1C。由图1C可知,生脉饮多糖提取率随着温度的升高先升后降,故选择提取温度70、80、90 ℃进行后续考察。(4)提取次数:按质量比1:2:1的比例精密称取红参、麦冬、五味子饮片5份,混合,以水为提取溶剂按料液比1:8分别提取1、2、3、4、5次,每次45 min,提取温度为80 ℃。提取液按“(1)”项下处理、测定并计算多糖提取率,结果见图1D。由图1D可知,生脉饮多糖提取率随着提取次数的增加而升高,当提取次数为4次后趋于平稳,综合考虑试验效率后,最终选择提取次数1、2、3次进行后续考察。

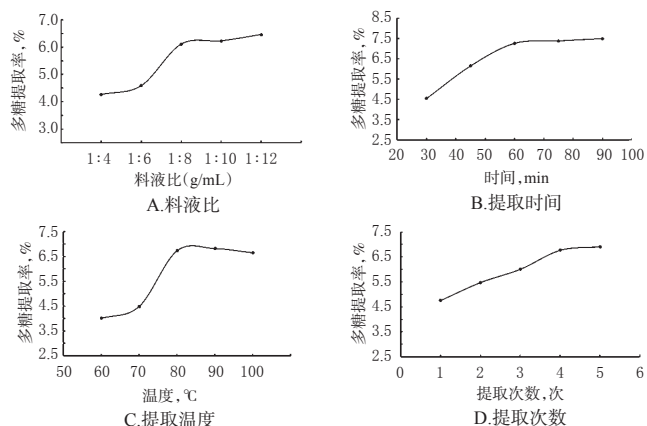


图1 各因素对生脉饮多糖提取率的影响

Fig 1 Effects of each factor on the extraction rate of polysaccharide

2.4.2 正交试验 根据“2.4.1”项下单因素试验考察结果,以多糖提取率为评价指标,对料液比(A)、提取时间(B)、提取温度(C)、提取次数(D)这4个因素进行考察,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选多糖提取工艺,其因素与水平见表2,试验设计与结果见表3,方差分析结果见表4。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素			
	A,g/mL	B,min	C,℃	D,次
1	1:6	30	70	1
2	1:8	45	80	2
3	1:10	60	90	3

表3 正交试验设计与结果

Tab 3 Design and results of orthogonal tests

编号	A	B	C	D	多糖提取率, %
1	1	1	1	1	4.47
2	1	2	2	2	5.47
3	1	3	3	3	5.58
4	2	1	2	3	6.21
5	2	2	3	1	7.27
6	2	3	1	2	3.92
7	3	1	3	2	5.42
8	3	2	1	3	4.69
9	3	3	2	1	7.58
K_1	15.52	16.10	13.08	19.32	
K_2	17.40	17.43	19.26	14.81	
K_3	17.69	17.08	18.27	16.48	
R	0.72	0.44	2.06	1.50	

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	均方差	F	P
A	0.93	2	0.46	0.27	>0.05
B	0.32	2	0.16	0.09	>0.05
C	7.35	2	3.67	2.12	<0.05
D	3.47	2	1.73	1.00	>0.05

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ Note: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

由表2、表3可见,各因素影响大小依次为C>D>A>B,即提取温度>提取次数>料液比>提取时间。方差分析结果显示,提取温度对生脉饮多糖的提取具有显著影响($P<0.05$);其最优提取工艺为 $A_3B_2C_2D_1$,即料液比1:10、提取时间45 min、提取温度80℃、提取1次。

2.4.3 验证试验 按质量比1:2:1的比例精密称取红参、麦冬、五味子饮片各适量,混合,按“2.4.2”项下最优工艺平行提取3次,提取液均按“2.1.2”项下方法处理后,按“2.2”项下方法测定多糖含量,再按“2.3”项下方法计算多糖提取率,结果分别为7.43%、7.64%、7.80% ($RSD=1.01\%$, $n=3$),表明该工艺稳定、可行。

2.5 生脉饮及生脉饮多糖对脾虚模型大鼠相关指标的影响

2.5.1 给药样品的制备 (1)生脉饮药液:按质量比1:2:1的比例精密称取红参、麦冬、五味子饮片各适量,混合,加入8倍量水,浸泡30 min,煎煮2次,每次30 min,合并2次提取液,浓缩即得。上述提取物经水稀释后,制得低、中、高剂量(350、700、1 400 g/L,按生药量计;剂量设置参考文献[10-11]及本课题组前期预实验结果)的生脉饮药液。(2)生脉饮多糖药液:按“2.4.2”项下最优工艺提取生脉饮多糖,临用前用0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液溶解,制得低、中、高剂量(24.5、49、98 g/L,按生药量计;剂量设置依据同“生脉饮”)的生脉饮多糖药液。(3)大黄水煎液:取大黄饮片适量,第1次加6倍量水,浸泡30 min,80℃温浸提取60 min;第2次加4倍量水,80℃温浸提取45 min;合并2次浸提液,浓缩,得质

量浓度为2 000 g/L(按生药量计;剂量设置参考文献[12])的大黄水煎液。

2.5.2 分组、造模和给药 将80只雄性SD大鼠随机分为8组,即空白组,模型组,生脉饮低、中、高剂量组以及生脉饮多糖低、中、高剂量组,每组10只。空白组大鼠灌胃水10 mL/kg,其余各组大鼠均灌胃大黄水煎液10 mL/kg以复制大鼠脾虚模型,每天1次,连续15 d。自第16天起,空白组和模型组大鼠均灌胃水10 mL/kg,其余各组大鼠均灌胃相应药液10 mL/kg,每天1次,连续10 d。

2.5.3 一般状况 观察各组大鼠的皮毛、大便排泄情况以及活动状态,并分别于造模前、造模后(给药前)及末次给药后称定其体质量。采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结果显示,造模前,各组大鼠体质量比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。造模后(给药前),除空白组外,其余各组大鼠均出现大便溏稀、体形消瘦、食量减小、皮毛枯槁、精神萎靡、蜷缩、拱背以及不同程度的脱肛。造模后(给药前),空白组大鼠的体质量较同组造模前显著增加,差异有统计学意义($P<0.01$);与空白组比较,其余各组大鼠的体质量均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。末次给药后,各给药组大鼠上述症状均有不同程度的改善,空白组、生脉饮各剂量组及生脉饮多糖各剂量组大鼠的体质量均较同组造模前显著增加,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与空白组比较,模型组大鼠的体质量显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,生脉饮中剂量组及生脉饮多糖低、高剂量组大鼠体质量均显著增加,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见表5。

2.5.4 血清D-木糖含量 测定各组大鼠造模后(给药前)及末次给药后血清中D-木糖的含量。所有大鼠均禁食、不禁水12 h后,自眼眶取血0.5 mL至1.5 mL EP管中;随后每只大鼠灌胃10% D-木糖溶液10 mL/kg,1 h后再自眼眶取血0.5 mL于另一1.5 mL EP管内。血液样品静置1 h后,以3 500 r/min离心10 min,分离血清,采用间苯三酚法以紫外-可见分光光度计于554 nm波长处测定光密度(OD)值,并计算大鼠血清中D-木糖含量[血清D-木糖含量=(测定OD值-测定空白OD值)/(标准OD值-试剂空白OD值)×标准品浓度(式中,“测定OD值”为各组大鼠灌胃D-木糖溶液后血浆样品的OD值,“标准OD值”为检测试剂盒中1.33 mmol/L D-木糖标准品溶液的OD值,“测定空白OD值”为各组大鼠灌胃D-木糖溶液前血浆样品的OD值,“试剂空白OD值”为测定试剂即间苯三酚的OD值,“标准品浓度”为检测试剂盒中D-木糖标准品溶液的浓度)],严格按照检测试剂盒说明书方法操作。统计学方法同“2.5.3”项。

结果显示,造模后(给药前),模型组及各给药组大

表5 生脉饮及生脉饮多糖对脾虚模型大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 5 Effects of Shengmaiyin and Shengmaiyin polysaccharide on body weight of spleen deficiency model rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	造模前, g	造模后(给药前), g	末次给药后, g
空白组	238.14 ± 5.12	268.14 ± 9.35 ^{ΔΔ}	287.29 ± 12.38 ^{ΔΔ}
模型组	239.07 ± 7.98	233.29 ± 15.47 ^{**}	240.86 ± 20.59 ^{**}
生脉饮低剂量组	238.14 ± 5.68	230.71 ± 9.45 ^{**}	260.00 ± 13.93 ^{ΔΔ}
生脉饮中剂量组	233.00 ± 8.70	243.14 ± 15.33 ^{**}	282.29 ± 27.75 ^{##ΔΔ}
生脉饮高剂量组	233.64 ± 7.38	229.14 ± 8.63 ^{**}	264.29 ± 14.02 ^{ΔΔ}
生脉饮多糖低剂量组	236.00 ± 3.27	228.43 ± 25.19 ^{**}	269.43 ± 19.81 ^{##ΔΔ}
生脉饮多糖中剂量组	236.71 ± 2.25	227.29 ± 15.49 ^{**}	258.00 ± 18.08 ^Δ
生脉饮多糖高剂量组	233.36 ± 6.30	240.71 ± 19.02 ^{**}	265.57 ± 39.93 ^{ΔΔ}

注:与空白组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$;与造模前比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

Note: vs. blank group, * $P < 0.01$; vs. model group, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; vs. pre-modeling, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

鼠血清D-木糖含量均显著低于空白组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。末次给药后,各组大鼠血清D-木糖含量均较给药前显著升高,且生脉饮中、高剂量组以及生脉饮多糖低、中剂量组大鼠血清D-木糖含量均显著高于同期模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表6。

表6 生脉饮及生脉饮多糖对脾虚模型大鼠血清D-木糖、GAS、VIP含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 6 Effects of Shengmaiyin and Shengmaiyin polysaccharide on serum contents of D-xylose, GAS and VIP in spleen deficiency model rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	D-木糖, mmol/L		GAS, ng/L	VIP, ng/L
	造模后(给药前)	末次给药后		
空白组	1.87 ± 0.16	2.28 ± 0.12 ^{ΔΔ}	203.03 ± 37.73	38.06 ± 12.53
模型组	1.02 ± 0.11 [*]	1.87 ± 0.45 ^{ΔΔ}	129.12 ± 15.33 [*]	67.61 ± 17.30 [*]
生脉饮低剂量组	0.99 ± 0.26 [*]	2.22 ± 0.50 ^{ΔΔ}	159.02 ± 39.15	44.70 ± 14.72 ^{##}
生脉饮中剂量组	0.89 ± 0.17 [*]	2.25 ± 0.28 ^{ΔΔ}	209.85 ± 30.82 ^{##}	45.79 ± 9.50 ^{##}
生脉饮高剂量组	0.87 ± 0.20 [*]	2.30 ± 0.33 ^{ΔΔ}	184.04 ± 27.10 ^{##}	50.22 ± 11.30 ^{##}
生脉饮多糖低剂量组	1.09 ± 0.18 [*]	2.51 ± 0.24 ^{##ΔΔ}	172.07 ± 45.45 [*]	47.34 ± 9.70 ^{##}
生脉饮多糖中剂量组	0.97 ± 0.25 [*]	2.56 ± 0.50 ^{##ΔΔ}	200.60 ± 10.82 ^{##}	37.57 ± 11.41 ^{##}
生脉饮多糖高剂量组	0.92 ± 0.15 [*]	1.92 ± 0.17 ^{ΔΔ}	151.06 ± 10.49	66.37 ± 10.14

注:与空白组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$;与造模后(给药前)比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

Note: vs. blank group, * $P < 0.01$; vs. model group, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; vs. post-modeling (before medication), $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

2.5.5 血清GAS、VIP含量 末次给药后,所有大鼠均禁食、不禁水12 h,自眼眶分别取血0.5 mL置于1.5 mL EP管内,静置1 h后,以3 500 r/min离心10 min,分离血清,采用ELISA法以全波长多功能酶标仪于450 nm波长处检测血清中GAS和VIP含量,严格按照试剂盒说明书操作。统计学方法同“2.5.3”项。

结果显示,与空白组比较,模型组大鼠血清GAS含量显著降低,VIP含量显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,生脉饮中、高剂量组以及生

脉饮多糖低、中剂量组大鼠血清GAS含量均显著升高,生脉饮各剂量组以及生脉饮多糖低、中剂量组大鼠血清VIP含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表6。

3 讨论

生脉饮出自《医学启源》,方中人参甘温,可益元气、补肺气、生津液,是为君药;麦冬甘寒,可养阴清热、润肺生津,是为臣药;二者合用,则益气养阴之功益彰。五味子酸温,可敛肺止汗、生津止渴,是为佐药。三药共奏,一补一润一敛,以达益气养阴、生津止渴之功。生脉饮方中人参、麦冬、五味子均含有大量多糖,对实验动物的肠道菌群失调有一定的改善作用^[2-8]。为此,本研究在优化生脉饮多糖提取工艺的基础上,初步探讨了生脉饮及其多糖对脾虚模型大鼠体质量和相关指标的影响。

中药的多糖提取率受提取方法、提取次数、提取温度、料液比等因素的影响较大^[13-16],需经过相关参数的优化来确定多糖的最优提取工艺。本研究通过单因素考察确定了各影响因素的参数范围,再结合经典的正交试验法、以多糖提取率为考察指标对生脉饮多糖提取工艺进行了筛选优化。结果显示,料液比1:10(g/mL)、提取时间45 min、提取温度80 ℃、提取1次为生脉饮多糖提取的最优工艺,且验证试验证实上述工艺稳定、可行。

中医认为“脾主运化”,其功能主要与小肠吸收、胃肠激素分泌等密切相关,脾失健运可导致腹胀、泄泻等肠道功能紊乱症状;同时,泄泻还可导致肠道蠕动加快、排便次数增加,最终造成肠道菌群的紊乱。大黄泻下致大鼠脾虚模型可致其肠道双歧杆菌、乳酸菌等厌氧菌数量显著减少,是公认的脾虚模型经典建立方法之一^[17-20],故本研究选择该方法建立大鼠脾虚模型。已有研究证实,生脉饮组方中的各药味均可不同程度地改善脾虚模型大鼠的肠道功能^[2-7],且本研究旨在初步考察生脉饮全方及其多糖对脾虚模型大鼠相关指标的影响,故暂未设立阳性对照组。

脾虚泄泻可导致大鼠肠道功能受损,使其体质量明显下降,故大鼠体质量的高低可间接反映其肠道功能正常与否。本研究结果显示,造模后(给药前),除空白组外,其余各组大鼠均出现大便溏稀、形体消瘦、食量减少等症状,且其体质量均较空白组显著降低。末次给药后,除模型组外,其余各组大鼠的体质量均显著增加,且生脉饮中剂量组及生脉饮多糖低、高剂量组大鼠体质量均较模型组显著升高。这提示生脉饮及其多糖可不同程度地缓解脾虚模型大鼠大便溏稀等症状,并有助于增加其体质量、恢复其肠道功能。

D-木糖是一种戊糖,口服后经小肠吸收,在体内不被肝脏代谢,直接经肾脏排出。正常情况下,D-木糖在血液中是几乎不存在的,因此在灌服一定剂量的D-木糖溶液后测定血清中D-木糖含量,可用以间接评价肠黏膜的吸收功能^[21]。本研究结果显示,造模后(给药前),模

型组及各给药组大鼠血清D-木糖含量均显著低于空白组,差异均有统计学意义;末次给药后,各组大鼠血清D-木糖含量均较给药前显著升高,且生脉饮中、高剂量组以及生脉饮多糖低、中剂量组大鼠血清D-木糖含量均显著高于同期模型组。这提示生脉饮及其多糖可促进D-木糖的小肠吸收,可能与其恢复肠道黏膜功能有关^[7]。

GAS是一种很重要的胃肠道激素,主要是由胃窦G细胞分泌,具有调节吸收、转运及代谢等生理活性,是衡量胃肠道生理功能的重要指标^[21],其含量的降低提示消化道功能处于低下或紊乱状态^[21-22]。VIP是肠道主要的抑制性神经递质之一,其可抑制胃酸的分泌,是胃肠道疾病研究的重要指标^[23]。本研究结果显示,与空白组比较,模型组大鼠血清GAS含量显著降低,VIP含量显著升高,差异均有统计学意义;与模型组比较,生脉饮中、高剂量组以及生脉饮多糖低、中剂量组大鼠血清GAS含量均显著升高,生脉饮各剂量组以及生脉饮多糖低、中剂量组大鼠血清VIP含量均显著降低。这提示生脉饮及其多糖对脾虚模型大鼠肠道的改善作用可能与调节肠道GAS、VIP含量有关。

本研究结果还显示,与模型组比较,末次给药后生脉饮高剂量组以及生脉饮多糖中剂量组大鼠体质量虽有所增加,但组间比较差异均无统计学意义,且与空白组亦无显著差异,笔者推测可能与大鼠个体差异有关。此外,生脉饮多糖高剂量组大鼠血清D-木糖(末次给药后)、GAS和VIP含量与模型组比较,差异均无统计学意义,笔者推测可能与剂量设置范围有关,具体量效关系还有待后续研究进一步探索。

综上所述,本研究以多糖提取率为指标,确定了生脉饮多糖的最优提取工艺,即料液比1:10(g/mL)、提取时间45 min、提取温度80℃、提取1次。生脉饮及其多糖可有助于恢复脾虚模型大鼠的肠道功能,这种作用可能与其调节肠道GAS、VIP等因子分泌有关。但本研究并未考察两者对肠道菌群的影响,也未深入挖掘其具体作用机制和量效关系,故有待后续研究进一步完善。

参考文献

[1] 林美斯,陈哲杰,罗林,等.生脉饮研究现状及其制剂开发中的问题分析[J].*中药与临床*,2017,8(2):69-73.

[2] ZHOU SS, XU J, ZHU H, et al. Gut microbiota-involved mechanisms in enhancing systemic exposure of ginsenosides by coexisting polysaccharides in ginseng decoction [J]. *Sci Rep*, 2016. DOI:10.1038/srep22474.

[3] SHI LL, LI Y, WANG Y, et al. MDG-1, an Ophiopogon polysaccharide, regulate gut microbiota in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2015.08.057.

[4] 王令仪,王源,阮克锋,等.麦冬多糖MDG-1对非糖尿病

小鼠糖耐量及肠道菌群的影响[J].*中国新药与临床杂志*,2011,30(6):453-457.

[5] 王令仪,王源,王源,等.麦冬多糖MDG-1对糖尿病小鼠糖耐量及肠道菌群的影响[J].*世界华人消化杂志*,2011,19(19):2058-2062.

[6] 石林林,王源,冯怡.麦冬多糖MDG-1对膳食诱导肥胖模型小鼠肠道益生菌群多样性影响的研究[J].*中国中药杂志*,2015,40(4):716-721.

[7] 周卫东,项磊,陈泽伟,等.五味子多糖对化疗性肠道黏膜炎小鼠的保护作用[J].*中国实验方剂学杂志*,2016,22(22):124-128.

[8] 田碧文,胡宏.阿胶、五味子、刺五加、枸杞对双歧杆菌生长的影响[J].*中国微生态学杂志*,1996,8(2):11-13.

[9] 王法琴,陆兔林,毛春芹,等.3种比色法测定五味子中多糖[J].*中成药*,2015,37(4):814-818.

[10] 赵娟.生脉散对II型糖尿病心肌纤维化的影响及机制研究[D].上海:上海中医药大学,2016.

[11] 倪青,王阶,赵安斌,等.生脉散对2型糖尿病性心脏病大鼠心肌的保护作用[J].*中国中医基础医学杂志*,2010,16(7):572-576.

[12] 王丹凤,刘玉强,才谦.苍术麸炒前后健脾作用研究[J].*时珍国医国药*,2013,24(1):155-156.

[13] 高笑一,鲍建才,黄建军.人参多糖化学的国内研究新进展[J].*人参研究*,2018,30(4):44-46.

[14] 王润平,冉夏雨.人参多糖提取的正交优化[J].*广州化工*,2018,46(10):63-65.

[15] 卢少玲,宋照凤,江龙章,等.微波提取麦冬多糖工艺的探究[J].*广东化工*,2018,45(9):102-104.

[16] 王彤,李德坤,周大铮,等.麦冬总糖提取工艺考察[J].*辽宁中医药大学学报*,2018,20(2):37-40.

[17] 沈丽波,钱会南.脾虚模型实验研究方法概述[J].*中国中医药信息杂志*,2005,12(1):93-95.

[18] 吴三明,张万岱.脾虚泄泻患者肠道微生物学的初步研究[J].*中国中西医结合脾胃杂志*,1996,4(4):203-204.

[19] 赵冉,王育苗,黄树杰,等.金仁陈子方对小鼠脾虚模型肠道菌群的影响研究[J].*医学研究杂志*,2014,43(6):59-62.

[20] 张仲林,臧志和,钟玲,等.六君子汤对脾虚证大鼠胃肠激素影响的实验研究[J].*中成药*,2010,32(4):659-661.

[21] 陆英杰,连志诚.胃肠激素对胃肠动力的影响[J].*免疫学杂志*,2006,22(3):94-96.

[22] 金敬善,王广才,张绳祖,等.血清中胃泌素水平与脾虚证的关系[J].*中西医结合杂志*,1982,2(1):25-26,62.

[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.

(收稿日期:2018-06-24 修回日期:2018-12-04)

(编辑:张元媛)