

· 经典名方 ·

五子衍宗丸中所含药物盐制后组方对 大鼠生精细胞凋亡的影响

廖宇娇, 张希, 敖明月, 胡昌江, 陈志敏*, 许润春*
(成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的:观察由不同炮制品组方的五子衍宗丸对肾精亏虚大鼠生精细胞凋亡的影响,探讨其对生精细胞的保护作用。方法:将SD大鼠随机分成空白组、模型组、全生品组、药典组、盐制组,每组8只。通过给予雷公藤多苷片复制肾精亏虚模型(剂量 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),利用流式细胞术(FCM)分析睾丸中生精细胞凋亡情况,运用免疫组化(IHC)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测睾丸中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)和Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达水平。采用高效液相色谱法(HPLC)比较由不同炮制品组方的五子衍宗丸中8个成分(绿原酸、鞣花酸、金丝桃苷、异槲皮苷、毛蕊花糖苷、紫云英苷、山柰酚、五味子醇甲)的含量,流动相乙腈(A)-0.4%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~5 min, 5%~15%A; 5~10 min, 15%~17%A; 10~25 min, 17%A; 25~35 min, 17%~26%A; 35~60 min, 26%~56%A),检测波长254 nm。结果:与模型组比较,各给药组对生精细胞总凋亡率, Bcl-2和Bax表达均有改善作用,且药典组与盐制组有显著作用($P<0.01$);同时,药典组与盐制组的改善作用明显优于全生品组($P<0.05$)。药物炮制后组方的五子衍宗丸中绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、毛蕊花糖苷含量增加;盐制组鞣花酸含量增加,但药典组鞣花酸含量减少;盐制组样品中毛蕊花糖苷、紫云英苷、山柰酚、五味子醇甲的含量高于药典组样品。结论:五子衍宗丸可能通过抑制Bax和促进Bcl-2的蛋白表达来减少大鼠睾丸中生精细胞的凋亡,发挥其补肾益精作用;组方药物炮制后抗生精细胞凋亡作用增强可能与炮制后化学成分含量的变化有关。

[关键词] 五子衍宗丸; 盐制; 肾精亏虚; 生精细胞凋亡; B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2); Bcl-2相关X蛋白(Bax); 化学成分

[中图分类号] R28; R943.1; Q2; Q657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)10-0001-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210946

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210208.1806.001.html>

[网络出版日期] 2021-2-9 11:24

Effect of Herbal Medicines in Wuzi Yanzong Wan Processed with Salt-water on Apoptosis of Spermatogenic Cells in Rats

LIAO Yu-jiao, ZHANG Xi, AO Ming-yue, HU Chang-jiang, CHEN Zhi-min*, XU Run-chun*
(School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Wuzi Yanzong Wan made of different processed products on the apoptosis of spermatogenic cells in rats with kidney essence deficiency, and explore its protective effect on spermatogenic cells. **Method:** SD rats were randomly divided into the blank group, model group, whole raw product group, pharmacopoeia group and salt-processed product group, with 8 rats in each group. The kidney essence deficiency model was replicated by giving tripterygium glycoside tablets (the dose of $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The flow cytometry (FCM) was used to analysis the apoptosis of spermatogenic cells in testis, the

[收稿日期] 20201231(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773899);成都中医药大学杏林学者学科人才科研提升计划项目(BSH20191026);成都中医药大学西南特色中药资源国家重点实验室开放研究基金项目(2020BSH012)

[第一作者] 廖宇娇,在读硕士,从事中药药剂学研究, E-mail: 602843904@qq.com

[通信作者] * 陈志敏,博士,讲师,从事中药炮制研究, E-mail: chenzhimin@cdutcm.edu.cn;

* 许润春,博士,副教授,从事中药炮制研究, E-mail: 309786953@qq.com

immunohistochemistry (IHC) and Western blot were used to detect the expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) in the testis. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to compare the contents of eight components (chlorogenic acid, ellagic acid, hyperoside, isoquercitrin, verbascoside, astragaloside, kaempferol and schisandrin) in Wuzi Yanzong Wan made of different processed products, the mobile phase was composed of acetonitrile (A)-0.4% phosphoric acid aqueous solution (B) for gradient elution (0-5 min, 5%-15%A; 5-10 min, 15%-17%A; 10-25 min, 17%A; 25-35 min, 17%-26%A; 35-60 min, 26%-56%A), the detection wavelength was set at 254 nm. **Result:** Compared with the model group, the total apoptosis rate of spermatogenic cells, protein expression of Bax and Bcl-2 in each administration group were improved. Among them, the pharmacopoeia group and salt-processed product group had significant effects ($P<0.01$), and the improvement effect of the pharmacopoeia group and salt-processed product group was significantly better than that of the whole raw product group ($P<0.05$). The contents of chlorogenic acid, hyperoside, isoquercitrin and verbascoside in Wuzi Yanzong Wan were increased after the herbal medicines being processed with salt-water. The content of ellagic acid in the salt-processed product group increased, while it decreased in the pharmacopoeia group. The contents of verbascoside, astragaloside, kaempferol and schisandrin in samples from the salt-processed product group were greater than those in samples from the pharmacopoeia group. **Conclusion:** Wuzi Yanzong Wan may reduce the apoptosis of spermatogenic cells in rat testis by inhibiting the expression of Bax and promoting the expression of Bcl-2, and exert its effect of nourishing kidney and enriching essence. The enhanced anti-spermatogenic effect of Wuzi Yanzong Wan after processing may be related to the changes in chemical composition content after processing.

[Key words] Wuzi Yanzong Wan; processing with salt-water; deficiency of kidney essence; apoptosis of spermatogenic cells; B-cell lymphoma-2 (Bcl-2); Bcl-2 associated X protein (Bax); chemical composition

五子衍宗丸是临床用于补肾益精的常用方,最早记载于《摄生众妙方》,具有填精益髓、补肾固精的功效,被称为“古今第一种子方”^[1]。由菟丝子、枸杞子、覆盆子、车前子、五味子组成,方中菟丝子、枸杞子补肾益精、益阴扶阳为君药;覆盆子、五味子固肾涩精为臣药;车前子利尿泻热为佐药,诸药合用,具有补中有泻、涩中有利、补阴扶阳的配伍特点,主要用于阳痿不育、遗精早泄等证^[2]。临床上常以其原方或加减方治疗肾精亏虚所致男性生殖系统疾病^[3-7],并取得良好疗效。

饮片炮制是中医临证治病用药的一大特色,中药炮制理论认为“盐制入肾”,药物盐制能引药下行,增强补肝肾、强筋骨的功效^[8]。在2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)^[9]所载五子衍宗丸中,菟丝子炒制、五味子蒸制,仅车前子盐炙;但在《中药制剂手册》所载五子衍宗丸中,运用的则是盐菟丝子,以补肾填精^[10]。据《中药炮制学辞典》记载,菟丝子盐炙可去其温燥之性,增强补肾固涩的作用^[11]。此外,《时方妙用·时方歌括》^[12]中要求五味子“盐水浸炒”;现代研究发现覆盆子盐制后补肾益精作用增强^[13]。针对五子衍宗丸中药物是否盐制后效果更佳这一问题,本课题组前期分别

研究了覆盆子、五味子、枸杞子盐制前后对肾精亏虚大鼠的作用,证实盐覆盆子、盐五味子效果更优,但枸杞子盐制前后无明显差异^[13];同时,以五子衍宗丸为研究对象,考察其所含药物盐制前后组方的补肾益精作用差异,结果发现药物盐制后组方可增强该复方对肾精亏虚大鼠精子密度、精子活率、睾丸及精囊腺脏器指数的改善作用^[14-15]。初步证明盐制可增强五子衍宗丸的补肾益精作用,但其作用机制尚不明确。基于此,本实验拟制备肾精亏虚模型,观察由不同炮制品组成的五子衍宗丸对大鼠生精细胞凋亡及凋亡因子B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达的影响,结合高效液相色谱法(HPLC)分析各灌胃药液中主要成分含量,探讨五子衍宗丸所含药物盐制后组方的科学性。

1 材料

85-2型数显控温磁力搅拌器(常州市金坛大地自动化仪器厂),CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman公司),Neofuge 13R型冷冻离心机[力新仪器(上海)有限公司],DYCZ-24DN型双垂直电泳仪(北京六一仪器厂),V300型扫描仪(精工爱普生公司),XSP-C204型显微镜(重庆光电仪器有限公司),KZ-II型匀浆仪和MX-F型涡旋混合器(武汉赛

维尔生物科技有限公司)。

菟丝子、枸杞子、覆盆子、车前子、五味子饮片均由四川新绿色药业科技发展有限公司提供,经成都中医药大学胡昌江教授鉴定,分别为旋花科植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* 的干燥成熟种子、茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* 的干燥成熟果实、蔷薇科植物华东覆盆子 *Rubus chingii* 的干燥果实、车前科植物车前 *Plantago asiatica* 的干燥成熟种子、木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* 的干燥成熟果实。绿原酸(批号 110753-202018,纯度 96.1%),金丝桃苷(批号 111521-201809,纯度 94.9%),五味子醇甲(批号 110857-201815,纯度 99.7%),山柰酚(批号 110861-202013,纯度 93.2%),毛蕊花糖苷(批号 111530-201914,纯度 95.2%),异槲皮苷(批号 111809-201804,纯度 97.2%)对照品均购于中国食品药品检定研究院;鞣花酸(批号 CHB-R-039)和紫云英苷(批号 CHB-Z-050)购于成都克洛玛生物科技有限公司,纯度均 $\geq 98\%$ 。雷公藤多苷片(湖南千金协力药业有限公司,批号 20171104,批准文号国药准字 Z43020138),细胞凋亡试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 BMS500FI-300);聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白定量试剂盒(批号 G2026),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒(批号 G2003),组化试剂盒二氨基联苯胺(DAB)显色剂(批号 G1211),Bcl-2 抗体(批号 GB12008),Bax 抗体(批号 GB11007-1), β -肌动蛋白(β -actin,批号 GB12001),辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔鼠(批号 G1211)均由武汉赛维尔生物科技有限公司提供;水为纯净水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

清洁级雄性 SD 大鼠,体质量(200 ± 20) g,购自成都达硕实验动物有限公司,合格证号 SCXK(川)2015-030。饲养于温度(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 55% $\pm$ 10%的环境中,保持 12 h 光照,12 h 黑暗,适应性饲养 1 周,初次给药前及末次给药前禁食 12 h,自由饮水。本文涉及的动物实验获成都中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号 TCM-2016-312。

2 方法与结果

2.1 药材的炮制

2.1.1 炒菟丝子^[16] 取净菟丝子,照清炒法[2020 年版《中国药典》(四部)通则 0213]炒至微黄,取出,放凉。

2.1.2 盐菟丝子^[16] 取净菟丝子,加入盐水拌匀,待盐水吸尽后,置炒制容器内,照盐炙法[2020 年版

《中国药典》(四部)通则 0213]炒至微鼓起,取出,放凉。每 100 g 菟丝子,用食盐 2 g。

2.1.3 盐覆盆子^[13] 取净覆盆子,加入盐水拌匀,闷润,待盐水吸尽后,置蒸制容器内蒸至透心,取出,干燥。每 100 g 覆盆子,用食盐 2 g。

2.1.4 盐车前子^[16] 取净车前子,置炒制容器内,照盐水炙法[2020 年版《中国药典》(四部)通则 0213]炒至起爆裂声时,喷洒盐水,炒干,取出,放凉。每 100 g 车前子,用食盐 2 g。

2.1.5 蒸五味子^[16] 取净五味子,照清蒸法[2020 年版《中国药典》(四部)通则 0213]蒸至表面黑色,取出,干燥。

2.1.6 盐五味子 取净五味子,加入盐水拌匀,闷润,待盐水吸尽后,置炒制容器内,文火炒干,取出,放凉^[17]。每 100 g 五味子,用食盐 2 g。

2.2 五子衍宗丸对生精细胞凋亡的影响

2.2.1 灌胃液的制备 取菟丝子、枸杞子、覆盆子、车前子、五味子,粉碎过 100 目筛,按 2020 年版《中国药典》(一部)^[9]规定的比例(8:8:4:2:1)称取药材粉末,加水配制成 $108 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混悬液,即得全生品组灌胃液。取炒菟丝子、枸杞子、覆盆子、盐车前子、蒸五味子,同法制得药典组灌胃液。取盐菟丝子、枸杞子、盐覆盆子、盐车前子、盐五味子,同法制得盐制组灌胃液。

2.2.2 动物分组、造模、给药及处理^[18] 将 SD 大鼠随机分成空白组、模型组、全生品组、药典组、盐制组,每组 8 只。上午除空白组外,其余各组灌胃给予雷公藤多苷($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。下午各给药组按剂量 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 灌胃对应药液(临用前用磁力搅拌器搅拌),模型组、空白组灌胃纯净水,连续给药 30 d。第 31 天处死大鼠,立刻取睾丸组织。

2.2.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐性采用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐采用 Tamhane's T^2 检验; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.2.4 生精细胞凋亡水平的检测 将 6 mL 的生理盐水预热至 37°C ,取适量右侧睾丸组织放入其中,剪碎,摇匀,经 300 目滤布过滤,用生理盐水调节细胞浓度为 1×10^6 个/mL,备用。取 1×10^6 个/mL 单细胞悬液 100 μL ,加入新鲜配制的 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 200 μL 重悬细胞,分别加入异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V(Annexin V-FITC)5 μL 和碘化丙啶(PI)10 μL ,涡旋混匀,室温避光,染色 5 min,立即上机

检测,采用Kaluza 2.1软件进行数据分析。结果发现与空白组比较,模型组生精细胞总凋亡率显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组生精细胞总凋亡率均减少,其中药典组、盐制组具有显著性差异($P<0.01$),且药典组与盐制组均明显低于全生品组($P<0.05$)。见表1。

2.2.5 免疫组化法测定睾丸中Bax和Bcl-2的蛋白表达 取部分右侧睾丸组织,放入Bouin's固定液中固定,常规制备石蜡切片,DAB显色后显微镜镜检,图像采集分析。苏木素染细胞核为蓝色,DAB显出的阳性表达为棕黄色。计算平均积分吸光度(AA)[AA=每张照片阳性的累积吸光度/组织的像素面积]。结果发现与空白组比较,模型组睾丸中Bax表达显著增加,Bcl-2表达显著减少($P<0.01$);与模型组比较,各给药组的Bax,Bcl-2表达均得到改善,其

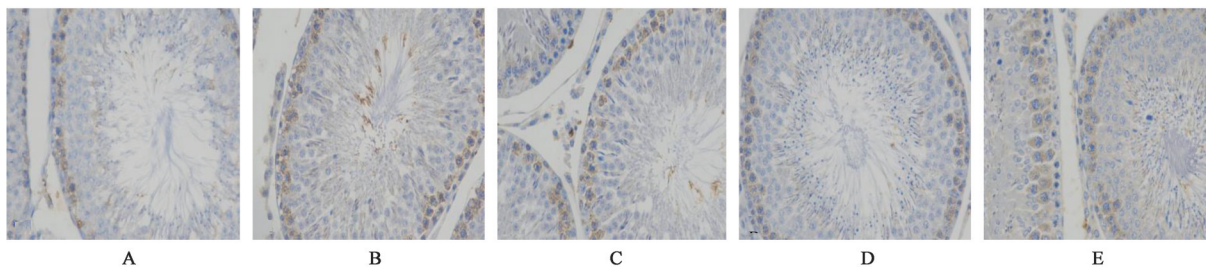
表1 各组大鼠睾丸的生精细胞总凋亡率及Bax,Bcl-2蛋白表达($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Total apoptotic rate of spermatogenic cells and protein expression of Bax and Bcl-2 in testis of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	细胞 总凋亡率/%	Bax 阳性表达	Bcl-2 阳性表达
空白		3.52±0.57	0.004 0±0.001 6	0.004 4±0.001 1
模型		4.70±0.58 ²⁾	0.008 1±0.003 1 ²⁾	0.001 7±0.000 4 ²⁾
全生品	1.08	4.41±0.48	0.006 9±0.000 8	0.002 4±0.000 9
药典	1.08	3.70±0.56 ^{3,4)}	0.004 2±0.0015 ^{3,4)}	0.003 9±0.000 7 ^{3,4)}
盐制	1.08	3.67±0.78 ^{3,4)}	0.004 0±0.002 2 ^{3,4)}	0.004 3±0.002 3 ^{3,4)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.01$;与全生品组比较⁴⁾ $P<0.05$ (表2同)。

中药典组和盐制组具有显著性差异($P<0.01$),且药典组与盐制组的作用明显优于全生品组($P<0.05$)。见表1和图1,2。



A. 空白组;B. 模型组;C. 全生品组;D. 药典组;E. 盐制组(图2,3同)

图1 各组大鼠睾丸中的Bax蛋白表达(免疫组化,×400)

Fig. 1 Protein expression of Bax in testis of rats in each group (IHC,×400)

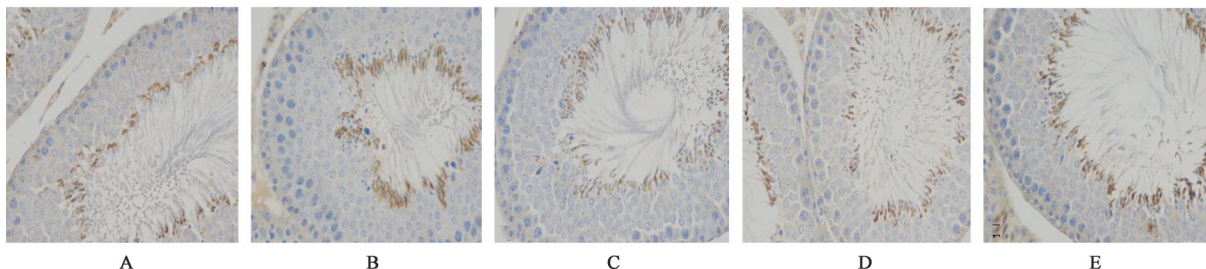


图2 各组大鼠睾丸中的Bcl-2蛋白表达(免疫组化,×400)

Fig. 2 Protein expression of Bcl-2 in testis of rats in each group (IHC,×400)

2.2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测睾丸中Bax和Bcl-2的蛋白表达 取大鼠左侧睾丸组织约100 mg,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗2~3次,加入RIPA裂解液,冰上手动匀浆60 s并冰浴30 min;于4℃,12 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径8.3 cm),收集上清液;严格按照BCA蛋白浓度测定试剂盒测蛋白浓度;沸水浴变性15 min;在15%分离胶及5%浓缩胶上进行电泳并完成转膜,用5%脱脂牛奶封闭1 h;4℃一抗孵育过夜,洗膜3次,每次5 min,室

温二抗孵育30 min,洗膜3次,每次5 min,电化学发光(ECL)显影,将胶片进行扫描存档,PhotoShop整理去色,Alpha软件处理系统分析目标带的灰度值。结果发现与空白组比较,模型组睾丸组织中Bax表达明显增加($P<0.05$),Bcl-2表达显著减少($P<0.01$);与模型组比较,各给药组的Bax和Bcl-2表达均得到了一定程度的改善,其中药典组和盐制组具有显著性差异($P<0.01$),且药典组与盐制组的作用明显优于全生品组($P<0.05$)。见表2和图3。

表2 各组大鼠睾丸中Bax和Bcl-2的相对表达量($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Relative expression levels of Bax and Bcl-2 in testis of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin
空白		0.34±0.09	0.52±0.07
模型		0.45±0.08 ¹⁾	0.37±0.09 ²⁾
全生品	1.08	0.37±0.07	0.46±0.07
药典	1.08	0.28±0.08 ^{3,4)}	0.49±0.07 ^{3,4)}
盐制	1.08	0.26±0.06 ^{3,4)}	0.50±0.06 ^{3,4)}

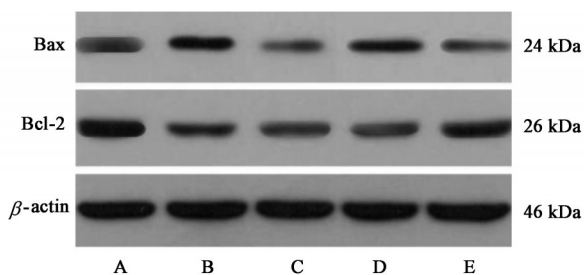
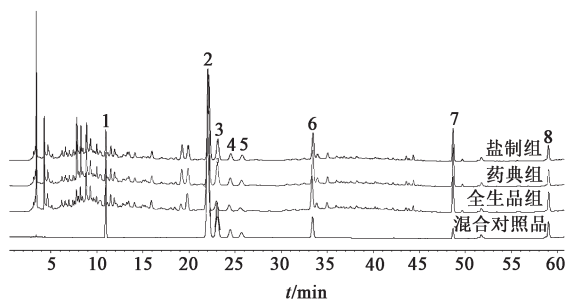


图3 各组大鼠睾丸组织中Bax和Bcl-2蛋白电泳表达情况

Fig. 3 Electrophoresis expression of Bax and Bcl-2 protein in testis of rats in each group

2.3 五子衍宗丸中8个成分的含量测定

2.3.1 色谱条件 采用Agilent 5TC-C₁₈(2)色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相选择乙腈(A)-0.4%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~5 min, 5%~15%A; 5~10 min, 15%~17%A; 10~25 min, 17%A; 25~35 min, 17%~26%A, 35~60 min, 26%~56%A),柱温40℃,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长254 nm,进样量5 μL。见图4。



1. 绿原酸; 2. 鞣花酸; 3. 金丝桃苷; 4. 异槲皮苷; 5. 毛蕊花糖苷; 6. 紫云英苷; 7. 山柰酚; 8. 五味子醇甲

图4 混合对照品和五子衍宗丸样品的HPLC

Fig. 4 HPLC of mixed reference substance and Wuzi Yanzong Wan samples

2.3.2 五子衍宗丸供试品溶液制备 按8:8:4:2:1的比例分别称取枸杞子、菟丝子、覆盆子、车前子、五味子粉末,过筛混匀,备用;取2 g,精密称定,置干燥洁净的具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇50 mL,称定质量,超声60 min(功率250 W,频率30 kHz),

取出,放冷,称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,续滤液经0.45 μm微孔滤膜过滤,得全生品组供试品溶液。同法制得药典组供试品溶液与盐制组供试品溶液。

2.3.3 对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸、鞣花酸、金丝桃苷、异槲皮苷、毛蕊花糖苷、紫云英苷、山柰酚、五味子醇甲对照品适量,置于5 mL量瓶中,加甲醇使溶解并定容至刻度,摇匀,得质量浓度分别为410, 436, 480, 400, 458, 412, 408, 432 mg·L⁻¹的对照品储备液。分别吸取上述对照品储备液240, 300, 240, 80, 240, 130, 80, 80 μL至5 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,得混合对照品溶液。

2.3.4 线性关系考察 依次精密吸取2.3.3项下的绿原酸、鞣花酸、金丝桃苷、异槲皮苷、毛蕊花糖苷、紫云英苷、山柰酚、五味子醇甲对照品储备液700, 370, 220, 120, 255, 280, 180, 57 μL至5 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,分别精密吸取2, 5, 10, 15, 20, 25 μL,按2.3.1项下色谱条件测定。以对照品进样量(μg)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程,见表3。

表3 五子衍宗丸中8个成分含量测定的线性关系考察

Table 3 Investigation on linear relationship of determination of 8 ingredients in Wuzi Yanzong Wan

成分	回归方程	R ²	线性范围/μg
绿原酸	$Y=19.278X-0.1098$	0.9998	0.1148~1.4350
鞣花酸	$Y=200.87X+1.1514$	0.9998	0.0645~0.8065
金丝桃苷	$Y=46.958X+0.1492$	0.9998	0.0422~0.5280
异槲皮苷	$Y=41.297X-0.1087$	0.9991	0.0192~0.2400
毛蕊花糖苷	$Y=11.084X+0.0096$	0.9998	0.0467~0.5840
紫云英苷	$Y=30.188X+0.0912$	0.9996	0.0461~0.5678
山柰酚	$Y=28.055X+0.1883$	0.9999	0.0294~0.3673
五味子醇甲	$Y=49.442X+0.0265$	0.9999	0.0098~0.1225

2.3.5 精密度试验 取2.3.3项下混合对照品溶液,按2.3.1项下色谱条件连续进样6次,记录各成分峰面积,计算绿原酸、鞣花酸、金丝桃苷、异槲皮苷、毛蕊花糖苷、紫云英苷、山柰酚、五味子醇甲峰面积的RSD均<1.5%,表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取同一五子衍宗丸全生品组供试品溶液适量,分别于制备后0, 2, 4, 8, 12, 24 h按2.3.1项下条件测定,记录各成分峰面积,计算绿原酸、鞣花酸、金丝桃苷、异槲皮苷、毛蕊花糖苷、紫云英苷、山柰酚、五味子醇甲峰面积的RSD均<2.0%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.3.7 重复性试验 按2.3.2项下方法平行制备五子衍宗丸全生品组供试品溶液6份,按2.3.1项下色谱条件测定,记录各成分峰面积,计算绿原酸、鞣花酸、金丝桃苷、异槲皮苷、毛蕊花糖苷、紫云英苷、山柰酚、五味子醇甲平均质量分数分别为0.077%, 0.038%, 0.021%, 0.018%, 0.038%, 0.11%, 0.042%, 0.044%, RSD均<2.0%,表明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收试验 按8:8:4:2:1的比例分别称取枸杞子、菟丝子、覆盆子、车前子、五味子粉末,过

筛混匀,称取6份,每份1.0 g,按1:1比例分别依次加入绿原酸、鞣花酸、金丝桃苷、异槲皮苷、毛蕊花糖苷、紫云英苷、山柰酚、五味子醇甲对照品,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件测定,计算上述8个成分的平均加样回收率分别为98.43%, 97.66%, 98.71%, 101.44%, 96.58%, 99.27%, 96.55%, 102.72%, RSD均<2.6%。

2.3.9 样品测定 取各组供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件测定,计算8个成分的含量,见表4。

表4 五子衍宗丸样品中8个成分的质量分数(n=3)

样品	绿原酸	鞣花酸	金丝桃苷	异槲皮苷	毛蕊花糖苷	紫云英苷	山柰酚	五味子醇甲
全生品组	0.074 9	0.037 5	0.022 3	0.019 0	0.037 7	0.105 9	0.041 4	0.044 3
药典组	0.097 4	0.035 5	0.048 4	0.022 4	0.060 4	0.083 6	0.035 8	0.032 3
盐制组	0.086 6	0.038 9	0.045 8	0.019 3	0.061 5	0.103 4	0.037 6	0.037 0

3 讨论

据报道,约10%~15%育龄夫妇有生育障碍,其中男方因素约占50%,精少、精弱占男性不育的75%^[19-20]。五子衍宗丸作为临床补肾益精的常用方,在治疗男性生殖系统疾病方面运用广泛。中药炮制理论认为,盐制入肾,肾主生殖,前期研究发现五子衍宗丸对精子活力、密度、睾丸脏器指数等有改善作用,且以盐制后组方效果更佳,但作用机制尚不明确^[14-15]。有研究表明,在精子发生过程中,睾丸精原细胞不断增殖与生精细胞正常凋亡共同保证了精子的数量与质量,生精细胞的异常凋亡是引起少弱精症的重要因素^[21-23]。生精细胞凋亡与基因、激素调控及其他理化因素密切相关,受多种凋亡因子调控,其中Bcl-2和Bax来自Bcl-2家族,定位于正常大鼠生精细胞细胞间质中,Bax与Bcl-2通过形成同源二聚体或异源二聚体调节细胞凋亡,当二者处于正常平时生精细胞正常增殖与凋亡,当细胞中Bax过量时,与所有Bcl-2形成异源二聚体,导致细胞过量凋亡^[24-25]。另外,有研究发现雷公藤多苷片具有生殖系统毒性,长期给予雷公藤多苷片可显著降低睾丸、附睾指数,减少精子及生精小管内生精细胞总数,显著增加精子畸形率、不动精子数及生精细胞凋亡率^[26-28]。因此,本文选择雷公藤多苷片复制肾精亏虚模型,探讨不同炮制品组方后五子衍宗丸对生精细胞凋亡的影响。

本文研究结果发现,模型组生精细胞凋亡较空白组明显增加,睾丸中凋亡因子Bax和Bcl-2表达异常,表明模型复制成功。给予五子衍宗丸后,能减

少大鼠生精细胞凋亡,增加睾丸中Bcl-2的表达,减少Bax的表达,与文献[22]报道一致;同时,以药物炮制后组方的五子衍宗丸效果更佳,且盐制组有优于药典组的趋势,提示药物炮制后组方的五子衍宗丸可以增强其补肾益精作用。2020年版《中国药典》中五子衍宗丸以金丝桃苷和五味子醇甲进行质量控制,也有学者提出测定金丝桃苷、异槲皮苷、山柰酚、毛蕊花糖苷、紫云英苷、五味子醇甲6个成分的含量可以更加全面地评价五子衍宗丸的内在质量^[29];同时,本课题组研究发现五子衍宗丸中绿原酸、鞣花酸对该复方的补肾涩精作用有一定贡献^[2]。因此,本文选择绿原酸、鞣花酸、金丝桃苷等8个成分作为含量测定评价指标。结果发现炮制后组方的五子衍宗丸中绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、毛蕊花糖苷含量增加,提示炮制可能通过促进药物溶出而增效;盐制组样品中鞣花酸含量增加,但药典组样品中其含量则减少,而现代研究表明鞣花酸具有减轻睾丸损伤、提高精子质量的作用^[30],提示鞣花酸可能对五子衍宗丸的补肾益精作用有重要贡献,推测对鞣花酸的不同影响可能是盐制组改善作用略优于药典组的原因之一。

综上所述,本文从不同炮制品组方五子衍宗丸对生精细胞凋亡的影响入手,探讨了该复方改善生精细胞凋亡的作用机制;并结合化学成分研究,表明鞣花酸可能是盐制组增效机制的原因之一。但中药复方是一个复杂的化学体系,其发挥疗效可能与各成分间的比例有关,炮制也有可能是通过改变五子衍宗丸中各成分间的比例来改变疗效,但炮制

是如何影响化学成分之间的比例还需通过增大样本量来进一步研究。同时,在建立的HPLC中,绿原酸分离度不太理想,且化学成分研究尚不深入,后续将优化色谱条件,更加精确地测定其含量,并建立不同炮制品组方后五子衍宗丸补肾益精作用的谱效关系,研究化学成分与药效之间的相关性。此外,盐制引药下行,直达病所,也可能通过促进有效成分的吸收、分布等过程来增强药效,后续还需加强此方面研究。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 张时彻. 摄生众妙方[M]. 北京:中医古籍出版社, 2004:237.
- [2] 张希,廖宇娇,杨卓,等. 五子衍宗丸补肾涩精有效部位的谱效关系[J]. 中成药,2020,42(8):2150-2153.
- [3] 李浩,俞旭君,阳方,等. 五子衍宗丸治疗男性不育症64例临床研究[J]. 中国性科学,2020,29(10):123-126.
- [4] 曹圣,热增才旦,李永平,等. 五子衍宗方及其拆方对大鼠糖尿病性勃起功能障碍、生精细胞凋亡及NO-cGMP通路的影响[J]. 中国高原医学与生物学杂志,2018,39(2):112-117.
- [5] 丁劲,张耀圣,商建伟. 五子衍宗丸治疗男性不育症的网络药理学探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(20):25-35.
- [6] 柯明辉. 基于支持细胞骨架研究补肾填精法治疗男性不育少精子症的效果和机制[D]. 北京:北京中医药大学,2017.
- [7] 何萌萌. 热激对大鼠睾丸生精细胞的凋亡作用与机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2015.
- [8] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 全国中药炮制规范[M]. 北京:人民卫生出版社,1988:178.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:611.
- [10] 中医研究院中药研究所. 中药制剂手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1975:77.
- [11] 叶定江,原思通. 中药炮制学辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005:372.
- [12] 陈修园. 时方妙用·时方歌括[M]. 北京:中国中医药出版社,2016.
- [13] 张希,廖宇娇,杨卓,等. 覆盆子盐制前后化学成分及药效学变化研究[J]. 时珍国医国药,2020,31(1):82-84.
- [14] 张希,杨卓,陈志敏,等. 五子衍宗丸中药物盐制前后的药效分析[J]. 中成药,2019,41(11):2706-2710.
- [15] 胡麟,吴珊珊,吴文辉,等. 五子衍宗丸中药物盐制对补肾生精作用的影响[J]. 中医药导报,2016,22(19):23-25,28.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:31.
- [17] 逢世峰,许世泉,孙成贺,等. 盐炙北五味子最佳炮制工艺研究[J]. 特产研究,2012,34(4):49-51,57.
- [18] 柯明辉,刘保兴,王传航,等. 五子衍宗丸改善肾精亏虚证大鼠精液质量及机制研究[J]. 中国男科学杂志,2016,30(9):30-33.
- [19] KHATUN A, RAHMAN M S, PANG M G. Clinical assessment of the male fertility [J]. Obstet Gynecol Sci,2018,61(2):179-191.
- [20] 刘媛,葛平玉. 中医药治疗少、弱精子症的现状[J]. 贵阳中医学院学报,2019,41(6):79-83.
- [21] ZHAO Y S, ZHANG S B. PGAM1 knockdown is associated with busulfan-induced hypospermatogenesis and spermatogenic cell apoptosis [J]. Mol Med Rep, 2019,19(4):2497-2502.
- [22] 刘红娟,吴德玲,童小慧,等. 五子衍宗丸干预线粒体通透性转换孔抑制精子凋亡的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(21):34-39.
- [23] GIHAN A F, MENNA A D, DALIA I I, et al. Histological study on the protective effect of endogenous stem cell mobilization in busulfan-induced testicular injury in albino rats [J]. J Microsc Ultrstruct, 2018,6(4):197-204.
- [24] 王卫东,陈正堂. Bcl-2/Bax比率与细胞“命运”[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2007,14(4):393-396.
- [25] 沈美玲. 人类生精细胞凋亡的调控因素[J]. 山东医学高等专科学校学报,2009,31(3):166-168.
- [26] 刘立玲,苏晓慧,田雅格,等. 两个厂家的雷公藤多苷片对CIA模型大鼠干预作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(14):84-92.
- [27] XI C, PENG S J, WU Z P, et al. Toxicity of triptolide and the molecular mechanisms involved [J]. Biomed Pharmacother,2017,90:531-541.
- [28] 任献青,郑贵珍,苏杭,等. 菟丝子黄酮对雷公藤多苷片致生精细胞周期阻滞、凋亡及相关蛋白表达降低的影响[J]. 药物评价研究,2018,41(1):55-60.
- [29] 董秋菊,周园,冯薇,等. 指纹图谱结合一测多评法在五子衍宗丸质量评价中的应用[J]. 中药材,2019,42(3):579-583.
- [30] HANY H A, AMANY M G, EBTEHAL M F, et al. Ellagic acid attenuates testicular disruption in rheumatoid arthritis via targeting inflammatory signals, oxidative perturbations and apoptosis [J]. Life Sci, 2019,239:117012.

【责任编辑 刘德文】