

水相体系的萃取效率^[3], 但本试验中 $MgCl_2$ 的加入对 FEP 类化合物的萃取具有负面影响, 反而大大降低了总黄酮得率, 可能与 FEP 类化合物中 2-苯基色原酮特殊结构有关。pH 值对 FEP 的得率也有较大影响, 因为 pH 值的变化改变了 FEP 的电性和表面性质, 同时也改变了无机离子的分配情况, 从而影响两相之间的电位差, 最终影响 K 值。升温同样有利于双水相的形成。原来还没来得及分相的体系, 在温度提高后相分离速度随着温度的升高而加快, 而 R 值则随着温度的升高而降低, 这主要是因为温度升高时, PEG 在水中的溶解度增加, PEG 分子部分转移到富含水的下相, 导致上相体积减小、下相体积增大。

双水相提取 FEP 工艺参数的回归模型为 $Y=95.06+3.85X_1+2.47X_2-0.89X_3-1.74X_1X_2-4.36X_1^2-1.68X_2^2-1.43X_3^2$ 。再利用 Design-Expert 8.05 统计软件进行分析, 求得最优工艺参数并优化后得到最佳条件为: PEG 600 质量分数为 12%, 硫酸铵质量分数为 28%, pH 值为 8。再将 FEP 用于考察其对 KM 小鼠的止血、凝血、抗炎作用, 发现 FEP 能明显缩短 KM 小鼠的止血时间, 缩短 KM 小鼠的凝血时间, 尤其是其剂量达到 $11.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时止血效果要优于三七(剂量为 $0.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 至于止血效果是否要优于传统止血中药三七还需要进一步考察。FEP 对二甲苯引起的 KM 小鼠急性耳肿胀有

抑制作用, 但没有阿司匹林显著。这些均提示 FEP 可以在口腔护理方面有较好的开发应用前景。

REFERENCES

- [1] ZHONG L, ZHANG Y F, LI X J, et al. Separation and purification of total flavonoids of *Astragalus membranaceus* with ethanol/phosphate aqueous two-phase system [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(22): 3395-3399.
- [2] ZHAO X L, YUE H, ZHANG Y, et al. Partitional behaviors of flavones of persimmon leaves in two-phase aqueous system [J]. Chem Ind Forest Product(林产化学与工业), 2006, 26(1): 83-86.
- [3] WU X T, WANG A Y, ZHOU H B, et al. Study on extraction by aqueous two-phase system and anti-oxidation of flavonoids from tea [J]. J Tea Sci(茶叶科学), 2012, 32(4): 289-296.
- [4] HAN X, WANG L N, LU R H. Research of hemostasis and anti-ulcer about An Zhi Xiao Yan Pian [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(1): 107-108.
- [5] JIANG H T, YANG W H, CHEN B, et al. Anti-inflammatory, analgesic and therapeutic effects on acute soft tissue injury of Shenjin Huoxue mixture [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(10): 269-272.
- [6] RUAN S Q, WANG Z P, HUANG Q H, et al. Study on extraction technology of the flavonoids ultrasonic by wave and aqueous two-phase system in the Durio Zibethinus Peel [J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2012(12): 1722-1725.
- [7] BABU B R, RASTOGI N K, RAGHAVARAO K S M S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two phase system [J]. Chem Eng Proc, 2008, 47(1): 83-89.
- [8] CAO Y L, PAN Z H, YANG Z F, et al. Comparative study on two extraction methods of flavones from Persimmon Leaves [J]. Food Nutr China(中国食物与营养), 2012, 18(8): 55-58.

收稿日期: 2013-10-08

心脑宁片对脑缺血大鼠乳酸、LDH、ATP 酶活力的影响

吕宏迪, 马珍珍, 郝少君, 孙建华, 张正臣* (解放军第 371 中心医院, 河南 新乡 453000)

摘要: 目的 研究心脑宁片对大鼠脑缺血模型脑匀浆乳酸(lactic acid, LD)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)水平及三磷酸腺苷(adenosine-triphosphate, ATP)酶活力的影响。方法 Wistar 大鼠随机分为 7 组, 每组 12 只: 空白对照组, 高、中、低剂量心脑宁片组、尼莫地平组、脑安片组和羧甲基纤维素钠组, 测定脑匀浆中蛋白含量、LD、LDH、ATP 酶水平。结果 大鼠脑缺血模型造模成功。与模型组相比, 各剂量心脑宁片均可显著降低脑匀浆 LD 水平($P<0.01$), 升高脑匀浆 LDH 活力($P<0.01$), 并可显著升高脑匀浆 $Na^+-K^+-ATPase$ ($P<0.01$)、 $Mg^{2+}-ATPase$ 和 $Ca^{2+}-ATPase$ 活力($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论 心脑宁片具有明显改善脑缺血作用。

关键词: 心脑宁片; 大鼠脑缺血模型; 乳酸; 乳酸脱氢酶; ATP 酶活力

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)09-1058-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.09.006

作者简介: 吕宏迪, 男, 主任医师 Tel: 15803730371 E-mail: ihongyi528@163.com *通信作者: 张正臣, 男, 副主任药师 Tel: 13903730299 E-mail: XXZZC2010@126.com

Effect of Xinnaoning Tablets on Lactic Acid, LDH and ATP in Cerebral Ischemia Rats

LYU Hongdi, MA Zhenzhen, HAO Shaojun, SUN Jianhua, ZHANG Zhengchen* (The 371th Central Hospital of PLA, Xinxiang 453000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of Xinnaoning tablets on lactic acid, LDH and ATPase activity effect in cerebral ischemia rats. **METHODS** Wistar rats were randomly divided into 7 groups: control group, model, high- middle- and low-dose of Xinnaoning tablets group, nimodipine group, Naoan tablets group and 0.5% CMC group. The content of brain homogenate protein, LD, LDH, ATPase levels were determined. **RESULTS** The model of cerebral ischemia rats were established successfully. Compared with model group, high-, middle-, and low- dose of Xinnaoning tablets could significantly decrease LD, raise LDH, and elevate brain homogenates of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ activity and $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ activity ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **CONCLUSION** Xinnaoning tablets have significantly improve effect on cerebral ischemia.

KEY WORDS: Xinnaoning tablets; cerebral ischemia; lactic acid; LDH, ATPase activity

心脑宁片由人参、当归、川芎、黄芪组成，是古方四君子汤和补阳还五汤化裁而来的经验方，具有活血化瘀、益气安神的作用，可用于治疗冠心病、脑血栓形成等，亦可用于防止记忆力减退、抗衰老等^[1-2]。近年研究表明，血液黏度的增高、血流速度减慢可使血浆成分在血管内皮中黏附形成阻塞，从而促进血栓形成及血脂进入管壁，造成血液循环(尤其是微循环)的障碍，导致血行不畅，肌肉筋脉失于濡养，从而产生半身不遂、言语不利、口眼歪斜等症状。据统计，在脑卒中的证候分类中，气虚血瘀证为主导地位，占脑卒中的73%以上。由此可见气虚血瘀是缺血性中风的基本病机，而益气活血、化瘀通络是治疗缺血性中风的关键。为探究心脑宁片的疗效原理，本实验考察心脑宁片对大鼠脑缺血模型脑匀浆乳酸(lactic acid, LD)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)水平及三磷酸腺苷(adenosine-triphosphate, ATP)酶活力的影响。

1 仪器和材料

1.1 药品

心脑宁片(解放军第371医院制剂室，批号：20110606)；尼莫地平片(山东新华制药股份有限公司，批号：1105036，规格：20mg)；脑安片(哈药集团三精制药四厂有限公产，批号：201109002，规格：0.53 g·片⁻¹)；考马斯亮兰试剂盒(南京建成生物工程研究所，批号：20111227)；LD试剂盒(南京建成生物工程研究所，批号：20111220)；LDH试剂盒(南京建成生物工程研究所生产，批号：20111220)；ATP酶试剂盒(南京建成生物工程研究所，批号：20111227)；羧甲基纤维素钠(CMC，天津恒兴化学试剂制造有限公司，批号：20090723)；

生理盐水(河南华利制药股份有限公司，批号：11041806)。

1.2 动物

大鼠，清洁级，Wistar，♂，体质量200~250 g，河北省动物实验中心提供，合格证号1112028。

1.3 仪器

UV-2000 分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]；FA(N)/JA(N)系列电子天平(上海民桥精密仪器有限公司)；TGL-16G 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)；DZKW-4 型电子恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂)；可调式移液器(上海雷勃分析仪器有限公司)。

2 方法

取体质量200~250 g的Wistar大鼠84只，♂，随机分为7组，分别为空白对照组，高、中、低剂量的心脑宁片组(给药剂量1.5，0.75，0.375 g·kg⁻¹，用0.5%CMC配成75，37.5，18.75 mg·mL⁻¹)、尼莫地平组(给药剂量20 mg·kg⁻¹，用0.5%CMC配成1 mg·mL⁻¹)、脑安片组(给药剂量0.354 g·kg⁻¹，用0.5%CMC配成17.7 mg·mL⁻¹)和CMC组(以同体积0.5%CMC给药)。空白对照组灌服同体积的0.5%CMC；每天给药1次，连续给药7 d，于第6天晚上8点禁食不禁水，第7天上午给药后1 h，用10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠，然后作颈部正中切口，分离双侧颈总动脉，动脉下各置一手术线，结扎血管；空白对照组只麻醉解剖不结扎双侧颈总动脉。各组动物结扎后挂线60 min(空白对照组除外)后，断头取脑，加9倍量生理盐水，用匀浆机制成10%脑匀浆，分别按试剂盒说明书采用紫外分光光度法测定脑匀浆中蛋白含量、LD、LDH和ATP酶水平。

数据分析用 SPSS 13.0 for Windows 统计软件包进行数据资料的统计学处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 等级资料采用经 Ridit 检验。

3 结果

3.1 心脑宁片对 LD, LDH 水平的影响

与空白对照组比较, 模型组脑匀浆 LD 水平显著升高 ($P < 0.01$)、脑匀浆 LDH 活力显著降低 ($P < 0.01$), 说明造大鼠脑缺血模型成功。与模型组比较, 高、中、低剂量心脑宁片组和脑安片组均可显著降低脑匀浆 LD 水平 ($P < 0.01$), 尼莫地平片组可明显降低血 LD 水平 ($P < 0.05$); 高、中、低剂量心脑宁片组和尼莫地平片组均可显著升高脑匀浆 LDH 活力 ($P < 0.01$), 脑安片组可明显升高脑匀浆 LDH 活力 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 心脑宁对大鼠脑缺血模型脑匀浆 LD、LDH 水平影响 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of Xinnaoning tablets on LD, LDH levels in brain homogenates of rats cerebral ischemia model ($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	LD/mmol·L ⁻¹	LDH/U·prot ⁻¹
空白对照组	0.336±0.042 ²⁾	11 812±2 345 ²⁾
模型组	0.490±0.079	7 866±1 374
尼莫地平片组	0.408±0.085 ¹⁾	9 683±1 184 ²⁾
脑安片组	0.396±0.048 ²⁾	9 779±2 029 ¹⁾
高剂量心脑宁片组	0.374±0.052 ²⁾	10 529±1 518 ²⁾
中剂量心脑宁片组	0.392±0.062 ²⁾	9 723±1 257 ²⁾
低剂量心脑宁片组	0.374±0.035 ²⁾	11 135±1 151 ²⁾

注: 与模型组比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

3.2 心脑宁片对 ATP 酶活力水平的影响

与空白对照组比较, 模型组脑匀浆 Na⁺-K⁺-ATPase、Mg²⁺-ATPase 和 Ca²⁺-ATPase 活力均显著降低 ($P < 0.01$), 说明大鼠脑缺血模型造模成功。与模型组比, 高、中、低剂量心脑宁片组均可显著升高脑匀浆 Na⁺-K⁺-ATPase 活力 ($P < 0.01$), 脑安片组可明显升高脑匀浆 Na⁺-K⁺-ATPase 活力 ($P < 0.05$); 低剂量心脑宁片组可显著升高脑匀浆 Mg²⁺-ATPase 活力 ($P < 0.01$), 高、中剂量心脑宁片组和脑安片组可明显升高脑匀浆 Mg²⁺-ATPase 活力 ($P < 0.05$); 高、中、低剂量心脑宁片组和脑安片组均可显著升高脑匀浆 Ca²⁺-ATPase 活力 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 心脑宁对大鼠脑缺血模型脑匀浆 ATP 活力的影响 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of Xinnaoning tablets on ATPase activity in brain homogenates of rats cerebral ischemia model ($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	μmol·mg prot ⁻¹ ·h ⁻¹		
	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Mg ²⁺ -ATPase	Ca ²⁺ -ATPase
空白对照组	4.732±0.709 ²⁾	3.048±0.553 ²⁾	2.357±0.423 ²⁾
模型组	3.242±0.514	1.994±0.503	1.349±0.279
尼莫地平片组	3.797±0.836	2.209±0.556	1.722±0.247
脑安片组	4.022±0.9 ¹⁾	2.373±0.329 ¹⁾	1.955±0.38 ²⁾
高剂量心脑宁片组	4.215±0.765 ²⁾	2.478±0.411 ¹⁾	2.159±0.438 ²⁾
中剂量心脑宁片组	4.173±0.74 ²⁾	2.504±0.363 ¹⁾	2.176±0.802 ²⁾
低剂量心脑宁片组	4.072±0.425 ²⁾	3.342±0.279 ²⁾	1.894±0.378 ²⁾

注: 与模型组比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

4 讨论

心脑宁片是根据中医理论和现代药理研究成果拟定的院内协定处方。方中以人参为君药, 以其主补五脏, 安精神, 定魂魄; 黄芪补中益气, 为臣药。当归活血养血, 川芎理气、活血化瘀为佐药。4 药合用, 既重视疏通脉管, 以改善脏器供血, 又注意改善人体整体功能及代谢, 达到扶正祛邪之目的。本制剂适用于气虚血瘀症之缺血性脑血管疾病的治疗。

本实验采用双侧颈总动脉结扎造大鼠脑缺血模型。温度在实验过程中影响较大, 控制合适的温度将大大提高大鼠的成活率^[3-6]。ATP 酶是存在于细胞器生物膜及组织细胞的一种蛋白酶, 其活力是评价神经元质膜功能的标志之一。当脑部缺血时, 脑组织供血不足, 能量生成物质供应减少, 能量耗竭, 糖类无氧代谢产生的 LD 含量增多, ATP 产生不足^[7-8], 细胞膜内 ATP 酶活性下降。Na⁺-K⁺-ATP 酶活性下降, 引起细胞内 Na⁺增高, 导致细胞毒性脑水肿而影响细胞功能, 同时 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性的下降可加剧线粒体 Ca²⁺增高, 两者均使能量匮乏, 加重脑部损伤^[9]。LDH 是标志脑组织损害最敏感的酶, 在脑损伤组织中, 各种氧依赖酶的活性也随之发生变化^[10-12]。LDH 能催化丙酮酸与乳酸之间的氧化还原反应, 属于氢转移酶, LDH 活性增强, 有助于清除氧自由基, 减少脑组织的缺血缺氧损伤。测定 LD、LDH、ATP 酶可以反映脑缺血后的能量代谢情况。本实验说明, 心脑宁片具有明显改善脑缺血作用, 其作用

机制可能与升高脑匀浆 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 活力有关。

致谢：本实验在河南中医学院苗明三教授指导下完成，特此致谢！

REFERENCES

- [1] ZHU G Z, ZHANG S L, WEI S Q, et al. Clinical research of Xinnaoning tablets in the treatment of coronary heart disease with angina pectoris [J]. Hebei J Tradit Chin Med(河北中医), 2012, (12): 1782-1784.
- [2] ZHU G Z, LYU H D, ZHANG S L, et al. Treatment of angina pectoris of coronary heart disease with Xinnaoning tablets [J]. Pract J Med Pharm(实用医药杂志), 29(10): 878-880.
- [3] XING L, WANG L N, MIAO M S, et al. Effects of Xingnaozaizao capsule on the hemorheology of blood stasis and the cerebral ischemia rat models [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(5): 377-379.
- [4] MIAO M S, ZHANG G L, ZHANG Y L, et al. Effects of Xingnaozaizao capsule on the blood stasis and cerebral ischemia rat models [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2007, 23(3): 69-70.
- [5] MIAO M S, CHENG Z X, ZAI Y B, et al. Establishment of blood stasis and brain ischemia rats model [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2007, 18(1): 1-5.
- [6] HAN G, LI X D, TANG J J, et al. Protective effects and related mechanisms of pre-treated coenzyme Q10 on rats suffered from focal cerebral ischemic-reperfusion injury [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(7): 715-718.
- [7] LI H, LIU K X, FENG J L, et al. The neuroprotective effect of tanshinone II A on cerebral ischemic reperfusion injury in rats and its mechanism [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2008, 19(7): 1648-1649.
- [8] LIU M, SUN J N, DONG S F, et al. Changes in brain energy metabolism for different duration of cerebral ischemia in rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(5): 216-217.
- [9] SHEN L, ZHANG G, WU Y L. Protective effects of total flavones of Herba Epimedii on cerebral ischemia in rats [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2007, 18(4): 266-269.
- [10] QIU L Y, DU B, FAN H B, et al. Effect of aspirin on brain energy metabolism in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Cerebrovasc Dis(中国脑血管病杂志), 2008, 5(9): 403-407.
- [11] TAO G Y, DU W Q. The status of Supplementing Qi and activating blood circulation in treating cerebral ischemia [J]. J Shanxi Coll Tradit Chin Med(陕西中医学院学报), 1998, 21(3): 1-2.
- [12] MIAO M S, FANG X Y. Effect of aloe polysaccharide on the aging model mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2005, 22(3): 181-184.

收稿日期：2013-08-29

不同产地草珊瑚优良种源筛选研究

邓思珊¹，刘洪旭¹，王全²，王伟峰³，梁一池³ (1.福建省医学科学研究院 福建省医学测试重点实验室，福州 350001；2.福建医科大学，福州 350108；3.福建中医药大学，福州 350108)

摘要：目的 测定 46 个不同产地种源草珊瑚叶、茎的生物量以及活性成分落新妇苷、迷迭香酸、异嗪皮啶含量，以总量为考查指标，筛选优良种源。方法 样品来自福建三明三元吉口采育场草珊瑚种植栽培示范区 3 年生成熟草珊瑚，每个产地随机取 20 株，分叶与茎，晾干，称量，计算成每 10 株叶、茎干品重量作为生物量；含量测定采用 HPLC。色谱柱：Ultimate C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相 A 为乙腈-0.2%磷酸溶液(18:82)，B 为乙腈-0.2%磷酸溶液(30:70)；梯度洗脱：0~30 min, A→B；流速：1 mL·min⁻¹；柱温：室温；检测波长：茎部位(测定迷迭香酸、异嗪皮啶)为 344 nm，叶部位(测定落新妇苷、迷迭香酸)为 290 nm；分析有效成分含量、生物量以及总量。结果 不同地理种源草珊瑚生物量差别显著，含量差别较大，计算总含量与总量均有较大差异，筛选 5 个高产优质的产地有 3 个来自福建三明。结论 多指标有效成分总含量结合生物量筛选高产优质良种，指导科学种植有很大意义。

关键词：草珊瑚；生物量；高效液相色谱法；迷迭香酸；落新妇苷；异嗪皮啶

中图分类号：R284.1；R917.101 文献标志码：A 文章编号：1007-7693(2014)09-1061-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.09.007

基金项目：福建省自然科学基金项目(2013J01366)

作者简介：邓思珊，女，研究员 Tel: 13860638586 E-mail: fzdss@163.com