

分类号         R271.1          
UDC     610     密级         

学校代号         10572          
学    号         20103101002        



# 广州中医药大学

---

Guangzhou University of Chinese Medicine

## 博士学位论文（非医攻博）

---

助孕丸中健脾组方提取物的药效学  
与药代动力学研究

---

学    位    申    请    人	<u>        陈  静  静        </u>
指  导  教  师  姓  名	<u>        罗  颂  平        </u>
专    业    名    称	<u>        中  医  妇  科  学        </u>
申  请  学  位  类  型	<u>        科  学  学  位        </u>
论  文  提  交  日  期	<u>        2015  年  4  月        </u>

## 广州中医药大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是个人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经特别加以注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明并致谢。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名 陈静静

日期：2015年5月28日

## 关于学位论文使用授权的声明

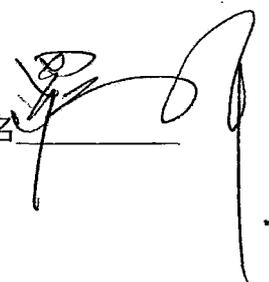
本人完全了解广州中医药大学有关保留使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门机构送交论文的复印件和电子版，允许被查阅和借阅。本人授权广州中医药大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复印手段保存和汇编本学位论文。

（保密论文在解密后应遵守此规定）

论文作者签名 陈静静

论文导师签名

日期：2015年5月28日



## 中文摘要

### 目的:

本研究应用超高效液相色谱与串联四极杆飞行时间质谱仪联用技术,建立 UPLC/Q-TOF-MS<sup>E</sup> 方法在正、负离子全扫描模式下采集助孕丸健脾组方(由党参、黄芪、白术组成)的一级及多级质谱信息,较全面地对助孕丸健脾组方提取物的化学成分进行分析及鉴定,阐明了健脾组方的物质基础,并归属了主要色谱峰的中药材来源,为提高助孕丸健脾组方的质量控制标准提供化学依据;建立 UPLC/Q-TOF-MS 定量检测党参炔苷含量的快速、高效、准确的液质联用方法,并应用该液质联方法检测中药党参提取液及健脾组方提取液中党参炔苷的含量。以党参炔苷为代表性成分研究健脾组方在 SD 大鼠体内的药代动力学过程,并与党参炔苷单体、中药党参中的党参炔苷的药代动力学过程进行比较,以探讨中药及组方中多种成分之间的相互作用关系,为中药配伍理论提供实验依据,也有助于助孕丸的药效学研究及临床应用。体外原代培养人早孕蜕膜细胞,应用米非司酮建立蜕膜细胞损伤模型,并考察健脾组方各组分对该模型的作用,探讨其可能的作用机理。

### 方法:

实验一 助孕丸健脾组方物质基础分析:购买健脾组方中的道地药材党参、黄芪、白术并进行鉴定,采用冷凝回流提取的方法制备助孕丸健脾组方提取液。应用 UPLC/Q-TOF-MS<sup>E</sup> 技术,通过正、负离子全扫描的检测模式对健脾组方中的化学成分进行分析及鉴定。对于有标准品的化合物,通过 Masslynx 4.1 software 比对标准品的保留时间、精确质量数、同位素丰度和一级、多级质谱图的质谱裂解规律进行鉴定;对于无法获取标准品的化合物的检测,结合质谱图上给出的准分子离子峰,应用 Masslynx 系统软件推测其可能的化学组成,将该化合物质谱裂解规律与同类化合物的质谱裂解规律进行比较,结合参考文献资料后进行推测。并归属了主要的色谱峰的药材来源,对健脾组方进行了较全面地物质基础分析。

实验二 UPLC/Q-TOF-MS 测定健脾组方及党参提取物中党参炔苷的含量:建立快速、高效地测定党参炔苷含量的 UPLC/Q-TOF-MS 方法,应用该方法测定党参提取液及健脾组方提取液中党参炔苷的含量。

实验三 基于 UPLC/Q-TOF-MS 技术党参炔苷药代动力学研究:以相同的党参炔苷灌胃量为标准,制备党参炔苷单体灌胃液、党参灌胃液及健脾组方灌胃液。将 24 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为以上 3 组,每组 8 只。于灌胃后的 5min、15min、30min、45min、60min、90min、120min、240min、480min、720min、1440min 进行眼眶取血约 0.5mL 置于加有 0.5%肝素的 EP 管内,常温下静置半小时。以 3500r/min 的转速离心 15min。离心后取上层血浆样品采用乙酸乙酯液液萃取的方法进行处理。应用 UPLC/Q-TOF-MS 技术检测不同时间点大鼠血浆中党参炔苷的含量并绘制药时曲线。应

用 PK.Solutions 2.0 软件计算药代动力学参数：峰浓度(C<sub>max</sub>)、达峰时间(T<sub>max</sub>)、血药浓度-时间曲线下面积(AUC)、平均滞留时间(MRT)、总体清除率(CL)。比较党参炔苷以当党参炔苷单体形式、中药党参形式、健脾组方形式灌胃后其药代动力学差异。

实验四 蜕膜细胞的原代培养：采用复合酶（0.25%胰酶+0.1% I 型胶原蛋白酶）消化的方法消化分离人早孕蜕膜组织，原代培养蜕膜细胞，通过差时贴壁及传代自然增殖法纯化蜕膜细胞。经倒置光学显微镜、电子显微镜及免疫组化的方法对所培养的蜕膜细胞进行鉴定。

实验五 健脾组方中化学成分对蜕膜细胞损伤模型的影响：应用米非司酮（RU-486）建立蜕膜细胞损伤模型，观察助孕丸健脾组方各成分对蜕膜细胞损伤模型的作用。应用 MTS 法比较正常组，模型组、孕酮组和不同药物组细胞的增殖活力，应用 AnnexinV-PI 法流式检测各药物对蜕膜细胞损伤模型早期凋亡率的影响，采用 Western Blot 技术检测各组药物对蜕膜细胞损伤模型凋亡蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9 的表达影响，初步筛选出健脾组方中的药效成分。

#### 结果：

实验一：完成了道地药材党参、黄芪、白术的鉴定。建立了分析助孕丸健脾组方 UPLC/Q-TOF-MS 的方法。得到了健脾组方及部分标准品在正、负离子模式下的一级和多级质谱图，对健脾组方中的主要成分（黄酮类、皂苷类、内酯类、糖苷类等）进行了质谱裂解规律分析。较全面地分析了健脾组方的化学成分，快速地表征了 37 个色谱峰（误差范围为 $\leq \pm 5$  ppm），并对这些色谱峰归属了药材来源。利用已知标准品鉴定了 7 个代表性化合物党参炔苷、黄芪甲苷、白术内酯 I、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素和芒柄花苷。

实验二：建立了测定党参及健脾组方中党参炔苷含量的 UPLC/Q-TOF-MS 的方法，所建立的标准曲线  $r > 0.999$ ，在 5-5000ng/mL 的浓度范围内线性关系良好，且精密度、回收率等均符合要求。应用该方法测得中药党参和健脾组方中党参炔苷的含量分别为 239.5 $\mu$ g/mL、87 $\mu$ g/mL。

实验三：血浆样品中的党参炔苷在 5-5000ng/mL 的浓度范围内线性关系良好 ( $r > 0.990$ )。日内和日间精密度分别小于 6.0%和 5.0%，血浆样品中党参炔苷的回收率为 70%，内标的回收率为 70.0%以上。最低检测限为 5ng/mL。应用药动学软件 PK.Solutions 2.0 计算出党参炔苷单体组、中药党参组、健脾组方组中党参炔苷的药代动力学参数分别为峰浓度 C<sub>max</sub> (ng/mL)：138.59 $\pm$ 28.65、127.61 $\pm$ 16.88、172.26 $\pm$ 94.71；达峰时间 T<sub>max</sub> (hr)：172.26 $\pm$ 94.71、1.57 $\pm$ 0.61、1.20 $\pm$ 0.47；血药浓度-时间曲线下面积 AUC (Area ng-hr/mL)：176.61 $\pm$ 20.59、551.07 $\pm$ 83.26、737.57 $\pm$ 127.97；平均滞留时间 MRT(area hr)：2.27 $\pm$ 1.80、4.46 $\pm$ 1.86、5.37 $\pm$ 1.94；总体清除率 CL(mL/hr)：6791.79 $\pm$ 1785.45、2023.76 $\pm$ 311.44、1559.73 $\pm$ 334.67。比较三者峰浓度(C<sub>max</sub>)结果得知党参中的成分对党参炔苷单体的体内的达峰浓度无影响，

而健脾组方中的成分可提高党参炔苷单体在体内的达峰浓度；比较三者达峰时间( $T_{max}$ )可知党参及健脾组方中的物质均可使党参炔苷单体在体内的达峰时间推后；比较三者血药浓度-时间曲线下面积(AUC)结果可知党参及健脾组方中的物质可提高党参炔苷单体在体内的生物利用度；比较三者平均滞留时间(MRT)结果可知党参及健脾组方中的物质可延长党参炔苷单体在体内的平均滞留时间。比较三者总体清除率(CL)结果可知党参及健脾组方中的物质可降低党参炔苷单体在体内的清除率。总体上讲党参及健脾组方中的物质有促进党参炔苷单体在体内的吸收，增加其生物利用度的作用。也为中药组方配伍提供了实验依据。

实验四：采用复合酶消化的方法成功地完成了蜕膜细胞的原代培养，经倒置光学显微镜、电子显微镜、免疫荧光法（角蛋白为阳性，波形蛋白为阴性）综合鉴定所培养的细胞为蜕膜细胞；用差时贴壁及自然传代增殖法纯化后检测所培养细胞的分泌功能显示99%以上的细胞都有泌乳素蛋白的表达，表明所培养的蜕膜细胞纯度高。

实验五：通过比较正常组与模型组细胞的增殖活力、早期凋亡率及凋亡蛋白Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9的表达情况表明采用60 $\mu$ mol/L的米非司酮所造的蜕膜细胞损伤模型是成功的。健脾组方、党参炔苷、黄芪甲苷、白术内酯I、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和孕酮对蜕膜细胞损伤模型都有不同程度的促进增殖，抑制凋亡的作用。

#### 结论：

1. 建立了液质联用分析健脾组方提取物药效物质基础的方法，该方法快速、高效、精确，为提高助孕丸健脾组方的质量控制标准提供化学依据。并为黄酮类、皂苷类、内酯类、糖苷类等化合物的分析提供了质谱裂解规律的参考。

2. 应用UPLC/Q-TOF-MS的方法可快速、准确地测定中药党参及健脾组方中党参炔苷的含量。该方法的方法学考察结果精密度及回收率等均符合实验要求。为中药党参药材的质量控制提供了保障。

3. 建立了UPLC/Q-TOF-MS测定大鼠血浆中党参炔苷含量的方法，采用的液液萃取的处理血浆样品的方法简便，快速，党参炔苷及内标连翘苷的回收率较高。进行方法学考察时，其专属性、线性关系、定量限、基质效应和稳定性等均符合实验要求。该方法可用于党参炔苷药代动力学的研究。经比较单体组、中药党参组及健脾组方组的药代动力学参数发现党参及健脾组方中的物质有促进党参炔苷的吸收，提高党参炔苷的生物利用度，延长党参炔苷在体内停留时间等作用。

4. 利用米非司酮(RU-486)建立的蜕膜细胞损伤模型筛选出了健脾组方中药效成分，健脾组方中的党参炔苷、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷等均对RU486蜕膜细胞损伤模型具有促进增殖的作用。健脾组方总提取物、孕酮亦有同样的作用。健脾组方及其中的化学成分对蜕膜细胞损伤模型有抑制早期凋亡率及凋亡蛋白表达的作用。从而推论其作用机制是通过促进损伤细胞增殖、抑制其凋亡实现的。

关键词：助孕丸； 健脾组方； UPLC/Q-TOF-MS； 药效物质基础； 蜕膜细胞损伤模型

# Study on pharmacodynamics and pharmacokinetics of Jian Pi decoction from Zhuyun Pill

Specialty: Gynecology of traditional Chinese Medicine

Author: Chen Jingjing

Tutor: Professor Luo Songping

## Abstract

### Objective

To clarify the chemical composition and source of Jian Pi decoction from Zhuyun Pill quickly and comprehensively with ultra-performance liquid chromatography with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS<sup>E</sup>). The results could be used for the quality control of Jian Pi decoction. To investigate the pharmacokinetic study of lobetyolin and interaction between Chinese herb and decoction. To provide a necessary theoretical basis for clinical application between Chinese herbs and help to further development Jian Pi decoction. Culture the decidual cells primarily and observe the effect and acting mechanisms of the active ingredients of Jian Pi decoction on decidual cells damage model.

### Methods

1. The genuine medicinal materials were purchased and identified. The Jian Pi decoction was prepared using the reflux condensation. Using UPLC/Q-TOF-MS<sup>E</sup> technology, the chemical composition of Jian Pi decoction were analyzed in the positive and negative ions full scan test patterns. To identify the chemicals with standard, the retention time, accurate mass number, isotope abundance and multi-stage mass spectrogram, mass spectrometry identification cracking rule standard from the decoction was compared with the standards by Masslynx 4.1 software. The anthers were identified not only using the method mentioned above but also according to references. The paper classified the main chromatographic peaks too.

2. Lobetyolin is one of active ingredients from the Jian Pi decoction. To determine contents of Lobetyolin in *Codonopsis pilosula* extraction and Jian Pi decoction, The appropriate UPLC/Q-TOF-MS method was established.

3. On the basis of content of lobetyolin, the rats were orally administrated lobetyolin, Codonopsis pilosula extraction and Jian Pi decoction. 24 male SD rats were randomly divided into 3 groups as mentioned above with 8 for each group. Serum of rats was got after orally administrated drugs 5min, 15min, 30min, 45min, 60min, 90min, 120min, 240min, 480min, 720min, 1440 min. Liquid-liquid extraction(LLE) for the sample pretreatment was used. To establish a UPLC/Q-TOF-MS/MS method to determine contents of lobetyolin at different time. Then drug-time curve was drawn. A series of pharmacokinetics parameters (such as C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, AUC, MRT, CL) we obtained by the functional pharmacokinetics program PK. Solutions 2.0. Compare the differences between them.

4. The decidual tissues were digested by 0.25% trypsin and 0.1% collagenase I, purified by differential adhesion method and proliferation and passage in vitro. The primary culture cells were identified by inverted microscope, electron microscope and immunocyto-chemistry.

5. Establish decidual cells damage model induced by mifepristone and observe the effect and acting mechanisms of the active ingredients of Jian Pi decoction on it. Compare the differences between the normal decidual cells and the decidual cells damage model by proliferation, apoptosis and apoptotic proteins expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-9. We can get active ingredients from the Jian Pi decoction.

#### **Results:**

1. The genuine medicinal materials were identified completely. Establish an ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer detection (UPLC/Q-TOF-MS/MS) comprehensive quickly clarify chemical of Jian Pi decoction. Based on the UPLC/Q-TOF-MS<sup>E</sup> analysis, 37 peaks were identified on line. By using the known standard 7 representative compounds were identified. The herbal sources of these peaks were assigned. The results implied that flavonoids, saponins, lactones, and glycosides were the main components in effective part of Jian Pi decoction.

2. Develop a special UPLC/Q-TOF-MS for rapid quantitative analysis of Lobetyolin in Jian Pi decoction. We had good linearity ( $r > 0.999$ ) within the detection range (5-5000ng/mL), The precision (RSD), accuracy, sensitivity proved the advantage of this new method. The contents of Lobetyolin in Codonopsis pilosula extraction and Jian Pi decoction are 239.5 $\mu$ g/ml and 87 $\mu$ g/ml.

3. The Lobetyolin had good linearity( $r>0.99$ ) within the detection range (5-5000ng/ml), the inter and intra day precision were good (RSD<6.0%, RSD<5.0%), and the average recovery rate reaches 70.0% , and the average recovery rate of IS reaches 70.0%. The pharmacokinetic parameters were calculated by PK.Solutions 2.0 software in the three groups were :Cmax (ng/mL): 138.59±28.65、127.61±16.88、172.26±94.71; Tmax (hr): 172.26±94.71、1.57±0.61、1.20±0.47; AUC (Area ng-hr/mL): 176.61±20.59、551.07±83.26、737.57±127.97;MRT(area hr): 2.27±1.80、4.46±1.86、5.37±1.94; CL(mL/hr): 6791.79±1785.45、2023.76±311.44、1559.73±334.67.

4. The primary culture cells were identified to be decidual cells by inverted microscope、electron microscope and immunocytochemistry (Keratin is positive and vimentin is negative). The purity of decidual cells could reach 99% with PRL.

5. We established decidual cells damage model successfully induced by 60μmol/L mifepristone. Lobetyolin Astragaloside IV、Calycosin、Calycosin-7-O-β-glucoside has、Formononetin、ononin、Atractylenolide I and Jian Pi decoction has the proliferation induction and apoptosis inhibition effect on decidual cells damage model.

## Conclusion

1. The method established is simple and rapid for elucidation the constituents of Jian Pi decoction and the results could be used for the quality control of Jian Pi decoction.

2. The decidual cells damage model induced by RU-486 could be use as carries for screening out active ingredients from Jian Pi decoction. The active ingredients may effect decidual cells damage model on proliferation induction and apoptosis inhibition.

3. Establish an accurate UPLC/Q-TOF-MS method for rapidly determining the content of Lobetyolin in Codonopsis pilosula and Jian Pi decoction. And this method could be used for rearch pharmacokinetic of Lobetyolin.

4. Somethings in Codonopsis pilosula and Jian Pi decoction are good for absorbing substances Lobetyolin and increase the length of time it remains in bodies.

**Key words:** Zhuyun Pill ;Jian Pi decoction ;The material basis ;  
UPLC/Q-TOF-MS ;Decidual cells damage model

# 目 录

广州中医药大学学位论文原创性声明.....	
摘 要.....	I
ABSTRACT.....	V
目 录.....	IX
引 言.....	1
第一章 文献综述.....	3
1.1 助孕丸治疗自然流产研究现状.....	3
1.1.1 助孕丸治疗自然流产的临床有效性研究及安全性评价.....	3
1.1.2 助孕丸治疗自然流产的实验研究.....	4
1.1.3 助孕丸补肾组方研究现状.....	6
1.1.4 助孕丸中健脾组方中药的相关研究.....	7
1.2 液质联用技术在中药研究中的应用.....	10
1.2.1 液质联用技术在中药化学成分分析方面的应用.....	10
1.2.2 液质联用技术在中药指纹图谱建立中的应用.....	11
1.2.3 液质联用技术在中药药代动力学中的应用.....	12
1.2.4 液质联用技术在中药活性成分的筛选中的应用.....	13
1.2.5 液质联用技术在中药血清药物化学的应用.....	13
1.3 自然流产与细胞凋亡.....	14
1.3.1 自然流产相关凋亡蛋白.....	15
1.3.2 蜕膜细胞损伤、凋亡模型的建立.....	16
第二章 实验研究.....	19
2.1 立论依据.....	19
2.2 实验内容及技术路线.....	19
2.3 助孕丸健脾组方物质基础分析.....	22
2.3.1 实验目的.....	23
2.3.2 实验材料与方法.....	23
2.3.3 结果.....	25
2.3.4 讨论.....	39
2.3.5 小结.....	40
2.4 UPLC/Q-TOF-MS 测定健脾组方及党参提取物中党参炔苷的含量.....	41
2.4.1 实验目的.....	41
2.4.2 实验材料与方法.....	41

2.4.3 结果.....	43
2.4.4 讨论.....	44
2.4.5 小结.....	45
2.5 基于 UPLC/Q-TOF-MS 技术党参炔苷药代动力学研究 .....	45
2.5.1 实验目的.....	45
2.5.2 实验材料与方法.....	45
2.5.3 结果.....	49
2.5.4 讨论.....	53
2.5.5 小结.....	54
2.6 蜕膜细胞的原代培养 .....	54
2.6.1 实验目的.....	54
2.6.2 实验材料与方法.....	54
2.6.3 结果.....	56
2.6.4 讨论.....	57
2.6.5 小结.....	57
2.7 健脾组方中化学成分对蜕膜细胞损伤模型的影响 .....	57
2.7.1 实验目的.....	58
2.7.2 实验材料与方法.....	58
2.7.3 结果.....	62
2.7.4 讨论.....	71
2.7.5 小结.....	73
结    语.....	74
参考文献.....	76
附    录.....	84
在读期间发表论文.....	87
致    谢.....	88

## 引 言

自然流产 (Spontaneous Abortion, SA) 是育龄期女性常见的妊娠疾病之一, 其发生率约占首次妊娠的 15%。自然流产连续发生 3 次或者 3 次以上者, 称为复发性流产, 亦称习惯性流产 (Recurrent Spontaneous Abortion, RSA)。该疾病严重影响了妇女的身心健康及家庭关系的和谐。自然流产的发生主要与遗传、解剖、免疫、内分泌等因素有关。进一步的研究发现自然流产的发生与蜕膜细胞异常凋亡相关。<sup>[1]</sup>

助孕丸是在全国著名中医家罗元恺教授指导下拟定的协定方。作为医院制剂应用于临床逾 20 年。具有补肾安胎, 健脾益气的作用。大量的临床及实验研究证实其在治疗自然流产方面疗效确切。<sup>[2-3]</sup>

助孕丸由菟丝子、桑寄生、续断、黄芪、党参、白术等八味中药组成, 包括补肾组方和健脾组方两部分。补肾组方以寿胎丸为主方加减; 健脾组方包括黄芪、党参、白术等。关于助孕丸的补肾组方已有大量的药效物质基础、药理学、药效学机制方面的研究。而关于健脾组方的物质基础及药效成分研究比较少, 也未见有药代动力学方面的报道。基于现状, 本文将应用超高效液相串联四级杆飞行时间质谱分析器, 对助孕丸健脾组方的化学成分进行分析。党参为健脾组方中的主要健脾药物, 以党参炔苷为代表比较党参炔苷单体、中药党参及健脾组方的药代动力学特征, 为研究单体、中药及组方的相关性, 中药配伍理论及健脾组方的合理应用提供依据。体外原代培养蜕膜细胞, 建立蜕膜细胞损伤模型考察健脾组方不同化学成分对蜕膜细胞损伤模型增殖率、凋亡率及相关凋亡蛋白的表达的作用。



## 第一章 文献综述

### 1.1 助孕丸治疗自然流产研究现状

助孕丸(助孕 3 号方)是全国著名中医学专家罗元恺教授的经验方。由菟丝子、桑寄生、续断、黄芪、党参、白术等八味中药组成,具有健脾补肾,安胎益气的功效。自上世纪 90 年代已广泛应用于临床,对胎漏、胎动不安及滑胎具有良好的临床疗效,尤适应于肾虚脾虚证型的患者。广州中医药大学第一附属医院罗颂平教授临床上善用助孕丸治疗妇科的不同病症,每获良效。并带领其团队对助孕丸进行了长达二十余年临床及实验研究,大量的研究表明助孕丸在临床疗效和实验研究方面的有效性与安全性是值得肯定的,应在临床上大力推广应用。

#### 1.1.1 助孕丸治疗自然流产的临床有效性研究及安全性评价

助孕丸治疗因免疫性因素造成的自然流产患者,治疗后患者的妊娠成功率可达 95%以上。进一步研究发现<sup>[4]</sup>助孕丸是通过促进封闭抗体的形成,提高患者 MLC 封闭效应趋势,增强患者的免疫功能,而达到助孕的目的。充分显示了助孕丸在治疗免疫性自然流产的有效性。赵颖<sup>[5]</sup>临床研究显示助孕丸通过调节内分泌或免疫功能治疗脾肾虚证胎漏、胎动不安、滑胎,其有效率达 90.24%,与安胎中成药滋肾育胎丸治疗效果接近( $P>0.05$ )。

刘昱磊<sup>[6]</sup>进行了助孕丸治疗自然流产的临床观察。临床结果显示助孕丸对自然流产临床治愈率为 80%。

有研究<sup>[7]</sup>证实助孕丸对于肾虚和脾肾两虚证先兆流产和反复自然流产疗效确切。可改善妊娠期黄体功能,通过调节细胞因子向 Th2 的方向进行偏移,达到维持早期妊娠的作用。

曹蕾<sup>[8]</sup>发现助孕丸可改善复发性流产患者子宫内膜容受性。对脾肾亏虚型复发性流产患者子宫内膜厚度有治疗作用。此种治疗作用是通过有效增加复发性流产患者子宫内膜的厚度,并降低其内膜下螺旋动脉血流阻力指数来实现。

助孕丸临床安全性评价,罗颂平<sup>[7]</sup>教授研究比较了因先兆流产或反复自然流产,经助孕丸等补肾安胎方药治疗后的妇女所生育的子代在体格和智力发育方面,与未经安胎治疗的孕妇所生育的同龄孩子之间的差异,结果显示多数指标差异无显著性,而且中药组的部分指标优于对照组,提示补肾安胎中药对子代是安全的。

综上所述,助孕丸在治疗自然流产方面疗效确切且安全性高,可在临床应用上积极推广。

### 1.1.2 助孕丸治疗自然流产的实验研究

有关助孕丸的实验研究涉及药效学、药理学机理、拆方及安全性等方面。罗颂平教授带领其团队先后建立各种证型的动物流产模型,从生殖内分泌、免疫因素、生殖安全性等方面,探讨助孕丸的药效及可能作用机制。

李小球<sup>[9]</sup>应用米非司酮(RU-486)建立动物流产模型,利用该模型探讨助孕丸对妊娠大鼠子宫蜕膜孕激素(P)及孕激素受体(PR)的影响,通过比较正常组、模型组、阳性对照组和助孕丸组之间大鼠的流产率,血清孕酮的变化及子宫内膜孕激素受体的差异,得出助孕丸能增加孕激素的分泌,降低米非司酮(RU-486)与孕激素受体的结合率的结论,认为助孕丸促进黄体功能可能从受体水平上发挥作用,而达到保胎的效果。

宁艳<sup>[10]</sup>等以羟基脲和米非司酮(RU-486)建立肾虚黄体抑制的病证结合妊娠大鼠流产模型,并研究助孕丸对该模型的整体调节及对胚胎的保护作用,研究表明助孕丸能维持妊娠大鼠孕激素分泌,并增加子宫蜕膜孕激素受体的阳性率,提示助孕丸在孕激素及孕激素受体水平上具有促进黄体功能的作用。

张铭<sup>[11]</sup>等以利血平、米非司酮(RU-486)建立脾虚、黄体不健的病证结合动物流产模型,模拟人体脾虚、黄体不健的状态,并观察助孕丸对该模型的作用,同时设立四君子汤组等进行比较。研究表明助孕丸组可改善脾虚大鼠体重减轻的状况,且流产率低于四君子汤组;在P水平、PR阳性率方面均优于四君子汤组。认为助孕丸可改善动物模型的脾虚证候,提高其整体功能,增加妊娠黄体和合体滋养细胞的分泌效应,维持靶细胞受体的含量。从多方面,多层次发挥助孕安胎效应。

陈伟仁<sup>[12]</sup>研究助孕丸对先兆性流产模型大鼠子宫兴奋性影响,采用电刺激+肌注催产素建立SD大鼠先兆流产模型,观察助孕丸对先兆流产模型大鼠孕酮、雌二醇、人 $\beta$ -内啡肽( $\beta$ -EP)、血栓素和6-酮前列腺素F1 $\alpha$ (6-酮-PGF1 $\alpha$ )的含量及对在体子宫收缩力和收缩频率的影响。研究结果表明助孕丸低、中、高剂量组有防止先兆流产的功效,中剂量组的治疗效果优于阳性对照药,其作用机理可能是通过调整模型大鼠体内孕酮、雌二醇、 $\beta$ -EP、血栓素和6-酮-PGF1 $\alpha$ 的含量,降低在体子宫收缩力和收缩频率,等实现的。

罗颂平<sup>[7]</sup>利用羟基脲建立肾虚排卵抑制动物模型,并运用助孕丸进行干预,助孕丸可调节模型动物的神经-内分泌功能,逆转模型排卵受抑制的状况;通过调控激素受体达到增强激素效应的作用,促进卵泡发育成熟,并在某些指标上表现出量效关系。

曹蕾<sup>[13]</sup>建立肾虚子宫内膜容受性不良大鼠模型,通过观察其子宫内膜形态学的变化,探讨助孕丸对子宫内膜容受性及其免疫环境方面的改善作用;结果表明助孕丸对肾虚模型大鼠内分泌-免疫功能紊乱具有调节作用,该调节作用是通过调节改善自然杀伤细胞(NK细胞)亚群含量及功能和提高内膜白血病抑制因子(LIF)表达来实现的。进而改善子宫内膜容受性并提高妊娠成功率。之后建立肾虚子宫内膜容受性不良大鼠妊娠模型,研究自然流产与子宫内膜容受性及其免疫环境的相关性及助孕丸对复发性

流产的防治机理。研究证明正常大鼠妊娠前后给予助孕 3 号方,亦可通过维护、强化大鼠机体内分泌-免疫协调平衡功能,达到防止流产的目的。

刘明珠<sup>[14]</sup>为了深入探讨自然流产的免疫学发病机制和中药助孕丸安胎的机理,应用肾虚黄体抑制流产模型孕鼠,观察助孕丸对模型孕鼠外周血 T 淋巴细胞亚群、蜕膜组织 Fas/FasL 表达的影响,研究结果表明助孕丸可能通过调整淋巴细胞亚群比率,使 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞和 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞在机体免疫应答过程中的免疫协调作用恢复,蜕膜组织 FasL 表达升高, Fas 表达下降,受异体抗原刺激增生的 Fas 阳性 T 淋巴细胞及早凋亡, Fas/FasL 介导的活化诱导的细胞死亡(AICD)机制恢复平衡,从而起到安胎的作用。

周英<sup>[15]</sup>应用肾虚-黄体抑制模型大鼠发现补肾健脾中药助孕丸可通过调整模型大鼠 Th1 型细胞因子, Th2 型细胞因子的分泌,纠正模型大鼠外周血和母胎界面中 Th2/Th1 平衡偏移,使母体免疫排斥作用下降,母胎免疫保护作用得以增强。最终可降低模型大鼠的流产率,取得防治流产效果。此治疗作用与中药剂量高低呈量效关系。同时研究表明助孕丸可调节流产大鼠外周血中 TCR $\gamma\delta$ T 细胞水平及 TCR $\gamma\delta$ T 淋巴细胞/CD3T 淋巴细胞比值。

赵红艳<sup>[16]</sup>研究助孕丸对肾虚黄体抑制妊娠流产大鼠模型外周血清转化生长因子  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)的影响,发现助孕丸具有上调 TGF- $\beta$ 1 的作用,推测助孕丸可通过参与免疫调节的作用,达到防治流产的目的。

郑文欣等<sup>[17]</sup>利用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取技术改进助孕 3 号丸提取工艺。分别采用了四种超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺,以药效实验和总黄酮含量为评价指标,并与原制剂工艺比较,比较了五种工艺的优劣。助孕 3 号丸的最佳提取工艺条件为女贞子、白术、续断三味药经固相萃取小柱(SFE)萃取后,药渣再水提,另外黄芪等五味药材水提。

许惠珍<sup>[18]</sup>采用正交拆方及化学特征谱追踪的方法研究助孕 3 号方的物质基础。将助孕丸分为补肾方及健脾方两部分,比较两部分在提高流产大鼠流产率,增加雌二醇、孕激素水平方面的贡献,结果表明补肾方在提高流产率及雌二醇水平方面优于健脾方,而在增加孕激素水平方面二者贡献度相近。这与罗元恺教授指出“胎孕的形成,主要在于先天之肾气,而长养胎元,则在于母体后天脾胃所生化之气血。因此肾虚不固,脾失摄养为胎动不安之发病关键。”的理论一致。

岳明明等<sup>[19]</sup>应用妊娠大鼠肾虚黄体抑制病证结合模型,探讨助孕丸拆方中的补肾组方及其补肾君药菟丝子对该模型的治疗作用。结果表明助孕丸拆方补肾组方及君药菟丝子均具有补肾助孕的功效,可改善模型孕鼠的肾虚症状,升高孕激素及其受体的含量,降低流产率;补肾组方在增强黄体功能,促进胚胎发育,方面作用优于补肾君药菟丝子。

助孕丸的实验安全性评价,赵颖<sup>[20]</sup>研究发现补肾健脾中药助孕丸能可通过调节内分泌、免疫功能干预溴氰菊酯的毒性,达到降低流产率、促进胎鼠发育及子代生殖内分泌功能等方面的效果。

### 1.1.3 助孕丸补肾组方研究现状

助孕丸补肾组方以寿胎丸为基础,主要有菟丝子、桑寄生、续断等。寿胎丸一方始载于清代名医张锡纯所著的《医学衷中参西录》,由菟丝子、桑寄生、续断、阿胶四味中药组成。具有补肾益精,养血安胎的功效。临床上广泛用于胎漏、胎动不安、滑胎的防治。国内外对寿胎丸进行了大量的临床与实验研究。

#### 1) 寿胎丸的临床研究

寿胎丸在临床应用广泛,临床研究表明其在调经、助孕、安胎方面均有较好的治疗效果。

李莹<sup>[21]</sup>等应用加味寿胎丸治疗青春期功能失调性子宫出血,临床效果显著,总有效率达 90%以上。

黄华清<sup>[22]</sup>等研究了寿胎丸对辅助生殖刺激周期助孕的作用,将经辅助生殖技术成功妊娠的肾虚型患者分为单纯西药组与寿胎丸联合西药治疗组,通过比较两组患者妊娠早期体内的激素水平、治疗所使用的激素药物量、治疗费用的高低等,得出寿胎丸联合西药组在辅助生殖刺激周期助孕的效果更佳的结论。

周从蓉<sup>[23]</sup>观察寿胎丸加味联合克罗米芬对于肾虚型黄体功能不全性不孕的患者的临床疗效。将肾虚证黄体功能不全性患者分为单纯克罗米芬治疗组与寿胎丸加味联合克罗米芬治疗组,将两组治疗前后的激素水平及中医证候疗效进行比较。结果表明寿胎丸加味联合克罗米芬治疗组在调节血清激素水平及改善中医证候疗效方面均优于单纯应用克罗米芬治疗组。认为寿胎丸在辅助治疗黄体功能不全性不孕症方面具有一定疗效。

高倩倩<sup>[24]</sup>研究发现寿胎丸加味可显著增加进行主动免疫治疗的复发性流产患者 CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> 细胞亚群的含量。可有效预防流产的发生,在辅助主动免疫治疗 RSA 方面疗效确切。

韩永梅<sup>[25]</sup>观察寿胎丸加减治疗先兆流产的疗效,将患者分为治疗组与对照组。治疗组予以寿胎丸加减治疗,对照组予以肌注黄体酮治疗。比较两种治疗方法在改善患者临床症状(如腹痛,阴道出血)的差异,认为寿胎丸加减在改善患者临床症状方面显著优于黄体酮针剂。

郜洁等<sup>[26]</sup>进行了寿胎丸治疗先兆流产的临床观察。将早孕期先兆流产患者分为中药组(寿胎丸),中西药结合组(寿胎丸、黄体酮、绒毛膜促性腺激素),西药组(黄体酮、绒毛膜促性腺激素)进行治疗,并以正常妊娠妇女作为对照组。通过比较各组间孕酮(P)、人绒毛膜促性腺激素( $\beta$ -HCG)水平及临床疗效,认为寿胎丸对早孕先兆流产具有显著的疗效,并推测其可能通过提高胎盘 HCG 的含量及 P 的水平,达到改善黄体

的功能。

## 2) 寿胎丸的实验研究

目前对寿胎丸实验研究涉及质量控制, 安全性评价, 药效学, 及安胎作用机理的研究。

曹越等<sup>[27]</sup>应用高效液相色谱 (HPLC) 技术建立了寿胎丸复方的指纹图谱, 为寿胎丸的质量控制提供了科学有效的方法。刘秀明等<sup>[28]</sup>采用单因素考察和正交试验的方法确定了减味寿胎丸总黄酮的最优提取工艺。夏建秋<sup>[29]</sup>运用光谱和色谱技术, 建立了分析寿胎丸生药材及煎煮液中微量元素及计算其溶出率的方法; 检测了寿胎丸煎煮液中游离氨基酸; 测定了寿胎丸煎煮液中金丝桃苷、槲皮素和山奈酚三种黄酮类化合物的含量。奠定了寿胎丸中物质成分与临床效果的相关性研究基础, 有利于指导合理的临床用药。

刘丹卓等<sup>[30]</sup>观察寿胎丸低、中、高剂量组对 SD 孕鼠胚胎-胎仔发育毒性的影响, 将寿胎丸各组孕鼠体内的吸收胎、畸胎数量, 胎仔内脏、骨骼及胎仔体质发育等状况与阳性对照相比较, 得出寿胎丸药液对于健康 SD 育龄孕鼠的生殖功能及其胚胎发育是安全的结论。

在药效学研究方面, 郜洁<sup>[31]</sup>应用肾虚黄体抑制病证结合动物流产模型对寿胎丸的药物组成及补肾安胎的药效进行了研究。研究发现寿胎丸可显著降低模型大鼠的流产率, 改善其肾虚状态。还具有拮抗米非司酮提高血清中雌激素 (E<sub>2</sub>)、孕激素 (P) 的水平、增加孕激素受体表达的作用。经药效学验证寿胎丸醇提与醇提后水提的复合成分补肾安胎效果最佳。

唐丽丽<sup>[32]</sup>等研究发现寿胎丸可促进同种异体卵巢移植模型大鼠动情周期的恢复, 提高移植卵巢的成活率, 增加其重量和体积, 认为寿胎丸对同种异体卵巢移植模型急性排斥反应有抑制作用。

何冬梅等<sup>[33]</sup>应用 CBA/J×DBA/2 建立反复自然流产小鼠模型, 用三个剂量组的寿胎丸对其进行干预, 通过检测蜕膜与胎盘组织中 SOCS1 和 SOCS3 蛋白的表达, 认为寿胎丸可能通过调节小鼠母胎界面中 SOCS1 和 SOCS3 蛋白的表达, 进而改变 Th1 和 Th2 细胞的比例达到治疗反复自然流产的目的。

### 1.1.4 助孕丸中健脾组方中药的相关研究

#### 1) 黄芪化学成分及药效药理学研究

黄芪始载于《神农本草经》, 为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。味甘, 性微温, 归脾、肺经<sup>[34]</sup>。被列为上品, 是临床上常用补气药。具有补气升阳, 益卫固表, 利水退肿, 托毒生肌的功效。黄芪的主要化学成分包括皂苷类、黄酮类、多糖类和氨基酸等。

(1) 皂苷类 皂苷类是黄芪中重要的组成成分。现已从黄芪和它的同属近缘植物

中分离出了40多种皂苷,主要有黄芪皂苷 I、II、III、异黄芪皂苷 I、II 和大豆皂苷 I 等。它们主要以9,19-环羊毛脂烷型的四环三萜皂苷类为苷元,统称为黄芪皂苷或黄芪总皂苷。黄芪皂苷IV是黄芪中的主要有效成分之一,常作为黄芪药材的定性定量指标。

近年来关于黄芪甲苷的药效学研究较多。临床和实验研究发现黄芪甲苷不仅可以调节整个机体的免疫功能,且对人体的多数器官组织如心、肺、脑、肝、肾等具有保护作用<sup>[35,39]</sup>。体外细胞实验发现黄芪甲苷具有促进细胞增殖和抗凋亡作用。刘维统<sup>[40]</sup>等研究发现:5-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄芪甲苷有促进软骨细胞的增殖,提高其活力、增加细胞内蛋白的含量及提高细胞异染反应的作用,且随浓度的增加促进作用越明显。王曦<sup>[41]</sup>等研究黄芪甲苷对人皮肤成纤维细胞增殖和凋亡的影响,结果表明黄芪甲苷在较低浓度5-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可促进皱纹和无皱纹皮肤成纤维细胞增殖,促进皱纹、无皱纹和老年皮肤成纤维细胞I型胶原蛋白合成,降低皱纹和无皱纹皮肤成纤维细胞凋亡率( $P<0.01$ )。得出黄芪甲苷在较低浓度时具有改善皱纹和非皱纹皮肤成纤维细胞生物学特性的作用。另有研究报道<sup>[42]</sup>黄芪甲苷能有效抑制紫外线对体外培养的人成纤维细胞的光损伤,有缓解皮肤光老化进程的作用,这一效应同黄芪甲苷促进成纤维细胞增殖和调节TGF- $\beta$ /Smad信号传导密切相关。黄海涛等<sup>[43]</sup>通过应用过氧化氢制作成骨细胞凋亡模型,观察了黄芪甲苷拮抗过氧化氢引起的小鼠成骨细胞凋亡作用,结果表明黄芪甲苷对小鼠成骨细胞凋亡有明显的抑制作用,为骨质疏松的治疗提供新的思路。

(2) 黄酮类 黄芪中黄酮类有三十多种,常见的有毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、芒柄花苷、山奈黄素、异鼠李素、鼠李异柠檬素、羟基异黄酮等。有文章报道毛蕊异黄酮葡萄糖苷是黄芪中含量较高的黄酮类物质。2010年版的《中国药典》也新增了毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量测定方法将其作为黄芪药材鉴定的指标性成分之一<sup>[34]</sup>。近年来研究表明黄芪中的黄酮类成分具有调节免疫、保护心脑血管、护肝、消炎、抗突变、清除自由基等药理作用。汪德清<sup>[44]</sup>等进行黄芪总黄酮生物学活性作用的化学成分基础研究,结果显示黄芪总黄酮中主要含有芒柄花素及其葡萄糖苷,毛蕊异黄酮及其葡萄糖苷、 $\beta$ -谷甾醇及其葡萄糖苷6种化合物,并认为它们之间的有机组合可能是黄芪总黄酮多种生物学活性的物质基础。毛蕊异黄酮是黄芪的主要活性成分之一,同时也是一种典型的植物雌激素,具有抗氧化应激、抗病毒和调节细胞凋亡等作用<sup>[45]</sup>。匡文娟<sup>[46]</sup>等研究了毛蕊异黄酮对人乳腺癌MCF-7细胞的作用,结果显示毛蕊异黄酮在低浓度时能促进MCF-7细胞增殖,降低其凋亡,其作用机制可能与毛蕊异黄酮的雌激素作用有关。唐菁燕<sup>[47]</sup>等研究表明毛蕊异黄酮通过雌激素受体促进内皮细胞增殖。

(3) 黄芪多糖(APS) 黄芪中的多糖以葡聚糖和杂多糖为主。葡聚糖包括水溶性的葡聚糖和非水溶性的葡聚糖。黄芪中的杂多糖主要是水溶性的酸性杂多糖,主要由葡萄糖和半乳糖等组成。

黄芪不单以中药的形式参与中药复方的组成,在临床上黄芪注射液应用也比较广泛,其具有益气养元、扶正祛邪、健脾利湿功效,主要应用于心脑血管疾病、糖尿病、肾病、肝病、哮喘等,临床治疗效果佳。窦辉<sup>[48]</sup>采用正、反相硅胶柱层析从黄芪注射液原液中分离纯化出14个化合物,经波谱分析鉴定了它们的结构。其中6个为异黄酮化合物,分别是芒柄花素,毛蕊异黄酮,6'-O-乙酰基芒柄花苷,芒柄花苷,红车轴草异黄酮-7-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖,毛蕊异黄酮-7-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖;1个紫檀烷化合物,结构为9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖;1个异黄烷化合物,结构为2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖;另外6个为黄芪皂苷类化合物,分别是乙酰黄芪皂苷I,黄芪皂苷I,异黄芪皂苷I,异黄芪皂苷II,黄芪皂苷II和黄芪甲苷。袁惠霞等<sup>[49]</sup>研究表明黄芪注射液对复发性先兆流产也有良好的治疗作用,并可预防胎儿宫内发育迟缓。冯婷<sup>[50]</sup>等采用体外培养滋养细胞的方法,利用60 $\mu$ mol/L的米非司酮造成滋养细胞损伤模型,加入体积分数为1%、0.1%、0.01%、0.001%的黄芪注射液进行干预,检测各组细胞的增殖,凋亡及凋亡蛋白的表达情况,结果表明黄芪注射液对滋养细胞的增殖率无显著改善( $P>0.05$ ),但可显著降低滋养细胞的早期凋亡率( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),可不同程度的抑制凋亡蛋白的表达。得出黄芪注射液对米非司酮诱导的滋养细胞凋亡有一定的抑制作用。

## 2) 党参化学成分及药理药效学研究

党参是我国传统名贵中药材,《中华人民共和国药典》2010版<sup>[34]</sup>收录的党参来源于桔梗科植物的3个品种,分别为党参 *Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf、素花党参 *Codonopsis pilosula* Nannf var. *modesta* (Nannf) L.T.Shen 或川党参 *Codonopsis tangshen* Oliv.的干燥根。党参味甘、性平,归脾、肺二经,具有补中益气、生津和胃之功效。在临床上主要用于治疗脾胃虚弱,中气不足,脾气亏虚,热病伤津等症。党参中化学成分包括甾醇类,糖苷类,生物碱类及含氮成分,挥发油成分,三萜类及其他类成分,还有多种人体必须的无机元素和氨基酸。现代药理研究表明,党参具有调节血糖,促进造血机能,降压,抗缺氧,耐疲劳,增强机体免疫力,调节胃收缩及抗溃疡等多种作用。党参中的聚乙炔类化合物党参炔苷是从党参中分离出的一水溶性成分。党参炔苷对乙醇所致的胃黏膜损伤有很好的保护作用,与党参补益脾胃的传统功效相符,是党参保护胃黏膜的活性成分之一<sup>[51]</sup>。可作为党参质量控制的指标性成分。

## 3) 白术化学成分及药效药理学研究

白术为菊科(Compositae)植物白术(*Atractylodes Macrocephala* Koidz.)的干燥根茎<sup>[52]</sup>。其性温,味甘、苦,具有健脾益气,燥湿利水,止汗,安胎之功效。常用于脾虚食少,腹胀泄泻,痰饮眩悸,水肿,自汗,胎动不安等症<sup>[53]</sup>。白术化学成分复杂,主要为多糖、挥发油和内酯类成分。白术根茎中挥发油主要成分为苍术酮、苍术醇等,内酯类主要为白术内酯I、白术内酯II、白术内酯III、白术内酯IV、双白术内酯、8,9-环氧白术内酯等。这些化学成分具有抗肿瘤、抗老年痴呆症、提高机体免疫力等药

理作用。

据《神农本草经》记载白术具有安胎功效。朱丹溪在《丹溪心法·金匱当归散论》中称“白术乃安胎圣药”，对后世影响巨大。白术对于以脾虚为主症的流产，具有补益脾气和安胎之功效。补肾固冲丸、泰山磐石散、白术散和举元煎等治疗流产的方剂中均应用白术。先宁霞<sup>[54]</sup>运用自拟安胎汤以白术为君药治疗习惯性流产，其有效率达 95%以上。林振<sup>[55]</sup>收集了 2000 年 1 月至 2009 年 12 月发表在医学期刊有关先兆流产的中医临床研究文献，对其中医辨证、治法、用药进行分析归纳，得出高频用药性味归经分类表，在出现频率最高的 12 味主要药物中白术位列第 5 位。张小花等<sup>[56]</sup>应用米非司酮建立妊娠 Wistar 大鼠先兆流产模型，观察白术散高、中、低组对模型大鼠血清孕酮、 $\beta$ -HCG 的影响。结果表明，大鼠血清孕酮、 $\beta$ -HCG 水平与模型对照组比较均有升高，差别有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。得出白术散能提高米非司酮造模的先兆流产 Wistar 大鼠的血清孕酮、 $\beta$ -HCG 水平，可维持妊娠继续，有保胎的作用。

## 1.2 液质联用技术在中药研究中的应用

中药及复方是中华民族的宝贵财富，在维护大众健康的领域内发挥着极为重要的作用。但由于中药特别是复方化学成分复杂，药效成分难以明确，严重地阻碍了中药现代化的进程。因此，利用现代化的技术手段揭示中药及复方化学物质基础是实现中药现代化的关键环节，并能促进中药学科的发展，推动中药产业的现代化。液质联用技术（LC-MS）将高效液相的（HPLC）的高分离效能与质谱（MS）的强大结构测定功能组合起来，为中药化学成分的快速分析提供了一个重要的新技术<sup>[57][58]</sup>。该技术具有灵敏度高，分离能力强、专属性好的特点。在分析中药化学成分、建立中药指纹图谱、研究中药的药代动力学、筛选中药中的活性成分及研究中药血清药物化学方面做出了巨大的贡献。

### 1.2.1 液质联用技术在中药化学成分分析方面的应用

中药药物成分复杂多样，分离提纯难度大，液质联用技术对样品不需要进行繁琐和复杂的预处理，因此在中药成分分析研究中得到广泛应用。除了对已知成分的定性定量分析外，还可对未知成分依据质谱检测器给出的丰富的结构信息，结合同类已知结构化合物的裂解规律，或结合其他检测方法，对未知成分进行直接分析。明继阳等<sup>[59]</sup>应用 HPLC-MS<sup>n</sup> 方法分析知母中的甾体皂苷类成分，根据负离子模式下的准离子峰和正离子模式下的二、三级质谱裂解规律，结合参考文献并与相应对照品进行比对，鉴定出七个甾体皂苷，从而建立了一种适用于紫外吸收弱的中药复杂成分的定性方法，为知母甾体皂苷类化学成分的体外、体内的定量分析提供了可靠依据。蒋叶娟等<sup>[60]</sup>利用超高效液相色谱与串联四极杆飞行时间质谱仪联用技术（UPLC/Q-TOF-MS）分析女贞子化学成分，采集正、负离子模式下数据，元素组成分析并结合对照品及相关文献数据对照，共鉴定出 14 个化合物，为阐明女贞子药效成分奠定基础。孙慧等<sup>[61]</sup>采用反相高效液相色谱-二极管阵列检测（RP-HPLC-DAD）和高分辨电喷雾飞行时间质谱联用技术

(ESI-TOF-MS), 对生大黄及制大黄中的主要成分进行定性定量研究, 比较二者的不同, 来考察炮制过程对大黄有效组分的影响, 研究表明, 大黄中主要含有多酚类、蒽醌衍生物类等成分; 生大黄与制大黄各组分含量变化各不相同。孙健<sup>[62]</sup>等应用 HPLC-MS<sup>n</sup> 对柴胡 60%乙醇提取液中的柴胡皂苷类成分进行分析, 利用总离子流图和多级质谱图共鉴定出 23 个柴胡皂苷类化合物, 为柴胡皂苷类成分的结构分析提供了快速、准确的评价方法。陈晓鹏等<sup>[63]</sup>采用多维液质联用系统 (HPLC-TOF/MS 及 HPLC-DAD-ESI-MS-MS) 对养血清脑颗粒中的化学成分进行分析。结合个色谱峰的保留时间, 化合物的精确分子量及相关质谱信息, 共鉴定出蒽醌类、生物碱类、酚酸类、苯酞类和单萜苷类化合物共 41 种。

李文兰<sup>[64]</sup>等采用液质联用技术研究了八珍汤的化学成分并与四物汤、四君子汤的色谱图进行比较, 明确了八珍汤补益气血的物质基础, 为八珍汤的质量评价提供了新的依据。失笑散为妇产科常用方剂, 具有活血化瘀散结止痛的功效。Zhou Wei<sup>[65]</sup>等应用液质联用技术及 Markerlynx 分析软件, 比较了失笑散醋制与水提两种提取工艺对复方中药效成分的影响。结果表明与水提物比较, 醋提物中黄酮类成分的溶解度会增加, 而黄酮类物质对助于镇痛活性成分的药效的发挥。同时说明了液质联用技术和 Markerlynx 分析软件将为中药研究提供一种快速有效的分析手段。

Wang DD 等<sup>[66]</sup>以牛黄上清片为例证明了 HPLC/Q-TOF-MS 的特征性数据收集及最优化分析功能, 令其在中药复方复杂性成分分析及质量控制方面的具有的优势。

### 1.2.2 液质联用技术在中药指纹图谱建立中的应用

中药指纹图谱是指某种或某产地的中药材或中成药经适当处理后, 采用一定的分析手段, 得到的能够标示该中药材或中成药物特性的共有峰的图谱<sup>[67]</sup>。中药指纹图谱技术能较全面地反映中药中所含成分的整体特点, 在确保样品的质量与一致性方面具有显著的优势。为中药的质量控制提供了有力的保障。

王薇丹等<sup>[68]</sup>对东北地区 10 个不同产地的五味子药材进行指纹图谱分析, 建立了该药材的指纹图谱, 得到 17 个共有峰, 并对其中 15 个共有峰进行了指认, 约一半为木脂素色谱峰。丰富了五味子的指纹图谱内容, 为五味子药材的质量控制标准提供了依据。

Luo Jiun-Lung<sup>[69]</sup>应用液质联用技术建立了检测中药黄芩指纹图谱的方法。对图谱中主要色谱峰进行了鉴定, 共鉴定出 16 个化合物。并成功运用该方法鉴定了三个复方中的黄芩药材。

蔡华, 叶方<sup>[70]</sup>等应用 UPLC-MS 技术对鄂西北地区十批次的竹叶柴胡进行指纹图谱研究。研究表明十批竹叶柴胡药材共有 8 个分离度良好的色谱峰, 结合相关质谱信息及参考文献, 成功分离并鉴定了其中的 6 个化合物。为鄂西北地区竹叶柴胡的质量评价提供了快速、简便的方法。

夏菁, 谢媛媛等<sup>[71]</sup>应用 HPLC、TOF-MS、Ion-trap/MS<sup>n</sup> 技术建立骨通贴膏的指纹图谱并进行多成分结构鉴定。该研究检测鉴定了图谱中 19 个峰 (21 个化合物的特征成分), 归属了各个化合物的药材来源。从大体上阐明了骨通贴膏的化学组成, 为该药膏的全面质量控制提供了科学的依据。

乔怀耀, 罗荣等<sup>[72]</sup>应用高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱技术建立了舒肝解郁胶囊的指纹图谱分析方法。鉴定了 22 个共有峰的化学成分。成功运用该方法对 34 批舒肝解郁胶囊进行了检测及相似度评价, 结果表明 34 批样品的相似度均达到 96% 以上, 并确立了 12 个特征吸收峰。在一定程度上反映了疏肝解郁胶囊制作工艺的稳定性。所建立的指纹图谱为其质量控制奠定了基础。

安福丽<sup>[73]</sup>等采用液质联用技术 (LC-MS/MS) 对不同产地中药葫芦巴中化学成分进行定性分析, 质谱采用 ESI 离子源, 正离子与负离子模式下采集数据, 通过分析 Q-TOF-MS 正、负离子质谱信息共检测到 23 个色谱峰, 并结合对照品与相关文献数据其中鉴定出 11 个化合物结构, 主要结构类型为黄酮类、皂苷类、生物碱类化合物。

### 1.2.3 液质联用技术在中药药代动力学中的应用

中药药代动力学 (Pharmacokinetics, PK) 是应用动力学原理, 研究中药活性成分、有效部位、单味药和复方的体内吸收 (Absorption)、分布 (Distribution)、代谢 (Metabolism)、排泄 (Excretion) 和毒性 (ADME / Tox) 的动态变化规律及其体内量-效、时-效关系, 并用数学函数加以定量描述的一门新兴学科。它对阐明中药药效物质基础、揭示中药科学内涵, 对中药新药创制、剂型改进以及方剂组分配伍机制的研究均发挥着十分重要的作用, 现已成为当今中药现代化研究链上一个不可分割的重要组成部分, 从而成为我国药代动力学研究的热点<sup>[74]</sup>。血药浓度法<sup>[75]</sup>是药代动力学研究的经典方法, 是计算药代动力学最常用最准确的测定方法, 所以血药浓度准确的测定是中药药代动力学研究至关重要的环节。LC-MS 在中药药代学研究方面的应用是很广泛的。

吴晓霞等<sup>[76]</sup>从黄连解毒汤生物碱类入手, 联用 (LC-MS/MS) 技术建立了测定药根碱、巴马汀、小果碱血药浓度的方法, 并成功应用于黄连解毒汤正常大鼠体内这 3 个成分的药动学研究, 为中药复方药动学研究提供了可以借鉴的分析方法。丁建刚<sup>[77]</sup>等以地西洋为内标, 采用 HPLC-MS/MS 技术, 建立了比格犬血浆中丹参酮 IIA 的测定方法, 而且本法的最低定量浓度为 1ng/ml, 已完全能够满足实验要求, 且样品处理和测定过程简便, 适合比格犬体内药代动力学研究。LI<sup>[78]</sup>等建立了一个快速, 特异和敏感的 UPLC-MS/MS 术分析大鼠口服袖皮苷和袖皮素 (骨碎补提取物) 后的药代动力学参数, 结果显示, 该方法符合 FDA 指导下的生物药品的分析标准, 袖皮苷及其活性代谢产物袖皮素的药代动力学研究可以为骨碎补的临床应用提供一个合理的参考。陈宁<sup>[79]</sup>等建立 SPE-HPLC-MS 测定大鼠血浆中黄芪甲苷含量的方法, 并研究了黄芪甲苷在大鼠体内的药代动力学和组织分布。Yujuan Li<sup>[80]</sup>应用 LC-MS/MS 定量分析大鼠血浆中白术内酯

I 的含量并对其药物代谢动力学进行了研究。Xiao-hua Liu<sup>[81]</sup>等应用 UPLC-MS 同时检测大鼠口服黄芪提取液后血浆中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、黄芪皂苷 II 6 种成分,对每种成分进行药代动力学研究。Mei-Ling Hou 等<sup>[82]</sup>应用 UPLC-MS/MS 技术研究了以三黄泻心汤为基础的 7 种中成药制剂中 6 种活性成分的含量。并比较了大鼠灌胃中药单体大黄酸,中药大黄,中药复方三黄泻心汤后,大黄酸单体的药物代谢动力学过程。研究表明中药复方及单味中药中的大黄酸的吸收率高于大黄酸单体的吸收率,从而得出在大黄酸的吸收率方面三黄泻心汤复方优于单味中药大黄及单体大黄酸的结论。中药杂质多,被测物浓度或活性极低,可供分析的样品量少,尤其是在连续测定过程中,很难再度获得完全相同的样品,此外工作量很大,因为中药中含有多种化学成分,而且每种化学成分含量低,需要大量的数据处理和分析,这些都给分析带来了一定的困难,也严重限制了其发展,液质联用色谱分离效能高、灵敏度高、选择性高,排除了这些因素的干扰,推动了中药药代学的发展。

葛根芩连汤是用于治疗胃肠道疾病传统复方。Zhang Y<sup>[83]</sup>等采用液质联用技术建立了一种同时检测葛根素和大豆黄酮有效的方法。并应用该方法比较了葛根芩连汤及葛根提取液中葛根素和大豆黄酮的药代动力学差异。结果表明与葛根汤相比,葛根芩连汤中的葛根素和大豆黄酮的吸收效率更高,且消除速率下降。为揭示葛根芩连汤的配伍规律提供了科学依据。

#### 1.2.4 液质联用技术在中药活性成分的筛选中的应用

中药化学成分复杂,从其中筛选出活性成分是一项巨大的任务。液质联用技术具有灵敏度高,分离度好,分析功能强大的优点。结合酶、受体和功能蛋白特异性结合的靶点模型体系,为筛选中药活性成分提供了强大的技术支持。

何忠梅,王晓慧等<sup>[84]</sup>应用靶向亲和与液质联用技术快速筛选人参茎叶总皂苷中  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂,从中筛选并鉴定出 12 种可能具有  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂活性的化合物,并对其中 5 个化合物进行了活性验证,研究结果表明人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 活性与人参总皂苷的活性相接近,被认为是人参总皂苷中活性最强的化合物。建立了适用于复杂体系中  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制高通量筛选的方法。

Xue Ying<sup>[85]</sup>等采用高效液相、液质联用技术以肝细胞膜为载体对虎杖中具有生物活性的化合物进行了筛选。比较了样品与肝细胞膜反应前与反应后色谱图之间的差异,从中筛选出虎杖中具有渗透性的化合物,并对它们进行了鉴定。研究发现了白藜芦醇苷等 8 种化合物与肝细胞膜结合特异性,为揭示虎杖的抗动脉硬化作用的机制建立了一个有用的方法。

#### 1.2.5 液质联用技术在中药血清药物化学的应用

中药血清药物化学是以传统药物化学方法为基础,综合应用多种现代技术,分析鉴定口服中药后血清中移行成分,研究其药效相关性,确定中药药效物质基础的应用学科。运用血清药物化学的方法研究中药复方,有助于揭示其作用机制。<sup>[86-87]</sup>

HuangYX 等<sup>[88]</sup>应用液质联用技术检测大鼠灌胃杜仲、川续断中药单煎剂及单煎混合液后, 血浆中杜仲苷、栀子苷、栀子酸、松脂醇二葡萄糖苷、开联番木鳖苷、马钱子苷的含量及药代动力学差异。结果表明杜仲苷和栀子苷的达峰时间显著增加, 同时达峰浓度显著降低。表明这两种药物同用时会影响药物有效成分及其药代动力学的改变。

芍药甘草汤是中医临床常用方剂, 具有缓急止痛的功效。Shen L<sup>[89]</sup>等应用液质联用技术研究芍药甘草汤的配伍及增效规律。比较大鼠口服芍药甘草汤单煎后混合剂与二者合煎剂血浆成分的差异。发现二者共有 15 个化合物。合煎剂促进了其中 12 个化合物的吸收。该研究为中药复方中各药物之间相互作用机理的探讨提供了参考思路。

孙健等<sup>[90]</sup>等应用高效液相技术比较了苦参、空白血清及含药血清的指纹图谱, 并应用液质联用技术确定苦参给药后吸收入血的活性成分。结果表明从苦参药材中共检测到 12 种生物碱成分, 其中 7 种以药物以原型形式吸收入血。并认为这七种药物成分是苦参药效物质基础。

刘学伟等<sup>[91]</sup>应用 UPLC/Q-TOF-MS 分析开心散 60%乙醇提取物各成分药物来源及大鼠灌胃提取物后入血成分分析。通过比较复方与单味药的正、负总离子流图, 对主要色谱峰进行了药材来源归属。并分析了该复方的入血成分, 认为血浆中的移行成分是复方治疗老年性痴呆的直接的药效物质基础。有助于进一步研究该复方的作用机制。

### 1.3 自然流产与细胞凋亡

自然流产 (Spontaneous Abortion) 在临床上比较常见, 其发生率占全部妊娠的 10%-15%, 其中 80%以上发生在妊娠早期。自然流产连续发生 3 次或 3 次以上称为习惯性流产 (Habitual Abortion)。有学者将连续两次流产者称复发性自然流产 (Recurrent Spontaneous Abortion)。自然流产的常见病因有胚胎因素和母体因素。胚胎因素主要是胚胎染色体的异常, 常见为染色体结构和数目的异常。影响自然流产的母体因素较多, 常见的有感染因素、内分泌因素、免疫因素、子宫结构异常等。<sup>[92]</sup>国外已有学者研究发现绒毛和蜕膜组织的异常凋亡是自然流产发生的机制之一。有研究报道<sup>[93][94]</sup>, 在胚泡植入、胎盘发育的早期, 通过影响正常的凋亡程序可能会直接或间接地对妊娠的成败造成影响。

细胞凋亡是细胞的程序性死亡, 是一种正常的生理现象, 为胚胎发生、特殊情况下除去受损细胞、不同病理状态下对抗异常细胞增殖所必须的<sup>[95][96]</sup>。妊娠过程中也涉及到细胞凋亡, 正常的细胞凋亡是妊娠继续维持的关键。早孕期来源于子宫内膜的蜕膜细胞的退化就是以凋亡形式发生的, 但蜕膜细胞的凋亡有一定的时空限制。蜕膜细胞的凋亡会随着妊娠的继续而明显减少, 并开始组织重建, 当蜕膜组织的重建和滋养层细胞的侵入达到相对稳定状态, 妊娠可以继续维持。若这一稳态被打破 (如感染、病理状态的 TNF- $\alpha$  增多等), 都可能会发生凋亡细胞增加, 导致胚胎停止发育, 妊娠终止而流产。

### 1.3.1 自然流产相关凋亡蛋白

细胞凋亡的相关的蛋白较多,有 Bcl-2 家族蛋白、Caspase 家族蛋白, P53 蛋白、survivin 等。目前广泛应用于细胞凋亡的调控基因以 Bcl-2 家族为主。Bcl-2 家族包括 Bcl-2、Bax、Bak、Bcl-x14 个家族分子。其中 Bcl-2 为凋亡抑制基因,具有抑制细胞凋亡的作用; Bax 蛋白具有促进细胞凋亡的作用。二者功能相关,常常通过形成二聚体来调控细胞的凋亡状况。如果 Bcl-2 蛋白过量表达则会形成较多的 Bcl-2/Bax 异源二聚体,则细胞存活;而当 Bax 蛋白表达过量时就形成较多的 Bax 同源二聚体,这会导致细胞内线粒体的通透性增强,进而导致细胞凋亡的发生<sup>[97]</sup>。大多学者研究认为细胞接受刺激信号后存活与否取决于 Bcl-2/Bax 的比值的高低<sup>[98]</sup>。Caspase 家族即半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(Cysteiny l aspartate specific proteinase, Caspase)家族,该家族在诱导细胞凋亡的分子机制中起着重要作用,多条凋亡通路可汇聚于此,最终细胞凋亡的过程。Caspase 家族成员主要由凋亡启动因子(apoptotic initiators)凋亡执行因子(apoptotic executioners)和炎症介导因子(inflammatory mediators)三类组成。在细胞凋亡的程序中三者分工明确,又相互作用。各级之间存在级联放大效应。其中凋亡启动因子与凋亡执行因子分别位于级联反应的上下游。常见的凋亡启动因子有 Caspase-8、Caspase-9 等,其具有自我活化、识别并激活下游 Caspase 的功效。Caspase-8 的激活效应比较广,几乎能激活所有的下游 Caspase 而诱发细胞凋亡<sup>[99][100]</sup>。凋亡执行因子有 Caspase-3、Caspase-7 等,它们通过作用于特异性底物而使细胞凋亡。Caspase-3 是 Caspase 家族中的最具代表性的凋亡执行者之一,它的活化标志着细胞凋亡进入不可逆阶段<sup>[101]</sup>。炎症介导因子有 Caspase-1、Caspase-4 等,可介导炎症反应并辅助死亡受体所介导的细胞凋亡途径。李拴明等<sup>[102]</sup>研究发现 Caspase-3 可表达于妊娠小鼠母胎界面蜕膜细胞的胞浆中,且与正常妊娠组比较实验对照组的 Caspase-3 蛋白的阳性表达率显著增高。由此认为蜕膜细胞中 Caspase-3 的表达会起到促进蜕膜细胞凋亡的作用,进而导致自然流产的发生。治疗上可应用腹腔注射大鼠抗小鼠 CD86 单克隆抗体,抑制 Caspase-3 蛋白的表达使其恢复至正常水平,从而降低自然流产模型的胚胎吸收率。Choi 等<sup>[103]</sup>研究发现习惯性流产妇女绒毛组织中 Caspase3、Caspase6、Caspase12 的表达均增高。

上个世纪 90 年代末,Lea 等<sup>[104]</sup>比较了凋亡抑制基因 Bcl-2,在正常妊娠组、自然流产组、习惯性流产组蜕膜组织中的表达情况。研究发现正常妊娠组蜕膜组织中 Bcl-2 基因的表达明显高于自然流产组和习惯性流产组。由此认为蜕膜组织异常凋亡可能参与了自然流产的过程。丁峰等<sup>[105]</sup>比较了孕 50 日的自然流产患者与同期正常妊娠患者蜕膜组织的凋亡情况。研究发现自然流产患者的蜕膜组织大量凋亡,与正常妊娠患者比较具有显著性差异。抑制凋亡的蛋白表达显著下降,促进凋亡的蛋白表达显著上升,同时两者之间的比例降低。得出早孕期蜕膜组织异常凋亡可能是自然流产的机制之一的结论。郭玉萍等<sup>[106]</sup>从细胞增殖与细胞凋亡的角度探讨了自然流产的发生机制。

对临床上要求主动终止妊娠的患者与自然流产患者的绒毛与蜕膜组织进行研究,发现自然流产患者的蜕膜组织中 Bcl-2/Bax 表达率的比值低于正常妊娠患者,在形态学上与细胞凋亡的发生相一致。由此表明蜕膜细胞的增殖和凋亡在妊娠过程中可能起着重要作用,蜕膜组织形态学退变是由大量的细胞凋亡引起的,进而阻碍了妊娠的顺利进程。张列转等<sup>[107]</sup>比较了自然流产小鼠与正常妊娠小鼠早孕期蜕膜细胞中 Bax, Bcl-2 的表达,结果发现正常妊娠小鼠蜕膜组织中的抑制凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白的表达明显高于自然流产组,而促凋亡蛋白 Bax 的表达明显低于自然流产小鼠。认为早孕期蜕膜组织细胞过度凋亡是自然流产的机制之一;早孕期蜕膜细胞的凋亡可能是通过 Bcl-2/Bax 途径实现的。彭梅等<sup>[108]</sup>应用免疫组织化学方法发现复发性流产患者的 Fas 表达显著高于正常妊娠组,而 Bcl-2 的表达显著低于正常妊娠组,认为子宫蜕膜细胞中 Fas 与 Bcl-2 的表达失衡可能是导致复发性流产的原因之一。Cobellis L<sup>[109]</sup>等研究发现早孕期自然流产患者的 Bax 蛋白的表达量与同期正常孕妇相比显著增加。

### 1.3.2 蜕膜细胞损伤、凋亡模型的建立

前期研究发现自然流产的发生与蜕膜细胞的损伤凋亡密切相关。现有大量学者采用体外培养蜕膜细胞的方法,利用细菌脂多糖(LPS),肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),米非司酮(RU-486)等建立蜕膜细胞损伤凋亡模型,并以此为载体进行相关的药效学研究。

Ejima 等<sup>[110]</sup>发现向妊娠大鼠腹膜内注射脂多糖(LPS)可诱导流产的发生,且蜕膜与滋养细胞中都出现了细胞凋亡,凋亡细胞的数量与时间存在一定的相关性。李云霞<sup>[111]</sup>等应用细菌脂多糖建立小鼠蜕膜细胞损伤模型,并利用该模型观察黄芩苷与槲皮素的中剂量组对蜕膜细胞损伤模型的作用。通过观察不同浓度的 LPS 对蜕膜细胞形态学上损伤差异,认为 100ng/mL LPS 可作为损伤模型浓度。黄芩苷和槲皮素的中浓度组可通过降低损伤蜕膜细胞 TNF- $\alpha$  的表达,达到保护损伤蜕膜细胞的作用。

秦明春等<sup>[112]</sup>用不同浓度的肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )作用于人蜕膜细胞,通过比较蜕膜细胞不同浓度 TNF- $\alpha$  下的增殖活力及凋亡率,将 10ug/L 的 TNF- $\alpha$  作为建立蜕膜细胞凋亡模型的最优浓度,并观察黄芩苷对凋亡模型的作用。研究结果表明应用 TNF- $\alpha$  建立可用于蜕膜细胞凋亡模型的方法是可行的。黄芩苷可抑制 TNF- $\alpha$  诱导的蜕膜细胞凋亡。

米非司酮(Mifepriston, RU-486)是一种受体水平甾体类拮抗药。临床上常用于避孕、抗早孕,中期妊娠引产,促宫颈成熟,宫外孕和妇科肿瘤的治疗。米非司酮对滋养细胞,蜕膜细胞的增殖都具有抑制作用。<sup>[113-114]</sup>米非司酮的终止流产是通过多环节共同发挥作用,其作用机理也有多种解释。但国内外学者普遍认为,米非司酮可直接作用于蜕膜组织中,与其中的孕激素受体结合,使孕激素的生理效应无法发挥,导致蜕膜组织变性坏死。绒毛组织继发受损与子宫壁相分离,最终导致流产的发生。Dai 等<sup>[115]</sup>予大鼠妊娠第 9 日灌胃 RU-486,发现 9%蜕膜细胞在用药 24h 后发生凋亡。Ghosh<sup>[116]</sup>等以蜕膜细胞模型为载体,研究了 RU-486 对恒河猴子宫蜕膜细胞的影响,发现 RU-486

使腺上皮细胞凋亡更加明显,但血管内皮细胞超微结构无任何改变。刘颖等<sup>[117]</sup>采用流式细胞技术对药流(米非司酮+米索前列醇)患者和人流术(负压吸引术)患者的绒毛和蜕膜组织,进行了凋亡水平及细胞周期的分析。分析结果显示药流组绒毛组织和蜕膜组织的凋亡水平均显著高于手术组。且药流组的绒毛滋养层细胞增生指数显著下降。由此认为 RU-486 可能通过干扰滋养层细胞正常细胞周期,导致其增生与凋亡失衡,促进绒毛和蜕膜细胞凋亡而终止早孕。施晓华<sup>[118]</sup>等研究米非司酮对早孕绒毛、蜕膜细胞增殖、凋亡的作用机制。认为米非司酮可促进早孕绒毛合体滋养细胞、蜕膜间质及腺上皮细胞的凋亡,并发现该作用主要通过 Fas/ FasL 途径所介导,也与 Bax 表达增加相关,认为这可能是 RU-486 终止早孕机制之一。对米非司酮药物流产引起的细胞凋亡调控进一步研究发现, RU-486 组蜕膜及绒毛的凋亡细胞数显著高于人流组,而抑凋亡蛋白 Bcl-2 与促凋亡蛋白 Bax 的比值显著低于人流组。可能是米非司酮诱导蜕膜与绒毛组织 Bcl-2/Bax 基因蛋白比率下降,引起细胞凋亡。<sup>[119]</sup>

上述研究表明自然流产与蜕膜细胞的异常凋亡有关,米非司酮能促进蜕膜细胞凋亡,因此本研究拟用米非司酮对体外早孕蜕膜细胞进行干预,建立体外蜕膜细胞凋亡模型,为研究自然流产凋亡机理和健脾组方中药的药效药理学提供了载体。

综上所述,大量的临床及实验研究表明助孕丸在治疗自然流产方面的有效性及安全性是值得充分肯定的。助孕丸是中医大家罗元恺教授在补肾健脾固冲任的安胎治则下,结合丰富的临床经验拟出的协定方。可分为补肾方与健脾方两个重要组成部分。补肾组方主要以寿胎丸为主方进行加减,前期导师的研究团队以补肾组方为研究对象,以细胞损伤模型和肾虚/脾虚-黄体抑制模型为载体,进行了有关补肾组方的中药指纹图谱、药效学、药理学及药代动力学等一系列详尽的研究。从而阐明了补肾组方的化学物质基础,安胎机理及体内过程。然而目前对健脾组方的研究较少。为了更全面、深入地探究助孕丸补肾健脾安胎的机理,对健脾组方的研究势在必行。基于此,本研究在“肾主藏精,为水火之宅,乃人体生长、发育、生殖之本;脾主运化,为后天之本,气血生化之源。胎元之长养,须由先天之肾气与后天之脾气相互协调,才无殒堕之虞。”的中医理论基础上,开展了关于健脾组方系列研究。健脾组方由党参、黄芪、白术三味中药组成,此三者均是临床常用的健脾益气的中药。国内外有大量学者对这三味中药进行中药指纹图谱等物质基础的研究,但目前尚未有关于三者提取物的物质基础报道。因此,本研究的第一部分将应用液质联用技术对健脾组方的物质基础进行研究。党参、黄芪、白术三味中药以党参健脾功效最佳,《中华人民共和国药典》2010年版将党参炔苷作为党参的质控性指标。以复方中的代表性成分进行药代动力学研究是研究复方药代动力学的一种方法。本研究的第三部分将以党参炔苷为代表研究健脾组方的药代动力学研究,同时比较了党参炔苷以单体形式,中药党参的形式及健脾组方形式灌胃后的药代动力学差异。所以,本研究的第二部分测定了中药党参及健脾组方中的党参炔苷的含量,为进行第三部分的研究打下基础。在对健脾组方的物质基础

及体内代谢过程有了一定认识基础上, 对其进行药效学的研究就提上日程了。药效学的研究常以细胞或动物为载体。考虑到进行动物研究所需实验周期长, 资本代价高, 故本研究暂选细胞为载体进行药效学试验, 待筛选出可能的有效安胎成分后, 进一步进行动物实验研究。故本研究的第四部分进行了蜕膜细胞的原代培养及鉴定; 为第五部分建立蜕膜细胞损伤模型及验证健脾组方各成分的药效奠定基础。总体来讲, 本研究在分析了助孕丸中健脾组方的物质基础后, 又进行了相关的药代动力学及药效学的研究。为更全面地探讨助孕丸的安胎机理, 推广其临床应用提供理论依据。

## 第二章 实验研究

### 2.1 立论依据

助孕丸是在中医大家罗元恺教授指导下拟定的经验方，临床上应用于脾肾虚证先兆流产和复发性流产，为补肾与健脾并重的安胎中药复方。作为临床验证有确切疗效的中药复方，我们有必要对助孕丸进行深入的研究。助孕丸可分为补肾组方和健脾组方两部分。补肾组方以寿胎丸为基础，前期导师的研究团队已对其进行了中药指纹图谱、药效学、药理学机制、药动学等一系列研究，为阐明补肾组方的安胎作用提供了理论依据。作为助孕丸的另一重要组成部分健脾组方的安胎理论也亟需进行阐释。以此为出发点，本研究拟利用液质联用技术首次对助孕丸中健脾组方的药效物质基础研究；为提高复方质控标准提供化学依据。并将复方中主要化学成分进行药材归属；以党参炔苷为代表成分，进行药代动力学研究，探究单体，中药及组方之间的关系，为中药配伍理论及助孕丸的进一步开发和临床应用提供科学依据。以蜕膜细胞损伤模型为载体考察复方及其中的组分对模型的影响及可能的作用机理。

### 2.2 实验内容及技术路线

本论文的研究内容主要包括以下五个部分：第一部分，应用超高效液相色谱与串联四极杆飞行时间质谱仪联用技术(UPLC/Q-TOF-MS<sup>E</sup>)研究健脾组方物质基础，归属主要色谱峰药材来源。根据各色谱峰的保留时间、精确分子量、分子碎片峰、对照品信息和相关文献，对主要色谱峰的化学结构进行了推断和鉴定，将组方的总离子流图与单味中药的总离子流图进行比对将各色谱峰药材来源进行归属。第二部分，建立UPLC/Q-TOF-MS方法测定党参炔苷含量的方法，并应用该方法测定中药党参及健脾组方中的党参炔的含量。第三部分，以相等的党参炔苷含量为标准，将健脾组方提取液，党参提取液，党参炔苷混悬液灌胃于SD大鼠，在预定的时间点采血。应用已建立的UPLC/Q-TOF-MS法检测灌胃后大鼠血浆中党参炔苷的含量，得到药时曲线，通过PK.Solution2.0软件计算药动学参数。比较党参炔苷以单体形式、中药党参及组方三种形式给药后的药动学差异。第四部分，原代培养人早孕蜕膜细胞，进行鉴定及传代培养。第五部分，建立蜕膜细胞损伤模型，应用MTS,流式细胞技术，Western Blot技术考察组方及其中的单体成分对模型的增殖及凋亡的作用并进行机理的探讨。技术路线图如下：

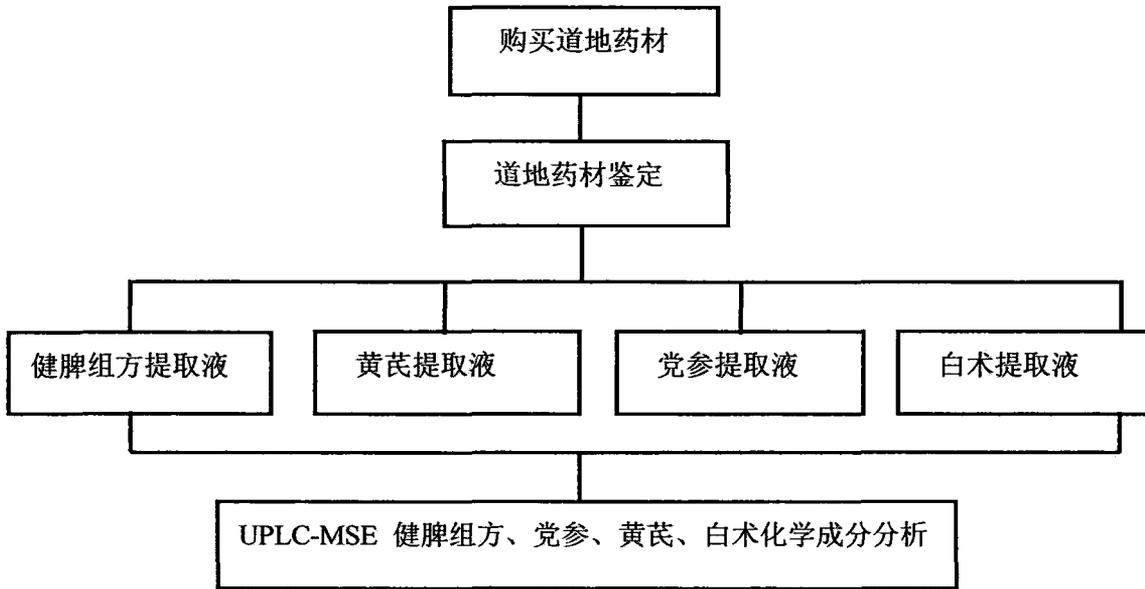


图 1 实验一 助孕丸健脾组方物质基础分析

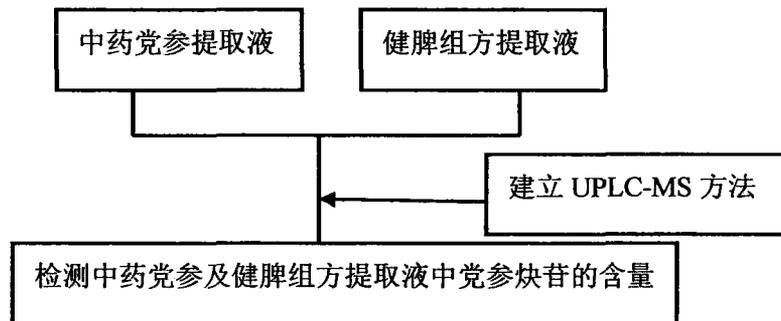


图 2 实验二 UPLC/Q-TOF-MS 测定健脾组方及党参提取物中党参炔苷的含量

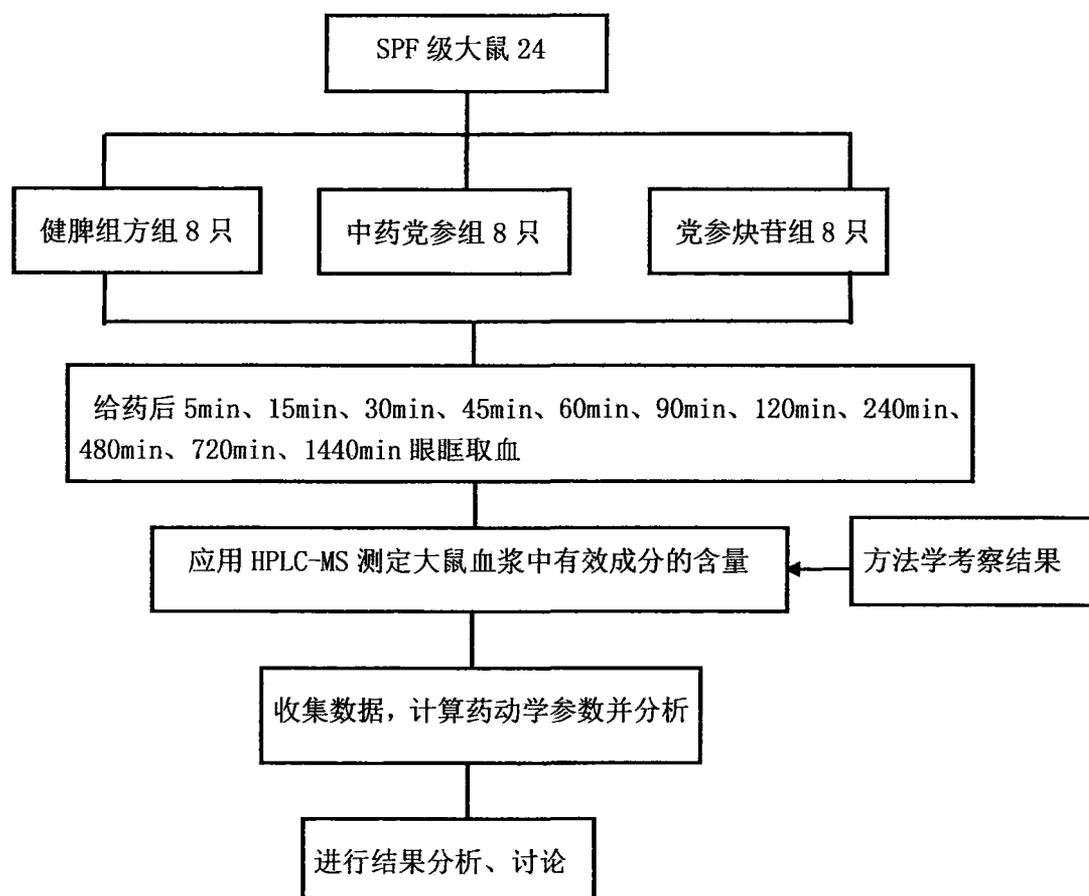


图 3 实验三 基于 UPLC/Q-TOF-MS 技术党参炔苷药代动力学研究

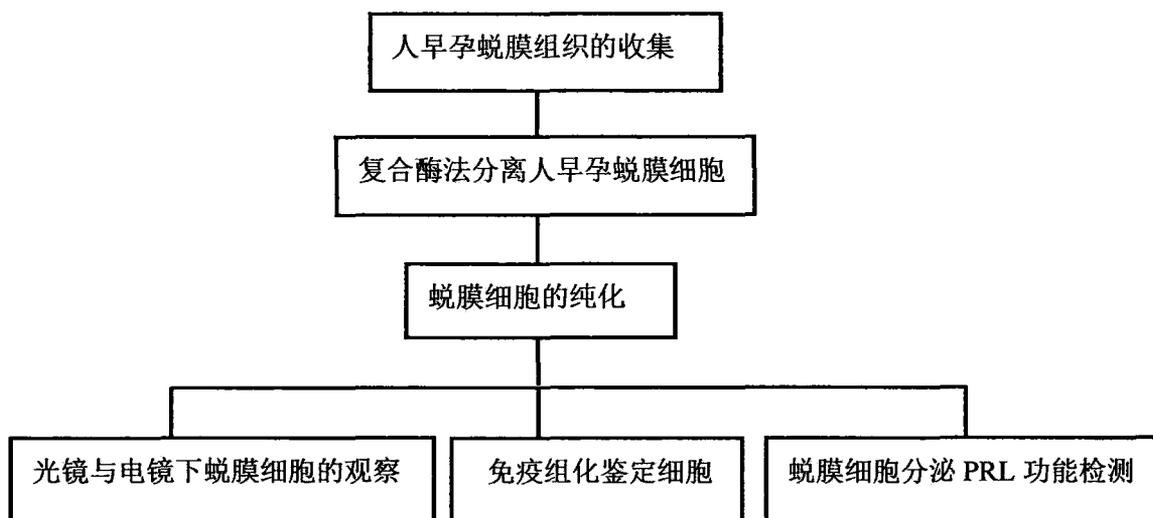


图 4 实验四 蜕膜细胞的原代培养

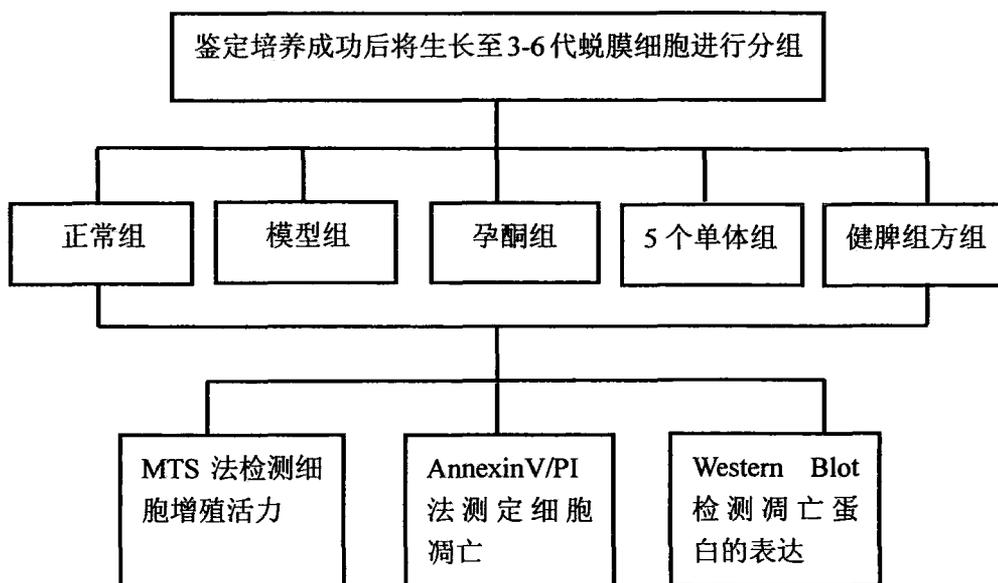


图 5 实验五 健脾组方中化学成分对蜕膜细胞损伤模型的影响

### 2.3 助孕丸健脾组方物质基础分析

助孕丸健脾组方由党参、黄芪、白术三味中药组成，具有健脾益气的功效。已有文献记载党参，黄芪，白术单味中药物物质基础与活性成分。但三者组成复方的物质基础目前未见报道。而这就是本节的内容研究。

### 2.3.1 实验目的

应用 UPLC/Q-TOF-MS<sup>E</sup> 技术分析助孕丸健脾组方物质基础, 将组方中的主要化学成分进行药材归属。

### 2.3.2 实验材料与方法

#### 2.3.2.1 实验仪器:

中药粉碎机: 型号 103, 瑞安市永历制药机械有限公司;

智能超声波清洗器: 型号 DL-360B, 上海之信仪器有限公司;

电热恒温水浴锅: HWS24 型, 上海一恒科技有限公司;

十分之一电子天平: JJ2000 型, 常熟市双杰测试仪器厂;

万分之一电子天平: BSA124S, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;

实验室专用超纯水机: Arium 611 型, 德国 Sartorius 公司

高速冷冻离心机: 3-30K, 德国 Sigma 公司

旋转蒸发仪系统: R-215, 瑞士 BUCHI 公司

质谱仪: Xevo G2-S Q-TOF, 美国 Waters 公司

超高效液相色谱仪: 美国 Waters 公司

#### 2.3.2.2 实验试药与试剂

试药: 党参、黄芪、白术均购自广东天诚中药饮片有限公司。由该公司提供各个药材的检验报告书。

表 1 药材来源表

药材	批号	来源	产地
党参	20140714	广东天诚	甘肃
黄芪	20140714	广东天诚	甘肃
白术	20140714	广东天诚	安徽

表 2 对照品来源表

对照品	批号	规格	来源
党参炔苷	201403	20mg	上海盛中医药化工有限公司
黄芪甲苷	201314	20mg	中国食品药品检定研究院
毛蕊异黄酮	201404	20mg	南京泽朗医药科技有限公司
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	201304	20mg	中国食品药品检定研究院
芒柄花苷	201409	20mg	南京泽朗医药科技有限公司
芒柄花素	201409	20mg	南京泽朗医药科技有限公司
白术内酯 I	201306	20mg	上海盛中医药化工有限公司

试剂: 甲醇、甲酸均为色谱纯(德国默克); 95%乙醇分析纯(富宇试剂)水为超纯水。

#### 2.3.2.3 实验方法与步骤

### 2.3.2.3.1 液质条件

#### 超高效液相色谱条件

色谱柱: Waters BEH C18 柱 (2.1×50mm, 1.7 $\mu$ m);

流动相 A: 甲醇, B: 水 (含有 0.1%甲酸);

梯度洗脱程序: 0-10min, 30%-60%A; 10-25min, 60%-80%; 10-25min, 80%-90%, 25-35min, 80%-90%; 35-40min, 90%-90%;

样品间平衡: 5min;

柱温: 40 $^{\circ}$ C;

分析时间: 40 分钟;

流速: 0.2ml/min;

进样体积: 5 $\mu$ L。

#### 质谱条件

离子源: ESI;

毛细管电压: 2.5KV;

离子源温度: 100 $^{\circ}$ C;

雾化温度: 100 $^{\circ}$ C;

锥孔气速: 50 L/h;

雾化气速: 800 L/h;

检测模式: 正、负离子全扫描;

扫描质量范围: 50-1200Da

数据采集所用软件: Masslynx 4.1 软件

### 2.3.2.3.2 样品制备方法

#### 2.3.2.3.2.1 健脾组方及组方中单味药材提取液的制备

##### 1. 健脾组方提取液的制备

取干燥药材党参、黄芪、白术适量, 分别用中药粉碎机粉碎成 20-30 目粗粉。用十分之一电子天平分别精密称取党参 100g, 黄芪 100g, 白术 100g。以 1: 10 的料液比加入 3000mL 的 50%乙醇冷凝回流提取 2 次, 每次 2 个小时。经真空过滤器过滤后收集滤液, 利用旋转蒸发仪 (浓缩温度 60 $^{\circ}$ C, 浓缩转速 75rpm) 进行浓缩。浓缩后定容至 200mL。精密吸取提取液 100 $\mu$ L 至 50mL 容量瓶中, 用 50%甲醇水超声溶解, 冷却后定容至刻度。精密吸取适量至进口 EP 管中, 以 12000r/min 的转速离心 20min 后, 取上清适量作为供试品溶液至上样瓶。

##### 2. 健脾组方中单味药材提取液的制备

精密称取单味中药 100g 加入 3000mL 的 50%乙醇冷凝回流提取 2 次, 每次 2 个小时。经真空过滤器过滤后收集滤液, 利用旋转蒸发仪 (浓缩温度 60 $^{\circ}$ C, 浓缩转速 75rpm) 进行浓缩。浓缩后定容至 200mL。精密吸取提取液 100 $\mu$ L 至 50mL 容量瓶中, 用 50%甲

醇水超声溶解,冷却后定容至刻度。精密吸取适量至进口 EP 管中,以 12000r/min 的转速离心 20min,取上清适量作为供试品溶液移至上样瓶。

### 2.3.2.3.2.2 对照品溶液制备

分别精密称取黄芪甲苷、党参炔苷、白术内酯 I、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷对照品适量至 100mL 容量瓶内,加入甲醇超声进行溶解。冷却后定容至刻度配成质量浓度分别为 27、25、29、30、27、15、21 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合标准品溶液。

## 2.3.3 结果

健脾组方由 3 味中药组成,化学成分复杂,为了对组方进行较全面地分析,本实验采用正、负离子两种全扫描模式对组方提取液、单味中药提取液及混合标准品溶液进行检测。健脾组方在正、负离子模式下的总离子流图见(图 6、7)从健脾组方色谱图中快速鉴定了 37 个色谱峰。组方中的主要成分包括黄酮类、皂苷类、内酯类、糖苷类等。本研究较全面地阐明了助孕丸健脾组方的化学成分,为健脾组方的药效物质基础研究和质量控制奠定了基础。在正离子扫描模式下,复方中的大部分化合物可产生  $[\text{M}+\text{H}]^+$  峰,由于流动相中存在  $\text{Na}^+$ ,故正离子模式下还可产生  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  峰;而在负离子扫描模式下,大部分化合物可产生  $[\text{M}-\text{H}]^-$  峰,由于流动相中存在  $\text{HCOO}^-$ ,故负离子模式下还可产生  $[\text{M}+\text{COOH}]^-$  峰;为了更好地分析健脾组方中化学成分的质谱裂解规律,依据健脾组方中涉及到的 3 味中药化学成分相关参考文献报道,首先对健脾组方中可能含有的化合物的对照品(包括黄酮类、皂苷类、内酯类、糖苷类等)进行了质谱裂解规律分析。对于有标准品的化合物的检测,通过 Masslynx 4.1 software 对比标准品的保留时间、精确质量数、同位素丰度和一级、多级质谱图质谱裂解规律进行鉴定;对于无法获得标准品的化合物的检测,对质谱图上给出的准分子离子峰,使用 Masslynx 系统软件推测其可能的化学组成,通过分析化合物质谱裂解规律、对比同类化合物的质谱裂解规律,并参考相关文献<sup>[120-127]</sup>进行推测。采用以上方法共鉴定出健脾组方中 37 个化合物,误差范围为  $\leq \pm 5$  ppm。在同样的液相质谱条件下得到党参、黄芪、白术提取液的总离子流图,按照同样的推断方法对单味中药中的主要化合物进行了推断。并将健脾组方的总离子流图与各单味中药的总离子流图进行比对,健脾组方中的大部分物质能被指认到相应的单味药材。实验结果见表 3。

复方中的化合物以黄酮类、皂苷类、内酯类、糖苷类为主。黄酮类化合物一般以 C6-C3-C6 为基本的母核结构,在质谱条件下易发生电离,并产生大量的碎片信息。化合物 2 在负离子模式下形成  $[\text{M}-\text{H}]^-$  准分子离子峰  $m/z$  445. 1155 ( $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_{10}$ ); 正离子模式下形成  $[\text{M}+\text{H}]^+$  准分子离子峰  $m/z$  447. 1288 ( $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_{10}$ ); 在  $\text{MS}^E$  多级裂解模式下经过丢失一分子葡萄糖产生碎片峰  $m/z$  285. 0760  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}]^+$ ; 丢失两分子水产生碎片峰  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ 。比对毛蕊异黄酮-7-O- $\beta$ -葡萄糖苷标准品的保留时间、精确质量数、同位素丰度、碎片信息等,可以确认化合物 2 为毛蕊异黄酮-7-O- $\beta$ -葡萄糖苷

(Calycosin-7-O- $\beta$ -glucoside)。化合物 5 在负离子模式下与流动相中存在  $\text{HCOO}^-$  结合, 形成  $[\text{M}+\text{COOH}]^-$  峰  $m/z$  475.1222 ( $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{O}_{11}$ ); 在正离子模式下形成  $[\text{M}+\text{H}]^+$  准分子离子峰  $m/z$  431.1340 ( $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_9$ ); 结合对照品的保留时间、精确分子量及碎片信息推测其为芒柄花苷 (Ononin)。化合物 11 在正离子模式下形成  $[\text{M}+\text{H}]^+$  准分子离子峰  $m/z$  285.0772 ( $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_5$ ); 负离子模式下形成  $[\text{M}-\text{H}]^-$  准分子离子峰  $m/z$  283.0612 ( $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_5$ ); 在  $\text{MS}^E$  多级裂解模式下经过丢失一个  $-\text{CH}_3$  产生碎片 268.0376  $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$ ; 丢失一个  $-\text{CO}_2$  产生碎片 239.0349  $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$ ; 继续丢失一个  $-\text{CO}$  产生碎片峰 211.0396  $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{CO}]^-$ ; 结合标准图谱及参考文献鉴定出化合物 11 为毛蕊异黄酮 (Calycosin)。化合物 15 正离子模式下形成  $[\text{M}+\text{H}]^+$  准分子离子峰  $m/z$  269.0820 ( $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_4$ ); 负离子模式下形成  $[\text{M}-\text{H}]^-$  准分子离子峰  $m/z$  267.0668 ( $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_4$ ); 在  $\text{MS}^E$  模式下丢失  $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}_2$ 、 $-\text{H}_2$ 、 $-\text{CO}$ 、 $\text{H}_2\text{O}$  等小分子产生一系列的碎片峰:  $m/z$  251.0354,  $m/z$  223.0400,  $m/z$  195.0455,  $m/z$  167.0484; 参照标准品图谱及相关文献报道, 鉴定出化合物 15 为芒柄花素 (Formononetin)。

皂苷类化合物: 化合物 25 在正离子模式下形成  $[\text{M}+\text{H}]^+$  准分子离子峰  $m/z$  785.4666 ( $\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{O}_{14}$ ); 加 Na 峰  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  807.4487 ( $\text{C}_{41}\text{H}_{67}\text{O}_{14}\text{Na}$ ); 在  $\text{MS}^E$  模式下形成碎片峰  $m/z$  473.3621  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{xyl}]^+$ ; 继续丢失一个水分子形成碎片峰  $m/z$  455.3512  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{xyl}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ; 丢失两个水分子形成碎片峰  $m/z$  437.3433  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{xyl}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ ; 丢失三个水分子形成碎片峰  $m/z$  419.3297  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{xyl}-3\text{H}_2\text{O}]^+$ ; 参考黄芪甲苷标准品的保留时间、精确质量数、碎片离子峰及文献信息, 鉴定化合物 25 为黄芪甲苷。化合物 28 在负离子模式下结合流动相中存在的  $\text{HCOO}^-$ , 形成  $[\text{M}+\text{COOH}]^-$  峰  $m/z$  871.4702 ( $\text{C}_{44}\text{H}_{71}\text{O}_{17}$ ); 在正离子模式下加 Na 峰  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  849.4596 ( $\text{C}_{43}\text{H}_{70}\text{O}_{15}\text{Na}$ ); 形成  $[\text{M}+\text{H}]^+$  准分子离子峰  $m/z$  827.4764 ( $\text{C}_{43}\text{H}_{71}\text{O}_{15}$ ); 丢失一个  $-\text{Glc}$  后形成碎片峰  $m/z$  647.4155  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}]^+$ ; 继续丢失一个  $-\text{Acetylxylyl}$  后形成碎片峰  $m/z$  473.3616  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{Acetylxylyl}]^+$ ; 以碎片峰  $m/z$  473.3616 为基础继续丢失一个  $-\text{H}_2\text{O}$  之后形成碎片峰  $m/z$  455.3528  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{Acetylxylyl}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ; 继续丢失两个  $-\text{H}_2\text{O}$   $m/z$  437.3407  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{Acetylxylyl}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ ; 继续丢失三个  $-\text{H}_2\text{O}$  之后  $m/z$  419.3289  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{Acetylxylyl}-3\text{H}_2\text{O}]^+$ ; 参考质谱信息及相关文献推测化合物 28 为黄芪皂苷 II。化合物 30 与化合物 31 是同分异构体, 其质谱裂解规律相似。在负离子模式下与流动相中存在  $\text{HCOO}^-$  结合, 形成  $[\text{M}+\text{COOH}]^-$  峰  $m/z$  913.4792 ( $\text{C}_{46}\text{H}_{73}\text{O}_{18}$ ); 在正离子模式下形成  $[\text{M}+\text{H}]^+$  准分子离子峰  $m/z$  869.4884 ( $\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{O}_{16}$ ); 加 Na 峰  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  891.4705 ( $\text{C}_{45}\text{H}_{72}\text{O}_{16}\text{Na}$ ); 丢失一个  $-\text{Glc}$  后形成碎片峰  $m/z$  689.42491  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}]^+$ ; 继续丢失两个  $-\text{Acetylxylyl}$  后形成碎片峰  $m/z$  473.3642  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-2\text{Acetylxylyl}]^+$ ; 以碎片峰  $m/z$  473.3642 为基础继续丢失一个  $-\text{H}_2\text{O}$  之后形成碎片峰  $m/z$  455.3512  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-2\text{Acetylxylyl}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ; 继续丢失两个  $-\text{H}_2\text{O}$   $m/z$  437.3416  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-2\text{Acetylxylyl}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ ; 继续丢失三个  $-\text{H}_2\text{O}$  之后  $m/z$  419.3289  $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-2\text{Acetylxylyl}-3\text{H}_2\text{O}]^+$ ; 结合参考文献信息, 推测化合物 31 为黄芪皂苷 I; 化合物 30

为异黄芪皂苷 I。

白术内酯类化合物：根据参考文献可知<sup>[128]</sup>，白术内酯类化合物的裂解主要发生在内酯环(C环)以及A环上。裂解方式一是先发生内酯键断裂，丢失H<sub>2</sub>O、CO等小分子后，接着A环丢失-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>、-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>等分子。裂解方式二是在A环上通过一个八元环的重排反应，失去一个-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>后，内酯环(C环)上丢失-H<sub>2</sub>O、-CO、-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O等分子。游离甲基的丢失也经常发生。在正离子模式下化合物20形成m/z 233.1550，加Na峰[M+Na]<sup>+</sup>m/z 255.1368；碎片峰215.1446，碎片峰205.0870，碎片峰187.1493。结合白术内酯I标准品的保留时间，精确分子量、同位素丰度及碎片信息，可鉴定化合物20为白术内酯I。同样在正离子模式下化合物24形成m/z231.1399，加Na峰[M+Na]<sup>+</sup>m/z 253.1218；形成碎片峰203.1078，碎片峰185.1345，碎片峰157.1037，碎片峰143.0864；依据参考文献推测化合物24为白术内酯II。在正离子模式下化合物18形成[M+H]<sup>+</sup>准分子离子峰m/z249.1500，形成碎片峰231.1392，碎片峰213.1290，碎片峰203.1442，碎片峰189.0920；碎片峰185.1339，碎片峰163.0400；碎片峰161.0950；结合参考文献推测化合物18为白术内酯III。

化合物9在正离子模式条件下形成[M+H]<sup>+</sup>准分子离子峰m/z 397.1874 (C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>O<sub>8</sub>)；加Na峰[M+Na]<sup>+</sup>m/z 419.1689 (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>8</sub>Na)；结合碎片峰397.1874、碎片峰361.1659、碎片峰317.1177等与党参炔苷标准品的保留时间、精确分子质量、碎片信息相对照结果相一致，确认化合物9为党参炔苷。

其余的化合物按照同样的方法进行推测。对于缺少标准品的化合物，经查阅文献获取同类化合物的裂解规律，再根据该化合物保留时间，精确质量数，分子碎片信息、及Masslynx 4.1 software提供的可能的结构式、准确分子量(误差≤±5 ppm)，对其进行推测。

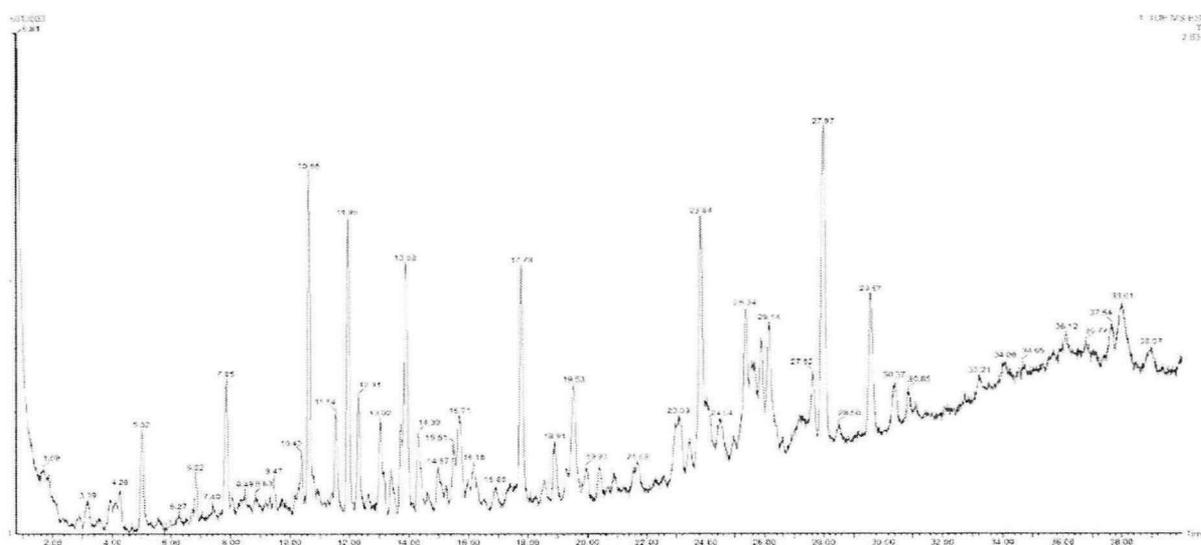


图6 健脾组方正离子模式下的总离子流图

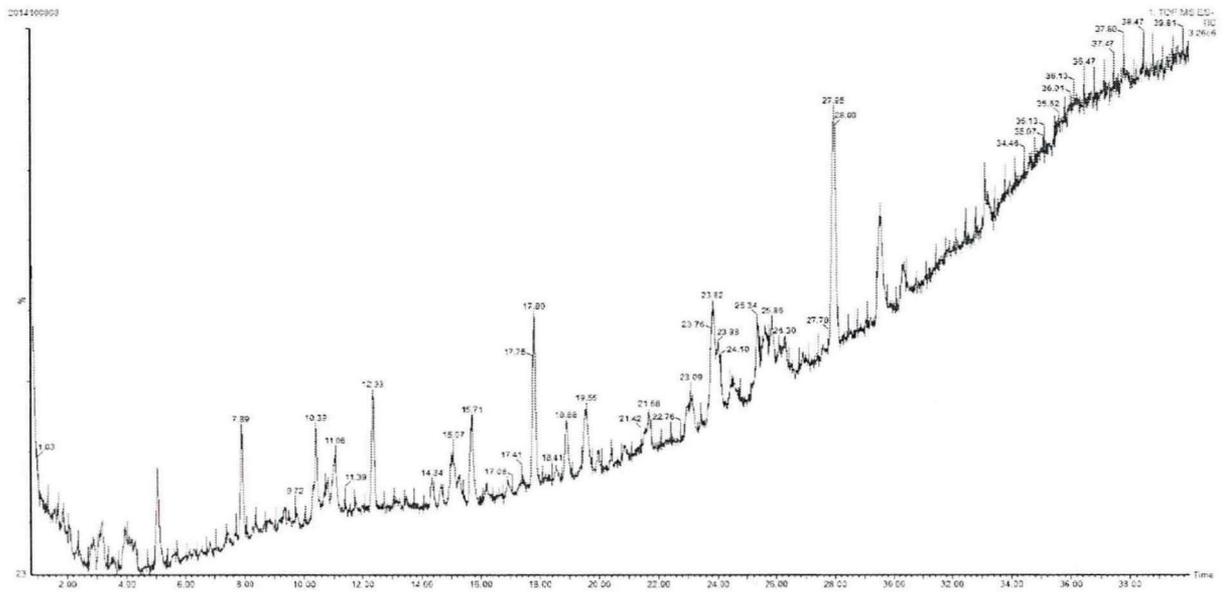


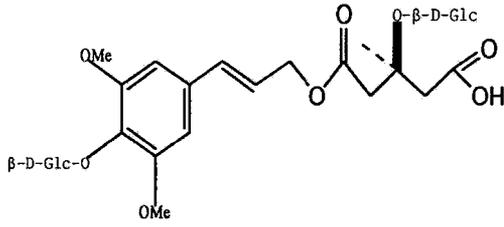
图 7 健脾组方负离子模式下的总离子流图

表 3 液质联用技术检测正、负离子模式下健脾组方提取物中的化合物 AB:黄芪; CP:党参; AM:白术

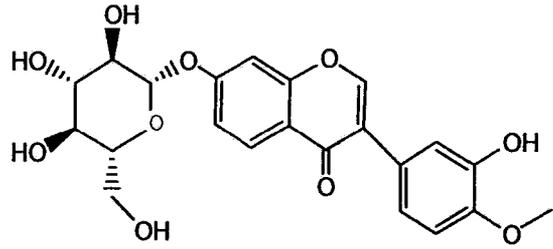
Compound no.	t <sub>r</sub> (min)	Selected ion	Measured Mass (m/z)	Calc.		Formu la	Source and ESI-MS/MS (m/z)	Identification
				mass (m/z)	ppm			
1	1.685	[M+Na] <sup>+</sup>	701.277	701.2269	0.1	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> O <sub>16</sub> Na	CP/332	克参苷 I
		[M-H] <sup>-</sup>	677.2276	677.2293	-2.5	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> O <sub>16</sub>		Tangshenoside I
2	1.856	[M+H] <sup>+</sup>	447.1289	447.1291	-0.4	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	AB/285、253	毛蕊异黄酮-7-氧-β-D-葡萄糖苷
		[M-H] <sup>-</sup>	445.1155	445.1135	2	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	283	Calycosin-7-O-β-D-glucoside
3	2.474	[M+H] <sup>+</sup>	207.0645	207.0657	-5.8	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	AM/149、163、175	滨蒿素 Scoparone
4	3.897	[M+H] <sup>+</sup>	431.1342	431.1355	3	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	AB	4'-甲氧基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷
		[M+Na] <sup>+</sup>	453.1162	453.1172	2.2	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub> Na		4'-methoxyisoflavone-7-O-β-D-glucopyranoside
		[M-H] <sup>-</sup>	429.1186	429.1165	-2.1	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>		
5	3.94	[M+H] <sup>+</sup>	431.134	431.1342	-0.5	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	AB	芒柄花苷
		[M+COOH] <sup>-</sup>	475.1227	475.124	-2.7	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>		Ononin
6	4.046	[M+Na] <sup>+</sup>	211.0958	211.0946	5.7	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> Na	AB	壬二酸
		[M-H] <sup>-</sup>	187.0973	187.097	1.6	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>		Azelaic Acid
7	4.124	[M+Na] <sup>+</sup>	485.1433	485.1424	1.9	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub> Na	AB/323	9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷

		[M-H] <sup>-</sup>	463.1593	463.1604	-2.4	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>10</sub>	299	9,10-dimethoxyptero-carpan
8	4.146	[M+H] <sup>+</sup>	463.1614	463.1604	2.2	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> O <sub>10</sub>	AB	Methylnissolin-3-glucoside
		[M+Na] <sup>+</sup>	485.1429	485.1424	1	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>9</sub> Na	419、285	
9	4.28	[M+H] <sup>+</sup>	397.1874	397.1862	3.0	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub>	CP	党参炔苷
		[M+Na]	419.1688	419.1682	1.4	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub> Na		Lobetyolin
10	5.02	[M+H] <sup>+</sup>	285.0709	285.0763	2.1	C16H13O5	AB/270	汉黄芩素
		[M-H] <sup>-</sup>	283.0609	283.0606	1.1	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	368	wogonin
11	5.02	[M+H] <sup>+</sup>	285.0772	285.0763	1.8	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	AB/270	毛蕊异黄酮
		[M-H] <sup>-</sup>	283.0612	283.0606	2.1	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	268	Calyeosin
12	5.462	[M+H] <sup>+</sup>	315.0881	315.0869	3.8	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>	AB271	熊竹素
		[M-H] <sup>-</sup>	313.0694	313.0712	-1.8	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	271	KuMatakenin
13	7.802	[M+H] <sup>+</sup>	303.124	303.1232	2.6	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub>	AB	2'-8-dihydroxy-4'-7'-dinothoxyisoflavan
		[M+Na] <sup>+</sup>	325.1052	325.1043	-2.8	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub> Na		
14	7.859	[M+H] <sup>+</sup>	269.0814	269.0817	1.1	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub>	AB	7'-羟基-4'-甲氧基异黄酮
		[M+Na] <sup>+</sup>	291.0633	291.0637	1.4	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> Na		7'-hydroxy-4'-methoxyisoflavone
		[M-H] <sup>-</sup>	267.0657	267.0666	3.4	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>		
15	7.86	[M+H] <sup>+</sup>	269.082	269.0814	3	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub>	AB/253	芒柄花素
		[M-H] <sup>-</sup>	267.0668	267.0657	4.1	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	252	Formononetin
16	8.485	[M+H] <sup>+</sup>	291.1604	291.1596	2.7	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub>	AM	白术内酯IV
		[M+Na] <sup>+</sup>	313.1404	313.1416	-3.8	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub> Na		Atractylenolide IV
17	10.69	[M+H] <sup>+</sup>	249.1503	249.1491	4.8	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub>	AM	白术内酯III
		[M+Na] <sup>+</sup>	271.131	271.1323	4.8	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> Na		Atractylenolide III
18	10.697	[M+H] <sup>+</sup>	263.1653	263.1647	2.3	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub>	AM	8-β-甲氧基白术内酯I
		[M-H] <sup>-</sup>	247.1334	247.1341	2.8	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub>		8β-ethoxyatractylenolide I
19	10.974	[M+Na] <sup>+</sup>	273.1483	273.1467	5.9	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub> Na	AM/226、149、158	7-羟基桉叶烷-4(15),11(13)-二烯-12-酸
		[M-H] <sup>-</sup>	249.1496	249.1491	2	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>		7-hydroxyeucalyptus paraffin-diene-12-acid
20	11.95	[M+H] <sup>+</sup>	233.1552	231.1542	4.3	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	AM/226、163、185	白术内酯I
		[M+Na] <sup>+</sup>	255.1373	255.1361	4.7	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> Na	279	Atractylenolide I
21	12.127	[M+H] <sup>+</sup>	947.5226	947.5216	1.1	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	AB	黄芪皂苷V Astragaloside V
22	12.93	[M+H] <sup>+</sup>	230.1554	230.1545	3.9	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NO	AM	白术内酰胺
		[M+Na] <sup>+</sup>	252.1382	252.1364	7.1	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub> Na		Atractylenolactam
23	13.002	[M+H] <sup>+</sup>	217.1609	217.1592	4.1	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> O	AM	苍术酮 Atractyloxide
24	13.955	[M+H] <sup>+</sup>	231.1399	231.1385	5.6	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub>	AM/255,226,187,131	白术内酯II
		[M+Na] <sup>+</sup>	253.1216	253.1204	4.7	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> Na	226,148,158	Atractylenolide II
25	14.346	[M+Na] <sup>+</sup>	335.2208	335.2198	3	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> O <sub>4</sub> Na	AB	Unkonwn

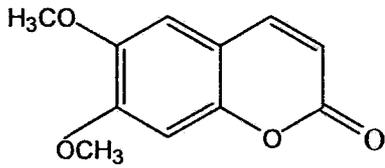
		[M-H] <sup>-</sup>	311. 2231	311. 2222	2. 9	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub>		
26	14. 993	[M+H] <sup>+</sup>	785. 4656	785. 4687	-8. 7	C <sub>31</sub> H <sub>49</sub> O <sub>11</sub>	AB	黄芪甲苷
		[M+Na] <sup>+</sup>	807. 4495	807. 4507	-1. 5	C <sub>31</sub> H <sub>49</sub> O <sub>11</sub> Na	579, 701, 627	Astragaloside IV
		[M-H] <sup>-</sup>	783. 4525	783. 4531	0. 6	C <sub>31</sub> H <sub>49</sub> O <sub>11</sub>	783	
		[M+COOH] <sup>-</sup>	829. 4583	829. 4586	-0. 4	C <sub>32</sub> H <sub>51</sub> O <sub>12</sub>	783	
27	15. 59	[M+H] <sup>+</sup>	277. 1811	277. 1804	2. 5	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub>	AM	8-β-乙氧基白术内酯 III 8-β-Ethoxy atractylenolide III
28	15. 64	[M+H] <sup>+</sup>	827. 4778	827. 4793	-1. 8	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>10</sub>	AB	黄芪皂苷 II
		[M+Na] <sup>+</sup>	849. 4587	849. 4612	-2. 9	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>10</sub> Na	789, 447, 669	Astragaloside II
		[M+COOH] <sup>-</sup>	871. 4702	871. 4691	1. 3	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>11</sub>	825, 792	
		[M-H] <sup>-</sup>	871. 4698	871. 4691	0. 8	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>10</sub>	-	
29	16. 11	[M+H] <sup>+</sup>	219. 1756	219. 1749	2. 7	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	AM	芹烷二烯酮
		[M+Na] <sup>+</sup>	219. 1755	219. 1749	2. 7	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O		Senlina (15)-7 (11)-dien-8-one
30	17. 767	[M+H] <sup>+</sup>	869. 4877	869. 4899	-2. 5	C <sub>36</sub> H <sub>53</sub> O <sub>16</sub>	AB/689, 473, 419	异黄芪皂苷 I
		[M+Na] <sup>+</sup>	891. 4696	891. 4718	-2. 5	C <sub>36</sub> H <sub>53</sub> O <sub>16</sub> Na	771	Isoastragaloside I
31	17. 796	[M+H] <sup>+</sup>	869. 4879	869. 4899	9. 5	C <sub>36</sub> H <sub>53</sub> O <sub>16</sub>	AB/689, 473, 455	黄芪皂苷 I
		[M+Na] <sup>+</sup>	891. 4705	891. 418	7. 6	C <sub>36</sub> H <sub>53</sub> O <sub>16</sub> Na	831, 711, 477	Astragaloside I
		[M+COOH] <sup>-</sup>	913. 4792	913. 4797	-0. 5	C <sub>36</sub> H <sub>53</sub> O <sub>17</sub>	-	
32	21. 737	[M+H] <sup>+</sup>	911. 501	911. 5004	0. 7	C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> O <sub>17</sub>	AB	乙酰基黄芪皂苷 I
		[M+Na] <sup>+</sup>	933. 4786	933. 4824	-4. 1	C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> O <sub>17</sub> Na	873, 743, 579	Acetylastragaloside I
33	23. 116	[M+H] <sup>+</sup>	463. 2869	463. 2848	4. 5	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> O <sub>2</sub>	AM/226, 337, 375, 457	双表白术内酯 I
		[M+Na] <sup>+</sup>	485. 2656	485. 2668	-2. 5	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> O <sub>2</sub> Na	-	Biepiasterolid
34	26. 139	[M+H] <sup>+</sup>	245. 0768	245. 0774	-2. 4	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	AM/226, 158	尿苷 Uridine
35	29. 504	[M-H] <sup>-</sup>	255. 2335	255. 2324	4. 3	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>	AM/248, 198, 130	棕榈酸 Palmitic acid
36	36. 709	[M+Na] <sup>+</sup>	597. 4134	597. 4131	0	C <sub>33</sub> H <sub>59</sub> O <sub>9</sub> Na	CP/430, 362, 226	α-菠菜醇-β-D-葡萄糖苷 α-Spinasterol-β-D-glucoside
37	37. 812	[M+Na] <sup>+</sup>	599. 4282	599. 4288	-1. 0	C <sub>33</sub> H <sub>59</sub> O <sub>9</sub> Na	CP/430, 226, 362	Δ <sup>7</sup> -豆甾烯醇-β-D-葡萄糖苷 7-Hydroxycoumarin-β-D-Glucopyranoside



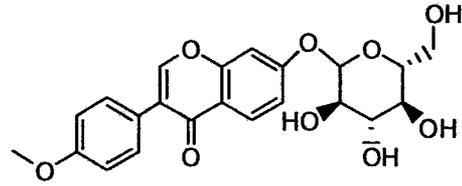
党参昔 I



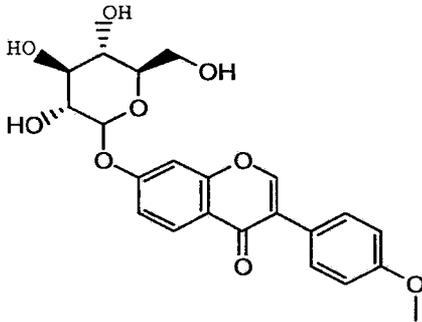
毛蕊异黄酮-7-氧-β-D-葡萄糖苷



滨蒿素



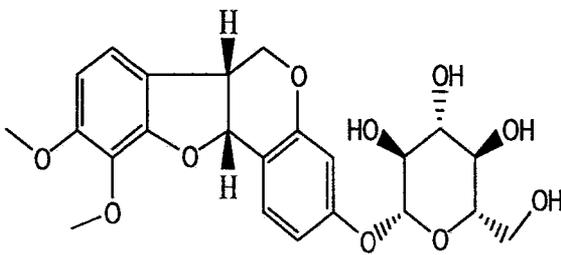
4'-甲氧基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷



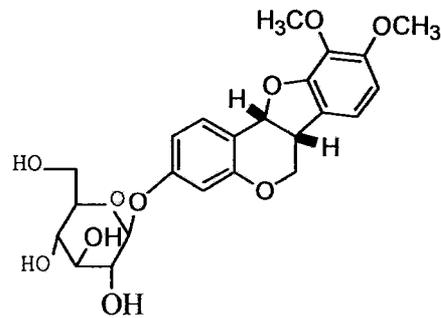
芒柄花苷



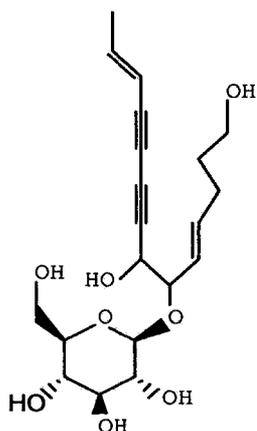
壬二酸



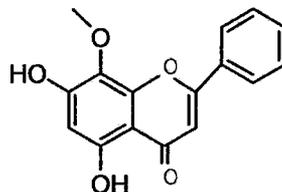
9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷



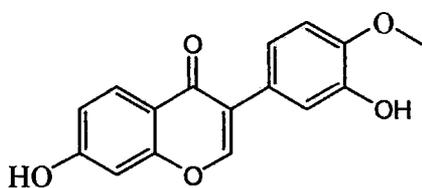
Methylnissolin-3-glucoside



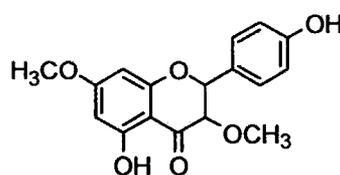
党参炔苷



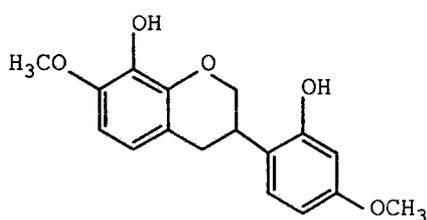
汉黄芩素



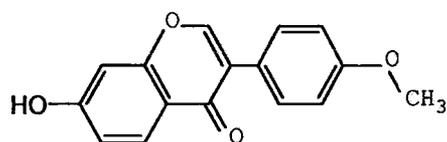
毛蕊异黄酮



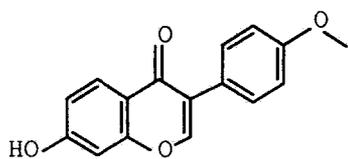
熊竹素



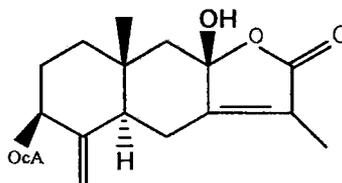
2'8-dihydroxy-4'7-dimethoxyisoflavan



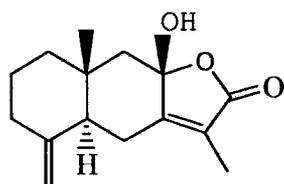
7'-羟基-4'-甲氧基异黄酮



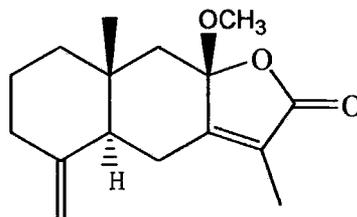
芒柄花素



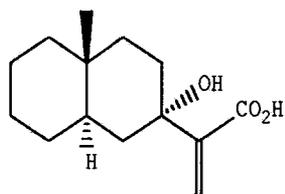
白术内酯IV



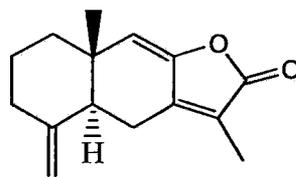
白术内酯III



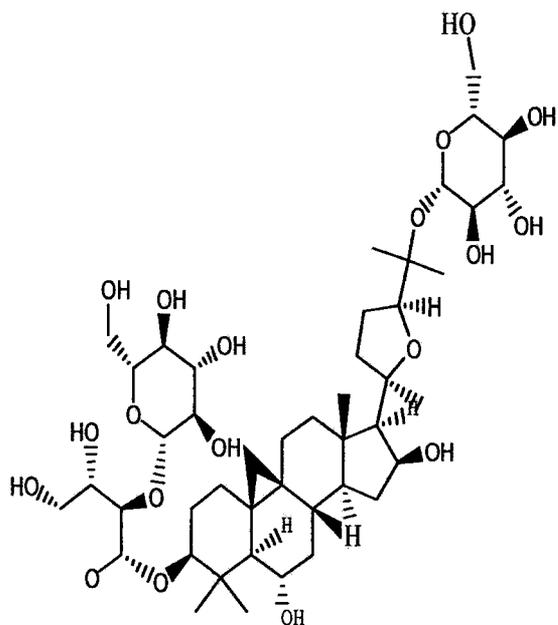
8-β-甲氧基白术内酯I



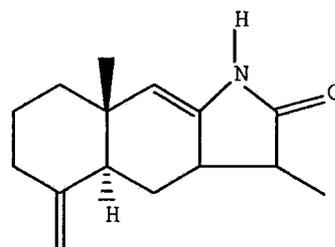
7-羟基桉叶烷-4(15),11(13)-二烯-12-酸



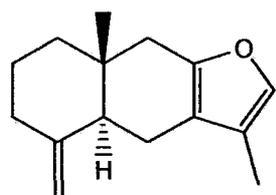
白术内酯 I



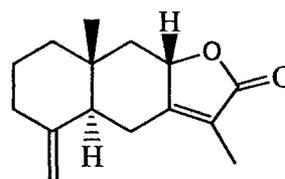
黄芪皂苷 V



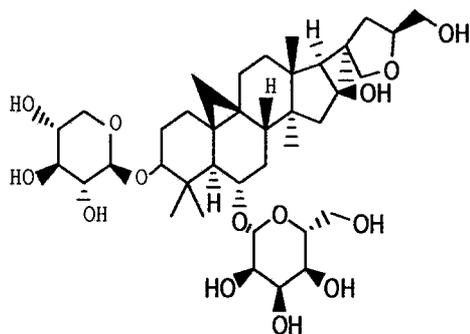
白术内酰胺



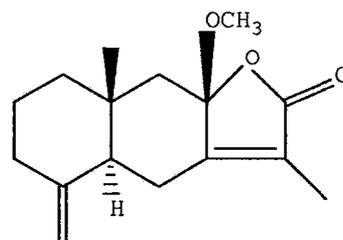
苍术酮



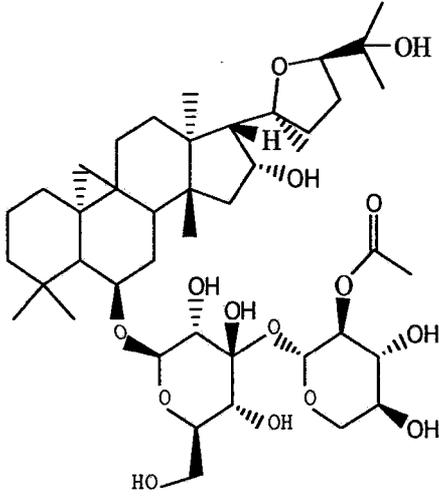
白术内酯 II



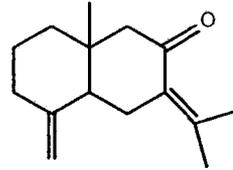
黄芪甲苷



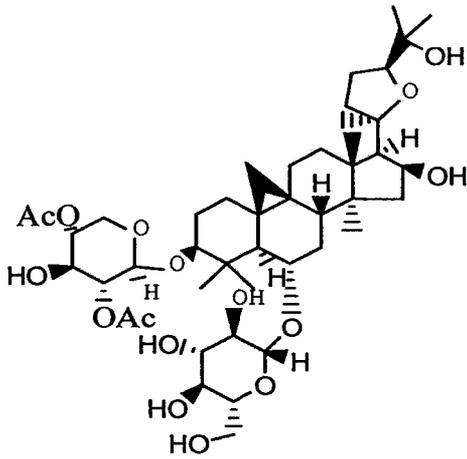
8-β-乙氧基白术内酯 III



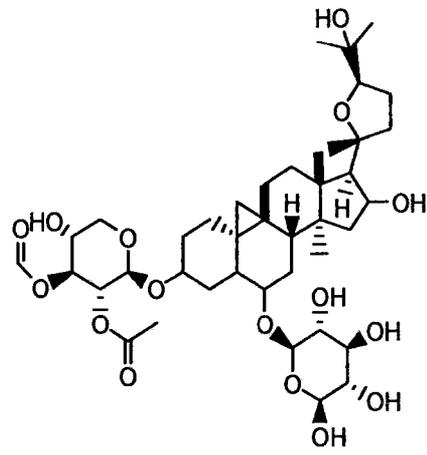
黄芪皂苷 II



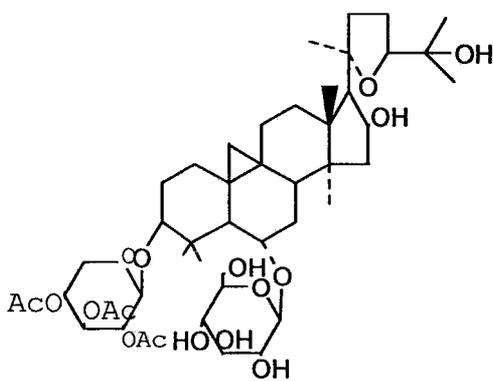
芹烷二烯酮



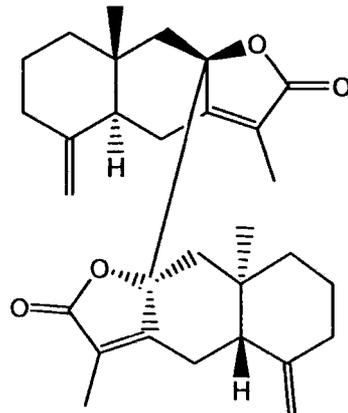
异黄芪皂苷 I



黄芪皂苷 I



乙酰基黄芪皂苷 I



双表白术内酯 I

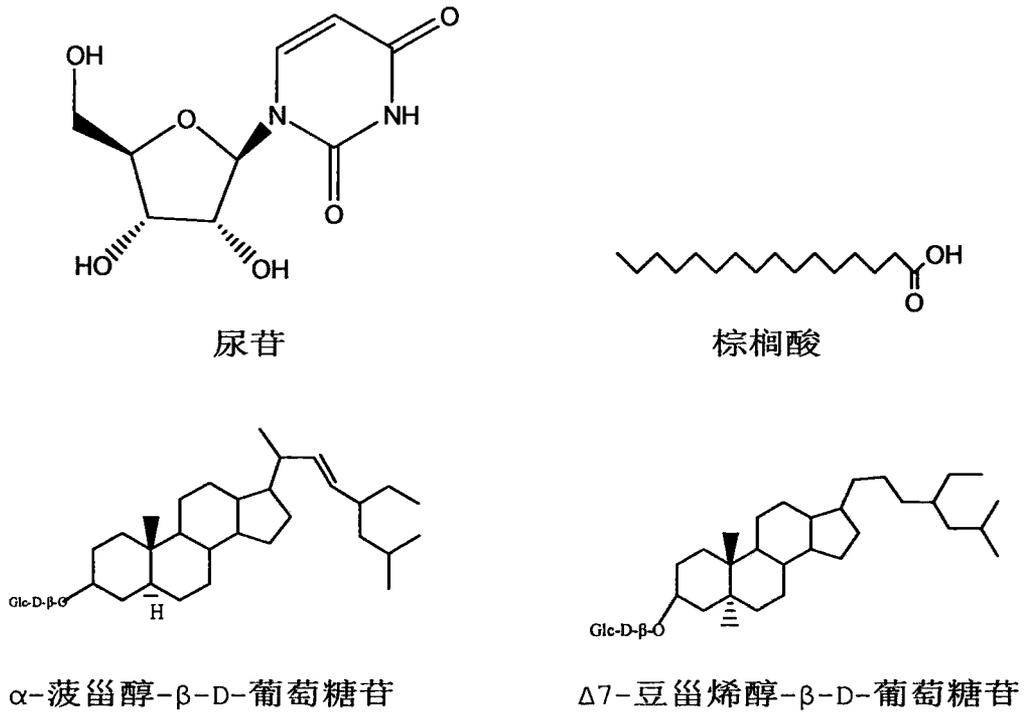


图 8 助孕丸健脾方中化合物的结构式

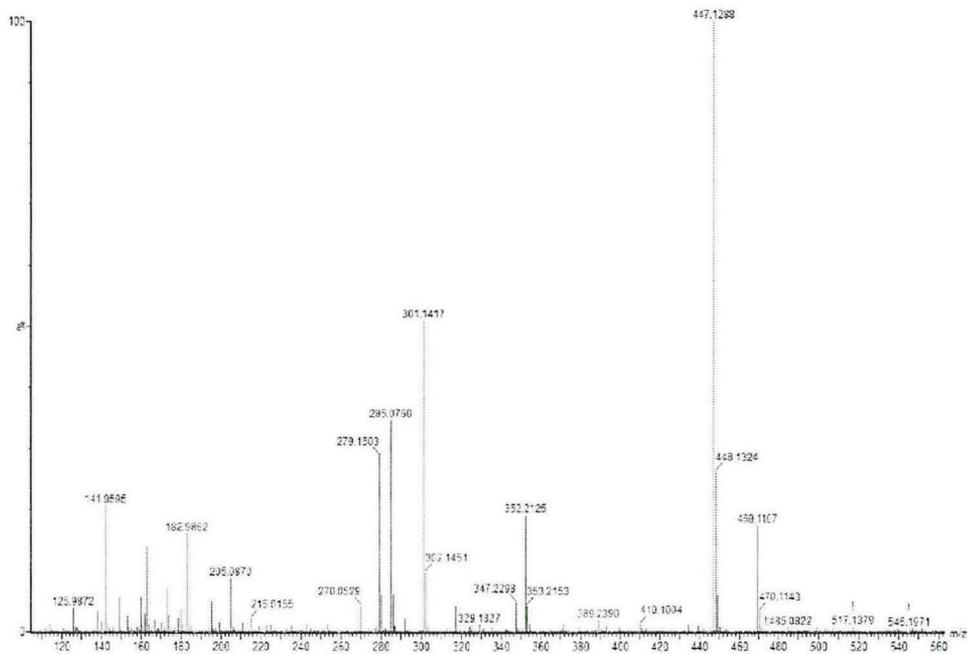


图 9 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 化合物 2 (被鉴定为毛蕊异黄酮葡萄糖苷) 的质谱图

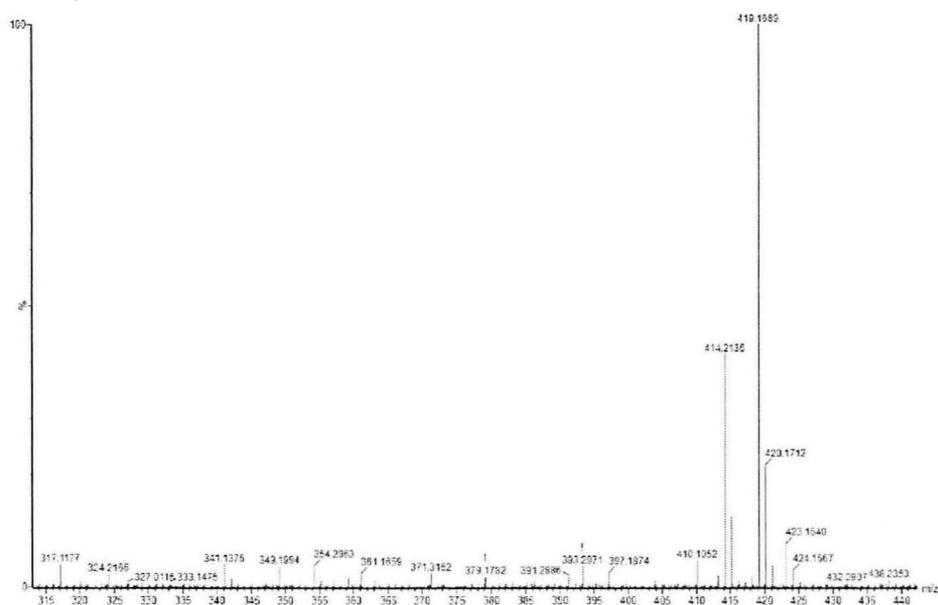


图 10 党参炔苷 化合物 9(被鉴定为党参炔苷)的质谱图

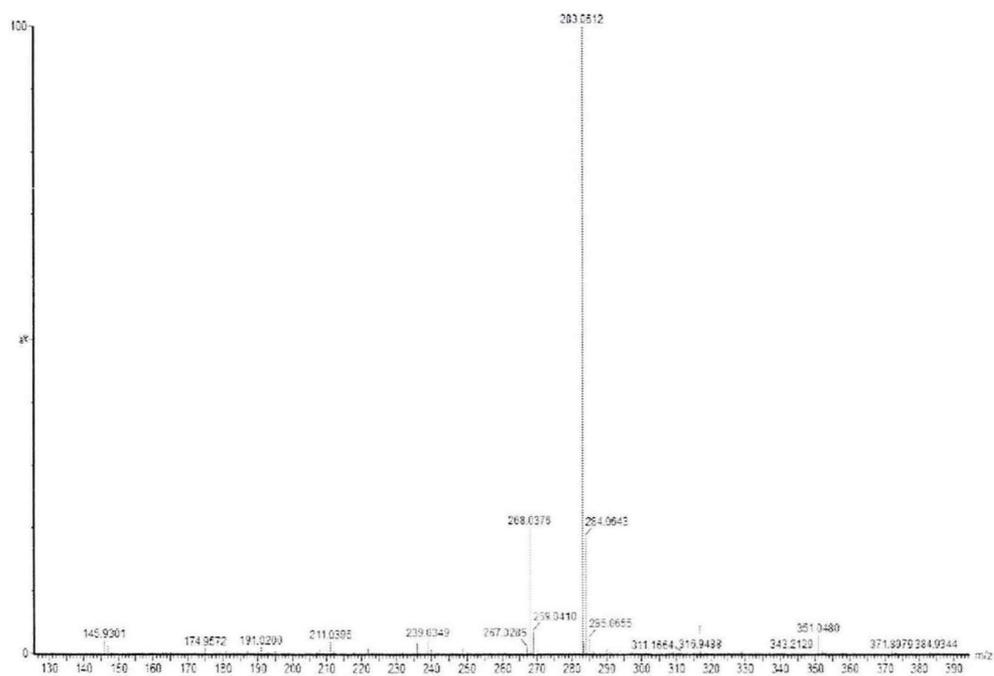


图 11 毛蕊异黄酮 化合物 11(被鉴定为毛蕊异黄酮)的质谱图

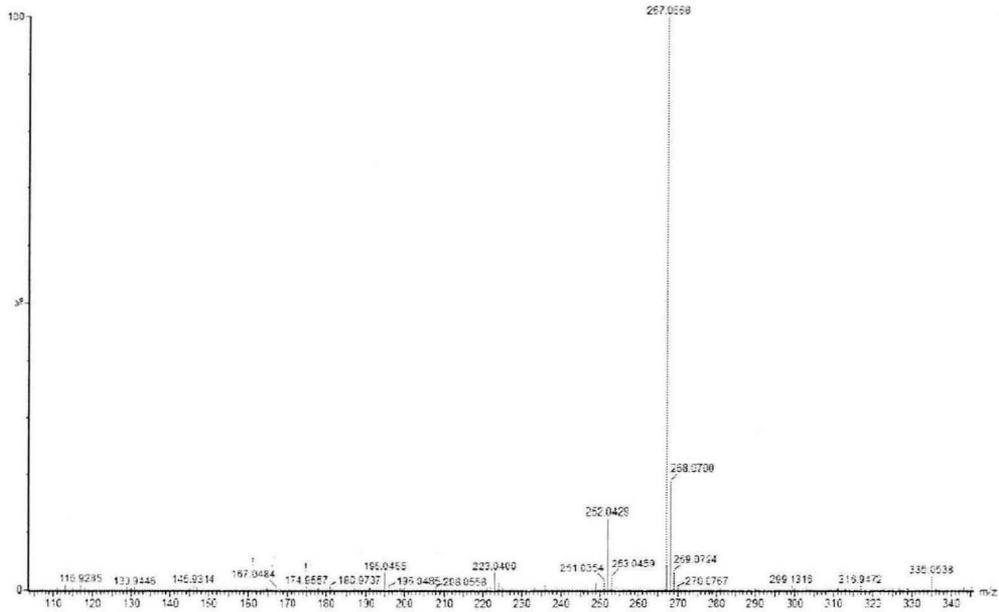


图 12 芒柄花素 化合物 15(被鉴定为芒柄花素)的质谱图

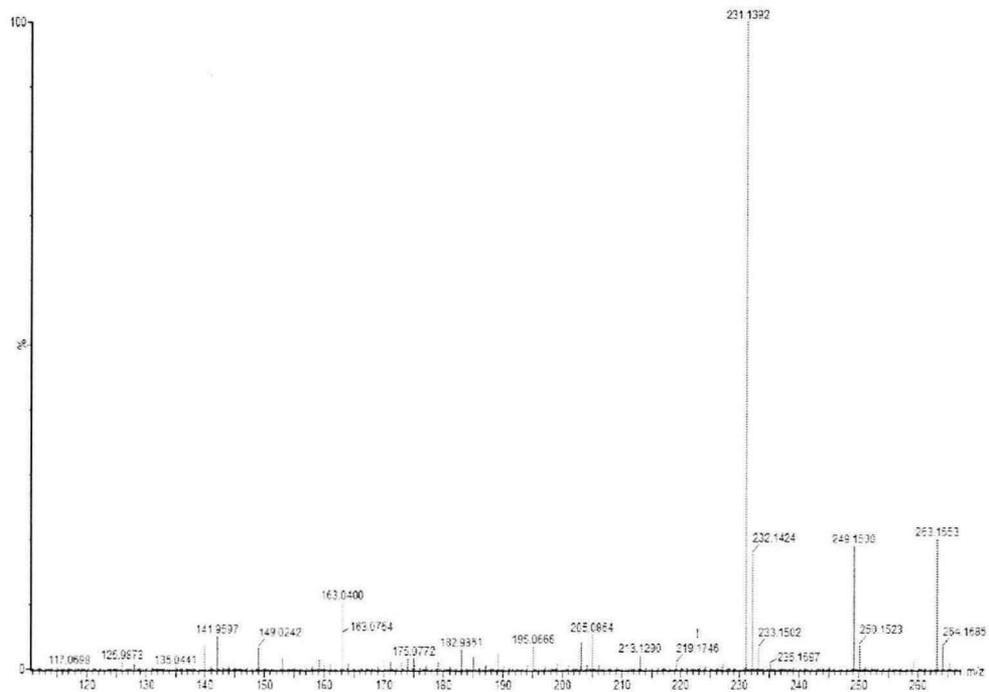


图 13 白术内酯 III 化合物 17(被鉴定为白术内酯 III)的质谱图

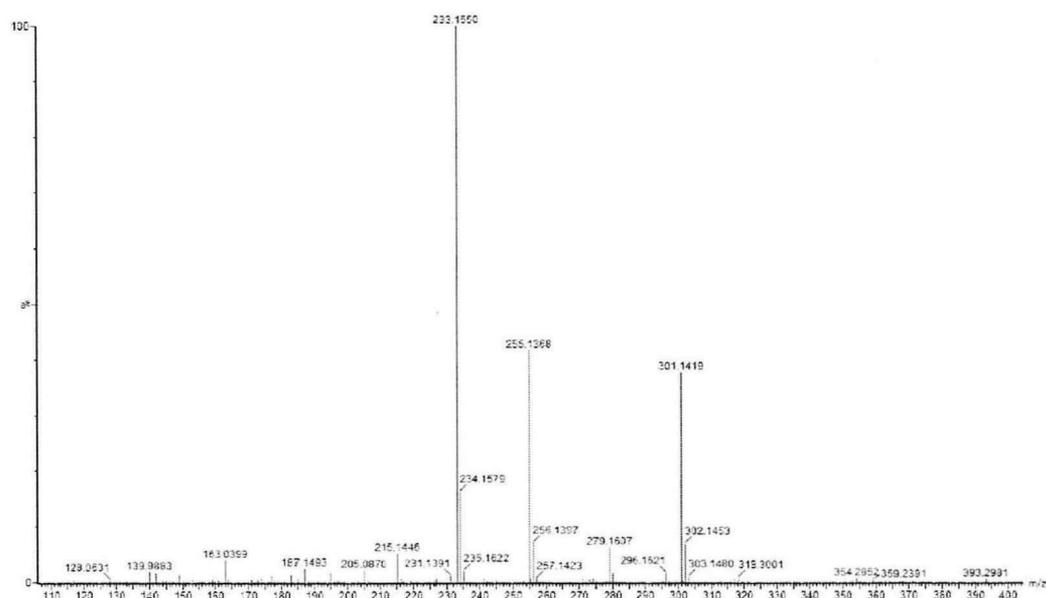


图 14 白术内酯 I 化合物 20(被鉴定为 白术内酯 I)的质谱图

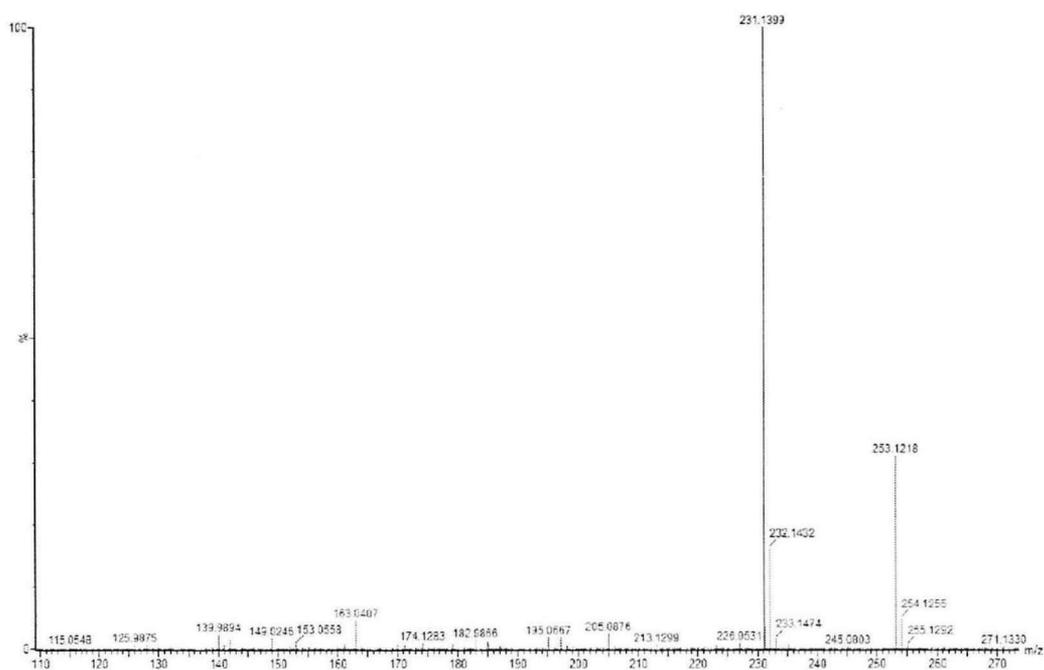


图 15 白术内酯 II 化合物 24(被鉴定为白术内酯 II)的质谱图

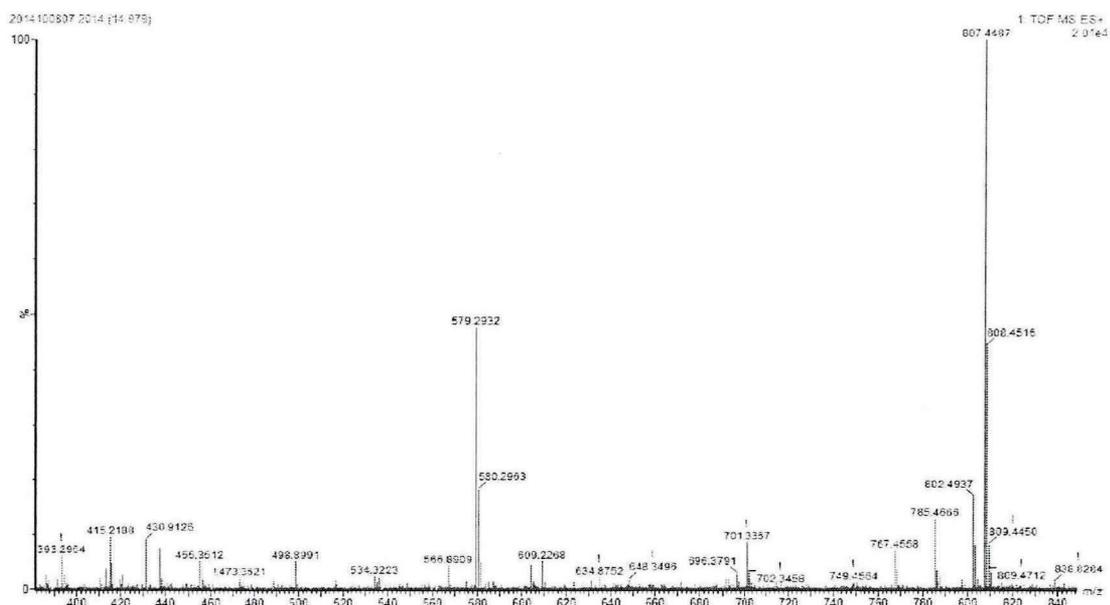


图 16 黄芪甲苷 化合物 26(被鉴定为黄芪甲苷)的质谱图

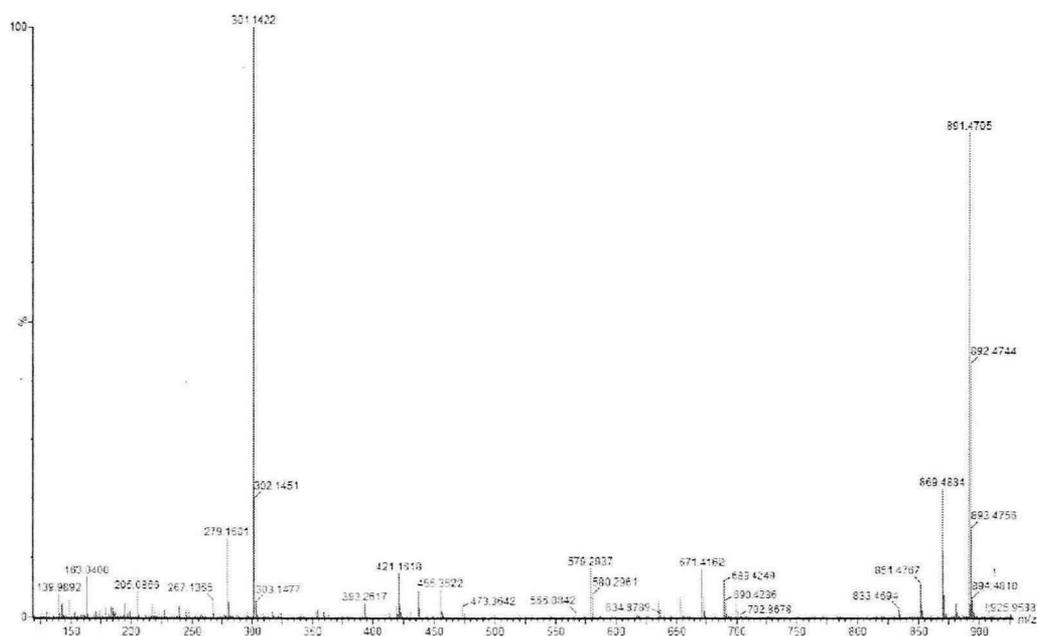


图 17 黄芪皂苷 I 化合物 31(被鉴定为黄芪皂苷 I)的质谱图

## 2.3.4 讨论

### 2.3.4.1 流动相的选择

流动相的选择对于组方中化学成分的分析至关重要。复方中的不同物质在不同流动相的影响下保留时间及分离度是不同的。本实验考察了实验室常用的有机溶剂甲醇

和乙腈作为有机相；纯水、0.1%的甲酸水、0.01%的甲酸水、0.3%的磷酸水作为无机相；进行不同的组合，比较组方在不同有机相、无机相的组合下，采用正、负离子全扫描模式所得到的总离子流图的差异。以复方中的物质尽可能多的被分离出且灵敏度高，分析时间适当为标准。综合比较后认为以甲醇为有机相可提高组方中化合物的分离度。纯水中加入0.1%的甲酸可增加化合物的离子化程度。故本实验采用甲醇-0.1%的甲酸水作为流动相。

#### 2.3.4.2 质谱条件的选择

健脾组方由三味中药组成，组方中的化学成分主要包括皂苷类、黄酮类、内酯类、糖苷类。这些化合物一般在正、负离子模式下都有响应值，但总体上正离子模式下的响应值高于负离子模式下的响应值；个别化合物如棕榈酸，仅在负离子模式下响应值较高。为了更多地获取组方中化合物的信息，本实验采用正、负离子两种模式进行检测。同时优化MS<sup>E</sup>的碎片采集模式搜集化合物的碎片信息。为化合物的鉴定与推测提供更丰富的信息。

#### 2.3.4.3 对色谱柱柱温的设置

本实验考察了常温下及35℃、40℃柱温对于复方中化合物分离的影响，复方在常温及35℃的柱温下色谱柱的柱压波动度较40℃柱温大，且各个化合物的分离度不及40℃柱温下的分离度，故将色谱柱的柱温设置为40℃。

#### 2.3.4.4 组方提取条件的选择

本实验对健脾组方比较了纯水、30%、50%、70%、95%的乙醇提取部位的考察结果，发现50%乙醇提取物中正、负模式下总离子流图中的物质最丰富，故选择50%的乙醇作为提取溶剂。

#### 2.3.4.5 检测方法的选择

中药党参、黄芪、白术中也存在挥发性成分，但挥发性成分的研究一般采用气相色谱-质谱联用的方法，结合本研究目的及现有条件，本实验中暂不考虑健脾组方中的挥发性成分。

### 2.3.5 小结

本研究建立了 UPLC/Q-TOF-MS<sup>E</sup>分离并鉴定助孕丸健脾组方中化学成分的方法。首次对健脾组方的化学成分进行了较全面而系统地研究，将组方中化合物的保留时间、精确分子量、碎片信息等与相应标准品相对照，并结合参考文献鉴定并推测出复方中37种化合物。将健脾组方的总离子流图与各单味中药的总离子流图进行比对，健脾组方中的大部分物质能被指认到相应的单味药材中。组方中化学成分主要包括皂苷类、黄酮类、内酯类、糖苷类等。结合相关文献中同类化合物的质谱裂解规律对组方中代表性成分进行了质谱条件下裂解行为的分析。本研究将为助孕丸健脾组方的质量控制提供参考依据，也为同类化合物的裂解行为提供了参考。

## 2.4 UPLC/Q-TOF-MS 测定健脾组方及党参提取物中党参炔苷的含量

健脾组方以健脾补气为主要功效，党参是临床上常用的健脾药物。党参炔苷是从党参中分离出的一种聚乙炔类化合物，2010年版《中国药典》(一部)将党参炔苷作为党参质量控制的指标性成分。目前国内外多采用 HPLC-UV, RP-HPLC 的方法对党参炔苷的含量进行测定。本节拟为党参炔苷的含量测定建立一种更为快速、灵敏、准确的 UPLC-MS 方法，从而为党参炔苷质量控制提供参考依据。

### 2.4.1 实验目的

建立 UPLC-MS 测定党参炔苷含量的方法，并将其应用于测定健脾组方及党参中党参炔苷的含量。

### 2.4.2 实验材料与方法

#### 2.4.2.1 实验仪器:

中药粉碎机: 型号 103, 瑞安市永历制药机械有限公司;  
智能超声波清洗器: 型号 DL-360B, 上海之信仪器有限公司;  
电热恒温水浴锅: HWS24 型, 上海一恒科技有限公司;  
十分之一电子天平: JJ2000 型, 常熟市双杰测试仪器厂;  
万分之一电子天平: BSA124S, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;  
实验室专用超纯水机: Arium 611 型, 德国 Sartorius 公司  
高速冷冻离心机: 3-30K, 德国 Sigma 公司  
旋转蒸发仪系统: R-215, 瑞士 BMCHI 公司  
质谱仪: Xevo G2-S Q-TOF, 美国 Waters 公司  
超高效液相色谱仪: 美国 Waters 公司

#### 2.4.2.2 试剂

试药: 党参、黄芪、白术均购自广东天诚中药饮片有限公司。由该公司提供各个药材的检验报告书。

党参炔苷标准品(批号 D-026-130528, 上海盛中医药化工有限公司)

甲醇、乙腈均为色谱纯(Merck, German)

甲酸 Sigma 乙醇 色谱级别

#### 2.4.2.3 方法

##### 2.4.2.3.1 液质色谱条件

色谱柱: Waters BEH C18 柱(2.1×50mm, 1.7μm);

柱温: 40℃;

流动相 A: 甲醇, B: 水(含有 0.1%甲酸);

梯度洗脱: 0-1.5min, 60%-80%A; 1.5-2min, 80%-60%;

样品间平衡 3min;

分析时间: 2 分钟;

流速为 0.2ml/min;

进样量为 5 $\mu$ L;

#### 2.4.2.3.2 质谱条件

离子化模式: 电喷雾离子源 (ESI);

毛细管电压: 2500V;

离子源温度: 100 $^{\circ}$ C;

雾化温度: 100 $^{\circ}$ C;

锥孔风速: 50 L/h;

雾化风速: 800 L/h;

检测模式: 正离子;

检测 m/z: 50-1200;

#### 2.4.2.3.3 样品制备方法

##### 2.4.2.3.3.1 健脾组方提取液的制备

精密称取黄芪 100g, 党参 100g, 白术 100g, 以 1: 10 的料液比加入 3000mL 的 50%乙醇回流提取 2 次, 每次 2 个小时, 浓缩定容至 200ml, 精密吸取提取液 100 $\mu$ L 至 50mL 容量瓶中, 以 50%甲醇水超声溶解, 冷却后定容至刻度。精密吸取适量至进口 EP 管中。12000r/min 离心 20min, 取上清适量至上样瓶。

##### 2.4.2.3.3.2 党参提取液的制备

精密称取党参 100g, 以 1: 10 的料液比加入 1000mL 的 50%乙醇回流提取 2 次, 每次 2 个小时, 浓缩定容至 200ml, 精密吸取提取液 100 $\mu$ L 至 50mL 容量瓶中, 以 50%甲醇水超声溶解, 冷却后定容至刻度。精密吸取适量至进口 EP 管中, 12000r/min 离心 20min, 取上清适量至上样瓶。

##### 2.4.2.3.3.3 对照品溶液制备

取 120 $^{\circ}$ C 减压干燥至恒重的党参炔苷对照品 2.5mg, 精密称定至 100mL 容量瓶中, 用甲醇超声溶解, 放冷定容, 得党参炔苷标准品母液, 党参炔苷对照品溶液浓度为 25 $\mu$ g/mL。

#### 2.4.2.3.4 方法学考察及提取物中党参炔苷含量测定

##### 2.4.2.3.4.1 标准曲线的制备

精密吸取 25、50、100、400、500、800、1000 $\mu$ L 标准母液, 至 10mL 容量瓶内 (写明标记), 分别以 50%的甲醇溶液定容至刻度, 制成 0.0625 $\mu$ g/mL, 0.125 $\mu$ g/mL、0.25 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL、1.24 $\mu$ g/mL、2 $\mu$ g/mL、2.5 $\mu$ g/mL 标准品溶液。分别取适量至进口 EP 管。12000r/min 离心 20min, 取上清至上样品瓶。以上述液质条件进行测定, 并记录峰面积, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得标准曲线。

将标准品溶液逐步稀释并进行测定, 以信噪比 S/N=10 和 S/N=3 时标准品的量为定量限和检测限。

#### 2.4.2.3.4.2 精密度、回收率

精密制备 6 份相同浓度的党参炔苷标准品,按前述操作方法操作,记录每份党参炔苷的峰面积并计算 RSD 值。

制备已知样品,加入 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准品,每个浓度平行 3 份,同上述条件测定,回收率公式(测得量-加入量)/样品重量 $\times 100\%$ 。

#### 2.4.2.3.4.3 样品测定:

分别精密吸取健脾组方、党参提取液各 100 $\mu\text{L}$  至 50mL 容量瓶中,以 50% 甲醇超声溶解,冷却后定容至刻度。精密吸取适量至进口 EP 管中,12000r/min,20min 超高速离心,取上清至上样品瓶,平行 6 份样品,同上述的液质条件进行测定。

### 2.4.3 结果

#### 2.4.3.1 专属性

党参炔苷标准品、党参提取液、健脾组方中质谱图。在本液质条件下,党参炔苷峰形较好,保留时间 0.87min。

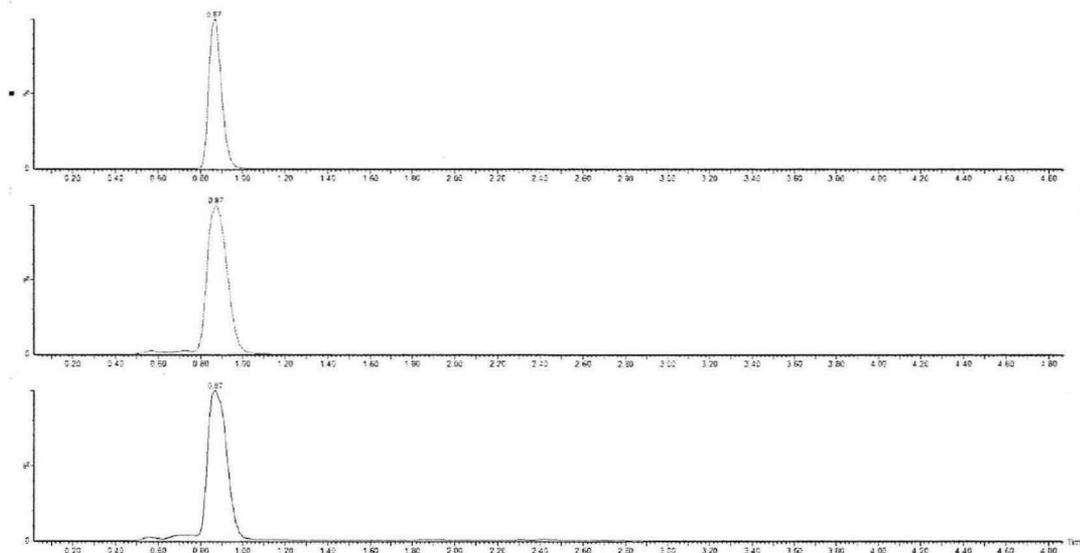


图 18 党参炔苷标准品、党参提取液、健脾组方中质谱图

#### 2.4.3.2 标准曲线、检测限和定量限

以党参炔苷标准品的浓度为横坐标(x 轴),各浓度对应的峰面积为纵坐标(y 轴)。应用 Masslynx 4.1 Software 绘制党参炔苷标准曲线及得出回归方程。其相关系数为  $r = 0.999503$ ,在 0.0625-2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内线性关系良好。党参炔苷的定量限和检测限分别为以信噪比  $S/N=10$  和  $S/N=3$  时各标准品的量为定量限 10ng/mL 和检测限 5ng/mL。

Compound name: DSQG  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999503$ ,  $r^2 = 0.999005$   
 Calibration curve:  $25416.5 \times x + 550.455$   
 Response type: External Std, Area  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x$ , Axis trans: None

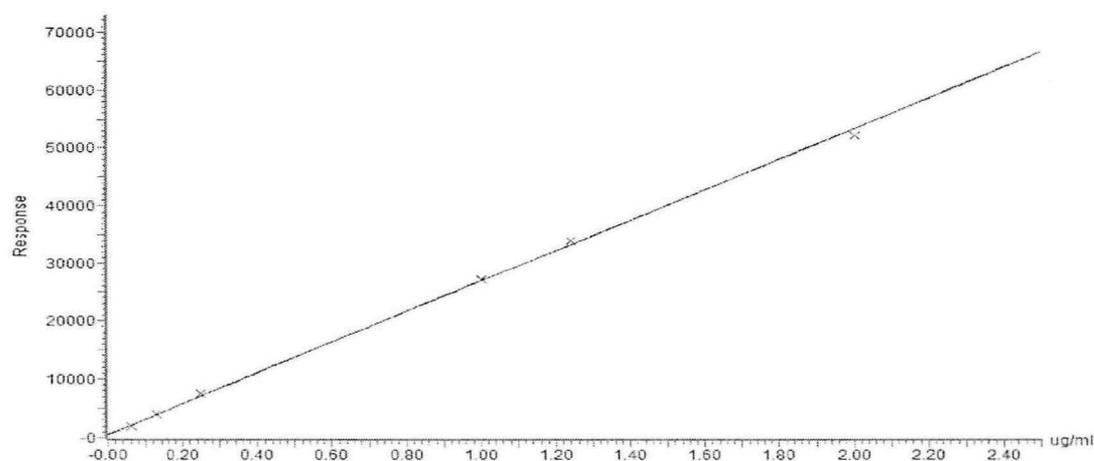


图 19 党参炔苷标准曲线

#### 2.4.3.3 精密度、回收率

如表 4 所示, 党参炔苷峰面积的相对标准偏差为 2.7%; 如表 5 所示党参炔苷的回收率可达 90%以上。

表 4 党参炔苷的精密度

序号	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD%
峰面积	6115	6378	6385	6515	6547	6607	6424±177	2.7

表 5 党参炔苷的回收率

序号	样品量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率%
1	1	0.125	1.09±0.02	96.9
2	1	0.62	1.56±0.06	96.0
3	1	1.25	2.13±0.04	94.7

#### 2.4.3.4 党参及健脾组方提取液中党参炔苷的测定

依据标准曲线。采用外标法测得党参及健脾组方中党参炔苷分别为 239 μg/mL 和 87 μg/mL, 如表 6 所示:

表 6 党参及健脾组方提取液中党参炔苷含量的含量 (μg/mL)

序号	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD%
1	235	245	230	239	244	245	239±6.3	2.62
2	86	90	88	87	85	87	87±1.7	1.97

注: 1. 党参中的党参炔苷 2. 复方中的党参炔苷

### 2.4.4 讨论

#### 2.4.3.1 提取方式

党参炔苷常见的提取方式有冷浸法、煎煮法、乙醇回流法和超声提取法。已有文章考察了不同提取工艺所得党参中党参炔苷含量的差异。结合实验室现有条件, 本研

究采用了与健脾组方相同的提取方法。采用 50% 的乙醇冷凝回流提取 2 个小时共提取两次的方法。为后续药代动力学的研究奠定基础。

#### 2.4.3.2 液质条件的选择

结合参考文献在高效液相色谱条件下党参炔苷含量检测多以乙腈为有机相, 纯水为无机相等度的洗脱方式。本实验预试时采用乙腈: 水 (78:22、75:25); 甲醇: 水 (78:22、75:25); 等度进行洗脱, 结果得到的党参炔苷的峰形欠佳, 后试验了几种以梯度洗脱方式, 以甲醇为有机相得到的党参炔苷的峰形较好, 再向纯水无机相中加入 0.1% 的甲酸, 其分离更佳。遂采用甲醇、0.1% 的甲酸水为流动相进行梯度洗脱。本实验对正、负离子模式下党参炔苷的响应值进行了比较, 正离子模式下的响应值优于负离子模式下的响应值, 故在正离子模式下采集数据。

#### 2.4.3.3 进样前样品处理方法

由于液质联用技术的灵敏度极高, 所以对样品的处理要求严格。中药成分复杂, 为了避免中药中的难溶解物质堵塞色谱柱, 常用的处理样品方法有经微孔滤膜除杂法或超高速离心沉淀除杂法。因为待测样品进样前多用流动相 (甲醇水) 处理, 为了避免流动相溶解滤膜中的物质而对实验结果产生干扰, 故本研究样品进样前的预处理采用超高速离心的方法去除样品中的杂质。

#### 2.4.5 小结

本实验建立了应用液质联用技术检测中药党参中、健脾组方中党参炔苷含量的方法。该方法快速、灵敏、稳定性好, 为党参炔苷的含量测定提供了新的参考方法。为党参炔苷药代动力学的研究奠定了基础。

## 2.5 基于 UPLC/Q-TOF-MS 技术党参炔苷药代动力学研究

### 2.5.1 实验目的

研究党参炔苷以三种不同形式党参炔苷单体、党参、健脾组方在大鼠体内的药代动力学过程, 并将三者进行比较。研究中药各成分之间, 组方各药物之间是否存在相互促进或抑制的作用。为揭示组方的配伍规律及指导临床合理用药提供科学依据。

### 2.5.2 实验材料与方法

#### 2.5.2.1 实验仪器:

中药粉碎机: 型号 103, 瑞安市永历制药机械有限公司;

智能超声波清洗器: 型号 DL-360B, 上海之信仪器有限公司;

电热恒温水浴锅: HWS24 型, 上海一恒科技有限公司;

十分之一电子天平: JJ2000 型, 常熟市双杰测试仪器厂;

万分之一电子天平: BSA124S, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司;

实验室专用超纯水机: Arium 611 型, 德国 Sartorius 公司

氮吹仪: 中国武汉中科仪器公司

高速冷冻离心机: 3-30K, 德国 Sigma 公司

旋转蒸发仪系统: R-215, 瑞士 BUCHI 公司

质谱仪: Xevo G2-S Q-TOF, 美国 Waters 公司

超高效液相色谱仪: 美国 Waters 公司

#### 2.5.2.2 试剂

试药: 党参、黄芪、白术均购自广东天诚中药饮片有限公司。由该公司提供各个药材的检验报告书。

党参炔苷标准品 (批号 D-026-130528, 上海盛中医药化工有限公司)

甲醇、乙腈均为色谱纯 (Merck, German)

甲酸 Sigma

乙醇 色谱级别

#### 2.5.2.3 实验动物

SD 雄性大鼠, SPF级, 24只,  $250 \pm 20$  g/只, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 许可证编号: SCXK (粤) 2013-0034, 合格证编号: 44005800000876。

#### 2.5.2.4 液质液相条件

色谱柱: waters BEH C18 柱 ( $2.1 \times 50$ mm,  $1.7 \mu\text{m}$ );

柱温:  $40^\circ\text{C}$ ;

流动相 A: 甲醇, B: 水 (含有 0.1%甲酸);

梯度洗脱: 0-1.5min, A: 60%-80%; 1.5-2min, A: 80%-60%;

样品间平衡 3min;

分析时间: 2分钟;

流速为 0.2ml/min;

进样量为  $5 \mu\text{L}$ ;

#### 2.7.2.5 液质质谱条件

离子化模式: 电喷雾离子源 (ESI);

毛细管电压: 2500V;

离子源温度:  $100^\circ\text{C}$ ;

雾化温度:  $100^\circ\text{C}$ ;

锥孔风速: 50 L/h;

雾化风速: 800 L/h;

检测模式: 正离子;

检测 m/z: 50-1200;

#### 2.5.2.6 灌胃药物的制备

##### 2.5.2.6.1 健脾组方的制备

精密称取黄芪 100g, 党参 100g, 白术 100g, 以 1: 10 的料液比加入 3000mL 的

50%乙醇回流提取 2 次, 每次 2 个小时, 浓缩定容至 200mL, 至 4℃冰箱保存, 灌胃前取出超声 30min。

#### 2.5.2.6.2 党参提取液的制备

精密称取党参 100g, 以 1: 10 的料液比加入 1000mL 的 50%乙醇回流提取 2 次, 每次 2 个小时, 浓缩定容至 200mL, 至 4℃冰箱保存, 灌胃前, 取出超声 30min。

#### 2.5.2.6.3 党参炔苷灌胃液的制备

精密称取 2.5g 羧甲基纤维素钠, 溶解于 500mL 超纯水中, 制成 0.5%羧甲基纤维素钠溶液。精密称取党参炔苷 8.7mg 混悬于 100mL 0.5%羧甲基纤维素钠溶液中超声溶解, 配成 0.087mg/mL 的党参炔苷单体灌胃液, 保存至 4℃冰箱。灌胃前取出超声 30min。

#### 2.5.2.7 党参炔苷标准品及内标母液的制备

精密称取在 120℃减压干燥至恒重的党参炔苷标准品 2.5mg 至 25mL 容量瓶, 用甲醇超声溶解, 放冷定容, 得党参炔苷标准品母液, 含党参炔苷标准品 100μg/mL 溶液。精密吸取标准品母液适量, 用 50%甲醇稀释标准品, 制成系列标准品工作液含有党参炔苷 10000ng/mL、2000ng/mL、1000ng/mL、200ng/mL、100ng/mL、20ng/mL、10ng/mL。

精密称取在 120℃减压干燥至恒重的连翘苷 2.5mg 内标至 25mL 容量瓶, 用甲醇超声溶解, 放冷定容, 得 100μg/mL 内标母液。精密吸取 125μL 内标工作液至 25mL 容量瓶, 用甲醇定容至刻度, 制成 500ng/mL 的内标工作液。放置 4℃冰箱保存。

#### 2.5.2.8 血浆样品的制备

血浆样品的制备采用液-液萃取的方法。取内标溶液 10μL 加入 100μL 血浆中, 涡流混旋 5min; 然后加入乙酸乙酯 1mL, 涡流混旋 15min, 以 12000r/min, 离心 20min, 取上清液, 氮气流下吹干, 残渣加 50%的甲醇 100μL 复溶, 以 12000r/min, 离心 20min, 取上清液进样。

#### 2.5.2.9 方法学考察

##### 2.5.2.9.1 专属性

对空白血浆、模拟含药血浆样品(空白血浆中添加标准品)和口服给药后的实际血浆样品分析和检测来考察内源性物质和代谢产物的干扰。

##### 2.5.2.9.2 标准曲线、定量下限和检测限

吸取空白血浆 100μL 至 EP 管, 精密加入 4.1.3 项下稀释的系列混合标准品工作液 10μL 和内标工作液 10μL, 标好序号。制备样品上样(制备方法同 4.3.2.5)。以确定液质联用条件进行测定, 以待测成分在血浆中的浓度为横坐标, 以峰面积比(A 待测物/A 内标物)为纵坐标, 绘制标准曲线。采用加权最小二乘法( $W=1/X^2$ )进行一元线性回归, 得到标准曲线方程。每个浓度平行测定 3 份, 重复 3 天。

将混合标准品溶液逐步稀释并进行测定, 以信噪比  $S/N=10$  和  $S/N=3$  时各标准品的量为定量限和检测限。

### 2.5.2.9.3 精密度和准确度

取空白血浆 100 $\mu$ L, 分别精密加入混合标准品工作液溶液, 制备低、中、高 3 种浓度的质控样品共 9 份党参炔苷 2000ng/mL、200ng/mL、20ng/mL; 同前法测定, 以当日同批制备的标准曲线计算质控样品的浓度。根据测定结果, 求算该方法的精密度和准确度。精密度用 RSD 表示, 准确度用 RE 表示, 公式为 $[(\text{测得值}-\text{真实值})/\text{真实值}] \times 100\%$ 。

### 2.5.2.9.4 回收率和基质效应

(1) 取空白血浆 100 $\mu$ L, 加入低、中、高三个浓度的标准品工作液各 10 $\mu$ L, 按血浆样品的制备方法处理质控样品, 每一浓度平行测定 6 份。

(2) 取空白血浆 100 $\mu$ L, 按血浆样品的制备方法处理后, 加入低、中、高三个浓度的标准品工作液各 10 $\mu$ L, 每一浓度平行测定 6 份。

(3) 取 50% 甲醇 100 $\mu$ L, 加入低、中、高三种浓度的标准品工作液各 10 $\mu$ L, 每一浓度平行测定 6 份。

### 2.5.2.9.5 稳定性

取空白血浆 100 $\mu$ L, 加入低、中、高三个浓度的标准品工作液各 10 $\mu$ L 平行测定 3 份。考察-20 $^{\circ}$ C 冰箱冻存 15 天及 3 次反复冻融的稳定性。

## 2.5.2.10 药代动力学研究

### 2.5.2.10.1 眼眶静脉采血实验方法:

(1) 随机将大鼠分为 3 组 (健脾组方组、中药党参组、党参炔苷组), 每组 8 只, 用油性笔在尾部编号, 1, 2, 3, ……8, 称重并记录, 计算灌胃量, 每只大鼠的灌胃量为 20mL/kg。

(2) 按先前分好的组别, 给与各组大鼠相应的药物, 灌胃后立刻计时。实验人员在每只大鼠灌药后 5min、15min、30min、45min、60min、90min、120min、240min、480min、720 min、1440 min 于大鼠眼眶静脉取血 0.5ml 至标记过的 EP 管中 (实验前已加肝素钠), 取血后盖好盖子并上下晃动 30 次左右。(每只大鼠在采血点 60min, 120min、240min、480min 采血后将给予 1ml 生理盐水补充血容量)

(3) 静置血样 30min 后, 以 3000r/min, 离心 10min。转移血浆至对应标记好的 EP 管内, 置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

### 2.5.2.10.2 液-液萃取法制备血浆样品

(1) 将-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存的血浆样品取出, 置于室温下待血浆完全融化。

(2) 从各 EP 管中取出 100 $\mu$ L 血浆至相应的 EP 管内 EP 管内。

(3) 向装有 100 $\mu$ L 血浆的 EP 管内分别加入内标溶液 10 $\mu$ L, 涡流混旋 5min。

(4) 向涡旋后的 EP 管中加入乙酸乙酯 1mL, 涡流混旋 15min, 以 12000r/min 的转速离心 20min。

(5) 取萃取液至对应 EP 管内, 置于氮气流下吹干。

(6) EP管中的残渣加100 $\mu$ L 50%的甲醇溶液复溶,复溶后以12000r/min,离心20min。

(7) 离心后取上清液进样。

记录党参炔苷峰面积比,用当日的标准曲线计算党参炔苷的浓度。绘制血药浓度时间曲线,采用PK. Solutions 2.0软件计算药代动力学参数。

### 2.5.3 结果

#### 2.5.3.1 专属性

比较模拟药物血浆、大鼠空白血浆及大鼠灌胃后的血浆质谱图(图20-21)。模拟药物血浆在该液质条件下,党参炔苷与内标连翘苷都能被检测到,党参炔苷的保留时间为0.60min,连翘苷的保留时间为0.57min,各自的峰形及分离度良好,血浆中的内源性物质未对党参炔苷及连翘苷的检测产生干扰。与空白血浆样品的色谱图比较,各成分的峰有良好的分辨率和灵敏度,这表明血浆样品中代谢物不干扰党参炔苷和内标连翘苷的测定,此方法专属性良好。

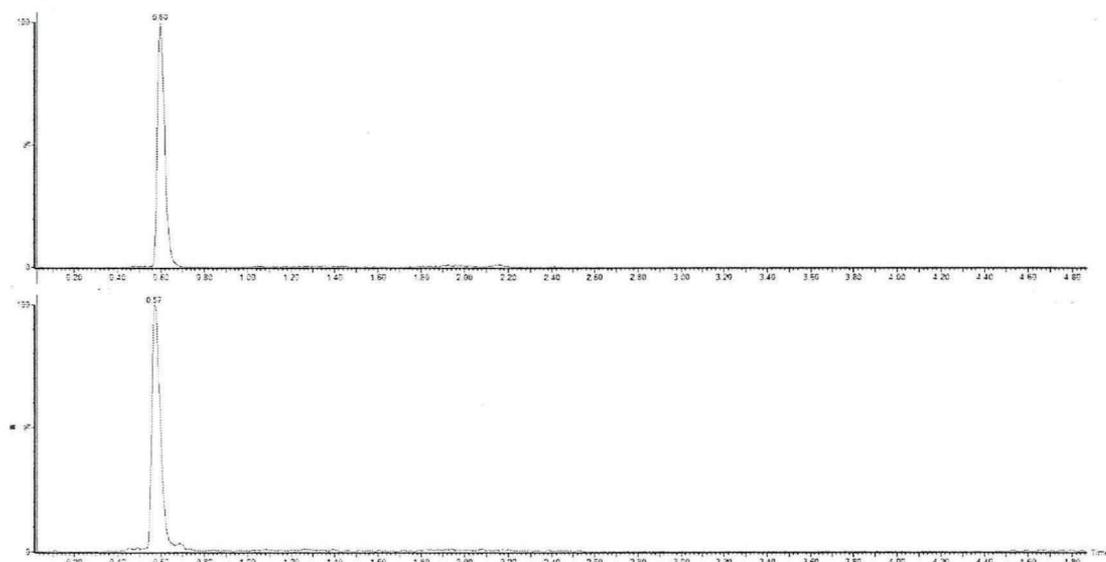


图20 模拟药物血浆离子提取质谱图:自上而下为党参炔苷、连翘苷

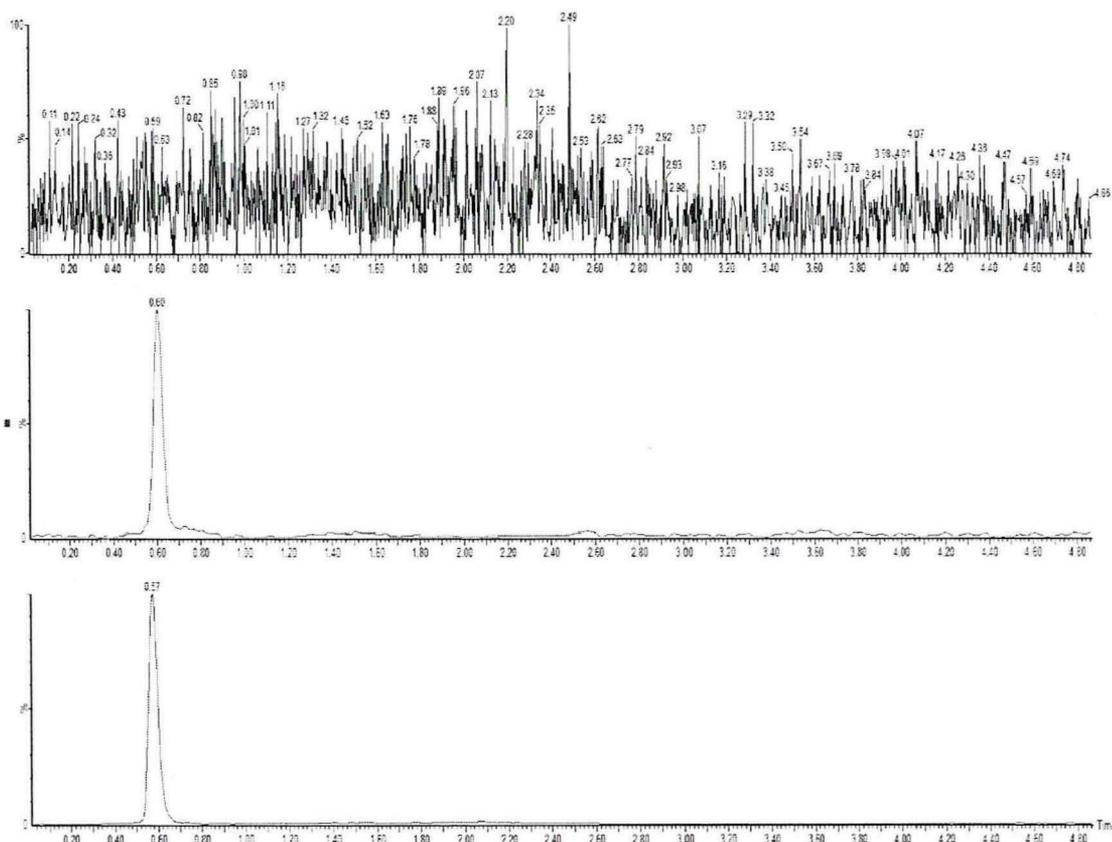


图21 自上而下为:空白血浆、党参炔苷药物血浆、连翘苷药物血浆离子提取质谱图

### 2.5.3.2 线性关系/定量下限和检测限

党参炔苷的标准曲线如图22, 标准曲线的相关系数 $r > 0.990$ , 表明党参炔苷在该线性范围内5-5000ng/mL, 线性关系良好。党参炔苷的定量限和检测限分别为10ng/mL和5ng/mL。

Compound name: dsqg  
 Correlation coefficient:  $r = 0.994199$ ,  $r^2 = 0.988432$   
 Calibration curve:  $0.0602167 * x + 0.226302$   
 Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x^2$ , Axis trans: None

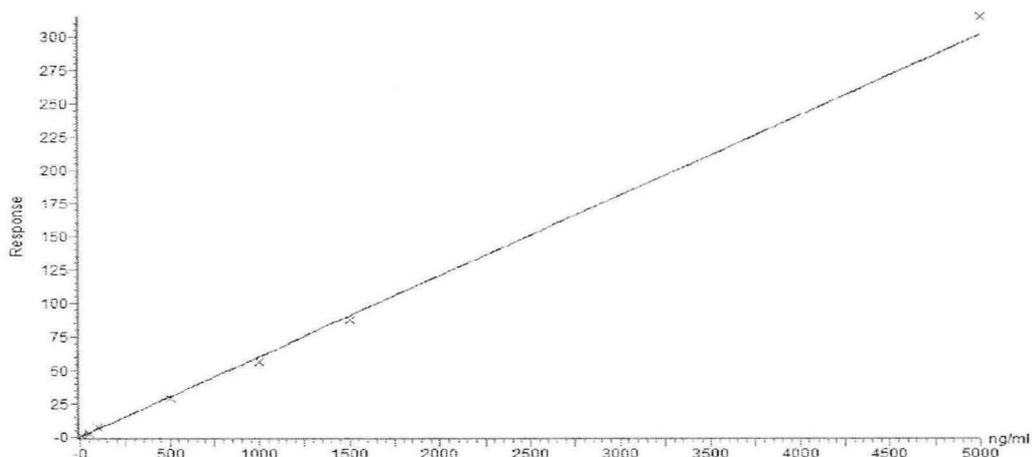


图22 党参炔苷标准曲线

### 2.5.3.3 精密度和准确度

党参炔苷的高、中、低三种浓度的日内和日间RSD% $<6.0\%$ , 准确度RE% $<5\%$  的范围内, 实验结果见表7由此可见, 此方法的精密度和准确度良好。

表7 大鼠血浆中党参炔苷的精密度和准确度 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

实际值 (ng/mL)	日内			日间		
	测得值	RSD%	RE%	测得值	RSD%	RE%
20	19.3 $\pm$ 0.55	2.9	-3.5	19.3 $\pm$ 0.97	5.0	-3.5
200	192.1 $\pm$ 7.06	3.7	-4.0	191.5 $\pm$ 6.8	3.6	-4.3
2000	1948.4 $\pm$ 86.01	4.4	-2.6	1914.6 $\pm$ 92.3	4.8	-4.3

#### 2.5.3.4 回收率

党参炔苷(高、中、低)三个浓度的平均提取率达在69.8%-75%范围内, 内标的回收率在69.5%-78.8%的范围内。

表8 大鼠血浆中党参炔苷的回收率和基质效应 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

党参炔苷 (ng/mL)	回收率%
20	73.0 $\pm$ 2.63
200	70.0 $\pm$ 1.20
2000	75.0 $\pm$ 4.36

#### 2.5.3.5 稳定性

党参炔苷的低、中、高三个浓度在15日内的稳定性均值处于65.3%-80.2%的范围内, 反复冻融三次的值处于82.9-99.5%的范围内, 见表9, 表明此方法的稳定性良好。

表9 大鼠血浆中党参炔苷的稳定性 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

实际值 (ng/mL)	反复冻融3次		-20℃储存15天	
	测得值	RE%	测得值	RE%
20	18.5 $\pm$ 1.2	-7.5	18.6 $\pm$ 1.4	-7.0
200	193.2 $\pm$ 4.0	-3.4	192.8 $\pm$ 4.3	-3.6
2000	1947.5 $\pm$ 54.5	-2.6	1954.95 $\pm$ 42.8	-2.3

#### 2.5.3.6 党参炔苷的药代动力学研究

实验大鼠分组后, 按设计的给药方案进行灌胃。灌胃后按预定的时间点进行眼眶采血, 血浆样品经乙酸乙酯液液萃取处理后, 应用建立的UPLC-MS法进行血浆样品中党参炔苷的含量测定。以采血时间为横坐标, 血药浓度为纵坐标, 绘制党参炔苷以不同形式下灌胃后的药时曲线, 见23-25。

党参炔苷组

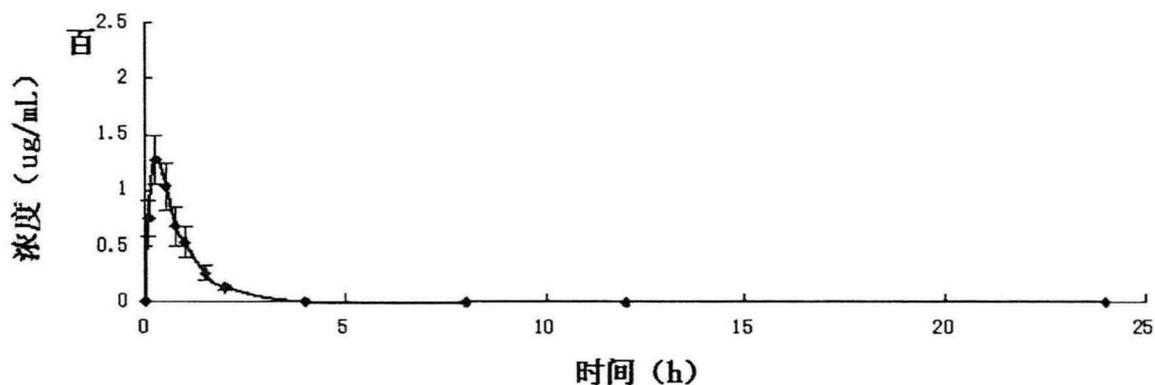


图23 党参炔苷单体药时曲线

党参组

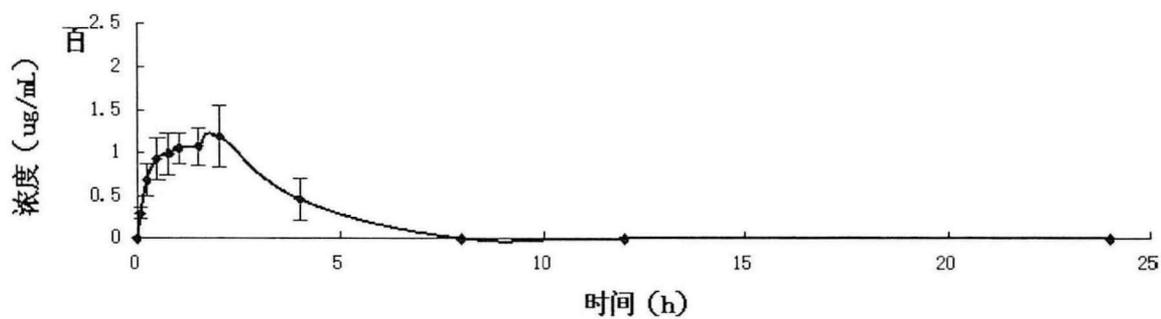


图24 党参中党参炔苷的药时曲线

健脾组方组

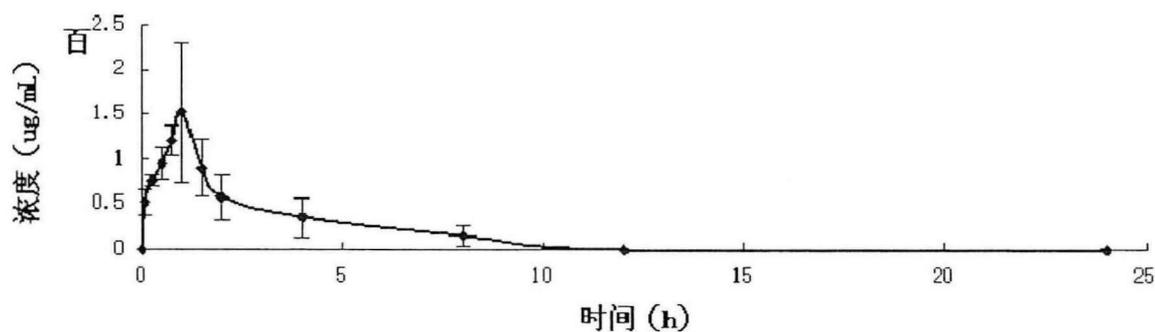


图25 健脾组方中党参炔苷的药时曲线

将所得的血药浓度数据利用PK.Solutions 2.0软件，计算获得各自的药代动力学参数。结果见表10。

表10 各组的药代动力学参数 (n=7,  $\bar{x} \pm s$ )

药代动力学参数	党参炔苷单体	党参组	健脾组方组	F	P
C <sub>max</sub> (ng/mL)	138.59±28.65	127.61±16.88	172.26±94.71	1.13	0.35
T <sub>max</sub> (h)	0.37±0.19	1.57±0.61*	1.20±0.47*		
AUC (ng·h/mL)	176.61±20.59	551.07±83.26*	737.57±127.97*		
MRT (Area h)	2.27±1.80	4.46±1.86*	5.37±1.94*		
CL (mL/h)	6791.79±1785.45	2023.76±311.44*	1559.73±334.67*		

注: \*党参组与党参炔苷单体组比较P<0.05; \*健脾组方组与党参炔苷单体组比较P<0.05;

## 2.5.4 讨论

### 2.5.4.1 血浆样品的处理方法

常用的血浆样品处理方法有固相小柱萃取法、有机溶剂沉淀法、液液萃取法。由于固相萃取法所需时间长、所需血浆样品量大、处理过程复杂、所需成本代价高。故本实验预试时采用了甲醇沉淀蛋白法、乙腈沉淀蛋白法和乙酸乙酯液液萃取法三种血浆样品处理方法。结果表明虽然有机溶剂沉淀法处理过程简单、省时,但处理后的血浆样品进样时仍存在仪器基线噪音高,分离度差等问题。相比而言采用乙酸乙酯液液萃取法不仅血浆样品回收率高,且仪器基线噪音低,分离度也好。故本实验采用乙酸乙酯液液萃取作为血浆样品的处理方法。

### 2.5.4.2 内标的选择

为了提高实验分析结果的准确度,本实验采用内标法对血浆中的党参炔苷含量进行测定。因此选择合适的内标物是至关重要的。预试时曾应用正离子模式下常用的内标卡马西平、黄芩苷、连翘苷等进行探索。应用已选定的血浆处理方法,液质检测方法进行试验,从回收率、与待测物的分离度、正离子模式下的响应值等角度综合比较,确定以连翘苷作为内标物。

### 2.5.4.3 党参炔苷灌胃液的制备

党参炔苷是聚乙炔类化合物,其溶解性为易溶于甲醇、乙醇、乙酸乙酯等有机溶剂,溶于乙醚、醋酸和氯仿,微溶于苯和水,不溶于二硫化碳和石油醚。因所配置的党参炔苷溶液需灌胃于大鼠,故排除了有机溶剂的溶解方式。采用羧甲基纤维素钠溶液超声溶解党参炔苷单体进行灌胃液的配置,羧甲基纤维素钠能使党参炔苷均一分散地溶解于溶液中,且性质比较稳定。

### 2.5.4.4 党参炔苷三种不同形式的药代动力学差异

由结果部分可知,比较三者C<sub>max</sub>结果得知党参中的成分对党参炔苷单体的体内的达峰浓度无影响,而健脾组方可提高党参炔苷单体在体内的达峰浓度;比较三者T<sub>max</sub>可知党参及健脾组方中的物质可使党参炔苷单体在体内的达峰时间推后;比较三者AUC结果可知党参及健脾组方中的物质可提高党参炔苷单体在体内的生物利用度;比较三者MRT结果可知党参及健脾组方中的物质可延长党参炔苷单体在体内的平均滞留

时间。比较三者CL结果可知党参及健脾组方中的物质可降低党参炔苷单体在体内的清除率。总体上讲党参及健脾组方中的物质有促进党参炔苷单体在体内的吸收,提高其生物利用度的作用。也为中药组方配伍提供了实验依据,充分体现了中药配伍时相须相使的理论。

### 2.5.5 小结

本研究建立了应用液质联用技术测定党参炔苷体内药代动力学的灵敏、准确的方法。比较了党参炔苷以单体形式、党参的形式、健脾组方的形式大鼠灌胃后的药代动力学差异。总体上讲党参中、健脾组方中的物质有促进党参炔苷单体体内吸收,提高其体内生物利用度的作用。为中药组方配伍时相须相使的理论提供实验依据。

## 2.6 蜕膜细胞的原代培养

本研究的第一部分及第二、三部分对助孕丸中健脾组方的物质基础级药代动力学进行了研究,在此基础上,从本节起将以蜕膜细胞为载体进行药效学方面的研究。蜕膜组织是子宫内膜在胚泡植入后受孕激素的作用转化生成的。蜕膜组织成分复杂,由多种细胞组成,可为胚胎提供营养,分泌细胞因子,阻止滋养细胞入侵,保护胚胎免受母体排斥等功能。对于妊娠的建立和维持至关重要。本实验结合参考文献对蜕膜细胞进行了原代培养及鉴定。

### 2.6.1 实验目的

完成蜕膜细胞的原代培养及鉴定。

### 2.6.2 实验材料与方法

2.6.2.1 标本来源:蜕膜组织标本采集于广州中医药大学第一附属医院妇科门诊部人流室,主动要求终止妊娠(孕期在6-8周)的正常健康妇女。(标本的收集获得医院伦理委员会的批准及患者本人同意)

#### 2.6.2.2 实验试剂及药物

DMEM/F12 培养液: Gibco 公司, 批号: 811308;

0.25%胰蛋白酶-EDTA: Gibco 公司, 批号: 1391608;

D-hanks: Gibco 公司, 批号: 8113296;

青霉素-链霉素溶液: Gibco公司, 批号: 8113036;

胎牛血清: Gibco 公司, 批号: 1365340;

PBS: Hyclone, 批号: NY130812;

一抗: Anti-Vimentin Abcam公司, 批号: ab8978;

Anti-Cytokeratin 7 Abcam 公司, 批号: ab9021

荧光二抗: Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody,

Alexa Fluor® 488 conjugate, 批号: A11008;

Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody,

Alexa Fluor® 594 conjugate, 货号: A11005;

抗荧光淬灭剂: ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI, Life公司 批号: P-36931;

Goat Serum: Life公司; 批号: 01-6201;

Triton X-100:Sigma-aldrich公司 批号: T8787-100mL;

4%多聚甲醛: 江苏碧云天生物技术研究所, 批号: P0098;

米非司酮纯化制剂 (Mifepristone, RU-486): Sigma; 批号: 13043408;

Annexin-PI凋亡检测试剂盒: 上海贝博生物技术公司 批号: BB140101;

#### 2.6.2.3 实验仪器与设备:

CO<sub>2</sub>细胞培养箱: Galaxy R型, Galaxy 公司

立体式压力蒸汽灭菌器: SHINYA 公司

酶标仪: FC 型, Thermo 公司;

流式细胞仪: Gallios 型, Beckman Coulter 公司;

Nikon 倒置系统相差显微镜: Ti 倒置显微镜型, 日本 Nikon 公司

2.6.2.4 蜕膜标本采集: 人流手术时取蜕膜组织, 生理盐水迅速冲洗血污, 将蜕膜组织置于含有双抗的D-hanks 液的无菌离心管中, 立即送至实验室进行培养。

#### 2.6.2.5 蜕膜细胞分离与原代培养

(1) 将蜕膜组织置于无菌培养皿中, 用D-Hanks液 (含双抗) 充分洗涤至蜕膜组织中无残留血污;

(2) 用灭菌后的眼科剪剪碎蜕膜组织, 重复此操作至蜕膜组织被剪碎至为1mm<sup>2</sup>左右大小;

(3) 加入等体积的复合消化酶 (0.25%胰酶与0.1% I 型胶原蛋白酶以7:3体积比配置而成), 置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中消化5min;

(4) 消化完成后向培养皿中加入等体积的完全培养基终止消化;

(5) 将复合消化液过200目不锈钢筛网, 并收集滤液至离心管内, 1000r/min×10min;

(6) 弃上清, 向沉淀中加入4倍体积的DMEM/F12 基础培养基1000r/min×10min;

(7) 弃上清, DMEM/F12基础培养基重悬沉淀后用细胞计数仪计数,

(8) 计数后用完全培养基调整细胞悬液为3×10<sup>5</sup>个/mL, 吹打混匀后均匀铺入培养瓶中; 置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养。

(9) 培养30min后取出, 弃上清, 加入3mL完全培养基, 置于CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

#### 2.6.2.6 蜕膜细胞培养条件:

培养蜕膜细胞的培养基为完全培养基 (含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基, PH 值7.0-7.2), 置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。每天定期观察蜕膜细胞的生长状况, 培养48小时后换液。当蜕膜细胞铺满培养瓶瓶底90%以上时, 用0.25%胰蛋白酶进行消化传代。蜕膜细胞前3代的培养需采用差时贴壁法进行纯化。具体操作: 将完成传代的蜕

膜细胞置于CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养30min, 之后吸去培养液及未贴壁的细胞, 加入新的完全培养基即可。

#### 2.6.2.7 蜕膜细胞的鉴定

细胞爬片: 将消化后的蜕膜细胞, 以  $4 \times 10^5$  个/mL 的密度, 轻轻吹打混匀后均匀铺入6孔板中(其内置有多聚赖氨酸包被过的盖玻片), 每隔48小时换1次液。待盖玻片上铺满细胞时将其取出。

##### 2.6.2.7.1 免疫组化对细胞进行鉴定:

- (1) 爬片的细胞用PBS洗3次后, 加入4%多聚甲醛, 于室温固定20分钟。
- (2) 固定后的细胞用PBS轻洗3次, 加入0.1% Triton X-100 (用PBS配制), 室温透膜10分钟, 再用PBS洗3次。
- (3) 用含10%山羊血清的PBS, 室温封闭30分钟。
- (4) 用封闭液按1:100稀释一抗(双染), 加入到细胞中, 室温孵育1小时。
- (5) 一抗孵育结束后, 用PBS洗3次, 加入用封闭液按1:1000稀释的荧光二抗, 避光孵育1小时。
- (6) 二抗孵育结束后, 用PBS洗三次; 在载玻片上滴加含DAPI的抗荧光淬灭封片剂, 将含细胞的玻片反扣, 用指甲油封片。
- (7) 放入冰箱中, 待指甲油凝固后, 采用zeiss 710激光共聚焦显微镜进行拍照成像。

##### 2.6.2.7.2 蜕膜细胞分泌泌乳素的鉴定

- (1) 爬片后的细胞用PBS洗3次后, 加入4%多聚甲醛, 于室温固定20分钟。
- (2) 固定后的细胞用PBS轻洗3次, 加入0.1% Triton X-100 (用PBS配制), 室温透膜10分钟, 再用PBS洗3次。
- (3) 用含10%山羊血清的PBS, 室温封闭30分钟。
- (4) 用封闭液按1:100稀释一抗(双染), 加入到细胞中, 室温孵育1小时。
- (5) 一抗孵育结束后, 用PBS洗3次, 加入用封闭液按1:1000稀释的荧光二抗, 避光孵育1小时。
- (6) 二抗孵育结束后, 用PBS洗三次; 在载玻片上滴加含DAPI的抗荧光淬灭封片剂, 将含细胞的玻片反扣, 用指甲油封片。
- (7) 放入冰箱中, 待指甲油凝固后, 采用zeiss710激光共聚焦显微镜进行拍照成像。

##### 2.6.2.7.3 透射电镜下观察细胞的形态

当蜕膜细胞生长至平台期时, 对其进行消化处理后, 收集细胞液以800r/min的转速离心5min。用3%的戊二醛固定后送电镜室观察。

### 2.6.3 结果

2.6.3.1 完成了蜕膜细胞的原代培养。原代培养的蜕膜细胞生长缓慢需约一周时

间才能铺满培养瓶。原代培养的蜕膜细胞成分不单一,以蜕膜基质细胞为主。蜕膜细胞接种30min后开始贴壁生长,细胞形态以梭形和不规则星形为主。随着传代的进行,蜕膜细胞逐渐伸展呈纤维状。其卵圆形的细胞核位于胞体中央,核仁边界清晰,胞浆丰富。生长至3-7代的蜕膜细胞增长速度较快,传代周期时间缩短为3日。光学显微镜下观察蜕膜细胞原代图片(见附图1)、传代前照片(见附图2)。

2.6.3.2应用免疫组化法对培养的蜕膜细胞进行鉴定显示:波形蛋白(Vimentin)的表达呈阳性,角蛋白(Cytokeratin 7)的表达呈阴性。蜕膜细胞免疫组化法鉴定图(见附图3)。

2.6.3.3应用免疫组化法鉴定蜕膜细胞分泌泌乳素的功能显示所鉴定的细胞全部都有泌乳素的表达,表明所培养的蜕膜细胞纯度高。蜕膜细胞分泌泌乳素功能鉴定图(见附图4)。

2.6.3.4经透射电镜下可见蜕膜细胞超微结构,其核仁大而明显,糖原颗粒比较丰富,染色质以常染色质为主。(见附图5)

## 2.6.4 讨论

### 2.6.4.1蜕膜细胞原代培养及鉴定方法

蜕膜细胞是一种与妊娠密切相关的细胞,在受精卵形成后胚泡种植于子宫内膜时,子宫内膜受卵巢激素的作用转化形成蜕膜组织。蜕膜组织对于孕卵的着床和胚胎的发育至关重要,其成分复杂,其中蜕膜基质细胞(DSC decidual stromal cell)约占蜕膜组织细胞数的75%,蜕膜基质细胞的功能主要包括参与蜕膜营养的供应,分泌细胞因子改善局部微环境和免疫调节等<sup>[129]</sup>。国外有文章报道<sup>[130]</sup>采用复合酶消化法可优化蜕膜组织的消化步骤,蜕膜细胞的纯化可采用全组份培养加传代的方法,而泌乳素免疫组化法可准确、灵敏地鉴定所培养的细胞<sup>[131]</sup>。故本实验采用0.25%胰酶与0.1% I型胶原蛋白酶复合消化的方法进行蜕膜组织的消化。采用差时贴壁与自然传代增殖的方法进行纯化。利用蜕膜细胞间质来源的属性,观察所培养细胞的波形蛋白及角蛋白的表达情况,鉴定出所培养的细胞为蜕膜细胞。蜕膜基质细胞具有分泌泌乳素的特异功能,本实验利用该特性,进一步对所培养的蜕膜细胞进行了纯度的鉴定。结果表明所培养的蜕膜细胞在分泌泌乳素功能方面具有高度的一致性。

### 2.6.5 小结

本节实验采用复合酶消化的方法原代培养蜕膜细胞,经差时贴壁与自然传代增殖法对蜕膜细胞进行纯化。应用免疫组化的方法对培养的细胞进行种类及功能的鉴定。为研究健脾组方中各种化学成分对蜕膜细胞损伤模型的干预作用奠定基础。

## 2.7 健脾组方中化学成分对蜕膜细胞损伤模型的影响

从实验第一部分我们得知健脾组方中化学成分多达几十种,但究竟哪些成分可能对防治流产有作用呢?带着这个问题,我们就结合参考文献及预实验条件摸索,采用60 $\mu$ mol/L的米非司酮溶液建立蜕膜细胞损伤模型,再以模型为载体考察健脾组方及

组方中的化学成分对模型的影响。从中初步筛选出对流产有作用的化学成分。

### 2.7.1 实验目的

建立蜕膜细胞损伤模型；探索健脾组方及其化学成分对蜕膜细胞损伤模型的影响及可能的作用机理。

### 2.7.2 实验材料与方法

2.7.2.1 标本来源：蜕膜组织标本采集如前所述。

2.7.2.2 实验试剂及药物

DMEM/F12 培养液：Gibco 公司，批号：811308；

0.25%胰蛋白酶-EDTA：Gibco 公司，批号：1391608；

D-hanks：Gibco 公司，批号：8113296；

青霉素-链霉素溶液：Gibco Co，批号：8113036；

胎牛血清：Gibco 公司，批号：1365340；

PBS：Hyclone，批号：NY130812；

米非司酮纯化制剂（Mifepristone, RU-486）：Sigma；批号：13043408；

2.7.2.3 蜕膜细胞损伤模型的建立及健脾组方药物干预

2.7.2.3.1 米非司酮母液制备：取米非司酮纯化制剂4.3mg 溶于100 $\mu$ L 无水乙醇中，再加入50%的乙醇900 $\mu$ L，形成 $1 \times 10^{-2}$ mol/l的米非司酮母液。取60 $\mu$ L  $1 \times 10^{-2}$ mol/L 的米非司酮母液加至10mLDMEM/F12 基础培养液中，形成60 $\mu$ mol/L 的米非司酮造模溶液。各反应体系的加入量：6 孔培养板，每反应体系加入1mL，96 孔板每个96孔板每反应体系加入100 $\mu$ L；

2.7.2.3.2 健脾组方单体溶液及复方溶液的制备

党参炔苷单体溶液：精密称取党参炔苷单体1mg，缓慢加入50 $\mu$ L的二甲基亚砷溶液及50 $\mu$ L的DMEM/F12基础培养基，使其完全溶解，形成 10mg/mL的党参炔苷母液备用。使用时用DMEM /F12基础培养基稀释至100 $\mu$ g/mL。

黄芪甲苷单体溶液：精密称取黄芪甲苷单体1mg，缓慢加入100 $\mu$ L的二甲基亚砷溶液，使其完全溶解，形成 10mg/mL的黄芪甲苷母液备用。使用时用DMEM/F12基础培养基将其稀释至2 $\mu$ g/mL。

白术内酯 I 单体溶液：精密称取白术内酯 I 单体1mg，缓慢加入100 $\mu$ L的二甲基亚砷溶液，使其完全溶解，形成 10mg/mL的白术内酯 I 母液备用。使用时用DMEM /F12基础培养基将其稀释至12.5 $\mu$ g/mL。

毛蕊异黄酮单体溶液：精密称取毛蕊异黄酮单体1mg，缓慢加入100 $\mu$ L的二甲基亚砷溶液，使其完全溶解，形成10mg/mL的毛蕊异黄酮母液备用。使用时用DMEM /F12基础培养基将其稀释至5 $\mu$ g/mL。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷单体溶液：精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷单体1mg，缓慢加入100 $\mu$ L的二甲基亚砷溶液，使其完全溶解，形成10mg/mL的毛蕊异黄酮葡萄糖苷母液

备用。使用时用DMEM /F12基础培养基将其稀释至2 $\mu$ L/mL。

健脾组方溶液：精密称取健脾组方提取物4mg至5mLEP管内，加入4mLDMEM/F12基础培养基，制成1mg/mL的健脾方溶液，过0.22 $\mu$ m的滤器后，4 $^{\circ}$ C保存备用。

孕酮溶液：将黄体酮注射液(20mg/mL)用DMEM/F12基础培养基稀释至20 $\mu$ g/mL4 $^{\circ}$ C保存备用。

### 2.7.2.3.3实验分组及给药：

正常组：DMEM/F12 基础培养液

模型组：应用60 $\mu$ mol/L的米非司酮造模溶液造模24h后，弃造模液，PBS清洗2次后加入DMEM/F12 基础培养液，继续培养24/48h。

党参炔苷组：应用60 $\mu$ mol/L的米非司酮造模溶液造模24h后，弃造模液，PBS清洗2次后加入100 $\mu$ g/mL的党参炔苷单体溶液，继续培养24/48h。

黄芪甲苷组：应用60 $\mu$ mol/L的米非司酮造模溶液造模24h后，弃造模液，PBS清洗2次后加入2 $\mu$ g/mL的黄芪甲苷单体溶液，继续培养24/48h。

白术内酯 I 组：应用60 $\mu$ mol/L的米非司酮造模溶液造模24h后，弃造模液，PBS清洗2次后加入12.5 $\mu$ g/mL的白术内酯 I 单体溶液，继续培养24/48h。

毛蕊异黄酮组：应用60 $\mu$ mol/L的米非司酮造模溶液造模24h后，弃造模液，PBS清洗2次后加入5 $\mu$ g/mL的毛蕊异黄酮单体溶液，继续培养24/48h。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷组：应用60 $\mu$ mol/L的米非司酮造模溶液造模24h后，弃造模液，PBS清洗2次后加入2 $\mu$ L/mL的毛蕊异黄酮葡萄糖苷单体溶液，继续培养24/48h。

健脾组方组：应用60 $\mu$ mol/L的米非司酮造模溶液造模24h后，弃造模液，PBS清洗2次后加入1mg/mL的健脾组方溶液，继续培养24/48h。

孕酮组：应用60 $\mu$ mol/L的米非司酮造模溶液造模24h后，弃造模液，PBS清洗2次后加入20 $\mu$ g/mL的孕酮溶液，继续培养24/48h。

### 2.7.2.4 MTS法检测细胞增殖活力

(1) 将原代培养的蜕膜细胞以 $1.5 \times 10^4$ 个/mL的密度接种于96孔板，100 $\mu$ L/孔，置37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱培养48h。

(2) 弃旧培养液，用PBS洗两次，每次3min。

(3) 加入DMEM/F12基础培养液，100 $\mu$ L/孔，置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱继续培养24h，使蜕膜细胞生长同步化。

(4) 根据实验设计进行分组，将细胞分成9组，每组设6个复孔，每孔所加试剂均为100 $\mu$ L。空白组加入DMEM/F12基础培养液，其余各组每孔加入60 $\mu$ mol/L的米非司酮造模溶液。将96孔板放回细胞培养箱中，继续孵育24h。

(5) 造模24h后，弃各孔中的培养液，加PBS清洗三次每次3min。向空白组及模型组各孔内加入DMEM/F12基础培养液100 $\mu$ L，其余各组加入相应药物100 $\mu$ L。将96孔板置于细胞培养箱中，孵育24/48h。

(6) 孵育24/48h后, 向96孔板每个孔内加入20 $\mu$ L的MTS, 置于细胞培养箱中, 继续孵育4h。

(7) 孵育4h后将细胞培养板取出, 使用酶联免疫分析仪检测各孔在490nm波长处的吸光度值(OD值)。

(8) 每组实验重复3次, 取平均值。

#### 2.7.2.4 Annexin V-PI 检测蜕膜细胞凋亡率:

(1) 将蜕膜细胞以 $1 \times 10^5$ 个/mL密度接种于6孔板, 每孔体积为1mL, 接种后将6孔板置于细胞培养箱中培养48h。

(2) 48h后吸出旧培养液, 用PBS清洗一遍洗1遍(3min), 加入1mL的DMEM/F12 基础培养液, 置于细胞培养箱中, 继续培养24h, 使蜕膜细胞生长同步化。

(3) 同步化后, 吸出旧培养液, 除正常组外, 其余各孔加入1mL60 $\mu$ mol/L的米非司酮造模溶液, 造模培养24h。

(4) 吸出造模溶液, 用PBS洗2遍, 每次3min。向正常组及造模组加入1mL DMEM/F12 基础培养液, 其余各组加入相应药物1mL。继续培养24/48h。

(5) 培养24/48h后将贴壁的蜕膜细胞消化下来, 以2000r/min的转速离心5min。弃上清, 用冷PBS 洗涤细胞两次, 以2000r/min的转速离心5min。

(6) 弃上清后, 每管中加入400 $\mu$ L1 $\times$ AnnexinV结合液悬浮细胞。

(7) 向细胞悬浮液中加入5 $\mu$ L AnnexinV-EGFP 染色液, 轻轻混匀后于2-8 $^{\circ}$ C避光条件下孵育15 分钟;

(8) 继续加入10 $\mu$ L PI染色液, 轻轻混匀于2-8 $^{\circ}$ C避光条件下孵育5min。在1小时内用流式细胞仪进行检测。检测结果重复三次。

#### 2.7.2.5 Western Blot检测各组凋亡蛋白的表达

##### 2.7.2.5.1 收集细胞蛋白

(1)将蜕膜细胞以 $1 \times 10^5$ 个/mL密度接种于6孔板, 每孔体积为1mL, 置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱培养48h。

(2) 弃旧培养液, 除正常对照组外, 各孔加入1mL 60 $\mu$ mol/L的米非司酮造模溶液, 造模培养24h。

(3)吸出造模溶液, 用PBS洗2遍, 每次3min, 正常组及造模组分别加入1mLDMEM/F12 基础培养液, 其余各组加入相应药物1mL, 培养24/48h。

(4) 吸出含药培养液, 用PBS洗2遍, 每次3min, 向6孔板中的每个孔内加入150 $\mu$ L 蛋白裂解液, 置于冰上静置5min。

(5)用细胞刮板刮下各孔表面的细胞, 将裂解的细胞同裂解液转移至相应EP管内, EP管插入碎冰中静置30min。

(6) 30min后取出EP管以12000r/min的转速置于4 $^{\circ}$ C离心机内离心15min。

(7) 离心后取上清转移至相应EP管内。

(8) 以BCA进行蛋白定量, 调蛋白浓度一致, 以每组加入5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液3mL, 瞬离, 100℃变性5min, -20℃保存备用。

#### 2.7.2.5.2 BCA法进行细胞蛋白定量

(1) 依据待测样品的数量, 将BCA试剂盒中的试剂A和试剂B以50:1的体积比进行均匀混合。

(2) 取1ml的蛋白标准配制液, 将20mg的BSA完全溶解, 配置成20mg/mL的蛋白标准溶液, 置于-20℃的冰箱内备用。

(3) 取20mg/ml 的蛋白标准溶液2.5μL用稀释液稀释至500μg/mL。

(4) 将标准品按0、1、2、4、8、12、16、20μL加到96孔板的标准孔内, 每孔内不足20μL的加入标准品稀释液补充至20μL。

(5) 向96孔板内加入适量待测样品, 用标准品稀释液补充至20μL。

(6) 各个孔内加入200μL的BCA 工作液, 37℃下放置30分钟。

(7) 测定各个孔在570nm处的吸光度值, 建立标准曲线, 并计算出样品蛋白的浓度。

(8) 结合样品蛋白的浓度, 将蛋白进行等量分装, 加入上样缓冲液, 于沸水中煮蛋白5min, 置于冰上立即冷却, 瞬时离心, -20℃冰箱保存。

#### 2.7.2.5.3 Western Blot步骤:

##### (1) 制胶

按厂商的使用指南操作, 具体步骤为: 将两块干净的玻璃平板和0.75mm垫片组装电泳装置中玻璃平板夹层, 并固定在灌胶支架上。立即用吸管将分离胶液体沿夹层中长玻璃的边缘加入于玻璃平板夹层中, 再从另一边垫片往夹层的液面顶部缓缓加入一层水。让凝胶在室温下聚合60min左右, 倾去顶层的水, 尽量用吸水纸吸干凝胶上部的水。用吸管将液体沿一条垫片加入到玻璃平板夹层, 直至夹层的顶部。将0.75mm厚15孔的梳子插入夹层的积层胶液中, 必要时再加积层胶液体充盈剩余空间。让积层胶层室温聚合60min左右。

##### (2) 电泳

小心拔出梳子, 避免损伤凝胶加样孔。将凝胶板固定到电泳装置的上缓冲液室(上槽), 两凝胶板之间加入1×SDS电泳缓冲液, 将同样浓度的蛋白质样品等体积加入到样品孔中, 小心加样, 避免蛋白溢出。同时往下缓冲液室(下槽)加入推荐量的1×SDS电泳缓冲液。将固定于上槽的凝胶板放入下槽中。连接电源, 先在70V下电泳至溴酚蓝染料从积层胶进入分离胶(30min), 再将电压调至120V继续65min。关闭电源并撤去连接的导线, 弃去电泳缓冲液, 连同上槽一起将凝胶夹层取出。

##### (3) 转膜

将凝胶板从上槽解离出来, 撬起上面的玻璃平板, 使凝胶暴露出来。接下来进行转膜, 把NC膜先浸于盛有少量转膜缓冲液的浅托盘中, 把滤纸也浸泡于其中。按一下

顺序放置转换装置,平放底部电极(阴极),放一张海绵垫片,在海绵垫片上放置1张用转移缓冲液浸泡过得滤纸,转移凝胶至滤纸上,覆盖NC膜,注意避免产生气泡,逐张叠放,精确对齐,然后用一玻璃移液管作滚筒以挤出气泡。将靠上方的电极(阳极)放于夹层物上,连接电源,根据凝胶面积按200mA接通电流,转移60min。

#### (4) 封闭与孵育:

把NC膜取出,以TBST溶液漂洗5min×3次,每次更换新的TBST溶液;弃去TBST,加入5%脱脂奶溶液的平皿中,平放在平缓摇动的摇床平台上于室温温育1h;加入一抗稀释液稀释的一抗,于4℃过夜;弃一抗液体,以TBST溶液漂洗5min,重复3次,每次更换新的TBST溶液;加入二抗稀释液,温室摇床慢摇1h,把滤膜转移至TBST溶液漂洗5min,重复3次,每次更换新的TBST溶液。

#### (5) 显色:

把经漂洗的NC膜转移至一浅托盘上,按滤膜面积加入0.1mL/cm<sup>2</sup>的底物溶液1:1的试剂A和试剂B,室温反应5min,于成像仪上成像。

#### (6) 计算结果: 凋亡相关蛋白相对表达率=条带灰度值/β-tubulin灰度值。

2.7.2.5.4 统计: 统计结果以 SPSS19.0 软件对数据进行数据处理和统计分析。统计结果采用均数±标准差表示。数据资料满足正态性与方差齐性,多个样本均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)检验,方差齐用 LSD 检验;方差不齐则采用 Tamhane 检验进行检验。P<0.05 有统计学意义。以上实验均重复三次。

### 2.7.3 结果

#### 2.7.3.1 MTS 法检测各药物组分对蜕膜细胞损伤模型增殖活力的影响

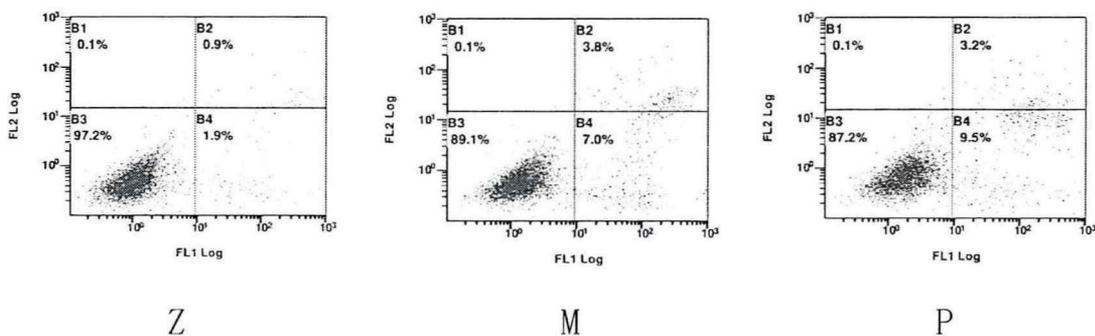
如表 11 所示:对于蜕膜细胞损伤模型 MTS 检测其增殖活力结果显示,各药物组分作用 24h 后,空白组与模型组比较有统计学意义(P<0.05),党参炔苷组、毛蕊异黄酮组、健脾组方组与模型组比较都具有统计学意义(P<0.05);孕酮组、黄芪甲苷组、白术内酯 I 组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组与模型组比较无统计学意义(P>0.05)。各药物组分作用 48h,空白组与模型组比较有统计学意义(P<0.05),孕酮组、黄芪甲苷组、党参炔苷组、毛蕊异黄酮组、健脾组方组与模型组比较都具有统计学意义(P<0.05);白术内酯 I 组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组与模型组比较无统计学意义(P>0.05)。

表 11 健脾组方各组分对蜕膜细胞损伤模型增殖活力的影响 (OD490) ( $n=7, \bar{x} \pm s$ )

分组	24h		48h	
	F	P	F	P
正常组	0.469±0.019 <sup>*</sup>	36.42	0.554±0.033 <sup>*</sup>	48.65
模型组	0.249±0.013	0.0	0.289±0.021	0.0
孕酮组	0.331±0.028		0.426±0.004 <sup>*</sup>	
黄芪甲苷组	0.275±0.031		0.433±0.020 <sup>*</sup>	
党参炔苷组	0.304±0.011 <sup>*</sup>		0.529±0.020 <sup>*</sup>	
白术内酯 I 组	0.275±0.012		0.363±0.021	
毛蕊异黄酮组	0.312±0.022 <sup>*</sup>		0.405±0.005 <sup>*</sup>	
毛蕊异黄酮葡萄糖苷组	0.277±0.048		0.411±0.068	
健脾组方组	0.425±0.042 <sup>*</sup>		0.564±0.030 <sup>*</sup>	

注: 24h: <sup>\*</sup> 与模型组比较有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 48h: <sup>\*</sup> 与模型组比较有统计学意义 ( $P<0.05$ );

2.7.3.2 AnnexinV-PI 法流式检测各药物对蜕膜细胞损伤模型早期凋亡率的影响如表 12 及图 26 所示: 各组药物作用 24h 后, 与模型组比较正常组的早期凋亡率低于模型组且有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 表明所造的蜕膜细胞损伤模型是成功的; 孕酮组与模型组比较其早期凋亡率高于模型组有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 表明孕酮对米非司酮造模的损伤模型有促进早期凋亡的作用; 黄芪甲苷组、党参炔苷组、白术内酯 I 组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组、健脾组方组早期凋亡率均低于模型组且具有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 表明以上各组药物有抑制蜕膜细胞早期凋亡的作用。各组药物作用 48h 后, 模型组与正常组比较有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 表明所造的蜕膜细胞损伤模型在 48h 仍有意义; 孕酮组、黄芪甲苷组、白术内酯 I 组与模型组比较凋亡率无差异 ( $P>0.05$ ); 党参炔苷组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组、健脾组方组的早期凋亡率低于模型组且有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 表明党参炔苷组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组、健脾组方组作用 48h 时仍存在抑制蜕膜细胞损伤模型早期凋亡的作用。



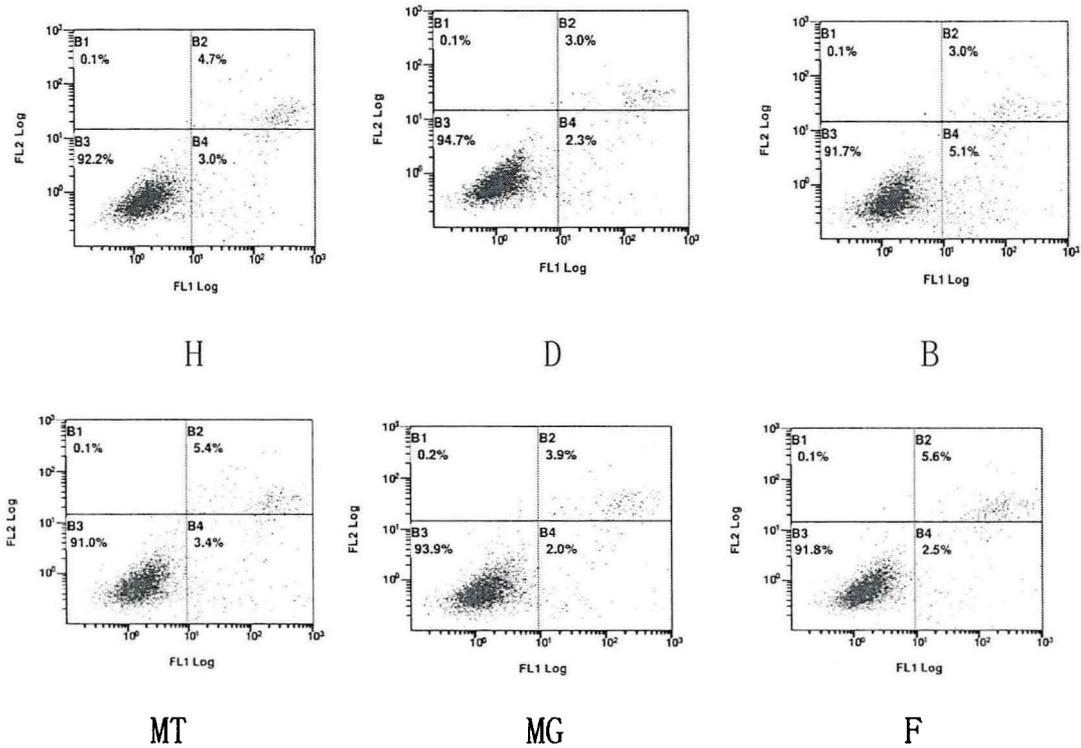


图 26 各药物组分对蜕膜细胞损伤模型早期凋亡率的影响

Z: 正常组; M: 模型组; P: 孕酮组; H: 黄芪甲苷组; D: 党参炔苷组; B: 白术内酯 I 组;  
 MT: 毛蕊异黄酮组; MG: 毛蕊异黄酮葡萄糖苷组; F: 健脾组方组;

表 12 各药物对蜕膜细胞损伤模型早期凋亡率的影响 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	24h		48h	
	F	P	F	P
正常组	1.96 ± 0.15*	256.38 0.0	2.33 ± 0.03*	198.13 0.0
模型组	7.42 ± 0.35		5.38 ± 0.15	
孕酮组	9.47 ± 0.69*		5.10 ± 0.15	
黄芪甲苷组	3.00 ± 0.14*		5.24 ± 0.11	
党参炔苷组	2.30 ± 0.14*		3.12 ± 0.23*	
白术内酯 I 组	5.10 ± 0.13*		4.90 ± 0.16*	
毛蕊异黄酮组	3.43 ± 0.21*		2.35 ± 0.26*	
毛蕊异黄酮葡萄糖苷组	2.18 ± 0.16*		1.60 ± 0.24*	
健脾组方组	2.47 ± 0.08*		4.23 ± 0.19*	

注: 24h: \*与模型组比较有统计学意义 (P<0.05); 48: \*与模型组比较有统计学意义 (P<0.05);

## 2.7.3.3 Western Blot 法检测各药物组分对蜕膜细胞损伤模型凋亡蛋白表达的影响

表 13 各组药物干预模型后凋亡蛋白 Caspase 3 表达 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	24h		48h			
	F	P	F	P		
正常组	1.00±0.00	11.69	0.0	1.00±0.00*	2.76	0.04
模型组	1.67±0.39			1.56±0.14		
孕酮组	1.39±0.15			1.03±0.20*		
黄芪甲苷组	0.97±0.13			1.05±0.25*		
党参炔苷组	1.63±0.22			1.31±0.19		
白术内酯 I 组	0.58±0.70			0.94±0.26*		
毛蕊异黄酮组	0.80±0.84			1.03±0.34*		
毛蕊异黄酮葡萄糖苷组	1.45±0.23			1.14±0.10*		
健脾组方组	1.87±0.29			1.26±0.17		

注: 24h: \*与模型组比较有统计学意义 (P<0.05); 48: \*与模型组比较有统计学意义 (P<0.05);

表 14 各组药物干预模型后凋亡蛋白 Caspase 9 表达 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	24h		48h			
	F	P	F	P		
正常组	1.00±0.00*	19.91	0.0	1.00±0.00*	6.88	0.0
模型组	1.91±0.31			1.72±0.24		
孕酮组	1.18±0.13*			1.49±0.15		
黄芪甲苷组	1.29±0.17*			1.42±0.13*		
党参炔苷组	2.00±0.34			1.41±0.08*		
白术内酯 I 组	0.56±0.09*			1.16±0.12*		
毛蕊异黄酮组	1.52±0.32*			1.44±0.18		
毛蕊异黄酮葡萄糖苷组	0.35±0.12*			1.39±0.17*		
健脾组方组	1.10±0.18*			1.81±0.27		

注: 24h: \*与模型组比较有统计学意义 (P<0.05); 48: \*与模型组比较有统计学意义 (P<0.05);

表 15 各组药物干预模型后凋亡蛋白 Bcl-2 表达 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	24h			48h		
		F	P		F	P
正常组	1.00±0.00*	18.55	0.0	1.00±0.00*	7.37	0.0
模型组	0.43±0.11			0.60±0.07		
孕酮组	1.58±0.29*			1.51±0.33*		
黄芪甲苷组	0.55±0.13			1.33±0.14*		
党参炔苷组	0.89±0.10*			1.52±0.27*		
白术内酯 I 组	0.14±0.06			1.76±0.35*		
毛蕊异黄酮组	1.61±0.37*			1.57±0.28*		
毛蕊异黄酮葡萄糖苷组	1.67±0.36*			1.47±0.17*		
健脾组方组	1.80±0.41*			1.59±0.19*		

注: 24h: \*与模型组比较有统计学意义 (P<0.05); 48: \*与模型组比较有统计学意义 (P<0.05);

表 16 各组药物干预模型后凋亡蛋白 Bax 的表达 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	24h			48h		
		F	P		F	P
正常组	1.00±0.00*	14.33	0.0	1.00±0.00*	17.68	0.0
模型组	1.49±0.36			1.42±0.15		
孕酮组	0.47±0.05*			0.68±0.15*		
黄芪甲苷组	0.67±0.07*			1.18±0.15*		
党参炔苷组	0.82±0.09*			0.55±0.12*		
白术内酯 I 组	0.27±0.10*			0.71±0.13*		
毛蕊异黄酮组	0.68±0.20*			1.20±0.12*		
毛蕊异黄酮葡萄糖苷组	0.74±0.12*			0.85±0.10*		
健脾组方组	0.80±0.13*			0.79±0.10*		

注: 24h: \*与模型组比较有统计学意义 (P<0.05); 48: \*与模型组比较有统计学意义 (P<0.05);

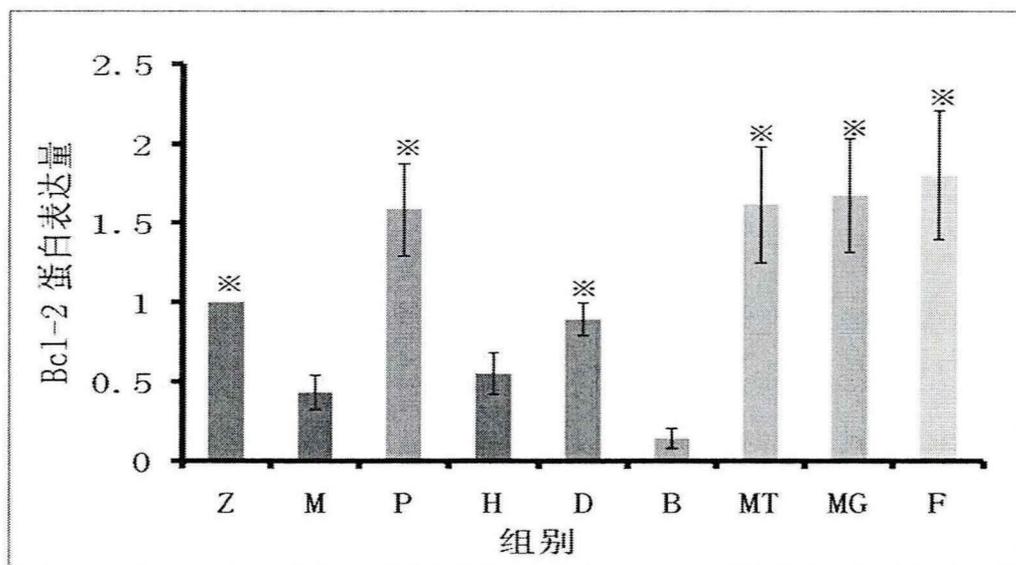


图 27 各组药物对蜕膜细胞损伤模型 Bcl-2 表达的影响 (24h)

注:Z:正常组; M:模型组; P:孕酮组; H:黄芪甲苷组; D:党参炔苷组; B: 白术内酯 I 组; MT:毛蕊异黄酮组; MG:毛蕊异黄酮葡萄糖苷组; F:健脾组方组; ※与模型组比较  $P < 0.05$ ;

如图 27 所示:与模型组比较正常组、孕酮组、黄芪甲苷组、党参炔苷组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组及健脾组方组的 Bcl-2 的表达增加;其中正常组、孕酮组、党参炔苷组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组、健脾组方组与模型组比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

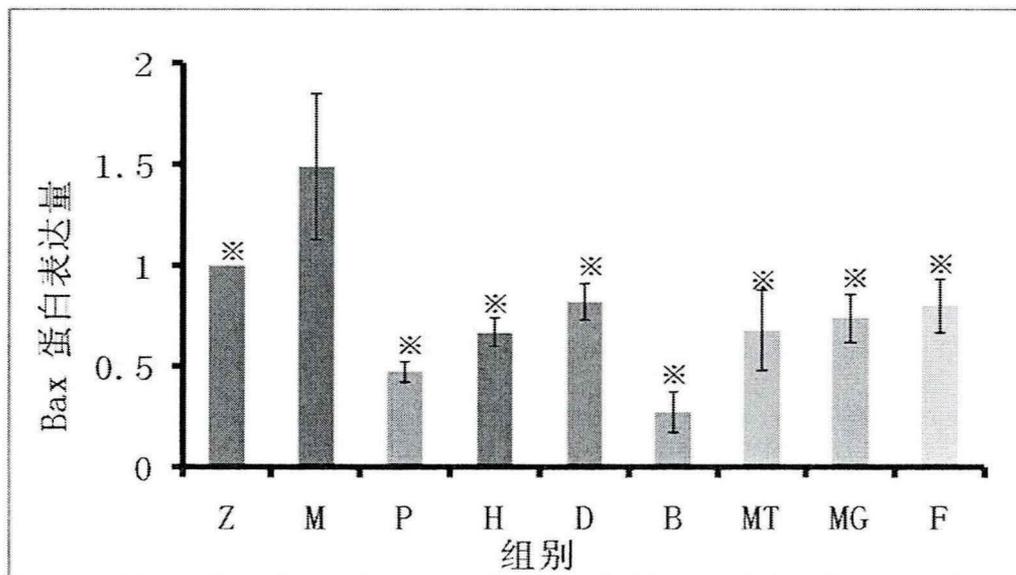


图 28 各组药物对蜕膜细胞损伤模型 Bax 表达的影响 (24h)

注:Z:正常组; M:模型组; P:孕酮组; H:黄芪甲苷组; D:党参炔苷组; B: 白术内酯 I 组; MT:毛蕊异黄酮组; MG:毛蕊异黄酮葡萄糖苷组; F:健脾组方组; ※与模型组比较  $P < 0.05$ ;

如图 28 所示:与模型组比较正常组、孕酮组、黄芪甲苷组、党参炔苷组、白术内酯 I 组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组及健脾组方组的 Bax 的表达降低,且均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

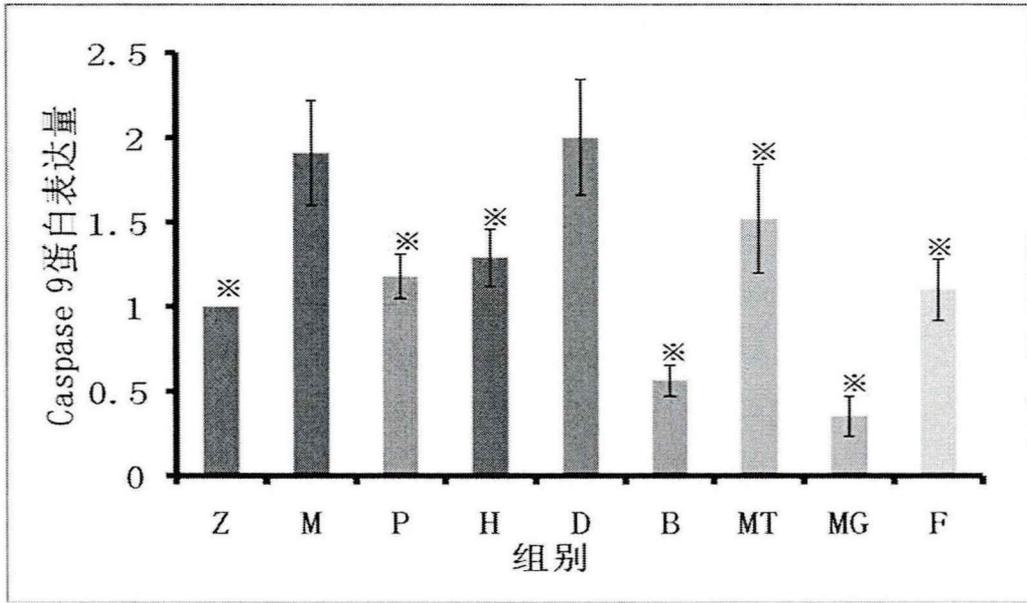


图 29 各组药物对蜕膜细胞损伤模型 Caspase 9 表达的影响 (24h)

注:Z:正常组; M:模型组; P:孕酮组; H:黄芪甲苷组; D:党参炔苷组; B:白术内酯 I 组; MT:毛蕊异黄酮组; MG:毛蕊异黄酮葡萄糖苷组; F:健脾组方组; ※与模型组比较  $P < 0.05$ ;

如图 29 所示:与模型组比较正常组、孕酮组、黄芪甲苷组、白术内酯 I 组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组及健脾组方组 Caspase 9 的表达降低,且具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

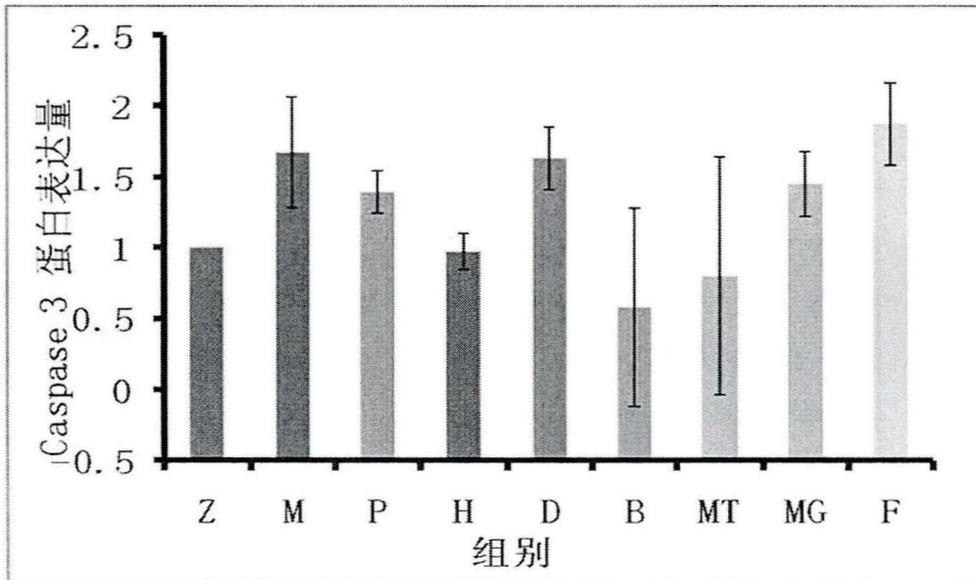


图 30 各组药物对蜕膜细胞损伤模型 Caspase 3 表达的影响 (24h)

注:Z:正常组; M:模型组; P:孕酮组; H:黄芪甲苷组; D:党参炔苷组; B:白术内酯 I 组; MT:毛蕊异黄酮组; MG:毛蕊异黄酮葡萄糖苷组; F:健脾组方组; ※与模型组比较  $P < 0.05$ ;

如图 30 所示:与模型组比较正常组、孕酮组、黄芪甲苷组、党参炔苷组、白术内酯 I 组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组的 Caspase 3 表达降低。

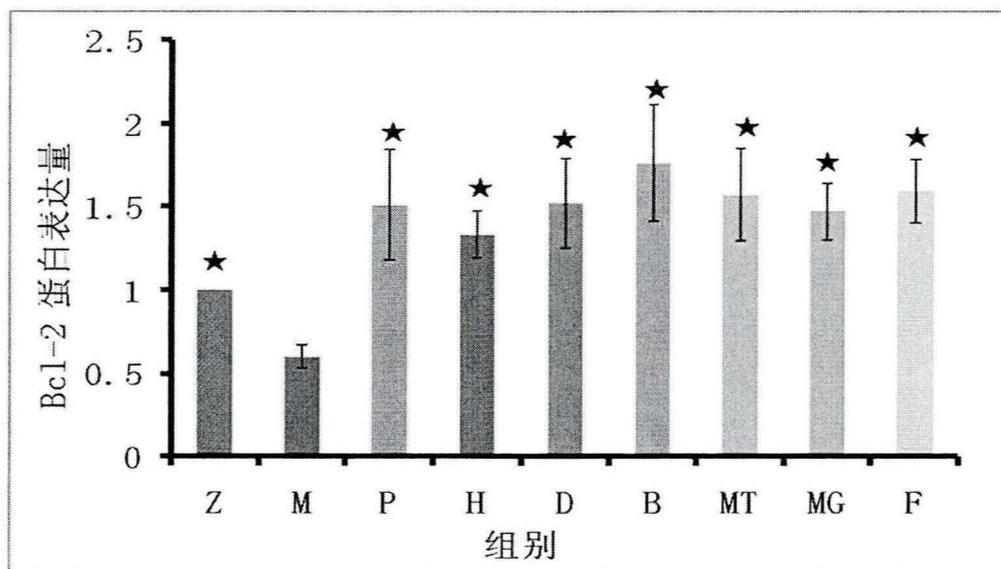


图 31 各组药物对蜕膜细胞损伤模型 Bcl-2 表达的影响 (48h)

注:Z:正常组; M:模型组; P:孕酮组; H:黄芪甲苷组; D:党参炔苷组; B: 白术内酯 I 组; MT:毛蕊异黄酮组; MG:毛蕊异黄酮葡萄糖苷组; F:健脾组方组; ★与模型组比较  $P < 0.05$ ;

如图 31 所示: 与模型组比较正常组、孕酮组、黄芪甲苷组、党参炔苷组、白术内酯 I 组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组、健脾组方组的 Bcl-2 表达增加, 且均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

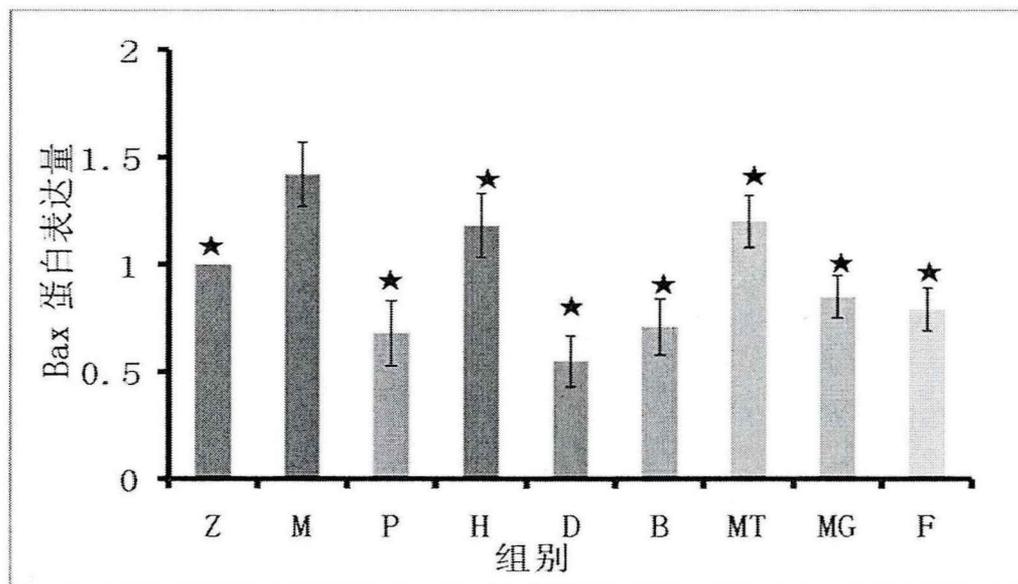


图 32 各组药物对蜕膜细胞损伤模型 Bax 表达的影响 (48h)

注:Z:正常组; M:模型组; P:孕酮组; H:黄芪甲苷组; D:党参炔苷组; B: 白术内酯 I 组; MT:毛蕊异黄酮组; MG:毛蕊异黄酮葡萄糖苷组; F:健脾组方组; ★与模型组比较  $P < 0.05$ ;

如图 32 所示: 与模型组比较正常组、孕酮组、黄芪甲苷组、党参炔苷组、白术内酯 I 组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组、健脾组方组的 Bax 的表达均降低, 且均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

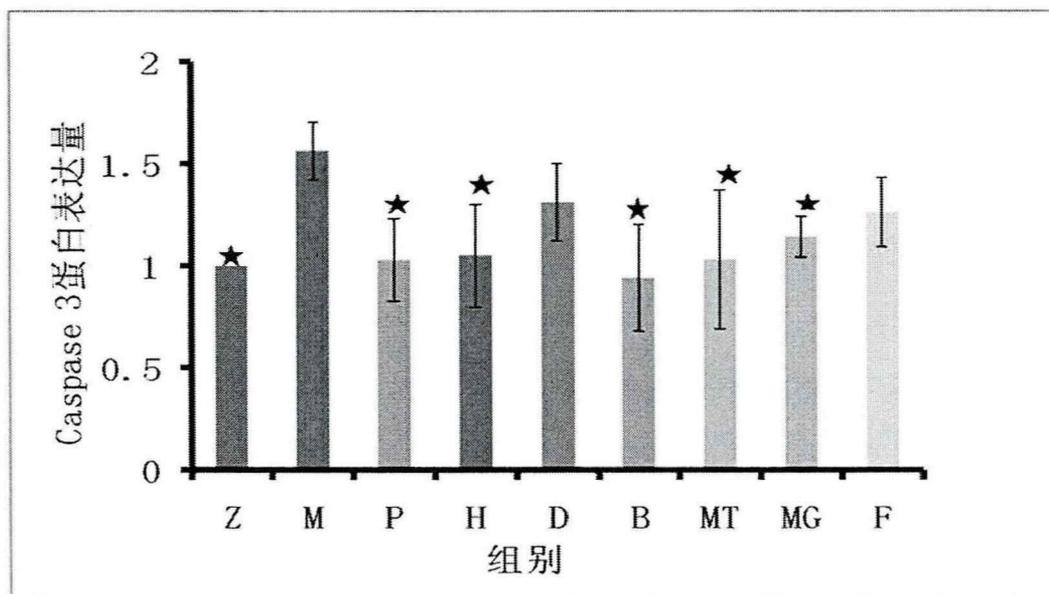


图 33 各组药物对蜕膜细胞损伤模型 Caspase 3 表达的影响 (48h)

注:Z:正常组; M:模型组; P:孕酮组; H:黄芪甲苷组; D:党参炔苷组; B:白术内酯 I 组; MT:毛蕊异黄酮组; MG:毛蕊异黄酮葡萄糖苷组; F:健脾组方组; ★与模型组比较  $P < 0.05$ ;

如图 33 所示:与模型组比较正常组、孕酮组、黄芪甲苷组、党参炔苷组、白术内酯 I 组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组、健脾组方组的 Caspase 3 的表达降低;其中正常组、孕酮组、黄芪甲苷组、白术内酯 I 组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组与模型组比较均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

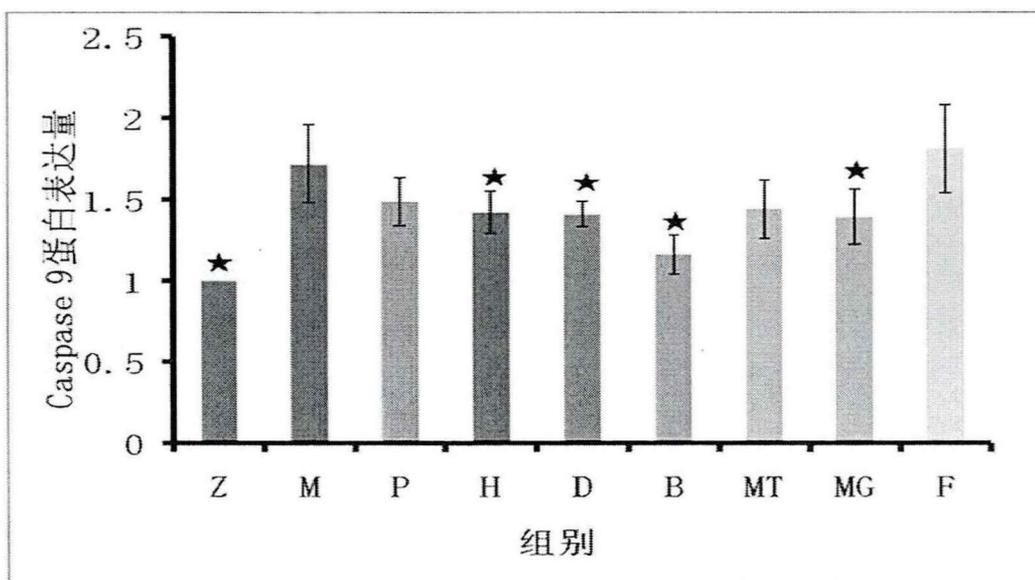


图 34 各组药物对蜕膜细胞损伤模型 Caspase 9 表达的影响 (48 h)

注:Z:正常组; M:模型组; P:孕酮组; H:黄芪甲苷组; D:党参炔苷组; B:白术内酯 I 组; MT:毛蕊异黄酮组; MG:毛蕊异黄酮葡萄糖苷组; F:健脾组方组; ★与模型组比较  $P < 0.05$ ;

如图 34 所示:与模型组比较正常组、孕酮组、黄芪甲苷组、党参炔苷组、白术内酯 I 组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组的 Caspase9 的表达降低;其中正常

组、黄芪甲苷组、党参炔苷组、白术内酯 I 组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组与模型组比较具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

#### 2.7.4 讨论:

胎孕的形成,主要在于先天之肾气;而长养胎儿,则在母体后天脾胃所生化之气血。因此,对于先兆流产的治疗,除应以滋肾补肾为主外,同时必须辅之以健脾而调理气血,使肾与脾,先天与后天相互支持,相互促进,以巩固胎元。对习惯性流产的治疗原则亦以补肾、健脾、补气、养血为主。

鉴于此,全国著名中医家罗元恺教授拟定了补肾健脾功效极佳的安胎成药助孕丸,从先天(肾)、后天(脾)两方面对先兆流产与习惯性流产进行诊治。助孕丸由补肾组方和健脾组方共同组成,与中医理论“肾主先天,脾主后天;肾主生殖,脾主营养。先天与后天相互支持,营养与生殖得以协调。”的中医理论相一致。前期导师的研究团队已对助孕丸补肾组方的安胎机制进行了深入的研究。本课题主要研究助孕丸健脾组方的安胎机理。助孕丸健脾组方由党参、黄芪、白术三味中药组成,具有健脾补气、安胎的功效。

党参味甘性平,不燥不腻,归脾、肺经。既擅补中气,又善益肺气,是临床上治疗脾肺气虚证最常用之品。气能生血,气旺津生,故又具有养血生津的功效。也可用于治疗血虚津亏之证。《本草正义》称其“力能补脾养胃,润肺生津,健运中气,本与人参不甚相远。其尤可贵者,则健脾运而不燥,滋胃阴而不湿,润肺不犯寒凉,养血而不偏滋腻,鼓舞清阳,振动中气,而无刚燥之弊。”

黄芪味甘性微温,归脾、肺经。具有补气升阳,益卫固表,利水消肿,托疮生肌的功效。既擅补益脾肺之气,有“补气之长”的美称,又善益升举阳气,常用于脾肺气虚诸证,而对脾阳不升,中气下陷,症见久泻脱肛、内脏下垂者尤为适宜。《本草纲目》“元素曰:黄芪甘温纯阳,其用有五:补诸虚不足,一也;益元气,二也;壮脾胃,三也;去肌热,四也;活血生血,内托阴疽,为疮家圣药,五也;”

白术甘温苦燥,入脾、胃经。功善补脾益气而燥湿,为健脾要药,适用于脾胃虚弱诸证。又有补气健脾而安胎之效,妊娠胎动不安,不论寒热虚实,均可用白术配相关药物治之。《本草汇言》:“白术,乃扶植脾胃,消食除痞之要药。脾虚不,术能补之;胃虚不纳,术能助之。”

由上可知,三者虽同有健脾益气之功效,但同中有异。《得配本草》:“肌表之气,补宜黄芪,五内之气,补宜人参”。党参健脾功效最佳,黄芪功偏于补肌表之气,白术燥湿而健脾。

而本实验部分将通过考察健脾组方中的党参、黄芪、白术中的代表性单体成分对蜕膜细胞损伤模型细胞的增殖率,早期凋亡率和凋亡蛋白的表达的影响来探讨各药物的作用机制。

#### 2.7.4.1 健脾组方中各单体成分细胞给药浓度的选择

本研究在选取健脾组方及各个单体的细胞给药浓度,是结合相关参考文献中各单体的细胞给药浓度并经欲试验摸索所得出的。预实验研究时以浓度梯度考察不同单体对细胞的作用发现各单体的药效并不与单体的药物浓度呈正比,有的单体在高浓度时表现出抑制蜕膜细胞损伤模型细胞的增殖、促进其凋亡的作用。结合本研究的目的故选取了不同药物的较适合的浓度进行研究。

#### 2.7.4.2 MTS 法检测各组药物对蜕膜细胞损伤模型增殖率的影响

MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]是一种新型的四唑化合物,可直接溶解于培养基中,孵育 1-4 小时,被细胞生物还原成为一种有色的甲臞产物,这种转化很可能是在代谢活跃的细胞中的脱氢酶产生的 NADPH 或 NADH 的作用下完成的。然后以酶标仪读取 490nm 的吸光度值<sup>[132-134]</sup>。米非司酮造模 24h 后,模型组比正常组增殖率明显下降 ( $P < 0.05$ ),表明应用  $60\mu\text{mol/L}$  的米非司酮溶液成功造模。米非司酮是临床上常用的终止早孕的药物,通过拮抗孕激素受体,诱导相关细胞凋亡,改变相关因子的表达发挥作用。孕激素组、黄芪甲苷组、党参炔苷组、毛蕊异黄酮组、健脾组方组作用 24h, 48h 与模型组比较其增殖率与模型组比较具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。表明以上 5 组在 48h 内对蜕膜细胞损伤模型都有促进增殖的作用;毛蕊异黄酮葡萄糖苷作用 24h 时与模型组比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),随药物作用时间的延续至 48h 与模型组比较具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),表明毛蕊异黄酮葡萄糖苷促进损伤模型的增殖与作用时间有相关性。白术内酯 I 组作用 24h, 48h 均无促进损伤模型增殖的作用。有文献<sup>[135]</sup>报道菟丝子总黄酮可通过增加卵巢 HCG/LH 受体数目并增强其功能,达到提高应激大鼠孕激素水平的目的。团队前期研究发现<sup>[136]</sup>助孕丸补肾组方中的黄酮类含药血清对蜕膜细胞损伤模型有促进增殖的作用。本研究也发现健脾组方中的黄酮类物质毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对蜕膜细胞损伤模型有促进增殖的作用。究其原因可能因为黄酮类物质具有的双酚环结构与孕激素结构极为相似,以至功能相近有关。党参具有补中益气,健脾益肺之功效,临床上常用于补益脾胃,实验研究发现党参对酒精所致的胃黏膜损伤有很好的保护作用,党参炔苷是党参保护胃黏膜的活性成分之一。本研究发现党参炔苷对蜕膜细胞损伤模型具有明显的促进增殖的作用,推断其在安胎方面应具有一定的疗效。有人研究黄芪中的黄芪甲苷对滋养细胞损伤模型有促进增殖的作用,本研究进一步证实黄芪甲苷对蜕膜细胞损伤模型也有促进增殖的作用。总体上讲不论是健脾组方复方成分还是其中的单体成分对蜕膜细胞损伤模型都有促进增殖的作用。

#### 2.7.4.3 AnnexinV-PI 法流式检测各组药物对蜕膜细胞损伤模型早期凋亡率的影响

应用 AnnexinV-PI 法流式检测结果表明应用  $60\mu\text{mol/L}$  的米非司酮所造的模型是

成功的。孕激素作用于损伤模型 24h 后, 损伤模型的早期凋亡增加, 48h 后与模型组无差异。有研究发现孕激素可诱导体外培养的蜕膜基质细胞的凋亡<sup>[137]</sup>, 推测孕酮对米非司酮诱导的蜕膜细胞损伤模型有诱导凋亡的作用。党参炔苷组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷组、复方组作用在 48h 内均可抑制模型的早期凋亡; 黄芪甲苷、白术内酯 I 在 24h 内有抑制模型凋亡的作用, 随着时间的延长至 48h 其抑制凋亡作用消失。

#### 2.7.4.4 Western Blot 法检测各药物组分对蜕膜细胞损伤模型凋亡蛋白表达的影响

Bcl-2 家族蛋白包括抗凋亡和促凋亡两类蛋白各十余种, 在细胞凋亡过程中发挥着关键作用。抗凋亡蛋白如 Bcl-2 是通过抑制细胞色素 c 及促凋亡因子的释放, 达到抑制凋亡的作用。促凋亡蛋白如 Bax 则通过发挥相反的作用达到促进细胞凋亡的作用。实际上细胞的凋亡与否受两类蛋白的共同作用: 抗凋亡蛋白 Bcl-2 阻碍由环境因素所造成的细胞凋亡; 而促凋亡蛋白 Bax 则与抗凋亡蛋白 Bcl-2 结合, 使解其凋亡抑制被解除, 开启细胞凋亡的过程。<sup>[138-139]</sup>从本实验 Bcl-2 的表达情况来看孕酮组、党参炔苷组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮葡萄糖苷在 24h 及 48h 与模型组比较 Bcl-2 的表达均有所增加, 从而对模型的凋亡起到抑制作用。黄芪甲苷组在 24h 时对模型 Bcl-2 的表达有促进的趋势, 但无统计学意义; 而在 48h 时其 Bcl-2 的表达增加与模型组比较具有统计学意义。白术内酯 I 组在 24h 时对模型 Bcl-2 的表达无作用, 而在 48h 时其 Bcl-2 的表达增加与模型组比较具有统计学意义。观测 Bax 的表达情况发现各组药物作用 24h、48h 后与模型组比较均降低了 Bax 表达。由此可推测出孕酮、健脾组方和健脾组方中成分抑制蜕膜细胞损伤模型的凋亡是通过促进抗凋亡蛋白的表达, 抑制促凋亡蛋白的表达来实现的。有学者<sup>[140]</sup>利用米非司酮进行子宫内膜间质细胞的造模研究, 发现米非司酮作用后子宫蜕膜间质细胞的凋亡率明显增加, 同时 Caspase-3、Caspase-9 等相关的凋亡基因及蛋白的表达升高, 而 VEGF 的基因蛋白水平下降。本研究发现黄芪甲苷组、白术内酯 I 组及毛蕊异黄酮组在 24h 和 48h 都有抑制 Caspase-3 表达的作用, 而孕激素及毛蕊异黄酮葡萄糖苷组则作用 48h 后才显示出该作用。从 Caspase-9 的表达情况看黄芪甲苷组、白术内酯 I 组及毛蕊异黄酮葡萄糖苷组不论在 24h 还是 48h 都表现出抑制 Caspase-9 表达的作用, 而孕酮组、毛蕊异黄酮组和健脾组方组在 24h 表现出抑制 Caspase-9 表达的作用至 48h 时该作用消失; 党参炔苷组在 24h 未抑制 Caspase-9 表达的作用, 48h 时抑制了 Caspase-9 的表达;

#### 2.7.5 小结

比较正常组与模型组蜕膜细胞的增殖活力、凋亡率及凋亡蛋白的表达情况均表明采用 60 $\mu$ mol/L 的米非司酮造模成功。健脾组方中的单体成分党参炔苷、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、芒柄花苷、白术内酯 I 及健脾组方、孕酮对蜕膜细胞损伤模型有不同程度的促进增殖, 抑制凋亡的作用。

## 结 语

本研究以导师带领的团队对助孕丸中补肾组方进行了中药指纹图谱、药效学及药代动力学研究为基础,从体外到体内再到细胞,对助孕丸中另一重要组成部分——健脾组方进行了物质基础分析,药代动力学研究及细胞损伤模型的功效学研究。形成了体外-体内-细胞一体化的探究模式,由此得出以下结论:

1.1 本研究建立了分析助孕丸健脾组方提取物药效物质基础的液质联用方法,并归属了主要色谱峰来源,为提高复方质控标准提供化学依据。并为黄酮类、皂苷类、内酯类、糖苷类等化合物的分析提供了质谱裂解规律的参考。

1.2 应用液质联用技术可快速、精确地测定中药党参及健脾组方中党参炔苷的含量。为中药党参药材的质量控制提供了保障。

1.3 建立了UPLC/Q-TOF-MS测定大鼠血浆中党参炔苷含量的方法。用于党参炔苷药代动力学的研究。经比较单体组、中药党参组及健脾组方组的药代动力学参数,发现党参及健脾组方中的物质有促进党参炔苷的吸收,提高党参炔苷的生物利用度,延长党参炔苷在体内停留时间等作用。

1.4 应用米非司酮(RU-486)建立了蜕膜细胞损伤模型并应用MTS法明确健脾组方中的党参炔苷、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、等对蜕膜细胞损伤模型具有促进增殖的作用。健脾组方总提取物、黄体酮亦有同样的促进增殖作用。应用流式细胞仪检测蜕膜损伤模型的早期凋亡率,Western Blot技术检测凋亡蛋白的表达情况初步明确健脾组方及其中的化学成分对蜕膜细胞损伤模型有不同程度的抑制早期凋亡率及凋亡蛋白表达的作用。从而推论其作用机制是通过促进损伤细胞增殖、抑制其凋亡实现的。

本文的创新之处在于:

2.1 首次应用UPLC/Q-TOF-MS<sup>E</sup>技术对健脾组方进行物质基础分析,并对主要色谱峰进行药材归属。表征了复方中的37个色谱峰,利用已知标准品鉴定了7个代表性化合物。

2.2 首次应用UPLC/Q-TOF-MS技术研究了党参炔苷的药代动力学,比较了党参炔苷以单体形式、中药党参形式、健脾组方形式的药代动力学差异,为组方配伍理论及助孕丸的临床合理应用提供参考依据;

2.3 观察了组方及其中的单体成分对蜕膜细胞损伤模型的作用,经观察细胞的增殖活力,早期凋亡率及凋亡蛋白的表达情况,明确健脾组方中的化学成分有促进损伤模型增殖,抑制其凋亡的作用。

论文虽取得了以上结果,但仍存在以下不足同时我们也提出了以后将要继续努力的方向:

3.1 中药复方成分复杂，而相应的标准品资源有限，因此复方中的大部分化合物是通过多级质谱的裂解信息、Masslynx软件提供的可能化合物组成结合相关文献信息对比推断得知的。由于个人能力有限未能解析检测到的全部化合物，后续还可深入研究。

3.2 论文第五部分经细胞学验证党参炔苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷等单体成分对蜕膜细胞损伤模型有促进增殖、抑制凋亡的作用，但本研究仅以党参炔苷单体为代表研究其体内的药代动力学过程，今后可对其他单体进行药代动力学的研究，能更全面地反映健脾组方的体内药代动力学过程，为临床合理用药提供良好的参考依据。

3.3 本研究仅选取了各单味中药中具有代表性的单体成分考察对蜕膜细胞损伤模型的影响，未探讨其他黄酮类物质如芒柄花素，芒柄花苷，内酯类物质等对蜕膜细胞损伤模型的作用。后续可继续研究这些成分对损伤模型的影响，还可将不同的成分按不同的比例进行组合筛选出最优配比。

3.4 在考察健脾组方中的成分对蜕膜细胞损伤模型的作用时，仅选取了24h和48h两个时间点，在今后的实验中可加入更多地检测时间点进行观测。

3.5 本实验初步筛选出健脾组方中对蜕膜细胞损伤模型的有作用的成分，对其作用机理也仅从增殖活力、细胞早期凋亡率及几种与凋亡密切相关的蛋白的表达来分析，今后可选择多条通路上的多个蛋白进行检测，也可利用RT-PCR技术从基因水平上进一步明确各个成分的作用机理。

## 参考文献

- [1]丁峰,傅国强,邢福祺.早孕期蜕膜组织细胞凋亡异常对妊娠的影响[J].第一军医大学学报,2002,22(2):145-147.
- [2]罗颂平.肾主生殖的中医理论探讨与补肾法防治肾虚生殖障碍的机理研究[D].博士学位论文.广州中医药大学.2005.
- [3]曹蕾,罗颂平,欧汝强.“助孕丸”对肾虚-内膜抑制大鼠妊娠结局的影响[J].检验医学与临床,2014,11(20):2818-2819.
- [4]罗颂平,张玉珍,梁国珍,等.自然流产的免疫性因素与中医药治疗[J].中国医药学报,1996,11(4):27-30.
- [5]赵颖,张玉珍.助孕3号丸治疗脾肾虚证胎漏、胎动不安、滑胎疗效观察[J].新中医,1999,31(2):20-21.
- [6]刘昱磊.助孕3号方治疗自然流产的实验研究和临床观察[D].博士学位论文.广州中医药大学,2001.
- [7]周英,罗颂平,许丽绵.助孕3号方对肾虚黄体抑制流产大鼠母胎界面Th1/Th2细胞因子的影响研究[J].现代中西医结合杂志,2008,17(1):12-14.
- [8]曹蕾.助孕丸对RSA内膜容受性及其免疫环境干预作用的机理研究[D].博士学位论文.广州中医药大学,2010.
- [9]李小球.肾健脾中药对妊娠大鼠孕激素及其受体的影响[J].广州中医药大学学报,1998,15(1):208-210.
- [10]宁艳,罗颂平,梁国珍.补肾健脾中药复方对肾虚黄体抑制妊娠大鼠流产模型的实验研究[J].中国医药学报,2000,15(6):28-30.
- [11]张铭,梁国珍,罗颂平.助孕3号方对脾虚黄体抑制动物流产模型的作用[J].广州中医药大学学报,2000,17(1):64-68.
- [12]陈伟仁.“助孕3号方”对先兆性流产模型大鼠子宫兴奋性影响[D].博士学位论文.广州中医药大学,2005.
- [13]曹蕾,罗颂平,欧汝强.补肾健脾中药复方对肾虚模型大鼠子宫内膜容受性的影响[J].中华中医药杂志.2011,26(5):1057-1061.
- [14]刘明珠,许丽绵.助孕3号方对肾虚黄体抑制流产孕鼠T淋巴细胞亚群、Fas/FasL表达干预的研究[C].全国中医妇科第七次学术研讨会论文汇编,南京,2007:210-215.
- [15]周英.肾虚自然流产蜕膜Th1/Th2表达及助孕丸对流产大鼠TCR $\gamma$  $\delta$ T和细胞因子调控的研究[D].博士学位论文.广州中医药大学,2006.
- [16]赵红艳.肾虚自然流产蜕膜黄体效应、TGF- $\beta$ 1表达及补肾中药对流产大鼠干预的研究[D].博士学位论文.广州中医药大学.2006.
- [17]郑文欣,雷华平,葛发欢.超临界CO<sub>2</sub>萃取改进助孕3号丸提取工艺及药效学评价[J].中药材,2005,28(4):334-337.
- [18]许慧珍.从正交拆方及化学特征谱追踪助孕丸物质基础的研究[D].博士学位论文.广州中医药大学,2007.

- [19]岳明明,罗颂平,谭字蕙.补肾中药对肾虚黄体抑制流产大鼠的实验研究[J].中医药学报,2005,37(1):47-49.
- [20]赵颖.拟除虫菊酯生殖和神经毒性及补肾健脾中药干预作用的研究[D]. 博士论文. 广州中医药大学,2005.
- [21]李莹,朱颖.加味寿胎丸治疗青春期功能失调性子宫出血 32 例[J].河南中医,2014,34(6):1152.
- [22]黄华清,谈勇,邹奕洁,等.寿胎丸对辅助生殖刺激周期助孕作用的临床研究[J].中国妇幼保健,2014,29(21):3483-3486.
- [23]周从容.寿胎丸加味配合克罗米芬干预肾虚型黄体功能不全性不孕的临床观察[J].中国临床医生,2014,42(5):45-47.
- [24]高倩倩.寿胎丸加味配合主动免疫治疗反复自然流产的临床研究[J].中医临床研究,2014,6(20):42-44.
- [25]韩永梅.寿胎丸治疗先兆流产临床研究[J].中医学报,2013,28(7):1025-1026.
- [26]郜洁,罗颂平.寿胎丸治疗先兆流产临床观察[J].新中医,2011,44(8):81-83.
- [27]曹越,罗颂平,苏薇薇.寿胎丸质量标准研究[J].新中医,2012,44(8):164-166.
- [28]刘秀明,罗颂平,冯婷,等.正交试验优选减味寿胎丸总黄酮提取工艺[J].江西中医药,2014,45(7):72-74.
- [29]夏建秋.中药复方寿胎丸中化学组分的研究[D]. 硕士论文. 广州中医药大学,2013.
- [30]刘丹卓,尤昭玲,赵新广.寿胎丸对 SD 孕鼠胚胎-胎仔发育毒性的研究[J].时珍国医国药,2009,20(12):2919-2920.
- [31]郜洁.寿胎丸的药物组成及其补肾安胎的药效学研究[D]. 博士论文. 广州中医药大学,2009.
- [32]唐丽丽,罗颂平.寿胎丸抗大鼠同种异体卵巢移植模型急性排斥反应的研究[J].中华中医药学刊,2009,27(10):2098-2101.
- [33]何冬梅,尤昭玲,雷磊,等.寿胎丸对反复自然流产小鼠母胎界面 SOCS1 和 SOCS3 蛋白表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2009,(1):2926-28
- [34]中华人民共和国药典委员会.中国药典 2010 年版一部[S].中国医药科技出版社,2010.
- [35]李香华,王洪新,王秋宁.黄芪甲苷对高糖诱导的乳大鼠心肌肥大的保护作用[J].中国动脉硬化杂志,2010,18(11):845-848.
- [36]熊平,蒋灵芝,廖秀清.黄芪甲苷保护大鼠肺缺血再灌注肺损伤的形态学研究[J].南方医科大学学报,2010,30(8):1864-1868.
- [37]Liu H, Wei W, Sun WY, et al. Protective effects of astragaloside IV on porcine serum-induced hepatic fibrosis in rats and in vitro effects on hepatic stellate cells [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 122(3):502.
- [38]徐维佳,牟姗,王琴,等.黄芪甲苷对高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤的保护作用[J].中国中西医结合肾病杂志,2012,13(9):765.
- [39]Qu YZ, Min L, Yan LZ, et al. Astragaloside IV attenuates cerebral ischemia-reperfusion-induced increase in permeability of the blood-brain barrier in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 606(1-3):137.

- [40]刘维统,王跃,郝鹏,等.黄芪甲苷对关节软骨细胞功能影响的实验研究[J].实用医院临床杂志,2009,6(4):44-47.
- [41]王曦.黄芪甲苷对人皮肤成纤维细胞增殖和凋亡的影响[J].中华医学美容美容杂志,2006,12(2):93-96.
- [42]闫宁,陈斌,李然,等.黄芪甲苷对紫外线诱导皮肤成纤维细胞表达 TGF $\beta$  R II 与 Smad7 的影响[J].中国美容医学,2011,20(2):225.
- [43]黄海涛,梁单,金昱.黄芪甲苷拮抗过氧化氢引起的小鼠成骨细胞凋亡作用[J].延边大学医学学报,2012,35(2):86.
- [44]汪德清,田亚平,向兰.黄芪总黄酮生物学活性作用的化学成分基础研究[J].军医进修学院学报,2006,27(1):13-15.
- [45]YU D H, BAO Y M, A N L J, et al. Protection of PC12 cells against superoxide -induced damage by isoflavonoids from Astragalus mongholicus [J]. Biomed Environ Sci, 2009, 22(1): 50-54.
- [46]匡文娟,刘立涛,谭显曙,等.毛蕊异黄酮对人乳腺癌 MCF-7 细胞作用的体外研究[J].肿瘤,2011,31(9):789-792.
- [47]唐菁燕,胡光,许贝文,等.毛蕊异黄酮通过雌激素受体促进内皮细胞增殖[J].中药药理与临床,2009,25(6):14-17.
- [48]窦辉.黄芪注射液的化学成分[J].天然产物研究与开发,2002,14(6):
- [49]袁惠霞,刘霞.黄芪注射液与胎儿安方治疗复发性流产临床观察[J].实用中西医结合临床,2010,10(6):13-17.
- [50]冯婷,刘秀明,方家.黄芪注射液对米非司酮诱导滋养细胞凋亡的影响[J].广州中医药大学学报,2014,3(14):612-616.
- [51]宋丹,王峥涛,李隆云,等.党参炔苷对胃溃疡模型大鼠胃黏膜损伤保护作用的研究[J].中国中医急症,2008,17(7):963-964.
- [52]李家实.中药鉴定学[M].上海:上海科学技术出版社,1998:201.
- [53]宿廷敏.白术的化学成分及药理作用研究概述[J].贵阳学院学报,2008,3(2):32-35.
- [54]先宁霞.自拟安胎汤治疗习惯性流产 162 例[J].甘肃中医,2008,21(4):36.
- [55]林振.先兆流产的中医证治及用药规律的文献研究[D].硕士学位论文.黑龙江中医药大学,2010.
- [56]张小花.《金匱要略》之白术散对先兆流产模型大鼠血清孕酮、 $\beta$ -hCG 水平的影响[J].中医研究,2014,27(8):72-74.
- [57]B I H, Hoffman KL, Pace G. et al. Mixed-mechanism ionization to enhance sensitivity in atmospheric pressure ionization LC/MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2000, 22(5):861.
- [58]Tyler AN, Clayton E, Green BN. Exact mass measurement of polar organic molecules at low resolution using electrospray ionization and a quadrupole mass spectrometer [J]. Anal Chem, 1996, 68(20):3561-3569.
- [59]明继阳,陆园园,罗建光,等.HPLC-MS<sup>n</sup>法分析知母中的皂苷类成分[J].中国药科大学学

报, 2009, 40(5):400-405.

[60] 蒋叶娟, 姚卫峰, 张丽. 女贞子化学成分的UPLC-ESI-Q-TOF-MS分析[J]. 中国中医药杂志, 2012, 37(15):2304-2308.

[61] 孙慧, 朱超, 章弘扬, 等. 大黄及其炮制品的液质联用分析及物质基础比较[J]. 中成药, 2009, 31(3):420-424.

[62] 孙健, 张立富, 范斌, 等. 柴胡皂苷类化学成分的LC-MS分析[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(12):725-727.

[63] 陈晓鹏, 张兰兰, 周水平, 等. 多维液质联用系统分析养血清脑颗粒化学成分[J], 中成药, 2013, 35(7):1499-1504.

[64] 李文兰, 代岐昌, 季宇彬, 等. HPLC-ESI/MS 分析八珍汤化学成分及来源[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(21):1622-1626.

[65] Zhou Wei, Su, Shu-Lan Duan, Jin-Ao, Characterization of the Active constituents in Shixiao San Using Bioactivity Evaluation Followed by UPLC-Q-TOF and Markerlynx Analysis. MOLECULES 15(9):6217-6230.

[66] HPLC/Q-TOF-MS oriented characteristic components data set and chemometric analysis for the holistic quality control of complex TCM preparations: Niu Huang Shangqing pill as an example. Wang DD, Liang J, Yang WZ, Hou JJ, J Pharm Biomed Anal, 2014, Feb(89):130-141.

[67] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药, 2000, 22(10):671-675.

[68] 王薇丹, 叶正良, 宋丽丽等. 五味子液相色谱指纹图谱的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(21):2871-2873.

[69] Luo Jiun-Lung, Lu Fen-Ling, et al. Identification of Scutellaria Baicalensis in Traditional Chinese Medicine Preparations by LC/MS/MS Fingerprinting Method[J]. Journal of food and drug analysis, 2012, 20(4):887-899.

[70] 蔡华, 叶方, 杨光义, 等. 鄂西北地区竹叶柴胡 UPLC-MS 指纹图谱研究[J]. 中国药师, 2014, 17(5):797-800.

[71] 夏菁, 谢媛媛, 张宗璇. 骨通贴膏指纹图谱及化学成分研究[J]. 中成药, 2014, 36(3):572-576.

[72] 乔怀耀, 罗荣, 吴娟. 朱文滴舒肝解郁胶囊的 UPLC-MS 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2014, 45(2):208-213.

[73] 安福丽, 张仲, 陈贵银, 等. 不同产地葫芦巴醇溶性化学成分的高效液相色谱-电喷雾质谱分析[J]. 临床合理用药, 2005, 3(10):42-45.

[74] Liu CX. The difficulty and hot-points on pharmacokinetic research of traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2005, 40:395-401.

[75] 李跃辉, 杨永华. 中药药代动力学研究方法进展[J]. 湖南中医志, 2004, 20(2):66.

- [76] 吴晓霞, 彭娟, 范斌, 等. 黄连解毒汤三种生物碱在糖尿病大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 3(10): 1276-1280.
- [77] 丁建刚, 高允生, 刘江林, 等. HPLC-MS/MS 法测定比格犬血浆中丹参酮 IIA 的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(5): 769-772.
- [78] Li XH, Xiong ZL, Lu S, et al. Pharmacokinetics of Naringin and its Metabolite Naringenin in Rats after Oral Administration of Rhizoma Drynariae Extract Assayed by UPLC-MS/MS [J]. S. Chin J Nat Med, 2010, 8(1): 40-46.
- [79] 陈宁, 张琪, 杜宇. 黄芪甲苷在大鼠体内的药代动力学和组织分布研究[J]. 生物加工过程, 2006, 4(3): 67-72.
- [80] Yujuan Li, Yushi Zhang, Zhimin Wang, Quantitative analysis of atractylenolid I in rat plasma by LC-MS/MS method and its application to pharmacokinetic study[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, (58): 172-176.
- [81] Xiao-hua Liu, Jian-bang Zhao, Long Guo, et. Simultaneous Determination of Calycosin-7-O- $\beta$ -D-Glucoside, Ononin, Calycosin, Formononetin, Astragaloside IV, And Astragaloside II in Rat Plasma After Oral Administration of Radix Astragali Extraction for Their Pharmacokinetic Studies by Ultra Pressure Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. Cell Biochem Biophys, 2014, 70: 677-686.
- [82] Meiling Hou, Liwen Chang, Chihung Lin, etc. Determination of Bioactive Components in Chinese Herbal Formulae and Pharmacokinetics of Rhein in Rats by UPLC-MS/MS, Molecules 2014, 19, 4058-4075.
- [83] Zhang Y, Yuan J, Wang Y, Wang Y, An R, Wang X. LC-MS/MS determination and pharmacokinetics study of puerarin and daidzein in rat plasma after oral administration of Gegenqinlian decoction and Radix Puerariae extract. Pharmacogn Mag. 2014, 10(39): 241-8.
- [84] 何忠梅, 王晓慧, 等. 靶向亲和-液质联用技术对人参茎叶总皂苷中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的快速筛选[J]. 分析化学, 2013, 41(11): 1694-1698.
- [85] Xue Ying, Liang Jianying. Screening of bioactive compounds in Rhizoma Polygoni Cuspidati with hepatocyte membranes by HPLC and LC-MS[J]. Journal of separation science, 2014, 37(3): 250-256.
- [86] 王喜军, 张宁, 孙晖等. 六味地黄丸的血清药物化学研究[J]. 中国天然药物. 2004, 2(4): 219-222.
- [87] 杨奎, 蒲旭峰. 中药血清药化学与中药血清药理学协同研究方法初探[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(4): 41-44.
- [88] Huang YX, Liu EW, Wang L, LC/MS/MS determination and pharmacokinetic studies of six compounds in rat plasma following oral administration of the single and combined extracts of Eucommia ulmoides and Dipsacus asperoides[J]. Chin J Nat Med, 2014 Jun, 12(6): 469-76.

- [89] Shen LI, Cong WJ, Lin X, Hong YL, Characterization using LC/MS of the absorption compounds and metabolites in rat plasma after oral administration of a single or mixed decoction of Shaoyao and Gancao.
- [90] 孙健, 孙明杰, 范斌, 等. 基于质谱分析的苦参血清药物化学研究[J]. 世界科学技术, 2010, 12(4): 647-651.
- [91] 刘学伟, 刘爽, 黄树明, 等. 抗老年性痴呆复方开心散有效提取物血清药物化学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(6): 179-183.
- [92] Kokawak, Shikone T. Apoptosis in human chorionic villi and deciduas during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester [J], Placenta, 1998, 19(1): 21-26.
- [93] Dai D, Moulton BC, Ogle TF, et al. Regression of the decidullized mesometrium and Decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of Bcl-2 family Memebers. [J] BiolReprod, 2000. 63(1): 188-195.
- [94] Lea RG, al-Sharekh N, Tuppala M, et al. The immunolocalization of Bcl-2 at the maternal-fetal interface in healthy and failing pregnancies [J], Hum Reprod, 1997, 12(1): 153 -158.
- [95] 彭黎明, 王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 9-14.
- [96] Okada H, Mak TW. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. Nat Rev Cancer 2004; 4(8): 592-603.
- [97] Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission H7N7 avian in fluenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands [J]. Lancet, 2004, 363(9409): 587-593.
- [98] Stephenson L, Nicholson KG, Wood JM, et al. Confronting the avian influenza at teat vaccine development for a potential pandemic [J]. Lancet Infect Dis. 2004 (8): 499-509.
- [99] Scatena R, Bottoni P, Botta G, et al. The role of mitochondria in pharmacotoxicology: a reevaluation of an old, newly emerging topic [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, (293): C12-21.
- [100] Hacker G, Paschen SA. Therapeutic targets in the mitochondrial apoptotic pathway [J]. Expert Opin Ther Targets, 2007, (11): 515-526.
- [101] Cryns V, Yuan J. Protease to die for [J]. Genes Dev, 1998, 12(11): 1551-1570.
- [102] 李拴明, 赵富玺, 刘润花. 流产鼠 Caspase-3 与 laminin B 和 PAI-1 的表达及对妊娠结局的影响. 实验与基础研究 2007(28): 3993-96.
- [103] Choi HK, Choi bc, Lee SH, et al. Expression of angiogenesis-and-apoptosis related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients [J]. Mol Reprod Dev, 2003, 66(1): 24-31.
- [104] Lea RG, al-Sharekh N, Tulppala M, et al. The immunolozation of bcl-2 at the maternal-fetal interface in healthy and failing pregnancies [J]. Hum REPROD, 1997, 12(1): 153-8.

- [105]丁峰,傅国强,邢福祺.自然流产中的早孕期蜕膜细胞 Bcl-2/Bax 比例异常[J].基础医学与临床,2002,22(4):363-367.
- [106]郭玉萍,张静,袁瑞.自然流产病例的绒毛与蜕膜细胞增殖和细胞凋亡的研究[J].第三军医大学学报 2002,24(2):216-219.
- [107]张列转,米亚英.自然流产模型小鼠蜕膜细胞凋亡及相关基因的表达[J].免疫学杂志,2007,23(5):521-527.
- [108]彭梅,丁依玲.复发性流产患者子宫蜕膜细胞凋亡蛋白 Fas、抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达的相关性研究[J].中国妇幼保健,2008(23):542-544.
- [109]Cobellis L1, De Falco M, Torella M, Trabucco E, Mod lation of Bax expression in physiological and pathological human placentas throughout pregnancy. In Vivo, 2007, Sep-Oct;21(5):777-83.
- [110]Ejima K, Koji T, Tsuruta D, Nanri H, Kashimura M, Ikeda M. Induction of apoptosis in placentas of pregnant mice exposed to lipopolysacc harides: possible involvement of Fas/Fas ligand system [J]. Biol Reprod, 2000, 62(1):178 -185.
- [111]李云霞.黄芩苷、槲皮素对 LPS 致小鼠蜕膜细胞损伤的保护作用[D]. 硕士论文. 河北农业大学, 2012.
- [112]秦明春,王若光,李春梅.基于激光解析/离子化-飞行时间质谱技术的中药阿胶蛋白质组分析[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(19)3793- 3796.
- [113]杨业洲,曹泽毅,韩宇研,等.米非司酮对人早孕绒毛细胞增殖和凋亡的影响[J].中华妇产科杂志,1998,33(5):268-70.
- [114]Murphy AA, Zhou MH, Malkapuram S. RU-486-induced growth inhibition of human endometrial cells [J]. Fertil Steril, 2000, 74(5):1014-9.
- [115]Dai D, Moulton BC, Ogle TF. Regression of the decidualized mesometrium and decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of bcl-2 family members[J]. Biol Reprod, 2000, 63(1):188-195.
- [116]Ghosh D, De P, Sengupta J, et al. Effect of RU 468 on the endometrial response to deciduogenic st imulus in ovariectomized rhesus monkeys treated with oest rogen and progesterone [J]. Hum Reprod, 1992, 7(8):1048-1060.
- [117]刘颖,冯霞.米非司酮促进早孕绒毛及蜕膜细胞凋亡的研究[J].徐州医学院学报,2001,21(3):218-220.
- [118]施晓华,钱小泉,张品南,等.米非司酮药物流产后绒毛蜕膜细胞凋亡的相关研究[J].生殖与避孕,2014,34(6):506-510.
- [119]丁峰,傅国强,邢福祺,等.米非司酮对人早孕期蜕膜细胞凋亡及其调控基因bcl- 2/bax 的影响[J].现代妇产科进展,2002,11(1):36-38.
- [120] LiL, Luo GA, Liang QL, et al. Rapid qualitative and quantitative analyses of Asian ginseng in adulterated American ginseng preparations by UPLC/Q-TOF-MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52:66-72.
- [121]Ma ZC, Zhou SS, Liang QD, et al. UPLC-TOF/MS based chemical profiling approach to evaluate toxicity-attenuated chemical composition in combination of ginseng and Radix Aconiti Praeparata [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2011, 46:1488-1492.

- [122]覃红萍,鲁静,林瑞超,等.黄芪中异黄酮类成分的研究[J].药物分析杂志,2009,29(5):746.
- [123]邱勇波,刘锦,武飞.黄芪化学成分及药理作用研究进展[J].中国疗养医学,2011,20(5):435-436.
- [124]孙洁,张蕾,张晓拢,等.蒙古黄芪的化学成分研究[J].现代药物与临床,2013,28(5),138-143.
- [125]马晓丰,田晓明,陈英杰,等.蒙古黄芪中黄酮类成分的研究[J].中草药,2005,36(9):1293.
- [126]卞云云,管佳,毕志明,等.蒙古黄芪的化学成分研究[J].中国药学杂志,2006,41(16):1217.
- [127]李瑾,蒋建勤.蒙古黄芪化学成分研究[J].今日药学,2010,20(11):32.
- [128]张艺轩.基于液质联用技术的温络方药效物质基础研究[D]北京协和医学院研究生院,2011.
- [129]Rui S,Hai MW,Jian HZ, et al.Recombinant human prolactin improve antitumor effects of murine natural killer cells invitro and ivivo[J].Neuro immunomodulation,2002.2.2003,10:169-176.
- [130]Peeva E,Michae E,Cleary J, et al.Prolactin modulates the naive B cell repertoire[J].J Clin Invest,2003,111:275-283.
- [131]Tan J,Raja S,Davis MK, et al.Evidence for coordinate interaction of cyclin D3 with p21 and CDK6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation[J].MechDev,2002,111(122):99-113.
- [132]Berridge,M.V.and Tan,A.S.(1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT):Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Arch. Biochem. Biophys. 303,474-82.
- [133]Cory,A.H. et al.(1991)Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer Commun. 3,207-12.
- [134]Riss,T.L.and Moravec,R.A.(1992) Comparison of MTT,XTT, and a novel tetrazolium compound for MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. Mol. Biol. Cell(Suppl.)3,184a.
- [135]蒋立辉,归绥琪.中药对溴隐亭致流产大鼠Th2/Th1细胞因子的影响[J].浙江中西医结合杂志,2003,13(3):155-157.
- [136]刘秀明.减味寿胎丸提取工艺及其有效成分的药动学和血清药理学研究[D].博士论文.广州中医药大学,2014.
- [137]魏艳秋.雌、孕激素对人早孕蜕膜基质细胞中BAFFR和Bcl-2/Bax表达的影响[D].硕士论文.山东大学,2009.
- [138]李军,王国荣,张秀琴,等.二苯乙烯苷对同型半胱氨酸诱导血管内皮细胞凋亡及bcl-2、bax、caspase-3表达的影响[J].中国病理生理杂志,2013,29(4):743-747.
- [139]Harris MH, hompson CB.The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability [J].Cell Death Differentiation, 2000,7(12):1182-1191.
- [140]Yang XQ,Zhang YQ, et al.Establishment of damaged endometrial stromal cells model in vitro[J]. Zhong Hua Fu Chan Ke Za Zhi, 2012,47(4):270-80.

## 附 录

## 附录 1: 中英文对照缩写词

缩略语	英文全称	中文全称
AICD	Activation-induced cell death	活化诱导的细胞死亡
$\beta$ -HCG	Human Chorionic Gonadotropin	人绒毛膜促性腺激素
$\beta$ -EP	Beta-Endorphin	$\beta$ -内啡肽
DMSO	Dimethylsulfoxide	二甲基亚砜
DSC	Decidual stromal cells	蜕膜基质细胞
E <sub>2</sub>	Estradiol	雌二醇
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高效液相色谱法
LIF	Leukemia inhibitory factor	白血病抑制因子
LLOQ	The lower limit of quantification	最低定量限
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
P	Progesterone	孕酮
PK	Pharmacokinetics	药代动力学
PR	Progesterone Receptor	孕激素受体
RU-486	Mifepristone	米非司酮
RSA	Recurrent spontaneous abortion	复发性流产
SA	Spontaneous abortion	自然流产
SPE	Solide phase extraction	固相萃取小柱
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor- $\beta$ 1	转化生长因子- $\beta$ 1
UPLC/Q-TOF-MS	Ultra high performance liquid chromatography with tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer coupled techniques	超高效液相色谱与串联四极杆飞行时间质谱仪联用技术

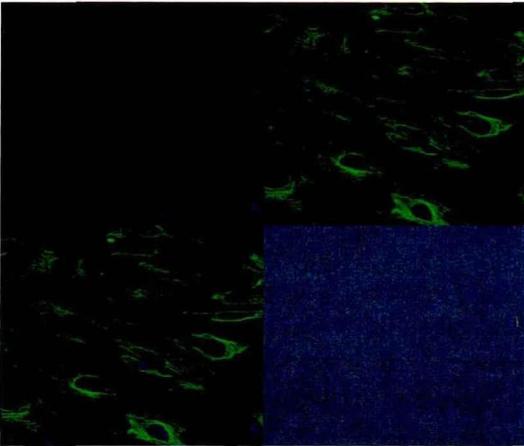
附录2: 实验图片



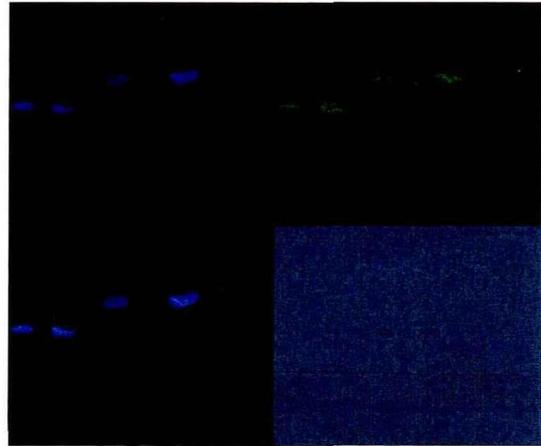
附图1原代培养第5日 (×100)



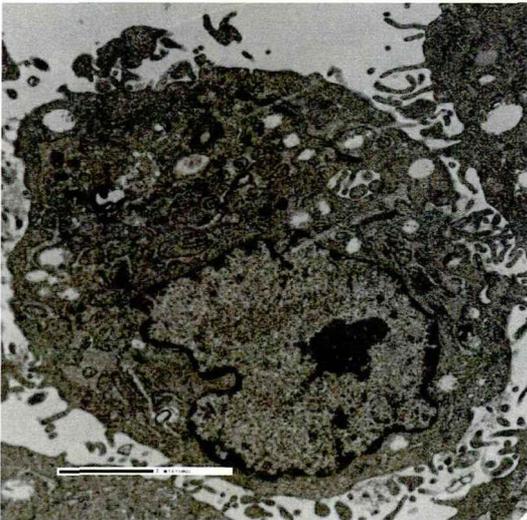
附图2 蜕膜细胞传代前 (×100)



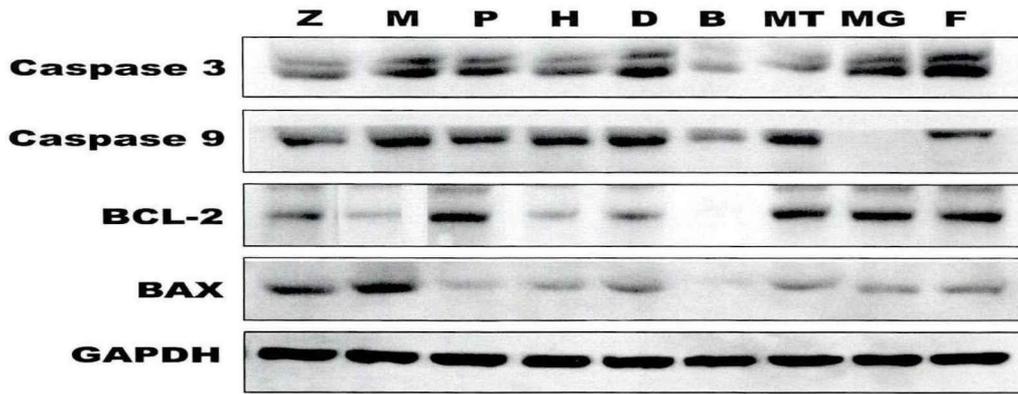
附图3 免疫荧光 vimentin 阳性 (×100)  
免疫荧光 CK7 阴性 (×100)



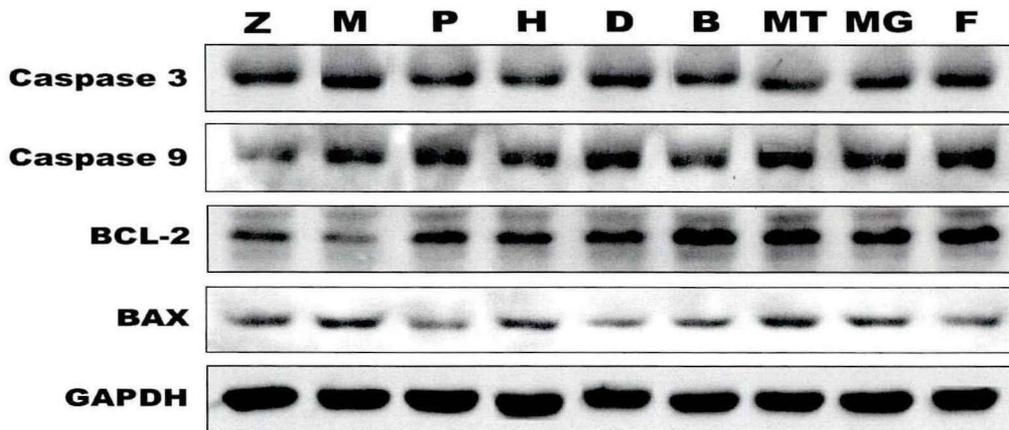
附图4 免疫荧光 PRL 阳性 (×100)



附图5 蜕膜细胞透射电镜图



附图 6 各组药物对蜕膜细胞损伤模型的影响 (24h)



附图 7 各组药物对蜕膜细胞损伤模型的影响 (48h)

## 在读期间发表论文

- [1] 陈静静, 倪张俊, 李亚迪. 罗颂平教授中药辅助 IVF-ET 临床思路与成功案例赏析, 新中医, 2015. 47 (4) .
- [2] 刘秀明, 罗颂平, 冯婷, 方家, 陈静静. 正交试验优选减味寿胎丸总黄酮的回流提取工艺, 江西中医药, 2014. 18 (8) .
- [3] 倪张俊, 管雁丞, 罗颂平, 赵颖, 郜洁, 李婧, 张宸铭, 冯婷, 刘秀明, 高飞霞, 陈静静. 雷公藤多甙致类风湿性关节炎炎症大鼠药源性卵巢耗损模型建立与评价, 中华中医药杂志, 2015. 30 (2) .

## 致 谢

我很庆幸来到广州，来到广州中医药大学。此生能够进入罗老师的门下，成为老师的学生，是我这辈子最自豪最明智的选择。从老师这里不仅领略到了中医的神奇与奥秘，端正了我的人生态度更提高了对生活的品味。老师的平和、优雅、博爱、谦逊与青春活力每一点都那么闪耀像夜空中璀璨的繁星照亮我前进的道路。与智者同行，你会觉得自己也会高尚起来。衷心地感谢老师一直以来对我的关爱与包容，使自己的内心逐渐地强大，可以独自去面对人生的各种“疑难杂症”。“一日为师终生为母”不论我以后走到哪里，我都会时刻铭记自己是老师的学生！仰之弥高，钻之弥坚！

衷心感谢欧汝强教授、黄可儿教授、赵颖教授、袁青教授、曾蕾副教授对本课题提出的宝贵的意见与建议！

衷心感谢倪张俊师兄、朱玲老师、郜洁老师、李婧老师、曹蕾老师、刘秀明师姐、方家师姐、冯婷师姐、张宸铭师兄对我的鼓励与支持！

衷心感谢一直陪伴着我的李亚迪、谢津津、高飞霞、巫海旺、杨利林、刘方、李佩琼、彭晋婷、蔡逸苗、郝晓丽等同门！

衷心感谢刘海滨博士、付季军博士、吕明亮硕士在实验第一部分给与的建议！

衷心感谢药理所的黄小桃老师、陈浩博士、闵建斌硕士、吕渭升硕士在药代动力学部分给与的帮助与支持！

衷心感谢广州中医药大学第一附属医院的许丽绵老师，宗利丽老师，李淑云老师等在我临床轮科时给予我的指导与帮助！

衷心感谢我的母校广州中医药大学！

衷心感谢非医攻博这个专业！

衷心感谢我所有的好朋友！

衷心感谢舅舅，舅妈和一博带给我的快乐与喜悦！

衷心感谢父母，爷爷奶奶地理解、鼓励与支持！

再次衷心感谢大家给与我的爱，那是我不断前进的源泉与动力！我也会将自己的爱回馈给更多人！