

不同炮制程度地黄对小鼠卵巢的影响及其寒热药性相关成分分析

阙晓慧, 桂蜀华*, 钟清元, 于兵兵, 林 好
(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 考察不同炮制程度地黄对小鼠卵巢的影响, 并分析其寒热药性相关成分。 **方法** 小鼠随机分为空白组、生地组、一晒熟地组、九晒熟地组、妈富隆组, 灌胃给予 4.5 g/kg 蒸馏水、不同炮制程度地黄、12.2 mg/kg 妈富隆 30 d, 阴道涂片观察小鼠动情周期, HE 染色观察卵泡形态并计数, IHC 法比较各组 FSHR 表达。HPLC 法建立地黄指纹图谱, 多元统计法分析其寒热药性相关成分。 **结果** 与空白组、九晒组比较, 生地组小鼠动情周期延长; 九晒组小鼠闭锁卵泡较生地组减少, 九晒组小鼠窦前卵泡较空白组增加, 九晒组小鼠窦状卵泡较空白组、生地组增加; 九晒组小鼠卵巢 FSHR 表达水平较空白、生地、一晒熟地组升高。九晒熟地与生地、一晒熟地存在成分差异, 1~4、6 号峰 VIP 得分>1, 1~4 号峰峰面积随炮制增加, 6 号峰随炮制减少, 其中 1 号峰为 5-HMF。 **结论** 九晒熟地性温, 能促进小鼠卵泡发育, FSHR 可能为其靶点, 5-HMF 可能为其潜在温性成分。

关键词: 地黄; 炮制; 卵巢; 寒热药性相关成分; FSHR; 多元统计分析

中图分类号: R283 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)11-3222-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.11.056

生地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥根, 熟地黄为生地炮制而来。古籍记载熟地以“色黑如漆”的九蒸九晒熟地(下文称九晒熟地)入药为佳^[1], 现今熟地多采用一次性炮制, 包括一次性蒸烘炮制(下文称一烘熟地)和一次性蒸晒炮制(下文称一晒熟地)。中医认为肾主生殖, 卵子为生殖之精, 熟地传统功效为补肾填精^[2], 课题组前期证明九晒熟地与一烘熟地对卵巢排卵的影响不同, 提示地黄未炮制透则会影响卵巢排卵^[3]。

生地性寒, 熟地性温, 将生地炮制为熟地的目的是为了制约生地的寒性, 不同炮制程度的地黄作用物质基础发生改变^[4], 其寒热药性不同, 从而可能使其对卵巢的作用不同。为了进一步探究地黄的寒热药性对卵巢的影响, 本研究将进一步比较生地、一晒熟地与九晒熟地三种不同炮制程度的地黄对小鼠卵巢卵泡的影响, 并分析可能与寒热药性相关的化学成分, 丰富地黄的药性理论研究, 并为地黄的科学炮制提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 KM 雌性小鼠 30 只, 性成熟, 体质量(20±2) g, 购自广州中医药大学实验动物中心, 动物生产许可证号 SCXK(粤)20180034, 动物使用许可证号 SYXK(粤)2018-0085, 适应性喂养 1 周, 维持 12 h/12 h 明暗交替照明, 自由进食饮水。

1.2 试剂与药物 生地黄购于河南省焦作市武陟县地黄种植户, 经广州中医药大学中药学院中药鉴定教研室吴文如副教授鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根。苏木素-伊红染色液(北京里根生物技术有限公司); PBS 粉末(武汉博士德生物工程有限公司); 免疫组化笔(福州迈新生物技术开发有限公司); 5-羟甲基糠醛、毛蕊花糖苷(纯度>98%, 北京索莱宝科技有限公司); FSHR 抗体(杭州华安生物技术有限公司)。甲醇、甲酸(色谱纯, 德国默克公司); 甲醇(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 福尔马林(广州永津生物科技有限公司)。

1.3 仪器 LC-20AT 型高效液相色谱仪、SIL-20A 自动进样器、LC-20A 色谱工作站(日本岛津公司); STP120 梯度脱水机、Histosta 石蜡包埋机、HM340E 半自动轮转石蜡切片机、Gemini AS 自动染色机(美国 Thermo Fisher 公司); BX53 生物显微镜(日本奥林巴斯公司); EL204 电子分析天平(十万分之一, 瑞士梅特勒-托利多公司); 0.22 μm 微孔滤膜(天津市科亿隆实验设备有限公司)。

2 方法

2.1 熟地黄制备 取个头相近的生地若干, 洗净表面泥沙, 以 0.2 mL/g 水润制 4 h, 蒸制 12 h, 晒制 7 h, 为一次蒸制, 所记为一晒熟地半成品, 重复上述步骤 8 次, 得九蒸九晒熟地半成品, 切成 2~3 mm 厚片, 置于 50 ℃烘箱中干燥 7 h, 即得, 拍照后避光保存于干燥罐中。

收稿日期: 2020-11-30

基金项目: 广东省药物非临床评价研究企业重点实验室基金项目(2018B030323024)

作者简介: 阙晓慧(1995—), 女, 硕士生, 从事中药活性部位筛选及其作用机理研究。Tel: 13587594970, E-mail: qxhmlczj@163.com

***通信作者:** 桂蜀华(1972—), 女, 副教授, 硕士生导师, 从事中药活性部位筛选及其作用机理研究。Tel: 18666928681, E-mail: gjl615@gzucm.edu.cn

2.2 不同炮制程度地黄对小鼠卵巢的影响

2.2.1 药液制备 取生地或熟地 20.0 g，加 100 mL 蒸馏水煎煮 1 h，滤过，滤渣加 50 mL 蒸馏水煎煮 0.5 h，滤过，合并滤液，浓缩至 50 mL，制成质量浓度为 0.4 g/mL 的水提液。取妈富隆片 1 片（0.081 g），加 90 mL 蒸馏水溶解，制成质量浓度为 0.9 mg/mL 的溶液。

2.2.2 分组与给药 30 只小鼠随机分为空白组、生地组、一晒熟地组、九晒熟地组、妈富隆组，每组 6 只，灌胃给予 4.5 g/kg 蒸馏水、不同炮制程度地黄、12.2 g/kg 妈富隆，每天 1 次，共 30 d。

2.2.3 动情周期观察 给药期间，每日早晨 8 点对小鼠进行阴道涂片检查^[5]，显微镜观察脱落细胞形态，判断小鼠所处动情周期阶段。

2.2.4 卵巢组织形态学观察 处死小鼠，分离左侧卵巢，置于福尔马林溶液中固定 48 h，经脱水、包埋、切制 5 μm 石蜡切片（连续切片）后进行常规 HE 染色，在显微镜下观察每个卵巢样本第 5 片切片的卵泡形态，对窦前卵泡、窦状卵泡进行计数，拍照。

2.2.5 卵巢组织促卵泡生成素受体（FSHR）表达检测 小鼠左侧卵巢组织石蜡切片经脱蜡后，按照相关说明书采用免疫组织化学法检测 FSHR 表达。

2.3 寒热药性相关成分分析

2.3.1 对照品溶液制备 精密称定对照品 5-羟甲基糠醛 2 mg、毛蕊花糖苷 0.5 mg，40% 甲醇定容于 2 mL 量瓶中，各移取 1 mL 于 5 mL 量瓶中，40% 甲醇稀释并定容至刻度，即得。

2.3.2 供试品溶液制备 取生地、熟地饮片剪碎，精密称取 1.000 g 至平底烧瓶中，加入 40% 甲醇 20.00 mL 冷浸 24 h，滤过，收集滤液，移取 10.00 mL 至 10 mL 量瓶中，即得。

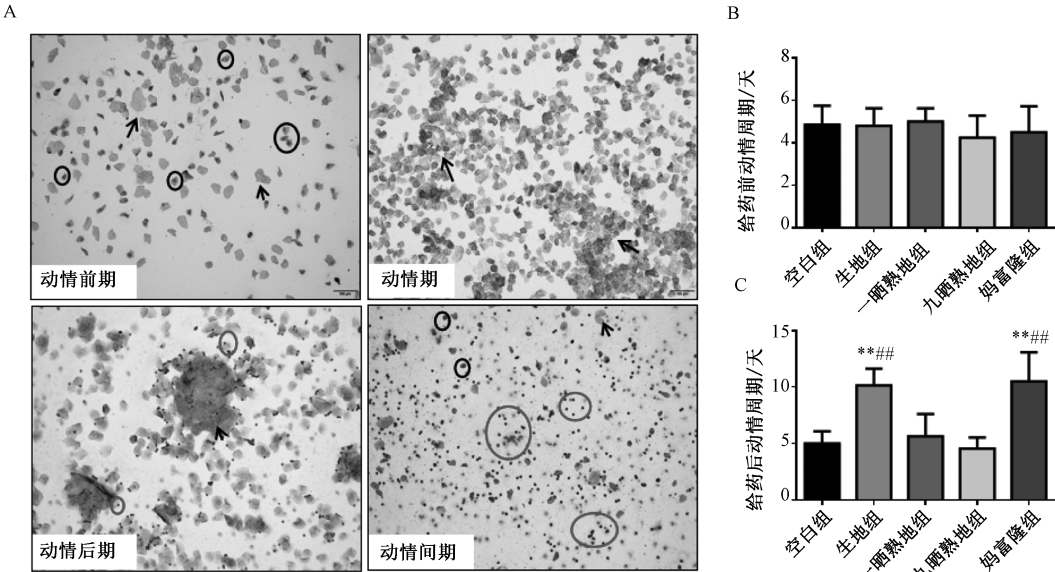
2.3.3 地黄 HPLC 指纹图谱建立 色谱条件为 Kromasil C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-水（含 0.02% 甲酸）（B），梯度洗脱（0~10 min，0%~0.1% A；10~20 min，0.1%~0.5% A；20~25 min，0.5%~1% A；25~30 min，1%~2% A；30~40 min，2%~7% A；40~60 min，7%~15% A；60~70 min，15%~21% A；70~80 min，21%~30% A）；体积流量 1 mL/min；柱温 35 ℃；检测波长 284 nm；进样量 10 μL。

2.3.4 多元统计分析 将不同炮制程度地黄 HPLC 指纹图谱共有峰数据导入 SIMCA 14.1.0 多元统计分析软件，进行偏最小二乘判别分析（OPLS-DA），分析 VIP 得分>1 的成分，比较其在不同炮制程度地黄中的变化。

2.4 统计学分析 通过 SPSS 26.0 统计软件进行处理，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，2 组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同炮制程度地黄对小鼠动情周期的影响 阴道涂片结果见图 1A。如图 1B 所示，给药前各组小鼠动情周期无明显变化（*P*>0.05）。如图 1C 所示，给药后与空白组比较，九晒熟地对小鼠动情周期无明显变化（*P*>0.05），而生地、妈富隆有所延长（*P*<0.01）；与九晒组比较，生地、妈富隆可延长小鼠动情周期（*P*<0.01）。

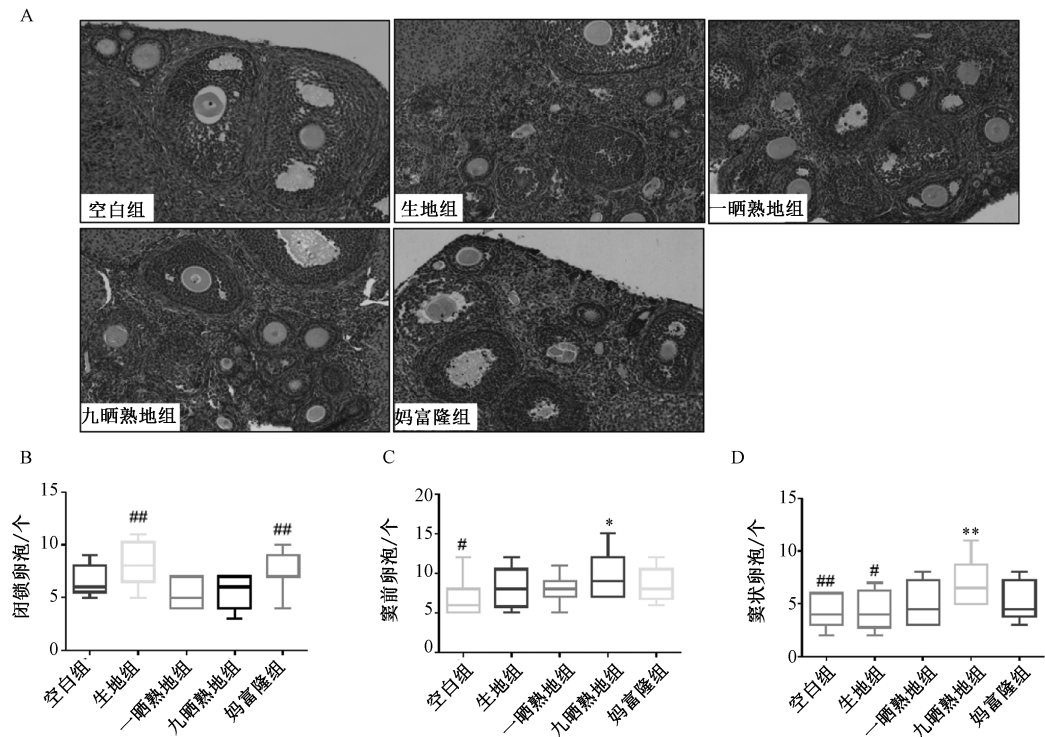


注：黑色圆圈为有核上皮细胞，黑色箭头为无核角化上皮细胞，红色圆圈为白细胞。与空白组比较，***P*<0.01；与九晒熟地组比较，###*P*<0.01。

图 1 各组小鼠动情周期变化（ $\bar{x}\pm s$ ，*n*=6）

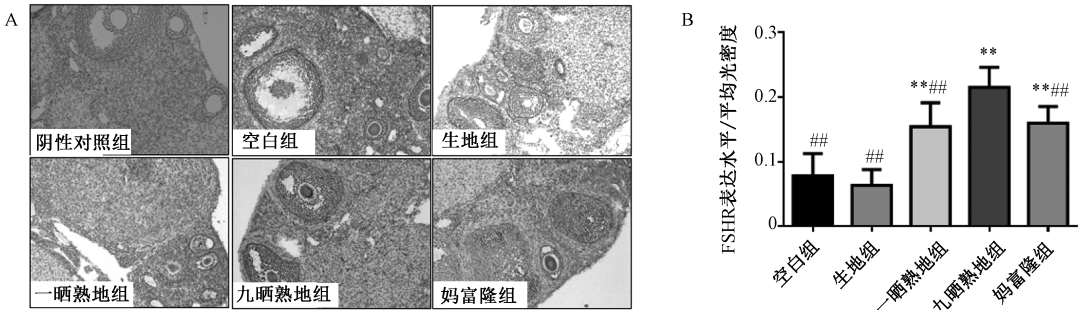
3.2 不同炮制程度地黄对卵泡形态及数量的影响 卵巢 HE 染色结果（×200）见图 2A。如图 2B 所示，各组闭锁卵泡与空白组比较无明显变化（*P*>0.05）；而九晒组闭锁卵

泡较生地组、妈富隆组减少（*P*<0.01）。如图 2C 所示，九晒组窦前卵泡较空白组增加（*P*<0.05）。如图 2D 所示，九晒组较生地组和空白组窦状卵泡增加（*P*<0.05，*P*<0.01）。



注：与空白组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与九晒熟地组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。
图 2 各组小鼠卵巢组织切片及卵泡数量 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.3 不同炮制程度地黄对卵巢组织 FSHR 表达的影响 如图 3 所示，九晒组 FSHR 表达较生地组、一晒熟地组、妈富隆组增加 ($P<0.01$)；九晒熟地组、一晒熟地组、妈富隆组 FSHR 表达较空白组增加 ($P<0.01$)。



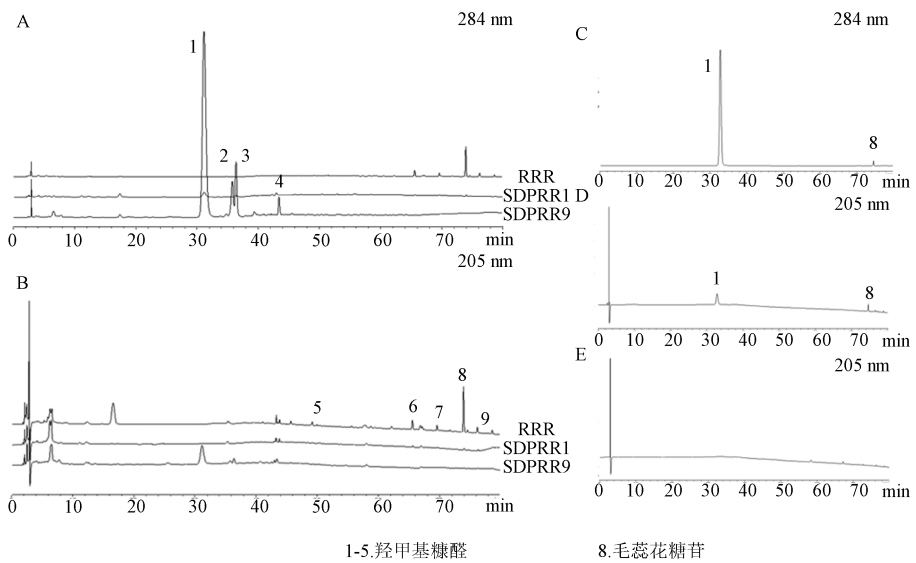
注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与九晒熟地组比较，## $P<0.01$ 。
图 3 各组小鼠卵巢组织 FSHR 表达水平 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.4 寒热药性相关成分分析 3 种炮制程度地黄在 205、284 nm 波长处，共标定 9 个共有峰，见图 4。在用于分析九晒熟地与生地之间成分差异的 OPLS-DA 模型中， $R^2X=0.990$ ， $R^2Y=0.996$ ， $Q^2=0.993$ ；在用于分析九晒熟地与一晒熟地之间成分差异的 OPLS-DA 模型中， $R^2X=0.845$ ， $R^2Y=0.981$ ， $Q^2=0.973$ 。九晒熟地聚为一类，生地聚为一类（图 5A）；1~4 号峰的 VIP 得分 >1 （图 5B）；一晒熟地聚为一类，九晒熟地聚为一类（图 5C）；1~4、6 号峰 VIP 得分 >1 （图 5D）。另外，1~4 号峰峰面积随炮制程度加深增加，6 号峰随炮制程度加深峰面积减少，见图 6。

4 讨论

卵巢是女性主要的生殖器官，为水火之脏，卵子的顺利发育、排出与肾中阴阳的顺利转化有关^[6-7]。动情周期是雌性哺乳动物性成熟后，生殖器官发生增生退化的周期性变化，动情周期延长或停滞提示排卵受影响^[8]，本研究中，生地延长小鼠动情周期，而一晒熟地、九晒熟地对小鼠动情周期无影响，说明熟地性温，入肾经能够顺应肾中阴阳转化，使卵子顺利排出，而生地性寒，入肾经不利肾中阴阳转化，导致排卵推迟。

卵巢中卵泡在排卵前的发育需经历窦前卵泡、窦状卵泡等的一系列过程，FSHR 在卵泡的发育过程中有重要作用，FSHR 与其配体促卵泡生成素（FSH）结合，可以激活多种酶促反应，促进卵巢中性激素的合成，从而促进卵泡发育^[9]。高表达 FSHR 的卵泡，在卵泡募集、选择的阶段，



注：A~B 中 RRR 为生地，SDPRR1 为一晒熟地，SDPRR9 为九晒熟地；C、D 分别为 284 nm、205 nm 下对照品；E 为 40% 甲醇的 HPLC 谱图。

图 4 3 种炮制程度地黄 HPLC 指纹图谱

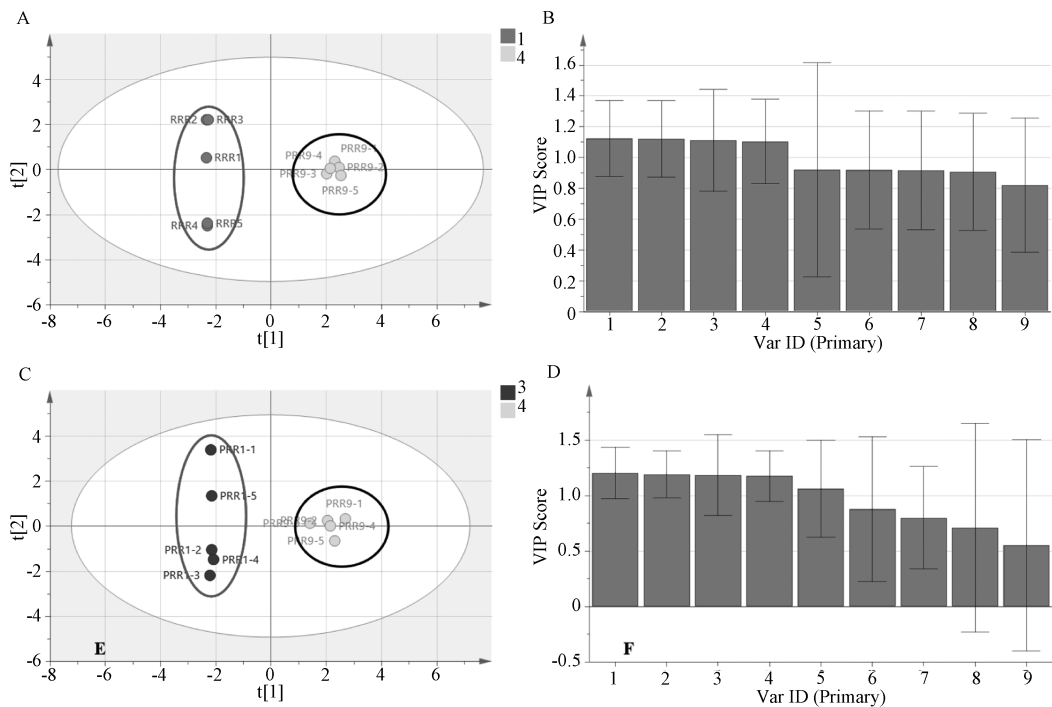


图 5 多元统计分析

即使在 FSH 水平低的情况下，亦能利用低水平 FSH，促进卵泡的发育，而低表达 FSHR 的卵泡则不能顺利发育，最终趋于闭锁^[10]。本实验中，九晒熟地较空白组增加小鼠卵巢窦前卵泡、窦状卵泡的数量，而生地、一晒熟地与空白组比较对窦前卵泡、窦状卵泡无影响，且九晒熟地较生地组窦状卵泡数量增加，可能是由于九晒熟地性温，补肾填精而够促进卵泡发育，而生地性寒，一晒熟地的温热药性不及九晒熟地，故未表现出促进卵泡发育的作用，说明地黄的寒热药性会影响地黄对卵巢排卵的作用。九晒熟地组

小鼠卵巢组织 FSHR 表达高于空白组、生地组、一晒熟地组小鼠，提示 FSHR 可能是九晒熟地促进排卵的靶点之一。

炮制改变中药的物质基础，为探究九晒熟地中区别于生地、一晒熟地的温性成分，本研究采用了色谱法结合多元统计分析方法。该方法是利用降维的思想，根据化合物的色谱信息，选取与化合物最相关的特征来参与分类，能够最大程度简化具有众多复杂化学变量的样本^[11]。结果显示 1~4 号峰、6 号峰为九晒熟地区别于生地、一晒熟地的主要差异成分。1~4 号峰其随炮制程度加深而增加，在九

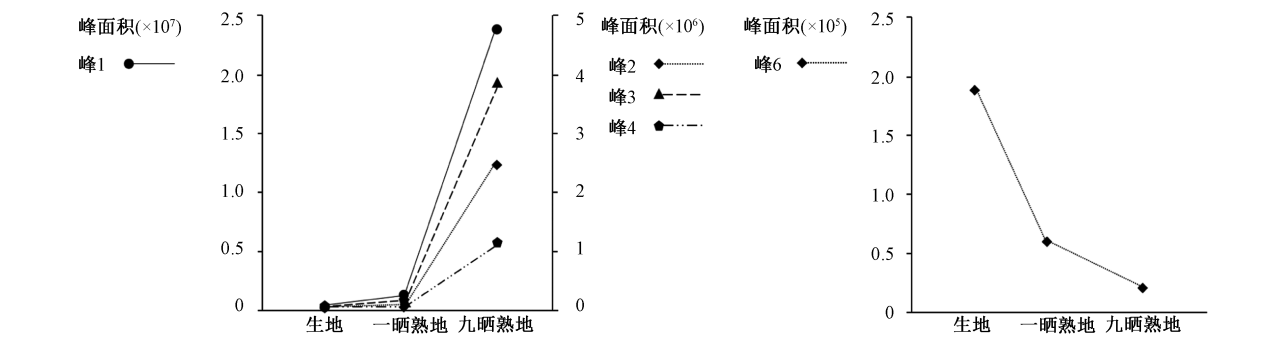


图 6 地黃 HPLC 共有峰峰面积变化

晒熟地中含量最高，可能为九晒熟地中的温性成分，其中 1 号峰为 5-羟甲基糠醛。5-羟甲基糠醛是由糖类、氨基酸在炮制过程中经美拉德反应生成的化合物，如党参^[12]、女贞子^[13]等药材经过炮制后 5-羟甲基糠醛含量增加，其被认为是引起这些中药炮制前后寒热药性发生改变的成分之一。

综上所述，不同炮制程度地黄寒热药性不同，对卵泡发育的影响不同，九晒熟地性温，能促进卵泡发育，FSHR 为其作用靶点之一，5-羟甲基糠醛可能为九晒熟地区别于生地、一晒熟地的温性成分之一。

参考文献:

[1] 姜宇宣, 谢国勇, 秦民坚. 中药材“九蒸九晒”炮制方法的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2019, 38(2): 48-51.

[2] 夏桂成. 实用中医妇科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2009.

[3] 柳祚勤, 桂蜀华, 夏 荃, 等. 不同炮制加工的熟地黄对雌性大鼠排卵功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 6-11.

[4] Zhou L, Xu J D, Zhou S S, *et al.* Chemomics-based marker compounds mining and mimetic processing for exploring chemical mechanisms in traditional processing of herbal medicines, a continuous study on *Rehmanniae Radix* [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1530: 232-240.

[5] Cora M C, Kooistra L, Travlos G. Vaginal cytology of the

laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears [J]. *Toxicol Pathol*, 2015, 43(6): 776-793.

[6] 史玉梅, 吴 芹, 夏桂成. 夏桂成教授补肾调经治疗排卵障碍性不孕症经验摘要[J]. 山西中医, 2006, 22(2): 7-8.

[7] 贺晓霞, 王若光. 基于“肾阴阳转化”理论探讨“不及、太过”两类月经病的防治[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(4): 574-576.

[8] McLean A C, Valenzuela N, Fai S, *et al.* Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification [J]. *J Vis Exp*, 2012(67): e4389.

[9] Bernal A B, Vickers M H, Hampton M B, *et al.* Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15558.

[10] Ginther O J. The theory of follicle selection in cattle[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2016, 57: 85-99.

[11] Biancolillo A, Marini F. Chemometric methods for spectroscopy-based pharmaceutical analysis[J]. *Front Chem*, 2018, 6: 576.

[12] 邹 利, 邱炳勋, 刘 珂, 等. 党参米炒前后党参多糖与 5-羟甲基糠醛的变化及其对胃肠平滑肌运动的影响[J]. 中草药, 2017, 48(1): 149-154.

[13] 戚志华, 王庆伟, 张 琰, 等. 成果期女贞子炮制后 5-羟甲基糠醛的含量变化[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(S1): 4719-4721.