

澳門大學碩士學位論文

**Study on liver protective effect and pharmaceutical
design of *Penthorum chinense* Pursh**

BY

Hu Yangyang



Master of Science

2013

Institute of Chinese Medical Sciences

University of Macau

Study on liver protective effect and pharmaceutical design of *Penthorum chinense* Pursh

BY

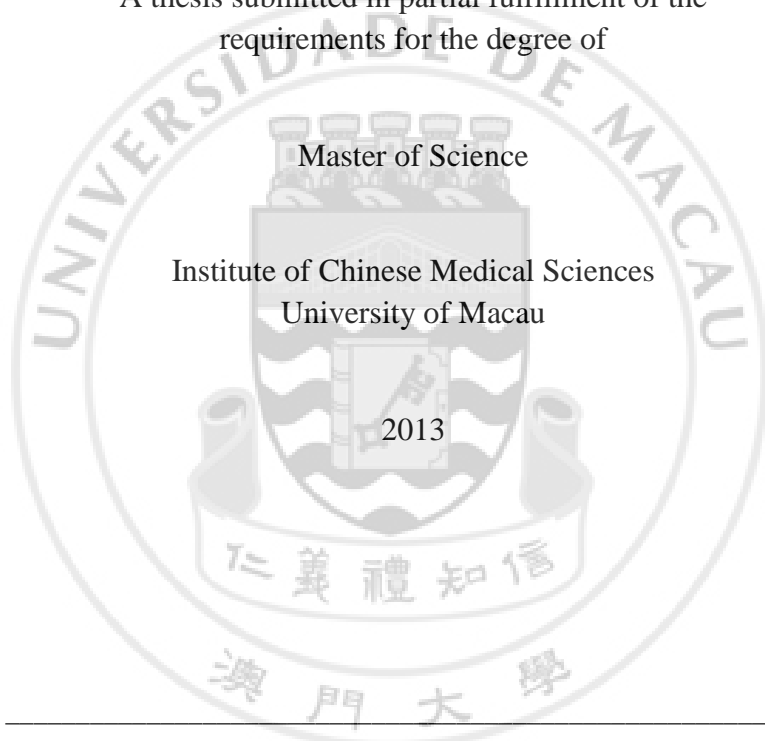
Hu Yangyang

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of

Master of Science

Institute of Chinese Medical Sciences
University of Macau

2013



Approved by _____
Supervisor

Date _____

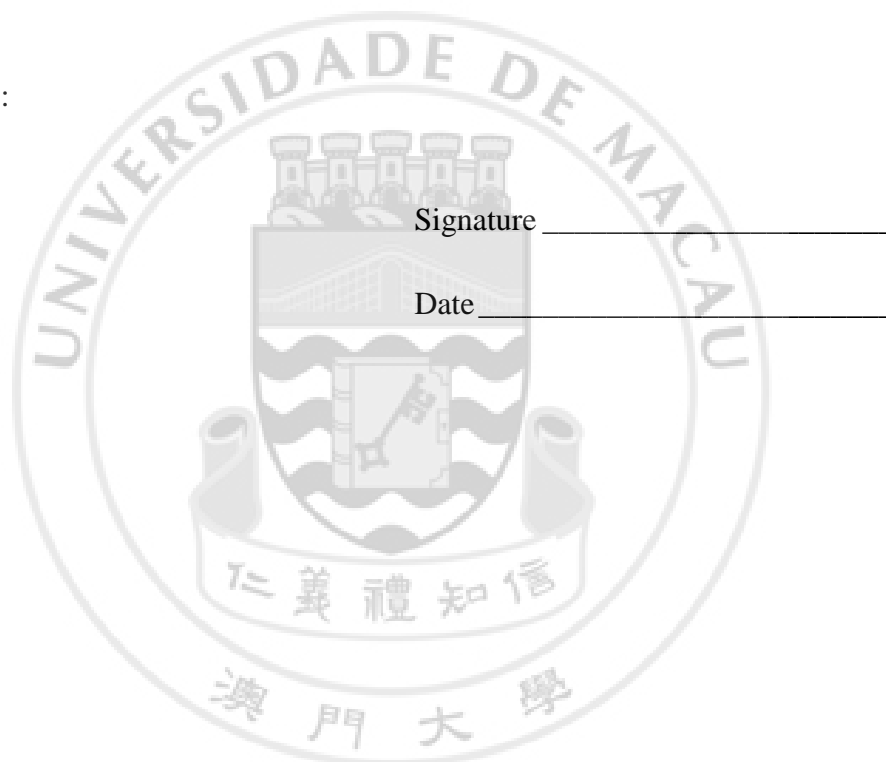
In presenting this thesis in partial fulfillment of the requirements for a Master's degree at the University of Macau, I agree that the Library and the Institute of Chinese Medical Sciences shall make its copies freely available for inspection. However, reproduction of this thesis for any purposes or by any means shall not be allowed without my written permission. Authorization is sought by contacting the author at

Address:

Telephone:

Fax:

E-mail:



致 謝

不知不覺，澳門大學的兩年研究生生涯即將結束。此刻在我心裡，只有滿滿的感恩。

首先感謝我的導師王一濤教授給我機會來中華醫藥研究院讀書，以他豐富的人生閱歷和人格魅力，引導我在碩士生涯中開拓思路、廣納百川，在人生的道路上積極向上、不懼艱難。王老師以他紮實的專業知識和嚴謹的治學態度指引我走向科研之路，他的言傳身教我將永遠銘記。

同時，感謝這兩年來一直對我予以指導和關懷的陳美婉博士，她在我的實驗和論文撰寫上都給我悉心指導，讓我受益良多。

感謝李紹平教授、李銘源教授、鄭穎博士、張慶文博士等老師對我的教導，感謝實驗室技術老師Leon、Sandy、Wing、Kio、Dorian和Joanna對我實驗的支持和幫助，感謝中華醫藥研究院所有關心我的老師！

感謝我的師兄王勝鵬、章津銘，我的同學丁倩、陳銳娥、陳鳳茜和王露，因為有你們的指導和陪伴，我領略到了學術道路的苦澀和幸福，有你們，我才有勇氣堅持信念，勇敢地走下去！

最後，感謝我的家人對我默默的不遺餘力的支援，沒有他們就沒有我的今天和明天。

在此，謹向參加論文審閱和答辯評審的所有專家和老師致以誠摯的謝意！

摘要

趕黃草護肝藥理篩選及藥學研究

胡楊洋

指導老師：王一濤教授

中華醫藥研究院

趕黃草為扯根菜屬虎耳草科的乾燥地上部分，是我國苗族傳統藥物，長期以來被用於改善飲酒和藥物所致的肝臟損害。現代研究表明，趕黃草中主要含有黃酮、生物鹼、多糖等成分，具有清熱利濕、活血、解毒、平肝、健脾等作用。已有的藥學研究方法已對趕黃草中活性成分及藥理作用進行不斷的探究，為趕黃草的應用開闢廣闊前景。然而，目前趕黃草的物質基礎和作用機制均不明，很大程度上限制了其臨床應用。為了保證藥材提取物的穩定性，本研究首先對趕黃草的化學物質基礎、提取工藝和品質控制進行了研究。利用課題組建立的體外肝損傷模型，發現趕黃草水提物對 t-THP 誘導的損傷具有明顯的保護作用，而對乙醇誘導的模型保護作用則不明顯。進一步通過 Hochest 染色法、JC-1 染色法、細胞內 ROS 的檢測和凋亡相關蛋白的表達的檢測發現，趕黃草水提物的保護作用可能是通過清除 t-THP 所誘導產生的 ROS，繼而減少其所產生的凋亡來實現保護作用的。此外，本文還通過原料性質、輔料種類、工藝優化等項目考察，初步制得品質穩定，工藝重現性較好的趕黃草泡騰片。基於這些研究結果，本研究為進一步深入研究和開發利用趕黃草提供了理論依據和實踐指導。

關鍵詞：趕黃草；保肝；活性成分；藥理機制；泡騰片。

Abstract

Study on liver protective effect and pharmaceutical design of *Penthorum chinense* Pursh

Yangyang Hu

Supervisor: Prof. Yitao Wang

Institute of Chinese Medical Sciences

Penthorum Chinense Pursh, a traditional Chinese medicine derived from Chinese ethnic group Miao, has been used to protect liver from damaging by alcohol and toxins for a long history. Modern research have showed that *Penthorum Chinense* Pursh containing many active ingredients such as alkaloids, flavonoids, glucose, and so on. It has a variety of activities, including detoxification, activating blood and dissolving stasis, liver-protecting, tonifying spleen, as well as anti-virus. However, until now, the liver protective effect of *Penthorum Chinense* Pursh remains blurry. In order to broaden the application of *Penthorum Chinense* Pursh, this study was designed to identify its active constitutes and explore the mechanism in protecting liver damage. In order to obtain stable samples, the chemical constitutes and extraction process were studied. Based on the *in vitro* t-BHP/ethanol-induced liver damage model, I found that the water extract of *Penthorum Chinense* Pursh could significantly protect HL-7702 cells from t-BHP induced damage, and the mechanism may be associated with its ability of scavenging ROS generation. In conclusion, with the aim to provide scientific foundation for further development and application of *Penthorum Chinense* Pursh, this study partially clarified its chemical constitutes and pharmacological mechanism, as well as a preliminary formulation for developing effervescent tablets. This study may benefit the further application of *Penthorum Chinense* Pursh in clinic.

Key words *Penthorum Chinense* Pursh, chemical constitutes, pharmacological machanism, effervescent tablets.



目 錄

致 謝	I
摘 要	II
Abstract	III
目 錄	V
圖表目錄	VII
第一章 前言	1
1.1 趕黃草概述	1
1.2 趕黃草的生藥學研究	1
1.2.1 趕黃草形態特徵	1
1.2.2 趕黃草葉片顯微鑒別	2
1.2.3 趕黃草莖顯微特徵	2
1.3 趕黃草的化學研究	3
1.3.1 趕黃草化學成分研究	3
1.3.2 提取工藝研究	5
1.4 趕黃草的藥理作用	6
1.4.1 利膽、退黃及降酶作用	6
1.4.2 保肝作用	6
1.4.3 抗病毒作用	7
1.4.4 抗氧化作用	8
1.4.5 抗突變作用	8
1.5 展望	8
第二章 趕黃草的提取工藝研究	10
2.1 試驗材料	10
2.1.1 儀器	10
2.1.2 試劑與藥材	10
2.2 試驗方法及結果	10
2.2.1 提取條件考察	10
2.2.2 趕黃草提取物化學成分譜研究	11
2.2.3 趕黃草水提物化學成分研究	13
2.4 小結	13
第三章 趕黃草保肝作用體外研究	14
3.1 試驗材料	14
3.1.1 儀器	14
3.1.2 試劑和藥品	14
3.2 細胞培養和傳代	15
3.3 肝損傷體外模型的建立	15
3.3.1 過氧化氫誘導的肝損傷模型的建立	15
3.3.2 乙醇誘導的肝損傷模型的建立	16

3.4 MTT 法檢測細胞存活率	17
3.4.1 趕黃草體外肝毒性的篩選	17
3.4.2 趕黃草體外保肝作用的篩選	18
3.5 Hoechst 染色法檢測細胞凋亡	20
3.6 JC-1 染色法檢測細胞膜電位	22
3.7 細胞內 ROS 的檢測	23
3.7.1 螢光顯微鏡觀察細胞內 ROS	23
3.7.2 細胞內 ROS 的定量檢測	24
3.7.3 流式細胞儀檢測細胞內 ROS	25
3.7.4 肝細胞內 ROS 檢測結果分析	26
3.7 WB 法檢測凋亡相關蛋白的表達	27
3.8 小結	29
第四章 趕黃草泡騰片的處方優化及製備工藝研究	30
4.1 實驗材料	30
4.1.1 實驗儀器	30
4.1.2 試劑和藥品	30
4.2 實驗方法	30
4.2.1 pH 值的測定方法	30
4.2.2 崩解時限的測量方法	30
4.2.3 顆粒休止角測定	30
4.2.4 成型性實驗	31
4.2.5 吸濕性實驗	31
4.2.6 臨界相對濕度 (CRH) 的測定	31
4.3 輔料的篩選	31
4.3.1 填充劑的篩選	31
4.3.2 潤滑劑的選擇	32
4.3.3 黏合劑的選擇	32
4.3.4 泡騰劑的選擇	32
4.3.5 正交試驗優化輔料組成	33
4.4 製備處方及工藝	34
4.4.1 處方	34
4.4.2 制法	34
4.5 小結	34
第五章 總結與展望	36
參考文獻	37
Achievements	41
附錄	43

圖表目錄

Table 1.1 趕黃草中分離得到的主要化合物結構	3
Table 2.1 正交試驗的 L9 (33) 安排.....	11
Table 2.2 趕黃草提取物 HPLC 梯度洗脫條件	11
Fig 2.1 HPLC Chromatogram of water/ethanol extract of Penthorum Chinense Pursh (275 nm).	12
Fig 2.2 HPLC Chromatogram of water/ethanol extract of Penthorum Chinense Pursh (360 nm).	12
Fig 3.1 Establishment of in vitro liver injury model by t-BHP.	16
Fig 3.2 Establishment of in vitro ethanol-induced liver injury model.	17
Fig 3.3 Cytotoxicity analysis of water extract of Penthorum Chinense Pursh (left for 12 h and right for 24 h, respectively).	18
Fig 3.4 Protective effect of water extract of Penthorum Chinense Pursh on t-THP-induced model.....	19
Fig 3.5 Protective effect of water extract of Penthorum Chinense Pursh on EtOH-induced model.....	19
Fig 3.6 Hoechst 33342 staining to detect apoptotic morphology in HL-7702 cells.....	21
Fig 3.7 JC-1 staining to detect mitochondrial membrane potential change ($\Delta\Psi_m$) in HL-7702 cells.....	22
Fig 3.8 ROS generation detected by fluorescence microscope.....	24
Fig 3.9 Quantitative detection of ROS generation in HL-7702 cells	25
Fig 3.10 ROS generation detected by flow cytometry	26
Fig 3.11 Apoptosis-related proteins detection by western blotting	28
Table 4.1 不同填充劑與原料組成處方	31
Table 4.2 各處方休止角和吸濕百分率的測定結果	32