

熟大黄水煎液中化学成分含量测定及其药效学研究

朱慧^{1,2}, 刘晓^{1,2}, 祝婷婷^{1,2}, 汪小莉^{1,2}, 朱晓钗^{1,2}, 蔡宝昌^{1,2,3*}

(1.南京中医药大学药学院,江苏南京 210023;2.国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心,江苏省中药炮制重点实验室,江苏南京 210023;3.南京海昌中药集团有限公司,江苏南京 210061)

摘要:目的 建立熟大黄水煎液中主要化学成分的含量测定方法并观察其对热毒血瘀模型大鼠的治疗作用。方法 采用 Hypersil GOLD C₁₈ 柱,以 0.1% 磷酸水(A)–乙腈(B)进行梯度洗脱,检测波长为 254 nm,柱温 30 ℃,在此条件下进行方法学验证及水煎液样品含量测定。给予热毒血瘀模型大鼠熟大黄水煎剂,取其腹主动脉血液检测以获得血液流变学参数,并测定血浆中血栓素 B₂ (TXB₂)、6-酮前列腺素(6-keto-PGF_{1α})的含量。结果 所建立的含量测定方法在一定浓度范围内线性关系良好,精密性、重复性、稳定性及回收率均符合相关要求。熟大黄水煎液能显著降低模型大鼠的全血粘度($P < 0.05$)、血浆粘度($P < 0.01$)和血液中纤维蛋白原含量($P < 0.01$),TT($P < 0.01$)和 PT($P < 0.01$)值显著延长,同时 TXB₂ 水平显著降低($P < 0.05$)而 6-keto-PGF_{1α} 水平显著升高($P < 0.05$),TXB₂/6-keto-PGF_{1α} 含量比值极显著下降($P < 0.01$)被纠正趋向正常。结论 该方法简便、准确可靠,可用于熟大黄水煎液的质量评价与控制。熟大黄能有效改善热毒血瘀模型大鼠血液流变学状态,促进 PGI₂ 分泌同时减少 TXA₂ 的生成,纠正 TXB₂/6-keto-PGF_{1α} 比值失衡,从而改善血管内皮功能并恢复血液循环,起到活血化瘀的作用。

关键词:熟大黄;含量测定;高效液相色谱法;热毒血瘀证;血液流变学

中图分类号:R284.1 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2017)05-0470-06

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2017.0470

Determination of the Related Components in Prepared Rhubarb Decoction and Its Pharmacodynamics Study

ZHU Hui^{1,2}, LIU Xiao^{1,2}, ZHU Ting-ting^{1,2}, WANG Xiao-li^{1,2}, ZHU Xiao-chai^{1,2}, CAI Bao-chang^{1,2,3*}

(1.College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Key Laboratory of State Administration of TCM for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 3. Nanjing Haichang Chinese Medicine Group Corporation, Nanjing, 210061, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for determination of main components in prepared rhubarb decoction and investigate its effects on rats with noxious heat blood stasis syndrome. **METHODS** The analysis was performed on a Hypersil GOLD C₁₈ column with the mobile phase of 0.1% phosphoric acid solution(A)-acetonitrile(B). The detection wavelength was set at 254 nm and the column temperature was 30 ℃. The method was validated and the samples were determined under this condition. The abdominal aortic blood of rats with noxious heat blood stasis syndrome was collected and tested to obtain the hemorheological parameters. Also, the TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α} levels in rats plasma were measured. **RESULTS** The developed HPLC method showed good linearity within certain concentration ranges. And the precision, repeatability, stability and recovery all met the requirements. Compared with rats in model group, the whole blood viscosity at four shear rates ($P < 0.05$), plasma viscosity($P < 0.01$) and the level of plasma fibrinogen content($P < 0.01$) in the high dose group were significantly decreased after doing, and the TT($P < 0.01$) and PT($P < 0.01$) values were significantly prolonged. Furthermore, the levels of TXB₂ (decreased, $P < 0.05$) and 6-keto-PGF_{1α} (increased, $P < 0.05$) were significantly changed, and their ratio was corrected to be normal. **CONCLUSION** The method was simple, accurate and reliable, which could be used for quality control of prepared rhubarb decoction. Prepared rhubarb could improve vascular endothelial function by modifying blood rheology, promoting the secretion of PGI₂, reducing the generation of TXA₂ and recovering the balance of TXB₂/6-keto-PGF_{1α}.

收稿日期:2017-04-11;修稿日期:2017-07-19

基金项目:江苏省自然科学基金青年项目(20140964);江苏省高等学校自然科学研究重大项目(17KJA360006)

作者简介:朱慧(1993-),女,江苏南京人,南京中医药大学 2015 级硕士研究生。* 通信作者:bccai@126.com

KEY WORDS: Prepared rhubarb; Assay; HPLC; Noxious heat blood stasis syndrome; Hemorheology

大黄为临床常用中药,性味苦寒,具有攻积泻下、泻火解毒之功效。熟大黄作为大黄的主要炮制品之一,经酒蒸法炮制后其苦寒之性变缓,泻下作用减轻而活血化瘀之功显著增强。以熟大黄为主药的组方如大黄廑虫丸、下瘀血汤和抵当汤改良方等,都具有较好的祛瘀通络生新作用。熟大黄在临床上对脑出血及上消化道出血均有较好的治疗效果,小剂量的熟大黄还可预防妊娠高血压综合征^[1]。现代研究表明,血液流变学是对血液的流体力学特性较为全面地表述,是血液系统疾病诊断时必要的检测参数,能够反映血液及其有形成分的流动与变形规律,但无法反映机体的复杂病理变化。血浆中血栓素 A_2 (TXA₂)和前列环素(PGI₂)的动态平衡对维持血管紧张性、协调性和溶血机制有重要作用,二者的比值失调在冠心病,动脉粥样硬化和微血管病变等疾病的发生发展中可能起重要作用,临床通过检测其代谢产物血栓素 $B_2/6$ -前列腺素(TXB_{2/6}-keto-PGF_{1 α})的比值代表二者在体内的变化。目前关于熟大黄活血化瘀作用的研究多采用药物醇提液作为药效学实验中的给药形式^[2-3],这与临床实际给药方式并不相符。综上所述,根据中医药理论指导结合药物药性,本文选择构建大鼠热毒血瘀模型,并给予动物熟大黄水煎剂进行治疗,通过测定熟大黄水煎液中6种主要成分的含量并考察其对热毒血瘀证模型大鼠的TXB_{2/6}-keto-PGF_{1 α} 的影响,同时辅以血液流变学相关指标考察,旨在为临床用药提供科学依据并进一步探讨大黄经过酒蒸炮制后发挥活血化瘀作用的分子机制。

1 材料

1.1 药材

大黄药材购于南京海昌中药有限公司(四川,批号:140510),经生药学鉴定为蓼科植物药用大黄 *Rheum officinale* Baill 的干燥根及根茎,依2015年版《中国药典》大黄项下测定均符合规定。熟大黄:参考2015年版《中国药典》附录II D及相关文献,取生大黄片(厚度约2~4 mm),加入酒水(黄酒:水=1:1)拌匀,闷润1.5 h,置笼屉内,隔水蒸24 h,取出于60℃下烘干。每100 g药材,加黄酒30 g及水30 g,蒸至内外均呈黑色,依2015年版《中国药典》熟大黄项下测定均符合规定^[4]。

1.2 试药

大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚及大黄素甲醚对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号: MUST-16031604、16031601、13030701、14031711、13022005),分析纯磷酸(上海凌峰化学试剂有限公司),色谱级甲醇(CNW,上海安谱实验科技股份有限公司),脂多糖(北京 BIOSHARP 有限公司),盐酸肾上腺素注射液(天津金耀药业有限公司),0.9%氯化钠注射液(江苏强生生物科技有限公司),复方丹参滴丸(天津天士力制药股份有限公司),水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司),一次性使用静脉血样采集针(山东省成武县医用制品厂),一次性使用静脉血样采集容器(添加肝素钠,生产批号: 20150215,江苏康捷医疗器械有限公司),凝血四项试剂盒(北京世帝科学仪器有限公司),大鼠血栓素 B_2 、大鼠6-酮前列腺素 ELISA 试剂盒(南京金益柏生物科技有限公司)。

1.3 实验仪器

LC-2010 A 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu), AG-285 型十万分之一天平(瑞典 METTLER TOLEDO),超纯水仪(美国 Millipore),SL 16R 离心机(美国 Thermo)。白鸽 TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂),众驰 ZL 1000i 血液流变仪(北京众驰伟业科技发展有限公司),世帝 LG-PABER-1CH 血凝仪(北京世帝科学仪器有限公司),ELx800 全自动酶标仪(美国 Bio Tek 仪器有限公司)。

1.4 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 30 只,雄性,体质量(250±20) g,实验动物生产许可证号: SCXK(浙)2014-0001。大鼠随机分为空白组,模型组,阳性药组,熟大黄低剂量组及熟大黄高剂量组,每组 6 只,实验前适应性饲养一周,大鼠自由饮水,进食标准大鼠饲料,温度(22±2)℃,湿度 40%~60%。

2 方法

2.1 水煎液中主要成分的含量测定

2.1.1 熟大黄药液的制备 取熟大黄饮片适量,加入10倍量水浸泡30 min后武火煮沸,文火保持微沸30 min,滤过。药渣再加入8倍量水按相同方法煎煮,将煎液滤过,合并两次滤液^[5]。

2.1.2 供试品溶液的制备 取1 mL熟大黄水煎液,加入4 mL甲醇,充分混合后高速离心(13 000 r/

min, 10 min), 吸取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 得供试品溶液。

2.1.3 对照品溶液的制备 分别精密称取没食子酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚对照品适量于容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀得到浓度为: 没食子酸 3 mg/mL、芦荟大黄素 53.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、大黄酸 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、大黄素 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、大黄酚 62.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、大黄素甲醚 54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的各对照品母液。精密量取各对照品母液至容量瓶中, 加甲醇定容至刻度摇匀, 配制成含有没食子酸 139.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、芦荟大黄素 8.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、大黄酸 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、大黄素 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、大黄酚 5.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及大黄素甲醚 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液, 并用甲醇分别稀释 2 倍、4 倍、8 倍、12 倍得到系列浓度的混标溶液。

2.1.4 色谱条件 色谱柱: C_{18} 反相 HPLC 柱 (Hypersil GOLD, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , Thermo); 流动相: 0.1% 磷酸水 (A)-乙腈 (B); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm; 进样量: 20 μL ; 梯度洗脱: 0~8 min, 5% B; 8~20 min, 5%~40% B; 20~35 min, 40%~75% B; 35~45 min, 75% B; 45~60 min, 5% B。

2.1.5 方法学考察 对所建立的方法进行方法学考察, 具体包括: 线性、精密度、准确度、重复性和稳定性。

2.1.6 样品测定 根据 2.1.2 项下平行制备 3 份熟大黄供试品溶液, 按照 2.1.4 项下的色谱条件进行六种成分的含量测定。

2.2 药效学实验

2.2.1 熟大黄药液的制备 按 2.1.1 项下方法制备熟大黄水煎液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至高剂量 0.5 g/mL, 低剂量 0.2 g/mL 以备用^[6]。

2.2.2 阳性药复方丹参滴丸的制备 取复方丹参滴丸数粒, 研磨后加纯水制配成 0.9 g/mL 的阳性对照药液。

2.2.3 血浆样品采集 通过首日腹腔注射脂多糖 (2 mg/kg), 次日上下午 (间隔 4 h) 各皮下注射一次 0.1% 盐酸肾上腺素 (0.6 mg/kg) 复制大鼠热毒血瘀模型, 并检测各项指标以确认造模结果。空白组大鼠则按以上方案同时注射等量生理盐水。造模成功后, 分别给空白组和模型组灌胃给与纯水, 阳性药组灌胃给与复方丹参滴丸溶液 (90 mg/kg), 熟大黄低剂量组灌胃给与熟大黄煎剂 (2 g/kg), 熟大黄高剂量组灌胃给与熟大黄煎剂 (5 g/kg)。各组于灌胃 0.5 h 后腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100 g) 麻醉, 腹主动脉取血约 3 mL, 置于添加了枸橼酸钠的采血管中。

2.2.4 样品采集与药效指标检测 取 400 μL 全血测试各切变率下的全血粘度, 剩余全血于 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清血浆, 吸取 400 μL 进行血浆粘度检测, 剩余血浆用于以下指标的检测。

依照试剂盒说明书操作, 仪检测获得凝血酶时间 (TT)、凝血酶原时间 (PT) 及血浆中纤维蛋白原 (FIB) 含量。

血栓素 B_2 (TXB_2)、6-酮前列腺素 (6-keto-PGF_{1 α}) 的含量测定采用 ELISA 法, 严格按照试剂盒说明书操作步骤进行, 采用酶标仪测吸光度 A 值, 通过标准曲线计算获得样品中含量, 测定波长为 450 nm。

2.2.5 数据处理 数据统计使用 SPSS17.0 软件进行统计, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间分析用单因素方差分析法。

3 结果

3.1 水煎液中主要成分的含量测定

3.1.1 线性关系考察 精密吸取 2.1.3 项下系列浓度的混标溶液进样 20 μL , 取峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 计算得到各成分回归方程、线性范围及相关系数, 详见表 1。

表 1 6 种成分的标准曲线

分析物	回归方程	线性范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	r^2
没食子酸	$Y=19\ 568X+6\ 217.4$	11.6~140	0.999 3
芦荟大黄素	$Y=110\ 255X+3\ 675.3$	0.670~8.01	0.999 8
大黄酸	$Y=92\ 012X+11\ 503$	2.33~28.0	0.999 8
大黄素	$Y=59\ 391X+2\ 047.5$	0.670~8.00	0.999 8
大黄酚	$Y=98\ 040X+4\ 717.2$	0.500~5.99	0.999 8
大黄素甲醚	$Y=55\ 029X+334.45$	0.200~2.40	0.999 4

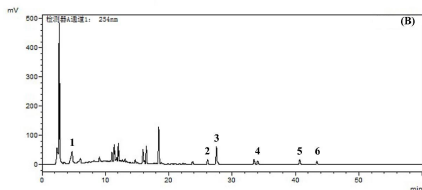
3.1.2 精密度考察 精密吸取 2.1.3 项下对照品溶液 20 μL ,连续进样 6 次。记录没食子酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的峰面积,计算其 RSD 分别为 2.89%、1.44%、1.51%、1.47%、1.21%、1.17%,表明仪器精密度良好。

3.1.3 重复性考察 按 2.1.2 项下平行制备 6 份熟大黄供试品溶液,进样测试并获得没食子酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量,计算其 RSD 分别为 0.50%、2.53%、0.61%、2.68%、1.28%、2.06%,表明该液相方法的重复性好。

3.1.4 稳定性考察 取同一份熟大黄供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 各进样 20 μL ,计算没食子酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.13%、2.90%、2.23%、1.53%、1.34%、2.99%,表明供试品在 24 h 内稳定。

3.1.5 加样回收率考察 精密量取熟大黄水煎液 0.5 mL,采用加样回收率方法法(1:1 加入),除精密加入 4.5 mL 甲醇外,其余均按 2.1.2 项下方法制备溶液,进样 20 μL 。计算得没食子酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的平均加样回收率分别为 101.0%、102.7%、101.6%、102.9%、103.0%、98.10%, RSD 分别为 2.43%、0.68%、2.60%、1.00%、0.21%、2.12%。

3.1.6 样品测定结果 在实验条件下进样,得混合对照品及熟大黄供试品测定的典型色谱图(图 1)。



1.没食子酸;2.芦荟大黄素;3.大黄酸;4.大黄素;5.大黄酚;6.大黄素甲醚

图 1 混合对照品溶液(A)及样品(B)测定的高效液相色谱图

按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,测定熟大黄水煎液中没食子酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的按生药量记平均含量分别为 (2.641 ± 0.015) 、 (0.094 ± 0.001) 、 (0.387 ± 0.003) 、 (0.120 ± 0.002) 、 (0.109 ± 0.002) 、 (0.034 ± 0.001) mg/g。

3.2 药效实验结果

3.2.1 对血液流变学的影响 与空白组相较,模型组大鼠 4 种切变率下的全血粘度、血浆粘度和纤维蛋白原含量均极显著增高($P < 0.01$),同时凝血酶原时间(PT)和凝血酶时间(TT)极显著延长($P < 0.01$),显示热毒血瘀模型复制成功。与模型组相较,熟大黄低剂量组在 5 s^{-1} 、 30 s^{-1} 、 200 s^{-1} 切变率下的全血粘度明显降低($P < 0.05$),血浆粘度明显下降($P < 0.05$),TT 值显著升高($P < 0.05$),但 1 s^{-1} 切变率下的全血粘度和血浆中纤维蛋白原含量均无显著变化,PT 值不增反降($P < 0.05$),结果表明低剂量的熟大黄的具有一定的活血化瘀作用但疗效欠佳;熟大黄高剂量组能极显著降低 1 s^{-1} 、 5 s^{-1} 、 30 s^{-1} 切变率下的全血粘度($P < 0.01$),显著降低 200 s^{-1} 切变率下的全血粘度($P < 0.05$),同时血浆粘度、血浆中纤维蛋白原的含量极显著降低($P < 0.01$),TT 和 PT 时间有效延长($P < 0.05$),提示高剂量的熟大黄在改善热毒血瘀大鼠血液流变性方面的作用更佳,且治疗效果接近阳性药复方丹参滴丸,详细结果见表 2~3。

表 2 各组大鼠全血黏度的影响($\bar{x} \pm s$, mPa·s, $n=6$)

组别	1 s^{-1}	5 s^{-1}	30 s^{-1}	200 s^{-1}
空白组	16.09 ± 1.35	7.06 ± 0.42	4.03 ± 0.21	3.01 ± 0.18
模型组	$22.41 \pm 2.03^{**}$	$9.82 \pm 0.73^{**}$	$5.61 \pm 0.39^{**}$	$4.18 \pm 0.29^{**}$
熟大黄低剂量组	20.06 ± 3.33	$8.41 \pm 0.36^{\#}$	$5.04 \pm 0.18^{\#}$	$3.88 \pm 0.16^{\#}$
熟大黄高剂量组	$18.20 \pm 1.21^{\#\#}$	$8.29 \pm 1.54^{\#\#}$	$4.77 \pm 0.97^{\#\#}$	$3.64 \pm 0.60^{\#\#}$
阳性药组	$18.36 \pm 0.62^{\#\#}$	$8.32 \pm 0.38^{\#\#}$	$4.89 \pm 0.30^{\#\#}$	$3.72 \pm 0.27^{\#\#}$

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

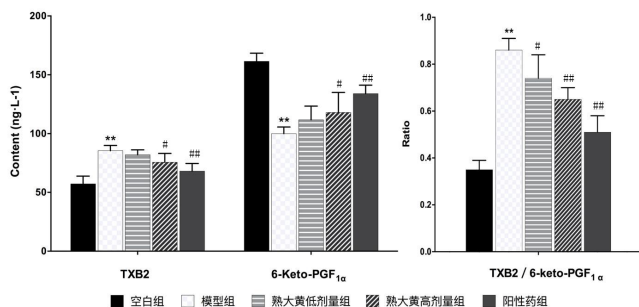
表 3 对各组大鼠血浆黏度、TT、PT 及纤维蛋白原的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	血浆黏度/(mPa·s)	TT/s	PT/s	FIB/(g·L ⁻¹)
空白组	1.23±0.05	35.48±1.76	12.45±0.55	2.78±0.09
模型组	1.48±0.09 ^{**}	28.05±5.49 ^{**}	10.63±1.83 [*]	4.54±0.35 ^{**}
熟大黄低剂量组	1.34±0.07 [*]	34.93±2.20 [#]	9.92±0.48 [#]	4.19±0.23
熟大黄高剂量组	1.28±0.10 [#]	35.47±3.40 [#]	13.22±0.92 [#]	3.75±0.54 [#]
阳性药组	1.30±0.04 [#]	33.15±1.28 [#]	11.80±0.78 [#]	3.54±0.40 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3.2.2 各组大鼠 TXB₂ 及 6-keto-PGF_{1 α} 的含量比较

采用内毒素结合盐酸肾上腺素造模后,与空白组相较,模型组大鼠血浆中的 TXB₂ 含量显著增加($P<0.01$),6-keto-PGF_{1 α} 的表达显著下降($P<0.01$),TXB₂/6-keto-PGF_{1 α} 的比值明显高于正常水平($P<0.01$),提示血小板聚集,黏附功能增强,热毒血瘀模型复制成功。采用熟大黄水煎剂治疗后,低剂量组的 TXB₂ 及 6-keto-PGF_{1 α} 含量与模型组相较,差异均无统计学意义,TXB₂/6-keto-PGF_{1 α} 含量比值有明显下降($P<0.05$);随着给药剂量的增加,高剂量组的 TXB₂ 含量明显低于模型组($P<0.05$),6-keto-PGF_{1 α} 的含量较模型组有显著增加($P<0.05$),TXB₂/6-keto-PGF_{1 α} 的比值较模型组可见极显著下降($P<0.01$)并趋向正常值。但治疗效果仍不及阳性药,阳性药组的 TXB₂、6-keto-PGF_{1 α} 含量及其比值较模型组均有极显著性差异($P<0.01$),详细结果见图 2。



注:与空白组比较,* $P<0.01$;

与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n=6$ 。

图 2 各组大鼠 TXB₂、6-keto-PGF_{1 α} 及其比值的影响

4 讨论

熟大黄中主要成分是蒽醌类化合物,2015 年版《中国药典》以大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄素甲醚及大黄酚作为其质量控制的指标成分^[4]。除蒽醌类成分外,熟大黄中没食子酸的含量也较高,且有文献指出没食子酸与保护血管改善微循环作用相关^[7],故本文综合 5 种蒽醌及没食子酸作为检测指标。熟大黄被应用于临床治疗时最常采用的提取方

法为水煎,但目前已有的研究多集中于熟大黄醇提回流法,缺乏实际的临床指导意义。故本文建立同时测定熟大黄水煎液中 5 种蒽醌及没食子酸含量的 HPLC 方法,以反映水煎液中相关成分的实际含量,以期从主要功效组分的角度指导临床合理用药。

传统中医认为热毒炽盛,阴伤络损是热毒血瘀证的基本病理变化,热毒和血瘀二者相互作用密不可分,温邪化毒,深入营血,营阴暗耗从而煎熬血液成瘀;热毒迫血妄行,出血留著而成瘀;热毒内攻阻滞气机,气滞而血瘀^[8]。单独采用内毒素或盐酸肾上腺素造模,大鼠存活率较低且药效指标变化甚微,模型构建欠佳。实验最终采用腹腔注射内毒素模拟外感热毒的过程,刺激大鼠下丘脑体温调节中枢产生发热反应并激活凝血机制,引起微循环障碍和血液流变异常,导致弥漫性血管内凝血,同时结合皮下注射盐酸肾上腺素,诱导血小板聚集,末梢血管收缩,增加模型大鼠的血液黏度^[9]。造模后的大鼠饮水量明显减少,不喜活动,毛色黯淡,眼睛分泌物增加,检测相关指标可见,与空白鼠相较全血黏度与血浆黏度均显著升高,TT,PT 时间显著缩短,同时 FIB 含量显著增加,体内 TXB₂/6-keto-PGF_{1 α} 比值失衡,表明热毒血瘀模型构建成功。

TXA₂ 和 PGI₂ 主要是由血小板及血管内皮细胞分别合成而来的一对作用相反的花生四烯酸衍生物。TXA₂ 是强烈的血管收缩剂和促血小板聚集剂,能够促进血栓的生成;PGI₂ 的作用与之相反,能有效抑制血小板局部聚集并扩张血管,从而抵抗血栓的形成;二者既是血小板活化的特异性指标,又是内皮损伤的指标。在正常血液中,TXA₂/PGI₂ 的比值保持相对平衡,从而维持适当的冠脉张力和血管内环境,有效防止血栓的形成,维持血液流动状态,保持血管畅通,是机体控制正常出血的机制^[10-11]。但二者的性质均极不稳定难以直接测定,易迅速降解转化为稳定的 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1 α} ,故目前均以其代谢产物作为间接判断其浓度的指标。但通过已有文

献调研,熟大黄对热毒血瘀模型大鼠 $\text{TXB}_2/6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 系统的影响至今尚未见相关报道,故本文通过检测其代谢产物 $\text{TXB}_2/6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 的比值以反映体内 $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$ 的比值变化,探明熟大黄对热毒血瘀证的治疗效果并进行作用机制。结果表明,通过内毒素结合盐酸肾上腺素造模后,模型大鼠血浆中 TXB_2 含量的显著降低及 $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 水平的显著升高均表明机体的血管内皮细胞受损,血管强烈收缩,血小板聚集从而促使血瘀情况加重,体内 $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$ 比值的相对平衡被打破。给予高剂量的熟大黄煎剂治疗,能有效减少 TXB_2 的合成释放,增加 $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 的生成表达,使得体内 $\text{TXB}_2/6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 的比值显著降低并趋向正常值,通过抑制血小板聚集、改善血管内皮功能,达到活血化瘀的作用。

参考文献:

- [1] 巩海涛,王雁群,贺广彬,等. 大黄虻虫丸抗栓作用及机理的研究[J]. 药学研究,2002,21(4):57-58.
GONG HT, WANG YQ, HE GB, et al. Study on antithrombotic effect and mechanism of Dahuang Zhechong Pill[J]. J Pharmaceut Res,2002,21(4):57-58.
- [2] 隋峰,闫美娟,李燕,等. 不同炮制法对大黄活血化瘀作用影响的对比研究[J]. 中药药理与临床,2012,28(6):90-93.
DUO F, YAN MJ, LI Y, et al. Comparison of the actions on blood stasis of rhubarb with different prepared methods[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med,2012,28(6):90-93.
- [3] 赵玲. 生、熟大黄活血化瘀作用及长期毒性的比较研究[D]. 成都:成都中医药大学,2015.
ZHAO L. The study on comparing blood circulation and long-term toxicity of rhubarb and stewed rhubarb[D]. Chengdu: Chengdu University of Chinese Medicine, 2015.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
China Pharmacopoeia Committee. Chinese Pharmacopoeia[S]. Beijing: China pharmaceutical technology press,2015.
- [5] ZHU TT, WU LI, WANG XL, et al. Investigation on relationships between chemical spectrum and bioeffect of prepared rhubarb decoction in rats by UPLC-ESI-Q-TOF-MS method coupled with gray correlation analysis[J]. J Funct Food,2017, 31:104-112.
- [6] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2011.
CHEN Q. Methodology on Chinese Medicinal Pharmacology[M]. Beijing: People's medical publishing house,2011.
- [7] KANG N, LEE JH, LEE WW, et al. Gallic acid isolated from *Spirogyra* sp. improves cardiovascular disease through a vasorelaxant and antihypertensive effect [J]. Environment Toxicol Pharmacol, 2015, 39, 764-772.
- [8] 杨威,张学进,郭勇. 热毒血瘀证与炎症相关性研究进展[J]. 中华中医药学刊,2010,28(10):2168-2171.
YANG W, ZHANG XJ, GUO Y. Research progress of correlation between toxic-heat-blood-stasis syndrome and inflammation [J]. Chin Arch Tradit Chin Med,2010,28(10):2168-2171.
- [9] 梁爱华,丁晓霜,李文,等. 血瘀证与血栓形成病证结合动物模型的研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(20):1613-1616.
LIANG AH, DING XS, LI W, et al. Development of an animal model of blood stasis syndrome and thrombosis[J]. China J Chin Mater Med,2005,30(20):1613-1616.
- [10] 孙静,温成平,曹灵勇,等. 解毒祛瘀滋肾拆方对狼疮样小鼠肾 $\text{TXB}_2/6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 的影响[J]. 浙江中医杂志,2010,45(6):456-457.
SUN J, WEN CP, CAO LY, et al. Effects of separated recipes of "Jiedu Quyu Zishen Decoction" on $\text{TXB}_2/6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ in lupoid mice model[J]. Zhejiang J Tradit Chin Med, 2010, 45 (6):456-457.
- [11] 陈春,杨天伦. $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$ 与心血管疾病[J]. 现代生物医学进展,2008,8(11):2166-2168.
CHEN C, YANG TL. $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$ and cardiovascular disease [J]. Progr Mod Biomed,2008,8(11):2166-2168.

(编辑:董宇)