

基于动物温度趋向行为学的吴茱萸多组分寒热药性差异研究

贾荣娣^{1,2}, 汪华君^{1,2}, 蒋俊², 贾晓斌³

(1. 江苏大学附属医院, 江苏 镇江 212008; 2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 3. 江苏省中医药研究院中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028)

摘要: **目的** 阐述热性中药吴茱萸中各组分的寒热药性差异。 **方法** 选用 KM 小鼠, 分别灌胃给予吴茱萸水提液及其不同洗脱部位, 考察不同组分对小鼠温度趋向性的影响, 并结合小鼠的肝脏 ATP 酶活力和能量代谢变化, 探讨吴茱萸不同组分寒热药性。 **结果** 与空白组比, 60% 醇洗部位、80% 醇洗部位和吴茱萸水提液组小鼠在低温区的停留比例明显增高 ($P < 0.05$); 水洗组小鼠在高温区的停留比例明显增高 ($P < 0.05$), 表现出明显的趋热性; 水洗组小鼠肝组织钠钾 ATPase、镁 ATPase 活力均显著降低 ($P < 0.05$); 20% 醇洗部位小鼠肝组织钙 ATPase 活力均显著提高 ($P < 0.05$); 60% 醇洗部位、80% 醇洗部位小鼠肝组织钠钾 ATPase 活力比空白组高, 且有显著差异 ($P < 0.05$); 吴茱萸水提液组钠钾 ATPase、钙 ATPase 较空白组高, 且有显著差异 ($P < 0.05$)。与空白组比较, 吴茱萸水提物组及其 20% 醇洗部位、60% 醇洗部位和 80% 醇洗部位均增加了小鼠的耗氧量、产热量和能量代谢 ($P < 0.05$); 吴茱萸水洗脱部位降低了小鼠的耗氧量、产热量和能量代谢 ($P < 0.05$)。 **结论** 吴茱萸所表现出的热性, 是在寒性组分和热性组分相互作用后药性作用的综合或加和, 其中包含了热性组分的热性抵抗寒性组分的寒性过程而最终体现出热性。

关键词: 吴茱萸水提液; 组分; 寒热药性; 温度趋向性; ATP 酶活力; 能量代谢

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-0482(2020)01-0063-05

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0063

引文格式: 贾荣娣, 汪华君, 蒋俊, 等. 基于动物温度趋向行为学的吴茱萸多组分寒热药性差异研究[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(1): 63-67.

Study on the Cold-Heat Nature of Multicomponents in Fructus Evodiae Based on the Ethology of Animal Temperature Tropism

JIA Rong-di^{1, 2}, WANG Hua-jun^{1, 2}, JIANG Jun², JIA Xiao-bin³

(1. Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, 212008, China; 2. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang, 212013, China; 3. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing, 210028, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To expound the cold and heat properties of different components in Evodia rutaecarpa. **METHODS**

KM mice were orally administrated with Evodia rutaecarpa water extract or its different elution parts. The different elution parts on the temperature tropism of mice, the ATP enzyme activity in mice liver, and the energy metabolism in mice were carried out to evaluate their cold-heat nature. **RESULTS** Compared with the blank control group, the proportion of mice staying in the low temperature area was significantly increased under the treatment of 60% ethanol washed part, 80% ethanol washed part and Evodia rutaecarpa aqueous extract group ($P < 0.05$). The retention rate of mice in the high temperature area was significantly higher in the washing group ($P < 0.05$). The activities of Na-K-ATPase and Mg-ATPase in mice liver were significantly decreased ($P < 0.05$) under the treatment of aqueous washing group. The activities of Ca-ATPase in mice liver of 20% group were significantly increased ($P < 0.05$). The activity of Na-K-ATPase in mice liver of 60% and 80% group was higher than control group ($P < 0.05$). The activity of Na-K-ATPase and Ca-ATPase of the Evodiae water extract group was higher than control group ($P < 0.05$). Compared with the blank group, Evodia rutaecarpa water extract group and its 20%, 60% and

收稿日期: 2019-03-17

基金项目: 国家自然科学基金(81703773); 江苏省自然科学基金(BK20170560); 中国博士后基金(2018T110461)

第一作者: 贾荣娣, 女, 副主任药师, E-mail: 736861367@qq.com

通信作者: 蒋俊, 男, 副教授, 主要从事中药炮制研究, E-mail: jiangjuntcm2007@hotmail.com

80% groups increased the mice oxygen consumption, heat production and energy metabolism ($P < 0.05$). Evodia rutaecarpa water elution site reduced the consumption Oxygen, caloric and energy metabolism ($P < 0.05$). **CONCLUSION** The thermal properties of Evodia rutaecarpa are the synthesis or addition of its cold and thermal components. Meanwhile, the thermal components resisted the cold nature of cold components and finally showed the nature of heat.

KEY WORDS: Evodiae water extract; components; cold and heat nature; temperature tropism; activity of ATPase; energy metabolism

中药根据其药性被划分为 4 类：寒、热、温、凉，但是，药性产生的物质基础至今尚未阐释清楚。中药药性的分类是根据作用于机体的客观反映，正因为中药中所含成分/组分复杂，尚不能确定中药的药性是中药中的某单一成分的作用还是所含多种成分/组分的综合体现，这是一个亟需解决科学难题^[1-3]。吴茱萸是中医临床的常用中药，具有散寒止痛、助阳止泻等功能^[4]，主要含有生物碱、苦味素、有机酸类等多种成分，其中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和吴茱萸内酯是主要活性成分^[5]。吴茱萸碱和吴茱萸次碱同为吴茱萸中生物碱类成分，研究发现吴茱萸碱和吴茱萸次碱对体温的影响不同，其中，吴茱萸碱会使脐部的温度升高，而吴茱萸次碱则使脐部的温度降低。因此，不同成分/组分具有不同的寒热药性。

寒热药性研究的技术方法是其研究瓶颈，大量研究表明动物对温度具有一定的选择性，表现出温度趋向性，这种温度趋向性受机体能量状态变化的影响^[6-10]。由此可见，机体对寒热环境适应性的差异可能是中药对机体能量代谢干预的结果，也可以认为是中药寒热药性的某种表达方式。肖小河团队创新性地提出了基于动物温度趋向行为学的冷热板示差法^[11-15]，这一技术也成功地评价了黄连、吴茱萸及黄连吴茱萸药对的寒热药性，众多科学家也将这一模型应用到了中药炮制和配伍前后的药性评价^[16-17]。但是，迄今为止，针对同一味药物的不同组分进行的寒热药性评价鲜有报道。本研究采用冷热板示差法探讨吴茱萸多组分的寒热药性与动物温度环境趋向性、ATP 酶活力以及能量代谢的内在联系，建立吴茱萸中不同组分的寒热药性客观评价方法，探讨热性中药吴茱萸药性的科学内涵。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

PB60-2E 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); R-220 型旋转蒸发仪(德国 Buchi 公司); HH-6 型数显电子恒温水浴锅(金坛市丹瑞电器厂); HB3 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工

贸有限公司); ATP 酶试剂盒、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 药物制备和剂量

吴茱萸采用水煎法：取吴茱萸适量，10 倍量的水煎煮 1 h 后，过滤，8 倍量的水煎煮 1 h 后，过滤并合并 2 次滤液，减压浓缩后得吴茱萸水提取物，合生药量 0.2 g/mL。黄连总生物碱的制备，按照文献方法^[18]，采用 70% 乙醇回流提取，料液比为 1 : 15，煎煮 3 次，每次时间为 1.5 h，合并提取液，减压浓缩，制备黄连总生物碱，浓度为 0.2 g/mL。

1.3 动物给药及分组处理

清洁级 KM 小鼠，雄性，体质量 18~20 g，动物许可证号：SYXK(苏)2013-0036，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。期间自由饮食、饮水，温度 (20±2)℃，湿度 60%~80%。

将小鼠随机分成空白组、黄连总生物碱组、吴茱萸水提物组、吴茱萸醇洗脱组(水洗组)、吴茱萸水提物 20% 醇洗脱组(20)、吴茱萸水提物 40% 醇洗脱组(40)、吴茱萸水提物 60% 醇洗脱组(60)、吴茱萸水提物 80% 醇洗脱组(80)，每组 10 只。实验开始前 30 min，使小鼠感受不同温区的温度，学习记忆不同温区的位置。给药前测定小鼠肛温，淘汰体温差异较大者。黄连组、吴茱萸组分别灌胃黄连、吴茱萸水煎液 5 g/kg，各部位组分按照相同生药量(5 g/kg)灌胃给药，空白组给予同体积的生理盐水，连续给药 7 d。

1.4 吴茱萸各组分的制备

AB-8 大孔树脂应用广泛，适宜用水溶性、具有弱极性物质的分离、纯化，并广泛用于生物碱、鞣质、多糖、黄酮等组分的分离。选用 AB-8 型大孔树脂分离吴茱萸中组分，从水洗部位得到酚酸类组分(绿原酸)、60% 醇洗部位得到了苦味素类组分(吴茱萸内酯)、80% 醇洗部位得到了生物碱类组分(吴茱萸碱和吴茱萸次碱)，20% 醇洗部位和 40% 醇洗部位的组分类型待进一步解析。为了对比各洗脱部位的化学成分差异，各组分均在相同的 HPLC 条件下进

行分离分析(流动相:乙腈-0.1%磷酸,梯度洗脱程序:0~7 min,5%~8%乙腈;7~13 min,8%~11%乙腈;13~40 min,11%~40%乙腈;40~70 min,

40%~60%乙腈。流速 1 mL/min,检测波长 205、225、324 nm;柱温:25 ℃),代表性的 HPLC 图谱如图 1 所示。

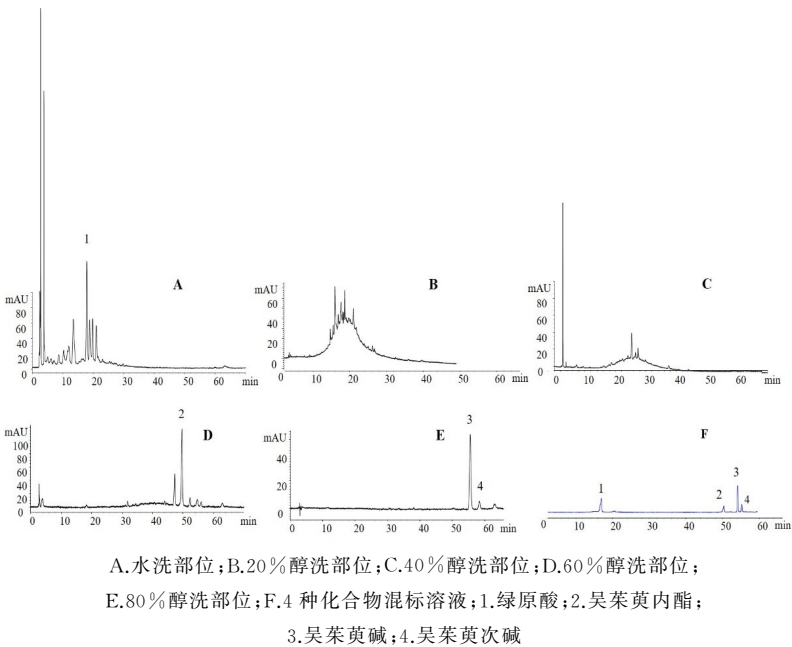


图 1 AB-8 大孔树脂制备吴茱萸各洗脱部位的 HPLC 色谱图

1.5 小鼠温度趋向性测定^[11-15]

选用 3 个数显电子恒温水浴锅,分别控制 3 个不同的温度区域(20、35、50 ℃),在 3 个温度区域上装上一自制挡板,将水浴锅上的温区均匀地地划分成 4 道,每一道均同时包含 3 个温区,不同组别的实验小鼠将被分别放入其中,待小鼠熟悉环境后,秒表计时,统计一段时间内各组小鼠在不同温区的总停留时间。实验室温度(20±2)℃,水浴温控系统温度设置:低温板 20 ℃,中温板 35 ℃,高温板 50 ℃。考察装置示意图,如图 2。每次给药 1 h 后,将小鼠依次放入冷热板上各通道内,待其熟悉各温区的位置后,监测并记录其不同温区的趋向活动,记录时间为 1 h。停留比例=各温区停留时间/总监测时间×100%。

1.6 小鼠肝组织 Na⁺-K⁺ ATP 酶、Ca²⁺ ATP 酶、Mg²⁺ ATP 酶活性测定

处死小鼠后取其肝脏,精密称量,制备成 2%的肝组织匀浆,采用定磷法测定 ATP 酶活性。其活性以每 1 h 每 1 mg 组织蛋白中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量作为一个 ATP 酶活力单位(U/mg)。

1.7 小鼠耗氧量、产热量和能量代谢率的检测

各组小鼠,最后 1 次灌胃 30 min 后,待其呼吸耗氧量稳定,放入 250 mL 玻璃磨砂代谢瓶(含钠石灰 6 g),橡胶瓶塞穿过 1 支温度计用于检测瓶内温度,瓶内和瓶塞均用凡士林涂抹密封,与瓶内相通的两条胶管,一条连接装有 20 mL 新鲜空气的注射器,另一条连接水测压计,不断向瓶内注入新鲜空气保持水测压计的水平面维持在瓶口密封时的刻度,记录 1 h 注入瓶内的空气量,根据《动物生理学实验》测算^[19]小鼠 1 h 的耗氧量、产热量、能量代谢率,每次试验前后称小鼠的体质量。

1.8 统计学方法

各数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,小鼠各温区活动分布率、肝组织 ATP 酶活性活力和能量代谢均采用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

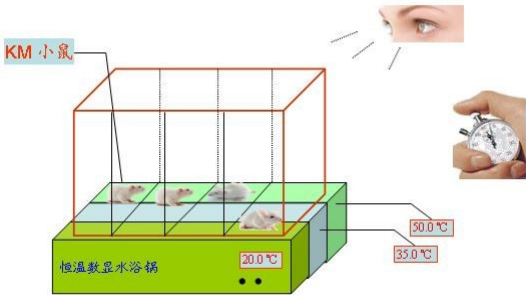


图 2 小鼠温度趋向行为学考察装置示意图

2 结果

2.1 小鼠温度趋向性行为比较

结果见表 1。

2.2 小鼠肝组织 ATP 酶活性的变化

表 1 小鼠在各温区的总停留时间比例($\bar{x} \pm s, n=10$)

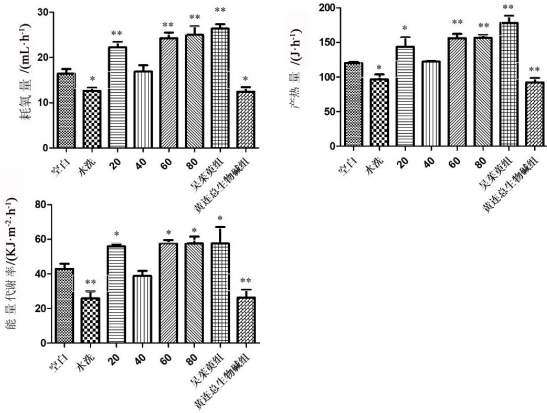
组别	20℃温区/%	35℃温区/%	50℃温区/%
空白组	0.31±0.07	0.42±0.15	0.22±0.05
水洗组	0.14±0.06	0.45±0.06	0.39±0.05*
20%醇洗部位	0.35±0.10	0.42±0.11	0.22±0.04
40%醇洗部位	0.38±0.13	0.40±0.14	0.20±0.05
60%醇洗部位	0.44±0.09*	0.28±0.12	0.27±0.07
80%醇洗部位	0.66±0.23*	0.26±0.20	0.07±0.09
吴茱萸水提液组	0.38±0.09*	0.30±0.12	0.30±0.12
黄连总生物碱组	0.25±0.15	0.32±0.20	0.41±0.20*

注:与空白组比较,* $P<0.05$ 。

表 2 小鼠肝组织中钠钾 ATPase、钙 ATPase 及镁 ATPase 活力的比较($\bar{x} \pm s, U \cdot \text{mg}^{-1}, n=10$)

组别	钠钾 ATPase 活力	钙 ATPase 活力	镁 ATPase 活力
空白组	5.51±0.69	4.74±0.56	3.85±0.45
水洗组	4.94±0.49*	4.86±0.76	3.13±0.30*
20%醇洗部位	5.81±0.68	5.34±0.59*	4.18±0.52
40%醇洗部位	5.43±0.85	4.82±1.38	3.91±0.99
60%醇洗部位	6.44±0.69*	4.60±0.73	3.71±0.61
80%醇洗部位	6.55±0.88*	4.52±0.67	3.53±0.56
吴茱萸组	6.30±0.63*	5.28±0.57*	3.75±0.44
黄连总生物碱组	4.63±0.87*	3.92±0.33*	3.75±0.26

注:与空白组比较,* $P<0.05$ 。



注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n=10$ 。

图 3 小鼠耗氧量、产热量和能量代谢率的比较

3 讨论

综合各组对小鼠温度趋向性、ATP 酶活性和基础能量代谢的影响,虽然吴茱萸的水提取物体现出了热性,但是吴茱萸水提取物中的多个组分却有截然不同的寒、热药性。其中,吴茱萸水提液中的水洗脱部分体现出了寒性,应归属于寒性组分;吴茱萸水提液中的 20%醇洗部位、60%醇洗部位、80%醇洗

结果见表 2。

2.3 小鼠耗氧量、产热量和能量代谢率的变化

结果见图 3。

部位组分体现出了热性,应归属于热性组分;吴茱萸水提液中的 40%醇洗部位组分体现出了平性,对吴茱萸的整体药性无特异性趋向。因此,吴茱萸整体上所表现出的热性,是在寒性组分和热性组分相互作用后的药效作用的综合或加和作用,其中包含了热性组分抵抗寒性组分,热性组分的强度大于寒热组分的强度,则寒性组分的寒性展现不出来,而吴茱萸整体(水提物)最终体现出了热性,实质是其内部热性组分的热性对抗了寒性组分的寒性的复杂过程。

中药本身即是一个复杂的整体,有其相应的物质基础,即相应的“组分结构”,而中药的药性即为中药中复杂的组分结构作用于人体后的综合体现^[20-24]。而中药的药性即为中药所具有的组分结构作用于人体后的综合体现。中药中的各组分/组分均可表现相应的药性属性(寒热温凉),组分与组分之间以及组分内部都存在着药性差异,若成分/组分之间的药性相同,表现为协同作用,能增强这一药性,若成分/组分之间的药性相者,则药性会相互抵

消。后续文章中将根据“组分结构”假说,探讨中药的配伍和炮制机制。

参考文献:

- [1] 赵兴业.中药寒热药性生理生化评价指标的初步研究[D].北京:北京中医药大学,2007.
- [2] 严永清,吴建新.药物的辛味与归经、作用及化学成分的关系[J].中药通报,1987,12(1):53-56.
- [3] 杨波,王振国.植物类中药寒热药性与无机元素相关性研究[J].南京中医药大学学报,2011,27(2):109-111.
- [4] 王毛妮,周春祥.吴茱萸汤证探幽[J].南京中医药大学学报,2006,22(4):214-216.
- [5] 刘陶世,赵新慧,黄耀洲.不同溶媒对左金丸小檗碱和吴茱萸碱等5种生物碱溶出行为的影响[J].南京中医药大学学报,2007,23(3):172-174.
- [6] 王立志,李晓晨,孙涛,等.中国林蛙蝌蚪和大蟾蜍蝌蚪的最适温度、逃避温度及致死温度[J].动物学杂志,2005,40(2):23-27.
- [7] CHRISTOPHER JG. Behavioral and autonomic thermoregulation in the rat following propylthiouracil-induced hypothyroidism[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1997, 58(1): 231-236.
- [8] HELBO S, BUNDGAARD AG, FAGO A. Myoglobin oxygenation and autoxidation in three reptilian species[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2015, 187: 8-12.
- [9] GORDON CJ, BECKER P, PADNOS B. Comparison of heat and cold stress to assess thermoregulatory dysfunction in hypothyroid rats[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000, 279(6): 2066-2071.
- [10] CHRISTOPHER JG, PEGGY B, JOSEPH SA. Behavioral thermoregulatory responses of single-and group-housed mice[J]. Physiol Behav, 1998,65(2): 255-262.
- [11] 周灿平,王伽伯,张学儒,等.基于动物温度趋向行为学评价的黄连及其炮制品寒热药性差异研究[J].中国科学C辑:生命科

学,2009,39(7):669-676.

- [12] 赵海平,赵艳玲,王伽伯,等.基于冷热板示差法的中药大黄和附子寒热药性差异的表征[J].中国科学C辑:生命科学,2009,39(8):803-808.
- [13] 周灿平,赵艳玲,王伽伯,等.基于动物温度趋向行为学评价初步建立中药寒热体质病理模型[J].中医杂志,2010,51(10):937-949.
- [14] 邢小燕,赵艳玲,孔维军,等.动物行为学在中药寒热药性研究中的思考与实践[J].中国中药杂志,2011,36(4):519-523.
- [15] 任永申,王伽伯,赵艳玲,等.小鼠限食/低温游泳模型评价黄连、吴茱萸及其复方寒热药性[J].药学学报,2009,44(11):1221-1227.
- [16] 关宇瞳,张振秋.基于冷热板示差法探究黄连-肉桂药对配伍前后的药性变化[J].中国药房,2016,27(7):916-919.
- [17] 王龙,张振秋.基于小鼠温度趋向行为学评价生炒决明子寒热药性差异研究[J].辽宁中医杂志,2016,43(1):187-190.
- [18] 孙宁,阳张宏,川顾健,等.葛根黄连组分毒理学研究[J].中药药理与临床,2017,33(1):95-98.
- [19] 张振汉,程富华,于洪川,等.不同温度对小鼠能量代谢的影响[J].农业科学研究,2007,28(3):18-20.
- [20] 蒋俊,高成林,贾晓斌,等.黄黄连寒热药性研究概况及其研究思路和方法[J].中草药,2009,40(9):1-4.
- [21] 蒋俊,贾晓斌,薛璟,等.黄连的炮制历史沿革及其炮制品现代研究进展[J].中国医院药学杂志,2010,30(2):156-158.
- [22] 贾晓斌,蒋俊,陈斌,等.黄黄连炮制研究进展及炮制机理研究思路和方法[J].中国中药杂志,2009,34(10):1314-1317.
- [23] 蒋俊,贾晓斌,封亮,等.中药炮制:反制与反佐制[J].中华中医药杂志,2009,24(9):1177-1181.
- [24] 蒋俊,贾晓斌,陈斌,等.基于组分结构假说构建中药药性矢量结构方程[J].中草药,2012,3:422-427.

(编辑:董宇)