

下瘀血汤中大黄生熟互换对热结血瘀模型大鼠血管内皮功能及微循环的影响

赵 玲, 胡昌江*, 潘 新, 耿媛媛, 吴晓青, 吴文辉, 张 乐

成都中医药大学, 四川 成都 611137

摘要: 目的 研究下瘀血汤中大黄生熟互换对热结血瘀模型大鼠血管内皮功能及微循环的影响。方法 采用 ig 热性中药结合 sc 盐酸肾上腺素的方法, 复制热结血瘀大鼠模型。大鼠 ig 热性中药 28 d, 第 22 天起 sc 盐酸肾上腺素, 并 ig 相应的药物。第 29 天, 眼眶取血检测检测血管内皮素 (ET)、一氧化氮 (NO)、前列环素 (PGI₂)、血管性血友病因子(vWF); 股动脉取血, 检测血液流变学各项指标。结果 含生大黄 (复方 A) 和熟大黄 (复方 B) 下瘀血汤均具有改善热结血瘀模型大鼠血液流变学、血管内皮细胞损伤和微循环的作用; 与复方 A 相比, 复方 B 各剂量组对血液流变学各指标、ET、NO、PGI₂、vWF 因子水平具有显著的改善作用 ($P < 0.05, 0.01$)。结论 含熟大黄下瘀血汤的活血化瘀作用更强, 可能是通过调节 ET、NO、PGI₂、vWF 因子水平而实现的。

关键词: 下瘀血汤; 生/熟大黄; 热结血瘀模型; ET; NO; PGI₂; vWF 因子

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2014)05-0413-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.05.007

Effect of raw/stewed Rhubarb in Xiayuxue Decoction on vascular endothelial function and microcirculation of rats with heat accumulation of blood stasis

ZHAO Ling, HU Chang-jiang, PAN Xin, GENG Yuan-yuan, WU Xiao-qing, WU Wen-hui, ZHANG Le

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To study the effect of raw/stewed Rhubarb in Xiayuxue Decoction on vascular endothelial function and microcirculation of rats with heat accumulation of blood stasis. **Methods** Seventy SD rats were divided into seven groups. The rats in experimental groups were given heat drugs of traditional Chinese medicine for 28 d, then injected adrenaline hydrochloride for later 7 d, twice a day. At the same time, those experimental rats were given different doses of Xiayuxue Decoction (9 and 4.5 g · kg⁻¹) orally for 7 d. Then blood rheologic parameters such as ET, NO, PGI₂, and VWF in rats were detected. **Results** Xiayuxue Decoction A/B have improved vascular endothelial cell injury and the microcirculation of the rats with heat accumulation of blood stasis. Compared with Xiayuxue Decoction A, each dose of Xiayuxue Decoction B has improved the levels of ET, NO, PGI₂, and vWF factor significantly ($P < 0.05, 0.01$). The efficiency on promoting blood circulation to remove blood stasis of Xiayuxue Decoction B was definitely better than Xiayuxue Decoction A. **Conclusion** The mechanism of promoting blood circulation to remove blood stasis may be through regulating the levels of ET, NO, PGI₂, and VWF factor.

Key words: Xiayuxue Decoction; raw/stewed Rhubarb; heat accumulation of blood stasis; ET; NO; PGI₂; vWF factor

下瘀血汤始载于《金匮要略》, 主要用于产妇腹痛, 腹中有干血着脐下, 经水不利。方中大黄荡逐瘀血, 为君药; 《金匮玉函经二注》记载“血之干燥凝着者, 非润燥荡涤不能去也。……须用大黄荡逐之。”但笔者并未见到各书中对该方中的君药大黄的

炮制品种的记载以及现代研究。本课题研究下瘀血汤配伍不同的大黄炮制品对热结血瘀模型大鼠血管内皮细胞及微循环的作用差别, 初步阐释下瘀血汤中大黄炮制对该方的影响, 为大黄“生熟有别”的炮制原理提供合理的科学依据。

收稿日期: 2014-06-23

基金项目: 中医药行业科研专项 (20110700710)

作者简介: 赵 玲 (1989—), 女, 硕士在读, 从事中药炮制原理研究。Tel: 18280408742 E-mail: zhaoling0221@126.com

*通信作者 胡昌江, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制原理的研究。Tel: 13980980796 E-mail: hhcjj@hotmail.com

1 材料

1.1 药物

大黄药材购自四川成都新荷花大黄基地, 经成都中医药大学炮制教研室卢先明教授鉴定为蓼科植物药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根茎。生大黄: 刮去外皮, 切厚片或块, 低温烘干; 熟大黄^[1]: 取生大黄片或块适量, 用黄酒拌匀, 闷 1.5 h 至酒被吸尽, 置高压灭菌锅内蒸制 6 h, 取出, 干燥。每 100 千克大黄片或块, 用黄酒 30 kg。

黄酒(四川巨龙食品有限公司), 盐酸肾上腺素(远大医药有限公司, 批号 121205), 医用生理盐水。阳性对照药阿司匹林肠溶片(石家庄康力药业有限公司, 批号 120318)。附子、干姜、肉桂、吴茱萸、胡椒、桃仁、蛭虫购于四川温江瑞和大药房。

1.2 仪器、试剂盒

酶标仪(芬兰 Labsystems Multiskan MS 352 型)、洗板机(芬兰 Thermo Labsystems AC8)、离心机(微量高速离心机 TG16W)、培养箱(隔水式恒温培养箱 GNP-9080 型)。

一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号 20130325), 大鼠血管性血友病因子(vWF) ELISA 试剂盒(成都光海科技有限公司提供, 批号 201310-X16), 大鼠内皮素-1(ET-1) ELISA 试剂盒(成都光海科技有限公司提供, 批号 201310-X07), 大鼠前列环素(PGI₂) ELISA 试剂盒(成都光海科技有限公司提供, 批号 201310-X24)。

1.3 动物

SD 大鼠, SPF 级, 雄性, 体质量 200~220 g, 由四川达硕动物实验中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(川) 2008-24。

2 方法

2.1 药液的制备

热性中药的制备: 参考文献^[2], 取等量的附子、干姜、肉桂、吴茱萸、胡椒提取热性中药溶液, 其中干姜、吴茱萸、胡椒、肉桂先提取挥发油后同其余药物合煎提取 2 次, 滤液浓缩至 2 g/mL。加入挥发油, 搅拌均匀后置冰箱保存, 待用。

下瘀血汤药液(复方 A)的制备: 取生大黄、桃仁、蛭虫适量, 按 2:4:3 的比例用 10 倍量 75% 的乙醇和水分别提取 2 次, 提取时间分别为 60、40 min。回收乙醇, 合并滤液, 减压浓缩至 1 g/mL(以方中的生药量计), 待用。

复方 B 的制备: 将复方 A 中的生大黄换成熟大

黄, 同法操作, 即得复方 B。

阳性药阿司匹林的制备: 取阿司匹林肠溶片适量, 粉碎, 配制成 10 mg/mL 的阳性对照药液, 冷藏备用。

2.2 药效学实验

参考文献方法^[2-3], 70 只 SD 大鼠随机分为阴性组、阳性组、模型组及复方 A 高、低剂量组, 复方 B 高、低剂量组等 7 个组。除阴性组外, 其余各组 ig 热性中药 10 mL/kg, 时间为 28 d。第 22 天开始, 上下午各 sc 一次盐酸肾上腺素, 间隔为 8 h, 剂量为 0.9 mg/kg。

第 22 天开始, 除阴性组外, 其余各组每天下午 ig 相应的药液, 阳性药 0.10 g/kg 阿司匹林, 复方 A/B 高剂量 9 g/kg, 复方 A/B 低剂量 4.5 g/kg。最后一次给药后, 禁食 12 h, 水合氯醛麻醉, 股动脉取血 3 mL, 置肝素钠抗凝管中; 眼眶取血 2 mL, 静置 30 min 后, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 4 ℃ 保存待测。

2.3 检测

全血由成都中医药大学附属医院代为检测血液流变学。

按一氧化氮(NO)测试盒说明书和血管性血友病因子(vWF)、内皮素-1(ET-1)、前列环素(PGI₂) ELISA 试剂盒说明书操作, 分别在 550、450 nm 波长下检测, 读取各样品的吸光度(A)值。

2.4 数据处理

数据使用 SPSS19.0 软件进行统计, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差(ANOVA)分析。

3 结果

3.1 对血液流变学的影响

与阴性组相比, 模型组的全血黏度、血浆黏度、纤维蛋白原的水平显著性升高($P < 0.01$), 说明模型造模成功; 各给药剂量组的血液流变学指标与模型组相比, 均有所改善, 使之趋向于正常水平($P < 0.05$ 、 0.01); 除纤维蛋白原外, 与等剂量复方 A 相比, 复方 B 各剂量组对模型大鼠血液流变学各水平的改善作用较为显著($P < 0.05$ 、 0.01)。见表 1。

3.2 对模型大鼠血管内皮细胞的影响

模型组的 NO、ET-1 水平均与阴性组有显著降低或升高($P < 0.01$); 给药后, 阳性组与复方 A/B 各剂量组均能调节 NO、ET-1 的量, 使之趋向于正常水平; 与等剂量复方 A 相比, 复方 B 各剂量组对二者的调节作用更明显($P < 0.05$ 、 0.01)。见表 2。

表1 对模型大鼠血液流变学的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 1 Effects on blood rheology of rats with heat accumulation ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	全血黏度/(mPa·s)				血浆黏度/ (mPa·s)	纤维蛋白原/ (g·L ⁻¹)
		1 s ⁻¹	5 s ⁻¹	30 s ⁻¹	200 s ⁻¹		
阴性	—	32.94±5.41	13.16±1.90	6.89±0.83	4.02±0.13	1.66±0.01	4.38±0.23
模型	—	45.07±3.87 ^{▲▲}	21.02±3.11 ^{▲▲}	8.45±0.45 ^{▲▲}	6.86±0.43 ^{▲▲}	1.96±0.08 ^{▲▲}	4.65±0.65 ^{▲▲}
阳性	0.1	33.91±1.78 ^{**}	15.53±1.46 ^{**}	7.26±0.55 ^{**}	5.26±0.09 ^{**}	1.68±0.03 ^{**}	4.37±0.41 ^{**}
复方 A	9.0	37.91±6.78 [*]	15.75±1.45 ^{**}	7.73±0.30 ^{**}	5.60±0.24 [*]	1.70±0.01 ^{**}	4.42±0.22 ^{**}
	4.5	38.57±1.87 [*]	16.51±1.87 ^{**}	7.86±0.98	5.97±0.16 [*]	1.74±0.05 ^{**}	4.51±0.35 [*]
复方 B	9.0	34.46±4.47 ^{**#}	14.73±1.12 ^{**##}	7.16±0.82 ^{**##}	5.22±0.23 ^{**#}	1.66±0.02 ^{**#}	4.32±0.18 ^{**}
	4.5	37.87±0.78 [*]	16.14±2.03 ^{**}	7.42±0.25 ^{*#}	5.73±0.18 [*]	1.71±0.09 ^{**}	4.49±0.34 [*]

与阴性组比较: ^{▲▲} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; 与等剂量复方 A 相比: [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; 下表同^{▲▲} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ vs model group; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ vs Xiayuxue Decoction A in same dose; same as below

表2 对热结血瘀模型大鼠血管内皮细胞的影响

($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Effects on vascular endothelial cells of rats with heat accumulation ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	NO/(μmol·L ⁻¹)	ET-1/(ng·L ⁻¹)
阴性	—	21.32±1.85	85.32±12.88
模型	—	8.65±2.32 ^{▲▲}	108.19±14.40 ^{▲▲}
阳性	0.1	21.91±3.66 ^{**}	88.53±10.89 ^{**}
复方 A	9.0	15.12±1.19 ^{**}	96.31±3.39 [*]
	4.5	11.80±2.98 ^{**}	99.84±3.83 [*]
复方 B	9.0	19.69±1.15 ^{**##}	87.29±16.71 ^{**#}
	4.5	14.30±1.68 ^{**#}	95.54±8.05 [*]

与正常组比较: ^{▲▲} $P<0.01$ ^{▲▲} $P<0.01$ vs control group

3.3 对模型大鼠微循环的影响

模型组的 PGI₂、vWF 水平均与阴性组有显著升高或降低 ($P<0.01$); 给药后, 阳性组与复方 A/B 各剂量组均能调节 PGI₂、vWF 二者的量, 使之趋向于正常水平; 与等剂量复方 A 相比, 复方 B 各剂量组对二者的调节作用更显著 ($P<0.05$)。见表 3。

表3 对热结血瘀模型大鼠微循环的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 3 Effects on vascular microcirculation of rats with heat accumulation ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	PGI ₂ /(ng·L ⁻¹)	vWF/(ng·mL ⁻¹)
阴性	—	154.04±29.8	18.38±3.58
模型	—	88.57±13.7 ^{▲▲}	37.17±6.17 ^{▲▲}
阳性	0.1	134.26±19.6 ^{**}	18.05±2.01 ^{**}
复方 A	9.0	120.54±12.8 ^{**}	24.82±2.95 ^{**}
	4.5	115.47±12.7 [*]	30.35±4.38 ^{**}
复方 B	9.0	142.14±15.43 ^{**#}	20.64±2.92 ^{**#}
	4.5	122.83±28.3 ^{**}	25.12±1.78 ^{**#}

4 讨论

下瘀血汤方出《金匮要略·妇人产后病脉证治》，原主治妇人产后干血凝于脐下，小腹刺痛等，现临床多用于治疗由瘀血凝结所引起的多种病症，如额头痛、肋痛、腹胀等^[4]，或是用于治疗肝纤维化、慢性盆腔炎^[5-6]。但是对于下瘀血汤活血化瘀的作用机制尚未清楚，本课题从血管内皮细胞和微循环两方面初步探讨其作用机制。

NO 是一种具有舒张血管、降低血压等生理作用的气体信号分子^[7]，已有研究证明 NO 具有明确的舒张血管作用^[8]，ET-1 是一种具有强大的血管收缩效应的血管收缩肽，对维持血管张力与心血管稳态有重要作用^[9]，NO 与 ET-1 处于平衡状态维持正常的血管张力以及调节血管内皮舒缩平衡和局部器官的血流^[10]；PGI₂ 是具有明显的扩张血管、抑制血小板聚集作用的花生四烯酸代谢的主要产物^[11]，vWF 是由血管内皮细胞和巨核细胞合成和分泌一种糖蛋白，参与血液凝固与血栓形成^[12]，PGI₂ 和 vWF 均参与血液的微循环。

实验结果显示，热结血瘀模型大鼠的血液流变学各指标、NO、ET-1、PGI₂、vWF 各水平均显著高于正常组 ($P<0.01$)，证明造模成功。给药后，各组大鼠的血液流变学各指标、NO、ET-1、PGI₂、vWF 水平逐渐恢复正常；复方 B 各剂量组对大鼠 NO、ET-1、PGI₂、vWF 水平的改善明显强于复方 A 各剂量组，提示复方 B 对模型大鼠的治疗作用强于复方 B，临床上应用下瘀血汤治疗由于血液凝结而引起的各种疾病时，应选用熟大黄进行组方。其活血化瘀作用可能是通过调节维持血管形态的 NO、ET-1 以及参与血液微循环的 PGI₂、vWF 的水平而达到的。

参考文献

- [1] 张 然. 九制大黄炮制工艺改革、质量标准及相关研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2008.
- [2] 陈立军, 张廷模, 彭 成. 大黄不同炮制品对热结便秘模型大鼠结肠 c-kitmRNA 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2009, 25(4): 37.
- [3] 赵 玲, 魏海峰, 李雅莉, 等. 从血液流变学的改变分析肾上腺素致血瘀证大鼠模型的建立 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(2): 188.
- [4] 彭述宪. 下淤血汤的临床应用 [J]. 湖南中医杂志, 1991, (2): 20.
- [5] 吴 旻, 李金会. 下淤血汤加减治疗肝硬化临床探讨 [J]. 中国实用乡村医生杂志, 2012, 19(15): 36.
- [6] 王振宇. 下淤血汤加味治疗慢性盆腔炎 116 例临床观察 [J]. 中华临床医学卫生杂志, 2006, 4(10): 20.
- [7] 金红芳, 杜军保, 唐朝枢. 气体信号分子在心血管疾病发病中的意义 [J]. 中国医学科学院学报, 2005, 27(4): 518.
- [8] 宁天一, 王婷婷, 姜 静, 等. 气滞血瘀证大鼠 NO/NOS 体系的变化 [J]. 世界中医药, 2013, 8(1): 71.
- [9] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 490.
- [10] 徐万忠, 李 思, 张 昱. 维持性血液透析患者血瘀证积分与 ET、NO+ 的相关性研究 [J]. 中医临床研究, 2013, 5(3): 1-2.
- [11] 王 硕, 张小天, 胡 亚, 等. 血栓心脉宁片对急性血瘀大鼠血浆 TXA₂ 及 PGI₂ 含量的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(6): 712.
- [12] 吴金花, 张海丽, 冯丽珍. H 型高血压患者血浆 ET-1、vWF 因子变化的相关研究 [J]. 武警后勤学院学报: 医学版, 2013, 22(5): 356.