

胶艾汤对血虚模型大鼠补血作用的有效部位筛选

贾梅, 郑传柱, 张丽*, 丁安伟

南京中医药大学 江苏省方剂高技术研究重点实验室/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 比较胶艾汤不同溶剂提取部位对血虚模型大鼠外周血象、免疫器官指数、白细胞介素 2 (IL-2) 和促红细胞生成素 (EPO) 水平以及红细胞膜能量代谢酶活性的影响, 筛选胶艾汤补血作用的有效部位。方法 采取每天于眼底静脉丛放血 5 mL/kg, 连续放血 12 d 的方法, 复制大鼠血虚模型; 造模同时各组动物分别 ig 给予胶艾汤及其正丁醇、石油醚、醋酸乙酯、水部位浸膏 (剂量均为生药量 12 g/kg), 以复方阿胶浆为阳性对照。造模第 12 天检测各组大鼠外周血红细胞计数 (RBC)、血红蛋白 (HGB)、红细胞压积 (HCT)、血小板计数 (PLT), 计算脾脏和胸腺器官指数, 检测血清中 IL-2 和 EPO 水平, 检测全血红细胞膜能量代谢酶 Na^+ , K^+ -ATP 及 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性, UPLC 法初步分析胶艾汤不同提取部位的化学成分差异。结果 与对照组比较, 模型组大鼠 RBC、HGB、HCT、PLT、胸腺指数以及 IL-2 水平明显降低, Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性明显减弱, 脾脏指数及 EPO 水平明显升高, 表明血虚模型复制成功。与模型组比较, 胶艾汤正丁醇组可明显升高 HCT、RBC、HGB、PLT ($P < 0.05$, 0.01); 降低脾脏指数及 EPO 水平 ($P < 0.05$, 0.01); 明显升高胸腺指数、IL-2 水平 ($P < 0.01$), 升高红细胞膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶及 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性 ($P < 0.05$, 0.01)。石油醚组可明显升高 PLT 及 IL-2 水平 ($P < 0.01$), 降低 EPO 水平及脾脏指数 ($P < 0.05$, 0.01)。醋酸乙酯组可明显降低脾脏指数及 EPO 水平 ($P < 0.01$), 升高红细胞膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性 ($P < 0.05$)。水部位组可明显升高 PLT ($P < 0.05$), 降低 EPO 水平 ($P < 0.01$)。胶艾汤正丁醇提取部位中检测到其他提取部位不含有的咖啡酸、苯甲酰芍药苷、甘草酸铵, 且正丁醇提取部位中没食子酸、原儿茶酸、磷酸川芎嗪、绿原酸的量均高于胶艾汤醋酸乙酯和水提取部位。结论 正丁醇部位是胶艾汤补血作用的最强有效部位。

关键词: 胶艾汤; 补血作用; 部位筛选; 促红细胞生成素; Na^+ , K^+ -ATP 酶; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)16-2428-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.16.015

Screening of effective parts in Jiaoai Decoction with blood enriching function in blood deficiency model rats

JIA Mei, ZHENG Chuan-zhu, ZHANG Li, DING An-wei

Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae and Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To screen the active parts with enriching the blood effects of different solvent extraction parts from Jiaoai Decoction (JAD) by comparing the peripheral blood, immune organ index, interleukin 2 (IL-2), and erythropoietin (EPO) and the effect of content of erythrocyte membrane and energy metabolism enzyme activity of blood deficiency model rats. **Methods** Taking the fundus venous plexus blood 5 mL/kg every day, continuous bleeding for 12 d, to establish the rat model of blood deficiency; The model animals in each group were ig given JAD and *n*-butanol, petroleum ether, ethyl acetate, parts of water extract (12 g/kg crude drug) with compound E-Jiao slurry as a positive control. On day 12 of modeling, the erythrocyte count (RBC), hemoglobin (HGB), red blood cell hematocrit (HCT), platelet count (PLT) were detected in rats and immune organ indexes of spleen and thymus were calculated, the levels of IL-2 and EPO content were detected, energy metabolism enzymes (Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase) activity were investigated; The difference of the chemical constituents in the different solvent extraction of JAD was analyzed by UPLC. **Results** Compared with the control group, the RBC, HGB, HCT, PLT, thymus index, and IL-2 levels of rats in the model group decreased significantly, Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity weakened significantly, the spleen index and EPO levels were significantly

收稿日期: 2015-01-30

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目 (12KJA360002); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (ysxk-2014)

作者简介: 贾梅 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药复方机制研究。Tel: 18351895576 E-mail: jiamei19891230@163.com

*通信作者 张丽, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药复方及质量标准研究。Tel: (025)85811509 E-mail: zhangliquanxiong@163.com

increased, indicating that blood deficiency model was successfully established. Compared with the model group, HCT, RBC, HGB, and PLT ($P < 0.05, 0.01$) of rats in *n*-butyl alcohol group could be significantly increased; The spleen index and the content of EPO ($P < 0.05, 0.01$) were reduced; The thymus index and the content of IL-2 ($P < 0.01$) were increased, the erythrocyte Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase and Na^+ , K^+ -ATPase activity ($P < 0.05, 0.01$) was elevated. The contents of PLT and IL-2 ($P < 0.01$) in petroleum ether group could be obviously increased; The content of EPO and the spleen index ($P < 0.05, 0.01$) were decreased. The ethyl acetate fractions could obviously reduce the spleen index and the content of EPO ($P < 0.01$), increase Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity in erythrocytes ($P < 0.05$). In water group PLT ($P < 0.05$) could be significantly increased and the content of EPO ($P < 0.01$) be decreased. There were no coffee acid, benzoyl paeoniflorin, and ammonium glycyrrhizinate in other solvent extracts of JAD, while the content of gallic acid, protocatechuic acid, ligustrazine phosphate, and chlorogenic acid in *n*-butanol extract were higher than those in ethyl acetate and water extract parts of JAD. **Conclusion** The *n*-butanol extract is the most active part of JAD for enriching the blood.

Key words: Jiaoai Decoction; enriching blood effects; parts screening; haemopoietin; hemopoietin; Na^+ , K^+ -ATPase; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase

胶艾汤出自东汉张仲景《金匱要略》^[1], 全方由阿胶、艾叶、甘草、当归、川芎、白芍、生地黄 7 味中药组成, 临床主要用于治疗妇人月水过多或妊娠下血、腹中疼痛, 为传统经方, 产科要方。实验研究^[2]发现胶艾汤具有补血作用, 且本实验室前期研究也已经证实了胶艾汤的补血作用^[3], 但胶艾汤补血作用的物质基础尚不明确, 因此, 本研究采用血虚模型大鼠筛选胶艾汤补血作用的有效部位, 为深入研究胶艾汤补血作用的物质基础提供依据。

1 材料

1.1 药材

当归、川芎、白芍、生地黄、艾叶、甘草饮片均购于安徽丰源铜陵中药饮片有限公司, 批号分别为 121203、121203、121106、120908、121106、120908; 阿胶购于山东福胶集团东阿镇阿胶有限公司, 批号为 120612; 上述各饮片均经南京中医药大学段金廛教授鉴定, 分别为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的干燥根、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根、菊科植物艾 *Artemisia argyi* Lévl. et Vant. 的干燥叶、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根茎和马科动物驴 *Equus asinus* L. 的鲜皮经加工而成。

1.2 仪器

血液细胞分析仪 (ABX Pentra XL80), Anke-LXJ-11B 离心机 (上海安寿科学仪器厂), Waters I Class 超高效液相色谱仪 (美国沃特世公司), SHANGPING YP601N 型 1/10 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), 分析天平 (Sartoriusag; BP211D, $d=0.01$ mg), 紫外/可见分光光度计

(PerkinElmer), 超声波清洗机 (南京以马内利仪器设备有限公司, 功率 500 W, 频率 50 Hz)。

1.3 试药与试剂

复方阿胶浆 (山东东阿阿胶股份有限公司, 批号 1408002)。乙二胺四乙酸二钠 (EDTA, 国药集团化学试剂有限公司); 肝素 (中国惠兴生化试剂有限公司); 水合氯醛、NaCl (国药集团化学试剂有限公司); 超微量 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 白细胞介素 2 (IL-2)、促红细胞生成素 (EPO) ELISA 检测试剂盒 (南京森贝伽生物科技有限公司); 乙腈为色谱纯 (Merck), 超纯水自制, 甲酸为色谱纯 (ACS)。芍药苷、甘草酸铵、甘草苷、磷酸川芎嗪、绿原酸、香草酸对照品均购自中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110736-201136、110731-201116、111610-201106、100845-201002、110753-200413、110776-200402, 各对照品质量分数均在 98% 以上; 苯甲酰芍药苷对照品购自 MUST 公司, 批号为 MUST-13030401, 质量分数在 98% 以上; 原儿茶酸、阿魏酸、咖啡酸、毛蕊花糖苷、没食子酸对照品均购自中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110809-200604、0773-9910、110885-200102、111530-200505、110831-200302, 各对照品质量分数均在 99% 以上。

1.4 实验动物

清洁级雌性 SD 大鼠 80 只, 体质量 180~220 g, 由浙江省实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (浙) 2014-0001。

2 方法

2.1 胶艾汤及其各提取部位的制备

称取胶艾汤组方各药材饮片共 2 880 g, 依文献方法进行煎煮^[4], 水煎液减压浓缩得到胶艾汤浸膏

1 637.1 g (得率 56.84%), 取胶艾汤浸膏适量减压真空干燥, 得胶艾汤干燥粉末, 保存备用。剩余浸膏趁热用硅藻土拌样(硅藻土-浸膏 1:1.5)后置减压真空干燥箱 55 °C 烘干。再采用系统溶剂提取法对胶艾汤干燥药粉进行提取, 各溶剂提取物减压真空干燥至干, 分别得石油醚部位浸膏 6.5 g (得率 0.23%)、醋酸乙酯部位浸膏 40.2 g (得率 1.40%)、正丁醇部位浸膏 268.8 g (得率 9.30%)、水部位浸膏 492.0 g (得率 17.08%)。分别称取适量的胶艾汤及 4 个提取部位浸膏, 加 0.5% CMC-Na 溶液适量, 制得质量浓度(按生药量计算)均为 1.20 g/mL 的各供试品溶液, 各供试品溶液置 4 °C 冰箱内保存备用。

2.2 动物分组及给药

按照随机数字表法将实验动物随机分为 8 组, 每组 10 只, 分别为对照组, 模型组, 复方阿胶浆(0.15 g/kg)组, 胶艾汤组, 胶艾汤石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、水部位组。各给药组均按照临床给药剂量 2 倍折算成动物给药剂量, 即胶艾汤组和胶艾汤石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、水部位组给药剂量均为 12 g/kg (按生药量计算), 按 10 mL/kg 给药量 ig 给予相应药物, 复方阿胶浆组按 12 mL/kg 剂量 ig 给予复方阿胶浆(相当于临床给药量的 2 倍), 对照组与模型组按 10 mL/kg 体积 ig 0.5% CMC-Na 溶液, 各组均每天给药 1 次, 连续给药 12 d。造模与给药同步进行。

2.3 模型复制

参照文献方法复制大鼠血虚模型^[4]。取 SD 大鼠, 按 5.0 mL/kg 放血量连续放血 12 d, 复制大鼠血虚模型。

2.4 指标检测

造模期间, 每天记录大鼠体质量变化, 观察其反应敏捷度、毛色等的变化。各组大鼠均于造模第 12 天眼底静脉丛采血 1 mL, 以 15 mg/mL EDTA (1:9) 抗凝, 采用 ABX Pentra XL80 五分类 26 项血液细胞分析仪进行血常规检测, 主要指标包括红细胞计数(RBC)、血小板计数(PLT)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT) 4 项指标; 静脉丛采血后的大鼠以 10% 水合氯醛麻醉, 颈总动脉取血, 以 5 mg/mL 肝素抗凝(1:9), 全血按照超微量 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶试剂盒测定 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶活性; 另取全血 2 mL (不加抗凝剂) 静置 30 min 后以 3 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清用 96T 按照 ELISA 试剂

盒说明书测定血清中 IL-2 和 EPO 水平。大鼠处死后, 迅速摘取脾脏、胸腺称质量, 计算各脏器指数(脾脏指数=脾脏质量/体质量, 胸腺指数=胸腺质量/体质量)。

2.5 UPLC 法定性分析胶艾汤及其各提取部位的化学成分

2.5.1 色谱条件 T3 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1% 甲酸溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱程序: 0~2 min, 0~8% B; 2~4 min, 8%~15% B; 4~9 min, 15%~35% B; 9~12 min, 35%~100% B; 12~13 min, 100% B; 13~15 min, 100%~1% B; 15~16 min, 1% B; 柱温 30 °C; 体积流量 0.4 mL/min, 进样量 2 μL; 检测波长 254 nm。

2.5.2 UPLC 定性分析用供试品溶液的制备 分别取胶艾汤浸膏 782.0 mg、石油醚部位浸膏 4.3 mg、醋酸乙酯部位浸膏 20.8 mg、正丁醇部位浸膏 138.9 mg、水部位浸膏 240.9 mg 置 25 mL 量瓶中, 加 30% 乙腈 20 mL 超声溶解, 定容至刻度, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 以 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.5.3 对照品溶液的制备 分别取甘草苷 21.33 mg、原儿茶酸 12.65 mg、苯甲酰芍药苷 6.58 mg、甘草酸铵 17.05 mg、磷酸川芎嗪 59.23 mg、绿原酸 29.27 mg、阿魏酸 31.64 mg、毛蕊花糖苷 5.54 mg、芍药苷 19.70 mg、咖啡酸 21.95 mg、没食子酸 48.83 mg、香草酸 33.50 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 30% 乙腈 20 mL 溶解, 定容至刻度, 即得。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行双样本 *t* 检验及方差分析, 所有实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对血虚模型大鼠一般体征的影响

对照组大鼠体质量呈平稳上升趋势, 皮毛光泽而密, 精神饱满, 反应敏捷; 血虚模型大鼠, 随放血次数增多, 体质量呈下降趋势, 反应迟钝, 精神萎靡, 毛发蓬松无光泽。

3.2 对血虚模型大鼠外周血象的影响

与对照组比较, 模型组大鼠 RBC、HGB、HCT、PLT 均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, 胶艾汤组和正丁醇部位组可明显升高大鼠 HCT、RBC、HGB、PLT ($P < 0.05$ 、 0.01); 复方阿胶浆组、石油醚组、水部位组可明显升高 PLT ($P < 0.05$ 、 0.01); 复方阿胶浆组可明显升高 RBC ($P < 0.01$)。结果见表 1。

表1 胶艾汤及其各提取部位对血虚模型大鼠外周血象的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of JAD and different extraction parts on peripheral hemogram in blood deficiency model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	RBC/(×10 ¹² ·L ⁻¹)	HGB/(g·L ⁻¹)	HCT/(L·L ⁻¹)	PLT/(×10 ⁹ ·L ⁻¹)
对照	—	7.65±1.05	140.55± 8.32	40.15±5.43	1 315.20±278.51
模型	—	4.00±0.48 ^{###}	87.29±11.27 ^{###}	25.32±3.35 ^{###}	1 089.30±124.82 [#]
复方阿胶浆	0.15	4.58±0.30 ^{**}	92.11± 6.36	27.50±2.02	1 352.50± 93.58 ^{**}
胶艾汤	12	4.59±0.36 ^{**}	96.72± 5.29 [*]	28.99±1.70 ^{**}	1 209.44± 91.94 [*]
石油醚部位	12	4.29±0.50	88.63±11.58	27.06±3.15	1 295.89±173.01 ^{**}
醋酸乙酯部位	12	4.27±0.31	88.73± 7.62	26.98±2.11	1 263.00±251.82
正丁醇部位	12	4.59±0.65 [*]	98.29± 9.53 [*]	29.52±3.04 ^{**}	1 309.60±225.15 [*]
水部位	12	4.26±0.46	91.62± 9.51	27.74±2.67	1 283.00±183.46 [*]

与对照组比较: [#]*P*<0.05 ^{###}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01, 下同
[#]*P*<0.05 ^{###}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01 vs model group, same as below

3.3 对血虚模型大鼠脾脏和胸腺指数的影响

与对照组比较, 模型组大鼠脾脏指数明显升高 (*P*<0.01)、胸腺指数明显降低 (*P*<0.01)。与模型组比较, 正丁醇组、复方阿胶浆组、胶艾汤组可明显降低脾脏指数、升高胸腺指数 (*P*<0.05、0.01); 醋酸乙酯组、石油醚组可明显降低脾脏指数 (*P*<0.05、0.01)。结果见表2。

3.4 对血虚模型大鼠血清 IL-2、EPO 的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清 IL-2 明显降低 (*P*<0.01)、EPO 明显升高 (*P*<0.01)。与模型组比较, 正丁醇组、石油醚组、胶艾汤组可明显升高大鼠血清 IL-2 (*P*<0.05、0.01); 胶艾汤组、石油醚组、醋酸乙酯组、水部位组、正丁醇组可明显降低大鼠血清 EPO (*P*<0.01, *P*<0.05)。结果见表3。

表2 胶艾汤及其各提取部位对血虚模型大鼠脾脏和胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of JAD and different extraction parts on indexes of spleen and thymus in blood deficiency model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	脾脏指数/(mg·g ⁻¹)	胸腺指数/(mg·g ⁻¹)
对照	—	2.69±0.59	2.08±0.28
模型	—	5.04±0.61 ^{###}	1.74±0.21 ^{###}
复方阿胶浆	0.15	3.66±0.43 ^{**}	1.96±0.24 [*]
胶艾汤	12	4.38±0.62 [*]	1.98±0.28 [*]
石油醚部位	12	4.17±0.77 [*]	1.91±0.39
醋酸乙酯部位	12	4.13±0.70 ^{**}	1.75±0.36
正丁醇部位	12	4.05±0.78 ^{**}	2.11±0.33 ^{**}
水部位	12	4.63±0.97	1.96±0.39

表3 胶艾汤及其各提取部位对血虚模型大鼠血清 IL-2、EPO 水平和红细胞膜能量代谢酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of JAD and different extraction parts on levels of IL-2 and EPO and energy metabolism enzyme of red cell membrane in blood deficiency model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-2/(ng·L ⁻¹)	EPO/(U·L ⁻¹)	Na ⁺ , K ⁺ -ATP 酶/U (1×10 ⁷ 个 RBC)	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATP 酶/U (1×10 ⁷ 个 RBC)
对照	—	1 292.94±43.53	13.22±1.03	9.52±1.78	5.98±1.67
模型	—	1 022.66±37.11 ^{###}	19.71±0.84 ^{###}	6.48±1.74 ^{###}	4.43±1.14 [#]
复方阿胶浆	0.15	1 028.11±80.61	19.17±1.74	9.19±1.35 ^{**}	5.58±0.60 [*]
胶艾汤	12	1 077.83±49.55 [*]	17.81±1.02 ^{**}	9.04±0.52 ^{**}	6.02±1.09 [*]
石油醚部位	12	1 114.65±46.18 ^{**}	16.98±0.78 ^{**}	6.76±0.71	5.42±0.87
醋酸乙酯部位	12	1 028.43±41.63	17.20±0.66 ^{**}	6.81±1.93	5.81±0.68 [*]
正丁醇部位	12	1 088.30±52.76 ^{**}	18.84±0.64 [*]	9.24±1.97 [*]	6.60±1.10 ^{**}
水部位	12	1 057.10±49.49	13.38±1.04 ^{**}	7.31±1.41	4.91±1.26

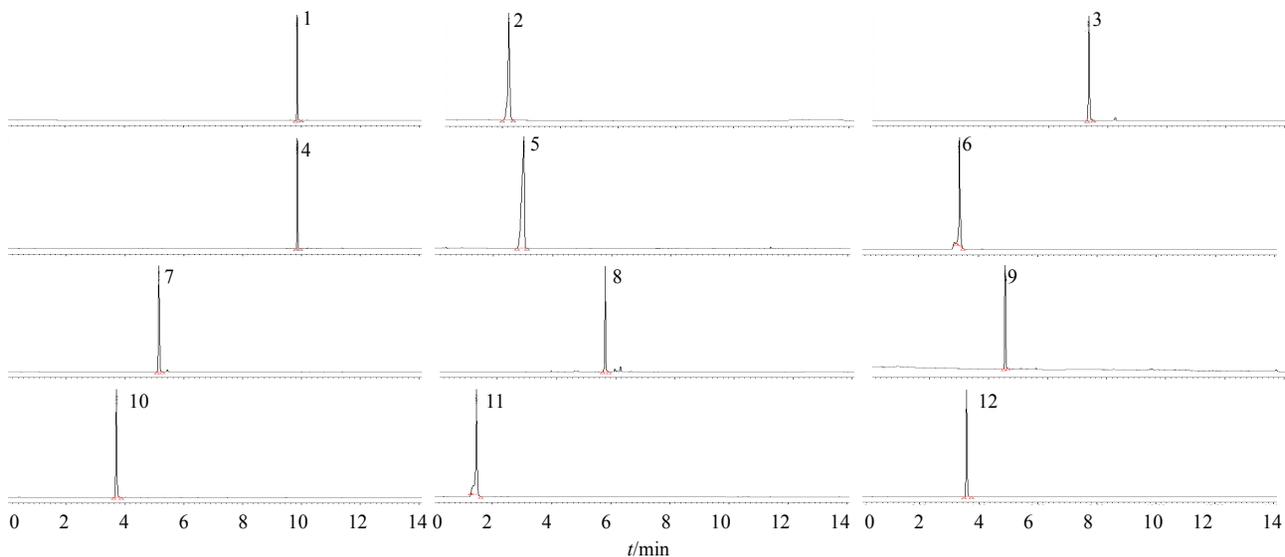
3.5 对血虚模型大鼠红细胞膜能量代谢酶的影响

与对照组比较,模型组大鼠全血红细胞膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较,胶艾汤组、复方阿胶浆组可明显升高 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性 ($P < 0.05$ 、 0.01); 正丁醇组可明显升高 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性 ($P < 0.05$ 、 0.01); 醋酸乙酯组可明显升高 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活

性 ($P < 0.05$)。结果见表 3。

3.6 胶艾汤不同提取部位化学成分分析及比较

对胶艾汤不同提取部位进行 UPLC 定性分析,由图 1 和 2 可知,胶艾汤醋酸乙酯、正丁醇部位含有共性成分没食子酸、磷酸川芎嗪、绿原酸。此外,胶艾汤正丁醇、水部位还含有原儿茶酸、甘草苷。胶艾汤正丁醇部位中还可以检测到其他提取部位中不含有的咖啡酸、苯甲酰芍药苷以及甘草酸铵。



1-甘草苷 2-原儿茶酸 3-苯甲酰芍药苷 4-甘草酸铵 5-磷酸川芎嗪 6-绿原酸 7-阿魏酸 8-毛蕊花糖苷 9-芍药苷 10-咖啡酸 11-没食子酸 12-香草酸, 图2同
1-liquiritin 2-protocatechuic acid 3-benzoyl paeoniflorin 4-ammonium glycyrrhizinate 5-ligustrazine phosphate 6-chlorogenic acid 7-ferulic acid
8-acteoside 9-paeoniflorin 10-coffee acid 11-gallic acid 12-vanillic acid, same as Fig.2

图 1 各对照品的 UPLC 色谱图
Fig. 1 UPLC of each reference substance

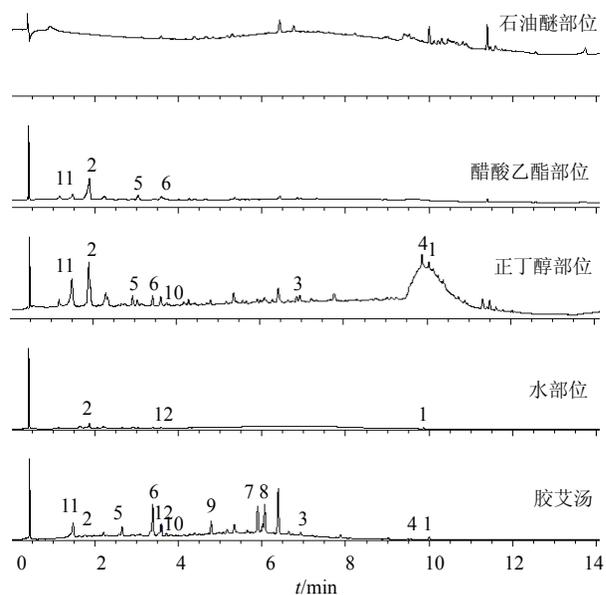


图 2 胶艾汤及各提取部位 UPLC 色谱图
Fig. 2 UPLC of JAD and its each extraction part

4 讨论

中医理论认为血虚证即血液亏虚,多因先天禀赋薄弱,后天失及时调养而致精血不足,气血来源不足而导致^[5]。血虚证涵盖了现代医学以贫血特征为主要表现的多种疾病^[6],如再生障碍性贫血^[7]、失血性贫血、溶血性贫血等。文献研究表明,目前有关血虚证动物模型的造模方法主要有环磷酸胺(CTX)化学损伤法、⁶⁰Co 辐射法、乙酰苯肼(APH)溶血法、乙酰苯肼-环磷酸胺复合法和放血法等。环磷酸胺(CTX)化学损伤法虽操作简单易行,但此法对红细胞的损伤作用不甚明显,且模型动物的血象易自然恢复。APH 溶血法通过对红细胞进行慢性氧化损伤作用造成血液中红细胞数明显减少,但该方法仅仅能改变模型动物的外周血象,对模型动物的造血系统基本无影响。⁶⁰Co 辐射法对设备要求较高,且辐射程度不宜控制。放血法通过使实验动

物失血而造成动物血虚模型，与中医上血液亏虚所致的血虚理论相一致，是最接近中医血虚证本质的造模方法，故本实验采用放血法复制动物血虚模型。

复方阿胶浆是在中医“损者益之”“劳者温之”以及“形不足者温之以气，精不足者补之以味”的指导原则下遣药组方而成^[8]，全方由阿胶、红参、熟地黄、党参、山楂5味中药组成^[9]。以往研究^[10]选择复方阿胶浆作为血虚模型实验的阳性药，取得较好的实验效果，故本实验选择复方阿胶浆作为阳性药。

血虚证最直接的病理表现为红细胞数量减少，由于红细胞的主要生理功能为运输氧气，红细胞数量减少导致机体新陈代谢减慢，从而导致红细胞膜上重要的酶蛋白 Na^+ 、 K^+ -ATP酶和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP酶活性随机体新陈代谢作用减弱而降低。血虚状态下血液不足或血液的濡养功能减弱导致机体免疫功能低下，免疫器官萎缩而引起免疫器官脏器指数下降。研究表明，脾脏在胎儿期是重要的造血器官，出生后通常不参与造血，但当机体发生贫血时脾脏可恢复造血作用，产生髓外造血，从而导致脾脏肿大^[11]。IL-2和EPO是机体重要的体液因子，研究表明，在缺血缺氧状态下，EPO的量随缺血缺氧时间的延长呈现升高的趋势，且两者具有一定的正相关性，提示EPO的量可以反映贫血程度的轻重^[12]。IL-2是机体重要的免疫增强剂，与机体免疫力呈正相关，故IL-2量也可反映机体免疫力的强弱。本实验研究表明，与对照组比较，模型组大鼠RBC、HGB、HCT、PLT、胸腺指数以及IL-2水平明显降低， Na^+ 、 K^+ -ATP酶和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP酶活性明显减弱，脾脏指数及EPO水平明显升高，表明血虚模型复制成功。与模型组比较，胶艾汤正丁醇组可明显升高大鼠RBC、HGB、PLT、HCT，从而改善外周血象，升高大鼠胸腺指数及血清IL-2水平，增强 Na^+ 、 K^+ -ATP酶和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP酶活性，降低脾脏指数及EPO水平。石油醚组可明显升高PLT及IL-2水平，降低脾脏指数及EPO水平。醋酸乙酯组可明显降低脾脏指数及EPO水平，升高 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP酶活性。水部位组可明显升高PLT，降低EPO的量。UPLC法定性分析胶艾汤各提取部位化学成分结果显示，胶艾汤正丁醇部位检测到其他提取部位中所不含有的咖啡酸，研究表明，咖啡酸具

有升血小板、升白细胞数及止血等作用^[13]，推测咖啡酸可能为胶艾汤正丁醇部位发挥补血作用的有效成分之一，且胶艾汤正丁醇部位中含有的没食子酸、原儿茶酸、磷酸川芎嗪以及绿原酸的量均高于胶艾汤其他3个提取部位，结合药理实验数据可初步推测，化学成分种类及量的差异可能是导致胶艾汤不同提取部位补血作用差异的主要原因。综上所述，正丁醇部位是胶艾汤补血作用的最强有效部位，但胶艾汤发挥补血作用的活性成分群以及化学成分与药理作用之间的关联性还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 汉·张仲景，晋·王叔和. 新编金匱要略方论 [M]. 北京: 商务印书出版社, 1955.
- [2] 李祥华, 王文英, 张家均, 等. 胶艾汤补血健脾作用研究 [J]. 中国药理与临床, 2005, 21(1): 4-5.
- [3] 贾梅, 郑传柱, 张丽, 等. 胶艾汤与四物汤对血虚模型大鼠补血功效的比较研究 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1640-1644.
- [4] 郑传柱, 贾梅, 张丽, 等. 胶艾汤与四物汤对血瘀模型大鼠活血功效的比较研究 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2652-2657.
- [5] 刘艳, 李毅. 浅论血虚证从“心生血”论治 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(2): 262.
- [6] 高月. 血虚证实质及四物汤反证研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(4): 58-60.
- [7] 于敬达, 李玉中, 金伟, 等. 乙酰苯肼、X射线和环磷酸胺联合复制小鼠再生障碍性贫血模型 [J]. 解剖科学进展, 2008, 14(1): 43-46.
- [8] 王琰, 徐瑞荣. 复方阿胶浆的应用研究进展 [J]. 临床合理用药, 2011, 4(6B): 151-153.
- [9] 刘茂玄, 罗洁, 王东亮, 等. 复方阿胶浆对肾性贫血大鼠的治疗作用及其机制 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 380-385.
- [10] 李伟霞, 唐于平, 郭建明, 等. 当归川芎药对及其组成药味对3种血虚模型补血作用的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(13): 1808-1814.
- [11] 董梅. 肿瘤和血液病相关的肝脾肿大 [J]. 中国实用儿科杂志, 2004, 19(6): 333-334.
- [12] 郭浩, 代强, 黄鹏, 等. 急性上消化道出血后贫血患者EPO与贫血程度的相关性研究 [J]. 西南国防医药, 2011, 21(4): 374-376.
- [13] 杨九凌, 祝晓玲, 李成文, 等. 咖啡酸及其衍生物咖啡酸苯乙酯药理作用研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(8): 577-582.