

基于血热证小鼠模型紫草素清热凉血与血液氧化还原稳态调控的研究

李天一^{1,2}, 张闪闪^{1,2}, 马晓茹^{1,2}, 徐宏宏^{1,2}, 张波^{1,2*}

1. 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002

2. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002

摘要: **目的** 探究紫草素(SK)对活性酵母诱导的血热证小鼠模型的清热凉血作用与血液氧化还原稳态调控的关系。**方法** 小鼠随机分为对照组、模型组、SK(10 mg/kg)组、阿司匹林(Asp, 200 mg/kg)组、L-丁硫氨酸亚砷亚胺(BSO, 600 mg/kg)组、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC, 400 mg/kg)组、BSO联合SK组、NAC联合SK组。小鼠颈背部sc 0.2 g/mL活性酵母提取物(10 mL/kg),造模0.5 h后ip SK,造模8 h后ig Asp,于实验开始前ip BSO、NAC,2次/d,连续1周。考察小鼠肛温(t_R)、基本活动、代谢、凝血、血细胞计数等指标,采用OPA荧光法测定小鼠血清中还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)水平。**结果** 与对照组相比,模型组小鼠造模4 h后 t_R 显著升高($P<0.05$),10 h达到 $(38.07\pm 0.11)^\circ\text{C}$;小鼠出现烦躁、口唇色红、喜饮、碳末推进率降低、粪便含水量降低、凝血时间延长现象($P<0.05$);肺组织红细胞、炎性细胞浸润;血清LPO、MDA水平显著升高、SOD活性降低、GSH/GSSG比率减小($P<0.05$)。与模型组相比,SK组小鼠 t_R 显著降低,10 h达到 $(37.51\pm 0.12)^\circ\text{C}$;各指标均得到显著改善;血清LPO、MDA水平降低、SOD活性升高、GSH/GSSG比率增大($P<0.05$)。BSO组可降低血清GSH/GSSG比率($P<0.05$),减弱SK对血热证小鼠的治疗作用;NAC组可增加血清GSH水平,增加GSH/GSSG比率($P<0.05$),增强SK对血热证小鼠的治疗效果。**结论** SK通过调控血液氧化还原稳态,缓解血热证小鼠高热、出血瘀血、血液氧化损伤,从而发挥清热凉血作用。

关键词: 血热证;紫草素;清热凉血;氧化还原稳态;谷胱甘肽

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)21-5487-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.012

Relationship between clearing heat and cooling blood and regulating blood redox homeostasis of shikonin based on blood heat syndrome mice model

LI Tian-yi^{1,2}, ZHANG Shan-shan^{1,2}, MA Xiao-ru^{1,2}, XU Hong-hong^{1,2}, ZHANG Bo^{1,2}

1. Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resources and utilization, Ministry of Education, Shihezi University, Shihezi 832002, China

2. School of Pharmaceutics, Shihezi University, Shihezi 832002, China

Abstract: Objective To explore the relationship between clearing heat and cooling blood of shikonin (SK) and regulation of blood redox homeostasis in blood-heat syndrome mice model induced by active yeast. **Methods** Mice were randomly divided into control group, model group, SK (10 mg/kg) group, aspirin positive (200 mg/kg) group, L-buthionine sulfoximine (BSO, 600 mg/kg) group, N-acetyl-L-cysteine (NAC, 400 mg/kg) group, BSO combined with SK group, NAC combined with SK group. Mice were sc with 0.2 g/mL active yeast (10 mL/kg) on the neck, mice were ip SK at 0.5 h, ig Asp at 8 h, ip BSO and NAC before the beginning of the experiment (twice a day for one week). The rectal temperature (t_R), general activity, metabolism, coagulation, and blood cell counting were determined. The levels of GSH and GSSG were determined by OPA assay. **Results** Compared with the control group, t_R of mice was significantly increased at 4 h ($P<0.05$) and reached $(38.07\pm 0.11)^\circ\text{C}$ at 10 h in model group; Irritability, redder lips, inclined to drinking, reduced carbon powder propelling rate, decreased pellet moisture capacity and prolonged coagulation time were observed ($P<0.05$); RBC and inflammatory cells infiltrated were observed in lung tissue sections; The levels of LPO and MDA in serum were significantly increased, the activity of SOD was decreased, GSH/GSSG was decreased ($P<0.05$). Compared with model

收稿日期: 2020-02-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(U1603122);兵团科技创新领域中青年领军人才项目(2018CB019);兵团英才项目(0320/CZ000601)

作者简介: 李天一(1996—),男,硕士,研究方向为系统生物学和中药药理学。Tel: 18299091499 Email: hnltity@163.com

*通信作者 张波(1978—),男,研究生导师,教授,从事系统药理学与中药药理学研究。Tel: (0993)2057670 Email: bozhang_lzu@126.com

group, t_R of mice was significantly reduced and reached $(37.51 \pm 0.12)^\circ\text{C}$ at 10 h in SK group; The symptoms were significantly attenuated; The level of LPO and MDA in serum were decreased; The activity of SOD and GSH/GSSG ratio were increased ($P < 0.05$). BSO significantly reduced the GSH/GSSG ratio ($P < 0.05$), reduced the effect of SK on blood-heat syndrome mice model. NAC increased the level of GSH in serum and GSH/GSSG ratio ($P < 0.05$), enhanced the SK treatment effect. **Conclusion** SK can attenuate hyperpyrexia, hemorrhage and congestion, oxidative damage in blood-heat syndrome mice model by regulating the blood redox homeostasis, and thereby the effect of clearing heat and cooling blood work.

Key words: blood-heat syndrome; shikonin; clearing heat and cooling blood; redox homeostasis; glutathione

中医认为实热证为邪气内犯脏腑、阳热内盛所致,临床表现为发热、面红目赤、口渴贪凉、烦躁不安、便秘溲黄等^[1]。热入血分、迫血妄行,损伤脏腑脉络,血液不循常道溢出脉外而出血,称之血热证^[2]。由于血热证血分有热,传统的治则常为清热凉血。现代药理学研究多采用脂多糖、酵母活性提取物等微生物源性致热原或热性中药提取物制备血热证动物模型,用于热证病理、清热凉血药物的研究^[3-4]。

紫草素(shikonin, SK)是临床常用的清热凉血中药软紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston. 中主要有效成分,具有舒张血管、抗血小板聚集、抑制血液系统肿瘤增殖、抗血管生成等多种血液循环系统有关活性^[5-6]。血液循环系统是氧气运载的唯一途径,也是维持氧化代谢氧化还原反应和调节自由基负反馈的重要场所。循环系统中血液一直暴露在内源性和外源性氧化应激下,多种血液循环系统疾病如出血、贫血、白血病、感染等疾病过程中均伴有血液氧化还原稳态的显著变化^[7]。课题组前期研究表明,SK 诱导肿瘤细胞凋亡与调节细胞氧化还原稳态有关^[8-9],本研究通过建立活性酵母诱导的血热证小鼠模型,评价 SK 的药效与血液氧化还原稳态的关系,探究 SK 的潜在作用机制,为紫草清热凉血的现代药理学研究提供依据。

1 材料与仪器

1.1 动物

SPF 级雄性昆明种小鼠,6~8 周龄,体质量 18~22 g,购自新疆医科大学实验动物研究中心,控制环境温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,实验动物许可证号 SYXK(新)2016-0002。

1.2 药品与仪器

SK(质量分数 98%)购自南京道斯夫生物科技有限公司;阿司匹林(Asp)、水合氯醛购自北京索莱宝生物科技有限公司;酵母购自安琪酵母股份有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、脂质过氧化物(lipid peroxide, LPO)试剂

盒购自南京建成生物工程研究所;OPA 荧光试剂盒购自美国 BioVision Incorporated 公司;小鼠外周血白细胞分离试剂盒购自天津灏洋生物制品有限责任公司;L-丁硫氨酸亚砷亚胺(BSO)、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)、DCFH-DA 探针购自美国 Sigma 公司;活性炭购自重庆莱美药业有限公司;阿拉伯胶购自西安天正药用辅料有限公司;枸橼酸钠抗凝管、乙二胺四乙酸二钾抗凝管购自沧州永康医药用品有限公司。

VarioFlash 3001 多功能酶标仪购自美国 Thermo 公司;5424 低温离心机购自德国 Eppendorf 公司;AU680 自动生化分析仪购自美国贝克曼库尔特公司;KX-21 三分类血细胞分析仪购自日本希森美康公司;电热恒温水浴锅购自北京长安科学仪器厂;wi78653 电子温度计购自北京东西仪科技有限公司。

2 方法

2.1 药品的制备

称取定量酵母,缓慢加入蒸馏水配制成 0.2 g/mL 的混悬液,25 $^\circ\text{C}$ 孵育 24 h,备用;称取适量 SK 加入生理盐水中,加入适量 DMSO,配制成 1 mg/mL 溶液,避光保存;Asp、BSO、NAC 分别溶于生理盐水配制成 20、60、40 mg/mL 溶液备用。

2.2 造模与给药

造模前 3 d,早晚测定小鼠肛温(t_R),同一时段 t_R 变化小于 0.3 $^\circ\text{C}$ 的小鼠用于后续实验。将 80 只小鼠随机分为对照组、模型组、SK(10 mg/kg)组、Asp(200 mg/kg)组、BSO(600 mg/kg)组、NAC(400 mg/kg)组、BSO 联合 SK 组、NAC 联合 SK 组,每组 10 只。对照组小鼠颈背部 sc 生理盐水,其余各组小鼠颈背部 sc 活性酵母混悬液(10 mL/kg)。造模 0.5 h 后,对应组小鼠 ip SK,造模 8 h 后对应组小鼠 ig Asp,模型组小鼠 ip 等量生理盐水。造模前 1 周对应组小鼠 ip BSO 和 NAC,连续 1 周。

2.3 血热证主要指标的考察

2.3.1 t_R 测定 造模后 0~13 h,每间隔 1 h 测定小鼠 t_R ,将小鼠固定,在电子体温计顶端涂少许液体

石蜡,轻送入肛门,示数稳定后读数。

2.3.2 粪便含水量测定 收集造模过程中新鲜粪便,称定湿质量,于 105 °C 干燥 5 h,冷却至恒定质量,称定干质量,并计算粪便含水量。

粪便含水量=(湿质量-干质量)/湿质量

2.3.3 饮水量测定 记录实验前后各组小鼠水瓶饮水体积(V)。

饮水量=(V_{实验前}-V_{实验后})/10

2.3.4 尿量测定 将滤纸置于各组鼠笼底部,实验结束后取出自然晾干,拍照保存,使用 ImageJ 软件测定滤纸水渍面积,作为小鼠尿量的间接反映。

2.3.5 碳末推进率 小鼠处死前 30 min,ig 10%活性炭与 5%阿拉伯胶混悬液(10 mL/kg),取出小肠,剪取幽门至回盲肠段肠管,拉直放于平面。测定肠管长度作为小肠总长度,幽门至碳末前沿的距离作为碳末推进距离。

碳末推进率=碳末推进距离/小肠总长度

2.4 凝血功能和血细胞计数检查

造模 13 h 后,从小鼠眼内眦刺入毛细管,血液滴在洁净载玻片上开始计时,每间隔 15 s 用注射器自边缘挑起,观察到血丝时停止计时。

小鼠 ip 10%水合氯醛,取血。取 1 mL 全血加入枸橼酸钠抗凝管中,测定活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)和纤维蛋白原(FIB);取 0.5 mL 全血加入乙二胺四乙酸二钾抗凝管中,进行血细胞计数^[10-12]。

2.5 小鼠肺组织病理学观察

实验结束后,颈椎脱臼处死小鼠,立即取出肺组织,以 4%甲醛溶液固定、石蜡包埋、常规 HE 染

色,于光学显微镜下(×200)观察。

2.6 外周血 GSH、GSSG 水平测定

取 1 mL 全血静置 30 min,3 500 r/min 离心 10 min,取血清,采用 OPA 荧光试剂盒测定血清中 GSH、GSSG 水平。

2.7 MDA、LPO、SOD 水平测定

取全血于 44 °C、3 500 r/min 离心 10 min,取血浆,于-80 °C 保存。按照试剂盒说明检测 MDA、LPO、SOD 水平。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 20.0 进行统计学分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间显著性分析采用 Duncan 法。

3 结果

3.1 SK 对血热证小鼠清热功效评价

3.1.1 SK 对血热证小鼠一般性指标的影响 如表 1 所示,与对照组相比,模型组小鼠饮水量大,尿量少,碳末推进率和粪便含水量降低($P<0.05$ 、 0.01);与模型组相比,SK 组和 Asp 组小鼠饮水量显著减少,尿量显著增加,碳末推进率和粪便含水量显著增加($P<0.05$ 、 0.01)。

3.1.2 SK 对血热证小鼠凝血功能的影响 如表 2 所示,与对照组相比,模型组凝血时间显著增加($P<0.01$),具有“易动血”倾向;APTT 时间显著延长,PT、TT 时间显著缩短,FIB 水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,SK 组和 Asp 组凝血时间显著缩短($P<0.01$),减轻“易动血”倾向;显著缩短 APTT、PT 时间,降低 FIB 水平($P<0.05$ 、 0.01),对 TT 时间无显著影响。

表 1 SK 对血热证小鼠一般性指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 General evaluation of SK on blood-heat syndrome ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	饮水量/mL	相对尿量/cm ²	碳末推进率/%	粪便含水量/%
对照	—	5.73±0.05	111.57±20.35	91.79±4.45	54.87±1.69
模型	—	8.88±0.57**	52.95±19.22**	58.32±15.17**	47.71±1.77*
SK	10	6.84±0.07##	63.47±7.01#	87.38±7.99##	51.51±1.53#
Asp	200	7.41±0.08##	59.38±3.55#	78.79±21.55#	52.77±1.33##

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$, 下表同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group, same as below tables

表 2 SK 对血热证小鼠凝血功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Coagulative function changes of SK on blood-heat syndrome ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	APTT/s	PT/s	TT/s	FIB/(g·L ⁻¹)	凝血时间/s
对照	—	33.03±1.27	10.40±0.31	12.07±0.53	2.62±0.25	111.53±11.07
模型	—	51.28±4.04**	8.92±0.19**	9.11±0.46**	4.55±0.26**	227.33±9.01**
SK	10	33.03±1.69##	8.61±0.47#	8.01±0.73	3.21±0.14##	158.81±5.77##
Asp	200	39.93±2.61##	8.84±0.72	8.21±0.62	3.54±0.15##	192.51±6.58##

3.1.3 SK 对血热证小鼠血细胞计数的作用 如表 3 所示,与对照组相比,模型组小鼠红细胞(RBC)、白细胞(WBC)、血红蛋白(HGB)水平显著升高,RBC/WBC 显著下降 ($P<0.01$);与模型组比较,SK 组 RBC、WBC、HGB 显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01),RBC/WBC 显著升高($P<0.01$);Asp 组 WBC 显著降低($P<0.01$)。

3.1.4 SK 对血热证小鼠 t_R 的影响 如图 1-A 所示,

活性酵母提取物诱导小鼠出现短暂低温,0~2 h t_R 下降,随后上升,10 h 达到 $(38.07\pm0.11)^\circ\text{C}$ 峰值后逐渐下降。SK 组小鼠 t_R 10 h 达到 $(37.51\pm0.12)^\circ\text{C}$ 峰值。 t_R 随时间的总体变化以曲线下面积(AUC)进行评估并以箱型图表示,如图 1-B 所示,活性酵母提取物在整个时间段内引起 AUC 显著增加,SK 组 AUC 显著降低 ($P<0.05$)。

表 3 SK 对血热证小鼠 RBC、WBC、HGB 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of SK on RBC, WBC, and HGB in blood-heat syndrome mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	RBC/($\times 10^{12}\cdot\text{L}^{-1}$)	WBC/($\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$)	HGB/(g·L ⁻¹)	RBC/WBC
对照	—	5.91 $\pm$ 0.74	2.69 $\pm$ 0.40	120.35 $\pm$ 3.76	2.20
模型	—	9.17 $\pm$ 0.11**	9.71 $\pm$ 0.52**	146.33 $\pm$ 2.73**	0.94**
SK	10	8.58 $\pm$ 0.13 [#]	3.37 $\pm$ 0.30 ^{##}	131.83 $\pm$ 1.45 [#]	2.55 ^{##}
Asp	200	8.94 $\pm$ 0.23	5.81 $\pm$ 0.63 ^{##}	138.59 $\pm$ 1.67	1.54

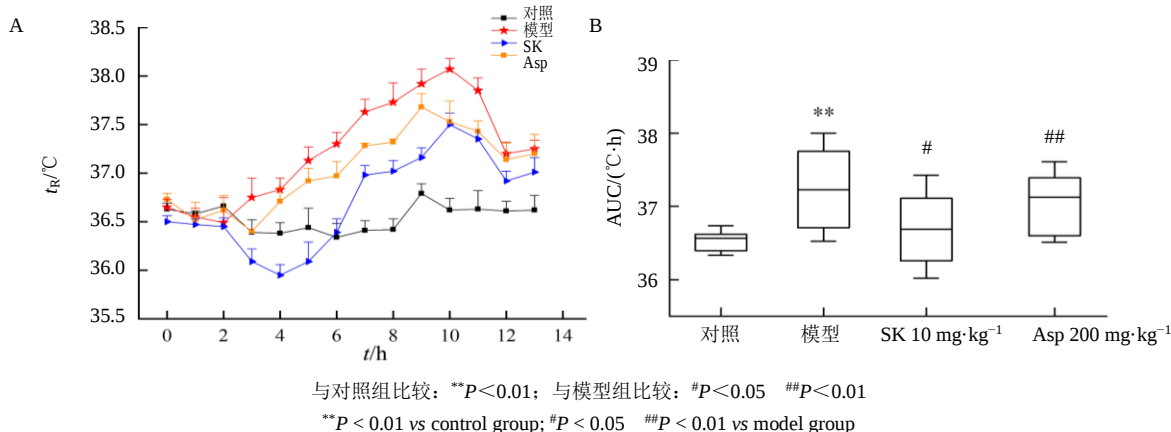


图 1 SK 对血热证小鼠 t_R (A)、以 AUC 表示的 t_R 变化箱型图 (B) 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 1 Effect of SK on t_R (A) and box-plots of AUC (B) in blood-heat syndrome mice model ($\bar{x}\pm s, n=10$)

3.1.5 SK 对血热证小鼠活动状态的影响 如图 2 所示,对照组小鼠活动量正常,披毛光洁、口唇色淡红、尿色清。模型组小鼠初期烦躁多动,后期抱团精神不振、蜷缩少动,颈部毛发蓬松,有类似“发汗”现象,口唇颜色以鲜红色居多,尿液橙黄色。SK 组小鼠初期活动量正常,后期安静,毛色光洁,“发汗”现象明显得到改善,口唇色红。

3.1.6 肺组织病理学切片检查 如图 3 所示,对照组小鼠肺组织结构正常;模型组小鼠肺组织瘀血,肺泡壁毛细血管扩张,部分区域肺泡扩张,肺泡间隔断裂,红细胞和炎性细胞浸润;SK 组小鼠肺组织瘀血、肺泡扩张、炎性细胞浸润等明显改善;Asp 组小鼠肺组织结构基本正常,肺泡腔内有少量渗出液和炎性细胞。

3.2 SK 对血热证小鼠血液氧化还原稳态的影响

3.2.1 SK 对血热证小鼠血清氧化损伤指标的影响 如图 4 所示,模型组血清 LPO、MDA 水平显著升高, SOD 活性显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01),表

明血热证过程中血液系统整体氧化代谢加快,还原能力减弱,机体氧化损伤与抗氧化保护效应之间的平衡机制被打破。SK 组 MDA、LPO 水平降低, SOD 活性升高 ($P<0.05$),恢复血液系统氧化还原平衡。

3.2.2 SK 对血热证小鼠血清 GSH/GSSG 的影响 如表 4 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中 GSH 水平显著降低 ($P<0.01$), GSH/GSSG 比率减小;相比模型组,SK 组血清中 GSH 含量得到恢复, GSH/GSSG 比率变大。血热证过程伴随着小鼠血清中 GSH 含量降低, GSSG 含量增加, GSH/GSSG 比率减小,血液整体氧化还原朝氧化方向偏移,SK 处理减轻血热证损伤并降低稳态朝氧化方向偏移的趋势。

3.3 干预血液氧化还原平衡对血热证小鼠的影响

3.3.1 干预血液氧化还原平衡对血热证小鼠综合指标的影响 以 GSH 耗竭剂 BSO 和 GSH 前体 NAC 干预血液氧化还原稳态,观察 SK 对血热证小鼠的治疗作用。如表 5~7 所示,BSO 组小鼠饮水量增

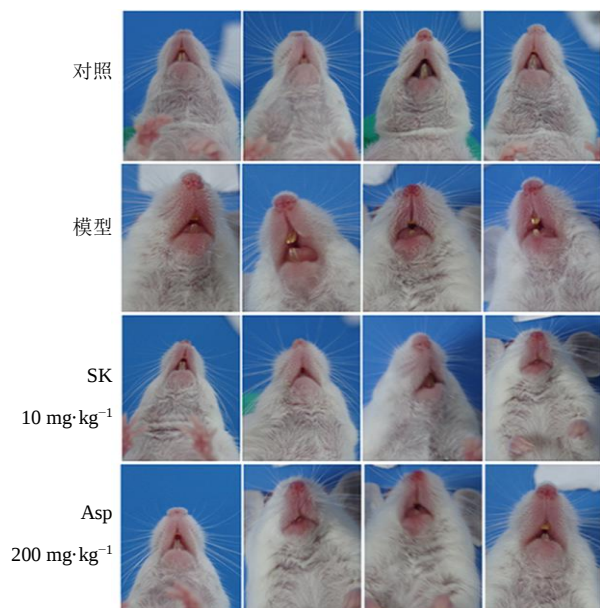
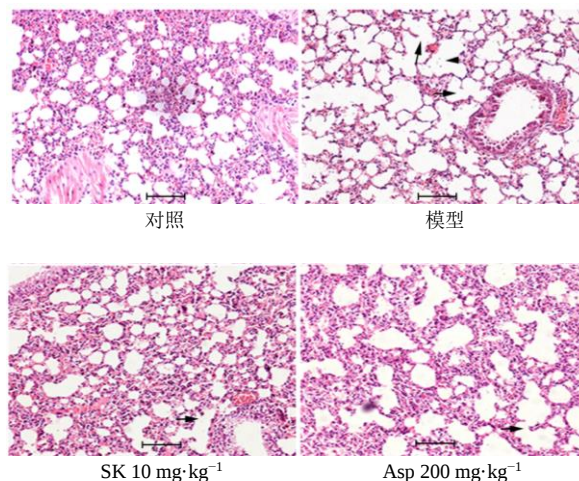


图 2 SK 对血热证小鼠口唇色的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 2 Effect of SK on lip in blood-heat syndrome mice model ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



短尾箭头表示断裂的肺泡间隔; 箭头表示浸润的炎症细胞; 标尺: 400 μm
short tail arrow indicates the broken pulmonary alveolar septum; arrow indicates the infiltrated inflammatory cells in alveolar; scale bar: 400 μm .

图 3 SK 对血热证小鼠肺组织病理变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 3 Effect of SK on histopathological changes of lung in blood-heat syndrome mice model ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

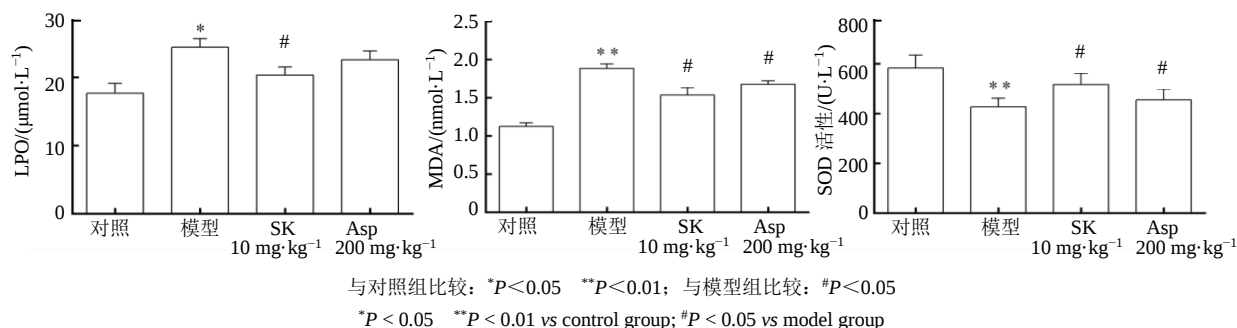


图 4 SK 对血热证小鼠血清 LPO、MDA、SOD 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effect of SK on levels of LPO, MDA, and SOD in blood-heat syndrome mice model ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 4 SK 对血热证小鼠血清氧化还原稳态的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of SK on serum redox homeostasis in blood-heat syndrome mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	GSH/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	GSSG/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	GSH/GSSG
对照	—	15.17 ± 0.45	3.61 ± 0.37	4.20
模型	—	$9.56 \pm 0.32^{**}$	$6.94 \pm 0.74^*$	1.38
SK	10	$12.03 \pm 1.11^{\#}$	$3.70 \pm 0.20^{\#}$	3.25
Asp	200	$10.73 \pm 1.35^{\#}$	$6.20 \pm 0.23^{\#}$	1.73

表 5 干预血液氧化还原稳态对血热证小鼠一般评估指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 General evaluation changes in blood-heat syndrome mice after blood redox homeostasis disrupted ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	饮水量/mL	相对尿量/ cm^2	碳末推进率/%	粪便含水量/%
BSO	600	8.96 ± 0.42^a	48.14 ± 15.46^d	40.49 ± 2.37^c	47.25 ± 3.31^d
NAC	400	7.64 ± 0.57^c	60.62 ± 17.52^b	70.17 ± 18.76^b	53.23 ± 1.83^b
BSO+SK	600+10	8.27 ± 0.52^b	52.81 ± 12.86^c	42.63 ± 2.83^c	51.62 ± 11.31^c
NAC+SK	400+10	7.41 ± 0.12^d	68.42 ± 6.52^a	86.25 ± 3.12^a	55.51 ± 1.41^a

a、b、c 和 d 表示组间具有统计学差异, $P < 0.05$, 下同

a, b, c and d are represented for statistical difference with $P < 0.05$, same as belows

表 6 干预血液氧化还原稳态对凝血指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 6 Coagulative function changes after blood redox homeostasis disrupted ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	APTT/s	PT/s	TT/s	FIB/(g·L ⁻¹)	凝血时间/s
BSO	600	53.25±0.55 ^a	7.29±0.25 ^c	8.35±0.15 ^c	4.75±0.35 ^a	303.32±20.52 ^a
NAC	400	37.58±8.36 ^c	9.18±0.64 ^a	10.74±0.16 ^b	4.48±0.19 ^c	197.25±8.13 ^b
BSO+SK	600+10	39.13±4.15 ^b	7.38±0.57 ^c	9.93±1.38 ^b	4.56±0.37 ^b	218.17±12.50 ^b
NAC+SK	400+10	31.66±5.18 ^d	8.24±0.51 ^b	11.73±1.47 ^a	3.37±0.35 ^d	135.79±7.34 ^c

表 7 干预血液氧化还原稳态对小鼠 RBC、WBC、HGB 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 7 Changes of RBC, WBC, and HGB in mice after blood redox homeostasis disrupted ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	RBC/($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$)	WBC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	HGB/(g·L ⁻¹)	RBC/WBC
BSO	600	9.33±0.47 ^a	14.25±0.27 ^a	141.50±2.51 ^a	0.65
NAC	400	9.11±0.41 ^b	8.32±0.27 ^c	136.31±6.72 ^b	1.09
BSO+SK	600+10	9.23±0.18 ^a	9.82±0.63 ^b	137.63±7.52 ^b	0.94
NAC+SK	400+10	8.87±0.32 ^c	3.22±0.11 ^d	128.34±5.72 ^c	2.75

加且尿量减少 ($P<0.05$), 小鼠粪便含水量显著低于各组小鼠 ($P<0.05$), 碳末推进率明显降低 ($P<0.05$), 小鼠凝血时间各组最长 ($P<0.05$), RBC/WBC 比率各组中最低; NAC 组、NAC 联合 SK 组小鼠口唇色变浅, 小鼠饮水量减少, 尿量增加, 粪便含水量增加, 血热证各项指标得到不同程度的改善 ($P<0.05$)。如图 5 所示, BSO 组小鼠 t_R 在 10 h 达到各组最高, BSO 干扰了 SK 对小鼠的清热作用; 如图 6 所示, BSO 组、BSO 联合 SK 组小鼠口唇色鲜红, NAC 组、NAC 联合 SK 组小

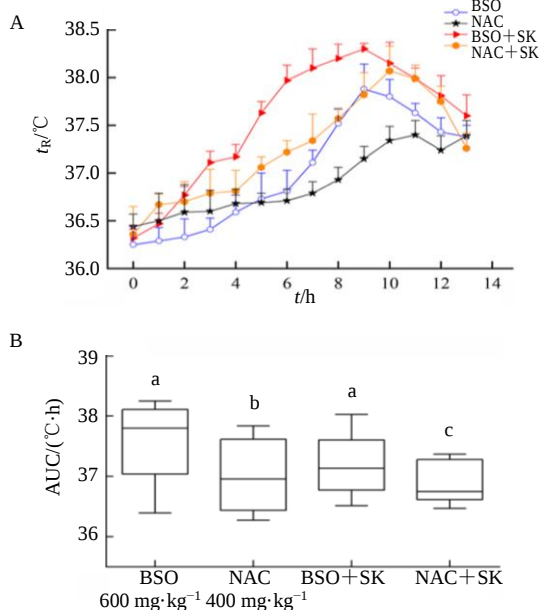


图 5 干预小鼠血液氧化还原稳态后, SK 对血热证小鼠血清 t_R (A)、以 AUC 表示的 t_R 变化箱型图 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 5 Effect of SK on t_R (A), box-plots of AUC (B) in blood-heat syndrome mice model when blood redox homeostasis disrupted ($\bar{x} \pm s, n=10$)

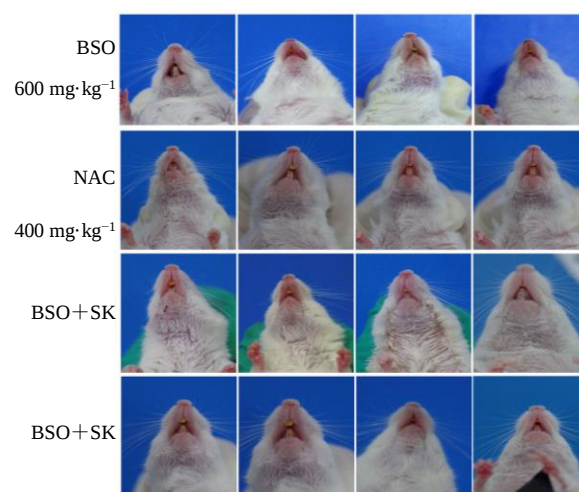


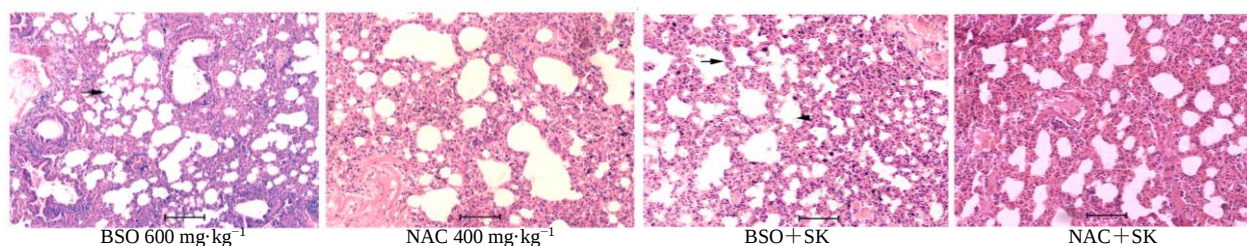
图 6 干预小鼠血液氧化还原稳态后 SK 对血热证小鼠口唇色的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 6 Effect of SK on lip in blood-heat syndrome mice model when blood redox homeostasis disrupted ($\bar{x} \pm s, n=10$)

鼠口唇色红或淡红。如图 7 所示, BSO 组小鼠肺泡不均匀扩张, 炎性细胞浸润, NAC 组肺组织病理明显改善。

3.3.2 干预血液氧化还原平衡对小鼠血清氧化还原指标的影响 如图 8 所示, BSO 组小鼠血清 LPO、MDA 水平最高 ($P<0.05$), SOD 活性显著降低 ($P<0.01$)。BSO 联合 SK 组、NAC 组、NAC 联合 SK 组小鼠血清中 MDA、LPO 水平均不同程度降低, SOD 活性不同程度升高 ($P<0.05$)。

如表 8 所示, BSO 组小鼠血清 GSH 含量显著低于各组, GSSG 水平显著高于各组, GSH/GSSG 比率最小 ($P<0.05$); NAC 联合 SK 组能够不同程度升高血清中 GSH 水平 ($P<0.05$), 且各组间 GSH、GSSG 水平有显著差异 ($P<0.05$)。



短尾箭头表示断裂的肺泡间隔，箭头表示浸润的炎症细胞；标尺：400 μm

short tail arrow indicates the broken pulmonary alveolar septum, arrow indicates the infiltrated inflammatory cells in alveolar; Scale bar: 400 μm

图 7 干预小鼠血液氧化还原稳态后，SK 对血热证小鼠肺组织病理变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 7 Effect of SK on histopathological changes of lung in blood-heat syndrome mice model when blood redox homeostasis disturbed ($\bar{x} \pm s, n=10$)

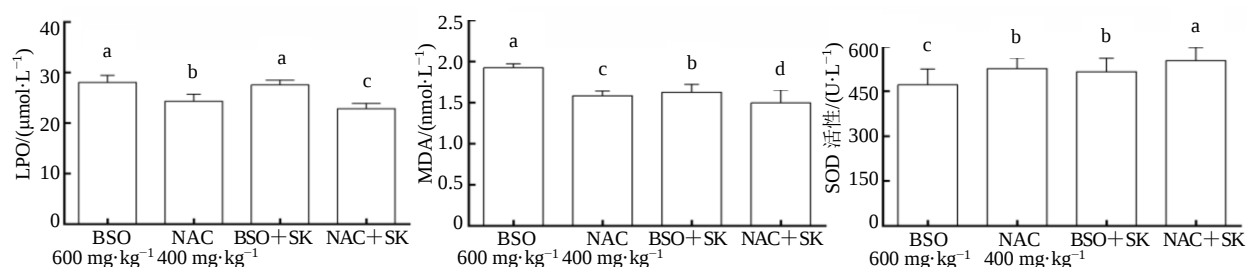


图 8 干预小鼠血液氧化还原稳态后，SK 对血热证小鼠血清 LPO、MDA、SOD 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 8 Effect of SK on levels of LPO, MDA, and SOD in blood-heat syndrome mice model when blood redox homeostasis disturbed ($\bar{x} \pm s, n=10$)

表 8 BSO、NAC 对血热证小鼠血清氧化还原稳态的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 8 Redox homeostasis changes in serum after blood redox homeostasis disturbed ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	GSH/(μmol·L ⁻¹)	GSSG/(μmol·L ⁻¹)	GSH/GSSG
BSO	600	13.78 ± 0.36 ^d	12.97 ± 0.70 ^a	1.06
NAC	400	15.57 ± 0.37 ^b	13.19 ± 0.70 ^a	1.18
BSO+SK	600+10	14.16 ± 0.76 ^c	13.01 ± 0.57 ^a	1.09
NAC+SK	400+10	16.79 ± 0.52 ^a	12.16 ± 0.84 ^b	1.38

综合以上结果，干预血液氧化还原平衡后，BSO 干扰 SK 对血热证小鼠的治疗作用，其中 NAC 联合 SK 组治疗效果最为显著，NAC 对 SK 治疗血热证小鼠有协同作用。

4 讨论

目前，可通过 ip 内毒素^[13]、热性中药水煎剂结合 ig 无水乙醇^[14]、颈背部 sc 活性酵母混悬液^[4]、复合造模等建立血热证模型。内毒素复制的模型有出血、瘀血特征，但肛温升高不稳定，易导致动物核心温度下降而死亡，不符合血热证热毒炽盛证候。热性水煎剂法结合 ig 无水乙醇造模实验周期长，且对动物胃黏膜损伤大，易干扰血热证临床指征。目前对血热证研究的观察指标局限在发热、血象、血流变、凝血功能和病理组织学方面，和血热证临床检查指标不一致。本研究针对现有血热证模型的观察指标少、具体机制不深入的特点，参考《中医临床诊疗术语》^[15]和中医临床“耗伤阴液、壮热口渴、

面赤唇焦、烦躁不宁、便结尿黄、舌红绛而干、或衄血”的记载，通过小鼠颈背部 sc 活性酵母混悬液建立血热证模型，小鼠 t_R 升高、口唇色鲜红、躁动、尿量减少、饮水量增加、碳末推进率降低、粪便含水量降低、凝血时间延长、肺泡破裂、肺组织瘀血，成功制备血热证小鼠模型。

新疆软紫草品质优良、清热凉血功效突出，临床广泛用于血热毒盛的治疗^[16]。研究认为清热凉血是广谱抗菌、抗炎、解热、抑制血小板凝集、镇痛镇静、免疫调节的集合^[17]，SK 作为紫草中最重要的萘醌化合物，其药理作用包括抗病毒、抗氧化、抗炎、解热、镇静、诱导白血病细胞分化等^[5,18]。研究表明，SK 可激活 Nrf2/ARE 通路，抑制 TLR4/MD2/MyD88 炎症信号通路。本研究结果显示，SK 可改善血热证小鼠的不同指征，证明 SK 可对症发挥清热凉血功效。以上结果从西医角度证实了 SK 的清热凉血作用，但 SK 的清热凉血作用与血液氧

化还原稳态关系尚不明确。

SK 对血液系统肿瘤、静脉炎、血管性紫癜有较好疗效^[5]；SK 的口服生物利用度为 34.3%，ig 后半衰期为 10.5 h，表观分布容积为 8.91 L/kg^[19]，表明 SK 主要保留在血液及少部分的细胞外液。袁萱等^[20]报道了 SK 对主动脉血管的舒张作用；本研究观察到 SK 对血热证过程“易动血”，凝血时间延长的保护作用；与模型组比较，SK 组小鼠的外周血 RBC/WBC 比率显著增加，与 SK 抗炎作用报道一致，表明了 SK 对血液系统的选择性。

越来越多研究表明血液氧化还原稳态与年龄、毒性和某些疾病相关^[21]，检测和干预氧化还原稳态有助于临床评估疾病进展，并提供潜在的治疗策略。评价氧化还原状态的常用指标是 GSH/GSSG，GSH/GSSG 降低表示平衡朝氧化方向移动。本研究发现模型组小鼠氧化应激产物 LPO、MDA 水平增加，SOD 活性降低，血清 GSH/GSSG 比率减小，SK 能够减轻氧化损伤，恢复 GSH/GSSG 失衡，保护血热证造成的病理损害。

羟基萘醌具有高效的 DPPH 自由基清除活性，SK 的抗氧化作用已被证实^[22]。课题组前期结果表明，SK 可作为 Nrf2 激动剂，正向调控抗氧化通路 Nrf2/ARE 活化，恢复细胞内 GSH/GSSG 平衡^[9,23]。抗氧化剂可保护小鼠免受高热造成的损伤和死亡^[24-26]。本研究假定 SK 调节血液氧化还原稳态平衡是 SK 发挥清热凉血作用之因，血热证小鼠分别 ip GSH 耗竭剂 BSO 和 GSH 前体 NAC，结果显示，BSO 组小鼠血清 GSH/GSSG 比率降低，氧化产物增加，血液氧化还原稳态朝向氧化态严重偏移，血热证指征加重；BSO 干扰了 SK 对血液氧化还原稳态的调节，减弱 SK 的治疗作用。与 BSO 作用相反，NAC 组血液氧化还原平衡恢复，SK 的清热凉血作用增强，血热证损伤减轻。指示 SK 干预血液氧化还原稳态作用和 SK 清热凉血作用紧密相关。

综上所述，本研究表明 SK 对血热证小鼠的清热凉血功效与调节血液氧化还原稳态平衡有直接关系。但 SK 清热凉血和调控血液系统氧化还原稳态的具体机制尚未阐明，仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 何建成, 潘毅. 中医学基础 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [2] 姚乃礼. 中医证候鉴别诊断学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.

- [3] 柳佳, 张丽, 丁安伟, 等. 基于中医辨证用药特点建立大鼠血热出血模型 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(9): 1319-1324.
- [4] 包贝华, 赵显, 曹雨诞, 等. 鸡冠花对致热复合出血模型大鼠的凉血止血效应机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(10): 1457-1461.
- [5] Papageorgiou V, Assimopoulou A, Samanidou V, et al. Recent advances in chemistry, biology and biotechnology of alkannins and shikonins [J]. *Curr Org Chem*, 2006, 10(16): 2123-2142.
- [6] Malik S, Bhushan S, Sharma M, et al. Biotechnological approaches to the production of shikonins: A critical review with recent updates [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2016, 36(2): 327-340.
- [7] Larson M C, Hillery C A, Hogg N. Circulating membrane-derived microvesicles in redox biology [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 73: 214-228.
- [8] 谢晨, 陈韩英, 钟晶, 等. 紫草素通过上调 Nrf2 途径及干预胞内氧化还原平衡稳态诱导 A549 细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(10): 1445-1451.
- [9] 马晓茹, 周维维, 张闪闪, 等. Nrf2/ARE 途径在紫草素诱导 U937 细胞分化中的作用 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(2): 488-492.
- [10] 李照雪, 胡思远, 王吉辉, 等. 基于促甲状腺功能的姜黄素延长低温冷冻小鼠生存时间的作用机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(9): 1291-1297.
- [11] 刘晨, 柳佳, 张丽, 等. 侧柏叶炮制前后对血热复合出血模型大鼠的止血作用比较 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 668-672.
- [12] 段红福, 荣春蕾, 张文峰, 等. 复合因素造模法建立血热出血大鼠模型及初步评价 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(1): 259-263.
- [13] 赵琳琳, 李盖, 赵媛, 等. 大黄甘草汤胶囊剂急性毒性及药效学实验研究 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 866-869, 873.
- [14] 贾秀梅, 张振凌, 吴瑞环. 鲜地黄及保鲜加工品对血热出血模型大鼠凉血止血药效比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(6): 127-132.
- [15] 中医临床诊疗术语 [S]. 1997.
- [16] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [17] Jiang W Y. Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: A perspective from modern science [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2005, 26(11): 558-563.
- [18] 陈阳, 陈忠坚, 高赞, 等. 紫草素及其衍生物抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3503-3509.
- [19] 王文杰, 仪明光, 朱秀媛. 3H-紫草素的吸收、组织分布和排泄 [J]. 药学报, 1988, 23(4): 246-251.
- [20] 袁萱, 张波, 甘露, 等. 紫草素对大鼠离体胸主

- 动脉舒张作用及机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(4): 587-588.
- [21] Kumar A, Yegla B, Foster T C. Redox signaling in neurotransmission and cognition during aging [J]. *Antioxid Redox Sign*, 2018, 28(18): 1724-1745.
- [22] Skrzypczak A, Przystupa N, Zgadzaj A, *et al.* Antigenotoxic, anti-photogenotoxic and antioxidant activities of natural naphthoquinone shikonin and acetylshikonin and *Arnebia euchroma* callus extracts evaluated by the umu-test and EPR method [J]. *Toxicol In Vitro*, 2015, 30(1 Pt B): 364-372.
- [23] Zhang B, Chen N, Chen H M, *et al.* The critical role of redox homeostasis in shikonin-induced HL-60 cell differentiation via unique modulation of the Nrf2/ARE pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012: 781516.
- [24] Oliver S R, Phillips N A, Novosad V L, *et al.* Hyperthermia induces injury to the intestinal mucosa in the mouse: Evidence for an oxidative stress mechanism [J]. *Am J Physiol-Reg I*, 2012, 302(7): R845-R853.
- [25] Ferreira A P, Pasin J S, Saraiva A L, *et al.* N-acetylcysteine prevents baker's-yeast-induced inflammation and fever [J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(2): 103-112.
- [26] Michelucci A, Paolini C, Canato M, *et al.* Antioxidants protect calsequestrin-1 knockout mice from halothane- and heat-induced sudden death [J]. *Anesthesiology*, 2015, 123(3): 603-617.