

# 5 种温热性活血化瘀中药对寒凝血瘀证大鼠内分泌激素及 5-羟色胺、去甲肾上腺素的影响

王 鹏<sup>1</sup> 付先军<sup>2</sup> 周 扬<sup>2</sup> 王振国<sup>2</sup>

**摘要** **目的** 探讨温热性活血化瘀中药干预寒凝血瘀证模型大鼠的性-效机制。**方法** 实验动物为远交群 SD 大鼠,采用冰水浸泡法复制寒凝血瘀证模型。300 只造模成功的寒凝血瘀证模型大鼠,按体重均衡原则随机分为 5 组,每组 60 只,分别用于平行观察三碘甲腺原氨酸(T<sub>3</sub>)、四碘甲腺原氨酸(T<sub>4</sub>)、孕酮(P)、5-羟色胺(5-HT)及去甲肾上腺素(NE)5 个指标;各组再分为模型组、姜黄组、川芎组、红花组、延胡索组、乳香组 6 个亚组,每组 10 只;每个指标组分别设正常对照组,每组 10 只,共使用正常大鼠 50 只。完成 1 项观察指标需 70 只大鼠(7 组),5 个观察指标共用 350 只大鼠。各给药组按 20 g 生药/kg 体重灌胃给予相应的中药水煎液,1 天 1 次,1 次 3 mL,连续 7 天;同时正常组和模型组予等量生理盐水。检测各组大鼠给药前、给药 1 周 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、P、5-HT 及 NE 的含量。**结果** 与本组给药前比较,给药后川芎组 T<sub>3</sub>、乳香组 T<sub>3</sub>、各给药组 T<sub>4</sub>、川芎组 5-HT、各给药组 NE 及各给药组 P 水平均升高( $P < 0.05$ );与正常组比较,模型组 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、5-HT、NE 及 P 水平均降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较,各给药组 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、5-HT、NE 水平升高( $P < 0.05$ ),P 水平川芎组、乳香组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 温热性活血化瘀中药对寒凝血瘀证模型大鼠血清 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、NE 及 P 等具有组群特征性调控作用,可促进机体甲状腺-性腺轴功能,增强内分泌系统功能,这可能是温热性活血化瘀中药调治寒性血瘀证的药效学机制之一。

**关键词** 活血化瘀中药;温热性;寒凝血瘀证;内分泌激素;外周神经递质

Effect of 5 Warm-Hot Nature Chinese Drugs for Promoting Blood Circulation and Removing Blood Stasis on 5-HT, NE, and Endocrine Hormones of Rats of Cold Coagulation and Blood Stasis Syndrome WANG Peng<sup>1</sup>, FU Xian-jun<sup>2</sup>, ZHOU Yang<sup>2</sup>, and WANG Zhen-guo<sup>2</sup> 1 Academy of Clinical Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230038), China; 2 Key Laboratory on Classical Theories of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250355), China

**ABSTRACT** **Objective** To study the mechanism of warm-hot nature Chinese drugs (WHNCD) for promoting blood circulation and removing blood stasis (PBCRBS) for intervening model rats of cold coagulation and blood stasis syndrome (CCBSS). **Methods** CCBSS rat model was set up in outbred SD rats using ice water immersion method. Totally 300 successfully modeled CCBSS rats were randomly divided into 5 groups according to the principle of balance weight, 60 in each group. Contents of triiodothyronine (T<sub>3</sub>), tetraiodothyroine (T<sub>4</sub>), progesterone (P), 5-hydroxytryptamine (5-HT), and noradrenalin (NE) were paralleledly detected in all groups. Then rats in each group were subdivided into 6 subgroups as the model group, the curcuma group, the *Ligsticum Chuanxiong* group, the safflower group, the *Rhizoma Corydalis* group, and the *Olibanumg* group. Besides, 5 normal control groups were set up for 5 indices, 50 rats in total. We need 70 rats (7 groups) to finish observing 1 index, 350 rats in total for 5 indices. Except those in the model group and the normal control group, rats were administered with corresponding decoction at 20 g crude drugs/kg body weight by gastrogavage, 3 mL each time, once daily for 7 succes-

基金项目:国家重点基础研究发展计划课题基金资助(No. 2007CB512601)

作者单位:1. 安徽中医药大学中医临床学院(合肥 230038);2. 山东中医药大学中医药经典理论教育部重点实验室(济南 250355)

通讯作者:王振国, Tel: 0531-89628317, E-mail: zhenguo@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.11.1365

sive days. Equal volume of normal saline was given to rats in the normal control group and the model group. Contents of T3, T4, P, 5-HT, and NE were detected before treatment and 1 week after treatment. Results Compared with before treatment in the same group, T3 increased in the *Ligsticum Chuanxiong* group and the *Olibanumg* group, 5-HT increased in the *Ligsticum Chuanxiong* group, T4, NE, and P increased in all medicated groups ( $P < 0.05$ ). Compared with the normal control group, contents of T3, T4, 5-HT, NE, and P in the model group decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, contents of T3, T4, 5-HT, and NE increased in each medicated group ( $P < 0.05$ ). There was statistical difference in contents of P between the *Ligsticum Chuanxiong* group and the *Olibanumg* group ( $P < 0.05$ ). Conclusions WHNCD for PBCRBS had regulatory roles in serum contents of T3, T4, P, and NE in modeled rats of CCBSS. They could promote the thyroid gland-gonadal axis function, enhance the function of the endocrine system, which might be one of the pharmacodynamic mechanism of WHNCD for PBCRBS in intervening CCBSS.

**KEYWORDS** Chinese drugs for promoting blood circulation and removing blood stasis; warm-hot nature drugs; cold coagulation and blood stasis syndrome; endocrine hormone; peripheral neurotransmitter

本课题组前期研究发现,热性、寒性活血化瘀中药对寒凝血瘀证和热毒血瘀证模型大鼠基础代谢率、直肠温度、饮水量、心率、血压和组织耗氧量等整体层次寒热指标的影响具有规律性<sup>[1]</sup>,由此认为,在微观指标上,特别是内分泌及细胞代谢与调节等方面,也可能存在体现寒、热性活血化瘀中药调治热、寒血瘀证的功能作用序列,通过持续研究,可渐次寻找能科学界定活血化瘀中药寒、热药性属性的“性效表达谱系”。机体内分泌激素和对内分泌功能有重要调节作用的神经单胺类物质与寒、热状态关系密切,对评价中药寒热药性具有重要意义<sup>[2]</sup>。课题组此前已开展了寒性活血化瘀中药对阴虚血瘀证模型大鼠的性-效机制研究<sup>[1]</sup>,本次研究通过复制寒凝血瘀证动物模型,观察常用温热性活血化瘀中药组群对其血清内分泌激素及5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、去甲肾上腺素(noradrenalin, NE)的影响。

## 材料与方法

**1 动物** 350只远交群SD大鼠,SPF级,雄性,体重(300±10)g,由山东鲁抗医药股份有限公司动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(鲁)2008-0002。大鼠饲养于屏障环境中,湿度为40%~70%,温度为20~24℃。笼具:苏州新区枫桥净化设备厂生产,许可证号:SCXK(苏)2002-0034。块状鼠饲料:山东省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(鲁)2008-0014。实验动物使用许可证号:SYXK(鲁)2008-0015。

**2 药物** 姜黄、川芎、红花、延胡索、乳香5种温热性活血化瘀中药,由山东中医药大学第一附属医院

药房提供,均经山东中医药大学中药学院中药鉴定学系李峰教授鉴定为正品。分别定量称取上述中药置砂锅中,加8倍蒸馏水浸泡60min,快速加热至沸腾,而后保持微沸状态20min,趁热滤过;剩余药渣加6倍蒸馏水,快速加热至沸腾,而后保持微沸状态15min,趁热滤过,合并滤液,65℃水浴浓缩至相当于含2g(生药)/mL浓度,分瓶装存,贴好标签,4℃储存备用。

**3 主要试剂** 氯化钠注射液:山东齐都药业有限公司生产,250mL/瓶,批号:2A09081710;氢化可的松注射液:天津药业焦作有限公司生产,2mL/支,批号:08051012;盐酸肾上腺素注射液:上海禾丰制药有限公司生产,2mL/支,批号:090603;三碘甲腺原氨酸(T3)、四碘甲腺原氨酸(T4)、孕酮(P)、5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)ELISA试剂盒,美国R&D公司生产,批号分别为:200910251311、200910181145、200911020116、200910223216、200910251078。

**4 主要仪器** 多标记分析仪购于美国PerkinElmer公司,型号为VICTOR2D;二氧化碳培养箱购于美国Forma公司,型号为3111;高速冷冻离心机购于美国Beckman公司,型号为J-25;微量振荡器购于上海象华化工有限公司,型号为MM-II;卧式冷藏冷冻转换柜购于青岛海尔特种电冰箱有限公司,型号为BC/BD-379HN。

**5 动物造模** 寒凝血瘀证模型制备参照文献方法<sup>[3]</sup>。大鼠适应性饲养2周后,置于0~1℃冰水中20min,每天1次,连续2周,待出现寒战、蜷缩少动、反应迟钝、爪尾部紫暗、耳色暗红、喜扎堆、被毛无光泽、饮水量少、小便色清、大便湿烂等症状,即为造模成

功<sup>[4]</sup>。本次研究过程中,动物模型造模成功率为 87%。

**6 动物分组及给药** 为确保指标检测的准确性,每只活鼠所取血液用于 1 项指标检测。300 只造模成功的寒凝血瘀证模型大鼠,按体重均衡原则随机分为 5 组,每组 60 只,分别用于平行观察 T3、T4、5-HT、NE 及 P 5 个指标;各组再分为模型组、姜黄组、川芎组、红花组、延胡索组、乳香组 6 个亚组,每组 10 只;每检测 1 个指标均单设正常对照组,每组 10 只,共使用正常大鼠 50 只。完成 1 项观察指标需 70 只大鼠(7 组),5 个观察指标共用 350 只大鼠。各给药组大鼠按 20 g(生药)/kg 体重分别灌胃给予相对应的药物(相当于临床成人剂量 10 倍),1 天 1 次,1 次 3 mL,连续给药 1 周;同时模型组和正常组大鼠给予等量生理盐水。

**7 检测指标及检测方法** 各组动物分别于给药前和给药 1 周后眼眶取血 5 mL,左手握持大鼠颈部,适度压迫使眶后静脉丛充血,右手持玻璃毛细管于内眦部以 45°角刺入,深度 4~5 mm,取足血量后,去除压力,拔出毛细管,干棉球压迫止血。所取血液肝素抗凝,3 000 r/min 离心 15 min,分离血清,-20℃存放待测。

**酶联免疫法(ELISA)检测血清 T3、T4、5-HT、NE 及 P 含量**,操作严格按照试剂盒说明书进行。依次对应分别加入标准品和待测样品各 100 μL 于反应孔内,在标准孔和样本孔中加入 50 μL 酶标记液,盖上膜板,轻轻振荡混匀,36℃温育 1 h;甩去孔内液体,每孔加满洗涤液,振荡 30 min,甩去洗涤液,吸水纸拍干。重复操作 3 次。每孔加入底物 50 μL,轻轻振荡混匀,36℃避光温育 15 min。取出酶标板,迅速加入 50 μL 终止液,450 nm 波长测定相应指标含量。

**8 统计学方法** 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。所有实验数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,同组前后比较采用配对 t 检验,组间均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

**1 各组大鼠血清 T3 及 T4 水平比较(表 1)** 与本组给药前比较,给药后川芎组、乳香组 T3 水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其他各给药组 T3 水平有降低趋势,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ );各给药组 T4 水平升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与正常组比较,模型组给药后 T3、T4 水平均降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,各给药组给药后 T3、T4 水平升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠血清 T3 及 T4 水平比较 (nmol/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	T3	T4
正常	给药前	0.35 ± 0.02(10)	23.14 ± 3.88(10)
	给药后	0.35 ± 0.03(10)	24.98 ± 3.74(10)
模型	给药前	0.33 ± 0.04(10)	22.34 ± 4.58(10)
	给药后	0.33 ± 0.05(10) <sup>△</sup>	21.44 ± 3.49(10) <sup>△</sup>
姜黄	治疗前	0.34 ± 0.02(10)	22.51 ± 3.06(10)
	给药后	0.35 ± 0.06(10) <sup>▲</sup>	26.12 ± 6.83(10) <sup>*▲</sup>
川芎	治疗前	0.31 ± 0.05(10)	22.20 ± 2.77(10)
	给药后	0.34 ± 0.02(10) <sup>*▲</sup>	26.05 ± 7.28(10) <sup>*▲</sup>
延胡索	治疗前	0.32 ± 0.03(10)	22.46 ± 2.63(10)
	给药后	0.34 ± 0.06(10) <sup>▲</sup>	25.65 ± 5.78(10) <sup>*▲</sup>
乳香	治疗前	0.31 ± 0.02(10)	22.71 ± 3.19(10)
	给药后	0.35 ± 0.03(10) <sup>*▲</sup>	26.10 ± 6.76(10) <sup>*▲</sup>
红花	治疗前	0.33 ± 0.04(10)	22.38 ± 2.80(10)
	给药后	0.35 ± 0.05(10) <sup>▲</sup>	26.02 ± 7.04(10) <sup>*▲</sup>

注:与本组给药前比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与正常组同期比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与模型组同期比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$ ;( )内为动物只数;下表同

**2 各组大鼠血清 5-HT、NE 及 P 水平比较(表 2)** 与本组给药前比较,川芎组 5-HT 水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其他各给药组 5-HT 水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ );各给药组 NE、孕酮水平均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与正常组比较,给药后模型组 5-HT、NE 及孕酮水平降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,给药后各给药组 5-HT、NE 水平升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );孕酮水平有升高趋势,其中川芎组、乳香组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 各组大鼠血清 5-HT、NE 及 P 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	5-HT(μmol/L)	NE(ng/L)	P(nmol/L)
正常	给药前	2.14 ± 0.43(10)	14.34 ± 1.629(10)	1.11 ± 0.36(10)
	给药后	2.13 ± 0.62(10)	14.15 ± 1.57(10)	1.21 ± 0.77(10)
模型	给药前	1.53 ± 1.48(10)	6.03 ± 0.60(10)	0.87 ± 0.34(10)
	给药后	1.54 ± 0.98(10) <sup>△</sup>	6.27 ± 0.81(10) <sup>△</sup>	0.98 ± 0.37(10) <sup>△</sup>
姜黄	治疗前	1.57 ± 1.26(10)	6.05 ± 1.17(10)	0.85 ± 0.29(10)
	给药后	1.63 ± 0.87(10) <sup>▲</sup>	7.18 ± 1.59(10) <sup>*▲</sup>	1.18 ± 0.41(10) <sup>*</sup>
川芎	治疗前	1.52 ± 1.49(10)	5.92 ± 1.42(10)	0.83 ± 0.35(10)
	给药后	1.64 ± 1.16(10) <sup>*▲</sup>	7.65 ± 1.70(10) <sup>*▲</sup>	1.28 ± 0.27(10) <sup>*▲</sup>
延胡索	治疗前	1.55 ± 1.38(10)	5.97 ± 1.38(10)	0.79 ± 0.36(10)
	给药后	1.55 ± 1.34(10) <sup>▲</sup>	6.96 ± 1.64(10) <sup>*▲</sup>	1.12 ± 0.36(10) <sup>*</sup>
乳香	治疗前	1.61 ± 1.37(10)	6.02 ± 0.88(10)	0.81 ± 0.23(10)
	给药后	1.58 ± 0.94(10) <sup>▲</sup>	7.72 ± 1.64(10) <sup>*▲</sup>	1.21 ± 0.43(10) <sup>*▲</sup>
红花	治疗前	1.57 ± 1.18(10)	6.06 ± 1.21(10)	0.80 ± 0.26(10)
	给药后	1.60 ± 0.92(10) <sup>▲</sup>	7.56 ± 1.83(10) <sup>*▲</sup>	1.15 ± 0.34(10) <sup>*</sup>

### 讨 论

中药以寒、热药性应对疾病热、寒证,是否能够准确把握药性之寒热是临床用药能否取得疗效的关键环节之一。中药寒热药性的性-效表达特征只有在证的基础上才能得到充分表征<sup>[4,5]</sup>,其性效机制研究,主要

目的是基于寒热证候模型,探讨一类热性、寒性中药在调治机体寒性、热性病证过程中,起到什么样的作用、如何起作用 and 起到什么程度的作用,通过持续研究,逐步归纳其共性表达特征及规律性<sup>[6-8]</sup>。

T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 是由甲状腺分泌的激素类物质,具有多种生理功能,是中枢系统的重要神经调质,参与调控体内脏器官及肌肉、骨骼等的代谢,脂肪、糖、蛋白质的合成和分解,以及水、盐转运等。孕酮是卵巢分泌的主要孕激素,可调控神经递质及其受体,其神经通路的调节与雌激素相反,主要通过结合受体调节 5-HT 及其他神经递质间的功能<sup>[9-11]</sup>。5-HT 属单胺类神经递质和血管活性物质,约 99% 存在于机体外周,因其难于通过血脑屏障,故中枢和外周 5-HT 分属两个功能不同的独立系统,在应激状态下,中枢 5-HT 释放减少时,外周血清中 5-HT 水平亦减少,外周 5-HT 与 NE 共同参与调节机体内分泌及免疫功能等<sup>[12,13]</sup>。外周血中 NE 水平是反映交感神经功能状态的重要指标,对研究交感神经生理功能、药理机制和病理状态具有重要意义<sup>[14,15]</sup>。

本次研究发现,寒凝血瘀证模型大鼠服用温热性活血化瘀中药 1 周后,血清内分泌激素 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 合成和释放增加,P 水平升高。据报道,虚寒证模型大鼠交感神经系统机能降低,脑、内脏、尿液及呼吸、消化系统中 NE 含量降低,5-HT 含量上升,而温热药可使其 NE 含量增多,5-HT 含量减少<sup>[16]</sup>。本研究结果与之不太一致,寒性活血化瘀中药对阴虚血瘀证模型大鼠血清 5-HT、NE 有显著抑制作用,温热性活血化瘀中药虽可使寒凝血瘀证模型大鼠血清 NE 水平升高,但 5-HT 的结果比较复杂,其中,姜黄、川芎、红花组呈升高趋势,延胡索、乳香组呈降低趋势,分析认为可能由以下两种原因所致,首先是观察部位不同,报告文献观察的是脑内 5-HT,本研究取材为血清 5-HT,另外,不同种类的热性中药对虚寒证和寒凝血瘀证的干预靶点也存在不同。分析总体研究结果,可以初步认定,温热性活血化瘀中药对寒凝血瘀证模型大鼠血清 T<sub>4</sub>、NE、孕酮具有明显的组群特征性调控作用,可促进机体甲状腺-肾上腺-性腺轴功能,增强内分泌系统功能,调整寒凝血瘀证机体基础代谢和内分泌系统低下的病理状态,这可能是活血化瘀类中药的温热药性纠正寒性血瘀证患者发病病因的药效学机制之一。结合前期开展的寒性活血化瘀中药对阴虚血瘀证模型大鼠的性-效机制研究结果推断,调节寒热血瘀证患者内分泌激素相关指标及与内分泌系统功能关系密切的 5-HT、NE 等的合成、分泌和代谢,可能是活血化瘀中药寒热药性表达的特征性作用之一,其调控的具体环节和通路有待进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] 王鹏,欧阳兵,王振国. 5 种寒性活血化瘀中药对阴虚血瘀证模型大鼠血清 5-HT、NE 含量的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2010, 34(4): 359-361.
- [2] 吴宏伟,李洪海,唐力英,等. 基于单胺类神经递质代谢谱研究姜黄和郁金的寒热药性差异[J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(4): 839-843.
- [3] 成秀梅,杜惠兰,李丹. 寒凝血瘀证动物模型的创建[J]. 中医基础医学杂志, 2005, 11(8): 604-605.
- [4] 王鹏,王振国,欧阳兵. 中药功效与寒热药性相关性研究的方法学框架[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2011, 13(1): 129-132.
- [5] 王普霞,周春祥. 基于“证-药效-药性”观念及“药性本质多元”假说探讨中药药性本质[J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(6): 345-347.
- [6] 王建,曾南,夏厚林,等. 中药药性理论研究模式的新思路[J]. 中医杂志, 2013, 54(2): 99-102.
- [7] 王耘,张燕玲,史新元,等. 基于药性组合的中药性效规律研究框架[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2012, 14(4): 1798-1802.
- [8] 王薇,李峰. 中药药性物质基础研究现状分析[J]. 西北药学杂志, 2011, 26(4): 303-305.
- [9] 祝佩芹,李莲. 参芪利水汤治疗大鼠卵巢过度刺激综合征模型的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2449-2450.
- [10] 张倩,张冰,金锐,等. 肉桂油与肉桂水提取物对虚寒证模型大鼠的药理作用及其数理分析[J]. 中西医结合学报, 2011, 9(9): 983-990.
- [11] 葛明晓,张金玉,赵彦鹏,等. 益气血补肝肾中药对体外授精-胚胎移植周期中卵泡液转化生长因子  $\beta_1$  和性激素水平的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(3): 327-330.
- [12] 黄燕琼,秦华珍,李世阳,等. 丁香 3 种提取物对寒证大鼠脑内神经递质及环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 153-155.
- [13] 李连珍,刘小青,崔一然,等. 辛热示例药对正常大鼠基础代谢及内分泌系统的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(3): 49-51.
- [14] 李明,曾晓锋,周志全,等. 甲基苯丙胺对大鼠外周血中肾上腺素、去甲肾上腺素及肿瘤坏死因子- $\alpha$  的影响[J]. 中国法医学杂志, 2011, 26(1): 19-21.
- [15] 刘海琴,盛国荣. 退银汤对寻常性银屑病患者外周血 NE 表达水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 294-296.
- [16] 梁月华,李薪萍,任红. 寒证和热证脑、脊髓、内脏 NE、DA、5-HT 含量变化[J]. 中医杂志, 1991, 28(12): 68-70.