

仲景法和药典方法制附子的温阳散寒药效比较及作用机制分析

焦鸣杰, 陈倩, 燕姝羽, 宋宜燕, 张佳*, 李飞*

(北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

[摘要] **目的:**探究仲景法炮附子与药典方法生附片、黑顺片及水煎液的温阳散寒药效及机制。**方法:**将36只SD大鼠随机分为空白组、模型组、生附片组、炮附子组、黑顺片组及炮附片组,每组6只。除空白组外,其余各组大鼠均肌肉注射氢化可的松琥珀酸钠诱导虚寒证模型,连续14 d后,各附子饮片以 $12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量持续灌胃7 d,空白组和模型组给予等量的生理盐水。给药结束后,测体质量、脾脏及胸腺质量,计算脾脏指数和胸腺指数;采用苏木素-伊红(HE)染色观察肾上腺组织病理形态;采用全自动生化仪检测血清中的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、乳酸脱氢酶(LDH)及乳酸(LAC)的水平;采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测17-羟皮质类固醇(17-OHCS)、皮质醇(CORT)、三碘甲状腺原氨酸(T_3)、甲状腺素(T_4)、促甲状腺激素(TSH)、免疫球蛋白(Ig)M、IgG、环磷酸腺苷(cAMP)及环磷酸鸟苷(cGMP)水平;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏组织中蛋白激酶A(PKA),cAMP反应元件结合蛋白(CREB),沉默信息调节因子1(Sirt1)及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)的表达水平;采用高效液相色谱法(HPLC)检测主要的生物碱成分含量,并和药效指标进行Pearson相关性分析。**结果:**造模14 d后,与空白组比较,模型大鼠出现精神萎靡、大便糖稀等症状,肾上腺组织结构轻度异常,脾脏和胸腺指数均显著降低($P<0.01$),甲状腺、肾上腺及免疫系统功能受到抑制,且血清中cAMP水平降低,cGMP的水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,4种附子饮片均可改善氢化可的松造成的肾上腺损伤,并明显升高脾脏指数($P<0.05$, $P<0.01$),生附片和炮附子可明显提高胸腺指数($P<0.05$);生附片和炮附子可明显升高 T_3 、TSH、17-OHCS及CORT的水平($P<0.05$)。此外,生附片、炮附子及炮附片可显著升高IgG的水平($P<0.01$),炮附子和黑顺片可明显升高IgM的水平($P<0.05$);对于环核苷酸系统,炮附子可明显升高cAMP,同时降低cGMP的水平($P<0.05$),在4种饮片中作用最明显;对于能量代谢指标,炮附子可明显改善TC、TG、LDH及LAC等异常指标($P<0.05$);黑顺片对于TG、LDH及LAC具有明显的改善作用($P<0.05$);炮附子和生附片均可显著升高PKA、CREB、Sirt1和PGC-1 α 蛋白的表达水平($P<0.01$)。此外,附子中的双酯型生物碱与TG、IgG、CORT呈强正相关,与LAC呈强负相关,与 T_4 呈中等正相关,与cAMP和脾脏指数呈中等负相关;单酯型生物碱与TG和IgG呈强正相关,与LAC呈强负相关,与CORT和 T_4 呈中等正相关,与cAMP和脾脏指数呈中等负相关;而水溶性生物碱的含量与TC、LDH、17-OHCS、 T_3 、TSH及胸腺指数呈强正相关,与cAMP、CORT、 T_4 及脾脏指数呈中等正相关,与cGMP呈中等负相关。**结论:**在不同制附子饮片中以仲景法炮附子温阳散寒的效果最好,其可通过调节甲状腺、肾上腺、免疫、环核苷酸系统及物质能量代谢等途径发挥药效。其中,水溶性生物碱与更多的虚寒证指标呈现强或中等的相关性,且在炮附子中的含量最高,因此仲景法炮附子可能通过水溶性生物碱发挥温阳散寒药效。

[关键词] 虚寒证; 制附子; 生物碱; 下丘脑-垂体-甲状腺轴; 免疫系统; 环磷酸腺苷/蛋白激酶(cAMP/PKA)通路

[中图分类号] R242;R943.1;R931 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)02-0207-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251768

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250708.1833.003>

[网络出版日期] 2025-07-09 11:06:42 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Comparison of Efficacy and Mechanism in Warming Yang and Dispersing Cold of Aconiti Radix Lateralis Praeparata Processed by ZHANG Zhongjing's Method and Pharmacopoeia Method

JIAO Mingjie, CHEN Qian, YAN Shuyu, SONG Yiyan, ZHANG Jia*, LI Fei*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

[收稿日期] 2025-03-30

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973479)

[第一作者] 焦鸣杰, 硕士, 从事中药炮制研究, E-mail: 1274117646@qq.com

[通信作者] * 张佳, 博士, 讲师, 从事中药炮制和质量评价研究, Tel: 010-53912125, E-mail: zhangjbuem@163.com;

* 李飞, 硕士, 教授, 从事中药炮制学研究, E-mail: lf668@sina.com

[Abstract] Objective: To investigate the therapeutic effects and mechanism of decoctions from four kinds of processed products of *Aconiti Radix Lateralis Praeparata* (ARLP) in deficiency-cold syndrome. **Methods:** A total of 36 SD rats were randomly divided into the control group, model group, Shengfupian(SFP) group, Paofuzi(PFZ) group, Heishunpian(HSP) group and Paofupian(PFP) group with 6 rats in each group. Except for the control group, rats in other groups were administered hydrocortisone sodium succinate via intramuscular injection to induce a cold deficiency syndrome model. After 14 consecutive days, each ARLP decoction pieces was administered via continuous gastric lavage at a dose of $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 7 d, while the control and model groups received an equivalent volume of physiological saline. After the end of administration, body weight, spleen weight and thymus weight were measured for calculating the spleen and thymus indexes. Hematoxylin-eosin(HE) staining was used to observe the pathological morphology of adrenal tissue. The fully automatic biochemistry analyzer was used to measure the total cholesterol(TC), triglyceride(TG), lactic dehydrogenase(LDH) and lactate(LAC) levels in serum. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was employed to measure the contents of 17-hydroxycorticosteroid(17-OHCS), cortisol(CORT), triiodothyronine(T_3), thyroxine(T_4), thyrotropin(TSH), immunoglobulin(Ig) M, IgG, cyclic adenosine monophosphate(cAMP) and cyclic guanosine monophosphate(cGMP). Western blot was used to measure the protein expression levels of protein kinase A(PKA), cAMP response element-binding protein(CREB), silent information regulator 1(Sirt1) and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α). And high performance liquid chromatography(HPLC) was used to determine the content of major alkaloids, followed by Pearson correlation analysis with pharmacodynamic indicators. **Results:** After modeling, compare with the control group, the model rats exhibited symptoms such as lethargy and loose stools, mild abnormalities were observed in adrenal tissue structure, and both spleen and thymus indices were significantly reduced($P < 0.01$). Thyroid, adrenal and immune system functions were suppressed, with decreased serum cAMP level and significantly elevated cGMP level($P < 0.01$). Compared with the model group, the adrenal injury by hydrocortisone sodium succinate were repaired and the spleen index were increased significantly in all four ARLP groups($P < 0.05$, $P < 0.01$). The thymus index in SFP and PFZ groups were increased significantly($P < 0.05$). The contents of T_3 , TSH, 17-OHCS and CORT were increased significantly in SFP and PFZ groups($P < 0.05$). In addition, the content of IgG in SFP, PFZ and PFP groups were increased significantly($P < 0.01$), while the content of IgM in PFZ and HSP groups were also increased significantly($P < 0.05$). Regarding the cyclic nucleotide system, PFZ significantly elevated cAMP level while reducing cGMP level($P < 0.05$), exhibiting the most pronounced effect among the four decoction pieces. For energy metabolism indicators, PFZ significantly improved abnormal markers including TC, TG, LDH, and LAC($P < 0.05$). HSP showed marked improvement effects on TG, LDH, and LAC($P < 0.05$). Both PFZ and SFP significantly elevated the expression levels of PKA, CREB, Sirt1, and PGC-1 α proteins($P < 0.01$). Additionally, the diester alkaloids in ARLP showed a strong positive correlation with TG, IgG, and CORT, a strong negative correlation with LAC, a moderate positive correlation with T_4 , and moderate negative correlations with cAMP and spleen index. Monomeric alkaloids showed strong positive correlations with TG and IgG, strong negative correlations with LAC, moderate positive correlations with CORT and T_4 , and moderate negative correlations with cAMP and spleen index. However, the content of water-soluble alkaloids showed strong positive correlations with TC, LDH, 17-OHCS, T_3 , TSH, and thymus index, moderate positive correlations with cAMP, CORT, T_4 , and spleen index, and moderate negative correlation with cGMP. **Conclusion:** Among different processed ARLP decoction pieces, PFZ processed according to ZHANG Zhongjing's method exhibits the most potent warming and cold-dispelling effects. Its pharmacological actions are mediated through regulating the thyroid, adrenal, immune, cyclic nucleotide systems, and material-energy metabolism pathways. Among these, water-soluble alkaloids show strong or moderate correlations with more indicators of deficiency-cold syndrome and exhibit the highest content in PFZ. Therefore, PFZ processed according to ZHANG Zhongjing's method may exert its warming and cold-dispelling effects through water-soluble alkaloids.

[Keywords] asthenic cold syndrome; processed *Aconiti Radix Lateralis Praeparata*; alkaloids; hypothalamus-pituitary-thyroid axis; immune system; cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A(cAMP/PKA) signaling pathway

附子是我国中医临床常用中药之一,始载于《神农本草经》,发展于《伤寒杂病论》,药性辛、热,纯阳,善于回阳救逆、散寒止痛,上助心阳、中温脾阳、下壮肾阳,为扶阳第一要药^[1]。附子来源于毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* 的子根,主要产自四川江油、陕西宁强等地^[2]。千百年来,附子被广泛用于温阳救逆、温经散寒、除胸痹心痛等功效,如四逆汤、小青龙汤、真武汤、附子汤、乌梅丸、理中丸等方剂^[3]。由于附子属有毒中药之一,大多数医家采用其炮制品入药,2025年版《中华人民共和国药典》

(以下简称《中国药典》)收录了黑顺片、白附片、炮附片及淡附片4种饮片规格,并广泛应用于桂附地黄丸、通痹胶囊、附子理中丸等成方制剂中^[4]。目前,现代研究已阐明了附子炮制减毒的机制,但对于不同规格饮片之间的功效和毒性差异缺乏数据支撑,有待于进一步探究。

在《伤寒论》中,张仲景常以附子入汤剂,且有阳虚重证附子生用、重用,阳虚轻证附子炮用、轻用的特点。仲景炮附子不同于药典方法,无浸胆和水处理,将泥附子片直接置于溱灰火中炮熟(现已发

展为砂烫法),发挥温阳散寒的作用,如桂枝加附子汤、附子泻心汤、芍药甘草附子汤及桂枝去芍药加附子汤等。虚寒证,也称为阳虚证,是由于机体阳气不足,阴寒内盛所致,临床多表现为面色少华、肢冷畏寒、精神不振、气短等症状^[5]。现代医学研究认为,阳虚状态下人体机能下降,常表现为免疫功能下降、内分泌系统功能受到抑制、机体代谢低下等情况^[6]。近年来,已有学者报道附子治疗虚寒证的研究,但多局限于附子的生品或提取物层面^[7-8],鲜见关于附子不同规格饮片温阳散寒药效比较及其作用机制的系统研究。本课题组常年聚焦于附子的炮制研究,对仲景炮附子、生附片、黑顺片及炮附片等饮片的化学成分和炮制原理进行了深入研究^[9-13]。为进一步探究仲景炮附子“温阳散寒”的作用特点,本文采用氢化可的松琥珀酸钠构建虚寒证大鼠模型,通过检测肾上腺轴、甲状腺轴、免疫系统、物质能量代谢及环核苷酸系统等相关指标,结合病理切片,综合比较生附子、仲景法炮附子及药典方法附子饮片(黑顺片、炮附片)水煎液对虚寒证的治疗作用,并采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测其对环磷酸腺苷/蛋白激酶A(cAMP/PKA)信号通路相关蛋白的影响,探索附子治疗虚寒证的作用机制,为附子的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器 BT-25S型十万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司),H1650R型台式高速冷冻离心机、TGL-16型冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),BK-280型全自动生化仪(山东BIOBASE公司),JJ-12J型组织脱水机、JB-P5型组织包埋机(武汉俊杰电子有限公司),RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司),NIKON ECLIPSE CI型正置光学显微镜、NIKON DS-U3成像系统(日本Nikon公司),Mini P-4小型垂直电泳系统、Mini TBC小型湿式转印电泳槽及Power B基础电泳电源(北京凯元信瑞仪器有限公司),DR-200Bs型酶标仪(无锡华卫德朗仪器有限公司),L4158型扫描仪[爱普生(中国)有限公司],1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)。

1.2 药物与试剂 生附片、黑顺片、炮附片(四川江油中坝附子科技发展有限公司,批号分别为190701、180703、180301,执行标准为2025年版《中国药典》),经北京中国食品药品检定研究院张继主任药师鉴定均为正品且符合2025年版《中国药典》中的质量标准。仲景炮附子为实验室按照前期模

拟仲景“炮”法的研究结果自制,具体为取净河砂至热锅内,当砂温达到约250℃,呈灵活状态时,投入大小分档的生附片(批号190701),不断翻炒约5 min,至饮片内外皆黄,且表面出现裂隙取出,筛去河砂,晾凉^[6]。

促甲状腺激素(TSH)、三碘甲腺原氨酸(T₃)、甲状腺素(T₄)、17羟基皮质类固醇(17-OHCS)、皮质醇(CORT)、免疫球蛋白(Ig)M、IgG、大鼠环磷酸腺苷(cAMP)、大鼠环磷酸鸟苷(cGMP)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉酶免生物科技有限公司,批号分别为MM-0573R1、MM-0582R1、MM-0583R1、MM-0536R1、MM-0574R1、MM-0065R1、MM-0064R1、MM-0549R1、MM-0027R1)。甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、乳酸脱氢酶(LDH)、乳酸(LAC)生化试剂盒(博科控股集团有限公司,批号分别为10408002H、10412001H、10220020N、10521060HT),4%组织细胞固定液、RIPA裂解液(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为P1110、R0020),苏木素-伊红(HE)染液、BCA蛋白质浓度测定试剂盒(武汉百仟度生物科技有限公司,货号分别为B1002、Ba1086),PKA抗体(北京博奥森生物技术有限公司,货号bs-0520R),cAMP反应元件结合蛋白(CREB)、沉默信息调节因子1(Sirt1)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(英国Abcam公司,货号分别为ab32515、ab189494、ab227387),过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号66369-1-Ig),辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔抗体、HRP标记山羊抗小鼠抗体[安诺伦(北京)生物科技有限公司,货号分别为5220-0336、5220-0341],注射用氢化可的松琥珀酸钠(天津生物化学制药有限公司,批号022111012)。盐酸多巴胺、鸟苷、尿苷、去甲猪毛菜碱、腺苷、去甲乌药碱对照品(上海诗丹德标准技术服务有限公司,批号分别为8783、3877、6213、8803、8178、8114,纯度均 \geq 98.0%),苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111795-201604、111794-201705、111796-201705、110799-201608、110798-201609,纯度均 \geq 98%),乌头碱对照品(上海康标化学品有限公司,批号121102,纯度 \geq 98%)。甲醇、乙腈、乙酸铵、氨水均为色谱级,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

1.3 动物 36只SPF级雄性SD大鼠,体质量200~220 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格

证号 SCXK(京)2019-0010。饲养于北京中医药大学实验动物中心,室温 22~25 °C,相对湿度 60%,饮食洁净,安静通风洁净环境下分笼饲养,实验期间 12 h/12 h 昼夜明暗交替。

1.4 伦理 本实验符合北京中医药大学实验动物伦理委员会标准,伦理号 BUCM-4-2022031501-1046。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备 称取附子饮片适量,10 倍量水浸泡 0.5 h,煎煮 0.5 h,过滤。滤渣再加入 8 倍量水再煎 0.5 h,过滤。合并滤液,浓缩至 1.2 g·mL⁻¹。根据文献报道,附子发挥温肾阳作用的最佳给药剂量是 12 g·kg⁻¹[14],因此灌胃量设置为 10 mL·kg⁻¹,储存于 4 °C 冰箱中备用。氢化可的松琥珀酸钠注射液的配制:称取注射用氢化可的松琥珀酸钠 0.1 g,加 0.9% 氯化钠注射液溶解,配制成 20 g·L⁻¹ 的溶液[15]。

2.2 动物分组、给药及造模 大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为 6 组,每组 6 只,即空白组、模型组、生附片组、炮附子组、黑顺片组、炮附片组。给药组和模型组肌肉注射氢化可的松琥珀酸钠 20 mg·kg⁻¹,空白组肌注等量的 0.9% 氯化钠溶液,每天 1 次,连续 14 d。第 15 天开始,给药组和模型组每天上午 8:00 肌肉注射氢化可的松琥珀酸钠 20 mg·kg⁻¹,空白组肌注等量的 0.9% 氯化钠溶液,下午 3:00 各给药组给予相应药液灌胃(12 g·kg⁻¹),空白组和模型组灌胃蒸馏水 1 mL·d⁻¹,持续 7 d[14]。以大鼠出现毛色黯淡、精神萎靡、少动、蜷缩及大便溏稀等表现,表明虚寒证模型造模成功。

2.3 样本收集 实验第 22 天,麻醉动物,腹主动脉取血后处死大鼠,血液室温下静置 2 h,于 4 °C、3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离血清(离心半径 10 cm,下同),-80 °C 冰箱冻存。取血后,迅速剖开胸腔,摘取大鼠肝、脾、胸腺及肾上腺,生理盐水冲洗干净后于吸水纸上吸去水分,称质量并计算脾脏和胸腺的脏器指数后,-80 °C 冰箱保存。脏器指数=脾脏质量(g)/体质量(g)×100%。

2.4 HE 染色观察肾上腺组织病理学 取大鼠肾上腺组织,4% 组织细胞固定液固定 24 h 以上,取出,用手术刀将目的部位组织修平整,流水冲洗干净脏器表面的固定液,经乙醇梯度脱水、浸蜡包埋、石蜡切片、二甲苯脱蜡复水后,进行 HE 染色、二甲苯透明、中性树胶封片。在光学显微镜下观察不同组别大鼠肾上腺的病理表现,进行组织学检查和评价。

2.5 大鼠血脂指标及血清中激素和免疫指标的检

测 按照试剂盒说明书方法操作,采用全自动生化仪检测大鼠血清中 TC、TG、LDH 及 LAC 的水平。参照 ELISA 试剂盒说明书,检测大鼠血清中 17-OHCS、CORT、T₃、T₄、TSH、IgM、IgG、cAMP 及 cGMP 的水平。

2.6 Western blot 检测大鼠肝脏组织蛋白表达 取各组大鼠肝脏组织,加入组织体积 10 倍量的 RIPA 裂解液,研磨匀浆取上清,使用 BCA 试剂盒定量,根据浓度确定上样量。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,将蛋白质转移到 PVDF 膜上后,封闭,分别加入 PKA(1:500)、CREB(1:500)、Sirt1(1:1 000)、PGC-1 α (1:5 000)、 β -actin(1:5 000)一抗,4 °C 孵育过夜,PBS 洗 3 次,二抗(1:10 000)37 °C 孵育 30 min,PBS 清洗后,用 ECL 显色曝光条带,采用 IPWIN 60 软件分析蛋白质条带,以 β -actin 为内参分析蛋白质的相对表达量。

2.7 水溶性生物碱的含量测定

2.7.1 色谱条件 Phenomenex Luna Omega Polar C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m),柱温 30 °C,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 280 nm,进样量 10 μ L,以 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠水溶液为流动相 A,以 50% 甲醇为流动相 B,梯度洗脱(0~25 min,100%~99%A;25~32 min,99%~91%A;32~75 min,91%~65%A;75~95 min,65%~35%A;95~110 min,35%~15%A)。

2.7.2 对照品溶液的制备 取盐酸多巴胺、尿苷、去甲猪毛菜碱、鸟苷、腺苷、去甲乌药碱对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇溶液制成每 1 mL 含盐酸多巴胺 1.385 mg、尿苷 1.71 mg、去甲猪毛菜碱 1.145 mg、鸟苷 2.5 mg、腺苷 1.335 mg、去甲乌药碱 2.5 mg 的混合对照品溶液。

2.7.3 供试品溶液的制备 称取饮片 10 g,置于烧杯中,加入 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min,置于多用电炉上煎煮,水沸开始计时,煎煮 30 min,减压滤过,药渣再加 8 倍量蒸馏水煎煮 30 min,合并 2 次煎液,40 °C 减压浓缩到 5 mL,12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,过 0.22 μ m 滤膜,取续滤液即得供试品溶液,待用。

2.7.4 方法学考察 按 2.7.3 项下方法制备生附片供试品溶液,按 2.7.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录并计算各成分峰面积相对标准偏差(RSD),考察仪器精密度。按 2.7.3 项下方法平行制备 6 份生附片供试品溶液,按 2.7.1 项下色谱条件进样检测,记录并计算各成分平均质量分数及其 RSD,考察方法重复性。按 2.7.3 项下方法制备生附片供试品溶液,按 2.7.1 项下色谱条件于 0、2、4、8、12、20 h 进样,

记录并计算各成分峰面积RSD,考察样品在室温下放置20 h内的稳定性。取2.7.2项下混合对照品溶液,稀释得到6个梯度浓度的对照品溶液,按2.7.1项下的色谱条件进样分析并记录色谱图。以各待测成分的质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。取已知含量的饮片10 g,共6份,按1:1准确加入各对照品溶液适量,按2.7.3项下方法制备供试品溶液,按2.7.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。

2.8 脂溶性生物碱的含量测定

2.8.1 色谱条件 Agilent Extend C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m),柱温30 $^{\circ}$ C,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长240 nm,进样量10 μ L,流动相A为乙腈,流动相B为40 mmol·L⁻¹乙酸铵缓冲液(氨水调pH为10),梯度洗脱(0~45 min,15%~60%A;45~60 min,60%A)。

2.8.2 对照品溶液的制备 精密称定新乌头碱、乌头碱、次乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱对照品适量,加0.05%盐酸-甲醇混合溶液制成每1 mL含新乌头碱0.224 mg、乌头碱0.254 mg、次乌头碱0.272 mg、苯甲酰新乌头原碱0.230 mg、苯甲酰乌头原碱0.242 mg、苯甲酰次乌头原碱0.259 mg的混合对照品溶液。

2.8.3 供试品溶液的制备 称取饮片10 g,置于烧杯中,加入10倍量蒸馏水浸泡30 min,置于多用电炉上煎煮,水沸开始计时,煎煮30 min,再加8倍量蒸馏水煎煮30 min,合并2次煎液,浓缩到5 mL,12 000 r·min⁻¹离心15 min,过0.22 μ m滤膜,取续滤液即得供试品溶液,备用。

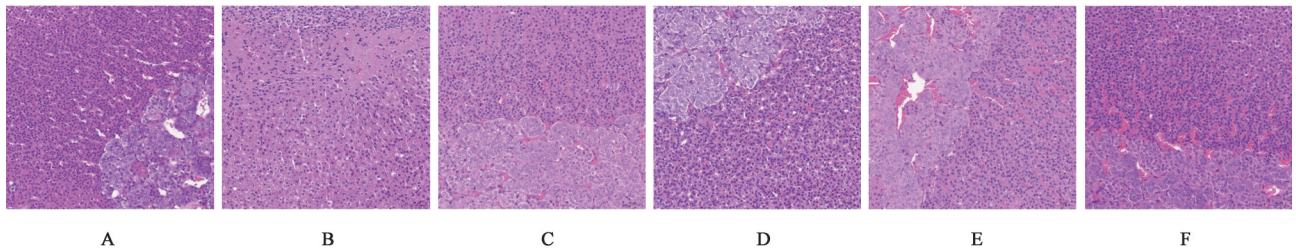
2.8.4 方法学考察 基于2.8.1~2.8.3项下的色谱条件及对照品、供试品制备方法,按照2.7.4项下方法进行脂溶性生物碱的方法学考察。

2.9 数据处理 采用SPSS 26.0统计软件分析实验数据,实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,符合正态分布采用单因素方差分析,若方差齐采用最小显著性差异法(LSD)进行事后检验,若方差不齐采用Games-Howell检验;不符合正态性分布的数据,采用Kruskal-Wallis非参数检验。以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。采用Origin 2024软件对药效指标和生物碱类化学成分进行Pearson相关性分析,使用软件自带的热图功能绘制可视化图谱,颜色映射范围为-1~1,相关系数 r 的绝对值 ≥ 0.8 认为强相关, ≥ 0.5 且 <0.8 认为中等相关, ≥ 0.3 且 <0.5 认为低相关, <0.3 认为基本不相关。

3 结果

3.1 一般状态 空白组大鼠精神状态良好、活动正常、反应敏捷、毛色光亮。与空白组比较,模型组大鼠在造模14 d后陆续出现毛色黯淡、无光、竖毛、精神状态不振或萎靡、少动、蜷缩、扎堆、反应迟钝、大便溏稀等表现。与模型组比较,各给药组大鼠的精神状态得到一定程度恢复,蜷缩、扎堆的现象减少,大便溏稀的状况也得到明显改善。

3.2 附子对虚寒证大鼠肾上腺病理组织影响 在高倍镜下观察各组大鼠的肾上腺病理切片,空白组大鼠肾上腺皮质网状带区组织结构,基本正常,皮质细胞较小,核小,着色深,未见坏死,血窦未见扩张;髓质内可见大量排列成索状或团状的髓质细胞。与空白组比较,模型组显示肾上腺组织结构轻度异常,部分皮质细胞结构异常,细胞排列紊乱,皮质内可见少量脂滴,说明虚寒证模型大鼠肾上腺受到损伤。与模型组比较,各给药组肾上腺组织病理情况均未出现明显的结构性变化,说明生附片、炮附子、黑顺片、炮附片对氢化可的松造成的肾上腺损伤均有一定的治疗作用。见图1。



注:A.空白组;B.模型组;C.生附片组;D.炮附子组;E.黑顺片组;F.炮附片组(图2同)

图1 附子饮片对虚寒证大鼠肾上腺的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Aconiti Radix Lateralis Præparata (ARLP) decoction pieces on adrenal glands of rats with deficiency-cold syndrome (HE,×200)

3.3 附子对虚寒证大鼠脾脏和胸腺指数的影响 与空白组比较,模型组大鼠脾脏和胸腺指数均显

著降低($P<0.01$),表明虚寒证模型大鼠免疫功能受到抑制。与模型组比较,生附片、炮附子、黑顺片和

炮附片组大鼠脾脏指数均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),生附片和炮附子组大鼠胸腺指数明显升高($P<0.05$),黑顺片和炮附片组胸腺指数升高,但差异无统计学意义。见表1。

表1 附子饮片对虚寒证大鼠脾脏和胸腺指数的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 1 Effect of ARLP decoction pieces on spleen and thymus indexes of deficiency-cold rats ($\bar{x}\pm s, n=6$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	脾脏指数	胸腺指数
空白组		0.26±0.03	0.20±0.02
模型组		0.19±0.02 ²⁾	0.10±0.02 ²⁾
生附片组	12	0.23±0.01 ³⁾	0.12±0.02 ³⁾
炮附子组	12	0.26±0.04 ⁴⁾	0.13±0.01 ³⁾
黑顺片组	12	0.24±0.04 ⁴⁾	0.11±0.01
炮附片组	12	0.25±0.03 ⁴⁾	0.12±0.02

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2-表7同)

3.4 附子对虚寒证模型大鼠甲状腺轴T₃、T₄、TSH的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清中T₃的水平显著降低($P<0.01$),T₄的水平明显降低($P<0.05$),TSH的水平有降低趋势,说明虚寒证模型大鼠甲状腺轴功能受到抑制。给予不同规格附子饮片治疗后,与模型组比较,生附片组、炮附子组、炮附片组大鼠T₃的水平均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),除黑顺片组外,各给药组大鼠T₄的水平均有升高趋势,但差异无统计学意义。生附片组、炮附子组大鼠血清中TSH的水平明显升高($P<0.05$)。见表2。

表2 附子饮片对虚寒证大鼠血清中T₃、T₄、TSH水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of ARLP decoction pieces on serum T₃, T₄ and TSH levels in deficiency-cold rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	T ₃ /pmol·L ⁻¹	T ₄ /pmol·L ⁻¹	TSH /mIU·L ⁻¹
空白组		80.40±7.98	2 002.22±49.91	23.10±0.27
模型组		67.36±3.34 ²⁾	1 707.78±16.39 ¹⁾	22.18±0.45
生附片组	12	81.67±4.93 ⁴⁾	2 007.78±218.18	24.19±0.63 ³⁾
炮附子组	12	88.73±7.61 ⁴⁾	1 955.00±174.16	25.34±1.33 ³⁾
黑顺片组	12	71.34±5.74	1 649.44±135.67	24.19±1.89
炮附片组	12	76.78±8.93 ³⁾	1 882.78±175.65	22.61±2.31

3.5 附子对虚寒证模型大鼠肾上腺轴17-OHCS和CORT的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清中17-OHCS的水平显著降低($P<0.01$),CORT的水平低于空白组,但差异无统计学意义,说明虚寒证模型大鼠肾上腺轴功能受到抑制,肾上腺皮质功能减退。与模型组比较,生附片和炮附子组的17-OHCS和

CORT的水平显著升高($P<0.01$),黑顺片组和炮附片组均有升高趋势,但差异无统计学意义。见表3。

表3 附子饮片对虚寒证大鼠血清中17-OHCS和CORT水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of ARLP decoction pieces on serum 17-OHCS and CORT levels in deficiency-cold rats ($\bar{x}\pm s, n=6$) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	剂量/g·kg ⁻¹	17-OHCS	CORT
空白组		61.70±2.21	520.24±14.05
模型组		52.66±1.78 ²⁾	472.62±25.82
生附片组	12	61.17±2.43 ⁴⁾	569.05±34.23 ⁴⁾
炮附子组	12	64.72±4.02 ⁴⁾	548.81±17.88 ⁴⁾
黑顺片组	12	57.09±4.12	521.43±59.72
炮附片组	12	53.19±6.34	495.24±41.26

3.6 附子对虚寒证大鼠免疫系统IgM和IgG的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清中IgG的水平明显降低($P<0.05$),IgM的水平低于空白组,但差异无统计学意义,说明虚寒证模型大鼠免疫系统功能受到抑制。与模型组比较,炮附子、生附片组和炮附片组大鼠血清中IgG的水平显著升高($P<0.01$),黑顺片组大鼠IgG的水平有升高趋势,但差异无统计学意义。炮附子和黑顺片组IgM的水平明显升高($P<0.05$),生附片组和炮附片组大鼠IgM的水平均有升高趋势,但差异无统计学意义。见表4。

表4 附子饮片对虚寒证大鼠血清中IgM和IgG水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of ARLP decoction pieces on serum IgM and IgG levels in deficiency-cold rats ($\bar{x}\pm s, n=6$) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IgM	IgG
空白组		18.42±1.47	657.33±70.05
模型组		16.13±1.01	519.00±30.17 ¹⁾
生附片组	12	19.11±0.59	749.00±88.71 ⁴⁾
炮附子组	12	19.91±1.47 ³⁾	697.33±36.70 ⁴⁾
黑顺片组	12	20.31±2.64 ³⁾	652.33±122.87
炮附片组	12	16.01±0.56	632.33±25.63 ⁴⁾

3.7 附子对虚寒证模型大鼠环核苷酸系统cAMP、cGMP的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清中cAMP的水平降低,但差异无统计学意义,cGMP的水平显著升高($P<0.01$),说明虚寒证模型大鼠环核苷酸系统紊乱。与模型组比较,炮附子组cAMP的水平明显升高($P<0.05$),炮附片组cAMP的水平显著升高($P<0.01$),生附片组和黑顺片组大鼠cAMP的水平均有升高趋势,但差异无统计学意义。炮附子组cGMP的水平明显降低($P<0.05$),生附片组、炮附片组和黑顺片组大鼠血清中cGMP的水平均低于模型

组,有降低趋势,但差异无统计学意义。见表5。

表5 附子饮片对虚寒证大鼠血清中cAMP和cGMP水平的影响
($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of ARLP decoction pieces on serum cAMP and cGMP levels in deficiency-cold rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	cAMP/nmol·L ⁻¹	cGMP/μmol·L ⁻¹
空白组		48.65±1.35	11.78±0.34
模型组		45.00±1.68	13.48±0.68 ²⁾
生附片组	12	51.39±4.32	12.84±0.79
炮附子组	12	53.22±5.48 ³⁾	12.20±0.33 ³⁾
黑顺片组	12	51.74±5.88	12.31±1.10
炮附片组	12	52.53±1.56 ⁴⁾	13.98±0.70

3.8 附子对虚寒证模型大鼠血清能量代谢指标的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清中TC、

LDH、LAC的水平显著降低($P<0.01$),TG的水平有升高趋势,但差异无统计学意义,说明虚寒证模型大鼠物质能量代谢水平降低。与模型组比较,炮附子组TC的水平明显升高($P<0.05$),生附片组、炮附片组和黑顺片组大鼠TC的水平均有升高趋势,但差异无统计学意义;炮附子组TG的水平显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),黑顺片组TG的水平明显降低($P<0.05$),生附片组和炮附片组大鼠TG的水平均有降低趋势,但差异无统计学意义;各给药组LDH的水平均显著升高($P<0.01$);炮附子组LAC的水平显著升高($P<0.01$),黑顺片组LAC的水平明显升高($P<0.05$),生附片和炮附片组大鼠TG的水平有升高趋势,但差异无统计学意义。见表6。

表6 附子饮片对虚寒证大鼠血清中TC、TG、LDH及LAC水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of ARLP decoction pieces on serum TC, TG, LDH and LAC levels in deficiency-cold rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹	LAC/mg·dL ⁻¹
空白组		2.26±0.33	0.48±0.15	2 019.83±227.38	27.98±0.44
模型组		1.32±0.14 ²⁾	0.63±0.05	1 087.33±88.69 ²⁾	7.12±0.89 ²⁾
生附片组	12	1.60±0.26	0.46±0.11	1 701.00±447.02 ⁴⁾	18.85±8.96
炮附子组	12	1.87±0.17 ³⁾	0.35±0.08 ⁴⁾	2 029.67±218.33 ⁴⁾	24.87±7.95 ⁴⁾
黑顺片组	12	1.55±0.22	0.35±0.09 ³⁾	1 521.33±239.58 ⁴⁾	27.45±4.85 ³⁾
炮附片组	12	1.58±0.21	0.39±0.04	1 743.00±138.79 ⁴⁾	25.55±4.94

3.9 附子对虚寒证模型大鼠肝组织中PKA、CREB、Sirt1、PGC-1α蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠肝组织中PKA、CREB、Sirt1、PGC-1α蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$),表明虚寒证模型大鼠cAMP/PKA通路处于下调状态,物质

能量代谢水平降低。与模型组比较,生附片和炮附子组上述蛋白表达水平均明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),黑顺片和炮附片组对于4种蛋白表达水平有升高趋势,但差异无统计学意义。见表7、图2。

表7 附子饮片对大鼠肝脏组织PKA、CREB、Sirt1、PGC-1α蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of ARLP decoction pieces on protein expressions of PKA, CREB, Sirt1 and PGC-1α in liver tissue of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PKA/β-actin	CREB/β-actin	Sirt1/β-actin	PGC-1α/β-actin
空白组		0.96±0.13	0.75±0.08	1.01±0.23	0.57±0.07
模型组		0.04±0.01 ²⁾	0.03±0.01 ²⁾	0.04±0.02 ²⁾	0.03±0.01 ²⁾
生附片组	12	0.50±0.22 ⁴⁾	0.37±0.12 ⁴⁾	0.70±0.18 ⁴⁾	0.30±0.06 ⁴⁾
炮附子组	12	0.39±0.17 ³⁾	0.43±0.18 ⁴⁾	0.64±0.15 ⁴⁾	0.32±0.04 ⁴⁾
黑顺片组	12	0.17±0.11	0.12±0.03	0.22±0.07	0.12±0.05
炮附片组	12	0.09±0.04	0.11±0.03	0.17±0.06	0.08±0.03

3.10 附子中生物碱类成分含量测定

3.10.1 方法学考察 精密度考察、稳定性考察和重复性考察结果显示,各目标成分峰面积或平均质量分数的RSD均<3%,表明精密度和稳定性良好。线性关系考察显示,各目标成分回归曲线分别为盐酸多巴胺 $Y=10\ 171X+4.865\ 7$ ($r=1.000\ 0$, 线性范围

$0.002\ 2\sim 1.385\ 0\ g\cdot L^{-1}$), 尿昔 $Y=10\ 707X+60.862$ ($r=0.999\ 9$, 线性范围 $0.002\ 7\sim 1.710\ 0\ g\cdot L^{-1}$), 去甲猪毛菜碱 $Y=9\ 526.8X+19.872$ ($r=0.999\ 9$, 线性范围 $0.001\ 8\sim 1.145\ 0\ g\cdot L^{-1}$), 鸟昔 $Y=14\ 153X+85.022$ ($r=1.000\ 0$, 线性范围 $0.003\ 9\sim 5.940\ 0\ g\cdot L^{-1}$), 腺昔 $Y=6\ 959X+23.261$ ($r=1.000\ 0$, 线性范围 $0.002\ 1\sim$

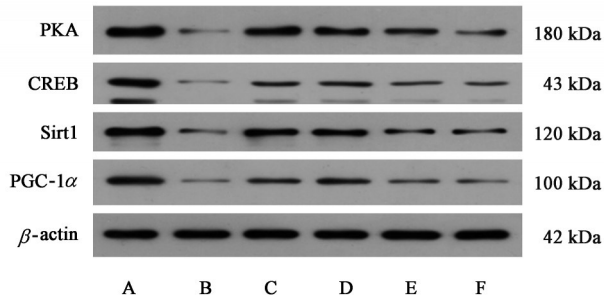


图2 各组大鼠肝脏组织PKA、CREB、Sirt1和PGC-1α蛋白电泳
Fig. 2 Electrophoresis of PKA, CREB, Sirt 1 and PGC-1α proteins in liver tissue of rats from each group

1.335 0 g·L⁻¹), 去甲乌药碱 $Y=9\ 032.4X+33.383$ ($r=0.999\ 9$, 线性范围 0.003 9~2.500 0 g·L⁻¹), 苯甲酰新乌头原碱 $Y=8\ 642.9X-25.609$ ($r=0.999\ 4$, 线性范围 0.0237~1.516 0 g·L⁻¹), 苯甲酰乌头原碱 $Y=7\ 362.2X+31.976$ ($r=0.999\ 1$, 线性范围 0.009 2~0.590 0 g·L⁻¹), 苯甲酰次乌头原碱 $Y=8\ 362.7X-$

19.099 ($r=0.999\ 9$, 线性范围 0.016 9~1.080 0 g·L⁻¹), 新乌头碱 $Y=8\ 762.4X-23.436$ ($r=0.999\ 0$, 线性范围 0.007 9~0.504 0 g·L⁻¹), 乌头碱 $Y=7\ 472.3X+37.622$ ($r=0.999\ 6$, 线性范围 0.004 5~0.580 0 g·L⁻¹), 次乌头碱 $Y=8\ 025.2X+36.437$ ($r=0.999\ 7$, 线性范围 0.012 3~0.786 5 g·L⁻¹)。盐酸多巴胺、尿苷、去甲猪毛菜碱、乌苷、腺苷和去甲乌药碱的平均回收率为 96.5%~103.6%, RSD 均 < 3%, 符合定量测定要求。

3.10.2 附子中生物碱类的定量分析 附子各炮制品水煎液中 6 种主要的水溶性生物碱(盐酸多巴胺、尿苷、去甲猪毛菜碱、乌苷、腺苷及去甲乌药碱)和 6 种典型的脂溶性二萜生物碱(苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、乌头碱及次乌头碱)的定量结果表明, 炮附子水煎液中水溶性生物碱总含量最高, 然而在脂溶性生物碱中, 单酯型生物碱总量少于生附片和炮附片, 双酯型生物碱的含量仅次于生附片水煎液。见表 8、表 9。

表 8 附子饮片中 6 种水溶性生物碱的质量分数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

饮片	盐酸多巴胺	尿苷	去甲猪毛菜碱	乌苷	腺苷	去甲乌药碱
生附片	0.004 4±0.000 0	0.021 0±0.000 7	0.022 4±0.000 6	0.019 2±0.000 5	0.031 2±0.000 0	0.010 7±0.000 6
炮附子	0.001 1±0.000 0	0.021 9±0.000 4	0.001 0±0.000 3	0.327 4±0.011 5	0.029 3±0.000 2	0.006 4±0.000 5
黑顺片	0.000 1±0.000 0	0.002 7±0.000 0	0.002 2±0.000 0	0.000 8±0.000 0	-	0.000 5±0.000 0
炮附片	0.001 8±0.000 0	0.001 9±0.000 0	0.002 5±0.000 0	0.008 8±0.000 0	0.000 2±0.000 0	-

注: - 未检出(表 9 同)

表 9 附子饮片中 6 种脂溶性生物碱的质量分数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

饮片	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	新乌头碱	乌头碱	次乌头碱
生附片	0.037 7±0.002 4	0.007 4±0.000 1	0.022 5±0.001 2	-	-	0.007 1±0.000 4
炮附子	0.003 7±0.000 0	0.000 3±0.000 0	0.003 9±0.000 0	-	-	0.000 9±0.000 1
黑顺片	0.003 4±0.000 0	0.000 5±0.000 1	-	-	-	-
炮附片	0.006 2±0.000 2	0.001 1±0.000 2	0.003 8±0.000 0	-	-	-

3.11 附子炮制品生物碱和温阳散寒药效相关性分析 分别将各药效指标与双酯型生物碱、单酯型生物碱及水溶性生物碱的含量进行相关性分析, 可知双酯型生物碱与 TG、IgG、CORT 呈强正相关, 与 LAC 呈强负相关, 与 T₄ 呈中等正相关, 与 cAMP 和脾脏指数呈中等负相关; 单酯型生物碱与 TG 和 IgG 呈强正相关, 与 LAC 呈强负相关, 与 CORT 和 T₄ 呈中等正相关, 与 cAMP 和脾脏指数呈中等负相关; 水溶性生物碱与 TC、LDH、17-OHCS、T₃、TSH 及胸腺指数呈强正相关, 与 cAMP、CORT、T₄ 及脾脏指数呈中等正相关, 与 cGMP 呈中等负相关。见增强出版

附加材料。

4 讨论

虚寒证主要源于寒邪伤阳、阳气不足而致虚, 导致能量代谢降低, 机体热量不足, 临床症状见精神萎靡、形寒肢冷、身体蜷卧等“寒”证, 并与内分泌、免疫、物质能量代谢及环核苷酸等系统紧密相关。中医临床常用附子、仙茅、吴茱萸等热性中药治疗虚寒证。其中, 仲景炮附子是《伤寒论》中附子的常用饮片规格, 入汤剂发挥温阳散寒的功效。如真武汤可用于少阴阳虚、阳虚水泛, 而炮附子起到温经扶阳, 助阳气化以利水的作用^[16]。但是, 以往

研究多关注附子单品,鲜少对比不同炮制规格之间温阳散寒药效的差异,不利于附子的临床应用。本文通过建立虚寒证大鼠模型,从内分泌、免疫、代谢等角度系统比较仲景炮附子与生附片、黑顺片、炮附片水煎液对虚寒证的治疗效果和作用机制,以期为炮附子的临床应用提供参考。

实验结果表明,附子各给药组均能够改善大鼠的虚寒症状,升高模型大鼠的脾脏和胸腺指数,保护肾上腺。其中, T_3 和 T_4 可使机体耗氧和产热量增加,TSH对甲状腺具有重要调节作用,而CORT和17-OHCS则是反映肾上腺皮质功能及确定肾阳虚和虚寒的重要指标。在本研究中,模型大鼠 T_3 、 T_4 、TSH、CORT及17-OHCS的含量均降低,而生附片和炮附子可显著升高 T_3 、TSH、CORT和17-OHCS的含量,可见生附片和炮附子对模型大鼠甲状腺和肾上腺功能具有显著改善作用,而炮附片和黑顺片作用不明显。此外,韩冰冰等^[17]研究表明生附子治疗虚寒证主要涉及免疫应答和氧化还原酶活性的相关基因。因此,本研究检测TC、TG、LDH及LAC等能量代谢相关指标,结果表明虚寒模型大鼠TC、LDH及LAC含量降低,TG含量升高,而生附片、炮附子等4种附子饮片水煎液能够升高TC、LDH及LAC的含量,降低TG的含量,从而改善大鼠物质能量代谢水平低下状态。乐娜等^[18]研究表明虚寒证和虚热证大鼠体内IgG和IgM的含量均会减少,机体体液免疫功能减弱。在本研究中,生附片、炮附子等4种附子饮片水煎液可升高虚寒证大鼠的IgG和IgM含量,结合脾脏和胸腺指数,表明其可通过增强免疫力来发挥温阳散寒作用,且炮附子的效果最为显著,炮附片的作用最弱。

脾阳虚、肾阳虚的发生与环核苷酸系统的异常有着密切关系,cAMP和cGMP被认为是评价虚寒证的重要指标,阳虚者cAMP和cAMP/cGMP会降低^[19-21]。在本研究中,炮附子和炮附片能够显著升高cAMP的含量,且炮附子可显著降低cGMP的含量。cAMP/PKA通路是机体物质能量代谢的主要细胞传导通路,能够调节线粒体能量代谢及机体ATP的合成,参与机体的糖代谢、蛋白质代谢、脂肪代谢等。 T_3 和 T_4 等可通过与G蛋白偶联受体结合,激活腺苷酸环化酶(AC),继而催化ATP生成cAMP,cAMP又可激活其依赖性蛋白激酶PKA,使其磷酸化,释放催化亚基激活CREB,CREB磷酸化后可上调PGC-1 α 的表达^[22-23],活化后的PGC-1 α 在机体适应性产热、线粒体生物合成、肝糖原异生及

脂肪酸 β 氧化等一系列能量代谢过程中发挥作用^[24]。Sirt1是细胞中的能量感应器,可与PGC-1 α 、AMPK等能量代谢相关蛋白组成一个能量感应网络^[25],通过调节肝脏糖脂代谢、骨骼肌蛋白代谢及脂肪酸氧化调节体内物质能量代谢,维持能量稳态^[26]。在虚寒状态下,cAMP/PKA通路处于下调状态,cAMP与PKA蛋白表达会显著降低^[27]。在本研究中,虚寒模型大鼠肝脏中PKA、CREB、Sirt1和PGC-1 α 蛋白表达水平均显著降低,说明虚寒证大鼠物质能量代谢水平降低。生附片与炮附子可显著升高PKA、CREB、Sirt1和PGC-1 α 蛋白的表达水平,黑顺片与炮附片仅有升高趋势,提示生附片和炮附子可能通过激活cAMP/PKA通路提高机体内物质能量代谢水平,这与炮附子显著提升cAMP含量相呼应。

在炮制过程中,附子的生物碱含量呈现下降的趋势,尤其在黑顺片和炮附片的炮制过程中,繁琐的步骤加剧了生物碱成分的流失^[28]。砂炒和煎煮可加速水溶性生物碱的溶出,同时也会影响脂溶性生物碱酯键的稳定性。在本实验中,炮附子的水溶性生物碱含量最高,其次生附片,远大于黑顺片和炮附片,这与虚寒证的各项药理指标相对应,也验证了生附片入四逆汤发挥温中祛寒功效的原理;但炮附子的单酯型生物碱总量少于生附片和炮附片,双酯型生物碱的含量次于生附片。将水溶性、单酯型及双酯型生物碱的含量分别和药效指标进行相关性分析,可知水溶性生物碱和脂溶性生物碱的相关的药效指标存在明显差异。其中,双酯型和单酯型生物碱与TG、IgG、CORT具有强正相关,水溶性生物碱则与TC、LDH、17-OHCS、 T_3 、TSH及胸腺指数有强正相关,且与cAMP、CORT、 T_4 及脾脏指数呈中等正相关,结合炮附子中的水溶性生物碱含量最多,推测水溶性生物碱可能是炮附子治疗虚寒证的物质基础。

综上所述,仲景炮附子对于虚寒证的治疗效果强于药典生附片、黑顺片及炮附片,其作用机制可能与增强机体内分泌系统、物质能量代谢、免疫系统,及上调cAMP/PKA信号通路有关,水溶性生物碱类成分可能是其发挥药效的主要成分。因此,张仲景以炮附子入汤剂发挥温阳散寒作用的炮制方法及用法具有一定的科学依据,值得进一步传承,但后续还有待于制定详细的质量标准,落实安全性和有效性。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 高斌,高慧明. 中药附子的历史善用于现代解析[J]. 延安大学学报:医学科学版,2012,10(3):2,17.
GAO B, GAO H M. The historical use and contemporary interpretation of Aconiti Lateralis Radix Praeparata(Fuzi)[J]. J Yan'an Univ: Med Sci, 2012, 10(3):2, 17.
- [2] 董思含,孟江,吴孟华,等. 附子历史沿革考辨[J]. 中国中药杂志,2020,45(22):5567-5575.
DONG S H, MENG J, WU M H, et al. Herbageological study of Aconiti Lateralis Radix Praeparata (Fuzi)[J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(22):5567-5575.
- [3] 张世臣,李可. 中国附子[M]. 北京:中国中医药出版社,2012.
ZHANG S C, LI K. Chinese Fuzi[M]. Beijing: Chinese Press of Traditional Chinese Medicine, 2012.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2025:207-208.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Volume 1[M]. Beijing: Chinese Medical Science Press, 2025: 207-208.
- [5] 李连珍,薛春苗,张冰,等. 虚寒状态大鼠肝脏能量代谢变化研究[J]. 天津中医药,2014,31(8):484-486.
LI L Z, XUE C M, ZHANG B, et al. Change of hepatic energy metabolism in rats with deficiency cold status [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2014, 31(8):484-486.
- [6] 周晓宇,赵海军,马柯,等. 虚寒证和虚热证模型的建立及其分子机制研究进展[J]. 中华中医药学刊,2021,39(9):133-136.
ZHOU X Y, ZHAO H J, MA K, et al. Establishment and molecular mechanism of deficiency cold syndrome and deficiency heat syndrome models[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2021, 39(9):133-136.
- [7] 刘珊,滕佳林,韩冰冰,等. 附子正丁醇及水提取物对虚寒证模型大鼠乳酸、丙酮酸含量的影响[J]. 山东中医药大学学报,2012,36(1):60-62.
LIU S, TENG J L, HAN B B, et al. Effects of *n*-butanol and water extracts of Aconiti Lateralis Radix Praeparata(Fuzi) on lactate and pyruvate levels in rat with cold deficiency syndrome [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2012, 36(1):60-62.
- [8] 李树华. 附片及其配伍治疗虚寒病症的文献研究[J]. 中国中医药现代远程教育,2018,16(4):159-160.
LI S H. A literature study on *Aconitum carmichaelii* and its compatibility on deficiency cold disease [J]. Chin Med Mod Dist Edu China, 2018, 16(4): 159-160.
- [9] 陈炯,谭鹏,吴月娇,等. 砂烫生附片与炮附片制备前后6种生物碱的变化[J]. 中成药,2016,38(6):1342-1345.
CHEN J, TAN P, WU Y J, et al. Variations of six alkaloids in Shengfupian heated with sand and Paofupian before and after preparation [J]. Chin Tradit Pat Med, 2016, 38(6): 1342-1345.
- [10] 尹贻慧,张凯,陈倩,等. 联合体内外多维化学物质组和分子对接策略的炮附子抗炎药效物质基础研究[J]. 中草药,2023,54(12):3785-3795.
YIN Y H, ZHANG K, CHEN Q, et al. Study on pharmacodynamic material basis of processed Aconiti Lateralis Radix Praeparata combined with *in vivo* and *in vitro* multi-dimensional chemical substance group and molecular docking strategy [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(12): 3785-3795.
- [11] 彭诗涛,张先灵,袁金凤,等. 基于张仲景学术思想的炮附子4种炮制方法的比较研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2018,20(5):716-721.
PENG S T, ZHANG X L, YUAN J F, et al. A comparative study on 4 kinds of processing methods of Paofuzi based on ZHANG Zhongjing's academic thoughts [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol, 2018, 20(5):716-721.
- [12] 焦鸣杰,李欣欣,刘淑明,等. 仲景炮附子对慢性心力衰竭的治疗作用及机制研究[J]. 药物评价研究,2022,45(10):1980-1991.
JIAO M J, LI X X, LIU S M, et al. Effect and mechanism of Zhongjing's Paofuzi on chronic heart failure [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(10):1980-1991.
- [13] 彭诗涛,柴冲冲,袁金凤,等. 炮附片HPLC特征图谱及炮制前后比较研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2019,21(12):2563-2568.
PENG S T, CHAI C C, YUAN J F, et al. Study on HPLC characteristic chromatogram of Radix Aconiti Lateralis Praeparata and comparison before and after processing [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol, 2019, 21(12):2563-2568.
- [14] 张宏,彭成,余成浩. 附子煎煮时间、给药剂量与温阳功效的相关性研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(20):2118-2123.
ZHANG H, PENG C, YU C H. Study on correlation between decocting time administration dose and efficacy of warming Yang of crude lateral root of aconite [J]. Chin J Chin Mater Med, 2007, 32(20):2118-2123.
- [15] 刘欣,张冰,刘小青,等. 辛热药附子对类阳虚状态的干预实验研究[J]. 天津中医药,2011,28(1):69-71.
LIU X, ZHANG B, LIU X Q, et al. Experimental study on intervention effect of Fuzi, a pungent-warm herb, on situation of like-Yang deficiency [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2011, 28(1):69-71.
- [16] 侯佑柱,周计春,张小琴.《伤寒论》附子炮制方法及用量应用探析[J]. 中国中医急症,2024,33(10):1828-1830,1834.
HOU Y Z, ZHOU J C, ZHANG X Q. Analysis of Radix Aconitum Carmichaelii processing methods and dosage applications in treatise on cold pathogenic diseases [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2024, 33(10): 1828-1830, 1834.
- [17] 韩冰冰,王世军,张发艳,等. 基因芯片技术研究附子对虚寒证大鼠肝全基因表达谱的影响[J]. 中国中药杂志,2012,37(4):500-504.
HAN B B, WANG S J, ZHANG F Y, et al. Influence of Aconiti Lateralis Radix Praeparata on asthenia cold syndrome

- rats with whole genome gene expression of liver by gene chip technique[J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2012, 37(4):500-504.
- [18] 乐娜,周雪,费文婷,等. 玛咖对虚寒及虚热证大鼠环核苷酸水平及神经-内分泌-免疫网络的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(5):1004-1010.
- YUE N, ZHOU X, FEI W T, et al. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on neurotransmitter level and neuro-endocrine-immune network of deficiency-cold and deficiency-heat syndrome rats [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(5):1004-1010.
- [19] 刘雅清,刘海帆,刘滨,等. 四神丸合痛泻要方治疗脾肾虚兼肝郁型溃疡性结肠炎的药效及作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(7):40-48.
- LIU Y Q, LIU H F, LIU B, et al. Sishenwan combined with Tongxieyao Fang treats ulcerative colitis with spleen-kidney Yang deficiency and liver depression [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(7):40-48.
- [20] 白梅荣,张冰,刘小青,等. 常态虚寒状态小鼠CYP3A活性P-gp水平比较研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2008, 35(3):460-462.
- BAI M R, ZHANG B, LIU X Q, et al. A comparative study on the level of P-glycoprotein and the activity of cytochrome P4503A of normal and deficient cold condition of mice [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2008, 35(3):460-462.
- [21] 邸松蕊,朱映黎,李一芄,等. 基于药证相应探讨附子对虚寒、虚热证候一氧化氮/线粒体能量代谢信号通路的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(8):3996-4001.
- DI S R, ZHU Y L, LI Y P, et al. Effects of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* via NO/mitochondrial energy metabolism signal pathway in deficiency cold and deficiency heat syndromes based on medicine-syndrome correspondence [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2024, 39(8):3996-4001.
- [22] 冯宇娟,王乐,韩广卉,等. 脑心安胶囊激活CREB/PGC-1 α 改善慢性脑缺血致VCI大鼠线粒体及氧化损伤的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(23):19-29.
- FENG Y J, WANG L, HAN G H, et al. Naoxin'an capsule alleviates mitochondrial and oxidative damage in chronic cerebral ischemia-induced VCI in rats via activating CREB/PGC-1 α pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(23):19-29.
- [23] ZHANG H Y, KONG Q B, WANG J, et al. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2020, 9(1):32.
- [24] ABU SHELBAYEH O, ARROUM T, MORRIS S, et al. PGC-1 α is a master regulator of mitochondrial lifecycle and ROS stress response [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(5):1075.
- [25] GERHART-HINES Z, DOMINY J E, BLÄTTLER, BLÄTTLER S M, et al. The cAMP/PKA pathway rapidly activates SIRT1 to promote fatty acid oxidation independently of changes in NAD⁺ [J]. *Mol cell*, 2011, 44(6):851-863.
- [26] 王凡,刘一平. Sirt1对能量代谢的调控作用[J]. *自然杂志*, 2020, 42(6):487-493.
- WANG F, LIU Y P. Regulation of Sirt1 on energy metabolism [J]. *Chin J Nat*, 2020, 42(6):487-493.
- [27] 李敏,张冰,刘小青,等. 基于cAMP-PKA信号通路的虚寒状态大鼠中枢神经递质变化机制研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(4):289-294.
- LI M, ZHANG B, LIU X Q, et al. Mechanism of central neurotransmitter alterations in rats with cold deficiency syndrome based on the cAMP-PKA signaling pathway [J]. *Chin J Basic Med in Tradit Chin Med*, 2010, 16(4):289-290, 294.
- [28] 胡云瑶,唐军,杨欣,等. 4种现代炮附子与仲景炮附子异同性比较研究[J]. *中草药*, 2024, 55(16):5437-5447.
- HU Y Y, TANG J, YANG X, et al. Comparative study on similarities and differences between four modern *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* and *Zhongjing Aconiti Lateralis Radix Praeparata* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(16):5437-5447.

[责任编辑 吕冬梅]