

不同方法炮制的熟地黄的补血作用比较

赵丹, 张振凌*, 王胜超, 王光会, 于文娜, 夏云岭
(河南中医药大学, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**比较不同方法加工炮制的熟地黄饮片的补血作用。**方法:**采用环磷酰胺和盐酸苯胍结合法进行血虚模型的建立,分别设立空白组、模型组、阿胶补血口服液组、传统酒炖组和产地加工饮片炮制一体化组,每组给药体积均为 $0.02 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$,后三者的给药剂量分别为 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 3.75 , $3.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。以全血外周血象、脏器指数和血清中促红细胞生成素(EPO)含量为指标对不同方法加工的熟地黄的补血作用进行综合评价。**结果:**与模型组相比,各给药组红细胞数目均较显著性升高($P < 0.01$);产地加工饮片炮制一体化组较显著性升高白细胞和血红蛋白($P < 0.01$),EPO($P < 0.01$)恢复至正常水平;传统酒炖组显著升高白细胞($P < 0.05$),EPO($P < 0.05$)恢复至正常水平;产地加工饮片炮制一体化组显著升高了胸腺指数($P < 0.01$),传统酒炖组明显升高了胸腺指数($P < 0.05$)。与空白组相比,模型组小鼠各指标均呈现显著性差异;与阿胶补血口服液组相比,产地加工饮片炮制一体化组明显升高了血红蛋白($P < 0.05$);与传统酒炖组相比,产地加工饮片炮制一体化组血红蛋白较显著性升高($P < 0.01$)。**结论:**不同方法加工的熟地黄饮片均有一定的补血作用,产地加工饮片炮制一体化组的熟地黄饮片略优于传统酒炖组,且该加工工艺具有一定的可行性。

[关键词] 熟地黄; 补血; 血虚; 炮制工艺; 加工炮制一体化

[中图分类号] R283.3;R943.1;R285.5;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0046-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017190046

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1411.056.html>

[网络出版时间] 2017-07-11 14:11

Comparison of Enriching Blood Effect of *Rehmanniae Radix Praeparata* Processed by Different Methods

ZHAO Dan, ZHANG Zhen-ling*, WANG Sheng-chao, WANG Guang-hui, YU Wen-na, XIA Yun-ling
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the different effect of *Rehmanniae Radix Praeparata* processed by different methods on the chemical damage anemia in mice as model of blood deficiency. **Method:** Blood deficiency model were induced by phenylhydrazine hydrochloride and cyclophosphamide. The experimental animals were randomly divided into blank group, model group, Ejiao blood enriching oral liquid group, traditional wine stewing group and origin processing integration group. The administration volume was $0.02 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, and dose of the latter three was $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 3.75 , $3.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. Enriching blood effect of *Rehmanniae Radix Praeparata* processed by different methods was evaluated by taking hemogram, level of erythropoietin (EPO) in serum and organ index as indexes. **Result:** Compared with the model group, red blood cells (RBC) of each administration group increased significantly ($P < 0.01$); white blood cells (WBC) and hemoglobin (HB) of origin processing integration group increased significantly ($P < 0.01$), EPO was gradually restored to normal level and significantly decreased ($P < 0.01$); WBC was increased in the traditional wine stewing group ($P < 0.05$), while EPO ($P < 0.05$) returned to normal levels; Thymus index of origin processing integration group was

[收稿日期] 20170417(021)

[基金项目] 国家中医药行业科研专项(201507002);河南中医药大学创新基金项目(2015YCX019)

[第一作者] 赵丹,在读硕士,从事中药饮片及新药研究,Tel:18039555293,E-mail:zhao1393906@163.com

[通讯作者] *张振凌,教授,博士生导师,从事中药饮片及新药研究,Tel:0371-65680970,E-mail:zhangzl6758@163.com

significantly increased ($P < 0.01$) and the parameter in traditional wine stewing group was increased ($P < 0.05$). Compared with the blank group, these indexes of model group were significantly different. Compared with the Ejiao blood enriching oral liquid group, HB ($P < 0.05$) was significantly increased in the origin processing integration group. Compared with the traditional wine stewing group, HB of the origin processing integration group was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Rehmanniae Radix Preparata processed by different methods has a certain blood enriching effect. Among them, the origin processing integration group is better than the traditional wine stewing group.

[**Key words**] Rehmanniae Radix Praeparata; enriching blood; blood deficiency; processing technology; integrative processing

熟地黄是地黄的炮制加工品,具有滋阴补血、益精填髓的功效,用于治疗血虚萎黄、心悸怔忡、月经不调、崩漏下血、肝肾阴虚、腰膝酸软、骨蒸潮热、盗汗遗精、内热消渴、眩晕、耳鸣、须发早白^[1]。说明补血是熟地黄的重要作用之一。近年来关于地黄糖类成分的药理研究较多^[2-3],但不同工艺加工的熟地黄饮片补血作用的研究鲜有报道。有关熟地黄的炮制方法记载也颇多,且各法不一^[4]。历版《中国药典》均规定,熟地黄为生地黄的炮制品,而不是鲜地黄的炮制加工品,也未见有鲜地黄直接加工炮制成熟地黄的相关研究报道。鲜地黄加工成生地黄,再到熟地黄的过程中,由于生地黄的炮制方法不一,质量参差不齐,会间接影响熟地黄的质量,并增加了炮制工序和时间^[5-6]。而且熟地黄在古代是以鲜地黄为原料进行加工蒸制的^[7-8];另外,鲜地黄的质量能以更直观便捷的方式进行优劣辨识,净洗过程方便、利于监测且成分完整,能够增加熟地黄的口感,使熟地黄的质量更可控。本实验基于前期工艺考察的结果,以酒炖法作为传统工艺,以鲜地黄直接加工成熟地黄的最佳工艺为产地加工饮片炮制一体化,比较产地加工饮片炮制一体化与传统工艺炮制的熟地黄饮片的补血作用,以验证产地加工饮片炮制一体化的药理药效,为该工艺的可行性分析提供实验依据。

1 材料

ACT 5DIFF 型血球分析仪(美国贝克曼库尔特有限公司),PT-3502G 型酶标分析仪(北京普天新桥技术有限公司),BS210S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司),TGL-16gR 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),BS210S 型 1/1 万电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

注射用环磷酰胺(江苏盛迪医药有限公司,批号 16071425),盐酸苯肼(上海展云化工有限公司,批号 160715),阿胶补血口服液(山东福胶集团有限

公司,批号 1161112),小鼠促红细胞生成素(EPO)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 611294206)。

昆明种小鼠 60 只,雌雄各半,体重(22 ± 2) g,购自河南省实验动物中心,合格证号 SCXK(豫)2015-0004,清洁级动物饲养室饲养。动物实验均符合河南中医药大学动物伦理审查指南的相关规定。

2 方法与结果

2.1 分组及血虚模型的制备 昆明种小鼠,常规饲养 3 d 适应环境后,按体重随机分为 5 组,分别为空白组、模型组、阿胶补血口服液组、传统酒炖组、产地加工饮片炮制一体化组。除空白组外,其余各组于实验第 1 天按剂量 150 mg·kg⁻¹腹腔注射环磷酰胺,并在第 3 天按剂量 50 mg·kg⁻¹皮下注射盐酸苯肼,制成血虚小鼠模型^[9]。从第 4 天开始灌胃给药,各给药组分别灌胃相应的药物,每天 1 次,每次给药体积 0.02 mL·g⁻¹,连续 12 d,空白组、模型组给予等体积生理盐水。

2.2 药物的制备

2.2.1 阿胶补血口服液组 以阿胶补血口服液作为阳性药,规格为每支 20 mL,剂量为 10 mL·kg⁻¹(按 15 倍等效剂量换算),故根据灌胃体积,将原液稀释至原浓度的 1/2。

2.2.2 传统酒炖组 取生地黄适量,洗净泥土,加入黄酒(每 100 kg 生地黄加黄酒 50 kg),置于紫砂炖盅内,密闭,隔水炖 24 h,取出,切厚片,干燥,得熟地黄饮片,检测符合 2015 年版《中国药典》的规定。取饮片 15 g,第 1 次加水 300 mL,浸泡 30 min 后,煎煮 30 min;第 2 次加水 200 mL,煎煮 20 min,煎煮 2 次,合并滤液,减压浓缩至 80 mL,得 0.188 g·mL⁻¹药液,给药剂量 3.75 g·g⁻¹(按生药量计算)。

2.2.3 产地加工饮片炮制一体化组 取鲜地黄,洗净泥土,烘箱烘干水气(90 ℃),切厚片,笼蒸 4 h,于

75 °C 烘至干燥,反复 5 次,取出,晾凉,得熟地黄饮片,检测符合 2015 年版《中国药典》的规定。取饮片 15 g,煎煮方法同 2.2.2 项,得 0.188 g·mL⁻¹ 药液,给药剂量 3.75 g·kg⁻¹ (按生药量计算)。

2.3 小鼠一般状况观察 实验过程中观察模型组小鼠,发现与空白组比较,模型组小鼠出现毛色无光泽、晦暗,尾色苍白等现象。灌胃即将结束后观察阿胶补血口服液组、传统酒炖组和产地加工饮片炮制一体化组小鼠毛色光亮洁白、行动敏捷,与空白组小鼠没有明显区别。

2.4 外周血象的测定 在末次给药 2 h 后,每只小鼠剪尾取血 80 μL,利用 ACT 5DIFF 型血球分析仪检测外周血象,测定白细胞(WBC),红细胞(RBC)和血红蛋白(HB)的数量。

2.5 EPO 的测定

2.5.1 样品的前处理 全血外周血象细胞检测结束后,每组各取 6 只小鼠,摘眼球取血后,将血液置于高速冷冻离心机上离心 20 min (2 000 × g),收集血清,置 -20 °C 冷冻保存。

2.5.2 样品的稀释与检测 取出冻存的动物血清,解冻后取样品稀释液 60 μL,加动物血清 60 μL (即将样品按 1:2 稀释),摇匀,待测。其他按照试剂盒说明进项操作,利用 PT-3502G 型酶标分析仪测定吸光度,计算 EPO 的含量。

2.6 脏器指数的测定 采血后将小鼠颈椎脱臼处死,解剖,取胸腺及脾脏,用镊子拨去表面的脂肪组织,置生理盐水中洗净表面血迹,并用滤纸擦干,迅速置分析天平上精密称定,记录数据,分别计算胸腺指数和脾脏指数,计算公式均为脏器指数 = 脏器质量/体重。

2.7 数据处理 利用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行处理,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 One-way ANOVA 方差分析,两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 有统计学意义。见表 1。结果发现与空白组相比,模型组小鼠外周血 WBC 和 HB 显著降低 ($P < 0.01$),RBC 极显著降低 ($P < 0.001$),血清中 EPO 明显升高 ($P < 0.01$),胸腺指数下降极为显著 ($P < 0.001$),而脾脏指数呈极显著上升 ($P < 0.001$)。

表 1 不同方法炮制的熟地黄的补血作用比较

Table 1 Comparison of enriching blood effect of Rehmanniae Radix Preparata processed by different methods

组别	给药剂量	WBC (×10 ⁹) /L ⁻¹	RBC (×10 ¹²) /L ⁻¹	HB /g·L ⁻¹	EPO /μg·L ⁻¹	胸腺指数 /mg·g ⁻¹	脾脏指数 /mg·g ⁻¹
空白	-	10.54 ± 3.04	9.24 ± 0.59	165.19 ± 9.08	0.63 ± 0.13	3.23 ± 0.84	3.76 ± 1.53
模型	-	7.06 ± 2.25 ²⁾	7.30 ± 1.30 ³⁾	147.88 ± 5.62 ²⁾	1.03 ± 0.16 ²⁾	2.40 ± 0.49 ³⁾	8.43 ± 1.33 ³⁾
阿胶补血口服液	10 mL·kg ⁻¹	10.81 ± 2.01 ⁵⁾	8.20 ± 0.56 ^{2,5)}	151.75 ± 10.14 ²⁾	0.72 ± 0.12 ⁴⁾	3.45 ± 0.96 ⁵⁾	9.37 ± 1.54 ³⁾
传统酒炖	3.75 g·kg ⁻¹	9.80 ± 3.83 ⁴⁾	8.38 ± 0.55 ^{2,5)}	146.02 ± 18.78 ³⁾	0.74 ± 0.25 ⁴⁾	3.16 ± 0.88 ⁴⁾	8.60 ± 1.32 ³⁾
产地加工饮片炮制一体化	3.75 g·kg ⁻¹	10.60 ± 2.52 ⁵⁾	8.43 ± 0.55 ^{1,5)}	162.99 ± 12.20 ^{5,7,8)}	0.71 ± 0.28 ⁵⁾	3.30 ± 0.88 ⁵⁾	9.02 ± 1.72 ³⁾

注:与空白组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$;与模型组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$,⁶⁾ $P < 0.001$;与阿胶补血口服液组比较⁷⁾ $P < 0.05$;与传统酒炖组比较⁸⁾ $P < 0.01$ 。

与模型组相比,阿胶补血口服液组 WBC, RBC 和胸腺指数均显著性升高 ($P < 0.01$), EPO 显著降低 ($P < 0.05$); 传统酒炖组的 WBC ($P < 0.05$), RBC ($P < 0.01$) 和胸腺指数 ($P < 0.05$) 分别呈显著性升高, EPO 恢复至正常水平 ($P < 0.05$); 产地加工饮片炮制一体化组的 WBC, RBC, HB 和胸腺指数均较显著性升高 ($P < 0.01$), EPO 恢复至正常水平 ($P < 0.01$)。与阿胶补血口服液组相比,产地加工饮片炮制一体化组 HB 显著性升高 ($P < 0.05$); 与传统酒炖组相比,产地加工饮片炮制一体化组 HB 较显著性升高 ($P < 0.01$)。

3 讨论

本文研究结果表明采用环磷酰胺和盐酸苯肼

综合造小鼠血虚模型较为成功,产地加工饮片炮制一体化工艺加工的熟地黄饮片与传统酒炖法加工的熟地黄饮片均能在一定程度上改善化学损伤致小鼠血虚的外周血 WBC 和 RBC 数目,均能使该类血虚小鼠的 EPO 水平恢复至正常水平;而产地加工饮片炮制一体化工艺组在改善血虚小鼠的 HB 方面优于传统酒炖组,说明 2 种方法加工炮制的熟地黄饮片均能利于血虚小鼠的恢复,均有一定的补血作用,但一体化工艺略优于传统酒炖工艺,这也可能是因为以鲜地黄为原料加工炮制熟地黄的过程,大大缩短和保证了炮制时间,从而最大限度地保留了其成分的完整性。

本实验进行外周血象检查时发现,模型动物中

血小板数量大量增加,这可能与盐酸苯胍破坏红细胞膜有关^[9],因此血小板数据失去参考价值。脏器指数中,与空白组相比,模型组胸腺指数降低,但脾脏指数却大于空白组小鼠,有研究认为环磷酰胺是免疫抑制剂,会抑制免疫器官的发育,所以免疫器官指数降低,但对于脾脏而言,外界的免疫应激可能会引起脾脏肿大,使得脾脏指数升高,有些研究血虚模型的实验中也有此现象发生,可能与所用试剂的剂量有关,使得模型组小鼠出现脾脏指数升高的现象。

造血虚模型中使用的环磷酰胺具有显著的免疫抑制作用,能够显著减少白细胞数量,在免疫功能方面,其能够导致免疫器官萎缩^[10-11]。而盐酸苯胍作为1种强氧化剂,能够破坏红细胞内的抗氧化系统,使红细胞破坏,导致血虚症状^[12]。本实验造模方法采用环磷酰胺与盐酸苯胍综合法制造血虚模型,能使模型组小鼠有显著的RBC降低现象,同时具有降低WBC和HB的特征,并由实验结果可知该造模方法可行,适用于本实验的研究。综上可知,产地加工饮片炮制一体化组补血作用稍优于传统酒炖工艺组,为该工艺的可行性提供了实验依据,后续研究可根据优选工艺在中药饮片生产车间进行中试生产试验,进一步验证其普遍实用性,为一体化工艺的推广提供更具说服力的理由。

[参考文献]

[1] 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,2015:124-126.

[2] 朱敏丰. 地黄多糖对局灶性脑缺血小鼠线粒体过氧化损伤的影响[J]. 中药药理与临床,2015,31(2):40-43.

[3] 孟剑锋. 地黄多糖对H₂O₂诱导乳鼠心肌细胞损伤的保护作用及其机制研究[J]. 中药药理与临床,2016,32(1):90-95.

[4] 张丽萍,李军,张振凌,等. 熟地黄炮制方法的历史沿革[J]. 河南中医学院学报,2005,20(2):69-71.

[5] 李强,胡晶红,张永清,等. 晒干与烘干地黄产量和质量比较[J]. 山东中医杂志,2013,32(9):664-665,683.

[6] 黄勤挽,苏娟,范润勇,等. 不同包装和贮藏条件对熟地黄小包装饮片有效期的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(8):13-20.

[7] 吴仪络. 本草从新[M]. 上海:上海科学技术出版社,1982:63-64.

[8] 凌奂. 本草害利[M]. 北京:中医古籍出版社,1982:97.

[9] 王玉华. 中药方剂四物汤补血作用有效部位的研究[D]. 济南:山东中医药大学,2004.

[10] 何雅馨. 环磷酰胺对小鼠脾脏的病理学影响[D]. 雅安:四川农业大学,2015.

[11] 任非非,刘敬霞,俞维,等. 枸杞不同制剂对环磷酰胺致血虚大鼠全血细胞及骨髓造血功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):187-189.

[12] 任德旺,叶淳淳,倪必辉,等. 盐酸苯胍致小鼠化学损伤性血虚证模型的改良[J]. 辽宁中医药大学学报,2015,17(8):108-110.

[责任编辑 刘德文]