

· 配伍 ·

黄芪-当归药对益气活血作用的药效物质基础

刘珊¹, 王文越¹, 王永春^{2*}, 徐凯勇^{1*}, 许丹丹¹, 滕佳林¹

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学第二附属医院, 济南 250001)

[摘要] 目的:探讨黄芪-当归药对(3:1)对气虚血瘀模型大鼠的益气活血作用,从特征图谱、药效物质辨识、入血成分对比三方面入手,为临床合理用药及复方药效物质辨识与质量控制提供理论依据。方法:使用高效液相色谱法(HPLC)建立黄芪-当归(3:1)指纹图谱,采用超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱联用技术(UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS)分析水煎液成分;选用SPF级成年雄性Wistar大鼠,随机分为空白组、模型组、黄芪-当归3:1组及黄芪-当归5:1组,每日通过控制食量及凉水游泳制备气虚血瘀模型,同时各组每天给药(水)1次,给药组剂量 $10.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,模型组和空白组给予等量的蒸馏水,连续15 d。观察大鼠一般状况;记录各组大鼠体质量,全血及血浆黏度,胸腺指数和脾脏指数,血清中三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、大鼠血管性血友病因子(vWF)水平及ATP/ADP值;苏木素-伊红(HE)及扫描电镜观察血管内皮形态;UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS分析血清中的原型及代谢成分。结果:建立了黄芪-当归(3:1)指纹图谱;UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS共鉴定出体外化学成分49个,初步鉴定了11种原型成分吸收入血。与空白组比较,模型组大鼠体质量明显降低($P<0.01$);全血(高切、中切、低切)黏度及血浆黏度均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);胸腺指数和脾脏指数均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$);血清ATP含量显著降低($P<0.01$),ADP含量显著升高($P<0.01$),ATP/ADP值显著降低($P<0.01$),vWF含量显著升高($P<0.01$);苏木素-伊红(HE)及扫描电镜结果显示,血管部分受损,表现为内膜结构紊乱,内皮凸起、缺损、粗糙,细胞黏附迁移明显。与模型组比较,黄芪-当归给药组体质量均明显增加($P<0.01$);全血及血浆黏度结果显示黄芪-当归3:1组可明显降低全血低切黏度($P<0.05$);胸腺指数及脾脏指数结果显示黄芪-当归5:1组能明显升高大鼠胸腺指数($P<0.05$);血清ATP、ADP水平结果显示黄芪-当归5:1组对ATP、ADP水平作用更明显($P<0.05$),两组均能显著降低ATP/ADP值($P<0.01$);血清vWF水平结果显示黄芪-当归3:1组vWF含量降低更明显($P<0.05$);HE及扫描电镜结果显示给药组对血管内皮损伤均有不同程度的改善,内膜结构较整齐。结论:黄芪-当归3:1及黄芪-当归5:1组均对气虚血瘀模型大鼠宏观及微观指标有改善作用,但传统配比黄芪-当归5:1益气效果更好,而黄芪-当归3:1活血作用更好。

[关键词] 黄芪; 当归; 益气活血; 血管内皮; 药效物质

[中图分类号] R284; R285; R289; R287; R22; R2-031; R33; R24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)09-0028-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230412 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20230224.1004.001.html>

[网络出版日期] 2023-02-24 14:50:33

Pharmacodynamic Material Basis of Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix Drug Pair in Supplementing Qi and Activating Blood Circulation

LIU Shan¹, WANG Wenyue¹, WANG Yongchun^{2*}, XU Kaiyong^{1*}, XU Dandan¹, TENG Jialin¹

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan 250355, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250001, China)

[收稿日期] 2022-11-30

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81903947);山东中医药大学教育教学研究课题(ZYY2022086);山东省研究生教育优质课程建设项目(SDYKC20048)

[第一作者] 刘珊,博士,从事中药药性理论与临床应用研究、中药及复方药理研究, E-mail: liushan5463@163.com

[通信作者] *王永春,硕士,主管技师,从事康复治疗技术理论与应用研究, E-mail: wyc19862012@163.com;

*徐凯勇,硕士,高级实验师,从事中药干预病证动物模型机制研究, E-mail: xkychina@163.com

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effect of Astragali Radix (AR)-Angelicae Sinensis Radix (ASR) drug pair on supplementing Qi and activating blood circulation in rats with Qi deficiency and blood stasis and provide a theoretical basis for clinical rational medication and identification and quality control of compound pharmacodynamic substances from the three aspects of characteristic map, identification of pharmacodynamic substances, and comparison of blood components. **Method:** High-performance liquid chromatography (HPLC) was employed to establish the fingerprint of AR:ASR (3:1), and ultra-high performance liquid chromatography-Q-Exactive Orbitrap-mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS) was employed to analyze the ingredients of the decoction. Adult male Wistar rats with SPF grades were selected and randomly divided into a blank group, a model group, a 3:1 group, and a 5:1 group. The rat model of Qi deficiency and blood stasis syndrome was prepared by controlling food intake and swimming in cold water every day. In parallel, each group was given medicine (or water) once a day. The dose of drug groups was $10.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, and the model group and blank group were given the same amount of distilled water for 15 d. Animal behavior, body weight, whole blood and plasma viscosity, thymus index, spleen index, the levels of adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), von willebrand factor (vWF), and ATP/ADP value in serum of rats were recorded. The morphology of vascular endothelium was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and scanning electron microscopy. UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS was used to analyze prototype and metabolic components in serum. **Result:** The fingerprint of AR-ASR drug pair (AR-ASR 3:1) was established. UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS identified 49 chemical components *in vitro* and preliminarily identified 11 prototype components absorbed into blood *in vivo*. As compared with the blank group, the body mass decreased significantly ($P < 0.01$), the whole blood (high shear, middle shear, and low shear) viscosity and plasma viscosity were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the thymus index and spleen index decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$), serum ATP content decreased significantly ($P < 0.01$), ADP content increased significantly ($P < 0.01$), ATP/ADP value decreased significantly ($P < 0.01$), and vWF content increased significantly ($P < 0.01$). The results of HE staining and scanning electron microscopy showed that the vessels were partially damaged, showing the structural disorder of the intima, the bulge, defect, and roughness of the endothelium, and the obvious cell adhesion and migration in the model group. As compared with the model group, the body mass also increased significantly ($P < 0.01$). The results of whole blood and plasma viscosity showed that the whole blood low shear viscosity was significantly decreased in the 3:1 group ($P < 0.05$). The results of thymus index and spleen index showed that 5:1 group significantly increased the thymus index of rats ($P < 0.05$). The results of serum ATP and ADP levels showed that the 5:1 group had more significant effects on ATP and ADP levels ($P < 0.05$), and both groups significantly reduced ATP/ADP values ($P < 0.01$). The results of serum vWF level showed that the vWF content in the 3:1 group decreased significantly ($P < 0.05$). The results of HE staining and scanning electronic microscopy showed that the damage of vascular endothelium was improved in the treatment group and the structure of intima was neat. **Conclusion:** AR-ASR drug pair can improve the macro and micro indexes of rats with qi deficiency and blood stasis in the 3:1 and 5:1 groups. Overall, the 5:1 ratio has a better effect on supplementing Qi but 3:1 ratio has a better effect on promoting blood circulation.

[Keywords] Astragali Radix; Angelicae Sinensis Radix; supplement Qi and activate blood circulation; vascular endothelium; pharmacodynamic substance

“黄芪-当归”药对是临床最为常用、具代表性的药对之一。两药配伍组成的“当归补血汤”，是一首补气生血的传世名方，既能自成一派，又可作为基础药对配伍组方。自李东垣《内外伤辨惑论》当归补血汤(DBD)创立以来，黄芪-当归药对的临床使用

及其影响无出其右。古之黄芪当归建中汤、归脾汤、补中益气汤、圣愈汤、泰山磐石散、补阳还五汤、黄芪内托散，今之归芪调经汤、气血注射液等，方中无不用黄芪-当归药对组方，临床应用及研究上多是围绕该药对展开。黄芪-当归药对作为一直以来的

研究热点,多集中于对当归补血汤的研究,无论在化学成分、物质代谢、药理作用、质量控制还是临床应用中都取得了较好的研究成果^[1-3]。气血在人体生命活动中具有重要意义,二者在生理上相互依存,表现为气能生血、气能行血、气能摄血、血能养气、血能载气。气为血之帅,血为气之母,血非气不运,气非血不和,二者一阴一阳,相互维系,相互影响。气虚指一身正气不足导致脏腑组织机能减退的病理变化,血瘀指血液运行不畅、阻滞脉道,或血离经脉而瘀积之象。气虚运血无力,瘀阻内停,不通则痛,易致局部疼痛、肿块或血逸脉外而出血等;血瘀又可影响对气之濡养与运载作用,阻滞气机并使瘀血留于五脏脉络,影响脏腑机能。气虚血瘀的病机,以气虚为本、血瘀为标,临床上治疗宜标本兼治、益气活血。黄芪-当归药对中的两味药,因黄芪善补脾肺之气,能益气养血,当归又可补血活血,因此二者在配伍原则上应为气血同治,具有益气生血、益气养血、益气摄血、益气活血等作用。黄芪与当归配伍可发挥不同的作用功效,二者配伍经典应用可谓李东垣之DBD,黄芪、当归自立成方,主要用于血虚发热、发燥之症,可体现补气生血、养血之效,且在《内外伤辨惑论》《兰室秘藏》《脾胃论》3部著作中均有提及,但后世引用多以《内外伤辨惑论·暑伤胃气论》所载为主。《陈素庵妇科补解·调经门》中二药配伍生姜、大枣,主治血少之“居经”,也可以说是益气生血之代表方。此外,该药对的益气摄血及益气活血之效在相关著作中也有所提及,如《血证论》载:“黄芪一两、当归五钱,此方以气统血,气行则血行。外充皮肤,则盗汗、身热自除;内摄脾元,则下血、崩漏能止”;《医宗金鉴》言:“若经水先期血少浅淡,乃气虚不能摄血也,以黄芪蜜炙一两、当归三钱补之”;另《医林改错》之补阳还五汤,主治中风之气虚血瘀证,以黄芪为君、当归为臣,益气活血之效显著。气虚血瘀是冠心病、糖尿病、高血压病、脑卒中、肾病综合征、恶性肿瘤等多种疾病的重要病理基础,而血管内皮损伤是诱发这些疾病的始动环节和最终共同途径^[4-5]。

团队前期研究已证实黄芪-当归药对以其多样的配伍比例,具有不同的功效或作用,在总量36g,3:1配伍时,表现为明显的益气活血作用,对血液流变学指标有明显的改善,而传统DBD的配比效果并不明显^[6]。后对其分子机制进行了探讨,发现其能显著降低气虚血瘀模型大鼠白细胞黏附率及白细胞黏附分子 β_2 整合素、细胞间黏附分子-1的表达;显

著降低气虚血瘀模型大鼠血浆一氧化氮含量,抑制血小板内皮细胞黏附分子、P选择素的过度表达^[6-7];并对黄芪甲苷、阿魏酸2种中药单体成分伍对糖尿病大鼠大血管病变进行了实验研究,发现其能下调糖尿病大鼠主动脉核转录因子(NF)- κ B p65的表达,通过降低氧化低密度脂蛋白、肿瘤坏死因子等抑制NF- κ B信号通路的激活,从而保护糖尿病大鼠血管内皮^[8]。近来发现黄芪-当归对于气虚血瘀型2型糖尿病大血管病变的患者也有良好的治疗效果,其机制或与抵抗氧化应激有关^[9-10]。在此基础上展开研究该配比对气虚血瘀模型大鼠的药效学影响,并建立水煎液指纹图谱,利用超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱联用技术(UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS)法探究黄芪-当归药对益气活血作用的药效物质,阐释对气血理论与气虚血瘀的认识。

1 材料

1.1 动物 SPF级Wistar雄性大鼠24只,体质量(260±10)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物质量合格证号SCXK(京)2016-0006,实验动物饲养于山东中医药大学动物实验中心,动物房温度控制在20~26℃,湿度40%~70%,光照明暗12h/12h。全部大鼠实验前自由饮食饮水,适应性饲养10d。动物实验经过了山东中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准文号为SDUTCM20210105001。

1.2 药材 黄芪(191001)购于亳州中强中药饮片有限公司,当归(批号A200501)购于河北康派中药材有限公司,经山东中医药大学李峰老师鉴定分别为豆科植物膜荚黄芪*Astragalus membranaceus*的干燥根、伞形科植物当归*Angelica sinensis*的干燥根,符合2020年版《中华人民共和国药典》规定。指纹图谱所用10批药材信息见表1。

1.3 药品与试剂 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为Y13F11H108672、H06S9Z69494、Y05J11H115098、L03A9D57744,纯度均≥98%)。乙腈(美国Fisher Scientific公司)、磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司)、甲醇(国药集团化学试剂有限公司)均为色谱纯;大鼠三磷酸腺苷(ATP)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、大鼠二磷酸腺苷(ADP)ELISA试剂盒、大鼠血管性血友病因子(vWF)ELISA试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号均为05/2021),磷酸盐缓冲液(PBS)、多聚甲醛、电泳液(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号分别为

表1 黄芪、当归中药饮片来源

Table 1 Source of Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix

饮片	批号	产地	来源	编号
黄芪	20070301	内蒙古	郑州瑞龙制药股份有限公司	A1
	2005035	甘肃	甘肃中天药业有限责任公司	A2
	A200802	内蒙古	河北康派中药材有限公司	A3
	2007008	甘肃	安国市聚药堂药业有限公司	A4
	20200201	内蒙古	山东建联盛嘉中药有限公司中药饮片厂	A5
	191105	甘肃岷县	亳州中强中药饮片有限公司	A6
当归	20060101	甘肃	郑州瑞龙制药股份有限公司	B1
	2006067	甘肃	甘肃中天药业有限责任公司	B2
	A200501	甘肃	河北康派中药材有限公司	B3
	2007001	甘肃	安国市聚药堂药业有限公司	B4
	20200601	甘肃	山东建联盛嘉中药有限公司中药饮片厂	B5
	190524179	甘肃	山东蓝泽中药饮片有限公司	B6

HJ203101、HJ203101、HP201005)、戊巴比妥钠、苏木素(美国Sigma公司,批号分别为P3761、041M0014V)、二甲苯(成都市科龙化工试剂厂)、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号100092683)、伊红(上海迈坤化工有限公司,批号20120831)、盐酸溶液(杭州双林化工试剂有限公司)、中性树胶(上海标本模型厂)、钨酸(TED PELLA);乙腈、甲酸[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],以上试剂均为色谱纯。

1.4 仪器 1260系列高效液相色谱仪(美国Agilent公司)、TGL-16C型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);n6c型血流变检测仪(上海普利生机电科技有限公司)、RM2235型包埋机、轮转式切片机(德国Leica公司)、TEC2500型病理组织漂烘仪(常州市郝思琳医用仪器有限公司)、DX45型显微镜(日本Olympus公司)、PYX-DHS500BS-II型隔水式恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司)、AR224CN型电子天平(奥豪斯仪器有限公司)、5810R型台式冷冻离心机(德国Eppendorf公司)、Sputter Coater 108型喷金仪(英国Cressington公司)、K850型临界点干燥仪(美国Quorum公司)、QuantaTM 450 PEG型场发射扫描电子显微镜(美国FEI公司)、Cytation 5型全波长酶标仪(美国BioTek公司);XH-C型涡旋振荡器(上海科哲生化科技有限公司)、MTN-5800型氮吹仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)、Allegra X-30R型低温高速离心机(美国Beckman Coulter公司)、Ultimate 3000型超高压

相色谱系统-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

2 方法

2.1 黄芪-当归对气瘀血虚模型大鼠的治疗方法

2.1.1 药品的制备 黄芪、当归药材浸泡1 h,加热回流提取2次。一煎加8倍量水,二煎加6倍量水,两次煎煮时间均为45 min,用4层纱布趁热滤过,合并滤液,加热浓缩至 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 备用。

2.1.2 动物分组、模型建立及给药 大鼠适应性饲养后随机分为4组,空白对照组、模型组、黄芪-当归3:1组(预实验确定组,以下简称3:1组)及黄芪-当归5:1组(传统用药组,以下简称5:1组),每组6只,称质量、标号。造模方法采用饥饿合并冷水游泳法,空白组正常进食,模型组与给药组每日每只摄空白组食量的2/3左右。各组每天给药1次,给药组剂量 $10.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,模型组和空白组给予等量的蒸馏水。在给药或给水40 min后,放入凉水(16 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 中游泳,以每只大鼠出现自然沉降的时间为其游泳耐疲劳时间。当每组大鼠出现自然沉降时停止游泳,如此连续15 d^[6,11-14]。

2.1.3 标本采集与处理 各组大鼠第16天不游泳,给药或给水40 min后称质量^[6],以2%戊巴比妥钠按 $0.2\text{ mL}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ 体质量进行腹腔注射麻醉,取脾、胸腺、血及腹主动脉。血样一部分置于肝素钠抗凝的采血管中用于血液流变学分析,一部分置于普通血清管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心10 min(离心半径7 cm,下同),收集上清,分装。腹主动脉一部分置于4%的多聚甲醛,另一部分置于电镜液中固定备用。

2.2 黄芪-当归入血成分研究方法

2.2.1 芪归药对及单味药药材水煎液的制备 取黄芪-当归药对药材36 g浸泡1 h,加热回流提取2次。一煎加8倍量水(288 mL),二煎加6倍量水(216 mL),两次煎煮时间均为45 min,用四层纱布趁热滤过,合并滤液。水浴加热浓缩定容至50 mL量瓶中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。单味药制备同上。

2.2.2 供试品及混合对照品溶液的制备 供试品溶液的制备:取药液2 mL加水定容至10 mL量瓶中,超声30 min,取1 mL于离心管中,加50%甲醇1 mL, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液用 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过得供试品溶液(液质供试品:取药液3 mL加水定容于10 mL量瓶中,超声30 min,取1 mL于离心管中,加50%甲醇1 mL, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上清液用 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔

滤膜滤过待测)。

混合对照品溶液的制备:分别精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸对照品约10 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,分别配制成约1 g·L⁻¹的母液。分别精密量取对照品各100 μL,置10 mL量瓶中,甲醇定容混匀,得混合对照品溶液。

2.2.3 色谱条件^[15] 指纹图谱条件:Agilent Zorbax SB-Aq色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱温30℃,以0.1%磷酸水(A)-乙腈(B)溶液为流动相进行梯度洗脱(0~5 min,2%~5%B;5~10 min,5%~10%B;10~20 min,10%~24%B;20~35 min,24%~40%B;35~40 min,40%~100%B;40~50 min,100%B),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长260 nm,进样量10 μL。

液相条件:Halo[®]C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,2.7 μm),柱温30℃,以0.05%甲酸水(A)-0.05%甲酸乙腈(B)溶液为流动相进行梯度洗脱(0~5 min,2%~5%B;5~10 min,5%~10%B;10~20 min,10%~24%B;20~35 min,24%~40%B;35~40 min,40%~100%B;40~50 min,100%B),流速0.3 mL·min⁻¹,进样量2 μL。

质谱条件:采用真空绝热保护的加热电喷雾离子源(HESI),正负离子全扫描模式,毛细管温度350℃,加热器温度350℃,鞘气压力45 arb,辅助气体压力10 arb,喷雾电压3.00 kV,质谱采集范围m/z 80~1 200。

2.3 全血黏度及血浆黏度 腹主动脉取血于肝素钠抗凝管中,用全自动血流变仪检测全血黏度和血浆黏度。

2.4 胸腺指数、脾脏指数 分离脾脏和胸腺,用PBS清洗干净,滤纸吸取表面水分后进行称重。脾脏指数及胸腺指数计算公式:脾脏指数=脾脏质量/体质量(mg·g⁻¹),胸腺指数=胸腺质量/体质量(mg·g⁻¹)。

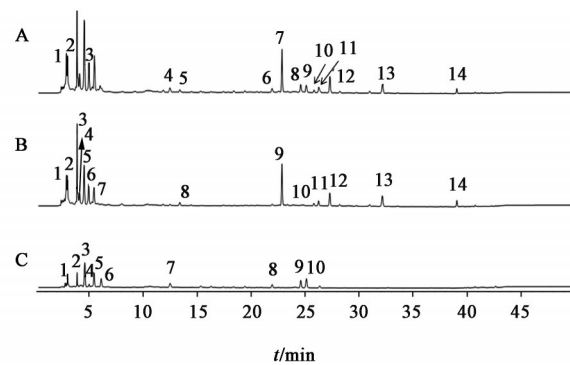
2.5 血清ATP、ADP、vWF含量测定 取血清标本,按照大鼠ATP ELISA试剂盒、大鼠ADP ELISA试剂盒、大鼠vWF ELISA试剂盒说明书操作,测定血清中ATP、ADP、vWF含量。

2.6 苏木素-伊红(HE)染色及扫描电镜观察血管形态 腹主动脉标本经固定、修块,脱水、透明,浸蜡,包埋,切片,烤片,脱蜡,染色,脱水后拍照观察。置于电镜液中固定的腹主动脉标本经PBS洗涤后,梯度乙醇脱水,二氧化碳临界点干燥仪干燥,喷金仪喷金后,扫描电镜观察拍照。

2.7 统计学方法 数据以($\bar{x}\pm s$)表示,采用SPSS 22.0软件进行统计分析。先将各组数据进行正态性、方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析,P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 指纹图谱的建立与分析^[15] 经过精密度试验、稳定性试验、重复性试验,建立了黄芪-当归(3:1)指纹图谱,标定出吸收信号强、响应值大、稳定性好的共有峰14个。10批黄芪-当归的指纹图谱见图1,相似度计算结果表明,10批供试品指纹图谱相似度均>0.97,见增强出版附加材料。同时根据指纹图谱确定了14个共有峰,其中经对照品对比,峰7为毛蕊异黄酮葡萄糖苷,峰8为阿魏酸,峰13为毛蕊异黄酮,峰14为芒柄花素。根据黄芪-当归水煎液及单味药水煎液比对结果显示,黄芪-当归中2、3号峰同时来自黄芪和当归,1、5、7、10、11、12、13、14来自黄芪,4、6、8、9来自当归,见图1。通过与单味药进行比对并对色谱峰进行归属,发现来源于黄芪的成分有8个,当归4个,同时来源于黄芪和当归2个,未见有新成分生成。该实验为黄芪-当归(3:1)质量控制提供了参考方法。10批黄芪-当归HPLC指纹图谱对照图、相似度见增强出版附加材料。



注:A.黄芪-当归;B.黄芪;C.当归

图1 黄芪-当归及单味药的HPLC色谱

Fig. 1 HPLC of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix

3.2 对全血及血浆黏度的影响 与空白组比较,模型组全血(高切、中切、低切)黏度均显著升高(P<0.01),血浆黏度明显升高(P<0.05);与模型组比较,3:1组及5:1组全血(高切、中切、低切)黏度、血浆黏度均有降低趋势,其中3:1组对全血低切黏度的降低有统计意义(P<0.05)。见表2。

3.3 胸腺、脾脏指数 与空白组比较,模型组大鼠体质量、胸腺指数均显著降低(P<0.01),脾脏指数明显降低(P<0.05);与模型组比较,3:1及5:1组均可升高胸腺及脾脏指数水平,其中5:1组对胸腺指数

表2 黄芪-当归对大鼠全血黏度 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effects of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on whole blood and plasma viscosity in rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	全血黏度			血浆黏度 /mPa·s
		高切/150 s ⁻¹	中切/60 s ⁻¹	低切/10 s ⁻¹	
空白组		5.46±0.30	7.49±0.39	14.87±1.12	1.33±0.31
模型组		6.53±0.17 ²⁾	9.10±0.27 ²⁾	19.49±1.17 ²⁾	2.13±0.62 ¹⁾
3:1组	10.2	6.26±0.15	8.68±0.25	17.79±0.75 ³⁾	1.71±0.38
5:1组	10.2	6.27±0.37	8.66±0.60	17.84±2.09	2.06±0.60

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3-表5同)

的升高差异有统计学意义(P<0.05),体质量显著升高(P<0.01)。见表3。

表3 黄芪-当归对大鼠体质量及胸腺、脾脏指数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effects of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on body mass, thymus index and spleen index in rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	体质量 /g	胸腺指数 /mg·g ⁻¹	脾脏指数 /mg·g ⁻¹
空白组		393.37±13.89	1.56±0.14	2.65±0.21
模型组		273.83±6.61 ²⁾	0.93±0.17 ²⁾	2.27±0.24 ¹⁾
3:1组	10.2	322.15±6.85 ⁴⁾	1.17±0.28	2.44±0.24
5:1组	10.2	316.81±18.57 ⁴⁾	1.22±0.04 ³⁾	2.53±0.20

3.4 对血清ATP、ADP、vWF含量及ATP/ADP值变化的影响 与空白组比较,模型组大鼠ATP含量显著降低(P<0.01),ADP含量显著升高(P<0.01),ATP/ADP值显著降低(P<0.01);与模型组比较,给药组均能升高ATP水平,其中5:1组差异有统计学意义(P<0.05);能降低ADP水平,其中5:1组差异有统计学意义(P<0.05);能升高ATP/ADP值(P<0.01)。见表4。

表4 黄芪-当归对大鼠血清ATP、ADP及ATP/ADP值的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effects of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on serum ATP, ADP and ATP/ADP values in rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ATP/ng·L ⁻¹	ADP/ng·L ⁻¹	ATP/ADP
空白组		4 753.39±415.60	409.13±36.98	11.66±1.06
模型组		4 037.79±356.49 ²⁾	465.79±40.00 ²⁾	8.69±0.71 ²⁾
3:1组	10.2	4 437.19±294.76	431.24±29.18	10.30±0.59 ⁴⁾
5:1组	10.2	4 470.48±306.96 ³⁾	423.64±29.24 ³⁾	10.56±0.48 ⁴⁾

与空白组比较,模型组大鼠vWF含量显著升高(P<0.01);与模型组相比,给药组均能降低vWF水平,其中3:1组差异有统计学意义(P<0.05),

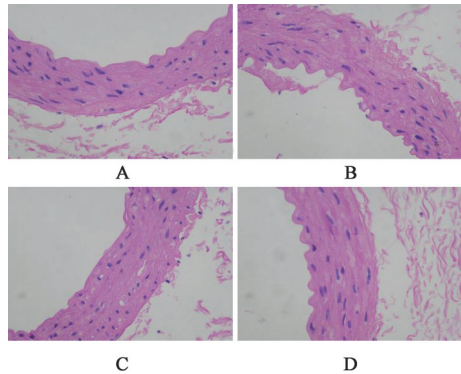
见表5。

表5 黄芪-当归对大鼠血清vWF含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on serum vWF content in rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	vWF/ng·L ⁻¹
空白组		2 206.08±60.09
模型组		2 409.50±51.01 ²⁾
3:1组	10.2	2 288.16±130.50 ³⁾
5:1组	10.2	2 343.48±102.84

3.5 HE及扫描电镜观察血管形态 HE染色结果显示,空白组腹主动脉内膜结构正常,表面光滑,内皮连续完整无明显突起、缺损及细胞黏附;模型组内膜结构紊乱,内皮凸起,缺损;给药组有不同程度改善,见图2。



注:A.空白组;B.模型组;C.3:1组;D.5:1组(图3同)

图2 黄芪-当归对大鼠腹主动脉病理学形态的影响(HE,×400)
Fig. 2 Effect of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on pathological morphology of rat abdominal aorta (HE,×400)

扫描电镜结果显示,空白组腹主动脉血管内皮完整,表面光滑,排列整齐,呈梭形排列,无细胞黏附及迁移;模型组内皮损伤,表面粗糙,结构紊乱,细胞黏附迁移明显;各给药组内皮损伤有不同程度的改善,见图3。

3.6 气虚血瘀模型大鼠血清药物化学分析 黄芪-当归(3:1)主要有效成分为黄酮类、皂苷类、有机酸、挥发油及糖类。根据质谱中碎片离子与文献进行分析比对^[16-20],共鉴定出49个成分。其中包括黄酮类20个,挥发油7个,皂苷类5个,有机酸7个,糖类4个,氨基酸及其衍生物6个。其正负离子模式图见增强出版附加材料。

通过对体内入血成分进行分析,共初步鉴定了11种原型成分吸收入血(M1~M11),7种代谢产物(M12~M18)。其中原型成分中有4种黄酮类成分,4种苯酚类,1种皂苷类,1种有机酸,1种氨基酸;代

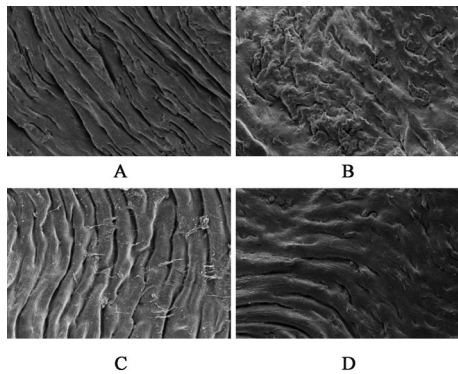


图3 黄芪-当归对大鼠血管内皮形态的影响(扫描电镜, ×1 600)
Fig. 3 Effect of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on morphology of vascular endothelial cells in rats (SEM, ×1 600)

代谢产物为黄酮及其苷类成分的代谢产物。见表6。

表6 黄芪-当归(3:1)对大鼠入血成分的鉴定

Table 6 Characterization of chemical components in rat serum after oral administration of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix(3:1)

No.	t_R /min	理论值	真实值	δ	母离子	化学式	MS/MS	名称	代谢途径
M1	0.64	177.098 2	177.098 1	-0.68	[M+H] ⁺	C ₅ H ₁₂ N ₄ O ₃	160.072 2, 131.092 1, 118.050 2, 102.055 4	刀豆氨酸	-
M2	13.80	193.050 6	193.049 7	-4.66	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	178.026 3, 149.059 5, 134.035 7	阿魏酸	-
M3	17.98	207.1016	207.1015	-0.34	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	189.091 0, 165.091 0, 161.096 0, 133.064 8, 119.085 7	4-羟基-3-正丁基苯酚或异构体	-
M4	18.25	303.122 7	303.122 4	-1.06	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	193.085 8, 167.070 1, 161.059 6, 133.064 7, 123.044 2	异木犀草醇	-
M5	19.69	431.133 7	431.133 5	-0.35	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	269.0804, 254.0551, 237.0530	芒柄花苷	-
M6	21.47	301.107 1	301.106 5	-1.79	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₆ O ₃	269.080 4, 241.085 4, 191.070 1, 167.070 1	3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷的异构体	-
M7	27.71	267.066 3	267.066 3	0	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	252.042 5	芒柄花素	-
M8	29.20	191.106 7	191.106 5	-0.63	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	-	3-正丁基苯酚	-
M9	29.38	829.458 0	829.461 9	4.69	[M+COOH] ⁻	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	-	黄芪甲苷IV	-
M10	29.61	191.106 7	191.106 4	-1.36	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	173.096 0, 163.111 6, 145.101 0, 117.070 2	E-藜本内酯	-
M11	30.01	191.106 7	191.106 4	-1.36	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	173.095 9, 163.111 8, 145.100 8, 117.070 1	Z-藜本内酯	-
M12	13.26	621.146 1	621.146 6	0.79	[M-H] ⁻	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₆	621.146 6, 459.093 8, 283.061 0, 268.037 8	毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷-3-O-葡萄糖醛酸	葡萄糖醛酸化
M13	17.88	459.093 3	459.093 6	0.70	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	459.093 4, 441.085 1, 283.061 2, 268.037 6, 239.034 4	芒柄花苷-CH ₃ +COOH	去甲基化+羧基化
M14	17.88	461.107 8	461.107 4	-0.91	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	285.075 3, 270.052 1, 137.023 3	毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖醛酸	葡萄糖醛酸化
M15	19.92	443.098 4	443.098 5	0.18	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₀	443.098 5, 267.066 2, 251.033 9	芒柄花素-7-O-葡萄糖醛酸	葡萄糖醛酸化
M16	20.24	301.070 7	301.070 2	-1.56	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	286.046 9, 269.043 9, 153.017 8	毛蕊异黄酮+O	羟基化作用
M17	20.25	475.088 2	475.088 2	0	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	475.124 5, 299.056 1, 284.032 5	毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷-CH ₃ +COOH	去甲基化+羧基化
M18	26.75	347.023 1	347.023 2	0.17	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₇ S	347.022 9, 267.066 2	芒柄花素+硫酸盐	硫酸盐化作用

4 讨论

黄芪、当归传统配伍主要为共煎汤剂,然而随着现代科学技术的发展,亦出现了不同提取部位、不同活性成分之间的配伍及单煎后再配伍等多种配伍方式。研究表明黄芪-当归不同功效或药效的发挥可以是不同极性部位或不同成分间综合作用的结果。团队前期实验已对药物高、中、低剂量做了药效对比研究,发现3:1配比在大剂量下,相当于临床成人用量的20倍,10.2 g·kg⁻¹效果最好,因此采用该剂量展开研究。前期研究和相关文献证实饥饿合并凉水游泳法建立气虚血瘀模型是公认的模式制作方法^[6,11-14],实验结果显示,饥饿合并凉水游泳法建立的气虚血瘀大鼠模型符合中医基础理论

之病因学说,一般表征、宏观指标及微观指标证明了该模型建立成功。模型大鼠出现倦怠乏力、身体消瘦、毛发无光泽、粪便部分不成型等症状,与气虚相吻合;舌偏紫暗,尾部发凉色淡伴有青紫色瘀斑,符合血瘀症状;且胸腺指数、脾指数、ATP含量及ATP/ADP值明显下降,ADP含量明显上升;全血(高切、中切、低切)黏度、血浆黏度、vWF均明显升高。给药后,各指标均有所改善,但以3:1组降低全血低切黏度差异明显,活血作用优于DBD。与传统DBD(5:1)补气生血相比,黄芪-当归(3:1)的作用体现为益气活血,重在活血。

指纹图谱中,标定出吸收信号强、响应值大、稳定性好的共有峰14个。来源于黄芪的成分有8个,当归4个,同时来源于黄芪和当归2个,未见有新成分生成。UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS对黄芪-当归(3:1)水煎液成分进行分析鉴定,鉴定出化学成分48个,包括黄酮类、挥发油、皂苷类、有机酸、糖类、氨基酸及其衍生物,明确了3:1配比下水煎液原型成分。同时鉴定出11种原型成分吸收入血及7种代谢产物,包括芒柄花素、阿魏酸、黄芪甲苷、芒柄花苷、4-羟基-3-正丁基苯酞或异构体、3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷异构体、异微凸剑叶莎醇、Z-藜本内酯、E-藜本内酯、3-丁基苯酞、刀豆氨酸及毛蕊异黄酮葡萄糖苷葡萄糖醛酸化产物、芒柄花苷脱甲基后羧酸化产物、毛蕊异黄酮葡萄糖苷脱甲基后羧酸化产物、芒柄花素葡萄糖醛酸化产物、芒柄花素硫酸化产物、毛蕊异黄酮羟基化产物、毛蕊异黄酮葡萄糖醛酸化产物,为后续进一步物质基础研究奠定了基础。其中毛蕊异黄酮及毛蕊异黄酮葡萄糖苷虽未检测到原型成分,但有相应的代谢产物,推测可能与血液标本采取时间有关,给药后40 min标本取样并不是所有成分的峰值时间点。SHI等^[21]研究了DBD中5种主要活性成分在血虚及正常大鼠体内、4 h、的代谢情况,结果显示阿魏酸于30 min达峰值;咖啡酸、毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷分别于60、30、30 min达峰值。考虑到整体实验的指标检测,故而选取给药后40 min作为采样时间,出现了只检测到代谢产物未检测到原型成分的情况,因此在后续的研究中,会依据内源性代谢产物的变化,分时间段多次采集血液标本,结合药效学分析,可作为一种参考思路推测黄芪-当归药对发挥益气活血作用的潜在药效物质。

综上所述,气虚血瘀大鼠模型符合中医基础理论之病因学说,并从一般表征、宏观指标及微观指

标证明了该模型建立成功,并在前期药效学研究基础上,研究发现黄芪-当归(3:1)时对气虚血瘀证有良好的益气活血作用。比较传统5:1配比的益气活血作用更好,有利于血管内皮损伤。利用HPLC建立了黄芪-当归药对(3:1)指纹图谱,为其质量控制及复杂的化学成分进行了全面的分析与鉴定。药效与化学成分体内分析检测,鉴定出11种原型成分,为阐述复方的药效物质基础提供理论依据。但这不能代表整个复方的所有成分,后期的研究中将关注内源性代谢产物的分析变化,探索不同极性部位的有效成分,明确其量效关系,分析模型给药前后的代谢组学变化,探讨相关的代谢通路,为黄芪-当归益气活血作用的药效物质全面研究提供思路与参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 杨飞霞,王玉,夏鹏飞,等. 当归补血汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2677-2685.
- [2] 王文越,刘珊,吕琴,等. 黄芪-当归药对益气活血药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 207-216.
- [3] LIU Y, LI X, LI A, et al. UHPLC Q-Exactive MS-based spleen metabolomics and lipidomics to explore the effect mechanisms of Danggui Buxue decoction in anemia mice [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 185: 113234.
- [4] FAVERO G, PAGANELLI C, BUFFOLI B, et al. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: Life style intervention [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 801896.
- [5] ZHANG H, WANG W R, LIN R, et al. Buyang Huanwu decoction ameliorates coronary heart disease with Qi deficiency and blood stasis syndrome by reducing CRP and CD40 in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 130(1): 98-102.
- [6] 滕佳林. 黄芪配伍当归益气活血作用的理论与实验研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2002.
- [7] 王惠,于丽秋,韩冰,等. 黄芪配伍当归对气虚血瘀模型大鼠血管内皮和肝窦内皮细胞CD54表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 39-41.
- [8] 阴永辉. 黄芪甲苷与阿魏酸抑制NF-κB信号途径干预糖尿病大鼠大血管病变的作用及机制[D]. 济南: 山东中医药大学, 2014.
- [9] 王勇,王浩,阴永辉. 芪归药对通过激活Nrf2通路干预气虚血瘀型T2DM大血管病变的临床研究[J]. 中

- 华中医药学刊,2019,37(7):1694-1697.
- [10] 阴永辉,王浩,周吉,等. 芪归药对干预气虚血瘀型2型糖尿病大血管病变血清8-iso-PGF₂α的临床研究[J]. 中华中医药学刊,2021,39(6):163-166.
- [11] 王瑾茜,蔺晓源,刘侃,等. 冠心病气虚血瘀证证结合大鼠模型的建立研究[J]. 中国实验动物学报, 2020,28(5):602-609.
- [12] 罗慧,焦文超,王青,等. 气虚血瘀型缺血性脑卒中动物模型建立与评价方法浅析[J]. 中华中医药杂志, 2020,35(12):6375-6377.
- [13] 扈新刚. 气虚血瘀大鼠模型表征及生物学基础相关研究[D]. 北京:北京中医药大学,2007.
- [14] 许家伟. 基于网络药理学研究补气活血方对气虚血瘀模型大鼠心功能的保护作用 and 机制探讨[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2021.
- [15] 姚静,施钧瀚,桂新景,等. 基于HPLC指纹图谱评价的当归补血汤传统汤剂与配方颗粒汤剂的成分差异分析[J]. 中草药,2019,50(11):2567-2574.
- [16] 雷冬梅,姚长良,陈雪冰,等. 基于RP-Q-TOF-MS和HILIC-Q-TOF-MS的经典名方当归补血汤成分分析[J]. 中国中药杂志,2022,47(8):2109-2120.
- [17] 殷会敏,黄文哲,肖伟. 基于RRLC-Q-TOF-MS/MS技术快速分析芪葛颗粒的化学成分[J]. 中国中药杂志,2018,43(21):4240-4247.
- [18] 张纪红,吴卫东,刘建庭,等. 基于UPLC-Q-TOF/MS技术活血止痛胶囊化学成分的快速分析[J]. 中草药,2020,51(12):3139-3146.
- [19] LI C Y, SONG H T, LIU S J, et al. Systematic screening and characterization of astragalosides in an oral solution of Radix Astragali by liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and peakview software [J]. J Sep Sci, 2016,39(6):1099-1109.
- [20] 许如玲,范君婷,董惠敏,等. 经典名方黄芪桂枝五物汤标准煎液化学成分的UPLC-Q-TOF-MS分析[J]. 中国中药杂志,2020,45(23):5614-5630.
- [21] SHI X, TANG Y, ZHU H, et al. Comparative tissue distribution profiles of five major bio-active components in normal and blood deficiency rats after oral administration of Danggui Buxue Decoction by UPLC-TQ/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 88: 207-215.

[责任编辑 顾雪竹]