

日服用次数对大黄体外抗氧化效应的影响

王陆军¹, 李仙义², 韩晋¹, 吕俊兰¹, 袁海龙^{1*}

(1. 解放军第302医院, 北京 100039; 2. 解放军总后勤部卫生部药品检验所, 北京 100071)

[摘要] **目的:** 研究日服用次数对大黄含药血清体外抗氧化效应的影响, 制定大黄用于抗氧化的合理日服用次数。**方法:** Wistar大鼠口服1次组(G1), 2次组(G2), 3次组(G3), 分别每日灌服大黄提取物 $3.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 1次、 $1.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 2次、 $1.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3次, 分别于第1次给药前(0 h)及给药后0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h眼眶后静脉取血, 用于测定大黄含药血清体外对超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、二苯代苦味酰基自由基(DPPH)以及羟基自由基的清除抗氧化实验, 并对其进行房室模型的拟合和参数计算, 得到抗氧化效应-时间曲线(E-T曲线), 制定大黄用于抗氧化时合理的日服用次数。**结果:** 日服用次数与大黄抗氧化作用的强弱显著相关, 给药2次E-T曲线下面积(AUC_E)明显高于给药1次和3次($P < 0.05$)。**结论:** 大黄用于抗氧化日服用次数以每日2次为宜。

[关键词] 大黄; 体外抗氧化; 日服用次数

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0262-04

[doi] 10.11653/syjf2013150262

Impact of Daily Administration Frequency on Antioxidant Effect *in vitro* of Rhubarb

WANG Lu-jun¹, LI Xian-yi², HAN Jin¹, LV Jun-lan¹, YUAN Hai-long^{1*}

(1. 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China;

2. Institute for Drug and Instrument Control of PLA, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of daily administration frequency of rhubarb on the antioxidant effect *in vitro* and to determine the rational frequency for rhubarb application. **Method:** Rhubarb extract was administrated to Wistar rats (G1, G2 and G3 group) in a dose of $3.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ once a day, $1.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ twice a day, $1.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ three times a day, respectively. Blood sample was collected from orbital venous before the administration (0 h) and after the administration of 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h. Blood sample was used for the experiments of antioxidant *in vitro*, such as scavenging effect of superoxide anion radical, diphenyl-generation bitterness acyl radical and hydroxyl radicals. And then antioxidant effect-time curve was obtained by fitting its compartment model and calculating parameters. **Result:** There was good correlation between daily administration frequency and antioxidant effects of rhubarb. Area under the curve of E-T (AUC_E) of administration twice daily was significantly higher than those of administrated 1 or 3 times daily ($P < 0.05$). **Conclusion:** It is more appropriate to administrate rhubarb twice daily when it is used as antioxidant.

[Key words] rhubarb; antioxidant effect *in vitro*; administration frequency daily

[收稿日期] 20121024 (009)

[第一作者] 王陆军, 副主任医师, 从事肝病临床工作, Tel: 010-66933367, E-mail: jsxpharm@126.com

[通讯作者] *袁海龙, 博士, 研究员, 从事药物新剂型新制剂研究, Tel: 010-66933367, E-mail: yhlpharm@126.com

大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *R. officinale* Bail. 的干燥根及根茎, 其中掌叶大黄应用最多。其根味苦, 性寒, 具有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀通经之功效。现代药理及临

床研究证明,大黄具有降血脂、抗动脉硬化、抗肿瘤、抗衰老、抗氧化等药理作用。近年来,随着对其药理作用的深入研究,大黄的抗氧化作用日益受到重视^[1-2]。研究表明大黄蒽醌类成分具有清除氧自由基、抑制小鼠肝脏脂质过氧化^[3]、抑制脂质过氧化物丙二醛^[4]、清除二苯代苦味酰基自由基(DPPH)^[5]及羟基自由基^[6]等作用。

由于中药成分复杂,有效成分不明确,药代动力学试验往往对其中的1个或几个成分进行测定,不能准确反应药物的治疗作用,而药效动力学试验,可在忽略有效成分的前提下,综合反映药物作用。本课题组针对大黄泻下作用及治疗实验性黄疸的日服用次数做了一定的研究,发现在规定的剂量下,大黄以每日服用2次为佳^[7]。然而尚未对其抗氧化作用进行研究。本研究采用血清药理学的方法,研究大黄含药血清体外抗氧化效应动力学,进行大黄抗氧化的日服用次数的研究,为临床应用提供依据。

1 材料

1.1 仪器 TGL-16GBd型离心机(上海安亭科学仪器厂),SAS124S型电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司),Infinite200型酶标仪(奥地利Tecan公司)。

1.2 药材与试剂 大黄(购自甘肃省礼县药材公司,经解放军302医院肖小河研究员鉴定为掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根,批号20080425),其他试剂均为分析纯。

1.3 动物与分组 Wistar大鼠购于中国人民解放军军事医学科学院,动物许可证号SCXK-(军)2007-004,雄性,体重(220±20)g。将大鼠随机分为3组,每组8只,分别记为G1,G2,G3。

2 方法

2.1 大黄提取物的制备 将300g大黄粉碎为粗粉,加3000mL蒸馏水预先浸泡30min,煎煮至沸腾并保持微沸20min,趁热滤过,残渣加10倍蒸馏水再煎煮2次,合并滤液,于旋转蒸发仪进行减压浓缩,置真空干燥箱中,60℃干燥后取出,粉碎为细粉,储存于干燥器中,备用。实验前称取3份该细粉,每份7.2g,分别加入40,80,120mL蒸馏水搅拌至充分溶解,备用。

2.2 给药与取血 G1,G2,G3组分别给予大黄提取物3.6g·kg⁻¹,1次/d(给药时间为9:30),1.8g·kg⁻¹,2次/d(给药时间为9:30,13:30)和1.2g·kg⁻¹,3次/d(给药时间分别为9:30,13:30,17:30)。分别于第1次给药前(0h)及给药后0.083,

0.167,0.25,0.5,1,2,4,6,8,10,12,24h由大鼠眼眶后静脉取血,置离心管,8000r·min⁻¹离心10min,分离血清,-20℃保存,备用。

2.3 对超氧阴离子自由基(O₂⁻)的清除作用^[8-9]

采用邻苯三酚自氧化法。取450μL Tris-HCl缓冲溶液(精密称取三羟甲基氨基甲烷3.0285g,以少量蒸馏水溶解后加入0.1mol·L⁻¹的盐酸溶液114.5μL,加入蒸馏水定容至500mL,即得)置于2mL离心管中,于25℃水浴中预热20min,分别加入30μL 25mmol·L⁻¹邻苯三酚溶液和100μL含药血清样品,涡旋混匀,25℃水浴中继续反应5min后,加入100μL 8mol·L⁻¹的浓盐酸终止反应。以100μL蒸馏水代替样品管中样品作为自氧化管,其处理方法同样品管,将上述处理后的样品加入到96孔板中,每个样品设3个复孔,以等体积的Tris-HCl缓冲液为空白,在325nm处测定吸光度(A)。

$$\text{超氧阴离子的清除率} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

其中,A₀为自氧化管的A;A₁为样品管的A。

2.4 对二苯代苦味酰基自由基(DPPH)自由基的清除作用^[10] 分别吸取样品液100μL,加入25.8mg·L⁻¹ DPPH乙醇溶液100μL,摇匀,静置30min,以无水乙醇为空白,测定试液在517nm处的吸光度A_i、样品液100μL与无水乙醇100μL混合液的吸光度A_j、DPPH溶液100μL与无水乙醇100μL混合液的吸光度A₀。将样品加入96孔板中,各样品设3个复孔,取平均值,计算样品的抑制率。

$$\text{抑制率} = \left[1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \right] \times 100\%$$

2.5 对羟基自由基的清除作用^[11] 取试管,编为空白管、对照管和测试管(n=1,2,3,4,……),分别加入150μL 1mmol·L⁻¹邻二氮菲溶液,加入450μL 0.1mol·L⁻¹ PBS缓冲液(pH 7.4),充分混匀后再加100μL 1mmol·L⁻¹ FeSO₄溶液,立即混匀。在对照管和测试管中各加入1mL 1% H₂O₂溶液,再向样品管中分别加入100μL不同浓度的样品溶液,混匀,空白管不加样品和H₂O₂,所有试管均用蒸馏水定容至1mL,然后37℃保温1h,将其加入96孔板中,各样品设3个复孔,测定其在536nm处的吸光度A,取平均值,并按公式计算·OH清除率。

$$\text{羟基自由基的清除率} = \frac{A_2 - A_1}{A_0 - A_1} \times 100\%$$

A₀为空白管的吸光度,A₁为对照管的A,A₂为测试管的A。

2.6 统计学方法 采用DAS 2.1.1软件对抗氧化

效应-时间曲线进行房室模型的拟合和参数计算,组间比较采用双侧 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

大黄含药血清对超氧阴离子、DPPH 自由基、羟基自由基的清除作用曲线分别见图 1~3。由图可知,大黄含药血清对超氧阴离子、对 DPPH 自由基、对羟基自由基具有明显的清除作用,日服用次数与大黄抗氧化作用的强弱显著相关,且随着给药次数的增加,清除率也相应的出现回升。

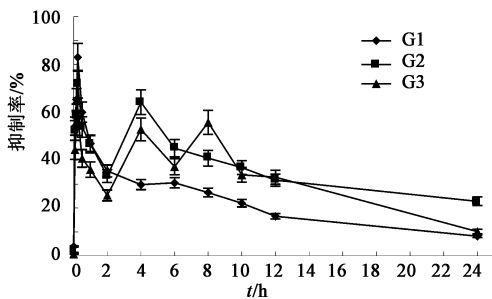


图 1 大黄含药血清对超氧阴离子的清除率-时间曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)

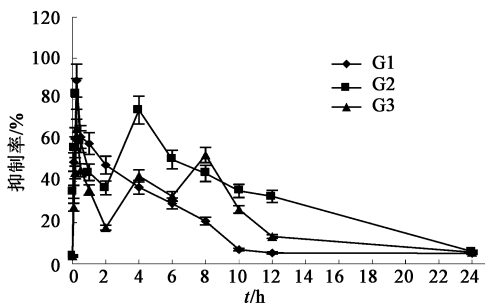


图 2 大黄含药血清对 DPPH 自由基的清除率-时间曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)

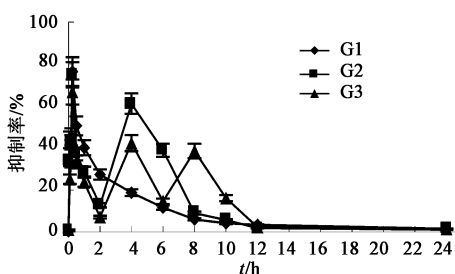


图 3 大黄含药血清对羟基自由基的清除率-时间曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)

借鉴药代动力学中 C-T 曲线的理论含义和研究方法,本文采用 DAS 2.1.1 软件对上述抗氧化效应-时间曲线进行房室模型的拟合和参数计算,得到其效应-时间曲线下面积(AUC_E),见表 1。

表 1 大黄含药血清抗氧化效应-时间曲线下面积

实验	AUC_E		
	G1	G2	G3
$O_2 \cdot$ 自由基	532.468	877.952 ¹⁾	786.278 ^{1,2)}
DPPH 自由基	424.795	846.353 ¹⁾	604.009 ^{1,2)}
OH 自由基	226.012	383.840 ¹⁾	330.514 ^{1,2)}

注:与 G1 组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 G2 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3 个不同的抗氧化实验中,抗氧化效应-时间(E-T)曲线下面积均为 $G2 > G3 > G1$,即每日给药 2 次时,大黄含药血清清除超氧阴离子、DPPH 自由基以及羟基自由基等体外抗氧化效应最强,持续时间最长。即大黄用于抗氧化时每日服用 2 次较好。

4 讨论

中医药的疗效评价是转化医学研究的前提,通过获得疗效的证据,在临床推广应用,才能实现从医疗卫生服务及政策制定的后期转化。以“效”为核心的中药日服用次数研究方法^[12]更加贴近临床,弥补了“唯成分论”的不足,适宜于中药日服次数的研究。

本文在前期工作基础上,研究了日服用次数对大黄体外抗氧化效应的影响,根据含药血清体外抗氧化的效应动力学分析,表明日服用次数与大黄抗氧化作用的强弱显著相关,且每日服用 2 次时,含药血清体外抗氧化效应最强,持续时间最长,证明,以每日服用 2 次为宜,为今后制定大黄用于抗氧化时的给药方案提供新的参考。

[参考文献]

- [1] 肖小河. 突破中药用量局限,提高中医药临床疗效[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(3):229.
- [2] 袁海龙,肖小河. 基于 PD-PK 的中药日服次数合理性评价模式商建[J]. 中草药, 2011, 46(10):1251.
- [3] 吴英良,曹颖林,时向群,等. 大黄对小鼠肝脏脂质过氧化的抑制作用[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(4):240.
- [4] 郭昌燕,张宁宇,陈玲,等. 大黄对脂质过氧化物一丙二醛的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2000, 2(2):136.
- [5] 朱德新. 中草药对 DPPH· 自由基的清除作用的研究[J]. 天津化工, 2008, 36(2):32.
- [6] 罗志毅,黄新,包国荣,等. 大黄中主要成分清除超氧阴离子自由基的 ESR 研究[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(3):612.
- [7] 吕俊兰,付珊珊,郭静静,等. 大黄用于治疗大鼠实验性黄疸的日服用次数初步研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24):3506.

工程牛黄组方牛黄降压丸与原方剂 对 SHR 血压影响的比较研究

李旭,王蕾,种影影,吕楠,陈卫平*
(天津市医药科学研究所,天津 300020)

[摘要] **目的:**评价工程牛黄组方的牛黄降压丸的降压作用,与原方剂进行疗效比较,为替代原组方中人工牛黄提供药效学依据。**方法:**采用自发性高血压大鼠(SHR)进行降压试验观察,分为模型对照组、原牛黄降压丸组和阳性药对照组,以及新组方牛黄降压丸 80%, 60%, 30%, 10% 替代组。分别灌胃给予各受试药(给药剂量均为 $1.76 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),连续给药 14 d,采用 ALC-NIBP 无创血压测定分析系统,分别测定给药 0, 5 h, 6, 10, 14 d, 停药后 3, 7 d 的血压情况。**结果:**给药 5 h 后,80% 工程牛黄替代组出现明显降血压作用[收缩压(SBP, 139.25 ± 19.24) mmHg,舒张压(DBP, 05.69 ± 19.18) mmHg],与对照组[SBP(187.2 ± 19.24) mmHg, DBP(123.76 ± 18.43) mmHg]比较,具有统计学差异($P < 0.05$)。80% 和 60% 工程牛黄替代组均于给药 6 d 表现出明显的降血压作用,与模型对照组比较 SBP 具有统计学差异($P < 0.01$),于给药 6 d 后各组降低 DBP 效果趋于稳定,以 80% 和 60% 工程牛黄替代组最为明显。停药后各受试组大鼠仍表现出明显的降压作用,以 80% 工程牛黄替代组降压效果最佳。80% 和 60% 工程牛黄替代组具有明显的减慢心率的作用,此作用与工程牛黄含量比例成正比,而原组方未见该作用。**结论:**工程牛黄替代品的牛黄降压丸组方的降压作用优于原组方,具有用量少、起效快、作用强且作用持久的优点。

[关键词] 工程牛黄; 人工牛黄; 牛黄降压丸; SHR; 降血压; 心率

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0265-04

[doi] 10.11653/syfy2013150265

Comparative Study between Effect of Engineering Niu Huang Jiangya Capsule and Artificial Niu Huang Jiangya Capsule on Blood Pressure in Spontaneously Hypertension Rats

LI Xu, WANG Lei, CHONG Ying-ying, LV Nan, CHEN Wei-ping*
(Tianjin Medicine Institute, Tianjin 300020, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the effect of engineering Niu Huang Jiangya capsule (ENJC) and artificial Niu Huang Jiangya capsule (ANJC) on blood pressure in spontaneously hypertension rats (SHR). **Method:** SHR were randomly divided into 7 groups in accordance with the systolic blood pressure: model control

[收稿日期] 20120810(005)

[第一作者] 李旭,在读研究生,从事心脑血管药理学研究,Tel:022-27236137,E-mail:lixu198423@yahoo.cn

[通讯作者] *陈卫平,副研究员,从事心脑血管药物研发,Tel:022-27236137,E-mail:weiping9679@163.com

- [8] 曹燕,庞市宾,徐磊,等. 金鸡菊提取物体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):144. [11] 牛英鹏,吕莹,曲天敏,等. 淫羊藿对羟基自由基的清除作用[J]. 中国运动医学杂志, 2000, 19(4):434.
- [9] 韦霄,黄兴贤,蒋运生,等. 3 种金花茶组植物提取物的抗氧化活性比较[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5):639. [12] 袁海龙,肖小河. 论口服中药日服次数合理性研究的现状与方法[J]. 世界科学技术——中医现代化, 2011, 13(12):952.
- [10] 赵启鹏,兰莎,张艺,等. 糖脉康颗粒清除 DPPH 自由基的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21), 41.

[责任编辑 李玉洁]