

芍药内酯苷和芍药苷对血虚肝郁证大鼠模型的影响及作用机制研究

陈周明, 李媛媛, 陈青微

丽水市中心医院, 浙江 丽水 323000

[摘要] 目的: 分析白芍“养血柔肝”功效物质基础与作用机制及血虚肝郁证证候实质。方法: 选取健康雄性 SD 大鼠 48 只, 随机数字表法将大鼠分成对照组、模型组、芍药内酯苷组及芍药苷组, 每组 12 只, 制备血虚肝郁大鼠模型, 造模第 1 天开始给药, 芍药内酯苷组灌胃 30 mg/(kg·d) 芍药内酯苷, 芍药苷组灌胃 30 mg/(kg·d) 芍药苷, 对照组和模型组灌胃等剂量生理盐水, 共灌胃 3 周; 观察大鼠一般活动情况, 高效液相色谱-电化学检测系统检测大鼠海马内单胺类神经递质 5-羟吲哚乙酸 (5-hydroxyindole acetic acid, 5-HIAA)、去甲肾上腺素 (Norepinephrine, NE)、肾上腺素 (Epinephrine, E)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 及多巴胺 (Dopamine, DA) 水平, 蛋白免疫印迹法检测大鼠海马内脑源性神经营养因子 (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、磷酸化元件结合蛋白 (P-cAMP-response element binding protein, P-CREB)、环磷酸腺苷 (Cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 及蛋白激酶 A (Protein kinase A, PKA) 蛋白表达状况。结果: 与对照组比较, 模型组大鼠 5-HIAA、NE、E、5-HT、DA、PKA、BDNF、cAMP、PKA 均显著降低, P-CREB 显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 芍药内酯苷组和芍药苷组大鼠 5-HIAA、NE、E、5-HT、DA、PKA、BDNF 及其大脑皮层内 cAMP、PKA 水平均升高, P-CREB 蛋白显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 芍药内酯苷和芍药苷可调节血虚肝郁大鼠神经递质含量, 调控大鼠机体内 cAMP/PKA 信号通路内相关蛋白表达, 起保护作用, 它们都是白芍养血柔肝功效物质基础。

[关键词] 血虚肝郁证; 芍药内酯苷; 芍药苷; 神经-内分泌-免疫网络; cAMP/PKA 信号通路; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 10-0014-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.10.004

Study on the Effect of Albiflorin and Paeoniflorin on Rat Models with Blood Deficiency and the Liver Depression Syndrome and the Mechanism

CHEN Zhouming, LI Yuanyuan, CHEN Qingwei

Abstract: **Objective:** To analyze the material basis and mechanism of white peony root in nourishing blood and softening the liver, and to analyze the essence of the syndrome of blood deficiency and the liver depression syndrome. **Methods:** Selected 48 healthy male SD rats and divided them into the control group, the model group, the albiflorin group and the paeoniflorin group according to the random number table method, 12 rats in each group. Established the rat models with blood deficiency and the liver depression syndrome and started to treat them with medicine from the first day. The albiflorin group was given 30 mg/(kg·d) of albiflorin by gavage, the paeoniflorin group was given 30 mg/(kg·d) of paeoniflorin by gavage, and the control group and the model group was given the same amount of normal saline by gavage. The four groups received treatment for three weeks. Observed the general activity of rats, detected levels of 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), norepinephrine (NE), epinephrine (E), 5-hydroxytryptamine (5-HT) and dopamine (DA) in hippocampus by high performance liquid chromatography electrochemical detection system, and detected the expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), P-cAMP-response element binding protein (P-CREB), Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and protein kinase A (PKA) in hippocampus of rats by immunoblotting test. **Results:** Compared with those in the control group, levels of 5-HIAA, NE, E, 5-HT, DA, PKA and BDNF as well as levels of cAMP and PKA in cerebral cortex in the albiflorin group and the paeoniflorin group were lower, while the P-CREB levels were significantly higher, differences being significant ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, levels of 5-HIAA, NE, E, 5-HT, DA, PKA and BDNF as well as levels of cAMP and PKA in cerebral cortex in the albiflorin group and the paeoniflorin group were higher, while the P-CREB levels were lower, significantly differences being significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Albiflorin and paeoniflorin can regulate the

[收稿日期] 2018-04-03

[基金项目] 浙江省中医药科技计划项目 (2016ZA209)

[作者简介] 陈周明 (1984-), 男, 主管中药师, 研究方向: 中药学。

[通信作者] 陈青微, E-mail: 2319889642@qq.com。

content of neurotransmitter of rats with blood deficiency and the liver depression syndrome, regulate protein expressions in cAMP/PKA signaling pathway of rats and protect the nerves. Albiflorin and paeoniflorin are the material basis of white peony root in nourishing blood and softening the liver.

Keywords: Blood deficiency and the liver depression syndrome; Albiflorin; Paeoniflorin; Nerve-endocrine-immunological network; cAMP/PKA signaling pathway; Animal experiment; Rats

血虚肝郁证为肝血亏虚导致肝失疏泄调达,为肝失疏泄与肝血亏虚同时存在的复合中医证候。现代医学中肝脏能量代谢与物质内影响和中医中肝藏血功能密切相关,肝脏能量代谢同时参与了神经-内分泌-免疫网络内免疫细胞因子和肽类激素等物质的存储及合成^[1-2]。白芍性微寒、味苦,为中医传统的补血药,主要治疗气郁不舒和肝失调达等。白芍既可滋肝阴养肝血,又可敛肝阴柔肝体,是养血柔肝的代表性中药。芍药内酯苷和芍药苷是白芍的主要成分。研究显示,芍药苷有抗惊厥、抑制形成凝血酶原、抗氧化、抗血小板聚集及改善血液微循环等生物学效应,而芍药内酯苷和芍药苷的化学结构近似,为芍药苷同分异构体^[3-4]。因此,本文通过观察芍药内酯苷和芍药苷对血虚肝郁证大鼠模型的影响,探究白芍“养血柔肝”功效物质基础与作用机制及血虚肝郁证证候实质。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取由浙江大学实验动物中心提供健康 SPF 级,雄性 SD 大鼠 48 只,6 周龄,体质量(195.27 ± 15.72) g,实验动物许可证号为:SCXK(浙)2007-0029,饲养大鼠室内温度 23 ~ 26℃,湿度 40% ~ 60%,光照周期为光:暗(12 h : 12 h),适应性喂养 1 周后开始实验。

1.2 药物、试剂及仪器 药物:芍药内酯苷(自制,含量高于 98%),芍药苷(自制,含量高于 96%)。试剂:电泳缓冲液、RIPA 裂解液、磷酸蛋白酶抑制剂、HRP 标记山羊抗大鼠(武汉谷歌生物科技公司生产)。甘氨酸(美国 Solarbio 公司生产)。

仪器:封口机 PF(温州江南机械厂生产,型号:PF-S-200),紫外分光光度计(上海现科仪器公司生产,型号:752-P),电泳仪(北京六一仪器厂,型号:DYY-6C),台式离心机(上海安亭科学仪器厂生产,型号:TGL-16C),磁力搅拌器(常州澳华仪器公司生产,型号:79-1),灰度分析软件(美国 Alpha Innotech 公司生产,型号:alphaEaseFC)。

1.3 动物分组与模型制备 随机数字表法将大鼠分成对照组、模型组、芍药内酯苷组及芍药苷组 4 组,各 12 只。制备血虚肝郁大鼠模型。依据张建军等^[5]的方法,除对照组外,其余各组大鼠采用束缚结合孤养,束缚操作:每天上午 8 点至 11 点束缚 3 h,共束缚 3 周,束缚期间大鼠饮食和光照均正常进行,经过移动束缚筒中内底板位置无损伤将大鼠完全固定,大鼠掉头、进退限制,以不影响排泄、呼吸及不产生压迫感为度。在实验第 8 天时,使用 ⁶⁰Co γ 射线对大鼠全身照射 1 次,照射距离为 4 m,剂量率为 191.55 Gy/h,照射剂量为 3.5 Gy,照射

后各组大鼠继续束缚结合单笼饲养 2 周。大鼠造模第 1 天开始给药,芍药内酯苷组灌胃 30 mg/(kg·d)芍药内酯苷(等于 2 g/kg 白芍饮片),芍药苷组灌胃 30 mg/(kg·d)芍药苷(等于 1.25 g/kg 白芍饮片),对照组和模型组灌胃等剂量生理盐水,共灌胃 3 周。

1.4 观察及检测指标 观察大鼠一般活动情况;灌胃 3 周后将大鼠断头处死,在冰上快速剥离海马,使用高效液相色谱-电化学检测系统检测海马内单胺类神经递质 5-羟吲哚乙酸(5-hydroxyindole acetic acid, 5-HIAA)、去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)、肾上腺素(Epinephrine, E)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺(Dopamine, DA)水平及大鼠大脑皮层内蛋白激酶 A(Protein kinase A, PKA)水平,大鼠腹主动脉取血 6 mL 并在大鼠没有死亡前,快速断头冰上分离并摘取大脑皮层,液氮冷冻保存。用蛋白免疫印迹法检测大鼠海马内脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、环磷酸腺苷(Cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、磷酸化元件结合蛋白(P-cAMP-response element binding protein, P-CREB)及 PKA 蛋白表达状况。

1.5 统计学方法 使用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和独立样本 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般活动情况 与对照组比较,模型组大鼠出现尾巴、耳朵慢慢变苍白,大部分时间懒动,反应迟钝,安静时拱背,眼眶取血时血色较暗红,食量降低等血虚症状,同时伴随对糖水和周边环境敏感性下降,毛发凌乱且色泽晦暗,灌胃时反抗较剧烈,警惕性高,喜欢蜷伏在角落等血虚肝郁特征;与模型组比较,芍药内酯苷和芍药苷组大鼠状态逐渐改善,眼睛、口唇颜色恢复正常,毛发整齐有光泽,活动度较好,对外界刺激较灵敏。

2.2 各组大鼠海马内单胺类神经递质和代谢产物水平比较 见表 1。与对照组比较,模型组大鼠海马内 5-HIAA、NE、E、5-HT 及 DA 水平均降低,差异均有统计学意义(*P* < 0.05);与模型组比较,芍药内酯苷组和芍药苷组大鼠海马内 5-HIAA、NE、E、5-HT 及 DA 水平均较高,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。

2.3 各组大鼠大脑皮层内 PKA、cAMP 水平比较 见表 2。与对照组比较,模型组大鼠大脑皮层内 cAMP、PKA 水平均下

表1 各组大鼠海马内单胺类神经递质和代谢产物水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	5-HIAA	NE	E	5-HT	DA	ng/g
对照组	12	27.47 ± 3.30	28.39 ± 5.40	29.63 ± 5.97	42.37 ± 6.02	110.49 ± 10.82	
模型组	12	22.98 ± 3.28 ^①	21.09 ± 5.32 ^①	19.89 ± 6.07 ^①	35.18 ± 5.81 ^①	86.21 ± 10.94 ^①	
芍药内酯苷组	12	26.09 ± 3.42 ^②	26.08 ± 5.31 ^②	25.75 ± 6.04 ^②	40.29 ± 5.46 ^②	107.58 ± 10.63 ^②	
芍药苷组	12	26.12 ± 3.54 ^②	26.31 ± 5.68 ^②	26.26 ± 6.13 ^②	40.11 ± 5.65 ^②	108.14 ± 10.51 ^②	

与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 芍药内酯苷组和芍药苷组大鼠大脑皮层内 cAMP、PKA 水平均较高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 各组大鼠大脑皮层内 PKA、cAMP 水平比较($\bar{x} \pm s$) pmol/mg

组别	n	PKA	cAMP
对照组	12	0.05 ± 0.02	1.90 ± 0.31
模型组	12	0.02 ± 0.01 ^①	1.34 ± 0.25 ^①
芍药内酯苷组	12	0.04 ± 0.01 ^②	1.84 ± 0.28 ^②
芍药苷组	12	0.04 ± 0.01 ^②	1.82 ± 0.24 ^②

与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

2.4 各组大鼠 cAMP/PKA 信号路径内相关蛋白表达比较 见表3。与对照组比较, 模型组大鼠 PKA、BDNF 蛋白显著降低, P-CREB 蛋白显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 芍药内酯苷组和芍药苷组大鼠 PKA、BDNF 蛋白显著升高, P-CREB 蛋白显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表3 各组大鼠 cAMP/PKA 信号路径内相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$) ppm

组别	n	PKA	BDNF	P-CREB
对照组	12	8.02 ± 0.31	4.02 ± 0.49	1.39 ± 0.63
模型组	12	1.95 ± 0.23 ^①	2.25 ± 0.54 ^①	3.91 ± 0.72 ^①
芍药内酯苷组	12	5.78 ± 0.27 ^②	3.50 ± 0.52 ^②	1.64 ± 0.71 ^②
芍药苷组	12	6.23 ± 0.25 ^②	3.56 ± 0.56 ^②	1.68 ± 0.69 ^②

与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

3 讨论

血虚肝郁证多见于月经不调、虚劳、胁痛及眩晕等妇科和内科疾病中^[6-7]。辐照联合慢性束缚应激建立的血虚肝郁证候模型为经典中医证候模型, 辐照状态下长时间束缚制动会导致大鼠的困境心理应激状况, 在病因上模拟情志病患者前期情志不畅、所愿不遂, 引起肝气郁结的发病特征^[8]。肝藏血, 体获得阴柔则能阳刚; 肝疏泄, 用能阳刚则体得阴柔, 泄藏互用, 相反相成。调肝以养护肝血, 先要柔肝体, 白芍可酸敛气机、阴柔养血, 不仅能够安已乱之气机, 还能够护肝脏之阴血, 切中病机^[9-11]。

单胺类神经递质为调节机体精神活动、行为状态和情绪的主要物质, 包含 5-HT 和儿茶酚胺等, 其中儿茶酚胺包含 DA、E 及 NE 等, 研究显示, 在抑郁症等精神疾病中单胺类神经递

质对患者发病有重要影响^[12-14]。本研究显示, 芍药内酯苷组和芍药苷组大鼠 5-HIAA、NE、E、5-HT 及 DA 水平均高于模型组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 说明芍药苷及芍药内酯苷都能够提升大鼠机体单胺类神经递质含量, 增强外周交感神经的兴奋性。大鼠 cAMP/PKA 信号路径内, G 蛋白耦联受体能够结合很多神经递质, 活化造成腺苷酸环化酶(Adenylyl cyclase, AC)活性上升, 进而使 cAMP 含量升高来激活 PKA, 活化 PKA 可以使 CREB 发生磷酸化, 转录因子活性得到调节, 介导细胞发生对外界刺激反应^[15-16]。BDNF 可以加速神经元分化, 保持神经元成长, 修复神经元损伤。本研究显示, 模型组大鼠海马组织内 BDNF 与 PKA 表达降低, 在灌胃治疗后 PKA 和 BDNF 蛋白较模型组升高, 说明模型组大鼠大脑皮层内 PKA 活性下降、cAMP 水平降低, 同时海马神经元胞内 BDNF 和 PKA 蛋白表达降低, 肝郁血虚大鼠脑组织的神经元内 cAMP/PKA 信号路径紊乱, 并引发神经系统的病理变化, 芍药苷与芍药内酯苷可激活 PKA 活性, 使 cAMP 水平升高, 上调 BDNF 与 PKA 蛋白表达量。

综上, 芍药内酯苷和芍药苷可调节血虚肝郁大鼠神经递质含量, 调控大鼠机体 cAMP/PKA 信号路径内相关蛋白表达, 从而起到保护神经作用, 它们都是白芍养血柔肝的药效物质基础。

【参考文献】

- [1] 朱映黎, 王林元, 赵丹萍, 等. 芍药内酯苷、芍药苷对血虚免疫抑制小鼠的补血作用及机制[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(3): 204-207.
- [2] Joyner RP, Tang JH, Helenius J, et al. A glucose-starvation response regulates the diffusion of macromolecules[J]. Elife, 2016, 5(2): 152-155.
- [3] 王成龙, 王林元, 朱映黎, 等. 芍药内酯苷对放射线辐照法致血虚免疫抑制小鼠的补血作用及机制研究[J]. 环球中医药, 2017, 10(7): 682-687.
- [4] Lin MY, Su YC, Li YZ, et al. Anti-tumor effect of Radix Paeoniae Rubra extract on mice bladder tumors using intravesical therapy[J]. Oncology Letters, 2016, 12(2): 904-910.
- [5] 张建军, 李艳霞, 王景霞, 等. 辐照结合束缚应激致血虚肝郁大鼠证候模型的建立[J]. 中华中医药杂志, 2014,

29(7): 2176-2179.

[6] Boukhenouna S, Mazon H, Branlant G, et al. Evidence that glutathione and the glutathione system efficiently recycle 1-cys sulfiredoxin in vivo[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 22(9): 731-743.

[7] 王成龙, 王林元, 王景霞, 等. 芍药内酯苷、芍药苷对放射线辐照致血虚小鼠 IL-3, GM-CSF, IL-6 及 TNF- α 的影响[J]. *世界中医药*, 2016, 11(8): 1574-1577.

[8] Qiu H, Zhang L, Zhu M, et al. Capture of anti-coagulant active ingredients from Moutan Cortex by platelet immobilized chromatography and evaluation of anticoagulant activity in rats[J]. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 2017, 95(25): 235-244.

[9] 朱映黎, 王林元, 王成龙, 等. 芍药内酯苷和芍药苷对慢性束缚应激大鼠神经营养因子以及一氧化氮影响的研究[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(22): 4240-4246.

[10] 朱映黎, 王林元, 王景霞, 等. 芍药内酯苷对环磷酰胺致血虚小鼠的补血作用及机制[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(5): 1892-1896.

[11] Xie P, Cui L, Shan Y, et al. Antithrombotic effect and mechanism of radix paeoniae rubra [J]. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 1-9.

[12] 李伟, 王景霞, 葛阳, 等. 芍药苷对血虚肝郁证模型大鼠海马谷氨酸及其不同类型受体 mRNA 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(4): 1241-1244.

[13] 王景霞, 周恬恬, 朱映黎, 等. 芍药苷对血虚肝郁证大鼠海马 CA1 区 sGC β 1 和 5 种 PDE 亚型蛋白表达的影响[J]. *环球中医药*, 2016, 9(7): 790-794.

[14] Li X, Shi F, Zhang R, et al. Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Amygdalin and Paeoniflorin After Single and Multiple Intravenous Infusions of Huoxue-Tongluo Lyophilized Powder for Injection in Healthy Chinese Volunteers[J]. *Clinical Therapeutics*, 2016, 38(2): 327-337.

[15] 王成龙, 王林元, 王景霞, 等. 芍药内酯苷及芍药苷对慢性束缚应激配合孤养肝郁模型大鼠行为学及下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(7): 3121-3125.

[16] 周恬恬, 王林元, 王景霞, 等. 芍药苷对血虚肝郁证大鼠海马磷酸二酯酶不同亚型的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2016, 39(4): 288-292.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)

无论国内还是国外
 有中医的地方就有《新中医》
 《新中医》专为中医临床服务
 《新中医》培养名医
 《新中医》造就高手

欢迎订阅 2019 年《新中医》

请到当地邮局订阅
 刊期: 每月1期
 刊号: ISSN 0256-7415 CN 44-1231/R
 邮发代号: 国内46-38 国外M186
 定价: 每期23元, 全年12期共276元
 地址: (510006) 广州市番禺区广州大学城外环东路232号
 广州中医药大学办公楼期刊中心
 联系电话: 020-39354129