

表3 DSQ-03 含药脑脊液最佳剂量筛选的结果

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
1.0000	6	.254667	.0662017	.0270267	.185192	.324141
2.0000	6	.396667	.0761752	.0310984	.316726	.476608
3.0000	6	.549000	.0844322	.0344693	.460394	.637606
4.0000	6	.408667	.0779863	.0318378	.326825	.490508
5.0000	6	.561500	.0604376	.0246735	.498075	.624925
6.0000	6	.667667	.0704121	.0287456	.593774	.741560
7.0000	6	.860667	.0384690	.0157049	.820296	.901037
8.0000	6	.521167	.0336180	.0137245	.485887	.556447
9.0000	6	.493167	.1115964	.0455591	.376053	.610280
10.0000	6	.401667	.0878309	.0358568	.309494	.493840
11.0000	6	.375833	.0941731	.0384460	.277005	.474662
12.0000	6	.390500	.0895226	.0365475	.296552	.484448
13.0000	6	.393333	.0956257	.0390390	.292980	.493686
Total	78	.482654	.1665459	.0188576	.445104	.520204

(SPSS for Windows12.0)

表3说明:高剂量组对神经细胞有毒害作用,比空白组(11-13)OD值明显下降($P < 0.01$),中剂量组(4-6)、低剂量(7-9)组对神经细胞有保护作用,OD值明显增高($P < 0.01$ 或 0.05)。

表4 第7组剂量 MTT 法测定 OD 值的显著性检验

(I) n	(J) n	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
7.0000	1.0000	.6060000 (*)	.0455203	.000	.515090	.696910
	2.0000	.4640000 (*)	.0455203	.000	.373090	.554910
	3.0000	.3116667 (*)	.0455203	.000	.220756	.402577
	4.0000	.4520000 (*)	.0455203	.000	.361090	.542910
	5.0000	.2991667 (*)	.0455203	.000	.208256	.390077
	6.0000	.1930000 (*)	.0455203	.000	.102090	.283910
	8.0000	.3395000 (*)	.0455203	.000	.248590	.430410
	9.0000	.3675000 (*)	.0455203	.000	.276590	.458410
	10.0000	.4590000 (*)	.0455203	.000	.368090	.549910
	11.0000	.4848333 (*)	.0455203	.000	.393923	.575744
	12.0000	.4701667 (*)	.0455203	.000	.379256	.561077
	13.0000	.4673333 (*)	.0455203	.000	.376423	.558244

* The mean difference is significant at the .05 level.

从表 3、4 看出,第 7 组的 OD 值最大,且有显著性差异。

从图 7 看出,第 7 组和其余各组均有统计学差异 ($P < 0.05$)。可认为,第 7 组即:终浓度为 20% 的小剂量组 CSF 为最佳剂量组。

3 讨 论

3.1 脑脊液药理学对研究中枢神经系统疾病的作用

1999 年,我国学者梅建勋、张伯礼^[4]等受到“中药血清药理学”的启发,为探求一种合理有效的研究中药作用与中枢神经系统药效的方法,首次提出“中药脑脊液药理学”的概念。梅建勋、张伯礼^[5]在对比不同浓度血清、中药血清、脑脊液、中药脑脊液对神经细胞的影响,结果表明正常血清和中药血清在三种浓度均出现对细胞的毒害作用。梅建勋、张伯礼^[6,7]于 2000 年初报道了用“中药脑脊液药理学”的方法,研究含中药脑脊液对离体神经元损伤的保护作用。利用体外细胞培养技术,以三种不同浓度血清、中药血清、脑脊液、中药脑脊液培养星形胶质细胞 48h 后,培养液用于培养神经元细胞。结果证明:利用脑脊液进行中药对中枢神经系统的药效观察明显优于血清,推测中药可诱导星形胶质细胞产生神经营养作用。

本研究参考上述学者的实验方法,在此基础上加以完善:(1)选用 CSF 更容易采集到的大动物 Beagle 犬作为含药 CSF 的来源;(2)在动物清醒、不麻醉的情况下采取标本,避免了对动物实施麻醉或处死动物采集标本时,CSF 产生各种有害体液因子对实验结

果的干扰;(3)对动物给药的浓度和剂量进行了更大范围的筛选。

3.2 最佳剂量与神经保护作用 我们在筛选最佳剂量的实验中发现低剂量组的 20% 含药 CSF 对神经细胞的活力保护作用最好,而且不呈明显的线形量效关系。按照 Beagle 犬的给药剂量,如果按照线形的量效关系,20% 的小剂量组与大剂量组的 5% CSF、中剂量组的 10% CSF 含中风醒脑口服液的量都相同,相当于临床用量的 1.63 倍,但对细胞影响的活力差别有显著性差异 ($P < 0.05$)。虽然本次研究不能得到一个明确的量效关系,但是我们可以看出,过高浓度的含药 CSF 对神经细胞的活力呈抑制作用,这与有的学者报道^[8]相同。当剂量降低到一定程度时,对神经细胞的保护作用才能显示出来。所以,在使用脑脊液药理学的方法进行体外实验时,应重视对剂量和浓度的筛选。本实验也提示在临床上使用 DSQ-03 时,应控制剂量,并不是使用的剂量越大对神经细胞的保护作用越好。本研究的结论为今后进行 DSQ-03 中药复方的深入作用机理研究和在体动物剂量研究提供了依据。

参考文献

- [1] 郭建文,刘明洁.活血化瘀中药及复方治疗急性脑出血的 Meta 分析 [J]. 中日友好医院学报. 2001, 15 (5): 283-286.
- [2] Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay [J]. J Neurosci Method, 1987, 20 (1): 83.
- [3] Masada T, Hua Y, Xi G, Yang GY, Hoff JT, Keep RE. Attenuation of intracerebral hemorrhage and thrombin-induced brain edema by overexpression of interleukin 1 receptor antagonist [J]. Neuro-surgery, 2001, 95 (4): 680-686.
- [4] 梅建勋,张伯礼,陆融.药脑脊液药理学方法的建立-清脑益智方对谷氨酸损伤神经保护作用的实验研究 [J]. 天津中医, 1999, 16 (6): 25.
- [5] 梅建勋,张伯礼,陆融.中药脑脊液保护神经元损伤的离体实验研究 [J]. 天津中医, 2000, 17 (5): 36-38.
- [6] 梅建勋,张伯礼,陆融.采用脑脊液药理学方法对中药影响星形胶质细胞神经营养作用的观察 [J]. 中药材, 2000, 23 (8): 467-470.
- [7] 梅建勋,张伯礼,陆融.中药脑脊液药理学研究方法的初建-对中药影响星形胶质细胞神经营养作用的观察 [J]. 中草药, 2000, 31 (7): 523-526.
- [8] 梅建勋,张伯礼,陆融.中药脑脊液药理学研究方法的初建-对中药影响星形胶质细胞神经营养作用的观察 [J]. 中草药, 2000, (7): 523-526.

红花牡丹膏的活血化瘀 抗疲劳作用研究

□ 叶其馨 曾惠芳 冼彦芳 索娟 林吉 陈建南

(广州中医药大学新药中心 广东 广州 510405)

摘要 目的：研究红花牡丹膏的药理作用，为其临床用于骨关节病引起肿胀疼痛、腰肌劳损提供了实验依据。方法：采用热板法、醋酸扭体法、抗疲劳实验、对血液流变学的影响和对微循环的影响实验，进行药效学研究。结果：红花牡丹膏能促进小鼠皮下血斑吸收，显著减少血斑面积并缩短血斑消失时间，并能缩短大鼠创伤性瘀斑消褪时间。可降低血瘀模型大鼠全血比粘度和血浆比粘度；且能明显扩张小鼠耳廓静脉血管口径，具有改善微循环作用；小鼠转棒实验也显示红花牡丹膏有一定的抗疲劳作用。结论：红花牡丹膏具有显著的活血化瘀、抗疲劳、改善微循环作用。

关键词 红花牡丹膏 祛瘀 抗疲劳 改善微循环 实验研究

骨伤科软组织损伤及骨关节病变，常以局部肿胀疼痛为主要特征，是中医常见痛证之一。其病机归纳起来总属瘀血内阻，寒湿袭至，经络不通。中医认为“痛则不通，通则不痛”。红花牡丹膏是由丹皮酚、红花、三七、两面针、川乌、松节油、樟脑、薄荷脑、冰片、肉桂油等多味中药制成的软膏剂，具有消肿止痛、疏经通络、活血化瘀，用于治疗软组织损伤及骨关节病引起的肿胀疼痛等症。临床应用为皮肤给药，根据其功能主治，本文对该药的祛瘀、抗疲劳、改善微循环的药效学进行了研究，现将结果报告如下。

1 实验材料

1.1 受试药物 红花牡丹膏：0.54 g 生药/g 软膏（批号：20040301）；由广东中大南海海洋生物技术国

家工程中心有限公司提供；硫化钠：上海联试化工试剂有限公司（批号：20030302）；空白对照药：空白基质由广东中大南海海洋生物技术国家工程中心有限公司提供。阳性对照：肝素由徐州万邦生化制药有限公司生产（批号：0206108）；青春宝 0.5 g/粒，正大青春药业有限公司（批号：0311024）；盐酸肾上腺素注射液，北京市永康制药厂生产（批号：20010406）；正骨水由广西玉林制药有限责任公司生产（批号：20030913）。

1.2 试验剂量 红花牡丹膏（0.54 g 生药/g），成人临床每日 4~6 次，一次 2g，即每天最大用量为 6.48 g 生药/d，以成人体重 60kg 计，平均用药剂量为 0.108 g 生药/kg/d。本试验小鼠低、中、高三个剂量组，分别设为 1.08、2.16、4.32 g 生药/kg，上述

剂量为临床用药剂量的 10、20、40 倍（按体重计算）；或大鼠低、中、高三个剂量组分别设为 0.54、1.08、2.16 g 生药/kg，上述剂量为临床用药剂量的 5、10、20 倍（按体重计算）。

1.3 动物 NIH 小鼠（合格证号 2003A021）；SD 大鼠（合格证号 2003A013），均由广东省医学实验动物中心提供，符合清洁级标准，正常饲养 3 天后供试。

1.4 仪器 BS110S 电子天平（Sartorius 公司产品）；毛细管放大法装置（自制）；DXP-2 型大小鼠疲劳仪（中国医学科学院药物研究所）；XN-100 型血液比黏度计（上海医大仪器厂）。

2 方法与结果

2.1 祛瘀消肿作用

2.1.1 红花牡丹膏对大鼠创伤性瘀斑的影响 取 SD 大鼠 50 只，体重 180~200g，雌雄兼用，随机分成 5 组，即空白基质对照组、正骨水阳性对照组、红花牡丹膏高、中、低剂量组。实验前一天将大鼠背部用 8% 硫化钠脱毛，然后用老虎钳夹皮肤，造成皮下出血（面积 4×4cm²），一小时后出现瘀斑，随即将药液均匀地涂于瘀斑处，每天两次，每天观察瘀斑消退情况，结果见表 1。

表 1 红花牡丹膏对大鼠创伤性瘀斑的影响 ($\bar{X} \pm SD$, n=10)

组别	动物数 (只)	剂量 (g 生药/kg)	瘀斑消退天数
空白	10	-	8.5 ± 1.3
正骨水	10	5ml	6.9 ± 1.1 **▲
红花牡丹膏	10	0.54	7.1 ± 1.2 *▲
红花牡丹膏	10	1.08	6.7 ± 1.2 **▲
红花牡丹膏	10	2.16	6.4 ± 1.1 **▲

注：与空白基质组比较，* $P < 0.05$ ，* * $P < 0.01$ ；与阳性对照组比较▲ $P > 0.05$ 。

2.1.2 红花牡丹膏对小鼠血瘀模型 参照文献方法^[4,5]，作适当改进，制备皮下血斑模型。将制成皮下血斑模型的 60 只 NIH 小鼠（雌雄各半）随机均分 5 组，即空白基质组、红花牡丹膏低、中、高剂量组、正骨水阳性组。4 小时后，测定血斑面积，作为给药前血斑面积。立即给药，每日在血斑上部涂药，一天两次，连续 7 天。并每天测定血斑面积 1 次，直至血斑消失，7 天仍未消失者，按 7 天计。第 3 天开始即有部分小鼠的血斑消失。故只比较血斑消失时间和第 1、第 2、第 3 天的血斑面积，结果见表 2。

表 2 红花牡丹膏对小鼠皮下血斑吸收的影响 ($\bar{X} \pm SD$, n=10)

组别	剂量 (g 生药/kg)	血斑面积 (mm ²)				血斑消失时间 (d)
		给药前	1d	2d	3d	
空白基质	-	94.3 ± 11.7	73.8 ± 12.4	55.7 ± 10.4	31.7 ± 7.8	5.7 ± 0.7
正骨水	10ml	93.4 ± 10.8	61.1 ± 6.6 **	44.8 ± 7.9 **	13.8 ± 10.5 **	4.5 ± 0.9 **
红花牡丹膏	1.08	96.0 ± 12.4	65.1 ± 5.8 *	46.3 ± 8.5 *	24.0 ± 7.4 *	4.9 ± 0.5 *▲
红花牡丹膏	2.16	95.2 ± 10.5	60.7 ± 9.0 **	40.6 ± 5.6 **	20.8 ± 8.7 **	4.8 ± 0.8 *▲
红花牡丹膏	4.32	100.0 ± 10.4	56.6 ± 13.0 **	37.3 ± 10.1 **	15.3 ± 6.7 **	4.2 ± 0.4 **▲

注：与空白基质组比较：* $P < 0.05$ ；* * $P < 0.01$ ；与阳性对照组比较▲ $P > 0.05$ 。

2.2 抗疲劳作用

2.2.1 红花牡丹膏对小鼠耐缺氧的影响 取 NIH 小白鼠 72 只，雌雄各半，体重 18~22g，随机分成 6 组，即空白基质组、正骨水阳性对照组、青春宝阳性对照组、红花牡丹膏低、中、高给药组。除青春宝阳性对照组每天灌胃给药外（给药容积为 20ml/kg），

其余各组每天涂药 1 次（给药前一天用 8% 硫化钠脱毛），空白对照组涂等量的基质，连续 7 天，末次给药 1h 后，将小鼠单个放入装有钠石灰的 250ml 广口瓶中，瓶盖周围涂以凡士林，以保证密封，观察小鼠缺氧死亡时间。结果见表 3。

表3 红花牡丹膏对小鼠耐缺氧试验的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

组别	动物数 (只)	剂量 (g 生药/kg)	耐缺氧时间 (分钟)
空白基质	12	-	29.5 ± 5.6
青春宝	12	2.0	34.8 ± 5.5 *
正骨水	12	10ml	31.9 ± 3.7
红花牡丹膏	12	1.08	32.8 ± 2.2 ▲
红花牡丹膏	12	2.16	31.0 ± 3.1 ▲
红花牡丹膏	12	4.32	30.3 ± 3.3 ▲

注:与空白基质组比较, * $P < 0.05$; 与阳性对照组比较 ▲ $P > 0.05$ 。

2.2.2 对小鼠游泳时间的影响 取 NIH 小鼠 72 只, 雌雄各半, 体重 18 ~ 22g, 小鼠游泳时间实验方法按文献记载常规进行, 结果见表 4。

表4 红花牡丹膏对小鼠游泳时间的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

组别	动物数 (只)	剂量 (g 生药/kg)	游泳时间(秒)
空白基质	12	-	491.2 ± 89.8
青春宝	12	2.0	563.8 ± 65.2 *
正骨水	12	10ml	539.8 ± 64.9
红花牡丹膏	12	1.08	505.1 ± 44.1 ▲
红花牡丹膏	12	2.16	531.1 ± 50.9 ▲
红花牡丹膏	12	4.32	544.3 ± 52.8 ▲

注:与空白基质组比较, * $P < 0.05$; 与阳性对照组比较 ▲ $P > 0.05$ 。

2.2.3 对小鼠协调运动能力及耐力的影响 取 NIH 小鼠 90 只, 雌雄各半, 体重 18 ~ 22g, 以转棒法观察(转速 12 转/min), 选用在棒上停留 3min 以上的动物

60 只, 随机分为 5 组, 即生理盐水空白对照组、正骨水阳性对照组、红花牡丹膏低、中、高给药组。每天涂药 1 次, 空白对照组涂等量的基质, 连续 7 天, 末次给药后 1 小时, 按转棒法测定 5 min 内各组小鼠从棒上跌落的次数, 结果见表 5。

表5 红花牡丹膏对小鼠协调运动能力及耐力的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

组别	动物数 (只)	剂量 (g 生药/kg)	跌落次数(5Min)
空白基质	12	-	4.1 ± 1.6
正骨水	12	10ml	2.4 ± 1.6 *
红花牡丹膏	12	1.08	2.8 ± 0.7 **▲
红花牡丹膏	12	2.16	2.5 ± 1.0 **▲
红花牡丹膏	12	4.32	2.3 ± 1.0 **▲

注:与生理盐水组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与阳性对照组比较 ▲ $P > 0.05$ 。

2.3 对血液流变学的影响 取 SD 大鼠 60 只, 随机分为 6 组, 即正常对照组、血淤模型组对照组、正骨水阳性药物组、红花牡丹膏低、中、高剂量组。每天涂药一次, 对照组给予等量空白基质, 除正常对照组外, 各组每天用冷开水灌胃 (5ml/只), 连续 7 天。于第七天除正常对照外, 其余各组皮下注射肾上腺素 (0.08 ml/100g), 共 2 次, 间隔 4h。在二次注射肾上腺素之间 (前后各间隔 2 小时) 将大鼠浸入冰水中 5min, 处置后禁食不禁水, 于第八天各组动物眼眶取血, 肝素抗凝, 分别测定全血比粘度、血浆比粘度。结果见表 6。

表6 红花牡丹膏对大鼠血液流变学的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

组别	剂量 (g 生药/kg)	动物数 (只)	全血比粘度	血浆比粘度
正常对照组	-	10	7.60 ± 0.62	1.78 ± 0.20
模型	-	10	12.64 ± 2.33 ▲▲	2.20 ± 0.37 ▲▲
正骨水	10ml	10	10.42 ± 1.07 **	1.80 ± 0.14 *
红花牡丹膏	0.54	10	10.50 ± 0.87 *	1.881 ± 0.16 *
红花牡丹膏	1.08	10	9.99 ± 0.51 **	1.82 ± 0.13 **
红花牡丹膏	2.16	10	9.37 ± 0.91 **	1.80 ± 0.07 **

注:与正常对照组比较: ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。