

· 基础研究 ·

桃红四物汤有效成分的交互作用及其对血清 VEGF 浓度的影响

熊辉¹, 李前¹, 谈立明¹, 杨腊平²

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

摘要 目的:探讨桃红四物汤主要有效成分的交互作用及其对血清 VEGF 浓度的影响。方法:从桃红四物汤中提取 4 类有效成分:总生物碱(A)、总苷(B)、总多糖(C)和总挥发油(D),按照前期实验所得结果(主要成分为 A,次要为 B、C、D),对清洁级小白鼠徒手定点折骨造模后进行实验。按照 $L_8(2^7)$ 正交设计方案分组,观察分析其对血清 VEGF 浓度的影响,探讨主要成分之间是否存在交互作用。结果:骨折造模后断端局部出现 VEGF 蛋白高表达,提取物组表达量显著高于模型组($P < 0.05$);动态观察结果,第 2 时相点(15 d)以内表达量逐渐升高,在第 15 天出现表达峰值,此后表达量开始下降;各组间比较,1~8 组、10 组 3 个时相点表达量均明显高于 9 组;在表达峰值(15 d)后 VEGF 表达量下降过程中,提取物及浓缩剂药物使表达量下降程度减缓,使其在第 3 时相点(25 d)断端骨痂组织内仍维持高量 VEGF 蛋白表达。正交实验表明,B 药取水平 1 与水平 2 差异有统计学意义($P < 0.05$),C 药和 D 药取水平 1 与水平 2 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:有效成分总生物碱与总苷有交互作用,与总多糖和总挥发油无交互作用;总苷、总多糖与总挥发油之间也无交互作用。

关键词 桃红四物汤 有效成分 交互作用 骨折愈合 血清 VEGF

The interactions of Taohongsiwu Decoction's effective constituents and the influences on the VEGF protein expression of serum XIONG Hui*, LI Qin, TAN Li-ming, et al. * Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China.

ABSTRACT Objective: To explore the interactions of Taohongsiwu Decoction's (THSWD's) effective constituents and the influences on the dynamic change of VEGF protein expression of serum. **Methods:** Based on the former experiment, we extracted 4 effective constituents from THSWD: A (total alkaloids TA) who is the principal, B (total glycosides TG), C (total polysaccharide TPS) and D (volatile oil TVO) who is the secondary, executed experiment on the musculus albus after bare-handed fixed-point bone snapped, layed 8 groups according to the orthogonal design proposal, analyzed the VEGF protein expression of serum, which in order to study on whether there is interactions on Taohongsiwu Decoction's (THSWD's) principal and secondary or not. **Results:** There was higher VEGF expression after fracture molding than in the model ($P < 0.05$). The result of dynamic viewing indicated that VEGF expression quantity was more in 1~8 group and in 10 group than in 9 group ($P < 0.05$), and the quantity of VEGF expression increased at the 15th day and reached the peak value. Then the quantity of VEGF expression decreased but more slowly in the extraction group, which made the higher concentrations of expression were maintained in the region of bone stump. The orthogonal experiment indicated that there was obvious difference between B's level 1 and level 2 ($P < 0.05$). But there was no difference between C's or D's level 1 and level 2 ($P > 0.05$). **Conclusion:** there was interactions between TA and TC, but there was no interactions among TA, TPS and TVO, and so did among TC, TPS and TVO.

Key words TAOHONG SIWU DECOCTION; effective constituents; interaction; healing of fracture; callus; histomorphology; Vascular endothelial growth factor (VEGF) of serum.

桃红四物汤是中医活血化瘀法治疗骨折的代表方剂,前期实验得出该方促进骨折愈合的主要成分是总生物碱,次要成分为总苷、总多糖、总挥发油,并从

干预实验鼠骨折断端微血管调控因子(Vascular endothelial growth factor VEGF)蛋白表达的角度,探讨了该方主、次要成分之间的交互作用^[1]。然而这些成分对全身血清 VEGF 浓度是否存在影响,未见报道。本研究拟从其对血清 VEGF 浓度影响的角度,探讨其主次

要成分之间是否存在交互作用。

1 实验药物

实验药物用桃红四物汤原方:桃红 20 g、红花 10 g、当归 20 g、生地 20 g、赤芍 20 g、川芎 10 g,全方每剂生药总量为 100 g。组方中药物均按《药典》所载道地药材的指定主产地由湖南中医学院附一院药剂科一次购进,经水煎煮浓缩制备出浓缩液,采用水提醇沉法提取总苷类、总生物碱类、总多糖类;采用蒸馏法提取总挥发油类。获得总生物碱 $2.06 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (生药,下同),总苷 $1.18 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,总多糖 $1.24 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,总挥发油 $0.23 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。根据前期急毒实验所得各类有效成分部位小鼠实验用药剂量为:总生物碱为生药 $2.946 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重,总多糖为生药 $12.976 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重,总甙为生药 $11.684 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重,总挥发油为生药 $4.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重。

2 实验动物

实验动物用 3 月龄昆明清洁级小鼠 120 只,体重 $18 \sim 22 \text{ g}$ 。120 只实验鼠根据要求一次选定并按顺序编号 1~120,先采用查随机数字表法分为 30 小组,每小组 4 只;再按随机数字表合为 10 大组,用阿拉伯数字 1、2、3、4、5、6、7、8、9(模型组)、10(水提浓缩剂组)表示,每组分别含 3 个小组即每组 12 只动物。参照

表 1 主、次要成分交互作用分析的因子和剂量水平

水平	主要成分($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)		次要成分($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	
	A(总生物碱 2.988)	B(总苷 11.53)	C(总多糖 13.432)	D(总挥发油 4.6)
1	用药灌胃	用药灌胃	用药灌胃	用药灌胃
2	用药灌胃	不用药灌胃	不用药灌胃	不用药灌胃

3.2 标本取材方法 每组分别在药液灌胃治疗后第 5、15、25 天分 3 个时相点处死动物,各组每时相点处死 4 只。采用断头法处死实验鼠,沿左大腿外侧剖开,暴露股骨骨折断端,剥离周围软组织,在距骨折处上、下端各 5 mm 左右,用牙科台式磨钻截取骨痂标本^[2]。将骨痂标本置于 4% 多聚甲醛中分瓶固定。

3.3 标本制备方法 将冷冻血清取出后采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测血清 VEGF 含量,选用鼠 VEGF 试剂盒(由上海森雄科技实业有限公司提供)。该试剂盒采用辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合,加入酶底物使之显色,测 OD 值,以求出小鼠 VEGF 浓度。

3.4 VEGF 定量酶联检测 各时相点标本采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测血清 VEGF 含量,并作定量计数统计。其检测程序如下。①标准品液制备:使

柴氏定点手法折骨术左手掌控制小鼠,并以拇、食指固定小鼠下肢股骨中点,用右手拇、食指于该点向内折骨,听到骨折声响后恢复原位,不予固定,术后放置于笼中自由活动进食。造模过程不予麻醉,以模拟创伤过程中精神和疼痛刺激。第 1~8 组实验鼠均在造模手术完全恢复约 4~6 h 后进行给药实验,给药途径采用灌胃法灌胃,每天 2 次。各处方组按表 1 和表 2 方案灌胃药物,9 组灌胃生理盐水,10 组灌胃给桃红四物汤水提浓缩制剂,即 100% 浓度药液 0.3 mL (含 0.3 g 生药)。

3 实验方法

3.1 因素水平的确定 根据前期实验结果所确定的主、次要药效成分进行实验^[1]。主要成分为总生物碱类(A),次要成分为总苷类(B)、总多糖类(C)、总挥发油类(D)。按两水平正交试验设计,以主要成分为基础因素(即两水平均取用药灌胃),次要成分取用药灌胃和不用药灌胃(生理盐水灌胃)两个水平,考虑次要成分之间及与主要成分之间的交互作用,进行正交表头设计,按相应正交表分布,组成若干处方组进行实验。根据结果确定主、次要成分间是否存在交互作用。为此,采用 $L_8(2^7)$ 正交实验进行交互作用分析。各有效成分所取剂量水平见表 1。

用前每管中加入蒸馏水 200 μL 溶解后即可。②洗涤液制备:用重蒸水 1:20 稀释。③低物工作液配制:显色前 5~10 min 将 OPD 片放入底物稀释液中溶解,每片加液 5 mL。④备实验板条:实验前 20 min 从冰箱中取出试剂盒,以平衡至室温,取出所需数量的板条。⑤建立标准曲线:设标准孔 8 孔,每孔中各加入样品稀释液 100 μL ,第 1 孔加标准品 100 μL ,混匀后用加样器吸出 100 μL ,移至第 2 孔,如此反复作对倍稀释至第 7 孔,最后从第 7 孔中吸出 100 μL 弃去,使之体积均为 100 μL (第 8 孔为空白对照)。⑥加样:待测品孔中每孔各加待测样品 100 μL 。⑦待反应:将反应板置 37 $^{\circ}\text{C}$ 室温下置放 120 min。⑧洗板:用洗涤液将反应板充分洗涤 4~6 次,向滤纸上印干。⑨加一抗液:每孔中加入一抗工作液 50 μL 。⑩待反应:将反应板充分混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 室温下再置 60 min。⑪洗板:同

前。⑫加酶标抗体:每孔加酶标抗体工作液 100 μL 。
 ⑬待反应:再将反应板置 37 $^{\circ}\text{C}$ 室温下置 60 min。
 ⑭洗板:同前。⑮待反应:每孔加入底物工作液 100 μL ,
 再在 37 $^{\circ}\text{C}$ 室温下置暗处反应 5 ~ 10 min,然后每孔加入
 50 μL 终止液混匀。⑯测值:在 492 nm 处测吸光
 值,然后经过计算机自动打印结果,所有 OD 值都先
 减除空白值后再行计算,以标准品 1000、500、250、
 125、62.5、31.25、15.62、0 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 值在半对数纸上
 作图,画出标准曲线,将浓度作为 X 轴(对数轴),OD
 值作为 Y 轴(线性轴)。根据样品 OD 值在该曲线图
 上查出相应小鼠 VEGF 含量。每小组以 4 只小鼠
 VEGF 浓度值均值作为计数值。

3.5 统计方法 将各标本观察计数均值数据分别输入
 SPSS13.0 for windows 进行参数描述($\bar{x} \pm s$)并选择正交
 设计方差分析(F 检验)和 q 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

4 结果

骨折造模后全身血清 VEGF 浓度升高,提取物组
 浓度显著高于模型组($P < 0.05$);动态观察结果,第 2
 时相点(15 d)以内浓度逐渐升高,在第 15 天出现表
 达峰值,此后浓度开始下降;各组间比较,1 ~ 8 组、10
 组前 2 个时相点浓度均明显高于 9 组,提示提取物处

方组以及原方水提浓缩剂组药物有增强血清 VEGF
 浓度的作用,在峰值(15 d)后 VEGF 浓度下降过程
 中,提取物及浓缩剂药物使浓度下降程度减缓,其中
 第 1、10 组药物对减缓下降趋势的作用最强,使 1、10
 组在第 3 时相点(25 d)血清内仍维持高量 VEGF 浓
 度。按 $L_8(2^7)$ 正交实验方差分析法分析,总苷类取
 水平 1 和水平 2 差异有统计学意义($P < 0.05$),而总
 多糖和总挥发油类取水平 1 和水平 2 均无统计学意
 义($P > 0.05$)。血清 VEGF 浓度计数结果见图 1 及表
 2、表 3。

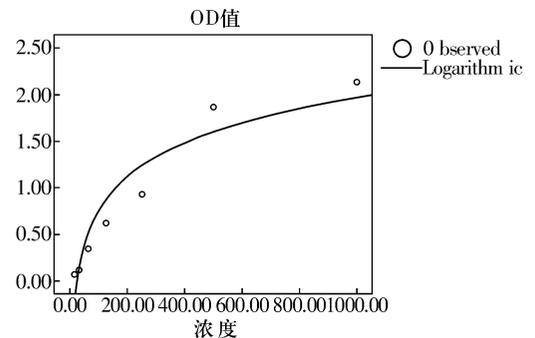


图 1 VEGF 浓度 - OD 值图
 标准曲线方程: $Y = -1.68 + 0.53(\ln X)$
 X 为浓度值 Y 为 OD 值

表 2 不同时相点组间血清 VEGF 含量统计分析结果 $\bar{x} \pm s$ $n = 4$

组别	观察时相点(天)		
	A(5d)	B(15d)	C(25d)
1	124.03 \pm 12.03 ²⁾⁴⁾	713.74 \pm 2.80 ²⁾⁴⁾	151.84 \pm 16.08 ²⁾³⁾
2	111.05 \pm 7.08 ²⁾⁴⁾	705.25 \pm 3.55 ¹⁾⁴⁾	142.11 \pm 4.89 ²⁾
3	105.46 \pm 2.63 ¹⁾⁴⁾	688.86 \pm 1.83 ¹⁾⁴⁾	134.56 \pm 2.68 ¹⁾
4	103.00 \pm 2.91 ⁴⁾	643.04 \pm 4.12 ⁴⁾	130.99 \pm 13.36 ¹⁾
5	88.63 \pm 7.02 ⁴⁾	530.60 \pm 8.13 ⁴⁾	118.87 \pm 11.75
6	81.11 \pm 2.36 ⁴⁾	527.26 \pm 6.83 ⁴⁾	116.52 \pm 8.04 ³⁾
7	77.54 \pm 3.00 ⁴⁾	527.13 \pm 14.73 ⁴⁾	111.39 \pm 7.34 ³⁾
8	77.26 \pm 5.06 ⁴⁾	520.45 \pm 5.93 ⁴⁾	109.25 \pm 6.94 ⁴⁾
9	29.78 \pm 3.43	133.22 \pm 5.70	144.56 \pm 3.51
10	135.97 \pm 6.91 ²⁾⁴⁾	790.48 \pm 7.48 ²⁾⁴⁾	153.84 \pm 4.07 ²⁾³⁾

注 与 8 组比较,1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$; 与 9 组比较,3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$

5 讨论

通过 ELISA 法测量外周血血清中 VEGF 浓度可
 以精确反映外周血中血管内皮生长因子的浓度^[3,4];
 研究证实桃红四物汤有效部位不同组合能促进骨痂
 的 VEGF 高表达,促进骨折的愈合;然而桃红四物汤
 其有效部位不同组合在促进骨痂的 VEGF 高表达的
 同时,在全身血清中 VEGF 浓度的影响如何,目前尚
 无报导。本实验中血清 VEGF 浓度检测结果显示,骨
 折后全身血清 VEGF 浓度升高,浓度显著高于模型组

($P < 0.01$);观察结果显示,第 2 时相点(15 d)以内
 浓度逐渐升高至峰值,此后浓度开始下降,与骨痂
 VEGF 蛋白表达结果一致。各组间比较结果提示,提
 取物处方组以及原方水提浓缩剂组药物有显著增强
 血清 VEGF 浓度的作用,在峰值(15 d)后 VEGF 浓度
 下降过程中,提取物及浓缩剂药物使浓度下降程度减
 缓,使其在第 3 时相点(25 d)血清内仍维持高量
 VEGF 浓度。经 $L_8(2^7)$ 正交实验方差分析,总苷类取
 水平 1 和水平 2 差异有统计学意义($P < 0.05$),而总

多糖和总挥发油类取水平 1 和水平 2 均无统计学意义($P > 0.05$),表明有效成分总苷类与总生物碱类之间存在交互作用;而总挥发油类与总生物碱类无交互作用,总苷类、总挥发油和总多糖类彼此之间亦无交互作用。

由此证明桃红四物汤有效成分不仅能促进骨痂局部微血管生长调控因子 VEGF 的表达,同时能提高全身血清 VEGF 的浓度,从而促进微血管新生,加速骨折愈合。

表 2 $L_8(2^7)$ 正交实验表及血清 VEGF 浓度统计结果 $\bar{x} \pm s$ $n = 12$

处方号	列号							处方组成	指标检测
	1B	2C	3B + C	4D	5B + D	6C + D	7B + C + D		血清 VEGF 浓度
1	1	1	1	1	1	1	1	A + B + C + D	329.87 ± 28.95
2	1	1	1	2	2	2	2	A + B + C	319.46 ± 85.26
3	1	2	2	1	1	2	2	A + B + D	309.62 ± 80.36
4	1	2	2	2	2	1	1	A + B	292.34 ± 59.39
5	2	1	2	1	2	1	2	A + C + D	246.03 ± 20.73
6	2	1	2	2	1	2	1	A + C	241.63 ± 21.56
7	2	2	1	1	2	2	1	A + D	238.69 ± 23.70
8	2	2	1	2	1	1	2	A	235.65 ± 20.85
								模型组	102.36 ± 53.94
								水提浓缩剂	360.10 ± 38.00
Σ I	1251.29	1136.99	1123.67	1124.21	1116.77	1103.89	1102.53		
Σ II	962.00	1076.30	1089.62	1089.08	1096.52	1109.70	1110.76		
R	-289.29	-60.69	-34.05	-35.13	-20.25	5.81	8.23		
P	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05		

6 参考文献

[1] 熊辉,左亚杰,丁志高,等.桃红四物汤干预骨痂微血管新生及 VEGF 表达的实验研究[J].中国医师,2004,6(2):195-197.

[2] 柴本甫,过邦辅.理气药物对骨折愈合影响的初步研究[J].中华外科杂志,1962,1(10):299-304.

[3] Span PN, Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot J, et al. EORTC Receptor and Biomarker Study Group Report: a sandwich en-

zyme-linked immunosorbent assay for vascular endothelial growth factor in blood and tumor tissue extracts[J]. Int J Biol Markers, 2000, 15(12):184-191.

[4] Clare R, Ozawa, Andrea B, et al. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2004, 113(4):516-527.

(2010-04-14 收稿 2010-05-30 修回)

· 通 知 ·

全国水针刀三氧消融术尸体解剖研修班及中华筋骨三针法学习班通知

水针刀三氧消融术及筋骨针法是由中国骨伤微创水针刀学术委员会会长、张仲景国医学院教授、广东省中医院主任导师吴汉卿教授在水针刀疗法的基础上,结合三氧治疗仪所研发的新技术,研制发明的多用系列筋骨针具已获国家专利,并创立了十大筋骨针法(已编入骨伤教材),出版了《中华筋骨三针疗法》。该项技术的培训班已举办 180 余期,来自国内包括台湾、香港等地区及国外(马来西亚、新加坡、韩国)的万余名医生学习、掌握了该技术。为满足广大医师要求,现继续举办以下研修、学习班:

水针刀三氧融盘术及尸体解剖研修班:由吴汉卿教授主要传授:水针刀新针法治疗骨伤颈肩腰腿痛病、水针刀三氧融盘术。应用水针刀法结合新鲜尸体详细讲解三针法安全入路法、配合独特松解液及椎间孔扩张术、侧隐窝分离术。新颖的三针法理论、独特的十大针法、结合尸体刀法入路、水针刀挂图,有专科医院手术病人治疗,同时讲解影像诊断,保证每位学员能够独立操作。临床上可治疗腰椎间盘突出症,对颈肩腰腿痛患者具有较好的疗效。

脊柱九病区药磁线植入技术:传授独特的脊背九大诊疗区,临床应用水针刀分离、磁线留置并配合整脊手法,快速治疗脊柱相关病,如颈源性心脏病、颈性咽炎、面瘫、三叉神经痛、癫痫病、慢性支气管炎、哮喘、胃炎、胃溃疡、结肠炎、生殖疾病等。

中华筋骨三针法学习班:中华筋骨三针法是吴汉卿教授在水针刀针法九针疗法基础上,根据人体生物力学,提出了人体软组织立体三角平衡学说,创立了平衡三针法。该班传授筋骨三针法原理、三针定位法、十大针法技巧。该法主要治疗:颈椎病、颈 1 横突综合症、颈 7 棘突综合症、肩关节周围炎、肌筋膜炎、腰椎间盘突出症、股骨头坏死症、膝关节骨关节炎、神经痛、类风湿性关节炎、脊柱相关病等。

其他:参加学习班者将授予国家级中医药 I 类继续教育学分(项目编号:390206382)

开学时间:2011 年每月 1 日开课,需提前 2 日报到

报到地址:河南省南阳市仲景路与天山路口(水针刀专科医院)

邮政编码:473000 联系电话:0377-63282507,13721820657 联系人:黄建

网址:www.shuizhendao.com 邮箱:shuizhendao@163.com