

基于吴茱萸汤相关功效从平滑肌角度 探讨其质量控制的可行性*

□王秀坤 雷 帆 (清华大学生物科学与技术系药物药理研究室 北京 100084)
曹兰秀 (陕西中医学院基础部 咸阳 712083)
王玉刚 (清华大学生物科学与技术系药物药理研究室 北京 100084)
王智民 (中国中医科学院中药研究所 北京 100700)
杨秀伟 (北京大学天然与仿生药物国家重点实验室 北京 100191)
张启伟 (中国中医科学院中药研究所 北京 100700)
杜力军** (清华大学生物科学与技术系药物药理研究室 北京 100084)

摘 要:目的:观察吴茱萸汤对平滑肌的活性及其特点,并探讨其作为全方质量控制方法的可行性。方法:利用体外实验从组织水平对血管、胃、小肠和子宫平滑肌收缩活性进行观察。结果:吴茱萸汤对血管平滑肌具有先收缩后舒张的双向作用,降低胃平滑肌的张力,对小肠及子宫平滑肌收缩具有明显的抑制作用。作为君药的吴茱萸与吴茱萸汤结果相近。其它组成药物则没有明显的作用。结论:吴茱萸汤的这种对不同平滑肌的收缩舒张的不同作用,可以作为对该方综合评定的指标。

关键词:吴茱萸 平滑肌 质量控制 药效

吴茱萸汤主要由吴茱萸、人参、生姜和大枣组成,是《伤寒论》的经方。主要用于治疗肝胃虚寒,浊阴上逆所致“食谷欲吐”,“手足厥冷”、烦躁欲死,“干呕,吐涎沫,头痛者”(《伤寒论》)。临床上用于治疗内科、妇科、神经科、五官科、外科、眼科等多种疾病,其中以耳源性眩晕和血管神经性头痛为多见^[1-3]。吴茱萸汤还用于治疗寒湿凝滞所致痛经,并取得较好的疗效^[4],提示吴茱萸汤对子宫平滑肌具有一定的活性。动物实验表明,吴茱萸汤水提醇沉物可以抑制

硫酸铜所致家鸽呕吐,抑制小鼠胃排空,抑制体外大鼠胃条收缩的作用^[5]。其主要止呕活性部分在50~70%乙醇洗脱液内^[6]。吴茱萸汤还具有明显增强小鼠脑血流的作用^[7]。在以往的报道中所表现出来的对血压结果的不一致性,均提示了其对血管平滑肌的双重作用。如以吴茱萸煎剂注射时,对实验狗具有升高血压的作用,恢复后有轻度下降。吴茱萸的水提醇沉液制成注射剂增加麻醉犬后肢血管阻力。吴茱萸的煎剂、冲剂或蒸馏液静注或灌胃对犬都有显著降压作用。吴茱萸水醇提取物给麻醉猫注射具有升高血压的作用^[8]。此外该方还有较好的镇

收稿日期:2009-02-04

修回日期:2009-03-20

* 国家科技部“十一五”科技支撑项目(2006BAI08B03-09):中药复方质量控制与评价方法研究-吴茱萸汤,药效负责人:杜力军。

** 联系人:杜力军,本刊编委,博士研究生导师,主要研究方向:药理学研究,E-mail:lijundu@mail.tsinghua.edu.cn。

痛作用^[9-11]。吴茱萸汤化学成分研究表明,该方中分离得到的化学成分主要为吴茱萸生物碱类(主要为吴茱萸次碱、吴茱萸碱),喹啉酮类,人参皂苷类(Rg1、Re、Rb1等)成分^[12]。

从其功效及相关药理实验结果分析,吴茱萸汤主要作用靶器官应该与平滑肌密切相关。本着靶组织明确、易操作的前提,我们以血管、胃、小肠以及子宫平滑肌为主要材料,对吴茱萸汤体外进行实验观察,并对平滑肌实验结果用于吴茱萸汤质量控制的可行性进行了探讨。

一、材料与方法

1. 药品与试剂

吴茱萸汤,由中国中医科学院中药所植化室提供。主要由吴茱萸、人参、大枣、生姜组成。按照成方剂量水提80%乙醇沉淀,取上清浓缩干燥。使用时称取一定重量,用生理盐水溶解配至所需浓度,将溶液置于分子量100D的透析袋内,4℃蒸馏水透析过夜,取袋内溶液用于实验。吴茱萸、人参、生姜和大枣提取物均由上述单位提供,其制备工艺及样品前处理同吴茱萸汤。Krebs缓冲液(mmol/L):NaCl 118,KCl 4.7,KH₂PO₄ 1.2,MgSO₄ 1.2,NaHCO₃ 25,CaCl₂ 1.5,葡萄糖 5.5,pH 7.4。

2. 仪器

肌肉张力换能器(JZJ01型,30g),RM6240BD多通道生理信号采集处理系统:成都仪器厂。恒温蠕动泵(MODEL210);PolyScience,USA。麦氏浴槽(25mL):Kent Science Corporation,USA。

3. 实验动物

Wistar大鼠,雌雄兼用,清洁级,体重180~250g;ICR小鼠,雌性,清洁级,体重22~25g;购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2007-0001。

4. 实验方法

(1)对血管平滑肌的影响。

大鼠颈椎脱臼处死后,迅速取出胸主动脉,置于4℃氧饱和的Krebs液中,去除血块和血管周围结缔组织。血管被均匀切成3~4mm长的血管环,套入上下平行的两个不锈钢钩。整个血管环,置于20mL恒温(37℃)通气(95%O₂+5%CO₂)的Krebs液中。经张力传感器,由RM6240BD多通道生理信号采集处理仪记录张力变化。保持静止张力2g,平衡

30min以上,直到血管张力平稳,期间每隔15min换一次新鲜的Krebs液。加入KCl 50mM收缩血管环3次,以诱发血管环的最大收缩幅度。待血管环重新稳定后加入药物,观察血管收缩舒张引起的张力变化。以KCl诱发最大收缩幅度为100%,药物诱发血管收缩的幅度与KCl诱发最大收缩幅度之间的比率为血管收缩率。

(2)对胃、小肠及子宫平滑肌条的影响。

取小鼠,禁食不禁水24h,颈椎脱臼处死,迅速剪取与十二指肠相连的空肠约2cm,同时取胃底全层肌标本,并Krebs液冲洗小肠及胃内容物。取未孕小鼠的卵巢与子宫分叉处之间的中段子宫,剪除周围组织。各肌条一端分别用手术缝线将肌条扎紧打结连于张力换能器,另一端打结后再结一个直径约0.5cm的环固定于浴槽底部的玻璃弯钩上,浴槽中装入20mL恒温(37℃)通气(95%O₂+5%CO₂)的Krebs液。胃肌条给予1g的前负荷温育,每20min更换一次新鲜的Krebs液(37℃)。温育1h左右,待肌条的自发活动平稳后加入药物。记录给药前5min,给药后30min胃平滑肌条的收缩波的频率、平均振幅和张。小肠及子宫平滑肌条温育15~20min后,待肌条的自发活动平稳后加入药物。记录给药前5min,给药后5min子宫平滑肌条的收缩波的频率、平均振幅和张。其中张力以每次收缩最低点表示;强度幅度以每次收缩所达到的最高点表示;频率每次收缩次数;子宫活动力以强度和频率的乘积表示。

(3)数据分析。

所得结果经RM6240BD软件进行数据处理,用MicrosoftExcel2000软件中的t检验对组间进行显著性比较分析。

二、结果

1. 对血管平滑肌的影响

吴茱萸汤体外给予血管条后,表现出先收缩后舒张的双向调节活性。其中收缩较快且幅度明显,一般均会达到50mM KCl所致血管收缩的50%以上。重现性好,可重复性强。这种血管收缩和舒张的双向性,以及收缩幅度的稳定性可以用作吴茱萸活性的控制指标。即:①血管须表现出收缩舒张双重性;②收缩幅度须达到50mM KCl所致血管收缩的50%以上(见图1)。从吴茱萸汤所组成的方药血管活性试验结果看,在此试验条件下,吴茱萸与吴茱萸汤具有类

似的收缩血管活性,其它组成药物则没有明显的作用(见图2)。

2. 对小肠平滑肌的影响

吴茱萸汤体外给予小肠后,表现出收缩幅度的抑制作用,收缩频率改变不明显。10min内收缩幅度的抑制率应达到50%以上。且重现性好,可重复性强。这种小肠平滑肌抑制收缩幅度的稳定性可以用作吴茱萸汤活性的控制指标。即:①小肠平滑肌收缩幅度明显抑制;②收缩幅度下降须达到给药前的50%以上(见图1)。从吴茱萸汤所组成的方药小肠平滑肌活性试验结果看,在此试验条件下,吴茱萸与吴茱萸汤具有类似的抑制小肠平滑肌收缩作用,但弱于全方。其它组成药物则没有明显的作用(见图3)。

3. 对胃平滑肌的影响

吴茱萸汤体外给药后,胃平滑肌表现出张力下降的作用,收缩频率和收缩幅度改变不明显。10~30min肌张力下降达到1倍以上。且重现性好,可重复性强。这种胃平滑肌张力下降的稳定性可以用作吴茱萸汤活性的控制指标。即:①胃平滑肌张力明显下降;②收缩幅度须达到给药前的1倍以上(见图1)。从吴茱萸汤所组成的方药胃平滑肌活性试验结果看,在此试验条件下,吴茱萸与吴茱萸汤具有类似的抑制胃平滑肌张力的作用,生姜也具有类似的作用。其它组成药物则没有明显的作用(见图4)。

4. 对子宫平滑肌的影响

吴茱萸汤体外给药后,子宫平滑肌表现出明显的收缩抑制作用,收缩频率和收缩幅度同时受到抑制。药后5min内收缩明显抑制。且重现性好,可重复性强。这种子宫平滑肌收缩抑制的稳定性可以用作吴茱萸汤活性的控制指标。即:①子宫平滑肌收缩频率和幅度明显下降;②给药5~10min后收缩完全抑制(见图1),其抑制率应为100%。从吴茱萸汤所组成的方药子宫平滑肌活性试验结果看,在此试验条件下,吴茱萸与吴茱萸汤具有类似的抑制作用。其它组成药物则没有明显的作用(见图5)。

三、讨 论

在前期研究时,将各受试药物进行量效关系考

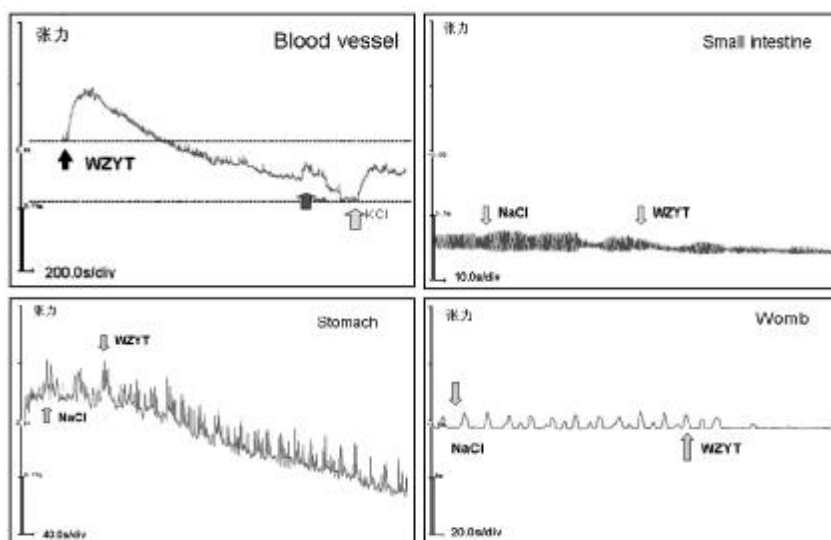


图1 吴茱萸汤对平滑肌功能的影响

左上为大鼠胸主动脉(blood vessel);右上为小肠平滑肌(small intestine);左下为胃平滑肌(stomach);右下为子宫平滑肌(womb)。WZYT:吴茱萸汤。

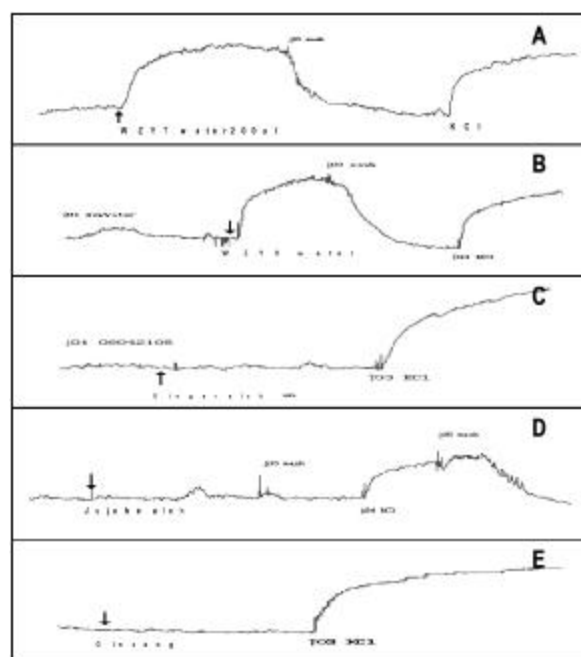


图2 吴茱萸汤及其组成药物体外
对大鼠胸主动脉收缩活性的影响

A:吴茱萸汤;B:吴茱萸;C:大枣;D:生姜;E:人参。所用样品均为水提醇沉工艺制备。药物终浓度:500μg/ml。张力负荷2g,记录速度:50s/div,记录频率80kHz。图中第1箭头(从左自右)所指为给药。第2箭头所指为KCl(50mM),以测定血管活性,并做收缩幅度内标。A,B给药后血管张力明显升高。C,D,E则无明显影响。

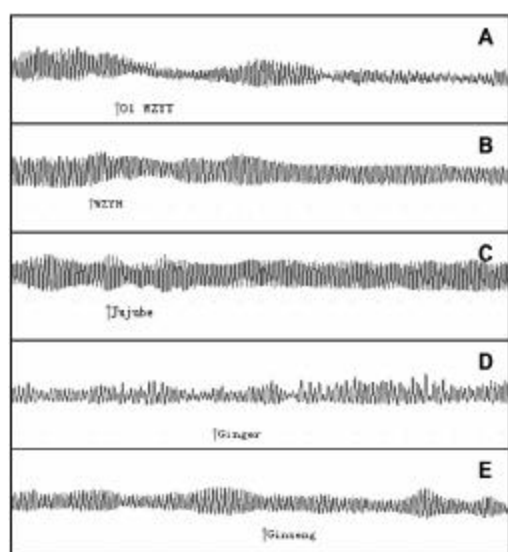


图3 吴茱萸汤及其组成药物体外
对小鼠小肠平滑肌收缩活性的影响

A: 吴茱萸汤; B: 吴茱萸; C: 大枣; D: 生姜; E: 人参。药物终浓度: $250\mu\text{g/mL}$ 。记录速度: 10s/div. , 记录频率 200Hz 。图中箭头所指为给药。

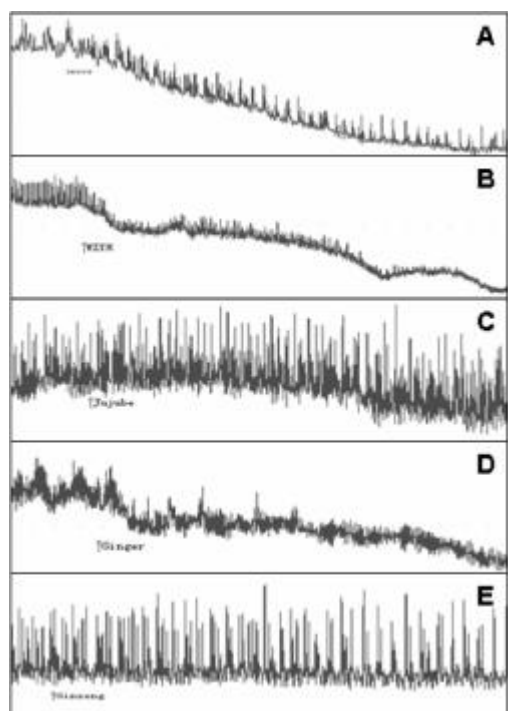


图4 吴茱萸汤及其组成药物体外
对小鼠胃平滑肌收缩活性的影响

A: 吴茱萸汤; B: 吴茱萸; C: 大枣; D: 生姜; E: 人参。药物终浓度: $250\mu\text{g/mL}$ 。张力负荷 1.5g , 记录速度: 100s/div. , 记录频率 200Hz 。图中箭头所指为给药。

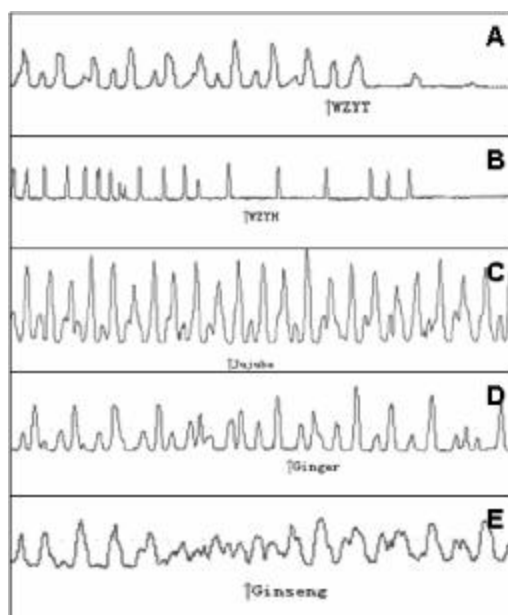


图5 吴茱萸汤及其组成药物体外
对子宫平滑肌收缩活性的影响

A: 吴茱萸汤; B: 吴茱萸; C: 大枣; D: 生姜; E: 人参。所用样品均为水提醇沉工艺制备。药物终浓度: $250\mu\text{g/mL}$ 。记录速度: 40s/div. , 记录频率 200Hz 。图中箭头所指为给药。

察(数据另文报道), 最终给药浓度确定为 $250\sim 500\mu\text{g/mL}$, 在这一浓度范围内, 吴茱萸的作用较强, 结果稳定上, 且具有较高的重视性($n=10$), 如此也有利于进行质量标准的考察。

基于吴茱萸汤的主治功效, 平滑肌应该是其作用的主要直接靶点部位之一。因此观察其对平滑肌的作用在很大程度上反映了药物的功效作用。吴茱萸汤对血管平滑肌的收缩舒张的作用, 对胃平滑肌张力下降作用, 对小肠平滑肌收缩幅度的抑制作用, 以及对子宫平滑肌的收缩抑制作用均从不同角度解释了吴茱萸汤的“吐”, “呕”和“头痛”的功效作用。因此以多部位平滑肌活性结果来综合评价吴茱萸汤, 并进而将其作用质量控制的方法具有一定的可行性。由于不同平滑肌所表现出来的不同活性, 从而使这种多指标多部位的活性对于综合评价吴茱萸汤的特异性得到了加强。避免了单一活性指标的偶然性和非特异性。这在基于活性的中药及其中药复方的质量标准控制的研究中是需要注意和提倡的。

从与吴茱萸汤所组成的药物的随行对照实验结果来看, 在相同剂量下, 吴茱萸的平滑肌活性与吴茱萸汤基本相同, 只是在作用的强弱上略有区别。其它

组成的三个中药人参、大枣和生姜均不同于吴茱萸汤。尽管生姜在胃平滑肌上表现出了与吴茱萸汤、吴茱萸相同的使其张力下降的活性,但在其它三种平滑肌上则未表现出明显的活性。综合考虑,也不难将其与吴茱萸汤鉴别。由此也提示了综合活性鉴别药物的重要性。将吴茱萸汤及其所组成药物的平滑肌活性进行归纳(见表1)以作其鉴别要点依据。

表1 吴茱萸汤及其组成药物的平滑肌活性

	平滑肌			
	胸主动脉	胃	小肠	子宫
吴茱萸汤	先↑后↓	↓	↓	↓
吴茱萸	先↑后↓	↓	↓	↓
大枣	-	-	-	-
生姜	-	↓	-	-
人参	-	-	-	-

注:“↑”表示兴奋或促进收缩;“↓”表示抑制或促进舒张;
“-”表示无明显作用

之所以以活性来作为药物质量控制的方法,主要是受监控药物的复杂性,以及特异性化学成分的不明确所致。针对这种复杂体系的药物理想的活性检测是体内实验。但是这种体内实验的受干扰因素较多,作为要求重现性好的质量控制方法来说很难满足。如果是在量上进行要求就更难达到。而中药复杂体系中的非特异性成分又影响了体外实验结果的判定。经过不断探索,我们采用如下方法:采用小分子量透析方法对受试样品前处理,尽可能减少未知的非特异性成分的干扰;实验指标以定性或半定量为主,并进行多靶点同时测试,综合评价^[13-14]。

本研究采用体外多平滑肌综合评价吴茱萸汤的活性,可以在一定程度上判定吴茱萸汤的质量品质。吴茱萸对平滑肌的活性基本同于吴茱萸汤,提示吴茱萸汤所表现出来的平滑肌综合活性主要来自于吴茱萸,同时也表明了吴茱萸作为全方君药的必要性。从临床应用角度讲,吴茱萸汤所组成的药物对于全方疗效的发挥均具有重要作用,但是作为质量鉴别

指标来看,其对平滑肌的无效作用则有助于对全方的鉴别。

以活性对中药复杂体系进行鉴别、进而达到质量控制,是一项艰巨而又复杂的工作。其中所测指标的特异性,受试样品的对实验的干扰性,以及标准评判建立及可行性等都需要付出大量的工作去探讨。本文只是就吴茱萸汤平滑肌活性进行了定性考察。其定量控制指标的可行性及其具体操作将有待于进一步研究。

参考文献

- 1 王毛妮,周春祥.吴茱萸汤证探幽.南京中医药大学学报,2006,22(4):412-414.
- 2 柴清波,高永泰.“吴茱萸汤”治疗呕吐 50 例报告.邯郸医学高等专科学校学报,2001,14(4):123.
- 3 刘红燕,刘春艳.吴茱萸汤治疗偏头痛 32 例临床观察.中国中医急症,2006;15(6):608.
- 4 马艳锦.辨证治疗痛经 98 例.陕西中医,2008,29(7):977-978.
- 5 邱赛红,窦昌贵.吴茱萸汤温胃止呕作用的实验研究.中药药理与临床,1988,4(3):9-14.
- 6 张婷,王敏伟,陈思维.吴茱萸汤醇提各组分止呕活性的研究.中国中药杂志,2002,27(11):268-271.
- 7 杜力军,李敏,孙虹,等.精制吴茱萸胶囊镇痛镇静和对脑血流的作用.中药药理与临床,1999,15(5):9-11.
- 8 逯振宇,蔺兴遥,崔佳.吴茱萸对心血管药理作用的研究.中医药研究,2002,18(2):44-45.
- 9 肖诗鹰,杜力军,王智民,等.吴茱萸汤的研究与开发.中国中药杂志,1999,24(8):503-504.
- 10 杜力军,孙虹,李敏,等.精制吴茱萸胶囊对偏头痛小鼠作用的研究.中药药理与临床,1998,14(5):4-6.
- 11 王智民,洪玉梅,王维皓,等.吴茱萸配方颗粒等效性研究.中国中药杂志,2007,32(12):1149-1155.
- 12 杨秀伟,肖诗鹰,杨智,等.精制吴茱萸胶囊化学成分的研究.北京大学学报(医学版),2001,33(3):280-282.
- 13 申佳,陶佳林,赵玉男,等.利用“分层法”综合评价中药复杂体系药效.世界科学技术-中医药现代化,2007,9(3):60-65.
- 14 陶佳林,赵玉男,王笑,等.利用分层法评价中药复杂体系药效时有关权重设立的讨论.世界科学技术-中医药现代化,2005,7(1),33-37.

Quality Control of Wuzhuyu Decoction: from the Perspective of Smooth Muscle Actions

Wang Xiukun¹, Lei Fan¹, Cao Lanxiu², Wang Yugang¹, Wang Zhimin³, Yang Xiuwei⁴, Zhang Qiwei³, Du Lijun¹

(1Laboratory of Pharmaceutical Sciences, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084 China)

(2 Section of Basic Medicine, Shanxi Traditional Chinese Medical College, Xianyang 712083 China)

(3Institute of Chinese Medicine, Chinese Academy of Chinese Medicine Beijing 100700 China)

(4 State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences,
Peking University, Beijing 100191 China)

To observe the action of Wuzhuyu decoction (evodiae complex) on smooth muscles, and discuss the possibility of the action as an assay of the complex quality control, a contraction test was made to blood vessels, stomach, small intestines and womb in vitro. Experimental results showed that the evodiae complex could regulate blood vessels in bi-phase, while reducing the tension of stomach and inhibiting the contraction of small intestines and womb smooth muscles. The fructus evodiae, a major ingredient in the complex, has the similar action with evodiae complex. The rest of the ingredients, including ginseng, jujube and ginger, appeared with a negative action on smooth muscles. It is suggested that the method be used for the comprehensive quality control of the decoction.

Keywords: Wuzhuyu decoction; Fructus Evodiae; smooth muscle; quality control; pharmacologic effect

(责任编辑:王 瑀,责任译审:邹春申)

中国科技走出去的四种模式

面向不同对象,中国科技以4种模式走出国门。

一、战略型“走出去”,面向资源丰富或市场巨大的发展中国家。主要方式有:

1. 进行联合调查。包括资源调查、科技情况调查、市场调查、基础设施建设方案调查和政府体制改革建设调查等。调查结果可支持发展中国家建设方案的决策,也为我国制定外交、科技政策提供决策依据。

2. 建立海外研发机构。通过建立联合实验室或联合研究中心,把中国产品和技术推广到目标国家腹地,大力拓展海外市场。

二、发展型“走出去”,面向技术领先于我国的发达国家。主要方式有:

1. 参加国际科技计划。鼓励国内的科研机构和企业积极参与国际科技计划,分享全球知识和信息积累的成果。

2. 加入重要国际组织。遴选中国籍的科学家和我国科技管理、科技外交人员,支持他们参加重要的国际和区域科技计划和活动,提高我国科技界的国际影响力。

3. 与跨国公司建立各种联盟。及时跟踪国际科技最新动态,吸取国外先进的产业技术和管理经验,培养和锻炼跨国经营人才,参与国际竞争。

三、合作型“走出去”,面向具有独特优势的发展中国家。主要方式有:

1. 开展科技合作。例如,近年来中国、印度在农业、生物技术、化工、电子和新材料等方面都取得了进步,两国在这些领域开展深层次的科技合作具有共同的利益。

2. 科技政策交流。中国与印度、巴西等国属于同一层次的创

新群体,都需要通过政策措施来引导国内创新,相互间的经验交流可以避免走弯路。

四、援助型“走出去”,面向技术水平落后于我国的发展中国家。主要方式有:

1. 先进适用技术的援助和转移。选择农业、新能源、医疗医药、信息、石油化工等众多领域的先进适用技术在部分发展中国家建立技术示范基地。

2. 派科技人员到国外进行技术服务。增派专家到国外进行技术指导与服务,充分发挥退休科学家、工程师以及科技志愿者的重要作用,开展特定技术合作项目的咨询、指导与现场研究等工作,条件成熟时进行推广应用。

3. 帮助培训技术人才。以来华培训、境外培训、短期考察培训和中长期专题研修等形式,举办不同技术主题、不同国别(区域)、不同形式的培训。通过技术培训,不仅增加了对中国社会、政治和文化的了解,而且奠定了未来合作的人际关系基础。

4. 进行实物捐赠。包括与技术援助项目相关的先进实用技术产品、科学仪器、实验设备、示范装置等。

为保障我国科技能够顺利地走出去,还必须建立配套的政策措施,如改进法律环境,为海外投资提供法律保障;完善符合国际惯例的扶持体系,如管理协调机制、投资风险补偿机制、知识产权保护机制、融资机制、人才培养机制、出入境管理机制等;健全各类中介组织,包括政府主导的公益型中介机构以及其他商业型中介机构。总的来说,政府必须在其中发挥引导、监管、协调、服务功能,从而指导着科技有目的、有步骤地走出去,为建设创新型国家,实现经济又好又快发展做出积极贡献。

(文 摘)