

[6] Ma J, Xiong J Y, Hou W W, *et al.* Protective effect of carnosine on subcortical ischemic vascular dementia in mice [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18(9): 745-753.

[7] Wu J, Zhang Y, Yang P, *et al.* Recombinant osteopontin stabilizes smooth muscle cell phenotype via integrin receptor/integrin-linked kinase/rac-1 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Stroke*, 2016, 47(5): 1319-1327.

[8] Tomimoto H. White matter integrity and cognitive dysfunction; Radiological and neuropsychological correlations [J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2015, 15(S1): 3-9.

[9] Van Dijk E J, Prins N D, Vrooman H A, *et al.* Progression of cerebral small vessel disease in relation to risk factors and cognitive consequences: Rotterdam Scan study [J]. *Stroke*, 2008, 39(10): 2712-2719.

[10] Liu H, Zhang X, Du Y, *et al.* Leonurine protects brain injury by increased activities of UCP4, SOD, CAT and Bcl-2, decreased levels of MDA and Bax, and ameliorated ultrastructure of mitochondria in experimental stroke[J]. *Brain Res*, 2012, 1474: 73-81.

[11] Choi B R, Kim D H, Back D B, *et al.* Characterization of white matter injury in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Stroke*, 2016, 47(2): 542-547.

[12] Gao L, Dong Q, Song Z H, *et al.* NLRP3 inflammasome: promising target in ischemic stroke[J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(1): 17-24.

[13] Lénárt N, Brough D, Dénes Á. Inflammasomes link vascular disease with neuroinflammation and brain disorders[J]. *J Cerebr Blood Flow Metab*, 2016, 36(10): 1668-1685.

[14] Conrad M, Angeli J P, Vandenabeele P, *et al.* Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(5): 348-366.

[15] Wallach D, Kang T B, Dillon C P, *et al.* Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules [J]. *Science*, 2016, 352(6281): 154.

独一味总环烯醚萜苷胶囊的主要药效学及急性毒性

张泉龙¹, 马晓花², 邱建国^{3*}, 贾正平³

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 杭州市萧山区第四中等职业学校, 浙江 杭州 311200; 3. 中国人民解放军兰州军区总医院药剂科, 甘肃 兰州 730050)

摘要: **目的** 考察独一味总环烯醚萜苷胶囊的主要药效学及急性毒性。**方法** 50 只 BALB/c 小鼠随机分为 5 组, 即模型组, 独一味胶囊高剂量组 (1 756 mg/kg), 独一味总环烯醚萜苷胶囊低、中、高剂量组 (86、172、430 mg/kg), 每组 10 只, 采用二甲苯致耳肿胀、冰醋酸致扭体、热板法镇痛实验考察抗炎、镇痛作用; 50 只 Wistar 大鼠随机分为相同 5 组, 每组 10 只, 连续灌胃给药 1 周, 末次给药后 1 h, 测定凝血酶原时间 (PT)、部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶时间 (TT)、纤维蛋白原 (FIB)。采用经典的急性毒性实验法, 比较独一味胶囊、独一味总环烯醚萜苷胶囊、总黄酮、大极性部分的急性毒性作用。**结果** 与对照组比较, 独一味总环烯醚萜苷胶囊中、高剂量组能显著抑制耳肿胀 ($P<0.05$); 各剂量组均能显著降低扭体次数 ($P<0.05$), 但痛阈值无明显变化 ($P>0.05$); 高剂量组能显著缩短 TT, 抑制 APTT, 增加 FIB ($P<0.05$), 但对 PT 无显著影响 ($P>0.05$)。不同剂量胶囊均未引起小鼠死亡, 仅高剂量组使小鼠轻度腹泻和活动下降。**结论** 独一味总环烯醚萜苷胶囊具有良好的抗炎、镇痛、止血作用, 而且急性毒性较低。

关键词: 独一味总环烯醚萜苷胶囊; 抗炎; 镇痛; 止血; 急性毒性

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2018)09-2048-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.034

独一味为唇形科独一味属植物独一味 *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo 的地上部分, 是我国藏、蒙等少数民族常用药之一, 始载于 2005 年版《中国药典》, 具有活血止痛、化瘀止血之功效, 用于治疗外科手术后的刀口疼痛和

收稿日期: 2017-09-09
基金项目: 国家科技部重大专项 (2008ZXJ09004-XXX); 甘肃省科技重大专项 (1102FKDA012); 全军中医药研发推广项目 (2006032001)
作者简介: 张泉龙 (1982—), 男, 硕士, 助理研究员, 从事中药新药临床前评价, Tel: (0571) 86613531, E-mail: 13484207@qq.com
* 通信作者: 邱建国 (1971—), 女, 主任药师, 从事高原植物药和新药研究。Tel: (0931) 8994676, 13609354193, E-mail: qjianguo@163.com
2048

出血、外伤骨折、筋骨扭伤、风湿麻痹、崩漏、痛经、牙龈肿痛等^[1]。

前期课题组通过大孔吸附树脂结合聚酰胺柱色谱得到独一味总环烯醚萜苷部分（得率 14.84%，含有量 66.92%）、总黄酮部分（得率 10.25%，含有量 64.97%）、以糖类为主的大极性部分（得率 44.30%）^[2]，其中总环烯醚萜苷部分具有止血^[3-4]、镇痛^[5]、抗炎^[6]活性。在此基础上，开发了以总环烯醚萜苷为有效成分的胶囊，并按照中药新药临床前研究办法完成中试生产^[7]、药学研究和质量评价^[8]。本实验对该制剂在抗炎、镇痛、止血方面的主要药效学和急性毒性进行评价，并与以独一味水提取物为主要原料的独一味胶囊进行比较，以期明确其口服起效剂量和毒性剂量，为相关临床应用和新药开发提供依据。

1 材料

1.1 试药 独一味总环烯醚萜苷提取物（中试生产样品，批号 20121025，其中 8-*O*-乙酰山梗苷甲酯含有量 69.6 mg/g，山梗苷甲酯质量分数 77.7 mg/g）、总黄酮部分、大极性部分均由甘肃省兰州市兰州军区总医院药剂科制剂室提供，制备方法参考文献 [7-8]。独一味胶囊（甘肃独一味生物制药股份有限公司，批号 1204024317）。冰醋酸（天津化学试剂有限公司，批号 20130325）；二甲苯（天津元立化工有限公司，批号 20130510）。

1.2 动物 BALB/c 小鼠，体质量（20 ± 2）g，雌雄兼具，购自兰州生物制品研究所动物实验中心，动物合格证号 SCXK（甘）2014-002；Wistar 大鼠，体质量（190 ± 10）g，雌雄兼具，购自兰州大学动物实验中心，动物合格证号 SCXK（甘）2014-0004。

1.3 仪器 RCY-2 热板测痛仪（上海黄海药检仪器有限公司）；单孔打孔机（6.00 mm，广州市旗标贸易有限公司）；SYSMEX CA-500 凝血测定仪（日本希森美康株式会社）；BP210S 电子天平（德国赛多利斯公司）；Spinchrom™ DLX 离心机（美国贝克曼库尔特公司）。

2 方法

2.1 给药剂量设置^[9] 参照 2015 版《中国药典》独一味胶囊临床用量（成人体质量按 70 kg 计）为 38.6 mg/（kg · d），相当于 128.6 mg 生药/（kg · d）。独一味总环烯醚萜苷得率为 14.84%，根据上述生药量推算，其临床起效剂量拟定为 19.08 mg/（kg · d），剂量换算见表 1。本实验中独一味总环烯醚萜苷胶囊分别为拟起效剂量的 0.5、1、2.5 倍，小鼠高、中、低剂量分别为 86、172、430 mg/kg，大鼠高、中、低剂量分别为 60、120、300 mg/kg；独一味胶囊高剂量组以临床用量的 5 倍，即小鼠 1 756 mg/kg、大鼠 1 211 mg/kg 设置。灌胃体积分别为小鼠 0.5 mL/20 g、大鼠 2 mL/200 g，将独一味总环烯醚萜苷、独一味胶囊用蒸馏水配制成相应给药浓度。

2.2 二甲苯致耳肿胀实验^[10-11] 50 只雄性 BALB/c 小鼠随机分成 5 组，即模型组、独一味胶囊高剂量组（1 756 mg/kg），总环烯醚萜苷低、中、高剂量组（86、172、430 mg/kg），

表 1 样品剂量换算[mg/（kg · d）]

样品	人(70 kg)	小鼠(20 g)	大鼠(200 g)
独一味	128.6	1 170.4	806.9
独一味胶囊	38.6	351.3	242.2
独一味总环烯醚萜苷胶囊	19.08	173.6	120.2

每组 10 只，均按设定剂量灌胃给药（模型组灌胃给予等量蒸馏水），每天 1 次，连续 7 d。于末次给药后 2 h，将 50 μL 二甲苯均匀涂抹于各组小鼠右耳廓两面致炎，以左耳为对照，30 min 后脱颈椎处死小鼠，打孔器分别在左右耳对称部位打下等面积圆形耳片，精密称定质量，计算肿胀度和肿胀抑制率，其中肿胀度以左右耳质量之差的平均值来表示。

2.3 冰醋酸致扭体实验^[11] 取 Balb/C 小鼠 50 只，雌雄各半，分组及给药同“2.2”项。于末次给药后 1 h，小鼠腹腔注射 0.7% 冰醋酸 0.2 mL 后，立即记录 15 min 内扭体次数（扭体反应为腹部内凹、躯干与后腿伸张、臀部抬高、身体左右扭动），并计算药物对其抑制率，公式为抑制率 = [（模型组平均扭体次数 - 独一味总环烯醚萜苷胶囊组平均扭体次数）/模型组平均扭体次数] × 100%。

2.4 热板法镇痛实验^[11] 取雌性 BALB/c 小鼠，给药前接触热板 [温度（55 ± 1）℃]，初筛小鼠舔后足痛反应程度，以痛阈 6 ~ 60 s 为合格。选取反应潜伏期为 10 ~ 30 s 的合格小鼠 50 只，根据药前痛阈和体质量随机分成 5 组，分组及给药同“2.2”项，分别检测末次给药后 0.5、1 h 痛阈。

2.5 凝血四项检测^[12] 取 Wistar 大鼠 50 只，雌雄各半，随机分成 5 组，即空白对照组，独一味胶囊高剂量组（1 211 mg/kg），总环烯醚萜苷低、中、高剂量组（60、120、300 mg/kg），每组 10 只，连续灌胃 7 d。末次灌胃 2 h 后，腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液麻醉，腹主动脉采血，置于含枸橼酸钠抗凝剂的负压试管中，3 000 r/min（离心半径 5 cm）离心 15 min 以去除血小板，分离血浆，检测凝血酶原时间（PT）、部分凝血活酶时间（APTT）、凝血酶时间（TT）、纤维蛋白原水平（FIB）。

2.6 急性毒性试验 根据《中药、天然物急性毒研究技术指导原则》（2005 年），取 Balb/c 小鼠 90 只，雌雄各半，随机分成 9 组，即空白对照组，独一味胶囊低、中、高剂量组（8.1、13.5、15.88 g/kg），独一味总环烯醚萜苷胶囊低、中、高剂量组（8.1、13.5、15.62 g/kg），总黄酮组（15.62 g/kg）、大极性部分组（15.62 g/kg），每组 10 只。给药前，小鼠禁食不禁水 12 h，给药组灌胃给予相应剂量药物，空白组给予相应体积生理盐水，给药后连续观察 14 d，记录其死亡数、死亡时间、中毒症状（观察指标参照小鼠急性毒性实验反应观察表）。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行处理，计量资料以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠耳肿胀率的影响 表 2 显示,与模型组比较,总环烯醚萜苷中、高剂量组和独一味胶囊高剂量组均能显著抑制二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀 ($P<0.05$);与独一味胶囊高剂量组比较,独一味总环烯醚萜苷胶囊高剂量组抑制率更高,而中剂量组相当。

3.2 对小鼠扭体反应的影响 表 3 显示,与模型组比较,独一味总环烯醚萜苷组、独一味胶囊高剂量组均可显著降低小鼠扭体次数 ($P<0.05$);与独一味胶囊组比较,独一

表 3 对小鼠扭体反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	扭体次数/(次 $\cdot 10\text{ min}^{-1}$)	抑制率/%
模型组	—	20.40 $\pm$ 12.67	—
独一味胶囊高剂量组	1 756	12.60 $\pm$ 7.66 *	38.24
独一味总环烯醚萜苷胶囊低剂量组	86	13.20 $\pm$ 6.49 *	35.29
独一味总环烯醚萜苷胶囊中剂量组	172	10.50 $\pm$ 3.34 *	48.53
独一味总环烯醚萜苷胶囊高剂量组	430	9.80 $\pm$ 6.21 *	51.96

注:与模型组比较,* $P<0.05$

3.3 对小鼠热板疼痛反应的影响 表 4 显示,与模型组比较,独一味总环烯醚萜苷胶囊组、独一味胶囊高剂量组均不

表 4 对小鼠热板疼痛反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	0.5 h 反应时间/min	1 h 反应时间/min
模型组	—	20.95 $\pm$ 4.40	20.67 $\pm$ 4.19
独一味胶囊高剂量组	1 756	19.20 $\pm$ 3.80	19.87 $\pm$ 4.39
独一味总环烯醚萜苷胶囊低剂量组	86	23.70 $\pm$ 5.82	20.87 $\pm$ 3.29
独一味总环烯醚萜苷胶囊中剂量组	172	18.55 $\pm$ 2.50	20.78 $\pm$ 3.79
独一味总环烯醚萜苷胶囊高剂量组	430	21.90 $\pm$ 4.05	22.56 $\pm$ 4.90

3.4 对大鼠凝血四项的影响 表 5 显示,与模型组比较,独一味胶囊高剂量组、独一味总环烯醚萜苷胶囊组均能显

表 5 对大鼠凝血四项的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	TT/s	APTT/s	PT/s	FIB/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
模型组	—	41.24 $\pm$ 5.59	18.58 $\pm$ 1.63	24.52 $\pm$ 2.11	2.73 $\pm$ 0.25
独一味胶囊高剂量组	1 211	36.62 $\pm$ 3.36 *	17.42 $\pm$ 1.17	24.61 $\pm$ 1.11	3.36 $\pm$ 0.58 *
独一味总环烯醚萜苷胶囊低剂量组	60	40.81 $\pm$ 4.73	17.18 $\pm$ 0.68	24.33 $\pm$ 2.24	2.82 $\pm$ 0.41
独一味总环烯醚萜苷胶囊中剂量组	120	38.88 $\pm$ 1.51	17.87 $\pm$ 1.99	24.88 $\pm$ 1.47	2.95 $\pm$ 0.23
独一味总环烯醚萜苷胶囊高剂量组	300	36.97 $\pm$ 1.35 *	16.35 $\pm$ 0.95 *	24.58 $\pm$ 0.96	3.45 $\pm$ 0.22 *

注:与对照组比较,* $P<0.05$

3.5 小鼠急性毒性 表 6 显示,独一味总环烯醚萜苷胶囊组小鼠均未死亡,但中、高剂量组出现腹泻和自发性活动减少现象,并呈剂量依赖性;总黄酮组小鼠未死亡,毒性反应为黑便;大极性部分组小鼠出现死亡现象(死亡率雌性 100%、雄性 60%),独一味胶囊高剂量组亦然;独一味胶囊低剂量组未出现毒性反应,但中、高剂量组毒性反应为腹泻和自发性活动减少,并且前一组出现雌性小鼠死亡(死亡率 60%),后一组死亡率增加(雌性 100%、雄性 60%),死亡时间均在 5~30 min,死亡前表现为腹部扭曲。

4 讨论

本实验发现,独一味总环烯醚萜苷胶囊中剂量组能有效抑制二甲苯致小鼠耳廓肿胀,表明对急性非特异性炎症有显著拮抗作用,对早期炎症有较好抑制作用;各剂量组

味总环烯醚萜苷胶囊中、高剂量组抑制率更高。

表 2 对小鼠耳肿胀率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	肿胀度/mg	抑制率/%
模型组	—	7.96 $\pm$ 3.27	—
独一味胶囊高剂量组	1 756	5.00 $\pm$ 1.21 *	37
独一味总环烯醚萜苷胶囊低剂量组	86	6.26 $\pm$ 2.35	21
独一味总环烯醚萜苷胶囊中剂量组	172	5.08 $\pm$ 2.09 *	36
独一味总环烯醚萜苷胶囊高剂量组	430	2.97 $\pm$ 1.89 *	63

注:与模型组比较,* $P<0.05$

能显著延长小鼠热反应痛阈值 ($P>0.05$)。

著缩短 TT ($P<0.05$),升高 FIB ($P<0.01$),其中后一组还能显著缩短 APTT ($P<0.05$)。

均能显著抑制醋酸诱导的小鼠扭体反应次数,表明具有一定镇痛作用;但各剂量组均不能显著延长热板疼痛反应,表明没有中枢镇痛作用,与文献[6]一致;高剂量组能明显缩短大鼠凝血酶原时间(PT)、部分凝血活酶时间(APTT),表明具有促进体内凝血止血功能,对内源性凝血系统功能也有一定促进作用^[13];高剂量组还能明显提高纤维蛋白原(FIB),表明其凝血作用可能与影响 FIB 溶解系统有关^[12-15]。同时,独一味总环烯醚萜苷胶囊小鼠抗炎、镇痛作用最低有效剂量分别为 172、86 mg/kg,大鼠止血作用最低有效剂量为 300 mg/kg。独一味总环烯醚萜苷胶囊起效剂量组与独一味胶囊高剂量组比较,除了镇痛、APTT 略强外,其他作用均相近。

表 6 小鼠急性毒性试验结果

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	性别	(动物数/死亡数)/只	毒性起效时间		毒性反应症状
空白对照组	—	雄	5/0			—
空白对照组	—	雌	5/0	—		—
独一味胶囊组	8.1	雄	5/0	—		—
独一味胶囊组	8.1	雌	5/0	—		—
独一味胶囊组	13.5	雄	5/0	—		活动能力减弱,腹泻,竖毛
独一味胶囊组	13.5	雌	5/3	5~30 min;1~3 d	腹部扭曲后死亡;活动能力减弱,腹泻,竖毛	
独一味胶囊组	15.88	雄	5/3	1~3 d	活动能力减弱,腹泻,竖毛	
独一味胶囊组	15.88	雌	5/5	5~30 min	腹部扭曲后死亡	
独一味总环烯醚萜苷胶囊组	8.1	雄	5/0	—		—
独一味总环烯醚萜苷胶囊组	8.1	雌	5/0	—		—
独一味总环烯醚萜苷胶囊组	13.5	雄	5/0	2 d	腹泻	
独一味总环烯醚萜苷胶囊组	13.5	雌	5/0	2 d	腹泻	
独一味总环烯醚萜苷胶囊组	15.62	雄	5/0	2 h~3 d	活动能力减弱,腹泻	
独一味总环烯醚萜苷胶囊组	15.62	雌	5/0	2 h~3 d	活动能力减弱,腹泻	
总黄酮组	15.62	雄	5/0	1~14 d	黑便,行为正常	
总黄酮组	15.62	雌	5/0	1~14 d	黑便,行为正常	
大极性部分组	15.62	雄	5/3	5~30 min	腹部扭曲然后死亡	
大极性部分组	15.62	雌	5/5	5~30 min	腹部扭曲然后死亡	

另外,独一味总环烯醚萜苷胶囊组和总黄酮组均未引起小鼠死亡,而大极性部分组死亡率为 80%,可认为是独一味药材(胶囊)的致毒部位。独一味总环烯醚萜苷胶囊组对小鼠的无毒性反应剂量为 8.1 g/kg,最大耐受剂量为 15.62 g/kg,分别为拟起效剂量(172 mg/kg)的 47 倍和 91 倍;独一味胶囊中、高剂量小鼠死亡率分别为 30%、80%,与文献报道的独一味浸膏半数致死量(LD₅₀)为 13.5 g/kg 相近^[16]。2015 年 3 月国家食品药品监督管理局对独一味口服制剂等药品说明书进行了修订,规定必须标注“胃(脘)不适”等 6 类不良反应^[17],本实验从急性毒性方面进行评价,有助于更好地阐述独一味临床不良反应。尽管与独一味胶囊相比,独一味总环烯醚萜苷胶囊已经去除了其中的毒性成分—大极性部分,但高剂量下还存在一定不良反应,表现为轻度腹泻和活动下降,其不良反应和毒性机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] 袁涛,王森,顿珠,等.藏药独一味的研究进展[J].中成药,2014,36(9):1958-1961.

[2] 李茂星,贾正平,胡之德,等.大孔树脂富集纯化藏药独一味总环烯醚萜苷[J].中国中药杂志,2007,32(17):1743-1747.

[3] 贾正平,李茂星,张汝学,等.独一味止血有效部位的实验研究[J].解放军药学报,2005,21(4):272-274.

[4] Li M X, Jia Z P, Hu Z D, *et al.* Experimental study on the hemostatic activity of the Tibetan medicinal herb *Lamiophlomis rotata*[J]. *Phytother Res*, 2008, 22(6): 759-765.

[5] Zheng Y N, Yin X F, Huo F Q, *et al.* Analgesic effects and possible mechanisms of iridoid glycosides from *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo in rats with spared nerve injury[J]. *J Eth-*

nopharmacol, 2015, 173: 204-211.

[6] Li M X, Shang X F, Zhang R X, *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of iridoid glycosides extract of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo[J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(3): 167-172.

[7] 邱建国,张泉龙,尉丽力,等.工业化提取分离纯化独一味总环烯醚萜苷类成分[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(13):32-35.

[8] 尉丽力,邱建国,李茂星,等.独一味环烯醚萜苷胶囊质量标准研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(22):137-140.

[9] 苗明三.实验动物和动物实验技术[M].北京:中国中医药出版社,1997.

[10] 王林林,王雪,刘燕,等.雪莲提取物 XL-12 的主要药效学研究[J].中成药,2011,33(11):1868-1874.

[11] 陈奇.中药药理实验方法[J],上海科学技术出版社,1994:120.

[12] 唐耀辉,杨捷,谢金鲜,等.经血宁胶囊凝血作用的药效学研究[J].中国医药导报,2017,14(3):8-11.

[13] 王振义.血栓与止血基础理论与临床[M].上海:上海科学技术出版社,2004.

[14] 张泉龙,李茂星,张文娟,等.藏药独一味总环烯醚萜对纤溶系统的实验研究[J].安徽医药,2011,15(12):1475-1477.

[15] 彭凯,张学兰,王莉,等.荷叶不同炮制品提取物对正常大鼠凝血功能影响的比较研究[J].中成药,2013,35(1):140-143.

[16] 梁重栋.藏药独一味的基础与临床研究[J].兰州医学院学报,1987,40(2):47-50.

[17] CFDA:独一味口服制剂说明书新增 6 类不良反应[J].中华医学信息导报,2015,30(3):6.