DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.01.017

盐制炮制对地黄凉血止血功效的增效作用探索

张月月[1,2],龙冰玉[1],王君明[1,2,3,4],何庆文[1],巫晓慧[1,2],宋玲玲[1],纪丽婕[1],张天柱[1]
(1.河南中医药大学药学院,河南 郑州 450046;2.郑州市中药安全与功效提升工程研究中心,河南 郑州 450046;
3.豫药全产业链研发河南省协同创新中心,河南 郑州 450046;4.呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心,河南 郑州 450046)

摘要:目的 探索盐制炮制对地黄凉血止血功效的增效作用。方法 在制备盐制地黄炮制品基础上,参考文献方法以干姜水煎液15 g·kg^{-1}联合5%乙醇复制小鼠血热出血模型,通过对小鼠一般体征、肛温、饮水量、出血时间、血浆凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原含量(FIB)以及对能够反映温度趋向性的热区停留比例等指标的检测分析,并通过对凉血止血功效的主成分分析和功效主成分分别与主要质控成分梓醇和地黄苷D的含量以及反映寒热药性的温度趋向性指标的灰色关联分析,综合评价盐制炮制对地黄凉血止血功效的增效作用。结果 模型引起了小鼠在热区停留比例显著降低、饮水量增加以及肛温、出血时间、PT、APTT、TT、FIB、Na^+-K^+-ATP、$Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$均显著延长或升高($P<0.05$或$P<0.01$);地黄生品及其盐制品低、高剂量(3、6 g·kg^{-1})对上述模型引起的指标异常均具有改善作用,且高剂量的改善作用优于低剂量($P<0.05$或$P<0.01$);地黄盐制品对上述指标的改善作用优于同剂量下的地黄生品($P<0.05$或$P<0.01$)。主要质控成分梓醇和地黄苷D对凉血止血功效成分(PCA)-灰色关联(GCA)分析的灰色关联系数分别为0.818和0.676,以及对寒热药性指标的灰色关联系数分别为0.801和0.572。结论 盐制炮制对地黄凉血止血功效具有增效作用,在一定程度上该炮制增效作用可能与盐制增强地黄的寒性药性、梓醇和地黄苷D含量有关,其中地黄苷D含量贡献最大。

关键词:盐制地黄;凉血止血功效;炮制增效;寒性药性;主成分-灰色关联分析
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)01-0077-05

Synergistic Effect of Salted Processing on Efficacy of Dihuang(Rehmanniae Radix) in Cooling Blood and Stopping Bleeding

ZHANG Yueyue[1,2],LONG Bingyu[1],WANG Junming[1,2,3,4],HE Qingwen[1],WU Xiaohui[1,2],SONG Lingling[1],JI Lijie[1],ZHANG Tianzhu[1]
(1. College of Pharmacy,Henan University of Chinese Medicine,Zhengzhou 450046,Henan,China;
2. Zhengzhou Engineering Research Center for Safety and Efficacy Enhancement of Chinese Materia Medica,Zhengzhou 450046,Henan,China;
3. Collaborative Innovation Center for Research and Development on the Whole Industry China of Yu-Yao,Zhengzhou 450046,Henan,China;
4. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of P.R. China,Zhengzhou 450046,Henan,China)

Abstract:*Objective* To investigate the synergistic effect of salted processing on the efficacy of Dihuang(Rehmanniae Radix) in cooling blood and stopping bleeding. *Methods* On the basis of the preparation of Dihuang(Rehmanniae Radix) processed with salt,the reference method was used to replicate the mouse model of bleeding due to blood heat syndrome with 15 g·kg^{-1} of Zingiberis Rhizoma Decoction combined with 5% ethanol,and the synergistic effect of salted processing on the efficacy of Dihuang(Rehmanniae Radix) in cooling blood and stopping bleeding was comprehensively evaluated by the general signs of mice,anal temperature,water intake,bleeding time and thrombin time(TT),prothrombin time(PT),activated partial thromboplastin time(APTT) and fibrinogen(FIB). The indicators such as the proportion of hot zone residence that can reflect temperature trend were detected and analyzed. Through principal component analysis of cooling blood and stopping bleeding effect and grey correlation analysis of the main quality control components,including the content of catalpol and digoxin D,as well as the temperature trend index reflecting the cold and heat medicinal properties,the synergistic effect of salt processing on the cooling blood and stopping bleeding effect was comprehensively evaluated. *Results* The model caused a significant decrease in the proportion of mice staying in the hot zone,an increase in water intake,as well as a significant prolongation or increase in anal temperature,bleeding time,PT,APTT,TT,FIB,Na^+-K^+-ATP and $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ ($P<0.05$ or $P<0.01$). Low and high doses(3 and 6 g·kg^{-1}) of Dihuang(Rehmanniae Radix) and its processed with salt products improved the abnormal indicators caused

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金C类项目(82505416);中原科技创新领军人才项目(254200510005);河南省自然科学基金杰出青年基金项目(232300421012);河南省高校科技创新团队支持计划项目(26IRTSTHN020);河南省级科技研发计划联合基金项目(222301420085)
作者简介:张月月(1988-),女,河南太康人,实验师,硕士,研究方向:中药性效机理与安全性评价。
通讯作者:王君明(1980-),男,河南洛宁人,教授,博士研究生导师,博士后合作导师,博士,研究方向:中药性效机理与安全性评价。E-mail:mjw98_2010@163.com。

by the above model and the improvement effect of high dose was better than that of low dose ($P<0.05$ or $P<0.01$). The improvement effect of Dihuang (Rehmanniae Radix) processed with salt on the above indicators was better than that of Dihuang (Rehmanniae Radix) under the same dose ($P<0.05$ or $P<0.01$). The grey correlation coefficients of the main quality control components, catalpol and Rehmannioside D, for the components of cooling blood and stopping bleeding efficacy (PCA) – grey correlation (GCA) analyses were 0.818 and 0.676, as well as for the indices of cold and heat properties of the drug were 0.801 and 0.572, respectively. *Conclusion* Salted processing has the synergistic effect on cooling blood and stopping bleeding effect of Dihuang (Rehmanniae Radix), and to a certain extent, the synergistic effect may be related to the enhancement of the cold and heat properties, the contents of catalpol and Rehmannioside D of Dihuang (Rehmanniae Radix) by salted processing, with Rehmannioside D content contributing the most.

Keywords: Dihuang (Rehmanniae Radix) processed with salt; cooling blood and stopping bleeding effect; increasing effect after processing; cold medicinal properties; principal component – grey correlation analysis

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根，为著名的四大怀药之一，首载于《神农本草经》，用药历史悠久，且具有凉血止血等功效，广泛用于血热出血证等病证的治疗。食盐味咸，性寒，具有涌吐、清火、凉血、解毒之功效[1]，既是日常不可或缺的一味中药调味品，又是一种常用的炮制辅料，如盐制知母、盐制黄柏均能够增强滋阴降火功效，再如盐制黄芩（条芩）能够用于治大便下血[2]。古籍挖掘发现，元代《世医得效方》记载有盐制地黄，这为盐制地黄的探究提供了基础。本研究依据前期以主要质控成分梓醇和地黄苷D结合熵权法考察确定的盐制地黄炮制方法[3]制备地黄盐制品。在此基础上，本研究参考文献方法[4-6]以干姜水煎液15 g·kg^{-1}联合5%乙醇复制小鼠血热出血模型，进一步通过对小鼠一般体征、温度趋向性、肛温、饮水量、出血时间、血浆凝血酶时间（TT）、凝血酶原时间（PT）、活化部分凝血活酶时间（APTT）、纤维蛋白原含量（FIB）等指标的检测，并通过“质控成分–凉血止血功效”主成分–灰色关联分析综合评价盐制炮制对地黄凉血止血功效的增效作用，以期为通过盐制炮制提升地黄在凉血止血功效的高效应用提供初步的临床前实验支撑。

1 材料

1.1 动物

ICR小鼠，雄性，SPF级，体质量16～18 g，购自济南朋悦实验动物繁育有限公司，动物许可证号 SCXK（鲁）2021－0015。本研究经河南中医药大学实验动物伦理委员会审核，符合《实验动物福利伦理审查指南》（GB/T35892－2018）、《关于善待实验动物的指导性意见》和《河南中医药大学实验动物伦理委员会章程》，实验动物伦理审查批准编号：DWLL20220815。

1.2 药物及试剂

生地黄饮片，河南省青山药业股份有限公司，批号：210201；未加碘盐，四川乐山联峰盐化有限责任公司，批号：GB/T 5461；凝血四项试剂盒：凝血酶（批号：2202211080M）、凝血酶原（批号：20221227M）、活化部分凝血活酶（批号：20220301M）、血浆纤维蛋白原（批号：2022110202M），雷杜生命科技股份有限公司、超微量ATP酶（Na^+－K^+、Ca^{2+}－Mg^{2+}、总）测试盒（批号：20230620），南京建成生物工程研究所。

1.3 主要仪器

高速中药粉碎机（永康市溪岸五金药具厂，型号：HX－1000A），电子天平（上海佑科仪器仪表有限公司，型号：FA2004B），分析天平（上海海康电子仪器厂，型号：AB1458），水浴锅（上海精宏实验设备有限公司，型号：DK－8D），高速冷冻离心机（常州金坛良友仪器有限公司，型号：TGL－16M），台式离心机（武汉塞维尔生物科技有限公司，型号：D3024R），涡旋混匀仪（武汉塞维尔生物科技有限公司，型号：MV－100），冷冻干燥机（东京理化器械株式会社，型号：FDU－2200），酶标仪（美国伯腾仪器有限公司，型号：EPOCH2NSC－SN），冷热板动物行为示差检测仪（北京圆融科技有限公司，型号：LRB003），医用电子体温计（广州市北倍尔康医疗器械有限公司，型号：DTCC8），全自动凝血分析仪（武汉塞维尔生物科技有限公司，型号：RAC－1830）。

2 方法

2.1 盐制地黄的制备

参考我们前期以主要质控成分梓醇和地黄苷D含量分析并结合古籍记载和现代演变优选确定的盐制地黄炮制方法[3]制备地黄盐制品，具体叙述如下：取生地黄饮片约50 g，加不含碘食盐水10 mL拌匀，闷润至药透水尽，无硬心，于－80 ℃冰箱冷冻24 h后，置冷冻干燥机干燥，冻干，即得地黄盐制品。

2.2 盐制炮制对地黄凉血止血功效的增效作用探索

2.2.1 干姜水煎液的制备 取干姜饮片适量，每次加8倍量水，首次浸泡1 h，煎煮3次，每次1 h，趁热过滤，合并3次滤液并浓缩至1.5 g·mL^{-1}，即得干姜水煎液。

2.2.2 地黄及地黄盐制品水提物制备 取地黄生品及地黄盐制品粗粉适量，分别加入体积为粗粉质量的10倍、8倍量的蒸馏水，连续回流提取2次，每次1 h，纱布过滤，合并两次滤液，4000 r·min^{-1}离心，弃滤渣取上清液，水浴蒸干，即得地黄生品水提物和地黄盐制品水提物，得率依次为61.7%、67.3%。

2.3 分组、造模及给药

小鼠60只适应性饲养7 d后，随机分为6组，即正常对照组、模型组、地黄生品低剂量组、地黄生品高剂量组、地黄盐制品低剂量组、地黄盐制品高剂量组，每组10只小鼠。除正常对照组外，其余各组均用5%的乙醇代替自由饮水，上午灌胃干姜水煎液15 g·kg^{-1}造模，1 d/次，连续给药15 d，以复制血热出血模型，下午灌胃地黄生品和盐制品水提物的低、高剂量，其中低剂量按地黄生药计均为3 g·kg^{-1}，高剂量按生药计均为6 g·kg^{-1}，连续给药15 d，1次/d。第15天下午末次给药30 min后剪尾测定小鼠的出血时间，末次给药1 h后依次测定温度趋向性。当晚禁食12 h，次日摘眼球取血，分离血浆、血清，以供相关指标检测。

2.4 检测指标

2.4.1 一般体征大体观察 观察小鼠的日常表现，例如毛发状态、精神、情绪变化以及尾巴颜色、体质量、饮食量等。

2.4.2 冷热板温度趋向性测定 实验室温度（20±2）℃自动温控系统底板温度设置：低温20 ℃，高温板40 ℃末次给药1 h

后,将小鼠依次放入冷热板上各通道内,通过摄像头远程监测其冷热板寒热温区趋向活动。热区停留比例 = 高温区停留时间(s)/总监测时间(s)。

2.4.3 肛温测定 采用电子体温计测定肛温。测试时,将医用电子体温计金属头对准小鼠的肛门,轻轻缓慢地插入小鼠的肛门口,深度大概 1 cm,待温度稳定后读数,即为小鼠肛温。

2.4.4 饮水量测定 在给药第 14 天检测小鼠饮水量。每只小鼠单独放入笼中,每个笼子放 1 个水瓶,每个水瓶事先用量筒准确量取水 50 mL 并称重,计时 24 h 后收取,接着称取剩余水量的重量进行计算。

2.4.5 出血时间测定 第 15 天,末次给药 30 min 后,在距尾尖 5 mm 处横断,开始记录时间,并用滤纸蘸血,每隔 30 s 蘸 1 次,直至出血停止,即为出血时间。

2.4.6 凝血功能指标检测 第 15 天给药结束后,晚上禁食 12 h 后于次日摘眼球取血,3.8% 枸橼酸钠 1∶9 抗凝,于 3800 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min 取上清血浆部分,用全自动凝血分析仪测定 TT、PT、APTT 和 FIB。

2.4.7 血清生化指标检测 末次给药结束后禁食 12 h,次日摘眼球取血,置于离心管中,室温下静置 2 h,4000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min 分离血清,测定血清中 $Na^+ - K^+$ - ATP 酶、$Ca^{2+} - Mg^{2+}$ - ATP 酶水平,具体操作按照试剂盒内说明书进行。

2.5 “质控成分 - 凉血止血功效”主成分 - 灰色关联分析

本研究之前对制备的盐制地黄的主要质控成分梓醇和地黄苷 D 进行了质量控制,确定其含量[3]。本研究将凉血止血药效指标经过 PCA 方法计算药效得分 F 值,并通过 GCA 方法将质控成分梓醇和地黄苷 D 与药效得分 F 值和反映寒热药性的温度趋向性指标分别进行灰色关联分析,并按照灰色关联系数大小进行排序,比较主要质控成分对盐制炮制增效作用的贡献程度,以及对寒热药性的贡献程度。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析,各组数据用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析,方差齐时采用最小显著性差异法(LSD),方差不齐时采用 Dunnett's T3 法,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 地黄盐制前后对小鼠一般体征的影响

给药第 1 天,各组小鼠表现良好,饮食正常,大便小便正常,毛发有光泽,精神状态良好,一般体征观察情况均无明显差异;随着给药天数的延长(直至第 15 天),模型组小鼠体质量下降,饮食量增加,毛发蓬竖而无光泽,躁动不安,大便干结,小便发黄等。灌服地黄生品及盐制品的小鼠上述异常体征表现有所改善,其中以地黄盐制品高剂量组的小鼠状态为佳。

3.2 地黄盐制前后对小鼠肛温和饮水量的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠肛温和饮水量显著升高,表明灌胃干姜水煎液结合 5% 乙醇引起模型小鼠产生内热。与模型组比较,地黄生品及盐制品低、高剂量组的小鼠肛温和饮水量显著下降($P < 0.01$),且随给药剂量增加,肛温下降明显($P < 0.01$)。与同剂量地黄生品比较,地黄盐制品低、高剂量对上述指标的逆转作用显著升高($P < 0.01$)。结果见表 1。

3.3 地黄盐制前后对小鼠出血时间的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠的出血时间显著延长;与模型组比较,地黄生品及盐制品低、高剂量组的小鼠出血时间不同程度缩短($P < 0.01$),且随给药剂量增加,止血作用明显增强($P < 0.01$)。与同剂量地黄生品比较,地黄盐制品低、高剂量对小鼠的出血异常状态改善作用显著高出 24.7% ($P < 0.01$)、26.6% ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 1 地黄盐制前后对小鼠肛温和饮水量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/($g \cdot kg^{-1}$)	肛温/(℃)	饮水量/(mL)
正常对照组	10	-	37.4 ± 0.2	10.9 ± 1.1
模型组	10	-	39.7 ± 0.2[2)]	14.6 ± 1.7[1)]
地黄生品低剂量组	10	3	38.4 ± 0.3[3)]	10.4 ± 1.3[3)]
地黄生品高剂量组	10	6	37.3 ± 0.2[3)5)]	9.2 ± 2.8[3)]
地黄盐制品低剂量组	10	3	37.0 ± 0.4[3)4)]	9.4 ± 1.0[3)]
地黄盐制品高剂量组	10	6	36.3 ± 0.3[3)4)5)]	8.7 ± 1.6[3)]

注:1)与正常对照组比较,$P < 0.05$;2)与正常对照组比较,$P < 0.01$;3)与模型组比较,$P < 0.01$;4)与同剂量地黄生品比较,$P < 0.01$;5)与各低剂量组比较,$P < 0.01$。

表 2 地黄盐制前后对小鼠出血时间的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/($g \cdot kg^{-1}$)	止血时间/(min)
正常对照组	10	-	3.41 ± 0.41
模型组	10	-	5.95 ± 0.47[1)]
地黄生品低剂量组	10	3	4.85 ± 1.21[2)]
地黄生品高剂量组	10	6	3.16 ± 1.08[2)5)]
地黄盐制品低剂量组	10	3	3.65 ± 1.24[2)4)]
地黄盐制品高剂量组	10	6	2.32 ± 0.90[2)3)5)]

注:1)与正常对照组比较,$P < 0.01$;2)与模型组比较,$P < 0.01$;3)与同剂量地黄生品比较,$P < 0.05$;4)与同剂量地黄生品比较,$P < 0.01$;5)与各低剂量组比较,$P < 0.01$。

3.4 地黄盐制前后对小鼠凝血相关指标的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠的 PT、APTT 和 TT 显著延长,FIB 含量显著增加($P < 0.01$),表明模型小鼠的凝血功能异常,结合前述指标表明血热出血模型小鼠造模成功。与模型组比较,地黄生品及盐制品低、高剂量组的小鼠 PT、APTT、TT 不同程度缩短,FIB 含量显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且随给药剂量增加,对凝血四项异常变化的改善作用明显增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与同剂量地黄生品比较,地黄盐制品低剂量对上述指标的异常变化改善作用显著高出 10.1% ($P < 0.05$)、10.7% ($P < 0.01$)、13.8% ($P < 0.01$)、17.1% ($P < 0.05$);地黄盐制品高剂量对上述指标的异常变化改善作用显著高出 18.4% ($P < 0.01$)、12.4% ($P < 0.01$)、15.0% ($P < 0.01$)、21.5% ($P < 0.01$)。结果见表 3。

3.5 地黄盐制前后对小鼠血清 $Na^+ - K^+$ - ATP 酶、$Ca^{2+} - Mg^{2+}$ - ATP 酶水平的影响

与正常对照组比较,模型引起了小鼠血清 $Na^+ - K^+$ - ATP 酶、$Ca^{2+} - Mg^{2+}$ - ATP 酶水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,地黄生品及盐制品低、高剂量组对模型引起的小鼠血清 $Na^+ - K^+$ - ATP 酶、$Ca^{2+} - Mg^{2+}$ - ATP 酶水平异常升高均有显著逆转作用($P < 0.01$),且随给药剂量增加,对上述指标异常升高的逆转作用明显增强。与地黄生品比较,地黄盐制品低剂量对上述指标的逆转作用显著高出 23.6% ($P < 0.05$)、29.4% ($P < 0.01$);地黄盐制品高剂量对上述指标的逆转作用显著高出 29.8% ($P < 0.01$)、37.1% ($P < 0.05$)。结果见表 4。

3.6 地黄盐制前后对小鼠在冷热板温度趋向性的影响

与正常对照组比较,模型引起了小鼠在冷热板的热区停留比例显著缩短($P < 0.01$),提示灌胃干姜水煎液结合 5% 乙醇引起模型小鼠产生内热。与模型组比较,地黄生品及盐制品

表 3 地黄盐制前后对小鼠凝血相关指标的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	PT/(s)	APTT/(s)	TT/(s)	FIB/(g/L)
正常对照组	10	–	15.73 ± 1.24	27.41 ± 1.34	35.63 ± 2.12	2.37 ± 0.24
模型组	10	–	25.62 ± 0.64[1)]	39.08 ± 1.33[1)]	46.12 ± 2.81[1)]	4.93 ± 0.22[1)]
地黄生品低剂量组	10	3	18.46 ± 1.11[3)]	29.54 ± 0.70[3)]	42.04 ± 1.69[2)]	3.81 ± 0.44[3)]
地黄生品高剂量组	10	6	17.33 ± 1.03[3)]	27.74 ± 0.45[3)7)]	38.32 ± 2.49[3)6)]	3.17 ± 0.35[3)6)]
地黄盐制品低剂量组	10	3	16.60 ± 1.01[3)4)]	26.39 ± 1.06[3)5)]	36.23 ± 2.21[3)5)]	3.16 ± 0.28[3)4)]
地黄盐制品高剂量组	10	6	14.14 ± 0.57[3)5)7)]	24.29 ± 1.34[3)5)7)]	32.56 ± 1.68[3)5)6)]	2.49 ± 0.29[3)5)7)]

注:1)与正常对照组比较,$P<0.01$;2)与模型组比较,$P<0.05$;3)与模型组比较,$P<0.01$;4)与同剂量地黄生品比较,$P<0.05$;5)与同剂量地黄生品比较,$P<0.01$;6)与各低剂量组比较,$P<0.05$;7)与各低剂量组比较,$P<0.01$。

表 4 地黄盐制前后对小鼠血清 Na^+-K^+-ATP 酶、$Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/($g \cdot kg^{-1}$)	Na^+-K^+-ATP 酶/($U \cdot mg^{-1}$)	$Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶/($U \cdot mg^{-1}$)
正常对照组	10	–	1.21 ± 0.41	0.99 ± 0.26
模型组	10	–	2.04 ± 0.50[1)]	1.85 ± 0.42[1)]
地黄生品低剂量组	10	3	1.40 ± 0.25[2)]	1.36 ± 0.27[2)]
地黄生品高剂量组	10	6	1.04 ± 0.19[2)5)]	0.97 ± 0.29[2)6)]
地黄盐制品低剂量组	10	3	1.07 ± 0.19[2)3)]	0.96 ± 0.33[2)4)]
地黄盐制品高剂量组	10	6	0.73 ± 0.16[2)5)]	0.61 ± 0.10[2)3)5)]

注:1)与正常对照组比较,$P<0.01$;2)与模型组比较,$P<0.01$;3)与同剂量地黄生品比较,$P<0.05$;4)与同剂量地黄生品比较,$P<0.01$;5)与各低剂量组比较,$P<0.05$;6)与各低剂量组比较,$P<0.01$。

低、高剂量组对模型引起的小鼠热区停留比例的缩短均有显著逆转作用($P<0.01$),提示地黄盐制前后在既定的给药剂量下均能够通过其寒性药性的清热改善模型引起的内热。与同剂量下的地黄生品组比较,地黄盐制品低、高剂量均能够显著延长小鼠在冷热板的热区停留比例($P<0.05$ 或$P<0.01$)。此外,地黄生品低、高剂量之间对小鼠在冷热板热区停留比例比较无明显差异($P>0.05$),而地黄盐制品低、高剂量之间存在显著差异,且高剂量优于低剂量($P<0.01$)。结果见表 5。

表 5 地黄盐制前后对小鼠在冷热板温度趋向性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/($g \cdot kg^{-1}$)	热区停留比例
正常对照组	10	–	0.50 ± 0.03
模型组	10	–	0.23 ± 0.03[1)]
地黄生品低剂量组	10	3	0.33 ± 0.03[2)]
地黄生品高剂量组	10	6	0.35 ± 0.04[2)]
地黄盐制品低剂量组	10	3	0.37 ± 0.02[2)3)]
地黄盐制品高剂量组	10	6	0.42 ± 0.03[2)4)5)]

注:1)与正常对照组比较,$P<0.01$;2)与模型组比较,$P<0.01$;3)与同剂量地黄生品比较,$P<0.05$;4)与同剂量地黄生品比较,$P<0.01$;5)与各低剂量组比较,$P<0.01$。

3.7 盐制炮制对地黄“主要质控成分-凉血止血功效-寒热药性”的相关性分析

对反映凉血止血功效的指标(饮水量、肛温、出血时间、PT、APTT、TT、FIB、Na^+-K^+-ATP 酶、$Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶)进行主成分分析,KMO 值为 0.922,Bartlett 球形检验 $P=0.000$,各指标方差贡献率(%)依次为 72.493、7.476、5.250、3.981、3.792、2.544、1.632、1.542、0.850、0.440,然后以方差贡献率作为权重值对各指标进行降维,从而获得反映凉血止血功效的综合得分 F 值(依次为 0.011 7、0.020 3、0.013 9、0.015 2、0.012 5、0.012 5、0.009 9);进一步采用灰色关联分析方法,将地黄主要质控成分梓醇和地黄苷 D 的含量指标与凉血止血功效综合得分 F 值以及反映寒热药性的冷热板温度趋向性指标分别进行灰色关联分析,得主要质控成分梓醇和地黄苷 D 对凉血止血功效综合得分的灰色关联系数分别为 0.818 和 0.676,以及对寒热药性指标的灰色关联系数分别为 0.801 和 0.572。

4 讨论

本研究受古籍记载盐制地黄启发,结合前期基于主要质控成分优选确定的炮制方法制备地黄盐制品,在此基础上,主要基于目前常用的小鼠血热出血模型评价了盐制法炮制对地黄凉血止血功效的影响,研究结果表明,地黄生品及其盐制品均有凉血止血功效,且均呈现出剂量依赖性关系,盐制炮制对地黄凉血止血的功效具有增效作用,且在一定程度上,该炮制增效作用可能与盐制增强地黄寒性药性有关。

血热出血模型[7-9]有多种建立方法,其中灌胃干姜水煎液结合乙醇可建立符合中医理论的热盛出血模型。凝血四项[10-11]是用来考察凝血功能的常用指标之一,其中 APTT 和 PT 分别反映内、外源性凝血系统状况,TT 主要反映纤维蛋白原转为纤维蛋白的时间,FIB 主要反映纤维蛋白原的含量。所以本研究运用干姜水煎液联合 5% 乙醇制备血热出血模型小鼠,并结合肛温、饮水量、凝血四项、Na^+-K^+-ATP 酶、$Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶水平等指标探究盐制炮制对地黄凉血止血功效的增效作用。实验结果显示模型小鼠表现出肛温升高、饮水量增加、饮食量减少、体质量减轻、大便干结、血清 Na^+-K^+-ATP 酶、$Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶水平显著升高等症状表明辛热之性的干姜能耗伤津液,造成小鼠热盛症状;出血时间延长,凝血四项中 PT、APTT 和 TT 显著延长,FIB 含量显著增加等指标也表明干姜结合低浓度乙醇造成模型小鼠凝血功能异常,说明血热出血模型小鼠造模成功。地黄生品及其盐制品低、高剂量的水煎剂可显著逆转模型小鼠凉血止血指标的异常水平($P<0.05$ 或$P<0.01$),且高剂量的逆转作用优于低剂量($P<0.05$ 或$P<0.01$),说明地黄生品及其盐制品均具有凉血止血的作用,且表现出剂量依赖性。

食盐水性味咸寒,能清热凉血[13],且中医学理论认为“咸入血”[14],所以推测地黄经盐炮制后会增强凉血作用,而且药性寒凉的药物可以使血分有热而运行过速的血恢复正常运行,避免出血。与同剂量的地黄生品比较,地黄盐制品可使小鼠肛温降低,饮水量减少,饮食量、体质量增加,血清 Na^+-K^+-ATP 酶、$Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶水平显著降低;缩短出血时间,显著降低凝血四项中 PT、APTT 和 TT 水平,FIB 含量显著减少($P<0.05$ 或$P<0.01$),表明地黄盐制品能通过影响内、外源性凝血途径以及纤维蛋白原的含量来达到促凝的效果,从而表

现出地黄生品经盐制炮制后凉血止血功效增强。

为了从寒热药性层面进一步探究盐制对地黄凉血止血功效的增效作用,采用了在反映寒热药性方面目前相对最为认可的冷热板示差法[15-17]对动物温度趋向性的检测分析方法。冷热板示差法[18]的原理是经寒热中药干预后的动物体内会出现能量(热)变化,从而对寒热环境产生温度趋向性,而寒热环境主要通过不同温度的冷热板实现。动物的温度趋向性也可以反映机体的寒热状态[19-21]。现有研究[22-24]表明,热区停留时间越短,机体热盛状态明显,给予药物后热区停留时间延长,提示药物药性寒凉,反之药性温热。本研究实验结果显示,地黄盐制前后均能够显著逆转模型引起的小鼠在冷热板的热区停留比例,提示不管是地黄生品还是其盐制品,均能够通过其固有的寒性药性对抗模型引起的小鼠产生内热;进一步分析显示,地黄盐制后对小鼠在冷热板的热区停留比例的改善作用显著优于地黄生品,能够在较大程度上提示盐制可能增强了地黄的寒性药性从而对其凉血止血的功效产生了增效作用。

主成分-灰色关联分析[25-27]常应用于炮制前后各因素变化及关联性分析,具有速度快、结果可靠、易于计算等优点。为了明确质控成分梓醇和地黄苷 D 二者在凉血止血增效作用方面的贡献率,本研究将凉血止血功效指标通过主成分分析累积得到 1 个主成分,将地黄主要质控成分梓醇和地黄苷 D 的含量指标与凉血止血功效综合得分 F 值以及反映寒热药性的冷热板温度趋向性指标分别进行灰色关联分析。研究结果显示,主要质控成分梓醇和地黄苷 D 对凉血止血功效综合得分的灰色关联系数分别为 0.818 和 0.676,以及对寒热药性指标的灰色关联系数分别为 0.801 和 0.572。上述结果提示盐制地黄梓醇和地黄苷 D 含量越高,药性寒性越强,凉血止血作用越好,且地黄苷 D 在盐制炮制增强地黄凉血止血功效方面贡献率较大。

本研究基于盐制地黄的古籍记载并结合前期确定的炮制方法,首次在常用的小鼠血热出血模型上探索了盐制炮制对地黄凉血止血功效的增效作用,并通过主成分-灰色关联分析方法确定了质控成分梓醇和地黄苷 D 二者在凉血止血增效作用方面的贡献率。研究结果表明,盐制法炮制对地黄凉血止血的功效具有炮制增效作用,且该增效作用可能与盐制炮制增强地黄的寒性药性、增加地黄苷 D 含量有关。本研究能够为通过盐制炮制提升地黄在凉血止血功效的高效应用提供重要的临床前实验支撑。

参考文献

[1] 王蕾,燕彩云,乐智勇,等. 盐制法及炮制辅料盐的炮制历史沿革研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(20):3880-3885.
[2] 张洁,王全利,史雪,等. 仁术便览[M]. 北京:中国中医药出版社,2015.
[3] 龙冰玉,张月月,王君明,等. 基于主要质控成分含量分析并结合古籍记载和现代演变的生地黄特色炮制评价[J]. 时珍国医国药,2024,35(4):887-891.
[4] 李海霞,周民,周有君,等. 水牛角对血热出血模型大鼠的止血作用及机制[J]. 中医药导报,2023,29(11):30-34.
[5] 贾秀梅,张振凌,吴瑞环. 鲜地黄及保鲜加工品对血热出血模型大鼠凉血止血药效比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(6):127-132.
[6] 董永喜,刘星星,董莉,等. 白及多糖对血热出血模型大鼠的止血作用及机制研究[J]. 中国药房,2016,27(31):4347-4350.
[7] 柳佳,张丽,丁安伟,等. 基于中医辨证用药特点建立大鼠血热出血模型[J]. 中国药理学通报,2012,28(9):1319-1324.
[8] 赵院院,王泽茜,曹利华,等. 基于中西医临床病症特点的血热出血动物模型分析[J]. 中药药理与临床,2022,38(1):188-191.
[9] 段红福,荣春蕾,张文峰,等. 复合因素造模法建立血热出血大鼠模型及初步评价[J]. 中华中医药杂志,2015,30(1):259-263.
[10] UGWU N I,UCHE C L,OGBENNA A A,et al. Blood coagulation normalization effect of *Parkia biglobosa* seed on potassium bromate-induced coagulopathy[J]. West Afr J Med,2023,40(2):148-154.
[11] YANG C G,WANG X,GUO Y,et al. Beneficial effect of edoxaban on preventing atrial fibrillation and coagulation by reducing inflammation *via* HBG1/HBD biomarkers[J]. Front Pharmacol,2022,13:904317.
[12] ZAGÓRSKI M,SEJBOTH J. Comparing the effectiveness of concentrate of all prothrombin complex factors with recombinant human coagulation factor VIIa in the treatment of bleeding after cardiac surgery[J]. Pol Merkur Lekarski,2023,51(5):448-455.
[13] 赵燕凤,赵变香. 浅谈中药盐制的作用[J]. 基层医学论坛,2004,8(3):244.
[14] 陈文贵,王秀蓉. 盐制药物与临床的应用[J]. 陕西中医,1989,10(9):420-421.
[15] 王龙,张振秋. 基于小鼠温度趋向行为学评价生炒决明子寒热药性差异研究[J]. 辽宁中医杂志,2016,43(1):187-190.
[16] 周灿平,王伽伯,张学儒,等. 基于动物温度趋向行为学评价的黄连及其炮制品寒热药性差异研究[J]. 中国科学(C 辑:生命科学),2009,39(7):669-676.
[17] 关宇曈,张振秋. 基于冷热板示差法探究黄连-肉桂药对配伍前后的药性变化[J]. 中国药房,2016,27(7):916-919.
[18] 王玥,郑丰杰,李宇航. 从热力学角度研究中药寒热量化的回顾与思考[J]. 环球中医药,2019,12(11):1765-1769.
[19] 周灿平,赵艳玲,王伽伯,等. 基于动物温度趋向行为学评价初步建立中药寒热体质病理模型[J]. 中医杂志,2010,51(10):937-940,949.
[20] 任永申,王伽伯,赵艳玲,等. 小鼠限食/低温游泳模型评价黄连、吴茱萸及其复方寒热药性[J]. 药学学报,2009,44(11):1221-1227.
[21] 巫晓慧,王君明,秦玲玉,等. 滋阴清热功效助力生地黄抗抑郁作用探究[J]. 中华中医药杂志,2023,38(5):2340-2349.
[22] 周雪,乐娜,王玉杰,等. 阿萨伊对虚热及虚寒证小鼠的生物学效应影响[J]. 环球中医药,2019,12(8):1172-1176.
[23] 贾雷,赵艳玲,邢小燕,等. 基于冷热板示差法研究麻黄汤与麻杏石甘汤寒热药性差异[J]. 中国中药杂志,2010,35(20):2741-2744.
[24] 赵海平,赵艳玲,王伽伯,等. 基于冷热板示差法的中药大黄和附子寒热药性差异的表征[J]. 中国科学(C 辑:生命科学),2009,39(8):803-808.
[25] 李璎峪,刘瑞连,谭小娟,等. 基于多元统计方法和成分差异分析栀子及其炮制品质量[J]. 中草药,2023,54(20):6836-6843.
[26] 程钰洁,邱彩月,洪婉敏,等. 车前子及其炮制品色度值、UPLC 指纹图谱及体外抗氧化活性的差异研究[J]. 中草药,2023,54(20):6657-6670.
[27] 葛宏霞,李思琪,梅景晨,等. 基于中药炮制"醋制入肝"理论醋五味子对急性肝损伤作用谱效关系研究[J]. 药物评价研究,2023,46(9):1897-1907.