



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112891362 B

(45) 授权公告日 2022. 09. 20

(21) 申请号 202110225428.6

(22) 申请日 2021.03.01

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112891362 A

(43) 申请公布日 2021.06.04

(73) 专利权人 天津红日药业股份有限公司

地址 301700 天津市武清区天津新技术产业  
业园区武清开发区泉发路西

(72) 发明人 于洋 王建立 蒋春亮 王向成

李玉坤 李宝齐 张桂萍 董凯  
姚小青

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 薛红凡

(51) Int. Cl.

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 31/7034 (2006.01)

A61K 31/351 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

(56) 对比文件

Xin-Tong Wang et al. Paeoniflorin and  
Hydroxysafflor Yellow A in Xuebijing  
Injection Attenuate Sepsis-Induced  
Cardiac Dysfunction and Inhibit  
Proinflammatory Cytokine Production (/   
paperRedirect/1382106124887547904) .  
《Frontiers in Pharmacology》.2020,摘要部  
分.

冯燕燕等.基于“药物-靶点-通路”网络的血  
必净注射液治疗脓毒症分子调控机制.《药理学  
报》.2017,第52卷(第4期),第558页左栏部门.

审查员 李圩田

权利要求书1页 说明书29页

(54) 发明名称

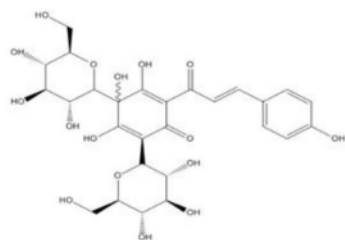
一种用于治疗脓毒症的药物组合物及其应  
用

(57) 摘要

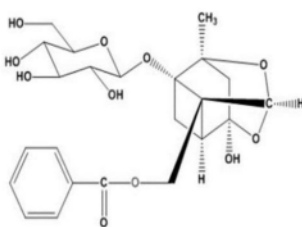
本发明提供了一种用于治疗脓毒症的药物  
组合物及其应用,属于化学药物技术领域。本发  
明提供一种包含羟基红花黄色素A、芍药苷和芍  
药内酯苷三组分药物组合物,还提供了一种包含  
羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍  
药苷、洋川芎内酯I、丹参素钠和阿魏酸的七组分  
药物组合物,本发明在细胞水平和动物水平验证  
两组药物组合物均具有有效治疗脓毒症的药效,同  
时药物毒性实验表明该药物具有较高的安全性。  
本发明提供的药物组合物是血必净注射液的药  
效成分,可用于临床上脓毒症的治疗。

1. 一种药物组合物在制备治疗脓毒症的药物中的应用,所述药物组合物由结构式如式I所示的羟基红花黄色素A、结构式如式II所示的芍药苷和结构式如式III所示的芍药内酯苷、结构式如式IV所示的氧化芍药苷、结构式如式V所示的洋川芎内酯I、结构式如式VI所示的丹参素钠、结构式如式VII所示的阿魏酸组成;

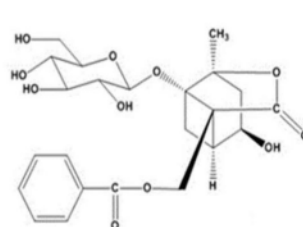
所述羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、洋川芎内酯I、丹参素钠和阿魏酸的质量比为100:100:1:0.1:1:10:0.01;



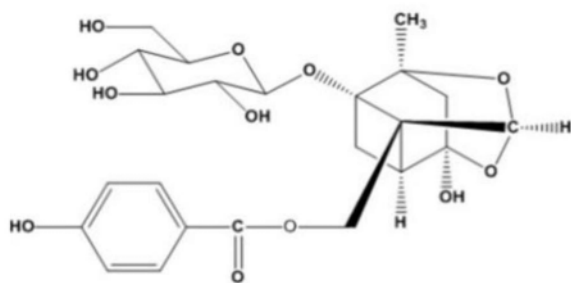
式 I



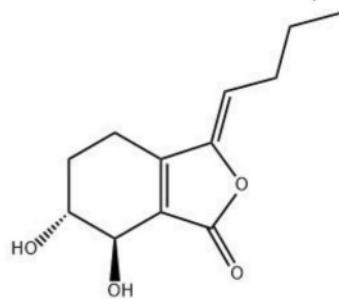
式 II



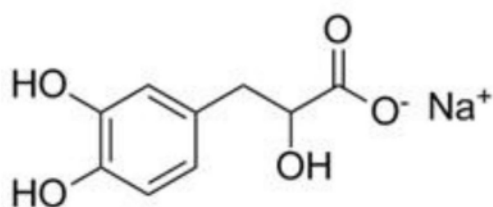
式 III;



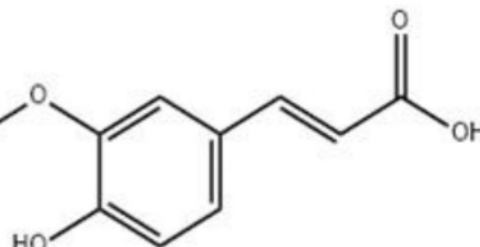
式 IV



式 V



式 VI



式 VII。

2. 根据权利要求1所述应用,其特征在于,所述药物组合物通过抑制IL-6、Foxp3、CTLA-4和/或HMGB1表达实现治疗脓毒症的目的。

3. 根据权利要求1所述应用,其特征在于,所述药物组合物通过抑制TF和/或TM释放实现治疗脓毒症的目的。

4. 根据权利要求1所述应用,其特征在于,所述药物组合物通过促进脓毒症调节性T细胞凋亡实现治疗脓毒症的目的。

5. 根据权利要求1所述应用,其特征在于,所述羟基红花黄色素A的药物剂量为600mg/kg,芍药苷的药物剂量为600mg/kg,芍药内酯苷的药物剂量为6mg/kg,氧化芍药苷的药物剂量为0.6mg/kg,洋川芎内酯I的药物剂量为6mg/kg,丹参素钠的药物剂量为60mg/kg,阿魏酸的药物剂量为0.06mg/kg。

## 一种用于治疗脓毒症的药物组合物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于化学药物技术领域,具体涉及一种用于治疗脓毒症的药物组合物及其应用。

### 背景技术

[0002] 脓毒症是针对感染的宿主反应失调引起的致命性器官功能障碍,病情凶险、致死率高是重症患者死亡的主要原因。多年以来,抗生素、抗病毒药物、血管升压药物等均用于脓毒症传统治疗,但尚未有足够的针对脓毒症发病机制的特异性药物投入临床实践。如何及时纠正脓毒症发生发展过程中的全身性炎症反应、凝血功能障碍和免疫功能紊乱,尽早恢复机体促炎-抗炎动态平衡,有效改善患者预后,成为了脓毒症治疗药物研发中亟待解决的重要课题。

[0003] 血必净注射液是依据“三证三法”的辨证原则,在“菌毒炎并治”的理论指导下,以清代王清任《医林改错》所载“血府逐瘀汤”为基础,研制而成的一种静脉注射液,由红花、赤芍、川芎、丹参、当归五味药材经提取、精制、干燥、调配等现代工艺制备而成,适用于脓毒症/因感染诱发的全身炎症反应综合征;也可配合治疗多器官功能失常综合征的脏器功能受损期。但血必净注射液是以中药材为原料制备得到,目前对脓毒症的主要药效成分还不明确,仍需要对多种中药材进行提取精制制备用于治疗脓毒症的药物组合物。

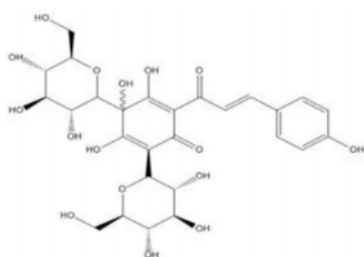
### 发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种新型的用于治疗脓毒症的药物组合物及其应用,该药物组合物是直接由脓毒症的活性化合物组成,避免中药提取繁琐步骤,且使药物组合物成分更加精简,提高产品药效。

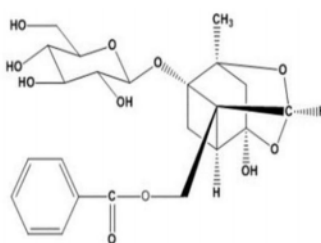
[0005] 本发明提供了一种用于治疗脓毒症的药物组合物,包括结构式如式I所示的羟基红花黄色素A、结构式如式II所示的芍药苷和结构式如式III所示的芍药内酯苷;

[0006] 所述羟基红花黄色素A、芍药苷和芍药内酯苷的质量比为1~100:1~100:0.1~10;

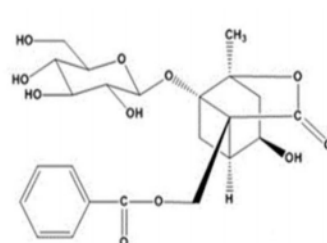
[0007]



式 I



式 II



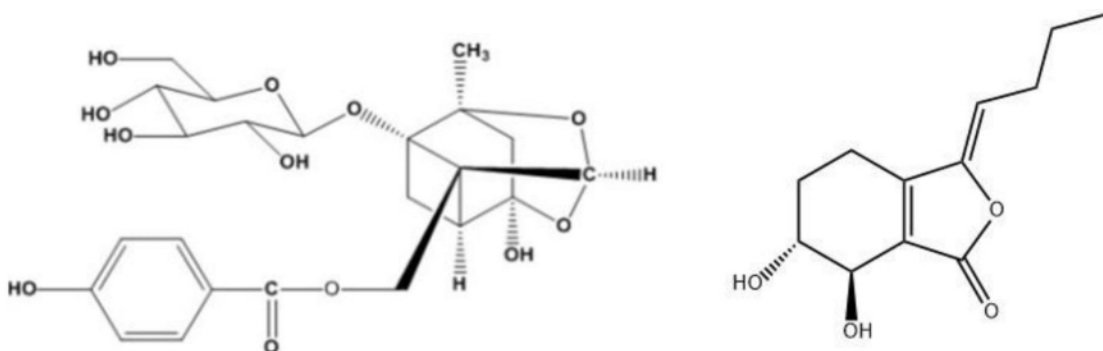
式 III。

[0008] 优选的,所述羟基红花黄色素A、芍药苷和芍药内酯苷的质量比为1~100:1~100:1~10。

[0009] 优选的,所述药物组合物还包括结构式如式IV所示的氧化芍药苷、结构式如式V所

示的洋川芎内酯I、结构式如式VI所示的丹参素钠、结构式如式VII所示的阿魏酸；

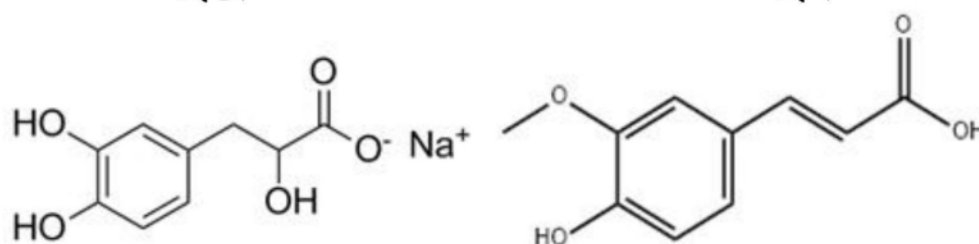
[0010] 所述羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、洋川芎内酯I、丹参素钠和阿魏酸的质量比为1~100:1~100:0.1~10:0.1~10:0.1~10:0.1~10:0.01~1；



[0011]

式 IV

式 V



式 VI

式 VII。

[0012] 优选的,所述羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、洋川芎内酯I、丹参素钠和阿魏酸的质量比为1~100:1~100:1~10:1~10:1~10:1~10:0.1~1。

[0013] 本发明提供了所述药物组合物在制备治疗脓毒症的药物中的应用。

[0014] 优选的,所述药物组合物在制备抑制脓毒症的IL-6、Foxp3、CTLA-4和/或HMGB1表达的药物中的应用。

[0015] 优选的,所述药物组合物在制备抑制脓毒症的TF和/或TM释放的药物中的应用。

[0016] 优选的,所述药物组合物在制备促进脓毒症调节性T细胞凋亡的药物中的应用。

[0017] 优选的,所述药物组合物由羟基红花黄色素A、芍药苷和芍药内酯苷三种活性化合物组成时,羟基红花黄色素A的药物剂量为6~600mg/kg,芍药苷的药物剂量为6~600mg/kg,芍药内酯苷的药物剂量为0.6~60mg/kg。

[0018] 优选的,所述药物组合物由羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、洋川芎内酯I、丹参素钠和阿魏酸七种活性化合物时,羟基红花黄色素A的药物剂量为6~600mg/kg,芍药苷的药物剂量为6~600mg/kg,芍药内酯苷的药物剂量为0.6~60mg/kg,氧化芍药苷的药物剂量为0.6~60mg/kg,洋川芎内酯I的药物剂量为0.6~60mg/kg,丹参素钠的药物剂量为0.6~60mg/kg,阿魏酸的药物剂量为0.06~6mg/kg。

[0019] 本发明提供的用于治疗脓毒症的药物组合物包括羟基红花黄色素A、芍药苷和芍药内酯苷;所述羟基红花黄色素A、芍药苷和芍药内酯苷的质量比为1~100:1~100:0.1~10。本发明在细胞水平和动物水平上证实,所述药物组合物对脓毒症中巨噬细胞IL-6、HMGB1、CTLA-4和Foxp3的表达具有抑制作用,有效抑制脓毒症的TF和TM的释放,同时对调节性T淋巴细胞的凋亡有促进作用,表明本发明提供的药物组合物对脓毒症具有明显的纠正

细胞或机体细胞免疫抑制状态的作用,从而实现脓毒症的治疗目的。

[0020] 同时,本发明所述药物组合物经过静脉给药急性毒性试验,结果表明,动物给药后未见明显异常,动物体重和体重增长率与对照组无显著性差异,大体解剖未见明显异常,说明本发明提供的药物组合物具有药物安全性。

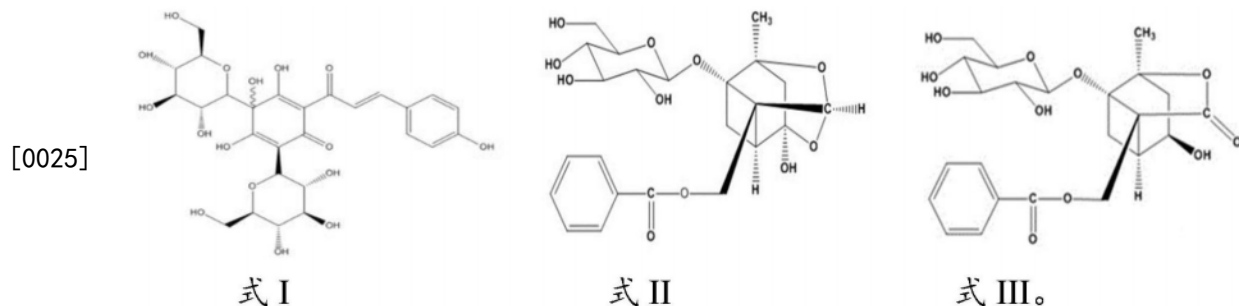
[0021] 进一步的,本发明提供的药物组合物还包括结构式如式IV所示的氧化芍药苷、结构式如式V所示的洋川芎内酯I、结构式如式VI所示的丹参素钠、结构式如式VII所示的阿魏酸;所述羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、洋川芎内酯I、丹参素钠和阿魏酸的质量比为1~100:1~100:0.1~10:0.1~10:0.1~10:0.1~10:0.01~1。本发明确定羟基红花黄色素A作为红花治疗脓毒症的活性成分,芍药苷、芍药内酯苷和氧化芍药苷作为赤芍和白芍治疗脓毒症的活性成分,洋川芎内酯I作为川芎及当归中治疗脓毒症的活性成分,丹参素作为丹参治疗脓毒症的活性成分,阿魏酸作为当归治疗脓毒症的活性成分,7种活性成分进行严格剂量配比,制备的药物组合物与3种化合物组成的药物组合物相比,在对脓毒症中巨噬细胞IL-6、HMGB1、CTLA-4和Foxp3的表达方面具有更强的抑制作用,对脓毒症的TF和TM的释放具有更强的抑制作用,同时对调节性T淋巴细胞的凋亡有更强促进作用,本发明实验表明所述药物组合物在治疗脓毒症方面具有更强的药效,达到更优的治疗效果。

[0022] 同时,本发明还对七种活性成分组成的药物组合物进行静脉给药急性毒性试验,结果表明,动物给药后未见明显异常,动物体重和体重增长率与对照组无显著性差异,大体解剖未见明显异常,说明本发明提供的药物组合物具有药物安全性。

### 具体实施方式

[0023] 本发明提供了一种用于治疗脓毒症的药物组合物,包括结构式如式I所示的羟基红花黄色素A、结构式如式II所示的芍药苷和结构式如式III所示的芍药内酯苷;

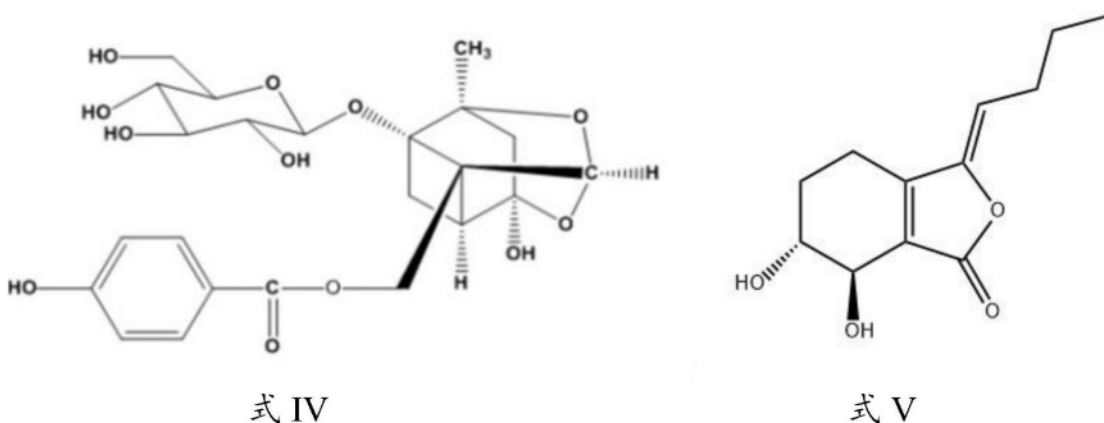
[0024] 所述羟基红花黄色素A、芍药苷和芍药内酯苷的质量比为1~100:1~100:0.1~10;



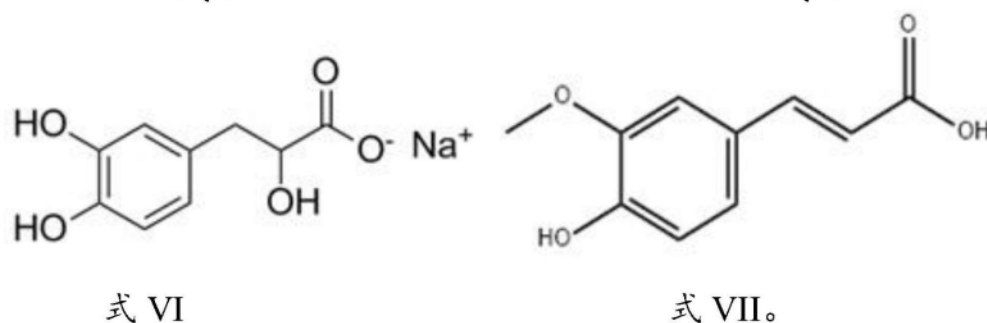
[0026] 在本发明中,所述羟基红花黄色素A、芍药苷和芍药内酯苷的质量比优选为1~100:1~100:1~10,包括1~100:1:1,1~100:10:1;1~100:100:1、1~100:1:0.01,1~100:1:10,1~100:10:10,1~100:10:1、1~100:10:0.01,具体为1:10:10、1:100:1、10:1:10、10:10:1、10:100:0.1、100:1:1、100:10:0.1和10:10:1,最优选为10:10:1。羟基红花黄色素A分子式: $C_{27}H_{30}O_{16}$ ,分子量:612.53,为常用中药红花的药效成分,羟基红花黄色素A是具有单查尔酮苷类结构的化合物,是红花药理功效的最有效水溶性部位,可抑制血小板激活因子诱发的血小板聚集与释放,可竞争性地抑制血小板激活因子与血小板受体的结合,具

有抗血小板和抗心肌缺血作用,是红花黄色素的活血化瘀有效成分,同时还具有一定的抗炎、细胞保护和抗肿瘤活性。芍药苷(Paeoniflorin),分子式: $C_{23}H_{28}O_{11}$ ,分子量为480.46,为常用中药赤芍和白芍的药效成分,芍药苷是一种单萜类糖苷化合物,药理作用多样,具有抗自由基损伤、抑制细胞内钙超载和抗神经毒性等活性,体内实验证明其有降低血液黏度、扩张血管、改善微循环、抗氧化、抗惊厥等多种生物学效应,并且毒副作用较小。芍药内酯苷分子式: $C_{23}H_{28}O_{11}$ ,分子量:480.46。芍药内酯苷与芍药苷化学结构相似,是芍药苷的同分异构体,其含量较芍药苷低,芍药内酯苷可作用于免疫系统中脾脏、胸腺和血液系统中造血细胞因子,具有明确的补血作用,同时还可作用于神经系统中HPA轴和脑内单胺类神经递,具有明显的抗抑郁作用。所述羟基红花黄色素A、芍药内酯苷和芍药苷的形式不仅包含其化合物单体,还优选包括其药学上可接受的盐、溶剂化物、多晶型、对映体或外消旋体混合物等。

[0027] 在本发明中,所述药物组合物优选还包括结构式如式IV所示的氧化芍药苷、结构式如式V所示的洋川芎内酯I、结构式如式VI所示的丹参素钠、结构式如式VII所示的阿魏酸;所述羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、洋川芎内酯I、丹参素钠和阿魏酸的质量比为1~100:1~100:0.1~10:0.1~10:0.1~10:0.1~10:0.01~1;



[0028]



[0029] 在本发明中,所述羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、洋川芎内酯I、丹参素钠和阿魏酸的质量比优选为1~100:1~100:1~10:1~10:1~10:1~10:0.1~1,具体优选为1:10:1:1:1:1:0.1、1:100:10:10:10:10:1、10:1:0.1:1:1:10:1、10:10:1:10:10:0.1:0.01、10:100:10:0.1:0.1:1:0.1、100:0.1:1:0.1:10:1:1、100:10:0.1:10:1:0.1:10:0.01、100:100:0.1:10:1:0.1:1、1:1:10:10:1:1:0.01、1:10:0.1:0.1:10:10:1、1:100:1:1:0.1:0.1:1、10:1:1:0.1:1:0.1:0.1、10:10:10:10:0.1:0.1:1、10:100:0.1:1:10:1:0.01、100:1:10:1:10:0.1:1、100:10:0.1:10:0.1:1:1、100:100:1:0.1:1:10:0.01,最优选为100:100:1:0.1:1:10:0.01。氧化芍药苷含量在赤芍和白芍中相对较小,其药理作用研究鲜有报导。芍药总苷有止痛、抗感染、抗氧化和抗癌等作用,有着极高的应用价值,因此值

得在临床中推广。洋川芎内酯I (Senkyunolide I) 为川芎及当归等中药提取物中分离得到的一种苯酞类化合物,具有很好的脂溶性和水溶性,并且具有多种药理作用,洋川芎内酯I能够抑制NF- $\kappa$ B通路,从而发挥抗炎作用,体内实验发现其对缺血性再灌注损伤具有一定的保护作用,同时能降低红细胞的变形指数和指向指数,降低红细胞的聚集性,具有抗凝和抗血小板聚集的活性作用。丹参素 (Tanshinol) 是丹参水溶性成分中的主要药效成分,是一种酚性芳香酸类化合物,为增加稳定性,将其制成丹参素钠,功效与丹参素一致,研究表明丹参素能够缩小心肌梗死范围和减轻病程,并减少心肌缺血再灌注损伤,对心肌具有保护作用,丹参素还能明显抑制血小板的聚集,降低全血粘度,其抗凝作用能够改善全身各脏器(如心、肝、肺等器官)的微循环障碍,有助于机体组织的康复,同时丹参素还具有一定的抗菌消炎及增强机体免疫作用。阿魏酸 (Ferulic Acid) 是当归的药效成分之一,属于酚酸类化合物,具有抗血小板聚集,抑制血小板5-羟色胺释放,抑制血小板血栓素A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 的生成,增强前列腺素活性,镇痛,缓解血管痉挛等作用。实验证明,羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、洋川芎内酯I、丹参素钠、阿魏酸是血必净注射液中的药效组分,在脓毒症治疗中的作用具有重要的现实意义和应用价值。在本发明中,氧化芍药苷、洋川芎内酯I、丹参素钠、阿魏酸的形式不仅包含其化合物单体,还优选包括其药学上可接受的盐、溶剂化物、多晶型、对映体或外消旋体混合物等。

[0030] 在本发明中,所述药物组合物的制备方法,优选包括以下步骤:

[0031] 将羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷按上述质量比混合得到。

[0032] 当药物组合物包括7种,将羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、洋川芎内酯I、丹参素钠和阿魏酸按上述质量比混合得到。

[0033] 本发明提供了所述药物组合物在制备治疗脓毒症的药物中的应用。所述药物组合物在治疗脓毒症中的应用。

[0034] 在本发明中,所述药物组合物优选在制备抑制脓毒症的IL-6、Foxp3、CTLA-4和/或HMGB1表达的药物中的应用。实验结果表明,在细胞水平和动物水平,对照组含有少量IL-6、HMGB1;模型组IL-6、HMGB1、Foxp3、CTLA-4含量即明显增加,所述药物组合物给药组(8h、24h和48h)的IL-6、HMGB1、Foxp3和CTLA-4血浆含量均显著低于模型组,各剂量组的三组分药物组可显著降低CLP脓毒症IL-6、HMGB1、Foxp3和CTLA-4的表达,提示对脓毒症大鼠模型早期炎症反应均具有明显的抑制作用。所述药物组合物通过抑制IL-6、Foxp3、CTLA-4和/或HMGB1表达达到治疗脓毒症早期炎症反应的效果。

[0035] 在本发明中,所述药物组合物优选在制备抑制脓毒症的TF和/或TM释放的药物中的应用。实验表明,在细胞水平和动物水平上,对照组单核细胞TM和TF存在一定表达;模型组TM和TF(术后12h,24h,48h和72h)表达均显著高于对照组( $p < 0.05$ ),且随术后时间的延长而逐渐增高;药物组合物给药组TM和TF(术后12h,24h,48h和72h)表达与模型组相比均出现显著降低( $p < 0.05$ )。说明所述药物组合物对脓毒症大鼠模型具有明显的抑制凝血因子释放、改善高凝状态的作用。所述药物组合物通过抑制TF和/或TM释放,达到治疗脓毒症凝血症的效果。

[0036] 在本发明中,所述药物组合物优选在制备促进脓毒症调节性T细胞(Treg)凋亡的药物中的应用。实验表明,模型组Treg细胞凋亡率明显低于对照组( $p < 0.05$ ),中药组合物给药组均显著高于模型组( $p < 0.05$ )。与模型组相比,各剂量组的三组分药物组和七组分药物

组均可促进脓毒症Treg凋亡,下调对T淋巴细胞增殖和分泌功能的抑制效应。所述药物组合物通过促进Treg凋亡,调节T淋巴细胞增殖和分泌功能。

[0037] 在本发明中,所述药物组合物在细胞水平和动物水平分别进行药物实验,在动物给药剂量的基础上,根据徐叔云主编的《药理实验方法学》中人和动物间按体表面积折算法,按照公式A计算人的给药剂量:

[0038] 人体剂量=大鼠剂量/0.018公式A

[0039] 其中,以成人体重70kg、大鼠体重0.2kg计。

[0040] 所述药物组合物优选由羟基红花黄色素A、芍药苷和芍药内酯苷三种活性化合物组成时,羟基红花黄色素A的药物剂量为6~600mg/kg,芍药苷的药物剂量为6~600mg/kg,芍药内酯苷的药物剂量为0.6~60mg/kg。所述药物组合物优选由羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、洋川芎内酯I、丹参素钠和阿魏酸七种活性化合物时,羟基红花黄色素A的药物剂量为6~600mg/kg,芍药苷的药物剂量为6~600mg/kg,芍药内酯苷的药物剂量为0.6~60mg/kg,氧化芍药苷的药物剂量为0.6~60mg/kg,洋川芎内酯I的药物剂量为0.6~60mg/kg,丹参素钠的药物剂量为0.6~60mg/kg,阿魏酸的剂量为0.06~6mg/kg。

[0041] 本发明对制备的药物的剂型没有特殊限制,采用本领域所熟知的药物剂型即可,例如片剂、胶囊剂、口服液、颗粒剂、冲剂、丸剂、散剂、膏剂、丹剂、混悬剂、粉剂、溶液剂、注射剂、栓剂、喷雾剂、滴剂等。本发明对所述药物的各剂型产品的制备方法没有特殊限制,采用本领域所熟知的药物剂型的制备方法即可。

[0042] 下面结合实施例对本发明提供的一种用于治疗脓毒症的药物组合物及其应用进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0043] 实施例1

[0044] 1.实验材料

[0045] 清洁级SD大鼠(雌雄各半),180~220g;羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷和丹参素钠购自上海同田生物技术股份有限公司;氧化芍药苷、洋川芎内酯I和阿魏酸购自鼎瑞化工(上海)有限公司,生理盐水(0.9%氯化钠注射液)。

[0046] 2.实验方法

[0047] 根据适应期动物体重增长、饮食、活动等筛选80只动物(雌雄各半)进入本试验,采用体重区组分组法分为4组,每组20只,雌雄各半。

[0048] 三组分药物中各组分的浓度:羟基红花黄色素A 30mg/ml,芍药苷40mg/ml,芍药内酯苷4mg/ml。药液配制方法如下:在精密天平(1/10000g)分别称取(3.0g羟基红花黄色素A、4.0g芍药苷、0.4g芍药内酯苷)溶解于适量生理盐水(0.9%的氯化钠水溶液)中,定容至100mL除菌过滤制成三组分药物。

[0049] 七组分药物中各组分的浓度:羟基红花黄色素A 30mg/ml,芍药苷40mg/ml,芍药内酯苷4mg/ml,氧化芍药苷4mg/ml,洋川芎内酯I 4mg/ml,丹参素钠4mg/ml,阿魏酸0.5mg/ml。药液配制方法如下:称量3.0g羟基红花黄色素A、4.0g芍药苷、0.4g芍药内酯苷、0.4g氧化芍药苷、0.4g洋川芎内酯I,0.4g丹参素钠,0.05g阿魏酸溶解于适量生理盐水(0.9%的氯化钠水溶液)中,定容至100mL除菌过滤制成七组分药物。

[0050] 大鼠静脉注射限量为6mL/kg,综上三组分药物给药剂量:羟基红花黄色素A

180mg/kg, 芍药苷240mg/kg, 芍药内酯苷24mg/kg。

[0051] 七组分药物给药剂量: 羟基红花黄色素A 180mg/kg, 芍药苷240mg/kg, 芍药内酯苷24mg/kg, 氧化芍药苷24mg/kg, 洋川芎内酯I 24mg/kg, 丹参素钠24mg/kg, 阿魏酸3mg/kg。

[0052] 实验组单次给药, 6mL/kg上述浓度的三组分药物和七组分药物, 静脉缓慢注射; 对照组给予相同剂量的生理盐水溶液。

[0053] 给药后至少连续观察2小时, 给药后第1天上下午各观察记录1次, 以后每日观察记录1次, 共观察14天。观察期内, 观察记录动物毒性反应情况和各组动物的死亡情况, 对死亡或濒死动物及时剖检。给药后14天, 所有存活动物进行剖检, 肉眼观察各主要脏器有无明显异常变化; 脏器出现体积、颜色、质地等改变时, 均应记录并进行病理组织学检查。

[0054] 3. 实验结果

[0055] 大鼠单次缓慢静脉推注三组分药物, 结果显示: (1) 动物给药后未见异常症状; (2) 给药组动物体重及体重增长率与对照组无显著性差异; (3) 大体剖检未见明显异常。

[0056] 大鼠单次缓慢静脉推注七组分药物, 结果显示: (1) 动物给药后未见异常症状; (2) 给药组动物体重及体重增长率与对照组无显著性差异; (3) 大体剖检未见明显异常。

[0057] 实施例2

[0058] 评价三组分药物、七组分药物对LPS刺激下大鼠腹腔巨噬细胞IL-6释放的影响

[0059] 1. 实验材料

[0060] 雄性清洁级SD大鼠 (180~220g), 内毒素 (LPS), 羟基红花黄色素A, 芍药苷, 芍药内酯苷, 氧化芍药苷, 洋川芎内酯I, 丹参素钠, 阿魏酸, RPMI-1640培养基, 24孔板, IL-6ELISA试剂盒。

[0061] 2. 实验方法

[0062] 分离雄性SD大鼠腹腔巨噬细胞, 具体方法如下: 雄性SD大鼠术前禁食12h, 麻醉后打开腹腔, 向腹腔注入预冷PBS液10mL, 用手指轻压揉腹壁, 使液体在腹腔内流动。吸取腹腔中的液体注入灭菌管中, 再用预冷PBS液10mL灌洗一次, 操作同上。将合并收集到的灌洗液250g, 4℃离心10min, 弃上清。加入2mL红细胞裂解液溶解红细胞, 轻微震荡两次, 每次5s, 静置5min后加入4mL D-Hanks溶液终止反应。按照上述方法再次离心, 弃上清。用培养液洗涤沉淀, 然后重悬细胞, 制成 $2 \times 10^6$ /mL细胞悬液。将细胞悬液接种于24孔板, 置于37℃, 5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱培养。每组6个平行孔。分别培养12h和24h后收集上清, 采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定细胞因子含量。

[0063] 实验分为对照组、模型组和给药组, 各组处理方法如下: 各组细胞置于37℃, 5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱培养过夜后, 对照组和模型组加入相应体积的培养液, 给药组加入等体积的对应浓度药液, 培养箱孵育1h后, 对照组不加入LPS, 模型组和给药组加入LPS (75ng/mL) 刺激, 各组在12h、24h后, 收集细胞培养液上清0.5mL, -20℃冰箱保存, 集中进行相应细胞因子检测。其中给药组采用正交实验法, 正交实验分组方法见表1和表2。

[0064] 表1三组分药物组正交实验分组

[0065]

| 组别 | 羟基红花黄色素A | 芍药苷 | 芍药内酯苷 |
|----|----------|-----|-------|
| 1  | 低        | 低   | 低     |
| 2  | 低        | 中   | 高     |
| 3  | 低        | 高   | 中     |

|   |   |   |   |
|---|---|---|---|
| 4 | 中 | 低 | 高 |
| 5 | 中 | 中 | 中 |
| 6 | 中 | 高 | 低 |
| 7 | 高 | 低 | 中 |
| 8 | 高 | 中 | 低 |
| 9 | 高 | 高 | 高 |

[0066] 表1中羟基红花黄色素A三个浓度分别为低2μM,中20μM,高200μM;芍药苷三个浓度分别为低4μM,中40μM,高400μM;芍药内酯苷三个浓度分别为低2μM,中20μM,高200μM;氧化芍药苷三个浓度分别为低2μM,中20μM,高200μM;洋川芎内酯I三个浓度分别为低4μM,中40μM,高400μM;丹参素钠三个浓度分别为低2μM,中20μM,高200μM;阿魏酸三个浓度分别为低4μM,中40μM,高400μM。

[0067] 表2七组分药物组正交实验分组

| 组别 | 羟基红花黄色素A | 芍药苷 | 芍药内酯苷 | 氧化芍药苷 | 洋川芎内酯I | 丹参素钠 | 阿魏酸 |
|----|----------|-----|-------|-------|--------|------|-----|
| 1  | 低        | 低   | 低     | 低     | 低      | 低    | 低   |
| 2  | 低        | 中   | 中     | 中     | 中      | 中    | 中   |
| 3  | 低        | 高   | 高     | 高     | 高      | 高    | 高   |
| 4  | 中        | 低   | 低     | 中     | 中      | 高    | 高   |
| 5  | 中        | 中   | 中     | 高     | 高      | 低    | 低   |
| 6  | 中        | 高   | 高     | 低     | 低      | 中    | 中   |
| 7  | 高        | 低   | 中     | 低     | 高      | 中    | 高   |
| 8  | 高        | 中   | 高     | 中     | 低      | 高    | 低   |
| 9  | 高        | 高   | 低     | 高     | 中      | 低    | 中   |
| 10 | 低        | 低   | 高     | 高     | 中      | 中    | 低   |
| 11 | 低        | 中   | 低     | 低     | 高      | 高    | 中   |
| 12 | 低        | 高   | 中     | 中     | 低      | 低    | 高   |
| 13 | 中        | 低   | 中     | 高     | 低      | 高    | 中   |
| 14 | 中        | 中   | 高     | 低     | 中      | 低    | 高   |
| 15 | 中        | 高   | 低     | 中     | 高      | 中    | 低   |
| 16 | 高        | 低   | 高     | 中     | 高      | 低    | 中   |
| 17 | 高        | 中   | 低     | 高     | 低      | 中    | 高   |
| 18 | 高        | 高   | 中     | 低     | 中      | 高    | 低   |

[0070] 药液配制方式如下:根据表1中对应的各组浓度,在精密天平(1/10000g)称取适当重量的羟基红花黄色素A、芍药苷和芍药内酯苷,按照不同浓度组合情况组合至不同容量瓶中,分别溶解于适量培养基(含10%胎牛血清)中,制成相应浓度的9组三组分药物;

[0071] 根据表2中对应的各组浓度,在精密天平(1/10000g)称取适合重量的羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、洋川芎内酯、丹参素钠和阿魏酸,按照不同浓度组

合情况组合至不同容量瓶中,分别溶解于适量培养基(含10%胎牛血清)中,制成相应浓度的18组七组分药物。

### [0072] 3. 实验结果

[0073] 实验结果(表3)表明:与模型组相比,各剂量组的三组分药物组和七组分药物组均可显著降低12h、24h大鼠腹腔巨噬细胞IL-6的释放水平,表明三组分药物组和七组分药物组对脓毒症细胞模型早期炎症因子具有很好的抑制效果。

[0074] 表3三组分药物组和七组分药物组对LPS刺激下大鼠腹腔巨噬细胞IL-6表达的影响( $\bar{x} \pm s$ , n=6, 单位:pg/mL)

| 组别     |   | 12h          | 24h          |
|--------|---|--------------|--------------|
| 对照组    |   | 113.91±5.75* | 113.91±5.75* |
| 模型组    |   | 223.35±6.18  | 242.15±2.83  |
| 三组分药物组 | 1 | 178.94±3.54* | 186.97±2.34* |
|        | 2 | 168.63±2.10* | 180.28±1.55* |
|        | 3 | 172.05±1.99* | 183.26±1.61* |

|        |        |    |              |              |
|--------|--------|----|--------------|--------------|
| [0076] | 七组分药物组 | 4  | 170.63±2.69* | 181.37±2.17* |
|        |        | 5  | 172.50±3.95* | 181.67±2.31* |
|        |        | 6  | 168.36±3.21* | 182.51±2.54* |
|        |        | 7  | 170.67±3.54* | 180.12±2.40* |
|        |        | 8  | 169.36±4.16* | 182.48±3.16* |
|        |        | 9  | 162.78±2.05* | 172.39±2.75* |
|        |        | 1  | 146.73±1.51* | 167.26±1.47* |
|        |        | 2  | 140.88±2.49* | 163.92±2.17* |
|        |        | 3  | 139.60±2.52* | 160.90±3.51* |
|        |        | 4  | 139.70±2.52* | 164.94±0.94* |
|        |        | 5  | 142.20±3.19* | 162.57±3.61* |
|        |        | 6  | 140.90±2.52* | 163.42±2.49* |
|        |        | 7  | 141.59±3.43* | 161.39±2.09* |
|        |        | 8  | 141.15±2.30* | 161.30±2.41* |
|        |        | 9  | 138.76±3.58* | 158.96±1.82* |
|        |        | 10 | 142.13±2.54* | 160.73±3.98* |
|        |        | 11 | 140.92±3.12* | 163.03±3.52* |
|        |        | 12 | 140.36±2.89* | 161.37±2.90* |
|        |        | 13 | 142.99±3.67* | 163.87±2.60* |
|        |        | 14 | 142.20±2.44* | 162.58±2.78* |
|        |        | 15 | 139.67±2.04* | 161.68±1.95* |
|        |        | 16 | 139.65±2.86* | 163.63±3.52* |
|        |        | 17 | 141.86±1.84* | 161.94±1.69* |
|        |        | 18 | 134.86±1.01* | 155.36±3.40* |

[0077] 注：\*,表示与模型组相比,P<0.05。

[0078] 实施例3

[0079] 评价三组分药物、七组分药物对LPS刺激下大鼠腹腔巨噬细胞HMGB1释放的影响

[0080] 1.实验材料

[0081] 雄性清洁级SD大鼠(180~220g),内毒素(LPS),羟基红花黄色素A,芍药苷,芍药内酯苷,氧化芍药苷,洋川芎内酯I,丹参素钠,阿魏酸,RPMI-1640培养基,24孔板,HMGB1 ELISA试剂盒。

[0082] 2.实验方法

[0083] 分离雄性SD大鼠腹腔巨噬细胞,具体方法如下:雄性SD大鼠术前禁食12h,麻醉后打开腹腔,向腹腔注入预冷PBS液10mL,用手指轻压揉腹壁,使液体在腹腔内流动。吸取腹腔中的液体注入灭菌管中,再用预冷PBS液10mL灌洗一次,操作同上。将合并收集到的灌洗液250g,4℃离心10min,弃上清。加入2mL红细胞裂解液溶解红细胞,轻微震荡两次,每次5s,静置5min后加入4mL D-Hanks溶液终止反应。按照上述方法再次离心,弃上清。用培养液洗涤沉淀,然后重悬细胞,制成 $2 \times 10^6$ /mL细胞悬液。将所述细胞悬液接种于24孔板,置于37℃,

5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱培养。每组6个平行孔。分别培养48h和72h后收集上清,采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)测定细胞因子含量。

[0084] 实验分为对照组、模型组和给药组,各组处理方法如下:各组细胞置于37℃,5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱培养过夜后,对照组和模型组加入相应体积的培养液,给药组加入等体积的对应浓度药液,培养箱孵育1h后,对照组不加入LPS,模型组和给药组加入LPS(75ng/mL)刺激,各组在48h、72h后,收集细胞培养液上清0.5mL,-20℃冰箱保存,集中进行相应细胞因子检测。实验分组及药液配制方式同实施例2。

### [0085] 3. 实验结果

[0086] 实验结果(表4)表明:与模型组相比,各剂量组的三组分药物组和七组分药物组均可显著降低48h、72h大鼠腹腔巨噬细胞HMGB1的释放水平,表明三组分药物组和七组分药物组对脓毒症细胞模型晚期炎症因子具有很好的抑制效果。

[0087] 表4三组分药物组和七组分药物组对LPS刺激下大鼠腹腔巨噬细胞HMGB1表达的影响( $\bar{x} \pm s$ , n=6, 单位:pg/mL)

[0088]

| 组别     |   | 48h         | 72h         |
|--------|---|-------------|-------------|
| 对照组    |   | 24.96±1.95* | 24.89±1.84* |
| 模型组    |   | 54.26±2.66  | 73.76±2.73  |
| 三组分药物组 | 1 | 43.37±1.34* | 60.92±2.75* |
|        | 2 | 38.59±3.30* | 55.68±1.78* |
|        | 3 | 36.79±3.16* | 55.69±3.04* |
|        | 4 | 36.09±3.71* | 55.51±2.20* |
|        | 5 | 36.71±3.38* | 54.18±2.25* |
|        | 6 | 36.40±3.38* | 55.95±2.06* |
|        | 7 | 35.08±2.72* | 54.62±2.45* |
|        | 8 | 39.71±2.98* | 54.44±2.42* |
|        | 9 | 30.46±1.81* | 47.51±2.55* |
| 七组分药物组 | 1 | 39.93±1.45* | 48.87±1.20* |
|        | 2 | 34.38±2.66* | 41.71±1.40* |
|        | 3 | 35.26±2.35* | 43.80±2.38* |
|        | 4 | 33.88±2.42* | 43.55±2.09* |
|        | 5 | 35.43±2.27* | 42.76±2.20* |
|        | 6 | 33.45±2.32* | 42.93±2.01* |
|        | 7 | 34.74±2.28* | 43.24±3.25* |

[0089]

|    |             |             |
|----|-------------|-------------|
| 8  | 35.84±2.81* | 43.32±2.28* |
| 9  | 34.88±1.80* | 44.35±2.51* |
| 10 | 35.65±2.53* | 42.45±1.76* |
| 11 | 34.58±2.15* | 43.50±2.87* |
| 12 | 36.50±1.54* | 44.40±3.63* |
| 13 | 33.55±0.71* | 43.24±2.89* |
| 14 | 35.34±2.22* | 44.68±2.61* |
| 15 | 34.91±2.19* | 44.64±2.82* |
| 16 | 36.56±1.56* | 42.64±2.30* |
| 17 | 33.01±1.49* | 43.52±2.47* |
| 18 | 29.43±1.05* | 37.16±1.23* |

[0090] 注：\*,表示与模型组相比,  $P < 0.05$ 。

[0091] 实施例4

[0092] 评价三组分药物、七组分药物对LPS刺激下大鼠腹主动脉内皮细胞TM释放的影响

[0093] 1. 实验材料

[0094] 雄性清洁级SD大鼠(180~220g), LPS, 羧基红花黄色素A, 芍药苷, 芍药内酯苷, 氧化芍药苷, 洋川芎内酯I, 丹参素钠, 阿魏酸, ECM培养基, 24孔板, 组织因子(TM) ELISA试剂盒。

[0095] 2. 实验方法

[0096] 用颈椎脱臼法处死大鼠后, 浸泡于体积分数为75%的乙醇中5min, 逐层打开胸、腹腔, 充分暴露胸、腹主动脉, 分离其周围组织, 从近心端分离主动脉至髂总动脉分支处, 放入含有PBS的培养皿中, 无菌剥离血管外膜的脂肪组织和纤维组织, PBS冲洗血管腔。将主动脉切成约1.5mm×1.5mm小块, 置于6mL 0.25%的IV型胶原酶中, 37℃消化15min, 每5min震荡一次, 小心吸走消化液, 保留组织块, 再加入6mL 1.0%的中性蛋白酶, 37℃消化15min, 每5min震荡一次, 吸走消化液, 补充ECM 10mL, 反复吹打, 1000r/min离心10min, 弃去培养基和消化液, 保留碎块, 将组织块平铺于10cm的培养皿底部, 倒放于37℃烘箱中2h, 使组织块粘牢, 加入适量ECM, 没入组织块为宜, 放37℃、体积分数为5%的CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱内培养, 3天更换一次培养基。7天左右可见内皮细胞由组织块边缘爬出并逐渐向外延伸, 呈扁平短梭形或多角形, 去除组织块, 此时用0.25%胰蛋白酶消化, 按1:3的比例在25cm<sup>2</sup>的培养瓶中传代, 用第3~4代细胞进行实验。[0097] 按照上述中大鼠腹主动脉内皮细胞的培养方法培养细胞, 制备细胞悬液, 以 $1.2 \times 10^5$ /mL接种细胞, 将细胞悬液接种于24孔板中, 37℃培养, 约12h后模型组和给药组给予LPS刺激, 1h后分别给予不同药液进行干预, 分别于刺激后24h、48h、72h收集上清。[0098] 实验分为对照组、模型组和给药组, 各组处理方法如下: 各组细胞置于37℃, 5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱培养过夜后, 对照组和模型组加入相应体积的培养液, 给药组加入等体积的对应浓度药液, 培养箱孵育1h后, 对照组不加入LPS, 模型组和给药组加入LPS (75ng/mL) 刺激, 各组在24h、48h、72h后, 收集细胞培养液上清0.5mL, -20℃冰箱保存, 集中进行相应细胞因子检测。实验分组及药液配制方式同实施例2。

## [0099] 3.实验结果

[0100] TM普遍存在于大鼠腹主动脉内皮细胞表面,通过与凝血酶结合和激活蛋白C系统发挥抗凝作用,在脓毒症状态下,TM大量释放到周围血液中,从而使抗凝作用减弱。药物干预下TM的降低有助于凝血因子抗凝/促凝的平衡,有利于促进细胞/机体凝血功能往正常状态恢复。

[0101] 实验结果(表5)表明:与模型组相比,各浓度组的三组分药物组和七组分药物组均可降低24h、48h和72h大鼠腹主动脉内皮细胞TM的释放,表明三组分药物组和七组分药物组对脓毒症细胞模型有促进凝血功能恢复正常的效果。

[0102] 表5三组分药物组和七组分药物组对LPS刺激下大鼠腹主动脉内皮细胞TM释放的影响( $\bar{x} \pm s$ , n=6, 单位:pg/mL)

[0103]

| 组别     |    | 24h         | 48h         | 72h         |
|--------|----|-------------|-------------|-------------|
| 对照组    |    | 8.34±0.87*  | 8.99±1.03*  | 8.63±0.96*  |
| 模型组    |    | 40.92±1.55  | 59.90±2.47  | 49.31±1.54  |
| 三组分药物组 | 1  | 27.19±0.86* | 38.00±1.56* | 46.57±1.57* |
|        | 2  | 21.34±2.39* | 32.52±2.20* | 42.48±1.45* |
|        | 3  | 23.09±1.76* | 33.24±2.64* | 41.36±2.13* |
|        | 4  | 21.44±2.88* | 33.52±1.66* | 41.04±1.82* |
|        | 5  | 20.87±2.15* | 33.18±2.62* | 40.83±2.83* |
|        | 6  | 18.86±1.90* | 32.90±2.67* | 41.33±2.07* |
|        | 7  | 21.37±2.54* | 33.81±3.19* | 40.22±2.13* |
|        | 8  | 22.37±2.24* | 33.08±3.12* | 41.79±2.02* |
|        | 9  | 16.69±1.36* | 27.57±1.84* | 35.95±1.94* |
| 七组分药物组 | 1  | 23.61±1.14* | 33.69±2.20* | 41.16±1.47* |
|        | 2  | 19.29±2.20* | 29.56±0.87* | 35.43±2.67* |
|        | 3  | 18.33±2.67* | 27.72±2.71* | 33.94±1.69* |
|        | 4  | 21.22±2.09* | 27.76±2.66* | 35.07±2.31* |
|        | 5  | 18.17±1.98* | 28.01±2.78* | 36.40±2.89* |
|        | 6  | 20.53±1.70* | 28.40±3.26* | 35.21±3.34* |
|        | 7  | 17.32±1.08* | 29.17±3.62* | 34.79±2.27* |
|        | 8  | 19.22±2.35* | 28.48±3.60* | 36.15±3.03* |
|        | 9  | 18.05±1.93* | 28.83±1.82* | 36.57±2.31* |
|        | 10 | 19.38±2.97* | 29.19±1.66* | 35.60±2.67* |

[0104]

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| 11 | 18.69±2.68* | 35.88±2.40* | 33.82±2.83* |
| 12 | 19.43±3.20* | 28.70±2.98* | 34.55±3.48* |
| 13 | 19.12±1.92* | 27.79±3.07* | 36.76±2.13* |
| 14 | 18.54±2.69* | 27.47±2.43* | 34.72±3.00* |
| 15 | 19.09±2.55* | 27.74±3.85* | 34.16±3.28* |
| 16 | 18.36±1.61* | 28.04±2.39* | 37.39±2.39* |
| 17 | 18.73±2.73* | 28.83±3.11* | 35.15±3.38* |
| 18 | 13.13±1.63* | 22.57±1.27* | 30.62±0.98* |

[0105] 注：\*,表示与模型组相比,P&lt;0.05。

[0106] 实施例5

[0107] 评价三组分药物、七组分药物对LPS刺激下大鼠腹主动脉内皮细胞TF释放的影响

[0108] 1.实验材料

[0109] 雄性清洁级SD大鼠(180~220g),LPS,羟基红花黄色素A,芍药苷,芍药内酯苷,氧化芍药苷,洋川芎内酯I,丹参素钠,阿魏酸,ECM培养基,24孔板,组织因子(TF)ELISA试剂盒。

[0110] 2.实验方法

[0111] 实验方法及分组处理方法同实施例4。

[0112] 实验分组及药液配制方式同实施例2。

[0113] 3.实验结果

[0114] TF是大鼠腹主动脉内皮细胞重要的促凝因子,在脓毒症状态下,高凝状态表现为TF的大量释放。药物干预下TF的降低有助于凝血因子抗凝/促凝的平衡,有利于促进细胞/机体凝血功能往正常状态恢复。

[0115] 实验结果(表6)表明:与模型组相比,各浓度组的三组分药物组和七组分药物组均可降低24h,48h和72h大鼠腹主动脉内皮细胞促凝因子TF的释放,表明三组分药物组和七组分药物组对脓毒症细胞模型有促进凝血功能恢复正常的效果。

[0116] 表6三组分药物组和七组分药物组对LPS刺激下大鼠腹主动脉内皮细胞TF释放的影响( $\bar{x} \pm s$ , n=6,单位:pg/mL)

[0117]

| 组别     | 24h         | 48h         | 72h         |
|--------|-------------|-------------|-------------|
| 对照组    | 18.54±0.98* | 19.02±0.83* | 16.73±1.19* |
| 模型组    | 32.39±0.73  | 33.49±1.79  | 28.99±0.70  |
| 三组分药物组 | 1           | 26.66±0.66* | 27.07±1.22* |
|        | 2           | 23.91±0.82* | 24.00±0.79* |
|        | 3           | 23.70±1.10* | 22.45±1.16* |
|        | 4           | 23.78±0.46* | 21.31±1.16* |
|        | 5           | 22.54±0.98* | 21.66±1.57* |
|        | 6           | 22.32±1.55* | 21.55±1.31* |

|        |        |    |             |             |             |
|--------|--------|----|-------------|-------------|-------------|
| [0118] | 七组分药物组 | 7  | 20.92±0.82* | 21.45±1.45* | 22.63±1.02* |
|        |        | 8  | 20.54±1.88* | 20.91±0.62* | 20.30±0.97* |
|        |        | 9  | 20.12±0.96* | 19.27±0.67* | 19.16±0.73* |
|        |        | 1  | 24.68±0.87* | 25.07±0.71* | 22.21±0.65* |
|        |        | 2  | 21.86±1.70* | 25.75±0.45* | 22.11±0.47* |
|        |        | 3  | 21.08±0.84* | 23.03±0.57* | 21.89±0.71* |
|        |        | 4  | 20.81±1.81* | 21.76±0.89* | 21.74±0.98* |
|        |        | 5  | 21.72±1.43* | 24.86±0.65* | 20.68±0.76* |
|        |        | 6  | 21.56±1.40* | 22.10±0.41* | 20.72±1.00* |
|        |        | 7  | 21.04±1.43* | 22.16±0.65* | 20.70±0.99* |
|        |        | 8  | 22.37±0.98* | 21.34±0.85* | 20.39±1.42* |
|        |        | 9  | 21.62±2.16* | 20.89±0.76* | 19.99±1.29* |
|        |        | 10 | 22.21±0.71* | 20.74±1.01* | 18.72±0.90* |
|        |        | 11 | 21.08±1.40* | 20.57±0.86* | 20.21±1.34* |
|        |        | 12 | 21.63±2.04* | 20.77±1.38* | 19.85±0.91* |
|        |        | 13 | 21.73±1.69* | 20.95±1.25* | 19.54±1.16* |
|        |        | 14 | 21.91±0.99* | 19.79±1.04* | 19.03±0.86* |
|        |        | 15 | 20.52±0.95* | 20.76±1.47* | 19.44±0.77* |
|        |        | 16 | 22.01±1.64* | 20.51±1.16* | 18.63±0.98* |
|        |        | 17 | 20.63±0.74* | 19.46±0.76* | 18.98±0.91* |
|        |        | 18 | 19.12±0.76* | 19.44±0.83* | 17.30±0.96* |

[0119] 注：\*,表示与模型组相比,  $P < 0.05$ 。

[0120] 实施例6

[0121] 评价三组分药物、七组分药物对LPS刺激下大鼠脾脏调节性T细胞(Treg)凋亡的影响

[0122] 1. 实验材料

[0123] 雄性清洁级SD大鼠(180~220g), LPS, 羧基红花黄色素A, 芍药苷, 芍药内酯苷, 氧化芍药苷, 洋川芎内酯I, 丹参素钠, 阿魏酸, 1640培养基, 24孔板, 藻红蛋白(PE)-抗大鼠CD25、异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗大鼠CD4、异硫氰酸荧光素(FITC)标记膜联蛋白V凋亡试剂盒; 大鼠CD25-APC抗体试剂盒、APC磁珠、CD4磁珠、MACS Buffer、MiniMACS磁性分离仪以及分选柱(LS); 抗大鼠CD3单克隆抗体、抗大鼠CD28单克隆抗体。

[0124] 2. 实验方法

[0125] 将雄性SD大鼠断颈处死, 取脾脏, 无菌注射器活塞研磨脾脏, 吸管吸取悬液到离心管, 1200转×7分钟离心, 弃上清, 加入适量MACS Buffer(10mL/每个脾)重悬, 沿着管壁加入到淋巴细胞分离液的上层(1:1)3000转×15分钟离心, 用吸管吸取中层液, 装入另一离心管中, 加入清洗液1200转×7分钟离心, 弃上清, 加入MACS Buffer重悬备用。

[0126] 每 $1 \times 10^7$ 单核细胞加入1 $\mu$ L抗CD25-APC抗体, 4℃孵育15min, MACS Buffer洗涤。每 $1 \times 10^7$ 细胞加入20 $\mu$ L抗APC磁珠和80 $\mu$ LMACS Buffer, 4℃孵育15min, MACS Buffer洗涤, 加适量MACS Buffer重悬, LS柱磁性分选, 即得CD25<sup>+</sup>细胞。

[0127] CD25<sup>+</sup>细胞计数后,每 $1 \times 10^7$ 细胞加入20 $\mu$ L解离剂,4℃孵育1min,MACS Buffer洗涤,每 $1 \times 10^7$ 细胞加入20 $\mu$ L抗CD4磁珠和30 $\mu$ L终止剂,4℃孵育15min,MACS Buffer洗涤,加入适量MACS Buffer重悬,LS柱磁性分选,即得CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞。

[0128] 将Treg细胞用适量培养液重悬,调整细胞数为 $2.5 \times 10^6$ /mL,96孔板,每孔接入细胞100 $\mu$ L,模型组和实验组加入CD3/CD28 (CD3为 $0.5 \mu\text{g}/10^6$ ,CD28为 $1 \mu\text{g}/10^6$ ) +LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激,实验分为对照组、模型组、给药组,1h后模型组和给药组分别给予不同药液进行干预,CO<sub>2</sub>培养箱37℃培养72h。

[0129] 收集细胞,细胞用预冷的PBS清洗,然后用1ml 1×Binding Buffer再次清洗,离心后去上清剩余100 $\mu$ L,然后加入5 $\mu$ L FITC Annexin V和5 $\mu$ L PI,室温(25℃)避光孵育15min,然后加入200 $\mu$ L 1×Binding Buffer混匀,1h内流式细胞仪检测。

[0130] 分组处理方法如下:模型组:细胞在细胞培养箱培养过夜后,加入LPS (75ng/mL) 刺激。给药组:加入对应浓度药液孵育1h,进行LPS刺激,不同浓度实验组干预72h后,收集细胞培养液上清0.5mL,-20℃冰箱保存,集中进行相应细胞因子检测。

[0131] 实验分组及药液配制方式同实施例2。

[0132] 3.实验结果

[0133] Treg细胞功能增强后通过产生免疫抑制因子如IL-10、IL-35、TGF- $\beta$ 等抑制普通T细胞,并通过颗粒酶B和穿孔素-1杀伤靶细胞,从而发挥免疫抑制作用。还能诱导DC树突状细胞产生吲哚胺2,3-双加氧酶,催化色氨酸分解为犬尿素导致周围细胞死亡,还能诱导DC细胞分泌其他氨基酸相关酶,从而抑制效应T细胞的增殖,从而发挥免疫抑制的作用。因此,药物在一定时期促进Treg细胞的凋亡,对机体免疫调控方面起着十分重要的作用。与模型组相比,各剂量组的三组分药物组和七组分药物组均能够促进大鼠调节T细胞(Treg)的凋亡(表7)。

[0134] 表7三组分药物组和七组分药物组对LPS刺激下大鼠脾脏调节性T细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n=6, 单位: %)

| 组别     |   | 72h               |
|--------|---|-------------------|
| 对照组    |   | 32.20 $\pm$ 3.23* |
| 模型组    |   | 16.46 $\pm$ 1.94  |
| [0135] | 1 | 18.36 $\pm$ 1.70* |
|        | 2 | 22.55 $\pm$ 1.11* |
|        | 3 | 22.55 $\pm$ 1.59* |
|        | 4 | 23.30 $\pm$ 0.57* |
|        | 5 | 26.00 $\pm$ 0.91* |
|        | 6 | 26.28 $\pm$ 0.96* |

|        |        |    |                         |
|--------|--------|----|-------------------------|
| [0136] | 七组分药物组 | 7  | 26.55±0.81 <sup>*</sup> |
|        |        | 8  | 28.51±1.48 <sup>*</sup> |
|        |        | 9  | 29.06±0.91 <sup>*</sup> |
|        |        | 1  | 20.73±1.07 <sup>*</sup> |
|        |        | 2  | 23.66±0.74 <sup>*</sup> |
|        |        | 3  | 24.95±0.82 <sup>*</sup> |
|        |        | 4  | 24.71±0.86 <sup>*</sup> |
|        |        | 5  | 24.78±1.33 <sup>*</sup> |
|        |        | 6  | 24.40±0.81 <sup>*</sup> |
|        |        | 7  | 25.88±1.18 <sup>*</sup> |
|        |        | 8  | 25.25±1.76 <sup>*</sup> |
|        |        | 9  | 24.78±1.11 <sup>*</sup> |
|        |        | 10 | 24.85±1.36 <sup>*</sup> |
|        |        | 11 | 26.33±0.95 <sup>*</sup> |
|        |        | 12 | 25.85±1.39 <sup>*</sup> |
|        |        | 13 | 27.32±1.44 <sup>*</sup> |
|        |        | 14 | 26.63±1.83 <sup>*</sup> |
|        |        | 15 | 26.62±0.75 <sup>*</sup> |
|        |        | 16 | 28.55±0.74 <sup>*</sup> |
|        |        | 17 | 30.54±1.15 <sup>*</sup> |
|        |        | 18 | 30.76±0.90 <sup>*</sup> |

[0137] 注：\*,表示与模型组相比,P<0.05。

[0138] 实施例7

[0139] 三组分药物组、七组分药物组对LPS刺激下大鼠脾脏调节性T细胞CTLA-4和Foxp3表达的影响

[0140] 1.实验材料

[0141] 雄性清洁级SD大鼠(180~220g),LPS,羧基红花黄色素A,芍药苷,芍药内酯苷,氧化芍药苷,洋川芎内酯I,丹参素钠,阿魏酸,1640培养基,24孔板,藻红蛋白(PE)-抗大鼠CD25、异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗大鼠CD4;大鼠抗-PE试剂盒、CD4磁珠、MiniMACS磁性分离仪以及分选柱;PE标记Foxp3试剂盒、PE标记CTLA-4试剂盒、抗大鼠CD3单克隆抗体、抗大鼠CD28单克隆抗体。

[0142] 2.实验方法

[0143] 实验方法及分组处理方法同实施例6。

[0144] 实验分组及药液配制方式同实施例2。

[0145] 3.实验结果

[0146] Foxp3<sup>+</sup>Treg细胞通过产生免疫抑制因子如IL-10、IL-35、TGF-β等抑制普通T细胞,并通过颗粒酶B和穿孔素-1杀伤靶细胞,从而发挥免疫抑制作用。CTLA-4还能诱导DC树突状细胞产生吡啶胺2,3-双加氧酶,催化色氨酸分解为犬尿素导致周围细胞死亡,还能诱导DC

细胞分泌其他氨基酸相关酶,从而抑制效应T细胞的增殖,从而发挥免疫抑制的作用。因此,Treg细胞通过Foxp3和CTLA-4在机体免疫调控方面起着十分重要的作用,Foxp3的表达与调节性T细胞(Treg)功能密切相关。

[0147] 与模型组相比,各剂量组的三组分药物组和七组分药物组均能够降低大鼠调节T细胞(Treg) 72h CTLA-4和Foxp3的表达水平,表明三组分药物组和七组分药物组有对脓毒症大鼠调节T细胞(Treg) 72h CTLA-4和Foxp3的表达水平降低的效果(表8和表9)。

[0148] 表8三组分药物组和七组分药物组对LPS刺激下大鼠脾脏调节性T细胞CTLA-4表达的影响( $\bar{x} \pm s$ , n=6, 单位: %)

| 组别     |    | 72h         |
|--------|----|-------------|
| 对照组    |    | 23.09±2.09* |
| 模型组    |    | 43.53±3.46  |
| 三组分药物组 | 1  | 37.46±1.48* |
|        | 2  | 34.60±0.98* |
|        | 3  | 33.81±0.73* |
|        | 4  | 35.07±0.86* |
|        | 5  | 32.66±1.49* |
|        | 6  | 32.13±1.14* |
|        | 7  | 30.29±1.49* |
|        | 8  | 25.06±0.82* |
|        | 9  | 25.87±1.07* |
| 七组分药物组 | 1  | 33.65±1.58* |
|        | 2  | 34.93±0.73* |
|        | 3  | 33.94±1.36* |
|        | 4  | 32.01±1.35* |
|        | 5  | 31.81±1.55* |
|        | 6  | 31.73±1.09* |
|        | 7  | 30.17±1.03* |
|        | 8  | 31.25±1.30* |
|        | 9  | 31.45±0.93* |
|        | 10 | 32.04±1.17* |
|        | 11 | 28.60±0.76* |
|        | 12 | 27.85±0.79* |
|        | 13 | 28.08±1.05* |
|        | 14 | 28.02±0.51* |
|        | 15 | 27.57±1.05* |

|        |    |             |
|--------|----|-------------|
| [0150] | 16 | 24.02±0.90* |
|        | 17 | 24.25±1.33* |
|        | 18 | 24.74±1.22* |

[0151] 注：\*,表示与模型组相比,P<0.05。

[0152] 表9三组分药物组和七组分药物组对LPS刺激下大鼠脾脏调节性T细胞Foxp3表达的影响( $\bar{x} \pm s$ , n=6, 单位: %)

| 组别     |    | 72h         |
|--------|----|-------------|
| 对照组    |    | 51.60±3.52* |
| 模型组    |    | 78.99±2.79  |
| 三组分药物组 | 1  | 71.41±2.71* |
|        | 2  | 71.04±1.36* |
|        | 3  | 71.11±0.87* |
|        | 4  | 69.75±0.98* |
|        | 5  | 68.01±1.02* |
|        | 6  | 65.68±1.46* |
|        | 7  | 58.18±0.94* |
|        | 8  | 54.12±1.51* |
|        | 9  | 54.05±1.18* |
| 七组分药物组 | 1  | 66.07±0.78* |
|        | 2  | 66.38±1.34* |
|        | 3  | 65.91±1.58* |
|        | 4  | 64.70±1.40* |
|        | 5  | 65.09±1.47* |
|        | 6  | 64.19±2.04* |
|        | 7  | 64.59±1.15* |
|        | 8  | 63.81±1.48* |
|        | 9  | 65.39±1.48* |
|        | 10 | 59.85±1.61* |
|        | 11 | 59.38±1.81* |
|        | 12 | 56.11±1.62* |
|        | 13 | 55.36±2.59* |
|        | 14 | 55.01±2.11* |
|        | 15 | 53.32±2.16* |
|        | 16 | 53.65±1.23* |
|        | 17 | 53.03±0.88* |
|        | 18 | 53.57±1.02* |

[0154] 注：\*,表示与模型组相比,P<0.05。

[0155] 实施例8

[0156] 评价三组分药物、七组分药物对CLP诱导的脓毒症大鼠IL-6表达的影响

[0157] 1. 实验材料

[0158] 雄性清洁级SD大鼠(180~220g),适应性饲养1周。羟基红花黄色素A,芍药苷,芍药内酯苷,氧化芍药苷,洋川芎内酯I,丹参素钠,阿魏酸,IL-6ELISA检测试剂盒。

[0159] 2. 实验方法

[0160] 2.1 分组与干预

[0161] 290只大鼠随机分为对照组、模型组和给药组共29组每组各10只,其中给药组采用正交实验法,正交实验分组方法见表10和表11。

[0162] 表10三组分药物组正交实验分组

[0163]

| 组别 | 羟基红花黄色素A | 芍药苷 | 芍药内酯苷 |
|----|----------|-----|-------|
| 1  | 低        | 低   | 低     |
| 2  | 低        | 中   | 高     |
| 3  | 低        | 高   | 中     |
| 4  | 中        | 低   | 高     |
| 5  | 中        | 中   | 中     |
| 6  | 中        | 高   | 低     |
| 7  | 高        | 低   | 中     |
| 8  | 高        | 中   | 低     |
| 9  | 高        | 高   | 高     |

[0164] 表10中羟基红花黄色素A三个浓度分别为低0.9mg/kg,中9mg/kg,高90mg/kg;芍药苷三个浓度分别为低0.9mg/kg,中9mg/kg,高90mg/kg;芍药内酯苷三个浓度分别为低0.09mg/kg,中0.9mg/kg,高9mg/kg;氧化芍药苷三个浓度分别为低0.09mg/kg,中0.9mg/kg,高9mg/kg;洋川芎内酯I三个浓度分别为低0.09mg/kg,中0.9mg/kg,高9mg/kg;丹参素钠三个浓度分别为低0.09mg/kg,中0.9mg/kg,高9mg/kg;阿魏酸三个浓度分别为低0.009mg/kg,中0.09mg/kg,高0.9mg/kg。

[0165] 表11七组分药物组正交实验分组

[0166]

| 组别 | 羟基红花黄色素A | 芍药苷 | 芍药内酯苷 | 氧化芍药苷 | 洋川芎内酯I | 丹参素钠 | 阿魏酸 |
|----|----------|-----|-------|-------|--------|------|-----|
| 1  | 低        | 低   | 低     | 低     | 低      | 低    | 低   |
| 2  | 低        | 中   | 中     | 中     | 中      | 中    | 中   |
| 3  | 低        | 高   | 高     | 高     | 高      | 高    | 高   |
| 4  | 中        | 低   | 低     | 中     | 中      | 高    | 高   |
| 5  | 中        | 中   | 中     | 高     | 高      | 低    | 低   |
| 6  | 中        | 高   | 高     | 低     | 低      | 中    | 中   |

|        |    |   |   |   |   |   |   |   |
|--------|----|---|---|---|---|---|---|---|
| [0167] | 7  | 高 | 低 | 中 | 低 | 高 | 中 | 高 |
|        | 8  | 高 | 中 | 高 | 中 | 低 | 高 | 低 |
|        | 9  | 高 | 高 | 低 | 高 | 中 | 低 | 中 |
|        | 10 | 低 | 低 | 高 | 高 | 中 | 中 | 低 |
|        | 11 | 低 | 中 | 低 | 低 | 高 | 高 | 中 |
|        | 12 | 低 | 高 | 中 | 中 | 低 | 低 | 高 |
|        | 13 | 中 | 低 | 中 | 高 | 低 | 高 | 中 |
|        | 14 | 中 | 中 | 高 | 低 | 中 | 低 | 高 |
|        | 15 | 中 | 高 | 低 | 中 | 高 | 中 | 低 |
|        | 16 | 高 | 低 | 高 | 中 | 高 | 低 | 中 |
|        | 17 | 高 | 中 | 低 | 高 | 低 | 中 | 高 |
|        | 18 | 高 | 高 | 中 | 低 | 中 | 高 | 低 |

[0168] 溶液配制方式与实验注射量如下：每只大鼠按照200g计算且实验注射量均为1.0mL/次/只。根据表10中对应的各组浓度，在精密天平(1/10000g)称取适合重量的羟基红花黄色素A、芍药苷和芍药内酯苷，按照不同浓度组合情况组合至不同容量瓶中，分别溶解于适量生理盐水(0.9%的氯化钠水溶液)，制成相应浓度的9组三组分药物；根据表11中对应的各组浓度，在精密天平(1/10000g)称取适合重量的羟基红花黄色素A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、洋川芎内酯、丹参素钠和阿魏酸，按照不同浓度组合情况组合至不同容量瓶中，分别溶解于适量生理盐水(0.9%的氯化钠水溶液)中，制成相应浓度的18组七组分药物。实验前12h禁食，称重并按照随机数字表法进行分组。对照组仅开腹暴露盲肠后缝合皮肤，皮下注射10mL生理盐水复苏；模型组和给药组进行盲肠结扎穿孔术(CLP)造模后，皮下注射10mL生理盐水复苏。CLP造模过程如下：用氯胺酮注射液+速眠新II注射液按体积比2:1比例制备的混合液肌肉注射麻醉大鼠，采用CLP制备脓毒症动物模型。结扎盲肠与回肠连接处，用18号针头贯通盲肠2次形成肠瘘，并留置2条引流条(0.5cm×2.0cm)防止针孔愈合，后逐层缝合皮肤，术毕立即皮下注射10mL生理盐水复苏。大鼠CLP手术后，给药组在术后2h, 12h, 24h, 36h, 48h和60h经尾静脉分别注射含上述不同药液；模型组和对照组在相应时间经尾静脉注射生理盐水。重复该实验至n=10。

## [0169] 2.2采血与检测

[0170] CLP后8h, 24h, 48h将各组动物麻醉后腹主动脉无菌采血3mL，利用ELISA法，检测血浆IL-6含量。

## [0171] 3. 实验结果

[0172] 实验结果(表12)表明：对照组血浆中含有少量IL-6；CLP手术后早期，模型组IL-6含量即明显增加，8h IL-6水平进一步提高，于24h逐渐下降，但术后48h仍高于对照组，差异均有统计学意义( $p < 0.05$ )。而给药组术后8h, 24h, 48h的IL-6血浆含量均明显低于模型组( $p < 0.05$ )，接近对照组水平。

[0173] 上述发现表明，与模型组相比，各剂量组的三组分药物组、七组分药物组均可显著降低CLP脓毒症大鼠IL-6的表达，提示对脓毒症大鼠模型早期炎症反应均具有明显的抑制作用，折算成人体剂量约为：三组分药物组(羟基红花黄色素A 6mg至600mg，芍药苷6mg至600mg，芍药内酯苷0.6mg至60mg)、七组分药物组(羟基红花黄色素A 6mg至600mg，芍药苷

6mg至600mg,芍药内酯苷0.6mg至60mg,氧化芍药苷0.6mg至60mg,洋川芎内酯I 0.6mg至60mg,丹参素钠0.6mg至60mg,阿魏酸0.06mg至6mg)。[根据徐叔云主编的《药理实验方法学》中人和动物间按体表面积折算法计算,人体剂量=大鼠剂量/0.018(以成人体重70kg、大鼠体重0.2kg计)]。

[0174] 表12三组分药物组和七组分药物组对CLP诱导的脓毒症大鼠IL-6表达的影响( $\bar{x} \pm s$ , n=10, 单位: pg/mL)

| 组别     |    | 8h           | 24h          | 48h          |
|--------|----|--------------|--------------|--------------|
| 对照组    |    | 109.79±2.86* | 111.94±2.43* | 110.03±3.60* |
| 模型组    |    | 250.47±3.29  | 280.14±3.14  | 259.82±4.43  |
| 三组分药物组 | 1  | 209.59±2.79* | 249.47±3.86* | 240.08±4.30* |
|        | 2  | 190.26±3.10* | 219.20±6.25* | 210.30±5.26* |
|        | 3  | 189.72±3.68* | 219.46±3.54* | 208.07±3.64* |
|        | 4  | 189.21±3.58* | 219.71±5.37* | 208.92±2.92* |
|        | 5  | 191.20±2.69* | 217.18±3.17* | 208.42±3.48* |
|        | 6  | 190.41±2.98* | 221.06±4.74* | 209.19±4.43* |
|        | 7  | 189.59±2.53* | 219.43±5.39* | 209.03±3.83* |
|        | 8  | 191.50±2.99* | 219.95±4.74* | 206.77±3.55* |
|        | 9  | 167.96±4.10* | 189.36±3.73* | 178.38±4.07* |
| 七组分药物组 | 1  | 211.54±3.65* | 218.80±4.59* | 210.28±2.46* |
|        | 2  | 181.26±4.32* | 199.51±4.46* | 179.59±3.57* |
|        | 3  | 183.41±4.64* | 202.33±4.22* | 180.13±3.92* |
|        | 4  | 180.63±4.31* | 202.29±3.86* | 180.19±4.85* |
|        | 5  | 181.95±5.15* | 199.63±3.86* | 181.41±3.26* |
|        | 6  | 182.43±4.01* | 198.05±1.94* | 179.47±4.53* |
|        | 7  | 183.23±4.89* | 202.77±5.34* | 179.78±2.87* |
|        | 8  | 182.77±4.90* | 200.05±4.43* | 180.79±4.30* |
|        | 9  | 182.51±3.26* | 201.26±4.09* | 177.18±2.49* |
|        | 10 | 181.53±4.28* | 201.99±4.94* | 178.23±3.64* |
|        | 11 | 181.21±4.84* | 203.40±4.99* | 178.79±4.13* |
|        | 12 | 182.73±5.35* | 199.75±4.00* | 175.95±2.55* |
|        | 13 | 181.65±3.95* | 201.98±4.31* | 180.27±4.05* |
|        | 14 | 182.45±3.66* | 199.05±3.98* | 179.97±4.72* |
|        | 15 | 182.83±3.70* | 200.65±4.84* | 179.48±3.93* |
| [0176] | 16 | 180.24±3.66* | 203.07±2.61* | 179.77±4.25* |
|        | 17 | 181.92±5.11* | 202.58±5.00* | 178.36±3.06* |
|        | 18 | 149.16±3.47* | 170.53±3.20* | 158.49±4.17* |

[0177] 注:\*,表示与模型组相比, P<0.05。

[0178] 实施例9

[0179] 评价三组分药物、七组分药物对CLP诱导的脓毒症大鼠HMGB1表达的影响

[0180] 1. 实验材料

[0181] 雄性清洁级SD大鼠(180~220g),适应性饲养1周。羟基红花黄色素A,芍药苷,芍药内酯苷,氧化芍药苷,洋川芎内酯I,丹参素钠,阿魏酸, HMGB1 ELISA检测试剂盒。

[0182] 2.实验方法

[0183] 2.1分组与干预

[0184] 见实施例8。

[0185] 2.2采血与检测

[0186] CLP术后48h和72h,将各组动物麻醉后腹主动脉无菌采血3mL,利用ELISA法,检测血浆HMGB1含量。

[0187] 3.实验结果

[0188] 实验结果(表13)表明:对照组血浆中含有少量HMGB1;CLP手术后晚期,模型组HMGB1含量明显增加,48h逐渐升高,术后72h仍高于对照组,差异均有统计学意义( $p<0.05$ )。而给药组术后48h和72h的HMGB1血浆含量均明显低于模型组( $p<0.05$ ),接近对照组水平。上述发现表明,与模型组相比,各剂量组的三组分药物组和七组分药物组可显著降低CLP脓毒症大鼠HMGB1的表达,提示三组分药物组和七组分药物组对脓毒症大鼠模型晚期炎症因子有抑制作用。折算成人体剂量约为:三组分药物组(羟基红花黄色素A 6mg至600mg,芍药苷6mg至600mg,芍药内酯苷0.6mg至60mg)、七组分药物组(羟基红花黄色素A 6mg至600mg,芍药苷6mg至600mg,芍药内酯苷0.6mg至60mg,氧化芍药苷0.6mg至60mg,洋川芎内酯I 0.6mg至60mg,丹参素钠0.6mg至60mg,阿魏酸0.06mg至6mg)。[根据徐叔云主编的《药理实验方法学》中人和动物间按体表面积折算法计算,人体剂量=大鼠剂量/0.018(以成人体重70kg、大鼠体重0.2kg计)]。

[0189] 表13三组分药物组和七组分药物组对CLP诱导的脓毒症大鼠HMGB1表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ ,单位:pg/mL)

| 组别     |   | 72h         |
|--------|---|-------------|
| 对照组    |   | 8.77±1.38*  |
| 模型组    |   | 46.04±2.17  |
| 三组分药物组 | 1 | 35.81±2.15* |
|        | 2 | 30.49±2.10* |
|        | 3 | 29.96±2.06* |

|        |        |    |             |
|--------|--------|----|-------------|
| [0191] | 七组分药物组 | 4  | 30.11±2.39* |
|        |        | 5  | 29.54±2.09* |
|        |        | 6  | 31.04±2.27* |
|        |        | 7  | 30.00±1.93* |
|        |        | 8  | 29.74±2.53* |
|        |        | 9  | 25.53±1.64* |
|        |        | 1  | 30.81±2.39* |
|        |        | 2  | 24.33±2.02* |
|        |        | 3  | 26.01±1.95* |
|        |        | 4  | 25.92±1.82* |
|        |        | 5  | 26.09±1.48* |
|        |        | 6  | 24.93±1.93* |
|        |        | 7  | 24.72±2.53* |
|        |        | 8  | 24.72±2.33* |
|        |        | 9  | 25.17±2.60* |
|        |        | 10 | 24.76±1.97* |
|        |        | 11 | 24.95±1.85* |
|        |        | 12 | 25.70±1.50* |
|        |        | 13 | 25.57±2.39* |
|        |        | 14 | 25.65±1.98* |
|        |        | 15 | 25.79±2.06* |
|        |        | 16 | 25.44±2.32* |
|        |        | 17 | 25.50±1.97* |
|        |        | 18 | 21.24±1.98* |

[0192] 注：\*,表示与模型组相比,P<0.05。

[0193] 实施例10

[0194] 评价三组分药物、七组分药物对CLP诱导的脓毒症大鼠TF释放的影响

[0195] 1.实验材料

[0196] 雄性清洁级SD大鼠(180~220g),适应性饲养1周。羟基红花黄色素A,芍药苷,芍药内酯苷,氧化芍药苷,洋川芎内酯I,丹参素钠,阿魏酸,TF ELISA试剂盒。

[0197] 2.实验方法

[0198] 2.1分组与干预

[0199] 见实施例8。

[0200] 2.2采血与检测

[0201] CLP术后12h,24h,48h和72h,将各组动物麻醉后腹主动脉无菌采血5mL。利用酶联免疫吸附法(ELISA),检测TF含量。

[0202] 3.实验结果

[0203] 实验结果(表14)表明:对照组单核细胞TF存在一定表达;模型组TF(术后12h,24h,48h和72h)表达均显著高于对照组( $p<0.05$ ),且随术后时间的延长而逐渐增高。给药组的TF(术后12h,24h,48h和72h)表达与模型组相比均出现显著降低( $p<0.05$ )。上述发现提示,与模型组相比,各剂量组的三组分药物组和七组分药物组均可显著降低CLP脓毒症大鼠TF的释放,表明三组分药物组和七组分药物组对脓毒症大鼠模型具有明显的抑制凝血因子释放、改善高凝状态的作用。折算成人体剂量约为:三组分药物组(羟基红花黄色素A 6mg至600mg,芍药苷6mg至600mg,芍药内酯苷0.6mg至60mg)、七组分药物组(羟基红花黄色素A 6mg至600mg,芍药苷6mg至600mg,芍药内酯苷0.6mg至60mg,氧化芍药苷0.6mg至60mg,洋川芎内酯I 0.6mg至60mg,丹参素钠0.6mg至60mg,阿魏酸0.06mg至6mg)。

[0204] 表14.三组分药物组和七组分药物组对CLP诱导的脓毒症大鼠TF释放的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ ,单位:pg/mL)

| 组别     |    | 术后 12 h       | 术后 24 h       | 术后 48 h       | 术后 72 h       |
|--------|----|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 对照组    |    | 200.75±5.25*  | 212.44±10.69* | 210.69±12.28* | 219.73±9.70*  |
| 模型组    |    | 218.03±15.82  | 248.17±19.99  | 340.61±15.30  | 316.46±21.51  |
| 三组分药物组 | 1  | 205.77±9.10*  | 231.71±14.30* | 268.90±17.49* | 262.32±20.41* |
|        | 2  | 203.76±8.69*  | 232.83±11.23* | 267.09±13.37* | 263.85±16.67* |
|        | 3  | 204.31±6.98*  | 233.45±18.23* | 264.59±20.43* | 276.09±19.99* |
|        | 4  | 206.81±10.71* | 235.63±18.22* | 259.25±8.58*  | 263.15±11.46* |
|        | 5  | 204.32±10.04* | 232.91±13.82* | 265.95±8.80*  | 261.04±14.77* |
|        | 6  | 205.63±6.77*  | 230.61±15.58* | 264.36±9.16*  | 264.31±12.44* |
|        | 7  | 201.27±4.57*  | 225.45±12.25* | 230.83±11.36* | 264.82±16.54* |
|        | 8  | 201.57±6.21*  | 218.20±13.81* | 235.01±13.13* | 261.47±17.11* |
|        | 9  | 201.47±6.93*  | 225.46±11.29* | 231.37±12.11* | 263.92±20.06* |
| 七组分药物组 | 1  | 206.56±11.18* | 226.84±13.57* | 269.10±16.73* | 272.74±13.20* |
|        | 2  | 203.78±5.80*  | 223.12±13.85* | 258.85±19.10* | 258.03±11.09* |
|        | 3  | 203.92±5.83*  | 221.37±12.48* | 258.73±18.88* | 262.93±15.10* |
|        | 4  | 203.57±6.70*  | 221.20±15.64* | 260.95±18.60* | 270.28±14.60* |
|        | 5  | 203.83±6.90*  | 224.84±13.90* | 249.47±17.09* | 271.82±16.01* |
|        | 6  | 202.52±4.65*  | 220.76±10.51* | 262.17±13.96* | 261.06±14.13* |
|        | 7  | 203.53±4.72*  | 224.39±11.96* | 262.49±21.74* | 266.46±16.34* |
|        | 8  | 203.68±7.39*  | 219.36±12.50* | 251.98±19.13* | 254.96±10.23* |
|        | 9  | 204.94±4.62*  | 220.57±11.97* | 257.70±15.48* | 262.85±11.16* |
|        | 10 | 204.34±6.70*  | 223.27±15.18* | 265.45±22.88* | 268.18±15.57* |
|        | 11 | 202.09±4.53*  | 223.56±14.86* | 260.44±21.96* | 270.95±15.40* |
|        | 12 | 203.32±4.85*  | 217.28±14.66* | 263.44±21.70* | 262.15±19.84* |
|        | 13 | 203.28±4.97*  | 217.47±14.28* | 259.01±20.01* | 263.37±14.00* |

|        |    |              |               |               |               |
|--------|----|--------------|---------------|---------------|---------------|
| [0206] | 14 | 203.00±6.59* | 224.99±12.91* | 260.50±19.32* | 266.70±12.30* |
|        | 15 | 202.62±6.71* | 222.32±13.94* | 265.86±21.31* | 273.18±12.49* |
|        | 16 | 204.57±5.18* | 221.68±13.03* | 263.94±19.09* | 273.34±15.98* |
|        | 17 | 204.36±6.50* | 217.14±11.68* | 265.88±18.00* | 265.85±12.98* |
|        | 18 | 202.06±7.19* | 219.87±15.54* | 250.36±20.40* | 256.04±10.03* |

[0207] 注：\*,表示与模型组相比,P<0.05。

[0208] 实施例11

[0209] 评价三组分药物、七组分药物对CLP诱导的脓毒症大鼠TM释放的影响

[0210] 1.实验材料

[0211] 雄性清洁级SD大鼠(180~220g),适应性饲养1周。羟基红花黄色素A,芍药苷,芍药内酯苷,氧化芍药苷,洋川芎内酯I,丹参素钠,阿魏酸,TM ELISA试剂盒。

[0212] 2.实验方法

[0213] 2.1分组与干预

[0214] 见实施例8。

[0215] 2.2采血与检测

[0216] CLP术后12h,24h,48h和72h,将各组动物麻醉后腹主动脉无菌采血5mL。利用酶联免疫吸附法(ELISA),检测TM含量。

[0217] 3.实验结果

[0218] 实验结果(表15)表明:对照组单核细胞TM存在一定表达;模型组TM(术后12h,24h,48h和72h)表达均显著高于对照组( $p<0.05$ ),且随术后时间的延长而逐渐增高。给药组的TM(术后12h,24h,48h和72h)表达与模型组相比均出现显著降低( $p<0.05$ )。上述发现提示,与模型组相比,各剂量组的三组分药物组和七组分药物组均可显著降低CLP脓毒症大鼠TM的释放,表明三组分药物组和七组分药物组对脓毒症大鼠模型具有明显的抑制凝血因子释放、改善高凝状态的作用。折算成人体剂量约为:三组分药物组(羟基红花黄色素A 6mg至600mg,芍药苷6mg至600mg,芍药内酯苷0.6mg至60mg)、七组分药物组(羟基红花黄色素A 6mg至600mg,芍药苷6mg至600mg,芍药内酯苷0.6mg至60mg,氧化芍药苷0.6mg至60mg,洋川芎内酯I 0.6mg至60mg,丹参素钠0.6mg至60mg,阿魏酸0.06mg至6mg)。 $[$ 根据徐叔云主编的《药理实验方法学》中人和动物间按体表面积折算法计算,人体剂量=大鼠剂量/0.018(以成人体重70kg、大鼠体重0.2kg计) $]$ 。

[0219] 表15三组分药物组和七组分药物组对CLP诱导的脓毒症大鼠TM释放的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ ,单位:pg/mL)

| [0220] | 组别     |   | 术后 12 h     | 术后 24 h     | 术后 48 h     | 术后 72 h     |
|--------|--------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|
|        | 对照组    |   | 20.96±1.02* | 21.56±1.46* | 23.57±1.56* | 22.54±1.89* |
|        | 模型组    |   | 25.76±1.39  | 26.59±1.94  | 31.17±2.05  | 30.09±1.89  |
|        | 三组分药物组 | 1 | 23.17±1.69* | 23.32±1.51* | 27.02±1.92* | 24.68±1.34* |
|        |        |   |             |             |             |             |

[0221]

|        |    |             |             |             |              |
|--------|----|-------------|-------------|-------------|--------------|
| 七组分药物组 | 2  | 22.60±1.98* | 23.16±1.56* | 26.26±1.86* | 23.56±0.98*  |
|        | 3  | 23.25±1.67* | 23.90±1.33* | 26.29±1.91* | 24.51±1.37*  |
|        | 4  | 21.25±1.36* | 22.85±1.28* | 24.96±1.53* | 24.38±1.46*  |
|        | 5  | 21.33±1.98* | 22.94±1.72* | 25.95±2.17* | 24.52±1.49*  |
|        | 6  | 20.64±1.72* | 22.54±1.71* | 24.72±1.22* | 24.39±1.85*  |
|        | 7  | 20.70±1.40* | 22.22±1.42* | 25.63±1.71* | 24.85±1.34*  |
|        | 8  | 21.23±1.98* | 22.70±1.66* | 25.78±1.81* | 23.97±1.22*  |
|        | 9  | 21.40±1.72* | 22.63±1.50* | 25.56±2.18* | 24.21±1.70*  |
|        | 1  | 23.55±1.79* | 23.58±1.42* | 27.34±2.67* | 27.77±0.94*  |
|        | 2  | 22.28±1.17* | 22.47±1.44* | 27.11±2.21* | 26.55±1.76*  |
|        | 3  | 22.87±1.29* | 22.86±1.82* | 25.75±1.74* | 26.17±1.84*  |
|        | 4  | 22.52±1.40* | 23.18±1.61* | 26.18±1.61* | 27.16±1.82*  |
|        | 5  | 22.19±1.57* | 22.80±1.14* | 26.38±2.09* | 26.78±1.23*  |
|        | 6  | 22.02±1.70* | 22.32±1.54* | 27.26±1.88* | 26.27±1.65*  |
|        | 7  | 22.35±1.46* | 23.26±1.42* | 26.52±1.89* | 26.71±1.60*  |
|        | 8  | 22.08±1.52* | 23.01±1.75* | 26.10±2.19* | 26.25±1.94*  |
|        | 9  | 22.23±1.44* | 22.91±1.76* | 26.42±1.95* | 26.60±1.45*  |
|        | 10 | 22.55±1.73* | 22.71±1.26* | 26.66±2.44* | 27.12±0.86*  |
|        | 11 | 22.49±0.86* | 22.28±1.29* | 26.84±2.39* | 26.50±1.46*  |
|        | 12 | 21.93±1.31* | 22.74±1.37* | 27.24±2.40* | 26.56±1.48*  |
|        | 13 | 21.35±1.28* | 22.53±1.25* | 25.99±1.81* | 27.03±1.63*  |
|        | 14 | 22.49±1.70* | 22.29±1.42* | 25.83±1.67* | 26.31±1.39*  |
|        | 15 | 22.10±1.74* | 22.82±1.19* | 26.08±1.98* | 26.95±1.41*  |
|        | 16 | 22.74±1.47* | 21.89±1.44* | 26.26±2.00* | 26.18±1.47*  |
|        | 17 | 21.57±1.11* | 22.60±1.33* | 26.76±2.15* | 26.66±1.43*  |
|        | 18 | 21.76±1.34* | 21.94±1.24* | 25.64±1.89* | 26.28±1.13*o |

[0222] 注：\*,表示与模型组相比,P&lt;0.05。

[0223] 实施例12

[0224] 评价三组分药物、七组分药物对CLP诱导的脓毒症调节性T细胞功能的影响

[0225] 1. 实验材料

[0226] 雄性清洁级SD大鼠(180~220g),内毒素(LPS),羟基红花黄色素A,芍药苷,芍药内酯苷,氧化芍药苷,洋川芎内酯I,丹参素钠,阿魏酸,1640培养基,24孔板,藻红蛋白(PE)-抗大鼠CD25、异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗大鼠CD4、异硫氰酸荧光素(FITC)标记膜联蛋白V凋亡试剂盒;大鼠抗-PE试剂盒、CD4磁珠、MiniMACS磁性分离仪以及分选柱;PE标记Foxp3试剂盒、PE标记CTLA-4试剂盒、抗大鼠CD3单克隆抗体、抗大鼠CD28单克隆抗体。

[0227] 2. 实验方法

[0228] 2.1 分组与干预

[0229] 见实施例8。

[0230] 2.2 细胞分离及培养

[0231] CLP术后72h大鼠断颈处死,酒精棉球消毒胸腹部3遍,开腹,保留完整腹膜,酒精棉

球再次消毒,另外一副镊子开腹膜,取脾脏,置于4℃15ml PBS中。用镊子撕开脾脏包膜,放入滤网,加PBS润湿,撕碎脾脏,去除筋膜,无菌注射器活塞研磨脾脏,吸管吸取悬液到离心管,1200转×7分钟离心,弃上清,加入适量MACS Buffer (10ml/每个脾)重悬,沿着管壁加入到淋巴细胞分离液的上层(1:1)3000转×15分钟离心,用吸管吸取中层液,装入另一离心管中,加入清洗液1200转×7分钟离心,弃上清,加入MACS Buffer重悬备用。

[0232] 每 $1 \times 10^7$ 单核细胞加入1 $\mu$ l抗CD25-APC抗体,4℃孵育15min,MACS Buffer洗涤。每 $1 \times 10^7$ 细胞加入20 $\mu$ l抗APC磁珠和80 $\mu$ l MACS Buffer,4℃孵育15min,MACS Buffer洗涤,加适量MACS Buffer重悬,LS柱磁性分选,即得CD25<sup>+</sup>细胞。

[0233] CD25<sup>+</sup>细胞计数后,每 $1 \times 10^7$ 细胞加入20 $\mu$ l解离剂,4℃孵育10min,MACS Buffer洗涤,每 $1 \times 10^7$ 细胞加入20 $\mu$ l抗CD4磁珠和30 $\mu$ l终止剂,4℃孵育15min,MACS Buffer洗涤,加入适量MACS Buffer重悬,LS柱磁性分选,即得CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞。

### [0234] 2.3检测与分析

[0235] Treg凋亡率检测:收集细胞,细胞用预冷的PBS清洗,然后用1ml 1×Binding Buffer再次清洗,离心后去上清剩余100 $\mu$ l,然后加入5 $\mu$ l FITC Annexin V和5 $\mu$ l PI,室温(25℃)避光孵育15min,然后加入200 $\mu$ l 1×Binding Buffer混匀,1h内流式细胞仪检测。

[0236] Foxp3和CTLA-4表达检测:细胞上清收集后,细胞用PBS清洗,去上清,加入CTLA-4-PE荧光抗体,4℃避光孵育30min,加入破膜剂过夜。第二天,加入破膜缓冲液清洗,去上清,加入Foxp3-PE-Cy7荧光抗体,室温避光孵育30min,加入破膜缓冲液清洗,去上清,1%多聚甲醛固定,流式细胞仪检测。

### [0237] 3.实验结果

[0238] 3.1三组分药物、七组分药物对CLP诱导的脓毒症调节性T细胞功能的影响

[0239] 实验结果(表16)表明:模型组Treg凋亡率明显低于对照组( $p < 0.05$ ),给药组均显著高于模型组( $p < 0.05$ )。模型组Foxp3、CTLA-4表达明显高于对照组( $p < 0.05$ ),给药组均显著低于模型组( $p < 0.05$ )。上述发现提示,与模型组相比,各剂量组的三组分药物组和七组分药物组均可促进脓毒症Treg凋亡,下调对T淋巴细胞增殖和分泌功能的抑制效应。表明各剂量组的三组分药物组和七组分药物组对脓毒症大鼠模型具有明显的纠正机体细胞免疫抑制状态的作用。折算成人体剂量约为:三组分药物组(羟基红花黄色素A 6mg至600mg,芍药苷6mg至600mg,芍药内酯苷0.6mg至60mg)、七组分药物组(羟基红花黄色素A 6mg至600mg,芍药苷6mg至600mg,芍药内酯苷0.6mg至60mg,氧化芍药苷0.6mg至60mg,洋川芎内酯I 0.6mg至60mg,丹参素钠0.6mg至60mg,阿魏酸0.06mg至6mg)。<sup>[根据徐叔云主编的《药理实验方法学》中人和动物间按体表面积折算法计算,人体剂量=大鼠剂量/0.018(以成人体重70kg、大鼠体重0.2kg计)]。</sup>

[0240] 表16三组分药物组和七组分药物组对脓毒症大鼠调节性T细胞凋亡率及Foxp3、CTLA-4表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ ,单位:%)

| 组别     |    | T 细胞凋亡率     | Ctla-4      | Foxp3       |
|--------|----|-------------|-------------|-------------|
| 对照组    |    | 40.01±3.79* | 11.19±1.58* | 38.11±3.80* |
| 模型组    |    | 10.15±2.63  | 48.31±4.06  | 89.46±3.61  |
| 三组分药物组 | 1  | 16.21±1.75* | 34.48±3.01* | 82.10±2.54* |
|        | 2  | 21.98±3.50* | 29.68±3.63* | 69.39±3.32* |
|        | 3  | 21.11±3.47* | 31.03±2.60* | 71.08±4.22* |
|        | 4  | 20.68±3.76* | 29.18±2.68* | 68.49±3.15* |
|        | 5  | 20.40±3.67* | 26.93±1.65* | 71.04±2.99* |
|        | 6  | 21.87±2.26* | 32.90±2.54* | 70.48±3.71* |
|        | 7  | 22.65±3.01* | 31.30±3.56* | 68.14±3.53* |
|        | 8  | 22.08±3.06* | 30.24±3.77* | 69.83±3.08* |
|        | 9  | 25.44±3.13* | 25.86±3.11* | 60.41±3.22* |
| 七组分药物组 | 1  | 20.97±2.84* | 32.37±2.38* | 70.11±2.87* |
|        | 2  | 24.84±3.55* | 25.56±3.74* | 59.90±3.11* |
|        | 3  | 25.14±4.21* | 28.39±1.89* | 61.68±3.80* |
|        | 4  | 25.15±2.92* | 24.15±3.64* | 59.40±3.58* |
|        | 5  | 25.51±3.17* | 24.61±3.21* | 58.85±4.04* |
|        | 6  | 25.42±3.31* | 25.24±3.91* | 59.55±3.28* |
|        | 7  | 26.28±2.53* | 25.43±3.20* | 59.96±2.69* |
|        | 8  | 26.60±3.58* | 25.38±3.34* | 60.12±3.02* |
|        | 9  | 25.49±3.64* | 25.01±3.37* | 57.13±2.80* |
|        | 10 | 26.72±2.93* | 27.61±2.97* | 59.57±3.73* |
|        | 11 | 26.16±2.92* | 23.97±3.33* | 59.83±3.78* |
|        | 12 | 26.41±3.14* | 25.71±3.01* | 58.19±2.67* |
|        | 13 | 26.47±3.35* | 26.78±2.59* | 59.27±3.37* |
|        | 14 | 25.40±3.23* | 26.19±3.81* | 56.96±2.70* |
|        | 15 | 25.71±3.11* | 26.55±3.28* | 58.29±4.39* |
|        | 16 | 25.52±3.87* | 26.65±3.57* | 61.26±3.11* |
|        | 17 | 25.93±3.41* | 25.69±3.07* | 58.53±3.43* |
|        | 18 | 29.09±3.17* | 19.96±3.44* | 48.11±3.52* |

[0242] 注：\*，表示与模型组相比， $P < 0.05$ 。

[0243] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。