

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.02.017

实验研究

柴胡加龙骨牡蛎汤不同静置时间对大鼠血铅值及肝肾功能的影响

卞尧尧¹, 杨丽丽², 王中立¹, 王庆¹, 徐桂华^{1*}

(1. 南京中医药大学, 江苏省南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210023; 2. 南通大学)

摘要 目的 探讨柴胡加龙骨牡蛎汤煎煮后最佳服用时间。方法 分别于柴胡加龙骨牡蛎汤煎煮后立即(0 min)及静置 5、10、20、30、60、100 min 时取水煎液, 检测各组水煎液温度和铅含量。将 SD 大鼠按照柴胡加龙骨牡蛎汤煎煮后静置时间随机分为 10 min 组、20 min 组、30 min 组、40 min 组、50 min 组、60 min 组及对照组, 每组 16 只。对照组每日予蒸馏水 2 ml 灌胃 1 次, 其余各组每日予相应柴胡加龙骨牡蛎汤 2 ml 浓缩液(含 2.244 g 生药)灌胃 1 次, 连续 7 天。检测各组大鼠血铅、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、尿酸(UA)含量及肝脏、肾脏 HE 染色。结果 柴胡加龙骨牡蛎汤的温度随着静置时间的延长呈下降趋势, 在 50 ~ 100 min 时温度所在区间为 59.14 ~ 43.57℃。水煎液铅含量随着时间的延长呈下降趋势, 各时间点组间两两比较铅含量差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较, 其余各组大鼠血铅值明显升高($P < 0.05$); 40 min 组、50 min 组、60 min 组血铅值明显低于 10 min 组、20 min 组、30 min 组($P < 0.05$)。10 min 组、20 min 组及 30 min 组大鼠 ALT、AST、Cr、UA 水平明显高于对照组($P < 0.05$); 40 min 组、50 min 组及 60 min 组 ALT、AST、Cr、UA 水平明显低于 20 min 组、30 min 组($P < 0.05$)。各组大鼠肝肾脏组织 HE 染色未见异常。结论 柴胡加龙骨牡蛎汤煎煮后静置 50 ~ 100 min 时口感温度合适, 铅含量已经下降至 150 $\mu\text{g/L}$ 以下, 此时服用对大鼠肝肾功能无影响。

关键词 柴胡加龙骨牡蛎汤; 血铅; 肝功能; 肾功能; 中药毒性

柴胡加龙骨牡蛎汤出自《伤寒论》, 临床运用广泛^[1], 但恐其组成药物铅丹的毒性^[2], 医家多有所顾忌。张仲景在记载该方时强调“去滓, 温服”, 考虑到张仲景所处的时代, 其所书必惜字如金, 强调“去滓”或有深意。我们认为, 铅丹质重, 易于沉降, 是否因为“去滓”以及等待温度降低的过程中产生沉淀从而影响摄入量值得探讨。本研究观察柴胡加龙骨牡蛎汤不同静置时间对大鼠血铅值及肝肾功能的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠 112 只, 23 周龄, 体重

(220.50 ± 11.47) g, 由南京中医药大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(浙)2008-0033。

1.2 药物及制备方法

柴胡加龙骨牡蛎汤: 以北柴胡: 龙骨: 黄芩: 生姜: 铅丹: 人参: 桂枝: 茯苓: 姜半夏: 大黄: 牡蛎: 大枣 = 8 : 3 : 3 : 3 : 3 : 3 : 3 : 3 : 5 : 4 : 3 : 4 的比例进行配置, 购于江苏省中医院门诊部。取上述诸药, 先在砂锅中加入 1600 ml 水浸泡 30 min, 龙骨、牡蛎先煎, 除大黄以外其余药物武火煎煮至沸腾, 煎煮至 800 ml 煎液时加入大黄, 再煮一二沸, 去滓, 分别于静置 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min 以及 60 min 后取水煎液进行浓缩, 浓缩成每毫升含生药 1.122 g 的浓缩液, 置于冰箱 -20℃ 保存, 用时取定量浓缩液。

1.3 主要试剂与仪器

丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定试剂盒(批

基金项目: 国家自然科学基金(81473791); 南京中医药大学青年自然科学基金(13XZR32); 南京中医药大学健康产业创新项目(201430)

* 通讯作者: guihua.xu@njucm.edu.cn

号: 408182H)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 测定试剂盒 (批号: 406272F)、血肌酐 (Cr) 测定试剂盒 (批号: 408152H)、尿素氮 (BUN) 测定试剂盒 (批号: 407282G)、血尿酸 (UA) 测定试剂盒 (批号: 406213F) 均购自北京利德曼生化股份有限公司。水合氯醛 (批号: 20140619) 购自国药集团化学试剂有限公司。台式高速冷冻离心机: Beckman 公司, 64R 型; 全自动生化分析仪: Hitachi 公司, 7020 型; 石蜡切片机: Leica 公司, RM2245 型; 脱水机: Leica 公司, ASP200S 型; 石蜡包埋机: Leica 公司, EG1150 型; 温度计: 常州市瑞明仪表厂, RM-885 型。

1.4 动物分组及给药方法

将 SD 大鼠按体重通过随机区组法分为对照组、10 min 组、20 min 组、30 min 组、40 min 组、50 min 组、60 min 组, 每组 16 只。对照组每日予蒸馏水 2 ml 灌胃 1 次, 其余各组每日予相应 2 ml 浓缩液 (含 2.244 g 生药) 灌胃 1 次, 连续 7 天。

1.5 观察指标及方法

1) 水煎液温度及铅含量: 以 1.2 中药物制备方法煎煮药物, 分别于煎煮后即刻 (0 min) 及煎煮后静置 5、10、20、30、60、100 min 时检测柴胡加龙骨牡蛎汤温度及铅含量。2) 大鼠肝、肾功能及血铅值: 给药 7 天后, 每组 8 只大鼠禁食不禁水 12 h, 次日按体重予 0.3 ml/100 g 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血, 3000 r/min 离心取血清, 检测血铅含量, 肝功能相关指标 AST、ALT, 肾功能相关指标 BUN、Cr、UA。每组 8 只大鼠取肝脏、肾脏, 予石蜡切片 HE 染色。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析, 重复测量设计资料采用方差分析, 完全随机设计资料采用单因素方差分析, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 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。

2 结果

2.1 不同静置时间对柴胡加龙骨牡蛎汤温度的影响

图 1 示, 柴胡加龙骨牡蛎汤的温度随着静置时间的延长呈下降趋势, 在 50 ~ 100 min 时温度所在区间为 59.14 ~ 43.57℃, 属于合适口感温度区间^[9], 即张仲景所强调的“温服”时间区间。

2.2 不同静置时间对柴胡加龙骨牡蛎汤铅含量的影响

图 2 示, 各时间点水煎液铅含量随着静置时间

的延长呈下降趋势。表 1 示, 各时间点组间两两比较铅含量差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

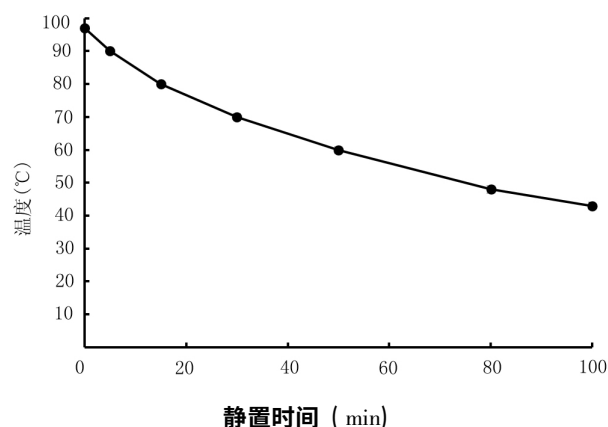


图 1 不同静置时间柴胡加龙骨牡蛎汤温度曲线图

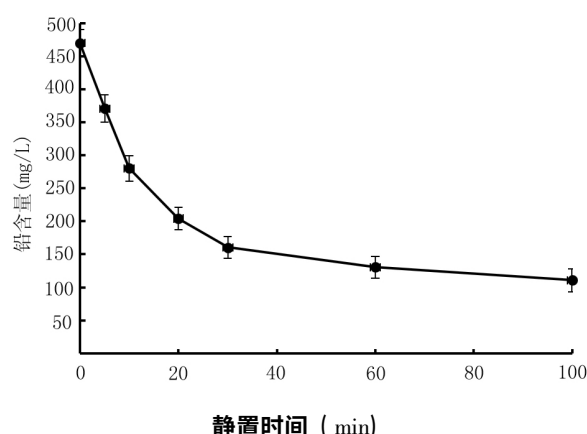


图 2 不同静置时间柴胡加龙骨牡蛎汤铅含量曲线图

表 1 各组柴胡加龙骨牡蛎汤水煎液铅含量比较 (mg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	铅含量
0 min 组	6	473.65 $\pm$ 16.31
5 min 组	6	371.24 $\pm$ 14.08*
10 min 组	6	279.08 $\pm$ 14.75* Δ
20 min 组	6	218.71 $\pm$ 12.02* Δ $\blacktriangle$
30 min 组	6	171.53 $\pm$ 9.86* Δ $\blacktriangle$ $\#$
60 min 组	6	144.87 $\pm$ 9.36* Δ $\blacktriangle$ $\#$ $\star$
100 min 组	6	126.43 $\pm$ 7.64* Δ $\blacktriangle$ $\#$ $\star$ $\diamond$

注: 与 0 min 组比较, * $P < 0.05$; 与 5 min 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 10 min 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; 与 20 min 组比较, $\# P < 0.05$; 与 30 min 组比较, $\star P < 0.05$; 与 60 min 组比较, $\diamond P < 0.05$

2.3 各组大鼠血铅值比较

表 2 示, 与对照组比较, 其余各组血铅值明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 10 min 组比较, 20 min 组、30 min 组、40 min 组、50 min 组、60 min 组血铅值明显降低 ($P < 0.05$); 30 min 组、40 min 组、50 min 组、60 min 组血铅值明显低于 20 min 组, 40 min 组、50 min 组、60 min 组血铅值明显低于 30 min 组 ($P < 0.05$)。40 min 组、

50 min 组、60 min 组血铅值组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠血铅值比较 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血铅值
对照组	8	21.84 $\pm$ 8.31
10 min 组	8	184.11 $\pm$ 35.86*
20 min 组	8	127.18 $\pm$ 24.37* Δ
30 min 组	8	76.09 $\pm$ 18.23* Δ $\blacktriangle$
40 min 组	8	47.55 $\pm$ 15.64* Δ $\blacktriangle$ $\#$
50 min 组	8	45.84 $\pm$ 15.04* Δ $\blacktriangle$ $\#$
60 min 组	8	45.33 $\pm$ 12.19* Δ $\blacktriangle$ $\#$

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 10 min 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 20 min 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; 与 30 min 组比较, $\#P < 0.05$

2.4 各组大鼠肝功能、肾功能比较

表 3 示, 与对照组比较, 10 min 组、20 min 组及 30 min 组大鼠 ALT、AST、Cr、UA 明显升高, 40 min 组、50 min 组 UA 及 10 min 组 BUN 亦明显升高 ($P < 0.05$)。与 10 min 组比较, 20 min 组、30 min 组、40 min 组、50 min 组及 60 min 组 AST 水平明显降低 ($P < 0.05$)。与 20 min 组比较, 30 min 组 ALT、AST 水平降低, BUN 水平升高 ($P < 0.05$)。40 min 组、50 min 组及 60 min 组 ALT、AST、Cr、UA 水平明显降低, BUN 水平明显升高 ($P < 0.05$)。与 30 min 组比较, 40 min 组、50 min 组及 60 min 组 ALT、AST、Cr、UA 水平明显降低, 60 min 组 BUN 水平降低 ($P < 0.05$)。60 min 组 UA 水平明显低于 40 min 组及 50 min 组 ($P < 0.05$)。

2.5 各组大鼠肝脏、肾脏 HE 染色结果

肝脏镜下 200 倍观察, 各组视野包括中央静脉及周边肝细胞, 肝小叶内肝板以中央静脉为中心呈辐射状整齐排列, 构成肝板的肝细胞未见明显病理变化, 胞浆染色均匀, 核浆比例适中, 肝细胞内及间质未见异常物质沉积及炎细胞浸润。肾脏镜下 200 倍观察, 视野主要体现肾皮质区组织结构, 包

括肾小球及其附属肾小管, 各组肾组织结构完整, 肾小球体积无明显差别; 未见组织增生及异物沉积; 肾球囊、球囊壁未见异常; 构成肾小管的上皮细胞未见明显病理变化, 无水肿、无异常物质沉积; 未见充血及炎症反应, 为正常肾组织结构。

3 讨论

铅丹化学名称为四氧化三铅 (Pb_3O_4), 异名为丹粉、红丹、铅黄等, 最早载于《神农本草经》, 功效为解毒止痒、敛疮生肌, 并是中医制造膏药的主要原料之一^[1,4]。李时珍称铅丹为“外科必用之物也”, 外科诸症均可以本品外用, 临床亦多有报道^[5]。现今恐其有毒, 多以他药代铅丹, 故临床运用日渐萎缩。但是, 有研究报道柴胡加龙骨牡蛎汤去铅丹后抗癫痫作用降低^[6], 可见, 铅丹在本方中不可忽略。临证中铅丹与龙骨、牡蛎相伍, 有祛痰镇惊之力; 与桂枝相合, 有通心阳安心神之效。值得关注的是, 张仲景方后注“去滓, 温服”。去滓强调弃去沉淀, 温服必然会有汤剂降温的过程, 恰恰“铅丹”重坠, 会不会在这一时间段内沉淀从而降低铅的实际摄入量呢? 基于此, 我们尝试通过探讨静置时间对柴胡加龙骨牡蛎汤温度的影响, 探求“温服”时间区间, 进而探讨该时间区间内柴胡加龙骨牡蛎汤水煎剂的铅含量的变化。

本研究结果显示, 柴胡加龙骨牡蛎汤水煎剂温度随着静置时间的延长呈下降趋势, 在 50 ~ 100 min 时温度所在区间为 45 ~ 60℃, 为合适口感温度, 即张仲景所强调的“温服”。铅丹质重, 在静置的过程中势必会沉淀, 本研究发现随着静置时间的延长, 该煎剂中铅含量呈下降趋势, 静置 30 min 后, 铅浓度已经下降至 200 $\mu\text{g/L}$ 以下, 在“温服”的时间区间内, 铅含量已经下降至 150 $\mu\text{g/L}$ 以下, 较煎煮完成时浓度明显降低。可

表 3 各组大鼠肝功能、肾功能比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	AST (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mmol/L)	Cr ($\mu\text{mol/L}$)	UA ($\mu\text{mol/L}$)
对照组	8	163.67 $\pm$ 28.29	45.60 $\pm$ 8.36	6.40 $\pm$ 0.92	42.33 $\pm$ 4.51	142.67 $\pm$ 40.20
10 min 组	8	203.00 $\pm$ 64.21*	90.75 $\pm$ 33.32*	8.13 $\pm$ 1.47*	66.00 $\pm$ 8.83*	168.33 $\pm$ 45.01*
20 min 组	8	196.67 $\pm$ 49.44* Δ	84.03 $\pm$ 13.08*	6.13 $\pm$ 0.50	51.67 $\pm$ 9.64*	163.91 $\pm$ 30.66*
30 min 组	8	173.33 $\pm$ 29.16* Δ $\blacktriangle$	72.33 $\pm$ 41.53* $\blacktriangle$	6.52 $\pm$ 1.15 $\blacktriangle$	56.23 $\pm$ 9.02*	167.46 $\pm$ 51.86*
40 min 组	8	165.67 $\pm$ 32.04 Δ $\blacktriangle$ $\#$	48.03 $\pm$ 11.02 $\blacktriangle$ $\#$	6.43 $\pm$ 1.27 $\blacktriangle$	44.33 $\pm$ 5.77 $\blacktriangle$ $\#$	152.67 $\pm$ 43.66* $\blacktriangle$ $\#$
50 min 组	8	162.50 $\pm$ 34.65 Δ $\blacktriangle$ $\#$	45.53 $\pm$ 13.51 $\blacktriangle$ $\#$	6.52 $\pm$ 0.78 $\blacktriangle$	40.50 $\pm$ 8.09 $\blacktriangle$ $\#$	154.55 $\pm$ 43.13* $\blacktriangle$ $\#$
60 min 组	8	157.67 $\pm$ 30.36 Δ $\blacktriangle$ $\#$	47.66 $\pm$ 11.93 $\blacktriangle$ $\#$	6.35 $\pm$ 1.23 $\blacktriangle$ $\#$	39.21 $\pm$ 6.64 $\blacktriangle$ $\#$	141.07 $\pm$ 8.72 $\blacktriangle$ $\#$ $\diamond$

注: AST, 门冬氨酸氨基转移酶; ALT, 丙氨酸氨基转移酶; BUN, 尿素氮; Cr, 血肌酐; UA, 尿酸; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 10 min 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 20 min 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; 与 30 min 组比较, $\#P < 0.05$; 与 40 min 组比较, $\star P < 0.05$; 与 50 min 组比较, $\diamond P < 0.05$

见,张仲景强调“去滓,温服”,降低了柴胡加龙骨牡蛎汤水煎剂的铅浓度。

以不同时间点柴胡加龙骨牡蛎汤灌服大鼠 1 周,检测其血铅含量,随着静置时间的延长,各组大鼠血铅值呈下降趋势。在“温服”的时间区间,血铅值较 10 min 组、20 min 组以及 30 min 组皆显著减低。可见,通过“去滓”,去除沉淀,通过“温服”,使得大鼠血铅值显著降低。检测肝功能、肾功能结果发现,随着静置时间的延长,ALT、AST 值呈下降趋势,40 min 组、50 min 组及 60 min 组与对照组比较差异无统计学意义;BUN、Cr、UA 值呈下降趋势,且各组值在 SD 大鼠生化值正常范围内^[7]。肝脏、肾脏 HE 染色未见异常,验证了张仲景服法未对肝肾造成器质性损伤。

综上所述,张仲景强调“去滓,温服”,这为服用柴胡加龙骨牡蛎汤毒性降低提供了依据。考虑到本实验样本量及毒性研究的复杂性,尚需进一步

深入研究,但本研究为汤剂服用方法以及柴胡加龙骨牡蛎汤铅丹毒性探讨进行了有益尝试。

参考文献

- [1] 刘庆芳. 铅丹的临床研究 [J]. 河南大学学报(医学版), 2005, 24(4): 65-66.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 522.
- [3] 张大力, 张海霞, 闵伟红, 等. 鲜食玉米物性测定及食用温度研究 [J]. 食品科学, 2011, 32(9): 111-113.
- [4] 晏后坚, 张月, 李洪珠, 等. 铅丹药理学研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(5): 1403-1405.
- [5] 周连三, 唐祖宣, 许保华, 等. 在柴胡加龙骨牡蛎汤中用铅丹的经验 [J]. 陕西中医, 1982(3): 18.
- [6] 卫向龙, 陈璐, 李娴. 柴胡加龙骨牡蛎汤方中有无铅丹的对比实验研究 [J]. 中医学报, 2014, 29(12): 1774.
- [7] 齐云, 蔡润兰, 刘彬, 等. 新药长毒试验动物血液生化测定规范化研究系列之五: SPF 级 SD 大鼠血液生化参考值的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(4): 193-196.

The Effect of *Chaihu Jia Longgu Muli Decoction* (柴胡加龙骨牡蛎汤) in Different Standing Time on Blood Level of Lead and Hepatorenal Function of Mice

BIAN Yaoyao¹, YANG Lili², WANG Zhongli¹, WANG Qing¹, XU Guihua¹

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023; 2. Nantong University)

ABSTRACT Objective To explore the best taking time of *Chaihu Jia Longgu Muli Decoction* (柴胡加龙骨牡蛎汤) after being decocted. **Methods** After *Chaihu Jia Longgu Muli Decoction* having being decocted, samples of the decoction were kept stand for 0.5 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min and 100 min, respectively, and then temperature and lead level of each sample was examined. According to the standing time, Sprague Dawley rats were randomly divided into the control group, the 10 min group, 20 min group, 30 min group, 40 min group, 50 min group, and 60 min group (n = 16 in each group). The control group was given 2 ml of distilled water once daily for gavage for 7 days. Each of other groups was given with 2 ml of the corresponding *Chaihu Jia Longgu Muli Decoction* concentrated solution (containing 2.244 g of crude herbs) once daily for gavage, for 7 days. Blood levels of lead, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), and uric acid (UA), and HE dye of liver and kidney tissues of rats in each group were examined. **Results** The temperature of *Chaihu Jia Longgu Muli Decoction* showed decreasing tendency with standing time. The temperature was between 59.14°C to 43.57°C when the decoction was kept stand for 50 min to 100 min. There was significant difference in blood level of lead between any two time point groups ($P < 0.05$). Compared with that in the control group, blood levels of lead in other groups remarkably increased ($P < 0.05$). Blood levels of lead in the 40 min group, 50 min group and 60 min group were remarkably lower than those in the 10 min group, 20 min group and 30 min group ($P < 0.05$). Levels of ALT, AST, Cr and UA in the 10 min group, 20 min group and 30 min group were remarkably higher than those in the control group ($P < 0.05$). Levels of ALT, AST, Cr and UA in the 40 min group, min group and 60 min group were remarkably lower than those in the 20 min group and 30 min group ($P < 0.05$). No abnormality was observed in HE dye of liver and kidney tissues of rats in any group. **Conclusion** When standing for 50 min to 100 min after being decocted, the temperature of *Chaihu Jia Longgu Muli Decoction* is appropriate for taking, and the lead level in the decoction has dropped to less than 150 μg/L, which has no side effect on hepatorenal function of rats. **Keywords** *Chaihu Jia Longgu Muli Decoction*; serum lead; hepatic function; renal function; toxicity of Chinese medicine

(收稿日期: 2015-04-01; 修回日期: 2015-08-11)

编辑: 邓 媛