

• 实验研究 •

生川乌配伍不同比例生半夏对大鼠心肌毒性的影响

许 柳¹ 佟继铭² 杨慧波² 张树峰^{2*}

(1. 河北联合大学中医学院, 河北省唐山市建设南路 57 号, 063000; 2. 承德医学院)

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究重点项目(ZD2010132)

* 通讯作者: zsf@cdmc.edu.cn, (0314)2291111

[摘要] 目的 观察不同比例配伍的生川乌和生半夏对心脏的毒性作用。方法 50 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、1:0 配伍组、1:0.25 配伍组、1:0.5 配伍组、1:1 配伍组各 10 只, 各配伍组给予相应浓度药物 0.4ml/100g, 正常对照组给予等体积生理盐水, 连续灌胃 4 周, 停药 2 周。分别于给药 4 周及停药 2 周, 计算体质量增长率、心脏系数、生化法和免疫组化法测定相关心肌酶。结果 各组大鼠给药 4 周及停药 2 周时体质量增长率差异均无统计学意义($P>0.05$)。给药 4 周各配伍组大鼠心脏系数显著高于正常对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 停药 2 周 1:0 配伍组及 1:0.5 配伍组心脏系数显著高于正常对照组($P<0.05$)。给药 4 周和停药 2 周, 各配伍组心肌酶含量不同程度高于正常对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 并且 1:0.25 配伍组、1:0.5 配伍组、1:1 配伍组部分心肌酶含量均较 1:0 配伍组低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 生川乌对大鼠心脏有明显的毒性, 生川乌与生半夏配伍对心脏的毒性则明显降低, 且配伍生半夏的比例越高, 对心脏的毒性越低。

[关键词] 生川乌; 生半夏; 心肌毒性; 心肌酶

Toxicity of Raw Chuanwu Combined with Raw Banxia in Different Proportions on Rat Myocardium

XU Liu¹, TONG Jiming², YANG Huibo², ZHANG Shufeng²

(1. TCM School, Hebei United University, Hebei Province 063000; 2. Chengde Medical University)

ABSTRACT Objective To observe the toxicity of raw Chuanwu (*Radix Aconiti*) combined with raw Banxia (*Rhizoma Pinelliae*) in different proportions on myocardium. **Methods** Fifty SD rats were randomized into the normal control group, 1:0 combination group, 1:0.25 combination group, 1:0.5 combination group and 1:1 combination group, with 10 in each. The combination groups were given 0.4ml/100g of corresponding concentration drugs. The normal control group was given the same volume of normal saline. The intragastric administration lasted for 4 consecutive weeks. The body mass growth rate and heart coefficient were calculated and the cardiac enzymes were detected before administration and after 4-week administration and 2-week withdraw. **Results** There was no significant difference between groups in the body mass growth rate after 4-week administration and 2-week withdraw ($P>0.05$). Comparing with the normal control group, the heart coefficient in the combination groups was significantly increased after 4-week administration ($P<0.05$ or $P<0.01$). Comparing with the normal control group, the heart coefficient in the 1:0 combination group and 1:0.5 combination group was significantly increased after 2-week withdraw ($P<0.05$). The cardiac enzyme levels in the combination groups were significantly higher than those in the normal control group after 4-week administration and 2-week withdraw ($P<0.05$ or $P<0.01$). Some of the cardiac enzyme levels in the 1:0.25 combination group, 1:0.5 combination group and 1:1 combination group were significantly lower than those in the 1:0 combination group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Raw Chuanwu is obviously toxic to rat heart. Combined with raw Banxia, the toxicity of raw Chuanwu to heart is greatly reduced. The higher the proportion of raw Banxia in combination, the lower toxicity to the heart.

Keywords raw Chuanwu (*Radix Aconiti*); raw Banxia (*Rhizoma Pinelliae*); myocardial toxicity; cardiac enzymes

乌头反半夏是中药“十八反”之首, 为历代医家所遵循。《中华人民共和国药典》^[1] 在乌头、半夏项下明确规定反药对不宜同用, 但从古至今不乏乌头与半夏配伍之方, 且具显效^[2], 故“十八反”存有争论。现代药理证明, 乌头碱是乌头的主要毒、效成分, 可直接毒害心肌细胞^[3]。本研究以生川乌、生半

夏为研究对象, 观察二者配伍后对心脏毒性的影响, 为该反药对配伍应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药材

生川乌, 购自河北光明饮片有限公司汉草饮片厂, 批号 090212, 产地: 四川。生半夏, 购自河北省

安国市光明饮片加工厂,批号 100101,产地:江西。将生川乌与生半夏按 1:0、1:0.25、1:0.5、1:1 比例配伍,取相应比例的生川乌与生半夏,加 3 倍量的水浸泡 3 次,每次 24h,合并滤液,冷冻干燥,备用,临用时加蒸馏水溶解至所需浓度。其中 1:0 配伍中生川乌给药剂量为 0.8g/(kg·d),1:0.25 配伍中生川乌 0.8g/(kg·d)+生半夏 0.2g/(kg·d),1:0.5 配伍中生川乌 0.8g/(kg·d)+生半夏 0.4g/(kg·d),1:1 配伍中生川乌 0.8g/(kg·d)+生半夏 0.8g/(kg·d)。

1.2 实验动物

清洁级 SD 大鼠 50 只,8 周龄,雌雄各半,体重(200±20)g,北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合格证号:SCXK(京)2009-0007。实验前在实验室适应 1 周,实验室温度(22±2)℃,相对湿度 55%~60%,光照 7:00-19:00。

1.3 仪器

AG-245 型电子分析天平(瑞士 Mettler 公司);CHRIST 实验室型冻干机(德国);ECG-6511 心电图机(上海光电医用电子仪器有限公司);Excelsior™ ES 自动组织脱水机(美国);Histocentre 3™ 组织包埋机(美国);Leica RM 2125 轮转式切片机(德国);TK-218 型恒温摊片烤片机(湖北泰维医疗科技有限责任公司);尼康 80i 数字影像处理系统(日本)。

1.4 动物分组及给药

50 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为正常对照组、1:0 配伍组、1:0.25 配伍组、1:0.5 配伍组、1:1 配伍组,每组 10 只,雌雄各半。各配伍组给予相应浓度药物 0.4ml/100g,正常对照组给予等体积生理盐水,连续灌胃 4 周,停药 2 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 一般情况 每日观察各组大鼠精神状态、行为活动、皮毛光泽、进食、粪便色泽及性状等。

1.5.2 体质量增长率 分别于给药前、给药 4 周及停药 2 周,称取大鼠体质量,计算体质量增长率。体质量增长率=(测量时体质量-给药前体质量)/给药前体质量×100%。

1.5.3 心肌酶、心脏系数 末次给药前禁食不禁水 12h,称取体质量。末次给药 1h 后,采用随机数字表法选取 2/3 大鼠(6 只,雌雄各半),10%水合氯醛(4ml/kg)腹腔注射麻醉,固定各组大鼠。腹主动脉采血,生化法检测血清丙氨酸氨基转移酶(AST)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶-MB(CK-MB)、乳

酸脱氢酶(LDH);免疫组化法定量检测血清肌钙蛋白 I(CTNI)、CK-MB、肌红蛋白(MYO)。取心脏,观察外观,PBS 冲洗滤纸吸净后称取质量,计算心脏系数。心脏系数=心脏重量/大鼠体质量×100%。各组剩余 1/3 大鼠(4 只)停药 2 周,同法处理,检测上述指标。

1.5.4 心肌结构 心肌组织以 4%多聚甲醛固定,梯度酒精脱水、浸蜡、包埋、切片、片厚 5μm,HE 染色光镜下观察心肌组织形态学变化。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

正常对照组大鼠精神状态良好,睡、卧、饮食、洗脸等生活行为平稳,追逐、打闹时有发生,被毛洁白有光泽,粪便成形,质软润、不燥硬。各配伍组大鼠灌胃 30min 内出现不同程度的活动减少、呼吸急促、呕吐、咳嗽、四肢抽搐等中毒症状。其中 1:0 配伍组反应明显,部分于给药 5min 后出现咳嗽,呕吐,流涎,步态不稳,四肢抽搐,甚则角弓反张,跳踯。1:0.25 配伍组可见呕吐,步态不稳,抽搐。1:0.5 配伍组及 1:1 配伍组见呕吐,活动减少。其中 1:0 配伍组于第 8 天给药 1h 后,死亡 1 只,解剖发现胃壁完整,肺部颜色正常,未见明显的饱满、肿胀,未见瘀血点,气管内未见液体。其余配伍组未见死亡,动物被毛光泽,无明显异常。

2.2 各组大鼠体质量增长率比较

表 1 示,各组大鼠给药 4 周及停药 2 周时体质量增长率差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠体质量增长率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	给药 4 周	停药 2 周
正常对照组	24.16±0.02(6)	30.01±12.54(4)
1:0 配伍组	19.35±18.43(6)	26.05±14.21(3)
1:0.25 配伍组	20.47±12.03(6)	26.49±11.32(4)
1:0.5 配伍组	21.12±9.03(6)	27.28±12.04(4)
1:1 配伍组	22.16±13.24(6)	29.05±13.02(4)

注:括号内为鼠数

2.3 各组大鼠心脏系数的比较

给药 4 周及停药 2 周各组大鼠心脏的形态、大小、颜色均未发现肉眼可见的变化。表 2 示,给药 4 周各配伍组大鼠心脏系数显著高于正常对照组

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 停药 2 周 1 : 0 配伍组及 1 : 0.5 配伍组心脏系数显著高于正常对照组 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠心脏系数比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	给药 4 周	停药 2 周
正常对照组	0.30 ± 0.02(6)	0.29 ± 0.03(4)
1 : 0 配伍组	0.37 ± 0.03** (6)	0.34 ± 0.03* (3)
1 : 0.25 配伍组	0.35 ± 0.02** (6)	0.32 ± 0.01(4)
1 : 0.5 配伍组	0.34 ± 0.03* (6)	0.34 ± 0.01* (4)
1 : 1 配伍组	0.34 ± 0.04* (6)	0.32 ± 0.01(4)

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 括号内为鼠数

2.4 各组大鼠生化法检测 AST、CK、CK-MB、LDH 水平比较

表 3 示, 给药 4 周时 1 : 1 配伍组 LDH 含量与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其余各组心肌酶含量均高于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 1 : 0.25 组 CK-MB、LDH 及 1 : 0.5 配伍组的 CK-MB 含量与 1 : 0 配伍组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其余各组心肌酶含量显著低于 1 : 0 配伍组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。停药 2 周,

1 : 0 配伍组 AST、CK、CK-MB 和 1 : 0.25 配伍组 AST、CK-MB 含量明显高于正常对照组, 1 : 0.5 配伍组和 1 : 1 配伍组 AST 含量也明显高于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。1 : 0.5 配伍组和 1 : 1 配伍组 AST、CK、CK-MB 低于 1 : 0 配伍组, 1 : 0.25 配伍组 CK 亦低于 1 : 0 配伍组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 各组 LDH 含量比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组大鼠免疫组化法检测 CK-MB、CTNI、MYO 水平比较

表 4 示, 给药 4 周各配伍组 CK-MB、CTNI、MYO 均高于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 1 : 0.25 配伍组 CTNI 低于 1 : 0 配伍组, 1 : 0.5 配伍组和 1 : 1 配伍组 CK-MB、CTNI、MYO 亦低于 1 : 0 配伍组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。停药 2 周 1 : 0 配伍组及 1 : 0.25 配伍组 CK-MB、CTNI、MYO 高于正常对照组, 1 : 0.5 配伍组和 1 : 1 配伍组 MYO 亦高于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 1 : 0.5 配伍组 CTNI 及 1 : 1 配伍组 CK-MB、CTNI、MYO 含量显著低于 1 : 0 配伍组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠生化法检测 AST、CK、CK-MB、LDH 水平比较(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	AST	CK	CK-MB	LDH
正常对照组	给药 4 周	6	34.33 ± 5.09	224.50 ± 30.74	22.50 ± 3.62	195.67 ± 48.32
	停药 2 周	4	36.02 ± 4.76	228.75 ± 36.94	22.50 ± 3.87	195.75 ± 51.81
1 : 0 配伍组	给药 4 周	6	168.01 ± 32.47**	434.83 ± 41.19**	39.51 ± 8.34**	392.33 ± 56.38**
	停药 2 周	3	111.75 ± 28.84**	392.25 ± 76.74**	34.75 ± 4.43**	293.25 ± 109.06
1 : 0.25 配伍组	给药 4 周	6	114.29 ± 62.08**#	356.71 ± 31.64**#	36.86 ± 4.81**	322.14 ± 89.34**
	停药 2 周	4	80.02 ± 22.63*	310.08 ± 21.21#	27.00 ± 1.73*	288.00 ± 45.25
1 : 0.5 配伍组	给药 4 周	6	99.67 ± 28.26**#	329.50 ± 32.60**#	35.50 ± 5.13**	293.17 ± 67.58**
	停药 2 周	4	72.01 ± 14.11**#	290.05 ± 41.00#	28.01 ± 2.65#	239.33 ± 78.42
1 : 1 配伍组	给药 4 周	6	90.29 ± 28.26**#	308.00 ± 38.83**#	32.14 ± 4.22**#	250.14 ± 50.15#
	停药 2 周	4	67.33 ± 22.19**	272.67 ± 21.01#	30.50 ± 4.95#	204.33 ± 89.59

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 1 : 0 配伍组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表 4 各组大鼠免疫组化法检测 CK-MB、CTNI、MYO 水平比较(ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	CK-MB	CTNI	MYO
正常对照组	给药 4 周	6	4.37 ± 1.17	0.14 ± 0.02	64.67 ± 7.39
	停药 2 周	4	4.37 ± 1.17	0.14 ± 0.03	65.75 ± 10.87
1 : 0 配伍组	给药 4 周	6	9.57 ± 2.11**	0.93 ± 0.17**	149.00 ± 18.38**
	停药 2 周	3	8.53 ± 1.61**	0.54 ± 0.08**	36.75 ± 20.20**
1 : 0.25 配伍组	给药 4 周	6	8.70 ± 1.30**	0.80 ± 0.15**#	137.50 ± 20.05**
	停药 2 周	4	7.58 ± 1.71*	0.47 ± 0.17**	128.50 ± 25.80**
1 : 0.5 配伍组	给药 4 周	6	7.62 ± 1.62**#	0.59 ± 0.07**#	122.57 ± 15.39**#
	停药 2 周	4	6.57 ± 2.41	0.36 ± 0.10#	114.00 ± 14.52**
1 : 1 配伍组	给药 4 周	6	6.50 ± 1.41**#	0.46 ± 0.11**#	115.01 ± 10.72**#
	停药 2 周	4	5.42 ± 2.32#	0.28 ± 0.16#	101.33 ± 12.86**#

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 1 : 0 配伍组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.6 各组大鼠心肌形态学观察结果

正常对照组大鼠心肌细胞排列整齐、致密,且结构清晰,细胞核呈卵圆形。1:0配伍组大鼠心肌细胞排列紊乱,细胞间连接减少,胞浆内出现大量空泡,心肌横纹模糊,心肌纤维间隙增宽,肌丝粗细不等,部分可见肌束细长,分裂、中断,并呈波浪状改变。1:0.25配伍组、1:0.5配伍组、1:1配伍组对心肌的损伤程度减小,且随着配伍生半夏比例的增高,对心肌的损害越低。

3 讨论

乌头反半夏是中药“十八反”之一,为中药配伍禁忌的重要内容。乌头为《医疗用毒性药品管理办法》约束的28种有毒中药之一。乌头类药物中毒主要表现为呼吸抑制和不同形式的心律失常,其中心律失常是乌头碱中毒最典型、最主要的临床表现^[3-5],中毒的靶器官为神经系统和心血管系统,其次为消化系统^[6]。生半夏中毒的主要表现为肿胀、疼痛、失音、流涎、痉挛、呼吸困难,甚至死亡,中毒的靶器官主要是肝、肠和肾脏,但一般不会引起各脏器明显的病理组织学改变,并有胚胎毒性或可致畸,及致突变效应^[7]。

本实验结果显示,各组大鼠给药后出现步态不稳、抽搐等,1:0配伍组出现角弓反张、跳踉,亦出现呕吐、流涎等消化系统症状,其他配伍组反应明显轻于1:0配伍组,随着生半夏比例的提高,毒性反应减轻。历代医家遵从“十八反”配伍将致毒性增强或产生剧烈毒性的认识^[8],不少实验亦加以证明^[9-10]。但本实验与此理论相悖,生川乌与生半夏配伍后对心肌毒性降低,且随着生半夏比例增高,毒性反应减轻。脏器系数是反映药物对脏器毒性反应的重要指标。脏器系数增加反映脏器有充血、水肿、肥大、增生等病理变化,脏器系数下降表示脏器有萎缩、退行性变化等^[11]。本实验各配伍组出现不同程度的心脏系数增大($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示对心脏有一定病理性损伤,但各配伍组的心脏系数差异无统计学意义,可能与观察例数有关,有待进一步比较研究。各配伍组心肌酶含量显著高于正常对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),1:0.25配伍组、1:0.5配伍组及1:1配伍组大鼠AST、CK、CK-MB、LDH、CTNI、MYO不同程度低于1:0配伍组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且各指标降低的程度与生半夏配伍比例呈正相关,停药2周各组上述指标水平不同程度低于给药4周,但仍高于正常对照组。结果与病理组织学检查相符。

本实验结果显示,生川乌对大鼠心脏有明显的毒性,但是生川乌与生半夏配伍对心脏的毒性明显降低,且对心脏的毒性与配伍半夏的比例呈负相关。在中医处方中,常以改变药物的比例达到不同的疗效,故药物配伍比例在方剂药效发挥中起着重要作用。如张仲景在内服方中运用半夏配伍乌头,未见明显毒性且疗效显著,除辨证准确外,关键为用量调配^[12],即半夏与乌头用量比例为2:1。龚可等^[13]研究发现,在外用中,乌头与半夏比例为1:1时镇痛作用最强,而在皮肤局部急性毒性方面,1:1比例时毒性最小,认为在此剂量比例配伍下,两药物对毒性似有相互抑制作用,随着剂量比例的改变毒性作用有升高的趋势,特别是半夏超过乌头时毒性增加尤为明显。为了研究配伍比例在处方中的重要作用,本实验计划继续研究,为临床安全用药提供参考。

参考文献

- [1]国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:化学工业出版社,2005:46.
- [2]陈馥馨. 782个含十八反、十九畏内服成药方组成与主治分析[J]. 中国医药学报,1987,2(2):26-28,22.
- [3]刘艳,章诗伟,周兰. 等. 乌头类生物碱对心肌的毒性作用及分子毒理学研究进展[J]. 中国法医学杂志,2009,24(6):345-348.
- [4]苏建宏,余成敏. 68例乌头碱中毒的心电图分析[J]. 中国医疗前沿,2009,4(3):104.
- [5]雷载权,张廷模. 中华临床中药学[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:723-732.
- [6]郭晓庄,喇万英,张树峰,等. 有毒中药大辞典[M]. 天津:天津科技翻译出版公司,1991:61.
- [7]孙蓉,黄伟,鲍志辉. 基于功效和物质基础的半夏毒性研究进展[J]. 中国药物警戒,2010,7(1):37-40.
- [8]高晓山,陈馥馨. 中药十八反的新涵义—妨害治疗[J]. 中国中药杂志,1992,17(12):754-756.
- [9]孙世晓,许蔚,王凤,等. 生附子、生半夏配伍后急性毒性的实验研究[J]. 中医药信息,2011,28(2):104-106.
- [10]金科涛,石苏英,沈建幸,等. 半夏乌头合用对大鼠肝脏CYP450的调节作用[J]. 中华中医药学刊,2007,25(7):1357-1361.
- [11]向丽华,陈燕萍,张智,等. 24味有毒中药长期毒性实验对大鼠脏器指数的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2006,12(1):35-36,52.
- [12]王付,王帮众. 经方运用半夏配乌头(附子)的探索与实践[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):284-286.
- [13]龚可,何光星,张世俊,等. 乌头与半夏配伍外用镇痛疗效及皮肤急性毒性研究[J]. 四川中医,2009,27(4):54-56.

(收稿日期:2012-10-25;修回日期:2013-03-22)

[编辑:邓媛]