

· 实验研究 ·

赤丸水煎液的心脏毒性作用研究※

● 晁利芹* 潘晓丽 王 付▲

摘 要 目的:探讨赤丸水煎液对大鼠的心脏毒性作用,为赤丸的科学运用提供依据。方法:80只大鼠随机分为4组,每组20只,即赤丸方水煎液低、中、高剂量组(5.5、16.5、33g生药/kg)和对照组,每天灌胃给药一次,连续90d。观察各组大鼠体重、一般情况、心电图变化;测定血清乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH或LD)、肌酸酶(Creatine Kinase, CK)心肌酶的含量;HE染色观察心脏组织病理学变化。停药3w后,检测指标与方法同上。结果:与正常对照组比较,大鼠体重在赤丸水煎液高剂量组的灌胃期增长缓慢($P < 0.05$),但在恢复期,体重趋向正常。余赤丸水煎液实验组各实验期与正常对照组无显著差异($P > 0.05$)。各组大鼠的心电图、心肌酶及心脏组织形态不论在灌胃期抑或恢复期,均未出现异常。结论:低、中、高浓度的赤丸方水煎液均未见对大鼠的心脏造成毒性反应,为赤丸方在临床中治疗寒饮内阻证的疾病提供了实验依据。

关键词 赤丸水煎液;心电图;心肌酶;心脏组织形态学

赤丸是《伤寒杂病论》中辨治寒痰的重要用方之一,辨治“寒气,厥逆”。导师王付教授根据张仲景用方要点并结合自身临床经验常用于辨治闭塞性脉管炎、深部静脉炎以及慢性胃炎等。其方由乌头、半夏、茯苓、细辛所组成,其中“乌头与半夏”为用药禁忌中“十八反”内容之一。为此笔者查阅了相关赤丸的实验研究和临床运用情况,发现其研究仅仅局限于相反药对及单味药^[1],故本课题重点开展赤丸方药配伍的整体性及其相互关联性的慢性毒性实验研究,观察其水煎液对大鼠心脏的毒理作用,以期为临床安全用药提供科学的实验依据。

※基金项目 河南中医药大学博士基金项目(No.BSJJ2016-11);国家自然科学基金项目(No.81804196);河南省教育厅科技攻关项目(No.009A360015)

* 作者简介 晁利芹,女,医学博士,讲师。研究方向:经方配伍及临床应用研究和中西医结合防治脑病预防研究。

▲通讯作者 王付,男,教授。主要从事经方配伍及临床应用研究。E-mail:1034383171@qq.com

• 作者单位 河南中医药大学(河南 郑州 450000)

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康清洁级 Wistar 大鼠,雌雄各半,共80只,体质量 200 ± 10 g,购于河南省实验动物中心,合格证号:SCXK(豫)2005-0001。动物房内的饲养环境:温度 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$,湿度 $60\% \pm 10\%$,声响 < 60 分贝,无对流风,人工昼夜(12h/12h)。大鼠饲料由河南省实验动物中心提供。本研究涉及所有实验均通过河南中医药大学动物实验伦理委员会。

1.2 试剂与仪器 75%乙醇:100mL,洛阳德之康生物工程有限公司,批号:090706;95%乙醇:2500mL,卫辉市众诚消毒制剂有限公司,批号:090206;乌拉坦:上海曹扬第二中学化工厂生产,批号:080517;肝素钠注射液:2mL,12500U,江苏万邦生化医药股份有限公司,产品批号:09061012;甲醛溶液:天津市博迪化工有限公司,500mL/瓶,批号:20080823;BL-420生物机能实验系统检测心电图:成都泰盟公司;全自动生化分析仪:型号AT-738,上海安泰分析仪器有限公司;生物显微镜:型号OLYMPUS-CX40,日本奥林巴斯公司;轮转式切片机:型号LEICA2025,德国徕卡仪器有限公司;电子天平:型号AE-240METTLER;赛多利斯

精密天平:型号 BS210S,北京赛多利斯天平有限公司;电热恒温干燥箱:北京市永光明医疗仪器厂;LEICARM2135型石蜡切片机:德国LEICA公司。

1.3 实验药物及制备 实验药物:于郑州市华龙中药行购买茯苓、生川乌、辽细辛、法半夏四味中药材,并由河南中医药大学药学院鉴定合格。

药物制备:依据全国高等中医药院校《金匱要略》赤丸方的用量按重浸渍法^[2]提取药物成份,并浓缩为浓度200%(2g生药/mL)的溶液。制备方法如下:取茯苓12g、生川乌6g、法半夏12g、辽细辛3g,依比例计算、称量、粉碎所需受试药物,将上药混合用实验所需的水溶液分三次提取有效成分,将三次浸提液混合过滤,调整至实验所需容积,加热沸腾后持续煎煮60min,滤其药液;所得药液的量即为当天各给药组所需浓度为200%(2g生药/mL)的溶液。

1.4 实验方法 (1)实验动物分组:80只Wistar大鼠,雌雄各半分笼,适应性饲养1周后,随机每20只雌雄各半大鼠分为1组,共分4组,即赤丸水煎液高剂量组、中剂量组、低剂量组、正常对照组。

(2)实验分期:实验全程分为灌胃期和恢复期两期。灌胃期是大鼠适应性饲养1周后,持续灌胃90天的这个时期。恢复期是灌胃结束后,每组随机选10只大鼠处死检测,剩余的40只大鼠停止灌胃,继续一般饲养3周的这段时间。

(3)给药方法:各给药组根据人与大鼠的体表面积比,即大鼠用药为人用药量的7倍,依次按33g、16.5g、5.5g生药/(kg·d)剂量灌胃,对照组用蒸馏水灌胃,灌胃体积为同等体重条件下高剂量组大鼠灌胃时所需药液的剂量。每日定时(15:00)灌胃1次,6次/周灌胃,每周日检测大鼠的体重,每周根据称重情况调整给药剂量,各组连续灌胃90天。

(4)实验样品收集:末次灌胃后,大鼠禁食不禁水2h,腹主动脉取血于普通的真空采血管中,4℃,3000r/min,离心15min,收集上清液,于-80℃保存备用。采血完毕后,剖腹迅速取出完整心脏,除净周围的结缔组织,切取大鼠同一部位的的心脏组织,放入装有4%甲醛溶液的标本瓶里,固定48h后,脱水,置于包埋盒中,做好标记,切片,HE染色,在光学显微镜下进行观察心脏组织病理学变化。

(5)一般中医症候指标观察:神志、皮毛、呼吸、行动、饮食、二便、分泌物等表现。

(6)心电图检测:灌胃前,每组随机选10只大鼠

在乙醚麻醉作用下采用BL-420生物机能实验系统进行心电图检测,并于末次给药后的次日的上午,进行相同的心电图检查。

(7)心功能指标测定:LDH、CK。在灌胃期结束末次大鼠心电图检测后,腹腔注射20%的乌拉坦(5mL/kg)进行麻醉,然后,从大鼠的腹主动脉取5mL血液,离心,存放,检测。

(8)恢复期大鼠的检测方法:进行与给药期相同的检测,借此观察赤丸方的毒性反应是否具有可逆性,抑或是否出现迟缓性的毒性。

1.5 统计分析方法 采用SPSS18.0统计软件对实验所得数据进行整理和分析,计数资料用 χ^2 检验,计量资料用 t 检验,各组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为有统计学意义, $P<0.01$ 为有显著统计学意义。

2 结果与分析

2.1 赤丸水煎液对大鼠一般生长情况的影响 在实验过程中,除赤丸水煎液高剂量组大鼠外,其余各组大鼠在饲养期间,状态良好,精神佳,活动灵活,皮毛光滑有色泽,食欲正常,未见异常分泌物。赤丸水煎液高剂量组大鼠饲养期间,精神不振,行动迟缓,皮毛不光滑,腹部微胀,食欲差并伴有不同程度的腹泻。其中有2只大鼠在灌胃的第4、5周出现异常反应,体重增长较正常大鼠的速度慢,于第11、12周时,有5只大鼠出现了中毒反应,第67、83天,有2只大鼠死亡,随即解剖2只大鼠制作心脏病理切片,观察心脏组织形态。余实验组没有发现异常情况。

2.2 赤丸水煎液对大鼠体重的影响 灌胃前:不同大鼠实验组间体重无显著差异($P>0.05$);灌胃期:与正常对照组比较,赤丸水煎液低、中剂量组大鼠体重无显著性差异($P>0.05$),赤丸水煎液高剂量组大鼠的体重明显增长缓慢($P<0.05$),具有统计学意义。在动物试验中,体重数值的高低可以作为整个机体变化的一个重要指标,在本课题的赤丸水煎液慢性毒理试验过程中,每周称量大鼠体重,既是调整给药剂量的依据,又是观察大鼠毒性反应的一个重要试验指标。本课题结果证实,赤丸水煎液高剂量组大鼠的体重受到了很大的影响,余给药组大鼠的体重未受到影响。恢复期:不同给药组大鼠的体重与正常对照组比较无显著性差异($P>0.05$)。提示:长期大剂量口服赤丸水煎液对大鼠体重的增长具有影响作用,然而,一

且停止给药一段时间后,就可恢复到正常体重。见表1。

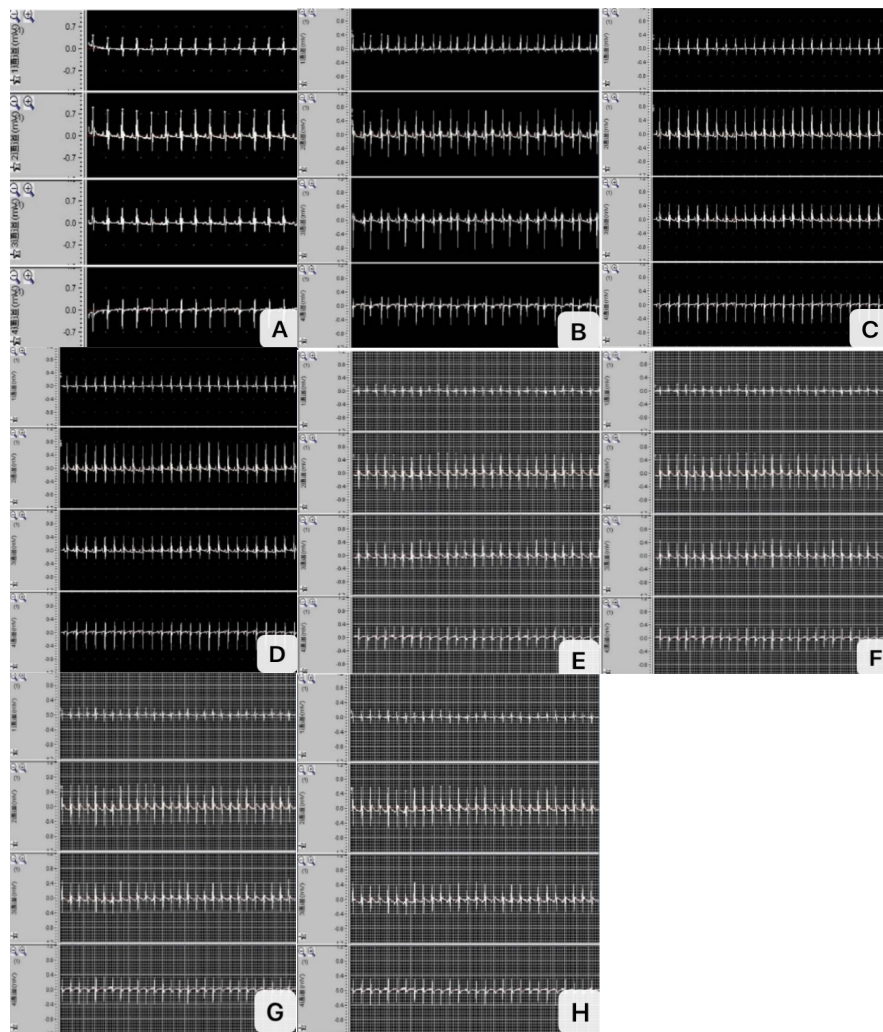
2.3 赤丸水煎液对大鼠心电图的影响 灌胃前:与

表1 各组大鼠体重比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

分组	给药前 (n=20)	给药期 (n=20)	恢复期 (n=10)
对照组	209.7±8.5	326.3±23.8	338.7±26.8
赤丸低剂量组	210.7±7.4	325.5±24.9	336.2±26.3
赤丸中剂量组	209.6±6.6	310.7±22.4	328.4±23.6
赤丸高剂量组	210.4±8.1	258.2±23.3*(n=18)	322.6±24.4(n=9)

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

对照组比较,不同赤丸水煎液剂量组大鼠的心电图包括心率,均无显著性差异($P > 0.05$)。灌胃期:与对照组比较,赤丸水煎液低、中、高剂量组大鼠的心电图、心率均无显著性差异($P > 0.05$)。恢复期:不同给药组大鼠的心电图、心率与正常对照组相比也无显著性差异($P > 0.05$)。本结果心率平均在335次/min。II、III、avF导联p波直立高尖,avR导联倒置,时限、振幅正常,QRS波V1导联主波向下,II、III、aVF向上,时限及振幅未见异常,J点抬高,T波前支陡后支缓。可以看出,长期灌服低、中、高剂量的赤丸水煎液对大鼠心脏无毒性反应。心电图见图1,心率结果见表2。



灌胃期: A正常对照组; B赤丸水煎液低剂量组; C赤丸水煎液中剂量组; D赤丸水煎液高剂量组。恢复期: E赤丸水煎液低剂量组; F赤丸水煎液中剂量组; G赤丸水煎液高剂量组; H正常对照组。在灌胃期、恢复期,4组大鼠的心电图均未见异常。

图1 赤丸水煎液对大鼠心电图的影响

2.4 赤丸水煎液对大鼠心肌酶的影响 灌胃期:赤丸水煎液不同剂量组大鼠的LDH、CK与正常对照组比较无显著性差异($P > 0.05$)。本结果证实,赤丸水

煎液低、中、高剂量组大鼠的心肌细胞均未受到损害。恢复期:不同赤丸水煎液实验组大鼠的LDH、CK与正常对照组比较,无显著性差异($P > 0.05$)。本课题结

表2 各组大鼠心率比较(次, $\bar{x} \pm s$)

表3 各组大鼠LDH、CK变化比较(U/L, $\bar{x} \pm s$)

果说明,不论灌胃期,还是恢复期,赤丸水煎液低、中、高剂量组大鼠的心肌细胞均未受到损害。见表3。

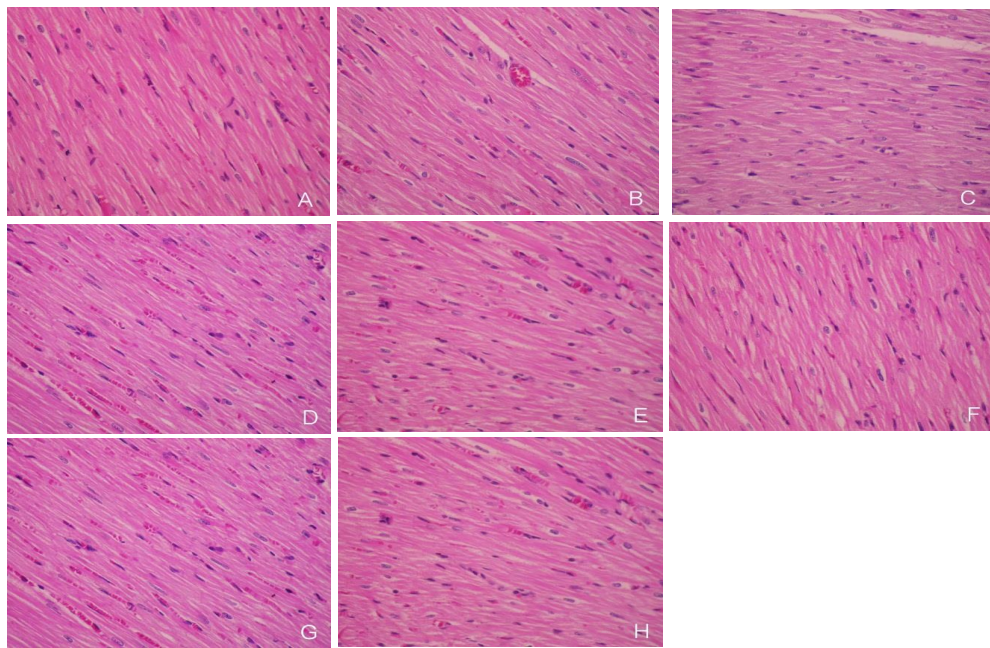
2.5 赤丸水煎液对大鼠心脏的组织形态的影响 整体情况:不同实验组大鼠心脏的结构完整,表面光滑,形态体积、色泽均正常,未见水肿、充血、糜烂,组织无隆起、脱落,触及质地也未发现异常。

形态组织学观察:在灌胃期、恢复期,在光镜下观察实验各组大鼠的心脏结构形态结果具有一致性,均

组别		LDH (U/L)	CK (U/L)
正常对照组 (n=10)	给药期	155.11±26.55	189.07±18.34
	恢复期	155.10±27.41	189.06±19.56
赤丸低剂量组 (n=10)	给药期	154.83±26.73	189.44±18.79
	恢复期	153.97±27.84	189.31±17.52
赤丸中剂量组 (n=10)	给药期	153.59±26.34	189.46±17.88
	恢复期	155.72±27.64	188.09±18.93
赤丸高剂量组 (n=9)	给药期	156.22±28.25	197.84±19.46
	恢复期	155.33±25.42	190.89±18.52

可见到由心外膜、心肌膜、心内膜构成的心脏壁,心肌细胞排列整齐,核居中,无变性、坏死等损伤性改变,间质内未见炎性细胞浸润、缺血、水肿等病理性改变。

本课题实验结果表明,在灌胃期及恢复期,各组大鼠的心脏组织形态皆未出现异常。见图2。



400倍光镜下观察心脏组织病理切片,其结果显示:大鼠心脏组织形态结构HE*400。灌胃期:A正常对照组;B赤丸水煎液低剂量组;C赤丸水煎液中剂量组;D赤丸水煎液高剂量组。恢复期:E赤丸水煎液低剂量组;F赤丸水煎液中剂量组;G赤丸水煎液高剂量组;H正常对照组。在灌胃期、恢复期,4组大鼠的心脏结构形态结果具有一致性,均可见到由心外膜、心肌膜、心内膜构成的心脏壁,心肌细胞排列整齐,核居中,无变性、坏死等损伤性改变,间质内未见炎性细胞浸润、缺血、水肿等病理性改变。

图2 光镜下赤丸水煎液对大鼠心脏形态学的影响

3 讨论

王付教授在临床中经常辨证使用赤丸方加味治疗各种疑难杂症^[3],疗效卓著。由于赤丸组方之药性的特殊性,所以进行该方的动物实验研究是很有必要的。基于本实验前期发现赤丸水煎方对机体肝、肾、

内分泌系统均无毒性反应^[4],本研究则进一步探讨赤丸水煎液有无心脏毒性的影响,借此观察存否心脏的急毒与慢毒反应,是否具有可逆性。在给药期,高剂量组大鼠体重增长显著缓慢,但停药21d后,大鼠体重恢复到正常水平。不论在给药期还是恢复期,各组

大鼠的心率、心电图、心肌酶(LDH、CK)及心脏组织病理学均未现病理性改变。

赤丸方中虽然含有有毒中药,且有十八反的配伍禁忌药物,但是在研究中发现低、中、高浓度的赤丸水煎液对大鼠心脏均未产生不良的反应。赤丸方中,茯苓性味甘、淡、平,无毒副作用,且有免疫调节和保肝护肝的作用。细辛,辛、温,有小毒。《中国药典》将细辛的成人日用量定为不得超过3g^[5]。在赤丸方中细辛用量为一两(3g),属安全范围。乌头辛、甘、大热,有大毒,其毒性可随煎煮时间延长而减弱或消失^[6]。半夏辛、温,有小毒。半夏与乌头属于十八反,属配伍禁忌。但从药理毒理相互作用上看,其毒性很可能被消除或减弱。乌头的毒性主要为心脏的毒性及神经系统毒性。而现代药理研究表明半夏具有镇咳、镇吐、抗心律失常的作用,能够很好的拮抗乌头引起的心脏毒性^[7-9]。同时,细辛还具有强心、扩血管、降压及保护心肌的作用。全方半夏燥湿化饮,茯苓利湿化饮,乌头、细辛既能通阳散寒又能温化寒饮,四药相互为用,以建其功^[10]。

综上所述,赤丸方水煎液对心脏未见毒性反应,为临床治疗寒饮内阻之痼疾提供了动物实验依据。

参考文献

- [1]刘登义,曹建雄.赤丸治疗阳虚阴结型卵巢癌经验探析[J].中医药导报,2018,24(11):21-24.
- [2]张兆旺.中药药剂学[M].2版.北京:中国中医药出版社,2007:90-91,86.
- [3]王付.学用赤丸方证及合方的思路与方法[J].中医药通报,2013,12(5):12-14.
- [4]潘晓丽,尚立芝,张明昊,等.长期服用赤丸水煎液对大鼠肝功能及肝组织形态学的影响[J].中医学报,2015,30(12):1785-1787.
- [5]国家药典委员会.中国药典[S].一部.北京:中国医药科技出版社,2005:159.
- [6]晁利芹.王付教授运用乌头汤加减治疗痹证心得[J].中医学报,2014,29(1):38-39.
- [7]田红艳.中药半夏的炮制方法与临床应用研究[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(25):143-144.
- [8]高振杰,罗沙,周建雄,等.半夏的研究进展[J].四川中医,2019,37(4):212-215.
- [9]张旭,邢淑丽,王志宏.半夏在方剂中的作用及配伍规律[J].现代中西医结合杂志,2019,28(14):1584-1588.
- [10]王付.经方妙用治百病[M].北京:人民军医出版社,2008:139-140.

(收稿日期:2019-06-06)

(本文编辑:金冠羽)

(上接第73页)

联合外科舒筋洗中药熏药治疗早期膝骨性关节炎的临床观察[J].云南中医中药杂志,2019,40(6):51-53.

[15]孙波,张明明.乌花透骨汤熏洗治疗寒湿阻络型膝骨性关节炎的临床效果观察[J].中外医学研究,2019,17(4):14-15.

[16]栗先增,薛建红,顾伯林,等.奇正消痛贴配合熏蒸外治法在膝关节骨性关节炎中的临床应用效果研究[J].辽宁中医杂志,2019,46(2):328-331.

[17]李洪涛,杨野,彭宇飞,等.浮针联合温针灸治疗膝关节炎性关节炎症研究[J].针灸临床杂志,2019,35(8):48-51.

[18]邓星佑,熊尤龙,武双艳,等.辨证取穴针刺法对膝关节炎性关节患者血清MMP、IL-1 β 表达的影响[J].辽宁中医杂志,2019,46(5):1048-1051.

[19]韦贵康.中国手法医学的形成及发展趋势[J].中国骨伤,2004,17(4):5-6.

[20]张欣,刘明军,杨寄渝,等.背部保健推拿对亚急性衰老家兔免疫功能的调节作用[J].中国老年学杂志,2015,35(24):6969-6970.

[21]梁立君.中医辨证推拿治疗膝骨性关节炎的疗效观察[J].中国医药指南,2019,17(3):172-173.

[22]刘萍,王文志,曾诚.中医定向透药治疗法治疗膝骨性关节炎疗效分析[J].四川中医,2019,37(6):118-121.

[23]夏一娇.中医定向透药治疗膝关节炎性关节炎症临床观察[J/OL].辽宁中医杂志,2019:1-4.

[24]张寿雄.基于经筋理论探析中医定向透药对早期膝骨性关节炎患者功能活动及步态特征的影响[D].福建中医药大学,2019.

[25]沈鹏,王腾腾,张浩,等.芪防膝痹颗粒对大鼠膝骨关节炎疼痛的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(9):3990-3994.

[26]牛娜.贵州苗族熏蒸法调控早期KOA家兔软骨组织相关因子蛋白表达的实验研究[D].贵阳中医学院,2016.

[27]梁楚西,郭妍,陶琳,等.针对膝骨性关节炎兔软骨细胞外基质II型胶原、聚集蛋白聚糖相关蛋白表达的影响[J].针刺研究,2015,40(2):119-124,140.

[28]曲崇正,刘姣,陶静,等.推拿对膝骨性关节炎大鼠滑膜TRAF6、NF- κ Bp65 mRNA及蛋白的影响[J/OL].云南中医学院学报,2019,42(1):24-29.

[29]朱鸿飞,刘益杰,冯伟,等.模拟按压手法对兔膝骨关节炎治疗作用的实验研究[J].上海中医药杂志,2012,46(9):72-75.

(收稿日期:2019-10-31)

(本文编辑:金冠羽)