

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.07.009

蒋运斌, 黄婷, 陈瑞鑫, 等. 基于“以药制药”理念探讨甘草制对细辛毒效的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(7): 97-106.

基于“以药制药”理念探讨甘草制对 细辛毒效的影响

蒋运斌¹, 黄婷², 陈瑞鑫², 陈文莉², 张燕飞³, 蒋桂华²1. 西南大学药学院/中医药学院, 重庆 400715; 2. 成都中医药大学药学院, 成都 611137;
3. 西藏藏医药大学藏医药研究所, 拉萨 850000

摘要: 剖析甘草制对细辛毒效的影响, 在急性毒性实验中, 将 130 只 KM 小鼠均分为 6 个生细辛组、6 个甘草制细辛组、1 个空白对照组, 给药 1 次, 观察 14 d 内动物的一般情况, 采用 Bliss 法计算半数致死量(LD_{50})。在长期毒性实验中, 将 50 只 SD 大鼠均分为空白对照组、生细辛低/高剂量组、甘草制细辛低/高剂量组, 每天 1 次, 连续灌胃给药 28 d, 观察动物的一般情况, 生化分析法检测血丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)水平, 测定肝肾脏器系数, HE 染色法检查肝肾组织病理学变化。在抗偏头痛药效实验中, 将 40 只 SD 大鼠均分为空白对照组、模型组、西比灵组、生细辛组、甘草制细辛组, 每天 1 次, 连续灌胃给药 7 d, 硝酸甘油造模, ELSIA 法检测血一氧化氮(NO)、一氧化氮合成酶(NOS)、降钙素基因相关肽(CGRP)和脑 5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)水平。毒性实验结果显示: 细辛经甘草炮制后, 出现毒性的时间延后, LD_{50} 增加, 对肝肾功能血液生化指标(ALT, AST, Cr 和 BUN)、脏器系数、病理损伤的影响减弱。抗偏头痛药效实验结果显示: 生细辛组与甘草制细辛组大鼠的血 NO, NOS, CGRP 和脑 5-HT, NE 水平差异无统计学意义。综上, 甘草制可使细辛减毒存效, 研究结果可进一步提升细辛临床用药的安全性和有效性。

关键词: 细辛; 甘草; 以药制药; 毒性; 药效

中图分类号: S567.7; R283.1 文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)07-0097-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Exploration on the Effect of Liquorice Processing on Toxicity and Efficacy of Asari Radix et Rhizoma Based on “Medicine Processed by Medicine” Concept

JIANG Yunbin¹, HUANG Ting², CHEN Ruixin²,
CHEN Wenli², ZHANG Yanfei³, JIANG Guihua²

收稿日期: 2021-11-18

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(82104528); 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2020jcyj-msxmX0146); 西藏藏医药大学(藏医)博士点建设科研支撑计划项目(BSDJS-20-08); 中央高校基本科研业务费专项(SWU118045)。

作者简介: 蒋运斌, 博士, 讲师, 主要从事中藏药研究。

通信作者: 蒋桂华, 教授, 博士研究生导师。

1. College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
3. Research Institute for Tibetan Medicine, University of Tibetan Medicine, Lhasa 850000, China

Abstract: This work aimed to dissect the effect of liquorice processing on toxicity and efficacy of *Asari Radix et Rhizoma* (ARR). In the acute toxicity test, 130 KM mice were equally divided into 6 raw ARR groups, 6 liquorice-processed ARR groups, and 1 blank control group. Mice were intragastrically given drugs once. The general conditions of the mice were observed for 14 days, and the median lethal dose (LD_{50}) was calculated by the Bliss method. In the long-term toxicity test, 50 SD rats were equally divided into blank control group, raw ARR low/high-dose groups, and liquorice-processed ARR low/high-dose groups. Rats were intragastrically given drugs once a day for 28 days. The general conditions of the rats were observed, and blood alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine (Cr), and urea nitrogen (BUN) levels of rats were detected by biochemical analysis method. Meanwhile, the coefficients of liver and kidney organs of rats were determined by analytical balance, and the histopathological changes of liver and kidney of rats were examined by HE staining method. In the anti-migraine pharmacodynamic experiment, 40 SD rats were equally divided into blank control group, model group, Sibelium group, raw ARR group, and liquorice-processed ARR group. Rats were intragastrically given drugs once a day for 7 days, and nitroglycerin was used to build migraine model. ELISA method was used to detect blood nitric oxide (NO), nitric oxide synthase (NOS), calcitonin gene-related peptide (CGRP), and brain serotonin (5-HT), norepinephrine (NE) levels of rats. The toxicity test results showed that after ARR was processed by liquorice, the time for toxicity manifestation was delayed, and the LD_{50} was increased. Meanwhile, the influence of liquorice-processed ARR on blood biochemical indexes (ALT, AST, Cr, and BUN) of liver and kidney function, organ coefficients, and pathological damage of rats was weakened compared to raw ARR. The anti-migraine pharmacodynamic experiment results suggested that there was no significant difference in blood NO, NOS, CGRP and brain 5-HT, NE levels of rats between raw ARR and liquorice-processed ARR groups. In conclusion, liquorice processing can reduce the toxicity and remain the efficacy of ARR. The results of this work can promote the safety and effectiveness of the clinical use of ARR.

Key words: *Asari Radix et Rhizoma*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; medicine processed by medicine; toxicity; efficacy

“以药制药”应用于中医药已有十分悠久的历史,最早可追溯至东汉张仲景《金匮要略方论》中记载的阿胶经蒲黄炒后可增效、川乌经蜜制后可减毒,其是以一些药物炮制另一些药物,以达到减毒、增效/存效等效果的传统制药技术^[1]。目前可用于炮制其他药物的药物较多,如生姜、蛤蚧粉、蜂蜜、蒲黄、吴茱萸、甘草^[1]。具有调和诸药功能的甘草备受关注,其在“以药制药”领域内应用广泛,可使被炮制的药物减毒、增效/存效,如甘草制雷公藤、款冬花等^[2-3]。

细辛 *Asari Radix et Rhizoma* 为马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.、汉城细辛 *Asarum sieboldii* Miq. var. *seoulense* Nakai 或华细辛 *Asarum sieboldii* Miq. 的干燥根和根茎,为中医临床常用中药。受“马兜铃酸肾病”的影响,其临床用药的安全性受到关注;同时大量研究表明,细辛长期大剂量服用会对肝肾等重要脏器产生毒性^[4-6]。炮制是一种能使中药减毒并存效或增效的有效方法^[7],目前关于炮制对细辛成分、药效、毒性的影响报道较少,相关研究亟待加强。有研究分析了不同炮制方法(盐制、炒焦、米泔水制、碱制、甘草制、醋制、姜制、酒制、碱醋制、蜜制)对细辛毒性成分(马兜铃酸 A、黄樟醚)含量的影响,结果表明细辛炮制后,马兜铃酸 A 和黄樟醚的量

均有不同程度的降低^[8]。据报道,细辛经碱(NaHCO_3)制后,其急性毒性降低,抗炎镇痛作用增强^[9]。综上,本研究拟基于“以药制药”理念,通过急性毒性实验、长期毒性实验、大鼠硝酸甘油偏头痛模型,对细辛经甘草炮制前后的毒性、药效变化进行剖析,以提升细辛临床用药的安全性和有效性。

1 材料

BS200 生化分析仪,迈瑞医疗国际有限公司;352 酶标分析仪,芬兰 Labsystems Multiskan MS 公司;Sorvall ST 40 冷冻离心机,美国 Thermo Fisher 公司;CX22 光学显微镜,日本 OLMPUS 公司;BP121S 电子分析天平,赛多利斯科学仪器北京有限公司;RM2235 石蜡切片机,德国 Leica 公司。

细辛购于重庆市解放路中药材专业市场,经重庆市中药研究院秦松荣研究员鉴定为马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 的干燥根和根茎。大鼠丙氨酸氨基转移酶(ALT,批号 202012)、门冬氨酸氨基转移酶(AST,批号 202012)、肌酐(Cr,批号 202012)、尿素氮(BUN,批号 202012)生化试剂盒,上海笃玛生物科技有限公司;大鼠一氧化氮(NO,批号 200739M)、一氧化氮合成酶(NOS,批号 200760M)、降钙素基因相关肽(CGRP,批号 200734M)、5-羟色胺(5-HT,批号 200787M)、去甲肾上腺素(NE,批号 200765M)ELISA 试剂盒,江苏酶免实业有限公司。苏木素(批号 420699)、伊红(批号 392155),美国 Thermo Fisher 公司。水合氯醛(批号 2018103001),成都市科隆化学品有限公司;盐酸氟桂利嗪胶囊(商品名西比灵,批号 180909075),西安杨森制药有限公司;硝酸甘油注射液(批号 20180522),北京益民药业有限公司。

SPF 级 KM 小鼠 130 只,体质量 20 ± 2 g,雌雄各半;SD 大鼠 90 只,体质量 200 ± 20 g,雌性 25 只,雄性 65 只,成都达硕实验动物有限公司,许可证号 SCXK(川)2015-030,实验前适应性喂养 4 d。实验动物饲养条件:室内温度 $20 \sim 26$ °C,相对湿度 40%~70%,12 h 白天,12 h 夜晚,自由进食、饮水。实验操作符合成都中医药大学实验动物福利伦理审查委员会标准。

2 方法

2.1 甘草汁及细辛炮制品的制备

2.1.1 甘草汁的制备

据文献^[10]和 2015 年版《四川省中药饮片炮制规范》,取甘草片,10 倍量水煎煮 2 次,每次 45 min,合并煎煮液,浓缩至浓度约为 1.5 g/mL,即得炮制用甘草汁。

2.1.2 细辛炮制品的制备

取细辛段 300 g,加入 300 mL 甘草汁,拌匀,闷润,待甘草汁被吸尽后,置烘箱内 25 °C 烘干,即得。在获得甘草制细辛后,将细辛生品、炮制品分别进行粉碎,过 5 号筛,备用。临用时,将细辛生品、炮制品粉末用蒸馏水配制成所需浓度。

2.2 炮制前后细辛急性毒性的测定

2.2.1 动物分组、给药

将 130 只 KM 小鼠随机均分为 13 组,雌雄各半,包括 6 个生细辛组(7.87, 6.30, 5.04, 4.03, 3.23, 2.58 g/kg),6 个甘草制细辛组(9.40, 7.52, 6.02, 4.81, 3.85, 3.08 g/kg),1 个空白对照组。按 30 mL/kg 灌胃给药 1 次,给药后连续观察 14 d。空白对照组小鼠灌胃给予等体积的蒸馏水。生细辛、甘草制细辛剂量是在预实验的基础上,按 0.8 组距进行设置。

2.2.2 动物一般情况观察、解剖及分析

每天早晨,对中毒反应(如烦躁、蹦跳、呼吸困难、痉挛等)进行记录,并记录各组小鼠的死亡数目,对死亡小鼠进行解剖,观察脏器是否异常。观察 14 d 后,采用颈椎脱臼法将剩余小鼠处死并进行解剖,观察脏器是否异常。Bliss 法计算半数致死量(LD_{50})。

2.3 炮制前后细辛长期肝肾毒性的测定

2.3.1 动物分组、给药

将 50 只 SD 大鼠随机均分为 5 组, 雌雄各半, 包括空白对照组(蒸馏水)、生细辛低剂量组(0.42 g/kg)、生细辛高剂量组(1.67 g/kg)、甘草制细辛低剂量组(0.42 g/kg)、甘草制细辛高剂量组(1.67 g/kg). 按 10 mL/kg 灌胃给药, 每天 1 次, 连续 28 d.

2.3.2 动物一般情况观察

给药后观察并记录大鼠行为、食欲、分泌物、皮毛、粪便等情况.

2.3.3 肝肾功能血液生化指标检测

末次给药 24 h 后, 测定大鼠体质量, 腹腔注射 10% 的水合氯醛(3.5 mL/kg) 进行麻醉, 腹主动脉采血 5 mL, 血液 4 °C 静置 3 h, 4 °C 下 4 000 r/min 离心 20 min, 取血清, 置 -80 °C 保存备用. 按生化试剂盒说明书, 检测血清中 ALT, AST, Cr 和 BUN 的含量.

2.3.4 脏器系数测定

腹主动脉取血后, 立即对大鼠进行解剖, 观察肝肾组织的外观形状, 随后对肝肾进行剥离, 用滤纸轻轻擦拭干净, 称质量, 按公式计算各脏器系数.

$$I_{\text{肝}} = W_{\text{肝}} / W \times 100\% \quad (1)$$

$$I_{\text{肾}} = W_{\text{肾}} / W \times 100\% \quad (2)$$

式中, $I_{\text{肝}}$ 表示肝脏脏器系数, $I_{\text{肾}}$ 表示肾脏脏器系数, $W_{\text{肝}}$ 表示肝脏质量(g), $W_{\text{肾}}$ 表示肾脏质量(g), W 表示体质量(g).

2.3.5 组织病理学观察

取各大鼠肝或肾的同一部位, 以 4% 多聚甲醛固定, 再经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片, 随后行常规苏木素-伊红(HE)染色, 在光学显微镜下观察各组大鼠的肝肾组织病理学变化.

2.4 炮制前后细辛抗偏头痛药效的测定

2.4.1 动物分组、给药、造模

将 40 只 SD 雄性大鼠随机均分为 5 组, 包括空白对照组(蒸馏水)、模型组(蒸馏水)、西比灵组(1 mg/kg)、生细辛组(330 mg/kg)、甘草制细辛组(330 mg/kg). 按 10 mL/kg 灌胃给药, 每天 1 次, 连续 7 d. 末次给药 30 min 后, 空白对照组大鼠后颈部皮下注射等量的生理盐水, 其余各组大鼠后颈部均皮下注射硝酸甘油(10 mg/kg), 从注射硝酸甘油起, 出现双耳发红、频繁挠头和甩头等现象, 表明偏头痛造模成功.

2.4.2 血 NO, NOS 和 CGRP

造模 4 h 后, 腹腔注射 10% 的水合氯醛(3.5 mL/kg) 进行麻醉, 腹主动脉采血约 8 mL, 其中 5 mL 室温下静置 20 min, 4 °C 下 3 000 r/min 离心 20 min, 取血清, 置 -20 °C 冰箱保存, 用于测定 NO 和 NOS 的水平. 另 3 mL 以乙二胺四乙酸二钾(EDTA-2K) 作为抗凝剂, 混合 20 min 后, 4 °C 下 3 000 r/min 离心 20 min, 取血浆, 置 -20 °C 保存, 用于测定 CGRP 的水平, 按 ELISA 试剂盒说明书进行测定.

2.4.3 脑 5-HT 和 NE 检测

大鼠取血后处死, 取脑组织, 迅速在液氮中冷冻, 称质量, 按质量体积比 1:9 g/mL 加入 9 倍体积的生理盐水, 用手工玻璃匀浆器在冰浴上研磨匀浆, 4 °C 下 3 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, -20 °C 保存, 按 ELISA 试剂盒说明书, 检测脑组织上清液中 5-HT 和 NE 的水平.

2.5 统计分析

基于 R-4.0.2 程序, 以 Bliss 法计算 LD_{50} , 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析. 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐者组间两两比较采用 LSD 法, 方差不齐者组间两两比较采用 Dunnett's T3 法. $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

3 结果与分析

3.1 甘草制对细辛急性毒性的影响

与空白对照组比较, 生细辛各剂量组、甘草制细辛各剂量组小鼠在给药后不同程度上出现了烦躁、

蹦跳、呼吸困难及全身痉挛等中毒症状;与生细辛组比较,甘草制细辛组开始出现上述症状的时间整体延后.小鼠解剖后,肉眼观察各脏器,未发现明显异常.经 Bliss 法计算 LD_{50} ,结果表明甘草制细辛的 LD_{50} (5.69 g/kg) 大于生细辛的 LD_{50} (4.83 g/kg),见表 1.

表 1 生细辛及甘草制细辛的急性毒性实验结果

药物	组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	动物数/ 只	死亡数/ 只	死亡率/ %	LD_{50} / (g · kg ⁻¹)	平均可信限
蒸馏水	1	—	10	0	0		
生细辛	2	7.87	10	10	100	4.83	0.73
	3	6.30	10	8	80		
	4	5.04	10	5	50		
	5	4.03	10	3	30		
	6	3.23	10	1	10		
	7	2.58	10	1	10		
	甘草制细辛	8	9.40	10	10	100	5.69
9		7.52	10	8	80		
10		6.02	10	6	60		
11		4.81	10	3	30		
12		3.85	10	1	10		
13		3.08	10	0	0		

3.2 甘草制对细辛长期肝肾毒性的影响

3.2.1 动物一般情况

给药第 2 周,生细辛高剂量组开始出现精神萎靡、食欲不振、眼部分泌物增加等现象.给药第 3 周,甘草制细辛高剂量组开始出现精神萎靡、食欲不振、呼吸困难等现象.各组大鼠皮毛、粪便无明显异常.

3.2.2 肝肾功能血液生化指标、脏器系数变化

与空白对照组比较,生细辛高剂量组的 ALT, AST 和 BUN 水平升高,差异有统计学意义 ($p < 0.01$, $p < 0.05$); Cr 水平差异无统计学意义;生细辛低剂量组、甘草制细辛低、高剂量组的 ALT, AST, BUN 和 Cr 水平差异无统计学意义.与生细辛低或高剂量组比较,甘草制细辛低或高剂量组的 ALT, AST, BUN 和 Cr 水平差异无统计学意义,但整体来看,甘草制可以减轻细辛对肝肾功能相关指标的影响(表 2).

与空白对照组比较,生细辛低、高剂量组和甘草制细辛高剂量组的肝脏脏器系数升高 ($p < 0.05$, $p < 0.01$),差异有统计学意义;生细辛高剂量组的肾脏脏器系数升高 ($p < 0.01$),差异有统计学意义,其余各组差异无统计学意义.与生细辛高剂量组比较,甘草制细辛高剂量组肝脏脏器系数降低 ($p < 0.05$),差异有统计学意义;肾脏脏器系数差异无统计学意义,但有降低趋势.与生细辛低剂量组比较,甘草制细辛低剂量组的肝脏、肾脏脏器系数差异无统计学意义,但也有降低趋势(表 3).

表 2 生细辛及甘草制细辛对大鼠肝肾血液生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	ALT/ (U · L ⁻¹)	AST/ (U · L ⁻¹)	Cr/ (μmol · L ⁻¹)	BUN/ (mmol · L ⁻¹)
空白对照组	—	18.70 ± 3.04	19.68 ± 6.52	89.85 ± 30.78	4.11 ± 0.73
生细辛低剂量组	0.42	18.04 ± 5.75	23.29 ± 6.85	97.86 ± 26.62	4.64 ± 1.48
生细辛高剂量组	1.67	25.86 ± 8.60**	27.11 ± 8.56*	78.71 ± 18.44	5.45 ± 1.59*
甘草制细辛低剂量组	0.42	18.18 ± 4.34	22.47 ± 5.74	107.37 ± 21.05	4.86 ± 1.27
甘草制细辛高剂量组	1.67	20.81 ± 6.48	25.23 ± 7.80	83.32 ± 21.87	5.02 ± 1.70

注:与空白对照组比较,*表示 $p < 0.05$,**表示 $p < 0.01$,差异有统计学意义.

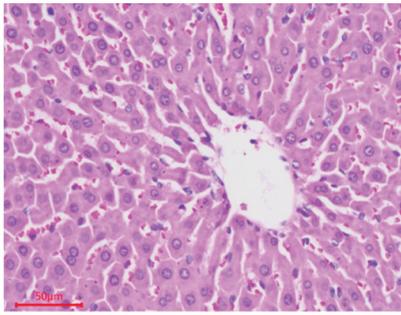
表 3 生细辛及甘草制细辛对大鼠脏器系数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

分组	剂量/(g·kg ⁻¹)	肝脏脏器系数/%	肾脏脏器系数/%
空白对照组	—	3.09±0.18	0.65±0.05
生细辛低剂量组	0.42	3.35±0.12*	0.69±0.05
生细辛高剂量组	1.67	3.75±0.24**	0.73±0.10**
甘草制细辛低剂量组	0.42	3.11±0.21	0.69±0.04
甘草制细辛高剂量组	1.67	3.41±0.52*#	0.68±0.05

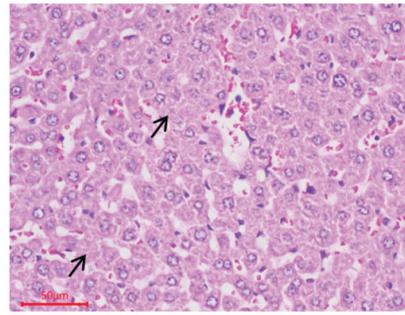
注:与空白对照组比较,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$,差异有统计学意义;与生细辛高剂量组比较,#表示 $p<0.05$,差异有统计学意义。

3.2.3 肝组织病理学变化

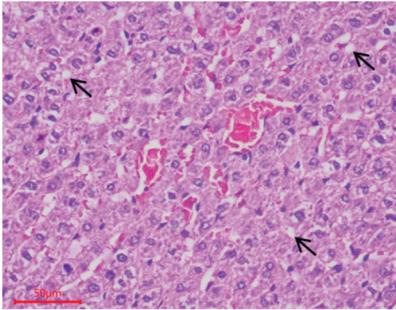
通过对各组大鼠肝组织病理学进行全面观察,发现肝细胞肿胀是各组大鼠肝组织间的主要差异性病理损伤,正常肝组织及各种肝细胞肿胀表现见图 1。根据肝细胞肿胀的程度,将其分为 I, II, III 和 IV 型,见表 4。各组在肝细胞肿胀各分型中的动物数量分布见表 5,与空白对照组相比,生细辛组或甘草制细辛组出现肝细胞肿胀的大鼠数量及严重程度均呈增加趋势,特别是生细辛高剂量组;与生细辛低或高剂量组比较,甘草制细辛低或高剂量组出现肝细胞肿胀的大鼠数量及严重程度均呈减弱趋势。



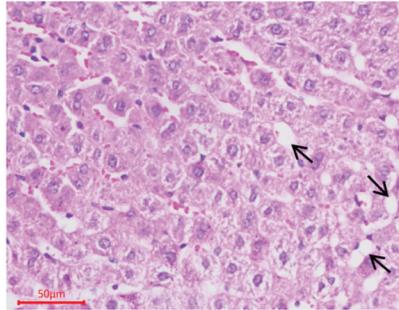
(a) 无明显的肝组织病理损伤



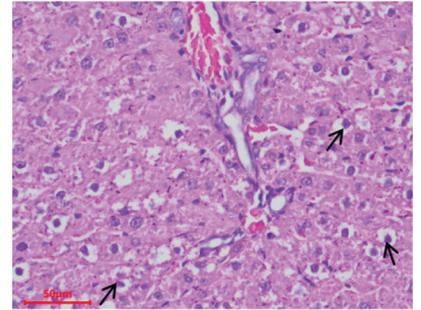
(b) 肝细胞弥漫性颗粒变性



(c) 肝细胞水泡变性



(d) 肝细胞气球样变



(e) 肝细胞坏死

图 1 正常肝组织及各种肝细胞肿胀表现显微图(HE 染色, 200×)

表 4 肝细胞肿胀的病理损伤分型

分型	程度	特征病变描述
I 型	+	肝细胞轻度肿胀,表现为颗粒变性,胞浆内见红染的细小颗粒。
II 型	++	肝细胞体积明显肿大,表现为水泡变性,胞浆内见大小不等的空隙,结构疏松呈网状。
III 型	+++	肝细胞体积肿大,胞浆内见少量红染的细胞基质,空白淡染形似气球,多数肝窦闭锁。
IV 型	++++	在细胞肿胀的基础上,出现明显的肝细胞坏死。

表 5 生细辛及甘草制细辛对大鼠肝脏细胞肿胀分型的影响 ($n=10$)

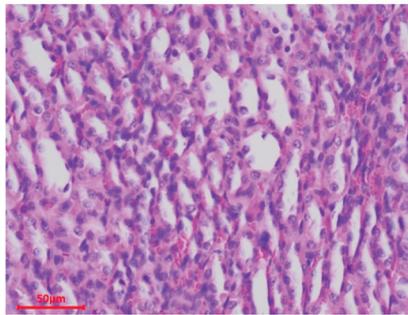
组别	I 型	II 型	III 型	IV 型
空白对照组	2	1	1	0
生细辛低剂量组	5	2	2	0
生细辛高剂量组	1	1	1	6
甘草制细辛低剂量组	4	2	0	0
甘草制细辛高剂量组	1	2	5	0

注: 数值代表各组出现对应肝细胞肿胀病理损伤分型的大鼠数量。

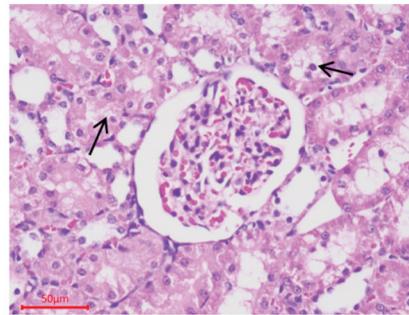
3.2.4 肾组织病理学变化

通过对各组大鼠肾组织病理学进行全面观察, 发现各组大鼠肾组织间的主要差异性病理损伤包括:

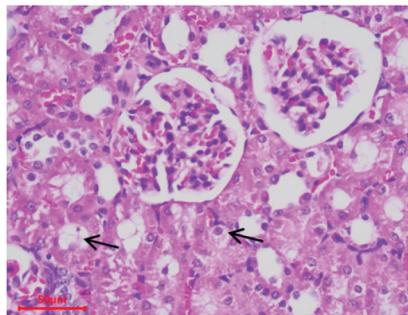
① 肾小管上皮细胞变性/坏死: 肾小管上皮细胞肿胀、颗粒变性、水泡变性, 部分细胞坏死、脱落, 进入肾小管管腔内; ② 充血: 间质小静脉和毛细血管扩张充血、肾小球充血, 致体积增大、肾小囊囊腔不同程度狭窄; ③ 部分肾小管管腔内见有浓厚的深染红色的蛋白管型。正常肾组织及各种病理损伤表现见图 2。



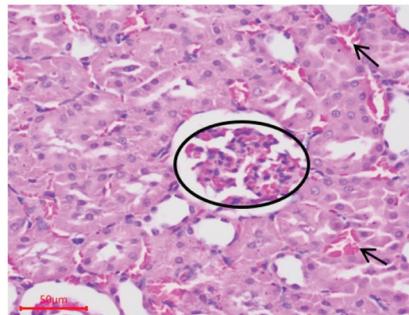
(a) 无明显肾组织病理损伤



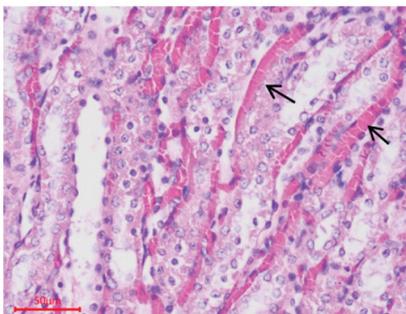
(b) 肾小管上皮细胞颗粒变性, 部分细胞脱落进入管腔



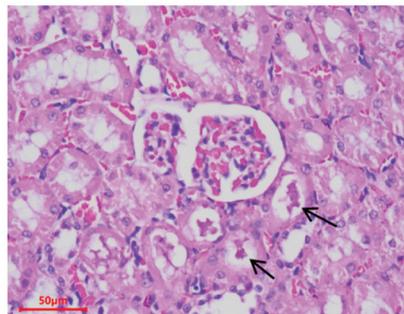
(c) 肾小管上皮细胞肿胀



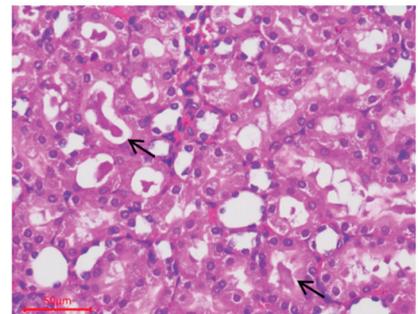
(d) 皮质区肾小球充血(圆圈), 肾小管之间的间质充血



(e) 髓质区间质毛细血管扩张充血



(f) 皮质区肾小管管腔内见红染的蛋白管型



(g) 髓质区肾小管内见浓厚的蛋白管型

图 2 正常肾组织及各种病理损伤表现显微图(HE 染色, 200×)

各组在不同肾组织病理损伤中的动物数量分布见表 6, 与空白对照组相比, 生细辛组或甘草制细辛组出现各肾组织病理损伤的大鼠数量呈增加趋势; 与生细辛低或高剂量组比较, 甘草制细辛低或高剂量组出现各肾组织病理损伤的大鼠数量呈降低趋势。

表 6 生细辛及甘草制细辛对大鼠肾组织病理损伤的影响($n=10$)

组别	肾小管上皮细胞变性/坏死	充血	蛋白管型
空白对照组	3	3	6
生细辛低剂量组	7	2	9
生细辛高剂量组	7	6	10
甘草制细辛低剂量组	6	3	6
甘草制细辛高剂量组	7	3	9

注: 数值代表各组出现对应肾组织病理损伤的大鼠数量。

3.3 甘草制对细辛抗偏头痛药效的影响

3.3.1 血 NO, NOS 和 CGRP 水平的变化

与空白对照组比较, 模型组大鼠血中 NO, NOS 和 CGRP 水平升高, 差异有统计学意义($p<0.01$)。与模型组比较, 西比灵组、生细辛组、甘草制细辛组大鼠血中 NO, NOS 和 CGRP 水平降低, 差异有统计学意义($p<0.01$)。与生细辛组比较, 甘草制细辛组大鼠血中 NO, NOS 和 CGRP 水平差异无统计学意义(表 7)。

表 7 细辛及甘草制细辛对偏头痛大鼠血中 NO, NOS 和 CGRP 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	NO/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	NOS/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	CGRP/($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)
空白对照组	—	22.72±1.83	28.40±1.43	44.14±3.52
模型组	—	40.39±2.86**	39.26±2.73**	58.62±2.64**
西比灵组	1	30.02±2.99##	32.56±1.10##	52.87±6.67##
生细辛组	330	29.62±3.67##	31.66±3.53##	50.04±1.81##
甘草制细辛组	330	30.14±2.34##	32.17±1.78##	49.73±2.24##

注: 与空白对照组比较, **表示 $p<0.01$, 差异有统计学意义; 与模型组比较, ##表示 $p<0.01$, 差异有统计学意义。

3.3.2 脑 5-HT 和 NE 水平的变化

与空白对照组比较, 模型组大鼠脑组织中 5-HT 和 NE 水平升高, 差异有统计学意义($p<0.01$)。与模型组比较, 西比灵组、生细辛组和甘草制细辛组大鼠脑组织中 5-HT 和 NE 水平降低, 差异有统计学意义($p<0.01$)。与生细辛组比较, 甘草制细辛组大鼠脑组织中 5-HT 和 NE 水平差异无统计学意义(表 8)。

表 8 细辛及甘草制细辛对偏头痛大鼠脑组织中 5-HT 和 NE 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	5-HT/($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	NE/($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
空白对照组	—	212.09±7.25	170.21±12.07
模型组	—	309.58±16.75**	227.63±10.35**
西比灵组	1	273.85±22.19##	191.83±13.86##
生细辛组	330	253.08±11.47##	184.20±9.09##
甘草制细辛组	330	249.90±8.54##	181.95±10.41##

注: 与空白对照组比较, **表示 $p<0.01$, 差异有统计学意义; 与模型组比较, ##表示 $p<0.01$, 差异有统计学意义。

4 讨论与结论

本研究基于“以药制药”理念, 以减毒、存效/增效为目的, 研究了甘草制对细辛毒效的影响。通过急性

毒性实验、长期毒性实验,以动物一般情况、 LD_{50} 、肝肾功能血液生化指标(ALT, AST, Cr 和 BUN)、肝肾脏器系数、肝肾组织病理学变化为指标,对细辛经甘草炮制前后的毒性变化进行阐释.基于大鼠硝酸甘油偏头痛模型,以血 NO, NOS, CGRP 和脑 5-HT, NE 水平为指标,对细辛经甘草炮制前后的抗偏头痛药效变化进行分析,结果表明甘草制可使细辛减毒存效.

LD_{50} 是表征药物急性毒性的常用指标^[11].急性毒性实验研究显示细辛经甘草炮制后,出现毒性的时间延后, LD_{50} 增加,表明甘草炮制降低了细辛的急性毒性.相对于急性毒性,细辛长期大剂量服用容易引起肝肾等重要脏器受损^[4-6].ALT 和 AST 是表征肝功能的经典指标,当肝功能受损后,血液中 ALT 和 AST 水平均上升^[12].Cr 和 BUN 是表征肾功能的重要指标,肾功能受损后,血液中 Cr 和 BUN 水平均升高^[13].脏器系数是实验动物某脏器的质量与体质量的比值,正常状态时动物各脏器与体质量的比值相对恒定,当动物染毒后,受损脏器因充血、水肿、萎缩等原因,导致对应脏器系数发生改变,目前脏器系数是毒理实验中常用的指标^[14].当脏器受损后,针对其进行病理组织学观察,可以直观、有效地反映出脏器受损情况,HE 染色是目前最基本、应用最广泛的病理组织学染色技术^[15].长期毒性实验研究显示细辛经甘草炮制后,出现毒性的时间延后,对肝肾功能血液生化指标(ALT, AST, Cr 和 BUN)、脏器系数的影响减弱;同时病理组织学结果显示,甘草制可减轻细辛对肝肾的损伤.综上,甘草制可降低细辛的长期毒性.

2020 版《中华人民共和国药典》记载,细辛具有解表散寒、祛风止痛、通窍、温肺化饮的功效,主要用于治疗风寒感冒、头痛、牙痛、鼻塞流涕、鼻鼾、鼻渊、风湿痹痛、痰饮喘咳.研究显示,细辛善于治疗偏头痛,其在临床治疗偏头痛用药中使用频率排在第 6 位^[16],故本研究基于大鼠硝酸甘油偏头痛模型,以血 NO, NOS, CGRP 和脑 5-HT, NE 水平为指标,考察了甘草制对细辛药效的影响.硝酸甘油偏头痛模型支持偏头痛发病机制的三叉神经血管学说,三叉神经传出神经纤维受到刺激后释放神经肽类物质(如 CGRP)作用于脑血管壁,进而引起神经源性炎症反应的发生,最终导致头痛^[17-18].NO 也是一种血管活性物质,不仅可扩张脑血管,也可刺激三叉神经释放 CGRP,进而引起偏头痛的发生^[19].NOS 参与了 NO 的合成,故其在激发偏头痛和维持偏头痛持续中显得非常重要^[20].此外,脑中 5-HT 和 NE 等的代谢紊乱也会促进偏头痛的发生^[21-22].本研究显示,生细辛和甘草制细辛具有明显抗偏头痛的作用.相对于生细辛,甘草制细辛的血 NO, NOS, CGRP 和脑 5-HT, NE 水平差异无统计学意义,即甘草制对细辛抗偏头痛药效没有明显影响,保持了细辛的药效.

本研究基于“以药制药”理念,通过急性毒性实验、长期毒性实验、大鼠硝酸甘油偏头痛模型,阐释了甘草制可使细辛减毒存效,可促进细辛临床用药的安全性、有效性,但其炮制减毒机制有待进一步研究.

参考文献:

- [1] 蔡泓,李军,王君明,等.“以药制药”炮制技术的历史沿革理论依据及其现代研究策略[J].时珍国医国药,2017,28(11):2703-2705.
- [2] 于小红,董捷鸣,吴昊,等.甘草炮制对雷公藤治疗窗的影响:以变应性接触性皮炎为例[J].中国中药杂志,2019,44(16):3454-3459.
- [3] 李明晓,周臻,田素英,等.正交试验优选甘草制款冬花的炮制减毒工艺[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(18):17-20.
- [4] 宋立群,王丽哲,马艳春,等.细辛对大鼠肾功能及组织形态学的影响[J].中医药学刊,2004,22(11):1979-1982.
- [5] 李晶晶,杨伟峰,周祯祥,等.细辛的长期毒性研究——长期大量服用细辛对大鼠肝组织形态学及功能的影响[J].湖北中医学院学报,2008,10(1):5-7.

- [6] 刘金伟, 韩林涛, 黄芳, 等. 基于 ^1H NMR 代谢组学细辛肝肾毒性的机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(4): 131-136.
- [7] ZHAO Z Z, LIANG Z T, CHAN K, et al. A Unique Issue in the Standardization of Chinese Materia Medica: Processing [J]. *Planta Medica*, 2010, 76(17): 1975-1986.
- [8] 严建业, 王元清, 王炜, 等. 细辛中马兜铃酸 A 与黄樟醚的炮制减毒方法研究 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 216-220.
- [9] 王雪, 李连坤, 张彦飞, 等. 细辛炮制前后的药效学及毒理学研究 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(22): 36-39.
- [10] 王元清, 江星明, 王智, 等. 细辛炮制品 HPLC 指纹图谱定性与有效成分定量分析研究 [J]. 中药材, 2015, 38(7): 1388-1392.
- [11] 黄洁瑶, 刘丹宁, 杨璐嘉, 等. 香连丸有效成分的急性毒性和长期毒性实验研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2020, 42(8): 33-41.
- [12] YU Y, WU Y, YAN H Z, et al. Rosmarinic Acid Ameliorates Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury in Mice via RACK1/TNF- α Mediated Antioxidant Effect [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2021, 59(1): 1286-1293.
- [13] 俞诗源, 魏娉婷, 郭耀, 等. 中药复方对麻黄素仔鼠血清 BUN、Cr 含量和肾组织的影响 [J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2013, 49(6): 84-90.
- [14] 张海燕, 韦迎春, 邬伟魁, 等. 3 种增溶性辅料致大鼠肝肾损伤 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 237-241.
- [15] 马恒辉, 周晓军. HE 染色常见问题与对策 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2008, 24(4): 478-481.
- [16] 谢立栋, 李海涛, 胡志强. 中医治疗偏头痛用药规律分析 [J]. 湖北中医杂志, 2011, 33(10): 52-53.
- [17] 张慧, 李冬霞, 栗志勇, 等. 芎芷石膏汤对硝酸甘油致偏头痛大鼠血浆 NO, NOS, CGRP 及脑中 5-HT, 5-HIAA 含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(17): 175-180.
- [18] MALHOTRA R. Understanding Migraine: Potential Role of Neurogenic Inflammation [J]. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 2016, 19(2): 175-182.
- [19] 倪红霞, 王春梅. 白芷总香豆素联合白芷挥发油对大鼠偏头痛的预防作用及其机制 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(3): 487-492.
- [20] 杜艳芬, 王纪佐. 偏头痛发病机制研究进展 [J]. 中国临床神经科学, 2002, 10(3): 314-317.
- [21] DRUMMOND P D. Effect of Tryptophan Depletion on Symptoms of Motion Sickness in Migraineurs [J]. *Neurology*, 2005, 65(4): 620-622.
- [22] SRIKIATKHACHORN A, ANUNTASETHAKUL T, PHANSUWAN-PUJITO P, et al. Effect of Serotonin Depletion on Nitric Oxide Induced Cerebrovascular Nociceptive Response [J]. *Neuroreport*, 2001, 12(5): 967-971.

责任编辑 周仁惠