

· 甘遂半夏汤的慢性毒性研究专题 ·

甘遂半夏汤对正常大鼠心肾功能及形态学的影响

王付^{1*}, 程秀娟², 张大伟¹, 郑攀¹, 刘宾¹, 李安祥¹, 李晓燕¹

(1. 河南中医学院 经方研究所, 郑州 450046; 2. 河南中医学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:探讨甘遂半夏汤水煎液对正常大鼠心脏、肾脏的慢性毒性作用。方法:将 80 只 SD 大鼠随机分为甘遂半夏汤高、中、低剂量组(37, 18.5, 9.25 g·kg⁻¹)及正常组,各组大鼠采用等体积 ig, ig 体积均为 0.02 mL·g⁻¹。给药组 ig 给药,正常组 ig 给蒸馏水。给药 90 d。最后 1 次给药后禁食 15 h,各组随机抽取一半大鼠,采用全自动生化分析仪检测心功能相关指标磷酸肌酸激酶(CK),乳酸脱氢酶(LDH)和 α -羟丁酸脱氢酶(α -HBDH)及肾功能相关指标血尿素(UREA),血肌酐(CREA)和尿酸(UA)。取心、肾,HE 染色观察大体形态和组织学形态。剩余动物停药后继续观察 2 周,重复上述检查指标。结果:在给药期和恢复期,与正常组比较,各组心、肾功能指标均无显著差异,心脏、肾脏大体形态和组织学形态均未见显著性异常变化。结论:长期服用甘遂半夏汤水煎液对大鼠心、肾功能及形态学无显著影响。

[关键词] 甘遂半夏汤;《伤寒杂病论》;经方;心肾功能;形态

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0155-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015080155

Effect of Gansui Banxia Tang on Functions and Morphology in Rat Heart and Kidney WANG Fu^{1*}, CHENG Xiu-juan², ZHANG Da-wei¹, ZHENG Pan¹, LIU Bin¹, LI An-xiang¹, LI Xiao-yan¹ (1. Henan College of Traditional Chinese Medicine (TCM) Classic Prescription Institute, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan College of TCM, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the chronic toxicity of Gansui Banxia Tang (GBT) on heart and kidney of rats. **Method:** Eighty healthy SD rats were randomly divided into four groups: the normal group, the high-, middle-, and low-dose GBT groups (37, 18.5, 9.25 g·kg⁻¹). The corresponding medicines at 0.02 mL·g⁻¹ were intragastrically administrated to rats for 90 days. After the last dose, the blood samples of the half rats from each group were collected. The heart function indexes including creatine phosphate kinase (CK), lactic dehydrogenase (LDH) and α -hydroxybutyric dehydrogenase (α -HBDH), and the kidney function indexes including blood urea (UREA), serum creatinine (CREA) and uric acid (UA) were detected. The morphology and histology of the heart and kidney were observed by HE staining. The remaining rats in each group were observed continuously for two weeks, and the above indexes were detected again. **Result:** In medicine taking and during following observation, there were no significant differences for the relative function indexes and the change of morphology in heart and renal between any two groups. **Conclusion:** GBT has no remarkable effects on heart and renal function, and morphology of rats by long-term medication.

[Key words] Gansui Banxia Tang; *Shanghan Zabing Lun*; Jingfang; heart and renal functions; morphology

张仲景设甘遂半夏汤对留饮具有特殊的治疗效果,可因方中“甘遂与甘草”配伍属于传统中药学中“十八反”的用药范围,《中国药典》中规定有相反的药物在一般情况下不宜使用,可在临床中治疗现代

医学中的肠结核、甲状腺炎^[1]等病具有良好治疗作用,为此开展甘遂半夏汤实验研究非常必要。近 20 年来,对传统中药学中“十八反”用药进行了较多研究,其研究仅仅局限于相反药对及单味药^[2]。可对

[收稿日期] 20140713(005)

[基金项目] 河南省科学技术厅科技攻关项目(2009A360015)

[通讯作者] * 王付,教授,从事经方配伍及临床应用研究, Tel:13083602901, E-mail:1034383171@qq.com

张仲景整方用药相互作用是否产生毒副作用,目前还缺乏理论研究依据。本课题在中医药基础理论的指导下,模拟人的临床用药,研究观察甘遂半夏汤水煎液对大鼠的慢性心脏、肾脏的毒性作用,为临床安全用药提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康SD大鼠80只,雌雄各半,体重(100±20)g,由河南省实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(豫)2010-0002。

1.2 药物及试剂 实验所需的中药材由河南中医药大学第三附属医院提供,并经本院中药鉴定实验室陈随清教授鉴定为正品,药材批号20110012。肌酸激酶试剂盒(creatine kinase, CK, 批号0307-2010),乳酸脱氢酶试剂盒(lactate dehydrogenase, LDH, 批号0716-2010), α -羟丁酸脱氢酶试剂盒(alpha-hydroxybutyric dehydrogenase, α -HBDH, 批号0323-2010),尿素试剂盒(blood urea, UREA, 批号0724-2009),肌酐试剂盒(serum creatinine, CREA, 批号0308-2010),尿酸试剂盒(blood uric acid, UA, 批号0725-2009),均购自南京神州英诺华科技有限公司。

1.3 仪器 DG302型自动生化分析仪(南京神州英诺华科技有限公司),TDL-5-A型电动离心机(上海安亭科学仪器厂),LEICA2025型轮转式切片机(德国徕卡仪器有限公司)。

2 方法

2.1 剂量与分组 剂量设计采取拟用临床剂量法,根据同类药物或国外资料或推荐临床剂量,采用60,30,15倍临床剂量^[3]。取大鼠80只,适应性喂养1周后,随机分为正常组(等体积蒸馏水代替)、高剂量组(相当于临床用量的60倍)、中剂量组(相当于临床用量的30倍)、低剂量组(相当于临床用量的15倍)4组,每组20只,雌雄各10只。

2.2 给药 甘遂半夏汤高、中、低剂量组分别按生药量37, 18.5, 9.25 g·kg⁻¹的比例ig给药,每日1次,每100g体重大鼠ig 2 mL,即所需的给药质量浓度分别为1.85, 0.925, 0.4625 g·mL⁻¹。正常组灌等体积的蒸馏水,每日按顺序ig给药1次,ig前禁食12h,每周连续ig 6d,休息1d,持续90d。每周称体重2次,根据体重变化调整给药量。

2.3 药物制备 结合张仲景《金匱要略》所载甘遂半夏汤用量,依据《经方学用基本功》中甘遂半夏汤方的用量,电砂锅水煎煮然后浓缩所需浓度。具体制备方法如下:按白芍15g,醋甘遂5g,法半夏12g,甘草5g的比例称取各药适量,加水浸泡2d,

550W电砂锅恒温加热,水沸后以小火煎煮50min,过滤,第2次加8倍量的清水煎熬,水沸后小火煎熬30min过滤,合并2次滤液,加适量的蜂蜜。最后将所得水煎液浓缩成46.25%(0.4625g生药/mL),92.5%(0.925g生药/mL),185%(1.85g生药/mL)的溶液足量,分瓶装,冰箱保存备用,每次ig前水浴加热。

2.4 检测指标及方法

2.4.1 心肾功能检测 最后1次给药后禁食15h称重,每组各取一半动物(雌雄各5只)进行实验。适量水合氯醛麻醉后腹主动脉采血,离心,用全自动生化分析仪检测心功能相关指标CK, LDH和 α -HBDH及肾功能相关指标UREA, CREA和UA。

2.4.2 心脏、肾脏形态学观察 采血后解剖大鼠,肉眼观察心脏、肾脏形状、体积大小、色泽、质地及有无隆起、水肿、充血等现象,有无肿物、被膜有无外翻等病变情况。取大鼠心脏、肾脏同一部位,称重,4%甲醛溶液固定48h,修剪组织切片,乙醇脱水,常规石蜡包埋,组织切片厚6 μ m,HE染色,光镜观察。

2.4.3 可逆性观察 余下动物停药,正常饲养2周后,同上次操作检测各项指标,以了解毒性反应的可逆程度和可能出现的迟缓性毒性。

2.5 统计学分析 采用SPSS 13.0统计分析软件处理实验结果,各项检测指标的测定值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较,资料服从正态分布和方差齐采用单因素方差分析,两两比较用LSD法,方差不齐采用Tamhane法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠心功能的影响 给药期,与正常组比较,甘遂半夏汤高、中、低剂量组LDH, CK, α -HBDH均无显著差异;与高剂量组比较,中、低剂量组LDH, CK, α -HBDH指标均无显著差异;中剂量组与低剂量组LDH, CK, α -HBDH指标比较均无显著性差异;低剂量组与正常组比较,LDH, CK指标均无显著性差异。恢复期,各组大鼠LDH, CK, α -HBDH指标两两比较均无显著性差异。见表1,2。

3.2 对大鼠肾功能的影响 给药期,与正常组比较,甘遂半夏汤高、中、低剂量组肾功能UREA, UA, CREA均无显著差异;与高剂量组相比,中、低剂量组UREA, UA, CREA指标均无显著差异;中剂量组与低剂量组比较,UREA, UA, CREA指标均无显著性差异;低剂量组与正常组比较,UREA, UA, CREA指标均无显著性差异。恢复期,各组单项指标两两比较均无显著性差异。见表3,4。

表 1 甘遂半夏汤对大鼠给药期 LDH,CK 和 α -HBDH 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Gansui Banxia Tang on LDH,CK and α -HBDH of dosing period in rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹	CK/U·L ⁻¹	α -HBDH/U·L ⁻¹
正常	-	178.18 ± 20.33	201.32 ± 21.83	180.67 ± 31.67
甘遂半夏汤	37	185.23 ± 23.36	203.32 ± 24.35	180.09 ± 33.80
	18.5	180.16 ± 34.67	200.20 ± 18.63	164.60 ± 23.67
	9.25	175.43 ± 21.86	196.12 ± 30.23	175.54 ± 36.19

表 2 甘遂半夏汤对大鼠恢复期 LDH,CK 和 α -HBDH 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of Gansui Banxia Tang on LDH,CK and α -HBDH of recovery period in rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹	CK/U·L ⁻¹	α -HBDH/U·L ⁻¹
正常	-	173.46 ± 18.40	200.13 ± 17.83	170.34 ± 30.17
甘遂半夏汤	37	179.54 ± 19.54	198.13 ± 18.25	169.21 ± 30.19
	18.5	181.46 ± 15.20	208.20 ± 19.63	172.60 ± 19.37
	9.25	170.09 ± 16.30	192.34 ± 12.23	181.32 ± 20.36

表 3 甘遂半夏汤对大鼠给药期 UREA,UA 和 CREA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Gansui Banxia Tang on UREA,UA and CREA of dosing period in rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	UREA/mmol·L ⁻¹	UA/ μ mol·L ⁻¹	CREA/ μ mol·L ⁻¹
正常	-	5.12 ± 1.38	188.18 ± 16.43	65.80 ± 13.48
甘遂半夏汤	37	6.44 ± 0.96	172.43 ± 49.21	58.00 ± 5.09
	18.5	6.10 ± 0.53	200.49 ± 29.72	63.50 ± 9.24
	9.25	6.77 ± 1.26	191.10 ± 41.65	60.00 ± 6.76

表 4 甘遂半夏汤对大鼠恢复期 UREA,UA 和 CREA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effects of Gansui Banxia Tang on UREA,UA and CREA of recovery period in rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	UREA/mmol·L ⁻¹	UA/ μ mol·L ⁻¹	CREA/ μ mol·L ⁻¹
正常	-	5.30 ± 1.49	133.17 ± 29.29	48.25 ± 8.32
甘遂半夏汤	37	5.01 ± 0.89	129.73 ± 34.12	47.50 ± 10.11
	18.5	5.42 ± 2.19	135.49 ± 31.76	51.84 ± 8.02
	9.25	5.90 ± 2.02	134.96 ± 38.13	50.50 ± 7.38

3.3 对大鼠心脏形态学的影响

3.3.1 大体形态 给药 90 d 后,解剖大鼠,观察心脏大体形态:各剂量组心脏色泽正常,表面光滑,被膜无外翻,体积、形状、质地未见明显异常,切面组织无隆起,未见水肿、糜烂及脱落等病理改变。恢复期各组大鼠心脏肉眼亦未见明显异常。

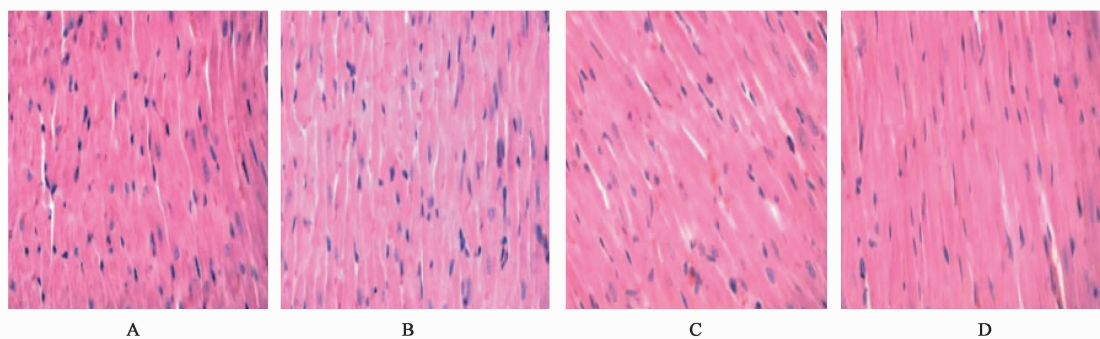
3.3.2 组织学形态 给药期,正常组心壁由内向外分别由心内膜、心肌膜和心外膜三层组织细胞构成,心肌细胞排列整齐,心肌细胞形态正常,核居中,无变性、坏死等损伤性改变,间质内未见炎性细胞浸润、缺血、水肿等病理性改变。高、中、低剂量组大鼠心脏镜检均未发现异常。恢复期,各组大鼠心脏镜检均未发现异常。见图 1,2。

3.4 对大鼠肾脏形态学的影响

3.4.1 大体形态 给药 90 d 后,解剖大鼠,观察肾

脏大体形态:各剂量组肾脏色泽正常,表面光滑,被膜无外翻,体积、形状、质地未见明显异常,切面组织无隆起,未见水肿、糜烂及脱落等病理改变。恢复期各组大鼠肾脏大体形态亦未见明显异常。

3.4.2 组织学形态 给药期,正常组肾皮质、髓质分界清晰,肾被膜不增厚,肾小球结构正常,未见增生、萎缩及纤维化;肾小管上皮细胞无变性、坏死,管腔内未见异常管型;肾髓质的髓袢降支、集合小管结构正常,肾间质内未见炎性细胞浸润。高剂量组除 1 只雌性大鼠偶见肾小管水肿伴管型外,其余肾脏镜检均未发现异常。中剂量组除 1 只雄性大鼠见肾小管水肿伴管型外,其他各大鼠肾脏镜检均未发现异常。低剂量组肾脏镜检均未发现异常。恢复期,除 1 只低剂量组雄性大鼠偶见局灶性炎症伴纤维增生外,其他各组大鼠肾脏镜检均未发现异常。见图 3,4。



A. 正常组; B. 甘遂半夏汤 37 g·kg⁻¹组; C. 甘遂半夏汤 18.5 g·kg⁻¹组; D. 甘遂半夏汤 9.25 g·kg⁻¹组(图 2~4 同)

图 1 甘遂半夏汤对大鼠给药期心脏组织形态学的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effects of Gansui Banxia Tang on heart tissue of dosing period in rats(HE, ×400)

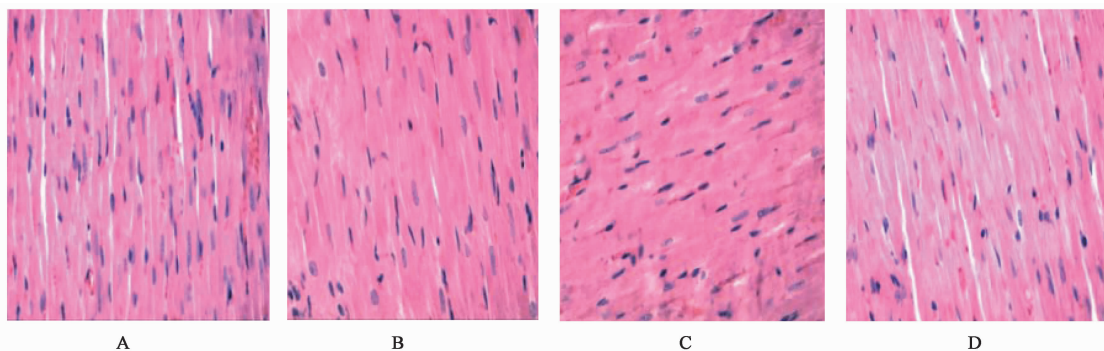


图 2 甘遂半夏汤对大鼠恢复期心脏组织形态学的影响(HE, ×400)

Fig. 2 Effects of Gansui Banxia Tang on heart tissue of recovery period in rats(HE, ×400)

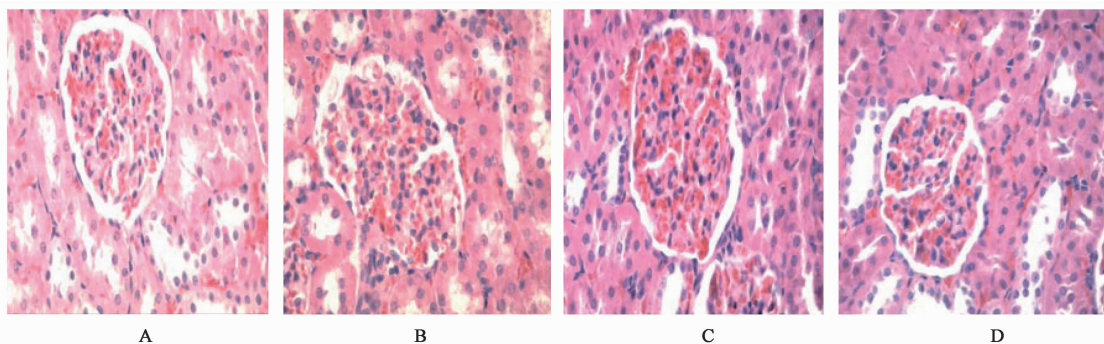


图 3 甘遂半夏汤对大鼠给药期肾脏组织形态学的影响(HE, ×400)

Fig. 3 Effects of Gansui Banxia Tang on kidney tissue of dosing period in rats(HE, ×400)

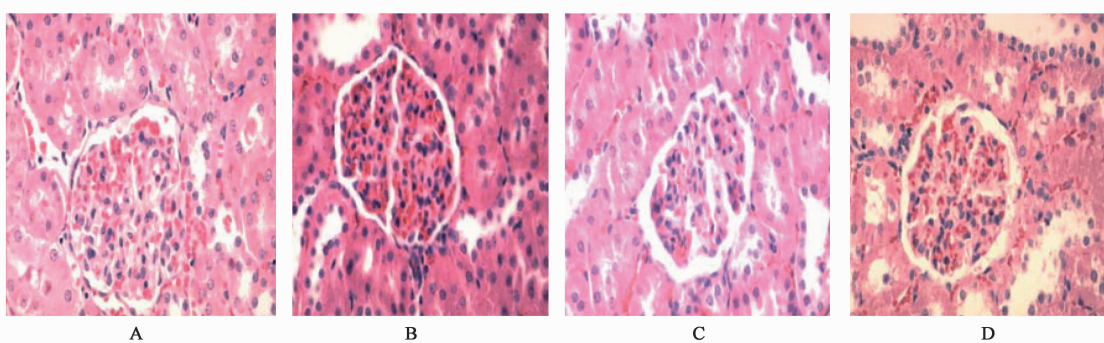


图 4 甘遂半夏汤对大鼠给药期肾脏组织形态学的影响(HE, ×400)

Fig. 4 Effects of Gansui Banxia Tang on kidney tissue of recovery period in rats(HE, ×400)

4 讨论

CK, LDH 和 α -HBDH 是存在于心肌的酶类, 心肌损伤时, 血中这些酶会升高。药物随血经心脏射出被运送至全身, 甘遂半夏汤中的成分作用于心肌是否对心肌造成损伤? 本实验结果表明: 给药期及恢复期, 各组大鼠血 CK, LDH, α -HBDH 均无显著差异, 心脏大体形态及组织学形态均未见明显异常, 说明甘遂半夏汤高、中、低剂量组对大鼠心功能及形态学无显著性影响。有研究认为甘遂与甘草配伍对大鼠心肌酶有明显影响, 对心肌组织形态有可逆性改变^[2], 说明甘遂与甘草这一相反药配伍对心脏有毒性作用, 但本实验应用的是含有反药的整体方剂。整体方剂对心脏无明显损伤, 可能是甘遂半夏汤中发生了某种化学反应, 使毒性降低所致。另有王茜^[4]研究认为甘遂与甘草不同比例配伍的甘遂半夏汤对 CK 值及心肌组织有一定影响, 可能是甘遂与甘草的比例与本实验所用甘遂半夏汤中该 2 种成分比例不同从而使毒性不同所致。

UREA, CREA 和 UA 是检测肾功能变化的重要指标。UREA 为人体蛋白质分解代谢的终末产物, 主要经过肾小球滤过随尿排泄, 当肾脏发生各种病变, 肾实质受损, 肾小球滤过率降低, 即引起血液尿素氮浓度升高; 血中 CREA 来自外源性和内源性 2 种, 外源性 CREA 是肉类食物在体内代谢后的产物, 内源性 CREA 是体内肌肉组织代谢的产物, CREA 主要由肾小球滤过排出体外。肾小球滤过率下降时, CREA 可升高; UA 是机体组织的核蛋白和核酸中嘌呤分解代谢的最终产物, 主要由肾脏排泄, 当肾脏有损害时, 血中 UA 浓度增高。血液中的药物流经肾脏时, 可能会引起肾损伤。本实验结果表明, 给药期及恢复期, 各组大鼠血 UREA, CREA 和 UA 均无显著差异, 说明甘遂半夏汤高、中、低剂量组对大鼠肾功能无显著性影响。形态学方面, 给药期及恢复期大鼠肾脏大体形态均未见明显异常。组织形态

学观察, 给药期, 中剂量组一只雌性大鼠偶见肾小管水肿伴管型, 高剂量组一只雄性大鼠偶见肾小管水肿伴管型; 恢复期, 低剂量组一只雄性大鼠偶见局灶性炎症伴纤维增高, 但均无统计学意义, 考虑为动物个体差异因素所致。说明长期服用甘遂半夏汤对大鼠肾脏形态学无显著影响。该结果与王茜^[4]的研究结果一致。从临床角度研究甘遂半夏汤配伍作用机制^[5], 得出甘遂半夏汤具有良好的治疗效果^[6-7]且无毒副作用; 又仅从甘遂半夏汤药对^[8]研究毒性而未能从整方中研究则是不符合张仲景用方配伍特色的。

综上所述, 此毒性实验表明, 长期服用甘遂半夏汤水煎液对大鼠肾脏功能及组织形态学无显著影响, 亦未见迟发性肾脏毒性损害。

[参考文献]

- [1] 王付, 王帮众. 经方运用甘遂配甘草的探索与实践[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 298-299.
- [2] 黄文权, 程相岭, 肖鸿, 等. 甘草甘遂伍用对大鼠心肝肾肾功能及形态的影响[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(12): 1439-1441.
- [3] 杜贵友, 方文贤. 有毒中药现代研究与合理应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 85.
- [4] 王茜, 钟赣生, 王宏蕾, 等. 甘遂与甘草不同比例配伍对癌性腹水模型大鼠心肾功能及病理形态的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(12): 3527-3531.
- [5] 王付. 经方学用基本功[M]. 北京: 人民军医出版社, 2012: 279.
- [6] 王付. 经方合方辨治疑难杂病[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2014: 81.
- [7] 刘宾, 孙宁, 王付. 甘遂半夏汤的临床应用[J]. 河南中医, 2014, 38(12): 2297-2298.
- [8] 王茜, 钟赣生, 王宏蕾, 等. 甘遂半夏汤中甘遂与甘草不同比例配伍对癌性腹水模型大鼠生物效应影响的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 177-181.

[责任编辑 周冰冰]