

“半夏反草乌”减弱抗炎效应及其减效机制

赖珍珍, 张凌, 李莹, 李文宏*, 杨世林
(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**探讨反药配伍之中半夏减弱草乌抗炎效应的初步机制及其表征形式。**方法:**64只SD大鼠随机分为模型组, 醋酸泼尼松组, 草乌组, 草乌与法半夏配伍9:1组, 3:1组, 1:1组, 1:3组, 1:9组。醋酸泼尼松组按20 mg·kg⁻¹ ig, 草乌组按生药量为0.6 g·kg⁻¹ ig, 草乌与法半夏配伍9:1组, 3:1组, 1:1组, 1:3组, 1:9组分别按生药量0.67, 0.8, 1.2, 2.4, 6.0 g·kg⁻¹ ig, 模型对照组灌服等体积生理盐水, 连续给药7 d。第7天给药1 h后, 每只大鼠右足足跖皮内注射新鲜蛋清建立蛋清致大鼠足跖肿胀模型, 尾静脉注射伊文思蓝(EB), ELISA法测定组织中EB含量, 血清中白细胞介素-1(IL-1), 前列腺素E₂(PGE₂), 肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量, 观察草乌与不同比例法半夏配伍对足跖肿胀程度、血管通透性及炎症介质释放影响的差异;经GraphPad Prism 5软件做四参数Hill拟合方程, 评判影响足跖肿胀度较密切相关的指标。**结果:**与模型组比较, 草乌组、草乌与法半夏各配伍组均可明显降低大鼠足跖肿胀程度和组织中的EB含量及血清中IL-1, PGE₂, TNF-α的含量;各配伍组与草乌组比较, 草乌组的抗炎作用最强(P<0.05), 而草乌与法半夏配伍组(9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:9)的抗炎作用随法半夏用量增加而依次减弱;血清IL-1, PGE₂, TNF-α含量与足跖肿胀度相关性均较好, 组织中EB含量与之相关性较差。**结论:**法半夏可降低乌头的抗炎活性, 该作用随法半夏用量的增加逐渐增强;“半夏反草乌”中的降效作用机制可能与法半夏可对抗乌头增加炎症介质生成、增加毛细血管通透性有关;血清PGE₂含量与肿胀程度相关性较好且是直接参与炎症反应的介质, 故可将其作为表征半夏反草乌中减弱抗炎效应的指标。

[关键词] 半夏反草乌; 减效表征; 抗炎作用; 作用机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0084-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170084

Research of Weaken Anti-inflammatory Effects and Reduced Effect Characterization on ‘Pinelliae Rhizoma anti Aconiti Kusnezoffii Radix’ LAI Zhen-zhen, ZHANG Ling, LI Ying, LI Wen-hong*, YANG Shi-lin
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the preliminary mechanism and manifestations among the anti-drug compatibility of which Pinelliae Rhizoma weakened the anti-inflammatory effects of Aconiti Kusnezoffii Radix. **Method:** Sixty-four SD rats were randomly divided into model group, prednisone group, Aconiti Kusnezoffii Radix group, the Aconiti Kusnezoffii Radix and Pinelliae Rhizoma compatibility 9:1 group, 3:1 group, 1:1 group, 1:3 group, 1:9 group. The prednisone group was given at dose of 20 mg·kg⁻¹ by gavage, the Aconiti Kusnezoffii Radix group was given at dose of 0.6 g·kg⁻¹ by gavage, the Aconiti Kusnezoffii Radix and Pinelliae Rhizoma compatibility 9:1 group, 3:1 group, 1:1 group, 1:3 group, 1:9 group were given at dose of 0.67, 0.8, 1.2, 2.4, 6.0 g·kg⁻¹ by gavage, the model group were treated with the same volume's physiological saline for 7 days. An hour after administration on the 7th day, the egg-white was injected into the rats right paw to establish the egg-white induced rat paw edema model. Rat's tail vein injection of Evans blue (EB), and determination of tissue EB, serum interleukin-1 (IL-1), prostaglandin E₂ (PGE₂), tumor necrosis factor-α (TNF-α) content by ELISA, study the difference of paw swelling degree, vascular permeability and the release of inflammatory mediators between Aconiti Kusnezoffii Radix and different proportions of Pinelliae Rhizoma. By GraphPad Prism 5 software to do a four-parameter fit equation of Hill, and judge the impact indicators which was

[收稿日期] 20141130(004)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2011CB505302)

[第一作者] 赖珍珍, 硕士, 从事中药药理研究, Tel:0791-87118919, E-mail:Laizhenzhen912@163.com

[通讯作者] *李文宏, 博士, 副教授, 从事中药药理研究, Tel:0791-87118919, E-mail:Liwhong0311@163.com

more closely related to paw swelling. **Result:** Compared with the model group, *Aconiti Kusnezoffii Radix* group, *Aconiti Kusnezoffii Radix* and *Pinelliae Rhizoma* compatibility group could significantly reduce the extent of rat's paw edema and the EB content in tissue, and the content of IL-1, PGE₂, TNF- α in serum. The *Aconiti Kusnezoffii Radix* group compared with the *Aconiti Kusnezoffii Radix* and various proportions of *Pinelliae Rhizoma* compatibility group, *Aconiti Kusnezoffii Radix* group showed the strongest anti-inflammatory action ($P < 0.05$). The *Aconiti Kusnezoffii Radix* and *Pinelliae Rhizoma* compatibility group (9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:9) of anti-inflammatory effects was weakened in turn of the increase of the amount of *Pinelliae Rhizoma*. The content of IL-1, PGE₂, TNF- α in serum were in good correlation with the paw swelling, but the content of EB in the tissue was to the opposite. **Conclusion:** *Pinelliae Rhizoma* can reduce the anti-inflammatory activity of *Aconiti Kusnezoffii Radix*, and the inhibitory effect increased with the amount gradually increase of *Pinelliae Rhizoma*. The content of PGE₂ in serum had a better correlation with the degree of swelling, and are directly involved in inflammatory reaction medium, so it can be the indicator of *Pinelliae Rhizoma* which weakens the anti-inflammatory effect of *Aconiti Kusnezoffii Radix*.

[Key words] *Pinelliae Rhizoma* anti *Aconiti Kusnezoffii Radix*; reduced effect characterization; anti-inflammatory effects; mechanism

“半夏反乌头”是十八反之一,记载于《神农本草经》,虽属配伍禁忌,但古今临床皆有应用。乌头类附子与半夏同用,最早见于张仲景《金匮要略》“腹中寒气,雷鸣切痛,胸胁逆满,呕吐,附子粳米汤主之”。整理历代方剂 96 529 首,其中含“十八反”同方配伍的方剂共 1 406 首,占总量的 1.46%,附子类尤其是附子与半夏组合应用较多^[1]。草乌主要化学成分为乌头碱、新乌头碱、次乌头碱等生物碱类,它们既是有效成分同时也是其毒性成分。近年来乌头类与半夏配伍的研究主要集中在配伍前后的有效化学成分含量变化和药效毒效影响方面^[2-4],还不能有力的阐明配伍前、后药效变化的实质。中药配伍禁忌概括为 3 类作用模式:表征相反配伍特征的致毒增毒作用模式;表征相恶/相畏配伍特征的降效减效作用模式;表征相反/相恶/相畏多元配伍特征的毒效复合作用模式^[5]。本文通过研究草乌与法半夏配伍前、后抗炎药效的变化及内涵,初步探讨“半夏反草乌”抗炎减效作用及其机制。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,雄性,体重 180 ~ 220 g,清洁级,长沙市天勤生物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(湘)2009-0012。

1.2 试药及试剂 生草乌 *Aconitum kusnezoffii* 购自浙江中医药大学中药饮片有限公司(批号 120701);法半夏 *Pinellia ternata* 购自北京华邈中药技术开发中心,经江西中医药大学药学院生药组邓可众副教授鉴定药材合格。草乌单煎醇提液:取生草乌粉末,准确称取 10 g,加 10 倍量 75% 乙醇浸泡 60 min,微

沸回流提取 60 min,过滤,再加 5 倍量 75% 乙醇微沸回流提取 60 min,合并滤液,在 60 °C 下减压浓缩至 1 g·mL⁻¹。草乌与法半夏配伍的提取液:取生草乌粉末,准确称取 10 g,按照相应比例称定法半夏粉末(9:1组 1.1 g,3:1组 3.3 g,1:1组 10 g,1:3组 30 g,混合,加 75% 乙醇量及提取方法同草乌单煎醇提液合并滤液,在 60 °C 下减压浓缩依次至 1.1,1.3,2,4,10 g·mL⁻¹。醋酸泼尼松(广东华南药业集团有限公司,批号 130401),伊文思蓝(EB, Sigma,批号 502A044),甲酰胺(Amresco,批号 210A021),乙醇(天津市恒兴化学试剂制造有限公司,批号 20130328);白细胞介素-1(IL-1),前列腺素 E₂(PGE₂),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)均购自 IBM 公司。

1.3 仪器 YLS-7A 型足跖容量测量仪(济南益延科技发展有限公司),ELx800 型光吸收酶标仪(美国 BioTek 公司),Thermo Multifuge X1R 型高性能通用台式离心机(德国 Thermo Fisher Scientific 公司),HR/HH-S1-型恒温水浴锅(北京恒瑞天创机电设备有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、模型建立及给药 将 64 只雄性 SD 大鼠随机分为模型组,阳性药物(醋酸泼尼松 0.02 g·kg⁻¹)组,草乌组 0.6 g·kg⁻¹,草乌与法半夏 9:1组 0.67 g·kg⁻¹,3:1组 0.8 g·kg⁻¹,1:1组 1.2 g·kg⁻¹,1:3组 2.4 g·kg⁻¹,1:9组 6.0 g·kg⁻¹(草乌的给药剂量均为 0.6 g·kg⁻¹),共 8 组,每组 8 只。模型组给生理盐水,其余按分组 *ig* 给药,连续给药 7 d。于第 7 日给药 1 h 后,

每只大鼠尾静脉注射 1% 伊文思蓝生理盐水 2 mL·kg⁻¹, 右足足跖皮内注射新鲜蛋清 0.1 mL^[6]。

2.2 大鼠足跖肿胀程度的测定 分别于注射蛋清前及注射后 1, 2, 3, 4, 6 h 测大鼠右足容积(容量法, mL), 计算大鼠足跖肿胀程度 = 注射后容积 - 注射前容积。

2.3 大鼠血清 IL-1, PGE₂, TNF-α 含量的测定 第 6 小时测定大鼠足容积后, 用乙醚麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 放置, 离心, 制备血清待用, 采用双抗体夹心酶联免疫吸附法 (ELISA), 严格按照试剂盒说明操作, 加样孵育, 加检测抗体孵育, 加酶, 显色, 检测大鼠血清中 IL-1, PGE₂, TNF-α 的含量。

2.4 足跖组织中伊文思蓝含量的测定 剪下各组大鼠致炎足, 剪碎, 加甲酰胺 2 mL, 在 60 °C 的恒温水浴槽内孵育 24 h, 3 000 r·min⁻¹ 离心 30 min。取其上清液各 25 μL, 在波长为 630 nm 的酶标仪下生

理盐水校零, 间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测其吸光度值。采用甲酰胺梯度稀释伊文思蓝做标准曲线, 根据标准曲线计算足跖组织中伊文思蓝的含量。

2.5 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件处, 采用单因素方差分析方法, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对蛋清致大鼠足跖肿胀的影响 草乌组及与不同比例法半夏配伍组可降低蛋清致大鼠足跖肿胀程度, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。其中草乌组效果最好, 与醋酸泼尼松组比较, 差异无统计学意义。与草乌组比较, 各配伍比例组随着法半夏含量的增加, 抗炎效果逐渐减弱, 当法半夏含量增加至草乌量的 9 倍时, 足跖肿胀度趋近模型组, 各比例组与草乌组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 1。

表 1 草乌及与不同比例法半夏配伍对蛋清致大鼠足跖肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Difference of paw swelling degree between Aconiti Kusnezoffii Radix and different proportions of Pinelliae Rhizoma ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	造模后肿胀程度/mL				
		1 h	2 h	3 h	4 h	6 h
模型	-	1.02 ± 0.04	0.98 ± 0.07	0.94 ± 0.06	0.87 ± 0.06	0.82 ± 0.07
醋酸泼尼松	0.02	0.68 ± 0.03 ²⁾	0.61 ± 0.05 ²⁾	0.50 ± 0.04 ²⁾	0.44 ± 0.03 ²⁾	0.37 ± 0.04 ²⁾
草乌	0.6	0.65 ± 0.07 ²⁾	0.59 ± 0.03 ²⁾	0.44 ± 0.05 ²⁾	0.35 ± 0.06 ²⁾	0.28 ± 0.05 ²⁾
草乌-法半夏 9:1	0.67	0.72 ± 0.06 ^{2,3)}	0.60 ± 0.08 ²⁾	0.53 ± 0.06 ^{2,4)}	0.48 ± 0.07 ^{2,4)}	0.41 ± 0.08 ^{2,4)}
草乌-法半夏 3:1	0.8	0.82 ± 0.05 ^{2,4)}	0.70 ± 0.05 ^{2,4)}	0.63 ± 0.06 ^{2,4)}	0.55 ± 0.08 ^{2,4)}	0.50 ± 0.08 ^{2,4)}
草乌-法半夏 1:1	1.2	0.84 ± 0.08 ^{2,4)}	0.69 ± 0.09 ^{2,4)}	0.64 ± 0.07 ^{2,4)}	0.59 ± 0.07 ^{2,4)}	0.53 ± 0.06 ^{2,4)}
草乌-法半夏 1:3	2.4	0.86 ± 0.07 ^{2,4)}	0.75 ± 0.06 ^{2,4)}	0.68 ± 0.05 ^{2,4)}	0.63 ± 0.06 ^{2,4)}	0.55 ± 0.05 ^{2,4)}
草乌-法半夏 1:9	6.0	0.99 ± 0.09 ⁴⁾	0.96 ± 0.07 ⁴⁾	0.87 ± 0.08 ^{2,4)}	0.82 ± 0.09 ⁴⁾	0.77 ± 0.11 ⁴⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与草乌组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

3.2 对蛋清致足肿胀大鼠血清 IL-1, PGE₂, TNF-α 含量的影响 与模型组比较, 草乌组及与不同比例法半夏配伍组大鼠血清 IL-1, PGE₂, TNF-α 含量明显降低, 且随着法半夏配伍比例的增加含量降低趋势逐渐减弱, 当草乌与法半夏比例达到 1:3 时, 降低血清中 IL-1 含量的作用与模型组差异无统计学意义, 当草乌与法半夏配伍比例达到 1:9 时, 血清中 IL-1, PGE₂, TNF-α 含量与模型组差异无统计学意义。见表 2。

3.3 对蛋清致足肿胀大鼠血管通透性的影响 与模型组比较, 草乌及与不同比例法半夏配伍组伊文思蓝渗出含量显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 蛋清致足肿胀大鼠的血管通透性明显降低, 且随着法半夏配伍比例的增加降低血管通透性的能力逐渐减弱。见表 2。

3.4 各给药组足跖肿胀程度与 IL-1, TNF-α, PGE₂, EB 含量相关性分析 应用 GraphPad Prism 5 对草乌及与法半夏配伍各给药组足跖肿胀程度与 IL-1, TNF-α, PGE₂, EB 含量进行相关性分析, 得出各拟合方程及相关系数分别为 $Y_{(IL-1)} = 127.20 \log(\text{足跖肿胀}) + 162.99$, $r_{(IL-1)} = 0.935 0$; $Y_{(TNF-\alpha)} = 249.17 \log(\text{足跖肿胀}) + 313.27$, $r_{(TNF-\alpha)} = 0.961 7$; $Y_{(PGE_2)} = 223.24 \log(\text{足跖肿胀}) + 410.86$, $r_{(PGE_2)} = 0.988 6$; $Y_{(EB\text{含量})} = 7.991 6 \log(\text{足跖肿胀}) + 4.615 2$, $r_{(EB\text{含量})} = 0.704 6$ 。各给药组足跖肿胀程度与 IL-1, TNF-α, PGE₂ 含量相关性良好, 各炎症介质与足跖肿胀程度相关性强于血管通透性 (EB 含量)。PGE₂ 作为参与急性炎症过程中是重要介质, 且与足跖肿胀相关性最好, 据此我们认为 PGE₂ 可作为抗炎表征指标。

表 2 草乌及与不同比例法半夏配伍对蛋清致足肿胀大鼠血清 IL-1, PGE₂, TNF-α 含量及足趾组织中 EB 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Difference of content of IL-1, PGE₂, TNF-α in serum and content of EB in tissue between Aconiti Kusnezoffii Radix and different proportions of Pinelliae Rhizoma ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	血清中/ng·L ⁻¹			足趾中 EB /μg·L ⁻¹
		IL-1	PGE ₂	TNF-α	
模型	-	153.49 ± 19.17	397.83 ± 41.71	305.83 ± 25.35	5.42 ± 1.09
醋酸泼尼松	0.02	92.28 ± 11.76 ²⁾	272.51 ± 41.22 ²⁾	152.77 ± 16.52 ²⁾	0.42 ± 0.12 ²⁾
草乌	0.6	93.74 ± 18.19 ²⁾	288.70 ± 25.22 ²⁾	183.98 ± 18.32 ²⁾	0.97 ± 0.18 ²⁾
草乌-法半夏 9:1	0.67	108.26 ± 25.96 ²⁾	321.25 ± 39.90 ^{2,3)}	207.83 ± 17.14 ^{2,3)}	1.42 ± 0.30 ²⁾
草乌-法半夏 3:1	0.8	121.46 ± 18.95 ^{2,4)}	339.70 ± 40.22 ^{2,4)}	228.64 ± 23.45 ^{2,4)}	1.75 ± 0.43 ^{2,3)}
草乌-法半夏 1:1	1.2	131.16 ± 17.73 ^{1,4)}	350.66 ± 30.29 ^{2,4)}	244.97 ± 24.60 ^{2,4)}	1.79 ± 0.46 ^{2,3)}
草乌-法半夏 1:3	2.4	138.08 ± 13.13 ⁴⁾	359.19 ± 48.06 ^{2,4)}	252.74 ± 28.76 ^{2,4)}	1.97 ± 0.42 ^{2,4)}
草乌-法半夏 1:9	6.0	145.06 ± 22.40 ⁴⁾	384.08 ± 32.02 ⁴⁾	290.94 ± 16.74 ⁴⁾	4.85 ± 0.56 ^{1,4)}

4 讨论

急性炎症主要是以血管反应为中心的渗出性变化,导致血管内的白细胞和抗体等透过血管壁进入炎症反应部位,消灭病原体,稀释并中和毒素,为炎症修复创造良好的条件。血管通透性升高是导致炎症局部液体和蛋白质渗出的最重要原因。

IL-1 和 TNF-α 是参与宿主防御的重要细胞因子,参与免疫反应,炎症、发热、急性期蛋白质合成,全身或局部诱发的 IL-1 及 TNF-α 可有力地启动、加强、延长疾病的炎症反应,研究发现,IL-1 和 TNF-α 等细胞因子能刺激炎性细胞产生和释放 PGE₂。PGE₂ 是一种重要的介质,具有多种生理功能,而且是参与急性炎症过程中是重要因素之一。PGE₂ 可选择性抑制 T 细胞的功能,从而导致 B 淋巴细胞功能亢进,分泌过多的抗体,造成组织器官严重损伤,局部血管通透性增加,直接参与炎症部位的病理损伤^[7]。

草乌主要含有双酯型乌头碱,乌头碱能明显降低大鼠肾上腺内抗坏血酸的含量,具有类似肾上腺皮质激素样的抗炎作用^[8,9]。在炎症的急性阶段,可抑制局部血管的扩张,降低毛细血管通透性,使充血、血浆渗出、白细胞浸润和吞噬减弱,从而改善和消除红、肿、热、痛等局部症状。乌头可抑制类风湿性关节炎巨噬细胞活化,降低血清中 TNF-α 和 IL-1 含量,抑制小鼠 T 淋巴细胞转化及 IL-1 的产生^[10]。

本实验中草乌可显著降低蛋清致大鼠足趾肿胀的肿胀程度,具有显著的抗炎作用,减少足趾肿胀大鼠血清中 PGE₂, IL-1, TNF-α 含量,降低炎症部位毛细血管通透性,与文献报道中乌头抗炎作用机制相一致。法半夏可抑制乌头的抗炎活性,且随着法半夏用药量的增加,抑制作用逐渐增强,且血清中炎症介质 PGE₂, IL-1, TNF-α 含量依次增加,毛细血管通

透性依次增强。“半夏反草乌”为表征相恶/相畏配伍特征的降效减效作用模式,其降效作用机制可能与法半夏可对抗乌头抑制炎症介质生成的作用、增加毛细血管通透性有关,PGE₂ 可作为抗炎表征指标。其深入的分子作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 范欣生,尚尔鑫,陶静,等.“十八反”同方配伍探讨[J]. 中医杂志,2011,52(12):991-994.

[2] 赵华,李新莉.半夏与乌头配伍对小鼠毒性作用的实验研究[J]. 长春中医药大学学报,2012,28(1):17-18.

[3] 李新莉,赵华.半夏配伍川乌产生相反作用的物质基础研究[J]. 中医药导报,2012,18(2):82-84.

[4] 王超,王宇光,梁乾德,等.UPLC/Q-TOFMS 分析十八反乌头半夏配伍化学成分的变化[J]. 药学学报,2010,45(10):1301-1306.

[5] 段金殿,宿树兰,范欣生,等.基于药物相互作用探讨中药七情合和相反/相恶/相畏配伍禁忌作用模式与机制[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2012,14(3):1547-1552.

[6] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991:298.

[7] 付雯雯. 乌头注射液对类风湿性关节炎的治疗作用及其机制[D]. 长春:吉林大学,2013.

[8] 毛理纳,罗予. 加温和乌头汤改善微循环和抗炎作用的观察[J]. 浙江中医杂志,2000,35(7):38-39.

[9] 毛理纳,胡新辉,杨玉华,等. 乌头汤内服和外用合并加温的镇痛作用观察[J]. 河南职工医学院学报,2000,12(2):3-4.

[10] 刘伟栋,施旭光,旷永强,等. 乌头汤对 RA 大鼠相关细胞因子影响的研究[J]. 中药材,2009,32(8):1267-1269.

[责任编辑 聂淑琴]