

生川乌配不同比例生半夏对乳鼠心肌细胞的毒性作用

许柳¹, 佟继铭², 李平², 刘玉玲², 张树峰^{2*}

(1. 河北联合大学中医学院, 河北 唐山 063000; 2. 承德医学院, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的:以半数抑制浓度及细胞搏动频率为指标,评价生川乌与生半夏合用对原代乳鼠心肌细胞的毒性影响及与生半夏比例的关系。方法:分离出生 3 d 内的 SD 乳鼠心肌细胞进行原代培养。生川乌组(I 组),生川乌配生半夏 1:0.25(II 组),1:0.5(III 组),1:1(IV 组)分别以生川乌终质量浓度 0,0.016,0.078,0.235,0.392,0.548,0.705,0.861,1.018 g·mL⁻¹(高效液相色谱法测得乌头碱含量分别为 0,1,5,15,25,35,45,55,65 mg·L⁻¹)染毒心肌细胞,分别培养 1,2,4,12 h,观察各时间点细胞搏动频率,以 MTT 法检测培养 12 h 时细胞存活率,应用概率单位法计算半数抑制浓度(IC₅₀)。结果:①染毒 12 h,生川乌组抑制率(CI)显著高于其他配伍组(P<0.01),且随着生半夏比例的提高,抑制率降低。②I,II,III,IV 组的 IC₅₀ 分别为 0.446,0.460,0.530,0.575 g·mL⁻¹。③在生川乌终质量浓度 0.016~0.078 g·mL⁻¹内,1~2 h 细胞搏动频率增高,4~12 h 搏动频率降低。在 0.235~0.861 g·mL⁻¹内,1 h 时细胞搏动频率降低,2 h 时搏动频率高于 1 h,但低于正常水平,4~12 h 频率低于 1 h。给药 1.018 g·mL⁻¹,细胞立即停搏。结论:生半夏配伍生川乌降低了生川乌的毒性,且有明显的剂量依赖关系。

[关键词] 心肌细胞;生川乌;生半夏;心肌毒性;半数抑制浓度

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0250-06

[doi] 10.11653/syjf2013140250

Toxicity of Raw Rhizoma Pinellia in Combination with Raw Radix Aconiti with Different Ratio on Lactation Rat Myocardial Cell

XU Liu¹, TONG Ji-ming², LI Ping², LIU Yu-ling², ZHANG Shu-feng^{2*}

(1. College of Chinese Medicine of Hebei Unite University, Tangshan 063000, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica of Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the toxicity effect of raw Radix Aconiti and raw Rhizoma Pinelliae on lactation rat's myocardial cells and the relationship between the toxicity effect and different proportion. **Method:** The SD lactation rat's myocardial cells were separated and cultivated when born in 3 days. The four groups were raw Radix Aconite, Radix Aconiti and raw Rhizoma Pinelliae 1:0.25, 1:0.5, 1:1 (I, II, III, IV) were given the final concentration of the Radix Aconiti of 0, 0.016, 0.078, 0.235, 0.392, 0.548, 0.705, 0.861, 1.018

[收稿日期] 20130125(007)

[基金项目] 河北省教育厅重点项目(ZD2010132)

[第一作者] 许柳,在读硕士研究生,从事中药毒理学研究,Tel:0314-2290076,E-mail:xuliuweixiao@163.com

[通讯作者] *张树峰,教授,博士研究生导师。从事中药毒理研究,Tel:0314-2291111,E-mail:zsf@cdmc.edu.cn

[5] 谢鸣,卞一明,白晶.地黄饮子对果蝇寿命的影响[J].中国实验方剂学杂志,1996,2(2):20.

[6] 谢鸣,袁学勤,张家俊,等.地黄饮子对老龄大鼠的血、脑组织过氧化脂质及相关酶的影响[J].中国实验方剂学杂志,2001,7(6):21.

[7] 陈帮森.脑血管疾病[M].北京:人民卫生出版社,1991:112.

[8] 刘小雨,杨孝芳,李国菁,等.肾与缺血性中风关系探析[J].中国中医急症,2005,14(2):165.

[9] 彭明付,郑湘瑞.肾气亏虚是缺血性中风的病理基础[J].中医研究,2003,16(9):9.

[10] 潘鹏.地黄饮子治疗脑血管病的临床与实验研究述要[J].中医药学刊,2002,20(5):659.

[11] 牛文民,李忠仁.缺血性脑血管病自由基损伤病原学及抗氧化治疗进展[J].上海针灸杂志,2005,24(1):43.

[责任编辑 李玉洁]

$\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ [aconitine (AC) dose were 0, 1, 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$] to the myocardial cells, respectively cultivating 1, 2, 4, 12 h, to observe the cell pulsation frequency in different time, with MTT method to detect the percentage of the cell survival at 12 hours, and calculate half inhibition concentration (IC_{50}) by probability unit method. **Result:** ① At 12 h, the inhibition rate (CI) of raw Radix Aconiti group was significantly higher than other groups ($P < 0.01$), and with the increasing of the proportion of the raw pinellia tuber, the inhibition rate was decreased. ② The IC_{50} of I, II, III, IV group were 0.446, 0.460, 0.530, 0.575 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ③ When the final concentration of raw Radix Aconiti is 0.016-0.078 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the cell pulsation frequency was increased in 1-2 h, and reduced in 4-12 h. Between 0.235-0.861 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the cell pulsation frequency was reduced in 1 h, and rised when 2 h, but less than normal level, then falled in 4-12 h. Dose with 1.018 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the cells were immediately arrested. **Conclusion:** The addition of Raw pinellia reduced the toxicity of the raw Radix Aconiti, and there is a significant dose-response relationship.

[**Key words**] myocardial cells; raw Radix Aconiti; raw Rhizoma pinelliae; IC_{50} ; pulsation frequency

乌头与半夏属“十八反”之一,但自古至今不乏二者伍用之方^[1-2],二者配伍毒性是否增强^[3],为历代医家争论之焦点。

乌头中毒的靶器官为神经系统和心血管系统^[4],主要表现为四肢麻木、抽搐和不同形式的心律失常,严重者可有多个系统器官损害,其中心律失常是中毒死亡的主要原因^[5-7]。目前关于两者配伍的毒性研究多从整体动物角度出发,观察其对血液心肌酶、脏器指数、心电图等的影响^[8-9],未见从细胞水平观察两者配伍对毒性影响的报道。原代乳鼠心肌细胞具有心脏的自动节律性和收缩性,有可视效果好,易于控制,定量,重复性好,可比性强,不受神经、体液因素影响等优点。故本实验以原代心肌细胞为研究对象,观察生半夏对生川乌的心肌毒性的影响及与半夏比例的关系。为临床安全用药提供依据。

1 材料

1.1 动物 出生3 d的SD乳大鼠,雌雄不拒,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。

1.2 受试药物及制备 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)。经承德医学院中药研究所佟继铭教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmicheali* Debx. 的干燥根茎。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)。经承德医学院中药研究所佟继铭教授鉴定为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit 的干燥块茎。

将生川乌与生半夏按 1:0, 1:0.25, 1:0.5, 1:1 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,24 h/次,0.45 μm 滤膜过滤,合并滤液,

冷冻干燥,使用时以二甲基亚砷(DMSO)溶解,DMEM/F12培养基稀释。

1.3 试剂 DMEM/F12培养基,胰蛋白酶,D-Hank's液(美国Gibco公司);胎牛血清(PAA),alpha-actin抗体(EPITOMICS),DAB显色液(北京中杉金桥生物工程有限公司);噻唑蓝(Amresco),DMSO(天津市标准科技有限公司),丙酮(天津市德恩化学制剂有限公司)。

1.4 仪器 CO_2 培养箱(Thermo);离心机(雷勃尔);超净工作台(上海新苗医疗器械制造有限责任公司);倒置相差显微镜(Leica);电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);超纯水系统(北京艾斯泰克科技开发有限责任公司)。

2 方法

2.1 心肌细胞的制备与培养 参照文献[10-11]方法,3 d内SD乳鼠无菌条件下开胸取出心脏,取心室肌,置于预冷的D-Hank's液中,冲洗3次,去除血液。剪组织块至1 mm^3 大小,D-Hank's液冲洗2次。加入0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA),置于37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱内8 min,中途轻晃几下。弃去上清,剩余组织块加入消化酶继续消化,重复6~8次,直至组织块剩余原来大小的1/3,弃去上清,加入含10%胎牛血清的DMEM/F12终止消化,轻柔吹打获取细胞。离心上清2次,每次1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,10 min,弃上清,沉淀中加入含10%血清的培养液,轻柔吹打混悬细胞,200目细胞筛网过滤,于37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 孵箱中培养1.5 h^[12],差速贴壁去除成纤维细胞。调整细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,接种于24孔板,每孔500 μL ,同时以 $10^5/\text{mL}$ 接种于96孔板,每孔200 μL 。每2天换液1次,连续培养4 d。

2.2 心肌细胞的形态及纯度鉴定 心肌细胞培养

3 d 后, 37 °C 的 D-Hank's 液冲洗数次, 冷丙酮(4 °C)固定 30 min, 采用横纹肌动蛋白 α -actin 抗体为一抗。用 SABC 法进行免疫细胞化学染色, 用磷酸盐缓冲液(PBS)作为一抗的阴性对照。随机取 10 个高倍(20 \times)视野计数阳性细胞及细胞总数。

阳性细胞率 = 阳性细胞数/细胞总数 \times 100%

2.3 原代心肌细胞生长曲线 24 孔板的细胞, 每天取 3 孔, 加入 5 g \cdot L⁻¹的 MTT 溶液 50 μ L/孔, 37 °C 孵育 4 h, 弃培养液, 加入 DMSO 600 μ L/孔, 吹打使 MTT 还原产物溶解, 移入 96 孔板, 200 μ L/孔, 酶联免疫检测仪于波长 492 nm 处测定溶液的吸光度(A), 实验重复 3 次, 合并结果。

2.4 心肌细胞的 IC₅₀ 将 I, II, III, IV 组冷冻干燥的粉末溶于 DMSO 中(DMSO 终浓度 < 5%), 以不含血清的培养基稀释。96 孔板的细胞培养 4 d 后, 随机分为 9 组, 每组 6 个复孔, 分别给予生川乌终质量浓度为 0, 0.016, 0.078, 0.235, 0.392, 0.548, 0.705, 0.861, 1.018 g \cdot mL⁻¹(乌头碱分别为 0, 1, 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65 mg \cdot L⁻¹)染毒心肌细胞, 连续培养 12 h, 弃含药培养基, 加入 5 g \cdot L⁻¹的 MTT 20 μ L/孔, 37 °C 孵育 4 h, 去掉 MTT, 加入 150 μ L/孔 DMSO, 酶联免疫检测仪于波长 492 nm 处测定溶液的吸光度(A), 实验重复 3 次, 将结果合并, 求得细胞抑制率(CI)。细胞抑制率 = (1 - A_{处理组}/A_{对照组}) \times 100%。以概率单位法求出各配伍组的细胞半数抑制浓度(IC₅₀), 并于光学显微镜下观察心肌细胞的形态变化。

2.5 各组药物对细胞搏动频率的影响 96 孔板的细胞培养 4 d 后, 给药前 60 min 更换无血清培养基, 在倒置相差显微镜下记录 30 s 内细胞搏动次数, 计算搏动频率。将 96 孔板的细胞随机分为 9 组, 每组 6 个副孔, 分别给予含药(浓度梯度同 2.4)的培养基, 在染毒 1, 2, 4, 12 h 时, 观察记录 I, II, III, IV 组在 30 s 内细胞搏动次数, 实验重复 3 次。

2.6 统计学处理 实验结果采用 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, 计数资料组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 心肌细胞的形态及纯度 刚消化的心肌细胞呈圆形, 边缘整齐光滑, 折光性好。差速贴壁 1.5 h 后, 贴壁的杂细胞多为成纤维细胞, 形状为小三角形, 心肌细胞多数变为不规则形, 如椭圆, 肾形, 有小突起等。6~24 h 后, 心肌细胞贴壁生长, 渐变为梭形, 偶

见单个细胞搏动, 继而在平皿皿底铺展, 呈不规则的星形, 相邻细胞连成细胞簇, 同步搏动。48 h 后形成单层细胞铺满培养皿, 并出现整皿细胞同步搏动, 频率为 50~100 次/min。经免疫组织化学染色法分析, 心肌细胞横纹肌动蛋白 α 免疫反应阳性, 显示纯化后心肌细胞可达 95% 以上, 结果见图 1。

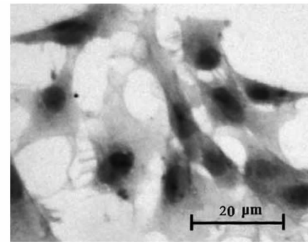


图 1 原代培养的心肌细胞鉴定(免疫组织化学法, $\times 200$)

3.2 心肌细胞的生长曲线 以培养天数为横坐标, A 为纵坐标绘制心肌细胞生长曲线图, 显示心肌细胞在第 4 天生长进入高峰, 故选在第 4 天给药, 见图 2。

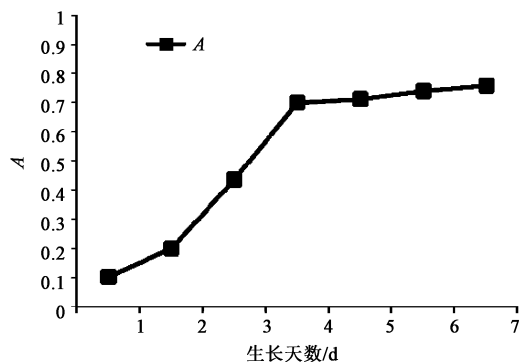


图 2 原代培养的心肌细胞生长曲线

3.3 对心肌细胞的抑制率及 IC₅₀ 生川乌终质量浓度在 0.016~0.078 g \cdot mL⁻¹各配伍组对心肌细胞的 CI 与 I 组比较差异无统计学意义; 在 0.235~1.018 g \cdot mL⁻¹各配伍组对心肌细胞的 CI 显著低于 I 组($P < 0.01$), 随着配伍生半夏比例的增高, 对心肌细胞的 CI 降低($P < 0.01$), 见表 1。I 组, II 组, III 组, IV 组的 IC₅₀ 分别为 0.446, 0.460, 0.530, 0.575 g \cdot mL⁻¹。

3.4 对细胞形态的影响 心肌细胞的损伤程度与药物剂量的增加具有相关性。在光学显微镜下, 可见随着浓度增加, 细胞连接减少, 细胞间空隙增多, 细胞膜破损加重, 细胞浆出现大量空泡, 连成网状, 细胞皱缩成条线状, 渐次变圆, 变小(死亡或受损后尚存活, 但形态变圆的细胞), 形成膜包裹的凋亡小体, 细胞固缩碎裂, 并且细胞脱壁现象加重。I 组对心肌细胞的损害最大, 随着生半夏比例的提高, 毒性

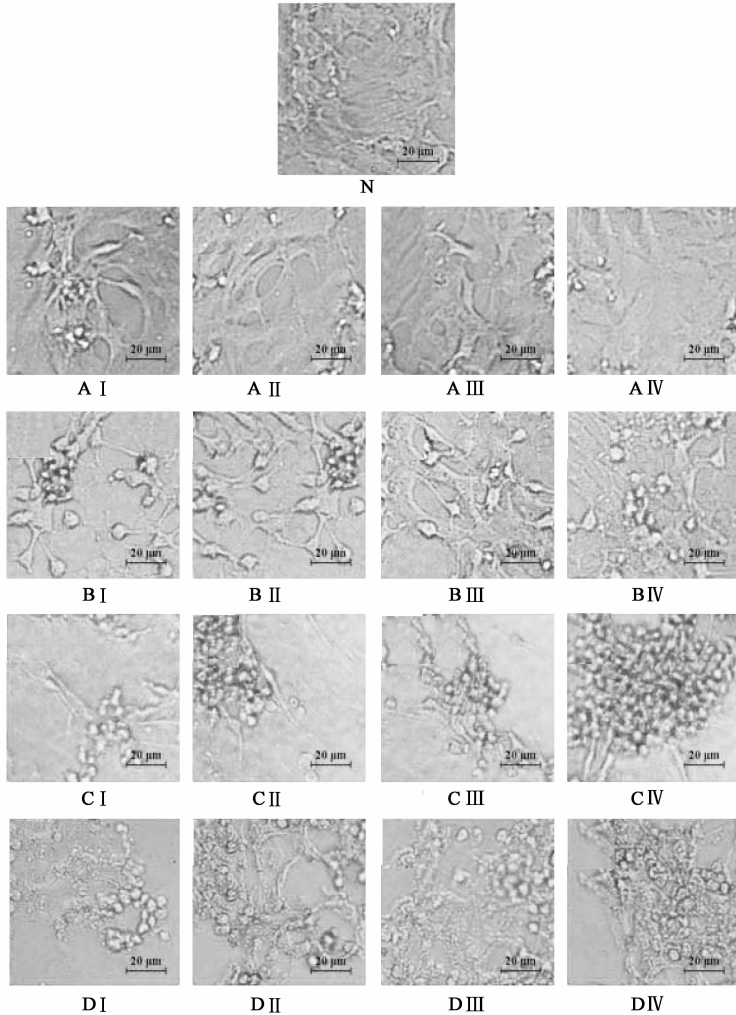
表1 生川乌配不同比例生半夏对乳鼠心肌细胞的CI($\bar{x} \pm s, n=6$)

生川乌浓度 /g·mL ⁻¹	I组		II组		III组		IV组	
	A	CI/%	A	CI/%	A	CI/%	A	CI/%
0	0.687 ± 0.003	0	0.687 ± 0.003	0	0.687 ± 0.003	0	0.687 ± 0.003	0
0.016	0.659 ± 0.006 ¹⁾	4.09	0.660 ± 0.010 ¹⁾	3.95	0.662 ± 0.006 ¹⁾	3.66	0.663 ± 0.002 ¹⁾	3.51
0.078	0.632 ± 0.003 ¹⁾	8.05	0.639 ± 0.006 ¹⁾	6.97	0.643 ± 0.008 ¹⁾	6.35	0.653 ± 0.003 ¹⁾	5.06
0.235	0.532 ± 0.007 ¹⁾	22.56	0.515 ± 0.007 ^{1,2)}	25.04	0.550 ± 0.005 ^{1,2)}	19.94	0.598 ± 0.006 ^{1,2)}	12.95
0.392	0.401 ± 0.006 ¹⁾	41.63	0.419 ± 0.005 ^{1,2)}	39.01	0.447 ± 0.014 ^{1,2)}	34.93	0.501 ± 0.003 ^{1,2)}	27.07
0.548	0.229 ± 0.004 ¹⁾	66.67	0.252 ± 0.004 ^{1,2)}	63.32	0.315 ± 0.006 ^{1,2)}	54.15	0.281 ± 0.03 ^{1,2)}	59.1
0.705	0.142 ± 0.004 ¹⁾	79.33	0.174 ± 0.006 ^{1,2)}	74.67	0.209 ± 0.006 ^{1,2)}	69.58	0.236 ± 0.002 ^{1,2)}	65.65
0.861	0.117 ± 0.011 ¹⁾	82.97	0.139 ± 0.004 ^{1,2)}	79.77	0.171 ± 0.005 ^{1,2)}	75.11	0.190 ± 0.004 ^{1,2)}	72.34
1.018	0.099 ± 0.003 ¹⁾	85.59	0.130 ± 0.004 ^{1,2)}	81.08	0.161 ± 0.005 ^{1,2)}	76.56	0.183 ± 0.003 ^{1,2)}	73.36

注:与0 g·mL⁻¹组比较¹⁾P < 0.01;与I组相比²⁾P < 0.01;生川乌与生半夏比例:I组为1:0,II组1:0.25;III组1:0.5;IV组1:1(表2同)。

降低。同时,药物作用时间与心肌细胞形态的损伤程度具有相关性,作用时间越长,细胞的损伤程度越严重^[13-14],见图3。

3.5 对心肌细胞搏动频率的影响 心肌细胞正常培养4 d后,搏动频率为50~100次/min,经无血清培养60 min后,呈下降趋势。



各配伍组在生川乌终质量浓度为0(N),0.016(A),0.235(B),0.548(C),1.018 g·mL⁻¹(D)时,对细胞形态的影响

I, II, III, IV组分别为生川乌组,生川乌配生半夏1:0.25组,1:0.5组,1:1组

图3 生川乌配不同比例生半夏与心肌细胞作用12 h对细胞形态的影响(×200)

在生川乌终质量浓度在 $0.016 \sim 0.078 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内, $1 \sim 2 \text{ h}$, 各组心肌细胞搏动频率显著高于 $0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.01$)。生川乌组搏动频率显著高于其他配伍组 ($P < 0.01$), 且随着配伍生半夏比例的增高, 搏动频率显著降低 ($P < 0.01$)。在 $0.235 \sim 0.861 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内, 染毒 1 h , 各组心肌细胞搏动频率显著低于 $0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组 ($P < 0.01$), 生川乌组搏动频率显著低于其他配伍组 ($P < 0.01$), 且随着配伍生半夏比例的增高, 搏动频率显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。染毒 2 h , 各组心肌细胞搏动频率回升, 但仍显著低于 $0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。生川乌组搏动频率显著高于其他配伍组

($P < 0.01$), 且随着配伍生半夏比例的增高, 搏动频率显著降低 ($P < 0.01$)。

在 $0.016 \sim 0.861 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内, $4 \sim 12 \text{ h}$, 各组心肌细胞搏动显著低于 $0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组 ($P < 0.01$), 且随着作用时间的延长, 搏动频率明显下降。生川乌组搏动频率显著低于其他配伍组 ($P < 0.01$), 且随着配伍生半夏比例的增高, 搏动频率显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在 $0.016 \sim 0.861 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内, 搏动细胞数渐少, 并可见偶发细胞搏动频率不齐的现象, 随着给药浓度的增大, 搏动减缓, 偶发性停搏现象增多。

剂量为 $1.018 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 细胞立即停止搏动, 结果见表 2。

表 2 生川乌配不同比例生半夏对小鼠心肌细胞搏动频率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组药物终质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	搏动频率/次/min			
	1 h	2 h	4 h	12 h
0	62 ± 4.9	55 ± 4.2	51 ± 4.6	40 ± 3.9
0.016	I $90 \pm 3.3^{2,3)}$	$104 \pm 4.9^{2)}$	$40 \pm 3.9^{2)}$	$23 \pm 5.1^{2)}$
0.016 + 0.004	II $85 \pm 3.6^{2,4)}$	$99 \pm 6^{2)}$	45 ± 4.5	$25 \pm 4.5^{2)}$
0.016 + 0.008	III $80 \pm 2.9^{2,4)}$	$90 \pm 3.7^{2,4)}$	$38 \pm 6.4^{2)}$	$28 \pm 7.7^{2)}$
0.016 + 0.016	IV $74 \pm 2.4^{2,4)}$	$88 \pm 5.1^{2,4)}$	$44 \pm 5.8^{1)}$	$31 \pm 5^{2,3)}$
0.078	I 60 ± 4.7	$80 \pm 4.2^{2)}$	$38 \pm 4.6^{2)}$	$15 \pm 4.5^{2)}$
0.078 + 0.0195	II 62 ± 2.9	$75 \pm 2.9^{2,3)}$	$42 \pm 3.7^{2)}$	$17 \pm 6^{2)}$
0.078 + 0.039	III $68 \pm 3.4^{1,4)}$	$72 \pm 2.5^{2,4)}$	$44 \pm 6^{1)}$	$19 \pm 4.1^{2)}$
0.078 + 0.078	IV 64 ± 3.5	$68 \pm 2.4^{2,4)}$	$46 \pm 6.1^{3)}$	$23 \pm 4.4^{2,4)}$
0.235	I $34 \pm 4.4^{2)}$	$60 \pm 3.5^{1)}$	$25 \pm 4.1^{2)}$	$10 \pm 3.4^{2)}$
0.235 + 0.059	II $42 \pm 2.9^{2,4)}$	$54 \pm 3.4^{3)}$	$27 \pm 5.1^{2)}$	$12 \pm 4.6^{2)}$
0.235 + 0.1275	III $45 \pm 3.2^{2,4)}$	$53 \pm 3.5^{4)}$	$31 \pm 5.6^{2,3)}$	$15 \pm 4.5^{2,3)}$
0.235 + 0.235	IV $40 \pm 3.9^{2,3)}$	$48 \pm 4.6^{2,4)}$	$33 \pm 3.5^{2,4)}$	$17 \pm 4.4^{2,4)}$
0.392	I $24 \pm 2.4^{2)}$	52 ± 2.9	$22 \pm 4.3^{2)}$	$4 \pm 3.4^{2)}$
0.392 + 0.098	II $32 \pm 2.9^{2,4)}$	$48 \pm 4.9^{2)}$	$25 \pm 4.5^{2)}$	$7 \pm 4.3^{2)}$
0.392 + 0.0196	III $28 \pm 4.4^{2)}$	$44 \pm 3.4^{2,4)}$	$27 \pm 5.1^{2)}$	$9 \pm 3.7^{2,3)}$
0.392 + 0.392	IV $34 \pm 3.4^{2,4)}$	$42 \pm 3.8^{2,4)}$	$30 \pm 4.5^{2,4)}$	$13 \pm 4.2^{2,4)}$
0.548	I $19 \pm 2.9^{2)}$	41 ± 3.1	$16 \pm 4.3^{2)}$	$1 \pm 4.4^{2)}$
0.548 + 0.137	II $27 \pm 1.8^{2,4)}$	$38 \pm 4.9^{2)}$	$19 \pm 4.5^{2)}$	$4 \pm 3.3^{2)}$
0.548 + 0.274	III $23 \pm 2.4^{2)}$	$33 \pm 3.3^{2,4)}$	$21 \pm 5.1^{2)}$	$6 \pm 3.1^{2,3)}$
0.548 + 0.548	IV $29 \pm 3.1^{2,4)}$	$31 \pm 3.9^{2,4)}$	$24 \pm 4.8^{2,4)}$	$10 \pm 3.2^{2,4)}$
0.705	I $13 \pm 2.7^{2)}$	31 ± 3.1	$9 \pm 4.3^{2)}$	$0^{2)}$
0.705 + 0.176	II $21 \pm 2.1^{2,4)}$	$28 \pm 4.9^{2)}$	$13 \pm 4.5^{2)}$	$1 \pm 2.3^{2)}$
0.705 + 0.352	III $17 \pm 3.4^{2)}$	$23 \pm 3.3^{2,4)}$	$15 \pm 5.1^{2)}$	$3 \pm 3.5^{2,3)}$
0.705 + 0.705	IV $23 \pm 3.1^{2,4)}$	$21 \pm 3.9^{2,4)}$	$18 \pm 4.8^{2,4)}$	$4 \pm 4.2^{2,4)}$
0.861	I $10 \pm 3.4^{2)}$	21 ± 2.9	$4 \pm 3.9^{2)}$	$0^{2)}$
0.861 + 0.251	II $17 \pm 2.3^{2,4)}$	$18 \pm 4.5^{2)}$	$7 \pm 4.1^{2,4)}$	$0^{2)}$
0.861 + 0.4305	III $14 \pm 3.2^{2)}$	$13 \pm 3.2^{2,4)}$	$9 \pm 5.1^{2,4)}$	$0^{2)}$
0.861 + 0.861	IV $19 \pm 2.9^{2,4)}$	$11 \pm 4.0^{2,4)}$	$7 \pm 4.4^{2,4)}$	$0^{2)}$

注:与 $0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 I 组相比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

本实验制备的乳大鼠心肌细胞 48 h 后基本贴壁,镜下呈不规则的星形,形成放射状排列的细胞簇,并呈现同步搏动。用抗 α 横纹肌动蛋白抗体进行免疫组织化学染色,心肌细胞 α 横纹肌动蛋白免疫染色阳性率 $>95\%$,细胞生长曲线显示,心肌细胞于第 4 天达到生长高峰,故选在此时给药。

本研究表明,在生川乌终质量浓度 $0.016 \sim 0.078 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 1 ~ 2 h 生川乌组的心肌细胞搏动频率显著高于其他配伍组,搏动频率的升高程度与生半夏的比例呈负相关。4 ~ 12 h 生川乌组心肌细胞搏动频率显著低于其他配伍组,搏动频率的降低程度且与生半夏比例呈负相关。染毒期间偶见细胞搏动频率不齐。12 h 时各配伍组对心肌细胞的抑制率与生川乌组比较差异无统计学意义,镜下可见细胞伪足回缩,细胞间连接减少,空隙增多,部分细胞脱壁死亡;在生川乌终质量浓度 $0.235 \sim 0.861 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 2 h 时搏动频率高于 1 h,但低于 $0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,生川乌组的心肌细胞搏动频率显著高于其他配伍组,搏动频率的升高程度与生半夏的比例呈负相关。4 ~ 12 h 搏动频率低于 1 h,生川乌组心肌细胞搏动频率显著低于其他配伍组,搏动频率的降低程度与生半夏比例呈负相关。染毒期间偶见细胞搏动频率不齐,且随着生川乌剂量的增加及时间的延长,搏动细胞数减少。生川乌 $1.018 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量,各组细胞均立即停搏。在 $0.235 \sim 1.018 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 12 h 时各组对心肌细胞的 CI 显著低于生川乌组,CI 的降低程度与半夏的比例呈正相关。镜下各组均可见细胞浆出现大量空泡,连成网状,细胞逐渐回缩成条线状,皱缩变圆,变小,细胞膜破损加重,固缩碎裂,并且细胞脱壁现象加重,但生川乌与半夏配伍组损伤程度低于生川乌组。

生川乌对心肌细胞有明显毒性作用,对心肌细胞的损伤程度与生川乌剂量及作用时间呈正相关。生川乌与生半夏配伍,可降低生川乌对心肌细胞的毒性,且有明显的剂量依赖关系。此研究结果有悖于传统医学“十八反”药对配伍毒性增强的理论,具

体机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 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): 25.
- [2] 于大猛, 瞿融, 范欣生, 等. 中药“十八反”基层医院应用现状调查[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 267.
- [3] 朱日然, 李启燕, 张学顺, 等. 附子与半夏不同炮制品种配伍应用的 ESI-MS 研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 62.
- [4] 石军民. 中药乌头的合理使用[J]. 中国当代医药, 2010, 17(27): 92.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 阳海鹰, 丁巍, 丁爱石, 等. 新生小鼠心肌细胞培养模型的建立及其在毒性评价研究中的应用[J]. 军事医学科学院院刊, 2012, 34(1): 30.
- [11] 王瑞华, 兰晓莉, 曹国祥, 等. 新生 SD 大鼠心肌细胞培养方法的简化及改良[J]. 心脏杂志, 2008, 20(2): 154.
- [12] 邵华, 金秀东, 梁军, 等. 不同差速贴壁时间对心肌细胞培养的影响实验性研究[J]. 牡丹江医学院学报, 2008, 29(1): 3.
- [13] 李志勇, 孙建宁, 张硕峰. 次乌头碱对乳大鼠原代培养心肌细胞的毒性作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2010, 24(8): 261.
- [14] 王衍堂, 李宏霞, 张建军, 等. 乌头碱对乳鼠心肌细胞的毒性作用[J]. 华西药理学杂志, 2007, 22(1): 4.

[责任编辑 聂淑琴]