

四逆汤缓释片毒理试验研究

吴伟康¹, 刘筱蔼², 赵明奇¹, 罗汉川¹

(1. 中山大学中山医学院中西医结合研究所, 广东 广州 510080; 2. 广州医学院生理教研室, 广东 广州 510182)

四逆汤是张仲景所创名方, 由附子、干姜和甘草组成。方中附子为有毒之品, 实验探讨了附子提取物和四逆汤缓释片的急性毒性以及四逆汤缓释片的亚急性毒性。在此基础上, 测定了急性和亚急性染毒时心肌和脑组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性。

1 实验材料

1.1 动物 普通级昆明种健康小鼠, (20 ± 2) g, 雌雄各半; 健康 SD 大鼠, (150 ± 20) g, 雌雄各半, 由中山大学中山医学院实验动物中心提供。

1.2 药物 四逆汤各单味药购于中山大学附属一院药剂

科。附子总生物碱提取物和四逆汤缓释片的制备按本课题组确定的制备工艺进行。

1.3 试剂 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性测定用 ATP 酶测试盒(南京建成生物工程研究所)。所用试剂均为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 附子提取物的急性毒性试验 取昆明鼠 80 只, 雌雄各半, 体重 18~ 22g, 随机分为四个剂量组(A、B、C 和 D 组), 分别用 135.00mg/ml、114.75mg/ml、97.54mg/ml 和 82.90mg/ml 浓度的附子提取物溶液以 0.2ml/10g 体重的剂量于空腹 12h 一次性灌胃, 给药后 4h 恢复正常饲养, 观察 7d。死亡小鼠迅速进行剖检, 肉眼观有异常的组织制成病理切片光镜下检查。采用综合计算法求得 LD_{50} 。结果见表 1。

表 1 附子提取物 LD₅₀ 的测定

剂量(mg/kg)	对数剂量	死亡率(p)	p ²	机率单位
2700	3.4314	0.85	0.7225	6.036
2295	3.3608	0.45	0.2025	4.874
1951	3.2903	0.05	0.0025	3.355
1685	3.2196	0	0	2.380

根据表 1 结果计算得附子提取物的 LD₅₀ 为 2.35g/kg, LD₅₀ 的 95% 平均可信限为 2.35 ± 0.11g/kg。相当于临床给药日剂量的 171.1 倍。多数动物死于用药后 12h, 2d 后基本稳定。其中毒症状主要为躁动不安, 步履蹒跚, 呼吸困难, 唾液分泌亢进, 死前阵发性抽搐; 剖检见心、肝、肾瘀血色暗, 未见水肿及出血。心、肝、肺、肾和脑病理切片未见异常。

2.2 四逆汤缓释片的急性毒性试验 取昆明鼠 20 只, 雌雄各半, 体重 18~22g。将四逆汤缓释片用蒸馏水混悬后配制成浓度为 0.17g 生药/ml 的溶液, 按 1ml/20g 体重的剂量于空腹 12h 一次性灌胃, 给药后 4h 恢复正常饲养, 观察 7d。死亡小鼠迅速进行剖检, 肉眼观有异常的组织制成病理切片光镜下检查。

结果显示, 给药后 1d, 小鼠的体重减轻, 活动减少, 2d 后恢复正常, 未见异常的行为和体征。7d 内未见小鼠死亡。四逆汤缓释片的最大耐受量(MTD) > 8.50g 生药/kg, 相当于拟临床给药日剂量的 33.5 倍。

2.3 四逆汤缓释片的亚急性毒性试验 取 SD 大鼠 16 只, 雌雄各半, 体重 130~170g。随机分为两组: 对照组和四逆汤缓释片组。四逆汤缓释片组将四逆汤缓释片用蒸馏水混悬后以拟临床给药日剂量的 50 倍灌胃; 对照组给予等体积蒸馏水灌胃。每日 1 次, 连续给药 1 个月。每日观察大鼠行为活动及体征, 每周称 1 次体重, 按体重调整给药量。最后 1 次给药后 24h 取大鼠测心电图。然后摘眼球取血, 送检白蛋白和肝肾功能。断头处死动物, 肉眼观察主要脏器, 摘取心、肝、肺、肾和脑, 称取质量(称重时尽量剔除脂肪和结缔组织, 要新鲜称重; 心脏内血宜流干净), 计算脏器系数。心、肝、肺、肾和脑作常规石蜡切片并染色, 进行光镜检查。

结果表明, 两组大鼠给药期间毛色、粪便无异常, 未见异常行为和体征, 心电图未见异常。两组小鼠给药前后体重变化及给药后脏器系数、白蛋白、谷丙转氨酶、胆汁酸和尿素氮比较均未见显著差异; 心、肝、肺、肾、脑病理学检查未见异常。

2.4 急性染毒时 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力测定 取昆明小鼠 16 只, 雌雄各半, 体重 18~22g, 随机分为两组: 对照组和染毒组, 每组 8 只。染毒组小鼠给予致死剂量的附子提取物灌胃, 动物死亡后迅速取出心脏和脑组织放入预冷的生理盐水中。对照组给予等体积双蒸水, 于相应时间点处死动物后, 迅速取出心脏和脑组织放入预冷的生理盐水中, 测定 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力。

结果显示, 染毒组心肌和脑组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力比

正常对照组显著降低。提示附子中毒时可能由于膜系统的损害和能量代谢障碍, 使心肌和脑组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力降低。结果见表 2。

2.5 亚急性染毒时 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力测定 取少量亚急性毒性试验中正常组和片剂组摘取的心肌和脑组织放入预冷的生理盐水中, 测定 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力。

结果显示, 片剂组心肌和脑组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力与正常组比较无显著差异。结果见表 3。

表 2 附子提取物急性染毒时心肌和脑组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力变化(μmolPi/mgprot/h) ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	心肌 Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶	脑组织 Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶
正常组	8	0.32 ± 0.04	2.34 ± 0.32
染毒组	8	0.25 ± 0.03*	0.47 ± 0.07*

注: 与正常组比较* P < 0.01

表 3 亚急性染毒时心肌和脑组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力变化(μmolPi/mgprot/h) ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	心肌 Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶	脑组织 Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶
正常组	8	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.03
染毒组	8	0.13 ± 0.03	0.14 ± 0.04

3 讨论

四逆汤中附子为有毒之品, 因此本实验探讨了附子提取物的急性毒性。附子提取物急性毒性实验结果显示, 其 LD₅₀ 为 2.35g/kg, 相当于临床给药日剂量的 171.1 倍。四逆汤缓释片未能测出其 LD₅₀, 其最大耐受量(MTD) 为 8.50g 生药/kg, 相当于拟临床给药日剂量的 33.5 倍。四逆汤缓释片的亚急性毒性试验未见明显毒性。究其原因, 可能有三点: 一是本实验所用的附子为制附子, 附子经过炮制后, 毒性大大降低。

由于乌头类生物碱中毒的机制为其影响电压门控性 Na⁺ 通道的功能, 主要损害循环系统和中枢神经系统。因此, 本实验测定了急性和亚急性染毒时心肌和脑组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力。结果发现, 急性染毒时, 心肌和脑组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力均比正常对照组显著降低。心肌组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力受抑制已有报道^[1]。但染毒时脑组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力下降未见相关报道。Na⁺-K⁺-ATP 酶活力的下降, 进一步加剧了细胞内 Na⁺ 的滞留, 加剧了细胞内外离子的异常分布。而细胞内外离子的正常分布是生物电活动的物质基础, 因此本实验观察到的 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力的下降可能参与了乌头碱引起的心律失常及神经中毒症状的形成, 如心律失常, 躁动不安, 步履蹒跚, 呼吸困难等。

参考文献:

- [1] Yang KS. Effect of aconitium tuber butanol fraction on the contractile protein myocardium [J]. Tachan Yakarihak Chapchi, 1976, 12(1): 23.