

心脏药代酶的附子-甘草配伍减毒机制

李晗, 张广平, 马梦, 苏萍, 杨依霏, 陈腾飞, 叶祖光*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 基于心脏细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 系统考察附子与甘草配伍后对正常大鼠心脏的减毒机制研究。**方法:** 雄性 SD 大鼠, 随机分为空白组、诱导剂苯巴比妥组 ($0.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 附子组 ($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 甘草组 ($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 和附子-甘草组 ($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。检测大鼠心肌酶天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transaminase, AST), 肌酸激酶 (creatinase kinase, CK) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 含量变化, 同时观察大鼠心脏组织的病理学改变, 并观察各组对药物代谢酶 CYP2B1, CYP2C11, CYP2E1, CYP2J3, CYP4A1, CYP4A3, CYP4F1, CYP4F5, CYP4F6 mRNA 表达水平的变化。**结果:** 与空白组比较, 附子组中大鼠血清 AST, CK 和 LDH 含量升高 ($P < 0.05$), 配伍后 AST, CK 和 LDH 心肌酶的含量较附子组降低, 但未出现统计学差异; 同时病理学结果显示附子组大鼠出现心脏损伤, 配伍后甘草可减轻由附子产生的心脏损伤作用; 在基因转录水平, 甘草组能不同程度地上调 CYP2C11 和 CYP2J3 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 甘草与附子配伍后能上调 CYP2B1, CYP2C11 和 CYP2J3 家族 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 推测配伍可促进花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 代谢生成环氧二十碳三烯酸 (expycoicatrienoic acid, EETs), 附子能上调 CYP4 家族中 CYP4A1, CYP4A3, CYP4F1, CYP4F5 和 CYP4F6 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 其能促进 20-羟-二十烷四烯酸 (20-hydroxyeicosatetraenoic acid, 20-HETE) 的生成, 附子-甘草配伍后能削弱附子下调 CYP4A3, CYP4F1, CYP4F5 和 CYP4F6 家族 mRNA 表达的能力 ($P < 0.05$), 抑制 20-HETE 的生成, 减轻由附子产生的心脏毒性。**结论:** 附子-甘草配伍后可调控心脏 CYP450 酶的表达, 使 EETs 生成量增加, 20-HETE 含量减少, 起到减毒的作用。

[关键词] 附子; 甘草; 心脏; 细胞色素 P450 酶; 配伍

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)01-0059-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192026

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190628.1100.001.html>

[网络出版时间] 2019-06-28 17:01

Attenuation Mechanism of Aconiti Lateralis Radix Praeparata Combined with Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Based on Heart CYP450 Isozymes

LI Han, ZHANG Guang-ping, MA Meng, SU Ping, YANG Yi-fei, CHEN Teng-fei, YE Zu-guang*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Aconiti Lateralis Praeparata Radix combined with Glycyrrhizae Radix et Rhizoma on mRNA expression of cytochrome P450 (CYP450) enzymes in rat's heart. **Method:** Male Sprague Dawley rats were randomly divided into the control group, the inducer group ($0.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), the aconite group ($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), the licorice group ($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and the compatibility group (aconite and licorice group $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), with 6 rats in each group. In each group, the serum concentrations of aspartate transaminase (AST), creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) were respectively measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the pathologic changes in the heart tissue of the rats. The expression of several CYP genes were measured. **Result:** After combination, the contents of AST, CK and LDH were lower than those of the aconite group. At the same time, the pathological

[收稿日期] 20190313(001)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09501004-003-002)

[第一作者] 李晗, 博士, 助理研究员, 从事中药药理研究, E-mail: wzf38@126.com

[通信作者] * 叶祖光, 博士生导师, 研究员, 从事中药药理研究, E-mail: yezuguang@vip.sina.com

results showed cardiac injury in rats in the aconite group, and licorice could alleviate the cardiac injury caused by aconite. At the level of gene transcription, the glycyrrhizae group could up-regulate the expressions of CYP2C11 and CYP2J3 to different degrees ($P < 0.05$), and the combination of licorice and aconite could up-regulate the expression of CYP2B1, CYP2C11 and CYP2J3 family ($P < 0.05$). It suggested that the combination could promote the formation of EETs in arachidonic acid (AA) metabolism, and the aconite could up-regulate the expressions of CYP4A1, CYP4A3, CYP4F5 and CYP4F6 in CYP4 family ($P < 0.05$), promote the formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE). The combination of aconite and licorice can weaken the ability of aconite, down-regulate the expression of CYP4A3, CYP4F1, CYP4F5 and CYP4F6 family mRNA ($P < 0.05$), inhibit the formation of 20-HETE and reduce the cardiotoxicity caused by aconite. **Conclusion:** The combination of licorice and aconite can regulate the expression of CYP450 enzyme in the heart, increase the production of EETs and the content of 20-HETE, and finally play a role in reducing toxicity.

[Key words] Radix Aconiti Lateralis Praeparata; Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; heart; cytochrome P450; compatibility

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* 子根的加工品,因其回阳救逆之功备受名家青睐^[1],作为毒与效并存的药物,附子既可以强心,也可导致心脏毒性^[2]。通常选用炮制、煎煮、限量来起到减轻附子毒性。甘草系豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis*, 胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* 的根及根茎除去杂质、洗净、润透并干燥的炮制品,具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功效^[3]。临床用药过程中,附子常与甘草配伍以达到减毒增效的目的,但作用机制尚不明确^[4-5],现阶段研究者对该药对配伍后药效成分含量变化及对肝脏细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP450) 的改变等角度进行了大量实验^[6],本课题组前期在肝脏角度下进行甘草与附子配伍调控 CYP450 系统减轻肝毒性研究,发现在转录水平通过下调 CYP1A2, CYP3A1 mRNA 的表达,代谢减慢,使有毒成分乌头碱在体内蓄积时间延长,毒性增加;甘草与附子配伍后可上调 CYP1A2, CYP3A1 mRNA 表达,减少乌头碱在体内的蓄积时间,起到减毒的作用^[7-10]。但从心脏细胞色素 P450 酶学角度考虑配伍产生的相互作用的报道较为少见。

相关研究显示心脏细胞色素 P450 代谢酶与心血管疾病的发生具有相关性,心脏 CYP450 途径主要分为 CYP 表氧化酶和 CYP ω -羟化酶 2 种途径^[11]。花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 通过 CYP 表氧化酶催化产生具有心血管保护作用的环氧二十碳三烯酸 (epoxyeicosatrienoic acids, EETs), 主要包含 5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET 和 14,15-EET 这 4 种异构体;而 CYP ω -羟化酶可催化产生代谢产物

20-羟-二十烷四烯酸 (20-hydroxyeicosatetraenoic acid, 20-HETE), 该物质在心肌细胞肥大时浓度升高,提示抑制 CYP ω -羟化酶可对心脏起到保护作用^[12-13]。本文研究了附子单用及与甘草配伍后对大鼠心肌酶,组织病理及心脏 CYP450 酶 mRNA 表达的影响,进一步从心脏 CYP 系统阐释附子与甘草配伍的减毒增效作用。

1 材料

1.1 动物 健康 SD 大鼠,雄性,6~8 周龄,体质量 (200 ± 20) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2013-0035。动物饲养于中国中医科学院中药研究所 SPF 级动物房,其使用许可证号 SYXK(京)2015-0041。饲养条件为 12 h 明暗交替,温度 (23 ± 1) °C,湿度 (50 ± 15)%,自主饮水及进食。本实验所进行的所有相关操作均在中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会的批准下进行,批准号 20172001。

1.2 药品与试剂 附子和甘草均购于安国市同利中药材有限公司,由军事医学科学院李鲁教授鉴定,附子为毛茛科多年生草本植物乌头 *A. carmichaelii* 的子根,甘草为豆科植物甘草 *G. uralensis* 的根及根茎;苯巴比妥 (50 mg, 北京百灵威公司,批号 H948960),天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 试剂盒,肌酸激酶 (CK) 试剂盒和乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所,批号分别为 C0010-2, A032, A020-2);cDNA 反转录,实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 试剂盒 (北京全式金公司,批号分别为 L21011, M40517);苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (珠海贝索生物技术有限公司,批号 2018051),苯巴比妥及其他试剂均为国产

分析纯。

1.3 仪器 98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);Finesse 325 型切片机,Excelsior ES 型全自动脱水机,Histocentre3 型石蜡包埋机,Varistain Gemini ES 型全自动染色机,NANODROP ONE 型核酸浓度测定仪(美国 Thermo 公司);LightCycler® 480 型 Real-time PCR 仪(瑞士 Roche 公司);VICTOR X 型多标记酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司)。

2 方法

2.1 药物准备 附子水提液的制备:取附子,粉碎,置于圆底烧瓶中,加入 8 倍量去离子水,浸泡 8 h,待煮沸后加热回流提取 30 min,4 层纱布滤过,回流提取 2 次,合并提取液,减压浓缩至生药质量浓度 0.05 g·mL⁻¹,4 °C 保存,备用。

甘草水提液的制备:取甘草,粉碎,置于圆底烧瓶中,加入 8 倍量去离子水,浸泡 8 h,待煮沸后加热回流提取 30 min,4 层纱布滤过,回流提取 2 次,合并提取液,减压浓缩至生药质量浓度 0.05 g·mL⁻¹,4 °C 保存,备用。

附子-甘草水提液的制备:取附子、炙甘草粉碎,甘草-附子 1:1 混匀^[14],置于圆底烧瓶中,加入 8 倍量去离子水,浸泡 8 h,回流提取 30 min,用 4 层纱布滤过,回流提取 2 次,合并提取液,减压浓缩至生药质量浓度 0.05 g·mL⁻¹,4 °C 保存,备用。

2.2 动物分组与给药 动物到达后适应性观察 3 d,按体质量随机分为 5 组,包括空白组,苯巴比妥

组,附子组,甘草组和附子-甘草组,每组 6 只。药物根据 2015 年版《中国药典》(一部)规定的临床剂量^[3]按体表面积换算成大鼠剂量。空白组给予生理盐水;苯巴比妥组(0.08 g·kg⁻¹·d⁻¹)连续腹腔注射给药 4 d;附子组(0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹),甘草组(0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹)和附子-甘草组(0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹)连续灌胃给药 8 d。全部大鼠于末次给药后禁食不禁水 16 h。

2.3 血清心肌酶活性检测 实验结束后,麻醉打开大鼠腹腔,用采血管自下腔静脉采血 5 mL,室温放置 1~3 h,4 °C,3 000 r·min⁻¹离心 15 min,上清放入 -20 °C 冰箱冻存备用,取血清 200 μL,测定血清中 AST,CK,LDH 水平变化,具体操作应严格按试剂盒说明书进行。

2.4 肝脏组织切片 HE 及病理学观察 将 4% 甲醛浸泡过心脏组织经脱水、包埋,制成 4 μm 的石蜡切片,行 HE 染色,常规显微镜下观察组织病理学变化并记录。

2.5 Real-time PCR 检测心 CYP mRNA 表达 取空白组,苯巴比妥组,附子组,甘草组和附子-甘草组的大鼠心脏 50~100 mg,利用 RNA 提取试剂盒,按照说明书提取心脏总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度(吸光度 A_{260 nm}/A_{280 nm} 1.8~2.0)。取总 RNA 1 μg 逆转录成 cDNA 后进行 Real-time PCR 检测,PCR 反应条件为预变性 95 °C 20 s,95 °C 5 s,60 °C 15 s,72 °C 10 s,共 40 个循环,以各目标基因 2^{-ΔΔC_t} 值表示各目标 mRNA 相对表达水平,特异性引物序列由北京博迈德公司合成,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequences

引物	上游序列/5'-3'	长度/bp	下游序列/5'-3'	长度/bp
CYP2B1	GGCCTCCTCAATTCCTTC	18	TGCTGTGCCACATAGCAT	19
CYP2C11	CACCAGCTATCAGTGGATTTGG	22	GTCTGCCCTTTGCACAGGAA	20
CYP2E1	TCTGCTCCTGTCTGCTATT	19	GTGGGATACTGCCAAAGC	18
CYP2J3	CATGAGCTCACAAAGTGGCTTT	22	CAATTCCTAGGCTGTGATGTCC	22
CYP4A1	TTGAGCTACTGCCAGATCCAC	22	CCCATTTTTGGACTTCAGCACA	22
CYP4A3	CTGCCATAGCCATGCTTATC	21	CCTTCAGCTCATTTCATGGCAATC	23
CYP4F1	CCCCCAAGGCTTTTTGATG	19	GAGCGCAACGGCAGCT	16
CYP4F5	AGGATGCCGTGGCTAACTG	19	GGCTCCAAGCAGCAGAAGA	19
CYP4F6	TCACTTGACCTTGATGAAGAACAAC	25	AAGAGAGGTGGATATCACGGAAC	23
β-actin	CCAGATCATGTTTGAGACCTTCAA	24	GTGGTACGACCAGAGGCATACA	22

2.6 统计学方法 所有数据重复 3 次,结果采用

$\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,

组间比较采用单因素方差分析及最小显著性差异法 (LSD) 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 附子与甘草配伍对大鼠心肌酶的影响 与正常组比较, 苯巴比妥组 AST, CK 水平的升高

($P < 0.05$); 附子组 AST, CK, LDH 水平升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明附子产生心肌损伤作用; 附子-甘草组与附子组比较, 心肌酶含量下降, 但未出现统计学差异, 提示甘草削弱了附子的心脏损失作用, 见表 2。

表 2 附子-甘草配伍对大鼠 AST, CK, LDH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

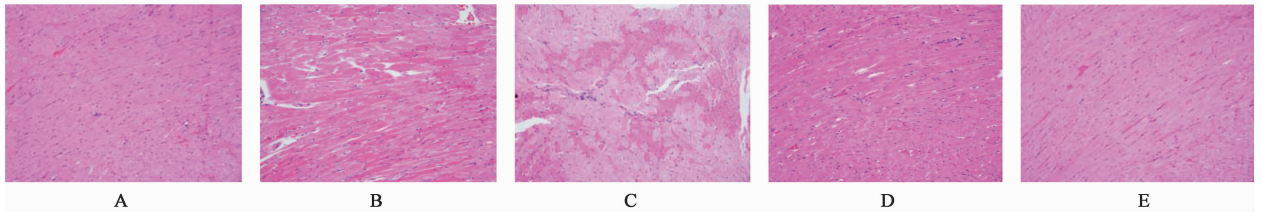
Table 2 Effect of Aconiti Lateralis Praeparata Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma on levels of AST, CK and LDH in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	AST	CK	LDH
空白	-	39.17 ± 19.83	4 369.17 ± 1 727.88	1 532.83 ± 247.11
苯巴比妥	0.08	67.00 ± 9.86 ¹⁾	5 917.50 ± 800.84 ¹⁾	1 784.17 ± 143.21
附子	0.5	67.00 ± 14.97 ¹⁾	5 913.17 ± 1 519.90 ¹⁾	2 605.17 ± 370.18 ²⁾
甘草	0.5	46.00 ± 40.03	4 795.17 ± 1 572.67	1 780.83 ± 213.72
附子-甘草	0.5	51.83 ± 26.27	4 983.33 ± 1 147.48	1 768.83 ± 172.72

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

3.2 附子与甘草配伍对大鼠心脏病理学的影响 心脏病理学检测发现空白组、甘草组、附子-甘草组心肌纤维排列整齐, 偶见灶性心肌纤维均质红染, 间质未见炎症细胞浸润, 组织结构正常。附子组、苯巴比妥组可见局灶性或大片状心肌纤维均质红

染, 嗜酸性变, 其余未见异常变化。本实验中, 附子-甘草配伍后, 心脏的病理变化与附子组比较灶性心肌纤维均质红染程度减轻, 心肌纤维排列整齐, 表明甘草可以减轻附子毒性, 对心脏起到保护作用, 见图 1。



A. 空白组; B. 苯巴比妥组; C. 附子组; D. 甘草组; E. 附子-甘草组

图 1 附子-甘草配伍对大鼠心脏组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Aconiti Lateralis Praeparata Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma on pulmonary pathological changes of rats (HE, ×200)

3.3 附子与甘草配伍对大鼠心 CYP mRNA 表达的影响 与空白组比较, 苯巴比妥作为肝药酶诱导剂, 对 CYP2 家族 mRNA 表达具有诱导作用 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组比较, 附子组、甘草组和附子-甘草组能不同程度地诱导 CYP2B1,

CYP2C11 mRNA 表达 ($P < 0.05$); 附子组能上调 CYP2E1 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 甘草组能上调 CYP2J3 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 与附子组相比, 附子-甘草配伍后能上调 CYP2J3 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 附子-甘草配伍对大鼠心 CYP 2 家族 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Aconiti Lateralis Praeparata Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma on expression of CYP2 family mRNA in rat heart ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CYP2B1	CYP2C11	CYP2E1	CYP2J3
苯巴比妥	0.08	5.00 ± 0.91 ²⁾	6.55 ± 1.11 ²⁾	4.09 ± 0.77 ¹⁾	2.83 ± 0.14 ²⁾
附子	0.5	2.37 ± 0.33 ¹⁾	1.68 ± 0.38 ¹⁾	2.72 ± 0.59 ¹⁾	0.87 ± 0.16
甘草	0.5	2.52 ± 0.70 ¹⁾	1.78 ± 0.55 ¹⁾	1.69 ± 0.50	1.54 ± 0.17 ¹⁾
附子-甘草	0.5	3.05 ± 0.29 ¹⁾	1.76 ± 0.27 ¹⁾	2.65 ± 0.74	1.57 ± 0.24 ³⁾

注: 设空白组相关指标 mRNA 相对表达为 1; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与附子组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

甘草对 CYP4 家族中 CYP4A1, CYP4A3, CYP4F1, CYP4F5, CYP4F6 mRNA 表达无影响, 附子能诱导 CYP4 家族中 CYP4A1, CYP4A3, CYP4F1,

CYP4F5, CYP4F6 mRNA 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与附子组相比, 附子-甘草配伍后能下调 CYP4 家族 mRNA 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见表 4。

表 4 附子-甘草配伍对大鼠心 CYP 4 家族 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Aconiti Lateralis Praeparata Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma on expression of CYP4 family mRNA in rat heart ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CYP4A1	CYP4A3	CYP4F1	CYP4F5	CYP4F6
苯巴比妥	0.08	1.61 \pm 0.01 ¹⁾	1.04 \pm 0.07	1.16 \pm 0.09	1.80 \pm 0.05 ¹⁾	1.20 \pm 0.10
附子	0.5	2.43 \pm 0.66 ¹⁾	2.05 \pm 0.01 ²⁾	2.45 \pm 0.06 ²⁾	2.48 \pm 0.02 ²⁾	1.81 \pm 0.04 ²⁾
甘草	0.5	1.11 \pm 0.23	0.71 \pm 0.12	0.94 \pm 0.11	1.05 \pm 0.08	0.93 \pm 0.10
附子-甘草	0.5	1.94 \pm 0.28 ¹⁾	1.44 \pm 0.00 ⁴⁾	1.33 \pm 0.13 ^{1,3)}	1.57 \pm 0.12 ^{1,3)}	1.50 \pm 0.09 ^{1,3)}

4 讨论

附子因具有回阳救逆之效, 因疗效显著, 使用广泛, 但作为毒与效并存的药物, 使用不当会引发严重的毒性反应, 特别是对心脏的毒性。临床常以甘草配伍附子, 既能缓“附子之性急”, 又能解“附子之性毒”, 代表方有四逆汤、甘草附子汤等^[15]。

在外界多种生理或病理刺激下, 磷脂酶 A₂ 分解细胞磷脂成分释放 AA, AA 作为一种不饱和脂肪酸, 广泛存在于心血管及肾脏系统中, 涉及多种细胞的信号转导与信号通路的调节, 主要有环氧化酶 (cyclooxygenase, COX) 途径, 脂氧酶 (lipoxygenase, LOX) 途径与 CYP 途径这 3 种代谢途径。细胞色素 P450 酶是血红蛋白家族基因编码的蛋白, 作为重要的 I 相代谢酶系, 涉及体内众多内源性 & 外源性物质的生物转化^[16]。在 CYP 途径中, AA 代谢生成 EETs 的过程中 CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP2J, CYP4A, CYP4F 等亚家族均有不同程度地贡献。

通过检测大鼠心脏心肌酶, 心脏病理组织学变化和基因转录水平变化来阐释基于心脏 CYP450 水平的附子-甘草配伍减毒增效作用机制。AST, CK, LDH 为临床最常应用判断心肌是否出现损伤的指标, 在细胞胞质中大量分布着 AST, CK, LDH, 在心肌出现缺血时, 细胞能量降低, 代谢产物蓄积, 细胞损伤及细胞生物膜通透性增加导致细胞胞质酶的释放, 灌注时钙超载及氧自由基造成生物膜进一步损伤, 促 AST, CK 和 LDH 大量漏出。同时 CK 和 LDH 在心肌细胞中的具有特异性且含量最高, 因此该指标在临床上对于心肌损伤具有显著的敏感性^[17-18]。本研究结果显示, 附子组 AST, CK, LDH 含量的升高, 说明附子对心脏产生损伤作用, 配伍后心肌酶含量下降, 推断甘草可缓解附子引起的心脏毒性。

大鼠心脏病理学观察发现, 甘草组、附子-甘草组心肌纤维排列整齐, 偶见灶性心肌纤维均质红染, 间质未见炎症细胞浸润, 组织结构正常。附子组、苯巴比妥组可见局灶性或小片状心肌纤维均质红染, 嗜酸性变, 其余未见异常变化; 附子配伍甘草后, 心脏的病理变化与附子组比较灶性心肌纤维均质红染程度减轻, 心肌纤维排列整齐, 证明甘草可以减轻附子产生的心脏毒性。

在基因转录水平心脏 CYP450 酶主要包括 2 家族与 4 家族, 其中表氧化酶 CYP2J3, CYP2C11 主要负责将花生四烯酸代谢生成 EETs, 且 CYP2J3 在心脏特异性高表达, EETs 作为一种心血管活性物质, 可以舒张血管, 参与血压调节, 促血管生成, 改善冠状动脉 (冠脉) 微循环, 调节心肌细胞收缩, 保护缺血心肌等心脏保护作用。实验结果显示, 甘草组能不同程度地上调 CYP2C11 和 CYP2J3 mRNA 的表达, 附子组下调 CYP2J3 mRNA 表达, 甘草与附子配伍后能上调 CYP2J3 mRNA 表达, 结果推测配伍可促进 AA 代谢生成 EETs。同时 ω -羟化酶 CYP4A1 和 CYP4F1 主要负责将 AA 代谢生成 20-HETE, 其主要参与机体血管收缩、心肌细胞凋亡、冠脉血流量等, 在高血压、冠心病等心血管疾病的发生发展中发挥着极为重要的作用^[19-22]。本文实验结果显示, 附子能上调 CYP4 家族中 CYP4A1, CYP4A3, CYP4F1, CYP4F5, CYP4F6 mRNA 表达, 推测其能促进 20-HETE 的生成。附子与甘草配伍后能削弱附子下调 CYP4A3 与 CYP4F1, CYP4F5, CYP4F6 家族 mRNA 表达的能力, 抑制 20-HETE 的生成, 减轻由附子产生的心脏毒性。

综上所述, 本实验基于心脏 CYP450 酶角度来阐释附子与甘草配伍后降低附子毒性的作用机制。

从而为揭示传统中药配伍理论科学内涵提供数据依据,同时为心血管疾病的治疗提供新的可能途径或靶点,提高中药复方临床使用的有效性和安全性,并为推动中药研究的现代化提供新思路。

[参考文献]

[1] 唐梅,赵立春,徐敏,等. 附子化学成分和药理作用研究进展[J]. 广西植物,2017,37(12):1614-1627.

[2] 谢晓芳,彭成. 附子心脏毒效的多维评价和整合分析研究进展[J]. 世界中医药,2017,12(11):2555-2562.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:86-87,191-193.

[4] Peter K, Schinnerl J, Felsing S, et al. A novel concept for detoxification: complexation between aconitine and liquiritin in a Chinese herbal formula (Sini Tang) [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 149(2):562-569.

[5] ZHANG Y Y, YU L, JIN W F, et al. Reducing toxicity and increasing efficiency: aconitine with liquiritin and glycyrrhetic acid regulate calcium regulatory proteins in rat myocardial cell [J]. Afr J Tradit Complem, 2017, 14(4):69-79.

[6] 李文,杨晓琴,章津铭,等. 附子配伍甘草后对附子生物碱类成分大鼠在体肠吸收特性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(22):11-16.

[7] 马增春,周思思,梁乾德,等. 基于 UPLC-TOF/MS 分析人参附子配伍减毒的物质基础[J]. 药学学报,2011,46(12):1488-1492.

[8] 李晗,王宇光,马增春,等. 基于临床用量的参附注射液对大鼠肝脏主要药物代谢酶的影响[J]. 药学学报,2013,48(5):728-733.

[9] 蔡悦,梁红玉,王建立,等. 甘草附子汤对佐剂性关节炎小鼠的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(14):142-146.

[10] 沈红,朱玲英,姚楠,等. 甘草与附子配伍对乌头碱、新乌头碱、次乌头碱大鼠药动学的影响[J]. 中药材,2011,34(6):937-942.

[11] Roman R J. P-450 metabolites of arachidonic acid, in the control of cardiovascular function[J]. Physiol Rev,

2002,82(1):131-185.

[12] Elbekai R H, ElKadi A O S. Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease[J]. Pharmacol Ther,2006,112(2):564-587.

[13] ElKadi A, Zordoky B. Modulation of cardiac and hepatic cytochrome P450 enzymes during heart failure[J]. Curr Drug Metab,2008,9(2):122-128.

[14] 张广平,朱丽君,周娟,等. 附子配伍甘草对 CYP3A4 体内活性的影响研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(15):2206-2209.

[15] 郭丽丽,唐雪春.《伤寒论》、《金匱要略方论》中附子应用特点的文献研究[J]. 新中医,2011,43(11):108-109.

[16] 覃琴,冯柏林,唐丽清,等. 五加科植物中药对胆固醇的调节作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(10):197-204.

[17] O'Brien P J, Smith D E C, Knechtel T J, et al. Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals[J]. Lab Anim Sci, 2006, 40(2):153-171.

[18] Walker D B. Serum chemical biomarkers of cardiac injury for nonclinical safety testing[J]. Toxicol Pathol, 2006,34(1):94-104.

[19] CHEN L, Ackerman R, Saleh M, et al. 20-HETE regulates the angiogenic functions of human endothelial progenitor cells and contributes to angiogenesis *in vivo* [J]. J Pharmacol Exp Ther,2014,348(3):442-451.

[20] 彭秋菊,严华成,石磊. 细胞色素 P450 SNP 与冠心病易感性关系的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2018,23(4):477-480.

[21] Lasker J M, CHEN W B, Wolf I, et al. Formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, a vasoactive and natriuretic eicosanoid, in human kidney. Role of Cyp4F2 and Cyp4A11[J]. J Biol Chem,2000,275(6):4118-26.

[22] FU Z, MA Y, XIE X, et al. A novel polymorphism of the CYP4A11 gene is associated with coronary artery disease. [J]. Clin Appl Thromb Hemost,2013,19(1):60-65.

[责任编辑 张丰丰]