

· 甘遂甘草反药研究专题 ·

甘遂半夏汤加減甘遂甘草不同给药次数对腹水大鼠肝脏病理形态的影响

张建美 许皖 钟赣生 赵桐 贾旭 柳海艳 郭岩松 修琳琳 王思睿

【摘要】 目的 同给药次数条件下的甘遂半夏汤加減甘遂甘草反药组合对腹水模型大鼠肝脏病理形态的影响。方法 采用 Walker-256 细胞制造癌性腹水模型,将 Wistar 大鼠按体重随机分为空白组、模型组、阳性对照组、全方给药一次组、去草给药一次组、去遂给药一次组、去草遂给药一次组、全方给药二次组、去草给药二次组、去遂给药二次组、去草遂给药二次组,共计 11 组。给药一次组每天上午给药 1 次,给药二次组上午、下午各给药 1 次,一二次组每天给药总量一致。腹水长成 14 天后取材,摘取肝脏,制成病理切片,在光镜下观察大鼠肝脏的病理形态变化,并进行半定量评分。结果 模型组肝细胞损伤严重,全方给药一次组及二次组肝损伤较模型组明显减轻,且一次组的减轻程度大于二次组。与全方一次组比较,去草一次组、去遂一次组、去草遂一次组肝损伤加重;与全方二次组比较,去草二次组、去遂二次组、去草遂二次组肝损伤加重。结论 全方给药一次组和二次组对肝损伤均有一定的改善作用,给药一次组的改善作用优于给药二次组;全方组损伤修复及抗炎作用优于全方去掉一味或两味反药组。

【关键词】 反药组合; 甘遂; 甘草; 肝脏病理形态

【中图分类号】 R285.5 【文献标识码】 A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.05.004

Comparing the effect of Gansui Banxia decoction plus or reduce kansui and glycyrrhiza on pathological morphology of liver of ascites rat under different times ZHANG Jian-mei, XU Wan, ZHONG Gan-sheng, et al. School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: ZHONG Gan-sheng, E-mail: zhonggansheng@sohu.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of combination of incompatible herb of kansui and glycyrrhiza in modification of prescriptions of Gansui Banxia decoction on pathological morphology of liver of ascites rats under different times of administration. Methods Walker-256 cells were used to make the malignant ascites rat model. The Wistar rats were randomly divided into blank group, model group, furosemide group, once or twice of Gansui Banxia decoction group, once or twice of Gansui Banxia decoction removed glycyrrhiza group, once or twice of Gansui Banxia decoction removed kansui group, once or twice of Gansui Banxia decoction removed glycyrrhiza and kansui group. Once group was gavaged at morning, and twice group was gavaged morning and afternoon, which the total dose was as much as the once group. After 14 days' feed, the liver of every rat was collected to observe pathomorphological changes, and semi-quantitative ratings was conducted. Results Liver cell damage of model group was

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2011CB505306); 北京中医药大学 2015 年度基本科研业务费项目(在读研究生项目)(2015-JYB-XS033)

作者单位: 100029 北京中医药大学基础医学院[张建美(硕士研究生)、许皖(硕士研究生)、郭岩松(硕士研究生)、修琳琳(博士研究生)、王思睿(硕士研究生)], 基础医学院方药系(钟赣生、柳海艳), 科研实验中心(贾旭); 中国中医药出版社(赵桐)

作者简介: 张建美(1986-), 女, 2013 级在读硕士研究生。研究方向: 中药药性理论研究。E-mail: kkm20110814@163.com

通讯作者: 钟赣生(1961-), 硕士, 教授, 博士生导师。研究方向: 中药药性理论研究。E-mail: zhonggansheng@sohu.com

very serious, while the once and twice of *Gansui Banxia* decoction group was alleviated, and the once group was better than twice group. Compared with the once of *Gansui Banxia* decoction group, the liver cell damage of once of *Gansui Banxia* decoction removed glycyrrhiza group, once of *Gansui Banxia* decoction removed kansui group, once of *Gansui Banxia* decoction removed glycyrrhiza and kansui group was aggravated. Compared with the twice of *Gansui Banxia* decoction group, the liver cell damage of twice of *Gansui Banxia* decoction removed glycyrrhiza group, twice of *Gansui Banxia* decoction removed kansui group, twice of *Gansui Banxia* decoction removed glycyrrhiza and kansui group was aggravated. **Conclusion**

The once and twice of *Gansui Banxia* decoction group has certain improvement effect on liver injury, and the once group is better than twice group; Injury repair and anti inflammatory effect of *Gansui Banxia* decoction group is better than *Gansui Banxia* decoction removed one or two incompatible herb.

【Keywords】 Combination of incompatible herb; Kansui; Glycyrrhiza; Pathological morphology of liver

“本草明言十八反,半蒺藜及攻乌,藻戟遂芫俱战草,诸参辛芍叛藜芦”。“十八反”属于中药配伍禁忌范畴,即某些药物合用会降低、破坏药效或产生剧烈的毒副作用,所以应该避免配合应用^[1]。然而关于反药能否同用的争论,从古至今从未停止。古有孙思邈云“草石相反,使人迷乱,力甚刀剑”。现代科研工作者在大戟配伍甘草对大鼠肝功能及肝脏微粒体中细胞色素氧化酶 P4503A2 的影响实验中发现大戟和甘草合用后谷丙转氨酶水平显著增高,对大鼠肝功能损害严重^[2]。然而古今不少医家学者提出了相反观点,如《金匱要略》中甘遂半夏汤用甘遂配伍甘草治疗“留饮欲去”;已故名医蒲辅周多次自服海藻甘草发现“海藻与甘草同用,只是服后心中稍感难受而已”,用于临床,发现其软坚散结之力更强^[3]。那么“十八反”中反药组合到底能否同用,大批科研工作者从不同学科领域、不同角度作了大量实验研究。然而现今对“十八反”的研究多从药物的配伍剂量、配伍比例、入药方式、炮制品种、给药途径、给药时间等方面开展,且多在生理条件下进行^[4]。本实验以含有甘遂甘草反药组合的甘遂半夏汤为载体,在癌性腹水模型大鼠的基础上,探讨甘遂甘草反药组合在不同给药次数的条件下对大鼠肝脏病理形态的影响,以期今后相关实验研究提供参考,也为临床合理用药提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠,体质量(200±20)g, SPF 级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2006-0009。

1.2 实验药物

醋甘遂:大戟科植物甘遂 *Euphorbia kansui* T.

N. Liou ex T. P. Wang 的干燥块根醋制而成(批号:120301);炙甘草:豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎蜜制而成(批号:120201);法半夏:天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb) Breit. 的块茎,经甘草和生石灰炮制而成(批号:100701)以上药物均购自安徽丰原铜陵中药饮片厂。白芍:毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的根,自行浸泡、切片、烘干备至实验所需饮片(批号:20120315)购自磐安科信中药材生产力促进中心。

呋塞米(批号:H32021428)购自江苏安邦艾普森药业有限公司。

1.3 实验试剂

甲醛溶液(批号:1111132)购自西陇化工股份有限公司;生理盐水(批号:1D11090302)购自山东齐都药业有限公司;水合氯醛(批号:T20101114)购自国药集团化学试剂有限公司;二甲苯(批号:1408112)购自北京益利精细化学品有限公司;苏木素染色液(批号:20140119)、伊红染色液(批号:20141120)均购自天合力恩化学试剂;石蜡(批号:20141119)购自上海华永石蜡有限公司;中性树脂(批号:20140901)购自国药集团化学试剂有限公司。

1.4 实验仪器

自动脱水机(ASP300)购自德国 Leica 公司;Nikon 50i 型正置显微镜购自日本尼康公司;石蜡烤片机购自德国 Leica 公司;切片机(RM2135)购自德国 Leica 公司。

1.5 药物制备

阳性药(呋塞米)的制备:给药浓度为 4.2 g/kg;药液制备为 0.42 g/mL。

甘遂半夏汤处方:醋甘遂 1 g/kg(研末),炙甘

草 15 g/kg, 法半夏 0.9 g/kg, 白芍 1.5 g/kg, 蜂蜜 1.5 g/kg(由课题前期实验结果得出:当醋甘遂与炙甘草配伍比例为 1:15 时,具有一定的肝损伤)。

甘遂半夏汤全方药液的制备:将炙甘草、法半夏、白芍加入 10 倍量水浸泡 1 小时,大火煮沸后小火煎煮 1 小时,将药液倒出。再加入 8 倍量水煎煮,大火沸腾后小火煎煮 1 小时。将两次煎煮的药液合并,加入蜂蜜,放置于水浴锅上浓缩至 1.89 g/mL,临用时按比例加入醋甘遂粉末,加水至 1.99 g/mL。

甘遂半夏汤去炙甘草药液的制备:将法半夏、白芍按照全方的煎煮方法浓缩至 0.78 g/mL,临用时按比例加入醋甘遂粉末,加水至 0.49 g/mL。

甘遂半夏汤去醋甘遂药液的制备:将法半夏、炙甘草、白芍按照全方的煎煮方法浓缩至 1.89 g/mL。

甘遂半夏汤去炙甘草醋甘遂药液的制备:将法半夏、白芍按照全方的煎煮方法浓缩至 0.39 g/mL。

1.6 造模方法

将 Walker-256 细胞分别以 0.5 mL、0.8 mL、1 mL 剂量注入大鼠体内,待出现腹水后再抽取腹水以 1 mL/只的剂量注入大鼠体内进行二次传代,二次传代的大鼠长出腹水后,选取淡黄色的腹水进行细胞计数,以细胞浓度为 1.68×10^6 个/mL 注入正式实验的大鼠体内,每只注射 1 mL。

1.7 给药方法

将大鼠按体质量随机分为空白组、模型组、阳性对照组、甘遂半夏汤全方给药一次组(简称全方一次组)、甘遂半夏汤全方去炙甘草给药一次组(简称去草一次组)、甘遂半夏汤全方去醋甘遂给药一次组(简称去遂一次组)、甘遂半夏汤全方去炙甘草醋甘遂给药一次组(简称去草遂一次组)、甘遂半夏汤全方给药二次组(简称全方二次组)、甘遂半夏汤全方去炙甘草给药二次组(简称去草二次组)、甘遂半夏汤全方去醋甘遂给药二次组(简称去遂二次组)、甘遂半夏汤全方去炙甘草醋甘遂给药二次组(简称去草遂二次组),共计 11 组。每组大鼠 20 只,各组于造模后第二天开始给药,给药方法参照临床实际用药情况设计:空白组、模型组给予生理盐(1 mL/100 g)水灌胃,每天 1 次;给药一次组及阳性对照组给予相应的实验药物(1 mL/100 g)灌胃,每天 1 次;给药二次组给予相应的实验药物(0.5 mL/100 g)灌胃,每天 2 次,上下午各 1 次。

1.8 样本处理方法

连续给药 14 天后取材。所有大鼠在取材前禁

食 12 小时,次日取材前 1 小时灌胃 1 次,之后行 10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,迅速取出肝右叶组织(每只大鼠所取组织大小、位置基本相同,1 cm × 1 cm × 0.5 cm),用 10% 甲醛溶液固定一周,逐级酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片,片厚 6 μm,采用 HE 染色法,于光镜下观察肝脏的病理形态改变并拍照。

1.9 评分标准及统计方法

1.9.1 肝细胞损伤评分标准 0 分:肝组织结构正常,肝细胞正常,无病变;1 分:肝细胞变性或点状坏死;2 分:肝细胞变性或灶性坏死;3 分:肝细胞坏死不到 1/3 肝小叶;4 分:肝细胞坏死超过 1/3 肝小叶。

1.9.2 炎细胞浸润评分标准 0 分:正常,无炎细胞浸润;1 分:炎细胞散在浸润,少见;2 分:炎细胞在某一局部聚集成群;3 分:炎细胞呈现弥漫性分布^[5]。

1.10 统计学处理

实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行分析,各组之间比较采用两个独立样本的非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色镜下观察

空白组:肝小叶结构清晰、完整,肝细胞索排列整齐,围绕中央静脉呈放射状排列,肝小叶内和肝小叶间无明显纤维组织增生。肝索间有不规则肝窦,肝窦结构清晰,分布规律,窦内可见少量红细胞。细胞呈多边形,大小均一,偶见双核,细胞内未见明显空泡。汇管区可见小叶间动脉、静脉和胆管。见图 1 空白组。

模型组:肝小叶结构破坏,肝细胞索结构紊乱,大量炎细胞浸润,在中央静脉附近肝细胞肿大,肝细胞广泛空泡样变,部分肝细胞呈现嗜酸性变伴核深染,局灶性出现肝细胞溶解和坏死。见图 1 模型组。

阳性药组:肝细胞索结构紊乱,部分肝小叶结构消失,较模型组减轻。肝细胞广泛空泡样变,部分肝细胞呈现嗜酸性变伴核深染。细胞肿大数量明显减少。偶见炎细胞浸润。见图 1 阳性药组。

全方一次组:肝细胞索结构较为整齐,炎细胞浸润减少,空泡样变依然广泛存在,部分肝细胞呈现嗜酸性变伴核深染。见图 1 全方一次组。

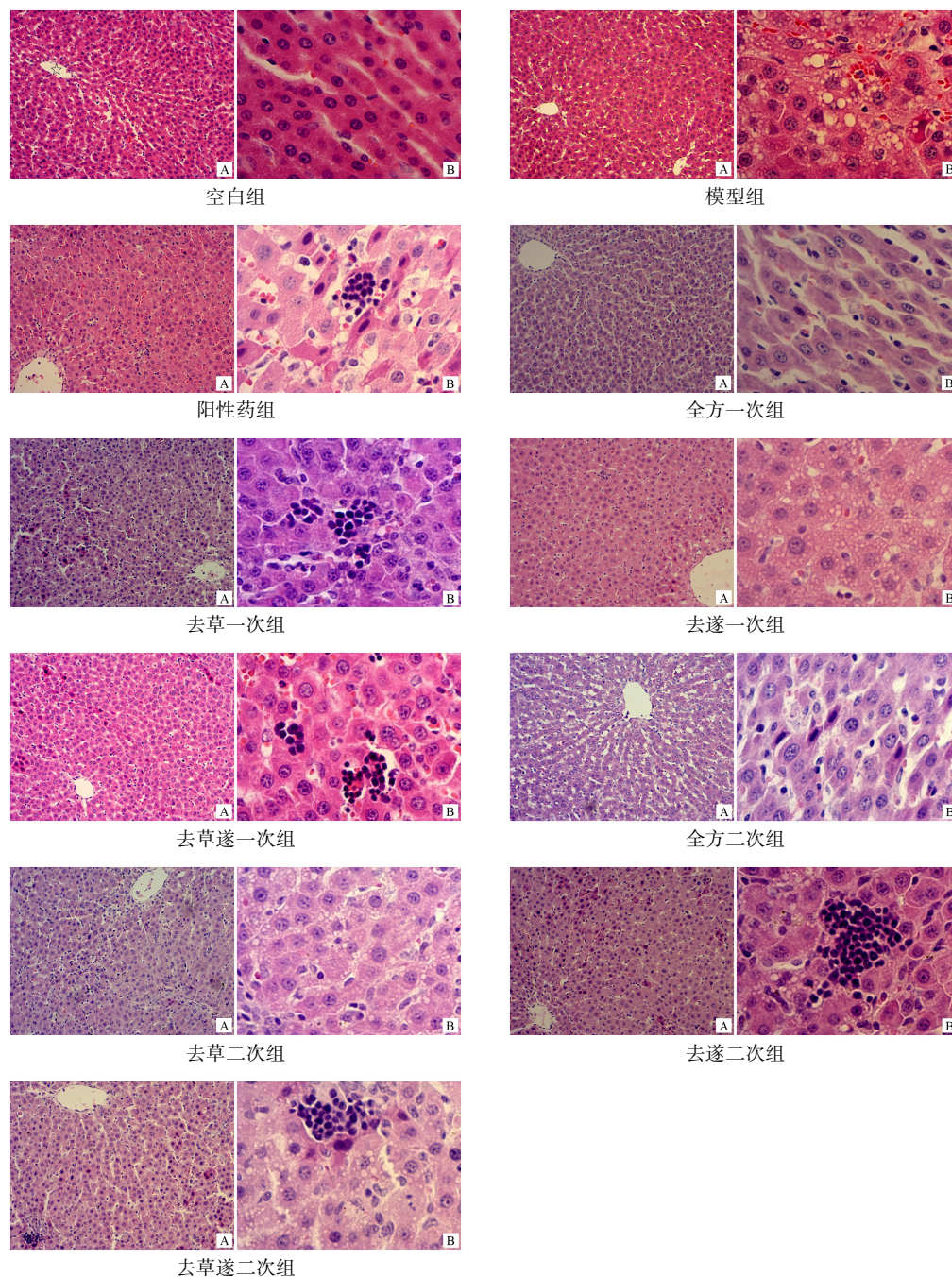


图 1 各组大鼠肝细胞组织形态(HE 染色, A×20, B×40)

去草一次组:肝细胞索结构紊乱,部分肝小叶结构消失,炎细胞浸润明显,大量空泡样变,部分肝细胞呈现嗜酸性变伴核深染。局灶性出现肝细胞溶解和坏死,偶见肝细胞水肿。见图 1 去草一次组。

去遂一次组:肝细胞索结构紊乱,部分肝小叶结构消失,空泡样变广泛存在,大量炎细胞浸润,部分肝细胞呈现嗜酸性变伴核深染。见图 1 去遂一次组。

去草遂一次组:肝细胞索结构紊乱,部分肝细

胞呈现嗜酸性变伴核深染,大量炎细胞浸润,空泡样变依然大量存在。见图 1 去草遂一次组。

全方二次组:肝细胞索结构紊乱,肝细胞溶解或坏死,空泡样变广泛存在,炎细胞浸润减少,部分肝细胞呈现嗜酸性变伴核深染。见图 1 全方二次组。

去草二次组:肝细胞索结构紊乱,部分肝小叶结构消失,空泡样变广泛存在,炎细胞浸润广泛存在。见图 1 去草二次组。

去遂二次组:肝细胞索结构紊乱,空泡样变未

见改善,散在肝细胞嗜酸性变伴核深染,部分地区可见炎细胞大量浸润。见图 1 去遂二次组。

去草遂二次组:肝细胞索结构紊乱,远离中央静脉处呈现局灶性肝细胞溶解或坏死,散在嗜酸性变,可见炎细胞聚集成群现象,空泡样变广泛存在。见图 1 去草遂二次组。

2.2 病理组织学检查积分结果

肝细胞损伤评分:与空白组比较,模型组及各给药组评分上升具有显著性差异;与模型组比较,全方一次组和全方二次组评分下降具有显著性差异;与全方一次组比较,全方二次组、去草一次组、去遂一次组、去草遂一次组评分上升具有显著性差异;与全方二次组比较,去草二次组、去遂二次组、去草遂二次组评分上升具有显著性差异。

炎细胞浸润评分:与空白组比较,模型组及各给药组评分上升具有显著性差异;与模型组比较,全方一次组和全方二次组评分下降具有显著性差异,其余各组也有不同程度下降;与全方一次组比较,全方二次组评分无差异,去草一次组、去遂一次组、去草遂一次组评分上升具有显著性差异;与全方二次组比较,去草二次组、去遂二次组、去草遂二次组评分上升具有显著性差异。见表 1。

3 讨论

甘遂半夏汤首载于张仲景的《金匮要略·痰饮咳嗽脉证并治》篇,“病者脉伏,其人欲自利,利反快,虽利,心下续坚满,此为留饮欲去故也,甘遂半夏汤主之”。甘遂半夏汤为张仲景治疗留饮的经方,但由于其含有甘遂甘草反药组合,属于中医所说的“十八反”的范畴,在临床应用中受到了

限制。但同时有一些医家认为反药同用可以起到相反相激的作用,因此对于一些疾病会有特殊的疗效。有学者归纳总结甘遂半夏汤的临床应用报道发现,甘遂半夏汤主要用于留饮内停导致的胸腹胀满、食欲不振、二便不通、苔腻、脉沉弦等症^[6]。本实验通过给大鼠腹腔注射肿瘤细胞,形成腹水模型,属于中医“痰饮”范畴,为甘遂半夏汤的治疗范围。

通过前期文献研究,有学者从肝脏功能^[6]、肝脏酶学^[7-8]等方面研究了甘遂甘草反药组合对肝脏的毒性,但未得出统一定论。本实验通过腹水大鼠肝脏病理组织学检查积分结果及病理图片可以看出,Walker-256 癌细胞对大鼠肝脏造成了一定程度的组织损伤及炎症感染。甘遂半夏汤给药一次组及给药二次组对损伤具有一定的修复作用,同时发挥了抗炎作用,且给药一次组的损伤修复作用强于给药二次组。而全方去掉一味或两味反药之后,损伤修复及抗炎作用均明显降低。

有研究表明,给药时间对维持稳定的有效血药浓度至关重要,不按规定间隔时间用药,血药浓度会产生很大波动,过高可发生毒性反应,过低则无效^[9]。药物在临床应用中,一次给药量在安全的剂量范围内,但若短时间内多次给药,导致药物在体内蓄积就会产生毒性反应^[10]。因此科学合理的实效关系,在控制不良反应的发生、制定和调整最佳给药方案等方面最有重要作用。对于不同疾病的治疗,应该设置不同的给药频次、给药间隔、给药周期^[11]。本实验设置了每天一次给药和两次给药的不同组别,发现给药一次组的损伤修复作用强于给药二次组。

表 1 腹水大鼠肝脏病理组织学检查积分(n,分)

组别	n	肝细胞损伤评分						炎细胞浸润评分				
		0	1	2	3	4	总分	0	1	2	3	总分
空白组	15	14	1	0	0	0	1	13	2	0	0	2
模型组	15	0	0	0	5	10	55 ^a	0	3	11	1	28 ^a
阳性药	15	0	0	2	5	8	51 ^{ab}	1	8	5	1	21 ^{ab}
全方一次组	15	6	4	5	0	0	14 ^{ac}	10	5	0	0	5 ^{ac}
去草一次组	15	0	0	0	6	9	54 ^{ad}	3	9	3	0	15 ^{acd}
去遂一次组	15	0	0	3	6	6	48 ^{abd}	1	3	9	2	27 ^{acd}
去草遂一次组	15	0	0	0	7	8	53 ^{ad}	0	7	7	1	24 ^{abd}
全方二次组	15	3	3	5	2	2	27 ^{acd}	10	3	1	1	8 ^{ac}
去草二次组	15	0	0	0	6	9	54 ^{ac}	2	6	5	2	22 ^{ace}
去遂二次组	15	0	0	0	8	7	52 ^{ac}	2	6	4	3	23 ^{ace}
去草遂二次组	15	0	0	1	8	6	50 ^{ac}	2	6	2	5	25 ^{ace}

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与全方一次组比较,^d $P<0.01$;与全方二次组比较,^e $P<0.01$ 。因每组大鼠均有死亡,但均不超过 5 只,故每组均取 15 例。

本实验以癌性腹水大鼠为模型,探讨加减甘遂甘草反药组合的甘遂半夏汤在不同给药次数条件下对大鼠肝脏病理形态的影响。实验结果表明,甘遂半夏汤全方一次组和二次组对癌性腹水模型造成的肝损伤有一定的改善作用,一次组的改善作用强于二次组,同时表现出一定的抗炎作用。全方去掉一味或两味反药后损伤修复及抗炎作用均明显降低。然而,人体是一个有机的整体,对肝脏病理形态的影响只是本课题组研究的一小部分,至于甘遂甘草同用对其他器官作用如何,仍需要继续努力探索,以期对临床合理用药提供参考。

参 考 文 献

- [1] 钟赣生. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2012:45.
- [2] 夏成云,高月,周京国,等. 大戟配伍甘草对大鼠肝功能及肝脏微粒体中 CYP3A2 的影响[J]. 中国中医急症,2006,15(9):1013-1015,1066.
- [3] 华浩明,范欣生,姚映芷,等. 十八反古今临床应用述要[J].

南京中医药大学学报,2010,26(2):85-88.

- [4] 张建美,许皖,钟赣生,等. 甘遂甘草反药组合宜忌条件的实验研究回顾与评析[J]. 环球中医药,2015,8(9):1053-1058.
- [5] 吴银萍,杜景霞,李艳,等. 参归软肝胶囊对实验性肝损伤的保护作用研究[J]. 河南科技大学学报(医学版),2011,29(4):244-246.
- [6] 王茜. 甘遂半夏汤中甘遂与甘草反药组合的配伍宜忌条件实验研究[D]. 北京:北京中医药大学,2012.
- [7] 邓毅,宁艳梅. 甘草甘遂配伍对小鼠血清 GPT、GOT、LDH 影响的实验研究[J]. 中医研究,2007,20(3):15-16.
- [8] 邓毅,杨志军,王昕,等. 甘草与甘遂配伍对小鼠肾脏功能及组织形态影响的实验研究[C]//中华中医药学会中药基础理论分会首届临床中药学学术研讨会论文集,2008.
- [9] 吕圭源. 药理学[M]. 北京:中国中医药出版社,2009:37.
- [10] 牛继红,常章富. 中药用法对药物毒性的影响[J]. 首都医药,1999,6(6):42-43.
- [11] 王智先,张少强,杜武勋,等. 药代动力学模式下复方中药时效关系的探讨[J]. 环球中医药,2013,6(5):337-339.

(收稿日期:2016-01-05)

(本文编辑:韩虹娟)