

生草乌和诃子制草乌细胞毒性及抗炎作用的比较研究^Δ

支美汝*, 韩舒, 刘凯洋, 韩喜桃, 唐雅楠, 刘子琴, 王宏月, 李飞, 杜红[#](北京中医药大学中药学院, 北京 100029)

中图分类号 R28 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)22-2701-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.22.03

摘要 目的:比较生草乌和诃子制草乌的细胞毒性及抗炎作用。方法:以大鼠心肌细胞H9c2为对象,采用CCK-8法检测0.5、1、2、4、6、8、10 mg/mL生草乌和诃子制草乌作用4、8、12、24 h对细胞抑制率的影响,采用Hoechst 33258染色法观察2、4、6 mg/mL生草乌和诃子制草乌作用24 h对细胞形态学特征的影响。以小鼠巨噬细胞RAW264.7为对象,采用CCK-8法检测0.05、0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2 mg/mL生草乌和诃子制草乌作用24 h对细胞存活率的影响,采用酶联免疫吸附试验法检测0.05、0.1、0.25、0.5 mg/mL生草乌和诃子制草乌对LPS致RAW264.7炎症细胞中一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)释放的影响。结果:当质量浓度为0.5、1 mg/mL时,生草乌和诃子制草乌对H9c2细胞几乎均无抑制作用;当质量浓度为2 mg/mL时,诃子制草乌在各时间点对H9c2细胞的抑制率均显著高于生草乌($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且作用24 h的细胞荧光强度虽强于生草乌,但其细胞核完整;当质量浓度为4~10 mg/mL时,诃子制草乌在各时间点(除8、10 mg/mL作用24 h外)对H9c2细胞的抑制率均显著低于生草乌($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且4、6 mg/mL生草乌组细胞的荧光强度强于诃子制草乌组,同时生草乌组的细胞核破碎现象更为严重。0.05~0.5 mg/mL的生草乌和诃子制草乌对RAW264.7细胞均无毒性,0.25、0.5 mg/mL的生草乌和0.1、0.25、0.5 mg/mL的诃子制草乌对RAW264.7炎症细胞中NO的释放以及0.05、0.1、0.25、0.5 mg/mL的生草乌和诃子制草乌对RAW264.7炎症细胞中TNF- α 、IL-6的释放均有显著的抑制作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中相同质量浓度下诃子制草乌对NO释放的抑制作用优于生草乌,对TNF- α 、IL-6释放的抑制作用弱于生草乌。结论:草乌经诃子汤炮制后毒性有所降低,尤其是以中或高浓度、短期内使用的毒性低于生草乌。同时,诃子制草乌的抗炎作用与同浓度生草乌相当。

关键词 生草乌;诃子制草乌;毒性;抗炎;H9c2细胞;RAW264.7细胞

Comparative Study of Cytotoxicity and Anti-inflammatory Effects between Raw *Aconitium kusnezoffii* and *Aconitium kusnezoffii* Processed with *Terminalia chebula*

ZHI Meiru, HAN Shu, LIU Kaiyang, HAN Xitao, TANG Yanan, LIU Ziqin, WANG Hongyue, LI Fei, DU Hong (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of TCM, Beijing 100029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare cytotoxicity and anti-inflammatory effects of raw *Aconitium kusnezoffii* and *A. kusnezoffii* processed with *Terminalia chebula*. METHODS: Using H9c2 cardiomyocytes isolated from rat as subjects, CCK-8 assay was used to detect the effects of 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL raw *A. kusnezoffii* and *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula* on cell inhibition rate after cultured for 4, 8, 12, 24 h. Hoechst 33258 staining was used to observe the effects on cell morphology characteristics after treated with 2, 4, 6 mg/mL raw *A. kusnezoffii* and *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula*. Using macrophages RAW264.7 cells as subjects, CCK-8 assay was used to detect the effects of 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mg/mL raw *A. kusnezoffii* and *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula* on cell survival rate after cultured for 24 h. ELISA assay was used to detect the effects of 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL raw *A. kusnezoffii* and *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula* on the release of NO, TNF- α and IL-6 in RAW264.7 inflammation cells induced by LPS. RESULTS: When the mass concentration was 0.5, 1 mg/mL, neither raw *A. kusnezoffii* and *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula* had no inhibitory effect on H9c2 cells. When the mass concentration was 2 mg/mL, the inhibitory effects of *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula* on H9c2 cells was higher than that of raw *A. kusnezoffii* ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); fluorescence intensity of cells treated for 24 h was stronger than that of raw *A. kusnezoffii*, but its nucleus was intact. When the mass concentration was 4-10 mg/mL, the inhibitory rate of *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula* on H9c2 cells at different time points (except for 24 h culture of 8, 10 mg/mL) was significantly lower than raw *A. kusnezoffii* ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The characteristics of cell morphology also showed that the fluorescence intensity of raw *A. kusnezoffii* group at 4, 6 mg/mL was stronger than that of *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula* group, and the cell

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81774004, No.81973479)

* 硕士研究生。研究方向:中药炮制。E-mail:zmr6822@163.com

[#] 通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药炮制。E-mail:duhong@vip.163.com

nucleus fragmentation was more serious in the raw *A. kusnezoffii* group. 0.05-0.5 mg/mL raw *A. kusnezoffii* and *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula* had no toxicity to RAW264.7 cells. 0.25, 0.5 mg/mL raw *A. kusnezoffii* and 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula*

showed significant inhibitory effect on the release of NO, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL raw *A. kusnezoffii* and *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula* showed significant inhibitory effect on the release of TNF- α and IL-6 in RAW264.7 cell ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The inhibitory effects of *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula* at the same concentration on the release of NO was better than that of raw *A. kusnezoffii*, but poorer than raw *A. kusnezoffii* in the inhibitory effects on the release of TNF- α and IL-6. CONCLUSIONS: The toxicity of *A. kusnezoffii* can be reduced after processed with *T. chebula*, especially the toxicity of it in medium or high concentration and short-term use is lower than that of raw *A. kusnezoffii*. At the same time, the anti-inflammatory effect of *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula* is comparable to that of raw *A. kusnezoffii* at the same concentration.

KEYWORDS Raw *Aconitum kusnezoffii*; *Aconitum kusnezoffii* processed with *Terminalia chebula*; Cytotoxicity; Anti-inflammatory effects; H9c2 cell; RAW264.7 cell

草乌 *Aconiti Kusnezoffii Radix* 为毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* Reichb. 的干燥块根, 具有祛风除湿、温经止痛的功效, 可用于风寒湿痹、关节疼痛、心腹冷痛、寒疝作痛及麻醉止痛, 有大毒^[1]。草乌是毒效并存的药材, 其在发挥抗炎、镇痛等作用的同时, 往往会因使用不当或者剂量过大而产生较强的毒副作用, 其主要毒性靶器官为心脏, 以心律失常等症状最为常见^[2]。因此, 临床上常通过炮制或者配伍以达到减毒的目的^[3-4]。草乌有多种炮制方法, 诃子汤制为蒙医炮制草乌的特色方法^[5], 蒙医中有“诃子解草乌毒”的说法^[6]。诃子 *Chebulae Fructus* 为使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Retz. 或绒毛诃子 *Terminalia chebula* Retz. var. *tomentella* Kurt. 的干燥成熟果实^[1]。本课题组前期研究发现, 诃子中的鞣质类成分可以有效避免草乌中双酯型生物碱的水解或流失, 进而减缓双酯型生物碱的水解速度, 使其缓慢地发挥毒性作用, 故诃子制草乌的半数致死浓度 (LD_{50}) 高于生草乌^[7-8]。可见, 诃子汤炮制能降低草乌的毒性, 但并不是通过降低剧毒草乌中双酯型生物碱的含量来实现的。为了进一步明确生草乌经诃子汤炮制后减毒存效的原理, 本研究比较了不同浓度生草乌和诃子制草乌作用不同时间对 H9c2 细胞的毒性, 同时利用经典炎症细胞模型 [脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型] 探讨生草乌和诃子制草乌的抗炎作用, 从量-毒-时关系的角度探讨诃子汤制法对草乌的减毒作用, 以期进一步明确诃子制草乌炮制前后的药效变化, 为该炮制方法及炮制品的开发和应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Thermo 3111 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SPECTROstar Nano 型全波长酶标仪 (上海微百科技发展有限公司); BY-R20 型低温高速离心机 (北京白洋医疗器械有限公司); Nikon Eclipse Ts2 型常规倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); MTN-5800 型氮吹仪 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司); ISO9001 型电子分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

生草乌饮片 (批号: 311271) 购自北京华邈中药工程技术开发中心, 诃子肉饮片 (批号: 180231) 购自北京鹤延龄药业发展有限公司, 经北京中医药大学中药资源与鉴定系王晶娟教授鉴定分别为毛茛科植物北乌头

A. kusnezoffii Reichb. 的干燥块根和使君子科植物诃子 *T. chebula* Retz. 的干燥成熟果实的去核品。青链霉素混合液 (美国 Caisson Labs 公司, 批号: 12181006); DMEM 高糖培养基 (批号: 0032019)、胎牛血清 (批号: AB20171102S)、胰蛋白酶 (批号: 0052419)、磷酸盐缓冲液 (PBS, pH=7.4, 批号: 0012819)、LPS (批号: L2880) 均购自美国 Sigma 公司; CCK-8 试剂 (批号: NV547)、二甲基亚砷 (批号: 1101G031) 均购自北京索莱宝科技有限公司; Griess 试剂盒 (北京拜尔迪生物技术有限公司, 批号: 106012); 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测试剂盒 (批号: A282H91224)、白细胞介素 6 (IL-6) ELISA 检测试剂盒 (批号: A206H91042)、Hoechst 33258 染色液 (批号: C1018) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

1.3 细胞

大鼠心肌细胞 H9c2 和小鼠巨噬细胞 RAW264.7 均购自于北京协和细胞资源中心。

2 方法

2.1 诃子制草乌的制备

参考《内蒙古蒙成药标准》, 按本课题组前期制定的参数制备诃子制草乌^[9-10]。按照草乌-诃子质量比 2:1 的比例称取药材, 先取诃子肉, 加适量水浸泡 1 h, 回流煎煮 1 h, 滤过得诃子汤 (每克诃子肉可得诃子汤约 0.8 mL); 再取生草乌, 用上述诃子汤浸泡 3 d, 至口尝微有麻舌感时取出, 阴干, 即得诃子制草乌。

2.2 样品预处理

分别将生草乌、诃子制草乌粉碎后, 过三号筛, 称取粉末约 2 g, 精密称定, 分别置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 在 25 °C 下超声 (功率: 300 W, 频率: 40 kHz) 处理 60 min, 冷却至室温, 再次称定质量, 用甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 将滤液用氮气流吹至干, 即得。

2.3 生草乌和诃子制草乌对 H9c2 细胞的毒性

2.3.1 细胞抑制率 采用 CCK-8 法检测。取对数生长期的 H9c2 细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基 (以下简称“完全培养基”) 调整细胞密度为 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L。在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h (培养条件下同) 后, 将细胞随机分为空白组和生草乌/诃子制草乌不同浓度给药组。弃去上清液, 各给药组细胞分别加

入不同质量浓度的生草乌培养液或诃子制草乌培养液(均用完全培养基稀释,下同),质量浓度分别为0.5、1、2、4、6、8、10 mg/mL(以生药量计,给药浓度按预试验结果设置);空白组细胞加入完全培养基;加入量均为100 μ L。另设无细胞、无药物的调零组,每组设置3个复孔。分别培养4、8、12、24 h后,各孔加入CCK-8试剂10 μ L,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中孵育1 h。使用酶标仪在450 nm波长处测定光密度(OD值)并计算细胞抑制率:细胞抑制率(%)=[1-(给药组OD值-调零组OD值)/(空白组OD值-调零组OD值)] \times 100%。试验重复3次。

2.3.2 细胞形态 采用Hoechst 33258染色法观察。取对数生长期的H9c2细胞,按“2.3.1”项下方法调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,接种于24孔板中,每孔500 μ L。培养24 h后,将细胞随机分为空白组和生草乌/诃子制草乌不同浓度给药组,每组设置3个复孔。弃去上清液,各给药组细胞分别加入不同质量浓度(根据“2.3.1”CCK-8试验结果选择对H9c2细胞有明显抑制作用的浓度为给药浓度)的生草乌培养液或诃子制草乌培养液;空白组细胞加入完全培养基;加入量均为100 μ L。继续培养24 h,弃去培养基,用PBS洗涤2次;每孔加入Hoechst 33258染色液300 μ L,避光孵育20~30 min;弃去染色液,再用PBS洗涤2次。置于倒置显微镜下观察细胞形态。

2.4 生草乌和诃子制草乌对LPS诱导RAW264.7细胞的影响

2.4.1 细胞存活率 采用CCK-8法检测。取RAW264.7细胞,加入完全培养基适量,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中培养至对数生长期。取上述处于对数生长期的细胞,用完全培养基调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,接种于96孔板中,每孔100 μ L。培养24 h后,将细胞随机分为空白组和生草乌/诃子制草乌不同浓度给药组。弃去上清液,各给药组细胞分别加入不同质量浓度的生草乌培养液或诃子制草乌培养液,质量浓度分别均为0.05、0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2 mg/mL(以生药量计,给药浓度按预试验结果设置);空白组细胞加入完全培养基;加入量均为100 μ L。另设无细胞、无药物的调零组,每组设置3个复孔。继续培养24 h后,各孔加入CCK-8试剂10 μ L,按“2.3.1”项下方法处理后测定OD值并计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(试验组OD值-调零组OD值)/(空白组OD值-调零组OD值) \times 100%。细胞存活率 $\geq 90\%$ 即为无毒^[11]。试验重复3次。

2.4.2 细胞中NO、TNF- α 、IL-6的释放量 采用ELISA法检测。取对数生长期的RAW264.7细胞,按“2.4.1”项下方法调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,接种于96孔板中,每孔100 μ L。培养24 h后,将细胞随机分为空白组、模型组和生草乌/诃子制草乌不同浓度给药组,每组设置3个复孔。弃去上清液,各给药组细胞分别加入含1 μ g/mL LPS和不同质量浓度(根据“2.4.1”CCK-8试验结果选择对RAW264.7细胞无毒性的浓度为给药浓度)生草乌培养液或诃子制草乌培养液;空白组和模型组细胞加入不

含或含1 μ g/mL LPS的DMEM高糖培养基;加入量均为100 μ L。继续培养24 h后,取上清液,采用ELISA法以酶标仪检测其中NO、TNF- α 、IL-6的释放量,严格按相应试剂盒说明书操作。试验重复3次。

2.5 统计学方法

采用Graphpad 8.0、SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 H9c2细胞抑制率的变化

当给药浓度为0.5、1 mg/mL时,生草乌和诃子制草乌对H9c2细胞几乎均无抑制作用,个别时间点还表现出一定的促进生长作用;当质量浓度为2 mg/mL时,诃子制草乌在各时间点对H9c2细胞的抑制率均显著大于生草乌($P<0.05$ 或 $P<0.01$);当质量浓度为4、6、8、10 mg/mL时,诃子制草乌在各时间点(除8、10 mg/mL作用24 h外)对H9c2细胞的抑制率均显著低于生草乌($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。随着质量浓度的增加、作用时间的延长,生草乌和诃子制草乌对H9c2细胞抑制作用的差异有缩小的趋势。各组细胞不同作用时间的细胞抑制率检测结果见图1。参考上述结果,本研究将后续试验生草乌和诃子制草乌的给药浓度分别均设置为2、4、6 mg/mL。

3.2 H9c2细胞形态学特征的变化

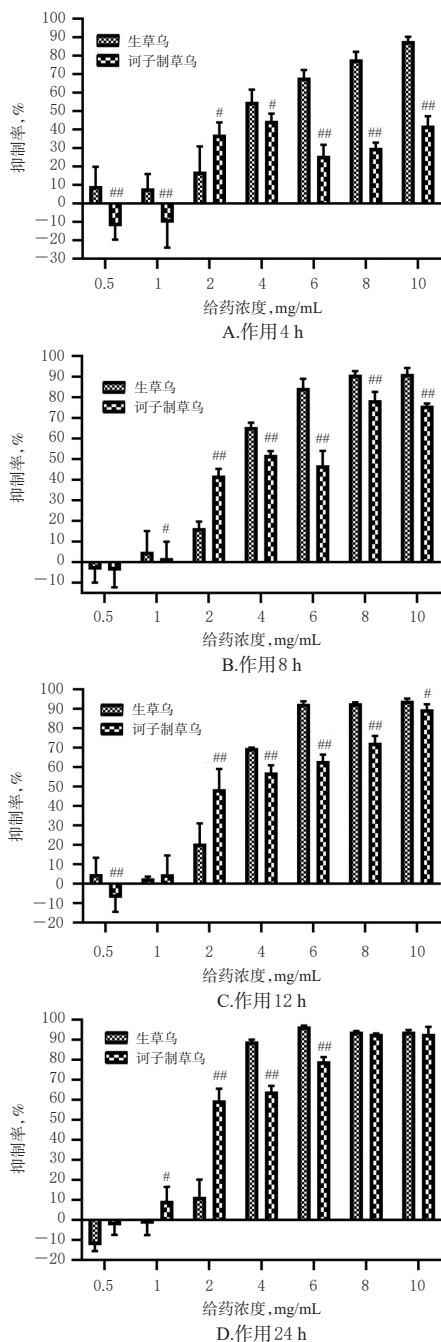
与空白组比较,当质量浓度为2 mg/mL时,生草乌组细胞的荧光强度无明显变化,细胞核形态完整;诃子制草乌组细胞的荧光强度增强,但细胞核完整;当质量浓度为4、6 mg/mL时,生草乌组和诃子制草乌组细胞的荧光强度均明显增强且细胞核面积缩小,其中生草乌组的荧光强度强于诃子制草乌组,且生草乌组的细胞核破碎现象更为严重,而诃子制草乌组的细胞核相对完整。各组细胞形态学特征的荧光显微图见图2。

3.3 RAW264.7细胞存活率的变化

与空白组比较,生草乌质量浓度在0.05~1 mg/mL范围内对RAW264.7细胞无毒性,但达到1.5 mg/mL以后有明显的细胞毒性;诃子制草乌质量浓度在0.05~0.5 mg/mL范围内对RAW264.7细胞无毒性,甚至有一定的促增殖作用,但达到0.75 mg/mL以后有明显的细胞毒性。各组细胞存活率的检测结果见图3。参考上述结果,本研究将后续试验生草乌和诃子制草乌的给药浓度分别均设置为0.05、0.1、0.25、0.5 mg/mL。

3.4 RAW264.7细胞中NO、TNF- α 、IL-6释放量的变化

与空白组比较,模型组细胞中NO、TNF- α 、IL-6的释放量均显著升高($P<0.01$),提示造模成功。与模型组比较,0.25、0.5 mg/mL生草乌组细胞中NO的释放量,0.1、0.25、0.5 mg/mL诃子制草乌组细胞中NO的释放量以及0.05、0.1、0.25、0.5 mg/mL生草乌组和诃子制草乌组细胞中TNF- α 、IL-6的释放量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。其中,诃子制草乌对NO释放量的抑制作用优



注:与相同质量浓度的生草乌给药组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. raw *A. kusnezoffii* group at same concentration, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

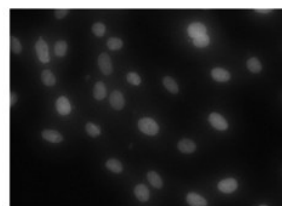
图1 各组细胞不同作用时间的细胞抑制率检测结果 ($n=3$)

Fig 1 Determination results of inhibitory rate of cells in each group at different time ($n=3$)

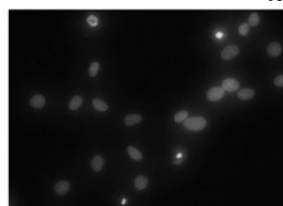
于生草乌,而对TNF- α 、IL-6释放量的抑制作用弱于生草乌。各组细胞中NO、TNF- α 、IL-6释放量的检测结果见图4。

4 讨论

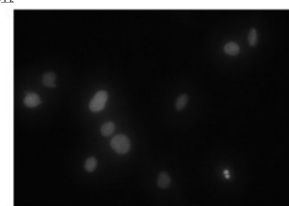
本研究发现,诃子制草乌可延缓草乌的毒性,并维持其抗炎药效,起到“减毒存效”的作用。当质量浓度较小时,诃子制草乌对心肌细胞增殖无抑制作用,甚至还



A.空白组



B.生草乌 2 mg/mL 给药组



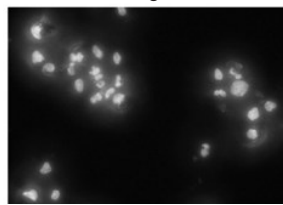
C.诃子制草乌 2 mg/mL 给药组



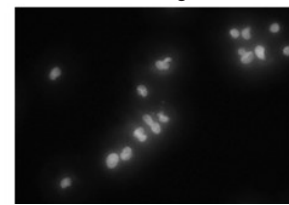
D.生草乌 4 mg/mL 给药组



E.诃子制草乌 4 mg/mL 给药组



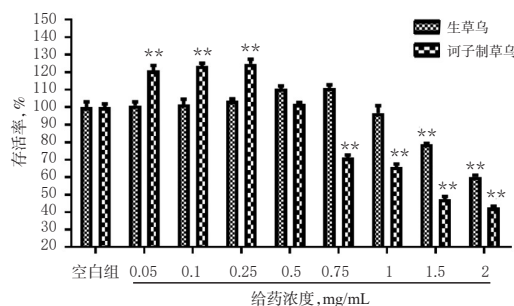
F.生草乌 6 mg/mL 给药组



G.诃子制草乌 6 mg/mL 给药组

图2 各组细胞形态学特征的荧光显微图 (Hoechst 33258 染色, $\times 40$)

Fig 2 Fluorescence micrographs of morphological characteristics of cells in each group (Hoechst 33258 staining, $\times 40$)



注:与空白组比较, ** $P < 0.01$

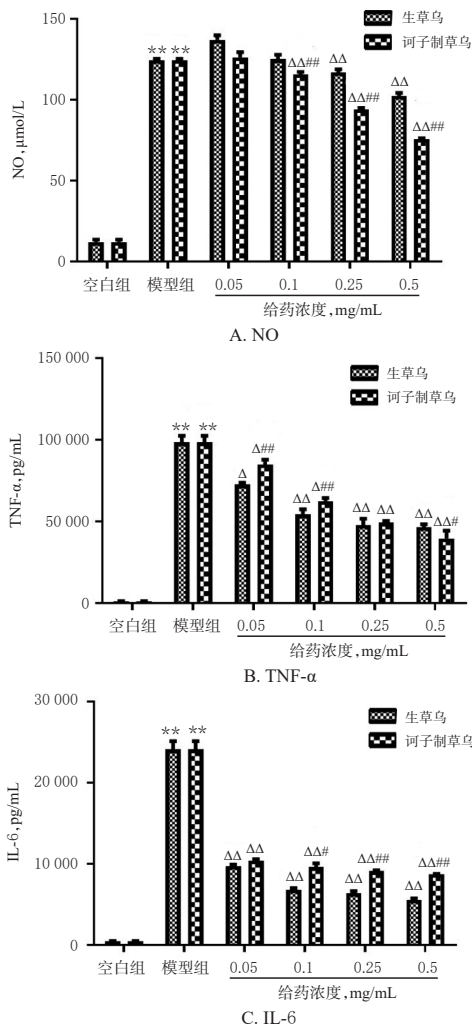
Note: vs. blank group, ** $P < 0.01$

图3 各组细胞存活率的检测结果 ($n=3$)

Fig 3 Determination results of survival rate of cells in each group ($n=3$)

有一定的促生长作用,这可能与诃子本身的强心作用有关^[6]。已有研究表明,诃子制草乌的减毒作用,可能与诃子中的成分抑制草乌中双酯型生物碱的水解和释放有关^[7-8]。本研究结果与文献结果一致。

2 mg/mL是诃子制草乌毒性作用的转折点,该剂量下,诃子制草乌对心肌细胞的抑制作用强于生草乌。本



注:与空白组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$;与相同质量浓度生草乌组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$

Note: vs. blank group, ** $P < 0.01$; vs. model group, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; vs. raw *A. kusnezoffii* group at same concentration, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$

图4 各组细胞中NO、TNF- α 、IL-6释放量的检测结果 ($n=3$)

Fig 4 Determination results of the release amount of NO, TNF- α and IL-6 in cells ($n=3$)

课题组前期研究表明,用清水浸泡的生草乌中双酯型生物碱的含量低于诃子制草乌^[6],说明在水浸泡过程中,双酯碱仍可少量水解,而诃子汤有明显抑制生物碱水解的作用。当给药浓度 ≤ 2 mg/mL时,生草乌中的双酯型生物碱在培养基中部分水解成低毒的单酯碱,而诃子制草乌大部分仍以双酯碱原型存在,加之剂量较小,其缓释作用得不到体现(剂量小于单位时间内的释放量),表现为毒性大于生草乌。

而当剂量开始增加至4 mg/mL以上(此剂量远超过草乌产生毒性的临界剂量)时,生草乌中即使有部分双酯碱水解,其剩余的双酯碱含量仍可致显著毒性,表现为短期内毒性急剧上升,达到峰值后维持稳定;而诃子制草乌由于诃子抑制双酯碱释放的特点,在短时间内,只能部分双酯型生物碱被释放,使药材毒性以比较缓慢

的速度增长,12 h左右方能达到峰值,而后趋于稳定。因此,诃子制草乌的毒性整体上低于生草乌。同时,大于4 mg/mL的剂量又可以分为两部分,其中4~6 mg/mL可视为中剂量,8~10 mg/mL可视为高剂量。中剂量下,诃子制草乌24 h的累积释放量仍然低于生草乌,随着时间延长,二者毒性差距逐渐增大;高剂量下,诃子制草乌24 h的累积释放量可与生草乌相当,二者毒性趋于一致。

本研究结果表明,生草乌和诃子制草乌均能抑制炎症因子NO、TNF- α 、IL-6的释放,但生草乌对NO的抑制作用弱于诃子制草乌,对TNF- α 、IL-6的抑制作用强于诃子制草乌,故结合毒性结果,可以很好的证明生草乌经诃子汤炮制后可达到“减毒存效”的目的。

综上,诃子可显著抑制生草乌的心肌细胞毒性,尤其是中剂量(4~6 mg/mL)使用时,其诃子炮制品能表现出比生草乌更高、更持久的安全性;而当剂量过高(8~10 mg/mL)时,如果持续作用时间较长,其累积毒性作用也能达到与生草乌相当的水平,但在短时间内(4 h以内)的毒性仍明显低于同剂量生草乌。诃子制草乌除能达到减毒作用以外,其抗炎作用也不低于生草乌,但二者对不同炎症指标的抑制作用表现不同,这可能与二者生物碱的组成不同^[12]有关。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:187、236-237.
- [2] 刘爽, 张晓菲, 苗鑫, 等. 蒙药“诃子解草乌毒”的配伍比例研究[J]. 中国药房, 2019, 30(11):1519-1524.
- [3] 魏旭雅, 邱子栋, 陈金龙, 等. 有毒乌头类中药炮制与配伍减毒机制的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(17):3695-3704.
- [4] 陈荣昌, 孙桂波, 张强, 等. 附子毒性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8):1126-1129.
- [5] 赵丽娟, 杜遵义. 诃子在藏蒙药中应用研究的概述[J]. 中国民族医药杂志, 2007, 13(4):31-32.
- [6] 占布拉·道尔吉. 蒙药正典[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社, 1987:208.
- [7] 刘帅, 李飞, 侯跃飞, 等. 诃子中的鞣质成分对诃子汤制草乌的影响-诃子制草乌炮制原理探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5):158-160.
- [8] 刘帅, 刘晓艳, 李妍, 等. 草乌及其炮制品的急性毒性实验研究[J]. 中国药物警戒, 2015, 12(9):513-516, 521.
- [9] 李福全, 李志勇, 王朝鲁, 等. 蒙药草乌毒性研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2011, 17(3):65-67.
- [10] 刘帅. 辅料因素对蒙药诃子制草乌化学成分的影响及炮制减毒原理研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [11] 王琴琴, 韩珊, 李新星, 等. 毛蕊花苷对脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症模型的作用及其机制研究[J]. 中草药, 2020, 51(16):4217-4222, 4250.
- [12] 张晓晨, 郑清阁, 杨菁华, 等. 附子C19二萜生物碱结构及活性研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(2):531-541.

(收稿日期:2020-07-05 修回日期:2020-10-28)

(编辑:邹丽娟)