

乌附经方预处理对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响

李 玲^{1,2} 马瑜红^{1,2} 王素青¹

摘要 目的 观察含乌头、附子、半夏、栝楼乌附经方对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用,探讨含有十八反药物的方剂用于特定病理状态的可行性。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 50 只随机分为 5 组,即:假手术对照组(SH 组)、心肌缺血再灌注模型对照组(I/R 组)、乌附经方低剂量组(I/R + JFL 组)、乌附经方中剂量组(I/R + JFM 组)及乌附经方高剂量组(I/R + JFH 组),每组 10 只。乌附经方低、中、高剂量组分别以 0.75、1.50、3.00 mL/100 g 体质量的剂量灌胃 14 天,浓度 500 g/L;除 SH 组外,其他各组结扎冠状动脉左前降支,使心肌缺血 30 min,再灌注 120 min。透射电镜观察心肌线粒体的超微结构改变;一步法脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)检测各组缺血心肌细胞凋亡;RT-PCR 法测 B 细胞白血病/淋巴瘤-2 基因(B-cell leukemia/lymphoma 2, Bcl-2)、与 Bcl-2 相关的 x 蛋白(Bcl-2 associated x protein, Bax)的 mRNA 表达;ELISA 检测血清乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)活性,并测定心肌梗死面积的大小。**结果** 与 I/R 组比较,乌附经方各组均能降低血清中 LDH、CK 的释放量(且随着剂量的增加 LDH、CK 的释放量递减),减小心肌梗死面积、降低凋亡指数($P < 0.05$);经方组凋亡基因 Bcl-2 表达水平上升, Bax 表达水平下降, Bcl-2/Bax 比值升高。**结论** 乌附经方预处理可能通过减少细胞凋亡,对心肌缺血再灌注损伤产生保护作用。说明“十八反”不是绝对的,而是相对的,含有相反中药的复方制剂可用于缺血性心脏病等特定的病理状态。

关键词 乌头;附子;半夏;栝楼;十八反;缺血再灌注;细胞凋亡

Effects of Preconditioning of Wufu Jingfang on Ischemia/Reperfusion Injury Induced Apoptosis in Rats LI Ling^{1,2}, MA Yu-hong^{1,2}, and WANG Su-qing¹ 1 School of Public Health, Wuhan University, Wuhan (430072), China; 2 Department of Basic Medicine, Nanyang Medical High School, Henan (473003), China

ABSTRACT Objective To observe the protective effect of Wufu Jingfang (WJ, containing *Aconitum carmichaeli* Debx, *Radix Aconiti Lateralis Preparatae*, *Rhizoma Pinelliae*, and snakegourd fruit) on myocardial ischemia-reperfusion injury (I/R) of rats, thus exploring the feasibility of recipes containing eighteen incompatible pairs for specific pathological conditions. **Methods** Fifty male Wistar rats were randomly divided into five groups, i.e., the sham-operative control group (the SH group), the I/R group, the low dose WJ I/R group (the I/R + JFL group), the middle dose WJ I/R group (the I/R + JFM group), the high dose WJ I/R group (the I/R + JFH group), 10 in each group. Rats in the latter three groups were administered with WJ at 0.75 mL/100 g, 1.50 mL/100 g, and 3.00 mL/100 g body weight for 14 consecutive days by gastrogavage. All groups except the SH group received ligation of left anterior descending branch of coronary artery for 30-min ischemia followed by 120-min reperfusion. The micro-structural changes of myocardial mitochondria were observed by transmission electron microscope. The ischemic cardiomyocyte apoptosis was detected in each group using one-step terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL). The mRNA expressions of B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2) and Bcl-

基金项目:南阳市 2009 年科技攻关计划项目(No. 2009GG039)

作者单位:1. 武汉大学公共卫生学院(武汉 430072); 2. 南阳医学高等专科学校基础医学部(河南南阳 473003)

通讯作者:王素青, Tel: 027-68759972, E-mail: swang2099@whu.edu.cn

2 associated x protein (Bax) were detected by RT-PCR. The activities of lactic dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) were detected using ELISA. The myocardial infarct size was detected. Results Compared with the I/R group, WJ pretreatment significantly suppressed the release of LDH and CK (Besides, the release of LDH and CK reduced along with increased dose.), reduced the myocardial infarct size, and lowered myocardial apoptosis index ($P < 0.05$). WJ pretreatment also modulated Bcl-2/Bax ratio by up-regulating Bcl-2 expression level while decreasing Bax expression level. Conclusions WJ pretreatment might protect the heart from I/R injury via decreasing myocardial cell apoptosis. The results suggested that eighteen incompatible pairs is not absolute, but relative. Chinese medical preparation containing opposite Chinese herbs could be used in specific pathological states such as ischemic cardiomyopathy.

KEYWORDS *Aconitum carmichaeli* Debx; *Radix Aconiti Lateralis Preparata*; *Rhizoma Pinellia*; snakegourd fruit; eighteen incompatible pairs; ischemia/reperfusion; apoptosis

中药配伍禁忌在《神农本草经》中已有相关记载^[1],后逐渐形成了被历代医家所推崇的“十八反歌”。然而,对于“十八反”理论中医学术界存在着巨大的分歧,一种观点认为,“十八反”是中医重要的药性理论,必须严格遵循;另一种观点认为,“十八反”没有科学依据,如张仲景《金匱要略》载经方“赤丸”中便同时应用了半夏和乌头。多年来不断有学者报道,在临床实践中,部分相反、相畏中药使用后并未发现明显毒副反应,而且有些具有相辅相成的作用^[2]。

中药十八反配伍禁忌并非单一指相反药对,而是在方剂运用中总结的经验^[3],应用方剂对“半蒺贝薤及攻乌”在病理状态下进行研究尚未见报道。南阳医学高等专科学校附属中医院李家生副教授在中医临床实践中,常将仲景《金匱要略》经方“栝楼薤白半夏汤”、“乌头赤石脂丸”与清代陈修园《时方歌括》载“丹参饮”合方为“乌附经方”,治疗胸痹心痛、胸阳不振、痰浊、淤血、互阻心脉者,合方中同时应用了乌头、附子和半夏、栝楼(瓜蒌),中医辨证认为该合方有宽胸、豁痰、通阳散寒、活血通脉之功效。这种包含“十八反”禁忌药对的乌附经方是否能用于特定的疾病状态,用药后是否有明显疗效,是否会出现明显的毒性反应,值得深入研究。本实验采用心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)模型,初步探讨乌附经方预处理对心肌缺血再灌注的保护作用及其机制。

材料与方法

1 药物 选取张仲景《金匱要略》经方“栝楼薤白半夏汤”、“乌头赤石脂丸”与清代陈修园《时方歌括》载“丹参饮”合方为乌附经方:由栝楼 15 g 薤白 10 g 姜半夏 9 g 蜀椒 3 g 乌头 5 g 制附子 10 g

赤石脂 20 g 丹参 20 g 檀香 10 g 砂仁 6 g 炙甘草 12 g 组成。中药由南阳医学高等专科学校中药饮片加工厂提供,由李家生副教授鉴定。将前述剂量的乌头及制附子置于粗陶制煎药罐中,加水 100 mL,浸泡 20 min 后大火煮开,改文火煎 20 min;其余中药加水 200 mL 浸泡 20 min,置于药罐中与乌头、制附子一同文火继续煎 20 min;滗出药液,药罐中加水 200 mL,再煎 20 min;将两次煎煮所得药液合并,纱布过滤后用量筒测量容量,加少量蒸馏水将浓度调整为 500 g/L。晾至常温后,置 4 ℃ 冰箱备用。给药剂量参照《药理实验方法学》^[4]的人与大鼠剂量对照数据,成人常用剂量为每日 1 剂乌附经方煎剂,即 120 g/天,计算出中剂量组的给药剂量,低、高剂量组分别取其半数 and 倍数剂量。

2 动物 Wistar 大鼠 50 只,雄性,体质量 190 ~ 230 g, SPF 级,购自华中科技大学同济医学院实验动物学部,合格证号 SCXK(鄂)2004-0007。

3 试剂与仪器 试剂:TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)、免疫染色洗涤液、蛋白酶 K、抗荧光淬灭封片液(江苏碧云天生物技术研究)、DAPI(美国 Sigma 公司);大鼠乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)定量检测试剂盒(ELISA 法,美国 Rapidbio 公司);TaKaRa Total RNA 提取试剂盒、TaKaRa Prime-Script One Step RT-PCR Kit Ver. 2 试剂盒(大连宝生物工程(大连)有限公司)等。仪器:BL-420S 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);Fastprep-24 核酸提取仪(美国 MPBIO 公司);PTC-200 PCR 热循环仪(美国 Bio-Rad 公司);DNAJY3 000 + 型多用途电泳仪、凝胶图像分析系统(北京君意东方电泳设备有限公司);Nikon 荧光显微镜(日本光学工业株式会

社);TU-1901 双束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);DMR + Q 550 型病理图像分析系统(德国 Leica 公司);7020 全自动生化分析仪(日本 HITACHI 公司)等。

4 分组及给药 大鼠适应性喂养 3 天后,随机分为 5 组,即:假手术对照组(SH 组)、心肌缺血再灌注模型对照组(I/R 组)、乌附经方低剂量组(I/R + JFL 组)、乌附经方中剂量组(I/R + JFM 组)及乌附经方高剂量组(I/R + JFH 组),每组 10 只。各组动物以普通饲料分笼喂养,每日以灌胃法分别给予:SH 组、I/R 组 1.5 mL/100 g 生理盐水,乌附经方低、中、高剂量组分别按 0.75、1.50、3.00 mL/100 g 体质量给予 500 g/L 合方煎剂。分组喂养 14 天后,称重,300 mg/kg 体质量 2%水合氯醛麻醉后仰位固定于解剖台上,连接 BL-420S 生物机能实验系统,记录每只大鼠的标 II 肢体导联心电图各 1 min,有异常者予以剔除。

4.1 造模及采样 I/R 模型的建立:参照文献[5,6]的造模方法对大鼠行气管插管,KR-200C 型小动物呼吸机辅助呼吸(通气量 1 L/min,EXP/INSP = 1:2,呼吸频率 70 ~ 80 次/min,潮气量 8 ~ 12 mL)。暴露心脏,结扎冠状动脉前降支,在 II 导联心电图见 R 波明显增大伴 ST 段即刻抬高或倒置时,说明心肌已缺血。缺血 30 min,再灌注 120 min。SH 组仅穿线,但不进行冠状动脉结扎,其他各组进行缺血再灌注。每只大鼠自腹主动脉取血 2 mL,供测定血清中 LDH、CK 的含量。每组随机选取 5 只大鼠,于低温条件下快速取出心脏,置于 0 °C 0.9%氯化钠溶液中洗净残血。将缺血区(对照组穿线下相应部位)心肌组织,剪为 3 块,第 1 块组织置于 -80 °C 超低温冰箱迅速冷冻,供检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达;第 2 块组织经 2.5%戊二醛溶液中固定后送检,进而观察心室肌的电镜超微结构;第 3 块组织用 4%多聚甲醛溶液浸泡固定,供检测心肌细胞凋亡指数(apoptotic index, AI)。每组另外 5 只大鼠取心室肌,用 0.9%氯化钠溶液洗去血污,剔除血管、脂肪等非心肌组织,用吸水纸吸去水分,置 -20 °C 冻存。

4.2 心肌酶 LDH 和 CK 的测定 将血清样本立即放入高速冷冻离心机中以 3 000 r/min 离心 5 min;取上清,置于 -20 °C 保存,用大鼠 CK、LDH 定量检测试剂盒(ELASA)检测酶活性。

4.3 透射电镜检查 将固定后的心肌组织送绍兴文理学院,经固定、梯度脱水、包埋及聚合后,做超薄切片,经醋酸双氧铀、枸橼酸铅双重染色各 10 min,用透射电镜观察心肌超微结构,拍照并进行分析。

4.4 心肌梗死面积的测定 心室肌冻存 5 min 后,从心尖至心底横切成厚约为 2 mm 的心室肌组织切片,置于 1%的氯化三苯基四氮唑红(TTC)磷酸缓冲液(pH = 7.4)中,37 °C 温孵 10 min,非心肌梗死区因脱氢酶还原 TTC 而被染色,呈深红色,梗死区因脱氢酶流失无法还原 TTC 而不被染色,呈灰白色。在透明纸上描出轮廓,扫描后接入病理图像分析系统,测定左心室及梗死区面积,计算出梗死面积百分率,梗死面积百分率(%) = 左心室组织切片梗死区面积/左心室组织切片总面积 × 100%。

4.5 一步法脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)测定心肌细胞 AI 将经 4%多聚甲醛固定 12 h 的心肌组织常规石蜡包埋,冰冻切片机制成 2 μm 切片。按照 TUNEL 凋亡检测试剂盒说明书进行操作。用抗荧光淬灭封片液封片后,在荧光显微镜下观察,激发波长为 450 ~ 500 nm,发射波长范围为 515 ~ 565 nm,凋亡细胞核发出绿色荧光,未凋亡细胞发出蓝色荧光。每张切片于缺血部位随机选取 5 个高倍视野(× 200 倍),记录每个视野的绿色荧光心肌细胞核数及蓝色荧光心肌细胞核数,并计算出凋亡心肌细胞总数和心肌细胞总数,计算 AI, AI = 凋亡心肌细胞总数/心肌细胞总数。

4.6 RT-PCR 检测 B 细胞白血病/淋巴瘤-2 基因(B-cell leukemia/lymphoma 2, Bcl-2)及与 Bcl-2 相关的 x 蛋白(Bcl-2 associated x protein, Bax)的 mRNA 表达 检测所用仪器物品均严格按照《现代分子生物学实验技术》^[7]要求准备。(1)总 RNA 提取:按 TaKaRa Total RNA 提取试剂盒说明书进行操作。用 Trizol 提取总 RNA,经紫外分光光度计测定总 RNA 光密度值(optical density, OD) OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀, 比值为 1.8 ~ 2.0,提示 RNA 纯度达到要求。RNA 样品的浓度为:OD₂₆₀ × RNA 稀释倍数 × 40/1 000,单位为 μg/μL。(2)RT-PCR:参照 TaKaRa PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2 试剂盒说明书进行操作。从 NCBI 的 nucleotide 中查得目的基因和内参照基因,由上海生工生物工程有限公司设计合成引物(表 1)。(3)产物检测及分析:PCR 结束后,每管各取 PCR 产物 6 μL,加入 6 × 溴酚蓝上样缓冲液 1 μL 混合后,上样于 2%琼脂糖凝胶上进行稳压电泳,电压 7 V/cm,电泳 45 min 后,在凝胶成像分析系统下电泳条带,观察并拍摄图像,确定所分离的片段符合预期长度。半定量检测各组

Bcl-2、Bax mRNA 的表达量。

表 1 实验中用到的引物及序列参数

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增长度 (bp)
bax	上游 GTCCAGCCCATGATGGTTCT	257
	下游 TCCACCAAGAAAGCTGAGCGA	
bcl-2	上游 CCGCATGCCTGGGGCCGTACAGTTCC	318
	下游 CGACGACTTCTCCCGCCGTACCGC	
β-actin-	上游 ATGTACACGACGATTTCCCGC	500
	下游 GGCATGGGTCAGAAGGATTCC	

5 统计学方法 实验原始数据采用 SPSS 18.0 统计软件对收集到的数据进行统计处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,分别进行成组资料的 t 检验和析因设计资料的方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

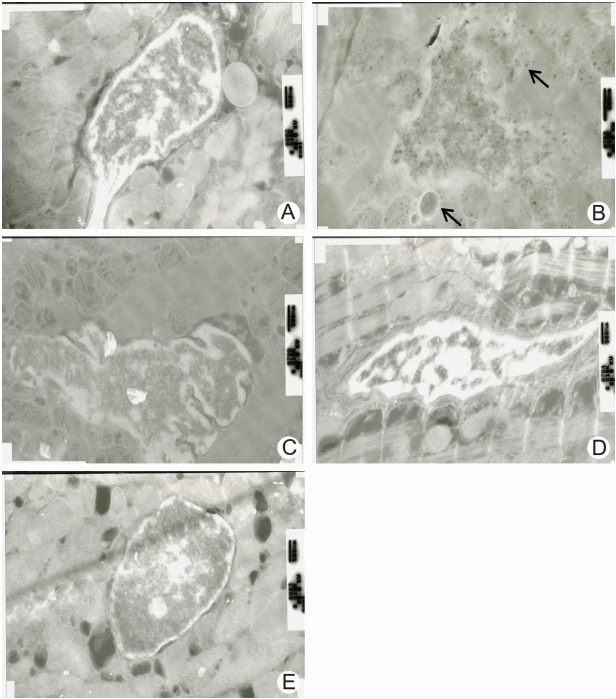
1 各组大鼠血清 LDH、CK 比较(表 2) 与 SH 组比较,I/R 组大鼠血清中 LDH、CK 的水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 I/R 组比较,乌附经方低、中、高剂量组大鼠血清中 LDH、CK 的水平均有所降低($P < 0.05$),且随着剂量的增加,LDH、CK 的释放量递减,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠血清 LDH、CK 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LDH(U/L)	CK(U/mL)
SH	10	1 980.25 ± 122.70	0.72 ± 0.18
I/R	10	7 530.62 ± 163.01 *	7.76 ± 0.54 *
I/R + JFL	10	6 201.34 ± 539.77 Δ	5.67 ± 0.39 Δ
I/R + JFM	10	5 124.44 ± 595.87 $\Delta\Delta$	4.47 ± 0.79 $\Delta\Delta$
I/R + JFH	10	3 474.88 ± 498.63 $\Delta\Delta\Delta$	3.07 ± 0.69 $\Delta\Delta\Delta$

注:与 SH 组比较,* $P < 0.05$;与 I/R 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 I/R + JFL 组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$;与 I/R + JFM 组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.05$

2 各组大鼠心肌细胞超微结构比较(图 1) SH 组的心肌细胞核完好,线粒体数量正常、包膜完整,嵴排列连续、整齐;I/R 组少见细胞核,核膜缺损,核内染色质散乱,似可见凋亡小体形成(图 1B 中箭头所指处),线粒体内无嵴结构;I/R + JFL 组心肌细胞核膜有多处断裂,核仁内陷,核形态不规则,线粒体数量增多,内有少量空泡,嵴尚可见;I/R + JFM 组细胞膜完整,核膜清晰,核内染色质浓缩,形成染色质块,聚集在核中央;I/R + JFH 组细胞核完整,胞膜清晰,线粒体无增多,嵴清晰可见。乌附经方预处理各组的线粒体及细胞核损伤程度与 I/R 组相比明显减轻,且剂量愈大,损伤程度愈轻。



注:A 为 SH 组;B 为 I/R 组;C 为 I/R + JFL 组;D 为 I/R + JFM 组;E 为 I/R + JFH 组;箭头所指为凋亡小体

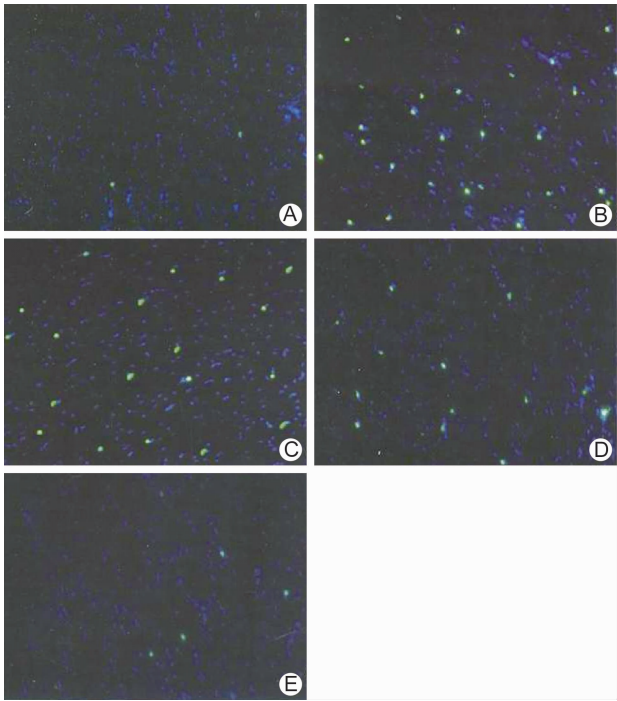
图 1 各组大鼠心肌细胞超微结构图
(透射电镜,×20 000)

3 各组大鼠心肌缺血导致的细胞凋亡和心肌梗死面积比较(图 2,表 3) 荧光显微镜下正常心肌细胞核呈蓝色荧光,着色浅而均匀;凋亡细胞核固缩,浓集成球状,或碎裂为不规则状,呈现明亮的绿色强荧光反应;坏死细胞无荧光反应,DAPI 标记的细胞核呈现深蓝色荧光反应;将二者叠加后,可见凋亡细胞处有蓝色和绿色融合现象。SH 组有散在的绿色荧光染色细胞核,少量的深蓝色染色细胞核;I/R 组的 TUNEL 阳性染色细胞明显增多,深蓝色染色细胞核也较多;I/R + JFL 组、I/R + JFM 组、I/R + JFH 组的 TUNEL 阳性染色细胞均较 I/R 组少,且随着预处理用药剂量的递增,绿色荧光染色细胞核数递减。与 SH 组比较,I/R 组大鼠心肌梗死面积明显增多,AI 明显上升($P < 0.05$);与 I/R 组比较,乌附经方预处理各剂量组心肌

表 3 乌附经方对心肌梗死面积和 AI 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	梗死面积(%)	AI(%)
SH	5	0.00 ± 0.00	2.84 ± 1.06
I/R	5	43.11 ± 3.03 *	21.82 ± 2.32 *
I/R + JFL	5	37.01 ± 2.74 Δ	17.69 ± 2.12 Δ
I/R + JFM	5	25.75 ± 3.94 $\Delta\Delta$	15.01 ± 1.68 $\Delta\Delta$
I/R + JFH	5	20.41 ± 3.28 $\Delta\Delta\Delta$	12.92 ± 2.95 $\Delta\Delta\Delta$

注:与 SH 组比较,* $P < 0.05$;与 I/R 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 I/R + JFL 组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$;与 I/R + JFM 组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.05$



注:A 为 SH 组;B 为 I/R 组;C 为 I/R + JFL 组;D 为 I/R + JFM 组;E 为 I/R + JFH 组

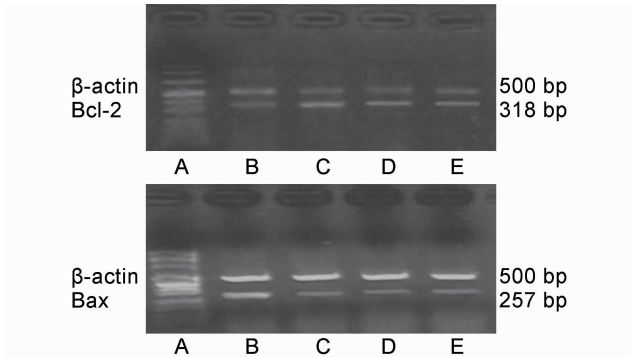
图2 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡情况(荧光染色, ×200)

梗死面积减少、AI 降低($P < 0.05$);中、高剂量组较低剂量组心肌梗死面积减小,AI 降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);高剂量组较中剂量组梗死面积显著减少($P < 0.05$),而 AI 与之比较,差异无统计学意义。

4 各组心肌凋亡蛋白 Bcl-2、Bax mRNA 的表达比较(表 4,图 3) 利用 RT-PCR 方法在 I/R 组及乌附经方预处理低、中、高剂量各组大鼠的心肌组织中,检测到了 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达。与 SH 组比较,I/R 组 Bcl-2 mRNA 表达水平下降,Bax mRNA 表达水平上升,Bcl-2/Bax 比值下降($P < 0.05$);与 I/R 组比较,各给药组 Bcl-2 mRNA 表达水平均上升,Bax mRNA 表达水平均下降,Bcl-2/Bax 比值均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而乌附经方预处理低、中、高剂量各组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 4 各组心肌凋亡蛋白 Bcl-2、Bax mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA	Bcl-2/bax
SH	5	1.51 ± 0.11	0.37 ± 0.02	4.08 ± 0.06
I/R	5	0.53 ± 0.03 *	0.82 ± 0.05 *	0.65 ± 0.05 *
I/R + JFL	5	1.42 ± 0.05 Δ	0.42 ± 0.03 Δ	3.38 ± 0.03 Δ
I/R + JFM	5	1.45 ± 0.03 Δ	0.44 ± 0.04 Δ	3.30 ± 0.02 Δ
I/R + JFH	5	1.39 ± 0.04 Δ	0.40 ± 0.03 Δ	3.48 ± 0.04 Δ

注:与 SH 组比较,* $P < 0.05$;与 I/R 组比较, $\Delta P < 0.05$



注:A 为 Mark;B 为 I/R 组;C 为 I/R + JFL 组;D 为 I/R + JFM 组;E 为 I/R + JFH 组

图3 各组 Bcl-2、Bax mRNA 水平的电泳分析图

讨 论

I/R 损伤是心血管临床常见现象,多见于心肌梗死溶栓治疗、冠状动脉介入治疗、心肺复苏、冠状动脉搭桥术以及心脏移植等过程^[8]。I/R 后不仅心脏正常的生理功能受到破坏,而且心肌的组织结构也发生了病理性改变。细胞凋亡是心肌细胞早期受损的主要形式,I/R 法诱发细胞凋亡已为众多实验证实^[9-12]。

心肌酶含量为心肌损伤的重要标志,特别是 CK 和 LDH 是目前临床诊断心肌缺血和心肌梗死的主要参考指标;心肌组织病理学改变是评价药物是否对 I/R 具有保护作用较为直接的证据;TUNEL 法是分子生物学与形态学相结合的研究方法,对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色,能准确地反应细胞凋亡典型的生物化学和形态特征,在细胞凋亡的研究中被广泛采用;Bax 是一种促凋亡基因,而 Bcl-2 是一种凋亡抑制基因,两者间相互作用调控细胞凋亡,Bcl-2/Bax 的比值可决定细胞对凋亡信号的敏感性,Bcl-2 蛋白表达超过 Bax 蛋白时抑制凋亡,Bax 蛋白表达超过 Bcl-2 蛋白时则促进凋亡^[13]。本实验中心肌酶 LDH、CK 检测,电镜观察、细胞凋亡检测及 Bax、Bcl-2 基因表达结果均较为一致地显示:乌附经方预处理对 I/R 所致大鼠心肌细胞凋亡具有保护作用。

药理学认为“药物”与“毒物”是一对孪生兄弟,并没有本质的区别,适量为“药”,过量为“毒”^[14]。乌头、附子药理作用的主要靶器官是心血管,其主要作用是强心、抗心律失常、抗心肌缺氧和抗凝血作用^[15,16]。早在被誉为“方书之祖”的《伤寒杂病论》中,医圣张仲景就有应用半夏与乌头这对相反药的记载,有报道附子与半夏在临床上用于心肌梗塞等疾病有奇效^[17],万氏认为姜半夏与制附子配用后无增毒作用,在常用剂

量时可以服用^[18]。朱氏用中医学理论分析认为,附子走而不守,通行十二经脉,具峻补下焦元阳、驱逐在里寒湿之功;半夏豁痰逐饮,消痞散结,降浊止呕,降气平喘,具温化痰饮水邪之效。两者配伍,辛开燥降,相辅相成,散脏腑经络、肌表上下的痰饮停滞,使阴寒得散,脾肾得温,水湿得化,痰饮得消,则阳虚痰浊痞呕诸症自除^[19]。另一方面,诸多文献记载,附子与甘草合用后强心升压作用显著而持久,毒性明显降低^[20-24],乌附经方中的炙甘草对乌头、附子可以起到减毒增效的作用。根据实验研究结果,我们可以推测,十八反的禁忌并不是绝对的,研究结果除与制剂方法、药物种类、配伍比例、给药途径、动物种类、机体状况等诸多因素有关外,还需有合理的方剂配伍,并用于特定的病理状态下,方可产生独特的疗效。

参 考 文 献

- [1] 孙星衍,孙冯翼.神农本草经(线装本)[M].池阳,周学海据孙氏本校刻本,清光绪十七年丁卯:42-48.
- [2] 姜利鲲,黄文权.中药“十八反临床应用概述”[J].中国中医急症, 2007, 16(5): 602-603.
- [3] 王宇光,高月.中药十八反药理毒理研究进展[J].中国实验方剂学杂志, 2003, 9(3): 60-63.
- [4] 徐叔云.药理实验方法学[M].第3版.北京:人民卫生出版社, 2003:1861.
- [5] 齐志敏.大鼠心肌缺血再灌注损伤模型几种开胸方法评述[J].锦州医学院学报, 2004, 25(6): 73-74.
- [6] 陈业农,周逸平,汪克明,等.急性心肌缺血再灌注损伤大鼠模型制备方法的改进与评价[J].中国中医急症, 2008, 17(3): 359-360.
- [7] 魏春红,李毅.现代分子生物学实验技术[M].北京:高等教育出版社, 2006:49-53.
- [8] 李健,冯义柏,田莉,等.吡格列酮预处理对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡细胞凋亡和线粒体超微结构的影响[J].临床心血管病杂志, 2008, 24(8): 620-624.
- [9] Gottlieb RA, Bureson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes[J]. J Clin Invest, 1994, 94(4): 1621-1628.
- [10] Samste A, Pulkki K, Kallajoki M, et al. Apoptosis in human acute myocardial infarction[J]. Circulation, 1997, 95(2): 320-323.
- [11] Mattson MP, Kroemer G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection[J]. Trends Mol Med, 2003, 9(5): 196-205.
- [12] Broeheriou V, Hagege AA, Oubenaissa A, et al. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury[J]. Gene Med, 2000, 2(5): 326-333.
- [13] Misao J, Kearney M, Bortman S, et al. Expression of Bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction[J]. Circulation, 1996, 94(7): 1506-1512.
- [14] 李玲,李志毅.药理学[M].西安:第四军医大学出版社, 2011:399.
- [15] 阎爱荣,张宏.附子的药理研究[J].中国药物与临床, 2008, 8(9): 745-747.
- [16] 沈丕安.中药药理与临床应用[M].北京:人民卫生出版社, 2006:945-951.
- [17] 李永清.附子与半夏、瓜蒌配伍使用的体会[J].内蒙古中医药, 2006;5(16): 16.
- [18] 万国庆.半夏反附子之说不能成立[J].中国医院药学杂志, 1991(6): 266.
- [19] 朱林平,李志强,李侠.附子、半夏配伍研究[J].中成药, 2007, 29(12): 1817-1818.
- [20] 李波,吴美兰,周昕欣,等.中药毒性产生的原因及减毒方法[J].中医杂志, 2006, 47(10): 788.
- [21] 邵立立,王均宁,张成博.经方中相制配伍抑减附子毒性探析[J].山东中医药大学学报, 2010, 34(5): 401-402.
- [22] 黄超,张学顺,朱日然.附子、半夏现代药理学研究进展及配伍变化[J].中国药业, 2012, 21(4): 19-21.
- [23] 顾树祥.附子伍半夏的普遍性及临床疗效[J].中医临床研究, 2010, 2(16): 31-33.
- [24] 陈长勋,徐姗姗.甘草、干姜与附子配伍减毒的物质基础与作用环节研究进展[J].中药新药与临床药理, 2006, 17(6): 472-476.

(收稿:2012-08-16 修回:2013-01-14)