

甘草配伍大戟的体外肝毒性研究

吴秀稳¹, 彭玉帅¹, 王如峰^{1*}, 刘莉嘉¹, 杨鑫¹, 张陆军², 刘辰¹

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 中国医药集团总公司, 北京 100191

摘要: **目的** 研究甘草和大戟配伍的体外肝毒性。**方法** 采用显微观察法和 MTT 法检测不同浓度的甘草单煎液、大戟单煎液、甘草-大戟合煎液和甘草-大戟单煎混合液对人肝癌细胞 HepG2 增殖的影响, 并比较大戟单煎液、甘草-大戟合煎液和甘草-大戟单煎混合液相当浓度下细胞毒性的影响。**结果** 大戟单用及大戟与甘草配伍均有细胞毒性, 且呈剂量相关性; 与大戟单煎液相比, 甘草-大戟单煎混合液细胞毒性无明显差异, 甘草-大戟合煎液细胞毒性减小。**结论** 甘草和大戟配伍导致大戟的体外肝毒性减小。

关键词: 甘草; 大戟; 肝毒性; MTT

中图分类号: R994

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2014)02-0122-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.02.006

In vitro hepatotoxicity of compatibility of *Glycyrrhizae Radix* and *Euphorbiae Pekinensis Radix*

WU Xiu-wen¹, PENG Yu-shuai, WANG Ru-feng¹, LIU Li-jia¹, YANG Xin¹, ZHANG Lu-jun², LIU Chen¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. China National Pharmaceutical Group Corporation, Beijing 100191, China

Abstract: **Objective** To study the hepatotoxicity of compatibility of *Glycyrrhizae Radix* (GR) and *Euphorbiae Pekinensis Radix* (EPR) *in vitro*. **Methods** Microscopic observation and MTT assay were employed to evaluate the effects of GR, EPR, GR-EPR decoction, and GR-EPR mixture at different concentration on the proliferation of human hepatoma cell line HepG-2, and their cytotoxicities were compared. **Results** Both EPR and compatibility of GR-EPR exhibited the inhibitory effect on cell proliferation in a dose-dependent manner. Compared with EPR, GR-EPR decoction showed lower cytotoxicity, while the GR-EPR mixture was almost as cytotoxic as EPR. **Conclusion** Compatibility of GR and EPR could reduce the hepatotoxicity.

Key words: *Glycyrrhizae Radix*; *Euphorbiae Pekinensis Radix*; hepatotoxicity; MTT

中药“十八反”是中药药性理论的重要组成部分, 是中药七情中“相反”这一配伍关系的具体体现^[1]。相反是指两种药物合用, 能产生毒性反应或副反应, 或者降低药效。中药“十八反”是传统中药配伍禁忌的重要内容之一, 自陶弘景的《本草经集注》对此有明确记载以来^[2], “十八反”被历代医家所重视, 从本草文献到医学教材再到国家药典中均注明“十八反”药对不宜同用。但是, 在古今临床实践中也一直有相反药物同用的经验, 在遣方用药中应用“十八反”药对配伍治疗某些疑难病症的例证并不罕见^[3-4], 医家们对此也各执看法, 未能给

出科学合理的解释。在现代临床实践中, 部分相反中药使用后并未发现明显的毒副作用, 且有相反相成的作用^[5-7]。“十八反”是否绝对禁忌, 无论是文献记载, 还是临床应用和实验研究, 均无定论, 因此, “十八反”仍然是存在争议的问题。

甘草 *Glycyrrhizae Radix* 和大戟 *Euphorbiae Pekinensis Radix* 配伍属于“十八反”配伍禁忌药对之一, 二者配伍对实验动物心脏、肝脏、肾脏组织的影响较单味药物明显增强, 导致丙氨酸氨基转移酶、尿素、肌酐、磷酸肌酸激酶、乳酸脱氢酶、 γ -羟丁酸脱氢酶比单用明显升高^[8-9]。有研究进一步

收稿日期: 2013-09-30

基金项目: 北京中医药大学自主选题项目“大戟的主要化学成分及其人肠内菌转化研究”

作者简介: 吴秀稳, 在读硕士研究生, 从事中药化学成分研究。Tel: (010)84738646 E-mail: wuxiuwen0725@126.com

*通信作者 王如峰 Tel: (010)84738646, E-mail: wangrufeng@tsinghua.org.cn

报道,二者配伍后,甘草抑制 CYP3A2,而大戟抑制 CYP1A2,二者共同的作用可能使大戟的毒性成分代谢减慢、蓄积而使毒性作用表现明显^[10-11]。但是,以上研究仅是基于间接指标来反映或推测甘草大戟配伍前后毒性的变化,缺乏直接的细胞或组织损伤证据,为此,本实验通过直接显微观察法和 MTT 法研究了甘草和大戟配伍对人肝癌细胞 HepG2 的形态及增殖的影响,以期为二者配伍的毒性机制提供直接证据。

1 材料

1.1 药材

甘草和京大戟均购自河北省安国药材市场,由北京中医药大学中药学院王如峰副教授鉴定,甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根及根茎,京大戟为大戟科大戟属植物大戟 *Euphorbia pekinensis* Rupr. 的干燥根。

1.2 细胞株

来源于人的肝癌细胞株 HepG2,购自北京协和医科大学细胞资源中心。

1.3 试剂

溴化二甲噻唑二苯四氮唑 (MTT) 和二甲基亚砷 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司; RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清 (FBS) 购自杭州四季青生物材料研究所;青-链霉素购自美国 Corning 公司;胰酶购自美国 Hyclone 公司;其他试剂皆为国产分析纯,实验用水为自制三蒸水。

1.4 仪器

MCO—18AIC 二氧化碳培养箱 (日本 SANYO 公司);尼康 TE2000S 型倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司);SpectraMax 190 酶联免疫检测仪 (美国 MDS 公司);JB—CJ—1500 超净工作台 (北京昌平长城空气净化设备工程公司);Heal Force Neofuge 15R 台式高速冷冻离心机 (上海圣科仪器设备有限公司);LLA 超声冰点渗透压仪 (德国格林德公司北京分公司)。

2 方法与结果

2.1 药液制备

2.1.1 甘草、大戟单煎液的制备 取甘草 1 g, 10 倍量去离子水浸泡 60 min, 加热微沸水煎 2 次, 每次 0.5 h, 随时补水。提取液 15 000 r/min 离心 2 次, 每次 10 min。取上清液, 加水稀释至 16.7 mL, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 得到 60 mg/mL 甘草单煎液, 加无菌水稀释成 30.00、26.25、22.50、18.75、15.00、

11.25 mg/mL, 备用。取大戟 1 g, 10 倍量去离子水浸泡 60 min, 加热微沸水煎 2 次, 每次 0.5 h, 随时补水。提取液 15 000 r/min 离心 2 次, 每次 10 min。取上清液, 加水稀释至 50 mL, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 得到 20 mg/mL 的大戟单煎液, 加无菌水稀释成 10.00、8.75、7.50、6.25、5.00、3.75 mg/mL, 备用。

2.1.2 甘草 - 大戟合煎液的制备 取甘草 0.9 g、大戟 0.3 g, 10 倍量去离子水浸泡 60 min, 加热微沸水煎 2 次, 每次 0.5 h, 随时补水。提取液 15 000 r/min 离心 2 次, 每次 10 min, 取上清液, 加水稀释至 15 mL, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 得到 80 mg/mL 的甘草 - 大戟合煎液, 加无菌水稀释成 40.00、35.00、30.00、25.00、20.00、15.00 mg/mL, 备用。

2.1.3 甘草 - 大戟单煎混合液的制备 将适量 60.00 mg/mL 甘草单煎液和 20.00 mg/mL 大戟单煎液等体积混合, 得到 40.00 mg/mL 的甘草 - 大戟单煎混合液, 加无菌水稀释成 35.00、30.00、25.00、20.00、15.00 mg/mL, 备用。

2.2 细胞培养

将复苏的 HepG2 细胞于 RPMI-1640 培养液 (含 10% 胎牛血清和 1% 双抗), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中静置培养。细胞生长至 80% 汇合后, 按 1:3 比例传代, 每 3~4 天传代 1 次。

2.3 渗透压测定

取 180 μL 新鲜 RPMI-1640 培养液, 加入 20 μL 上述配制好的不同质量浓度的药液或无菌水, 混合均匀, 用渗透压测定仪测定含药培养液和空白培养液的渗透压。空白培养液的渗透压为 264 mOsm/kg, 各实验组结果见表 1。

表 1 各实验组的渗透压

Table 1 Osmotic pressures of each experimental group

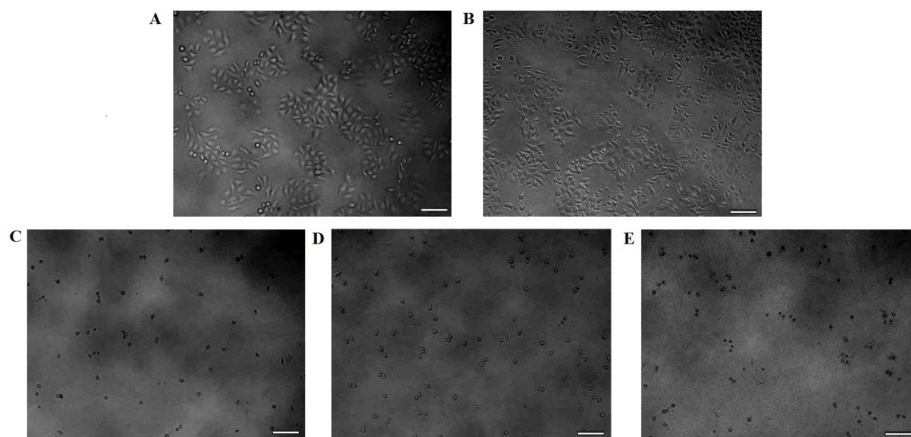
组别	渗透压/(mOsm·kg ⁻¹)	
	最高浓度	最低浓度
甘草单煎液	292	275
大戟单煎液	283	279
甘草 - 大戟合煎液	280	264
甘草 - 大戟单煎混合液	269	267

从表 1 可知, 不同剂量含药培养液的渗透压均在 260~300 mOsm/kg, 而大多数哺乳动物细胞培养的渗透压要求在 260~320 mOsm/kg^[12], 因此, 药液的加入对细胞生长产生的影响不是由于渗透压的不当造成的, 而是药物自身在发挥作用。

2.4 显微观察

取对数生长期的 HepG2 细胞, 按细胞浓度 3×10^4 个/mL, 100 μ L/孔接种于 96 孔板中, 根据实验分组分别加入甘草单煎液、大戟单煎液、甘草-大戟合煎液和甘草-大戟单煎混合液的终质量浓度依次为 3、1、4、4 mg/mL, 空白对照组加入 180 μ L RPMI-1640 培养液和 20 μ L 无菌水。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的孵箱中培养 24 h 后, 于倒置相差显微镜 10 倍物镜下观察细胞数目及细胞形态的变化, 并使用 Nikon NIS-Element BR 图像分析系统成像。

结果见图 1, 甘草单煎液组细胞生长良好, 细胞形态正常, 大小均一, 细胞数目与阴性对照组差别不明显, 而大戟单煎液组、甘草-大戟合煎液组和甘草-大戟单煎混合液组的细胞明显皱缩, 细胞数目明显减少, 与空白对照组和甘草单煎液组细胞差别较大。这说明甘草单煎液基本无毒, 对细胞生长无影响, 而另外 3 组由于大戟的存在而表现出细胞毒性。相同浓度下, 大戟单煎液组、甘草-大戟合煎液组和甘草-大戟单煎混合液组的细胞形态差别不大, 甘草-大戟合煎液组细胞形态略好。



A-空白对照组; B-甘草水煎液组; C-大戟水煎液组; D-甘草-大戟合煎液组; E-甘草-大戟单煎混合液组; 比例尺=1 000 μ m

A-blank control; B-aqueous decoction of GR; C-aqueous decoction of EPR; D-GR-EPR decoction; E-GR-EPR mixture; bar = 1 000 μ m

图 1 各实验组显微观察结果

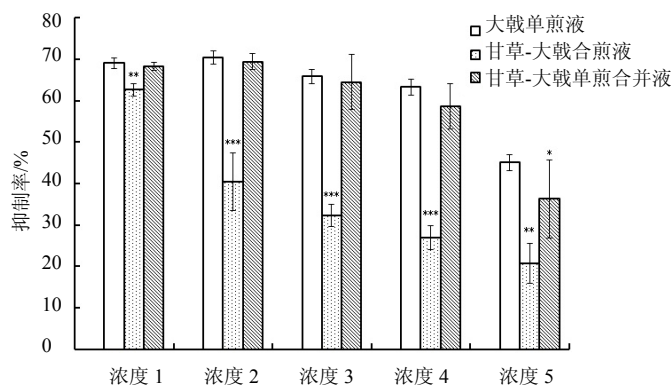
Fig. 1 Microscopic observation of each experimental group

2.5 MTT 检测

取对数生长期的 HepG2 细胞, 制成密度为 3×10^4 个/mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔板中培养, 每孔 100 μ L。分为不同剂量加药组和空白对照组, 每组设 4 个平行孔。细胞贴壁后, 弃去旧的培养液, 依次加入 180 μ L 新鲜培养液, 20 μ L 不同浓度的药液或 20 μ L 无菌水, 混匀。药物作用于细胞 24 h 后, 弃去含药培养液, 每孔加入 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液 100 μ L, 混匀。继续培养 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 震荡 10 min 使结晶充分溶解。用酶标仪测定每孔的吸光度 (A) 值, 波长为 490 nm。根据测得的 A 值计算细胞存活率, 再采用下式计算细胞抑制率:

$$\text{细胞抑制率} = (1 - \text{加药组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值})$$

应用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 t 检验, 结果见图 2。结果表明, 甘草 (0~3 mg/mL) 对 HepG2 细胞的增殖没有明



浓度 1~5 中, 大戟单煎液依次为: 1、0.875、0.75、0.625、0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 甘草-大戟合煎液和甘草-大戟单煎合并液分别依次为: 4、3.5、3、2.5、2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与大戟单煎液组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ Concentration 1—5, aqueous decoction of EPR was 1, 0.875, 0.75, 0.625, 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; GR-EPR decoction and GR-EPR mixture were 4, 3.5, 3, 2.5, 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs aqueous decoction of EPR

图 2 不同水煎液对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effects of different decoctions on proliferation of HepG2 cells

显抑制作用,细胞存活率都在85%以上,因此,甘草对HepG2细胞没有毒性。而大戟、大戟配伍甘草可以抑制HepG2细胞的增殖,且随着大戟生药浓度的增加,这种增殖抑制作用逐渐增强,呈现明显的量效关系。无论是大戟单煎液,还是甘草-大戟合煎液和甘草-大戟单煎混合液均有明显的细胞毒性作用。甘草-大戟单煎混合液的细胞毒性与大戟单煎液的细胞毒性相当($P>0.05$),只有在2 mg/mL时甘草-大戟单煎混合液的毒性略低于大戟单煎液的毒性($P<0.05$)。表明甘草-大戟单煎混合液的细胞毒性只是由大戟引起的,也就是说,大戟单煎液中加入甘草单煎液对大戟的细胞毒性基本没有影响。然而,在上述5个质量浓度下,甘草-大戟合煎液的毒性均明显低于大戟单煎液的毒性($P<0.01$),说明大戟和甘草合煎后导致大戟的毒性降低。

3 讨论

本实验从形态学和细胞活力的角度对甘草和大戟配伍的细胞毒性进行了比较,但是,并没有发现甘草配伍大戟后导致细胞毒性增加,相反,发现甘草与大戟合煎具有减缓大戟毒性的作用。而这种作用是基于二者合煎造成的,二者单煎后再合并则不然,提示在合煎过程中可能发生了某些化学变化,导致毒性成分的破坏,或者抑制了毒性成分的溶出。这虽然有悖于人们传统认识的“十八反”理论,但是与大戟“有小毒”和甘草“清热解毒,调诸药”的性质相符。当然,本实验的研究结果仅是基于体外细胞试验,不能完全代表药物在体内与机体作用的实际情况。本研究的结果提示,对甘草和大戟配伍禁忌的研究不能只集中于毒理学方面,应该结合药效学和体内药动学等进行综合考虑,如有研究报道^[13],甘草和大戟配伍后能够减弱大戟的“峻下”作用,降低其药效。这与大戟的“峻下”和甘草“甘缓”功效相符。

“中药十八反”是中医理论中一个古老而神秘的组成部分,对其合理性及作用机制的探讨一直是科研工作者的兴趣所在。然而,迄今为止,对“十八反”的认识还不够深入,争议颇多。对其研究的广

度也有待拓宽,目前主要是试图通过证明相反药对配伍后毒性增加或药效减弱来证明“十八反”的合理性及作用机制,研究中也可能存在一些先入为主的因素。中医理论强调整体观和辨证施治,对“十八反”的认识也应该结合药对配伍后产生的化学成分与人体的相互作用,并充分考虑个体差异进行客观的综合研究。

参考文献

- [1] 高建联, 苗明三. “十八反”药理毒理研究现状、存在问题及研究思路 [J]. 中医学报, 2010, 25(3): 483-486.
- [2] 唐于平, 吴启成, 丁安伟, 等. 对中药“十八反”、“十九畏”的现代认识 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(6): 79-81.
- [3] 宿树兰, 段金廛, 李文林, 等. 基于物质基础探讨中药“十八反”配伍致毒/增毒机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 123-130.
- [4] 杨环, 范欣生, 尚尔鑫, 等. “十八反”甘草与甘遂、芫花、大戟反药配伍的方剂特点分析 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(3): 620-623.
- [5] 王延章. 辨证新治肺癆 102 例临床疗效观察 [J]. 四川中医, 1994, 13(1): 22-23.
- [6] 李雪飞. 甘草-大戟配伍的血清药物化学研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [7] 刘青, 邓毅, 宁艳梅. 中药“十八反”配伍研究进展 [J]. 甘肃中医, 2007, 20(11): 11-12.
- [8] 黄文权, 程相岭, 肖鸿, 等. 中药十八反中部分禁忌中药的毒理实验研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2001, 24(1): 45-47.
- [9] 李冠军. 甘草反大戟的试验研究 [J]. 畜牧与饲料科学, 2011, (2): 7-8.
- [10] 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.
- [11] 何益军, 石苏英, 金科涛, 等. 甘草与大戟甘遂芫花配伍对大鼠肝脏细胞色素P4501A2酶活性的影响 [J]. 中国药物与临床, 2007, 7(4): 278-280.
- [12] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996: 20.
- [13] 丁爱华, 华永庆, 段金廛, 等. 甘草与大戟、甘遂、芫花的反药组合对大鼠离体回肠运动的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(4): 345-349.