

含与不含朱砂的万氏牛黄清心丸对高热惊厥大鼠模型的影响

陈 斌¹, 李飞艳¹, 李福元¹, 陈北阳²

1. 湖南中医药高等专科学校, 湖南 株洲 412012

2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410007

摘要: 目的 比较含与不含朱砂的万氏牛黄清心丸的抗惊厥作用。方法 制备大鼠高热惊厥模型, 记录模型大鼠给予万氏牛黄清心丸(1号方)、去除朱砂的万氏牛黄清心丸(2号方)、酸枣仁替代朱砂的万氏牛黄清心丸(3号方)后的惊厥潜伏期; 取大鼠海马切片, HE染色和尼氏染色, 观察海马CA1、CA2、CA3区神经元形态并海马神经元计数; 以安宫牛黄丸作为阳性对照。结果 随着惊厥诱导次数的增加, 各组动物惊厥潜伏期均延长, 与模型组比较, 各给药组不同程度地延长惊厥潜伏期; 与1号方比较, 2号方及3号方各剂量组大鼠惊厥潜伏期均无明显差异; 模型大鼠海马各区神经元形态发生明显的病理改变, 1号方能明显增加模型大鼠海马神经元数目, 与模型组比较差异非常显著; 2号方和3号方对海马神经元的影响与1号方无明显差异。结论 1号方、2号方和3号方均有明显的抗惊厥作用, 三者作用无明显差异。

关键词: 万氏牛黄清心丸; 朱砂; 酸枣仁; 抗惊厥; 神经元

中图分类号: R282.5; R971.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2502-05

Effects of Wanshi Niu Huang Qingxin Pill containing cinnabar or not on convulsive of rats with hyperpyrexia

CHEN Bin¹, LI Fei-yan¹, LI Fu-yuan¹, CHEN bei-yang²

1. Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou 412012, China

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Key words: Wanshi Niu Huang Qingxin Pill; cinnabar; semen; anticonvulsion; neurons

万氏牛黄清心丸为经典中药复方, 由牛黄、朱砂、黄连、栀子、郁金、黄芩 6 味中药组成, 具有清热解毒、镇惊安神之功效, 主要用于热入心包、热盛动风证, 症见邪热内闭、烦躁不安、神昏谵语、小儿高热惊厥^[1]。方中朱砂主要成分为 HgS, 对人体毒性较大, 有关朱砂或含朱砂的中成药的不良反应日益引起人们的重视, 相关研究已有报道^[2-7]。此外, 由于国内外对中药中重金属限量的要求^[8], 使万氏牛黄清心丸的临床应用及出口受到一定限制。抗惊厥是中药镇惊安神的现代药理基础, 本实验比较研究了万氏牛黄清心丸及用酸枣仁替代朱砂的万氏牛黄清心丸和去除朱砂的万氏牛黄清心丸对高热惊厥模型大鼠惊厥潜伏期、脑海马 CA1、CA2、CA3 区神经元的影响, 为万氏牛黄清心丸中的朱砂是否可以舍弃或用酸枣仁替代提供科学依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

万氏牛黄清心丸(1号方)按《中国药典》方法^[1]自制: 牛黄(体外培育牛黄)10 g、朱砂 60 g、黄连 200 g、黄芩 120 g、栀子 120 g、郁金 80 g, 朱砂水飞成极细粉, 牛黄研细, 余下的黄连等 4 味中药粉碎成细粉, 与上述粉末配研过筛, 混匀, 每 100 g 粉末加炼蜜 70 g, 得到每 1.70 g 相当于生药 1 g 的 1 号方。自制去除朱砂的万氏牛黄清心丸(2号方): 药粉与蜂蜜比例为 100:90, 除不加朱砂外, 其余组分与制法同 1 号方, 得到每 1.90 g 相当于生药 1 g 的 2 号方。自制酸枣仁替代朱砂的万氏牛黄清心丸(3号方): 将方中朱砂以酸枣仁 200 g 替代, 药粉与所加蜂蜜比例为 100:88, 其他组分与制法同 1 号方, 得到每 1.88 g 相当于生药 1 g 的 3 号方。安宫牛黄丸, 哈药集团世一堂制药厂, 批号 0902131,

收稿日期: 2011-07-18

基金项目: 湖南省卫生厅中医药科研基金项目(06301)

作者简介: 陈 斌, 男, 副教授, 主要从事中药药理学和中药化学成分研究和教学。Tel: (0731)28519074 E-mail: cb-6311@163.com

每丸 3 g。多聚甲醛,天津市化学试剂研究所;苏木素-伊红(HE)染色液、尼氏染色液均由湖南中医药大学显微形态实验室提供。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠,体质量 60~90 g,SPF 级,湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号 004476。

1.3 仪器

SJH—8S 数显恒温水浴锅,宁波天恒仪器厂;江南双目光学显微镜,江南光学仪器厂;LKB—VI 型超薄切片机,瑞典 LKB 公司;DM—LB2 莱卡生物摄影显微镜,德国。

2 方法

2.1 大鼠惊厥模型的制备

采用热水浴诱导幼年 SD 大鼠高热惊厥模型^[9-11]:将大鼠置于 44.5~45 °C 水浴缸中,水深以大鼠沿缸壁站立时仅露出头部为度,5 min 内发生惊厥即取出,惊厥判断标准以前肢阵挛抽搐为准,隔日诱导惊厥 1 次,共诱导 10 次。

2.2 对大鼠惊厥潜伏期的影响

造模后,选出在 5 min 内惊厥反应较明显的大鼠 70 只,随机分为 7 组(每组 10 只),分别为安宫牛黄丸(0.14 g/kg)组、1 号方(0.69 g/kg)组、2 号方低和高剂量(0.77、2.31 g/kg)组、3 号方低和高剂量(0.76、2.28 g/kg)组、模型组。其余动物为对照组。对照组及模型组 ig 给予蒸馏水,各药物组于每次诱导高热惊厥模型前 1 h,ig 给予相应药物。2、3 号方低剂量的确定以所含生药量与 1 号方相同为依据,高剂量为低剂量的 3 倍,ig 体积均为 0.01 mL/g。分别记录每次动物置于热水浴以及发

现前肢阵挛的时刻,以两时刻的差值为大鼠惊厥潜伏期。

2.3 对大鼠海马神经元的影响

动物分组及给药同“2.2”项。将高热诱导惊厥 10 次后的大鼠与对照组大鼠脱颈处死,剪下头部,快速分离大脑并放入备有 10%多聚甲醛的容器中固定,修整后经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,矢状切片,厚度 5 μm,烤片后用 HE 染色。进行尼氏体染色,脱蜡,蒸馏水洗,预热,1% 甲苯胺蓝染色,得到大脑海马神经元的切片,分别对海马神经元 CA1 区、CA2 区及 CA3 区摄像,观察神经元形态、尼氏体的变化,对相同区域同样大小视野中正常神经元(形态正常、尼氏体无丢失)及总神经元计数,计算正常神经元百分率。

2.4 数据处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据的比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 对大鼠惊厥潜伏期的影响

10 次高热诱导惊厥后,各组动物的惊厥潜伏期逐渐延长。2 号方低剂量组的惊厥潜伏期比其高剂量组短,3 号方低剂量组潜伏期在第 4 次诱导惊厥后长于其高剂量组。安宫牛黄丸在第 6 次与第 7 次诱导惊厥后潜伏期明显延长,与模型组比较有显著差异($P < 0.05$ 、 0.01),在前 8 次诱导惊厥后的潜伏期明显长于其他各给药组。1 号方在第 6 次诱导惊厥后潜伏期明显延长,与模型组比较有显著差异($P < 0.05$)。3 号方低剂量组在第 9 次诱导惊厥后潜伏期明显延长,与模型组比较有显著差异($P < 0.05$)。与 1 号方组比较,各药物组大鼠惊厥潜伏期均无显著差异。结果见表 1。

表 1 万氏牛黄清心丸对高热惊厥模型大鼠惊厥潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Wanshi Niu Huang Qingxin Pill on convulsive latent time of rats with hyperpyrexia convulsion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	惊厥潜伏期/s									
		第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	第 6 次	第 7 次	第 8 次	第 9 次	第 10 次
模型	—	200±41	206±32	212±41	223±23	227±41	217±34	218±43	229±32	238±22	248±45
1 号方	0.69	195±37	197±30	216±49	218±33	237±39	249±31*	235±38	241±44	245±38	259±31
2 号方	0.77	194±47	201±46	206±46	220±48	229±30	231±41	232±45	234±46	239±42	251±43
	2.31	203±47	209±36	222±39	225±40	238±21	240±38	246±37	247±42	254±39	264±46
3 号方	0.76	196±46	202±29	217±46	227±40	236±37	242±49	246±46	256±30	276±35*	274±38
	2.28	203±46	211±48	218±35	229±30	231±35	238±42	243±44	248±45	260±33	273±42
安宫牛黄丸	0.14	225±43	229±48	223±44	234±37	241±40	261±20**	266±39*	256±38	261±47	267±46

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3.2 对海马神经元的影响

3.2.1 尼氏染色海马神经元计数 对照组海马各区神经元 80%以上形态正常, 尼氏体无丢失。模型组大鼠神经元出现明显病变, 尼氏体严重丢失, 与对照组比较差异非常显著 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 安宫牛黄丸与 1 号方组大鼠海马各区受损神经元明显减少, CA1 区神经元明显减少, 其余各区无明显差异; 2、3 号方各组 CA1、CA2 区各区海马神经元损伤不同程度地降低, 除 2 号方低剂量组 CA2 区、3 号方高剂量组大鼠 CA1 区无明显差异外, 其余与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01), CA3 区神经元无明显变化。结果见表 2。

3.2.2 HE 染色结果 对照组 CA1 区细胞排列紧密、整齐、极向好、染色均匀, 细胞核位于中央、大小一致, 细胞长椭圆形; CA2 区细胞较大, 排列较疏松, 细胞核位于中央、大小一致; CA3 区细胞大, 大多为锥体状, 排列较疏松。模型组 CA1 区细胞排列紊乱, 部分细胞可见细胞核, 部分细胞溶解而只见细胞轮廓; CA2 区细胞大部分溶解, 细胞核固缩; CA3 区细胞大部分溶解。与对照组比较, 模型组大鼠海马各区神经元形态发生明显改变。1、2、3 号

方各给药组大鼠 CA1 区细胞排列紧密、染色较均匀, 细胞椭圆形; CA2 区细胞较大, 细胞核位于中央; CA3 区细胞相对较大, 多为锥体状, 排列疏松, 表明这 3 个复方可抗神经元损伤, 进而起到抗惊厥作用。结果见图 1。

3.2.3 尼氏染色结果 对照组 CA1 区神经元排列紧密、极向好, 细胞大小一致、长椭圆形, 大部分神经元中尼氏体完好; CA2 区神经元较大、排列较紧密、略呈锥体状, 核仁位于中央, 大部分尼氏体完好; CA3 区神经元排列较疏松、较大, 明显锥体状, 尼氏体完好。模型组 CA1 区细胞排列紧密、极向不清, 尼氏体溶解消失; CA2 区细胞排列紧密、极向不清, 细胞核固缩, 部分细胞溶解; CA3 区细胞核固缩, 大部分溶解消失, 可见鬼影细胞。与对照组比较, 模型组神经元尼氏体丢失, 形态明显改变甚至发生细胞溶解。1、2、3 号方各给药组大鼠海马各区神经元数显著增加, 表明其可抗神经元损伤, 进而起到抗惊厥作用。结果见图 1。

与 1 号方比较, 除 2 号方和 3 号方低剂量组大鼠海马 CA2 区神经元损伤明显增加外, 其余均无明显影响。

表 2 万氏牛黄清心丸对高热惊厥模型大鼠海马 CA1、CA2、CA3 区神经元的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Wanshi Niu Huang Qingxin Pill on normal hippocampus neurons CA1, CA2, and CA3 regions of rats with hyperpyrexia convulsion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	CA1 区/%	CA2 区/%	CA3 区/%
对照	—	85.8 ± 2.3	80.4 ± 4.5	80.6 ± 7.8
模型	—	69.3 ± 7.9**	65.2 ± 8.7**	66.2 ± 6.0*
1 号方	0.69	78.0 ± 6.7**▲▲	79.2 ± 5.2▲▲	76.7 ± 5.7▲▲
2 号方	0.77	77.6 ± 8.6**▲	72.6 ± 7.4*△	75.9 ± 4.1▲▲
	2.31	75.8 ± 4.7**▲	74.7 ± 4.9**▲▲	74.0 ± 5.9▲
3 号方	0.76	77.6 ± 5.4**▲	73.7 ± 3.5**▲△	73.9 ± 6.3*▲
	2.28	74.5 ± 4.8**	74.9 ± 4.9**▲▲	75.4 ± 3.2▲▲
安宫牛黄丸	0.14	81.2 ± 5.9*▲▲	81.8 ± 5.6▲▲	77.7 ± 7.9▲▲

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$; 与 1 号方组比较: △ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs No.1 formula group

4 讨论

惊厥发作是由于中枢神经系统某些神经细胞群发生的突然的、过度的、同步的异常放电而引起的神经功能异常的表现, 是某种脑部损伤或代谢障碍的症状, 具有多种诱因, 包括儿童期急性感染、高热、佝偻病等。本实验参考文献方法^[9-10]制备幼年大鼠高热惊厥模型, HE 染色结果显示, 模型组大鼠海马各区神经元细胞排列紊乱、核固缩, 细胞溶

解; 尼氏染色结果显示, 模型组大鼠海马大部分细胞尼氏体溶解消失、核固缩, 甚至溶解消失, 结果与文献报道^[9]基本吻合。由此推断, 高热惊厥大鼠模型制备成功。

高热诱导惊厥过程中, 各组大鼠惊厥潜伏期逐渐延长, 分析原因可能与大鼠机体对外界刺激有一定的适应性, 因模型制备周期较长, 随着动物的生长发育神经系统发育日趋完善有关。具体原因还有

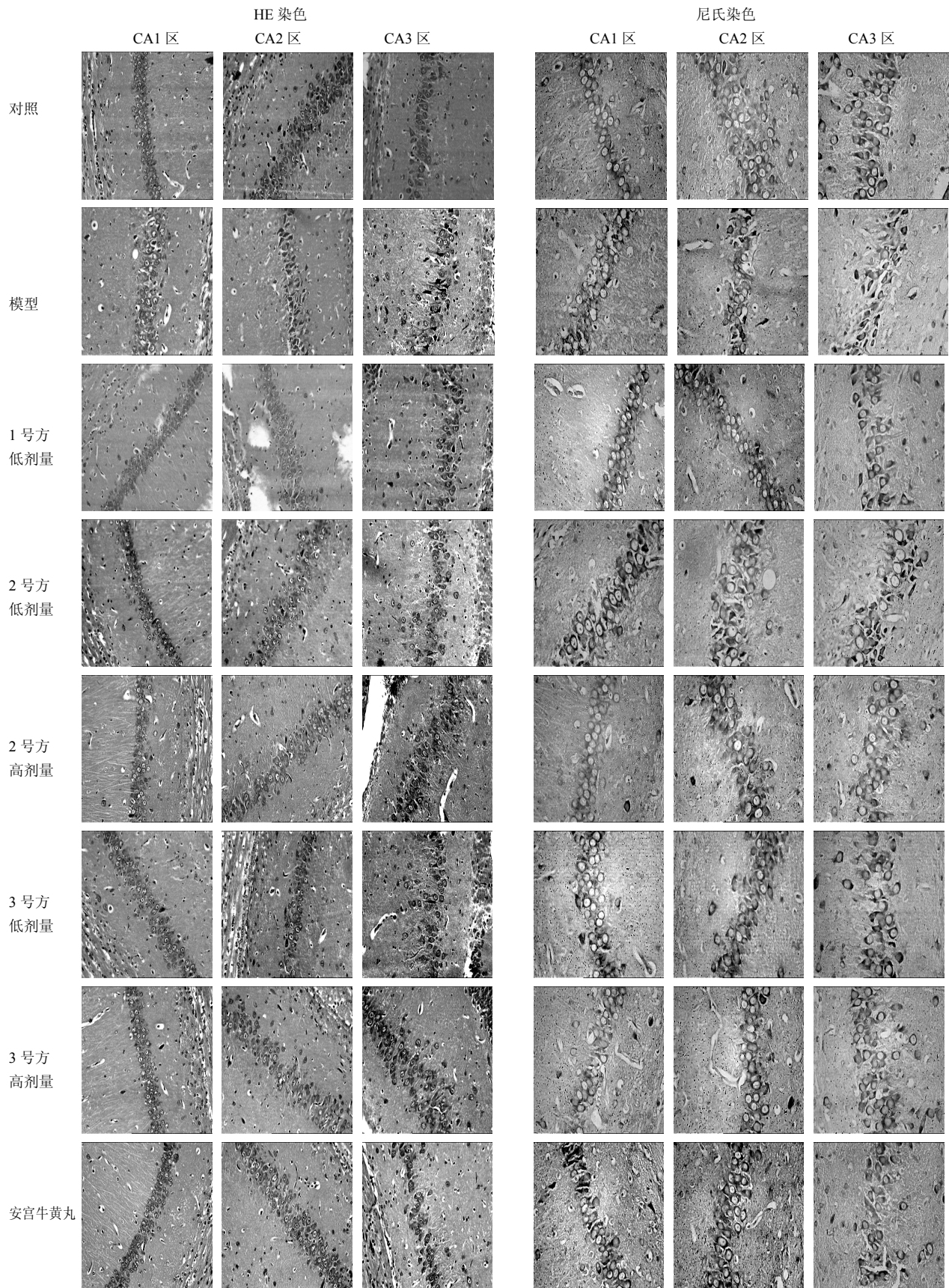


图1 大鼠海马神经元病理学观察

Fig. 1 Hippocampus neurons pathologic image in rats

待进一步研究,在已有研究及文献中尚未发现相关报道。

由尼氏染色结果可知,与对照组比较,高热惊厥模型大鼠海马 CA3 区神经元尼氏体丢失非常严重,CA2 区其次,而 CA1 区神经元基本未受影响。安宫牛黄丸作为清热解毒、镇惊开窍之经典方药,对高热惊厥具有显著疗效。万氏牛黄清心丸亦为经典方药,具有清热解毒、镇惊安神之功效,用于邪热内闭、烦躁不安、神昏谵语、小儿高热惊厥的治疗^[1]。给药后海马各区神经元数显著增加,表明该药可抗神经元损伤,从而起到抗惊厥作用,与其传统功效相一致。万氏牛黄清心丸去除朱砂或用酸枣仁替代朱砂的制剂也具有不同程度的抗神经元损伤作用,尤其是去朱砂的 2 号方高剂量组与酸枣仁代朱砂 3 号方的低剂量组对模型大鼠海马 CA1、CA2、CA3 区神经元损伤均有明显的对抗作用,表明其同样具有抗惊厥作用,且与万氏牛黄清心丸比较无明显差异。因此根据本实验结果并综合文献报道^[12],可初步推断朱砂并非为万氏牛黄清心丸抗惊厥作用的主要药效物质,可以从方中去除或用酸枣仁替代,但其具体关系及机制尚需深入研究。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

- [2] 任颖,韩贞琳,胡英华,等.朱砂致汞毒性皮炎 3 例报告 [J].中国工业医学杂志,2005,18(6):345-346.
- [3] 金伟军,周阳海,张志东.含朱砂中药成方制剂安全性问题的探讨 [J].今日药学,2008,18(3):56-58.
- [4] 余立友,徐喆,胡望生,等.朱砂的毒性和配伍及其应注意的问题 [J].传统医药,2007,16(4):58-59.
- [5] 梁爱华,徐严菊,商敏凤.朱砂的不良反应分析 [J].中国中药杂志,2005,30(23):1809-1811.
- [6] 康峰,张俊青,吴琴,等.朱砂及其复方与甲基汞、氯化汞的体外细胞毒性对比研究 [J].贵阳中医学院学报,2010,32(2):19-22.
- [7] 尹利辉,王瑾.药品中汞的分析进展 [J].药物分析杂志,2005,25(4):480-483.
- [8] 范桂高,南方.新加坡中药管理评述 [J].国外医学:卫生经济分册,2007,24(2):86-96.
- [9] 常杏芝,秦炯,吴希如.幼年大鼠反复热性惊厥脑损伤的研究 [J].中国当代儿科杂志,2002,4(6):439-442.
- [10] 杨志仙,秦炯,周国平,等.发育期大鼠高热惊厥脑损伤模型的建立 [J].北京大学学报:医学版,2002,24(3):225-228.
- [11] 李仪奎.中药药理实验方法学 [M].上海:上海科学技术出版社,1991.
- [12] 张梅,夏厚林,万丽,等.万氏牛黄清心丸中汞的不同存在状态与药效的关系 [J].成都中医药大学学报,2001,24(4):51-52.