

制草乌配方颗粒与饮片煎剂对 H9c2 心肌细胞毒性的比较研究

业康¹, 韩月丹^{2,3}, 毛培江^{1*}, 王志安¹, 黄晶晶¹, 栾会玲¹, 金捷¹(1.浙江省中药研究所有限公司, 杭州 310023; 2.浙江中医药大学第四临床医学院, 杭州 310053; 3.杭州市第一人民医院, 杭州 310006)

摘要: 目的 比较相同生药量浓度下制草乌中药配方颗粒与饮片煎剂对 H9c2 心肌细胞毒性的差异。方法 以不同浓度制草乌配方颗粒与同批次原料饮片煎剂作用于 H9c2 心肌细胞, MTT 法检测细胞活性; Hoechst 33258 荧光染色法检测细胞核形态并半定量统计分析; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒测定细胞 LDH 释放率。结果 H9c2 细胞在制草乌饮片煎剂的干预下, 高剂量组细胞活力下降, LDH 释放率提高, 且呈浓度依赖, 较配方颗粒组有显著性差异; Hoechst 33258 荧光染色下可见细胞核固缩碎裂等, 相同浓度下饮片煎剂组荧光强度强于配方颗粒组($P<0.05$)。结论 在相同生药浓度下, 制草乌中药配方颗粒对 H9c2 心肌细胞的毒性显著小于制草乌饮片煎剂。

关键词: 制草乌; 配方颗粒; 饮片煎剂; 毒性; H9c2 心肌细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)13-1622-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.13.005

引用本文: 业康, 韩月丹, 毛培江, 等. 制草乌配方颗粒与饮片煎剂对 H9c2 心肌细胞毒性的比较研究[J]. 中国现代应用药理学, 2019, 36(13): 1622-1626.

Comparative Study on Toxicity of Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta Formula Granule and Decoctum on H9c2 Myocardial Cell

YE Kang¹, HAN Yuedan^{2,3}, MAO Peijiang^{1*}, WANG Zhian¹, HUANG Jingjing¹, LUAN Huiling¹, JIN Jie¹
(1.Zhejiang Research Institute of Chinese Medicine Co., Ltd., Hangzhou 310023, China; 2.The Fourth Clinical Medical College of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China; 3.Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare the toxicity of Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta formula granule and decoctum on H9c2 myocardial cells under the same dosage. **METHODS** Different concentrations of Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta formula granule and decoctum were applied to H9c2 myocardial cells, MTT assay was used to detect cell activity; Hoechst 33258 staining was used to detect cell nucleus morphology and semi quantitative analyze its fluorescence intensity. The release rate of lactate dehydrogenase(LDH) was analyzed by using LDH kits. **RESULTS** The activity of H9c2 myocardial cells decreased under the action of Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta decoctum, the release rate of LDH increased and appeared to be concentration dependent, there was a significant difference in high concentration group with formula granule group. The cell nucleus were shrunken and fragmented under Hoechst 33258 staining, fluorescence intensity significant increased in decoctum group compared with the formula granule group under the same crude drug concentration($P<0.05$). **CONCLUSION** The toxicity of Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta formula granule to H9c2 myocardial cells is significantly less than its decoctum under the same crude drug concentrations.

KEYWORDS: Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta; formula granule; decoctum; toxicity; H9c2 myocardial cells

中药配方颗粒是以符合炮制规范的中药饮片为原料, 经现代制药技术提取、浓缩、分离、干燥、制粒、包装精制而成的供中医临床配方用的颗粒。其既能保证中医传统的君、臣、佐、使和辩证施治、随证加减的特点, 又免去了患者传统煎煮的麻烦, 具有作用迅速、成分完全、疗效确切、安全卫生、携带保存方便、易于调制和适合工业化生产等优点。对于中药配方颗粒与其传统

饮片煎剂特别是有些毒性药材、复方等的有效性、安全性是否一致有待论证。有观点认为, 传统中药特别是复方, 都是以中医药理论为基础, 在四气五味、升降浮沉、性味归经, 君臣佐使、十八反、十九畏等配伍理论指导下, 共同煎煮后制得, 而中药配方颗粒采用单独加工混合冲服的应用模式, 则违反了中医药的制备理论, 其疗效及安全性值得进一步探讨, 这也是我国目前中药配方颗

基金项目: 浙江省科技计划项目(2018F10079)

作者简介: 业康, 男, 硕士, 工程师 Tel: (0571)85241073
工程师 Tel: (0571)85241073 E-mail: maopeijiang@163.com

E-mail: yksimon1988@163.com *通信作者: 毛培江, 男, 硕士, 高级

粒没有全面放开的主要原因^[1]。

制草乌是毛茛科植物北乌头 *Aconitum Kusnezoffii* Reichb.干燥块根的炮制加工品,味辛、苦,性热,有毒。气微,味微辛辣,稍有麻舌感,具有祛风除湿、温经止痛的效果,用于风寒湿痹、关节疼痛等。草乌药材中含有乌头碱、次乌头碱以及新乌头碱等有毒生物碱成分,炮制成制草乌后毒性有所降低,但仍具有一定的心脏与神经毒性^[2]。本研究以有毒药材制草乌配方颗粒为例,H9c2大鼠心肌细胞为研究载体,比较同批次药材来源的制草乌配方颗粒和其传统饮片煎剂相同生药浓度下的毒性差异,为配方颗粒有效性、安全性、质量标准等研究提供实验研究依据,为配方颗粒的临床安全用药提供参考。

1 材料

1.1 药物

制草乌配方颗粒(批号:K1604074;规格:每袋100g;每克颗粒相当于饮片6g)、制草乌饮片(批号:16031401;规格:每袋2kg)均由浙江景岳堂药业有限公司提供,该配方颗粒与相应的饮片均来源于同一批次药材饮片来源,质量标准符合中国药典2015年版要求。

制草乌饮片煎剂的制备:取适量中药饮片于清洁煎药罐,加入8倍量的水,浸泡1h后开始煎煮,待充分煮沸后再煎煮40min,煎煮过程中用玻璃棒搅拌2~3次,保证充分煎透,无糊块状,无白心,无硬心。趁热用80目药筛过滤,药渣同法再煎煮1次,合并2次滤液,沸水浴加热浓缩至生药0.5g·mL⁻¹。

1.2 试剂

高糖DMEM培养液(Gibco,批号:8118110);胎牛血清(四季青,批号:20170315);0.25%胰蛋白酶-EDTA、青链霉素双抗(Genview,批号:711160101100,84020101100);四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)(Amresco,批号:0472C487,1077C109);Triton X-100(Solarbio,批号:301G051);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)试剂盒(南京建成,批号:20180425);Hoechst 33258 荧光染液、抗荧光猝灭封片液(碧云天,批号:032318180417,030218180319)。

1.3 仪器

M200 Pro 多功能酶标仪(TECAN);NU 5810E 智能CO₂培养箱(NUAIRE);DM 4000 荧光显微镜

(Leica);CS-FNX 超速冷冻离心机(Hitachi);超净工作台。

1.4 细胞

大鼠心肌细胞株H9c2,购于中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

H9c2心肌细胞用含10%FBS,1%青-链霉素的高糖DMEM(NaHCO₃含量为1.5g·L⁻¹)完全培养液培养,置37℃,5%CO₂的培养箱中,饱和湿度下进行常规培养。观察其培养液的颜色变化与细胞生长情况,及时换液,细胞长至对数生长期时用于实验。

2.2 MTT法检测细胞活力

取生长状态良好的对数期H9c2心肌细胞,经无菌PBS清洗2次,适量0.25%胰酶消化细胞后,加入5mL完全培养基终止消化,1000r·min⁻¹离心5min。弃去上清液加适量培养基反复吹打至单细胞悬液,进行细胞计数。调整细胞密度至每毫升5×10⁴个后接种于96孔板,每孔100μL。放置于培养箱内孵育至细胞对数生长期时,弃去旧培养液。将制草乌配方颗粒与饮片水煎剂用完全培养基均配制成浓度为生药24g·L⁻¹的母液,临用时以完全培养液稀释。每块96孔板设6个空白孔,给药组分别加入不同浓度(母液组以及1/2,1/4,1/20,1/100,1/500,1/2500,1/12500母液浓度组)的中药配方颗粒与饮片水煎剂,每组设6个复孔,每孔200μL,分别暴露24,48h后,弃去含药培养液,每孔加入新的培养液100μL,MTT溶液(5mg·mL⁻¹)20μL,4h后弃去上清液,每孔加入150μL DMSO溶液,37℃振荡10min,多功能酶标仪检测490nm处各孔吸光度(A)值。计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(A_{给药组}-A_{空白})/(A_{对照组}-A_{空白})×100%。

2.3 Hoechst 33258染色法检测细胞核形态与半定量荧光分析

收集处于对数生长期的H9c2细胞制成单细胞悬液并计数,无菌盖玻片置于6孔板内,以每毫升5×10⁴个细胞接种至6孔板,每孔2mL,常规培养至对数期,弃去旧培养基,分别加入生药12,24g·L⁻¹的制草乌中药配方颗粒与饮片水煎剂,设不加药物的对照组,暴露48h后,弃去培养基,PBS溶液清洗2次,每孔加入0.5mL4%多聚甲醛固定,固定10min后弃去固定液,PBS溶液清洗

2 次, 每次 3 min, 吸尽液体, 每孔加入 0.5 mL Hoechst33258 染液, 染色 5 min, 吸尽液体后 PBS 溶液清洗 2 次, 每次 3 min, 滴一滴抗荧光猝灭封片液于载玻片上, 盖上贴有细胞的盖玻片, 在激发 360 nm 处显微镜观察并拍照, 进行细胞核形态观察, 并使用 Image J 软件进行荧光强度半定量分析。

2.4 LDH 释放实验

收集处于对数生长期的 H9c2 细胞制成单细胞悬液并计数, 以每毫升 5×10^4 个细胞接种至 96 孔板, 每孔 100 μ L, 常规培养至对数期, 弃去旧培养基, 分别加入不同浓度的制草乌中药配方颗粒与饮片水煎剂(母液浓度为生药 24 $g \cdot L^{-1}$, 给药组分别为母液组以及母液浓度的 1/2, 1/4, 1/20, 1/100, 1/500 组), 每组设 3 个复孔, 并设对照组与空白组, 作用 48 h 后按试剂盒说明书进行操作。于 450 nm 处读取 A 值, 根据标准曲线算出酶活力单位。LDH 释放率(%)=细胞培养液中测定的酶活力单位/(细胞培养液中测定的酶活力单位+细胞裂解液中测定的酶活力单位) $\times 100\%$ 。

2.5 统计分析

采用 SPSS 20.0 统计软件分析统计, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-T 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 H9c2 心肌细胞活力的影响

制草乌配方颗粒与饮片煎剂作用 H9c2 心肌细胞 24 h, 饮片煎剂母液组与 1/2 浓度组细胞存活率分别为(88.18 \pm 8.10)%与(88.37 \pm 10.34)%, 较对照组有显著性减低($P < 0.05$); 而配方颗粒 1/2 与 1/4 浓度组细胞存活率分别为(117.92 \pm 11.91)%与(113.37 \pm 9.43)%, 较对照组有显著性提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。48 h, 饮片煎剂中母液组及 1/2 浓度组细胞存活率为(78.08 \pm 3.58)%和(92.47 \pm 4.12)%, 与对照组比较呈极显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 而配方颗粒母液组以及 1/2, 1/4 与 1/20 浓度组的细胞存活率分别为(120.47 \pm 8.43)%, (124.19 \pm 16.13)%, (115.56 \pm 5.44)%与(114.36 \pm 9.36)%, 较对照组有显著性提高($P < 0.01$)。结果见图 1~2。

3.2 对 H9c2 心肌细胞形态结构的影响

生药 12, 24 $g \cdot L^{-1}$ 的制草乌配方颗粒与饮片煎剂作用于 H9c2 细胞 48 h, 经 Hoechst 33258 染色后, 荧光显微镜下观察各组细胞核固缩、部分破裂、胞质浓缩等凋亡现象, 细胞核固缩时其荧光

强度逐渐增强, 利用 Image J 软件对图片进行荧光半定量分析, 以九宫格的方式对每张荧光染色片子随机选取 9 个视野进行荧光分析统计。结果显示, H9c2 心肌细胞在制草乌配方颗粒与饮片煎剂作用 48 h 后出现不同程度的细胞凋亡, 同剂量下饮片煎剂组细胞核固缩情况较配方颗粒组显著增多($P < 0.05$), 结果见图 3~4。

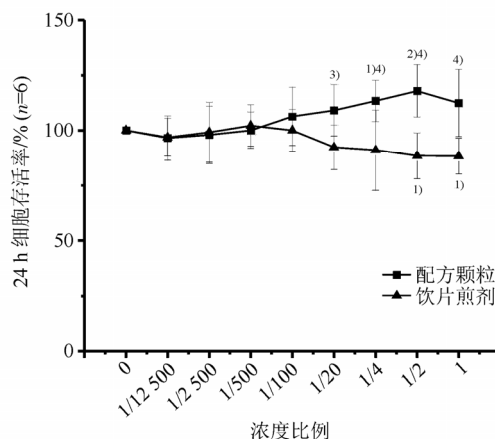


图 1 不同浓度制草乌配方颗粒与饮片煎剂作用 24 h 对 H9c2 细胞存活率的影响($n=6$)

与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与饮片煎剂组比较, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Effect of Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta formula granule and decoctum at different concentrations on cell viability in H9c2 cells in 24 h($n=6$)

Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with decoctum group, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$.

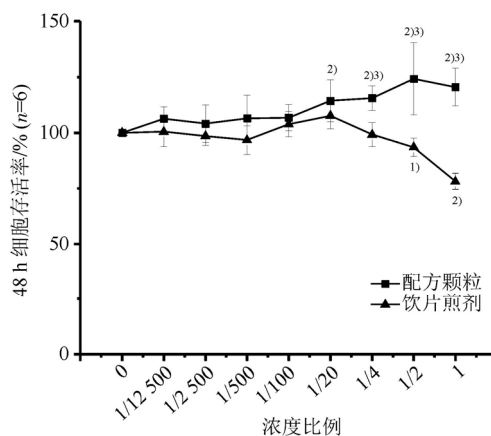


图 2 不同浓度制草乌配方颗粒与饮片煎剂作用 48 h 对 H9c2 细胞存活率的影响($n=6$)

与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与饮片煎剂组比较, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Effect of Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta formula granule and decoctum at different concentrations on cell viability in H9c2 cells in 48 h($n=6$)

Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with decoctum group, ³⁾ $P < 0.01$.

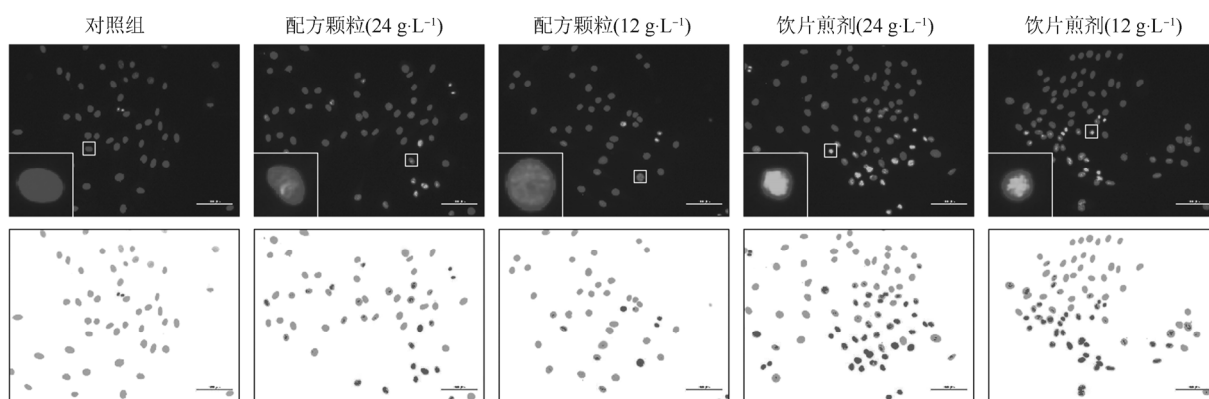


图3 制草乌配方颗粒与饮片煎剂对 H9c2 细胞形态的影响(Hoechst 33258 染色, 200×)

Fig. 3 Effect of Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta formula granule and decoctum on cell morphology of H9c2 cells(Hoechst 33258 staining, 200×)

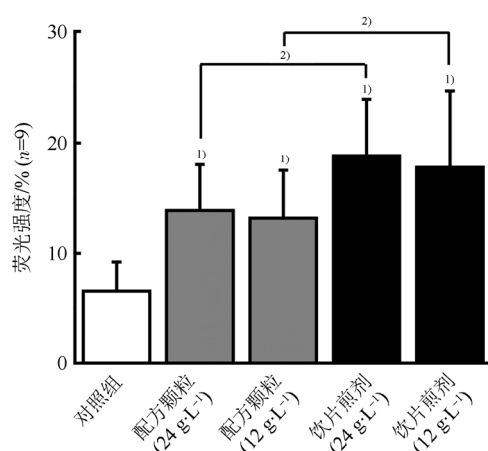


图4 荧光强度半定量分析结果(n=9)

与对照组比较, ¹⁾P<0.01; 与相同浓度配方颗粒组比较, ²⁾P<0.05。

Fig. 4 Results of fluorescence intensity semi-quantitative analysis(n=9)

Compared with control group, ¹⁾P<0.01; compared with formulated granule group at the same dosage, ²⁾P<0.05.

3.3 对 H9c2 心肌细胞 LDH 释放率的影响

不同浓度的制草乌配方颗粒与饮片煎剂作用于 H9c2 细胞 48 h 后, 随着药物浓度的升高, 细胞 LDH 释放率增加, 与同剂量配方颗粒组相比, 饮片煎剂组为母液浓度(生药 24 g·L⁻¹)以及 1/2 母液浓度(生药 12 g·L⁻¹)时 LDH 渗透率有显著性提高, 提示在该浓度下饮片煎剂对细胞有较大的不良反应, 且明显大于同生药浓度下的配方颗粒组, 结果见图 5。

4 讨论

中药配方颗粒起源于 20 世纪 60~70 年代的日本, 后韩国、中国台湾效仿并迅速发展至全球。我国中药配方颗粒的发展起步较晚, 推广较缓慢, 2001 年 7 月国家药品监督管理局颁布《中药配方

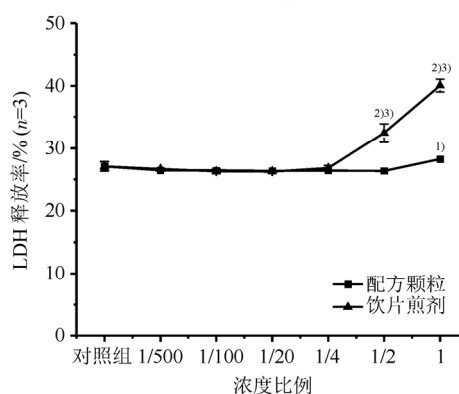


图5 48 h 不同浓度制草乌配方颗粒与饮片煎剂对 H9c2 细胞 LDH 释放率的影响(n=3)

与对照组比较, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; 与相同浓度配方颗粒组比较, ³⁾P<0.01。

Fig. 5 Effect of Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta formula granule and decoctum at different concentrations on LDH release rate in H9c2 cells in 48 h(n=3)

Compared with control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; compared with formulated granule group at the same dosage, ³⁾P<0.01.

颗粒管理暂行规定》及《中药配方颗粒质量标准研究的技术要求》(国药监注[2001]325 号), 首次规定将中药配方颗粒纳入饮片管理范畴, 并与饮片一样逐步实施文号管理。从此, 中药配方颗粒取得了合法身份, 标志着中药配方颗粒在质量标准 and 临床应用逐渐成熟, 同时也为中药配方颗粒向科学化、产业化、标准化方向发展奠定了基础。2015 年 12 月《中药配方颗粒管理办法(征求意见稿)》发布, 征求意见稿显示, 未来监管部门将放开配方颗粒。2016 年 2 月 26 日国务院又印发《中医药发展战略规划纲要(2016-2030 年)》, 明确将中药配方颗粒纳入国家中医药发展战略规划内容之中^[3-5]。中药配方颗粒的产生是我国中医药事业进步的一个标志, 但是它在丰富、发展传统中药中

面临一系列问题,如“合煎”和“分煎”疗效争议,我国中药配方颗粒至今没有一个统一的质量标准等。因此需要广大中医药科技工作者结合中医理论基础,对中药配方颗粒生产工艺、成分分析、质量标准,以及与传统汤药的有效性、安全性进行深入研究,共同促进我国中药配方颗粒的发展与推广^[6-8]。

本研究在细胞水平,对有毒中药制草乌配方颗粒与其传统煎剂的毒性进行了初步的研究。草乌具有较大的毒性,炮制成制草乌、诃子制草乌等之后毒性得到了显著的减轻,其炮制减毒的原理主要是通过水加热处理后使双酯型生物碱(如乌头碱等)分解成毒性更小的苯甲酰单酯型生物碱,苯甲酰单酯型生物碱可进一步分解为氨基醇类生物碱,其毒性约为乌头碱的1/2 000~1/4 000左右^[9-11]。故制作工艺中加热温度与加热时间对有效成分与毒性成分的含量有着极其重要的影响。对比2种制剂的工艺发现,本研究中饮片煎剂的加热提取时间较配方颗粒短;而在浓缩环节饮片煎剂的加热时间较长,饮片煎剂采用沸水浴浓缩,配方颗粒采用喷雾干燥浓缩。工艺中有效成分与毒性成分含量的变化将在后续的研究中体现。

本研究将H9c2细胞暴露于生药0.001 92~24 g·L⁻¹的含有制草乌制剂的培养液中,作用24, 48 h后,饮片煎剂组细胞活力逐渐减低,呈浓度依赖,而配方颗粒组随着药物浓度的提高,其细胞活力却有所增强,多次重复试验结果一致,推测可能与制草乌配方颗粒生产工艺过程中,可能有毒成分降低以及中药本身含有多糖类具有营养细胞成分有关。具体原因有待后续结合成分分析等更深入的研究来验证。本研究探索性地使用细胞毒性评价的方法对比制草乌饮片煎剂与其所制成中药配方颗粒的毒性差异,实验结果表明,在相同生药浓度下,中药饮片煎剂在高浓度时,其毒性明显大于配方颗粒,且呈浓度依赖的关系。

该试验结果与研究者前期进行的小鼠急性毒性试验结果一致,制草乌饮片煎剂的最小致死量为生药25.6~32 g·kg⁻¹,而制草乌配方颗粒的最小致死量为生药40~50 g·kg⁻¹。

REFERENCES

- [1] LI R, ZHAI H Q, TIAN W L, et al. Comparative analysis between origin of cooked traditional Chinese medicine powder and modern formula granules [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2016, 41(5): 965-969.
- [2] 图雅, 张贵君, 刘志强, 等. 蒙药草乌的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(7): 1581-1582.
- [3] ZHANG H M, SONG J Z, TAN H S, et al. From traditional decoction to modern granule: perspectives and prospects of Chinese medicine dispensing granules [J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med*[世界科学技术(中医药现代化)], 2012, 14(4): 1740-1753.
- [4] SUN Y Y, SHI P. Countermeasures for promoting internationalization of Chinese materia medica by virtue of formula granule [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2013, 44(8): 929-934.
- [5] 李松林, 宋景政, 徐宏喜. 中药配方颗粒研究浅析[J]. *中草药*, 2009, 40(S1): 1-7.
- [6] 陈培胜, 朱月信. 中药配方颗粒行业标准研究思路[J]. *中医杂志*, 2012, 53(6): 469-472.
- [7] ZHENG M X, HE J Q, WANG X M, et al. Development, confronted problems and management solution of traditional Chinese medicine formula granules in Zhejiang province [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2018, 35(3): 408-410.
- [8] TIAN Z, ZHEN Y Q, DONG Q J, et al. Variation of four chemical components in *Plantaginis Semen* during decoction process [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2018, 27(16): 1927-1931.
- [9] LIU S, LIU X Y, LI Y, et al. Experimental study on acute toxicity of the *Aconiti kusnezoffii Radix* and its processed products [J]. *Chin J Pharmacovigil*(中国药物警戒), 2015, 12(9): 513-516, 521.
- [10] 叶定江. 中药炮制学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- [11] ZHAO W L, YAN A J, HUANG Q W, et al. Study on the processing technology for *Aconiti Kusnezoffii Radix* by bean curd [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2018, 35(1): 107-110.

收稿日期: 2018-08-08

(本文责编: 李艳芳)