

四逆汤化学物质基础及配伍机制的研究进展

缪萍¹, 裘福荣², 蒋健^{2*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203;

2. 上海中医药大学附属曙光医院临床药理科, 上海 201203)

[摘要] 通过对近年来国内外四逆汤研究的文献回顾, 针对四逆汤组方药物的化学成分, 整理了其与强心、抗心律失常等药理作用的关系, 并从吸收与代谢角度阐明复方的配伍机制, 揭示了四逆汤配伍的合理性和科学内涵。四逆汤是一首组方简单、疗效确切的经典方, 临床应用十分广泛。目前国内外对四逆汤的主要研究方向多集中在 3 味药中主要活性成分对心血管系统的作用, 但对于复方的药效物质基础及从药物吸收、代谢层面阐释配伍机制的系统研究则较为有限。建议将四逆汤复方药物的有效组分与药理作用结合进行综合分析 (PK/PD 联接), 借鉴现代先进分析技术 (如 HPLC、LC-MS/MS 等), 寻找复方体内药效物质基础, 诠释减毒增效机制, 解析复方配伍规律的科学性, 对临床上安全、有效用药和四逆汤方剂的二次开发具有重要的意义。

[关键词] 四逆汤; 化学成分; 药理; 配伍机制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0234-05

[doi] 10.11653/syfy2014050234

Progress on Chemical Basis and Compatible Mechanism of Sini Decoction

MIAO Ping¹, QIU Fu-rong², JIANG Jian^{2*}

(1. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine,

Shanghai 201203, China; 2. Department of Clinical Pharmacology, Shuguang Hospital Affiliated to

Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Literatures of Sini decoction in recent years were reviewed. In this paper, the studies on cardiogenic, antiarrhythmic effects of chemical components of Sini decoction are summarized. To illustrate the compatible mechanism of Sini decoction based on absorption and metabolism. The aim of this study is to reveal the rational and scientific connotations of compatibility of Sini decoction. Sini decoction is a simple Chinese classic herbal formula. There are various studies that reported the major active ingredients in these three herbs (*Radix Aconiti Laterlis*, *Zingiber officinale Rose* and *Radix Glycyrrhizae*) has been widely used to treat cardiovascular diseases in clinics at home and abroad. So far, there is limited systemic research on chemical substances and compatible mechanism focused on absorption and metabolism of Sini decoction. Therefore, pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK-PD) correlation, advanced analysis techniques (such as high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)) should have been carried out in order to seek the chemical basis *in vivo*, interpret the decreasing toxicity and increasing efficacy

[收稿日期] 20130425(023)

[基金项目] 国家“十二五”“重大新药创制”J科技重大专项创新药物研究开发技术平台建设项目(2012ZX09303009-001);上海市教委重点学科中药临床药理学项目(J50303);上海市中医临床重点实验室项目(C10dZ2220200)

[第一作者] 缪萍, 博士生, 从事中医内科临床与基础研究, Tel:021-20256536, E-mail: pingping124miao@sina.com

[通讯作者] * 蒋健, 医学博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事中医证型研究以及中医临床疗效评价研究, Tel:021-53821650, E-mail: jiangjiansg@126.com

compatible mechanism, and to provide useful information for safe, effective use and re-evaluation of Sini decoction.

[Key words] Sini decoction; chemical composition; pharmacology; compatible mechanism

四逆汤为东汉名医张仲景之名方,始载于《伤寒论》,全方由生附子一枚、干姜一两半和炙甘草二两组成,具有回阳救逆之效,主治少阴病如四肢厥逆、下利清谷、呕吐腹痛、苔白滑、脉沉迟或细微等症。方中以附子为君,干姜为臣,甘草为佐使。现代临床疗效观察和动物实验研究均表明,四逆汤具有强心、升压、抗休克、提高免疫功能等作用,能保护心脑血管系统和肠粘膜,对冠心病、心绞痛、动脉粥样硬化、脑梗死、高脂血症等有较好的治疗效果^[1-2]。本文概括归纳了组方药物的主要化学成分及对心血管系统的药理作用,并对四逆汤减毒增效的配伍机制进行了初步探讨。

1 附子的化学成分及对心血管系统的作用

1.1 附子的化学成分

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根的加工品,始载于《神农本草经》。其主要成分为二萜类生物碱,包括 C₁₉型和 C₂₀型二萜类生物碱。C₁₉型二萜生物碱种类较多,根据 C₈和 C₁₄位取代基团结构的不同,可分为双酯型、单酯型和醇胺型^[3]。研究表明^[4],双酯型乌头碱类对热不稳定,在高温煎煮过程中, C₈位的乙酰基先水解,转化成单酯型苯甲酰乌头原碱类,继续水解则脱去 C₁₄位的苯甲酰基,生成醇胺型乌头原碱类。

1.2 附子的毒理学研究

双酯型二萜类生物碱(乌头碱、新乌头碱和次乌头碱)是附子的毒性成分,易导致严重的心律失常、呼吸抑制和休克,甚至死亡^[4]。其毒性机制研究很多,主要与 Na⁺, K⁺离子通道的改变、能量代谢障碍和细胞凋亡等有关^[5]。故临床上使用附子必须经过浸泡-漂洗-煎煮,或加豆腐、甘草、黑豆共制等炮制方法^[6],将剧毒成分水解为毒性较小及很小的单酯型和醇胺型生物碱^[7]。

1.3 附子对心血管系统的作用

1.3.1 强心

附子为“回阳救逆第一品药”,能明显增强离体心衰蛙心的心肌收缩力,且在一定浓度范围内(0.625 ~ 70 g·L⁻¹)与此效应呈良好的线性关系^[8]。附子的多种成分(如去甲乌药碱、去甲猪毛菜碱、氯化甲基多巴胺、尿嘧啶、附子苷、醇胺类生物碱等)具有正性肌力的作用^[9]。其中去甲乌药碱具有激动 β-肾上腺素能受体的活性,但含量很少。氯化甲基多巴胺对 α 受体有兴奋作用,去甲猪毛菜

碱则对 α 和 β 受体均有兴奋作用。

1.3.2 抗心肌缺血、抗心律失常

乌头类生物碱具有扩张冠状血管,增加外周和冠脉血流量的作用,乌头碱在未致心室纤颤时,小剂量就已产生抗急性心肌缺血的作用^[10]。实验结果表明,附子总生物碱能改善缺血心肌的能量代谢,是附子抗心肌缺血的有效成分^[11]。乌头类生物碱易导致心律失常,但附子中同时也存在抗心律失常的物质,如 heteratisine, napelline, 高乌甲素等^[4]。

1.3.3 抗休克

附子及其复方对失血性休克、内毒素性休克和心源性休克都有明显防治效果。目前认为其抗休克的有效成分为去甲乌药碱、尿嘧啶等^[4]。

2 甘草的化学成分及对心血管系统的作用

2.1 甘草的化学成分

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat, 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根及根茎。其主要有效成分为三萜皂苷类和黄酮类。甘草酸又名甘草甜素,是含量最高的皂苷类物质,口服后难以原形状态被吸收,经胃肠道细菌水解生成甘草次酸后吸收入血。甘草苷、甘草素、异甘草苷、异甘草素等是甘草中最主要的黄酮类物质^[12]。

2.2 甘草对心血管系统的作用

2.2.1 抗心律失常

炙甘草汤为治疗“心动悸,脉结代”的名方,现代广泛应用于冠心病、心绞痛和早搏病人的临床治疗^[13-14]。甘草中的黄酮类成分可明显对抗乌头碱、氯化钡、CaCl₂-Ach 混合液或结扎左冠状动脉前降支等各种原因诱发的室性心律失常,具有负性频率和负性传导的作用,减少室颤率^[15]。仰礼真等^[16]推测甘草次酸抗心律失常的机制可能与促使 L 型钙通道开放,增加心肌细胞内钙浓度有关。

2.2.2 心肌保护作用

猫的心肌缺血再灌注损伤实验证实甘草酸单铵盐能抑制血清中磷酸肌酸激酶(CPK)和乳酸脱氢酶(LDH)的释放,降低脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的含量,明显增加超氧化物歧化酶(SOD)的活性,保护心肌细胞^[17]。乌拉尔甘草的己烷/乙醇提取物(不含甘草酸)15 mg·L⁻¹预处理 24 h 能显著对抗阿霉素诱发的 H9c2 大鼠心肌细胞凋亡,蛋白免疫印迹结果显示甘草提

取物能明显降低被升高的 p53、磷酸-p53 和 Bax 水平,升高被降低的 Bcl-xL 水平,减轻阿霉素导致的心脏毒性^[18]。

3 干姜的化学成分与及对心血管系统的作用

3.1 干姜的化学成分 干姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎。干姜与生姜成分类似,主要含挥发油和辛辣成分两大类。挥发油成分以 β -水芹烯、茨烯等为主。辛辣成分主要有姜辣素、姜烯酚和姜酮等酚类成分,姜酚是其主要的活性成分^[19]。

3.2 干姜对心血管系统的作用

3.2.1 改善心功能作用 干姜提取物能改善戊巴比妥钠所致兔急性心衰的心肌舒缩性能,减轻心衰症状,降低心肌耗氧量,改善血流动力学,保护心肌细胞^[20]。

3.2.2 改善血液循环作用 干姜提取物($2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)抑制去甲肾上腺素诱导的血小板聚集效果与阿司匹林类似,其抑制率可达 100%^[21]。

3.2.3 抗氧化作用 姜在体内和体外都具有显著的抗氧化作用,对缺氧缺糖引起的乳鼠心肌细胞损伤有明显的保护作用,明显提高过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)的水平,清除氧自由基,其效果可与抗坏血酸相当^[21-22]。

4 四逆汤对心血管系统的药效成分

四逆汤的化学成分主要包括四大类:二萜类生物碱、黄酮类、三萜皂苷类和姜辣素。Tan 等^[23]对四逆汤拆方和全方的体内外样品进行了研究,归属了含药血浆中 38 个色谱峰的来源,包括 33 种原型成分(主要为二萜生物碱、黄酮类成分和少量的皂苷类化合物)和 5 种代谢物(分别为葡萄糖醛酸甘草素、葡萄糖醛酸芒柄花素、葡萄糖醛酸异甘草素、葡萄糖醛酸-6-姜酚和甘草次酸)。目前对四逆汤作用于心血管系统的药效物质基础的研究报道比较少。附子生物碱是四逆汤有效成分组合中的关键因素,而干姜挥发油和甘草酸也是组方中不可或缺的因素^[24]。实验结果证明森布星 B 和去甲猪毛菜碱为四逆汤抗心肌缺血的可能药效成分^[25],为进一步研究四逆汤“回阳救逆”的作用机制奠定基础。

5 四逆汤的配伍机制研究

5.1 四逆汤的减毒机制研究 与附子单煎液比较,附子-甘草合煎液对大鼠心脏的毒性程度显著降低^[26]。正如《本草经集注》云:“俗方每用附子,须甘草、人参、生姜相配者,正制其毒故也”。附子-甘草作为配伍减毒的代表药对,目前对其减毒机制的

研究主要集中在配伍前后煎液中毒性成分溶出量的变化,而从吸收代谢动力学角度考虑配伍后多组分间的相互作用研究则较少。附子中主要含乌头类生物碱,甘草中主要含有甘草酸和甘草次酸等酸性皂苷类成分,两者是一对酸碱药对。陈建萍等^[27]实验表明,附子与甘草同煎后,附子中的乌头类生物碱与甘草中的甘草酸发生沉淀反应,生成不溶于水的大分子络合物,降低了药液中乌头碱和次乌头碱的含量。附子-甘草配伍减毒作用也与甘草影响附子毒性成分在胃肠道的吸收过程有关^[28],乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的达峰浓度(C_{\max})和药-时曲线下面积(AUC)均降低,减缓了有毒成分的吸收,从而发挥解毒作用。甘草对细胞色素 P450(CYP)有诱导作用^[29],附子具有抑制 CYP 酶活性的作用,当附子与甘草合用时,对肝药酶的诱导起到了主导作用,通过加速附子的代谢而缓和其毒性^[30]。甘草对附子在体内的排泄过程也有影响。甘草酸的水解产物葡萄糖醛酸可与乌头类生物碱的羟基形成低毒或无毒的葡萄糖醛酸络合物,经尿液排出体外,从而显示出一定的减毒活性^[31]。

干姜也有类似甘草的解毒作用。《本草纲目》称:“生姜解半夏、南星、乌头、附子及鸟兽肉毒”。通过对附子-干姜合煎液的化学成分的分析,毒性较大的双酯型生物碱含量降低^[32]。干姜能够抑制附子中毒性较大的双酯型生物碱的吸收,使其在小肠中的生物利用度明显降低,其机制可能为干姜通过诱导 P-糖蛋白(P-gp),从而抑制作为 P-gp 底物的双酯型生物碱的吸收,最终起到减毒的作用^[33]。

5.2 四逆汤的增效机制研究 甘草对附子的增效作用主要表现在附子中的水溶性部分与甘草中的甘草酸和黄酮类成分之间的协同作用^[31]。附子无姜不热,两药相须配伍为用经常出现在各类方剂中,尤其是在心血管方面,干姜与附子有相似的作用,相伍后可增强心衰大鼠的心肌收缩力,减少心肌能量需求,改善冠脉血流量,达到回阳救逆的目的^[34]。干姜中的主要活性成分-姜酚可以抑制 CYP3A 的活性^[35],可能使附子中的有效成分代谢减少,从而显示出增效的作用。

作为回阳救逆的经典名方,四逆汤对心血管系统有良好的保护和治疗作用。研究表明^[24],四逆汤配伍后对心衰、低血压等疾病的疗效最佳,明显优于各单味药或任意两两组合,应系活性成分配伍之后,相互协调、相互促进,多靶点作用于体内,发挥着协同药效的作用,诠释了四逆汤配伍机制的科学性。

6 讨论与展望

四逆汤是一首组方简单、疗效确切的经典方,临床应用十分广泛。目前国内外对四逆汤的主要研究方向多集中在三味药中主要活性成分对心血管系统的作用,但对于复方的药效物质基础及从药物吸收、代谢层面阐释配伍机制的系统研究则较为有限。因此建议将四逆汤复方药物的有效组分与药理作用结合进行综合分析(PK/PD 联接),借鉴现代先进分析技术(如 HPLC、LC-MS/MS 等),寻找复方体内药效物质基础,诠释减毒增效机制,解析复方配伍规律的科学性,对临床上安全、有效用药和四逆汤方剂的二次开发具有重要的意义。

[参考文献]

[1] 闫旭,张琦. 四逆汤研究现状与展望[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(12):70.

[2] 王珏,韩经丹,马大勇. 基于经方剂量折算的有毒中药剂量的探索-四逆汤不同折算剂量对失血性低血压大鼠血压、心率、呼吸的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):181.

[3] Hu R,Zhao J,Qi L W, et al. Structural characterization and identification of C₁₉-and C₂₀-diterpenoid alkaloids in roots of *aconitum carmichaeli* by rapid-resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2009,23(11):1619.

[4] Singhuber J, Zhu M, Prinz S, et al. Aconitum in traditional Chinese medicine-a valuable drug or an unpredictable risk [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 126(1):18.

[5] 李志勇. 附子成分次乌头碱心脏毒性及中毒机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2008.

[6] 黄勤挽,周子渝,王瑾,等. 附子炮制历史沿革研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(23):269.

[7] Lu G, Dong Z, Wang Q, et al. Toxicity assessment of nine types of decoction pieces from the daughter root of *Aconitum carmichaeli* (Fuzi) based on the chemical analysis of their diester diterpenoid alkaloids [J]. Planta Med,2010,76(8):825.

[8] 邓家刚,范丽丽,郝二伟,等. 附子的回阳救逆量效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):150.

[9] 周远鹏. 作用于心血管系统的附子水溶性活性成份研究回顾和评价[J]. 中药药理与临床,2011,27(6):106.

[10] 张为亮,徐楚江,杨明,等. 附子毒效关系的实验研究[J]. 广西中医药,1997,20(3):43.

[11] 李劲平,吴伟康,曾英,等. 附子总生物碱对缺血心肌蛋白质组的影响[J]. 中南药学,2008,6(1):18.

[12] Asl M N, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds [J]. Phytother Res,2008,22(6):709.

[13] 张本贞,黄春玲,周小波,等. 4种方法制取炙甘草汤方治疗气阴两虚型冠心病心绞痛的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(6):64.

[14] 李进禧,仰礼真,侯霄雷. 加味炙甘草汤合乙吗噻嗪治疗早搏的临床观察[J]. 上海中医药杂志,2000,34(9):15.

[15] 谢世荣,黄彩云,杨静娴,等. 甘草黄酮抗实验性心律失常的作用[J]. 基础医学与临床,1998,18(2):72.

[16] 仰礼真,姚望,祁小燕,等. 甘草次酸对豚鼠心室肌单个细胞 L 型钙通道的影响[J]. 中药新药与临床药理,2002,13(3):161.

[17] 朱若凯,陈奇,毕明. 炙甘草汤及有效成分配伍对猫缺血再灌注心脏触发活动及心肌损伤影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2001,7(6):27.

[18] Choi H J, Seon M R, Lim S S, et al. Hexane/ethanol extract of *Glycyrrhiza uralensis* licorice suppresses doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 rat cardiac myoblasts [J]. Exp Biol Med,2008,233(12):1554.

[19] Badreldin H Ali, Gerald Blunden, Musbah O Tanira, et al. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research [J]. Food Chem Toxicol,2008,46(2):409.

[20] 许庆文,卢传坚,欧明,等. 干姜提取物对兔急性心衰模型的保护和治疗作用[J]. 中药新药与临床药理,2004,15(4):244.

[21] 谢恬,钱宝庆,徐红. 干姜对心肌细胞缺氧缺糖性损伤的保护及其抗血小板聚集功能的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,1998,4(6):47.

[22] Ahmed R S, Seth V, Banerjee B D. Influence of dietary ginger (*Zingiber officinale* Rosc) on antioxidant defense system in rat: comparison with ascorbic acid [J]. Indian J Exp Biol,2000,38(6):604.

[23] Tan G G, Zhu Z Y, Jing J, et al. Characterization of constituents in Sini decoction and rat plasma by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to time-of-flight mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr,2011,25(8):913.

[24] 孙慧兰,吴伟康. 四逆汤有效成分不同组合抗心肌缺血再灌注损伤的作用研究[J]. 中草药,2002,33(4):333.

[25] 李翔. 四逆汤化学成分和抗心肌缺血作用的研究[D]. 上海:第二军医大学,2008.

基于 DNA 水平的中国药用植物分子鉴定方法

毛帅, 刘朝奇, 向婷婷, 袁丁*

(湖北三峡大学化生学院天然产物国家重点实验室, 宜昌 443002)

[摘要] 通过对近年来国内外基于 DNA 水平分子鉴定方法研究的文献回顾, 作者整理了几种经典的基于 DNA 水平的中药分子鉴定方法, 包括 RFLP, DNA microarray, RAPD, CAPS, ISSR, SSR 等。随着分子生物学的迅速发展, DNA 分子标记技术日趋成熟, 该领域出现了诸多分子标记技术, 并且已经能够很好的应用到中药基源鉴定中。最近兴起的 DNA barcoding 和 DNA chip 技术在 DNA 分子标记领域亦显示出了极大的优越性和潜力, 结合即将出现的新的分子生物学分析方法笔者做了相应的阐述。任何一种药材的鉴定方法都存在局限性, 重要的是要充分了解和应用其优势, 从而合理和有效地对现有方法进行补充和改进, 随着生物分子领域的迅速发展, 有理由相信 DNA 分子鉴定方法值得进一步的研究和开发。

[关键词] 分子标记; DNA; 中药鉴定; 分子生物学

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0238-05

[doi] 10.11653/syfy2014050238

DNA-based Authentication of TCM by Molecular Biological Techniques

MAO Shuai, LIU Zhao-qi, XIANG Ting-ting, YUAN Ding*

(Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development,
China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

[Abstract] Recently, molecular biotechnology has provided sophisticated molecular techniques for authentication of botanical materials at the DNA level and DNA technology provides a powerful tool to complement chemical analyses for authentication of Chinese medicinal plants and to ensure that herbal materials are not

[收稿日期] 20130805(005)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30873383;31070314)

[第一作者] 毛帅, 硕士研究生, 从事鄂西中药材研究与开发, Tel:15071726179, E-mail:947161858@qq.com

[通讯作者] *袁丁, 博士, 教授, 从事中药药理研究, Tel:15572799866, E-mail:yxydd@ctgu.edu.cn

- [26] 秦素红, 章泽铭, 何宇新, 等. 基于化学组分动态变化的附子配伍甘草煎煮条件研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24):20.
- [27] 陈建萍, 谭炳炎, 吴伟康, 等. 四逆汤中附子甘草配伍规律研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(3):16.
- [28] 沈红, 朱玲英, 姚楠, 等. 甘草与附子配伍对乌头碱、新乌头碱、次乌头碱大鼠药动学的影响[J]. 中药材, 2011, 34(6):937.
- [29] 张锦楠, 李亚伟, 徐艳霞, 等. 甘草和五味子对大鼠肝微粒体 CYP450 诱导作用的研究[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(6):424.
- [30] 潘英伟, 袁冬平, 陈卫平, 等. 以 HPLC 法测定附子甘草配伍对丙咪嗪血药浓度的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(1):102.
- [31] 杨明, 刘小彬, 黄庆德. 附子甘草配伍减毒增效机理探析[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(4):197.
- [32] 越皓, 皮子凤, 宋凤瑞, 等. 附子不同配伍药对中生物碱成分的电喷雾质谱分析[J]. 药学报, 2007, 42(2):201.
- [33] 韩天娇, 宋凤瑞, 刘忠英, 等. 附子配伍过程中二萜类生物碱在 Caco-2 小肠吸收细胞模型中吸收转运的 UPLC/MS 研究[J]. 化学学报, 2011, 69(15):1795.
- [34] 展海霞, 彭成. 附子与干姜配伍对心衰大鼠血流动力学的影响[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(1):42.
- [35] 向云亚, 蒋苏贞, 黄兆胜. 姜酚对小鼠肝药酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20):208.

[责任编辑 邹晓翠]