基础研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0916-04

复元胶囊的毒理学研究

刘婵娟[1],李荣亨[1],杨俊卿[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院中西医结合科,重庆 400016;2. 重庆医科大学药学院药理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察动物对复元胶囊的急性及长期毒性反应,为临床用药的安全剂量提供参考。方法:(1)急性毒性试验:昆明种小鼠 40 只,随机分成给药组和对照组,采用最大给药量法测定小鼠口服复元胶囊最大耐受量。(2)长期毒性试验:SD 大鼠 80 只,随机分成 4 组,采用 3 个剂量(9.0、3.0、1.0 g/kg)ig 大鼠。每天灌胃给药 1 次,连续灌胃 90 d,观察大鼠的一般情况,检测血常规及血液生化学、组织病理变化及停药 14 d 时上述指标的变化。结果:小鼠口服复元胶囊的最大耐受量为 30 g/kg。大鼠连续给药 90 d 时,高剂量组的谷丙转氨酶、谷草转氨酶及肌酐值比空白对照组升高($P<0.01$);肝肾重量系数增大($P<0.05$);2 只大鼠肾脏近曲小管上皮细胞局部中度水肿,轻度脂肪变性溶解,管腔稍增大,肾间质少量炎细胞浸润。1 只大鼠肝细胞局部脂肪变性溶解。停药 14 d 后,大鼠体重、摄食量、行为活动、血象、重要器官脏器系数均正常,病理学检查,各组各脏器均未发现明显的改变。结论:复元胶囊在规定剂量下服用是安全可靠的。

【关键词】复元胶囊;急性毒性;小鼠;长期毒性;大鼠

【中国图书分类法分类号】R99 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-23

A toxicological study of Fuyuan capsule

LIU Chan-juan, et al

(*Department of Traditional Medicine Integrated Western Medicine, the First Affiliatted Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the acute toxicity and the long-period toxicity reaction of Fuyuan Capsule (FYC) to provide the reference dosage for human beings. *Methods*:Tests of acute oral toxicity: 40 mice (Kun Ming kind) were randomly divided into two groups, the drug test group and the control group. The maximum administration dosage (MAD) of FYC were determined by iq administration in mice. Tests of long oral toxicity: 80 SD rats were randomly divided into four groups: high, middle, and low dose of FYC group and control group. FYC was continuously administered for 90 days. Rats were given drugs every day. When the experiment was finished and withdrawed for 14 days, rats were killed and the growth condition, blood cell counting and biochemical targets were measured. Histomorphologieal examination were simultaneously performed. *Results*:The MAD of FYC by iq administration was greater than 30g/kg in mice.In the long-period toxicity test, after administered repeatedly for 90 days, in high dose group AST, ALT and Crea increased($P<0.01$); The weight coefficients of liver and kidneys were larger in high dose group than that in control group ($P<0.01$). Edema of the epithelium cells in proximal convoluted tubule, degeneration of fat , broadening of lumens occured in two rats; Fat in liver cells was degenerated in one rat.14 days after stopping the drug, the values of AST, ALT, Crea, hematobiochemical, and pathological findings and coefficient of organs could completely return to nomorl. *Conclusion*: FYC is safe to be administered in the dose prescribed.

【Key words】Fuyuan capsule; Acute toxicity; Mouse; Long-period toxicity; Rat

复元胶囊主要由人参、黄芪、丹参、淫阳藿、川芎、三七、鹿茸等十几味中药组成而制成的胶囊剂,是治疗肾虚兼气虚血瘀证的经验方。经多年临床试验证明复元胶囊能明显改善气虚血瘀病人的血液流变学,心脑血流动力学及血管活性物质的失衡状态,提高气虚血瘀证冠心病溶学磷脂酸水平,改善心脏功能[1]。另外复元胶囊能抑制骨关节炎软骨中白介素 1β 的蛋白表达,提高骨关节炎软骨中转化生长因子 β2 的蛋白和 mRNA 的水平,稳定二者水平,对软骨退变有一定的预防作用[2]。为给临床用药提供安全的实验依据,对复元胶囊进行了毒理学研究,观察该药的急性毒性及长期毒性反应。

作者介绍:刘婵娟(1979-),女,硕士,研究方向:新药的开发与研制。

通讯作者:李荣亨,男,教授,E-mail:lrongheng1231@163.com。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 昆明种小鼠 40 只,雌雄各半,健康状况良好,18~22 g;清洁级 SD 大鼠 80 只,180~200 g(8 周龄),雌雄各半,均由重庆医科大学实验动物中心提供,实验动物在 SPF 条件下饲养,实验动物质量合格证:SCXK(渝)2007-0001,实验动物使用许可证:SYXK(渝)2007-0001。动物实验室环境温度:20℃~25℃,湿度:40%~55%。

1.1.2 药物 由黄芪、人参、丹参、淫羊藿、菟丝子、川芎、三七等经水提醇沉后浓缩、干燥再加入鹿茸粉灭菌混匀制成的复元胶囊剂,为棕褐色粉末,每克胶囊重 0.41 g,每克粉末相当于 3 g 生药,临床用量为 0.10 g/kg 体重,折合 0.30 g 生药/kg 体重。由重庆希尔安药业公司生产,批号:2007827。实验前蒸馏水灌胃使用。

1.1.3 仪器 7080 型全自动生化分析仪(日立公司);BC-3000 型全自动血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);PM-10AD 光学显微镜(日本 Olympus 公司);JA2003 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.1.4 试剂 天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(T-BIL)、肌酐(Crea)、尿素氮(BUN)、血糖(GLU)、总胆固醇(T-CHO)试剂盒均由上海申能博彩生物科技有限公司提供。全自动血球计数生化仪试剂由深圳迈瑞生物技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 小鼠口服急性毒性实验 因受药物的浓度和体积限制,无法测出半数致死量(LD_{50}),做最大给药量试验[3]。取 40 只小鼠,雌雄各半,按文献方法[4]实验禁食不禁水,随机分成实验组和空白组,每组 20 只。以浓度为 0.4 ml/10 g 体重 ig 给药,空白对照组给与同等剂量的蒸馏水,1 d 内给药 3 次,严密观察并记录药后动物死亡及其饮食活动、毛发、排泄等情况。并连续观察 14 d,称其体重。实验结束时处死动物,肉眼观察主要脏器组织有无异常,并计算小鼠口服复元胶囊的最大耐受剂量。

1.2.2 大鼠长期毒性实验[4,5] 根据复元胶囊的临床推荐剂量,将大鼠按性别和体重随机分成 4 组,即空白对照组和高剂量组(9.0 g/kg)、中剂量组(3.0 g/kg)、低剂量组(1.0 g/kg),每组 20 只,共 80 只,雌雄各半。各组均灌胃给药,每周 6 d,给药体积为 30 ml/kg 体重,对照组灌胃为等体积的蒸馏水,给药前及给药后每周称动物体重 1 次,并按平均体重调整给药量。实验期间每天观察大鼠的一般状态、体征、摄食量,饮水及粪便状况。给药 90 d,于末次给药后 24 h,各组均抽取 10 只大鼠,雄雌各半;停药 14 d 各组抽取剩下大鼠,腹腔注射 1%的戊巴比妥钠溶液浅麻,从下腔静脉取血,检查血液学和血液生化学指标。血液学检查项目为:血色素(Hb),红细胞计数(RBC),白细胞计数(WBC),白细胞分类(DC),血小板(PLT),网织红细胞计数(RC)。血液生化学检查项目为:AST、ALT、ALP、TP、ALB、T-BIL、Crea、BUN、GLU、T-CHO。取血后立即取动物的心、肝、脾、肺、肾、睾丸、子宫脏器,用精密电子天平称重,根据体重分别计算出脏器系数;进行肉眼观察后用福尔马林液浸泡固定,作组织切片,包埋,HE 染色,光镜下检查病理学改变。

1.3 统计学处理方法

应用 SAS8.2 统计软件进行数据分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法采用 t 检验、方差分析、各因素水平间效应的两两比较采用 SNK 法。

2 结 果

2.1 小鼠急性毒性实验

3 次/d 最大浓度、最大体积 ig 复元胶囊后,动物皮毛,行为活动,进食进水未见任何异常。观察 14 d 后动物无 1 例死亡,测得动物的复元胶囊小鼠口服最大给药量为 30 g/kg,折合 90.0 g 生药/kg 体重,相当于成人(按 60 kg 计)临床每日口服剂量的 300 倍。肉眼尸检未见主要脏器组织明显异常,给药组小鼠体重增长与空白对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.2 大鼠长期毒性实验

2.2.1 对大鼠一般状况的影响 给药 90 d 高、中剂量组和对照组各死亡动物 1 只,尸检肉眼未见明显病变。高剂量组与中剂量组给药后 7 d 摄食量增加,其余各组大鼠的自主活动、饮水摄食、排泄等均未见异常反应。但给药各组与生理盐水对照组相比较,在连续用药的过程中出现体重增加,尤其是高剂组的雄性大鼠,给药后第 10 d 开始到 90 d 停止给药为止,体重一直明显高于生理盐水组($P<0.05$),停药后体重增加有所缓解,在停药期间的体重与生理盐水组比较已无明显差异($P>0.05$)。见表 2。

2.2.2 对血液学的影响 复元胶囊各给药剂量组对大鼠连续给药 90 d,各血液学检查指标与对照组比较均无显著性差异($P>0.05$),并且均在正常值范围内。连续给药 90 d 与停药 14 d 前后各组间比较均无显著性差异(P>0.05)。见表 3。

2.2.3 对血液生化指标的影响 复元胶囊连续给药 90 d,高剂量组 AST、ALT、Crea 升高,停药后 14 d 各组大鼠生化指标均恢复正常,结果见表。说明连续服用复元胶囊 90 d 引起 AST、ALT、Crea 升高($P<0.01$),停药后 14 d 恢复正常,各组比较均无差异($P>0.05$)。见表 4。

2.2.4 对主要脏器系数的影响 连续服用复元胶

囊 90 d,高剂量组肝肾重量系数增高,恢复期各个剂量组脏器系数与空白对照组比较均无差异。结果见表 4。说明复元胶囊连续服用 90 d,高剂量组大鼠的肝脏和肾脏重量系数有一定的影响($P<0.01$),停药后可恢复,未见滞后性毒性反应,对其余各给药剂量组各脏器系数无明显影响($P>0.05$)。见表 5。

2.2.5 对重要器官组织病理形态的影响 连续给药 90 d 时高剂量组 2 只大鼠肾脏近曲小管上皮细胞局部中度水肿,轻度脂肪变性溶解,管腔稍增大,肾间质少量炎细胞浸润;1 只大鼠肝细胞局部脂肪

表 1 小鼠 1 d 内多次最大给药量试验体重变化表($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (n)	剂量(g/kg)	给药前		给药后		增长率(%)	
			雄性小鼠	雌性小鼠	雄性小鼠	雌性小鼠	雄性小鼠	雌性小鼠
空白组	20	-	19.78 ± 0.69	19.66 ± 0.74	24.82 ± 1.07	25.26 ± 1.05	25.48	28.48
给药组	20	30	19.64 ± 0.72	19.46 ± 0.74	24.24 ± 0.94	24.6 ± 1.06	23.42	26.41

注:给药组小鼠体重的增长与空白组比较,采用成组 t 检验;给药组雄性小鼠体重的增长与空白组比较,差异无统计学意义($P=0.073$);给药组雌性小鼠体重的增长与空白组比较,差异无统计学意义($P=0.064$)。

表 2 大鼠高剂量给药后体重变化表($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	给药 90 d		停药后 14 d		增长率(%)	
		雄性大鼠	雌性大鼠	雄性大鼠	雌性大鼠	雄性大鼠	雌性大鼠
高剂组	20	441.40 ± 8.86	409.90 ± 10.83	385.90 ± 17.82	360.00 ± 6.50	427.54	398.49
对照组	20	382.60 ± 15.90	352.70 ± 11.58	376.90 ± 7.40	350.29 ± 7.60	375.63	351.23

注:高剂组大鼠体重的增长与对照组比较,采用成组 t 检验;给药 90 d 高剂组大鼠体重的增长与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);停药后 14 d 高剂组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 对大鼠血液学的影响($\bar{x}\pm s$)

项目	给药 90 d 后即刻				停药后 14 d			
	高剂量(n=10)	中剂量(n=10)	低剂量(n=10)	对照组(n=10)	高剂量(n=10)	中剂量(n=10)	低剂量(n=10)	对照组(n=10)
WBC(10^9 个/L)	13.51 ± 4.68	9.85 ± 3.62	9.25 ± 4.79	10.73 ± 2.76	11.94 ± 5.32	8.74 ± 6.44	8.45 ± 8.56	7.64 ± 7.55
L(10^9 个/L)	8.26 ± 7.54	7.17 ± 6.55	7.06 ± 1.32	8.54 ± 6.34	8.07 ± 3.64	6.48 ± 4.67	6.75 ± 3.67	6.43 ± 4.76
N(10^9 个/L)	4.34 ± 3.66	2.30 ± 1.47	2.07 ± 2.41	2.14 ± 3.45	3.54 ± 7.45	2.21 ± 6.35	1.11 ± 3.54	1.14 ± 4.65
RBC(10^{12} 个/L)	8.56 ± 6.78	7.64 ± 4.56	7.04 ± 5.78	7.58 ± 5.73	8.43 ± 3.21	8.02 ± 5.44	7.56 ± 7.84	7.84 ± 9.71
Hb(g/L)	157.47 ± 7.56	152.78 ± 8.56	147.67 ± 3.45	150.48 ± 7.56	160.45 ± 2.34	150.46 ± 5.47	148.78 ± 8.22	156.21 ± 5.46
PLT(10^9 个/L)	820.45 ± 1.32	812.32 ± 5.68	769.06 ± 9.12	780.76 ± 5.86	812.63 ± 6.44	789.33 ± 6.02	764.76 ± 4.76	789.43 ± 7.74
RC(%)	2.76 ± 5.93	2.53 ± 7.08	2.45 ± 3.40	2.35 ± 6.48	2.73 ± 6.68	2.41 ± 9.33	2.68 ± 7.89	2.45 ± 6.41

表 4 对大鼠生化指标的影响($\bar{x}\pm s$)

项目	给药 90 d 后即刻				停药后 14 d			
	高剂量 (n=10)	中剂量 (n=10)	低剂量 (n=10)	对照组 (n=10)	高剂量 (n=10)	中剂量 (n=10)	低剂量 (n=10)	对照组 (n=10)
AST(U/L)	210.45 ± 20.24*↑	150.03 ± 6.50	120.24 ± 16.3	80.56 ± 10.06	81.31 ± 11.23	76.29 ± 8.45	72.36 ± 8.63	78.21 ± 9.75
ALT(U/L)	96.31 ± 11.24*↑	82.48 ± 4.74	71.47 ± 11.67	35.68 ± 7.4 6	36.14 ± 9.07	35.47 ± 6.62	29.89 ± 2.45	35.84 ± 6.78
ALP(U/L)	133.65 ± 23.53	141.09 ± 46.25	107.68 ± 27.48	97.78 ± 41.69	90.44 ± 22.73	97.54 ± 36.92	87.46 ± 67.32	73.33 ± 68.58
TP(g/L)	60.50 ± 34.66	56.78 ± 48.51	64.43 ± 57.38	51.34 ± 12.46	53.89 ± 67.45	57.43 ± 19.06	60.12 ± 34.46	56.23 ± 64.79
ALB(g/L)	38.45 ± 67.90	33.75 ± 34.56	36.12 ± 34.41	43.89 ± 56	35.89 ± 23.11	35.21 ± 54.77	34.56 ± 78.22	36.77 ± 65.46
T-BIL(μmol/L)	3.24 ± 1.22	3.21 ± 7.68	2.49 ± 9.12	4.67 ± 5.86	2.65 ± 7.44	3.01 ± 8.02	2.98 ± 1.76	2.56 ± 7.43
Crea(μmol/L)	51.46 ± 7.93*↑	48.53 ± 7.08	32.45 ± 3.40	28.45 ± 6.48	40.73 ± 8.68	36.41 ± 9.33	30.78 ± 7.89	26.45 ± 9.41
BUN(mmol/L)	11.12 ± 2.43	8.34 ± 6.59	9.68 ± 34.22	10.13 ± 7.56	7.98 ± 6.83	7.08 ± 5.41	6.49 ± 7.88	6.45 ± 8.66
GLU(mmol/L)	9.57 ± 7.88	8.97 ± 5.68	9.32 ± 6.08	10.01 ± 4.70	9.01 ± 8.44	8.05 ± 3.65	8.45 ± 7.09	8.56 ± 6.80
T-CHO(mmol/L)	1.58 ± 8.67	1.87 ± 6.98	1.59 ± 3.33	1.87 ± 2.68	1.34 ± 3.48	1.47 ± 3.45	1.45 ± 9.68	2.23 ± 7.84

注:与对照组比较,*$P<0.01$,↑表示增高

表 5 对大鼠主要脏器系数（mg/100 g 体重）的影响（$\bar{x}\pm s$）

脏器	给药 90 d 后即刻（n=10）				停药后 14 d（n=10）			
	高剂量	中剂量	低剂量	对照组	高剂量	中剂量	低剂量	对照组
心	332.09 ± 21.18	328.29 ± 39.04	328.00 ± 13.57	328.00 ± 13.57	329.85 ± 30.97	325.05 ± 64.58	274.55 ± 56.20	316.41 ± 81.40
肝	376817 ± 35987*↑	3581.67 ± 189.37	3362.87 ± 182.99	3362.87 ± 182.99	3328.16 ± 290.36	2908.39 ± 288.30	2874.03 ± 344.53	2817.13 ± 195.59
脾	204.92 ± 28.50	183.47 ± 46.99	181.53 ± 25.60	181.53 ± 25.60	195.79 ± 36.82	170.20 ± 19.71	174.04 ± 35.97	176.40 ± 50.71
肺	612.60 ± 93.06	578.38 ± 12.85	549.64 ± 69.92	549.64 ± 69.92	558.97 ± 95.66	516.75 ± 57.52	503.55 ± 78.32	521.44 ± 62.87
肾	767.60 ± 15.47*↑	678.45 ± 36.30	615.83 ± 85.83	615.83 ± 85.83	666.16 ± 64.00	648.61 ± 13.81	577.10 ± 57.40	582.96 ± 46.41
睾丸	855.71 ± 66.67	827.81 ± 67.90	815.02 ± 41.12	815.02 ± 41.12	845.29 ± 84.23	765.17 ± 35.52	763.09 ± 60.71	745.55 ± 29.65
子宫	205.18 ± 41.58	168.84 ± 17.68	162.05 ± 92.42	154.41 ± 75.12	210.64 ± 26.26	168.23 ± 49.21	151.50 ± 76.79	145.27 ± 26.59

注：与对照组比较，*P<0.01，↑表示增高

变性溶解。其余各脏器未见明显异常改变。停药 14 d 后，各给药剂量组大鼠脏器组织病理切片未发现病理改变。

3 讨 论

复元胶囊是由黄芪、人参、丹参、三七、淫羊藿、菟丝子、鹿茸、川芎等组成，我们采用淫羊藿、菟丝子、鹿茸等补益肝肾，配以黄芪、人参、丹参、川芎、三七活血化瘀。全方标本兼治，以补益肝肾为主治其本，活血化瘀为辅治其标，使“通则不痛”，从而达到标本兼治的目的，临床用于肾虚兼气虚血瘀证取得很好的疗效。在急性毒性实验中发现，给小鼠 ig 复元胶囊的最大耐受量可达 30 g/kg，折合 90 g 生药/kg 体重，相当与临床成人按（60 kg 计）每日口服剂量的 300 倍；给药 90 d 后，高剂量组肝脏和肾脏功能，脏器系数和组织形态学有一定的毒性影响，但停药后各项指标均在正常范围内与对照组相比无显著性差异。

方中人参谓大补元气之品，所含的人参皂苷是主要活性成分，但时有服人参中毒甚至死亡的报道，中毒时可出现头昏、失眠、抑郁、心悸、胸闷、呕吐、腹胀、食欲减退等症状。现代研究证明人参的毒性与剂量有关，小鼠口服人参粉的急性 LD_{50} 在 5 g/kg 以上，皮下注射人参浸膏的急性 LD_{50} 在 16.5 mg/kg，其半数致死量较高，说明人参确实有毒，但属小毒之物，用之宜慎，尤不可大剂量或长期使用[6]。三七含三七皂苷，小剂量有收缩血管作用，大剂量则有扩张血管的作用。因毛细血管扩张使炎性细胞乘机侵入，致局部毛细血管充血、水肿[7]。鹿茸多肽是鹿茸中的活性物质，剂量过大可出现恶心呕吐、腹痛腹泻等消化系统影响和血清转氨酶升高，肝功能异常等不良反应[8]。川芎中含川芎嗪，口服偶有轻度消化系统症状和头晕、一过性氨基转移升高及变态反应等不良反应[9]。这些均为复元胶囊在临床应用中提供了毒理学依据。

参 考 文 献

[1] 刘 洪，李荣亨. 复原胶囊对气虚血瘀证冠心病血液 TXB2、6-Keto-PGF1a、NO、ROS 的干预作用及相关机制研究[J]. 中国老年学杂志，2006，11(26)：1484-1485.

[2] 钟 玉，李荣亨，周小莉，等. 复元胶囊对实验性兔骨关节炎白介素 1 及转化生长因子 β_2 的调节作用[J]. 重庆医科大学学报，2007，32(8)：856-861.

[3] 国药管理[1999]363 号，中药新药研究的技术要求[S].

[4] 陈 奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，2000.118-120.

[5] 徐淑云. 药理实验方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，1991.201-203.

[6] 孙小侠. 有毒中药药性药理及临床研究应用实用手册[M]. 当代中国音像出版社，2004.1023-1024.

[7] 缴秀芹，王芳普，郭清峰. 药物不良反应及其相互作用[M]. 第 1 版. 中国科学技术出版社，2000.194-195.

[8] 高东宸，张丽雅. 药物不良反应监察指南[M]. 第 1 版. 中国医药科出版社，1996.278.

[9] 孙定人，齐 平，靳颖华. 药物不良反应[M]. 第 3 版. 北京：人民卫生出版社，2003.960.

（责任编辑：冉明会）