

克方的急性毒性和长期毒性实验研究[△]

张光际*, 杨凡, 时乐, 尹莲, 徐立[#](南京中医药大学药学院, 南京 210023)

中图分类号 R994.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)34-4777-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.34.08

摘要 目的:考察克方的急性毒性和长期毒性,为其临床试验与合理用药提供参考。方法:将20只ICR小鼠随机分为克方组(350 g/kg)和正常对照组(饮用水),每组10只,每天ig给药2次(间隔8 h),连续14 d,进行急性毒性实验。将120只SD大鼠随机分为正常对照组(饮用水)和克方高、中、低剂量组[5、2.5、1.25 g(生药)/ml],每组30只(♀♂各半),每天ig给药2次(间隔8 h),连续12周,进行长期毒性实验。结果:克方最大耐受量为350 g/kg,相当于临床人用量的140倍。与正常对照组比较,克方高剂量组大鼠体重增长缓慢、摄食量减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$);雄性大鼠血中红细胞分布宽度、血红蛋白含量分布宽度、平均血红蛋白浓度降低,血小板平均体积、网织红细胞升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但均在本实验室正常生理值范围内;克方高剂量组大鼠血中尿素氮、总胆红素、天冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶活性升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),恢复期大鼠未见异常;给药12周后,克方中、低剂量组大鼠凝血酶原时间缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$);克方高剂量组发现8只大鼠膀胱黏膜上皮细胞轻、中度变性和坏死、脱落,恢复期无异常。结论:克方在临床140倍用量下对小鼠未见明显毒性作用。克方连续重复给药12周后,对大鼠肝脏、肾脏代谢有影响;具有一定的可逆性膀胱毒性;恢复期大鼠各项检查未见病变加深或迟发性病变。

关键词 克方;急性毒性;长期毒性;大鼠;小鼠

Study on Acute Toxicity and Long-term Toxicity of Kefang

ZHANG Guangji, YANG Fan, SHI Le, YIN Lian, XU Li (College of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate acute toxicity and long-term toxicity of Kefang (KF), and to provide reference for clinical trial and rational drug use. **METHODS:** 20 ICR mice were randomly divided into KF group (350 g/kg) and normal control group (drinking water), with 10 mice in each group; they were given relevant medicine intragastrically, twice a day (every 8 h), for consecutive 14 d; acute toxicity test was conducted. 120 SD rats were randomly divided into normal control group (drinking water), KF high-dose, medium-dose and low-dose groups [5, 2.5, 1.25 g (crude drug)/ml], with 30 rats in each group (half male and half female); treatment groups were given relevant medicine intragastrically twice a day (every 8 h), for consecutive 12 weeks; long-term toxicity was conducted. **RESULTS:** The maximum tolerated dose of KF was 350 g/kg, which was equal to 140 times as clinical human dosage. Compared to normal control group, body weight of rats in KF high-dose group increased slowly and food intake decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$); red blood cell distribution width (RDW), hemoglobin distribution width (HDW), mean hemoglobin concentration (MCHC) of male rats were all decreased, while mean platelet volume (MPV) and reticulocyte (RET) were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$); these indicators were all in normal physiological range of our laboratory. BUN, TBIL, AST and ALT activities of KF high-dose groups increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and no abnormal change was found during recovery period; 12 weeks after medication, prothrombin time of KF medium-dose and low-dose groups shortened ($P<0.05$ or $P<0.01$); mild and middle degeneration and necrosis, denudation of bladder epithelial cells were found in 8 rats of KF high-dose group, no abnormality was found during recovery period. **CONCLUSIONS:** There was no obvious toxic effect on the mice in the dose of 140 times of the clinical dose. Continuous 12-week administration of KF will influence liver and renal metabolism of rats; KF shows reversibility toxicity to bladder. No deeper lesions or delayed lesions is found in rats during recovery period.

KEYWORDS Kefang; Acute toxicity; Long-term toxicity; Rat; Mice

国医大师周仲瑛教授根据多年的临床观察与治疗经验,总结出肺癌的关键癌毒因素在于痰浊、瘀血、气逆,肺之气阴两虚是肺癌发生、复发、转移的关键。因此,他确立治则重在标实祛邪、正虚治本,治法重在化痰泄浊、活血祛瘀、行气降逆

△ 基金项目:江苏省社会发展项目(No.BE2011848);2015年度南京中医药大学科技创新风险基金项目(No.CX201505)

* 硕士研究生。研究方向:新药安全性评价。E-mail:15861812316@163.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:代谢性疾病药理和毒理学研究、新药安全性评价。E-mail:xuliglp@126.com

以及益气养阴,进而总结出了一种治疗肺癌的临床经验方——克方。克方由冬瓜子、法夏、胆南星、山慈姑、猫爪草、金荞麦、鱼腥草、仙鹤草、苏木、红花、沙参、玉竹、麦冬等13味中药组成。其中,法半夏等燥湿化痰;金荞麦、鱼腥草软坚散结;仙鹤草、红花活血化瘀;沙参、麦冬益气养阴。克方临床用量为163 g(生药)/d,煎煮后口服。为了在临床更好地推广和使用汤药,本实验从动物急性毒性实验和长期毒性实验两个方面对克方进行安全性评价^[1-3]。

1 材料

1.1 仪器

ADVIA 2120 全自动血液分析仪(德国 Siemens 公司); 7100 全自动生化分析仪(日本日立公司);全自动凝血分析仪(法国 Stago 公司);BX41 光学显微镜(日本 Olympus 公司);BSA323S-CW 分析天平(德国 Sartorius 集团)。

1.2 药品

克方[南京中医药大学中药化学教研室自制,棕褐色流浸膏,批号:20140916,规格:5 g(生药)/ml]。

1.3 动物

ICR 小鼠 20 只,SPF 级,♀♂ 各半,体质量 18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号:SCXK(京)2012-0001];SD 大鼠 120 只,SPF 级,♀♂ 各半,体质量 60~80 g,购自浙江省实验动物中心[许可证号:SCXK(浙)2014-0001]。

1.4 实验环境

南京中医药大学实验动物中心[动物中心批准使用许可证号:SYXK(苏)2014-0001]。给药前,动物先饲养、观察 1 周。给药后,同组每 5 只同性别动物合笼,用全价颗粒饲料(江苏省协同医药生物工程责任有限公司供给)喂养,自由饮水。饲养环境温度为(23±3)℃、湿度为 50%~65%。

2 方法

2.1 急性毒性实验

取 ICR 小鼠 20 只,适应性饲养 1 周后以随机数字表法随机分为正常对照组和克方给药组。克方给药组小鼠每天 ig 给药 2 次,药液质量浓度为 5 g(生药)/ml,每次给药量为 35 ml/kg,两次给药间隔 8 h;正常对照组小鼠 ig 等体积饮用水。连续观察 14 d,记录小鼠行为、活动、体质量、粪便、死亡等情况。观察期间若发生小鼠濒死或死亡,则及时解剖进行尸检观察;未死亡小鼠于 2 周后处死,进行尸检观察。

2.2 长期毒性实验

取 SD 大鼠 120 只(♀♂ 各半),适应性饲养 1 周后以随机数字表法随机分为正常对照组和克方高、中、低剂量组,每组 30 只(♀♂ 各半)。克方高、中、低剂量组大鼠每天 2 次以 7 ml/kg 分别 ig 5、2.5、1.25 g(生药)/ml 克方水煎液(分别对应成人临床剂量的 28、14、7 倍剂量),正常对照组大鼠 ig 等体积饮用水,2 次给药间隔 8 h。连续给药 12 周后,每组取大鼠 20 只(♀♂ 各半),麻醉后腹主动脉取血,作血常规、凝血四项及血液生化指标测定。然后颈椎脱臼处死并解剖大鼠,作主要脏器的肉眼观察、脏器系数计算并进行组织学检查。恢复期停药 2 周后,将剩余大鼠按上述要求进行同样检查^[4-8]。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行数据处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 急性毒性实验结果

以克方 350 g(生药)/kg(5 g/ml×35 ml/kg×2 次)剂量 1 日内分 2 次 ig 给药的 10 只小鼠,仅给药 24 h 内见小鼠自发活动减少,给药 24 h 后恢复正常。在观察时间内一般情况良好,毛色光滑,活动、摄食、粪便色泽与质地均正常,活动无减少;且 2 周

内无死亡及其它异常现象发生。14 d 后处死小鼠,解剖无肉眼可见的病理性改变。

3.2 长期毒性实验结果

3.2.1 一般情况 在克方 70、35、17.5 g(生药)/kg 3 个剂量连续对大鼠 ig 给药 12 周及恢复期 2 周内,各组大鼠一般情况均良好,外观、行为、排泄物等方面均未见异常变化。

3.2.2 体质量与摄食量 体质量测定结果表明,克方高剂量组大鼠体质量增长缓慢,从第 2 周开始体质量与正常对照组大鼠比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);其余各组大鼠体质量与正常对照组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。摄食量检查结果表明,克方高剂量组大鼠的摄食量减少,雄性大鼠从第 2 周开始,雌性大鼠从第 3 周开始,其摄食量与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);其余各组大鼠的摄食量与正常对照组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3.2.3 血常规 给药 12 周后,克方高、中、低剂量组雄性大鼠的红细胞分布宽度(RDW)、平均血红蛋白分布宽度(HDW)均显著降低,克方高、中剂量组雌性大鼠网织红细胞(RET)水平显著升高,与正常对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。恢复期,克方高、中、低剂量组雄性大鼠平均血小板体积(MPV)升高,克方高、中、低剂量组雌性大鼠平均血红蛋白浓度(MCHC)降低,与正常对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。以上指标的变化均在本实验室正常生理值范围内,与供试品无相关性。

3.2.4 血液生化 给药 12 周后,克方高剂量组雄性大鼠尿素氮(BUN)水平升高,雌性大鼠天冬氨酸转氨酶(AST)水平升高;克方中、低剂量组雄性大鼠总胆红素(TBIL)水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。恢复期内各组大鼠血液生化指标均未见异常,这提示临床用药要密切注意这一项指标的变化。其余有变化的血液生化指标都是由于 SD 偏小所致,同时变化幅度均在 10% 内,与供试品无相关性。

3.2.5 凝血四项 给药 12 周后,克方中、低剂量组大鼠凝血酶原时间(PT)明显缩短,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);克方给药组大鼠的其余凝血指标与正常对照组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3.2.6 脏器系数 给药 12 周及恢复期,各组大鼠心、肝、脾、肺、胸腺、肾、肾上腺、脑、子宫、卵巢、睾丸、附睾等脏器系数与正常对照组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3.2.7 尸检及病理组织学 经肉眼观察,正常对照组和克方高、中、低剂量组大鼠各主要脏器均未见异常变化。光学显微镜观察,克方高剂量组出现 8 只大鼠膀胱黏膜上皮细胞轻、中度变性和坏死、脱落,其中 3 只大鼠膀胱内可见大量沉积物,与正常对照组比较有明显差异。这提示克方在所设高剂量下对大鼠膀胱有一定的毒性;其余各脏器未见实质细胞变性、坏死,未见间质血管扩张、充血、炎细胞浸润等病理变化。恢复期未见大鼠膀胱及其他脏器有病变,这说明克方在所设剂量下对大鼠有膀胱靶向毒性且具有可逆性。

4 讨论

急性毒性实验中因克方毒性较小,预实验中无法测定其半数致死浓度(LD₅₀),故测定其最大耐受量。在本实验中,小

鼠灌服克方,一日最大耐受量为35 ml/(kg·d)×2次[350 g(生药)/(kg·d)],以正常人体质量为65 kg计,相当于成人临床剂量的140倍]。小鼠给药后24 h内自见活动减少。其原因可能由于高剂量的药物灌服后引起胃肠反应且方中红花、麦冬等有一定的中枢抑制作用导致。本方中的鱼腥草、仙鹤草、苏木、红花、玉竹等药均可单独测出其LD₅₀,组方配伍后无法测出克方ig给药后的LD₅₀,这表明克方配伍可有效降低单味药毒性。可能有以下两个原因:一是方中仙鹤草和猫爪草的解毒作用;二是方中冬瓜子、鱼腥草、红花、沙参、玉竹、麦冬等药均有不同程度的免疫促进作用,个药间相互作用降低了整方毒性。根据本研究结果可知,克方在临床140倍用量下未见对小鼠有明显毒性反应,这提示临床用药较为安全。

长期毒性实验中体质量、摄食量的结果检查可见,克方高剂量组大鼠摄食量减少、体质量增长缓慢。可能有以下几个原因:(1)可能与所设克方高剂量组给药的质量浓度较高,影响了大鼠的胃肠活动有关;(2)方中冬瓜子、法半夏等对胰蛋白酶有抑制作用,影响了大鼠进食后的消化;(3)方中仙鹤草对大鼠在位小肠的蠕动也有部分抑制作用,降低了小肠的收缩幅度和张力,影响动物进食后的排泄活动。可见,可能是由于上述几个因素影响了高剂量组大鼠的摄食量,进而导致该组大鼠的体质量增长缓慢。

由血液生化指标的检查结果可见,给药12周后仅见受试大鼠血清中BUN、TBIL、AST升高,这表明该方可能对肝、肾有一定的影响,这可能是由于半夏的肝、肾损伤毒副作用导致。但方中所用半夏为炮制品,毒副作用大大减轻,且停药2周后,大鼠血液生化指标恢复正常,这表明克方对动物肝、肾功能指标的影响具有可逆性,并提示临床用药时应密切关注患者肝、肾相关指标的变化,定期监测。

由凝血四项的检查结果可见,所设克方中、低剂量组连续给药12周后,克方中剂量组大鼠PT缩短了0.56 s,低剂量组大鼠PT缩短了0.95 s,与正常对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$);然而克方高剂量组大鼠PT与正常对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),这可能与中药多成分、多靶点的特点有关。方中法半夏、仙鹤草、麦冬等含有促凝血成分,而红花中的红花黄色素具有抗凝血作用,且抗凝血作用随剂量的增加而增强。随着克方给药质量浓度的升高,红花中红花黄色素的抗凝血作用增强,逆转了法半夏、仙鹤草、麦冬等药物的促凝血作用。克方高、中、低剂量组大鼠连续ig给予克方12周后与正常对照组比较,凝血四项指标仅见PT缩短,且都在正常值范围内;恢复期大鼠凝血四项指标均无异常,且方中法半夏的凝血作用具有动物种属专一性,对人不产生促凝作用。可见,克方对凝血四项的影响极小。

病理检查发现,连续给药12周后,所设克方高剂量组大鼠

出现8只大鼠膀胱黏膜上皮细胞轻、中度变性和坏死、脱落,其中3只大鼠膀胱内可见大量沉积物,与正常对照组比较有明显差异。停药2周后大鼠可恢复正常,这提示克方毒性的膀胱靶向性与可逆性。方中13种不同比例配伍的中药尚未见有膀胱毒性的报道,且有研究证明方中鱼腥草对膀胱炎有显著的治疗效果^[9-10]。本实验所设高剂量达到临床人用剂量的28倍,可能是由于随着给药的剂量增加,超过了治疗量而产生了膀胱毒性,所设中、低剂量克方分别对应临床人用量的14、7倍,临床人用量更接近所设低剂量,未见有明显膀胱毒性。这提示临床使用中应严格控制使用剂量,谨遵医嘱。

综上所述,克方毒副作用较小。临床使用过程中应在临床医师指导下定期监测肝、肾功能指标变化。由于方中含有仙鹤草,而仙鹤草中鹤草酚与食用油同服可增加鹤草酚的毒性,故建议临床使用时叮嘱患者清淡饮食。在克方安全性较好得到实验验证后,本实验后续将进一步探讨克方的有效性,并探讨其可能的作用机制。

参考文献

- [1] 吴芳,姚佳琪,尹莲. GC法同时测定周氏克金岩方挥发油配伍前后变化[J]. 中成药,2013,35(5):974.
- [2] 韩曼,吴芳,张旭,等. 周氏克金岩方中6种黄酮指标成分的UV在线检测[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(9):56.
- [3] 黄震洲,陈美娟,熊飞,等. 周氏克金岩方有效成分槲皮素促进肺癌细胞NCI-H460凋亡的相关机制研究[J]. 南京中医药大学学报,2012,28(3):235.
- [4] 李志强,詹君,常艳鹏,等. 苦碟子注射液安全性再评价中的急毒及长毒研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(18):2828.
- [5] 国家食品药品监督管理局. 药物非临床质量管理规范[S]. 2003.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002:226-240.
- [7] 国家食品药品监督管理局. 中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则[S]. 2005.
- [8] 赵小倩,钱英,胡姗姗,等. 复方莪术油乳膏外用对大鼠长期毒性实验研究[J]. 中国药房,2016,27(7):882.
- [9] 李文标,唐录英,邓欢,等. 鱼腥草提取液膀胱灌注治疗大鼠非细菌性膀胱炎的实验研究[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2015,9(8):85.
- [10] 汤宏涛. 八正散加用大剂量鱼腥草治疗女性急性膀胱炎70例[J]. 河南中医,2012,32(5):633.

(收稿日期:2016-05-30 修回日期:2016-09-09)

(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅