

引用:陈小林,高天慧,李玉泽,等. 芪珠升白口服液大鼠长期毒性实验研究[J]. 陕西中医药大学学报,2023,46(5): 83-87.

芪珠升白口服液大鼠长期毒性实验研究^{*}

陈小林¹ 高天慧¹ 李玉泽¹ 张东东¹
黄文丽¹ 姜祎¹ 曹林林² 王薇¹ 宋小妹^{1**}

(1. 陕西中医药大学,陕西 咸阳 712046;2. 陕西中医药大学制药厂,陕西 咸阳 712083)

摘要:目的 评价芪珠升白口服液对大鼠的长期毒性研究,为临床用药安全提供理论依据。方法 将SD大鼠随机分为空白对照组、高($26\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中($13\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、低($6.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组,连续灌胃60 d后,取腹主动脉血进行血常规检测和血液生化指标检查;每周测大鼠体重;解剖大鼠,观察脏器组织情况,取出心、肝、脾、肺、肾称重并求出脏器指数。结果 连续给药60 d后,与对照组比较,低剂量雄性大鼠在给药一周体重显著性增加($P<0.05$),低剂量和中剂量组雌性大鼠在给药一周体重显著增加($P<0.05$);雌性大鼠的中、高剂量组的肾脏系数显著性升高($P<0.05$);雄性低剂量组大鼠红细胞压积(Hematocrit, HCT)显著降低($P<0.05$),雌性低剂量大鼠红细胞计数(Red blood cell count, RBC)显著性降低($P<0.05$);SD大鼠的血液生化指标未见异常变化。病理组织学检查表明,各剂量组动物的脏器均无明显病理变化。结论 芪珠升白口服液连续用药60 d后未出现明显的毒性反应,其临床用药为安全用量。

关键词:芪珠升白口服液;长期毒性;血常规;血液生化指标

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:2096-1340(2023)05-0083-05

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2023.05.013

芪珠升白口服液是陕西中医药大学附属医院在长期的临床实践基础上,结合民间使用经验,得出的一种用于放化疗致白细胞减少的复方中药制剂,由黄芪、女贞子、珠子参、当归、灵芝、甘草组成^[1-2]。黄芪为上品,是常见的补品之一,具有提高免疫力、抗肿瘤等作用^[3-5];女贞子性平、味微苦,无毒,补中固五脏,养神消疾,可调节人体自身的免疫功能^[6-7];珠子参微寒,温、平,味苦甘,补肺养阴,祛瘀止痛,止血^[8];当归其性温,味甘、辛,为“补血之要药”,具有补血活血、调经止痛的功能,用于血虚萎黄、月经不调之证^[9];灵芝甘平,安神补虚,祛痰止咳,无毒,具有提高机体免疫能力、保护肝脏、降低血糖、改善人体睡眠等作用^[10];甘草甘平,补脾益气、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药,用于脾胃虚弱、中气不足,解药毒^[11-12]。其具有升高白细胞、提高机体免疫能力、加强化疗药物的细胞敏感性、降低肿瘤放化疗带来的不良反应等作用^[13]。

近年来,中药毒性与安全性评价受到了广泛的关注^[14-15]。本实验所用的芪珠升白口服液经前期实验证明具有升高白细胞、提高免疫力等作用,但其毒性与安全性未作出评价,因此临床用药安全需进一步验证。本试验对该复方制剂采用大鼠进行了长期毒性试验研究,对大鼠的体重、血常规、血液生化指标、脏器指数的分析,全方位地评价其服用的安全性,为科学、合理应用此药提供合理依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 800TS型吸收光酶标仪(美国BioTek公司), Heraeus Fresco 21型高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher公司), Bayer Advia 2120型全自动血球分析仪(美国拜耳公司)

1.2 试药 黄芪、珠子参、女贞子、当归、灵芝、甘草饮片均购自陕西兴盛德药业有限责任公司,经检验均符合陕西省中药饮片标准。蛋白定量测定

^{*} 基金项目:陕西省科技厅项目(2019ZDLSF04-03-02);陕西中医药大学学科创新团队项目(2019-YL12)

^{**} 通讯作者:宋小妹,教授。E-mail:songxiaom@126.com

试剂盒(批号 20221103)、谷丙转氨酶试剂盒(批号 20221101)、谷草转氨酶试剂盒(批号 20221101)、肌酐测定试剂盒(批号 20221031)、总胆固醇试剂盒(批号 20221101)、白蛋白测定试剂盒(批号 20221215),以上试剂均购于南京建成生物科技有限公司。

1.3 实验动物 SD 大鼠,155 ~ 235 g,雌雄各半,购自成都达硕实验动物有限公司,许可证号:SCXK(川)2020-030。

2 方法与结果

2.1 动物处理 取 SD 大鼠,实验前观察 1 w,然后选出 80 只健康大鼠,随机分为 4 组,即对照组(予生理盐水)、高、中、低剂量组,每组雌雄各 10 只,雌雄分开饲养,每笼 5 只,定时给予饲料,自由饮水^[16]。根据前期课题组药效学研究,设计高、中、低剂量组分别为生药量 26 g · kg⁻¹、13 g · kg⁻¹ 和 6.5 g · kg⁻¹,分别相当于临床剂量的 30 倍、15 倍、7.5 倍;给药体积为 2 g · mL⁻¹,采用灌胃给药的方法,连续给药 60 d。

2.2 检测指标^[17-21] 每周称重 1 次,并根据体重变化调整给药量,给药后观察记录动物的饮食、粪便、行为等一般状态,发现死亡动物及时分析死亡原因并进行尸检。给药 60 d 后,麻醉处死,取腹主动脉血进行生化和生理指标的测定,包括蛋白定量(TP)、谷丙转氨酶(ALT/GPT)、谷草转氨酶(AST/GOT)、肌酐(CRE)、总胆固醇(T-CHO)、白蛋白(ALB)、白细胞计数(WBC)、淋巴细胞百分比(LYMPH#)、红细胞计数(RBC)、血红蛋白浓度

(HGB)、红细胞压积(HCT)、血小板计数(PLT)。解剖动物,观察各脏器情况,取心、肝、脾、肺、肾称重,算出脏器指数[脏器指数 = 脏器质量(g)/体重(g)]。

2.3 统计学方法^[22] 各项指标检查结果经 Excel 录入,用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据处理,试验结果均以($\bar{x} \pm s$)表示,多组之间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异性显著。

3 结果与结论

3.1 一般状况 试验期间有个别动物死亡,经解剖未见异常,各组死亡情况见表 1。各剂量组给药后大鼠皮毛整洁光滑,饮水量、摄食量、大小便、活动情况均未出现异常。结果表明,各组动物死亡并无剂量-反应关系,经解剖证实应属自然疾病或其他原因所致。

表 1 各组动物死亡情况

组别	总数(只)	死亡数(只)	死亡率(%)
空白组	20	0	0.00
低剂量组	20	2	10.00
中剂量组	20	1	5.00
高剂量组	20	2	10.00

3.2 芪珠升白口服液对大鼠体重影响 实验期间,大鼠生长情况良好,对照组和试验组大鼠每周称重一次,平均体重变化见表 2 和 3。可见,与对照组比较,低剂量雄性大鼠在给药一周体重显著性增加($P < 0.05$),低剂量和中剂量组雌性大鼠在给药一周体重显著增加($P < 0.05$),其他剂量组大鼠体重均随周龄而增长。

表 2 芪珠升白口服液对雄性大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, g, n = 5$)

组别	空白	低剂量	中剂量	高剂量
给药前	216.00 ± 6.52	221.00 ± 4.18	221.00 ± 9.62	232.00 ± 4.47
第一周	266.00 ± 23.56	299.00 ± 4.18 *	280.00 ± 24.24	295.00 ± 18.37
第二周	299.00 ± 29.87	320.00 ± 35.18	326.00 ± 68.50	319.00 ± 21.04
第三周	295.00 ± 39.37	337.00 ± 41.02	339.00 ± 60.46	346.00 ± 19.81
第四周	345.20 ± 15.09	368.00 ± 39.15	375.00 ± 56.24	387.00 ± 14.40
第五周	356.00 ± 28.59	367.00 ± 32.90	380.00 ± 44.30	386.00 ± 12.45
第六周	397.00 ± 34.39	407.00 ± 39.47	414.00 ± 56.06	428.00 ± 10.37
第七周	413.00 ± 42.66	436.00 ± 40.68	447.00 ± 54.27	461.00 ± 7.42
第八周	420.00 ± 42.28	448.00 ± 39.62	471.00 ± 46.96	480.00 ± 7.91

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

表 3 芪珠升白口服液对雌性大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	空白	低剂量	中剂量	高剂量
给药前	182.00 ± 11.51	209.00 ± 7.41	194.00 ± 7.42	197.00 ± 16.04
第一周	224.00 ± 6.52	237.00 ± 13.04 *	208.00 ± 9.75 *	225.00 ± 3.54
第二周	238.00 ± 14.40	248.00 ± 2.74	226.00 ± 12.45	239.00 ± 4.18
第三周	242.00 ± 7.58	252.00 ± 10.37	237.00 ± 8.37	252.00 ± 4.47
第四周	260.00 ± 7.07	261.00 ± 9.62	249.00 ± 10.84	264.00 ± 7.42
第五周	259.80 ± 10.11	262.00 ± 16.81	251.00 ± 13.87	258.00 ± 7.58
第六周	275.00 ± 6.12	275.00 ± 16.96	261.00 ± 12.94	271.00 ± 8.22
第七周	277.00 ± 9.08	283.00 ± 20.19	265.00 ± 13.69	277.00 ± 8.37
第八周	282.00 ± 8.37	289.00 ± 17.46	273.00 ± 10.37	282.00 ± 8.37

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

3.3 大鼠剖检观察及其脏器指数的变化 给药 60 d 后,进行各组动物剖检,观察其脏器形态位置正常,色泽良好,各脏器间无粘连、无病理学变化。雌性大鼠的中、高剂量组的肾脏系数与对照组比较显著性升高($P < 0.05$),其他脏器系数无显著性差异($P > 0.05$)。结果见表 4 和表 5。

表 4 雌性大鼠脏器系数情况($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	心(10^3)	肝(10^3)	脾(10^3)	肺(10^3)	肾(10^3)
空白对照组	3.15 ± 0.19	24.13 ± 1.56	1.80 ± 0.25	5.44 ± 0.57	2.54 ± 0.13
低剂量组	3.17 ± 0.61	23.48 ± 4.64	1.73 ± 0.23	5.23 ± 1.26	2.76 ± 0.54
中剂量组	3.28 ± 0.22	24.10 ± 2.25	2.05 ± 0.88	5.96 ± 0.59	2.89 ± 0.18 *
高剂量组	3.50 ± 0.25	23.31 ± 0.95	1.74 ± 0.27	5.46 ± 0.51	2.96 ± 0.13 **

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 5 雄性大鼠脏器系数情况($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	心(10^3)	肝(10^3)	脾(10^3)	肺(10^3)	肾(10^3)
空白对照组	3.26 ± 0.18	27.00 ± 1.84	1.70 ± 0.19	5.51 ± 0.91	3.02 ± 0.30
低剂量组	3.08 ± 0.33	24.21 ± 2.18	2.19 ± 0.99	5.09 ± 1.75	3.12 ± 0.14
中剂量组	3.27 ± 0.16	25.25 ± 5.48	1.61 ± 0.21	4.96 ± 0.63	2.97 ± 0.41
高剂量组	3.19 ± 0.20	24.80 ± 1.49	1.40 ± 0.15	4.82 ± 0.33	2.89 ± 0.15

注:与对照组比较, $P > 0.05$

3.4 芪珠升白口服液对大鼠血常规指标的影响 实验终点,检测各剂量组大鼠的血常规指标水平。结果显示,雄性低剂量组大鼠 HCT 与对照组比较显著降低($P < 0.05$);雌性低剂量大鼠 RBC 与对照组比较显著性降低($P < 0.05$)。其他剂量组血常规指标均未见异常,与空白对照组比较无显著性差异($P > 0.05$)。芪珠升白口服液对大鼠血常规的结果见表 6 和表 7。

表 6 雄性大鼠血常规指标情况($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	WBC ($10^9 \cdot L^{-1}$)	LYMPH# ($10^9 \cdot L^{-1}$)	RBC ($10^{12} \cdot L^{-1}$)	HGB ($g \cdot L^{-1}$)	HCT (%)	PLT ($10^9 \cdot L^{-1}$)
空白对照组	10.29 ± 1.14	7.43 ± 1.66	9.32 ± 0.48	168.80 ± 6.14	53.34 ± 1.69	1321.20 ± 185.99
低剂量组	9.49 ± 1.39	7.29 ± 1.20	8.69 ± 0.60	165.00 ± 6.93	50.06 ± 2.27 *	1132.20 ± 18.28
中剂量组	9.16 ± 1.23	7.31 ± 1.03	9.07 ± 0.27	176.00 ± 2.35	53.84 ± 0.77	1045.80 ± 86.32
高剂量组	10.57 ± 2.26	8.57 ± 1.85	8.88 ± 0.60	164.80 ± 8.44	51.10 ± 3.43	1085.00 ± 95.50

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

表 7 雌性大鼠血常规指标情况($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	WBC ($10^9 \cdot L^{-1}$)	LYMPH# ($10^9 \cdot L^{-1}$)	RBC ($10^{12} \cdot L^{-1}$)	HGB ($g \cdot L^{-1}$)	HCT (%)	PLT ($10^9 \cdot L^{-1}$)
空白对照组	6.00 ± 1.39	4.62 ± 1.22	8.29 ± 0.35	154.60 ± 5.41	47.44 ± 1.60	984.60 ± 128.02
低剂量组	5.64 ± 1.25	4.06 ± 1.12	7.66 ± 0.56 *	148.40 ± 5.86	45.46 ± 1.49	972.20 ± 384.91
中剂量组	6.44 ± 1.08	4.76 ± 0.56	8.29 ± 0.38	156.80 ± 9.18	48.26 ± 2.44	897.00 ± 324.73
高剂量组	5.38 ± 0.92	3.93 ± 0.82	7.92 ± 0.25	153.80 ± 3.83	47.20 ± 1.15	1017.00 ± 126.51

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

3.5 芪珠升白口服液对大鼠血液生化指标的影响 实验结束后,对各剂量组大鼠血液生化指标分析,结果显示随着给药剂量的增加,大鼠生化指标未见明显的变化规律,且无雌雄差异,各剂量组血液生化指标与空白对照组比较无显著性差异($P > 0.05$)。各剂量组大鼠生化指标检测结果见表 8。

表 8 各剂量组大鼠血液生化指标($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	TP ($g \cdot L^{-1}$)	T-CHO ($mmol \cdot L^{-1}$)	CRE ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	ALT ($U \cdot L^{-1}$)	AST ($U \cdot L^{-1}$)	ALB ($g \cdot L^{-1}$)
空白对照	97.31 ± 7.58	1.64 ± 0.21	40.25 ± 6.12	4.35 ± 3.79	4.89 ± 3.58	21.43 ± 1.62
低剂量组	98.06 ± 28.21	1.71 ± 0.43	43.15 ± 10.27	1.50 ± 1.27	3.26 ± 1.83	21.07 ± 2.68
中剂量组	98.62 ± 28.87	1.34 ± 0.39	32.65 ± 2.44	2.83 ± 1.25	7.05 ± 8.49	21.56 ± 2.46
高剂量组	94.69 ± 19.68	1.45 ± 0.48	38.20 ± 4.05	2.59 ± 1.52	4.65 ± 2.98	19.54 ± 0.40

注:与对照组比较, $P > 0.05$

4 讨论

近年来,人们对中药用药安全尤为重视,因此中药复方制剂的毒性研究显得十分必要^[23-24]。前期急性毒性实验结果显示,实验小鼠未出现死亡和明显的急性毒性反应,各组织病理切片没有明显差异病变,且最大耐受量为人的 72 倍。在试验期间,各剂量组动物外观、行为活动、进食饮水等均未出现异常,生长状况良好;各剂量组动物体重均随周龄增长而增长。

在药物安全评价中,药物常会对一些器官产生影响^[25]。通过计算脏器指数,发现与空白对照组比较雌性大鼠的中、高剂量组的肾脏系数显著性升高($P < 0.05$),其他剂量组均无显著差异。剖检结果显示,各剂量组动物脏器均未出现异常。

本试验的血液生化指标显示,大鼠连续给药 60 d 后,与空白对照组比较均未出现显著差异;血常规结果显示,与空白对照组比较,雄性低剂量组大鼠 HCT 显著降低($P < 0.05$);雌性低剂量大鼠 RBC 显著性降低($P < 0.05$),其他剂量组均无显著性差异。提示芪珠升白口服液并未对 SD 大鼠各项生化指标及脏器指数造成影响。

综上所述,在试验条件下长期合理使用芪珠升白口服液对 SD 大鼠的生长、血常规、脏器指数和血液生化指标无显著影响,以生药量 $26 g \cdot kg^{-1}$ 、 $13 g \cdot kg^{-1}$ 和 $6.5 g \cdot kg^{-1}$,给药体积为 $2 g \cdot mL^{-1}$,连续给药 60 d,未出现毒性反应,表明芪珠升白口服液按临床拟用剂量长期服用具有较高的安全性,可作为临床用药安全性评价、不良反应监测和临床剂量设计的参考依据。因此,芪珠升白口服液具有良好的开发前景,有望成为治疗白细胞减少症的中药新药。

参考文献

[1] 梁卓菲,丁超,黄文丽,等. 芪珠升白口服液多指标成分测定及质量评价[J]. 陕西中医药大学学报,2022,45(5):114-118.

[2] 郭琳,张旋,范少敏,等. 芪珠升白口服液药效学研究[J]. 陕西中医,2012,33(12):1683-1685.

[3] 薛嘉宁,赵容,蔡欣航,等. 黄芪的本草考证及其研究进展[J]. 中国民族民间医药,2023,32(1):58-64.

[4] 胡逸中,薛征,胡煊. 黄芪甲苷对环磷酰胺所致免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 时珍国医国药,2021,32

- (8):1843-1844.
- [5]袁伟琛,甄建华,李晓红.黄芪抗肿瘤作用的研究现状[J].中华中医药学刊,2023,41(6):91-97.
- [6]刘婵婵,杨薪正,钱卫东,等.中药女贞子的化学成分及药理作用研究进展[J].海峡药学,2021,33(2):37-39.
- [7]张明发,沈雅琴.红景天苷及其苷元酪醇的抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用[J].药物评价研究,2013,36(3):228-234.
- [8]宋小妹,刘海静.太白七药研究与应用[M].北京:人民卫生出版社,2011.
- [9]毛宇,徐芳,邹云,等.当归多糖对造血功能的影响及其机制的研究[J].食品研究与开发,2015,36(8):122-126.
- [10]张瑞婷,周涛,宋潇潇,等.灵芝活性成分及其药理作用的研究进展[J].安徽农业科学,2018,46(3):18-19,22.
- [11]邓桃妹,彭灿,彭代银,等.甘草化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的探讨[J].中国中药杂志,2021,46(11):2660-2676.
- [12]李明亮,沈桂兵.炙甘草汤在急性冠脉综合征经皮冠状动脉介入治疗术后中的应用[J].现代中医药,2020,40(2):71-73.
- [13]范少敏,郭琳,张旋,等.正交试验法优选芪珠升白口服液最佳提取工艺[J].陕西中医,2013,34(10):1408-1409.
- [14]严妍,吴娟,焦月华,等.毒性中药复方临床安全性再评价的思考[J].中国新药杂志,2017,26(15):1762-1766.
- [15]钟梦媛,王春洋,庄铭,等.中药临床安全性评价存在的问题与思考[J].中国中药杂志,2023,48(12):3404-3408.
- [16]段梦迪,王湘妍,胡超群,等.抗感败毒口服液对大鼠生长和血液理化指标的影响[J].中国兽药杂志,2017,51(9):30-35.
- [17]王林丽,吕金胜,李卓恒,等.金嗓口服液大鼠长期毒性试验研究[J].中国药业,2013,22(2):13-14.
- [18]刘媛,陈进凡,杨育红,等.肠毒清口服液对全身炎症反应综合征大鼠血生化、血常规等指标的影响[J].卫生职业教育,2011,29(23):114-116.
- [19]王林丽,李卓恒,吕金胜,等.乳宁口服液大鼠长期毒性试验研究[J].中国药业,2013,22(14):14-15.
- [20]黄平,宣自华,汪宁.脑络欣通胶囊长期毒性试验研究[J].时珍国医国药,2021,32(8):1845-1849.
- [21]Geerlofs L, He ZY, Xiao S, et al. Repeated dose (90 days) oral toxicity study of ursolic acid in Han-Wistar rats[J]. Toxicology Reports, 2020, 7:610-623.
- [22]胡洋,毛丹,伍津正,等.甜梦口服液联合穴位贴敷治疗乳腺癌化疗后患者癌因性失眠临床研究[J].现代中医药,2023,43(1):83-88.
- [23]李雪,王磊,卜睿臻,等.基于模型引导的中药安全用药的研究策略:中药定量毒理学[J].中草药,2023,54(2):359-366.
- [24]李强,方志斌,程诚,等.基于临床中药安全观的“毒”-“效”药物研究及实践:以《本草图经》为例[J].中草药,2022,53(1):270-277.
- [25]李韵峰,马俊峰.影响实验动物脏器重量及脏器系数因素分析[J].畜牧业环境,2020(10):39.

(修回日期:2023-04-23 编辑:崔春利)