

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201812022

一种抗肿瘤中药复方制剂的小鼠急性毒性试验及对血液生理生化指标的影响研究

王庆杰¹, 刘增萌¹, 杨卫星², 杨莉², 信吉阁¹,
徐尤坤³, 徐昆龙^{1**}

(1. 云南农业大学 动物医学院, 云南昆明 650201;
2. 云南农业大学 食品科学技术学院, 云南昆明 650201;
3. 云南省农业农村厅, 云南昆明 650000)

摘要:【目的】研究一味中药复方制剂的安全性,为人体肿瘤临床治疗用药提供参考。【方法】本试验对复方制剂进行了经口急性毒性、最大耐受量及其28 d经口毒性方面的研究。经口急性毒性预试验对各组小鼠一次灌服剂量0.2、0.6、1.8、5.4、16.2 g/kg(bw)的提取液,最大耐受量试验提取液按1.25、1.00、0.80、0.64、0.51 g/mL的质量浓度、0.04 mL/g(bw)的灌胃量对各组小鼠24 h之内灌胃3次,对小鼠连续观察7 d;将40只小鼠随机分为高、中、低剂量组及对照组,连续28 d灌服等体积不同含量[15、7.5、3.75、0 g/kg(bw)]的复方制剂,测定小鼠的血液生理生化指标。【结果】急性毒性结果表明:该复方制剂粗提物经口LD₅₀>5 g/kg(bw),小鼠对其最大耐受量达到150 g/kg(bw),最大耐受量为人用剂量的1 050倍;28 d经口毒性试验中各组小鼠体重、血液生理指标与对照组相比差异不显著($P>0.05$)。血液生化指标仅中剂量组LDH与对照、低、高剂量组差异显著($P<0.05$),GPT、GOT、Cr和BUN各指标无显著差异($P>0.05$)。【结论】该复方制剂对小鼠无毒性作用,对血液生理生化部分指标无影响,临床使用安全。

关键词: 中药复方制剂; 急性毒性; 生理生化指标

中图分类号: R 285.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2019)03-0420-05

Study on the Acute Toxicity and Effect of an Anti-tumor Traditional Chinese Medicine Compound Formulations on the Blood Physiological and Biochemical Indexes of Mice

WANG Qingjie¹, LIU Zengmeng¹, YANG Weixing², YANG Li², XIN Jige¹,
XU Youkun³, XU Kunlong¹

(1. Animal Medical College, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
3. Agricultural and Rural Affairs Department of Yunnan Province, Kunming 650000, China)

Abstract: [Purpose] To study the safety of a traditional Chinese medicine compound formulation, and to provide a reference for clinical treatment of human tumor. [Method] The acute toxicity, the maximum tolerated dose and the 28 d oral toxicity of the compound formulations were studied. The

收稿日期: 2018-12-06

修回日期: 2019-01-05

网络出版时间: 2019-03-11

作者简介: 王庆杰(1992—), 男, 云南昆明人, 硕士研究生, 主要从事动物性食品检验与检疫的研究。

E-mail: 982036230@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 徐昆龙(1963—), 男, 云南昆明人, 学士, 教授, 主要从事动物性食品卫生检验与安全性评价研究。E-mail: xkl910@163.com

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201812022](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201812022)



mice were given a dose of 0.2, 0.6, 1.8, 5.4, 16.2 g/kg (bw) at the same time for oral acute toxicity test. The maximum tolerated test extract with the concentrations of 1.25, 1.00, 0.80, 0.64, 0.51 g/mL 0.04 mL/g (bw) was administered orally to the mice in each group within 3 hours, and the mice were continuously observed for 7 days. Forty mice were randomly divided into high, medium, low and control dose group. In the control group, the compound preparations of different concentrations [15, 7.5, 3.75, 0 g/kg (bw)] were administered for 28 days, and the blood physiological and biochemical indexes of the mice were determined. [Result] The results of acute toxicity showed that the crude extract of the compound preparation had an oral tolerance of $LD_{50} > 5$ g/kg (bw), and the maximum tolerance of the mice was 150 g/kg (bw), and the maximum tolerated dose was 1 050 times of the human dose. The body weight and blood physiological indexes of the mice in each group were not significantly different ($P > 0.05$). The blood biochemical parameters only showed significant difference between the LDH and the control, low and high dose groups ($P < 0.05$), and there were no significant differences in GPT, GOT, Cr and BUN ($P > 0.05$). [Conclusion] The compound preparation has no toxic effect, has no effect on blood physiological and biochemical indexes, and is safe for clinical use.

Keywords: Chinese medicine compound formulations; acute toxicity; physiological and biochemical indexes

中医药作为中国具有原创优势的卫生资源,近年来,被国内及其国际社会广泛应用,其以阴阳五行理论基础,通过“望闻问切”四诊法的实践经验探求病因^[1],应用中药的合理配伍,发挥治疗、保健、养生等多重功效。然而对于中医药更普遍的认识是其安全无毒,其安全性研究尚处于探索阶段。随着应用的愈发广泛,中药及其制剂的安全性也备受关注。本研究的中药复方制剂(石韦、木通、地榆、金钱草、仙灵脾、川大黄、半枝莲、山药、元胡、梔子、川黄连、车前子、黄芩、地龙、猪鬃草、三棱、莪术、皂刺、牡蛎、岩白菜、枸杞子、重楼、蒲公英、黄芪、当归、蝎子和蜈蚣等27种成分)在实践中用于治疗结直肠肿瘤并已取得一定的治疗效果,但其安全性有待研究。通过研究该抗肿瘤中药复方制剂提取液对昆明种小鼠的急性毒性、最大耐受量及其

对小鼠血液生理生化指标的影响,为临床合理安全用药提供数据支撑,为其在人体肿瘤治疗用药剂量方面提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验药物

(1) 原药及其微生物影响因素的处理

抗肿瘤中药复方制剂(粉末):石韦、木通、地榆、金钱草、梔子、川大黄、当归等27种成分配伍而成,由云南华源核辐射技术有限公司实施9.0 kGy辐照处理,排除微生物因素干扰,微生物数量符合《中国药典》2010版口服给药制剂微生物限度标准要求(表1)。

(2) 药液(粗提物)制备

称取上述经辐照处理的复方制剂粉末(准确

表1 中药原药辐照前后微生物限度

Tab. 1 Microbial limits before and after irradiation of traditional Chinese medicines

检验项目 test items	单位 unit	标准 standard	微生物数量 number of microorganisms	
			辐照前 before irradiation	辐照后 after irradiation
需氧菌总数 total aerobic bacteria	cfu/g	$\leq 10\ 000$	460 000	30
霉菌和酵母菌 mold and yeast count	cfu/g	≤ 100	185 000	< 10
大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	g^{-1}	不得检出 negative	检出 positive	未检出 n.d.
耐胆盐革兰阴性菌 gallbladder-resistant gram-negative bacteria	N	< 100	$N > 1\ 000$	$N < 10$
沙门氏菌数量 $\times 10^{-1}$ <i>Salmonella</i> number	g^{-1}	不得检出 negative	检出 positive	未检出 n.d.
检验结论 test results			不合格 unqualified	合格 qualified

到0.001 g)于双层药袋中,按药材重量的8倍加入冷的蒸馏水,浸泡30 min,分3次武火煮沸后文火煎煮^[2-3],文火时间分别为20、15和10 min,将3次药液过滤合并,经减压低温浓缩至质量浓度为1.25 g/mL(1 mL药液相当于1.25 g原药),用玻璃器皿密封杀菌封装,于4 ℃低温冷藏,灌胃时根据剂量稀释药液(粗提物)。

1.1.2 试验动物

SPF级昆明种小鼠(约6周龄,体质量18~22 g)100只(雌雄各50只),合格许可证号:SCXK(滇)K2015—0002,由昆明医科大学提供。试验前适应性饲养1周,自由饮食进水,观察小鼠健康状况。

1.2 方法

1.2.1 急性毒性预试验

取健康小鼠30只,随机分为5个组,每组6只,雌雄各3只。灌胃前、后分别禁食12 h、4 h,自由饮水。根据《药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算关系》,结合人用剂量10 g/70 kg (bw),换算得到等效剂量1.8 g/kg (bw)为此中药复方制剂预期LD₅₀值,以此为中间剂量,设计组间距为3的5个剂量组,即剂量分别为0.2、0.6、1.8、5.4和16.2 g/kg (bw)的5个剂量组,灌胃中药复方制剂药液,对各组小鼠连续观察14 d,记录给药前后小鼠行为活动、症状表现、小鼠死亡时间及死亡数,以找出复方制剂引起小鼠10%~90%死亡的剂量范围。

1.2.2 最大耐受量试验

在上述试验基础上,取健康小鼠30只,随机分为5个组,每组6只,雌雄各3只。各组小鼠按照0.4 mL/10 g (bw)的灌胃量灌胃给药^[4],按1:0.8的计量间比值^[5]设计5个剂量组,灌胃前、后分别禁食12 h、4 h,自由饮水,按1.25、1.00、0.80、0.64、0.51 g/mL的质量浓度24 h之内3次最大灌胃容量^[6]灌胃小鼠。对小鼠连续观察7 d,每天记录每只小鼠的精神状况、食欲、行为、发病、死亡状况及粪便是否成型等情况。试验结束时,处死所有小鼠进行尸体剖检,肉眼观察心、肝、脾、肺、肾外观有无异常病理变化。通过计算判断小鼠对受试物的最大耐受量,计算其与人的最大耐受量的倍数关系。小鼠最大耐受倍数=(每只小鼠耐受药量/小鼠平均体重)×(成人平均体重/成人日用剂量)^[7]。式中,成人平均体重取70 kg,每日临床推荐剂量10 g。

1.2.3 28 d 经口毒性试验

取健康小鼠40只,随机分4个组,每组10只,雌雄各5只。中药复方制剂粗提物分别按高、中、低剂量试验组和对照组进行28 d经口毒性试验。单笼饲养,自由饮水,试验组按人用剂量[10 g/70 kg (bw)]的100^[3]、50和25倍[15、7.5和3.75 g/kg (bw)]连续28 d灌胃给药,对照组灌胃等体积纯净水,每天灌胃1次。灌胃前和灌胃后每7 d称取体重1次,试验期间记录每只小鼠的精神状况、食欲、行为、发病及死亡等状况。灌胃第29天称取小鼠体重,牺牲小鼠,肉眼观察心、肝、脾、肺、肾等脏器外观有无异常病理变化,测定血液生理生化指标。血液生理指标包括红细胞数(RBC)、白细胞数(WBC)、淋巴细胞百分比(Lymph%)、单核细胞百分比(Mon%)、中性粒细胞百分比(Gran%)等,采用全自动血液细胞分析仪测定;血液生化指标中的谷丙转氨酶(ALT/GPT)、谷草转氨酶(AST/GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)活性及肌酐(Cr)含量运用酶标仪配合试剂盒测定,尿素氮(BUN)含量用紫外分光光度计配合试剂盒测定^[4]。

1.3 数据处理

各项数据采用SPSS 19.0进行单因素方差分析并统计,数据结果均用“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 急性毒性预试验

急性毒性预试验结果表明:小鼠灌服中药复方制剂药液后,均出现呆立1~3 min的灌胃应激,之后恢复正常。对各组小鼠连续观察14 d,进食、饮水、活动状况、精神状态无异常,皮毛光滑,排泄物正常。各组小鼠均无死亡,LD₅₀均大于5 g/kg (bw),最大给药剂量达16.2 g/kg (bw),肉眼可见主要脏器大小、外观和色泽均无变化,也无充血、出血、水肿或其他改变。按照化学物质相对毒性分级标准,LD₅₀>5 g/kg (bw)判断受试物实际无毒,LD₅₀>15 g/kg (bw)判断受试物无毒。表明该中药复方制剂粗提物无毒。

2.2 最大耐受量试验

小鼠于24 h之内3次最大体积灌胃中药复方制剂药液,最小剂量组到最大剂量组小鼠每次灌胃应激出现呆立3~10 min不等,最大剂量组小鼠

在灌胃当天出现轻微耸毛、卧立、抽搐的现象,第2天恢复正常,其他组小鼠均无异常表现,对小鼠连续观察14 d。结果表明:各组小鼠均存活,心、肝、脾、肺、肾均无肉眼可观的病理变化,最大剂量组小鼠给药剂量达150 g/kg(bw),最大耐受倍数是临床成人用量的1 050倍。按照WTO有关外源性化学物毒性分级标准进行评价,最大给药剂量大于人的可能摄入量剂量的300倍,表明该中药复方制剂粗提物无毒。

2.3 28 d 经口毒性试验

2.3.1 一般状况观察及体重测定

各剂量组在灌胃后3 d内均出现呆立的应激反应,除此之外,整个灌胃期间小鼠的精神状态、活动状况、饮食能力情况、粪便尿液均无异常。由表2可知:3个剂量试验组小鼠连续灌胃28 d前后体重增加量与对照组无显著差异($P>0.05$)。

表2 不同剂量中药复方制剂对小鼠体重的影响
Tab. 2 Effects of different doses on the body weight of mice

组别 group	体重增加量/g weight gain
对照组 control group	8.33±0.23
低剂量组 low dose group	8.77±0.49
中剂量组 medium dose group	8.60±0.46
高剂量组 high dose group	8.81±0.59

表3 不同剂量中药复方制剂对小鼠血常规的影响
Tab. 3 Effects of different doses on the blood routine examination in mice

组别 group	血红蛋白/(g·L ⁻¹) HGB	计数×10 ⁹ /L ⁻¹ count		占白细胞总数的比例/% ratio of total number of leukocyte		
		白细胞 WBC	红细胞 RBC	淋巴细胞 Lymph	单核细胞 Mon	中性粒细胞 Gran
对照组 control group	149.33±3.16	3.89±0.31	9.50±0.61	73.80±6.78	2.36±0.39	22.77±4.70
低剂量组 low dose group	148.78±5.78	4.12±0.60	9.64±0.38	75.82±6.79	2.29±0.40	21.29±2.19
中剂量组 medium dose group	145.56±6.19	3.60±0.36	9.30±0.46	75.70±3.90	2.87±0.62	22.01±3.24
高剂量组 high dose group	150.25±7.92	3.69±0.41	9.70±0.64	75.28±6.62	2.30±0.58	19.79±3.54

表4 不同剂量中药复方制剂对小鼠血液生化指标的影响
Tab. 4 Effects of different doses on the blood biochemical indexes of mice

组别 group	谷丙转氨酶/(U·g ⁻¹) ALT/GPT	谷草转氨酶/(U·g ⁻¹) AST/GOT	乳酸脱氢酶/(U·L ⁻¹) LDH	肌酐/(μmol·L ⁻¹) Cr	血尿素氮/(μmol·L ⁻¹) BUN
对照组 control group	22.36±4.88	58.43±3.08	412.50±28.85 a	14.99±2.28	7.46±1.04
低剂量组 low dose group	25.56±4.78	61.49±5.16	419.72±27.79 a	15.00±2.89	7.93±1.23
中剂量组 medium dose group	26.40±3.79	61.05±4.44	458.33±19.69 b	15.55±1.89	8.40±1.11
高剂量组 high dose group	23.32±4.42	64.55±4.06	438.75±25.62 a	16.10±1.24	7.52±0.59

注:同列中不同小写字母表示差异性显著水平为 $P<0.05$ 。

Note: The date with the different small letters show significant difference ($P<0.05$) in the column.

3 讨论

中药复方制剂是根据中医药学的用药特点,结合对各药物的理论认识基础,多组分构成的中医药方剂^[8]。高效低毒、多靶点、特异性强等多重特点是中药制剂用药的优势^[9],但其成分复杂,存在多种有效的生物活性成分,在多种疾病的临床治疗中发挥了协同作用,但其毒副作用和安全性也备受关注。本研究的中药复方制剂粗提物包括27味中药,急性毒性试验结果表明:该

复方制剂粗提物经口染毒 LD_{50} 大于5 g/kg(bw),且所有小鼠存活;最大耐受量试验中最大剂量组小鼠经3次最大剂量药液灌胃后的累积剂量达到150 g/kg,各组小鼠在1周内无异常变化,其最大耐受量倍数是临床成人用量的1 050倍,表明该中药复方制剂无毒。中药复方作为一个整体,煎煮过程的变化是否造成成分的改变或新物质的产生,配伍的变化或者成分的加减是否会产生不同的治疗及毒副作用,这些问题还有待我们进一步深入研究。

28 d 连续灌胃高、中、低 3 种剂量的复方中药制剂粗提物后, 试验组小鼠的体重增加量与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$), 表明该复方制剂不影响小鼠的生长发育。各剂量组血液学指标与对照组相比差异均不显著 ($P>0.05$)。血液生化指标中的谷丙转氨酶 (ALT/GPT)、谷草转氨酶 (AST/GOT)、乳酸脱氢酶 (LDH) 作为判定肝脏损伤的重要指标^[10-11], 肌酐 (Cr)、血尿素氮 (BUN) 是判定肾脏损伤的重要指标^[12], 结果显示除中剂量组 LDH 含量与对照、低、高剂量组差异显著 ($P<0.05$) 外, 其余数据都无显著差异 ($P>0.05$), 总体来看, 该中药复方制剂对试验动物肝、肾功能无影响。中剂量组乳酸脱氢酶 (LDH) 与对照、低、高剂量组差异显著, 可能与受试动物个体因素干扰有关。

4 结论

抗肿瘤中药复方制剂粗提物对昆明种小鼠的急性毒性及其对小鼠血液生理生化指标的影响试验结果表明: 该复方制剂粗提物经口染毒 LD_{50} 大于 5 g/kg (bw), 且所有小鼠存活, 病理解剖学观察主要脏器大小、外观、色泽均无变化, 也无充血、出血、水肿或其他改变; 最大耐受量倍数是临床成人用量的 1 050 倍, 大于人可能摄入剂量的 300 倍。28 d 经口毒性试验测定小鼠体重变化, 血常规及血液肝、肾生化指标, 试验结果也表明小鼠生长发育、血常规和肝、肾生化指标正常, 故该复方制剂粗提物对小鼠无毒性作用, 对血液学和肝功等部分生化指标无影响, 临床使用安全。

[参考文献]

- [1] 叶培汉, 孙贵香, 何清湖. 国医大师熊继柏谈《黄帝内经》诊法学[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(2): 117. DOI: 10.3969/j.issn.1674-070X.2018.02.001.
- [2] 马立秀, 陈永忠. 论中药汤剂的煎煮方法与服用方法[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(12): 2311. DOI: 10.16281/j.cnki.jocml.2017.12.109.
- [3] 戴璐. 寒性中药对实热证疗效的表述及大黄、黄连对实热证大鼠效应的实验研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2011.
- [4] GB 15193.1—2014. 食品安全性毒理学评价程序和方法[S].
- [5] 王冉. 复方中药对肉用犊牛生长性能和免疫功能的影响研究[D]. 重庆: 西南大学, 2015.
- [6] 刘伟, 程波, 蒋瑞东, 等. 中药催情散的急性和亚慢性毒性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2018, 46(5): 43. DOI: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.05.007.
- [7] 杨露苗. 中兽药丹连花子宫灌注液的安全性评价[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [8] 信晨曦, 梁洁, 周昱杉, 等. 中药复方制剂配伍机理的研究概况[J]. 中国新药杂志, 2018(24): 2895.
- [9] 杨志杰, 李秀丽. 中医药诱导细胞凋亡治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. 中医学报, 2013, 28(1): 18. DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2013.01.027.
- [10] HOR S Y, AHMAD M, FARSI E, et al. Acute and subchronic oral toxicity of *Coriolus versicolor* standardized water extract in Sprague-Dawley rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 137(3): 1067. DOI: 10.1016/j.jep.2011.07.007.
- [11] IHSAN A, WANG X, HUANG X J, et al. Acute and subchronic toxicological evaluation of Mequindox in Wistar rats[J]. Regulatory Toxicology & Pharmacology, 2010, 57(2/3): 307. DOI: 10.1016/j.yrtph.2010.03.011.
- [12] 万贞元, 王造昌, 温月红, 等. 血尿素氮与肌酐联合血清胱抑素 C 与 β_2 微球蛋白检测在肾功能损伤中的诊断应用[J]. 实验与检验医学, 2014, 32(5): 595. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1129.2014.05.045.

责任编辑: 何承刚