

Clin Sleep Med, 2011, 7(4): 384-390.

4 刘力生. 中国高血压防治指南 2010[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19(8): 701-708.

5 Oliveira MG, Nery LE, Santos-Silva R. Is portable monitoring accurate in the diagnosis of obstructive sleep apnea syndrome in chronic pulmonary obstructive disease? [J]. Sleep Med, 2012, 13(8): 1033-1038.

6 Ayas NT, Fox J, Epstein L, et al. Initial use of portable monitoring versus polysomnography to confirm obstructive sleep apnea in symptomatic patients: An economic decision model [J]. Sleep Med, 2010, 11(3): 320-324.

7 Takama N, Kurabayashi M. Effectiveness of a portable device and the need for treatment of mild-to-moderate obstructive sleep-disordered breathing in patients with cardiovascular disease [J]. J Cardio, 2010, 56(1): 73-78.

8 Gantner D, Ge JY, Li LH. Diagnostic accuracy of a questionnaire and simple home monitoring device in detecting obstructive sleep apnoea in a Chinese population at high cardiovascular risk[J]. Respirology, 2010, 15(6): 952-960.

9 Epstein LJ, Kristo D, Strollo PJ Jr, et al. Clinical guideline for the evaluation, management and long-term care of obstructive sleep apnea in adults[J]. J Clin Sleep Med, 2009, 5(3): 263-276.

10 孙小青, 殷敏, 程雷. 便携式睡眠监测仪在阻塞性睡眠呼吸暂停综合征诊断中的应用[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(6): 1695-1697.

11 Erman MK, Stewart D, Einhorn D, et al. Validation of the ApneaLink for the screening of sleep apnea: A novel and simple single-channel recording device[J]. J Clin Sleep Med, 2007, 3(4): 387-392.

[收稿日期 2012-10-12][本文编辑 刘京虹 吕文娟]

课题研究 · 论著

软坚护肝片对 SD 大鼠的长期毒性研究

汪永玲, 孔晓龙, 莫凤珍, 梁凯, 章振明, 朱海璇

基金项目: 广西科学研究与技术开发项目(编号: 桂科攻 10124008-7)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学药学院
作者简介: 汪永玲(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 新药研究与开发。E-mail: iaowang311@163.com
通讯作者: 孔晓龙(1966-), 男, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 新药研究与开发。E-mail: kx1192@yahoo.com.cn

[摘要] **目的** 观察软坚护肝片对 SD 大鼠的长期毒性。**方法** 将 160 只大鼠随机分为 4 组(每组 40 只), 分别为软坚护肝片低剂量组(1.24 g/kg)、中剂量组(2.48 g/kg)、高剂量组(4.96 g/kg)和对照组。给药的三组每日灌胃 1 次, 每周给药 6 d, 连续 26 周; 对照组等体积蒸馏水灌胃。观察大鼠一般状况、体重、摄食量等变化, 给药后 13、26 周及停药后 4 周时检查大鼠的血液学、血液生化学、脏器系数和组织病理学改变。**结果** 各剂量组动物一般状况良好, 血液学、血液生化学及脏器系数与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$), 组织病理学检查未见异常改变。**结论** 软坚护肝片在临床剂量范围内毒性小, 用药安全。

[关键词] 软坚护肝片; SD 大鼠; 长期毒性

[中图分类号] R 994.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)02-0105-04
doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.02.04

A study on long-term toxicity of Ruanjian hugan tablet in SD rattus norregicus WANG Yong-ling, KONG Xiao-long, MO Feng-zhen, et al. Pharma Cological School, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To observe the long-term toxicity of Ruanjian Hupan Tablet(RJHGT) in SD rattus norregicus. **Methods** One hundred and sixty rattus norregicus were randomly divided into four groups (40 in each group); low, moderate, high dosage groups (group L, M, H) and control group (group C). Experimental groups were given RJHGT by garage, and group C was given distilled water instead. The experiment was carried out for 26 consecutive weeks. General conditions, body weight, food intake of SD rattus norregicus were observed. Hematology, biochemical parameters, coagulation function, organ coefficient, histopathology changes of SD rattus norregicus were detected in 13 and 26 weeks of the experiment, and in 4 weeks after drug withdrawal. **Results** All the indexes mentioned above

were normal in group L, M and H. **Conclusion** The toxicity of RJHGP is low when it is used in its clinical range, and it is safe.

[**Key words**] Ruanjian hugan tablet; SD rattus norregicus; Long-term toxicity

软坚护肝片是由丹参、虎杖、赤芍等十二味中药组成的方剂,经过现代制剂技术研制而成,动物实验表明该药可以改善大鼠肝纤维化过程中肝脏胶原纤维的面积、纤维化程度和降低血清透明质酸、层粘连蛋白、IV型胶原水平,对大鼠肝纤维化有很好的预防作用^[1]。临床应用发现对于肝癌术后3年和5年复发率显著降低,并且生存率明显提高^[2]。本实验的目的是观察软坚护肝片对实验动物重复给药所产生的毒性反应和严重程度及可逆程度,评估可能对机体的损伤、体内蓄积和对靶器官作用的相关信息,确定无毒剂量,为临床安全应用提供理论依据^[3]。现将软坚护肝片对大鼠长期毒性研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 适应性观察后健康SD大鼠160只,雌雄各半,5周龄,体重90~120 g,由广西医科大学实验动物中心提供,合格证号:scxk桂2009-0002。动物按性别分笼饲养,每笼5只,温度19~29℃,相对湿度40%~80%。

1.2 实验药物 软坚护肝片(以下简称为RJHGP):由广西医科大学制药厂制备,批号为20110115,规格0.31 g/片,临床人日用量为0.062 g/kg。乌来糖(Ethyl carbamate):晶欣生物科技公司产品,批号为20100219。

1.3 仪器与试剂 EL204电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);TDL-5A台式低速大容量离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司);HITACHI7600-120生化全自动分析仪(日本);Sysmex XE-2100全自动血液分析仪(日本);Leica 2135型石蜡切片机(德国);Olympus BX60型高级显微镜(日本);Citadel 2000型自动脱水机(英国);日立ISE参比电极液(LI070,日立仪器苏州有限公司);日立ISE内部标准液(J1359,日立仪器苏州有限公司);日立ISE稀释液(K1126,日立仪器苏州有限公司);天门冬氨酸转氨酶试剂盒(EQ030,日本和光);丙氨酸转氨酶试剂盒(ER718,日本和光);碱性磷酸酶试剂盒(KH308,日本和光);尿素氮试剂盒(KG664,日本和光);总胆固醇试剂盒(KG676,日本和光);总胆红素(KF003,日本和光);甘油三酯试剂盒(KF020,日本和光);血清总蛋白试剂盒(6013160606,英科新创厦门万方数据);血清白蛋白试剂盒(6014160607,英

科新创厦门科技有限公司);肌酐试剂盒(MARJ013,上海执诚生物技术有限公司);血糖试剂盒(APRJ014,上海执诚生物技术有限公司);乳酸脱氢酶试剂盒(60058526/1,德赛公司)。

1.4 研究方法

1.4.1 分组及给药 健康SD大鼠160只,按excel表格随机分组法随机分为软坚护肝片低、中、高剂量组和对照组,每组40只。各组大鼠分笼饲养,每笼5只。每周给药6 d,每日按10 ml/kg灌胃1次,连续给药26周。每周记录1次体重、摄食量,根据体重变化重新计算给药量^[4]。对照组给予等体积蒸馏水。根据急性毒性试验结果,确定低、中、高剂量组给药剂量为1.24 g/kg、2.48 g/kg、4.96 g/kg(相当于20、40、80倍临床成人日用量)。将软坚护肝片粉碎,以蒸馏水配制受试物,低、中、高剂量组药液浓度分别为0.124 g/ml、0.248 g/ml、0.496 g/ml。给药后第13周末进行中期检测,高剂量组和对照组各取10只大鼠,雌雄各半;给药后第26周末各组取20只大鼠,雌雄各半,同上方法进行末期检查。各组余下动物于停药后第4周末同法进行恢复期检查。

1.4.2 观察指标^[5]

1.4.2.1 一般观察 给药期间,每日观察大鼠外观体征、行为活动、腺体分泌、呼吸及粪便等情况,并记录饲料消耗和体重,每周记录一次。

1.4.2.2 血液学及血液生化指标检测 腹主动脉采血,取约2 ml新鲜全血低温保存于EDTA-K2抗凝管中检测网织红细胞百分率(RET%)、淋巴细胞计数(LY)、平均RBC血红蛋白浓度(MCHC)、血小板计数(PLT)等血液学指标,剩余血液3 000 r/min离心15 min后,取血清检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、肌酐(CREA)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBil)等血液生化指标。

1.4.2.3 系统解剖、脏器系数和组织病理学检查 肉眼观察实验动物的脏器外观、颜色和质地,并称量实验动物的脑、心、肝、脾、肺、肾等脏器重量[按脏器系数=脏器重量·(100 g体重)⁻¹计算],10%甲醛固定,包埋,切片,HE染色观察。

1.5 统计学方法 应用SPSS19.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用

随机区组设计方差分析,均数间两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般观察结果 实验期间,RJHGP 各剂量组和对照组实验动物外观体征、行为活动、腺体分泌、呼吸、粪便、摄食量等状况正常,无一只死亡。大鼠体重增长正常,与对照组比较差异无统计学意义。停药观察 4 周后亦无明显变化。

2.2 血液学及血液生化学检测结果 RJHGP 各剂量组与对照组的白细胞计数、淋巴细胞计数、平均 RBC 血红蛋白浓度、血小板计数等血液学指标和钾离子、白蛋白、门冬氨酸氨基转移酶、总胆固醇等血

液生化指标比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。给药第 13 周末、第 26 周末、停药后 4 周末上述各指标比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 系统解剖、脏器系数和组织病理学检查结果 不同时间点 RJHGP 各剂量组与对照组的实验动物系统解剖肉眼观察,给药后大鼠心、肝、脾、肺、肾等脏器外形、体积、色泽均属正常,无坏死、充血、肿胀等异常现象。RJHGP 各剂量组与对照组的肝脏系数、肾脏系数等比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。组织病理学检查所有实验动物均未发现明显可能由于药物毒性引起的异常组织病理学改变。

表 1 RJHGP 各剂量组大鼠脏器系数、血液学及血液生化指标的比较($\bar{x} \pm s$)

分 组	时点	例数	脏器系数		血液学指标			
			肝脏 (%)	肾脏 (%)	网织红细胞百分率	淋巴细胞 (10 ⁹ /L)	平均 RBC 血红蛋白浓度 (g/L)	血小板 (10 ⁹ /L)
对照组	13 周	10	2.86 ± 0.31	0.59 ± 0.04	1.01 ± 0.15	4.94 ± 0.76	287.10 ± 17.43	344.70 ± 56.78
	26 周	20	2.67 ± 0.24	0.59 ± 0.03	1.08 ± 0.19	4.61 ± 0.71	290.55 ± 15.36	332.20 ± 41.83
	停药 4 周	10	2.70 ± 0.22	0.61 ± 0.02	1.15 ± 0.10	4.57 ± 0.72	293.20 ± 19.90	367.90 ± 53.58
高剂量组	13 周	10	2.80 ± 0.48	0.54 ± 0.04	1.02 ± 0.17	5.13 ± 1.09	300.60 ± 16.02	314.20 ± 49.18
	26 周	20	2.95 ± 0.44	0.60 ± 0.03	1.08 ± 0.13	4.99 ± 0.86	283.90 ± 19.53	348.00 ± 33.78
	停药 4 周	10	2.47 ± 0.15	0.62 ± 0.04	1.22 ± 0.10	4.61 ± 0.57	287.40 ± 16.70	356.70 ± 53.25
中剂量组	13 周	10	2.76 ± 0.35	0.54 ± 0.03	1.04 ± 0.18	4.90 ± 0.70	286.70 ± 19.79	357.80 ± 40.27
	26 周	20	2.80 ± 0.35	0.59 ± 0.07	1.05 ± 0.17	4.81 ± 0.74	286.25 ± 19.57	342.85 ± 50.02
	停药 4 周	10	2.70 ± 0.41	0.61 ± 0.07	1.11 ± 0.13	4.81 ± 0.89	294.90 ± 15.89	333.50 ± 42.88
低剂量组	13 周	10	3.00 ± 0.29	0.58 ± 0.06	1.02 ± 0.40	4.90 ± 0.90	284.90 ± 16.50	336.60 ± 38.00
	26 周	20	2.51 ± 0.33	0.61 ± 0.07	1.07 ± 0.22	4.35 ± 0.73	291.05 ± 17.12	341.15 ± 87.91
	停药 4 周	10	2.74 ± 0.27	0.60 ± 0.06	1.12 ± 0.17	4.59 ± 0.79	296.70 ± 16.65	361.50 ± 42.67
<i>F_A</i>	—	—	0.007	0.543	0.343	1.024	0.057	0.178
<i>F_B</i>	—	—	1.915	2.606	2.687	2.147	1.112	1.209
<i>P_A</i>	—	—	0.999	0.655	0.794	0.384	0.982	0.911
<i>P_B</i>	—	—	0.155	0.081	0.091	0.120	0.331	0.301

分 组	时点	例数	血液生化指标			
			丙氨酸氨基转移酶(U/L)	肌酐(μmol/L)	门冬氨酸氨基转移酶(U/L)	总胆红素(μmol/L)
对照组	13 周	10	41.60 ± 3.63	39.68 ± 2.51	2.68 ± 0.26	2.68 ± 0.26
	26 周	20	41.30 ± 3.29	41.31 ± 2.62	2.55 ± 0.28	2.55 ± 0.28
	停药 4 周	10	40.40 ± 3.69	39.36 ± 2.47	2.54 ± 0.36	2.54 ± 0.36
高剂量组	13 周	10	41.00 ± 2.49	39.93 ± 2.88	2.61 ± 0.22	2.61 ± 0.22
	26 周	20	40.90 ± 2.83	40.97 ± 2.68	2.59 ± 0.26	2.59 ± 0.26
	停药 4 周	10	42.40 ± 4.12	39.39 ± 3.23	2.7 ± 0.17	2.70 ± 0.170
中剂量组	13 周	10	41.60 ± 3.98	39.39 ± 2.38	2.63 ± 0.26	2.63 ± 0.26
	26 周	20	41.10 ± 3.26	39.94 ± 2.59	2.54 ± 0.26	2.54 ± 0.26
	停药 4 周	10	41.70 ± 3.80	39.51 ± 3.30	2.67 ± 0.34	2.67 ± 0.34
低剂量组	13 周	10	41.60 ± 2.72	40.13 ± 3.09	2.69 ± 0.22	2.69 ± 0.22
	26 周	20	40.85 ± 3.39	39.55 ± 2.49	2.55 ± 0.26	2.55 ± 0.26
	停药 4 周	10	40.80 ± 4.10	40.72 ± 3.58	2.43 ± 0.22	2.43 ± 0.22
<i>F_A</i>	—	—	1.095	0.133	1.879	0.565
<i>F_B</i>	—	—	0.089	0.94	0.017	0.639
<i>P_A</i>	—	—	0.353	0.799	0.136	0.173
<i>P_B</i>	—	—	0.915	0.382	0.983	1.06

注:RJHGP 各剂量组与对照组比较, $P > 0.05$
万方数据

3 讨论

3.1 肝纤维化多由情志不遂、饮食不节、疫毒内侵导致肝郁脾虚、气滞血瘀和痰湿壅阻。软坚散结中药抗纤维化治疗有很多报道,动物实验证明小茴香、苦参碱、熊果酸、姜黄素等均有不同程度的抗肝纤维化作用^[6~9];临床观察证明,复方鳖甲软肝片能够降低肝纤维化程度、软肝缩脾及改善门静脉高压^[10]。

3.2 软坚护肝片是由山豆根、赤芍等 12 种中草药组成。方中以山豆根、虎杖等清热解毒;以丹参等药活血化瘀、疏肝理气;以黄芪补气;以女贞子养肝肾之阴,扶助正气;以砂仁醒脾;以山楂消食。诸药合用,具有补益、逐瘀、化湿、散结之功效,符合中医治疗肝纤维化原则中的活血化瘀、软坚散结、补益肝肾等治法,作为医院制剂应用多年,显示出其安全、有效和价廉的优点。

3.3 软坚护肝片作为久用多年的经验复方,方中单一成分的毒性研究较多,而对山豆根、丹参、赤芍等多种毒性的相关研究并未十分透彻,其原因一方面由于中药为“多途径”、“多靶点”的作用机制;另一方面由于中药的制剂工艺亦能产生某些影响,部分伪品入药及药材混杂也是引起中药毒性的原因^[11~13]。为此,研究复方制剂的长期毒性对于探讨功效与毒性相关的“有效剂量窗”和“安全窗”有重要的意义。多数中药复方长期毒性研究结果表明,各剂量组均值的意义大于单个数据,但单个数据显著的异常改变也非常值得关注,虽然部分研究结果出现个别指标差异有统计学意义,但其仍在正常值范围之内,不具有生物学差异^[14]。现有的各机构研究水平、研究设备参差不齐,导致研究的重现性不好,有时可能重复研究会得出相反结论。这些都是中药复方长期毒性研究值得思考的问题。合理的剂量设计、详细的实验观察、正确的统计分析是解决问题的必然途径。

3.4 本研究以 3 个剂量组(即 1.24、2.48、4.96 g/kg,相当于 20、40、80 倍临床成人日用量)连续给药 13、26 周及停药 4 周后,通过血液学、血液生化学、组织

解剖学、病理检查学各方面观察,研究结果表明,对于敏感的 RET%、ALT、AST 等指标均在正常值范围,并未发现血液系统其他指标的异常变化。对于药物吸收代谢关键的肝脏、肾脏,其脏器形态功能亦未发现改变。研究结果提示,软坚护肝片对大鼠的长期重复给药,未发现明显毒性反应及延迟性毒性反应,可以安全推广使用。

参考文献

- 1 郭庆渠,梁水庭,梁雪婧,等.软坚护肝片预防肝纤维化形成的实验研究[J].广西医科大学学报,2007,24(2):261-263.
 - 2 梁水庭,覃晓,黎乐群,等.软坚护肝片及甘草甜素片对肝癌术后复发的干预性研究[J].临床肝胆病杂志,2004,20(5):293-294.
 - 3 魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].第4版.北京:人民卫生出版社,2010:393-395.
 - 4 李仪奎.中药药理实验方法学[M].第2版.上海:上海科学出版社,2006:1008-1012.
 - 5 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].2005:1-10.
 - 6 吴小川,马秀敏,薛志琴,等.维吾尔药小茴香对肝纤维化大鼠转化生长因子-β1的影响[J].科学导报,2010,28(9):84-88.
 - 7 陈小亮,李俊,邓子煜,等.苦参素对肝纤维化大鼠肝脏 TGF-β1的调节作用[J].中国药理学通报,2009,25(6):761-764.
 - 8 欧阳灿晖,朱萱,张焜和,等.熊果酸对肝纤维化大鼠肝组织 TGF-β1 和 α-SMA 表达的影响[J].世界华人消化杂志,2009,17(22):2237-2243.
 - 9 赵珍东.姜黄素抗肝纤维化作用及机理研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(3):122-125.
 - 10 陈志平.复方鳖甲软肝片治疗肝纤维化 32 例[J].福建中医药,2011,42(2):17-18.
 - 11 吕莉莉,谢元璋,张蓉.基于功效和物质基础的山豆根毒性研究进展[J].中国药物警戒,2011,8(2):105-107.
 - 12 张旭静,王素春,王桂清.复方丹参萃取液的毒理学研究[J].中国药理与临床,2005,21(5):55-57.
 - 13 黄秋云,张锦铭,李丹.赤芍急性毒性实验观察[J].海峡药学,2008,20(10):40-41.
 - 14 阿不都热依木·王苏甫,古孜力努尔·依马木,麦合素木·艾克木,等.异黑成熟颗粒的急性毒性和长期毒性实验研究[J].新疆医科大学学报,2011,34(12):1324-1325.
- [收稿日期 2012-09-18][本文编辑 宋卓孙 蓝斯琪]

欢迎 订 阅

欢迎 投 稿

欢迎 刊 登 广 告

本刊地址:广西南宁市桃源路 6 号,邮编:530021,电话:(0771)2186013

E-mail:zglexyzz@163.com

《中国临床新医学》杂志编辑部