

安神补脑液对大鼠长期毒性的观察

张海晶¹, 孙桂波², 陈荣昌², 王健², 陈大忠¹, 王永彬³, 王永宽³, 解钧秀^{3*}, 孙晓波^{2*}

(1. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;
3. 吉林敖东延边药业股份有限公司, 吉林 延吉 133700)

【摘要】 目的 观察安神补脑液长期灌胃给药对大鼠所产生的毒性反应及严重程度, 提供毒副反应的靶器官及其损害的可逆程度, 确定无毒反应剂量, 以评价安神补脑液长期用药的安全性, 为拟定临床试验剂量及观察指标提供参考。方法 Wistar 大鼠随机分为安神补脑液低、中、高剂量组 (2.5、5、10 mL/kg) 和溶剂对照组 (灌服同容积蒸馏水 2 mL/100 g), 每组 60 只, 雌雄各半, 每天给药 1 次, 每周给药 6 d, 连续 26 周。观察大鼠的外观行为、体重、摄食量, 并分别于给药第 13、26 周末及四周恢复期结束进行血液学及血液生化学等各项指标检测及脏器系数、病理组织学检查。结果 长期连续灌胃给予安神补脑液, 对动物一般状态、行为活动和外观体征无明显不良影响; 各剂量组的摄食量、体重、血液学及血液生化学指标与对照组比较无明显差别; 给药 3 个月、6 个月对动物各脏器组织位置、重量和脏器系数无不良影响, 但部分脏器重量有所增加, 各组动物脏器系数在正常范围内; 病理结果显示对照组和安神补脑液高剂量组动物未见明显与给药相关的异常病理改变和毒性改变, 恢复期停药后未见延迟性毒性, 因此, 中、低剂量组动物各脏器组织无需进行组织病理形态学检查。结论 安神补脑液长期用药对大鼠未见明确的毒性反应, 停药后亦无延迟性毒性反应, 预期拟定的临床用药量为安全剂量。

【关键词】 安神补脑液; 长期毒性; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 02-0147-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.02.009

Evaluation of the chronic toxicity of Anshen Bunao liquid in rats

ZHANG Hai-jing¹, SUN Gui-bo², CHEN Rong-chang², WANG Jian², CHEN Da-zhong¹,
WANG Yong-bin³, WANG Yong-kuan³, XIE Jun-xiu^{3*}, SUN Xiao-bo^{2*}

(1. Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union
Medical College, Beijing 100193; 3. Jilin Ao Dong Yanbian Pharmaceutical Co., Ltd., Yanji 133700)

【Abstract】 Objective To study the chronic toxicity and its severity of a Chinese medicine, Anshen Bunao Liquid (ABL), in rats, provide the target organs and extent of reversibility of their adverse effects, determine its non-toxic dose, and to evaluate the safety of medication and provide reference for clinical trial dose and observation indexes. **Methods** Two hundred and forty healthy 6-week old Wistar rats (male:female = 1:1) were divided into low, middle, and high dose Anshen Bunao liquid groups (2.5, 5, 10 mL/kg), and solvent control group (distilled water 2 mL/100 g), with 60 rats in each group. The drug was orally administered to rats once a day and 6 days per week for 26 weeks. The general state, body mass and food intake were measured. By the end of 13 weeks, 26 weeks of experiment and 4-week recovery period after drug withdrawal, hematological and biochemical indexes were assayed, organ coefficients were determined, and histopathological observation was performed. **Results** Long-term continuous oral administration of Anshen Bunao liquid, the general state, behavior and gross appearance showed no significant abnormal changes. Compared with the control group, no significant differences in all checked items were found in the treatment groups. During 3 and 6 months, the size and location of organs,

[基金项目] 国家科技重大专项课题, 重大新药创制基金项目 (编号:2012ZX09501001-004)。

[作者简介] 张海晶 (1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药新药与物质基础。

[通讯作者] 解钧秀, 正高级工程师, 从事新药开发研究, E-mail: kf6237458@163.com; 孙晓波, 研究员, 研究方向: 心血管药理, E-mail: xb-sun@imPlad.ac.cn。

organ weight and organ coefficient had no obvious changes, with only non-significant increase of weight of some organs. All the organ coefficients of the animals in different groups were within normal range. Histopathology showed no obvious pathological and toxicological changes even in the high-dose drug treatment group, and no delayed toxicity occurred after withdrawal of drug administration. **Conclusions** The Chinese drug, Anshen Bunao liquid has no obvious toxicity and no delayed toxicity after withdrawal of the drug in rats. It is expected that the planned dose in clinical use is a safe dose.

【Key words】 Anshen Bunao liquid; Chronic Toxicity; Rats

安神补脑液由鹿茸、甘草、制何首乌、干姜、淫羊藿等多味中药组成^[1],有养心安神、滋补肝肾、定志安神之功效,适用于神经衰弱所引起的失眠多梦、头昏脑胀、烦躁心悸、记忆力减退等不适,对促进血液循环,改善睡眠和食欲,缓解肌肉疲劳,提高心脏、大脑工作效率等具有较好的治疗效果^[2-3]。目前国内对安神补脑液的研究多集中于其有效成分的含量测定及不同工艺对其疗效的影响,以及对于镇静安神作用的探讨,对于长期服用的有关毒理学方面报道较少,而长期毒性试验可以观察连续反复给药时,实验动物出现的毒性作用、剂量与毒性效应的关系、主要毒性靶器官、毒性反应的性质和程度、毒性反应是否可逆等,是临床前毒性评价的主要内容,是新药审评重点内容之一,它为临床安全用药的剂量设计提供参考依据,为临床毒副作用的监护及生理生化指标检测提供依据^[4]。因此为探讨安神补脑液安全性,参照国家药品安全试验研究的有关规定,对其进行了长期毒性实验研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 受试药物

安神补脑液由吉林敖东延边药业股份有限公司提供(批号:1107059),蒸馏水配制成不同浓度的药液,备用(每天配制一次)。

1.1.2 实验动物

6 周龄 Wistar 大鼠 240 只,SPF 级,雌雄各半,雄性(120 ± 7.26)g;雌性(112 ± 10.9)g,购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-0001】。饲养于 SPF 级动物实验室内,室温 20~25℃,湿度 40%~70%,自由取食全价鼠颗粒饲料和实验动物饮用水。动物实验过程在中国医学科学院药用植物研究所完成【SYXK(京)2013-0023】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.1.3 实验仪器

美国 Hemavet 950 动物血液分析仪、Olympus CH-20 显微镜、德国 BT-M1 单通道血凝仪测定、美

国雅培 Alcyon-300 型全自动生化分析仪。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及给药

Wistar 大鼠(SPF 级)雌雄各半,实验前检疫与驯化 1 周,取状况良好的大鼠 240 只,随机分为 4 组,安神补脑液低、中、高剂量组和溶剂对照组,每组 60 只。根据国家食品药品监督管理局 2004 年下发的《中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则》给药剂量的一般原则,安神补脑液各剂量组分别为 2.5、5、10 mL/(kg·d),对照组灌服同容积蒸馏水 2 mL/100 g。各组每日灌胃给药 1 次,每周给药 6 d,停药 1 d,连续给药 26 周,并设 4 周恢复期。按《中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则》中的要求检测各项指标。

1.2.2 大鼠一般状况、体重及摄食量观察

试验期间每天对大鼠的外观体征、被毛状态、行为活动,有无震颤、痉挛等神经反应、粪便形状及颜色、下腹部、肛门处有无污物及排泄物等进行观察。给药期间以及恢复期,体重和摄食量每周测定一次。另外,在进行解剖时先测定动物的体重。

1.2.3 血液学指标检测

分别于给药第 13、26 周末及 4 周恢复期结束进行血液学各项指标检测。各组 20 只,均雌雄各半。末次给药后大鼠禁食 16 h,10% 水合氯醛(0.4 mL/100 g 体重)腹腔注射麻醉,腹主动脉采血。动物血液分析仪检测血红蛋白(Hb)含量、红细胞(RBC)、白细胞(WBC)及其分类、血小板(PLT)等,显微镜法检测网织红细胞计数(RET),比浊法测定凝血酶原时间(PT)。

1.2.4 血液生化指标检测

各检测时间同血液学指标检测,腹主动脉采血后,室温静置 1 h 左右,3000 r/min 离心 10 min,分离血清。如不能当日检测血清,将之放入冻存管中,-80℃冻存。全自动生化分析仪检测血清中天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、肌酸磷酸激酶(CK)、尿素氮(Urea)、总蛋白(TP)、总胆固醇(CHO)等指标。

1.2.5 系统尸检、脏器系数及组织病理学检查

给药第 13、26 周末及 4 周恢复期结束,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,剖检,细致全面检查脑、心脏、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏、肾上腺、胸腺、雄性动物睾丸和附睾、雌性动物子宫和卵巢等脏器并称其重量,计算各脏器重量与重量之比(脏器系数)。将给药 13 周的每组 20 只动物、26 周的每组中 12 只动物及恢复期的每组中 8 只动物的脑、脊髓、胸腺、甲状腺(连甲状腺旁腺)、心脏、肾脏等 20 种组织脏器用 4% 甲醛固定、保存。先将高剂量组和对照组的脏器组织,按常规方法进行脱水、包埋、切片、HE 染色后,光学显微镜观察。如某一组织发生病理改变,其他剂量组动物该组织再进行组织病理学检查,以确定剂量-反应关系。反之,中、低剂量组免做组织病理学检查。

1.2.6 统计学分析

体重、摄食量、血液学、血液生化、脏器系数以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 17.0 及 ANOVA 进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 对大鼠一般状况、体重及摄食量的影响

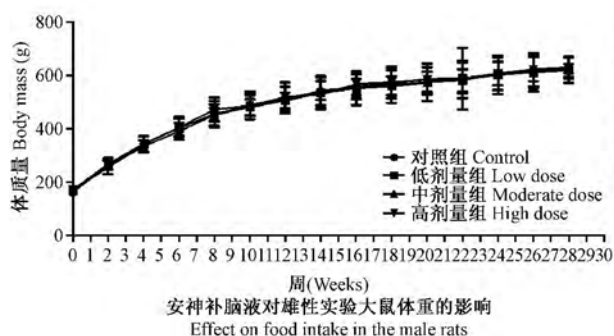


图 2 安神补脑液对大鼠血液学指标的影响

Fig.2 Effect of Anshen Bunao liquid on hematologic parameters in the rats

2.2 对大鼠血液学及血液生化学指标的影响

给药 3 个月、6 个月,安神补脑液各剂量组动物的血液学及血液生化学指标均在正常值范围之内,与对照组比较差异无显著性。恢复期各组血液学及血液生化学指标均与对照组无差别,如图 3、4。

2.3 对大鼠脏器系数及组织病理学的影响

给药后第 13 周末、26 周末及恢复期观察结束尸体解剖,对照组及各给药组动物系统脏器组织均未发现肉眼可见的病理改变。所有的脏器重量及脏器系数均在正常生理值范围之内,各给药组脏器重量及脏器系数与同期对照组比较,在统计学上均无

显著性差异。恢复期观察结束,雄性动物低剂量组提肛肌重量高于对照组,雌性动物高剂量组肾上腺重量及卵巢和子宫的重量高于对照组;各给药组脏器系数与同期对照组比较,在统计学上均无显著性差异。具体见表 1。

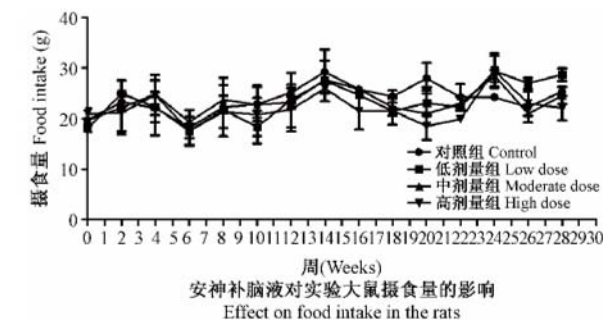
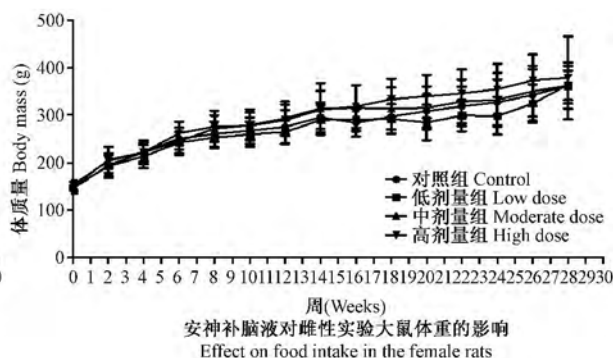


图 1 安神补脑液对实验大鼠摄食量的影响

Fig.1 Effect of Anshen Bunao liquid on the food intake of rats



显著性差异。恢复期观察结束,雄性动物低剂量组提肛肌重量高于对照组,雌性动物高剂量组肾上腺重量及卵巢和子宫的重量高于对照组;各给药组脏器系数与同期对照组比较,在统计学上均无显著性差异。具体见表 1。

病理组织学检查显示对照和高剂量给药组动物未见明显与给药相关的大体及显微镜观察异常病理改变,未见与给药相关的毒性改变,恢复期停药 1 个月未见延迟性毒性,因此中、低剂量组动物各脏器组织未做组织病理形态学检查;所观察到的病理改变均为常见的自发性或偶发病变,与给药无明显相

关性, 见图 5、6。

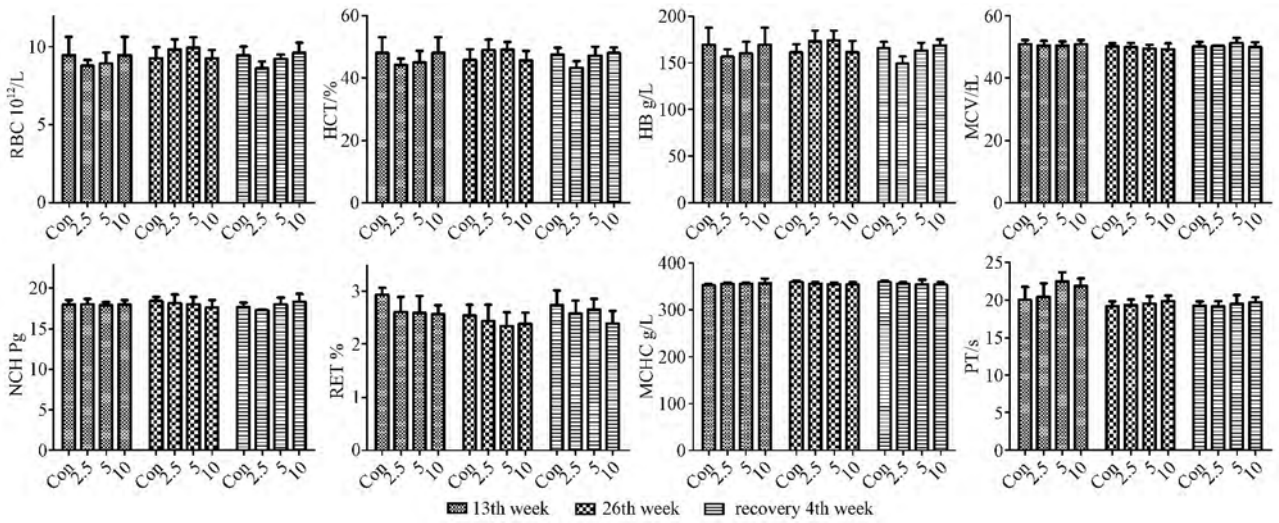


图 3 安神补脑液对大鼠血液学指标的影响

Fig. 3 Effects of Anshen Bunao liquid on hematology in the rats

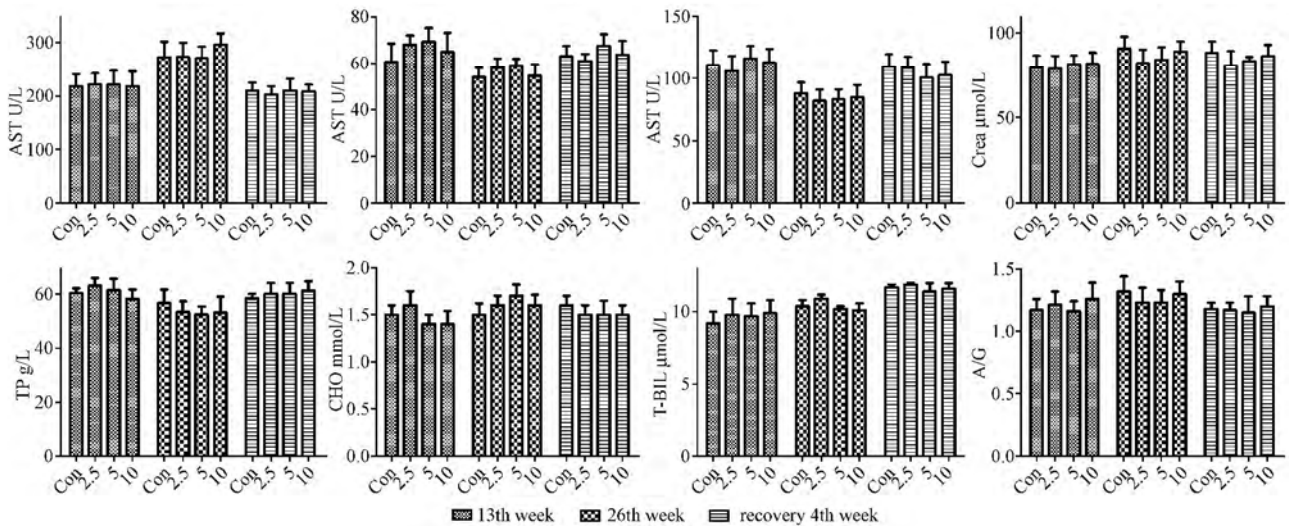


图 4 安神补脑液对大鼠血液生化指标的影响

Fig. 4 Effects of Anshen Bunao liquid on biochemical parameters in the rats

表 1 安神补脑液对大鼠主要脏器重量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10, g$)

Tab. 1 Effects of Anshen Bunao liquid on organ weight in the rats

脏器 Organs	对照组 Control	安神补脑液组 Anshen Bunao liquid groups			
		2.5	5	10	
提肛肌 Levator ani muscles (♂)	给药 13 周 13 th weeks	1.828 ± 0.375	2.036 ± 0.416	1.809 ± 0.325	1.788 ± 0.342
	给药 26 周 26 th weeks	2.058 ± 0.244	2.083 ± 0.194	1.941 ± 0.221	2.064 ± 0.172
	恢复 4 周 recovery 4 th weeks	1.906 ± 0.147	2.247 ± 0.188*	2.089 ± 0.264	1.925 ± 0.18
肾上腺 Adrenal gland (♀)	给药 13 周 13 th weeks	0.059 ± 0.016	0.067 ± 0.016	0.07 ± 0.014	0.068 ± 0.026
	给药 26 周 26 th weeks	0.088 ± 0.015	0.086 ± 0.023	0.091 ± 0.030	0.091 ± 0.024
	恢复 4 周 recovery 4 th weeks	0.061 ± 0.002	0.071 ± 0.009	0.106 ± 0.014	0.097 ± 0.012*
卵巢和子宫 Ovary and uterus (♀)	给药 13 周 13 th weeks	0.744 ± 0.107	0.822 ± 0.208	0.905 ± 0.288	0.844 ± 0.134
	给药 26 周 26 th weeks	0.966 ± 0.164	1.002 ± 0.191	0.997 ± 0.222	1.015 ± 0.133
	恢复 4 周 recovery 4 th weeks	0.900 ± 0.093	0.869 ± 0.093	1.064 ± 0.075	1.077 ± 0.125*

注: * $P < 0.05$ 与对照组比较。

Note. * $P < 0.05$, vs. control group.

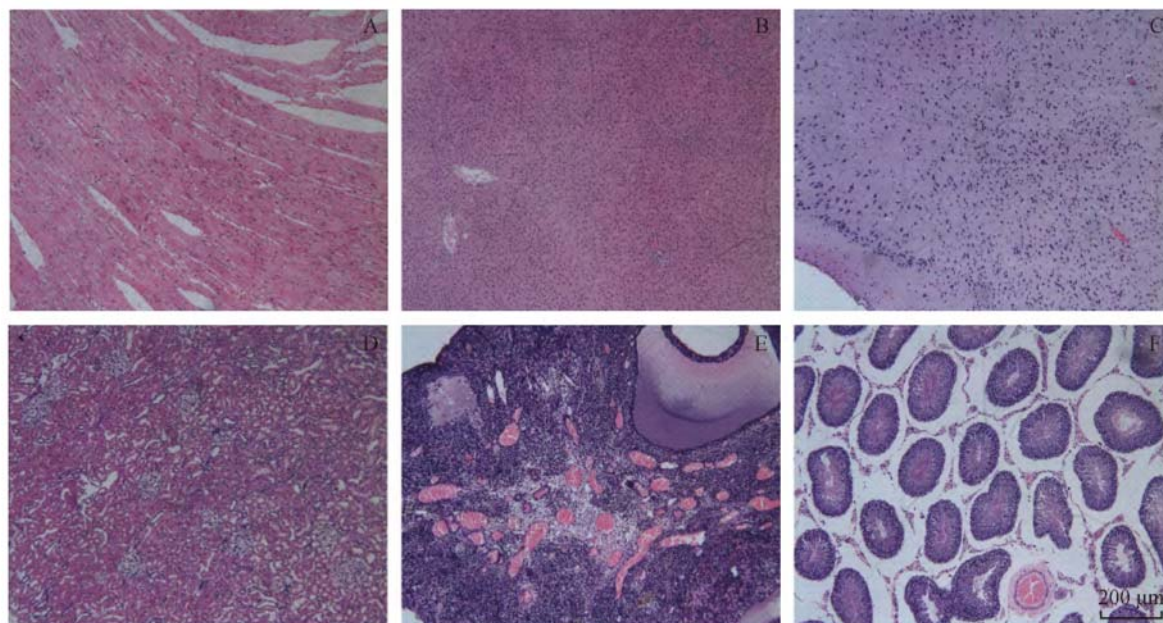


图 5 安神补脑液高剂量组大鼠给药期心、肝、脑、肾、卵巢、睾丸的组织学图像 (×10)

Fig. 5 Histological appearance of heart (A), liver (B), brain (C), kidney (D), ovary (E), and testis (F) of the rats during the period of high dose Anshen Bunao liquid administration. (×10)

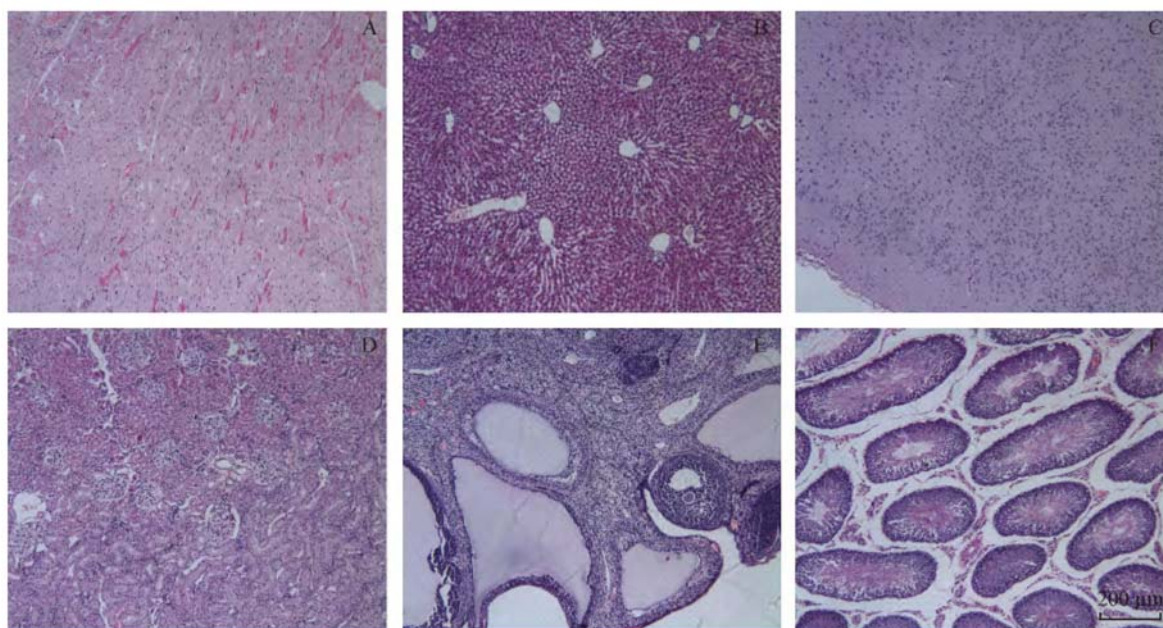


图 6 安神补脑液高剂量组大鼠恢复期心、肝、脑、肾、卵巢、睾丸的组织学图像 (×10)

Fig. 6 Histological appearance of heart (A), liver (B), brain (C), kidney (D), ovary (E), and testis (F) of the rats during the recovery period after high dose Anshen Bunao liquid administration (×10)

3 讨论

安神补脑液为治疗神经衰弱类药物,用药周期较长,因此观察其毒性反应对临床安全用药有重要的参考价值。实验结果显示:安神补脑液低、中、高剂量组连续灌胃给药 6 个月及停药 1 个月,各剂量

组雌、雄大鼠体重增长正常,饮水、进食量及一般状况与对照组比较差异均无统计学意义,提示安神补脑液不影响大鼠生长发育;安神补脑液各剂量组的血液学及血液生化学指标与对照组比较差异均无统计学意义,提示安神补脑液不影响大鼠骨髓造血功能,对肝肾功能亦无损害,不影响蛋白质、糖的代谢

和排泄;主要脏器系数及组织病理学检查均无明显差异和异常变化,提示安神补脑液对大鼠主要脏器质量和脏器系数无明显影响。

根据《中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则》,本实验条件下安神补脑液低剂量组给药量与预期的临床治疗剂量是等效剂量,且高、中剂量组分别达到临床用药剂量的 4、2 倍,而大鼠的各项检查均未见药物引起的毒性反应,未发现明确的毒性靶器官,亦无延迟性毒性反应。依据本试验的结果分析,可认为安神补脑液无明显的长期毒性,表明其临床用药量为安全剂量。此试验既为安神补脑液的长期合理应用提供科学的理论依据,也为国内对安

神补脑液的进一步及有关研究奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部 [S]. 北京:中国医药科技出版社,2010: 715-716.
- [2] 陈从祥. 磁疗加安神补脑液治疗神经衰弱 886 例疗效观察 [J]. 中国实用医药, 2008, 3(20): 91.
- [3] 于玲玲, 王安翠. 安神补脑液的药理研究 [J]. 黑龙江科技信息, 2012, 15(7): 50.
- [4] 许迪, 孔利佳, 杜佐华, 等. 大鼠长期毒性试验质量控制探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(1): 61-63, 69.

[收稿日期] 2014-10-09

(上接第 146 页)

参 考 文 献

- [1] Korkut C, Asoglu O, Aksoy M, et al. Histopathological comparison of topical therapy modalities for acute radiation proctitis in an experimental rat model [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(30): 4879-4883.
- [2] Doi H, Kamikonya N, Takada Y, et al. Long-term sequential changes of radiation proctitis and angiopathy in rats [J]. J Radiat Res, 2012, 53(2): 217-224.
- [3] 姜爱琴, 高庆元, 刘长宝. 芦荟生肌膏对大鼠直肠损伤模型的治疗机制 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2010, 16(4): 442-444.
- [4] Haines DC, Gorelick PL, Battles JK, et al. Inflammatory large bowel disease in immunodeficient rats naturally and experimentally infected with *Helicobacter bilis* [J]. Vet Pathol, 1998, 35

(3): 202-208.

- [5] Yanaba K, Yoshizaki A, Asano Y, et al. IL-10-producing regulatory B10 cells inhibit intestinal injury in a mouse model [J]. Am J Pathol, 2011, 178(2): 735-743.
- [6] Yao JY, Lu Y, Zhi M, et al. Inhibition of the interleukin-23/interleukin-17 pathway by anti-interleukin-23p19 monoclonal antibody attenuates 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced Crohn's disease in rats [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(4): 2105-2110.
- [7] 王振军, 赵博, 韩炜, 等. 复方角菜酸酯对直肠黏膜急性损伤的治疗作用及其机制研究 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2005, 8(3): 245-248.

[收稿日期] 2014-09-22