

· 毒理 ·

痔血胶囊水提物和醇提物对大鼠肝毒性的影响

李品¹, 王琦¹, 彭莉¹, 赵保胜², 张晶璇², 荆鲁^{3*}, 王婷^{2*}

(1. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 100029; 3. 中国中医科学院眼科医院, 北京 100040)

[摘要] 目的:通过比较痔血胶囊水提物和醇提物对大鼠肝毒性的影响,探讨工艺因素对中药制剂安全性的影响。方法:Wistar大鼠80只,雌雄各半,随机分为空白组、全方水提组、全方60%醇提组、全方85%醇提组,除正常组灌服蒸馏水外,其余组按剂量 $4.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌服对应药物,连续给药30 d。末次给药后,腹腔注射10%水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,离心取血清,全自动生化仪检测血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),丙氨酸氨基转移酶(ALT),总胆红素(TBIL)等血清肝功能指标;摘取肝脏,称取质量,计算脏器指数;取肝脏最大叶同一部位肝组织,10%中性甲醛固定48 h,脱水,石蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色后,在光学显微镜下进行病理检查。结果:痔血胶囊全方醇提物存在明确的肝脏毒性,组织病理学主要表现为肝小叶周边带肝细胞小泡型脂肪变性;并且其肝毒性与提取溶剂中乙醇含量正相关;此外根据大鼠肝脏小灶灶炎细胞浸润评分,发现痔血胶囊的抗炎作用,水提组明显优于醇提组,说明痔血胶囊醇提物较水提物药效降低。结论:工艺因素对中药复方制剂的安全性具有重要影响,提示今后新药研发应关注现代工艺对中药安全性的影响,过分强调成分富集存在严重的安全隐患,工艺筛选应采用毒效结合的思路。

[关键词] 痔血胶囊; 肝毒性; 提取工艺; 中药安全性; 水提取; 乙醇提取

[中图分类号] R99; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)08-0154-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017080154

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170214.0837.008.html>

[网络出版时间] 2017-02-14 8:37

Effect of Water Extract and Ethanol Extract of Zhixue Capsule on Hepatotoxicity in Rats

LI Pin¹, WANG Qi¹, PENG Li¹, ZHAO Bao-sheng², ZHANG Jing-xuan², JING Lu^{3*}, WANG Ting^{2*}

(1. Department of Basic Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine,

Beijing 100029, China; 3. Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of process factors on the safety of traditional Chinese medicine (TCM) preparation by comparing the effect of water extract and ethanol extract of Zhixue capsule on hepatotoxicity. **Method:** The 80 Wistar rats (40 male and 40 female) were randomly divided into blank control group, Zhixue capsule water extract group, Zhixue capsule 60% ethanol extract group, and 85% ethanol extract group. The rats in normal group received distilled water by gavage, and the rats in other groups received $4.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ extraction by gavage for 30 days. Intraperitoneal injection of 10% chloral hydrate was used to anesthetize the rats after the last drug administration, then blood was taken from abdominal aorta and serum was taken by

[收稿日期] 201611161(014)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81274181)

[第一作者] 李品,在读硕士,从事中医体质学与用药安全性研究, Tel:18518486054, E-mail:lipin1991@163.com

[通讯作者] *王婷,博士,教授,硕士生导师,从事中药毒性研究, Tel:010-64286407, E-mail:wangting1973@sina.com;

*荆鲁,博士,硕士生导师,从事中药复方拆方学研究, Tel:010-68688877, E-mail:jinglu00@sina.cn

centrifugation. Aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), and total bilirubin (TBIL) in serum were detected to indicate the liver injury. Their livers were taken for weighing and calculating the viscera index, the liver tissues in the same place of the largest liver lobe were taken and fixed by 10% neutral formalin for 48 h, then dehydration, paraffin embedding, and slicing were conducted. After hematoxylin-eosin (HE) staining, pathological examination was done under the microscope. **Result:** Zhixue capsule ethanol extract had clear hepatotoxicity, histopathologically demonstrated as small bubble type fatty degeneration surrounding hepatic lobule, and its hepatotoxicity was positively correlated with the ethanol concentration. In addition, water extract group had significantly better anti-inflammatory effect than ethanol extract group according to the liver focal necrosis and inflammatory cells infiltration scores, indicating that the effect of Zhixue capsule ethanol extract was lower than that of water extract. **Conclusion:** Processing factors have important effects on the safety of TCM compound preparations, indicating that the impact of modern technology on safety shall be concerned in new drug research and development, serious safety risks shall be emphasized in composition enrichment, and toxicity-effect thinking shall be adopted in technology screening.

[**Key words**] Zhixue capsule; hepatotoxicity; extraction process; safety of traditional Chinese medicine; water extract; ethanol extract

近年来,随着中药不良反应报道的逐渐增多,特别是一些传统上认为是无毒的药材却引起严重不良反应(SAE)和急性死亡病例的报道^[1],使得中药的安全性问题备受关注。痔血胶囊是由白鲜皮、苦参 2 味中药组成的中药复方制剂,功能清热解毒,凉血止血,主要用于 I, II 期内痔及混合痔所致的便血、肛门坠胀或坠痛,大便干燥或秘结等证。上市后国家不良反应中心陆续收到痔血胶囊药品不良反应报告,特别是 2008 年报告数量迅速增加,不良反应表现以肝损害为主。截至 2008 年 9 月 25 日,共收到痔血胶囊相关病例报告 35 例,其中 21 例(60%)不良反应名称描述为肝功能异常、胆汁淤积型肝炎、药物性肝炎。其中导致的肝损害症状表现为典型的乏力、尿黄、纳差以及皮肤和巩膜黄染,血清中天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)明显增高^[2],此后服用痔血胶囊后导致肝损害的临床报道逐渐增加^[3-7]。

中药引起肝损害的原因复杂,其药物因素包括中药材原、炮制、产地以及生产工艺等,其个体因素包括患者的个体体质差异、不合理用药^[8]。痔血胶囊原组方作为老中医经验处方,在长期的临床实践中已经证实其疗效确切、安全可靠,但在制成中成药,上市后出现严重不良反应。倪晓珺等^[9]通过研究痔血胶囊组方、白鲜皮和苦参对原代大鼠肝细胞和小鼠肝脏的毒性的影响,发现痔血胶囊存在明确的肝脏毒性。通过对痔血胶囊研究过程的回顾,发现其经验方在临床使用中,以传统水煎煮为主要提取方法,而痔血胶囊则以 85% 乙醇进行提取。由

于中药成分复杂,采用不同的提取方法,其物质基础差别极大,顾刚妹等^[10]对八味中药的水和乙醇提取物进行元素测定,发现水提物元素含量明显高于醇提物;此外不同的提取方法对中药的药效,以及药物安全性也有重要影响。如许玲玲等^[11]研究发现白鲜皮醇提取物的抑菌活性强于水提取物;谈英等^[12]通过比较乳香、没药生药及其不同提取物对大鼠的肝脏毒性的作用,发现不同提取物对大鼠的肝毒性有明显差异。因此痔血胶囊出现肝损害的原因可能与提取工艺有关。故本实验从痔血胶囊的提取工艺出发,通过大鼠长期毒理实验,对不同提取工艺制备的痔血胶囊提取物肝毒性进行比较,分析工艺改变对痔血胶囊肝毒性的影响。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wistar 大鼠 80 只,雌雄各半,体重 160 ~ 180 g,购于斯贝福(北京)实验动物科技有限责任公司,合格证号 SCKX(京)2011-0004,动物饲养于屏障环境动物室,实验期间自由饮水、摄食,室温 20 ~ 25 ℃,湿度 40% ~ 70%,光照周期明暗各 12 h,通风良好。经北京中医药大学实验动物伦理分委员会审查通过,伦理审查编号 BUCM-4-2016041201-2001。

1.2 药物 白鲜皮、苦参均购于北京燕北饮片厂,批号分别为 151016, 150416;饮片经北京中医药大学中药学院李向日教授鉴定,白鲜皮为芸香科植物白鲜 *Dictamnus dasycarpus* 的干燥根皮;苦参为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* 的干燥根。痔血胶囊处方来源经验方,临床应用为全方水煎煮,开发为中成

药后采用全方 85% 乙醇提取。为考察痔血胶囊肝毒性与提取溶剂的关系,分别采用纯水,60% 乙醇,85% 乙醇进行提取。醇提组制备工艺:分别取白鲜皮 3 kg,苦参 1 kg,加入 8 倍量溶剂,回流提取 2 次,得到提取液,静置、滤过,回收乙醇,浓缩成稠膏,减压干燥成干膏,60% 乙醇提取物与 85% 乙醇提取物干膏 1 g 分别相当于生药 20.3,33.4 g,粉碎成细粉,密封置于 4 °C 冰箱中保存,备用。水提组制备工艺:取白鲜皮 3 kg,苦参 1 kg,加入 8 倍量水,回流提取 2 次,得到提取液,静置、滤过,浓缩成稠膏,减压干燥成干膏,水提取物干膏 1 g 相当于生药 14.3 g,粉碎成细粉,密封置于 4 °C 冰箱中保存,备用。临用前,用蒸馏水分别配成所需浓度。

1.3 试剂 ALT,AST,碱性磷酸酶(ALP),总胆红素(TBIL),总蛋白(TP),白蛋白(ALB)试剂盒均由贝克曼库尔特试验系统(苏州)有限公司提供,批号分别为 AUZ 3774, AUZ 3645, AUZ 3684, AUZ 3798, AUZ 3701, AUZ 3752;酒精,甲醛,水合氯醛均为分析纯。

1.4 仪器 COULTER AU480 型全自动血液生化分析仪[贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司];EG1150 H 型石蜡包埋机,ST5020 型染色机/盖片机工作站, RM2245 型轮转式切片机(德国 Leica 公

司);Olympus BX41 型光学显微镜(中国上海赖氏电子科技有限公司)。

2 方法

2.1 痔血胶囊水提物、醇提物肝毒性比较 Wistar 大鼠随机分为空白组,水提组,60% 醇提组,85% 醇提组;分别灌服蒸馏水、痔血胶囊全方水提物、痔血胶囊全方 60% 醇提物、痔血胶囊全方 85% 醇提物,每组雌雄大鼠各 10 只。空白组及各给药组按灌胃体积 10 mL·kg⁻¹灌胃蒸馏水和相应痔血胶囊制剂,各给药组给药量均为含生药 4.1 g·kg⁻¹(成人每日剂量为生药 0.33 g·kg⁻¹),1 次/d,用药剂量根据前期实验结果而定,连续给药 30 d。期间观察并记录大鼠的一般状态,如毛色、活动度等基本情况;每 3 d 称 1 次体重。末次给药后,下午 7 点禁食,不禁水,第 2 天早晨 8 点,用 10% 水合氯醛腹腔麻醉大鼠,腹主动脉取血,3 500 r·min⁻¹,4 °C 离心 10 min,取血清,全自动生化分析仪测定 ALT,AST,ALP,TBIL,TP,ALB。完整摘取肝脏,称取肝质量,计算脏体系数;取肝脏最大叶同一部位肝组织,10% 中性甲醛固定 48 h,脱水,石蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色后,在光学显微镜下进行病理检查。大鼠肝脏组织病变以肝细胞脂肪变性、小灶状炎细胞浸润为主,病变描述及评分标准参考表 1。

表 1 大鼠肝脏病变描述及评分标准

Table 1 Description and scoring criteria of rat liver lesions

病变类型	病变描述	评分	病变程度	评分标准
肝细胞	肝细胞内	0	- , 正常	肝组织内未见明显肝细胞脂肪变性
脂肪变性	大小不等圆	1	+ , 轻微	少数肝细胞脂肪变性,病变累及肝小叶范围 < 25%
	形空泡,空	2	2+ , 轻度	一些肝细胞脂肪变性,病变累及肝小叶范围 ≥ 25% , < 50%
	泡越大越透	3	3+ , 中度	较多肝细胞脂肪变性,病变累及肝小叶范围 ≥ 50% , < 75%
	明空亮	4	4+ , 重度	多数肝细胞脂肪变性,病变累及肝小叶范围 ≥ 75%
小灶状	肝脏组织	0	- , 正常	每个组织切片上少于 3 个病灶,且均为微小病灶
炎细胞浸润	内小灶状炎	1	+ , 轻微	每个组织切片上多于 3 个病灶,少于 10 个病灶,病灶较小
	细胞浸润或	2	2+ , 轻度	每个组织切片上多于 10 个病灶,少于 30 个病灶,或平均每个肝小叶病灶不超过 3 个,且病灶较小
	肝细胞点状	3	3+ , 中度	每个组织切片上较多病灶,平均每个肝小叶病灶超过 3 个,病灶较小
	坏死	4	4+ , 重度	每个组织切片上弥漫性小灶状炎细胞浸润灶或肝细胞坏死灶

2.2 统计学分析 使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较是否齐性,采用 LSD 方法分析,方差不齐时用 Dunnett 方法进行分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 痔血胶囊水提物与醇提物对大鼠一般情况的影响 给药前,各组动物体重无明显差异。给药 30 d 后,与空白组比较,水提组,60% 醇提组以及 85% 醇提

组雄性大鼠体重均无明显差异;与空白组比较,水提组,85% 醇提组雌性大鼠体重无明显差异,60% 醇提组雌性大鼠体重明显降低(*P* < 0.05)。见表 2。给药期间至 30 d,各给药组动物毛发、自主活动、进食量、排便等与空白组比较无明显差异。

3.2 痔血胶囊水提物与醇提物对大鼠肝脏绝对质量及肝脏脏器系数的影响 给药 30 d 后,与空白组比较,痔血胶囊 60% ,85% 醇提组雄性大鼠肝脏绝对质量均显著增加(*P* < 0.01);水提组雄性大鼠的

表 2 痔血胶囊水提物与醇提物对大鼠肝脏绝对质量、脏体系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Zhixue capsules water extract and ethanol extract on absolute liver weight, organ body coefficient in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	雄性			雌性		
		体重/g	肝脏绝对质量	肝脏脏体系数	体重/g	肝脏绝对质量	肝脏脏体系数
空白	-	381.75 ± 10.51	10.85 ± 0.58	2.84 ± 0.10	247.53 ± 11.16	7.03 ± 0.98	2.84 ± 0.36
水提	4.1	378.96 ± 21.83	11.84 ± 1.02 ¹⁾	3.12 ± 0.16 ²⁾	239.83 ± 9.09	7.59 ± 0.55	3.16 ± 0.17 ²⁾
60% 醇提	4.1	387.20 ± 8.90	11.97 ± 0.26 ²⁾	3.09 ± 0.09 ¹⁾	235.80 ± 8.91 ¹⁾	7.83 ± 0.60 ²⁾	3.32 ± 0.29 ²⁾
85% 醇提	4.1	375.00 ± 23.91	12.26 ± 1.08 ²⁾	3.27 ± 0.22 ²⁾	239.09 ± 11.91	7.72 ± 0.66 ²⁾	3.23 ± 0.16 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同)。

肝脏绝对质量明显增加 ($P < 0.05$); 60%, 85% 醇提组雌性大鼠肝脏绝对质量显著增加 ($P < 0.01$)。与空白组比较, 水提组雄性大鼠肝脏脏体系数显著增大 ($P < 0.01$); 60% 醇提组雄性大鼠肝脏脏体系数明显增大 ($P < 0.05$); 85% 醇提组雄性大鼠肝脏脏体系数显著增大 ($P < 0.01$); 水提组, 60%, 85% 醇提组雌性大鼠肝脏脏体系数均显著增大 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 痔血胶囊水提物与醇提物对大鼠血清中肝功能生化指标的影响 给药 30 d 后, 与空白组比较, 各给药组雌、雄大鼠血清中 ALT, AST, TBIL 等未见异常改变。与空白组比较, 雄性大鼠血清中 ALP 明显下降 ($P < 0.05$), 但无毒理学意义, 60%, 85% 醇提组雌性大鼠血清中 TP, ALB 明显减低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与空白组比较, 85% 醇提组雄性大鼠血清中 TP 明显减低 ($P < 0.05$)。见表 3, 4。

表 3 痔血胶囊水提物和醇提物对雌性大鼠肝脏生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Zhixue capsules with different extraction processes on serum biochemical indicators in female rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$) U·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ALT	AST	ALP	TBIL	TP	ALB
空白	-	25.23 ± 3.56	89.56 ± 11.06	73.33 ± 19.45	4.21 ± 0.84	56.50 ± 4.13	31.98 ± 2.04
水提	4.1	25.42 ± 2.31	93.07 ± 14.42	80.18 ± 11.19	4.04 ± 0.99	57.51 ± 2.94	31.91 ± 1.70
60% 醇提	4.1	24.92 ± 7.03	81.37 ± 21.99	80.53 ± 37.47	4.06 ± 0.95	47.98 ± 11.86 ¹⁾	26.58 ± 6.56 ¹⁾
85% 醇提	4.1	23.90 ± 4.17	73.78 ± 20.40	69.05 ± 42.20	3.93 ± 0.92	43.00 ± 7.96 ²⁾	22.20 ± 5.72 ²⁾

表 4 痔血胶囊水提物与醇提物对雄性大鼠肝脏生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Zhixue capsules with different extraction processes on serum biochemical indicators in male rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$) U·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT	AST	ALP	TBIL	TP	ALB
空白	-	28.08 ± 8.32	110.58 ± 23.44	201.08 ± 41.26	2.35 ± 0.85	51.46 ± 2.78	28.06 ± 1.36
水提	4.1	26.72 ± 6.46	107.26 ± 32.39	191.73 ± 33.29	2.31 ± 0.82	48.67 ± 8.20	26.89 ± 4.14
60% 醇提	4.1	27.78 ± 8.57	96.79 ± 22.65	135.34 ± 40.42 ²⁾	2.84 ± 0.91	46.94 ± 8.63	25.19 ± 5.53
85% 醇提	4.1	28.28 ± 5.63	89.66 ± 19.97	153.48 ± 51.92 ¹⁾	2.52 ± 0.39	44.60 ± 5.74 ¹⁾	24.50 ± 3.67

3.4 痔血胶囊水提物与醇提物对大鼠肝脏病理学的影响 给药 30 d 后, 痔血胶囊的肝脏毒性主要表现为肝小叶周边带肝细胞小泡型脂肪变性。与空白组比较, 60% 醇提组的雄性大鼠肝细胞脂肪变性评分显著升高 ($P < 0.01$)。与空白组比较, 60%, 85% 醇提组雌性动物肝细胞脂肪变性评分显著升高 ($P < 0.01$); 且各给药组雌性动物的肝脏肝细胞脂肪变性评分率随乙醇体积分数升高有增加趋势, 与

水提组雌性动物比较, 60%, 85% 醇提组雌性动物的病变评分升高。与空白组比较, 各给药组雄性大鼠小灶炎评分均下降, 并且雄性大鼠水提组的下降最为显著 ($P < 0.01$)。见表 5 和图 1。

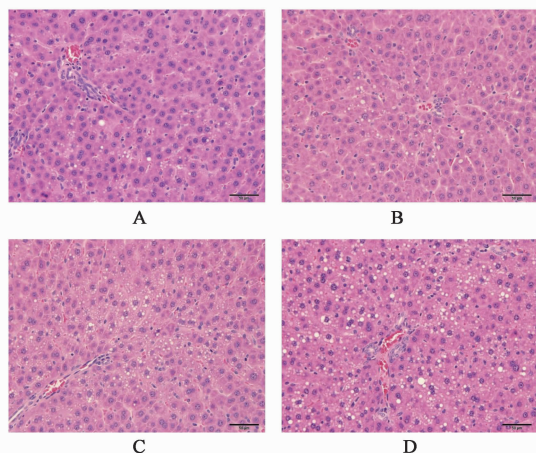
4 讨论

4.1 现代工艺对中药安全性的影响 工艺决定了中药新药发挥作用的物质基础。科学合理的工艺既可以保证新药的有效性, 也可减少安全性方面的

表 5 痔血胶囊水提物及醇提物对大鼠肝脏病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of Zhixue capsules with different extraction processes on liver pathological grading in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	肝细胞脂肪变性评分		小灶状炎细胞浸润评分	
		雄	雌	雄	雌
空白	-	0.20 ± 0.42	0.80 ± 0.63	0.80 ± 0.42	0.70 ± 0.48
水提	4.1	0.50 ± 0.53	1.33 ± 0.50	0.25 ± 0.46 ²⁾	0.67 ± 0.50
60% 醇提	4.1	1.67 ± 0.71 ²⁾	1.67 ± 0.71 ²⁾	0.44 ± 0.53	0.56 ± 0.53
85% 醇提	4.1	0.60 ± 0.70	1.70 ± 0.48 ²⁾	0.40 ± 0.52	0.70 ± 0.67



A. 空白组; B. 水提组; C. 60% 醇提组; D. 85% 醇提组

图 1 痔血胶囊水提物及醇提物对雌性大鼠肝脏损伤程度的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Zhixue capsules with different extraction processes on degree of liver injury in female rats (HE, ×400)

再次提示一些传统认为未含毒性药材的中药复方制剂, 由于制剂工艺改变而可能导致毒性成分的产生或增加, 进而使新药制剂具有毒性。

4.2 中药新药工艺筛选要采用毒效结合的思路

本实验发现, 痔血胶囊制备工艺采用醇提后, 实验大鼠出现了明确的肝损害, 安全性减低, 甚至疗效也出现降低。这提示在今后的中药新药研发, 特别是有效成分尚不清楚的中药复方研制过程中, 要走出提取工艺选择以富集主要成分为主要依据的误区, 因为中药的临床疗效并不一定就是某一种或几种成分的作用^[16]。要认识到中药成分的复杂性、以及多样性, 不仅仅是其发挥疗效的基础, 也是保证中药制剂安全性的基础^[17], 片面强调成分的富集, 极有可能导致效减毒增的后果。进行中药新药工艺筛选, 应当采用“毒效结合”的理念, 不仅选择与临床疗效密切相关的药效学指标, 还应选择必要的毒理学指标, 因为单纯考虑有效性, 忽视了安全性, 在富集有效成分的同时可能也富集了毒性成分, 导致出现安全性问题。

在中药新药的研究中应充分重视提取纯化工艺可能带来的安全性问题。尤其对于来源于临床经验方的中药复方新药, 工艺研究应围绕临床应用的有效性、安全性开展相关工作, 是在已有研究基础上的提高。在没有充分把握的情况下, 复方新药的工艺路线可以按照临床用药时的工艺来进行研究。若采用与临床用药时的制备工艺不同的工艺路线, 应有充分的研究数据阐明该工艺路线的科学性、合理性, 如与临床用药时的工艺进行对比研究的结果证明该工艺路线的有效性、安全性优于临床用药 (以汤剂为主) 的有效性、安全性, 以符合中药新药“更安全、更有效”的要求^[18]。

4.3 加强中药新药研发过程的规范性

在今后的中药新药研发中, 应尽快实施中药新药复方制剂在具有药物非临床研究质量管理规范 (GLP) 认证资质单位进行毒理实验; 同时, 必须加强对临床研究过程的监督管理, 严格实施药品临床试验管理规范 (GCP), 以保证中药新药的安全性。有学者对 2006—

风险。而不合理的工艺很可能会产生或增加安全性方面的风险。近几年中药以及中成药的临床安全问题突出, 痔血胶囊原组方作为临床上能够有效治疗痔疮出血的老中医经验处方, 其组成药物苦参及白鲜皮均为传统临床常用的清热燥湿药。苦参中的苦参碱和苦参素具有明显的保肝、护肝作用, 常用于治疗慢性肝炎等^[13]。白鲜皮有抗菌、抗肿瘤、抗炎与抗变态反应、抗溃疡、抗冠状动脉粥样硬化和神经等药理作用^[14]。这两味中药在传统临床应用中并无明确的毒性记载, 且两者临床常相须为用, 治疗痔疮出血, 但依据此处方研制出的痔血胶囊, 在上市后出现严重的药物性肝损害事件。通过本实验研究发现, 痔血胶囊制备工艺采用醇提后, 实验大鼠出现了明确的肝损害。此外, 如 2008 年出现严重肝损害的“仙牛健骨颗粒事件”, 其处方来源同样为临床经验方, 原临床使用方法为水煎, 但处方中补骨脂改为醇提以后, 富集了补骨脂中的香豆素类成分, 动物实验表明大剂量香豆素类成分具有明确的肝脏毒性, 这种工艺上的改变可能是产生严重不良反应的原因之一^[15]。这两例中药制剂引起严重肝损害的事件,

2008 年国家食品药品监督管理局药品审评中心受理承办的中药新药品种中审评结论为“不批准”的品种进行分析后,发现非临床安全性问题涉及品种数量最多,是申请临床试验品种不批准的最主要原因^[19]。因此应对新药研发中非临床安全性研究进行严格的规范。

4.4 关注痔血胶囊肝损害的性别差异 实验中发现痔血胶囊的肝毒性具有明显的性别聚集现象,发现痔血胶囊的肝毒性主要集中在雌性大鼠。王晓今等^[20]对南京军区上海临床肝病研究中心 14 个月收治的由痔血胶囊单药导致的群发性肝损害病例进行回顾性分析,表明痔血胶囊导致的肝损害中女性患者占 83.34%,本次动物实验结果与临床报道一致。在多数情况下,女性对药物性肝损害有更大的易感性,例如对乙酰氨基酚诱导的急性肝功能衰竭及特异质性药物反应均以女性为主,可达 67%~74%^[21]。痔血胶囊成分复杂,其肝损害出现的性别聚集现象,是否与患者药酶的遗传多态性有关,需进一步研究。

4.5 1 个月大鼠长期毒性实验 60%,85% 乙醇提取的痔血胶囊有明显的肝损害,表现为肝脏绝对质量和肝脏脏体系数明显升高,肝脏病理表现出明显的肝小叶周边带肝细胞小泡型脂肪变性,雌性大鼠肝损害表现更为明显,并且其肝毒性与提取溶剂中乙醇含量正相关;水提组雌雄大鼠肝脏绝对质量、肝脏脏体系数均比空白组升高,肝小叶周边带肝细胞小泡型脂肪变性评分比空白组高,但病变较轻微,且明显轻于醇提组。综上所述,痔血胶囊醇提物较水提物可对大鼠肝脏产生明显的肝损害。此外,鉴于长期毒性实验是药效实验的放大与延伸,根据大鼠肝脏小灶状炎细胞浸润评分,发现痔血胶囊的抗炎作用,水提组明显优于醇提组,说明痔血胶囊醇提物较水提物药效降低。

本实验表明,痔血胶囊提取工艺由水提改为醇提后,显示其肝毒性增加,抗炎药效则降低,提示今后中药新药研发,特别是处方源于临床经验方的研发,应注重工艺对药物安全性和有效性的影响,其传统用药工艺应作为工艺路线设计的重要依据之一。

【参考文献】

[1] 张丽,赵怡婷,陈冰. 623 例中药不良反应报告分析[J]. 中国医院用药评价与分析,2009,9(2):151-153.
[2] 国家药品不良反应监测中心《药品不良反应信息通报》[J]. 中国药物警戒,2009,6(1):55-56.
[3] 甘戈,孙骏. 14 例痔血胶囊致肝损害不良反应/事件

报告分析[J]. 中国药物警戒,2009,6(6):351-353.
[4] 谢龙腾. 痔血胶囊致急性药物性肝损害 13 例分析[J]. 浙江中医杂志,2009,44(7):527.
[5] 程宏,吴淑云. 痔血胶囊致严重肝损害[J]. 药物不良反应杂志,2009,11(4):298.
[6] 张春红,叶晓兰,张晓颖,等. 痔血胶囊致肝功能不良 12 例报告分析[J]. 海峡药学,2009,21(9):179-180.
[7] 杨婉花,何娟. 5 例痔血胶囊致急性药物性肝损害不良反应分析[J]. 中国药物警戒,2010,7(6):375-376.
[8] 李大寿,艾远征. 中药致药物性肝损伤的原因与预防措施[J]. 中国实用医药,2011,6(28):251-253.
[9] 倪晓珺,程能能. 痔血胶囊组方对原代培养大鼠肝细胞和小鼠肝脏的毒性[J]. 中国临床药理学杂志,2010,19(5):271-275.
[10] 顾刚妹,刘昌林,刘懋生,等. 八味中药的水和乙醇提取物中 21 种元素含量比较[J]. 中国中药杂志,1996,21(5):30-32.
[11] 许玲玲,杨晓东,李群力,等. 白鲜皮提取物抑制皮肤癣菌活性研究[J]. 现代中药研究与实践,2014,28(1):31-34.
[12] 谈英,徐鑫,周昆,等. 乳香没药及其提取物对大鼠肝毒性的实验研究[J]. 中国药物警戒,2010,7(4):193-195.
[13] 顾关云,肖年生,蒋昱. 苦参的化学成分、生物活性和药理作用[J]. 现代药物与临床,2009,24(5):265-271.
[14] 张明发,沈雅琴. 白鲜皮药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学,2012,9(2):95-99.
[15] 王停,董润生. 一起中药临床试验严重不良事件带给我们的思考[J]. 中国新药杂志,2008,17(14):1185-1187.
[16] 张铁军,许浚,韩彦琪,等. 中药质量标志物(Q-marker)研究:延胡索质量评价及质量标准研究[J]. 中草药,2016,47(9):1458-1467.
[17] 孙蓉,李晓宇,王亮,等. 基于“效-毒”相关的 Q-marker 合理辨识与科学控制[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2016,18(8):1224-1231.
[18] 周刚,王停. 关注中药新药研发中潜在的安全性问题[J]. 中国新药杂志,2014,23(14):1611-1614.
[19] 张晓东,张磊,王海南. 近年我国中药新药注册申请不批准原因分析[J]. 中国中药杂志,2012,37(15):2333-2337.
[20] 王晓今,陈成伟,傅青春,等. 痔血胶囊单药致群发性肝损伤——附 30 例分析[J]. 肝脏,2009,14(4):287-290.
[21] 于乐成,陈成伟. 药物性肝损伤[J]. 肝脏,2008,13(3):238-243.

[责任编辑 张丰丰]