

· 毒理 ·

不同来源牛黄与雄黄配伍的牛黄解毒片对小鼠毒性的影响

汤家铭^{1*}, 顾祖曦¹, 赵源¹, 张泽安¹, 陆雄¹, 朱娴丹¹, 米金霞¹, 吴文斌¹,
黄小燕¹, 樊海艇¹, 张超超¹, 夏晶², 李丽敏², 季申²

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海市食品药品检验所, 上海 201203)

[摘要] 目的:比较不同来源牛黄与雄黄配伍的牛黄解毒片对小鼠的毒性反应,探讨临床上牛黄解毒片引起慢性砷中毒的机制。方法:按 2015 年版《中国药典》的配方用天然牛黄、人工牛黄、体外培育牛黄分别制成牛黄解毒片,并用同法制成无牛黄成分、无雄黄成分的缺味组,另设同剂量单味雄黄作为对照,每种牛黄解毒片组再分为 0.5,1.0,2.0 g·kg⁻¹ 剂量组,单味雄黄组分为 0.06,0.12,0.24 g·kg⁻¹ 剂量组,对 ICR 小鼠进行灌胃给药 28 d,观察毒性反应;给药结束后解剖取血,分离血清检测肝肾功能,取心、肝、脾、肺、肾做组织病理学检查和电镜下超微结构观察。结果:给药期间各给药组未观察到毒性反应,给药结束亦未观察到大体内脏及体表皮肤病变,血液生化指标检查未能明确雄黄对肝肾的毒性作用。组织病理学和电镜下超微结构检查各牛黄解毒片组未发现异常毒性病理改变,但苏木素-伊红(HE)染色显示单味雄黄高剂量组肝脏出现小叶中心性肝细胞肥大和糖原聚集,过碘酸希夫(PAS)染色表明肝细胞内糖原聚集,电镜下超微结构检查发现肝细胞内局灶性胞浆溶解,内有数量不等糖原颗粒,提示雄黄可致小鼠肝脏毒性。结论:用不同来源牛黄与雄黄配伍的牛黄解毒片对小鼠进行 28 d 灌胃给药,均未发现对小鼠有明显的毒性反应。而用单味雄黄却引起肝脏毒性,提示牛黄解毒片中的其他成分与雄黄配伍能显著降低可溶性砷和价态砷的含量,从而降低雄黄的毒性。

[关键词] 牛黄解毒片; 配伍; 慢性砷中毒; 组织病理学; 超微结构

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)24-0164-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240164

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1422.042.html>

[网络出版时间] 2017-09-12 14:22

Toxicity of Niu Huang Jiedu Tablets Containing Calculus Bovis from Different Sources in Mice

TANG Jia-ming^{1*}, GU Zu-xi¹, ZHAO Yuan¹, ZHANG Ze-an¹, LU Xiong¹, ZHU Xian-dan¹,
MI Jin-xia¹, WU Wen-bin¹, HUANG Xiao-yan¹, FAN Hai-ting¹, ZHANG Chao-chao¹,
XIA Jing², LI Li-min², JI Shen²

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To conduct a comparative study on the toxic reaction of Niu Huang Jiedu tablets containing Calculus Bovis (Niu Huang) from different sources in mice, in order to explore the mechanism of chronic arsenic poisoning clinically caused by Niu Huang Jiedu tablets. **Method:** Test sample Niu Huang Jiedu tablets were respectively made by using natural Calculus Bovis, Bovis Calculus Artificial, and Bovis Calculus Sativus, with no Calculus Bovis element and no Realgar element, according to *Chinese Pharmacopoeia* (Version 2015). The same dose of test sample single Realgar was used for control. Each Niu Huang Jiedu tablets group was divided into low,

[收稿日期] 20170607(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473347)

[通讯作者] * 汤家铭, 硕士, 研究员, 从事药理学与毒理学和药物安全性评价研究, Tel:021-51322647, E-mail: tangjiaming@hotmail.com

middle and high-dose groups, ICR mice were intragastrically administered with drugs for 28 days, then the toxic reaction was observed during the period of drug administration. After drug administration, these mice were put to death. Their blood samples were collected to test liver and kidney function, and tissues of heart, liver, spleen, lung and kidney were collected for histopathological examination and ultrastructure observation under electronic microscopy. **Result:** In each test group, no toxic reaction was observed during drug administration. No gross lesion was observed in viscera and skins after the mice were put to death. And no clear toxic effect of Realgar on liver and kidney functions was found in blood biochemistry examination. In each Niu Huang Jiedu tablets group, no change in histopathology and ultrastructure under electronic microscopy was found. But in high-dose single Realgar group, the histopathological examination showed that in hepatic lobule, hepatocytes became enlarged, and glycogen accumulated in cytoplasm according to hematoxylin-eosin (HE) staining, which were further confirmed by periodic acid Schiff reaction (PAS) staining. Ultrastructure under electronic microscopy showed in hepatocytes focal cytoplasm dissolutions, and glycogen granules were found inside. **Conclusion:** No obvious toxic reaction was found in ICR mice after administration with Niu Huang Jiedu tablets containing bovis calculus from different sources for 28 days, but the same dose of single Realgar could cause liver toxicity. It is suggested that other ingredients in Niu Huang Jiedu tablets combined with Realgar can significantly reduce the concentrations of soluble arsenic and arsenic valence state, thus reducing the toxicity of Realgar.

[**Key words**] Niu Huang Jiedu tablets; compatibility of medicines; chronic arsenic poisoning; histopathology; ultrastructure

牛黄解毒片(丸)为中医清热解毒的传统名方,由牛黄、雄黄、石膏、大黄、黄芩、桔梗、冰片、甘草等组成,用于火热内盛,咽喉肿痛,牙龈肿痛,口舌生疮,目赤肿痛等证^[1],临床疗效显著。此外,在治疗急性咽炎、乳腺炎、带状疱疹和便秘等也有独特的疗效^[2],是我国常备的家庭用药。

牛黄解毒丸最早记载于《咽喉脉证通论》,2015年版《中国药典》中收录了处方相同但剂型不同的牛黄解毒丸、牛黄解毒片、牛黄解毒软胶囊和牛黄解毒胶囊 4 种,临床上以片剂应用最广泛^[3]。虽然从古至今处方几经改变,但其主要药味牛黄、雄黄的配伍一直未经调整,其中牛黄指的是天然牛黄,但 1970 年代起国家允许将其处方中天然牛黄改用为人工牛黄。

近年来,牛黄解毒片中不良反应报道时常发生^[3-11],并引起国内外关注。其中慢性砷中毒是引发人们质疑牛黄解毒片安全性的主要方面之一。牛黄解毒片引起药源性慢性砷中毒不良反应主要是处方中含有雄黄,但其中雄黄产生疗效和毒性的机制尚未阐明,雄黄与成药中其他药味配伍后产生的作用机制也尚不清楚。有研究表明,安宫牛黄丸中牛黄等其他药味与雄黄配伍后,可降低可溶性砷含量而具有减毒作用^[12]。前期研究曾分别对牛黄及其代用品(人工牛黄、体外培育牛黄)质量^[13]和雄黄的药材、炮制方法、矿产资源等进行了深入研究^[14]。

在安宫牛黄丸的质量研究中,发现天然牛黄与体外培育牛黄含有大量人工牛黄不具备的结合胆红素和共价胆红素,因此与金属离子具有较强配位作用。

经典方剂中含雄黄制剂中常常是雄黄与牛黄配伍,由此推测牛黄解毒片使用牛黄替代品人工牛黄可能无法有效与雄黄中可溶出砷形成配位化合物,造成体内砷含量增加,从而使临床慢性砷中毒病例增加。为了证明这一推测,本研究分别用天然牛黄、人工牛黄和体外培育牛黄按 2015 年版《中国药典》的配方制成牛黄解毒片,对小鼠灌胃给药 4 周,比较观察不同来源牛黄与雄黄配伍在药理剂量下的毒性反应,探讨牛黄解毒片引起临床慢性砷中毒的机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 ICR 小鼠,清洁级,体重 26 ~ 30 g,由上海必凯实验动物有限公司提供,许可证号 SYXK(沪)2009-0069。动物购入后,饲养在本中心清洁级动物实验室 IVC 笼架内,温度控制在 20 ~ 25 ℃,湿度控制在 40% ~ 70%。动物自由摄食、饮水。动物实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会审查批准,审查号 201505009。

1.2 药物 根据 2015 年版《中国药典》中牛黄解毒片的配方(人工牛黄 5 g,雄黄 50 g,石膏 200 g,大黄 200 g,黄芩 150 g,桔梗 100 g,冰片 25 g,甘草 50 g),用不同来源的牛黄制成牛黄解毒片小片,每片 0.25 g。分别为 A 含天然牛黄的牛黄解毒片,B

含人工牛黄的牛黄解毒片, C 含体外培育的牛黄解毒片, D 不含牛黄的牛黄解毒片, E 不含雄黄的牛黄解毒片。另设 F 单味雄黄。

供试品不同来源牛黄制成的牛黄解毒片中的雄黄及单味雄黄批号均为 H2007052401, 由上海市食品药品监督管理局提供, 并由该检验所鉴定为正品, 由湖南石门雄黄矿业有限公司生产。

1.3 试剂 羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 F20120508), 天门冬氨酸氨基转移酶(ALT, 日本世诺临床诊断制品株式会社, 批号 R1: F661, R2: H657), 丙氨酸氨基转移酶(AST)试剂(日本世诺临床诊断制品株式会社, 批号 R1: I663, R2: J658), 总胆红素(TBIL)试剂(日本和光纯药工业株式会社, 批号 R1: KG970, R2: KG972), 碱性磷酸酶(ALP)试剂(日本世诺临床诊断制品株式会社, 批号 R1: D656, R2: L555), 尿素氮(BUN)试剂(日本世诺临床诊断制品株式会社, 批号 R1: I553, R2: E658), 肌酐(CREA)试剂(日本世诺临床诊断制品株式会社, 批号 R1: A659, R2: I555)。

1.4 仪器 7080 型全自动生化仪(日本日立株式会社), BX51/BX52 型光学显微镜(日本奥林巴斯株式会社), Tecnai G2 Spirit BioTM IN 型透射电子显微镜(荷兰 FEI 公司)。

2 方法

2.1 分组和给药 小鼠购进后在饲养室饲养 5 ~ 7 d, 观察无异常后再按体重分层随机进行分组。不同来源牛黄配伍的牛黄解毒片按上述顺序依次分为 A ~ E 组, 单味雄黄组为 F 组。每种供试品组又分成牛黄解毒片低剂量组、中剂量组和高剂量组 3 组, 每组各 10 只, 高剂量组按《药理学实验方法》, 设为人等效剂量的 11 倍, 另设空白组。

各组牛黄解毒片分别用研钵研成细粉末, 用 0.5% CMC-Na 稀释悬浮成低、中、高剂量(0.5, 1.0, 2.0 g·kg⁻¹) 组; 单味雄黄低、中、高剂量(0.06, 0.12, 0.24 g·kg⁻¹) 组。采用灌胃给药方法按 10 mL·kg⁻¹ 给药, 每天 1 次, 共 28 d。给药期间每周按体重变化调整给药量。

2.2 一般状态观察 给药期每天观察外观体征、行为活动、粪便性状, 给药局部反应等。分别于第 0, 7, 14, 21, 28 天称体重。实验结束后动物麻醉处死。

2.3 肝肾功能指标测定 取全血离心分离血清, 用日立 7080 型全自动生化仪检测血清肝肾功能指标, 包括 ALT, AST, TBIL, ALP, BUN, CREA 水平。

2.4 取材和病理学检查 取部分心、肝、脾、肺、肾组织用 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片, 苏木素-伊红(HE)染色, 光镜下观察组织病理改变。

2.5 PAS 染色观察糖变化 石蜡切片用过碘酸和 Schiff 氏液处理后, 再用苏木素染色, 光镜下观察糖原聚集情况。细胞浆呈红色为阳性, 细胞浆呈无色为阴性。

2.6 电镜检测超微结构 取部分心、肝、脾、肺、肾组织用 2.5% 戊二醛液固定, 醋酸铀染色, 超薄切片, 扫描电镜下观察细胞超微结构变化。

2.7 统计学处理 实验数据采用 SPSS 18.0 进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布和方差齐性, 进行单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠毒性的观察 从给药到实验结束, 各给药组小鼠与空白组比较, 总体一般情况良好, 未发现给药组小鼠有精神萎靡、活动减少、腹泻等症状。实验结束小鼠解剖时内脏器官无明显的大体病理改变, 体表皮无皮疹、角质增生及色素沉着等病变。

3.2 对小鼠体重增长的影响 本研究分 3 批进行, 第 1 批 A, B 组和空白组, 第 2 批 C, D, E 组和空白组, 第 3 批 F 组和空白组。

给药后 A ~ F 组的体重增长逐渐落后于空白组, 且有随着给药剂量的增长, 体重增长有减慢趋势。其中与空白组比较, A(天然牛黄)组低剂量给药第 2 周, 高剂量给药第 3 周, B(人工牛黄)组高剂量给药后第 1, 2, 4 周, C(体外培育牛黄)组中、高剂量给药后第 3 周, E(无雄黄)组低、中、高剂量给药后第 3, 4 周的体重明显下降(P < 0.05, P < 0.01)。见表 1。

3.3 对小鼠肝肾功能检测指标的影响 对给药 4 周后的空白组及各高剂量组小鼠进行血清生化肝、肾功能检查。肝功能, 与空白组比较, A 组 ALT 下降(P < 0.01); C, D 组 AST 升高(P < 0.01), F 组 AST 下降(P < 0.05); A 组 TBIL 下降(P < 0.01); C, D 组 ALP 升高(P < 0.01), F 组 ALP 降低(P < 0.01)。肾功能, 与空白组比较, B 组 BUN 增高, E 组 BUN 下降(P < 0.05, P < 0.01), A, B 组 CREA 增高, F 组 CREA 降低(P < 0.05)。见表 2。

3.4 对小鼠组织病理学的影响 对空白组和 A ~ F 高剂量组的一半小鼠(各 5 只)心、肝、脾、肺、肾进行了 HE 染色。结果显示, 与空白组相比, A ~ E 组心、肝、脾、肺、肾和 F 组的心、脾、肺、肾, 均未见

表 1 牛黄解毒片对小鼠体重增长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Niu Huang Jiedu tablets on mouse body weights ($\bar{x} \pm s, n = 10$) g

组别	剂量/g·kg ⁻¹	给药前	给药后 1 周	给药后 2 周	给药后 3 周	给药后 4 周
空白 1	-	29.6 ± 0.52	30.4 ± 1.51	30.9 ± 1.48	31.8 ± 1.27	31.5 ± 1.88
A	0.5	29.7 ± 0.56	29.0 ± 1.43	29.1 ± 2.23 ¹⁾	31.2 ± 1.25	30.8 ± 1.46
	1.0	29.9 ± 0.49	29.2 ± 1.02	30.2 ± 0.68	30.5 ± 1.68	30.4 ± 2.23
	2.0	29.7 ± 0.67	29.2 ± 2.21	29.6 ± 2.24	30.2 ± 1.93 ¹⁾	30.9 ± 2.69
B	0.5	29.7 ± 0.63	29.9 ± 0.94	30.7 ± 1.74	30.9 ± 1.25	30.4 ± 1.02
	1.0	29.4 ± 0.70	29.7 ± 1.61	30.6 ± 1.46	30.4 ± 1.66	30.3 ± 0.84
	2.0	29.9 ± 0.90	28.5 ± 2.29 ¹⁾	28.6 ± 1.96 ²⁾	30.3 ± 2.45	29.4 ± 1.71 ¹⁾
空白 2	-	28.4 ± 1.47	30.8 ± 0.94	31.8 ± 1.02	33.2 ± 0.99	33.4 ± 1.29
C	0.5	28.0 ± 0.88	30.2 ± 1.09	30.7 ± 1.54	31.6 ± 1.33	31.5 ± 1.08
	1.0	28.0 ± 1.25	29.8 ± 2.14	30.2 ± 2.16	30.9 ± 2.21 ³⁾	31.2 ± 1.68
	2.0	28.4 ± 1.30	29.1 ± 2.55	31.1 ± 2.25	31.2 ± 1.89 ³⁾	31.0 ± 2.67
D	0.5	28.3 ± 0.92	30.8 ± 1.37	31.3 ± 1.23	31.2 ± 1.30	31.9 ± 1.16
	1.0	28.3 ± 1.01	30.6 ± 1.31	31.4 ± 1.88	31.6 ± 1.65	31.4 ± 2.21
	2.0	27.7 ± 1.49	30.3 ± 1.43	31.1 ± 1.34	30.6 ± 2.05	31.7 ± 2.48
E	0.5	28.9 ± 0.64	29.8 ± 1.41	29.8 ± 1.42	30.6 ± 1.47 ⁴⁾	30.2 ± 1.69 ⁴⁾
	1.0	28.1 ± 1.17	29.6 ± 1.74	29.3 ± 1.53 ³⁾	29.7 ± 1.21 ⁴⁾	29.7 ± 1.34 ⁴⁾
	2.0	28.6 ± 1.27	29.7 ± 1.81	30.4 ± 1.45	30.4 ± 1.20 ⁴⁾	29.0 ± 2.17 ⁴⁾
空白 3	-	27.6 ± 1.88	30.6 ± 1.13	31.1 ± 2.15	31.3 ± 1.74	32.6 ± 1.79
F	0.06	27.9 ± 1.51	30.2 ± 1.48	31.0 ± 2.63	31.5 ± 2.32	31.0 ± 2.24
	0.12	27.0 ± 1.41	29.9 ± 2.33	31.2 ± 2.48	31.1 ± 3.07	30.5 ± 2.68
	0.24	26.4 ± 1.99	29.8 ± 1.09	29.7 ± 1.09	30.2 ± 2.41	30.0 ± 1.87

注:与空白组 1 比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与空白组 2 比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 牛黄解毒片对小鼠肝、肾功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Niu Huang Jiedu tablets on mouse liver and kidney function parameters ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TBIL/μmol·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	CREA/μmol·L ⁻¹
空白	15	-	38.4 ± 13.08	106.7 ± 31.30	2.14 ± 0.46	140.9 ± 78.75	10.50 ± 2.79	8.80 ± 1.66
A	5	2.0	20.8 ± 2.28 ²⁾	82.0 ± 12.23	1.35 ± 0.69 ²⁾	107.4 ± 17.04	8.46 ± 1.45	11.20 ± 2.59 ¹⁾
B	5	2.0	33.2 ± 5.81	114.4 ± 22.35	2.06 ± 0.66	131.2 ± 14.10	14.56 ± 2.82 ¹⁾	11.80 ± 2.28 ¹⁾
C	6	2.0	39.0 ± 5.79	143.2 ± 21.03 ²⁾	2.30 ± 0.20	243.4 ± 29.64 ²⁾	10.06 ± 1.28	8.80 ± 0.84
D	6	2.0	40.4 ± 11.33	140.8 ± 28.80 ²⁾	2.00 ± 0.33	230.8 ± 50.77 ²⁾	12.08 ± 0.82	9.64 ± 0.82
E	6	2.0	43.8 ± 24.11	93.4 ± 31.29	2.64 ± 0.61	155.4 ± 18.85	6.76 ± 1.39 ²⁾	7.80 ± 1.30
F	6	0.24	33.4 ± 5.13	78.8 ± 6.69 ¹⁾	2.21 ± 0.84	40.6 ± 10.85 ²⁾	8.30 ± 2.12	6.60 ± 0.55 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

明显的病理性改变。F 组 5 只小鼠肝脏均出现轻微的小叶中心性肝细胞肥大和程度不等的糖原聚集。见图 1。

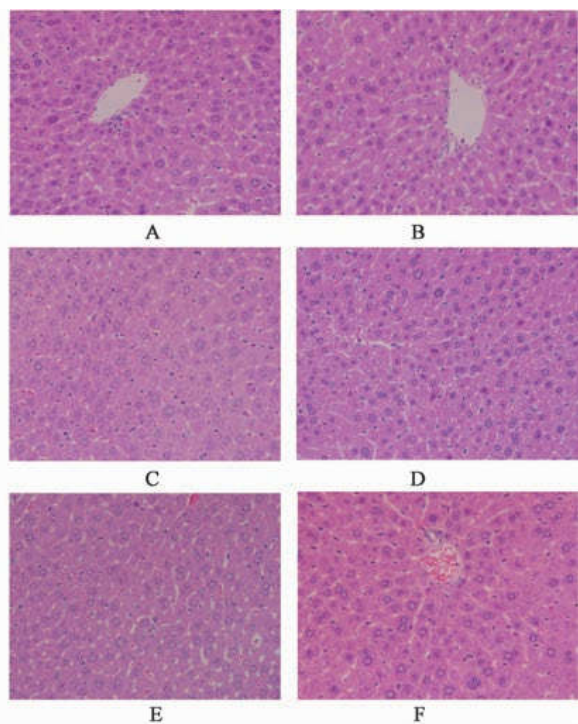
3.5 对空白组和各高剂量组小鼠组织糖原聚集的影响 进一步用 PAS 特殊染色,空白组及 A ~ E 组小鼠肝脏均未上色,而 F 组 5 只小鼠肝脏多数细胞浆程度不均染成红色,证实肝细胞浆内有糖原聚集。见图 2。

3.6 对空白组及各高剂量组小鼠脏器超微结构的影响 对空白组和 A ~ F 各高剂量组小鼠(各 5 只)

的心、肝、脾、肺、肾等组织进行了电镜超微结构观察。结果显示,与空白组比较,A ~ E 组心、肝、脾、肺、肾和 F 组心、脾、肺、肾组织的细胞超微结构均未见明显的病理性改变。F 组 5 只小鼠肝组织内均可见局灶性胞浆溶解,内有数量不等散落的糖原颗粒。见图 3。

4 讨论

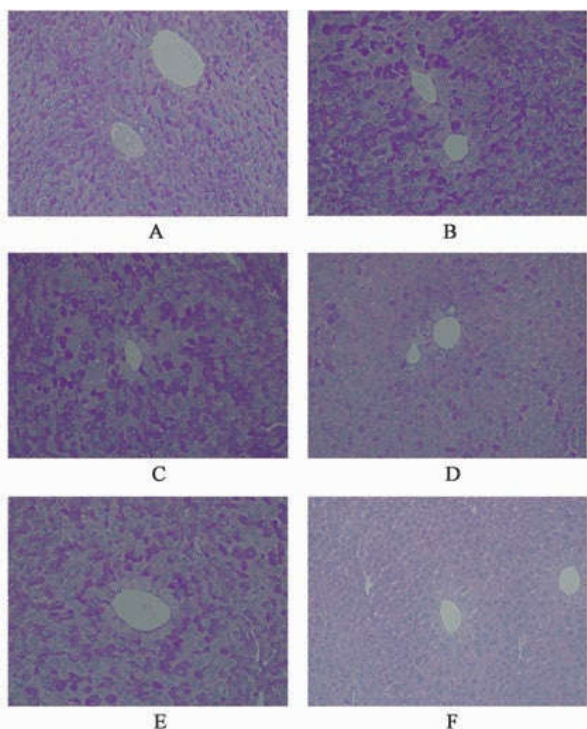
我国自 1960 年起,对牛黄解毒片的安全性问题时有报道^[3-11]。国外对其安全性的报道起源于 2003 年新西兰卫生部网站公布的因牛黄解毒片中含有砷



A. 天然牛黄组; B. 人工牛黄组; C. 体外培育牛黄组; D. 无牛黄组; E. 无雄黄组; F. 单味雄黄组

图 1 牛黄解毒片对小鼠肝脏病理学的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Niuhuang Jiedu tablets on liver pathology in mice (HE, $\times 200$)



A~E. 单味雄黄组 1~5 号肝脏; F. 空白组; 其他组别无变化(图 3 同)

图 2 单味雄黄对小鼠肝脏糖原的影响 (PAS, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of single realgar on mouse liver glycogen staining (PAS, $\times 200$)

而被召回的消息,英国药品和保健产品管理局同时警示公众勿服此药,以免引起严重不良反应^[3]。

由于牛黄解毒片中雄黄与本品的药源性慢性砷

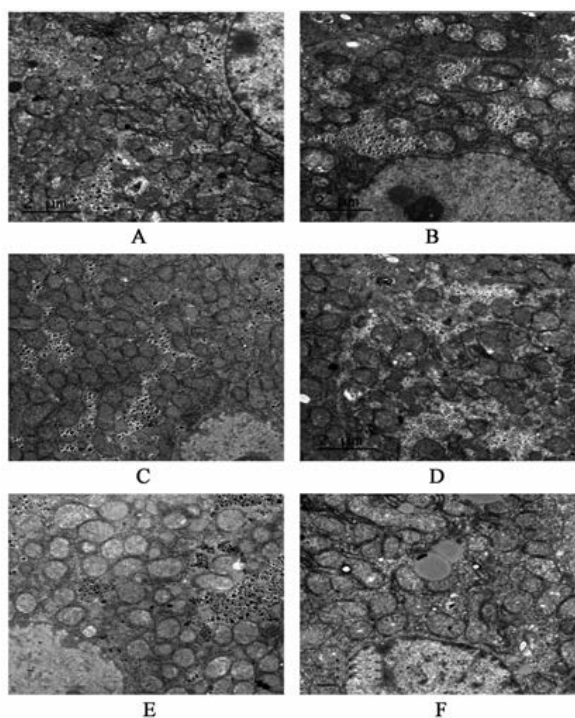


图 3 单味雄黄对小鼠肝细胞超微结构的影响(透射电镜, $\times 6\ 000$)

Fig. 3 Effect of single realgar on ultrastructure of hepatocytes in mice (transmission electron microscope, $\times 6\ 000$)

中毒有关,而慢性砷中毒的病例近年来屡有报道,这可使人联想到是否是因为用人工牛黄替代了天然牛黄才导致慢性砷中毒病例的增加。为了探讨这个问题,本研究通过用不同来源牛黄(A 天然牛黄, B 人工牛黄, C 体外培育牛黄)配伍的牛黄解毒片分别对小鼠灌胃给药 28 d,观察比较给药后的一般毒性反应、血清生化肝肾功指标及组织病理学和超微结构改变,分析不同来源牛黄与雄黄配伍的毒性差异。除采用不同牛黄与雄黄配伍外,为更好进行对比,本实验设计中增加了 D 无牛黄, E 无雄黄配伍的牛黄解毒片组和 F 单纯雄黄组。除 E 组外,其余各组雄黄含量均与 2015 年版《中国药典》规定的牛黄解毒片中的含量一致,也与 F 组的雄黄含量一致。

本实验不采用毒理学剂量设计方法,在剂量设计上主要考虑在药效高剂量下可反映慢性毒性,因此各组高剂量中雄黄的含量设计为人等效剂量的 11 倍。结果显示从给药到实验结束,各给药组小鼠与空白组比较,总体一般情况良好,未发现给药组小鼠有精神萎靡、活动减少、腹泻等毒性反应症状,以及人慢性砷中毒常见的皮肤症状,如皮肤角化、色素沉着、黑皮病等^[6-11]。各组给药前后体重增长情况显示给药各组在给药期间体重增长低于空白组,且有随着给药剂量的增长,体重增长减慢的趋势。但这并不能证明是雄黄的毒性反应所致,因为 E 组给药后的体重增长也低于空白组,且也有随着给药剂

量的增长,体重增长减慢的趋势。供试品中各中药成分亦有可能对小鼠食欲有影响,抑制小鼠的摄食,导致给药组小鼠体重增长缓慢。

给药结束后对各给药组的高剂量组小鼠进行血清生化肝肾功能检查,与空白组比较,A~E组有的肝肾功能指标增高,F组的多项指标却下降,似有矛盾之处,也与下述组织病理学的改变相矛盾。此现象在以往对雄黄的研究中亦有发现。因此单凭肝肾功能指标很难确定雄黄的毒性作用。

对空白组和 A~F 组小鼠心、肝、脾、肺、肾等器官进行了病理学检查和细胞超微结构观察,结果发现 F 组 5 只小鼠肝脏出现轻微的小叶中心性肝细胞肥大,个别有糖原聚集的形态学表现;进一步用 PAS 特殊染色,F 组小鼠 5 个肝脏的多数细胞浆均染成红色,证实肝细胞浆内有糖原聚集。F 组 5 只小鼠肝组织内可见局灶性胞浆溶解,可见散落的糖原颗粒。组织病理学检查和电镜超微结构观察结果一致有力地证明了雄黄可致小鼠的肝脏毒性。

A~D 组的牛黄解毒片均含有雄黄,但没有组织病理学和电镜超微结构改变这一问题,先前研究证明雄黄的毒性成分与可溶性砷和价态砷有关^[15],本研究分析雄黄与牛黄解毒片中其他中药成分配伍,可溶性砷和价态砷可能以某种形式结合到植物性成分大黄、黄芩、桔梗、甘草,和矿物性成分石膏中,降低了可溶性砷和价态砷对细胞的直接毒性作用。这一分析也得到相关研究的支持^[16]。

上述实验结果表明用天然牛黄、人工牛黄或体外培育牛黄配伍制成的牛黄解毒片对小鼠进行 28 d 灌胃给药,结果均没有显示具有毒性,而同样剂量的单味雄黄却引起肝细胞损伤。这提示了如果再延长牛黄解毒片的给药期或者加大给药剂量可能也会再现毒性反应。对文献报道的服用牛黄解毒片致慢性砷中毒病例^[6-11]分析,这 6 个病例均有服用时间长(4 年以上,最长达 9 年)、服用剂量大(最多病例达 12~36 片/日)的特点。因此,临床医生对牛黄解毒片的用药毒性意识差或医嘱不够,导致患者盲目随意增加药量、延长用药时间等是造成牛黄解毒片所致药源性慢性砷中毒的主要原因^[17-18]。

砷是原浆毒,对体内酶蛋白的巯基具有特殊的亲和力,使酶失去活性,影响细胞正常代谢^[19]。值得注意的是,慢性砷中毒早期对肝细胞损伤时,常用的肝功能指标 ALT,AST 等并不显示酶活性的升高。因此,临床医生诊断牛黄解毒片所致慢性砷中毒时有可能凭肝功能检测指标正常而忽视了肝脏的实际

损伤。至于雄黄引起肝脏内糖原的聚集是否是由于砷抑制糖原代谢酶的活性有待于进一步证实。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:660-664.
- [2] 孙一元. 牛黄解毒片外用新招[J]. 农家科技,2011(9):51.
- [3] 张力,高思华,周超凡,等. 从牛黄解毒片(丸)看含砷中成药的安全性问题[J]. 中国中药杂志,2006,31(23):2010-2013.
- [4] 郭娟. 中成药牛黄解毒丸(片)的不良反应及其防范措施[J]. 中国医药指南,2013,11(32):192-193.
- [5] 马斌,李彤,姜泓. 我国雄黄及其复方的毒副作用研究进展[J]. 中华中医药学刊,2013,31(8):1623-1625.
- [6] 郭集军,潘金城. 长期大量服用牛黄解毒片致慢性砷中毒及黑皮病 1 例报告[J]. 中国职业医学,2003,30(2):7.
- [7] 姜良铎,刘涓. 过量服用牛黄解毒片引起慢性砷中毒 1 例[J]. 药物警戒,2004,1(2):49.
- [8] 王燕兰. 1 例长期服用牛黄解毒片致慢性砷中毒报告[J]. 中国职业医学,2007,34(3):258.
- [9] 赵越,吕小岩,王琳,等. 牛黄解毒片只慢性砷中毒 1 例[J]. 临床皮肤科杂志,2007,36(1):61.
- [10] 焦扬,陈涛. 排毒疗法治愈长期超量服用牛黄解毒片致慢性砷中毒 1 例报告[J]. 中医杂志,2007,48(8):724-725.
- [11] 朱启上,彭莉君. 药源性慢性砷中毒 1 例报告[J]. 中国工业医学杂志,2007,20(5):307-308.
- [12] 汤毅珊,王宁生. 安宫牛黄丸中配伍药物对雄黄可溶性砷含量的影响[J]. 现代食品与药物杂志,2006,16(3):4-7.
- [13] 曹帅,夏晶,杨新华,等. 3 种牛黄级安宫牛黄丸中总胆红素含量测定方法的优化[J]. 药物分析杂志,2014,34(2):329-334.
- [14] 夏晶,曹帅,吴赵云,等. 药用雄黄的基源考证及实地调研[J]. 中华中医药杂志,2012,27(6):1543-1546.
- [15] 顾晶晶,黄珍祯,谷颖敏,等. 雄黄可溶性砷和价态砷与小鼠急性毒性关系的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):266-269.
- [16] 徐智,俞姗姗,黄可龙. 牛黄解毒片中不同单味组分对雄黄可溶性砷含量影响的比较研究[J]. 中国生化药物杂志,2009,30(2):121-123.
- [17] 赵胜利,钟露苗. 牛黄解毒片的不良反应及其安全性综述[J]. 药物警戒,2006,3(4):193-194.
- [18] 王晓钰,郑剑红,江荣高. 牛黄解毒片质量及安全隐患的摸查分析[J]. 传统医药,2010,19(24):81-82.
- [19] 王弘,郭代红,陈宜鸿,等. 牛黄解毒片的不良反应与砷相关性分析[J]. 中国新药杂志,2005,14(9):1212-1213.

[责任编辑 张丰丰]