

痔血胶囊肝毒性药物因素分析

范琼尹, 赵保胜, 张晶璇, 李品, 贾旭, 王停*
(北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 100029)

[摘要] **目的:**通过均匀设计法安排大鼠长期毒性拆方实验,比较痔血胶囊5种拆方对大鼠肝毒性的影响,寻找引起痔血胶囊肝毒性的药物因素。**方法:**Wistar大鼠,雌雄各半,随机分为正常组、痔血胶囊1~5号拆方组,灌胃给予相应的药物,连续给药30 d。末次给药后,取材测试大鼠血清的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),总胆红素(TBIL), γ -谷氨酰转移酶(GGT)等指标情况,并同时观察各组大鼠肝脏色泽、质地、肿块等形态情况,摘取肝脏和脑,计算肝脏绝对质量、脏器系数;取肝脏最大叶同一部位肝组织,做苏木素-伊红(HE)染色后进行病理组织学检查。**结果:**与正常组比较,痔血胶囊各拆方组一般状况良好,血清生化学检测拆方5号组GGT显著升高($P < 0.01$),拆方3,4,5号组肝脏绝对质量、脏器系数明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),肝脏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;根据肝脏脂变评分回归分析,白鲜皮可能为痔血胶囊肝毒性的主要药物因素。**结论:**建立一种新的中药安全性评价模式,发现潜在毒性中药,为今后完善中药安全性基础数据提供支撑,同时指导临床安全用药及中药新药研发。

[关键词] 痔血胶囊;肝毒性;均匀设计;白鲜皮;药物因素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)01-0150-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018010150

Analysis on Drug Factors for Hepatotoxicity of Zhixue Capsule

FAN Qiong-yin, ZHAO Bao-sheng, ZHANG Jing-xuan, LI Pin, JIA Xu, WANG Ting*

(Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the drug factors for hepatotoxicity of Zhixue capsule, the uniform design method was used by comparing five different Chinese medicine prescriptions in rats. **Method:** Wistar rats were randomly divided into blank control group and five Zhixue capsule groups. The rats were administrated with different drugs by gavage for 30 days. After the last drug administration, blood was collected from abdominal aorta, and serum was taken by centrifugation. Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (TBIL) and γ -glutamyltransferase (GGT) in serum were detected to indicate the liver injury. The livers were taken for weighing and calculating absolute liver weight and organ coefficient. The largest liver lobe was stained with hematoxylin-eosin (HE), and then pathological examination was performed under the microscope. **Result:** Compared with normal control group, general conditions of rats of Zhixue capsule groups were good, GGT of Zhixue capsule No. 5 was significantly increased ($P < 0.01$), absolute liver weight and organ coefficient of Zhixue capsule groups No. 3, No. 4 and No. 5 were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and Zhixue capsule ethanol extracts showed a clear hepatotoxicity, and histopathological observation showed small bubble type fatty degeneration surrounding hepatic lobule. According to the regression analysis of the indicators, cortex dictam may be the main drug factors for hepatotoxicity of Zhixue capsule. **Conclusion:** It is possible to improve the basic data for the safety of traditional Chinese medicine, guide the

[收稿日期] 20170904(018)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81773994,81274181,81374056)

[第一作者] 范琼尹,博士,在站博士后,从事中药毒性研究,Tel:18801113290,E-mail:bingofqy@163.com

[通信作者] *王停,博士,教授,从事中药毒性研究,Tel:010-64286407,E-mail:wangting1973@sina.com

clinical safety medication, and improve the research and development of traditional Chinese medicine.

[Key words] Zhixue capsule; hepatotoxicity; uniform design; cortex dictam; drug factor

药物性肝损伤(DILI)是指在正常治疗或临床试验剂量范围内的药物使用过程中,因药物本身或其代谢产物引起的程度不同的直接或间接的肝脏损害,临床主要分为肝细胞损伤型、胆汁淤积型和混合型 3 种,DILI 常常是药物研发失败、上市后被撤市或限制使用的主要原因之一。与西药相比,中药一直被认为安全性好,不良反应少^[1]。但近年来,中药在应用于各种疾病并取得确切疗效的同时,其不良反应的报道逐渐增多,特别是一些传统上认为是无毒药材却引起严重不良事件(SAE)和急性死亡病例的报道^[2-3],使得中药的安全性问题备受关注。相关报告指出,40.3%的药物性肝损伤为中草药所致,其次是抗生素、心血管疾病用药和内分泌疾病用药,在我国中药已成为药物性肝损伤的首要原因^[4],因此对于中药肝损伤的研究已是当务之急。

痔血胶囊是国家药监局于 2003 年批准生产的中药新药,其功能主治为清热解毒、凉血止血,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。痔血胶囊由白鲜皮和苦参组成,工艺为全方 85% 乙醇回流提取。痔血胶囊处方来源于名老中医经验方,在长期的临床实践中以汤剂使用,已经证实其疗效确切、安全可靠。但近年来国家药品不良反应监测中心陆续收到关于痔血胶囊的药品不良反应报告,特别是 2008 年报告数量迅速增加。国家药品不良反应中心第 17 期《药品不良反应信息通报》报告了痔血胶囊引起肝损害的不良反应情况,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,另有腹痛 8 例,皮疹 4 例,过敏样反应 1 例,头晕、头痛 1 例^[5]。经对报告病例系统分析后,不能排除痔血胶囊与肝损害事件的关联性。中药引起肝损害的原因复杂,主要包括中药材基原、炮制、产地、工艺以及个体体质差异、不合理用药等^[6-7]。本课题组前期研究发现,痔血胶囊全方醇提组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,其肝毒性与提取溶剂中乙醇含量呈正相关,同时发现痔血胶囊水提组也有轻度肝损害。因此认为痔血胶囊的 2 味药中存在肝毒性成分,且醇提工艺

可能导致这种成分富集,加重了其肝毒性^[8]。倪晓珺等^[9]研究了痔血胶囊组方不同拆方组对体外原代大鼠肝细胞毒性的影响,结果认为苦参可能是痔血胶囊引起肝损害的药物因素。但本课题组前期分析痔血胶囊处方量后发现,2015 年版《中国药典》记载白鲜皮和苦参用量均为 4.5 ~ 9 g,本品处方中苦参日服生药量为 5 g,未超过《中国药典》规定用量,但白鲜皮日服生药量达到 15 g,远超过规定的上限,因此怀疑痔血胶囊的肝毒性可能为白鲜皮引起。但至今为止,痔血胶囊产生肝毒性的药物因素尚未研究明确。因此,在上述工作基础上,本实验将采用数学方法均匀设计法寻找痔血胶囊产生肝毒性的药物因素,发现潜在的毒性中药,这对将来指导临床安全用药及新药研发具有重要的理论意义和应用价值。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wistar 大鼠 120 只,雌雄各半,160 ~ 180 g,购于斯贝福(北京)试验动物科技有限责任公司,合格证号 SCKX(京)2016-0002,动物饲养于屏障环境动物室,室温 20 ~ 25 ℃,湿度 40% ~ 70%,光照周期明暗各 12 h,通风良好,实验期间自由饮水、摄食。经北京中医药大学实验动物伦理分委员会审查通过,编号 BUCM-4-2017033001-1002。

1.2 药物 白鲜皮、苦参均购于北京燕北饮片厂,批号分别为 161016,160916。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。

1.3 试剂 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),总胆红素(TBIL),直接胆红素(DBIL),碱性磷酸酶(ALP),总蛋白(TP),白蛋白(ALB), γ -谷氨酰转移酶(GGT)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 AUZ4271, AUZ3645, AUZ3798, AUZ4392, AUZ3684, AUZ3710, AUZ3752, AUZ3698。

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),OLMYPUS BX53 型光学显微镜(日本 Olympus

公司)。

2 方法

2.1 运用均匀设计安排动物长期毒性拆方实验分组

2.1.1 确定方中各药成人日服生药量 根据痔血胶囊原处方及用法用量^[10],各味药材人日服生药量白鲜皮用量为 15 g,苦参为 5 g,具体换算方式由企业提供。

2.1.2 编制因素-水平及组别设计 以药物作为因素、用量作为水平,结合专业知识确定考察各药的用量间隔作为“步长(Step)”,并依此划分各药的用量水平,编制因素-水平,利用均匀设计法安排实验方案 $U_5(5^3)$,分为正常组,拆方 1 号组(单用苦参 3 g),拆方 2 号组(白鲜皮 5 g,苦参 10 g),拆方 3 号组(单用白鲜皮 10 g),拆方 4 号组(白鲜皮 15 g,苦参 5 g),拆方 5 号组(白鲜皮 20 g,苦参 15 g)。

2.2 实验药品制备 痔血胶囊拆方 5 组。各拆方组,加 8 倍量的 85% 乙醇,浸泡 1 h,回流提取 2 次,

每次 1 h,合并提取液,静置、滤过,回收乙醇,浓缩成稠膏,减压干燥成干膏,粉碎成细粉,置于 4 ℃ 中,备用,出膏率分别为 18.63%, 18.24%, 8.94%, 10.34%, 10.84%。临用前,用蒸馏水分别配成所需质量浓度,分别为 0.062 5, 0.312 5, 0.208 8, 0.416 3, 0.728 8 g·mL⁻¹。

2.3 大鼠长期毒性观察 Wistar 大鼠随机分为正常组、痔血胶囊 1~5 号拆方组。正常组及各给药组按 10 mL·kg⁻¹灌胃蒸馏水和相应痔血胶囊拆方,分别为 0.625, 3.125, 2.088, 4.163, 7.288 g·kg⁻¹, 1 次/d,连续给药 1 个月。每天给药后对动物外观体征、行为活动等一般情况进行观察,并于给药期间每周固定时间测定实验动物体重 2 次,同时记录动物摄食情况。大鼠给药结束后,重点观测其血清的 AST,ALT,ALP,TP,ALB,TBIL,GGT 等指标情况,并同时观察各组动物肝脏色泽、质地、肿块等形态情况,检测计算肝脏系数,肝脏进行病理组织学检查。肝脏病变相关评分标准^[8]见表 1。

表 1 大鼠肝脏病变描述及评分标准

Table 1 Description and scoring criteria of liver lesions in rats

病变类型	评分	评分标准
肝细胞脂肪变性(肝细胞内大小不等圆形空泡,空泡越大越透明空亮)	0	肝组织内未见明显肝细胞脂肪变性
	1	少数肝细胞脂肪变性,病变累及肝小叶范围 <25%
	2	一些肝细胞脂肪变性,病变累及肝小叶范围 ≥25%, <50%
	3	较多肝细胞脂肪变性,病变累及肝小叶范围 ≥50%, <75%
	4	多数肝细胞脂肪变性,病变累及肝小叶范围 ≥75%
小灶状炎细胞浸润(肝脏组织内小灶状炎细胞浸润或肝细胞点状坏死)	0	每个组织切片上少于 3 个病灶,且均为微小病灶
	1	每个组织切片上多于 3 个病灶,少于 10 个病灶,病灶较小
	2	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
	3	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
	4	每个组织切片上弥漫性小灶性炎细胞浸润灶或肝细胞坏死灶

2.4 痔血胶囊长期毒性实验结果回归分析 以药物与用量的不同组合作为“解释变量”,以反映肝毒性的不同效应指标作为“应变变量”,利用 SAS 软件进行多元回归分析,求解回归方程。以组织病理学结果为金指标进行运算,其他指标结果作为参考。根据回归分析,得到理论上毒理学指标肝毒性最大时的可能药物组合,用数学模型阐明痔血胶囊产生肝脏毒性的可能药物因素,并同时结合中医药理论和临床用药实际,确定产生毒性的药物因素。

2.5 统计学方法 以 SPSS 22.0 统计软件处理,用

One-Way ANOVA 方法,多组间采用单因素方差分析,方差齐时采用 LSD 方法分析,方差不齐时采用 Dunnett's T3 方法进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。等级资料采用多组秩和检验 Kruskal-Wallis H test, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

3 结果

3.1 对大鼠一般状况的影响 给药前后,与正常组比较,各组动物体重无明显差异。给药期间,拆方 2 号组 1 只雌鼠、拆方 4 号组 1 只雌鼠、拆方 5 号组 2 只雌鼠有脱毛现象;拆方 2 号组 2 只雌鼠、拆方 4 号组 1 只雌鼠流涎;其余各大鼠未见死亡和濒死,一般

状况良好,自主活动、进食量、毛发、粪尿与正常组比较无明显差异。见表 2,3。

表 2 痔血胶囊 1~5 号拆方组对雄性大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Zhixue capsules groups No.1-No.5 on body weight in male rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	给药前	时间							
			4 d	7 d	11 d	14 d	18 d	21 d	24 d	28 d
正常	-	198.6 ± 5.72	230.5 ± 6.92	266.7 ± 8.38	294.3 ± 11.58	323.7 ± 12.92	345.1 ± 18.48	362.7 ± 18.10	379.7 ± 20.11	394.6 ± 23.08
拆方 1 号	0.625	199.1 ± 6.89	229.8 ± 8.05	268.5 ± 11.15	292.0 ± 11.44	329.4 ± 13.11	343.1 ± 15.31	362.4 ± 17.72	379.4 ± 19.39	395.3 ± 21.08
拆方 2 号	3.125	197.7 ± 10.12	223.2 ± 12.06	260.4 ± 10.99	286.2 ± 10.40	321.6 ± 8.62	340.0 ± 7.60	359.5 ± 6.84	378.8 ± 8.57	395.7 ± 9.41
拆方 3 号	2.088	198.2 ± 12.28	225.8 ± 14.7	265.8 ± 18.10	289.3 ± 17.78	327.3 ± 20.04	345.2 ± 21.91	368.4 ± 24.15	383.5 ± 28.08	402.9 ± 28.71
拆方 4 号	4.163	198.6 ± 9.98	224.7 ± 12.87	262.6 ± 13.57	286.7 ± 13.57	320.6 ± 13.95	341.0 ± 14.30	360.7 ± 16.77	379.7 ± 18.90	399.2 ± 21.04
拆方 5 号	7.288	198.6 ± 8.29	219.7 ± 9.06	253.3 ± 9.19	278.5 ± 10.96	308.2 ± 15.05	327.1 ± 16.85	348.2 ± 22.17	362.7 ± 23.57	378.4 ± 23.38

表 3 痔血胶囊 1~5 号拆方组对雌性大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Zhixue capsules groups No.1-No.5 on body weight in female rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	给药前	时间							
			4 d	7 d	11 d	14 d	18 d	21 d	24 d	28 d
正常	-	179.1 ± 9.27	195.5 ± 7.93	214.3 ± 9.93	226.4 ± 13.54	245.8 ± 15.38	251.5 ± 14.92	261.5 ± 14.66	266.4 ± 13.99	269.6 ± 14.98
拆方 1 号	0.625	180.8 ± 8.74	194.8 ± 7.53	209.9 ± 10.08	218.7 ± 12.67	233.7 ± 14.94	239.3 ± 13.39	252.3 ± 15.00	257.8 ± 18.65	263.9 ± 20.10
拆方 2 号	3.125	180.4 ± 8.41	190.9 ± 8.83	210.0 ± 8.77	221.4 ± 11.33	239.0 ± 15.08	240.1 ± 13.27	253.9 ± 17.61	259.9 ± 17.60	267.2 ± 18.44
拆方 3 号	2.088	181.0 ± 6.98	194.2 ± 5.96	212.0 ± 6.99	221.2 ± 7.35	235.6 ± 11.13	240.8 ± 9.10	250.4 ± 12.18	259.5 ± 12.17	264.8 ± 13.80
拆方 4 号	4.163	180.8 ± 8.70	193.1 ± 9.29	208.7 ± 9.88	220.9 ± 10.07	237.5 ± 10.77	239.9 ± 14.33	249.4 ± 13.09	257.2 ± 16.14	265.3 ± 15.54
拆方 5 号	7.288	180.4 ± 8.28	192.2 ± 10.90	211.7 ± 12.52	222.0 ± 13.27	240.4 ± 18.97	246.8 ± 20.20	260.0 ± 20.40	265.0 ± 20.99	272.1 ± 21.85

3.2 对大鼠肝脏绝对质量及脏器系数(包括脏脑比和脏体比)的影响 给药 30 d 后,与正常组比较,拆方 1 号的雌雄大鼠肝脏绝对质量及脏器系数无统计学差异;拆方 2 号雄性大鼠脏体比,拆方 3,4,5 号雄性大鼠肝脏绝对质量及脏器系数均明显增加

($P < 0.05, P < 0.01$),但升高幅度较小,无毒理学意义。与正常组比较,拆方 2~5 号雌性大鼠肝脏绝对质量及脏器系数均明显增加($P < 0.05, P < 0.01$),说明痔血胶囊产生的毒性有一定的性别差异,见表 4。

表 4 痔血胶囊 1~5 号拆方组对大鼠肝脏绝对质量及脏器系数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Zhixue capsules groups No.1-No.5 on absolute liver weight and organ coefficient in rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	肝脏绝对质量/g		脏脑比		脏体比	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
		正常	-	10.88 ± 0.95	7.41 ± 0.76	5.57 ± 0.45	3.94 ± 0.47
拆方 1 号	0.625	11.04 ± 1.21	7.49 ± 1.17	5.56 ± 0.53	3.99 ± 0.46	2.75 ± 0.19	2.77 ± 0.26
拆方 2 号	3.125	11.71 ± 0.80	8.84 ± 0.80 ²⁾	5.95 ± 0.40	4.68 ± 0.37 ²⁾	2.92 ± 0.18 ²⁾	3.27 ± 0.21 ²⁾
拆方 3 号	2.088	12.20 ± 0.89 ¹⁾	8.41 ± 0.62 ¹⁾	6.17 ± 0.41 ¹⁾	4.53 ± 0.40 ²⁾	2.98 ± 0.11 ²⁾	3.15 ± 0.22 ²⁾
拆方 4 号	4.163	12.17 ± 1.28 ¹⁾	8.75 ± 0.59 ²⁾	6.15 ± 0.52 ¹⁾	4.71 ± 0.33 ²⁾	3.01 ± 0.18 ²⁾	3.24 ± 0.12 ²⁾
拆方 5 号	7.288	12.29 ± 1.37 ²⁾	9.11 ± 1.08 ²⁾	6.25 ± 0.78 ²⁾	4.73 ± 0.54 ²⁾	3.21 ± 0.18 ²⁾	3.30 ± 0.24 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05, ^{2)}$ $P < 0.01$ (表 5,6 同)。

3.3 对大鼠血清肝功能生化指标的影响 给药 30 d 后,与正常组比较,各拆方组 A/G, ALT, AST, IBIL, TBIL 等指标未见异常改变。与正常组比较,

拆方 2~5 号雄性大鼠以及拆方 4 号雌性大鼠 ALB 升高,拆方 1~5 号雄性大鼠 TP 升高,拆方 1 号雄性大鼠 GLB 升高,拆方 2~5 号雌性大鼠 DBIL 降低

($P < 0.05, P < 0.01$), 但均无毒理学意义。与正常组比较, 拆方 1 号雄性大鼠 ALP 显著升高 ($0.05, P < 0.01$), 拆方 2 号雄性大鼠、拆方 5 号雌雄大鼠 GGT 明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5, 6。

表 5 痔血胶囊 1~5 号拆方组对雄性大鼠血清肝功能生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of Zhixue capsules groups No. 1-No. 5 on serum biochemical indicators in male rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

指标	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	A/G	ALB/ $g \cdot L^{-1}$	ALP/ $U \cdot L^{-1}$	ALT/ $U \cdot L^{-1}$	AST/ $U \cdot L^{-1}$	DBIL/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
正常	-	1.06 ± 0.07	29.32 ± 1.01	151.2 ± 13.35	39.96 ± 6.79	116.0 ± 17.55	0.57 ± 0.17
拆方 1 号	0.625	1.02 ± 0.07	30.19 ± 0.85	194.80 ± 18.18 ²⁾	46.05 ± 14.51	125.0 ± 17.60	0.57 ± 0.16
拆方 2 号	3.125	1.09 ± 0.06	31.81 ± 1.23 ²⁾	188.1 ± 33.32	37.45 ± 10.25	130.0 ± 28.63	0.58 ± 0.13
拆方 3 号	2.088	1.07 ± 0.06	31.44 ± 1.41 ²⁾	195.2 ± 48.48	39.92 ± 17.60	130.7 ± 27.75	0.65 ± 0.12
拆方 4 号	4.163	1.09 ± 0.03	31.83 ± 0.91 ²⁾	194.7 ± 37.08	34.82 ± 8.56	129.0 ± 17.06	0.65 ± 0.10
拆方 5 号	7.288	1.11 ± 0.08	31.58 ± 1.65 ²⁾	179.9 ± 36.59	34.67 ± 7.50	117.9 ± 25.44	0.54 ± 0.10

指标	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	GGT/ $U \cdot L^{-1}$	GLB/ $g \cdot L^{-1}$	IBIL/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	TBIL/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	TP/ $g \cdot L^{-1}$
正常	-	0.19 ± 0.12	27.90 ± 2.04	1.69 ± 0.28	2.26 ± 0.30	57.22 ± 2.50
拆方 1 号	0.625	0.32 ± 0.23	29.73 ± 2.03 ¹⁾	1.96 ± 0.27	2.53 ± 0.40	59.92 ± 2.29 ¹⁾
拆方 2 号	3.125	0.46 ± 0.37 ¹⁾	29.28 ± 1.87	1.83 ± 0.21	2.42 ± 0.25	61.08 ± 2.84 ²⁾
拆方 3 号	2.088	0.20 ± 0.17	29.44 ± 1.68	1.89 ± 0.19	2.54 ± 0.24	60.88 ± 2.66 ²⁾
拆方 4 号	4.163	0.41 ± 0.32	29.35 ± 1.25	1.83 ± 0.13	2.48 ± 0.14	61.18 ± 2.04 ²⁾
拆方 5 号	7.288	0.55 ± 0.34 ²⁾	28.56 ± 2.10	1.98 ± 0.11	2.52 ± 0.14	60.15 ± 3.10 ¹⁾

表 6 痔血胶囊 1~5 号拆方组对雌性大鼠血清肝功能生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of Zhixue capsules groups No. 1-No. 5 on serum biochemical indicators in female rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

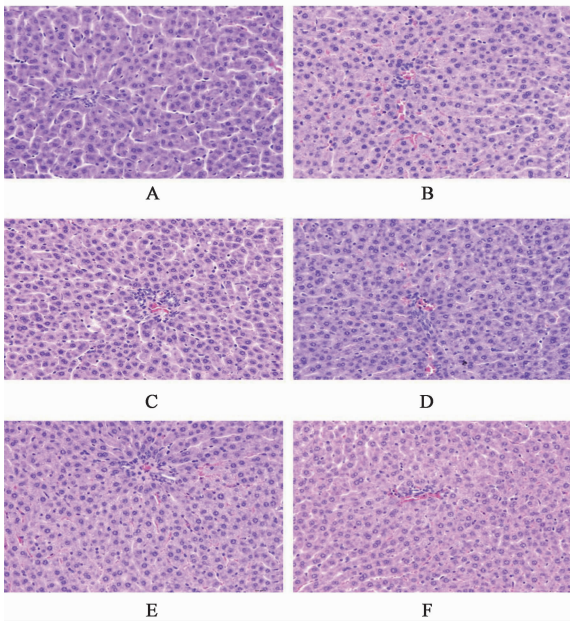
指标	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	A/G	ALB/ $g \cdot L^{-1}$	ALP/ $U \cdot L^{-1}$	ALT/ $U \cdot L^{-1}$	AST/ $U \cdot L^{-1}$	DBIL/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
正常	-	1.15 ± 0.08	33.29 ± 2.31	97.03 ± 31.28	32.73 ± 5.76	110.2 ± 25.35	0.95 ± 0.29
拆方 1 号	0.625	1.16 ± 0.06	33.88 ± 2.17	77.80 ± 11.60	32.02 ± 4.71	93.59 ± 10.75	0.81 ± 0.20
拆方 2 号	3.125	1.10 ± 0.05	33.66 ± 1.93	101.30 ± 26.48	32.99 ± 9.54	102.1 ± 17.22	0.60 ± 0.28 ²⁾
拆方 3 号	2.088	1.14 ± 0.08	34.85 ± 4.44	72.47 ± 17.48	28.20 ± 5.86	116.7 ± 17.17	0.68 ± 0.15 ²⁾
拆方 4 号	4.163	1.18 ± 0.06	35.62 ± 2.11 ¹⁾	84.15 ± 30.63	27.95 ± 4.36	105.1 ± 19.66	0.58 ± 0.07 ²⁾
拆方 5 号	7.288	1.15 ± 0.05	33.16 ± 1.37	108.7 ± 22.80	35.62 ± 6.73	102.9 ± 22.34	0.58 ± 0.18 ²⁾

指标	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	GGT/ $U \cdot L^{-1}$	GLB/ $g \cdot L^{-1}$	IBIL/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	TBIL/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	TP/ $g \cdot L^{-1}$
正常	-	0.42 ± 0.25	29.02 ± 1.88	2.67 ± 0.47	3.62 ± 0.73	62.31 ± 3.51
拆方 1 号	0.625	0.27 ± 0.18	29.29 ± 1.96	2.45 ± 0.39	3.26 ± 0.55	63.17 ± 3.81
拆方 2 号	3.125	0.39 ± 0.20	30.56 ± 1.96	2.44 ± 0.58	3.04 ± 0.83	64.22 ± 3.61
拆方 3 号	2.088	0.60 ± 0.21	30.53 ± 2.36	2.19 ± 0.51	2.87 ± 0.55	65.38 ± 6.66
拆方 4 号	4.163	0.54 ± 0.25	30.30 ± 1.41	2.29 ± 0.26	2.87 ± 0.30	65.92 ± 3.14
拆方 5 号	7.288	1.02 ± 0.35 ²⁾	28.98 ± 0.99	2.34 ± 0.13	2.92 ± 0.24	62.14 ± 1.95

3.4 对大鼠肝组织病理影响 给药 30 d 后, 肝脏组织切片 HE 染色病理观察显示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, 以肝细胞内微泡性为主, 光学显微镜低倍镜下仅见肝小叶周边带肝细胞染色浅淡, 高倍镜下可见肝细胞内细网状微泡或小泡, 切片图像采集显示不是很清楚, 用油红 O 进行脂肪特殊染色后证实肝细胞

内确实为脂肪微滴, 见图 1, 2。与正常组比较, 拆方 3~5 组大鼠脂肪变性的大鼠增加, 且评分升高, 见表 7。

3.5 均匀实验结果的回归分析 以药物与用量的不同组合作为“解释变量”, 以反映药效水平的不同效应指标“应变变量”, 利用 SAS 软件进行多元回归分析, 求解回归方程。鉴于实验中痔血胶有肝损害的



A. 正常组; B ~ F. 拆方 1 ~ 5 号组(图 2 同)

图 1 痔血胶囊 1 ~ 5 号拆方组对雌性大鼠肝脏损伤程度的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Zhixue capsules groups No. 1-No. 5 on degree of liver injury in female rats (HE, ×400)

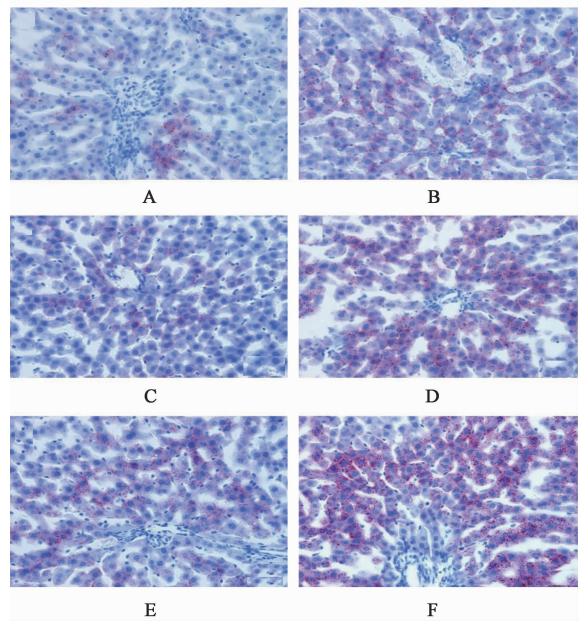


图 2 痔血胶囊 1 ~ 5 号拆方组对雌性大鼠肝脏损伤程度的影响 (油红 O, ×400)

Fig. 2 Effect of Zhixue capsules groups No. 1-No. 5 on degree of liver injury in female rats (油红 O, ×400)

表 7 痔血胶囊 1 ~ 5 号拆方组对大鼠肝脏病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effect of Zhixue capsules groups No. 1-No. 5 on liver pathological in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	肝细胞脂肪变性发生例数			肝细胞脂肪变性平均评分	
		分数	雄	雌	雄	雌
正常	-	1	5	1	0.90 ± 0.74	0.50 ± 0.85
		2	2	2		
拆方 1 号	0.625	1	4	4	0.60 ± 0.70	0.40 ± 0.52
		2	1	0		
拆方 2 号	3.125	1	9	3	0.90 ± 0.32	0.50 ± 0.71
		2	0	1		
拆方 3 号	2.088	1	5	3	1.60 ± 1.08	0.80 ± 1.03
		2	1	1		
		3	3	1		
拆方 4 号	4.163	1	4	2	1.10 ± 0.99	0.60 ± 0.84
		2	2	2		
		3	1	0		
拆方 5 号	7.288	1	6	5	0.80 ± 0.63	1.10 ± 0.74
		2	1	3		

性别差异现象,同时肝脏的病理学结果为肝毒性检测的金指标,故根据雌性大鼠肝组织 HE 病理评分回归得到方程: $y = 0.602 + 0.023 7a_1 - 0.000 387a_1^2 - 0.087a_2 + 0.006 6a_2^2$ 。其中白鲜皮为 a_1 ,苦参为 a_2 ,各项指标值为 y ,并通过编写的 SAS

程序,计算机按毒性指标结果由大到小排序,毒性最大时的可能药物因素组合为白鲜皮 25 g,苦参为 15 g。通过回归分析中的回归系数提示,白鲜皮在痔血胶囊对大鼠的毒性作用中为正相关,苦参为负相关,即白鲜皮为痔血胶囊肝损害的药物因素。

4 讨论

4.1 关于痔血胶囊肝毒性药物因素的探讨 本实验通过大鼠长期毒性实验寻找痔血胶囊产生肝毒性的药物因素。大鼠血清生化指标的检测结果显示,拆方2号组雄性大鼠、拆方5号组雌雄大鼠 GGT 升高,与临床痔血胶囊导致肝损伤的患者中血清主要变化的肝功能生化指标有一定一致性,提示有肝脏损伤。与正常组比较,拆方3~5号组雄性大鼠的肝脏绝对质量以及肝脏系数虽然有显著性差异,但与正常组比较无毒理学意义;雌性大鼠的该两项指标均显著性升高,提示肝脏可能出现充血、水肿、增生等损伤。组织病理学是肝损害评价的金指标,根据肝脏组织病理评分,各拆方组大鼠与正常组比较有升高趋势,其中变化最明显的为拆方3~5号组,结果显示肝小叶周边带肝细胞小泡型脂肪变性,可能会导致肝肿大。因此以上指标均提示痔血胶囊可能导致大鼠肝细胞损伤。通过实验结果进一步分析发现,拆方的肝毒性随着白鲜皮含量的增大而增强,而含有苦参的拆方组毒性相对较低,这可能与临床上苦参有肝保护作用有关^[11]。且根据均匀实验结果中脂变评分的回归分析,白鲜皮在痔血胶囊对大鼠的毒性作用中为正相关,苦参为负相关,这也提示引起痔血胶囊肝损害的主要药物因素为白鲜皮。

4.2 关注痔血胶囊肝损害的性别差异 实验中还发现,与正常组比较,痔血胶囊的肝损害在雌性大鼠表现更为明显。临床上王晓今等^[12]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的回顾性分析,女性患者明显多于男性,占83.34%。本次动物实验结果与临床报道一致。越来越多的研究表明,肝毒性在流行病学、临床表现等方面均表现出明显的性别差异,且女性较男性更容易受到外源性物质造成的肝毒性损伤。有研究报告显示,在美国有高达74%的药物引起的肝损伤发生在女性^[13]。而关于肝损害引起性别差异的发生机制可能与代谢酶以及基因表达不同有关,尚需进一步探索研究。

4.3 出现不良反应已上市中成药药物因素方法学探索 重视中药毒性的研究,进行安全性实验设计,加强对药物的安全性评价,尽早发现受试药物肝毒性信号,已是当务之急。然而中药物质基础复杂,对其研究有诸多难点,因此进行研究思路和方法学的探索,将对研究中药出现不良反应药物因素的顺利发展发挥巨大作用。

近年来,研究者经常从拆方对中药复方制剂不

良反应发生的原因和机制进行研究,然而研究中存在诸多问题,如毒理学拆方实验方法多采用简单的单因素轮换方法,或中医理论指导的不完全因子设计,忽视了药物之间的交互作用,也未考虑药量这一影响毒效的关键因素;同时实验中多以处方中1~2味药的毒性来推断整个复方不良反应的发生原因。这种方法忽视了中药复方是一个复杂的体系,1~2味药的毒理学研究不等于整个复方的不良反应。因此近年来应用数学模式指导中药复方优化的研究日益受到重视,该模式将先采取试验设计,后进行回归分析,方法更为科学。

均匀设计是我国数学家方开泰和王元于1978年提出的一种多因素试验设计方法。该方法与正交设计不同,它的特点是只考虑试验点的“均匀分散”性,而不考察“整齐可比”性,因而大大减少了试验次数,结果通过回归分析得出最佳试验条件^[14-15]。近年来,随着学科交叉的发展,均匀设计法已逐渐应用于中药复方的研究当中,如中药复方制剂的制备工艺、复方最佳配比等。本实验首次采用数学方法研究痔血胶囊产生肝损害的药物因素,为其他中药的毒性客观评价研究提供参考。

4.4 指导临床安全合理用药及新药研发 近年来,有关中药的毒性和不良反应事件频繁发生,不良反应的报道逐渐增多,如马兜铃酸成分中药肾毒性事件^[16],千里光不良反应事件^[17],何首乌肝毒性事件^[18]等,使得中药的安全性问题备受关注。据世界卫生组织统计,药物性肝损害已上升为全球死亡原因的第5位^[19]。相关报告指出,40.3%的药物性肝损伤为中草药所致,其次是抗生素、心血管疾病用药和内分泌疾病用药^[20]。然而,目前在中药的临床使用及研发方面,人们仍将主要注意力集中在已知的毒性药材,而较少关注潜在毒性药材。

本实验中具体分析痔血胶囊的处方药味,苦参为豆科植物苦参的干燥根,现代药理研究表明,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^[21-22]。白鲜皮为芸香科植物白鲜的干燥根皮,现代研究表明,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^[23]。本课题组查阅相关文献,Jang等^[24]报道4例白鲜皮煎剂引起中毒性黄疸性肝炎,停药后1月内肝损伤恢复。McRae等^[25]报道白鲜皮引起6例肝炎。实验中有发现白鲜皮的主要成分白鲜碱对肝细胞 HepG2 具有一定毒性作用,可能造成动物肝损伤^[26]。经查阅,近年来国家不良

反应中心通报的多个已上市中成药均报道含有白鲜皮,如复方青黛丸、克银丸、白癜风胶囊以及湿毒清胶囊等。本实验的研究也进一步推断证实了白鲜皮可导致肝脏损伤,这为将来临床合理用药以及为处方中含有白鲜皮的新药研发提供指导。

随着中药临床应用的快速增长,中药的安全性问题正越来越受到行业内的高度关注与重视,然而多数中药缺乏规范系统的安全性评价研究数据。因此,开展中药安全研究,发现新的潜在毒性中药,建立中药安全性评价体系,完善中药安全性基础数据,势在必行。

[参考文献]

[1] CHAN K, ZHANG H, LIN Z X. An overview on adverse drug reactions to traditional Chinese medicines[J]. Br J Clin Pharmacol, 2015, 80(4): 834-843.

[2] Gromek K, Drumond K, Simas P. Pharmacovigilance of herbal medicines[J]. Int J Disast risk Safe Med, 2015, 27(2): 55-65.

[3] Teschke R, Wolff A, Frenzel C, et al. Review article: Herbal hepatotoxicity-an update on traditional Chinese medicine preparations [J]. Aliment Pharm Therap, 2014, 40(1): 32-50.

[4] 宋捷, 钟荣玲, 夏智, 等. 中药肝毒性研究方法技术的新进展及其应用[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 41-48.

[5] 国家食品药品监督管理局. 药品不良反应信息通报(第17期)关注痔血胶囊引起的肝损害[R], 2008-10-28. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0078/33571.html>.

[6] 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.

[7] 彭莉, 张林, 李品, 等. 潜在毒性中药探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 227-234.

[8] 李品, 王琦, 彭莉, 等. 痔血胶囊水提物和醇提物对大鼠肝毒性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(8): 95-100.

[9] 倪晓璐, 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]. 中国临床药学杂志, 2010, 19(5): 271-275.

[10] 张艺, 张毅, 吴庆江. 治疗痔疮的胶囊及其制备方法: 中国, ZL02113266. 6[P]. 2004-8-18.

[11] 蔡艳. 苦参素药理作用研究进展[J]. 实用中医药杂

志, 2016, 32(4): 387-389.

[12] 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.

[13] Mennecozzi M, Landesmann B, Palosaari T, et al. Sex differences in liver toxicity-do female and male human primary hepatocytes react differently to toxicants *in vitro*? [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0122786.

[14] 曾昭钧. 均匀设计及其应用[M]. 沈阳: 辽宁人民出版社, 1994: 5.

[15] 李卫民, 高英, 陆森和, 等. 均匀设计方法在筛选丹皮与薄荷最佳配比中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(3): 26-28.

[16] Vanherweghem J L, Depierreux M, Tielemans C, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women; association with slimming regimen including Chinese herbs[J]. Lancet, 1993, 341(8842): 387-391.

[17] 梁爱华, 叶祖光. 千里光属植物的毒性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(2): 93-97.

[18] 孙震晓, 张力. 何首乌及其制剂相关肝损害国内文献回顾与分析[J]. 药物不良反应杂志, 2010, 12(1): 26-30.

[19] 袁玲, 杨永耿, 沈有秀, 等. 药物性肝损伤的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(2): 375-378.

[20] American Academy of Pediatrics Committee on Drugs. Transfer of drugs and other chemicals into human milk [J]. Pediatrics, 2001, 108(3): 776-789.

[21] 孟林, 赵存刚, 刘进, 等. 苦参成分及药理作用研究进展[J]. 中国科技信息, 2012, 20(77): 128.

[22] 薛爱华, 宋文静. 苦参碱药理作用研究概况[J]. 天津药学, 2010, 22(5): 62-64, 73.

[23] 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.

[24] Jang J S, Seo E G, HAN C, et al. Four cases of toxic liver injury associated with *Dictamnus dasycarpus* [J]. Korean J Hepatol, 2008, 14(2): 206-212.

[25] McRae C A, Agarwal K, Muimer D, et al. Hepatitis associated with Chinese herbs [J]. Eur J Gastroent Hepat, 2002, 14(5): 559-562.

[26] Nam S W, Baek J T, Lee D S, et al. A case of acute cholestatic hepatitis associated with the seeds of *Psoralea corylifolia* (Boh-Gol-Zhee) [J]. Clin Toxicol, 2005, 43(6): 589-591.

[责任编辑 张丰丰]