

· 安全性评价 ·

同仁安神丸的安全性评价

刘靖^{1,2}, 李春英², 赵雍², 易艳², 王连娟², 田婧卓², 邓诺², 李小龙², 李桂琴²,
潘辰², 韩佳寅², 张宇实², 刘素彦², 解素花³, 李晋生³, 梁爱华^{2*}

(1. 首都医科大学 中医学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
3. 北京同仁堂股份有限公司 科学研究所, 北京 100079)

[摘要] 目的:通过对同仁安神丸长期用药的安全性评价,明确其潜在的毒性作用及可逆性、毒性靶器官、无不良作用剂量及用药时间,为临床安全用药提供依据。方法:SD大鼠随机分为4组,正常组(每日灌胃给予饮用水)和同仁安神丸高、中、低剂量组(含生药6.4,3.2,1.6 g·kg⁻¹)。每日灌胃1次,连续给药3个月。分别于给药1,3个月和停药2个月后解剖并分析血液生化、血液细胞、尿常规、脏器系数和组织形态学等指标。结果:给药1个月,除高剂量组体重降低、饲料消耗量减少外,血液细胞、生化、尿常规、脏器系数等指标及脏器组织病理学检查等均未见明显与毒性相关的变化。给药3个月,高剂量组雌性动物的天门冬氨酸氨基转移酶(AST),肌酸激酶(CK)较正常组显著增高;病理检查可见肝细胞、肾小管轻度变性和肾间质炎性浸润等病理变化,其他血液生化学指标及血液学、尿常规、脏器系数等指标均在该品系动物的正常值范围内,故不认为有毒性学意义。停药2个月后,高剂量组上述肝功能指标和肝、肾组织形态学基本恢复正常。结论:高剂量组大鼠长期给药时,可见轻度肝肾毒性损伤。给予同仁安神丸3个月的无明显不良作用剂量(NOEL)为3.2 g·kg⁻¹·d⁻¹,相当于临床剂量的29倍。临床上服用该药时,应严格控制剂量,服药时间不宜过长。

[关键词] 同仁安神丸; 毒性; 肝脏毒性; 肾脏毒性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)01-0142-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018010142

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171011.1406.030.html>

[网络出版时间] 2017-10-11 14:06

Safety of Tongren Anshen Pill

LIU Jing^{1,2}, LI Chun-ying², ZHAO Yong², YI Yan², WANG Lian-mei², TIAN Jing-zhuo²,
DENG Nuo², LI Xiao-long², LI Gui-qin², PAN Chen², HAN Jia-yin², ZHANG Yu-shi²,
LIU Su-yan², XIE Su-hua³, LI Jin-sheng³, LIANG Ai-hua^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
3. Scientific Research Institute of Beijing Tongrentang Co. Ltd., Beijing 100079, China)

[Abstract] **Objective:** To define potential toxicity and reversibility, target organs of toxicity, no adverse effect dosage and medication time of Tongren Anshen pill through the safety evaluation for long-term medication of Tongren Anshen pill, in order to provide basis for clinical safety medication. **Method:** SD rats were randomly divided into four groups: the control group and high-dose, medium-dose and low-dose Tongren Anshen pill groups

[收稿日期] 20170801(008)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09501004);公益性行业科研专项(201507004);中国中医科学院重点领域研究专项(ZZ10-025);北京市科技计划项目(Z15110000115012,Z161100004916025)

[第一作者] 刘靖,在读硕士,从事中药药理研究,E-mail:woshiliujing0812@163.com

[通信作者] *梁爱华,博士生导师,研究员,从事中药药理与毒理研究,Tel:010-84052805-2207,E-mail:ahliang@icmm.ac.cn

(containing 6.4, 3.2, 1.6 g·kg⁻¹ of medicinal herbs). The rats were administered with the drugs by gavage once daily for 3 months. The blood biochemistry, hematology, urinalysis, relative organ weights (ROWs) and histomorphological indexes were examined in the 1st and 3rd months after administration, and the 2nd month after drug discontinuance. **Result:** In the study, the results of hematology, biochemistry, urinalysis, ROWs and histopathological examination showed no significant change related to drug toxicity after 1 month of administration; however, the body weights and food consumption of rats in high-dose Tongren Anshen pill group were significantly decreased. After 3 months of administration, aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK) of female rats in the high-dose group significantly increased compared with those in the control group. The histopathological changes in livers and kidneys were observed, including hepatocytes, mild renal tubular degeneration and renal interstitial inflammatory infiltration. There were no significant difference in other indexes, including serum biochemistry, hematology, urinalysis and ROWs. Two months later after drug discontinuance, no significant change in liver function parameters and morphology of liver and kidney was observed in the high-dose group. **Conclusion:** Long-term administration with high-dose Tongren Anshen pill could induce slight hepatic and renal damages. No observed adverse effect level (NOAEL) is 3.2 g·kg⁻¹·d⁻¹, which was equivalent to 29 times of clinical dosage. Its dosage and medication time shall be strictly controlled in clinic.

[**Key words**] Tongren Anshen pill; toxicity; hepatotoxicity; nephrotoxicity

目前含重金属朱砂的中成药在临床上使用仍然较为普遍,有不少含朱砂的中成药有较长的应用历史,其中不乏古代名方。然而由于朱砂为汞化合物,社会上很多人一直对含朱砂中成药的安全性存在质疑和担忧。欧美国家以及某些亚洲国家禁止含朱砂的中成药销售和使用。我国也时常发生有关含汞中成药的安全性争议和风波,例如,2013年百年老店同仁堂由于香港卫生署的一则汞超标通告而被推上舆论的风头浪尖,一时间社会上又一次对含朱砂中成药的安全性产生了激烈的争论,负面影响很大。由于许多含朱砂中成药缺乏系统的安全性评价,没有足够的安全性数据回答公众质疑,因而公众对含朱砂中成药安全性的担忧及其负面影响难以消除,因此,有必要对含朱砂中成药进行必要的安全性研究。同仁安神丸由黄连、甘草、熟地黄、地黄、当归、黄芪、酸枣仁(炒)、龙齿、茯苓、柏子仁、远志(甘草炙)、朱砂12味药组成,具有养血益气,镇惊安神的功效,用于心血不足引起的心烦体倦,怔忡健忘,少眠多梦,心神不安^[1]。该方除了朱砂记载有毒外,其他均未记载有毒。全方190g,其中朱砂为水飞制品,用量为11.5g,占全方的6.05%。《神农本草经》^[2]将朱砂列为上品,称其“无毒”。其他一些医书包括《名医别录》^[3],《证类本草》^[4],《本草纲目》^[5]等也认为朱砂“无毒”,但指出朱砂经过高温、烧制后可“化为汞”,则变为有毒,即朱砂的无毒“盖指生砂而言也^[6]”,即生粉入药是安全的。2015年版《中国药典》^[7]一部规定朱砂需要采用水飞炮制后用。同仁

安神丸中所用的朱砂是采用水飞方法炮制、以其生粉直接入药的。然而,据实验研究报道,由于朱砂仍然存在少量可溶性汞,给大鼠长时间服用朱砂可造成一定的汞在体内蓄积,从而导致轻度肝肾损害^[8-12]。以往对含朱砂的中成药长期给药的毒理研究报道并不多见。文献曾报道了安宫牛黄丸、万氏牛黄清心丸的长期毒性研究^[13-14],未观察到明显的毒性反应。然而另有研究报道,给小鼠灌胃给予朱砂安神丸20g·kg⁻¹(相当于临床剂量的10倍)20d后,可见肝细胞变性和坏死^[15]。同仁安神丸在朱砂安神丸的处方基础上增加了熟地黄、黄芪、酸枣仁(炒)、龙齿、茯苓、柏子仁、远志(甘草炙)7味中药,在临床上用于失眠等慢性疾病,以往对该药未进行过长期给药的毒性研究,因此,长期用药是否可能产生不良作用尚不明确^[16-17],因此有必要对其安全性进行研究,本研究通过大鼠长期给药的毒理学实验,以客观评价同仁安神丸的安全性,了解其是否具有潜在的不良反应及其可能的靶器官,了解不良反应与用药剂量、时间的关系,为同仁安神丸的临床用药提供参考。

1 材料

1.1 药物 同仁安神丸由北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂提供,为全方12味药研磨成粉末后混合而成,批号16020001112。

1.2 动物 ICR小鼠,SPF级别,雌雄各半,体重19~21g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2012-0001;SD大鼠,SPF

级别,雌雄各半,体重70~90 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2012-0001。动物饲养于中国中医科学院SPF动物房。动物房内温度20~25℃,湿度为40%~60%,全新风,人工光照12 h阴暗周期。动物到达后适应性饲养1周。采用大鼠标准颗粒饲料喂养,饲料由北京科澳协力饲料有限公司提供。研究方案符合中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会批准(编号20162022)。

1.3 试剂 肌苷(Cr,苦味酸法,批号SG5105B),总蛋白(TP,双缩脲法,北京康泰临床试剂有限公司,批号GG5104A),尿素(UREA,动力法,批号SG5104A),总胆固醇(CHOL,氧化酶法,批号ZL5103B),总胆红素(TBIL,钒酸盐氧化法,批号GG5105A),葡萄糖(GLU,氧化酶法,批号XT5103A),白蛋白(ALB,溴甲酚绿法,批号GG5104A),天门冬氨酸氨基转移酶(AST,IFCC法,批号GG5104A),丙氨酸氨基转移酶(ALT,IFCC法,批号GG5104A),碱性磷酸酶(ALP,金氏法,批号GG5103A)均由北京康泰临床试剂有限公司提供;检测血清钠、钾、氯离子浓度试剂盒(美国Medica公司,批号15208/1);尿蛋白试剂盒(美国Radox公司,批号506061);尿酸检测试剂盒(南京建成公司,批号20150805)。

1.4 仪器 BSA3202S-CW型电子天平(德国Sartorius公司);3-18K型高速冷冻离心机(德国Sigma公司);TBA-40FR型全自动生化分析仪(日本Toshiba公司);IX71型光学倒置显微镜(日本Olympus公司);ADVIA2120型全自动血液分析仪,Status Multistix 10G型尿液分析仪(德国Siemens Clinitek);ExcelsiorES型全自动脱水机,Histocentre3型石蜡包埋机,Finesse325型切片机,Varistain Gemini型全自动染色机(美国Shandon公司)。

2 方法

2.1 小鼠单次给药耐受量测定 小鼠随机分为正常组和同仁安神丸组,每组雌雄各半各5只。实验前小鼠禁食16 h,禁食期间自由饮水。由于供试品为中药饮片粗粉,配制浓度有限,最高可配质量浓度为640 g·L⁻¹。给小鼠灌胃给药0.02 mL·g⁻¹[18],剂量为含生药12.8 g·kg⁻¹。临床上人服用同仁安神丸的剂量为0.2 g·kg⁻¹(按照人平均体重60 kg计算),其中扣除辅料后服用的中药剂量为0.11 g·kg⁻¹。因此,小鼠剂量12.8 g·kg⁻¹相当于临

床剂量的116倍)。正常组按照体重给同体积蒸馏水。给药后连续观察14 d,记录动物毒性反应情况以及毒性发生时间、持续时间、恢复情况等。

2.2 剂量设置 将大鼠随机分为正常组和给同仁安神丸高、中、低3个剂量组,每组雌雄各半各5只。同仁安神丸可配制的最高质量浓度为640 g·L⁻¹,大鼠灌胃给药0.02 mL·g⁻¹,1 d给药1次,剂量为含生药6.4 g·kg⁻¹,将该剂量设为大鼠给药的最高剂量;中、低剂量分别设为含生药3.2,1.6 g·kg⁻¹。正常组按照给药体积10⁻² mL·g⁻¹体重灌胃给予饮用水。同仁安神丸3个剂量分别相当于人临床用量的58,29,14.5倍(按照每公斤体重折算)。根据朱砂在全方中的比例,同仁安神丸3个给药剂量水平分别相当于朱砂剂量0.4,0.2,0.1 g·kg⁻¹(分别相当于2015年版《中国药典》规定的临床朱砂剂量的80,40,20倍)。

2.3 动物给药方案和处死时间点试验 分为两批进行。第1批实验,正常组和同仁安神丸3个剂量组动物按照设计的剂量灌胃给药,每日给药1次,共给药1个月后处死。第2批实验,开始给药时,同仁安神丸高、中、低剂量同第1批。但由于高剂量组药液太稠,加之大鼠灌胃体积较大,影响动物进食,动物由于营养不良导致体重下降过快。另外,由于过稠的药液容易造成灌胃意外,导致个别动物死亡。为了减少由于营养不良对安全性评价结果的影响,于给药第5周将高剂量组剂量下调至含生药4.8 g·kg⁻¹(约相当于临床剂量的44倍);中、低剂量水平同前。第2批实验动物每日灌胃给药1次,共3个月。给药3个月结束后,处死部分动物(每组雌雄各5只)。剩余动物停药2个月后处死。

2.4 观察指标 在以上2批实验的给药期间和停药期间,每天观察动物状态,毛发光泽,活动行为,分泌物等并进行记录。每周称体重1次,并按照体重适当调整给药体积,按照体重标化的剂量一致。

2.4.1 尿液检查 分别于给药1个月,3个月结束以及停药恢复2个月结束时,将大鼠放入代谢笼,禁食不禁水,收集16 h尿液,记录饮水量和尿量,并观察尿液颜色。用尿液分析仪试纸条法检测尿液中以下指标,比重(SG),pH,葡萄糖(GLU),蛋白(PRO),胆红素(BIL),尿胆原(URO),酮体(KET),潜血(BLO)和白细胞(WBC)。

2.4.2 血液学检查 将动物禁食,采用戊巴比妥钠30 mg·kg⁻¹腹腔注射麻醉。经腹主动脉取血,全血

用全自动血液分析仪测定各组动物的血红蛋白(HGB),红细胞计数(RBC),血小板计数(PLT),白细胞计数(WBC),平均红细胞容量(MCV),血小板比积(PCT),红细胞比积(HCT),平均红细胞血红蛋白量(MCH),平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC),白细胞分类,网织红细胞计数(Ret%)。

2.4.3 血液生化检查 经腹主动脉取血,离心,取血清,用全自动生化分析仪测定血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT),尿素(UREA),总蛋白(TP),白蛋白(ALB),血糖(GLU),肌肝(CREA),总胆红素(TBIL),总胆固醇(CHO),碱性磷酸酶(ALP),甘油三酯(TG),肌酸激酶(CK), γ -谷氨酰基转移酶(γ -GT),用电解质分析仪测定钠离子浓度(Na^+),钾离子浓度(K^+),氯离子浓度(Cl^-)。

2.4.4 病理学检查 取血结束后,处死动物,进行解剖。肉眼观察动物各部分脏器形态、颜色、质地是否有异常,胸腔、腹腔是否有积液、粘连、肿块等。摘取心脏、肝脏、脾脏、肺(附带支气管)、肾(双肾)、肾上腺、脑(大脑、小脑和延髓)、胸腺、睾丸、附睾、子宫(加子宫颈)、卵巢(加输卵管)进行称重,计算出脏器系数。然后将上述取出的脏器进行福尔马林浸泡,包埋,制蜡块,最后切片,HE染色制成病理切片,显微镜下观察。

2.5 统计学方法 体重、摄食量、血液细胞、血清生化标、尿量、饮水量、脏器质量及系数等指标,分雌、雄进行统计分析,各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验进行组间比较。尿液定性指标按照雌、雄分别用等级资料表示,采用非参数检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 被认为有统计学显著性差异。除了统计学分析外,各指标均结合该种系大鼠的正常值范围分析指标的变化是否具有毒理学意义。

3 结果

3.1 单次灌胃给药对小鼠耐受性的影响 小鼠给药后观察14 d未见有死亡,动物状态、行为、毛色、饮食粪便均正常,肉眼观察,给药组与正常组相比无差异。处死解剖后观察动物脏器形态、颜色,与正常组相比无明显差异。结果表明,小鼠灌胃给予同仁安神丸 $6.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后,耐受良好,未产生明显的毒性反应。

3.2 反复灌胃给药1个月对大鼠血液学、生化学以及组织形态学的影响 同仁安神丸给药1个月,与正常组同期比较高剂量组动物体重明显降低($P < 0.05$),伴有饲料消耗量降低。中、低剂量组体重和饲料消耗量与正常组比较无显著差异;雌雄差异不

明显。各剂量组动物精神状态、步态、毛色等未见明显异常。

同仁安神丸高、中、低3个剂量组的血液细胞学、血液生化、尿常规、脏器质量和脏器系数等指标均与正常组比较未见明显差异。各脏器大体观察以及显微病理学观察等均未见明显病变。

3.3 反复灌胃给药3个月对大鼠体重和饲料消耗量的影响 同仁安神丸给药4周后,高剂量组从给药后第3周开始体重显著下降,饲料消耗量明显降低,动物消瘦。可能与药物浓度较高,影响动物进食,动物营养状况较差等有关。中、低剂量组动物体重与正常组比较无统计学显著性差异,但中剂量组体重仍有降低趋势。各剂量组大鼠活动、步态等均正常,未见走路不稳、摇晃、四肢无力等现象;毛有光泽,未见毛发松散、脱毛等。皮肤未见红、肿或溃烂;口、鼻、眼未见异常分泌物;未见喘息或张口呼吸、恶心、呕吐、抽搐等反应。大便正常;未见便血、尿血或尿液明显混浊等。体重在给药期间,雄性同仁安神丸高剂量组与正常组相比有明显差异(表1),并且在停止给药后逐渐恢复,雌性同仁安神丸高剂量组与正常组相比有差异(表2)。

3.4 反复灌胃给药3个月对大鼠尿液定性指标的影响 给药3个月及停药2个月后,同仁安神丸3个剂量组动物尿量、饮水量,以及各项尿液定性指标包括GLU,PRO,BIL,URO,KET,BLO和WBC均与正常组比较无显著性差异。

血液生化指标分析 给药3个月以及停药后2个月,雄性大鼠同仁安神丸各剂量组的各生化指标与正常组相比无显著差异或在正常值范围(表3)。给药3个月时,雌性大鼠高、低剂量组的AST以及高剂量组的CK均较正常组显著增高($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中高剂量组的AST,CK平均值分别接近正常组同指标平均值的2倍,但低剂量组的AST值较正常组增高的幅度较小。高剂量组雌鼠的低剂量组白蛋白/球蛋白比例较正常组明显降低($P < 0.01$)。除此之外,雌鼠各剂量组其他生化指标均在正常值范围(表4)。停药2个月后,雌性大鼠各给药组的所测生化指标均与正常组比较无显著差异或分布在正常值范围。

3.5 反复灌胃给药3个月对大鼠血液细胞计数的影响 给药3个月和停药2个月时,与正常组相比,同仁安神丸3个剂量组雌性和雄性大鼠的各血液学指标虽然有少数与正常组比较有统计学显著性差异,但基本在该品系动物的正常值范围。见表5,6。

表 1 同仁安神丸灌胃给药 3 个月对雄性大鼠体重增长的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Tongshen Anshen pill on body weight growth in male rats for three months($\bar{x} \pm s$)

g

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周
正常	0	133.83 ± 8.31	191.65 ± 9.24	254.13 ± 14.80	315.32 ± 22.18	355.97 ± 30.16	387.87 ± 39.61	402.38 ± 45.36	457.39 ± 47.46
同仁安神丸	1.6	133.30 ± 9.20	188.69 ± 15.09	247.97 ± 22.42	308.51 ± 30.75	349.09 ± 37.97	378.14 ± 55.67	416.54 ± 60.19	438.59 ± 62.23
	3.2	133.11 ± 9.02	191.32 ± 14.43	250.37 ± 18.81	311.57 ± 27.43	343.48 ± 31.82	377.30 ± 29.80	402.95 ± 32.12	436.31 ± 44.90
	6.4	133.71 ± 8.18	183.67 ± 14.59	240.37 ± 27.00	271.9 ± 37.59 ²⁾	311.1 ± 36.64 ²⁾	354.09 ± 39.21 ¹⁾	380.55 ± 40.68 ¹⁾	403.7 ± 44.57 ²⁾
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周	13 周	14 周	
正常	0	481.46 ± 51.67	500.59 ± 56.66	515.47 ± 61.56	530.62 ± 64.65	539.87 ± 66.59	539.90 ± 83.32	555.62 ± 90.65	
同仁安神丸	1.6	460.26 ± 60.84	474.49 ± 66.56	473.42 ± 72.87	481.65 ± 72.99	490.44 ± 65.11	487.12 ± 76.14	510.10 ± 76.83	
	3.2	464.14 ± 53.44	487.07 ± 43.19	505.06 ± 48.66	517.10 ± 51.57	537.31 ± 39.83	408.40 ± 207.31	427.94 ± 217.80	
	6.4	415.10 ± 50.36 ²⁾	420.50 ± 55.66 ²⁾	416.00 ± 43.31 ²⁾	427.00 ± 39.36 ²⁾	429.00 ± 34.68 ²⁾	347.52 ± 175.33	356.42 ± 181.14	
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	15 周	16 周	17 周	18 周	19 周	20 周	21 周	
正常	0	566.12 ± 88.46	570.74 ± 95.24	581.28 ± 94.98	585.88 ± 98.39	591.86 ± 103.43	604.42 ± 97.12	607.96 ± 98.16	
同仁安神丸	1.6	534.30 ± 84.11	541.54 ± 89.20	549.78 ± 88.40	556.58 ± 95.42	565.76 ± 99.10	575.50 ± 100.61	580.74 ± 101.19	
	3.2	446.58 ± 227.26	455.40 ± 232.20	469.32 ± 240.15	479.92 ± 245.39	485.96 ± 248.82	498.10 ± 254.80	503.74 ± 258.86	
	6.4	374.16 ± 189.32	384.76 ± 194.00	392.14 ± 197.93	398.98 ± 200.64	404.58 ± 204.17	412.86 ± 208.50	418.56 ± 212.44	

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~8 同);1~12 周每组 10 只动物,13~21 周每组 5 只动物(表 2 同)。

表 2 同仁安神丸灌胃给药 3 个月对雌性大鼠体重增长的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Tongshen Anshen pill on body weight growth in female rats for three months($\bar{x} \pm s$)

g

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周
正常	0	120.63 ± 7.34	156.83 ± 10.82	181.88 ± 12.79	208.74 ± 14.63	226.59 ± 21.36	236.99 ± 28.12	257.98 ± 21.04	266.87 ± 21.79
同仁安神丸	1.6	120.24 ± 6.69	154.40 ± 4.22	183.35 ± 11.49	207.22 ± 11.10	222.17 ± 10.62	239.47 ± 11.92	250.92 ± 13.63	257.80 ± 9.82
	3.2	120.96 ± 7.54	159.98 ± 9.90	187.22 ± 13.30	211.18 ± 20.68	231.81 ± 23.07	249.70 ± 29.05	262.76 ± 30.19	269.09 ± 30.41
	6.4	120.32 ± 7.36	158.08 ± 9.86	180.19 ± 14.30	197.49 ± 20.31	221.77 ± 20.96	225.49 ± 33.44	246.95 ± 23.42	253.80 ± 23.81
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周	13 周	14 周	
正常	0	278.79 ± 26.32	285.26 ± 24.16	290.17 ± 26.00	297.97 ± 27.42	300.03 ± 29.73	299.86 ± 26.34	304.90 ± 26.68	
同仁安神丸	1.6	269.22 ± 11.49	271.70 ± 12.41	270.45 ± 13.21	282.25 ± 12.37	285.85 ± 15.00	287.80 ± 7.49	292.92 ± 13.08	
	3.2	282.27 ± 31.35	286.79 ± 32.58	290.24 ± 29.75	295.36 ± 32.92	297.61 ± 31.60	309.78 ± 30.75	308.78 ± 31.41	
	6.4	261.92 ± 26.86	267.69 ± 26.59	268.10 ± 28.28 ¹⁾	275.92 ± 25.33 ¹⁾	275.54 ± 26.56 ¹⁾	260.80 ± 38.11	264.13 ± 37.82	
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	15 周	16 周	17 周	18 周	19 周	20 周	21 周	
正常	0	310.16 ± 28.96	308.66 ± 27.82	315.80 ± 28.95	315.24 ± 28.17	315.78 ± 28.22	319.28 ± 24.71	317.36 ± 27.35	
同仁安神丸	1.6	294.50 ± 6.38	299.72 ± 9.46	302.82 ± 10.50	307.12 ± 7.51	306.52 ± 10.18	314.72 ± 11.18	312.86 ± 10.02	
	3.2	318.58 ± 27.85	323.66 ± 30.28	339.38 ± 30.07	330.82 ± 30.01	331.12 ± 34.88	338.42 ± 31.84	336.90 ± 32.15	
	6.4	269.80 ± 38.25	267.67 ± 38.50	272.93 ± 37.89	277.10 ± 37.89	276.47 ± 37.16	279.33 ± 41.49	282.10 ± 40.10	

表 3 同仁安神丸灌胃给药 3 个月对雄性大鼠血液生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of Tongshen Anshen pill on blood biochemical parameters in male rats for 3 months ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	A/G	ALB /g·L ⁻¹	ALP /U·L ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	CHO /mmol·L ⁻¹	CK /U·L ⁻¹	GGT /U·L ⁻¹
正常	0	1.36 ± 0.06	31.22 ± 1.32	67.56 ± 9.53	32.22 ± 4.60	120.44 ± 31.37	1.22 ± 0.20	495.78 ± 238.26	0.36 ± 0.18
同仁安神丸	1.6	1.34 ± 0.03	28.52 ± 1.17 ²⁾	72.60 ± 11.53	35.20 ± 19.96	93.6 ± 24.70	1.22 ± 0.36	300.20 ± 172.48	0.42 ± 0.13
	3.2	1.30 ± 0.05	30.32 ± 1.62	72.00 ± 5.90	26.60 ± 1.36 ²⁾	76.4 ± 16.61 ²⁾	1.12 ± 0.16	182.20 ± 103.08 ²⁾	0.50 ± 0.26
	6.4	1.23 ± 0.14 ¹⁾	25.64 ± 3.92 ²⁾	92.22 ± 36.90	76.11 ± 88.19	146.22 ± 77.85	0.77 ± 0.14 ²⁾	337.67 ± 82.28 ¹⁾	0.38 ± 0.36
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	GLB /g·L ⁻¹	GLU /mmol·L ⁻¹	O/P	TBIL /μmol·L ⁻¹	TG /mmol·L ⁻¹	TP /g·L ⁻¹	UREA /mmol·L ⁻¹	CRE /μmol·L ⁻¹
正常	0	22.94 ± 9.27	6.94 ± 0.94	3.78 ± 0.70	0.82 ± 0.16	0.39 ± 0.08	54.17 ± 1.63	6.49 ± 0.65	37.22 ± 6.80
同仁安神丸	1.6	21.30 ± 0.96	6.81 ± 0.79	3.00 ± 0.80	0.64 ± 0.15	0.25 ± 0.03	49.82 ± 2.07 ²⁾	6.50 ± 1.14	33.80 ± 4.79
	3.2	23.42 ± 1.42	7.08 ± 0.13	2.86 ± 0.53 ¹⁾	0.78 ± 0.19	0.42 ± 0.07	53.74 ± 2.88	5.94 ± 0.51	38.20 ± 9.17
	6.4	21.13 ± 3.77	6.72 ± 0.63	2.92 ± 1.01 ¹⁾	0.50 ± 0.12 ²⁾	0.26 ± 0.08 ²⁾	46.78 ± 6.98	6.63 ± 0.85	32.44 ± 5.23

表 4 同仁安神丸灌胃给药 3 个月对雌性大鼠血液生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of Tongshen Anshen pill on blood biochemical parameters in female rats for 3 months ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	A/G	ALB /g·L ⁻¹	ALP /U·L ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	CHO /mmol·L ⁻¹	CK /U·L ⁻¹	GGT /U·L ⁻¹
正常	0	1.61 ± 0.10	34.56 ± 4.94	35.00 ± 8.05	20.30 ± 5.35	66.40 ± 14.16	1.24 ± 0.26	179.00 ± 98.75	0.55 ± 0.29
同仁安神丸	1.6	1.57 ± 0.07	34.34 ± 3.09	37.40 ± 4.96	37.20 ± 13.53 ²⁾	87.00 ± 19.31 ¹⁾	1.20 ± 0.22	178.40 ± 82.89	0.73 ± 0.22
	3.2	1.55 ± 0.04	39.88 ± 5.92	44.00 ± 17.14	36.80 ± 9.35 ²⁾	74.20 ± 12.50	1.55 ± 0.42	110.80 ± 33.65	0.57 ± 0.15
	6.4	1.36 ± 0.11 ²⁾	32.10 ± 4.40	104.00 ± 113.67	43.20 ± 32.54	117.00 ± 37.39 ²⁾	1.07 ± 0.28	362.20 ± 98.23 ²⁾	1.29 ± 1.77
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	GLB /g·L ⁻¹	GLU /mmol·L ⁻¹	O/P	TBIL /μmol·L ⁻¹	TG /mmol·L ⁻¹	TP /g·L ⁻¹	UREA /mmol·L ⁻¹	CRE /μmol·L ⁻¹
正常	0	21.46 ± 2.97	6.97 ± 1.40	3.46 ± 1.01	0.52 ± 0.25	0.31 ± 0.09	56.02 ± 7.78	7.51 ± 1.14	40.40 ± 11.59
同仁安神丸	1.6	21.96 ± 2.03	6.74 ± 0.72	2.45 ± 0.34	0.88 ± 0.15 ¹⁾	0.30 ± 0.08	56.30 ± 4.94	7.54 ± 1.48	42.60 ± 7.89
	3.2	25.72 ± 3.23 ¹⁾	7.00 ± 0.40	2.08 ± 0.33 ¹⁾	0.96 ± 0.20 ²⁾	0.47 ± 0.14 ¹⁾	65.60 ± 9.13	6.28 ± 0.58	36.80 ± 4.53
	6.4	23.67 ± 3.10	8.43 ± 4.37	3.26 ± 0.90	0.81 ± 0.23 ¹⁾	0.31 ± 0.05	55.77 ± 7.17	7.19 ± 2.62	33.70 ± 5.40

表 5 同仁安神丸灌胃给药 3 个月对雄性大鼠血液学指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effect of Tongshen Anshen pill on hematological parameters of male rats for three months ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	RBC / × 10 ¹² /L	HCT /%	RDW /%	HGB /g·L ⁻¹	MCHC /g·L ⁻¹	PLT (× 10 ⁹)/L	PCT /%	MPV /fL
正常	0	31.22 ± 1.32	67.56 ± 9.53	120.44 ± 21.37	1.22 ± 0.20	37.22 ± 6.80	0.36 ± 0.18	22.94 ± 9.27	6.94 ± 0.94
同仁安神丸	1.6	28.5 ± 1.17 ²⁾	72.60 ± 11.53	93.60 ± 24.70	1.22 ± 0.36	33.80 ± 4.79	0.42 ± 0.13	21.30 ± 0.96	6.81 ± 0.79
	3.2	30.32 ± 1.62	72.00 ± 5.90	76.40 ± 16.61 ²⁾	1.12 ± 0.16	38.20 ± 9.17	0.50 ± 0.26	23.42 ± 1.42	7.08 ± 0.13
	6.4	25.64 ± 3.92 ¹⁾	92.22 ± 36.90	146.22 ± 77.85	0.77 ± 0.14 ¹⁾	32.44 ± 5.23	0.38 ± 0.36	21.13 ± 3.77	6.72 ± 0.63
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	PDW /%	WBC (× 10 ⁹)/L	LYM /%	NEUT /%	EOS /%	MONO /%	RET (× 10 ¹²)/L	
正常	0	3.78 ± 0.67	0.82 ± 0.16	0.39 ± 0.08	54.17 ± 1.63	6.49 ± 0.65	4.19 ± 0.28	8.29 ± 0.40	
同仁安神丸	1.6	3.01 ± 0.80	0.64 ± 0.15	0.25 ± 0.03 ¹⁾	49.80 ± 2.07 ¹⁾	6.50 ± 1.14	3.69 ± 0.391)	8.25 ± 2.25	
	3.2	2.86 ± 0.53 ¹⁾	0.78 ± 0.19	0.42 ± 0.07	53.74 ± 2.88	5.94 ± 0.51	3.57 ± 0.11 ¹⁾	8.35 ± 0.68	
	6.4	2.92 ± 1.01 ¹⁾	0.52 ± 0.12 ¹⁾	0.26 ± 0.08 ¹⁾	46.78 ± 6.98 ¹⁾	6.63 ± 0.85	4.02 ± 0.29	8.46 ± 0.47 ¹⁾	

表 6 同仁安神丸灌胃给药 3 个月对雌性大鼠血液学指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 6 Effect of Tongshen Anshen pill on hematological parameters of female rats for three months ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	RBC (×10 ¹²)/L	HCT /%	RDW /%	HGB /g·L ⁻¹	MCHC /g·L ⁻¹	PLT (×10 ⁹)/L	PCT /%	MPV /fL
正常	0	34.56±4.94	35.00±8.05	66.40±14.16	1.24±0.26	40.40±11.59	0.55±0.29	21.46±2.97	6.97±1.40
同仁安神丸	1.6	34.34±3.09	37.40±4.96	87.00±19.31 ¹⁾	1.20±0.22	42.60±7.89	0.73±0.22	21.96±2.03	6.74±0.72
	3.2	39.88±5.92	44.00±17.15	74.20±12.50	1.55±0.42	36.80±4.53	0.57±0.15 ¹⁾	25.72±3.23	6.70±0.40
	6.4	32.10±4.40	104.00±113.67	117.40±37.39 ¹⁾	1.07±0.28	33.70±5.40	1.28±1.77	23.67±3.09	8.43±4.37

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	PDW /%	WBC (×10 ⁹)/L	LYM /%	NEUT /%	EOS /%	MONO /%	RET (×10 ¹²)/L
正常	0	3.46±1.01	0.52±0.25	0.31±0.09	56.02±7.78	7.51±1.14	3.72±0.63	7.14±0.27
同仁安神丸	1.6	2.45±0.34	0.88±0.15 ¹⁾	0.30±0.08	56.30±4.94	7.54±1.48	3.51±0.29	7.20±0.20
	3.2	2.08±0.33 ¹⁾	0.96±0.20 ¹⁾	0.47±0.14 ¹⁾	65.60±9.13	6.28±0.58	3.60±0.30	7.25±0.46
	6.4	3.26±0.90	0.81±0.23 ¹⁾	0.31±0.05	55.77±7.17	7.19±2.62	3.68±0.14	7.32±0.44

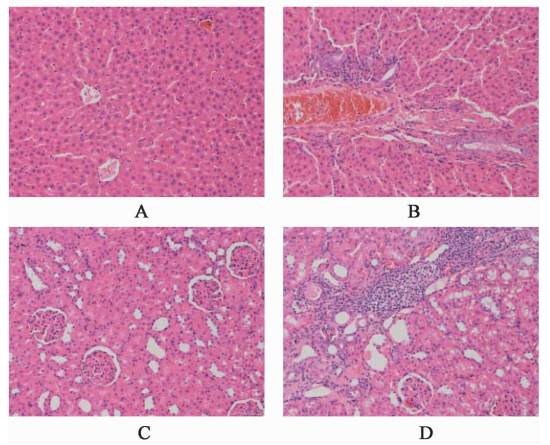
3.6 反复灌胃给药 3 个月对大鼠血液电解质的影响 给药 3 个月及停药 2 个月,同仁安神丸 3 个剂量组雌性和雄性动物的血清电解质包括钠离子浓度(Na⁺),钾离子浓度(K⁺),氯离子浓度(Cl⁻)均与正常组相比无显著性差异。

3.7 反复灌胃给药 3 个月对大鼠主要脏器组织形态学的影响 同仁安神丸给药 1 个月时,肝、肾的组织结构未见明显异常。给药 3 个月时,同仁安神丸高剂量组在肝脏中部分大鼠可见轻度肝包膜下水肿(占比为 30%),片状坏死(占比为 60%),肝细胞间隙增大(占比为 30%),中央静脉周围细胞变性(占比为 20%)等症状;在肾脏中部分大鼠可见肾小管水肿(占比为 30%),炎细胞渗出(占比为 70%)等症状(图 1)。停药 2 个月后,高剂量组上述肝、肾组织形态学基本恢复正常。

4 讨论

本研究采用大鼠,反复灌胃给予同仁安神丸低、中、高 3 个剂量(1.6,3.2,6.4 g·kg⁻¹)1 个月,除了高剂量组体重降低、饲料消耗量明显减少以外,动物未见明显其他毒性反应,3 个剂量组的血液学、血液生化学、尿常规、脏器系数等指标均未见明显与毒性相关的变化;各脏器组织病理学检查均未见明显病变。结果提示,同仁安神丸在可给予的最高剂量下(最高为临床剂量的 58 倍)经口给药 1 个月,安全性较好,未见明显毒性反应。

当给药时间延长至 3 个月时,虽然同仁安神丸最高剂量下调至 4.8 g·kg⁻¹,高剂量组雌性动物的肝功能指标 AST,CK 较正常组显著增高,并达到正常组的 2 倍左右,认为有一定毒理学意义。病理检



A. 正常组肝脏;B. 同仁安神丸高剂量组肝脏;C. 正常组肾脏;D. 同仁安神丸高剂量组肾脏

图 1 同仁安神丸灌胃给药 3 个月对大鼠肝肾组织的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Tongshen Anshen pill on liver and kidney tissue of rats for three months(HE, ×200)

查也可见肝细胞、肾小管轻度变性和肾间质炎性浸润等病理变化。停药 2 个月后,高剂量组上述肝功能指标和肝、肾组织形态学基本恢复正常。除此之外,同仁安神丸 3 个剂量组给药 3 个月后,雌性和雄性动物的其他血液生化学指标以及血液学、尿常规、脏器系数等指标中虽然少数指标与正常组有统计学上的显著性差异,但是仍在该品系动物的正常值范围内,故不认为有毒性学意义。从本研究结果可见,同仁安神丸长期给药剂量较高时,可能造成潜在的肝脏、肾脏毒性,但为轻度并且可逆性的改变,停药后可恢复正常。当剂量降低至 3.2 g·kg⁻¹(相当于临床剂量的 29 倍)或以下时,给药 3 个月未见明显

毒性反应。

同仁安神丸中含有一定量的朱砂(朱砂占全方的 6%)。朱砂的主要成分为硫化汞,2015 年版《中国药典》规定朱砂需要采用水飞炮制后入药,并且水飞后的朱砂含硫化汞不得少于 96%^[11]。据研究报道表明^[19-20],水飞炮制合格的朱砂给小鼠单次给药剂量高 24 g·kg⁻¹时,未见毒性反应,表明朱砂单次用药是很安全的。前期研究报道,由于朱砂尚含有少量可溶性汞,长期用药时可造成一定量的汞蓄积,其中肾脏和肝脏中蓄积量较高,并可能造成肾脏、肝脏病理损伤,故汞蓄积与靶器官毒性有一定关系^[10-12,21-22]。汞在肾脏中主要蓄积于集合管、近曲小管等,能与蛋白质的巯基、氨基、羧基以及核酸的磷酸基和碱基等化学基团产生相互作用,从而产生肾脏损害^[10]。根据朱砂在同仁安神丸中所含的比例(6%),本研究大鼠给予同仁安神丸的最高剂量 6.7 g·kg⁻¹相当于给予朱砂 0.4 g·kg⁻¹(相当于临床朱砂剂量的 80 倍)。在本研究组的前期研究中,单味药朱砂 0.4 g·kg⁻¹给大鼠灌胃给药 1 个月就可见肾小管轻度病理损伤;给药 2 个月和 3 个月均可见肝、肾病理损伤^[11]。而本研究采用含朱砂的中药复方同仁安神丸给大鼠灌胃给药,给药 1 个月后,动物未见明显肝、肾毒性,给药 3 个月仅有轻度肝脏毒性,有可能中药复方配伍相对降低了朱砂的肝、肾毒性,其进一步的机制尚需今后进一步研究。本研究提示大鼠反复灌胃给予同仁安神丸 3 个月的无明显不良作用剂量(NOEL)为 3.2 g·kg⁻¹d⁻¹,相当于临床剂量的 29 倍。临床上服用该药时,应严格控制剂量,服药时间不宜过长。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部. WS3-B-2130-96 中华人民共和国卫生部药品标准-中药成方制. 第十一册[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:65.

[2] 马继兴. 神农本草经辑注[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:148.

[3] 尚志钧辑校. 名医别录. 第 1 卷[M]. 北京:人民卫生出版社,1986:2.

[4] 唐慎微. 重修政和经史证类备用本草[M]. 北京:人民卫生出版社,1957:79.

[5] 李时珍. 本草纲目校本. 第 1 册[M]. 北京:人民卫生出版社,1979:517.

[6] 唐慎微. 重修政和经史证类备用本草[M]. 北京:人

民卫生出版社,1957:79.

[7] 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,2015:137.

[8] 丁通,骆骄阳,韩旭,等. 朱砂毒性的研究进展及配伍必要性分析[J]. 中国中药杂志,2016,41(24):4533-4540.

[9] 梁爱华,徐严菊,商敏凤. 朱砂的不良反应分析[J]. 中国中药杂志,2005,30(23):1809-1811.

[10] 梁爱华. 朱砂的毒性研究[D]. 北京:北京中医药大学,2008.

[11] 梁爱华,王金华,薛宝云,等. 朱砂对大鼠的肝肾毒性研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(3):312-317.

[12] 霍韬光,王海宇,林欣然,等. 朱砂中汞的生物可接受性及其吸收与排泄[J]. 化学研究,2012,23(4):52-55.

[13] LU Y F, WU Q, YAN J W, et al. Realgar, cinnabar and Angong Niu Huang Wan are much less chronically nephrotoxic than common arsenicals and mercurial[J]. Exp Biol Med, 2011, 236(2):233-239.

[14] 黄海,高鑫,周颖,等. 朱砂与万氏牛黄清心丸致大鼠亚急性肝毒性的比较研究[J]. 中草药,2017,48(9):1825-1828.

[15] 康峰,吴琨,何海洋,等. 朱砂、朱砂安神丸与甲基汞、氯化汞的毒性对比研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(4):499-502.

[16] 何海洋,康峰,颜俊文,等. 朱砂、朱砂安神丸与氯化汞、轻粉的急性毒性对比[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):219-223.

[17] 杨铭,于德伟,陈文学,等. 高丽红参毒理学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(6):174-178.

[18] OECD. OECD Guideline for Testing of Chemicals; acute oral toxicity-acute toxic class method, 423[M]. Paris: OECD,2001:3.

[19] 付中祥,时京珍,刘杰,等. 朱砂、含朱砂复方对人肝细胞的毒性对比研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(15):285-289.

[20] 田南卉. 朱砂毒性成分的研究与评估[J]. 北京中医,1996,15(5):38-40.

[21] 梁爱华,李春英,薛宝云,等. 朱砂汞在大鼠体内的蓄积性研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(23):3068-3072.

[22] Cordon-Cardo C, O'Brien J P, Casals D, et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1989,86(2):695-698.

[责任编辑 邹晓翠]