

· 毒理 ·

均匀设计结合多元回归分析用于淫羊藿对大鼠肝毒性的影响

张林¹, 张晶璇¹, 范琼尹¹, 苏泽琦¹, 陈聪², 彭莉², 王婷^{1*}

(1. 北京中医药大学 北京中医药研究院, 北京 100029;

2. 北京中医药大学 中医体质与生殖医学研究中心, 北京 100029)

[摘要] **目的:**通过研究淫羊藿对大鼠肝脏毒性的影响,探索淫羊藿潜在肝毒性,并对造成其毒性的原因进行初步分析。**方法:**以基原、工艺、剂量、疗程为考察因素,采用均匀设计方法设计各实验分组,将220只SD大鼠随机分为正常组与各给药组,每组20只,雌雄各半,连续灌服对应淫羊藿提取物,灌胃过程中观察大鼠一般情况,每周定期测定体质量和摄食量2次,在各疗程给药结束后,腹主动脉取血,测定与肝功能相关的血液生化指标,大鼠处死后取肝脏称质量,计算脏脑比和脏体比,再制作肝脏石蜡切片,经苏木素-伊红(HE)染色后进行病理评分,比较各给药组与对应正常组间各指标统计学差异,并将肝脏病理评分结果作为“金指标”,结合其他检测指标作为参考,进行回归分析,评价各因素对肝毒性的影响。**结果:**与正常组相比,实验6组与实验8组大鼠直接胆红素(DBIL), γ -谷氨酰转氨酶(GGT),总胆红素(TBIL),肝脏质量,脏脑比值出现明显差异($P < 0.05$),肝脏病理评分较高,表现出较明显的肝损伤情况,经回归分析并综合各指标检测结果推断,朝鲜淫羊藿和巫山淫羊藿潜在肝毒性较强,工艺与肝脏毒性强度呈负相关,剂量和疗程与肝脏毒性强度呈正相关,雌性动物受肝损害较雄性动物明显;**结论:**朝鲜淫羊藿及巫山淫羊藿存在潜在肝毒性,并与提取工艺、给药剂量和用药疗程存在密切关系,应当在临床应用及新药研发中引起重视。

[关键词] 淫羊藿; 中药潜在毒性; 肝毒性; 均匀设计; 回归分析

[中图分类号] R22; R2-03; R285.5; R274; R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0189-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180617

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171226.1334.012.html>

[网络出版时间] 2017-12-28 9:29

Hepatotoxicity of Epimedii Folium in Rat Model Based on Uniform Design and Regression Analysis

ZHANG Lin¹, ZHANG Jing-xuan¹, FAN Qiong-yin¹, SU Ze-qi¹, CHEN Cong², PENG Li², WANG Ting^{1*}

(1. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM), Beijing University of

Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Research Centre of TCM Constitution and Reproductive Medicine,

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the potential hepatotoxicity of Epimedii Folium and explore the reasons for toxicity by the study of the hepatotoxic effect of Epimedii Folium on rats. **Method:** The experiment was performed by uniform design, and the study factors included original plant, process, dose and course. A total of 220 SD rats were randomly divided as the normal group and the drug group, with 20 in each group, half male and female. The rats were given the corresponding drugs and observed; and on a regular basis, the weight and food intake were determined twice a week. After the administration of each course, the rats were anesthetized with 1%

[收稿日期] 20171017(025)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81374056)

[第一作者] 张林,博士,从事中药新药及新剂型研发工作, Tel:010-64286407, E-mail: zlbucm@163.com

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

pentobarbital, and blood was collected from abdominal aorta and used to detect the blood biochemical indexes related to liver function. The livers were weighted, and the ratio of liver to brain and body was calculated; and then the livers were made into paraffin sections and histopathologically scored after hematoxylin-eosin (HE) staining. The statistical differences between normal control group and drug groups were compared. With the histopathologic score as the gold indicator and other indicators for reference, the effects of each factor on the potential hepatotoxicity were evaluated by regression analysis. **Result:** Compared with normal group, the animals in group 6 and 8 showed significant differences in indirect bilirubin (DBIL), γ -glutamyltransferase (GGT), total bilirubin (TBIL), the liver weight and the ratio of liver to brain ($P < 0.05$), and had a higher liver pathological score, which indicated a severer hepatotoxicity. After the regression and comprehensive analysis, under the experiment conditions, epimedium koreanum nakai and epimedium wushanense had a stronger toxicity, the process was negatively correlated with the liver damage degrees, the dose and course were positively correlated, and females were more seriously damaged than males. **Conclusion:** Epimedium koreanum nakai and epimedium wushanense have a potential hepatotoxicity, which is closely correlated with the four factors. The potential hepatotoxicity of Epimedium Folium shall be given more attention in clinical application and drug development.

[**Key words**] Epimedium Folium; potential toxicity of traditional Chinese medicine; hepatotoxicity; uniform design; regression analysis

淫羊藿为小檗科淫羊藿属多年生的药用植物,始载于《神农本草经》,列为中品,应用历史悠久。2015年版《中国药典》中记载,淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicomu*, 箭叶淫羊藿 *E. sagittatum*, 柔毛淫羊藿 *E. pubescens* 或朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* 的干燥叶^[1]。巫山淫羊藿曾被《中国药典》收录于淫羊藿项下,目前单独列出^[1],为小檗科植物巫山淫羊藿 *E. wushanense* 的干燥叶。淫羊藿与巫山淫羊藿均具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的作用功效,用于肾阳虚衰、阳痿遗精、筋骨痿软、风湿痹痛、麻木拘挛,是中医临床中常用的补阳类中药。然而在现代应用与新药研发中,含淫羊藿的多种中药复方制剂被发现造成人体一定程度肝脏损伤的情况^[2-7],被认为是可能具有肝脏毒性的潜在毒性中药,但限于影响因素复杂等原因,尚未有系统地研究报道。针对这一现状,为确保淫羊藿药材的合理使用,避免引起严重不良反应事件,有必要对其毒性进行实验确证和全面深入的系统研究。

均匀设计(uniform design),是一种多领域广泛应用的试验设计方法,其在每一个试验点都具良好代表性的前提下,大幅度减少试验点的数目,成为寻找最佳实验条件、最佳配比等方面是选择优化条件的有力工具^[8-9]。多元回归分析是一种预测性的建模技术,目的在于研究因变量(目标)和自变量(预测器)之间的关系,可用于预测分析时间序列模型以及发现变量之间的因果关系^[10]。将均匀设计与多元回归分析相结合,可高效、科学地解决受多因

素、多水平影响的复杂医药领域问题。

本研究以SD远交群大鼠为实验对象,采用均匀实验设计安排实验分组,考察与中药潜在毒性密切相关多个因素,检测与肝脏损伤相关的多项生理、生化指标,并通过回归分析进行综合评价,旨在为淫羊藿药材的潜在肝毒性提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠,雌雄各半,5~7周龄,体质量(200±20)g。购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0011,本实验经北京中医药大学学术委员会实验动物伦理分委员会审查通过,伦理审查编号BUCM-4-2017031001-3001。

1.2 仪器 CX4 Pro型全自动生化分析仪(美国贝克曼公司);KQ-300VDE型超声仪(昆山市超声仪器有限公司);TDL80-2B型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);ASP300S型组织脱水机, RM2245型组织切片机(德国徕卡仪器有限公司);YP1002N型电子天平(上海京孚仪器有限公司);BX53自动化智能型正置研究级显微镜(日本Olympus公司)。

1.3 药物 经中国医学科学院药用植物研究所郭宝林教授鉴定,淫羊藿药材为小檗科植物淫羊藿 *E. brevicomu*, 箭叶淫羊藿 *E. sagittatum*, 柔毛淫羊藿 *E. pubescens* 或朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* 的干燥叶,巫山淫羊藿药材为小檗科植物巫山淫羊藿 *E. wushanense* 的干燥叶;10%甲醛(益利化工有限公司,批号20170605);血液生化检测试剂盒[贝克曼库尔

特试验系统(苏州)有限公司,批号 AUZ3777];戊巴比妥钠(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 3761-5G)。

2 方法

2.1 均匀设计安排动物毒性实验分组 本研究在分析了引起中药肝毒性主要原因的基础上,选择淫羊藿药材基原、提取工艺、给药剂量、服用疗程 4 方面因素进行研究,结合专业知识确定各因素的水平间隔及水平。基原因素考察淫羊藿、柔毛淫羊藿、朝鲜淫羊藿、箭叶淫羊藿、巫山淫羊藿;工艺(乙醇浓度)因素考察 0%,50%,70% 乙醇;剂量因素(临床日服用量)考察 5,10,15,20 g;疗程因素考察 1,3,6 个月。采用 $U_8(8^5)$ 均匀设计使用表^[11],得动物毒性实验安排分组。见表 1。

表 1 淫羊藿大鼠肝毒性研究均匀设计实验分组

Table 1 Experimental group of Epimedii Folium hepatotoxicity in rat model set by uniform design

组别	基原	工艺(乙醇浓度)/%	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	疗程/月
实验 1	淫羊藿	0	0.86	6
实验 2	淫羊藿	50	1.71	6
实验 3	柔毛淫羊藿	50	0.86	3
实验 4	柔毛淫羊藿	70	1.71	3
实验 5	朝鲜淫羊藿	0	0.43	3
实验 6	朝鲜淫羊藿	0	1.29	1
实验 7	箭叶淫羊藿	50	0.43	1
实验 8	巫山淫羊藿	70	1.29	1

2.2 药材检测及提取 收集各基原淫羊藿和巫山淫羊藿药材,进行药材鉴定,并按照 2015 年版《中国药典》内容^[1-2],测定淫羊藿药材中淫羊藿苷含量和巫山淫羊藿中朝藿定 C 含量。在证实药材符合要求的情况下,按照表 2 中相应工艺进行提取。提取过程中,水提取工艺,加 10 倍量水提取 3 次,每次 1.5 h,合并 3 次提取液后浓缩,于真空干燥箱中 60 °C 条件下减压干燥,干膏研磨成细粉,即得水提取物;醇提取过工艺,加 7 倍量相应浓度醇溶液,加热回流提取 2 次,每次提取 2 h,合并 2 次提取液后使用旋转蒸发器回收乙醇,至提取液无醇味后,浓缩,于真空干燥箱中 60 °C 条件下减压干燥,干膏研磨成细粉,即得醇提取物。药材检测及提取见表 2,表明所收集的不同产地药材经鉴定确定植物种属,且符合 2015 年版《中国药典》要求,可用于实验研究。

2.3 大鼠一般情况观察 按照表 1 中实验分组

表 2 淫羊藿收集、指标成分含量测定及提取物出膏率

Table 2 Collection, content determination of index ingredient and extraction ratio of Epimedii Folium

组别	药材产地	药材种属	指标成分含量/%*	提取物出膏率/%
实验 1	甘肃	淫羊藿	4.01	19.97
实验 2	甘肃	淫羊藿	4.01	13.68
实验 3	四川	柔毛淫羊藿	7.31	12.90
实验 4	四川	柔毛淫羊藿	7.31	12.18
实验 5	辽宁	朝鲜淫羊藿	5.31	23.15
实验 6	辽宁	朝鲜淫羊藿	5.31	23.15
实验 7	安徽	箭叶淫羊藿	1.07	15.35
实验 8	陕西	巫山淫羊藿	7.75	18.45

注:*.2015 年版《中国药典》中,淫羊藿各基原药材指标成分淫羊藿苷含量要求不低于 0.5%,巫山淫羊藿指标成分朝藿定 C 含量要求不低于 1.0%^[1]。

内容,将 220 只 SD 大鼠,随机分为正常组(各疗程分别设置相应正常组,共设 3 个空白组)和实验 1~8 组,每组 20 只,雌雄各半。实验 1~8 组动物按照表 1 中剂量和疗程进行连续、定点给药(正常组按 10 mL·kg⁻¹灌服蒸馏水),1 次/d,不设恢复期,并在每天给药后观察动物外观体征、行为活动、腺体分泌、呼吸、粪便性状、生殖器、死亡等情况及其它中毒表现 1 次;在大鼠灌胃给药期间每周固定时间测定大鼠体质量 2 次,同时记录动物 24 h 摄食情况,计算各测定时间每组大鼠平均体质量和平均摄食量。

2.4 大鼠血清生化检测 各给药疗程结束后,将各组大鼠禁食(自由饮水)12 h,经戊巴比妥钠(1%,腹腔注射,40 mg·kg⁻¹)麻醉,自腹主动脉采血约 5 mL,血样不抗凝,室温下静置 30 min,3 000 r·min⁻¹离心 15 min,分离血清,使用全自动生化分析仪,对于肝功能相关的白蛋白/球蛋白(A/U),白蛋白(ALB),碱性磷酸酶(ALP),丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),直接胆红素(DBIL), γ -谷氨酰转移酶(GGT),球蛋白(GLB),高密度脂蛋白(HDL-C),间接胆红素(IBIL),低密度脂蛋白(LDL-C),总胆红素(TBIL),总蛋白(TP)各指标进行检测。

2.5 大鼠系统尸解及肝脏质量检测 将取血后大鼠处死,进行解剖,全面、细致观察各组动物内脏色泽、质地、肿块等形态情况,并对肝脏和脑称质量,计算脏器比和脏脑比。

2.6 大鼠肝脏组织病理学检查 肝脏称质量后于

10% 甲醛中固定,再经过组织修切、石蜡包埋、常规切片、切片脱蜡、苏木素-伊红(HE)染色、乙醇梯度

脱水、透明、封片等步骤后,切片使用光学显微镜观察,依据肝脏病理评分表^[12](表 3),进行评分。

表 3 大鼠长期毒性实验肝脏病理检查结果评分

Table 3 Liver pathological score of rat long term toxicity experiment

病变类型	分值	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 <3 个病灶,且均为微小病灶
	1	每个组织切片上 ≥3 个病灶, <10 个病灶,病灶较小
	2	每个组织切片上 ≥10 个病灶, <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

2.7 大鼠肝脏毒性回归分析 以均匀设计中基原、工艺、剂量、疗程因素与其水平的不同组合作为“解释变量”,分别设为 a_1, a_2, a_3, a_4 , 由于组织病理学评分结果为毒理研究“金指标”,故以其作为“因变量”设为 y , 选择最小 R^2 增量法,利用 SAS 软件,进行多元回归分析,进而推导出多变量的最优回归模型,同时结合其他检测指标结果,从而对各因素毒性影响进行评价,用数学模型阐明各因素导致淫羊藿产生肝脏毒性的情况。

2.8 统计学分析 使用 SPSS 20.0 软件 One-Way ANOVA 方法进行统计分析,各测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验组与正常组的差异性比较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 T_3 方法分析, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

3 结果

3.1 对大鼠一般情况的影响 通过观察发现,各组大鼠一般情况各项指标均较为稳定,各给药组中大鼠毛色正常,行为活动无异常,腺体分泌量稳定,呼吸功能良好,粪便性状正常,与正常组相比无明显差异。各灌胃周期的给药组雄性、雌性大鼠平均体质量和平均摄食量分别与对应正常组大鼠在各相应测定时间点进行比较,均无统计学差异,体质量、摄食量变化趋势近似,说明按照实验设计的给药,对大鼠体质量、摄食量变化影响不大。

3.2 对大鼠血清中肝功能生化指标的的影响 肝功能相关血液生化各指标检测后,各给药组大鼠

A/U, ALB, ALP, ALT, AST, GLB, HDL-C, IBIL, LDL-C, TP 与正常组相比均无统计学差异。与正常组比较,实验 6 组雄性大鼠 DBIL, GGT, TBIL 明显升高 ($P < 0.05$), 雌性大鼠 DBIL, GGT 明显升高 ($P < 0.05$); 实验 7 组雄性大鼠 GGT, TBIL 明显升高 ($P < 0.05$), 雌性大鼠 DBIL, GGT 明显升高 ($P < 0.05$); 实验 8 组雄性和雌性大鼠 GGT 均明显升高 ($P < 0.05$)。见表 4, 5。

3.3 系统尸解情况及药物对大鼠肝脏质量的影响 各组大鼠心、肝、脾、肺、肾等主要脏器,肉眼观察未见异常。肝脏绝对质量、脏体比、脏脑比测定及计算,实验 1~5, 7 组中雄性和雌性大鼠肝脏质量、脏体比、脏脑比与相应正常组相比,均无统计学差异,表明这些实验条件未对肝脏的质量产生实质性影响;与正常组比较,实验 6 组雄性大鼠肝脏质量、脏脑比值明显升高 ($P < 0.05$); 实验 8 组雌性大鼠肝脏质量明显升高 ($P < 0.05$)。见表 6。

3.4 对大鼠肝脏病理组织学的影响 各组均有部分大鼠肝脏组织可见肝小叶周边带肝细胞小泡性脂肪变性,其中实验 6, 8 组表现出较为严重的肝细胞内大小不等空泡或微泡病变,切片图像采集可清晰观察到肝细胞内大小不等圆形光亮空泡。肝细胞脂肪变性病理评分结果所示,与正常组相比,实验 6, 8 组大鼠肝脏脂肪变性病变程度增加明显,评分升高,且雌性大鼠病变程度重于雄性大鼠。见图 1, 2, 表 7, 8。

3.5 均匀实验结果多元回归分析 采用 SAS 软件进行回归分析并充分考虑因素间交互作用,得方程,

表 4 淫羊藿对各组雄性大鼠血液生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Epimedii Folium on blood biochemical indexes of male animals ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

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	DBIL /μmol·L ⁻¹	GGT /U·L ⁻¹
正常(6个月)	-	0.83 ± 0.05	29.17 ± 2.93	116.20 ± 16.40	34.40 ± 6.80	150.30 ± 13.00	0.81 ± 0.09	0.30 ± 0.10
实验 1	0.86	0.88 ± 0.06	27.78 ± 2.01	62.00 ± 16.30	39.00 ± 10.30	150.10 ± 35.30	0.79 ± 0.14	0.30 ± 0.20
实验 2	1.71	0.88 ± 0.04	31.06 ± 2.50	71.80 ± 19.20	40.90 ± 5.30	164.50 ± 16.30	0.91 ± 0.22	0.20 ± 0.20
正常(3个月)	-	0.87 ± 0.10	28.12 ± 1.88	108.77 ± 22.34	40.09 ± 6.00	123.34 ± 19.86	0.60 ± 0.18	0.57 ± 0.33
实验 3	0.86	1.05 ± 0.07	30.22 ± 2.00	104.44 ± 19.61	40.36 ± 28.01	129.29 ± 39.82	0.77 ± 0.24	0.60 ± 0.63
实验 4	1.71	0.96 ± 0.08	29.09 ± 1.22	119.21 ± 24.42	37.80 ± 12.35	133.50 ± 34.55	0.59 ± 0.16	0.37 ± 0.31
实验 5	0.43	0.83 ± 0.14	28.35 ± 2.65	122.56 ± 25.22	35.31 ± 4.92	136.14 ± 24.92	0.66 ± 0.10	0.52 ± 0.31
正常(1个月)	-	0.96 ± 0.06	28.69 ± 0.90	208.50 ± 42.20	32.00 ± 3.90	119.10 ± 11.60	0.54 ± 0.13	0.30 ± 0.10
实验 6	1.29	1.01 ± 0.06	30.73 ± 1.05	188.60 ± 46.00	36.30 ± 5.50	122.30 ± 17.50	0.70 ± 0.14 ¹⁾	0.90 ± 0.20 ¹⁾
实验 7	0.43	0.98 ± 0.06	30.76 ± 0.94	211.00 ± 27.80	35.50 ± 3.80	121.00 ± 20.90	0.60 ± 0.12	0.90 ± 0.20 ¹⁾
实验 8	1.29	1.00 ± 0.05	30.66 ± 1.13	228.30 ± 34.90	35.60 ± 5.90	126.70 ± 15.90	0.63 ± 0.10	0.80 ± 0.20 ¹⁾

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	GLB /g·L ⁻¹	HDL-C /mmol·L ⁻¹	IBIL /μmol·L ⁻¹	LDL-C /mmol·L ⁻¹	TBIL /μmol·L ⁻¹	TP /g·L ⁻¹
正常(6个月)	-	35.41 ± 4.25	1.03 ± 0.38	1.42 ± 0.53	0.28 ± 0.11	2.23 ± 0.59	64.59 ± 7.03
实验 1	0.86	31.75 ± 3.58	0.97 ± 0.21	1.48 ± 0.23	0.23 ± 0.12	2.27 ± 0.22	59.52 ± 5.42
实验 2	1.71	35.34 ± 3.65	1.09 ± 0.21	1.69 ± 0.12	0.31 ± 0.07	2.60 ± 0.27	66.40 ± 6.02
正常(3个月)	-	32.44 ± 3.14	0.90 ± 0.20	1.96 ± 0.44	0.36 ± 0.08	2.55 ± 0.57	60.56 ± 3.37
实验 3	0.86	28.92 ± 2.81	1.90 ± 0.29	2.12 ± 0.45	0.32 ± 0.08	2.88 ± 0.57	59.14 ± 3.37
实验 4	1.71	30.62 ± 2.29	0.98 ± 0.26	1.94 ± 0.40	0.33 ± 0.13	2.53 ± 0.39	59.71 ± 2.09
实验 5	0.43	34.70 ± 2.73	0.90 ± 0.32	1.95 ± 0.24	0.34 ± 0.09	2.61 ± 0.26	63.05 ± 1.22
正常(1个月)	-	29.82 ± 2.43	0.90 ± 0.32	1.64 ± 0.03	0.37 ± 0.16	2.18 ± 0.10	58.50 ± 3.30
实验 6	1.29	30.64 ± 1.84	0.84 ± 0.15	1.66 ± 0.15	0.36 ± 0.09	2.36 ± 0.18 ¹⁾	61.37 ± 2.50
实验 7	0.43	31.58 ± 1.40	0.81 ± 0.17	1.77 ± 0.17	0.32 ± 0.09	2.37 ± 0.19 ¹⁾	62.34 ± 1.49
实验 8	1.29	30.75 ± 1.48	0.74 ± 0.16	1.16 ± 0.07	0.25 ± 0.08	2.20 ± 0.11	61.41 ± 2.18

注:与正常组(1个月)相比¹⁾P < 0.05(表 5,6 同)。

表 5 淫羊藿对各组雌性大鼠血液生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of Epimedii Folium on blood biochemical indexes of female animals ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

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	DBIL/μmol·L ⁻¹	GGT/U·L ⁻¹
正常(6个月)	-	1.06 ± 0.12	39.32 ± 3.84	43.80 ± 10.60	47.90 ± 15.70	161.60 ± 51.00	1.15 ± 0.25	0.40 ± 0.20
实验 1	0.86	1.03 ± 0.07	39.03 ± 2.67	34.30 ± 24.60	53.50 ± 19.40	178.30 ± 61.40	1.08 ± 0.20	0.40 ± 0.30
实验 2	1.71	1.02 ± 0.14	37.39 ± 7.29	34.20 ± 22.30	77.20 ± 71.60	201.20 ± 105.10	1.08 ± 0.35	0.40 ± 0.20
正常(3个月)	-	1.17 ± 0.10	37.56 ± 3.45	66.56 ± 22.07	37.09 ± 19.27	124.42 ± 48.84	0.82 ± 0.15	0.44 ± 0.31
实验 3	0.86	1.16 ± 0.10	37.78 ± 3.95	54.29 ± 15.82	58.26 ± 49.91	204.38 ± 175.86	0.91 ± 0.21	0.43 ± 0.30
实验 4	1.71	1.08 ± 0.14	38.94 ± 4.39	53.34 ± 22.86	52.46 ± 41.00	226.67 ± 187.78	0.90 ± 0.20	0.56 ± 0.36
实验 5	0.43	1.08 ± 0.15	36.32 ± 5.07	52.81 ± 23.86	37.29 ± 15.41	131.52 ± 33.88	0.71 ± 0.20	0.44 ± 0.31
正常(1个月)	-	1.00 ± 0.04	32.17 ± 2.00	107.10 ± 8.60	30.60 ± 5.30	112.40 ± 22.20	0.64 ± 0.14	0.60 ± 0.30
实验 6	1.29	0.98 ± 0.14	33.02 ± 3.30	103.10 ± 35.70	27.00 ± 4.40	101.60 ± 15.10	0.82 ± 0.12 ¹⁾	1.20 ± 0.50 ¹⁾
实验 7	0.43	1.05 ± 0.06	33.92 ± 0.95	116.90 ± 41.40	29.90 ± 3.80	123.00 ± 13.90	0.81 ± 0.11 ¹⁾	1.00 ± 0.20 ¹⁾
实验 8	1.29	1.05 ± 0.13	32.26 ± 4.31	100.00 ± 12.10	28.90 ± 4.60	99.60 ± 10.10	0.68 ± 0.11	1.00 ± 0.30 ¹⁾

续表 5

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	GLB /g·L ⁻¹	HDL-C /mmol·L ⁻¹	IBIL /μmol·L ⁻¹	LDL-C /mmol·L ⁻¹	TBIL /μmol·L ⁻¹	TP /g·L ⁻¹
正常(6个月)	-	37.39 ± 4.56	1.55 ± 0.21	2.38 ± 0.35	0.38 ± 0.08	3.54 ± 0.52	76.71 ± 7.59
实验 1	0.86	38.24 ± 4.48	1.72 ± 0.30	2.40 ± 0.35	0.41 ± 0.13	3.48 ± 0.50	77.27 ± 6.89
实验 2	1.71	36.43 ± 4.57	1.58 ± 0.40	2.30 ± 0.50	0.33 ± 0.10	3.38 ± 0.75	73.82 ± 11.13
正常(3个月)	-	32.04 ± 2.53	1.33 ± 0.36	2.72 ± 0.28	0.34 ± 0.15	3.54 ± 0.34	69.59 ± 5.32
实验 3	0.86	32.71 ± 2.66	1.59 ± 0.34	2.97 ± 0.37	0.46 ± 0.15	3.88 ± 0.56	70.49 ± 5.96
实验 4	1.71	36.25 ± 3.39	1.66 ± 0.39	3.08 ± 0.49	0.48 ± 0.13	3.98 ± 0.66	75.19 ± 5.54
实验 5	0.43	33.90 ± 3.56	1.35 ± 0.39	2.62 ± 0.38	0.34 ± 0.10	3.33 ± 0.50	70.22 ± 6.92
正常(1个月)	-	32.09 ± 1.29	1.16 ± 0.07	2.07 ± 0.14	0.34 ± 0.03	2.71 ± 0.22	64.26 ± 3.12
实验 6	1.29	33.98 ± 2.74	1.06 ± 0.17	2.02 ± 0.24	0.38 ± 0.13	2.84 ± 0.30	67.00 ± 3.35
实验 7	0.43	32.29 ± 1.80	1.12 ± 0.17	1.95 ± 0.14	0.34 ± 0.07	2.76 ± 0.19	66.20 ± 2.25
实验 8	1.29	30.82 ± 2.04	0.98 ± 0.23	1.89 ± 0.21	0.30 ± 0.07	2.57 ± 0.24	63.08 ± 5.53

表 6 淫羊藿对大鼠肝脏相关指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of Epimedii Folium on liver-related indexes($\bar{x} \pm s, n = 10$)

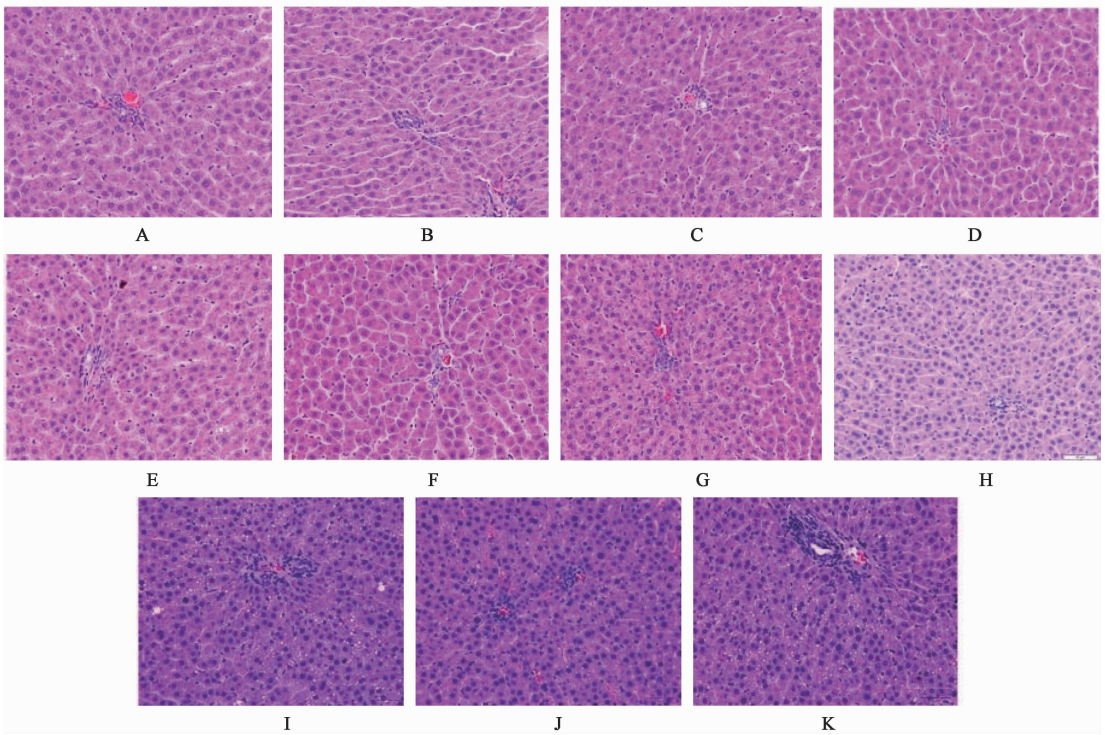
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	雄性				雌性			
		体质量 /g	肝脏质量 /g	脏体比 /g·(100 g) ⁻¹	脏脑比 /g·g ⁻¹	体质量 /g	肝脏质量 /g	脏体比 /g·(100 g) ⁻¹	脏脑比 /g·g ⁻¹
正常(6个月)	-	644.90 ± 47.20	14.21 ± 1.84	2.20 ± 0.18	6.74 ± 0.91	337.00 ± 22.75	8.23 ± 0.95	2.44 ± 0.24	4.14 ± 0.58
实验 1	0.86	598.10 ± 65.94	12.75 ± 1.90	2.13 ± 0.15	5.99 ± 0.70	328.20 ± 20.65	7.61 ± 0.81	2.31 ± 0.16	3.92 ± 0.42
实验 2	1.71	660.70 ± 88.19	14.89 ± 2.43	2.25 ± 0.12	6.77 ± 1.00	349.90 ± 40.83	8.64 ± 1.09	2.47 ± 0.14	4.33 ± 0.63
正常(3个月)	-	515.75 ± 37.13	11.49 ± 1.39	2.25 ± 0.16	5.45 ± 0.61	290.40 ± 14.21	7.45 ± 0.59	2.57 ± 0.27	3.81 ± 0.29
实验 3	0.86	527.70 ± 58.31	12.06 ± 1.96	2.28 ± 0.18	5.87 ± 0.87	289.40 ± 24.27	7.28 ± 0.85	2.52 ± 0.18	3.81 ± 0.48
实验 4	1.71	527.40 ± 30.10	11.97 ± 1.35	2.22 ± 0.16	5.63 ± 0.62	317.00 ± 22.46	7.94 ± 0.55	2.51 ± 0.21	4.06 ± 0.30
实验 5	0.43	503.50 ± 76.55	11.17 ± 2.19	2.21 ± 0.23	5.54 ± 1.04	297.80 ± 26.50	7.43 ± 0.84	2.50 ± 0.26	3.92 ± 0.45
正常(1个月)	-	321.90 ± 41.35	8.83 ± 1.48	2.73 ± 0.18	4.84 ± 0.72	232.70 ± 26.29	6.31 ± 1.07	2.70 ± 0.25	3.49 ± 0.60
实验 6	1.29	369.10 ± 35.68	10.01 ± 1.30 ¹⁾	2.70 ± 0.16	5.23 ± 0.54 ¹⁾	244.22 ± 24.59	7.09 ± 0.71	2.92 ± 0.35	4.02 ± 0.45 ¹⁾
实验 7	0.43	363.20 ± 23.35	9.46 ± 1.05	2.60 ± 0.16	4.85 ± 0.45	243.60 ± 20.90	6.59 ± 0.80	2.70 ± 0.17	3.64 ± 0.47
实验 8	1.29	378.00 ± 21.01	9.82 ± 0.89	2.60 ± 0.13	5.11 ± 0.33	238.50 ± 13.63	7.16 ± 1.07 ¹⁾	3.03 ± 0.62	3.92 ± 0.68

雄性大鼠为 $y = 0.082\ 09\ a_1 a_4 - 0.002\ 07\ a_2 + 0.001\ 16 a_2 a_4 + 0.224\ 94 a_3 - 0.009\ 21 a_3^2 + 0.002\ 83 a_3 a_4 - 0.002\ 55 a_4^2$ ($R^2 = 0.655\ 5$, 均方根误差为 0.074 8), 响应均值(模型因变量平均值) 1.577 2, 参数估计值 0.082 09, -0.002 07, 0.001 16, 0.224 94, -0.009 21, 0.002 83, -0.002 55; 雌性大鼠为 $y = 0.004\ 26 a_1 a_2 - 0.015\ 36 a_2 - 0.000\ 009\ 32 a_2^2 + 0.000\ 121\ 74 a_2 a_3 + 0.007\ 83 a_3 a_4 + 0.083\ 91 a_4 - 0.033\ 48 a_4^2$ ($R^2 = 0.889\ 0$, 均方根误差为 0.086 9), 响应均值 2.280 3, 参数估计值 0.000 426, -0.015 36, -0.000 009 32, 0.000 121 74, 0.007 83, 0.083 91, -0.033 48。可见两方程均在一定程度上

较好地拟合方中各组分基原、工艺、剂量、疗程对大鼠肝脏毒性产生的影响。通过对方程各因素参数估计值分析可得出, 雄性大鼠实验结果所得回归方程, a_1, a_2, a_3 各项均与 a_4 均存在交互作用, 可见 a_4 所代表的疗程因素对研究结果影响较大; 雌性大鼠实验结果所得方程存在工艺与基原、工艺与剂量、疗程与剂量的多种交互作用, 表明 a_2 所代表工艺因素也对研究结果影响较大; 两种性别的大鼠, a_1, a_3, a_4 与 y 值呈正相关性, a_2 与 y 值呈负相关性。

4 讨论

潜在毒性中药的毒性根源常在于药物成分复杂性, 加上其多靶点、多途径的作用特点, 以及用药



A. 正常组(6个月);B. 实验1组;C. 实验2组;D. 正常组(3个月);E. 实验3组;F. 实验4组;G. 实验5组;H. 正常组(1个月);I. 实验6组;J. 实验7组;K. 实验8组(图2同)

图1 淫羊藿对雄性大鼠肝脏损伤程度的影响(HE, ×400)

Fig.1 Effect of Epimedii Folium on degree of liver injury in male rats(HE, ×400)

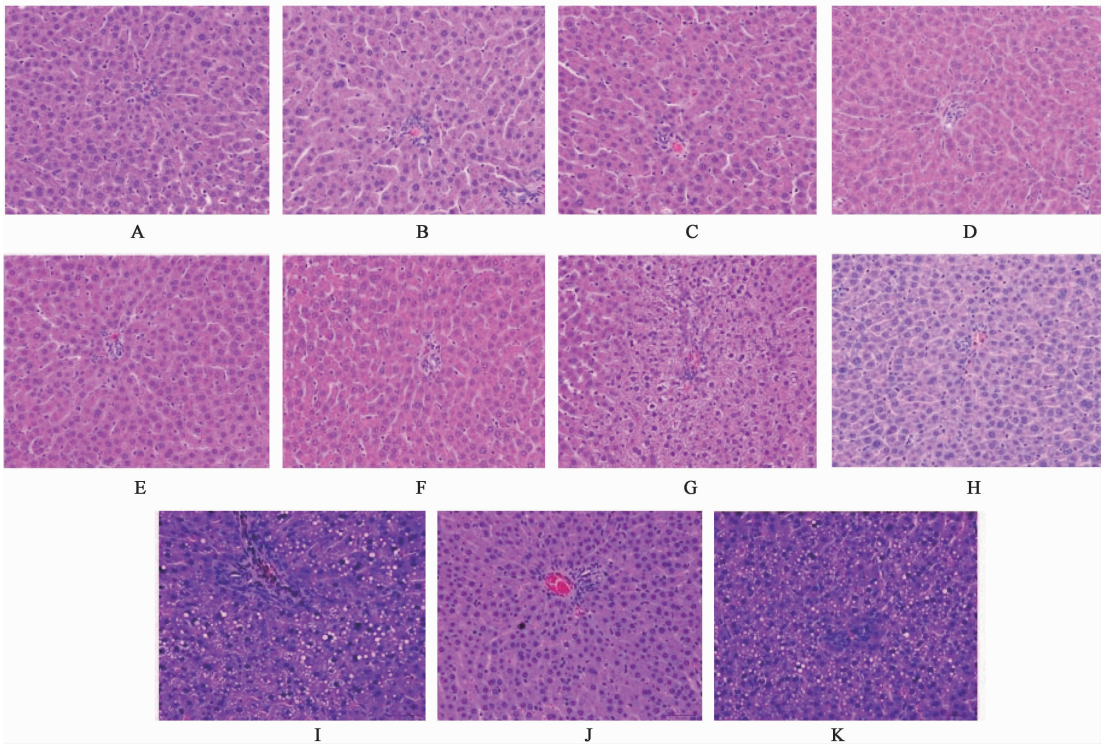


图2 淫羊藿对雌性大鼠肝脏损伤程度的影响(HE, ×400)

Fig.2 Effect of Epimedii Folium on degree of liver injury in female rats(HE, ×400)

个体间的体质差异,使得引起中药潜在毒性的因素多种多样。本研究在实验设计过程中,通过总结

文献及对临床病例分析^[13-15],发现引起中药潜在毒性最主要的药物因素为药物使用基原、制剂工艺、使

表 7 淫羊藿对雄性大鼠肝脏病理评分的影响

Table 7 Effect of Epimedii Folium on liver pathological score of male animals

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	脂肪变性 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) /分	脂肪变性分值比/%				
			0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
正常(6 个月)	-	1.20 ± 0.92	20.00	50.00	20.00	10.00	0
实验 1	0.86	0.70 ± 0.82	50.00	30.00	20.00	0	0
实验 2	1.71	0.60 ± 0.70	50.00	40.00	10.00	0	0
正常(3 个月)	-	0.70 ± 0.10	60.00	10.00	30.00	0	0
实验 3	0.86	1.00 ± 1.05	40.00	30.00	20.00	10.00	0
实验 4	1.71	0.60 ± 0.97	70.00	0	30.00	0	0
实验 5	0.43	0.70 ± 0.95	60.00	10.00	30.00	0	0
正常(1 个月)	-	0.70 ± 0.67	40.00	50.00	10.00	0	0
实验 6	1.29	0.80 ± 0.79	40.00	40.00	20.00	0	0
实验 7	0.43	0.40 ± 0.52	60.00	40.00	0	0	0
实验 8	1.29	0.90 ± 0.99	40.00	40.00	10.00	10.00	0

表 8 淫羊藿对雌性大鼠肝脏病理评分的影响

Table 8 Effect of Epimedii Folium on liver pathological score of female animals($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	脂肪变性 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) /分	脂肪变性分值比/%				
			0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
正常(6 个月)	-	0.30 ± 0.48	70.00	30.00	0	0	0
实验 1	0.86	0.40 ± 0.97	80.00	10.00	0	1.00	0
实验 2	1.71	0.20 ± 0.42	80.00	20.00	0	0	0
正常(3 个月)	-	0.20 ± 0.42	80.00	20.00	0	0	0
实验 3	0.86	0.20 ± 0.42	80.00	20.00	0	0	0
实验 4	1.71	0.40 ± 0.70	70.00	20.00	10.00	0	0
实验 5	0.43	0.70 ± 1.16	70.00	0	20.00	10.00	0
正常(1 个月)	-	0.60 ± 0.84	60.00	20.00	20.00	0	0
实验 6	1.29	0.89 ± 1.17	50.00	10.00	20.00	10.00	0
实验 7	0.43	0.60 ± 0.70	60.00	40.00	0	0	0
实验 8	1.29	1.00 ± 1.33	60.00	0	20.00	20.00	0

用剂量、服用疗程,因此最终确定将这 4 个因素作为均匀设计的考察因素。为了能够全面、系统地对这些因素产生的毒性影响进行评价,在实验检测过程中,本研究既设立了对大鼠整体生理机能的观察指标,又设立了对肝脏功能及毒性具有突出针对性的病理检查项目,从而也确保对药物肝损伤情况进行充分、客观的分析。

由于实验分组中涉及多项考察因素和检测指标,且同时对多因素进行回归分析,因素之间存在错综复杂的交互作用,使得实验结果众多、回归结果分析难度较大,但通过结合以往研究经验与实际情况仍可明确得出,①所研究的实验组中,淫羊藿、柔毛

淫羊藿 2 种基原作为市场中淫羊藿药材最常用的药材基原^[16],造成的肝脏损伤情况相对较小,箭叶淫羊藿对大鼠具有一定影响,而朝鲜淫羊藿和巫山淫羊藿造成肝损伤情况相对较大;②研究药物的毒性随着剂量增加和疗程延长而增强;③雌性大鼠受淫羊藿肝损害的影响较雄性大鼠明显。

随着中医药现代化研究的飞速发展,中医中药在全世界范围的应用得到巨大的推广和广泛的认可,中药安全性问题也更加受到关注,但当前用药安全工作的重点仅放在了对具有明确毒性药物的管控方面,限于对中药毒性机制认识尚不全面,很大程度上忽视了对潜在毒性药物的关注^[17-18],这就造成

潜在毒性中药成为用药安全的真正隐患。因此,对于潜在毒性药物所造成的危害不容小视,在实际应用中同样应当加以重视,更应当加强对潜在毒性中药的毒性研究。因此,本研究在针对淫羊藿潜在肝毒性进行研究的同时,也希望能够提高广大研究者对中药潜在肝毒性的认识,增进大众对中药潜在毒性的关注度,为相关潜在毒性药物研究提供有效借鉴。

综上所述,本研究在充分运用均匀实验设计的基础上,开展淫羊藿多因素潜在肝毒性大鼠实验研究,通过多项肝脏病理相关指标检测研究,结合多远回归数学模型分析结果,证实了朝鲜淫羊藿及巫山淫羊藿存在潜在肝毒性的情况,对造成肝脏毒性的原因进行了初步探索,提升对淫羊藿潜在肝毒性的科学认识,从而为淫羊藿临床安全、合理应用及相关药物制剂的研发提供参考依据,并为后续开展淫羊藿潜在肝毒性的毒性物质基础和毒性作用机制的深入研究奠定坚实基础。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:327-328,167.

[2] 贺琴,谭华炳. 淫羊藿致 HBV 携带者发生肝脏损害 1 例[J]. 中国肝脏病杂志:电子版,2015,7(1):113-114.

[3] 周健强. 雄激素治疗贫血并发肝功能损害的临床观察[J]. 临床荟萃,2004,19(4):211-212.

[4] 国家食品药品监督管理局. 药品不良反应信息通报:警惕壮骨关节丸引起的肝损害[EB/OL]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0078/32614.html>.

[5] 国家食品药品监督管理局. 药品不良反应信息通报:警惕仙灵骨葆口服制剂引起的肝损伤风险[EB/OL]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0078/>

167184.html.

[6] 王停,周刚,赵保胜,等. 中药新药研发策略分析[J]. 中国新药杂志,2017,26(8):865-871.

[7] 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.

[8] 马路,刘剑刚,史大卓. 均匀设计在中医药研究中的应用[J]. 中国中西医结合杂志,2005,25(3):278-281.

[9] 俞腾飞,李卫民,孟宪纾,等. 均匀设计在中药药理试验中的应用[J]. 中国中药杂志,1991,16(3):168-170,192.

[10] 马利,沈绍武,蔡晓红. 多元统计方法在中医药研究中的应用[J]. 中医药信息,2009,26(1):46-48.

[11] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京:科学出版社,1994:13.

[12] 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):154-159.

[13] 吴艳,马明华,年华. 中药不良反应产生原因以及临床对策综合分析[J]. 世界中西医结合杂志,2016,11(3):360-363.

[14] 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.

[15] 刘莹,汪刚,仲青香,等. 中药制剂肝毒性的影响因素探析[J]. 中国中药杂志,2017,42(16):3049-3055.

[16] 郭宝林,黄文华,孙娥,等. 淫羊藿药材和饮片市场调查[J]. 中国中药杂志,2010,35(13):1687-1690.

[17] 张帅男,李煦照,卢芳,等. 中药毒性研究的新方向“无毒”药物潜在毒性的发现[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2015,17(3):627-632.

[18] 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.

[责任编辑 张丰丰]