

筋骨片对动物的急性毒性和长期毒性研究

欧莉^{1*}, 赵鹏¹, 程虎印¹, 郭建生²

(1. 陕西中医学院药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410007)

[摘要] 目的: 观察筋骨片对小鼠的急性毒性和对大鼠的长期毒性, 为临床用药的安全剂量提供参考。方法: 急性毒性试验: 昆明种小鼠 40 只, 随机分成给药组和对照组, 采用最大给药量法测定小鼠口服筋骨片最大耐受量; 长期毒性试验: SD 大鼠 120 只, 随机分成 4 组, 采用 3 个剂量(按生药量计为 61.4, 30.7, 15.3 g/kg) ig 大鼠。每天给药 1 次, 连续 ig 6 个月, 观察大鼠的一般情况, 检测血常规及血液生化学、组织病理变化及停药 1 个月时上述指标的变化。结果: 小鼠口服筋骨片的最大耐受量按生药计为 842 g/kg, 相当于成人临床每日口服剂量的 1 477 倍。大鼠连续给药 6 个月后筋骨片各剂量组各项指标未见明显异常改变; 2 只大鼠的肝、肾细胞有轻度水样变性, 1 只大鼠的细小支气管周围淋巴细胞浸润。停药 1 个月后, 大鼠体重、摄食量、行为活动、血象、重要器官脏器系数均正常, 病理学检查, 各组各脏器均未发现明显的改变。结论: 筋骨片在规定剂量下服用是安全可靠的。

[关键词] 筋骨片; 急性毒性; 小鼠; 长期毒性; 大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0149-03

筋骨片主要由延胡索、三七、黄芪、全蝎、牛膝、千斤拔等十几味中药组成而制成的片剂, 具有活血舒筋, 通脉镇痛, 补肾健骨的作用, 在医院及民间应用已有近 20 年, 用于治疗骨性关节炎筋脉瘀滞, 如关节疼痛、肿胀, 活动不利, 肢体麻木, 腰膝酸痛等。先期动物实验研究表明, 筋骨片能明显改善大鼠及兔退行性骨关节炎的症状与各项相关指标^[1]; 显著改善急性血瘀大鼠血液黏度、血浆黏度和红细胞压积的异常^[2]; 抑制二甲苯所致小鼠耳廓肿胀与大鼠角叉菜胶所致足跖肿胀, 促进小鼠血清溶血素抗体生成, 提高小鼠碳粒廓清指数^[3]。为给临床用药提供安全的实验依据, 对筋骨片进行了毒理学研究, 观察该药的急性毒性及长期毒性反应。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级昆明种小鼠 40 只, 18 ~ 22 g, 雌雄各半, 健康状况良好, 实验动物质量合格证号 scxk(湘) 2006-0001 号; 清洁级 SD 大鼠 160 只, 50 ~ 90 g, 雌雄各半, 实验动物质量合格证号 scxk(湘) 2006-0003 号, 均由长沙市开福区东创实验动物科技服务部提供。动物实验室环境温度 20 ~ 25 ℃, 湿度: 40% ~ 55%。

1.1.2 药物 由延胡索、三七、黄芪、牛膝、千斤拔、全蝎、菝葜等药经水提醇沉后浓缩干燥制成筋骨片干浸膏, 为棕褐色粉末, 每 1 g 干浸膏含生药 12.27 g, 由湖南中医药研究所提供, 批号 20060104。

1.1.3 仪器 AU2700 型全自动生化分析仪(日本 Olympus 公司); BC-3000 型全自动血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); BX-41 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); ES-1100 型电子天平(湖南省长沙市湘平科技发展有限公司)。

1.1.4 试剂 天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(T-BIL)、肌酐(Crea)、尿素氮(BUN)、血糖(GLU)、总胆固醇(T-CHO)试剂盒均由上海申能博彩生物科技有限公司提供。全自动血球计数生化仪试剂由深圳生物技术迈瑞生物技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 小鼠口服急性毒性试验 经预试验, 因受药物的浓度和体积限制, 无法测出筋骨片口服给药的半数致死量(LD₅₀), 故进行最大给药量试验^[4]。取小鼠 40 只, 雌雄各半, 按文献方法[5]实验禁食禁水, 随机分为空白对照组和筋骨片组, 每组 20 只, 雌雄各半。禁食不禁水 12 h, 然后以最大给药剂量(0.4 mL·10 g⁻¹体重), 用 10.519 g 生药 mL⁻¹的筋骨片药液(最大浓度) ig 2 次, 每次间隔 8 h。空白对照组 ig 给予同样剂量的蒸馏水。连续 14 d 观察动

[收稿日期] 2010-01-17

[作者简介] * 欧莉, 女, 硕士, 讲师, 从事中药药效毒理研究,

Tel: 13891472452, E-mail: oli999@sina.com

物一般状态、毛色、饮食、活动等指标的变化及死亡情况,称量小鼠给药前和给药后第 14 d 的体重。实验结束时处死动物,肉眼观察主要脏器组织有无异常,并计算小鼠口服筋骨片的最大耐受剂量。

1.2.2 大鼠长期毒性试验 按文献[6]方法,实验前将大鼠在动物实验室饲养观察 1 周,包括外观体征、行为活动、腺体分泌、呼吸、粪便性状、食量、体重等。取大鼠 120 只,雌雄各半,按性别和体重随机分为 4 组,每组 30 只。筋骨片各组给药剂量分别为 61.4, 30.7, 15.3 g 生药·kg⁻¹ (分别为临床成人用量的 108, 54, 27 倍),给药容量为 10 mL/kg 体重,空白对照组给予同样体积的蒸馏水。每天 ig 给药 1 次,连续 6 个月,每周称体重 1 次并调整剂量。观察给药后动物一般状态、毛色、体重、饮食、活动等指标的变化。给药期第 3 个月末、6 个月末和停药后 1 个月末每组分别随机处死 10 只大鼠,雌雄各半,测定血液学和生化指标。解剖处死大鼠,用肉眼观察各主要脏器有无病变,同时取脑、胸腺、心脏、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏、肾上腺、卵巢、子宫、睾丸、前列腺、甲状腺等称重,并计算脏器系数,用 10% 的甲醛溶液浸泡固定,作常规病理检查。

1.3 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件对数据进行分析,统计方法采用 *t* 检

验、方差分析。

2 结果

2.1 小鼠急性毒性试验 小鼠在每次 ig 给药后,出现少动,不进食症状,粪便带药色,约 3~4 h 恢复正常。连续观察 14 d,各组动物饮食、活动、生长发育、二便均正常,精神状态良好,毛色光滑,各组均未出现死亡动物。处死动物后肉眼观察各脏器未见病理学形态改变。测得小鼠对筋骨片的最大耐受量为 842 g 生药·kg⁻¹,相当于 60 kg 体重成人临床每日用量(0.57 g 生药·kg⁻¹)的 1 477 倍。小鼠体重给药前后组间比较,差异无统计学意义。

2.2 大鼠长期毒性试验

2.2.1 对大鼠一般状况的影响 给药 6 个月及停药 1 个月期间,动物的行为活动、饮食、粪便等均未见异常,未见明显毒性反应,也未见大鼠死亡。各给药组动物在各时间的体重分别与空白对照组动物体重比较,组间差异均无统计学意义。

2.2.2 对血液学的影响 筋骨片连续给药 3 个月、6 个月及停药 1 个月,各给药组血液学各项指标与空白对照组比较,差异均无统计学意义,并且均在正常值范围内。连续给药 3 个月、6 个月与停药 1 个月前后各组间比较均无显著性差异。见表 1。

表 1 筋骨片对长期毒性试验大鼠血液学的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	测定时间	红细胞/ $n/10^{12} \cdot L^{-1}$	血小板/ $n/10^9 \cdot L^{-1}$	血红蛋白/ $g \cdot L^{-1}$	白细胞/ $10^9 \cdot L^{-1}$	淋巴细胞/%	单核细胞/%
空白	给药 3 个月	9.00 ± 0.54	848.1 ± 123.1	144.6 ± 13.56	8.66 ± 2.61	56.44 ± 11.21	20.11 ± 7.72
	给药 6 个月	8.53 ± 0.61	861.1 ± 164.7	158.5 ± 6.79	8.17 ± 1.11	59.76 ± 6.72	18.23 ± 5.06
	停药 1 个月	8.57 ± 0.70	830.0 ± 142.0	159.0 ± 7.40	7.71 ± 1.74	62.6 ± 3.14	22.80 ± 2.08
低剂量	给药 3 个月	8.31 ± 0.93	873.6 ± 155.8	135.7 ± 13.33	7.51 ± 1.40	66.43 ± 7.40 ¹⁾	22.88 ± 6.95
	给药 6 个月	8.66 ± 0.51	816.3 ± 136.4	158.9 ± 8.4	7.72 ± 1.82	57.83 ± 5.40	21.86 ± 4.27
	停药 1 个月	9.10 ± 0.51	802.0 ± 134.0	161.0 ± 5.60	7.32 ± 1.95	60.3 ± 4.22	24.50 ± 5.13
中剂量	给药 3 个月	8.35 ± 1.01	762.2 ± 101.5	138.6 ± 15.68	7.12 ± 1.99	61.93 ± 6.14	24.91 ± 4.60
	给药 6 个月	7.97 ± 1.52	732.2 ± 76.4	149.1 ± 27.59	7.25 ± 2.15	57.97 ± 7.74	18.18 ± 3.98
	停药 1 个月	9.00 ± 0.40	759.0 ± 172.0	164.0 ± 6.20	7.17 ± 1.05	59.9 ± 3.77	25.60 ± 2.24
高剂量	给药 3 个月	8.90 ± 0.70	756.3 ± 157.5	150.0 ± 7.31	7.02 ± 1.77	62.11 ± 5.69	24.62 ± 5.13
	给药 6 个月	8.64 ± 1.19	770.6 ± 101.8	145.9 ± 21.25	7.29 ± 0.97	62.13 ± 5.65	18.04 ± 3.90
	停药 1 个月	8.22 ± 0.41	789.0 ± 116.0	167.0 ± 5.88	7.05 ± 1.85	59.2 ± 4.89	26.50 ± 5.15

注:与空白组比较,¹⁾ $P < 0.01$

2.2.3 对血液生化指标的影响 筋骨片连续给药 3 个月、6 个月及停药 1 个月,各给药组血液生化各项指标与空白对照组比较,差异均无统计学意义。连续给药 3 个月、6 个月与停药 1 个月前后各组间比较均无显著性差异。见表 3, 4。

2.2.4 对主要脏器系数的影响 连续 ig 筋骨片 3 个月、6 个月及停药 1 个月,3 个剂量组脏器系数

与空白对照组比较均无差异,各剂量组间比较均无显著性差异。

2.2.5 对重要器官组织病理形态的影响 连续给药 6 个月时,病理观察结果显示高剂量组 2 只大鼠的肝、肾细胞有轻度水样变性,1 只大鼠的细小支气管周围淋巴细胞浸润。由于这些病理表现缺少药物剂量依赖关系,空白对照组和筋骨片各组之间差异

无统计学意义, 故认为与筋骨片的毒性作用无关, 考虑系动物自身性病变或其他原因所致。其余各脏器

未见明显异常改变。停药 1 个月后, 各给药剂量组大鼠脏器组织病理切片未发现病理改变。

表 2 筋骨片对长期毒性试验大鼠生化指标的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	测定时间	BUN/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Crea/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	GLU/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	TP/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	T-CHO/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	TBL/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	给药3个月	6.00 \pm 1.25	83.09 \pm 5.44	4.55 \pm 1.41	67.32 \pm 8.97	1.69 \pm 0.53	1.15 \pm 0.42
	给药6个月	6.21 \pm 1.02	83.9 \pm 11.18	5.30 \pm 0.90	79.44 \pm 7.04	2.10 \pm 0.31	0.81 \pm 0.47
	停药1个月	5.29 \pm 0.71	90.8 \pm 12.2	4.98 \pm 1.10	78.24 \pm 5.08	2.10 \pm 0.52	0.97 \pm 0.42
低剂量	给药3个月	5.20 \pm 0.77	87.13 \pm 5.37	5.24 \pm 1.22	71.73 \pm 2.69	1.76 \pm 0.22	1.19 \pm 0.40
	给药6个月	6.74 \pm 1.06	92.5 \pm 7.98	5.38 \pm 0.85	82.14 \pm 4.85	1.89 \pm 0.48	1.13 \pm 0.74
	停药1个月	4.73 \pm 0.42	90.3 \pm 4.4	4.77 \pm 0.38	75.75 \pm 3.89	1.96 \pm 0.35	0.56 \pm 0.21
中剂量	给药3个月	5.27 \pm 0.85	86.52 \pm 4.28	5.25 \pm 0.49	72.02 \pm 1.99	1.85 \pm 0.16	1.04 \pm 0.40
	给药6个月	5.94 \pm 0.90	87.2 \pm 4.83	4.67 \pm 0.73	80.07 \pm 3.19	2.11 \pm 0.53	0.70 \pm 0.22
	停药1个月	4.94 \pm 0.66	85.8 \pm 4.2	5.68 \pm 0.79	73.48 \pm 2.24	2.46 \pm 0.32	0.93 \pm 0.30
高剂量	给药3个月	6.74 \pm 2.04	86.65 \pm 5.75	5.69 \pm 1.52	72.07 \pm 3.90	1.83 \pm 0.23	1.22 \pm 0.48
	给药6个月	6.90 \pm 0.56	87.4 \pm 9.07	4.05 \pm 1.68	85.25 \pm 3.03	1.94 \pm 0.61	1.41 \pm 2.38
	停药1个月	5.00 \pm 0.84	86.0 \pm 10.0	5.20 \pm 0.39	73.51 \pm 3.12	2.15 \pm 0.36	0.82 \pm 0.40

表 3 筋骨片对长期毒性试验大鼠生化指标的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	测定时间	ALB/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	球蛋白/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AIP/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	给药 3 个月	35.47 \pm 5.98	36.85 \pm 7.43	45.7 \pm 7.28	185.59 \pm 46.79	160.85 \pm 34.83
	给药 6 个月	35.25 \pm 2.75	44.19 \pm 4.85	56.11 \pm 9.26	216.41 \pm 19.93	137.40 \pm 29.39
	停药 1 个月	36.10 \pm 2.08	42.14 \pm 4.36	74.71 \pm 25.55	276.4 \pm 128.4	187.23 \pm 20.64
低剂量	给药 3 个月	41.06 \pm 3.84	36.67 \pm 4.51	48.35 \pm 7.53	180.35 \pm 28.56	184.93 \pm 41.57
	给药 6 个月	33.26 \pm 4.64	47.88 \pm 7.84	61.29 \pm 22.49	205.8 \pm 58.63	124.92 \pm 56.02
	停药 1 个月	34.5 \pm 1.31	38.81 \pm 1.81	68.77 \pm 18.69	196.4 \pm 22.61	185.72 \pm 12.31
中剂量	给药 3 个月	37.01 \pm 1.83	35.01 \pm 2.50	45.11 \pm 7.76	150.07 \pm 25.66	184.60 \pm 38.76
	给药 6 个月	35.37 \pm 1.67	44.7 \pm 3.41	65.78 \pm 22.04	232.33 \pm 35.16	114.94 \pm 36.46
	停药 1 个月	34.2 \pm 1.89	39.3 \pm 1.64	55.92 \pm 9.84	209.9 \pm 70.42	172.71 \pm 19.78
高剂量	给药 3 个月	36.05 \pm 2.53	36.02 \pm 2.72	42.21 \pm 7.52	168.94 \pm 39.27	173.85 \pm 32.46
	给药 6 个月	37.08 \pm 1.87	45.17 \pm 3.29	53.26 \pm 15.44	201.99 \pm 28.25	116.9 \pm 33.25
	停药 1 个月	35.0 \pm 2.58	40.72 \pm 2.06	61.49 \pm 11.33	179.1 \pm 35.83	171.7 \pm 17.9

3 讨论

筋骨片在医院及民间应用已有近 20 年, 主要由延胡索、三七、黄芪、全蝎、牛膝、千斤拔等十几味中药组成而制成, 具有活血舒筋, 通脉镇痛, 补肾健骨的作用。为确保临床用药的安全性, 本选题通过精细、严密的动物实验研究, 观察该药的急性毒性及长期毒性反应。

该药的临床给药途径为口服, 故实验选择灌胃给药。急性毒性试验中, 预实验未测出筋骨片口服给药的半数致死量, 给小鼠 ig 筋骨片的最大耐受量可达 842 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (生药量), 相当于成人(按 60 kg 计)临床每日口服剂量的 1 477 倍, 且动物的行为活动、饮食、粪便等均未见异常, 未见明显毒性反应, 无动物死亡。提示筋骨片对机体无明显急性毒副作用。长期毒性试验中, 3 个剂量组的体重、血液学及生化指标、主要脏器系数等均在正常范围内, 未发现

与受试药物相关的指标改变, 表明筋骨片临床剂量口服安全, 无蓄积毒性。

[参考文献]

- [1] 郭建生, 欧莉, 周军, 等. 筋骨片对骨性关节炎大鼠模型的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(3): 232.
- [2] 郭建生, 欧莉, 周军, 等. 筋骨片对兔骨性关节炎影响的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(3): 48.
- [3] 欧莉, 郭建生. 筋骨片活血化瘀作用研究[J]. 医药导报, 2008, 27(5): 513.
- [4] [Z] GPT2-1. 中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则[S]. 2005.
- [5] 王瑞, 王苏会, 闫荟, 等. 四珍力维胶囊对小鼠的急性毒性及耐缺氧、抗疲劳作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(7): 86.
- [6] [Z] GPT3-1. 中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则[S]. 2005.