

淫羊藿总黄酮的长期毒性研究

李冬梅*, 尹晓飞, 刘晋华, 蔡大伟

(中国人民解放军第 251 医院, 河北 张家口 075000)

[摘要] 目的: 考察淫羊藿总黄酮的长期毒性。方法: Wistar 大鼠灌胃(ig)淫羊藿总黄酮 1.0、2.0 和 4.0 g·kg⁻¹, 1 次·d⁻¹, 连续 12 周, 逐日观察动物行为、外观及大小便, 每 2 周测食物消耗量 1 次, 每周及停药后 2 周称体重 1 次, 给药 12 周后和停药 2 周后各查每组 10 只大鼠血液学指标、血生化指标, 并测脏器系数, 同时对主要脏器进行病理学检查。结果: 所查各项指标与对照组比较均无明显异常。结论: 淫羊藿总黄酮无明显的长期毒性。

[关键词] 淫羊藿总黄酮; 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(2008)07-0060-03

淫羊藿总黄酮是从小蘗科淫羊藿(拉丁学名: *Herba Epimedii*) 茎叶中提取的淫羊藿苷和淫羊藿次苷等多种黄酮类成分的总称, 具有促进免疫功能、参与骨代谢、抗肿瘤、增强心血管活动、补肾壮阳、延缓衰老^[1]等多方面的药理作用, 为初步评价其安全性, 本实验研究淫羊藿总黄酮对大鼠的长期毒性, 为临床应用提供实验数据。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠, ♀ ♂各半, (6~8) 周龄, 体重(80~120) g, 清洁级, 购自解放军总医院医学实验动物中心, 动物合格证号: 医动字第 013081 号。动物受试环境: 解放军第 251 医院实验动物中心, 医学实验动物环境二级标准, 合格证号: 军医动字第 SYXK(军) 2006-013 号。饲料、饮水、垫料均符合《北京市实验动物质量控制标准》。

1.2 药物 淫羊藿总黄酮样品, 由我院制剂室提取纯化(总黄酮含量 78.24%)。

1.3 试验仪器 雅培 3700 全自动血球分析仪, 日立-7060 全自动生化分析仪。

2 方法

2.1 淫羊藿总黄酮的剂量及实验周期 淫羊藿总黄酮拟定成人 60 kg 口服有效剂量为每日 1.5 g, 30 d 为 1 个疗程。初步实验表明, 大鼠灌服的有效剂量为 0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹, 以此 2、4、8 倍作为长期毒性试验

的小、中、大剂量。确定长期毒性的小、中、大 3 个剂量分别为 1.0、2.0 和 4.0 g·kg⁻¹, 分别相当于成人临床拟用日剂量 0.025 g·kg⁻¹ 的 40、80 和 160 倍。连续给药时间为 12 周。

2.2 实验方法^[2-4] 取 Wistar 大鼠 80 只, 按体重性别随机分成对照组和淫羊藿总黄酮大、中、小剂量组 4 组, 每组 20 只, 剂量如上述, 口服给药, 给药容积 10 mL·kg⁻¹, 空白对照组给予同容积蒸馏水。1 次/d, 连续给药 12 周后各组处死一半动物, 测定各项指标。其余动物停止给药, 在同样条件下饲养 2 周后处死, 观察各项指标恢复情况。

2.3 检查项目

2.3.1 一般观察 实验期间逐日观察动物的外观、行为、粪便等。

2.3.2 食物消耗量 每 2 周测食物消耗量 1 次, 观察其增长趋势。

2.3.3 体重 每周称体重 1 次, 观察其变化。

2.3.4 血液学指标 末次用药后 24 h, 禁食 16 h 后断尾采血, 雅培 3700 全自动血球分析仪检测血液红细胞、白细胞及其分类、血小板, 试管法测定凝血时间。停药 2 周后做同样处理。

2.3.5 血液生化指标 动物用乙醚浅麻醉, 采血分离血清, 日立-7060 全自动生化分析仪检测 AST、ALT、ALP、TP、ALB、BUN、TBIL、Glu、CRE、CHO。

2.3.6 系统尸解和脏器系数 动物分期处死后, 肉眼检查全身各脏器, 并取心、肝、脾、肺、肾、脑、胸腺、肾上腺、胰腺、卵巢、子宫、睾丸、前列腺, 置滤纸上吸去血液, 称湿重(单位: g), 计算脏器系数, 脏器系数

[收稿日期] 2007-07-30

[通讯作者] * 李冬梅, Tel: 13932360206; E-mail: yxf790724@163.com

= (脏器重量/体重) × 100%。

2.3.7 病理组织学检查 各脏器用 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片 HE 染色、光镜检查。

2.4 统计学分析 数据均以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用组间 *t* 检验。

3 结果

3.1 一般体征 给药期间, 对照组和淫羊藿总黄酮大、中、小 3 个剂量组大鼠的一般体征、行为活动、皮毛色泽、大小便均未见明显异常。

3.2 体重和食物消耗量的变化 给药期间, 动物食物消耗量及体重持续增长, 3 个剂量组与对照组比较均无显著性差异(见表 1, 2)。表明连续 ig 淫羊藿总黄酮对大鼠体重增长无明显影响。

3.3 对血液学指标的影响 给药 12 周后和停药 2 周后 3 个剂量组的红细胞数、血红蛋白、白细胞数及其分类、血小板数和凝血时间与对照组比较均无显著性差异(见表 3)。

表 1 淫羊藿总黄酮 ig 后对大鼠食物消耗量的影响($n = 20, g \cdot d^{-1}$)

用药时间(周)	对照组	大剂量组	中剂量组	小剂量组
0	14 ± 2	13 ± 4	13 ± 3	12 ± 4
2	19 ± 5	18 ± 3	18 ± 3	17 ± 4
4	21 ± 3	22 ± 4	21 ± 3	20 ± 4
6	24 ± 4	23 ± 6	24 ± 4	23 ± 5
8	29 ± 5	26 ± 4	27 ± 5	26 ± 6
10	31 ± 4	27 ± 5	29 ± 5	29 ± 7
12	32 ± 6	29 ± 3	31 ± 5	32 ± 6
停药后 2 周	34 ± 6	32 ± 5	33 ± 6	34 ± 5

注: 各组与同期对照组比较 $P > 0.05$ (下同)

表 3 淫羊藿总黄酮对大鼠血液学指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	用药 12 周后				停药 2 周后			
	RBC ($10^{12} \cdot L^{-1}$)	Hb ($g \cdot L^{-1}$)	WBC ($10^9 \cdot L^{-1}$)	中性 WBC (%)	RBC ($10^{12} \cdot L^{-1}$)	Hb ($g \cdot L^{-1}$)	WBC ($10^9 \cdot L^{-1}$)	中性 WBC (%)
对照组	4.92 ± 0.40	130 ± 9	10.0 ± 2.1	17 ± 5	5.75 ± 0.41	151 ± 12	9.7 ± 3.6	19 ± 6
大剂量	5.30 ± 0.51	139 ± 12	9.6 ± 3.4	21 ± 5	5.72 ± 0.45	150 ± 10	8.2 ± 2.8	18 ± 5
中剂量	5.12 ± 0.52	135 ± 12	11.0 ± 2.0	21 ± 6	5.66 ± 0.26	148 ± 8	8.3 ± 1.9	17 ± 2
小剂量	4.93 ± 0.39	131 ± 8	11.8 ± 4.5	22 ± 6	5.69 ± 0.23	147 ± 7	8.4 ± 2.0	17 ± 3

组别	用药 12 周后				停药 2 周后			
	淋巴细胞 (%)	单核细胞 (%)	血小板 ($10^9 \cdot L^{-1}$)	凝血时间 (min)	淋巴细胞 (%)	单核细胞 (%)	血小板 ($10^9 \cdot L^{-1}$)	凝血时间 (min)
对照组	84 ± 5	0.2 ± 0.4	302 ± 56	4.3 ± 1.7	82 ± 6	0.5 ± 0.5	337 ± 46	3.3 ± 1.5
大剂量	77 ± 5	0.8 ± 0.5	327 ± 50	4.1 ± 1.6	79 ± 5	0.6 ± 0.5	336 ± 40	3.1 ± 1.6
中剂量	79 ± 2	0.6 ± 0.5	328 ± 46	4.0 ± 1.5	82 ± 3	0.4 ± 0.7	328 ± 36	4.0 ± 2.2
小剂量	78 ± 6	0.6 ± 0.6	332 ± 52	3.8 ± 2.3	80 ± 5	0.6 ± 0.6	331 ± 42	3.5 ± 1.5

表 2 淫羊藿总黄酮 ig 后及停药后 2 周对大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, g$)

用药时间(周)	n	对照组	大剂量组	中剂量组	小剂量组
0	20	107 ± 7	109 ± 9	111 ± 6	108 ± 8
1	20	130 ± 12	135 ± 15	129 ± 13	132 ± 23
2	20	165 ± 19	163 ± 21	145 ± 19	163 ± 28
3	20	180 ± 17	174 ± 19	162 ± 23	175 ± 30
4	20	198 ± 23	197 ± 21	183 ± 26	195 ± 27
5	20	205 ± 21	203 ± 23	197 ± 25	223 ± 31
6	20	213 ± 28	215 ± 31	223 ± 31	243 ± 32
7	20	233 ± 21	229 ± 35	238 ± 16	245 ± 31
8	20	238 ± 25	236 ± 29	247 ± 18	261 ± 29
9	20	246 ± 25	242 ± 26	256 ± 23	273 ± 31
10	20	261 ± 25	249 ± 28	267 ± 19	268 ± 43
11	20	271 ± 33	253 ± 31	271 ± 18	276 ± 32
12	20	275 ± 35	264 ± 29	284 ± 17	273 ± 29
停药 2 周	10	295 ± 39	289 ± 29	293 ± 29	293 ± 34

3.4 对血液生化指标的影响 给药 12 周后和停药 2 周后, 淫羊藿总黄酮 3 个剂量组的 10 项生化指标 ALT、AST、ALP、TRIL、TP、ALB、CHO、BUN、CRE、GLU 与对照组比较均无显著性差异($P > 0.05$)。提示淫羊藿总黄酮对大白鼠血液生化指标无明显影响(见表 4)。

3.5 对系统尸解和脏器系数的影响 肉眼观察, 未见各脏器有明显异常。给药 12 周后和停药 2 周后 3 个剂量组的脏器系数与对照组比较均无明显差异(见表 5)。

表 4 淫羊藿总黄酮对大鼠血液生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

指标	用药 12 周后				停药 2 周后			
	对照组	大剂量	中剂量	小剂量	对照组	大剂量	中剂量	小剂量
ALT/($u \cdot L^{-1}$)	54.0 ± 19.6	62.5 ± 15.6	53.0 ± 20.1	55.5 ± 18.1	55.2 ± 19.1	52.5 ± 12.6	63.0 ± 20.2	59.8 ± 19.0
AST/($u \cdot L^{-1}$)	177 ± 55.0	183 ± 51.3	179 ± 52.0	180 ± 45.3	237 ± 58.2	243 ± 50.3	279 ± 52.3	260 ± 45.2
ALP/($u \cdot L^{-1}$)	62.7 ± 28.3	68.2 ± 22.3	64.1 ± 22.3	63.6 ± 22.4	82.7 ± 28.0	78.2 ± 22.3	74.1 ± 20.4	73.6 ± 27.0
TBIL/($\mu mol \cdot L^{-1}$)	6.50 ± 1.2	7.55 ± 1.7	7.20 ± 1.4	6.90 ± 1.40	9.11 ± 1.3	9.52 ± 1.7	9.20 ± 1.3	8.90 ± 1.4
TP/($g \cdot L^{-1}$)	67.5 ± 2.6	68.6 ± 2.2	66.4 ± 2.0	66.1 ± 2.4	60.2 ± 2.8	58.4 ± 2.0	56.4 ± 2.7	62.1 ± 1.9
ALB/($g \cdot L^{-1}$)	31.2 ± 3.3	33.2 ± 3.8	32.3 ± 1.8	30.2 ± 2.8	26.3 ± 3.0	25.2 ± 2.5	26.3 ± 1.6	28.2 ± 2.5
Glu/($mmol \cdot L^{-1}$)	2.58 ± 1.2	3.00 ± 1.3	3.21 ± 1.3	2.88 ± 1.2	4.00 ± 1.6	3.80 ± 1.4	3.91 ± 1.5	3.88 ± 1.4
CHO/($mmol \cdot L^{-1}$)	2.51 ± 0.7	2.63 ± 0.5	2.57 ± 0.6	2.81 ± 0.9	1.86 ± 0.6	1.63 ± 0.3	1.57 ± 0.3	1.51 ± 0.6
BUN/($mmol \cdot L^{-1}$)	6.00 ± 0.77	6.30 ± 0.53	6.02 ± 0.87	6.14 ± 0.87	8.60 ± 1.67	8.30 ± 1.53	7.02 ± 1.6	8.14 ± 1.3
CRE/($\mu mol \cdot L^{-1}$)	51.3 ± 2.5	55.7 ± 3.4	58.3 ± 2.0	55.1 ± 2.2	45.2 ± 2.1	45.7 ± 3.8	48.3 ± 5.1	45.1 ± 4.1

表 5 淫羊藿总黄酮对大鼠脏器系数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10, \%$)

脏器	用药 12 周后				停药 2 周后			
	对照组	大剂量	中剂量	小剂量	对照组	大剂量	中剂量	小剂量
心	0.36 ± 0.06	0.37 ± 0.05	0.36 ± 0.03	0.37 ± 0.05	0.33 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.05
肝	3.66 ± 0.60	3.42 ± 0.31	3.50 ± 0.28	3.47 ± 0.35	3.38 ± 0.51	3.52 ± 0.60	3.56 ± 0.65	3.42 ± 0.63
脾	0.36 ± 0.10	0.33 ± 0.08	0.34 ± 0.05	0.36 ± 0.07	0.36 ± 0.06	0.32 ± 0.08	0.34 ± 0.09	0.33 ± 0.05
肺	0.68 ± 0.15	0.72 ± 0.12	0.74 ± 0.11	0.70 ± 0.13	0.69 ± 0.12	0.73 ± 0.15	0.72 ± 0.10	0.75 ± 0.14
肾	0.80 ± 0.10	0.78 ± 0.07	0.78 ± 0.08	0.80 ± 0.05	0.75 ± 0.05	0.73 ± 0.08	0.74 ± 0.06	0.76 ± 0.09
脑	0.64 ± 0.18	0.66 ± 0.10	0.67 ± 0.12	0.68 ± 0.11	0.62 ± 0.14	0.65 ± 0.10	0.64 ± 0.18	0.67 ± 0.15
肾上腺	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
胸腺	0.08 ± 0.03	0.09 ± 0.06	0.07 ± 0.04	0.10 ± 0.05	0.10 ± 0.05	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.14 ± 0.04
胰腺	0.51 ± 0.20	0.53 ± 0.12	0.50 ± 0.14	0.49 ± 0.16	0.48 ± 0.13	0.47 ± 0.13	0.50 ± 0.15	0.48 ± 0.12
卵巢	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
子宫	0.21 ± 0.06	0.20 ± 0.11	0.19 ± 0.08	0.18 ± 0.07	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.05	0.14 ± 0.06	0.17 ± 0.03
睾丸	1.70 ± 0.18	1.72 ± 0.20	1.75 ± 0.11	1.77 ± 0.10	1.40 ± 0.21	1.46 ± 0.20	1.41 ± 0.30	1.20 ± 0.12
前列腺	0.16 ± 0.08	0.12 ± 0.03	0.14 ± 0.04	0.12 ± 0.08	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.04	0.11 ± 0.05	0.13 ± 0.04

3.6 病理组织学检查 给大鼠连续用药 12 周和停药 2 周后, 分别处死动物, 剖取各组大鼠的心、肝、脾、肺、肾等脏器, 肉眼观察主要脏器外形、体积、色泽均属正常, 无充血、肿胀和坏死等异常表现。光镜下检查, 淫羊藿总黄酮大、中、小剂量组大鼠的心、肝、脾、肺、肾、小肠、肾上腺、胸腺、子宫、卵巢、睾丸等器官组织形态学均为正常, 与空白对照组比较, 未明显见到由于药物毒性引起的病理改变。

4 讨论

按照中药新药申报要求, 首先对淫羊藿总黄酮进行了急性毒性试验, 其小鼠最大耐受量为 $36 g \cdot kg^{-1}$, 未发现毒副作用, 据此进一步进行淫羊藿总黄酮大鼠长期毒性试验。实验结果说明, 按人临床用

量的 40, 80 和 160 倍给予大鼠灌服 12 周, 未发现明显的毒副作用, 提示淫羊藿总黄酮用于临床是安全的。

[参考文献]

- [1] 蒋淑君, 许兰芝. 淫羊藿总黄酮的药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2004, 32(4): 60.
- [2] 袁伯俊, 王治乔. 新药临床前安全性评价与实践[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1997. 43.
- [3] 徐叔云, 卞如濂. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 231.
- [4] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 82, 260.