

胃复方的急性毒性实验研究

胡花婷¹, 李东芳², 何侃成³

- (1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙, 410007;
2. 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院, 湖南 长沙, 410003;
3. 中南大学湘雅二医院, 湖南 长沙, 410001)

[摘要] 目的:对胃复方进行急性毒性实验研究,观察其安全性。方法:将实验小鼠按体质量随机分为2组,采用最大给药量法测定小鼠口服胃复方的最大耐受量,给药组24h内2次以最大浓度、最大体积的中药胃复方给予小鼠灌胃,对照组小鼠灌服等剂量蒸馏水,观察记录2组小鼠一般情况及死亡情况,对主要脏器进行病理组织学检测。结果:给药组小鼠一般情况良好,无1例死亡。与对照组比较,体质量变化差异无统计学意义($P>0.05$);主要脏器病理组织学检测未见明显异常;最大给药量为221.7g生药/kg,相当于60kg成人临床推荐剂量的127倍。结论:胃复方无明显毒性,在规定剂量下用药是安全可靠的。

[关键词] 胃复方;小鼠;急性毒性实验;最大耐受量

[中图分类号] R285.1 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.12.045

An experimental study of the acute toxicity of Weifu prescription

HU Huating¹, LI Dongfang², HE Kancheng³

- (1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China;
2. The Affiliated Tumor Hospital, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410003, Hunan, China;
3. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410001, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the safety of Weifu prescription based on an experimental study of acute toxicity. Methods: Experimental mice were randomly divided into administration group and control group based on body weight, and the maximum administration dosage method was used to determine the maximum tolerance dose of oral Weifu prescription in mice. The mice in the administration group were given the traditional Chinese medicine Weifu prescription at the maximum concentration and volume by gavage twice within 24 hours, and those in the control group were given an equal dose of distilled water. General status and death were observed and recorded, and a histopathological examination was performed for the main visceral organs. Results: The mice in the administration group had a good general status, and no death was observed. There was no significant difference in the change in body weight between the administration group and the control group ($P>0.05$). The histopathological examination of the main visceral organs showed no obvious abnormalities. The maximum administration dosage was 221.7g/kg (crude drug), which was 127 times the clinical recommended dose for an adult with a body weight of 60kg. Conclusion: Weifu prescription has no obvious toxicity and is safe and reliable under the prescribed dose.

[Key words] Weifu prescription; mouse; acute toxicity experiment; maximum tolerance dose

胃癌是我国最常见的消化系统恶性肿瘤之一,病死率居世界所有肿瘤类型的第二位^[1]。胃癌早期症状隐匿,缺乏特异的诊断方式及指标,导致超过80%的胃癌患者就诊时已为进展期胃癌^[2]。目前针对胃癌治疗的主要方法有根治性或姑息性手术、放化疗及免疫治疗等^[3-4],但临床效果并不理想,5年生存率不超过10%^[5]。研究发现中药复方

具有抑制肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡,同时具有抗肿瘤血管生成、调节免疫功能等作用^[6]。胃复方是中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院中西医结合科经过长期临床实践总结出治疗中晚期脾虚瘀毒型胃癌的协定方,以四君子汤为基础方加减化裁而来,主要由黄芪、党参、白术、茯苓、香附、郁金、莪术、半枝莲、甘草等十余味中药组成,具有健脾益气、

基金项目:湖南省自然科学基金面上项目(编号:2017JJ2174)

第一作者:胡花婷,女,2017级硕士研究生,研究方向:中西医结合肿瘤研究

通讯作者:李东芳,女,教授,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合肿瘤研究, E-mail: kekou3190@163.com

解毒祛瘀之功效^[7]。经过三十余年的临床实践及多项临床观察证实,胃复方对中外晚期胃癌患者具有较好的临床疗效^[7-8]。为进一步研究其临床价值,笔者对胃复方进行急性毒性实验研究,以期为更加全面地指导该药的临床安全用药提供依据。本实验的开展严格按照《中药新药研制开发技术与方法》^[9]中“中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则”进行。现报告如下。

1 实验材料

1.1 动物 SPF 级昆明种健康小鼠 56 只,5~7 周龄,雌雄各半,体质量(20.0±2.0)g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2016-0002。小鼠雌雄分笼常规饲养管理,每笼 5 只,环境适宜,自由进食、饮水,鼠用颗粒饲料由中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院提供。

1.2 药物 1)胃复方干浸膏粉的制备:取 5 倍的胃复方(黄芪 20g、党参 15g、白术 10g、茯苓 10g、香附 10g、郁金 10g、苏木 10g、莪术 10g、女贞子 10g、菟丝子 10g、蚤休 10g、半枝莲 15g、甘草 5g、白花蛇舌草 15g、炒麦芽 15g、炒谷芽 15g、鸡内金 10g)饮片(1000g),参考《标准汤剂论》^[10]的煎煮法,经煎煮、浓缩、烘干机烘干后得到干浸膏粉 150g(含生药 6.7g/g),该中药饮片及浸膏粉均由湖南省中医药研究院统一提供与制备。2)最大浓度的配置:以灌胃针能自由通过的最大浓度,配制成为最大灌胃浓度(5.226g 生药/ml)的混悬液,胃复方成人临床推荐用量为每天 3.3g/kg 体质量。

1.3 主要仪器和试剂 ACS 电子秤(武汉精宜电子称重仪器有限公司);小鼠灌胃针 12 号针头 2 只(上海艾研生物科技有限公司);电子显微镜(上海万恒精密仪器有限公司);水合氯醛(上海国药集团生产)。

2 实验方法

参照文献^[9,11-14]中的急性毒性实验方法进行实验。

2.1 预实验 取小鼠 16 只,按体质量随机分为 2 组,雌雄各半,给药组灌胃前禁食不禁水 12h,以胃复方可供灌胃的最大浓度(5.226g 生药/ml)、小鼠灌胃可承受的最大体积(40ml/kg 体质量)做一次灌胃给药,灌胃前根据各小鼠体质量,计算各小鼠所需灌胃剂量,给药后常规饲养,观察 7d。对照组灌胃等量蒸馏水,余同给药组,7d 后小鼠全部存活,由于受到胃复方浓度和体积的影响,灌胃给药无法测出本品的半数致死量(LD50),故改用最大给药量法进行小鼠最大耐受量的测定。

2.2 正式实验 采用最大给药量法测定最大耐受量。小鼠 40 只,随机分为 2 组,雌雄各半,给药组灌胃前禁食不禁水 12h,间隔期间不喂食,以本品可供小鼠灌胃的最大浓度(5.226g 生药/ml)一次灌胃(40ml/kg 体质量),连续 2 次,间隔 6h。对照组灌胃等量蒸馏水,余同给药组。给药后常规饲养,连续观察 14d,记录小鼠活动、饮食、二便等指标变化及中毒症状和死亡情况,并于给药前和给药后第 7、14 天称取体质量,计算小鼠口服胃复方的最大耐受量。

2.3 指标观察及测定 观察小鼠的毛发、饮食饮水、二便、一般行为活动、肌肉运动、植物神经系统反应等方面的变

化,14d 观察期结束后解剖小鼠各主要脏器,先肉眼观察各脏器有无病变,再取心、肝、脾、肺、肾等重要脏器进行组织病理学检查。

2.4 统计学方法 使用 SPSS 23.0 软件对数据进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 小鼠一般情况 以最大浓度、最大体积的胃复方灌胃 1h 后,给药组小鼠出现摄食减少、精神萎靡、喜静卧、四肢活动减少,4h 后排黑色稀便,但无竖毛、抽搐、翻倒、尖叫、震颤等异常情况,12h 后活动增加,饮食饮水恢复增加,摄食量增加,大便恢复正常,观察期内给药组小鼠皮毛光泽,四肢活动正常,呼吸、神经、消化系统未见异常反应,未见毒副反应,2 组小鼠灌胃第 1、14 天的反应症状见表 1。

表 1 2 组灌胃第 1、14 天实验小鼠反应症状

组别	只数	时间	呼吸系统	神经系统	消化系统	泌尿系统	死亡
给药组	20	灌胃第 1 天	-	△	*	-	0
		灌胃第 14 天	-	-	-	-	0
对照组	20	灌胃第 1 天	-	-	-	-	0
		灌胃第 14 天	-	-	-	-	0

注:“-”表示正常;△表示灌胃 1h 后出现萎靡,喜静卧,活动减少;*表示灌胃 1d 内排黑色稀便。

3.2 2 组小鼠给药前及给药第 7、14 天体质量的比较 给药前及给药第 7、14 天 2 组小鼠体质量差异均无统计学意义。(见表 2)

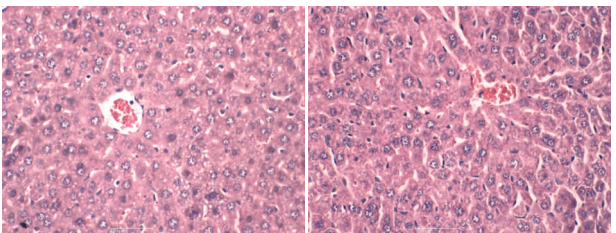
表 2 2 组小鼠给药前及给药第 7、14 天体质量的比较($\bar{x} \pm s$,g)

组别	性别	只数	给药前	给药后	
				第 7 天	第 14 天
给药组	♂	10	27.13±1.54 ^a	36.13±1.59 ^a	42.65±2.18 ^a
	♀	10	25.94±1.09 ^a	31.58±2.80 ^a	35.02±2.47 ^a
对照组	♂	10	27.30±3.25	34.46±6.68	40.64±8.79
	♀	10	26.26±1.83	32.10±2.42	37.81±3.47

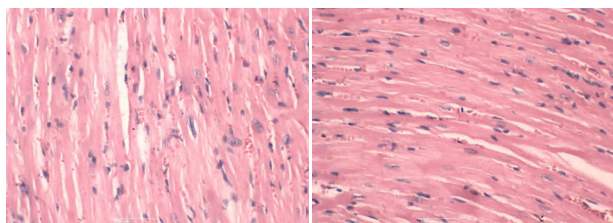
注:与对照组比较,^a*P*>0.05。

3.3 2 组小鼠心、肝、脾、肺、肾、胃、肠病理组织学检查结果

2 组小鼠心、肝、脾、肺、肾、胃、肠等重要脏器肉眼观察其大小、颜色、质地均无明显病理改变,病理组织学切片镜下检查结果表明,给药组与对照组上述脏器均未见明显病变,表明该实验用药对所送检脏器未造成急性损伤,见图 1~7。

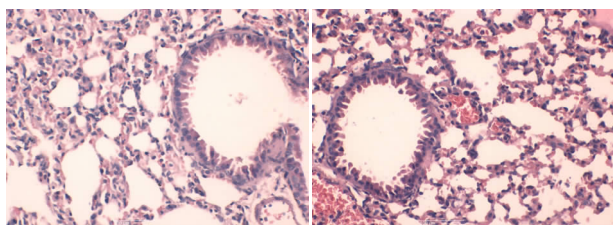


给药组 对照组
图 1 肝组织病理变化(HE×400)



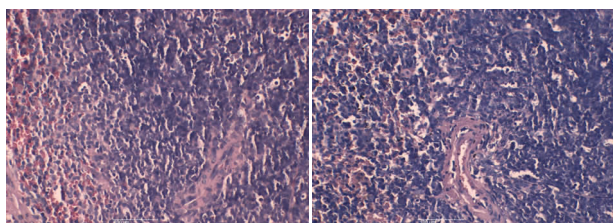
给药组 对照组

图 2 心组织病理变化(HE × 400)



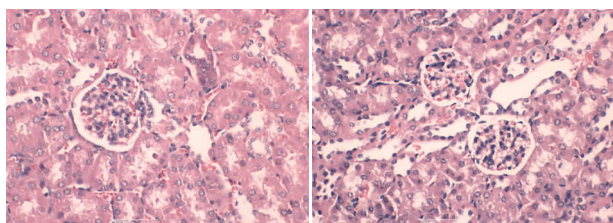
给药组 对照组

图 3 肺组织病理变化(HE × 400)



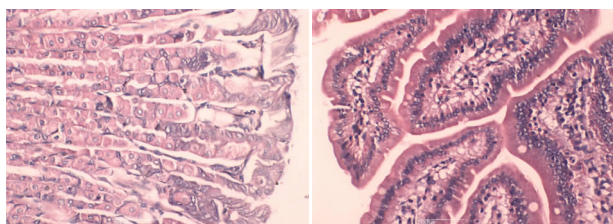
给药组 对照组

图 4 脾组织病理变化(HE × 400)



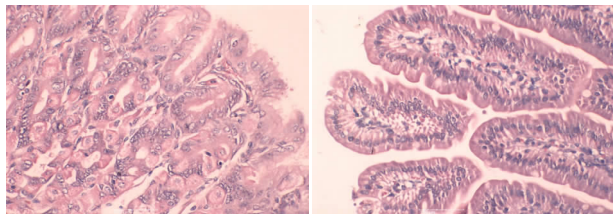
给药组 对照组

图 5 肾组织病理变化(HE × 400)



给药组 对照组

图 6 胃组织病理变化(HE × 400)



给药组 对照组

图 7 肠组织病理变化(HE × 400)

4 讨 论

胃复方作为中晚期胃癌的临床协定方,对于中晚期胃癌具有良好的治疗作用。前期实验研究表明胃复方含药血浆可能通过上调 PPAR γ 基因表达的途径来抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖,促进胃癌细胞凋亡^[15],从细胞水平及分子生物学水平研究了胃复方治疗中晚期胃癌可能的作用机制,其可作为中晚期胃癌的一种替补疗法及长期维持治疗方法,具有广阔的临床运用前景,可为胃癌的精准治疗、研发新的靶标药物提供可借鉴的思路,为开发新的中成药提供可靠的依据,具有良好的社会经济效应。急性毒性实验是新药开发的必经临床实验过程,是目前评价临床用药安全性的重要方法之一^[16]。本研究参照《中药新药研制开发技术与方法》^[9]中“中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则”设计了该药的急性毒性实验,旨在客观评价胃复方对小鼠的一般生存状态及主要脏器的影响,预实验中以最大给药量给药后小鼠无 1 例死亡,无法计算出半数致死量(LD₅₀),故采用最大给药量法测定小鼠最大耐受量。根据《中药新药药理毒理研究的技术要求》中的有关规定,以及毒理学研究的一般原则,多数学者认为按体质量计算,小鼠 1d 最大给药量相当于临床成人日用量的 100 倍以上则较为安全。单次给药量大于 20g 生药/kg 体质量而实验动物不出现死亡者,可以认为该药是安全的^[16]。最大给药量指单次或 24h 内多次(2~3 次)给药所采用的最大给药剂量,最大给药量试验是指在合理的给药浓度及合理的给药容量的条件下,以允许的最大剂量给予实验动物,观察动物出现的反应^[17]。本研究提示胃复方小鼠最大给药量对小鼠体质量和主要脏器及其他指标并未产生影响,病理切片未见明显异常,观察期内小鼠一般状态良好,体质量增加,未见毒副反应。本实验中我们给予小鼠最大给药量为 221.7g 生药/kg,依据最大耐受量倍数计算公式^[17],最大耐受量倍数=(每只小鼠的耐受量/小鼠平均体质量 20g)×(成人平均体质量 60kg/成人每天用量),折合成人(60kg)推荐临床日用量为 127 倍,从而证明胃复方临床应用较为安全,可以进一步在临床广泛推广使用。

参考文献

- [1] Oh Cheul. Update of adjuvant chemotherapy for resected gastric cancer[J]. Journal of gastric cancer, 2012, 12(1): 3-6.
- [2] 余佩武,罗华星. 腹腔镜胃癌根治术:未来治疗胃癌的标准手术[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(18): 1889-1892.
- [3] 周际昌. 实用肿瘤内科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2011: 589.
- [4] 李田静,牛建星,毕陆欣,等. 中晚期胃癌的综合治疗进展[J]. 河北医科大学学报, 2008, 29(2): 308-312.
- [5] Lordick F, Allum W, Carnicero F, et al. Unmet needs and challenges in gastric cancer: The way forward[J]. Cancer Treatment Reviews, 2014, 40(6): 692-700.
- [6] 熊轩轩,吴克俭,费素娟,等. 骨髓间充质干细胞治疗大鼠溃疡性结肠炎的作用及机制研究[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013(7): 3029-3035.

玄参主要环烯醚萜苷热稳定性研究

龚友兰¹, 刘东亮¹, 邓长凤², 龙奕文¹, 雷 洋¹, 陈 橙¹

(1. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙, 410006;

2. 中南大学湘雅二医院药学部, 湖南 长沙, 410008)

[摘要] 目的:研究玄参中各主要环烯醚萜苷在干燥过程和水浴加热过程中的稳定性。方法:将 4 等份玄参叶分别采用室温(20℃)干燥 20d 及 40℃、60℃、80℃ 直接烘干,5 等份玄参根冷浸液不同水浴温度(40℃、60℃、70℃、80℃、90℃)加热 1h, HPLC 法测定玄参中主要环烯醚萜苷桃叶珊瑚苷、哈帕苷、哈帕俄苷含量。结果:不同烘干温度下测得玄参叶中各环烯醚萜苷含量,以室温及 40℃ 最低,60℃ 最高,但与 80℃ 差异不明显;玄参根冷浸液不同水浴温度加热 1h 后,4 种成分含量变化不显著。结论:玄参鲜药材干燥温度对其主要环烯醚萜苷含量影响很大,但提取过程中的温度对其影响不大。

[关键词] 玄参;环烯醚萜苷;热稳定性;实验研究

[中图分类号] R282. 710. 5 **[文献标识码]** A DOI:10. 16808/j. cnki. issn1003 - 7705. 2019. 12. 046

Thermostability of the main iridoid glycosides in Radix Scrophulariae

GONG Youlan¹, LIU Dongliang¹, DENG Changfeng², LONG Yiwen¹, LEI Yang¹, CHEN Cheng¹

(1. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China;

2. Department of Pharmacy, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the stability of the main iridoid glycosides in Radix Scrophulariae during drying and water - bath heating. Methods: Four equal portions of Radix Scrophulariae leaves were dried at room temperature (20℃) for 20 days, 40℃, 60℃, and 80℃, respectively, and five equal portions of cold extraction liquid of Radix Scrophulariae root were placed in water - bath with a temperature of 40℃, 60℃, 70℃, 80℃, and 90℃, respectively, for 1 hour. High - performance liquid chromatography was used to measure the content of the main iridoid glycosides in Radix Scrophulariae, i. e., aucubin, harpagide, and harpagoside. Results: Radix Scrophulariae leaves dried at room temperature and 40℃ had the lowest content of the iridoid glycosides, and those dried at 60℃ had the highest content, but with no significant difference from those dried at 80℃. There were no significant changes in the content of these four iridoid glycosides after the cold extraction liquid of Radix Scrophulariae root was placed in water - bath with different temperatures for 1 hour. Conclusion: Drying temperature for fresh Radix Scrophulariae has a great impact on the content of the main iridoid glycosides, while temperature during extraction has little influence.

[Key words] Radix Scrophulariae; iridoid glycoside; thermostability; experimental study

基金项目:湖南省自然科学基金项目(编号:14JJ7086)

第一作者:龚友兰,医学硕士,助理研究员,研究方向:中药新资源开发及中医药信息研究

- [7] 李东芳,樊江丽,王云启,等.胃复方干预治疗脾虚瘀毒型中晚期胃癌临床研究[J].中国中医药信息杂志,2015,22(3):20-24.

[8] 樊江丽,李东芳,焦蕉,等.胃复方联合化疗对中晚期脾虚瘀毒型胃癌患者生活质量的影响[J].中医杂志,2015,56(2):120-123.

[9] 王北婴,李仪奎.中药新药研制开发技术与方法[M].上海:上海科学技术出版社,2001:995.

[10] 魏刚.标准汤剂论[J].中国中医药信息杂志,1998,5(4):6-8.

[11] 崔明超,欧阳强,潘金火.鸦胆子油亚纳米乳注射液的急性毒性及长期毒性实验[J].中国药师,2014,1(2):305-307.

[12] 陈晓军,李燕婧,谭建宁.复方龙胆胶囊急性毒性实验研究[J].中国药师,2014,17(8):1414-1415.
- [13] 史传道,张荣强,张志刚,等.抗疏健骨颗粒急性毒性实验研究[J].实用中医药杂志,2016,32(6):521-522.

[14] 赵岩,妙志岩,邵玉钢,等.人参茸芝胶囊的急性毒性实验研究[J].食品安全质量检测学报,2015,25(2):614-618.

[15] 胡亚,李东芳.胃复方含药血浆对胃癌 SGC-7901 细胞株增殖及 PPAR γ 基因活性的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2016,24(3):178-181.

[16] 国家药品监督管理局.中药新药研究的技术要求[S].1999:16.

[17] 谢秀琼.中药新制剂开发与应用[M].2版.北京:人民卫生出版社,1994:830. (收稿日期:2019-04-09)