

doi:

三黄连散的亚慢性毒性试验研究

陈燕晴¹, 吴苑滢¹, 梁万文², 施君¹, 韦英益¹, 胡庭俊^{1*}

(1. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530005; 2. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西南宁 530022)

[收稿日期] 2018-07-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 10-0000-00 [中图分类号] S

[摘要] 探讨大鼠长期口服三黄连散的亚慢性毒性作用。将 80 只大鼠随机分为空白对照组、三黄连散低(2.5 g/kg·BW)、中(5.0 g/kg·BW)和高剂量组(10.0 g/kg·BW), 每组 20 只, 雌雄各半, 采用混饲给药的方式连续给药 30 d, 每日观察临床表现, 记录体重和饲料消耗量, 停药后继续观察 7 d。分别于给药后 30 d 和停药后 7 d 进行血液常规指标、血液生化指标和脏器解剖学、病理学检查。结果显示, 给药期间和停药后, 各试验组大鼠未出现中毒和死亡情况, 临床症状、解剖学检查等均无异常变化, 脏器指数、组织病理学检查结果均无异常; 血液常规指标、血液生化指标结果表明该药物无毒副作用, 仅见高剂量组大鼠的体重和饲料消耗量显著低于空白对照组($P < 0.05$)。结果表明, 三黄连散给大鼠连续饲喂 30 天未见明显毒性反应。

[关键词] 三黄连散; 亚慢性毒性; SD 大鼠

Experimental Study on Subchronic Toxicity of Sanhuanglian powder

CHEN Yan-qing¹, WU Yuan-ying¹, LIANG Wan-wen², SHI Jun¹, WEI Ying-yi¹, HU Ting-jun^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China. 2 Guangxi Academy of Fishery Science)

Corresponding author: HU Ting-jun, E-mail: tingjunhu@126.com

Abstract: To investigate the subchronic toxicity of Sanhuanglian powder by oral administration in rats, eighty SD rats were randomly divided into four groups: the blank control group; the Sanhuanglian powder low-, middle-, high-dose groups [2.5, 5.0 and 10.0 g/kg·BW], 20 animals (half male and female) each group. Sanhuanglian powder was given the rat by feed for 30 days, clinical observations were made daily, and body weights and food consumption were determined daily, the next observation for 7 days was conducted post treatment. Blood samples were collected on Day 30 and Day 37 respectively for measurement of blood routine and blood biochemistry indexes, gross anatomic and histological examination were conducted. The results showed that no significantly toxicological change in mortality, clinical signs, necropsy findings, organ index, and histopathological findings

基金项目: 广西创新驱动发展专项资金课题“罗非鱼链球菌病新型快速诊断技术与三黄连中草药复方制剂研发应用”(课题任务书编号: 桂科 AA17204081-1); 国家现代农业产业技术体系广西创新团队建设专项资金资助(课题任务书编号: nycytxgxcxtd-08-02-02)

作者简介: 陈燕晴, 硕士研究生, 从事中兽药制剂方向研究。

通讯作者: 胡庭俊。E-mail: tingjunhu@126.com

were found. There is no significant change in blood routine and biochemical indexes. The body weight and food consumption of rats at high-dose group were significantly lower when compared with blank control ($P < 0.05$). In conclusion, no toxicological effect has been observed in rats treated with Sanhuanglian powder for 30 days.

Key words: Sanhuanglian powder; subchronic toxicity; SD rat

三黄连散是由黄连、黄芩、大黄和连翘提取物加适宜辅料,经混合制成的中药散剂,具有清热解毒之效,用于罗非鱼链球菌病的预防和治疗。研究表明,中草药提取物复方制剂中的有效成分分别作用于不同的靶点,发挥抗菌抗炎等作用^[1]。黄芩苷是一种从黄芩的干燥生根中提取的生物活性黄酮,具有抗菌^[2]、抗炎^[3]、抗寄生虫^[4]等的作用,连翘苷具有解热抗炎^[5]和抗氧化^[6]等的功效,含有黄芩苷和连翘苷成分的中药方剂具有清热解毒,提高机体免疫力的效果。相关研究表明,复方药与单方药相比,在用药量和药效方面具有较多优势。周永梅等^[7]的研究表明,黄芩甙、灯盏花乙素合用时对人颊癌细胞株(HB)的抑制率随药物浓度的增加而升高,对细胞株的抑制与二者单用时相比较,所用药物的浓度降低而作用更强,存在明显差异。狄斌等^[8]的研究表明,复方双黄连颗粒剂比黄芩颗粒剂在黄芩苷的代谢产物存在明显差异,复方配伍促进了总黄芩素在胆汁中的排泄。市场上现有的方剂主要有双黄连粉剂、双黄连制剂^[9]等,而三黄连散的相关研究还未见任何报道。

因此,本次试验通过参考本课题组前期的急性毒性结果,确定了亚慢性毒性试验的最大剂量。连续 30 天经口给予大鼠不同剂量的三黄连散,预测受试物可能引起的临床毒性反应、临床毒性靶器官或靶组织,评估该药剂临床应用的安全性,为临床应用剂量设计提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验药物 三黄连散,广西大学、广西水产科学研究院共同研制,山西首爱动物药业有限公司中试生产;每 g 含黄芩苷不少于 80 mg;1000 g/袋。按试验分组,于粉碎后的基础日粮中加入不同质量的三黄连散,而后制作成型,58 ℃烘干至质量恒定备用。

1.2 主要仪器 日本 Hitachi-7180 全自动生化分析仪,配套试剂购自美康生物科技公司;日本 Sysmex-2100 全自动血液分析仪及其配套试剂;ZT-12M 生物组织自动脱水机(孝感市亚光医用电子技术有限公司),RM2245 轮转式切片机(徕卡显微系统贸易有限公司)等。

1.3 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 100±20 g,80 只,雌雄各半,购于广西医科大学实验动物中心。动物生产许可证号:SCXK 桂 2014-0003。饲养条件:室温 22~27 ℃,相对湿度 40%~75%。试验前常规饲养 5 d。

1.4 分组与给药 将 80 只大鼠随机分为 4 组,即空白对照组,三黄连散低剂量组(2.5 g/kg·BW)、中剂量组(5.0 g/kg·BW)和高剂量组(10.0 g/kg·BW),每组 20 只,雌雄各半,分笼饲养。自由饮水(双蒸水)。采用混饲给药的方式连续给药 30 d,停药后继续观察 7 d。每组按基础日粮喂养。

1.5 临床观察及检测项目 每天观察大鼠的健康状况,记录大鼠饲料消耗量(饲料消耗量(g)=每日给料量-每日剩料量),每周称重一次。于第 31 d 和停药后第 8 d,每组随机抽取雌雄各半大鼠 10 只,进行眼球采血,全血用于血常规测定,血清用于血液生化指标测定;后处死,进行解剖学检查,取心、肝、肺、肾、胃、肠、胸腺、卵巢子宫、睾丸进行称重,计算脏器指数(脏器指数=脏器重 mg/体重 g);用 10%的福尔马林固定,用于组织病理学检查。

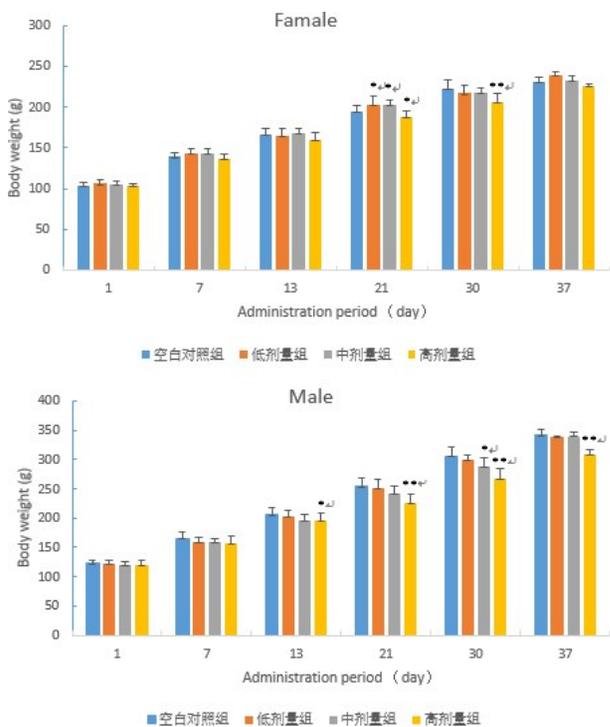
1.6 数据处理 结果以平均值±标准差表示,试验数据采用 SPSS 21.0 软件比较进行单因素方差分析和多重比较。

2 结果

2.1 一般观察 整个试验期间,各给药组大鼠的外观、毛发、行为、粪便未见明显异常,与空白对照组比较均无差异,且未出现动物死亡。说明三黄连

散对大鼠无明显的不良影响。

2.2 体重和饲料消耗量 给药第 21 d, 雌性大鼠中、低剂量组的体重显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 高剂量组的体重显著低于空白对照组 ($P < 0.05$); 给药第 30 d, 与空白对照组比较, 雌性大鼠高剂量组的体重极显著降低 ($P < 0.01$), 中、低剂量组差异不显著 ($P > 0.05$); 停药 7 d, 各组大鼠的体重差异不显著 ($P > 0.05$)。自给药第 21 d 起, 雄性大鼠高剂量组的体重均极显著低于同期的空白对照组 ($P < 0.01$); 给药第 30 d, 中剂量组雄性大鼠的体重显著低于空白对照组 ($P < 0.05$) (图 1)。



与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。下表同
 图 1 三黄连散亚慢性毒性试验的大鼠体重变化
 Fig 1 Changes of rat's body weight in subchronic toxicity test of Sanhuanglian powder

给药第 14 d, 雌性大鼠中、高剂量组的饲料消耗量和空白对照组比较显著升高 ($P < 0.05$); 给药第 21 d, 高剂量组的饲料消耗量和空白对照组比较极显著降低 ($P < 0.01$); 给药第 30 d 和第 37 d, 低、中剂量组的饲料消耗量极显著高于空白对照组 ($P < 0.01$), 高剂量组的饲料消耗量极显著低于空白对

照组 ($P < 0.01$)。给药第 21 d 起, 雄性大鼠中、高剂量组的饲料消耗量显著低于同期的空白对照组 ($P < 0.05$) (图 2)。

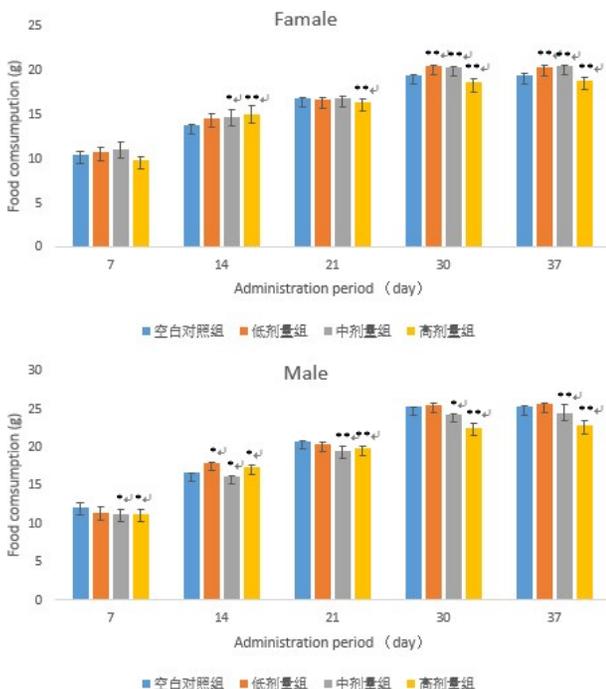


图 2 三黄连散亚慢性毒性试验大鼠的饲料消耗量
 Fig 2 Feed consumption of rats with subchronic toxicity test in Sanhuanglian powder

2.3 血常规检查结果 给药 30 d 后, 和空白组相比, 雌性大鼠的中、低剂量组的中性粒细胞极显著降低 ($P < 0.01$); 雄性大鼠的高剂量组淋巴细胞数极显著降低 ($P < 0.01$), 中剂量组显著降低 ($P < 0.05$), 高剂量组中性粒细胞显著升高 ($P < 0.05$)。停药 7 d 后, 各组的血液学指标与空白对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。(详见表 1 表 2)。

2.4 血液生化指标检测结果 给药 30 d 后, 与空白对照组相比, 雌性大鼠低剂量组 TG 显著降低 ($P < 0.05$), 中、低剂量组 GLU 极显著降低 ($P < 0.01$), 三个剂量组的 TBL 均极显著升高 ($P < 0.01$), 其余指标无统计学差异 ($P > 0.05$); 雄性大鼠高剂量组 ALT、BU 显著降低 ($P < 0.05$), 高、中剂量组 TC 显著降低 ($P < 0.05$); 中剂量组 GLU 显著降低 ($P < 0.05$), 三个剂量组的 TBL 均极显著升高 ($P <$

0.01), 其余指标无统计学差异 ($P>0.05$)。停药后 7 d, 与空白对照组相比, 雌性大鼠高剂量组 BU 显著降低 ($P<0.05$), 中剂量组 BU 极显著降低 ($P<0.01$), 高剂量组 TG 极显著升高 ($P<0.01$), 高剂量组 TC 显著升高 ($P<0.05$), 其余指标无统计学差异

($P>0.05$); 雄性大鼠高剂量组 ALT、AST 显著降低 ($P<0.05$), 高、中剂量组 BU 显著降低 ($P<0.05$), 低剂量组 CRE 显著降低 ($P<0.05$), 高、中剂量组 GLU 显著降低 ($P<0.05$), 其余指标无统计学差异 ($P>0.05$)。(详见表 3、表 4)。

表 1 三黄连散处理 30 d 的大鼠血常规指标测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Hematological values of rats treated with Sanhuanglian Powder for 30 days (mean±S.D.)

性别 Sex	组别 Groups	白细胞 WBC $10^9/L$	红细胞 RBC $10^9/L$	血红蛋白 HGB g/L	淋巴细胞 LYMPH%	嗜碱性粒细胞 BASO%	嗜酸性粒细胞 EO%	中性粒细胞 NEUT%	单核细胞 MONO%
雌性	高剂量组 High dose group	9.76±2.39	7.58±0.32	141.60±2.41	88.30±2.68	0.00±0.00	1.65±0.39	6.6±2.77	3.45±0.98
	中剂量组 Medium dose group	7.84±1.72	7.76±0.20	146.60±4.51	89.76±1.44	0.00±0.00	1.14±0.19	6.12±1.17	2.98±1.24
	低剂量组 Low dose group	8.20±2.82	7.35±0.32	140.40±1.52	89.00±2.84	0.00±0.00	1.66±0.46	6.24±2.21	3.1±0.89
	空白对照组 Blank group	11.46±3.53	7.26±0.60	141.80±9.98	86.40±4.47	00.00±0.00	1.44±0.80	9.08±3.79	3.06±0.33
雄性	高剂量组 High dose group	12.65±3.73	7.70±0.99	144.20±15.07	83.12±1.90**	0.00±0.00	1.34±0.25	11.13±2.67*	3.95±0.85
	中剂量组 Medium dose group	11.14±1.79	7.74±0.30	146.80±5.40	86.32±1.28*	0.00±0.00	1.54±0.53	9.09±2.87	3.05±1.03
	低剂量组 Low dose group	12.63±1.24	7.68±0.20	146.60±3.65	89.00±1.37	0.00±0.00	1.18±0.38	6.52±1.35	3.3±0.60
	空白对照组 Blank group	13.84±1.98	7.78±0.71	151.25±13.07	88.38±0.76	00.00±0.00	1.35±0.48	7.1±0.35	3.17±0.78

与空白对照组比较, “*”表示差异显著 ($P<0.05$), “**”表示差异极显著 ($P<0.01$)。下同

表 2 停药后 7d 大鼠血液学指标测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Hematological values of rats on Day 7 post last treatment (mean±S.D.)

性别 Sex	组别 Groups	白细胞 WBC $10^9/L$	红细胞 RBC $10^9/L$	血红蛋白 HGB g/L	淋巴细胞 LYMPH%	嗜酸性粒细胞 EO%	嗜碱性粒细胞 BASO%	中性粒细胞 NEUT%	单核细胞 MONO%
雌性	高剂量组 High dose group	4.75±1.12	7.51±0.47	141.80±6.61	85.04±3.31	1.46±1.21	0.00±0.00	11.24±2.87	2.26±1.27
	中剂量组 Medium dose group	4.78±0.43	7.43±0.26	140.25±4.92	82.6±3.5	1.55±0.60	0.00±0.00	13.52±3.86	2.3±0.95
	低剂量组 Low dose group	8.19±3.64	7.58±0.49	139.80±6.14	87.5±3.15	1.38±0.79	0.00±0.00	9.3±2.74	1.82±0.45
	空白对照组 Blank group	8.25±4.84	7.06±0.31	137.80±4.71	86.45±3.52	1.38±0.11	0.00±0.00	10.37±4.3	1.8±0.99
雄性	高剂量组 High dose group	7.13±1.96	7.80±0.26	144.60±3.13	84.7±1.93	0.76±0.60	0.00±0.00	10.2±5.96	2.3±0.85
	中剂量组 Medium dose group	8.09±3.53	7.75±0.38	146.20±3.83	80.32±3.97**	1.26±0.66	0.00±0.00	15.74±2.35	2.68±1.66
	低剂量组 Low dose group	8.11±2.19	7.79±0.27	146.80±5.40	81.8±4.7*	0.88±0.57	0.00±0.00	15.02±5.57	2.3±0.76
	空白对照组 Blank group	10.57±2.17	7.84±0.56	149.40±11.10	86.48±1.98	0.66±0.18	0.00±0.00	10.68±1.64	2.18±0.86

表 3 三黄连散处理 30 d 大鼠的血清生化指标测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 3 Serum biochemical index of rats treated with Sanhuanglian Powder for 30 days (mean±S.D.)

性别 Sex	组别 Groups	总蛋白 TP /(g·L ⁻¹)	白蛋白 ALB /(g·L ⁻¹)	谷丙转 氨酶 ALT /(IU·L ⁻¹)	谷草转 氨酶 AST /(IU·L ⁻¹)	尿素 BU /(mmol·L ⁻¹)	肌酐 CRE /(μmol·L ⁻¹)	总胆固醇 TC /(mmol·L ⁻¹)	甘油三酯 TG /(mmol·L ⁻¹)	葡萄糖 GLU /(mmol·L ⁻¹)	总胆红素 TBL /(μmol·L ⁻¹)
雌性	高剂量组 High dose group	62.50±1.60	31.16±1.19	34.80±3.27	108.40±15.34	6.77±1.72	41.40±8.79	2.29±0.32	0.90±0.42	7.62±0.25	2.32±0.08**
	中剂量组 Medium dose group	61.64±1.95	30.58±1.20	40.20±5.81	120.40±26.16	6.52±1.45	40.00±3.67	2.17±0.14	0.79±0.26	6.77±0.43**	1.94±0.38**
	低剂量组 Low dose group	61.52±2.39	30.88±1.65	41.60±6.11	145.40±24.11	8.23±1.25	43.20±7.33	2.05±0.24	0.58±0.08*	6.59±0.63**	1.74±0.15**
	空白对照组 Blank group	61.68±2.77	30.70±1.14	46.75±18.46	144.50±43.56	7.27±1.20	41.00±4.69	2.30±0.20	1.17±0.52	7.85±0.32	1.20±0.26
雄性	高剂量组 High dose group	56.74±0.96	27.92±0.85	40.00±4.24*	117.40±5.50	4.73±0.81*	31.40±3.58	1.63±0.18*	0.96±0.26	8.06±0.71	2.34±0.27**
	中剂量组 Medium dose group	56.48±0.72	27.70±0.37	46.00±4.12	140.60±32.10	6.04±1.28	32.00±3.74	1.61±0.32*	0.87±0.36	7.05±0.47*	2.12±0.23**
	低剂量组 Low dose group	58.00±0.69	27.66±0.74	50.40±7.83	134.40±14.79	6.24±1.57	32.00±3.67	1.79±0.15	1.40±0.49	8.19±1.64	1.84±0.28**
	空白对照组 Blank group	57.00±2.33	27.74±0.96	50.20±6.14	147.00±29.88	7.00±1.12	33.40±4.93	2.03±0.26	1.10±0.12	8.8±0.81	1.38±0.2

表 4 大鼠停药后 7 d 血清生化指标测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 4 Serum biochemical index of rats on Day 7 post last treatment (mean±S.D.)

性别 Sex	组别 Groups	总蛋白 TP /(g·L ⁻¹)	白蛋白 ALB /(g·L ⁻¹)	谷丙转 氨酶 ALT /(IU·L ⁻¹)	谷草转 氨酶 AST /(IU·L ⁻¹)	尿素 BU /(mmol·L ⁻¹)	肌酐 CRE /(μmol·L ⁻¹)	总胆固醇 TC /(mmol·L ⁻¹)	甘油三酯 TG /(mmol·L ⁻¹)	葡萄糖 GLU /(mmol·L ⁻¹)	总胆红素 TBL /(μmol·L ⁻¹)
雌性	高剂量组 High dose group	62.36±2.70	31.48±1.40	44.20±3.90	108.20±28.38	7.32±0.83*	43.80±4.15	2.21±0.21	0.93±0.19**	0.71±0.32	2.74±0.23
	中剂量组 Medium dose group	61.33±1.11	30.88±1.41	35.25±12.42	99.75±16.44	6.38±0.64**	42.25±2.22	1.99±0.17	0.54±0.10	1.21±0.60	2.65±0.13
	低剂量组 Low dose group	61.88±3.55	30.50±1.70	35.20±7.98	93.80±12.97	7.72±0.90	38.00±6.40	1.79±0.18	0.60±0.07	0.24±0.11	2.80±0.38
	空白对照组 Blank group	60.56±2.26	30.26±1.35	39.40±4.62	130.60±33.89	9.02±1.92	39.60±10.16	1.93±0.15	0.51±0.06	1.07±0.48	2.78±0.73
雄性	高剂量组 High dose group	55.72±2.67	27.64±1.25	41.80±4.76	90.2±10.57	5.07±0.42*	39.2±3.56	1.73±0.18	1.35±0.31	8.96±0.87*	2.54±0.21
	中剂量组 Medium dose group	56.46±1.31	27.58±0.89	46.60±2.3	96.8±9.68	4.92±0.81*	38.8±3.77	1.84±0.30	1.18±0.37	8.32±1.09*	2.72±0.13
	低剂量组 Low dose group	56.14±1.57	27.24±0.99	47.25±5.12	99.75±23.20	5.34±1.25	32.8±7.63**	1.67±0.10	0.93±0.24	10.20±1.58	2.78±0.13
	空白对照组 Blank group	55.46±4.03	27.12±1.53	49.20±4.92	114.80±12.56	6.36±1.07	43.6±4.67	1.62±0.24	1.14±0.22	12.40±4.21	2.84±0.40

2.5 脏器指数 给药 30 d,与空白对照组比较,雌性大鼠中剂量组的胃脏器指数显著下降($P<0.05$),其余指标无统计学差异($P>0.05$);雄性大鼠三个剂量组的胃脏器指数均极显著下降($P<0.01$),高剂量组心脏器指数显著下降($P<0.05$),其余指标无统计学差异($P>0.05$)。停药 7 d 后,与空白对照组比较,雌性大鼠中、低剂量组肾脏器指数均显著上升

($P<0.05$),中、低剂量组胃脏器指数均显著下降($P<0.05$),高剂量组心脏器指数显著下降($P<0.05$),中剂量组卵巢子宫脏器指数显著上升($P<0.05$),其余指标无统计学差异($P>0.05$);雄性大鼠三个剂量组的胃脏器指数均显著下降($P<0.05$),高剂量组胸腺和睾丸脏器指数均显著下降($P<0.05$),其余指标无统计学差异($P>0.05$)。(详见表 5,6)

表 5 三黄连散处理 30 d 大鼠的脏器指数($\bar{x}+s, n=5$)

Tab 5 The organ indexes of rats treated with Sanhuanglian powder for 30 days (mean±S.D.)

性别 Sex	组别 Groups	心 Heart /(mg·g ⁻¹)	肝 Liver /(mg·g ⁻¹)	脾 Spleen /(mg·g ⁻¹)	肺 Lung /(mg·g ⁻¹)	肾 Kidney /(mg·g ⁻¹)	胃 Gastric /(mg·g ⁻¹)	肠 Intestinal /(mg·g ⁻¹)	卵巢/睾丸 Ovary/Testis /(mg·g ⁻¹)	胸腺 Thymus /(mg·g ⁻¹)
雌性	高剂量组 High dose group	0.79±0.07	8.97±0.25	0.46±0.06	1.16±0.07	1.66±0.11	1.98±0.25	1.28±0.33	0.66±0.05	0.47±0.10
	中剂量组 Medium dose group	0.72±0.04	8.47±0.75	0.44±0.03	1.19±0.12	1.58±0.08	1.77±0.25*	1.16±0.29	0.56±0.11	0.52±0.12
	低剂量组 Low dose group	0.76±0.07	8.42±0.62	0.43±0.06	1.28±0.15	1.54±0.05	1.86±0.39	1.03±0.32	0.76±0.43	0.48±0.07
	空白对照组 Blank group	0.76±0.07	9.27±0.69	0.46±0.07	1.24±0.08	1.63±0.11	2.22±0.28	1.37±0.34	0.78±0.30	0.53±0.08
雄性	高剂量组 High dose group	0.88±0.09*	11.63±0.80	0.62±0.15	1.33±0.13	2.12±0.16	2.18±0.15**	1.11±0.11	3.32±0.25	0.45±0.07
	中剂量组 Medium dose group	0.96±0.20	11.25±2.17	0.61±0.10	1.40±0.20	2.35±0.3	2.16±0.33**	1.29±0.20	3.11±0.16	0.46±0.08
	低剂量组 Low dose group	0.95±0.08	12.22±0.69	0.62±0.09	1.34±0.07	2.57±0.45	2.14±0.08**	1.32±0.09	3.14±0.06	0.50±0.10
	空白对照组 Blank group	1.08±0.15	13.22±2.06	0.58±0.06	1.41±0.05	2.37±0.17	3.42±1.12	1.27±0.34	3.24±0.18	0.58±0.13

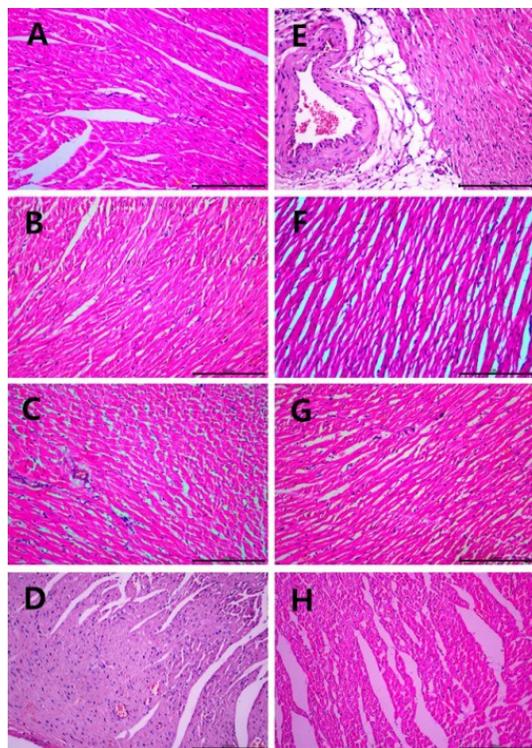
表 6 大鼠停药后 7 d 脏器指数的测定结果($\bar{x}+s, n=5$)

Tab 6 The organ indexes of rats on Day 7 post last treatment (mean±S.D.)

性别 Sex	组别 Groups	心 Heart /(mg·g ⁻¹)	肝 Liver /(mg·g ⁻¹)	脾 Spleen /(mg·g ⁻¹)	肺 Lung /(mg·g ⁻¹)	肾 Kidney /(mg·g ⁻¹)	胃 Gastric /(mg·g ⁻¹)	肠 Intestinal /(mg·g ⁻¹)	卵巢/睾丸 Ovary/Testis /(mg·g ⁻¹)	胸腺 Thymus /(mg·g ⁻¹)
雌性	高剂量组 High dose group	0.74±0.06*	8.48±0.56	0.44±0.05	1.15±0.15	1.50±0.06	1.82±0.36	1.02±0.12	0.56±0.12	0.47±0.13
	中剂量组 Medium dose group	0.84±0.08	8.16±0.46	0.44±0.07	1.25±0.13	1.69±0.16*	1.62±0.17*	1.10±0.24	0.74±0.17*	0.54±0.15
	低剂量组 Low dose group	0.83±0.07	8.37±0.55	0.44±0.07	1.13±0.12	1.81±0.20*	1.58±0.12*	1.03±0.19	0.63±0.14	0.43±0.03
	空白对照组 Blank group	0.86±0.07	7.94±0.28	0.45±0.04	1.19±0.13	1.24±0.61	1.93±0.19	1.17±0.32	0.56±0.05	0.48±0.12
雄性	高剂量组 High dose group	1.04±0.15	11.98±1.71	0.60±0.08	1.45±0.20	2.16±0.20	2.31±0.32*	1.35±0.64	2.99±0.18*	0.37±0.10*
	中剂量组 Medium dose group	1.05±0.10	12.29±0.97	0.69±0.08	1.49±0.11	1.80±1.01	2.33±0.23*	1.28±0.26	3.10±0.27	0.48±0.07
	低剂量组 Low dose group	1.11±0.12	11.95±1.14	0.71±0.09	1.47±0.21	2.39±0.17	2.38±0.35*	1.21±0.20	3.29±0.13	0.42±0.03
	空白对照组 Blank group	1.02±0.11	13.13±1.07	0.62±0.05	1.39±0.10	2.42±0.18	2.96±0.49	1.35±0.22	3.28±0.21	0.50±0.09

2.6 病理组织学检查 给药 30 d 和停药一周后, 对大鼠进行剖检, 逐个观察各脏器, 各剂量组大鼠的内脏均无肉眼可见病理变化。取各剂量组大鼠的心、肝、肺、肾、胃、肠、卵巢、子宫、睾丸、胸腺等主

要脏器做石蜡切片, 用于病理组织学检查。在低倍镜和高倍镜下观察各内脏器官组织切片, 高、中、低剂量组与空白对照组比较亦无明显组织学病变。(图 3-图 11)



A, E 高剂量组; B, F 中剂量组; C, G 低剂量组; D, H 空白组
A, B, C, D 表示给药 30d; E, F, G, H 表示停药后 7d。下同
A, E: High dose group; B, F: Medium dose group;
C, G: Low dose group; D, H: blank group
A, B, C, D represent on Day 30 post treatment;
E, F, G, H represent Day 7 post last treatment. The same as follows

图 3 给药 30 d 后和停药一周后大鼠
心脏病理组织学 (HE 200×)

Fig 3 Histopathological figure of the heart of rat on
Day 30 post first treatment and Day 7 post last treatment

3 讨论

亚慢性毒性试验是对试验动物连续多日给予受试物所致生物学效应的毒理学评价, 可获得重要的毒理学参数^[10]。本研究过程中, 各试验组未出现大鼠死亡情况, 且所有大鼠的精神状态、行为、饮食等无异常。给药第 21 d 内, 雌、雄大鼠高剂量组的饲料消耗量极显著降低 ($P < 0.01$), 但第 21d 起, 雌、雄大鼠高剂量组的体重都显著空白对照组 ($P <$

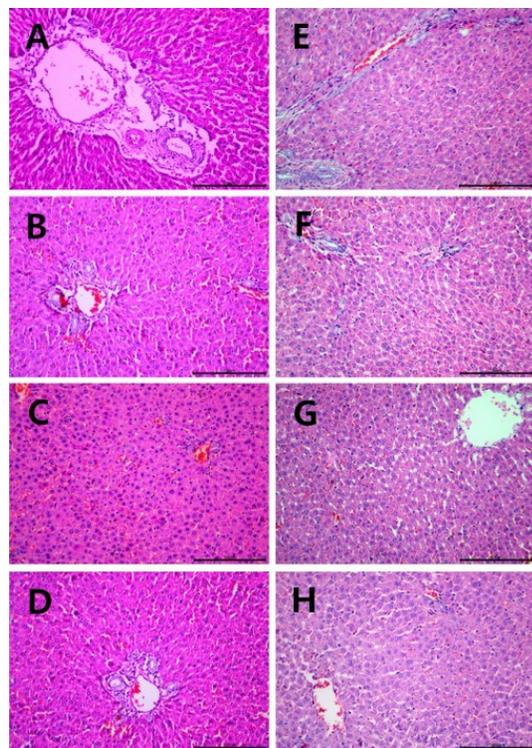


图 4 给药 30d 后和停药一周后大鼠肝脏病理组织学 (HE 200×)
Fig 3 Histopathological figure of the liver of rat
on Day 30 post first treatment and Day 7 post last treatment

0.05), 说明高剂量的三黄连散可能影响大鼠食欲, 降低对饲料的摄入, 进而影响大鼠的体重。这与复方双黄连口服液影响动物适口性相似^[11]。

血液常规指标的变化可以反映动物机体的某些病理状态, 中性粒细胞具趋化作用、吞噬作用和杀菌作用, 淋巴细胞是机体免疫应答功能的重要细胞成分, 而应激情况下大鼠的血液学和血生化指标也会发生差异^[12], 不同血样处理方式对大鼠的生化指标的也有影响^[13-14], 麻醉剂的选择同样也影响大鼠的部分生化指标结果^[15]。给药后 30 d, 雌性大鼠的中、低剂量组中性粒细胞, 雄性大鼠的高、中剂量组淋巴细胞、高剂量组中性粒细胞与空白对照组相比均具统计学意义, 但均在正常范围内; 停

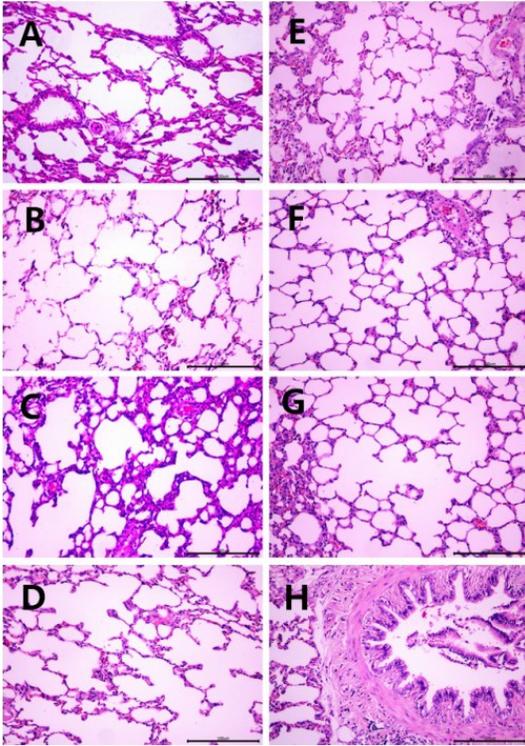


图 5 给药 30d 后和停药一周后大鼠肺脏病理组织学 (HE 200×)

Fig 3 Histopathological figure of the lung of rat on Day 30 post first treatment and Day 7 post last treatment

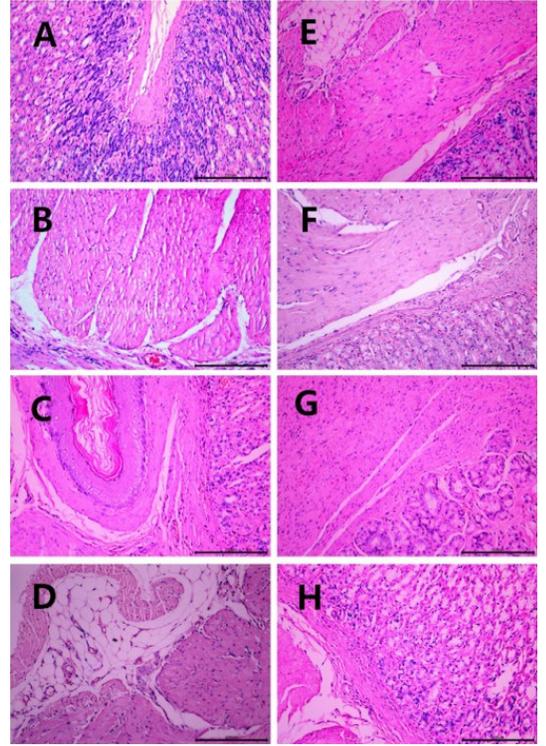


图 7 给药 30d 后和停药一周后大鼠胃病理组织学 (HE 200×)

Fig 3 Histopathological figure of the gastric of rat on Day 30 post first treatment and Day 7 post last treatment

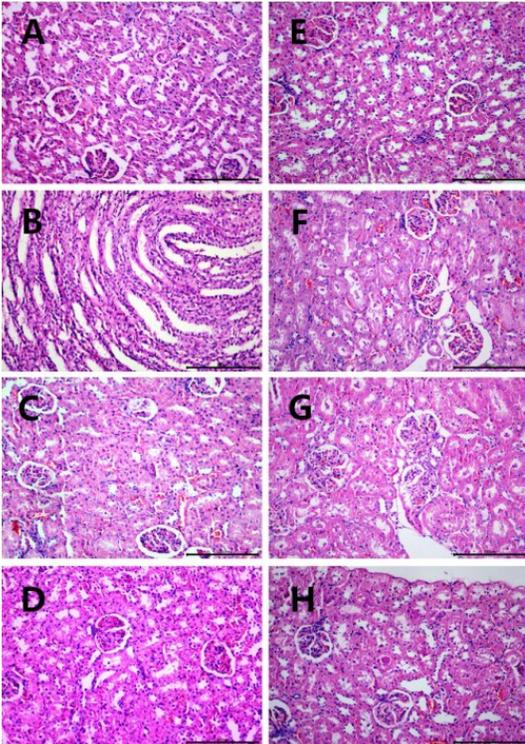


图 6 给药 30d 后和停药一周后大鼠肾脏病理组织学 (HE 200×)

Fig 3 Histopathological figure of the kidney of rat on Day 30 post first treatment and Day 7 post last treatment

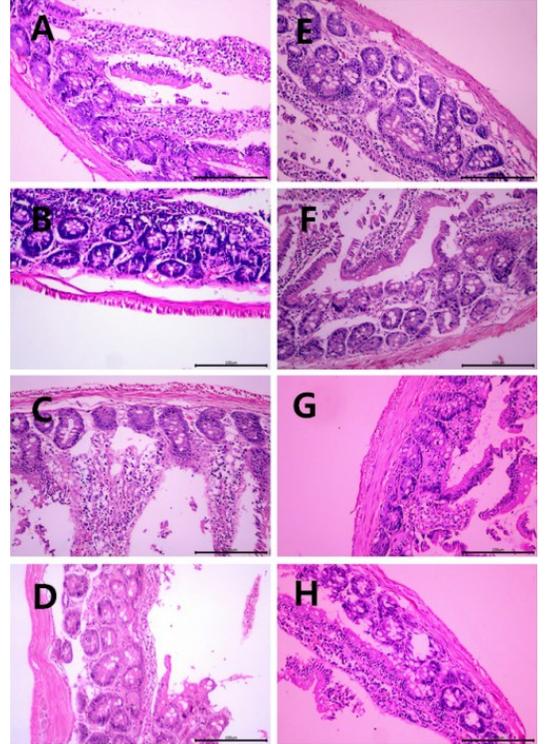


图 8 给药 30d 后和停药一周后大鼠肠病理组织学 (HE 200×)

Fig 3 Histopathological figure of the intestinal of rat on Day 30 post first treatment and Day 7 post last treatment

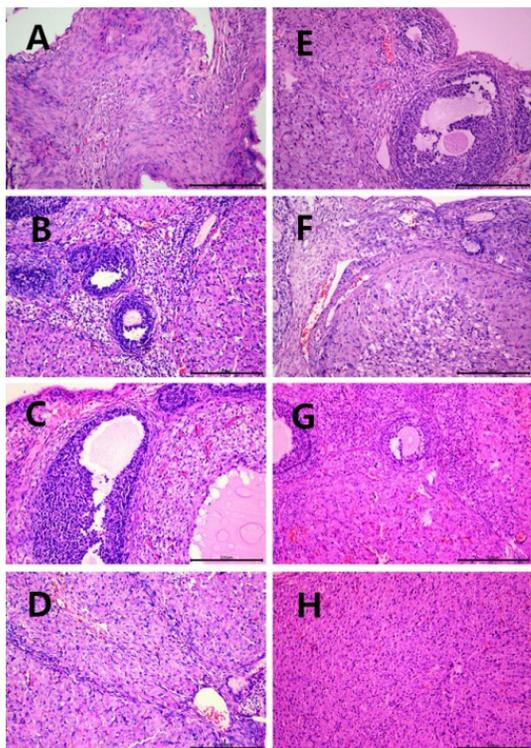


图 9 给药 30d 后和停药一周后大鼠卵巢病理组织学 (HE 200×)

Fig 3 Histopathological figure of the ovary of rat on Day 30 post first treatment and Day 7 post last treatment

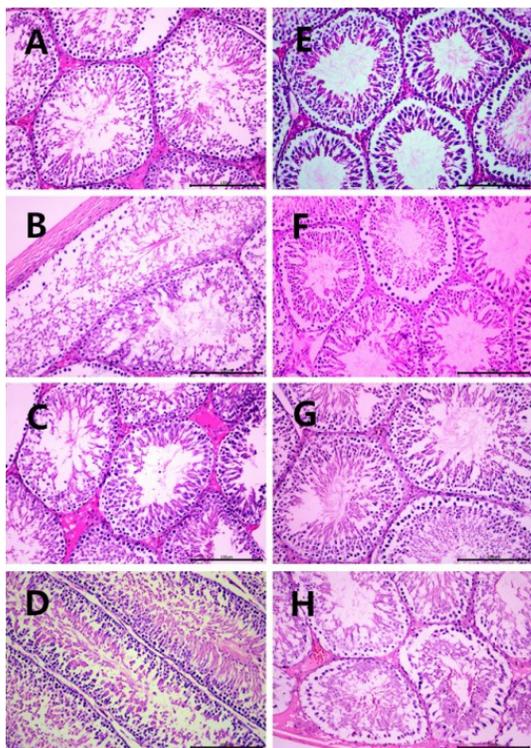
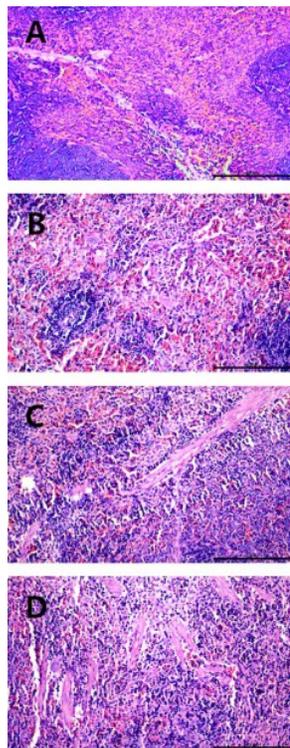


图 10 给药 30d 后和停药一周后大鼠睾丸病理组织学 (HE 200×)

Fig 3 Histopathological figure of the testis of rat on Day 30 post first treatment and Day 7 post last treatment



A, C 高剂量组; B, D 空白组

A, B 表示给药 30d; C, D 表示停药 7d 后

A, C: High dose group; B, D: Black group

A, B represent on Day 30 post treatment;

C, D represent Day 7 post last treatment.

图 11 给药 30 d 后和停药一周后大鼠脾脏病理组织学 (HE 200×)

Fig 3 Histopathological figure of the spleen of rat on Day 30 post first treatment and Day 7 post last treatment

药后 7 d, 各组的血液学指标与空白对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$)。由此说明三黄连散对大鼠血液常规基本无影响。

黄雪峰等^[16]的研究表明黄芩苷含量在肝脏分布较高, 其次是心脏和肾脏。ALT、AST 是肝功能的主要指标之一, 当肝损害时这些酶由细胞内大量释放到血液中, 导致血清中的含量升高, 因此这两种酶浓度升高是肝脏受到损害的一种应答反应。TBL 含量升高也是肝脏受损的重要标志, 可能是肝细胞黄疸或溶血性黄疸、梗阻性黄疸。肝脏是 TG、TC 合成清除的主要器官, 当血液中 TG、TC 含量升高, 则提示肝脏受损。血清中蛋白水平 TP、ALB 也能指示肝脏是否受损, 水平升高提示肝脏受损, 水平降低则提示肝脏慢性损伤^[10]。BU、CRE、GLU 是反

应肾脏功能的重要指标,当肾功能受损时,血清中尿素、肌酐、葡萄糖的水平会上升。本次试验中,给药后 30 d,雌性大鼠低剂量组的 TG 显著低于空白对照组($P<0.05$);雄性大鼠高剂量组 ALT、BU 两次生化检测均显著低于空白对照组($P<0.05$);停药后 7 d 雌性大鼠高、中剂量组 BU 均显著降低,雄性大鼠低剂量组 CRE 也显著降低,均不指示毒性作用。给药 30 d,雌雄大鼠药物组的 TBL 均极显著升高($P<0.01$),停药后 7 d,则与空白对照组差异不显著,提示可能在服用高剂量组药物时对肝产生影响,但停药后该影响即消失,与相关研究文献报道比较,该 TBL 值在正常范围^[17,18]。停药后 7 d,雌性大鼠高剂量组 TC 和 TG 显著高于空白对照,但其变化在正常参考值范围内(1.73~3.15 mmol/L, 0.52~1.22 mmol/L)。由此说明三黄连散对大鼠血液生化指标基本无影响。

脏器指数在一定程度上可以反映受试物对脏器的影响^[10]。给药后 30 d,雌性大鼠中剂量组的胃指数显著下降($P<0.05$),且停药 7 d 后,中、低剂量组胃指数均显著下降($P<0.05$);雄性大鼠三个剂量组的胃指数在两次检测结果均显示极显著或显著下降($P<0.01, P<0.05$),提示药物可能对大鼠胃指数有影响,这可能是大鼠饲料消耗量和体重减少的原因。给药前后雌雄大鼠的肝脏指数与空白对照组无统计学差异;停药 7 d 后,雌性大鼠中低剂量组肾脏指数显著高于空白对照组($P<0.05$),雄性大鼠的肾脏指数与空白对照组相比无统计学意义($P>0.05$);给药 30 d,雄性大鼠高剂量组心脏指数显著下降($P>0.05$),但停药 7 d 后差异不显著($P>0.05$);停药 7 d 后,雌性大鼠中剂量组卵巢子宫脏器指数显著上升($P>0.05$);雄性大鼠高剂量组睾丸指数显著下降($P<0.05$)。但上述指标的改变缺乏剂量反应关系,不能证明药物有毒性作用。大体解剖以及病理切片检查结果显示,心、肝、脾、肺、肾、胃肠、卵巢子宫或睾丸等主要脏器的组织结构清晰,无可见的病理变化。

前人研究表明,黄芩根部提取的类黄酮采用静脉内注射给药大鼠,LD₅₀为 286.15 mg/kg^[19],连续

90 天静脉注射 Beagle 犬,60mg/kg 未发现毒性反应^[20]。四倍体黄芩 D20 的无可见有害作用水平(NOAE)为 10g/kg^[21]。郝玉玲^[22]等的研究表明,口服黄芩茎叶总黄酮可显著提高用药的安全性,LD₅₀值为 14.87 g/kg,相当于小鼠药效学试验最大剂量的 68.5 倍。张喜平等^[23]的研究表明,将黄芩苷粉以最大浓度小鼠灌胃给药,小鼠没有出现死亡,其最大给药量为 15g/kg,具有较好的安全性。柳璐等^[24]的研究表明,连翘苷对大鼠无长期毒性作用。艾霞等^[25]的研究表明,连翘叶水提取物为无毒性物质,亦无致突变作用。贯叶连翘提取物给 SD 大鼠灌胃用药的安全剂量为 0.3g/kg^[26]。吴苑滢等^[27]的研究表明,浓缩型兽用双黄连口服液对小鼠无急性毒性作用,长期连续用药也无亚慢性毒性作用,安全性较高。周德刚等^[28]的研究也表明,双黄连口服液对小白鼠最小致死量范围为 49.2~60.8g/kg,相当于禽临床用量的 111.8~138.2 倍,说明双黄连口服液临床应用具有一定的安全性。这都与本试验研究结果一致。

4 结 论

本试验结果表明,三黄连散给大鼠连续饲喂 30 天未见明显毒性反应。

参考文献:

- [1] 蒋 宁,张永祥,杜冠华. 新思路·新方法——中药药理学研究与中药新药研发[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2016,30(9):893-909.
Jiang N, Zhang Y X, Du G H. Novel ideas and methods of pharmacological and new drug researches of traditional Chinese medicine [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2016, 30(9):893-909.
- [2] 刘 昊,赵自冰,王 新. 黄芩苷抗菌作用研究进展[J]. 畜牧与饲料科学,2017,38(7):61-63.
Liu H, Zhao Z B, Wang X. Research progress on antibacterial activity of baicalin [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2017, 38(7): 61-63.
- [3] Dinda B, Dinda S, Dassharma S, et al. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders [J]. Eur J Med Chem, 2017, 131:68-80.
- [4] 邝枣园,吴 伟,黄衍寿,等. 黄芩苷抗肺炎病原体的研究[J].

- 中国微生态学杂志, 2005, 17(2): 87-88.
- Kuang Z Y, Wu W, Huang Y S, *et al.* Studies on against mycoplasma pneumoniae of baicalin [J]. Chinese Journal of Microecology, 2005, 17(2): 87-88.
- [5] 胡竞一, 雷玲, 余悦, 等. 连翘的抗炎解热作用研究[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(3): 51-52.
- Hu J Y, Lei L, Yu Y, *et al.* Forsythia anti-inflammatory and antipyretic effect [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2007, 23(3): 51-52.
- [6] 赵咏梅, 李发荣, 杨建雄, 等. 连翘苷降血脂及抗氧化作用的实验研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(2): 157-159.
- Zhao Y M, Li F Y, Yang J X, *et al.* Study on the reducing blood lipid and antioxidation effects of phillyrin [J]. Natural Product Research and Development, 2005, 17(2): 157-159.
- [7] 周永梅, 周曾同. 中药单方和复方对人类癌细胞株体外抑制作用研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2008(01): 3-5.
- Zhou Y M, Zhou Z T. On the effect of four Chinese herbal medicines on human buccal cancer cell lone (HB) [J]. Journal of Clinical Stomatology, 2008(01): 3-5.
- [8] 狄斌, 冯年平, 刘文英. 复方双黄连颗粒与黄芩颗粒剂中黄芩苷在大鼠胆汁中代谢的比较研究[J]. 中国药科大学学报, 2004(05): 51-56.
- Di B, Feng N P, Liu W Y. Study on metabolism difference of baicalin in compound Shuanghuanglian granules from that in huangqin granule in rat bile [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2004(05): 51-56.
- [9] 王建明, 赵楚文. 双黄连制剂中连翘苷含量与退热作用相关性研究[J]. 中国药师, 2010, 13(10): 1405-1408.
- Wang J M, Zhao C W. Study on relationship between the content of forsythin in Shuanghuanglian preparations and antipyretic effect [J]. China Pharmacist, 2010, 13(10): 1405-1408.
- [10] 高晨阳, 吴雨龙, 江海涛, 汪振炯, 王仁雷, 华春. 蛹虫草基质多糖的急性毒性及亚慢性毒性研究[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(18): 4776-4782.
- Gao C Y, Wu Y L, Jiang H T, *et al.* Acute and sub-chronic toxicity studies of polysaccharides from cordyceps militaris stroma [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(18): 4776-4782.
- [11] 王优杰. 中药复方双黄连掩味技术及掩味效果评价方法研究[D]. 上海中医药大学, 2006.
- Wang Y J. Study on taste technology of chinese medicine compound shuanghuanglian and evaluation method of taste masking effect [D]. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2006.
- [12] 刘科亮, 郑华, 高俊, 等. 2种取血方式下SD大鼠血常规及生化指标变化的探讨[J]. 预防医学情报杂志, 2016, 32(4): 383-386.
- Liu K L, Zhen H, Gao J, *et al.* Difference of two blood collecting methods on blood biochemical indicators and blood routine test of SD rats [J]. Journal of Preventive Medicine Information, 2016, 32(4): 383-386.
- [13] 张素才, 安丰俊, 彭霞, 等. 不同血样处理方式对大鼠部分血生化指标的影响[J]. 中国新药杂志, 2017(12): 1439-1442.
- Zhang S C, An F J, Peng X, *et al.* Effects of different blood sample treatment methods on biochemical indexes of rats [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2017(12): 1439-1442.
- [14] 李迎, 崔晓霞, 尚世臣, 等. 不同样本和方法对测定大鼠血液生化指标的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(10): 7-9.
- Li Y, Cui X X, Shang S C, *et al.* Effects of different samples and methods on the determination of blood biochemical indexes in rats [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2017, 27(10): 7-9.
- [15] 赖朝刚, 刘振中, 何康玫, 等. 部分麻醉剂对雌性大鼠体内电解质和生化指标的影响[J]. 中国职业医学, 2010, 37(5): 361-364.
- Lai G C, Liu Z Z, He K W, *et al.* Effects of some anesthetics on blood gas, serum electrolytes and biochemical indexes in female SD rats [J]. China Occupational Medicine, 2010, 37(5): 361-364.
- [16] 王雪峰, 刘芳, 王永梅, 等. 小柴胡汤中黄芩苷在大鼠体内的代谢动力学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2001(02): 84-87.
- Wang X F, Liu F, Wang Y M, *et al.* A pharmacokinetic study on baicalin of xiao chaihui tang in rats [J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2001(02): 84-87.
- [17] 魏若尧, 裴彦宇, 孙井江, 等. 决明子冻干粉对SD大鼠的长期毒性研究[J]. 中国医药导报, 2017, 14(15): 4-9.
- Wei R Y, Pei Y Y, Song J H, *et al.* Study on chronic toxicity of freeze-dried powdered Cassiae Semen in Sprague-Dawley rats [J]. China Medical Herald, 2017, 14(15): 4-9.
- [18] 刘俊丹, 陈彩萍, 邱文才, 等. 芩黄清肺散的急性毒性和长期毒性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(01): 225-233.
- Liu J D, Chen C P, Qiu W C, *et al.* Study on chronic toxicity of freeze-dried powdered Cassiae Semen in Sprague-Dawley rats [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(01): 225-233.
- [19] 齐琪, 彭杰, 刘伟, *et al.* Toxicological studies of wogonin in experimental animals [J]. Phytotherapy Research, 2009, 23(3): 417-422.

- [20] Peng J, Qi Q, You Q, *et al.* Subchronic toxicity and plasma pharmacokinetic studies on wogonin, a natural flavonoid, in Beagle dogs [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 124 (2): 257-262.
- [21] 王丽娟, 刘玉, 柴俊雯, 等. 四倍体黄芩 D20 急性和亚急性毒性试验研究[J]. *中兽医医药杂志*, 2017(03): 11-14.
Wang L J, Liu Y, Chai J W, *et al.* Study on the acute and sub-acute toxicity of tetraploid *Scutellaris Radix*. [J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2017, 36(03): 11-14.
- [22] 郗玉玲, 商亚珍. 黄芩茎叶的研究进展[J]. *承德医学院学报*, 2007(03): 293-295.
Xi Y L, Shang Y Z. The research progress of *Scutellaria baicalensis* stem-leaf [J]. *Journal of Chengde Medical College*, 2007(03): 293-295.
- [23] 张喜平, 程琪辉, 张宇. 黄芩苷胶囊小鼠急性毒性试验[J]. *医学研究杂志*, 2006(09): 16-19.
Zhang X P, Chen Q H, Zhang Y. Acute Toxicity test of baicalin capsule in mice [J]. *Journal of Medical Research*, 2006(09): 16-19.
- [24] 柳璐, 雷夏凌, 杨威. 中药一类新药连翘苷生殖毒性试验研究: 中国毒理学会中药与天然药物毒理专业委员会第一次(2016年)学术交流大会, 中国天津, 2016[C].
Liu L, Lei X L, Yang W. Experimental Study on Reproductive Toxicity of Forsythiaside, a New Drug of Traditional Chinese Medicine. The First (2016) Academic Exchange Conference of the Chinese Medicine and Natural Medicine Toxicology Committee of the Chinese Society of Toxicology, Tianjin, China, 2016 [C].
- [25] 艾霞, 董雪婷, 王丽洁, 等. 连翘叶水提取物对小鼠急性毒性和微核试验[J]. *安徽农业科学*, 2011(11): 6397-6398.
Ai X, Dong X T, Wang L J, *et al.* Acute toxicity test and micronucleus test of *Forsythia suspensa* leaves in mice [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011(11): 6397-6398.
- [26] 谢家骏, 周广兴, 乔正东, 等. 贯叶连翘提取物长期给药对大鼠的肝肾毒性[J]. *中成药*, 2013, 23(12): 2555-2560.
Xie J J, Zhou G X, Qiao Z D, *et al.* Chronic toxicity of extract from *Hypericum perforatum* to liver and kidney in rats [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2013, 35(12): 2555-2560.
- [27] 吴苑滢, 宋漫玲, 谷俐媛, 等. 浓缩型兽用双黄连口服液的急性毒性及亚慢性毒性试验[J]. *南方农业学报*, 2017(11): 2086-2091.
Wu Y Y, Song M L, Gu L Y, *et al.* Acute toxicity and sub-chronic toxicity tests for veterinary concentrated *Shuanghuanglian* oral liquid [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2017(11): 2086-2091.
- [28] 周德刚, 张晓会, 刘兴金, 等. 双黄连口服液的急性毒性试验研究[J]. *中国兽药杂志*, 2011(12): 29-30.
Zhou D G, Zhang X H, Liu X J, *et al.* Research of acute toxicity of *shuanghuanglian* oral liquid [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2011(12): 29-30.

(编辑:陈希)