

4 种中药注射剂大分子富集液的重复给药毒性实验研究^{*}

殷 华, 李 月, 司季青, 张路梅, 董鲜祥, 杨 榕, 吕小满, 段为钢[△]

(云南中医学院中医药学分子生物学重点实验室, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 以清开灵、丹参、双黄连、灯盏细辛 4 种注射液的大分子富集液为研究对象, 以发现中药注射剂大分子物质的潜在毒性。**方法** 采用分子筛将注射剂原液制备成 10K 大分子富集液。家兔随机分为空白对照组、原液组、大分子富集液组, 用红外耳温仪每天测量静脉给药前和给药后 2h 耳温, 称量体重变化, 连续观察 5d。将动物进行取血液检测血常规、血生化、体温、体重, 其中 3 只处死检测脏器系数并进行病理切片; 余下动物停药继续观察 5d。**结果** 给药 5d, 大分子富集液组动物的体重下降; 白细胞、粒细胞、血小板和血生化指标 (GPT 和 GOP) 都有不同程度的升高; 体温有不同程度的升高; 对家兔肝肾组织均有不同程度的损害。停药 5d 有一定程度的恢复。**结论** 中药注射液中的大分子物质对家兔具有一定的肝肾毒性。

关键词: 中药注射剂; 大分子物质; 不良反应; 重复给药毒性; 病理检查

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)04-0014-07

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.04.004

中药注射剂是传统医药理论与现代工艺结合的产物, 它不但保留了中药的传统治疗, 而且起效快、生物利用度高、作用迅速, 在临床上也得到广泛应用, 尤其是在急危重症的治疗方面发挥着重要作用。近年来, 中药注射剂引发的药品不良反应报道屡见报端, 根据 2014 年^[1]和 2015 年^[2]国家食品药品监管局 (SFDA) 发布的国家药品不良反应监测年度报告, 中药注射剂的安全问题依然不容忽视。中药注射剂的安全性问题必然存在物质基础^[3-4], 根据我们前期的分析和实验确证, 中药注射剂所含的大分子物质不是传统中药注射剂的活性成分^[5], 更可能是导致中药注射剂产生不良反应或“毒性”的主要物质^[6]。中药注射剂的 (类) 过敏毒性已经得到广泛关注^[6-8], 但潜在的其他毒性却罕见报道, 本文将探讨中药注射剂大分子富集液重复给药 5d 的毒性。

1 材料方法

1.1 材料

清开灵注射液、双黄连注射液、丹参注射液和灯盏细辛注射液均为上市产品, 批号分别为 1003272、

20100324、1005104 和 20130533。纤维过滤器 (10K) 由美国 Millipore 公司生产。ZC 系列全自动血细胞分析仪 (ZC-960 型, 医用) 由吉林省紫宸光电技术有限责任公司生产, 电子红外耳温仪 (GLEW-2 型) 由美国格朗公司生产, TECAN 多功能酶标仪由奥地利 TECAN 公司生产。实验中用到的其他试剂 (分析纯)、试剂盒和耗材均为国产。

清洁级新西兰白兔, 雌雄各半, 体质量 1.5~2.0Kg, 购于四川省实验动物养殖中心, 许可证号: SCXK(川)2014-16。常规条件饲养, 自由饮水进食。动物房定时通风消毒, 模拟自然光照, 室温保持在 23~25℃, 湿度 30%~70%, 适应环境 3d 后进行实验。

1.2 4 种大分子富集液的制备

采用分子筛原理, 将四种中药注射液分别取 10mL 加入到分子筛超滤管中, 配平。低温离心 (4℃, 3000rpm) 以获得中药注射剂大分子富集液 (上层截留液) 1mL 和去大分子中药注射液 (滤膜下液) 9mL, 重复该操作以制备足够的大分子富集液。操作过程严格执行无菌操作, 样品保存于 -40℃, 使用前恢复到室温。

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金 (81160495, 81560645); 云南中医学院应用基础研究联合专项 (2017FF117-032)

收稿日期: 2017-07-16

作者简介: 殷华 (1980-), 女, 云南西双版纳人, 硕士, 讲师, 研究方向: 分子药理学。

[△] 通信作者: 段为钢, E-mail: deardwg@126.com

1.3 动物实验

动物分9组,参见表1。每组家兔6只,雌雄各半。给药前人工固定家兔,用红外耳温仪记录家兔耳温,称体重。上午经耳缘静脉注射生理盐水、中药注射液原液或大分子富集液,随后进行观察,给药剂量根据注射剂原液的临床剂量计算,见表1。给药后2d测量给药对侧耳温,连续给药5d并观察。5d后经耳缘静脉采集血样,并每组随机处死3只动物收集脏器(心、肝、脾、肺、肾),剩余动物不给药继续观察5d,然后处死动物收集血样和脏器。

表1 动物分组及给药剂量

序号	组别	药物	给药剂量/ (mL·kg ⁻¹)
1	空白组	生理盐水	2.31
2	QKL原液组	清开灵注射液原液	2.31
3	QKL10K组	清开灵大分子富集液	2.31
4	SHL原液组	双黄连注射液原液	2.31
5	SHL10K组	双黄连大分子富集液	2.31
6	DS原液组	丹参注射液原液	0.46
7	DS10K组	丹参大分子富集液	0.46
8	DZXX原液组	灯盏细辛注射液原液	2.31
9	DZXX10K组	灯盏细辛大分子富集液	2.31

1.4 指标检测

给药5d后2h和恢复5d后抽血检测全血血常规和肝肾功能。血常规检测用全自动血细胞分析仪2h内完成检测;肝功能检测谷丙转氨酶(GPT)活性、血清谷草转氨酶(GOT)和血清胆红素。肾功能检测血尿素氮(BUN)和血肌酐(Cr)。脏器称重,计算脏器系数(=脏器重/体重×100%)。部分脏器组织用10%甲醛溶液固定后进行常规石蜡切片和HE染色检查。体重变化采用“相对体重”进行衡量,即将给药第1天的家兔体重定义为“1”,以获得同一只家兔的体重变化。

1.5 统计学分析

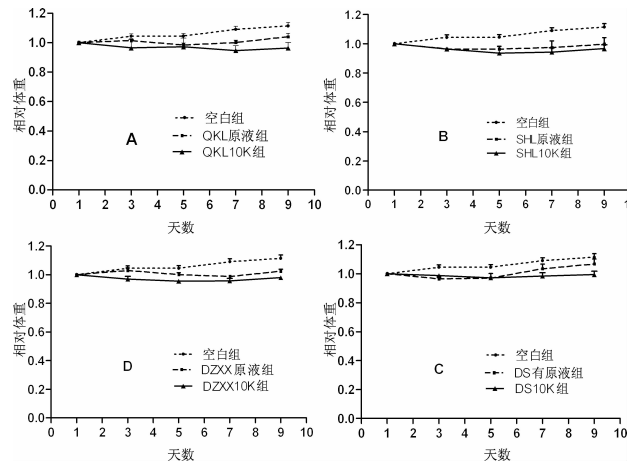
实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布且方差齐性者使用单因素方差分析,组间比较用LSD检验,若方差不齐进行Tamhane's T2检验,以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 4种大分子富集液对家兔体重的影响

空白组家兔的体重呈增加趋势,原液组体重下降

程度较轻,而大分子富集液组体重下降明显;停药5d后,各组家兔体重有一定程度恢复,见图1。

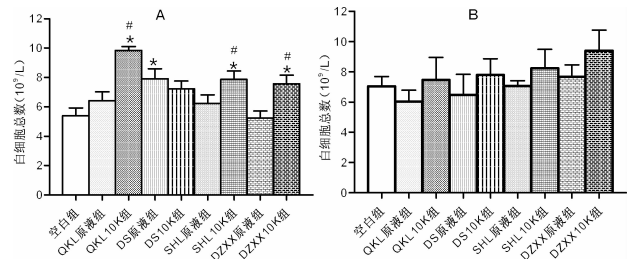


注:A.清开灵大分子富集液;B.双黄连大分子富集液;C.丹参大分子富集液;D.灯盏细辛大分子富集液

图1 4种大分子富集液对家兔体重的影响(前5d, n=6;后5d, n=3)

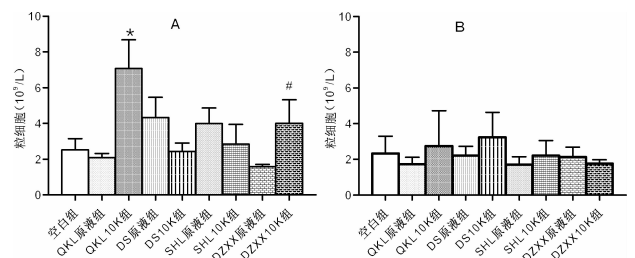
2.2 4种大分子富集液对血常规的影响

血常规共检测了20项指标,其中大分子富集液给药5d对白细胞(图2A)、粒细胞(图3A)和血小板(图4A)影响较明显;停药5d后有一定程度恢复(图2B、图3B、图4B)。



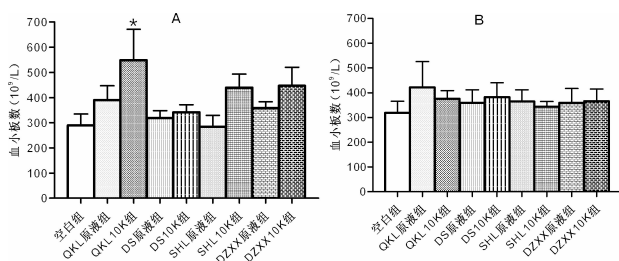
注:与空白组相比,* $P < 0.05$;大分子富集液组与原液组相比,# $P < 0.05$

图2 4种大分子富集液给药5d后(n=6)和停药5d后(n=3)对家兔血常规白细胞的影响



注:与空白组相比,* $P < 0.05$;大分子富集液组与原液组相比,# $P < 0.05$

图3 4种大分子富集液给药5d后(n=6)和停药5d后(n=3)对家兔血常规粒细胞的影响

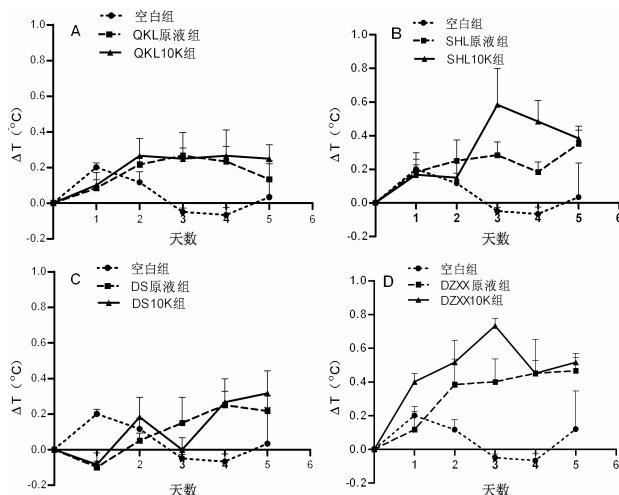


注:与空白组相比, * $P < 0.05$

图 4 4 种大分子富集液给药 5d 后(n=6)和停药 5d 后(n=3)对家兔血常规血小板数的影响

2.3 4 种大分子富集液对家兔体温的影响

对照组家兔的体温变化值(ΔT)变化较小,各原液组有一定的体温升高作用,而大分子富集液在给药期间较原液有进一步的体温增加趋势,见图 5。

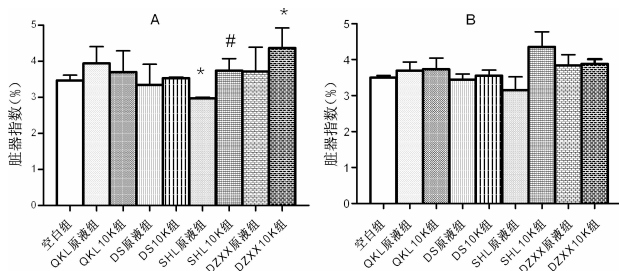


注:A.清开灵大分子富集液;B.双黄连大分子富集液;C.丹参大分子富集液;D.灯盏细辛大分子富集液

图 5 4 种大分子富集液对家兔体温的影响(n=6)

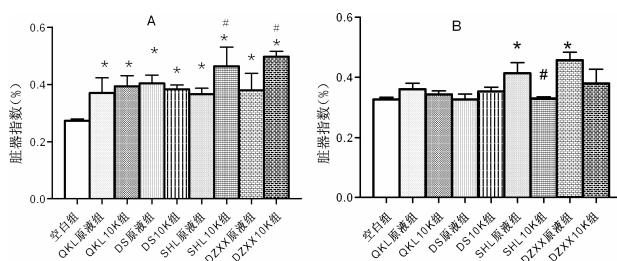
2.4 4 种大分子富集液对家兔脏器系数的影响

4 种大分子富集液对家兔心、肝、脾、肺、肾均有一定影响,但总体上对肝(图 6)、肾(图 7)脏器指数



注:与空白组相比, * $P < 0.05$;大分子富集液组与原液组相比, # $P < 0.05$

图 6 4 种大分子富集液给药 5d 后(A)(n=6)和停药 5d 后(B)(n=3)对家兔肝脏指数的影响(n=3)



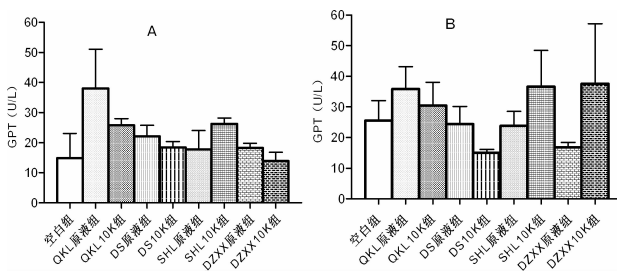
注:与空白组相比, * $P < 0.05$;大分子富集液组与原液组相比, # $P < 0.05$

图 7 4 种大分子富集液给药 5d 后和停药 5d 后对家兔肾脏(左)指数的影响(n=3)

的影响较为明显。给药 5d,丹参、清开灵和灯盏细辛的大分子富集液组的肝脏指数均具有升高趋势(图 6A),双黄连和灯盏细辛大分子富集液组的肾脏指数也有升高(图 7A);停药 5d 有所恢复,但双黄连大分子富集液组的肝脏指数(图 6B),双黄连和灯盏细辛大分子富集液的肾脏指数(图 7B)仍较高。

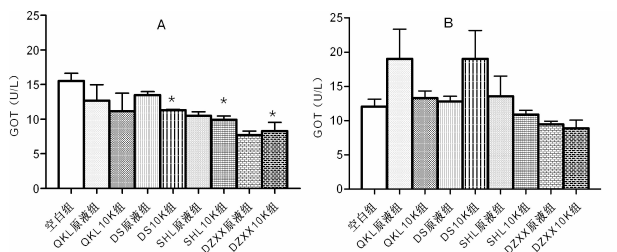
2.5 4 种大分子富集液对家兔肝功能的影响

4 种大分子富集液对家兔的总胆红素有影响,但均在参考值范围之内。对于 GPT 而言,用药 5d,清开灵原液组有个别动物的血清值超出参考值(图 8A);恢复 5d 后,清开灵原液组、清开灵大分子富集液组、丹参原液组、双黄连大分子富集液组和灯盏细辛大分子富集液组均有 1 例超出参考值(>45U/L)(图



注:各组间未见统计学差异

图 8 4 种大分子富集液给药 5d 后(A)(n=6)和停药 5d 后(B)(n=3)对血清 GPT 的影响



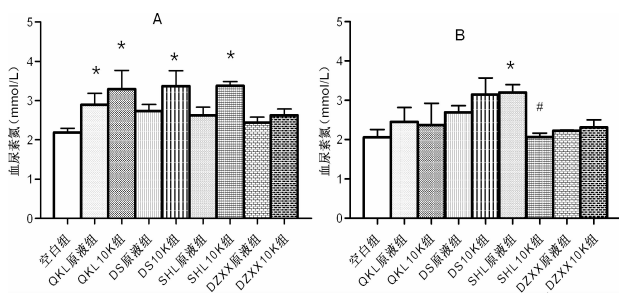
注:与空白组相比, * $P < 0.05$

图 9 4 种大分子富集液给药 5d 后(A)(n=6)和停药 5d 后(B)(n=3)对血清 GOT 的影响

8B)。对于 GOT, 用药 5d, 4 种注射液原液组各动物的值均在参考值范围之内 (图 9A); 但在恢复期, 清开灵原液组、丹参 10K 组各有 1 例动物的检测值超出范围 ($>35\text{U/L}$) (图 9B)。

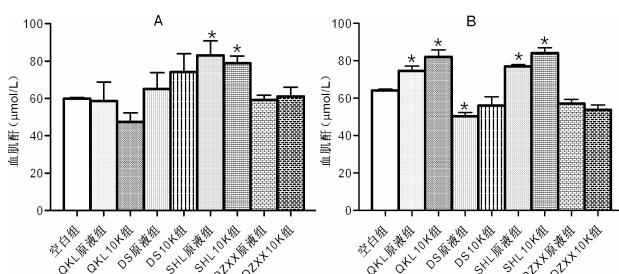
2.6 4 种大分子富集液对家兔肾功能的影响

用药 5d 后, 4 种大分子富集液对家兔 BUN 的影响都在参考值范围之内 ($<7.1\text{mmol/L}$) (图 10A), 但有升高趋势; 停药 5d 后有一定恢复, 但丹参大分子富集液组仍恢复不完全 (图 10B)。对于 Cr, 用药 5d 和停药 5d 的值均在参考值范围之内 ($<133\mu\text{mol/L}$) (图 11)。



注: 与空白组相比, $*P < 0.05$; 大分子富集液组与原液组相比, $\#P < 0.05$

图 10 4 种大分子富集液给药 5d 后 (A) 和停药 5d 后 (B) (n=3) 对家兔 BUN 的影响



注: 与空白组相比, $*P < 0.05$

图 11 4 种大分子富集液给药 5d 后 (A) 和停药 5d 后 (B) (n=3) 对家兔 Cr 的影响

2.7 4 种大分子富集液对家兔脏器的显微病理观察

4 种注射剂的原液和大分子富集液对脾脏未见明显影响, 对心和肺可见小量轻度病理改变, 但对肝脏和肾脏的病理改变较为明显。用药 5d 后对家兔肝脏均产生从水肿、脂肪变性或伴有炎症细胞浸润等不同程度的病理改变, 总体上大分子富集液组较严重, 甚至停药 5d 也未能较好地恢复 (图 12)。用药 5d 后, QKL 原液组肝细胞普遍中度水肿变性, 大泡及小泡混合型脂肪变性; QKL10K 组肝细胞普遍中重度水肿变性; DS 原液组肝细胞普遍轻至中度水肿变性,

广泛脂肪变性; DS10K 组肝细胞普遍轻至中度水肿变性; SHL 原液组肝细胞普遍轻度水肿变性, 个别汇管区少数几个炎症细胞浸润; SHL10K 组肝细胞普遍中重度水肿变性; DZXX 原液组, 肝细胞普遍轻度水肿变性, 广泛脂肪变性; DZXX10K 组肝细胞普遍轻度水肿变性, 个别汇管区少数几个炎症细胞浸润。停药 5d 后, QKL 原液组肝细胞普遍轻至中度水肿变性, 轻度脂肪变性; QKL10K 组肝细胞普遍轻至中度水肿变性; DS 原液组肝细胞普遍中重度水肿变性, 轻度脂肪变性; DS10K 组肝细胞普遍轻度水肿变性, 广泛脂肪变性; SHL 原液组肝细胞轻度脂肪变性; SHL10K 组肝细胞普遍重度水肿变性; DZXX 原液组肝细胞普遍轻度水肿变性, 广泛脂肪变性; DZXX10K 组肝细胞普遍轻至中度水肿变性, 汇管区少数几个炎症细胞浸润。

4 种注射剂原液和含大分子液给药后, 各组肾脏的肾小球和肾小管均出现不同程度的显微病理变化, 总体上以大分子富集液组病理改变较重, 停药 5d 也未能较好恢复。图 13 可见, 给药 5d 后, QKL 原液组肾小球结构正常, 多分布于皮质部; QKL10K 组肾小球及肾间质淤血, 肾小管上皮细胞轻度水肿, 可见肾小管内见红染渗出物; DS 原液组, 肾小球结构正常, 肾小球及肾间质淤血, 肾小管上皮细胞轻度水肿; DS10K 组肾小球及肾间质淤血个别肾小球溶解, 肾小管上皮细胞轻度水肿; SHL 原液组肾小球结构正常, 肾小球及肾间质淤血, 肾小管上皮细胞轻度水肿; SHL10K 组肾小球及肾间质淤血, 肾小管上皮细胞轻度水肿; DZXX 原液组肾小球结构正常, 肾小球及肾间质淤血, 肾小管上皮细胞轻度水肿; DZXX10K 组肾小球及肾间质淤血, 肾小管上皮细胞轻度水肿。停药 5d 后, QKL 原液组未见明显异常; QKL10K 组肾小球及肾间质淤血, 肾小管上皮细胞轻度水肿, 可见肾小管内见红染渗出物; DS 原液组肾小球结构正常, 肾小球及肾间质淤血, 肾小管上皮细胞轻度水肿; DS10K 组肾小球结构正常, 肾小球及肾间质淤血, 肾小管上皮细胞轻度水肿; SHL 原液组肾小球及肾间质淤血, 肾小管上皮细胞轻度水肿; SHL10K 组肾小球及肾间质淤血, 个别发生溶解, 肾小管上皮细胞轻度水肿; DZXX 原液组肾小球及肾间质淤血, 肾小管上皮细胞轻度水肿; DZXX10K 组肾小管上皮细胞轻度水肿, 肾间质少数散在炎症细胞浸润。

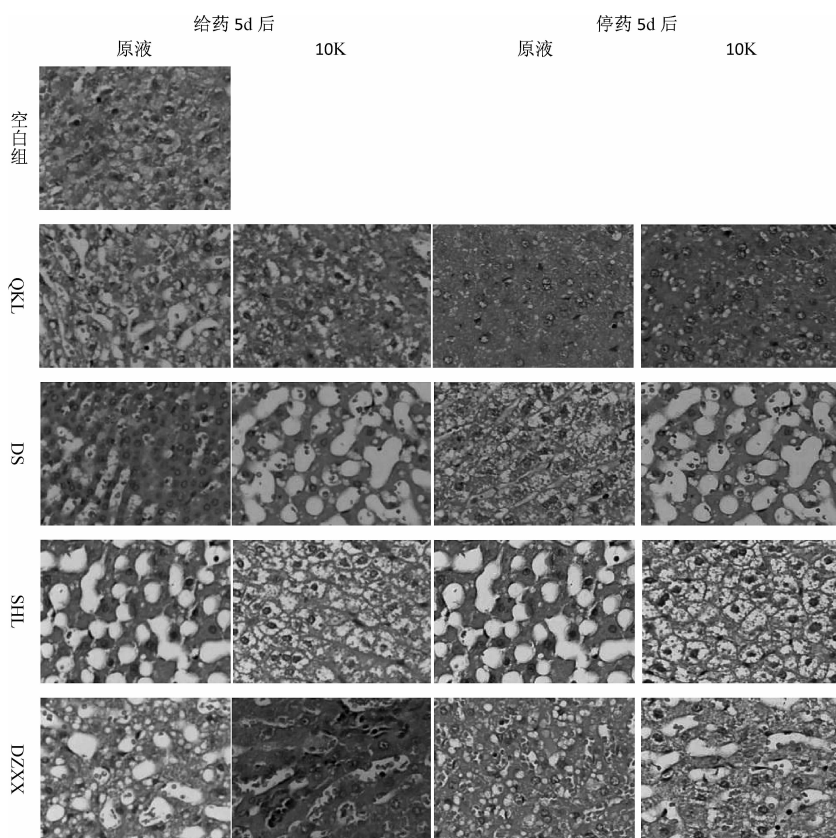


图 12 4 种中药注射液对肝脏的病理影响 (400X, 图片: 125 μ m $\times$ 90 μ m)

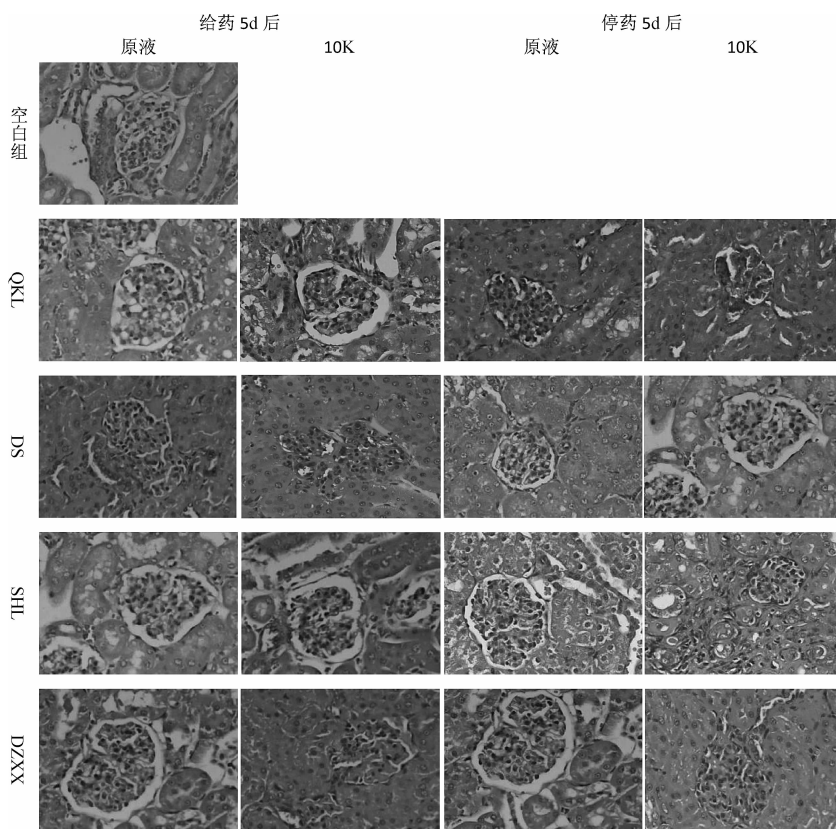


图 13 4 种中药注射液对肾脏的病理图片观察 (400X, 图片: 125 μ m $\times$ 90 μ m)

3 讨论

目前认为中药注射剂的主要安全性问题表现为(类)过敏反应,中药注射剂的其他脏器毒性风险关注较少^[9]。由于大多中药注射剂的开发是基于口服疗效的,因此大分子物质更可能是杂质而非活性成分^[10]。实际上,去除大分子物质后,可明显提升安全性^[5],而有效性也能得到很好的保留^[11],外观质量和稳定性^[12]均能明显提高。

然而,中药注射剂大分子物质的重复给药毒性反应未见报道。本研究中,大分子物质不是拟研究中中药注射剂的活性成分和主要成分,这些注射液的去大分子液和 10 倍富集大分子注射液的固体物浓度变化较小(10%以内)^[5]。通过 10 倍富集,本研究证实中药注射剂的大分子物质具有更强的毒性,可导致动物体重增长缓慢甚至体重减轻,主要影响白细胞、粒细胞和血小板数量,对肝脏和肾脏的毒性相对明显。本研究还发现个别家兔的心肌也有显微病理改变,提示大分子物质的潜在心脏毒性也是不容忽视的^[13]。显然,这些毒性单次用药不容易发现。

中药注射剂具有生物提取物的特征,可能含有蛋白质、(缩合)鞣质、树脂以及核酸和多糖等大分子物质^[10, 14-16]。大分子物质除了会引起(类)过敏反应,也可在体内代谢或作用于相应的靶组织或靶细胞产生效应^[17]。如,脂多糖^[18]和鞣质^[19]具有一定的肝毒性,会引起 GPT、GOT 升高。对于肾脏而言,大分子物质^[20]有可能阻塞肾小球而导致肾小球淤血甚至肾小球溶解,也可能损伤肾小管;由于肾小球具有不可

再生性,大分子物质对肾小球的毒性应当格外重视。

总之,对于基于传统疗效开发的中药注射剂来说,大分子物质不是活性成分,更可能是杂质,不但可能会引起(类)过敏反应,也具有较大的肝肾毒性风险;而去除大分子物质则有望减轻之。

参考文献:

- [1] 国家食品药品监督管理局网站. 国家药品不良反应监测年度报告(2014年)[J]. 中国药物评价, 2015, 32(4): 252-256.
- [2] 国家食品药品监督管理局网站. 2015年药品不良反应监测年度报告发布[J]. 中国药房, 2016, 27(25): 3527.
- [3] 段为钢. 中药注射剂安全性的技术思考[J]. 云南中医学院学报, 2009, 32(6): 12-13.
- [4] 段为钢. 用“活性成分谱”思路破解中药的安全性和有效性[J]. 医学与哲学(人文社会医学版), 2009, 30(9): 60-61.
- [5] 柯瑾, 张陆勇, 殷华, 等. 大分子物质对中药注射剂的安全性影响[J]. 中成药, 2014, 36(4): 855-859.
- [6] 段为钢, 李奇峰, 柯瑾. 中药注射剂有效性及“毒性”的物质基础分析[J]. 医学与哲学(临床决策论坛版), 2011(8): 56-57.
- [7] 徐煜彬, 窦德强. 中药注射剂类过敏研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(14): 2765-2773.
- [8] 闫位娟, 李连达, 张美玉, 等. 7种中药注射剂对 Beagle 犬类过敏反应研究[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(20): 1895-1898.
- [9] 蔡琴. 中药注射剂致急性肾损伤文献分析[J]. 中南药学, 2014, 12(1): 86-88.
- [10] 段为钢, 张陆勇. 提高中药注射剂安全性的技术策略[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2201-2205.
- [11] 殷华, 王俊杰, 司季青, 等. 4种去大分子中药注射液与原液的主要疗效对比实验研究[J]. 中医药导报, 2017, 23(3): 62-65.
- [12] 云宇, 侯肖霖, 殷华, 等. 4种去大分子中药注射剂的稳定性研究[J]. 云南中医学院学报, 2016, 39(4): 20-25.
- [13] 陈龙. 中药注射剂心脏安全性隐患及临床抢救对策[C]//中国毒理学会第七次全国毒理学大会暨第八届湖北科技论坛论文集. 武汉: 中国毒理学会, 2015: 126.
- [14] 刘清成, 殷华, 侯肖霖, 等. 中药注射剂树脂检查方法的改进[J]. 中成药, 2016, 38(8): 1872-1874.
- [15] 段为钢, 柯瑾, 李奇峰, 等. 蛋白质包被 PVDF 膜吸附法检查中药注射剂缩合鞣质[J]. 中成药, 2011, 33(11): 1916-1919.
- [16] 李奇峰, 柯瑾, 段为钢, 等. PVDF 膜吸附染色法检测中药注射剂微量蛋白[J]. 云南中医学院学报, 2010, 33(6): 43-46.
- [17] 云宇, 王蕾, 段为钢. 从机体处理物质的方式认识代谢和免疫的一致性[J]. 医学争鸣, 2017, 8(1): 24-27.
- [18] Choi JW, Kim IH, Kim YM, et al. Pyropia yezoensis glycoprotein regulates antioxidant status and prevents hepatotoxicity in a rat model of D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(4): 3110-3114.
- [19] 王伽伯, 马永刚, 张萍, 等. 炮制对大黄化学成分和肝肾毒性的影响及其典型相关分析[J]. 药学学报, 2009, 44(8): 885-890.
- [20] Rocsoreanu A, Cernea D, Simionescu C. E, et al. The complexity of hemorrhage-generating factors in various organs in acute kidney injury[J]. Rom J Morphol Embryol, 2016, 57(2): 491-494.

(编辑:徐建平)

Repeated Dose Toxicity of Four Traditional Chinese Medicine Injections Rich in Macromolecules

YIN Hua, LI Yue, SI Jiqing, ZHANG Lumei, DONG Xianxiang, YANG Rong, LV Xiaoman, DUAN Weigang

(Key Laboratory of Molecular Biology for Sinomedicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500 China)

ABSTRACT: **Objective** Four kinds of Traditional Chinese Medicine Injections (TCMIs) including Qingkailing, Danshen, Shuanghuanglian, Dengzhanxixin rich in macromolecules were investigated to find their potential toxicity, and to prove that macromolecular substances was one of the most important causes. **Methods** Four injections rich in macromolecules (≥ 10 k) were prepared with molecular sieves. Rabbits were randomly divided into blank control group, original injection group, and injection rich in macromolecule group. Rabbits' temperature was recoded with an ultra-red ear thermometer, and their weight was also measured, before and 2 hours after intravenous administration every day. Intravenous administration was arranged once a day for 5 days. Then, 3 animals in every group were sacrificed, and their blood and organs were collected. Routine blood test, blood biochemistry assay, organ coefficient, body temperature, weight, and pathological investigation were made. The remaining animals without administration were used to observe recovery for additional 5 days. **Results** The results of blood tests showed that, in injections rich in macromolecules groups administrated for 5 days, some values of blood routine test (white blood cell, granulocyte, and platelet) and blood biochemical assay (GPT and GOP) increased to some extent; rabbit's weight decreased; body temperature increased; some injuries were found in liver and kidney tissue. However, the abnormal value or injuries recovered to some extent. **Conclusion** The results suggested that, macromolecular substances were harmful for liver and kidney function in rabbit.

KEY WORDS: traditional Chinese medicine injection; macromolecular substances; adverse reactions; repeated dose toxicity; pathological investigation