

# 益骨口服液的毒理学研究

姚新苗, 黄真, 吴刚(浙江中医药大学附属第三医院, 杭州 310005)

**摘要:** 目的 观察益骨口服液的急性毒性和长期毒性。方法 急性毒性试验: ICR 小鼠 40 只, 随机分成对照组和给药组, 采用最大给药量法测定小鼠口服益骨口服液最大耐受量。长期毒性试验: SD 大鼠 80 只, 随机分成 4 组, 采用高、中、低 3 个剂量(80, 40, 20 g·kg<sup>-1</sup>)灌胃给药, 每天 1 次, 连续 12 周, 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 28 d 后上述指标的变化。结果 小鼠口服益骨口服液的最大耐受量为生药量 358.852 g·kg<sup>-1</sup>, 此剂量相当于临床成人拟日服剂量的 287.08 倍。连续给药 90 d 时, 高剂量组的碱性磷酸酶和白蛋白低于空白对照组( $P<0.05$ ); 停药 28 d 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 在本次试验条件下, 该口服液安全无毒。

**关键词:** 益骨口服液; 急性毒性; 长期毒性

中图分类号: R965.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)10-0880-06

## Study on Toxicity of Yigu Oral Solution

YAO Xinmiao, HUANG Zhen, WU Gang(*The Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China*)

基金项目: 浙江省科技计划面上项目(2007C33019); 浙江省重中之重学科建设项目(浙教高科[2008]255 号)

作者简介: 姚新苗, 男, 硕士, 主任医师, 教授 Tel: (0571)87238018 E-mail: yxmtcm@yahoo.com.cn

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To observe the acute and chronic toxicity of Yigu oral solution. **METHODS** Tests of acute toxicity: 40 ICR mice were randomly divided into two groups, the control group and the drug test group. The maximum tolerable dosage (MTD) of Yigu oral solution were determined by i.g. administration in mice. Tests of chronic toxicity: 80 SD rats were randomly divided into four groups: high, middle, and low dose(80, 40, 20 g·kg<sup>-1</sup>) of Yigu oral solution group as well as the control group. Yigu oral solution was continuously administered intragastrically for 12 weeks, once per day. The growth condition, blood routine test, blood biochemical indexes and histopathological changes of rats were measured immediately at the terminal of experiment and 28 days after the terminal of experiment. **RESULTS** The MTD of Yigu oral solution via i.g. administration was 358.852 g·kg<sup>-1</sup> in mice. It was equivalent to 287.08 times of the dosage used in clinic. After rats were administered consecutively for 12 weeks, the level of ALP and ALB in high dose group were lower than the control group ( $P<0.05$ ). Twenty-eight days after the terminal of experiment, the body weight of rats, food consumption, behavioral activity, hematological parameters as well as viscera index of important organs were normal. No obvious histopathologic changes of important organs were found. **CONCLUSION** Under this experimental condition, Yigu oral solution is safe and nontoxicity.

**KEY WORDS:** Yigu oral solution; acute toxicity; chronic toxicity

益骨汤是自1994年以来医院长期应用的有效协定方,由补骨脂、骨碎补、丹参、山药等组成,加工为口服液剂,应用于临床多年无不良反应,但中药复方的药理作用极为复杂,为了进一步考察中药的安全性与临床效果,综合近几年国内外对中药的研究,中药口服液做毒性试验的报道较少。为了全面、客观、科学地考察本品的急性毒性,同时观察连续给药后对机体产生的毒性反应及其严重程度,确定无毒反应剂量,为拟定人用安全剂量提供参考,本实验进行了小鼠最大剂量急性毒性试验及大鼠12周连续给药的长期毒性试验。

## 1 试剂与动物

益骨口服液由浙江中医药大学制剂中心按成型工艺加工。清洁级ICR小鼠,体重18~22 g;12周龄SD大鼠,体重(180±20)g。实验动物合格证号:SCXK(沪)2008-0016,动物级别:一级,均由浙江中医药大学动物实验中心提供,室内温度:22~24℃,湿度:65%~75%。大鼠每笼5只,♀♂分笼饲养,体重每周称1次,隔天更换垫料。大鼠饲料由浙江中医药大学动物中心提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 小鼠急性毒性试验

**2.1.1 益骨口服液半数致死量(LD<sub>50</sub>)测定试验** 选用小鼠10只,♀♂各半。以每日最大浓度8.97 g(生药)·mL<sup>-1</sup>及最大体积0.4 mL·(10 g)<sup>-1</sup>给小鼠灌胃,结果益骨口服液最大浓度达生药量358.852 g·kg<sup>-1</sup>,观察7 d,均不引起死亡。限于药物浓度及给药体积不能再增大,不能测出其半数致死量。

**2.1.2 益骨口服液最大耐受量(the maximum tolerable dosage, MTD)测定试验** 选用小鼠40只,♀♂各半,随机分为对照组与给药组。给药组于6 h内分2次灌服益骨口服液,每日9:00和15:00分别灌胃一次,每次0.2 mL·(10 g)<sup>-1</sup>,生药8.97 g·mL<sup>-1</sup>,对照组灌服等体积蒸馏水。两组动物均于

服药前禁食不禁水12 h,给药后连续观察7 d内动物的外观形态、行为活动、精神状态等反应。结果动物未出现任何毒性反应及死亡现象。测得益骨口服液对ICR小鼠的MTD为生药358.852 g·kg<sup>-1</sup>,此剂量相当于临床成人拟日服剂量的287.08倍,未出现任何毒性反应及死亡现象。

### 2.2 大鼠长期毒性试验

**2.2.1 动物与药物** 清洁级SD大鼠,80只,♀♂各半,随机分成高剂量组、中剂量组、低剂量组和空白对照组,每组20只。益骨口服液醇提液:按照益骨口服液的提取与成型工艺,分别制成为8,4,2 g·mL<sup>-1</sup>,由浙江中医药大学实验制剂中心加工。

**2.2.2 剂量分组** 根据益骨口服液的急性毒性实验测不出小鼠的LD<sub>50</sub>,且未见明显毒性反应,故给药剂量依据高剂量组不低于临床剂量的50倍的标准,设高剂量组、中剂量组和低剂量组和空白对照组,分别给予临床剂量的64倍、32倍、16倍的高、中、低浓度益骨口服液(80, 40, 20 g·kg<sup>-1</sup>)和蒸馏水。

**2.2.3 给药方法与检测** 将大鼠测体重,给药前观察4 d,大鼠一般情况良好,于每周一至周六上午9:00—11:00为给药时间,周日停药,根据本课题的所处阶段和临床疗程,Ⅱ期临床试验,疗程3个月,连续给药12周,每周测体重一次,并根据动物体重变化情况每周调整给药量<sup>[1]</sup>。

检测时间:给药12周后,高剂量组、中剂量组、低剂量组和空白对照组每组各取10只大鼠(♀♂各半),自上腔静脉采血做血液学与血液生化指标检测。采血后用脱颈椎处死动物,并做系统尸解及病理组织学检查,其余大鼠停止给药,饲养照常,进行恢复性观察,以了解毒性反应的可逆程度和可能出现的迟发性毒性反应。观察内容与给受试药期间相同。停药后4周各组动物全部采血处死,做相应检查,检查方法同上。

检测指标:一般观察:外观体征和行为活动(包

括神态萎靡、卷缩不动或过度兴奋、躁动惊跳、肌肉麻痹或震颤、步态异常等)。皮毛光泽度、贴身或稀疏竖散,粪便性状,颜色、食量及体重变化。发现中毒反应的动物要取出单笼饲养,对死亡或濒死动物及时尸检。血液学检查:红细胞(RBC)、血红蛋白(Hb)、白细胞总数(wbc)及分类淋巴细胞百分数(LYM)、中性白细胞百分数(MID)、粒细胞百分数(GRAN)、血小板计数(PLT),均以美国 CD-3200 雅培全自动血球分析仪测定。血液生化检查:天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸氨基转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(AKP 或 ALP)、白蛋白(ALB)、直接胆红素(DBILI)尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)。使用日立 7180 全自动生化分析仪(日本)检测测定。

**2.2.4 系统尸解和病理学检查** ①系统尸解:全面细致,为组织学检查提供依据;②脏器重量:心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、睾丸、附睾、卵巢、子宫;③脏器系数:心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、睾丸、附睾、卵巢、子宫,脏器系数( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )=脏器重/体重 $\times 100\%$ ;④病理组织学检查:空白对照组、高剂量组和尸检异常时要详细检查,中剂量组、低剂量组只有在高剂量组有异常时才进行检查。检查器官内容包括:心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、睾丸、附睾、卵巢、子宫。

**2.3 统计分析方法**

采用 SPSS 13.1 统计软件包进行方差分析,方

差不齐采用秩和检验,方差齐采用  $q$  检验。

**2.4 结果**

**2.4.1 一般观察结果** 各剂量组 SD 大鼠给药前后被毛平顺、洁白光泽、眼睛红亮有神、反应灵敏、步态正常、口周及尾部黏膜无破溃,没有出现萎靡、卷缩不动等情况,呼吸平稳、饮食正常、大便无黏液和稀溏,口周无紫绀,四肢及头部无震颤,呈现出健康活泼的状态。说明益骨口服液对 ♀ ♂ SD 大鼠一般行为无显著影响。

**2.4.2 对 SD 大鼠体重的影响** 益骨口服液对大鼠体重的影响表明,益骨口服液给药 12 周及停药后 4 周,未对大鼠体重有明显影响,体重随周龄增加而增加,体重增加速度随周龄的增加而减慢,提示益骨口服液不影响大鼠的生长发育。

**2.4.3 对 SD 大鼠系统尸解和脏器重量检查影响** 在给药 12 周及停药 4 周后分批活杀大鼠,观察各脏器(心、肺、肝、脾、肾、睾丸、附睾、子宫、卵巢、肾上腺、胸腺等),色泽良好,形态及位置关系正常,脏器间无粘连,脏器表面及内膜无瘀血、充血、出血点、水肿、糜烂、溃疡等情况;胸腔、心包无积液等病理改变。

脏器称重结果表明,益骨口服液各剂量组对 SD 大鼠脏器重量无明显影响,停药后也未见迟发型影响。说明益骨口服液对 SD 大鼠脏器重量无显著影响,结果见表 1。

表 1 各剂量组 SD 大鼠,给药后与停药后脏器重量( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

Tab 1 Comparison of visceral weights of SD rats among 4 groups at 12 weeks after consecutive and terminal of administration( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

| 脏器  | 性别 | 给药后脏器重量/g    |              |              |              | 停药后脏器重量/g    |              |              |             |
|-----|----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
|     |    | 高剂量组         | 中剂量组         | 低剂量组         | 空白对照组        | 高剂量组         | 中剂量组         | 低剂量组         | 空白对照组       |
| 心   | ♂  | 1.413±0.125  | 1.444±0.228  | 1.503±0.015  | 1.356±0.156  | 1.429±0.123  | 1.434±0.103  | 1.423±0.103  | 1.347±0.186 |
|     | ♀  | 0.966±0.149  | 0.976±0.149  | 1.017±0.125  | 1.020±0.024  | 0.943±0.094  | 0.931±0.046  | 0.925±0.097  | 0.921±0.095 |
| 肝   | ♂  | 11.619±0.842 | 11.262±1.365 | 11.383±0.847 | 11.197±1.148 | 10.270±0.771 | 11.406±1.713 | 10.882±0.949 | 9.863±0.894 |
|     | ♀  | 7.607±1.555  | 7.890±1.001  | 7.294±0.557  | 8.190±0.753  | 7.006±0.783  | 6.814±0.731  | 6.848±0.442  | 7.156±0.753 |
| 脾   | ♂  | 0.754±0.107  | 0.746±0.090  | 0.683±0.065  | 1.514±0.262  | 0.843±0.252  | 11.406±1.713 | 0.733±0.142  | 0.698±0.055 |
|     | ♀  | 0.575±0.104  | 0.570±0.132  | 0.561±0.068  | 0.626±0.060  | 0.563±0.092  | 0.521±0.077  | 0.493±0.017  | 0.576±0.096 |
| 肺   | ♂  | 1.708±0.237  | 1.617±0.249  | 1.688±0.283  | 1.514±0.262  | 1.636±0.267  | 1.651±0.231  | 1.845±0.342  | 1.604±0.201 |
|     | ♀  | 1.293±0.111  | 1.231±0.066  | 1.251±0.097  | 1.224±0.145  | 1.312±0.191  | 1.206±0.140  | 1.225±0.040  | 1.315±0.143 |
| 肾   | ♂  | 2.969±0.170  | 3.000±0.446  | 3.016±0.110  | 2.985±0.082  | 2.738±0.461  | 2.952±0.343  | 3.226±0.545  | 2.856±0.323 |
|     | ♀  | 2.044±0.244  | 1.911±0.092  | 1.948±0.184  | 2.092±0.206  | 1.806±0.175  | 1.739±0.192  | 1.857±0.194  | 1.791±0.099 |
| 脑   | ♂  | 1.978±0.085  | 1.853±0.162  | 1.851±0.137  | 1.941±0.193  | 1.875±0.124  | 1.890±0.101  | 1.772±0.180  | 1.865±0.072 |
|     | ♀  | 1.791±0.061  | 1.822±0.063  | 1.846±0.038  | 1.834±0.127  | 1.731±0.097  | 1.700±0.073  | 1.746±0.038  | 1.823±0.169 |
| 胸腺  | ♂  | 0.508±0.069  | 0.525±0.092  | 0.537±0.143  | 0.448±0.091  | 0.572±0.267  | 0.575±0.291  | 0.568±0.057  | 0.487±0.073 |
|     | ♀  | 0.476±0.066  | 0.443±0.053  | 0.482±0.055  | 0.466±0.029  | 0.459±0.028  | 0.622±0.216  | 0.474±0.094  | 0.511±0.068 |
| 肾上腺 | ♂  | 0.062±0.007  | 0.070±0.013  | 0.078±0.020  | 0.062±0.007  | 0.072±0.009  | 0.066±0.013  | 0.061±0.010  | 0.064±0.010 |
|     | ♀  | 0.074±0.026  | 0.072±0.021  | 0.073±0.015  | 0.072±0.011  | 0.073±0.021  | 0.083±0.017  | 0.070±0.018  | 0.078±0.033 |
| 睾丸  | ♂  | 2.686±0.208  | 2.819±0.199  | 2.858±0.168  | 2.922±0.120  | 3.005±0.192  | 2.921±0.151  | 2.761±0.085  | 2.702±0.291 |
| 附睾  | ♂  | 1.238±0.258  | 1.238±0.258  | 1.152±0.127  | 1.182±0.077  | 1.295±0.110  | 1.296±0.152  | 1.132±0.096  | 1.374±0.291 |
| 子宫  | ♀  | 0.572±0.155  | 0.748±0.141  | 0.661±0.087  | 0.820±0.160  | 0.582±0.140  | 0.507±0.096  | 0.576±0.144  | 0.579±0.168 |
| 卵巢  | ♀  | 0.138±0.013  | 0.184±0.082  | 0.197±0.073  | 0.171±0.033  | 0.160±0.024  | 0.161±0.033  | 0.134±0.013  | 0.170±0.047 |

**2.2.4 对 SD 大鼠脏器系数的影响** 脏器系数查结果表明, 益骨口服液的高、中、低剂量组大鼠脏器系数与空白对照组均无显著性差异, 停药 4

周后检查也无显著性差异, 说明益骨口服液各剂量组给药后对脏器系数无明显影响, 也未发现迟发性影响。结果见表 2。

表 2 各剂量组 SD 大鼠给药后与停药后脏器系数( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

Tab 2 Comparison of organ coefficients of SD rats among 4 groups at 12 weeks after consecutive and terminal of administration( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

| 脏器  | 性别 | 给药后脏器重量/g   |             |             |             | 停药后脏器重量/g   |             |             |             |
|-----|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|     |    | 高剂量组        | 中剂量组        | 低剂量组        | 空白对照组       | 高剂量组        | 中剂量组        | 低剂量组        | 空白对照组       |
| 心   | ♂  | 0.316±0.031 | 0.311±0.032 | 0.313±0.009 | 0.286±0.029 | 0.317±0.014 | 0.297±0.011 | 0.298±0.017 | 0.294±0.030 |
|     | ♀  | 0.340±0.023 | 0.337±0.037 | 0.350±0.032 | 0.342±0.034 | 0.319±0.021 | 0.306±0.022 | 0.307±0.022 | 0.300±0.031 |
| 肝   | ♂  | 2.591±0.137 | 2.426±0.135 | 2.372±0.181 | 2.360±0.219 | 2.281±0.086 | 2.355±0.270 | 2.275±0.128 | 2.155±0.133 |
|     | ♀  | 2.670±0.320 | 2.730±0.232 | 2.512±0.111 | 2.738±0.301 | 2.366±0.128 | 2.231±0.132 | 2.275±0.078 | 2.331±0.196 |
| 脾   | ♂  | 0.168±0.022 | 0.161±0.009 | 0.142±0.010 | 0.158±0.024 | 0.187±0.051 | 0.142±0.021 | 0.153±0.024 | 0.153±0.007 |
|     | ♀  | 0.202±0.022 | 0.197±0.043 | 0.193±0.016 | 0.209±0.017 | 0.190±0.028 | 0.170±0.017 | 0.164±0.013 | 0.187±0.022 |
| 肺   | ♂  | 0.382±0.055 | 0.348±0.039 | 0.351±0.042 | 0.319±0.052 | 0.364±0.063 | 0.341±0.038 | 0.387±0.030 | 0.352±0.051 |
|     | ♀  | 0.460±0.066 | 0.428±0.021 | 0.431±0.027 | 0.407±0.020 | 0.444±0.056 | 0.396±0.046 | 0.408±0.019 | 0.431±0.066 |
| 肾   | ♂  | 0.663±0.034 | 0.646±0.059 | 0.629±0.030 | 0.630±0.023 | 0.608±0.092 | 0.610±0.053 | 0.674±0.097 | 0.624±0.065 |
|     | ♀  | 0.721±0.042 | 0.666±0.070 | 0.670±0.027 | 0.698±0.064 | 0.611±0.034 | 0.570±0.050 | 0.618±0.067 | 0.585±0.040 |
| 脑   | ♂  | 0.442±0.012 | 0.401±0.036 | 0.386±0.028 | 0.410±0.042 | 0.418±0.036 | 0.391±0.006 | 0.372±0.043 | 0.409±0.029 |
|     | ♀  | 0.636±0.500 | 0.634±0.040 | 0.638±0.039 | 0.616±0.058 | 0.587±0.036 | 0.559±0.033 | 0.581±0.034 | 0.595±0.058 |
| 胸腺  | ♂  | 0.113±0.015 | 0.113±0.020 | 0.112±0.031 | 0.094±0.017 | 0.127±0.058 | 0.118±0.056 | 0.119±0.009 | 0.106±0.012 |
|     | ♀  | 0.168±0.018 | 0.154±0.016 | 0.166±0.012 | 0.156±0.019 | 0.156±0.016 | 0.201±0.063 | 0.159±0.036 | 0.167±0.020 |
| 肾上腺 | ♂  | 0.014±0.002 | 0.015±0.002 | 0.016±0.004 | 0.013±0.001 | 0.016±0.001 | 0.014±0.003 | 0.013±0.002 | 0.014±0.002 |
|     | ♀  | 0.026±0.008 | 0.025±0.007 | 0.026±0.006 | 0.024±0.004 | 0.024±0.005 | 0.027±0.006 | 0.023±0.006 | 0.025±0.006 |
| 睾丸  | ♂  | 0.599±0.038 | 0.609±0.018 | 0.596±0.046 | 0.616±0.024 | 0.670±0.065 | 0.606±0.037 | 0.579±0.040 | 0.593±0.084 |
| 附睾  | ♂  | 0.277±0.062 | 0.256±0.026 | 0.240±0.021 | 0.249±0.016 | 0.288±0.025 | 0.268±0.027 | 0.237±0.022 | 0.302±0.076 |
| 子宫  | ♀  | 0.202±0.068 | 0.258±0.076 | 0.227±0.024 | 0.274±0.056 | 0.196±0.043 | 0.167±0.037 | 0.192±0.049 | 0.190±0.073 |
| 卵巢  | ♀  | 0.049±0.007 | 0.063±0.025 | 0.069±0.029 | 0.057±0.011 | 0.054±0.007 | 0.053±0.012 | 0.045±0.006 | 0.056±0.017 |

**2.2.5 对 SD 大鼠血常规检查的影响** 各组大鼠水合氯醛麻醉后, 腹腔采血。血常规检查结果表明, 益骨口服液长期用药对大鼠血常规无明显影

响, 停药后 4 周检也没有发现迟发性影响。说明益骨口服液长期大量用药对血常规无影响, 结果见表 3 和表 4。

表 3 SD 大鼠给药后对血常规影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

Tab 3 Comparison of blood routine of SD rats among 4 groups at 12 weeks after consecutive administration ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

| 组别    | 性别 | 大鼠血常规              |                       |                      |                    |            |            |           |
|-------|----|--------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|------------|------------|-----------|
|       |    | WBC/ $10^9 L^{-1}$ | RBC/ $10^{12} L^{-1}$ | Hb/ $g \cdot L^{-1}$ | PLT/ $10^9 L^{-1}$ | LYM/%      | GRAN/%     | MID/%     |
| 高剂量组  | ♂  | 6.58±1.71          | 7.23±0.47             | 138±9                | 1 027±159          | 79.46±2.80 | 19.56±2.45 | 0.56±0.39 |
|       | ♀  | 5.74±1.27          | 7.13±0.39             | 137±7                | 1 018±122          | 80.56±4.17 | 18.32±4.98 | 0.74±0.27 |
| 中剂量组  | ♂  | 7.18±2.63          | 7.18±0.21             | 136±6                | 995±285            | 81.82±3.10 | 17.32±3.15 | 0.50±0.33 |
|       | ♀  | 5.91±1.25          | 7.31±0.62             | 132±4                | 1 048±123          | 83.18±4.03 | 16.24±3.89 | 0.58±0.22 |
| 低剂量组  | ♂  | 6.09±1.20          | 7.15±0.49             | 140±8                | 1 137±153          | 82.76±2.84 | 16.36±2.99 | 0.46±0.26 |
|       | ♀  | 6.18±1.29          | 7.48±0.34             | 139±6                | 1 074±143          | 84.00±3.11 | 15.64±3.28 | 0.50±0.25 |
| 空白对照组 | ♂  | 5.76±2.05          | 7.41±0.18             | 134±6                | 1 123±221          | 83.98±6.26 | 14.78±4.61 | 0.62±0.37 |
|       | ♀  | 5.10±1.25          | 7.09±0.29             | 135±9                | 1 005±217          | 83.88±7.55 | 13.32±8.74 | 0.80±0.45 |

表 4 SD 大鼠恢复期血常规影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

Tab 4 Comparison of blood routine of SD rats among 4 groups at 4 weeks after the terminal of adiministration ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

| 组 别   | 性别 | 大鼠血常规              |                       |                      |                    |            |            |           |
|-------|----|--------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|------------|------------|-----------|
|       |    | WBC/ $10^9 L^{-1}$ | RBC/ $10^{12} L^{-1}$ | Hb/ $g \cdot L^{-1}$ | PLT/ $10^9 L^{-1}$ | LYM/%      | GRAN/%     | MID/%     |
| 高剂量组  | ♂  | 7.10±1.84          | 7.46±0.39             | 135±4                | 1 039±78           | 80.66±4.43 | 17.84±5.03 | 0.70±0.48 |
|       | ♀  | 6.77±2.38          | 7.11±0.67             | 126±8                | 1 066±35           | 82.78±3.51 | 15.54±3.07 | 0.58±0.44 |
| 中剂量组  | ♂  | 6.47±1.89          | 7.01±0.21             | 137±5                | 1 025±86           | 83.28±5.50 | 14.48±4.97 | 0.60±0.41 |
|       | ♀  | 4.19±0.59          | 7.21±0.48             | 127±4                | 1 020±41           | 85.24±5.20 | 12.98±5.45 | 0.56±0.22 |
| 低剂量组  | ♂  | 6.88±1.81          | 7.41±0.59             | 140±4                | 1 055±94           | 78.16±5.07 | 20.30±4.99 | 0.32±0.30 |
|       | ♀  | 4.93±0.75          | 7.50±0.31             | 133±6                | 1 046±53           | 88.60±3.21 | 9.60±3.15  | 0.34±0.21 |
| 空白对照组 | ♂  | 4.92±1.29          | 7.38±0.39             | 136±8                | 934±81             | 82.94±4.54 | 15.52±4.37 | 0.24±0.15 |
|       | ♀  | 5.34±1.48          | 7.45±0.25             | 132±5                | 1 006±83           | 87.38±3.38 | 11.06±4.01 | 0.46±0.28 |

2.2.6 对 SD 大鼠血清生化检查影响 各组大鼠水合氯醛麻醉后,腹腔采血,离心。血清生化检查结果表明,益骨口服液长期大剂量给药 12 周对 SD 大鼠高剂量组 ALP 值有显著影响( $P<0.05$ ),低于空白对照组;对高剂量组 ♂,SD 大鼠的 ALB 有显著性影响( $P<0.05$ ),低于空白对照组。但大鼠 ALP 和 ALB 以及其它生化指标都在正常范围之内<sup>[2]</sup>。说明益骨口服液长期大剂量口服,对肝功能可能有一定影响,

有降低 ALP 和 ALB 倾向,但无明显肝功能损伤。

停药 4 周后检查,SD 大鼠生化各项指标均未见异常,说明停药后 SD 大鼠各组肝功能差异迅速消失,生化指标未见迟发性反应。

结果表明益骨口服液长期大剂量给药对 SD 大鼠肝功能有潜在影响,但无肝功能损伤,无迟发性损害作用,且停药后肝功能差异迅速消失,结果见表 5 和表 6。

表 5 SD 大鼠给药后对血生化的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

Tab 5 Comparison of blood biochemistry of SD rats among 4 groups at 12 weeks after consecutive adiministration( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

| 组 别   | 性别 | 大鼠血生化                 |                       |                         |                               |                       |                          |                            |
|-------|----|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------|
|       |    | ALT/ $U \cdot L^{-1}$ | AST/ $U \cdot L^{-1}$ | ALP T/ $U \cdot L^{-1}$ | TBILI/ $\mu mol \cdot L^{-1}$ | ALB/ $g \cdot L^{-1}$ | BUN/ $mmol \cdot L^{-1}$ | Cr/ $\mu mol \cdot L^{-1}$ |
| 高剂量组  | ♂  | 75±19                 | 241±67                | 91±15 <sup>1)</sup>     | 2.5±0.4                       | 29±3 <sup>1)</sup>    | 8.0±1.4                  | 38±10                      |
|       | ♀  | 38±10                 | 159±70                | 57±27 <sup>1)</sup>     | 1.6±0.8                       | 36±6                  | 8.4±1.9                  | 42±15                      |
| 中剂量组  | ♂  | 45±19                 | 217±90                | 104±53                  | 1.6±0.8                       | 32±2                  | 8.0±0.5                  | 37±6                       |
|       | ♀  | 37±14                 | 233±83                | 64±15                   | 2.0±0.7                       | 33±3                  | 7.5±1.4                  | 45±8                       |
| 低剂量组  | ♂  | 45±10                 | 217±90                | 109±17                  | 1.4±0.7                       | 33±1                  | 6.2±0.7                  | 34±3                       |
|       | ♀  | 31±10                 | 183±87                | 67±18                   | 1.1±0.3                       | 35±1                  | 6.7±0.5                  | 38±5                       |
| 空白对照组 | ♂  | 51±15                 | 239±133               | 139±36                  | 1.8±0.9                       | 35±1                  | 6.5±0.9                  | 40±14                      |
|       | ♀  | 39±13                 | 147±60                | 90±15                   | 2.2±0.8                       | 36±3                  | 8.0±1.7                  | 37±9                       |

注:与空白对照组比较,<sup>1)</sup> $P<0.05$

Note: Compared with control, <sup>1)</sup> $P<0.05$

表 6 SD 大鼠恢复期血生化的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

Tab 6 Comparison of blood biochemistry of SD rats among 4 groups at 4 weeks after the terminal of adiministration( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

| 组别    | 性别 | 大鼠血生化                 |                       |                       |                               |                       |                          |                            |
|-------|----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------|
|       |    | ALT/ $U \cdot L^{-1}$ | AST/ $U \cdot L^{-1}$ | ALP/ $U \cdot L^{-1}$ | TBILI/ $\mu mol \cdot L^{-1}$ | ALB/ $g \cdot L^{-1}$ | BUN/ $mmol \cdot L^{-1}$ | Cr/ $\mu mol \cdot L^{-1}$ |
| 高剂量组  | ♂  | 37±4                  | 180±66                | 95±18                 | 1.9±0.7                       | 32±2                  | 6.4±0.8                  | 38±7                       |
|       | ♀  | 27±2                  | 131±21                | 49±5                  | 1.8±0.8                       | 37±1                  | 8.0±1.2                  | 49±8                       |
| 中剂量组  | ♂  | 36±4                  | 139±40                | 102±22                | 1.7±0.8                       | 34±1                  | 5.0±0.4                  | 39±5                       |
|       | ♀  | 29±1                  | 125±11                | 65±19                 | 1.6±0.3                       | 39±2                  | 8.1±1.2                  | 43±9                       |
| 低剂量组  | ♂  | 41±6                  | 120±20                | 115±43                | 1.4±0.6                       | 34±1                  | 6.4±0.8                  | 32±4                       |
|       | ♀  | 29±3                  | 114±22                | 51±10                 | 1.5±0.4                       | 39±2                  | 8.9±0.9                  | 40±6                       |
| 空白对照组 | ♂  | 37±7                  | 108±24                | 110±21                | 1.7±0.7                       | 36±3                  | 5.9±0.3                  | 33±8                       |
|       | ♀  | 29±7                  | 110±9                 | 63±15                 | 1.7±0.5                       | 38±2                  | 8.6±0.4                  | 50±10                      |

2.2.7 病理检查 益骨口服液给药 12 周末及恢复 4 周活杀各组 SD 大鼠，取心脏、肝脏、肺、脾脏、肾脏、脑、肾上腺、胸腺、睾丸、附睾、子宫、卵巢，用 10%甲醛固定，首先检查高剂量

组和空白对照组，在高剂量组与空白对照组有区别的情况下，再做中剂量组和低剂量组，石蜡切片，HE 染色，光镜观察。SD 大鼠送检情况见表 7。

表 7 SD 大鼠送检情况表

Tab 7 Samples of SD rats for pathological examination

| 组别    | 给药时间    | 动物数/只 |   |    | 送检脏器                           |
|-------|---------|-------|---|----|--------------------------------|
|       |         | ♀     | ♂ | 合计 |                                |
| 高剂量组  | 给药 12 周 | 5     | 5 | 10 | 心，肝，脾，肺，肾，脑，肾上腺，胸腺，卵巢，子宫，附睾，睾丸 |
|       | 停药 4 周  | 5     | 5 | 10 |                                |
| 中剂量组  | 给药 12 周 | 5     | 5 | 10 | 心，肝，脾，肾                        |
|       | 停药 4 周  | 5     | 5 | 10 |                                |
| 低剂量组  | 给药 12 周 | 5     | 5 | 10 | 心，肝，脾，肾                        |
|       | 停药 4 周  | 5     | 5 | 10 |                                |
| 空白对照组 | 给药 12 周 | 5     | 5 | 10 | 心，肝，脾，肺，肾，脑，肾上腺，胸腺，卵巢，子宫，附睾，睾丸 |
|       | 停药 4 周  | 5     | 5 | 10 |                                |

益骨口服液给药 12 周和停药后 4 周高剂量组 SD 大鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾上腺、睾丸、附睾 (或子宫、卵巢)等组织的结构及细胞形态与同期空白对照组相比无显著性差异，表明对以上脏器组织无明显毒性作用。益骨口服液连续给药 12 周及恢复 4 周末见对各脏器有明显影响。由生化指标可见，其影响可能性较大的是肝脏和肾脏。

给药 12 周后，病理检查高剂量 SD 大鼠有肝细胞轻微水肿 1 例，肝细胞血管扩张 1 例轻微，1 例轻度，肾脏血管扩张 1 例轻微，1 例轻度。空白对照组肝细胞水肿 1 例轻微，肝细胞血管扩张 1 例轻度，肾脏血管扩张 1 例轻度。高剂量组和空白对照组均没有见肝细胞小叶结构改变、脂肪变、纤维增生等及肾脏肾小球改变、变性坏死、纤维增生、蛋白管型等肝肾实质性损伤，外表及大体检查均良好，而且空白对照组也有少量轻微轻度改变，说明益骨口服液连续给药 12 周对 SD 大鼠肝脏和肾脏均没有明显的损伤。

停药 4 周后，病理检查高剂量 SD 大鼠有肝细胞血管扩张 2 例轻微，肾脏血管扩张 1 例轻微。空白对照组肝细胞水肿 1 例轻微，肝细胞血管扩张 1 例轻微，肾脏血管扩张 1 例轻微。高剂量组和空白对照组均没有见肝细胞小叶结构改变、脂肪变、纤维增生等及肾脏肾小球改变、变性坏死、

纤维增生、蛋白管型等肝肾实质性损伤，外表及大体检查均良好，说明益骨口服液连续给药后停药 4 周，对 SD 大鼠肝脏和肾脏均没有迟发性损伤。

益骨口服液高剂量给药组和空白对照组没有明显区别，益骨口服液对肝肾无明显损伤，故可推断，中剂量和低剂量也无损伤。

3 结论

本次实验中，对益骨口服液进行了 2 个阶段的毒性试验。在第 1 阶段急性经口毒性试验中，50 只 SD 大鼠安全剂量均>40 g·kg<sup>-1</sup>，是临床拟用剂量的 32 倍。该样品属于无毒性物质。在第 2 阶段实验中，本药长期给药不影响大鼠活动、行为及外观；对大鼠生长发育无明显影响；大鼠的血常规指标无明显变化；大鼠心、肝、脾、肺、肾、脑、胸腺、肾上腺、子宫、卵巢、睾丸、附睾等组织无明显影响；长期大剂量口服给药对 SD 大鼠肝功能有一定影响，但没有肝功能明显损伤。由上述试验结果可以初步判断，益骨口服液是安全的。

REFERENCES

[1] CHEN Q. Traditional Chinese Drug Pharmacology Research Methodology(中药药理研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993: 33, 199, 808.

[2] LI Y K. Traditional Chinese Drug Pharmacology Experimental Methodology(中药药理实验方法学) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1991: 533.

收稿日期: 2010-11-11