

Experimental Study of Jiawei Erchen Granule on Acute Toxicity in Mice

Yuanyuan Xiao¹, Mengshu Yu¹, Ying Liu², Wenhan Liu¹, Cong Zhou¹, Shuo Zhou¹, Mengquan Li^{1*}

¹Medical Research Center of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang Heilongjiang

²Basic Medical College of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang Heilongjiang

Email: limengquan@mdjmu.edu.cn, 1229145234@qq.com

Received: Feb. 16th, 2020; accepted: Mar. 2nd, 2020; published: Mar. 9th, 2020

Abstract

Objective: To study the acute toxicity of Jiawei Erchen granule in mice. **Methods:** Crude drugs in prescription were extracted with water and concentrated under reduced pressure. Jiawei Erchen granule was made from the concentrate with starch and dextrin which served as excipients. The experimental mice were given Jiawei Erchen granule with the maximum concentration and the maximum volume that mice could tolerate, three times a day, gavage for one day. With continuous observation for 14 days, calculated maximal feasible dose and its multiple equivalent to the clinical dosage; recorded the general state and body mass; measured blood routine; examined histopathology of main organs. **Results:** Jiawei Erchen granule was prepared, per gram of which equivalent to 6.86 g of crude drugs in prescription. Maximal feasible dose for mice was equivalent 3.02 g/20 g of crude drugs in prescription, which was 147, multiples the recommended clinical adult dose. During 14 days of continuous observation, the mice had no abnormalities in appearance, diet, behavior, respiration, stool and urine; no affects in body mass and blood routine indexes; no pathological changes in heart, liver, spleen, lung, kidney and other important organs. **Conclusions:** Jiawei Erchen granule has not been found acute toxicity in mice, so its short-term application is relatively safe.

Keywords

Jiawei Erchen Granule, Acute Toxicity, Maximal Feasible Dose, Mice

加味二陈颗粒小鼠急性毒性实验研究

肖圆圆¹, 于梦书¹, 刘颖², 刘文涵¹, 周聪¹, 周硕¹, 李孟全^{1*}

¹牡丹江医学院医药研究中心, 黑龙江 牡丹江

²牡丹江医学院基础医学院, 黑龙江 牡丹江

*通讯作者。

Email: limengquan@mdjmu.edu.cn, 1229145234@qq.com

收稿日期: 2020年2月16日; 录用日期: 2020年3月2日; 发布日期: 2020年3月9日

摘要

目的: 研究加味二陈颗粒在小鼠体内的急性毒性。方法: 处方药材水提取, 减压浓缩, 用淀粉和糊精为辅料制备加味二陈颗粒。以最大浓度和小鼠所能耐受的最大体积灌胃给予加味二陈颗粒, 一日三次, 给药1天, 求算最大给药量及其相当于临床用量的倍数。连续观察14天, 记录小鼠一般状况、体质量, 测定血常规, 检查主要脏器组织病理学。结果: 制得加味二陈颗粒, 每克相当于处方药材6.86 g。小鼠最大给药量折算成处方药材量为3.02 g/20 g, 相当于临床成人使用剂量的147倍。14天内, 小鼠的一般状况未见异常, 体质量和血常规指标未受影响, 重要脏器组织病理学未见改变。结论: 尚未发现加味二陈颗粒小鼠急性毒性反应, 因此其短期应用相对安全。

关键词

加味二陈颗粒, 急性毒性, 最大给药量, 小鼠

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

急性毒性(Acute toxicity)是指药物在单次或24小时内多次给予后一定时间内所产生的毒性反应[1], 是药品安全性研究的基本内容之一。加味二陈颗粒(咳尔康)是课题组在古方二陈汤基础之上加味衍化而成的纯中药制剂, 主要药味包括半夏、陈皮、茯苓、甘草、黄芩、紫苑等, 具有理气健脾、燥湿化痰之功效。课题组前期研究揭示该制剂具有抗炎、抗菌、抗病毒以及提高机体免疫力的作用[2][3][4][5], 近期研究揭示该制剂具有体外抗肿瘤活性[6]。本实验通过在小鼠体内的急性毒性研究初步评价该制剂的安全性, 为进一步开发应用该制剂提供实验数据。

2. 材料与方法

2.1. 仪器

XE2100全自动血球分析仪(日本SYSMEX公司生产); BS214D分析天平(德国塞多利斯公司生产); TY6027显微镜(日本OLYMPUS公司生产)。

2.2. 动物

SPF级昆明小鼠, 雌雄各半, 体质量18~22 g, 来源: 哈尔滨医科大学实验动物学部, 合格证号: SCXK(黑)2013-0001。雌雄分笼饲养, 观察一周。实验室温度20℃~25℃, 相对湿度40%~60%, 自然光照, 专用饲料, 自由饮水。动物实验获得牡丹江医学院实验动物福利与伦理许可(批准文号: 20180926007)。

2.3. 药物

中药饮片：茯苓(安徽岳西, 批号: 14040006)、清水半夏(甘肃清水, 批号: 13110016)、甘草(内蒙古杭锦旗, 批号: 14040024)、紫苑(河北安国, 批号: 13090051)、黄芩(河北燕山, 批号: 13090030)、陈皮(福建泉州, 批号: 13030009), 以上中药饮片购自安国市同义中药饮片有限公司; 糊精、淀粉(安徽山河药用辅料股份有限公司); 黄芩苷(上海源叶生物科技有限公司, 批号: PS0912SB13)。

2.4. 加味二陈颗粒的制备

依照参考文献[6]制备加味二陈颗粒, 实际步骤简述如下: 处方药材速洗、水煎、浓缩, 加入辅料淀粉糊精混合制备成颗粒, 每克相当于处方药材 6.86 g。临床推荐成人(60 kg)每日使用该颗粒总量相当于处方药材 61.7 g/60 kg。

2.5. 最大给药量测定

加味二陈颗粒加水溶解后浓缩至最大浓度, 以小鼠最大耐受体积灌胃, 依照参考文献[7]推出如下公式求算小鼠最大给药量及其相当于成人临床用药量的倍数。小鼠每日最大给药量 = 最大浓度 × 最大耐受体积 × 每日给药次数 × 小鼠平均体重; 相当于成人每日用药量的倍数 = (小鼠的最大给药量/小鼠平均体重) × (成人平均体重/成人临床用药量)。

2.6. 小鼠的毒性反应测定

昆明种健康小鼠 40 只, 雌雄各半, 随机分为给药组和对照组, 雌雄分开, 每组 10 只。给药组给予加味二陈颗粒最大给药量, 一日三次, 每次间隔 6 h, 灌胃 1 天, 对照组给予等体积的生理盐水。连续观察 14 天, 记录小鼠一般状况、体质量, 测定小鼠血常规, 检测主要脏器组织病理学。

2.7. 统计学方法

采用 SPSS 19.0 版统计软件分析处理数据, 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间采用单因素方差分析, 两组间均数比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 最大给药量测定结果

按照 2.5 项下依法操作。以处方药材量核算, 加味二陈颗粒最大浓度为 1.68 g/mL。以小鼠最大灌胃体积 0.03 mL/g, 灌胃 3 次, 每次间隔 6 h。依照所推出的公式则: 小鼠每日最大给药量(折合生药) = $1.68 \times 0.03 \times 3 \times 20 = 3.02 \text{ g/20 g}$; 相当于成人每日用药量的倍数 = $(3.02/20) \times (60,000/61.7) = 147$ 倍。

3.2. 小鼠的毒性反应检测结果

3.2.1. 一般状况、体质量和血常规检测结果

按照 2.6 项下依法操作。小鼠一般状况的检测结果显示如表 1 所示: 给药组和对照组的外观特征、行为活动、粪便情况均未见异常, 小鼠无一例死亡, 表明加味二陈颗粒的最大给药量对小鼠一般状况不产生影响。小鼠体质量的检测结果如表 2 所示: 各组小鼠体质量实验后均高于实验前, 经过配对 *t* 检验差异具有统计学意义($P < 0.05$)。然而, 实验前后各组之间体质量经过单因素方差分析差异均没有统计学意义($P > 0.05$), 表明加味二陈颗粒没有影响小鼠体质量, 增重来自于自然生长, 与给药无关。小鼠血常规的检测结果如表 3 所示: 六项血常规指标在给药组和对照组之间, 经过单因素方差分析均无显著差异($P > 0.05$), 表明加味二陈颗粒对小鼠血常规指标无影响。

Table 1. Effect of Jiawei Erchen granule on general state of mice**表 1.** 加味二陈颗粒对小鼠一般状况的影响

| 组别 | 性别 | 数量 | 一般状况 | | | |
|-----|----|----|------|------|------|------|
| | | | 外观特征 | 行为活动 | 粪便情况 | 存活情况 |
| 给药组 | ♀ | 10 | 良好 | 正常 | 正常 | 存活 |
| | ♂ | 10 | 良好 | 正常 | 正常 | 存活 |
| 对照组 | ♀ | 10 | 良好 | 正常 | 正常 | 存活 |
| | ♂ | 10 | 良好 | 正常 | 正常 | 存活 |

Table 2. Effect of Jiawei Erchen granule on bodymass of mice**表 2.** 加味二陈颗粒对小鼠体质量的影响

| 组别 | 性别 | 体质量/g | | <i>t</i> 配对 | <i>P</i> |
|-----|----------|--------------|--------------|-------------|----------|
| | | 实验前 | 实验后 | | |
| 给药组 | ♀ | 20.71 ± 1.82 | 23.35 ± 1.50 | 15.58 | <0.05 |
| | ♂ | 19.98 ± 2.10 | 23.00 ± 0.46 | 20.40 | <0.05 |
| 对照组 | ♀ | 21.02 ± 1.76 | 24.12 ± 1.44 | 16.44 | <0.05 |
| | ♂ | 21.23 ± 2.74 | 24.59 ± 2.45 | 17.75 | <0.05 |
| | <i>F</i> | =0.65 | =1.49 | | |
| | <i>P</i> | >0.05 | >0.05 | | |

($\bar{x} \pm s, n = 10$)。

Table 3. Effect of Jiawei Erchen granule on blood routine of mice**表 3.** 加味二陈颗粒对小鼠血常规的影响

| 血常规指标 | 给药组 | | 对照组 | | <i>F</i> | <i>P</i> |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------|----------|
| | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | | |
| 白细胞计数($10^9/L$) | 4.42 ± 0.92 | 3.08 ± 0.84 | 3.43 ± 1.54 | 3.27 ± 0.82 | 1.81 | >0.05 |
| 红细胞计数($10^{12}/L$) | 9.31 ± 0.74 | 9.48 ± 0.76 | 9.24 ± 0.67 | 10.04 ± 0.88 | 1.55 | >0.05 |
| 血红蛋白(g/L) | 137.20 ± 18.32 | 141.80 ± 10.21 | 137.90 ± 13.70 | 138.40 ± 18.00 | 0.11 | >0.05 |
| 红细胞比容(L/L) | 0.491 ± 0.04 | 0.49 ± 0.04 | 0.50 ± 0.03 | 0.53 ± 0.05 | 1.16 | >0.05 |
| 平均血小板体积(fL) | 6.72 ± 0.23 | 6.40 ± 0.33 | 6.84 ± 0.41 | 6.96 ± 0.33 | 1.25 | >0.05 |
| 淋巴细胞计数($10^9/L$) | 3.00 ± 0.86 | 1.88 ± 0.45 | 2.51 ± 0.76 | 2.51 ± 1.29 | 1.51 | >0.05 |

($\bar{x} \pm s, n = 10$)。

3.2.2. 组织病理学检测结果

实验结束解剖动物，肉眼观察动物脏器颜色、形状、大小等，均未见明显病变。主要脏器采用体积分数为 10% 的甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片、HE 染色后光学显微镜观察。结果显示，给药组有 2 例、对照组有 1 例肝细胞内散在分布脂肪滴，但体积较小，数量较少。给药组有 1 例、对照组有 2 例肝脏汇管区可见少量炎细胞浸润。由于以上组织病变两组动物程度相似，故可以排除是受试药物所致，属动物的自发轻型病变。其他脏器未见病理组织学改变，见图 1。表明加味二陈颗粒对动物的主要脏器组织没有损害作用。

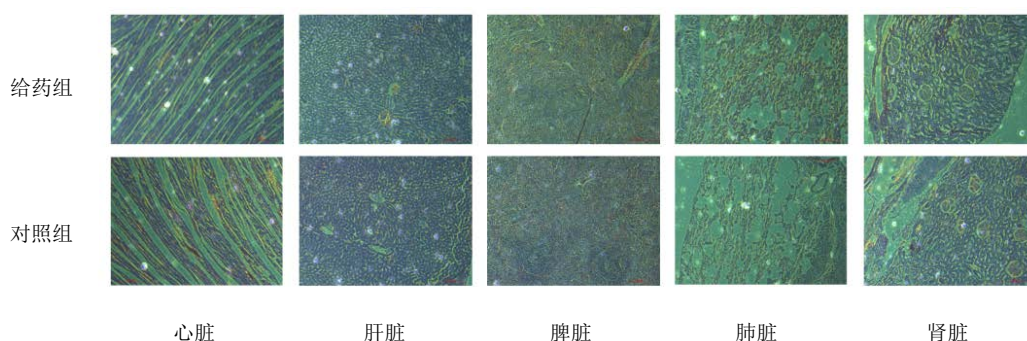


Figure 1. Observation on histological slices of mice primary viscera (×100)

图 1. 小鼠主要脏器组织切片观察(×100)

4. 讨论

药品的安全性、有效性和质量可控性是药品的三个基本属性，亦是药品审批的核心内容。加味二陈颗粒是在古方二陈汤基础之上加味衍化中药方剂，临床疗效显著。课题组前期完成该制剂的药效学实验及其制备工艺和质量控制[8] [9]，本研究通过急性毒性实验对其安全性提供一定的实验依据。

最大给药量指单次或 24 小时内多次(2~3 次)给药所采用的最大给药剂量。最大给药量测定是指以最大浓度、最大容积，单次或 24 h 内多次(2~3 次)给药的最大给药剂量。本研究测出加味二陈颗粒对小鼠的最大给药量，折合成处方药材量为 3.02 g/20 g，相当于成人临床每日用药量的 147 倍。此结果表明加味二陈颗粒安全范围宽。

毒性反应是安全性评价的重要关注点。本研究结果显示，在最大给药量下，小鼠的外观、饮食、行为活动、呼吸表现和大小便未见异常，小鼠体质量和血常规指标未受影响，重要脏器未见病理组织学改变。这些结果表面加味二陈颗粒毒性低，安全性高。

5. 结论

综上，本研究结果尚未发现加味二陈颗粒急性毒性反应，提示加味二陈颗粒临床应用较为安全。

特别值得一提的是，撰写此文之时正值新型冠状病毒肺炎爆发之际，开发特效药物乃属当务之急。中药作为治病祛疾的重要手段备受关注，从历史上看，中华民族屡经天灾、战乱和瘟疫，却能一次次转危为安，中药作出了重大贡献。写到这里，笔者心潮起伏，本文研究的中药加味二陈颗粒具有止咳、平喘、抗炎、抗病毒以及提高机体免疫力之功效，今又证实其毒性低，安全性高，或可用于新型冠状病毒肺炎。

致 谢

本研究在数据整理过程中得到牡丹江医学院大学生科研创新团队鲁懿萱和王静雯同学的鼎力相助，在此一并表示诚挚谢意。

基金项目

黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(201810229031)；牡丹江医学院大学生科研立项(2018)。

参考文献

- [1] 国家药品审评中心. 药物单次给药毒性研究技术指导原则[EB/OL]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=189>, 2014-05-13.

- [2] 郭强, 李孟全, 赵玉佳, 等. 咳尔康口服液抗炎作用研究[J]. 医药导报, 2010, 29(8): 996-997.
- [3] 黄永存, 孙立群, 黄波, 等. 咳尔康口服液体外抑菌作用的研究[J]. 国际中医中药杂志, 2009, 31(3): 205-206.
- [4] 黄永存, 孙立群, 黄波, 等. 咳尔康口服液体外抗病毒作用的研究[J]. 国际中医中药杂志, 2009, 31(5): 397-398.
- [5] 才玉婷, 李孟全, 梁忆红, 等. 咳尔康口服液对小白鼠碳粒廓清功能的影响[J]. 牡丹江医学院学报, 2009, 30(5): 16-17.
- [6] 侯广玉, 李孟全, 赵鹏程, 等. 咳尔康颗粒剂对肺腺癌细胞 A549 体外抗肿瘤作用[J]. 医药导报, 2019, 38(1): 27-32
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 117.
- [8] 巩丽虹, 李孟全. 咳尔康颗粒的质量控制方法研究[J]. 高师理科学刊, 2018, 38(2): 50-53.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 7-8.