

## 方药纵横

调脏舒秘合剂小鼠急性毒性实验研究<sup>\*</sup>林鑫静<sup>1</sup> 张明<sup>2\*\*</sup> 李鑫<sup>1</sup> 周春阳<sup>1</sup> 蒲跃<sup>2</sup> 袁斌<sup>1</sup> 范艺缤<sup>2</sup>范润勇<sup>2</sup> 夏天琴<sup>1</sup> 尤俊<sup>1</sup> 杨晓曦<sup>3</sup> 胥正敏<sup>1</sup>

(1. 川北医学院药学院, 四川 南充 637000; 2. 四川省南充市中医医院, 四川 南充 637000

3. 雅安市中医医院, 四川 雅安 625000)

**摘要:**目的 探讨调脏舒秘合剂口服给予对小鼠的急性毒性。方法 将昆明小鼠随机均分成对照组、常量组和极量组 3 组。灌胃给药, 药物剂量按照小鼠体重  $20.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  和  $104 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃。于 24 h 内重复给药 2 次。观察记录 14 d 内小鼠体重、精神状态、活动情况、饮食量、排泄物的变化。Elisa 检测肝功指标谷丙转氨酶 (glutamic-pyruvic transaminase, ALT) 和谷草转氨酶 (glutamic-oxalacetic transaminase, AST), 肾功指标尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和肌酐 (creatinine, CRE)。HE 染色法观测小鼠肝、肾、脾组织、结肠病理变化。结果 与对照组相比, 常量组和极量组小鼠体重无明显变化, 外观、精神状态、饮食、排泄物、一般情况均正常。解剖肉眼观小鼠肝、肾、结肠、脾, 均未见明显改变, HE 染色显示各组织无明显病理改变。肝功和肾功检测发现与对照组相比常量组和极量组无明显变化。结论 调脏舒秘合剂在极量  $104 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的情况下未引起小鼠中毒性损伤。

**关键词:**调脏舒秘合剂; 灌胃; 急性毒性; 小鼠; 肝功; 肾功

中图分类号: R285.5 文献标识码: A

文章编号: 1672-0571 (2023) 02-0091-05

DOI: 10.13424/j.cnki.mtem.2023.02.019

Experimental Study on Acute Toxicity of  
Tiaozang Shubi Mixture in MiceLIN Xinjing<sup>1</sup> ZHANG Ming<sup>2</sup> LI Xin<sup>1</sup> ZHOU Chunyang<sup>1</sup> PU Yue<sup>2</sup> YUAN Bin<sup>1</sup>FAN Yibin<sup>2</sup> FAN Runyong<sup>2</sup> XIA Tianqin<sup>1</sup> YOU Jun<sup>1</sup> YANG Xiaoxi<sup>3</sup> XU Zhengmin<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China;

2. Nanchong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Sichuan Nanchong 637000, China;

3. Ya'an Traditional Chinese Medicine Hospital, Sichuan Ya'an 625000, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the acute toxicity of Tiaozang Shubi mixture in mice after oral administration. **Methods** Kunming mice were randomly divided into control group, normal group and maximum group. The drug was administered by gavage at the dose of  $20.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  and  $104 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  respectively. Repeat administration twice within 24 hours. The changes of body weight, mental state, activity, diet and excretion of mice were observed and recorded within 14 days. Elisa was used to detect the liver function indicators of glutamic-pyruvic transaminase (ALT) and glutamic-oxalacetic transaminase (AST), and the renal function indicators of blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE). HE staining was used to observe the pathological changes of liver, kidney, spleen and colon in mice. **Results** Compared with the control group, the body weight of mice in the normal group and the maximum group did not change significantly, and their appearance, mental state, diet, excreta and general conditions were normal. No obvious changes were found in the liver, kidney, colon and spleen of the mice by anatomical and macroscopic observation, and no obvious pathological

<sup>\*</sup> 基金项目: 四川省科技计划项目-重点研发项目 (2020YFS0528)<sup>\*\*</sup> 通讯作者: 张明, 副主任中药师。E-mail: 3183066838@qq.com

changes were found in the tissues by HE staining. Compared with the control group, the liver function and kidney function of the normal group and the maximum group had no significant changes. **Conclusion** Tiaozang Shubi Mixture did not cause toxic damage in mice at the maximum dose of  $104\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

**Key words:** Tiaozang Shubi Mixture; Gavage; Acute toxicity; Mice; Liver function; Renal function

慢传输型便秘 (slow transit constipation, STC) 属于功能性便秘中的一个亚型<sup>[1]</sup>, 指结肠的运动功能障碍、肠内容物传输缓慢引起的以腹胀、便意淡漠及排便困难等为主要症状的慢性顽固性便秘<sup>[2-3]</sup>。西医治疗多采用泻剂, 初期有效, 若长期服用泻剂会产生药物依赖, 形成更为顽固的便秘<sup>[4]</sup>。中医病因病机主要责之饮食不当、情志失调、气血虚衰、六淫袭扰等所致大肠传导功能失常, 其本在大肠, 与脾胃肺肝肾等密切相关, 中医治疗方案效果较好, 相比于西药, 中药长期应用药物依赖性小, 停药后不易复发<sup>[5-7]</sup>。

调脏舒秘合剂是由南充市中医医院自主研制的能有效治疗 STC 的院内制剂, 经多年临床应用证实效果显著<sup>[8]</sup>。在《素问·五脏别论》中指出“魄门亦为五脏使”, 魄门的启闭有序、糟粕浊气排泄有度, 是心、肺、脾、肝、肾五脏生克制化、阴阳对立统一和气机升降出入共同作用的结果。调脏舒秘合剂在中医整体观念指导下, 基于“魄门亦为五脏使”理论, 并以“调脏利腑、润肠通便”为基本治则配伍良药而成<sup>[9]</sup>。近年来, 随着对中药及其制剂毒性研究的深入, 许多原认为无毒的中药, 甚至某些补益中药被证实具有一定的毒副作用<sup>[10]</sup>。因此, 为了更好的指导调脏舒秘合剂的临床安全性应用, 本研究依据《中药、天然药物急性毒性研究指导原则》的要求, 以小鼠作为实验模型, 探讨了院内制剂调脏舒秘合剂急性毒性作用<sup>[11-12]</sup>。

## 1 仪器与材料

**1.1 仪器** N4 紫外分光光度计 (上海仪电分析仪器有限公司); iMark Microplate Reader 酶标仪 (BIO-RAD 公司); CKX41 高倍显微镜 (OLYMPUS 公司); LEICA RM2235 轮转切片机 (Leica Biosystems Nussloch GmbH)。

**1.2 试药** 调脏舒秘合剂由南充市中医医院中药制剂中心提供, 调脏舒秘合剂配伍: 柏子仁 30 g, 生白术 60 g, 生白芍 45 g, 肉苁蓉 30 g, 瓜蒌皮 15 g, 瓜蒌子 20 g, 枳实 20 g, 当归 30 g, 生甘草

10 g。提取工艺为加水为药物质量 8 倍, 加水煎煮 2 次, 每次 1 h, 合并煎液滤过, 滤液浓缩至约 500 mL, 并检测芍药苷含量不低于 1.0%。最终每毫升药液含生药量为 0.52 g, 临床人使用剂量为 52 g/60 kg 每次, 一天两次。小鼠常量组浓度为  $20.8\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 相当于临床人用剂量的 24 倍, 极量组浓度为  $104\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 相当于临床人用剂量浓度的 120 倍。

HE 染色试剂盒 (批号: G1120) 购自 Solarbio; 无水乙醇与二甲苯购自重庆茂业化学试剂公司; 多聚甲醛购自成都科龙化工; 谷丙转氨酶 (ALT) 试剂盒 (批号: C009-2-1)、谷草转氨酶 (AST) 试剂盒 (批号: C010-2-1)、尿素氮 (BUN) 试剂盒 (批号: C013-2-1) 和肌酐 (CRE) 试剂盒 (批号: C011-2-1) 均购自南京建成生物工程研究所。

**1.3 实验动物** 鼠龄为 6 w (17 ~ 22 g) SPF 级昆明 (KM) 小鼠 30 只, 雌雄各半, 由川北医学院实验动物中心提供, 动物合格证号为: SCXK (川) 2018-18。实验环境为川北医学院实验动物中心, 温度:  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度: 55% ~ 70%, 自然昼夜, 适应性喂养 1 w 后开始实验。

## 2 方法

**2.1 小鼠灌胃实验** 给药前小鼠禁食不禁水 12 h, 实验当天实验组和对照组分别灌胃给药。对照组灌生理盐水。由于小鼠灌胃给药量受药物浓度和体积的限制, 根据《中药、天然药物急性毒性研究指导原则》<sup>[11]</sup>, 分别对常量组与极量组小鼠进行灌胃。灌胃体积为  $0.4\text{ mL}/10\text{ g}$  (小鼠一次能耐受的最大给药量), 于 24 h 内给药两次, 间隔期间不进食, 第二次给药后恢复正常饮食。

**2.2 观察记录小鼠日常情况** 给药后观察小鼠的毛色、进食、饮水、日常活动及精神状态等基本状况, 判断其是否出现毒性症状, 并从初次给药之日起, 每日记录一次小鼠的体重, 计算出小鼠的体重变化率。体重变化率 (%) = (实验后某一天的体重 - 第一天的体重) / 第一天的体重  $\times 100\%$ 。

**2.3 肝功能肾功能检测** 给药后 14 d, 在每只小鼠内眦取血, 收集到足够量后离心分离血清。按

照试剂盒说明,分别用酶标仪和紫外分光光度计检测谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)和肌酐(CRE)。

**2.4 脏器 HE 染色** 所有小鼠在采血后处死,并将其解剖,观察其内脏病理变化,若存在肉眼可见的异常变化则进行病理学检查。解剖后取小鼠肝、肾、结肠、脾等组织,并立即用 4% 多聚甲醛固定。收集完成后用乙醇对肝、肾、结肠、脾进行梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片,并经 HE 染色后,在光学显微镜下观察其病理学变化。

**2.5 统计学方法** 使用 SPSS 20.0 软件和 Graph-Pad Prism 6 软件处理数据、统计分析。计量数据以平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用  $t$  检验,三组间比较则采用方差分析。 $P < 0.05$  为差

异有统计学意义。

3 结果

**3.1 调脏舒秘合剂灌胃后小鼠一般情况** 实验结果显示,极量组调脏舒秘合剂灌胃后有 6 只小鼠出现轻微腹泻,但很快就恢复正常,考虑应为灌胃后的应激反应。对照组和常量组小鼠未出现腹泻情况。三组小鼠灌胃后,连续观察 14 d 并每日记录小鼠体重,体重变化见表 1,体重差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果显示小鼠精神状态无明显变化,正常饮食,眼角及口鼻无异常分泌物,皮毛光滑,无毒性反应。对照组在给药后第 2 d 死亡一只雄性,常量组给药后第 10 d 死亡一只雄性。发现死亡后对其立即解剖,未发现肉眼可见的病理变化。小鼠死亡情况见表 2。

表 1 调脏舒秘合剂灌胃对小鼠体重的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别		体重变化率(%)						
		第 2 d	第 4 d	第 6 d	第 8 d	第 10 d	第 12 d	第 14 d
对照组	♂	-3.7±1.9	2.3±2.9	8.3±5.7	15.4±5.5	25.3±6.7	51.8±2.9	53.8±3.1
	♀	-1.8±0.9	-2.2±1.9	13.2±4.2	21.4±4.1	32.8±3.0	37.5±2.6	39.2±3.5
常量	♂	-5.6±0.7	-0.8±1.0	15.8±1.8	25.7±2.7	27.1±3.1	34.0±3.6	35.2±4.2
	♀	-6.0±0.8	-1.7±0.6	16.9±0.7	27.6±1.2	29.1±1.3	37.8±2.7	36.5±1.8
极量	♂	-3.7±1.4	3.9±1.5	19.6±2.4	29.0±2.3	30.1±3.5	32.9±4.5	38.3±7.0
	♀	-2.6±1.3	-2.3±1.2	15.4±1.9	28.1±2.0	34.1±2.0	37.1±1.9	42.2±1.5

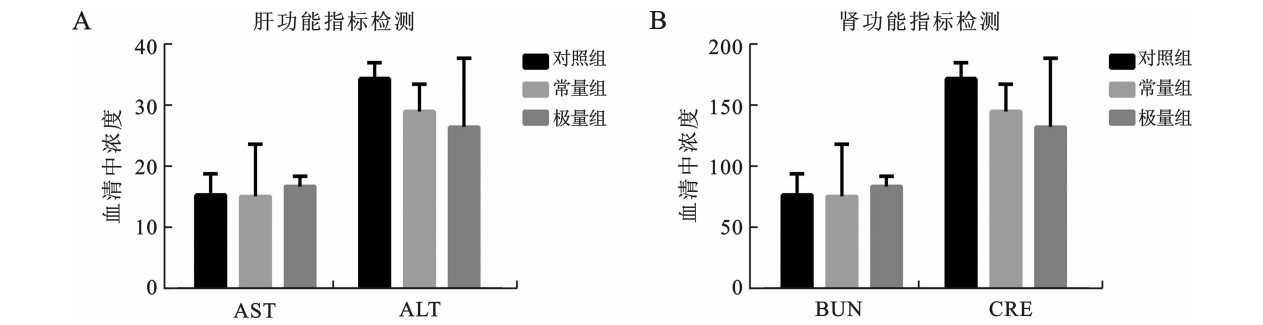
注:实验组与对照组比较,\* $P < 0.05$

表 2 小鼠死亡情况

组别	$n$	给药次数(次)	药物浓度	死亡只数(只)	死亡率(%)
对照组	10	2	生理盐水	1	10
常量	10	2	临床合剂	1	10
极量	10	2	5 倍合剂	0	0

**3.2 调脏舒秘合剂灌胃后小鼠血液生化学指标检验结果** 根据结果显示,常量组与极量组小鼠血液生化学指标中 AST、ALT、BUN、CRE 分别与对照组小鼠血液生化学指标相比,差异均无统计学

意义( $P > 0.05$ )。计算过程中 AST 标准曲线公式为  $Y = 3600.6X^2 - 32.544X + 2.236, r^2 = 0.9968$ ; ALT 标准曲线公式为  $Y = 989.46X^2 + 363.35X + 0.2219, r^2 = 0.9999$ 。结果见图 1。

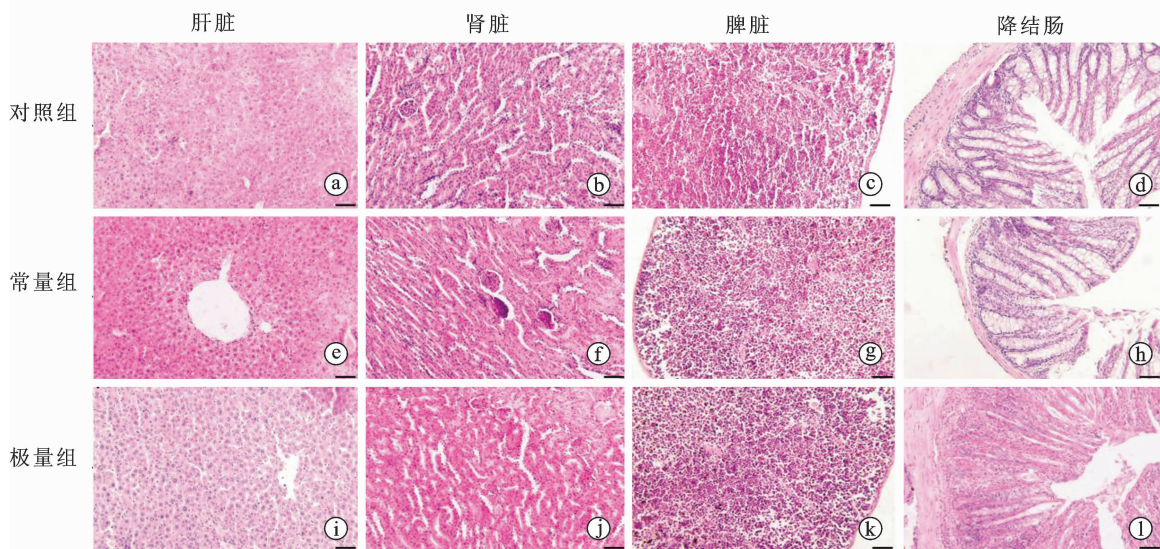


A. 血液中肝功能指标浓度( $U \cdot L^{-1}$ ); B. 血液中肾功能指标浓度, BUN( $mmol \cdot L^{-1}$ ), CRE( $\mu mol \cdot L^{-1}$ )

图 1 小鼠血液中肝功能与肾功能检测结果

**3.3 小鼠主要脏器形态学检查结果** 三组小鼠的肝脏、肾脏、降结肠段和脾脏 HE 染色结果如图 2。对照组小鼠肝组织结构正常、细胞排列紧密,未见坏死等现象,肝血窦结构规整,肝小叶完整清晰。常量组、极量组与对照组未见明显差异,肝脏组织正常。肾脏组织肾小球结构完整,出球

小管入球小管血管壁完整厚度均匀,未见炎性细胞浸润,毛细血管无充血无扩张。结肠组织肠黏膜结构完整,细胞连接紧密,腺体及杯状细胞排列整齐,未见炎性细胞浸润。脾脏组织形态正常,脾血窦结构完整,脾索内细胞形态正常。HE 染色结果显示在三组小鼠中,未见病变情况。



注:a,b,c,d 为对照组肝脏、肾脏、脾脏、降结肠;e,f,g,h 为常量组肝脏、肾脏、脾脏、降结肠;i,j,k,l 为极量组肝脏、肾脏、脾脏、降结肠

图 2 小鼠主要脏器 HE 染色情况

## 4 讨论

“阴平阳秘、精神乃治”,调脏舒秘合剂根据中医学整体观念,强调五脏之间的协调和平衡,脏调腑利<sup>[13]</sup>。方中重用柏子仁养心为君,生白芍柔肝、生白术健脾、肉苁蓉温肾和全瓜蒌润肺共同为臣,当归和枳实调理气血共为佐助,生甘草调和诸药为使,符合经方配伍原则,药少而精,效专力宏,在本院临床使用二十余年,结果显示该制剂具有良好的治疗便秘和五脏同调的功效<sup>[8]</sup>。

为了进一步推广调脏舒秘合剂的临床应用,本研究以小鼠作为模型,进行了急性毒性实验,进而为该合剂临床应用安全性提供理论依据。肝脏是药物代谢和排泄的主要器官,是中和清理毒素的主要场所,因此肝脏易受药物影响产生病理损伤<sup>[14-15]</sup>。肾脏是体内过滤器,可保持体液平衡,去除新陈代谢的废弃物,是药物代谢的重要器官<sup>[16]</sup>。脾脏是造血器官,含有丰富且复杂的血管,可以滤过各种感染物质。因此在急毒试验中选择脾脏观察是否产生病理损伤来判断药物的安全性<sup>[17]</sup>。本实验结果显示,小鼠在能承受的极量给药后,主要

参与代谢的器官肝肾脾未见急性病理损伤;靶器官肠的病理切片均未见急性病理改变,肠道黏膜未见明显炎症及其他反应。

肝肾功的生化指标作为药物急毒评价的重要指标<sup>[18-19]</sup>。BUN 是蛋白代谢的终产物,并通过肾脏随尿液排出体外,它构成了血液中绝大部分的非蛋白氮<sup>[20]</sup>。当肾小球滤过功能下降时,血液中 BUN 会随之升高<sup>[21]</sup>。可能出现失水过多造成尿素潴留,急性肾小球肾炎等问题。因此血液中 BUN 的水平对肾损伤检测有重要意义。CRE 由肌肉代谢产生,且 99% 由肾脏排泄。当肾脏有实质性损害,血清中的肌酐就会升高<sup>[22]</sup>。临床上测定肌酐含量主要用于检测肾脏功能的变化,可以帮助鉴别肾脏功能是否处于潜在的衰竭状态或处于改善中<sup>[23]</sup>。在本次实验中,常量组和极量组小鼠 BUN 和 CRE 与对照组无明显差异,表明该合剂对肾功能无影响。AST 与 ALT 在正常血清中的含量很低,当肝细胞受损时,肝细胞膜通透性增加,胞质内的 AST 与 ALT 释放入血,致使血清 AST 与 ALT 的酶活性升高<sup>[24]</sup>。本研究中常量组、极量组

小鼠与对照组小鼠相比血清中 AST、ALT 水平没有升高,说明该合剂对肝脏无急性毒性。

本研究中极量组部分小鼠的血液生化指标相比于对照组小鼠不但没有升高,甚至有不同程度的降低,可能存在调节肝肾功的作用。在未来的研究中我们将扩大样本量以证实此五脏同调作用,并探究可能的作用机制,为临床治疗脏腑失调疾病提供更好的选择。本次研究证实,调脏舒秘合剂在临床患者使用浓度的 24 倍 120 倍的极量下,均未对小鼠脏器和生理状态造成急性毒性作。参照《中药新制剂开发与应用》,小鼠 1 d 给药量为临床患者使用剂量 100 倍及以上时未出现急性毒性反应,则认为该药临床使用剂量是安全的<sup>[25-26]</sup>。故本研究中调脏舒秘合剂临床使用浓度是安全的,且安全范围较大,具有良好的应用前景。

参考文献

[1] 刘启鸿,柯晓,骆云丰,等.理气通便方治疗慢传输型便秘气滞证 30 例随机对照试验[J]. 中医杂志,2021,62(7):604-608.

[2] 王澍彬,徐小玲,周义,等.大黄配方颗粒对慢性传输性便秘模型大鼠 Cajal 间质细胞自噬及胃肠动力调节作用研究[J]. 国际中医中药杂志,2021,43(8):777-783.

[3] 牛媛媛,汪龙德,胥文娟,等.汪龙德主任医师辨证论治功能性便秘经验[J]. 陕西中医药大学学报,2022,45(5):30-34.

[4] 赵向东,曹永清,徐向.基于中医传承辅助系统的曹永清治疗便秘用药规律研究[J]. 国际中医中药杂志,2020,42(6):583-587.

[5] 王芳.中医治疗便秘的研究进展[J]. 临床合理用药杂志,2020,13(1):171-173.

[6] 黎琮毅.功能性便秘的中医治疗研究进展[J]. 实用中医内科杂志,2020,34(4):20-24.

[7] 王微微,范红结,杨文红,等.金钗石斛提取物对便秘模型小鼠通便功能的影响[J]. 食品工业科技,2021,42(20):342-347.

[8] 范艺缤,魏照洲,唐学贵,等.调脏舒秘汤加减治疗慢传输型便秘临证探析[J]. 实用中医药杂志,2019,35(6):749-750.

[9] 范艺缤,吴至久,魏照洲.调脏舒秘汤对慢传输型便秘大鼠结肠推进率和微管相关蛋白 2 表达影响的实验研究[J]. 中医药临床杂志,2016,28(9):1263-1266.

[10] 夏青,张晓昕,徐柯心,等.《中华人民共和国药典》2015 版收载的有毒中药毒性研究概况[J]. 环球中医药,2017,10(3):377-384.

[11] 朱凤,刘与进,吴慧,等.医院制剂复方苦参合剂对小鼠急性毒性实验研究[J]. 亚太传统医药,2021,17(1):22-24.

[12] 《中药、天然药物急性毒性试验技术指导原则》课题组.中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则[S]. GPT2-1,2004.

[13] 宋瑞芳.《内经》关于便秘的认识[J]. 现代中医药,2021,41(1):106-110.

[14] 胡绍杰,蒋莎莎,张瑾,等.细胞凋亡在肝脏衰老中的作用[J]. 生命科学研究,2018,22(5):397-405.

[15] 师少军.肝脏“代谢-转运互作”及其对药物药代动力学、疗效和毒性影响的研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2020,40(5):579-585.

[16] 刘程程,张嘉阳,杨光锐,等.生物钟基因与肾脏功能和疾病[J]. 生命科学,2021,33(6):736-741.

[17] 林志,李珊珊,张颀,等.药物临床前安全性评价中脾脏的作用和意义[J]. 医学研究杂志,2010,39(1):111-113.

[18] 田海军,刘开放,任胜杰.十二烷基苯磺酸钠对黄河鲤急性毒性及血液生理生化指标的影响[J]. 水产科学,2021,40(3):380-386.

[19] 吴倩.血清胱抑素 C、肌酐、尿素氮联合检测在肾功能损害诊断中的应用价值[J]. 临床医学,2022,42(10):68-69.

[20] 杨琳,高淑婷,许欢.温肾健脾利水方联合缬沙坦胶囊治疗脾肾气虚型慢性肾小球肾炎临床研究[J]. 新中医,2022,54(23):93-97.

[21] 许丽,孙祖越.常见实验动物血液学和血清生化指标背景数据的建立[C]//中国毒理学会第四届中青年学者科技论坛论文集,2014:41.

[22] 唐炯,陆春梅.百令胶囊联合肾衰宁颗粒治疗慢性肾功能衰竭的疗效观察[J]. 世界中西医结合杂志,2022,17(10):2029-2034.

[23] 董书清.血清肌酐、尿素氮的检测值及其比值与肾脏损害的探讨[J]. 中国医药指南,2011,9(36):136-137.

[24] 聂青和.肝衰竭实验室检测的临床价值及新指标评价[J]. 临床肝胆病杂志,2013,29(9):666-669.

[25] 蒋平,杨阳,孙阳,等.养胃颗粒灌胃给药对小鼠的急性毒性实验[J]. 时珍国医国药,2014,25(4):841-843.

[26] 谢秀琼.中药新制剂开发与应用[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2006:726-747.