

小儿牛黄清心散对幼年大鼠的毒性作用

范治云, 李志坤, 赵 岩, 孙昌华, 祝清芬
(山东省食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室, 山东 济南 250101)

摘要: **目的** 观察小儿牛黄清心散对幼年大鼠的毒性反应, 为其临床应用提供参考。**方法** SD 幼年大鼠 120 只随机分为对照组和小儿牛黄清心散高、中、低剂量组, 每组 30 只。采用高剂量 (7.5 g/kg)、中剂量 (3.75 g/kg)、低剂量 (1.875 g/kg) 小儿牛黄清心散连续灌胃给药 14 d, 观察大鼠一般状况、体质量、摄食量、血常规、血凝、血生化、骨密度、脏器系数及组织病理学变化。**结果** 小儿牛黄清心散各剂量对大鼠一般状况、血常规、骨密度及脏器系数均无明显影响; 中剂量可引起大鼠血清丙氨酸转氨酶、总胆红素、甘油三酯指标增高, 高剂量对大鼠体质量有一定的抑制作用, 摄食量降低, 可引起大鼠血液纤维蛋白原、血清丙氨酸转氨酶、谷草转氨酶、总胆红素、甘油三酯指标增高; 停药 14 d 后, 除谷草转氨酶指标外, 其他各项指标基本恢复正常。**结论** 小儿牛黄清心散的毒性靶器官可能为肝、肾, 1.875 g/kg 为无毒性反应剂量。

关键词: 小儿牛黄清心散; 幼年大鼠; 毒性

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)09-2563-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.09.055

药品上市后再评价是对药品上市前研究的必要补充及上市后研究的全面总结, 是药品评价过程的重要阶段。由于历史原因, 大部分中成药在临床广泛使用的同时, 其安全性缺乏科学的临床证据。尤其是近年来, 中药安全事件屡见报端, 人们从“中药安全无毒”的片面认识走入了“中药谋财害命”的另一个片面认识, 其安全性问题成为医药界乃至社会各界所关注的热点^[1-2]。小儿牛黄清心散主要由天麻、雄黄等 14 味中药配伍而成, 为临床较为常用的儿科药物^[3-5], 其用药安全性问题更为引起重视, 但其安全性研究国内外未见报道^[6-7]。为此, 本文依据长期毒性实验方法和技术要求, 并根据小儿牛黄清心散儿童用药的特点, 选用幼年大鼠, 对其进行了为期 14 d 的毒性试验。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠, 4~5 周龄, 体质量 54~63 g, 雌雄各半, 购于济南朋悦实验动物繁育有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(鲁) 2014-0007, 温度 20~26 ℃, 相对湿度 40%~70%, 实验动物使用许可证号 SYXK(鲁) 2013-0012。

1.2 药物 小儿牛黄清心散 (山东方健制药有限公司, 批号 20160914, 0.3 g/袋)。实验时用蒸馏水配制成所需浓度。

1.3 仪器 ADVIA 2120i 全血细胞分析仪 (德国西门子子公司); CA-530 全自动血凝分析仪 (日本希森美康公司); 7180 全自动生化分析仪、DCS-600EXV 骨密度仪 (日本日立公司); DP72 病理图文处理系统、BX51 生物显微镜 (日本奥林巴斯公司)。

2 方法 参考文献 [8-10] 报道。

2.1 分组与给药 取上述大鼠 120 只, 按体质量随机分成 4 组, 每组 30 只, 雌雄各半。检疫 7 d 后, 每笼 3 只, 雌雄分养, 并开始给药, 小儿牛黄清心散低、中、高剂量分别用蒸馏水配成 62.5、125、250 mg/mL 的混悬液, 给药容量 15.0 mL/kg, 每日上下午各灌胃给药 1 次, 剂量分别达 1.875、3.75、7.5 g/kg, 对照组同法给等体积蒸馏水。给药后予常规颗粒饲料喂饲, 连续给药 14 d。每周测体质量 2 次, 摄食量 2 次, 并根据体质量变化调整药量。每日观察动物的外观、行为体征、活动、精神状态、进食、体质量变化及粪便等情况。在给药 14 d 和恢复期 (停药 14 d) 后, 各剂量组分别抽取 2/3 和 1/3 的大鼠, 麻醉采血后处死。收集全血, 检测血常规、血凝、血生化指标。同时剖取取心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胸腺、脑、子宫、卵巢、睾丸、附睾等重要脏器组织, 肉眼观察组织脏器的变化、称重, 计算各脏器指数 (单位 g/100 g 体质量), 并作病理学组织检查。另取一侧股骨作骨密度检查。

2.2 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析组间差异, *t* 检验进行组内比较。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 一般观察 在给药期间, 各剂量组大鼠的外观体征、行为活动等均无明显异常; 给药当天下午, 药物组粪便呈土黄色软便, 恢复期停药第 2 天, 逐渐恢复正常; 中、高剂量组大鼠日摄食量降低, 体质量增长缓慢; 恢复期体质量、日摄食量等均恢复正常。见表 1~2。

表 1 大鼠给药前、给药期间和恢复期体质量 (g, $\bar{x}\pm s$)

性别	组别	给药前	给药 7 d	给药 14 d	恢复期 7 d	恢复期 14 d
雄性	对照组	58.7±2.4	107.1±5.5	167.4±8.2	228.7±7.7	279.1±13.7
	低剂量组	58.8±2.2	104.3±5.1	163.1±12.3	221.1±8.4	267.2±21.6
	中剂量组	58.8±2.2	104.6±7.0	160.2±9.0	223.5±8.7	270.4±18.8
	高剂量组	58.7±2.2	99.5±6.6**	147.2±10.2**	196.8±8.5**	247.1±12.8
雌性	对照组	59.8±2.1	108.6±7.1	148.6±12.0	164.9±7.7	186.8±8.8
	低剂量组	59.9±2.0	106.7±5.3	145.3±9.7	174.1±10.7	188.7±13.7
	中剂量组	59.7±2.0	101.4±5.8*	135.5±9.8**	159.6±10.1	182.9±16.0
	高剂量组	59.7±2.3	94.4±10.1**	129.6±11.7**	159.5±11.7	182.5±17.0

注:给药前及给药期间 $n=15$,恢复期 $n=5$;与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 2 大鼠给药期间及恢复期日摄食量统计结果 (g/只, $\bar{x}\pm s$)

组别	雄性		雌性	
	给药期	恢复期	给药期	恢复期
对照组	4.6±0.2	8.5±3.3	4.3±0.2	6.0±1.6
低剂量组	4.4±0.1	8.9±3.4	4.1±0.2	6.0±1.9
中剂量组	4.3±0.2**	8.9±3.2	3.8±0.2*	5.8±1.3
高剂量组	3.9±0.2**	8.6±2.8	3.5±0.3**	5.9±1.9

注:给药期 $n=5$,恢复期 $n=2$;与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.2 对大鼠血常规、血凝学的影响 给药结束,其血常规

表 3 给药结束血凝学检查结果 ($\pm s$, $n=10$)

性别	组别	PT/s	APTT/s	Fbg/(g·L ⁻¹)	TT/s
雄性	对照组	12.0±0.4	19.7±1.6	2.814±0.311	44.0±3.9
	低剂量组	12.2±0.3	20.0±1.7	2.860±0.429	45.2±3.1
	中剂量组	12.0±0.2	20.8±2.5	2.841±0.235	45.0±2.0
	高剂量组	12.3±0.5	22.3±4.7	3.307±0.368**	46.6±5.0
雌性	对照组	12.2±0.4	22.2±2.3	2.499±0.268	42.3±3.1
	低剂量组	11.9±0.3	21.2±1.8	2.341±0.222	42.2±3.3
	中剂量组	11.9±0.3	21.9±1.2	2.511±0.277	42.9±3.2
	高剂量组	12.0±0.3	23.0±2.0	3.080±0.363**	41.5±3.9

注:与对照组比较,** $P<0.01$ 。

表 4 恢复期观察结束血凝学检查结果 ($\bar{x}\pm s$)

性别	组别	PT/s	APTT/s	Fbg/(g·L ⁻¹)	TT/s
雄性	对照组	12.5±0.5	20.0±3.0	2.598±0.261	43.5±6.9
	低剂量组	11.9±0.2	19.7±1.0	2.442±0.224	46.2±2.2
	中剂量组	12.1±0.6	19.9±0.4	2.635±0.075	43.1±9.7
	高剂量组	12.1±0.2	19.7±1.5	2.711±0.274	46.4±1.9
雌性	对照组	12.3±0.2	18.7±1.3	2.406±0.126	42.2±4.3
	低剂量组	12.3±0.4	18.7±0.9	2.308±0.115	43.1±2.3
	中剂量组	12.6±0.3	20.7±1.3	2.497±0.389	41.4±3.2
	高剂量组	12.5±0.5	18.7±0.8	2.630±0.489	40.2±2.8

表 5 雄性动物给药结束血清生化指标检测结果 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	TBIL/(μmol·L ⁻¹)
对照组	58.50±18.63	189.60±29.26	50.74±3.57	29.33±1.51	4.14±0.70
低剂量组	59.10±6.82	209.70±12.92	48.07±2.28	28.35±1.04	4.12±0.41
中剂量组	73.10±15.10*	232.70±49.36	49.22±2.00	28.85±1.08	4.96±0.76*
高剂量组	74.40±9.16*	223.90±42.89	50.39±1.88	28.64±0.89	4.99±0.81*
组别	ALP/(U·L ⁻¹)	GLU/(mmol·L ⁻¹)	UREA/(mmol·L ⁻¹)	CREA/(μmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)
对照组	449.90±138.71	4.43±0.54	4.98±1.01	11.90±1.29	2.22±0.28
低剂量组	444.20±108.43	3.99±0.42	4.74±0.56	12.00±1.33	2.28±0.33
中剂量组	409.90±76.89	3.76±1.17	4.23±0.51	11.90±1.37	2.25±0.31
高剂量组	439.30±53.45	4.17±0.80	4.77±0.72	11.90±1.37	2.46±0.15
组别	TG/(mmol·L ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	K ⁺ /(mmol·L ⁻¹)	Na ⁺ /(mmol·L ⁻¹)	Cl ⁻ /(mmol·L ⁻¹)
对照组	0.72±0.29	864.20±146.79	4.44±0.61	144.56±1.83	103.67±1.73
低剂量组	0.88±0.30	958.10±146.62	4.44±0.51	144.39±1.00	104.84±1.91
中剂量组	1.13±0.38	1 050.10±261.57	4.46±0.44	144.34±1.23	104.64±0.94
高剂量组	1.04±0.41	972.00±283.25	4.48±0.58	145.33±1.15	104.33±1.70

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

指标无显著变化 ($P>0.05$)。高剂量纤维蛋白原 (Fbg) 指标高于对照组,恢复期恢复正常。血凝学检查结果见表 3~4。

3.3 对大鼠血生化的影响 低剂量组血生化指标无显著变化 ($P>0.05$)。中剂量大鼠血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、总胆红素 (TBIL)、甘油三酯 (TG) 指标增高;高剂量组大鼠血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、甘油三酯 (TG) 指标增高;停药 14 d 后,除 AST 外,其他各项指标基本恢复正常。见表 5~8。

表 6 雌性动物给药结束血清生化指标检测结果 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	TBIL/(μmol·L ⁻¹)
对照组	50.80±10.35	180.50±27.54	50.66±3.16	30.09±1.42	3.19±0.45
低剂量组	47.40±13.35	178.50±32.13	51.05±2.63	30.38±1.00	3.64±0.83
中剂量组	51.40±11.85	185.90±26.50	52.05±3.43	30.48±1.80	4.24±0.88**
高剂量组	74.90±16.41**	213.60±26.42*	50.25±2.95	29.08±1.62	4.39±0.64**
组别	ALP/(U·L ⁻¹)	GLU/(mmol·L ⁻¹)	UREA/(mmol·L ⁻¹)	CREA/(μmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)
对照组	297.90±74.68	5.64±0.69	5.33±1.15	14.70±1.49	2.10±0.38
低剂量组	295.10±84.48	5.03±0.59	5.35±0.73	13.90±1.52	2.16±0.52
中剂量组	276.80±25.76	4.61±0.97*	5.64±1.34	14.60±1.17	2.14±0.21
高剂量组	345.40±74.64	4.94±0.89	5.90±0.82	14.30±1.16	2.41±0.41
组别	TG/(mmol·L ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	K ⁺ /(mmol·L ⁻¹)	Na ⁺ /(mmol·L ⁻¹)	Cl ⁻ /(mmol·L ⁻¹)
对照组	0.54±0.13	897.00±155.78	4.24±0.25	143.63±1.26	106.49±1.56
低剂量组	0.59±0.17	929.80±264.70	4.35±0.56	144.32±1.66	105.86±1.71
中剂量组	0.84±0.17**	890.30±200.08	4.97±0.94	144.15±1.81	105.41±1.68
高剂量组	0.84±0.21**	972.80±204.23	4.84±0.84	143.20±1.30	104.17±1.38**

注:与对照组比较,**P*<0.05,***P*<0.01。

表 7 雄性动物恢复期结束血清生化指标检测结果 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	TBIL/(μmol·L ⁻¹)
对照组	35.80±4.60	130.20±29.47	50.92±1.07	29.76±0.41	3.12±0.40
低剂量组	44.60±10.60	130.20±16.60	47.90±3.12	28.24±1.45	3.14±0.37
中剂量组	41.40±6.11	133.40±15.24	50.70±3.09	29.50±1.32	3.05±0.25
高剂量组	39.60±8.14	153.00±30.31	49.06±2.45	29.04±0.93	3.33±0.65
组别	GLU/(mmol·L ⁻¹)	UREA/(mmol·L ⁻¹)	CREA/(μmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
对照组	5.91±0.91	4.07±0.74	21.60±0.89	1.43±0.25	0.30±0.08
低剂量组	6.61±0.55	3.54±0.61	21.00±2.45	1.54±0.21	0.28±0.08
中剂量组	6.01±1.15	3.99±0.62	21.00±1.00	1.89±0.37	0.29±0.06
高剂量组	5.83±0.76	4.08±0.85	19.20±0.84*	1.81±0.31	0.35±0.14
组别	CK/(U·L ⁻¹)	K ⁺ /(mmol·L ⁻¹)	Na ⁺ /(mmol·L ⁻¹)	Cl ⁻ /(mmol·L ⁻¹)	
对照组	645.60±229.26	4.32±0.23	145.72±0.54	107.88±0.70	
低剂量组	613.80±101.50	4.25±0.23	144.88±0.93	108.70±1.26	
中剂量组	712.60±66.94	4.49±0.13	144.70±0.71	108.12±1.53	
高剂量组	829.20±261.70	4.34±0.13	145.46±0.91	108.32±1.93	

表 8 雌性动物恢复期结束血清生化指标检测结果 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	TBIL/(μmol·L ⁻¹)
对照组	30.80±5.36	141.80±11.56	51.68±3.28	30.58±1.22	3.85±0.68
低剂量组	28.80±6.65	152.80±7.05	51.94±1.39	31.08±0.82	3.55±0.24
中剂量组	35.00±8.37	160.80±12.38	50.98±1.00	30.54±0.76	3.85±0.63
高剂量组	35.20±6.42	169.60±21.80*	53.52±4.57	31.80±2.39	4.39±0.61
组别	ALP/(U·L ⁻¹)	GLU/(mmol·L ⁻¹)	UREA/(mmol·L ⁻¹)	CREA/(μmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)
对照组	176.20±30.58	6.21±0.81	6.08±0.72	23.80±4.15	1.48±0.29
低剂量组	163.80±36.70	6.01±0.93	7.84±1.91	27.80±5.81	1.50±0.25
中剂量组	165.20±53.87	5.70±0.72	6.52±1.03	24.80±2.39	1.68±0.24
高剂量组	176.80±29.38	5.72±0.72	7.51±1.59	27.20±4.44	1.83±0.15
组别	TG/(mmol·L ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	K ⁺ /(mmol·L ⁻¹)	Na ⁺ /(mmol·L ⁻¹)	Cl ⁻ /(mmol·L ⁻¹)
对照组	0.20±0.04	645.60±102.29	4.10±0.33	144.42±1.06	108.70±2.05
低剂量组	0.21±0.05	813.20±103.92	4.33±0.22	143.42±1.11	108.26±1.52
中剂量组	0.24±0.04	794.00±100.45	4.18±0.29	143.70±0.53	106.76±1.25
高剂量组	0.25±0.04	831.40±140.96	5.10±1.76	144.54±1.32	108.88±1.20

3.4 对大鼠脏器系数、骨密度及脏器病理组织学的影响 给药结束、恢复期结束各组动物组织脏器肉眼观察其位置，形态，色泽，硬度等均无明显异常情况，各组主要脏器系数及骨密度与对照组比较均无统计学差异 (*P*>0.05)。组织病理学检查，本品各剂量组灌胃给药 14 d 后恢复 14 d，

未见明显药物相关性组织病理学改变。

4 讨论

小儿牛黄清心散由天麻、胆南星、黄连、赤芍、大黄、全蝎、水牛角浓缩粉、僵蚕（麸炒）、体外培育牛黄、琥珀、雄黄、冰片、朱砂等组成，其中黄连、大黄、牛黄、

雄黄等多种成分为黄色，因此大鼠各剂量组连续灌胃给予小儿牛黄清心散后粪便呈黄色为样品本身颜色所致，无毒理学意义，且停药后各剂量组大鼠粪便相继恢复正常。与对照组比较，高剂量组大鼠摄食量显著降低，体质量呈现显著抑制作用，这可能与本品含具有泻下利便作用的大黄等成分有关。

中剂量组大鼠血清 ALT、TBIL、TG 指标显著升高；高剂量组大鼠血清 ALT、AST、TBIL、TG 及血凝 Fbg 指标显著升高；停药 14 d 后，除高剂量组 AST 指标外，其他各项指标基本恢复正常。给药结束和恢复期结束，肉眼观察和组织病理学检查各组动物脏器组织均未发现有明显药物相关性病理学改变^[11-12]，提示中、高剂量的小儿牛黄清心散可能对幼年大鼠的肝、肾功能造成损害^[13]，但未造成器质性损害，且这种损害经过一段时间可基本恢复正常。

综上所述，小儿牛黄清心散高剂量（7.5 g/kg）、中剂量（3.75 g/kg）、低剂量（1.875 g/kg）（分别相当于 14 kg 儿童一日最大用量的 87.5、43.8、21.9 倍）对幼年大鼠重复给药 14 d，恢复 14 d，小儿牛黄清心散的毒性靶器官可能为肝、肾，1.875 g/kg 为幼年大鼠无毒性反应剂量。本研究为小儿牛黄清心散临床用药安全提供了参考，并为更长期的毒性试验研究提供了数据支持。

参考文献：

[1] 郑文科. 上市后中成药临床安全性再评价的现状、问题与展望[J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36(5): 333-336.
[2] 李 博, 高 蕊, 李 睿, 等. 中成药上市后再评价临床试验政策法规及操作规范探讨[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(6): 650-653; 664.

[3] 周红亮, 章建英, 陈 洁. 小儿牛黄清心散联合左乙拉西坦治疗小儿热性惊厥的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(11): 3306-3309.
[4] 陈艳新. 小儿牛黄清心散联合重组人干扰素治疗小儿普通型手足口病疗效观察[J]. 中国中西医结合儿科学, 2014, 6(3): 229-230.
[5] 郑瑞庆, 陈瑞华. 小儿牛黄清心散治疗小儿急性上呼吸道感染 42 例疗效观察[C] //中华医学会第十七次全国儿科学术大会论文汇编（上册）. 郑州: 中华医学会, 2012: 417.
[6] 邵 欣, 邱智东. 儿童用中药安全性研究[J]. 长春中医药大学学报, 2016, 32(4): 719-721.
[7] 高学敏, 马 融, 张德芹. 我国儿童中成药用药现状、存在问题及解决建议 [J]. 中 成 药, 2016, 38 (5): 1192-1196.
[8] 国家药品监督管理局药品审评中心. 中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则[EB/OL]. （2007-08-23）[2020-06-23]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=2086>.
[9] 袁伯俊, 缪明阳, 李 波. 药物毒理学实验方法与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 256.
[10] 李永明. 丹参多糖的急性和亚急性毒性试验研究[J]. 药学研究, 2016, 35(1): 16-18; 36.
[11] 黄暨生, 吴淑仪, 詹锦河, 等. 幼龄 SD 大鼠自发性病变分析[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(2): 128-135.
[12] 李恒华, 施汀兰, 王天文, 等. 不同周龄、性别、环境下 SD 大鼠自发病变的病理学研究[J]. 实验动物科学, 2019, 36(2): 47-54.
[13] 徐景宏, 马 璟, Whalan J E. 实验动物临床检验指南 [M]. 上海: 上海科学普及出版社, 2014: 98.