

耳聋胶囊急性毒理实验

崔兵¹ 范梓阳² 党静静² 高盛云² 马宇嘉² 王子睿²

1. 景忠山国药(唐山)有限公司, 中国·河北唐山 063000

2. 河北中医药大学, 中国·河北石家庄 050200

摘要: **目的:** 观察耳聋胶囊对大鼠的急性毒理性。**方法:** 先进行预实验, 将 40 只 SPF 级 SD 大鼠随机分成四组: 空白组、耳聋胶囊成人剂量的 5 倍、10 倍、20 倍。再进行最大给药量实验, 取 40 只 SPF 级 SD 大鼠雌雄各一半, 按性别随机分为空白对照组、耳聋胶囊给药组两组, 每组共 20 只。耳聋胶囊是用生理盐水和 0.5% 羧甲基纤维素钠溶成所需浓度, 耳聋胶囊组以最大给药浓度(以刚好通过灌胃针而不阻塞针头为度) 0.2268g/mL、给药体积 20mL/kg、给药量为 4.536g/kg, 24h 内经口灌胃一次, 空白对照组给予等体积生理盐水。**结果:** LD₅₀ 预实验中与空白组比较, 大鼠没有出现死亡情况。最大给药量实验中, 实验组与空白对照组相比, 耳聋胶囊对大鼠的体重、肝肾脏器组织、体质量、脏器指数、血常规及肝功肾功血液生化指标无统计学意义, 毒性小。

关键词: 耳聋胶囊; 急性毒理性; 最大给药量

Acute Toxicology Experiment of Erlong Capsules

Bing Cui¹ Ziyang Fan² Jingjing Dang² Shengyun Gao² Yujia Ma² Zirui Wang²

1. Jingzhongshan National Pharmaceutical (Tangshan) Co., Ltd., Tangshan, Hebei, 063000, China

2. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei, 050200, China

Abstract: Objective: To observe the acute toxicity of Erlong Capsules on rats. **Methods:** A pre-experiment was conducted and 40 SPF SD rats were randomly divided into four groups: blank group, 5 times, 10 times, and 20 times the adult dose of Erlong Capsules. Then, the maximum dosage experiment was carried out, and 40 SPF SD rats were divided into two groups, blank control group and deafness capsule administration group, with 20 rats in each group. The deafness capsule was dissolved with normal saline and 0.5% sodium carboxymethyl cellulose to form the required concentration, and the deafness capsule group was given an equal volume of normal saline at the maximum administration concentration (just through the gavage needle without blocking the needle) of 0.2268g/ml, the administration volume was 20ml/kg, and the administration volume was 4.536g/kg, and the blank control group was given an equal volume of normal saline. **Results:** In the LD₅₀ pre-experiment, compared with the blank group, there was no death in the rats. In the maximum dosage experiment, compared with the blank control group, the deafness capsule in the experimental group had no statistically significant effect on the body weight, liver and kidney tissues, body weight, organ index, blood routine and blood biochemical indexes of liver and kidney function, and the toxicity was small.

Keywords: erlong capsule; acute toxicology; maximum dosing

0 前言

耳聋胶囊是大众所熟悉的一种中成药。它具有清肝泻火, 利湿通窍的作用, 经常用于治疗上焦湿热、头晕头痛、耳聋耳鸣、耳内流脓等症状。在临床上多用于治疗突发性耳聋。突发性耳聋的症状表现为单侧听力下降, 还有耳鸣、耳堵塞感、眩晕、恶心、呕吐等。耳聋胶囊可以与抗生素合用治疗急性中耳炎肝胆火盛症^[1]和急性化脓性中耳炎^[2]。此外, 也可以联合甲泼尼龙治疗突发性耳聋, 并且安全性能较好^[3]。相关文献表明, 对于 Mate 分析桥接网络药理学耳聋胶囊通过多靶点和多通路治疗突发性聋, 其作用机制可能与抗炎、抗氧化、调节免疫、改善循环等方面有关^[4]。最近研究发现,

百乐眠胶囊联合血栓通、巴曲酶对突发性耳聋也有一定的治疗作用^[5]。研究发现, 乌灵胶囊不仅对治疗突发性耳聋患者的伴随症状(耳鸣、焦虑等)有着十分显著的作用^[6], 而且与长春胺缓释胶囊结合治疗突发性耳聋效果佳^[7]。对于突发性耳聋伴眩晕患者采用银丹心脑血管胶囊联合糖皮质激素治疗, 可提高治疗效率, 且安全性较高^[8], 并且可以提高睡眠质量^[9]。经过研究发现, 耳聋胶囊 HPLC 指纹图谱测定 5 种成分并得出该方法简便可行, 可用于耳聋胶囊质量控制的结论^[10]。耳聋胶囊有这么多的药理作用, 但是吃多了会不会有毒害性还要加以研究。本次实验就是要研究耳聋胶囊的急性毒理性, 通过预实验和最大给药量实验来确定毒性大小, 能不能广泛应用于临床。

1 实验材料

1.1 实验动物

选取 SPF 级 SD 大鼠，雌雄各半，6~7 周龄。雄鼠体重 200~220g；雌鼠体重 180~200g，由辽宁长生生物技术有限公司提供，生产许可证号：SCXK（辽）2020-0001。饲养于河北中医学院 SPF 级动物饲养中心，自喂食水，室内温度 21℃，相对湿度 40%~60%，光照时常昼夜交替 12h/12h。

1.2 实验药物试剂及主要仪器

药物：耳聋胶囊由河北唐山景忠山国药（唐山）有限公司提供，产品规格：0.42g×12×2 板，批号：国药准字 Z20030026；仪器：台式高速冷冻离心机（H2050R）、全自动生化分析仪（深圳雷社生命科技 Chemray 420）、Leica 包埋机（型号：HistoCore Arcadia C）、Leica 病理切片机（型号：HistoCore MULTICUT）、奥林巴斯生物显微镜（型号：BX53）。

2 实验方法

2.1 预实验

取 40 只 SPF 级 SD 大鼠，雌雄各半，随机分为空白组、耳聋胶囊成人剂量的 5 倍、10 倍、20 倍四组，每组十只雌雄各半。将耳聋胶囊用生理盐水配制成所需要的浓度，24h 内经口给药一次，耳聋胶囊各组给药剂量分别为 1.134g/kg、2.268g/kg、4.536g/kg 给药后 2h 内密切观察大鼠一般情况如饮食活动、精神状态、大小便、呼吸、口唇鼻是否出现发绀、并对死亡大鼠进行解剖观察各脏器组织是否出现肉眼可见的异常改变。给药两周后大鼠未出现死亡情况，因此未能得出半数致死量，故又进行最大耐受量实验。

2.2 最大给药量实验

2.2.1 实验分组及给药

取 40 只 SPF 级 SD 大鼠，雌雄各半，按性别随机分为空白对照组、耳聋胶囊给药组两组，每组 20 只。耳聋胶囊用生理盐水和 0.5% 羧甲基纤维素钠溶成所需浓度，耳聋胶囊组以最大给药浓度（以刚好通过灌胃针而不阻塞针头为度）0.2268g/mL、给药体积 20mL/kg、给药量为 4.536g/kg，24h 内经口灌胃一次，空白对照组给予等体积生理盐水。

2.2.2 给药后一般情况观察与体重变化

给药后连续观察两周大鼠的饮食变化、行为活动、分泌物及体重变化。分别在给药前、给药后一周、给药后两周称量大鼠体重，比较大鼠体重变化情况。

2.2.3 血常规及血液生化指标检查

给药后观察两周进行采血，采血前对所有实验动物禁食 12h。用 3% 戊巴比妥钠麻醉后进行腹主动脉采血，血常规检测使用一次性静脉采血针采血装入 EDTA 抗凝管中进行检测，血液生化指标检测使用 10mL 离心管采集后在 4℃、3500r/min 下离心 15min 后收集上清进行检测。

2.2.4 肝肾脏器指数

通过腹主动脉收集完血液样本后进行解剖取肝肾，剥离多余的脂肪和筋膜后称量各组肝肾重量并计算脏器指数。脏器指数 = 器官重量 / 体重 × 100。

2.2.5 组织病理学检测

取肝肾组织放入多聚甲醛中进行固定、在乙醇中脱水，包埋在石蜡中并以 5μm 厚度切片。切片用苏木精和伊红（H&E）染色，并在显微镜下观察。

2.2.6 统计方法

各组实验数据通过采用 SPSS 25 统计软件进行数据处理，用均数 \bar{x} false 标准差 (\bar{x} false ± s) 值表示。体重、器官重量、血液学和生化参数的所有统计分析均使用单因素方差分析 (ANOVA) 进行分析，P < 0.05 有显著性差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 预实验

LD₅₀ 预实验中与空白组比较，耳聋胶囊组中大鼠的饮食活动、精神状态、大小便、呼吸等均表现正常，未出现死亡情况。解剖后所有大鼠的器官组织肉眼观察其颜色、质地均未发生明显差异性。

3.2 最大给药量实验

3.2.1 一般情况和体重变化

给药后与空白组相比，给药组大鼠的饮食变化、行为活动、分泌物等无明显差异，两周内未出现大鼠死亡。实验第 1d、7d、14d 对各组大鼠进行称重，结果显示耳聋胶囊对大鼠体重变化没有影响，差异无统计学意义 (P > 0.05) 见图 1。

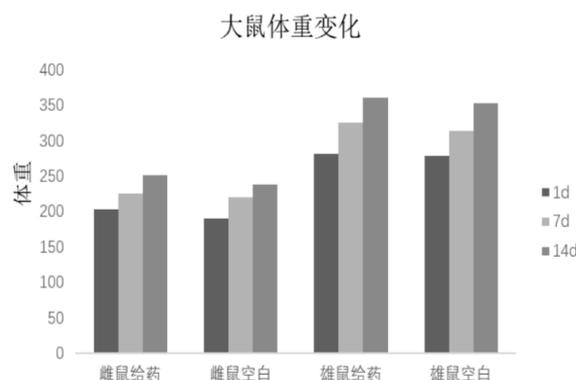


图 1 大鼠给药两周后体重变化

3.2.2 血常规及肝肾功生化指标

经口给药一次后，观察两周对其进行血常规和血液生化检测。与空白组相比，耳聋胶囊给药组血常规指标无统计学意义 (P > 0.05)。肝肾功相关血液生化指标与空白组相比无统计学意义 (P > 0.05) 见表 1、表 2。

表 1 给药 14d 后对大鼠血常规的影响

检测指标	雌鼠		雄鼠	
	空白组	给药组	空白组	给药组
白细胞数目 (WBC) / (10 ⁹ /L)	4.10 ± 0.91	3.90 ± 1.45	5.80 ± 0.63	6.70 ± 1.11
红细胞数目 (RBC) / (10 ⁹ /L)	6.80 ± 0.36	6.69 ± 0.91	7.02 ± 0.12	6.87 ± 0.15
淋巴细胞数目 (Lymph#) / (10 ⁹ /L)	3.10 ± 0.79	2.90 ± 1.27	4.30 ± 0.60	5.30 ± 1.15
中性粒细胞数目 (Gran#) / (10 ⁹ /L)	0.86 ± 0.15	0.90 ± 0.26	1.40 ± 0.05	1.20 ± 0.20
血红蛋白 (HGB) / (g/L)	136.6 ± 1.52	132 ± 2.00	138.3 ± 0.57	138.6 ± 2.51
单核细胞数目 (Mon#) / (10 ⁹ /L)	0.11 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.058	0.13 ± 0.058
淋巴细胞百分比 (Lymph%) / %	76.93 ± 1.66	73.50 ± 5.01	72.77 ± 3.25	79.26 ± 4.37
单核细胞百分比 (Mon%) / %	2.30 ± 0.36	2.90 ± 0.70	2.70 ± 0.26	2.57 ± 0.30
中性粒细胞百分比 (Gran%) / %	19.63 ± 4.95	23.60 ± 4.31	24.53 ± 3.15	18.16 ± 4.10
红细胞压积 (HCT) / %	41.70 ± 1.31	42.73 ± 0.55	43.06 ± 0.95	42.60 ± 1.04
平均红细胞体积 (mvc) /fl	60.63 ± 1.11	60.63 ± 0.64	60.93 ± 1.85	62.03 ± 0.76
平均红细胞血红蛋白含量 (MCV) /Pg	20.00 ± 1.00	19.67 ± 0.32	19.67 ± 0.42	20.10 ± 0.10
平均红细胞血红蛋白浓度 (MCHC) / (g/L)	321 ± 2.00	324 ± 2.00	323.33 ± 3.51	325.33 ± 3.79
红细胞分布宽度 RDW / %	11.40 ± 0.61	10.87 ± 0.81	13.00 ± 1.56	12.43 ± 1.88

表 2 给药 14d 后对大鼠血液生化指标的影响

指标	雌鼠		雄鼠	
	空白	给药	空白	给药
ALT (U/L)	30.39 ± 4.95	38.45 ± 11.03	47.08 ± 2.10	49.01 ± 1.92
AST (U/L)	109.42 ± 17.05	145.83 ± 10.94	115.74 ± 34.43	148.71 ± 38.62
ALB (g/L)	39.12 ± 0.89	37.52 ± 1.11	35.29 ± 0.73	34.07 ± 1.66
BUN (mg/dl)	17.32 ± 2.37	15.92 ± 2.88	15.77 ± 1.00	16.07 ± 3.39
CR (umol/L)	40.22 ± 1.72	40.41 ± 3.14	30.88 ± 2.66	30.67 ± 6.31

注: ALT: 丙氨酸氨基转移酶; AST: 天门冬氨酸氨基转移酶; ALB: 白蛋白; BUN: 尿素氮; CR: 肌酐。

3.2.3 肝肾脏器指数比

观察两周后对实验大鼠进行解剖, 取肝肾组织器官称重。所有大鼠的肝肾脏器指数比服从正态分布 ($P > 0.05$), 方差齐性 ($P > 0.05$)。与空白组相比, 给药组脏器指数比没有显著性差异, 不存在统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 肝肾脏器指数比

	雌鼠		雄鼠	
	空白	给药	空白	给药
肝体系数	2.96 ± 0.12	2.85 ± 0.28	3.23 ± 0.2	3.26 ± 0.18
肾体系数	0.69 ± 0.04	0.67 ± 0.13	0.72 ± 0.02	0.73 ± 0.04

3.2.4 组织病理观察

实验分别对大鼠肝肾组织进行 HE 染色, 组织病理切片结果表明, 空白对照组与耳聋胶囊给药组肝脏肝细胞核浆比均匀, 胞浆丰富, 核大小形态基本一致, 未出现病理性核分裂, 肝细胞内无大小不等的空泡, 肝小叶无红色淤血区, 肝窦无扩张 (见图 2)。空白对照组与耳聋胶囊给药组中, 肾小球呈现大量毛细血管含丰富的血细胞, 球内系膜细胞核小而圆, 着色最深; 近曲小管上皮细胞细胞较大, 分界不清,

胞质强嗜酸性, 呈深红色, 游离面的刷状缘毛糙不齐; 远曲小管细胞较小, 细胞分界较清楚排列整齐, 胞质嗜酸性较弱, 呈浅红色, 游离面无刷状缘; 致密斑核排列紧密, 未出现病理性改变 (见图 3)。

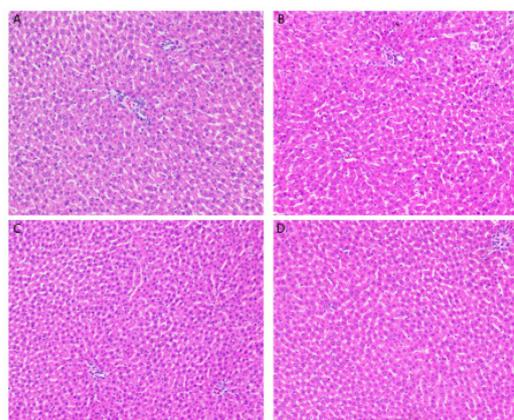


图 2 耳聋胶囊对大鼠肝脏组织的影响 (×200)

注: A: 雄性给药大鼠; B: 雄性空白大鼠; C: 雌性给药大鼠; D: 雌性空白大鼠。

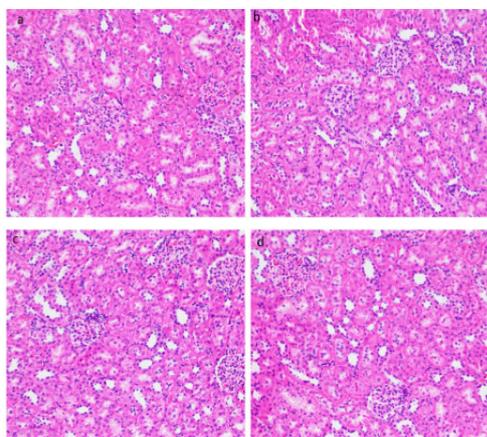


图 3 耳聋胶囊对大鼠肾脏组织的影响 (× 200)

注: a: 雄性给药大鼠; b: 雄性空白大鼠; c: 雌性给药大鼠; d: 雌性空白大鼠。

4 讨论

耳聋胶囊为一种中成药,由龙胆、黄芩、地黄、泽泻、木通、栀子、当归、九节菖蒲、甘草、羚羊角等 10 味中药组成。这个药为胶囊型,内容物为棕黄色至棕褐色的粉末。经查阅文献得知可以运用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法对耳聋胶囊的化学成分进行辨识和归属,可为耳聋胶囊药效物质基础研究及质量控制提供科学依据和数据支撑^[11]。耳聋胶囊虽多次在临床使用,但未有相关动物实验佐证,本研究主要是考察耳聋胶囊急性毒理性,给药后大鼠未出现明显的不良反应,科学验证了耳聋胶囊的安全性。

本次实验中给药组与空白组相比大鼠体重、血常规和肝肾生化指标均无统计学意义 ($P > 0.05$)。组织病理切片结果显示耳聋胶囊未对大鼠肝肾组织产生明显的毒性作用。综上所述,耳聋胶囊对大鼠的肝肾脏器组织、体质量、脏器指数、血常规及肝肾功血液生化指标均没有表现出显著性差异,说明耳聋胶囊毒性较小。实验中给药量为 4.536g/kg,未出现中毒及死亡情况,其剂量为大鼠最大给药量,为成人

临床给药剂量的 126 倍,证明耳聋胶囊经口给药毒性较小,临床规定剂量服用较为安全。

参考文献:

- [1] 马文成,刘爽,张丽.耳聋胶囊联合抗生素治疗急性中耳炎肝胆火盛证的疗效观察[J].中国中西医结合耳鼻喉科杂志,2020,28(1):13-16.
- [2] 马文成,刘爽.耳聋胶囊联合抗生素治疗急性化脓性中耳炎的临床研究[J].当代医学,2020,26(30):68-71.
- [3] 唐慧玲,郭家亮,王园.耳聋胶囊联合甲泼尼龙治疗突发性耳聋的临床研究[J].现代药物与临床,2021,36(1):130-134.
- [4] 张元衡,刘钢,吴飞虎.基于Meta分析桥接网络药理学耳聋胶囊治疗突聋的疗效评价及作用机制[J].中国中西医结合耳鼻喉科杂志,2023,31(1):20-25+47.
- [5] 刘芸.百乐眠胶囊联合血栓通、巴曲酶在突发性耳聋中的应用效果[J].临床医学研究与实践,2024,9(22):68-71.
- [6] 吴迪.精神因素与突发性耳聋的相关性及乌灵胶囊对突聋患者的干预性治疗研究[D].合肥:安徽中医药大学,2020.
- [7] 朱晓月,孙越甲,岳鑫,等.乌灵胶囊结合长春胺缓释胶囊对突发性耳聋患者疗效影响[J].辽宁中医杂志,2022,49(11):69-72.
- [8] 黄俊杰,宋晓,寇贵贤.银丹心脑通胶囊联合糖皮质激素治疗突发性耳聋伴眩晕的效果及安全性[J].辽宁医学杂志,2023,37(3):73-75.
- [9] 洪连造,庄琼珍.突发耳聋伴眩晕银丹心脑通胶囊+糖皮质激素治疗后睡眠质量的观察[J].世界睡眠医学杂志,2023,10(10):2264-2266.
- [10] 彭小园,陈子月,崔兵,等.耳聋胶囊HPLC指纹图谱建立及5种成分测定[J].中成药,2022,44(3):718-723.
- [11] 李偲,张东旭,刘羽康,等.基于UPLC-Q-TOF-MS/MS法的耳聋胶囊化学成分辨识及归属[J].中成药,2022,44(1):132-141.

基金项目:河北省重点研发计划项目(项目编号:20373001D)。